

公益社団法人日本農芸化学会 助成金受領者報告書 (2023)



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18回農芸化学研究企画賞報告書	5
3. 第2回夢にチャレンジ企画賞報告書.....	17
4. 第3回中小企業産学・産官連携研究助成報告書.....	25
5. 第48回研究奨励金報告書	45
6. 第49回研究奨励金報告書	49
7. 第76回国際会議出席費補助金報告書	59
8. 第77回国際会議出席費補助金報告書	63
9. 第78回国際会議出席費補助金報告書	67
10. 第1回女性研究者チャレンジ研究助成金報告書.....	73
11. 第1回若手女性研究者チャレンジ研究助成金報告書.....	79
12. 2020年度農芸化学女性研究者賞報告書	85

1. 助成金交付実績一覧

農芸化学研究企画賞，中小企業産学・産官連携研究助成の交付実績

年 度	農芸化学研究企画賞		夢にチャレンジ企画賞		中小企業産学・産官連携研究助成		計
平成15年	2件	400万円					400万円
16年	3件	600万円					600万円
17年	4件	800万円					800万円
18年	3件	600万円					600万円
19年	2件	400万円					400万円
20年	3件	600万円					600万円
21年	3件	600万円					600万円
22年	3件	600万円					600万円
23年	3件	600万円					600万円
24年	3件	600万円					600万円
25年	3件	600万円					600万円
26年	2件	400万円					400万円
27年	3件	600万円					600万円
28年	3件	600万円					600万円
29年	2件	400万円					400万円
30年	3件	600万円			7件	700万円	1300万円
令和元年	2件	400万円			7件	700万円	1100万円
2年	3件	600万円	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
4年	3件	600万円	2件	90万円	7件	700万円	1390万円

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

年 度	研究奨励金		国際会議出席費補助金		計
63年	17件	846.4万円	16件	450万円	1,296.4万円
平成元年	18件	894.7万円	15件	449.7万円	1,344.4万円
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
4年	5件	250万円	3件	60万円	310万円

女性研究者チャレンジ研究助成金, 若手女性研究者チャレンジ研究助成金の交付実績

年 度	女性研究者チャレンジ研究助成金		若手女性研究者チャレンジ研究助成金		計
3年	3件	297万円	3件	150万円	447万円
4年	3件	300万円	3件	150万円	450万円

2. 第18回農芸化学研究企画賞報告書

第18回農芸化学研究企画賞報告書

受賞テーマ：多剤耐性細菌感染治療に有効な次世代型抗菌薬の開発

大阪大学産業科学研究所
岡島俊英

「研究の背景」

薬剤耐性病原菌の市中への蔓延は、世界の公衆衛生に対する大きな脅威である。一旦、薬剤耐性病原菌のパンデミックが起されば、多くの人命が失われ世界に大きな混乱をもたらすことになる。現時点において、既存のすべての抗生物質には耐性菌が存在しており、その薬剤耐性遺伝子が伝播され共存することによって、ほとんどの抗生物質が効かない多剤耐性病原菌も出現している。英国オニール委員会の推計によると、このまま何も対策を取らなければ、2050年には全世界で薬剤耐性病原菌に起因する年間死者数が1000万人へと爆発的に増加する危険性が警告されている(1)。感染症に対する備えは決して怠るべきではないことは、新型コロナウイルスの世界的パンデミックからも明らかである。しかしながら、すでに薬剤耐性病原菌に対抗しうる抗菌薬の研究開発からは多くの製薬企業が撤退しており、そのため新規抗菌薬のパイプラインが枯渇してきているのが現状である。製薬企業にとっては抗菌薬の収益性が低いという経済的な要因がある一方で、抗菌薬開発停滞のもう一つの大きな原因は、創薬ターゲット・新規骨格の不足とも言われている(2)。製薬企業が一般的に行う汎用的大規模化合物ライブラリーの単純なスクリーニングでは、新規な抗菌薬を得ることが困難になっている。

このような状況の中、アカデミックの研究者が果たす役割は極めて重要である。それは短期的な成果や採算性のある程度度外視した長期的な視野に立つ開発研究が可能だからである。基礎研究の積み上げにより何らかのブレイクスルーをもたらし、停滞する抗菌薬開発を活性化できるものと期待される。これまでに、我々の研究グループでは、細菌の主要な環境応答システムである二成分情報伝達系(two-component signal transduction system, 以下TCS)に注目してきた(2)(図1a)。TCSは、細胞膜に存在するセンサーヒスチジンキナーゼ(HK)と転写因子レスポンスレギュレーター(RR)から構成されている。HKは外部の環境シグナルに応答して、自己のHis残基をリン酸化し、そのリン酸基をRRのAsp残基へ転移する。リン酸化RRは各種遺伝子の発現を制御し、各種の重要な生理過

程を制御する(図1a)。TCSはヒト細胞にはなく細菌に特有の情報伝達システムであり、薬剤標的としても適している。ゲノム解析によると、1細菌細胞あたり平均29個のTCSが存在し、各種の病原菌も多数のTCSを有している(病原性大腸菌:30個、赤痢菌:30個、緑膿菌:62個、黄色ブドウ球菌:17個、腸球菌:17個)。多種のTCSが、これらの病原細菌の増殖、病原性、薬剤耐性を制御している。その結果、病原細菌はヒト体内で感染・増殖して、病原性を発現し、さらに使用された抗菌薬に対して耐性を示すことができる。したがって、HKの自己リン酸化を阻害し、TCSの機能を妨害する化合物は、ヒト体内に感染した薬剤耐性細菌を含む各種病原細菌に対して抗菌性、抗病原性、抗薬剤耐性を示すことが期待される。本研究において、細菌情報伝達系HKを新規な標的として捉え、抗菌性、抗病原性、抗薬剤耐性を併せ持つ次世代抗菌薬を創生することを最終的な目的とした。

「研究の課題」

我々の研究グループでは、TCSを構成するHKを特異的に阻害する化合物(walidiomycin, signermycin, walkmycin)を放線菌から複数発見し(2)、特許化している。そのひとつwalidiomycin(図1b)は、angucycline環とtetraen/dioxolan環の2つの部分構造からなる直鎖状の化合物であり、HKの自己リン酸化His残基周辺の保存領域(Hbox, 図1c)に特異的に作用し自己リン酸化阻害活性を示す。それによって、MRSAやバンコマイシン耐性腸球菌等のグラム陽性多剤耐性菌の情報伝達を阻害し抗菌作用を示すことが判明している。両病原菌に対する抗菌性は、細胞壁合成に関与し増殖制御に関わるHKであるWalKの阻害によるものと考えられている。さらに、核磁気共鳴を用いたHKとの相互作用解析、HKへの変異導入、およびwalidiomycin誘導体の阻害効果などに基づいて複合体モデルを構築した結果、angucycline環は水素結合ネットワークを介してHbox領域に、dioxolan環領域は、疎水的な相互作用介してX領域と呼んでいる保存性のある疎水性領域に結合すると考えられた(3)。このような二価性の結合によってHKに阻害

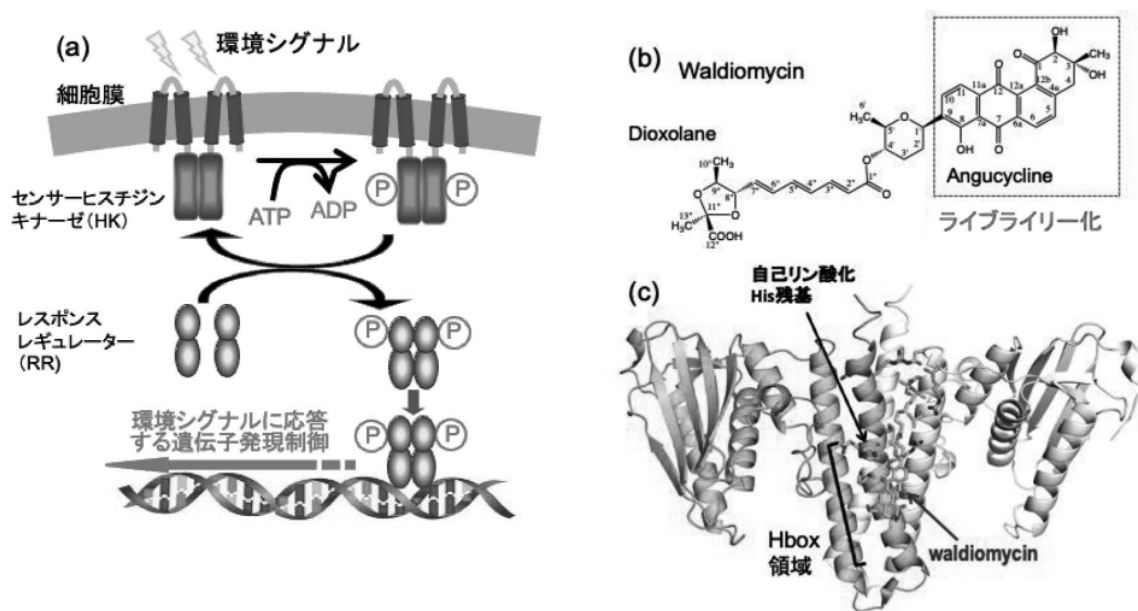


図1. (a) 二成分情報伝達系の模式図. (b) waldiomycin の化学構造. 赤点線で囲った部分がライブラリー化した angucycline 環領域に相当する. (c) WalK モデル上で予測される waldiomycin 結合部位. Waldiomycin は、二量体化ドメイン 4-helix bundle 内の Hbox 領域に結合すると考えられている.

活性を示す天然化合物は、HK 阻害による新規抗生物質を開発する上で、重要なシーズとなりうると期待される。しかし、天然化合物では広範な誘導体展開並びに最適化が困難であるため、waldiomycin の特異性を担う angucycline 環を模した低分子合成化合物を多数作り出し、waldiomycin を志向する化合物ライブラリーを得ることを計画した (図1b)。このような化合物群から、オリジナルの waldiomycin を超える HK 阻害活性と抗菌性を持つ化合物を得るとともに、さらに、waldiomycin が持つ幅広い HK に対する阻害活性を生かして、抗菌性に加え、抗病原性、抗薬剤耐性を持つ化合物を得ることを目標とすることにした。

「研究の結果」

我々の研究グループでは、angucycline 環を模倣した低分子化合物群の合成を行っており、これまでに進めていた研究成果とも合わせ、200種以上の化合物からなる waldiomycin を志向する化合物ライブラリーを得ることに成功した。各化合物は基本的に dimethyl sulfoxide (DMSO) に可溶性であった。薬剤耐性菌を含む種々の細菌に対して、DMSO による化合物希釈系列を用いて生存菌数を測定し、各化合物の最小発育阻止濃度値 (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) を求め、抗菌性を評価した。また、HK 自己リン酸化阻害活性については、細胞質領域 (自己リン酸化部位とキナーゼドメインを含む) を調製し、まず一定濃度の化合物 (概ね 100 $\mu\text{g/mL}$) に対して、自己リ

ン酸化阻害が見られるのか、抗リン酸化 His 抗体を用いたウェスタンブロットによって網羅的に解析した (図2a)。一定の阻害活性が認められた場合には、さらに、化合物希釈系列を用いて、阻害活性を詳細に測定し、その濃度依存性から 50% 阻害濃度 (IC₅₀) を求めた (図2b)。その結果、想定していたよりも多くの化合物に抗菌活性と HK 自己リン酸化阻害活性が認められた (表1)。多くの化合物は、元々の waldiomycin と同様に、主にグラム陽性細菌に対して抗菌性を示し、多剤耐性を持つ MRSA 株である *Staphylococcus aureus* Mu 50 株に対しても抗菌性を示すことがわかった。詳細な in vivo での転写産物の解析が今後必要であるが、waldiomycin と同様に、おそらく細菌増殖に必須な HK である WalK の阻害によるものと推測された。一方、waldiomycin とは異なり、少数の化合物ではグラム陰性細菌である *Klebsiella pneumoniae* PCI602 に対しても抗菌活性を示す化合物が見出された (表1, W3)。後述するように、グラム陰性細菌は、化合物の膜透過性の低さと WalK のような生存必須性のある HK がないことから、その抗菌特性には興味を持たれる。少なくとも何らかの膜透過性を高める構造モチーフが化合物の構造に含まれている可能性がある。枯草菌 WalK に関する阻害活性に関しては、waldiomycin とほぼ同レベルの活性を持つ化合物があることが判明した。

これらの結果は、angucycline 環を模倣した化合物ライブラリーに着目することが、新規な抗菌薬を作り出すための方向性として正しいことを示唆している。ただ、モデル

表1. Angucycline 環を模倣した化合物ライブラリーの抗菌活性 (MIC) と HK 阻害活性 (IC50)

Compounds	Waldiomycin	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7
MIC ($\mu\text{g/mL}$)								
<i>Bs</i> 168	2	8	0.5	0.5	32	1	8	64
<i>Sa</i> Mu50 (MRSA)	4	16	0.5	1	64	2	0.5	64
<i>Kp</i> PCI602	128	32	>128	0.5	32	8	32	64
IC50 ($\mu\text{g/mL}$)								
<i>Bs</i> WalK	9.2	4.6	38.7	>50	4.3	52.0	38.3	9.3
<i>Sm</i> VicK	10.1	14.7	6.4	10.1	ND	ND	ND	ND
<i>Ec</i> EnvZ	16.8	0.6	16.5	16.8	ND	ND	ND	0.46

Bs, *Bacillus subtilis*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Kp*, *Klebsiella pneumoniae*; *Sm*, *Streptococcus mutans*; *Ec*, *Escherichia coli*; ND, not determined.

表2. 化合物ライブラリーから選択された化合物の病原性および薬剤耐性に関わる HK に対する阻害活性 (IC50)

Compounds	Waldiomycin	X1	X2	X3	X4
IC50 (μM)					
<i>Ec</i> EvgS	66.8	109	25.8	50.0	0.20
<i>Ec</i> EnvZ	33.1	77.3	47.2	26.8	1.3
<i>Ec</i> PhoQ	10.9	96.3	72.3	133	0.10
<i>Ec</i> CpxA	93.9	104	19.5	32.7	0.80
<i>Sa</i> VanS	155	ND	ND	ND	0.92
<i>Sa</i> AgrC	ND	ND	ND	ND	1.22
<i>Ab</i> AdeS	420	ND	ND	ND	0.24
<i>Ab</i> PmrB	500	ND	ND	ND	0.59

Ec, *Escherichia coli*; *Sa*, *Staphylococcus aureus*; *Sm*, *Streptococcus mutans*; *Ab*, *Acinetobacter baumannii*; ND, not determined.

とした枯草菌において, WalK に関する阻害活性と抗菌性の間には, おおよその相関性が認められるものの, 必ずしも一致しなかった (抗菌性が高い化合物において, HK 阻害活性が高いとは限らない). おそらくは個々の化合物において, 膜透過性が異なること, HK 以外に抗菌性の標的となっている可能性があり, 抗菌性の高い化合物に関しては, 今後より詳細な個別の解析が必要である.

さらに, WalK 以外の病原菌の病原性や薬剤耐性に関わる HK に対する阻害活性を, より詳細に評価するために, WalK 阻害能や waldiomycin との交換性などに基づいて, 4つの化合物 (X1, X2, X3, および X4) をライブラリーから選択し, 詳細な HK 阻害能の解析を行なった. いずれも有意な抗菌活性を有しており, WalK に対して自己リン酸化阻害効果を示していた. まず, 病原性大腸菌において感染や病原性に関与する4つのHK, EvgS, EnvZ, PhoQ, および CpxA (4) について, 選択した化合物の効果を調べた (表2). その結果, 化合物 X1-X3 は上記の HK に対しておおよそ 10-100 μM の IC50 を示した. これらはモデルとした waldiomycin と概ね同様なレベルであった. さらに, 化合物 X4 は, 上記の4つのHKに対して0.2-1.3 μM の IC50 を示し, 大幅な親和性の増大が認められた. さらに,

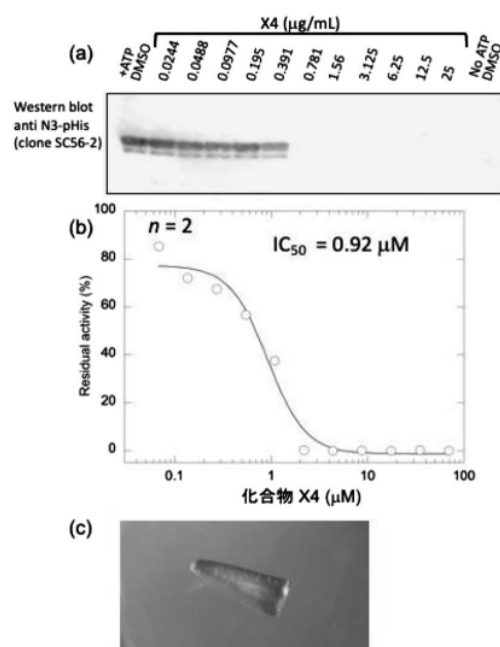


図2. (a) 抗リン酸化ヒスチジン抗体で検出した化合物X4のVanSの自己リン酸化阻害効果. 化合物濃度を増加させると, リン酸化されたヒスチジンが減少していることがわかる. (b) リン酸化されたヒスチジン含量の阻害剤濃度依存性曲線. (c) 化合物X4をソーキングした *Streptococcus mutans* VicK細胞質領域の結晶. 集積した化合物X4によって, 結晶が赤紫色を示している.

同じ化合物について, 非常に高い薬剤耐性獲得能有し院内感染の原因菌として問題となっている *Acinetobacter baumannii* に由来した AdeS, PmrB, および *S. aureus* 由来した VanS, AgrC についても, 阻害活性を解析した. *A. baumannii* において AdeS は病原性因子の発現制御に, PmrB はコリスチン, ポリミキシンなどの薬剤耐性に関与することが知られている. また, *S. aureus* において AgrC はクオラムセンシングを介して *hla* (α -hemolysin) などの病原性因子の発現制御に, VanS はバンコマイシン耐性の発現に関与することが示されている. 化合物 X1-

X3はwaldiomycinと同様なレベルの阻害活性を示したが、化合物X4は、上記の4つのHKに対しても高い阻害活性を示した(表2, 図2b)。これらの結果は、X4をはじめとする化合物は、病原菌の病原性、薬剤耐性を制御するHKを特異的に阻害する合成阻害剤となりうることを示している。予備的なレベルではあるが、より詳細な阻害機構と最適化を進めるために、HKとの複合体の結晶構造解析も進めている。図2cは化合物X4をソーキングした*Streptococcus mutans* VicK細胞質領域の結晶を示している。*S. mutans* VicKは、*S. aureus* WalKと相溶性が高いHKであり、その複合構造はWalK阻害による新規抗菌性化合物を作り出すために、重要な情報を与えるものと考えられる。低濃度のX4に浸漬したにもかかわらず、結晶の色から赤紫色を示すX4が結晶に集積しており、高い親和性が示唆される。ソーキングによりX線回折データの分解能が3 Å程度にまで低下することが避けられず、現時点、詳細な結合情報は得られていないが、今後、結晶化条件および浸漬条件の最適化によって、高分解能データのX線回折データの収集を目指す必要がある。

「今後の実用化への展望」

以上のように、主要なグラム陽性多剤耐性細菌であるMRSAに関しては、細胞壁合成を制御する生存必須のHKであるWalK、バンコマイシン耐性に関わるVanS、および病原性発現に関わるAgrCを高い親和性で阻害する化合物(X1-X4)を得ることができた。これらは、抗菌性、抗病原性、抗薬剤耐性を持つ次世代抗菌薬を実用化するためのシーズとして極めて重要である。最適化によって、3つの特性を併せ持つものを作り出すことも可能であり、また、個別の特性に特化するように最適化することも可能であると考えている。特にVanSに対する阻害剤の開発は急務である。バンコマイシン高耐性を示すVanA型では、関連する遺伝子群はオペロンを形成しており、トランスポゾン上にコードされている。このようなトランスポゾンが接合により異菌種間を移動することで、バンコマイシン耐性が水平伝播される。VanSはバンコマイシンを認識することで活性化され、オペロン全体の発現に関わるため、これを阻害する薬剤があれば、バンコマイシン耐性の発現を妨害することができる。既存のバンコマイシン耐性菌において、耐性を無効化し、バンコマイシンの抗菌性効果を高めるも

のと期待される。

また、グラム陰性の病原細菌に関しては、病原性大腸菌あるいは遺伝子に基づく分類では同種となる赤痢菌の感染や病原性に関わるHKについて、waldiomycinや本研究で得られた合成阻害剤の効果を調べており、有効な結果を得ている。*Acinetobacter baumannii*に由来したAdeS, PmrBについても、表2に示す阻害効果が示されている。しかしながら、グラム陰性細菌に関しては、化合物の外膜透過性が低く化合物が取り込まれない懸念がある。この問題を解決する方策として、カテコール基を付加し、鉄イオンの取り込みを利用する方法がすでに他の研究グループから報告されている(5)。また、前述したように、本研究に含まれた少数の化合物では、グラム陰性細菌において何らかの膜透過性を高める構造モチーフが含まれている可能性もある。

本研究において得られた化合物のいくつかについては、すでに*in vivo*での効果を検証する段階に入っている。得られた成果を発展させることによって、われわれの目指す次世代型抗菌薬の実用化に迫ることができるものと期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、内海龍太郎先生(大阪大学)、五十嵐雅之先生(微生物化学研究会)、石川彰彦先生(岡山大学)、江口陽子先生(近畿大学)、中山二郎先生(九州大学)、Bianca Colonna先生(Sapienza University of Rome)、春田純一先生(大阪大学)をはじめとする多くの共同研究者のご助力を得ました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. J. O'Neill: The Review on Antimicrobial Resistance, London. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. (2016).
2. 岡島俊英, 五十嵐雅之, 江口陽子, 内海龍太郎, 化学と生物 **57**, 416-427 (2019).
3. Y. Eguchi, T. Okajima, N. Tochio, Y. Inukai, R. Shimizu, S. Ueda, S. Shinya, T. Kigawa, T. Fukamizo, M. Igarashi, R. Utsumi, *J. Antibiot.* **70**, 251-258 (2017).
4. M. Pasqua, M. Coluccia, Y. Eguchi, T. Okajima, M. Grossi, G. Prosseda, R. Utsumi, B. Colonna *Biomolecules* **12**, 1321 (2022).
5. A. Ito, T. Nishikawa, S. Matsumoto, H. Yoshizawa, T. Sato, R. Nakamura, M. Tsuji, Y. Yamano. *Antimicrob Agents Chemother.* **60**, 7396-7401 (2016).

北海道大学大学院農学研究院
田上貴祥

【研究の背景】

農林水産省の『畜産物流通調査』によると日本国内で1年間にと殺される家畜は、ウシ100万頭、食用鶏7億羽、ブタ1,650万頭にのぼる。畜産における資源循環は積極的に取り組まれており、と畜副産物（内臓や脂）の飼料や油脂への加工や、家畜排せつ物の堆肥化・メタン発酵によるエネルギー生産などの研究に注力されてきた。一方で、と畜の際に排出される血液の利用度は国内外を問わずに極めて低く、ほとんどが汚水として排水処理施設にて処分されている。このような畜産系廃棄物を原料として高付加価値製品を安価に生産する技術の開発は、経済的な効果のみならず循環型社会の形成にも貢献できることが期待される。

高付加価値製品の一例として、人々の健康増進に貢献するファインケミカルがある。国際糖尿病連合による調査では、世界の糖尿病人口は2045年までに7億人（世界人口の10%）を超えると推定されており、糖尿病治療薬のさらなる研究開発が強く求められている。しかし、糖尿病の創薬ターゲットである小腸局在型 α -グルコシダーゼ（小腸AGLと呼ぶ）は製剤化されておらず、治療薬研究のスピードが加速しない現状がある。

申請者は過去に科研費の助成（若手研究B: 2017年度～2018年度）を受けて様々な生物のAGLについて研究し、ブタ血液中のAGLについて以下の点を明らかにしていた。

1. ブタ1頭分の血液に含まれるAGL量は約300 mgであること
2. ブタ血液AGLは分子量200 kDaのタンパク質で、酵素学的機能（基質特異性・至適pH・pHおよび温度に対する安定性）がヒト小腸AGLと同等であること
3. ブタ血液AGLの遺伝子がヒト小腸AGLの遺伝子と相同であること
4. ブタ血液AGL遺伝子にコードされたN/Cサブユニットそれぞれの組換えタンパク質を生産し、それらが既報のヒト小腸N/Cサブユニット組換えタンパク質と同じ基質特異性を有すること
5. ブタ血液AGL全長の組換えタンパク質生産に世界で初めて成功したが、その生産効率は低いこと

以上の研究結果はブタ血液AGLとヒト小腸AGLが酵素学的に同等の酵素であることを示すものであり、糖尿病治

療薬研究におけるブタ血液由来の小腸AGL製剤の有用性を支持するものであった。そこで、第18回農芸化学研究企画賞において、世界的に大量廃棄されているブタ血液を原料とした小腸AGL製剤の生産と応用研究を提案した。

【研究の課題】

畜産業では長らく血液に利用価値を見出せず、世界の食肉加工場の多くが費用とエネルギーを投じて血液を浄化処理して排水してきた。本研究の最終目標は、と畜で排出される血液から有用酵素を回収して製剤化する新たな廃棄物処理システムを構築し、既存のと畜施設に実装することで、畜産における経済的・資源循環の損失をプラスに転じることとした。また応用研究として「小腸AGL製剤を用いた糖尿病治療薬の新規単離同定法の実証実験」を計画した。

ブタ血液からの小腸AGL製剤の開発における課題は、その調製法の確立であった。実験開始時点において申請者は、2リットル程度のブタ血液（ブタ2～3頭分）から小腸AGLを高純度で単離精製するプロトコルを確立していたが、工業生産へのスケールアップにはコストがかかる煩雑な方法であると考えられた。一方で、既存の食肉加工場でと畜生産ラインを停止させずに血液を効率的かつ衛生的に回収するには新たな専用設備を導入する必要があり、設備開発には時間を要する。よって本助成期間内の到達目標を「ブタ1頭分の血液から小腸AGLを簡便に精製する技術を確立し、用途に応じた純度の小腸AGL製剤を凍結乾燥品としてmgオーダーで製造できる体制を整えること」とした。目標設定の根拠は以下の通りであった。

・純度：酵素製剤は使用用途によって要求される純度が異なる。高純度製剤は低純度製剤の使用用途を包含するが、高純度化にはコストがかかる為に、高純度製剤では費用対効果が低い場合が想定される。本研究では粗精製法と高純度化精製法を開発し、目的に応じた純度・コストの小腸AGL製剤の生産技術を開発する。

・製剤の性状：保存性や取扱の容易さを考慮すると、酵素製剤を乾燥粉末として供給することが望ましい。凍結乾燥は酵素活性を維持したままタンパク質を粉末化することが可能である場合が多く、小腸AGL製剤の凍結乾燥品化を目指すのは妥当である。凍結乾燥機についてはラボ機～セミプラント機に至る様々な機種が市販されており、将来的

な小腸 AGL 製剤の工業スケールでの生産にも対応可能である。

・生産量：先行研究の結果から、ブタ 1 頭分の血液に含まれる小腸 AGL 量が 300 mg 程度と見積もっている。既報のラボスケールの精製法によって高純度精製した場合の回収率は 15% であった。これに匹敵する精製技術の確立を目指すこととし、mg スケールでの高純度製剤生産が妥当であると考えている。ただし、将来的には設備の大型化によって g スケールでの生産が可能になると考えている。

また応用研究として計画した「小腸 AGL 製剤を用いた糖尿病治療薬の新規単離同定法の実証実験」については、小腸 AGL の立体構造解析が課題であった。申請者はこれまでに小腸 AGL の X 線結晶構造解析を目指して結晶化条件の探索を行っていたが、良質な結晶は得られていなかった。そこで本研究ではクライオ電子顕微鏡-単粒子解析による小腸 AGL の立体構造解析を実施することとした。

【研究の結果】

①小腸 AGL 粗精製法の検討

ブタ全血からガーゼで血餅を除去し、ろ液を遠心分離して得られた上清画分を血清とした。血清および各種粗精製法により得られた画分のタンパク質量および AGL 活性を測定し、AGL 活性の回収率および精製倍率（比活性の変化）を比較した（表 1）。検討した粗精製法の中では硫酸アンモニウム分画が最も効果的であり、精製倍率は 10 倍、回収率は 62% であった。pH 調整、有機溶媒沈殿、活性炭や柿タンニンによる夾雑タンパク質の沈殿除去を試みたが、小腸 AGL も夾雑タンパク質と一緒に沈殿するなどしてしまい、低精製倍率・低回収率であった。小腸 AGL が 200 kDa という比較的大きなタンパク質であることから限外ろ過膜によるサイズ分画も試みたが、血清タンパク質との分離は不良であり、比活性の向上は見られなかった。以上の結果から、血清から小腸 AGL を部分精製する方法と

しては硫酸アンモニウム分画が最適であると結論づけた。

②小腸 AGL の凍結乾燥条件の検討

血清から硫酸アンモニウム分画および 3 種類のカラムクロマトグラフィーによって電気泳動的に単一になるまで精製した小腸 AGL を各種保護剤とともに凍結乾燥し、活性の測定した（図 1A）。保護剤には、0.15% スクロース、0.15% トレハロース、0.2 M グリセロール、0.1 M ソルビトールおよび 0.4% L-アルギニン塩酸塩を用いた。保護剤未添加条件では凍結乾燥によって AGL 活性が 38% まで減少したのに対し、グリセロールを除く保護剤存在下では 85-97% の残存活性を維持していた。

0.15% スクロースを添加して凍結乾燥させた小腸 AGL を室温または 4℃ で保存し、経時的に AGL 活性を測定した（図 1B）。保護剤を添加せずに凍結乾燥して 4℃ で保存した場合には、12 週間の保存によって活性が 60% に減少した。スクロースを保護剤とした凍結乾燥小腸 AGL は、室温で 12 週間保存した場合に活性が 62% に減少したが、4℃ で 12 週間保存した場合には活性の減少が見られなかった。以上の結果から、小腸 AGL は 0.15% スクロースを含む溶液中で凍結乾燥し、4℃ で保存することで安定に長期保存が可能であると結論づけた。

③クライオ電子顕微鏡-単粒子解析による小腸 AGL の立体構造解析

Titan Krios G3i を用いて小腸 AGL と擬似五糖阻害剤との複合体構造を分解能 2.7 Å で決定した。小腸 AGL は N サブユニットと C サブユニットの 2 つの AGL サブユニットが連結した構造であり、それぞれのサブユニットの活性部位に擬似五糖阻害剤に一致する静電ポテンシャルマップが観察された。擬似五糖はそれぞれのサブユニットに属するアミノ酸残基のみで補足されており、2 つのサブユニットが互い基質結合に関与しないことが明らかとなった。

④新規阻害剤の探索

市販の茶葉 45 種を高圧熱水抽出し、得られた抽出液の小腸 AGL 阻害活性を測定した（図 2）。最も阻害活性を示したのは「桑の葉茶」であった。先行研究において桑葉には AGL を阻害する 1-デオキシノジリマイシンが多く含まれることが明らかとなっており、本研究における「桑の葉茶」の AGL 阻害活性物質も 1-デオキシノジリマイシンである可能性が高い。一方で、これまでに報告例のない茶葉抽出液においても AGL 阻害活性が検出されており、新規の AGL 阻害物質が含まれる可能性が示唆された。

表 1. 各種粗精製法による小腸 AGL の精製倍率と回収率

操作	回収画分	精製倍率 (-倍)	回収率 (%)
血清		1.0	100
硫酸アンモニウム分画	沈殿	10	62.0
pH 調整 (pH 3~9)	上清	0.14~1.6	4.5~110
13~37.5% エタノール沈殿	上清	0.93~1.5	31~60
13~37.5% アセトン沈殿	上清	0.87~1.0	33~56
2.4~8.3% PEG 沈殿	上清	0.14~0.81	5.1~63
活性炭吸着	上清	1.1	81
柿タンニン沈殿	上清	1.3	110
2.4~8.3% PEG 沈殿	沈殿	0.42~0.89	0.48~22
限外ろ過 (300,000 MWCO)	濃縮液	1.3	80
限外ろ過 (100,000 MWCO)	濃縮液	0.95	94

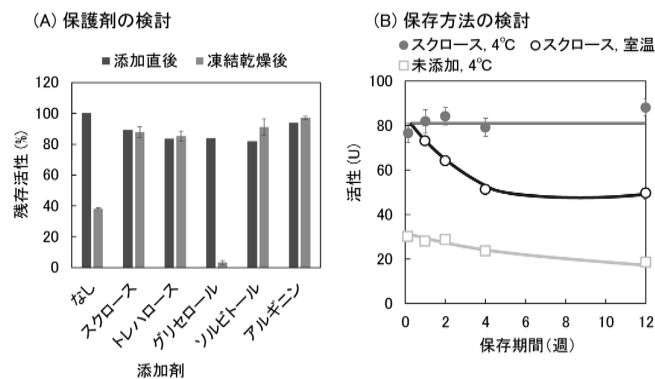


図1. 小腸 AGL の凍結乾燥条件の検討

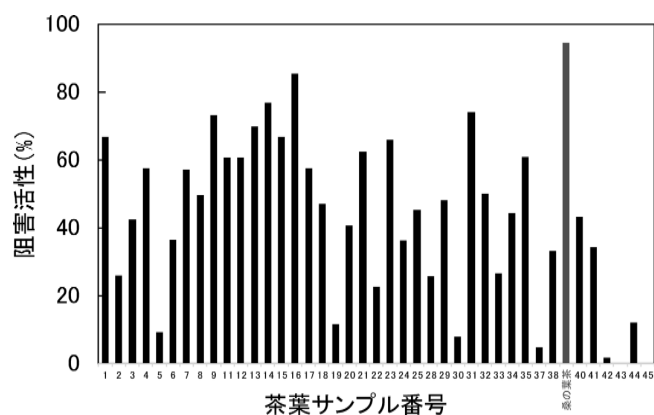


図2. 各種茶葉抽出液の小腸 AGL 阻害活性

【今後の実用化への展望】

本研究は、畜産業が盛んな地域特性を活かした地域循環共生圏の創造、畜産業における水質環境負荷の軽減、新たな畜産廃棄物処理技術としての世界の畜産業への発信、糖尿病やポンペ病の治療研究の基盤形成による健康増進への貢献を通じて『Society 5.0』や『SDGs』の実現に寄与できる発展性が見込まれるものである。

本研究を実用化するためには食肉加工業者との共同研究が不可欠であると考え、本研究期間の2年間を通じていくつかの国内企業に研究シーズを紹介してきたが、現時点で共同研究開始の目処は経っていない。今後は、血液を原料

とする試薬開発を行う企業などにも対象を広げて共同研究先を募り、実用化への展開を目指していく。

【謝辞】

ブタ血液は日本フードパッカー株式会社道南工場から恵与された。粗精製法の検討に用いた柿タンニンと限外ろ過膜はそれぞれ株式会社三樹嘉七商店と東レ株式会社地球環境研究所から提供された。阻害剤探索のための茶葉は株式会社ルピシアから提供された。クライオ電子顕微鏡-単粒子解析は BINDS の支援を受けて実施された。ここに感謝の意を表する。

受賞テーマ：昆虫疑似感染モデルを利用した昆虫寄生菌類分離法の確立と殺虫剤リード化合物の探索

北里大学大村智記念研究所（現所属：帝京科学大学生命環境学部）
野中健一

「研究の背景」

近年の急激な人口増加に伴い、住宅地の拡大による農作

地の減少および地球温暖化による干ばつ等が原因で食料不足の問題は深刻である。この様な中、安定的に食料を供給

するためには農作物の天敵である害虫（昆虫・線虫）および病原菌への対策として、安全かつ効果的な農薬の開発が急務となっている。

昆虫寄生菌の一種である *Beauveria bassiana* は宿主に感染する過程において、宿主の神経に作用する毒性物質を生産している事が解明された (Sandhu et al. *J. Pathog.* 2012)。このような物質は害虫駆除剤（農薬）に応用出来る可能性を秘めており、本種の寄生菌は植物病原性がないため安全な農薬への展開が期待される。そのため、天然由来の化学農薬の探索源や微生物農薬の開発において昆虫寄生菌類、線虫寄生菌類など農業害虫に寄生する菌類が注目を集めている。

しかし、野外に発生した寄生菌類を探すのは容易でなく、出現時期や場所も限定的である。寄生ステージでない時期は通常土壌中に生息しているが、これら寄生菌類のみを選択的に土壌から分離する方法は未だ確立されていないため、分離培地上に出現した多種多様な菌類から絞り込まなくてはならず、膨大な時間と費用を要する。そこで、これらの問題を打破する寄生菌選択分離法の確立が求められている。

筆者は、事前検討として昆虫寄生菌類、線虫寄生菌類および菌寄生菌類が宿主に寄生する際に、これらの宿主である昆虫の表皮、線虫の卵および菌類の細胞壁の共通構成成分の1つであるキチンを分解するためにキチナーゼを分泌することに着目し、キチン素材を含む培地の開発に取り組んだ。既存のキチン培地はキチン粉末を利用するが、本粉末は沈殿し易く、ハローの確認がしにくい難点がある。

そこで筆者は、繊維状新規素材であるキチンナノファイバーを低濃度寒天で固めた分離培地の開発を進めることで、均一な培地の作製に成功し、キチン分解菌周辺のハローの確認がより容易になった (岩崎・野中 日本農芸化学会 2018 年度大会発表)。

「研究の課題」

〈これまでの成果を発展させる工夫〉

キチン分解能を指標に土壌から菌類の分離を行う事で、昆虫寄生菌類のみならず、線虫寄生菌類や菌寄生菌類等、様々な寄生菌類の効率的な収集が可能となった。しかし、キチン分解菌には寄生菌類以外の菌類も存在する。

昆虫寄生菌類が昆虫に寄生するシステムは、(1) 宿主（昆虫）の『認識』、(2) 昆虫表皮への『付着』、(3) 加水分解酵素による昆虫表皮の『分解』、(4) 免疫応答からの『回避』、(5) 宿主内での『増殖』の順で行われる (Sandhu et al. *J. Pathog.* 2012)。これまで筆者が指標に利用して来た「キチン分解能」は前述の (3)『分解』に相当するため、

これに加え (1)『認識』または (2)『付着』のシステムを分離培地上で再現する事で、より選択性が高い分離法の実現が可能と考えた。

そこで、宿主の認識・付着・分解を利用した昆虫寄生菌の選択分離法を達成する素材としてナノ（またはマイクロ）カプセルの性質に着目した。

〈ナノ（マイクロ）カプセルとは〉

内部に薬剤等を内包出来る極微小（直径 50 nm ~ 30 μ m 程度）のカプセルである。カプセルの成分を酵素では分解されず、水に徐々に溶ける素材にすることにより、目的の部位まで分解されずに内包した医薬品を輸送することが可能なドラッグデリバリーシステムに応用されている。

〈1. 疑似昆虫培地の構築〉

寒天培地上で昆虫表皮を再現した分離培地を作製する。培地上の疑似昆虫は昆虫表皮成分の1つであるキチンで微小カプセルを作成し、カプセル内に昆虫寄生菌類の生育に必要な栄養成分を内包する。昆虫表皮を模倣した本カプセルを、栄養成分を全く含まない固形培地に添加する。そうすることにより、疑似昆虫カプセルを分解可能な菌類は栄養を獲得出来るため生育が可能となるが、カプセルを分解出来なければ栄養を獲得出来ないため生育する事が出来ない (図1)。この仕組みにより昆虫寄生菌類のみを高い選択性で分離が可能になると考えた。

固形培地に添加する微小カプセル（疑似昆虫）の大きさと添加割合および内包栄養成分などの検討については、土壌から菌類の分離操作を行いながら決定することで、土壌から昆虫寄生菌類を選択的に分離する新たな方法を確立する。

〈2. 確立した分離法を駆使した未知寄生菌の探索〉

筆者は有用物質の探索源として国内の海洋島由来の菌類（特に寄生菌類）に着目し、2013年までに全国から分離した1,500株を超える菌類について分類を行ったところ、寄生菌類の多くの種が所属するバクカクキン科菌類は日本本土からの出現率が6%であるのに対し、海洋島からの出現率が11%と2倍高い事を明らかとした。さらに分離株から昆虫寄生菌類である *Simplicillium* 属の5新種、*Lecanicillium* 属の1新種などを含む17新種の菌類を発見し、報告して来た (Nonaka et al. *Mycoscience* 2011, 2012, 2013, 2015 など)。

そこで確立した疑似昆虫培地を用いて、寄生菌類が所属する子囊菌類のアナモルフの分離に最適な希釈平板法で海洋島土壌から探索を行うことで、未知寄生菌類の発見につなげる。昆虫寄生菌類は昆虫に感染していない時は通常土

壤中に生息している。未知寄生菌類を効率良く分離するために、海洋島である伊豆諸島の土壌を使用し、本研究で確立した分離法を駆使して未知寄生菌類の探索を行う。

「研究の結果」

①昆虫表皮を模倣した微小カプセルの作製

微小カプセルは重合体（ポリマー）で薬剤等を内包するシステムである。昆虫寄生菌は加水分解酵素（キチナーゼ等）で宿主の一部を分解して侵入する。そこで、昆虫表皮の安定な構成成分であるキチンを水中で自己組織化させることで微小カプセルを作製することを考案し、作製においてはホソカワミクロン株式会社の協力を得て検討した。しかしながら、カプセル作製時に利用可能な有機溶媒の中から、キチンを溶解できる溶媒を見出すことが出来なかった。そこで、代替案として作製実績があるポリエチレングリコール-ポリアミノ酸で自己組織化し、キチンの脱アセチル化体であるキトサンでコーティングした微小カプセルの作成に成功した。

キトサンは天然では接合菌類の細胞壁構成成分としての

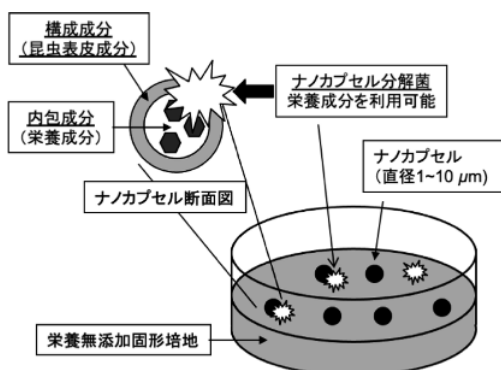


図1. ナノカプセルを用いた分離培地

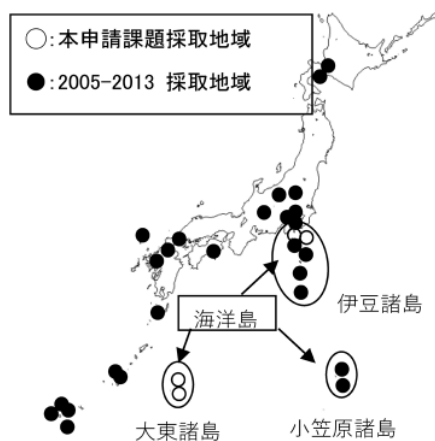


図2. 土壌採取地域

み見出されているが、キトサンは部分的にキチンを含んでいるため、キチナーゼによる分解が可能であると推測した。*Beauveria*属菌、*Lecanicillium*属菌などの昆虫寄生菌類4種を含む計10種の保有菌類を用いてキトサン分解試験を行なったところ、昆虫寄生菌類はキトサンを分解し、非昆虫寄生菌類は分解出来ない結果が得られたため、本カプセルで昆虫を模倣できると判断した。

また、微小カプセルの表面を糖鎖で修飾する予定であったが、作製が困難であることが判明したため、代替案として、昆虫表皮を構成する脂肪酸成分で修飾することで、昆虫寄生菌類が昆虫へ「付着」するシステムを構築出来ると判断した。これは現在も検討を継続中である。そのため、以下の検討は表面修飾なしのカプセルで行った。

②カプセルの大きさおよび、微小カプセルに内包する栄養成分の決定

微小カプセルは50 nm～30 μmの範囲で作製が可能である。昆虫寄生菌は孢子（大きさ約3 μm）が昆虫を認識するが、カプセルの大きさが小さいと認識できない可能性がある。前述の①の検討の際、ナノカプセルの大きさを5 μm および 10 μm の2種を作製し、土壌を用いた菌の分離検討時に両者に明確な差が見られなかったため、今後の表面修飾の検討を考慮して10 μmを採用することとした。

また①を検討する際に、菌類の生育に適したポテト・デキストロース粉末またはグルコースを内包したカプセルを試作した。前述の昆虫寄生菌を用いて検討した結果、ポテト・デキストロース粉末とグルコースの間に明確な差が見られなかったため、扱いが容易なグルコースを内包成分として決定した。

③培地への処理方法および固形培地への微小カプセルの添加割合の検討

また、実際の土壌からの菌類の分離は希釈平板法を利用することを想定しており、昆虫を模倣した微小カプセルを培地に処理するには、カプセルを培地に「塗布」、または「混釈」する必要がある。両者で比較検討を行なったところ、塗布法ではムラが生じ、混釈法では均一に培地中に分布さ

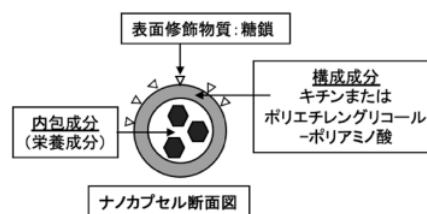


図3. ナノカプセルの構造

せることが可能であったため、混釈法を採用した。

微小カプセルの添加割合の検討は、土壌を用いて菌類の分離操作を行いながら実施する。固形培地に添加するナノカプセルの濃度を0.05%~1%の間で検討を行った。カプセルは比重が非常に小さいため、低濃度であっても添加量が多すぎてしまう結果となった。寒天平板上に出現する菌類のコロニー数を分離に適した30~50程度に調整する場合は、カプセル濃度を0.05%とした時が最も分離効率が良い結果となった。

④微小カプセルの酸耐性試験

本研究では昆虫寄生菌類の昆虫への感染システムを利用して菌類の分離を想定しているが、一部の菌類は生育する過程で有機酸を生産する。酸でカプセルが分解された場合、内包成分が漏れ出し、昆虫寄生菌類以外の菌類も生育が可能になってしまうため、カプセルの酸耐性試験を行った。検討の際はpH3, 4, 5, 6の4段階で行った。その結果、pH3ではカプセルが分解されてしまう結果となったが、pH4以上では安定して形状を維持出来ていた。培地上が強酸性とならなければ問題とならないため、本分離法を用いた選択分離に支障がないと判断した。

⑤土壌からの昆虫寄生菌類の分離

東京都江戸川区、八王子市、伊豆諸島八丈島および神奈川県相模原市より土壌を採取した。現時点で採用した条件の微小カプセルを用いて土壌から昆虫寄生菌類の分離検討を行った。土壌サンプルを改変Winogradsky溶液を用いて段階希釈し、100倍希釈、1,000倍希釈溶液を作製した。各希釈溶液をカプセル含有分離培地に200 μ L塗布し、25℃暗黒条件で2週間培養した。出現したコロニーは純化した後に分離株として確立した。分離株の同定は光学顕微鏡下での微小形態観察およびITS配列に基づく分子同定で行った。この際、菌類分離培地としてよく使用されるポテト・デキストロース寒天培地(PDA)との間で、全分離株に占める昆虫寄生菌類の多くが所属する旧バツカクキン科菌類の割合で比較した。

江戸川区および八王子市の土壌では、全分離株に占める旧バツカクキン科菌類の割合はPDA培地はそれぞれ18%, 13%, 2%であるのに対し、微小カプセル培地では43%, 32%, 21%と大幅に分離割合が向上した。一方で、相模原市の土壌では、全分離株に占める旧バツカクキン科菌類の割合は、PDA培地と微小カプセル培地で明確な差は見られなかった。しかし、分離された旧バツカクキン科菌類の属数で比較した場合、PDA培地では*Metarhizium*属1属

のみであったのに対し、微小カプセル培地では*Metarhizium*属、*Tolypocladium*属、*Metapochonia*属、*Acromonium*属、*Purpureocillium*属の5属と分離属数が向上する結果が得られた。

「今後の実用化への展望」

昆虫等の寄生菌類は天然物由来の農薬の探索源および微生物農薬の開発においても注目を集めている。しかし、これら寄生菌を土壌から選択的に分離する方法は確立されていない。そこで、筆者は昆虫寄生菌が宿主に感染するシステムに着目した。この感染システムを菌類の分離に利用するためには、昆虫の表皮を固形培地上で再現する必要がある。この目的を達成するために微小カプセルで昆虫の表皮を再現し、昆虫寄生菌類の選択的な分離に利用した例はない。寒天培地を用いた菌類の分離は、長い歴史と伝統を有するが、ナノファイバーやナノカプセルといった新規素材との組み合わせにより、寒天平板法にはまだ発展の余地があることを示すことができたのではないかと考えている。

本研究課題は理想型とするカプセルが完成していない状態での結果ではあるが、昆虫寄生菌類の選択分離法の可能性を見出せることが出来たと考えている。また、コロナ禍で出張制限の影響で当初計画していた時期に伊豆諸島の土壌を用いた検討が出来なかったため、過去に昆虫寄生菌が多く発見された本土の地域から採取した土壌を中心とした検討となったが、予測したよりも昆虫寄生菌類の分離割合が高く、十分に検討を進めることが出来た。

今後はさらにカプセルの構成についても改善を進めていく。予備検討により、昆虫の脂肪酸成分が昆虫寄生菌類の発芽・生育を促進する効果が見出されているため、本成分をカプセル表面に組み込むことにより、より昆虫表皮に近づけた擬似昆虫の作製が期待され、更なる選択性の向上が期待される。そのため、本方法を発展させる様、研究を継続して行っている。本方法の開発が達成されたなら、昆虫寄生菌類の収集に要する費用や時間を大幅に抑える事が可能となると考えている。今回の検討では昆虫を模倣したカプセルについて検討を重ねてきたが、線虫や菌類を模倣したカプセルへと応用できる可能性もあるため、農業用殺虫剤のみならず殺線虫剤や殺菌剤の開発でも効率化を図ることができる可能性を秘めている。さらに通常の方法で出現しにくい菌類の分離割合が向上した傾向から、未知寄生菌類の探索・収集の効率化も図ることができるため、農薬開発への展開のみならず、微生物保全分野への寄与も期待される。

3. 第2回夢にチャレンジ企画賞 報告書

第2回夢にチャレンジ企画賞報告書

がんカヘキシアにおける筋萎縮分子機序の解析

研究分野：生命科学，健康科学，分子栄養学，医学

研究キーワード：筋萎縮，カヘキシア，人生100年時代，健康寿命，アトロカイン

発表テーマ：人生100年時代を迎えて寝たきりにならない社会を実現するために

～筋タンパク質分解の活性化を遮断したマウスの解析から新規の生理活性物質「アトロカイン」を発見する～

京都府立大学大学院生命環境科学研究科分子栄養学研究室
大藪 葵

研究成果の概要

がんなどの疾患に付随した筋萎縮は，日常生活動作や生活の質を低下させるだけでなく，生命予後にまで影響を与えることが明らかになり，筋量・筋機能の維持の重要性が指摘されている．本研究では，骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスのがんカヘキシアモデルを作製した．その結果として，筋量の低下だけでなく，がんカヘキシアに伴う筋力の低下も，骨格筋FoxOシグナルの遮断によって抑制できることを明らかにした．また，臓器連関の解析から，飢餓時の脂肪肝発症における骨格筋FoxOシグナルの重要性を示唆するデータを得ていたことから，タンパク質栄養欠乏（タンパク質低栄養）によって誘導される脂肪肝における骨格筋FoxOシグナルの役割を調べた．また，本企画賞の受賞を起点に，筋萎縮由来の生理活性物質として「アトロカイン」の概念を考案し，現在アトロカインの同定に向けた解析の準備を行っている．

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う筋量や筋機能の低下（サルコペニア）および，がんなどに伴う悪液質（筋量の減少を特徴とする代謝症候群，カヘキシアとも呼ばれる）は，日常生活動作や生活の質を低下させるだけでなく，これまで骨格筋を「動かす」ことで得られていた健康効果を消失させることなどから，さまざまな二次的疾患の罹患リスクを高めるとともに，がんにおいては抗がん治療における治療抵抗性の要因となる．したがって，骨格筋の量と機能を調節する分子機構の解明は，「人生100年時代」を迎えた我が国における喫緊の課題である．本研究をさらに発展させることで，骨格筋の量および機能を調節する新しい分子機序の解明と筋萎縮がもたらす全身性効果の理解に繋がり，サルコペニアやカヘキシアを起点とした多岐にわたる疾患の予防・治療を可能にする新規介入法の確立につながると期待している．

1. 研究の背景

「人生100年時代」を迎え，若者から高齢者まで，全ての国民が健康かつ元気に活躍し続けられる社会の実現は喫緊の課題となっている．加齢に伴う筋量や筋機能の低下（サルコペニア），ならびにがんなどの疾患に伴う悪液質（筋量の減少を特徴とする代謝症候群，カヘキシアとも呼ばれる）は，日常生活動作や生活の質を低下させることから，骨格筋の量と機能を維持することは，健康で元気に活躍し続けられる社会の実現において極めて重要な視点である．

骨格筋は筋タンパク質の合成と分解のバランスによって維持されており，筋分解系が筋合成系よりも亢進することで萎縮する．研究代表者の研究室では，これまでに骨格筋特異的FoxO1過剰発現マウスを作製することで，FoxO1が筋萎縮を強力に誘導する因子であることを発見した（Kamei et al, *JBC*, 2004）．近年，研究代表者らを含めた研究成果から，骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスでは，飢餓や除神経，糖尿病，後肢懸垂による不動化，老化などにおける筋萎縮に対して抵抗性を示すことが明らかになってきた（*Nat Commun* 2015, *J Physiol* 2017, *Diabetes* 2019, *FASEB J* 2022, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2023）．しかしながら，臨床で問題となっているがんカヘキシアにおいて，骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスで，がんカヘキシアに付随した筋萎縮の発症が抑制されるかは不明であった．また，上述のように骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスは，さまざまな筋萎縮に対して抵抗性を示すことが明らかになってきたものの，個体全身レベルでの骨格筋FoxOシグナルの役割は不明のままであった．

そこで，本研究ではがんカヘキシアに付随した筋萎縮や，タンパク質栄養欠乏（タンパク質低栄養）によって誘導される脂肪肝における骨格筋FoxOシグナルの役割を調べた．

2. 研究の目的

本研究では、「疾患に付随した筋萎縮がどのような分子機序で発症するのか？」を問いとして、がんカヘキシアに付随した筋萎縮における骨格筋 FoxO シグナルの役割の解明を目指した。

研究代表者はこれまでに、飢餓誘導性の脂肪肝の発症には、骨格筋 FoxO シグナルが抑制的に機能することを見出していた。そこで本研究では、タンパク質栄養欠乏（タンパク質低栄養）によって誘導される脂肪肝における骨格筋 FoxO シグナルの役割を調べることを目的とした。

3. 研究の方法

①がんカヘキシアモデルマウスの作製

骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスは、ヒト- α -actin-Cre (HSA-Cre) 発現プラスミドを *FoxO1^{fllox/fllox}*, *FoxO3^{fllox/fllox}*, *FoxO4^{fllox/fllox}* マウスの受精卵にマイクロインジェクションすることによって作製した (Oyabu et al, *FASEB J* 2022). マウスは、CE2 (日本クレア) 餌を自由摂取させ、24℃、12時間の明暗周期下で飼育した。マウスのがんカヘキシアモデルは、ルイス肺がん細胞 (LLC 細胞) を麻酔下で皮下注射し、4週間飼育することにより作製し、コントロールマウスには、麻酔下で同量の PBS を皮下注射した。設定した人道的エンドポイントから、腫瘍重量が体重の10%を超えないように細心の注意を払うとともに、マウスが被る苦痛を最小限に抑える努力を施した。骨格筋重量と筋力の測定 (握力測定装置: GPM-101B を使用) に加えて、骨格筋における遺伝子発現解析 (qRT-PCR)、タンパク質発現解析 (ウェスタンブロット) を行った。

②タンパク質栄養欠乏モデルマウスの作製

タンパク質栄養欠乏実験では、離乳直後の骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスとコントロールマウス (*FoxO1^{fllox/fllox}*, *FoxO3^{fllox/fllox}*, *FoxO4^{fllox/fllox}*) に、表1に示した20%カゼイン食、3%カゼイン食、1%カゼイン食を2週間給餌した。肝臓および血漿中のトリグリセリド量は、トリグリセリド

表1. タンパク質欠乏餌の組成 (1500 g 調製の場合)

	20%カゼイン餌 (20C) (g)	3%カゼイン餌 (3C) (g)	1%カゼイン餌 (1C) (g)
カゼイン	300	45	15
DL-メチオニン	4.2	0.645	0.21
コーンスターチ	373.55	631.25	662.45
スクロース	523	523	523
大豆油	75	75	75
ビタミン Mix	15	15	15
ミネラル Mix	60	60	60
セルロース	150	150	150

E-テストワコーを用いて測定した。

4. 研究の成果

①がんカヘキシアに伴う筋萎縮における FoxO シグナルの重要性

In vivo でがんカヘキシアに付随した筋量・筋機能の低下が FoxO 経路によって制御されているかを明らかにするために、骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスのがんカヘキシアモデルを作製した。骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスとコントロールマウスでは、腫瘍形成の程度や血中炎症性サイトカイン (IL6) の濃度に変化は見られなかったものの、腫瘍形成に伴う筋量と筋力の低下が抑制された (図1)。また、FoxO 標的遺伝子である筋萎縮関連遺伝子 (Atrogin1, MuRF1, C/EBP δ) の腫瘍形成に伴う発現増加は、骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスでは抑制された (図2)。以上の結果から、がんカヘキシアに伴う筋萎縮は、骨格筋特異的 FoxO1,3,4 欠損マウスで抑制されることが示された。

②離乳直後のタンパク質欠乏誘導性脂肪肝における骨格筋 FoxO シグナルの役割

研究代表者はこれまでに、飢餓誘導性の脂肪肝の発症には、骨格筋 FoxO シグナルが抑制的に機能することを見出していた。飢餓時には、エネルギー欠乏とタンパク質欠乏の両方が生じ、タンパク質欠乏だけでも脂肪肝が誘導され

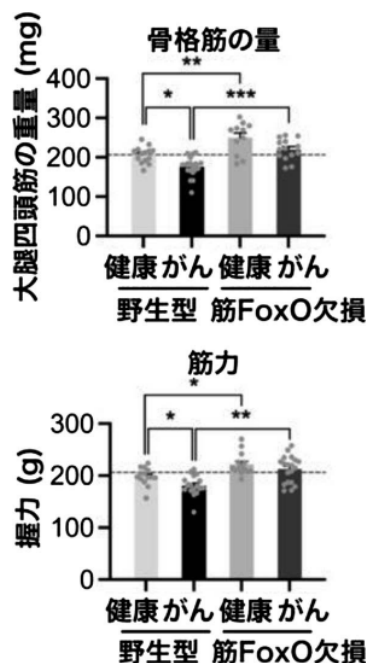


図1. 筋特異的 FoxO 欠損マウスでは腫瘍形成に伴う筋量と筋力の低下が抑制された

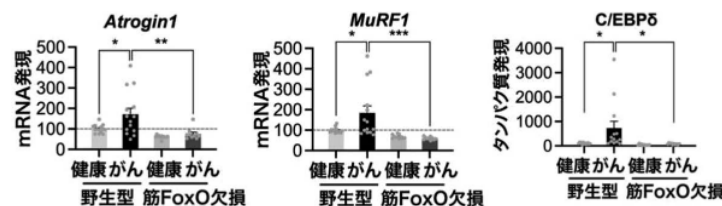


図2. 筋特異的FoxO欠損マウスでは腫瘍形成による筋萎縮関連遺伝子の発見増加が抑制された

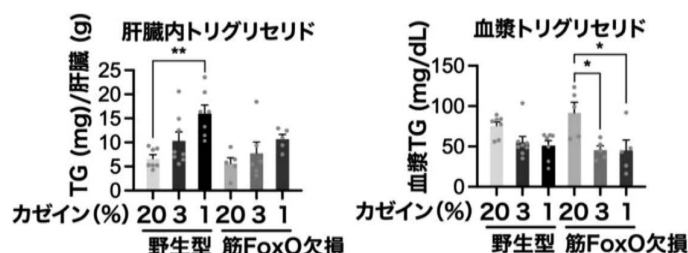


図3. 離乳食後のタンパク質欠乏誘導性脂肪肝には骨格筋FoxOは影響を及ぼさない

ることが知られている。そこで、タンパク質栄養欠乏時の脂肪肝の発症における骨格筋FoxOシグナルの役割を調べるために、骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスのタンパク質栄養欠乏モデルを作製した。その結果、骨格筋特異的FoxO1,3,4欠損マウスでは、タンパク質欠乏による肝臓内トリグリセリドの蓄積が野生型マウスと同程度あるいは若干抑制された(図3)。以上の結果から、骨格筋FoxOシグナルは離乳直後のタンパク質欠乏による脂肪肝を悪化させないことが示唆された。離乳直後では、骨格筋形成が未成熟な段階であることから、タンパク質欠乏時の骨格筋FoxOシグナルの役割を明らかにするためには、より成熟したマウスにおいても検討が必要であると考えられる。

5. 謝辞

本企画賞での研究実現にあたって、研究助成だけでなく、研究発表・内容・考えに対するディスカッション、他大学との共同研究のマッチング支援などを受けました。多大なるご指導・ご支援を賜りました阿部圭一委員長をはじめ、産学官学術交流委員会(さんわか)メンバーの皆様ならびに関連企業の皆様に、厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたって、タンパク質栄養欠乏実験、アミノ酸分析にご協力くださいました東京大学大学院農学生命科学研究科の高橋伸一郎教授、伯野史彦准教授、西宏起博士、東京大学農学部の中中大介特任助教、合田祐貴博士、沖野良輔博士に御礼申し上げます。また、実験データに関する貴重なディスカッションをいただきました東京大学大学院農学生命科学研究科の山内祥生准教授に厚く感謝申し上げます。

6. 主な学会発表・受賞等

〈学会発表・研究会等での受賞〉

1. 日本農芸化学会関西支部第525回講演会(2023年5月)
筋刺激に応じた筋萎縮関連代謝産物(Atrometabolite)の統合的メタボローム解析による同定(優秀発表賞「支部長推薦」)

大藪葵, 水谷彩子, 亀井康富

2. 第9回骨格筋生物学研究会(2023年3月)

飢餓適応としての骨格筋FoxOsシグナルの新たな役割(Young Investigator Award)

大藪葵

3. 第36回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会(2023年2月)

低栄養性脂肪肝における骨格筋FoxOsシグナルの役割の解明(若手研究奨励賞)

大藪葵, 川口留奈, 吉岡潔志, 石原健吾, KwonJungin, 菅波孝祥, 後藤剛, 亀井康富

4. The 22nd International Congress of Nutrition (ICN)(2022年12月)

Loss of FOXOs in skeletal muscle prevents the onset of cancer cachexia-induced muscle atrophy (Young Investigator Excellent Abstract Award) Mamoru Oyabu, Ono Yusuke, Fujimaki Shin, Yoshioka Kiyoshi, Junya Fujimaki, Runa Kawaguchi, Yukino Hatazawa, Shinji Miura, Yasutomi Kamei

5. 第12回4大学連携研究フォーラム（2022年11月）

がん悪液質誘導性筋萎縮における骨格筋FoxOsシグナルの役割（優秀賞）

大藪葵，小野悠介，藤巻慎，吉岡潔志，藤巻絢哉，川口留奈，三浦進司，亀井康富

6. 日本アミノ酸学会第16回学術大会（2022年11月）

飢餓時の「筋肝連関」を介した脂肪肝の調節機構の解析（優秀ポスター賞）

大藪葵，川口留奈，吉岡潔志，石原健吾，菅波孝祥，Kwon Jungin，後藤剛，亀井康富

〈国際学会（海外開催）での発表〉

1. The 2023 American Physiology Summit (APS) (アメリカ，2023年4月)

Healthy skeletal muscle atrophy and/or metabolism via FoxOs signaling pathway protects starvation-induced fatty liver Mamoru Oyabu, Tsuyoshi Goto, Kiyoshi Yoshio-ka, Runa Kawaguchi, Jungin Kwon, Yuto Ohira, Kengo Ishihara, Takayoshi Suganami, Shinji Miura, Yasutomi Kamei

光合成ハウス ～微生物を最大活用し，環境問題を解決する～

吉崎万莉

解決したい社会課題

人間は，生産活動や消費活動の結果，さまざまな排出物や廃棄物を生み出している。産業革命以降，人間の活動がより活発になり，CO₂排出量は依然として急速に増加し，近年の大気中のCO₂濃度は過去200万年の間で最も高いレベルに達している⁽¹⁾。世界で人為的に排出されているCO₂量（350億トン炭素）のうち，自然吸収源（陸と海）が吸収できる量は約半分にすぎず，今後も大気中のCO₂濃度は急速に増加し続ける⁽¹⁻³⁾。現在では，CO₂の他に生成機構が複雑な光化学オキシダントや低濃度長期暴露による健康影響が心配される有害大気汚染物質による大気汚染が起きている。このように自然環境の汚染がすすみ，生態系が破壊されて人間の健康にも被害が生じ，大気汚染をはじめとする公害問題が発生するようになった⁽⁴⁾。地球温暖化や大気汚染などの地球環境問題は，私達の子孫が生存の基盤を失うほど深刻なものになりつつある。

今後予想されている気候変動による生態系や社会への危険な影響を避けるため，長期的な気候変動対策として，地球平均の気温変化を「産業革命前に比べて2℃増加」に抑えること，いわゆる「2℃目標」に国際合意（G8，UNFCCCカンクン合意等）がすでに得られている。しかし，この目標を達成するためには，近い将来に世界のCO₂排出量を頭打ちにし，2050年には排出量を50%以上削減し，さらに今世紀の後半には，排出量を負にしなければならず，達成は非常に難しい。このように全世界的に緩和策が求められている中，日本は再生可能エネルギーを最大限に導入す

る方針を固めている。しかし太陽光や風力は天候に左右されるというデメリットがあるため，電力を安定させるために火力発電は欠かせない。化石燃料の使用を完全にゼロにするのは現実的ではないことから，単に排出を削減するだけでなく，大気中のCO₂を吸収するネガティブエミッション技術の開発および大規模に実施することが求められている⁽³⁾。

課題解決のための着想に至った研究成果

植物は，光合成によってCO₂を吸収することで，温室効果ガスのひとつであるCO₂を減らし，地球温暖化を抑える力を持っている。また，植物には，窒素酸化物（NO_x）や硫黄酸化物（SO_x）などの大気汚染物質を吸収するはたらきがあることもわかっている。そこで植林や森林保護をすることでCO₂の吸収を試みているが，人口増加や農地への転用，焼畑移動耕作などの理由から森林面積は減少の一途をたどっている⁽⁵⁾。

ゴーヤなどのつる性の植物を利用して建物の窓や壁面に強い日差しが当たらないようにしたグリーンカーテンなど，垂直方向の面積を有効活用する手段もとられている。グリーンカーテンは日射の熱エネルギーの80%をカットする効果があるとされ，30%の電力を削減することができるとされている。また，8m²のグリーンカーテンのCO₂削減量としては，杉の木約9本分の削減効果があると推定されている⁽⁶⁾。しかし，虫が集まりやすく，栽培や枯れた後の掃除も多くの労力がかかるなどの理由から普及して

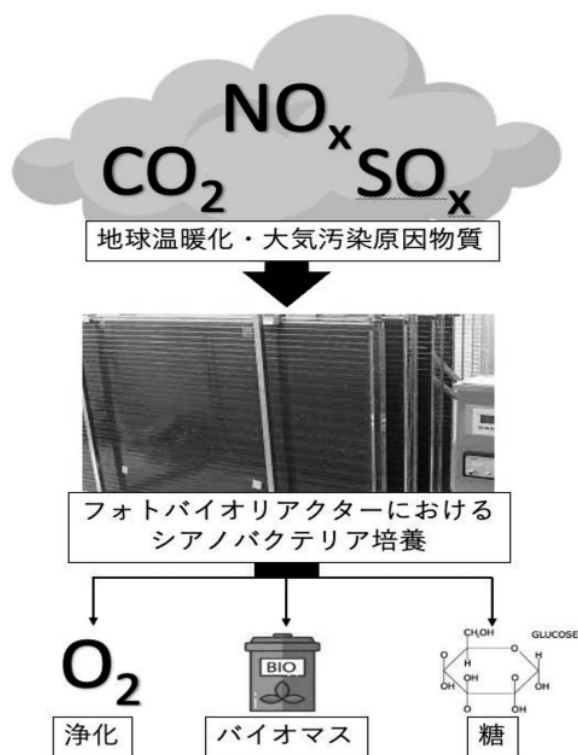


図1. 課題解決のための着想に至った研究成果

いない。

垂直方向の面積を有効活用する手段として、フォトバイオリアクターによる微細藻類の培養に関する研究が広く行われている。微細藻類の一種であるシアノバクテリアは CO_2 を回収し、光合成による CO_2 固定を行い、バイオマスを産生する。半数のシアノバクテリアは窒素固定を行うため、 NO_x を変換することができる。その他に希少糖やポリマー原料として注目されているシアノフィシンを生産することが知られている。しかし、目的物質の生産性やコストパフォーマンスの低さから実用化には至っていない。また、研究室や工場以外での運用ができないため、変換できる CO_2 量も少ない。現在は陸生のシアノバクテリアを用いたフォトバイオリアクターの研究が進められ、培養液を最小限にすることで低コスト化に成功している。これらのシアノバクテリアは工場などの排気ガス通気下でも培養可能である⁽⁷⁾ (図1)。しかし、培養器への菌の塗布や回収が難しいなど、低コスト状態で大量培養するには大きな問題がある。また、陸生シアノバクテリアのバイオマスや糖、タンパク質などの有用物質の生産性は低く、生産性の向上が求められる。これらの結果から、地球温暖化および大気汚染などの環境問題解決のためのシアノバクテリアを用いたグリーンカーテンという着想に至った。グリーン

カーテンとして使用後は、肥料や飼料として活用することを視野に入れている。

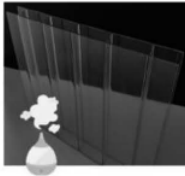
研究課題のブラッシュアップ

フォトバイオリアクターを実用化し、二酸化炭素の削減に取り組むため、様々な方との話し合いを経て課題のブラッシュアップを行った。一つ目の課題は、フォトバイオリアクターの設計と最適化である。フォトバイオリアクターの設計に関して、反応槽の形状、寸法、材料などを最適化する必要がある。さらにフォトバイオリアクター内の微生物が必要な二酸化炭素、酸素などのガスを効率的に供給し、産生された酸素、水素などを効果的に除去する方法を研究する必要もある。そしてフォトバイオリアクターの製造コストや運用コストを低減し、持続可能なシステムも検討課題である。これらの課題を考慮し、フォトバイオリアクターの形状を決めるために培地削減、海水の利用、排水システム、通気システム、気化熱の発生、 CO_2 の固定、臭い、窓、見た目、菌体の方法塗布、設置、軽量化、回収方法、培地供給方法等の要件を実用化にあたる優先順位に基づき、法律をふまえ、装置の形状や素材を検討することとした。また、 CO_2 の放出を防ぐための循環系も検討することとした。二つ目の課題は微生物の選定である。フォトバイオリアクターに利用する光合成微生物の生存、成長、光合成能力の維持を向上させるために、日本の気候に適応可能な微生物の選定を課題とした。

本研究の目的

先述の通り、環境問題の大きな原因の一つである CO_2 は地球温暖化や大気汚染の原因となり、異常気象や、生態系破壊を引き起こす。しかし、人の産業活動を止めることはできないので、早急に CO_2 削減する施策が必要である。特に日本政府は、世界的な取り決めであった2013年比50%削減がこのままでは不可能であると試算を出している。残りの4%を削減するには新規の効果的な CO_2 削減方法が必要である。我々はこの残りの4%、5250万トンの削減を、この光合成ハウスプロジェクトで達成したいと考えている。しかし、建物の壁面に設置するようなフォトバイオリアクターの実用的な方法は提案できていない。我々は実用化を目的とした1. 光合成微生物の選定、2. フォトバイオリアクターの形状の選定、3. フォトバイオリアクターの素材の選定、の3つのアプローチにより、光合成ハウスに最適なフォトバイオリアクターの基盤研究を行うことを目的とした。

表1. 当初検討のフォトバイオリアクター比較

						
装置		閉鎖系回転式	水槽型	超音波式	開放系回転式	フィルム容器
植菌		容易	困難	困難	容易	容易
回収		容易	困難	困難	容易	大量回収は困難
コスト	培地	少量	少量	少量	ある程度	大量
	電力	不明	不要	超音波・通気	回転	不明
気化熱の発生		起こる	不明	不明	起こる	起こらない
閉鎖系・解放系		閉鎖系	混合系	閉鎖系	解放系	閉鎖系
建物への設置		容易 (全面は困難)	容易	容易	場所が必要	困難

本研究の取り組み

1. 光合成微生物の選定

日本において建物の壁面に設置するフォトバイオリアクターに利用する光合成微生物には光ストレス耐性、高温および低温耐性、乾燥耐性などの能力を有する必要がある。これまでのフォトバイオリアクターの研究で用いられている光合成微生物は生育度が高く、燃料となるバイオマスを生産する。しかし、これらの微生物は遺伝子組換えされており、培地も強塩基性であるなど、地震多い日本で安全に活用でき、上記のような耐性を持つ株はみられなかった。そこで、様々なストレスに強い陸棲シアノバクテリア等を検討した結果、*Nostoc* sp. X-01株、*Leptolyngbya* sp. X-04株、*Calothrix* sp. X-05株、*Nostoc commune*、*Scytonema* sp. X-06株の5株を選抜した。その中でも *Nostoc* sp. X-01株は光ストレス耐性、高低温耐性、乾燥耐性、窒素固定能を持ち、タンパク質含有量も高く、古くより健康食品として食べられており、有用性が高い。今後、本研究ではこの *Nostoc* sp. X-01株を最有力候補として研究を進める予定である。

2. フォトバイオリアクターの形状

様々な形状を比較した(表1)。日本において建築物の壁面に設置する上で最も重要なことは法律および気象である。まず、日本の建築物には多くの法律があり、それに適

応しなければならない。臭い(環境衛生法)、住宅であれば窓を塞がないこと(建築基準法)、高さ4m以下(建築基準法)などがある。これらの点から、需要が最も高い大型倉庫または工場をターゲットとすることとし、これらの建築物に適應する装置が求められる。さらに建築物省エネ法が改正され、これに対応できるような装置であれば尚良いと考える。そのため、当初は臭いやコンタミネーションを防ぐために閉鎖回転式や水槽型を想定していた(表1)。しかし、日本には台風があり、異常気象も起こっている。これらの風雨に耐えうるまたは受け流す形状である必要がある。そこで、風雨を受け流すことができ、閉鎖系であり、培地を循環させることも可能であるチューブ状の形状が最適であると考え(図2)。

3. フォトバイオリアクターの素材

今回のようなリアクターに使用するには、透明かつ紫外線による劣化や雨による加水分解を起こさない樹脂である必要がある。そこで、光透過性、UV耐性、耐候性を持つアクリル樹脂、ポリカーボネート、メタクリル樹脂を選抜した。また、気化熱による節電効果のために多孔性の物質である吸水ポリマーやエアロゲルについても検討した。吸水ポリマーは強い塩基性を示し、開放形であってもコンタミネーションを防ぐには最適である。しかし、菌体のみの回収は困難であり、肥料など二次利用には不向きであり、



<https://euref.de/entry/algen-fassadenreaktor-von-mint-engineering/>

図2. MINT Engineering GmbH ベルリン本社に設置されたフォトバイオリアクター

生分解性ポリマーでは耐久性に欠ける。続いて、半透明な多孔質で熱伝導率が極めて低く、超軽量であるエアロゲルは非常に軽量であるため建物への負荷を減らすことができる。しかし、非常に高価で成形が難しく、脆く崩れやすいため、今回は見送った。ゆえに、今後はポリカーボネート樹脂またはアクリル樹脂、メタクリル樹脂を活用しようと考えている。

今後の展望

本技術の確立には、温度や光ストレスなど日本における自然環境に対応可能な装置が必要であり、大型のプロトタイプを作製し、検証実験を進める。加えて、カーボנקレジットへの適用を見越して行政および企業様へのヒアリングを通して実用化を目指す。

謝辞

本研究に際し、研究助成および助言をいただいた公益社団法人日本農芸化学会、企業の皆様に心より感謝申し上げます。

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三重大大学 加藤浩助教授、徳島大学 小川宏樹教授、Technical University of Kaiserslautern Prof. Dr. rer. nat. Roland Ulber, Technical University of Kaiserslautern Dorina Dr. Strieth に心より御礼申し上げます。

本活動を通じて産学官学術交流委員会委員長の阿部圭一先生、国立研究開発法人宇宙航空研究開発機構宇宙科学研究所木村駿太特任助教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。本賞を受賞したことによって、外部研究者との人脈形成や海外でのディスカッション、研究の重要性の再確認、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。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。

参考文献

1. Pierre F, et al. (2020), Global Carbon Budget 2020, Earth Syst. Sci. Data, 12: 3269-3340
2. Global Carbon Project, (2013), Global Carbon Budget, (https://data.ess-dive.lbl.gov/view/doi:10.3334/CDIAC/GCP_2016)
3. Nancy H, David G (2021), Forests Absorb Twice As Much Carbon As They Emit Each Year, World Resources Institute news
4. 環境省, 2021, 令和2年光化学大気汚染の概要—注意報等発令状況, 被害届出状況—
5. World Resources Institute, (2021), How Much Land is Being Restored in Africa? We Don't Yet Know, (<https://www.wri.org/insights/how-challenges-solutions-land-restoration-monitoring-africa>)
6. 佐俣満夫, 福田亜佐子 (2009), 緑のカーテンによる省エネ及びCO₂削減効果の試算, 横浜市環境科学研究所報: 17-20
7. Kai S, Judith S, Dorina S, Michael Wahl, Roland Ulber (2020), Development of a lightweight multi-skin sheet photobioreactor for future cultivation of phototrophic biofilms on facades, Journal of Biotechnology, Volume 320: 28-35

4. 第3回中小企業産学・産官連携 研究助成報告書

第3回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成報告書

「松太郎のゲノム編集による香気コントロール」

研究代表者 福島大学共生システム理工学類・教授 杉森大助

中小企業研究責任者 INS株式会社・代表取締役社長 永石俊夫

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）

松太郎はシイタケ (*Lentinula edodes*) とマツタケ (*Tricholoma matsutake*) のハイブリッド種であり、弊社では吊り下げ式により大規模栽培し、市販している。ところが、松太郎のマツタケ香が安定しないため、生産性が安定しないという大きな課題を抱えていた。

・大学との連携研究の具体的内容

松太郎のマツタケ香を安定化させるための育種研究が必要と考え、研究実施可能な福島大・杉森先生に相談し、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

目的のうち5割以上の成果が得られた。具体的には、香気成分分析により、香気コントロールの指針が得られた。さらに、ゲノム編集あるいは育種のためターゲット遺伝子の絞り込みができた。得られた成果を活用し、今後香気品質の高い松太郎の栽培技術を確立し、事業に活かしたいと考えている。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

これまでの「松太郎」の栽培技術の検討、栄養成分分析の実績、技術の蓄積を活かし、本研究では香気成分分析法を確立した後、栽培法と香気成分の関係、ゲノム編集による「松太郎」の香気品質向上を目指した。

・研究の詳細

香気品質が低下した「松太郎」では、悪臭成分であるスルフィド系化合物および Oct-(2E)-enal が増加し、マツタケ香であるケイ皮酸メチルとマツタケオールが低下していることを突き止めた。この結果を踏まえ、栽培技術を検討した結果、珈琲滓含有培地を用いた栽培により、悪臭成分の低減とともに香気成分を増強させることに成功した。

さらに、ゲノム編集による「松太郎」個体そのものの育種にチャレンジした。「松太郎」ゲノム解析、RNA-Seq (mRNA 変動) 解析、KEGG パスウェイおよび文献調査に

より、破壊遺伝子（悪臭成分生合成に関与する遺伝子）の推定とともにゲノム編集を行うために「松太郎」細胞のプロトプラスト化、子実体形成のための培養法の検討、遺伝子導入法の検討を行った。ゲノム解析の結果、表1に示すように「松太郎」のゲノムサイズはシイタケより約10 Mbp大きく、予測遺伝子数も約1.5倍多いことがわかった。

「松太郎」ゲノムは、シイタケゲノムのほとんどの領域をカバーしており、83.5%がシイタケゲノムにアライメントされた。しかしながら、unmapped 配列も20%程度あることがわかった。一方、マツタケゲノムには、「松太郎」のリード配列は2.4%のみアライメントされた。つまり、マツタケと「松太郎」は、塩基配列レベルで類似する部分がほとんどないことがわかり、多くがシイタケゲノムであると考えられた。

RNA-Seq 解析の結果、「松太郎」mRNA のうちマツタケのみにヒットした配列が176配列、うちタンパク質をコードする配列が140配列、うち127配列が帰属できた。

KEGG パスウェイおよび文献調査により、破壊候補遺伝子としてリボキシゲナーゼ (linoleate 10R-lipoxygenase [EC:1.13.11.62]) 遺伝子を推定した (図1)。本遺伝子はマツタケ、ブナシメジ中には類似配列が見出されたが、マツタケには存在しないことから破壊候補遺伝子となり得ると考えた。

リボキシゲナーゼ遺伝子をゲノム編集により破壊するため、「松太郎」のプロトプラスト化条件と遺伝子導入法を検討した。その結果、プロトプラスト化条件と遺伝子導入法を確立し、導入効率は極めて低いものの遺伝子導入確認用の蛍光タンパク質GFPの発現まで確認することができた。

・考察と展望

廃棄物である珈琲滓を利用した培地で栽培することによ

表1 各キノコのゲノムサイズと予測遺伝子数

	ゲノムサイズ/bp	予測遺伝子数
松太郎	56,248,496	14,493
マツタケ	175,758,422	22,864
シイタケ	45,870,312	9,804

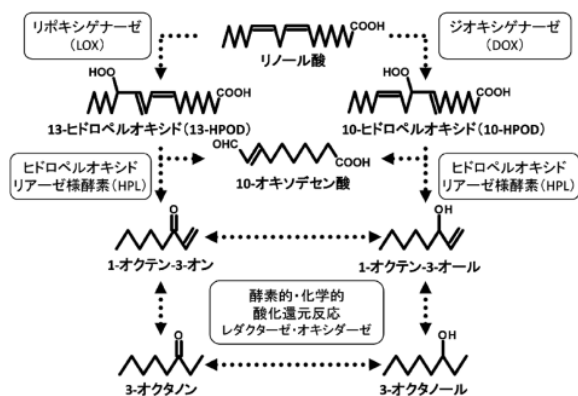


図1 キノコ香気成分の合成経路
(参考文献1)

り香気品質の安定化と品質向上を達成できたことは大きな収穫と言える。また、香気品質に関わる香気成分を明らか

にし、その生合成経路を概観することができた。さらに、ゲノム解析およびRNA-Seq (mRNA変動) 解析結果を踏まえ、香気品質向上につながると予想される遺伝子を推定し、ゲノム編集により当該遺伝子を破壊するための準備を整備した。今後、ゲノム編集「松太郎」を創製し、より一層香気品質が向上した商品につなげたいと考えている。

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

1. 城 斗志夫, 工藤卓伸, 田崎裕二, 藤井二精, 原 崇, キノコの香気とその生合成に関わる酵素, におい・かおり環境学会誌 (2013).

「アミノ酸高生産酵母の育種技術を活用した 泡盛の高付加価値化・ブランド化」

研究代表者 奈良先端科学技術大学院大学 高木博史
中小企業研究責任者 株式会社バイオジェット 塚原正俊

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）

600年以上の歴史を有する沖縄県の伝統的蒸留酒である泡盛は、県内食品産業の大きな柱であり、その継続的發展は県全体の産業振興に不可欠である。しかし、近年は需要の微減傾向が続き、酒税軽減措置の終了、競合商品である焼酎ブームなどの厳しい環境下にある。一方、消費者の嗜好は個性的な本物志向が進み、泡盛の認知度と競争力の向上には、各酒造所での独自の商品開発や製造工程の改良が求められている。泡盛製造には黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) が用いられ、泡盛の風味や酒質に大きな影響を与えている。特に、主要な芳香成分である高級アルコール、エステル類は発酵過程で主に酵母のアミノ酸代謝から生成される。泡盛では主としてエタノール生産性と芳香性に優れた「泡盛101号酵母」(101株) が使用されているが、これまで育種に関する研究は行われてこなかった。したがって、泡盛の品質向上や酒質の差別化には、アミノ酸の組成や生成量に特徴を有し、泡盛に高香味性を付与できる酵母の育種が重要である。

・大学との連携研究の具体的内容

最近、塚原（中小企業研究責任者）は泡盛のブランド化戦略として、沖縄らしいイメージを持つ島バナナの茎から泡盛の醸造に応用可能な酵母（島バナナ酵母）を単離した。そこで、本研究では高木（研究代表者）のアミノ酸高生産酵母の育種技術を活用し、島バナナ酵母を用いて多様な風味を有する泡盛の開発を目的に、本事業に応募することとした。

・成果による事業への期待効果

本事業で取得した島バナナ酵母の変異株 (BNNL80株) は、新たな泡盛醸造用酵母として付加価値の高い特性を有することから、本菌株を用いた泡盛の開発を泡盛酒造所（比嘉酒造）と進めており、新たな泡盛として2023年に商品化される予定である。

また、アミノ酸高生産酵母の育種技術を活用することで、泡盛酵母だけでなく、種々の産業酵母（清酒酵母、ビール酵母、ワイン酵母、焼酎酵母、パン酵母、醤油酵母、バイオエタノール酵母など）の高機能開発（エタノール生産性・発酵力の向上、味・風味の差別化など）、酵母を利用した食品（酒粕、酵母エキスなど）の高付加価値化（味・風

味の強化, 健康機能性の向上など) に資することができる。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

高木（研究代表者）は、酵母に見出したアミノ酸の新しい代謝制御機構および生理機能について解析しており、多くの業績を挙げている（日本農芸化学会賞、生物工学功績賞など）。また、突然変異や代謝工学によりアミノ酸の高生産株を効率的に取得、作製する育種手法を「アミノ酸機能工学」と命名して、産業酵母（パン酵母、清酒酵母、泡盛酵母、ビール酵母）の高機能開発（発酵力の向上、味・風味の多様化、健康イメージの付与など）を行ってきた¹⁻⁴⁾。泡盛においては、塚原（中小企業研究責任者）との共同研究により、酵母の育種と泡盛の商品化に成功している⁵⁻⁷⁾。まず、ロイシン (Leu) の代謝中間体から合成され、吟醸香・バナナ香の主要成分である酢酸イソアミル (IAA) に着目し、泡盛酵母の Leu アナログ（トリフルオロロイシン；TFL）耐性変異株から、親株に比べて Leu および IAA の含量が増加した株を取得した。次に、本株には α -イソプロピルリンゴ酸シンターゼ Leu4 をコードする遺伝子 (*LEU4*) にアミノ酸置換を伴う変異があり、Leu によるフィードバック阻害感受性の低下が Leu 高生産の原因であることを明らかにした。これは泡盛酵母の育種に関する初めての成果であり、本株で醸造した泡盛は香味性が向上し、商品化された。また、沖縄に自生するハイビスカスの花から酵母を単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析によって詳細な系統解析を行うとともに、Leu および IAA の含量が増加した株を育種し、*LEU4* 遺伝子の新規変異および Leu 高生産機構の解明、泡盛の商品化に至った。

最近、塚原は泡盛のブランド化戦略として、ハイビスカスの他に沖縄らしいイメージを持つ島バナナの茎から泡盛の醸造に応用可能な酵母（島バナナ酵母；35a14 株）を単離した。35a14 株を用いた泡盛に含まれる IAA は従来の泡盛酵母 101 株の約 60% と低かった。そこで、本研究ではアミノ酸高生産酵母の育種技術を活用し、島バナナ酵母から Leu・IAA を高生産する株の育種に取り組み、多様な風味を有する泡盛の開発を行うことを目的とした。

・研究の詳細

1) Leu 蓄積を伴う島バナナ酵母変異株の分離

島バナナ酵母 35a14 株について、泡盛醸造に適した特性を付与するため、IAA の高生産株の取得を目指し、細胞内に Leu を蓄積する TFL 耐性変異株の分離を試みた。35a14 株を 6 分間の紫外線照射により変異を誘発した後、TFL (50 mg/L) を含む最少培地に播種したところ、約 100 個の

TFL 耐性コロニーが得られた。これらのコロニーから、Leu を高生産する株をスクリーニングし、最終的に BNNL80 株を選抜した。BNNL80 株は、親株 35a14 株と比較して、乾燥重量当たりの Leu 含量が約 3.3 倍に増加していた (図 1)。

2) BNNL80 株の *LEU4* 遺伝子配列の解析

BNNL80 株の *LEU4* 遺伝子配列を解析したところ、*LEU4* 遺伝子の 1,732 番目の塩基がグアニンからアデニンへのホモ接合変異を特定し、この変異は Leu4 タンパク質のアミノ酸置換 (Asp578Asn) を伴うことを確認した。清酒酵母では、Leu4 の Asp578 を Tyr に置換すると、Leu によるフィードバック阻害感受性が低下し、Leu が過剰生産されることで清酒中の IAA の含量が増加することが報告されている⁸⁾。したがって、BNNL80 株の Leu4 の Asp578Asn 置換も Leu によるフィードバック阻害に対して脱感作することが考えられた。

3) *LEU4* 変異が Leu 合成におよぼす影響

Leu4 の Asp578Asn 置換が Leu 合成に及ぼす影響を解析した。その結果、Leu4 変異体 (Asp578Asn) を発現する 35a14 株の細胞内 Leu 含量は、空ベクター導入株および親株 35a14 株と比較して乾燥細胞重量当たり 1.6 倍および 1.4 倍高かった (図 2)。

4) Leu4 変異体における Leu 結合部位の構造予測

フィードバック阻害を引き起こす Leu と結合した結核菌

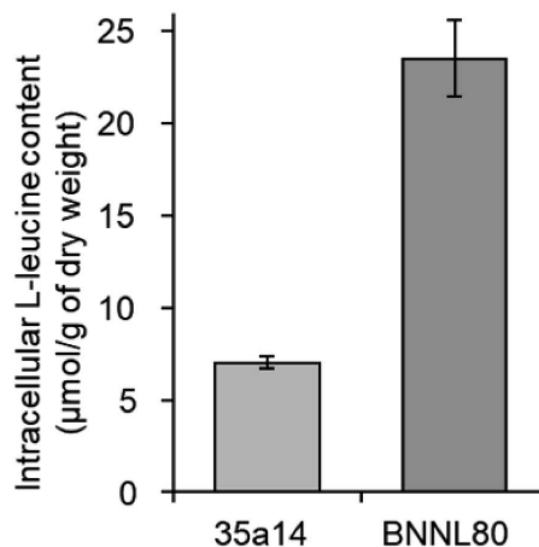


図1 島バナナ酵母 35a14 株と BNNL80 株の細胞内 Leu 含量
酵母細胞を 5 ml の最少培地で 30℃、2 日間培養した (OD₆₀₀ = 10.0)。数値は 3 回の独立した実験での平均と標準偏差で示す。

由来LeuAの構造 (PDB ID: 3FIG) では、2つのLeu結合部位が隣接する単量体の調節ドメインで構成されている⁹⁾。Leu4の活性を阻害するLeuは、Leu4のAsn515, Ile518, Thr549, Glu577, Val579に対応するAsn532*, Leu535*, Ala565, Pro625, Ile627によって認識される (アスタリスクは、隣接するモノマー残基を示す)。Leuと結合した結晶構造とLeuを含まない結晶構造 (PDB ID: 3HPZ) の比較では、Asn532*とAla565の空間位置がLeuを認識するように変化していることが示された。参照構造としてL-ロイシン (PDB ID: 3HPZ) を使用せずにLeu4から構築したLeu4のホモ二量体構造モデル (Swiss-model repository P06208) では、Asp578は2つの隣接するモノマーのモノマー-モノマー界面に位置し、Asp578の側鎖のヒドロキシル基は、Asp581とのモノマー内相互作用、およびLys489*およびArg495*とのモノマー間相互作用していると予想された (図3)。一方、Leuを結合したMtIPMS (3FIG) を鋳型として構築された

Leu4の構造モデルでは、Glu577, Lys489*, Arg495*の側鎖の向きを変えることで、Asn515*がLeuを認識するように移動することが示唆された (図3)。さらに、Asp578とArg495*の間の相互作用はLeu結合によって遮断され、Asp578がLeuを介したコンフォメーション変化に寄与することが示唆された。したがって、Asp578をアスパラギンに置換すると、この相互作用が消失することで、同じモノマーのGlu577と隣接するモノマーのAsn515の空間位置が変化し、Leuの結合が妨げられると考えられた。

5) BNNL80株の泡盛酵母としての有用性

BNNL80株を用いて小仕込み試験を行い、得られた泡盛に含まれる4ビニルグアヤコール (4-VG)、イソアミルアルコール、IAAの濃度を評価した (図4)。その結果、4-VG濃度は泡盛酵母101株と比較して約4倍で、親株の35a14株と同等の値であり、BNNL80株は4-VGを高生産することが確認された (図4A)。一方、イソアミルアルコール、IAAは、泡盛酵母101株と比較して、35a14株では低かったものの (約87%, 60%), BNNL80では親株35a14株の3-5倍に増加していた (図4B)。以上の結果から、BNNL80株を用いることで、泡盛酵母101株と比較して、古酒香成分バニリンの前駆体である4-VG濃度および吟醸香成分であるIAAの濃度がともに高い泡盛醸造が可能であることが示された。

・考察と展望

今回、島バナナの茎から分離された35a14株を親株として育種したBNNL80株は、①従来の商用酵母 (泡盛酵母101株) とは系統的に異なり沖縄独自の系統と考えられる株で、本菌株を用いることで、②泡盛古酒香のバニリンの前駆体である4-VGを高含有、かつ③吟醸香の一つであるIAAを多く含む泡盛の醸造が可能な酵母であることが示

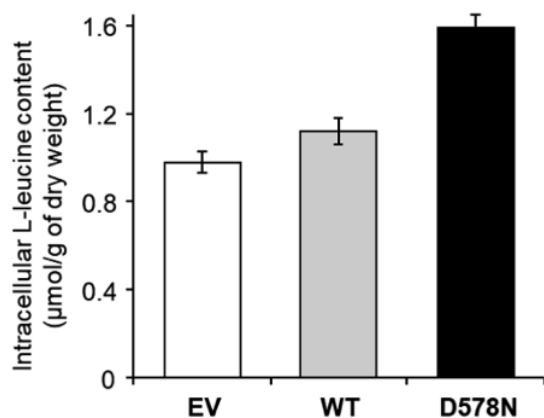


図2 BNNL80株のLEU4変異が細胞内Leu含量に及ぼす影響

pYC130 ベクターのみ (EV), pYC130_LEU4 (WT), および pYC130_LELJ4^{Asp578Asn} (D578N) を保持する酵母の細胞内Leu含量。数値は3回の独立した実験での平均と標準偏差で示す。

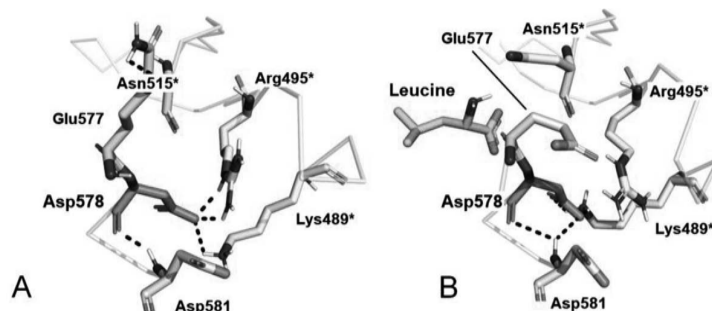


図3 Leu4変異体におけるLeu結合部位の構造予測

(A) Leuが結合していない状態、(B) Leuが結合した状態について、MtIPMSを使用して構築されたLeu4の構造モデルを示した。それぞれのLeu (水色)、Asp578 (マゼンタ)、Glu577 (灰色)、Asp581 (白)、Lys489* (黄)、Arg495* (黄)、Asn515* (黄) のスティックモデルとして表示した。黒い点線は、推定水素結合を示す。Glu577とAsp581の間の残基は白いリボンで示し、Lys489*とAsn515*の間の残基は黄色で示す。

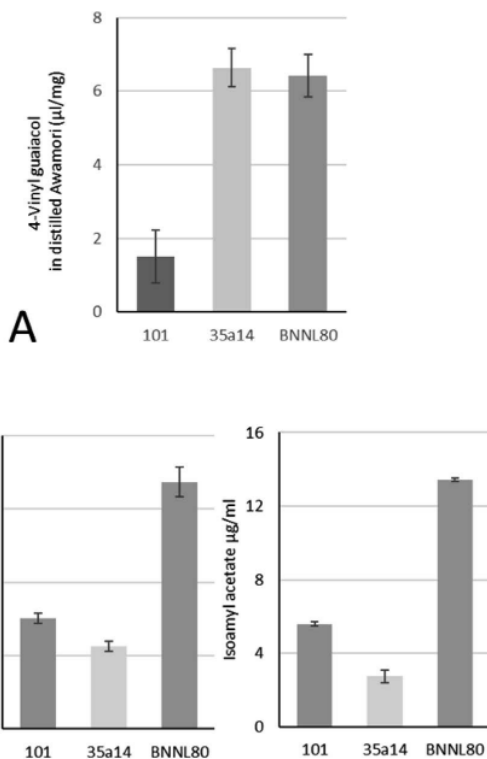


図4 BNNL80株を用いた小仕込み試験における泡盛の香り成分
(A) 4-VG濃度, (B) イソアミルアルコール, IAA濃度。
数値は3回の独立した実験の平均と標準偏差で示す。

された。さらに、BNNL80株のIAA高生産に寄与する機構を解明することもできた。BNNL80株は、新たな泡盛醸造用酵母として付加価値の高い特性を有することから、本菌株を用いた泡盛の開発を泡盛酒造所と進めており、新たな泡盛として2023年に商品化される予定である。

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なる助成をいただきました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。また、島バナナ酵母の分離とゲノム解析でご協力いただいた株式会社バイオジェットの東春奈さん、塚原恵子さん、変異株の取得と遺伝子・酵素レベルの解析でご協力いただいた奈良先端科学技術大学院大学の豊川洋一博士、磯貝章太博士に厚くお礼申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

成果報告

- 1) Masatoshi Tsukahara, Shota Isogai, Haruna Azuma, Keiko Tsukahara, Yoichi Toyokawa and Hiroshi Takagi: Characterization of a new *Saccharomyces cerevisiae* isolated

from banana stems and its mutant with L-leucine accumulation for awamori brewing. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **87**, 240–244, 2023.

- 2) 高木博史：「アミノ酸機能工学」による酵母の高機能開発と酒類産業への応用。日本農芸化学会2023年度大会シンポジウム「酵母の高機能開発が先導する醸造・発酵のイノベーションとグローカリゼーション」, 2023年3月14日, Web開催。
- 3) 塚原正俊：沖縄の自然から単離した野生酵母の解析と泡盛醸造への応用。日本農芸化学会2023年度大会シンポジウム「酵母の高機能開発が先導する醸造・発酵のイノベーションとグローカリゼーション」, 2023年3月14日, Web開催。

参考文献

- 1) Ariunzaya Tzolmonbaatar, Keisuke Hashida, Yukiko Sugimoto, Daisuke Watanabe, Shuhei Furukawa, Hiroshi Takagi: Isolation of baker's yeast mutants with proline accumulation that showed enhanced tolerance to baking-associated stresses. *Int. J. Food Microbiol.*, **238**, 233–240, 2016.
- 2) Naoyuki Murakami, Atsushi Kotaka, Shota Isogai, Keiko Ashida, Akira Nishimura, Kengo Matsumura, Yoji Hata, Hiroki Ishida, Hiroshi Takagi: Effects of a novel variant of the yeast γ -glutamyl kinase Prol on its enzymatic activity and sake brewing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 715–723, 2020.
- 3) Masataka Ohashi, Ryo Nasuno, Shota Isogai, Hiroshi Takagi: High-level production of ornithine by expression of the feedback inhibition-insensitive N-acetyl glutamate kinase in the sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, **62**, 1–9, 2020.
- 4) Hiroshi Takagi: Metabolic regulatory mechanisms and physiological roles of functional amino acids and their applications in yeast. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **83**, 1449–1462, 2019.
- 5) Hiroshi Takagi, Keisuke Hashida, Daisuke Watanabe, Ryo Nasuno, Masataka Ohashi, Tomoya Iha, Maiko Nezu, Masatoshi Tsukahara: Isolation and characterization of awamori yeast mutants with L-leucine accumulation that overproduce isoamyl alcohol. *J. Biosci. Bioeng.*, **119**, 140, 2015.
- 6) Takayuki Abe, Yoichi Toyokawa, Yukiko Sugimoto, Haruna Azuma, Keiko Tsukahara, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Masatoshi Tsukahara, Hiroshi Takagi: Characterization of a new *Saccharomyces cerevisiae* isolated from hibiscus flower and its mutant with L-leucine accumulation for awamori brewing. *Front. Genet.*, **10**, 490, 2019.
- 7) 阿部峻之, 豊川洋一, 塚原正俊, 高木博史：ハイビスカス花から単離した酵母の特性と泡盛醸造への応用。 *バイオサイエンスとインダストリー*, **78**, 18–20, 2020.
- 8) Takahiro Oba, Shuji Nomiya, Hideki Hirakawa, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara: Asp578 in LEU4p is one of the key residues for leucine feedback inhibition release in sake yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1270–1273, 2005.
- 9) Nayden Koon, Christopher J. Squire, Edward N. Baker: Crystal structure of LeuA from *Mycobacterium tuberculosis*, a key enzyme in leucine biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8295–8300, 2004.

「バラポリフェノールの抗肥満作用及び コレステロール代謝改善作用に関する研究」

研究代表者 岐阜大学 長岡 利

中小企業研究責任者 株式会社東洋発酵 岡田利孝

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）

ポリフェノールは植物体に含まれる様々な生体調節機能を示す食品成分であり、我々の健康維持・向上に寄与することが期待されている。ROSE CRYSTA®-70 はバラ花びらから抽出されたポリフェノールを濃縮した機能性素材（他社には類を見ない東洋発酵の独自の素材）であり、肌の老化防止や脂肪吸収抑制、食後の血糖値上昇抑制、抗酸化活性が若干報告されているが、脂質代謝改善作用の詳細は明らかにされていない。特に、バラ花びらに含まれるポリフェノールは多様な成分から構成されており、脂質代謝改善作用を発揮する有効成分は未だ不明である。そこで、本研究（岐阜大学応用生物科学部（長岡利）と株式会社東洋発酵との共同研究：2016年～現在）では、まずは、*in vitro* において、ヒト培養肝細胞HepG2を用いてROSE CRYSTA®-70 およびバラ花びらに特徴的に含まれるポリフェノールであるEugeninの脂質代謝に対する影響を検討中であり、その一部は特許申請（1）（類似特許なし）し、学会発表した（2）。

（1）特許出願：脂質代謝改善剤、脂質代謝改善剤の製造方法、組成物および成形体

特願2017-238375（出願日：2017年12月13日）、特許第7024965号

（2）長岡 利ら：日本農芸化学会2018年度大会講演要旨（名古屋）

・大学との連携研究の具体的内容

上述の主に *in vitro* の共同研究成果を考慮し、同時に、肥満は心血管疾患、高血圧、Ⅱ型糖尿病および慢性疾患や癌の増加に大きく影響を与えており、特に心血管疾患は毎年、世界の死因の第1位であることから、この現状を改善するため、我々はROSE CRYSTA®-70の抗肥満作用について、更に発展的に共同研究することとした。なお、バラには健康維持・向上に寄与する機能性の発揮が期待される多様なポリフェノールが含まれているが、バラポリフェノール

の研究は極めて少ない。ROSE CRYSTA®-70 はバラ花びらから抽出したポリフェノールを濃縮した機能性素材であり、（株）東洋発酵では、肥満に対する影響は未検討である。そこで、*in vivo* で食餌性肥満マウスを用いて、バラポリフェノール（ROSE CRYSTA®-70）の肥満などに対する影響評価及び作用機構解明を共同研究の目的とする。

・成果による事業への期待効果

共同研究を実施した結果、ROSE CRYSTA®-70 は、抗肥満作用を発揮することを明らかにした。また、その作用機構の一部も明らかにした。今後は、得られた研究成果を基盤にして、ROSE CRYSTA®-70 に含まれるポリフェノールの構成成分などを解明し、機能性表示食品などの事業展開を視野に入れた研究開発に生かしていく方針である。

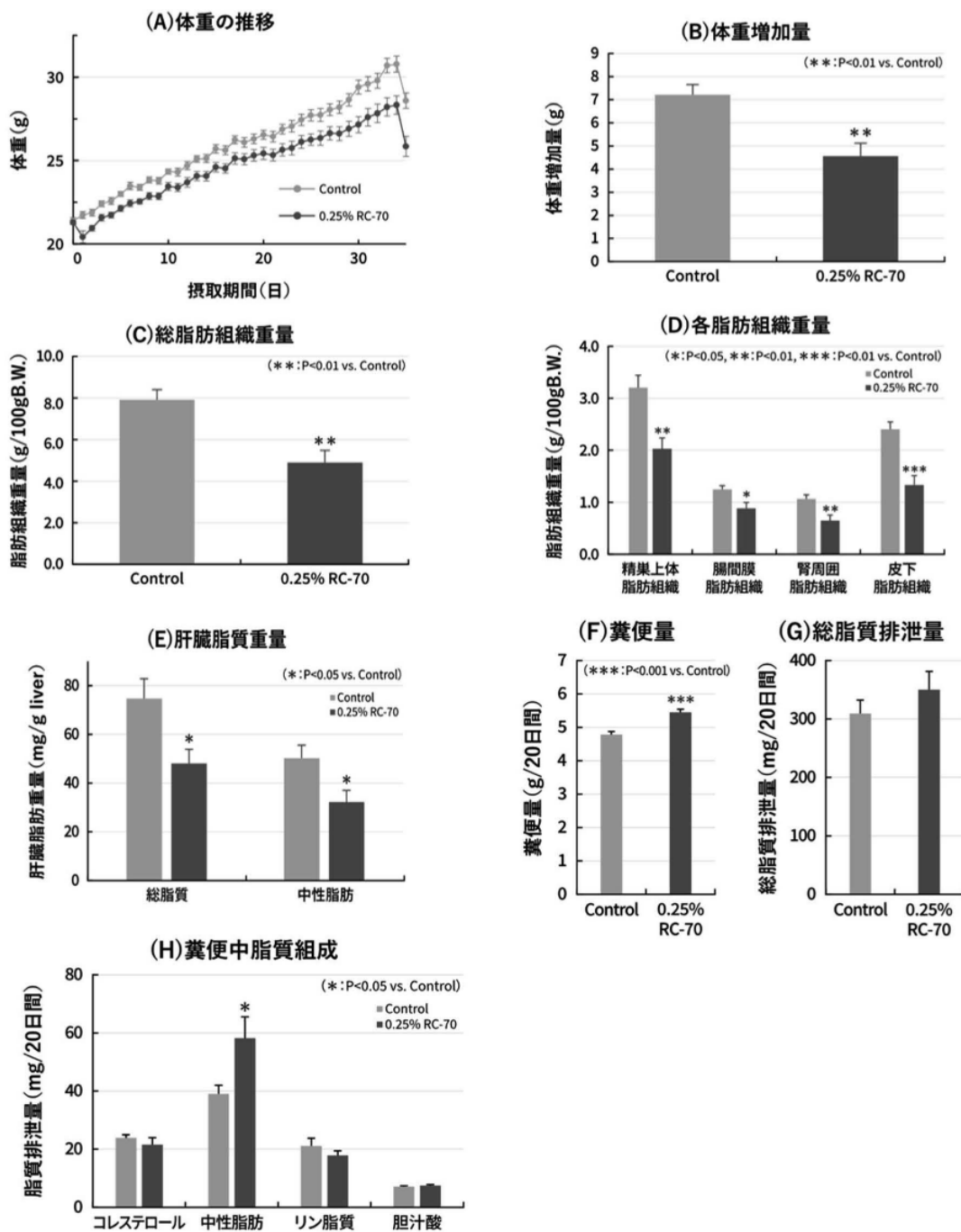
2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

岐阜大学（長岡利）と（株）東洋発酵との共同研究は2016年から継続中である。その間、まずはヒト培養肝細胞HepG2を用いてROSE CRYSTA®-70 およびバラ花びらに特徴的に含まれるポリフェノールであるEugeninの脂質代謝に対する影響を検討した結果、脂質代謝改善作用が *in vivo* でも期待できる成果を得て、上述1.の学会発表や特許出願・取得した。以上の研究成果を基盤に *in vivo* で食餌性肥満マウスを用いて、バラポリフェノール（ROSE CRYSTA®-70）の肥満などに対する影響評価・作用機構解明を実施した。

・研究の詳細

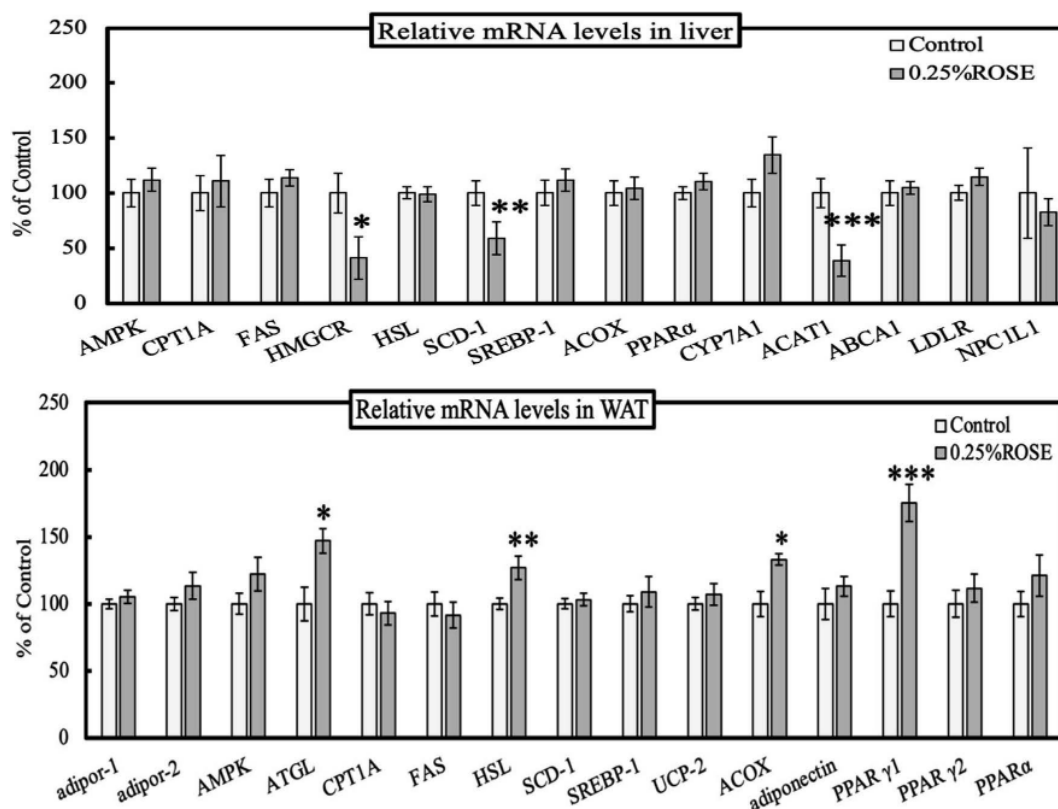
〔方法〕C57BL/6J系雄マウスに高脂肪食（Control群）、高脂肪食+0.25%ROSE CRYSTA®-70（0.25%ROSE CRYSTA群：図中ではRC-70）を35日間摂取させ、体重増加量、食餌摂取量、肝臓重量、血清トリグリセリド濃度、血清コレステロール濃度、脂肪組織（精巣上体、腎臓周囲、皮下、腸間膜）重量を測定した。肝臓及び糞中脂質はFolch法により抽出し、市販のキットで測定した。肝臓組織および脂肪組織の総RNAを回収し、脂質代謝関連遺伝子mRNA発



現量は Real-time PCR により測定した。

[結果] 下記の F1(A)～(H) に記載のように、0.25%ROSE CRYSTA 群は Control 群と比較して、体重、体重増加量、肝臓重量、脂肪組織重量（精巣上体、腎臓周囲、皮下、腸間膜）、血清コレステロール及び肝臓総脂質、肝臓中性脂肪（トリグリセリド）は有意に低下した。0.25%ROSE

CRYSTA 群は Control 群より糞中トリグリセリドは有意に上昇した。Liver（肝臓）の Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD-1), Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) 及び Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (ACAT1) の mRNA は、0.25%ROSE CRYSTA 群で Control 群より有意に低下した、Hormone-sensitive lipase (HSL) mRNA は 0.25%ROSE CRYSTA 群で Control 群より有意に上昇した。



WAT（脂肪組織）の Adipose triglyceride lipase（ATGL）、HSL、Peroxisome proliferator-activated receptor gamma（PPAR γ ）、Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase（ACOX）の mRNA は 0.25%ROSE CRYSTA 群で Control 群より有意に上昇した。mRNA は relative mRNA levels で表示した。

・考察と展望

以上の研究結果により、糞中トリグリセリドの上昇は ROSE CRYSTA[®]-70 が食餌脂肪吸収を抑制する効果があることを示している。ROSE CRYSTA[®]-70 は脂肪分解系 HSL 及び ATGL の mRNA 発現量を上昇させ、脂肪分解を促進する。ROSE CRYSTA[®]-70 は脂肪合成系 SCD-1 の mRNA 及びタンパク質発現量を低下させ、脂肪合成を抑制する。よって、ROSE CRYSTA[®]-70 は、食餌脂肪の吸収抑制、脂肪分解促進及び脂肪合成の抑制作用により、抗肥満作用を発揮することを明らかにした。今後は、得られ

た研究成果を基盤にして、ROSE CRYSTA[®]-70 に含まれるポリフェノールの構成成分などを解明し、抗肥満作用に寄与する有効成分を特定し、機能性表示食品などの研究開発に生かしていく方針である。

3. 謝辞

本研究を実施するにあたり、第3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. バラポリフェノールの抗肥満作用に関する研究
葉 宇陽¹、川口勇矢¹、岡田利孝²、長岡 利¹（¹岐阜大応生、²（株）東洋発酵）
日本ポリフェノール学会第14回学術大会発表、2021年9月10日

「天然色素を利用した高付加価値化粧品の開発研究」

研究代表者 北海道大学大学院 農学研究院 橋本 誠
中小企業研究責任者 株式会社マナビス 栗井浩二

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）

ナデシコ目特徴的に含まれる天然赤色色素であるベタニンは、同じ赤色色素であるアントシアニンと異なり、インドール骨格やアミノ酸骨格中のアミノ基を利用した部分構造をもち、この化学的反応性に由来するアントシアニンには見られない代謝や生理活性が期待されている。デキストリンなどの基材にまぶすことにより安定性が増し低濃度でもヒトの視覚による認識が容易であることから化粧品素材として注目してきたが、その生理活性はベタニン自身の反応性の高さ（化学的不安定性）に立脚しており、網羅的な化学的性質について検討されることはほとんど無く、その為適用可能な加工工程の予測も立てる事が難しいのが実情であった。ベタニン色素において最も含有率が高いとされるものですら量的確保が難しい状況にあり、ベタレイン色素群はその詳細な生理活性について検討することが難しかった。

・大学との連携研究の具体的内容

上記の問題を解決するために比較的全国の中でも栽培の進んでいる北海道で栽培し易く比較的植物体量を確保できる赤ビートを用い、新規の効率的ベタニン単離精製方法の確立による高濃度ベタニンの安定供給が可能な手法を開発中の北海道大学農学研究院 橋本先生に相談し、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

数種の試作品を作成し、その保存性、色素安定性について検討した結果、ワセリン系を利用したクリームとすることで、保存性、安定性が向上されることが明らかとなり、この結果を踏まえ、商品化事業に生かしていきたい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

有色ビートからの赤色色素ベタニンの単離精製方法を検討する中で、色素成分の退色が高濃度ベタニンの安定供給に向けて一番の問題となり、共存する水を含む求核性化合物の共存を可能な限り排除することが重要であるとのこれ

までの知見に基づき連携研究を進めた。

・研究の詳細ならびに考察と展望

各問題点に関し以下の検討を実施した。

問題点1) 色認識は可能だが、絶対含有量の少なさにより単離精製品での生理活性検討がされていない。

解決策：北海道の気候が赤ビート栽培に適していることを利用して、十分な原材料の確保と効率的な単離精製方法の確立による化粧品素材としての安定的な供給。

成果：2021年度は天候不順により塊根の極端な不作に見舞われ、予定量通り抽出が難しい困難に見舞われた。精製方法に関しては硫酸アンモニウム、ゲルろかを用いた除たんばく質操作により大量処理を可能とし、色素単離の簡便化に成功した。

問題点2) 高い反応性のため単離生成が容易ではなく、有機合成化学による調製も困難。

解決策：部分構造ならびに全体構造に関する化学的安定性に関する知見を蓄積することで、加工、配合時に適用可能な処理に対する反応性の予測や、高濃度生理活性測定時における安定性に対する考察を行う。

成果：当初予想したように、精製後の化合物の不安定性による退色よりも、精製途中の段階による共存物による退色進行が問題となることが経時観察により明らかとなり、

問題点3) 最も含有量の多いとされるベタニンですらこの状況なので 含有量の更に少ないベタキサンチン類の生理活性の詳細検討はほとんど行われていない。

解決策：微量ベタキサンチン類の大量調製法を確立し、生理活性検討の検討。

成果：黄色ビートを用い赤色色素の手法を利用した単離精製を検討した。赤色色素とはゲル濾過担体に対する吸着力に違いがあることが明らかとなり、その特性を利用した単離精製法の確率を検討した。

また、赤ビート色素抽出物が液体飲料として市販されていることから、それらの経口摂取における運動機能性への影響も検討することで、より多くの提供方法の可能性を検討した。

3. 謝辞

この研究を推進するにあたり、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

口頭発表

1. Yuya Goto, Takashi Kato, Makoto Hashimoto, Yasuko Sakihama, Bioactivity evaluation of betaxanthin purified from yellow beets. The 10th Academic Exchange and Co-

operative Research Symposium between ETHZ and Hokkaido University (AECOR-X), Sapporo, Hokkaido University, 2023.3.7

2. 後藤優弥, 加藤嵩士, 橋本誠, 崎浜靖子
イエロービーツ由来 betaxanthin の精製および動物細胞に対する生理活性に関する研究. 日本農芸化学会 2022年度北海道支部学術講演会, 札幌, 北海道大学, 2022.12
3. 中村駿太郎, 志村虎太郎, 橋本 誠, 崎浜靖子, 若林 斉
赤ビーツ摂取が寒冷環境下における末梢循環と手指作業能力に及ぼす影響. 第24回日本体力医学会北海道地方大会, 札幌, 北海道大学, 2022.4

「球磨焼酎粕で培養する光合成細菌の稲作での有効性に関する検証試験」

研究代表者 崇城大学生物生命学部 宮坂 均
中小企業研究責任者 株式会社Ciamo 古賀 碧

1. 背景：企業からの説明

・背景, 事業課題

弊社は崇城大学発学生ベンチャーで, 大学研究シーズを基に球磨焼酎粕(かす)で培養する光合成細菌を事業化している. この光合成細菌を稲作で普及させることを目的に, 弊社と崇城大学はこれまでに水田での実証試験を行い, 種もみを光合成細菌で処理する方法により1反(10a)あたり80kgから100kg程度の増収効果があることを確認している.

・大学との連携研究の具体的内容

上述のように現場での実証データは出つつあるが, 光合成細菌の稲作での有効性についての科学的エビデンスはほとんどない. そこで, 実験室での研究により科学的エビデンスを強化することを目的として本事業に応募することとした.

・成果による事業への期待効果

本研究により, 光合成細菌の稲作での効果について「2. 研究成果」で述べる科学的エビデンスが得られた. 今後はこのデータを顧客にわかりやすく説明する工夫をして, 光合成細菌販売の促進につなげたい. またエビデンスはイネに限ることではないので, 他の作物での光合成細菌の普及にも活用したい. また予想外の結果として, 光合成細菌が植物の病害や環境ストレス抵抗性を高める可能性が示されたので, 病害対策微生物資材としての製品開発も今後行いたい.

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景 光合成細菌(紅色非硫黄細菌)は通性嫌気性菌で, 病原性がなく安全な菌であり, 植物の成長促進効果があるため農業で利用されている. 植物成長促進効果のメカニズムも多く解明されてきており, 主なメカニズムとしては, 光合成細菌が生産する植物ホルモンのインドール酢酸(IAA)や葉緑素前駆体の5-アミノレブリン酸(ALA), 光合成細菌による窒素固定, リン酸の可溶化, 硫化水素の分解などが知られている¹⁾. また, 当研究室では光合成細菌の新たな成長促進物質として細胞壁成分のLipopolysaccharide(LPS)をコマツナ(*Brassica rapa* var. *perviridis*)を用いた研究で明らかにした²⁾. 本研究では光合成細菌の稲作における有効性に関する科学的エビデンスを確立するために, 画像解析による根の発達の定量的評価, および次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析(RNA-seq)を行った.

1) Sakarika et al, Microb Biotechnol 2020, **13**, 1336-13652

2) Hayashi, S. et al. Microorganisms 2022, **10**, 771

・研究の詳細

(1) 根の画像解析による光合成細菌バイオプライミングの有効性の実証

バイオプライミングとは, 種子を微生物や植物ホルモンで浸漬処理(priming)することにより発芽後の成長を促進したり, ストレス耐性を高めたりする技術である(図1).

図2に光合成細菌バイオプライミングの播種後の根の発達に及ぼす効果の画像解析による定量評価を示した.

光合成細菌株は熊本県八代市坂本町鶴喰(つるばみ)地

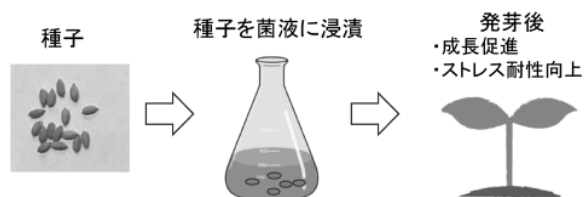


図1 バイオプライミング

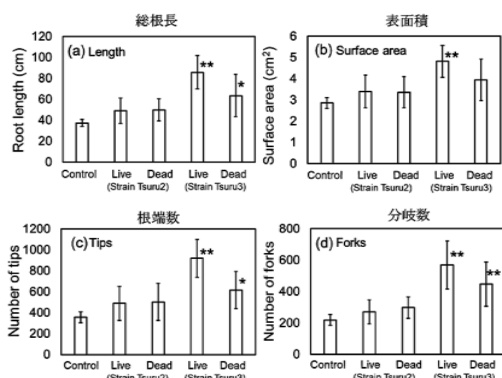


図2 光合成細菌バイオプライミングの効果

区の水田から分離した *Rhodopseudomonas* sp. Tsuru2 (以下 Tsuru2) および *Rhodobacter* sp. Tsuru3 (以下 Tsuru3) を用いた。 1×10^5 菌/mL の濃度の光合成細菌液 (生菌または死菌) にイネ種もみ (品種: くまさんのちから) を 24 時間浸漬してバイオプライミングを行い、 7×7 のセルトレイに播種して栽培した。 2 週間後に根の発達を画像分析システム WinRHIZO (Regent Instruments Inc) で評価した。 WinRHIZO は水に浮かべた根をスキャンして画像化し、総根長、根表面積、根端数、分岐数などを自動的に数値化して表すことができる。 Tsuru2 および Tsuru3 でバイオプライミングを行うことで、総根長、根表面積、根端数、分岐数が増大し、特に Tsuru3 で顕著かつ有意な効果が認められた。 また生菌だけでなく死菌でも効果がみられた。 死菌でも効果がみられたことから有効成分を LPS と予想し、LPS によるバイオプライミングも検討した。 LPS は光合成細菌標準株の *Rhodobacter sphaeroides* NBRC 12203^T 由来 LPS (InvivoGen) を用いた。 結果を図3に示した。 LPS 濃度 5 ng, 50 ng/mL の条件で根の伸長促進効果が見られ、有効成分の一つが LPS であることがバイオプライミングでも示された。

(2) 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS)

RNA-seq による遺伝子発現レベルでの効果の検証

光合成細菌の効果のエビデンスを遺伝子発現レベルで示すために、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行っ

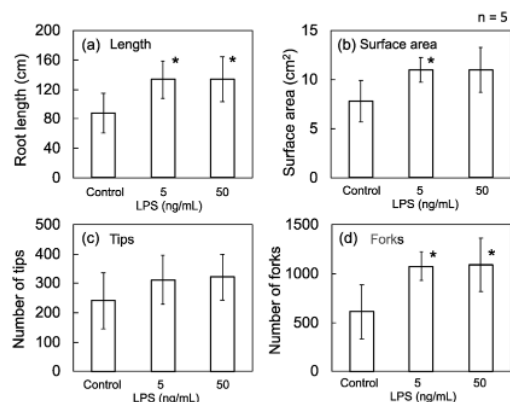


図3 *Rhodobacter sphaeroides* NBRC 12203^T 由来 LPS によるバイオプライミングの効果

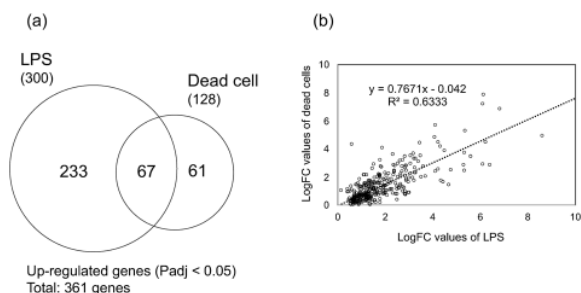


図4 *R. sphaeroides* NBRC 12203^T 由来 LPS と同菌の死菌により有意に発現上昇した遺伝子数と LPS と死菌の相関 (a) LPS と死菌の有意に発現上昇した遺伝子の重なりを示すベン図 (b) LPS と死菌の個々の遺伝子の発現変動 (log2Fold Change: logFC) の相関

た。 光合成細菌は標準株 *R. sphaeroides* NBRC 12203^T を用い、同株由来の LPS についても検討した。 処理濃度は光合成細菌死菌 1×10^1 菌/mL (菌乾燥重量約 50 pg/mL), LPS 10 pg/mL とし、寒天培地に添加した。 培地上でイネ種子を発芽させ、発芽後 3 日目に根から RNA を回収して RNA-seq 解析を行った。 図4a に LPS と死菌により有意に発現上昇した遺伝子の重なりをベン図で示した。 LPS (300), 死菌 (128), 共通遺伝子 (67), 合計 361 遺伝子が有意に発現上昇した。 全 361 遺伝子の発現変動 (log2Fold Change: logFC) の LPS と死菌での相関を図4b に示した。 logFC 値は LPS と死菌で高い相関 ($P < 0.001$) を示し、このことから LPS が光合成細菌の有効成分であることが遺伝子発現レベルでも証明された。

表1に LPS と死菌で共通して有意に ($\text{Padj} < 0.05$) 発現上昇した遺伝子のリストを示した。 機能不明の 20 遺伝子を除いた 47 遺伝子のうち 44 遺伝子がストレス応答に関連する遺伝子で、特に病害ストレス、環境ストレス応答に関わるジャスモン酸シグナル関連の 18 遺伝子で有意な上昇が見られた。

表1 LPS と死菌で共通して有意に (Padj<0.05) 発現上昇した遺伝子のリスト
(機能不明の 20 遺伝子を除いた 47 遺伝子を LPS の logFC 値が高い順にソート)

GeneID	LPS logFC	Dead cells logFC	Gene description	ストレス 関連	JA*
Os06 g0514100	6.17	7.82	Thionin, Antimicrobial peptide	X	
Os10 g0177300	5.38	5.28	Chalcone and stilbene synthases	X	
Os03 g0183500	4.54	3.88	FCS-like zinc finger protein	X	X
Os11 g0603000	4.34	4.17	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein	X	X
Os02 g0137700	4.25	2.53	NAD(P) binding domain containing protein	X	
Os01 g0946600	3.65	2.74	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	X	
Os10 g0392400	3.55	2.01	Tify domain containing protein	X	X
Os07 g0153000	3.51	3.48	Jasmonate ZIM-domain (JAZ) family	X	X
Os06 g0513781	3.41	3.09	Thionin, Antimicrobial peptide	X	
Os03 g0741100	3.29	2.67	Basic helix-loop-helix transcription factor, Drought tolerance	X	X
Os11 g0684000	3.25	1.76	Myb transcription factor	X	X
Os01 g0946700	3.17	1.93	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	X	
Os03 g0142600	3.10	3.52	Myb transcription factor	X	X
Os03 g0180900	3.09	2.22	Jasmonate ZIM-domain containing protein	X	X
Os10 g0118200	3.08	2.94	Acetylserotonin O-methyltransferase	X	
Os01 g0124700	3.04	1.93	Bowman-Birk type protease inhibitor	X	
Os03 g0181100	2.92	2.78	Tify domain containing protein	X	X
Os12 g0478400	2.90	2.46	EGF-type aspartate/asparagine hydroxylation site domain containing protein		
Os01 g0225500	2.85	3.47	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase	X	
Os01 g0124650	2.91	1.84	Bowman-Birk type protease inhibitor	X	
Os05 g0161500	2.73	2.75	Calcium-activated (p)ppGpp synthetase	X	
Os02 g0808000	2.57	1.98	Wall-associated receptor kinase 2	X	
Os05 g0586200	2.53	1.35	Gretchen hagen 3 (GH3)	X	
Os08 g0190100	2.38	2.12	Germin-like protein	X	
Os12 g0503000	2.08	2.08	Allantoin transporter	X	
Os09 g0439200	1.97	1.24	Jasmonate ZIM-domain protein	X	X
Os01 g0108600	1.76	1.51	Basic helix-loop-helix dimerisation region bHLH domain containing protein	X	X
Os02 g0181300	1.75	1.56	WRKY transcription factor	X	X
Os03 g0402800	1.71	0.89	TIFY family protein, JASMONATE-ZIM domain (JAZ) protein	X	X
Os03 g0198600	1.71	1.56	Homeodomain-leucine zipper transcription factor, Regulation of panicle exertion	X	X
Os12 g0138800	1.59	1.92	Six-bladed beta-propeller, TolB-like domain containing protein	X	X
Os12 g0548401	1.58	1.64	Proteinase inhibitor	X	
Os06 g0231600	1.53	1.13	RING-H2 finger protein ATL1Q	X	
Os07 g0475900	1.50	1.52	ACT domain containing protein kinase	X	
Os12 g0267200	1.46	1.32	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	X	
Os09 g0401300	1.45	0.57	JASMONATE ZIM-domain (JAZ)	X	X
Os07 g0138200	1.37	1.51	NAC transcription factor, ABA-induced leaf senescence and tillering	X	
Os01 g0314800	1.32	1.11	Late embryogenesis abundant protein 3	X	
Os11 g0644700	1.29	1.61	Plant disease resistance response protein	X	
Os06 g0112100	1.17	1.03	Nucleoside phosphorylase		
Os05 g0126800	1.15	1.02	Mss4-like domain containing protein	X	
Os01 g0370000	1.14	1.33	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	X	
Os05 g0542200	1.06	0.69	Alpha/beta hydrolase fold-1 domain containing protein	X	
Os09 g0248900	1.04	1.30	Myb/SANT-like domain containing protein	X	X
Os07 g0633400	0.90	1.51	IQ calmodulin-binding region domain containing protein	X	
Os12 g0626400	0.82	0.84	Phytoene synthase 1		
Os04 g0517100	0.74	0.61	SG2-type MYB transcription factor, Cold tolerance, Resistance to fungal and bacterial pathogens	X	X

* ジャスモン酸シグナルに関連する遺伝子

図5にLPSと死菌のジャスモン酸シグナル関連遺伝子 (NGSでマップされた全36遺伝子) の発現変動を示した。縦軸はlogFC値、横軸はその遺伝子の発現レベル (NGS

の baseMean 値) を示している。赤い丸は有意に発現変動した遺伝子を示している。LPS, 死菌ともにジャスモン酸シグナル関連遺伝子の発現が上昇していることがわかる。

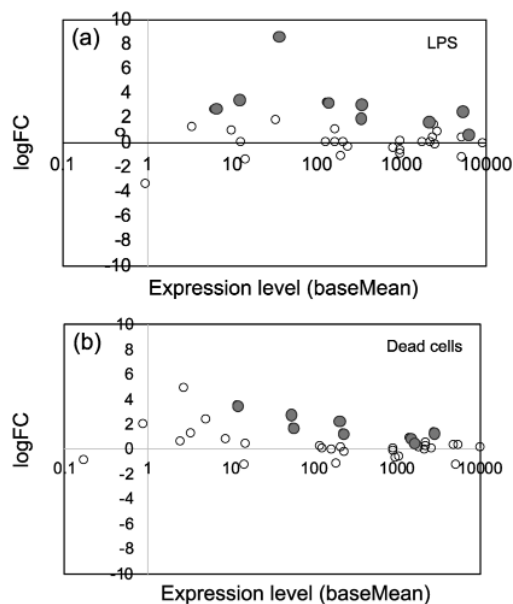


図5 *R. sphaeroides* NBRC 12203^T由来LPS (a)と同菌の死菌 (b)によるジャスモン酸シグナリング関連遺伝子の発現変動 ●は有意に変動した遺伝子を示す。

以上のことから植物に病原性がない光合成細菌が植物によって病原菌と認識されていることが示された。

光合成細菌によって根の伸長が促進される理由については、データは示さないが活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) 発生系・消去系の遺伝子の上昇が認められたことから、微弱なROS発生が起これ根の伸長が促進されたものと推測している。

・考察と展望

これまで一部の農家の間で行われていた光合成細菌バイオプライミングについて、画像解析による定量的なデータと、有効成分 (LPS) の特定により科学的エビデンスを確

立することができた。

RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った結果、光合成細菌死菌、LPSで多くの病害ストレス、環境ストレス関連遺伝子の発現上昇が認められ、植物に病原性がない光合成細菌が植物によって病原菌と認識されていることが示された。このことは光合成細菌が植物の自然免疫を活性化して病害抵抗性を高める可能性を示している。今後は光合成細菌により実際に植物がカビなどによる病害に強くなるかを検討していく予定である。

3. 謝辞

本研究を助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

(論文・学会発表)

1. R. Iwai, S. Uchida, S. Yamaguchi, F. Sonoda, K. Tsunoda, H. Nagata, D. Nagata, A. Koga, M. Goto, T. Maki, S. Hayashi, S. Yamamoto, H. Miyasaka, Effects of seed bio-priming by purple non-sulfur bacteria (PNSB) on the root development of rice. *Microorganisms*, **10**, 2197 (2022).
2. 永田大樹, 内田春汰, 岩井蘭子, 山口紗耶馨, 林 修平, 山本新二郎, 宮坂 均 光合成細菌lipopolysaccharide (LPS) のイネおよびシロイヌナズナの根の伸長促進効果について (2022年12月3日第28回日本生物工学会九州支部佐賀大会)
3. R. Iwai, S. Uchida, S. Yamaguchi, D. Nagata, A. Koga, S. Hayashi, S. Yamamoto, H. Miyasaka, Stimulation of jasmonate signaling pathway by lipopolysaccharide (LPS) from *Rhodobacter sphaeroides*, a purple non-sulfur bacterium (PNSB), in rice root. *Microorganisms*, **11**, 1676 (2023).

(特許申請)

出願番号: 特願2022-198402, 発明の名称: コーティング種子, 種子コーティング剤, 及び種子のコーティング方法, 発明者: 宮坂 均, 岩井蘭子, 山口紗耶馨, 園田文花, 角田佳奈, 永田寛人, 古賀 碧, 出願人: 学校法人君が淵学園, 株式会社Ciamo

蒟蒻芋多糖類の完全加水分解とその多様な用途開発

研究代表者 山口大学大学院創成科学研究科・教授 薬師寿治
中小企業研究責任者 株式会社原田食品・代表取締役 原田敏弘

研究の背景: マンノースとグルコースが β -1,4結合している蒟蒻芋の多糖類コンニャクマンナンは、ヒトには不消化なために、蒟蒻芋は古くから食材コンニャクに用途が限定されてきた。酸やアルカリを使わずに、温和な酵素反応によって蒟蒻芋多糖類を完全に加水分解する事例の報告は殆んど見られていない。研究代表者らは蒟蒻芋麴 (図1) を

作り、これを使って蒟蒻芋多糖類を完全に加水分解できることを見出した (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **84**(10), 2160-2173, 2020)。蒟蒻芋多糖類の加水分解に関する研究報告の殆んどは、蒟蒻芋から精製した蒟蒻粉 (精粉) を使用していて、外皮に近い部分が製麴時に含まれていないことが指摘できる。蒟蒻芋多糖類の完全加水分解に必要な酵



図1. 蒟蒻芋麴

素の誘導生成は外皮構造を分解できる酵素が十分に製麹されていることと密接な関係が推察される。本課題申請にあたり、外皮をも含んだ蒟蒻芋麴を使用すると蒟蒻マンナンは完全に加水分解され、マンノースとグルコースの混合液(M/G=1.5~1.6)が得られた。加水分解液を発酵原料にアルコールや焼酎の製造ができ、アルコール発酵液に酢酸菌を植えると食酢が製造できた。加水分解液に含まれるマンノースからマンノン酸やケトマンノン酸を製造できた。マンノースを還元したマニトールの用途に加え、酢酸菌で酸化すると果糖を生産できた。ヒトには不消化な蒟蒻芋を豊かな炭水化物資源として食料や発酵醸造産業の原料となることを明らかにした(上記論文)。本研究によって、蒟蒻芋がエネルギー源としてカロリーを計算できる食料資源となって、我が国の食料自給率向上に寄与できる。

年産約55千トンの蒟蒻芋を生産する群馬県以外では、各地で小規模な蒟蒻芋栽培が継続している。昭和30年代から平成の初めに相当する往時に比べて、蒟蒻芋農業のその後の衰退には以下の要因が指摘される。(1) 食事の欧米化によるコンニャク消費量の減少、(2) 蒟蒻芋栽培に適した中山間地の農業人口の減少と農業人口構成の変化(高齢化)、(3) 収穫まで3年を要する蒟蒻芋の慢性的な価格の低迷(100-150円/kg)などである。昨年来の輸入小麦の政府売り渡し価格の大幅な値上がりは、米、豪やアフリカでの大旱魃や露のウクライナ侵攻などが要因と言われる。食卓のパンをはじめとする食品・調味料などの生活物資の大幅な高騰は人々の生活を圧迫し始めた。外貨を使っても穀物を輸入できなくなる事態はこれまで想定されていなかったが、我が国の食糧自給率をいかに維持・向上させるかは今後の重要な国政課題となってきた。

このような状況下にあって蒟蒻芋から何ができるのか？蒟蒻芋の加水分解液に含まれるマンノースを果糖へ異性化して果糖・ブドウ糖・液糖が製造できれば、多くの技術

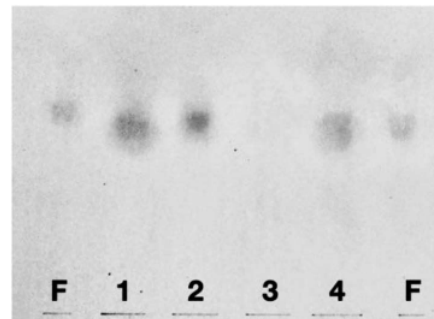


図2. 細胞膜結合型D-マンノース異性化酵素の証明
D-マンノースを基質として、細胞、細胞膜画分、細胞質画分、又は細胞膜画分からの可溶性酵素とを反応させて、それぞれの反応液をTLC解析した結果を示す図である。Fレーン標準果糖、1レーンは細胞とD-マンノースとの反応液、2レーンは細胞膜画分とD-マンノースとの反応液、3レーンは細胞質画分とD-マンノースとの反応液、4レーンは細胞膜画分からの可溶性酵素とD-マンノースとの反応液である。図に示すように、細胞、細胞膜画分と可溶性酵素は果糖を生成したが、細胞質は果糖を生成しなかった。即ち、D-マンノース異性化酵素は典型的な細胞膜結合型であると確認された。従来知られている細菌由来の糖類の異性化酵素は例外なく細胞質に存在するのと対照的である。

的欠陥を擁しているトウモロコシからの異性化糖製造を凌ぐ新規な技術開発につながると考えた。幸いなことに、本研究への共同研究者として、株式会社原田食品が名乗ってくださり、以下に述べる研究の展開となった。株式会社原田食品は2024年に創業100年を迎える山口県内屈指のコンニャク製造業を営まれ、大学の研究室はコンニャクに関する知識の大いなる注入と刺激を享受することになった。

研究結果：マンノースを果糖への異性化反応を触媒するマンノース異性化酵素が酢酸菌に細胞膜結合型で見つかった(図2)。糖質異性化酵素が細胞膜結合型で見つかった例はこれまでになく、本研究が最初の知見となった。細胞膜結合型マンノース異性化酵素(MMI)の特性を調べた結果、MMIは酸性pH域(pH 5-6)でよく反応し、広い

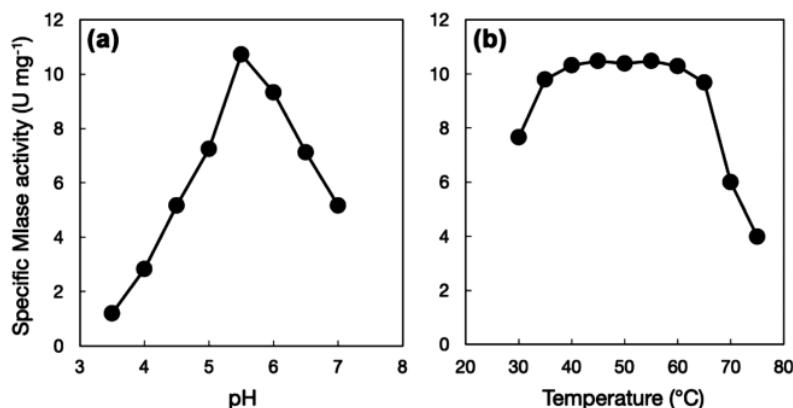


図3. MMI の最適反応 pH (a), 及び反応温度 (b)

温度域でよく反応し、50°C で1ヶ月以上も酵素活性は安定に保持された (図3)。対照的に、これまで報告されている糖質異性化酵素はすべて細胞質に存在し、アルカリ域に最適反応 pH を示し、熱安定性や酵素活性の半減期が産業化において重要な要素となっていた。MMI はマンノースから果糖への異性化率は80%を超えた。トウモロコシ澱粉からの現行の異性化糖製造では、果糖濃度が約42%に達すると反応は停止するのとは対照的であった。MMI の酵素化学的、理化学的諸性質も明らかにした。MMI の酵素分子質量は196 kDa で、48 kDa サブユニット4個から構成されていた。N 末端アミノ酸配列の解析結果から MMI が真のマンノース異性化酵素であることも明らかになった。MMI はマンノースを唯一の基質として反応した。MMI を含む酢酸菌細胞またはその膜画分をアルギン酸カルシウムゲルとして固定触媒化したものでは、一層効率よくマンノースから果糖が製造できた。固定化触媒は酵素活性を失うことなく乾燥させることができ、水に浸漬することで活性な固定化触媒として機能を取り戻した。蒟蒻芋加水分解物と少量の固定化 MMI 触媒とを 50°C で3日間反応させた結果、反応2日目ではほぼ異性化反応は平衡に達し、仕込み時のマンノースは80%を超える変換率で果糖へ変換された。図4に要約するように、蒟蒻芋から果糖・ブドウ糖・液糖が製造できた。蒟蒻芋から得られた液糖は、官能評価の結果、トウモロコシからの液糖と異なり、クロロゲン酸に由来する爽やかな苦味が特徴であった。データの詳細については、公表成果 (3) を参照。

蒟蒻芋の中心部から精粉 (蒟蒻粉) が作られ、多くはコンニャク製造に仕向けられている。その外皮として廃棄される部分にはかなりの蒟蒻マンナンが含まれていて、それを蒟蒻芋麴で分解したのち、MMI を使って果糖・ブドウ糖・液糖を作った。生芋からコンニャクを作る場合、蒟蒻芋をスライスしたのち外皮部分を分厚く除去するので、蒟

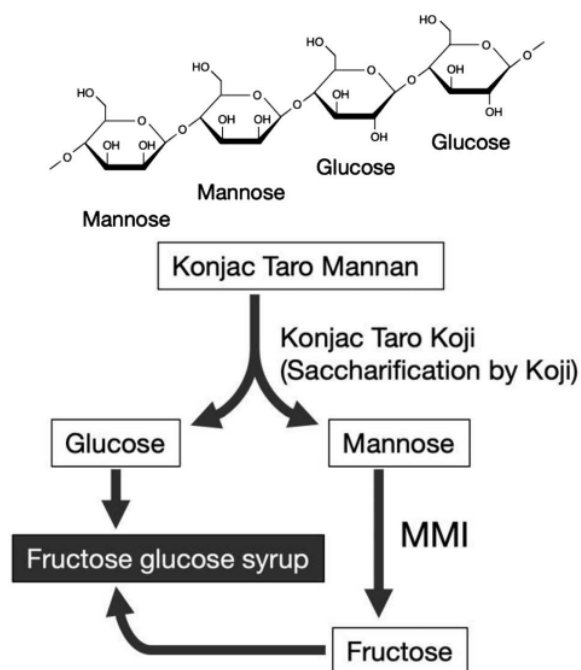


図4. 蒟蒻芋から果糖・ブドウ糖・液糖の製造

蒻芋の約10-15%に相当する部分が外皮として廃棄されている。精粉からコンニャクを、外皮から液糖を作れば、産業廃棄物として捨てられていた外皮の有効利用に繋がると考えた。今叫ばれているSDGsにも合致するものといえる。生芋が小さければ外皮の占める割合は高く、逆に大きな芋では外皮として捨てられる部分の割合は小さくなる。これらの結果から、コンニャク製造工場でコンニャク製造と液糖製造を並行して実施できる。トウモロコシ澱粉からの異性化糖製造では、技術的欠陥を補うために設備が巨大化しているのとは対照的に、本稿でのべる蒟蒻芋からの液糖製造には巨額な設備投資も必要ないと見積もられる。

本研究から得られた産物：

- (1) MMI活性を持つ固定化酢酸菌触媒
- (2) 蒟蒻芋からの果糖・ブドウ糖・液糖の製造法の確立

謝辞：

本研究を助成くださいました「公益社団法人日本農芸化学会」に感謝申し上げます。

公表した成果：

- (1) 特許公報 特許第7178096号 (2022. 11. 25)
特許の名称：コンニャク芋麴の製造方法、および、コンニャ

ク芋麴の利用方法

発明者：足立収生，薬師寿治，片岡尚也，松下一信

- (2) 特許出願 2021-001146 (2021. 1. 6出願)：PCT出願PCT/JF2021/048791 (2021.12.28出願)

特許の名称：D-マンノース異性化酵素及びD-フルクトースの製造方法

発明者：足立収生，薬師寿治，片岡尚也，松下一信

- (3) 論文の発表

論文題名：Membrane-bound D-mannose isomerase of acetic acid bacteria: finding, characterization, and application. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **86**(7), 938-948 (2022).

著者：O. Adachi, N. Kataoka, K. Matsushita, Y. Akakabe, T. Harada, T. Yakushi

「熊野市特産柑橘『新姫』の肥満症予防効果の検証とその応用」

研究代表者 十文字学園女子大学 渡辺章夫
中小企業研究責任者 熊野市ふるさと振興公社 今西孝典

1. 背景：企業からの説明

・背景，事業課題

新姫は、タチバナと在来柑橘が交配した比較的新しい柑橘であり、三重県熊野市で限定的に栽培されている特産柑橘である。熊野市ふるさと振興公社では新姫の強い酸味と独特の爽やかな香りを活かしたジュースやボン酢など様々な商品をこれまでに開発してきた。新姫には肥満症予防・改善する効果が期待されることから、新しい可能性を見出すため、本事業を十文字学園女子大学と共同で実施することとなった。

・大学との連携研究の具体的内容

抗肥満効果については、他の研究チームにより新姫果皮粉末を投与したラットにおいて中性脂肪蓄積抑制作用が報告されているが、具体的な作用成分や肥満症モデル動物（抗肥満，抗糖尿病）における作用メカニズムなど明らかにされていない。そこで、申請者らは新姫の未利用資源を有効活用するSDGsに貢献する素材として果皮搾汁残渣に着目し、搾汁後に果皮を乾燥させた果皮搾汁乾燥残渣を十文字学園女子大学に提供することで肥満症モデル動物（抗肥満，抗糖尿病）における影響を検討した。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

新姫には抗肥満効果のあるノビレチンを豊富に含むという特徴があり、既にシークワーサー由来のノビレチンにお

いて「中性脂肪を低減させる効果（抗肥満効果）を有する」機能性関与成分として届出されている。新姫もまたノビレチンを豊富に含むことから、シークワーサーと同様の抗肥満効果が期待されている。そこで、新姫の肥満症に対する機能性を顕在化することを目的とした。まず、①ノビレチンを中心としたポリメトキシフラボノイドを高純度で精製する技術を確認し、②ポリメトキシフラボノイド高含有粉末エキスを肥満症モデル動物および③Ⅱ型糖尿病モデル動物における糖脂質代謝への効果の検証と④3T3-L1脂肪細胞を用いた作用メカニズムを解析した。

・研究の詳細

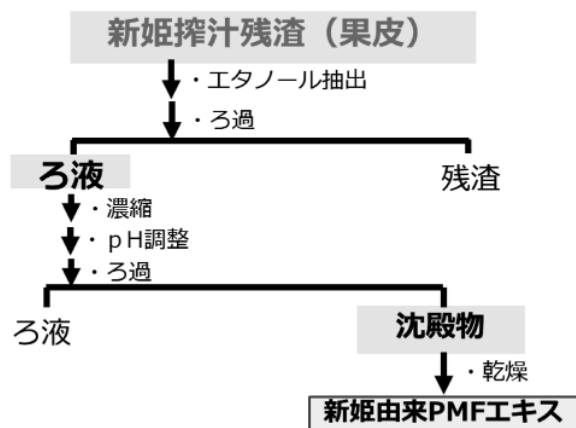
- ①ノビレチンを中心としたポリメトキシフラボノイドを高純度製法

新姫果皮搾汁残渣からエタノール抽出およびアルカリ・酸沈殿法により、PMFを25.8%まで高純度にした新姫由来PMFエキスを製造した。

- ②PMFエキスの肥満症モデル動物における糖・脂質代謝への効果の検証

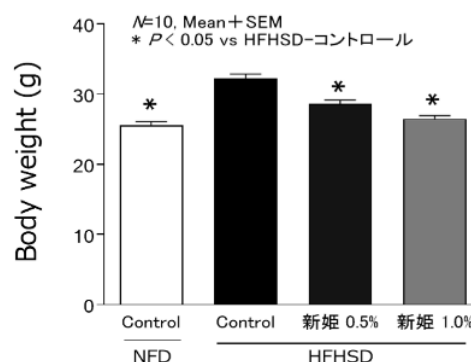
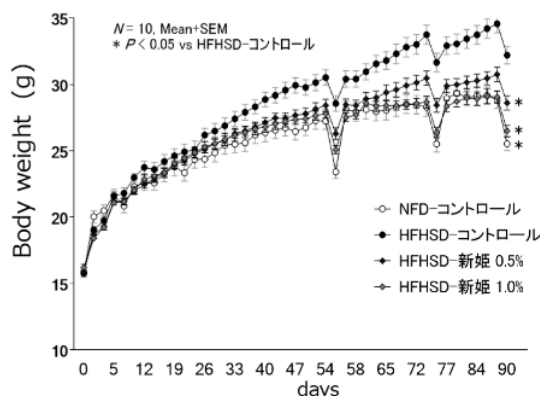
高脂肪・高ショ糖食誘発性肥満モデル動物に新姫由来PMFエキスの長期投与実験を行ったところ、高脂肪・高ショ糖食＋新姫由来PMFエキス投与群では高脂肪・高ショ糖食のみ投与群と比較して、有意に体重増加と白色脂肪細胞の増加を抑制した。また新姫果皮抽出エキス投与群では血中コレステロールと遊離脂肪酸を減少させた。これ

新姫果皮から高濃度PMFの抽出



新姫由来PMFエキス中のPMF含有量

イソシネンセチン	1.0 g/100g
シネンセチン	7.4 g/100g
5,7,8,4'-TMF	1.8 g/100g
ノビレチン	6.1 g/100g
5,6,7,4'-TMF	6.3 g/100g
タンゲレチン	3.1 g/100g
合計	25.8 g/100g



	NFD	HFHSD		
	Control	Control	新姫エキス 0.5%	新姫エキス 1.0%
Initial body weight (g)	15.8±0.3	15.8±0.3	15.9±0.2	16.2±0.3
Final body weight (g)	25.5±0.5*	32.2±2.1	28.6±1.7* ↓	26.5±1.4* ↓
Daily diet intake (g)	6.2±0.2*	3.7±0.1	3.5±0.1	3.6±0.1
Daily water intake (g)	8.1±0.2*	4.8±0.2	4.0±0.1*	5.0±0.4

らのことから新姫には抗肥満効果があることが示唆された。

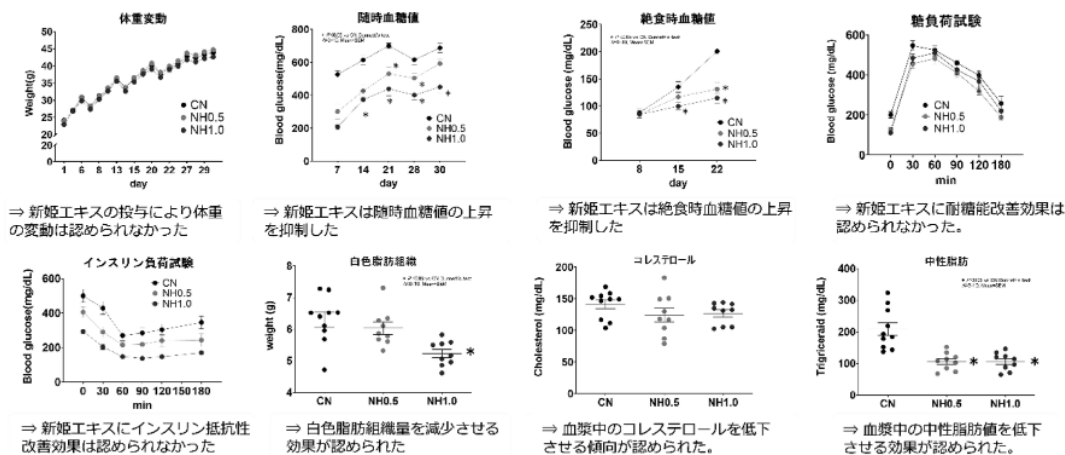
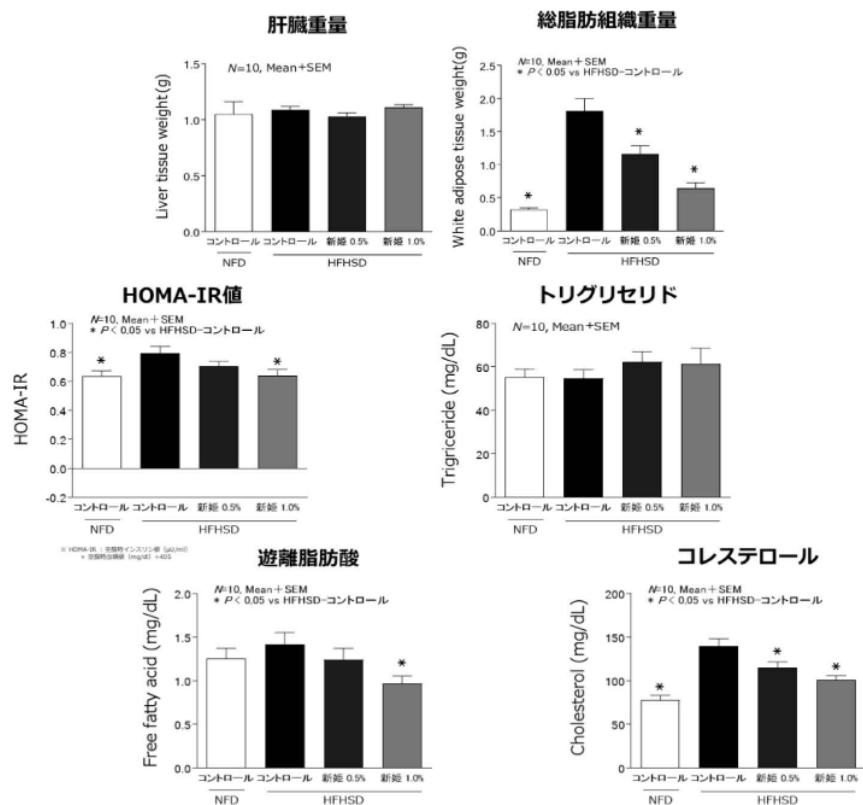
③PMF エキスのⅡ型糖尿病モデル動物における糖・脂質代謝への効果の検証

次に糖尿病に与える影響を検討するためにⅡ型糖尿病モデルであるKK-Ay マウスを用いて新姫果皮抽出エキスのⅡ型糖尿病への影響を検討することを目的として実験を行ったところ、随時および絶食時における血糖値の上昇を抑制する効果が認められた。しかし、糖負荷試験による耐

糖能改善効果やインスリン抵抗性改善効果は認められなかった。血漿脂質成分等を測定したところ、中性脂肪を有意に抑制していた。体重に影響は見られなかったが白色脂肪細胞の増加を有意に抑制する効果が認められた。

④PMF エキスの3T3-L1脂肪細胞を用いた作用メカニズムを解析

新姫果皮抽出エキスの抗肥満効果の作用メカニズムを明らかにするために新姫果皮抽出エキスを3T3-L1成熟脂肪細胞に添加したところ、新姫果皮抽出エキスが濃度依存的

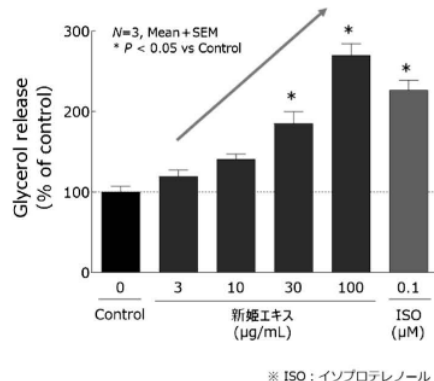
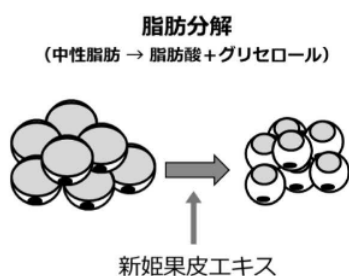
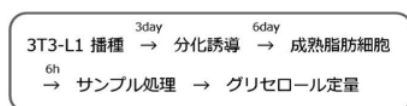


に脂肪分解を促進するという結果が得られた。脂肪分解作用における詳細な作用メカニズムについては解析中である。

・考察と展望

『新姫』果皮抽出エキ스에耐糖能改善効果やインスリン抵抗性改善効果は認められなかったが、脂肪蓄積を抑制する抗肥満効果は認められた。新姫には抗肥満効果があることが示唆され、シークワサーと同様に脂質代謝の改善

に有効な新しい機能性食品素材として展開できると考えられた。本研究助成による研究により、新姫搾汁残渣に新しい付加価値が見出されたことから、新姫果皮抽出エキ스를新しい健康食品素材として展開できれば、栽培農家からの買取価格にも転嫁することが可能となり、熊野市の農産業を支援することに繋がると考えられる。また新姫搾汁残渣は未利用資源でSDGsにも貢献できる素材でもあり、持続可能な社会の実現に繋がる。今後は、ヒト臨床試験を行



うための大規模な外部研究資金の獲得を目指したいと考えている。

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

(招待講演)

1. 新姫由来ポリメトキシフラボノイドの成分特性と健康機能, 渡辺章夫, 第5回ノビレチン研究会, 2021/12/10

(学会発表)

1. 熊野市特産柑橘『新姫』果皮抽出エキスのⅡ型糖尿病モデルマウスに対する影響, 渡辺章夫ら, 渡邊晴奈, 石川富夕音, 山野亜紀, 夏目矩行, 照屋俊明, 米澤貴之, 禹 濟泰, 第6回ノビレチン研究会, 2022/11/26
2. 新姫由来ポリメトキシフラボノイドの体内吸収評価, 衛藤未侑, 小山彩華, 要害 心, 米澤貴之, 禹 濟泰, 渡辺章夫, 第6回ノビレチン研究会, 2022/11/26

5. 第48回研究奨励金報告書

第48回研究奨励金報告書

医薬品の創製を志向したチオ糖の効率的な新規合成法の開発

東北医科薬科大学薬学部 名取良浩

[背景・目的]

糖の環内部の酸素を硫黄でおきかえた糖をチオ糖という(図1)。チオ糖は、糖の疑似体であり、糖の代謝に関わる酵素やトランスポーターをコントロールし得る化合物である。そのためチオ糖は、薬の候補化合物と考えられ、これまでに精力的な研究が行われてきた。

その結果、フロリジン(リンゴの根の皮から発見)から開発されたチオ糖であるルセオグリフロジンが薬となった(図2)。天然の有機化合物をもとにチオ糖の薬が開発されたため、その研究は農芸化学における重要な課題である。本研究では、高活性な新規チオ糖の誘導体を開発し、活性を評価することで創薬科学研究を行うことを目的とした。

[応募者のこれまでの知見]

応募者は、これまでにキラルプール法によるチオフラノースの合成を報告した(スキーム1)。L-アラビノース(1)から6工程でモノチオアセタール2を合成した。化合物2をメシル化した後、水素化ホウ素ナトリウムと水を加えるとチオフラノース3が収率86%(ワンポット)で得られた。この反応はメシラート4から、「3員環と5員環が縮環したスルホニウムイオン5(鍵中間体)」ができた後、メトキシ基のローンペアによる3員環の開環を経て進行する。

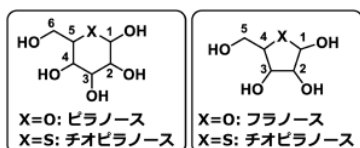


図1. 糖とチオ糖の化学構造

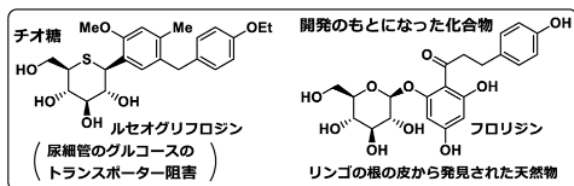


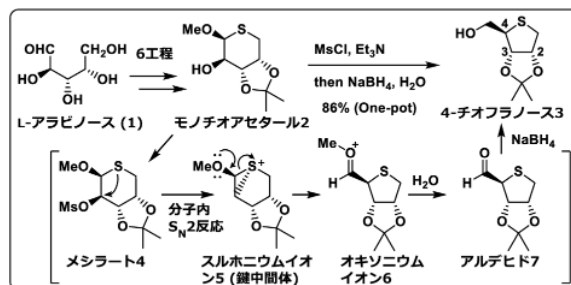
図2. ルセオグリフロジン(薬)とフロリジン(天然物)の構造

今回、応募者は、「3員環と5員環が縮環したスルホニウムイオン」から着想を得て、分子間での3員環の開環を鍵工程としてチオフラノース誘導体を合成することとした。

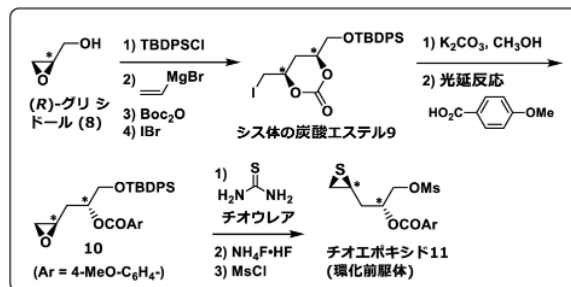
[研究結果]

(R)-グリシドール(8)を原料として4工程でシス体の環状炭酸エステル9を得た(スキーム2)。炭酸エステル部の加溶媒分解、光延反応により4-メトキシ安息香酸エステル10を合成した。チオウレアにより、エポキシドを立体反転させつつチオエポキシ化した。TBDPS基で保護したヒドロキシ基をメシラートに変換して環化前駆体であるチオエポキシド11を得た。

チオエポキシド11を用いて、チオフラン環の構築を行った(表1)。60℃のDMF中、酢酸イオンが発生する条件下で反応を行った(Runs 1-3)。その結果、フッ化セシウムと酢酸の組み合わせを用いた際に、収率が向上することが判

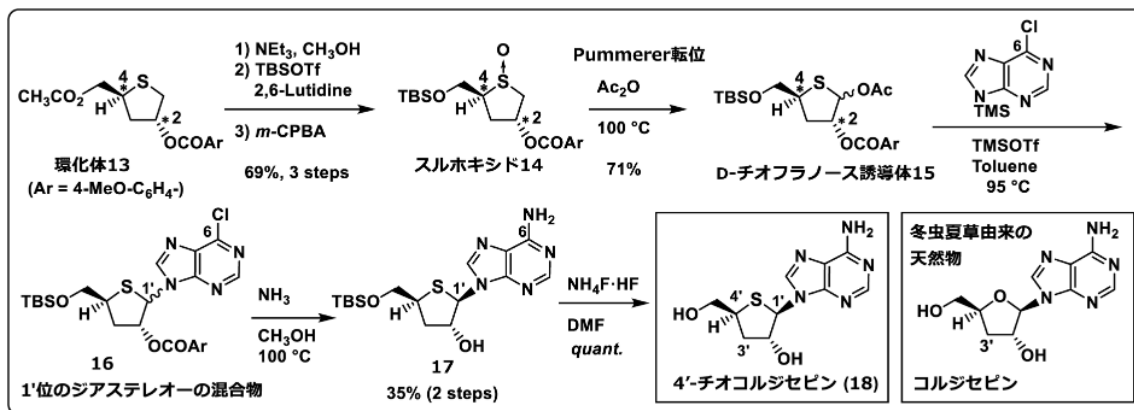
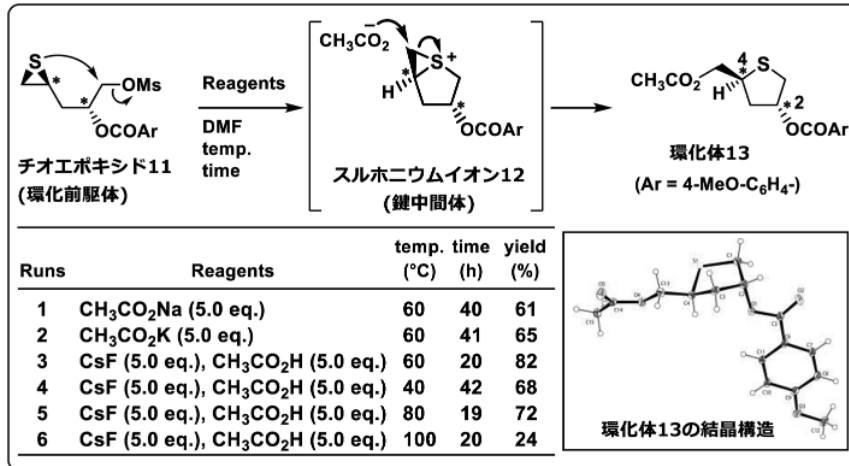


スキーム1. 申請者がこれまでに開発したチオ糖の合成法



スキーム2. 環化前駆体11の合成

表1. チオエポキシド 11 の環化反応の条件検討



スキーム 3. 環化体13から4'-チオコルジセピン (18) の合成

明した。さらに、反応温度を検討した結果、60℃が最適であることがわかった (Runs 3-6)。

環化体**13**に対して4位のヒドロキシメチル基の保護基をTBS基に変更した後、酸化してスルホキシド**14**を合成した(スキーム3)。無水酢酸とのPummerer転位によって1位にアセトキシ基をもつチオフラノース誘導体**15**を合成できた。1位を6-クロロプリンで置換して化合物**16**をジアステレオマー混合物として得た。さらに塩素からアミノ基への置換・保護基の除去を経て4'-チオコルジセピン**18**(コルジセピン糖部の酸素を硫黄に置き換えたもの)の合成を達成した。なお、コルジセピン(3'-デオキシアデノシン)は、冬虫夏草由来の天然物であり、抗がん・抗ウイルス活性をもつことが知られている。

[まとめ]

本研究では、応募者の過去の知見をもとに新しいチオ糖誘導体の合成を検討し、以下の知見を得た。

- ・チオ糖合成の鍵工程として、チオエポキシド **11** からチオフラン環と4位の置換基を一挙に構築できる画期的な手法を開発した。
- ・チオフラン環をもつ化合物 **13** から、4'-チオコルジセピン **18** の合成を達成した。

今後は、4'-チオコルジセピン **18** の活性評価, およびアデニン以外の核酸塩基を導入する予定である.

[謝辭]

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝いたします。

6. 第49回研究奨励金報告書

第49回研究奨励金報告書

植物病原菌二次代謝産物フシコクシンは植物成長を促進する

信州大学学術研究院（農学系）
大神田 淳子

背景・目的

ジテルペン配糖体フシコクシン-A (FC-A, Fig. 1) は、植物病原真菌が生産する2次代謝産物であり、気孔開口と蒸散を過剰に促進し植物を枯死に至らしめる植物毒として知られている。その植物毒性の作用機序は、孔辺細胞の原形質膜に存在する plasma membrane H^+ -ATPase (PM H^+ -ATPase) が 14-3-3 たんぱく質と相互作用して活性化する際、このたんぱく質複合体の疎水性間隙に結合して相互作用を安定化し、結果、PM H^+ -ATPase の酵素活性が亢進して気孔が過剰に開口し、蒸散過多を誘導するものと理解されている。

2014年に名古屋大学の木下俊則教授らは、シロイヌナズナの孔辺細胞特異的に PM H^+ -ATPase を過剰発現させると、二酸化炭素吸収量と光合成活性が促進され植物成長が亢進することを明らかにした [1]。これらのことは、十分な光と水の供給下では気孔開度が植物成長の光合成と成長における制限要因であり、人為的な気孔開口の制御が作物収量を向上させる有効な戦略となり得ることを示している。従って、PM H^+ -ATPase を活性化させ時空間特異的な気孔開口の調節を可能とする低分子量有機化合物は、化学的なアプローチによる植物成長促進剤としての農業利用が期待できると考えた。本研究では、「気孔開口促進活性を持つ FC-A を、水や光を十分に供給する適切な条件下で植物に処理したとき、毒ではなくむしろ気孔開口により光合成活性を向上させ成長促進活性を示すのではないか」との作業仮説を立て（図1）、各種 FC 類縁体を用いた構造活性相関を指標に検証を進めた。

結果・考察・展望

FC の植物成長促進効果は PM H^+ -ATPase C 末端と 14-3-3 の相互作用の安定化能に依存すると予想される。結晶構造解析から、FC の 12 位水酸基と 16 位メトキシ基が安定な 3 者会合体形成に重要であることが判っている。このことから、天然型 FC-A と類似の化学構造を持つ生合成中間体 FC-J は FC-A と同等の活性を示し、一方 12 位と 16 位の構造特性が異なる FC-H では活性が低下すると予想された。

FC 類の気孔開口促進効果について検討した結果、FC-A と FC-J では顕著な気孔開口促進効果が観察された一方、FC-H ではその効果が弱いことが判った（図2）。また、*A. thaliana* PM H^+ -ATPase 抗体を用いた共免疫沈降実験および AHA2 の C 末端ペプチドと 14-3-3f を用いた蛍光偏光滴定実験により、FC 類は PM H^+ -ATPase の C 末端と 14-3-3 と 3 者会合体を形成して PPI を亢進することが明らかになった。さらに気孔コンダクタンスおよび光合成活性を測定した結果、化合物処理により二酸化炭素吸収量と光合成活性が共に亢進されることが確認された。

これらの結果を踏まえ、化合物の植物成長促進活性の検証を行った。十分な水と光の供給下において *A. thaliana* に FC-A を 15 日間葉面散布して栽培したところ、明らかな成長促進効果が見られた（図3）。この効果は化合物投与量と相関して増加し、最大 1.3 倍の重量増加が観察された。同様の条件下で FC 類の成長促進効果を比較検証した結果、FC-J においては FC-A と同等の重量増加が確認された一方で、FC-H はほぼ不活性であったことから、植物成長が FC による PPI 安定化と気孔開口の亢進に相関することが示された。

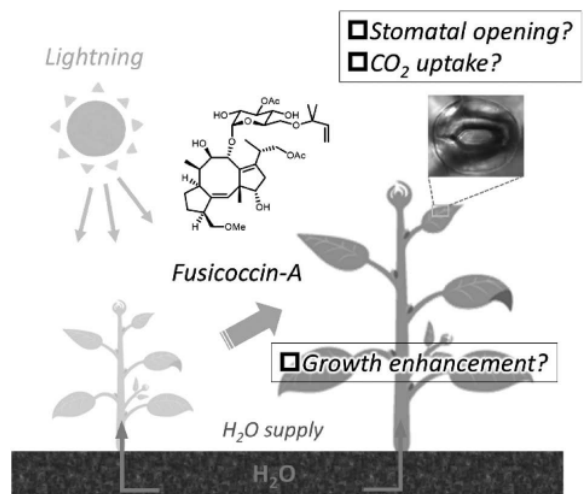


図1. FC類による気孔開口促進と植物成長促進の作業仮説

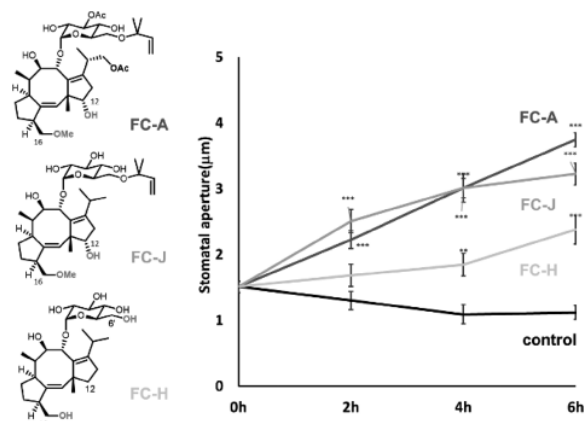


図2. フシコクシン類の気孔開口促進活性

同じアブラナ科であるコマツナを屋外ビニールハウスで水耕栽培し、FC-Jを継続的に処理したところ、FC-Aの場合とほぼ同等の成長活性が認められた。また、セロリ、レタス、ネギについてもFC-Jの処理群において有意な重量増加が観察され、本化合物が栽培作物にも広く適用可能であることが明らかになった[2]。さらに室内施設におけるレタス水耕栽培のパイロット試験を実施した結果、育苗期間のみにFC-Jを処理しその後は薬剤処理をせずに栽培しても、4週目の重量が20%程度増加することが判った。植物工場での実地応用の可能性を示す結果として興味深い。

以上、本研究では、FC-Aは孔辺細胞中のPM H^+ -ATPaseと14-3-3の相互作用を安定化することで、気孔開口の促進に伴い CO_2 吸収量、光合成活性を向上させ、これまでの植物毒としての通説と相反する植物成長促進活性を示すことを明らかにした[3]。真菌のバイオ生産により大量取

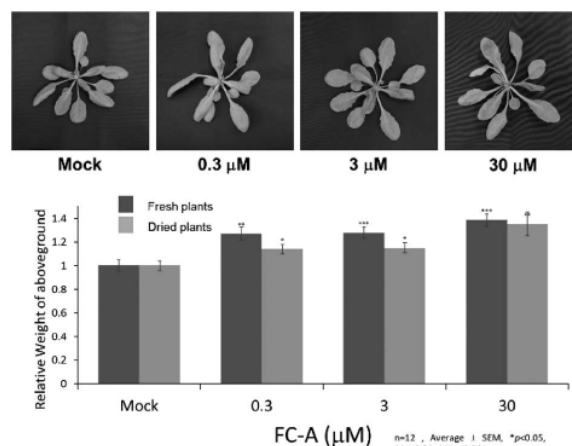


図3. 化合物の長期間処理によるシロイヌナズナの成長促進効果

得可能なFCは、食糧生産効率を改善する植物成長促進剤として農業利用が期待できる。

謝辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深謝いたします。

参考文献

- [1] Y. Wang, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 533–538.
- [2] J. Ohkanda, H. Kiriya, S. Kasuga, H. Irieda, T. Kinoshita, *JP Patent* 2022-029413.
- [3] H. Kiriya, S. Kinoshita, Y. Hayashi, S. Kasuga, T. Kinoshita, H. Irieda, J. Ohkanda, **2023**, submitted.

超好熱アーキアにおけるL-プロリン生合成酵素の同定

徳島大学大学院社会産業理工学研究部
川上竜巳

研究の背景と目的

以前の研究で超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT3の増殖におけるアミノ酸要求性を解析した結果、本菌はL-プロリンを生合成できることが示唆された¹⁾。L-プロリンはL-アルギニンを出発物質として、アルギナーゼ (Arginase)、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (OrnAT)、ピロリン-5-カルボン酸レダクターゼ (P5CR) の3酵素が関与して生合成されるが (図1左)、アーキアにおいて各酵素活性が検出された例は報告されていなかった。最近我々のグ

ループは *P. horikoshii* から OrnAT を見出し²⁾、プロリン生合成経路解明の第一歩とすることができた。本研究では、OrnAT反応で生じたP5Cを還元するP5CRについて注目した。

P5CRは通常、NAD(P)H依存的にP5Cを還元する酵素であり、超好熱アーキアにおいては一部にしか保存されていない。一方で我々は、超好熱アーキアに幅広く保存されているL-プロリン/NADH脱水素酵素複合体 (ProDH/NADHDH) を見出している³⁾。αβγδ構造のこの酵素は、α、

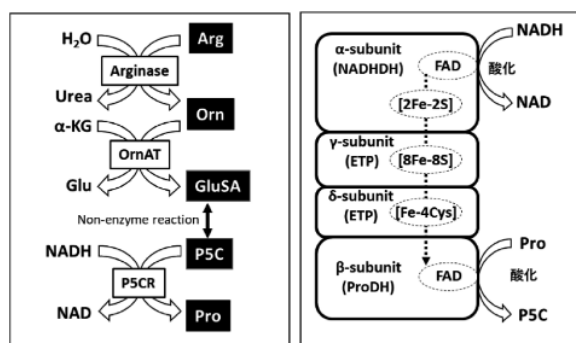


図1. L-プロリン合成経路 (左) と ProDH/NADHDH 複合体の構造 (右)

βサブユニットがそれぞれ単独で NADHDH 活性, ProDH 活性を示し, α, γ, δサブユニットには鉄硫黄クラスター (ISC) が含まれている (図1右). これまでこの複合体酵素の生理的な機能については全く不明であったが, ProDH 反応の逆反応が進行すれば, 反応自体は既知の P5CR と同じであることに気が付いた. そこで本研究では, この複合体酵素における P5CR 活性の検出を試みた.

これまでの研究経過

①P5CR 活性の解析

P5CR 活性の測定は, OrnAT 反応との共役反応で行った. L-オルニチン, 2-オキソグルタル酸, NADH と OrnAT, ProDH/NADHDH (もしくは P5CR) を嫌氣的に混合し, 60℃ で 0~60 分間インキュベートすることで行い, NADH 減少量と L-プロリン生成量を経時的に定量した.

まず初めに, P5CR を用いて活性測定を行った結果, L-プロリン量の増加に伴って, NADH 量は減少しており, この活性測定系に問題ないことを確認した (図2上). この条件で, ProDH/NADHDH を用いて測定を行ったところ, NADH 減少量に比べて L-プロリン生成量が若干少ないものの, この複合体酵素が P5CR 反応を触媒できることを明らかにできた (図2下). このことはこの酵素が, 既知の P5CR とは反応機構が全く異なる, 新奇な P5CR であることを示している.

②ProDH/NADHDH の結晶化

我々はこれまでも, 複数種の ProDH/NADHDH を組換え発現させ結晶化に取り組んできたが, 成功には至っていない. 結晶化要因の一つとして, タンパク分子としての単分散性が関与することが一般的に知られている. 今回, *Thermococcus peptonophilus* の酵素がこれまでの酵素より高い単分散性を示すことが強く示唆されたため, αまたは βサブユニットに His タグ配列を付加した発現ベクターを構築した (TpepPDH-Ahis, Bhis). また比較のために, P.

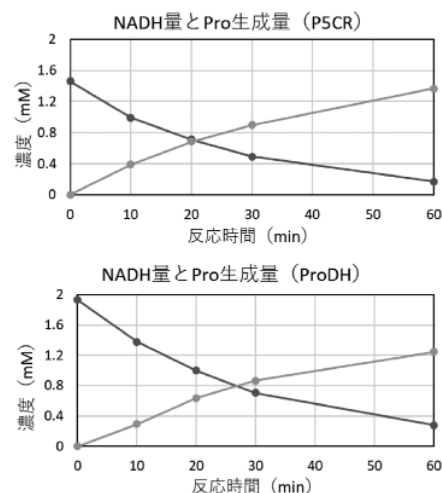


図2. P5CR (上) と ProDH/NADHDH 複合体 (下) を用いた活性測定における NADH と L-プロリンの定量

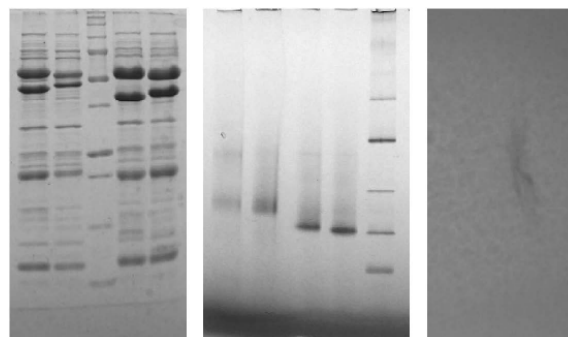


図3. 左, SDS-PAGE, 左から PhoPDH-Ahis, Bhis, マーカ, TpepPDH-Ahis, Bhis, 中央, Blue-Native PAGE, 左から PhoPDH-Ahis, Bhis, TpepPDH-Ahis, Bhis, マーカ, 右, TpepPDH-Ahis の結晶

horikoshii の酵素 (PhoPDH-Ahis, Bhis) の発現ベクターも構築し, 発現させた.

可溶性画分として発現した各酵素をニッケルカラムで精製した後の SDS-PAGE (図3左) と Blue-Native PAGE (図3中央) の結果から, 各酵素は適切な複合体構造を形成しているが, TpepPDH の方が高い単分散性を示すことが分かった. 精製酵素を濃縮し, 結晶化クリーニングにより, 図3右のような結晶を得ることに成功した. この条件を基に良質な結晶を作製し, 回折実験を行う予定である.

まとめ

これまで機能不明であった ProDH/NADHDH 複合体から P5CR 活性を検出できたことにより, 超好熱アーキアにおける L-プロリン合成経路の解明をさらに進めることができた. この複合体酵素の詳細な構造を明らかにすることで, 鉄硫黄クラスターを介した分子内電子伝達システム

の解明につなげていきたい。現在、アルギナーゼの候補タンパク質についても解析を進めており、超好熱アーキアにおけるL-プロリン生成経路の全貌を明らかにしたい。

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いたします。

参考文献

- 1) Kawakami, R.; Ohmori, T.; Sakuraba, H.; Ohshima, T. Iden-

tification of a novel amino acid racemase from a hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT-3 induced by D-amino acids. *Amino acids*. **2015**, 47, 1579-1587.

- 2) Kawakami, R.; Ohshida, T.; Hayashi, J.; Yoneda, K.; Furumoto, T.; Ohshima, T.; Sakuraba, H. Crystal structure of a novel type of ornithine δ -aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, 208, 731-740.
- 3) Kawakami, R.; Satomura, T.; Sakuraba, H.; Ohshima, T. L-Proline dehydrogenases in hyperthermophilic archaea: distribution, function, structure and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 93, 83-93.

モデル生物カイコを用いた *in vivo* 評価系による 農薬シード化合物の探索

北里大学感染制御科学府 博士課程
近藤直純

背景・目的

農作物の安定した大量生産には害虫制御が必須であり、現状、農薬の使用は必要不可欠である。しかし、同一系統の農薬を連続使用することで起こる農業害虫の薬剤耐性化が問題となっている。ガ類害虫は農業害虫の中でも特に薬剤耐性化の報告頻度が高く¹⁾、世界的なガ類害虫であるコナガ・オオタバコガ・ハスモンヨトウにおける薬剤耐性化および農業被害は深刻である。これらガ類害虫の薬剤耐性化を回避する戦略として、異なる作用機序を有する農薬のローテーションが有効であることから、ガ類害虫に対して有効な新規作用の農薬開発が強く望まれている。このような状況から、所属研究所ではガ類害虫の1種であるハスモンヨトウを用いた殺虫活性物質の探索研究が実施されてきた。しかし、ガ類害虫は様々な要因から殺虫剤に対する感受性が低く、ガ類害虫を試験生物として機能未知の殺虫活性物質を新たに見出すことは困難であった。我々は、ガ類昆虫のモデル生物として知られるカイコ (*Bombyx mori*) が他のガ類昆虫と比べ殺虫剤に対して感受性が高いことに着目し²⁾、カイコ初齢幼虫を用いた高感度殺虫活性検出系を新たに構築した³⁾。本評価系を用いることで、ガ類害虫の1種であるハスモンヨトウ初齢幼虫と比較して、最大で300倍の検出感度でサンプル中の殺虫活性成分を捉えることが可能となった³⁾。さらに、カイコ評価系において殺虫活性を示す化合物はコナガ、オオタバコガ、ハスモンヨトウに対しても活性を示すことを確認している³⁾。そこで本研究では、微生物培養物からのカイコ初齢幼虫を用いた殺

虫活性物質の探索を行った。

方法

- ・カイコ初齢幼虫を用いた殺虫活性評価

24-well プレートに詰めた人工飼料に微生物培養物サンプルを添加し、カイコ初齢幼虫が入った別のプレートとwell同士を重ねた(図1左)。初齢幼虫はwellの壁を登りエサを食べるため、エサを食べたカイコの成長度合いや行動を観察して殺虫活性を評価することができる。殺虫活性の評価基準としては、エサを摂食したカイコが初齢幼虫のまま成長せず、動かない、あるいはその他異常行動をとる群を活性ありとした(図1右)。一方、エサを摂食して成長し、活発に活動する群は活性なしとした(図1右)。

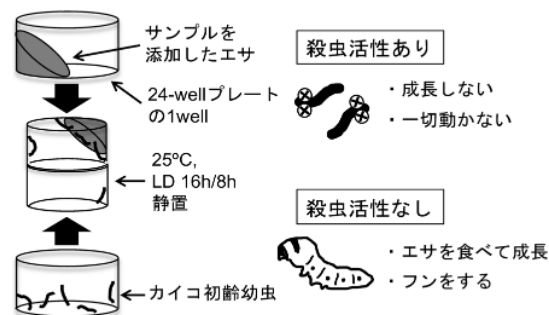


図1. カイコ初齢幼虫を用いた評価系

- ・薬剤感受性酵母を用いた選択性評価

事前検討において、前述したカイコ評価系は非特異的な

生物活性物質であるスタウロスポリンやロイシノスタチンなどでも殺虫活性を検出することが分かっていた³⁾。そのため、カイコ評価系において殺虫活性を示した微生物培養物サンプルの中で、非特異的な生物活性物質を含むサンプルを排除する必要があると考えた。そこで、薬剤耐性に関わる薬剤排出ポンプや膜透過性に関わるエルゴステロールの発現を抑制した出芽酵母株である薬剤感受性酵母⁴⁾に着目した。薬剤感受性酵母は通常の出芽酵母と比較して薬剤感受性が高いことから、より鋭敏にサンプル中の非特異的な生物活性物質を検出できると考えた。すなわち、殺虫活性を示したサンプルを用いて薬剤感受性酵母に対するペーパーディスク法による抗真菌活性評価を行い、双方に活性を示すサンプルを排除することで殺虫活性選択的なサンプルを選別した。

結果・考察

所属研究所が保有する放線菌・糸状菌培養液ライブラリーから2,951サンプルを用いた殺虫活性物質のスクリーニングを実施した。スクリーニング結果を以下に示す(表1)。

表1. 殺虫活性物質のスクリーニング結果

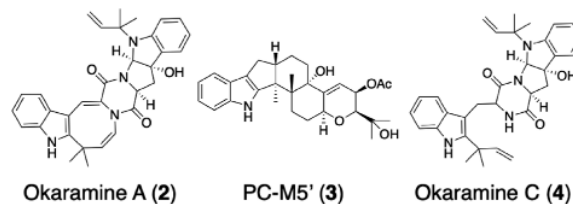
微生物培養液	サンプル数	1 st 通過	2 nd 通過
糸状菌由来	1,851	88	18
放線菌由来	1,100	26	18
合計(カイコ)	2,951	114 (3.9%)	36 (1.2%)
先行研究 (ハスモンヨトウ)	15,360	95 (0.6%)	—

カイコを用いたスクリーニングの結果、糸状菌と放線菌合わせて114サンプルに殺虫活性を確認した。さらに、薬剤感受性酵母を用いることで殺虫活性選択的な微生物培養物36サンプルを選別することができた。また、我々が先行して実施したハスモンヨトウ初齢幼虫を用いたスクリーニングと比較すると、カイコ評価系の陽性検出率は約6倍に向上した。この結果から、カイコ評価系を利用することで、より幅広く・より鋭敏に微生物培養物中の殺虫活性物質を検出可能であることが示唆された。本スクリーニングを通過したサンプルの中で、殺虫活性の再現性があり、摂食したカイコが特有の表現型を示したサンプルから優先して殺虫活性物質の精製を行った。

長野県の土壌より分離された糸状菌*Penicillium* sp. FKI-10806株の培養物を摂食したカイコ初齢幼虫は、エサ

のwellに留まることが出来ず、下のwellに落下してしまうために成長することが出来ない。筆者はこの表現型に興味を持ち、本株培養物から殺虫活性を指標とした生物活性物質の精製を試みた。以下に培養・精製工程を示す。

糸状菌*Penicillium* sp. FKI-10806株の種培養物30 mLをきな粉を主成分とする液体培地3 Lに接種した。6日間の振盪培養後、同量のアセトンを加えたのちに遠心分離にて上清を回収し、減圧下で溶媒を留去することで培養抽出水溶液3 Lを得た。これをODSカラムクロマトグラフィーに供し、アセトニトリル60%画分500 mLに殺虫活性を確認した。本画分を減圧下で有機溶媒を留去し、酢酸エチル抽出を行うことで有機層115.3 mgに殺虫活性を確認した。本画分を高圧液体クロマトグラフィーに供することで、殺虫活性物質**1** (5.6 mg, LD₁₀₀=3 ppm), **2** (3.9 mg, LD₁₀₀=3 ppm), **3** (3.3 mg, LD₁₀₀=300 ppm), **4** (3.1 mg, LD₁₀₀=300 ppm)を得た。これらの高分解能ESI-MS解析および¹H, ¹³C NMR解析結果を天然化合物データベースであるDictionary of Natural Products⁵⁾と照合した。その結果、**2**をokaramine A⁶⁾, **3**をpaxillin類縁体であるPC-M5⁷⁾, **4**をokaramine C⁸⁾と同定した。物質**1**については、データベースと一致する化合物が確認されなかったため2次元NMR解析に基づく詳細な化学構造解析を行っている。



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財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝致します。

引用文献

- 1) Arthropod Pesticide Resistance Database.
- 2) *Afr. J. Biotechnol.*, **2010**, 9, 1771-1775.
- 3) *ACS Agric. Sci. Technol.*, **2023**, 3, 278-286.
- 4) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **2014**, 60, 160-162.
- 5) The Dictionary of Natural Products version 31.2, CRC Press, USA.
- 6) *Agric. Biol. Chem.*, **1988**, 52, 885-886.
- 7) *Chem. Pharm. Bull.*, **1990**, 38, 3473-3475.
- 8) *Agric. Biol. Chem.*, **1991**, 55, 3143-3145.

ワイン発酵におけるプロリン資化抑制機構の解明

奈良先端科学技術大学院大学
先端科学技術研究科
西村 明

1. 研究背景と目的

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、ワインなどの酒造に用いられる微生物であり、酵母による原料の資化（細胞への取り込みと利用）が、酒類の特性を決めている。特に窒素源の資化は、味や香りに影響を与える窒素源の代謝に直接関係し、酒質を決める重要な因子となっている。プロリンはワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれる窒素源である。しかし、発酵中の酵母はプロリンをほとんど利用することができず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインの酒質を低下させると考えられている。さらに、発酵中の窒素源枯渇を防ぐために、人工窒素源（アンモニウム塩など）の添加が必要となる。この添加物は、ワインの品質に影響を与えるだけでなく、製造コストの増加要因にもなっている。このため、プロリンは「最も無駄な窒素源」として認識されており、いかにしてプロリンを資化できるかという試みが30年以上前からなされてきたが、現在でも未解決のままである。

本研究では、実用ワイン酵母を用いて、プロリン資化の抑制に関与する遺伝子群の探索・解析を行うことで、プロリン資化抑制機構の解明およびプロリン高資化性酵母の創製を目指した。

2. 研究結果と考察

プロリン要求性株はプロリン資化が抑制される環境では生育できないため、プロリン要求性株を使用することでプロリン資化抑制に関与する遺伝子のスクリーニングが可能である。そこで、ワイン酵母のプロリン要求性株を親株として、白ブドウ培地でも生育可能な自然突然変異株をスクリーニングしたところ、 10^{10} 個の細胞から2個の変異株を取得した。また、これらの変異株のプロリン消費を測定した結果、白ブドウ培地でもプロリン資化が可能であることがわかった。これらの変異株の全ゲノム DNA シーケンス解析を実施し、親株のゲノム情報と比較した。その結果、両者のゲノムの *CDC25* 遺伝子にストップコドンが生じる同一のホモ変異が存在していることが判明した。Cdc25 はグルコース応答に関わる GTPase involved in G-protein

signaling in adenylate cyclase activation (Ras1/2) の制御因子として知られている。取得した変異株は活性部位である Ras-GEF ドメインが削除された変異型 Cdc25 を発現するため、機能欠損型である可能性が考えられた。以上のことから、炭素源の代謝がプロリン代謝に関与していることが示唆された。最後に、CRISPR/Cas9 システムによって野生株に *cdc25* 変異を導入した結果、野生株はプロリン消費が全く見られない一方で、*cdc25* 変異株は有意にプロリンを消費することが判明した。

本研究では、プロリン要求性株を利用して、プロリン資化抑制に関与する遺伝子の探索とその解析を行った。その結果、糖代謝の制御に重要な Cdc25/Ras/cAMP 依存性プロテインキナーゼ A シグナル経路がプロリン資化抑制を制御していることが判明した。以上より、酵母において糖代謝とプロリン代謝の密接なクロストークの存在が強く示唆された（図1）。

3. 今後の課題と展望

プロリン高資化性変異株は世界で初めて取得されたものであり、大きな成果である。今後、この変異株については共同研究先である UC Davis のワイン・ビール研究所において、発酵試験を実施する予定である。一方で、同定した遺伝子群がプロリン資化を制御するメカニズムは全く不明であるため、今後は PKA 経路の下流遺伝子の破壊や網羅的な発現解析を通して全体像を明らかにする予定である。

ビール・ワイン醸造においてプロリンは「最も無駄な窒素源」として認識されており、いかにしてプロリンを資化可能にするかという試みがなされてきた。本研究で得られたプロリン高資化性酵母を用いることで、プロリン含量が低下し、苦みを抑えたすっきりとした味わいのビール・ワ

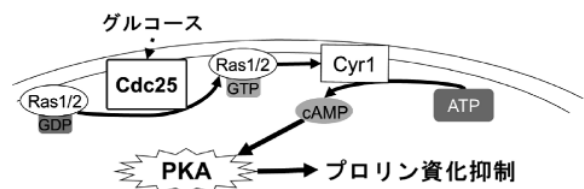


図1. 本研究のまとめ

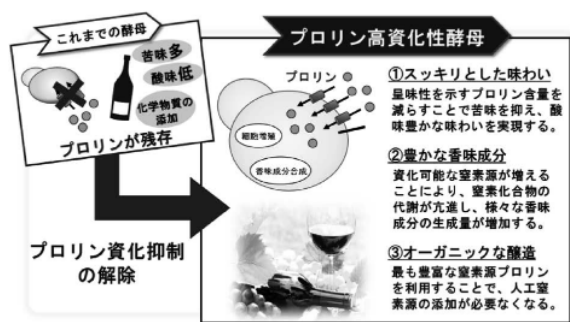


図2. 本研究の展望

イン醸造が可能となり、ビール・ワインの高品質化に資すると考えている。また、酵母が利用可能な窒素源が増えることで香味性の強化、人工添加物の添加なしのオーガニックなビール・ワインが製造可能となり、ビール・ワインの高付加価値化に繋がると考えている（図2）。

4. 謝辞

本研究を遂行するに当たり貴重なご支援を頂いた公益社団法人日本農芸化学会に厚く御礼を申し上げます。

活性硫黄含有アミノ酸群の システイン脱硫黄酵素に対する作用に関する研究

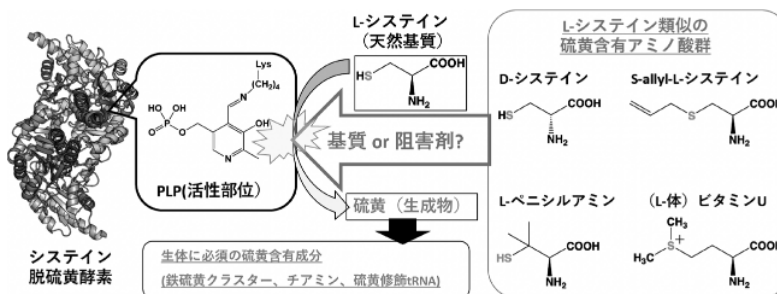
埼玉大学大学院理工学研究科
藤城貴史

【序論】

システイン脱硫黄酵素は、生体内における硫黄を含む有機／無機補因子（例：チアミン、鉄硫黄クラスター）や thio-tRNA などの生合成において、無機硫黄を供給する重要な役割を担う酵素であり、活性部位のピリドキサル-5'-リン酸（PLP）部位で、基質L-システインからの無機硫黄の抽出反応を触媒する [1]。これまでのアミノ酸配列比較や分子系統解析の結果から、システイン脱硫黄酵素は、活性部位の構造の違いによって2つの Type に分けられることが示されており、長らくシステイン脱硫黄酵素の異なる Type 間での共通点や相違点は興味を持たれてきた。この問いに答えるべく、我々はごく最近、鉄硫黄クラスター生合成系に見られる異なる Type のシステイン脱硫黄酵素（Type I: NifS, Type II: SufS）の基質L-システインに対する触媒反応、および、シクロセリンによる阻害反応における、両者の共通点や相違点を明らかとした [2, 3]。一方で、システイン脱硫黄酵素の非天然の硫黄含有アミノ酸との反

応性についての研究は、これまで全くなされていない。もし、上記の研究により、システイン脱硫黄酵素の新たな反応性を引き出すことができれば、システイン脱硫黄酵素の新たな阻害剤の開発や、バイオテクノロジー分野における基質特異性改変型システイン脱硫黄酵素を用いた硫黄含有物質の合成触媒系の開発などが見込める。

そこで、本研究では2つの異なる Type のシステイン脱硫黄酵素 NifS, SufS を用いて、これらの酵素と天然基質L-システイン以外の硫黄含有アミノ酸との反応についての調査を行う。硫黄含有アミノ酸として、天然由来のもの（例：D-システイン、L-ホモシステイン、S-allyl-L-システイン、ビタミン U）、非天然のもの（例：L-penicillamine, S-methyl-L-cysteine）と NifS, SufS を混合し、PLP 由来の UV-visible スペクトル吸収変化を追うことで、反応性の有無について調べた。また、NifS, SufS 結晶に、上記アミノ酸をソーキングすることで複合体型結晶を作成する系を構築し、その X 線結晶構造解析により、NifS, SufS の PLP を含む活



性部位周辺に、ソーキングしたアミノ酸が結合するかどうかを調べた。

【結果と考察】

NifS, SufS のどちらの場合にも、分子サイズが大きく（分子量で 150 以上程度）、これらの活性部位に立体障害により収まらないと思われる硫黄含有アミノ酸は、PLP 由来の UV-visible スペクトルの変化を示さない結果となった。一方、より小さい硫黄含有アミノ酸については、全てのアミノ酸が PLP に反応しうる 1 級アミンを持つにも関わらず、UV-visible スペクトルが変化するものと変化しないものに分けられた。つまり、少なくとも「加えたアミノ酸のサイズだけが、NifS, SufS との反応の有無を決める要因ではない」ということが、この実験から示された。

UV-visible スペクトルが変化するアミノ酸をソーキングした NifS, SufS の X 線結晶構造解析の結果、どの場合も、PLP の C4' の部位にアミノ酸ソーキング前よりも大きな電子密度が観測されており、アミノ酸が PLP に直接共有結合したことが示された。現在、より詳細な構造精密化を進めている段階であり、特に aldimine (400–420 nm に吸収ピーク)、quinonoid (500–600 nm に吸収ピーク)、または ketimine (330–350 nm に吸収ピーク) などの、PLP-アミノ酸付加体の共役系の異なる分子種の構造に関する検証や議論が必要となっている。

【今後の展望】

X 線構造解析が完了し次第、システイン脱硫黄酵素とアミノ酸の混合系で実際に起こる反応について調べる。すなわち、電子密度が観測されたアミノ酸は、天然基質 L-システイン同様の硫黄抽出がなされるのか、あるいは、ただ単に阻害剤のように PLP に結合しただけなのかなど、詳細な検証を進めていく。もし aldimine などの分子種の確定が困難である場合には、結晶の顕微 UV-visible スペクトル測定を行い [2]、分子種に特異的な吸収ピークから、結晶中に生成した分子種の共役状態の判断を行う。構造と分光分析、生化学的な反応解析のデータを統合して、最終的に、種々の硫黄含有アミノ酸と NifS, SufS との反応機構を決定する予定である。

【引用文献】

- [1] T. Fujishiro, R. Nakamura, K. Kunichika, Y. Takahashi, Structural diversity of cysteine desulfurases involved in iron-sulfur cluster biosynthesis. *Biophys. Physicobiol.* 19, e190001, 2022.
- [2] R. Nakamura, M. Hikita, S. Ogawa, Y. Takahashi, T. Fujishiro, Snapshots of PLP-substrate and PLP-product external aldimines as intermediates in two types of cysteine desulfurase enzymes. *FEBS J.* 287, 1138–1154, 2020.
- [3] R. Nakamura, S. Ogawa, Y. Takahashi, T. Fujishiro, Cycloserine enantiomers inhibit PLP-dependent cysteine desulfurase SufS via distinct mechanisms. *FEBS J.* 289, 5947–5970, 2022.

7. 第76回国際会議出席費補助金 報告書

第76回国際会議出席費補助金報告書

EMBO Workshop Chemical biology 2022 参加報告

筑波大学人間総合科学学術院人間総合科学研究群
宇津木優樹

2022年9月5日から9月8日まで、ドイツのHeidelberg, EMBL Advanced Training Centreで開催されたEMBO Workshop Chemical biology 2022において、口頭発表をさせていただきました。

EMBO Workshop Chemical biologyは、2年に一度EMBLで開催されるケミカルバイオロジーに関する国際学会です。2020年度は、COVID-19の流行のため、Virtualでの参加のみでしたが、2022年度は、VirtualとOn-siteの両方での参加が可能でした。On-siteでの参加には、COVID-19の陰性証明と医療用マスクの着用が必要でした。

2022年度は、以下の6つのSession topicが設定され、Keynote lecture, Invited lecture, Oral presentation, Flash talks, Poster presentationが行われました。

- Drug and target discovery
- Genetically-encoded biosensors
- Structure-function relations in chemical biology
- Chemical tools for biological imaging
- Metabolism and natural products
- Synthetic biology and protein design

会議では、改変したHaloTagや小分子蛍光プローブを用いた生体内イメージング法やタンパク質間相互作用の検出法から、計算薬物設計や蛍光タンパク質レパートリーの計算科学的デザインに至るまで、様々なトピックを扱っていました。博士課程修了後に、欧州または米国でケミカル

バイオロジー分野のpostdoctoral researcherを目指す私にとって、魅力あるプログラムが組まれており、欧州を中心に世界の研究動向を探る上で、この上ない機会となりました。

初日は、Prof. Dorothee Kern (Brandeis University)により、35億年の間に地球が冷却することによって生じた触媒速度の低下に、酵素がどのように適応してきたか、分子進化プロセスの解明を目指した生物物理学的研究について基調講演が行われました。シンプルな科学的疑問から、生物学的に重要な発見が導かれたストーリーが興味深かったです。

Poster presentationでは、Arnaud Gautier (Sorbonne University)の研究グループが開発したタンパク質の三元相互作用の検出法やHagan Bayley (University of Oxford)の研究グループが開発したprotein nanoreactorについての発表を聞き、理解できなかった原理や研究データで気になった点を中心に質問しました。発表者のpostdoctoral researcherとPhD studentはともに私と年齢が近く、同世代の研究者でしたが、研究内容や発表のレベルが高いだけでなく、研究課題の設定から実施まで主体的に遂行しており、刺激を受けました。

私は、4日目のSession 6で、“A method for conditional control of cellular protein stability using an excisable degron tag”という演題で発表を行いました。私たちの研



写真1. Heidelberg



写真2. 会場



写真3. 筆者

究グループが開発した、細胞内脱ユビキチン化酵素により切除可能なデグロンタグを用いた標的タンパク質発現制御法について発表させていただきました。講演後は、Prof. Yimon Aye (EPFL) と Prof. Edward Lemke (IMB) から、標的タンパク質の局在や半減期の違いによる発現制御への

影響について質問を受けました。発表に対する質疑応答を通して、今後、開発した研究手法の一般性をより詳細に評価していく上で、考慮すべき重要な気づきが得られました。

Coffee Break, Lunch, Dinner の間には、前述の Prof. Aye の研究グループや Prof. Gonçalo Bernardes (University of Cambridge) の研究グループの postdoctoral researcher や PhD student から、研究内容や研究環境について情報を得ることができました。同世代の研究者とも交流ができ有意義な時間となりました。

ケミカルバイオロジー分野で最前線を走る世界中の研究者の前で、自身の研究課題を口頭発表する機会に恵まれたばかりでなく、同世代の研究者とも交流ができ、将来に向けて貴重な経験を得ることができました。今後は、この経験を生かして一層、研究活動に励んで参りたいと思います。

最後に、本学会への参加にあたり、ご支援をいただきまし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。

8. 第77回国際会議出席費補助金 報告書

第77回国際会議出席費補助金報告書

21st World Congress of Food Science & Technology (第21回世界食品科学技術会議)に参加して

鹿児島大学大学院連合農学研究科 応用生命科学専攻博士課程3年
鶴留奈津子

2022年10月31日から11月3日までの3日間、シンガポールのマリーナベイサンズにて開催された21st World Congress of Food Science & Technology (IUFoST2022)にて発表する機会を与えていただきました。シンガポールは多民族国家で、街中には中国・インド・イスラムなどの伝統的文化が広がり、まるで数カ国を訪問したような錯覚を抱くほど、多種多様な文化を肌身に感じる事が出来ました。

今回参加したIUFoSTは1962年から近年は2年おきに開催されており、前回の2020年大会はコロナウイルスの世界的なパンデミックにより中止となっていました。そのため、本大会は世界中が待ち望んだ4年ぶりの開催となりました。本会議のサブテーマはFuture of Food - Innovation, Sustainability & Healthで、世界的な食糧危機を打開するために研究者に求められる資質や科学技術などに関して、様々な発表を聞くことが出来ました。

本学会で私は「Use of fisetin and mulberry leaves as nutraceuticals to prevent vascular abnormal contraction」という演題名のもと、ポスター発表を行いました。私の研究で対象としている血管異常収縮は世界的な死因の約50%を占めている血管病の一因で、偏頭痛や肩こりをはじめ、最悪の場合は、心筋梗塞や脳梗塞を引き起こし突然死の原因となるような病態です。しかしながら、その発症機序や治療法、予防法については未解明で多くの人が現在も苦しめられています。たとえ救命されたとしても重篤な後遺症を来することが多く、治療法ではなく予防法の確立が重要であると考え、私の研究では日常的な食生活から予防できるような血管異常収縮を予防する食品探索と機能性成分の同定を行ってきました。その結果、桑葉に血管異常収縮予防効果を見出し、その活性成分がフラボノイド類に属するFisetinであることを同定したため、本学会ではその研究成果について発表を行いました。桑葉(Mulberry leaves)はアジアのみならず世界中に自生しているものの、その主

な飲食方法である桑茶は紅茶や緑茶と比べ、あまり普及していません。そのため桑葉を受け入れてもらえるのかと不安でしたが、日常的に飲食されている国もあり、毎日飲んでいるお茶で健康になればラッキーよね、といった声を多くいただきました。

また様々なアドバイスをいただき、今後の研究の展開に繋がるような議論を交わすことが出来ました。博士課程の最終学年でこのような機会を頂けたことを大変有難く感じております。

本学会は博士課程の学生やポストドクなどの若手研究者が多く参加されており、どなたと話してもコロナ禍で本学会が久々の対面での国際学会だと仰っていました。特に同学年の学生とは、博士課程入学と共にコロナ禍に突入し、これが学生最初で最後の国際学会だという話で盛り上がりました。コロナ禍に翻弄された3年間でしたが、国境を問わず皆、同じことに惑わされた経験談を共有することができ、感慨深くも、より一層仲良くなった気がします。

また本学会では、多くの発表でSDGsについての発表がありました。SDGsは近年よく耳にしますが、多くの項目が私たち食品科学の研究者に関係する課題です。世界で加速する高齢化と食糧不足に打ち勝ち、健康寿命を延伸させることが私たち研究者に求められているのだと思います。



写真1. 会場の様子

今回、IUFoST2022に参加したことで様々な分野の研究発表を拝聴し、また自分の発表を通じて多くの方と交流することで、世界との一体感を感じることが出来ました。また国内外問わず、多くの研究者と知り合い、様々な研究について学ぶことで、たくさんのアイデアが浮かびました。

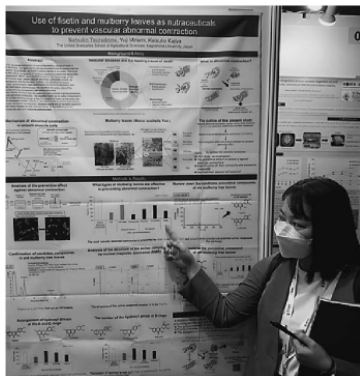


写真2. 発表の様子

今後の研究活動が楽しみで仕方ないです。学術研究者として自立を目指すこのタイミングで、このような貴重な機会を頂戴しましたことに感謝申し上げます。また、本会議への参加にあたりご支援いただきました、日本農芸化学会に厚く御礼申し上げます。



写真3. 学会参加登録会場にて

9. 第78回国際会議出席費補助金
報告書

第78回国際会議出席費補助金報告書

ゴードン会議（生体エネルギー）参加報告書

京都大学農学研究科応用生命科学専攻
石川 萌

開催期間：2023年6月24日-29日

開催場所：アメリカ合衆国・ニューハンプシャー州

1. 学会の概要

ゴードン会議（生体エネルギー）とは、生体エネルギー分野の研究者が最先端の研究について共有し、所属や世代を問わないニュートラルな議論の場を提供することで、当該分野の発展に貢献することを目的に行われている国際会議である。COVID-19の感染も収まりつつあり、数年ぶりとなる規制なしの国際会議ということで、生体エネルギー資源ATPを生産するF1F0-ATP synthaseをはじめ、ATP生産の駆動力を提供するH⁺イオン勾配に寄与するミトコンドリアの呼吸鎖酵素群、および原核生物中でNa⁺イオン勾配を形成する酵素群に関する専門家が一堂に会した。

また、本会の1日前には学生およびポスドクを中心とした若手による研究集会（GRS）も企画されており、ポスター発表や一部選抜された学生による口頭発表が行われた。

2. 学会の雰囲気

開催地はプロクターアカデミーという学校の施設であり、参加者はその敷地内の寮に寝泊まりした。午前中の口頭発表セッションは毎日8時ごろに始まり、昼過ぎにはポスターセッションが二時間ほど行われ、夕食を挟んで再び口頭発表が午後9時半ごろまで行われた。口頭発表では当分野では知らぬ人がいないほどの大御所の発表をはじめ、

さまざまなアプローチでエネルギー生産酵素を理解しようという最新の試みを聴講することができ、多くの刺激をいただいた。また、適宜挟まれるコーヒープレイクでは、発表者に直接質問を試み、実験手法の細い注意点や実験についてもアドバイスもいただくことができた。食事は朝昼晩とフルーツや生野菜を含む健康に配慮されたメニューが提供され、毎食ごとに初対面の参加者と意見交換や交流をおこなうことができた。また、昼食後には毎日二時間ほどの自由時間が設けられており、学会が用意したハイキングなどのアクティビティーに参加する人もいれば、ビリヤードなどのゲームを介して交流を図る人など過ごし方は人それぞれであった。1日の終わりには必ずお酒を交えた交流会があり、研究の話題のみならず、進路の選択や異国での生活のことまでなんでも質問することができた。私自身がアジアの女子学生というマイノリティーであることもあってか、会期全体を通して多くの方が認知してくださり、毎日フレンドリーに声をかけてくださった。このようなオープンな雰囲気のおかげで、沢山の方と顔見知りになることができ、たくさん連絡先を交換できたことは今後の研究人生において大きな財産となるに違いない。

3. 発表の反響

今回、光栄なことに若手の会および本会ともに口頭発表に選抜していただき、一部参加費を免除していただいた。



図1. 発表会場前で参加者と記念撮影

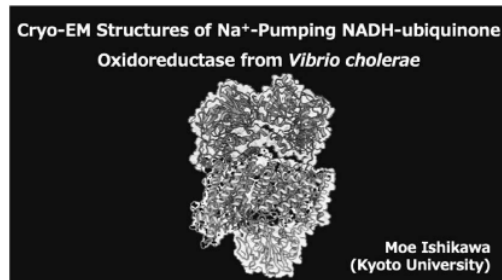


図2. 会場内での撮影は禁止されていたため、発表スライドの表紙

若手の会では、「5歳児にもわかるように研究を紹介しよう」というテーマのもと、研究紹介を行った。そこで、私の研究対象であり、 Na^+ 勾配の「形成に寄与する NQR」という酵素を某人気アメコミ漫画のメンバーに例えたり、日本の某人気海賊漫画の言い回しを引用したり、自作のイラストを用いることで初めて海外で笑いを取ることに成功した。本会では、「薬剤耐性菌に対抗する」というテーマのセッションにて、大御所の先生たちに一人紛れて口頭発表を行った。COVID-19 のせいもあり、博士課程後期の最終年度にして初めての海外学会・初めての英語口頭発表でまさかの大舞台を仰せつかり、人生で一番緊張したことは言うまでもない。自分の発表が近づくにつれて、みるみる血

の気が引くのを感じ、不安の波が途方もなく押し寄せた。しかし、ディスカッションリーダーが直前の紹介で場を和ませてくださり、同じセッションの先生たちも励ましてくださったこともあり、どうにか発表を終えることができた。発表後、有益な質問をいただき、食事の際やすれ違い様にたくさんの反響をいただくことができた。

私は卒業後に海外で研究を行うことを計画しているため、卒業前に自分の語学における課題と研究に関する手応えを明確にでき、かけがえのない人脈を作る機会をいただけたことは、関係各位に感謝しても仕切れないほどである。最後に、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。

The 6th International Insect Hormone Workshop 2023 参加報告書

筑波大学 理工情報生命学術院 生命地球科学研究群生物学学位プログラム
海老原佳奈

開催期日：2023年6月18日～6月24日
開催場所：アメリカ合衆国、リバーサイド

学会の概要

国際昆虫ホルモンワークショップ（The 6th International Insect Hormone Workshop 2023 (IIHW2023)）は、2023年6月18日から24日にアメリカ合衆国カリフォルニア州リバーサイドの The Mission Inn Hotel & Spa にて開催された（写真1）。会場はリバーサイドのダウンタウンにあり、あちこちにヤシの木がある街並みが印象的であっ



写真1.

た（写真2）。6月のカリフォルニアは雨が降らず、日本と比べて湿度が少なく過ごしやすい気候だった。

IIHW とは

International Insect Hormone Workshop (IIHW) は、昆虫のホルモンに関する最新の研究成果を共有・議論することを目的とするワークショップである。本ワークショップは、1976年にロンドン王立協会（英国）が主催した昆虫ステロイドホルモン（エクジソン）の研究集会（1975-2010）を源流とするが、2013年に「International Insect Hormone Workshop」と名称を変え、あらゆる昆虫ホルモンに焦点を当てたワークショップへと変革した。そして現在では、本会議は昆虫ホルモンに関心を持つ多様な研究者が参集する世界で最も重要な会合と認識されている。



写真2.



写真3.

2023年のIIHWの参加者は70名ほどで例年よりも少なかったようだ。講演は、口頭発表（招待講演含む）が42題、ポスター発表が20題であった。

会場はとても和やかで、服装もTシャツにジーンズ姿の参加者が多い。そのような中でエクジソン、幼若ホルモンをはじめとする昆虫ホルモンに関する論文投稿前のデータについて積極的に発表し、議論されていた。研究室の論文紹介でよく耳にしている有名な研究者ばかりで、聞き応えのある発表ばかりだった。

筆者の発表

筆者は、6月19日のポスターセッションにおいて、“Larvicidal compounds that inhibit the enzymatic activity of the Halloween glutathione S-transferase Noppera-bo from the mosquito *Aedes aegypti*” というタイトルで発表した（写真3）。エクジソン生合成酵素の阻害を標的とし



写真4.

た蚊に対する新規の殺虫化合物について発表した。

初めての国際学会の参加であり、これまでに英語での発表の経験はあったものの英語の質疑応答に関して不安が多くあった。しかし、ポスターの前に立つと多くの方々に足を止めていただけて、筆者が質問を聞き取れなかった時も嫌な顔せず、真摯に聞いてくださる方ばかりだった。そのおかげで落ち着いて一つずつの質問に答えることができ、活発な議論ができた。また、聞いてくださった方々が優しく、褒めていただくことができた。

これまでCOVID-19の影響で筆者はオンラインでの学会参加がほとんどであったため、学外の同世代の研究者との交流の機会に恵まれてこなかった。本学会の初日と4日目の懇親会（写真4）では様々な研究者と交流する機会があり、同世代の研究者とのコミュニティを築くことができた。また、懇親会を通して、英語が伝わることの嬉しさと、研究の話以上に日常の会話が難しいことを痛感し、今後の英語学習のモチベーションが高まった。

謝辞

本会議への参加にあたり、多大なるご支援賜りました公益財団法人日本農芸化学会に熱く感謝申し上げます。

21st European Carbohydrate Symposium （第21回欧州糖質会議）参加報告

京都工芸繊維大学繊維学系
田中知成

2023年7月9日（日）～13日（木）にフランス・パリで開催された21st European Carbohydrate Symposium (Eu-

rocarb 21, 第21回欧州糖質会議）に参加した。Eurocarbは2年に一度、ヨーロッパ内で開催される糖質科学に関する



写真1 会場内風景

る国際会議である。当初2021年7月にパリでの開催が予定されていたが、新型コロナウイルス COVID-19の影響により開催が延期された。会場はセヌ川左岸（南部）に位置する Maison de la Chimie（化学会館）で、エッフェル塔、ルーブル美術館、コンコルド広場などに程近いパリの中心地で、パリの雰囲気味わうには抜群のロケーションであった。毎日、エッフェル塔を見ながらセヌ川を渡って会場まで歩いて行く道程は、久しぶりのヨーロッパの雰囲気を感じるのに十分満足な時間であった。開催直前にはパリ近郊での暴動がパリ市内にまで広がったと報道されて少々心配したが、私自身がパリ市内でその影響を感じることは無かった。今回の Eurocarb への筆者自身の参加は、2017年7月のスペイン・バルセロナでの開催以来、2回目であった。

会議初日は夕方から始まり、糖質科学に関する国際賞である Emil Fischer Award の受賞講演が、2021年受賞の Antonio Molinaro 教授と今年2023年受賞の Jeroen Codée 教授の2名により2件行われた。また、糖質科学の若手研



写真2 会場の中庭

究者に贈られる Carbohydrate Research Award を2021年に受賞した慶應大学の高橋大介先生の受賞講演も行われた。今回の Eurocarb には37か国600人以上が参加し、11件のプレナリー講演、17件の基調講演、144件の口頭発表、72件のフラッシュ発表を含む296件のポスター発表が行われた。

筆者自身は、Enzymatic glycosylation catalyzed by GH84 O-GlcNAcase using an oxazoline derivative のタイトルで発表した。近畿大学農学部の大沼貴之先生のグループとの共同研究であり、糖質加水分解酵素のファミリー84に分類される *N*-アセチルグルコサミン加水分解酵素を触媒とする初めてのグリコシル化反応の報告について発表した。海外の研究者と直接ディスカッションや交流をすることにより、非常に有意義な時間を過ごすことができ、今後の本研究テーマの発展を心に強く刻んだ。

最後に、本国際会議参加にあたりご支援いただきました公益社団法人日本農芸化学会に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

10. 第1回女性研究者チャレンジ研究
助成金報告書

第1回農芸化学女性研究者チャレンジ研究助成報告書

渋味刺激の消化管感覚神経による認識メカニズムの解明

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科
越阪部奈緒美

1. 背景

ポリフェノールは最大の多様性を示す植物二次代謝産物群であり、現在8000種以上が同定されており、我が国ではトクホや機能性表示食品の関与成分として広く普及している。また、植物性食品の黄色～紫といった色調、あるいは苦味・渋味といった官能特性を示すことから、食文化においても重要な成分である。2022年4月には、カカオ由来のポリフェノール画分を2.1万人の高齢者を対象に3.6年間摂取させた介入試験結果が報告され、約30%の心血管系疾患死の低減が確認された¹⁾。一方2000年代初頭には、食品から摂取したポリフェノールは消化管からは吸収されず、そのほとんどが糞便へと排泄されることが明らかとなったことから²⁾、現在ではポリフェノールの標的臓器は消化管であると考えられている²⁾。ポリフェノールは抗菌物質であり腸内細菌叢を変動させることが知られている。そのため、腸内細菌バランスの変動や変化した細菌叢が生成する代謝物がなんらかの機能性を示すのではないかとする「腸内環境説」が唱えられているが³⁾、証明には至っていない。他方多くの介入試験において、ポリフェノールを豊富に含む食品の摂取2時間後には、末梢血管内皮細胞機能の亢進が認められることが報告されている⁴⁾。我々は実験動物で再現する試験系を開発し、様々なポリフェノール類の作用を比較した⁵⁾。その結果、渋味を呈するポリフェノールにおいて、摂取直後から骨格筋血流量の顕著な上昇が観察されたことから、この効果は、腸内環境に依存しないのではないか、また神経系を介して認識される渋味そのものが、生理的な変動を与えるのではないかと考えた。そこで本研究では、(-)-epicatechin (EC) およびその四量体

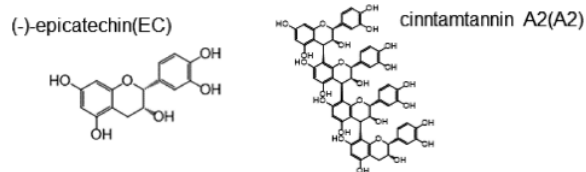


図1 渋味モデル化合物の化学構造

である cinntamtannin A2 (A2) を渋味モデル化合物 (図1) として用い、渋味の認識メカニズムを解明することを目的として実験を進めた。

2. 実験方法および結果

ポリフェノールは電気化学的に強い活性を示す化合物であり、特に pH の上昇によって安定性が顕著に低下し、酸化分解することが知られている。一方、口腔・小腸・大腸の pH は中性であることから、消化管を模した条件における EC および A2 のレドックス特性を発光試薬 MPEC を用いて観察した。中性条件下でキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系を用いて発生させた O_2 に対して、EC は低濃度でプロオキシダント、高濃度でアンチオキシダント活性を示したのに比較し、A2 はいずれの濃度においても O_2 産生を増加させた (図2)。

次にウレタン麻酔下で挙筋筋をプレパレーションした Wistar 系雄性ラットにカニューレから EC または A2 を $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与し、挙筋筋細動脈血流量をレーザー Doppler 法で計測したところ、投与直後から EC では若干の、

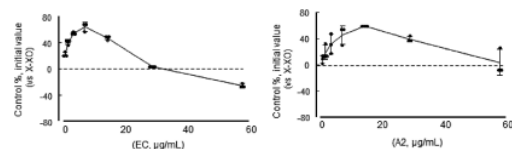


図2 EC (左) または A2 (右) のレドックス特性
キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生させた O_2 -MPEC 発光量に対する割合で示した。

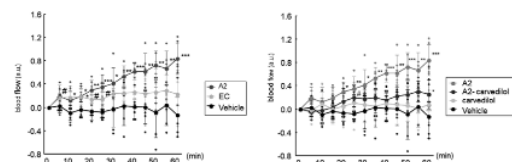


図3 EC または A2 経口投与後のラット骨格筋血流量の変化 (左) および A2 と促進性アドレナリン受容体阻害剤 (carvedilol) 共投与後の血流量の変化 (右)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs vehicle.

また A2 では顕著な血流量の上昇が見られ、A2 のこの効果は促進性アドレナリン受容体ブロッカーであるカルベジロールの共投与によって阻害された (図3)。

これらのことから、A2 は交感神経活動亢進を介して、血流量を上昇させることが推測された。また同様に、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を共投与した場合、A2 の血流量上昇作用はキャンセルされたことから、A2 が産生を促進する活性酸素が作用の発現に関与することが示唆された (図4)。感覚神経終末上には侵害受容器であ

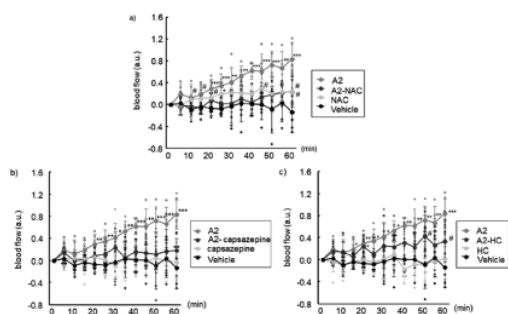


図4 A2 と抗酸化剤 (NAC) 共投与 (a), A2 と TRPV1 阻害剤 (capsazepine) 共投与 (b), A2 と TRPA1 阻害剤 (HC03001) 共投与 (c) 後血流量の変化
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs vehicle.

る Transient receptor potential (TRP) チャンネルが分布し、活性酸素を認識することが知られている⁶⁾。そこで TRP vanilloid (V) 1 阻害剤であるカプサゼピン、あるいは TRP ankyrin (A) 1 阻害剤である HC030031 を A2 と併投与したところ、カプサゼピンでは血流量上昇がキャンセルされ、HC030031 では部分的に抑制されることが示された (図4)。

これらのことから、作用の発現には活性酸素を認識する TRP チャンネルが関与することが示唆された。次に、EC や A2 と TRPV1 あるいは TRPA1 との相互作用をモデリングシミュレーション法で推測することとした。図5に示したように EC あるいは A2 の TRP チャンネルとの結合エネルギーは、それぞれのリガンドであるカプサイシンやアリルイソチオシアネート (AITC) と比較して非常に高く、直接的に結合することは難しいことが予測された (図5)。

3. 考察と今後の展望

以上のことから、ポリフェノール摂取直後に観察される末梢血流量の上昇は、消化管内で発生する O_2^- とそれらを認識する TRP チャンネルが関与することが明らかとなり、TRP チャンネルが渋味受容体である可能性が示された (図6)。この仮説を立証するためには、TRP チャンネルノック

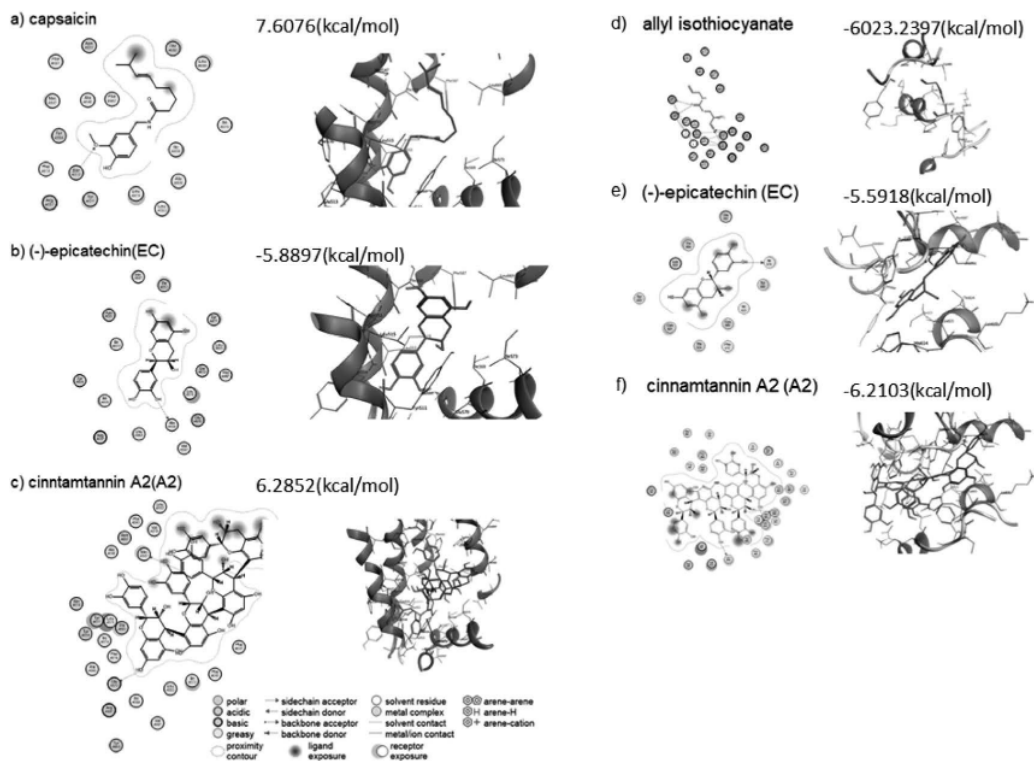


図5 TRPV1 (a-c) または TRPA1 (d-f) とそれぞれのリガンドあるいは EC・A2 とのモデリングシミュレーション (左, 2D; 右, 3D) と結合エネルギー

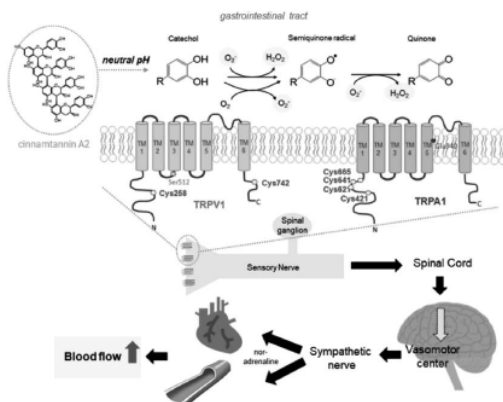


図6 渋味の認知機構と生体調節作用（仮説）

アウトマウスや電気化学的に不活性なポリフェノール誘導体を用いた検証が必要である。また、ポリフェノール摂取直後には認知機能の改善や脳血流量の増加が報告されていることから、「渋味」と脳機能の関係性についても更なる検討を重ねる予定である。

引用文献

- 1) Sesso HD, et al. Am J Clin Nutr. (2022) 115, 1490-1500
- 2) Baba S et al. Free Radic Biol Med. (2002) 33,142-8
- 3) Balzerani F et al. NPJ Syst Biol Appl. (2022) 8, 24.
- 4) Osakabe N & Terao J. Nutr Rev. (2018) 76, 174-186
- 5) 越阪部奈緒美 他, 中枢神経賦活化剤, PCT/JP2021/012174
- 6) Clapham DE. Nature. (2003) 426, 517-24

新規組成バイオプラスチックの微生物合成を目指したモノマー供給酵素活性向上変異体の創出

岩手大学農学部
山田美和

【研究の背景と目的】

世界規模で深刻となっているマイクロプラスチック問題の解決策のひとつとして、生分解性プラスチックの微生物合成法の開発がある。近年、天然のバイオプラスチック重合酵素の改変により、非天然のグリコール酸(GA)モノマーを取り込んだpoly(glycolate-co-3-hydroxybuturate) [P(GA-co-3HB)] 共重合体 (GA ポリマー) の生合成が可能になった [S. Taguchi, M. Yamada et al., Proc Natl Acad Sci USA, 105, 17323 (2008), K. Matsumoto et al., J Biotech, 156, 214 (2011)]. 合成された GA ポリマーの物性解析によって、ポリマー中の GA 分率を向上させることができれば、優れた弾性能や生分解性の制御など、既存の生分解性プラスチックにはない新たな機能の開発が期待できるとわかってきた。そこで、本研究ではポリマー中の GA 分率を高める戦略として、培地へ GA を添加する従来法から、細胞内の GA 生産法に切り替えることを考案している。細胞内部で GA を高濃度に生産し、ポリマー鎖内への GA 取り込み効率を上げるための新規代謝経路を構築する。原料はエチレングリコール（産業廃棄物の主成分）とし、細胞内に流入すると同時に GA に変換され、GA 高分率の共重合コポリマーが合成されるデザインである（図1）。我々はすでに、試薬のエチレングリコールから GA への細胞内変換の基盤を開発してきたが、本研究では GA 供給酵素の活

性向上変異体作成によって、細胞質内に高濃度に GA モノマーを合成し、GA 凝縮環境で重合系と連動して、化学合成でも報告のない GA 高分率ポリマーの合成系構築の実現を目指す。

【研究成果】

多くの先行研究において、*Escherichia coli* 由来 lactaldehyde

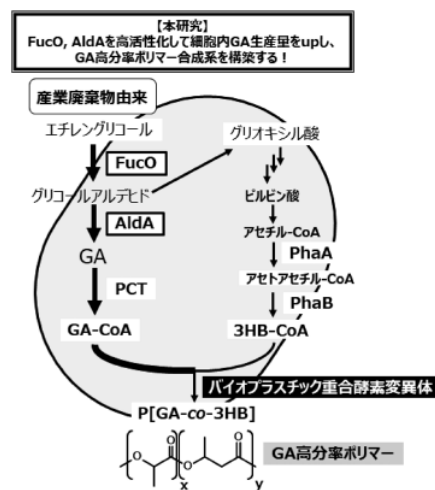


図1 本研究で目指す GA 高分率ポリマー合成経路

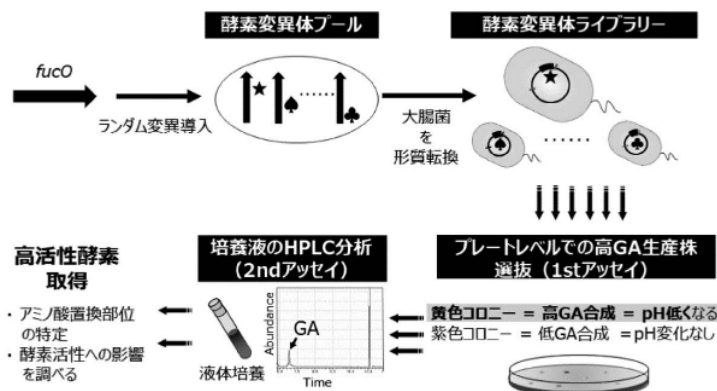


図2 GA合成量を向上させるFucO高活性変異体のスクリーニング方法

reductase (FucO) と lactaldehyde dehydrogenase (AldA) を過剰発現させた組換え *E. coli* によるエチレングリコールを基質としたGA合成が報告されているが、生産性の低さが課題であった。そこで、我々は、本反応系における律速酵素と推定された *fucO* にランダム変異を導入したライブラリーから、GA生産性を向上させるFucO高活性変異体を探索した。高活性変異体のスクリーニングアッセイでは、*fucO* 変異体ライブラリー遺伝子と *AldA* を共発現させるプラスミドを導入した大腸菌においてGAを合成させ、GA合成量が高いと培地中のpHが低下するという現象を利用した。具体的には、プレート培地にpH指示薬を添加し、低pH(本実験の場合黄色)の呈色を示したコロニーを選抜する方法を構築し、採用した(図2)。

スクリーニングの結果、エチレングリコール添加培地での培養時に、野生型FucOを導入した際の組換え大腸菌と比較してGA合成量を1.3倍程度向上させるFucO変異体mf2-9を4,600コロニーの中から取得した。このmf2-9変異体は、3塩基のミスセンス変異(アミノ酸置換はD23E, E222K, G363S)、と2塩基のサイレント変異(c.93G>A, c.1131T>C)を有していた。我々は、最初に、mf2-9におけるミスセンス変異がGA合成量の向上に寄与していると考え、FucO(D23E/E222K/G363S)変異体を作製したが、GA合成量は野生型FucOを用いた場合と差がなかった。そこで、サイレント変異のみを導入したFucO変異体を作製した結果、FucO c.1131T>C変異体は、野生型の1.3倍のGAを合成し、mf2-9と同等のGA合成量を示した。よって、mf2-9におけるGA合成量の向上は、FucOのc.1131T>Cサイレント変異の影響によるものであることが強く示唆された。

さらに、このFucOサイレント変異は、同プラスミド上

でオペロンを形成し、*fucO* 遺伝子の下流に位置している *aldA* の発現量を向上させることが、SDS-PAGEや酵素活性測定によって確認できた。そこで、*AldA* のmRNA量をReal time PCR法により比較分析したところ、サイレント変異導入の有無によって *AldA* のmRNA量に有意な差はなかった。一方で、mRNAの安定性を計算した結果、FucOへのサイレント変異導入によってmRNAの局所的不安定化(高次構造形成しにくいこと)が予測され、*fucO* 遺伝子下流に存在する *aldA* のSD配列にリボソームが結合しやすくなり、*aldA* 発現量が向上した可能性が示唆された。さらに、本成果によって、本系におけるGA合成では、FucOではなく、予想外に *AldA* の反応が律速であることが示唆された。

今後は、得られた成果・知見を基に大腸菌におけるさらなるGA合成量の向上を目指すとともに、エチレングリコールを原料としたGA高分率なGAポリマーの微生物合成を試みる。

【学会発表】

1. 村主 渉, 杉森大助, 山田美和, 生物工学会北日本支部 2021年度第一回オンライン若手シンポジウム (2021)
2. 太田陽介, 山田美和, 第7回デザイン生命工学研究会 (2022)
3. 村主 渉, 山田美和, 日本農芸化学会2022年度大会 (2022)
4. 根本真夕, 村主 渉, 杉森大助, 山田美和, 日本農芸化学会2023年度大会 (2023)
5. CHEN SHUTING, 村主 渉, 杉森大助, 山田美和, 日本農芸化学会2023年度大会 (2023)

【謝辞】

助成くださっ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。

11. 第1回若手女性研究者チャレンジ研究
助成金報告書

第1回農芸化学若手女性研究者チャレンジ研究助成報告書

カルノシンの筋幹細胞および筋再生における 生理的役割の解明, および応用

広島大学大学院統合生命科学研究科
Thanutchaporn Kumrungsee

研究の背景及び目的

カルノシン (β -アラニル-L-ヒスチジン) は骨格筋において豊富に存在するイミダゾールジペプチドファミリーの一つである。骨格筋に対するカルノシンの保護効果が示唆されているが, *in vivo* においてはカルノシン摂取による運動能力の改善効果が示されている程度であり, 生理機能は未だ解明されていない。本研究では, 骨格筋より単離した単一筋線維細胞やカルノシン合成酵素遺伝子欠損マウス (カルノシン欠損マウス) を用い, 筋衛星細胞の観察と骨格筋再生モデルを作製することで, カルノシンの新規生理機能を探索する。

研究の結果

1. 骨格筋の損傷・再生過程におけるカルノシンの動員

骨格筋の損傷・再生過程では, 損傷誘発後12時間以内に筋線維の壊死が急速に起こり (図1B), その後24時間後に炎症性細胞の浸潤が起こる (図1C)。受傷後48時間 (図1D) には, 死筋細胞の除去のために, より多くの炎症細胞が受傷部位に集められる。受傷後5日目には筋再生が始まり, 中心部に核を持つ新しい筋線維が生成される (図1E)。受傷後10日目には, 新しく再生した筋線維が成長し, 大きくなる (図1F)。

本研究で, 筋肉の損傷・再生過程でカルノシンが動員される極めて興味深い結果が得られた。図2Aにおいて, 骨格筋のカルノシンは, 筋線維の壊死が始まる受傷後12時

間で急速に減少し, 筋再生が始まる受傷後5日で増加し始め, 筋線維の成長が始まる受傷後10日で基底レベルにまで回復した。一方, 骨格筋タンパク質から放出される Leu, Val, Ile などの遊離アミノ酸は, 受傷後徐々に増加した後, 炎症と死筋細胞のクリアランスが顕著になる受傷後48時間から有意に増加した。この遊離アミノ酸の増加は, 受傷後5日目まで持続し, 受傷後10日目には基底レベルにまで低下した。

次に, カルノシン代謝に関わる酵素の発現を調べたところ, カルノシン分解酵素であるカルノシナーゼ (CNDP1) は, 受傷後12時間で発現レベルが顕著に上昇し (図2B), 2日目から10日目まで基底レベルに戻った。逆に, カルノシン合成酵素であるカルノシンシンターゼ (CARNS1) の発現は受傷後12時間で著しく下がり, その後徐々に上昇し受傷後10日目で基底レベルに戻った。この結果は, 損傷後12時間でカルノシンが急速に減少したこと (図2A) の理由となるものである。

これらの結果から, 骨格筋は筋外傷に応答して, 自身の筋タンパク質を分解する前に, まずカルノシンを分解することが示された。このことは, カルノシンが筋タンパク質の分解を防ぐことで, 筋萎縮を予防・遅延させるために重要であることを示唆していると考えられる。

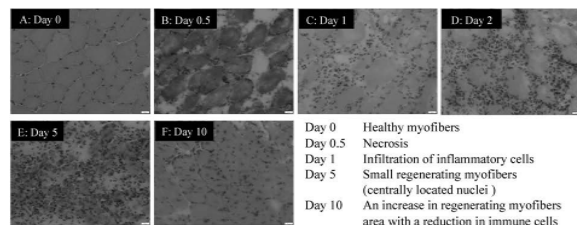


Fig. 1 Time course changes in skeletal muscle histology during muscle injury/regeneration process

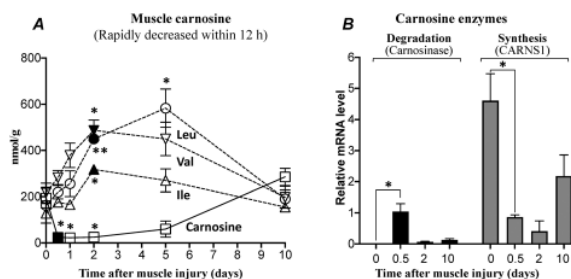


Fig. 2 Mobilization of muscle carnosine and its enzymes during muscle injury/regeneration

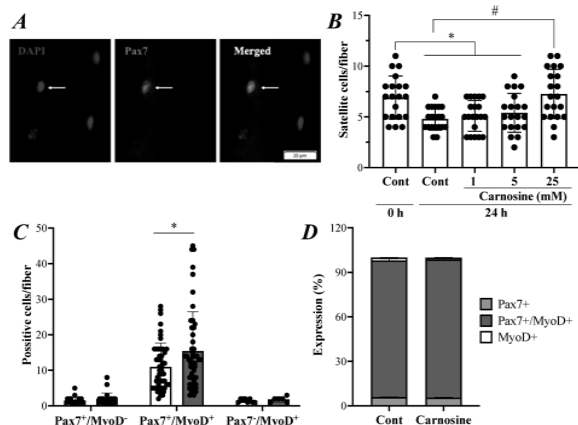


Fig. 3 Carnosine (25 mM) supplementation in plating medium induces the higher number of SCs on myofibers cultured for 24 h (A, B) or 48 h (C, D). Pax7⁺/MyoD⁺, Pax7⁺/MyoD⁻, and Pax7⁻/MyoD⁺ indicate self-renewal, proliferating, and differentiation committed SCs, respectively. n=20-50 myofibers/treatment group

2. カルノシンの筋衛星細胞に与える影響

2.1. 外来性カルノシンの筋衛星細胞への影響

次に、カルノシンが骨格筋幹細胞である衛星細胞に対して何らかの影響を及ぼすかどうかを、単一筋線維を用いて検討した。CD1 マウスの長指伸筋から単一筋線維を分離し、カルノシンを 1, 5, 25 mM で含む生理的濃度培地で 24 時間培養した。図 3A は、筋線維の衛星細胞の Pax7 と Pax7 抗体の特異的結合を示す。図 3B に示すように、培地中にカルノシンを添加しない場合、単一筋線維当たりの衛星細胞の数は、24 時間培養後には、単離した直後 (0 時間) と比較して減少しており、衛星細胞は活性化後に細胞死を起こしている可能性が示された。しかし、カルノシン (25 mM) を培地に添加することで、このような衛星細胞数の減少を防ぐことができた。さらに、筋線維の培養時間を 48 時間に延長したところ、衛星細胞の増殖を示す Pax7⁺/MyoD⁺ の核数は、コントロール培養と比べて、カルノシン存在下で多くなった (図 3C)。活性化後 24 時間で衛星細胞の数は有意に減少するため (図 3B)、Pax7⁺/MyoD⁻ (自己複製)、Pax7⁺/MyoD⁺ (増殖)、Pax7⁻/MyoD⁺ (分化) 核の割合を算出したところ、有意な差は見られなかった (図 3D)。この結果から、カルノシンは、自己複製や増殖の過程、および細胞分化には影響を与えない可能性が高いが、活性化後 24 時間の衛星細胞の初期細胞死に対する感受性を低下させることが示唆された。

2.2. 内因性カルノシンの筋衛星細胞への影響

衛星細胞の感受性に対するカルノシンの影響を確認するために、カルノシン欠乏マウスの長指伸筋から単一筋線維

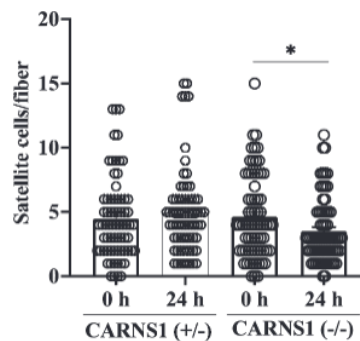


Fig. 4 The number of SCs on myofibers isolated from CARNS1 (+/-) and CARNS1 (-/-) mice cultured for 0 h or 24 h. n=70 myofibers/treatment group

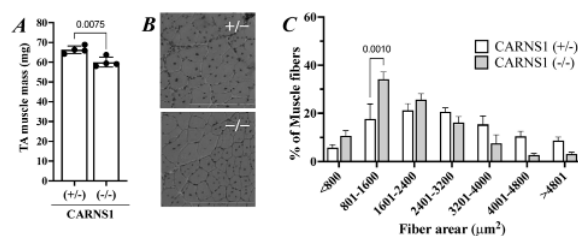


Fig. 5 Carnosine deficient mice (CARNS1 (-/-)) exhibited lower muscle growth or muscle hypertrophy. (A) Regenerating muscle mass, (B) regenerating myofiber size, and (C) distribution of regenerating myofiber area.

を分離し、24 時間培養を行った。図 4 において、カルノシン欠乏マウス (CARNS1 (-/-)) は、静止期 (0 時間、培養していない) において、CARNS1 (+/-) と比較して、筋線維上の衛星細胞数が同程度であり、静止状態の衛星細胞プールに対してカルノシンの影響がないかほとんどないことが示された。しかし、24 時間培養後、カルノシン欠乏マウスの衛星細胞数は有意に減少した。このことは、衛星細胞が最も脆弱である活性化の初期段階において、カルノシンが衛星細胞の細胞死を防ぐのに重要である可能性を示しており、2.1 の知見を支持していると言える。

3. カルノシンの筋再生への影響

カルノシンが筋再生に何らかの影響を及ぼすかどうかを調べるため、カルノシン欠乏マウスの前脛骨筋をカルジオトキシン (CTX) 注射により損傷した。損傷後 5 日目では、CARNS1 (-/-) マウスと CARNS1 (+/-) マウスの間で再生筋量と筋線維大きさに有意差はなかった。しかし、筋損傷後 1 か月回復させた後、再び損傷したところ、CARNS1 (-/-) マウスは CARNS1 (+/-) マウスに比べて、再生筋量が著しく低く、筋線維が小さいことがわかった (図 5)。この結果は、カルノシンは筋再生の初期にはあまり影響を及ぼさないが、筋再生後の筋成長 (筋肥

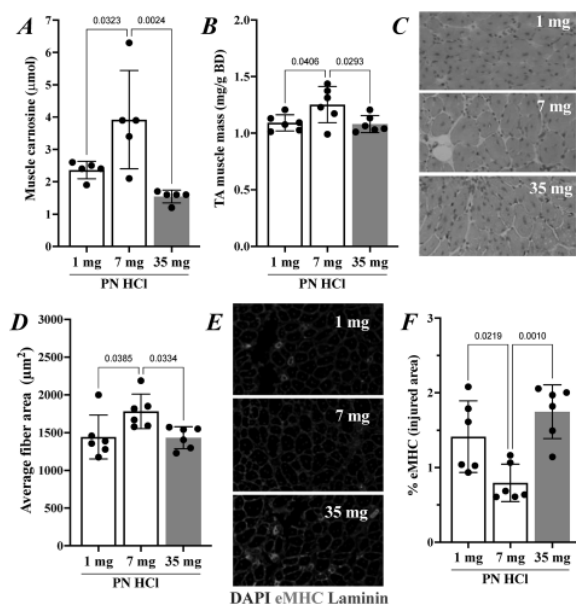


Fig. 6 Vitamin B6 deficient (1 mg) and supplemented (35 mg) diets cause delays in muscle regeneration following 10 days of injury. Carnosine levels in skeletal muscles (A), regenerating muscle mass (B), myofiber size (C, D), and eMHC expression levels (E, F). PN HCl; pyridoxine hydrochloride, eMHC; embryonic myosin heavy chain

大)時に、筋量や筋線維の大きさを維持するために重要である可能性を示している。

4. ビタミン B6 の筋肉再生への影響

次にビタミン B6 がカルノシンの強力な調節因子であることを示す。図6Aにおいて、ビタミン B6 欠乏食 (1 mg/kg 食餌) および過剰食 (35 mg/kg 食餌) は、ビタミン B6 推奨レベル食 (7 mg/kg 食餌) と比較して、骨格筋のカルノシン濃度を有意に低下させた。この結果は、我々のグループの以前の研究結果 (1) と一致する。また図6B-D に示すように、ビタミン B6 の欠乏は、ビタミン B6 推奨レベルと比較して、再生筋量が少なく、筋線維が小さいことから、筋再生に障害を与えた。我々の予想に反して、ビ

タミン B6 の過剰も筋肉の再生を悪化させた。ビタミン B6 欠乏食および過剰食摂取時における筋肉の修復・再生の遅延は、eMHC 面積が高いことでも確認された (図6E, F)。この結果は、ビタミン B6 の適度な摂取が、適切な筋肉再生プロセスに重要であることを示唆している。

5. ビタミン B6 の筋衛星細胞への影響

単一筋線維を用いてさらに検討したところ、ビタミン B6 欠乏が、静止状態の衛星細胞数を減少させ、その増殖と自己複製を抑制しているように見えることを明らかにした。さらに、ビタミン B6 欠乏培地が、C2C12 筋細胞におけるカルノシン生合成を抑制することを見出した。より詳細な結果は論文として発表している (2)。これらのことから、ビタミン B6 はカルノシンを誘導し、そのビタミン B6 の減少や欠乏は、衛星細胞の生存性や機能に悪影響を及ぼす可能性があることが仮説として導かれる。

結論

カルノシンが筋肉の損傷・再生過程に関与していることがわかった。筋肉の外傷に対して、カルノシンの分解は筋タンパク質の分解の前に行っている可能性が高い。カルノシンは、筋肉の成長または筋肥大に関与している可能性がある。カルノシンはまた、活性化された衛星細胞の感受性を調節する役割を果たす。カルノシンの強力な調節因子であるビタミン B6 については、ビタミン B6 の欠乏および高濃度摂取により、筋肉の再生に遅れが生じることを発見した。ビタミン B6 は、静止状態の衛星細胞プールを維持し、衛星細胞の増殖と自己複製を助ける役割を担っている。これらのことから、カルノシンとビタミン B6 は、サルコペニアを予防するための栄養素として期待される。

参考文献

- 1) Kumrungsee T. et al. Novel metabolic disturbances in marginal vitamin B6-deficient rat heart. *J. Nutr. Biochem.* 2019; 65: 26-34.
- 2) Komaru T. et al. Satellite Cells Exhibit Decreased Numbers and Impaired Functions on Single Myofibers Isolated from Vitamin B6-Deficient Mice. *Nutrients.* 2021; 13(12): 4531.

ヒザラガイ類のトランスクリプトーム比較に基づく 生物磁鉄鉱形成の分子基盤解明

岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域
根本理子

研究背景と目的

海岸の岩場などで見られる軟体動物のヒザラガイは、歯

舌と呼ばれる歯を持ち、その歯冠部に磁鉄鉱 (Fe_3O_4) を沈着させる。磁気メモリや二次電池の材料、MRI造影剤

などとして様々な分野で応用されている磁鉄鉱は、工業的には劇物存在下や90℃を越える高温条件下で合成される。ヒザラガイはタンパク質等の生体分子を使って、鉄の濃縮や酸化還元を制御することで生体内の穏和な条件下で磁鉄鉱を形成していると考えられる。ヒザラガイの磁鉄鉱形成を制御する生体分子を明らかにすることができれば、環境に優しい磁鉄鉱合成法の開発につながり、材料科学分野に大きなインパクトをもたらす。

筆者らは、ヒザラガイの磁鉄鉱形成機構を明らかにするため、世界最大のヒザラガイ、オオバンヒザラガイ (*Cryptochiton stelleri*) を用いて研究を行ってきた。ヒザラガイは、通常、歯舌の前方の数列の歯のみ摂餌に利用しており、歯が擦り減ると、新しく形成された歯が後方から前に押し出されることにより歯が新生される。そのため、歯舌組織中では常に新しい歯が形成されている。筆者らは、歯舌組織の発現遺伝子を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いてRNAシーケンス解析を行ない、トランスクリプトームデータを取得した。遺伝子発現解析を行なったところ、発現上位20位に鉄の輸送・蓄積に関わるフェリチン遺伝子が含まれており、歯舌組織が磁鉄鉱形成に特化した細胞から成る事が示唆された。次に、磁鉄鉱が沈着した歯からタンパク質を分離・抽出する方法を確立し、22個の磁鉄鉱菌特異的タンパク質を同定することに成功した。この中には、酸化還元タンパク質、鉄を酸化するフェロキシンダーゼの他に、既知のタンパク質に相同性を示さない機能未知の新奇タンパク質が含まれていた。これらのタンパク質は、歯内部で磁鉄鉱形成に関与している可能性が示唆された (Nemoto, et al. 2019)。一方で、歯舌組織の高発現遺伝子や磁鉄鉱菌特異的タンパク質が他のヒザラガイ類に共通するかは不明である。

そこで、本研究ではヒザラガイ類の歯舌組織のトランスクリプトームデータを比較し、歯舌組織の高発現遺伝子およびオオバンヒザラガイで見つかった磁鉄鉱菌特異的タンパク質ホモログを同定・比較し、ヒザラガイの磁鉄鉱形成に必要なタンパク質の最小セットを明らかにすることを目的とする。

結果および考察

本研究では、オオバンヒザラガイ *C. stelleri* のほかに新たに3種のヒザラガイ類、ヒザラガイ (*Acanthopleura japonica*)、ヒメケハダヒザラガイ (*Acanthochitona achates*)、ババガセ (*Placiphorella stimpsoni*) についてコンテイング数約10万個、ORF数約4万個の歯舌組織トランスクリプトームデータを構築した。

構築した4種のヒザラガイ類の歯舌組織トランスクリプ

トームデータを比較し、ヒザラガイ類が共通して有する磁鉄鉱菌の形成に関与する可能性のある遺伝子を探索した。相同性検索を行った結果、オオバンヒザラガイから同定された22個の磁鉄鉱菌特異的タンパク質のホモログが他の3種のヒザラガイ類の歯舌組織で共通して発現していることが明らかとなった。特に、オオバンヒザラガイで同定された機能未知の新奇タンパク質のホモログが全てのヒザラガイ類から同定されたことから、磁鉄鉱菌特異的な新奇タンパク質はヒザラガイ類のみに存在するタンパク質である事が示唆された。

次に、4種のヒザラガイ類の歯舌組織で共通して高発現している遺伝子の探索を行った。オーソログ解析を行った結果、9,400個の Orthogroups (解析対象種における共通祖先の1つの祖先遺伝子から派生した遺伝子グループ) が4種のヒザラガイ類の歯舌組織で共通して発現していることが明らかとなった。共通だった9,400個の Orthogroups について、ドメイン検索及びリード数から推定した発現量データを用いて、発現量が特に高いグループで、高頻度で出現するドメインを調査した。解析の結果、発現量が高いグループにはキチン結合ドメインが高頻度で出現した。これらの遺伝子の中で、機能が明らかになっているものには、キチン繊維の配列を制御する Obstructor E や、キチンの分解反応を触媒する Chitotriosidase 1、キチンの脱アセチル化反応を触媒する Chitin deacetylase をコードする遺伝子が含まれていた。ヒザラガイ類の歯はキチンを主成分とする基盤構造上に形成される。従って、ヒザラガイ類の歯舌組織で共通して高発現していたキチン結合タンパク質は、基盤構造の形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

オオバンヒザラガイの歯舌組織では鉄の貯蔵及び輸送に関与するフェリチンタンパク質が高発現しており、歯の形成に必要な鉄の輸送に関与していることが示唆されている。そこで、フェリチン遺伝子について解析を行ったところ、4種のヒザラガイ類の歯舌組織では細胞質型と分泌型の2種類のフェリチンが発現していることがわかった。トランスクリプトームデータのリード数から、各フェリチン遺伝子の発現量を推定した結果、細胞質型のフェリチンの発現量は分泌型の30倍以上であり、最大数千倍高発現していた。以上の結果より、ヒザラガイ類の歯舌組織では細胞質型のフェリチンが分泌型のフェリチンと比較して高発現していることが明らかとなった。

4種のヒザラガイ類の歯舌組織で共通して発現していた遺伝子について、歯の形成に伴う発現量変化を解析した。酸化鉄が沈着していない形成初期の透明の歯列をステージ1、赤茶色を呈し、非晶質の酸化鉄 (フェリハイドライト)

が沈着している菌列をステージ2, その後, 酸化鉄が結晶化し, 黒色の磁鉄鉱が沈着した菌列をステージ3とし, 各ステージにおける遺伝子発現量を解析した. その結果, キチン結合タンパク質の多くが菌の基盤構造が形成されるステージ1で最も高発現しており, 菌の形成初期において重要な役割を果たす可能性が考えられた. また, 細胞質型フェリチン遺伝子の発現量はステージ1で最も高く, 形成初期の菌への鉄の輸送に関与していることが示唆された. 一方, 22個の磁鉄鉱菌特異的タンパク質遺伝子について発現量を解析した結果, 酸化還元タンパク質である peroxiredox-

in 6 遺伝子およびヒザラガイ類に特異的な新奇タンパク質の遺伝子がステージ2で高発現しており, これらのタンパク質が酸化鉄の沈着に関与していることが示唆された. 上記結果の1部を日本農芸化学会中四国支部会第58回講演会(例会)で報告した(現在論文投稿準備中).

謝辞

本研究を支援いただきました日本農芸化学会に深く感謝致します.

12. 2020年度農芸化学若手女性研究者賞 報告書

2020年度農芸化学女性研究者賞報告書

種子植物の生殖器官における発熱分子機構と ミトコンドリア特性に関する研究

宮崎大学農学部
稲葉靖子

背景・目的

種子植物の花（花序や球果を含む）による発熱には、訪花昆虫の誘引や昆虫との相利共生等、原始種子植物の生殖機構に絡む主要な役割がある。一般的に、花の温度を外気温に対して0.5℃以上上昇させる能力を持つ植物のことを「発熱植物」と呼び、発熱能力の高い植物では、花の温度が外気温に対して20℃以上も上昇する。これまでに報告された発熱植物の中で、約半数は裸子植物のソテツ（ソテツ科とザミア科から成る）が占め、残りを占める被子植物の大部分はサトイモ科植物である¹⁾。これまでのトランスクリプトーム解析から、植物の発熱組織や発熱期に発現が上昇する遺伝子は多数同定されているが、これら遺伝子の機能解析は、これまでシロイヌナズナや酵母を用いて行われており、発熱植物の細胞を用いて機能解析を行う手法は確立されていなかった。そこで本研究では、サトイモ科発熱植物からプロトプラスト（細胞壁を酵素的に除去した細胞）を調製して、当該細胞における一過的遺伝子発現（PTE: Protoplast-based transient expression）法の確立を目指した。

方法・結果

最初に、サトイモ科発熱植物の中で、発熱能力の高いザゼンソウ（*Symplocarpus renifolius*）を用いて、実験を行った。

まず、本植物の葉から、純度の高いプロトプラストを、高い収量（ 1.0×10^5 /g Fresh Weight）で調製する方法を確立した（図1）。続いて、調製したプロトプラストに対して、ポリエチレングリコール法により、35S::GFPのトランスフェクションを行った。その結果、50%程度の良好なトランスフェクション効率を得られ、かつ、GFPタンパク質は、細胞内の核を中心に局在した。さらに、植物ミトコンドリアにおいて発熱に強く関与すると推定されているタンパク質の中から、シアン耐性呼吸酵素（SrAOX1）、脱共役タンパク質（SrUCPA）、或いはタイプII NAD（P）H脱水素

酵素（SrNDA1）とGFPとの融合タンパク質を、当該プロトプラストで発現させたところ、SrAOX1-GFP、SrUCPA-GFP、SrNDA1-GFPはいずれもミトコンドリアに局在することが判明した（図2）。ただし、SrUCPA-GFPを発現したプロトプラスト内のミトコンドリアは、SrAOX1-GFP、SrNDA1-GFPを発現した場合に比べて、個々のミトコンドリアが凝集したような大きな塊として観察された。

次に、ザゼンソウの葉で確立したPTEシステムが、発熱性を持つ植物の発熱器官に適用できるかを検証するため、ザゼンソウ（*S. renifolius*）およびクワズイモ（*Alacasia odora*）の花序を用いて、実験を行った。

まず、葉と同様の方法で、ザゼンソウの発熱器官である肉穂花序からプロトプラストを調製したところ、球形のプロトプラスト様細胞を単離することができ、これらの細胞に対しては、35S::GFPのトランスフェクションも成功した。しかしながら、当該プロトプラストは、収量もトランスフェクション効率もともに低く、安定した結果を得ることはできなかった。一般的に、発熱能力の高い植物細胞の多くは、固い細胞壁に覆われており、このことが、ザゼンソウ花序からの安定的なプロトプラスト調製を困難にしているのではないかと考えられた。

そこで、ザゼンソウ花序よりも発熱能力が低いクワズイモを利用して、実験を進めることにした（図3）。クワズイモは、一つの花序内に、発熱能力の異なる複数の部位を持ち合わせている。ザゼンソウの花序が両性花であるのに対して、クワズイモの花序は単性花であり、上から付属体（Appendix）、稔性雄花（Male part）、不稔部位（Sterile part）、雌花（Female part）と分かれている（図3A）。付属体と稔性雄花が主たる発熱部位であり、不稔部位と雌花は発熱能力が微弱な部位である。本実験では、発熱期（thermogenic stage）のクワズイモ花序の4つの各部位から、PTE法によりプロトプラスト調製および35S::GFPのトランスフェクションを行ったところ、発熱能力が最も

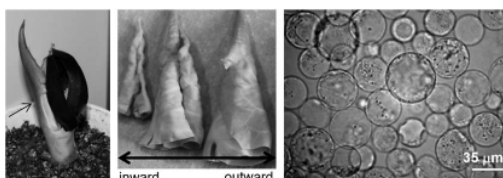


図1 ザゼンソウ葉由来プロトプラストの調製
(左) 鉢植えザゼンソウ。(真ん中) 左写真の矢印の葉を切り取り、外葉、中葉、内葉を並べた写真。(右) 調製したプロトプラスト。

低い雌花では、安定したプロトプラスト収量 ($2.90 \times 10^5/\text{g}$ FW) およびトランスフェクション効率 ($\sim 46\%$) を得ることができた (図3B)。一方で、不稔部位からのプロトプラスト収量は、値が一桁小さく ($4.38 \times 10^4/\text{g}$ FW)，当該プロトプラストへのトランスフェクションは成功しなかった。稔性雄花および付属体については、プロトプラストの回収もできなかった。続いて、発熱前 (pre-thermogenic stage) の花序の各部位からも同様の実験を行ったところ、発熱期花序を用いた実験と類似した結果が得られ、発熱能力が最も低い雌花では、安定したプロトプラスト収量 ($2.48 \times 10^5/\text{g}$ FW) およびトランスフェクション効率 ($\sim 50\%$) を得ることができた。一方で、不稔部位と雄花から、各々 $0.54 \times 10^4/\text{g}$ FW および $0.94 \times 10^4/\text{g}$ FW の収量で調製できたが、トランスフェクション効率とはともに極めて低かった。付属体については、プロトプラストの回収はできなかった。

今回、我々は、サトイモ科発熱植物の葉および花序からプロトプラストを調製して、当該細胞における PTE 法の確立に関して、一定の成果を得た²⁾。本システムは、今後、花の発熱を調査する有効な生物学ツールとして利用できるものである。しかしながら、発熱能力の高い植物組織では、プロトプラストの収量が低かったり、トランスフェクション効率が低かったりして、現時点では、本システムが十分に機能しているとは言い難い。先に述べたように、発熱能力の高い植物細胞は固い細胞壁に覆われていることが多いため、プロトプラスト調製の際の細胞壁を分解する工程を見直す必要がある。また今回、ザゼンソウのように発熱能力が高い植物ではなく、クワズイモのように発熱能力が低～中程度の植物を選定して実験をした方が良好な結果が得られたことから、PTE 法が有効に機能する新たな植物種の選定をしていく必要があるかもしれない。

プロトプラストは、植物研究では、必須の実験ツールであり、植物にみられる生理的応答や細胞活性 (概日時計、光応答、葉緑体形成プロセス、花弁の匂い物質整合性など) をそのまま維持する例も多い。したがって、植物の発熱組織から、発熱性を持つ、或いは発熱ポテンシャルを持つ

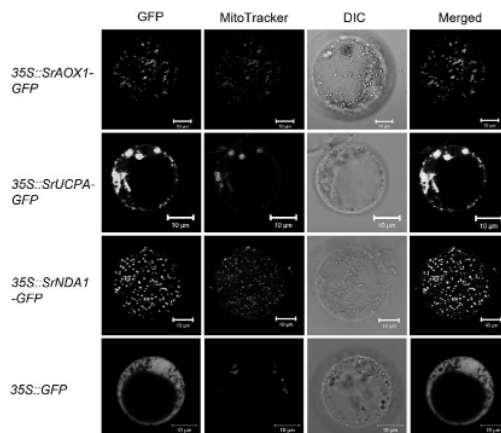


図2 ザゼンソウ葉由来プロトプラストにおける SrAOX1-GFP, SrUCPA-GFP, および SrNDA1-GFP の細胞内局在解析

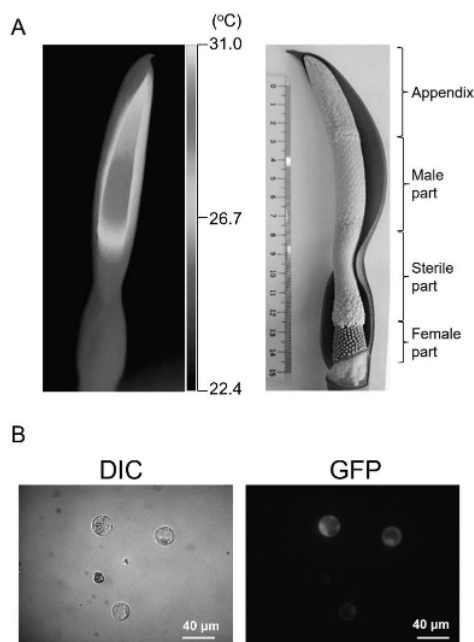


図3 クワズイモ発熱期花序からのプロトプラスト調製および *35S::GFP* によるトランスフェクション
(A) 発熱するクワズイモ花序の熱画像 (左) および可視画像 (右)。
(B) 雌花から調製したプロトプラスト (左) および GFP タンパク質による緑色蛍光が観察された細胞 (右)

プロトプラストを調製することは、不可能ではないと考えている。今後は、植物組織の選定を含めた一連の実験プロセスをハイスループット化して、各段階で実験の最適化を行うことにより、発熱性或いは発熱ポテンシャルを持つ細胞の調製を目指して行きたい。このような細胞を単離することで、例えば、ゲノム編集により発熱遺伝子をノックアウト

トして、細胞の発熱を抑える実験などを開始することができることから、植物の発熱機構を解明する上で、当該技術は、やはり欠くことのできない技術と考えている。

参考文献

- 1) 稲葉靖子, 大坪 雅. (2021) アロイドとサイカドから切

- り拓く発熱植物の新たな世界. 化学と生物 59(9): 426-434.
- 2) Maekawa, H., Otsubo, M., Sato, M.P., Takahashi, T., Mizoguchi, K., Koyamatsu, D., Inaba, T., Ito-Inaba, Y. (2022) Establishing an efficient protoplast transient expression system for investigation of floral thermogenesis in aroids. *Plant Cell Reports* 41(1): 263-275.

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、あらかじめ本会にて許諾を求めてください。

Copyright © 2023 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（2023）

2023年11月1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/> grant@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
