

公益社団法人日本農芸化学会 助成金受領者報告書 (2025)



—— 公益社団法人日本農芸化学会 ——

Japan Society for Bioscience,
Biotechnology, and Agrochemistry
<https://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20回農芸化学研究企画賞報告書.....	5
3. 第5回中小企業産学・産官連携研究助成報告書	15
4. 第51回研究奨励金報告書.....	39
5. 第80回国際会議出席費補助金報告書.....	49
6. 第81回国際会議出席費補助金報告書.....	53
7. 第1回女性研究者チャレンジ研究助成金報告書	61

1. 助成金交付実績一覧

農芸化学研究企画賞、中小企業产学・産官連携研究助成の交付実績

年 度	農芸化学研究企画賞	夢にチャレンジ企画賞	中小企業产学・産官連携研究助成	計
平成15年	2件 400万円			400万円
16年	3件 600万円			600万円
17年	4件 800万円			800万円
18年	3件 600万円			600万円
19年	2件 400万円			400万円
20年	3件 600万円			600万円
21年	3件 600万円			600万円
22年	3件 600万円			600万円
23年	3件 600万円			600万円
24年	3件 600万円			600万円
25年	3件 600万円			600万円
26年	2件 400万円			400万円
27年	3件 600万円			600万円
28年	3件 600万円			600万円
29年	2件 400万円			400万円
30年	3件 600万円		7件 700万円	1300万円
令和元年	2件 400万円		7件 700万円	1100万円
2年	3件 600万円	6件 180万円	7件 690万円	1470万円
3年	2件 400万円	2件 100万円	7件 695万円	1195万円
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
6年	3件 600万円		7件 700万円	1300万円

研究奨励金、国際会議出席費補助金の交付実績

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

年 度	研究奨励金		国際会議出席費補助金		計
平成元年	18件	894.7万円	15件	449.7万円	1,344.4万円
2年	20件	1,000万円	18件	521万円	1,521万円
3年	22件	1,099万円	18件	532.6万円	1,631.6万円
4年	22件	1,098万円	18件	532万円	1,630万円
5年	18件	900万円	12件	315万円	1,215万円
6年	10件	500万円	10件	200万円	700万円
7年	9件	449.8万円	12件	180万円	629.8万円
8年	5件	250万円	6件	89.7万円	339.7万円
9年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
10年	5件	250万円	4件	57万円	307万円
11年	5件	250万円	8件	120万円	370万円
12年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
13年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
14年	5件	250万円	6件	89万円	339万円
15年	5件	250万円	5件	75万円	325万円
16年	5件	249万円	6件	90万円	339万円
17年	5件	250万円	5件	75万円	325万円
18年	5件	250万円	6件	85万円	335万円
19年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
20年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
21年	5件	250万円	6件	90万円	340万円
22年	5件	250万円	4件	60万円	310万円
23年	5件	250万円	4件	55万円	305万円
24年	5件	250万円	4件	60万円	310万円
25年	5件	250万円	3件	55万円	305万円
26年	5件	250万円	5件	90万円	340万円
27年	5件	250万円	10件	160万円	410万円
28年	5件	250万円	5件	100万円	350万円
29年	5件	250万円	4件	60万円	310万円
30年	5件	250万円	6件	104万円	354万円
令和元年	5件	250万円	3件	60万円	310万円
2年	5件	219.7万円	1件	2,220円	2,199,220円
3年	5件	250万円	3件	414,797円	2,914,797円
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
6年	5件	250万円	9件	210万円	460万円

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
6年	2件	200万円	2件	100万円	300万円

2. 第20回農芸化学研究企画賞報告書

第20回農芸化学研究企画賞報告書

受賞テーマ：翻訳を促進する新生ペプチドの探索とタンパク質生産への産業応用

名古屋大学大学院生命農学研究科
准教授 加藤晃代

1. 研究の背景

酵素、抗体、ホルモンなどのタンパク質は、持続可能なバイオエコノミーを支える分子であり、タンパク質を低コストで大量に生産するための技術は、産業の発展に必要不可欠なものとしてその重要性はますます高まっている。

近年、様々な微生物および動・植物細胞などを宿主としたタンパク質発現技術は、研究・産業界に必須な技術として普及している。しかしながら、どの発現系を用いた場合でも、目的タンパク質の発現量が少ない場合があり、コドン最適化、培養条件の変更、他のタンパク質との融合発現、発現系の見直し、シャペロンとの共発現、といった時間・労力のかかる検討を要している。

一方、申請者は、これまでに有用タンパク質の微生物生産系や産業利用を目指し研究に励んできた。その過程において、大腸菌において難発現なタンパク質のN末端にSer-Lys-Ile-Lysをコードするタグ配列（SKIKペプチドタグ）を付加し発現させることにより、その生産量を数十倍にも増大可能であることを独自に見出した（J. Bioeng. Biosci., 123, 540, 2017）。そしてその後の解析により、本SKIKペプチドタグは「翻訳工程で生じた新生鎖として翻訳を促進する可能性」や「翻訳停滞を起こす新生鎖として知られる翻訳アレストペプチドの翻訳停止効果を見かけ上打ち消す」という驚くべき機能を有しており、その結果タンパク質生産量を増大させている可能性を明らかにしてきた（J. Biol. Chem., 299, 104676, 2023）。

2. 研究の課題

申請者の知る限り、そのような翻訳促進ペプチドに関する報告はこれまでに無く、その適用範囲や機構、他の宿主における存在は未知である。そこで、本研究では、「翻訳を促進可能な新生鎖」を、産業的に重要なタンパク質生産宿主（大腸菌、酵母、動物細胞等）で網羅的に探索・同定し、実際のタンパク質生産へ応用することを目指した。なお、農芸化学会の特徴を活かした応用研究では「実際に生産できず困っている難発現タンパク質」を研究者から広く募集し、翻訳促進配列の適用範囲を探ると同時に、現場で

実際に生産困難が故にお蔵入り化した様々なタンパク質を扱うことにより、その低生産の要因を探ることも副次的な目的とした。本研究を通じ、生命の基本である「翻訳」における未知な制御機構の理解、およびバイオ産業の基盤でもあるタンパク質生産の効率化技術の開発、の両方に資する知見集積を目指した。

3. 研究の結果

（1）大腸菌発現系における翻訳促進配列の探索と評価

まず、大腸菌発現系における翻訳促進配列の拡充のためには、大腸菌生細胞系および無細胞系を用いた新規翻訳促進配列のスクリーニングを行い（図1）、強度の異なる複数の新規配列を取得し配列情報と促進強度に関するデータベースを独自に構築した。それら配列が実際に生産困難なタンパク質の生産量増大に効果的であることを確認し利用法に関する特許を出願した（特願2024-232917）。また、翻訳を停滞することで知られる連続したプロリン残基を含む難生産タンパク質の生産量を増大させるためには、翻訳促進配列と連続プロリンとの距離関係が重要である可能性を明らかにした（論文1件）。新規促進配列のスクリーニングとその配列特徴解析、cDNAディスプレイ法による探索系に関する論文を2報執筆中である。

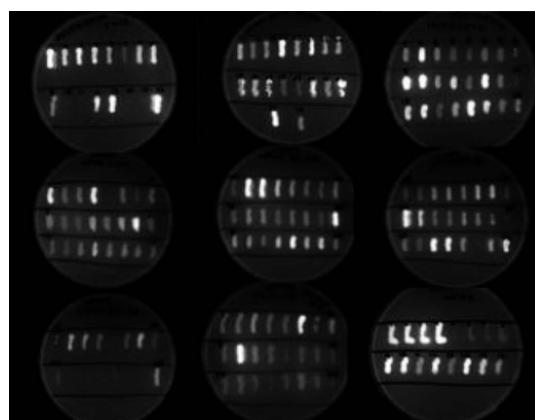


図1. スクリーニングで得られた大腸菌の一例
蛍光タンパク質の強度の違いが翻訳促進強度の違いを表す

(2) 大腸菌における生産困難タンパク質への応用

農芸化学会の学会活動を通じ、生産困難なタンパク質を募り、共同研究として、翻訳促進配列の利用やその効果を評価検討した。論文執筆準備中のものが多く、具体的なデータ開示が現時点では困難なものが多いことについては、ご容赦いただけたと幸いである。

糖質関連酵素

大腸菌生産系で生産困難が故に機能評価が困難であった機能未知な複数の糖質関連酵素遺伝子の生産性改善に向けて翻訳促進新生鎖の効果を評価した。N末端へのタグ付加により可溶性画分への生産性が改善されたものに関しては、現在、機能評価を進めている。

また、生産困難であった別の酵素遺伝子に関しては、アミノ酸配列、構造および生産性に関する系統解析で認められた相違点を指標としたアプローチでそのタンパク質生産性を改善可能であることを明らかにした(図2)。アフィニティ精製後の精製酵素は、ユニークな触媒機能を有することがわかっており、現在詳細な機能解析を進めている。

ヒト由来酵素

コドン最適化済であるにもかかわらず、大腸菌における生産性が非常に乏しかったヒト由来酵素に対する翻訳促進

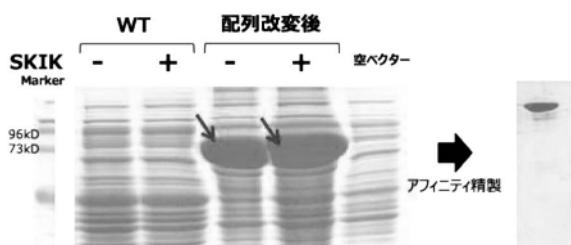
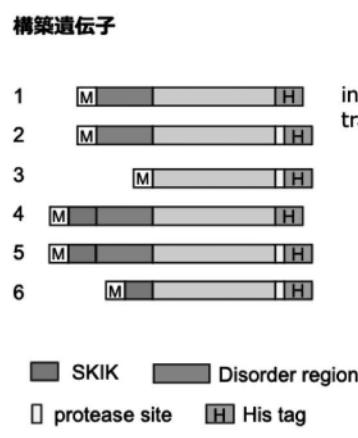


図2 翻訳促進配列挿入とは異なる手法により生産性が改善された検討事例

図中赤矢印は目的タンパク質バンドを示す。可溶性画分の SDS-PAGE 後の CBB 染色結果。



配列の利用と生産増大、および低生産の原因解明を目指し、配列改変による評価を行った。その結果、翻訳促進配列である SKIK 配列と不要配列の除去を組み合わせることで、*in vitro* における翻訳効率が飛躍的に增大できることを見出した(図3)。本現象は、大腸菌生細胞系による発現でも同様に認められており、改変遺伝子を用いた酵素生産とその活性評価を進めている。

脂質関連酵素

大腸菌における生産性が乏しかった放線菌由来脂質関連酵素に関し、その難生産の原因解明と翻訳促進配列の利用を検討した。ここでは、N末端への翻訳促進配列に加え、内部のアミノ酸変異導入により新規な翻訳促進配列に置き換えることが、生産量の増大に更に有効であることを明らかにした(図4)。本検討においては、可溶性の生産量が増大しつつ酵素活性も維持している変異体も認められたことから、現在、酵素の精製と機能評価を進めている。

(3) 酵母発現系による探索

酵母においても翻訳促進配列のスクリーニング系を立ち上げ、生細胞系におけるスクリーニングを実行した。10の5乗規模のペプチドライブリを作製し、その中から複数の候補配列を得ることに成功した。本件に関しては再現性を確認中であり、論文化および酵母において生産困難なタンパク質による実証を進める。

(4) 枯草菌による検討

当初、哺乳類細胞系によるスクリーニングを計画していたが、微生物系と比較し、系の立ち上げおよび再現性の不安定さが認められた。一方、農芸化学系の産業界においては枯草菌 *Bacillus subtilis* を宿主とした際のタンパク質生産増大技術開発の潜在需要が大きいことがわかつてきた。

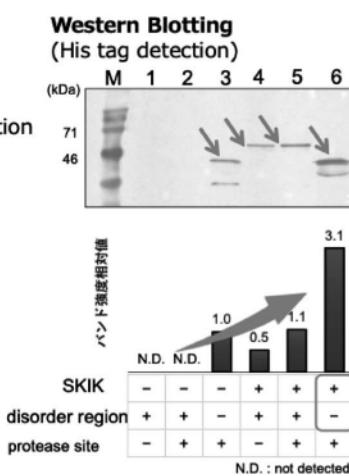


図3. 翻訳促進配列の付加と不要配列の除去の組み合わせにより生産性が改善された検討事例

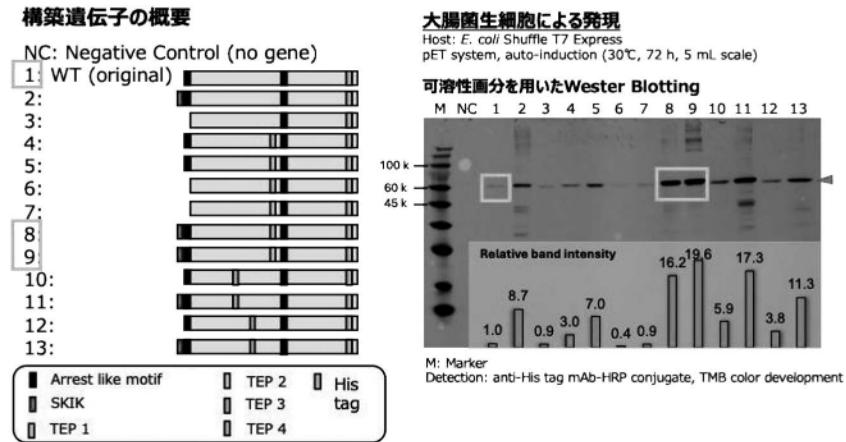


図4. 遺伝子ORFの様々な位置への翻訳促進配列導入による効果
図中TEPは翻訳促進配列を意味する。

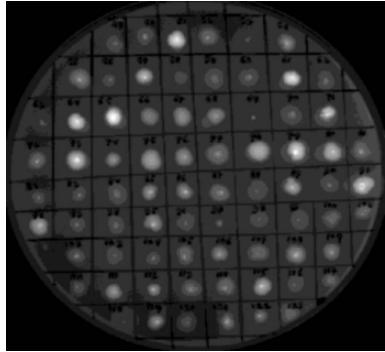


図5. スクリーニングで得られた枯草菌の一例
蛍光タンパク質の強度の違いが翻訳促進強度の違いを表す

そこで、先行して *Bacillus subtilis* の翻訳促進配列のスクリーニング系を立ち上げ、実行することとした。その結果、新規かつ有効なペプチド配列を複数得られた。得られた配列は、実際に枯草菌で生産困難であったタンパク質の生産増大に有効であることが示された。本件については現在、論文化の準備を進めている。

4. 今後の実用化への展望

今回の検討により、原核・真核を問わず、様々な微生物宿主において、新規翻訳促進配列を見出すことができた。いずれの場合も数アミノ酸残基から構成される短いペプチド配列であるため、簡単かつ低コストで利用可能なタンパク質生産量増大技術の一つとして活用されることが期待される。今後は、これら配列の特徴解析を進め、宿主による違いや共通的な特徴を見していくこと、さらにその翻訳促進のメカニズムを解明することが科学的にも実用的にも重要であると考えられる。

また、本企画では、農芸化学分野の研究者らが現場で実際に困っている大腸菌における難生産タンパク質を複数検討し、それぞれの生産改善のための有効な手段を探ると同時に、難生産の原因の一端解明に取り組んだ。快くご協力いただいた佐分利亘先生（北海道大学）、恒松雄太先生（名古屋大学）、ダムナニヨヴィッチ・ヤスミナ先生（名古屋大学）および岩崎雄吾先生（中部大学）に感謝申し上げたい。タンパク質の配列バラエティや機能は膨大であり、「タンパク質によって異なる」ことが最大の課題であるが、難生産の原因を探る取り組みを引き続き続け、その特徴を明らかにすることにより、翻訳促進配列の利用のみに拘らず、生産性改善のための有効かつ簡便な手段を見出していきたいと考えている。

5. 得られた成果

論文（投稿準備中を含む）

- Nishikawa, Y., Fujikawa, R., Nakano, H., Kanamori, T., and Ojima-Kato, T. (2024) Effect of Translation-Enhancing Nascent SKIK Peptide on the Arrest Peptides Containing Consecutive Proline, ACS Synth. Biol., 13, 3908–3916
- Takai, R., Tsuda, M., Fujikawa, R., Shimoji, R., Damjanovic, J., Nemoto, N., Nakano, H., Ojima-Kato, T. Screening and Identification of Translation Enhancing Peptides in *Escherichia coli* by in vitro cDNA display technique [投稿準備中]
- Yoshino, A., Nishikawa, Y., Shimoji, R., Nakano, H., Ojima-Kato, T. Analysis and application of translation-enhancing peptides for improved production of proteins containing polyproline [投稿準備中]

4. Ojima-Kato, T., Yokoyama, G., Nakano, H., Hamada, M., Motono, C., Screening and machine-learning assisted prediction of translation-enhancing peptides reducing ribosomal stalling in *Escherichia coli* <https://doi.org/10.1101/2025.07.17.665026>, bioRxiv

特許出願

特願2024-232917, タグ含有タンパク質, 翻訳錆型mRNA, 発現ベクター, タグ含有タンパク質の生産方法」2024年12月27日

受賞テーマ：産業応用を目指した肝臓オルガノイドの新規培養技術開発とヒト肝臓生理機能の解明

東京大学大学院農学生命科学研究科
高橋 裕

【研究の背景】

肝臓は糖、脂質などの栄養素やアルコール、薬剤といった様々な生理活性物質の代謝を中心的に担う臓器である。その中心的な機能を担うのは、肝臓の体積の約8割を占める肝実質細胞（肝細胞）であることが知られている。肝硬変などの疾病により肝細胞機能が失われると死に直結するため、発症・増悪化の機序解明やそれを基にした治療法開発を目指す上で、正常なヒト肝生理機能を有したモデルの構築は必須である。また、肝疾患の予防、治療薬の候補となる化合物の同定、評価のための病態モデルの作製や、移植治療を目指した肝細胞の再生医療等製品の開発も社会的に重要な課題となっている。これらを達成するため、これまでに様々な *in vitro*, *in vivo* モデルを用いた研究が行われてきた。

【研究の課題】

従来用いられてきた代表的な *in vitro* モデルとして、HepG2細胞や HuH7細胞などのヒト肝がん由来細胞株が挙げられる。しかし、これらの株化細胞では薬物代謝能をはじめとした肝細胞の機能が正常な肝細胞とは異なることが指摘されている。薬物代謝能が高い HepaRG細胞、初代ヒト肝細胞、ヒト多能性幹細胞から分化させた肝細胞なども市販されているが、増殖能が限られるため基本的に使い切りの仕様となっており、高いコストが必要となる。また、*in vivo* モデルとして汎用されてきたマウスやラットにおいても、例えばヒトには存在しない胆汁酸の合成やリポタンパク質の代謝機構がヒトとは異なるといった、種差の存在が明らかにされている。そのため、日常的に使用可能な、正常ヒト肝臓、肝細胞の機能を有したモデルの開発が求められてきた。

本研究では、近年、生理機能の高い *in vitro* モデルとして着目されているオルガノイドに着目した。オルガノイドは臓器特異的な幹細胞および幹細胞から分化した複数の細胞種から構成され、臓器に類似した構造および応答性を有するという特長を持つ (*Cell Stem Cell* **28**, 816–832,

2021)。ヒト肝臓オルガノイドの研究は比較的新しく、機能的な肝細胞を含むヒト肝臓オルガノイドとして、2018年に成人ヒト組織から樹立する方法 (*Cell* **175**, 1591–1606, e19, 2018), 2019年にヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞から分化誘導する方法 (*Cell Metabolism* **30**, 374–384, 2019) がそれぞれ報告された。しかし、オルガノイドは従来の細胞よりも高い生理機能を発揮することが期待される一方で、培養に必要な因子を含む培地が非常に高額であること、三次元培養を必要とするために遺伝子導入などの従来の技術を適用することが困難であるといった課題があつた。また、実際の生理機能が従来モデルよりも高いという具体的な証拠はほとんど提示されていなかった。そこで本研究では、基礎研究、応用研究、産業応用の垣根を超えた様々な研究分野におけるヒト肝臓オルガノイドの活用促進を目指し、ヒト肝臓オルガノイドを実験材料として日常的に用いるための様々な方法論の構築とその評価を実施した。

【研究の結果】

1) 安価で安定したヒト肝臓オルガノイドの培養方法の確立

生体組織由来ヒト肝臓オルガノイドの増殖には、R-spondin1, hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF) 7, FGF10 が必要とされている (*Cell* **175**, 1591–1606, e19, 2018)。しかし市販の組換えタンパク質を用いると、24-well plate 1枚分の培養を行う場合には6万円以上もの高額な費用が必要となる。筆者らは、これまでヒト小腸オルガノイドに関する研究に取り組んでおり、その培養コストの削減方法を開発してきた (*Stem Cell Reports* **10**: 314–328, 2018; *Scientific Reports* **13**: 5407, 2023)。その具体的な原理は、株化細胞であるマウス L細胞に各種増殖因子を同時に安定発現させ、その培養上清をオルガノイドの増殖用培地として用いるというものである。本法のポイントはレンチウイルス発現系を用いたことであり、各因子発現用レンチウイルスの力値を変えることで、各因子の発現量をオルガノイ

ドの培養に至適な分泌濃度となるように調整することが可能となる。そこで筆者らは、本法を活用してL細胞に上述の4因子を安定発現させたL-RHF2細胞を樹立し、その培養上清をヒト肝臓オルガノイドの培地として、ヒト肝臓オルガノイドの培養コストを大きく削減する方法の確立に成功した(図1)。興味深いことに、同じ濃度の組換えタンパク質よりも培養上清を用いたときのほうがオルガノイドの増殖は早く、そのため培養上清を用いた方法は、ヒト肝臓オルガノイドを効率的に大量に培養する上でより優れていると考えられた。また、各因子の分泌量は2か月以上に渡って変化せず、さらに-80°Cで1年間凍結保存した培養上清を用いてもオルガノイドの増殖能は変化しなかった。以上の結果から、本法はヒト肝臓オルガノイドを安定して増殖させるための方法として適していると考えられた。

2) ヒト肝臓オルガノイドへの高効率な遺伝子導入方法の確立

肝臓オルガノイドは三次元の細胞塊であるため、従来の

二次元条件で培養を行う細胞に対して行う遺伝子導入法をそのまま適用することは難しい(高効率な遺伝子導入を行うことができない)。しかし、オルガノイドに対して高効率に外来遺伝子を導入することは、遺伝子の機能解析や遺伝子改変による病態模倣を行う上で必要不可欠である。これまでに筆者らは、ヒト小腸オルガノイドにおいて三次元培養したオルガノイドを破碎後に敢えて二次元培養することで、従来法による遺伝子導入を適用できることを示してきた(*Stem Cell Reports* 10: 314–328, 2018; *iScience* 25, 104542, 2022)。遺伝子導入後は三次元培養することで再度オルガノイドを得られるため、結果としてオルガノイドに対して高効率な遺伝子導入を達成することが可能となる。筆者らはこの方法をヒト肝臓オルガノイドに対しても適用し、一過的なプラスミドDNAの導入やウイルス感染による高効率な遺伝子導入が可能であることを示した(図2)。本法の確立により、ヒト肝臓オルガノイドを活用した研究の幅は今後、大きく広がることが期待される。

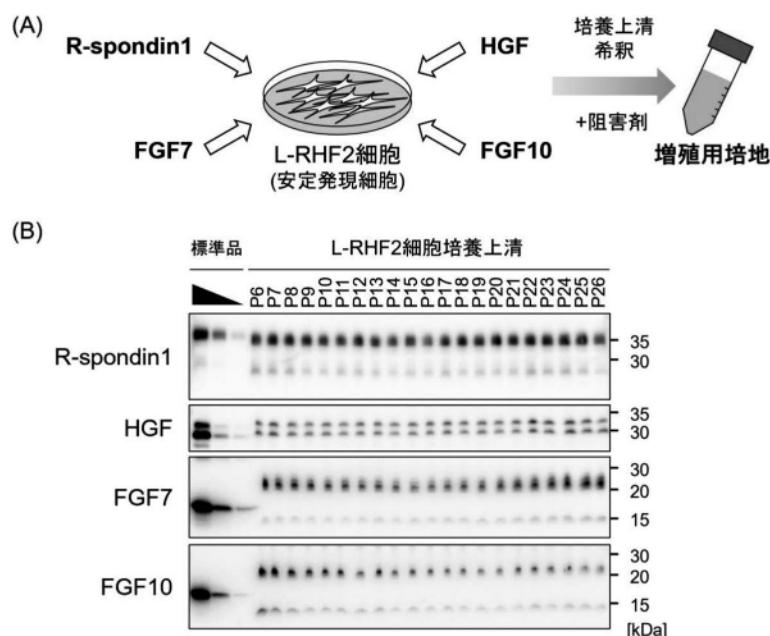


図1. L-RHF2細胞培養上清によるヒト肝臓オルガノイド培養コスト削減法の確立

(A) L細胞に強制発現させる因子と増殖用培地調製の概要を示した。(B) レンチウイルス発現系により樹立したL-RHF2細胞を3日毎に継代し、培養上清中に含まれる各因子のタンパク質量をウェスタンプロットティングにより検出した。L-RHF2細胞は、少なくとも2か月間、各タンパク質を安定して分泌することが示された。

※図中のPは継代数を示す。



図2. 二次元培養を介したヒト肝臓オルガノイドへの高効率な遺伝子導入法の確立

三次元培養したヒト肝臓オルガノイドをゲルから回収後、酵素処理～ピッピングにより破碎することでシングルセル化する。シングルセル化したオルガノイドを一過的に二次元培養することで、通常の細胞株に対する遺伝子導入操作が可能となる。遺伝子導入後に細胞を回収し、再度三次元培養することで、結果的にオルガノイドに対して高効率に外来遺伝子を導入することができる。

3) ヒト肝臓オルガノイドの肝細胞機能評価方法の確立とその実例

上記1) の方法によりヒト肝臓オルガノイドの増殖は簡便に行なうことが可能となったが、増殖期の肝臓オルガノイドにおいて、肝細胞成熟マーカーであるアルブミンの発現量は低くなっていることが判明した。しかし、増殖用培地から増殖能を示さない、ヒトiPS細胞から肝臓オルガノイドに分化させる際の最終段階で用いる分化用培地に切り替えると、アルブミンの発現は大きく誘導されることが見出された(図3)。このとき、脂肪酸合成やトリグリセリド合成など、肝細胞の代謝機能を司る様々な遺伝子の発現も誘導されることが確認された。したがって、培地交換により増殖期から静止期に変えることで肝細胞は成熟し、その生理機能は高まることが示唆された。

分化用培地で培養後、ヒト肝臓オルガノイドは、インスリンに対する応答性、細胞内の脂質蓄積能、肝細胞機能を司る遺伝子発現を制御する核内受容体のリガンド応答性といった、肝細胞に特徴的かつ基本的な機能、応答性を示すことが確認された。そこで、次にヒト株化肝細胞やマウスでは十分に評価できない現象として、超低密度リポタンパク質(Very low-density lipoprotein, VLDL) 分泌に着目した。VLDLは、HepG2細胞などの株化細胞でも產生されるが、十分に密度が低い状態とはなっておらず、未成熟であることが指摘されている(*Journal of Lipid Research* 52: 152–158, 2011)。また、マウスやラットにおいてはリポタンパク質代謝に重要なコレステリルエステル輸送タンパク質(Cholesteryl ester transfer protein, CETP)が欠損しているため、その代謝機構にはヒトとの種差が存在する(*Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry&Molecular Biology* 135: 219–229, 2003)。したがって、ヒトのVLDL分泌、代謝を正確に評価するためには、生理的なヒト肝細胞を用いる必要がある。

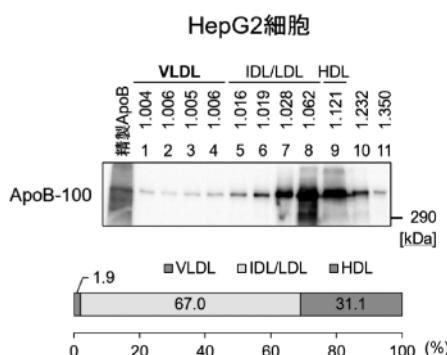


図4. ヒト肝臓オルガノイドからの生理的な超低密度リポタンパク質(VLDL)の分泌
オレイン酸負荷後、HepG2細胞およびヒトiPS細胞由来肝臓オルガノイドの培養上清を密度勾配遠心し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動～ウェスタンブロッティングによりVLDLに含まれるApoB-100タンパク質を検出した。HepG2細胞の培養上清には生理的なVLDLに相当する密度の画分にApoB-100はほとんど検出されなかったが、ヒト肝臓オルガノイドの培養上清には多くのApoB-100が検出された。

ある。そこで、脂肪酸の一種であるオレイン酸を負荷後に回収した培養上清を密度勾配遠心し、VLDL産生能を評価した。まず、比較対照して設定したHepG2細胞においては、VLDLが含まれるべき密度の画分において一分子のVLDLにおいて一分子含まれるApolipoprotein B-100(ApoB-100)の量が少なく、これは既報と一致する結果となった。同様の実験をヒトiPS細胞由来肝臓オルガノイドを用いて行ったところ、VLDLに相当する画分においてApoB-100が多く検出された(図4)。この全体に占める割合は初代肝細胞と近かつ

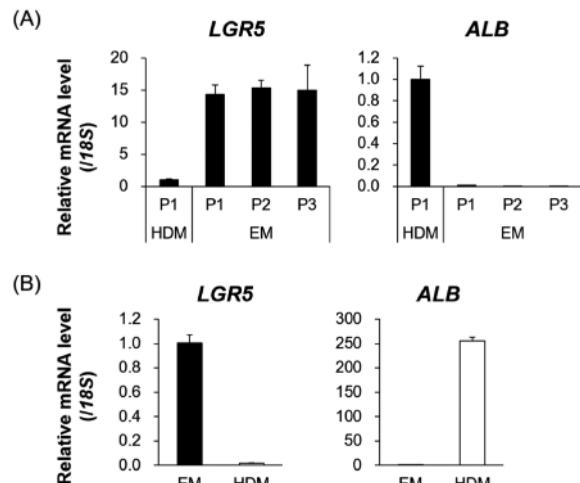
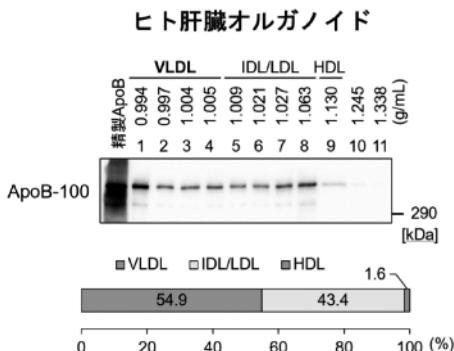


図3. 二次元培養を介したヒト肝臓オルガノイドへの高効率な遺伝子導入法の確立

(A) ヒトiPS細胞から肝臓オルガノイドへと分化させる最終段階で用いる肝細胞分化用培地(Hepatocyte differentiation medium, HDM)から増殖用培地(Expansion medium, EM)に交換すると、幹細胞マーカーであるLGR5の発現は増加し、肝細胞成熟マーカーであるALBの発現が減少した(平均値±標準誤差)。(B) EMで培養後にHDMに培地交換すると、LGR5の発現が減少し、ALBの発現が増加した(平均値±標準誤差)。すなわち、EMにより増殖させた後にHDMに切り替えることで肝細胞機能評価が可能になることが示唆された。

※図中のPは継代数を示す。



したことから (*Gastroenterology* 139: 1355–1364.e6, 2010), ヒト肝臓オルガノイドは生理的な VLDL を分泌するモデルとして適していると結論づけられた。

【今後の実用化への展望】

本研究で構築した様々な基盤技術により、ヒト肝臓オルガノイドの培養とその活用は従来の方法よりも安価かつ簡便にできるようになった。今後はヒト肝臓オルガノイドを活用することで、特に実験動物とヒトで種差のある現象、従来のヒト株化細胞では十分に再現できない生理機能に着目した解析が可能となり、それを基にすることで、新たな分子機構の発見や疾患予防・治療を目指す上での新規標的分子の同定につながることが期待される。

受賞テーマ：ネコのマタタビ反応の研究から着想した蚊の忌避剤の開発

名古屋大学大学院生命農学研究科
西川俊夫

研究の背景

我々は、ネコのマタタビ反応の研究から、ネコに反応を引き起こす強力な活性物質として「ネペタラクトール」(図1a) をマタタビ葉から初めて同定し、この植物成分が蚊の忌避・殺虫活性を示すことを見出した[1]。そして、マタタビ反応はネコが体にネペタラクトールを含む植物成分を擦り付ける行動であり、それによって蚊に刺されにくくなることを明らかにし、この特異な反応の生物学的意義を解明した[2]。さらに、完全肉食のネコがマタタビ葉を舐めたり噛んだりする理由を追究し、マタタビ葉がネコによって損傷を受けると、ネペタラクトールとともに過去に報告されたマタタビラクトンと総称される類縁体(図1b) の放出量が増大、組成が多様化することを見出した

【謝辞】

本賞を受賞するにあたり、審査をいただいた先生方、助成金を賜りました企業関係者の皆様に厚く御礼を申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、主な実験を担当していただいた久保山(佐々木)文音博士をはじめ、多くの先生方にこの場を借りまして感謝申し上げます。

【発表論文】

*Kuboyama-Sasaki, A., *Takahashi, Y., et al. (*equally contributed) Establishment of a cell culture platform for human liver organoids and its application for lipid metabolism research. *Biotechnology Journal* 19: e2300365. (2024)

(図1c)。そして、この組成の変化により、ネコのマタタビ反応が増強されるだけでなく、蚊の忌避活性も増強されることを明らかにした[3]。

現在、蚊などの昆虫に対する忌避剤として汎用されているディート(DEET, 図1d)は安全性が高いとされているが、化学合成品であり、特有の異臭があり、皮膚刺激性も報告されている。一方、ネペタラクトールは、植物成分でありヒトにはほぼ無臭である。蚊のネペタラクトール受容体はTRPイオンチャネルの一つTRPA1であり [N. Meloら *Curr. Biol.* 2021, 31, 1988], DEETとは異なる作用機序を持つ。よって蚊が媒介する感染症対策にネペタラクトールを利用できればメリットは計り知れない。またマタタビは古くから生薬として使われており、マタタビ酒も流

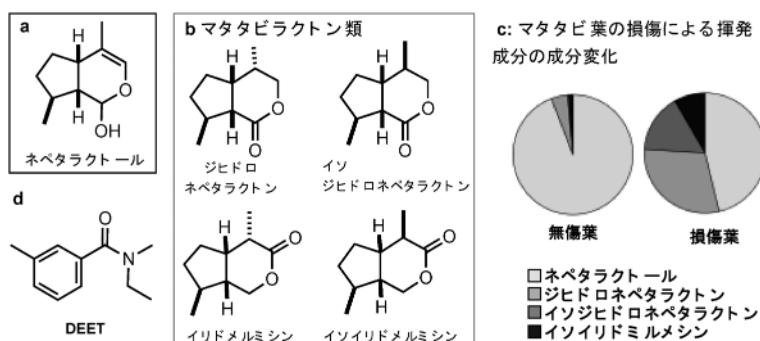


図1. マタタビから単離された(a) ネペタラクトール、(b) マタタビラクトン類、(c) マタタビ葉の損傷による揮発性成分の変化、(d) 忌避剤DEET

通していることから、その安全性に期待が持てる。

研究課題

そこで、本研究では、以上のネコのマタタビ反応の研究成果を最大限活用して、マラリアなど致死的伝染病を媒介する蚊などの害虫に対する安全で効果的な忌避剤を開発することを最終的な目的とした。具体的には、ネペタラクトールをマタタビラクトン類との混合物とすることによって、活性を強化した蚊の忌避剤を開発する。本研究テーマは、ネコのマタタビ反応の研究というcuriosity-drivenの基礎研究から得られた予想外の研究成果を活用するもので、化学と生物学の融合研究という典型的な農芸化学的な研究から生まれたものもある。しかし、ネペタラクトールとマタタビラクトンを混合した忌避剤を実用化するためには多くの課題を解決する必要がある。以下にその課題と結果について記す。

研究結果

1. ネペタラクトールとその関連化合物の供給法

(a) 化学合成法の改良の試み

我々はネペタラクトールを、文献 [S. L. Schreiber ら J. Am. Chem. Soc. 1986, 108, 8274] に従い、市販の (S)-シトロネラール (**1**) から3工程で化学合成し(図2)、これを起点にマタタビラクトンを合成してきた。この合成法のコストの大半は原料**1**にある。一方、より安価な (S)-シトロネロール (**2**) からネペタラクトールの合成を検討したが、この方法の問題は2回目の酸化反応 (**4** → **3**) 反応剤 (IBX) のコストの高さにある。この酸化反応を触媒反応 (IBS と

oxone[®]など) に置き換えることを検討したが、生成物**3**が不安定なため反応が複雑化し、困難であることがわかった。環化反応 (**3** → **5**) と環化生成物の加水分解 (**5** → ネペタラクトール) をL-プロリンを触媒にして一挙に行うことも可能だったが、収率はほとんど改善されなかった。なお、**3**から**5**への変換は、これまで収率が安定しないことが問題だったが、安息香酸を過剰に添加することで再現性よく反応が進行することがわかった。以上の検討で、**1**あるいは**2**から中間体の精製を行うことなく、いずれも総収率約30%でネペタラクトールを再現よく得られる方法を確立した。一方、原料に関しては、光学活性体のおよそ10分の1のコストで入手可能な**1**のラセミ体の利用を検討(後述)するために、(R)-シトロネロールから天然ネペタラクトールの鏡像体も合成した。

マタタビラクトン類は、過去の文献 [J. E. Hofferberth ら J. Org. Chem. 2013, 78, 7318] と申請者らによる改良法 [4] によってネペタラクトールから1-3工程で化学合成してきた。しかし、この中でイソイリドミルメシンは立体選択性的な合成が困難で、これまでイリドミルメシンの合成で経由する中間体の立体異性体を分離することで合成していたため、大量調製が困難だった。文献に報告されているイソイリドミルメシンの合成法 [P.A. Hina ら J. Org. Chem. 2018, 83, 6086] にも再現性がなかったため、新たにイソジヒドロネペタラクトンから5工程での合成法を開発した(図3)。工程数がかかるが、高い純度のイソイリドミルメシンが得られた[未発表]。

(b) マタタビにおけるイリドトイドの局在化と季節変動

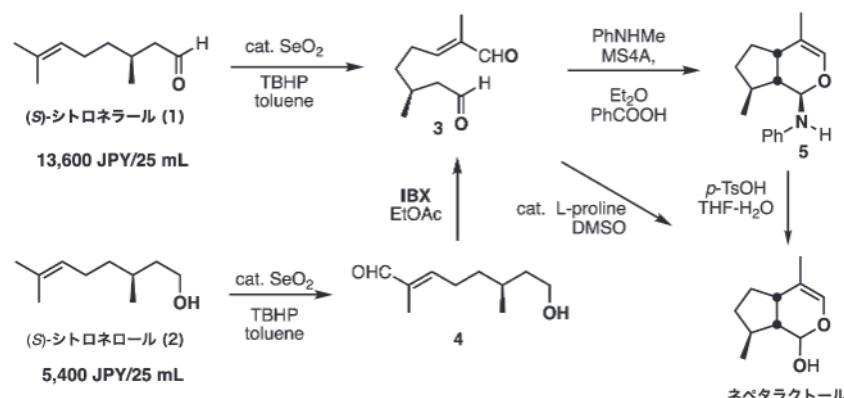


図2. ネペタラクトールの化学合成法の改良

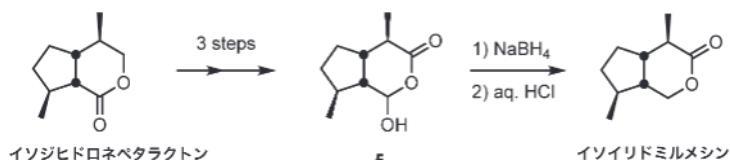


図3. イソイリドミルメシンの高立体選択性的合成法の開発

ネペタラクトールの供給法として最も有望なマタタビのどの部位にネペタラクトールとマタタビラクトンがどれだけ含まれるかGC-MSによって分析した。通常の実、虫実果、緑葉、白葉、枝を調べたところ、実に圧倒的に多くのイリドトイドが含まれていることが明らかになった(図4)。一方、5月から9月にその含量が多いこともわかった[4]。

(c) マタタビ科に属する植物のイリドトイドの含有量

マタタビ以外の植物のマタタビ科に属する植物として、キウイフルーツ (*Actinidia deliciosa*)、サルナシ (*Actinidia arguta*) とミヤマタタビ (*Actinidia kolomikta*) の葉と根に含まれるイリドトイド量を調べた。いずれも地下茎にイリドトイドを含むことがわかったが、その量はマタタビに比べ非常に少なく、イリドトイドの供給源にはなり得ないと判断された[5]。

2. ネペタラクトール、マタタビラクトンの昆虫への作用：

(a) ネペタラクトールと関連物質の生活環境中の生物活性

ネペタラクトールを始めとするイリドトイド化合物は、昆虫がフェロモンや防御物質として活用している例が多数知られている。例えば、ネペタラクトールとネペタラクトンはある種のアブラムシが性フェロモンとして使っており、イリドミルメシンはもともとアルゼンチンアリの防御物質として単離されたものである。また、マタタビラクトン類はクサカゲロウを誘引することが報告されている。したがって、ネペタラクトールを蚊の忌避剤として利用するためには、その使用環境に生息する昆虫への作用を調べる必要がある。そこで、7月に名古屋大学東山キャンパスと岩手大学キャンパスの数カ所にネペタラクトールを使ったトラップを設置し昆虫の捕捉実験を行った。その結果、名古屋大学キャンパスでは、特定の場所で毎回クサカゲロウが捕獲された。なお、ネペタラクトールの鏡像体ではクサカゲロウを含む昆虫が捕捉されることはなかった。一方で、イエネコに対するマタタビ反応と蚊の忌避活性は、天然型とその鏡像体で優位な活性の差はなかった[未発表]。したがって、蚊の忌避剤の開発においては、ラセミ混合物の利用が可能であることが示された。ラセミ体としての利用は、化学合成の原料コストを大きく低減する大きなメリットがある。

今後の実用化への展望

民間企業と行ったネペタラクトールを単独で使った蚊の忌避剤としての試験研究は、残念ながら期待したような効果を与えることができなかった。揮発性の高さに原因の一つがあると考えられるため、今後、その製剤法を工夫するとともに、マタタビラクトンとの混合物としての試験を計画中である。なお、実用化におけるもう一つの課題は、ネペタラクトールとマタタビラクトンの合成コストの高さにある。化学合

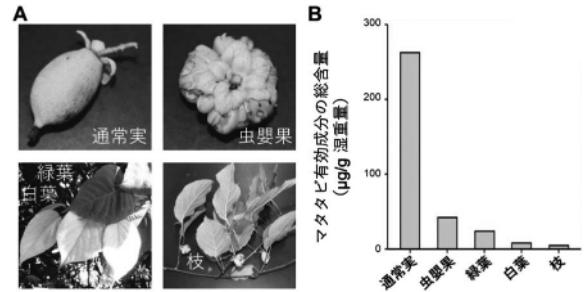


図4. マタタビにおけるイリドトイドの局在化

成ではコストの削減に限界があるので、今後、ネペタラクトンが主成分であるキャットニップオイル（イヌハッカの精油成分）などの活用も検討する。

一方で、これらの研究を基盤にして、共同研究者の宮崎雅雄らは、ネコの嗅覚エンリッチメントとしてネコ用マタタビスプレーを開発し、株式会社Nrf2（ナーフツー）より発売された。有効成分の含量の最も多い季節のマタタビの葉からヘキサンを使って抽出したものを原料にして、カラムクロマトグラフィーでイリドトイド分画を濃縮したものである。

謝辞

本研究は宮崎雅雄教授（岩手大学農学部）との共同研究として行われたもので、ここに感謝します。最後に本研究企画申請を審査いただきました産学官学術交流委員会の先生と、本賞をサポートしていただいた農芸化学関連企業の皆様に厚くお礼を申し上げます。

関連文献

- 特許：宮崎雅雄、上野山怜子、西川俊夫、害虫に対する忌避・殺虫剤およびこの製造方法。特願2020-140755
- (a) Uenoyama, R.; Miyazaki, T.; Hurst, J.; Beynon, R. J.; Adachi, M.; Murooka, T.; Onoda, I.; Miyazawa, Y.; Katayama, R.; Yamashita, T.; Nishikawa, T.; Miyazaki, M. The characteristic response of domestic cats to plant iridoids allows them to gain chemical defense against mosquitoes. *Science Advances* **2021**, eabd9135. (b) 上野山怜子、西川俊夫、宮崎雅雄：ネコがマタタビに反応する生物学的意義の解明 マタタビへの顔の擦り付けは蚊への化学防除を可能にする。化学と生物 **2021**, 59 (9), 435-440.
- Uenoyama, R.; Miyazaki, T.; Adachi, M.; Nishikawa, T.; Hurst, L. J.; Miyazaki, M. Domestic cat damage to plant leaves containing iridoids enhances chemical repellency to pests, *iScience* **2022**, 25, 104455.
- Adachi, M.; Miyazawa, Y.; Nishikawa, T. Improved Syntheses of (+)-Iridomyrmecin and (+)-Isoiridomyrmecin, Major Components of Matatabilactone. *Natural Product Communications* **2016**, 11, 883-886.
- Uenoyama, R.; Ooka, S.; Miyazaki, T.; Mizumoto, H.; Nishikawa, T.; Hurst, Jane L. Assessing the safety and suitability of using silver vine as an olfactory enrichment for cats, *iScience* **2023**, 26, 107848.

3. 第5回中小企業産学・産官連携 研究助成報告書

第5回中小企業産学・産官連携研究助成報告書

「ヒノキ精油の機能性探索：ヒアルロン酸（HA）产生促進作用による化粧品素材への展望」

研究代表者 三重大学大学院生物資源学研究科 奥村克純
中小企業研究責任者 辻製油株式会社 籠谷和弘

1. 背景：企業からの説明

HAの水分保持能力により皮膚に潤いを与え、乾燥やシワを防ぐ効果が多数報告され、HA产生促進作用を持つ成分が化粧品業界で注目されている^{1,2)}。特に、天然素材から得られる機能性成分の需要は高まっており、多くの研究が成されている。

辻製油(株)では、FSC[®]認証を取得し適切に管理された三重県産ヒノキの未利用材（間伐材、加工端材）から水蒸気蒸留によりヒノキ精油を得て、価値の高い製品として販売を行ってきた。しかし、ヒノキ精油の香料としての活用に留まっている、ヒノキ精油の持つ可能性を十分に活用できていないと感じている。また、国産ヒノキ精油の機能性に関する研究報告は乏しく、特に化粧品素材に利用できる機能性については報告がない。そこで、徹底管理されたヒノキの未利用材を最大限に活用できる利点を活かして、良質のヒノキ精油について、三重大学と協力して独創的な研究を行うことで、化粧品素材に利用できるヒノキ精油の機能性を見出し、さらなる価値を付加する必要があると考えた。この研究によって得られる結果は新規性に富み、学術的に非常に重要な知見となり得る。加えて、香料として販売しているヒノキ精油に機能性を付加することで、さらに価値の高い製品になるだけではなく、ヒノキ精油の販売促進を目指すことで、より多くの未利用材を有効活用することができる。これにより今まで廃棄されてきた木材資源に価値を与えるとともに、ヒノキ精油の販売を通じて地域社会に貢献でき、ひいては森を守り、育てる日本の林業の一助となり得る。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

【背景】

研究代表者は、企業側研究責任者を通して、辻製油(株)と主に食品素材に関する研究等で共同研究を実施してきており、これまでに、しょうが抽出オイルの破骨細胞分化抑

制作用³⁾や、かぼす抽出オイルの脂肪蓄積抑制作用⁴⁾など、食品由来機能性成分等の研究について多くの実績がある。また、辻製油(株)は三重大学内に辻H&B サイエンス研究室を構えるなど、大学との共同研究に極めて積極的に取組む姿勢があり、今回のヒノキ精油の機能性に関する研究は、これまでの共同研究の延長線上にあって、準備は十分に整っており、連携研究を進めて本助成事業として実施することにした。

これまでに、ヒト新生児由来真皮線維芽細胞株NB1RGBをヒノキの幹材から水蒸気蒸留によって得た精油で処理し、細胞内に產生された HA を蛍光検出した結果、ヒノキ精油に HA 产生促進作用があることを見出しており⁵⁾、本研究では、ヒノキ精油に含まれる機能性成分の同定・決定と作用機序を明らかにすることを目指した。

【研究の詳細】

①機能性成分の探索

これまでの実験結果から、ヒノキの幹材に多く含まれる成分に、HA 产生を促進する効果があると推測した。まず、ヒノキの幹部をチップに粉碎したものを水蒸気蒸留して得たヒノキ精油を HPLC により分析し、図1に示すクロマトグラムを得た。ヒノキ精油中の成分のうち、 α -ピネンお

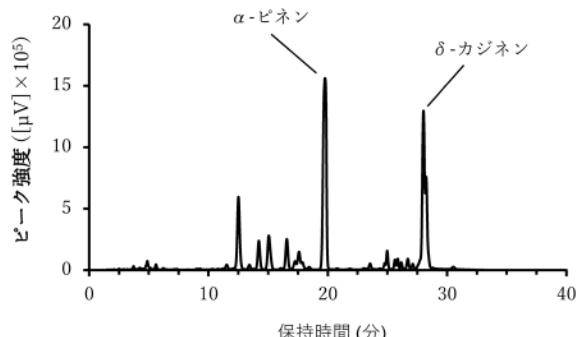


図1. ヒノキ精油の HPLC クロマトグラム

および δ -カジネンが特に多く含まれていることが判明した。HA産生促進効果への α -ピネンおよび δ -カジネンの関与を確認するため、各標準品でNB1RGB細胞を72時間処理した後、ヒアルロン酸結合タンパク質（HABP）を蛍光により検出し、HA量とみなして画像解析により定量した。その結果、ヒノキ精油処理ではHA産生を有意に促進したが、 α -ピネンあるいは δ -カジネン処理では、HA産生は有意には促進されなかった（データ省略）。

そこで、ヒノキ精油中のHA産生促進活性成分を探索において、より極性が高い成分に機能性の発現が示されるのではないかと考え、ヒノキ精油からエタノールを用いた液-液分配を行い、含水エタノール抽出物を調製し、HA産生を調べた。その結果、HA産生促進効果が認められ（図2）、活性成分は含水エタノール抽出物に分画されることが示唆された。

含水エタノール抽出物中の活性成分を探索するため、LC-MS分析を行ったところ、3つピークが認められ、いずれも同じm/zの[M+H-H₂O]⁺イオンであること、加えて、GC-MS分析では同じm/zの[M-H₂O]⁺イオンとして検出された。したがって、これら3つのピークの分子量は同一で、分析結果に基づきそれぞれの構造を推定した。これらの化合物は、ヒノキの特徴的な成分であり、枝葉にはほとんど存在せず、幹に豊富に含まれることが報告されている。皮膚中で最も多くのHAを産生する真皮細胞において効果が確認されたことから、化粧品などに応用した際には、特にシワの改善や皮膚状態の向上に有用であると考えられる。これらの化合物については、標準物質が市販されておらず、現在、これらを単離し、それぞれのHA産生促進効果の違いを検証する研究を進めている。

②ヒアルロン酸合成酵素（HAS）の発現変動

含水エタノール抽出物処理によるHA合成酵素（HAS）

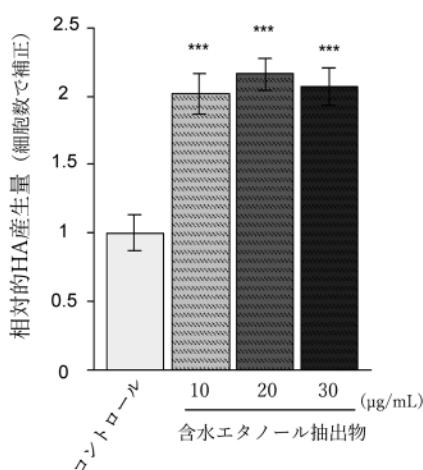


図2. 含水エタノール抽出物のHA産生促進効果
***: $p < 0.001$ 対コントロール

遺伝子の発現変動がHA産生促進効果に関与しているかを検討するため、真皮細胞で主に発現しているHAS1およびHAS2の遺伝子発現量をqPCRにより定量した。含水エタノール抽出物（20 $\mu\text{g/mL}$ ）処理後6, 36, 72時間で発現量を測定した。その結果、HAS1については、含水エタノール抽出物処理6時間後に有意な発現増加が認められたものの、36時間および72時間処理では有意な変動は認められなかった。HAS2については、いずれの処理時間においても顕著な発現変化は認められなかった（データ省略）。これらの結果から、含水エタノール抽出物はHAS2遺伝子の発現量には影響を及ぼさないことが示唆された。

③HA産生促進メカニズムの解明

含水エタノール抽出物処理によりHAS2の発現量に変化が認められなかったことから、含水エタノール抽出物中の活性成分が細胞膜上のHAS2活性を促進する可能性を考えた。HAS2活性には、遺伝子発現による調節以外にも厳密な制御機構が存在することが知られており、その一例がERKによるHAS2の直接リン酸化である。そこで、ERKのリン酸化状態（pERK）を検討した。その結果、ERKの発現量には有意な変化は認められなかったが、pERK量は有意に増加し（図3）、pERK/ERK比も含水エタノール抽出物処理により有意に上昇した。分子メカニズムとして、細胞膜上のHAS2がpERKによって直接リン酸化されると仮定し、pERKが細胞内のHAS2近傍に移動し共局在する可能性を検討した。すなわち、含水エタノール抽出物処理細胞においてHAS2およびpERKを同時に蛍光顕微鏡下に可視化検出し、それぞれのシグナルの重複領域を抽出して、細胞あたりの面積を画像解析により定量した結果、有意な増加が認められた（データ省略）。これらの結果は、含水エタノール抽出物処理により増加したpERKが、HAS2のリン酸化に直接関与している可能性を示唆している。

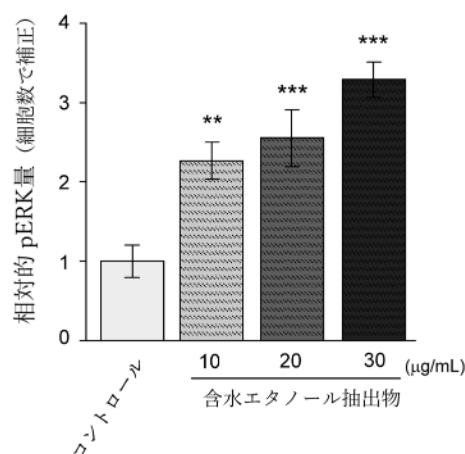


図3. ERKのリン酸化状態の定量
: $p < 0.01$, *: $p < 0.001$ 対コントロール

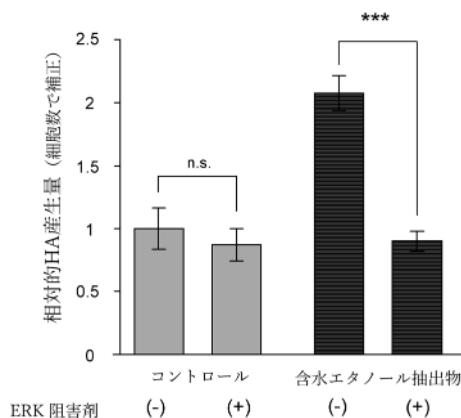


図4. 含水エタノール抽出物のHA産生促進効果のERK阻害剤による抑制
***: $p < 0.001$ 対阻害剤未処理

以上の結果から、含水エタノール抽出物中の活性成分は、ERKを介してHAS2活性を促進することによりHA産生促進効果を有する可能性が示唆された。ERK阻害剤を用いてこの仮説を直接検証した結果、含水エタノール抽出物と阻害剤の同時処理では、HA産生が有意に減少し、阻害剤単独処理時と同程度まで低下した(図4)。これらの結果から、含水エタノール抽出物はERKリン酸化を介してHAS2活性を促進し、HA産生を誘導することが明らかとなつた。

【考察と展望】

本研究では、ヒノキ木材チップから水蒸気蒸留により得られた精油が真皮細胞において濃度依存的にHA産生促進効果を示すこと、さらに、エタノールで分画した含水エタノール抽出物が強力なHA産生促進効果を有することを示した。LC-MS解析、GC-MS解析により、含水エタノール抽出物に含まれる3つの成分を特定した。含水エタノール抽出物処理は、HAS2遺伝子発現を変化させることなく、ERKリン酸化率とpERK-HAS2共局在率を上昇させた。さらに、ERK阻害剤との併用により、そのHA産生促進効果が消失した。以上より、含水エタノール抽出物は、ERKを介してHAS2活性を向上させ、HA産生を促進することが示された。ヒノキ精油に含まれる成分が、真皮細胞においてユニークな経路によるHA産生促進効果を示すことが明らかとなった。これらの研究成果については、一部を2024年度日本農芸化学会大会にて口頭発表し⁶⁾、現在、原著論文を投稿中である⁷⁾。

ヒノキ精油の含水エタノール抽出物中の活性成分については、標準物質が市販されておらず、現在、これらを単離し、それぞれのHA産生促進効果の違いを検証する研究を進めている。

HAの減少に起因する主な健康問題として、ドライアイ、動脈硬化、骨粗鬆症、変形性関節症などが挙げられる。ドライアイに対するHA添加点眼薬の有効性は報告されているが、これは一時的に外部からHAを補う対症療法に過ぎず、根本的な解決には至らない。もしヒノキ精油に含まれる成分が眼組織においてもHA産生促進効果を示すのであれば、これらを日常的に点眼薬として使用することで、持続的なHA供給が可能となり、症状改善が期待できる。同様に、体内各所でHA産生を促進することで、動脈硬化、骨粗鬆症、変形性関節症の予防・緩和にも寄与する可能性がある。本研究では、ヒノキ精油による真皮細胞におけるHA産生促進効果を検討したが、今後は、HA保持に関与するコラーゲンやエラスチンの産生促進効果についても検討し、さらなる機能性の解明を目指す。

機能性を最大限に引き出せるヒノキ精油の製造条件を検討し、製品改良による付加価値の向上、製品の販売促進により未利用資源の活用をさらに促進させることができる。そして、ヒノキを通じての産業の活性化や環境を配慮した循環型システムの構築による地域社会への貢献に繋がることが期待される。

3. 謝辞

研究全般で辻製油(株)早川琢也氏、加川達樹氏、構造解析等で三重大学大学院生物資源学研究科勝崎裕隆准教授、大学院生の前川実優氏に協力いただき感謝申し上げます。第5回農芸化学中小企業产学・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) Jegesothy SM, et al. Efficacy of a new topical nano-hyaluronic acid in humans. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.*, 7: 27-29 (2014)
- 2) Kawada C, et al. Ingested hyaluronan moisturizes dry skin. *Nutr. J.*, 13: 70 (2014)
- 3) Ito S, et al. Ginger hexane extract suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 80: 779-785 (2016)
- 4) Tsuji T, et al. Hexane Extract of *Citrus sphaerocarpa* Suppresses the Accumulation of Lipid Droplets in 3T3-L1 Adipocytes. *ACS Food Sci. Technol.*, 2: 1507-1516 (2022)
- 5) 早川琢也ら. ヒアルロン酸産生促進剤およびその製造方法. 特開2024-170256
- 6) 前川実優ら. ヒノキ精油に含まれるヒアルロン酸産生促進効果を示す成分の探索. 日本農芸化学会2024年度大会講演要旨集(東京) 2024/3/24-27.
- 7) Hayakawa T, et al. Essential oil from Hinoki cypress induces hyaluronic acid production in dermal cells by enhancing hyaluronic acid synthase activity via ERK phosphorylation. submitted.

「乳酸発酵による色落ち海苔の高付加価値化による新規有用食品素材の開発」

研究代表者 佐賀大学農学部生物資源科学科 小林元太

中小企業研究責任者 株式会社オフィス・タカハシ 高橋勝則

1. 背景：企業からの説明

株式会社オフィス・タカハシでは、「食品企画販売部門」として、佐賀県産の特産農水産物の加工販売を実施している。これまでに、有明海でアサリなどの貝類の食害が報告されているナルトビエイをハンバーグに加工して製品化し、生産量が19年連続で日本一であった佐賀海苔をカステラに混ぜることで海苔の風味を活かした新しい食品等を開発している。しかし、近年では、気象条件や海の環境状態（赤潮、貧酸素水塊等々）で海苔の生育状態が変化し、時として「色落ち海苔」と呼ばれる低品質の海苔が产出され、入札に掛けられても不落となり、生産しても全く価値のないものになる場合がある。そこで、色落ち海苔を含めた低価格で流通している海苔の有効活用に着目し、新たな商品開発を目指した。一方で乳酸菌および乳酸発酵液はプロバイオティクスとしての機能性が注目されており、色落ち海苔を原料とした乳酸発酵液を調製できれば、機能性を付与した高付加価値の新規有用食品素材の開発が可能になると想定し、有明海から数多くの乳酸菌や酵母などの分離の実績がある佐賀大学の小林元太教授に相談し、本事業に応募することとした。その結果、新規の乳酸菌の分離に成功し、さらに、それらの菌株によって発酵させることにより色落ち海苔溶液の免疫賦活化活性が向上することを明らかとした。すなわち、当初の目的である「乳酸発酵による色落ち海苔の高付加価値化」を達成することができたため、国内特許も出願し、さらに(株)サン海苔や西海製薬(株)などと結成した佐賀海苔加工品輸出協議会を通じて新規有用素材の開発を実施している。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

本事業では、商品価値が著しく低下した色落ち海苔を原料として乳酸発酵を行うことにより、付加価値を向上させることを目的としており、そのためには海苔を原料とした乳酸発酵に適した乳酸菌株の分離が必須である。乳酸菌は菌株によって発酵の基質として使用できる糖が異なるが、最も一般的に利用される発酵性糖はグルコースである。本

研究の発酵基質は色落ち海苔であり、海苔構成糖のうち最も多量に含まれるポルフィランはガラクトースを構成糖とする多糖であるため、色落ち海苔の発酵に適した乳酸菌を探索する必要がある。これまでに佐賀大学応用微生物学研究室では、有明海の底泥等から乳酸菌や酵母等の微生物を分離に成功している⁽¹⁾⁽²⁾。本研究では、色落ち海苔の構成糖類を資化することを目的として、有明海産の生海苔を分離源として、新規乳酸期の分離を行い、さらに分離菌株の性状解析を行い、さらに乳酸発酵液の機能性評価を実施した。

・研究の詳細

①生海苔由来の乳酸期の分離

図1に示す有明海湾奥の6地点（A～F地点）から摘採した生海苔を分離源として、MRS培地（DifcoTM Lactobacilli MRS Broth）を用いて、30°C・嫌気条件下（Anaero Pack・ケンキ；三菱ガス化学）にて常法に従って乳酸菌の分離を行った。

有明海から摘採された生海苔6検体から各2株ずつを分離し、1地点（B地点）からの菌株がカタラーゼ陽性だったことにより、それ以外の合計10株について、16S rRNA遺伝子の相同性解析により菌種を同定した。同定の結果、有明海産の生海苔から分離された10株は、それぞれ *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Latilactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Lacticaseibacillus manihotivorans* であると同定された（表1）。



図1 生海苔の摘採場所

②色落ち海苔を原料とした乳酸発酵評価

MRS培地および色落ち海苔抽出培地（NE培地）を用いて上記の分離株による乳酸発酵試験を実施した（図2および図3）。

その結果、*Latilactobacillus sakei* D-1株が、両培地において分離株10株の中で最も高い乳酸生産能を示した。

③乳酸発酵物の機能性評価

生海苔から分離した乳酸菌の機能性評価として、MRS

表1 本研究で分離された菌株の同定結果

株名	同定結果
A-1	<i>Lactococcus lactis</i>
A-2	<i>Lacticaseibacillus manihotivorans</i>
C-1	<i>Enterococcus faecium</i>
C-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
D-1	<i>Latilactobacillus sakei</i>
D-2	<i>Lactococcus lactis</i>
E-1	<i>Lactococcus lactis</i>
E-5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
F-1	<i>Lactococcus lactis</i>
F-2	<i>Lactococcus lactis</i>

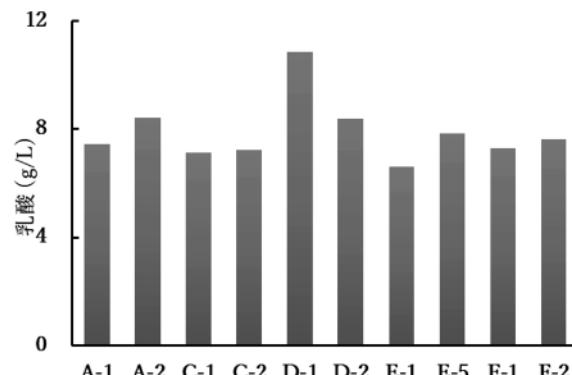


図2 分離菌株の乳酸生産量の比較（MRS培地）

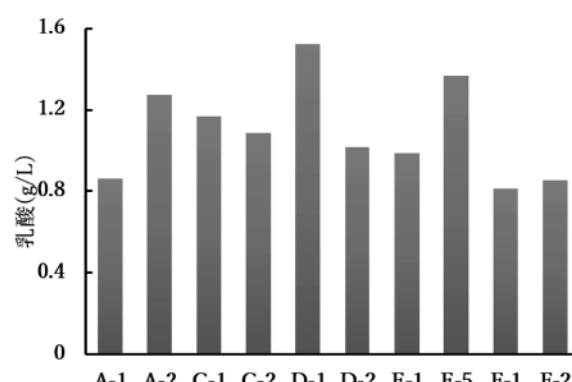


図3 分離菌株の乳酸生産量の比較（NE培地）

培地による培養液上清を用いたナチュラルキラー（NK）細胞の細胞障害活性の評価を行った。図4に示すように、*Latilactobacillus sakei* D-1株、*Lactococcus lactis* D-2株、*Lactococcus lactis* F-2株で有意に高い細胞障害性を示した。

NK細胞の細胞障害性を向上させた菌株のうち、NE培地での発酵性が最も高かった*Latilactobacillus sakei* D-1株と発酵性が比較的高かった*Lactococcus lactis* D-2株の2菌株を選抜し、それぞれの同種基準株である*Latilactobacillus sakei* NBRC15893^Tと*Lactococcus lactis* NBRC100933^Tを用いて、Kawashimaら⁽³⁾の方法に準じて、ヒト末梢血単核球（HPBMC）の抗体（Immunoglobulin A; IgA）産生能を指標とした機能性評価を行った。

その結果、図5に示すように*Latilactobacillus sakei* D-1株とその基準株は乳酸菌無添加区（none）と比較して特段のIgA濃度の増強は見られず、逆に高濃度でD-1株および

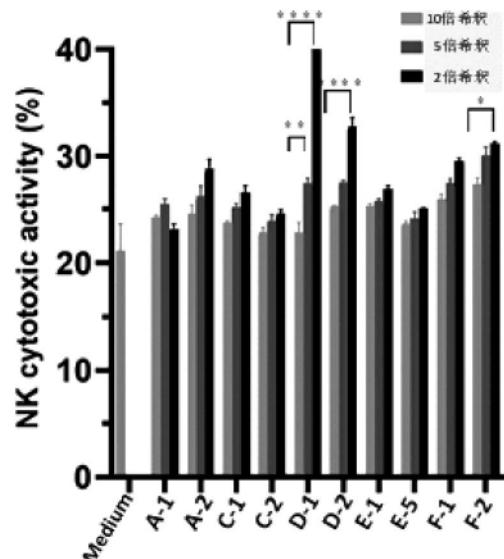


図4 NK細胞の細胞障害性
各乳酸菌の培養上清を希釈して細胞に添加した。
p<0.01, *p<0.0001 vs Medium

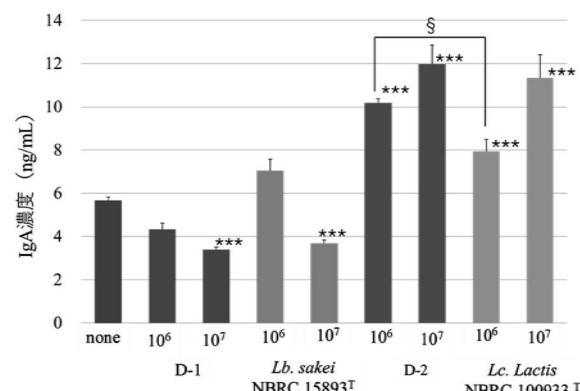


図5 乳酸菌による HPBMC の IgA 産生能に及ぼす影響

その基準株を添加すると IgA 濃度が低下することが示された。一方で、*Lactococcus lactis* D-2 株とその基準株では、 10^7 及び 10^6 CFU/well の添加量で乳酸菌無添加に比べ有意に高い IgA 濃度を示し、2 株を高濃度で添加すると IgA 濃度が増強することが認められた。さらに、 10^6 CFU/well の濃度で添加した D-2 株については、同濃度で添加した基準株と比較して有意に高い IgA 濃度を示した。以上の結果から、供試菌株間での比較において、*Latilactobacillus sakei* と比較して *Lactococcus lactis* がより顕著な IgA 産生能を示した。特に、生海苔由来分離株である *Lactococcus lactis* D-2 株において、最も高い IgA 産生能が認められた。乳酸菌の細胞形態の違いが IL-12 産生誘導能に影響を及ぼすことが過去に報告されている⁽⁴⁾。また近年、乳酸菌の免疫賦活作用は、乳酸菌の菌体表層成分と免疫細胞表層との相互作用により発現することが多いということが明らかとなりつつある⁽⁵⁾⁽⁶⁾。このことから、乳酸桿菌である *Latilactobacillus sakei* と球菌である *Lactococcus lactis* では細胞の形態や菌体表層成分が異なることにより、免疫細胞との相互作用様式に違いが生じ、それが免疫応答、すなわち IgA 産生能の差異として現れた可能性が考えられる。

また、本研究において新たに見い出された *Lactococcus lactis* D-2 株の顕著な IgA 産生能は、生海苔由来乳酸菌の新たな機能性を示唆するものである。さらに、本菌株は生海苔という食経験の豊富な食材から分離された乳酸菌であることから、食品の安全性という観点からも有望な機能性乳酸菌としての有効利用が期待できる。

・考察と展望

乳酸菌は、現在までに 400 種近くが命名され、その一部は食品の保存性や風味の向上のために古来より利用されてきたが、はプロバイオティクス（整腸作用）や免疫賦活作用などの生理機能性も見出され、ヒトの健康維持や体調改善に貢献している。本研究では、低品質の海苔の付加価値向上を目指して、生海苔から海苔の発酵性が高い乳酸菌株を初めて単離し、その同定に至った。同定した乳酸菌のなかでも *Latilactobacillus sakei* D-1 株は、海苔を最もよく発酵し、海苔由来の発酵食品の生産に適していると考えられた。一方、D-1 株にも NK 細胞の障害性向上作用が見られたが、HPBMC の IgA 抗体産生能は *Lactococcus lactis* D-2 株の方が強く、その作用は D-2 の基準株を凌駕するものであった。したがって、海苔発酵食品を機能性食品として商品化するには機能性が高い D-2 株を使用する方が好ましいと考えられる。最近では乳酸菌の整腸作用だけでなく、免疫調節作用も報告されており、HPBMC の IgA 產生に働きかける乳酸菌としてはすでに *Pediococcus acidilactici*

K15 株が報告されている。*Pediococcus acidilactici* K15 株の HPBMC 活性化作用は、菌体を構成する成分が HPBMC に作用することが明らかとなっているが、我々が見出した *Lactococcus lactis* D-2 株の HPBMC 活性化作用のメカニズムは現段階では明らかでない。今後は免疫賦活の作用メカニズムの解明が重要である。あわせて、有明海沿岸域が抱える色落ち海苔の問題解決に貢献し、地域産業や人々の暮らしを支える視点が必要不可欠であると考える。本乳酸菌や乳酸菌で発酵させた新規海苔発酵食品が実用化され、サステナブルな未利用資源の有効活用や新産業創出に結実することを強く期待するものである。

3. 謝辞

本研究は第5回農芸化学中小企業产学・連携研究助成金にて実施いたしました。助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。乳酸菌の分離源としての生海苔の摘採にご協力いただいた佐賀大学農学部・川村嘉応特任教授、機能性評価試験にご協力いただいた佐賀大学農学部・川添嘉徳准教授、佐賀県工業技術センター食品コスメ部・柘植圭介部長、岩元彬博士および佐賀大学医学部・末岡榮三郎教授、中村秀明助教、さらに事業化に向けてご協力いただいた佐賀海苔加工品輸出協議会の皆様に深謝いたします。

4. 成果報告および参考文献

口頭発表

- 木下千鶴、柘植圭介、川添嘉徳、後藤正利、小林元太。有明海産生ノリからの新規乳酸菌の分離。第28回日本生物工学会九州支部佐賀大会。2022年12月3日
- 木下千鶴、藤井佳奈、後藤正利、小林元太。佐賀大学におけるバイオリファイナリーを通じた地域貢献。みえバイオリファイナリー研究会公開セミナー。2023年12月22日
- 藤井佳奈、木下千鶴、柘植圭介、岩元彬、高橋勝則、後藤正利、小林元太。有明海産生ノリ由来乳酸菌の機能性評価。日本農芸化学会2024年度西日本支部大会。2024年9月20日

特許出願

- 発明者：柘植圭介、岩元彬、小林元太、高橋勝則、北村和秀、江口浩介、松尾修、原口武大、権藤宏常、吉賀正弘
発明の名称：乳酸菌及び乳酸菌を含有する組成物、並びに海苔発酵物の製造方法、海苔発酵物及び海苔発酵物を含有する組成物
出願番号：特願2023-145792

公開番号：特開2024-80596

出願日：2023年9月8日

公開日：2024年6月13日

参考文献

- 1 Kobayashi G., et al., A novel type II restriction endonuclease from *Leuconostoc mesenteroides* in the Ariake sea, Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria, 19, 96–99, 2008
- 2 Baba S., et al., Isolation of sake yeast strains from Ariake Sea tidal flats and evaluation of their brewing characteristics, The Journal of General and Applied Microbiology, 68, 30–37, 2022
- 3 Kawashima T., et al., The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici* K15 and the clinical impact in a randomized trial, Scientific Reports, 8, 5065, 2018
- 4 Kawamoto-Miyamoto N., et al., Glutamate in the medium of *Lactiplanibacillus plantarum* FL-664 affects the production of IL-12 (p40) on murine spleen cells, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 86, 535–542, 2022
- 5 Kurata A., Membrane vesicles released by lactic acid bacteria, Japanese Jornal of lactic Acid Bacteria, 33, 179–185, 2022
- 6 Lee IC., et al., The quest for probiotic effector molecules: Unraveling strain specificity at the molecular level, Pharmacological Research, 69, 61–74, 2013

「VHH抗体の選別と生産を一貫して行える宿主ベクター系の開発」

研究代表者 鳥取大学工学部 鈴木宏和

中小企業研究責任者 株式会社プロテイン・エクスプレス 渡辺俊介

1. 背景：企業からの説明

抗体は対象物質への結合能をもったタンパク質で、学術分野や診断医療分野などで幅広く活用される。その中でもラクダ科動物の重鎖抗体から開発されたVHH抗体は、一般的なIgG抗体より小型かつ安定性に優れ、微生物で生産しやすいといった長所をもつ。(株)プロテイン・エクスプレスでは、ブレビバチルス菌を利用した組換えタンパク質の生産を受託しているが、その一環としてVHH抗体のスクリーニングと生産も手掛けている。スクリーニングでは、変異ライブラリから発現するVHH抗体を無細胞翻訳系で粒子表面に提示させ、その中から目的とするVHH抗体を選び出す。つづく生産工程では、ブレビバチルス菌を宿主としてVHH抗体を分泌生産させる。ところが困ったことに、スクリーニングで決定されたVHH抗体がブレビバチルス菌で生産されにくいという不具合が往々にして起こる。対象タンパク質によって生産効率は変動するものなので、この不具合はスクリーニング宿主と生産宿主を一致させることで改善されると考えている。

好熱菌(*Geobacillus thermodenitrificans* K1041)を宿主とした組換えタンパク質生産技術が、代表者である鈴木先生により開発された。当該技術の導入を検討する過程では、K1041株を宿主として変異ライブラリを構築できること、ならびにVHH抗体の生産が可能であることも見出された。このことからK1041株を宿主としたVHH抗体の細胞表層提示系が確立できれば、スクリーニングから生産までの宿主をK1041株に統一できると期待した。この期待から鈴木先生に相談し、本事業に応募した。本研究の成果から、ソルターゼ反応を利用してVHH抗体の表層

提示ができることが示唆された。提示効率が低く更なる改良が必要だが、提示効率の向上が達成できれば、VHH抗体事業にK1041株を活用できると期待している。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

*Geobacillus*属細菌は、中等度好熱性のグラム陽性桿菌で、常温から60°Cあたりで良好に生育する。代表者は*Geobacillus*属細菌の遺伝子改変技術を確立し、それら技術を活用しながら*Geobacillus*属細菌の「強み」を研究してきた。その過程では、本菌群がタンパク質生産能に優れていることを見出し¹、強力なプロモーターや扱いやすい宿主(K1041株)なども開発してきた^{2,3}。関連技術は、(株)プロテイン・エクスプレスで実装されている。その際には、K1041株でモデルVHH抗体(抗GFP-VHH)が分泌生産されることを確認した。よってK1041株を宿主としてVHH抗体をスクリーニングできれば、VHH抗体のスクリーニングと生産をK1041宿主に統一できる可能性がある(図1A)。さらにK1041株では分泌される内在性タンパク質(タンパク質分解酵素を含む)が少ないため、表層提示されたVHH抗体が安定に維持されること、また生産されたVHH抗体の精製が容易であることも想定できた。加えて高温培養であることから、構造不安定なVHH抗体をスクリーニング段階で排除できる効果も期待された。K1041株をVHH抗体事業に活用することを目的とし、本研究ではVHH抗体のスクリーニングに必要な技術「VHH抗体の細胞表層提示法」の開発に取り組んだ。

タンパク質を細胞表層に提示させる方法はいくつかあるが、グラム陽性菌に有効な手法にソルターゼを用いたもの

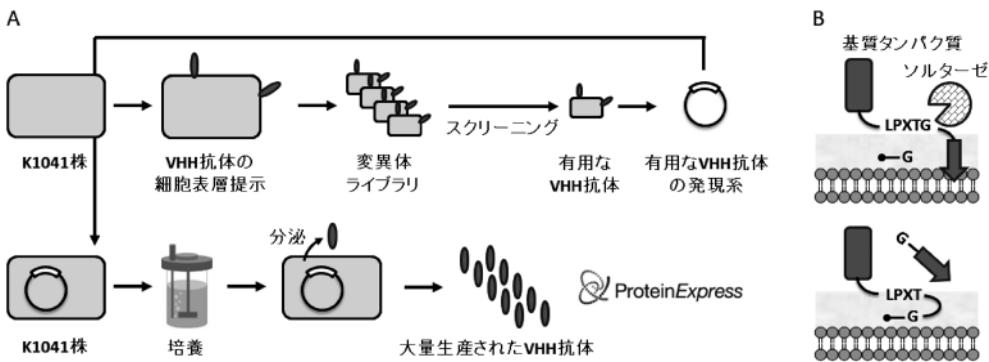


図1 本研究の目的

(A)VHH抗体のスクリーニングと生産を同一宿主（K1041株）で行うことを目指している。その達成には、K1041株の細胞表層にVHH抗体を提示させる技術が必要である。(B)ソルターゼの原理。黄色ブドウ球菌のソルターゼAは、基質タンパク質のLPXTG配列を認識し、TG間を切断しながらペプチドグリカン合成単位のグリシン残基に共有結合させる。その合成単位がペプチドグリカンに取り込まれることで、表層提示が完了する。

がある。ソルターゼは細胞表層に局在する酵素で、基質の表層提示タンパク質を細胞壁に共有結合させることができる。黄色ブドウ球菌のソルターゼAは古くから研究されており、その基質タンパク質にはLPXTG配列が含まれる。ソルターゼはTG間を切断、つづいてペプチドグリカン合成単位に含まれるグリシン残基に上流部分を転移する。その生成物がペプチドグリカンに取り込まれることで、基質タンパク質の表層提示が完了する（図1B）。K1041株のゲノム配列を調べると、2つのソルターゼ遺伝子（*srt1*と*srt2*）が見出された。*srt1*の上流には基質と思われる表層提示タンパク質の遺伝子（*csp1*）があり、Csp1のC末端側にはLPKTA配列と細胞膜挿入ドメインがあった（図2A）。*srt2*の上流にも表層提示タンパク質の遺伝子（*csp2*）があり、Csp2のC末端側にもLPDTA配列と細胞膜挿入ドメインがあった。またCsp1とCsp2のN末端領域には、推定分泌シグナルが見出された。以上の情報から、Csp1とCsp2はソルターゼ依存的にK1041株の細胞表層に提示されるタンパク質と予想した。

抗GFP-VHHをモデルにしながら、Csp1もしくはCsp2を利用したVHH抗体表層提示を検討した。そのために、抗GFP-VHHとCspの融合タンパク質を生産する好熱菌発現ベクターを構築した。融合タンパク質は、N末端にCsp分泌シグナルを、C末端にLPXTA配列と細胞膜結合ドメインを連結した構造とした。細胞膜挿入ドメインに細胞毒性があるためか、構築できない発現ベクターもあった。それらについては、プロモーターの強度を下げるか、細胞膜挿入ドメインを削ることで対応した。結果的に構築できた発現ベクターを表1にまとめる。各ベクターをK1041株に導入し、形質転換体を55°Cで培養した。培養液上清に分泌生産された融合タンパク質をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリラミドゲル電気泳動で分析すると、高強

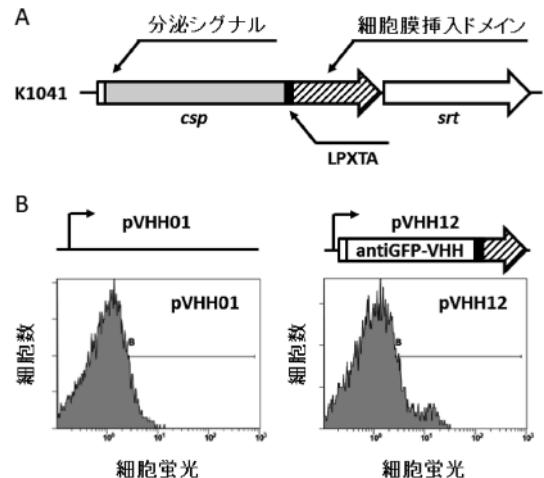


図2 K1041株のソルターゼを利用した抗GFP-VHHの提示
(A)K1041株のソルターゼ遺伝子（*srt*）は表層提示タンパク質の遺伝子（*csp*）とクラスターを形成している。類似したカセットはゲノム上の2カ所で見出された（*csp1-srt1*と*csp2-srt2*）。CspのN末端には分泌シグナルが、C末端には細胞膜挿入ドメインがあった。細胞膜挿入ドメインの上流には、ソルターゼの認識配列と思われるLPXTA配列が含まれていた。(B)K1041株における抗GFP-VHH表層提示。陰性コントロールベクター（pVHH01）もしくは抗GFP-VHH発現ベクター（pVHH12）をもつK1041細胞とGFPを混合し、蛍光フローサイトメトリーで分析した。

度のプロモーターを使用した場合に生産が確認できた。K1041株で生産された抗GFP-VHHが機能的であること（GFP結合能をもっていること）は、常法にしたがい確認した。抗GFP-VHHが細胞表層に結合しているかは、GFPに晒した細胞を蛍光フローサイトメトリーに供することで分析した。GFPの非特異的吸着が多かったため、GFPに晒した後に細胞を洗浄する必要があった。細胞蛍光の上昇は小さく、また上昇した細胞割合も低かったが、幾つかの発現系においてGFP結合を示唆する結果が得られた

表1 抗GFP-VHH表層提示ベクターの構築と評価

ベクター	プロモーター	分泌シグナル	認識配列	挿入ドメイン	分泌生産	表層提示
pVHH01	gk704			—	—	—
pVHH10	gk704	SS1	LPKTA	—	+	—
pVHH11	gk704	SS1	LPKTA	AN1 (9)	+	+
pVHH12	gk704	SS1	LPKTA	AN1 (16)	+	++
pVHH13	<i>sigA</i>	SS1	LPKTA	AN1 (35)	—	+
pVHH14	<i>rpoB</i>	SS1	LPKTA	AN1 (35)	—	+
pVHH24	gk704	SS1	LPDTA	AN2 (36)	+	+

プロモーターには、発現効率が高いもの (gk704) と低いもの (*sigA* と *rpoB*) を使用した。SS1は、Csp1由来の分泌シグナルを示す。AN1はCsp1由来の細胞膜挿入ドメイン（全長35アミノ酸残基）を示し、必要に応じて一部を使用した。カッコ内の数字は、使用した挿入ドメインのアミノ酸残基数を示す。AN2は、Csp2由来の細胞膜挿入ドメイン（全長36アミノ酸残基）を示す。プラスは検出されたことを、マイナスは検出されなかったことを示す。

(表1)。解析データの一部を図2Bに示す。細胞蛍光の上昇が小さい理由は、細胞当たりの抗GFP-VHH提示数が少ないと帰属できた。上昇した細胞割合が小さい理由は、提示反応の不安定性を暗示した。

提示効率が低い原因としては、ソルターゼの力価が足りない点が考えられる。そこで今後はソルターゼを大腸菌pETシステムなどで高生産させ、抗GFP-VHHを分泌生産するK1041細胞に外因ソルターゼを晒す方法を検討する。この場合、K1041株のソルターゼに拘る必要はないかもしれません。K1041株のソルターゼに加えて、黄色ブドウ球菌や乳酸菌のソルターゼが候補に挙げられる。後者のソルターゼは耐熱性ではないが、機能性が確約されているという強みがある。またソルターゼを使用しない細胞表層提示も検討の余地がある。抗GFP-VHHのC-末端領域にLysMやペプチドグリカン結合ドメインを連結することで、抗GFP-VHHの細胞表層提示ができるかも検討したい。結合が非共有結合という弱点はあるが、結合力次第では有望な手法と思われる。

本研究では、VHH抗体のスクリーニング法も検討した。モデルとして抗GFP-VHHを細胞表層に提示するK1041株と非提示細胞を混合し、得られた混合細胞から抗GFP-VHH提示細胞を濃縮する工程を検討した。そのためにヒスチジンタグを融合したGFPを調製し、ヒスチジンタグ結合性の磁気ビーズに結合させた。そこに混合細胞を添加し、磁気ビーズを磁石で集積させた。これにより抗GFP-VHH提示細胞が特異的に濃縮されると期待した。しかし

磁気ビーズに対する細胞の非特異的吸着が強く、期待したような濃縮は観察されなかった。磁気ビーズの変更ならびに細胞の洗浄方法も検討したが、抗GFP-VHH提示細胞が再現性良く濃縮される工程は確立できなかった。この課題については、VHH抗体の提示効率を向上させてから再検討する予定である。以上で得られた成果は、日本農芸化学会支部講演会で発表した⁴。

3. 謝辞

本研究は、農芸化学中小企業产学・産官連携研究助成を受けて行いました。ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

- Kurashiki R, Mizuno T, Murata K, Ohshiro T, Suzuki H. A plasmid vector that directs hyperproduction of recombinant proteins in the thermophiles *Geobacillus* species. *Extremophiles* 24, 147–156 (2020)
- Koyama K, Mikawa Y, Nakagawa S, Kurashiki R, Ohshiro T, Suzuki H. New platform for screening genetic libraries at elevated temperatures: biological and genomic information and genetic tools of *Geobacillus thermodenitrificans* K1041. *Appl. Environ. Microbiol.* 88, e0105122 (2022)
- Kurashiki R, Koyama K, Sakaguchi Y, Okumura Y, Ohshiro T, Suzuki H. Development of a thermophilic host-vector system for the production of recombinant proteins at elevated temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 107, 7475–7488 (2023)
- 小野達哉、大城隆、鈴木宏和. ソルターゼを用いたVHH抗体の好熱菌細胞表層提示. 日本農芸化学会中四国支部第71回講演会 (2025年6月14日)

「独自の人工結合タンパク質創生技術を基盤とする創薬標的の構造解析支援システム」

研究代表者 京都府立大学大学院・准教授 田中俊一
研究分担者 立命館大学大学院・教授 松村浩由
中小企業研究責任者 株式会社創晶 安達宏昭

1. 背景：企業からの説明

・背景、事業課題

当社（株式会社創晶）は、製薬企業や研究機関から依頼を受け、タンパク質の結晶化を通じた構造解析支援サービスを提供しています。しかし実際の解析現場では、「標的タンパク質が不安定で結晶化できない」「分子量が小さくCryoEM解析が困難」「分子配向や構造の不均一性により高分解能が得られない」などの技術的課題が頻繁に発生しており、従来技術だけでは対応できない状況が増えています。

・大学との連携研究の具体的内容

こうした課題を抜本的に解決する手段として、京都府立大学・田中俊一准教授が開発した人工結合タンパク質（モノボディ、Monobody）創生技術に注目しました。同技術は、小型で高親和性の人工結合タンパク質を設計・取得し、標的タンパク質と結合させることで、構造解析上の諸問題を克服できる可能性のある有効な手法です。実際に、田中准教授、立命館大学・松村浩由教授らとの共同研究において、解析困難だったタンパク質の結晶化やCryoEM解析に成功した事例も確認されています。そこで、同先生方に相談し、本事業を通じて技術実証を進めることとしました。

・成果による事業への期待効果

本研究では、実際に複数の標的タンパク質に対して構造解析に成功しました。これらの成果は、当社の既存の結晶化サービスに新たな付加価値を与え、より広範な解析ニーズに応える独自サービスの確立につながると考えています。将来的には、構造解析だけでなく、バイオ医薬や酵素利用など幅広い産業分野への応用展開も見込んでおり、事業の持続性向上と雇用拡大にも大きく寄与すると期待しています。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

本研究は、代表者がこれまでに開発してきた人工結合タンパク質創生技術を基盤とするものである。本技術は、鑄

型骨格に変異ライブラリを導入し、ファージディスプレイおよび酵母表層ディスプレイ法を併用することで、標的タンパク質に特異的に結合する人工タンパク質を高効率で取得可能とする¹⁾。過去の研究では、同技術を用いて様々な結合分子を創出し、分子認識や酵素機能制御^{2,3)}、さらには構造解析支援ツールとしての可能性を実証してきた⁴⁾。これらの成果をもとに、本研究では創薬標的タンパク質の構造解析における諸課題（結晶化困難、小分子の解析限界、構造不均一など）を克服する手段として、本技術の応用可能性を検討した。

・研究の詳細

本研究では、創薬標的タンパク質として、アデニル酸キナーゼやATP-Binding Cassette (ABC) トランスポーター、スーパーオキシドジスマターゼなど複数種類を対象に、それぞれに対して特異的に結合するモノボディの作製を行った。得られたモノボディを標的タンパク質と複合化させ、X線結晶構造解析およびクライオ電子顕微鏡(CryoEM)による構造解析を実施した。その結果、いずれのケースにおいても高分解能での構造解析が実現できた(図1)⁵⁻¹⁰⁾。CryoEMでは分子量が小さいため解析が困難だった標的においても、モノボディ結合により高次構造化が促されて解析可能性を示唆する結果が得られた。さらに、CryoEMグリッド上での分子配向制御技術の開発にも着手し、複数のエピトープに結合するモノボディを介して方向性の制御が可能であることを示唆する予備的なデータも得られた。

・考察と展望

本研究により、人工結合タンパク質が構造解析支援において極めて有用であることが明らかとなった。従来技術では困難であった標的タンパク質の構造解析に成功したことで、創薬研究や分子機能解明における新たなアプローチが提示されたと言える。今後は、CryoEM用モノボディの最適設計やグリッド固定化技術の高度化を進め、より汎用的

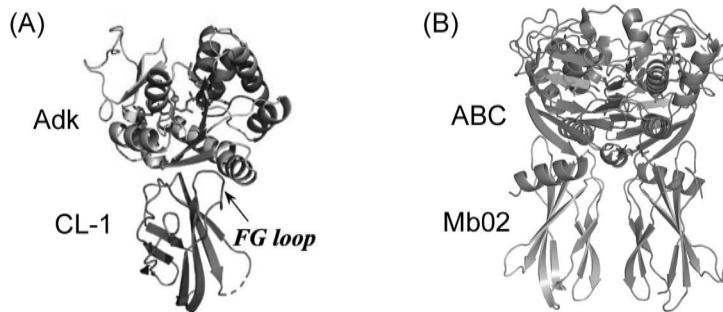


図1 創薬標的とモノボディとの複合体の結晶構造
(A) アデニル酸キナーゼ (Adk) とモノボディ (CL-1) の複合体構造⁵⁾.
(B) ABC トランスポーター (ABC) とモノボディ (Mb02) の複合体構造⁶⁻⁷⁾.

な解析支援ツールとして発展させていく予定である。また、構造解析に留まらず、タンパク質の安定化や機能制御を目的とした産業応用も視野に入れており、本技術の波及効果は大きいと期待される。

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、助成をいただきました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。創薬標的タンパク質の調製ならびに構造解析でご協力をいただきました奈良先端大学大学院 松尾貴史准教授、慶應義塾大学大学院 古川良明教授、東北大学大学院 斎藤芳郎教授に厚くお礼申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

- 1) Hiroshi Amesaka, Marin Tachibana, Mizuho Hara, Shuntaro Toya, Haruki Nakagawa, Hiroyoshi Matsumura, Azumi Hirata, Masahiro Fujihashi, Kazufumi Takano, Shun-ichi Tanaka: Heat-sterilizable antibody mimics designed on the cold shock protein scaffold from hyperthermophile *Thermotoga maritima*. *Protein Sci.* 34, e70018, 2025.
- 2) Shun-ichi Tanaka, Tetsuya Takahashi, Akiko Koide, Satoru Ishihara, Satoshi Koikeda, Shohei Koide: Monobody-mediated alteration of enzyme specificity. *Nat. Chem. Biol.* 11, 762–764, 2015.
- 3) Shun-ichi Tanaka, Tetsuya Takahashi, Akiko Koide, Riki Iwamoto, Satoshi Koikeda, Shohei Koide: Monobody-mediated alteration of lipase substrate specificity. *ACS Chem. Biol.* 13, 1487–1492, 2018.

- 4) Junso Fujita, Hiroshi Amesaka, Takuya Yoshizawa, Kota Hibino, Natsuki Kamimura, Natsuko Kuroda, Takamoto Konishi, Yuki Kato, Mizuho Hara, Tsuyoshi Inoue, Keiichi Namba, Shun-ichi Tanaka, Hiroyoshi Matsumura: Structures of a FtsZ single protofilament and a double-helical tube in complex with a monobody. *Nat. Commun.* 14, e4073, 2023.
- 5) Ibuki Nakamura, Hiroshi Amesaka, Satoshi Nagao, Naoki Orito, Shigeru Negi, Shun-ichi Tanaka, Takashi Matsuo: Binding mechanism of adenylate kinase-specific monobodies. *FEBS Lett.* in print 2025.
- 6) 岡本恵祐, 神谷友華, 雨坂心人, 松村浩由, 高野和文, 田中俊一: ABC transporter の非保存部位を標的とした抗体模倣分子による ABC transporter の基質排出能阻害. 第97回日本生化学大会, 2024年11月6日~8日, パシフィコ横浜ノース
- 7) 岡本恵祐, 神谷友華, 雨坂心人, 松村浩由, 高野和文, 田中俊一: 非保存部位特異的な人工結合タンパク質による ABC transporter の基質排出能阻害. 日本農芸化学会関西支部第530回講演会, 2024年5月31日, 京都府立大学 (優秀発表賞受賞)
- 8) Hiroshi Amesaka, Mizuho Hara, Yuki Sakai, Atsuko Shintani, Kaori Sue, Tomoyuki Yamanaka, Shun-ichi Tanaka, Yoshiaki Furukawa: Engineering a monobody specific to monomeric Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Protein Sci.* 33, e4961, 2024.
- 9) 堀 優貴, 雨坂心人, 原 瑞穂, 上原 了, 松村浩由, 古川良明, 田中俊一: 筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関する単量体Cu/Zn-superoxide dismutaseを高感度検出する人工プローブの開発. 第25回日本蛋白質科学会年会, 2025年6月18日~20日, アクリエひめじ
- 10) 梅 蓮弥, 雨坂心人, 越智杏奈, 高野和文, 三原久明, 斎藤芳郎, 田中俊一: セレノシステイン含有リコンビナントセレノプロテインPの大腸菌生産とその機能性評価. 第96回日本生化学大会, 2023年10月31日~11月2日, 福岡国際会議場

「ドライ熟成過程における肉の表層と内部の微生物菌叢と肉質の変化」

研究代表者 帯広畜産大学 生命・食料科学研究部門 三上 奈々
中小企業研究責任者 北一ミート株式会社 田村 健一

1. 背景：企業からの説明

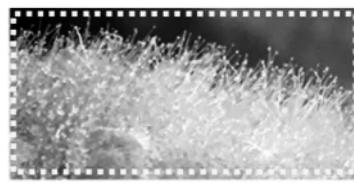
ドライ熟成肉 (Dry-aged beef: DAB) は、肉の表面を空気に晒し、温度・湿度が制御された熟成庫内で一定期間貯蔵して作る発酵食肉製品である。DAB の表面には「クラスト」と呼ばれる乾燥した硬い殻が形成され、そこに生育する真菌・細菌といった様々な微生物が風味を作り出すと考えられている。弊社の DAB では過去にクラストから接合菌（ケカビ類）の存在を確認しているが、それ以外の微生物に関する情報はほとんどなかった。このような背景より、熟成期間中の DAB の微生物叢や肉質の変化を明らかにするため、DAB 研究を実施可能な三上先生に相談し、本事業に応募することとした。

本事業の研究助成を頂き研究を遂行することで、DAB のクラストや内部の微生物の種類や菌数を把握でき、それらの安全性や生成される風味成分を評価することができた。また、DAB の基本的な製造条件である湿度などのパラメーターが微生物の生育に与える影響についても調べられた。これらの成果を踏まえ、DAB 製造期間中における微生物制御を介し、安全性の担保や品質の安定化に結び付けたいと考えている。

【1】ドライ熟成肉(DAB)の外観



【2】クラスト菌叢の拡大図



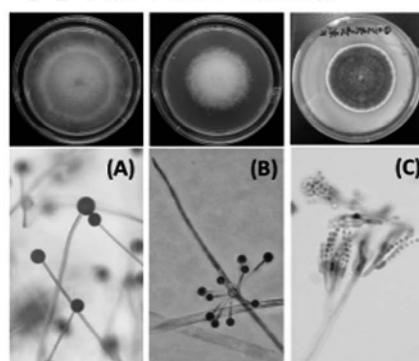
ケカビの菌糸が垂直に伸びている

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

研究代表者はこれまでに連携中小企業である北一ミート(株)の熟成庫内で製造された DAB のクラストに様々な微生物が生育することを確認し、その中でも真菌類のケカビ (*Mucor flavus* · *Helicostylum pulchrum*) やアオカビ (*Penicillium series Camembertiorum*)、酵母 (*Debaryomyces hansenii*) を同定してきた⁽¹⁾ (図1【1-3】)。加えて、*Staphylococcus* 属菌や *Pseudomonas* 属菌など様々な細菌類の存在も見出し、クラスト上の微生物のバリエーションは非常に多様であると考えられた。実際に我々は北一ミートの DAB のクラスト菌叢を接種した DAB にて、クラストの微生物が安定的に生育することも確認しており⁽²⁾、クラストの微生物叢が DAB 特有の香りや味わいの形成に深く関わる可能性を見出してきた。

一方、DAB のクラスト微生物は上述のように分離・同定され質的には評価されてきたものの、組成や菌量を示す量的な評価はほとんど行われていなかった。また、実際には DAB のクラストはトリミングして除去され内部だけが喫食されるため、食肉製品としては内部の微生物叢がどのような変遷を遂げているかにも着目する必要がある。

【3】単離・同定した微生物



(A) *Mucor flavus* (KT1a)
(B) *Helicostylum pulchrum* (KT1b)
(C) *Penicillium series Camembertiorum* アオカビ

生育を確認している細菌類



- ・コアグラーゼ陰性 *Staphylococcus* 属菌
- ・乳酸菌

図1. ドライ熟成肉 (DAB) のクラストの様子と生育する微生物

これらに加えて、熟成中のDABの呈味成分や香りの変化に関する報告はあるものの⁽³⁾、微生物叢と肉質成分の関わりは評価されていない。我々はこれまでの予備的検討で *M. flavus* や *H. pulchrum*などのケカビ類がプロテアーゼ活性を有する可能性や、蔵付き菌の接種の有無が肉内部の成分に影響する可能性があることを示唆してきた。そのため、本研究では、熟成過程におけるDABの表面（クラスト）と内部の微生物叢に着目し、その質的・量的な変化を調べる。併せて肉質成分への影響についても評価し、生育する微生物叢の役割を考察した。

DABの製造には約1kgのホルスタイン去勢牛ロース6ブロックを用い、北一ミート（株）の熟成庫内で製造されたDABのクラスト懸濁液（菌液）を噴霧した。小型熟成装置内に配置し、平均温度4.0°C、相対湿度69.2%の環境下で最大5週間まで熟成させた。肉ブロックは熟成期間中毎週1ブロックずつサンプリングし、クラスト菌叢のDNAより真菌はITS領域、細菌は16S rRNA領域の配列からメタゲノム解析を行った。

クラストより抽出されたDNAから真菌組成を調べると、過去に我々が同定した *H. pulchrum*, *M. flavus*, *Debaryomyces* 属が優占しており、多くの週でこの3菌株が全体の90%以上を占めていた（図2（A））。熟成0週目では *Chaetomium globosum* や *Trichosporon asahii*などの菌も見られたが、熟成1週目以降ではこれらの菌はほとんど見られなくなった。

一方、細菌組成は熟成期間を通して *Pseudomonas* 属が優勢であり、熟成0~5週全てに渡って全体の60%以上を占めていた。また、熟成期間の後半になると *Lactobacillales* の割合が増えている。熟成開始前（0週目）では菌液中からも検出された *Brevibacterium* 属の細菌が全体の10~30%ほどを占めていたが、熟成1週目には大きく減少した。

これらの結果より、DABに接種した微生物叢は熟成期間を通して大きな変化ではなく、真菌も細菌も接種時の優占菌がクラスト上の主要な菌として生育し続けることが示

された。

また、クラスト菌液を同様に牛ロースブロックに接種し、相対湿度を高湿度（80~95%）、中湿度（55~85%）、低湿度（35~85%）で5週間ドライ熟成したDABについても、クラストと内部の微生物について調べた。

図3に示すように、熟成中の湿度条件によってDABのクラストの外観が異なり、湿度が高いほど菌量が多いように見受けられた。統計的な有意差は見られなかったが、優占菌である *M. flavus* や *H. pulchrum* を含む低温系状菌では低湿度より高湿度で菌数が多い傾向があった。また、クラストと内部を比較すると圧倒的に内部では菌数が少なく、クラストと同様に内部でも湿度が高いほど菌数が多いことが示唆された。

図4には図3のDABにおけるクラストと内部の総遊離アミノ酸量（18種の合計）を示した。総遊離アミノ酸量は、ドライ熟成前と比べて5週間のドライ熟成で約2倍以上に増加していた。特に高湿度のクラストでは顕著に増え、ドライ熟成前の5倍以上となった。湿度による影響は、クラストで湿度が高いほど総遊離アミノ酸量が高い値となつた。一方内部では、高湿度では高くなるが中湿度と低湿度の間に差は認められなかった。これらは低温細菌数や酵母数と同様の傾向を示していたことから（図3）、遊離アミノ酸の増加は微生物の影響を大きく受けている可能性が示唆された。タンパク質からアミノ酸への代謝が促進されることを結果としてアンモニアなどの好ましくない物質の產生にもつながる可能性があるため、それらについても包括的に検討する必要があるが、DABのクラストや内部に生育する微生物がタンパク質代謝に関与し、DABの呈味成分に寄与する可能性が示唆された。

現在、我が国ではDABの製造基準や製品規格がなく、その製法は食肉加工業者にすべて委ねられている。そのため、DAB製品の安全性への懸念、品質の不安定性が課題となっている。今後も引き続きDABを製造する食肉加工業者である北一ミート（株）と協同し、DABの微生物叢や

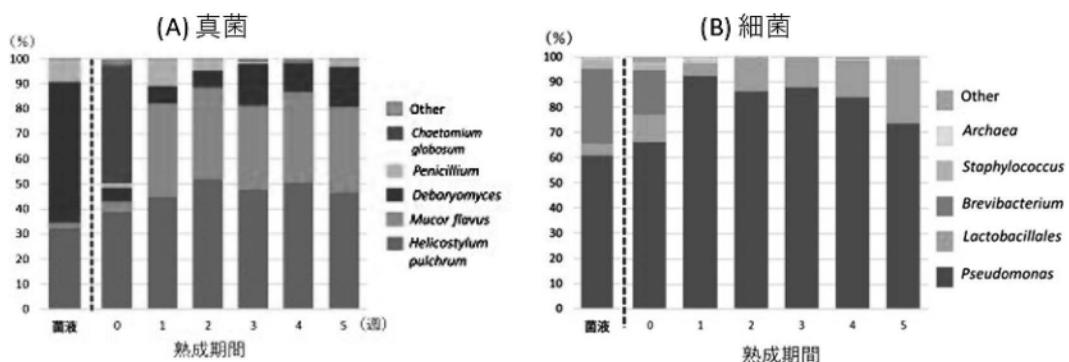


図2. DABの熟成中におけるクラストの微生物菌叢の変化

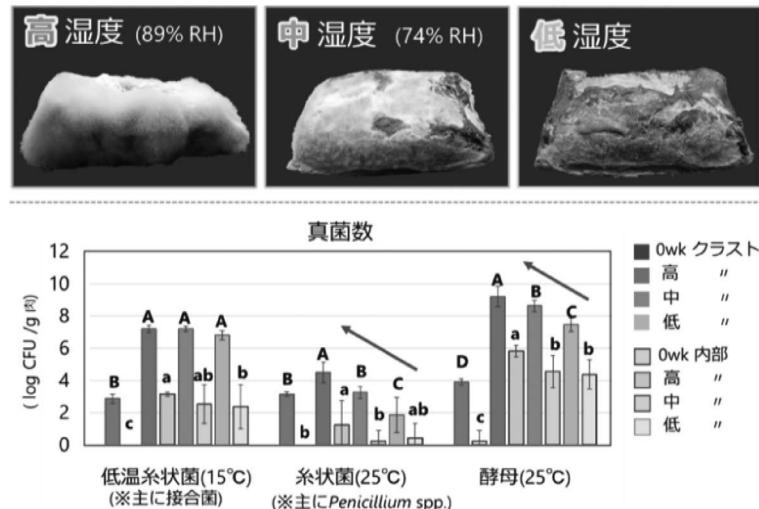


図3. 湿度条件の異なるDABのクラストと内部の微生物量の違い

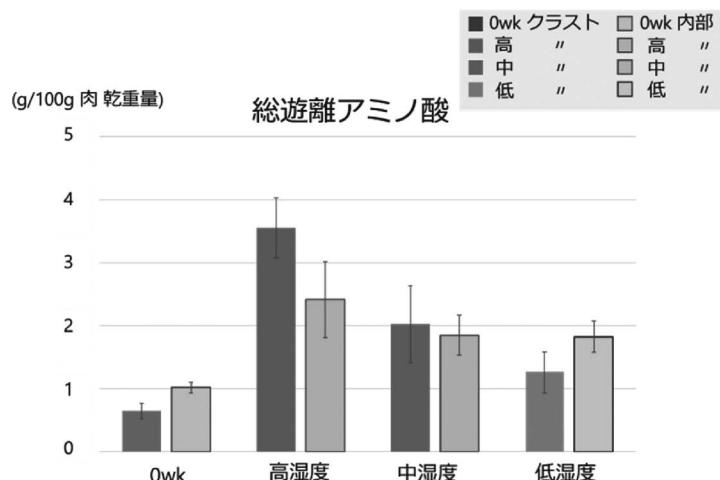


図4. 湿度条件の異なるDABのクラストと内部の遊離アミノ酸量の違い

肉質成分の挙動を明らかにすることで、安全性が高く均質で美味しいDAB製造のための制御要因を探査し、国内外の加工業者にも波及できるようなDABの基準を学術的に提案できることを考える。

3. 謝辞

本助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

【成果報告】

・鳥丸碧里、豊留孝仁、山崎夢々、山崎栄樹、平田真樹、森松文毅、田村健一、三上奈々. ドライ熟成肉に生育する細菌類のタンパク質・脂質分解活性の評価. 2023年度日本農芸化学会北海道支部 第2回学術講演会 2023年.

・鳥丸碧里、豊留孝仁、細野未紗、庄司陽織、田村健一、三上奈々. ドライ熟成肉のクラストにおける微生物叢の質的・量的な変化. 第77回日本栄養・食糧学会大会, 2023年.

・鳥丸碧里、豊留孝仁、田村健一、三上奈々. ドライ熟成中の湿度条件が牛肉の微生物学的品質に与える影響. 2024年度 日本農芸化学会大会, 2024年.

【参考文献】

- (1) Mikami N, Toyotome T, Yamashiro Y, Sugo K, Yoshitomi K, Takaya M, Han KH, Fukushima M, Shimada K. Dry-aged beef manufactured in Japan: Microbiota identification and their effects on product characteristics. *Food Res Int*. 2021; 140: 110020.
- (2) Mikami N, Toyotome T, Takaya T, Tamura K.

- Direct rub inoculation of fungal flora changes fatty acid composition and volatile flavors in dry-Aged Beef: A preliminary study. *Animals*. 2022; 12: 1391.
(3) Hanagasaki T, Asato N. Changes in free amino acid

content and hardness of beef while dry-aging with *Mucor flavus*: Changes in the quality of beef while dry-aging with *Mucor flavus*. *J Anim Sci Technol*. 2018; 60: 19.

「アクアポニックス農法による機能性野菜の創出」

研究代表者 新潟大学大学院自然科学研究科 山口智子
中小企業研究責任者 株式会社プラントフォーム 榎 康明

1. 背景：企業からの説明

株式会社プラントフォームでは、水産養殖と水耕栽培を統合したアクアポニックス技術を活用し、養殖魚（チョウザメ）の排泄物を肥料源とする水耕栽培に取り組んでいる。当社を含むアクアポニックス農園の多くは化学肥料や化学農薬を使用しない有機栽培に準じた方法で農作物の生産をしているが、水耕栽培は有機認証の対象外となっているため、「有機」や「オーガニック」といった表示を行うことができないという課題があった。そのため、有機認証に代わる付加価値の創出が求められていた。当社の栽培野菜は鮮やかな発色が特徴で、ポリフェノール等の機能性成分を多く含むことが予想されたため、機能性野菜としての高付加価値化の可能性について検証すべく、農作物の高付加価値化に造詣の深い新潟大学の山口智子先生に相談し、本事業に応募することとした。

本事業によって、アクアポニックス野菜には栄養成分・機能性成分が豊富に含まれていることが明らかとなり、成果の一部を活用し、アクアポニックス産農作物としては全国初となる栄養機能食品としての商品化を実現することができた。今後も本研究で得られた知見を活用し、更なる栄養・品質の向上に向け、研究を進めてまいりたい。

2. 研究成果：大学からの研究成果報告

・研究に関する背景

アクアポニックスは持続可能な食料生産システムとして注目されており、近年、国内で急速に普及している。これまで、アクアポニックスの生産性については多くの議論がされてきたが、栄養機能等に関する知見は限られていた。慣行栽培と比較し、有機栽培作物は一部ビタミンやポリフェノール等の抗酸化成分が多いことが報告されており¹⁾、有機水耕栽培であるアクアポニックスにおいても抗酸化成分等による高付加価値化の可能性が考えられた。そこで、株式会社プラントフォームのアクアポニックスプランツで栽培されている野菜を対象に栄養・機能性成分の評価を行い、機能性野菜とし

ての高付加価値化の可能性について検討を行った。

・研究の詳細

研究①：リーフレタスの栄養・機能性成分の評価

2023年春にアクアポニックスプランツで栽培・収穫された葉色の異なる4系統のリーフレタス（緑系：グリーンウェーブ、チマサンチュ；赤系：レッドファルダー、ワインドレス）について、主要栄養成分、ビタミン（V.A, V.C, V.E, V.K, 葉酸）、ミネラル（K, Ca, Mg, Fe, Zn）、硝酸塩、ポリフェノール（アントシアニン、クロロゲン酸、総ポリフェノール）、および抗酸化活性を測定した。本研究に先立ち、2022年夏から2023年冬にかけての3季節にわたって同様の評価を実施しており、以下に、それらを含めた4季節分の主な知見について報告する。

1) ビタミン

品種、季節は分析した全てのビタミン含量に有意な影響を及ぼし、V.C, V.E, 葉酸には有意な交互作用が認められた（表1）。V.C, V.K, 葉酸は、慣行農法のリーフレタスと比較し高含有しており、特に、V.Kと葉酸は栽培季節によって変動はあるものの、栄養機能食品制度の水準を満たすことが明らかとなった（表2）。

2) ミネラル

いずれのミネラルも品種間差は認められず、カルシウムを除き、有意な季節の影響が認められた（表3）。カリウムは正常な血圧を保つのに必要な栄養素であり、栄養機能食品制度では840 mg以上で栄養機能を表示することができる。本研究では、新鮮重量100 g当り366~1,074 mgと大きく変動し、夏季に最大のカリウム濃度を示した。アクアポニックスでは養殖飼料が栽培植物の主要な栄養素となっており、植物に必要な栄養素のほとんどが養殖飼料から共有される。一方、カリウム、鉄、カルシウムといった養殖飼料にほとんど含まれていない栄養素については欠乏することが多く、一般的にはこれらミネラルの追肥が行われている²⁾。本研究においても、カリウムと鉄の追肥が行われており、特に、鉄含量については追肥による水耕液中

表1. レタスの葉のビタミン含量に対する品種および季節の影響

Source of Variance	Vitamin A (μg RAE/100 g)	Vitamin C (mg/100 g)	Vitamin E (mg/100 g)	Vitamin K (μg/100 g)	Folic acid (μg/100 g)
Cultivar					
Green wave (GW)	111.6 ± 39.4 bc	15.9 ± 2.7 c	0.8 ± 0.2 b	130.3 ± 24.3 b	95.8 ± 19.0 d
Chimasanchu (CS)	146.0 ± 34.7 a	18.8 ± 3.7 b	0.8 ± 0.2 b	155.0 ± 18.3 a	111.6 ± 13.5 b
Red falder (RF)	90.4 ± 32.6 c	16.8 ± 2.3 c	0.8 ± 0.2 b	136.7 ± 16.7 b	104.1 ± 19.9 c
Winedress (WD)	124.1 ± 18.1 ab	23.3 ± 4.9 a	1.4 ± 0.2 a	129.1 ± 21.2 b	124.4 ± 13.0 a
p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Season					
Summer	96.0 ± 23.2 c	21.2 ± 4.3 a	1.1 ± 0.3 a	130.8 ± 22.3 bc	102.5 ± 16.3 c
Autumn	110.4 ± 45.1 bc	19.1 ± 3.8 b	0.9 ± 0.4 c	140.0 ± 13.5 b	113.6 ± 23.6 b
Winter	128.1 ± 41.0 ab	20.3 ± 4.1 ab	0.7 ± 0.3 d	121.9 ± 21.3 c	98.0 ± 18.2 c
Spring	137.6 ± 23.3 a	14.0 ± 1.6 c	1.0 ± 0.2 b	158.3 ± 14.0 a	121.8 ± 7.4 a
p-value	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Cultivar × Season					
GW-Summer	86.8 ± 31.2	19.4 ± 0.4 a	1.0 ± 0.1 a	143.3 ± 20.8	85.9 ± 9.9 b
-Autumn	112.5 ± 11.7	15.3 ± 1.2 bc	0.5 ± 0.0 c	126.7 ± 11.5	113.0 ± 7.0 a
-Winter	129.8 ± 77.0	16.4 ± 0.8 ab	0.6 ± 0.1 bc	101.3 ± 16.3	72.8 ± 8.0 b
-Spring	117.3 ± 7.3	12.3 ± 0.7 c	0.8 ± 0.1 ab	150.0 ± 17.3	111.7 ± 3.1 a
CS-Summer	100.5 ± 28.5	21.2 ± 2.6 a	1.0 ± 0.2 a	146.7 ± 28.9	96.1 ± 13.7 b
-Autumn	152.8 ± 27.8	18.6 ± 1.6 a	0.7 ± 0.1 b	156.7 ± 5.8	119.7 ± 6.9 a
-Winter	161.5 ± 18.5	21.6 ± 2.3 a	0.7 ± 0.2 b	143.3 ± 11.5	107.7 ± 9.9 ab
-Spring	169.2 ± 18.2	13.8 ± 1.7 b	0.8 ± 0.1 ab	173.3 ± 5.8	122.8 ± 1.7 a
RF-Summer	85.3 ± 7.7	17.0 ± 1.6	0.9 ± 0.1 ab	120.0 ± 10.0	105.8 ± 8.6 b
-Autumn	44.7 ± 3.1	18.0 ± 2.1	0.7 ± 0.1 bc	136.7 ± 11.5	79.9 ± 0.6 c
-Winter	102.1 ± 5.0	17.9 ± 2.8	0.5 ± 0.1 c	133.3 ± 15.3	99.7 ± 10.1 b
-Spring	129.4 ± 9.2	14.2 ± 0.3	1.0 ± 0.1 a	156.7 ± 5.8	131.0 ± 2.5 a
WD-Summer	111.4 ± 20.5	27.5 ± 0.1 a	1.5 ± 0.1 a	113.3 ± 11.5	122.3 ± 4.3 b
-Autumn	131.4 ± 20.7	24.4 ± 2.1 a	1.6 ± 0.1 a	140.0 ± 0.0	141.9 ± 2.5 a
-Winter	119.1 ± 12.1	25.4 ± 2.6 a	1.1 ± 0.1 b	109.7 ± 10.5	111.7 ± 13.3 b
-Spring	134.3 ± 17.0	15.8 ± 1.3 b	1.4 ± 0.2 a	153.3 ± 15.3	121.5 ± 2.3 b
p-value	0.0853	< 0.01	< 0.001	0.1048	< 0.001

RAE, retinol activity equivalent.

Different letters within each column indicate significant differences according to Shaffer's Modified Sequentially Rejective Bonferroni Procedure.
All data are expressed as mean ± standard deviation.

表2. 栄養機能食品制度におけるビタミンの基準とリーフレタス中のビタミン含量

Vitamin	Specified Range of nutritional ingredient of the advisable daily intake	Vitamin concentrations in fresh lettuce leaves (/100 g)			
		GW	CS	RF	WD
Vitamin A (μg)	231–600	111.6 (43.1–190.2)	146.0 (70.8–180.0)	90.4 (41.8–137.6)	124.1 (97.2–149.3)
Vitamin C (mg)	30–1,000	15.9 (11.8–19.8)	18.8 (12.1–23.8)	16.8 (13.9–21.2)	23.3 (14.6–27.7)
Vitamin E (mg)	1.98–150	0.8 (0.5–1.1)	0.8 (0.5–1.2)	0.8 (0.4–1.0)	1.4 (1.0–1.6)
Vitamin K (μg)	45–150	130.3 (90–170)	155.0 (130–180)	136.7 (110–160)	129.1 (99–170)
Folic acid (μg)	72–200	95.8 (67.8–119.1)	111.6 (85.3–124.1)	104.1 (79.3–133.3)	124.4 (96.9–144.8)

The specified nutrient range for "Foods with Nutrient Function Claims" and the vitamin content of leaf lettuce in this study.
The vitamin content of leaf lettuce was shown as an average value, with the minimum and maximum values also provided.

表3. レタスの葉のミネラル含量に対する品種および季節の影響

Source of Variance	Potassium (mg/100 g)	Calcium (mg/100 g)	Magnesium (mg/100 g)	Iron (mg/100 g)	Zinc (mg/100 g)
Cultivar					
Green wave (GW)	629 ± 252	62.0 ± 18.4	22.4 ± 7.6	0.66 ± 0.38	0.21 ± 0.09
Chimasanchu (CS)	542 ± 193	52.8 ± 17.8	21.9 ± 8.7	0.74 ± 0.40	0.21 ± 0.09
Red falder (RF)	567 ± 372	57.8 ± 28.3	22.9 ± 10.5	0.62 ± 0.38	0.24 ± 0.12
Winedress (WD)	627 ± 187	60.1 ± 15.8	26.3 ± 10.9	0.63 ± 0.35	0.25 ± 0.12
p-value	0.5805	0.6875	0.4185	0.3915	0.1321
Season					
Summer	878 ± 292 a	50.5 ± 16.8	21.7 ± 6.8 b	0.24 ± 0.28 d	0.29 ± 0.10 a
Autumn	572 ± 215 b	53.8 ± 11.4	19.7 ± 7.4 b	0.48 ± 0.11 c	0.33 ± 0.09 a
Winter	471 ± 112 b	69.0 ± 22.1	33.1 ± 9.7 a	0.90 ± 0.10 b	0.14 ± 0.03 b
Spring	436 ± 41 b	59.6 ± 25.3	18.9 ± 6.4 b	1.06 ± 0.15 a	0.15 ± 0.01 b
p-value	< 0.001	0.1227	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Cultivar × Season					
GW-Summer	873 ± 57	52.9 ± 9.8	20.8 ± 2.8	0.14 ± 0.01	0.32 ± 0.06 a
-Autumn	808 ± 317	58.5 ± 4.8	15.8 ± 0.1	0.55 ± 0.06	0.26 ± 0.03 ab
-Winter	511 ± 101	68.1 ± 30.6	32.8 ± 5.8	0.82 ± 0.03	0.12 ± 0.01 c
-Spring	404 ± 34	68.4 ± 23.3	20.0 ± 5.9	1.11 ± 0.19	0.15 ± 0.02 bc
CS-Summer	717 ± 270	35.8 ± 8.3	16.3 ± 5.2	0.45 ± 0.58	0.19 ± 0.04 bc
-Autumn	556 ± 39	50.9 ± 6.0	17.9 ± 1.1	0.52 ± 0.11	0.35 ± 0.04 a
-Winter	415 ± 31	73.5 ± 21.4	35.0 ± 6.4	0.83 ± 0.15	0.15 ± 0.01 b
-Spring	420 ± 53	51.0 ± 9.6	18.3 ± 1.1	1.16 ± 0.17	0.15 ± 0.01 b
RF-Summer	1074 ± 490	56.5 ± 30.5	26.8 ± 11.3	0.18 ± 0.09	0.38 ± 0.14 a
-Autumn	366 ± 41	40.9 ± 3.8	17.3 ± 9.6	0.34 ± 0.06	0.29 ± 0.07 a
-Winter	384 ± 14	57.0 ± 27.6	24.3 ± 13.3	0.95 ± 0.04	0.15 ± 0.05 b
-Spring	443 ± 7	77.0 ± 41.4	22.9 ± 11.5	1.00 ± 0.08	0.16 ± 0.01 b
WD-Summer	900 ± 91	56.7 ± 3.1	22.9 ± 1.8	0.19 ± 0.03	0.27 ± 0.01 b
-Autumn	560 ± 49	64.7 ± 12.8	28.0 ± 8.1	0.51 ± 0.09	0.42 ± 0.10 a
-Winter	572 ± 156	77.3 ± 13.6	40.1 ± 8.3	0.99 ± 0.07	0.16 ± 0.01 c
-Spring	477 ± 30	41.8 ± 4.7	14.4 ± 0.7	0.94 ± 0.09	0.15 ± 0.01 c
p-value	0.4360	0.3000	0.1152	0.3836	< 0.01

Different letters within each column indicate significant differences according to Shaffer's Modified Sequentially Rejective Bonferroni Procedure.
All data are expressed as mean ± standard deviation.

の鉄濃度の影響を強く受けることが示唆された。

3) 硝酸塩

硝酸塩含量は明確な季節変動が認められ、水耕液中の硝酸濃度が低かった夏・冬と比較し、硝酸濃度の高かった秋と春で増加した（表4）。近年、機能性素材として硝酸塩が注目されており、スポーツフードとしての利用が広まっているほか、日本においては血圧の正常化をヘルスクレームとした機能性表示食品にも利用されている。本研究の結果、品種、季節によるものの、血圧の低減効果が期待される250 mg以上の硝酸塩³⁾を含んでいることが確認され、硝酸を関与成分とした機能性農産物としての高付加価値化の可能性が示された。

4) ポリフェノール

レタスはフェノール化合物の豊富な供給源であり、赤系レタスではフラボノールやアントシアニンが多く蓄積されている。アントシアニンはヒトにおける糖質代謝や血管内皮機能の改善が期待されるフェノール化合物であり、1日に22 mg以上のアントシアニンを摂取することで2型糖尿病のリスク低減が期待される⁴⁾。本研究で最も高濃度にアントシアニンを蓄積していたのは濃赤色系品種のワインドレスであり（表4）、新鮮重量100 g当り34.2 mg（春）～73.8 mg（秋）のアントシアニン含量を示したことから、日常的にアクアポニックス産のワインドレスを摂取することで糖尿病のリスク低減が期待できるかもしれない。クロロゲン酸および総ポリフェノールもワインドレスが最大量

表4. レタスの葉の機能性成分含量に対する品種および季節の影響

Source of Variance	Nitrate ion (mg/100 g)	Anthocyanin (mg CCE/100 g)	Chlorogenic acid (mg CAE/100 g)	Total polyphenols (mg CAE/100 g)	Antioxidant activity (mmol TE/100 g)
Cultivar					
Green wave (GW)	209 ± 110 c	5.6 ± 0.8 c	66.4 ± 22.3 c	192 ± 35 d	0.70 ± 0.12 d
Chimasanchu (CS)	176 ± 92 d	6.3 ± 0.8 bc	99.9 ± 51.4 b	306 ± 152 b	1.00 ± 0.46 c
Red falder (RF)	279 ± 59 a	7.2 ± 2.2 b	96.5 ± 45.1 b	269 ± 103 c	1.09 ± 0.41 b
Winedress (WD)	250 ± 74 b	48.9 ± 15.7 a	174.2 ± 33.5 a	737 ± 152 a	2.34 ± 0.63 a
p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Season					
Summer	176 ± 67 c	15.8 ± 16.0 b	164.0 ± 49.4 a	403 ± 204 a	1.60 ± 0.54 a
Autumn	312 ± 43 a	23.1 ± 30.5 a	85.6 ± 51.4 c	369 ± 371 bc	1.41 ± 1.15 b
Winter	151 ± 81 c	14.9 ± 18.4 bc	84.1 ± 47.5 c	338 ± 202 c	0.93 ± 0.48 d
Spring	275 ± 62 b	14.1 ± 12.2 c	103.4 ± 35.1 b	395 ± 178 a	1.20 ± 0.64 c
p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Cultivar × Season					
GW-Summer	111 ± 36 c	6.3 ± 0.2	96.9 ± 8.5 a	171 ± 8	0.87 ± 0.05 a
-Autumn	269 ± 50 b	6.1 ± 0.2	50.5 ± 3.4 b	177 ± 13	0.73 ± 0.02 ab
-Winter	113 ± 13 c	4.4 ± 0.4	49.9 ± 8.1 b	196 ± 12	0.60 ± 0.06 b
-Spring	343 ± 35 a	5.8 ± 0.2	68.4 ± 19.7 b	223 ± 64	0.61 ± 0.07 b
CS-Summer	137 ± 20 c	6.6 ± 0.6	184.3 ± 4.1 a	544 ± 30 a	1.74 ± 0.08 a
-Autumn	296 ± 2 a	6.8 ± 0.2	73.6 ± 5.3 b	169 ± 38 c	0.86 ± 0.13 b
-Winter	60 ± 7 d	5.1 ± 0.1	65.6 ± 9.1 b	230 ± 11 bc	0.73 ± 0.05 bc
-Spring	212 ± 18 b	6.5 ± 0.8	76.1 ± 5.8 b	282 ± 33 b	0.65 ± 0.07 c
RF-Summer	269 ± 14 b	8.2 ± 0.3 a	149.8 ± 5.2 a	256 ± 26 b	1.49 ± 0.06 a
-Autumn	364 ± 24 a	5.8 ± 0.3 b	50.0 ± 6.0 c	147 ± 9 c	0.75 ± 0.07 b
-Winter	237 ± 35 b	4.9 ± 0.5 b	60.8 ± 19.1 c	257 ± 14 b	0.67 ± 0.15 b
-Spring	246 ± 39 b	10.1 ± 0.9 a	125.3 ± 10.6 b	417 ± 41 a	1.46 ± 0.08 a
WD-Summer	187 ± 26 b	42.3 ± 3.0 c	224.8 ± 11.0 a	639 ± 27 b	2.28 ± 0.15 b
-Autumn	318 ± 7 a	73.8 ± 0.7 a	168.2 ± 15.4 b	983 ± 54 a	3.31 ± 0.14 a
-Winter	196 ± 77 b	45.4 ± 1.6 b	160.3 ± 9.6 bc	668 ± 38 b	1.71 ± 0.02 d
-Spring	301 ± 51 a	34.2 ± 1.7 d	143.6 ± 11.2 c	656 ± 19 b	2.07 ± 0.04 c
p-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

CCE, cyanidin chloride equivalent; CAE, chlorogenic acid equivalent; TE, Torolox equivalent.

Different letters within each column indicate significant differences according to Shaffer's Modified Sequentially Rejective Bonferroni Procedure.

All data are expressed as mean ± standard deviation.

を示し、抗酸化活性についても同様の傾向を示した。

研究②：養殖水への鉄添加の影響

農作物の高付加価値化の一つとして、鉄を強化した機能性農作物の研究開発が進められている。水耕栽培養液中の鉄濃度を高めることで葉物野菜の鉄含有量を高めることが報告されているが、例えば栄養機能食品を目標とした場合、50 ppm以上の鉄濃度が必要となり、高濃度の鉄による成長阻害が生じることが課題となっている⁵⁾。研究①において、アクアポニックスでは水耕液中の鉄濃度が低濃度であってもリーフレタス中の鉄含量を高められる可能性が示されたため、養殖水への鉄添加がリーフレタスの生産性および生理活性成分に及ぼす影響について検討した。チョウ

ザメの養殖水にキレート鉄を添加し、4段階の異なる鉄濃度（無添加、2.5, 5, 10 ppm）に調整した試験区と、対照として化学肥料区を設定し、緑系（グリーンウェーブ）および赤系（ワインдрес）の2品種のリーフレタスで栽培試験を行った。収量、糖度への鉄添加の有意な影響は認められなかったが、葉緑素含有量は鉄添加により有意に増加した。一方で、高濃度鉄区（5, 10 ppm）において廃棄率の増加が認められた。養殖水中の鉄濃度の増加に伴い、レタス中の鉄量が有意に増加した一方で、亜鉛は鉄添加により有意に低下した。また、抗酸化成分については、ワインдресにおいて、化学肥料区と比較し高濃度鉄区でアントシアニン、クロロゲン酸、総ポリフェノール、抗酸化活性が増加した。

研究③：リーフレタス以外のアクアポニックス生産野菜の評価

アクアポニックスは様々な植物の栽培が可能で、20種類以上の作物を育てる生産者も少なくない⁶⁾。近年、鮮やかな色彩のスイスチャードや栄養価の高いケール、ハーブ類の人気が高まっており、プラントフォーム社でもこれら作物を栽培している。そこで、同社より提供を受けたスイスチャード、ケール、クレソンについてもリーフレタス同様、栄養成分等の評価を行った。評価した作物の中でもケールは特に栄養価が高く、慣行栽培品と比較し、食物繊維やβ-カロテンを豊富に含んでいた。

・考察と展望

本研究では、リーフレタスを中心にアクアポニックスで栽培された農作物の栄養・機能性成分の評価を実施した。アクアポニックスで栽培されたリーフレタスには多種多様な栄養・機能性成分が豊富に含まれており、ビタミンKや葉酸等、一部の成分については機能性食品として展開可能な水準にあることが示された。本研究は、アクアポニックスで栽培された生産物について、機能性農作物としての高付加価値化が可能であることを示した初めての研究であり、アクアポニックスが経済的にも持続可能性の高いシステムであることを示唆している。今回の研究では、アクアポニックスの栽培環境と栄養・機能性成分の関係を明らかにするまでには至らなかったが、我々は可能性の一つとして微生物の作用に着目している。植物生育促進細菌(PGPB)の中には植物のミネラル、カロテノイド、ポリフェノール類といった栄養・機能性成分含量の強化に有用なものも存在しており、今後、アクアポニックスにおけるこれら有用菌の存在や機能について、さらに研究を進める予定である。

3. 謝辞

本研究に助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に感謝申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

成果報告（学術論文）

1. Yasuaki Enoki, Satomi Tsutsuura, Keigo Mikame, Norikuni Otake, Tomoko Yamaguchi, Nutritional and functional profiles of aquaponic leaf lettuce

across seasons. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2025; 89: 1024–1037.

成果報告（学会発表）

1. 筒浦さとみ, 浅倉瑠奈, 大竹憲邦, 三亀啓吾, 榎康明, 佐藤大仁, 山口智子. アクアポニックスにより栽培されたリーフレタスの栄養・機能性成分評価. 第77回日本栄養・食糧学会大会, 2023年5月14日, 北海道.
2. 山口智子, 浅倉瑠奈, 大竹憲邦, 三亀啓吾, 筒浦さとみ, 榎康明, 佐藤大仁. アクアポニックス農法により栽培された品種及び栽培時期の異なるリーフレタスの抗酸化性評価. 日本家政学会第75回大会, 2023年5月28日, 東京.
3. 榎康明, 筒浦さとみ, 大竹憲邦, 三亀啓吾, 浅倉瑠奈, 齐嶋成美, 山口智子. アクアポニックスで栽培されたリーフレタスの栄養・機能性成分含量とその季節変動評価. 日本農芸化学会2024年度大会, 2024年3月27日, 東京.
4. 榎康明, 大竹憲邦, 三亀啓吾, 鈴木一輝, 筒浦さとみ, 山口智子. 養殖水への鉄添加がアクアポニックスにおけるリーフレタスの生産性、品質及び生理活性成分に及ぼす影響. 日本農芸化学会2025年度大会, 2025年3月8日, 北海道.

参考文献

1. Barański M, Srednicka-Tober D, Volakakis N et al. Higher antioxidant and lower cadmium concentrations and lower incidence of pesticide residues in organically grown crops: a systematic literature review and meta-analyses. *Br J Nutr* 2014; 112: 794–811.
2. 榎康明, 山口智子, 筒浦さとみ. アクアポニックス～水産養殖と水耕栽培の統合による新たな食料生産システム～. 化学と生物 2023; 61: 530–38.
3. He Y, Liu J, Cai H et al. Effect of inorganic nitrate supplementation on blood pressure in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Nitric Oxide* 2021; 113–114: 13–22.
4. Guo X, Yang B, Tan J et al. Associations of dietary intakes of anthocyanins and berry fruits with risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Clin Nutr* 2016; 70: 1360–1367.
5. Giordano M, El-Nakhel C, Pannico A et al. Iron biofortification of red and green pigmented lettuce in closed soil-less cultivation impacts crop performance and modulates mineral and bioactive composition. *Agronomy* 2019; 9: 290.
6. Raulier P, Latrille F, Ancion N et al. Technical and business evaluation of professional aquaponics in europe. *Water*. 2023; 15: 1198.

「廃棄パンを活用した新たな発酵調味料の開発研究」

研究代表者 岩手大学農学部 山下哲郎

中小企業研究責任者 株式会社 浅沼醤油店 浅沼宏一

1. 背景：企業からの説明

現在、地球レベルでの気象変動やウクライナ危機などにより世界的な食糧供給が脅かされている。その一方で、日本において年間に廃棄される食品の量は年間522万トンに上り、世界の食料廃棄量は年間約13億トンで、食料全体の約3分の1が廃棄されている。日本の食品ロス量522万トンのうち、事業者によるものが275万トンで、売れ残りや食べ残し、規格外品などがその原因である。一方、円安の影響で輸入品価格が高騰し、小麦価格も上昇基調を続けている。この状況下で、持続可能な原料調達とコスト削減が醤油業界の重要な課題となっている。日本国内の小麦用途を見ると、パン用が最も多く、全体の29%を占めている。パンの製造過程で生じる副産物であるパンの耳を焙煎小麦の代替原料としてすることで、小麦価格高騰の影響を軽減でき、食品ロス削減にもつながると考えられる。また、パンの耳特有の香りや風味を適切に調整することにより、新たな付加価値を持つ「パン醤油」の開発が期待される。このためには、麹菌が効率よく発酵できる基材としての適性を確認し、醤油独特の旨味と香りを引き出す技術を確立する必要がある。

本研究においては、廃棄パンを材料として、通常の醤油の代替品として利用できるような高品質の発酵調味料（パン醤油）の製品化を目指して醸造の基本条件の検討を行う。次いで、マルチオミクス解析によって醸造条件の違いによるパン醤油の呈味成分・香気成分の変動解析を行い、定量的官能評価法（QDA法）を用いて対照品となる通常醤油とパン醤油を比較することにより、最適な醸造条件を確立する。そこで、食品成分の分析について研究実績のある岩手大学農学部の山下教授と共同で本事業に応募することとした。本研究によるパン醤油の商品化が実現すれば、食品ロスの削減が困難だった廃棄パンを有効活用することができるとともに、気候変動等によって大豆の入手が困難になった場合のリスク対応も可能になりSDGsに即した持続可能な事業モデル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

これまでの共同研究で、様々な雑穀と通常醤油の原料か

ら醸造した発酵調味料の物理化学組成、遊離アミノ酸レベル、GC-MSによる香気成分の分析、色度計による色の分析、QDA法による官能評価などの包括的な分析を通じて、各製品の特性を明らかにした（Food Bioscience 59, 104198, (2024)）。その成果を生かしてパンを材料にした醤油風調味料の開発を進めた。

2.1 原材料の選定

今回の検討では、保存料や乳化剤を含まないパンを選定することを重要視し、比較的シンプルな原材料構成を持つ食パンの耳を採用した。食パンの耳には砂糖、食塩、バターを含むマーガリンが使用されているが、保存料や乳化剤は含まれていない。この選定により、麹菌の発育が妨げられるリスクを低減しつつ、パン由来の特有の風味や成分を活かした発酵が可能であると考えられる。

2.2 殺菌工程

原料のパンは通常の醤油原料として使用される乾燥小麦に比べて水分を多く含むため雑菌の汚染を受けやすい。後の製麹工程で雑菌が繁殖しないように殺菌を行う必要がある。本検討ではフライパンで乾熱加熱殺菌を行う方法とオートクレーブにて湿熱殺菌を行う方法を試した。パンの耳には耐熱性芽胞菌も増殖するので、高温焙煎または高温高圧殺菌処理が好ましいと考えられる。

2.3 水分調整

一般的な醤油麹は水分量が約45%になるように調整されるが、原材料を変える場合は、使用する穀物原料によって保水特性が異なるため、麹菌の生育を妨げない適切な水分量に調整する必要がある。パンの耳を115°Cで30分加熱殺菌した後、霧吹きを用いて均一に散水し、常圧加熱乾燥法（135°C、3時間）で水分量を測定した。その結果、30%を超える70%未満の水分量で麹菌が最も生育しやすいことが確認された。

2.4 使用微生物

麹菌：醤油の醸造には、*Aspergillus oryzae* または *Aspergillus sojae* が使用される。本検討では、プロテアーゼ活性

が高い *Aspergillus sojae* と比較して、 α -アミラーゼ活性が高く幅広い酵素活性を示した *Aspergillus oryzae* を採用した。

乳酸菌：乳酸菌による有機酸生成は、酵母菌によるアルコール生成と組み合わせて複雑な香りを生み出すため、品質安定化を目的として *Tetragenococcus halophilus* を添加した。酵母：発酵を安定化させるため、耐塩性の主発酵酵母である *Zygosaccharomyces rouxii* を添加した。この酵母は醤油独特の風味を形成するうえで重要である。

2.5 酿造条件

模索した処理条件に基づき、パンの耳のみを主原料とした醤油風発酵調味料を仕込み、その特徴を評価した。まず、パンの耳を約20 mmにカットし、全体重量の30%の水を加えて混合した。その後、オートクレーブを用いて121°C、15分間の条件で殺菌処理を実施した。この工程によりパンの耳の水分量は約40重量%となり、醤油の発酵原料として適した状態が得られた。殺菌後、醤油醸造で用いられる常法に従い、醤油用種麹を接種し製麹を行った。製麹期間は48時間とし、この間に麹菌が十分に増殖してアミノ酸や香気成分の生成に必要な酵素が形成された。その後、製麹した麹に食塩と水を加えて諸味を仕込み、諸味の塩分濃度は13.1~13.4% (w/w)、水分量は61~64重量%になるように調整した。諸味には乳酸菌と主発酵酵母を加え、発酵温度30°Cで180日間発酵させた。発酵期間中には乳酸菌による酸生成と酵母によるアルコール生成が進み、醤油特有の風味が醸成された。発酵が終了した諸味を濾過(ろ紙5C種を使用)し、「パン生揚」と呼ぶ試料を得た。この工程を3回繰り返し、試料の再現性を確認した。

2.6 アミノ酸組成

日清製粉株式会社の醤油醸造用小麦「こうじむぎST」を用いて同様の条件で製麹・発酵を行い、「小麦生揚」とした。また、市販の白醤油製品であるA社およびB社の

製品を比較対象として用いた。これらの試料についてアミノ酸組成を分析したところ、パン生揚と小麦生揚、さらに市販品の白醤油の間で、アミノ酸組成の割合は類似していることが確認された(図1)。

2.7 基本5味の官能評価

それぞれの試料について、白醤油を基準として設定した基本5味(甘味、酸味、塩味、苦味、うま味)の強度を比較するため、味覚テストを実施した。このテストには、味覚の感受性が高く訓練を受けた5名のパネルが参加した。白醤油を想定した基準品を作成し、パネルはそれと比較した味覚の強度を数値化した。テストの結果、パン生揚、小麦生揚、および市販の白醤油の間で、5味の強度に大きな差は見られなかった。特に、甘味と塩味のバランスは白醤油に非常に近い結果を示し、酸味やうま味についても基準値内に収まっていることが確認された。苦味に関しては若干の違いが見られたものの、全体として味覚の強度は白醤油と同等であり、試料間での再現性も高いものであった。この結果から、通常の小麦をパンの耳に置き換えて製造したパン醤油は、味覚の基本的な要素において白醤油と遜色のない調味料であることが示された。

2.8 香気成分の特徴

GCMSを用いてそれぞれの試料の香気成分の分析を行い、パン醤油に特徴的な香気成分の同定を行った(表1)。その結果、特にチーズやバターに見られるような多様な香気成分が捕捉された。これらの成分は、パンそのものからは検出されず、一度イースト菌で発酵させたパンを麹菌で分解し、さらに酵母発酵を経た過程で生成されたと考えられる。この過程が、従来の醤油にはない新しい香気の創出につながったと推測される。

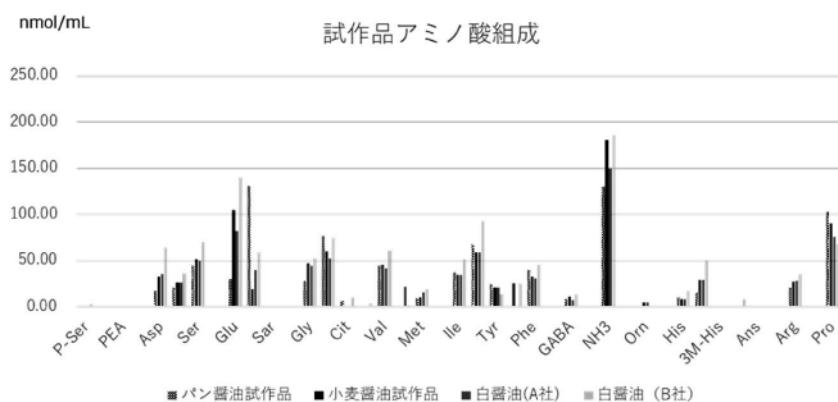


図1 パン醤油試作品と小麦醤油および白醤油の遊離アミノ酸組成

表1 パン醤油のみで検出される特徴的な香気成分

パン醤油独自の香気成分	CAS RN	香りの特徴
<i>1-Butanol, 3-methyl acetate</i>	123-92-2	完熟リンゴ、バナナあるいはメロン様の果実臭
<i>2-Pentanol</i>	6032-29-7	甘くてフルーティーな香り、バナナやナシに似た香り
<i>1-Propanol, 3-ethoxy-</i>	111-35-3	軽い甘さとエーテル臭を伴う香り
<i>Butanoic acid</i>	107-92-6	酸味が強く、腐敗したバターや汗、足の臭いに似た臭い。銀杏の悪臭の原因物質
<i>Hexanoic acid</i>	142-62-1	ヤギの体臭様、発酵食品やチーズに典型的な香り
<i>Octanoic Acid</i>	124-07-2	バターやチーズに特有の香り。低濃度ではフルーツやナッツに似た香り
<i>Phenol, 4-methyl-</i>	106-44-5	フェノール類の化合物で、木材や煙の香り、または香辛料の香り
<i>Thiophene, 2,3-dihydro-</i>	1120-59-8	チオエーテル様の匂い。煙草や焼き菓子に特有の香り



図2 パンからつくった朝のパン醤油（2024年4月10日発売）

2.9 考察と展望

本研究の結果、パンを主原料とした醤油はアミノ酸組成などの点で、通常の醤油原料の代替として十分な栄養価を有していることが分かった。また、通常の醤油にはない独自の香気成分を含むものとなった。これらの香気成分により、チーズのような洋風の香りを有する調味料となり、通常の濃口醤油と比較をしながら、①刺身、②寿司、③焼き魚、④おひたし、⑤お吸い物として試したが、いずれも洋風の香りが素材の香りと合わず、通常の醤油の代用としては難しいことがわかった。しかしながら、パン醤油は洋風料理、特に目玉焼きとの相性が良いことが判明したため、「パンから作った朝のパン醤油」として商品化を進め、2024年4月に浅沼醤油店から販売することとなった（図2）。

本研究により、中小の蔵元が持つ独自の発酵技術を活かし新たな製品開発に挑戦することにより、食品ロスの削減や地域資源の活用に貢献できることが示された。このような取り組みは、日本の発酵文化に新たな価値を生み出すとともに、地域の活性化にも寄与するものであると考えられる。

3. 謝辞

本研究を助成していただいた公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。官能評価と統計解析にご協力いただいた岩手大学農学部袁春紅教授と王卓琳博士にこの場をお借りして御礼申し上げます。

4. 成果報告および参考文献

1) 著書

NTS出版『発酵・醸造の新展開』金内誠編第7編 発酵技術によるアプリサイクル第2章第2節「パンの耳を発酵して作った朝のパン醤油の開発」

浅沼宏一、菅原健太郎（2025年夏出版予定）

2) 原著論文

Development and characterization of Japanese soy sauce-like fermented seasoning with various ingredients. Asanuma, K., Wang, Z., Miyazaki, T., Yuan, C. and Yamashita, T. Food Bioscience 59, 104198, (2024)

Chemical and sensory characterization of shiro shoyu-like fermented seasonings produced from bread waste. Asanuma, K., Yuan, C. Yamashita, T., and Wang, Z. manuscript in preparation

3) 特許出願特願2024-54364

【発明の名称】醤油風調味料、醤油風調味料の製造方法および麹の製造方法

【発明者】浅沼宏一、菅原健太郎

商願2024-00813 「朝のパン醤油」

4) 学会発表等

Development and characterization of Japanese soy sauce-like fermented seasoning with various ingredients. Asanuma, K., Wang, Z., Miyazaki, T., Yuan, C. and Yamashita, T. International Symposium on Precision

Quality Control of Aquatic and Agro Foods: Innovations in Green Process (AIC2024) (2024年10月26日)

今日からできる人材育成の一歩 浅沼宏一 いわて高等教育地域連携プラットフォーム シンポジウム (2024年10月23日)

郡山発未来を切り拓くイノベーションと知財戦略 浅沼宏一 つながる特許庁in郡山 (2024年2月8日)

5) マスコミ報道等

(注目の一品) 浅沼醤油店の「パンからつくった 朝の

パン醤油」廃棄の「耳」活用、洋食にも合う味 日本経済新聞 (2024年3月20日)

老舗しょうゆ店が開発「パンから作った朝のパン醤油」 洋食にあう新たな味わい 廃棄物や食品ロス削減へ FNN プライムオンライン (2024年4月27日)

食パンのミミから作った醤油「朝のパン醤油」 大阪ほんわかテレビ (2024年5月31日)

食品ロス削減 捨てられるパンを“おいしく”減らす 午後LIVE ニュースーン (2024年10月16日)

4. 第51回研究奨励金報告書

第51回研究奨励金報告書

イネの子葉鞘における耐病性機構の解明

立命館大学立命館グローバル・イノベーション研究機構 石川和也

【背景および目的】

世界的な食料需要拡大のため、これから農業には、より高い生産性を安定して維持することが求められる。しかしながら、作物は様々な環境ストレスに曝されて生育しているため、生産性は安定していない。中でも病害による被害は甚大である。これまでに、世界中でイネいもち病やイネ白葉枯病に対する耐病性機構に関しては解析されているが、イネもみ枯細菌病など他の病原細菌に対してはほとんど解析されていないのが現状である。イネもみ枯細菌病菌はもみの褐変や枯死、葉鞘の腐敗を引き起こす細菌であり、世界中で猛威を奮っているため、“*Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?”と題した論文が発表されるほど世界の注目を集めている(Ham *et al.*, 2011)。さらに、イネもみ枯細菌病菌は日本の東北や北陸などの寒冷な地域では、箱育苗時に苗が腐敗する苗腐敗症や本田移植後の腐敗症状を引き起こすことも報告されている(Azegami, 2009)。そのため、箱育苗での多発時には、移植苗の安定供給ができず、問題となることがある。しかしながら、病徵を示す部位が葉身以外の場所(穎や子葉鞘)であり、その解析の難しさなどからイネもみ枯細菌病菌に対する耐病性機構に関する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究では、水稻品種開発の資とするため、イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に注目し、抵抗性遺伝子の同定およびイネの組織特異的な耐病性機構を解明することを目的とし、解析を行なった。

【材料】

材料は、東北地域の主力品種である「ひとめぼれ」と世界のイネ・コレクション(Kojima *et al.* 2005)に含まれるスリランカ品種「KALUHEENATI」、その交配後代(RILs) F₉世代191系統を用いた。イネもみ枯細菌病菌は、MAFF302928を使用した。

【結果および考察】

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。

「ひとめぼれ」と「KALUHEENATI」の種子に対しイネもみ枯細菌病菌の接種実験を行った結果、「KALUHEENATI」は「ひとめぼれ」と比較し、イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対して抵抗性を示した。「KALUHEENATI」が有する抵抗性遺伝子を同定するため、RILs191系統に接種実験を行ない、QTL解析を行なった。その結果、「KALUHEENATI」遺伝子型で抵抗性を付与するQTL(*qRBSR-1*)、「ひとめぼれ」遺伝子型で抵抗性を付与するQTL(*qRBSR-2*)をそれぞれ検出した。

抵抗性遺伝子を同定するために、イネもみ枯細菌病菌の接種後の「KALUHEENATI」と「ひとめぼれ」のサンプルを用いて、RNA-seq解析を行なった。その結果、抵抗性を示した「KALUHEENATI」では、「ひとめぼれ」よりジャスモン酸応答性遺伝子など耐病性に関わる遺伝子の発現量が上昇しており、表現型と一致する結果であった。一方、感受性品種である「ひとめぼれ」では、「KALUHEENATI」と比較してアブシジン酸応答性遺伝子の発現量が上昇していた。このことから、アブシジン酸シグナリングが抵抗性に関与すると推察し、次の解析を行なった。感受性品種である「ひとめぼれ」にアブシジン酸合成阻害剤を処理し、抵抗性品種である「KALUHEENATI」にアブシジン酸を処理し、接種実験を行なった。その結果、アブシジン酸合成阻害剤の処理により抵抗性が付与され、アブシジン酸処理により抵抗性が減少した。これらのことから、アブシジン酸シグナリングは耐病性を負に制御することが示唆された。さらに、エチレンシグナリングがアブシジン酸シグナリングと拮抗すること、エチレン(エチレン前駆体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸)処理を行なった「ひとめぼれ」は、コントロールと比較して抵抗性を示し、エチレン合成阻害剤で処理した「KALUHEENATI」は、感受性を示すことも明らかにした。これらの結果をもとに、*qRBSR-1*および*qRBSR-2*両方から苗腐敗症に対する抵抗性遺伝子の有力な候補遺伝子を絞り込み、解析を行なっている。

*qRBSR-1*を保有するひとめぼれ準同質遺伝子系統を作出し、抵抗性の解析を行なった。その結果、「ひとめぼれ」



図1. ひとめぼれ準同質遺伝子系統は苗腐敗症に抵抗性を示す

と比較して苗腐敗症に抵抗性を示した（図1）。このことから、本研究で育成したひとめぼれ準同質遺伝子系統は、有用な育種素材であると考えられる。現在、農業形質を調査するため、圃場にて栽培を行っている。

基質複合体の解析を指向したミトコンドリア ADP/ATP 輸送体の分子内架橋

受領者 愛媛大学大学院農学研究科 伊藤 剛

共同研究者 徳島大学先端酵素学研究所、徳島大学大学院薬学研究科 篠原康雄

1. 研究背景と目的

ミトコンドリア内膜の ADP/ATP 輸送体 (Aac) は、酸化的リン酸化 (ATP合成) の基幹分子であり、それぞれサイトゾル側あるいはマトリックス側に開口した c-state と m-state の間のコンフォメーション変化を介してヌクレオチドを輸送すると考えられている（図1）。本輸送体における基質の輸送メカニズムの解明や新規阻害剤の創出といった基礎研究の進展は、医農薬分野では病害虫や寄生虫を、ヒトではガン細胞を標的とする薬剤の研究開発において資するところが大きい。Aac の特異的阻害剤であるカルボキシアトラクチロシド (CATR) とポンクレキン酸 (BKA) は、それぞれ c-state と m-state の開口部に結合する（図1）。2019年には、両者の共結晶構造が出揃い、輸送メカニズムが明らかになりつつある¹⁾。しかしながら、肝心の基質が結合した輸送体については安定な複合体が得られず、輸送体と基質の相互作用の様式は不明のままとなっている。本研究では、この相互作用解析を可能とする「基質と安定な複合体を構築できる ADP/ATP 輸送体」の創出を目指した。すなわち、阻害剤非存在下でも c-state を固定できる変異輸送体のデザインとその生化学的解析を実施した。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたりご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝致します。本研究は、阿部陽研究部長をはじめとした岩手生物工学研究センターゲノム育種研究部の方々との共同研究であり、共同研究者の方々に暑く御礼申し上げます。

【引用文献】

- Ham J.H., Melanson R.A., Rush M.C., Burkholderia glumae: next major pathogen of rice, *Mol. Plant Pathol.* 2011, 12(4): 329–339.
- Azegami K., *Burkholderia glumae* and *Burkholderia planatarii*, the pathogens of bacterial grain rot of rice and bacterial seedling blight of rice, respectively, *MAFF Microorganism Genetic Resources Manual*, 2009, 26.
- Kojima Y., Ebana K., Fukuoka S., Nagamine T., Kawase M., Development of an RFLP-based Rice Diversity Research Set of Germplasm. *Breeding Science*, 2005, 55: 431–440.

2. 研究結果と考察

[酵母 Aac の分子内架橋を可能とする変異導入] ミトコンドリア Aac は図1のように立体変化により、基質と結合/解離する開口部を形成すると考えられている。開口部の反対側では口が閉じた状態となり、開口状態において立体的に遠く離れていたアミノ酸残基が閉口状態になると互いに接近する。例えば、CATR が結合した c-state の結晶構造を参照すると、T62 と S159 の間の距離は 5.9 Å であるが、BKA が結合した m-state では 16.9 Å まで離れる（図1）。そこで、c-state では 3~7.5 Å まで接近し、m-state の形成の際には大きく離れるアミノ酸残基のペアを Cys 残基に置換することで、分子内ジスルフィド結合 (SS結合) の形成に基づく c-state 固定型の変異輸送体の構築を試みた。実験材料として、AAC1 と AAC2 を欠損させたパン酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* WB-12)²⁾ を利用し、変異 Aac2 発現酵母を作製した (Cys-less AAC2-T62C/S159C, -T62C/Q169C, -T62S/S159C, -T62S/Q169C)。なお、酵母 Aac2 にはもともと 4 つの Cys 残基が含まれるが、いずれも輸送体機能に必須ではないため、全て Ala 残基に置換した (Cys-less AAC2)³⁾。また、Cys 残基の代わりに Ser 残基に置換

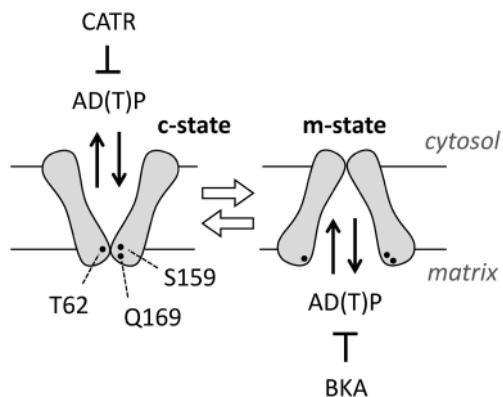


図1. ミトコンドリア ADP/ATP輸送体のスクレオチド輸送モデル。アミノ酸残基は酵母輸送体を参照したもの。

したネガティブコントロールを作製した。

[変異輸送体における分子内架橋形成の評価] 分子内でSS結合が形成されると見かけの分子サイズが小さくなる。この性質を利用し、変異輸送体における分子内SS結合の有無を電気泳動解析にて検証した（図2）。単離ミトコンドリアに0.1 mM copper *o*-phenanthroline ($\text{Cu}(\text{OP})_2$) を添加し、酸化処理（10 min, on ice）を行うことでSS結合の形成を試みた。5 mM EDTAにより反応を停止した後、非還元あるいは還元条件にてSDS-PAGEとWestern-blotを行った。非還元条件では、全ての株において、Aac2に相当する30 kDa程度のバンドが確認された。ただし、T62C/S159CとT62C/Q169Cでは、還元条件では認められない分子サイズのやや小さなバンドがより強く検出された。すなわち、これらの変異Aac2において、分子内SS結合が形成されたことを示している。

[ADP輸送能の評価] 分子内SS結合が形成された変異Aac2について、単離ミトコンドリアを用いた $^{[3]\text{H}}$ ADP取込み活性を評価した。分子内SS結合によりc-state固定型となった変異体は輸送活性を失う。一方、SS結合をDTTで還元すれば輸送活性を取り戻すと予想される。活性評価の結果、分子内SS結合の形成によって輸送活性が抑制され、還元処理により輸送能を取り戻すことが確認された（図3）。ただし、本実験条件ではSS結合を形成していないAac2が残存しているため（図2）、分子内SS結合によって輸送能が完全に失活する、すなわちc-state固定型であると結論づけることはできなかった。

3. 今後の課題と展望

輸送体と基質の相互作用の様式を詳細に解析するには、両者の安定な複合体を得られることが望ましい。点変異に

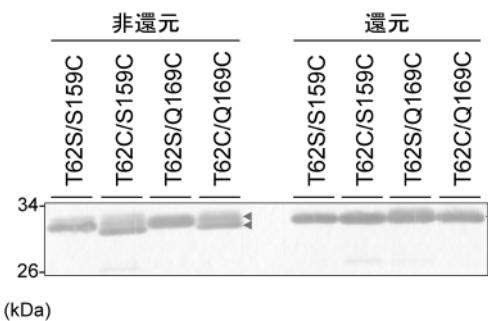


図2. 酸化処理した単離ミトコンドリアのWestern-blot解析。矢印は変異Aac2を示す。

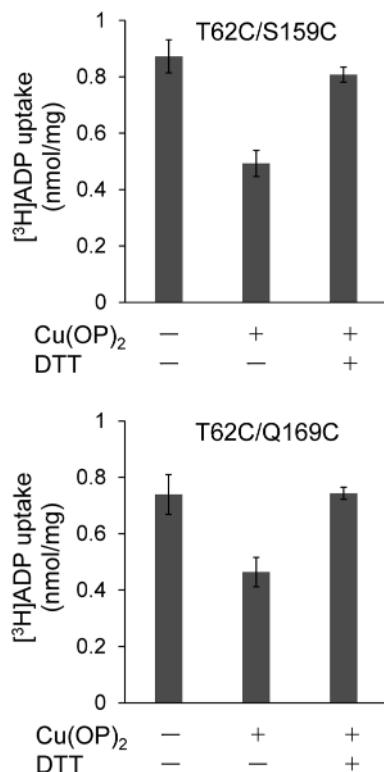


図3. 単離ミトコンドリアのADP輸送活性評価。

より任意の位置に分子内架橋を導入し、「基質が結合し得る輸送体の立体構造を固定する」本アプローチは合理的な手法である。本研究により、輸送能を抑制する（あるいは失活させる）分子内架橋を形成可能な変異Aac2の構築を達成した。ただし、目的のc-state固定型として結論づけるには至っていない。X線結晶構造解析等に適用するためにも、分子内SS結合をより高効率で形成させなければならぬ。Aacの輸送メカニズム解明を目指し、分子内SS結合の形成における反応条件の最適化に取り組む必要がある。

4. 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。

5. 参考文献

1. *Cell* **176**, 435 (2019).
2. *Biochim Biophys Acta* **1409**, 113 (1999).
3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **286**, 936 (2001).

病原菌細胞壁糖鎖を分解するとされる新規酵素および 遺伝子クラスターの分子解析

東京大学大学院農学生命科学研究科 鹿島謙真

【背景と目的】

β -D-Galactofuranose は galactose 異性体の中でも希少な糖構造であり、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) やアスペルギルス症の原因菌 (*Aspergillus fumigatus*) などの病原菌の細胞壁糖鎖に含まれている。こういった β -D-galactofuranose 含有糖鎖は、病原菌の呼吸器系などの生存に重要であり、病原性の発現に不可欠であると示唆されている。したがって β -D-galactofuranose は医療やバイオテクノロジーでの応用研究で着目されており、特に糖鎖から β -D-galactofuranose を切り出す酵素、 β -D-galactofuranosidase の研究が現在進められている^{1,2)}。

私は腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* より新規の β -D-galactofuranosidase (以降 *BtGalFX*) を発見した。本研究では *BtGalFX* が病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* の galactomannan (以降 GM)、あるいは結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* の arabinogalactan のいずれかに作用すると想定して研究を行った。

【結果】

以降、本研究の経過を大きく 3 点に分けて報告する。

① *BtGalFX* を含む遺伝子クラスターの解析

B. thetaiotaomicron のゲノム上で、*BtGalFX* の周辺遺伝子をアノテーションした。アノテーションで特筆する点として、糖質関連酵素アノテーションツール dbCAN だけでなく、AlphaFold の予測構造を用いた構造比較解析を行った。これにより既知酵素と配列相同性を示さないタンパク質（既知酵素に対して BLAST 解析を行ってもヒットが得られない）であっても、構造類似性から新規糖質関連酵素である可能性を評価することができた。この手法により *BtGalFX* を含む 15 の糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolase, 以降 GH) 遺伝子を含む巨大な多糖利用遺伝子座 (Polysaccharide utilization loci, 以降 PUL) を発見した。発見した GH 遺伝子を全てクローニングし、異種発現した酵素を精製、開発中の基質ライブラリに対する活性測定を行った。その結果、15 の酵素の

うち 8 つが β -D-galactofuranosidase、6 つが α -D-mannosidase あるいは α -D-mannanase、1 つが α -D-glucuronidase であった。

特に α -D-mannosidase のうち 1 つは、既知酵素と一切配列相同性を示さない新規性の高い酵素（以降 *BtManpX*）であり、先述のアノテーション法の有用性が示された。*BtManpX* は合成基質やオリゴ糖に対しては活性を示さず、酵母由来の mannan より微量の mannose を遊離した。このことから真の基質は特定できていないと考えられ、今後は酵母由来の mannan を酸分解し、生成されるオリゴ糖から基質の探索を試みる。

α -D-glucuronidase 以外の全ての酵素が *A. fumigatus* の GM の構成糖に対して加水分解活性を示すため、本遺伝子クラスターは GM の分解系であると考えられる（図1）。そこで、*A. fumigatus* の菌糸体に対してそれぞれの酵素の作用を薄層クロマトグラフィーで評価したが、いずれも活性は確認できなかった。これには GM の精製純度などが多大に影響している可能性があるため、更なる条件検討が必要である。

② *BtGalFX* の構造解析

タンパク質 X 線結晶構造解析に向けて *BtGalFX* の大量調製系を確立し、300 mg 近くの酵素を容易に獲得できるようになった。これを用いて広範な結晶化スクリーニングを行ったが、残念ながら結晶は得られなかった。Alpha-Fold による予測構造では推定活性ドメインから離れた位置に β -sandwich ドメインが存在し、このドメインの柔軟性が結晶化の障壁になっている可能性が示唆された。予測構造だけではリガンドの認識様式や反応メカニズムの解明が困難であるため、今後も β -sandwich ドメインを欠失させたコンストラクトの設計などを行い、結晶化を試みる予定である。また、①で示した 8 つの β -D-galactofuranosidase のうち、3 つは *BtGalFX* の近縁ホモログ（配列同一性 50% 以上）であり、これらでも結晶化を試みる予定である。

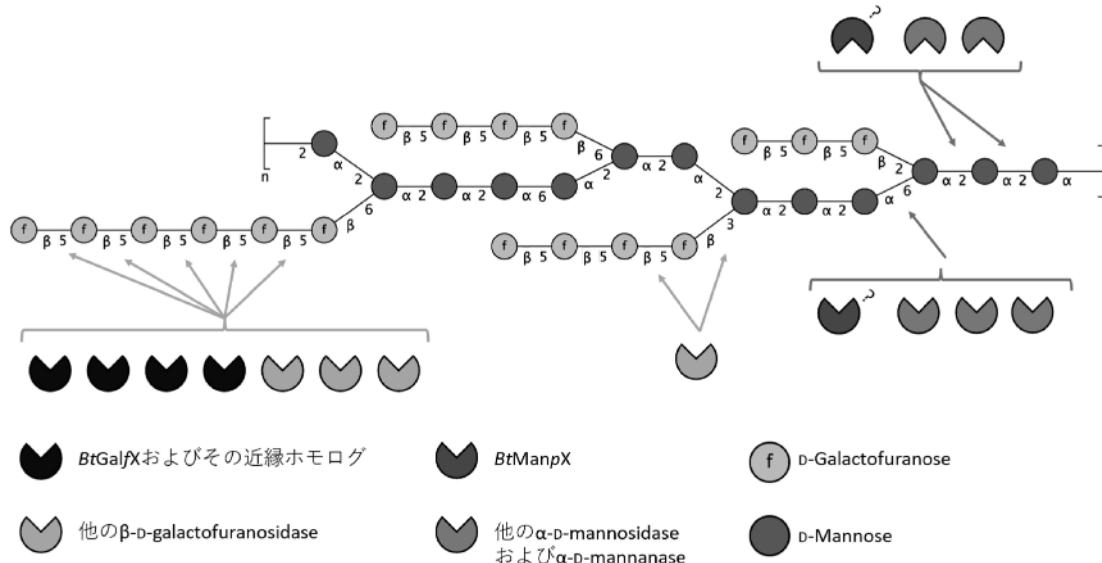


図1. 活性から推測される、各酵素がGMに対して作用する部位

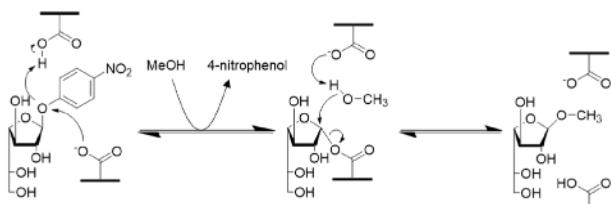


図2. *BtGalFX* を用いて観測された糖転移反応の推定機構

③ *BtGalFX* のメカニズム解析

単糖は溶液中で α -アノマー、 β -アノマーが平衡的に混在する。*BtGalFX* の加水分解反応によって生成されるD-galactofuranose のアノマー型によって、*BtGalFX* の触媒メカニズムを推定することができる。そこで ^1H NMR を用いて *BtGalFX* の加水分解反応初期生成物の化学構造解析を試みたが、重水置換後、酵素の反応効率が著しく低下したため、構造決定に至らなかった。

代案として、 β -NP- β -D-galactofuranoside を基質として加水分解反応を行った際に微量の有機溶媒（メタノール）を加え、糖転移反応の有無を評価するため薄層クロマトグラフィーを行った。結果、Me- β -D-galactofuranoside が検出、すなわち糖転移反応が確認された。このような反応はアノマー保持型反応機構を有するGHに特有であり、本酵素も保持型機構で反応を触媒する可能性が示唆された（図2）。しかしながら転移反応については最近、例外が報告されているため³⁾、提唱する機構は確定できない。今後は ^1H NMR や QM/MM シミュレーションでの反応機構の解明

を目指す。

以上、本研究でいくつかの成果が得られたものの、進捗がやや遅れていることは否めない。今後も本研究を遂行することで感染症の診断薬の開発や、腸内細菌による病原菌定着の抑制に関わる生態的メカニズムの解明を目指し、農芸化学やバイオメディックスの分野に貢献していきたい。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に深く感謝申し上げます。また、酵素活性測定に用いた一部の基質類をご分与下さった崇城大学の岡拓二教授、九州大学の竹川薰教授、東北医科薬科大学の田中大教授に厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- 1) E. Matsunaga, Y. Higuchi, K. Mori, N. Yairo, T. Oka, S. Shinozuka, K. Tashiro, M. Izumi, S. Kuhara and K. Takegawa: Identification and characterization of a novel galactofuranose-specific β -D-galactofuranosidase from *Streptomyces* species. *PLoS ONE*, **10**, (2015).
- 2) L. Shen, A. Viljoen, S. Villaume, M. Joe, I. Halloum, L. Chêne, A. Méry, E. Fabre, K. Takegawa, T.L. Lowary, S.P. Vincent, L. Kremer, Y. Guérardel and C. Mariller: The endogenous galactofuranosidase GlfH1 hydrolyzes mycobacterial arabinogalactan. *Journal of Biological Chemistry*, **295**, (2020).
- 3) S. Motouchi, S. Komba, H. Nakai and M. Nakajima: Discovery of anomer-inverting transglycosylase: Cyclic glucohexadecaose-producing enzyme from *Xanthomonas*, a phytopathogen. *Journal of the American Chemical Society*, **146**, 17738-17746 (2024).

エピジェネティック制御による休眠二次代謝覚醒を利用した植物培養細胞での革新的物質生産技術の確立

富山県立大学工学部生物工学科 野村泰治

【背景と目的】

植物が合成する多種多様な二次代謝産物は、その生物活性／薬理活性や機能性に基づいて、医薬、化粧品、香料、食品などの様々な産業で利用されている。技術的およびコスト的制約のため化学合成による供給が困難なものは、今でも植物体からの抽出・精製によって供給されている。しかし、日本では原料植物の多くを輸入に依存しているため、国内での安定供給維持のために植物体に依存しない物質生産法の確立が強く求められている。

そのうちの一つが植物培養細胞を利用した物質生産である。しかし、植物を培養細胞化すると多くの場合、植物体でみられていた二次代謝の著しい減衰・消失（＝休眠）が起こるため、植物培養細胞を利用した物質生産はほとんど実用化に至っていないのが現状である。培養細胞化に伴う二次代謝の休眠の根本的な原因は、生合成酵素遺伝子（群）の転写サイレンシングであると考えられる。そこで実施者は、転写調節の根幹をなす「DNA修飾」と「ヒストン修飾」を人為的に制御・変更し、生合成遺伝子の転写を活性化することで、休眠二次代謝を覚醒させることができるとの考え方のもと、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤やDNAメチル化酵素阻害剤といった「エピジェネティック修飾剤」を植物培養細胞に投与することによる新たな休眠二次代謝覚醒技術の確立に取り組んできた。

実施者はこれまでに、単子葉植物であるホウライチク（タケの一種）Bm培養細胞をモデルとした実験によって、本手法の有効性を世界で初めて発見・実証している [1-5]。本研究では、この新たな手法の汎用性検証の一環として、タバコ BY-2 培養細胞をモデルとして実証実験を行い、双子葉植物における本手法の有効性を検証することを目的とした。エピジェネティック修飾剤の投与によって覚醒誘導された化合物の単離、構造解析を行うとともに、エピジェネティック修飾剤の投与条件が当該化合物の覚醒誘導に及ぼす影響について、単子葉植物（Bm培養細胞）との比較を行った。

【方法と結果】

BY-2細胞に投与するエピジェネティック修飾剤として、実施者が以前Bm細胞において休眠二次代謝の覚醒に成功

しているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の一種suberoyl bis-hydroxamic acid (SBHA) を使用し、二次代謝の覚醒誘導の有無を調べた。その結果、SBHA を投与した細胞において、非投与コントロールと比べて顕著に誘導されている4種の未知化合物が見いだされた（図1）。このことから、エピジェネティック修飾剤の投与による休眠二次代謝覚醒法は、単子葉植物だけでなく双子葉植物も含めた植物種全般に広く適用可能な技術となる可能性が強く示唆された。

SBHA 投与細胞 (174 g) から覚醒誘導化合物4種の単離・精製を行った結果、化合物1が77 mg、化合物2が7 mg、化合物3が52 mg、化合物4が21 mg得られた。構造解析の結果、それらはいずれもヒドロキシ桂皮酸誘導体であることが明らかとなった（図2）。このことから、BY-2細胞においては SBHA の投与によって特にフェニルプロパノイド系二次代謝の生合成遺伝子の発現が活性化されていることが示唆された。

次に、BY-2細胞に異なる濃度の SBHA (0.1~2 mM)

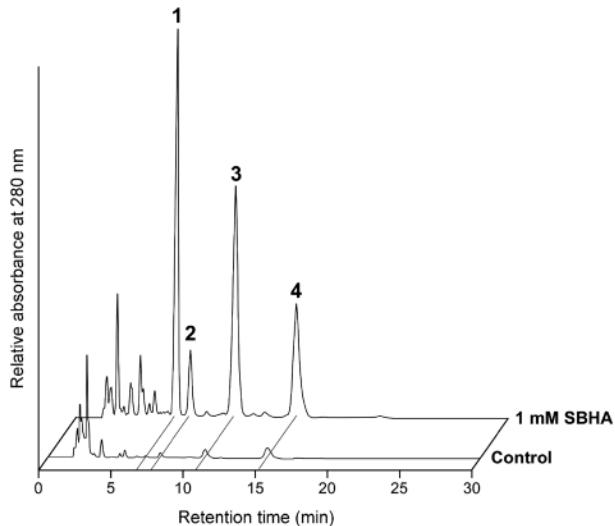


図1. ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (SBHA) の投与による休眠二次代謝の覚醒。

SBHA 投与 (1 mM) および非投与 BY-2 懸濁細胞の抽出物の HPLC クロマトグラムを示す。SBHA 非投与コントロールでは痕跡レベルの化合物1-4の生合成レベルが、SBHA の投与によって大幅に増大した。化合物1-4以外にも SBHA の投与によって増大しているマイナー化合物が複数みられた。

を投与し、化合物**1-4**の覚醒誘導レベルに及ぼす影響を調べた。その結果、細胞新鮮重量当たりの蓄積量は、化合物**1-3**は2 mM、化合物**4**は1 mMのSBHA投与時に培養開始1週間前後で最大となった(図3)。

以前行ったBm細胞へのSBHA投与においては、数十 μ M程度の投与で二次代謝の覚醒誘導レベルが最大となり、それ以上の投与濃度では、覚醒誘導レベルならびに細胞の増殖レベルの大幅な減衰がみられた。これは、SBHAの細胞毒性によるものであると考えられるが、今回の実験結果から、少なくともBY-2細胞はBm細胞よりもSBHAに対する感受性が低い(細胞毒性耐性が高い)ことが示された。このことは、対象とする培養細胞ごとに休眠二次代謝覚醒のための最適なエピジェネティック修飾剤投与濃度が異なることを意味している。おそらく、投与化合物の一部が細胞内生の酵素によって解毒代謝されており、その解毒代謝能の違いが、投与化合物に対する感受性の差異の要因であると考えられる。

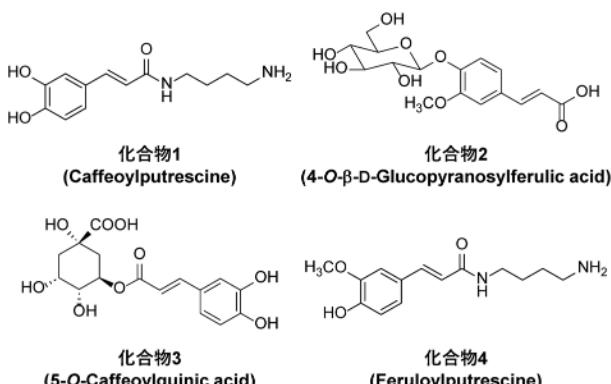


図2. SBHAを投与したBY-2細胞において覚醒誘導された化合物の化学構造。

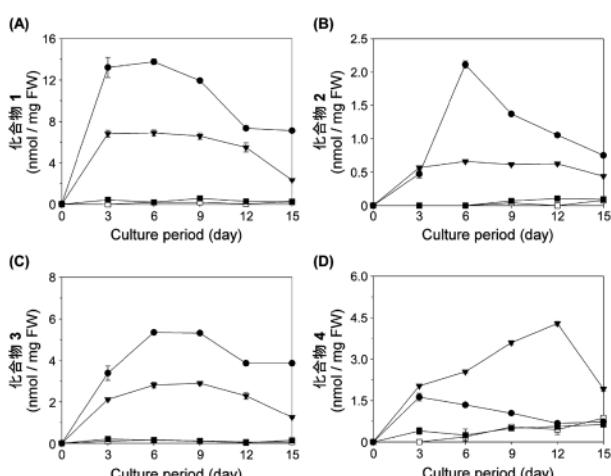


図3. 異なる濃度のSBHAを投与したBY-2細胞における化合物**1-4**の覚醒誘導レベルの経時変化。

(A) 化合物**1**, (B) 化合物**2**, (C) 化合物**3**, (D) 化合物**4**. SBHA投与濃度: 0 mM (○), 0.1 mM (■), 1 mM (▲), 2 mM (●).

次に、SBHAの投与濃度を1 mMに固定し、投与開始時の細胞量を2.5~20% SCVとして、化合物**1-4**の覚醒誘導レベルの違いを調べた。その結果、細胞新鮮重量当たりの蓄積量は初期細胞量が少ない方が高く、初期細胞量が高くなるにつれて減少する傾向がみられた。この結果も、投与化合物の一部が細胞によって解毒代謝されているという上記の予想を支持するものである。

続いて、SBHA以外のヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与による休眠二次代謝の覚醒誘導の有無を調べた。その結果、suberoylanilide hydroxamic acidやtrichostatin Aの投与によっても、化合物**1-4**の覚醒誘導が再現された。また、その際の覚醒誘導レベルは、SBHAの投与時とほぼ同等であった。このことから、当初SBHAの投与によってみられた二次代謝の覚醒誘導は、SBHAの副次的な作用によるものではなく、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害作用によって、生合成遺伝子の転写が活性化したことによるものであることが強く示唆された。

一方、DNAメチル化酵素阻害剤であるzebularineの投与によっても化合物**1-4**の覚醒誘導はみられたものの、その効果はヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の投与に比べ限定的なものであった。このことから、少なくともBY-2細胞においては、二次代謝生合成遺伝子の休眠にはDNAのメチル化レベルよりもヒストンタンパク質のアセチル化レベルが強く影響を及ぼしていることが示唆された。

以上の結果は、対象とする培養細胞が何であってもエピジェネティック修飾剤を投与しさえすれば休眠二次代謝の覚醒・生産に成功するということではなく、対象とする培養細胞ごとに投与条件の最適化を行う必要があることを意味している。しかし、これまでのような培養条件の総当たり的な検討や種々のエリシターの投与検討による手法に比べ、エピジェネティック修飾剤の投与による休眠二次代謝覚醒法では最適化にかかる手間と時間は大幅に軽減されることが期待され、植物培養細胞を利用した有用物質生産系を確立する上で非常に有効な手法となると考えている。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に心より感謝いたします。共同研究者の加藤康夫教授(富山県立大学)に厚く御礼申し上げます。

【成果発表】

・原著論文

- Nomura, T., Kato, Y. Activation of cryptic secondary metabolite biosynthesis in tobacco BY-2 suspension cells by epigenetic modifiers. *Appl. Biochem. Bio-*

technol. **2025**, 197, 1225–1241.

・解説論文

- 1) 野村泰治, 加藤康夫. 植物二次代謝酵素および培養細胞を用いた新たなアプローチによる物質生産・物質探索. 日本農芸学会誌, **2024**, 42, 135–139.

・招待講演

- 1) 野村泰治. 植物二次代謝酵素および培養細胞を用いた新たなアプローチによる物質生産・物質探索. 第16回化学生態学研究会（函館）2024.6.21–22.
- 2) 野村泰治. 植物培養細胞における二次代謝の休眠打破：新手法の発見と意義. バイオインダストリー協会植物バイオ研究会（東京）2024.7.3.
- 3) 野村泰治. 植物培養細胞における二次代謝の休眠打破：新手法の発見と意義. 第10回植物二次代謝フロンティア研究会（箱根）2024.11.16–17.

・学会発表

- 1) 野村泰治, 加藤康夫. タバコ BY-2 培養細胞におけるエピジェネティック修飾剤投与による休眠二次代謝覚醒. 第41回植物バイオテクノロジー学会（仙台）2024.8.30–9.1.
- 2) 野村泰治, 加藤康夫. ケミカルエピジェネティクスによるタバコ BY-2 培養細胞の休眠二次代謝覚醒. 日本農芸化学会2025年度大会（札幌）2025.3.4–8.

【引用文献】

- [1] Nomura, T. et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **2021**, 193, 3496–3511.
- [2] Nomura, T. et al. *Plant J.*, **2022**, 112, 1266–1280.
- [3] 野村泰治, 加藤康夫. バイオサイエンスとインダストリー, **2023**, 81, 308–309.
- [4] 野村泰治, 加藤康夫. 生物工学会誌, **2023**, 101, 587–590.
- [5] 野村泰治, 加藤康夫. 化学と生物, **2024**, 62, 67–75.

渋味がもたらす新規機能性発見への挑戦 ～カテキンオリゴマーの睡眠-覚醒への影響～

芝浦工業大学SIT総合研究所 藤井靖之

1. 研究の背景と目的

近年の大規模かつ長期的な介入試験により、カテキンオリゴマー（CO）の摂取が高齢者の認知機能を向上させることが報告されている¹⁾。認知機能と睡眠・覚醒状態は密接に関連していることから、本研究では、COの摂取がマウスの睡眠覚醒に与える影響とその作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 方法・結果

2.1 COによるマウスの自発行動への影響

実験には、日本クレア株式会社より購入した10週齢の雄性C57BL/6Jマウスを用い、搬入後2週間のハンドリングにより不安行動の低減を図った。オープンフィールド試験を用いて、マウスに精製水、カフェイン（CF: 阳性対照, 1 mg/kg), またはCO (25 µg/kg) を単回経口投与し、直後から180分間の行動を観察した。精製水群では探索行動が次第に減少し、アリーナの隅で睡眠様行動が確認された。一方、CF群およびCO群では180分間にわたり自発行動が維持され、覚醒状態の持続が示された。

2.2 COによる睡眠覚醒サイクルへの影響

マウスに脳波・筋電図記録用電極を手術により装着し、

5日間の回復期間を経た後、精製水、CF、またはCOを単回経口投与し、24時間にわたり脳波・筋電図を記録した。4秒を1エポックとし、筋電信号により睡眠と覚醒を判別し、睡眠と判定されたエポックについては、脳波に基づきNREMおよびREM睡眠に分類した。CFおよびCO投与群では、精製水群と比較して覚醒時間が延長された。CO群ではその後、精製水群と同様の睡眠覚醒サイクルが観察されたが、CF群ではマウスの活動期である暗期において睡眠覚醒サイクルが著しく乱れた。

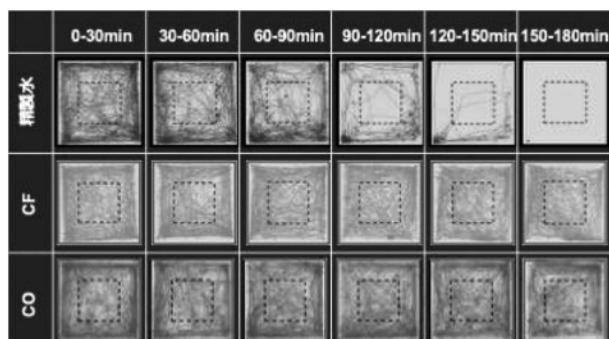


図1. マウスの軌跡の代表例

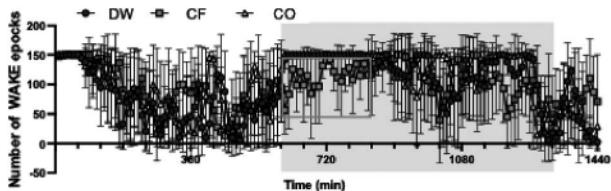


図2. 睡眠覚醒サイクルの推移



図3. CO 単回摂取後の脳内神経伝達物質の挙動

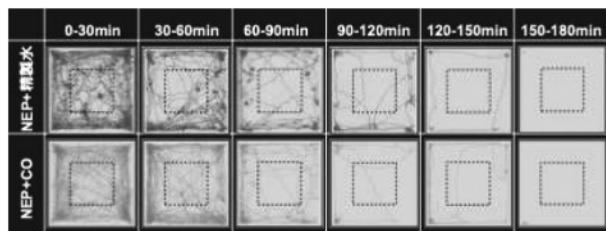


図4. ノルアドレナリン合成酵素阻害剤を用いたマウスの軌跡の代表例

2.3 COによる神経伝達物質への影響

精製水またはCOを単回経口投与したマウスを経時に抜脳し、脳をサジタル方向に凍結切片として調製した。2,4,6-トリメチルピリリウムトリフルオロメタンスルホン酸を全体に噴霧後、60°Cで10分間反応させ、イオン化誘導剤として α -シアノ-4ヒドロキシ桂皮酸を用いた。MALDI Guided SpatialOMxR on the tims TOF flex (Bruker) を用いて脳内の神経伝達物質分布を観察した。また、連続切片により神経伝達物質合成酵素のmRNA発現を併せて解析した。その結果、精製水群ではノルアドレナリンの弱いシグナルが広く検出されたのに対し、CO投与群では投与直後に青斑核、視床下部、脳幹に強いノルアドレナリンシグナルが認められた。特に青斑核では、ノルアドレナリン合成酵素のmRNA発現が顕著であり、CO摂取により青斑核が活性化され、視床下部や脳幹にノルアドレナリンが伝達されたことが示唆された。

2.4 COによる覚醒作用におけるノルアドレナリンの関与

CO摂取による覚醒作用にノルアドレナリン作動性神経網が関与しているかを検証するため、ノルアドレナリン合成酵素阻害剤 (NEP: nepicastat) を併用してオープンフィールド試験を実施した。その結果、CO摂取により観

察された自発行動の持続および覚醒維持作用は消失し、ノルアドレナリンの関与が示唆された。

3. 考察

本研究では、CO摂取による青斑核の活性化を介してノルアドレナリンが視床下部へ投射され、睡眠覚醒の制御に関わるスリープアクティブニューロン (SAN) の活動を抑制することで、覚醒が誘導・維持されたことが示唆された。カフェインはアデノシン受容体の拮抗を介して覚醒作用を發揮し、広く利用されているが、依存性や中毒性などの副作用が知られている。一方、COは消化管から吸収されないため、副作用を生じる可能性が低く、安全な覚醒物質として応用が期待される。

4. 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。イメージング質量分析の実施にあたり、ご指導いただきました福島大学食農学類平修教授に心より感謝申し上げます。

5. 学会発表

- 1) 藤井靖之, 柴田穂, 海野蒼太, 篠田佳亮, 高野和成, 土渕諒太, 安住瑞妃, 越阪部奈緒美「カテキンオリゴマーが睡眠覚醒サイクルに与える影響」, 日本農芸化学会, 2025年3月
- 2) Yasuyuki Fujii, Kazuki Sakata, Jun Sakata, Kazunari Takano, Minoru Shibata, Sota Umino, Sota Tsuchibuchi, Mizuki Azumi, Naomi Osakabe "A single dose of flavanol induces arousal by a mechanism different from that of caffeine." International conference of polyphenol and health, 2024 December
- 3) 藤井靖之, 柴田穂, 海野蒼太, 篠田佳亮, 高野和成, 土渕諒太, 安住瑞妃, 越阪部奈緒美「Flavan 3-olsによる睡眠覚醒サイクルへの影響」, 日本フードファクター学会, 2024年12月
- 4) 藤井靖之, 坂田和生, 柴田穂, 海野蒼太, 越阪部奈緒美, 「カテキンオリゴマーによる睡眠覚醒サイクルへの影響の検証」日本ポリフェノール学会, 2024年8月

参考文献

1. Brickman, A. M., et al. (2023). Dietary flavanols restore hippocampal-dependent memory in older adults with lower diet quality and lower habitual flavanol consumption. *PNAS*, 120(23), e2216932120.
2. Saito, Y. C., et al. (2018). Monoamines Inhibit GABAergic Neurons in Ventrolateral Preoptic Area That Make Direct Synaptic Connections to Hypothalamic Arousal Neurons. *J. Neurosci.*, 38(28), 6366–6378.

5. 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年南アフリカ生化学・分子生物学会議 (2024SASBMB) に参加して

東北大学大学院農学研究科 教授
小川智久

2024年7月7日（日）から10日（水）に南アフリカ共和国リンポポ州ポロクワネ（首都ヨハネスブルクから北に330 km の都市）の Protea Hotel Ranch Resort で「生化学が未来を導く」を大会テーマとして開催された南アフリカ生化学・分子生物学会議 (2024SASBMB: <https://www.sasbmbcongress.co.za/>) に基調講演者のひとりとして参加した（写真1は、オーガナイザーと招待講演者の集合写真。写真2は、Addmore Shonhai大会長の挨拶の様子）。

本学会は南アフリカ国内の学会ではあるが、今回国際生化学・分子生物学連合 (IUBMB) とも関連して行われ、この学会が2年に1度の開催であることもあり、南アフリカだけでなくジンバブエなど近隣諸国からの参加者も多く



写真1. 南アフリカ生化学・分子生物学会議 (2024SASBMB) のオーガナイザーと招待講演者の集合写真



写真2. Addmore Shonhai博士 (2024SASBMB大会長) の開会式での挨拶の様子

集まっていた。大会組織は、Addmore Shonhai教授を大会長として Venda大学のメンバーを中心に運営されていた。その主要な運営委員の中に20年ほど前に南アフリカのポートエリザベス大学と二国間共同研究を行ったときに当時博士課程の学生だった Shpnisani Tshidino博士がいたこともあり、今回基調講演についてお声がけをいただいた（写真3）。2度目の南アフリカとなったが、20年前に比べるとかなり治安が良くなっているように感じた。

学会では、Malaria や HIV をはじめとしたアフリカでの様々な感染症についての発表が多く、Kiaran Kirk博士（オーストラリア国立大学）の抗マラリア薬開発をターゲットとしたナトリウムポンプなど膜輸送タンパク質についての IUBMB 基調講演が行われた。その他アフリカ特有の薬草などからの新規化合物の解析や特有の植物、動物のオミクス解析など興味深い先端的な研究も報告されていた。筆者は「Venomics to the drug discovery for Alzheimer's disease」というタイトルで基調講演を行い、南アフリカ特有の毒蛇やサソリなどの毒生物を研究しているヨハネスブルク大学の学生やポスドクの Benedict Offer博士らに興味を持ってもらい、ランチの間に交流する機会があり、様々な生物毒についての議論をおこなった（写真4）。懇親会は、近くのホワイトライオンもいるレストランで行ったが、挨拶もそこそこに、いきなり参加者のダンスから始まる内容



写真3. 今回招待いただいた Shpnisani Tshidino博士（右）と筆者



写真4. ヨハネスブルク大学の生物毒研究の学生さんと
Benedict Offer博士（右端）と筆者（左手前）

でした。一緒にダンスすることで一体感が生まれ、今後の共同研究や国際交流にも繋がっていくのかなと思う学会でした。

謝辞

本会議の参加にあたり、多大なるご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会にこの場をお借りし、厚く感謝申し上げます。

6. 第81回国際会議出席費補助金 報告書

第81回国際会議出席費補助金報告書

5th European Conference on Natural Products に参加して

東北大大学院理学研究科化学専攻博士課程1年
奥村太知

学会の概要

2024年10月22日から24日の3日間、ドイツのWürzburgで開催された第5回ヨーロッパ天然物会議(5th European Conference on Natural Products)に参加しました。Würzburgは中世の面影を残す旧市街や、マイン川沿いの美しいブドウ畑、さらに世界遺産に登録されているレジデンツ宮殿などがあり、ヨーロッパの魅力的な町並みを存分に堪能することができました。

本学会では、生合成、合成生物学、有機合成化学、ケミカルバイオロジー、化学コミュニケーションなど、天然物化学を基盤にした多岐にわたるテーマが議論されました。特に、データサイエンスを活用した天然物化学研究が数多く発表され、最新の研究動向に触れる貴重な機会となりました。

発表に関して

今回、私は「JA-Ile-lactone enhanced alkaloid biosynthesis in Tomato」というタイトルで発表いたしました。植物は、

二酸化炭素を原料として医薬品や各種素材などの多くの二次代謝産物を生産します。これらの有用二次代謝産物の生産は、植物ホルモンであるジャスモン酸イソロイシン(JA-Ile)によって制御されています。しかしながら、JA-Ileは、二次代謝生合成活性化とともに、重篤な生長阻害を引き起こすことが知られています。本発表では、生長阻害を引き起こすことなく植物アルカロイド生産を活性化するジャスモン酸類縁体に関する発表を行いました。発表後、様々なバックグラウンドを持つ研究者から多くのフィードバックをいただき、今後の研究に有益なアドバイスを得ることができました。英語でのディスカッションには不安がありましたがあが、参加者の方々が丁寧にご質問をしてくださいり、有意義な意見交換を行うことができました。

謝辞

本国際会議に参加するにあたり、多大なるご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に、心より感謝申し上げます。



写真1 Würzburg の町並み

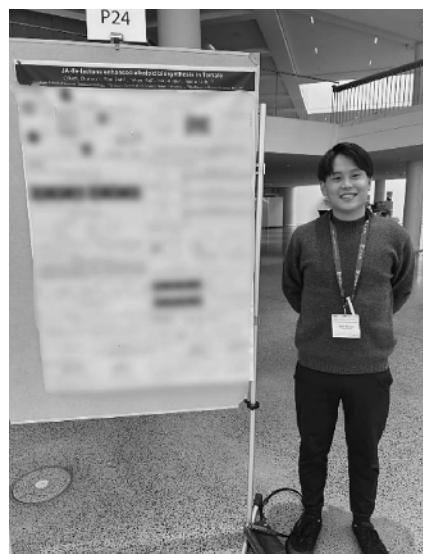


写真2 ポスター発表の様子

PRiME2024 参加報告書

京都大学農学研究科応用生命科学専攻
府川江央留

開催期間：2024年10月6日-11日

開催場所：アメリカ合衆国・ハワイ州

1. 学会の概要

PRiME (Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science) は、米国電気化学会が主催する国際学会であり、電気化学を中心とした世界中の研究者が集い、分野を超えた議論の場を提供することで、当該分野の発展に貢献することを目的とする。本来、4年周期でアメリカ合衆国・ハワイ州で開催されるが、COVID-19の影響により2020年度は中止となり、今回は8年ぶりの開催となった。その名が示す通り、電気化学と固体化学を中心として、A-バッテリーとエネルギー貯蔵、B-カーボンナノ構造とデバイス、C-腐食科学技術、D-誘電体科学と材料、E-電気化学／無電解めっき、F-電気化学工学、G-電子材料とプロセス、H-電子・光デバイスおよびシステム、I-燃料電池・電解槽・エネルギー変換、J-発光／ディスプレイ材料・デバイス・プロセッシング、K-有機および生物電気化学、L-物理／分析電気化学・電極触媒・光電気化学、M-センサからなる13セッションの他、申請者が参加した学生ポスターセッションが含まれるZ-ジェネラルトピックスを合わせ、計14セッションが開かれた。発表題目数は延べ5,000件を超え、6日間の開催期間を通しての大変な盛況がうかがえた。

2. 学会の雰囲気

開催地は、ホノルル市街地に位置するハワイ・コンベンション・センターであった（図1）。徒歩圏内にハワイ最

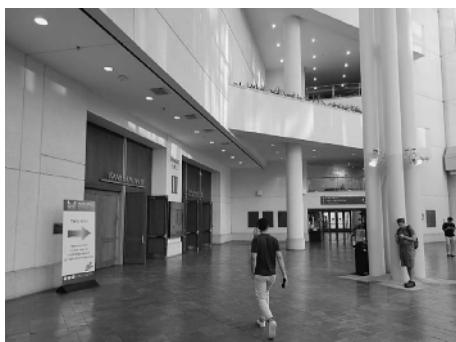


図1 会場内メインホールの様子。

大級のショッピングモール「アラモアナセンター」が存在しており、会場の空気感も穏やかであった。申請者にとって海外での学会参加は初めてであり、英語の討論に関して不安を感じていたが、カジュアルな雰囲気の中落ち着いて質疑応答に挑むことができ、当初の不安は杞憂であった。会場内の中庭では、ハワイらしき心地よい風と美しい太陽が降り注ぎ、発表前の緊張をリラックスすることができた。参加者の服装は、Tシャツからスーツまで、十人十色であったが、オフィスカジュアルが多く見られた。申請者は、襟付きのアロハシャツがハワイでの正装であることを考慮し、会場近くのディスカウントショップで購入したアロハシャツを着用し、ポスター発表に参加した（図2,3）。

3. 学会参加の効果

申請者は、生物電気化学という学際的な研究を遂行しており、国境を越えた分野横断的な意見交換が可能な本学会に参加することにより、更に知見を広げることを目的とし、



図2 発表会場での記念撮影。

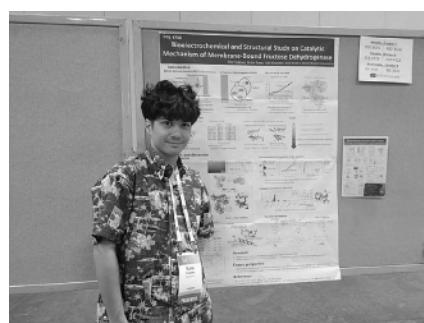


図3 ポスター発表の様子。

本学会に参加した。慣れない英語でのコミュニケーションに多少の戸惑いは感じながらも、申請者の研究内容である「酵素電極反応」について、有意義な議論ができ、多くを学ぶことができた。大御所の先生方と一緒に討論をする機会も多々あり、国内学会では味わうことのできない刺激をいただいた。特に、酵素電極反応の重鎮であるノースカロライナ大学の Sode 教授からは、有益な質問を多々頂いた。

主宰が米国電気化学会であることもあり、申請者が参加したジェネラルセッションでは、農学・生物学系の発表は多少畠違いに感じることもあった。実際、酵素電極反応の概念や可能性を討論する際に困難を感じた場面があった。しかしながら、電気化学の理論や各種解析法を専門とする先生方から頂いたアドバイスは、農学研究科に所属する申

請者にとっては、ウイークポイント克服に必至なものであった。特に、交流インピーダンス法を用いた実験など、本会議に参加しなければ確実に思いもよらなかったアイデアをいただき、酵素電極反応の応用可能性を一層理解できた。この点を顧みて、学際的な視野を広げるという当初の目的は十分に達成することができたと自負している。

申請者は、博士課程在学中あるいは学位取得後に海外で研究を行うことを計画しており、PRiME2024における経験は、確実に英語で行う討論における課題と手応えを確実に感じ取ることができ、自身の研究者キャリアにとって極めて重要な礎となると確信している。本会議への参加にあたり、最後になりますが、多大なる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。

International Conference on Polyphenols and Health 参加報告書

芝浦工業大学SIT 総合研究所
藤井靖之

1. 学会の概要

2024年10月16-19日にアメリカのマサチューセッツ州ボストンで開催された11th ICPH (International Conference on Polyphenols and Health) に参加した。10月のボストンは、10°C前後で朝夜はさらに冷えたが、紅葉にはもう少しだった。また、缶ビール1本1,500円と物価の高さには驚かされた。

ICPHは2年に一度開催されるポリフェノールに関する国際学会で、今回はブリガム・アンド・ウイメンズ病院／ハーバード大学医学部の JoAnn Manson 先生と同所准教授 Howard Sesso 先生の共同主催によって開催された。6つのkeynoteと7つのセッションが組まれ、ポスターセッ

ションでは昼ごはんの後半の時間を使ってポスターフラッシュツアーが催され、各会場で盛んにディスカッションが交わされた。

アメリカでカカオポリフェノールを用いて、2.1万人の高齢者を対象に3.6年間介入したCOSMOS trial (COcoca Supplement and Multivitamin Outcomes Study) の結果が2022年に報告され (Howard D Sesso et al. Am J Clin Nutr 2022), 一日500 mgのカカオポリフェノールの摂取が、心血管系疾患死を27%抑制することが明らかにされた。さらに、Adam M. BrickmanらはCOSMOS trialの脳機能への影響について解析し、生活水準が低位な高齢者の海馬依存性認知機能に寄与することを見出した (Adam M. Brickman et al. PNAS 2023)。これら大規模長期摂取



写真1 ボストンの街並み



写真2 ボストン名物ロブスター・ロール



写真3 マサチューセッツ工科大学

試験の結果から、ポリフェノールの機能性はより注目を集め、ヨーロッパではヒト試験を用いて盛んに検証されている。今回の国際会議では、様々なポリフェノールを用いた数多くのヒト試験が報告され、さらにそれらをデータベース化するプロジェクトが発表された。8,000種存在するポリフェノールのうち、どのような構造の化合物が有効なのか、至適用量がどれくらいなのかなど推測する手がかりになり、今後注目を集めそうである。

2. 筆者の発表について

筆者は“A single dose of flavanol induces arousal by a mechanism different from that of caffeine.”というタイトルでポスター発表をした。カカオポリフェノールが有する特有な味質である渋味刺激が脳の青斑核に入力され、ノルアドレナリンが視床下部視索前野に存在するスリープアク

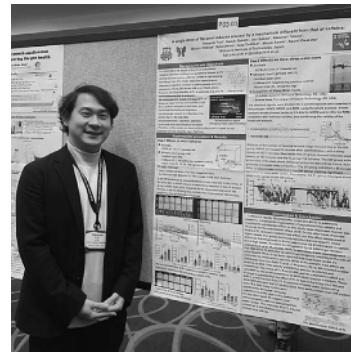


写真4 発表の様子

ティブニューロンに投射されることで、覚醒する（目がさめる）ことを発表した。

多くの研究者はポリフェノールの反復摂取がどのような機能性をもたらすのか検証している一方で、筆者は単回摂取が脳機能に与える影響について発表したため、どのような機序なのか、ポリフェノールは苦味もしくは渋味を有するが、苦いポリフェノールではどうなのかなど、多くの質問をもらい討論を深めた。

今回の国際会議を通して、地域ごとに研究に用いるポリフェノールの違いや研究の方向性、思考が異なり、非常に興味深かった。研究者ごとに発想やアプローチが違うからこそ、多角的に検証を進めることができることをまじまじと感じた。次回2026年度大会は、日本の誘致活動の結果、横浜で開催されることが決定した。それまでに新たな知見を重ねたい。

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

11th International Conference on Polyphenols & Health 参加報告

徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学域食料科学分野 向井理恵

開催期日：2024年10月16日-19日

開催地：Boston, MA, USA

International Conference on Polyphenols & Health (ICPH) は2年に1度開催されるポリフェノールと健康に関する国際学術会議です。新型コロナウイルス感染症の影響により、2022年にロンドンで開催された会議に参加できなかつた私にとって、今回の出席は重要な意義をもちました。

第11回目となる ICPH2024 では、keynote lecture, invited lecture, oral presentation, poster presentation が行われま

した。Keynote lecture の一つでは cellular aging がトピックとして挙げられ、米国Cedars-Sinai Medical Center の Prof. James Kirkland が登壇し、細胞の老化を予防する senolytics とポリフェノールに関する研究が紹介されました。この研究はポリフェノールの健康増進効果の領域を広げるものとして注目されており、興味深い内容でした。Oral presentation では、臨床試験に関する発表が多く行われました。その中で、ポリフェノールの吸収や代謝に関する個人間の違いについて解析し、いくつかの代謝タイプに分類した研究発表がありました。ポリフェノールの代謝



写真1 学会のメインスライド

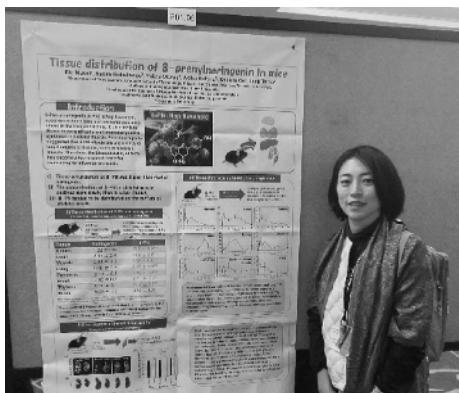


写真2 発表風景

には腸内細菌が関わることが知られていますが、今回の発表では腸内細菌の影響と個人固有の代謝パターンとの組み合わせによる総合的な解析結果が紹介されました。そのほか、ポリフェノールの分析や慢性疾患の予防に関する報告も多くありました。

今回私は、ポリフェノールの体内動態に関するポスター発表を行いました。ポリフェノールの構造は多岐にわたっており、その体内動態は母骨格や官能基の影響を受けるため、生体内での分布も個々に異なります。今回の発表に対し、ポリフェノールの分析を専門とする研究者と議論を交わし、分析手法に対する有益なアドバイスを得ることができました。



写真3 会場の様子

Coffee breakでは、ヨーロッパ圏の研究者と交流を深めました。まず、英国University of ReadingのProf. Jeremy Spencerとは、進行中の共同研究について状況報告を行いました。また、英国University of BirminghamのDr. Catarina Rendeiroとは、運動機能および認知機能とポリフェノールとの関係に関する研究について情報交換を行いました。それにより、共同研究の実施に向けた議論を進めることになりましたことは、大きな収穫でした。

今回ICPH2024に参加したことにより、ポリフェノールや健康に関する研究の潮流を感じるとともに、新たな概念や手法について知見を広げることができました。また、勉強不足を痛感する場面もあり、今後の課題を発見する良い機会となりました。最後になりましたが、本会議への参加にあたり、多大なご支援を賜りました公益社団法人日本農芸化学会に厚く感謝申し上げます。

第11回 Internarional Conference on Polyphenols and Health (ICPH: ポリフェノールと健康国際会議) 参加報告

神戸大学大学院農学研究科
山下陽子

2024年10月16日（水）～19日（土）にアメリカ・ボストン

で開催された 11st Internarional Conference on Polyphenols



図1 学会会場



図2 会場内の様子

and Health (ICPH; ポリフェノールと健康国際会議)に参加した(図1)。ICPHは2年に一度開催されるポリフェノールと健康に関する国際会議である。世界各国からポリフェノールの機能性に関する研究者が集まり、熱心な議論が交わされる。今回は、ボストンで開催された。ボストンにはハーバード大学を始め、数多くの大学や研究機関が集まる街であり、学生がたくさん見受けられた。街並みは落ち着いた建物が多いことが印象的であった。滞在期間中、朝夕は10度以下に気温が下がる気候で、すでに紅葉が始まっていたが美しかった。今年のICPHは、40題の口頭発表と97題のポスター発表があった。参加者同士がとてもフレンドリーで、会場での質疑応答はもちろん、コーヒーブレイクやポスターでのセッションタイムにも様々な情報交換がなされ、大変有意義な時間を過ごすことができた(図2)。

筆者は、Polyphenol-rich extract from black soybean seed coat ameliorates high-fat diet induced obesity and abnormal feeding rhythm.というタイトルでポスター発表に採択され、発表を行った(図3)。黒大豆に含まれるポリフェノールが高脂肪食摂取により誘導される脳視床下部のミクログリアの炎症を抑制し、食事リズムの異常を改善することで肥満予防に寄与するというメカニズムについてである。肥満予防のメカニズムとして、末梢組織ではなく脳の炎症をターゲットにしている点と、高脂肪食が食事リズムの乱れを誘導するという点が、参加者にとっては新奇的なアプローチであり、興味を持っていただいた。しかし、ポリフェノールは、脳に移行するのか?という重要な指摘を多くいただいた。今後の研究の発展のための貴重な助言なども多

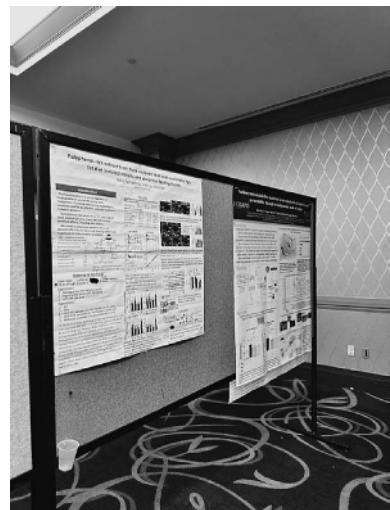


図3 発表したポスター

くいただきました。その他にも、今後実施していくたいと考えているポリフェノールの体内動態や認知機能に関する発表も数多くあり、多くの情報と成果を得ることができた。

博士課程後期課程3年生の学生も1名同行させ、世界の研究を目の当たりにする機会を得ることができたとともに、積極的に情報交換に参加していた点でも大きな成果であったと感じている。歴史的な円安や物価高の状況で、費用面からも参加は厳しいと断念しようとしていたが、本助成をいただきことができ、参加がかなったことは本当にありがとうございました。最後に、本学会への参加にあたり、多大なるご支援賜りました公益財團法人日本農芸化学会に熱く感謝申し上げます。

7. 第1回女性研究者チャレンジ研究 助成金報告書

第1回女性研究者チャレンジ研究助成報告書

嗅覚刺激による心理・行動変容の新たな指標確立 一人の感情に変化をもたらしうる匂いによる感情の動きの解析—

東京大学大学院農学生命科学研究科生物化学研究室
白須未香

背景

現代社会においては、体臭＝悪臭とみなされ敬遠されがちであるが、実は、その慣れ親しんだ愛おしい香りは、安寧や幸福感ももたらすツールともなり得る。実際に、どんな香りが好きかという自由記述アンケートを取ると、“赤ちゃんの頭の匂い”や“配偶者の洋服の匂い”というように体臭に起因する匂いが上位にランクインする。本研究では、ヒトが安心して心地よく過ごせる香り空間の創造を大目標とし、体臭が人間関係にもたらすポジティブな効果を複数の生理・心理評価系を用いて実証することを目指した。

目的

種の繁栄存続のためには、適切な時期に、最適な状態の配偶者と出会い、生殖行動を営むことは必須である。近年、受胎可能な排卵期の女性腋臭（着衣腹部）が、他の時期の匂いと比較して、男性にとって快く魅力的に感じるという研究が複数報告され、排卵期女性の匂いが男性にとって魅力的なシグナルとして機能している可能性が示されている（図1）。しかし、その化学的実体は未だ不明であり、その質的プロファイルや心理生理効果を定性定量的に示す知見はない。そこで、本研究では、女性の排卵期に着目し、排卵期に増加する香り成分の同定を行い、当該香りが異性の感情にもたらす効果を官能評価、心理評定、生理計測により検証した。

排卵期特徴成分の同定

まず、月経周期の各時期の腋臭をガーゼで捕集し、官能評価を実施、先行研究と同様に、排卵期腋臭が月経期のそれよりも快であることを明らかにした（図2、腋臭捕集：女性n=21、匂い評価：男性n=21）。次に、加熱脱着装置付GCMSと大容量ヘッドスペース濃縮システムを併用し、低・高揮発性の成分が混在する腋臭を從来よりも網羅的に解析する手法を確立した。本手法を用いて、月経・卵胞・

排卵・黄体期の周期ごとに21名の腋臭を捕集分析し、排卵期に多く分泌される三つの香り成分（以下、排卵期3成分）の同定に成功した（図3）。なお、腋臭捕集女性のABCC11遺伝子（腋臭強度は野生型>変異型、欧米人98%、アジア人20%が野生型）も並行して調査し、〈排卵期3成分〉が遺伝型によらず、人種間で普遍的に排卵期に増加する成分であることも明らかにした。また、月経期、卵胞期、黄体期のそれぞれに特徴的に増加する成分の同定にも成功した。

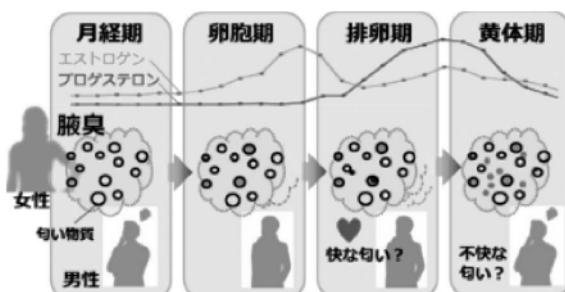


図1 排卵期の女性腋臭は快い

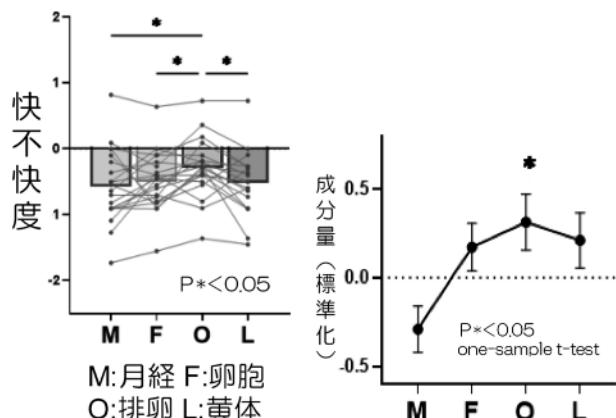


図2 腋臭捕集模式図

図3 排卵期増加成分例

匂いの質的プロファイルと心理・生理効果の検証

20-30代男性を対象とした官能心理評価より、〈排卵期3成分〉は、シトラス・香粧品様の香りを有し、匂いを嗅ぐことで安心・落ち着き（リラックス感）を感じることが示された（対溶媒コントロール、 $p < 0.05$, Paired t-test with FDR correction, $n = 72$ ）。本結果より、排卵期に増加する香り成分〈排卵期3成分〉は、一般的に好まれる質の匂いを有し、かつ、男性に安寧効果をもたらすと示唆された。また、一般的に不快と評定されるモデル腋臭（過去に報告された腋臭分析論文参照）に〈排卵期3成分〉を混ぜることで不快さ・汗臭さが減りリラックス感が増すことも示された（図4, $p < 0.001$, Paired t-test with FDR correction, $n = 72$ ）。これは、排卵期女性の腋臭が男性にとって快いものであるという過去の漠然とした心理的知見に、確かな物質レベルのエビデンスを与えるものであると考える。続いて、社会実装する上でエビデンスをより確かなものにするために、〈排卵期3成分〉の匂い呈示により生じる男性の心理生理的変化を調査した。具体的には、①感情の変化を測定する心理尺度評定より、本成分が敵意を抑制しリラックス度を増すこと、②女性顔画像に対する印象評定実験より、本成分が顔から感じるイメージをアップさせること、③唾液中アミラーゼ濃度を指標とする悪臭ストレス測定実験より、モデル腋臭のみでは生じるストレス上昇が本成分のミックスにより抑制されることが明らかになった。以上の〈排卵期3成分〉が有する効果と、月経周期の各時期に特徴的な同定成分の時期特定マーカーとしての有用性

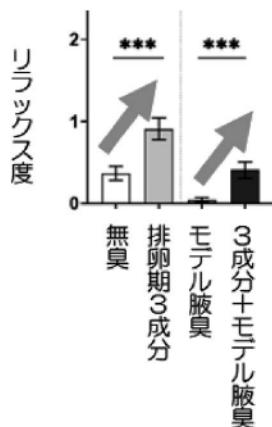


図4 排卵期3成分はリラックス度を上げる

について、“香料組成物および月経周期マーカー”として特許出願を行った。本研究を通して明らかにされた排卵期の香り成分が、例えば、人が多く集まる場におけるポジティブな環境作りに寄与できるのかといったことを今後検証していきたい。

謝辞

本研究は、公益社団法人日本農芸化学会農芸化学女性研究者チャレンジ研究助成金、JSPS科研費の助成を受け、東京大学農学生命科学研究科生物化学研究室の皆様のお陰で遂行することができました。また、日本農芸化学会での学会発表の際には、有意義なディスカッションをさせていただき、関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

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 © 2025 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（2025）

2025年10月1日発行

非売品

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

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