

# 公益社団法人日本農芸化学会 助成金受領者報告書 (2024)



—— 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19回農芸化学研究企画賞報告書 .....	5
3. 第3回夢にチャレンジ企画賞報告書.....	13
4. 第4回中小企業産学・産官連携研究助成報告書.....	21
5. 第50回研究奨励金報告書 .....	43
6. 第78回国際会議出席費補助金報告書 .....	55
7. 第79回国際会議出席費補助金報告書 .....	57
8. 第80回国際会議出席費補助金報告書 .....	63
9. 第2回女性研究者チャレンジ研究助成金報告書.....	67
10. 第2回若手女性研究者チャレンジ研究助成金報告書.....	75
11. 国際シンポジウム補助金報告書 .....	81

## 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
5年	2件	400万円			7件 700万円	1100万円

## 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
5年	5件	250万円	6件	140万円	390万円

## 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
5年	3件	300万円	3件	150万円	450万円

## 2. 第19回農芸化学研究企画賞報告書

# 第19回農芸化学研究企画賞報告書

受賞テーマ：タンパク質ビーズ法による人工天然物エキスの新規タウ分解分子のりの開発

慶應義塾大学理工学部生命情報学科  
荒井 緑

## 【研究の背景】

神経変性疾患であるアルツハイマー病は、タンパク質タウの異常なリン酸化ののちの凝集が発病の一因となることが知られている。本疾患の医薬として、近年開発されたアミロイドβの抗体医薬レカネマブが挙げられるが、抗体医薬は高価であり、広く用いられる根本的治療法の確立にはまだ道のりがある。

一方、疾病に関わるタンパク質をユビキチンリガーゼに強制的に近づけ、ユビキチン化の後、プロテアソーム分解させる化合物のことを近年、「分子のり」と呼び、脚光を浴びている。「分子のり」の先駆けは、FK506 (Liu, J. et al. *Cell* **1991**, 66, 807-815) であり、近年では抗がん剤のレナリドミド (Ito, T. Ando, H., Suzuki, T. et al. *Science* **2010**, 327, 1345-135) やインディスラム (Uehara, T. et al. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, 13, 675-680) が開発された。

## 【研究の課題】

疾病に関わるタンパク質を除去する分子のりは大変魅力

的な医薬候補であるが、その数は未だ少なく効率的な開発法が望まれている。本研究ではここ39年の新薬の約46%を排出し (D. J. Newman et al. *J. Nat. Prod.*, **2020**, 83, 770), その新薬への貢献が多である天然物から「分子のり」を、人工天然物エキスをを用いて申請者独自のプレートアッセイ及びタンパク質ビーズ法により見いだす方法論を構築することを目的とした (図1)。脳に多く発現しているE3ユビキチンリガーゼ複合体中の基質認識タンパク質であるcerebron (CRBN) を標的例とし、アルツハイマー病の原因タンパク質であるタウタンパク質を強制的に分解できる化合物を開発する。天然物に化学反応でCRBNを認識するリガンドを連結させ「人工天然物エキス」を作成する。この化合物の混合物である人工エキスより、タウタンパク質に結合する化合物を申請者独自の「タンパク質ビーズ法」で釣り上げる方法論を開拓する。またその活性は、CRBN プレートアッセイや、タウ強制発現細胞でのWestern blot や蛍光顕微鏡画像取得により評価する。

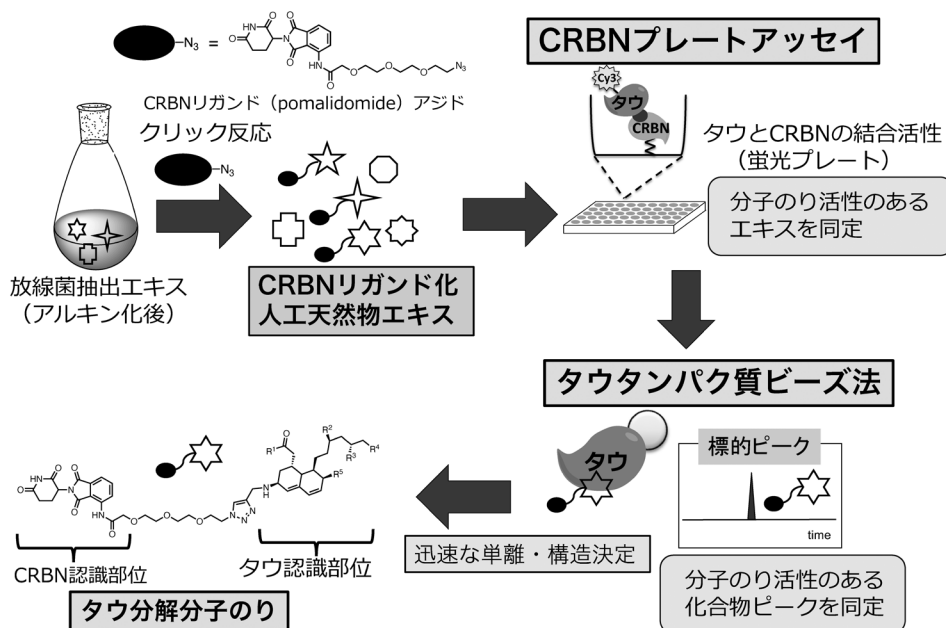


図1. 本研究の流れ

## 【研究の結果】

本研究ではユビキチンリガーゼの基質認識タンパク質としてCRBNを選択し、分解するタンパク質としてタウを選択した(図2)。まず、大腸菌を用いて、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として、CRBNとタウを発現することに成功した。続いて、人工天然物エキスをからタウに結合する化合物を釣り上げるための「タウタンパク質ビーズ法」の構築に成功した(図3)。本方法は、申請者がこれまで開発してきた「標的タンパク質指向型天然物単離法」であり、天然物の混合物である天然物エキスを標的タンパク質ビーズを混合することで、そのタンパク質に結合する化合物を釣り上げることができる。タウビーズ法も、GST-タウをグルタチオンビーズに結合させたタウビーズを作成し、エキスと混合することで化合物を釣り上げることができる。また、分子のりの活性を評価する、CRBNプレート法の構築にも成功した(図4)。CRBNをプレートの底に結合させ、そこにCy5で蛍光化したタウを添加する。化合物に分子のり活性があれば、蛍光が増大する。当研究室の放線菌エキスをスクリーニングしたところ、CC45株がヒットした。活

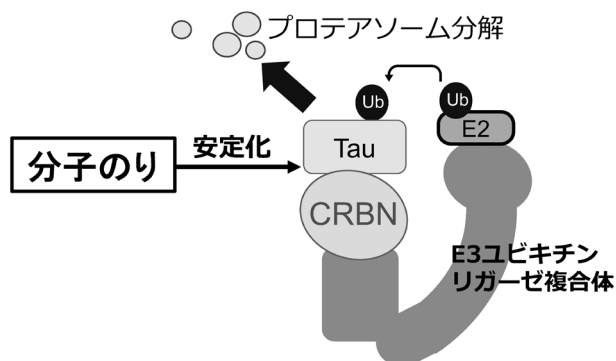


図2. タウとCRBNの結合を安定化する分子のり

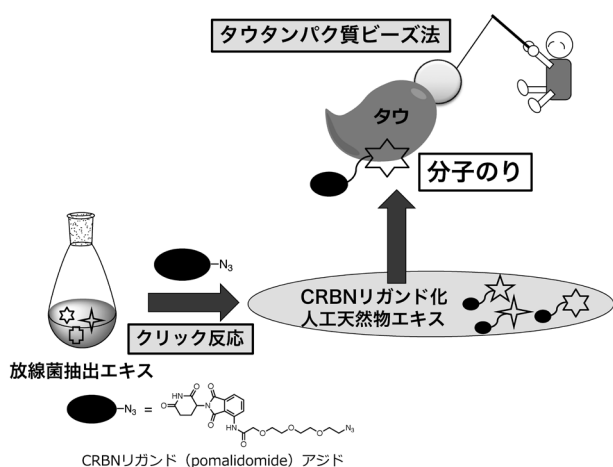


図3. 「人工天然物エキス」からの「タウタンパク質ビーズ法」による分子のりの釣り上げ

性を指標に化合物を単離したところ、compound AをCRBNとタウの分子のりとして単離、構造決定することに成功した。本化合物の活性を、タウを強制発現した細胞により評価したところ、タウとリン酸化タウを減少させることが示唆され、蛍光顕微鏡画像でもタウを減少させることを見いだしている(図5)。

タウ分子のり活性を有する化合物の評価法が確立したため、人工天然物エキスの構築検討を行った(図6)。まず、いくつかの当研究室の放線菌エキスをライブラリーから放線菌液体培養を行い、アセトン破碎を行い、酢酸エチルで抽出し放線菌エキスを作成した。そこに、プロパルギルプロミドを塩基性条件下で添加し、LC-MSで確認したところ、ポジティブコントロールとして混合させていたフェノール性化合物のアルキニル化を確認した。次にCRBNリガンドであるポマリドミドアジドを銅触媒存在下、反応させたところ、ポジティブコントロールとのクリック反応を確認することに成功した。

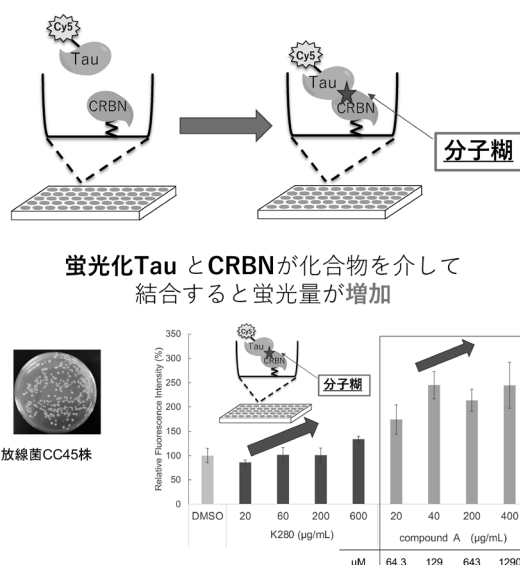
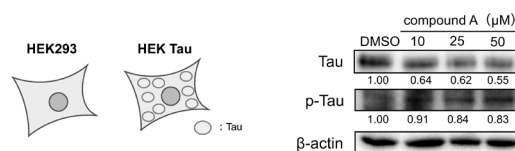
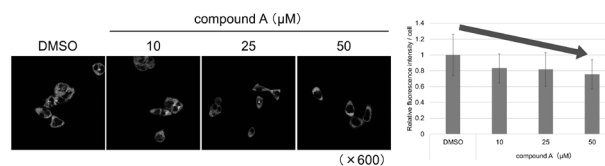


図4. CRBNプレートアッセイ



Compound Aはタウとリン酸化タウを減少させた。



Compound Aは蛍光化タウを減少させた。

図5. Compound Aのタウ分解活性



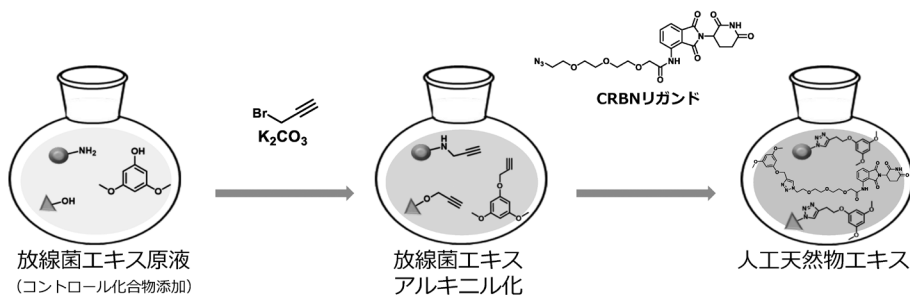
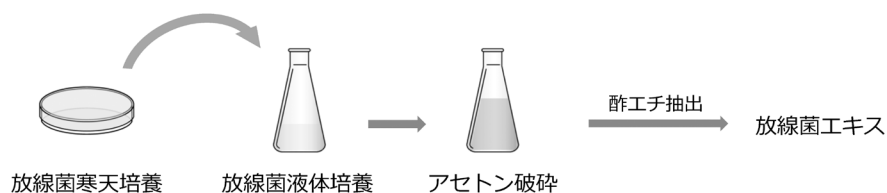


図6. 人工天然物エキス合成のスキーム

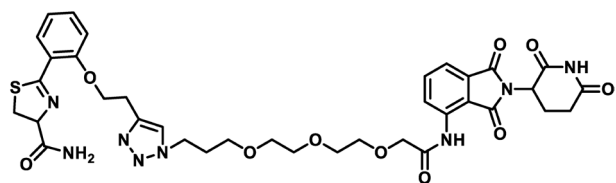


図7. プリカチンFとポマリドミドの天然物エキス内でのクリック反応での生成物

そこで、以前に天然物を単離している放線菌AY34株を用いることで、実際の天然物プリカチンとCRBNリガンドとの天然物エキス内でのクリック反応を試みた。そうしたところ、予想通り、天然物プリカチンFがアルキニル化され、さらにポマリドミドアジドとのクリック反応が進行した(図7)。

本結果により、天然物エキス内で、CRBNリガンド化天然物混合物(人工天然物エキス)を作成できることが証明された。現在、放線菌エキスライブラリーを用いて人工天然物エキスライブラリーを作成中であり、作成後は、タウビーズ法により、タウ結合能を有する化合物を単離して

いく。また分子の活性は、今回構築したCRBNプレートアッセイ、タウ強制発現細胞でのWestern blot、蛍光顕微鏡画像により評価していく。

#### 【今後の実用化への展望】

本研究により、ユビキチンリガーゼの基質認識タンパク質CRBNに結合するポマリドミドアジドを用いて、天然物エキスに含まれる天然物をアルキニル化した後にクリック反応が進む条件を確立することができた。天然物は非常に医薬に近い化合物群であり、その混合物のエキスを用いた効率的な分子の探索は、今後の分子の医薬を開発していく上で重要であると考えている。今後は、当研究室の放線菌エキスライブラリーを用いて、疾病タンパク質を分解できる分子のりやPROTACを創製していくことで、本手法の有用性を表明していきたい。

最後に、本研究企画書を審査、運営頂いた皆様方に、厚く御礼申し上げます。

受賞テーマ：昆虫エクジステロイド生合成酵素に対する阻害剤に注目した新規殺蚊剤開発に向けた研究

筑波大学 生存ダイナミクス研究センター  
丹羽隆介

#### 研究の背景

地球上で最もヒトを殺す危険な生物は、蚊である。世界保健機関の統計によれば、現在、マラリアや黄熱、デング熱、そしてジカウイルス感染症など、蚊が媒介する重篤な

感染症による死者は年間70万人にものぼる[World Health Organization (2020)]。そのため、蚊を適切に駆除することは、世界的に重要な課題と認識され、活発な研究が展開されている。

蚊によって媒介される感染症に対する防衛策として、現在広く用いられている方法の1つは、蚊に対して有効な殺虫剤の使用である。例えば、ピレスロイド系殺虫剤は、蚊集団抑制に効果的な安価な農薬として、世界中で広く使用され、社会的にも大きな貢献を果たしている。しかし、ピレスロイド系殺虫剤を含む既存殺虫剤に対して、抵抗性を示す蚊の出現が確認されている [Moyes et al., 2017]。このことは、残念ながら、既存殺虫剤は決して未来永劫に万能ではないことを意味する。これを回避するには、単一の薬剤に過剰に頼るのではなく、作用機序の異なる、しかも環境負荷の少ない複数の薬剤をローテーションすることで、薬剤抵抗性の出現を回避しつつ殺虫剤を利用する戦略が不可欠である。

害虫に対する高い殺虫能や成長阻害能を示しつつも、昆虫以外の生物に対して副作用がない薬剤として、昆虫特有の生命現象を攪乱する「昆虫成長制御剤 (Insect Growth Regulator; IGR)」がある [Jindra, 2021]。そして、昆虫の脱皮と変態を司る昆虫ステロイドホルモン「エクジステロイド」の働きを攪乱する薬剤は、優れた IGR となることが古くから議論されている。実際、エクジステロイドの核内受容体 EcR/USP に対する阻害剤であるジベンゾイルヒドラジン化合物は、殺虫剤として農業現場で使用されている [Nakagawa, 2005]。一方、エクジステロイドの「受容」ではなく「生合成」も IGR の有力なターゲットであるが、その実現のためにはエクジステロイド生合成酵素の同定が必要であった。そのような中で、2002年～2014年に受賞者を含む複数のグループによって、前駆体であるコレステロールから活性型エクジステロイドへの変換を担う酵素群がほぼ網羅的に同定された [総説: Niwa & Niwa, 2014; Kamiyama & Niwa, 2022]。これまでに同定されたエクジステロイド生合成酵素10種類のうちの7種類は、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼに属する。これを受けて、東京大学の片岡宏誌教授らによって、エクジステロイド生合成 P450 をターゲットにした IGR 探索が試みられた [片岡, 2013]。しかし、P450 タンパク質の精製と可溶化は困難である上、エクジステロイド生合成 P450 の活性はクロマトグラフィーと質量分析に頼る必要があり、多数の化合物を対象としたハイスループットスクリーニングは未だ困難である。

このような中で受賞者は、受賞者自身が同定した非 P450 型のエクジステロイド生合成酵素 Noppera-bo (略称 Nobo) [Enya et al., 2014; 2015] をターゲットとすることで、上述の問題点を解決した。すなわち、Nobo は、グルタチオン S-転移酵素 (GST) ファミリーに属しており、既存の大腸菌での GST タンパク質精製技術を用いて安定的かつ

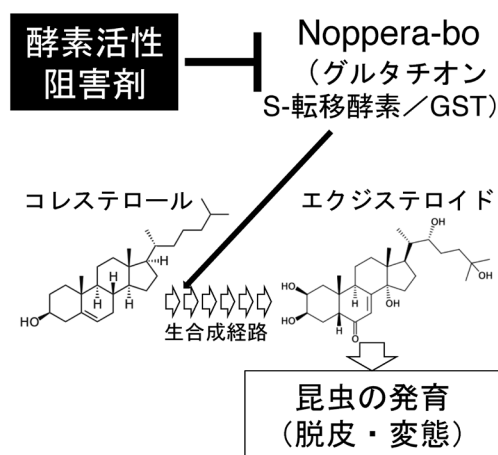


図1. Nobo の作用. Nobo 酵素活性阻害剤によってエクジステロイド生合成が抑制されれば、昆虫の発育過程は抑制されると期待できる。

安価に大量調製できる。また、Nobo の酵素活性は、東京薬科大学の藤川雄太博士らが開発した GST 酵素活性検出蛍光プローブ 3,4-DNADCF を用いて迅速に測定できる [Fujikawa et al., 2015]。以上の技術を用いて受賞者らは、1万種類の化合物に対しても1日でスクリーニングを完了できるハイスループット系を確立した。そして、Nobo 酵素活性を阻害する薬剤を探索することで、エクジステロイド生合成を阻害する新しい IGR を発掘することを提案した (図1) [丹羽, 2016]。さらに Nobo は、進化的に蚊を含むハエ目昆虫とチョウ目昆虫のみに保存されているため、殺虫効果を示す昆虫を限定できる選択的殺虫剤の開発にも好適と期待できる。

これまでに受賞者は、このスクリーニング系を活用し、キイロシヨウジョウバエ由来の Nobo に対する阻害化合物を複数同定した [Koiwai et al., 2020; 2021]。さらに受賞者は、デング熱やジカウイルス感染症の媒介蚊ネッタイシマカ *Aedes aegypti* の Nobo タンパク質 (AeNobo) に対する阻害化合物を探索した。その結果、複数の阻害化合物の同定に成功し、同定化合物のうちフラボノイド類に注目した構造生物学的解析による作用機構解明を報告した [Inaba et al., 2022]。

#### 研究の課題

受賞者は、フラボノイド類以外に、イソキノリン骨格を有する AeNobo 阻害化合物「R22 (通称)」の同定に成功した。本化合物は過去に殺虫剤として報告されたことはなく、殺虫剤としては新規化合物である。R22 は AeNobo に対して高い酵素活性阻害能 (50%酵素活性阻害濃度 832 nM) を示す。また受賞者らは、構造生物学的解析から、R22 は AeNobo の 113 番目のグルタミン酸残基との水素結合を介して相互作用をすることを見出した。さらに、ネッタイシ

マカ 1 齢幼虫に R22 を 24 時間処理した際の半数個体致死量 (LC<sub>50</sub>) は 0.83 ppm であり, EcR に作用する IGR の LC<sub>50</sub> (例えばテブフェノジドであれば 0.76 ppm, RH-5849 なら 1.09 ppm) [Beckage et al., 2004] と比べて遜色のない成績であった。以上の結果から受賞者は, R22 はエクジステロイド生合成を阻害する初の IGR になり得ると考えた。

以上を踏まえ, 本研究において受賞者は, 以下に記載する研究を通じて R22 の IGR としての特性をさらに精査し, 最終的に R22 に関する特許を出願し, R22 を有力 IGR シードとして世に問うことを課題とした。

## 研究の結果

以下の成果の詳細なデータについては, 英語原著論文としての発表を現在準備中である。同一データの二重投稿の恐れを避けるため, 本原稿においては具体的なデータを図として表現することを避けることをご容赦いただきたい。

### (1) R22 類縁化合物を用いた構造活性相関解析

R22 だけでなく, 同様のイソキノリン骨格を有する化合物 10 種類以上を検討し, ネットアイシマカ Nobo に対する酵素阻害活性を検討した。X 線結晶構造解析から, ネットアイシマカ AeNobo に対する阻害活性の高い化合物については, すべからず, Nobo の 113 番目のグルタミン残基, そして結合ポケット中の別の 2 箇所のアミノ酸残基の相互作用が確認された。また, これらのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 Nobo を用いた解析から, 各化合物とこれらのアミノ酸との相互作用が阻害活性に必要であることが示唆された。

### (2) R22 のネットアイシマカ幼虫致死とエクジソンシグナリングの関係

R22 が IGR であると主張するためには, R22 によるネットアイシマカの幼虫致死が, エクジステロイド生合成の特異的阻害によるものであることを確認する必要がある。この疑問に応えるために, R22 処理群と対照群のネットアイシマカ体内でのエクジステロイド応答遺伝子である *E74B* の発現を逆転写定量 PCR によって比較した。その結果, ネットアイシマカ幼虫に処理した R22 の濃度依存的に *E74B* 量の減少が認められ, R22 によってエクジソンシグナリングが抑制されていることが示唆された。

一方で, R22 処理群の幼虫におけるエクジステロイド量が低下していることを, 質量分析などにより直接的に検証することも試みた。低下傾向を得ることはできたものの, 分散が大きく, 統計的優位なデータを得ることはできなかった。これは, ネットアイシマカの発生同調を実験的に制御できなかったことが原因と考えており, 今後の実験での改善を模索したい。

### (3) R22 のネットアイシマカ以外の昆虫に対する殺虫活性

R22 が蚊以外の昆虫に対する殺虫能を有するかの部分的検討も目的で, モデル昆虫であるキイロショウジョウバエおよび近縁のショウジョウバエを用いたアッセイを実施した。その結果, ショウジョウバエ類幼虫に対して, R22 は高濃度においても致死性を発揮しなかった。ショウジョウバエ類以外の昆虫への検討を本研究期間中に完了はできず今後の研究課題として残されているが少なくとも, あらゆる昆虫に対する殺虫活性を示す化合物ではないことは示唆された。

### (4) R22 の哺乳動物細胞の生存と増殖に対する影響

R22 が IGR たりえるためには, ヒトを含む哺乳動物に対する毒性が低いことが必須である。しかし, R22 は現状高額のため, マウスですら経口投与による毒性試験は金銭的に現実的でない。そこで, 哺乳動物培養細胞を用いた細胞毒性実験によって, 代替的に哺乳動物に対する作用を検討した。具体的には, 多くの薬剤が肝毒性を発揮することを考慮にいてヒト肝臓由来 HepG2 細胞, および多くの薬剤が血中で免疫系血球細胞に影響を与えることを考えてマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いた。そして, いずれの細胞株においても, ネットアイシマカ幼虫を殺傷できる濃度に比べて 1,000 倍以上の濃度の R22 を投与した際でも, 有意な細胞致死性を示すことはなかった。この結果は, R22 が哺乳動物細胞に対しては顕著な毒性がないことを強く示唆する。

### (5) 化合物特許出願

上述の本研究で得られたデータ, および本研究実施前から得られていた一連のデータを踏まえて, 受賞者らは R22 および類縁化合物の殺虫剤としての特許出願を以下の通り実現した。

【発 明 者】 丹羽隆介・海老原佳奈・高谷大輔・横島聡・金源

【発明名称】 殺虫剤, 殺虫活性を有する新規化合物及びその用途

【出願番号】 特願 2024-072221

### 今後の実用化への展望

今回見出した R22 などのイソキノリン骨格を有する化合物は, ネットアイシマカ Nobo 酵素活性阻害化合物としては従来になく高い LC<sub>50</sub> を示しており, 将来的な IGR として有力な候補化合物と言える。しかしながら, 既存の殺蚊剤として広く用いられているピレスロイド系殺虫剤と比べればその殺虫能力ははるかに劣るのが現状である。さらには, 殺虫剤として広く用いられるためには化合物合成のコストは安価であるべきだが, R22 および類縁化合物が安価であるとは言い難い。今後, 上市の実現を鑑みる上では,

R22 および類縁化合物を出発材料として、そしてこれまで得られた構造活性相関の知見を活用し、官能基を様々に変化したイソキノリン化合物をさらに用意して Nobo 酵素活性阻害能と殺蚊能を検討しつつ、真に有力な化合物については合成方法の開発も必要となるだろう。それでもなお、今回の研究によって新しいタイプの IGR を提案できた意義は小さくないと自負しており、今後、本化合物に関心を持つ農薬会社・農薬ベンチャーとの対話を通じて実用化の夢が実現できることを強く期待している。

#### 謝辞

本企画賞に関連するすべての先生方と協賛企業に感謝いたします。また、今回の R22 に関する研究は、以下の方々との共同研究の一部として実施されました。ここに感謝申し上げます（順不同）：海老原佳奈・稲葉和恵・新開泰弘・熊谷嘉人（筑波大学）、葛西真治（国立感染症研究所）、千田美紀・小祝孝太郎・千田俊哉（高エネルギー加速器研究機構）、安孫子ユミ（長崎大学）、金源・横島聡（名古屋大学）、西村隆史（群馬大学）、佐久間知佐子・嘉糠洋陸（東

京慈恵会医科大学）、川嶋裕介（星薬科大学）、高谷大輔・福澤薫（大阪大学）、渡邊千鶴・本間光貴（理化学研究所）、藤川雄太・井上英史（東京薬科大学）、竹内恒・今村理世・小島宏建・岡部隆義（東京大学）。

#### 参考文献

- Beckage et al. (2004) *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 57: 111-122  
Enya, S. et al. (2014) *Sci. Rep.* 4: 6586  
Enya, S. et al. (2015) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 61: 1-7  
Fujikawa, Y. et al. (2015) *Chem. Commun.* 51: 11459  
Inaba, K. et al. (2022) *BMC Biol.* 20: 43  
Jindra, M. (2021) *J. Pestic. Sci.* 46: 3-6  
Kamiyama, T. & Niwa, R. (2022) *Front. Physiol.* 13: 823418.  
片岡宏誌 (2013) [https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/inv\\_up/epf\\_report/2013/057905.html](https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/inv_up/epf_report/2013/057905.html)  
Koiwai, K. et al. (2020) *J. Biol. Chem.* 295: 7154-7167  
Koiwai, K. et al. (2021) *J. Pestic. Sci.* 46: 75-87  
Moyes, C. L. et al. (2017) *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11: 1-20  
Nakagawa, Y. (2005) *Vitam. Horm.* 73: 131-73  
Niwa, R. & Niwa, Y. S. (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 1283-1292  
丹羽隆介 (2016) 化学と生物 54: 508-513  
World Health Organization (2020) [http://www.who.int/neglected\\_diseases/vector\\_ecology/mosquito-borne-diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/vector_ecology/mosquito-borne-diseases/en/)

### 3. 第3回夢にチャレンジ企画賞 報告書



## 第3回夢にチャレンジ企画賞報告書

### 味覚・嗅覚を実装した人間拡張による健康長寿社会の実現

芝浦工業大学  
伏見太希

#### 1. 背景

苦味は摂取した食物中に含まれる様々な有害物質を検知して、それらの摂取を抑制するという点で生命維持に特に重要である。

苦味を受容する T2R ファミリーは、ヒトで 25 種、マウスで 35 種同定されている。このように T2R はその他の味覚受容体と異なり、その多様性が特徴である。これは、苦味が一般に毒物を忌避するために発達した味覚であり、多種多様な化合物を検知するため、柔軟性が必要とされるためと考えられている。これらの複数の苦味受容体は生物種に応じて分類されている（例えば、ヒト：hT2R1~60、マウス：mT2R102~144）。T2R 遺伝子はイントロンレスであり、ファミリー内で比較的高い相同性を持つ。またその多様性は、全長が約 900 bp と短いにもかかわらず、遺伝子内に一塩基多型やアミノ酸置換を多く含むことによる。更に、T2R のうちいくつかの遺伝的多型は苦味感受性における機能的変化を起こすことが知られており、T2R38 の遺伝子多型は苦味に対して高い感受性を示す“スーパーテイスター”として知られている。

口腔内で苦味物質が T2R と反応すると、T2R 発現細胞内の小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  が放出され、transient receptor potential (TRP) melastatin-5 が活性化し、脱分極が起こって活動電位が生成され、ATP とセマフォリンを神経節ニューロンに分泌する。この刺激が孤束核、傍小脳脚核、視床、味覚野へと伝わる。一方近年、口腔以外に存在する T2R が恒常性の維持・増進に大きく関与していることが分かってきている。気道に発現する苦味受容体 T2R38 によって、緑膿菌やグラム陰性菌が分泌するアシルホモセリンラクトンが認識されると、気道粘液纖毛によるクリアランス機能が活性化し、これらの細菌が排除される。また、腸管においては、小腸下部および大腸や直腸に分布する腸管内分泌細胞（I 細胞や L 細胞）上に発現する T2R が食品中の苦味物質と相互作用する。その結果、コレシストキニンや glucagon-like peptide-1 (GLP-1) に代表されるインクレチンの分泌を促進する。これらインクレチンは末梢に

において糖代謝を制御するだけでなく、迷走神経を興奮させ、中枢を介して摂食を抑制する事が報告されている。このインクレチンは II 型糖尿病の治療薬として用いられているが、強い副作用（低血糖症状や急性膵炎）が生じるリスクがある。

植物の二次代謝物であるポリフェノールの多くは苦味を呈する。ポリフェノールは生体利用性が低いにも関わらず、これまでに多くの介入試験や *in vivo* 研究では血中 GLP-1 濃度が上昇し、耐糖能を亢進することが分かっている。これは、ポリフェノールと腸管分泌細胞に発現する T2R との相互作用を介して GLP-1 などのインクレチンが血中へ分泌されている可能性を示唆するものである。また、T2R 強制発現細胞を用いた *in vitro* 研究では 100 種類以上のポリフェノールが T2R を活性化することが示されている。

#### 2. 研究の目的

腸管分泌細胞には T2R が 4~10 個が発現することが報告されており、苦味を呈する 1000 種類以上のリガンドとどのように相互作用するかについては不明な点が多い。例えばポリフェノールである epigallocatechin gallate (EGCG) は T2R4・T2R5・T2R14・T2R30・T2R39・T2R43 といった 6 つの T2R を活性化する事が *in vitro* 研究により報告されている。これらのことから、8000 種類以上存在するポリフェノールと T2R の相互作用を従来の実験的手法によって解明することは難しく、ケモインフォマティクスなどの計算化学的手法を利用した複雑性の解明が必要となる。そこで本研究では、*in silico* におけるモデリングシミュレーション法を用いることにより、T2R とポリフェノールの相互作用を解明することを目的とした。

#### 3. 研究の方法

##### 3-1. ソフトウェア

本研究では、統合化学計算ソフトウェア Molecular Operating Environment (MOE; 2022.02 Chemical Computing Group) を用いて行った。

### 3-2. 被験受容体 (T2R46)

受容体として、ヒトの苦味受容体の一種である T2R46 (hT2R46) を用いた。T2R46 は、先行研究により 2022 年にその詳細な立体構造が T2R ファミリーで初めて明らかにされ、Protein Data Bank (PDB) 上に公開されている (PDB code: 7XP6; cryo-EM structure of a class T GPCR in active state)。

### 3-3. 被験物質

被験物質として、Phenol-Explorer (<http://phenol-explorer.eu/>) 上に SMILES 記法が記載されている 491 種のポリフェノールを用いた。先行研究により、有毒な苦味アルカロイドである strychnine やポリフェノールである tangeretin, nobiletin, amarogentin は T2R46 のリガンドであることが報告されている。Phenol-Explorer に記載がない strychnine (非ポリフェノール)、および amarogentin を追加して、これら 4 物質をポジティブコントロールとして用いた。更に、代表的な苦味ポリフェノールである tannic acid を追加した。

### 3-4. ドッキングシミュレーション

T2R とポリフェノールの結合親和性を明らかにするため、ドッキングシミュレーションを行った。T2R46 の化学構造は PDB より得た。MOE の Quick Prep 機能を用いて、破綻した結合やループ構造の欠損の修正、水素原子の付加、部分電荷の付与などの前処理を行った。T2R46 の化学構造は、リガンドである strychnine を結合させた状態でクライオ電子顕微鏡にて観察されている。strychnine と T2R46 の相互作用は、T2R 上の TRP88・GLU265 であることが報告されている。そこで、本研究ではこれらのアミノ酸を被験物質の結合部位として指定した。被験物質の結合部位への配置には、まず狭いポケットへの配置に最適な Alpha PMI という手法を用い、リガンドの異なるコンフォメーションの配置を行った。配置するコンフォメーションの数は 1000 とした。1000 種のコンフォメーションのうち、MOE の London dG により上位 100 種のスコアを示したコンフォメーションを選抜した。その後選抜されたリガンドの構造に対して構造最適化計算を行った。その際に、induced fit を使用した。最終的な結合エネルギー値を 20 ポーズ算出した。これらの結果、T2R46 と種々のポリフェノールの結合親和性を表す結合エネルギー値スコア  $S$  [kcal/mol] が得られた。この値を QSAR 解析 (QSAR-Evolution) に用いた。

### 3-5. QSAR 解析 (QSAR-Evolution)

ドッキングシミュレーションにより得たポリフェノールと T2R の結合親和性を示す結合エネルギー値  $S$  とポリフェノールの構造的性質の関連性を評価するため、QSAR (Quantitative Structure-Activation Relationship; 定量的構造活性相関) 解析を行った。まず、被験物質の記述子について計算を行った。記述子とは、分子の特徴を数字に変換したものであり、算出に必要な分子の情報に応じて、クラスに分かれている。各分子に対して記述子の計算を行った後、QSAR-Evolution によりモデル式の算出を行った。QSAR-Evolution は、記述子の自動選択が可能な QSAR の手法として、遺伝的アルゴリズム (GA) がコード化されたものであり、MOE より CCG SVL Exchange (<https://svl.chemcomp.com/>) にて提供されているものである。このプログラムではランダムに選択した記述子を組み合わせ、多数の回帰式を作成し母集団とし、この中から 2 つの式をランダムに (ただし、優れた個体がより多く選択されるようなバイアスをかけて) 選択し、かけ合わせ、突然変異を経て、母集団の中の最も劣った式よりも優れた式が得られた場合に、世代交代させるというものである。QSAR-Evolution で設定可能なパラメータとしては母集団の式の長さ、個体数、突然変異確率、優れた個体が次世代に子孫を残す確率、世代数、式を固定長とするか可変長とするか、などがある。式が進化しているかどうかを判定する基準である評価関数としては、LOF (Lack of Fit) を用いた。LOF とはモデル内で使用される記述子の数が増えると自動的にペナルティがかかるような評価関数である。本研究では、オプションとして Test set を併用した QSAR-Evolution を行った。Test set の併用により、評価関数である LOF とともに Test set に対するスコアを考慮して進化させることが可能となる。具体的な手法としては、記述子の計算を行った 491 種類のポリフェノールを、乱数を用いてランダムに 5 分割し、そのうち 4/5 を Training set (アルゴリズムに学習を行わせる物質群)、1/5 を Test set (アルゴリズムの学習をテストする群) として、Training set と Test set の両群に対して当てはまりの良いモデル式を算出した。最終的に、得られたモデル式に含まれる記述子に対して、最初に計算した被験物質の記述子の具体的な値を代入し、ドッキングシミュレーションにより得た実測値と、モデル式により算出した推算値の当てはまりの良さを評価した。

## 4. 研究成果

### 4-1. ドッキングシミュレーション

#### 4-1-1. ポジティブコントロール

T2R46 との結合様式の詳細が先行研究にて示されている, strychnine のドッキングシミュレーション結果を Fig. 1 に示した. Fig. 1 の左側は T2R46 と strychnine の計算結果を 3D で表したものである. Fig. 1 の右側は 2D で表した, strychnine と T2R の相互作用の詳細である. strychnine が相互作用することが報告されている TRP88・GLU265 の両方に対して, 相互作用を示すことが確認された. また, T2R46 と strychnine の結合親和性を示す結合エネルギー値スコア  $S$  は  $-6.2035$  kcal/mol であった.

続いて, *in vitro* 実験により T2R46 との結合が示唆されたポリフェノール tangeretin, nobiletin, amarogentin に関して算出した. T2R46 のアミノ酸残基との相互作用に関して, tangeretin と nobiletin では TRP88, amarogentin では ASN184・PHE252・GLU265 との相互作用が確認された. いずれのポリフェノールも TRP88 または GLU265 と相互作用を示したことが分かった. 結合エネルギー値スコア

は, tangeretin, nobiletin, amarogentin の順に  $-7.5580$  kcal/mol,  $-7.9201$  kcal/mol,  $-9.2510$  kcal/mol であった.

#### 4-1-2. 被験ポリフェノール

491 種のポリフェノールに関して, その結合エネルギー値スコア  $S$  の平均値は  $-6.56723$  kcal/mol であった. また, 全計算結果 (各物質の,  $S$  が最も良かったコンフォメーションをピックアップする前の結果) に関して, 被験物質が相互作用を示したアミノ酸残基のポピュレーションマップを Fig. 2 に示した. 結果, 全計算結果の 50.9% のポリフェノールが GLU265 に対して相互作用を示すことが分かった.

### 4-2. QSAR

4-1. で得られた結果を用いて QSAR 解析を QSAR-Evolution によって行った. その結果, (1) で表される式を得た.

$$S = -6.77172 - 0.00106 \times DCASA + 0.00003 \times E \quad (1)$$

$S$ : 活性値, 結合エネルギー値スコア

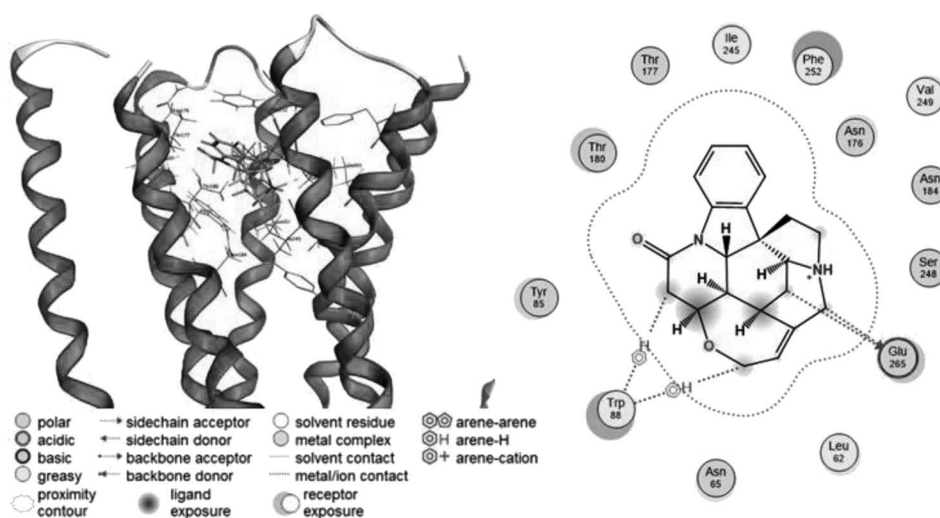


Fig. 1 Strychnine のドッキングシミュレーション結果

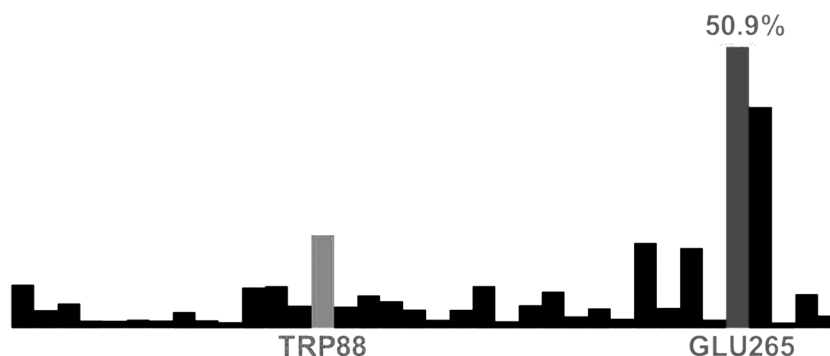


Fig. 2 相互作用アミノ酸のポピュレーションマップ



ASA+：正の部分電荷をもつ（厳密には0より大きい）すべての原子の，溶媒にアクセス可能な表面積。  
ASA-：正の部分電荷をもつ（厳密には0より大きい）すべての原子の，溶媒にアクセス可能な表面積。  
CASA+：正電荷で重み付けした表面積，ASA+に原子の部分電荷の最大値をかけたもの。  
CASA-：負電荷で重み付けした表面積，ASA-に原子の部分電荷の最大値をかけたもの。  
DCASA：CASA+とCASA-の差の絶対値。  
E：分子のポテンシャルエネルギー。

このモデル式の算出過程ではオプションとして Test set を併用することで，Training set とともに Test set に対する当てはまりを考慮して進化を行っている。結果として，得られた Training set における  $R^2$  値は 0.9266，Test set に

おける  $R^2$  値は 0.6490 であった。最終的に，被験ポリフェノール全体に対して，同様に推算値と実測値の当てはまりの確認を行った。その結果， $R^2$  値は 0.7258 であった。

## 5. 結論

以上のように，ポリフェノールと T2R46 の結合エネルギーは既知の苦味物質と比較しても同等であること，またリガンドとして報告されている strychnine と同様に T2R46 の GLU265 と相互作用することが示唆された。食品に含まれるポリフェノールの多くが T2R46 を活性化する可能性が考えられた。

これまでの *in vitro* 研究では，多くのポリフェノールは T2R14，T2R39 と相互作用することが報告されていることから，今後更にこれらの苦味受容体との結合親和性について検証することが必要である。

# 海洋環境負荷問題を解決するペプチド含有塗料の開発

筑波大学・生命環境学群・生物学類  
吉本賢一郎

## はじめに

グローバル化が進む現在の国際社会において，海上輸送はきわめて重要な地位を占める。石油などのエネルギー資源を中心に，我々の生活に不可欠な物資が船舶によって輸送されている。特に島国である日本ではその傾向が顕著であり，輸出入の 99% 以上が海上輸送によって行われている。低コストで大量の輸送物を運ぶことができる海上輸送は今後も国内外の両方で常に必要とされ続けるだろう。

こうした海上輸送において古くから問題となっているの

が海洋付着生物の付着である。フジツボやムラサキガイなどに代表される海洋付着生物は岸壁などの自然物のみならず，人工物にも付着する。特に船舶に対する海洋生物の付着は深刻な環境問題を引き起こす。船舶の底に付着した海洋生物は，船舶重量の増加と水流抵抗の増大を招く。その影響により燃料消費が約 40% も増加すると試算されている。燃料消費の増加に伴い，二酸化炭素や硫黄酸化物，窒素酸化物の排出量も増大し，地球温暖化や大気汚染を引き起こす。また超過燃料費用による経済問題も深刻である。

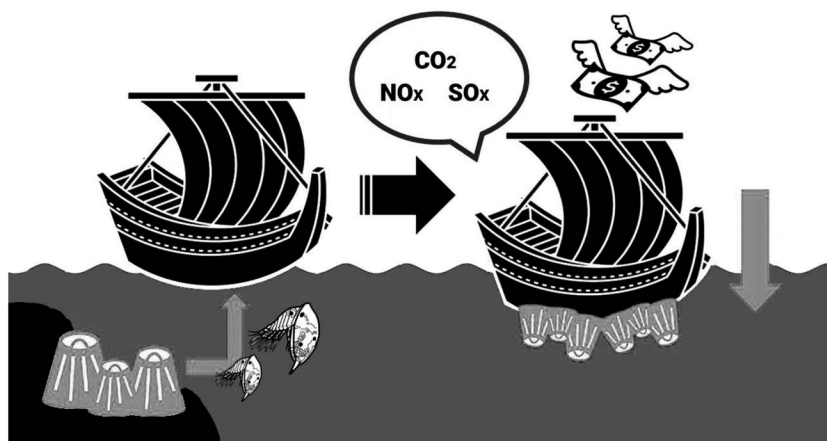


図1. 海洋付着生物による環境問題・経済被害を示す概略図

燃料だけでなく、付着生物の分離費用や付着による物理的破損の修理費用も発生している。これらを複合した経済被害は年間29兆円にものぼる。さらに海水を冷却水として用いている発電所においても海洋付着生物による被害が報告されている。このように海洋付着生物による環境問題・経済被害は甚大であり、解決が急務である<sup>1)</sup>。

海洋生物の付着を防ぐためにこれまで数々の対策が取られてきた。1960年代には水銀やヒ素などの有毒物質を用いた対策が取られていたが、他の海洋生物への悪影響や人間への健康被害により、使用が中止された。その後、有機スズ化合物などを利用した付着防汚剤の利用が進められたが、これらの物質も海洋生態系への悪影響が指摘されるようになった。そのため1990年に日本で、2008年には世界で使用が禁止された。現在、これらの物質よりも生物毒性が低いとされる付着防汚剤が利用されているが、環境被害の完全な解決には至っていない。また、付着防汚剤そのものの環境被害がなくとも、分解物に毒性がある事例も存在する。近年は船舶底面の物理的構造を工夫することで付着を防ぐアプローチも取られつつあるが、海洋に生息する多種多様な生物のさまざまな付着機構に、単一の表面構造のみで対処するのは難しい。結局のところ、海洋付着生物によって引き起こされる環境負荷問題の解決にむけた取り組みは未だ難航しており、深刻な社会問題であり続けている<sup>2)</sup>。

## 本研究の着眼点・目的

こうしたなかで我々は生物由来の天然有機化合物に注目した。ウミウシや紅藻などの一部の海洋生物は、生存のために付着生物の付着を阻害する物質を体内で生産していることが知られている。こうした物質は非常に低濃度で作用するうえに、付着生物そのものの生存に影響を与えないものも多い。そのため、これらの物質を利用すれば、付着生

物そのものも含めた海洋生態系を破壊することなく、海洋環境負荷問題を解決できる可能性が高い<sup>3)</sup>。しかし、海洋で生きる生物から直接化合物を収集し、利用することは現実的ではない。生物が生合成している化合物量は微量であり、人工的に利用するには大量の生物個体が必要とされるからである。また、化学合成によるアプローチもいまのところ実用化に十分な収率を得られていない。

そこで我々は微生物に、海洋生物が生合成している化合物を合成させることを考えた。大腸菌や酵母を用いれば、生体内で合成されている複雑な化学物質をそのまま物質合成に利用できる利点が存在する。また、合成に際して化学合成よりも合成過程で有害物質が混入する可能性も低いと考えられる。こうした利点を踏まえ、本研究では海洋生物由来の物質を微生物に生合成させ、工業的に利用することを目指す活動を行なった。

海洋付着生物の付着を阻害する天然有機化合物15種類を精査し、本研究に適した天然有機化合物Cyclo-L-Trp-L-Alaを選定した。この化合物は自然界ではカイメン *Graptia compressa* に生息する菌類 *Eurotium chevalieri* が合成している。この化合物はムラサキガイの付着に必要なチロシナーゼの働きを阻害する<sup>4)</sup>。また、この化合物と構造が類似しているジケトピペラジンである Baretin はフジツボに対して付着阻害効果を有する<sup>5)</sup>。Cyclo-L-Trp-L-Ala がフジツボに付着阻害効果があるかは試験されていないが、付着阻害活性を持つ可能性は十分考えられる。本物質は放線菌において合成に関わる遺伝子が同定されており、微生物合成が可能な状態である<sup>6)</sup>。さらに本物質はアラニンとトリプトファンという生体内にありふれたアミノ酸から合成されるため、一次代謝の操作で容易に合成量の増大が見込めるという利点も存在する。



図2. 海洋付着生物による付着阻害機構の模式図

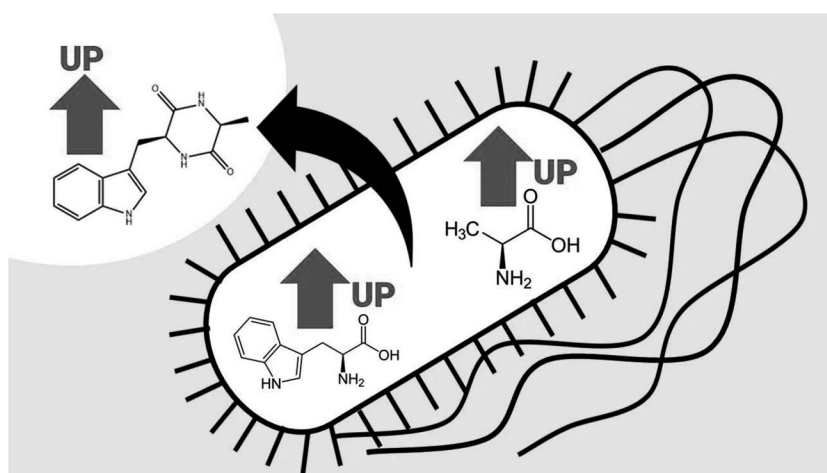


図3. 本研究における物質増産の概略図

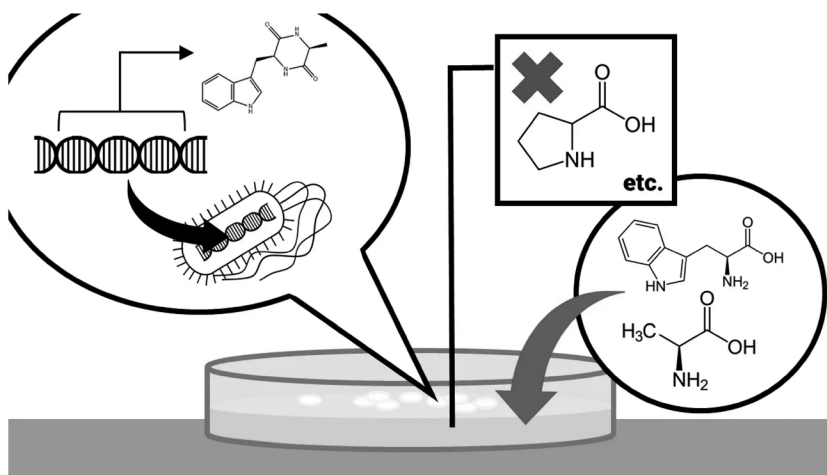


図4. 培地最適化実験の模式図

### 本研究の取り組み

今年度の研究期間で我々は大腸菌に Cyclo-L-Trp-L-Ala を合成させることを試みた。まず Cyclo-L-Trp-L-Ala の合成酵素を大腸菌に導入し、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) を用いて定量を行なった。その結果、先行研究で報告されているものとはほぼ同量の物質合成が確認できた。

その後、培地におけるアミノ酸量を調整し、物質合成への影響を調べた。Cyclo-L-Trp-L-Ala の合成に関わる酵素は、別の環状ジペプチド合成も触媒している。そのため、今回の酵素が反応する別のアミノ酸が培地中に多いと目的物質の合成量が低下することが予想される。アラニンやトリプトファンの含有量が多く、他のアミノ酸の量が生存に影響しない範囲で低い培地を作成し、そこで大腸菌を培養することで物質合成量が多くなるのではないかと考え、実験を行なった。結果として、他のアミノ酸量を低下させると物質合成量が落ち込むことがわかった。また、アラニン

やトリプトファンの培地での量も物質合成量の増加に寄与しなかった。そのため、生体内でのアラニン量を増大させるアラニン合成酵素群を導入し実験を行なっている。実験と結果の解析は現在も進行中であるため本報告書での結果の掲載は省略する。

また、社会実装面に関して、さまざまな企業や漁港とディスカッションを行なった。特に本化合物がフジツボやその他の付着生物に対して付着阻害活性があるか否かを判定するための付着阻害実験や、他の海洋生物に対して安全性が保証されているか調べる安全性試験を行なっている。また、本物質を塗料としての利用可能性を推定するために分子モデリングを利用した分子挙動の解析も行なっている。

### 今後の展望

微生物を用いた物質増産に取り組んできたが、本格的に社会実装するためには造船企業や塗料会社、発電所などと連携しながら必要な物質量の算定や利用方法の確立を推し

進めていく必要がある。今回の研究にディスカッションした企業の方々と議論を続けつつ、社会実装も見据えながら研究を続けていく。

## 謝辞

本研究では研究助成だけでなく、研究内容のブラッシュアップや方向性の議論に際して、日本農芸化学会およびその関連企業の皆様に多大なるご支援・ご指導をいただきました。厚く御礼申し上げます。また、筑波大学 生命環境系の鈴木石根先生や前田義晶先生、高谷直樹先生、榎尾俊介先生には日頃から研究のご指導をいただきました。分子モデリングに関しましては筑波大学 計算科学研究センターの重田育照先生にご指導をいただきました。社会実装を目指したディスカッションの際には株式会社 ワールドアクセス、株式会社 セシルリサーチの皆様大変に有意義な視座をいただきました。心より感謝申し上げます。

## 会議報告等

本研究の成果の一部を遺伝子工学に関する国際会議 iGEM (The international Genetically Engineered Ma-

chine competition) にて報告しました。本プロジェクトは Silver Medal を受賞しました。

## 参考文献

- 1) 梅澤大樹 (2023), 海洋付着生物に対する付着阻害有機化合物の創製の試み 付着阻害ユニットを組み込んだ効率的な化合物の合成, 化学と生物, 61 (7) 331-338
- 2) 沖野龍文 (2021), 海洋生物の付着防止技術研究の展開 フジボとの長い戦い, 化学と生物, 59 (1) 16-22
- 3) 北野克和 (2019), “環境にやさしい”付着防汚剤の開発: 付着阻害活性を有する天然物をリード化合物とした付着阻害活性に関する構造活性相関の考察と新規付着阻害物質の創製 海洋生物の化学的防御システムがヒント, 化学と生物, 57 (6) 352-358
- 4) Bovio et al. (2019), The Sponge-Associated Fungus *Eurotium chevalieri* MUT 2316 and its Bioactive Molecules: Potential Applications in the Field of Antifouling, Mar Biotechnol, 21 743
- 5) Hedner et al. (2006), Brominated Cyclodipeptides from the Marine Sponge *Geodia barretti* as Selective 5-HT Ligands, J Nat Prod, 69 1421
- 6) Liu et al. (2018), Expanding tryptophan-containing cyclodipeptide synthase spectrum by identification of nine members from *Streptomyces* strains, Appl Microbiol Biotechnol, 102 (10) 4435-4444

# 4. 第4回中小企業産学・産官連携 研究助成報告書



## 第4回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成報告書

### 「伝統味噌由来乳酸球菌が産生する細胞外多糖の産業利用に向けて」

研究代表者 岡山大学学術研究院環境生命自然科学学域 荒川健佑  
中小企業研究責任者 株式会社機能性食品開発研究所 村上允唯

#### 1. 背景：企業からの説明

乳酸菌が産生する細胞外多糖（Exopolysaccharide, EPS）は、食品の物性を変化させるだけでなく、様々な生理機能が知られていることから、発酵食品製造において有益な効果が期待される。株式会社機能性食品開発研究所では、福井県の伝統味噌から EPS を産生する乳酸菌を分離・選抜し、その食品・飲料・サプリメント等への活用を期待し、選抜乳酸菌株（FFC003株）の微生物学的性質および産生 EPS の構造・生理機能の解析を行うこととした。そこで、同研究内容で実績のあった岡山大学の荒川准教授に共同研究を依頼し、本助成事業に応募するに至った。本事業からの助成を頂くことにより、当該乳酸菌株の菌種同定、EPS 産生最適条件の決定、産生 EPS の精製、産生 EPS の分子量・構成糖の同定、産生 EPS の抗酸化能の評価を行うことができた。本助成研究で明らかにした点を踏まえて、引き続き研究を進展させ、これまでと異なる食感および新たな保健効果を付与した発酵食品・飲料・素材の開発に結びつけたいと考えている。

#### 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

##### 【背景】

細菌の中には細胞外多糖（EPS）を産生する菌株があり、その EPS は粘性・ゲル化性・乳化性・離水防止性等の有用な物理的性質を有することから、食品やスキンケア製品に産業利用されている<sup>1</sup>。中でも、乳酸菌は菌株ごとに多種多様な EPS を産生することが知られており、近年では、物性への影響だけでなく、プレバイオティクス作用・血圧降下作用・抗腫瘍作用・免疫賦活作用・抗酸化作用等の生理機能も報告され、その産業利用への期待はますます高まっている<sup>2</sup>。しかし、その EPS の構造や性質は菌株特異的であり、個別に調べる必要がある。これまで研究代表者は、世界の様々な伝統的発酵乳製品から分離した乳酸菌の EPS の構造および生理機能（特に抗酸化能）を調べてきた。そこで、本助成事業では、株式会社機能性食品開発研究所との共同研究で、同社が福井県の伝統味噌から分離・選抜

した EPS 産生乳酸菌株（FFC003株）の将来的な産業利用を目指し、当該菌株の菌種同定、産生 EPS の精製・構造解析・抗酸化活性評価を行うこととした。

##### 【研究の詳細】

##### ①EPS 産生乳酸菌株の菌種同定

まず、試料として用いた FFC003株の菌種同定を光学顕微鏡を用いたグラム判定・形態観察（墨汁染色）、および 16S rRNA 遺伝子配列解析によって行った。その結果、確かに FFC003株は EPS を産生しており、乳酸球菌 *Pediococcus pentosaceus* と同定された。

##### ②EPS の最適産生条件の検討

乳酸菌 EPS の分析および産業利用のためには、より効率的な EPS 産生条件の検討が重要になる。そこで、FFC003株の最適 EPS 産生条件を決定するために、MRS 液体培地・還元脱脂乳・還元チーズホエイを培地に用い、25, 30, 37℃にて 60時間静置培養し、経時的に生育性（培養液 pH・生菌数）および EPS 生産性（曳糸性）を評価した。その結果、FFC003株は MRS 液体培地のみで良好な生育性および EPS 生産性を示し、25℃で 24時間培養した際に、最も高い EPS 生産が見られた（図1, 表1）。次に、同培地・培養条件をベースとし、種々の栄養成分を添加することで培地の改良を試みた。培地の改良には、単一要因試験法（One variable at a time method, OVAT法）と中心複合計画応答曲面法（Central composite design in response surface method, CCD-RSM）を用いた。また、EPS の粗精製は、培養上清にトリクロロ酢酸を添加することで除タンパクし、その上清のエタノール沈殿物を蒸留水にて3回洗浄後、蒸留水に対して透析し、内液を凍結乾燥することによって行った。その結果、OVAT法によって酵母エキス・肉エキス・グルコース・クエン酸アンモニウムの増量が EPS 産生には有効であることが示され、CCD-RSMにてそれぞれ 10.00, 17.75, 49.75, および 3.85 g/L の添加が最大の EPS 産生をもたらすと示唆された。実際に、MRS 液体培地では  $110.75 \pm 1.44$  mg/L の粗精製 EPS 生産量であったのに対し、改良培地では

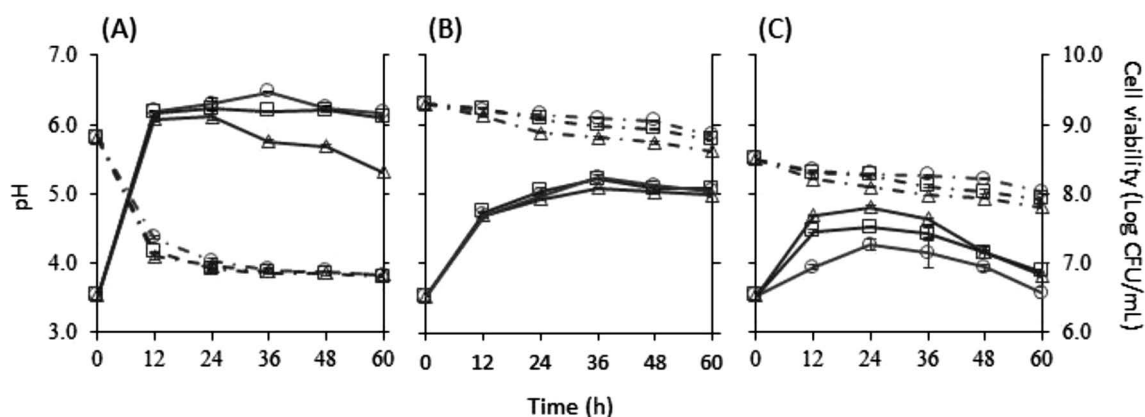


図1. FFC003株の生育性. (A) MRS液体培地, (B) 還元脱脂乳, (C) 還元チーズホエイ. 破線: 培養液pH, 実線: 生菌数. ○: 25℃, □: 30℃, △: 37℃.

表1. FFC003株のEPS生産性 (曳糸性)

培地	培養温度 (℃)	培養時間 (h)					
		0	12	24	36	48	60
MRS培地	25	—	+++	++++	+++	+++	+
	30	—	+++	+++	+++	+	—
	37	—	—	+	—	—	—
還元脱脂乳	25	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—	—
	37	—	—	—	—	—	—
還元チーズホエイ	25	—	—	—	—	—	—
	30	—	—	—	—	—	—
	37	—	—	—	—	—	—

曳糸性: —, 0 cm; +, 0-1 cm; ++, 1-2 cm; +++, 2-3 cm; +++, 3-4 cm.

362.63±16.36 mg/L の粗精製EPS生産量を達成した。

### ③産生EPSの精製と分子量・構成糖分析

②で確立した培養条件を用いてFFC003株を培養し、生産されたEPSの粗精製物を得た。その後、弱陰イオン交換クロマトグラフィーにてEPSの分離・精製を試みた。その結果、1つの中性EPSピーク (EPS-1NF) と、2つの酸性EPSピーク (EPS-1AF, -2AF) を検出・分画することができた (図2)。次に、それら精製EPSの分子量を分析用デキストランを対照としたサイズ排除HPLCにて測定したところ、EPS-1NFのピーク分子量は $4.53 \times 10^5$  Da, EPS-1AF, -2AFのピーク分子量は $6.54 \times 10^5$  Daおよび $1.54 \times 10^5$  Daであることが明らかとなった (図3)。さらに、強塩酸にて加水分解後、精製EPSの構成糖分析 (逆相HPLC) を行ったところ、EPS-1NFはマンノース: グルコース=10:90, EPS-1AFはマンノース: リキソース: リボース: ラムノース: グルコース: ガラクトース: アラビノース=14:3:3:5:27:36:12, EPS-2AFはマンノース: リキソース: リボース: グルクロン酸: グルコース: ガラクトース=3:6:6:5:34:46で構成されていることが明ら

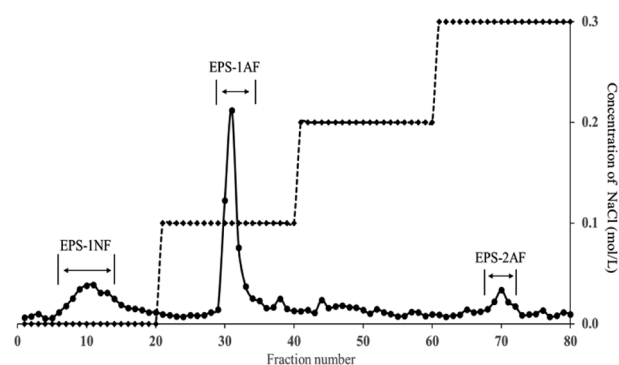


図2. FFC003株が産生するEPSの陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製. 実線: クロマトグラム, 破線: 移動相塩濃度. EPS-1NF: 中性EPS, EPS-1AF, -2AF: 酸性EPS.

かとなった (図4)。

### ④酸性EPSの抗酸化活性測定

②と③で得られた粗精製EPSおよび各精製EPSの抗酸化活性を酸素ラジカル吸収能 (Oxygen radical absorbance capacity, ORAC) とヒドロキシラジカル抗酸化能

(Hydroxyl radical antioxidant capacity, HORAC) を測定することで評価した。その結果、全ての EPS は高い ORAC 活性を示し、一方で、HORAC 活性は粗精製 EPS と酸性 EPS (EPS-1AF, -2AF) でのみ検出された (図5)。

### 【考察と展望】

本研究で EPS 産生乳酸菌として同定された *P. pentosaceus* は、味噌等の伝統的な発酵食品に高頻度に検出される乳酸球菌種であり、いくつかの菌株では EPS 産生が既に報告されている<sup>3</sup>。ただし、本研究で用いた FFC003 株の最適培養条件下での EPS 生産量は  $362.63 \pm 16.36$  mg/L であり、この値はこれまで報告のあったどの *P. pentosaceus* 菌株 (最大で 263.63 mg/L)<sup>4</sup> よりも高かった。また、精製した中性および酸性 EPS の分子量はいずれも  $10^5$  Da オーダーであり、この値は既知の *P. pentosaceus* の EPS ( $1.1 \times 10^4 \sim$

$4.0 \times 10^7$  Da) の分子量の範囲内にあったが、酸性 EPS の構成糖は他よりも明らかに複雑で、特にリキソースを含んでいる EPS はこれまでに見出されたことはない。さらに、乳酸菌 EPS が抗酸化活性を有することは既に数多く報告されているが、FFC003 株の ORAC 活性はベリー類等の他のよく知られた抗酸化性食品成分に匹敵する値であり、有益な機能性成分になり得ると期待された。以上のことから、本研究において、新たな物性や機能性を付与した発酵食品の開発に FFC003 株が有用であるという基盤情報を提供することができたと考えている。

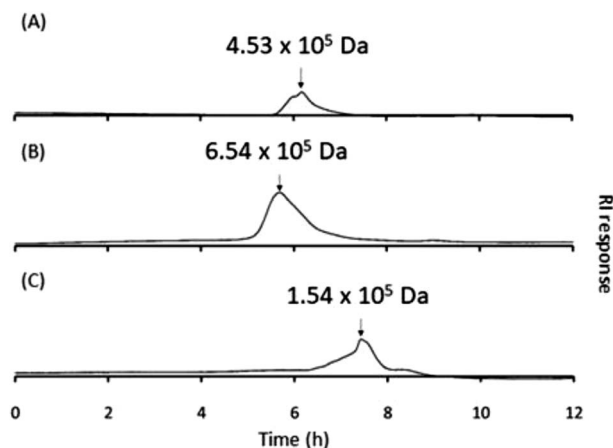


図3. FFC003株が産生するEPSのサイズ排除HPLCによる分子量測定。(A) EPS-1NF, (B) EPS-1AF, (C) EPS-2AF。

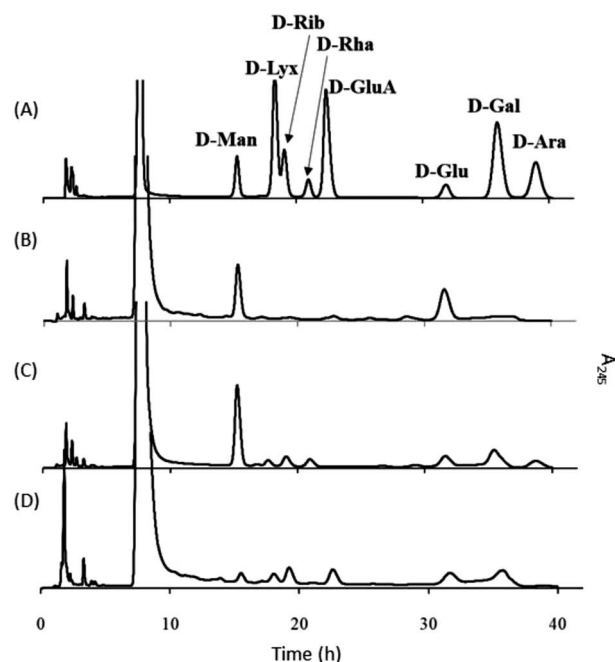


図4. FFC003株が産生するEPSの構成糖分析 (加水分解後の逆相HPLC分析)。(A) 標準物質, (B) EPS-1NF, (C) EPS-1AF, (D) EPS-2AF。

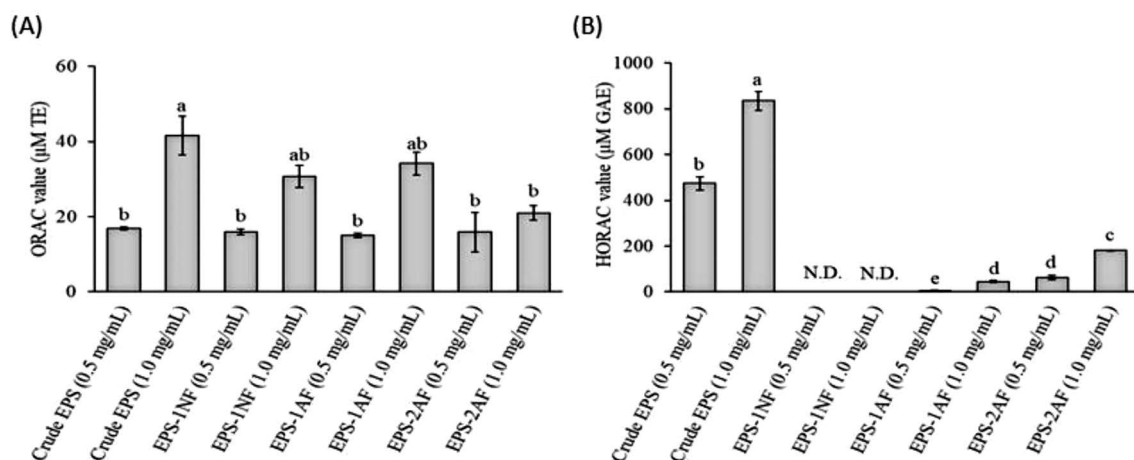


図5. FFC003株が産生するEPSの抗酸化活性測定。(A) ORAC分析, (B) HORAC分析。TE: トロロックス当量, GAE: 没食子酸当量。



### 3. 謝辞

本研究は第4回農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成金にて実施いたしました。助成頂きました公益社団法人日本農芸化学会に深く御礼申し上げます。

### 4. 参考文献

1. Hussain A., Zia K. M., Tabasum S., Noreen A., Ali M., Iqbal R., Zuber M. Blends and composites of exopolysaccharides; properties and applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **94**, 10-27, 2017.
2. Sørensen H. M., Rochfort K. D., Maye S., MacLeod G., Brabazon D., Loscher C., Freeland B. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: Production, purification and health benefits towards functional food. *Nutrients* **14**, 2938, 2022.
3. Smitnont T., Tansakul C., Tanasupawat S., Keeratipibul S., Navarini L., Bosco M., Cescutti P. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *Int. J. Food Microbiol.* **51**, 105-111, 1999.
4. Abedfar A., Hosseinienezhad M., Sadeghi A., Raeisi M. Comparative survival of exopolysaccharide encapsulated *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in simulated gastrointestinal conditions and storage time. *J. Food Meas. Charact.* **15**, 594-603, 2021.

## 「ゴマペーストの物性とおいしさの制御」

研究代表者 岐阜大学応用生物科学部 勝野那嘉子  
中小企業研究責任者 株式会社真誠 藤村 誠

### 1. 背景：企業からの説明

#### ・背景・課題・内容

株式会社真誠では、焙煎後のゴマをペーストに加工した製品を製造している。この製造には主に、①ステンレス製やジルコニア製の微小球体を媒体とした媒体攪拌ミル、および②石臼型ミルの2種の製造方法を用いている。それら製造装置の条件を微調整することで性状をコントロールしようとしているが、品質を一定に保つことは困難で、実際の現場における品質管理はペーストの粒度分布測定のみである。一方で、粒度分布が同一であっても、粘度などの物性は異なる場合があり、加工方法の違いに起因すると推察されるものの、詳細な原因、メカニズムは不明であった。それらが明らかとなれば、生産現場でより細かなペースト物性制御への応用が期待でき、製品品質の向上が見込まれる。また、ゴマペーストは、ドレッシングなど2次加工原料としての利用が多く、例えば粘度調整ペーストを使用することで最終製品の品質向上にも寄与できると考えられる。加えて、ペースト物性は官能にも影響を与えると考えており、物性制御により食味の制御にも何らかの知見が得られると期待される。以上のことから、ペースト加工方法毎の物性（粘度、粒子形状、ゼータ電位など）と食味に関して研究を行いたいと考え、包括的に研究が実施できる勝野那嘉子先生に相談し、本事業に応募することとした。

#### ・成果等

加工方法ごとに異なる物性値を示すことが分かり、媒体攪拌型と石臼型で異なるような官能上の結果も得られた。ペーストに現れる物性の特徴が加工方法毎にある程度決

まっていると示唆されたため、必要とされる物性を持つペーストを狙った製造の実現が期待できた。

### 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

#### ・研究背景

これまでの研究において、ゴマペースト中に分散している粒子の特性解析から、分散安定性向上に重要な粒子特性を明らかにし<sup>1)</sup>、実際に安定性の向上につなげている実績を有していることと、各種顕微鏡観察と画像解析による内部構造の定量的評価や放射光を用いた食品成分のナノ構造解析の実績<sup>2)</sup>を有していることから、それらの知見をもとにペースト化方法の違いがゴマペーストの物性や食味の違いに与える影響を明らかにすることを目的とし連携研究を進めた。

#### ・研究の詳細

煎りゴマは脂質を約50%含み、ミルによる粉砕で分散媒が油脂、分散質がたんぱく質などの粒子からなる油中粒子分散系のペーストになる。初めにミル加工法が異なる3種類のゴマペースト、すなわち、ボールミル（媒体攪拌ミル）加工ペースト（B式）、臼式ミル加工ペースト（F式）、臼式と微粉砕媒体攪拌ミル加工を組み合わせたペースト（F+A式）で物性の違いを明らかにした。ペースト化方法は図1に示した。左の媒体攪拌ミルがB式とA式ミルである。右のミルが臼式ミル（F式ミル）である。初めに3つの異なるペーストの粒子特性を分析した。レーザー回折式粒度分布測定の結果から、どのペーストも粒度分布は二峰性を示し、粒子径が小さい方のピークは10 μm程度、粒子径が

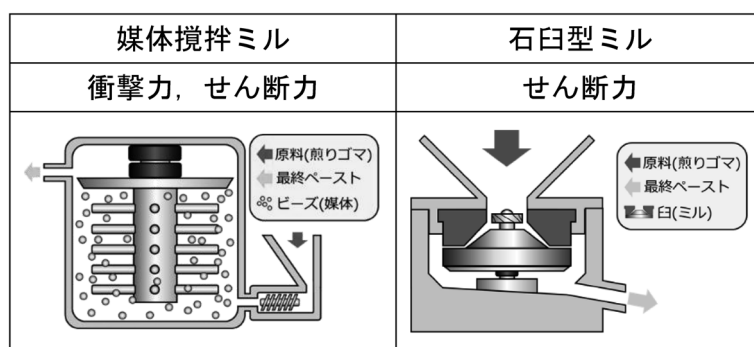


図1. ペースト化方法

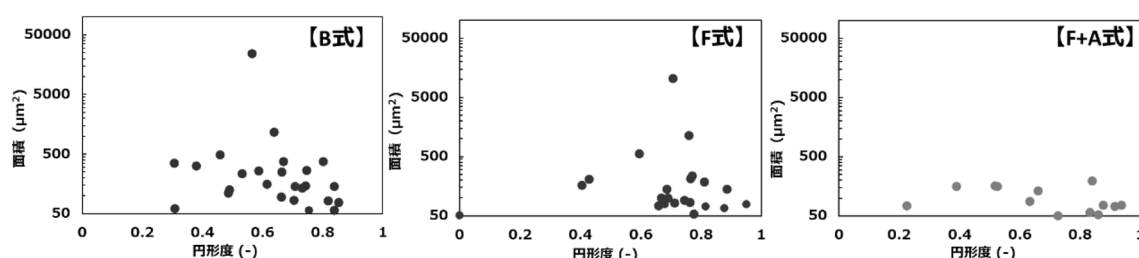


図2. 各ペーストに含まれるざらつきを感じる粒子の面積と円形度の分布

大きい方のピークは  $300\ \mu\text{m}$  程度であった。B式, F式のペーストには粒径  $300\ \mu\text{m}$  程度の粒子が多く含まれていたが, F+A式ペーストは  $7\ \mu\text{m}$  程度の粒子の方が多く含まれていた。食物の粒子感覚の認知閾値は粒子径  $10\sim 25\ \mu\text{m}$  の範囲にあると報告されている<sup>3)</sup>。各ゴマペースト中の粒子は, 粒子感覚認知閾値より大きな粒子径において, 分布や量が異なっていた (図2)。

次に小角X線散乱測定からペーストのナノ構造の解析を行った。成分が全く同じであるゴマから加工したにもかかわらず, 散乱曲線がペーストの種類によって異なっており, ペースト加工方法を変えるとナノ構造から変化することが明らかとなった。F+A式ミル加工ペーストでは  $q = 1.1\ \text{nm}^{-1}$  に Bragg ピークが出現しており,  $5.6\ \text{nm}$  の周期性のある構造があることが明らかとなった。B式ではF+A式に見られた  $q$  値に若干のショルダーがあり, その他に  $q = 0.4\ \text{nm}^{-1}$  にもショルダーがあり, Guinier-Porod モデルから回転半径  $R_g$   $4\ \text{nm}$  程度の構造が存在することが明らかとなった。また, F式では Guinier-Porod モデルから  $R_g$   $2\ \text{nm}$  程度の構造が存在することが明らかとなった。B式, F式, F+A式ミル加工のペーストの粒子のゼータ電位は, それぞれ,  $-24, 6.9, 13.9$  となり, ミル加工法が異なるとゼータ電位も異なっていた。

次に, ペーストを喫食した際の物性変化を明らかにするために飲み込む直前の唾液量である  $1.1\ \text{ml/min}$  を元にペーストに対して最大10%の人工唾液を混合し<sup>4)</sup>, 人工唾液ゴ

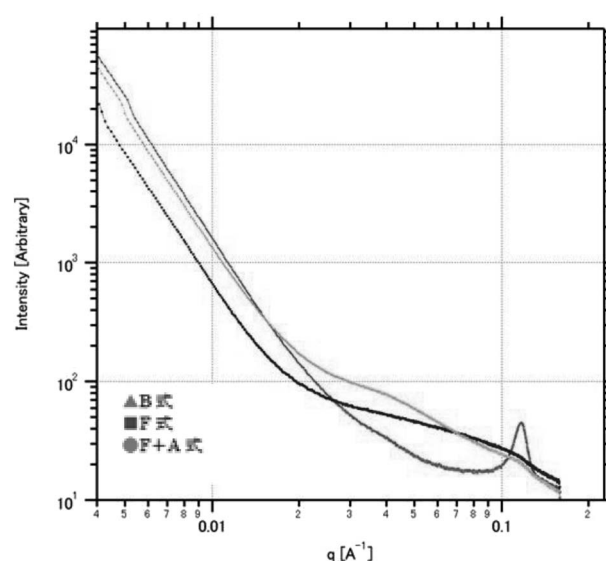


図3. 各ペーストの小角X線散乱曲線の比較 (100倍希釈ペースト)

マ混合モデルペーストを作製し, 動的粘弾性測定に供した。人工唾液添加ペーストの動的粘弾性試験において, B式ミル加工ペーストは  $G'$ ,  $G''$  ともに最も大きい値となった。B式及びF式ミル加工ペーストの  $\tan\delta$  値は, 添加前は  $0.09$  ( $1\ \text{Hz}$ ) であったが添加量の増加に伴い上昇し, 唾液添加量が10%で両ペーストとも約  $0.3$  となった (図4)。一方でF+A式ミル加工ペーストの  $\tan\delta$  値は, 添加前は  $0.76$  ( $1\ \text{Hz}$ ) であったが添加量の増加に伴い減少し, 唾液添加量が10%

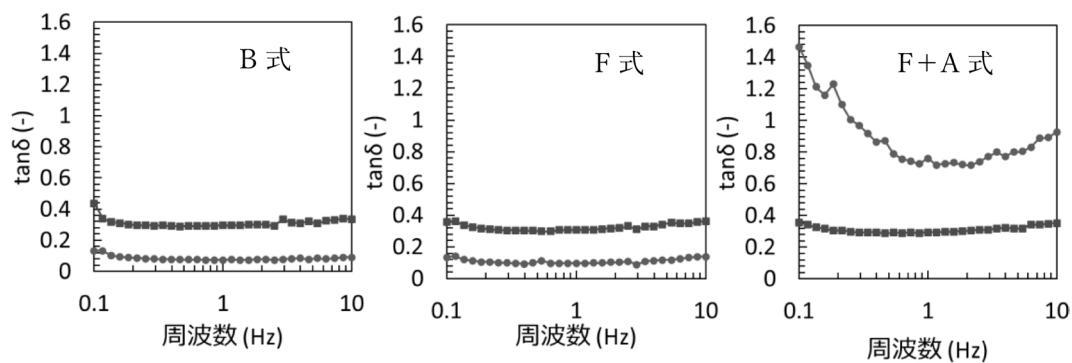


図4. 人工唾液添加前後のゴマペーストの物性とミル加工法の関係  
●は人口唾液を添加していないペースト，■は人工唾液を10%添加し、混合したペースト

で0.29となった(図4)。ペーストそのものの物性がミル加工法の違いにより大きく異なっており、唾液混量が増加していく過程の粘弾性変化が、ペーストによって異なっていることが示唆された<sup>5)</sup>。

各ペーストの物性が異なっていたことから共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて、ペーストの構造を観察した。染色には Nile Red を用いて油脂を染色し観察を行った。水分添加量の増加に伴い油水界面が観察され、分散媒が油から水へと転相することが確認された。転相後に観察された油滴は、どのペーストも固形粒子を含み、直径30  $\mu\text{m}$ 程度の大きさであった。

次に質的経時変化測定法を用いて官能評価試験を行った。ミル加工法の違いによって評価用語の出現する時間及び強度が異なっていた。「ざらざら」はB式およびF式ミル加工のペーストで喫食初期に感じられた。一方で、F+A式ミル加工のペーストでは喫食初期からクリーミーさを感じていることが明らかになった。このことは、ペーストに分散している固形粒子の大きさや形状が直接関与していると考えられ、ざらつきを感じ始める粒子の大きさである面積約50  $\mu\text{m}^2$ 以上の粒子が多いB式やF式ミル加工のペーストでざらつきが感じられていた(図2)。また、B式ミル加工のペーストでは口腔内にまとわりつく感覚が喫食直後から強く、人工唾液混合時の粘弾性測定の結果と一致しており、唾液混合量が少ない段階でのペーストの粘弾性が他のペーストより大きいことが影響していると考えられた。

#### ・考察と展望

本研究では、ミル加工法が異なるペースト3種を用いて、喫食時の食感変化とペースト物性の関係解明を行った。ミル加工法が異なると分散する固形粒子の大きさが変わるだけでなく、ナノレベルから構造変化が起きており、その結果、ゼータ電位などの分散安定性に影響する粒子特性も変化したと考えられた。喫食前のペースト物性はミル加工法

によって異なり、喫食中にどのペーストも同じ物性に近づいたことから、ミル加工法の異なるペーストの初期物性の違いが、喫食中の口腔内での食感変化に影響し、その食感の時間変化がゴマペーストの食味に重要な要素となっていると考えられた。ミル加工法を変えることにより、ペーストの初期物性とそれに伴う喫食中の物性も変えることができたことから、ペースト加工条件やペースト化方法の検討はゴマペーストの食味の制御に有効であることが明らかになった。今回の研究では、ゴマペーストの食味に重要とされるコク味と口腔内でのペーストの時間的な物性変化やフレーバーリリースとの関係を明らかにするまでには至らなかったため、今後、さらなる研究を行う予定である。

#### 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

1. Katsuno, N. et al, Effect of Heat Temperature on Colloidal Stability of Sesame Paste. The 20th International Drying Symposium, Proceedings B-6-1, 7-10 Aug. 2016.
2. Dang, Y. et al, Effect of the addition of pregelatinized rice starch paste on the retrogradation of rice starch gel. Food Hydrocolloids 145: 109159, 2023.
3. 今井悦子；口腔内粒子感覚と食品特性，日本調理科学会誌，33(1)，76-81，2000.
4. 渡部 茂；口腔保健学は輝くか～一隅を照らしたイグ・ノーベル賞～，小児保健研究，79(2)，104-108，2020.
5. 青山農吾，藤村 誠，北山朱美，今泉鉄平，西津貴久，勝野那嘉子；ミル加工法がゴマペースト物性に与える影響，日本農芸化学会2023年度大会講演要旨集

# 「ヒト嗅覚受容体センサーによる全ての匂い・香り情報のデジタル化」

研究代表者 大阪大学産業科学研究所 黒田俊一  
中小企業研究責任者 株式会社香味醗酵 久保賢治

## 1. 背景：企業からの説明

ヒトの5感による感覚情報を、「完全にデジタルデータ化（網羅的かつ一義的表現）して、他人に正確に伝搬し、遠隔地で正確に再現する技術」は非常に重要である。実際に、視覚はカメラとLCD、聴覚はマイクとスピーカー、触覚は3D スキャナーと3D プリンター、味覚は基本味7種（甘、塩、渋、酸、旨、雑、苦）の味覚センサーが実用化されており、嗅覚以外の感覚情報のデジタル化はほぼ達成されている。しかし、ヒト嗅覚が感じる数十万種類の匂い分子を全て識別できる匂いセンサー（化学センサーや金属センサー）は未だ存在せず、ヒト嗅覚に依存した主観的な「官能試験」しかない。そこで、ヒト嗅覚を支える388種類の嗅覚受容体をセンシング分子としてバイオセンサー化した大阪大学産業科学研究所の黒田先生に相談し、本事業に応募することにした。本センサーを活用すれば、ヒト嗅覚が感じる全ての匂い分子（単純臭）だけでなく、複雑に入り混じった複合臭までも、嗅覚受容体応答で評価して、388次元のパラメーターでデジタルデータ化できると考え、次世代情報機器においてヒト嗅覚情報の「記録、保存、伝送、再生（一連の流れを匂い情報DXと命名）」を可能

にし、全く新しい産業の創生が促されると期待された。

## 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

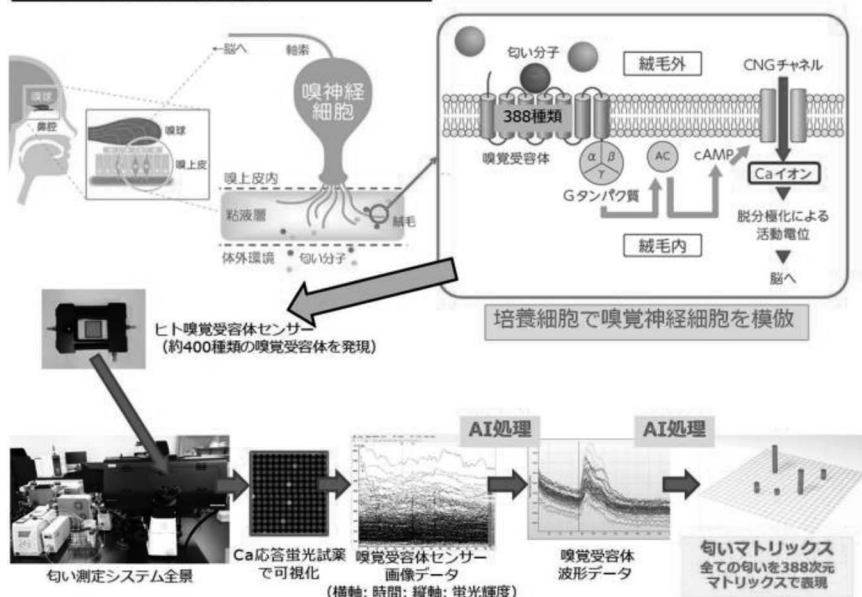
### 【ヒト嗅覚受容体センサーの必要性】

ヒト嗅覚受容体群はヒトが感じる全ての匂い分子を表現するために「絶対的基準」であるので、センシング分子として使用するのには非常に有意義である。また、現代の科学では、ヒト嗅覚受容体群を完全に再現する代替センシング分子を創製することは不可能に近い。

### 【ヒト嗅覚受容体センサーの概要】

ヒト嗅覚は僅か388種類の嗅覚受容体のみで、数十万種類の匂い分子（単純臭から複合臭迄）を認識する。これは、各嗅覚受容体がファジーな分子認識機構を有し、数多くの匂い分子と異なる親和性で結合し、活性化し、嗅神経細胞内にCaイオンを取り込む（このCaイオン量が嗅神経活性化度合いと同義）。つまり、388種類の嗅覚受容体全体の活性化パターンが嗅覚情報（デジタル情報）となる。このパターン認識機構全体を「嗅覚受容体レパートリー」と呼ぶ。我々は、マウス嗅覚受容体を用いた実績（鈴木ら、

## ヒト嗅覚受容体センサー





Sci. Rep. 6 (2016) 19934) に基づき、スライドグラス上に 20×20 の計400 ウェルを形成し、各ウェルに全ヒト嗅覚受容体発現細胞 (388種類; 各ウェル毎に異なる受容体) を整列配置し、ヒト嗅覚受容体センサーとした。次に、還流装置・ビデオ付蛍光顕微鏡に同センサーをセットし、匂い分子で刺激した。その際、活性化した嗅覚受容体発現細胞にはCa イオンが動員されるので、予め加えていたCa 応答蛍光タンパク質により経時的なCa濃度変化が蛍光強度変化として動画記録した。得られた動画から、各細胞単位の蛍光変化をAI プログラムにより抽出解析し、最終的に「各嗅覚受容体の活性化度」を得て、388次元の匂いマトリックスとして表現する。これが求めるデジタルデータ化されたヒト嗅覚情報になる。

### 【本研究の詳細】

本研究開始当時は、「ヒト嗅覚受容体センサー」はプロトタイプであったが、すでに、様々な匂い分子 (単純臭・複合臭) の測定から匂いマトリックスの生成まで一連の作業は可能になっていた。しかし、上述の匂い情報DX を実現するためには、一層安定して測定し匂いマトリックスデータを蓄積するために、以下の改良を行った。

#### ①使用するヒト嗅覚受容体発現細胞の最適化

基本的にヒト嗅覚受容体発現細胞には、HEK293細胞を使用するが、発現した嗅覚受容体が小胞体中に蓄積し、細胞表面への嗅覚受容体発現がスムーズにいかないケースが多い。そこで、各種シャペロン分子を導入し、また嗅覚受容体のN末端側にシグナルペプチドを付加して、嗅覚受容体の細胞表面への発現効率の改善を図った。

#### ②匂い分子に応答した嗅覚受容体により駆動する細胞内情報伝達分子の最適化

嗅覚受容体はG タンパク質共役型受容体であるが、 $G\alpha$  タンパク質は嗅神経細胞特異的なGNALを要求するので、GNAL 遺伝子を安定的に発現させた。また、従来の嗅覚受容体応答は匂い分子刺激直後から数時間までに生じるcAMP 産生量 (累積) のエンドポイントで評価していたが、それでは、嗅覚の迅速な匂い認識機構を正確に評価できないと考え、嗅神経細胞の活動電位の源であるCNG チャネル (細胞内へのNa イオンとCa イオンの流入を行う) を共発現させ、匂い分子刺激直後から数分間の細胞内Ca イオン濃度変化をリアルタイムで評価した。その結果、ヒト嗅覚が同じ匂いを感じなくなる「順応」までも評価できるようになった。

#### ③Ca イオン濃度検知用蛍光タンパク質の最適化

当初のヒト嗅覚受容体センサーでは、Ca イオン応答性蛍光色素により、細胞内Ca濃度の定量を行っていたが、

測定直前に同蛍光色素を導入する手間が測定誤差を生む可能性が高いと考え、Ca イオン応答性タンパク質を導入して、測定精度の改良を行った。

#### ④データ処理用AI プログラムの最適化

本来であれば、この部分も進めるべきであったが、本研究期間中に実施することは出来なかった。

### 【考察と展望】

本研究により「ヒト嗅覚受容体センサー」の充実を図ることが出来た。その結果、2023年度より、NEDO先導研究プログラム／新産業・革新技術創出に向けた先導研究プログラムに「ヒト嗅覚受容体応答に基づく世界初の匂い情報DX の研究開発」の課題で採択され、匂い情報DX実現のために、同センサーでヒトに対して使用可能な匂い分子 (食品添加物、香料、アロマ精油など、約3000種類) の匂いマトリックスのデータベース化を進めている。その結果、匂い情報DX (記録、保存、伝送、再生) が可能になり、VR (仮想現実)・AR (拡張現実)・MR (複合現実)・SR (代替現実) などのXR (クロスリアリティ) にも導入されて、新規な映像・娯楽・生活・ロボット関連産業を創出することが期待される。

### 3. 謝辞

2022年度農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成金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

1. Effects of 3-octen-2-one on human olfactory receptor responses to vanilla flavor  
Motoki Yasunaga, Eiji Takai, Shoji Hattori, Kenji Tatemasu, Shun'ichi Kuroda  
Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2022, Vol. 86, No. 11, 1562-1569  
Doi: 10.1093/bbb/zbac147
2. Human olfactory receptor sensor for odor reconstitution.  
Shun'ichi Kuroda, Yukiko Nakaya-Kishi, Kenji Tatemasu, Shuji Hinuma  
Sensors, 2023, Vol. 23, 6164  
Doi: 10.3390/s23136164
3. 感覚的消臭の変調作用における嗅覚受容体応答の変化  
光田 恵, 竹下剛司, 花岡早苗, 近藤早紀, 立松健司, 黒田俊一  
人間と生活環境, 2023, Vol. 30, No. 1, 1-8

# 「プラズマローゲン代謝を行う発酵細菌の同定と 多様なプラズマローゲン分子種を含む発酵食品の開発」

研究代表者 九州大学大学院農学研究院 土居克実  
中小企業研究責任者 レオロジー機能食品研究所 馬渡志郎

## 1. 背景：企業からの説明

レオロジー機能食品研究所では、様々な食品から機能性物質を抽出し、サプリメントや食品・飲料、また、健康産業へ価値の高い製品開発に役立つ素材についての研究を行っている。これらのうち、ホタテ貝より新たな抽出法で高純度のプラズマローゲンを抽出し、プラズマローゲンBOOCSソフトカプセル、同ハードカプセルとして製品化している。

上記の研究で、プラズマローゲンの詳細な機能解明が必須となったが、そのためにはプラズマローゲンの大量調製が必要であった。また、ホタテ貝以外の安価な材料を用いたプラズマローゲン生産方法を開発することを企図した。このため、乳酸菌などの微生物生産や機能解明を専門としている土居教授との連携研究を実施することで、上記の目的を達成することが可能と考えた。具体的には、土居教授が単離した細菌株および菌株保存機関から購入した菌株等を用い、プラズマローゲン生産性を確認後、生産株のゲノム解読を行い、プラズマローゲン生合成に関わる遺伝子を解明し、大腸菌でのプラズマローゲン生産を試みた。また、培養条件の違いによるプラズマローゲン生産性の違いを確認した。

・成果による事業への期待効果：本研究の成果から、プラズマローゲン合成誘導体KIT-13が、米国食品医薬品局より「レット症候群治療薬」の希少小児疾患指定を受けることができた。また、本研究の成果から3件の特許を出願できたことから、新製品の開発、機能利用が進展することが期待できる。

## 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

プラズマローゲンは偏性嫌気性細菌や動物に広く存在する一方で、好気性細菌と通性嫌気性細菌には存在しないと考えられてきた。微生物においてプラズマローゲンの存在が確認され始めたのは1960年代であり、それ以降、*Clostridium*属を中心にいくつかの偏性嫌気性細菌からプラズマローゲンが見つかった。当初、自然界のプラズマローゲン生合成経路は微生物と動物細胞で共通している

と考えられていたが、1970年代初頭に動物のPIs生合成経路が解明され、飽和エーテル脂質の脱飽和に分子酸素が必要であることが判明した。また、代謝標識によって動物のプラズマローゲン生合成経路の前駆体であるDHAPが嫌気性細菌の経路では前駆体となり得なかったことから、嫌気経路と好気経路の2つの経路の存在が明らかとなった。さらに2021年、*Clostridium perfringens*において嫌気的なビニルエーテル結合の導入を触媒するプラズマローゲン生合成酵素(PIsA, PIsR)遺伝子が同定された。我々はこれらの遺伝子がヒト腸内細菌を含む偏性嫌気性細菌と通性嫌気性細菌で広く保存されていることを確認し、これまで偏性嫌気性細菌に特有と考えられていたプラズマローゲンが、通性嫌気性細菌にも存在する可能性を認めた。そのため、これまでサイレージやヨーグルト等の乳酸発酵製品より乳酸菌の単離と同定から、これらのゲノム解析や有用遺伝子利用を実施してきた実績に基づき、本研究を開始することを決断した。

### プラズマローゲン生産菌の探索

通性嫌気性細菌におけるプラズマローゲンの存在を確認するため、*Lactobacillales*目に着目した。*Lactobacillales*目は多くの乳酸菌を含んでおり、乳酸菌はヒトに関連する細菌の中で最も多様であると考えられている。また、*Lactobacillus*属や*Lactococcus*属などでは産業的に利用価値の高い株も多く含まれる。そこで、*Lactobacillales*目の各菌株から脂質を抽出し、HPLC解析により、プラズマローゲン生産株の同定とプラズマローゲン高生産株の分離を試みた。

試験には当研究室分離菌株および菌株保存機関からの購入菌株を用い、表1に示す条件で培養した。

各菌株を培養後、0.9%塩化ナトリウム溶液で3回洗浄し、菌体湿重量を測定した。洗浄後菌体は使用まで-30℃で保管した。次に、菌体からの脂質抽出には、Bligh & Dyer法を用いた。菌体ペレットに1 mlの水を添加して混和後、3.75 mlのクロロホルム/メタノール溶液(1:2)に懸濁し超音波破碎後、遠心分離によってクロロホルム層を回収し、脂質をヘキサン/イソプロパノール(3:2)に再懸

表1. 本研究で使用した菌株およびそれらの培養条件

科	株名	培地	培養方法	培養温度
Aerococcaceae	<i>Aerococcus christensenii</i> JCM18985 <sup>T</sup>	Columbia blood 培地	静置培養	30℃
	<i>Aerococcus urinae</i> JCM18986 <sup>T</sup>	Columbia blood 培地	静置培養	31℃
	<i>Aerococcus urinaehominis</i> JCM18987 <sup>T</sup>	Columbia blood 培地	嫌気培養	32℃
	<i>Aerococcus viridans</i> JCM20461 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> JCM1154 <sup>T</sup>	Trypticase glucose 培地	静置培養	30℃
	<i>Carnobacterium mobile</i> JCM12516 <sup>T</sup>	Trypticase glucose 培地	静置培養	30℃
Enterococcaceae	<i>Enterococcus faecalis</i> K-4	M17 培地	静置培養	30℃
	<i>Enterococcus faecalis</i> JCM8726 <sup>T</sup>	Trypticase soy blood 培地	静置培養	30℃
	<i>Enterococcus</i> sp. NB13	MRS 培地	静置培養	30℃
Streptococcaceae	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC11602	Tomato juice 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC11603	Tomato juice 培地	嫌気培養	26℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC14365	MRS 培地	嫌気培養	26℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC BAA-493	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> JCM16167 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> #34	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> #63	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus cremoris</i> subsp. <i>cremoris</i> #6346	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactococcus</i> sp. #8-3	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Streptococcus agalactiae</i> JCM5671 <sup>T</sup>	Trypto-soya 培地	静置培養	37℃
	<i>Streptococcus equinus</i> JCM7879 <sup>T</sup>	BHIY 培地	静置培養	37℃
	<i>Streptococcus mutans</i> JCM5705 <sup>T</sup>	Trypto-soya 培地	静置培養	37℃
Lactobacillaceae	<i>Lentilactobacillus rapi</i> NGRI0130	MRS 培地	静置培養	37℃
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> JCM1149 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> JCM1115 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lentilactobacillus buchneri</i> subsp. <i>silagei</i> MGR2-32*	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lentilactobacillus kefir</i> JCM5818 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lentilactobacillus otakiensis</i> JCM15040 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lentilactobacillus parafarraginis</i> NRIC0677 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Limosilactobacillus fermentum</i> JCM1173 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> JCM1166 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Pediococcus acidilactici</i> JCM87970 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM6124 <sup>T</sup>	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Leuconostoc</i> sp. T21-2	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. dG3	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0111	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0114	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0225W	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0225Y	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0233S	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0301	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0304	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0305	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0315	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0506	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0524	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI0529	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI1149	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. NGRI1191	MRS 培地	静置培養	30℃
	<i>Lactobacillus</i> sp. FA4	MRS 培地	静置培養	30℃

\*参考文献 1

濁し、0.45 µm フィルターでろ過した。抽出した脂質を窒素ガスで乾燥させ、0.5 ml の 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン-塩酸塩溶液を加えて加水分解後、クロロホルム/メタノール (1:2) と混和後、クロロホルム層を回収して窒素ガス下でさせた脂質をアセトニトリルに再懸濁し、0.45 µm フィルターでろ過した。調製した脂質溶液の解析には、HPLC を用いた。菌体の総リン脂質の検出は蒸発光散乱器、酸加水分解後のアルデヒドの検出は UV 検出器にて波長 356 nm で行った。HPLC システムは、Agilent 1200 シリーズを使用した。総リン脂質の検出の場合、カラムは Lichrosphere DIOL (250×3 mm, 5 µm) を使用し、流速 0.8 ml/min, カラム温度 50℃ で行なった。脂質標準溶液として、PC のヘキサン/イソプロパノール (3:2) 希釈系列を用いた。グリセリン脂質の 3 つのサブクラスのうち、ビニルエーテル結合を含むプラズマローゲンが酸加水分解を受けやすく、アルデヒドを放出するという性質を利用し、菌体脂質からアルデヒドが検出された菌株をプラズマローゲン生産株とした。

その結果、供試した *Lactobacillales* 目 51 株中 14 株からアルデヒドが検出され、通性嫌気性細菌におけるプラズマローゲンの存在を確認できた。アルデヒドの検出量は菌体のプラズマローゲン量に由来するため、菌体湿重量 1 mg 当たりのアルデヒド量が各菌株のプラズマローゲン生産量の指標となる。14 株のプラズマローゲン生産株のうち、*E. faecalis* K4 と *L. cremoris* #8-3 は菌体湿重量 1 mg 当たりのアルデヒド量がそれぞれ 0.45 µg と 0.56 µg と多く、プラズマローゲン高生産性であった。

#### プラズマローゲン高生産株のゲノム解析

プラズマローゲン高生産性であった K4 株のプラズマローゲン生産に関与する遺伝子群の特定を目的とし、K4 株の全ゲノムシーケンスを行い、詳細なゲノム情報の入手を試みた。培養菌体をラビアーゼ、リゾチーム、プロテイナーゼ K により溶菌後、溶菌液をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール処理し、核酸をエタノール抽出し、RNase 処理を行い、DNA を精製した。精製した K4 株ゲノム DNA は、ONT MinION によるロングリードシーケンスと、Illumina MiSeq によるショートリードシーケンスを併用してゲノム解読を行なった。リードのトリミングには *platanus trim ver.1.0.7* と *Guppy ver. 4.0.15* を使用した。*de novo* アセンブルは *Unicycler ver. 0.4.8* で行い、アノテーションは *DFAST ver. 1.2.6* で行った。

*E. faecalis* K4 の染色体は 2,790,927 bp であり、本株は 2 つのプラスミド (pEK4 L, pEK4S) を保有していた (参考文献 2)。K4 株ゲノム全体の GC 含量は 37.5% で、合計

2,734 個の CDS が推定された (GCA\_021655635.1)。K4 株染色体ゲノムを他の *Enterococcus* 属のゲノム配列と比較したところ、*E. faecalis* 76EA1 と ANI および dDDH でそれぞれ 99.8%, 99.3% の相同性を示し、最も近縁であった。

嫌気性細菌のプラズマローゲン生合成経路は *Clostridium beijerinckii* で推定されているため、本経路上の酵素と相同性のあるアミノ酸配列をコードする遺伝子領域を K4 株で探索した。*C. beijerinckii* は 3 種類のプラズマローゲン種 (PlsPE, PlsPG, PlsCL) を生産すると推定されているが、K4 株では PlsPE の前駆体である PtdSer および PE を合成する酵素のうち Pss と Psd を持たないことから、PlsPE を生産できず、PlsPG と PlsCL が主要な Pls 種であると考えられた。また、K4 株ゲノム上には *C. perfringens* のプラズマローゲン生合成酵素遺伝子と相同性を示す遺伝子が見つかった。本遺伝子は 1,416 aa の 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase をコードする遺伝子としてアノテーションされた。本酵素は *C. perfringens* では *plsA*, *plsR* の 2 遺伝子から成るオペロン構造を取っていたのに対して、K4 株では単一遺伝子として座乗していた。

#### 大腸菌における K4 株 *plsA* の異種発現

ゲノムシーケンスにより判明した K4 株 *plsA* 遺伝子を PCR 増幅して、pETite N-His SUMO Kan vector に挿入し、大腸菌 HI-Control 10G Chemically Competent Cells を形質転換した。得られた形質転換大腸菌から、組換えプラスミド pPlsAK4 を調製した。上記で得られた形質転換大腸菌を、ZYM5052 培地を用い、嫌気条件下及び好気条件下にて 30℃ で 24 時間培養した。嫌気培養には AnaeroPak-Anaero を用い、好気培養では 180 rpm 往復振とうを行った。得られた菌体を超音波破碎後、SDS-PAGE に供し、Western blotting 後、抗 His-tag 抗体によって検出した。

その結果、K4 株の推定 *plsA* 遺伝子を保有する大腸菌 BL21 (DE3)/pPlsAK4 株からは、目的タンパク質の発現が検出された (図 1)。一方、*plsA* 遺伝子を保有しない大腸菌株からは目的の位置にバンドが検出されなかった。また、大腸菌 BL21 (DE3)/pPlsAK4 株は好気培養と嫌気培養によらず目的タンパク質の発現が見られた。

#### *E. faecalis* K4 株におけるプラズマローゲン生産の最適条件の検討

ルーメン微生物叢のプラズマローゲン分析では集積培養のために培地成分が変更されることはあったが、純粋培養における培地とプラズマローゲン生産性の関係は調べられてこなかった。そこでプラズマローゲン高生産性の K4 株を用い、培養条件がプラズマローゲン生産性に与える影響について検討した。



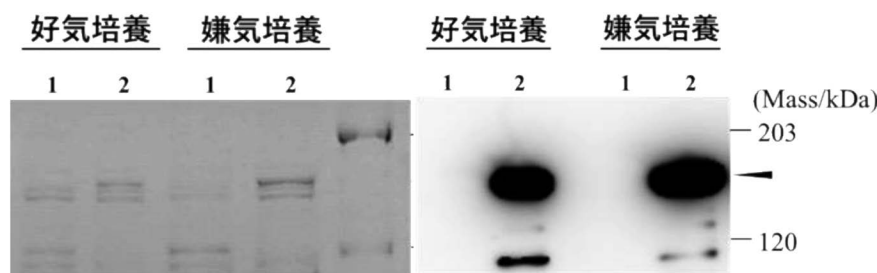


図1 *plsA* 遺伝子による形質転換大腸菌タンパク質の SDS-PAGE (左) と抗 His-tag 抗体を用いた Western Blotting  
1: 大腸菌 BL21 株, 2: 大腸菌 BL21 (DE3)/pPlsAK4 株

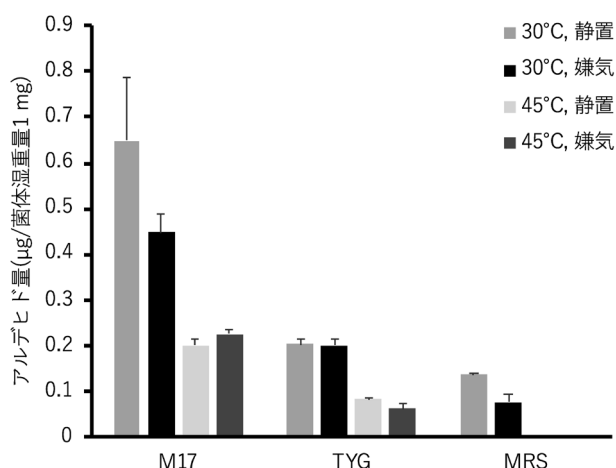


図2 異なる培地で培養した K-4 株脂質からのアルデヒド検出量

K-4 株の培養には M17 培地, MRS 培地, TYG 培地を用い, 30°C または 45°C で静置培養または嫌気培養を行った。その結果, 培養温度や嫌気度によらず, M17 培地で培養した K-4 株脂質から高いアルデヒド量が検出された (図2)。また, M17 培地にて 30°C, 静置培養すると菌体脂質からのアルデヒド検出量が最大となった。MRS 培地で培養した K-4 株脂質は最もアルデヒド検出量が少なく, 45°C 培養では全く検出されなかった。さらに, 静置培養と嫌気培養ではアルデヒド検出量に大きな差は生じなかったが, 30°C と比較して 45°C で培養した菌株脂質からのアルデヒド検出量はおおよそ半減していた。

### 3. 謝辞

本申請研究に助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。

### 4. 成果報告および参考文献

#### 学術論文

- Irimajiri R, Kuwabara M, Togo S, Fujino Y, Honsho M, Mawatari S, Fujino T, Doi K (2024) Complete genome sequence of *Lentilactobacillus buchneri* subsp. *silagei*

MGR2-32 isolated from guinea grass silage in Okinawa, Japan, *Microbiol Resour Announc.*, **13**(4), e0069523.

- Kuwabara M, Irimajiri R, Togo S, Fujino Y, Honsho M, Mawatari S, Fujino T, Doi K (2023) Complete genome sequence of the thermophilic *Enterococcus faecalis* strain K-4, isolated from a grass silage in Thailand, *Microbiol Resour Announc.*, **12**(4), e0081422.

#### 特許出願

- 発明者: 藤野武彦, 馬渡志郎, 土居克実, 本庄雅則  
発明の名称: プラズマローゲン産生促進用培地, プラズマローゲン含有組成物の製造方法及びプラズマローゲンの製造方法  
出願番号 (国際出願番号): 特願2022-166287  
公開番号 (公開出願番号): 特開2024-058887  
出願日: 2022年10月17日  
公開日 (公表日): 2024年04月30日
- 発明者: 藤野武彦, 馬渡志郎, 土居克実, 本庄雅則  
発明の名称: タンパク質, ポリヌクレオチド, 発現ベクター, 形質転換体, プラズマローゲン含有組成物及びプラズマローゲンの製造方法  
出願番号 (国際出願番号): 特願2022-139676  
公開番号 (公開出願番号): 特開2024-035303  
出願日: 2022年9月2日  
公開日 (公表日): 2024年3月14日
- 発明者: 藤野武彦, 馬渡志郎, 土居克実, 本庄雅則  
発明の名称: プラズマローゲン合成用乳酸菌, プラズマローゲン含有組成物及びプラズマローゲンの製造方法  
出願番号 (国際出願番号): 特願2022-025310  
出願日: 2022年2月22日

#### 口頭発表

- 桑原芽美, 入交伶, 藤野泰寛, 本庄雅則, 馬渡志郎, 藤野武彦, 土居克実 プラズマローゲン生産株の探索と効率的プラズマローゲン生産法の検討, 第74回日本生物工学会大会, 2022年10月18日
- 入交伶, 桑原芽美, 藤野泰寛, 本庄雅則, 馬渡志郎, 藤野武彦, 土居克実 プラズマローゲン生産性細菌株の探索と高生産条件の確立, 第60回化学関連支部合同九州大会, 2023年7月1日
- 入交伶, 桑原芽美, 藤野泰寛, 本庄雅則, 馬渡志郎, 藤野武彦, 土居克実 通性または絶対嫌気性菌由来プラズマローゲンの効率的な生産方法の確立, 日本農芸化学会2023年度西日本・中四国支部合同大会, 2023年9月22日

# 「無農薬栽培米および無肥料自然栽培米の免疫機能性の解析」

研究代表者 東北大学大学院農学研究科 戸田雅子  
中小企業研究責任者 田伝むし 木村 純

## 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）
- ・大学との連携研究の具体的内容

田伝むしは肥料を使わず，田んぼに収穫後の稲藁を戻して土の中の栄養分を補給するなど，除草剤をはじめとする農薬を使わないことで土壌や地上の多様な生き物が盛んに活動して循環する環境を作り，稲に天然の栄養を吸収させる無肥料自然栽培のササニシキを栽培している．この無肥料自然栽培のササニシキの付加価値化や，また無肥料自然栽培と慣行栽培の収穫物の細菌叢の違いはあるかなどの研究が必要と考え，研究実施可能な戸田雅子先生と相談し，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

今回の共同研究により，無肥料自然栽培において収穫されたササニシキの米糠は，慣行栽培由来米糠と同程度の自然免疫賦活化能をもち，また脂肪酸成分を含むことが明らかになった．白米のアミノ酸や有機酸の含有レベルに関しても自然栽培と慣行栽培で顕著な差はないことが検出され，この点は意義深い．細菌叢に関しては，無肥料自然条件栽培と慣行栽培で異なることが示唆された．この結果は，農薬を使わない無肥料自然栽培が可能である説明の一端になると期待され，本事業の推進になると考えられる．

## 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

- ・研究に関する背景

コメは品種，産地，栽培法が様々であるが，そのような条件の違いがコメの三次機能に及ぼす影響についての知見は限られている．近年，環境微生物がヒト免疫系へ作用することが明らかになってきており<sup>(1)</sup>，慣行栽培と有機栽培の圃場では微生物相が異なることも示唆されている<sup>(2)</sup>．植物の「生体防御分子」や植物に寄生・共生する菌類由来分子は，ヒトやマウスの免疫系においては外来分子として認識され，免疫機能性分子として活用できるポテンシャルを持つ．また我々はこれまでに，米糠はマクロファージ（Mφ）や樹状細胞などの抗原提示細胞に対して活性化作用を持つことを見いだしている（日本農芸化学会2021年度年次大会発表）．Mφや樹状細胞は自然免疫系において中心的役割を果たし，食品成分によるこれらの細胞の活性

化は自然免疫の賦活化につながる．このような背景のもと，本研究は，田伝むし（宮城県石巻市和刈地区）から無肥料自然栽培のササニシキを，そしてその隣接地で栽培されていた慣行栽培のササニシキについても供与を受け，その自然免疫賦活性や含有成分を解析した．また，栽培法の違いが米糠の細菌叢に及ぼす影響を解析した．

- ・研究の詳細

(1) 栽培法の違いが米糠のマクロファージ活性化作用に及ぼす影響の解析

2022年と2023年に収穫された自然栽培と慣行栽培に由来する米糠PBS抽出物（水溶性抽出物）のMφ活性化作用を，ヒトMφ株BLaER1を用いて比較した．Mφ活性化指標として細胞のサイトカイン（IL-6とIL-10）産生を測定した．どのサンプルも顕著にMφにおけるサイトカイン産生を誘導し，自然栽培と慣行栽培に由来するサンプルのMφ活性化作用はほぼ同程度であった（図1A，2頁）．単球由来の樹状細胞モデルである骨髓由来マウス樹状細胞でも同様の結果が観察された．また，収穫後に即座に調製した米糠と，その後に数週間，低温保存された玄米から調製した米糠でMφ活性化レベルにほとんど差はなかった．白米PBS抽出物によるMφ活性化は，ほぼ検出限界以下であった．

食品・微生物成分による抗原提示細胞の賦活化メカニズムとして，トル様受容体への結合があげられる．そこで，TLR2あるいはTLR4/MD2/CD14複合体を発現するIL-8レポーター細胞（HEK 293 Transfectant）を用いたTLR反応性の解析を行った．興味深いことに，米糠抽出物はTLR4/MD2/CD14複合体に対してのみ，反応性を示した（図1B，2頁）．

TLR4に結合する代表的分子はグラム陰性菌の細胞壁成分・リポ多糖（LPS）である．リムルス試薬（LAL）法をベースとした解析により，2022年と2023年に由来する米糠抽出物には，ほぼ同レベルのLPSが検出された（図1C）．以上より，米糠抽出物に含まれる主なMφ活性化成分はTLR4結合分子であることが示唆された．

(2) 栽培法の違いが米糠及び白米に含まれる成分に及ぼす影

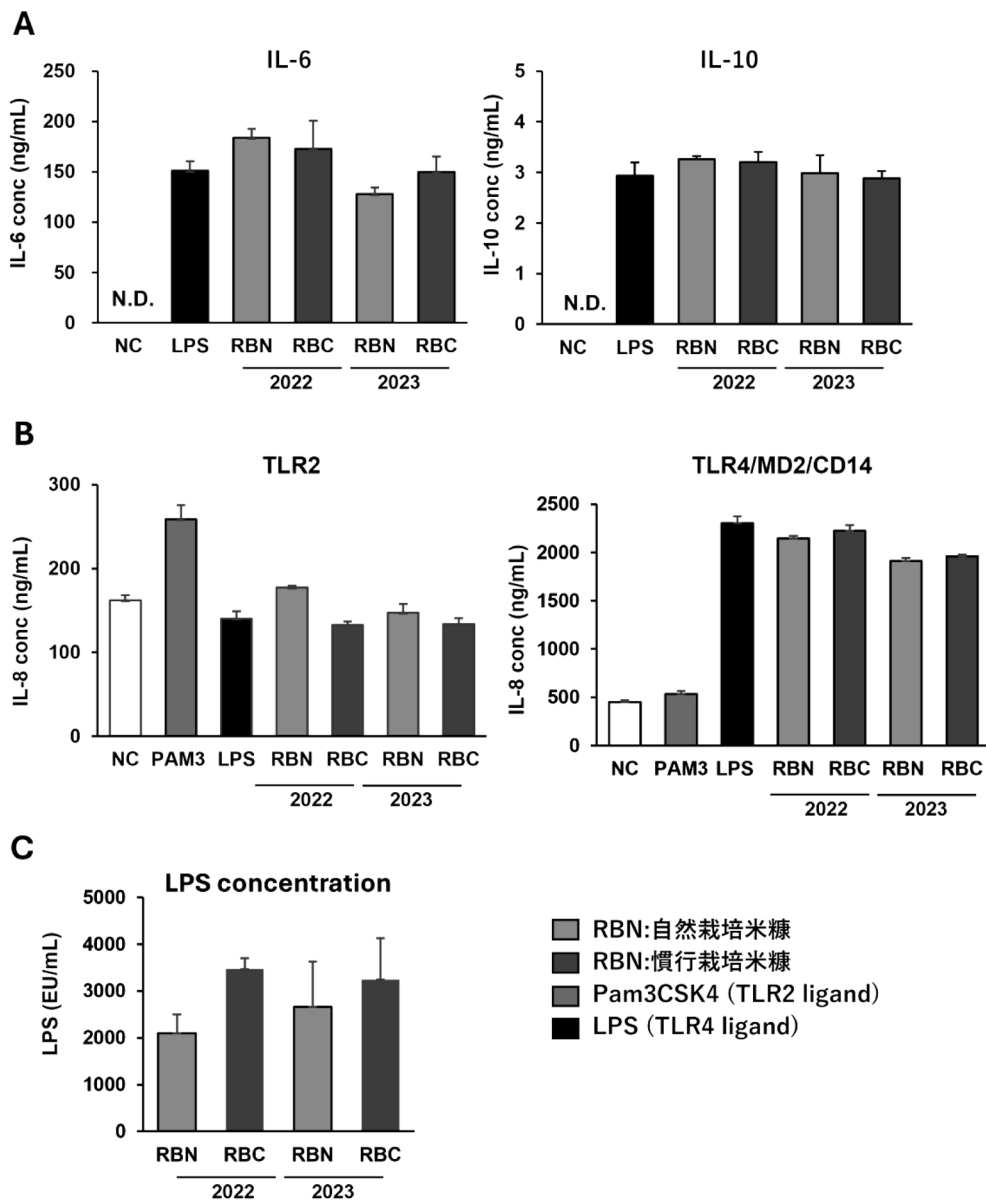


図1. 栽培法の違いが米糠のマクロファージ活性化作用に及ぼす影響の解析  
2022年と2023年に収穫した自然栽培あるいは慣行栽培に由来する米糠抽出物を調製した。(A) 米糠抽出物でMφ株BLaER1を処理し、培養上清中のサイトカイン濃度をELISAにより測定した。(B) 米糠抽出物中分子のTLR2やTLR4/MD2/CD14複合体に対する結合性を解析した。(C) 抽出物中のLPS濃度を測定した。N.D. not detectable

#### 響の解析

近年、アミノ酸や有機酸、脂肪酸が免疫細胞の機能に影響を与えることが示唆されている。そこで、自然栽培と慣行栽培が米糠や白米の成分レベルに及ぼす影響を調べるために、GC-MS/MS (GCMS-TQ8040 NX, Shimadzu Corporation) によるメタボローム解析を行った。その結果、白米抽出物では主要アミノ酸18種類、有機酸20種類などを中心として142種類の代謝物が検出されたが、自然栽培と慣行栽培のサンプルにおける各成分レベルに顕著な差はなかった。米糠抽出物に関しては、2022年と2023年に収穫

された慣行栽培由来サンプルにおいて、ロイシン、イソロイシン、バリンなどの分岐アミノ酸のレベルが高い傾向にあった。自然栽培から得られた米糠では、分岐鎖アミノ酸の含有量が高い傾向にあった。シロイヌナズナでは、飢餓時にオートファジーによってアミノ酸が生じ、さらに中でも分岐鎖アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンがエネルギー源とされることが報告されている<sup>(3)</sup>。一方で、米糠サンプルのフェニルアラニンやリジンは収穫年によって傾向が異なった(図2)。有機酸に関しては、乳酸やクエン酸、コハク酸、リンゴ酸などが検出されたが、自然栽培

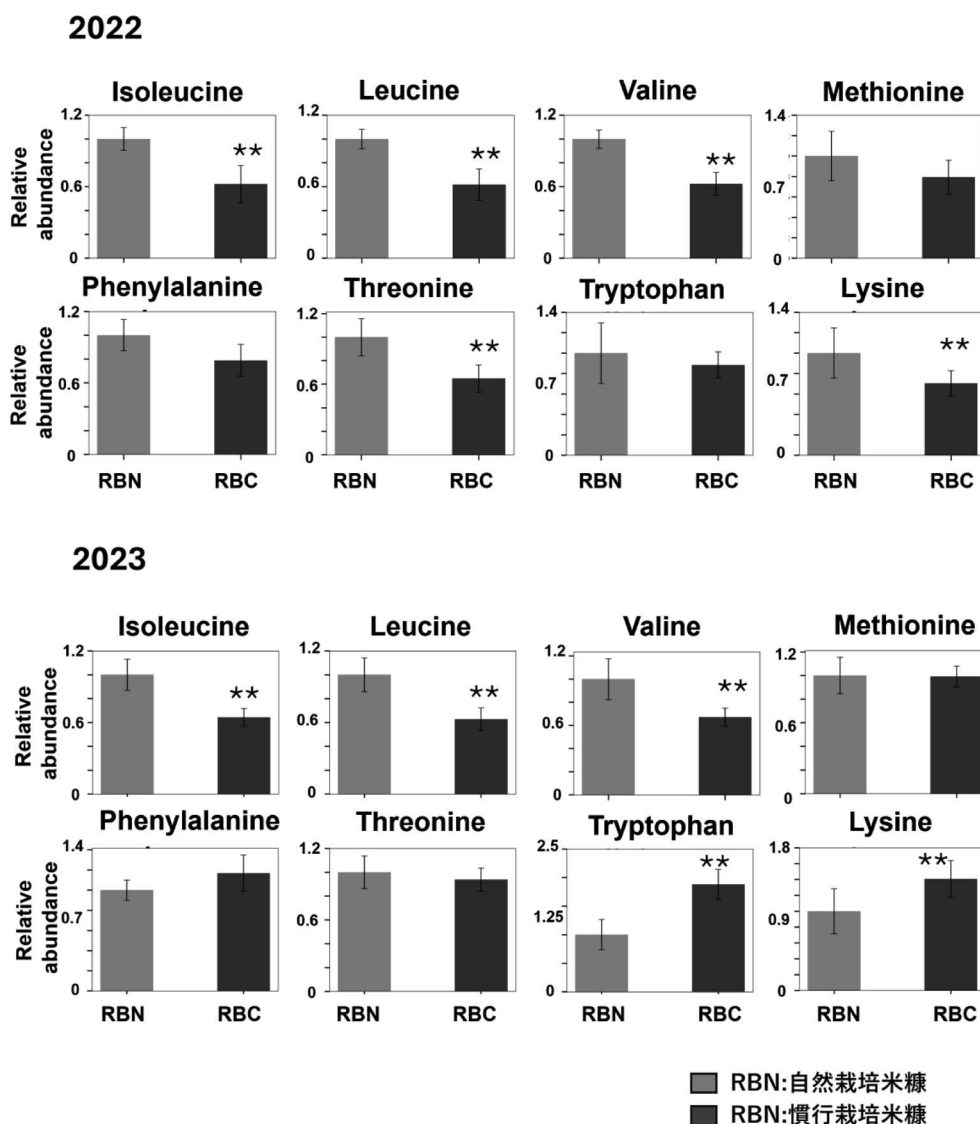


図2. 栽培法の違いが米糠のアミノ酸レベルに及ぼす影響の解析  
 2022年と2023年に収穫した自然栽培や慣行栽培に由来する米糠抽出物を調製し、GC-MS/MSによりアミノ酸レベルを分析した。特に差が見られたアミノ酸を含めたデータを記す。\*\*  $P < 0.01$

培と慣行栽培のサンプルにおける各成分レベルに顕著な差はなかった。

米糠の脂肪酸組成についてはGC-FID (SHIMADZU GC-2010, Shimadzu Corporation) により分析したが、栽培法による顕著な差は検出されなかった(図3, 4頁)。得られた脂肪酸組成は、文部科学省による日本食品標準成分表2020年版の既存のデータとほぼ一致していた。また同量の米糠より回収された脂質量もほぼ同レベルであった。

### (3) 栽培法の違いが米糠の細菌叢に及ぼす影響の解析

玄米の糠層は最外層である果皮や、その内側に種皮、胚芽と胚乳を覆う薄い細胞の層である糊粉層(アリューロン層)からなる。玄米の果皮は糠に囲まれているが、多くの

植物で、果皮には細菌が共生している。そこで米糠に細菌叢が検出されるかを調べるために、米糠よりDNAを抽出し、16SrRNA アンプリコンシーケンス解析を行った。得られた遺伝子産物の配列を解析したところ、葉緑体(クロロプラスト)や植物ミトコンドリア由来の配列が優位に検出されたものの、細菌由来の配列も検出された。

検出された上位7位までの細菌属は *Pantoea* 属, *Methylobacterium*-*Methylorubrum* 属, *Erwinia* 科, *Pseudomonas* 属, *Sphingomonas* 属, *Curtobacterium* 属, *Allo-rhizobium*-*Neorhizobium*-*Pararhizobium*-*Rhizobium* 属であり、2つの栽培法で共通していた(図4)。これらの細菌属は自然栽培に由来する米糠の細菌叢において約91%, 慣行栽培に由来する米糠において約81%を占めた。米糠の低

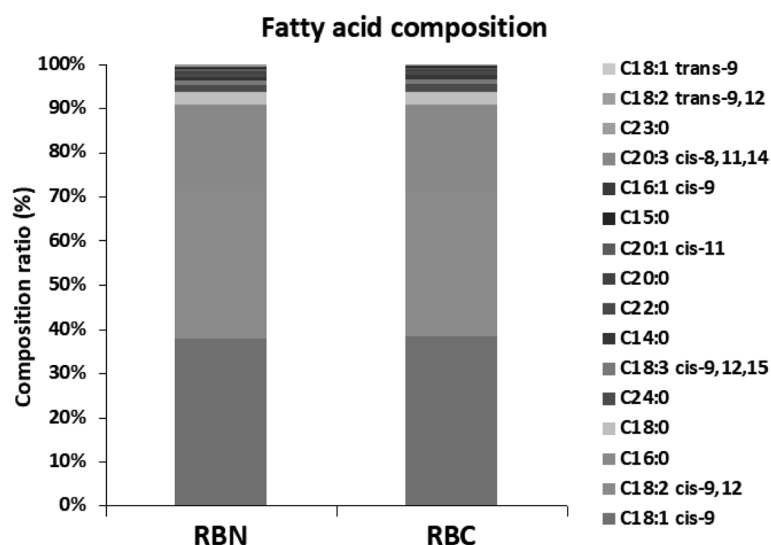


図3. 栽培法の違いが米糠の脂質組成に及ぼす影響の解析  
2022年に収穫した自然栽培や慣行栽培に由来する米糠より脂質抽出物を調製し、GC-FIDにより脂質組成を分析した。2023年に収穫した米糠の抽出物についても、同様の結果が観察された。RBN: 自然栽培由来米糠、RBC: 慣行栽培由来米糠

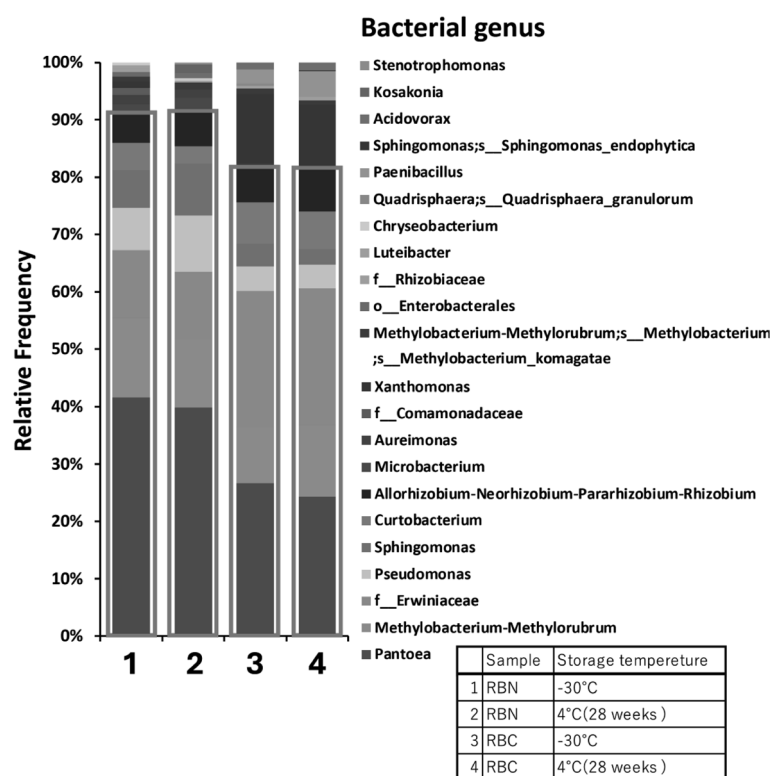


図4. 栽培法の違いが米糠の細菌叢に及ぼす影響の解析  
2022年に収穫した自然栽培や慣行栽培に由来する米糠の細菌叢を16SrRNA アンプリコンシーケンスにより解析した。RBN: 自然栽培由来米糠、RBC: 慣行栽培由来米糠

温条件下における細菌叢変化についても解析したが、4°C、28週間の保存は細菌叢に大きな影響を与えなかった。

栽培法間で最も異なる組成を示す細菌は *Xanthomonas* 属であり、自然栽培と慣行栽培の米糠で、各々約1%と約12%の割合で検出された。*Microbacterium* 属は自然栽培

由来の米糠で検出された。

#### ・考察と展望

自然栽培や慣行栽培から得られた米糠の水溶性抽出物は、ほぼ同レベルのMφ活性化作用を示し、米糠の免疫賦



活素材としてのポテンシャルが改めて示された。米糠にはグラム陰性菌を含む細菌叢やLPSが検出された。このことから、米糠抽出物における主なMφ活性化成分は、TLR4と結合する細菌由来分子と考えられる。

自然栽培から得られた米糠では、分岐鎖アミノ酸の含有量が高い傾向にあった。一方で、白米や米糠における大部分のアミノ酸や有機酸の含有レベルや、米糠における脂肪酸の組成に関して、自然栽培と慣行栽培で顕著な差は検出されなかった。慣行栽培に比較して、自然栽培で収穫される玄米や白米は粒子サイズが小さい。しかしながら、重量あたりでは多くの成分が同等レベルで含有されていることが分かり、我々の解析結果からは栄養分の比較評価は行えないものの、この結果は意義深い。

米糠に検出された細菌は、稲の果皮に共生する細菌と考えられる。米糠の細菌叢解析により検出された *Pantoea* 属、*Methylobacterium-Methylorubrum* 属、*Pseudomonas* 属などの多くは土壌細菌である。このことにより、稲の果皮の細菌叢形成においては、土壌環境が影響因子の一つであると示唆された。植物の栽培法の違いは、土壌細菌叢や根の細菌叢、そして根からの栄養吸収に影響を与える。今後、自然栽培と慣行栽培の土壌の細菌叢解析を行うことにより、自然栽培におけるイネの栄養吸収や病害抑制におけるメカニズム解明が推進されると期待される。興味深いことに、有機栽培育苗土で培養したイネの内生菌には *Bacillus* sp., *Curtobacterium* sp., *Microbacterium* sp. と推定される *Microbacterium* 属の細菌類が特徴的に含まれていること、これらの細菌類はもみ枯細菌と苗立枯病細菌に対する病害抑制効果を持つことが報告されている<sup>(4)</sup>。自然栽培から得られた米糠には、病原菌抑制素材としての活用が期待される細菌種を含む *Microbacterium* 属が検出されており、今後のさらなる解析により、微生物素材としての活用にもつながる。本研究で得られた知見は、自然栽培米事業の付

加価値検討に貢献すると考える。

### 3. 謝辞（※連名としての謝辞）

本研究の米糠の細菌叢解析は、福島大学食農学類の松田幹教授や西尾俊亮助教、東北大学大学院農学研究科の大坪和歌子助教にご指導頂きました。田んぼでのサンプル回収に関しては、福島大学食農学類の二瓶直登准教にご助言頂きました。また、米糠や米のメタボローム解析や脂肪酸解析は、東北大学未来科学技術共同研究センターの宮澤大樹准教授との共同研究により行われました。TLR2やTLR4/MD2/CD14複合体レポーター細胞を用いた解析は、Paul-Ehrlich-InstituteのVPr1セクションDr. Stephan ScheurerとFr. Maren Krauseにより行われました。ここに厚くお礼を申し上げます。

### 4. 成果報告および参考文献

#### 成果報告

日本農芸化学会2025年度大会 発表予定

#### 参考文献

- (1) Donald K, Finlay BB. Early-life interactions between the microbiota and immune system: impact on immune system development and atopic disease. *Nat Rev Immunol*. 2023; 23: 735-748.
- (2) Fujiwara F, Miyazawa K, Nihei N, Ichihashi Y. Agroecosystem engineering extended from plant-microbe interactions revealed by multi-omics data. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2022; 87: 21-27.
- (3) Hirota T, Izumi M, Wada S, Makino A, Ishida H. Vacuolar Protein Degradation via Autophagy Provides Substrates to Amino acid catabolic pathways as an adaptive response to sugar starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 2018; 59: 1363-1376.
- (4) Ando S, Takahashi H. Analysis of endophytes from intercellular fluid of organically grown rice plants and its effect on disease tolerance. *Soil Microorganisms*. 2011; 65N: 100-103.

## 「レジスタントスターチを多く含む米品種 「まんぷくすらり」を使った加工食品の開発」

研究代表者 秋田県立大学生物資源科学部 藤田直子  
中小企業研究責任者 株式会社スターチテック 中村保典

### 1. 背景：企業からの説明

米の消費量の低下や小麦価格の高騰から、今後は「米」を、主食用米のみならず、加工用米等として用いる必要がある。申請者らのグループは、20年以上、米どころ秋田

でイネの澱粉生合成研究を行ってきた。澱粉生合成に重要な酵素の変異体を多数扱う過程で、レジスタントスターチ(RS)を多く含む変異体は、機能性米として人々の健康に資する品種として成り立つのではないかと考え、RSが通

常の米の10倍高い高RS米品種「まんぷくすらし」を2019年12月に品種登録申請（第34394号、公開済み）した。申請者は、2019年2月にこれら品種の加工食品の開発および販売する会社として、秋田県立大学発ベンチャー企業、(株)スターチテックを設立した。

近年、国民の健康志向が上昇し、機能性食品やサプリメント等に高い関心が寄せられている。穀類のRSは、ヒト試験から血糖値上昇抑制が、また、動物実験から整腸作用が証明されており、機能性食品としての将来性は高い。そのような背景で、米粉を使って様々な食品に加工する企業などから、「まんぷくすらし」を使った加工食品の開発意欲が高くなってきた。本研究では、「まんぷくすらし」を用いた加工食品を様々な企業と共同開発し、それらの機能性をRS値を測定することで検証する。

## 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

### 研究に関する背景：

通常の米のRS値は、1%に満たないが、澱粉生合成関連酵素のうち、枝作り酵素BEIIbが欠損すると米のRS値は劇的に増加することが知られている（Tsuiki et al., 2016）。「まんぷくすらし」は、BEIIbに加えて、アミロペクチンの長鎖の生合成に関与するスターチシンターゼ(SS)IIIaが同時に欠損しており、通常の米と比較してアミロース含量が約40%と非常に高く、アミロペクチンの長鎖が増加することでRS値が通常米と比べて10倍程度高い。一方で以上の様な澱粉構造の変化は、同時に澱粉の老化を促進させるため、食味が優れないことが多いため、食味向上のための加工法が必要である。また、この米を使って加工食品を作る際、他の米や副材料と混合するとRS値が希釈されることになる。さらに、これらの米を普及する際、収量が高いことは採算をとる上で必要な条件となる。

### 研究の詳細：

### 1. 新規高RS米系統の開発

「まんぷくすらし」より種子が大きく、RS値が高い系統は、BEIIbが欠損し、ジャポニカ米由来のSSIIaとインディカ米由来のGBSSIの組み合わせを持った系統であることを明らかにした（Miura et al., 2022）。これらの材料は、消化酵素で16時間処理しても消化しないRS値が「まんぷくすらし」よりも3~5倍高く、種子重量は1.3倍高かった。今後、次世代の高RS米として品種登録を目指している。

### 2. 高RS米品種「まんぷくすらし」を使った商品開発

「まんぷくすらし」を使った加工食品の試作を行った。①甘酒を試作したところ、消化が悪いため、米粒が多く残存し、甘さも控えめであった。残存した米のRS値を測定したところ、「あきたこまち」で作った甘酒の米粒の60倍高い値を示した。②「まんぷくすらし」の玄米を焙煎したものをグラノーラと混合することで、「手作り雑穀グラノーラ」を商品化し（図1）、上市した。焙煎玄米のRS値は8.25%と高い値を示した。③「まんぷくすらし」の米粉をゲル化し、通常米の生地と混合することで、せんべい生地を試作した。RS値は、約3%であり、通常米のせんべいのRS値がほぼ0%であるのに対して、高い値を示した。さらにRS値が高くなるように混合割合を増やすなど、検討中である。④「まんぷくすらし」の米粉を多く含むマカロニと米粉麺を試作し、上市した（図1）。それらのRS値を測定したところ、それぞれ3.6%と5.2%であった。通常米を用いた場合、1%以下となることから、これらのRS値は著しく高い値を示すといえる。⑤「まんぷくすらし」の米粉を約30%含むパンを試作したところ、小麦粉100%のパンと比べてふくらみがやや劣るが、良好なパンができることがわかった。⑥「まんぷくすらし」の精米を機能性表示食品として普及させるため、消費者庁に届け出を提出した。7回の再提出を経て、システマティックレビューにより、届け出が完了した（2024年4月10日付、図2）。今後、血



図1. 「まんぷくすらし」を用いた加工食品のうち、上市したもの。



図2. 「まんぷくすらし」精米の機能性表示の内容。2024年4月付で届け出が完了した。

糖値上昇抑制の表示をしたうえでの販売が可能となる。

#### 考察と展望：

「まんぷくすらし」を食品企業に使用してもらう場合、この米を使用したことでどのようなメリットがあるのかを伝える際、食品に表示できないことが大きな足かせとなっていた。上述したように、つい最近、「まんぷくすらし」の精米が、機能性表示食品への届け出が完了し、今後、血糖値上昇抑制の機能性を表示した上での販売が可能となる。加工食品については、現在、育成中の高RS米系統を品種として確立し、これらを用いた加工食品で機能性表示が可能となるように進めていくつもりである。

#### 3. 謝辞

「まんぷくすらし」の委託栽培にご協力いただいた北鷹

ファーム、カンパーニャアグリの各農業法人様、加工食品の試作にご協力いただいた奥羽食品工業、新山発酵食品工場、群馬製粉、木能実の各企業様に御礼申し上げます。最後に、助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。

#### 4. 成果報告および参考文献

1. Tsuiki K, Fujisawa H, Itoh A, Sato M, Fujita N. (2016) Alterations of starch structure lead to increased resistant starch of steamed rice: Identification of high resistant starch rice lines. **Journal of Cereal Science** 68: 88-92.
2. Miura S, Narita M, Crofts N, Itoh Y, Hosaka Y, Oitome NF, Abe M, Takahashi R, Fujita N. (2022) Improving agricultural traits while maintaining high resistant starch content in rice. **RICE**. 15: 28.

## D-アミノ酸酵素定量法の開発

研究代表者 立命館大学生命科学部 若山 守

中小企業研究責任者 Dアミノ酸ラボ株式会社 黒野 剛

#### 1. 背景：企業からの説明

ネコは泌尿器の疾患が多く、腎疾患は家ネコの死亡率の半数近くを占める。症状が出にくい慢性腎疾患では、早期発見と食餌の改善などが寿命の延長に重要となる。通常、

腎疾患の健診では、血中の尿素窒素（BUN）、クレアチニン、対称性ジメチルアルギニンなどがマーカーとなるが、採血を伴うこれらの検査は獣医師によって行われる。最近、腎疾患の猫の尿中D-アミノ酸濃度が健常な猫に比べて有意に



低下することが示され (1), D-アミノ酸が非侵襲的に採取可能な猫腎疾患のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。しかし 2 次元 HPLC や LC-MS/MS などを用いる現行の D-アミノ酸測定法は極めて高コストである。

そこで簡便で正確な尿中 D-アミノ酸の酵素定量法の開発を計画した。アセチル CoA から D-アミノ酸にアセチル基を転移する D-アミノ酸アセチルトランスフェラーゼ (HPA3) を用いた酵素定量法を考案し、以前から同酵素の研究を行っていた立命館大学生命科学部の若山守教授と相談し、本事業に応募することとした。

本研究の結果、HPA3 によってネコ尿中 D-アミノ酸濃度の定量が可能であり、かつその濃度が上述の BUN や血中クレアチニンと逆相関を示すことが示された。2024 年度のペット関連産業の市場規模は 1 兆 8 千億円に達すると予想されている。本研究によって D-アミノ酸はネコ腎疾患のマーカーとなる可能性が示され、今後家庭で採取した尿を郵送して分析するといった事業への展開が期待される。

## 2. 研究成果：大学からの研究成果報告

### ・研究に関する背景

*Saccharomyces cerevisiae* の D-アミノ酸-N-アセチルトランスフェラーゼ (HPA3) は histone H4 の他、様々な D-アミノ酸のアミノ基にアセチル CoA のアセチル基を転移する反応を触媒する (2)。HPA3 は GNAT スーパーファミリーに属する *S. cerevisiae* のヒストンアセチルトランスフェラーゼである HPA2 と 49% の配列同一性および 81% の配列類似性を有している。HPA2 は histone H3 と H4 を基質とするが D-アミノ酸には働かない。

HPA3 と D-アミノ酸の反応によって CoA-SH が生成するが、ここにエルマン試薬 (DTNB) があれば、二量体である DTNB が解離して一方は CoA の SH に結合し、一方は 412 nm に吸収を有する 2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸となる。2-ニトロ-5-メルカプト安息香酸の分子吸光計数は  $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  で NADH より大きく、従って本法は簡便で感度のよい D-アミノ酸定量法となりうる。

立命館大学の若山研究室では HPA3 を用いて酵母細胞内で D-アミノ酸をアセチル化し D-アミノ酸の生産性を高める、といった研究を行っており HPA3 の調製や取り扱いについてのノウハウを有している。これを生かして D-アミノ酸ラボ株式会社との連携研究を進めた。

### ・研究の詳細

これまで用いてきた HPA3 精製標品は精製で用いるための His-Tag を付加していたが、His-Tag を有する酵素では濃度を高めた場合に沈殿しやすい傾向が認められた。こ

れは結晶構造解析といった基礎研究においても、保存性といった応用面からも不利である。そこで、本研究ではまず His-Tag を持たない HPA3 の調製を試みた。ニッケルアフィニティーカラムから溶出させた His-Tag 付き酵素をトロンビンで処理し、DEAE カラム、ゲル濾過カラムで精製した結果、溶解性が高い Tag を持たない精製酵素が得られた。

得られた精製 HPA3 の基本的性質を検討した。基質特異性検討したところ、同酵素は D-Phe, D-Met, D-Gln, D-Asn, D-Ser, D-Ala などの中性アミノ酸と D-Lys, D-His, D-Arg の塩基性アミノ酸に高い活性を示す一方、D-Asp, D-Glu の酸性アミノ酸と D-Pro, および L-Lys を除く L-型アミノ酸にはほとんど活性を示さなかった。また酵素の最適 pH は 8.0 付近にあった。

精製 HPA3 を用いたネコ尿中の D-アミノ酸測定を検討した。上述のように HPA3 は酸性アミノ酸と Pro を除く様々な D-アミノ酸に作用するが、その反応速度は一定ではなく基質によって異なる。従って種類も組成も一定しないネコ尿中 D-アミノ酸を測定するためには可能な限り反応を進めてほとんどの D-アミノ酸をアセチル化する条件を見出す必要がある。そこで酵素量と反応時間を中心に、猫尿中 D-アミノ酸測定に適した酵素反応の条件を検討した。

得られた条件に基づいて、獣医師によってそれぞれ健常、腎疾患と診断された猫 (各 8 検体) の尿中 D-アミノ酸濃度を測定した結果、両者の間には明らかな差が認められた。すなわち用いた条件において、健常なネコ尿中の D-アミノ酸はすべて 0.8 mM 以上であったのに対して、腎疾患のネコでは 0.6 mM 以下であった。また D-アミノ酸濃度はネコの腎疾患の指標として使われる BUN, 血中クレアチニンと逆相関を示し、尿中 D-アミノ酸濃度が腎疾患の重篤度を反映することが示唆された。

本研究ではまた HPA2 と HPA3 が非常に高い配列相同性を有するにも関わらず、HPA3 のみが D-アミノ酸に対する反応性を示す構造的特性について検討した。すでに結晶構造が明らかにされている HPA2 の構造を基に HPA3 の立体構造モデルを構築したところ、HPA2 のアセチル CoA の結合部位近傍の Y33 が HPA3 では Q38 に置き換わっていることを見出した。部位特異的変異の結果、この Y33 が D-アミノ酸の認識に必須であることが示唆された。

### ・考察と展望

本研究によって、HPA3 によるネコ尿中 D-アミノ酸測定が可能であること、かつ尿中 D-アミノ酸濃度が BUN や血中クレアチニンと逆相関を示すことが明らかとなった。すなわち尿中 D-アミノ酸は非侵襲的に採取できるネコ腎疾患

のマーカーとなる可能性が示された。

HPA3 は一部を除く様々な D-アミノ酸に作用するが、D-アミノ酸定量のツールとしては、各々の D-アミノ酸に対する特異性を有する酵素、あるいは本来は反応性を示さない酸性D-アミノ酸にも作用するようになった酵素などがあれば便利である。本研究では HPA3 の基質認識に関わる酵素構造について検討し、Y33 が D-アミノ酸の認識に必須であることを見出した。今後 Y33 の周辺の残基を改変することにより基質特異性がどのように変化するかを検討したい。なお本研究ではこのような構造機能相関研究の基礎となる HPA3 の結晶構造解析にも着手している。自動結晶化装置 mosquito を用いて結晶の作成を試み、これまでに 1 mM の CoA と D-Met の存在下で HPA3 の結晶を得ることができた。今後は結晶構造に基づく本酵素の構造機能相関研究を進めていく。

### 3. 謝辞

本研究に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

#### 学会発表（予定）

1. 吉村 徹, 黒野 剛, 廣瀬優太, 伊藤智和, 平島康博, 今飯田創太, 若山 守  
尿中 D-アミノ酸の酵素定量によるネコ腎臓疾患のスクリーニング  
日本ペット栄養学会第25回定例大会 2024年7月28日 麻布大学, 相模原市
2. Kurono T, Hirose Y, Ito T, Heishima Y, Imaidan S, Wakayama M., Yoshimura T, Screening for cat renal diseases by enzymatic measurement of urinary D-amino acids. The 6th International Conference of D-Amino acid Research, Aug 21-24, Kanazawa University, Kanazawa
3. Nakai T, Yoshimura T, Wakayama M, Structure and function of D-amino acid N-acetyltransferase (HPA3). The 6th International Conference of D-Amino acid Research, Aug 21-24, Kanazawa University, Kanazawa

#### 参考文献

- (1) 池田裕美ら (2017) ペット栄養学会誌 20, 47-48.
- (2) Yow et al. (2004) Arch. Microbiol. 182(5), 396-403.

## 5. 第50回研究奨励金報告書

## 第50回研究奨励金報告書

### 電極による「電子供与システム」を活用する微生物探索

京都工芸繊維大学 分子化学系 竹内道樹

#### 研究の背景と目的

「電子供与システム」は、微生物活性を顕在化させるシステムとして重要である。「電子供与システム」の産業への応用に成功した例として、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を用いた NAD(P)H 再生系による、キラルアルコール生産が挙げられる。GDH による NAD(P)H 再生系を共存させることで、立体選択性の高い酵素活性の顕在化に成功している<sup>(1)</sup>。GDH による NAD(P)H 再生系は極めて有用な「電子供与システム」であるが、NAD(P)H よりも酸化還元電位が負の化合物を還元することは熱力学的に難しい。そこで本研究では、酸化還元電位がより負の化合物として、酸性～中性条件における還元型メチルピオロゲンに着目し、NAD(P)H では還元が難しい化合物の還元への応用を考えた。pH 酸性～中性では、メチルピオロゲンの酸化還元電位が、相対的にさらに負になるため、NAD(P)H で還元することは難しいが、電極を用いれば、pH に関わらず容易に還元型メチルピオロゲンを供給できる。電極によりメチルピオロゲンを還元・供給し、NAD(P)H では還元が難しい化合物を還元できる酵素の取得を目標とした。本研究で狙う酵素反応の既報例としては、タングステン酵素のギ酸脱水素酵素による CO<sub>2</sub> 還元が挙げられる<sup>(2)</sup>。このようなユニークな酵素の取得を目指して、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系を構築し、微生物探索を実施した。

#### 方法・結果

BMAL-CHO 脱水素酵素<sup>(3)</sup> はモリブデン酵素であり、サリチルアルデヒドを基質とすることから、還元型メチルピオロゲンを供給することで、サリチル酸還元が可能と期待できる。本酵素遺伝子を発現する組換え大腸菌を用いたサリチル酸還元をモデルとして、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系の構築に取り組んだ。休止菌体を用いて電極により活性を検出するには、活性がかなり高い必要がある。そのため、菌体濃度を高くする工夫として、サンプルホルダー 9.0 mmφ (BAS 社製) 内に高濃度の菌体を添加し、グラッシーカーボン作用電極をセット

した。反応液として 1.6 mM サリチル酸、1.6 mM メチルピオロゲン、20 mM KPB pH 6.0 を含む溶液を用いた。構築した系を用いて測定した結果を図 1 に示す。サリチル酸添加時において、触媒電流が観察されたことから、サリチル酸が還元されていると考えられる。

休止菌体を用いて活性を検出できたことから、電極による「電子供与システム」を用いた微生物探索系が構築できたと考え、本系を用いた微生物酵素の探索を実施した。探

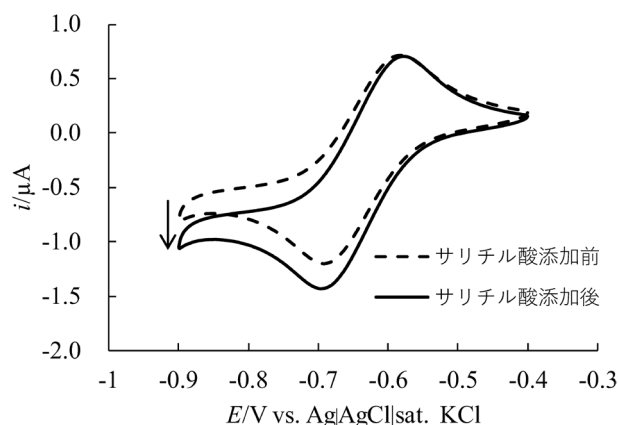


図1. BMAL-CHO 脱水素酵素遺伝子発現組換え大腸菌を用いたサリチル酸の還元

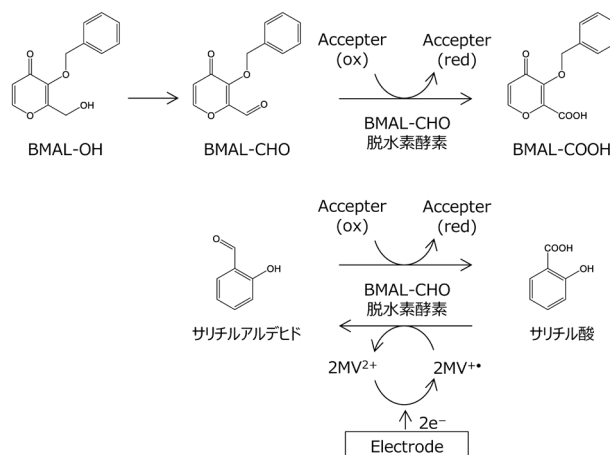


図2. BMAL-CHO 脱水素酵素の触媒する反応と本研究で構築した電極による電子供与システム

索ターゲットの反応としては、コハク酸の還元とした。一般的にコハク酸の還元はスクシニル CoA を経由してコハク酸セミアルデヒドへと還元されるが、コハク酸からコハク酸セミアルデヒドへの直接還元できる微生物酵素の取得を試みた。

スループット性が低いことから、探索対象をある程度絞る必要があったため、BMAL-OH 資化性菌から BMAL-CHO 脱水素酵素が取得された経緯を踏まえて、1,4-ブタンジオール資化性菌を探索対象とした。1,4-ブタンジオールを単一炭素源とする培地を用いて、集積培養を実施し、取得した菌株を用いて、コハク酸還元活性を本系により評価した。現在のところ、還元型メチルビオロゲンを利用してコハク酸を還元する微生物は取得できていないが、今後探索を継続し、ユニークな微生物酵素の取得を試みる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。また、電気化学的手法をご教授いただきました加納健司先生、宋和慶盛先生に厚く御礼申し上げます。

## 参考文献

- 1) 八十原良彦, 木崎憲之, 川野 茂, 長谷川淳三, 高効率バイオ不斉還元システムの開発と工業化 2006年農芸化学技術賞
- 2) K. Sakai, B.C. Hsieh, A. Maruyama, Y. Kitazumi, O. Shirai, K. Kano, Interconversion between formate and hydrogen carbonate by tungsten-containing formate dehydrogenase-catalyzed mediated bioelectrocatalysis. *Sens. Bio-Sens.* 5, 90-96 (2015)
- 3) I. Kozono, M. Hibi, M. Takeuchi, J. Ogawa, Purification and characterization of molybdenum-containing aldehyde dehydrogenase that oxidizes benzyl maltol derivative from *Pseudomonas nitroreducens* SB32154. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 84, 2390-2400 (2020)

# 糖結合性天然物に基づく変異対応型抗ウイルス薬の開発

名古屋大学糖鎖生命コア研究所 中川 優

## 【背景と目的】

ウイルスは増殖や感染をくり返すなかで変異しており、感染性や病原性を大きく変化させる場合がある。ウイルス感染症の最大の問題点は、ワクチンや抗ウイルス薬の有効性に影響を与える変異が起これ、新たなパンデミックが繰り返されることである。新型コロナウイルス感染症の蔓延にみられるように、現在の創薬技術ではウイルスの変異に迅速に対応することは容易ではなく、いかなる変異株にも対応可能なワクチンや抗ウイルス薬の開発が急務の課題となっている。

放線菌由来の pradimicin A (PRM-A; 図1) は、D-マン

ノース (Man) に結合するユニークな天然物であり、ウイルス表面に存在する糖鎖に結合してウイルス感染を阻害する [1]。糖鎖構造はウイルス変異の影響をほとんど受けないことから、PRM-A は変異株に対応可能な抗ウイルス薬の候補として注目を集めている。しかしながら、PRM-A は血中で凝集してしまうために、創薬への利用は実現していない。近年、我々は PRM-A の 18 位カルボキシ基あるいは 4' 位アミノ基をアミド化することで凝集性をほぼ完全に抑制できることを見いだした [2, 3]。そこで本研究では、糖鎖を標的とした新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染阻害薬となりうる非凝集性 PRM-A 誘導体の開発を目指し、① PRM-A と SARS-CoV-2 糖鎖との結合解析と② PRM-A およびアミド誘導体の抗 SARS-CoV-2 活性評価を行ったので、その成果を報告する。

## 【PRM-A と SARS-CoV-2 糖鎖との結合解析】

SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に付加されている糖鎖の部分構造に対応するオリゴ糖9種を化学合成し、PRM-A に対する結合活性を真菌マンナン (Man を構成糖とする多糖) との競合結合試験によって評価した。その結果、PRM-A は非還元末端に Man を有するオリゴ糖のみに結合し、特に非還元末端を二つ有する分岐型オリゴマン

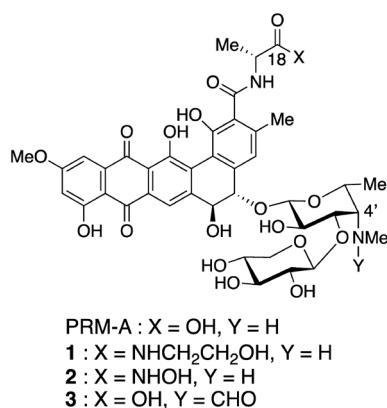


図1. Pradimicin A (PRM-A) とアミド誘導体 (1-3)



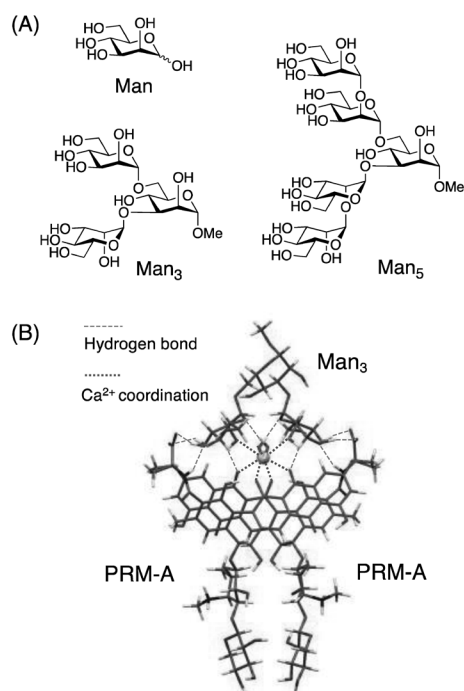


図2. (A) Man と分岐型オリゴマンノース (Man<sub>3</sub>, Man<sub>5</sub>), (B) PRM-A と Man<sub>3</sub> の結合モデル

ノース (Man<sub>3</sub>, Man<sub>5</sub>; 図2A) に極めて強く結合することが明らかとなった。

そこで次に、PRM-A に高いアフィニティーを示す最小オリゴ糖構造である Man<sub>3</sub> に着目し、共沈殿試験による PRM-A/Man<sub>3</sub> 複合体の組成分析と PRM-A/Man 複合体構造 [4] を基にしたドッキングシミュレーションを行なった。その結果、PRM-A 二量体が Man<sub>3</sub> の二つの非還元末端 Man と同時に相互作用することで、単糖の Man よりもエントロピー的に有利な複合体を形成していることが示唆された (図2B)。本複合体モデルの妥当性は、Man<sub>3</sub> の非還元末端 Man を D-グルコースに置換した三糖の PRM-A 結合能が Man<sub>3</sub> と比べて大幅に低いことから支持された。

#### 【PRM-A およびアミド誘導体の抗 SARS-CoV-2 活性評価】

SARS-CoV-2 が有する糖鎖の部分構造に PRM-A が強く結合することが確認できたので、ヒト気管支上皮由来 Calu-3 細胞に対する野生型 SARS-CoV-2 (欧州株) の感染阻害試験を行なった (図3A)。その結果、PRM-A は細胞毒性を示すことなく (CC<sub>50</sub>>100  $\mu$ M)、SARS-CoV-2 の感染を阻害することが初めて明らかとなった (IC<sub>50</sub>=1.2  $\mu$ M)。さらに、この PRM-A による SARS-CoV-2 感染阻害活性は Man<sub>3</sub> 存在下で大幅に低下することが確認され (図3B)、PRM-A が SARS-CoV-2 の糖鎖を標的として感染を阻害していることが強く支持された。

そこで次に、非凝集性アミド誘導体3種 (図1) [3, 5] に

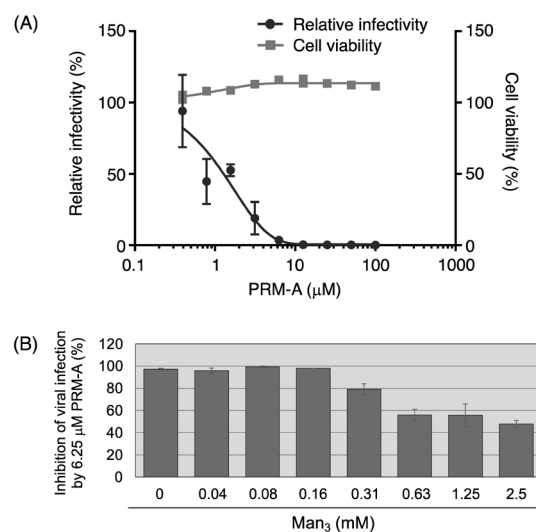


図3. (A) PRM-A による SARS-CoV-2 感染阻害試験, (B) Man<sub>3</sub> 存在下における PRM-A の SARS-CoV-2 感染阻害活性. これらの試験では、ヒト気管支上皮由来 Calu-3 細胞を用いた。

ついて SARS-CoV-2 感染阻害活性を評価した。その結果、18位アミド誘導体 (**1**, **2**) は SARS-CoV-2 の感染を全く抑えなかったのに対し (IC<sub>50</sub>>100  $\mu$ M)、4'位アミド誘導体 (**3**) は PRM-A と比較すると活性は低いものの、顕著にウイルス感染を阻害することが確認された (IC<sub>50</sub>=27.9  $\mu$ M)。本結果は、4'位アミノ基の構造修飾を基軸として SARS-CoV-2 感染阻害薬となりうる非凝集性 PRM-A 誘導体を開発できることを示唆するものであり、現在 Man<sub>3</sub> との結合様式に基づいてウイルス感染阻害活性を高めたアミド誘導体の設計開発を進めているところである。

#### 【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝いたします。本研究は、長崎大学の安田二郎教授、木下貴明助教、櫻井康晃助教、広島大学の相田美砂子教授、赤瀬大助教、富山県立大学の五十嵐康弘教授との共同研究であり、共同研究者の方々に厚く御礼申し上げます。

#### 【成果発表】

##### ・ 発表論文

- 1) Nakagawa, Y., Fujii, M., Ito, N., Ojika, M., Akase, D., Aida, M., Kinoshita, T., Sakurai, Y., Yasuda, J., Igarashi, Y., Ito, Y. Molecular basis of N-glycan recognition by pradimicin A and its potential as a SARS-CoV-2 entry inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **2024**, 105, 117732.

##### ・ 招待講演

- 1) 中川 優, 糖結合性天然物に基づく研究ツールおよび創薬リードの開発, 第4回糖鎖技術研究セミナー (名古屋)



2023/10.30.

#### ・学会発表

- 1) Nanaka Ito, Kazue Tsuzuki, Shintaro Kakihara, Yuzuka Oya, Makoto Ojika, Yasuhiro Igarashi, Yukishige Ito, Yu Nakagawa, Glycobiological and therapeutic applications of antibiotics with lectin-like activity, Canadian Glycomics Symposium (Edmonton, Canada), 2023/5.10-12.
- 2) 中川 優, 藤井将人, 伊藤那奈香, 小鹿 一, 木下貴明, 櫻井康晃, 安田二郎, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, Pradimicin A の N 結合型糖鎖認識機構と抗 SARS-CoV-2 活性, 第 42 回日本糖質学会年会 (鳥取), 2023/9.7-9.
- 3) 中川 優, 藤井将人, 伊藤那奈香, 小鹿 一, 赤瀬 大, 相田美砂子, 木下貴明, 櫻井康晃, 安田二郎, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, Pradimicin A のウイルス糖鎖認識機構と抗 SARS-CoV-2 活性, 第 65 回天然有機化合物討論会 (東京), 2023/9.13-15.
- 4) 伊藤那奈香, 藤井将人, 小鹿 一, 木下貴明, 櫻井康晃, 安田二郎, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, 中川 優, Pradimicin A は SARS-CoV-2 タンパク質上のオリゴマンノースに結合することでウイルス感染を阻害する, 糖鎖科学中部拠点第

19 回若手の力フォーラム (静岡), 2023/9.21.

- 5) 木下貴明, 櫻井康晃, 中川 優, 五十嵐康弘, 安田二郎, Pradimicin A は SARS-CoV-2 タンパク質上のオリゴマンノースに結合することでウイルス感染を阻害する, 第 70 日本ウイルス学会学術集会 (仙台), 2023/9.26-28.
- 6) 中川 優, 藤井将人, 伊藤那奈香, 小鹿 一, 木下貴明, 櫻井康晃, 安田二郎, 五十嵐康弘, 伊藤幸成, Pradimicin A はオリゴマンノース含有糖鎖に結合して SARS-CoV-2 の感染を抑制する, 日本農芸化学会 2024 年度大会 (東京), 2024/3.24-27.

#### 【引用文献】

- [1] Fukagawa, Y. *et al. Actinomycetol.* **1993**, 7, 1.
- [2] Nakagawa, Y. *et al. J. Nat. Prod.* **2021**, 84, 2496.
- [3] Nakagawa, Y. *et al. Tetrahedron* **2022**, 121, 132919.
- [4] Nakagawa, Y. *et al. Cell Chem. Biol.* **2019**, 26, 950.
- [5] Miyanishi, W. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 55, 116590.

## イネいもち病菌と放線菌との相互作用を成立させる分子機構の解明

東京理科大学 創域理工学部 生命生物科学科 古山祐貴

#### 【背景と目的】

自然環境中で微生物は互いに影響を与えあっている。しかし、糸状菌-細菌間のような、他種の微生物間における相互作用機構には依然として未詳な点が多い。微生物の挙動は他の微生物からの影響を強く受けることが知られており、微生物間相互作用の結果により病原性や生育速度、代謝などが変化する [1-3]。これらのことから、微生物間相互作用メカニズムを解明することは、学術的な側面だけでなく、病原性微生物の制御や有用化合物の産生といった応用的側面からも重要である。一方で、自然環境中における膨大な組み合わせの可能性の中から、実際に相互作用関係にある微生物の組み合わせを特定することは容易ではない。

我々は、植物病原糸状菌である *Pyricularia oryzae* (イネいもち病菌) と土壌放線菌である *Streptomyces griseus* が化合物を介した競合関係にあることを見出していた。この 2 種間における競合メカニズムの解析過程において、競合関係にあるにも関わらず、*P. oryzae* によって *S. griseus* の生育が誘導される場合があることを見出した (図 1)。本研究では、この生育誘導作用のメカニズム解析を行った。

#### 【これまでの研究経過】

*S. griseus* の生育が菌体同士の接触によらずに誘導されたことから、*P. oryzae* が *S. griseus* の生育を誘導する代謝産物を産生していることが予想された。2 種間の寒天培

地を切り離した結果、生育誘導作用は見られなくなった (図 2)。この結果から、寒天培地中を拡散する *P. oryzae* 由来の代謝産物が *S. griseus* の生育に影響を与えていることが示唆された。

放線菌の生育は培地の pH による影響を受けることから、本現象に培地の pH 変化が関与しているのかを検討した。まず、使用培地 (Potato Dextrose Agar: PDA) の pH 変化が

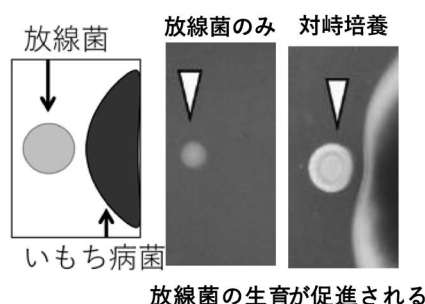


図 1 *P. oryzae* による *S. griseus* の生育誘導



図 2 培地の切り離しが対峙培養に与える影響

*S. griseus* の生育に影響を与えるのかを検証した。培地の pH を調整することで単独での培養でも *S. griseus* が生育することが確認された (図3A)。このことから、*S. griseus* が PDA 培地上で生育できない主な理由は pH であると推定された。

次に、pH 指示薬であるフェノールレッドを混合した PDA 培地を用いて、*P. oryzae* と *S. griseus* の共培養を実施した。その結果、*P. oryzae* コロニーの周辺部位において、経時的な培地 pH の上昇が認められた。また、培地 pH が上昇している領域が *S. griseus* の植菌箇所に到達すると *S. griseus* の生育が促進されることが確認された (図3B)。一方で、*S. griseus* の単独培養時には培地 pH の変化は観察されなかった (図3C)。さらに、生育誘導活性の特異性を検証するために、*P. oryzae* と同様に植物病原糸状菌である *Fusarium oxysporum* との共培養を行った。その結果、*F. oxysporum* は *S. griseus* の生育を促進せず、培地 pH の上昇も確認されなかった (図3D)。以上の結果から、*P. oryzae* が産生する代謝産物により培地 pH が上昇することで *S. griseus* の生育が誘導されていること、また本現象は *P. oryzae*-*S. griseus* 間に特有のものであることが示唆された。

培地 pH を上昇させる代謝産物としてアンモニアが想定された。そこで、簡易インドフェノール法によるアンモニアの検出を試みたが、*P. oryzae* によって pH 上昇が引き起こされている培地からであってもアンモニアは検出されなかった。この結果から、本現象に関与している活性化合物はアンモニアではないことが示された。

#### [今後の課題と展望]

現在までに、*P. oryzae* と *S. griseus* の共培養プレート、*F. oxysporum* と *S. griseus* との共培養プレート、*S. griseus* の単独培養プレートから有機溶媒により化合物を抽出し、LC-MS による分析を実施したが、*P. oryzae* との共培養プレートに特異的な化合物は検出されなかった。抽出方法などを検討することで *P. oryzae* 由来の活性化合物の特定を試みる。また、*F. oxysporum* 以外の糸状菌や *S. griseus* 以外の放線菌を用いて本現象の一般性の検証も行う予定である。

*P. oryzae* は現在でも甚大な被害を引き起こす植物病原糸状菌であるとともに、薬剤耐性菌の出現が問題となっている。近年、イネに内生する *Streptomyces* 属菌が *P. oryzae* の制御に有用である可能性が報告されている [4]。 *S. griseus* は土壤中に幅広く生息する放線菌であることから、本菌は環境負荷の少ない新たな生物農薬としての活用が期待できる。

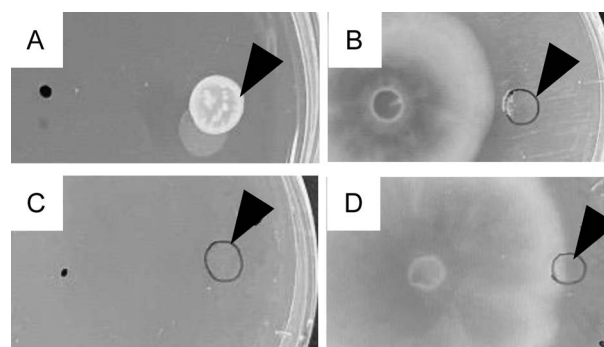


図3 pH が対峙培養に与える影響。(A) *S. griseus* 単独培養, pH 調整。(B) vs. *P. oryzae*, (+) Phenol red. (C) *S. griseus* 単独培養, (-) Phenol red, (D) vs. *F. oxysporum*, (+) Phenol red.

#### [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. Santus, W., Devlin, J.R., Behnsen, J., 2021. Crossing Kingdoms: How the Mycobiota and Fungal-Bacterial Interactions Impact Host Health and Disease. *Infect. Immun.* 89, e00648-20.
2. Jones, S.E., Ho, L., Rees, C.A., Hill, J.E., Nodwell, J.R., Elliot, M.A., 2017. *Streptomyces* exploration is triggered by fungal interactions and volatile signals. *ELife.* 6, e21738.
3. Stubbendieck, R.M., Straight, P.D., 2016. Multifaceted Interfaces of Bacterial Competition. *J. Bacteriol.* 198, 2145-2155.
4. Law, J.W.-F., Ser, H.-L., Khan, T.M., Chuah, L.-H., Pusparajah, P., Chan, K.-G., Goh, B.-H., Lee, L.-H., 2017. The Potential of *Streptomyces* as Biocontrol Agents against the Rice Blast Fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Front. Microbiol.* 8, 3.

# 天然物生合成遺伝子によるがん治療の基盤技術開発

筑波大学生命環境系 松田真弥

## 研究背景・目的

天然由来の低分子有機化合物（天然物）は、古来より人類の薬として重宝されてきた。バイオ医薬品や再生医療が台頭する現代創薬においても、天然物や天然物誘導体は医薬品の重要な割合を占めている。一方で、天然物は望まぬ標的に対しても作用することがあるため、常に副作用のリスクが伴う。さらに、現代の医薬品開発では薬剤候補化合物は細胞への吸収性や体内動態が重視されており、天然資源から生物活性のある天然物を見出して薬に仕上げるといった従来の開発戦略では、これらの要件を満たす天然物を探し当てることは極めて困難である。そのため、天然物の効果を最大限に発揮できる新たな天然物活用法の開発が求められている。このような背景の中、“天然物生合成遺伝子を疾患治療に用いる”，という概念が提唱された。例えば、抗がん効果をもつ天然物の生合成遺伝子を、がん細胞内で発現させる。がん細胞内では、代謝産物を原料にして天然物が生合成されるようになり、がん細胞自身が産生した天然物によって抗がん効果が発揮される。この方法では、薬物動態の悪い天然物であっても細胞内で永続的に生合成されるため、高い薬効を発揮でき、がんを確実に治療することが期待される（図1）。また、がん細胞でのみ機能するプロモーターを用いることで、副作用を低減できる可能性もある。しかしながら、これまでにヒトの細胞内で天然物を生合成した前例は無かった。

Fumagillin(1) は強力な血管新生阻害活性を有する糸状菌由来の天然物である。その生合成遺伝子の1つである *Fma*-P450 は無毒な代謝産物である  $\beta$ -trans-bergamotene(2) を抗がん活性を示す fumagillol 前駆体 (3) に変換する（図2）。ウイルスベクターを用いて、HeLa細胞内で *Fma*-P450 を発現させ、2 を培養液に添加して LC-MS 分析を

行った。その結果、培地溶液中にて 3 が還元された 5-*epi*-demethoxyfumagillol(4) が検出された。すなわち、天然物生合成遺伝子を導入することで、ヒト細胞において天然物は生産可能であることを実証できた<sup>1)</sup>。一方で、4 の生合成量は極めて少なく、細胞死を誘導するには至らなかった。そのため、本研究では、ヒト細胞内での天然物の生合成効率を向上させることを目指して下記 (1) – (3) の実験を行った。また、がん細胞でのみ天然物生合成遺伝子を発現させるために下記 (4) の課題にも着手した。

## 研究成果

### (1) 宿主細胞の検討

1 は内皮細胞に対して強い増殖抑制効果を示す<sup>2)</sup>。また、

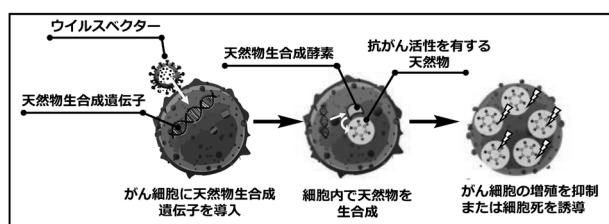


図1. 天然物生合成遺伝子によるがん治療の概念図

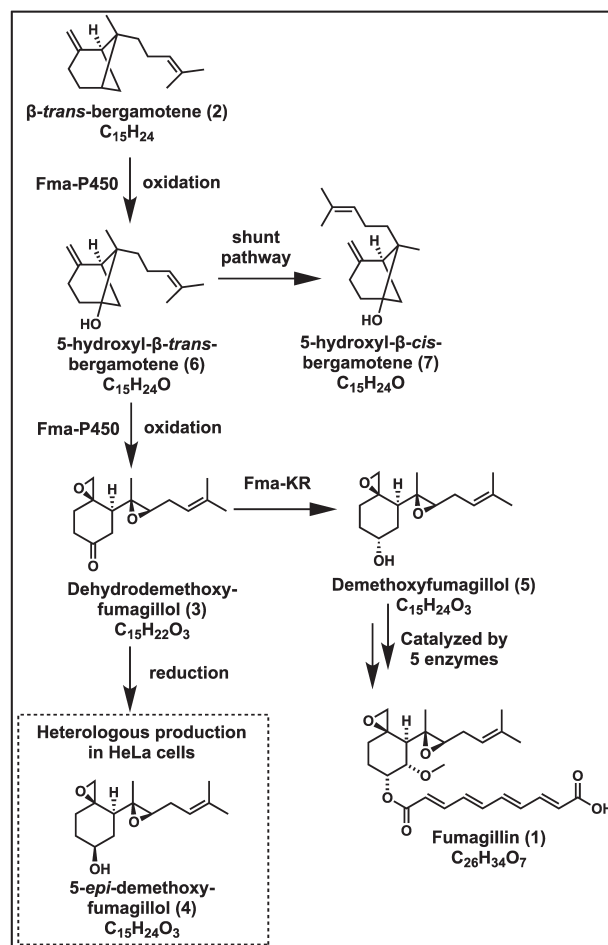


図2. Fumagillin の生合成経路

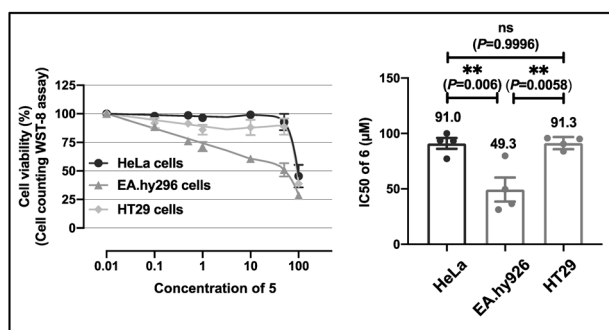


図3. Demethoxyfumagillol の増殖抑制効果

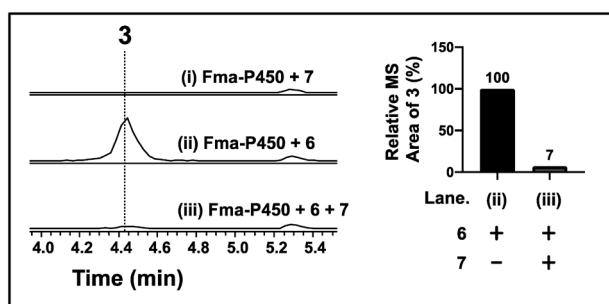


図4. *In vitro* における Fma-P450 の活性試験

demethoxyfumagillol(5) は, HeLa細胞や大腸癌細胞 HT29 と比べてヒト血管内皮細胞 EA.hy926 に対して強い増殖抑制効果を示した (図3). このことから, EA.hy926 細胞は 4 に対する感受性が高いことが予想された.

#### (2) 5-*epi*-demethoxyfumagillol の生合成効率向上

2 から 3 への変換過程で, 無毒の 5-hydroxyl- $\beta$ -transbergamotene(6) とシャント化合物である 5-hydroxyl- $\beta$ -cisbergamotene(7) が生合成される<sup>1,3)</sup>. 興味深いことに, 7 存在下では, Fma-P450 による 6 から 3 への変換が抑制された (図4, lane(iii)). すなわち, 7 が Fma-P450 の活性を阻害していると予想される. 実際に, Fma-P450 を発現させた EA.hy926 に 6 を添加したところ, 2 を添加した場合と比べて 4 の生産量がおおよそ3倍上昇した (図5).

#### (3) Fma-P450 の発現による EA.hy926 の増殖抑制

前述の実験 (1), (2) から, EA.hy926 を宿主とし, 基質として 6 を用いれば, 細胞内で生合成された 4 による増殖抑制効果が発揮されると予想した. Fma-P450 を発現させた EA.hy926 に 6 を添加した結果, 細胞生存率が低下した (図6). このことから, 本法により細胞増殖を抑制できる可能性が示唆された. 今後, 複数の天然物生合成遺伝子を導入することにより, 4 よりもさらに強力な抗がん物質をがん細胞内で生合成できるか検証を進めたい.

#### (4) がん細胞選択的に天然物を生合成する仕組み

がんを標的とした遺伝子治療技術は幾つか開発されており, 例えば, ウイルス製剤テロメラインは, ウイルスの

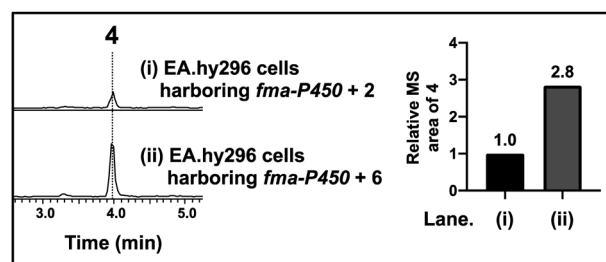


図5. Fma-P450 を発現させた EA.hy926 細胞における 5-*epi*-demethoxyfumagillol の生合成

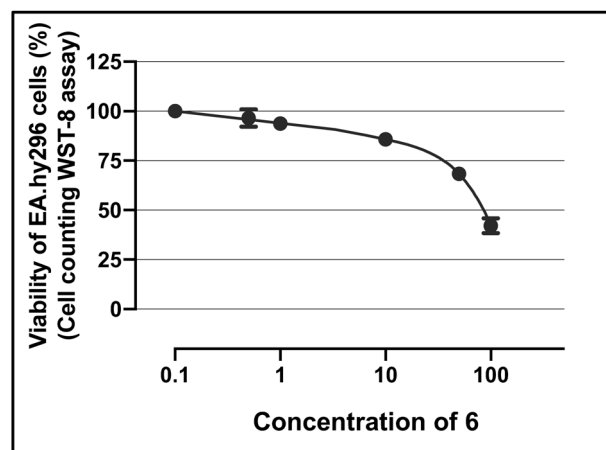


図6. Fma-P450 を発現させた EA.hy926 における細胞生存率

増殖に必要な E1A 遺伝子および E1B 遺伝子を human telomerase reverse transcriptase (hTERT) プロモーター制御下に置くことでがん特異的に腫瘍溶解性5型アデノウイルスを発現させることができる<sup>4)</sup>. そこで, Fma-P450 を hTERT プロモーター制御下においたレトロウイルスベクターを作製し, がん細胞選択的に Fma-P450 の発現を誘導できるか試みた. 現在までにベクターの構築は終わっており, 今後, 正常細胞とがん細胞にそれぞれ遺伝子導入し, hTERT プロモーターにより発現制御可能か検証したい.

#### 謝辞

本研究にご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます.

#### 引用文献

1. S. Matsuda *et al.*, *ChemBioChem*, **2021**, 23, e202100645.
2. Ingber, Donald, *et al.* *Nature*, **1990**, 348, 555-557.
3. H. C. Lin, Y. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, 136, 4426-44.
4. S. Kyo *et al.*, *Cancer Science*, **2008**, 99, 1528-1538.



# 油脂の摂取が健康的な脂肪組織を生み出す機構の解明

大阪公立大学生生活科学研究科 松村成暢

## 序論

ドーナツやケーキ、霜降り肉や大トロなど油脂を多く含む食品はなんとも言えない格別な美味しさがある。この美味しさを醸し出す要因は油脂である (1)。油脂を多く含む食品に人々は魅了され、ついつい食べすぎてしまう。このようなことが頻発すると当然の如く肥満してしまうため、油脂の摂取には注意が必要である。

油脂の摂取は肥満に直結すると考えられがちであるが、近年、我々の研究グループは油脂の摂取そのものが肥満を引き起こすわけではないことを発見した (2,3)。マウスは油脂を好んで大量に摂取する性質を持つが、マウスに油脂を好きなだけ摂取させても肥満しないのである。マウスは油脂を大量に摂取できる環境下では、熱産生（エネルギー消費）能力の高い代謝的に健康な脂肪組織を形成し、肥満を予防することができるのである。一方で油脂の摂取とともにストレスホルモンを投与すると炎症を伴う代謝的に不健康な脂肪組織が形成される。なぜ、このような違いが生み出されるのか不明であるが、油脂の摂取により分泌が促進するドーパミンやエンドルフィンそしてストレスに関与する脳部位の異常が自律神経を介して脂肪組織形成に影響していると予想される。

そこで本研究では油脂の種類の違いが脂肪組織の形成と遺伝子発現に与える影響ならびに、交感神経の以上がこれらにどのような影響を与えるのかについて検討を行った。

## 研究方法

### 動物飼育

本研究は大阪公立大学遺伝子組み換え実験安全委員会から倫理的に問題がないことの承認を受けた上で、大阪公立大学動物実験規程およびNational Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals に遵守して実施した。マウスは全て自家繁殖により得られたものを使用した。12時間の明暗期サイクル（明期6:00-18:00）で、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持して飼育した標準食（Normal Chow: NC; 固形飼料NMF; オリエンタル酵母株式会社、東京、日本）と水を自由摂食とし、ペパークリーンを敷いたクリーンケージにて繁殖した。

### 摂食実験

油脂摂取が体重増加に与える影響を検討するため、油脂を自由摂取させた際の体重変化、血中成分の変化および脂肪組織の mRNA 発現に与える影響を検討した。マウスのケージに給水瓶とは別に大豆油またはラードを入れたボトルを設置し、マウスが飼料と大豆油またはラードそして水を自由に摂取できる環境にした。なお、コントロール群には標準飼料のみを与えた。

いずれの実験も試験食を8週間与えた後に、解剖を行い、各種臓器重量の測定を行った。

### 組織中 mRNA 解析

それぞれの飼料を8週間自由摂食させた後に、各種臓器を摘出した。摘出した臓器は解析まで $-70^{\circ}\text{C}$ で保存した。凍結したままのサンプルにガラスビーズと Sepasol RNA Super (Nacalai, Kyoto) を加え、ビーズホモジナイザー (Precellys evolution, Bertin Technologies, Montigny-le Bretonneux, France) により臓器を破碎した。その後、Sepasol の説明書に従い RNA を抽出した。抽出した RNA より Rever Tra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, 大阪, 日本) を使用して cDNA を合成した。抽出した RNA を、エネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を quantitative PCR により定量を行った。

### 血液成分解析

それぞれの飼料を8週間自由摂食させた後に、血液を採取した。採取した血液は常温で10分静置した後、遠心分離により血清を得た。グルコース CII-テストワコー (FujiFilm Wako, Osaka, Japan)、トリグリセライド E-テストワコー、NEFA C-テストワコーを用いてグルコース、トリグリセライド、遊離脂肪酸濃度を測定した。Mercodia mouse Insulin ELISA kit (Uppsala, Sweden)、および Leptin ELISA kit (proteintech, IL, USA) を用いてインシュリンおよびレプチン濃度の測定を行った。

## 結果

本報告書執筆時点では論文誌へ投稿予定のため、本研究で得られた結果の詳細は省略する。

我々の過去の研究より100%の油脂摂取に伴い、脂肪組



織に接続する交感神経活性化が代謝的に健康な脂肪組織の形成に関与しているという結果が得られている (2, 3). そこで、遺伝的に交感神経活動が低いマウス (Melanocortin-4 receptor 発現神経特異的 Creb regulated transcription coactivator-1 欠損マウス: MC4R/CRTC1 KO マウス) (4) を用いて、交感神経活動が脂肪組織形成に与える影響の検討を行った。

MC4R/CRTC1 KO マウスは標準飼料のみで飼育した場合、野生型マウスと体重に変化は見られない (4)。しかしながら、MC4R/CRTC1 KO マウスに大豆油を自由摂取させると野生型マウスと比較して、顕著な体重増加が観察された。一方で、過去の研究と同様に野生型マウスに大豆油を摂取させても、標準飼料のみで飼育した場合とで、体重変化に大きな変化は観察されなかった。

また、MC4R/CRTC1 KO マウスでは大豆油摂取により脂肪組織の顕著な肥大が観察された。脂肪組織中の mRNA を調べると、両群ともに大豆油摂取によりアディポネクチン mRNA の増大がみられたが、MC4R/CRTC1 KO マウスでは野生型と比較して低値であった。レプチン mRNA は MC4R/CRTC1 KO マウスでのみ大豆油摂取により増大が観察された。さらに、MC4R/CRTC1 KO マウスでは大豆油摂取時に脂肪分解に関わる LPL や HSL などが減少し、マクロファージマーカーの mRNA が顕著に増大した。

血液成分の解析を行ったところ、大豆油自由摂取の有無で血糖値およびインシュリン値に大きな変化は見られなかった。しかしながら、MC4R/CRTC1 KO マウスでは大豆油摂取により、血中レプチン値、トリグリセライド値および血中遊離脂肪酸値に増加が観察された。

ラードを自由摂取させると、標準飼料のみで飼育した場合と比較して、野生型マウス、MC4R/CRTC1 KO マウスともに緩やかな体重増加が観察された。しかしながら、野生型マウスと MC4R/CRTC1 KO マウスとの間に大きな体重差は見られなかった。ラード摂取により野生型マウス脂肪組織ではアディポネクチン mRNA の増加が観察されたが、MC4R/CRTC1 KO マウスではラード摂取による増加が見られなかった。レプチン mRNA はラード摂取による変化は見られなかった。

## 考察

脂肪組織は単に脂肪をエネルギーとして蓄積するだけでなく、全身の糖代謝を正常に行うためにも非常に重要な臓器である。脂肪組織から分泌されるレプチンやアディポネクチンは骨格筋などの糖取り込みを交感神経系により間接的に促進するのみならず、インシュリン感受性も向上させる作用を持つ。また、過剰な脂肪蓄積や疾病、炎症によ

り脂肪組織が機能不全を引き起こすと、脂肪を蓄積できなくなる。この時、行き場を失った脂肪は異所性脂肪として肝臓や骨格筋など本来脂肪を貯蔵しない臓器に蓄積し、脂肪肝や骨格筋インシュリン感受性の低下を引き起こすことが報告されている。このため、健康的な脂肪組織を維持することは我々の健康にとって非常に重要なことであるが、何が健康的な脂肪組織を不健康なものにするのかは不明な点が多い。

本研究では油脂の摂取が脂肪組織にどのような影響を与えるのか検討を行った。その結果、植物性油脂である大豆油の摂取は脂肪組織の脂肪燃焼能力を高め、インシュリン感受性を高めるアディポネクチンの発現量を増加させることが明らかとなった。また、大豆油の摂取は肥満を誘導しないことに加え、血糖値や血中脂肪量に影響を及ぼさないことが示された。一方で動物性油脂であるラードの摂取は脂肪組織に炎症を引き起こすとともに体重を増加させる傾向があることが示された。

Melanocortin-4 receptor (MC4R) は脳の摂食を調節する神経系に発現する G タンパク質共役型の受容体である。MC4R 遺伝子に変異や欠損があると過食により強烈的な肥満を引き起こすことから肥満原因遺伝子と考えられている (5)。近年、我々は MC4R 発現神経を刺激すると、交感神経を介して脂肪燃焼を促進すること、脂肪組織の代謝を制御することを発見した (6)。さらに、MC4R 神経細胞中の CRTC1 (Creb regulated transcription coactivator-1) を欠損させると、高脂肪食摂取により脂肪組織で重度の炎症が引き起こされ、糖尿病を発症させることを明らかとした (4)。これらの結果は、脳内の MC4R 神経が交感神経を介して脂肪組織の健康維持に寄与していること、そして MC4R 神経細胞中の CRTC1 が交感神経活動を調節し脂肪組織の機能維持の一端を担っていることを示唆している。本研究では MC4R 神経細胞特異的に CRTC1 を欠損させたマウス (MC4/CRTC1 KO マウス) を用いて、CRTC1 欠損に伴う交感神経の活性低下が脂肪組織にどのような影響を与えるのかを検討した。

MC4/CRTC1 KO マウスに大豆油を摂取させると肥満するとともに脂肪組織のレプチン mRNA 発現量および炎症マーカーが野生型と比較して顕著に増大した。さらにラードの摂取により野生型マウスではアディポネクチンの発現上昇がみられたが、MC4/CRTC1 KO マウスではラード摂取による発現量の上昇がみられなかった。これらの結果は、油脂を大量に摂取すると交感神経が活性化され、脂肪組織での脂肪燃焼を促進し、脂肪組織の肥大を抑制すること、そして脂肪組織の炎症を抑制することを示唆している。交感神経の末端より分泌されるアドレナリンや ATP が脂肪

組織に作用しこのような減少を引き起こしていると予想される。さらに、交感神経はアディポネクチンの発現を上昇させる可能性が示された。アディポネクチンはインシュリン感受性を亢進させることから、交感神経はこのような経路で脂肪組織を健常に保ち、糖代謝の恒常性を維持しているのかもしれない。

## 参考文献

1. Matsumura S, Eguchi A, Okafuji Y, Tatsu S, Mizushige T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T. Dietary fat ingestion activates  $\beta$ -endorphin neurons in the hypothalamus. *FEBS Lett.* 2012 Apr 24; 586(8): 1231-5.
2. Matsumura S, Odanaka M, Ishikawa F, Sasaki T, Manio MCC, Fushiki T, Inoue K. *Physiol Behav.* 2019 May 15; 204: 112-120. Chronic high corticosterone with voluntary corn oil ingestion induces significant body weight gain in mice.
3. Matsumura S, Ishikawa F, Sasaki T, Odanaka M, Manio MCC, Fushiki T, Inoue K. *Mol Nutr Food Res.* 2018 Nov; 62(22): e1800241. Voluntary Corn Oil Ingestion Increases Energy Expenditure and Interscapular UCP1 Expression Through the Sympathetic Nerve in C57BL/6 Mice.
4. Matsumura S, Miyakita M, Miyamori H, Kyo S, Ishikawa F, Sasaki T, Jinno T, Tanaka J, Fujita K, Yokokawa T, Goto T, Momma K, Takenaka S, Inoue K. *CRTC1 deficiency, specifically in melanocortin-4 receptor-expressing cells, induces hyperphagia, obesity, and insulin resistance.* *FASEB J.* 2022 Dec; 36(12): e22645.
5. Wei R, Li D, Jia S, Chen Y, Wang J. *Adv Biol (Weinh).* MC4R in Central and Peripheral Systems. 2023 Sep; 7(9): e2300035.
6. Matsumura S, Miyakita M, Miyamori H, Kyo S, Shima D, Yokokawa T, Ishikawa F, Sasaki T, Jinno T, Tanaka J, Goto T, Momma K, Ishihara K, Berdeaux R, Inoue K. Stimulation of Gs signaling in MC4R cells by DREADD increases energy expenditure, suppresses food intake, and increases locomotor activity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2022 May 1; 322(5): E436-E445.

## 6. 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

# Microbes & RNA 2023, 7th Meeting on Regulating with RNA in Bacteria and Archaea Hilton Bayfront St. Petersburg, Florida, USA

宮腰昌利 筑波大学医学医療系

アメリカ合衆国フロリダ州セントピーターズバーグにて、2023年9月5日から8日に開催された Microbes & RNA 2023 に参加した。細菌と古細菌における RNA による制御に関する本国際会議は今回で7回目となる。2020年10月の第5回、2022年1月の第6回はオンラインとなったため、2018年3月にスペイン・セビリアで開催された第4回以来はじめて対面での会議となった。

リボスイッチ、small RNA、CRISPR などの RNA の分解、プロセッシングや制御ネットワーク、RNA タンパク質の機能、構造に関する 44 件の口頭発表、83 件のポスター発表が行われ、活発な議論が繰り広げられた。我々は、 $\gamma$ -プロテオバクテリアに広く保存されるアミノ酸代謝のグローバルレギュレーター GcvB small RNA の機能を制御する mRNA 3'UTR 由来 small RNA (スポンジ RNA) に関する発表を行い、多くの研究者と情報交換を行うことができた。我々の研究成果が期待されていることを直接感じることは、やはり対面での国際学会で最も重要な点であろう。また、口頭発表は全て同一の会場で行われ、世界中の研究者が一堂に会して休憩時間にも質疑応答が絶えない状況は、オンライン会議では味わうことができない貴重な体験であり、得られる情報量も格段に多いと言える。

大変光栄なことに、今回はじめて、私は CRISPR に関するセッションの座長に指名された(写真1)。2011年3月にプエルトリコ・サンファンで開催された第2回の本会議の際に、Emmanuelle Charpentier と Jennifer Doudna が意気投合し、ノーベル化学賞の共同受賞に繋がったことは有名である(私は本会議の最終日に起きた出来事の方が深く記憶に刻み込まれている)。そのようなエピソードを紹介しつつ、冗談も交えながら、円滑にセッションを進行することができた。

今回は日本からの参加者は多くはなかったが、参加していた大学院生が非常に活発に交流している様子を見て大変感激した。私も大学院生だった頃に国際会議に参加する機会を与えていただいていたが、果たして自分はその頃ここまで有意義な時間を過ごすことができていたのだろうか？ポ

ストコロナの今回は、海外でのポスドクの経験を通して知り合った仲間たちと5年ぶりに旧交を温めることができた(写真2)。研究以外の話もできる友人が海外にもいるのは大変喜ばしいことで、今後も本会議に参加し続けたいと思う。様々な活動を通して日本の若手研究者を増やしていき、次の世代に研究の楽しさを伝えていけたら幸いである。最後に、本国際会議への出席にあたりご支援を賜りました公益財団法人日本農芸化学会に厚く御礼申し上げます。



写真1 座長を務めたセッション



写真2 ポスドク時代の同僚たちと

# 7. 第79回国際会議出席費補助金 報告書



## 第79回国際会議出席費補助金

# The 37th International Specialised Symposium on Yeasts 参加報告書

広島大学大学院統合生命科学研究科  
益村晃司

開催期日：2023年11月27日～12月1日  
開催場所：オーストラリア、アデレード

### 1. 学会の概要

**International Specialised Symposium on Yeasts (ISSY)** は酵母の基礎から応用研究の普及と発展を目的として、特定のトピックスについて最新の情報発信や共有を行うシンポジウムである。本年度 (ISSY2023) は37回目の開催にあたり、オーストラリア屈指のワイン産地アデレード市内の **National Wine Center of Australia** (写真1, 2) で開催された。本年度は30か国以上から174名の参加登録があり、講演者は84名、ポスター発表は筆者を含め41題であった。

ISSY2023のテーマは「Yeast Biotech 2.0: New yeast, knowledge & Application (酵母のバイオテクノロジー：新しい酵母, 知識, 応用)」であり、世界各国の大学や研究機関、バイオテクノロジー関連の企業の酵母研究者が一堂に会し発表を行った。シンポジウムは5日間にわたって14のセッションから構成され、ワイン酵母やビール酵母などの醸造用酵母の育種やその応用に関する演題が多かった。その他、酵母を利用した分子生物学、遺伝子工学に関連した発表も多数あった。

来年度は、酵母研究全体を対象とした国際会議 International Congress on Yeasts (ICY) の4年に1度の開催年であり (ISSYはICYの非開催年に開催)、ICY16が南アフリカのケープタウンで開催予定である。

### 2. 参加の流れ

筆者の所属する研究室では、実験室酵母株の *SSG1* 変異株を取得し、*SSG1* 変異株が寿命延長やストレス耐性を示すことを見出した。最近の解析から、*SSG1* 変異株が細胞内に高蓄積するS-アデノシルホモシステイン (SAH, メチオニンの代謝物) を酵母野生株に与えるだけでも寿命延長

やストレス耐性を示すことがわかった。さらに興味深いことに、SAHは酵母の高発酵性とも関連することがわかってきた。そこで筆者は *SSG1* やSAHによるストレス耐性機構、高発酵性に関する研究成果を発信、意見交換するため本学会への参加を希望した。参加登録は6月に行い、8月に発表の承諾を頂いた。

開催地であるアデレードへは、広島空港から羽田空港、シドニー国際空港を経由して計13時間のフライトで学会前日の夕方に着いた。アデレード空港から会場のある市



写真1



写真2

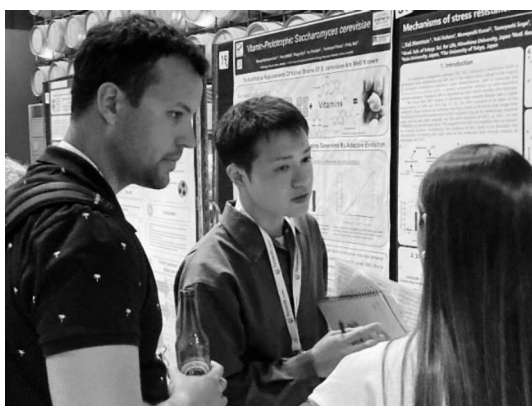


写真3

内中心部へはタクシーで移動し20分で到着した。会場周辺にはオーストラリアでトップレベルの評価を受けるアデレード大学のほか、公共の植物園、美術館、博物館、図書館が無料で入園、入館でき教育施設や文化施設が大変充実していた。街は活気がありつつも、落ち着いた雰囲気を感じた。

学会初日の歓迎会や最終日前夜の懇親会、ポスター発表ではワインやビールを片手にリラックスした雰囲気の中、活発な議論が交わされた。

筆者は今回が初めての国際会議・学会への参加であったが、世界の最先端の研究やトレンドを直接知ることができ、刺激的で大変有意義な学会参加となった。

### 3. 筆者の発表

筆者は学会3日目のポスターセッションで「Mechanisms of stress resistance mediated by methionine restriction」というタイトルで1時間半の発表を行った(写真3)。ポスターは初日から掲載可能であったため、発表時間外にも議論や意見を頂くことができた。

#### 発表内容

筆者の所属研究室では実験室酵母の *SSG1* 変異株を取得

し、*SSG1* 変異株がメチオニン (Met) の代謝物である S-アデノシルメチオニン (SAM) と SAH を高蓄積し寿命を延長することを見出した。

興味深いことに、*SSG1* 変異は元来、清酒酵母などの実用酵母が有している遺伝子であったことから、*SSG1* 変異株の表現型解析は清酒酵母などの醸造特性を分子レベルで解明する基盤として期待される。

これまでに *SSG1* 変異株の解析から、SAM 合成の活性化は SAM の生合成に必要な Met と ATP を消費するため、寿命延長効果が報告される Met 制限の誘導と長寿遺伝子 AMPK を活性化し、寿命延長することを明らかにした (Ogawa *et al.*, *PNAS*, 2016)。さらに、この寿命延長メカニズムは SAH を酵母野生株に作用させるだけでも模倣できることがわかった (Ogawa, Masumura *et al.*, *Aging Cell*, 2022)。最近の解析から SAH を与えた細胞では長寿以外にもミトコンドリアの活性化や、種々のストレスへの耐性を示すことがわかった。また、*SSG1*/SAH は発酵との関連も予想されたことから、SAH を作用させた野生株で培養液中のエタノール量を測定した。その結果、コントロールよりもエタノール量が増加しており、発酵過程において *SSG1*/SAH が重要な役割を果たすことが示唆された。

質疑応答では、SAM は生体内の主要なメチル基供与体であることから、*SSG1*/SAH で観察された表現型や発酵特性が DNA やヒストンのメチル化と関連があるか議論した(写真3)。また、SAH でエタノール発酵量が増加した理由について質問を受け、SAH を作用させた細胞では解糖系遺伝子の発現が増加している観点から、意見の交換を行った。

#### 謝辞

最後に本会議への参加にあたり、ご支援賜り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。

## スターチャウンドテーブル 2023 参加報告書

秋田県立大学生物資源科学部  
三浦聡子

開催期日：2023年10月15日～10月17日  
開催場所：アメリカ合衆国、シャンパーグ

### 1. スターチャウンドテーブル 2023 の開催概要

本学会は、2年に1回アメリカで開催される、世界の澱粉研究者が集い、クローズドで濃密な議論を交わす会合である。2021年はオンラインでの開催であったため、今年

は4年ぶりの対面での開催であった。スターチャラウンドテーブル2023 (Starch round table 2023) は、2023年10月15日から17日にアメリカ合衆国イリノイ州シャンバーグの Hyatt Regency Schaumburg ホテルで開催された。今年の日本の夏は猛暑となり、残暑が続く中で10月になっても上着を必要としなかったが、北海道と同じ北緯42度に位置するシャンバーグの朝晩の冷え込みは厳しく感じた。2020年から猛威を振るった新型コロナウイルス感染症が今年5月以降、5類感染症に移行した。それに伴い、海外への渡航規制が緩和されて本学会へ参加することができた。多くの諸外国では、すでに社会活動が活発になっている。そのため、アメリカ、ヨーロッパ、アジア、オーストラリアなど世界各国から研究者が多数参加していた。

スターチャラウンドテーブルは例年、澱粉科学に関して Biosynthesis, Structure/function と Applications の3つの分野からの招待講演者、各5~6名が講演する。その後、Volunteered talks で一般講演者による発表が行われる。私は、最終日10月17日に行われた Volunteered talks で “Analysis of leaf sheath starch structure in starch branching enzyme (BE) double mutant rice lines.” のタイトルで口頭発表を行った。

## 2. 発表内容

澱粉の主成分であるアミロペクチンは、直鎖伸長酵素であるスターチシンターゼ (SS)、枝作り酵素 (BE) や枝切り酵素 (DBE) など様々な澱粉生合成酵素によって形成される。イネの澱粉の貯蔵器官である胚乳の澱粉含量は約90%である一方で、その他の器官の澱粉含量は非常に少ない。そのため、イネの胚乳澱粉の構造は先行研究で詳細に調べられているが、胚乳以外の器官の澱粉構造は未解明な部分が多い。

イネの BE は、BEI, BEIIa と BEIIb の3つアイソザイムが存在する。先行研究により BEI はアミロペクチンの長鎖、BEIIa と BEIIb は短鎖の分岐形成に関与することが示されている。BEIIb は胚乳で特異的に発現し、BEI は胚乳と葉鞘等で発現しているが、BEIIa は胚乳と比べて葉鞘等での発現の方が強い。本研究では、ジャボニカ米野生型に化学突然変異源 (MNU) 処理をして得られた *be1*, *be2a* と *be2b* のシングル変異体をそれぞれ交配し、その後代の種子を選抜して得られた二重変異体3系統 (*be1 be2a*, *be1 be2b*, *be2a be2b*) の胚乳澱粉と葉鞘澱粉を用いて澱粉構造を調べることで、各アイソザイムの両器官における機能分担について考察した。

胚乳澱粉の *be1* と *be2a* の見かけのアミロース含量 (AAC) は野生型と有意差はなかった。 *be1 be2a*, *be2a*

*be2b* の AAC は野生型と比べて低かった。一方、*be2b* は26.5%であり、野生型と比べて有意に高かった。 *be1 be2b* は51.7%であり、系統間で最も高かった。アミロペクチンの長鎖に対する短鎖の割合 (III/II) は、野生型と *be1*, *be2a* は3.0~3.2であり同程度だった。 *be1 be2a* は3.4であり、野生型と有意な差はなかった。一方、*be2b* は1.0とアミロペクチン長鎖の割合が高かった。 *be2a be2b* は0.9であり、*be2b* と同程度だったが、*be1 be2b* はアミロペクチン長鎖の割合が最も高く、0.5だった。

葉鞘澱粉の AAC は、*be1* と *be2b* では野生型と同等だった。一方、葉鞘で発現の強い BEIIa のみが欠損した時は37.4%であり、系統間で最も高かった。二重変異体の AAC は *be1 be2a* は29.2%であり、野生型よりは有意に高かったが、*be2a* と比べて低かった。 *be2a be2b* は25.9%であり、野生型と比べてやや高かったが、有意差はなかった。これに対して、*be1 be2b* は系統間で最も低く、14.9%だった。葉鞘澱粉の III/II は、野生型と *be1*, *be2b* 及びそれらの二重変異体 *be1 be2b* は2.0~2.4であり、有意差はなかった。一方、*be2a* およびその二重変異体である *be1 be2a* と *be2a be2b* は、0.8~1.2であり、野生型と比べてアミロペクチン長鎖の割合が有意に高かった。

胚乳で発現の強い BEIIb が欠損すると胚乳の澱粉構造は、野生型と比べてアミロペクチン短鎖が激減し、相対的にアミロペクチン長鎖とアミロース含量が増加した。さらに、BEI と同時欠損させると、この傾向がより顕著になった。一方、胚乳で発現の弱い BEIIa の欠損は胚乳澱粉の構造にはほとんど影響を与えず、*be1 be2a* は野生型と類似し、*be2a be2b* は *be2b* と類似した。葉鞘で発現の強い BEIIa が欠損すると、胚乳で BEIIb が欠損した時と同様に葉鞘澱粉構造が劇変した。さらに BEI とともに欠損した場合、アミロペクチンの構造はさらに変化する傾向にあったが、アミロース含量の増加は、シングルほどではなかった。一方、葉鞘で発現の低い BEIIb 欠損の影響はほとんどなかった。 *be1 be2b* の構造はアミロース含量が低下していたものの、アミロペクチン構造は野生型と類似したことから、葉鞘では BEIIa が存在すればアミロペクチン構造に影響がないと考えられる。

本研究では、各器官で発現の強い短鎖の分岐に関与する酵素が欠損すると、その器官で澱粉構造が激変することが示された。

## 3. 謝辞

本学会へ参加するにあたり、ご支援頂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。

#### 4. 出席証明写真

本学会は非公開の学会であるため、発表中の撮影が禁止

されていました。会合の最後に撮影した全体写真，前から  
2列目左から9人目くらいの所に写っています。



## 8. 第80回国際会議出席費補助金 報告書



## 第80回国際会議出席費補助金報告書

# 2024 International Garlic Symposium への参加報告 —Frontiers of Garlic Research in Health Promotion and Disease Prevention—

鹿児島大学農学部  
加治屋勝子

開催期日：2024年4月26日～29日  
開催場所：ドイツ、ミュンヘン

### 1. 出国までの長い道のり

2024 International Garlic Symposium にて研究成果を発表することとなり、開催地がミュンヘンだったため羽田空港からミュンヘン空港への直行便を利用することにした。開催日前日にあたる4月25日、まずは鹿児島から東京へ飛ぶ必要がある。利用予定の国際線が国内航空会社とのコードシェア便だったため、鹿児島でスーツケースを預けて（東京では引き取らず）ミュンヘンで受け取れるという利便さに足取りが軽い。羽田空港を22時55分出発予定の飛行機に搭乗し、機内エンターテインメントを楽しんでいたが、ふと外に目をやるとまだ地上にいた。かれこれ1時間は経っていたが、遅延はよくあるので引き続きマッタリとしていたら、機内アナウンスが流れ、致命的な計器の異常により本日のフライトはキャンセルとのこと。気持ちはすっかりドイツに飛んでいたのに、慌てて呼び戻して降機した。海外出張は何度も経験しているが、出国スタンプに「出国中止」のスタンプが押されたのは初体験であった。振替便が未定のため、とりあえず航空会社に用意していただいたホテルに一泊することとなり、ミュンヘンで受け取るはずだったスーツケースを東京で引き取った。航空会社の対応はとて丁寧だったが、如何せん200名を超える乗客がいたため、重い足取りでホテルにチェックインしたのは朝4時。既に15時間のフライト後のような心持ちであったが、とても快適なホテルをご準備いただいたことが救いであった。

翌日、24時間遅れで飛行機が飛ぶことになったが、25日の遅延便と26日の通常便が同時に飛ぶため、何とかややこしかった。そして、26日の通常便は離陸したのに、25日の遅延便は搭乗予定時刻を過ぎても搭乗できず、時間は刻々と過ぎ、まさか！？とドキドキする時間を過ごし

たが、今度は無事に離陸し、発表には間に合いそうだった。これで飛行機が飛ばなかったら、いったい何をしに行くのか…となるところだった。発表日（27日）当日の朝7時半頃にミュンヘン空港に到着し、休む間もなく会場に直行。すぐさまポスターを貼付してシンポジウムに参加という、思い出深いスタートを切った。

### 2. 学会の概要

2024 International Garlic Symposium は、2024年4月26日から29日にドイツのミュンヘンにある The Westin Grand Munich ホテルにて開催された。1990年にアメリカで第1回国際会議が開催され、今回で7回目であり、各国の研究者から興味深い研究結果が発表されている。この国際会議では、健康増進や疾病予防におけるニンニクとその成分の最前線の研究から得られた最新の科学的発見についての報告があり、食品化学、栄養学、薬学、医学等の研究者が多数参加していた。前述の通り、4月26日は飛行機の遅延で参加できなかったため、27日朝のセッションか



写真1 シンポジウムの聴講



写真2 コーヒーブレイク

ら参加した (写真1)。

セッション1はBasic Studies of Garlic, セッション2は, Studies on Cancer and Infectious Disease (I) と題して4名の発表があり, アリイン生合成経路に関する遺伝子の網羅的研究や, 熟成ニンニクエキスの成分 (S-アリルシステインやS-1-プロペニルシステイン) の生理作用について大変勉強になった。コーヒーブレイクでは山盛りのスイーツ & ドリンクが提供され, 朝食が機内食だけだった私の胃は満たされた (写真2)。セッション3はStudies on Cancer and Infectious Disease (II), セッション4はStudies on Inflammation and Immunity と題して4名の発表があり, ニンニクエキスの抗炎症作用, 消化管機能に与える影響などを学んだ。ランチョンセミナーでは, サンドイッチを頬張りながら THE CANCER STORY AND PUBLISHING IN BIO-MEDICAL SCIENCES について最新の研究に触れることができた。

午後はCardiovascular SystemのBasic Studies (セッション5) とClinical Studies (セッション6) で5名の発表があり, 自身の専門分野だったこともあり非常にわかりやすい研究内容で, 動脈硬化に対するニンニクの可能性について新たな知見を得た。Plenary Lecture (I) では, つい最近*Cell Metabolism* (377-392, 36 (2), 2024) で関連論文を拝読したばかりの内容だったため非常に理解が進んだ。セッション7のポスター発表については次項をご参照いただきたい。ポスター発表後はWelcome Dinnerがあり, 大会長のProf. Norbert Weiss (ドレスデン工科大学) を囲む8名席に通された。少々緊張したが, Weiss教授は大変気さくな方で「いただきます」の日本語を教えて, と話しかけてくださった (写真3)。

翌28日はPlenary Lecture (II) としてオートファジー



写真3 大会長との記念写真



写真4 ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン, 通称: ミュンヘン大学の本館

の講演から始まり, セッション8ではBrain System, セッション9ではOral Healthに対するBasic and Clinical Studiesが6題発表され, 当研究室でおこなっている他の研究テーマに参考となる研究手法を知ることができた。

### 3. 発表内容

ポスター発表では20題の発表があり, 私は「SCREENING OF AGRICULTURAL PRODUCTS CONTAINING FUNCTIONAL COMPOUNDS FOR PREVENTION OF HYPERTENSION」について発表し, たくさんの研究者に質問やコメントをいただくことができた。本研究は, 血管機能を向上させるための食材を探索していく中で, ラッキョウやニンニクに辿り着き, その成分同定を試みたものである。まだまだ始めたばかりの研究であり, 少しでもヒ

ントを得たくてこの国際会議に参加したのだが、ポスター発表をしたことで、今後の研究に繋がる貴重なアドバイスをいただいた。このことだけでも、この国際会議に参加した甲斐があったと思う。

#### 4. 寄り道

最終日28日はClosing Remarkが始まる前に会場を出て（ごめんなさい、汗）、ミュンヘン市街地へ急いだ。バスケットの購入方法を現地の方に（ドイツ語がわからなかったので身振り手振りで）教えていただきながら、どこかのサッカーチームのテーマソングを歌う集団と一緒に同乗し

て盛り上がっていたら、あっという間にミュンヘン大学の目の前に到着した（写真4）。本館は歴史的な建造物で、世界でも最も古い大学に数えられるらしく、博物館のようだった。このような場所で教育や研究ができるのも素敵だな、と思いつつキョロキョロしながら歩いていたら、広い構内で迷子になってしまい、また一つ、思い出が増えた。

#### 5. 謝辞

大変貴重な経験ができました。本シンポジウムへの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厚く御礼申し上げます。

9. 第2回女性研究者チャレンジ研究  
助成金報告書

## 第2回農芸化学女性研究者チャレンジ研究助成報告書

### 天然由来タイトジャンクション透過促進物質の標的解析

筑波大学生命環境系  
南雲陽子

#### はじめに

上皮組織で細胞同士を密着させ物質透過性を制御するタイトジャンクション (TJ) は、外界からの異物侵入を防ぐバリア機能を担っているが、同時にバイオ医薬品をはじめとする難吸収性医薬品の吸収障壁にもなっている。我々は TJ を薬剤投与時のみ一時的に緩めること (可逆的 TJ 開口) により、難吸収性医薬品の非侵襲的投与が可能になると考え、化合物探索や作用機構解析を進めている。MA026 (図1) は、TJ 形成に必須なタンパク質 claudin-1 (Cld1) の部分配列に結合することが報告されていた<sup>1</sup>。そこで TJ への影響を検討したところ、可逆的な TJ 透過性上昇が認められ、Cld1 部分配列ペプチドでその活性が阻害されることを発見した<sup>2-6</sup>。しかし MA026 と Cld1 との相互作用はまだ確認できていない。そこで本研究では細胞レベルでの MA026 と Cld1 間相互作用を解析することで、Cld1 の分子標的としての役割を明らかにすることを目的とした。

#### 結果と考察

Claudin (Cld) ファミリータンパク質は TJ 形成に必須な膜タンパク質である。同一細胞膜上でストランド状に side-by-side 重合し、さらに隣り合う細胞のストランドと head-to-head 結合して細胞同士を密に接着させることで、物質透過性を制御している。我々が TJ 透過性試験に用いている MDCK II 細胞では Cld1, 2, 3, 4, 7 を発現していることが知られている。MA026 が Cld1 との相互作用が主で

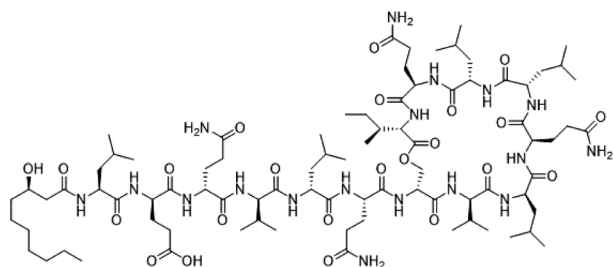


図1 MA026 の化学構造

TJ 開口を引き起こしているならば、Cld1 を発現していない細胞では MA026 の作用が減弱し、逆に Cld1 のみを発現する細胞では MA026 の作用が顕在化すると考えられる。そこで Cld1 のみを破壊した、または Cld1 のみを発現する MDCK II 細胞を構築し、MA026 による TJ 開口活性を検討することとした。

#### 1. Cld1 knockout細胞を用いた解析

MDCK II の Cld1 破壊細胞をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 を用いて作成した。Cas9 タンパク質と sgRNA の複合体を MDCK II 細胞に導入し、限界希釈により複数クローンを樹立した。塩基配列解析により欠損様式を確認し、ウエスタンブロッティングで Cld1 を発現していないこと、関連する TJ タンパク質について大きな発現変動がないことを確認した3クローンについて、TJ 透過促進活性の検討に進んだ。なお、Cld1 欠損による TJ バリア機能に対する影響については、残存する Cld2, 3, 4, 7 により形成される TJ バリアが野生型と同程度あることを経時的 TER 測定により確認した。野生型、Cld1-KO MDCK II 細胞それぞれを transwell insert (図2A) に播種し単層を形成させた。Insert の apical 側に FITC 4 kDa dextran (FD-4) 溶液を加えた後、DMSO vehicle control もしくは MA026 (3  $\mu$ M) を5時間処理した。Insert の basal 側の溶液を経時的に回収し、その蛍光を測定することで、insert を透過した FD-4 を検出した。その結果、野生型 MDCK II 単層では DMSO 処理による FD4 透過はほとんどみられず、MA026 による FD4 透過促進が観測された。一方で、Cld1-KO クローンでは、MA026 処理による FD4 透過促進が DMSO 処理とほぼ同程度まで顕著に減弱した (図2B)。以上から MA026 はその TJ 透過促進活性に Cld1 の存在を必要とすることが示唆された。

#### 2. Cld1 knockin細胞を用いた解析

Cld1, 2, 3, 4, 7 を欠損させた quin KO MDCK II 細胞 (qKO 細胞) を生理学研究所古瀬教授よりご供与いただき<sup>7</sup>、ヒト



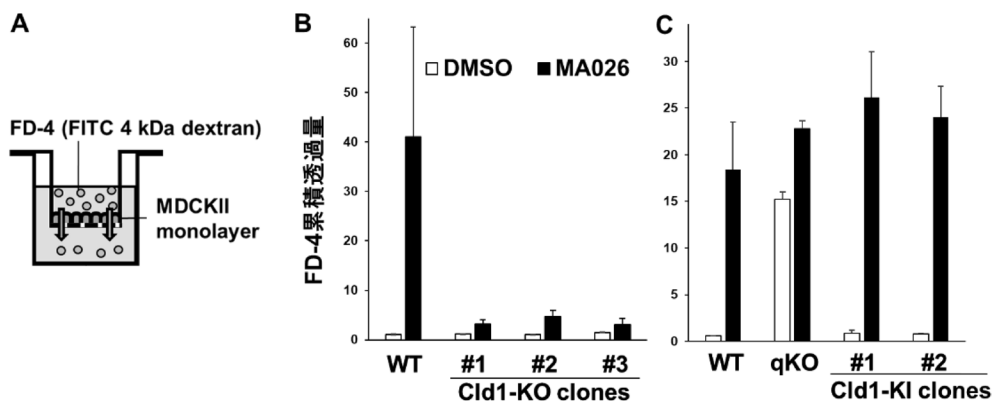


図2 A) Transwell を用いた FD-4 透過促進活性測定模式図。  
B) Cld1-KO, または C) Cld1-KI 細胞を用いた MA026 による FD-4 透過促進活性。

Cld1 のみを導入しクローンを樹立した (Cld1-KI 細胞)。WB による発現確認, 抗体染色による発現様式確認, TER による TJ バリア機能の増強を確認し, FD-4 透過促進活性検討に進んだ。図 2C に示すように野生型では MA026 処理により FD-4 透過促進が見られ, qKO 細胞では TJ バリア機能が減弱しているため DMSO 処理でも FD-4 透過が観察された。Cld1-KI 細胞では検討した 2 クローンともに DMSO 処理では透過が見られなくなった上, MA026 による透過促進が野生型と同程度にみられるようになった。以上を考えると MA026 による TJ 透過促進活性には Cld1 が関与していると考えられる<sup>8</sup>。

以上より, Cld1 の MA026 分子標的としての役割を明らかにすることができた。MA026 が結合するとされている Cld1 細胞外ドメイン中の VFDSL 配列は Cld が同一細胞膜上で重合してストランドを形成するのに必要なドメインと考えられている。そのため MA026 が Cld1 の VFDSL 配列に結合することで Cld ストランドが乱れ TJ 透過性が高まることが想起される。そこで qKO 細胞に蛍光ヒト Cld1 を単一発現した細胞を作成し, 光退色後蛍光回復法によって細胞膜上に形成された蛍光 Cld1 ストランドの乱れを観測する予定である。これまでに GFP やその他の蛍光タンパク質を結合させたヒト Cld1 を qKO 細胞に導入したクローンを取得し, TJ が存在する細胞間隙に蛍光タンパク質発現が見られることを確認した。また, これらクローンでは qKO 細胞に比べ FD-4 透過量の減少が観察されたことから, 部分的なバリア機能が確認できたため, 今後

MA026 存在下で各種顕微鏡観察を行う予定である。

### おわりに

本研究により MA026 が Cld1 を標的とし TJ バリア変動を引き起こしていることを明らかにできた。一方で, ヒトでは 26 種類存在する Cld ファミリーの VFDSL 相同領域ペプチドによる競合阻害実験を平行して行っており, 配列がごく一部異なるだけで阻害活性が失われたり, 配列のほとんどが異なっても阻害活性があるなど興味深い結果が得られている。今後, MA026 の Cld 特異性についてより詳細な検討を行うことで, Cld ファミリー特異的な阻害活性を示す MA026 類縁体が合成できる可能性があり, 組織選択的透過促進剤という新たなコンセプトに発展する。科学技術の発展により複雑な生体高分子の生産が容易になり, 医療を含む多様な分野で利用されるようになった。それらは親水性の中・高分子であることが多いため, MA026 をはじめとする透過補助剤により, 作用部位まで届ける DDS 技術も同時に進展していく必要があると考えられ, 貢献できるような研究を行っていきたい。

### References

1. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 18949 (2013)
2. *J. Antibiot.* **170**, 691 (2017)
3. *Angew. Chem. Int. Ed.* **60**, 8792 (2021)
4. *PCT/JP2020/12446*
5. 日本農芸化学会大会 2022 一般公演 3E05-06
6. 日本農芸化学会大会 2022 大会シンポジウム 4FS-6
7. *J. Cell Biol.* **218**, 3372 (2019)
8. 日本農芸化学会大会 2024 一般公演 4B5A11

# 規耐塩化・耐塩性酵素を用いた環境修復と保護

東京工業大学 生命理工学院  
八波利恵

## 1. 研究の背景と目的

近年、海洋環境におけるプラスチックごみ汚染が地球規模で問題となっている。海洋環境に流出したプラスチックごみは、海水より比重の重いものは直ちに沈下して、海底に蓄積される。一方、ポリエチレンテレフタレート (PET) などの比重の軽いプラスチックごみはしばらく海上を漂ったあぐく一部は海岸に打ち上げられ、塩が付着した漂着プラスチックごみとなる。その後、紫外線により劣化してマイクロプラスチック化し、海洋に沈降していく。この漂着プラスチックごみは、回収後埋め立てあるいは、焼却処理される。しかしながら、埋め立てた場合、ごみに付着した塩が公共用水域に高濃度の塩化物イオンとして排出される。また、焼却処理を行った場合には塩化水素が発生し、焼却炉の劣化を引き起こす原因となっている。

近年、*Ideonella sakainensis* 201-F6株より PET 分解酵素 (PETase) が発見され<sup>1)</sup>、バイオリサイクルに向けて大きな期待が寄せられている。PETase は、PET をモノヒドロキシエチルテレフタレートへと加水分解する (Fig. 1)。また、*I. sakainensis* は、PETase の他に、PET を加水分解して生じる MHET を分解する酵素 (MHETase) も有しており、両酵素が機能することで PET の完全分解を行なっている<sup>2)</sup>。しかしながら、漂着プラスチックごみには、塩が付着している (= 高濃度の塩を含む) ため、非耐塩性酵素である PETase では分解できない。また、PETase の反応至適温度は 40℃ であり、耐熱性が低いことも

産業利用における問題として挙げられている。そこで本研究では、塩付着プラスチックごみを分解する新規耐塩化・耐塩性酵素を開発し、当該酵素を用いて PET を分解することを目的とした。

## 2. 実験方法、結果および考察

### 2.1 塩存在下における PETase の酵素活性と安定性

PETase 発現型プラスミドを大腸菌に形質転換し、形質転換体より組換え型 PETase を精製した。精製標品を用いて、NaCl 存在下での活性を測定した。すなわち、組換え型 PETase を pH 5.5 あるいは 7.0 において 0-5.0 M の各塩濃度中で pNP 基質と 30℃ で 30 秒間反応させた。反応停止後、415 nm で吸光度を測定し、活性を評価した。その結果、塩を含まない場合は pH 5.5 と 7.0 で活性の差はあまり見られなかった (Fig. 2)。しかしながら、塩を含む場合、pH 5.5 では活性が急激に低下した。pH 7.0 の場合、塩存在下ではある程度活性を維持するものの、塩濃度の上昇に伴って活性は低下し、4.0 M を越えると、どちらの条件でも活性が大幅に失われることがわかった。

次に、pH 7.0、塩存在下における組換え型 PETase の安定性を評価した。すなわち、pH 7.0、30℃ で本酵素を 0-5.0 M の各塩濃度下で 2 時間インキュベートした後、基質を加えて活性を評価した。その結果、本酵素は塩を含まない場合でも活性が低下し、その残存活性は塩濃度によらず同程度であることがわかった。これより、本酵素は 30℃ における安定性が低いことがわかった。

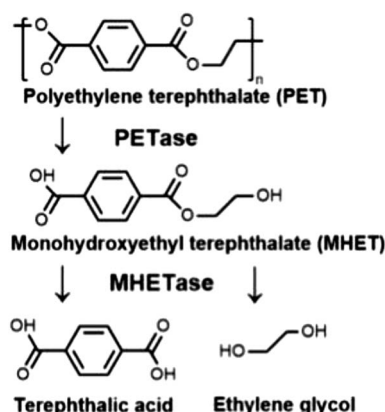


Fig. 1 PETase および MHETase による PET の分解

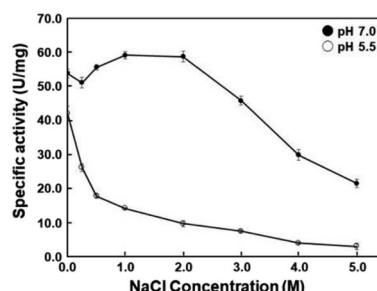


Fig. 2 各塩濃度下における PETase の pNP-C4 に対する活性

## 2.2 変異型PETaseの取得および塩存在下における酵素活性

高塩濃度下でも活性を有し、安定性が高いPETaseを取得するため、組換え型PETaseにアミノ酸置換を導入した変異型PETaseを作製することとした。これまでの研究により、高度好塩菌由来耐塩性タンパク質は、分子表面の多量の酸性アミノ酸によって、高塩濃度下でも構造を維持できることが明らかになっている<sup>3)</sup>。これより、本酵素に含まれる分子表面のアミノ酸を酸性アミノ酸に置換することで、高塩濃度下でも活性を有するPETaseを取得できると考えた。そこで、本酵素のアミノ酸の溶媒露出度をタンパク質モデリングソフトを用いて算出した。その結果、10, 185, 250番目のアスパラギン(N10, N185, N250とよぶ。以下、同様)およびR32の露出度が高いことがわかった。そこで、これらのアミノ酸をアスパラギン酸へと置換した4つの変異型酵素(N10D, N185D, N250DおよびR32D)を作製した。さらに、作製した変異型酵素を用いて、pH 7.0において0-5.0Mの各塩濃度中で基質と反応させ、その活性を予備的に評価した。その結果、変異型酵素はいずれも、野生型酵素に比べ高塩濃度下で比較的高い活性を有することがわかった。とりわけ、R32Dは塩濃度が2.0Mを超えても高い活性を有しており、野生型に比べ耐塩性が向上し

た可能性が示された。

## 3. 今後の展望

現在、R32Dを基盤として、さらに耐塩性を強化した変異型PETaseの取得を進めている。また、PETをPETaseで加水分解して生じるMHETを分解するMHETaseについても、同様に耐塩性MHETaseを取得し、塩付着プラスチックごみの完全分解を検討していく予定である。

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、支援いただきました公益社団法人日本農芸化学会に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Yoshida S. et al. A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). Science. 2016; 351: 1196-1199.
- 2) Hachisuka S.-I. et al. Development of a targeted gene disruption system in the poly (ethylene terephthalate)-degrading bacterium *Ideonella sakaiensis* and its applications to PETase and MHETase genes. Appl. Environ. Microbiol. 2021; 87: e0002021.
- 3) Mevarech M. et al. Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. Biophys. Chem. 2000; 86: 155-164.

# シガテラ中毒の治療に向けたヒト化抗シガトキシン抗体の創製

大阪公立大学大学院理学研究科  
山口亜佐子

## 研究背景と目的

シガテラは年間5万人以上の人が発症し、細菌によるものを除けば世界最大規模の食中毒である。主に熱帯・亜熱帯海域で頻発するが、地球温暖化の影響で感染域が広がり、日本でも発生件数が増加している。原因毒素は渦べん毛藻類が産生するシガトキシン (CTX) であり、食物連鎖を介して魚類に移行し、これらの魚を食べることにより、神経系や消化器系などの深刻な症状を引き起こす。症状の回復には数ヶ月から数年もの期間が必要であるが、現在では有効な治療法は存在せず、新たな治療薬開発が望まれている。

これまで、シガトキシンの一種、太平洋型シガトキシンCTX3Cの部分構造のハプテン (図1A) をマウスに免疫することにより、CTX3C-ABCDEおよびCTX3C-IJKLMのそれぞれを特異的に認識するモノクローナル抗体10C9および3D11が作製された<sup>1)</sup>。CTXを含む有毒魚の判別

は難しいが、これらの2つの抗体を組み合わせたサンドイッチ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法 (図1B) によりCTXの微量検出に成功している<sup>2)</sup>。また、マウス体内にこれら2つの抗体を投与することにより効果的にCTX毒性を中和することが確認された<sup>3)</sup>。しかしマウス抗体はヒト体内で免疫原性を持つため、治療薬として利用することができない。この問題を解決するため、抗体医薬の分野では、マウス抗体の抗原結合に関わる相補性決定領域 (CDR) をヒト抗体フレームワーク (FW) に移植したヒト化技術が研究されている (図1C)。

そこで本研究では、シガテラ治療薬開発を目指してマウス抗体10C9・3D11のヒト化を行なった。

## 結果および考察

### 1. ヒト化抗体10C9

マウス抗体10C9のアミノ酸配列を分析し、61~70%の

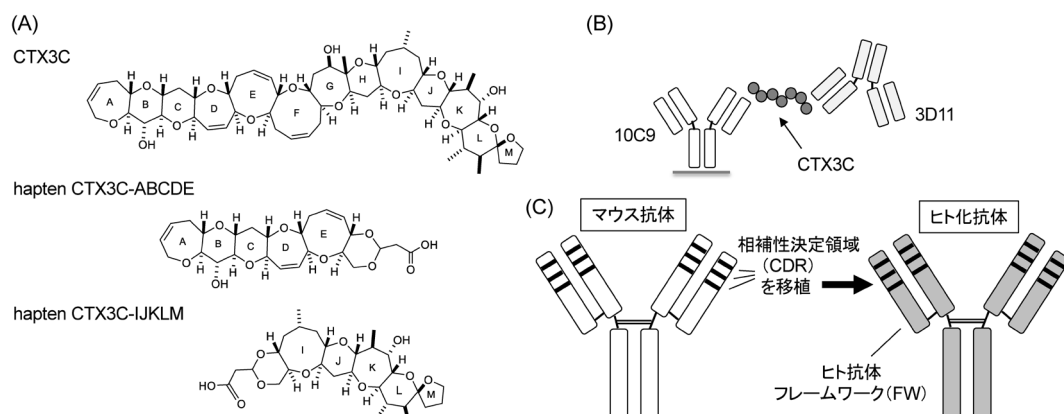


図1 (A) シガトキシンとハプテンの構造, (B) サンドイッチ ELISA, (C) 抗体のヒト化.

高い相同性を持つヒト抗体の生殖細胞系列 (germline) 配列を, ヒト化抗体の FW として選択した. マウス 10C9 の CDR をヒト FW に移植した. 抗原結合に関する残基は FW にも存在するため, マウス FW 中のアミノ酸残基を調べ, 抗原結合に関する重要なマウス由来残基 (Glu<sup>L1</sup>, Leu<sup>L2</sup>, Thr<sup>L7</sup>, Arg<sup>L46</sup>, Gly<sup>L60</sup>, Tyr<sup>L71</sup>, Leu<sup>H5</sup>, Arg<sup>H71</sup>, Ser<sup>H73</sup>, Cys<sup>H94</sup>) をバックミューテーション残基 (ヒトからマウスに戻す) として同定した. これらのバックミューテーション残基をヒト FW 中に残したヒト化抗体 10C9 をデザインした.

デザインしたヒト化 10C9Fab の遺伝子を作製し, 大腸菌を用いたタンパク質発現を行った. その後, 抗体アフィニティーカラムにより精製した. マウス 10C9Fab も同様に発現・精製を行い, ヒト化 10C9Fab とともに表面プラズモン共鳴 (SPR) 法により CTX3C-ABCDE に対する結合活性を測定した. その結果, デザインしたヒト化 10C9Fab は解離定数  $K_D = 5.9$  nM, マウス 10C9Fab は  $K_D = 4.6$  nM となり, ヒト化 10C9Fab はマウス抗体と同様の高い親和性を維持していた.

さらに免疫原性を低下させるために最適化ヒト化抗体の作製を検討した. マウス由来バックミューテーション残基をヒト由来アミノ酸残基へ置換した変異体を数種類作製し, SPR 法により結合活性を調べた結果, 2 つの変異体で活性が低下し, ヒト化 10C9 の FW においてはマウス由来残基 Arg<sup>L46</sup>, Cys<sup>H94</sup> が抗原結合に重要であることが明らかになった. 抗体の分子認識機構の解明のため, すでに結晶構造解析により決定されているマウス 10C9Fab と CTX3C-ABCDE の複合体の立体構造<sup>4)</sup> より, 2 つの残基の周辺構造を調べた (図2). Arg<sup>L46</sup> は CTX3C の A 環と水素結合を形成していた. 一方, Cys<sup>H94</sup> は CTX3C と直接的な相互作用の形成はなかった. しかし, Arg への変異により立体障害が大きくなり, 隣の Asp<sup>H95</sup> と CTX3C-ABCDE の相互作用

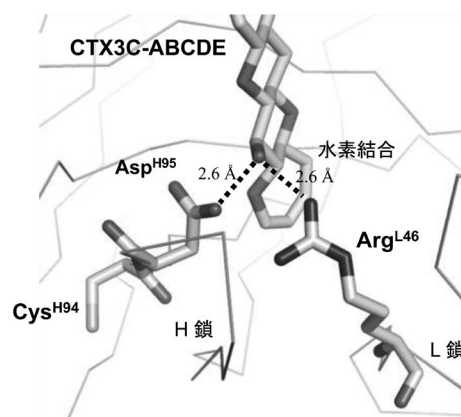


図2 マウス 10C9Fab における CTX3C-ABCDE の結合サイト周辺の構造.

に影響し, 結合活性が低下したのではないかと考えられた. 最終的に, マウス由来 Arg<sup>L46</sup>, Cys<sup>H94</sup> をヒト FW に残した最適化ヒト化抗体を作製し, SPR 法により CTX3C-ABCDE に対する結合活性を測定した結果, 最適化ヒト化 10C9 の結合活性は  $K_D = 3.7$  nM となり, デザインしたヒト化抗体の親和性より少し向上していることが明らかになった.

## 2. ヒト化抗体 3D11

3D11 のヒト化についても, 基本的に 10C9 と同様の方法で行った. マウス抗体 3D11 の L 鎖は  $\lambda$  (ラムダ) 型であるが, 上市されている抗体医薬のほとんどが  $\kappa$  (カッパ) 型である. またマウス 3D11 は大腸菌によるタンパク質発現量が少ない. これらの問題を改善するために, ヒト化 3D11 の L 鎖はカッパ型を用いてデザインした. アミノ酸配列解析により, 36~50% の相同性を持つヒト抗体 germline の L 鎖カッパ型配列をヒト化抗体の FW として選択した. H 鎖については 63~73% の相同性を持つヒト抗体 germline 配列を, ヒト化抗体の FW として選択した. マウス FW 中の残基 (Leu<sup>L2</sup>, Val<sup>L36</sup>, Glu<sup>L38</sup>, Phe<sup>L44</sup>, Gly<sup>L46</sup>,



Phe<sup>L87</sup>, Leu<sup>H5</sup>, Glu<sup>H6</sup>, Ser<sup>H71</sup>, Thr<sup>H82a</sup>, Phe<sup>H91</sup>, Val<sup>H93</sup>) をバックミューテーション残基として同定し、ヒトFW中に残したヒト化抗体3D11をデザインした。大腸菌によるタンパク質発現・精製を行い、SPR法によりCTX3C-IJKLMに対する結合活性を測定した結果、ヒト化3D11κFabは $K_D=10.5$  nM, マウス3D11Fabは $K_D=17.3$  nMとなり、L鎖をカッパ型に変えても、高い親和性を維持していた。

さらに免疫原性を低下させるために最適化ヒト化抗体3D11の作製を検討し、数種類の変異体の結合活性を調べた。その結果、3D11はバックミューテーション残基を必要とせず、マウスCDRをヒトFWに移植するだけでCTX3C-IJKLMへの親和性を保持できることが明らかとなった（ヒト化3D11κFab-CDR,  $K_D=9.1$  nM）。

#### まとめ

以上のことから、マウス由来抗シガトキシン抗体のヒト化によりシガテラの治療薬として応用可能であると考えられた。さらに、本研究で得られた分子認識機構などの情報を基に、太平洋型シガトキシンの類縁体や他のカリブ海型

シガトキシンなどの食中毒に対しても、治療薬開発へ展開できると期待される。

#### 謝辞

助成いただきました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。

#### 学会・論文発表

- 1) 山口亜佐子, 相野弘明, 円谷健, 平間正博, 藤井郁雄, 日本農芸化学会2023年度大会, オンライン (2023年3月).
- 2) 山口亜佐子, 相野弘明, 円谷健, 平間正博, 藤井郁雄, 日本農芸化学会2024年度大会, 東京 (2024年3月).
- 3) Yamaguchi, A. *et al.* Humanization and characterization of an anti-ciguatoxin CTX3C monoclonal antibody. *Toxicon* **247**, 107848, 1–9 (2024).

#### 参考文献

- 1) Tsumuraya, T. *et al.* *Toxicon* **48**, 287–294 (2006).
- 2) Tsumuraya, T. *et al.* *Anal. Chem.* **90**, 7318–7324 (2008).
- 3) Inoue, M. *et al.* *Toxicon* **53**, 802–805 (2009).
- 4) Ui, M. *et al.* *J. Biol. Chem.* **285**, 19440–19447 (2008).



10. 第2回若手女性研究者チャレンジ  
研究助成金報告書

## 第2回農芸化学若手女性研究者チャレンジ研究助成報告書

### 高脂肪食による腸管粘膜免疫制御に寄与する microRNA の発現解析

北海道大学大学院農学研究院  
逢坂文那

#### 背景・目的

食餌が腸管粘膜免疫の調節に影響をおよぼす際の細胞分子機序については不明な点が多い。我々はこれまでに、腸内細菌叢を持たない無菌マウスと通常マウスの比較解析により、腸内細菌叢の存在が大腸粘膜固有層白血球 (lamina propria leukocyte, LPL) における microRNA (miRNA)-200 ファミリーの発現を増加させる結果、それらの標的遺伝子の発現を低下させ、腸管粘膜免疫の恒常性維持に重要な役割を担うインターロイキン-2 (IL-2) 産生を減少させることを明らかにした (Ohsaka *et al. Biochem Biophys Res Commun* 2021)。しかしながら、食餌による腸管粘膜免疫の調節に miRNA の関与を報告した例はこれまでにほとんどない。そこで、腸管粘膜免疫調節に影響をおよぼすことで知られる高脂肪食 (HFD) をマウスに与えると、大腸 LPL において制御性 T 細胞 (Treg) のマスター転写因子である *Foxp3* の mRNA レベルが低下することを観察した。さらに、HFD の摂取は、*Foxp3* の発現を正に制御する核内受容体をコードする *Nr4a3* の mRNA レベルの低下および *Nr4a3* を標的とする miR-20a-5p の発現を増加させた。これらのことは、HFD を摂取したマウスの大腸 LPL において、miR-20a-5p が *Nr4a3* のサイレンシングを介して *Foxp3* の発現を抑制する結果、Treg 分化が抑制されることを示唆している。本研究ではこのことを証明するため、培養細胞に合成した当該 miRNA を導入した。さらに、miRNA の発現変化が腸内細菌叢の影響によるものかどうかを確かめるため、HFD を摂取したマウスの大腸内細菌叢を次世代シーケンスにより解析し、菌叢データと大腸 LPL における miR-20a-5p、*Nr4a3* および *Foxp3* の mRNA 発現との相関解析を行った。

#### 方法および結果

マウス T 細胞株である EL-4 細胞に、miR-20a mimic を Neon transfection system を用いてエレクトロポレートした。条件は、1,080 V、パルス幅 50 ms、パルス回数 1 回とし、その後、抗生剤不含の 10% FBS/DMEM (低グルコース)

中で 24 時間培養した。細胞ライセートから small RNA を含む総 RNA を分離し、標的遺伝子である *Nr4a3* ならびに Treg のマスター転写因子である *Foxp3* の mRNA レベルをリアルタイム定量 PCR 法により解析した。

その結果、miR-20a-5p の導入により *Nr4a3* の発現が低下することを観察した。続いて、高脂肪食を摂取したマウスの盲腸内容物から DNA を分離し、次世代シーケンシング (NGS) によるメタ 16S 解析を行った。 $\alpha$ -多様性を評価する Shannon index は通常脂肪食 (NFD) 群と比較して HFD 群で有意に低下したが、Chao1 index においては群間差は観察されなかった。また、 $\beta$ -多様性を評価する Unweighted UniFrac distance および Weighted UniFrac Distance はそれぞれの *p* 値が 0.015 および 0.004 であり、NFD 群と HFD 群で菌叢が有意に異なることが示された。さらに、LEfSe 解析により、HFD 摂取が *c\_Clostridia*、*g\_Eubacterium\_xylanophilus\_group*、*f\_Ruminococcaceae*、*g\_Romboutsia*、*g\_Harryflintia*、*g\_Eubacterium\_nodatum\_group*、*g\_Turicibacter* および *f\_Desulfovibrionaceae\_g\_uncultured* の 8 種類の細菌を有意に増加させ、とりわけ *genus Romboutsia* が顕著に増加したことが ANCOM 解析により示された。最後に、*genus Romboutsia* との相関解析を行ったところ、miR-20a-5p との間に正の相関が、*Nr4a3* および *Foxp3* との間に負の相関が認められた。

#### 考察

EL-4 細胞への miR-20a-5p の導入により、標的遺伝子である *Nr4a3* mRNA レベルの発現低下を観察した。このことは miR-20a-5p が直接 *Nr4a3* をサイレンシングした結果、*Foxp3* の発現を低下させ、Treg 分化を抑制することを示唆している。今後は、NR4A3 および FOXP3 のタンパク質レベルをウエスタンブロッティングにより解析する予定である。

HFD 摂取により、腸内細菌叢の構成が変化し、とりわけ *genus Romboutsia* が増加した。さらに、miR-20a-5p と *genus Romboutsia* の間には正の相関がみられた。以上の

結果は、HFD摂取によって増加した *Romboutsia* が大腸 LPL における miR-20a-5p の発現を増加させ、*NR4a3* の発現を低下させた結果、*Foxp3* の発現を低下させ Treg 分化を抑制することを示唆している。しかしながら、*Romboutsia* が miRNA の発現に直接影響およぼすことについては明らかにしていないため、マウスへの *Romboutsia* 投与試験を検討中である。

※未発表データを含むため、図表の掲載は差し控えさせていただきます。

## 謝辞

本研究に多大なご支援を賜りました日本農芸化学会に深く感謝致します。

# 消化管における亜鉛吸収機構の全容解明と 亜鉛欠乏症への改善法の確立

京都大学大学院生命科学研究科  
西藤有希奈

## 1. はじめに

亜鉛は、タンパク質の構造維持や酵素の活性調節など、生体内に不可欠な必須微量金属元素であり、その欠乏は、皮膚炎・脱毛・味覚障害などの諸症状に加え、認知症・大腸炎など様々な疾患の発症にも関連する<sup>1)~3)</sup>。特に、高齢者においては亜鉛欠乏が高頻度に認められると共に、加齢に伴い発症する疾患の多くが、亜鉛欠乏による症状に類似することが指摘されており、亜鉛欠乏の予防・改善は、高齢者の Quality of life (QOL) の保持において重要である<sup>4), 5)</sup>。亜鉛欠乏症を改善する上で、消化管からの亜鉛吸収機構の理解が重要となる。しかしながら、消化管から吸収された亜鉛がどの様にして血液中へと運ばれるかなど、消化管における亜鉛吸収機構の全容は解明されていない。

消化管からの亜鉛の吸収過程は、頂端膜を介した亜鉛の取り込み、取り込んだ亜鉛の頂端膜から側底膜上への送達、亜鉛の側底膜からの血液中への供給過程によって説明できる。これまでに、頂端膜に局在する亜鉛輸送体 ZIP4 が亜鉛の取り込みにおいて重要な役割を果たすこと、また、側底膜に局在する亜鉛輸送体 ZNT1 が亜鉛の血液中への供給において重要な役割を果たすことが明らかとなっている<sup>6)~10)</sup>。一方で、ZIP4 によって取り込まれた亜鉛がどの様にして側底膜上の ZNT1 へと受け渡されるかについては、その送達に関わる因子や分子機序については全く不明である。そこで、本研究では、消化管内での亜鉛の送達に関与する“亜鉛シャペロンタンパク質”を同定することを目的とし研究を進めた。具体的には、亜鉛の取り込みに関わる ZIP4 の発現を薬剤依存的に誘導できる系を用い、ZIP4 の発現に応じて特異的に誘導されるタンパク質の候補因子について網羅的解析を行なった。更に、候補因子の中から、実際

に、頂端膜上の ZIP4 から側底膜上の ZNT1 へと亜鉛を送達する亜鉛シャペロンの同定を目指した。以上の解析を通じ、消化管での亜鉛吸収機構のより詳細な仕組みを解明することを目標とし研究を進めた。

## 2. 結果および考察

これまでの申請者らの解析により、亜鉛の取り込みに関わる頂端膜上の ZIP4 の発現誘導により、細胞内の亜鉛量が上昇し、これに伴い、側底膜上の ZNT1 の発現も上昇することが判明している<sup>11)</sup>。これらの知見から、ZIP4 により取り込まれた亜鉛の周辺に亜鉛送達因子が存在し、相互作用する可能性が高いと考えた。そこで、遊離亜鉛イオン (Mobile Zinc) に応答し、周辺に存在するタンパク質にフルオレセイン標識するコンディショナルプロテオミクス試薬を用いて、ZIP4 の発現誘導に応じて特異的に蛍光標識されるタンパク質を網羅的に解析した。具体的には、ZIP4 をドキシサイクリンという薬剤の添加依存的に誘導可能な株を樹立し、この株において亜鉛コンディショナルプロテオミクス試薬を処理し、ZIP4 の周辺に存在するタンパク質を網羅的に蛍光ラベル化した。ラベル化処理を行なった細胞抽出液中から、ZIP4 誘導時のみ蛍光標識化されるタンパク質を、抗フルオレセイン抗体を用いた免疫沈降により精製した。精製したタンパク質を電気泳動により分離した後、銀染色を用いてタンパク質の検出を行なったところ、ZIP4 発現株にのみ特異的に検出される複数のバンドを認めた (図1)。そこで、これらのタンパク質について質量分析装置を用いて解析を行なった結果、亜鉛シャペロンの候補となりうるタンパク質をいくつか見出すことに成功した。

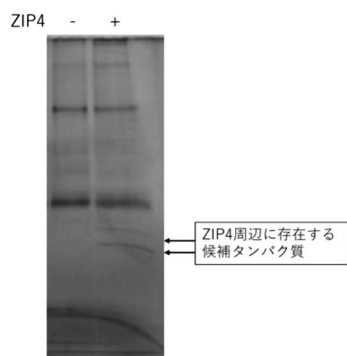


図1 ZIP4非誘導株（左レーン）またはZIP4誘導株（右レーン）において、亜鉛コンディショナルプロテオミクス試薬を処理した後、細胞抽出液中より、蛍光標識化されるタンパク質を、抗フルオレセイン抗体を用いた免疫沈降により精製した。電気泳動によりタンパク質を分離し、銀染色を行なった結果、矢印で示す様なZIP4誘導時のみ特異的に検出されるバンドを認めた。

次に、見出した候補タンパク質が、実際に、細胞内の亜鉛送達因子として機能するか解析を行なった。共免疫沈降法を用いて、実際に候補因子とZIP4が結合するかについて解析を行なった。その結果、これらの候補因子とZIP4の相互作用の検出には至らなかった。ZIP4とシャペロン因子は、強力に結合するのではなく、互いに近傍に存在することで亜鉛の受け渡しを行なっている可能性が考えられる。そのため、現在は、クロスリンカーなどを用いた解析を行うなど、より詳細な解析を進めている。また、上述の様に、申請者らの解析により、頂端膜上のZIP4の発現誘導に比例して、側底膜のZNT1の発現が上昇することが判明している。そこで、今後は、上記で見出した候補因子の欠損をCrisper Cas9システムを用いて作成し、候補因子の欠損によってZNT1の発現上昇が阻害されるかを検証することも予定している。更に、上皮細胞系モデルを再現することが可能なCaCO2細胞をトランスウェルを用いて長期単層培養し、側底膜側（血液中）の培養液中の亜鉛量を誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）を用いて比較解析し、候補因子が実際に亜鉛の消化管吸収過程に寄与することを実証することで、亜鉛の消化管吸収過程に寄与する因子を明らかとすることを目標としている。加えて、シャペロン因子が同定できた場合には、見出した制御機構を標的とした亜鉛吸収促進化合物の培養細胞系でのスクリーニングすることで、亜鉛吸収効率を高める化合物を見出すことも考えている。以上の解析を通じ、亜鉛欠乏症の予防や改善に繋がる知見を得たいと思っている。

### 3. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を受け賜りました、公益社団法人日本農芸化学会に御礼申し上げます。本研究では、京都大学大学院生命科学研究科で行われたものであり、数多くのご助言をいただきました京都大学大学院生命科学研究科 准教授 神戸大朋先生に御礼申し上げます。また、亜鉛コンディショナルプロテオミクス解析、並びに、質量分析解析に関する研究にご協力いただいた京都大学大学院工学研究科 講師 田村朋則先生に御礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) Kambe T, Tsuji T, Hashimoto A, Itsumura N: The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev*. **95**(3): 749-84. (2015).
- 2) Hojyo S, Fukada T: Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis. *Arch Biochem Biophys* **611**: 43-50. (2016).
- 3) Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutr*. **130** (5S Suppl): 1344S-9S. (2000).
- 4) Kogirima M, Kurasawa R, Kubori S, Sarukura N, Nakamori M, Okada S, Kamioka H, Yamamoto S: Ratio of low serum zinc levels in elderly Japanese people living in the central part of Japan. *Eur J Clin Nutr* **61**: 375-381. (2007).
- 5) Yasuda H, Tsutsui T: Infants and elderlies are susceptible to zinc deficiency. *Sci Rep* **6**: 21850. (2016).
- 6) Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK: Novel zinc-responsive post-transcriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem* **388**: 1301-1312. (2007).
- 7) Hashimoto A, Nakagawa M, Tsujimura N, Miyazaki S, Kizu K, Goto T, Komatsu Y, Matsunaga A, Shirakawa H, Narita H, Kambe T, Komai M: Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status: a study of the effects of zinc deficiency during lactation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **310**: R459-R468. (2016).
- 8) Palmiter RD, Findley SD: Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J*. **14**(4): 639-49. (1995).
- 9) Palmiter RD: Protection against zinc toxicity by metallothionein and zinc transporter 1. *Proc Natl Acad Sci USA*. **101**(14): 4918-23. (2004).
- 10) Nishito Y, Kambe T: Zinc transporter 1 (ZNT1) expression on the cell surface is elaborately controlled by cellular zinc levels. *J Biol Chem*. **294**(43): 15686-97. (2019).
- 11) Nagamatsu S, Nishito Y, Yuasa H, Yamamoto N, Komori T, Suzuki T, et al: Sophisticated expression responses of ZNT1 and MT in response to changes in the expression of ZIPs. *Sci Rep*. **12**(1): 7334. (2022).



# 免疫マーカーの探索と免疫賦活食品への応用に関する研究

信州大学農学部

田中沙智

## 1. 背景および目的

免疫系は生体内に侵入してきたウイルスや細菌などの異物を排除する生体防御機構である。免疫機能が低下すると、感染症やがんなどの免疫関連疾患を発症することが示唆されている。特に、最近では新型コロナウイルスに対する抵抗力やワクチン接種が行われ、「免疫」という言葉が日常的に聞くようになり、多くの人が注目している学問分野の一つである。一方、食品の機能には第3次機能である「生体調節機能」があり、毎日の食生活を通じて免疫機能を維持することが、病気を予防する上で重要である。

我々は、信州の伝統野菜の一つである「野沢菜」には、ナチュラルキラー（NK）活性を高め、免疫賦活効果があることを見出した（1）。NK活性は、ウイルス感染細胞やがん細胞を攻撃する力のことであり、免疫機能の増加を示す指標の一つである（2）。しかしながら、NK活性などの *in vivo* の評価では、マウスの解剖後に免疫細胞の単離や無菌的な細胞培養が必要なため、作業が煩雑で専門的な技術が必要である。さらに、抗体などの高コストな消耗品に加えて、細胞培養関連機器やフローサイトメーターなどの大型機器類も必要となるため、ハードルが高い。

そこで本研究では、乳酸菌を投与したマウス脾臓細胞のNK活性と相関を示す血液中の遺伝子発現を解析し、PCRで簡便に発現レベルを評価でき、個体の免疫状態を反映する「免疫マーカー」を同定することを目的とした。また、同定した免疫マーカーの発現制御メカニズムの解析を行った。

## 2. 方法と結果

乳酸菌の投与でNK活性が増加することを確認するため、14日間の経口投与を行ったPBS投与群（Control）および、乳酸菌投与群のマウスから脾臓細胞を単離した。その後、CFSEで染色したYAC-1細胞と4時間共培養した。培養後の細胞を回収し、YAC-1細胞の死細胞割合をフローサイトメーターで解析した。その結果、乳酸菌投与群のマウスのNK活性がControl群と比較して有意に増加した。次に、マウスから末梢血を採取し、Total RNAを抽出してNK細胞の活性化に関与する遺伝子の発現量を、RT-qPCRにより解析した。その結果、IFN- $\gamma$ 、Granzyme BおよびIL-12p35の遺伝子発現が、乳酸菌の投与で有意に増加す

ることを確認した（図1）。

また、NK活性関連遺伝子の候補としてNKG7、IL-18RAP、KLRC1、KLRC3についても同様に解析した結果、乳酸菌の投与でこれらの遺伝子発現が有意に増加した（図2）。

次に、NK活性関連遺伝子の候補の一つであるNKG7に着目し、その発現制御メカニズムについて解析を行った。IL-15は樹状細胞から産生され、NK細胞を活性化させるサイトカインである（3）。マウスから単離した脾臓細胞にrecombinant IL-15（rIL-15）を添加し、Granzyme Bの産生量とNK活性を解析した。その結果、rIL-15の添加でいずれも有意に増加したことから、IL-15によってNK細胞が活性化することが示された（図3A）。そこで、NKG7の発現誘導に関わるIL-15の下流シグナル分子を明らかにするため、rIL-15存在下でAKT、STAT5、MEKの阻害剤を添加し、NKG7の遺伝子発現を解析した結果、AKT、STAT5、MEKの阻害でNKG7の遺伝子発現が有意に低下した（図3B）。以上のことから、NK活性関連遺伝子の一つであるNKG7は、IL-15の刺激で発現が誘導され、その発現誘導にAKT、STAT5、MEKを介することが示された。

## 3. 考察

本研究において、一般にNK活性を増強させる乳酸菌をマウスへ経口投与することにより、末梢血において、NK活性増強に伴うNK活性関連遺伝子の発現増加が確認された。その中でも、本研究で着目したNKG7の発現は、IL-15で刺激したNK細胞で誘導され、AKT、STAT5、MEKなどのシグナル分子を介することが示された。

本研究では、乳酸菌の投与でNK活性が増加し、それに伴い、末梢血中で発現が増加する遺伝子発現について着目した。また、乳酸菌は直接NK細胞に作用せずに、IL-15を介していることが示唆された。今後は、乳酸菌を投与したマウス生体内でのNKG7発現増加のメカニズムを解明する必要がある。また、NK活性が重要な役割を果たす抗腫瘍効果や抗ウイルス感染の免疫応答において、NKG7の機能を明らかにする必要がある。これらの科学的エビデンスを蓄積することで、将来的にNKG7を「免疫マーカー」として活用することが期待される。また、免疫マーカーを用いた免疫評価方法を確立することができれば、免疫機能



の簡便な評価が可能になると考えている。

## 謝 辞

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

## 引用文献

1. Yamamoto K, Furuya K, Yamada K, Takahashi F, Hamajima C, Tanaka S. Enhancement of natural killer activity

and IFN- $\gamma$  production in an IL-12-dependent manner by a *Brassica rapa* L. Biosci Biotechnol Biochem. 82, 654-668. 2018.

2. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. Mol Immunol. 42, 501-510. 2005.
3. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. Adv Immunol. 86, 209-239. 2005.

# 11. 国際シンポジウム補助金 報告書

## 国際シンポジウム報告書

### Valorization of Thermotolerant microbial resources for Biofuels and Bioproducts under BCG (Bio-Circular-Green) Concept (バイオ・サーキュラー・グリーンコンセプトに基づいた バイオ燃料・バイオ生産物生産のための中高温微生物の活用)

山口大学 大学研究推進機構 中高温微生物研究センター  
阿座上弘行

開催日時：2023年11月10日（金）13時～17時  
開催場所：山口大学大学会館2階会議室  
参加人数：51名 国内（山口大学の学内20名，学外4名），国外（27名）

2023年11月10日（金）13:00-17:00, 山口大学大学会館2階会議室（山口吉田キャンパス）において，中高温微生物研究センター環境微生物部門国際シンポジウム「Valorization of Thermotolerant microbial resources for Biofuels and Bioproducts under BCG (Bio-Circular-Green) Concept (バイオ・サーキュラー・グリーンコンセプトに基づいたバイオ燃料・バイオ生産物生産のための中高温微生物の活用)」が開催された。

本国際シンポジウムは，今井剛教授（工学部，中高温微生物研究センター環境微生物部門長）と本センターの特命教授として招へい中の Alissara Reungsang教授（コンケン大学）が責任者となり，「脱炭素社会に向けたバイオ燃料およびバイオ製品のための耐熱性微生物資源の価値向

上」をテーマに中国，台湾，デンマーク，フランスなど国際色豊かな7名の招待講演者による最新の知見が発表された。対面とオンラインによるハイブリッドで開催されたシンポジウムには，学内外から51名：国内（山口大学の学内20名，学外4名），国外（27名）の参加者があり，活発な研究交流の機会となった。

阿座上弘行教授（中高温微生物研究センター長）による開会挨拶，上西研学術研究担当副学長による歓迎挨拶の後，Qiang Liao教授（重慶大学），安井英斉教授（北九州市立大学），渡邊友浩助教（北海道大学），Chen-Yeon Chu教授（逢甲大学），Irin Angelidaki教授（デンマーク工科大学），Eric Trably教授（モンペリエ大学），Cristina Cavinato教授（ヴェネツィア大学）の講演があり，最後は本センターの特命教授として招へい中の Alissara Reungsang教授（コンケン大学）による挨拶で締めくくられた。それぞれの発表は非常に興味深いもので，国際共同研究への発展が期待される演題も多く，今後の展開が期待される。

### 2023年日米国際植物化学シンポジウム（第59回植物化学シンポジウム）

国立研究開発法人理化学研究所 淡川孝義

開催日時：2023年11月10日（金）13時～19時  
開催場所：東京大学山上会館本館  
参加人数：100人

2023年日米国際植物化学シンポジウム（第59回植物化学シンポジウム）が2023年11月10日，東京大学山上会館

本館（東京）にて開催された。本会議はこれまで58回の開催を数え，これまで，植物化学に関するあらゆるサイエンスの最新の研究成果について討論する国内最大級の会議であり，最も長い歴史を持つ。植物化学シンポジウムは，植物由来の新規天然薬用化合物の単離，構造決定，生理，生物活性評価，生合成経路解析，生合成エンジニアリング

研究の討論によって、植物化学関連コスメトロジー分野の発展に大きく貢献してきた。マサチューセッツ工科大学Jing-Ke Weng教授とケンブリッジ大学Ryan Nett教授、カリフォルニア大学ロサンゼルス校Yi Tang教授の3名の国外研究者、鳥取大学大学院工学研究科永野真吾教授、神戸大学院農学研究科水谷正治准教授、富山大学和漢医薬学総合研究所森田洋行教授、東京大学薬学系研究科牛丸理一郎助教の4人の国内外研究者により、植物化学に関する生合成、酵素化学、酵素工学、合成生物学の最先端の研究成果に関する講演が行われた。Nature誌を含む、インパクトの大きい植物化学関連の原著論文を数多く発表している、Ryan Nett教授の講演を中心に、本分野で活躍する多くの研究者の知的交流が行われ、アルカロイド、テルペノ

イド、ポリケタイド、リグニンといった医薬品など活性化化合物の材料となる化合物の生合成酵素、合成生物学に関する植物化学分野のさらなる発展につながる基盤が築かれた。本基盤を元に、国境を越えた研究グループ間の人的交流や共同研究がいくつか生まれ、植物化学に関する農芸化学学術分野が大いに発展することが考えられる。また、海外講演者に国内の植物化学関連の研究を行っている研究室を訪問していただき、教員、ポスドク、学生とのディスカッションを行なっていただき、大いに研究の裾野が広がった。以上より、本助成金による国際シンポジウム開催は非常に有意義なものであり、日本農芸化学会学術活動強化委員会に厚く御礼申し上げます。

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

Copyright © 2024 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（2024）

2024年12月10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

<http://www.jsbba.or.jp/> [grant@jsbba.or.jp](mailto: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

---