ISSN 2186-7976

March 5, 2016
平成２８年３月５日発行

# Annual Meeting of the Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 2016

# 大会講演要旨集

## ■２０１６年度(平成２８年度)大会[札幌]■



公益社団法人日本農芸化学会

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

© Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

# 目次

授賞式、受賞者講演、受賞者----------3
一般講演(ポスター発表)番号の見方----------7
一般講演(ポスター発表)プログラム----------8
一般講演(ポスター発表)要旨----------71
大会シンポジウムプログラム----------2, 202
大会シンポジウム要旨----------2, 210
ランチョンシンポジウムプログラム----------2, 349
ランチョンシンポジウム要旨----------2, 350
ランチョンセミナープログラム----------2, 353
ランチョンセミナー広告要旨----------2, 356

# 日本農芸化学会
# (2016 年度)学会賞等授賞式，受賞者講演，受賞者一覧

日　時：2016 年 3 月 27 日(日) 9 時 30 分～16 時 10 分(受付 9 時 00 分～)
場　所：札幌市教育文化会館大ホール(札幌市中央区北 1 条西 13 丁目)
進行予定：

(9:30) **2016 年度日本農芸化学会賞等授賞式**
　　1　授賞選考委員長報告
　　2　日本農芸化学会賞等授与
(9:50) **日本農芸化学会特別賞授賞式**
(9:55) **第 13 回農芸化学研究企画賞表彰式**
　　1　産学官学術交流委員長報告
　　2　農芸化学研究企画賞表彰
(10:00) **BBB 論文賞，BBB Most-Cited Paper Award 及び BBB Most-Cited Review Award 表彰式**
　　1　英文誌編集委員長報告
(10:05) **会長祝辞**
(10:10) ＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
(10:20) **受賞者講演開始**
(10:20) 日本農芸化学会賞受賞者講演(2 件，各 25 分)
(11:10) 日本農芸化学会功績賞受賞者講演(2 件，各 25 分)
(12:00) ＊＊＊＊＊＊　休憩 60 分間　＊＊＊＊＊＊
(13:00) 農芸化学技術賞受賞者講演(4 件，各 15 分)
(14:00) 農芸化学奨励賞受賞者講演　前半(5 件，各 12 分)
(15:00) ＊＊＊＊＊＊　休憩 10 分間　＊＊＊＊＊＊
(15:10) 農芸化学奨励賞受賞者講演　後半(5 件，各 12 分)
(16:10) **終了予定**
(18:30～20:30) **懇親会**　ホテルロイトン札幌

受賞者：

**【日本農芸化学会賞】**(2 件，50 音順)

河田　照雄　(京都大学大学院農学研究科)
　　「メタボリック症候群調節因子の栄養生化学的研究」
佐藤隆一郎　(東京大学大学院農学生命科学研究科)
　　「コレステロール代謝制御の分子細胞生物学研究」

**【日本農芸化学会功績賞】**(2 件，50 音順)

福田　雅夫　(長岡技術科学大学)
　　「微生物による芳香族化合物分解システムの生化学的・分子生物学的解明」
山田　耕路　(崇城大学生物生命学部)
　　「食品成分の体調調節機能に関する統合的研究」

**【農芸化学技術賞】**(4 件，企業名 50 音順)

山本　万里・立花　宏文・酒瀬川洋児・岡本　武久(食品総合研究所・九州大学大学院・JA かごしま茶業株式会社・アサヒ飲料株式会社)
　　「健康機能を有する緑茶「べにふうき」の効果，作用機序，茶葉特性の解明ならびに飲食品の開発」
上田　恭義・植田　尚宏・久保　博司・北野　光昭(株式会社カネカ)
　　「還元型コエンザイム Q10 の実生産および商品化に向けた技術研究開発」

キッコーマン株式会社（賛助会員）
「醸造技術の革新による血圧降下ペプチド高含有醤油の開発」
藤原　大介・城内　健太・杉村　哲・藤井　敏雄（キリン株式会社・小岩井乳業株式会社）
「ウイルス感染防御機能を持つ *Lactococcus lactis* JCM5805 の発見と事業応用」

**【農芸化学奨励賞】**（10 件，50 音順）
浅水　俊平（東京大学大学院農学生命科学研究科）
「放線菌由来窒素含有天然生物活性物質の生合成に関する研究」
大池　秀明（農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所）
「食品・栄養成分と生体概日リズムの相互作用に関する研究」
岸野　重信（京都大学大学院農学研究科）
「嫌気性細菌における特異な脂肪酸代謝の解明と応用」
近藤　竜彦（名古屋大学大学院生命農学研究科）
「植物ペプチドホルモンに関する生物有機化学的研究」
志水　元亨（名城大学農学部）
「糸状菌のユニークな代謝系を支える新規酵素の発見と多様な代謝を制御する細胞内レドックス恒常性維持機構の解明」
新谷　政己（静岡大学大学院総合科学技術研究科）
「環境細菌間における可動性遺伝因子の挙動に関する研究」
富田　武郎（東京大学生物生産工学研究センター）
「アミノ酸代謝に関わる酵素に関する構造生物学的研究」
野村　泰治（富山県立大学工学部）
「有用植物二次代謝産物の生合成機構に関する生化学および分子細胞遺伝学的研究」
鮒　　信学（静岡県立大学食品栄養科学部）
「芳香族ポリケタイドの生合成研究と物質生産への応用」
渡辺　大輔（奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科）
「酵母における環境応答と代謝調節に関する分子遺伝学的研究とその応用」

**【第 13 回農芸化学研究企画賞受賞者】**（3 件）
**重点研究領域①　先導的生物活性物質研究と新技術開発**
（1）革新的医薬医療を志向した生物活性物質の探索・合成・生産等の研究と新技術開発
（2）革新的農林水産物生産を志向した生物活性物質研究と新技術開発
臼井　健郎（筑波大学生命環境系）
「非侵襲的薬剤投与法を可能にする上皮タイトジャンクション可逆的開口剤の開発」
**重点研究領域②　機能性食品素材および食品**
仲川　清隆（東北大学大学院農学研究科）
「食後高血糖改善成分を含む新規食材の活用に関する研究」
**重点研究領域③　グリーンバイオテクノロジー**
（1）バイオマス資源の生産・供給・利用（有用物質生産プロセス等）に関わるテクノロジー
（2）省資源・省エネルギープロセスに関わるバイオテクノロジー
（3）環境浄化・資源循環に関わるバイオテクノロジー
笠井　大輔（長岡技術科学大学工学部）
「廃棄ゴムの再資源化を目指したゴム処理技術の革新」

**【平成 28 年度日本農学賞受賞者】**（本会推薦）
本会より推薦した下記の者が日本農学賞を受賞いたしました.
2016 年 4 月 5 日東京大学山上会館で開催される日本農学大会において，日本農学賞授与式並びに受賞者講演が予定されています.
受 賞 者：河岸　洋和（静岡大学グリーン科学技術研究所 教授）
受賞題目：キノコの産生する 2 次代謝産物に関する天然物化学的研究

**【2015年(Vol.79)B.B.B. 論文賞(掲載順)】**(11件)

pp.422～431 Taku Chibazakura, Yui Toriyabe, Hiroshi Fujii, Kiwamu Takahashi, Mariko Kawakami, Haruna Kuwamura, Hazuki Haga, Shun-ichiro Ogura, Fuminori Abe, Motowo Nakajima, Hirofumi Yoshikawa & Tohru Tanaka
5-aminolevulinic acid enhances cell death under thermal stress in certain cancer cell lines

pp.443～455 Sumiko Nakamura, Hikaru Satoh & Ken'ichi Ohtsubo
Development of formulae for estimating amylose content, amylopectin chain length distribution, and resistant starch content based on the iodine absorption curve of rice starch

pp.658～663 Kazuhiro Sakamoto, Tatsuya Okahashi, Shigenobu Matsumura, Yoko Okafuji, Shin-ichi Adachi, Satoshi Tsuzuki, Kazuo Inoue & Tohru Fushiki
The opioid system majorly contributes to preference for fat emulsions but not sucrose solutions in mice

pp.845～854 Motokazu Nakayama, Kanami Shimatani, Tadahiro Ozawa, Naofumi Shigemune, Daisuke Tomiyama, Koji Yui, Mao Katsuki, Keisuke Ikeda, Ai Nonaka & Takahisa Miyamoto
Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis*

pp.1240～1245 Hiroshi Kumagai, Mami Fujiwara, Masaki Kuse & Hirosato Takikawa
A concise synthesis of optically active solanacol, the germination stimulant for seeds of root parasitic weeds

pp.1430～1437 Naoki Harada, Toshiki Takagi, Yoshihisa Nakano, Ryoichi Yamaji & Hiroshi Inui
Protein arginine methyltransferase 10 is required for androgen-dependent proliferation of LNCaP prostate cancer cells

pp.1447～1453 Shiho Murakami, Sayuri Nakayama, Makoto Hattori & Tadashi Yoshida
Establishment and characterization of a novel murine model for pollen allergy

pp.1473～1480 Daisuke Matsui & Yasuhisa Asano
Heterologous production of L-lysine $\varepsilon$-oxidase by directed evolution using a fusion reporter method

pp.1608～1614 Siqi Tian, Akinori Ohta, Hiroyuki Horiuchi & Ryouichi Fukuda
Evaluation of sterol transport from the endoplasmic reticulum to mitochondria using mitochondrially targeted bacterial sterol acyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*

pp.1946～1953 Kouji Kuramochi, Tomohisa Matsushita & Kazunori Tsubaki
Catch and release of concanavalin A by a mannose-immobilized photoaffinity PEGA resin coupled with a cleavable disulfide linker

pp.1980～1986 Yoshiki Takai & Kazushige Touhara
Enantioselective recognition of menthol by mouse odorant receptors

**【Most-Cited Paper Award】** 被引用回数　23 回

Vol.77, No.1, pp.167～172

Akane KUBOTA, Kimitsune ISHIZAKI, Masashi HOSAKA & Takayuki KOHCHI

Efficient *Agrobacterium*-Mediated Transformation of the Liverwort *Marchantia polymorpha* Using Regenerating Thalli

**【Most-Cited Review Award】** 被引用回数　29 回

Vol.77, No.3, pp.455～466

Tadasu URASHIMA, Epi TAUFIK, Kenji FUKUDA & Sadaki ASAKUMA

Recent Advances in Studies on Milk Oligosaccharides of Cows and Other Domestic Farm Animals

# 一般講演（ポスター発表）番号の見方

○ 講演番号の

最初の１桁の数字は講演発表日

２ ⟶ ３月２８日（月）
３ ⟶ ３月２９日（火）
４ ⟶ ３月３０日（水）

次のアルファベットは大分類

| | |
|---|---|
| Ａ | 環境科学・バイオマス利用 |
| Ｂ | 有機化学、天然物化学 |
| Ｃ | 生体高分子・生体脂質 |
| Ｄ | 酵素 |
| Ｅ | 食品 |
| Ｆ | 微生物 |
| Ｇ | 動物 |
| Ｈ | 植物 |
| Ｉ | 糖鎖生化学・糖鎖工学 |
| Ｊ | 生物化学工学 |
| Ｋ | 新技術 |

次の数字は、ポスター番号

００１～２３２

○ ポスター発表のコアタイムは、次の通りです。

講演番号の末尾が

奇数番号　　１３：１５～１４：１５
偶数番号　　１４：１５～１５：１５

たとえば、**２Ｆ１８５**は、

３月２８日（月）、大分類：微生物、１８５番　のポスターとなり
発表のコアタイムは１３：１５～１４：１５となります。

## 一般講演（ポスター発表）プログラム

1. ◦はコアタイム発表者を示す．
2. 講演番号 1 文字目（数字）は講演日（2：3 月 28 日，3：3 月 29 日，4：3 月 30 日），2 文字目は大分類，3〜5 文字目はポスター番号（001〜232）．
3. ポスター発表のコアタイムは奇数番号：13:15〜14:15，偶数番号：14:15〜15:15 となる．
   （例）「2A001」は，3 月 28 日，大分類「環境科学・バイオマス利用」．ポスター番号 001，コアタイム 13:15〜14:15 となります．

第 2 日（3 月 28 日）

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

### A：環境科学・バイオマス利用

**2A001　ポリアミド 4 の各種環境での生分解**
◦山野尚子，川崎典起，中山敦好　（産総研）

**2A002　脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解**
◦中山敦好，山野尚子，川崎典起，上垣浩一　（産総研）

**2A003　魚類の共代謝動態に基づく生態系評価法の構築**
◦朝倉大河[1,2]，坂田研二[2]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]　([1]横市院・生医，[2]理研 CSRS，[3]名大院・生命農）

**2A004　魚類代謝物および共生微生物複合系を特徴付けるデータサイエンス手法の構築**
◦菊地　淳[1,2,3]，佐藤有穂[2]，福地　実[2]，朝倉大河[1,2]，坂田研二[1]，魏　菲菲[1]，伊達康博[1,2]　([1]理研環境資源，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農）

**2A005　Cooperative pyrene degradation by a microbial consortium obtained from mangrove sediments in Thailand**
◦Felipe VEJARANO[1]，Joydeep CHAKRABORTY[1]，Masaki SHINTANI[2]，Pagakrong WANAPAISAN[4]，Chanokporn MUANGCHINDA[4]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Kengo INOUE[3]，Kazunori OKADA[1]，Onruthai PINYAKONG[4]，Hideaki NOJIRI[1]　([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ., [3]Univ. of Miyazaki, [4]Chulalongkorn Univ.）

**2A006　ピレン分解菌の単離と比較ゲノム解析**
◦森田知美[1,2]，　ペハラノフェリペ[1]，　水口千穂[1]，　ワナパイサンパガクロン[3]，ムアンチンダチャノクポーン[3]，岩田健一[2]，岡田憲典[1]，ピンヤコンオルタイ[3]，野尻秀昭[1]　([1]東大生セ，[2]芝工大シ生，[3]チュラーロンコーン大学）

**2A007　カルバゾール資化性新規海洋性細菌の探索と分解系遺伝子の取得**
◦森屋　純，岡崎洋介，岩田健一　（芝工大院シ）

**2A008　多環芳香族化合物資化性新規海洋性細菌の探索**
菅谷優斗，◦岩田健一　（芝工大シ生）

**2A009　海洋性キシレン分解菌の分離と解析**
◦寺垣内将也，岩木宏明，長谷川喜衛　（関西大化学生命工）

**2A010　*Corynebacterium cyclohexanicum* MU 株のシクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子の解析**
◦佐藤ゆう，岩木宏明，長谷川喜衛　（関西大化学生命工）

**2A011　*Burkholderia* sp. KU-46 株の 2,4-ジニトロフェノール分解系遺伝子の解析**
◦小早　希，岩木宏明，長谷川喜衛　（関西大化学生命工）

**2A012　非放射性同位体を用いた野菜等におけるセシウムの挙動解析**
◦本條秀子，中山和美　（東京電力福島復興本社）

**2A013　PCB/biphenyl 分解細菌株が有する新規 haloalkane dehalogenase 遺伝子の解析**
◦佐藤あや華，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝　（東北大学・院生命科）

**2A014　ハロアルカンデハロゲナーゼの細胞内酵素機能進化系の構築**
◦小山　旺[1]，森内良太[2]，大坪嘉行[1]，永田裕二[1]，津田雅孝[1]　([1]東北大学・大学院生命科学研究科，[2]静岡大学・グリーン科学技術研究所）

**2A015　*Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化**
◦高　未麗[1]，松村吉信[2]　([1]関大院 化生工，[2]関西大 化生工）

**2A016　低濃度水銀(II)イオン溶液における水銀減少機構の解明**
◦井村祐己，渡辺翔太，吉村悦郎　（東大院農生科）

**2A017　渡良瀬遊水地に生息する藻類の銅耐性解析**
◦清水佑一[1]，川瀬俊悟[2]，柏田祥策[1,2,3]，長坂征治[1,2,3]　([1]東洋大生命科学，[2]東洋大院生命科学，[3]東洋大学生命環境科学研究センター）

**2A018　Pseudomonas sp. YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL －フルオロ酢酸(MFA)複合体の分子動力学(MD)計算による構造解析**
◦中井康太[1]，田中成典[2]，中村　卓[1]　([1]長浜バイオ大学大学院，[2]神戸大学大学院）

**2A019　海鳥における塩素化多環芳香族類の生体蓄積性**
◦高柳茉友子，新妻靖章，大浦　健　（名城農）

**2A020　Fps1 のキシロース資化性を示す組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の発酵に及ぼす効果**
◦赤松　隆，田口久貴　（崇城大 生物生命）

**2A021　キシロース資化性を示す組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるキシリトール低蓄積を導く遺伝背景**
◦田口久貴，赤松　隆　（崇城大・生物生命）

**2A022　出芽酵母への高効率なキシロース資化能付与に資するキシロースイソメラーゼの開発**
清家泰介[1,2]，　藤森一浩[1]，　◦佐原健彦[1]，　小林洋介[1]，　扇谷　悟[1]，鎌形洋一[1]　([1]産総研 生物プロセス，[2]国立遺伝学研究所）

**2A023　セルロース系エタノール生産のための C5CC6 発酵酵母の開発：Xylose isomerase 遺伝子の改良と同時糖化発酵プロセスにおける利用**
◦藤森一浩，　清家泰介，　小林洋介，　佐原健彦，　扇谷　悟，鎌形洋一　（産総研生物プロセス）

**2A024　セルロース系バイオエタノール生産実用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 におけるペントースリン酸経路の最適化と耐熱化**
◦小林洋介[1]，　藤森一浩[1]，　佐原健彦[1]，　鈴木俊宏[2]，　蒲池沙織[2]，松鹿昭則[2]，星野　保[1,2]，扇谷　悟[1]，鎌形洋一[1]　([1]産総研 生物プロセス，[2]産総研 機能化学）

**2A025　C5C6 糖類発酵酵母を用いたパイロットスケールにおける同時糖化併行複発酵**
◦沖野祥平，池應真実，種田大介　（日揮）

**2A026　水蒸気爆砕処理バガス，及びアビセル糖化時における，基質へのセルラーゼ各酵素の吸着脱離挙動の定量的解析**
◦豊澤佳子，沖野祥平，池應真実，種田大介　（日揮）

**2A027　ムコン酸生産の効率化に寄与する Protocatechuate decarboxylase 活性化機構の解析**
◦尾形拓哉，菊地晟弘，今　仁志，諸岡深雪，園木和典　（弘前大学）

**2A028　リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産**
◦菊地晟弘，諸岡深雪，尾形拓哉，園木和典　（弘前大・農生）

**2A030　バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発（その 1）*Trichoderma reesei* 糖化酵素におけるセルラーゼ成分比とバイオマス糖化効率の関係解析**
◦白井晴奈[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，森川　康[2]，小林良則[1]　([1]バイオインダストリー協会，[2]長岡技大）

**2A031　バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発 Trichoderma reesei PC-3-7 株の生産する成分酵素組成比率の検討**
◦千葉史子[1]，　白井晴奈[1]，　坂井可南子[1]，　志田洋介[2]，　小笠原渉[2]，森川　康[1]，小林良則[1]　([1]JBA つくば研，[2]長岡技術科学大学）

**2A032　バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発(その 3)バイオマス由来セルロースの構造解析および酵素糖化機構の解析**
◦三橋麻子[1]，　今井牧子[2]，　杉山淳司[2]，　志田洋介[3]，　小笠原渉[3]，森川　康[1]，小林良則[1]　([1]JBA つくば研，[2]京都大学生存圏研究所，[3]長岡技術科学大学）

**2A033　バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発（その 4）*Trichoderma reesei* PC-3-7 株由来高機能糖化酵素生産菌株の培養条件検討**

◦小林良則[1]，古川麻記子[1]，永岡幸一郎[1]，山口桂右[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，森川　康[1]（[1]JBA つくば研，[2]長岡技科大）

**2A034　*Pseudomonas* sp. 61-3 の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングと組換え大腸菌による共重合ポリエステルの生合成**

◦脇田　和[1]，倉富優季[2]，外村彩夏[3]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県立大院・環境共生，[2]熊本県立大・環境共生，[3]理研）

**2A035　組換え *Ralstonia eutropha* による糖からの P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの生合成**

◦倉富優季[1]，脇田　和[2]，外村彩夏[3]，田中賢二[4]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大・環境共生，[2]熊本県大院・環境共生，[3]理研，[4]近大・産理工）

**2A036　組換え大腸菌による乳酸ユニットを含む新規モノマー組成からなる生分解共重合ポリエステルの生合成**

◦後藤早希[1]，中上美歩[2]，外村彩夏[3]，田口精一[4]，松本謙一郎[4]，田中賢二[5]，松崎弘美[1,2]（[1]熊本県大院・環境共生，[2]熊本県大・環境共生，[3]理研，[4]北大院・工，[5]近大・産理工）

**2A037　林地残材糖化液からの効率的な乳酸生産**

◦荒井隆益[1]，李　　霞[1]，池　正和[2]，徳安　健[2]，小杉昭彦[1]（[1]国際農研，[2]農研機構）

**2A038　付着安定性を有する新規ウキクサ成長促進微生物の単離とその特徴**

◦山川祐介[1]，三輪京子[1,2]，森川正章[1,2]（[1]北大院・環境，[2]JST-ALCA）

**2A039　Development of a simple and rapid method to estimate decomposition rate of organic materials**

◦Nadda KHONGSAY，Kiwako S. ARAKI，Masaki MUKAI，Dinesh ADHIKARI，Motoki KUBO（Ritsumeikan Univ.）

**2A040　スギリグニンを分解する新規菌類の探索**

◦土田博子，松本朋子，菊池　淳，松井　南（理研 CSRS）

**2A041　竹バイオマスのバイオリファイナリー**

◦椎葉　究[1]，新井一斗[1]，安部智子[1]，望月瑠也[1]，関本智登[1]，小笠原武大[1]，吉田周平[2]，内園浩幸[2]，平木　純[2]（[1]東京電機大学，[2]JNC 株式会社）

**2A042　海産バイオマス成分を利用可能なポリヒドロキシアルカン酸合成微生物の探索**

◦幸田有以，花角優太，山田美和，下飯　仁（岩手大農）

**2A043　バイオ燃料電池のための好熱菌由来酵素を用いたアミノ酸人工代謝経路の構築**

◦田中志乃[1]，里村武範[2,3]，坂元博昭[2]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[2,3]（[1]福井大学工，[2]福井大院工，[3]福井大生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大工）

**2A044　ゲノム解析による微生物燃料電池での発電に関わる遺伝子の探索**

◦井上謙吾[1]，河野好裕[1]，小椋義俊[2]，林　哲也[2]（[1]宮崎大農，[2]九大医）

**2A045　バイオ電池のための超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼを用いたバイオカソードの構築**

◦高村映一郎[1]，坂元博昭[1,3]，里村武範[2,3]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維，[2]福井大学院・工・生物応用化，[3]福井大学・生命セ，[4]香川大農，[5]大阪工大）

**2A046　超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素を用いたバイオアノードの電極表面解析**

◦小松丈紘[1]，山崎晃司[2]，坂元博昭[2]，里村武範[1,3,6]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,3,6]（[1]福井大学・工・生物応用化，[2]福井大院・工・繊維，[3]福井大院・工・生物応用化，[4]香川大農，[5]大阪工大，[6]福井大学・生命セ）

**2A047　超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来のグルコース脱水素酵素を用いたバイオアノードの構築**

◦殿岡愛菜[1]，向當綾子[2]，坂元博昭[2,6]，里村武範[1,3,6]，櫻庭春彦[4]，大島敏久[5]，末信一朗[1,2,6]（[1]福井大・工・生物応用化，[2]福井大院・工・繊維，[3]福井大院・工・生物応用化，[4]香川大農，[5]大阪工大，[6]福井大・生命セ）

**2A048　プローブ修飾ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の電気化学的 DNA バイオセンシング**

◦中村卓登[1]，澤井崇行[2]，渡邊和也[2]，坂本博昭[2]，吉見泰治[1,3]，里村武範[1,3,4]，末信一朗[1,2,3,4]（[1]福井大・工・生物応用化，[2]福井大院・工・繊維，[3]福井大院・工・生物応用化，[4]福井大・生命セ）

## B：有機化学，天然物化学

**2B001　サナギタケ(*Cordyceps militaris*)由来の機能性化合物の探索**

◦邱　偉涛[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[3]，西田浩志[4]，平井浩文[1,3,5]，河岸洋和[1,3,5]（[1]静大院・創造，[2]宇都宮大・バイオ，[3]静大農・応生化，[4]新潟薬科大・応生科，[5]静大・グリーン研）

**2B002　冬虫夏草(*Cordyceps militaris*)由来レクチンとその結合物質の糖鎖構造解析**

◦稲吉里美[1]，竹島愛乃[1]，鈴木智大[2]，崔　宰熏[1]，道羅英夫[3]，加藤竜也[1,3]，朴　龍洙[1,3,4]，三家本利之[5]，佐伯　潤[5]，小林夕香[6]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,3,4]（[1]静大農･応生化，[2]宇都宮大･バイオ，[3]静大・グリーン研，[4]静大院・創造，[5]にちはら総研，[6]J-オイルミルズ）

**2B003　高等菌類の子実体形成物質の探索**

◦呉　　静[1,2]，崔　宰熏[3]，平井浩文[1,3]，河岸洋和[1,3,4]（[1]静大･グリーン研，[2]JSPS，[3]静大農・応生化，[4]静大院・創造）

**2B004　サケツバタケ(*Stropharia rugosoannnulate*)由来 strophastrol 類，新規機能性物質の探索**

◦清水俊吾[1]，呉　　静[2]，崔　宰熏[1]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・グリーン研，[3]静大院・創造）

**2B005　ヤマブシタケ(*Hericium erinaceus*)培養ろ液由来の生理活性物質の探索**

◦内田和輝[1]，呉　　静[2]，石神洸太[1]，崔　宰熏[1]，徳山真治[1]，西田浩志[4]，平井浩文[1,2,3]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大農，[2]静大院･グリーン研，[3]静大院・創造，[4]新潟薬科大・応生科）

**2B006　黒穂菌とマコモの共生に関する化学的研究**

◦西山祐貴[1]，小堀　一[2]，石神洸太[3]，崔　宰熏[1]，徳山真治[1]，平井浩文[1,2,4]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・創造，[3]静大院農・応生化，[4]静大・グリーン研）

**2B007　ツチクラゲ(*Rhizina undulata*)培養ろ液由来の植物成長調節活性化合物の探索**

◦加藤理史[1]，小堀　一[2]，石神洸太[3]，崔　宰熏[1,3]，徳山真治[1,3]，平井浩文[1,2,3,4]，河岸洋和[1,2,3,4]（[1]静大院・総合農，[2]静大院・創造，[3]静大院・農，[4]静大・グリーン研）

**2B008　ナラタケ属の産生する他感作用物質に関する化学的研究**

◦小堀　一[1]，関谷　敦[2]，崔　宰熏[3]，平井浩文[1,3,4]，河岸洋和[1,3,4]（[1]静大院･創造，[2]森林総研，[3]静大農･応生化，[4]静大･グリーン研）

**2B009　微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索**

◦柘植聡志[1]，深澤　航[2]，森美穂子[1,3]，野中健一[1,3]，松本厚子[1,3]，野崎智義[4]，大村　智[3]，塩見和朗[1,3]（[1]北里大院，感染制御，[2]北里大 , 理学部，[3]北里大 , 生命研，[4]感染研）

**2B010　フェアリー化合物の新プリン代謝経路に関する化学的研究**

◦崔　宰熏[1]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，稲井　誠[3]，菅　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大院農･応生，[2]静大･グリーン研，[3]静県大･薬，[4]静大院・創造）

**2B011　イネにおけるフェアリー化合物 AOH の生合成経路に関する化学的研究**

◦杉浦　輝[1]，崔　宰熏[1]，平井浩文[1,2]，浅川倫宏[3]，稲井　誠[3]，管　敏幸[3]，河岸洋和[1,2,4]（[1]静大農･応生化，[2]静大･グリーン研，[3]静県大･薬，[4]静大院・創造）

**2B012　フェアリー化合物である ICA の代謝に関する化学的研究**

◦松崎信生[1]，崔　宰熏[2]，平井浩文[2,3]，近藤　満[3]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,3]（[1]静大院・創造，[2]静大院・農，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬）

**2B013　フェアリー化合物 AHX の代謝に関する化学的研究**

◦澤田　梓[1]，近藤遼一[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2,3]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,3,5]（[1]静大院・総合農，[2]静大農・応生化，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬，[5]静大院・創造）

**2B014　フェアリー化合物 AHX と AOH の糖転移酵素の化学的研究**

◦近藤遼一[1]，澤田　梓[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2,3]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,3,5]（[1]静大農・応生化，[2]静大院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬，[5]静大院・創造）

**2B015　コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物の生合成に関する化学的研究**

◦伊藤彰将[1]，寺島百合香[2]，崔　宰熏[1,2]，平井浩文[1,2,3]，浅川倫宏[4]，稲井　誠[4]，菅　敏幸[4]，河岸洋和[1,2,3,5]（[1]静大農・応生化，[2]静大

院・総合農，[3]静大・グリーン研，[4]静県大・薬，[5]静大院・創造）

**2B016　コムラサキシメジのフェアリー化合物生合成酵素遺伝子の網羅的解析**

◦寺島百合香[1]，伊藤彰将[2]，崔　宰熏[1,2]，鈴木智大[3]，道羅英夫[4]，平井浩文[1,2,4]，浅川倫宏[5]，稲井　誠[5]，菅　敏幸[5]，河岸洋和[1,2,4,6]（[1]静大院・総合農，[2]静大農・応生化，[3]宇都宮大・バイオ，[4]静大・グリーン研，[5]静県大・薬，[6]静大院・創造）

**2B017　ジャバラ果皮に含まれる抗肥満成分**

◦大田時帆，奥野祥治（和歌山高専）

**2B018　梅干しに含まれるアポトーシス誘導物質**

◦和田穂乃香[1]，奥野祥治[1]，河野良平[2]，野村幸子[2]，前野覚大[2]，宇都宮洋才[2]（[1]和歌山高専，[2]和歌山医大）

**2B019　仏手柑に含まれるα−グルコシダーゼ阻害物質の探索**

◦高野樹理，奥野祥治（和歌山高専）

**2B020　新規麻痺性貝毒生合成関連化合物の同定**

◦土屋成輝[1]，長由扶子[1]，吉岡廉平[1]，此木敬一[1]，長澤和夫[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]東京農工大院工）

**2B021　有毒藍藻の細胞破砕液を用いた新規麻痺性貝毒生合成中間体の探索**

◦美野輪高之，土屋成輝，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

**2B022　*Moorella thermoacetica* 由来テトラプレニル-β-クルクメン合成酵素ホモログのゲノムマイニング**

◦藤井友里恵[1]，田中勇真[2]，藤橋雅宏[3]，三木邦夫[3]，河合優人[4]，中島田豊[5]，品田哲郎[6]，佐藤　努[1]（[1]新潟大学，[2]京大理，[3]京大院理，[4]広島大工，[5]広島大院先端物質，[6]阪市大院理）

**2B023　スクアレンからアンブレインへの一段階酵素合成**

◦奥野琴音，上田大次郎，星野　力，佐藤　努（新潟大学）

**2B024　納豆菌におけるテトラプレニル-β-クルクメン環化酵素の新たな機能**

◦高橋宏忠，高橋秀長，佐藤　努（新潟大学）

**2B025　ポリプレニルアセトン類の生合成：活性酸素によるメナキノンの非酵素的開裂反応の提唱**

◦上田大次郎[1]，岡本　渉[1]，橋本昌征[2]，佐藤　努[1]（[1]新潟大学，[2]成功大分子医学研）

**2B026　テトロドトキシンの生合成経路解明を目指した有毒イモリからの推定生合成中間体の探索**

◦工藤雄大，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

**2B027　フグから得られた新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造**

◦上山　望，工藤雄大，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

**2B028　ビール酵母由来の細胞壁成分によるイネ（*Oryza sativa*）の根張り向上効果と植物ホルモン応答性遺伝子の挙動**

◦森田智也[1]，中道貴也[1]，吉永直子[1]，横尾敬行[4]，高崎智子[2]，北川隆徳[2]，安原貴臣[2]，新開茂樹[3]，小林　優[1]，寺石政義[4]，奥本　裕[4]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]アサヒグループホールディングス，[3]東果大阪株式会社，[4]京大院農・農）

**2B029　ビール酵母由来の多糖によるシキミ酸経路の代謝変化とイネ(Oryza sativa)における根の生育促進効果との関連性**

◦中道貴也[1]，森田智也[1]，吉永直子[1]，横尾敬行[4]，高崎智子[2]，北川隆徳[2]，安原貴臣[2]，新開茂樹[3]，小林　優[1]，西野雄人[1]，宮下正弘[1]，寺石政義[4]，奥本　裕[4]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]アサヒグループホールディングス，[3]東果大阪株式会社，[4]京大院・農）

**2B030　ミドリサンゴ由来 β-amyrin 合成酵素の W612 残基の機能解析**

◦相場悠圭里[1]，仲野千秋[1]，中川和也[2]，伊藤遼介[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

**2B031　*Herpetosiphon aurantiacus* 由来の新規ジテルペン環化酵素の機能解析**

仲野千秋[1]，◦倉嶋のどか[1]，井出夕貴[2]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

**2B032　抗生物質アラレマイシン生合成経路の解明**

◦森ひかる，岩井伯隆，和地正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）

**2B033　アラレマイシン生産放線菌 *Streptomyces* sp. A012304 のポルホビリノーゲン合成酵素の特性**

上田沙蘭，◦岩井伯隆，和地正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）

**2B034　アミノ酸キャリアタンパク質(AmCP)を介して生合成されるアミノ酸 DADH 修飾酵素の同定**

◦長谷部文人，松田研一，白石太郎，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大・生物生産工学研究センター）

**2B035　アミノ基キャリアタンパク質を指標とした新規天然化合物の探索及びその生合成に関する研究**

◦松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1]，志波　優[2]，兼崎　友[2]，吉川博文[2]，新家一男[3]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東京大学，[2]東京農業大学，[3]産業技術総合研究所）

**2B036　II 型アミノ基キャリアタンパク質を介した二次代謝産物の生合成に関する研究**

◦内藤一洋[1]，松田研一[1]，長谷部文人[1]，富田武郎[1]，手塚武揚[2]，大西康夫[2]，志波　優[3]，吉川博文[3]，新家一男[4]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東京大学生物工学センター，[2]東京大学大学院農学生命科学研究科，[3]東京農業大学ゲノム解析センター，[4]産業技術総合研究所）

**2B037　フェガノマイシン，レゾルシノマイシン類抗生物質の構造活性相関**

◦小笠原泰志，藤盛道子，雄谷洸一，野池基義，大利　徹（北大院工）

**2B038　ペプチド系天然化合物 JBIR-78 および 95 の生合成研究**

◦竹田薫平[1]，佐藤康治[1]，小笠原泰志[1]，新家一男[2]，大利　徹[1]（[1]北大工，[2]産総研）

**2B039　メナキノン新規生合成経路阻害剤の探索**

◦近藤憲介，原田立夏子，小笠原泰志，大利　徹（北大院工）

**2B040　*Xanthomonas oryzae* に見出した新規アミノ酸異性化酵素**

◦馮　若茵，佐藤康治，大利　徹（北大工）

**2B041　放線菌 *Streptomyces rochei* の遺伝子変異株における二次代謝産物プロファイルの解析**

◦勝賀瀬夏実，NINDITA Yosi，木梨陽康，荒川賢治（広島大院・先端研）

**2B042　Secondary metabolites production of plasmidless mutants of *Streptomyces rochei* 7434AN4**

◦Yosi NINDITA[1]，Kuninobu INADA[2]，Haruyasu KINASHI[1]，Kenji ARAKAWA[1]（[1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.，[2]N-BARD, Hiroshima Univ.）

**2B043　ランカサイジン生合成における補酵素ピロロキノリンキノンの機能解析**

◦梅代亜紗子，山内佑介，藪内　優，鈴木敏弘，木梨陽康，荒川賢治（広島大院・先端研）

**2B044　放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン型化合物の生合成機構の解析**

◦岸本拓也[1]，國武博文[2]，NINDITA Yosi[2]，木梨陽康[2]，荒川賢治[1,2]（[1]広大・工，[2]広大院・先端研）

**2B045　放線菌 *Streptomyces rochei* 変異株で見出された抗カビ化合物ペンタマイシンとシトレオジオールの生合成遺伝子の解析**

◦山手直貴[1]，片岡憂祐[2]，NINDITA Yosi[2]，木梨陽康[2]，荒川賢治[1,2]（[1]広島大・工，[2]広島大院・先端研）

**2B046　*Rhodococcus jostii* RHA1 株のカテコール異化経路における CatC の役割**

◦山梨智也[1]，原　啓文[2]，鮒　信学[1]（[1]静県大食栄，[2]マレーシア工科大マ日国際工科環境）

**2B047　放線菌 *Streptomyces* sp. 由来イソクマリン生合成経路**

◦中村修人，曽根祐輔，鮒　信学（静県大食栄）

**2B048　III 型ポリケタイド合成酵素 DpyA による閉環反応の機構解析**

◦谷美生夏[1]，小野寺渓斗[1]，相澤光輝[1]，高橋俊二[2]，長田裕之[2]，鮒　信学[1]（[1]静県大食栄，[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

**2B049　*Saccharopolyspora erythraea* 由来 FabB/F 様ポリケタイド合成酵素の *in vitro* 解析**

◦天野結香子，鮒　信学（静県大食栄）

**2B050　生合成エンジニアリングによる β-lysine oligopeptide 生産菌の構築**

◦川崎春香，丸山千登勢，牛丸和乗，濱野吉十（福井県立大学）

**2B051　BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵**

素学的諸性質
◦新倉春香[1]，丸山千登勢[1]，泉川美穂[2]，新家一男[3]，濱野吉十[1]（[1]福井県大・生物資源，[2]JBIC，[3]産総研）

**2B052　カプシエイト生合成前駆体，バニリルアルコールの ex vivo 生成系の確立**
◦丸山将明，桐山裕加，中谷祥惠，古旗賢二，和田政裕（城西大薬）

**2B053　プラディミシン A との結合における環内酸素原子の寄与**
◦渡邉泰典[1]，中川　優[1,2]，都築麗江[1]，菅原貴弘[3]，相田美砂子[3]，五十嵐康弘[4]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]理研，[3]広大院・理，[4]富山県大・生工）

**2B054　プラディミシン A はアントラキノン部分でカルシウムと結合する**
◦都築麗江[1]，中川　優[1,2]，戸村友彦[1]，土井崇嗣[3]，竹腰清乃理[3]，五十嵐康弘[4]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]理研，[3]京大院・理，[4]富山県大・生工）

**2B055　プラディミシンと *Candida* 属真菌の細胞壁マンナンとの結合解析**
◦山地史哉[1]，中川　優[1,2]，渡邉泰典[1]，五十嵐康弘[3]，伊藤幸成[2]，小鹿　一[1]（[1]名大院・生命農，[2]理研，[3]富山県大・生工）

**2B056　Thapsigargin の C1 ドメインに対する結合能と結合選択性の評価**
◦高橋知世[1]，柳田　亮[2]，川浪康弘[2]，入江一浩[3]（[1]香川大院農，[2]香川大農，[3]京都大院農）

**2B057　膜透過性 D-allose-6-phosphate 誘導体の合成とヒト白血病 MOLT-4F 細胞増殖抑制活性**
◦石山大展[1]，小橋克哉[1]，柳田　亮[2]，川浪康弘[2]（[1]香川大院農，[2]香川大農）

**2B058　分子モデリングによる Aplysiatoxin とプロテインキナーゼ C C1 ドメインとの結合様式の予測**
◦芦田能基[1]，柳田　亮[2]，川浪康弘[2]，入江一浩[3]（[1]香川大院農，[2]香川大農，[3]京大農）

**2B059　久慈産琥珀の超臨界流体による分解・抽出物の単離精製，構造，並びに生物活性**
◦川村哲晃[1]，越野広雪[2]，清水栄作[3]，丸山美紅[1]，上杉祥太[4]，永澤佳之[5]，七尾英孝[5]，白井誠之[5]，木村賢一[1,3,4]（[1]岩手大・農，[2]理研・CSRS，[3]岩手大院・農，[4]岩手大院・連合農，[5]岩手大院・工）

**2B060　久慈産琥珀メタノール抽出物と kujigamberol の抗アレルギー活性**
◦丸山美紅[1]，清水栄作[2]，小林　幹[2]，大川佑介[2]，内田武史[2]，上杉祥太[3]，木村賢一[1,2,3]（[1]岩手大・農，[2]岩手大院・農，[3]岩手大院・連合農）

**2B061　*Aspergillus* 属のアフラトキシン生産を阻害する dioctatin の作用機構に関する研究**
◦古川智宏[1]，片山秀和[2]，市川琢万[2]，木村太一[1]，飯村九林[1]，山本利義[1]，根岸瑠美[3]，鈴木道生[1]，作田庄平[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]東海大・工・生化，[3]東大・分生研）

**2B062　コムネシンの殺虫活性発現機構に関する研究：ターゲットの候補に関する電気生理学的研究**
◦橋本杏樹[1]，橋本真宜[1]，古谷章悟[1]，甲斐健次[2]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]（[1]近畿大農，[2]阪府大院・生命環境）

**2B063　海産生物由来物質 eudistomin C の作用機構解析**
◦工藤　駿[1]，吉田圭佑[1]，南雲陽子[1]，山田諒介[2]，海原浩辰[2,4]，横島　聡[2]，福山　透[2]，小林淳一[3]，臼井健郎[1]（[1]筑波大生命環境，[2]名大創薬科学，[3]北大薬，[4]東大薬）

**2B064　γ-チューブリン特異的阻害剤 gatastatin の抗腫瘍活性検討**
◦恵比須春菜[1]，知念拓実[1]，塩田秀也[2]，早川一郎[3]，木越英夫[2]，臼井健郎[1]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大数理物質，[3]岡山大自然科学）

**2B065　Sialidase による可逆的 Tight junction 開口作用機構解析**
◦山崎洋平，神田祐輔，南雲陽子，臼井健郎（筑波大生命環境）

**2B066　γ-tubulin 特異的阻害剤 gatastatin を用いた分裂期 γ-tubulin 機能の解析**
◦知念拓実[1,2,3]，塩田秀也[4]，PAGEL Judith[3]，SCHIEBEL Elmar[3]，早川一郎[5]，木越英夫[4]，臼井健郎[2]（[1]理研 QBiC，[2]筑波大院・生命環境，[3]ハイデルベルグ大学・分子生物学研究所，[4]筑波大院・数理物質，[5]岡山大院・自然科学）

**2B067　11-oxoTTX をハプテンとしたポリクローナル抗体の作製と TTX 誘導体の生理活性**
◦猿橋祥吾[1]，長由扶子[1]，此木敬一[1]，西川俊夫[2]，山下まり[1]（[1]東北大院農，[2]名大院生命農）

**2B068　トラフグ属（Takifugu）以外の属のフグ血漿中の PSTBP 類似タンパク質の解析**
◦長岡佑真，長由扶子，此木敬一，山下まり（東北大院農）

**2B069　DHA によるメラノーマ細胞増殖抑制**
◦山田秀俊，箱崎真友佳（岩手生工研）

**2B070　脂肪酸によるメラニン合成制御機構の解明**
◦箱崎真友佳[1]，山下哲郎[2]，山田秀俊[1]（[1]岩手生工研，[2]岩手大・農）

**2B071　微生物フラクションライブラリーより単離した新規ネオアンチマイシン類縁体ウナンチマイシン A の構造**
◦野川俊彦[1]，リムチュン・リャン[1,2]，岡野亜紀子[1]，二村友史[1]，川谷　誠[1]，高橋俊二[1]，ダーライブラヒム[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]マレーシア科学大）

**2B072　RK-144171, a new benadrostin derivative produced by Stretomyces sp. RK88-1441**
◦Jun-pil JANG[1,2]，Toshihiko Nogawa[1]，Shunji Takahashi[1]，Jong Seong Ahn[2]，AhnHiroyuki Osada[1,2]（[1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Chemical Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology（KRIBB）, Korea）

**2B073　真菌の形態変化を指標とした抗真菌物質の探索研究**
◦山本甲斐[1,2]，二村友史[1]，植本雅志[3]，鈴木龍一郎[2]，白瀧義明[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー研究グループ，[2]城西大学，[3]理研・ナノ医工学）

**2B074　登熟中のオオムギ種子に蓄積する hordatine A β-D-glucopyranoside の特性と赤カビ病菌に対する効果**
◦神山紀子[1]，平八重一之[2]，小野裕嗣[3]（[1]農研機構作物研，[2]農研機構九州研，[3]農研機構食総研）

**2B075　ダイズ葉焼病菌に対して活性をもつ抗菌ペプチド D 型フェニルセプチンの細胞膜との相互作用の解析**
◦川村　出，松尾雄大，金田志穂，北橋由貴（横浜国立大学）

**2B076　アシルホモセリンラクトン合成酵素のプルダウンによる精製・同定法の開発**
◦山田将太，赤川　貢，甲斐建次（阪府大院・生命環境）

**2B077　出芽酵母 tafazzin によるカルジオリピンのリモデリング機構に関する研究**
◦長谷川裕以，安部真人，奥　公秀，阪井康能，三芳秀人（京大農）

**2B078　Isoarborinol 合成酵素の *boat* 型コンフォメーション制御に関わる残基の同定**
◦柿原麻衣[1]，楢木真吾[1]，中根孝久[2]，高野昭人[2]，鈴木秀幸[3]，久城哲夫[1]（[1]明大農，[2]昭和薬大，[3](財)かずさ DNA 研）

**2B079　アミロイド β の毒性コンホマーにきわめて特異的な抗体の開発とアルツハイマー病診断への応用**
◦村上一馬[1]，徳田真樹[1]，鈴木天志[1]，入江由美[1]，花木瑞穂[1]，柳田　亮[2]，物部容子[3]，赤木謙一[3]，石井亮太郎[4]，建部陽嗣[4]，徳田隆彦[4]，前田雅弘[5]，久米利明[6]，泉尾直孝[7]，清水孝彦[7]，入江一浩[1]（[1]京大院農，[2]香川大農，[3]医薬基盤研，[4]京府医大，[5]免疫生物研，[6]京大院薬，[7]千葉大院医）

**2B080　Chemical array screening of matrix metalloproteinase inhibitors**
◦Yasumitsu KONDOH，Makoto KAWATANI，Kaori HONDA，Tomomi SEKINE，Hiroyuki OSADA（Chem. Biol., RIKEN CSRS）

**2B081　Dieldrin 抵抗性イエバエ（OCR 系）に対する Dieldrin，Endrin，γ-BHC 類縁体の殺虫活性，GABA アンタゴニスト活性類縁体の殺虫活性，GABA アンタゴニスト活性**
◦高市成美[1]，田中啓司[2]，松田一彦[1]，尾添嘉久[3]（[1]近畿大農，[2]近畿大農/名古屋大 IMass 研，[3]島根大生物資源）

**2B082　光学活性な Heptachlor，Heptachlorepoxide，γ-BHC 類縁体の各エナンチオマー間の GABA アンタゴニスト活性**
◦田中啓司[1]，木下泰輔[2]，松田一彦[2]，尾添嘉久[3]（[1]近畿大農/名古屋大 IMass 研，[2]近畿大農，[3]島根大生物資源）

**2B083　植物葉由来の氷核形成阻害物質の探索**
◦鈴木伸吾，福田　怜，福士幸治，荒川圭太（北大農）

**2B084　Gallic acid 誘導体の抗真菌活性に関する研究**
◦須嵜大祐，谷澤　悟，伊藤晋作，佐々木康幸，矢嶋俊介（東農大・応生科・バイオ）

**2B085　化合物アレイを用いたアフラトキシン生産阻害物質の探**

索(その 2)－PacC 結合物質の探索 ―
◦影本貴大[1]，山本利義[1]，飯村九林[1]，高城景子[1]，近藤恭光[2]，本田香織[2]，長田裕之[2]，作田庄平[1]（[1]東大・院・応生化，[2]理研 CSRS）

**2B086　沖縄産ミナミソゾから得られた殺虫活性物質ローリンテロール**
◦長嶺　匠[1]，ウィンガオクェンビン[2]，多和田眞吉[1]，石井貴広[1]（[1]琉球大学，[2]鹿児島大学大学院連合農学研究科）

**2B087　タバココナジラミの EcR の全配列決定とコンピューターシュミレーションによる EcR-リガンド結合様式予測**
◦南　沙紀[1]，石塚千遥[1]，横井大洋[1]，水口智江可[2]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]（[1]京大院農，[2]名大院農）

**2B088　ブラシノステロイドの側鎖部分の構造と活性の関係**
◦横井大洋[1]，山本修資[1]，杉浦愛理[1]，渡辺文太[2]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]（[1]京大院農，[2]京大化研）

**2B089　シロイヌナズナの根の伸長に対する殺菌剤イソプロチオランの影響**
◦草島美幸，井上真依，仲下英雄（福井県大生物資源）

**2B090　β-アミリン合成酵素：基質末端メチル基の疎水性相互作用による環化制御**
◦金子一輝[1]，笹川智弘[2]，仲野千秋[1]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

**2B091　スクアレンーホペン環化酵素：末端メチル基をヒドロキシメチル基に置換した基質アナログの酵素反応**
◦寺澤有里，金子一輝，仲野千秋，星野　力（新潟大院自）

**2B092　スクアレン-ホペン環化酵素による 27-noroxidosqualene の酵素反応産物**
仲野千秋[1]，◦渡辺拓海[1]，南野　舞[2]，星野　力[1,2]（[1]新潟大院自，[2]新潟大農）

**2B093　ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A 右側部分の合成研究**
◦宮澤　悠，駒田武馬，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

**2B094　ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A 左側部分の合成研究**
◦長谷川耕太，鳥居真衣，安立昌篤，西川俊夫（名大院生命農）

**2B095　コラーゲンペプチド酸化体の化学合成と生理活性評価**
◦三井美彩，三田千鶴，木村駿介，寺内達彦，蕪山由紀人，二瓶賢一（宇都宮大農）

**2B096　ジヒドロレスベラトロールグルクロニドおよび関連誘導体の化学合成と，メラニン形成調節作用**
◦大出知里[1]，島田　亙[2,3]，横田真理子[3]，二瓶賢一[1,2]（[1]宇都宮大農，[2]農工大院連農，[3]ニッコール株式会社コスモステクニカルセンター）

**2B097　スパイダミン類の化学合成とチロシナーゼ阻害活性評価**
◦舞木鏡徳，小木万梨子，二瓶賢一（宇都宮大農）

**2B098　植物の気孔分化を調節する stomagen の効率的生産**
◦近藤竜彦，能瀬　遥，根岸佑香里，小鹿　一（名大院･生命農学）

**2B099　ネコブセンチュウの誘引現象に関与する宿主根由来物質の精製(第二報)**
◦樋口侑夏，西川博崇，小川　舞，村瀬　潤，近藤竜彦，小鹿　一（名大院・生命農）

**2B100　ダイズ葉毛茸のハスモンヨトウ食害抵抗性への化学・物理的な寄与**
◦中田　隆[1]，木村有希[1]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，寺石政義[1]，Eric SCHMELZ[2]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農，[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校）

**2B101　伊江島産月桃精油の抗酸化活性とその香気特性**
◦山城瑠唯，藏屋英介，仲田志奈，當山瑛子，伊東　繁（沖縄高専）

**2B102　クマリンーカルコン複合分子の合成と構造活性相関**
◦栗原崇史[1]，川井　悟[1]，常盤野哲生[2]，吉澤結子[2]（[1]東電大理工，[2]秋田県大生資料）

**2B103　新規低毒性 X 線応答物質の探索**
◦外山実千留[1]，森　崇[1]，溝脇由衣[1]，高橋淳子[2]，岩橋　均[1]（[1]岐阜大応用生物，[2]産総研）

**2B104　ヒト γーグルタミルトランスペプチダーゼ阻害剤を応用した分子プローブの開発**
◦黒田　航，斎藤慎吾，苗代和樹，渡辺文太，平竹　潤（京大化研）

## C：生体高分子・生体脂質

**2C001　動物細胞外マトリックス(グリコサミノグリカン)を基質とする病原性細菌 ABC トランスポーター**
◦老木紗予子[1]，丸山如江[2]，三上文三[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]（[1]京大院・農，[2]摂南大・理工）

**2C002　転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインの機能構造解析**
◦稲葉理美，織田昌幸（京府大・院生命環境科学）

**2C003　クラゲ由来コラーゲンの酸性および中性条件における熱安定性解析**
◦三木彩子[1]，稲葉理美[1]，馬場崇行[2]，木平孝治[2]，深田はるみ[3]，織田昌幸[1]（[1]京都府大・院生命環境科学，[2]海月研究所，[3]大阪府大・院生命環境科学）

**2C004　カイコバキュロウイルス発現系による急性骨髄性白血病に特異的な FLT3/ITD タンパク質の効率的な生産**
◦開　俊樹[1]，菊池次郎[1]，喜多俊介[2]，前仲勝実[2]，古川雄祐[1]，柴山修哉[1]（[1]自治医大，[2]北大院薬）

**2C005　*Shewanella livingstonensis* Ac10 における多価不飽和脂肪酸プローブの機能評価**
◦徳永智久，渡辺文太，川本　純，栗原達夫（京大化研）

**2C006　バイセルを利用したインビトロ機能型膜タンパク質合成系**
◦武井里美[1]，戸澤　譲[2]（[1]埼大理，[2]埼大院理工）

**2C007　ヨメガカサガイの卵巣から新たに見いだされた Δ 9,15 ジエン酸の構造と分布特性**
◦川島英城（岩手県立大宮古短大部）

**2C008　海洋微生物ラビリンチュラ類における PUFA 含有ステロールエステルの合成機構**
石丸真由，◦石橋洋平，渡邉　昂，沖野　望，伊東　信（九大院農）

## D：酵素

**2D001　好熱性古細菌由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ及びメバロン酸 3-キナーゼの変異解析**
◦本山賢人[1]，服部　愛[1]，海野英昭[2]，吉村　徹[1]，邊見　久[1]（[1]名大院生命農，[2]長崎大院工）

**2D002　Bacteroidetes 門バクテリア *Flavobacterium johnsoniae* のメバロン酸経路**
◦祖父江史明，吉村　徹，邊見　久（名大院生命農）

**2D003　カイコで発現したヒトアセチル CoA カルボキシラーゼの脱リン酸化とクエン酸による重合化に関する研究**
◦當真和也[1]，牧島　悠[1]，鈴木智大[2]，加藤竜也[1,3]，Park Sungjo[4]，Terzic Andre[4]，朴　龍洙[1,3]（[1]静大農・応生化，[2]宇都宮大・バイオサイエンス教育センター，[3]静大･グリーン研，[4]メイヨー医科大）

**2D004　コリネ型細菌由来アセチル CoA カルボキシラーゼ ε サブユニットの生化学的機能**
◦栃木夢丸[1]，山内健太郎[1]，今村未央[2]，川崎　寿[1,2]，夏目　亮[1,2]（[1]東電大院・工，[2]東電大・工）

**2D005　大豆リポキシゲナーゼ T756R・dG 変異体の酵素学的性質と結晶構造解析**
◦日置友輔，長屋　敦，三上文三，高橋延行，水谷公彦（京大農）

**2D006　リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の機能解析**
◦杉森大助[1]，柏原奈々[1]，小山貴之[1]，酒瀬川信一[2]，松本英之[2]（[1]福島大理工，[2]旭化成ファーマ）

**2D007　ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の探索**
◦川上祐生，森　香子，岡本憲典，大河内脩史，金山友紀，金子由季，神崎圭太，山本登志子，木本眞順美，山下広美，伊東秀之，高橋吉孝（岡山県大保福）

**2D008　麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来分泌型ホスホリパーゼ $A_2$ オルソログの持つ新奇な酵素学的性質**
◦高柳亜由美[1]，宮川拓也[2]，大塚　淳[2]，吉野龍ノ介[1]，寺田　透[1,3]，田之倉優[2]，有岡　学[1]（[1]東大院 農生科 応生工，[2]東大院 農生科 応生化，[3]東大院 農生科 アグリバイオ）

**2D009　大豆油分解高温リアクターから単離した好熱菌とその耐熱性リパーゼの特性解明**
◦山田千早[1]，澤野孝太[1]，岩瀬徳康[1]，松岡真生[1]，西田茂雄[2]，

伏信進矢[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]環清技研エンジニアリング）

**2D010　深海好圧性微生物由来酵素における高圧適応の分子，構造メカニズム**

◦加藤千明[1]，濱島裕輝[1,2]，永江峰幸[3]，渡邉信久[3]，大前英司[4]，今井竹夫[2]，山田康之[2]（[1]海洋機構多様性，[2]立大生命，[3]名大工，[4]広大数理）

**2D011　シロウリガイ共生細菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の活性**

◦濱島裕輝[1]，山田康之[1]，加藤千明[2]（[1]立教大，[2]海洋研究開発機構）

**2D012　オフタルミン酸の新規発酵生産法の開発**

◦伊藤智和，所真衣子，山内綾子，邊見　久，吉村　徹（名大院生命農）

**2D013　*E.coli* YggS による Ile，Val 代謝制御機構の解析**

◦山内綾子，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹（名大院生命農）

**2D014　*Thermococcus litralis* DSM 5473 由来アスパラギナーゼの X 線結晶構造解析**

◦山内貴恵[1]，藤井知実[1]，加藤志郎[2]，老川典夫[2,3]，畑　安雄[1]（[1]京大・化研，[2]関大・先端科学技術推進機構，[3]関大・化生工）

**2D015　好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の二種類のアラニン脱水素酵素の機能解析**

◦安達泰志，大森勇門，大島敏久（大阪工業大学大学院）

**2D016　*Sulfolobus solfataricus* P2 のグルタミン酸脱水素酵素推定遺伝子，SSO2044 の機能解析**

◦谷口健太郎，大森勇門，大島敏久（大阪工業大学大学院）

**2D017　Clostridium phytofermentans 由来 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼの機能構造解析**

◦小堤悠生[1]，古川那由多[1]，田中信清[1]，宮永顕正[4]，伏信進矢[3]，中井博之[2]，中島将博[1]，田口速男[1]（[1]東理大理工，[2]新潟大農，[3]東大院農，[4]東工大）

**2D018　β-1,2-グルコオリゴ糖に作用する β-グルコシダーゼの機能構造解析**

◦石黒陸斗[1]，前田拓磨[1]，田中信清[1]，宮永顕正[2]，中井博之[3]，中島将博[1]，田口速男[1]（[1]東理大理工，[2]東工大，[3]新潟大）

**2D019　*Listeria innocua* 由来ソホロオリゴ糖に特異的な ABC トランスポーター基質結合タンパク質の機能と構造**

◦阿部紘一[1]，中島将博[2]，砂川直輝[1]，石田卓也[1]，五十嵐圭日子[1]，鮫島正浩[1]，宮永顕正[3]，中井博之[4]，田口速男[2]，荒川孝俊[1]，伏信進矢[1]（[1]東大院農生科，[2]東理大院理工，[3]東工大院理工，[4]新潟大院自然科）

**2D020　担子菌 Coprinopsis cinerea 由来タンパク質 CcGH131B の X 線結晶構造解析**

◦奥山舜朔[1]，林　昌宏[1]，砂川直輝[2]，石田卓也[2]，五十嵐圭日子[2]，吉田　誠[1]，西河　淳[1]，殿塚隆史[1]（[1]東京農工大院農，[2]東大院農）

**2D021　*Aspergillus oryzae* が生産する GH3 に属するイソプリメベロース生成酵素の解析**

◦松沢智彦，矢追克郎（産総研 生物プロセス）

**2D022　メタゲノム由来 β−グルコシダーゼ Ks5A7 の性状解析**

◦内山　拓[1]，矢追克郎[2]，宮崎健太郎[2]（[1]東大院農，[2]産総研）

**2D023　*Eisenia fetida* 由来のキチン分解関連酵素遺伝子クローニングと発現**

◦上田光宏[1]，中土井啓[1]，塩山岳志[1]，中澤昌美[1]，阪本龍司[1]，尾形善之[1]，平野　優[2]，玉田太郎[2]（[1]阪府大院生環科，[2]原子力研究開発機構）

**2D024　*Trichoderma reesei* キシラナーゼ III（XynIII）の高機能化**

◦矢追克郎[1]，松沢智彦[1]，金子　哲[2]（[1]産総研生物プロセス，[2]琉球大農）

**2D025　セルロース分解性嫌気性細菌 *Ruminiclostridium josui* 由来のアラビナンを分解するモジュラー酵素 Abn43A の酵素特性**

◦山田和伸，粟冠真紀子，木村哲哉，粟冠和郎（三重大院生資）

**2D026　*Trichoderma reesei* 由来 β-グルコシダーゼの糖転移生成物の解析**

◦前川滉大[1]，田村真澄[1]，二階堂望[1]，中島将博[2]，中井博之[3]，戸谷一英[1]（[1]一関高専・物化工，[2]東理大院・理工，[3]新潟大・農）

**2D027　オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索**

◦田中優史[1,2]，後藤　京[1]，石川孝博[1,2]（[1]島根大・生物資源，[2]JST / CREST）

**2D028　海洋性子嚢菌由来 4-*o*-methyl glucuronoyl esterase の精製及び新規エステル基質の合成**

◦高　相昊[1]，水野正浩[1,2]，大川浩作[2]，天野良彦[1]（[1]信大院理工，[2]信大 IFES）

**2D029　CE-14 family デアセチラーゼの基質認識**

◦中村　努[1]，新山真由美[1]，井田くるみ[1,2]，大嶋真紀[1]，森田潤司[2]，上垣浩一[1]（[1]産総研，[2]同志社女子大）

**2D030　枯草菌細胞壁合成に関与する酵素による新規ペプチド合成反応における反応機構解析**

◦安部智子[1]，橋本義輝[2]，荘　葉[2]，熊野匠人[2]，葛　寅[2]，小林達彦[2]（[1]東電大・理工，[2]筑波大院・生命環境）

**2D031　Adenylate-forming superfamily 酵素における新規ペプチド/アミド合成の反応機構解析**

◦橋本義輝[1]，安部智子[2]，熊野匠人[1]，荘　葉[1]，葛　寅[1]，小林達彦[1]（[1]筑波大院，[2]東電大）

**2D032　Grimontia hollisae1706B 由来コラゲナーゼの触媒機構に関与する活性解離基の熱力学的解析**

耿　紅敏[1]，銭　鈞[1]，田中啓友[2]，服部俊治[2]，滝田禎亮[1]，◦保川　清[1]（[1]京大農，[2]（株）ニッピ・バイオマトリックス研究所）

**2D033　原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ（パエニダーゼ）ホモローグの構造と活性**

◦韮澤　悟[1]，高橋砂織[2]（[1]国際農研，[2]秋田県総食研セ）

**2D034　放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株由来新規メタロアミノペプチダーゼの性状解析**

◦万　クン，裏地美杉，畑中唯史（岡山県生物科学研究所）

**2D035　シイタケ培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析**

◦福田泰久，白坂憲章（近大農）

**2D036　ブナシメジ栽培工程における，アミノペプチダーゼ群の活性の変動**

◦大庭将矢，福田泰久，白坂憲章（近畿大院・農）

**2D037　*Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログの機能解析**

◦富田武郎，西山　真（東京大学生物工学センター）

**2D038　A novel endonuclease responsible for damaged DNA repair in archaeal order *Thermococcales***

◦MIYAKO SHIRAISHI[1,2,3], SONOKO ISHINO[1], YURIKO EGASHIRA[1], SHINICHI KIYONARI[1], TAKESHI YAMAGAMI[1], ISAAC CANN[2,3], YOSHIZUMI ISHINO[1,2]（[1]Grad. Sch. of Bioresource & Bioenvironmental Sci., Kyushu Univ., [2]Inst. for Universal Biology, NASA Astrobiology Inst., [3]C.R. Woese Inst. for Genomic Biology, Univ. of Illinois）

**2D039　Purine biosynthesis pathway as a new drug target for *Trypanosoma congolense* infection**

◦Albertus SARWONO[1], Keisuke SUGANUMA[2], Shinya MITSUHASHI[1], Kengo SHIGETOMI[1], Marcin JĄKALSKI[3], Tadashi OKADA[2,4], Molefe NTHATISI[2], Junya YAMAGISHI[1], Noboru INOUE[2], Makoto UBUKATA[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., [3]Univ. of Münster, Germany, [4]Chubu Univ.）

**2D040　ペプチドのマルチサイト分子内架橋形成を触媒するラジカル SAM 酵素の反応機構**

◦岡島俊英[1]，中井忠志[1]，小林一雄[1]，高橋康弘[2]，堀　洋[3]，鍔木基成[3]，谷澤克行[1]（[1]阪大産研，[2]埼玉大理工，[3]神戸大理）

**2D041　Kinetic and Nuclear Magnetic Resonance（NMR）study on the interaction of halide inhibitors with polyphenol oxidase（PPO）**

◦Giselle Grace LIM，Yuki Imura，Michio Suzuki，Etsuro Yoshimura（The University of Tokyo）

**2D042　アナモックス菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析とシトクロム *c* との電子伝達反応**

◦松村光紗，北村龍史，平　大輔，藤井隆夫（崇城大応生命）

**2D043　超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* glycerol-3-phosphate dehydrogenase の機能解析**

◦高野　築，小林　淳，小西香菜子，鈴木誠志，清野智史，大政健史，古賀雄一（阪大工）

**2D044　ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する NAD（P）H 依存性カルボニル還元酵素の研究**

◦福田雄大[1]，曽根孟起[1]，荒木朋洋[1]，仁木隆博[1]，櫻庭春彦[2]，

大島敏久[3]，芝田　猛[1]，米田一成[1]　([1]東海大・農，[2]香川大・農，[3]大阪工大・工)

**2D045　麹菌由来チロシナーゼと阻害剤複合体の結晶構造解析**
◦藤枝伸宇，馬越恭平，伊東　忍　(阪大院工)

**2D046　*Sphingobium* sp. TCM1 株ホスホジエステラーゼの特徴解析とクローニング**
◦阿部勝正，向井奈緒子，牧野　剛，高橋祥司，解良芳夫　(長岡技科大工)

**2D047　好熱性放線菌由来クチナーゼの表面アミノ酸残基の選択的改変による高活性変異体の取得**
◦亀谷貴仁，大門結花，伊藤貴文，日ビ隆雄　(福井県大･生物資源)

**2D048　超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis 由来分岐鎖ポリアミン合成酵素の構造と機能**
◦木村成吾[1]，Carman Ka Man Tse[2]，秀瀬涼太[1]，溝端栄一[2]，井上　豪[2]，藤原伸介[1]　([1]関学大理工，[2]阪大院工)

**2D049　超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis 由来 SF2 ヘリカーゼの機能解析**
◦川戸克展[1]，藤原綾子[1]，秀瀬涼太[1]，保川　清[2]，藤原伸介[1]　([1]関学大理工，[2]京大農)

**2D050　ヒト tRNA ($m^2_2G$) methyltransferase(hTRM1)の酵母での発現系の構築**
◦久野翔平，粟井貴子，石塚盛雄　(中央大学)

**2D051　*Aspergillus oryzae* 由来 α-L-ラムノシダーゼの酵素学的諸性質**
◦石川真衣，塩野義人，小関卓也　(山形大農)

**2D052　*Aspergillus oryzae* 由来タイプ D フェルラ酸エステラーゼの基質識別に関わるアミノ酸残基の特定**
◦半田暖尚，塩野義人，小関卓也　(山形大農)

## E：食品

**2E001　活性炭を触媒とする糖縮合反応のメカニズム解析**
◦濱口徳寿[1]，西村祐一[1]，平井宏和[1]，山本敏寛[1]，小川浩一[1]，小林広和[2]，福岡　淳[2]　([1]日本食品化工(株)，[2]北大触媒研)

**2E002　難消化性グルカン組成物の安全性評価と整腸作用**
◦平井宏和，尾藤寛之，濱口徳寿，山本敏寛，小川浩一　(日本食品化工(株))

**2E003　植物の葉部における有用脂質の含量**
◦高桑直也[1]，木下幹朗[2]，宮下和夫[3]　([1]農研機構・北海道農研，[2]帯畜大，[3]北大院水)

**2E004　腸管炎症に与える食餌性植物由来グルコシルセラミドの効果**
◦木下幹朗[1]，荒井克仁[1]，菱木拳史郎[1]，櫻井梨帆[1]，山下慎司[1]，間　和彦[2]，大西正男[3]　([1]帯広畜大・食品科学，[2]日本製粉・中研，[3]藤女子大・人間環境)

**2E005　LC-MS/MS による脂肪酸ヒドロペルオキシドの新規異性体解析法の構築**
◦伊藤隼哉[1]，水落俊介[1]，加藤俊治[2]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[3,4]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]日本医科大・糖尿病内分泌代謝内科，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)

**2E006　炊飯条件における呈味成分の変化と食味の関係**
◦横野一歩[1]，高津地志[2]，藤田明子[2]，渡邉義之[1]，岡田芳治[1]，野村正人[1]　([1]近畿大・シス工，[2]株式会社サタケ)

**2E007　α-グルコシダーゼにおける α-EG 生産性と α-EG 分解性**
◦櫻井　楓[1]，兼重知尚[1]，戸倉慶大[1]，内野昌孝[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学)

**2E008　DART-MS による食品中の油脂の迅速分析法の開発**
◦渡辺　淳[1]，坂倉幹始[2]，塩田晃久[2]　([1]株式会社島津製作所，[2]エーエムアール株式会社)

**2E009　糖化リン脂質を基材とする新規リポソームの調製**
◦上吉原怜奈[1]，仲川清隆[1]，張替敬裕[1]，宮澤大樹[2]，木村ふみ子[1]，宮澤陽夫[3,4]　([1]東北大院農・機能分子解析，[2]タフツ大，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター，[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)

**2E010　味噌の発酵・貯蔵過程におけるマンニノトリオース含有量の変化について**
◦石川千秋[1]，兒玉しずさ[2]，森光康次郎[1,2]　([1]お茶大生活科，[2]お茶大院ライフ)

**2E011　デンプン粒の表層がデンプンの糊化開始に与える影響について**
◦野口治子[1]，丸山慶輔[2]，芳原章太[2]，野口智弘[3]，高野克己[1]　([1]東農大応生，[2]東農大院農，[3]東農大食加技セ)

**2E012　Preparation of a fluid agar from Gelidium amansii by acid hydrolysis**
◦Hyeon-JIn SUN[1]，Suk-Min KO[1]，Yousung OH[2]，Changgeun CHOI[2]，Hyo-Yeon LEE[1]　([1]Jeju National Univ.，[2]JEJUAGAR Co., Ltd)

**2E013　タンパク質と 3-デオキシキシロソンの反応による架橋型メイラード反応後期段階生成物の同定**
◦岡部脩平[1]，鳥海春香[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]　([1]明治大農，[2]女子栄養大栄養)

**2E014　タンパク質間を架橋するメイラード反応後期段階生成物の推定**
◦鳥海春香[1]，岡部脩平[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]　([1]明治大農，[2]女子栄養大栄養)

**2E015　甘味タンパク質ソーマチンの甘味強化**
◦桝田哲哉[1]，太田圭介[1]，小代奈央子[1]，村田一輝[1]，三上文三[1]，谷　史人[1]，Temussi Piero[2]，北畠直文[3]　([1]京大院農，[2]Universita' di Napoli Federico II，[3]ノートルダム清心女大)

**2E016　ジバレラン骨格を有する新規香料化合物の創製とその香気特性**
◦和田善行[1]，鈴木孝洋[2]，吉田　啓[1]，鈴木真也[3]，中西健太[4]，佐久間克也[1]，作田圭亮[1]，谷野圭持[2]，清水功雄[3]　([1]小川香料株式会社，[2]北海道大学大学院理学研究院，[3]早稲田大学大学院先進理工学研究科，[4]北海道大学大学院総合化学院)

**2E017　時間経過による赤米の濃色化現象機構の解明**
◦林　咲那，柳瀬笑子　(岐大)

**2E018　アズキ種皮色素の分解反応による構造解析**
◦河上若菜，大島綾華，柳瀬笑子　(岐大応用生物科学)

**2E019　D-キシロース-グリシン系メイラード反応へのジカルボニル化合物による影響**
◦泉　雄斗，横関俊昭，渡辺寛人，早瀬文孝　(明治大農・農化)

**2E020　栽培方法の相違が樹成り熟成不知火の品質に及ぼす影響**
◦山口千紘[1]，吉村歩奈美[2]，森英里奈[2]，桐原智美[2]，山元涼子[2]，白土英樹[1,2]　([1]熊本県大院環境共生，[2]熊本県大環境共生)

**2E021　トマト加工食品に含まれるカフェ酸配糖体とカフェオイルキナ酸類について**
◦榊原彩加，飯島陽子　(神奈川工科大院工)

**2E022　*Lactobacillus brevis* SBC8803(SBL88)によるセロトニン分泌促進効果に関する研究**
◦寺島健仁，田端佐和子，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹　(東京農大院・食品)

**2E023　果汁飲料の品質劣化に対する新規抗酸化製剤の作用**
◦門脇章夫，大久保茉見，檜山真一郎，大久保泰宏　(太陽化学株式会社)

**2E024　泡盛もろみ中から分離した乳酸菌を用いた泡盛醸造**
◦新川翔也[1]，宮平勝人[2]，宮城　誠[1]，池松真也[1]，玉城康智[1]　([1]沖縄工業高等専門学校，[2]北大大学院環境科学院)

**2E025　LC-MS による光照射柑橘果汁飲料の網羅的分析**
◦大木伽耶子，隅谷栄伸　(公益財団法人 東洋食品研究所)

**2E026　登熟温度が米胚乳酵素活性量に及ぼす影響**
◦風見真千子[1]，辻井良政[1]，後藤　元[2]，浅野目謙之[2]，高野克己[1]　([1]東京農大応生，[2]山形県農総研)

**2E027　糯蒸米の良食味評価に及ぼす糯精米の理化学的特性-2014 年産糯米の場合-**
◦守屋実奈[1]，芥子　薫[2]，辻井良政[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学)

**2E028　網羅的解析手法を用いた製パン工程での低分子化合物の挙動解析**
◦吉川知宏[1]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]東京農大応生・食化技セ)

**2E029　米飯食味に関わる低分子化合物の解析**

○三木崇広[1]，辻井良政[2]，飯島　健[3]，堀　清純[3]，高野克己[2]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]生物研）

**2E030　茶飲料における天然吸着剤のカフェイン吸着特性解析**

○河合淳一郎[1]，山本研一朗[1]，今田七洋[1]，四元祐子[1]，西田武央[2]，松尾　諒[2]，岡　宏匡[2]，横山寛行[2]，塩野貴史[1]（[1]キリン（株）飲料技術研究所，[2]キリンビバレッジ（株）商品開発研究所）

**2E031　天然吸着剤の改質処理が低カフェイン茶飲料の品質に及ぼす影響**

○山本研一朗，四元祐子，塩野貴史（キリン（株）飲料技術研究所）

**2E032　コーヒーにおける天然吸着剤のカフェイン吸着特性解析**

○塩野貴史，山本研一朗，四元祐子（キリン（株）飲料技術研究所）

**2E033　Encapsulation of flavor in yeasts by spray drying**

○Afroza SULTANA[1,2]，Ayaka MIYAMOTO[1]，Quynh Lan HY[1]，Yusuke TANAKA[3]，Yoshiya FUSHIMI[3]，Hidefumi YOSHII[1]（[1]Kagawa Univ.，[2]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ.，[3]Fuji Foods Corp.）

**2E034　Encapsulation of squalene oil by spray drying**

○Asmaliza ABD GHANI[1,2]，Keisuke MATSUMURA[3]，Atsuki YAMAUCHI[3]，Hirokazu SHIGA[4]，Shuji ADACHI[5]，Hidefumi YOSHII[1,3]（[1]Ehime Univ.，[2]Univ. Sultan Zainal Abidin，[3]Kagawa Univ.，[4]Kyoto Gakuen Univ.，[5]Kyoto Univ.）

**2E035　海洋性発光細菌を利用した防ばい剤のバイオアッセイ技術**

○長浜千夏[1]，桑原　眸[1]，二宮純子[1]，森田　洋[2]（[1]北九大院国際環境工，[2]北九大国際環境工）

**2E036　脂肪酸塩の *Cladosporium cladosporioides* と *Dermatophagoides farinae* に対する抑制効果**

○奥野結衣[1]，恵良真理子[1]，川原貴佳[2]，完山陽秀[2]，森田　洋[3]（[1]北九大院国際環境工，[2]シャボン玉石けん（株），[3]北九大国際環境工）

**2E037　小麦粉・米粉混成パン生地における米タンパク質のグルテン形成に及ぼす影響**

○北村奈生子[1]，喜村美穂[1]，佐生　愛[1]，森田重人[1,2]，増村威宏[1,2]（[1]京府大・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ）

**2E038　酒造原料米（11 種類）を対象としたプロテオーム解析**

○北　和海[1]，森川拓磨[1]，佐生　愛[1]，森田重人[1,2]，渡部邦彦[1]，増村威宏[1,2]（[1]京府大生命環境，[2]京都農技セ 生資セ）

**2E039　キサンタンガム添加が液状食品のレトロネーザル香へ与える影響**

○武井友里恵[1]，松宮健太郎[1]，林　和寛[2]，杉山真悟[2]，松村康生[1]（[1]京大院農，[2]味の素（株）食品研）

**2E040　Espresso coffee の crema を構成する主成分は特定のペプチドではない**

○有井康博[1]，横山晴菜[1]，山根早紀子[1]，西澤果穂[2]（[1]武庫女大，[2]武庫女大院）

**2E041　食品高分子溶液の粘度に与える NaCL の電気粘性効果**

○佐藤之紀[1]，岩本あやこ[2]，尾野絵里奈[2]，七森由麻[2]，宮脇長人[3]（[1]北見工大工，[2]県立広島大生命環，[3]石川県大生資環）

**2E042　破壊機構の異なるタピオカと馬鈴薯澱粉の混合ゲルの物性と構造の解析**

○李　　超，中村　卓（明治大院農）

**2E043　製粉方法の異なる米粉の紛体特性**

○澤いくみ，石川大太郎，藤井智幸（東北大農）

**2E044　超音波測定による油脂結晶化の評価**

○森　大獎[1]，勝野那嘉子[2]，増子朝貞[3]，松浦傳史[3]，西津貴久[2]（[1]岐阜大院・応生，[2]岐阜大・応生，[3]三菱化学フーズ（株））

**2E045　超音波位相速度を用いたミルクコーヒーの沈殿発生予測に関する研究**

○田丸竜万[1]，勝野那嘉子[2]，西津貴久[2]（[1]岐阜大院・応生，[2]岐阜大・応生）

**2E046　凍結が与える乳酸菌に対する損傷に関する研究**

○関口由起，鈴木　徹，渡辺　学（東京海洋大学）

**2E047　高分解能 LC-MS を用いたフモニシンと二糖類の反応物の検出**

○松尾洋輔[1]，高原健太郎[2]，佐合由紀[1]，久城真代[1]，長嶋　等[1]，中川博之[1]（[1]農研機構・食総研，[2]（株）サーモフィッシャーサイエンティフィック）

**2E048　ポモル酸の 3T3-L1 脂肪細胞に対する効果**

○甲木孝弘，井土良一（（公財）東洋食品研究所）

**2E049　3T3-L1 脂肪細胞に対するポモル酸の脂肪蓄積抑制機構の解明**

○井土良一[1]，甲木孝弘[1]，豊田　集[2]，石島智子[2]，岡田晋治[2]（[1]（公財）東洋食品研究所，[2]東大院農生科・応生化）

**2E050　LC-ESI-MS/MS を用いた脂肪酸アミド化合物の検出定量法の確立**

○岡本拓也，柴田貴広，内田浩二（名古屋大学名古屋大学大学院生命農学研究科）

**2E051　魚油による脂質代謝変動における farnesoid X receptor の関与**

○新野耕平，坂口大輔，木下佑一，杉浦義正，宮田昌明（水大校）

**2E052　アリルイソチオシアネート代謝物が肝細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響に関する研究**

○網野紗与，橋本堂史，中村紫乃，藍原祥子，水野雅史（神大農）

**2E053　高脂肪食摂取マウスにおける乳脂肪球皮膜摂取による脂質代謝への影響**

○廣瀬彰人[1]，山田　潔[1]，蕪山由己人[1]，元島英雅[2]，東　徳洋[1]（[1]宇都宮大農，[2]よつ葉乳業株式会社中央研究所）

**2E054　酒粕由来の HMG − CoA 還元酵素抑制物質**

○大浦　新[1]，入江元子[1]，久保緋紗子[2]，山本康子[2]，堤　浩子[1]，齋藤邦明[2,3]，秦　洋二[1]（[1]月桂冠・総研，[2]京大院・医学研究科，[3]藤田保健衛生大院）

**2E055　褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子とその機序解明**

○西川　翔，青山広樹，神谷美沙，樋口　潤，加藤愛子，河合妙子，曽我　実，津田孝範（中部大応生）

**2E056　食餌脂肪酸の腸内細菌代謝物摂取は肥満に伴う代謝異常症を改善する**

○古薗智也[1]，後藤　剛[1,2]，山國加成衣[1]，金　英一[1]，金みんじ[1]，北村苗穂子[3]，朴　時範[3]，岸野重信[3]，内田邦敏[4,5]，高橋信之[1,2]，小川　順[2,3]，富永真琴[4,5]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]京大院農・応用生命，[4]岡崎統合バイオ（生理研）・細胞生理，[5]総研大・生理科学）

**2E057　魚油摂取が脂肪組織における UCP1 発現誘導に及ぼす影響**

○KIM Minji[1]，後藤　剛[1,2]，内田邦敏[3,4]，富永真琴[3,4]，狩野百合子[5]，高橋信之[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]岡崎統合バイオ（生理研）・細胞生理，[4]総研大・生理科学，[5]神戸女子大学家政）

**2E058　db/db マウスが等カロリー条件下の高脂肪食で肥満する機構の探索**

○池田英介，井上奈穂，池田郁男（東北大院農）

**2E059　ビワ葉水抽出物による糖・脂質代謝改善作用**

○神田尚幸[1]，平井　静[1]，熊野未佳子[1]，大江靖雄[2]，江頭祐嘉合[1]（[1]千葉大院園芸応生化，[2]千葉大院園芸食資）

**2E060　カフェインは緑茶カテキンの内臓脂肪蓄積抑制作用に影響するのか？**

○池田郁男，伊藤知美，井上奈穂（東北大院農）

**2E061　低アルギニン食による肝脂肪蓄積メカニズムの解析**

○赤坂優太[1]，小山彩香[1]，大谷りら[1]，佐藤正幸[1]，高橋伸一郎[2]，加藤久典[1]（[1]東大院・総括・食と生命，[2]東大院・農生科・応動科）

**2E062　年齢および性の違いによる酸化コレステロールの代謝の変化**

○関原花会，古木　葵，長田恭一（明治大農）

**2E063　嫌気性細菌によるエピラクトース代謝の多様性**

○坂井未悠，佐分利亘，森　春英（北大院農）

**2E064　パルミチン酸およびリノール酸の添加加熱による澱粉の消化性制御**

○森　大輝[1]，中嶋奎太[2]，大堀翔子[2]，石川匡子[1,2]，張　　函[1,2]，陳　介余[1,2]，藤田直子[1,2]，秋山美展[1,2]（[1]秋田県大院生物資源，[2]秋田県大生物資源）

**2E065　微生物を用いたアザ糖 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養**

○高須蒼生[1]，山岸賢治[2]，小野瀬晋二[1]，伊藤隼哉[1]，池田亮一[3]，木村俊之[4]，仲川清隆[1]，宮澤陽夫[5,6]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]食品総合研究所，[3]旭松食品（株），[4]中央農業総合研究センター，[5]東北大・未来科学技術共同研究センター，[6]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**2E066　小麦グルテン加水分解物の血糖上昇抑制効果**

○嵯峨根里穂[1]，三矢沙貴奈[2]，竹森久美子[1,2]，米谷　俊[1,2]（[1]近大院・

農・応生化，[2]近大・農・食栄）

**2E067　リグナン腸内細菌代謝物エンテロラクトンの抗糖尿病作用とその機構解析**

◦矢ヶ崎一三[1,2]，周　芳[2]，古橋慶亮[2]，孫　銘辰[2]，豊崎美紅[1]，吉澤史昭[1,3]，三浦　豊[2]（[1]宇都宮大バイオセ，[2]東農工大農，[3]宇都宮大農）

**2E068　コーヒーの STZ 誘発性膵 β 細胞死に対する効果の解析**

◦倉田貴生，小林美里，浜名芳輝，村井篤嗣，堀尾文彦（名古屋大院生命農・応用生命）

**2E069　細胞内 *de novo* セリン合成系欠損による酸化ストレス脆弱性惹起と炎症関連遺伝子発現誘導**

◦濱野桃子[1]，佐矢野智子[2]，有本八潮[2]，川野裕輝[2]，鵜殿美弥子[2]，片倉喜範[2]，小川拓哉[3]，加藤久典[4]，平林義雄[5]，古屋茂樹[2,5]（[1]福岡女子大，[2]九大，[3]奈良先大，[4]東大，[5]理研）

**2E070　SHRSP の血管障害に対するカツオ動脈球由来エラスチンペプチドの効果**

◦竹森久美子[1]，堀内喜高[2]，赤星保光[2]，米谷　俊[1]（[1]近大農，[2]近大ライフサイエンス）

**2E071　卵黄由来新規育毛素材のヒト育毛効果検証試験**

◦原田清佑[1]，中村紀夫[1]，山村春男[2]，金　武祚[1]（[1](株)ファーマフーズ，[2](株)シャルレ）

**2E072　ラットにおける高タンパク質食の満腹感効果に及ぼすグルタミン酸ナトリウムの影響**

◦真柳佑希，後藤知子，白川　仁，駒井三千夫（東北大院農）

**2E073　魚肉タンパク質摂取による筋重量増増加－他のタンパク質源との比較およびアルギニンの関与の検討－**

◦岸田太郎[1]，原　由真[1]，澤井真梨子[1]，山本晋平[1]，速水耕介[2]，韓　力[3]，岡田晋治[4]（[1]愛媛大農，[2]横浜薬大薬，[3]日本水産株式会社，[4]東京大農）

**2E074　分岐鎖アミノ酸（BCAA）が皮膚機能に及ぼす影響**

◦森岡由夏[1]，岩槻　健[1]，大石祐一[1]，北浦靖之[2]，下村吉治[2]，山根拓実[1]（[1]東農大応生科，[2]名大院生命農）

**2E075　IL-12 産生を誘導する *Lactobacillus crispatus* 由来菌体成分の特性付け**

◦渡邉　樹，飛田啓輔（株式会社キティー）

**2E076　*in vitro* においてラット脳内キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸の検索**

関根愛莉，岡本美沙希，金谷侑香，佐野光枝，柴田克己，◦福渡　努（滋賀県大人間文化）

**2E077　タンパク質栄養の悪化による滲出液の成分変化が創傷治癒に与える影響**

◦志村茉里，岩槻　健，大石祐一，山根拓実（東農大応生科）

**2E079　米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果（第 3 報）**

◦藤井幹夫[1]，樋口裕樹[1]，近藤葉月[1]，杉浦孝宏[2]，北林大侑[3]，渡邊令子[4]，細島康宏[5]，牧野利明[3]，斎藤亮彦[5]（[1]亀田製菓，[2]日本バイオリサーチセンター，[3]名市大院・薬，[4]新潟県大，[5]新潟大・医）

**2E080　コレステロール酸化物が生体に与える影響及びその腸管吸収特性**

◦多田篤生[1]，荻原琢男[2]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]高崎健大院薬・薬，[3]KAST）

**2E081　テアフラビンおよび関連物質が胆汁酸吸収トランスポーター活性に与える影響**

◦石川和樹[1]，石井剛志[2]，小川真奈[1]，阿部啓子[1,3]，小林彰子[1]（[1]東大院農，[2]神戸学院栄，[3]神奈川科学技術アカデミー）

**2E082　海産物由来スフィンゴ脂質セラミドアミノエチルホスホン酸の消化**

◦友永奈美，真鍋祐樹，菅原達也（京大院農）

**2E083　炭水化物の分子種の差がラットの食後血糖の推移に与える影響**

◦田中愛健[1]，高橋清美[1]，加藤順一[1]，澤崎　愛[1]，赤坂泰輝[1]，藤田直子[2]，齊藤雄飛[3]，城内文吾[1]，佐藤匡央[1]（[1]九大院・農，[2]秋田県立大・生物資源科，[3]亀田製菓（株））

**2E084　フラクトオリゴ糖による腸内細菌叢修飾の Biogeographic 解析**

◦宮内栄治，大野博司（理研 IMS）

**2E085　高脂肪食摂取ラットの盲腸内菌叢の変化における腸内細菌の胆汁酸耐性の寄与**

◦渡辺真通[1]，萩尾真人[2]，李　慈英[1]，小椋義俊[3]，林　哲也[3]，清水英寿[4]，石塚　敏[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]（[1]北大院農，[2]東洋大生命科学，[3]九大院医，[4]島根大生物資源）

**2E086　腎臓における糖再吸収トランスポーター SGLT2 活性の安定評価系の構築**

◦武田博士，鈴木大斗，薩　秀夫（前橋工大工）

**2E087　自然薯のプロスタグランジン $E_2$ 合成系抑制と含有成分ジオスゲニンの効果**

◦目賀拓斗[1]，戸田圭祐[1]，津嘉山泉[1]，伊東秀之[2]，川上祐生[2]，高橋吉孝[2]，木本眞順美[2]，荒川俊哉[3]，山本登志子[2]（[1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科，[2]岡山県立大学保健福祉学部栄養学科，[3]北海道医療大学歯学部生化学）

**2E088　皮膚癌モデルマウスにおける自然薯の抗炎症・抗腫瘍効果**

◦津嘉山泉[1]，武田泰典[1]，戸田圭祐[1]，目賀拓斗[1]，川上祐生[2]，高橋吉孝[2]，木本眞順美[2]，山本　圭[3,4]，村上　誠[3,5]，山本登志子[2]（[1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科，[2]岡山県立大学保健福祉学部栄養学科，[3]東京都医学総合研究所，[4]徳島大学生物資源産業学部，[5]AMED-CREST）

**2E089　嚥下調整食開発に向けた自然薯低温乾燥粉末の物性ならびに嚥下機能評価**

◦田中充樹[1]，大野智子[2]，野村奈央[1]，津嘉山泉[1]，戸田圭祐[1]，目賀拓斗[1]，川井恵梨佳[2]，中村孝文[2]，木本眞順美[2]，山本登志子[2]（[1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科，[2]岡山県立大学保健福祉学部）

**2E090　*Lactobacillus gasseri* OLL2809 の抗原提示細胞に対するサイトカイン産生誘導メカニズムの解明**

◦大西一政，佐藤麻子，古市圭介，浅見幸夫（(株)明治研究本部本食機能科学研究所）

**2E091　乳酸菌体の加熱処理による免疫賦活機能の変化とそのメカニズムの解明**

◦佐藤麻子，大西一政，古市圭介，浅見幸夫（(株)明治　研究本部本　食機能科学研究所）

**2E092　DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおけるイソマルトデキストリンの効果（1）**

◦高柿了大，谷口美文，宮田聡美，高山和江，櫻井岳夫，新井成之，渡辺　光，福田恵温（(株)林原　研究開発本部）

**2E093　DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおけるイソマルトデキストリンの効果（2）**

◦櫻井岳夫，新井千加子，谷口美文，新井成之，吉實知代，渡辺　光，福田恵温（(株)林原　研究開発本部）

**2E094　Application of comprehensive extraction coupled to NMR based metabolomics to identify immune-modulatory compounds from Indonesian Plectranthus amboinicus Lour.**

◦Dewi Yuliana Nancy[1,2]，Masao Goto[2]，Jun Watanabe[2]，Yasuyo Sekiyama[2]，Rizal Martua Damanik[1]，Yuko Takano-Ishikawa[2]（[1]Bogor Agricultural University Indonesia，[2]National Food Research Institute）

**2E095　プロシアニジンは解糖系を阻害することで活性化 $CD4^+$T 細胞のエフェクター機能を抑制する**

◦後藤真生[1]，若木　学[1]，庄司俊彦[2]，石川(高野)祐子[1]（[1]農研機構食総研，[2]農研機構　果樹研）

**2E096　メチル化カテキンは脂肪組織において RNF216 依存的に TLR4 の発現を低下させインスリン抵抗性を緩和する**

◦山下麻衣，中村友紀，熊添基文，立花宏文（九大院農院・生機科）

**2E097　動物培養細胞を用いた NF-κB 転写活性評価系の構築**

◦相田美緒，薩　秀夫（前橋工大工）

**2E098　腸管保護成分ポリリン酸を高蓄積した乳酸菌菌体の生理活性評価**

◦斎木朝子[1]，石田康晃[2]，廣田隆一[2]，瀬川修一[1]，中村　剛[1]，黒田章夫[2]（[1]サッポロビール株式会社，[2]広島大院先端物質・分子生命）

**2E099　ゼラニウム精油とその主成分であるシトロネロールの抗アレルギー効果**

◦実宝智子[1]，小林優子[1]，佐藤晴美[1]，頼田美佳[1]，中山博登[2]，宮里博成[2]，杉本圭一郎[2]（[1]千里金蘭大学，[2]長岡香料株式会社）

**2E100　ガーリック由来香気成分が外因系凝固に及ぼす影響**

◦矢口真実，荒木彩花，奥江紗知子，細野　崇，関泰一郎　（日本大院・生資科・応生科）

**2E101　食物アレルギー性皮膚炎モデルにおける CD4$^+$ T 細胞応答の解析**

◦平出恵利華[1]，　足立（中嶋）はるよ[1]，　戸村道夫[2]，　北村紀子[3]，上滝隆太郎[1,4]，神沼　修[3]，廣井隆親[3]，八村敏志[1,4]　（[1]東大院農生科・食の安全研セ，[2]大阪大谷大学・薬，[3]東京都医学総合研・花粉症プロ，[4]東大院農生科・応生化）

**2E102　乳酸菌が産生する菌体外多糖（Extracellular polysaccharides: EPS）の腸管細胞を介した免疫賦活性試験**

◦岸本真奈，水野雅史，大澤　朗　（神大院農）

**2E103　緑茶カテキン EGCG は細胞表面セラミド量を増加させることで脂質ラフトの崩壊を誘導し増殖因子受容体活性を抑制する**

◦黄　宇慧，　塚本俊太郎，　熊添基文，　山田脩平，　山下修矢，立花宏文　（九州大学大学院農学研究院）

**2E104　スイカスプラウトによるヒト白血病細胞株 Jurkat 細胞の増殖抑制機構について**

◦伊藤智広[1]，小野暁人[1]，寺岡沙也可[1]，川口かおり[1]，原田万葉[1]，安藤正史[1]，塚正泰之[1]，橋詰利治[2]　（[1]近大農，[2]（株）萩原農場生産研究所）

**2E105　玄米米糠麹（FBRA）のアポトーシス誘導活性成分の探索**

◦堀江裕紀子[1]，伊藤麻里[1]，小坂弘明[1]，池川繁男[2]　（[1]（株）コーケン，[2]（株）玄米酵素）

**2E106　酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用処理による 抗腫瘍作用の増強**

◦楠本啓博[1]，加治佐真吾[1]，江藤　博[2]，吉田年宏[3]，白畑實隆[1,4]，照屋輝一郎[1,4]　（[1]九大院生資環，[2]第一産業（株），[3]吉田クリニック，[4]九大院農院）

**2E107　キクイモ塊茎に含まれる白血病細胞増殖抑制成分の解明**

◦小林悠生，高橋優佳，五十嵐大輔，白岩雅和　（茨大農　資生科）

**2E108　MK を指標とした神経芽腫細胞に対するジャボチカバ葉のエタノール抽出液の抗腫瘍活性評価**

◦城間博紹[1]，　折田光希[1]，　坪田庄真[2]，　岸田　聡[2]，　千葉俊明[1]，門松健治[2]，池松真也[1]　（[1]沖縄高専，[2]名大医）

**2E109　ショウジョウバエを用いた新規ながん予防食品探索法の開発**

◦永長一茂，前多隼人　（弘前大）

**2E110　Flavan 3-ols の循環刺激作用は交感神経刺激を介して発現する**

◦齊藤晃子，　稲川広大，　深瀬　忍，　江部力彦，　柴田政廣，越阪部奈緒美　（芝工大　生命）

**2E111　Flavan 3-ols の廃用性筋萎縮抑制効果の検証**

◦伊藤麻央，工藤直人，中村将広，三宅勇司，越阪部奈緒美　（芝工大生命）

**2E112　一重項酸素吸収能測定法の妥当性確認およびパプリカの抗酸化能評価**

◦若木　学，渡辺　純，石川（高野）祐子　（農研機構・食総研）

**2E113　宮城県産パプリカトマトの抗酸化能の品種，収穫時期による変動**

◦石川（高野）祐子，若木　学，後藤真生，荻田　佑，渡辺　純　（農研機構食総研）

**2E114　食品素材由来 1 型コラーゲン産生促進物質の探索**

◦須賀久世，加藤英介，川端　潤　（北大院農）

**2E115　ハブソウ（*Cassia torosa* L.）中の有効成分の検索と生理活性**

◦元矢倫子[1]，元矢知志[2]，岡田芳治[1]，元矢雅彦[3]，野村正人[1]　（[1]近畿大・シス工，[2]島根大・医，[3]三幸食品工業（株））

**2E116　完全合成培地中での希少糖 D-プシコースの線虫寿命延長効果**

◦佐藤正資[1]，　砂古口博文[1]，　吉原明秀[2]，　新谷知也[3]，　大隈一裕[3]，何森　健[2]　（[1]香川大農，[2]香川大・希少糖研究セ，[3]松谷化学工業（株））

**2E117　Tyrosinase 反応で生成する・OH に対する機能性成分の低減効果**

◦多田美香[1]，河野雅弘[2]，庭野吉己[3]　（[1]東北工学共通教育センター，[2]東工大　大学院生命理工，[3]東北大歯）

**2E118　ヨモギ乾燥粉末添加による食用油の酸化安定性と嗜好性への影響**

◦平松直子[1]，吉田和利[2]，辻美乃里[1]　（[1]兵庫県立大，[2]兵庫県立工業技術センター）

**2E119　黒麹菌培養物が有する抗酸化能の解析**

◦岩倉翔太，加藤朝子，竹内道雄，山形洋平　（東京農工大院農）

**2E120　焙煎コーヒー酢酸エチル可溶画分のキサンチンオキシダーゼ阻害物質－ピロガロールおよびその変化物について－**

◦本田沙理[1,2]，増田晃子[3]，増田俊哉[2]　（[1]徳島大院・総合，[2]大阪市大院・生活，[3]四国大・生活）

**2E121　腸内環境の酸性化は腸内細菌由来の生理活性物質であるポリアミンを増加させる**

◦北田雄祐[1]，栗原　新[2]，村松幸治[1]，松本光晴[1]　（[1]協同乳業・技術開発，[2]石川県大・生資環）

**2E122　イミダゾールジペプチド（アンセリン/カルノシン）の中高齢者における記憶機能に対する作用**

◦金子　順，貴田潤平，澤田　翔，白井隆貴，久恒辰博　（東大新領域）

**2E123　2 型糖尿病併発型アルツハイマーモデルマウスにおけるイミダゾールジペプチドの認知機能障害に対する予防作用**

◦栃木真美，金子　順，塩谷秋子，久恒辰博　（東大新領域）

**2E124　高齢者の記憶機能低下に対するイミダゾールジペプチドの緩和メカニズムの解明**

◦谷川輝虎[1]，　金子　順[1]，　倉重宏樹[1]，　今林悦子[2]，　松田博史[2]，久恒辰博[1]　（[1]東大新領域，[2]国立精神神経医療研究センター）

**2E125　粉餌あるいは固形餌を長期間摂取させたラットの脳内発現遺伝子の比較解析**

◦小川真奈[1]，　永井俊匡[2]，　齊藤美佳[2]，　石丸喜朗[1]，　阿部啓子[1]，朝倉富子[1]　（[1]東大院農生科・応生化，[2]高崎健大・栄養）

**2E126　咀嚼頻度の異なる餌を摂取させたラットの行動および脳内発現遺伝子の比較解析**

◦田熊彩子[1]，永井俊匡[3]，石丸喜朗[2]，阿部啓子[2]，朝倉富子[2]　（[1]東大農，[2]東大院農生科・応生化，[3]高崎健大・栄養）

**2E127　ローズマリー精油の神経分化促進作用を介した抗ストレス作用**

◦池谷亜有美[1]，ネファティモハメド[2]，礒田博子[1,3]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]チュニジア国立乾燥地研究所，[3]北アフリカ研究センター）

**2E128　腸内細菌脂肪酸代謝物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid（HYA）による腸管ホルモン分泌系を介した代謝改善機能評価**

◦宮本潤基[1]，　長谷川沙恵[1]，　粕渕真由[1]，　岸野重信[2]，　米島靖記[3]，菅原達也[2]，小川　順[2]，木村郁夫[1]　（[1]東京農工大農，[2]京大農，[3]日東薬品工業株式会社）

**2E129　L-シトルリンがヒトの認知機能に与える効果の精神生理学的検討**

◦小長井ちづる[1]，鈴木貴視[2]，森田匡彦[2]，古賀良彦[3]　（[1]新渡戸文化短大生活，[2]協和発酵バイオ，[3]杏林大医）

**2E130　CYP27B1 ノックアウトマウスにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の代謝解析**

◦西川美宇[1]，　安田佳織[1]，　高松将士[1]，　青木健悟[1]，　生城真一[1]，中川公恵[2]，津川尚子[3]，岡野登志夫[2]，榊　利之[1]　（[1]富山県大，[2]神戸薬科大，[3]大阪樟蔭女子大）

**2E131　L-アスコルビン酸 2-グルコシド共存下でのアントシアニンの安定性の検討**

◦犬伏　光，　安田亜希子，　内田智子，　金子啓祐，　丸田和彦，吉田憲史，三皷仁志，有安利夫，福田恵温　（（株）林原）

**2E132　発酵および非発酵ルイボスティーの抽出条件による影響**

◦村上　香，田尾祐一郎，道垣内貴斗，岡　聡子　（広島工業大）

**2E133　LS180 細胞を用いた PXR を介した栄養素ー医薬品間相互作用の解析**

◦加藤綾華，白川　仁，後藤知子，駒井三千夫　（東北大院農）

**2E134　食餌中亜鉛含量が SD 系ラットの糖溶液嗜好性に及ぼす影響**

◦今野美帆，後藤知子，白川　仁，駒井三千夫　（東北大院農）

**2E135　クワの実凍結乾燥粉末摂取による肥満抑制効果の検討**

◦畑生俊光[1]，　渡邉　智[1]，　藤原崇子[2]，　大西直規[2]，　村田芳行[1]，舟橋弘晃[1]　（[1]岡大農，[2]岡山県青果物販売株式会社）

**2E136　クワの実は上皮細胞死を抑制することでインドメタシン**

誘発性胃潰瘍発症を阻止する
◦定兼侑里[1]，藤原崇子[2]，大西直規[2]，村田芳行[1]，舟橋弘晃[1]，畑生俊光[1]（[1]岡大農，[2]岡山県青果物販売）

**2E137　複合サプリメント『カロリミット®』（ギムネマ酸，桑の葉エキス，緑茶エキス，キトサン，インゲン豆エキス含有）摂取による食後血糖値上昇抑制効果検証試験-無作為化二重盲検クロスオーバー試験-**
◦清水良樹[1]，北野　嶺[1]，松岡小百合[1]，由井　慶[1]，海老原淑子[2]，細井孝之[3]，折茂　肇[3]（[1]株式会社ファンケル　総合研究所，[2]チヨダパラメディカルケアクリニック，[3]医療法人財団健康院 健康院クリニック）

**2E138　複合サプリメント『カロリミット®』（ギムネマ酸，キトサン，緑茶エキス，桑の葉エキス，インゲン豆エキス含有）摂取による食後血中中性脂肪値上昇抑制効果検証試験-無作為化二重盲検クロスオーバー試験-**
◦北野　嶺[1]，清水良樹[1]，松岡小百合[1]，由井　慶[1]，高野和彦[2]（[1]株式会社ファンケル　総合研究所，[2]医療法人北武会 美しが丘病院）

**2E139　ツボクサが脂肪細胞分化と機能に与える影響**
◦原田洸輔[1]，飯塚佑菜[1]，仁科淳良[2]，只石　幹[1]，清水　誠[1]，服部一夫[1]（[1]東農大応生科，[2]日大理工）

**2E140　3T3-L1 脂肪細胞に及ぼすヒハツ茎メタノール抽出物の影響**
◦宮本夏子[1]，原田洸輔[1]，飯塚佑菜[1]，池田　萌[1]，佐々木桃佳[1]，仁科淳良[2]，只石　幹[1]，清水　誠[1]，服部一夫[1]（[1]東農大応生科，[2]日大理工）

**2E141　ブルーベリー葉抽出物（BLEx）摂食がアルコール代謝とアルコール性肝障害に与える影響**
◦山崎　楓[1]，長友宏賢[2]，菅本和寛[3]，甲斐孝憲[4]，亀長浩蔵[4]，竹下正彦[5]，菊地幸治[5]，松浦　靖[6]，柚木崎千鶴子[6]，西山和夫[1,2]，山崎正夫[1,2]（[1]宮大院農応生科，[2]宮大農応生科，[3]宮大工環応化，[4]（株）なな葉コーポレーション，[5]南日本酪農協同（株），[6]宮崎県食品開発センター）

**2E142　ブルーベリー葉抽出物（BLEx）によるインスリン抵抗性改善作用**
◦濱田健作[1]，田里博之[2]，荒川輝晃[2]，甲斐孝憲[3]，亀長浩蔵[3]，松浦　靖[4]，柚木崎千鶴子[4]，西山和夫[1]，山崎正夫[1]（[1]宮大 院 農応生，[2]備前化成（株），[3]（株）なな葉コーポレーション，[4]宮崎県食品開発センター）

**2E143　Neuro2a APPswe 細胞が産生するアミロイド $\beta$ によるリン酸化 Tau レベル亢進の FACS 解析**
◦原　　崇[1]，池内　健[2]，徳武孝允[3]，佐藤佳太[4]，中村澄子[1]，城斗志夫[1]，西澤正豊[2]，山崎　彬[5]，小林　篤[5]，大坪研一[1]（[1]新潟大農，[2]新潟大脳研，[3]新潟大医歯学総合病院，[4]新潟大院自然科学，[5]越後製菓）

**2E144　食品素材による認知症予防効果の予備検討及び機能性パンの試作**
中村澄子[1]，西澤正豊[2]，池内　健[2]，山崎　彬[3]，小林　篤[3]，原　　崇[1]，城斗志夫[1]，前田英郎[4]，◦大坪研一[1]（[1]新潟大農，[2]新潟大脳研，[3]越後製菓，[4]農研機構）

**2E145　ゴボウスプラウトのポリフェノール成分とアセチルコリンエステラーゼ阻害活性**
◦城斗志夫[1]，高橋亮祐[2]，原　　崇[1]，中村澄子[1]，池内　健[3]，西澤正豊[3]，小林　篤[4]，山崎　彬[4]，大坪研一[1]（[1]新潟 大 農，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大脳研，[4]越後製菓）

**2E146　清酒酵母による睡眠の質の向上作用について－ヒト臨床試験－**
◦物井則幸[1]，松野あゆみ[1]，永盛友樹[1]，内山　章[1]，裏出良博[2]（[1]ライオン（株），[2]筑波大 WPI-IIIS）

**2E147　清酒酵母の長期摂取時の機能性・安全性評価－ヒト臨床試験－**
◦永盛友樹[1]，上野聡子[1]，高橋千晶[1]，物井則幸[1]，内山　章[1]，裏出良博[2]（[1]ライオン（株），[2]筑波大 WPI-IIIS）

**2E148　メダカを用いた新規経シナプス性トレーサーの開発**
◦横井京子，池永直弥，三坂　巧，岡田晋治（東大院農生科・応生化）

**2E149　小型魚類を用いた味覚情報伝達・処理のイメージング解析**
◦若泉宏樹[1]，川崎隆史[2]，弓場俊輔[2]，阿部啓子[1]，岡田晋治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]産業技術総合研究所）

**2E150　発芽玄米酒粕の ACE 阻害活性**
◦小木曽加奈[1]，岡崎光雄[2]（[1]長野県短期大学，[2]岡崎酒造）

**2E151　LC/MS による ACE 阻害活性ペプチドの簡易探索法の検証**
◦古田一匡[1]，小木曽加奈[2]（[1]富士通株式会社，[2]長野県短期大学）

**2E152　エクオールのチロシナーゼ阻害活性に関する研究**
◦丹羽利夫[1]，秋山治菜[1]，越川まどか[1]，横山慎一郎[2]，望月美佳[3]，大澤俊彦[3]（[1]修文大健康栄養，[2]岐阜県産業技術セ，[3]愛知学院大心身科学）

**2E153　月桃（*Alpinia zerumbet*）由来 5,6-dehydrokawain によるマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の分化促進作用**
◦熊谷百慶[1,2]，三嶋　隆[1]，渡辺章夫[1]，原田哲平[1]，井出将博[1]，小泉慶子[1]，吉田　泉[1]，藤田和弘[1]，渡井正俊[1]，多和田真吉[3]，西川慶祐[2]，森本善樹[2]（[1]日本食品分析センター，[2]阪市大院理，[3]琉大農）

**2E154　酒粕ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用**
◦川上賀代子[1]，加藤春華[1]，垣内紗恵子[1]，守谷智恵[1]，藤田明子[2]，川上晃司[2]，畑中唯史[3]，洲崎悦子[1]，坪井誠二[1]（[1]就実大薬，[2]（株）サタケ，[3]岡山生物研）

**2E155　小麦ふすまの短期摂取による腸内環境の変化に関する機能性解析**
◦岩井克機[1]，吉川悠子[1]，三好規之[1]，大橋典男[1]，福富竜太[2]，浅田憲一[2]（[1]静岡県立大食品栄養，[2]日清ファルマ株式会社）

**2E156　ニコチアナミンの定量方法の検討と沖縄県産植物のニコチアナミン定量評価**
◦長嶺　伸，高良健作，和田浩二（琉大農）

**2E157　オリーブ葉が養殖ブリの肉タンパク質に与える影響**
◦日比光磨[1]，二宮成美[1]，野崎智絵[1]，赤澤隆志[1]，吉田大地[1]，早川　茂[1]，小川雅廣[1]，大山憲一[2]（[1]香川大農，[2]香川県水産試験場）

**2E158　ケルセチン配糖体代謝物の新規タグフリープローブの開発**
◦中島清花，劉　　哲，山口佑也，齋木俊也，中村俊之，宗正晋太郎，村田芳行，中村宜督（岡山大学院・環境生命）

**2E159　マウス行動学実験に基づいたレバウディオサイド A の甘味増強作用評価**
◦河合崇行，日下部裕子（農研機構　食品総合研究所）

**2E160　疑似スズメバチ幼虫由来アミノ酸混合溶液投与による肝臓および脂肪組織におけるトランスクリプトームの協調調節**
◦篠崎文夏[1]，阿部　岳[2]，亀井飛鳥[1]，渡部由貴[1]，安岡顕人[1]，嶋田耕育[1]，近藤　香[1]，荒井綜一[1,3]，熊谷弘太[4]，近藤　隆[1]，阿部啓子[1,5]（[1]神奈川科学技術アカデミー，[2]Hornet Research Center，[3]東農大総研，[4]協和発酵バイオ，[5]東大院農生科・応生化）

**2E161　エピガロカテキンガレートとケルセチン含有食のマウス血清コレステロール値に及ぼす影響**
◦八巻幸二，高橋陽子（農研機構食総研）

**2E162　タモギダケ由来グルコシルセラミドの皮膚機能性評価**
◦鈴木　健[1,5]，関口博太[2,6]，酒井祥太[3]，高橋環奈[1,5]，松本　聡[2]，勝又亮祥[4]，五十嵐靖之[3]（[1]日生バイオ株式会社，[2]株式会社エル・エスコーポレーション，[3]北海道大学先端生命科学研究院，[4]株式会社エクサム，[5]NPO 法人遺伝子栄養学研究所，[6]株式会社ライフサイエンス研究所）

**2E163　緑茶に含まれる機能性関与成分エピガロカテキンガレート（EGCG）による LDL コレステロール値の低下の機能に関する研究レビュー**
◦百瀬祐子，山本万里，鍋谷浩志（農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所）

**2E164　A very low carbohydrate ketogenic diet increases hepatic glycosphingolipids related to regulation of insulin signaling**
◦Tetsuya OKUDA，Naoki MORITA（AIST）

**2E165　短時間吸水小麦のアミラーゼ類およびグルテン形成タンパク質に関わる遺伝子の発現変動**
◦胡　雪亭[1]，田村倫子[1]，阿久澤さゆり[1]，荒井綜一[2]，村　清司[1]（[1]東農大応生科・栄養，[2]東農大総研）

**2E166　水溶性食物繊維であるイヌリンの整腸効果に関するシステマティックレビュー**
◦原健二郎[1]，和田　正[1]，辻　修一[2]，磯村達也[3]，近藤　文[4]，鈴木貞夫[4]，若林敬二[2]（[1]フジ日本精糖，[2]静岡県大院食環，[3]CLIN -

ICAL STUDY SUPPORT，[4]名市大院医）

**2E167　持久性運動後におけるラットへのイソマルチュロース投与が筋グリコーゲン量に及ぼす影響**

◦石川修平[1]，　笹川克己[1]，　櫻井美仁[2]，　能見祐理[2]，　越中敬一[3]，佐藤眞治[2]　（[1]ブルボン健康科学研，[2]新潟薬大応生，[3]新潟医療福祉大健康科学）

**2E168　発酵大麦エキス（FBE）の抗炎症作用の解析および活性成分の同定**

◦青山薫英[1]，Islam Jahidul[1]，外薗英樹[2]，白川　仁[1]，駒井三千夫[1]（[1]東北大・院農，[2]（株）三和酒類）

## F：微生物

**2F001　*Pseudomonas stutzeri* 17-6-2 株の分離と $N_2O$ 還元能に関する研究**

◦窪田江里，濱口曜子，村上周一郎　（明治大・農化）

**2F002　嫌気性メタン資化性菌の分離**

◦橋間千紗[1]，　高橋　結[1]，　伊藤亮至[2]，　登尾浩助[3]，　村上周一郎[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化，[3]明治大農・農）

**2F003　プロテオタイピングによる新規な微生物識別ソフト「Strain Solution」**

◦田村廣人[1,2]，　山本奈保美[1]，　加藤晃代[2]，　島　圭介[3]，　船津慎治[3]（[1]名城大農，[2]科学技術交流財団，[3]（株）島津製作所）

**2F004　*S10*-GERMS 法に基づく MALDI-TOF MS を用いたプロテオタイピングによる *Listeria monocytoegens* 血清型の迅速簡便な識別**

◦山本奈保美[1]，加藤晃代[2]，中山淳子[1]，田村廣人[1]　（[1]名城大農，[2]（公財）科技財団）

**2F005　Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発**

◦黒田ひかり[1]，　佐野芽生[1]，　小原仁実[1]，　安藤　寛[2]，　松本圭司[2]，麻生祐司[1]　（[1]京都工繊大，[2]（株）カネカ）

**2F006　Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発**

◦佐野芽生[1]，　黒田ひかり[1]，　小原仁実[1]，　安藤　寛[2]，　松本圭司[2]，麻生祐司[1]　（[1]京都工繊大，[2]（株）カネカ）

**2F007　東京・荒川から発見した新たなマルセイユウイルス科「*Tokyovirus*」に関する報告**

◦武村政春[1,2]，笠谷竜太[2]　（[1]東京理科大・理，[2]東京理科大・院・科学教育）

**2F008　日本の淡水・海水から発見した新規ミミウイルス科「*Origamivirus*」に関する報告**

◦室野晋吾[1]，武村政春[1,2]　（[1]東京理科大・院・科学教育，[2]東京理科大・理）

**2F009　散水濾床から分離された新規 *Bosea* 属細菌の生理学的および系統的特徴**

◦藤平卓也，　荒瀧元明，　井原奏太，　坂本拓郎，　谷川大輔，木村善一郎　（呉高専）

**2F010　タイ由来のアルコール飲料用スターターの微生物叢の解析とアルコール生産糸状菌の探索**

◦三澤涼太[1]，　米田英伸[1,2]，　高橋裕里香[1]，　西田洋巳[1]，H-Kittikun Aran[3]，浅野泰久[1,2]　（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]Prince of Songkla University）

**2F011　循環型汚水浄化槽内の細菌叢変遷とタンパク質分解に関わる代謝系の解析**

◦増子幸佑[1]，有見芳樹[1]，鈴木智順[1,2]　（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研）

**2F012　循環型汚水浄化槽から単離した細菌株の有機物分解能解析**

◦田中裕介，榊原健太，鈴木智順　（東理大　応生）

**2F013　汚水浄化における真菌および細菌の有機物分解メカニズム解析**

◦永井　茜，鈴木智順　（東理大）

**2F014　PCR-DGGE 法による熟成チーズにおける乳酸菌の検出条件の検討**

◦松下紘士，貝沼（岡本）章子，大西章博，小泉幸道，石川森夫　（東京農大・応生科醸造）

**2F015　奥塩原新湯温泉から分離した新規好熱性アーキアの分離と培養性状**

◦長森麻衣[1,2]，　大西真史[1,2]，　加藤真悟[2]，　高品知典[1]，　伊藤　隆[2]，大熊盛也[2]　（[1]東洋大院・生命科学，[2]理研 BRC-JCM）

**2F016　PCR-DGGE による水田土壌中のメタン生成古細菌の群集解析**

◦徳永　岳[1]，　高杉幸大[1]，　常重友佑[2]，　梶原明日香[3]，　小関詩穂[3]，登尾浩助[3]，村上周一郎[1]　（[1]明治大農（農化），[2]明治大院農（農），[3]明治大農（農））

**2F017　II 型糖尿病を誘起する未知腸内細菌の系統と生理機能の解明**

◦草田裕之[1]，亀山恵司[2]，孟　憲英[1]，鎌形洋一[1]，玉木秀幸[1]　（[1]産総研，[2]味の素（株））

**2F018　中東石油基地スラッジ処分地の微生物叢解析と好熱菌単離の試み**

◦宮平勝人[1]，加藤雄大[1]，田崎雅晴[2]，森川正章[1]　（[1]北大院・環境，[2]清水建設・技術研究所）

**2F019　広島県土壌から分離された新規 *Dyella* 属細菌の生理学的および系統的特徴**

◦牛尾幸航，岡田大輝，松村紫穏，栗山大輝，木村善一郎　（呉高専）

**2F020　*P. aeruginosa* の進化動態変化をもたらす共存細菌 *S. aureus* との種間相互作用**

◦山本京祐[1]，草田裕之[1]，鎌形洋一[1]，玉木秀幸[1,2]　（[1]産総研生物プロセス，[2]東大生物生産工学研究センター）

**2F021　汚水浄化システムにおける細菌の物質的依存関係の解析**

◦島田紘帆[1]，鈴木智順[1,2]　（[1]東理大 応生，[2]東理大 総研）

**2F022　有機物感受性を示す *Acidithiobacillus* 属新規単離株の単離と生理学的性質の解析**

◦上岡永佳，高妻篤史，渡邉一哉　（東薬大生命）

**2F023　ワックス分解に関する環境微生物の挙動解析**

◦植田雄仁，　荒木希和子，　向　真樹，　アディカリディネッシュ，久保　幹　（立命館大学）

**2F024　海洋からのセルロース分解微生物の分離**

◦江水秀之，時川鴻希，藤井克彦　（山大農）

**2F025　酸性イオウ泉試料を種菌として用いた集積培養液におけるアーキア群集構造の変化**

◦酒井博之，黒沢則夫　（創価大院工）

**2F026　*Arthrospira* 属の食用シアノバクテリアの凍結保存方法**

◦白石英秋，田玉翔太郎，廣田翔平，坂井田彩野　（京大生命）

**2F027　乳酸菌と大腸菌の酵母接着特性の類似性**

◦渡辺恭平，平山　悟，古川壮一，森永　康　（日大院・生資科）

**2F028　酵母接着性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 の有する *msa* 遺伝子の解析**

◦平山　悟，森永　康　（日大・生資科）

**2F029　酵母と酵母接着性乳酸菌の共生関係の解析**

◦牧　大剛，平山　悟，古川壮一，森永　康　（日大院・生資科）

**2F030　乳酸菌の共存が酢酸菌の生育・代謝活性に及ぼす影響**

◦東垂水彩乃，古川壮一，森永　康　（日大院・生資科）

**2F031　高塩濃度環境での酵母と乳酸菌の相互作用に関する研究**

◦佐藤有紗，古川壮一，森永　康　（日大院・生資科）

**2F032　伝統的パン種の発酵機構に関する研究**

◦山本暁久[1]，　石川春佳[1]，　伊藤惠介[2]，　伊藤円香[2]，　藤本章人[2]，藤田善樹[2]，井藤隆之[2]，古川壮一[1]，森永　康[1]　（[1]日大院・生資科，[2]MC フードスペシャリティーズ）

**2F033　ヒト大腸フローラモデルを用いたプレバイオティクス効果の検証**

◦高木理沙[1]，佐々木建吾[2]，佐々木大介[2]，福田伊津子[1]，大澤　朗[1]　（[1]神戸大院農，[2]神戸大自然科学系）

**2F034　植物表層に棲息する *Methylobacterium* 属細菌におけるビタミン B 群要求性の解析**

◦吉田裕介[1]，井口博之[2]，由里本博也[1]，阪井康能[1]　（[1]京大院農・応用生命，[2]京都学園大・バイオ環境）

**2F035　*Methylobacterium* sp. strain OR01 の可視化によるアカシソ上での動態観察**

◦片山志織，由里本博也，阪井康能　（京大院農・応用生命）

**2F036　大腸菌抗酸化システム多重欠損株を用いたアミノ酸生合成系の酸化損傷の解析**

◦坂元　仁[1]，古田雅一[1,2]，土戸哲明[1]　（[1]大阪府大・放射線研究セ

ンター，[2]大阪府大院工）

**2F037　枯草菌芽胞のコアのタンパク質変性および加熱・放射線耐性におけるジピコリン酸の役割**

◦前田伸彦[1]，坂元　仁[2]，土戸哲明[2]，古田雅一[1,2]（[1]大阪府大院工，[2]大阪府大・放研セ）

**2F038　出芽酵母の *SSG1-1* 長寿変異株における新規寿命制御機構の解析**

◦小川貴史[1]，　椿山諒平[1]，　金井宗良[2]，　藤井　力[2]，　平田　大[3]，水沼正樹[1]（[1]広島大院・先端研・分子生命，[2]酒総研，[3]朝日酒造・研究開発）

**2F039　出芽酵母の液胞膜に局在する寿命制御因子 Ssg1 の機能解析**

◦竹内悠人，小山哲也，久米一規，水沼正樹（広島大学 先端研 分子生命）

**2F040　出芽酵母の高浸透圧シグナルによる寿命制御機構の解析**

◦米北久美子，小山哲也，久米一規，水沼正樹（広島大院・先端研・分子生命）

**2F041　出芽酵母の寿命制御に関わるメチル基転移酵素の探索**

◦橋本沙也加，小川貴史，久米一規，水沼正樹（広島大学 先端研 分子生命）

**2F042　Volvox 目緑藻の進化におけるアミノ酸とアラニンラセマーゼ**

◦二重作和宏[1]，　平戸祐喜[1]，　小田真弓[1]，　谷川　実[1]，　西村克史[1,2]（[1]日大理工，[2]日大短大）

**2F043　バイオフィルム中に形成される芽胞は浮遊細胞由来芽胞とは異なる耐性を有する**

◦横山佳奈[1]，　尾花　望[1]，　久保田浩美[2]，　富山大輔[2]，　蓮見基充[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大生物資源，[2]花王安全性科学研）

**2F044　フルクトフィリック乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* の比較ゲノム解析から見える乳酸菌の環境適応**

◦前野慎太朗[1]，谷沢靖洋[2,3]，兼崎　友[4]，久保田恵理[4]，矢嶋俊介[4]，SALMINEN SEPPO[5]，　中川純一[1]，　有田正規[3,6]，　遠藤明仁[1]（[1]東京農業大学 生物産業学部，[2]東京大学 新領域創科学研究科，[3]国立遺伝学研究所 生命情報センター，[4]東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター，[5]トゥルク大学 食品機能性フォーラム，[6]理化学研究所環境資源科学研究センター）

**2F045　葉上細菌 *Methylobacterium* 属の光応答性の挙動解析**

◦井口博之（京都学園大・バイオ環境）

**2F046　出芽酵母液胞膜タンパク質 Ypq3 のアミノ酸輸送活性及び発現調節**

◦池田紘一[1]，　真鍋邦男[1]，　山縣里奈[1]，　河田美幸[1,2]，　関藤孝之[1]，柿沼喜己[1]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大学術支援センター）

**2F047　出芽酵母におけるリジンに応答した TORC1 活性の変化**

◦山口翔吾[1]，　國米春香[1]，　兵頭美波[1]，　村尾奈美[1]，　河田美幸[1,2]，関藤孝之[1]，柿沼喜己[1]（[1]愛媛大農，[2]愛媛大学術支援センター）

**2F048　麹菌 *A. oryzae* における RhoGAP タンパク質 FipB とその標的 GTPase の細胞損傷応答**

◦原田堅伍，矢萩大貴，丸山潤一，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

**2F049　麹菌 *A. oryzae* における糸状菌特異的な新規細胞融合関連タンパク質の解析**

◦片山琢也[1]，　Ozgur Bayram[2]，　竹本大吾[3]，　Gerhard H. Braus[4]，北本勝ひこ[1]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]アイルランド国立大学，[3]名大院・生命農学，[4]ゲッティンゲン大学）

**2F050　糖脂質酵素 MPIase に依存するタンパク質膜挿入反応は YidC により促進される**

◦志水優子[1]，佐々木優[1]，Ross Dalbey[2]，西山賢一[1]（[1]岩手大寒冷バイオ，[2]オハイオ州立大）

**2F051　膜小胞を産生する　*Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛分解に関する研究 ～ケラチン分解性プロテアーゼ遺伝子破壊株の作成とトリ羽毛分解の検討～**

◦清水　歩[1]，　西　海斗[1]，　俣野明日香[1]，　森川拓磨[1]，　増村威宏[1]，佐生　愛[1]，川崎一則[2]，茂里　康[2]，渡部邦彦[1]（[1]京都府大，[2]京都市産業技術研究所）

**2F052　糸状性細菌 *Thiothrix fructosivorans* における鞘伸長および細胞分裂パターン**

◦河崎雄太[1]，　遠藤智友樹[1]，　藤原篤男[1]，　近藤敬子[2]，　片平正人[2]，佐藤道夫[3]，武田　穣[1]（[1]横国大工，[2]京大エネルギー理工研，[3]明治大農）

**2F053　麹菌 *A. oryzae* の株系統と細胞融合における不和合性との関連の解析**

◦岡部知弥[1]，　中村英淳[1]，　岩下和裕[2]，　藤井郁雄[3]，　丸山潤一[1]，北本勝ひこ[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]酒総研，[3]阪府大院・理）

**2F054　プリオンが新しい栄養環境での酵母細胞の生存を可能にする**

田中秀樹[1]，村田幸作[2]，◦河井重幸[1]（[1]京大院農，[2]摂南大）

**2F055　*Legionella pneumophila* に見出した MazE-MazF toxin-antitoxin system の機能解析**

◦釋　真緒[1]，山口良弘[1,2]（[1]阪市大・理，[2]阪市大・複合先端研）

**2F056　大腸菌 MqsR-YgiT toxin-antitoxin system の MqsR toxin の諸性質の解明**

◦山口良弘[1,3]，井上正順[2]（[1]阪市大・複合先端研，[2]米国ラトガース大，[3]阪市大・理）

**2F057　大腸菌における新規 YjjJ-HipB toxin-antitoxin system の同定**

◦前田有紀[1]，成谷宏文[3]，山口良弘[1,2]（[1]阪市大・理，[2]阪市大・複合先端，[3]香川大・医）

**2F058　大気圧低温プラズマに対する出芽酵母応答機構の解析**

◦糸岡洸樹，高橋和生，井澤真吾（京工繊大・工芸科学）

**2F059　エタノールによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母遺伝子の同定とその応用**

山内雪菜，◦井澤真吾（京工繊大・工芸科学）

**2F060　翻訳抑制ストレス下における *BDH2* の優先的発現とバニリン耐性への寄与**

◦石田陽子，NGUYEN Trinh，井澤真吾（京工繊大・工芸科学）

**2F061　酵素合成グリコーゲンはヒト正常皮膚細胞において UVB 照射によるダメージを抑制する**

◦吉岡泰淳[1]，三谷塁一[2]，古屋敷隆[3]，芦田　均[2]（[1]神戸大自然科学，[2]神戸大院農，[3]江崎グリコ（株）健康科学研究所）

**2F062　Quercetin and isorhamnetin at the physiological concentration increase glucose uptake via insulin-, AMPK-, and JAK/STAT-pathway in L6 myotubes.**

◦Hao Jiang[1]，　Yasukiyo Yoshioka[2]，　Yoko Yamashita[1]，Hitoshi Ashida[1]（[1]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.）

**2F063　3 成分制情報伝達システムによる病原性因子トロポロンの生産制御**

◦三輪瞬平[1]，　吉岡誠訓[1]，　紀平絵梨[1]，　仲曽根薫[2]，　五十嵐雅之[3]，波多野和樹[3]，　吉川博文[4,5]，　兼崎　友[5]，　江口陽子[1]，　内海龍太郎[1]（[1]近大院農バイオ，[2]近大工，[3]微化研，[4]東京農大応生化バイオ，[5]東京農大ゲノム解析セ）

**2F064　枯草菌のヒスチジンキナーゼに対する H-box 阻害剤 waldiomycin の作用機構**

◦植田修平[1]，　犬飼洋一[1]，　江口陽子[2]，　大島　拓[3]，　清水莉子[1]，岡島俊英[4]，　木下英司[5]，　木下恵美子[5]，　五十嵐雅之[6]，　梅北まや[6]，内海龍太郎[1]（[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大院・生物理工・食品衛生管理学研，[3]奈良先端大，[4]阪大・産研，[5]広島大，[6]微化研）

**2F065　土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における Fur 制御下の機能未知遺伝子 *hemP* の解析**

◦佐藤拓哉，湯原悟志，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

**2F066　*Burkholderia multivorans* における鉄硫黄クラスター合成系遺伝子群の転写制御機構の解析**

◦野々山翔太，　佐藤拓哉，　岸田康平，　大坪嘉行，　永田裕二，津田雅孝（東北大院生命科）

**2F067　エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* CP4 の耐熱化株における耐熱化変異の解析**

◦加藤　舜[1]，　白丸優貴[1]，　山下舞子[2]，　村田正之[2]，　松谷峰之介[1]，高坂智之[1,3]，山田　守[1,2,3]（[1]山口大農，[2]山口大院医，[3]山口大中高温微生物セ）

**2F068　Mutator を利用した *Zymomonas mobilis* のさらなる耐熱化**

◦吉田咲紀[1]，　村田正之[1]，　高坂智之[2,3]，　兼崎　友[4]，　吉川博文[4,5]，山田　守[1,2,3]（[1]山口大院医，[2]山口大農，[3]山口大中高温微生物セ，[4]東京農大 生物資源ゲノム解析セ，[5]東京農大）

**2F069　抗酸化遺伝子の高発現による *Zymomonas mobilis* の耐熱化**
◦高坂智之[1,3]，城戸啓佑[1]，青木浩介[1]，村田正之[2]，山田　守[1,2,3]
（[1]山口大農，[2]山口大院医学系研究科，[3]山口大中高温微生物セ）

**2F070　麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つホスホリパーゼ AoplaA の機能解析**
◦伊澤　翔，高柳亜由美，駒井紀之，小谷昌平，北本勝ひこ，有岡　学（東大院・農生科・応生工）

**2F071　出芽酵母の持つ細胞質型ホスホリパーゼ $A_1$様タンパク質の機能解析**
◦浦藤喬生，有岡　学（東大院・農生科・応生工）

**2F072　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する新規デカルボキシラーゼ遺伝子の機能解析**
◦三宅恭平[1]，高橋健司[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，梶田真也[3]，片山義博[4]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]東農工大院・BASE，[4]旧大・生資科）

**2F073　*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する lignostilbene α, β-dioxygenase 遺伝子の同定**
◦廣瀬優作[1]，高橋健司[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，片山義博[3]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]旧大・生資科）

**2F074　*Sphingobium* sp. SYK-6 株における β-1 型リグニン由来化合物代謝に関わる立体選択的脱水素酵素の解析**
◦小林将大[1]，南保美姫[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研）

**2F075　*Sphingobium* 属細菌におけるリグニン由来化合物の外膜輸送システム**
◦藤田雅也，森　光佑，上村直史，笠井大輔，福田雅夫，政井英司（長岡技科大・生物）

**2F076　コニフェリルアルデヒド二重結合還元酵素のアラニンスキャニング変異体の解析**
◦渡辺眞悟[1]，上村直史[1]，菱山正二郎[2]，笠井大輔[1]，福田雅夫[1]，梶田真也[3]，政井英司[1]（[1]長岡技科大・生物，[2]森林総研，[3]東農工大院・BASE）

**2F077　ゴム分解性土壌放線菌のゴム分解酵素の機能解析と比較**
◦久保木紗哉[1]，笠井大輔[1]，米山史紀[2]，今井俊輔[2]，Dao Viet Linh[1,3]，田端理朗[1]，上村直史[1]，政井英司[1]，福田雅夫[1]（[1]長岡技科大院・生物，[2]住友理工（株），[3]ハノイ工科大）

**2F078　*Rhizobacter gummiphilus* NS21 株のゴム分解酵素遺伝子の異種宿主発現と解析**
◦浅野翔太[1]，笠井大輔[1]，今井俊輔[2]，田端理朗[1]，上村直史[1]，政井英司[1]，福田雅夫[1]（[1]長岡技科大院・生物，[2]住友理工（株））

**2F079　Characterization of the latex-clearing protein from a *Rhodococcus* rubber degrading bacterium**
◦Viet Linh DAO[1,2]，Lan Huong NGUYEN[2]，Kim Anh TO[2]，Michiro TABATA[1]，Daisuke KASAI[1]，Masao FUKUDA[1]（[1]Nagaoka University of Technology, [2]Hanoi University of Science and Technology）

**2F080　*Rhodococcus jostii* RHA1 株の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸代謝遺伝子群の転写制御機構**
◦儀武菜美子，笠井大輔，吉川翔太，上村直史，政井英司，福田雅夫（長岡技科大院・生物）

**2F081　*Pseudomonas stutzeri* PTH10 株の新規フタル酸ジオキシゲナーゼの機能解析**
◦阿部篤季[1]，笠井大輔[1]，荒木直人[1]，岩崎卓己[2]，西　達也[2]，高橋健司[1]，上村直史[1]，政井英司[1]，福田雅夫[1]（[1]長岡技科大院・生物，[2]（株）ジナリス）

**2F082　腸内生存に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築**
◦中川路伸吾[1]，阪中幹祥[2]，横田　篤[1]，吹谷　智[1]（[1]北大農，[2]石川県大）

**2F083　枯草菌バイオフィルムを分解するファージタンパク質の解析**
◦山本達也，野村暢彦（筑波大学生命環境）

**2F084　分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に関わる新たな因子 Spo45 の解析**
◦新美柊子，中村太郎（阪市大院理）

**2F085　分裂酵母胞子壁の最外タンパク質層（Isp3 層）構築に関わる遺伝子の取得と解析**
◦酒井崇史，中村太郎（阪市大院理）

**2F086　麹菌 *A. oryzae* における明暗および温度の周期的変化に対する応答機構の解析**
◦山本実侑[1]，川田純毅[2]，溝上　豊[1]，松尾花枝[1]，丸山潤一[2]，北本勝ひこ[2]（[1]横浜サイエンスフロンティア高等学校，[2]東大院・農生科・応生工）

**2F087　麹菌実用株におけるゲノム編集と非相同組換え修復欠損を用いた高効率遺伝子操作技術の開発**
◦中村英淳[1]，片山琢也[1]，岡部知弥[1]，岩下和裕[2]，藤井　渉[3]，有岡　学[1]，北本勝ひこ[1]，丸山潤一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]酒総研，[3]東大院・農生科・応動）

**2F088　ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達関連遺伝子 traDEF の解析**
◦岸田康平，井上　慧，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大・院生命科）

**2F089　麹菌の Cre 組換え酵素直接導入法における応用開発**
◦利田賢次[1]，林　梨咲[1]，五味勝也[2]，山田　修[1]，水谷　治[1]（[1]酒類総合研究所，[2]東北大院農・生物産業創成）

**2F090　緑膿菌における高酸素親和性 $cbb_3$型末端酸化酵素の機能解析**
◦酒井義瑛，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

**2F091　緑膿菌の新規シアン応答転写調節因子による好気呼吸酵素遺伝子の転写制御解析**
◦多田羅圭，石井正治，新井博之（東大院農生科・応生工）

**2F092　枯草菌胞子形成のトリガー遺伝子 *kinB* の転写制御**
◦藤田泰太郎，仁井里美，広岡和丈（福山大生命工）

**2F093　枯草菌のラムノース資化に関わる遺伝子群の発現と機能の解析**
◦広岡和丈，藤田泰太郎（福山大生命工・生物工）

**2F094　cell wall integrity pathway によるメタノール誘導性遺伝子発現制御**
◦大澤　晋，由里本博也，阪井康能（京都大院農・応用生命科学農・応用生命科学）

**2F095　エタノール代謝産物によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制機構**
◦西田　晋，大澤　晋，由里本博也，阪井康能（京大農）

**2F096　枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾機構および制御機構の解析**
◦鈴木祥太[1]，吉田　稔[2]，西山　真[1]，古園さおり[1,2]（[1]東大・生物工学セ，[2]理研 CSRS）

**2F097　枯草菌 ECF シグマ因子 SigX のグルコース依存的な活性化に関わる RNA ポリメラーゼ のアセチル化**
◦米沢祐大[1]，小倉光雄[2]，鈴木祥太[1]，吉田彩子[1]，朝井　計[3]，吉田　稔[4]，西山　真[1]，古園さおり[1,4]（[1]東大・生物工学研究セ，[2]東海大・海洋研，[3]埼玉大・分子生物，[4]理研 CSRS）

**2F098　コリネ型細菌における ECF シグマ因子 $\sigma^C$のレギュロンの同定**
◦豊田晃一[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

**2F099　Adaptive Laboratory Evolution によるコリネ型細菌高温耐性株の育種**
◦生出伸一[1]，郡司　渉[1]，茂木康弘[1]，山本省吾[1]，須田雅子[1]，城島　透[1]，湯川英明[1]，乾　将行[1,2]（[1]地球環境産業技術研究機構，[2]奈良先端大・バイオ）

**2F100　コリネ型細菌における RNase J 遺伝子及び RNase E/G 遺伝子の発現解析**
◦濱本　渚[1,2]，田中裕也[2]，竹本訓彦[2]，前田智也[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大・バイオ，[2]RITE）

**2F101　コリネ型細菌におけるピリミジン新規合成経路遺伝子の発現制御解析**
◦田中裕也[1]，寺本陽彦[1]，乾　将行[1,2]（[1]（公財）地球環境産業技術研究機構，[2]奈良先端大・バイオ）

**2F102　放線菌を宿主とする構成型分泌発現ベクターの機能解析**
◦土屋杏那，橋本義輝，齋藤結希，松本雅子，熊野匠人，小林達彦（筑波大）

**2F103　*Rhodococcus* を宿主とする構成型大量発現シャトルベクターの機能解析**
◦松本雅子，橋本義輝，劉　瑞，熊野匠人，小林達彦（筑波大院）

**2F104　糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発**
◦國武絵美，山口楓絵，金丸京子，木村　真，小林哲夫　（名大院・生命農）

**2F105　糸状菌の新規 sirtuin アイソザイムの定常期から死滅期における機能**
◦伊藤英里子，高谷直樹　（筑波大）

**2F106　プラスミド保持に伴う遺伝子発現の一細胞レベルでの多様性の解析**
◦高比良早紀[1]，水口千穂[1]，宮崎　亮[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]産総研）

**2F107　*Aspergillus* 属菌の休眠胞子および発芽胞子のトランスクリプトーム解析**
◦萩原大祐，高橋弘喜，楠屋陽子，川本　進，亀井克彦，五ノ井透　（千葉大真菌センター）

**2F108　麹菌のロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子（*lapA*）のプロモーター解析**
◦高見英輝，豊島快幸，茂木喜信　（ヤマサ醤油）

**2F109　超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子の解析**
◦福田青郎[1]，内田圭亮[1]，ジャジリアブドルアジズ[1]，市村瑞葉[1]，何あゆみ[1]，金井　保[2,3]，跡見晴幸[2,3]，今中忠行[1,3]　（[1]立命館大生命，[2]京都大院工，[3]CREST）

**2F110　デオキシニバレノールのアセチル化体が酵母細胞にもたらす毒性影響の違い**
◦鈴木忠宏，岩橋由美子　（農研機構・食総研）

**2F111　ビフェニル/PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715（NBRC 110667）株のゲノム再編成現象**
◦末永　光[1]，藤原秀彦[2]，木村信忠[1]，廣瀬　遵[3]，渡邊崇人[4]，二神泰基[5]，後藤正利[6]，古川謙介[2]　（[1]産総研生物プロセス，[2]別府大食物，[3]宮崎大工，[4]京大生存研，[5]鹿大農，[6]九大農）

**2F112　*Pseudomonas aeruginosa* KF702 のビフェニル・サリチル酸・安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの再編成**
◦廣瀬　遵[1]，寺野貴洋[1]，横井春比古[1]，末永　光[2]，木村信忠[2]，渡邊崇人[3]，二神泰基[4]，後藤正利[5]，藤原秀彦[6]，古川謙介[6]　（[1]宮崎大工・環境応用化，[2]産総研・生物プロセス，[3]京大・生存研，[4]鹿大・農，[5]九大院・農，[6]別府大・食物栄養）

**2F113　富山湾海水中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立**
◦宮西謙弥[1]，中野椋太[1]，磯貝泰弘[1]，畠　俊郎[2]，西田洋巳[1]，高橋裕里香[1]　（[1]富県大生工科・生工セ，[2]富県大環工科）

**2F114　富山湾海底堆積物中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立**
◦中野椋太[1]，宮西謙弥[1]，磯貝泰弘[1]，畠　俊郎[2]，西田洋巳[1]，高橋裕里香[1]　（[1]富県大生工科・生工セ，[2]富県大環工科）

**2F115　メタゲノム解析と環境ゲノムのビン詰めによるバイオオーグメンテーション中の微生物機能評価**
◦三浦隆匡[1]，関口勇地[2]，沼田　充[1]，山副敦司[1]，藤田信之[1]　（[1]NITE, NBRC，[2]産総研，バイオメディカル）

**2F116　細菌叢構造のメタ 16S 解析による土壌汚染評価の試み**
◦高橋　咲[1]，姜　天龍[2]，黄　光偉[3]，齊藤玉緒[1]　（[1]上智大理工，[2]上智大院理工，[3]上智大院地球環境）

**2F117　高温環境メタゲノムの大規模解析と超耐熱性 β−キシロシダーゼの スクリーニング**
佐藤　大[1]，須田みぎわ[1]，大熊二郎[2]，加藤友彦[1]，広瀬佳嗣[2]，西村明日香[2]，近藤康弘[2]，◦柴田大輔[1]　（[1]かずさ DNA 研，[2]ホンダ・リサーチ・インスティチュート・ジャパン）

**2F118　主要な好熱性糸状菌類の菌体外酵素生産と培養特性**
◦島村麻美子，デオリベイラポルシウンクラジュリアーノ，安宅花子，西嶋桂子，紙野　圭　（(独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター）

**2F119　系統解析と分子動力学計算に基づく[NiFeSe]ヒドロゲナーゼの環境適応モデル**
◦田村　隆[1,2]，恒川直樹[3]，根本理子[1]，平野敏行[3]，佐藤文俊[3]，稲垣賢二[1]　（[1]岡山大農，[2]JST さきがけ，[3]東大生産技）

**2F120　腸内細菌叢変化を介したヒト生体機能の調整：次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析と遺伝子発現解析結果との関連性**
◦小田由里子[1]，井上　亮[2]，植田文教[1]，亀井飛鳥[3]，宇津山正典[4,5]，阿部啓子[3,6]，廣川勝いく[4,5]　（[1]富士フイルム（株），[2]京府大院生命環境科学，[3]KAST，[4]（株）健康ライフサイエンス，[5]東医科歯科大，[6]東大院農）

**2F121　食物アレルギー発症児と非発症児の乳幼児期における腸内細菌叢の比較解析**
◦田中　優[1]，東佳那子[1]，山本麻寿紗[1]，本田倫子[1]，百田理恵[1]，清原千香子[2]，園元謙二[1,3]，鷲尾昌一[4]，中山二郎[1]　（[1]九大院・農，[2]九大院・医，[3]九大・バイオアーク，[4]聖マリア学院大学）

**2F122　佐鳴湖から採取された新規微生物の生理活性解析およびゲノム解析**
◦村口雄亮[1]，久志本晃弥[2]，佐藤安里紗[1]，福田洸平[3]，大坪嘉行[4]，鈴木智大[5]，道羅英夫[5]，金原和秀[1,2,3]，新谷政己[1,2,3]　（[1]静大工，[2]静大院，[3]静大創造院，[4]東北大院生命科学，[5]静大グリーン研）

**2F123　低希土類や Ca を要求しない新規な *Methylobacterium* 属細菌のスクリーニングとそのメタノール脱水素酵素の性質について**
◦王　倫，濱田昂志，日比野歩美，早川享志，中川智行　（岐阜大院応生）

**2F124　*Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 のレアアースに対する発現応答と性質**
◦菅沼宗矢[1]，日比野歩美[1]，海老原章郎[1]，岩本悟志[1]，谷　明生[2]，三井亮司[3]，早川享志[1]，中川智行[1]　（[1]岐阜大応生，[2]岡山大植物研，[3]岡山理大理）

**2F125　*Corynebacterium glutamicum* 由来 ODH/PDH-E2 サブユニットのアセチル 化部位の機能解析**
◦阿部理乃[1]，久保翔世[1,2]，永野　愛[1,3]，川崎　寿[2]，吉田　稔[4]，西山　真[1]，古園さおり[1,4]　（[1]東大・生物工学セ，[2]東京電機大，[3]協和発酵バイオ，[4]理研 CSRS）

**2F126　*Corynebacterium glutamicum* 由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）のアセチル化制御はグルタミン酸生産に重要である**
◦永野　愛[1,2]，山田鮎果[1]，水野裕太[2]，菊地正樹[3]，白水美香子[3]，梅原崇史[3,4]，吉田彩子[1]，吉田　稔[5]，西山　真[1]，古園さおり[1,5]（[1]東大・生物工学セ，[2]協和発酵バイオ，[3]理研 CLST，[4]JST さきがけ，[5]理研 CSRS）

**2F127　大腸菌におけるエネルギー代謝の切り替え機構**
◦島田友裕，田中　寛　（東工大資源研）

**2F128　大腸菌新規リボゾーム結合タンパク質 ElaB における N 末端セリンアセチル化修飾の同定と解析**
◦鷹巣全希，島田友裕，田中　寛　（東工大資源研）

**2F129　網羅的解析による *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が有する新奇 $CO_2$ 固定経路の推定**
◦矢野嵩典[1]，高木博史[2]，吉田信行[1]　（[1]静大院，[2]奈良先端大バイオ）

**2F130　超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の細胞内糖質の分析**
船水悠平[1]，矢野嵩典[2]，◦吉田信行[1,2]　（[1]静大工，[2]静大院）

**2F131　化学物質の微生物に対する毒性を評価するフロー式蛍光計測システムの開発**
◦櫻井琢磨[1]，尾崎　愛[2]，新谷政己[1,2]，木村元彦[1,2]，金原和秀[1,2]（[1]静大院，[2]静大工）

**2F132　ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成に関与するカルボキシスペルミジン脱炭酸酵素**
◦阪中幹祥[1]，杉山友太[1]，北方　彩[1]，片山高嶺[1,2]，栗原　新[1]（[1]石川県大，[2]京大院生命）

**2F133　酵母のアルギニン代謝における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規経路の解析**
◦乗船沙紀，関口春菜，那須野亮，高木博史　（奈良先端大・バイオ）

**2F134　超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* における Coenzyme A 生合成制御機構の解明**
◦下坂天洋[1]，跡見晴幸[1,2]　（[1]京大院・工，[2]JST, CREST）

**2F135　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における $NAD^+$ 熱分解産物の代謝機構**
◦蜂須賀真一[1]，佐藤喬章[1,2]，跡見晴幸[1,2]　（[1]京大工，[2]JST, CREST）

**2F136　酵母における炭素源の厳密な選択に関与する Fmp12 の機能解析**
◦西田郁久，渡辺大輔，河野祐介，大津厳生，高木博史 （奈良先端大バイオ）

**2F137　メチロトローフ酵母の $C_1$ 固定の鍵因子キシルロース 5-リン酸供給系の解析**
◦川瀬貴斗[1]，福岳寛隆[1]，由里本博也[2]，奥　公秀[2]，阪井康能[2]，早川享志[1]，中川智行[1] （[1]岐阜大応生，[2]京大院農）

**2F138　*Bifidobacterium longum* 105-A のメチオニン利用性に関与する *S*-アデノシルメチオニン回路の解析**
◦松本菜々恵[1]，小松一喜[1]，阪中幹祥[2]，鈴木　梓[1]，吹谷　智[1]，横田　篤[1]，和田　大[1] （[1]北大院農，[2]石川県大）

**2F139　環境常在細菌におけるアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* 関与の普遍的低栄養環境適応戦略**
◦稲葉慎之介，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝 （東北大･院生命科）

**2F140　*Zymomonas mobilis* の呼吸鎖の塩耐性への関与に関する解析**
◦林　毅[1,2]，加藤剛士[2]，渡壁理志[1]，宋　原準[1]，相川靖穂[1] （[1]別府大・食栄科，[2]別府大院・食栄研）

**2F141　エタノールとグルコース存在下での *Acetobacter* 属酢酸菌の代謝特性**
◦新井博之，新井　凌，桜井健太，石井正治 （東大院農生科）

**2F142　発酵温度と発酵期間が国産キムチの微生物群集構造に与える影響**
◦村岡奈緒美[1]，天知誠吾[1]，本間　崇[2]，中村茉莉子[2]，柳澤康平[2]，安藤昭一[1] （[1]千葉大院園芸，[2]株式会社美山）

**2F143　国産キムチの容器膨張・白点化に及ぼす酵母の影響**
◦鈴木彩香[1]，大宮亜沙美[1]，天知誠吾[1]，本間　崇[2]，中村茉莉子[2]，柳澤康平[2]，安藤昭一[1] （[1]千葉大院・園芸，[2]美山）

**2F144　*Corynebacterium glutamicum* の native membrane におけるグルタミン酸排出チャネルの機能解析**
中山義敬[2]，◦駒澤光祐[1]，橋本賢一[1]，川崎　寿[1]，Martinac Boris[2] （[1]東電大院・物質工，[2]Victor Chang Cardiac Research Institute）

**2F145　分子動力学シミュレーションを用いた Tween 40 による Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激応答の解析**
◦澤田康之[1]，橋本賢一[2]，中松　亘[2]，曽我部正博[3]，川崎　寿[2] （[1]名大院医，[2]東京電機大工，[3]名大医メカノバイオロジー）

**2F146　還元力高産生コリネ菌におけるリジン発酵中の NADPH/NADP$^+$ 比の測定**
◦堀　一将[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2F147　脂肪酸合成経路に着目したビオチン生産菌の分子育種**
◦長島　堯[1]，大下政一[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2F148　ピメリン酸バイオアッセイ系の開発**
◦川上春佳[1]，加藤峻介[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2F149　コリネ菌におけるピメリン酸分泌株の取得**
◦加藤峻介[1]，川上春佳[1]，三橋　敏[2]，竹野誠記[1]，池田正人[1] （[1]信州大農・応生科，[2]協和発酵バイオ）

**2F150　クエン酸シンターゼの活性低下が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響**
◦愛甲　徹，柳瀬真紀，佐藤桃梨，和田　大，横田　篤 （北大院農）

**2F151　リンゴ酸デヒドロゲナーゼ欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響**
◦佐藤桃梨，柳瀬真紀，愛甲　徹，和田　大，横田　篤 （北大院農）

**2F152　組換え大腸菌を用いたキラルな 1,2-プロパンジオール発酵生産に関する研究**
◦河済真也，松原　充，山田尚平，鳴滝　藍，片岡道彦 （阪府大院・生環科・応生科）

**2F153　組換え大腸菌を用いたグルコースを出発原料とする 1-プロパノール発酵生産に関する研究**
◦山田尚平，松原　充，浦野信行，藤居実咲，片岡道彦 （阪府大院・生環科・応生科）

**2F154　1-プロパノール発酵生産のための酵素遺伝子発現系の解析**
◦松原　充，浦野信行，山田尚平，藤居実咲，片岡道彦 （阪府大院・生環科・応生科）

**2F155　*Halomonas* sp. KM-1 を用いた(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸およびピルビン酸生産における代謝シフトに関する検討**
◦西村　拓[1]，松下　功[1]，坪田　潤[1]，河田悦和[2] （[1]大阪ガス，[2]産総研・バイオメディカル）

**2F156　異なる窒素供給下の *Halomonas* sp. KM-1 によるピルビン酸の分泌生産**
◦河田悦和[1]，坪田　潤[2]，松下　功[2]，西村　拓[2] （[1]産総研・バイオメ，[2]大阪ガス・エネ技研）

**2F157　*Halomonas* sp. KM-1 とその変異体を用いたピルビン酸生産の検討**
◦岡本成平[1,2]，中薗沙也佳[1]，武井靖子[1,2]，倉本華歩[1]，辻　彩花[1]，新川悠一[1]，西村　拓[3]，松下　功[3]，坪田　潤[3]，河田悦和[4]，東　慶直[1] （[1]近大・生物理工，[2]JST・ALCA，[3]大阪ガス，[4]産総研・バイオメディカル）

**2F158　麹菌 *Aspergillus oryzae* の非イオン性界面活性剤添加培養による遊離脂肪酸の高効率分泌**
◦玉野孝一，三浦　愛，小池英明，神坂　泰，梅村舞子，町田雅之（産総研生物プロセス）

**2F159　2,3-ブタンジオール高生産出芽酵母株の構築**
◦松田史生[1]，伊田賢吾[3]，木下翔平[1]，森田啓介[1]，石井寛子[1]，富田淳美[1]，石井　純[2]，近藤昭彦[1]，清水　浩[3] （[1]阪大情報，[2]神戸大自科，[3]神戸大工）

**2F160　紙パルプの同時糖化発酵によるカフェ酸の微生物生産**
◦川口秀夫[1]，勝山陽平[2]，トタンヤオ[2]，鶴田祥子[1]，南　博道[3]，荻野千秋[1]，大西康夫[2]，近藤昭彦[1] （[1]神戸大院・工，[2]東大院・農生命科学，[3]石川県大・資源研）

**2F161　希少糖が *Acetobacter aceti* による酢酸発酵に及ぼす影響**
◦吉田大地，小川綾子，小川雅廣，早川　茂 （香川大農）

**2F162　簡易型サイロにおける酸素濃度とサイレージ発酵品質の検討**
◦木村俊之[1]，大澤　玲[2]，川野和男[3]，上垣隆一[4] （[1]中央農業総合研究センター，[2]埼玉県農業技術研究センター，[3]日本化薬フードテクノ(株)，[4]動物衛生研究所）

**2F163　超音波洗浄器を用いた米麹中の各種酵素の迅速抽出**
◦三木功次郎，中谷美智，石丸裕士，北村　誠 （奈良高専）

**2F164　清酒麹における混合培養系を用いたグルコアミラーゼ生産**
◦竹藤春香[1]，二宮純子[1]，森田　洋[2] （[1]北九大院，[2]北九大）

**2F165　米及び麦を培養基質とした液体麹における白麹菌の培養条件の構築**
◦井菜々子[1]，三貝咲紀[1]，二宮純子[1]，森田　洋[2] （[1]北九大院，[2]北九大）

**2F166　改変大腸菌によるプトレッシンの生産**
◦入江加奈子，鈴木秀之 （京都工繊大院応生）

**2F167　ゴードスポリンの酵素的全合成**
◦山下湖奈[1]，尾崎太郎[1]，浅水俊平[1]，後藤佑樹[2]，菅　裕明[2]，尾仲宏康[1] （[1]東大院農，[2]東大院理）

**2F168　二次代謝誘導物質ゴードスポリン作用機構の解析**
◦尾崎太郎，浅水俊平，尾仲宏康 （東大院農）

**2F169　複合培養特異的に生産されるテトラヒドロキノリン生合成遺伝子の解析**
◦下村杜人[1]，尾崎太郎[1]，杉山龍介[2]，西村慎一[2]，浅水俊平[1]，掛谷秀昭[2]，尾仲宏康[1] （[1]東大院農，[2]京大院薬）

**2F170　RNA-seq によるミコール酸含有細菌に対する Streptomyces coelicolor A3（2）の応答解析**
佐々木槇子[2]，◦浅水俊平[1]，尾崎太郎[1]，宮本憲二[2]，尾仲宏康[1] （[1]東大院農，[2]慶応・理工）

**2F171　ATP 依存的に生合成される各種化合物群の効率的生産を実現する放線菌宿主-ベクター系の構築**
吉村友宏[1]，柴田展行[1]，濱野吉十[2]，◦山中一也[3] （[1]JNC・横浜研，[2]福井県大・生物資源，[3]関西大・化生工）

**2F172　ATP 高生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした高分子量ヒアルロン酸及び 5-アミノレブリン酸の効率的異種生産**
吉村友宏[1]，◦柴田展行[1]，濱野吉十[2]，山中一也[3] （[1]JNC・横浜研，[2]福井県大・生物資源，[3]関西大・化生工）

**2F173　リーダーレスバクテリオシン生合成機構を利用した新奇抗菌ペプチドの創出・評価系の構築**

矢野瑞季[1]，緒方詩保[1]，石橋直樹[1]，○善藤威史[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大院・農，[2]九大・バイオアーク）

**2F174　乳酸菌由来環状抗菌ペプチドの新奇生合成遺伝子群の同定と分泌発現系の構築**

○高城博也[1]，石橋直樹[1]，沢　稔彦[1]，杉野春貴[1]，善藤威史[1]，園元謙二[1,2]（[1]九大農・院，[2]九大・バイオアーク）

**2F175　ゲノムマイニングに基づく *Streptomyces cattleya* の新規ラッソペプチドの単離**

○小谷真也[1,2]，菅井翔吾[2]，亀山眞由美[3]（[1]静大･学術院･農，[2]静大･大学院・総，[3]農研機構・食総研）

**2F176　*Streptomyces* sp. No. 3 株が生産する抗菌物質に関する研究**

○阿部優依奈，清藤結子，吉原周佑，村上周一郎（明治大農）

**2F177　アラキドン酸含有脂質を蓄積する緑藻株の探索**

○加藤康夫[1]，木野貴仁[1]，米田有紗[1]，野村泰治[1]，荻田信二郎[1,2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]県立広島大・生命科学）

**2F178　Alteration of secondary metabolite production by primary metabolism inhibitors**

○Dana Ulanova[1]，Masashi Tsuda[2]（[1]Science Research Center, Kochi University, [2]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University）

**2F179　*Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素同族体生合成遺伝子の探索**

○荻原　淳[1,2]，茂木美樹[2]，小嶋　涼[2]，新居鉄平[1]，岩田悠志[1]，渡邉泰祐[1,2]，春見隆文[1,2]（[1]日大生物資源科学，[2]日大院生物資源科学）

**2F180　ニバレノール生合成の分子生物学**

前田一行[1]，田中　彰[2]，杉浦涼介[1]，越野広雪[3]，東海武史[4]，佐藤真之[4]，棚橋和義[1]，中嶋佑一[1]，金丸京子[1]，小林哲夫[1]，西内　巧[5]，藤村　真[4]，安藤直子[2]，○木村　真[1]（[1]名大院生命農，[2]東洋大院理工，[3]理研，[4]東洋大院生命，[5]金沢大学際）

**2F181　ヴィオラセイン化合物の抗菌活性**

○滝口泰之，嶋田純也，平野沙耶，酒井亜里沙，尾形　仁（千葉工大工）

**2F182　Bacillus sp.No.1003 が生産するコリネ型細菌特異的生育阻害物質の精製**

○鶴岡祐太，川崎　寿，中松　旦，夏目　亮（東電大・院・工）

**2F183　沖縄県本部産リュウキュウアイの機能性評価**

○嶺井　凛[1]，嶺井美枝子[2]，嶺井政秀[2]，田中　博[1]（[1]沖縄高専・生物資源，[2]アイリーフ）

**2F184　糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH family 134 に属する β-1,4-マンナナーゼ（Man134A）の活性部位残基の探索**

○木本紗蘭，山田みゆき，酒井杏匠，金子優平，志水元亨，加藤雅士（名城大農）

**2F185　新規 GH134 ファミリーに属する糖質加水分解酵素の機能解析**

○酒井杏匠[1]，新沢祐大[1]，嶺澤美帆[1]，山田みゆき[1]，望月麻衣[1]，神藤定成[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]名城大理工）

**2F186　糸状菌 *Aspergillus nidulans* および *Aspergillus oryzae* 由来の新規 GH134 に属する β-マンナナーゼの酵素学的性質**

○嶺澤美帆[1]，酒井杏匠[1]，新沢祐大[1]，望月麻衣[1]，山田みゆき[1]，木本紗蘭[1]，金子優平[1]，石原紗彩耶[1]，小林哲夫[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]名古屋大院農学）

**2F187　糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 β-1,4-マンナナーゼ Man134A の β-マンナン分解における役割**

○新沢祐大[1]，酒井杏匠[1]，嶺澤美帆[1]，望月麻衣[1]，山田みゆき[1]，金子優平[1]，石原紗彩耶[1]，神藤定生[2]，小林哲夫[3]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]名城大理工，[3]名大院生命農）

**2F188　ヘミセルロース応答的に生産さ れる糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞外プロテオーム解析**

○鈴木梨央，糀谷紗季，村田俊輔，酒井杏匠，河合竜治，志水元亨，加藤雅士（名城大農）

**2F189　植物由来香気成分の微生物資化に関わる酵素**

○土居志織，橋本義輝，富田千晶，熊野匠人，小林達彦（筑波大院・生命環境）

**2F190　微生物によるセサミン代謝における新規なメチレン基転移酵素の発見**

○熊野匠人，藤木恵津子，橋本義輝，小林達彦（筑波大院・生命環境）

**2F191　Heterologous expression in Pichia pastoris and characterization of an imidazole sensitive beta-glucosidase from the gregarious wood-feeding cockroach Panesthia angustipennis**

○Yihai LI[1]，Gaku Arakawa[2]，Gaku Tokuda[3]，Hirofumi Watanabe[2]，Manabu Arioka[1]（[1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Nat. Inst. Agrobiol. Sci., [3]Univ. of the Ryukyus）

**2F192　麹菌 *A. oryzae* を宿主としたシロアリ腸内共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼの生産**

○北本真理奈[1]，川田純毅[1]，丸山潤一[1]，小田切正人[2]，守屋繁春[2]，有岡　学[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]理化学研究所）

**2F193　文化財修復に有用な *Pseudomonas vesicularis* 由来ポリビニルアルコール分解酵素の生産性の向上に向けた検討**

○山中勇人[1]，駒　大輔[1]，森芳邦彦[1]，酒井清文[2]，早川典子[2]，川野邊渉[2]，大本貴士[1]（[1]阪市工研，[2]東文研）

**2F194　可溶性糖質を原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの半連続生産**

○池　正和，田伏美峰，徳安　健（農研機構・食総研）

**2F195　キチン由来ヘテロ 2 糖による *Shewanella baltica* のキチン分解酵素生産誘導**

○池嶋聖史[1]，平野貴子[2]，白石晴香[1]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

**2F196　*Brevibacillus* 分泌発現系を利用したカラギーナン分解酵素の精製**

○大西浩平，笹岡美波，高橋　亮（高知大農）

**2F197　*Bacillus circulans* KA-304 由来 α-1,3-グルカナーゼに含まれる機能未知ドメインの役割**

○残間寿美香[1]，矢野成和[1]，若山　守[2]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命科学）

**2F198　変異導入による $Ca^{2+}$ 活性化 PET 分解酵素の基質認識部位の特定**

○山上由莉[1]，三木彩子[2]，川端　猛[3]，神谷成敏[4]，織田昌幸[2]，河合富佐子[5]（[1]京府大・生環，[2]京府大院・生環科，[3]阪大・蛋白研，[4]理研・AICS，[5]京工繊大・繊科セ）

**2F199　*Lactobacillus plantarum* H78 株におけるタンナーゼ遺伝子のクローニングと配列解析及びタンナーゼの特徴**

○松田麻李[1]，金内　誠[1]，戸塚　昭[2]，笠原　紳[1]（[1]宮城大食産，[2]感性科学研究所）

**2F200　アラビノキシラン利用コリネ型細菌の構築**

○久下貴之[1,2]，渡邉　彰[2]，寺本陽彦[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE）

**2F201　コリネ型細菌由来 phenol 2-monooxygenase の機能解析**

○前田淳哉[1,2]，平賀和三[2]，久保田健[2]，乾　将行[1,2]（[1]奈良先端大･バイオ，[2]RITE）

**2F202　コリネ型細菌による 4-ヒドロキシ安息香酸の高生産**

○平賀和三[1,2]，橋本龍馬[1,2]，北出幸広[1,2]，須田雅子[1,2]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]グリーンフェノール開発（株））

**2F203　コリネ型細菌における糖消費速度の大幅な向上をもたらす *pfkB1* 破壊の解析と物質生産への応用**

○長谷川智[1]，田中裕也[1]，須田雅子[1]，城島　透[1]，乾　将行[1,2]（[1]RITE，[2]奈良先端大・バイオ）

**2F204　好塩性細菌の PHB 合成における塩濃度の影響**

○世嘉良宏斗[1]，花城隆二[1]，合田雅浩[1]，照屋盛実[1]，常盤　豊[2]（[1]沖縄県工技セ，[2]グリーン・プロダクツ・ラボ）

**2F205　天然の藍染料を用いた藍染め液の微生物**

○常盤　豊[1]，角　寿子[2]，ノームホルムアタポン[3]，世嘉良宏斗[4]（[1]グリーン・プロダクツ・ラボ，[2]北の藍染織工房，[3]アジア工科大学院，[4]沖縄県工業技術センター）

**2F206　枯草菌ゲノム縮小株における代謝工学によるポリグルタミン酸の生産性向上**

○増田健太[1]，劉　生浩[1]，戸谷吉博[2]，平沢　敬[2,3]，森本拓也[1]，影山　泰[1]，吉田健一[4]，清水　浩[2]，小笠原直毅[5]，尾崎克也[1]，萩原　浩[1]（[1]花王・生科研，[2]阪大院・情報・バイオ情報，[3]東工大院生命理工・生物プロセス，[4]神戸大・農，[5]奈良先端大院・バイオ）

**2F207　代謝フラックス解析に基づいた枯草菌ゲノム縮小株 MGB874 のジピコリン酸生産性の向上**
◦劉　生浩[1]，増田健太[1]，戸谷吉博[2]，平沢　敬[2,3]，森本拓也[1]，影山　泰[1]，吉田健一[4]，清水　浩[2]，小笠原直毅[5]，尾崎克也[1]，萩原　浩[1]（[1]花王・生科研，[2]阪大院・情報・バイオ情報，[3]東工大院生命理工・生物プロセス，[4]神戸大・農，[5]奈良先端大院・バイオ）

**2F208　アミノ酸ラセミ化能を有する乳酸菌の探索**
◦岡田奈津実，岸野重信，小川　順（京大院農・応用生命）

**2F209　乳酸菌の生育に対する D-アミノ酸の影響**
◦坂口貴之，岡田奈津実，竹内道樹，岸野重信，小川　順（京大院農 応用生命）

**2F210　乳酸菌由来水和酵素を活用したリノール酸含有油脂からの水酸化脂肪酸生産**
◦朴　時範[1]，岸野重信[2]，竹内道樹[2]，米島靖記[3]，小川　順[2]（[1]京大院・農・産業微生物，[2]京大院・農・応用生命，[3]日東薬品工業）

**2F211　*Pediococcus* 属乳酸菌による水酸化脂肪酸生産**
田辺香緒里，岸野重信，◦北村苗穂子，竹内道樹，小川　順（京大院農・応用生命）

**2F212　脂質代謝異常症改善に有用な 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid を生産する微生物の探索**
◦中辻亮太[1]，岸野重信[1]，米島靖記[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]日東薬品工業）

**2F213　ラッカーゼ-メディエーターシステムが触媒する酸化的開裂反応による水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸からのジカルボン酸の生産**
◦竹内道樹[1]，岸野重信[1]，北村苗穂子[1]，日比　慎[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

**2F214　レスベラトロール資化微生物の探索**
◦瀧下友理，熊野匠人，橋本義輝，小林達彦（筑波大院･生命環境）

**2F215　ニトリル前駆体アナログの微生物代謝**
◦石上佳奈，橋本義輝，熊野匠人，小林達彦（筑波大院･生命環境）

**2F216　微生物変換能力を利用した金属廃棄物からの革新的な水素生産技術**
◦若井　暁[1]，伊藤公夫[2]，原山重明[3]（[1]神戸大自然，[2]新日鐵住金，[3]中央大理工）

**2F217　クロストリジウム属由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼを発現させた組換え大腸菌の菌体反応による水素生産と光触媒反応への応用**
◦本田裕樹[1]，萩原英久[1,2]，伊田進太郎[1,2]，石原達己[1,2]（[1]九大 I2CNER，[2]九大院工）

**2F218　メタノール資化性細菌の C1 代謝酵素反応を利用した新規メタノール生成経路の構築**
◦竹谷友之，由里本博也，藤澤健斗，阪井康能（京大院農・応用生命）

**2F219　大腸菌におけるエステル合成経路の代謝工学**
◦田代洋平[1]，DESAI Shuchi H.[2]，渥美正太[2]（[1]理研，[2]カリフォルニア大学デイビス）

**2F220　タモギタケの針葉樹と広葉樹における腐朽特性の差異**
◦大城幸太，田邊俊朗（沖縄高専・専・生資工）

**2F222　液胞膜 $H^+$-ATPase サブユニットへの結合を起点とするポリミキシン B の真菌液胞膜破壊作用**
◦飯田真希[1]，山口良弘[2]，荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大・複合先端研，[3]阪市大・健康研セ）

**2F223　出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸における Kar9 の役割**
◦村田和加恵[1,2]，山口良弘[1,4]，荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院理，[2]米子高専物質，[3]阪市大・健康研セ，[4]阪市大複合先端）

**2F224　非イオン性界面活性剤ジグリセリルラウリルエーテルの真菌液胞膜障害作用**
◦池側智香子[1]，土井剛志[2]，熊澤史貴[2]，荻田　亮[1,3]，藤田憲一[1]，田中俊雄[1]（[1]阪市大院・理，[2]太陽化学，[3]阪市大・健康研セ）

**2F225　$Cu^{2+}$および $Mn^{2+}$が γ-ポリグルタミン酸の発酵生産に与える影響**
冨山敬史[1]，中野太一[1]，西山　聖[2]，堀邊英夫[2]，高橋良輔[3]，北村進一[3]，山口良弘[1,4]，荻田　亮[1,5]，田中俊雄[1]，◦藤田憲一[1]（[1]阪市大院・理，[2]阪市大院・工，[3]阪府大院・生命環境，[4]阪市大・複合先端，[5]阪市大・健康・研セ）

**2F226　*Paenibacillus* 属細菌のもつ機能未同定べん毛モーター固定子の機能解析**
◦今澤　陸[1]，高橋優嘉[2]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大院・生命科学，[2]東洋大・バイオナノ）

**2F227　脂肪酸カリウムによる抗アメーバ効果と形態観察**
◦田中　彩[1]，惠良真理子[1]，川原貴佳[2]，完山陽秀[2]，森田　洋[3]（[1]北九大院，[2]シャボン玉石けん（株），[3]北九大）

**2F228　脂肪酸塩及び脂肪酸によるアカントアメーバの不活化**
◦増田愛実[1]，惠良真理子[1]，川原貴佳[2]，完山陽秀[2]，森田　洋[3]（[1]北九大・院，[2]シャボン玉石けん（株），[3]北九大）

**2F229　大腸菌のバイオフィルム細胞と浮遊細胞の細胞内遊離アミノ酸プロファイル**
◦森永　康[1]，太田瑛美[1]，島崎純次[1]，古川壮一[1]，唐川幸聖[2]，岩畑大悟[2]（[1]日大院 生資科，[2]味の素（株）イノベーション研）

**2F230　トリプトファンの欠乏や過剰は大腸菌のバイオフィルム形成を誘発する**
◦太田瑛美[1]，臼井有美[1]，古川壮一[1]，上野聡子[2]，梶浦貴之[2]，森永　康[1]（[1]日大院・生資科，[2]味の素（株）イノベーション研）

**2F231　高圧二酸化炭素を用いたバイオフィルムの殺菌**
◦長木健太郎，佐々木陽平，古川壮一，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

**2F232　香辛料からのバイオフィルム形成阻害物質の探索**
◦柳原希枝子，古川壮一，松藤　寛，荻原博和，森永　康（日大院・生資科）

## G：動物

**2G001　AgRP 神経の活動が味嗜好性に与える影響の解析**
◦傅　　欧，岩井　優，成川真隆，三坂　巧，中島健一朗（東大農）

**2G002　橋結合腕傍核における味神経の分子マーカーの発現解析**
◦岩井　優，傅　　欧，三坂　巧，中島健一朗（東大院農生科・応生化）

**2G003　好中球からのサイトカイン産生におけるミエロペルオキシダーゼの役割**
◦遠藤大樹，荒谷康昭（横浜市大・院・生命ナノシステム科学）

**2G004　好中球のザイモザン貪食能におけるミエロペルオキシダーゼの役割**
◦藤本健太，荒谷康昭（横浜市大・院・生命ナノシステム科学）

**2G005　胆汁酸受容体 TGR5 は骨格筋を肥大化し，肥満に伴うインスリン抵抗性を改善する**
◦佐々木崇，三田萌子，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農）

**2G006　胆汁酸受容体 TGR5 の柑橘成分ノミリンによる活性化機構解析**
◦三田萌子[1]，佐々木崇[1]，清水　誠[1]，井上　順[1]，石黒正路[2]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農，[2]新潟薬大応生）

**2G007　環境温度条件がマウスにおけるカプサイシン摂取による体温変化に与える影響**
◦森　紀之，浦田朋実，福渡　努（滋賀県大人間文化）

**2G008　食品成分由来 TRPA1 アゴニスト摂取による体温変化の作用機序の検討**
◦浦田朋実，森　紀之，福渡　努（滋賀県大人間文化）

**2G009　ミナミコメツキガニ由来酸化還元酵素の探索**
◦富永　昇，田邊俊朗（沖縄高専・専・生資工）

**2G010　ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について**
◦長田和実[1]，宮園貞治[2]，柏柳　誠[2]（[1]北医療大歯，[2]旭川医大医）

**2G011　PDXD1_Human はヒト Phe decarboxylase の有力な候補である**
◦安藤　秀[1]，鈴木良雄[1]，中村　顕[2]（[1]順大院スポーツ健康科学，[2]筑波大生命環境系）

**2G012　ヒト唾液中には酸性で活性化するプロテアーゼがある**
◦鈴木雄大，鈴木良雄（順大院スポーツ健康科学）

**2G013　アスコルビン酸の LPS 誘発性炎症での救命作用の機構解析**

◦辻野祥伍，　川出野絵，　徳田優希，　小林美里，　松田　幹，村井篤嗣，堀尾文彦　（名古屋大院生命農・応用生命）

**2G014　抗 CD98 依存性細胞融合に対するホスファターゼ阻害剤の効果**

◦鵜飼容子[1]，　青山友果[1]，　伊藤守弘[2]，　禹　済泰[1]，　中川　大[1]，大西素子[1]　([1]中部大学応用生物学研究科，[2]中部大学生命健康科学部)

**2G015　ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索**

◦松島雄一，高橋和也，瀬戸山大樹，康　東天　（九州大医）

**2G016　SAA3 プロモーターを利用した慢性炎症の in vivo imaging，および C/EBP β の役割**

◦佐竹里香[1]，真田洋平[2]，山本岳史[2]，仮屋大志[1]，Fons A.J. van de Loo[3]，加藤範久[2]，矢中規之[2]　([1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏科学，[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)

**2G017　接着斑タンパク質ビンキュリンは細胞外マトリックスの硬さに応じた転写因子 YAP の挙動を制御する**

◦黒田美都[1,3]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]　([1]京大農，[2]京大 iCeMS，[3]日本学術振興会特別研究員 DC)

**2G018　脂肪肝発症に対する細胞老化因子 SMARCD1 の寄与**

◦杉原由佳[1]，　児崎智美[1]，　井上千聡[1]，　鵜殿美弥子[1]，　片倉喜範[2]　([1]九大院・生資環，[2]九大院・農院)

**2G019　ABCA1 による細胞遊走の制御**

◦伊藤志帆[1]，松尾道徳[2]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,3]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京女・食物栄養，[3]京大 iCeMS)

**2G020　カルシウム結合タンパク質 ALG-2 による初期分泌経路調節タンパク質 TFG の細胞内局在制御**

◦京　卓志[1]，桑田啓子[2]，高原照直[1]，牧　正敏[1]，柴田秀樹[1]　([1]名大農，[2]名大 ITbM)

**2G021　細胞外基質の硬さに応じた乳腺上皮細胞の嚢胞・管腔形成に与えるビンキュリンの効果**

◦今井まり子[1]，市川(長里)彩花[1]，植田和光[1,2]，木岡紀幸[1]　([1]京大院農，[2]京大 iCeMS)

**2G022　ビネキシン α とホスファチジン酸の相互作用解析**

◦伊藤有亮[1]，　市川尚文[1]，　木村泰久[1]，　植田和光[1,2]，　木岡紀幸[1]　([1]京都大学，[2]iCEMS)

**2G023　HDL 産生を担う ABCA1 の 1 分子解析**

◦永田　紘[1]，石神正登[2]，笠井倫志[3]，吉村安寿弥[1]，永岩耕太[2]，HEUSER John[1]，楠見明弘[1,3]，植田和光[1,2]　([1]京大 iCeMS，[2]京大院農，[3]京大再生研)

**2G025　軟骨細胞のアポトーシスにおけるカルシウム及びリンの役割**

◦上田博也，河田歩美，中谷祥恵，古旗賢二，和田政裕　（城西大薬）

**2G026　神経幹/前駆細胞におけるプログラニュリン依存的な Col3a1 発現調節**

◦佐藤和典[1]，田中良法[2]，松脇貴志[3]，西原真杉[3]，根建　拓[1]　([1]東洋大院生命，[2]東京都医学総合研究所，[3]東大院農)

**2G027　C2C12 細胞における収縮依存的な IP-10 分泌制御について**

◦石内友里，柴垣拓也，佐藤　整，根建　拓　（東洋大生命）

**2G028　自己抗体反応性ピロール化タンパク質と相互作用する血清タンパク質**

◦廣瀬冴美[1]，　日沖裕介[1]，　中村哲彰[1]，　宮下宙士[1]，　近澤未歩[1]，柴田貴広[1]，町田幸子[2]，内田浩二[1]　([1]名大院生命農，[2]食総研)

**2G030　ネオニコチノイドの活性発現機構に関する研究：ハイブリッド型ニコチン性アセチルコリン受容体のオルトステリック部位との相互作用の解析**

◦伊原　誠，松井孝太郎，坂元美史，山口彰啓，松田一彦　（近畿大農）

**2G031　M23 メタロペプチダーゼフォールドをもつヘパトカイン LECT2 の機能進化の構造基盤**

◦宮川拓也[1]，　鄭　　海[1]，　澤野頼子[1,2]，　山越　智[3]，　田之倉優[1]　([1]東大院・農生科，[2]東京医歯大・教養，[3]国立感染研)

**2G032　ヒト甘味受容体の膜貫通領域における甘味物質相互作用部位の探索**

◦松谷拓弥[1]，中北智哉[1]，広川貴次[2]，三坂　巧[1]　([1]東大農，[2]産総研)

**2G033　ヒト ABCB6 に存在する機能未知膜ドメイン(TMD0)の解析**

◦西澤奈美[1]，木村泰久[2]，大貫　元[2]，木岡紀幸[2]，植田和光[2,3]　([1]京大・農・応用生命，[2]京大院・農・応用生命，[3]京大・iCeMS)

**2G034　クモ糸の氷核活性と構成タンパク質の MALDI・TOFMS 測定**

◦山田寛生，佐竹祐之介，杉山優介，田中眞人，村勢則郎　（東電大理工）

**2G035　原子間力顕微鏡(AFM)観察に向けた ABC タンパク質サンプルの最適化**

◦山原一晃[1]，　木村泰久[2]，　柴田幹大[3]，　内橋貴之[3,4]，　安藤敏夫[3,4]，木岡紀幸[2]，植田和光[2,5]　([1]京大・農・応生，[2]京大院・農・応生，[3]金沢大・理工，[4]金沢大・バイオ AFM，[5]京大・iCeMS)

**2G036　マダニ由来抗菌ペプチド persulcatusin のバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性**

◦三好就英，磯貝恵美子　（東北大農）

**2G037　ヌクレオチド依存的な ATP 感受性カリウムチャネルチャネルの構造変化**

◦木村泰久[1]，　菅野　亮[2]，　松尾道憲[3]，　加藤博章[4]，　光岡　薫[5]，植田和光[1,6]　([1]京大院・農・応用生命，[2]福島医大，[3]京女大・家政，[4]京大院・薬，[5]阪大・超高圧電顕センター，[6]京大・iCeMS)

**2G038　ヒト ABCG4 に存在するコレステロール認識配列の機能解析**

◦見月俊吾[1]，　木村泰久[1]，　木岡紀幸[1]，　松尾道憲[2]，　植田和光[1,3]　([1]京大院・農・応用生命，[2]京女・家政・食物栄養，[3]京大・iCeMS)

**2G039　ドリコールサイクルにおけるヒト RFT1 蛋白質の物理的相互作用に関する解析**

◦高橋哲夫，田中智恵美　（東海大工生命化学）

**2G040　マウスキトトリオシダーゼの大腸菌のペリプラズムでの発現**

◦木村将大，　脇田悟誌，　石川晃太朗，　関根一孝，　吉川　聡，佐藤　章，樫村昭徳，坂口政吉，菅原康里，小山文隆　（工学院大学）

**2G041　マウス IgE 抗体への結合活性が上昇したヒト Fc ε RI α サブユニット改変体の作製**

◦山本真也[2]，　中野信浩[1]，　八代拓也[2]，　笠倉和巳[2]，　奥村　康[1]，西山　真[3]，西山千春[2]　([1]順天堂大院・医，[2]東京理科大・基礎工生物工，[3]東大・生物生産工)

**2G042　樹状細胞の活性化反応における核内受容体型転写因子 NR4a3 の機能解析**

◦八代拓也，長岡雅典，笠倉和巳，西山千春　（東京理科大･基礎工）

**2G043　肝特異的転写因子とリポタンパク質産生能の関係**

◦佐々木玲[1,3]，　木村文子[2]，　三浦瑞穂[2]，　高橋純一郎[2]，　小林正之[3]，畠　恵司[1]　([1]秋田県総食研，[2](株)スカイライト・バイオテック，[3]秋田県大院生資)

**2G044　Stabilon 融合タンパク質を用いた iPS 細胞分化誘導**

◦峰岸紋子[1,2]，　相原絵理[1]，　細野　崇[1,2]，　舛廣善和[2]，　花澤重正[2]，関泰一郎[1,2]　([1]日本大・生資科・生命化，[2]日本大院・生資科・応生科)

**2G045　ヒト cyclinD1，CDK4，TERT の導入によるウシ腸管細胞株の樹立**

◦黒田健吾[1]，清野　透[2]，磯貝恵美子[1]，増田みずき[1]，成田　萌[1]，奥野克哉[1]，小柳友佳子[1]，福田智一[1]　([1]東北大学大学院農学研究科，[2]国立がん研究センター　発がん機構研究グループ)

**2G046　マウス腸管上皮細胞株からの腸管オルガノイド誘導の試み**

◦長尾淳史[1]，青木綾子[2]，清水　誠[3]，岩槻　健[4]，戸塚　護[2]　([1]東大農・生命化学工学，[2]東大院・農生科・応生化，[3]東京農大応生・栄養，[4]東京農大)

**2G047　ROCK 阻害剤は PI3K を介して ES 細胞から神経細胞への分化を促進する**

◦上芝原佑[1]，川口英夫[1]，清水範夫[2]　([1]東洋大院生命科学，[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター)

**2G048　プロトン透過性膜タンパク質を利用した細胞外 pH 低下検出系の開発**

◦三島　誠，三坂　巧　（東大院農生科・応生化）

**2G049　マウス生体位およびオルガノイドにおける回腸および結腸の機能性遺伝子発現の比較**

◦斉藤伸一[1]，尾崎洋輔[2]，濱田晃弘[2]，園山　慶[1]　([1]北大・院・農，[2]北大・院・生命)

**2G050　CHO 細胞において均一な発現レベルを示すプロモーターの検討**

◦西島謙一[1]，　森　孔明[1]，　金岡英徳[1]，　上平正道[2]，　大政健史[3]，飯島信司[1]　([1]名大院工，[2]九大院工，[3]阪大院工)

**2G051　幹細胞の培養因子としてのセリシン加水分解物の有用性**
◦寺田　聡[1]，奥本光軌[1]，松田庄平[1]，神道紀志[1]，佐々木真宏[2]，高橋　潤[2]（[1]福井大工，[2]セーレン）

**2G052　ニワトリシアル酸転移酵素の解析**
◦木溪俊介，金岡英徳，西島謙一，飯島信司（名大院工）

**2G053　線虫 *C.elgans* の幼虫休眠を制御する短鎖ペプチドの探索**
◦嵯峨聖月，岩崎　崇，河野　強（鳥取大院）

**2G054　初代培養細胞を用いた線虫 *C. elegans* インスリン様分子の評価系構築**
◦河野　強，藤森　匠，小松真希，岩崎　崇（鳥取大院・農）

**2G058　ミズクラゲ幼生の変態に対するリソソーム酵素の関与**
◦辻田菜摘[1]，今井つかさ[1]，小山寛喜[1]，辻　敏之[2]，矢中規之[1]，小路　淳[1]，荒川賢治[3]，国吉久人[1]（[1]広島大院・生物圏，[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス，[3]広島大院・先端研）

**2G059　バイオ医薬品生産を可能とする「スーパーミミズ」の開発**
◦町田　悠，菊入祐生，小田陽介，赤澤真一（長岡高専物質工）

## H：植物

**2H001　カンキツ類の傷害応答反応における二次代謝物質の変動解析**
◦伊佐木芳，松川哲也，浅井智紀，梶山慎一郎（近畿大生物理工）

**2H002　カンキツ葉中の一次代謝物質の環境ストレス応答における代謝変動解析**
◦浅井智紀，松川哲也，梶山慎一郎（近畿大院生物理工）

**2H003　チューリッポシド変換酵素による 1-チューリッポシド A の酵素合成法の確立**
◦野村泰治[1]，山口航平[1]，荻田信二郎[1,2]，加藤康夫[1]（[1]富山県大・生工研セ，[2]県立広島大・生命科学）

**2H004　タキサジエンの 10 位を水酸化する新規シトクロム P450 遺伝子の単離と機能解析**
◦小森　彩[1]，竹村秀史[1]，久保　崇[2]，石井　純[4]，町田雅之[3]，近藤昭彦[5]，播本孝史[1]，鈴木宗典[1]（[1]神戸天然物化学，[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合，[3]産総研・生プロ，[4]神戸大・自科・研究環，[5]神戸大院・工・応化）

**2H005　タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）由来フラボノイド *C*-配糖化酵素の機能解析**
◦小柳祐輔[1]，伊藤崇充[1]，山本茉摘[2]，田口悟朗[2]（[1]信州大院・理工学系，[2]信州大・繊維）

**2H006　ウメの品種間代謝物プロファイリング**
◦松川哲也[1]，平山幸千[1]，北村祐人[2]，竹中正好[2]，梶山慎一郎[1]（[1]近畿大生物理工，[2]和歌山県うめ研）

**2H007　レモン花器由来カフェインシンターゼ遺伝子の単離と機能解析**
佐藤裕子[1]，梅澤沙貴[1]，常盤野哲生[1]，鈴木秀幸[2]，吉澤結子[1]，◦水野幸一[1]（[1]秋田県大生物資源，[2]かずさ DNA 研バイオ開発）

**2H008　大根葉に含まれる抽だい抑制化合物の生物有機化学的研究**
◦荻原　毅，天野就基，藤野介延，高橋公咲，松浦英幸（北大農）

**2H009　器官特異性を示すジベレリン受容体制御剤の作用機構解析**
◦都外川識志，宮崎　翔，尹　禎敏，安装卓也，福井康祐，大谷征史，PARK SEUNG-HYUN，中嶋正敏，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

**2H010　ジベレリン代謝制御剤 CBTC の構造展開と活性評価**
◦下尾純平，大谷征史，宮崎　翔，下高原宏明，尹　禎敏，PARK Seung-Hyun，中村英光，中嶋正敏，浅見忠男（東大院・農生科・応生化）

**2H011　オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の作用解析**
◦TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[1]，尹　禎敏[1]，大谷征史[1]，白井郁也[1]，Park Seung-Hyun[1]，林謙一郎[3]，中井雄二[2]，中嶋正敏[1]，浅見忠男[1]（[1]東大院・農生科・応生化，[2]弘前大・食料研，[3]岡山理大・生物化学）

**2H012　新規化合物 FPX によるカルス誘導活性，植物成長促進活性およびブラシノステロイド情報伝達における分子機構**
◦田中翔太[1,2]，藤岡昭三[1]，久城哲夫[2]，長田裕之[1]，篠崎一雄[1]，浅見忠男[3,4]，中野雄司[1,4]（[1]理研・CSRS，[2]明治大院・農芸化学，[3]東大院・農生科，[4]JST CREST）

**2H013　ブラシノライド様化合物の探索と活性評価**
◦杉浦愛理[1]，瀧本征佑[1]，山上あゆみ[2]，中野雄司[2]，中川好秋[1]，宮川　恒[1]（[1]京大院農，[2]理研 CSRS）

**2H014　植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおいて早期に発現変動する遺伝子の解析**
◦神村麻友[1]，小林　毅[2]，蔡　晃植[1]（[1]長浜バイオ大，[2]アグロカネショウ（株））

**2H015　ヒメツリガネゴケ原糸体の分化に関与するジベレリン様成長制御物質の探索**
◦宮崎　翔[1]，Yang Che-Dong[1]，Park Seung-Hyun[1]，川出　洋[2]，林謙一郎[3]，浅見忠男[1]，中嶋正敏[1]（[1]東大院農生科，[2]東京農工大院農，[3]岡山理大理）

**2H016　イネのストリゴラクトン生産におけるリンとサイトカイニンの影響**
◦米山香織，米山弘一，野村崇人（宇都宮大学）

**2H017　A 環が水酸化された CL の MAX1 酵素及び植物による変換産物の解析**
◦森　愛美[1]，米山香織[2]，謝　肖男[2]，野村崇人[2]，米山弘一[2]，秋山康紀[1]（[1]阪府大院・生命環境，[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター）

**2H018　イネ属におけるファイトアレキシン生産能の進化動態**
◦明石翔大[1]，宮本皓司[2]，藤田雅丈[3]，Matthew Shenton[3]，古海弘康[3]，倉田のり[3]，豊増知伸[4]，山根久和[2]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・理工，[3]遺伝研，[4]山形大・農）

**2H019　イネのジテルペン系フィトアレキシン生合成遺伝子クラスターの進化過程**
宮本皓司[1]，藤田雅丈[2]，Shenton Matthew[2]，坂井亜莉里[3]，菅原千都[3]，川出　洋[4]，長谷川守文[5]，三橋　渉[3]，山根久和[1]，倉田のり[2]，岡田憲典[6]，◦豊増知伸[3]（[1]帝京大バイオ，[2]遺伝研，[3]山形大農，[4]農工大農，[5]茨城大農，[6]東大応生セ）

**2H020　ダイズ耐塩性に関わる機能未知タンパク質 GmTDF-5 のユビキチン－プロテアソームによる制御**
◦小川佳祐，木村　愛，佐藤光朗，小島俊雄（茨城大農）

**2H021　ダイズ塩ストレス応答における機能未知遺伝子 Gm-TDF-5 の転写制御機構**
◦須藤弘樹，鈴木美緒，木村　愛，野口和斗，小島俊雄（茨城大農）

**2H022　継続的な End-of-day 光照射はタバコのニコチン含有量に影響を与える**
◦伊藤　隼[1]，雨木若慶[2]，渡邊博之[1]（[1]玉川大院農，[2]東農大農）

**2H023　異なる光質と光強度下で栽培したリーフレタスのメタボローム解析**
◦福山太郎[1]，内田笙太郎[2]，三ツ木智子[2]，草野　都[3]，七夕高也[4]，渡邊博之[1]（[1]玉川大院農，[2]玉川大農，[3]筑波大生，[4]理研 CSRS）

**2H024　イネにおけるストレス誘導的なジャスモン酸生産への malondialdehyde の関与**
◦石田　翼[1]，田代裕也[1]，鶴見明彦[1]，宮本皓司[1]，見目　凌[1]，酒澤智子[1]，湯本絵美[1]，柴田恭美[1]，朝比奈雅志[1]，横田孝雄[1]，飯野盛利[2]，岡田憲典[3]，山根久和[1]（[1]帝京大バイオ，[2]大阪市大院理，[3]東大生物工学セ）

**2H025　アブシジン酸により発現誘導されるシロイヌナズナ MAPKKK の機能解析**
◦松岡大介，南森隆司（神戸大自然科学系先端融合研究環）

**2H026　シロイヌナズナ孔辺細胞におけるジャスモン酸とエチレンのシグナルクロストーク**
◦宗正晋太郎[1]，平尾友加里[2]，田浪かすみ[2]，中村宜督[1]，村田芳行[1]（[1]岡山大院・環境生命，[2]岡山大・農）

**2H027　イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析**
◦片山貴等[1]，村上孝彦[1]，河合美咲[2]，高井亮太[2]，蔡　晃植[2]（[1]長浜バイオ大学院バイオ，[2]長浜バイオ大学バイオ）

**2H028　アレロパシー物質モミラクトンに対するイネの自己耐性機構の解明**
◦富田啓介，藤原　薫，野尻秀昭，岡田憲典（東大・生物工学セ）

**2H029　有機肥料及び化学肥料の施肥による連作土壌の細菌叢変化**
◦宮崎恭之介，アディカリディネッシュ，向　真樹，荒木希和子，

久保　幹（立命大生命）

**2H030　植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布**
◦村上貴彦[1]，片山貴等[1]，高井亮太[2]，蔡　晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大院・バイオ，[2]長浜バイオ大・バイオ）

**2H031　酸化チタン光触媒を用いた *Microcystis aeruginosa* の不活化**
◦金川海人[1,2]，鞆　達也[3]，寺島千晶[2]，勝又健一[2]，池北雅彦[1,2]，藤嶋　昭[2]，中田一弥[1,2]（[1]東理大理工，[2]東理大総研光触媒セ，[3]東理大理）

**2H032　C4 光合成の炭酸固定酵素と脱炭酸酵素の C3 植物への導入による代謝系の改変：水ストレス耐性の向上とその基盤のメタボローム解析**
◦西村隆秀[1]，高木祐子[2]，中山泰宗[3]，傳寶雄大[3]，福崎英一郎[3]，蘆田弘樹[4]，陀安一郎[5]，秋田　求[1,2]，泉井　桂[2]（[1]近畿大院生物理工，[2]近畿大先端技術研，[3]阪大院工，[4]神大院人間環境，[5]京大生態研究セ）

**2H033　マツタケ菌根が生産する抗菌性アルミニウム錯体の生態学**
西野勝俊[1]，城美沙緒[1]，大泉一也[1]，大倉龍起[1]，藤田　徹[2]，山口宗義[3]，山田明義[4]，田中千尋[1]，笹森貴裕[5]，時任宣博[5]，◦平井伸博[1]（[1]京大院農，[2]京都府農水技セ，[3]森林総研，[4]信州大農，[5]京大化研）

**2H034　エンバク根に含まれるアベナシンの他感作用**
◦鶴嶋　鉄[1]，宮川　恒[2]，Osbourn Anne[3]（[1]阪南大，[2]京都大院農，[3]John Innes Centre）

**2H035　β-Tyrosine のイネ品種間における含量の比較と生理活性の探索**
◦網干貴子[1]，松本ふう香[2]，Yan Jian[3]，寺石政義[2]，奥本　裕[2]，Jander Georg[4]，森　直樹[2]（[1]山形大農，[2]京大院農，[3]華南農業大，[4]ボイス・トンプソン研究所）

**2H036　生物の代謝産物としてキュウリで初めて見つかったリボフラビン(ビタミン B2)誘導体とその分布**
◦佐藤純一[1]，越野広雪[2]，関野滉太[1]，金子元優[1]，伊藤晋作[1]，勝田　亮[3]，武田晃治[4]，吉村悦郎[5]，新町文絵[6]，川崎信治[1]，額田恭郎[3]，新村洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ，[2]理研 CSRS，[3]東農大応生科・醸造，[4]東農大・教職，[5]東大院農生科・応生科，[6]日大短大・生物資源）

**2H037　低分子量ダイズ PDI ファミリー PDIL6 の同定及びその酵素学的性質の解析**
◦奥田　綾，松崎元紀，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

**2H038　ダイズにおける Ero1-PDI 経路による種子貯蔵タンパク質のジスルフィド結合形成メカニズム**
◦松崎元紀，奥田　綾，河野慧一，土雄一朗，廣瀬明歩，成尾由理香，小石原克典，三田竜太，増田太郎，裏出令子（京大院農・農学）

**2H039　ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究 1：新規不可逆阻害剤の合成展開**
◦明石拓也[1]，山崎智穂子[2]，宇都宮麻衣[2]，伊原　誠[2]，松田一彦[2]，平竹　潤[1]（[1]京大化研，[2]近畿大院・農・応生化）

**2H040　ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究(2)：不可逆阻害剤存在の活性評価**
◦山崎智穂子[1]，宇都宮麻衣[1]，伊原　誠[1]，明石拓也[2]，平竹　潤[2]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農，[2]京大化研）

**2H041　ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究(3)：不可逆阻害剤存在下での結晶化**
◦宇都宮麻衣[1]，山崎智穂子[1]，伊原　誠[1]，明石拓也[2]，平竹　潤[2]，松田一彦[1]（[1]近畿大院農，[2]京大化研）

**2H042　乾ノリ由来色素体リボソームのプロテオーム解析**
◦山口健一[1,2]，山脇萌美[2]，桑野和可[1,2]，小田達也[1,2]（[1]長大水，[2]長大院水環）

**2H043　ステロイドグリコアルカロイド生合成遺伝子 SGA3 をターゲットとしたゲノム編集トマトの解析**
◦秋山遼太[1]，中安　大[1]，李　栄宰[1]，刑部敬史[2]，刑部祐里子[2]，梅基直行[3]，村中俊哉[4]，斉藤和希[3,5]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院農，[2]徳島大，[3]理研，[4]大阪大院工，[5]千葉大院薬）

**2H044　次世代シーケンス解析に向けた高純度のイネ葉緑体 DNA 精製法**
◦高松　壮[1]，大西孝幸[2]，猪俣拓也[1]，及川和聡[1]，木下　哲[2]，三ツ井敏明[1]（[1]新大自然研，[2]横市大木原研）

**2H045　シロイヌナズナ $F_1$雑種の発生過程で見られる種々の雑種強勢現象の解析**
◦山口貴史[1]，中川原真澄[2]，円谷徹之[3]，高山誠司[4]，柴　博史[2]（[1]筑波大院生命環境科学研究科，[2]筑波大・生命環境系，[3]阪大院工学研究科・生命先端工学，[4]奈良先端大・バイオサイエンス）

**2H046　様々な植物種における生体内ポリアミン分析**
◦高橋芳弘[1]，ベルベリッヒトーマス[2]（[1]九産大，[2]BiK-F）

**2H047　ナンノクロロプシス由来 β-ケトアシル ACP シンターゼの一種は中鎖脂肪酸の生産に関与する**
◦杉原慎二，尾崎達郎，遠藤寛子，斎藤　猛，東條卓人，瀧村　靖，萩原　浩（花王・生科研）

**2H048　ココヤシの中鎖脂肪酸蓄積関連遺伝子の探索**
◦東條卓人，杉原慎二，漁慎太郎，瀧村　靖，萩原　浩（花王・生科研）

**2H049　イネの転写因子 DPF による根でのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子及び共発現遺伝子の転写制御機構の解析**
◦山村千紘[1,2]，水谷恵美[1,2]，田中惇訓[1,2]，福島説子[1]，鎌倉高志[2]，岡田憲典[3]，山根久和[4]，高辻博志[1]，森　昌樹[1]（[1]生物研，[2]東理大・理工，[3]東大・生物工学セ，[4]帝京大・バイオ）

**2H050　イネの bHLH 型転写因子 DPF によるファイトアレキシン生合成遺伝子 *OsCPS2* の発現誘導機構の解析**
◦田渕雄夢[1]，堤　涼[1]，根本圭一郎[2]，澤崎達也[2]，森　昌樹[3]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]愛媛大・工，[3]農業生物資源研）

**2H051　高等植物スプライシングにおけるエキソンスキップと短鎖 RNA の関係性**
◦中川原咲恵，児玉浩明（千葉大学）

**2H052　アラビドプシスにおいてスプライシング効率を上げるタバコ由来のイントロン配列**
◦太田小百合[1]，中川原咲恵[2]，児玉浩明[2]（[1]千葉大園芸，[2]千葉大融合）

**2H053　植物色素ベタレインによる活性窒素依存性脂質過酸化反応及びタンパク質ニトロ化反応の抑制**
◦林　寛容[1]，布施　茜[2]，羽馬大輔[1]，橋本　誠[3]，橋床泰之[3]，崎浜靖子[3]（[1]北大院農，[2]北大農，[3]北大院農学研究院）

**2H054　ナカジマナ(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*)から単離した ACE 阻害物質の同定**
◦根古谷竜[1]，加藤美佳[2]，下村講一郎[1,3]（[1]東洋大院生命，[2]三栄源エフ・エフ・アイ株式会社　香料基礎研究室，[3]東洋大食環境）

**2H055　生分解性プラスチック分解酵素と植物病原菌を利用した除草効果**
◦植田浩一[1]，黒瀬大介[2]，釘宮聡一[1]，渡部貴志[1]，光原一朗[3]，田端　純[1]，小板橋基夫[1]，北本宏子[1]（[1]農環研，[2]CABI，[3]生物研）

**2H056　周期的な暗期パルスを用いたレタスの概日時計制御環境下における生育評価**
◦東　孝信[1]，竹岡真梨[2]，青木　考[1]，福田弘和[3]（[1]阪府大院生命，[2]阪府大工，[3]阪府大院工）

**2H057　クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)に対するアルギン酸オリゴマーの銅イオンストレス軽減効果**
◦上野幹憲，山口健一，小田達也（長崎大院水・環）

## I：糖鎖生化学・糖鎖工学

**2I001　カイコ絹糸腺で発現させたインターフェロン γ の *N*-型糖鎖構造解析**
◦杉村理恵[1]，立松謙一郎[2]，瀬筒秀樹[2]，大橋貴生[1]，三崎　亮[1]，藤山和仁[1]（[1]大阪大，[2]農業生物資源研）

**2I002　アライグマ(食肉目イヌ亜目)とチーター（食肉目ネコ亜目）のミルクの糖質分析**
◦大島岳晴[1]，山口英美[1]，ホワイトハウスキャサリン[2]，オフテダルオラフ[3]，福田健二[1]（[1]帯広畜産大，[2]ノッチンガムトレント大，[3]スミソニアン環境研）

**2I003　鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析**
◦武田尚子[1]，上村明寿美[2]，井之上侑雅[2]，鎌田　和[2]，杉田大輝[2]，田村純一[2]（[1]鳥取大・産学連携，[2]鳥取大・地域環境）

**2I004　異なる環境に生息する魚類に含まれるコンドロイチン硫酸**

の分析
◦田村純一[1]，上田健人[1]，武田尚子[2]　([1]鳥取大･地域環境，[2]鳥取大･産学連携)

**2I005　ER alpha-1,2 mannosidase I の一塩基多型による特性への影響**
◦相川順一[1]，伊藤幸成[1,2]　([1]理研，[2]ERATO-JST)

**2I006　非天然型シアニジン配糖体の合成研究**
◦吉村弥生，松尾一郎　(群馬大理工)

**2I007　昆虫におけるシアル酸単糖の生合成と分解酵素**
◦北島　健[1,2]，熊澤慎介[1,2]，呉　　迪[1,2]，濱口香代[1,2]，藤田明子[1]，郷　慎司[1,2]，水口智江可[2]，池田素子[2]，小林迪弘[2]，佐藤ちひろ[1,2]　([1]名大・生物機能セ，[2]名大・生命農学)

**2I008　マンノース-6-リン酸を有する糖ペプチドの合成**
◦山本直幸，朝比奈雄也，北條裕信　(阪大蛋白研)

**2I009　植物細胞壁ペクチンの生合成に必要な UDP-アピオースの単離法の開発**
◦松田諒子，鈴木真未，石水　毅　(立命館大生命)

**2I010　植物ゴルジ体膜局在ペクチン合成酵素複合体の解析**
◦高田和拓，加藤大詞，平岡誉登，石水　毅　(立命館大生命)

**2I011　植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の生化学的解析と超活性化**
◦松本直樹，上原洋平，田村峻佑，高田和拓，柳生健太，石水　毅　(立命大生命)

**2I012　分枝鎖を有する β-グルカンオリゴ糖の合成と endo-β-1,3-グルカナーゼの加水分解特異性解析**
◦宮川　淳[1]，三木彩子[2]，織田昌幸[2]，山村初雄[1]　([1]名工大院工，[2]京府大院生命環境科学)

**2I013　シアリルリン酸ドナーを用いたシアリルガラクトース誘導体の合成とメタセシス反応による蛍光基の導入**
◦栗本健太，山村初雄，宮川　淳　(名工大院工)

**2I014　植物 N 型糖鎖分解に関与するシロイヌナズナ液胞 α-マンノシダーゼの同定**
◦川原悠太郎，石水　毅　(立命大生命)

**2I015　化学修飾した糖鎖を基質とした Endo-M の糖転移反応**
◦石井希実[1]，　須永千恵[1]，　吉村弥生[1]，　熊田純一[2]，　松崎祐二[2]，松尾一郎[1]　([1]群馬大院理工，[2]東京化成工業株式会社)

**2I016　ENGase 活性検出に向けた糖鎖分子プローブの合成**
◦須永千恵，石井希実，吉村弥生，松尾一郎　(群馬大院・理工)

## J：生物化学工学

**2J001　TetR 型転写因子のリガンド結合特異性改変のための新規なスクリーニング手法の開発**
◦室井太木，勝山陽平，大西康夫　(東大院・農生科・応用工)

**2J002　耐熱性 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた高温同時糖化発酵によるセルロース系バイオマスからの乳酸生産**
◦高野真希[1]，山下聖樹[2]，星野一宏[1]　([1]富大院理工，[2]富大工)

**2J003　有用酵素の基質特異性改変とバイオイソプレン生産への応用**
◦折下涼子，白井智量，近藤昭彦　(理化学研究所)

**2J004　耐熱性酵素を用いたキチンからの有用物質生産**
◦木村圭佑，岡野憲司，本田孝祐　(阪大工)

**2J005　アルギニン誘導体が示す歯周病原因子の抑制効果**
◦恒原由佳[1]，有馬二朗[2]　([1]鳥大院農，[2]鳥大農)

**2J006　封入体を形成する組換え酵素のアミノ酸置換による可溶性生産**
◦松井大亮[1,2]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工・生工研セ，[2]JST ERATO)

**2J007　INTMSAlign を用いた組換えタンパク質を可溶化させるホットスポット同定法の開発**
◦中野祥吾[1,2,3]，松井大亮[2,3]，モハマドダダシプール[2,3]，三好規之[1]，伊藤創平[1]，浅野泰久[2,3]　([1]静岡県大･食栄，[2]富山県大･生工研セ，[3]JST・ERATO)

**2J008　アミノ酸置換によるコメ由来ペプチドの多彩な生理活性の増強の試み**
◦齊藤健吾，　金子陽徳，　生江俊樹，　豊田　竜，　落合秋人，田中孝明，谷口正之　(新潟大自然研)

**2J009　コメ糠タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製とその生理活性の解明**
◦谷口正之，亀田光裕，落合秋人，田中孝明　(新潟大自然研)

**2J010　緑膿菌 OprM LOOP2 に対するモノクローナル抗体遺伝子の塩基配列の取得と単鎖抗体遺伝子の構築**
◦矢野遥香，良原栄策，小島直也，笹川　昇　(東海大学)

**2J011　酵素合成したシステインエチルエステルとグルタミン酸ジエチルエステルの共重合ペプチドの脱エステル**
◦奈良井朝子，澁谷明大，嘉戸俊輔，中山　勉　(日獣大　応生科)

**2J012　近赤外発光ホタルルシフェリンアナログの水溶性向上への挑戦**
◦盛満　玲[1]，　木山正啓[1]，　齊藤亮平[1]，　北田昇雄[1]，　大塚智史[1]，東　翔子[1]，岩野　智[2]，丹羽治樹[1]，平野　誉[1]，牧昌次郎[1]　([1]電気通信大学，[2]理研)

**2J013　高速処理精製可能な抗体医薬品精製用分離剤**
◦野崎晋也[1,4]，與田祥也[1,4]，徳永和彦[1,4]，安田則幸[1,4]，福田義人[1,4]，小原祥平[1,4]，　砥綿正人[1,4]，　伊藤　望[1,4]，　渡邉理紗[2,4]，　宮地正悟[2,4]，足立　正[3]　([1]三菱化学・開発研，[2]三菱化学・経営戦略部門，[3]三菱化学・イオン交換樹脂事業部，[4]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合)

## K：新技術

**2K001　An ultrasensitive near-infrared quinternary alloyed quantum dot-molecular beacon nanodiagnostic bioprobe for influenza virus RNA**
◦Oluwasesan Adegoke[1]，　Tatsuya Kato[1,2]，　Enoch Y. Park[1,2]　([1]Shizuoka Univ.，[2]Shizuoka Univ. Department of Applied Biological Chemistry)

**2K002　ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を利用したレプチン・GLP-1 の高感度・迅速検出**
◦竹村謙信[1]，　オルワセサンアデゴケ[2]，　加藤竜也[1,2]，　池本圭輔[3]，稲垣貴之[3]，朴　龍洙[1,2]　([1]静大農 応生化，[2]静大グリーン科技研，[3]株式会社コスミックコーポレーション)

**2K003　熱測定法による嫌気性菌の増殖過程の測定**
◦青木奈緒子[1]，　三宅英雄[2]，　前田有希子[1]，　石川　卓[2]，　田中晶善[2]　([1]三重大生資，[2]三重大院生資)

**2K004　酵素/蛋白質の進化工学的改良における宿主の影響**
◦河原崎泰昌[1,2]，坂上稔典[1]，伊藤圭祐[1,2]　([1]静県大院薬食生命総合学府，[2]静県大食)

**2K005　MMLV 逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系の構築とマイクロアレイへの応用**
◦片野裕太[1]，　久好哲郎[2]，　久世郁美[1]，　岡野啓志[2]，　伊東昌章[3]，西垣功一[4,5]，滝田禎亮[1,2]，保川　清[1,2]　([1]京大農，[2]京大院農，[3]沖縄高専，[4]埼玉大，[5]産総研)

**2K006　Plasmonic signal detection of H1N1 virus using immunoassay with magnetic nano particle**
◦Dong-kyu LEE[1,2]，Tatsuya Kato[1,2]，Enoch Park[1,2]　([1]Shizuoka Univ.，[2]Green&Science Technology)

**2K007　Detection of influenza virus using bio-mimic enzymatic reaction of gold nanoparticles**
◦SYED RAHIN AHMED[1]，Enoch Y Park[1,2]　([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University，[2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

**2K008　植物の概日時計評価におけるハイパースペクトルデータの有用性**
◦長野将吾[1]，谷垣悠介[1]，福田弘和[1,2]　([1]大阪府・大院・工，[2]JST さきがけ)

**2K009　Qualitative analysis of *Botryococcus braunii* lipids by $^{1}$H-Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy ($^{1}$H-DOSY)**
◦Yuu Minamida，Suguru Yanagiya，Hiroshi Matsuura　(National Institute of Technology, Asahikawa College)

**2K010　フラグメント集積法による代謝混合物の構造生成と計算化学による推定構造の総合評価**
◦伊藤研悟[1,2]，小松功典[1,2]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]　([1]横市院，[2]理研 CSRS，[3]名大院)

**2K011　Utility of Energy-Resolved Tandem Mass Spectrometry in Structural Characterization of Small Molecules**

◦Takemichi NAKAMURA[1], Futoshi SATO[2] ([1]RIKEN CSRS, [2]Nihon Waters K.K.)

**2K012　多次元 HPLC 手法を用いた脂質化合物の分子種分析**

◦高橋良輔，小谷口美也子，中屋　慎，北村進一 （大阪府大院 応用生命）

**2K013　超臨界流体クロマトグラフィーと液体クロマトグラフィーの融合技術を用いたステロイド一斉分析法の構築**

◦田口歌織[1]，福崎英一郎[1]，馬場健史[2] ([1]阪大院・工，[2]九大・生体防御医学研)

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

## A：環境科学・バイオマス利用

**3A001　バイオオーグメンテーション法が塩素化エチレン類汚染土壌の浄化現場の生態系へ与える影響評価手法の開発**
◦綿引沙織[1,2]，木村信忠[1,2]，山副敦司[3]，三浦隆匡[3]，野田尚宏[4]，松倉智子[4]，高畑　陽[5]，野尻秀昭[6]，福田雅夫[7]（[1]産総研･生プロ，[2]筑波大院・生，[3]NITE，[4]産総研・バイオメディカル，[5]大成建設(株)，[6]東大・生セ，[7]長岡技大・生物）

**3A002　自然止水域における対流型水処理装置の浄化効果**
◦脇　孝典，アディカリディネシュ，向　真樹，荒木希和子，久保　幹（立命大生命）

**3A003　Effect of circulation-based water purification system on environmental bacteria in a pond sediment**
◦IMA YUDHA PERWIRA，DINESH ADHIKARI，MASAKI MUKAI，ARAKI KIWAKO S.，MOTOKI KUBO（Ritsumeikan Univ.）

**3A004　*Rhodococcus jostii* RHA1 におけるジクロロエチレンの分解**
◦木内勇貴[1]，米塚健太[1]，荒木直人[1]，千野加奈子[1]，笠井大輔[1]，上村直史[1]，山副敦司[2]，下平　潤[2]，藤田信之[2]，高畑　陽[3]，政井英司[1]，福田雅夫[1]（[1]長岡技科大院・生物，[2]NITE(NBRC)，[3]大成建設(株)）

**3A005　EMS 変異による油脂高分解活性菌株の取得**
◦稲垣泰治[1]，倉根隆一郎[1]，稲川顕嗣[2]，平野達也[2]（[1]中部大学，[2]シーシーアイ株式会社）

**3A006　極低濃度の VOC 含有空気浄化のための光触媒反応器の開発**
◦田之上祐太[1]，古藤俊昭[2]，伴野　豊[1]，白石文秀[1]（[1]九大院農，[2]九大農）

**3A007　挿入型 2 subunits メタ開裂酵素の発現機構の解明**
◦山本寛樹，岩田健一（芝工大院シ）

**3A008　消石灰散布による土壌微生物への殺菌効果と影響評価**
◦南　純一，中谷　剛，高橋和樹，坂上吉一，森　美穂（近大農）

**3A009　好気条件における黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* RIB2604 株によるセレンオキサニオン変換とセレン回収**
◦阪口利文[1,2]，永岡美優[2]，有馬寿英[2]，木村博美[2]（[1]県立広大生命科，[2]県立広大環境科）

**3A010　炭素繊維強化プラスチック分解菌の探索**
◦渡邉みちる[1]，河合盛進[2]，山田美和[1]，下飯　仁[1]（[1]岩手大農，[2]トヨタ紡織 基礎研）

**3A011　有機塩素系農薬クロロタロニルの汚染土壌微生物による分解**
◦松原光悦，八田　貴（岡山理大工）

**3A012　トリクロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* の 後期 3 代謝遺伝子の役割**
◦畢　　貞，八田　貴（岡山理大工）

**3A013　生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と解析**
◦佐藤俊貴[1]，落合　剛[2,3]，森戸祐幸[4]，藤嶋　昭[2,3]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大　応生，[2]東理大　総研，[3]神奈川技術アカデミー，[4]ユーヴィックス株式会社）

**3A014　微生物を利用した汚泥減容化に関する研究**
◦杉村寿将，佐藤　駿，倉根隆一郎（中部大応生）

**3A015　放射能汚染土壌の光合成細菌による除染と食用基準内の野菜栽培**
◦佐々木慧，中村　薫，岡川眞和，竹野健次，新川英典，佐々木健（広島国際学院大学）

**3A016　一槽式アナモックスリアクターのパイロシーケンス解析**
◦石川　秀，多田羅昌浩，上野嘉之（鹿島技術研究所）

**3A017　炭素鋼の微生物腐食と炭素鋼表面に形成されたバイオフィルムの関係**
◦平野伸一，長岡　亨，松本伯夫（電中研）

**3A018　放射能汚染牛および下水汚泥の好気性高温発酵処理堆肥の特徴**
◦吉井貴宏[1]，矢野紘子[1]，古井義博[1]，杉原孝文[1]，森屋利幸[1]，志村有通[1]，吉川泰弘[2]，大島泰郎[1]（[1]共和化工・環境微生物研，[2]千葉科学大学・危機管理）

**3A019　果実廃棄物のコンポスト化状況の解析**
◦早瀬伸樹[1]，安野秀瑛[1]，中川克彦[1]，豊田英昭[2]（[1]新居浜高専，[2]関西化工(株)）

**3A020　Enzymatic investigation in autothermal thermophilic aerobic treatment process of human excreta**
◦Huijun Cheng，Yuki Okugawa，Yukihiro Tashiro，Kenji Sakai（Fac. Agric., Kyushu Univ.）

**3A021　地下環境褐炭から取得した微生物群による嫌気条件下での腐植物質分解。**
◦上野晃生[1]，清水　了[1]，玉村修司[1]，荒牧憲隆[1]，山本愼一[2]，重吉八郎[2]，長沼　毅[3]，金子勝比古[1]（[1]幌延地圏環境研究所，[2]三菱マテリアル株式会社，[3]広島大院・生物圏科学）

**3A022　アクチノイドの回収を目的とした新規フルオラス金属抽出剤の設計と合成**
◦中川洸希，稲津敏行（東海大学）

**3A023　重希土元素による巨大菌生育速度の増加とポリ-γ-グルタミン酸の増産**
◦白米優一[1]，松村歩梨[2]，柴田由香[2]，尾池翔太[1]，芦内　誠[1,2]（[1]高知大院，[2]高知大）

**3A024　大気中窒素ガスを N 源とした枯草菌―紅色非硫黄細菌共生系の増殖評価**
◦前田　勇，久下沼匠（宇都宮大院農）

**3A025　CaCCO プロセス由来固形残渣からのアルカリ可溶性リグニン抽出条件最適化**
◦山岸賢治[1]，趙　　鋭[1]，池　正和[1]，関　　笛[1]，我有　満[2]，徳安　健[1]（[1]農研機構食品総合研究所，[2]農研機構九州沖縄農業研究センター）

**3A026　緑藻 *Actinastrum* sp. ならびに *Chlorella* sp. における脂肪酸合成能の評価**
◦井上麻衣，大浦　健（名城大院農）

**3A027　Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate)(PHBH)を分解するメタン発酵プロセスの構築と微生物群集構造**
◦重松　亨[1]，帆苅萌子[1]，千葉有紀[1]，本間辰也[1]，林真由美[1]，井口晃徳[1]，坪田　潤[2]，菅谷剛彦[3]，松本圭司[4]（[1]新潟 薬大・応生科，[2]大阪ガス・エネルギー技術研，[3]カネカ・GP 事業開発部，[4]カネカ・R&D 企画部）

**3A028　エタノール生産コスト削減のための耐熱性微生物による高温発酵技術**
◦村田正之，高坂智之，山田　守（山口大・中高温微生物セ）

**3A029　新規熱溶菌糸状菌の糸状菌バイオマスへの変換率とグルコース量の比較**
◦森　慶太，荒木希和子，向　真樹，アディカリディネッシュ，久保　幹（立命館大学）

**3A030　アルコールの添加が希硫酸前処理の効率に与える影響の解析**
◦寺村　浩[1]，佐々木建吾[2]，白井智量[3]，川口秀夫[1]，荻野千秋[1]，菊地　淳[3]，佐塚隆志[4]，近藤昭彦[1]（[1]神大工，[2]神大院自然科学，[3]理研・CSRS，[4]名大農）

**3A031　膜分離プロセスによる稲わら水熱処理液からのリグニン回収**
◦佐々木建吾[1]，白井智量[2]，柘植陽太[1]，近藤昭彦[3]（[1]神戸大・自然科学，[2]理研・バイオマス，[3]神戸大院・工）

**3A032　木質中のリグニン糖複合体とその酵素分解反応の解析**
◦西村裕志[1]，Baath Jenny Arnling[2]，永田一真[3]，Klaubauf Sylvia[2]，Olsson Lisbeth[2]，Nylander Filip[2]，Westman Gunnar[2]，片平正人[3]，渡辺隆司[1]（[1]京都大生存圏研，[2]チェルマース工科大学，[3]京都大エネルギー理工学研）

**3A033　生乳由来プロピオン酸菌と乳酸菌の混合培養による産業廃棄物からの有機酸生産**
◦高屋朋彰[1]，布川玲奈[1]，松井　徹[2]，上田　誠[1]（[1]小山高専･物質，[2]東京工科大応生）

**3A034　低分子リグニン類から生産されるベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生成機構の検討**
◦坂野優稀[1]，松藤　寛[2]，砂入道夫[1]，岩淵範之[1]（[1]日大・生資科・応生科，[2]日大・生資科・食生科）

**3A035　好熱性菌由来ヒスチジンアンモニアリアーゼの性質**
◦森芳邦彦，駒　大輔，山中勇人，大本貴士（阪市工研）

**3A036　Mechanistic analysis of poly(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) degradation by soil bacterium depolymerase**

◦Camila UTSUNOMIA[1], Jian SUN[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Toshihiko OOI[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

**3A037 粗粉砕草本系バイオマス含有リグニン分解酵素産生微生物の菌学的性質**
◦湯下佳和，田中菜月，伊藤 龍，伊藤雅貴，倉根隆一郎 （中部大・応生）

**3A038 草食性甲殻類からのバイオマス分解細菌群の単離**
◦裏 佳織[1]，柳井清治[2]，三宅克英[1] ([1]石川県大資源研，[2]石川県大環境）

**3A039 インドネシアより単離されたキシロース資化性油脂生産新種酵母**
◦小林隆一[1]，Atit Kanti[2]，川崎浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構・NBRC，[2]LIPI, Indonesia）

**3A040 偏性嫌気性細菌 *Megasphaera elsdenii* の水素発酵能の評価と応用技術の開発**
◦小林邑弥，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治 （東農大）

**3A041 酵母 *Issatchenkia orientalis* における耐酸性・耐塩性遺伝子の単離と解析**
◦松鹿昭則[1]， 根宜香奈子[1]， 鈴木俊宏[1]， 五島徹也[2]， 星野 保[1] ([1]産総研・機能化学，[2]酒総研）

**3A042 Trichoderma 属菌株の菌体外酵素生産の多様性**
◦デオリベイラポルシウンクラジュリアーノ，島村麻美子，稲葉重樹，鶴海泰久，紙野 圭 （(独)製品評価技術基盤機構）

**3A043 沖縄糖蜜を用いた発酵水素生産とその菌叢解析**
◦佐久本太一[1]，田邉俊朗[1]，谷生重晴[2] ([1]沖縄高専，[2]水素バイオ株式会社）

**3A044 大腸菌の 1,3-ブタンジオール高生産に向けた代謝改変**
◦片岡尚也[1]， VANGNAI Alisa S.[2]， 薬師寿治[1]， 加藤純一[3]，和田 大[4]，横田 篤[4]，松下一信[1] ([1]山口大農，[2]チュラロンコン大，[3]広島大院先端物質，[4]北大院農）

**3A045 サイズの異なる銀ナノ粒子の *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する毒性の違い**
◦川瀬俊悟[1]， 清水佑一[2]， 薗田 諒[2]， 柏田祥策[1,2,3]， 長坂征治[1,2,3] ([1]東洋大院生命科学，[2]東洋大生命科学，[3]東洋大学生命環境科学研究センター）

**3A046 単一細胞元素分析による微細藻類と金属ナノ粒子の相互作用解析**
◦三橋弘明[1]， 宮下振一[2]， 藤井紳一郎[2]， 安保 充[1]， 高津章子[2]，日置昭治[2]，稲垣和三[2] ([1]明大農，[2]産総研）

## B：有機化学，天然物化学

**3B001 深海底泥からの放線菌の分離，分類と代謝物の多様性**
◦波多野和樹[1]， 高橋裕子[1]， 澤 竜一[1]， 五十嵐雅之[1]， 加藤千明[2] ([1]微化研，[2]JAMSTEC）

**3B002 MALDI-TOF MS を用いた放線菌の識別**
◦高橋裕子[1]，波多野和樹[1]，五十嵐雅之[1]，澤 竜一[1]，梅沢洋二[1]，加藤千明[2] ([1]微化研，[2]JAMSTEC）

**3B003 深海底泥由来放線菌二次代謝産物からの新規シデロフォアの発見**
◦竹花康弘[1]，澤 竜一[1]，五十嵐雅之[1]，波多野和樹[1]，梅北まや[1]，梅沢洋二[1]，加藤千明[2] ([1]微化研，[2]JAMSTEC）

**3B004 *Phytophthora infestans* 遊走子嚢の低温における直接発芽促進物質の探索**
◦奥野照基，甲斐建次，谷 修治，炭谷順一，川口剛司 （阪府大院）

**3B005 卵菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質の同定と作用解析**
◦西尾尚堯，甲斐建次，谷 修治，炭谷順一，川口剛司 （阪府大院）

**3B006 枯れ枝より分離した糸状菌 *Fusarium solani* T-13 株の生産する物質について**
◦塩野義人[1]， Nanang Rudianto Ariefta[1]， Ruengrit Sappapan[1]，村山哲也[1]，小関卓也[1]，川村哲晃[2]，上杉祥太[3]，木村賢一[2,3] ([1]山形大・農，[2]岩手大・農，[3]岩手大院・連合農）

**3B007 *Streptomyces davawensis* JCM 4913 において新規亜硝酸生合成経路を用いて生合成される二次代謝産物の同定**
◦萩原亮太，勝山陽平，菅井佳宣，尾仲宏康，大西康夫 （東大院・農生科・応生工）

**3B008 微生物代謝産物からのマラリア原虫解毒酵素 *Pf* GlOI 阻害物質の探索**
◦浮山 颯[1]， 岩月正人[1,2]， 野中健一[1,2]， 松本厚子[1,2]， 大村 智[2]，塩見和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研）

**3B009 青枯病菌のクオラムセンシングシグナル分子は(*R*)-methyl 3-hydroxymyristate である**
◦甲斐建次[1]， 大西秀幸[1]， 嶋谷美香[1]， 石川詩歩[2]， 森 友花[2]，木場章範[2]，大西浩平[3]，曳地康史[2] ([1]阪府大院・生命環境，[2]高知大・農，[3]高知大・総研セ）

**3B010 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ特異的システイン合成酵素阻害化合物の探索**
◦森美穂子[1,2]， 深澤 航[3]， 伯耆原愛[3]， 柘植聡志[1]， 野中健一[1,2]，松本厚子[1,2]，大村 智[2]，野崎智義[4]，塩見和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]北里大理，[4]感染研）

**3B011 理論計算を併用した ECD による天然物の絶対配置決定**
◦橋本 勝[1]，伊藤 厚[2]，荒山美紀[1]，本村優奈[1]，根平達夫[3] ([1]弘大農生，[2]岩手連農，[3]広島大総合科学）

**3B012 アコヤガイ貝殻稜柱層の炭酸カルシウム結晶形成を制御する有機基質に関する研究**
◦近都浩之[1]， 奥村大河[2]， 根岸瑠美[3]， 小暮敏博[2]， 作田庄平[1]，鈴木道生[1] ([1]東大院・農生科・応生科，[2]東大院・理学科・地惑科，[3]東大・分生研）

**3B013 マダラサソリ毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定**
北中淳史，焼尾真緒，◦宮下正弘，中川好秋，宮川 恒 （京大院農）

**3B014 ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる殺虫性ペプチド LaIT3 の単離・同定**
◦十一浩典，宮下正弘，中川好秋，宮川 恒 （京大院農）

**3B015 ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* におけるホタル毒の蓄積**
◦吉田達哉[1]， 城野哲平[2,4]， 竹内寛彦[3]， 吉永直子[1]， 小野 肇[1]，丁 利[2]，唐 並忠[2]，森 哲[4]，森 直樹[1] ([1]京大農，[2]CIB，[3]京大フィールド研，[4]京大理）

**3B016 アオイラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性化物質の探索**
◦青山裕飛，平川祥成，野呂真奈美，勝崎裕隆 （三重大院・生資）

**3B017 Screening of bioactive compounds in pufferfish and marine invertebrates from Solomon Islands**
◦Clyde Gorapava PUILINGI， Yuta KUDO， Yuko CHO，Keiichi KONOKI，Mari YOTSU-YAMASHITA （Tohoku Univ.）

**3B018 高純度ラノステロールの生産**
◦石野暢好，松本恵実，中塚宏志，中塚進一 （長良サイエンス株式会社）

**3B019 ワイン成分のアンチエイジング効果とワイン圧搾残渣の有効利用**
◦沢辺昭義[1]， 川村晴希[1]， 吉田裕一[1]， 竹田竜嗣[1]， 飯田 彰[1]，濱原典正[2]，米虫節夫[3]，川上浩平[4]，頓宮美樹[4]，山田高也[4] ([1]近畿大農，[2]神戸みのりの公社，[3]大阪市大院工，[4]島根大総科研支援セ）

**3B020 イネフィトアレキシン モミラクトン A のイネいもち病菌による代謝産物の同定**
◦武山恵典， 平石由貴， 遠藤 尚， 今井卓也， 戸嶋浩明，長谷川守文 （茨大農）

**3B021 ブドウ科植物における ε-viniferin の鏡像異性体の混在**
◦山本諭志，松本恵実，中塚進一 （長良サイエンス株式会社）

**3B022 トチュウに含まれる癌幹細胞特異的阻害剤 Eucommicin A の同定**
◦藤原綾香[1]，西真由子[2]，吉田茂男[3]，長谷川守文[1]，安間智慧子[4]，梁 明秀[2]，鈴木義人[1] ([1]茨大農，[2]横浜市大医，[3]理研，[4]碧山園）

**3B023 ミズナラ外樹皮由来の抗トキソプラズマ活性物質の単離・構造決定**
◦遠藤麻理奈[1]， 重冨顕吾[2]， 三橋進也[2]， 五十嵐慎[3]， 生方 信[2] ([1]北大農，[2]北大院農，[3]帯畜大・原虫研）

**3B024 アレチオグルマ地上部滲出物に含まれるセスキテルペン類と誘導体の生物活性**
◦森田 遼，森本正則，松田一彦 （近大農院）

**3B025 プリン塩基の過冷却促進活性の検索とその諸性質**

◦田川絵理，濱田　純，濱田沙也加，河原秀久　（関西大化生工）

**3B026　*Eurycoma longifolia* からの脂肪分解促進物質の探索**

◦廣澤亮太，ルーシーラーリタ，加藤英介，川端　潤　（北大院農）

**3B027　ホオノキ(Magnolia obovata)の果実に含まれる高極性成分について**

◦武田滉平，小松　翔，網干貴子，塩野義人，村山哲也　（山形大農）

**3B028　マタタビ蔓に含まれる HL-60 増殖抑制物質の探索**

◦三浦清宏[1]，常盤野哲生[2]，中村祐美子[2]，川井　悟[3]，吉澤結子[2]（[1]秋田県立大生資科院，[2]秋田県立大生資科，[3]東京電機大理工）

**3B029　ピーチ由来の高純度グルコシルセラミドの精製**

◦藤野和孝，松本恵実，牧岡富広，中塚進一　（長良サイエンス株式会社）

**3B030　Isolation and biosynthesis of novel methylbenzene-containing polyketides from a Streptomyces that spontaneously acquired rifampicin resistance**

◦Wei li THONG，Makoto NISHIYAMA，Tomohisa KUZUYAMA（BRC, Univ. of Tokyo）

**3B031　ベンザスタチン類生合成に関与する新規ゲラニルニリン酸-6-メチル化酵素の機能解析**

◦堤　隼馬[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]　（[1]東大院･農生科･応生工，[2]AIST）

**3B032　13C 同位体を用いた微生物由来ジテルペノイド環化機構の解明**

◦中川和也[1]，菅井佳宣[1]，千葉康隆[2]，三橋　渉[2]，夏目雅裕[1]，豊増知伸[2]，川出　洋[1]　（[1]東京農工大院農，[2]山形大農）

**3B033　変異酵素を用いた非リボソームペプチド JBIR-34, -35 生合成の in vitro 解析**

◦曽根　薫[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]　（[1]東大院･農生科･応生工，[2]AIST）

**3B034　オオスカシバ幼虫のクチナシ防御物質に対する対抗適応機構**

◦志野真実子[1]，内藤裕彬[1]，齊藤　準[2]，吉永直子[1]，森　直樹[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京工繊大・応生）

**3B035　リンゴ果実に昆虫による食害で誘導される化合物群の動態の比較**

◦森田沙代[1]，吉永直子[1]，石栗陽一[2]，森　直樹[1]　（[1]京大院農，[2]青森産技セ りんご研）

**3B036　ヒカゲノカズラ由来オノセリンおよびセラタン型トリテルペンの生合成遺伝子の同定**

◦佐賀裕亮[1]，荒木健志[1]，丸上萌々[1]，大高潤之介[1]，荒谷　博[1]，斉藤和季[2]，山崎真巳[2]，鈴木秀幸[3]，久城哲夫[1]　（[1]明大農，[2]千葉大薬，[3]かずさ DNA 研）

**3B037　インドールジテルペン生合成における特異な骨格修飾酵素の機能解析**

◦劉　成偉[1]，南　篤志[1]，スコットバリー[2]，五味勝也[3]，大利　徹[4]，及川英秋[1]　（[1]北大院理，[2]Massey University，[3]東北大院農，[4]北大院工）

**3B038　アルキルクエン酸型天然物の生合成研究(1)**

◦竹内一朗[1]，南　篤志[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農）

**3B039　麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究(1)**

◦小崎拓登[1]，南　篤志[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]　（[1]北大理，[2]北大院理，[3]東北大院農）

**3B040　糸状菌異種発現系を用いた 2 －ピリドン系ポリケタイドの生合成研究**

◦鵜飼孝大[1]，南　篤志[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大院農）

**3B041　細胞分裂阻害剤の構造活性相関研究**

◦清水謙志郎[1,2]，清水　猛[1]，渡邉信元[1]，真田英美子[1]，Maria Pascual-Lopez Alberca[1]，篠崎　開[2]，長田裕之[1]　（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東京電機大学大学院）

**3B042　NPD37 の構造活性相関研究**

◦加藤勇輝[1,2]，清水　猛[1]，二村友史[1]，篠崎　開[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東京電機大学）

**3B043　チョウトウコウに含まれるウンカリン酸 C およびその誘導体のアミロイド β 凝集阻害活性**

◦吉岡卓也[1]，村上一馬[1]，花木瑞穂[1]，緑川諭弘[2]，谷脇慎治[2]，郡司祐樹[2]，入江一浩[1]　（[1]京大農，[2]アルプス薬品）

**3B044　ChemProteoBase によるがん代謝作用薬の解析**

◦室井　誠，田中美帆，長田裕之　（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

**3B045　抗腫瘍活性を持つ化合物 SQAP の作用機構解明**

◦川久保悠史[1]，カルボネルヘスス[1]，村田　寛[1]，佐原弘益[2]，紙透伸治[1]，菅原二三男[1]　（[1]東理大・理工，[2]麻布大・獣医）

**3B046　67LR 活性化剤は膵臓がんに対し抗がん作用を発揮する**

◦熊添基文[1]，高井美佳[1]，山内真麻[2]，高橋孝志[3]，田中浩士[2]，立花宏文[1]　（[1]九大院農院・生機科，[2]東京工業大学，[3]横浜薬科大学）

**3B047　トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノン結合部位の特異的メチル化**

◦稲岡宏幸，村井正俊，桝谷貴洋，油屋駿介，青木　航，三芳秀人　（京大院農）

**3B048　糸状菌が産生する昆虫制御物質オカラミンの活性発現機構に関する研究：選択的スプ ライシングによるターゲットの多様化と活性**

◦古谷章悟[1]，甲斐建次[2]，伊原　誠[1]，松田一彦[1]　（[1]近畿大・農，[2]阪府大・生環科）

**3B049　ケモカインレセプター CCR5 阻害剤 TAK779 類縁体の蛍光標識化**

◦山口椋平，東海林由憲，二階堂由莉，今野博行　（山形大院理工・バイオ化学）

**3B050　5，7 位に位置選択的にガロイル基を導入したフラバン-3-オール類縁体の合成と構造-活性相関**

◦法島太一[1]，米田慎吾[2]，森　一起[1]，中島範行[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電通大院工，[2]大阪電通大工，[3]富山県立大工）

**3B051　光反応性 2-propoxyanirine 誘導体の合成**

◦吉田卓真[1]，村井勇太[2]，橋床泰之[1]，橋本　誠[1]　（[1]北大院農，[2]北大院先端生命）

**3B052　光反応性 Phenylthiourea 誘導体とその性質**

◦石田明子，橋床泰之，橋本　誠　（北大院農）

**3B053　チロシン代謝産物シクロドーパの化学的特性再検討及び重水素交換**

◦中川詩織，橋床泰之，橋本　誠　（北大院農）

**3B054　植物病原菌感染因子コロナチンの COI1-JAZ 非依存的作用に関するケミカルバイオロジー**

◦江越脩祐[1]，山越博幸[2]，闥闥孝介[3]，岩下利基[1]，鈴木健史[1]，石丸泰寛[1]，高岡洋輔[1]，袖岡幹子[3]，上田　実[1]　（[1]東北大院理，[2]名市大院薬，[3]理研）

**3B055　出芽酵母ミトコンドリア VDAC はユビキノンと特異的に結合する**

◦奥田絢香[1]，村井正俊[1]，山本武範[2]，篠原康雄[2]，三芳秀人[1]　（[1]京大農，[2]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター）

**3B056　新規抗がん剤シード・10-Me-aplog-1 のがん細胞増殖抑制機構**

◦花木祐輔[1]，堀田夏紀[1]，菊森将之[1]，岡村睦美[2]，旦　慎吾[2]，入江一浩[1]　（[1]京大農，[2]がん研）

**3B057　3-β-Methoxy-5-cholestene: オビヤスデ目ヤスデで普遍的に分布**

◦桑原保正[1]，田辺　力[2]，浅野泰久[1]　（[1]富山県立大・生工科・生工研セ，[2]熊本大・教育・理科教育）

**3B058　β-catenin 変異型がん細胞選択的に細胞死を誘導する化合物の探索**

◦池田拓慧，田代　悦，井本正哉　（慶大理工）

**3B059　疫病菌交配ホルモン α 2 は対ホルモン α 1 のアンタゴニストである**

張　莉[1]，矢島　新[2]，◦小鹿　一[1]　（[1]名大院生命農，[2]東農大応生科）

**3B060　Inhibitory activities of deoxy-D-allose fatty acid esters on plant growth**

◦Md Tazul Islam Chowdhury[1]，Hikaru Ando[2]，Ryo C. Yanagita[2]，Yasuhiro Kawanami[2]　（[1]Ehime Univ.，[2]Kagawa Univ.）

**3B061　多剤超感受性酵母を用いたリードスルー活性評価系の構築**

◦岩本亮介[1]，濱田圭佑[1,2]，林　良雄[2]，臼井健郎[1]　（[1]筑波大生命環境，[2]東京薬大薬）

**3B062　電位依存性ナトリウムチャネルに対するテトロドトキシンおよび類縁体の阻害活性評価**
◦塚本匡顕[1]，千葉雪絵[1]，安立昌篤[2]，榊原　良[2]，所　聖太[2]，今津拓也[2]，佐竹佳樹[2]，長由扶子[1]，西川俊夫[2]，山下まり[1]，此木敬一[1]（[1]東北大農，[2]名大農）

**3B063　オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による褐変機構の解明**
◦手林慎一[1]，森　梓紗[1]，及川　彰[2]，佐々木亮介[3]，斉藤和季[4]，上手麻希[5]，間世田英明[5]，石原　亨[6]（[1]高知大農，[2]山形大農，[3]理研 PSC，[4]千葉大院薬，[5]徳島大 STS，[6]鳥取大農）

**3B064　カイコ麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の三次元構造－活性相関**
◦増田裕一[1,2]，田中　錬[2]，土井隆行[2]（[1]三重大生物資源，[2]東北大薬）

**3B065　スルホクリックを指向した発蛍光性光ラベル法の開発**
◦森本正大，千葉順哉，畑中保丸，友廣岳則（富大薬）

**3B066　天然小分子化合物ゼルンボンによる分子シャペロン Hsp90 の活性化に関与するシステイン残基の同定**
◦小松太和，仲本　準（埼玉大・理・分子）

**3B067　5-リポキシゲナーゼ代謝産物による Nrf2 活性化機構**
◦長洞　希，箱崎真友佳，平田優紀，白石朗子，山田秀俊（岩手生工研）

**3B068　ヒト β-ガラクトシダーゼ(GLB1)のゴルジ体における新たな糖鎖修飾酵素としての可能性**
◦三浦一輝[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科，[2]日大生資科・生命化）

**3B069　ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノン QT の還元はプロトン輸送と共役しない**
◦奥田健司，村井正俊，油屋駿介，青木　航，三芳秀人（京大院農）

**3B070　Mechanism of lipid-suppressing activity of Eurycoma longifolia Jack in 3T3-L1 adipocytes**
◦Lucy LAHRITA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA（Hokkaido University）

**3B071　セリ科植物由来ポリアセチレン化合物 falcarindiol の糖新生抑制機構と GSK-3 β 阻害作用**
◦吉田　潤[1]，西谷直之[2]，伊藤芳明[3]，木村賢一[3]（[1]岩手医大・教養教育セ・化学，[2]岩手医大・薬，[3]岩手大・農）

**3B072　aldohexose 異性体の線虫成長阻害活性**
◦砂古口博文[1]，佐藤正資[1]，吉原明秀[2]，新谷知也[3]，大隈一裕[3]，何森　健[2]（[1]香川大農，[2]香川大・希少糖研究セ，[3]松谷化学工業(株)）

**3B073　中国産食用茸ツブイボタケ（*Thelephora vialis*）含有 vialinin A によるエキソサイトーシスを介した TNF-α 放出阻害メカニズムの解明**
◦菅谷紘一[1]，並木大輔[1]，吉岡泰淳[2]，金田紗耶香[1]，煙山紀子[1]，小野瀬淳一[1]，阿部尚樹[1]（[1]東農大・応生・食品安全健康，[2]神戸大自然科学）

**3B074　Cisplatin 持続暴露による EMT 誘導機構**
◦今辻紗也佳，大嶽弘之，奈良部進，田代　悦，井本正哉（慶大理工）

**3B075　茶ポリフェノール類のコレステロールミセル溶解阻害活性とその分子機構に関する研究**
◦小川和樹，廣瀬紗弓，内田和宏，長岡　利，柳瀬笑子（岐大応用生物科学）

**3B076　ストリゴールの全合成研究**
◦高橋愛子，桑原重文（東北大院農）

**3B077　ウーロンテアニン類の生成機構と平衡反応**
◦廣瀬紗弓，小川和樹，柳瀬笑子（岐大）

**3B078　Homophymine B の全合成を目指した非タンパク性アミノ酸の合成**
◦東海林由憲，吉野　諒，今野博行（山形大院理工）

**3B079　Inagami-Tamura EDLF の合成化学的研究：光学活性体の合成ルートの確立**
◦橋本圭古，池田　藍，西川俊夫，中崎敦夫（名大院生命農）

**3B080　Strophasterol A の合成研究**
◦佐藤俊太郎，福田裕紀，村上真裕子，廣川高史，桑原重文（東北大農）

**3B081　セスペンドール芳香環部分の光学活性体の合成研究**
◦植木佳織，樋口恵子，安立昌篤，西川俊夫（名大農）

**3B082　Glabramycin B の合成と構造訂正**
◦山本将起，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

**3B083　Okundoperoxide の改良合成と絶対立体配置の決定**
◦森　直紀，迫田大地，渡邉秀典（東大院農生科）

**3B084　ベンゾベンゾピラノインドール-6-オン型抗がん活性物質の合成と生理活性**
◦石橋郁人[1]，松倉一晃[1]，河野将弘[1]，岩尾正倫[2]（[1]長崎大・水産，[2]長崎大院・工）

**3B085　Amphirionin-4 の不斉全合成**
◦小倉由資，佐藤　光，榎本　賢，桑原重文（東北大院農）

**3B086　抗マラリア活性を有する Myristicyclin 類の合成研究**
◦久保伸一郎，渡邉秀典（東大院農生科）

**3B087　Versipelostatin A セグメントカップリングの検討**
◦藤川祥汰[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**3B088　コレステロール成合成阻害活性を有する Decarestrictine H 及び J の合成と立体化学に関する研究**
◦政田尚子[1]，下平雄一郎[1]，上田彩恵子[1]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**3B089　ヒガンバナ科アルカロイド crinasiadine 類の短段階合成**
◦桑田祥幸，園田素啓，谷森紳治（阪府大院生命環境）

**3B090　ペスタロキノール類の合成研究**
◦廣川高史，陰山真将，桑原重文（東北大院農）

**3B091　Amphidinolide N の C17-C29 フラグメントの合成研究**
◦藤島悠記，福山　圭，小倉由資，桑原重文（東北大院農）

**3B092　可溶性担体を用いたペプチド核酸の効率的な合成**
◦大神啓介，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院）

**3B093　希少糖含有糖脂質の合成**
◦平田圭亮[1]，水木　徹[1,2]（[1]東洋大，[2]東洋大･バイオナノセンター）

**3B094　9-norlignan の 7 位の phenyl 基上の構造と細胞毒性活性との関係**
◦庄司有璃子，谷村僚亮，西脇　寿，西　甲介，菅原卓也，山内　聡（愛大農）

**3B095　マタイレジノール誘導体の細胞毒性活性**
◦越智吉明，トゥッティウキルサリ，西脇　寿，西　甲介，菅原卓也，山内　聡（愛大農）

**3B096　3-fluorophenyl 基と 3-fluoro-4-hydroxyphenyl 基をもつリグナン類の *Alternaria* 属に対する抗かび活性**
◦中崎翔子[1]，西脇　寿[1]，秋山浩一[2]，山内　聡[1]（[1]愛大農，[2]愛大学術支援センター）

**3B097　Novel cellulose pretreatment solvent: amino acid ionic liquid/cosolvent for enhancing enzymatic synthesis of methyl β-D-glucoside from cellulose**
◦Noriyuki NAKAJIMA, Juan Tao, Masahiro Hamada, Takao Kishimoto（Toyama Prefectural Univ.）

**3B098　*o*-ジフェノール配糖体類の化学合成，生理活性評価および探索**
◦岩舘丈央[1]，二瓶賢一[1,2]（[1]農工大院連農，[2]宇都宮大農）

**3B099　ウロリチン類の化学合成**
◦張間紗希[1]，小松　渡[2]，矢ヶ崎一三[3]，二瓶賢一[1]（[1]宇都宮大農，[2]獨協医大，[3]宇都宮大バイオ）

**3B100　磁性粒子を用いた効率的液相合成法の開発**
◦谷口大輔，岡田洋平，北野克和，千葉一裕（東農工大院）

**3B101　タチノシドおよびその関連誘導体の化学合成と生理活性評価**
◦松本大志，中島拓弥，二瓶賢一（宇都宮大学農）

**3B102　ジヒドロレスベラトロールグリコシド類の化学合成とメラニン形成調節活性**
◦島田　亙[1,2]，横田真理子[2]，二瓶賢一[3]（[1]農工大院連農，[2]コスモステクニカルセンター，[3]宇都宮大農）

**3B103　*in vivo* イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの合成**
◦齊藤亮平，木山正啓，北田昇雄，東　翔子，平野　誉，牧昌次郎（電気通信大学　先進理工学専攻）

## C：生体高分子・生体脂質

**3C001　コリネ型細菌由来 PDHc/ODHc 超複合体の活性制御機構の解析**
◦山内健太郎[1]，栃木夢丸[1]，古園さおり[2]，川崎　寿[1]，夏目　亮[1]（[1]東電大・院・工，[2]東大・生物生産工学研究センター）

**3C002　沖縄島産ハブ(Protobothrops flavoviridis)個体からの毒性成分 HR1B 検出**
◦大城聡子[1]，岩崎公典[2]，平良東紀[3]，盛根信也[1]，泉水由美子[1]，寺田考紀[1]，久高　潤[1]（[1]沖縄県衛生環境研究所，[2]琉球大学熱帯生物圏研究センター，[3]琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科）

**3C003　タンパク質の S-ニトロシル化修飾を標的とした食品機能性評価の可能性**
◦芳村俊広[1]，黒木勝久[1,2]，水光正仁[1,2]，榊原陽一[1,2]（[1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科，[2]宮崎大学農学部応用生物科学科）

**3C004　KvAP カリウムチャネルの電位センサーの膜組込み機構**
三島枝里子[1]，佐藤陽子[1]，阪口雅郎[2]，◦魚住信之[1]（[1]東北大院工バイオ，[2]兵庫県大院理）

**3C005　枯草菌芽胞形成制御因子 Spo0M タンパク質の構造と機能に関する研究**
◦園田　陽，水谷公彦，三上文三（京大農）

**3C006　β-キチンナノファイバーを基盤とするインフルエンザウイルス阻害**
◦戸谷一英[1]，三浦勇生[1]，二階堂望[1]，末永　信[2]，長田光正[2]，山下和彦[3]（[1]一関高専・物化工，[2]信州大・繊維，[3]ヤエガキ醗酵技研(株)）

**3C007　Renature-β-1,3-1,6-グルカン/シコニン複合体の安定性**
◦児玉歩夢[1]，中川暁史[1]，鈴木利雄[2]，谷口泰造[3]，甲元一也[1]（[1]甲南大 FIRST，[2]阪市大院工，[3]姫路獨大薬）

**3C008　Extracellular polysaccharides produced by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 are novel plant growth-promoting factor for aquatic vegetation (*Lemna minor*)**
◦RAHUL JOG[1,2]，MASAYUKI SUGAWARA[1,2]，KYOKO MIWA[1,2]，MASAAKI MORIKAWA[1,2]（[1]Hokkaido Univ.，[2]JST-ALCA）

## D：酵素

**3D001　好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* における D-アミノ酸脱水素酵素の役割**
◦鈴木里菜[1]，鍋倉未香[1]，大崎由美子[1]，小田真弓[1]，谷川　実[1]，西村克史[1,2]（[1]日本大学，[2]日本大学短期大学部）

**3D002　*Arthrobacter globiformis* 由来ヒスタミンオキシダーゼ Glu378 残基の役割**
◦武山航平[1]，竹島大貴[1]，芦田裕之[2]，石川孝博[1]，澤　嘉弘[1]（[1]島根大 生資，[2]島根大 総合科学支援セ）

**3D003　アミノ基キャリアタンパク質を介したリジン生合成酵素 LysY の基質認識機構の構造基盤**
◦清水　哲，富田武郎，葛山智久，西山　真（東大生物工学セ）

**3D004　*Thermus thermophilus* における Stand-alone RAM ドメインタンパク質を介した新規トリプトファン生合成調節と生理的意義の解明**
◦久保田哲央，松下　創，富田武郎，葛山智久，西山　真（東京大学・生物工学センター）

**3D005　好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* シスタチオニン γ-シンターゼの温度による活性中心の構造変化**
◦佐藤　暖[1]，水野紗恵[1]，川村あやか[1]，志波智生[1]，稲垣賢二[2]，原田繁春[1]（[1]京都工繊大院応生，[2]岡山大院環境生命）

**3D006　ラン藻由来アラニンラセマーゼの基質認識機構の解析**
◦芦田裕之[1]，村上佳穂[3]，稲垣賢二[3]，澤　嘉弘[2]（[1]島根大総科研センター，[2]島根大生資，[3]岡山大院環境生命）

**3D007　D, L-セリンの酵素的分別定量法の開発とヒト尿中 D, L-セリンの動態解析**
◦安森　望，伊藤智和，邊見　久，吉村　徹（名大院生命農）

**3D008　肝臓実質細胞特異的セリン合成酵素 Phgdh KO マウスは耐糖能異常を呈する**
◦毛利紳哉[1]，森安一樹[1]，江崎加代子[2]，田代康介[1]，平林義雄[2]，古屋茂樹[1]（[1]九州大学大学院　生物資源環境科学府，[2]理研・脳科学総合研究センター）

**3D009　*Pseudomonas putida* 由来 D-リジントランスポーターの基質結合タンパク質の解析**
◦山内美咲，青木志帆，近藤和貴，佐藤大起，戸部隆太，三原久明（立命大生命）

**3D010　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における Cys 生合成経路の解明**
◦佐藤喬章[1,3]，牧野勇樹[1]，川村弘樹[1]，今中忠行[2,3]，跡見晴幸[1,3]（[1]京大院工，[2]立命館大，[3]JST, CREST）

**3D011　乳酸菌 *Lactobacillus otakiensi* における $_D$-分岐鎖アミノ酸の局在と機能**
◦十時繁幸[1]，前田純平[1]，牟田口祐太[2]，大島敏久[3]，土居克実[1]（[1]九大農，[2]秋田県立大，[3]大工大）

**3D012　L-ピペコリン酸代謝系の解析および新規生体触媒スクリーニングへの応用**
◦森川直樹[1]，日比　慎[2]，森　亮輔[1]，三宅良磨[3,4]，川端　潤[3,4]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・農・産業微生物，[3]三菱化学科学技術研究センター，[4]エーピーアイコーポレーション）

**3D013　*Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明－触媒クレフト入口の芳香族アミノ酸残基の役割について－**
◦杉本華幸[1,2]，出澤有太[1]，猪浦　弾[1]，鈴木一史[1,2]，渡邉剛志[1,2]（[1]新大院　自然研，[2]新大農　応生化）

**3D014　酢酸菌における複数の新規な PQQ- 酵素の同定**
◦足立収生[1]，アワーズロケA.[2]，赤壁善彦[1]，阿野嘉孝[3]，品川惠美子[4]，片岡尚也[1]，薬師寿治[1]，松下一信[1]（[1]山口大・農，[2]ラプラタ大学・発酵工学研，[3]愛媛大・農，[4]宇部高専・物質工学）

**3D015　*Bifidobacterium adolescentis* 由来の GH27 β-L-アラビノピラノシダーゼ/α-D-ガラクトピラノシダーゼの機能解析**
◦藤田清貴，福元　諒，北原兼文（鹿児島大・農）

**3D016　*Vibrio parahaemolyticus* KN1699 由来キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の機能解析**
◦神澤沙耶[1]，平野貴子[2]，中村美緒[2]，小島祐哉[2]，袴田　航[1,2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科･生物資源利用，[2]日大生資科･生命化）

**3D017　ステロイドホルモン類に対する糖転移**
◦木曽太郎[1]，安居弘樹[2]，湯口宜明[2]，桐生高明[1]，村上　洋[1]，中野博文[1]（[1]阪市工研，[2]大阪電通大）

**3D018　*Bacillus niacini* JAM F8 におけるグリコサミノグリカンの分解に関与するタンパク質の機能解明**
◦平井晴奈[1]，西村みどり[2]，倉田淳志[2]，小林　徹[3]，岸本憲明[2]（[1]近畿大院農，[2]近畿大農，[3]海洋研究開発機構）

**3D019　*Penicillium chrysogenum* 由来新規エキソーラムノガラクチュロナンリアーゼの反応特性解析および X 線結晶構造解析**
◦國重由花[1]，岩井麻凛[1]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，多田俊治[2]，西村重徳[1]，阪本龍司[1]（[1]大阪府大･生命環境科学，[2]大阪府大･理）

**3D020　*Penicillium chrysogenum* 由来ペクチンメチルエステラーゼの異種発現と反応特性解析**
◦久保笙子[1]，吉田靖彦[2]，中澤昌美[1]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]（[1]大阪府大生命環境科学，[2]不二製油株式会社）

**3D021　*Zymomonas mobilis* 由来 levansucrase と invertase の反応特異性の解析**
◦芹沢　領，田沼正成，奥山正幸，木村淳夫（北大院農）

**3D022　希少糖生産酵素 *Arthrobacter* 属由来 D-プシコース 3-エピメラーゼの結晶化および X 線結晶解析**
◦吉田裕美[1]，吉原明秀[2]，大谷耕平[3,4]，秋光和也[3]，何森　健[3]，神鳥成弘[1]（[1]香川大総合生命研究セ，[2]香川大希少糖研究セ，[3]香川大農，[4]松谷化学）

**3D023　深海微生物 *Bacillus* sp. JAMB-FW51 株由来イソマルトデキストラナーゼの解析**
◦桐ケ谷綾菜[1]，増田美希[1]，増田範生[2]，弓田　涼[1]，細谷美菜子[1]，柳田早智[1]，宮崎征行[2]，秦田勇二[1,2]（[1]横浜市立大学，[2]海洋研究開発機構）

**3D024　リガンドによるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 2 の動的構造変化**

◦海谷京香，藤野泰寛，土居克実，西本悦子，廣政恭明 （九大農）

**3D025　細菌グルコアミラーゼの N 末端配列の役割**

◦坂口政吉[1]，松嶋裕大[1]，永峯雄介[1]，松橋智希[1]，本田翔太郎[1]，菅原康里[1]，小山文隆[1]，川喜田正夫[1,2]（[1]工学院大先進工，[2]東京都医学研）

**3D026　Solubilizing ability of double-anchor type isomaltomegalosaccharide for drug delivery of ibuprofen**

◦Sota UEKUSA, Weeranuch Lang, Yuya Kumagai, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura （Laboratory of Molecular Enzymology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University）

**3D027　Polysaccharide lyase family 7 に分類される新規アルギン酸リアーゼの特性評価**

◦八木寿梓[1]，藤瀬麻紗子[2]，板橋成美[3]，鈴木宏和[2]，大城　隆[2]（[1]鳥大・工・GSC，[2]鳥大院・工，[3]鳥大・工）

**3D028　*Kribbella flavida* 由来 isomaltosyltransferase の機能解析**

◦宮野江梨[1]，田上貴祥[2]，奥山正幸[1]，木村淳夫[1]（[1]北大院農，[2]酪農学園大）

**3D029　Efficient production and characterization of α-1,3-glucosidase from *Aspergillus niger***

◦Min MA[1], Takayoshi TAGAMI[2], Masayuki OKUYAMA[1], Atsuo KIMURA[1]（[1]Hokkaido Univ., [2]Rakuno Gakuen Univ.）

**3D030　*Thalassomonas agarivorans* A33 株由来 α アガラーゼの諸性質解析および枯草菌を宿主とした生産検討**

◦細谷美菜子[1]，弓田　涼[1]，桐ヶ谷綾菜[1]，高木瑛実子[1]，大田ゆかり[2]，能木裕一[1,2]，秦田勇二[1,2]（[1]横浜市立大学，[2]海洋研究開発機構）

**3D031　緑藻 Volvox carteri 由来キチナーゼがもつ LysM ドメインのキチンオリゴ糖結合様式**

◦北奥喜仁，大沼貴之，深溝　慶 （近畿大農）

**3D032　酵素反応・ボロン酸ゲルを用いた分離による D-プシコース，D-アロースの生産技術の開発**

野崎智帆[2]，十川直也[2]，後藤成暁[2]，吉原明秀[1]，高田悟郎[1]，◦森本兼司[1]（[1]香大希研セ，[2]香大農）

**3D033　酵素反応解析モデルを活用した糖脂質混合液の効率的調製法**

◦伊藤　博，星野優人，鈴木大樹，小林厚志 （日大工）

**3D034　Intein を利用した超好熱菌由来プロテアーゼ(Tk-SP)の発現系構築**

◦足立航平，上原　了，タンヌスエリアス，大政健史，古賀雄一（阪大工）

**3D035　カルパイン 3 欠損型およびプロテアーゼ活性欠失変異型マウスの比較プロテオミクスによる肢帯型筋ジストロフィー 2A 型発症機序の解析**

◦大内史子[1]，進藤真由美[2]，伊藤義城[1]，小野弥子[1]，秦　勝志[1]，今西美知子[2]，反町洋之[1]（[1]都医学研･カルパイン PJ，[2]都医学研･基盤技術研究センター）

**3D036　冷水病に罹患したアユから単離された *Flavobacterium psychrophilum* 由来コラゲナーゼの大腸菌での発現**

◦森真璃子[1]，中山仁志[2]，田中啓友[3]，服部俊治[3]，滝田禎亮[1,4]，保川　清[1,4]（[1]京大農，[2]和歌山県水産試験場，[3]株式会社ニッピ･バイオマトリックス研究所，[4]京大院農）

**3D037　D-アミノ酸アミド加水分解酵素の活性部位ポケットを形成する残基と副反応“ペプチド結合形成能”との相関**

◦宮谷一紗，有馬二朗 （鳥取大農）

**3D038　乳酸菌の分岐側鎖 D-2-ヒドロキシ酸脱水素酵素ホモログの機能と構造**

◦田口速男[1]，森田一弘[1]，古川那由太[2]，三宅真太郎[1]，内田好美[1]，高橋　葉[1]，藤澤伸介[1]，荒井一人[1]，宮永顕正[3]，中島将博[1]（[1]東京理大理工，[2]新潟薬大応生科，[3]東工大院理工）

**3D039　好熱性アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を用いた D-乳酸バイオセンサの開発**

◦里村武範[1,2]，大柳佑太[1]，布浦拓郎[5]，高木善弘[5]，高見英人[5]，高井　研[5]，櫻庭春彦[3]，大島敏久[4]，末信一朗[1,2]（[1]福井大院工，[2]福井大生命セ，[3]香川大農，[4]大阪工大工，[5]海洋研究開発機構）

**3D040　*Lactobacillus plantarum*(*pentosus*)由来 L 型乳酸脱水素酵素へのアロステリック特性の導入**

◦久保志歩[1]，荒井一人[1]，古川那由多[2]，斉藤祐介[1]，中島将博[1]，田口速男[1]（[1]東理大院，[2]新潟薬科大）

**3D041　*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が産生する第 2 のアルコール脱水素酵素の精製と性質解明**

◦七田沙耶香[1,2]，上田量子[1,2]，松井大亮[1,2]，礒部公安[1,2]，三木慎介[3]，西井哲郎[3]，石井章央[3]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大生工科･生工研セ，[2]JST, ERATO，[3]セントラル硝子）

**3D042　ギ酸オキシダーゼの亜硝酸を電子受容体とする酸化半反応**

◦田邊直人[1]，道林泰樹[1]，中垣康平[1]，沖　昌也[1]，三上文三[2]，内田博之[1]（[1]福大院・工，[2]京大院・農）

**3D043　超好熱アーキア由来アルコール脱水素酵素の熱活性化による酵素活性及び構造の経時変化の解明**

◦郷田秀一郎，梶山晃成，永野結花，内田拓郎，海野英昭，畠山智充 （長崎大工）

**3D044　マルチ銅オキシダーゼのタイプ I 銅酸化還元電位の精密制御による酵素活性制御**

◦片岡邦重，松田奈々，櫻井　武 （金沢大理工）

**3D045　麹菌由来の D-乳酸脱水素酵素(D-LDH)のホモ 6 量体形成と乳酸生産最適条件の検討**

◦渡部　昭，佐藤陽子，五味勝也 （東北大院・農・生物産業創成）

**3D046　深海微生物 Novosphingobium sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素の解析**

◦弓田　涼[1]，桐ヶ谷綾菜[1]，細谷美菜子[1]，大田ゆかり[2]，黒澤佳奈子[2]，嶋根康弘[2]，林　昌宏[3]，殿塚隆史[3]，秦田勇二[1,2]（[1]横浜市立大学，[2]日本海洋研究開発機構，[3]東京農工大学）

**3D047　好塩性古細菌およびシアノバクテリアに保存された新規ビオチン生合成酵素の機能解析**

◦大石恵太[1]，清水　哲[1]，小林一幾[2]，富田武郎[1]，田中　寛[2]，葛山智久[1]，西山　真[1]（[1]東大生物工学セ，[2]東京工業大学　資源化学研究所）

**3D048　酵母由来デカプレニルニリン酸合成酵素の解析**

◦森山大輔[1,2]，戒能智宏[2]，矢島麗嘉[1]，柳井良太[2]，池中康裕[1]，長谷川淳三[1]，鷲田元久[1]，難波弘憲[1]，川向　誠[2]（[1]株式会社カネカ，[2]島根大・生物資源・生命工）

**3D049　Purification and characterization of hydroxynitrile lyase from millipedes, *Parafontaria laminata***

◦Aem NUYLERT[1], Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yuko ISHIDA[1,2], Yasumasa KUWAHARA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2]（[1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST）

**3D050　ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの探索と大腸菌での発現系の確立**

◦山口拓也[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**3D051　放線菌フェルラ酸エステラーゼの活性と構造の関わり**

◦裏地美杉[1]，田村はるか[1]，溝端栄一[2]，万　クン[1]，小川健一[1]，井上　豪[2]，畑中唯史[1]（[1]岡山生物研，[2]阪大院工・応化）

**3D052　タイプ 2・Extradiol 型二原子酸素添加酵素 PraA における環開裂位置選択性の解明**

◦此下亜椰[1]，TING Kah Wei[1]，杉本敬祐[1]，千田美紀[2]，上村直史[3]，笠井大輔[3]，福田雅夫[3]，政井英司[3]，千田俊哉[2]（[1]旭川高専，[2]KEK・構造，[3]長岡技科大・生物）

## E：食品

**3E001　酸化食用油によるヒト神経細胞 SH－SY5Y への影響**

◦上野有紀，中根大和，夏目梨冴，三浦叶子，服部恵美，公文春枝，大澤俊彦 （愛知学院大心身科学）

**3E002　糖の加熱における機能性ポリフェノールの生成―加熱条件と HHQ の生成―**

◦野島祥子[1]，増田俊哉[1]，岡村雄介[2]（[1]大阪市大院･生活，[2]花王･ヘルスケア食品研）

**3E003　新規機能性材料としてのコンニャク由来グルコマンナンオリゴ糖の構造解析**

◦藤野　良[1]，竹本克宏[1]，清水功雄[2]，岡本真由美[2]（[1]株式会社スイスロワール，[2]早大理工）

**3E004　発酵小麦デンプン(久寿澱粉)の糖鎖構造とゲル特性**
○丸山慶輔[1]，野口治子[2]，内野昌孝[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学)

**3E005　トコトリエノール類及び PQQ によるアマドリ化合物の分解作用**
○酒井伸崇[1]，臼井照幸[1,2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]　([1]明治大農，[2]女子栄養大栄養)

**3E006　米 SSP の精製および α-アミラーゼのデンプン分解性に与える影響**
○塩野弘二[1]，辻井良政[2]，野口智弘[3]，高野克己[2]　([1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]東京農大応生・食加技セ)

**3E007　沖縄県産海産物のプロテアーゼ加水分解により得られるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドと SHR における血圧降下作用**
○荻　貴之[1]，　市村年昭[2]，　鎌田靖弘[1]，　照屋盛実[1]，　潮平憲二[3]，瑞慶山良寧[3]，稲福桂一郎[3]，丸山　進[1]　([1]沖縄県工業技術センター，[2]産総研，[3]金秀バイオ(株))

**3E008　LC-MS/MS を用いたオウトウアレルゲンタンパク質 Pru av 2 の定量法の開発**
○一法師克成，笹沼基恵，大池秀明，小堀真珠子，山本(前田)万里　(農研機構・食総研)

**3E009　ナタマメから粗抽出したカナバリンは二価金属塩濃度に依存した可逆的溶解性を示す**
○西澤果穂[1]，有井康博[2]　([1]武庫女大院，[2]武庫女大)

**3E010　メイラード反応を利用した β-コングリシニンの機能改変**
○高橋良平，友野美怜，好田　正，服部　誠　(東農工大農)

**3E011　本みりんの熟成における D- アミノ酸の生成機構**
○井上　裕[1,2]，　鈴木理恵[2]，　勝又忠与次[2]，　渡辺寛人[1]，　早瀬文孝[1]　([1]明治大農，[2]MC フードスペシャリティーズ(株))

**3E012　国内主要茶産地で生産された緑茶の成分および嗜好性に関する比較分析**
○岡本由希[1]，内山裕美子[2]，高橋貴洋[2]，山下まゆ美[3]，築舘香澄[4]，加藤みゆき[5]，大森正司[4,6]　([1]和洋女大，[2]味香研，[3]高崎商科短大，[4]大妻女大，[5]香川大，[6]お茶大学)

**3E013　日本国内で生産される後発酵茶中の環状ジペプチドの定量**
○大塚祐季[1]，　林　未季[1]，　山本憲司[1,2]，　柏木丈拡[1]，　島村智子[1]，受田浩之[3]　([1]高知大農，[2]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)，[3]高知大地域協働)

**3E014　パウチ封入がジャガイモ中の γ-アミノ酪酸に及ぼす影響**
○喜田　駆[1]，　田中麻美子[1]，　西田　毅[2]，　松田寛子[1]，　白井隆明[1]　([1]東京海洋大院・サラダサイエンス，[2]ケンコーマヨネーズ(株))

**3E015　沖縄産パインアップル(*Ananas comosus*)のフレーバーおよび品質特性**
○宮城春里[1]，　ASIKIN Yonathan[2]，　竹内誠人[3]，　諸見里知絵[3]，玉城　聡[3]，平良英三[1]，平良東紀[1]，高良健作[1]，和田浩二[1]　([1]琉球大・農，[2]琉球大・熱生圏，[3]沖縄農研・名護)

**3E016　スレオニン・グルコースならびにセリン・グルコース系メイラード反応で形成される新規ピロロオキサゾール色素について**
○野田響子，村田容常　(お茶大院ライフ)

**3E017　アスコルビン酸添加におけるアントシアニン分解物の探索**
○江崎正信[1]，野口治子[2]，津久井亜紀夫[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学)

**3E018　チーズの貯蔵褐変とメイラード反応**
○井越明日香，佐藤由依，亀山久美，村田容常　(お茶大院ライフ)

**3E019　食品の複合臭とイミテーションフレーバーに対するマウス嗅球応答パターンとヒト官能評価との比較**
○藤田　怜[1,2,3]，堀尾奈央[2]，東原和成[2,3]　([1]長谷川香料(株)，[2]東大院農生科・応生化，[3]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト)

**3E020　モモの香気特性における傷害および保存の影響について**
○飯島陽子，角谷南斗　(神奈川工科大応用バイオ)

**3E021　コリアンダーの部位の違いによる香気成分の比較**
○伊藤裕才，斉藤みなみ，寺門料子　(共立女子大家政)

**3E022　醸造醤油の香気に寄与するチオール化合物 2-methyl-3-furanthiol に関する研究**
○孟　　き[1]，　北川莉帆[1]，　今村美穂[2]，　片山　弘[2]，　小幡明雄[2]，菅原悦子[1]　([1]岩大教，[2]キッコーマン(株))

**3E023　様々な年代の日本食に含まれる成分の一斉分析**
○坂本有宇[1]，菅原達也[2]，木村和彦[3]，都築　毅[1]　([1]東北大院・農，[2]京大院・農，[3]宮城大)

**3E024　NMR メタボリックプロファイリングによる和牛肉熟成過程の解析と熟成段階予測モデルの構築**
○小谷良徳[1]，宮川拓也[1]，小松智彦[2]，田之倉優[1]　([1]東大院･農生科，[2]山形県農業総合研究センター畜産試験場)

**3E025　だしの評価への味覚センサーの応用**
○林由佳子[1]，高橋拓児[2]，松村康生[1]，伏木　亨[3]　([1]京大院農，[2]木乃婦，[3]龍谷大農)

**3E026　ウメ '南高' 果実貯蔵中のフェノール性化合物の成分変化**
○堀西朝子，安井理世，中村裕一，尾崎嘉彦　(近畿大生物理工)

**3E027　レトルト食品に混入した虫の混入時期推定法の開発**
○坂井浩晃[1]，　垣谷彩乃[1]，　井上智統[1]，　表　雅之[2]，　永富康司[1]，宮本靖久[1]，原山耕一[1]　([1]アサヒグループホールディングス(株)，[2]アサヒビール(株))

**3E028　米飯特性は炊飯中のプラチナ作用で変化する**
○辻井良政[1]，木村圭一[1]，吉田貴美[2]，宮松宏樹[2]，高野克己[1]　([1]東京農大・応生・化学，[2](株)エルブ)

**3E029　小麦登熟過程中の PDI 活性の挙動解析**
○加藤　亮[1]，野口智弘[2]，高野克己[3]　([1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・食化技セ，[3]東京農大応生・化学)

**3E030　乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からの *d*-リモネン徐放挙動に及ぼす賦形剤の影響**
○高重至成[1]，四日洋和[2]，安達修二[3]，吉井英文[1]　([1]香大院農，[2]京学大バイオ，[3]京大院農)

**3E031　醸造用ブドウにおける果汁成分中からの新規成熟指標探索**
○石川勇人[1]，　潮上史生[2]，　斉藤史恵[1]，　久本雅嗣[1]，　三澤彩奈[2]，三澤茂計[2]，奥田　徹[1]　([1]山梨大ワイン研，[2]中央葡萄酒(株))

**3E032　浸透圧脱水凍結が牡蠣の品質に及ぼす影響**
○易　　峰，川井清司，羽倉義雄　(広島大院生物圏科学)

**3E033　蒸気吹き込み法によるエマルションの調製～撹拌速度及び撹拌槽の槽径が分散粒子に及ぼす影響～**
○村上亮介[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]　([1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏科学)

**3E034　炭酸飲料水の氷晶メカニズムに関する研究**
○菅沼　剛[1]，鈴木　徹[2]　([1]アサヒ飲料株式会社，[2]東京海洋大学大学院)

**3E035　銀担持ゼオライトによるウイスキー硫黄化合物の選択的除去技術の開発**
○杉本利和[1]，　村田充子[2]，　各務成存[3]，　河島義実[2]，　朝日　輝[1]，細井健二[1]　([1]ニッカ技開セ，[2]出光先進研，[3]出光生技セ)

**3E036　*esp2* 変異体とコシヒカリの交配後代の農業形質および加工適性の評価**
○飯島　健[1]，　堀　清純[1]，　中村健治[2]，　早川克志[2]，　奥西智哉[3]，石井卓朗[4]，山本敏央[1]，川越　靖[1]　([1]農業生物資源研究所，[2]日清製粉(株)，[3]農研機構食総研，[4]農研機構作物研)

**3E037　乳含有飲食品に対するコンブ抽出物の光劣化抑制効果**
○鈴木健介，　十川詩帆，　八木芙雪，　山口麻美，　神村　篤，瀬川めぐみ　(三菱商事フードテック株式会社)

**3E038　大豆ホエー中の冷凍保護物質の探索**
○金井大樹[1]，風見真千子[2]，野口治子[2]，高野克己[2]　([1]東京農大院，[2]東京農大)

**3E039　国産および中国産落花生からの豆腐様ゲルの形成**
○門間美千子　(農研機構　食総研)

**3E040　リンゴ果実加工時の物性及び成分変化に対する中高圧処理の影響**
○樋口　拓[1]，　藤田智之[1]，　山本和貴[2]，　深井洋一[3]，　山崎慎也[4]，三輪章志[5]，有手友嗣[5]，吉野　勇[6]，新田一朋[6]　([1]信州大院農，[2]農研機構･食総研，[3]長野農工研，[4]長野工技セ，[5]石川農研，[6]スギヨ)

**3E041　タンパク質が米粉バッター粘度に与える影響について**
○奥西智哉，岸根雅宏，宮下香苗　(農研機構・食総研)

**3E042　ガゴメ昆布(*Kjellmaniella crassifolia Miyabe*)を用いたグルテンフリーパンの製造研究**
○井関杏子，田原　彩，瀬口正晴　(神戸女子大)

**3E043　小麦粉生地中における SS 結合形成に対する酸化剤と PDI**

及び POD の影響について
◦樋口貴俊[1]，岡　大貴[2]，野口治子[3]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

**3E044　グリアジン添加の製パン性向上効果と ω-グリアジンの関係**
◦岡　大貴[1]，野口智弘[1]，高野克己[2]（[1]東京農大応生・食加技セ，[2]東京農大応生・化学）

**3E045　分画グリアジンを用いたグリアジン分子種間相互作用の解析**
◦北尾悠樹，東野ゆうき，岩村紗季，裏出令子（京大院農・農学）

**3E046　グリセリン脂肪酸エステルによるコエンザイム Q10/γ-シクロデキストリン包接複合体の可溶化**
◦上梶友記子[1]，大西麻由[1]，中田大介[1]，吉井英文[2]，寺尾啓二[1]（[1]シクロケムバイオ，[2]香大農）

**3E047　官能評価を反映した嚥下調整食の動的粘弾性による物性基準と予測モデルの構築**
◦茅沼友希[1]，上田玲子[1]，南　道子[2]，舟木淳子[3]，石丸喜朗[1]，阿部啓子[1]，朝倉富子[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京学芸生科，[3]福岡女子大院）

**3E048　高加熱処理乳のチーズカード形成不良に関する新たな知見**
◦小野　航[1]，岡　大貴[2]，野口智弘[2]，高野克己[3]（[1]東京農大院農・農化，[2]東京農大応生・食加技セ，[3]東京農大応生・化学）

**3E049　加熱調理過程における食材の粘弾性物性の非破壊・連続測定**
◦梶原　翼[1]，川井清司[2]，羽倉義雄[2]（[1]広島大生物生産，[2]広島大院生物圏科学）

**3E050　チルドうどんの食感の差を物性と構造の違いから解析**
◦徐　シキ[2]，山下紫緒里[1]，渡辺哲也[1]，中村　卓[1]（[1]明治大農・農化，[2]明治大院農・農化）

**3E051　温州ミカン果皮及び摘果ポンカン配合ヨーグルト中のノビレチンの分析**
◦福田直大[1]，玉井敬久[1]，永田洋子[1]，菅　忠明[1]，門家重治[1]，菅原卓也[2]，菊池泰三[3]，門田　歩[4]（[1]愛媛県産業技術研究所，[2]愛媛大学農学部，[3]四国乳業（株），[4]伊方サービス（株））

**3E052　相分離構造の異なる卵白・寒天共存ゲルにおける構造破壊によるアロマリリースの解析**
◦上川理絵，中村　卓（明治大院農・農化）

**3E053　ペプチドアレイによる新規コレステロール代謝改善ペプチドの探索評価と作用機構解析**
◦秋江祐希，久松賢太郎，柳瀬笑子，島田昌也，長岡　利（岐阜大学）

**3E054　アロエベラゲル抽出物による小腸上皮細胞の PPAR α 活性化が食後高脂血症に及ぼす影響**
◦渡邊奈津実[1]，高橋信之[2]，田中美順[3]，三澤江里子[3]，後藤　剛[1]，河田照雄[1]（[1]京大院農　食品生物，[2]東京農業大学　応用生物科学部，[3]森永乳業株式会社　素材応用研究所）

**3E055　炎症誘導が ApoE 欠損マウスの肝臓の病理学的特徴に及ぼす影響**
◦新保美里，梅ケ谷南，城内文吾，佐藤匡央（九大農）

**3E056　レチノイン酸受容体活性化を介した β-クリプトキサンチンの抗肥満作用の検討**
◦原　英之[1]，高橋信之[1,2]，高橋春弥[1]，杉浦　実[3]，後藤　剛[1,2]，河田照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物，[2]京大・生理化学研究ユニット，[3]農研機構　果樹研究所）

**3E057　クルクミンの機能性発現機構におけるタンパク質ストレス作用の関与**
◦村上　明[1,2,3]，今林健登[1]，村川　慧[1]，バレンティンシンディー[1]，中畑恵利奈[1]，大西康太[4]，入江一浩[1]（[1]京大院農・食品生物，[2]兵庫県大・環境人間，[3]兵庫県大・先端食科学研セ，[4]徳島大院・医歯薬学）

**3E058　ライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol の脂質低下作用**
◦林　洪太[1]，河合咲紀[1]，長田恭一[1]，高成　準[2]，北舘健太郎[2]（[1]明治大農，[2]アミノアップ化学）

**3E059　乳酸発酵豆乳中のイソフラボンとタンパク質は共存することで高コレステロール食投与ラットの脂質異常症を予防する**
◦小林麻貴[1]，江草信太郎[2]，福田　滿[3]（[1]兵庫大　健康科学，[2]マルサンアイ株式会社，[3]武庫川女子大・栄養科学研）

**3E060　ラットにおけるアルギン酸カルシウムの血中コレステロール低下作用**
◦荻原琢男[1]，井戸田陽子[1]，木暮悠美[1]，加藤多佳子[1]，小川真奈[2]，小林彰子[2]，柿沼千早[1]，矢野健太郎[1]，荒川　大[1]，宮島千尋[3]，笠原文善[3]（[1]高崎健大・薬，[2]東大院・農生科，[3]（株）キミカ）

**3E061　米タンパク質酵素分解物のマウス前駆脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用**
◦吉澤　瞳[1]，下田博司[2]，柏木　豊[1]，前橋健二[1]（[1]東京農大院・醸造，[2]オリザ油化株式会社）

**3E062　高脂肪食を与えたマウスに対するキサントフモール精製物の抗肥満作用**
◦高橋光輝，佐久間祐子，長田恭一（明大農）

**3E063　Chalcones suppress fatty acids-induced lipid accumulation through LKB1/AMPK pathway in hepatocytes**
◦Hitoshi ASHIDA[1]，Tianshun ZHANG[1]，Yoko YAMASHITA[1]，Norio YAMAMOTO[2]（[1]Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, [2]House Wellness Foods Corporation）

**3E064　米糠抽出物の摂取が閉経後ベトナム人女性の動脈硬化リスク因子に与える影響**
◦中島有里[1]，Vu Anh Linh[2]，伊藤幸彦[1]，由井　慶[1]，Bui Thi Nhung[3]，山本　茂[2]（[1]ファンケル総合研究所，[2]十文字学園女子大学大学院，[3]ベトナム国立栄養研究所）

**3E065　Tomatidine による肝細胞の脂肪蓄積抑制作用の解明とその作用機構の解析**
◦楠ひかり[1]，上久保綾祐[2]，赤川　貢[2]（[1]大阪府大・生命環境科学，[2]大阪府大院・生命環境科学）

**3E066　ビート種子由来フェノール性アミド化合物の 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用**
◦金沢　匠[1]，福士幸治[2]，菊地裕人[3]，知地英征[2,4]（[1]千葉県立保健医療大栄養，[2]北大院農，[3]日本甜菜製糖，[4]藤女子大食物栄養）

**3E067　キサントフモールによる転写因子 SREBP 活性抑制効果および分子機構の解明**
◦宮田慎吾，井上　順，SHIMIZU Makoto，佐藤隆一郎（東大院農生科・応生化）

**3E068　フコキサンチンによる初代培養白色脂肪細胞での UCP1 発現調節作用**
◦小舘めい，菅野翔伍，前多隼人（弘前大）

**3E069　パプリカ色素投与による食事性肥満マウスに対する効果，及び各種臓器へのカロテノイドの蓄積**
◦三上翔平，中村　望，前多隼人（弘前大農）

**3E070　MIG12 による ACC 発現調節機構の解析**
◦成田淳子，和泉彬子，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院・農生科・応生化）

**3E071　日本食の質の多様性が脂質蓄積に及ぼす影響**
◦岩垣ゆい，都築　毅（東北大院　農）

**3E072　べにふうき緑茶摂取のヒトにおける脂質代謝関連遺伝子発現調節作用**
◦平島亜沙美[1]，山下修矢[1]，花房俊昭[2]，山本(前田)万里[3]，立花宏文[1]（[1]九大院農院・生機科，[2]大阪医科大学，[3]農研機構・食総研）

**3E073　フコキサンチンの PPARs を介した脂質代謝調節**
◦金沢　功[1]，橋本堂史[2]，水野雅史[2]（[1]吉備国際大学，[2]神戸大学）

**3E074　大豆米糠発酵物(OE-1)の血糖上昇抑制における活性物質の解析**
◦加藤　亮[1]，熊倉　慧[1]，冨永隆生[2]，清水厚志[2]，松岡寛樹[1]（[1]高崎健大，[2](株)ラフィーネインターナショナル）

**3E075　ウメポリフェノールの高脂肪食誘導性肥満マウスにおける糖尿病予防効果**
◦永井宏平，劉　延平，吉田昂司，伊谷　強，東山瑞季（近大生物理工）

**3E076　膵 β細胞において S-エクオールは細胞膜で cAMP を産生して protein kinase A シグナルを活性化する**
◦堀内寛子[1]，原田直樹[1]，乾　博[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

**3E077　米ぬか由来ステロール配糖体が ApoE 欠損マウスの動脈**

硬化に及ぼす影響
◦宇田川賢太[1]，大村妃代[1]，船戸里香[2]，中島有里[3]，奥原康英[3]，太田慶彦[3]，石川純嗣[3]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大・生資科・生命化，[2]日本大院・生資科・応生科，[3]ファンケル総合研究所）

**3E078　小腸におけるビタミン E 吸収活性の性差の解析**
◦佐藤遼太[1]，熊谷　悠[1]，藤田尚子[1]，井上佳奈[2]，長谷川由希子[2]，長田恭一[2]，林　洪太[1]，竹中麻子[2]（[1]明大院農，[2]明大農）

**3E079　鉄欠乏がラット小腸各部位の Hcp1/Pcft, HO-1, Fpn1 mRNA 発現に及ぼす影響**
◦東　雄貴，陳　風霞，篠田粧子（首都大院・人間健康科学）

**3E080　酸性乳飲料は牛乳よりも水分吸収が速く，糖質・電解質飲料よりも水分が体内に長く保持される**
◦伊藤健太郎，津田悠一，山口　真，山地健人，谷口　茂（(株)明治　食機能科学研）

**3E081　根菜類抽出成分による血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果**
◦黒田　怜，南　雄二，加治屋勝子（鹿大農）

**3E082　小型魚類における摂餌量測定と摂餌誘引評価への応用**
◦笹渕和樹，菅原沙恵子，小川智久，村本光二（東北大･院生命科）

**3E083　難消化性二糖 Melibiose 摂食によるケルセチン配糖体吸収促進作用について**
◦小泉光可，原　　博，田中誠也（北大院農・応生科）

**3E084　機能性大麦 BARLEYmaxTM の整腸効果について**
◦北薗英一[1]，妹脊和男[1]，楠　桃子[2]，松井輝明[2]（[1]帝人株式会社新事業推進本部，[2]帝京平成大学　健康メディカル学部　健康栄養学科）

**3E085　*Lactobacillus casei* 327 の経口摂取によるマウスの糞の軟化と腸管セロトニンレベルの上昇**
◦三原敏敬[1]，渡邉由梨子[2]，熊谷武久[1]，城斗志夫[3]，原　　崇[3]（[1]亀田製菓，[2]新潟大院自然科学，[3]新潟大農）

**3E086　L-トリプトファンおよび L-プロリンがマウス腸管上皮細胞のサイトカイン産生応答に与える効果**
◦羽多野安曇，青木綾子，戸塚　護（東大院農生科・応生化）

**3E087　ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide によるタンパク質分解系を介した 第一相薬物代謝酵素 CYP2E1 発現抑制機構の解明**
◦荒木彩花，矢口真実，奥江紗知子，細野　崇，関泰一郎（日本大院・生資科・応生化）

**3E088　ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide の抗炎症作用メカニズムの解明**
◦奥江紗知子[1]，今井孝俊[1]，日吉滉平[1]，荒木彩花[1]，矢口真実[1]，船戸里香[1]，林　浩和[2]，小島貴之[2]，横山令奈[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院・生資科・応生科，[2]日本大・生資科・生命化）

**3E089　光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発**
◦數村公子[1]，原　顕子[1]，ウーユーチュー[2]，土屋広司[1]，美和登志幸[1]，森下直計[3]，大澤俊彦[4]（[1]浜松ホトニクス・中研，[2]ヘルスケアシステムズ，[3]浜松ホトニクス･電子管，[4]愛知学院大･心身）

**3E090　腸間膜リンパ節樹状細胞の RALDH 活性および腸管指向性ホーミングレセプター誘導能の加齢による変化**
◦高野智弘[1,2]，上滝隆太郎[1,2]，宮川拓也[1]，朴　知賢[1]，塩河亜弥[1,2]，好田　正[3]，足立(中嶋)はるよ[2]，田之倉優[1]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生化・食の安全研セ，[3]東農工大農・応生化）

**3E091　ケルセチンの摂取は食餌性肥満モデルにおける精巣上体脂肪組織の炎症を抑制する**
◦小堀真珠子，高橋弓子，桜井　睦，秋元由香里，大池秀明，一法師克成（農研機構　食総研）

**3E092　スギ花粉症モデルマウスに対するフロロタンニンの抑制効果**
◦杉浦義正，太田怜吾，谷口凌佑，古家圭祐，臼井将勝，宮田昌明（水大校 食品科学）

**3E093　イチジク茶抗アレルギー作用の生体効果と有効成分の探索**
◦阿部竜也，西村耕作，高橋　徹，沖浦　文（公益財団法人 東洋食品研究所）

**3E094　*Lactococcus lactis* T21 株の花粉症に対する効果**
◦砂田洋介[1]，上原和也[1]，大木篤史[1]，中山俊憲[2]，青木玲二[3]，鈴木チセ[3]，田中　充[1]，松尾伸二[1]，田辺創一[1]（[1]日清食品 HD・グローバルイノベーション研究センター，[2]千葉大院･医学研究院，[3]農研機構・畜草研）

**3E095　LPS で刺激した RAW264.7 細胞に対する 12 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体の作用**
◦仁科淳良[1]，鈴木啓太[1]，浮谷基彦[1]，深津　誠[1]，二ノ宮真之[2]，纐纈　守[2]（[1]日大理工，[2]岐阜大工）

**3E096　なたまめ茶摂取によるアレルギー症状の QOL 改善効果**
◦藤田美華[1]，関口博太[1]，竹田竜嗣[2]，森　充子[3]，宇住晃治[1]，須藤慶太[1]（[1]株式会社ライフ・サイエンス研究所，[2]株式会社 TES ホールディングス，[3]一般社団法人オリエンタル労働衛生協会）

**3E097　米タンパク質酵素分解物の RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制作用**
◦都能諒太[1]，曽根田祐太[1]，下田博司[2]，柏木　豊[1]，前橋健二[1]（[1]東京農大院・醸造，[2]オリザ油化株式会社）

**3E098　紫外線 B 波照射により誘導されるヘアレスマウスの皮膚障害に対する芳香族ピルビン酸の防御効果**
◦青木玲二[1]，青木綾子[2]，鈴木チセ[1]，高山喜晴[1]（[1]農研機構・畜草研，[2]東大院農生科）

**3E099　*Kaempferia parviflora* に含まれるポリメトキシフラボンの抗アレルギー作用**
◦小林彰子[1]，加藤太朗[1]，東　鋭明[2]，阿部啓子[1,3]，菊崎泰枝[4]（[1]東大院農，[2]阪市大院・栄養，[3]KAST，[4]奈良女・栄養）

**3E100　マイタケ由来エルゴステロール誘導体の RBL-2H3 マスト細胞に対する脱顆粒抑制作用**
◦森光一郎[1]，樋口侑夏[2]，川井絢矢[1]，大内謙二[1]，廣田　満[2]（[1]ホクト，[2]信州大農）

**3E101　β-クリプトキサンチン高含有ミカンジュースが食餌誘導肥満マウスの炎症応答と盲腸内細菌叢に及ぼす影響の解析**
◦荻田　佑，若木　学，渡辺　純，後藤真生，石川(高野)祐子（農研機構　食総研）

**3E102　水熱処理法で精製した黒酵母 β グルカンによるマクロファージ活性化の抑制**
◦正林由美[1]，林　信行[1]，福留健司[2]，近藤修啓[3]（[1]佐大･農，[2]佐大･全教，[3]伊藤忠製糖）

**3E103　樹状細胞において RALDH2 発現を亢進する食品成分の探索**
◦山口昌樹，八代拓也，笠倉和巳，西山千春（東京理科大･基礎工）

**3E105　シトラスペクチンによる食物アレルギー予防効果の検討**
◦岩城佳那，矢部富雄，北口公司（岐阜大院・応生科・応用生命）

**3E106　塩酸処理小麦タンパク質含有石鹸使用による経皮感作成立の要因解明**
◦松風成美，藤井礼佳，土井　栞，阿部竜典，赤尾　真，熊谷日登美（日大）

**3E107　Jurkat 細胞の IL-2 産生能に対する PMA 処理の影響**
◦大沼祐人，服部　誠，好田　正（東農工大農・応生化）

**3E108　クリルオイルは軽度膝関節痛に対して改善効果がある**
◦鈴木良雄[1,2]，福嶋　稔[3,4]，櫻庭景植[1,2,3]，澤木啓祐[1,2]，関川和晃[1]（[1]順大院スポーツ健康科学，[2]順大スポーツ健康科学，[3]順大医整形外科，[4]福島整形外科病院）

**3E109　ハニーブッシュ抽出物の免疫調節機能の解析**
◦村上詩歩，服部　誠，好田　正（東農工大農・応生化）

**3E110　腸内細菌叢の有無によるマウス由来血清エキソソーム構成の違い**
◦宇都侑莉子[1]，青木綾子[2]，青木玲二[3]，園山　慶[4]，戸塚　護[2]（[1]東大・農，[2]東大院・農生科，[3]農研機構・畜草研，[4]北大院・農）

**3E111　香辛料による免疫賦活効果の検討**
◦西本壮吾[1]，佐々木藍美[1]，平野里枝[1]，恩田浩幸[2]，菅原卓也[3]（[1]石川県大，[2]エスビー食品(株)，[3]愛媛大・農）

**3E112　*Leuconostoc mesenteroides* NTM048 が産生する菌体外多糖(EPS)の摂取は乾癬を予防・軽減する**
◦畑堀　翔[1]，久　景子[2]，米島靖記[2]，鈴木卓弥[1]（[1]広島大院生物圏科学，[2]日東薬品工業株式会社 研究開発本部）

**3E113　*Lactococcus lactis* C59 株由来莢膜多糖の免疫調節機能**
◦山田剛史[1]，青木綾子[1]，青木玲二[2]，野村　将[2]，鈴木チセ[2]，

戸塚　護[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・畜草研）

**3E114　Investigation of immunologically functional Okinawan bioresource**

◦Biligsaikhan BILIGT[1]，Makoto MIYAGI[1]，Ipputa TADA[1]，Inoue YUICHI[2]，Kawahara HIROHARU[2]，Ikematsu SHINYA[1]（[1]National institute of technology, Okinawa college, [2]National institute of technology, Kitakyushu college）

**3E115　短期間の高脂肪食摂取によってマウスの腹腔内脂肪におけるリポ多糖結合タンパクの発現が増加する**

◦関　真実[1]，三輪秋穂[2]，鶴田剛司[3]，園山　慶[4]（[1]北大農，[2]北大院生命，[3]岡山大農，[4]北大院農）

**3E116　制御性 B 細胞の IL-10 産生増強効果を示すフラボノイドの作用機構の解析**

◦堀内準矢[1]，葉　鎮豪[1]，清水　誠[1,2]，戸塚　護[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東京農大・応生・栄養）

**3E117　*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 で発酵したヨーグルトのアジュバント効果とそのメカニズムの検証**

◦逸見　隼，千葉芳香，中村真梨枝，牧野聖也，狩野　宏（株式会社 明治）

**3E118　Effect of extracts from different parts of pomegranate on chemokine expression by mouse intestinal epithelial cells.**

◦PENG LI[1]，AYAKO AOKI[1]，HIDEYUKI ITO[2]，MAMORU TOTSUKA[1]（[1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Okayama Pref. Univ.）

**3E119　ユズ果皮抽出物摂取による食物アレルギー緩和効果**

◦小林みさき，手東奈央，東　徳洋，山田　潔（宇都宮大農）

**3E120　ボイセンベリーポリフェノールによる脂質代謝調節を介した抗炎症作用**

◦古内　亮[1]，斎藤雅史[2]，前島大輔[1]，横山忠幸[1]，西田浩志[2]（[1]ブルボン・健康科学研，[2]新潟薬大・応用生命）

**3E121　SIRT1 を増強するアンチエイジング乳酸菌の同定とその機能性検証**

◦山口大貴[1]，味志美穂[2]，高田洋樹[4]，片倉喜範[1,2,3]（[1]九大院・シス生，[2]九大院・生資環，[3]九大院・農院，[4]江崎グリコ）

**3E122　昆布の新規生理機能の開拓**

◦白杉一郎[1]，松井隆史[1]，伝宝啓史[1,2]，榊原陽一[3]，水光正仁[3]（[1]株式会社くらこん，[2]株式会社くらこんホールディングス，[3]宮崎大・農・応生科）

**3E123　フェルラ酸エステルの Hsp70 発現誘導を介する神経細胞保護効果**

◦丹治典子，片山　茂，三谷塁一，真壁秀文，中村宗一郎（信大院農）

**3E124　老化促進マウス SAMP8 における緑茶品種「サンルージュ」の認知機能保護効果**

◦和才昌史[1,2]，村田　希[2]，野中遥奈[2]，河岡明義[1]，立花宏文[2]（[1]日本製紙（株），[2]九大院・農院・生機科）

**3E125　大豆ペプチドに含まれる神経保護効果を有する機能性ペプチドの同定**

◦清水綾乃[1]，片山　茂[1]，前渕元宏[2]，三谷塁一[3]，中村宗一郎[1]（[1]信大農，[2]不二製油株式会社，[3]信州大 . 先鋭領域融合研究群）

**3E126　トコトリエノールによる細胞老化の抑制作用**

◦永塚貴弘[1]，舘脇直人[1]，西田浩志[1]，仲川清隆[2]，宮澤陽夫[3]（[1]新潟薬大・応用生命，[2]東北大院農・機能分子解析，[3]東北大・未来科学技術共同研究センター）

**3E127　レスベラトロール 3-*O*-α-グルコシドの諸性質**

◦杉本和久，三瓶春代，鷹羽武史，栗木　隆（江崎グリコ（株）健康研）

**3E128　光照射を用いた食品のヒドロキシラジカル消去能**

◦阿部　準，高橋有志，西川佳子，中里孝史（日本食品分析センター）

**3E129　ウロリチン誘導体の機能開拓に関する研究（第 2 報）－ヒト産生試験－**

◦中島賢則[1]，矢ヶ崎秀雄[1]，山本浩明[1]，伊東秀之[2]（[1]ダイセル・コーポレート研，[2]岡山県大・保健福祉）

**3E130　Effect of Oolong Tea Polyphenol on Low-Density Lipoprotein Oxidation *In Vitro***

◦Enkhtsetseg Sukhbold，Shogo Sekimoto，Emiko Watanabe，Akane Yamazaki，Lifeng Yang，Hirofumi Arai（Kitami Institute of Technology）

**3E131　セサモールを用いたアフィニティークロマトグラフィーの作成**

◦玉巻沙季子，工藤絵美，勝崎裕隆（三重大院・生資）

**3E132　マガキ由来抗酸化物質による抗酸化酵素群の遺伝子発現**

◦布田博敏[1]，上甲紗愛[1]，渡邉　貢[2]，恵　淑萍[1]，武田晴治[1]，渡邉孝之[2]，千葉仁志[1]（[1]北海道大学大学院 保健科学研究院，[2]株式会社渡辺オイスター研究所）

**3E133　ゼブラフィッシュにおける酸化ストレス応答とヒスチジン含有ペプチドの抗酸化特性**

◦下岡千尋[1]，大山結香[1]，小川智久[1]，村本光二[1]，鈴木　徹[2]，数村公子[3]（[1]東北大院生命，[2]東北大院農，[3]浜松ホトニクス中研）

**3E134　鶴の子柿を原料とした柿酢の機能性**

◦上野義栄[1]，植村亮太[1]，高野慶一[2]（[1]京都府中小企業セ，[2]宇治田原むく福祉会）

**3E135　β2 アドレナリン受容体の発現を制御し筋萎縮を予防する食品成分の探索**

◦近澤未歩，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大農）

**3E136　発酵乳ケフィアの抗酸化活性と筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果**

◦松元拓也[1]，原田大輔[2]，徳丸浩一郎[3]，白畑實隆[1,2,4]，照屋輝一郎[1,2,4]（[1]九大院シス生，[2]九大院生資環，[3]日本ケフィア，[4]九大院農院）

**3E137　リポソームを用いた抗酸化能評価と抗酸化物の Median effect analysis による併用効果解析**

◦山内良子，世古なぎ，圓口睦子，小林弘司，石川洋哉（福岡女子大 国際文理）

**3E138　カルノシンによるアンチエイジングシグナル活性化効果**

◦久保智里[1]，藤井　薫[2]，松本貴之[3]，片倉喜範[4]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・シス生，[3]日本ハム中央研究所，[4]九大院・農院）

**3E139　SIRT6 活性化食品の探索とその機能性解明**

◦松岡沙季[1]，藤田幸佑[1]，西田典永[3]，長友暁史[3]，田中幸雅[3]，伊東秀之[4]，片倉喜範[1,2]（[1]九大院・生資環，[2]九大院・農院，[3]森下仁丹，[4]岡山県大保福）

**3E140　オートファジー誘導食品の探索とその機能性**

◦小野友愛[1]，西田典永[2]，長友暁史[2]，田中幸雅[2]，伊東秀之[3]，片倉喜範[4]（[1]九大院シス生，[2]森下仁丹株式会社，[3]岡山県大保福，[4]九大院農院）

**3E141　米麹（糀）の抗酸化活性と関連する機能性化合物の探索**

◦中島加奈子[1]，山崎京子[2]，木戸みゆ紀[3]，林真由美[3]，野村一樹[3]，井口晃徳[3]，重松　亨[3]（[1]新潟薬大・産官学，[2]山崎糀屋，[3]新潟薬大・応生科）

**3E142　賀茂茄子のポリフェノール抽出量増加手法の検討**

◦内田健太郎[1]，冨田晴雄[1]，礒野浩太[2]，城田浩治[2]，三村　裕[2]，竹森利和[1]（[1]大阪ガス株式会社，[2]京都府農林水産技術センター）

**3E143　カシス水溶性抽出物の紫外線ダメージ抑制効果の検討**

寺下美穂[1]，加藤陽治[2]，◦山本　歩[1]（[1]八戸工業高等専門学校，[2]弘前大教育）

**3E144　低濃度白金ナノ粒子による細胞内抗酸化活性化機構の解明**

◦石井ふらの[1]，濱崎武記[3]，樺山　繁[4]，照屋輝一郎[1,2,3]，白畑實隆[1,2,3]（[1]九大院生資環，[2]九大院シス生，[3]九大院農院，[4]日本トリム）

**3E145　老化皮膚モデル細胞を用いたコンドロイチン硫酸の有効性評価**

◦田中寛奈，渡邊准子，中谷祥恵，古旗賢二，和田政裕（城西大学）

**3E146　酒粕の抗酸化性に及ぼす精米歩合および貯蔵条件の影響**

◦谷本昌太，岩佐美月，近藤留未，馬渕良太（県立広島大人間文化）

**3E147　Antioxidant Effect of Yabumame Bean Extract on Low-Density Lipoprotein Oxidation *In Vitro* and Structural Characterization of Major Isoflavonoids in the Extract**

◦LIFENG YANG[1]，TAKASHI YAMAGISHI[1]，SHOGO SEKIMOTO[1]，KENJI FUKUNAGA[2]，ATSUYUKI HISHIDA[3]，HIROFUMI ARAI[1]（[1]Kitami Institute of Technology, [2]Kansai Univ., [3]National Institute of Biomedical Innovation）

**3E148　小腸各部位の *Dmt1* スプライシング異性体 mRNA 発現に及ぼす鉄欠乏の影響**

◦有田安那[1,2]，篠田粧子[1]（[1]首都大院・人間健康科学，[2]十文字女

子大・健康栄養）

**3E149　ピロロキノリンキノン（PQQ）による乳酸デヒドロゲナーゼの新規反応制御機構**

◦三宅佑季[1]，峰松謙治[2]，柴田貴広[3]，近藤竜彦[3]，石井剛志[4]，内田浩二[3]，赤川　貢[2]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大院・生命環境，[3]名古屋大院・生命農，[4]神戸学院大・栄養）

**3E150　鉄欠乏状態が細胞老化と細胞内浄化機構オートファジーに及ぼす影響**

◦井上博文[1]，小林謙一[2]，鈴木　司[2]，山本祐司[2]，勝間田真一[3]，勝間田（坪井）理恵[1]，高橋信之[1]，上原万里子[1]（[1]東京農大・応生・健康，[2]東京農大・応生・化学，[3]東京農大・応生・栄養）

**3E151　腎臓中ビタミン D 活性化酵素（CYP27b1）に及ぼす鉄欠乏の影響**

◦塙　信彰，井上博文，高橋信之，上原万里子（東農大院）

**3E152　ビタミン E 同族体が培養膵 β 細胞のインスリン分泌能に与える影響**

◦佐藤春香[1]，近松出穂[1]，市　育代[1]，曽根保子[2]，藤原葉子[1]（[1]お茶の水女子大学，[2]高崎健康福祉大学）

**3E153　CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の骨形成および生殖機能に対する生理作用の検討**

◦高松将士[1]，西川美宇[1]，安田佳織[1]，青木健悟[1]，生城真一[1]，中川公恵[2]，津川尚子[3]，岡野登志夫[2]，榊　利之[1]（[1]富山県大，[2]神戸薬大，[3]大阪樟蔭女子大）

**3E154　L-シトルリンの疲労軽減による運動パフォーマンス向上効果**

◦松川隼也[1]，佐藤　薫[1]，本嶋秀子[2]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大北アフリカ研究センター，[3]筑波大生命環境系）

**3E155　緑茶摂取はヒトにおいて血液凝固阻害因子 TFPI の産生を促進する**

◦高倉卓也[1]，上崎浩克[1]，山下修矢[1]，山本（前田）万里[2]，栗山進一[3]，立花宏文[1]（[1]九大院農院・生機科，[2]農研機構・食総研，[3]東北大・IRIDeS）

**3E156　水溶性食物繊維は高脂肪食摂取ラットの大腸 Alkaline phosphatase 活性を増加させる**

◦岡崎由佳子[1]，関田彩夏[1]，田中　文[1]，清水寿夫[2]，知地英征[1]，加藤範久[3]（[1]藤女子大，[2]清水化学（株），[3]広島大・生物圏科学）

**3E157　アンカー型イソマルトメガロ糖を用いたフラボノイドの可溶化とバイオアベイラビリティの向上**

◦今井裕介[1]，鈴木志保[1]，木村淳夫[2]，飯塚貴久[3]，藤本佳則[3]，原　博[2]，北村進一[1]（[1]大阪府大院　応用生命，[2]北大農，[3]日本食品化工）

**3E158　マラリア原虫 *Plasmodium berghei* 感染 ICR マウスにおける硫酸化多糖の抗マラリア効果**

◦嘉正雄太，橋本堂史，藍原祥子，水野雅史（神戸大院・農）

**3E159　テオフィリンによる脂肪細胞由来の炎症性アディポカインの発現抑制機構の解析**

◦三谷塁一[1,2]，片山　茂[3]，中村宗一郎[3]，芦田　均[2]（[1]信州大・先鋭領域融合研究群，[2]神大院・農，[3]信州大院・農）

**3E160　ラクトフェリン＋ラクトパーオキシダーゼ配合食品の摂取による感冒症状に及ぼす影響**

◦新光一郎[1]，若林裕之[1]，杉田千泰[2]，吉田裕樹[2]，佐藤圭創[2]，園田　徹[3]，山内恒治[1]，阿部文明[1]，黒川昌彦[2]（[1]森永乳業素材応用研，[2]九州保福大薬，[3]九州保福大保健管理センター）

**3E161　クロレラのロタウイルス増殖阻害効果**

◦中島綾香[1]，曽我部りほ[2]，金城次雄[3]，石垣勝己[3]，鈴木健吾[1]，伊勢川裕二[2]（[1]株式会社ユーグレナ，[2]武庫川女子大学生活環境学部，[3]八重山殖産株式会社）

**3E162　微細藻類，Nostoc 属の抗発ガン性について**

◦小原章裕[1]，和仁麻依佳[1]，川村磨史[1]，山口裕司[2]，竹中裕行[2]，湊健一郎[1]（[1]名城大農，[2]MAC 総合研究所）

**3E163　大豆イソフラボンの PAPD5 依存的な microRNA 発現調節作用**

◦山下修矢，林イチェン，小松智美，立花宏文（九大院・農院・生機科）

**3E164　アロエステロール含有ヨーグルト摂取による皮膚に及ぼす影響**

◦田中美順，三澤江里子，齊藤万里江，鍋島かずみ，山内恒治，阿部文明（森永乳業　素材応用研）

**3E165　米糠ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素および細胞内グルタチオンに対する影響**

◦畑中唯史[1]，藤田明子[2]，川上晃司[2]，川上賀代子[3]，守谷智恵[3]，坪井誠二[3]（[1]岡山生物研，[2]株式会社　サタケ，[3]就実大学）

## F：微生物

**3F001　運動性を示す *Lactobacillus agilis* のマウス腸管への定着と局在**

◦鎌田美帆[1]，田中尚人[2]，岡田早苗[1]，梶川揚申[1]（[1]東農大応生科・化学，[2]東農大・菌株）

**3F002　家畜の生産性を向上させる新規プロバイオティクス細菌，*Bacillus hisashii* N-11$^{T}$**

◦渡邉　凌[1]，西田彩夏[1]，宮本浩邦[1,2,3,4]，堀内三吉[5]，森田英利[6]，福田真嗣[7,8]，大野博司[8,9,10]，市野瀬志津子[11]，宮本　久[3]，児玉浩明[1]（[1]千葉大院融合，[2]（株）日環科学，[3]（株）三六九，[4]慶大医，[5]医科歯科大医歯学総合，[6]岡大院環境生命，[7]慶大先端生命研，[8]理化学研究所，[9]横市大院ナノバイオ，[10]千葉大院医，[11]医科歯科大医歯学総合研）

**3F003　インドネシア原産微細藻類による抗酸化活性物質の生産**

◦岡田和也[1]，Susilaningsih Dwi[2]，関口弘志[1]，川崎浩子[1]，鈴木健一朗[1]（[1]（独）製品評価技術基盤機構（NBRC），[2]インドネシア科学院（LIPI））

**3F004　Characterization of a novel bacterium species isolated from thermophilic compost prepared from marine animal resources material**

◦Clament CHIN[1]，Pramod POUDEL[1]，Hirokuni MIYAMOTO[2]，Yuki OKUGAWA[1]，Yukihiro TASHIRO[1]，Kenji SAKAI[1]（[1]Fac. Agric., Kyushu Univ.，[2]Japan Eco-science Co. Ltd.，）

**3F005　ミャンマー産発酵食品からの共培養による乳酸菌の分離とその発酵特性**

◦乙黒美彩[1]，前田康太郎[1]，標　智仁[2]，岸本宗和[1]，安藤勝彦[3]，Nyunt Phay[4]，早川正幸[5]，柳田藤寿[1]（[1]山梨大院・ワイン研，[2]山梨大・COC，[3]NBRC，[4]パテイン大学，[5]山梨大院・生命）

**3F006　Screening of lanthanum-dependent methylotrophs**

◦HAOXIN LYU，AKIO TANI（IPSR Okayama Univ.）

**3F007　3,4-OH-DAP および OH-Glu を有する放線菌 *Rhizocola hellebori* K12-0602$^{T}$ 株の細胞壁ペプチドグリカン構造解析**

◦武　晃[1]，中島琢自[2]，稲橋佑起[2]，廣瀬友靖[1,2]，塩見和朗[1,2]，大村　智[2]，高橋洋子[2]，松本厚子[1,2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研）

**3F008　地熱環境から単離した好熱性繊維状ファージの特性解析**

◦永吉佑子[1]，熊谷健太[1]，相川浩輝[1]，藤野泰寛[2]，土居克実[3]（[1]九大院・生資環，[2]九大・基幹，[3]九大院・農）

**3F009　RFLP を用いた簡易的 *Lactobacillus* 属菌種同定法の確立とその応用**

◦吉川悠子[1,2]，田中実穂[1]，大橋典男[1]（[1]静県大食品栄養，[2]日獣大獣医）

**3F010　MALDI-TOF MS による嫌気性微生物の識別**

◦細田晃文，加藤ひとみ，鈴木真弓，田村廣人（名城大農）

**3F011　南極淡水氷河湖におけるバクテリア・アーキア・真核微生物群集構造の解析**

◦茶屋　葵[1]，川又明徳[2]，伊村　智[3]，黒沢則夫[1]（[1]創価大学大学院，[2]愛媛県総合科学博物館，[3]国立極地研究所）

**3F012　金属鉄を電子源として利用する有用物質生産菌の探索**

◦井上達也[1]，平野伸一[2]，松本伯夫[2]，新井博之[1]，石井正治[1]（[1]東大農，[2]電中研）

**3F013　ゲノム情報を用いたアプローチによる酢酸菌 *Komagataeibacter* 属の分類学的位置付けの検証**

◦新村梨恵[1]，松谷峰之介[2]，石川森夫[1]，矢吹　岳[1]，海野祥子[1]，志波　優[3]，鈴木治夫[4]，平川英樹[5]，吉川博文[3,6]，松下一信[2]，小泉幸道[1]，貝沼（岡本）章子[1]（[1]東京農大・応生科醸造，[2]山口大・農，[3]東京農大・ゲノムセンター，[4]山口大・院・理工，[5]かずさDNA 研，[6]東京農大・応生科バイオ）

**3F014　芳香族化合物分解コンソーシアムに存在する非分解菌の**

分解菌に対する効果
◦小川なつみ，加藤広海，大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝 （東北大院生命科学）

**3F015　フェナントレン分解コンソーシアム MixEPa4 における構成細菌間の相互作用**
◦守屋　梓，　小川なつみ，　加藤広海，　大坪嘉行，　永田裕二，津田雅孝 （東北大院生命科学）

**3F016　有機質肥料活用型養液栽培に適した微量要素供給剤の開発 2**
◦篠原　信[1]，　太田香菜子[5]，　藤原和樹[1]，　安藤晃規[2]，　宮本憲二[3]，加藤康夫[4]，浅川　晋[6]，小川　順[2]，高野雅夫[5] （[1]農研機構，[2]京大院農・応用生命，[3]慶大・理工，[4]富山県立大工，[5]名大院・環境，[6]名大院・生命農）

**3F017　Investigation of organic compounds-mineralizing conditions by designed microbial consortia**
◦Sakuntala SAIJAI[1]，　Akinori Ando[1,2]，　Yuki Shimura[1]，Makoto Shinohara[3]，Jun Ogawa[1,2] （[1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.，[2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.，[3]NARO）

**3F018　酸性鉱山廃水処理システムにおける微生物群集構造の高解像度解析**
◦青柳　智，堀　知行，稲葉知大，Navarro Ronald，愛澤秀信，尾形　敦 （産総研・環境管理）

**3F019　超高感度 rRNA-Stable Isotope Probing による未知環境微生物群の機能解析**
◦堀　知行[1]，青柳　智[1]，田中亮一[2]，尾形　敦[1] （[1]産総研・環境管理，[2]熊本県・産技セ）

**3F020　*Leucobacter* 属 ASN212 株に対する増殖活性因子としての porphyrin 類金属錯体の構造活性相関研究**
◦高井亮吾，モハンマドナズルールイスラムブイヤン，重冨顕吾，鎌形洋一，生方　信 （北大院農）

**3F021　高脂肪食における難消化性オリゴ糖 DFAIII と FOS の投与による腸内細菌叢の比較評価**
◦鳶　諒介，　石上純佳，　北川　航，　曾根輝雄，　鎌形洋一，石塚　敏，原　　博，浅野行蔵 （北大農）

**3F022　超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来細胞外多糖の構成糖解析**
◦小原薬子，阿形朋子，三輪京子，森川正章 （北大院・環境）

**3F023　分裂酵母 *ura4* 遺伝子破壊株が受ける培地成分の影響の解析**
◦西野耕平，櫛間満咲，松尾安浩，川向　誠 （島根大・生物資源・生命工）

**3F024　*Pseudomonas* 属細菌の細胞離散に関与する因子の同定**
◦土田大暁，鈴木誉士，上田賢志，高野英晃 （日大生資科）

**3F025　分裂酵母の窒素源カタボライト抑制を解除する分泌性活性物質の同定**
◦孫　暁穎[1,2]，八代田陽子[1,3]，平井　剛[4,5]，植木雅志[6]，廣田　洋[3]，王　倩倩[5]，　本郷やよい[7]，　中村健道[7]，　人羅勇気[1]，　高橋秀和[8]，袖岡幹子[4,5]，長田裕之[9]，浜本牧子[2]，吉田　稔[1,3] （[1]理研・化学遺伝学，[2]明治大院・農，[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス，[4]理研・有機合成，[5]理研 CSRS・触媒・融合，[6]理研・ナノ医工学，[7]理研 CSRS・分子構造解析，[8]山口大院・医，[9]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

**3F026　枯草菌の中央代謝系と脂質代謝系を共役させる新規制御機構の解析**
◦多喜乃雄太[1]，　高田　啓[2]，　兼崎　友[3]，　渡辺　智[1]，　千葉櫻拓[1]，吉川博文[1,3] （[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]立教大・理・生命理，[3]東京農大・ゲノム解析セ）

**3F027　細菌細胞はプラスミド保持に伴う負荷にどう適応するのか？**
◦河野　響，久保　彩，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭 （東大・生物工学セ）

**3F028　枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析**
◦大坂夏木[1]，　高田　啓[3]，　多喜乃雄太[1]，　兼崎　友[2]，　渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，吉川博文[1] （[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]立教大・理・生命理）

**3F029　絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の $O_2$ 存在下における生育停止機構に関する研究**
◦岡田拓也，　赤間拓海，　浦本　勲，　長田裕暉，　関根悠太，新村洋一，川崎信治 （東農大 バイオ）

**3F030　*Cladosporium cladosporioides* の加熱損傷胞子の発育特性**
◦原田真美[1]，　堀切茂俊[2]，　坂元　仁[3]，　土戸哲明[3]，　古田雅一[1,3] （[1]大阪府大院工，[2]パナソニックエコシステムズ（株）・R & D，[3]大阪府大・放研セ）

**3F031　*Amphibacillus xylanus* の好気代謝における遊離フラビンと SH 化合物に関する研究**
◦木俣真弥[1]，　名須川哲哉[1]，　及川雅人[1]，　新地大輔[1]，　富塚　駿[1]，吉村悦郎[2]，　有賀智子[2]，　阿部　晃[3]，　武田晃治[4]，　佐藤純一[1]，川崎信治[1]，新村洋一[1] （[1]東農大応生科・バイオ，[2]東大院・農生科・応生科，[3]札幌医大医・眼科，[4]東農大・教職）

**3F032　*Bacillus subtilis* 芽胞の発育に及ぼす香辛料精油成分の影響**
◦阪井俊夫[1]，古田雅一[1,2]，土戸哲明[2] （[1]大阪府大院・工，[2]大阪府大・地域連携研）

**3F033　CO2 耐性を持つ微細藻類の探索**
◦渡邉一樹，藤井克彦 （山口大学）

**3F034　赤色光照射による *Nostoc commune* の培養速度改善**
◦荒西佳織，河原秀久 （関西大化生工）

**3F035　麹菌 *A. oryzae* における核の自食機構ヌクレオファジーの解析**
◦三谷隆宏，菊間隆志，北本勝ひこ （東大院・農生科・応生工）

**3F036　対数期における *Lactobacillus gasseri* JCM 1131$^T$ のリポテイコ酸の局在**
◦白石　宗[1]，　横田伸一[1]，　佐藤耶舞羽[2]，　伊藤利章[2]，　吹谷　智[2]，山本　聡[1]，小笠原徳子[1]，佐藤豊孝[1]，横田　篤[2] （[1]札医大医，[2]北大院農）

**3F037　分裂酵母の胞子の細胞膜は Rab と SPB の相互作用によって形成される**
◦今田一姫，中村太郎 （阪市大院理）

**3F038　正確な染色体分配を保証する微小管アンカーリングの分子機構**
◦湯川格史[1,2] （[1]広島大，[2]英国癌研究所）

**3F039　真核微生物における AipA 様 AAA ATPase の機能解析**
◦樋口裕次郎，柿本健一，宋　原準，竹川　薫 （九大農）

**3F040　ウェルシュ菌はメンブランベシクルを介して宿主免疫応答を誘導する**
◦永山恭子[1]，　尾花　望[1]，　中尾龍馬[2]，　泉福英信[2]，　中村幸治[1]，野村暢彦[1] （[1]筑波大・院・生命環境，[2]国立感染研・細菌第一）

**3F041　ヒスチジンキナーゼ HysA による糸状菌ミトコンドリアの機能制御**
◦平川卓実，　金丸京子，　稲葉真友子，　林　早紀，　小島憲介，木村　真，小林哲夫 （名大院生命農）

**3F042　*Lactobacillus* 属における細胞壁テイコ酸の金属保持とその役割**
◦森脇涼平[1]，田中尚人[2]，梶川揚申[3]，岡田早苗[3] （[1]東農大院農，[2]東農大菌株，[3]東農大応生科）

**3F043　新規単離極限環境紅藻の Mn 耐性関連遺伝子の探索**
◦小田しおり[1]，　重信直人[1]，　兼崎　友[2,5]，　渡辺　智[1]，　千葉櫻拓[1]，笠原浩司[3]，三角修己[4,5]，吉川博文[1,5] （[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]東京農大・アイソトープ，[4]山口大・院・医，[5]CREST）

**3F044　出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構における NAD(H) キナーゼの機能と役割の解明**
◦高木哲史[1]，　河井重幸[2]，　村田幸作[3]，　奥　公秀[2]，　由里本博也[2]，阪井康能[2]，早川享志[1]，中川智行[1] （[1]岐阜大応生，[2]京都大院農，[3]摂南大理工）

**3F045　Thiamine is an important factor for acetaldehyde tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae***
◦Annisyia Zarina Putri，Nodoka Kubota，Takashi Hayakawa，Tomoyuki Nakagawa （Gifu Univ.）

**3F046　オカラ抽出物に含まれる *Bacillus* 芽胞形成誘導物質の探索，単離精製，構造決定**
◦池田　陽，KIM Dongyeop，橋床泰之 （北大農）

**3F047　分子シャペロン DnaK(Hsp70)は脂質・生体膜と相互作用し，UV-B ストレス下で重要な働きをする**
◦仲本　準[1]，　Pilbat Ana Maria[2]，　Huq Saaimatul[1]，　末岡啓吾[1]，Varvasovszki Viktoria[2]，　栗井光一郎[3]，　Glatz Attila[2]，Torok Zsolt[2]，　Vass Imre[2]，　Horvath Ibolya[2]，　Vigh Laszlo[2] （[1]埼玉大院理工，[2]Biol. Res. Centr，[3]静岡大理）

**3F048　糖脂質の欠損による枯草菌 ECF シグマ因子 $\sigma^V$の活性化メカニズムの解析**
◦関　貴洋，松岡　聡，松本幸次，原　弘志　（埼大理工学）

**3F049　ストレス応答時に枯草菌が蓄積するグアニンリボヌクレオチドの再検証**
野村勇太[1]，近藤久海香[2]，◦戸澤　譲[1]　（[1]埼大院理工，[2]埼大理）

**3F050　出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における高圧ストレス応答に寄与するミトコンドリア機能の解析**
◦野村一樹[1,2]，井口晃徳[1]，岩橋　均[2]，重松　亨[1]　（[1]新潟薬大応生科，[2]岐阜大応生）

**3F051　65℃の熱処理で枯草菌胞子の不活性を可能にする圧力処理条件**
◦平澤貴昭[1]，中原健太[1]，小林裕紀[1]，中島加奈子[2]，木戸みゆ紀[1]，林真由美[1]，野村一樹[1]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]　（[1]新潟薬大・応生科，[2]新潟薬大・産官学連携セ）

**3F052　牛乳 β-ラクトグロブリン由来の新規グレリン分泌抑制ペプチド**
◦青木隼人[1]，中戸絢也[1]，水重貴文[1,2]，岩倉　浩[3]，鈴木秀幸[4]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]　（[1]京大院農食品生物，[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット，[3]京大メディカルイノベーションセンター，[4]公益財団法人かずさ DNA 研究所）

**3F053　活性汚泥処理水に存在するバイオフィルム形成細菌における Quorum Sensing 機構の解析**
◦我妻隆樹[1]，石塚美和[2]，池田　宰[1]，諸星知広[1]　（[1]宇都宮大院工，[2]（株）東芝）

**3F054　VNC 状態のサルモネラにおける新規検出マーカーの探索**
◦吹田一将，磯貝恵美子　（東北大農）

**3F055　QS によって制御される *Paracoccus denitrificans* の凝集体形成因子の探索**
◦森永花菜，豊福雅典，野村暢彦　（筑波大院生命環境）

**3F056　細菌が放出するナノ膜小胞メンブランベシクルの形成機構解析**
◦黒沢正治，豊福雅典，野村暢彦　（筑波大・生命環境）

**3F057　生息環境で異なる緑膿菌の微生物間コミュニケーション**
◦遠矢正城[1]，豊福雅典[1]，木暮一啓[2]，野村暢彦[1]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]東京大・大気海洋研）

**3F058　植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質生産における Quorum Sensing の多重制御機構の解析**
◦山口貴人[1]，一村奈々瀬[1]，染谷信孝[2]，池田　宰[1]，諸星知広[1]（[1]宇都宮大院工，[2]農研機構）

**3F059　*Paenibacillus* sp. NAIST15-1 株の特異な運動能**
◦小林和夫[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2]　（[1]奈良先端大バイオ，[2]東京農大応生）

**3F060　温度応答性高分子を用いた新規微生物制御法の開発**
◦勝亦雄太，豊福雅典，小川和義，野村暢彦　（筑波大院 生命環境）

**3F061　Rag/Gtr 複合体非依存的 TORC1 活性化機構の解析**
◦谷川美頼，前田達哉　（東大分生研）

**3F062　分裂酵母プロテインキナーゼ A は，塩化カルシウムストレスにおいて転写因子 Prz1 を制御している**
◦松尾安浩，川向　誠　（島根大・生物資源・生命工）

**3F063　熱耐性と胞子形成に関与する枯草菌 rpoC 遺伝子の新規機能解析**
◦高松美沙樹[1]，兼崎　友[2]，朝井　計[3]，吉川博文[1,2]　（[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]埼玉大・院・理工）

**3F064　酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成および細胞死誘導の制御機構**
◦那須野亮，吉川雄樹，佐藤裕士，高木博史　（奈良先端大・バイオ）

**3F065　過酷な生育環境から単離した真核微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析**
◦長嶋雄大[1]，小俣　翼[1]，田邉義和[1]，石毛太一郎[2]，久保田恵理[2]，豊島拓樹[1]，広瀬　優[1]，新村陽一[1]，川崎信治[1]　（[1]東農大バイオ，[2]東農大・ゲノムセ）

**3F066　ラパマイシンに応答した出芽酵母リボソーム分解機構の解析**
◦赤川博文，　陣内　凱，　島日佳理，　大石早希子，　大本哲也，小川哲弘，日高真誠，正木春彦　（東大農）

**3F067　分泌経路遮断時の TOR を介したシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質の役割**
◦矢吹友佳理，水田啓子，船戸耕一　（広大院）

**3F068　酵母の細胞壁合成に関わる新規膜タンパク質の機能解析**
◦上原千央，星　直美，浜本　晋，魚住信之　（東北大・院工）

**3F069　糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるキチン合成酵素の機能解析**
◦藤原南帆[1]，　田原伸悟[1]，　志田洋介[1]，　岡田　仁[2]，　大隅正子[2]，小笠原渉[1]　（[1]長岡技科大 生物，[2]綜合画像研究支援）

**3F070　Possible roles and cellular localization of wild type and dominant negative sirtuin in *Lactobacillus paracasei* BL23**
◦Glaezel Angelique Torres[1]，Hotaka Atarashi[1]，Shinji Kawasaki[2]，Aiko Hirata[3]，　Akinobu Kajikawa[4]，　Akihito Endo[1]，Junichi Nakagawa[1]　([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [3]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [4]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture)

**3F071　好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter themophilus* TK-6 の酸化ストレス防御系に関する研究**
◦加藤真美[1]，佐藤由也[2]，新井博之[1]，石井正治[1]　（[1]東大院・農生科，[2]産総研・環境管理）

**3F072　*dltD* 欠損による *Lactobacillus casei* IGM393 の免疫応答への影響**
◦桝田和彌[1]，　竹内まみ[2]，　金子真梨恵[2]，　冨田　理[3]，　朝倉　宏[1]，梶川揚申[2]，岡田早苗[2]，五十君靜信[1]　（[1]国立医薬品食品衛生研究所，[2]東農大応生科・化学，[3]農研機構食品総合研究所）

**3F073　L1 リボソームタンパク質欠損による胞子形成・タンパク質分泌異常**
◦赤沼元気[1]，飯塚祐加[2]，矢野晃一[1]，河村富士夫[1]　（[1]立教大理，[2]中央大理工）

**3F074　Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性と輸送機構の解明**
◦松井光恵，伊藤政博　（東洋大院・生命科学）

**3F075　*Achromobacter denitrificans* YD35 株のメチオニン生合成を介した一酸化窒素耐性機構**
◦長岡亜依[1]，平林美保[1]，土肥裕希[2]，高谷直樹[1]　（[1]筑波大院生命環境，[2]岡山理大工）

**3F076　細胞壁合成阻害剤を用いた NAB6 遺伝子の機能解析**
◦松山　崇[1]，北川孝雄[3]，入江賢児[2]　（[1]（株）豊田中研，[2]筑波大人間総合科学，[3]山口大医）

**3F077　新規 RNAi ベクターを導入したシイタケ形質転換体のラッカーゼの発現**
◦吉田一生，但野健太，佐藤利次　（北見工大）

**3F078　麹菌のハイドロフォービン HypD は分生子表面に局在する**
◦石倉幹大，藤井祐希，土屋文美，関公一朗，中島春紫　（明治大・農・農化）

**3F079　分裂酵母の環状染色体の形成および維持に関係する遺伝子の探索**
◦上野　勝，田中大樹，南結香子，シャミムホシャイン　（広大・院先端・分子生命）

**3F080　Molecular mechanism underlies transcriptional regulation of cellulolytic enzymes in Streptomyces sp. SirexAA-E**
Wakana SATO[1]，　◦Yuto MAEDA[1]，　James ELLINGER[2]，Taichi TAKASUKA[1]　([1]Hokkaido Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

**3F081　pLC-hph 導入シイタケ組換え株のラッカーゼ発現の解析**
◦伊藤優希，山形明史，佐藤利次　（北見工大）

**3F082　微生物殺虫剤 *Bacillus thuringiensis* の巨大プラスミドの構造多型領域の解析**
◦野澤貴洋，岩崎　誠，菱山浩平，千　菊夫　（信州大・農・応生科）

**3F083　放線菌プラスミド pSN22 由来 tra 遺伝子群挿入による染色体移行の解析**
◦村端広介，金　眞熙，宮武　徹，横井崇紘，片岡正和　（信州大学大学院）

**3F084　様々な環境からの新規自己伝達性プラスミドの取得**
◦仲田裕貴[1]，福田洸平[2]，金原和秀[3]，新谷政己[3]　（[1]静大工，[2]静大創造院，[3]静大工，静大創造院）

**3F085　放線菌プラスミド pSN22 における接合伝達関連タンパク質 TraB の機能解析**
◦矢野嵩紘，宮武　徹，片岡正和　（信州大学大学院）

**3F086　線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析**
◦丸山直也[1]，池田治生[2]，片岡正和[1]　（[1]信州大学大学院，[2]北里大学北里生命科学研究所）

**3F087　*Gluconobacter frateurii* CHM43 の耐熱化に関する多剤耐性輸送体の機能解析**
◦松本奈実[1]，服部浩美[1]，松谷峰之介[1]，外山博英[2]，片岡尚也[1,3]，薬師寿治[1,3]，松下一信[1,3]　（[1]山口大農，[2]琉球大農，[3]山口大 中高温微生物研究センター）

**3F088　リアルタイム細胞内 pH センサーによる大腸菌長期定常期の解明**
◦小林美貴[1]，淡路健雄[2]，片岡正和[1]　（[1]信州大学大学院，[2]埼玉医科大学）

**3F089　麹菌におけるアクティベーションタギング法の検討**
◦松岡太郎[1]，井上　樹[2]，徳岡昌文[2]，進藤　斉[2]，穂坂　賢[2]　（[1]東農大院・農，[2]東農大・応生）

**3F090　食用担子菌ヒラタケのセルロース分解助長因子エクスパンシン様遺伝子 Poexp5 の単離**
◦本間靖隆，佐々木優太，菅原大希，猪股　希，佐藤利次　（北見工大）

**3F091　変異型 T7 RNA polymerase プラスミドによって転位誘発される好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の転位因子**
◦鈴木宏和[1]，小林淳平[1]，田靡実咲[1]，八木寿梓[2]，大城　隆[1]　（[1]鳥取大院・工・化生応工，[2]鳥取大・工・GSC）

**3F092　イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク質 Cbp1 の機能解析**
◦志賀友理子，岡内香奈，黒木美沙，成川　恵，鎌倉高志　（東理大）

**3F093　イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析**
◦藤原志帆[1]，樋口裕也[1]，佐藤佑樹[1]，尾瀬農之[2]，神谷昌克[3]，浅野行蔵[1]，曾根輝雄[1]　（[1]北大院農，[2]北大院薬，[3]北大院先端生命）

**3F094　*Lactobacillus plantarum* 環境単離株集団中におけるムコイド型コロニーの出現機構の解析**
◦江橋由夏[1]，河嶋伊都子[1]，尾花　望[1]，久保田浩美[2]，清川達則[1]，八城勢造[2]，柿原健佑[1]，小山二花[1]，蓮見基充[2]，野村暢彦[1]　（[1]筑波大・生命環境，[2]花王・安全性科学）

**3F095　LysR 型転写制御因子 MexT のプラスミド保持依存的な機能変化の評価**
◦久保　彩，能登　優，水口千穂，岡田憲典，野尻秀昭　（東大・生物工学セ）

**3F096　糸状菌由来の新規 poly(ADP-ribose)glycohydrolase の発見**
◦宮地雄大[1]，平野　澪[1]，山本竜也[1]，西尾理志[1]，渡邊美紀[1]，高谷直樹[2]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]　（[1]名城大農，[2]筑波大生命環境）

**3F097　メチオニン添加による *Shewanella oneidensis* MR-1 株の電流生成量の上昇**
◦茂木久恵，吉野恵里加，高妻篤史，渡邉一哉　（東薬大生命）

**3F098　麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の炭素源依存的なリン酸化と細胞内局在変化**
◦田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也　（東北大院農）

**3F099　ストレス応答遺伝子 HO-1 発現への INO80 クロマチンリモデリング複合体の関与と bicyclic peptide による人為的制御の試み**
◦秋山祐亮[1]，高橋裕一朗[2]，村上寛和[2]，Christian Heinis[3]，加藤恭丈[4]，五十嵐和彦[4]，原田昌彦[1,2]　（[1]東北大・農・分子生物，[2]東北大・院農・分子生物，[3]EPFL・LPPT,Lausanne，[4]東北大・院医・生物化学）

**3F100　大腸菌ミニ染色体複製サイクルと転写・翻訳反応の再構成の試み**
◦高田　啓，辻本寛子，末次正幸　（立教・生命理）

**3F101　イネいもち病菌の *EHS1* ノックアウト株・ノックダウン株の表現型比較と *EHS1* ノックアウト株における機能相補因子の探索**
◦村野慶奈[1]，林　平[1]，新井和良[2]，荒添貴之[3]，成川　恵[1]，大鐘　潤[2]，桑田　茂[2]，鎌倉高志[1]　（[1]東理大院理工，[2]明治大院農，[3]神戸大院工）

**3F102　超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis の低温発現誘導機構**
◦秀瀬涼太，山岡裕梨，藤原伸介　（関学大理工）

**3F103　放線菌におけるエネルギー代謝と分化・抗生物質生産の連携に関する研究**
◦千々和雅人，高野英晃，上田賢志　（日大生資科）

**3F104　プラスミド・宿主染色体由来 MvaT ホモログの DNA 結合能の評価**
◦角埜裕基[1]，水口千穂[1]，高橋裕里香[2]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]　（[1]東大・生物工学セ，[2]富山県大生工科・生工セ）

**3F105　PCB 分解菌 *Alcarigenes denitrificans* A41 株がもつ *bph* 遺伝子群の転写制御の分子機構の解明**
◦谷川洋祐，前田理久　（明治大農）

**3F106　シアノバクテリア由来 RNA polymerase の枯草菌での発現とその解析**
◦高橋宏輝[1]，白川文教[1]，渡辺　智[2]，朝山宗彦[4]，今村壮輔[5]，兼崎　友[3]，吉川博文[2,3]，朝井　計[1]　（[1]埼玉大理工，[2]東京農大応生科バイオ，[3]東京農大ゲノム解析セ，[4]茨城大農，[5]東工大資源化学研）

**3F107　PCB 分解菌 Alcaligenes denitrificans A41 株における bph 遺伝子群のリボヌクレアーゼ E による転写後制御**
◦久保理那子，前田理久　（明治大学）

**3F108　Specificity of antibodies for three MvaT homologs encoded on plasmid pCAR1 and chromosome of *Pseudomonas putida* KT2440**
◦Zongping SUN[1,2]，Delyana VASILEVA[1]，Kohei KAWAZUMA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Kazunori OKADA[1]，Feng LUO[2]，Yasuo IGARASHI[2]，Hideaki NOJIRI[1,2]　（[1]The Univ. of Tokyo，[2]Southwest Univ.）

**3F109　H-NS ファミリータンパク質における二量体/多量体形成機構の多様性**
◦水口千穂[1]，川妻孝平[1]，松澤　淳[1]，ヴァシレヴァデリアナ[1]，藤本　瑞[2]，寺田　透[3,4]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1,4]　（[1]東大・生物工学セ，[2]農生資研，[3]東大院農生科・応生工，[4]東大院農生科・アグリバイオ）

**3F110　*Rhodococcus jostii* RHA1 における安息香酸分解遺伝子群の転写制御**
◦宮内啓介[1]，伊藤　拓[3]，斎藤聖太[1]，鈴木吉寛[1]，石川　諒[1]，東海林和馬[1]，荒木直人[2]，福田雅夫[2]，遠藤銀朗[1]　（[1]東北学院大工，[2]長岡技大工，[3]東北学院大工総研）

**3F111　小分子 RNA・ChiX による *chiR* 発現抑制とその解除**
◦鈴木一史[1,2]，南　晴香[1]，山岸拓矢[2]，小川知佐奈[1]，佐々木直美[1]，杉本華幸[1,2]，渡邉剛志[1,2]　（[1]新潟大院・自然科学，[2]新潟大・農・応生化）

**3F112　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢形成の制御遺伝子 AMIS_76070 の機能解析**
◦安久都卓哉[1]，平田愛子[2]，手塚武揚[1]，大西康夫[1]　（[1]東大院農生科・応生工，[2]東大院新領域・先端生命）

**3F113　放線菌 *Streptomyces griseus* の液体培養での対数増殖に重要なシグマ因子 SGR6823**
◦石川佳世子，手塚武揚，大西康夫　（東大院農生科・応生工）

**3F114　麹菌染色体の任意領域の大規模多コピー重複株の作製と表現型の解析**
◦高橋　理　（野田産業科学研究所）

**3F115　RNA-Seq を用いた冬虫夏草(Cordyceps militaris)の感染過程における網羅的解析**
◦鈴木智大[1]，道羅英夫[2]，崔　宰熏[3]，加藤竜也[2,3]，朴　龍洙[2,3,4]，三家本利之[5]，佐伯　潤[5]，平井浩文[2,3]，河岸洋和[2,3,4]　（[1]宇都宮大・バイオ，[2]静大・グリーン研，[3]静大農・応生化，[4]静大院・創造，[5]にちはら総研）

**3F116　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の休眠を制御する転写制御因子 TcrA のレギュロンの網羅的同定**
◦毛利佳弘，手塚武揚，大西康夫　（東大院・農生科）

**3F117　プラスミド pCAR1 を保持した 3 宿主における転写開始点の網羅的決定と宿主間比較**
◦舘はる香[1]，水口千穂[1]，高橋裕里香[2]，大坪嘉行[3]，津田雅孝[3]，

岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]　([1]東大・生物工学セ，[2]富県大生工科・生工セ，[3]東北大院生命科学)

**3F118　dRNA シーケンスによる希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 胞子嚢の開裂過程に働く遺伝子のプロモーター領域の解析**

◦安田理沙，手塚武揚，大西康夫　(東大院農生科・応生工)

**3F119　ClrB-ManS regulatory mechanism for mannanase gene expression in *Aspergillus nidulans***

◦Nuo Li，Emi Kunitake，Kyoko Kanamaru，Makoto Kimura，Tetsuo Kobayashi　(Nagoya Univ.)

**3F120　*Streptococcus mutans* のスクロースに応答した eDNA 放出機構の解析**

◦井上紗智[1]，稲葉知大[2]，尾花　望[1]，八幡　穣[3]，泉福英信[4]，野村暢彦[1]　([1]筑波大生命環境，[2]産総研環境管理，[3]Department of Civil, Environmental and Geomatic Engineering, Institute for Environmental Engineering, ETH Zurich，[4]感染研細菌第一部)

**3F121　高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるファージ *Φ* OH16 感染時の CRISPR/Cas の応答**

◦白丸優貴[1]，永吉佑子[1]，田代康介[3]，藤野泰寛[2]，土居克実[1]　([1]九大院・生資環，[2]九大・基幹教育，[3]九大院・シス生科)

**3F122　イネ細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質 *p*-coumaryl alcohol の *Agrobacterium* による分解**

庄田佐知子[1]，福満啓博[1]，藤井研人[1]，坂井綾子[1]，高木隆吉[2]，安倍　学[2]，◦山本真司[1]，鈴木克周[1]　([1]広大院理・生物，[2]広大院理・化学)

**3F123　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における異化代謝系遺伝子の cAMP 依存的転写応答**

◦笠井拓哉，高妻篤史，渡邉一哉　(東薬大生命)

**3F124　大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE はロイシン応答性調節タンパク質(Lrp)により制御される**

◦伊原航平，勝部　哲，佐藤一樹，堀　初弘，安藤太助，磯貝恵美子，米山　裕　(東北大院農)

**3F125　麹菌における選択的転写開始機構を有する解糖系酵素遺伝子プロモーターのシスエレメント解析**

◦井上大志，田路洋紀，高間　充，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也　(東北大院農)

**3F126　RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の RpoE レギュロンの解析**

◦佐藤契太[1]，石川森夫[1]，原田佳子[1]，勝間田憲子[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2,3]，小泉幸道[1]，貝沼(岡本)章子[1]　([1]東京農大・応生科醸造，[2]東京農大・ゲノムセンター，[3]東京農大・応生科・バイオ)

**3F127　糸状菌 *Trichoderma reesei* における窒素源応答転写調節因子の解析**

◦平沢大樹，志田洋介，小笠原渉　(長岡技科大・生物)

**3F128　麹菌のグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株における二次代謝産物生産性**

◦一瀬桜子，田中瑞己，新谷尚弘，五味勝也　(東北大院農)

**3F129　*Rhodobacter sphaeroides* におけるピリドキサルリン酸依存型転写調節因子による 5-アミノレブリン酸生合成遺伝子の発現制御**

◦天野　修，石井正治，新井博之　(東大大学院農生科)

**3F130　*Ralstonia* sp. NT-80 株におけるリパーゼ 転写調節因子 LipR80-4 の機能解析**

◦多勢真大，関谷麻美，赤沼元気，石塚盛雄　(中央大学)

**3F131　*Yersinia* 由来 Invasin を細胞表層に提示する組換え *Lactobacillus casei* の Caco-2 細胞を用いた評価及びその解析**

◦田中健一[1]，桝田和彌[2]，梶川揚申[1]，岡田早苗[1]，五十君靜信[2]　([1]東農大院・農化，[2]国立医薬品食品衛生研究所)

**3F132　ゲノム解析による maridomycin/platenomycin 生合成遺伝子クラスターの特定と生産菌の分類**

◦小牧久幸，市川夏子，小口晃央，田村朋彦，浜田盛之，藤田信之，鈴木健一朗　(NBRC)

**3F133　日本の高山帯から単離された根粒菌のゲノム解析**

◦高梨功次郎[1]，池田　啓[2]，瀬尾直登[3]，佐藤修正[4]，矢崎一史[3]　([1]信大・山岳研，[2]岡山大・植物研，[3]京大・生存研，[4]東北大・院生命科学)

**3F134　ゲノム配列解析に基づく嫌気性細菌の分類における新たなアプローチ**

◦林　将大[1]，一宮尚志[2]，武藤吉徳[3]，田中香お里[1]　([1]岐阜大・生命セ・嫌気性菌，[2]岐阜大・医・医療情報，[3]岐阜大・医・生命機能)

**3F135　微生物統合データベースを高度化する微生物環境オントロジーと解析アプリケーションの開発**

◦鈴木真也[1]，山本　希[2]，森　宙史[1]，黒川　顕[1,2]　([1]東工大生命，[2]東工大地球生命研)

**3F136　分裂酵母における胞子特異的なタンパク質の網羅的解析**

◦松崎彩子，東谷未来，中村太郎　(阪市大院理)

**3F137　放線菌 Streptomyces coelicolor A(3)2 M145 における内在性 NO による代謝制御の解明**

◦行岡揺弥，小口　悠，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸　(東京農業大学)

**3F138　*Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産におけるメチオニン合成酵素 MetE の生理的役割の解明**

◦高橋　慧，高田明香，山下周子，岩井伯隆，和地正明　(東工大院・生命理工・生物プロセス)

**3F139　*Aspergillus terreus* における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の解明(第二報)**

◦尾花克哉[1]，安藤祥生[1]，田中　遼[2]，金政　真[2]　([1]中部大院･応生，[2]中部大・環境生科)

**3F140　Changing autotrophy to heterotrophy-Isolation of serine auxotroph in *Hydrogenobacter thermophilus*-**

◦KeugTae KIM[1]，Yoko Chiba[2]，Hiroyuki Arai[1]，Masaharu Ishii[1]　([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tsukuba)

**3F141　*A. ferrooxidans* のチオ硫酸代謝酵素系の解析**

◦上村一雄，高田弓梨乃，金尾忠芳　(岡山大院環境生命)

**3F142　翻訳因子 eIF5A によるエネルギー代謝制御**

◦近藤直子[1,2]，白井温子[1,6]，松山晃久[1,3]，夏目　徹[4]，堂前　直[3]，浜本牧子[5]，吉田　稔[1,2,3]　([1]理研 化学遺伝，[2]東京大院農，[3]理研 CSRS，[4]産総研 創薬分子，[5]明治大院農，[6]理研 細胞記憶)

**3F143　高温条件での酸化ストレスの低減が *Kluyveromyces marxianus* のエタノール消費と酢酸生産を抑え，それに伴う酵母の死滅を防ぐ**

◦西田成輝[1]，高坂智之[2,3]，山田　守[1,3]　([1]山大医，[2]山大農，[3]山大中高温微生物セ)

**3F144　呼吸鎖改変大腸菌 *Δ* NDH-I *Δ* Cyt *bo* の酸素制限による糖代謝の変化**

◦杉本　諒[1]，加藤竜一[1]，荒井博紀[1]，紀平知枝[1]，吹谷　智[1]，和田　大[1]，片岡尚也[2]，横田　篤[1]　([1]北大院農，[2]山口大農)

**3F145　メタボロームデータを利用した酵母の発酵呼吸状態推定の試み**

◦藤丸裕貴，門脇真史，Ferdouse Jannatul，木村佑太，寺沢洋平，北垣浩志　(佐賀大農)

**3F146　高品質清酒醸造のための醸造用米・越淡麗の酒造適性に関する研究**

◦市川絵梨[1]，安澤義彦[1]，鍋倉義仁[2]，佐藤謙仁[1]，佐藤優子[1]，中村　諒[1]，田村博康[1]，金桶光起[2]，渡邊健一[2]，岩下和裕[3]，平田　大[1,4]　([1]朝日酒造，[2]新潟醸試，[3]酒総研，[4]広大・先端研)

**3F147　メタボローム解析による清酒中の麹由来成分の探索**

◦矢澤　彌，後藤美保，橋本知子，日下一尊，水野昭博　(酒総研)

**3F148　漬物から分離した乳酸菌による LPS 失活メカニズムに関する研究**

◦浅見恭子，金内　誠　(宮城大学)

**3F149　白神山地から分離した酵母の分子系統解析と清酒酵母としての可能性の検討**

◦森山裕理子[1]，小倉　亮[2]，齋藤知明[2]，殿内暁夫[1]　([1]弘大農，[2]青森県産業技術センター弘前地域研究所)

**3F150　富山県産大麦麦芽由来「とやま産まれの酵母」の清酒醸造特性**

◦尾仲宏康[1,2]，丸山潤一[1]，黒岩真弓[1]，北本勝ひこ[1]　([1]東大院農生科，[2]富山県大地域セ)

**3F151　ヨーグルト発酵における　*Streptococcus thermophilus* NADH oxidase の重要性の比較検討**

◦田中雅人[1]，小柳沙織[1]，村松明日香[1]，堀内啓史[2]，佐々木泰子[1]　([1]明治大農，[2](株)明治・食品開発研)

**3F152　*Streptococcus thermophilus* 及び *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* のヨーグルト発酵におけるウレアーゼの役割について**

◦山内理夏子[1]，堀内啓史[2]，佐々木泰子[1]　([1]明治大農，[2](株)明治・食品開発研)

**3F153　*Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸発酵能と中間代謝物アセトアルデヒド生成との相関**

◦楢崎　暢[1]，石川森夫[1]，阿部達明[1]，岸　幹也[2]，小泉幸道[1]，貝沼(岡本)章子[1]　([1]東京農大・応生科醸造，[2]Mitzkan Holdings 中研)

**3F154　清酒酵母の醸造特性に及ぼすアルギナーゼ活性の影響**

◦五島徹也[1]，濱田つかさ[1,2]，周　延[1]，福田　央[1]，赤尾　健[1,2]　([1]酒総研，[2]広島大院・先端研・分子生命)

**3F155　ユビキチン-プロテアソームシステムの遺伝子発現を司る転写因子 Rpn4 を介したパン酵母の冷凍ストレス耐性**

◦渡辺大輔[1]，関口拓史[2]，杉本幸子[1]，長澤　淳[2]，喜田直孝[2]，高木博史[1]　([1]奈良先端大･バイオ，[2]テーブルマーク･食品開発セ)

**3F156　コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵における遺伝子発現・代謝プロファイルの解析**

◦平沢　敬[1]，齊藤正輝[2]，吉川勝徳[2]，古澤　力[3]，清水　浩[2]　([1]東工大院生命理工・生物プロセス，[2]阪大院情報・バイオ情報，[3]理研・QBiC)

**3F157　RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株のグリセリン利用時における転写挙動の網羅的解析**

◦阿部達明[1]，石川森夫[1]，松原拓哉[1]，兼崎　友[2]，吉川博文[2,3]，小泉幸道[1]，貝沼(岡本)章子[1]　([1]東京農大･応生科醸造，[2]東京農大･ゲノムセンター，[3]東京農大・応生科バイオ)

**3F158　油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の油脂合成・分解遺伝子の発現解析**

◦海老名沙也佳[1]，阿部史歩[1]，志田洋介[2]，小笠原渉[2]，山崎晴丈[1]，高久洋暁[1]　([1]新潟薬大・応生命，[2]長岡技科大)

**3F159　焼酎用 4 号酵母を用いた差し酛において麹に用いる原料の違いが酵母純度に与える影響**

◦武藤貴史，稲橋正明，岡崎直人，石川雄章　(日本醸造協会)

**3F160　PEPA 破壊株を用いた米麹・清酒の成分分析**

◦濱田雄太郎[1,2]，梅尾美幸[2]，織田　健[2]，岩下和裕[1,2]　([1]広大院・先端研，[2]酒総研)

**3F161　TCA 回路酵素遺伝子過剰発現による *Mortierella alpina* の脂質生産性向上の検討**

◦島田良美[1]，安藤晃規[2]，和泉自泰[3]，馬場健史[3]，岸野重信[1]，櫻谷英治[4]，島　純[5]，小川　順[1,2]　([1]京大院・農，[2]京大・生理化，[3]九大・生医研，[4]徳島大院・ソシオ，[5]龍谷大・農)

**3F162　並行複発酵による乳からのアルコール発酵の可能性**

◦脇田義久[1]，神田　一[2]，金子　剛[2]，加戸久生[1]，金田弘挙[1]，土屋陽一[1]，中村　剛[2]　([1]サッポロホールディングス・グループ研究戦略推進部，[2]サッポロビール･価値創造フロンティア研究所)

**3F163　*Cryptococcus diffluens*が持つ未知のガラクチュロン酸代謝経路についての研究**

◦松原健生[1]，松村知拓[2]，若林彩香[2]，濱田翔平[1]，岸田正夫[1]　([1]阪府大院生環科・応生科，[2]阪府大生環科・応生科)

**3F164　自然界より分離した納豆菌の LDH 活性阻害様化合物の探索と分画**

◦七尾圭香，大箸信一，袴田佳宏　(金沢工大)

**3F165　原料米の違いによるエチル α-グルコシド(α-EG)の発酵製造効率の検討**

◦坊垣隆之[1,2]，中川賢哉[3]，澤飯大夢[3]，尾関健二[1,3]　([1]金工大･院・工・バイオ化学，[2]大関(株)・総研，[3]金工大・バイオ化学・応用バイオ)

**3F166　脂肪細胞分化段階における脂肪生合成関連遺伝子発現に対する紅麹水抽出物の影響**

◦橘信二郎[1,2]，ワンニナイカインディカ･プラディープ[1,2]，田中啓士朗[1]，外山博英[1,2]　([1]琉大・農，[2]鹿児島大・連大農)

**3F167　深海由来真菌の分子同定および抗生物質の探索**

◦高橋こなみ[1,2]，長野由梨子[2]，瀧下清貴[2]，藤倉克則[2]，横田賢史[1]　([1]東京海洋大学，[2]海洋研究開発機構)

**3F168　抗糸状菌作用を示す微生物の単離とそのメカニズムの解析**

◦杉村祐哉[1]，高塚由美子[1]，横田健治[2]，西野徳三[1]，原富次郎[1]　([1]山形大院理工，[2]東農大・応生科)

**3F169　放線菌 *Streptomyces avermitilis* におけるセルラーゼ遺伝子発現と avermectin 生産**

◦春日　和[1]，佐羽内彩香[1]，牟田口祐太[1]，志村洋一郎[1]，石川　淳[2]，池田治生[3]，小嶋郁夫[1]　([1]秋田県大生資，[2]国立感染研，[3]北里大・北里生命研)

**3F170　放線菌汎用宿主における二次代謝産物生産に適した構成的発現プロモーターの探索**

◦小松　護，池田治生　(北里大・北里生命研)

**3F171　*Fusarium graminearum* のトリコテセン生合成における *Tri6* のフィードバック制御とその生理的役割**

◦中嶋佑一，前田一行，金丸京子，小林哲夫，木村　真　(名大院生命農)

**3F172　麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコウジ酸生産新規制御因子の機能解析**

◦荒川弦矢[1]，児玉はる花[2]，江口優一[1]，小川真弘[3]，小山泰二[3]，徳岡昌文[2]，進藤　斉[2]，穂坂　賢[2]　([1]東農大院・農，[2]東農大・応生，[3]野田産研)

**3F173　糸状菌代謝産物由来の Sirtuin A 阻害剤の探索**

◦松本貴良，茂本亮輔，張本修平，伊藤英里子，高谷直樹　(筑波大院生命環境)

**3F174　清酒酵母の *S*-アデノシルメチオニン高蓄積能に関与する分子機構の解析**

◦金井宗良[1]，喜多靖子[1]，吉田艶枝[1]，河田知子[1,2]，藤井　力[1,2]，水野昭博[1]，山田　修[1]　([1]独立行政法人酒類総合研究所，[2]広大院･生物圏)

**3F175　高効率オウトウショウジョウバエ捕虫器の開発**

石井友理[2]，東久保遥[2]，◦赤坂直紀[1]，秀瀬涼太[2]，佐古田久雄[1]，藤原伸介[2]　([1]マルカン酢(株)，[2]関西学院大理工)

**3F176　富有柿幼果黒麹菌発酵物の機能性に対する加熱処理条件の検討**

◦折居千賀　((公財)東洋食品研究所)

**3F177　*Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L における多糖産生制御因子の探索**

◦菊地淳史[1]，菅原　誠[2]，梶川揚申[1]，田中尚人[3]，岡田早苗[1]　([1]東農大応生科・化学，[2]マルサンアイ株式会社，[3]東農大・菌株)

**3F178　*Synechocysits* のゲラニルゲラニルピロリン酸合成酵素 Slr0739 の酵素学的解析とイソプレノイド生産への応用**

◦清田浩史[1,2]，奥田裕紀子[1]，梅野太輔[3]，平井優美[2]，池内昌彦[1,4]　([1]東大総合文化，[2]理研環境資源科学研究センター，[3]千葉大工，[4]CREST)

**3F179　化合物アレイを用いたアフラトキシン生産阻害物質の探索(その 1)－ LaeA 結合物質の探索－**

◦山本利義[1]，影本貴大[1]，飯村九林[1]，高城景子[1]，近藤恭光[2]，本田香織[2]，長田裕之[2]，作田庄平[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]理研 CSRS)

**3F180　ナズナから分離した乳酸菌 *Enterococcus* sp. PUK13 が生産する多成分バクテリオシンの精製と同定**

◦山下奈菜[1]，善藤威史[2]，松崎弘美[1,3]　([1]熊本県大院・環境共生，[2]九大院・農，[3]熊本県大・環境共生)

**3F181　進化工学による *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のグリコール酸酸化活性の向上**

◦高橋迪子，山田美和，礒部公安　(岩手大農)

**3F182　酵母からの細胞破砕をせずにタンパク質を抽出する方法**

◦西岡佐都子[1]，中村美紀子[2]，美澄幸恵[2]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]　([1]山口大・工・応化，[2]山口大・医系・応用分子生命)

**3F183　分裂酵母のエリスロアスコルビン合成における新奇な D-アラビノース脱水素酵素について**

森村健一[1]，島田友未[2]，大八木真希[2]，蔭山梨南[2]，垣内彩也香[2]，◦尼子克己[2]　([1]神院大栄養，[2]仁愛大人間生活)

**3F184　種々の炭素源で生育させた白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の細胞外プロテオーム解析**

◦糀谷紗季，鈴木梨央，山田麻衣子，河合竜治，酒井杏匠，村田俊輔，志水元亨，加藤雅士　(名城大農)

**3F185　*Aspergillus oryzae* の変異処理及び光応答能力を利用したプロテアーゼの増産**

◦楠本憲一[1]，ムルティプシュパ[1,2]，鈴木　聡[1]　([1]農研機構食総研，

[2]インド国中央食品技術研究所）

**3F186　担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* GB-4(0)の MEL 生合成遺伝子の破壊と酵素生産への影響**

◦森田友岳[1]，雜賀あずさ[1]，吉田重信[2]，鎗水　透[2]，小池英明[1]，渡部貴志[2]，羽部　浩[1]，北本宏子[2]（[1]産総研，[2]農環研）

**3F187　ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyB の産物多様性の解析**

◦飯島知之，齊藤玉緒（上智大理工）

**3F188　卵殻膜分解酵素の異種発現と同酵素を用いた卵殻膜からの生理活性ペプチドの取得**

◦竹中慎治，大坂宇津実，山下陽子，芦田　均（神戸大農）

**3F189　タイ土壌から分離した耐熱性 *Streptomyces* 属放線菌の生産するリパーゼの特性解析**

◦大坂宇津実[1]，タノングサックチャイヤソ[2]，田中耕生[3]，吉田健一[1]，竹中慎治[1]（[1]神戸大農，[2]チェンマイ大アグロインダストリー，[3]神戸大自）

**3F190　セルロース結合ドメインを付加した NADH: DCIP 酸化還元酵素とグルコースデヒドロゲナーゼの調製とグルコース定量への応用**

◦堀友佳理[1]，矢野成和[1]，白石晴樹[2]，立木　隆[2]（[1]山形大院理工，[2]立命館大生命科学）

**3F191　Discovery and characterization of ulvan-degrading enzymes from *Alteromonas* sp. strain KUL17**

◦CHUAN HE，Ryo Takahashi，Kouhei Ohnishi（Research Institute of Molecular Genetics, Kochi Univ.）

**3F192　イノシトール遊離能を持つ新規フィターゼの探索**

◦佐々木海[1]，　シャーマンケビン[1]，　吉田健一[2]，　阿部　歩[1]，浅野行蔵[1]，曾根輝雄[1]（[1]北大院農，[2]神戸大院農）

**3F193　工学的改変ピキア酵母：同一ベクターによる多重遺伝子導入系の開発**

◦渋井達郎，原　宏佳，坂口大介（日本獣医生命科学大学）

**3F194　担子菌 *Bjerkandera adusta* Dec 1 株が分泌する酵素 DyP の生理的機能**

◦大出恵津乃[1]，天野芳美[2]，長谷川美穂[1]，佐藤麻衣[1]，菅原佳奈子[1]，菅野靖史[1]（[1]日本女子大・理・物生，[2]東工大院・総合理工）

**3F195　黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ多重欠損株の菌体外プロテアーゼの解析**

◦上野絢子，前田　浩，山形洋平，竹内道雄（東京農工大学院農）

**3F196　神経剤分解を目的とした organophosphprus hydrolase 産生系の構築**

◦中山公介[1]，　岩田なつみ[1]，　大森　毅[2]，　瀬戸康雄[2]，　石川暁志[1]，川原一芳[1]（[1]関東学院大理工生命，[2]科警研）

**3F197　enantio-pure な(*R*)-*β*-Phe の生産に役立つ酵素の構造解析及び生化学解析**

◦加藤雄己[1]，野上真央[2]，川崎　寿[1,2]，夏目　亮[1,2]（[1]東電大・院・工，[2]東電大・工）

**3F198　リンカー領域にパリンドロームなアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来セルラーゼ遺伝子のクローニング**

◦大田　毅[1]，堀江瞳美[1]，松浦愛奈[1]，河合富佐子[2]（[1]県立広島大生命環境，[2]京都工芸繊維大学）

**3F199　従属栄養硝化を駆動する酵素『Pyruvic oxime dioxygenase』の分子的性質**

◦辻野修平[1]，　上松千紗都[1]，　岡　俊彦[1]，　吉松勝彦[2]，　藤原健智[1]（[1]静大理，[2]静大グリーン研）

**3F200　選択的抗菌活性による皮膚菌叢の健全化と皮膚疾患予防を目指した植物油からのパルミトオレイン酸異性体への微生物変換**

◦永尾寿浩[1]，田中重光[1]，倉田淳志[2]，岸本憲明[2]（[1]阪市工研，[2]近畿大院・農）

**3F201　キラル化合物生産に有用な微生物由来イミダーゼに関する研究**

◦志澤宏明[1]，日比　慎[2]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

**3F202　変異型豚腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いたシアン付加反応**

◦川原寛弘[1,2]，安川和志[1,2]，浅野泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**3F203　*Bacillus licheniformis* が生産する包接作用を有する新規多糖質の研究**

◦鳥居楓子[1]，篠原友里江[2]，Kuakarun Krusong[3]，Jarunee Kauliboon[4]，Piamsook Pongsawasdi[3]，村上周一郎[2]（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・農化，[3]Faculty of Science, Chulalongkorn Univ.，[4]Faculty of Medicine, Thammasat Univ.）

**3F204　糖転移反応によるオリゴ糖アルドン酸の合成**

◦村上　洋[1]，　宮本康平[2]，　水揚貴史[2]，　湯口宜明[2]，　桐生高明[1]，木曽太郎[1]，中野博文[1]（[1]大阪市工研，[2]阪電通大・工）

**3F205　微生物由来の新規な nucleside hydrolase を用いた核酸医薬原料 2'-*O*-メチルリボヌクレオシドの酵素的合成**

◦光川侑輝[1]，日比　慎[2]，松谷成裕[1]，堀之内伸行[1]，高橋里美[2]，小川　順[1]（[1]京大院・農・応用生命，[2]京大院・農・産業微生物）

**3F206　ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属する，Pseudomonas sp.YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL Y12DS175GS176D 変異体の作製とそのホスファターゼ活性測定**

◦李　貢順，殷　梓蘭，中村　卓（長浜バイオ大 バイオサイエンス）

**3F207　ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属するホスファターゼのハロ酸デハロゲナーゼへの機能転換**

殷　梓蘭，伊奈胤仁，◦中村　卓（長浜バイオ大学　バイオサイエンス）

**3F208　大腸菌のコドンに最適化された遺伝子を利用した，超好熱性古細菌由来システイン合成酵素の大腸菌内での発現量増加のための条件探索**

◦岡本章豊[1]，桐生智子[2]，武田瑛美[1]，中村　卓[2]（[1]長浜バイオ大院　バイオサイエンス研究科，[2]長浜バイオ大　バイオサイエンス）

**3F209　*Geobacillus kaustophilus* HTA426 の IolE ホモログの機能解析**

◦岡田　大，白江雄介，田中耕生，竹中慎治，吉田健一（神戸大院農学研究科）

**3F210　ラビリンチュラ類の新規高度不飽和脂肪酸合成システムを利用したエイコサペンタエン酸(EPA)の生産**

◦合田初美[1]，　持永聖也[1]，　濱口理恵[1]，　坂口圭史[1]，　石橋洋平[1]，関口峻允[2]，　石渡夕子[2]，　沖田裕司[2]，　沖野　望[1]，　本多大輔[3]，林　雅弘[4]，伊東　信[1,5]（[1]九大院農，[2]日水中研，[3]甲南大理工，[4]宮大農，[5]九大院農 i-BAC）

**3F211　異種遺伝子発現による出芽酵母イソブタノール合成活性化**

◦森田啓介[1]，松田史生[1]，石井　純[2]，近藤昭彦[3]，清水　浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報，[2]神戸大・自科・研究環，[3]神戸大院・工・応化）

**3F212　エイコサペンタエン酸の酸化的変換能を有する微生物の探索**

◦齊藤一輝[1]，石川千弘[1]，永野秀昭[2]，岸野重信[1]，小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]京大院農・産業微生物）

**3F216　人工 DNA 切断酵素 TALEN を用いた *Rhizopus oryzae* における遺伝子破壊技術の確立**

◦壺井雄一[1]，高橋史員[1]，五十嵐一暁[1]，萩原　浩[1]，佐久間哲史[2]，山本　卓[2]（[1]花王・生科研，[2]広島大院・理）

**3F217　$TiO_2$光触媒反応による細菌への影響の網羅的解析**

◦三ツ木理騎[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大･応生，[2]東理大･総研）

**3F218　細菌細胞壁に対する $TiO_2$光触媒反応の影響**

◦大嶋佑治[1]，芦田美稀[1]，藤嶋　昭[2]，鈴木智順[1,2]（[1]東理大　応生，[2]東理大　総研）

**3F219　*Enterobacter* 属細菌におけるリン酸欠乏誘導性のリン酸鉄溶解機構の解明**

◦山栗瑞希，矢野敦士，岡野憲司，本田孝祐，大竹久夫（阪大院工）

**3F220　好熱性細菌によるシリカ沈殿機構の解明**

◦岡田智紗[1]，　藤野泰寛[1]，　花島映里[2]，　横山拓史[1]，　上田　晃[2]，土居克実[1]（[1]九大，[2]富山大理工）

**3F221　酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の菌膜形成多糖の構造解析**

◦與那嶺秋帆，外山博英，高野　良（琉球大農・亜熱生資）

**3F222　鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析**

◦長谷成記[1]，　中山久之[2]，　小坂　恵[3]，　玉田太郎[4]，　上村一雄[2]，

金尾忠芳[2]（[1]岡山大農，[2]岡山大院･環境生命，[3]岡山大･自科支セ，[4]原子力研）

**3F223　プロトプラスト-PEG 法による黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の形質転換系の構築**

◦渡嘉敷直杏[1]，外山博英[1]，渡邉泰祐[2]（[1]琉球大農・亜熱生資，[2]日大生資科・生命化）

**3F224　硫酸アルミニウムの抗菌剤としての利用にかかわる因子とその作用機序**

◦大本貴士，駒　大輔，山中勇人，森芳邦彦（阪市工研）

**3F225　大腸菌 $H^+$駆動型べん毛モーター固定子 MotAB のイオン選択性に重要なアミノ酸残基**

◦石川健太郎[1]，高橋優嘉[2]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大学 生命科，[2]東洋大・バイオナノ）

**3F226　好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のべん毛モーターにおけるイオン選択機構の解明**

◦長縄　俊[1]，今澤　陸[2]，伊藤政博[1,2]（[1]東洋大・生命科，[2]東洋大院・生命科学）

**3F227　枯草菌における高圧損傷菌の特性解析**

◦稲岡隆史[1]，木村啓太郎[1]，森松和也[2]，山本和貴[1]（[1]農研機構・食総研，[2]愛媛大）

**3F228　低温適応性乳酸菌を宿主とした新規ベクターの構築**

◦二宮健匡[1]，　後藤清太郎[2]，　川本　純[1]，　工藤和幸[2]，　栗原達夫[1]（[1]京大化研，[2]日本ハム（株）商開研）

## G：動物

**3G001　Sirt1 はオキシトシンを介してショ糖嗜好性を抑制する**

◦松居　翔，　佐々木努，　橋本博美，　沼田友理，　小林雅樹，北村忠弘（群大生調）

**3G002　低タンパク質食を給餌した *Fgf21* ノックアウトマウス肝臓の cDNA マイクロアレイ解析**

◦尾崎　依[1]，　中澤京子[2]，　斉藤憲司[2]，　小西守周[3]，　伊藤信行[4]，高橋伸一郎[5]，加藤久典[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大･農･農化，[2]東大･総括寄付講座･食と生命，[3]神戸薬科大･薬，[4]京大院･薬，[5]東大･院・農生化）

**3G003　発達初期低タンパク質栄養による統合失調症関連行動異常発症の分子基盤としての脳内遺伝子発現変化**

◦今井明香，中畑亜加音，市瀬嵩志，田代康介，古屋茂樹（九州大学大学院 生物資源環境科学府）

**3G004　標準日本食飼料の作製とその検討**

◦溝脇由衣，都築　毅（東北大院・農）

**3G005　高脂肪食給与マウスのインスリン抵抗性に対する短梗五加果実の作用**

◦齋藤哲男，西田美也子，齋藤雅史，永塚貴弘，西田浩志（新潟薬科大）

**3G006　低炭水化物・高脂肪食摂餌マウスにおける血糖値調節機構の解明**

◦船戸里香[1]，宇田川賢太[2]，小泉洸太[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本大院・生資科・応生科，[2]日本大・生資科・生命化）

**3G007　アミノ酸欠乏に応答して観察される肝臓トリグリセリド蓄積における脂肪酸 β 酸化の寄与**

◦関亜理砂[1]，　丸井未槻[1]，　川原夕記[1]，　尾崎　依[1]，　長田恭一[1]，高橋伸一郎[2]，竹中麻子[1]（[1]明治大･農･農化，[2]東大･院･農生化）

**3G008　筋原線維タンパク質の維持における分岐鎖アミノ酸代謝制御の重要性**

◦北浦靖之，　石川卓弥，　森下由佳子，　太田美樹，　Xu Minjun，門田吉弘，下村吉治（名大院生命農）

**3G009　食餌中のタンパク質の質の違いが創傷治癒に及ぼす影響**

◦上岡美沙，山根拓実，岩槻　健，大石祐一（東農大応生科）

**3G010　胎児期から成長期おける高脂肪食ならびに食事時間制限がラットの発育に及ぼす影響**

◦松本義信，津崎智之，小野章史，松枝秀二（川崎医療福祉大臨床栄養）

**3G011　Human vaginal lactobacilli inhibit the inflammation by lipopolysaccharide stimulation through modulation of toll-like receptor expression**

◦Keiuske Tobita，Itsuki Watanabe（KITII Co., Ltd.）

**3G012　老化モデルマウスを用いた加齢依存的な味覚嗜好性変化の解析**

◦幸田理恵，成川真隆，三坂　巧（東大院農生科・応生化）

**3G013　NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒成分の効果**

◦矢吹　智[1]，則包潔人[1]，上村勇貴[1]，伊豆英恵[2]，山田康枝[1]（[1]近畿大工，[2]酒類総合研究所）

**3G014　ミツバチ類の化学コミュニケーションと，ヒト社会の健康に関する科学コミュニケーション。**

◦笹川浩美[1,2,3]（[1]学校法人　跡見学園，[2](公財)JSF･科学技術館，[3](独)科学技術振興機構・さきがけ研究 21）

**3G015　マグネシウム摂取不足が骨代謝に及ぼす影響の包括的検討**

◦矢後拓己[1]，　生貝咲貴[1]，　石島智子[1]，　阿部啓子[1,2]，　岡田晋治[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー）

**3G016　ビタミン E 欠乏がストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットの不安行動に及ぼす影響**

◦遠藤　駿，竹中麻子（明大・農・農化）

**3G017　母マウスの choline 欠乏食が仔の肝臓中 choline 代謝，および遺伝子発現に与える影響**

◦宮地佑希野[1]，佃　慶子[1]，齊藤亜佑美[2]，橋本貴生[1]，加藤範久[1]，矢中規之[1]（[1]広島大 生物圏科学，[2]広島大 生物生産）

**3G018　アデノシンの糖代謝への影響**

◦鳥羽裕太郎，　滝森美穂，　伊藤由華，　吉田智美，　清水　誠，服部一夫，只石　幹（東農大・応生科・栄養）

**3G019　体内時計を利用してマウスに肥満を誘導する飼育法**

◦大池秀明，桜井　睦，一法師克成，小堀真珠子（食総研/農研機構）

**3G020　Wnt シグナルを介する間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化制御**

◦鬼丸祐二[1]，　谷口実由紀[1]，　田中　牧[1]，　鋳方綾香[1]，　細田明美[2]，金　東浩[1]，佐伯　茂[1]（[1]大阪市大院・生活科学・生体情報，[2]東京医療保健大・医療栄養）

**3G021　摂食時間制限がエネルギー代謝，肥満に及ぼす影響の解析**

◦小島貴之[1]，船戸里香[2]，細野　崇[1,2]，関泰一郎[1,2]（[1]日本 大・生資科・生命化，[2]日本大院・生資科・応用科）

**3G022　プラスミン阻害剤がラット部分肝切除モデルの肝再生に及ぼす影響**

◦三浦　徳[1]，　山口朋美[2]，　小泉洸太[2]，　細野　崇[1,2]，　関泰一郎[1,2]（[1]日本大院・生資科・応生科，[2]日本大・生資科・生命化）

**3G023　PCTK3/CDK18 は FAK1 を抑制して細胞形態を制御する**

◦松田真弥，宮本賢治，辻　明彦，湯浅恵造（徳島大院 STS）

**3G024　TIPE2 は *Helicobacter pylori* CagA 誘導性 TAK1-NF-κB シグナルを抑制する**

◦中野利沙[1]，　櫻井　渉[1,2]，　大穂満隆[1,3]，　舛廣善和[1]，　高橋恭子[1]，花澤重正[1]（[1]日本大学・生物資源・応用生物，[2]キッセイ薬品，[3]クインタイルズ）

**3G025　Geranylgeranyl pyrophosphate が脂肪細胞の分化に与える影響**

◦葉　語勝[1]，　高橋信之[1,2]，　江川　香[1]，　金　英一[1]，　河田照雄[1,2]，後藤　剛[1,2]（[1]京大院農･食品生物，[2]京大･生理化学研究ユニット）

**3G026　炎症制御を目指したシアル酸認識レクチンの基礎研究**

◦樋口廣士，庄司　徹，村瀬佑介，立山博之，飯島信司，西島謙一（名大工）

**3G027　低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析**

◦橋本康太郎，佐藤直也，三浦　豊（東京農工大・院・応用生命化学）

**3G028　Crisper/Cas9 法による Pin1-欠損ヒト細胞の作製と解析**

◦秋吉皓太，韋　達狒，カスジャンマシュー，内田隆史（東北大農）

**3G029　*Xenopus laevis* 由来錐体 Phosphodiesterase 6 のシャペロン共発現下における機能的発現**

◦田端勇人，　大森夢子，　長岡健斗，　尾谷優磨，　嶺岸卓徳，奥田祐介，岡崎修治，赤沼元気，栗井貴子，石塚盛雄（中央大学）

**3G030　紫外線 DNA 損傷の修復機構における SUMO 化 DDB2 の機能解析**

◦金岡英徳，奥嵜雄也，萩原遙太，飯島信司（名大院工）

**3G031　マウスの胃における酸性ほ乳類キチナーゼの発現と活性**

◦大野美紗[1,2]，大貫理穂[1]，根本千雪[1]，大川一明[1]，樫村昭徳[1]，坂口政吉[1]，菅原康里[1]，小山文隆[1]（[1]工学院大先進工，[2](独)日本学術振興会特別研究員 DC[2]）

**3G032　キメラ体を利用したヒトとマウス AMCase の機能比較**

◦大川一明[1]，樫村昭徳[1]，大野美紗[1,2]，坂口政吉[1]，菅原康里[1]，小山文隆[1]（[1]工学院大先進工，[2](独)日本学術振興会特別研究員 DC[2]）

**3G033　味覚受容体 T1R3 膜貫通領域における発現検討**

◦中北智哉[1]，三坂　巧[2]，小林拓也[1]（[1]京大医，[2]東大院農生科・応生化）

**3G034　HDL 産生の鍵を握る ABCA1 の C 末端領域の機能解析**

◦岡本雄介[1]，永田　紘[2]，笠井倫志[3]，楠見明弘[2,3]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大院農，[2]京大 iCeMS，[3]京大再生研）

**3G035　ABCA1 細胞外ドメインの HDL 産生における役割の解析**

◦小笠原史彦[1]，石神正登[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大・院農・応用生命科学，[2]京大・物質－細胞統合システム拠点）

**3G036　ヒト ABCA1 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の作製とエピトープ探索**

◦三好里奈[1]，富岡麻衣子[2]，小笠原史彦[1]，木村泰久[1]，木岡紀幸[1]，植田和光[1,2]（[1]京大・農・応用生命，[2]京大 iCeMS）

**3G037　ヒト-ウシ間のキメラを利用した抗ガン剤輸送タンパク質 MRP1（ABCC1)の基質認識部位の探索**

◦田口善智，戸木星菜，徳原　舞，梶友里恵，南　美幸，佐伯和弘（近畿大生物理工）

**3G038　転写因子 Bcl11b の脂肪細胞分化および脂肪蓄積における機能解析**

◦安本啓甫[1]，井原悠介[1]，塚本大介[1]，橋詰　力[2]，清水　誠[1]，井上　順[1]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大 IOG）

**3G039　ミミズに含まれる血栓分解並びに消化系酵素遺伝子発現条件の検討**

赤澤真一[1]，◦阿部　透[1]，田中和歌子[1]，脇本真之介[2]，志田洋介[3]，小笠原渉[3]（[1]長岡高専物質工，[2]ワキ製薬，[3]長岡技大工）

**3G040　新規に作製したヒト細胞株とそのタンパク質生産能等について**

◦井上祐一，山本涼平，榮田佳那子，川原浩治（国立高専機構北九州高専）

**3G041　糖応答性遺伝子 ChREBP $\beta$ は HNF4 $\alpha$ により転写制御される**

◦吉満　和，清水　誠，井上　順，佐藤隆一郎（東大院農）

**3G042　インスリン受容体基質が cap 非依存的翻訳促進に果たす新規機能**

◦中沖優里[1]，尾添淳文[1]，曽根芽里[1]，山中大介[1]，福嶋俊明[1,3,4]，片岡直行[2]，浅野知一郎[3]，千田和広[1]，伯野史彦[1]，高橋伸一郎[1]（[1]東大・院・農生科，[2]京大・院・医科，[3]広大・院・医歯薬保健学，[4]東工大・院・生命理工科）

**3G043　レスベラトロール投与によるオキシトシン受容体への影響**

◦菊池昇平[1]，日出間志寿[1]，堀江謙吾[1]，平山貴士[3]，鈴木紳吾[1]，矢内隆章[2]，高田良二[2]，西森克彦[1]（[1]東北大農，[2]キリン(株)R & D，[3]順天堂大学医学部）

**3G044　脂肪組織慢性炎症における新規性ホルモン作用の機能解析**

◦諸岡信克，植栗　慧，佐藤隆史（群馬大学）

**3G045　時計遺伝子 BMAL1 による海馬 CA1 ニューロンの樹状突起スパイン形態の制御**

◦宮原瑞希[1]，長谷川俊介[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大・応生科・バイオ，[2]科学技術振興機構・CREST）

**3G046　転写因子 CREB 恒常的活性化による海馬ニューロンスパイン密度と樹状突起分枝数の増加**

◦芹田龍郎[1,2]，福島穂高[1,2]，喜田　聡[1,2]（[1]東京農業大学院・農・バイオ，[2]JST・CREST）

**3G047　新規ヒストン H3 バリアント H3mm7 は骨格筋分化能を制御する**

◦原田哲仁[1]，前原一満[1]，田口裕之[2]，佐藤優子[3]，謝　炎[2]，木村　宏[3]，胡桃坂仁志[2]，大川恭行[1]（[1]九大医，[2]早稲田先進理工，[3]東工大生命理工）

**3G048　共培養系において初代培養細胞が iPS 細胞の分化成熟に与える影響**

◦八代侑己，川口英夫（東洋大学）

**3G049　マスト細胞における C/EBP $\alpha$ 遺伝子の発現抑制の調節**

◦笠倉和巳[1]，八代拓也[1]，原むつ子[2]，奥村　康[2]，西山千春[1]（[1]東京理大・基礎工，[2]順天堂大・医 アトピー疾患研究センター）

**3G050　ミズクラゲ幼生の内在性変態制御物質の探索**

中谷みなみ[1]，辻田菜摘[1]，吉岡沙弥香[1]，小山寛喜[1]，荒川賢治[2]，◦国吉久人[1]（[1]広島大院・生物圏，[2]広島大院・先端研）

**3G051　FRET を生じる蛍光発色団を導入した昆虫幼若ホルモン結合タンパク質の特性**

◦塩月孝博[1]，山崎俊正[1]，鈴木倫太郎[1]，土屋　渉[1]，菊田真吾[2]（[1]農生資研，[2]東京農工大農）

**3G052　超深海性ヨコエビの地理的隔離**

◦小林英城[1]，長濱統彦[2]，荒井　渉[1]，高見英人[1]，藤岡勘太郎[3]，木戸ゆかり[1]（[1]海洋機構，[2]ノートルダム大食品栄養，[3]神奈川大工）

**3G053　ダイズシストセンチュウの硝酸イオンへの誘引**

◦細井昂人[1]，内山博允[2]，近藤竜彦[3]，佐々木康幸[1]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]（[1]東農大・バイオ，[2]東農大生物資源ゲノム解析センター，[3]名大院・生命農学）

**3G054　*o*-phenanthroline によるダイズシストセンチュウの孵化促進**

◦野中詩織[1]，細井昂人[1]，内山博允[2]，近藤竜彦[3]，佐々木康幸[1]，浅見忠男[4]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]（[1]東農大・農学研・バイオ，[2]東農大生物資源ゲノム解析センター，[3]名大院・生命農学，[4]東大院・農生科・応生化）

**3G055　アコヤガイ真珠の白化現象の原因となる微細構造と有機基質に関する研究**

◦鈴木道生[1]，三木　匠[1]，向井広樹[2]，青木秀夫[3]，吉村悦郎[1]，作田庄平[1]，長澤寛道[1]，小暮敏博[2]（[1]東大院農，[2]東大院理，[3]三重県水産研）

**3G056　Genomic DNA cloning of sqst-3 gene, which encodes a predicted ZZ-type zinc finger protein in *C. elegans***

◦Zhanar Nurtoleu，Noboru Sasagawa（Tokai University）

**3G057　ブレビバチルス菌を用いたカイコガ前胸腺刺激ホルモンの大量調製法の確立**

◦此上祥史，山下雄佑，楊　易文，片岡宏誌，齋藤一樹（東大院・新領域・先端生命）

**3G058　カイコガ pH 感受性塩素チャネルの発現変動と遺伝子産物の多様化**

◦奥原大樹[1]，松田一彦[1]，伊原　誠[1]，伊藤克彦[2]（[1]近畿大農，[2]東農工大農）

**3G059　ダイズシストセンチュウに対する誘引物質の探索**

◦勝山　勉[1]，大木拓海[1]，近藤竜彦[2]，佐々木康幸[1]，矢嶋俊介[1]，伊藤晋作[1]（[1]東農大・農学研・バイオ，[2]名大院・生命農学）

## H：植物

**3H001　ムラサキ培養細胞を用いたシコニン分泌機構に関わる脂質の探索**

◦巽　奏[1]，岡咲洋三[2]，斎藤和季[2,3]，上撫健太[1]，杉山暁史[1]，矢崎一史[1]（[1]京大生存圏，[2]理研 CSRS，[3]千葉大薬）

**3H002　シソ目植物におけるフラボノイド生合成関連酵素群の相互作用ネットワーク形成**

◦天間菜月[1]，藤野尚人[1]，小松崎友紀[1]，杉山圭吾[1]，和氣駿之[1]，本橋令子[2]，田中良和[3]，高橋征司[1]，中山　亨[1]（[1]東北大院工，[2]静岡大農，[3]サントリーグローバルイノベーションセンター(株)）

**3H003　シロイヌナズナ CYP716A サブファミリー酵素遺伝子の機能解析**

◦安本周平，福島エリオデット，關　　光，村中俊哉（阪大院･工･生命先端）

**3H004　ナス科植物の有毒ステロイドグリコアルカロイド生合成に関わるアミノトランスフェラーゼの機能解析**

◦中安　大[1]，梅基直行[2]，大山　清[2,3]，宮地陽香[1]，渡辺文太[4]，村中俊哉[5]，斉藤和季[2,6]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]（[1]神戸大院・農，[2]理研 CSRS，[3]東工大院・理工，[4]京大・化研，[5]大阪大院・工，[6]千葉大院・薬）

**3H005　カワラヨモギのフェニルプロパノイド特異的プレニル基**

転移酵素遺伝子の同定
◦竹村知陽[1]，　棟方涼介[1]，　杉山暁史[1]，　鈴木秀幸[2]，　關　　光[3]，村中俊哉[3]，山浦高夫[4]，矢崎一史[1]　([1]京大・生存研，[2]かずさ DNA 研，[3]阪大院・工，[4]日本新薬)

**3H006　トマトにおける α-トマチン生合成に関わるステロイド 3 位酸化異性化酵素の解析**
◦李ヒョン宰，小林　緑，中安　大，杉本幸裕，水谷正治　(神戸大院・農・生命機能科学)

**3H007　刈込みにより獲得されたスズメノカタビラの矮性形質に関する研究**
◦鈴木宏佳[1]，岡崎麻衣子[2]，小笠原勝[2]，鈴木義人[1]　([1]茨大・農，[2]宇大・雑草と里山センター)

**3H008　Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of *Physcomitrella patens***
◦Masatoshi NAKAJIMA[1]，　Che-Dong YANG[1]，　Sho MIYAZAKI[1]，Seung-Hyun PARK[1]，　Masato OTANI[1]，　Hiroshi KAWAIDE[2]，Ken-ichiro HAYASHI[3]，Tadao ASAMI[1]　([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Dept. Biochem., Okayama Univ. Sci.)

**3H009　D14 と相互作用する転写因子・NF-YC の機能解析**
◦池上佳菜子[1]，　長江未有[1]，　増口　潔[2]，　高橋郁夫[1]，　中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科，[2]東北大院・生命科学)

**3H010　ストリゴラクトン-ジベレリンシグナル伝達のクロストーク機構を応用した新たな SL 制御法の開発**
◦久保田真康[1]，　吉澤真人[1]，　小石原暉[1]，　山上大智[1]，　姜　　凱[1]，伊藤晋作[1,2]，　中村英光[1]，浅見忠男[1]　([1]東大院・農生科・応生化，[2]東農大・応生科・バイオ)

**3H011　植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開**
◦栗本哲哉，　姜　　凱，　徐　銀卿，　中村英光，　宮崎　翔，中嶋正敏，浅見忠男　(東大院・農生科・応生化)

**3H012　Karrikins response in parasitic plants**
◦Wenqian HU，Yusaku IMAMURA，Hidemitsu NAKAMURA，Tadao ASAMI　(Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

**3H013　Strigolactones and Brassinosteroids Crosstalk on Arabidopsis Hypocotyl Elongation under Weak Light Condition**
◦JUTIPORN THUSSAGUNPANIT[1]，Yuko Nagai[1]，Takeshi Nakano[2]，Hidemitsu Nakamura[1]，Tadao Asami[1]　([1]Dept Applied Bio Chem, Univ of Tokyo, [2]RIKEN, Wako)

**3H014　酵母細胞壁が誘導する植物の病害応答機構の生物有機化学的研究**
◦矢口賢臣[1]，　木南朋久[2]，　岩渕千賀子[2]，　北川隆徳[2]，　安原貴臣[2]，高橋公咲[1]，松浦英幸[1]　([1]北大院農，[2]アサヒグループホールディングス株式会社)

**3H015　シロイヌナズナ中アシルポリアミンの探索・機能解析**
◦和田隆之介[1]，　山野博之[1]，　岩川純也[1]，　山岸卓矢[1]，　彦坂政志[1]，中村英光[1]，前田　哲[2]，森　昌樹[2]，浅見忠男[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]農業生物資源研究所)

**3H016　ストリゴラクトン受容体 D14 によるストリゴラクトン類縁体の被加水分解性と生理活性の解明**
◦呂　　瑩，　戸塚直哉，　喜久里貢，　竹内　純，　山野博之，中村英光，浅見忠男　(東大院・農生科・応生化)

**3H017　植物新規アシルスペルミジン類の探索・機能解析**
◦山野博之[1]，　岩川純也[1]，　山岸卓矢[1]，　彦坂政志[1]，　中村英光[1]，前田　哲[2]，森　昌樹[2]，浅見忠男[1]　([1]東大院農生科，[2]農業生物資源研究所)

**3H018　昆虫におけるインドール酢酸生合成過程に関する研究**
◦横山千晃[1]，永田晋治[2]，鈴木義人[1]　([1]茨大農・資源，[2]東大院・新領域・先端生命)

**3H019　オカボノクロアブラムシが形成するハルニレゴールの適応的意義に関する研究**
◦武井麻美[1]，　伊藤晋作[2]，　石毛太一郎[3]，　田中啓介[3]，　鈴木義人[1]([1]茨城大・農，[2]東農大・応生科・バイオ，[3]東農大・ゲノムセ)

**3H020　糖シグナリングによる側枝形成機構の解明**
◦大鳥久美[1,2]，岩城孝平[1]，田部記章[1,2]，田茂井政宏[1,2]，重岡　成[1,2]([1]近畿大・農・バイオ，[2]JST,CREST)

**3H021　シロイヌナズナ HsfA1d/A1e を介した β-シクロシトラールによる遺伝子発現制御機構の解明**
◦薮田行哲[1]，佐々木悠[1]，重岡　成[2]，渡邊文雄[1]　([1]鳥取大院農，[2]近畿大農)

**3H022　被覆栽培したチャの RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析**
◦森田重人[1,2]，　北島佐紀人[3]，　栗栖加奈[1]，　竹本哲行[4]，　寺島　伸[5]，山本直樹[1]，　三村　裕[4]，　矢野健太郎[5]，　佐野　智[1]，　増村威宏[1,2]([1]京都府大生命環境，[2]京都農技セ生資セ，[3]京都工繊大応用生物，[4]京都農技セ農林セ，[5]明治大農)

**3H023　イネのジャスモン酸応答性転写因子 RERJ1 は虫害抵抗性においてリナロールの生産を制御する**
◦茂手木敦史[1]，河村奈央子[1]，宮本皓司[1,2]，山根久和[2]，小澤理香[3]，高林純示[3]，　イバンガリス[4]，　新屋友規[4]，　野尻秀昭[1]，　岡田憲典[1]([1]東大・生物工学セ，[2]帝京大・理工，[3]京大・生態学研究センター，[4]岡山大・資源植物科学研究所)

**3H024　植物熱耐性向上物質サンギナリンの熱ショック応答誘導機構**
◦松岡恵里奈[1]，村野宏樹[1]，松原　匠[1]，原　正和[1,2]　([1]静大農，[2]静大グリーン研)

**3H025　ズッキーニにおけるダイオキシン類の体内輸送に関わる遺伝子の発現調節機構**
◦乾　秀之[1,2]，　吉原亮平[1]，　廣田又士[2]，　後藤純弥[2]，　殷　熙洙[3]([1]神戸大遺伝子，[2]神戸大院農，[3]農環研)

**3H026　植物のアスコルビン酸蓄積量の制限に関わる因子の解析**
伊藤史帆[1]，大北由佳[1]，重岡　成[2]，◦吉村和也[1]　([1]中部大応生，[2]近畿大農)

**3H027　The arsenic accumulation and arsenate reductase gene of three Pteris ferns.**
◦SHUJUN WEI[1]，　HAN WANG[2]，　KAZUKI SUGAWARA[1]，MEIFANG CHIEN[1]，CHIHIRO INOUE[1]　([1]Tohoku Univ., [2]TianJin Univ.)

**3H028　イネの転写因子 OsbZIP79 によるファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構**
◦渋谷大地[1]，宮本皓司[2]，山根久和[2]，野尻秀昭[1]，岡田憲典[1]　([1]東大・生セ，[2]帝京大・理工)

**3H029　鉄欠乏応答に関与する葉緑体 $H_2O_2$ 応答性遺伝子の機能解析**
◦野志昌弘[1]，森　大輔[2]，田部記章[1]，田茂井政宏[1,2]，高木　優[3,4]，丸田隆典[5]，重岡　成[1,2]　([1]近畿大・農・バイオ，[2]近畿大院・農・バイオ，[3]産総研・生物プロセス，[4]埼玉大・環境科学，[5]島根大・生資科・生命工)

**3H030　根粒菌の生産するジベレリンが根粒数を制御する**
◦立上陽平[1,2]，植田充美[1]　([1]京大院農，[2]学振(DC[1]))

**3H031　マメ科モデル植物であるミヤコグサを用いた根粒菌との共生の初期過程の解析**
◦菅沼智淑[1]，鳥井健次[1]，川口正代司[5]，松岡　健[1,2,3,4]　([1]九大院生資環境，[2]九大院農，[3]九大生資セ，[4]九大オルガネラセ，[5]基生研)

**3H032　日本のダイズリソースにおける Rj2 遺伝型の分布**
◦菅原雅之[1]，　梅原洋佐[2]，　柿崎芳里[1]，　佐藤修正[1]，　加賀秋人[2]，石本政男[2]，南澤　究[1]　([1]東北大生命，[2]生物研)

**3H033　植物生長促進細菌の単離と養液栽培における利用**
◦中岡知規，宮澤知愛，阿野貴司，岡南政宏　(近畿大生物理工)

**3H034　*Pseudomonas fluorescens* によるシロイヌナズナの生長促進作用メカニズムの解析**
◦大浦麻里[1]，　中岡知規[2]，　田中雄矢[2]，　奥野圭祐[2]，　阿野貴司[1,2]，岡南政宏[1,2]　([1]近畿大院生物理工，[2]近畿大生物理工)

**3H035　シロイヌナズナにおける花粉色素体増殖の遺伝的制御解析**
◦佐々木駿[1]，　石川浩樹[1]，　鈴木麻央[1]，　風間裕介[2]，　阿部知子[2]，伊藤竜一[3]，藤原　誠[1,2]　([1]上智大理工，[2]理研，[3]琉球大理)

**3H036　シロイヌナズナ花粉体細胞分裂時における色素体の増殖**
◦石川浩樹[1]，　佐々木駿[1]，　平野智也[2,3]，　風間裕介[2]，　阿部知子[2]，伊藤竜一[4]，藤原　誠[1,2]　([1]上智大理工，[2]理研，[3]宮崎大農，[4]琉球大理)

**3H037　アンチマイシン A 誘発シロイヌナズナ根色素体の形態変化**
◦三家本梨央[1]，　高橋　史[1]，　笹川展幸[1]，　藤原　誠[1]，　伊藤竜一[2]([1]上智大理工，[2]琉球大理)

**3H038　イネジベレリン 2 酸化酵素は多量体構造形成によりジベレリン代謝を促進する**
◦竹原清日[1]，三上文三[2]，樫尾　徹[1]，松岡　信[1]，上口(田中)美弥子[1]

（[1]名大・生物機能セ，[2]京大院・農）

**3H039　イネジベレリン 3 酸化酵素の機能解析および構造解析に関する研究**

◦樫尾　徹，竹原清日，松岡　信，上口(田中)美弥子　（名大・生物機能セ）

**3H040　アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の転写調節因子の探索**

◦近藤隆之，藤川愉吉，江坂宗春　（広島大院生物圏）

**3H041　トマトのアルドケト還元酵素のアスコルビン酸生合成とストレス応答発現に関する機能解析**

◦末川麻里奈，藤川愉吉，江坂宗春　（広島大院生物圏）

**3H042　イチジク由来 Rubber Elongation Factor のクローニングと大腸菌による発現**

◦横田早希[1]，鈴木友里奈[2]，北島佐紀人[3]，大谷典正[4]，後藤　猛[1]（[1]秋田大院工資，[2]秋田大工資，[3]京都工繊大応用生物，[4]山形大理）

**3H043　スイレンのアルカン合成酵素 NyCER1 および NyCER3 の同定と炭素鎖長特異性の解析**

◦小島久恵[1]，山本寛太[1]，鈴木孝征[2,3]，早川侑里[1]，徳弘健郎[4]，片平悟史[4]，東山哲也[3,5,6]，榊原　均[1,7]，石黒澄衛[1]（[1]名大生命農，[2]中部大応用生物，[3]JST-ERATO，[4]豊田中研，[5]名大 ITbM，[6]名大理，[7]理研 CSRS）

**3H044　エリシターペプチド PIP-1 のタバコ細胞による分解に関わる酵素の同定**

◦眞重るり，宮下正弘，宮川　恒　（京大院農）

**3H045　クローバー複葉形成関連遺伝子の発現・機能解析**

◦大橋ほなみ，瀬川　香，松田修一，斎藤靖史　（岩大農・寒冷バイオ）

**3H046　イネ胚乳シンシチウム形成，細胞化の時期に発現する F-box 遺伝子の機能解析**

◦斎藤靖史，杉山輝樹，藤原奈津美，松田修一，水谷征法，堤　賢一　（岩手大農寒冷バイオ）

**3H047　パスウェイエンジニアリングを用いたフリージア・エアリーパープル及びエアリーピーチの新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の機能解析**

◦樋口雄貴[1]，八反順一郎[1]，大野史菜[1]，伊藤智子[2]，澁谷ゆりか[2]，渡邉ありさ[2]，石井　純[3]，近藤昭彦[4]，三沢典彦[1]（[1]石川県大・生資研，[2]日本女子大・家政，[3]神戸大・自科・研究環，[4]神戸大院・工・応化）

**3H048　出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いた紅藻スサビノリ由来脂肪酸合成関連遺伝子の機能解析**

◦渡部智弘[1,2]，森田嵩子[2]，長島　生[2]，菅野陽平[3]，佐原健彦[2]，扇谷　悟[2]，三上浩司[4]，森田直樹[1,2]（[1]北大院農・基礎環境微生物学，[2]産総研・生物プロセス，[3]道衛研，[4]北大院水産科学・育種生物学）

**3H049　ヒメツリガネゴケに存在する二つのアスコルビン酸生合成経路の機能検証**

袖山　翼，丸田隆典，澤　嘉弘，◦石川孝博　（島根大生物資源）

**3H050　Metallothionein 遺伝子を導入した *Mentha aquatica* 形質転換体の作出と解析**

◦田渕　晃，小野里真志，栗田将平，柴田涼太　（信州大農）

**3H051　植物のフルクタン合成酵素(6-SFT)遺伝子を利用した直鎖 $\beta$ (2,6)レバンの生産**

◦吉田みどり，松平洋明，田村健一　（農研機構・北海道農業研究センター）

**3H052　リゾビウム属細菌の Ti/Ri プラスミドの交換と形質転換特性に与える影響**

◦坂井綾子，山本真司，鈴木克周　（広島大理）

**3H053　ラン藻 FBP/SBPase 導入によるサツマイモバイオマスへの影響**

◦田部記章[1,3]，大鳥久美[1,3]，田茂井政宏[1,3]，横田明穂[2,3]，重岡　成[1,3]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]奈良先端大・先端科技推進セ，[3]JST, CREST）

**3H054　R4 Gateway リサイクリングクローニングシステムによる種々のプロモーターを用いた植物での複数遺伝子発現**

◦税所利基[1]，芝原健太[1]，木村哲哉[2]，中川　強[1]（[1]島根大・総科センター・遺伝子，[2]三重大院・生物資源）

## I：糖鎖生化学・糖鎖工学

**3I001　リポオリゴ糖の酸性分岐内部コア 4 糖および 5 糖の合成**

◦成本裕文，蟻　瑞欽，野添未来，一柳　剛　（鳥取大農）

**3I002　リポ多糖の酸性内部コア Kdo2 糖の合成研究ー Kdo 供与体の配座と反応性の比較ー**

◦一柳　剛，田坂瑞葵，村岡南美，田中琢也　（鳥取大農）

**3I003　酵母細胞表層糖鎖の合成研究**

◦吉田英恵[1]，秋田　真[2]，勝田　亮[2]，矢島　新[2]，額田恭郎[2]（[1]東農大院農，[2]東農大応生）

**3I004　DMT-MM を用いた GlcNAc ペプチドの合成と糖鎖の酵素的付加反応**

◦苫米地祐輔[1]，山本憲二[1]，稲津敏行[2]，国嶋崇隆[3]（[1]石川県大・生資工研，[2]東海大・工，[3]金沢大院・薬）

**3I005　遠隔位からの分子内アグリコン転移反応によるシスグリコシル化の検討**

◦石渡明弘[1]，伊藤幸成[1,2]（[1]理研，[2]ERATO・JST）

**3I006　チオサリチルアルデヒド型糖供与体を用いた糖鎖合成法の開発**

◦駒井亮太[1]，堺　英俊[1]，小室晴香[1]，西田芳弘[1,2]，土肥博史[1,2]（[1]千葉大院融合科学，[2]千葉大分子キラリティーセンター）

**3I007　水酸基近傍にチオエーテルを有する糖受容体を用いた 1,2-*cis* 選択的グリコシル化**

◦小林真己[1]，江澤あやめ[1]，山本佳奈[1]，西田芳弘[1,2]，土肥博史[1,2]（[1]千葉大融合科学，[2]千葉大学分子キラリティー研究センター）

**3I008　脱離基中の官能基の違いによる新しい連続グリコシル化法の開発**

◦江澤あやめ[1]，木村智文[1]，金澤　尊[1]，小林真己[1]，駒井亮太[1]，西田芳弘[1,2]，土肥博史[1,2]（[1]千葉大融合科学，[2]千葉大学分子キラリティー研究センター）

**3I009　糖鎖基質酵素反応におけるマイクロ波効果の研究**

◦長島　生[1]，作田智美[1]，杉山順一[2]，佐々木正秀[1]，清水弘樹[1]（[1]産総研生物プロセス，[2]産総研ナノ材料）

**3I010　担子菌の産生する糖鎖遊離酵素を利用した Native な糖タンパク質からのアスパラギン結合型糖鎖除去**

高橋剛生[1]，海住宜広[1]，Nakapong Santhana[2]，Kuttiyawong Kamontip[3]，Krusong Kuakarun[4]，Kaulpiboon Jarunee[5]，Pongsawasdi Piamsook[4]，◦伊藤和央[1]

（[1]阪市大院・理，[2]ラムカンヘン大・理，[3]カセサート大・教養，[4]チュラロンコン大・理，[5]タマサート大・医）

**3I011　食物繊維による腸管上皮細胞応答とヘパラン硫酸糖鎖構造変化の相関**

◦桑江俊成[1]，西田光貴[1]，伊藤千弘[1]，森雄一郎[2]，山本宏貴[2]，伊神孝生[2]，北口公司[1]，矢部富雄[1]（[1]岐阜大院・応生科，[2]三基商事(株)）

**3I012　サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの細胞増殖促進効果における制御メカニズムの解明**

◦佐野栄宏，齋藤知明　（青森県産業技術センター）

**3I013　Cell surface N-linked glycan alteration in HepAD38 cell lines expressing hepatitis B virus**

◦Surya Agung Priyambada[1]，Ryo Misaki[1]，Toru Okamoto[2]，Yuta Okamoto[1]，Takao Ohashi[1]，Yoshiharu Matsuura[2]，Kazuhito Fujiyama[1]（[1]International Center for Biotechnology, Osaka University，[2]Departement of Molecular Virology, Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University）

**3I014　コウキクサ成長促進活性を有する酵母マンナンの構造限定**

◦倉本　歩[1]，菅原雅之[2]，三輪京子[1,3]，仲山賢一[4]，森川正章[1,3]（[1]北大院・環境，[2]東北大院・生命，[3]JST-ALCA，[4]産総研・中国セ）

**3I015　EndoS2 変異体による抗体糖鎖のリモデリング**

◦高島　晶[1]，黒河内政樹[1]，森　昌子[1]，大隅賢二[1]，戸治野真美[1]，月村　亘[1]，菅原州一[1]，弘瀬友理子[1]，冨田正浩[2]，高柳　淳[3]，水野真盛[1]，松田昭生[1]，天野純子[1]，白井　孝[1]（[1](公財)野口研究所，[2](株)免疫生物研究所，[3]慶應大学）

**3I016　蛍光標識糖脂質をプローブとした細胞内膜系の動態解析**

◦新井健太[1,2]，蟹江善美[2,3]，蟹江　治[1,2,3]（[1]東海大大学院工学研究科，[2]東海大工学部生命多様性研究会，[3]東海大学糖鎖科学研究所）

**3I017　ループ構造の数が異なる植物由来ファミリー GH19 キチ**

ナーゼの機能に関する研究
◦田中　盾[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[2]，沼田倫征[3]，深溝　慶[1]（[1]近畿大，[2]琉球大，[3]産総研）

## J：生物化学工学

**3J001　好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* を用いたアーキア由来タンパク質発現系の構築**
◦小栗隆寛[1]，前田英利[1]，里村武載[1,2]，鈴木匠爾[3]，黒沢則夫[3]，末信一朗[1,2]（[1]福井大院工，[2]福井大・生命セ，[3]創価大）

**3J002　構造情報に基づく部位特異的変異及びランダム変異導入に依るヘモグロビン A1c ダイレクトオキシダーゼの造成**
◦小川徳之[1]，木村豪秀[1]，益成利幸[1]，天野芙美[1]，片山有基[1]，永井　豪[1]，市村通朗[1]，丸山如江[2]，伊藤貴文[3]，橋本　渉[3]，村田幸作[2]，相阪和夫[4]（[1]協和メデックス（株）研究開発本部，[2]摂南大・理工，[3]京大院・農，[4]無所属）

**3J003　組換えカイコを用いて作製したシロアリセルラーゼ固定化シルクの特性**
炭谷めぐみ，渡辺裕文，中島健一，飯塚哲也，立松謙一郎，瀬筒秀樹，◦石橋　純（国立研究開発法人農業生物資源研究所）

**3J004　DNA 結合タンパク質タグを利用した酵素の整列化技術とビーズディスプレイへ応用**
◦林　健太，太田英里，朱　　博，兒島孝明，中野秀雄（名大院・生命農・生命技術）

**3J005　蛍光タンパク質を用いた BACE1 新規 FRET 基質**
◦安達　稔[1]，山口淳一[1,2]，飯田泰広[1,3]（[1]神奈川工大工，[2]神奈川工大応用化学，[3]神奈川工大応用バイオ）

**3J006　キトサンおよび臭化シアン活性化セファロースに固定化したパパインによるオリゴチロシンペプチドの合成**
◦三橋　純[1]，中山　勉[1,2]，奈良井朝子[2]（[1]日獣大院 獣生科，[2]日獣大 応生）

**3J007　*Stenotrophomonas maltophilia* 4A が産生するエステラーゼの特性とその遺伝子**
◦奥野圭祐[1]，朝倉紗也栞[1]，前田真美[1]，大浦麻里[2]，阿野貴司[1,2]，岡南政宏[1,2]（[1]近畿大生物理工，[2]近畿大院生物理工）

**3J008　反応次数感度に基づく阻害および活性化の大きさの判定法**
◦山田正嗣[1]，岩永征士[2]，シユタサカンスポーン[3]，平井優美[3]，白石文秀[1]（[1]九大院農，[2]九大農，[3]理研環資研）

**3J009　乳酸菌の菌体外多糖類生産における培養工学的検討**
◦齊田実紗[1]，大政健史[2,3]（[1]徳島大院・先端技術，[2]徳島大院・STS 研，[3]阪大院・工）

**3J010　ヒトヘアケラチンによる中間径フィラメント束の形成**
◦小池謙造[1]，高田　京[2]，中村朱里[2]，本田裕子[3]，佐藤　博[4]，松元俊彦[2]，安藤祥司[2]（[1]花王・HC 研，[2]崇城大・生物生命，[3]佐賀大・医，[4]熊本大・理）

**3J011　二官能基性人工アミノ酸を利用したタンパク質コンジュゲートの合成**
◦山口　純[1]，渡邉貴嘉[2]，芳坂貴弘[2]，坂本健作[1]（[1]理研 CLST，[2]北陸先端大マテリアルサイエンス）

**3J012　UAG コドンの再定義化株 B95. *Δ* A *Δ fabR* 株を用いたスルホチロシン含有ヒルジン（sulfo-HV1）の発現**
◦高橋美穂子，向井崇人，坂本健作（理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター（CLST））

**3J013　枯草菌由来リパーゼ LipA の界面活性化に関する機能解析**
◦高木良樹，伊藤貴文，西田智里，仲上真由，日比隆雄（福井県大・生物資源）

**3J014　可溶化 *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素の大腸菌スクリーニング系の構築**
◦村上　諒，永田圭介，小原仁実，麻生祐司（京都工繊大院）

## K：新技術

**3K001　ハートカット GC と酸化物半導体センサを組み合わせたオミッションテストによる香気分析**
◦三津谷尭史[1]，喜多純一[2]，山下哲郎[1]，宮崎雅雄[1]（[1]岩手大学院農学研究科，[2]島津製作所）

**3K002　電界効果トランジスタ（FET）センサを用いたソバ 16kD アレルゲンタンパク質 の非標識高感度検出**
◦原田義孝[1]，綱　美香[1]，藤田圭祐[3]，秀島　翔[2]，黒岩繁樹[2]，中西卓也[2]，逢坂哲彌[2,3]（[1]日本製粉（株）中央研究所，[2]早稲田大学ナノ理工学研究機構，[3]早稲田大学先進理工学部）

**3K003　ほだ木中のシイタケ成育過程の MRI による追跡**
田中秀弥[1]，八島武志[2]，◦石田信昭[1]（[1]石川県大食品，[2]石川農林総研）

**3K004　メタボロミクス技術による成分基本台帳整備と食品研究への応用**
◦櫻井　望，秋元奈弓，須田邦裕，池田千晶，小澤馨史，花野　滋，宗藤玲子，山田　学，柴田大輔（かずさ DNA 研）

**3K005　質量分析イメージング法を用いたトマト果実の生理応答に対する代謝動態解析**
◦中村純也[1]，一瀬智美[2]，早川英介[2]，藤村由紀[2]，割石博之[1,2,3]，三浦大典[2]（[1]九大院生資環，[2]九大レドックスナビ，[3]九大基教）

**3K006　デュアルフィルトレーションを用いた細菌検査試料前処理法の開発（第 2 報）**
◦種田明子，金政　真（中部大応生）

**3K007　新規微生物微小コロニー染色法の開発**
◦海谷慎一[1]，中内茂樹[2]（[1]豊橋技科大 環境生命工，[2]豊橋技科大 情報知能工）

**3K008　近赤外蛍光を利用した食中毒菌の検出方法の確立と装置開発**
◦田中和裕[1]，加藤晃代[2]，海谷慎一[3]，三宅司郎[4]，渕　真悟[5]，中野秀雄[6]，田村廣人[1]（[1]名城大農，[2]（公財）科技財団，[3]豊橋技科大 環境生命工，[4]（公財）京都高度技術研究所，[5]青山学院大学理工学部，[6]名大院生命農）

**3K009　希少糖を用いた酸化グラフェンの還元および機能性の付与**
小堺悠可[1]，平田圭亮[1]，内田貴司[1,2]，中島義賢[1,2]，◦水木　徹[1,2]（[1]東洋大，[2]東洋大バイオナノセンター）

**3K010　多世代進化工学による転写スイッチの高性能化**
◦木村友紀，大野琢也，河合（野間）繁子，斎藤恭一，梅野太輔（千葉大院・工・共生応化）

**3K011　培地中の非天然アミノ酸で厳密に遺伝子の発現を制御する方法**
◦加藤祐輔（農業生物資源研）

**3K012　In vivo イメージングを志向した近赤外発光ルシフェリンの改良**
◦北田昇雄[1]，岩野　智[2]，木山正啓[1]，齊藤亮平[1]，丹羽治樹[1]，平野　誉[1]，牧昌次郎[1]（[1]電通大，[2]理研）

**3K013　簡易電気泳動装置の開発と高等学校生物における授業実践**
◦倉林　正[1,3]，武村政春[1,2]（[1]東京理科大・院・科学教育，[2]東京理科大・理，[3]沼田女子高校）

**3K014　化学プロファイリングによる植物―土壌生態系の共代謝システム評価**
◦伊達康博[1,2]，篠阿弥宇[1]，菊地　淳[1,2,3]（[1]理研 CSRS，[2]横市院生命医，[3]名大院生命農）

講演番号　　演　題　　発表者氏名(所属)

## A 環境科学・バイオマス利用

**4A001　*Methylobacterium* sp. FD1 株のホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子の単離と大腸菌での発現**
◦米光　裕[1]，菊地悠太[1]，瀬田寛行[2]，藏富大智[1]，岸本　昇[1]，奥野祥治[1]（[1]和歌山高専物質，[2]和歌山高専専攻科）

**4A002　講演取消**

**4A003　緩速・生物ろ過による硬度低減法の実用化研究**
◦宮平理恵，栗本真衣，小宮理絵，鈴木智子，中田未来，小関正道（東京家政大学）

**4A004　セシウム蓄積細菌の探索およびセシウム蓄積能の評価**
◦渡辺　剛[1]，松本貴良[1]，齋野一葵[2]，林　秀謙[1,2]（[1]前工大工，[2]前工大院工）

**4A005　嫌気性微生物叢の解析方法の検討**
◦松本邦成，堀西直人，渡邊克二（福工大・工）

**4A006　*Stenotrophomonas maltophilia* は一種類の走化性センサーによりフェノールを感知する**
◦渡邉祐子[1]，荷方稔之[1]，内田智美[2]，柿井一男[1]（[1]宇都宮大院工，[2]宇都宮大工）

**4A007　抗がん剤 5-フルオロウラシルとその類似体を用いた微生物変換産物の挙動解析**
◦岡山真哉，前田憲成（九州工大生命工）

**4A008　カルバゾール分解菌における分解遺伝子群の多様性の解析**
◦徳田裕太[1,2]，ベハラノフェリペ[1]，水口千穂[1]，兼崎　友[3]，岩田健一[2]，吉川博文[3,4]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]芝工大シ生，[3]東京農大・NGRC，[4]東京農大・応生科・バイオ）

**4A009　Aerobic and anaerobic benzene degradation pathway of *Azoarcus* sp. strain DN11**
◦Allan DEVANADERA[1], Felipe VEJARANO[1], Yu ZHAI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yuki KASAI[2], Yoh TAKAHATA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.）

**4A010　環境汚染物質 PCB/ビフェニル分解菌を利用したバイオプラスチック(PHA)生産の効率化**
◦矢島泰斗，前田理久（明治大学）

**4A011　油糧系バイオ燃料植物ジャトロファの重金属応答の解析**
◦山田みな美[1]，山田　智[1,2]，辻本　壽[2,3]，マランバニホイツィオネ[2]，明石欣也[1,2]（[1]鳥取大農，[2]鳥取大院連合農学，[3]鳥取大乾燥地研）

**4A012　生物膜と包括担体を併用した SNAP 法による窒素除去の試み**
◦海老根会，高品知典，角野立夫（東洋大生命）

**4A013　アセトニトリル分解能を有する微生物の探索と機能解析に向けて**
◦齋藤麻理，岡部海里，森澤理紗，菅原佳奈子，菅野靖史（日本女子大・理・物生）

**4A014　バクテリアの還元型リン化合物輸送機構の解析**
◦廣田隆一，森部重彬，作田敦士，野口麗次，池田　丈，黒田章夫（広島大院先端物質・分子生命）

**4A015　*Pseudomona stutzeri* NT-I 株の Dimethyl diselenide 合成速度促進因子の探索**
◦大塚　治[1]，黒田真史[2]，池　道彦[2]，山下光雄[1]（[1]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター，[2]大阪大院・工・環エネ）

**4A016　環境水中における相互変動因子評価技術の構築**
◦大島嵩裕[1]，三澤拓真[1,2]，坪井裕理[2]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横市院・生命医，[2]理研・CSRS，[3]名大院・生命農）

**4A017　ユーグレナによる低酸素下ワックスエステル合成における呼吸鎖電子伝達系の役割解明**
◦中澤昌美[1,2]，太田剛志[1]，井上凌太[1]，石川孝博[2,3]，上田光宏[1]，阪本龍司[1]，乾　博[4]，中野長久[1]，宮武和孝[5]（[1]阪府大生命，[2]科学技術振興機構 CREST，[3]島根大生資，[4]阪府大総リハ，[5]帝塚山学院大人科）

**4A018　代謝工学を用いた大腸菌によるアンモニア生産**
◦三上洋祐[1]，米田久成[1]，立上陽平[1,2]，青木　航[1,3]，植田充美[1,3]（[1]京大・農・応用生命，[2]日本学術振興会特別研究員(DC[1])，[3]バイオ計測センター）

**4A019　Establishment of volumetric oxygen transfer coefficients in batch fermentation for optimal algal biofuel production by *Aurantiochytrium* sp. NBRC102614 strain**
◦BONIFACIUS PEDRO SATRIA, FUMIYA MATSUSHITA, HIROSHI MATSUURA（National Institute of Technology, Asahikawa College）

**4A020　植物バイオマス糖化液を用いた新奇ラビリンチュラ類によるバイオ燃料生産**
◦林　雅弘[1]，松田綾子[1]，松田高宜[2]，泉　可也[2]（[1]宮崎大農，[2](株) bits）

**4A021　コリネ型細菌による UV 吸収性アミノ酸の生産**
◦柘植陽太[1]，山本省吾[2]，曽田匡洋[2]，荻野千秋[3]，近藤昭彦[3,4]（[1]神戸大・研究環，[2]長瀬産業株式会社，[3]神戸大院・工，[4]理研・CSRS）

**4A022　マンナンバイオマスからのエタノール生産：β-マンナナーゼと β-マンノシダーゼを細胞表層に提示した出芽酵母の開発**
◦石井　純[1]，岡崎文美[1]，Djohan Apridah Cameliawati[2]，原　清敬[1]，浅井菜々実[1]，Andriani Ade[2]，寺村　浩[3]，Kahar Prihardi[3]，Yopi[2]，Prasetya Bambang[2]，荻野千秋[3]，近藤昭彦[3]（[1]神戸大・自科・研究環，[2]インドネシア科学院(LIPI)，[3]神戸大院・工・応化）

**4A023　Integrated engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from structurally unrelated sugars and glycerol**
◦MENGXIAO ZHANG, Yui Kawashima, Shunsuke Kurita, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui（Grad. Sch. Biosic. & Biotechnol, Tokyo Tech.）

**4A024　講演取消**

**4A025　海洋性細菌 *Microbulbifer* sp. KIT-19 株のアルギナーゼの性質とミックスプライマーを用いたアルギナーゼ遺伝子の取得**
◦袴田佳宏，庄山創太，大箸信一（金沢工大）

**4A026　粗粉砕草本系バイオマス含有リグニン分解酵素について**
◦伊藤　龍，伊藤雅紀，湯下佳和，倉根隆一郎（中部大院）

**4A027　Improvement of efficiency of lignocellulose hydrolysis by cellulase complexes from Trichoderma reesei strains**
◦Xu FANG, Jiannan Li, Lijuan Han, Mingyu Wang（Shandong University）

**4A028　ゲノム工学を用いた物質生産微生物工場開発の新戦略**
◦門屋亨介[1,2]，松本謙一郎[1]，大井俊彦[1,2]，田口精一[1,2]（[1]北大院工，[2]JST-CREST）

**4A029　汚泥分解微生物の生化学的解析**
◦佐藤颯音，藤井克彦（山口大院農）

**4A030　大腸菌における 1,4-ブタンジオール人工生合成経路の構築**
◦江口晃一[1]，工藤基徳[2]，荒木通啓[2]，石井　純[2]，山本浩明[1]，近藤昭彦[2]（[1]株式会社ダイセル，[2]神戸大学）

**4A031　加水分解性を有するグリコール酸ベースポリマーの微生物合成**
◦工藤悠希[1]，平出幸和[1]，大井俊彦[1,2]，田口精一[1,2]，松本謙一郎[1,3]（[1]北大院工，[2]JST CREST，[3]JST PRESTO）

**4A032　白色腐朽菌の混合培養によるセルロース系原料からのエタノール生産**
◦井上瑛絵，安藤広将，内土井さくら，堀沢　栄（高知工科大）

**4A033　嫌気性細菌の共存培養によるセルロースからの水素ガス生産**
関　兵馬，吉田　稜，栗冠真紀子，◦木村哲哉，栗冠和郎（三重大院生資）

**4A034　ウキクサ亜科植物葉状体からの植物生育促進細菌の探索**
◦岩下智貴[1]，田中靖浩[1]，玉木秀幸[2]，米田恭子[2]，牧野彩花[2]，遠山　忠[3]，鎌形洋一[2]，森川正章[4]，森　一博[3]（[1]山梨大生命環境，[2]産総研生物プロセス，[3]山梨大工，[4]北大院環境）

**4A035　ユーグレナのバイオ燃料生産性に及ぼすラン藻 FBP/SBPase 導入による光合成機能強化の影響**
◦小川貴央[1,3]，作山治美[1,3]，田茂井政宏[1,3]，石川孝博[2,3]，重岡　成[1,3]（[1]近畿大・農・バイオ，[2]島根大・生資科・生命工，[3]JST, CREST）

**4A036　遺伝子組換え分裂酵母を用いた D-乳酸の無中和発酵プロ**

セス
◦木村修一郎，田中博己，原　太志，田中崇之　（旭硝子株式会社）

**4A037　ジャーファメンターを用いた組換え *E. coli* による乳酸ベースバイオポリマー生産法の確立**
◦滝沢憲治[1,2]，大井俊彦[1,2]，松本謙一郎[1]，田口精一[1,2]　（[1]北大院工，[2]JST-CREST）

## B：有機化学，天然物化学

**4B001　アロニアに含まれる水溶性成分が及ぼすブドウ球菌属への抗菌効果**
◦阪上　綾[1]，鈴木友里[1]，森本亮祐[1]，隅谷栄伸[2]，伊勢川裕二[1]（[1]武庫川女子大院食栄，[2]東洋食品研究所）

**4B002　*Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養により生産される新規イソキノリンアルカロイド**
◦小川凌太[1]，齊藤太樹[2]，仁戸田照彦[2]，神崎　浩[2]　（[1]岡山大・農，[2]岡山大院・環境生命）

**4B003　放線菌 *Streptomyces griseus* OS-3601 が生産する新規物質 iminimycin A 及び iminimycin B について**
◦宮野　怜[1]，松尾洋孝[2]，木村　徹[1]，浅見行弘[2]，岩月正人[1,2]，佐藤倫子[3]，塩見和朗[1,2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]，中島琢自[2]（[1]北里大院・感染制御，[2]北里大・生命研，[3]北里大・薬学部）

**4B004　放線菌 Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216 株が生産する新規化合物に関する研究**
◦木村　徹[1]，稲橋佑起[2]，岩月正人[1,2]，高田拓和[1]，谷口寿章[3]，塩見和朗[1,2]，高橋洋子[2]，大村　智[2]，中島琢自[2]（[1]北里大院感染制御，[2]北里大生命研，[3]徳島大疾患酵素学研究センター）

**4B005　海洋由来の放線菌を用いた physicochemical screening による新規化合物の探索**
◦田島文乃[1]，木村　徹[2]，岩月正人[1,2]，森山俊介[1]，高橋洋子[3]，大村　智[3]，中島琢自[3]（[1]北里大海洋生命，[2]北里大感染制御，[3]北里大生命研）

**4B006　Isolation of haplacutine F as a potent antibiotic from Burkholderia cepacia MBAF1239**
◦Dandan Li[1], Atsumi Hasada[1], Naoya Oku[1], Masafumi Shimizu[2], Igarashi Yasuhiro[1]　([1]Toyama Prefectural University, [2]Gifu University)

**4B007　AM 菌胞子から分離した AHL 生産菌に由来する菌糸分岐誘導活性物質**
◦三宅　智，甲斐建次，秋山康紀　（阪府大院・生命環境）

**4B008　海藻抽出物の β-グルクロニダーゼ阻害成分**
◦張　　鐸，今井雅志，栗原秀幸　（北大院水）

**4B009　ポルチーニ茸からの膵リパーゼ阻害物質の探索**
◦竹本彩乃[1]，加藤英介[2]，川端　潤[2]　（[1]北大院農，[2]北大農）

**4B010　ツルナ（*Tetragonia tetragonoid*）由来のフラボノイド配糖体の分離，同定および定量**
◦島袋瑞己，町田宗貴，高野　良，玉城　一　（琉大農）

**4B011　Antioxidant activity and tyrosinase inhibition of marine-derived bromophenols**
◦Md. Reazul ISLAM,　Momoka ONO,　Hideyuki KURIHARA（Hokkaido Univ.）

**4B012　レモンバーベナの脱タンニン画分からの α-アミラーゼ阻害物質の探索**
◦櫛引夏花[1]，加藤英介[2]，川端　潤[2]　（[1]北大農，[2]北大院農）

**4B013　ネコにマタタビ反応を誘発する新規活性物質の探索**
◦室岡孝信[1]，宮澤　悠[2]，安立昌篤[2]，山下哲郎[1]，西川俊夫[2]，宮崎雅雄[1]　（[1]岩手大学農学部，[2]名大院生命農）

**4B014　オオムギ属植物における防御関連二次代謝産物**
◦宇部尚樹[1]，西坂美穂[2]，上野琴巳[2]，武田　真[3]，石原　亨[2]　（[1]鳥大院・農，[2]鳥大・農，[3]岡山大・植物研）

**4B015　ミヤコグサが生産する新規ストリゴラクトンの探索**
◦謝　肖男[1]，松下明真[1]，米山香織[1]，内田健一[2]，横田孝雄[2]，野村崇人[1]，秋山康紀[3]，米山弘一[1]　（[1]宇都宮大・バイオ，[2]帝京大・理工・バイオ，[3]大阪府立大・生命環境・応用生命科学）

**4B016　イネ葉身のケイ酸体形成に関与する有機基質の探索と同定**
◦石田拓也，宍戸勇太，岡野桂樹，吉澤結子，尾崎紀昭　（秋田県大生資料）

**4B017　超臨界流体クロマトグラフィー（SFC）によるカテキン類の分離分析**
◦宮田健吾，中塚宏志，松本恵実，中塚進一　（長良サイエンス株式会社）

**4B018　紫外線エンド吸収と分取セルを利用したグルコシルセラミドの改良定量法**
◦松本恵実，石野暢好，藤野和孝，牧岡富広，中塚進一　（長良サイエンス（株））

**4B019　麹菌異種発現系を用いたインドールセスキテルペン，セスペンドールの生合成研究**
◦松本知之[1]，南　篤志[2]，劉　成偉[2]，五味勝也[3]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]東北大農）

**4B020　麹菌発現系を利用した生物活性セスタテルペノイドのゲノムマイニング**
◦成田興司[1]，千葉諒太[1]，南　篤志[2]，児玉基一郎[3]，五味勝也[4]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]鳥取大農，[4]東北大院農）

**4B021　植物疫病菌交配ホルモン α 1 の生合成酵素の探索**
◦戸村友彦，小鹿　一　（名大院生命農）

**4B022　Reconstitution of biosynthetic machinery for ustiloxin B**
◦Ying Ye[1], Atsushi Minami[2], Myco Umemura[4], Yuya Igarashi[2], Kazuo Shinya[5], Miho Izumikawa[6], Masayuki Machida[4], Katsuya Gomi[3], Hideaki Oikawa[2]　([1]Grad.Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [4]Bioproduction Research Institute, AIST, [5]Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST, [6]Japan Biological Informatics Consortium)

**4B023　抗生物質 pleuromutilin 生合成における環化酵素の機能解析**
◦山根桃華[1]，塚越多映[2]，南　篤志[2]，常盤野哲生[3]，五味勝也[4]，及川英秋[2]　（[1]北大院総化，[2]北大院理，[3]秋田県立大院，[4]東北大院農）

**4B024　イネいもち病菌のピリクロール類生合成遺伝子クラスターの同定**
◦古山祐貴[1]，本山高幸[2]，鎌倉高志[1]，長田裕之[2]　（[1]東理大，[2]理研）

**4B025　Design and Labelling of Proposed Cyclic Intermediates in the Biosynthesis of Coelenterazine-type Luciferins**
◦Richard Metzner[1,2], Yasuhisa Asano[1,2]　([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST)

**4B026　放線菌由来ジテルペン環化酵素 CotB2 が触媒する精巧な環化反応機構の解明**
◦寺本和矢[1]，目黒亜由子[1]，本吉祐大[1]，佐藤　玄[2,3]，増本優衣[2,3]，手塚則亨[2,3]，坂井健太[4]，上田翔太[4]，遠塚悠輔[4]，安藤祐美[4]，富田武郎[1]，金　承榮[1]，木村智之[5]，五十嵐雅之[5]，澤　竜一[5]，品田哲郎[4]，王　超[2,3]，内山真伸[2,3]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]東大院・薬，[3]理研，[4]大阪市大院・理，[5]微化研）

**4B027　安定同位体を用いたハスモンヨトウ幼虫に対するダイズ葉の化学的応答の動態解析**
◦木村有希[1]，中田　隆[1]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，寺石政義[1]，Eric SCHMELZ[2]，奥本　裕[1]，森　直樹[1]　（[1]京大院農，[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校）

**4B028　*Caloglyphus rodriguezi* における炭化水素の生合成経路の探索**
◦小木曽浩也[1]，中田　隆[1]，吉永直子[1]，小野　肇[1]，桑原保正[2]，清水伸泰[2]，森　直樹[1]　（[1]京大院農，[2]京都学園大）

**4B029　クサギカメムシ由来アルデヒド酸化酵素の体内分布と基質特異性**
◦野下浩二，田母神繁　（秋県大・生資科）

**4B030　コナダニ類が生産する不飽和炭化水素の生合成**
◦森山太介[1]，森　直樹[2]，桑原保正[3,4]，清水伸泰[1]　（[1]京都学園大院バイオ環境，[2]京大院農・応用生命，[3]富山県大工・生工研セ，[4]JST, ERATO）

**4B031　非リボソームペプチド JBIR-126 が有するピロリジン環の形成機構に関する研究**

○角田　毅[1]，勝山陽平[1]，泉川美穂[2]，橋本絢子[2]，藤江　学[3]，佐藤矩行[3]，新家一男[4]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]JBIC，[3]OIST，[4]AIST）

**4B032　紅藻マギレソゾ Laurencia saitoi 由来ブロモペルオキシダーゼの臭素化反応**

○正木志良[1]，金子賢介[3]，小林大毅[1]，石川高史[1]，西川慶祐[4]，森本善樹[4]，鷲尾健司[1,2]，森川正章[1,2]，沖野龍文[1,2]（[1]北大院環境，[2]北大院地球環境，[3]八戸高専，[4]阪市大院理）

**4B033　*Methylopila* sp. Yamaguchi のピロロキノリンキノン生合成遺伝子 *pqqE*，*pqqF*，*pqqG* 及び *pqqFG* 欠損株の作製と性質**

○石川枝里奈，外山博英（琉球大農・亜熱生資）

**4B034　Biosynthetic study of akaeolide and lorneic acid A, two structurally unique polyketides from marine Streptomyces**

○Tao Zhou[1]，Hisayuki Komaki[2]，Natsuko Ichikawa[2]，Akira Hosoyama[2]，Seizo Sato[3]，Yasuhiro Igarashi[1]（[1]Toyama Prefectural University，[2]Biological Resource Center，National Institute of Technology and Evaluation，[3]Nippon Suisan Kaisha，Ltd.）

**4B035　カプラザマイシン生合成におけるジアゼパノン環形成機構の解明**

○白石太郎[1]，五十嵐雅之[2]，西山　真[1]，葛山智久[1]（[1]東大・生物工学セ，[2]微化研）

**4B036　抗真菌性ポリケタイド butyrolactol の生合成に関する研究**

○春成円十朗[1]，小牧久幸[2]，市川夏子[2]，細山　哲[2]，五十嵐康弘[1]（[1]富県大・生工セ，[2]NITE・NBRC）

**4B037　Verticilactam 生合成遺伝子クラスター異種発現による新規類縁体の同定**

○高橋俊二[1]，寺井淳高[2]，野川俊彦[1]，天貝啓太[1,3]，二村友史[1]，橋本絢子[4]，新家一男[5]，池田治生[6]，川崎　寿[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]東電大院・物質，[3]次世代天然物化学技術研究組合，[4]バイオ産業情報化コンソーシアム，[5]産業技術総合研究所，[6]北里大・生命研）

**4B038　カビ由来新規 NRPS-PKS 融合酵素によるカビ毒テヌアゾン酸の生合成**

○尹　忠鉄，本山高幸，長田裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）

**4B039　希少放線菌の β-アルキル化酵素遺伝子群を含む II 型ポリケタイド合成酵素遺伝子クラスターに関する解析**

○佐藤　啓，横田康介，勝山陽平，大西康夫（東大院・農生科・応生工）

**4B040　プレニル化インドールアルカロイド okaramine の遺伝学的手法による生合成経路解析**

○加藤直樹[1]，古谷章悟[2]，大高潤之介[1]，衣笠清美[1]，高橋俊二[1]，松田一彦[2]，長田裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー，[2]近畿大農）

**4B041　麹菌 astellolide 生合成遺伝子クラスターの解析**

○篠原靖智[1]，高橋俊二[2]，長田裕之[2]，小山泰二[1]（[1]野田産研，[2]理研・CSRS）

**4B042　ポリエンを生合成する II 型ポリケタイド合成酵素の機能解析**

○杜丹ヤオ[1]，勝山陽平[1]，新家一男[2]，大西康夫[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]産業技術総合研究所）

**4B043　微生物における *cis*-jasmone の生合成経路の解明**

○松井　稜，天野就基，高橋公咲，松浦英幸（北大院農）

**4B044　*Trichoderma* sp. USF-2690 産生 sorbicillinol の生合成研究**

○河上悠香，並木大輔，盛岡　陽，清水寛之，加藤達也，煙山紀子，菅谷紘一，小野瀬淳一，阿部尚樹（東京農大院・食品）

**4B045　イネ様々な品種におけるファイトアレキシン，サクラネチンとナリンゲニンの蓄積**

○北野生薫[1]，西口沙也加[1]，上野琴巳[2]，藪田行哲[2]，寺石政義[3]，奥本　裕[3]，森　直樹[3]，石原　亨[2]（[1]鳥取大院・農，[2]鳥取大・農，[3]京大院・農）

**4B046　リンゴ実生における Phlorizin 類の生成に関する研究**

○小山愛美[1]，常盤野哲夫[2]，水野幸一[2]，小森貞男[3]，吉澤結子[2]（[1]秋田県立大生資科院，[2]秋田県立大生資科，[3]岩手大農）

**4B047　小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の開発と抗ウイルス剤への応用**

○荒井詩織[1]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

**4B048　トウモロコシ芽生えの重力屈性に関わる生理活性物質の機能解明**

○繁森英幸[1]，須藤恵美[2]，牧野　譲[2]，長谷川剛[2]，山田小須弥[1]，長谷川宏司[1]（[1]筑波大生命環境，[2]筑波大院生命環境）

**4B049　フラバン-3-オール誘導体の糖化反応検討**

○野呂健太[1]，柴崎　亨[1]，法島太一[1]，橋場祥智[2]，八上修一[2]，川崎　崇[3]，齊藤安貴子[1,2]（[1]大阪電気通信大学工学研究科先端理工学専攻，[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科，[3]立命館大学薬学部薬学科）

**4B050　ベツリン酸とオレアノール酸は細胞接着因子 ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用する**

○平松令子，福原早友里，三津田智嗣，横道公伸，片岡孝夫（京都工繊大院・応生）

**4B051　低酸素誘導因子の情報伝達経路に対する 4-O-methylascochlorin の作用機序の解析**

○武田賢治[1]，馬替純二[2]，伊藤昭博[3,4]，吉田　稔[3,4]，片岡孝夫[1]（[1]京都工芸繊維大学応生，[2]馬替生科研，[3]理研化学遺伝，[4]理研環境資源ケミカルゲノミク）

**4B052　酵母凝集反応を利用した新規なエピ変異原可視化検出系の開発**

○杉山圭一[1]，古沢博子[1]，清水雅富[2]，本間正充[1]（[1]国立衛研・変異，[2]東京医療保健大学）

**4B053　マウス 3T3-L1 細胞を用いたイソキノリンアルカロイドの生理活性評価**

○十亀真実，岩田優子，チョウイライ，佐藤文彦（京大生命）

**4B054　抗ガン活性を持つゴルジ体マンノシダーゼ I 阻害剤の開発：天然化合物ライブラリからの新規非糖ミミック阻害剤の探索**

○小山亮祐[1]，江田大曜[2]，袴田　航[1,2]，平野貴子[2]，西尾俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用，[2]日大生資科・生命化）

**4B055　ポリオキソメタレートの抗菌活性評価**

○今野博行，小林大樹，矢野成和，二階堂由莉，東海林由憲，似内郁美，川井貴裕，野々村美宗，鵜浦　啓，並河英紀（山形大院理工）

**4B057　シスチン－グルタミン酸アンチポーター（system $x_c^-$）を標的とした阻害剤の分子設計及び合成**

○尹　紫薇[1]，李　春傑[1]，佐藤茉美[2]，渡辺文太[1]，佐藤英世[2]，平竹　潤[1]（[1]京大化研，[2]新大医）

**4B058　プロリン異性化酵素 Pin1 阻害ポリフェノールの発見**

○對馬早織[1]，日高將文[1]，高橋典子[2]，津吹政可[2]，内田隆史[1]（[1]東北大学農学部 分子酵素学，[2]星薬科大学）

**4B059　新規プロアントシアニジン誘導体の開発－動脈硬化治療薬を目指して－**

○水野美麗[1]，川村綾乃[1]，大石菜摘[1]，根本徳子[1]，小森公陽[1]，中西郁夫[2]，松本謙一郎[2]，福原　潔[1]（[1]昭和大薬，[2]放医研）

**4B060　癌遺伝子産物 PPM1D を阻害する低分子化合物**

岩崎祐太[1]，青山友果[1]，鵜飼武寛[1]，鵜飼容子[1]，饒村　修[2]，○大西素子[1]（[1]中部大応生，[2]中部大工）

**4B061　クラビゲリン類の両鏡像体の合成**

○柿本　望，石神　健，渡邉秀典（東大院農生科・応生化）

**4B062　花芽形成誘導物質 LDS1 の合成研究**

○高安悠希，十和田諒，桑原重文（東北大院農）

**4B063　フルオラスマンガンサレン錯体を用いる不斉エポキシ化反応と共溶媒効果**

○宮崎裕紀，小林佑基，杉山祐也，濱本博三，塩入孝之，松儀真人（名城大農）

**4B064　長鎖ペプチドの合成に有用な新規 Cys 残基側鎖保護基の開発**

○片山秀和，後藤拓眞（東海大工・生命化学）

**4B065　Dichrocephone 類の合成研究**

○小林宗隆[1,2]，小西俊介[2]，渡邉秀典[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]長谷川香料）

**4B066　可溶性担体を用いた修飾核酸の液相合成法の開発**

○福冨弘貴，小路貴生，千葉一裕（東農工大農）

**4B067　選択的分子内環化反応を利用した環状エーテル類の分岐合成**
◦平田　瞭，倉持幸司，椿　一典　（京都府大・生命環境）

**4B068　シクロペンタン導入型 KODA 類縁体の合成研究**
◦渡辺美聡[1]，横山峰幸[2]，長谷川守文[1]，戸嶋浩明[1]　([1]茨城大農，[2]横浜市大)

**4B069　Spiroleptosphol 類の合成研究**
◦竹田珠実，高橋萌子，橋本　勝　（弘大農生）

**4B070　Synthetic Study on Lycojapodine A through palladium-catalyzed cascade allylation and Claisen rearrangement**
◦Wenyu Huang, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki　(Nagoya Univ.)

**4B071　1,4-ナフトキノン天然物群の系統的合成法の開発**
◦吉岡　快, 加茂翔伍, 倉持幸司, 椿　一典　（京都府大院生命環境）

**4B072　8-*epi* テトロドトキシンの合成研究**
◦岩瀬翔太郎，堀田貴大，安立昌篤，西川俊夫　（名大院生命農）

**4B073　紅茶テアルビジン類の構造解明に向けた茶カテキン類の酸化反応に関する研究**
◦内田和宏，小川和樹，柳瀬笑子　（岐阜大応生）

**4B074　(+)-Epogymnolactam の類縁体合成ならびにオートファジー誘導活性評価**
◦上田一貴[1]，岡戸祐治[2]，重冨顕吾[2]，生方　信[2]　([1]北大農，[2]北大院農)

**4B075　アミスギタケ子実体形成因子 basidifferquinone 類の光学活性体の合成研究**
◦橋村　奏[1]，浦尾翔太[1]，矢島　新[2]，勝田　亮[2]，額田恭郎[2]　([1]東農大院農，[2]東農大応生)

**4B076　活性エステル担体を用いたペプチド合成法の構築**
◦早川聡美，岡田　郁，千葉一裕，北野克和　（東農工大農）

**4B077　アプリシアトキシンの合成研究**
◦野倉吉彦，西川俊夫　（名大院生命農）

**4B078　エンドファイトが産生するアルカロイド，ペラミンの化学合成研究**
◦山本雄太，西川俊夫　（名大院生命農）

**4B079　炭素環構造を持つユニークな糖 Bradyrhizose の合成研究**
◦今野寛之，松島芳隆　（東京農業大学・生物応用化学科）

**4B080　タグ法による環状ペプチドの効率的な合成方法の開発**
◦山上紗弓理[1], 大神啓介[2], 藤田裕子[2], 千葉一裕[1]　([1]東京農工大学, [2]東京農工大学大学院)

**4B081　セルラーゼ反応遷移状態構造解明を目的とする糖アナログの合成研究**
◦熊谷郁也，橋本　勝　（弘前大農生）

**4B082　液相ペプチド合成を指向した発色機能をもつ疎水性ベンジルアルコール担体の開発**
◦若松弘起[1]，　岡田洋平[2]，　菅井正枝[1]，　Esko I. Kauppinen[3]，千葉一裕[1]　([1]東農工大院農，[2]東農工大院 BASE，[3]Aalto Univ., Finland)

**4B083　リパーゼを触媒とする，フラボノイドアセタートの位置選択的脱アセチル化の活用**
◦須貝　威，山下泰信，花村　駿，マンダルスサンタ，花屋賢悟，庄司　満　（慶應大薬）

**4B084　電子移動型 Diels-Alder 反応の反応メカニズムに関する研究**
◦尾崎惇史，山口勇将，岡田洋平，北野克和，千葉一裕　（東農工大院）

**4B085　(+)-マグノフロリンの不斉全合成研究**
◦石井　亮，一柳　剛　（鳥大農）

**4B086　臭化オキサノルボルナジエンを利用した多置換安息香酸誘導体の合成**
◦池田安裕[1]，　園田素啓[1]，　篠原広幸[2]，　早金直哉[2]，　小川昭弥[2]，谷森紳治[1]　([1]阪府大院生命環境，[2]阪府大院工)

**4B087　花芽誘導物質 LDS1 構造要求性の解明**
◦山田優作[1]，　土屋　諒[2]，　廣住操俊[1]，　佐藤浩平[1]，　鳴海哲夫[1]，戸田三津夫[1]，大西利幸[2,3]，間瀬暢之[1,3]，渡辺修治[1,4]　([1]静大工，[2]静大農，[3]静大グリーン研，[4]静大創造科学技術大学院)

## C：生体高分子・生体脂質

**4C001　ジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の安定的な発現・精製系の構築と NMR による構造解析**
◦山野めぐみ，　神谷昌克，　熊木康裕，　菊川峰志，　出村　誠，相沢智康　（北大理）

**4C002　R13A5.9 のシナプス小胞と初期エンドソームへの局在**
◦對馬駿弥，辻　俊祐，小栗栖太郎，坂田和実　（岩手大学）

**4C003　ソテツ由来抗菌ペプチド Cy-AMP1 の X 線結晶構造解析**
◦永田宏次[1]，神谷知貴[1]，横山勢也[2]，南　雄二[2]，田之倉優[1]　([1]東大院農生科，[2]鹿児島大農)

**4C004　麹菌由来の両親媒性タンパク質 ハイドロフォービンの物性解析**
◦安藤祐人，　中野宏軌，　陶山友彰，　廣木寛之，　石倉幹大，中島春紫　（明治大農）

**4C005　Cleaved 型病原性ニューロセルピン変異体 S49P の X 線結晶構造解析**
◦久留宮綾人[1]，津田美代子[1]，山崎正幸[2]，恩田真紀[1]　([1]大阪府立大学理学系研究科，[2]龍谷大学農学部)

**4C006　生物進化過程におけるタンパク質の安定性の役割**
◦倉橋　亮，佐野　智，高野和文　（京府大生命環境）

## D：酵素

**4D001　緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質と結晶化**
◦平戸祐喜[1]，　後藤　勝[2]，　小田真弓[1]，　谷川　実[1]，　西村克史[1,3]　([1]日大理工，[2]東邦大理，[3]日大短大)

**4D002　緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 Serine Racemase の遺伝子クローニング**
◦小池美弥[1]，　平戸祐喜[1]，　小田真弓[1]，　谷川　実[1]，　西村克史[1,2]　([1]日大理工，[2]日大短大)

**4D003　Isoleucine 2-epimerase ホモログ遺伝子をもつ乳酸菌の D-アミノ酸生産**
◦牟田口祐太，春日　和，小嶋郁夫　（秋田県大生資）

**4D004　PGC1 α を過剰発現させた骨格筋における代謝変動の網羅的解析**
◦畑澤幸乃[1,2]，妹尾奈波[3]，三浦進司[3]，亀井康富[1]　([1]京都府立大学, [2]日本学術振興会特別研究員，[3]静岡県立大学)

**4D005　植物における環状アミノ酸ピペコリン酸生合成酵素の解明**
◦松田達也[1]，三宅良磨[2]，川端　潤[2]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]　([1]神戸大院農，[2]三菱化学科学技術研究センター)

**4D006　*Pseudomonas putida* 由来 L-メチオニン γ-リアーゼ変異酵素を用いた L-ホモシステイン定量法の開発**
◦安田江里[1]，　福本充樹[1]，　湯之戸俊介[2]，　根本理子[1]，　田村　隆[1]，佐藤　暖[2]，原田繁春[2]，稲垣賢二[1]　([1]岡山大院・環境生命，[2]京工繊大院・応生)

**4D007　非海洋性細菌由来ネオアガロビオース加水分解酵素の諸性質検討と遺伝子解析**
◦樫村佳奈，渡辺輝彦，小林慶一，桐村光太郎　（早大理工・応化）

**4D008　乳中ラクトースのエピラクトースへの直接変換を指向した各種セロビオース 2-エピメラーゼの機能評価**
◦武藤洋彦，佐分利亘，森　春英　（北海道大院農）

**4D009　*Ruminococcus albus* 由来 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼのサブサイト +1 に保存される Arg92 の基質結合への関与**
◦塩田咲耶子[1]，尾高　伶[1]，佐分利亘[1]，イエウキン[2]，鷹田圭介[2]，加藤公児[2]，西本　完[3]，北岡本光[3]，姚　　閔[2]，森　春英[1]　([1]北大院農，[2]北大院生命，[3]食総研)

**4D010　小麦 0.19 アミラーゼインヒビターの大腸菌発現および N 末端領域の改変**
◦小根田洋史　（長田産業）

**4D011　環状四糖[cyclo-(1→6)-(α-nigerosyl-nigerosyl)]の分解を担う 2 種の糖質加水分解酵素の発見**
◦田上貴祥[1]，貞廣樹里[2]，奥山正幸[2]，木村淳夫[2]，岩崎智仁[1]　([1]酪

農大，[2]北大院農）

**4D012　ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* における *N*-アセチルグルコサミンおよび *N*-アセチルガラクトサミン資化経路の生化学的解析**

◦谷内寛之[1]，　櫻間晴子[2]，　西本　完[3]，　後藤愛那[4]，　杉山友太[1]，和田　潤[5]，栗原　新[1]，北岡本光[3]，片山高嶺[4]　([1]石川県大院生物資源環境，[2]山形大院理工，[3]農研機構食総研，[4]京大院生命，[5]京都市産技研）

**4D013　*Gluconobacter oxydans* 由来の菌体外酵素 dextran dextrinase は自らの生成物デキストランによって細胞表層から遊離する.**

◦貞廣樹里，森　春英，佐分利亘，奥山正幸，木村淳夫　（北大院農）

**4D014　*Aspergillus aculeatus* 由来 β-glucosidase 1 のセロオリゴ糖に対する反応性が高い変異酵素の取得**

◦田中清貴，馬場祐太朗，谷　修治，炭谷順一，川口剛司　（阪府大生命）

**4D015　キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来する酸化型キチン分解酵素の解析**

◦松山友香，矢野健太，田口悟朗，野川優洋，下坂　誠　（信州大・繊維・応生系）

**4D016　*Euglena gracilis* Z 由来ラミナリビオースホスホリラーゼのクローニングと大腸菌での異種発現**

◦土橋柚美[1]，　津野裕美[1]，　中澤昌美[1,2]，　阪本龍司[1]，　石川孝博[2,3]，谷　修治[1]，炭谷順一[1]，川口剛司[1]　([1]阪府大院・生環科，[2]JST CREST，[3]島根大院・生資科）

**4D017　Serratia marcescens 2170 の多糖モノオキシゲナーゼ CBP21 の生理機能の解明**

◦桜井大地[1]，杉本華幸[1,2]，鈴木一史[1,2]，渡邉剛志[1,2]　([1]新大院 自然研，[2]新大農 応生化）

**4D018　アレルゲン活性をもつスギ花粉キチナーゼ CJP-4 の構造と機能**

◦高島智也[1]，　梅本尚之[1]，　大沼貴之[1]，　平良東紀[2]，　沼田倫征[3]，深溝　慶[1]　([1]近大院農，[2]琉球大農，[3]産総研）

**4D019　L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性および位置特異性の異なる β-グルコシダーゼの速度論的研究**

◦菅沼笙子，寺坂美紀，仁戸田照彦，神崎　浩　（岡山大院環境生命）

**4D020　高等植物由来推定 GPI アンカー型ポリガラクツロナーゼの細胞内局在解析**

◦大橋貴生，鈴木真未，三崎　亮，藤山和仁　（大阪大学生物工学国際交流センター）

**4D021　ループ構造を欠失している植物由来 GH19 キチナーゼの構造と機能**

◦河本大毅[1]，隠岐　円[1]，大沼貴之[1]，平良東紀[2]，深溝　慶[1]　([1]近大院農，[2]琉球大農）

**4D022　マツタケ（*Tricholoma matsutake*）培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析**

◦大沼広宜，福田泰久，亀井健吾，白坂憲章　（近大農）

**4D023　糖オキサゾリンの効率的精製法の確立と植物由来 GH18 キチナーゼを用いたキチンオリゴ糖の合成**

◦梅本尚之[1]，　野口正人[1]，　齋藤夏貴[1]，　大沼貴之[2]，　深溝　慶[2]，正田晋一郎[1]　([1]東北大院工，[2]近畿大院農）

**4D024　*Melioribacter roseus* 由来ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析**

森　晴彦，◦磯野直人　（三重大院生資）

**4D025　高効率 1,2-α-L-fucosynthase を用いた *O*-型および *N*-型糖鎖のフコシル化**

◦杉山友太[1]，　加藤紀彦[1,2]，　後藤愛那[1]，　本多裕司[1]，　吉田永史奈[1]，栗原　新[1]，山本憲二[1]，北岡本光[3]，片山高嶺[1,2]　([1]石川県大，[2]京大院生命，[3]農研機構・食総研）

**4D026　*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* のヘミセルロース分解酵素遺伝子クラスターの解析**

◦芦田　久，米野雅大，速水穂乃香　（近大生物理工）

**4D027　*N* 結合型糖鎖修飾経路に関わるカイコ *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II の解析**

◦西村茉莉，三崎　亮，大橋貴生，藤山和仁　（阪大）

**4D028　マルトースを出発物質とするトレハロース 6-リン酸の酵素合成法の確立**

◦田口陽大[1]，佐分利亘[2]，今井亮三[2,3]，森　春英[2]　([1]北大 農，[2]北大院農，[3]農研機構・北農研）

**4D029　非凍結結晶を用いた β-アミラーゼ/マルトース複合体の pH による構造変化の解析**

◦三上文三[1]，　河村和広[1]，　安達基泰[2]，　姜　有那[1]，　水谷公彦[1]，高橋延行[1]　([1]京大農，[2]日本原子力機構）

**4D030　*Bacillus* sp. NTP-1 株由来マンガンカタラーゼ様タンパク質の機能解析**

◦梅村晃弘[1]，戸部隆太[1]，田島寛隆[1,2]，三原久明[1]　([1]立命大生命，[2]立命大 R-GIRO）

**4D031　Exploring Microbial Genomes in Search of Novel Rieske Oxygenase**

◦Joydeep CHAKRABORTY,　Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI　(The Univ. of Tokyo)

**4D032　糸状菌 Z26-4-8 株が産生するタンパク質酸化能を持つアミノ酸オキシダーゼの諸性質**

◦土屋高伸，平良竜大，山田美和，礒部公安　（岩手大農）

**4D033　*Sporidiobolus salmonicolor* TPU 2001 由来新規エノン還元酵素**

◦山本和範[1,2]，　伊奈隆年[1,2]，　奥　裕子[1,2]，　銅谷正晴[3]，　江端秀司[3]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工・生工研セ，[2]JST，ERATO，[3]（株）東邦アーステック）

**4D034　*Streptomyces avermitilis* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの異種発現と特性解析**

◦菅原佳奈子[1]，　成岡知美[1]，　加藤史帆[1]，　森田美文[2]，　菅野靖史[1]　([1]日本女子大・理・物生，[2]東工大院・総合理工）

**4D035　*In vitro* maturation of soluble manganese peroxidase expressed in chaperones over-expressing *E. coli***

◦Almasul Alfi，Bo Zhu，Jasmina Damnjanovic，Takaaki Kojima, Yugo Iwasaki，Hideo Nakano　(Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ.)

**4D036　アナモックス菌のヘムタンパク質発現系構築**

◦平　大輔[1]，古川憲治[2]，藤井隆夫[1]　([1]崇城大応生命，[2]熊大院自然）

**4D037　酢酸菌のイソマルトビオン酸生産酵素の同定**

◦桐生高明，　駒　大輔，　田中重光，　木曽太郎，　中野博文，村上　洋　（大阪市工研）

**4D038　ヤンバルトサカヤスデ由来マンデロニトリル酸化酵素の性質の解明と分子系統樹解析**

◦石田裕幸[1,2]，桑原保正[1,2]，森田將史[1,2]，市来弥生[1,2]，浅野泰久[1,2]　([1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**4D039　Cumene dioxygenase における oxygenase-ferredoxin 間相互作用部位の解明**

◦小竹立朗[1,2]，　松澤　淳[1]，　伏信進矢[3]，　岩田健一[2]，　水口千穂[1]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]　([1]東大生物工学セ，[2]芝工大院シ，[3]東大院農生科・応生工）

**4D040　酸性多糖の代謝に関わる還元酵素の補酵素要求性に関わる構造要因**

高瀬隆一[1]，　丸山如江[2]，　老木紗予子[1]，　三上文三[1]，　村田幸作[2]，◦橋本　渉[1]　([1]京大院・農，[2]摂南大・理工）

**4D041　α- プロテオバクテリアの細菌が持つコハク酸脱水素酵素の鉄硫黄クラスター近傍アミノ酸変異による活性制御の解析**

◦前多晴香[1]，福士実咲[1]，Daldal Fevzi[2]，坂元君年[1]　([1]弘前大農，[2]ペンシルバニア大）

## E：食品

**4E001　フコイダン含有食品に対する ELISA 測定系の応用**

◦伊波匡彦[1]，嘉手納築[1]，松田優子[1]，長嶺竹明[1]，中嶋克行[2]　([1]サウスプロダクト，[2]群馬大院・医）

**4E002　食用海藻の低分子量糖の分析**

◦垣田浩孝，小比賀秀樹　（産総研健康工学）

**4E003　ペクチンによる細胞表面糖鎖構造変化の誘導機構の解析**

◦下吉美澄，西田光貴，村田一馬，北口公司，矢部富雄　（岐阜大学）

**4E004　レジスタントスターチの新規機能性の解明と調理過程における生成量の変動に関する研究**

◦田中麻美子[1]，　熊崎広大[1]，　男澤　嶺[1]，　西田　毅[2]，　松田寛子[1]，白井隆明[1]　([1]東京海洋大院　サラダサイエンス，[2]ケンコーマヨ

ネーズ(株))

**4E005　鉄触媒によるリノール酸メチルヒドロペルオキシドの分解に対するγ-トコフェロールの作用**

◦木下知美，岩本悟志，山内　亮　(岐阜大院)

**4E006　コンドロイチン硫酸がマウス前駆軟骨細胞 ATDC5 に与える影響**

◦工藤俊也，中谷祥恵，古旗賢二，和田政裕　(城西大学)

**4E007　超小角 X 線散乱法による小麦タンパク質グリアジン水和凝集体の構造解析**

◦佐藤信浩[1]，東野ゆうき[2]，北尾悠樹[2]，岩村紗季[2]，岡田ひかり[2]，奥田　綾[2]，松崎元紀[2]，大場洋次郎[1]，井上倫太郎[1]，杉山正明[1]，裏出令子[2]　([1]京大原子炉，[2]京大院農・農学)

**4E008　ローヤルゼリー由来ペプチドによる IEC-6 細胞に対するアポトーシス誘導**

◦竹内まい子[1]，大島和也[1]，松岡拓磨[2]，川島拓司[2]，中村　正[2]，北口公司[1]，矢部富雄[1]　([1]岐阜大院・応生科・応用生命，[2](株)秋田屋本店)

**4E009　バイオハイブリッド創出による β-ラクトグロブリンの機能改変**

◦堀内建吾，池田理沙，好田　正，服部　誠　(農工大農)

**4E010　抗酸化性ポリフェノールによる自然抗体リガンドの生成**

◦古橋麻衣[1]，畑佐行紀[1]，柴田貴広[1]，赤川　貢[2]，内田浩二[1]　([1]名大院生命農，[2]阪府大院生命環境)

**4E011　酵素的化学修飾によるエビアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化**

◦菰田俊一，佐々木直美　(宮城大)

**4E012　エゴマによるコラーゲン産生促進メカニズムの解析**

◦永井美帆[1]，加島隆洋[2]，鈴木　寿[2]，北口公司[1]，矢部富雄[1]　([1]岐阜大院・応生科・応用生命，[2]岐阜県産業技術センター)

**4E013　食品由来 ACE 阻害ペプチドの生体組織 ACE 阻害メカニズム**

◦小山正浩，興津　翔，野尻恵資，岩本しほり，中村浩蔵　(信大農)

**4E014　グリセルアルデヒド由来メイラード反応後期段階生成物「GLAP」による RAGE を介した細胞毒性発現機構の解明**

◦藤野峻行[1]，長谷川俊樹[1]，村上庸人[1]，三浦　彩[1]，臼井照幸[2]，渡辺寛人[1]，早瀬文孝[1]　([1]明治大農，[2]女子栄養大)

**4E015　卵白塩基性様タンパク質(OVAX)の鶏卵の胚発達中における生化学的な変化**

◦赤澤隆志，小川雅廣，早川　茂　(香川大農)

**4E016　食素材蛋白質の網羅的ペプチドアレイを用いた苦味マスキング剤の新規探索法～茶殻 RubisCo 由来 EGCG 結合ペプチドの解析例～**

◦小池麻友[1]，黒田侑希[1]，伊藤圭祐[1]，石井剛志[2]，中村順行[1]，渡辺達夫[1]，河原崎泰昌[1]　([1]静県大・食栄，[2]神戸学院大・栄)

**4E017　香気成分シトロネラールを含むアガロースゲルの破壊によるフレーバーリリース**

◦山田恭正，石井麻菜，甲斐理紗子　(同志社女子大食栄)

**4E018　国産小麦の麺生地形成時における揮発性成分の変化**

◦成澤朋之[1]，仲島日出男[1]，小島登貴子[1]，杉山健二郎[2]，山田昌治[2]　([1]埼玉産技セ北部，[2]工学院大先進工)

**4E019　乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC100933 株におけるフェノール酸脱炭酸酵素遺伝子(*padC*)の構造と発現**

◦仲宗根薫　(近畿大工学部)

**4E020　バレイショ品種・系統のアントシアニン評価**

◦石黒浩二，田宮誠司，瀧川重信，遠藤千絵，野田高弘　(北農研)

**4E021　青葉アルデヒドの生成に関わる酵素遺伝子の同定とトマトの香気成分の改変**

◦國嶋幹子，山内靖雄，水谷正治，杉本幸裕　(神大農)

**4E022　ウメ果実由来のフェノール化合物中の *cis-p*-クマル酸の生成と役割**

◦味村妃紗[1]，林　行則[2]，岡崎一誠[2]，小山　一[3]，三谷隆彦[1]　([1]和歌山大産研セ，[2]JA 紀南，[3]和歌山県立医大)

**4E023　炭素・水素安定同位体比分析による梅酒中酸味料の原材料判別**

◦赤松史一[1]，橋口知一[2]，久常有里[1]，大江孝明[2]，川尾尚史[2]，藤井　力[1]　([1]酒総研，[2]和歌山県)

**4E024　講演取消**

**4E025　LC-MS/MS を用いたかつお節抽出液のアミノ酸定量の検討**

◦上原大輝[1]，与那嶺務[2]，玉城　一[1]　([1]琉大農，[2]与那嶺鰹節店)

**4E026　古代米味噌の抗酸化性**

◦近藤(比江森)美樹[1]，山下夏海[1]，山田光春[2]，大熊紘治[3]　([1]徳島文理大人間生活，[2]佐那河内村良土れん，[3](株)みむら)

**4E027　高知県四万十町産ショウガの機能性成分および呈味成分に関する研究**

◦野村　凜[1]，市田彩香[1]，岡村健志[2]，武井秀樹[3]，柏木丈拡[1]，島村智子[1]，受田浩之[2,4]　([1]高知大・農，[2]高知大・地域連携セ，[3]四万十町，[4]高知大・地域協同)

**4E028　セルロースカラムを用いた *cis-p*-coumaric acid の調製と単離**

◦三谷隆彦[1]，味村妃紗[1]，小山　一[2]，坂本英文[3]　([1]和歌山大産研セ，[2]和歌山県立医大，[3]和歌山大システム工)

**4E029　泡盛油が泡盛酒質に及ぼす影響**

◦新垣壱馬[1]，宮澤　舞[2]，玉城康智[1]　([1]沖縄高専，[2]三洋化成工業株式会社)

**4E030　乾熱処理による米粉タンパク質の SH 基の露出と米粉パンの製パン性劣化について**

◦田原　彩[1]，中川真理子[1]，牛島雄毅[2]，松永幸太郎[2]，中村智英子[3]，竹内美貴[3]，瀬口正晴[1]　([1]神戸女子大家政，[2]熊本製粉(株)，[3]神戸女子短大)

**4E031　Improving the emulsifying properties of egg white protein by partially hydrolysis**

◦Hajime HATTA[1]，Mayuko YAMASHITA[1]，Yu WANG[1]，Francoise NAU[2]　([1]Kyoto Women's University, [2]Agrocampus-Ouest, Rennes, France)

**4E032　パンへのグルテンまたはデンプン添加がパン粥のテクスチャーへ及ぼす影響**

西原百合枝[2]，◦沖邉敦代[1]，久保奈美[2]，松尾実優[2]，芹田千穂[1]，江頭和佳子[2]，朝倉富子[3]，舟木淳子[1,2]　([1]福岡女子大院，[2]福岡女子大・国際文理，[3]東大院)

**4E033　ウメ新品種「橙高」の乳化特性に関する研究(第 1 報)**

◦赤木知裕[1]，根来圭一[1]，行森　啓[2]，土田靖久[2]　([1]和歌山工技セ，[2]和歌山果樹試うめ研)

**4E034　東北の地域資源“ツノナシオキアミ”を用いた魚味噌**

◦福田　翼[1]，及川克敏[2]，大関美咲[1]，藤澤和貴[1]，辰野竜平[1]，古下　学[1]，原田和樹[1]　([1]水大校食品科学，[2](株)小野万)

**4E035　発酵バターの製造法の違いによる脂肪酸量の比較**

◦栃原孝志，高橋　翼，斎藤優里，竹田保之　(酪農大食と健康)

**4E036　高温低酸素気流によるソバ粉の加熱殺菌処理**

◦森川卓哉[1]，伊藤綾香[2]，三浦　靖[1,2]，廣瀬宏一[3]，船崎健一[3]，齋藤和良[4]，川端　實[5]　([1]岩手大三陸水産研究センター，[2]岩手大農，[3]岩手大工，[4](株)平岩鉄工所，[5](株)川喜)

**4E037　異なる製造施設で作られた北海道産ゴーダタイプチーズにおける特性の違い**

◦竹田保之，上田高之，堀内祥太，千葉知孝，山本佳人，栃原孝志　(酪農大)

**4E038　瞬間的高圧処理による北限ユズ果汁の高付加価値化**

◦藏屋英介[1]，仲田志奈[1]，當山瑛子[1]，比嘉　修[1]，安田　淳[2]，伊東　繁[1]　([1]沖縄高専，[2]大阪サニタリー株式会社)

**4E039　中高圧処理を活用した長期冷蔵保存可能な果実シロップ漬の新規製造法**

◦山本和貴[1]，三輪章志[2]，有手友嗣[2]，深井洋一[3]，山崎慎也[4]，水野文敬[5]，新川　猛[6]，藤田智之[7]，吉野　勇[8]，新田一朋[8]，森松和也[9]，中浦嘉子[1]　([1]農研機構食総研，[2]石川農研セ，[3]長野農工研，[4]長野工技セ，[5]岐阜中山間農研，[6]岐阜農技セ，[7]信州大農，[8]スギヨ，[9]愛媛大農)

**4E040　冷凍処理と組み合わせた中高圧処理による微生物不活性化**

◦中浦嘉子[1]，森松和也[2]，小田真知子[1]，山本和貴[1]　([1]農研機構・食総研，[2]愛媛大農)

**4E041　緑豆もやしの冷蔵中の褐変とポリフェノールオキシダーゼ**

◦向後佑佳子，鮫島那奈，村田容常　(お茶大院ライフ)

**4E042　食肉中における各種食中毒菌の付着・侵入および増殖に対する液体塩こうじの抑制効果**

◦島村裕子[1]，江川瑞規[1]，平田伸行[2]，松原英祐[2]，増田修一[1]　([1]静岡県大・食品栄養科学，[2]ハナマルキ(株))

**4E043　黒糖におけるアクリルアミド生成の低減化**

◦島田健作[1], 高良健作[1], 広瀬直人[2], 和田浩二[1] ([1]琉大農, [2]沖農セ)

**4E044　米飯におけるエンテロトキシン A 産生とその制御**

◦筒浦さとみ, 村田容常 (お茶大院 人間文化創成科学)

**4E045　東南アジアの農業用水に含まれるグラム陰性衛生指標細菌**

◦稲津康弘[1], 宮崎圭子[1], Rithy Chrun[2], Ek Sopheap[2], Thongsavath Chanthasombath[3], Dam Sao Mai[4], 細谷幸恵[1] ([1]農研機構 食総研, [2]カンボジア王立農業大, [3]ラオス清浄農研センター, [4]ベトナム ドンナイ大学)

**4E046　サトウキビ内実部を原料とした含蜜糖の嗜好性と抗酸化性の分析**

◦高橋 誠[1], ムタンダイシュマエル[2], ヨナタンアシキン[3], 広瀬直人[4], 水 雅美[5], 和田浩二[1] ([1]琉球大･農, [2]鹿児島大連大, [3]琉球大・熱生圏, [4]沖縄県農研セ, [5]三井製糖 (株))

**4E047　構造を改変した米澱粉の物性と味物質の溶出挙動に関する研究**

◦阿久澤さゆり[1], 矢田千晶[1], 藤田直子[2], 木下 健[3], 松川真吾[4] ([1]東京農大・健康, [2]秋田県大・生物資源, [3](株)島津製作所, [4]東京海洋大学・大学院)

**4E048　玄米米糠麹(FBRA)の多変量解析による品質管理に関する基礎的検討**

◦根本英幸[1], 堀江裕紀子[1], 新実香保里[1], 池川繁男[2] ([1](株)コーケン, [2](株)玄米酵素)

**4E049　酢〆調理加工工程における最適浸漬状態を評価可能にする計測システム開発**

◦石川匡子, 佐藤柊也, 秋山美展 (秋田県立大生物資源)

**4E050　麺内部のグルテンタンパク質の三次元ネットワーク構造の新規計測～麺をまるごと透明に～**

◦小川剛伸, 松村康生 (京大院農)

**4E051　機能性乳酸菌(*Lactobacillus paracasei* MCC1849 株)飲料の冷蔵保存における官能特性と香味成分の変化**

◦鈴木泰輔[1], 秋山正行[1], 佐藤由康[2], 岳上美紗子[3], 村上祐介[4], 大西正展[4], 溝田泰達[1], 越智 浩[2], 小泉玲子[3], 池田三知男[1], 岩渕久克[4] ([1]森永乳業(株)食品総合研究所, [2]森永乳業(株)素材応用研究所, [3]森永乳業(株)応用技術センター, [4]三栄源エフ・エフ・アイ(株))

**4E052　ヨーグルトの食感の見える化～破壊過程に着目した物性・構造の解析～**

◦日下 舞[1], 市村武文[3], 風間紫穏[1], 上川理絵[2], 中村 卓[1] ([1]明治大農・農化, [2]明治大院・農化, [3]株式会社 明治)

**4E053　食品中イソフラボンの簡易エストロゲン様活性分析法に関する研究**

◦永野理佳[1], 金内 誠[1], 下山田真[2], 石田光晴[1] ([1]宮城大学, [2]静岡県立大学)

**4E054　和食に共通して含まれる麹グリコシルセラミドが腸内細菌叢に及ぼす影響の解析**

佐藤友哉[1], 譚 政[1], 中山二郎[2], 浜島浩史[1], 光武 進[1], 永尾晃治[1], ◦北垣浩志[1] ([1]佐賀大学農学部, [2]九州大学大学院農学部)

**4E055　乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する菌体外多糖による代謝改善作用**

◦柴田光治[1], 宮本潤基[2], 清水秀憲[1], 山本憲二[3], 木村郁夫[2], 久 景子[1] ([1]日東薬品工業株式会社, [2]東京農工大学 大学院農学研究科, [3]石川県立大学 生物資源工学研究所)

**4E056　ライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol と共役リノール酸の併用投与による脂質代謝調節作用**

◦河合咲紀[1], 林 洪太[1], 依田浩樹[1], 長田恭一[1], 高成 準[2], 北舘健太郎[2] ([1]明治大農, [2]アミノアップ化学)

**4E057　更年期脂質代謝変動に対する大豆イソフラボンと共役リノール酸の併用摂取効果**

◦谷澤 郁[1], 小栗幹也[1], 長田恭一[1], 戸田登志也[2] ([1]明治大農, [2]フジッコ研究所)

**4E058　高 β-コングリシニン大豆がラットの脂質代謝に及ぼす影響**

◦高橋陽子[1], 石黒貴寛[2], 高橋浩司[3], 羽鹿牧太[3] ([1]農研機構食総研, [2]旭松食品, [3]農研機構作物研)

**4E059　卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸とヘスペリジンの脂質代謝異常予防効果**

◦小栗幹也, 谷澤 郁, 吉富 廉, 長田恭一 (明治大農)

**4E060　キノコ由来新規化合物が NPC1L1 依存性コレステロール取込みに及ぼす影響**

◦千場智尋[1,3], 櫻田剛史[1], 渡邊理恵[1], 山口宏二[1], 木村泰久[2], 木岡紀幸[2], 河岸洋和[4,5,6], 松尾道憲[7], 植田和光[2,3] ([1]ファンケル総研, [2]京大院農, [3]京大 iCeMS, [4]静大院・創造, [5]静大・グリーン研, [6]静大院農, [7]京女大・家政)

**4E061　1 型糖尿病モデルラットを用いた脂肪酸合成関連遺伝子の発現制御機構の解析**

◦森田貴大, 白川 仁, 我妻紀代恵, 駒井三千夫 (東北大院農)

**4E062　アミノ酸バランスの異なる食事が脂質蓄積に及ぼす影響**

◦南野勝彦[1], 堀尾拓之[2] ([1]羽衣国際大学, [2]名古屋経済大学)

**4E063　アカガシに含まれる α-グルコシダーゼ阻害活性成分の単離と同定**

◦柏木丈拡[1], 森本ゆかり[1], 陳 新陽[1], 金 哲史[1], 渡邊浩幸[3], 鈴木大進[2], 川北浩久[2], 篠原速都[2], 渡邊高志[4], 島村智子[1], 受田浩之[5] ([1]高知大農, [2]高知工技セ, [3]高知県立大健康栄養, [4]高知工科大学地域連携機構, [5]高知大地域)

**4E064　ナツメの抗メタボリックシンドローム作用における分子機序の解明と有効性の検証**

◦川畑球一[1], 成瀬翔真[1], 松浦倫大[1], 海道洋子[2], 川上文清[3] ([1]福井県大･生物資源, [2](株)シーロード, [3]北陸産業活性化センター)

**4E065　スダチ果皮成分の糖代謝への影響**

◦酒井 徹, 中本真理子, 首藤恵泉 (徳島大大学院医歯薬学研究部実践栄養学)

**4E066　ラットにおける肥満誘導食への DFA III，ラフィノース添加の影響**

◦古賀俊希[1], 比良 徹[1], 高橋敬典[2], 名倉泰三[2], 内野浩克[2], 原 博[1] ([1]北大院農・応生科, [2]日本甜菜製糖株式会社)

**4E067　サケ白子由来血糖値上昇抑制ペプチドのヒト臨床試験での検証**

◦鎌田 彰[1], 広瀬あかり[1], 高橋義宣[1], 山本 久[1], 西村三恵[2], 西平 順[2] ([1]マルハニチロ, [2]北海道情報大学)

**4E068　サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンが血糖値および空腸グルコース吸収に及ぼす効果の検討**

◦土谷 庸[1], 川俣幸一[2], 富田雅弘[1], 坪井 誠[3], 高橋達治[3], 米塚正人[4] ([1]東北女子大健康栄養, [2]東北生活文化大家政, [3]一丸ファルコス(株), [4](株)角弘プロテオグリカン研究所)

**4E069　多糖修飾ソバアルブミンの食後血糖値上昇抑制効果**

◦中条早紀, 茂木 崇, 稲 成信, 赤尾 真, 熊谷日登美 (日大･生資科・生化)

**4E070　クルクミンによる GLP-1 分泌促進作用と血糖値制御**

◦加藤正樹[1], 池畑秋穂[1], 谷 翼[1], 高橋 司[2], 今泉 厚[2], 津田孝範[1] ([1]中部大・応生, [2](株)セラバリューズ)

**4E071　高エネルギー食摂取が世代を越えて孫世代の糖尿病リスクに与える影響**

◦畠山雄有, 都築 毅 (東北大院・農)

**4E072　フェネチルイソチオシアネートの糖新生抑制作用における ErbB3 の役割について**

◦鈴木安沙美, 伊藤芳明, 長澤孝志 (岩手大農)

**4E073　スフィンゴミエリンによる培養筋管細胞における糖取り込み促進作用とその機構解析**

◦吉田佳穂里, 譚 哲立, 三浦 豊 (東農工大)

**4E075　アミノ酸がパネト細胞 α ディフェンシンに与える影響**

◦高桑暁子[1,2], 中村公則[2], 櫻木直也[2], 綾部時芳[2] ([1]天使大, [2]北大生命)

**4E076　テレメトリー法を用いた高血圧自然発症ラットにおけるアセチルコリン反復経口投与の抗高血圧作用評価**

◦中村浩蔵[1], 渡辺 旭[1], 早崎大輔[1], 小山正浩[1], 猪狩直樹[2] ([1]信大農, [2]大和薬品(株))

**4E077　発酵豆乳の単回飲用試験 －発酵による大豆イソフラボン吸収性の亢進－**

◦榔野崇之[1], 狩野光芳[1], 増岡範江[1], 加賀千晶[1], 安部慶憲[2], 志田 寛[1], 宮崎幸司[1], 蒲池桂子[3], 田中 明[3] ([1]ヤクルト本社中央研究所, [2]ヤクルト本社開発部, [3]女子栄養大学栄養クリニック)

**4E078　クロレラの健康機能に資する活性成分の探索**

◦井関達也[1], 伊藤隼哉[1], 樋口央紀[2], 佐々木将人[2], 堀籠 悟[3], 渡辺章夫[3], 竹腰英夫[4], 藤島雅基[4], 大西真人[4], 仲川清隆[1],

宮澤陽夫[5,6]（[1]東北大院農・機能分子解析，[2]（株）機能性植物研究所，[3]（一財）日本食品分析センター，[4]（株）サン・クロレラ，[5]東北大・未来科学技術共同研究センター，[6]東北大院農・食の健康科学ユニット）

**4E079　福井県伝統野菜類のラジカル産生抑制活性ならびに肝脂肪蓄積抑制効果の検討**

◦古矢康久[1]，松原竜之典[1]，小林恭一[2]，村上　茂[1]，高橋正和[1]（[1]福井県大生物資源，[2]福井県食品加工研）

**4E080　湿式微粒子化装置を用いたフコイダンの低分子化**

◦武部静香[1]，鈴木志保[1]，クリステンセンビヨン[2]，湯口宜明[3]，北村進一[1]（[1]大阪府大院　応用生命，[2]ノルウェー科学技術大学，[3]大阪電気通信大学）

**4E081　アルコール性胃炎はエビアレルギーリスクを増大させる可能性がある**

臼井将勝，◦新井健太，田邉真悠，森田夏妃，杉浦義正，宮崎泰幸（水大校・食品科学）

**4E082　ヒト腸上皮細胞株 Caco-2 における牛乳カゼインの取り込みと細胞内分解およびペプチド断片の放出**

◦櫻井那央，秋山友香，西尾俊亮，大島健司，灘野大太，松田　幹（名大院・生命農学）

**4E083　腸管免疫系細胞におけるインターロイキン-5 産生に与える腸内共生菌の影響**

◦畑井俊哉[1]，上滝隆太郎[2]，於　鉄崢[1]，高橋恭子[1]，八村敏志[2]，細野　朗[1]（[1]日大生資科・食品生命，[2]東大院農生科・食の安全研究セ）

**4E084　アトピー性皮膚炎モデル NC/Nga マウスにおける アルキルリン脂質摂取による症状改善効果**

◦西向めぐみ[1]，鈴木卓弥[2]，山崎裕也[3]，小池誠治[3]（[1]岩大農，[2]広大院生物圏，[3]（株）ADEKA）

**4E085　Notch シグナル阻害による食物アレルギーの症状の軽減**

◦中野信浩[1]，本庄明日香[1]，西山千春[1,2]，大塚宜一[1]，清水俊明[1]，奥村　康[1]，小川秀興[1]（[1]順天堂大院・医，[2]東京理科大・基礎工）

**4E086　経口免疫寛容において誘導される $CD62L^{high/int}CD44^{int}$ および $CD62L^{low}CD44^{high}$ T 細胞の遺伝子発現・機能解析**

◦芝原恭子[1,2]，門岡桂史[3]，片倉喜範[3]，田邊康祐[1]，塩河亜弥[1,2]，村上　仁[4]，細野　朗[4]，上野川修一[4]，足立（中嶋）はるよ[2]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]九大院農院，[4]日大生資科・食品生命）

**4E087　ロコモティブシンドロームに対するフラバンジェノールの多面的効果（関節炎および変形性関節症に対する作用メカニズムの違い）**

◦佐藤　敬，鍔田仁人，友澤　寛，森川琢海，上野　栞，池口主弥（株式会社東洋新薬）

**4E088　抗原の経口感作により誘導される気管支関連リンパ組織の T 細胞応答の解析**

◦高橋　輝，鞍田汐莉，生井千裕，半澤直行，津田真人，細野　朗（日大生資科・食品生命）

**4E089　乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による濾胞性ヘルパー T 細胞誘導機構の *in vitro* 解析**

◦糸賀翔大[1,2]，上滝隆太郎[1,2]，佐藤風太[1,2]，芝原恭子[1,2]，新井　聡[3]，岩淵紀介[3]，清水（肖）金忠[4]，阿部文明[3]，八村敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]森永乳業・素材研，[4]森永乳業・基礎研）

**4E090　野沢菜抽出物を摂取したマウスにおける免疫賦活効果の解析**

◦田中沙智，山本佳奈，古屋花暖，山田和輝，大角友紀，高橋楓香，浜島知里（信大農）

**4E091　大腸リンパ組織における制御性 T 細胞フェノタイプ特性の解析**

◦村木悠平[1]，小熊俊生[1]，津田真人[1]，於　鉄崢[1]，沓掛優香[1]，八村敏志[2]，高橋宣聖[3]，高橋恭子[1]，上野川修一[1]，細野　朗[1]（[1]日大生資科・食品生命，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]感染研・免疫）

**4E092　パイエル板樹状細胞は T 細胞の IL-21 遺伝子発現を誘導する．**

◦上滝隆太郎[1,2]，糸賀翔大[1,2]，石井俊祐[3]，輪島隼一[1,2]，芝原恭子[1,2]，高橋恭子[3]，上野川修一[3]，細野　朗[3]，八村敏志[2]（[1]東大院農生科・応生化，[2]東大院農生科・食の安全研セ，[3]日大生資科・食品生命）

**4E093　抗原刺激下におけるエリオジクチオールの制御性 T 細胞分化およびサイトカイン応答への影響**

◦松田　幸，青木綾子，戸塚　護（東大院農生科・応生化）

**4E094　腸内細菌により誘導される miR-21-5p は腸管上皮機能を調節する**

◦中田一彰，高橋恭子，杉　由高，小早川哲朗，楢林ひかり，花澤重正，津田真人，細野　朗，上野川修一（日本大学生物資源科学部）

**4E095　河内晩柑果皮水溶性抽出物の抗炎症作用に関する研究**

◦竹國千尋[1]，西　甲介[1]，福田直大[2]，玉井敬久[2]，菅原卓也[1,3]（[1]愛媛大・農，[2]愛媛県・産技研，[3]愛媛大・農・食品健康科学研究センター）

**4E096　ロタウイルス増殖抑制活性に関与する牛乳ラクトフォリンの分子構造の特定**

◦稲垣瑞穂[1]，大野翔平[1]，小林純子[2]，山田佳太[3]，金丸義敬[1]，中込とよ子[4]，中込　治[4]，鈴木　徹[1]（[1]岐阜大応生，[2]北大院医，[3]大阪大谷大薬，[4]長崎大院医歯薬）

**4E097　黒大豆種皮抽出物の抗酸化能を介した肝損傷抑制効果について**

◦山下陽子[1]，李　岫[1]，戸田登志也[2]，難波文男[2]，芦田　均[1]（[1]神大院農，[2]フジッコ株式会社）

**4E098　アスタキサンチンの経口摂取による光老化抑制作用とそのメカニズムの解明**

◦小松俊之[1]，佐々木克[1]，真鍋祐樹[1]，斎藤仁美[2]，菅原達也[1]（[1]京大院農，[2]富士フイルム（株））

**4E099　細胞培養系を用いた尿酸産生抑制検定系の構築と天然物・食品由来成分の作用解析**

◦安達真一[1]，高見有希[2]，小池慎一郎[3]，豊崎美紅[1]，吉澤史昭[2,3]，矢ヶ崎一三[1]（[1]宇都宮大・バイオセ，[2]宇都宮大・農，[3]農工大院・連農）

**4E100　老化に伴う脂質吸収能低下は高脂肪食摂取によって抑制される**

◦山本和史，都築　毅（東北大院・農）

**4E101　生理的濃度における非標識，迅速な表皮のターンオーバー評価のための *in vivo*-like セルベースアッセイの開発－約 1 時間で判定－**

◦小名俊博[1,2]，柴田純子[1,2]（[1]九大院農，[2]小名細胞アッセイ技術研究所）

**4E102　改良親油性 ORAC 法の室間共同試験による妥当性確認**

◦渡辺　純[1]，沖　智之[2]，竹林　純[3]，箭田浩士[1]，若木　学[1]，石川祐子[1]，安井明美[1]（[1]農研機構食総研，[2]農研機構九沖研，[3]国立健栄研）

**4E103　亜鉛は消化管内分泌細胞からの CCK 分泌を誘導する**

◦中島進吾[1]，比良　徹[2]，岩谷一史[3]，原　博[2]（[1]北大保健，[2]北大農，[3]ラホヤ研究所）

**4E104　3,4,5-トリカフェオイルキナ酸の有する神経新生促進作用の解析**

◦荒尾紗代[1]，VILLAREAL Myra[2,3]，本嶋秀子[3]，礒田博子[2,3]（[1]筑波大院生命環境，[2]筑波大生命環境系，[3]筑波大北アフリカ研究センター）

**4E105　食用菊フラボノイド組成の種による特徴と神経栄養因子様作用**

◦馬　東建，若生　豊（八戸工大）

**4E106　ロスマリン酸による脳機能改善機作の解明**

◦宍戸　駿[1]，山下　玲[2]，豊田　集[1]，濱口　毅[3]，篠原もえ子[3]，小野賢二郎[4]，山田正仁[3]，阿部啓子[1,5]，小林彰子[1]（[1]東大 院 農，[2]東大農，[3]金沢大医，[4]昭和大医，[5]神奈川科学技術アカデミー）

**4E107　ケトジェニック環境下における短鎖脂肪酸受容体 FFAR2 を介した生理機能**

◦粕渕真由，長谷川沙恵，木村郁夫（東農工大農）

**4E108　RNA-Seq 法を用いた小腸刷子細胞発現遺伝子の網羅的探索**

◦谷下道大[1]，吉岡美紗子[1]，朝倉富子[1]，阿部啓子[1,2]，石丸喜朗[1]（[1]東大院農生科・応生化，[2]KAST）

**4E109　コール酸の経口投与が C57BL/6J マウスの社会性行動および不安行動に与える影響**

◦伊藤誠晃[1]，青木綾子[1]，山岸直子[2]，青木玲二[2]，鈴木チセ[2]，

高山善晴[2]，戸塚　護[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]農研機構・畜草研)

**4E110　短鎖脂肪酸受容体 FFAR2 を介した脂肪組織マクロファージ機能とインスリン抵抗性**

◦長谷川沙恵，粕渕真由，宮本潤基，木村郁夫　(東農工大農)

**4E111　経口投与で抗うつ薬様作用を示す大豆由来ペプチドの腸ー脳相関**

◦森　薫葉[1]，山本あかね[1]，小田桐紗織[2]，山田大輔[2]，関口正幸[2]，和田圭司[2]，鈴木秀幸[3]，柴田大輔[3]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]　([1]京大院農食品生物，[2]国立精神・神経医療研究センター，[3]公益財団法人かずさ DNA 研究所)

**4E112　短鎖脂肪酸がマウス結腸オルガノイドの腸内分泌細胞分化に及ぼす影響**

◦尾崎洋輔[1]，斉藤伸一[2]，濱田晃弘[1]，鶴田剛司[3]，園山　慶[2]　([1]北大院・生命，[2]北大院・農，[3]岡山大・農)

**4E113　食品タンパク質由来のグレリン分泌促進ペプチドの発見**

◦中戸絢也[1]，青木隼人[1]，水重貴文[1,2]，岩倉　浩[3]，金本龍平[1]，大日向耕作[1]　([1]京大院農食品生物，[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット，[3]京大メディカルイノベーションセンター)

**4E114　Menaqauinone-4 and geranylgeraniol regulate testosterone production and insulin secretion.**

◦Hsin-Jung Ho，Hitoshi Shirakawa，Risa Yoshida，Misato Maeda，Tomoko Goto，Michio Komai　(Tohoku Univ.)

**4E115　ラットを用いたエイコサペンタエン酸の不安抑制効果の検討**

◦大島靖世[1]，遠藤　駿[1]，渡辺　剛[2]，竹中麻子[1]　([1]明治大・農・農化，[2]タマ生化学(株))

**4E116　りんご果汁摂取によるアスコルビン酸の組織特異的蓄積**

◦井澤弘美，三浦みこと，神　友美　(青森県立保健大学)

**4E117　ジンゲロールによる肥満改善効果**

◦岡本真由美[1]，酒井美帆[1]，侭田貴史[2]，清水功雄[1]　([1]早大理工，[2]永谷園)

**4E118　巨大胚芽米における発芽条件の GABA 生成量に及ぼす影響**

◦船田京子　(美作大学)

**4E119　ヒシポリフェノールの化粧品素材としての有用性の評価**

◦安田みどり[1]，斎木まど香[1]，浜島弘史[1]，柳田晃良[1]，池岡正樹[2]，深田拓也[2]，森　隆志[2]　([1]西九州大健栄，[2]日本リファイン)

**4E120　イソチオシアネート類が破骨細胞分化シグナルに及ぼす影響 ～初代培養および破骨細胞前駆細胞様株を用いて～**

◦高木智弘，井上博文，高橋信之，上原万里子　(東農大院)

**4E121　カルノシン酸の新規作用機構と脳機能保護効果**

◦柴田紗知[1]，石飛博之[2]，味八木茂[2]，萱島知子[3]，川岡知博[4]，松原主典[1]　([1]広島大院教育，[2]広島大病院，[3]佐賀大文化教育，[4]川岡クリニック)

**4E122　乳酸菌と酵母を用いて発酵させた発酵乳の香りがラットの脳波に及ぼす影響**

◦久住朝子，小谷　恵，川口恭輔，大木浩司　(カルピス(株)発酵応用研究所)

**4E123　2 つのプロバイオティクス摂取によるスギ花粉症患者の腸内フローラに与える影響**

◦原田　岳[1,2]，Kumar Himanshu[2]，久保田晃[1]，宮澤賢司[1]，依田一豊[1]，川瀬　学[1]，何　方[1]，Salminen Seppo[2]　([1]タカナシ乳業(株)，[2]Turku 大学)

**4E124　大豆イソフラボン代謝産物 equol 鏡像異性体が破骨細胞分化に及ぼす影響の差異**

◦藤井駿吾[1]，井上博文[1]，高橋信之[1]，上野友美[2]，内山成人[2]，上原万里子[1]　([1]東農大院・農・食品栄養，[2]大塚製薬(株)・佐賀栄養製品研)

**4E125　食生活状況及び身体の健康が若年層における皮膚機能に及ぼす影響**

◦山根拓実[1]，吉崎貴大[2]，君羅好史[3]，岩槻　健[1]，大石祐一[1]　([1]東農大応生科，[2]東洋大学食環境，[3]城西大薬)

**4E126　腸管オルガノイドを用いた幹細胞機能に及ぼす食品成分の研究**

◦齋藤由季，齋野瑞姫，渡部由佳梨，岩槻　健，清水　誠，只石　幹，服部一夫　(東農大応生科)

**4E127　オルガノイド培養系を用いた消化管インクレチン分泌細胞の同定**

◦大木淳子[1]，熊木竣佑[1]，小村汐里[1]，山根拓実[1]，大石祐一[1]，松本征仁[2]，粟飯原永太郎[3]，岩槻　健[1]　([1]東農大応生化，[2]埼玉医大医，[3]シンシナティ大学)

**4E128　コラーゲン，ヒアルロン酸，グルコシルセラミド配合大麦若葉末(むぎおう)粉末飲料の皮膚症状に及ぼす影響**

◦神谷智康，鍔田仁人，青木幸久，永瀧達大　(大地の力研究所)

**4E129　蛍光標識レスベラトロールを用いた細胞内動的イメージング**

◦小林謙一，島野愛美，柳　佑芽，茂木裕暉，高橋明日香，鈴木　司，山本祐司　(東京農大・応生・化学)

**4E130　カドミウム蓄積に伴う脂肪組織の機能変化**

◦吉城由美子，福井里菜，嵯峨彩花，田中陽介，和田恭平　(石川県大)

**4E131　ラットにおけるケルセチン配糖体の腸管吸収代謝経路の比較**

◦室田佳恵子[1]，金城ちなつ[1]，中村俊之[2]，中村宜督[2]，加藤陽二[3]，生城真一[4]　([1]近大・理工，[2]岡山大院・環境生命，[3]兵庫県大・環境人間，[4]富山県大・工)

**4E132　ケルセチンとその配糖体投与後のラット血漿およびリンパ液中代謝物の比較**

◦中村俊之[1]，中村宜督[1]，加藤陽二[2]，生城真一[3]，室田佳恵子[4]　([1]岡山大院・環境生命，[2]兵庫県大・環境人間，[3]富山県大・工，[4]近畿大・理工)

## F：微生物

**4F001　高知県沖海綿に生息する放線菌の分離と多様性解析**

◦富岡寿也[1]，木谷　茂[1]，野田大貴[1]，ウラノヴァダナ[2]，津田正史[3]，仁平卓也[1]　([1]阪大・生物工学国際交流セ，[2]高知大・総合研究セ，[3]高知大・海洋コア)

**4F002　南極淡水湖からの低温活性プロテアーゼ産生菌の分離と同定**

◦松井美保子[1]，川又明徳[2]，小杉真貴子[3]，伊村　智[4]，黒沢則夫[1]　([1]創価大院工，[2]愛媛県総合科学博物館，[3]中央大，[4]国立極地研究所)

**4F003　国際宇宙ステーション「きぼう」における真菌動態調査：中間報告**

◦佐藤一朗[1]，山崎　丘[1,2]，梅田宜子[1]，檳村浩一[1]　([1]帝京大医療共通教育研，[2]宇宙航空研究開発機構)

**4F004　伝導率の違いを利用した微生物のスクリーニング法の検討および構築**

◦中野　栞[1]，渡邉彬宏[1]，小林　徹[2]，三浦　健[1]　([1]東洋大生命科，[2]海洋研究開発機構)

**4F005　担子菌 *Ganoderma lucidum* NBRC 8346 における継代培養が引き起こす遺伝子領域の塩基配列の変化**

◦桜井健太，田村朋彦，稲葉重樹，細山　哲，黄地祥子，山副敦司，川崎浩子，佐藤真則　(製品評価技術基盤機構)

**4F006　MALDI-TOF MS を用いた糸状菌の同定のためのプロテオミクス**

◦岩本孝樹，濱田亮介，堀沢　栄　(高知工科大学)

**4F007　微生物細胞の付着現象に基づく分離技術の開発**

◦松尾朋昇，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治　(東農大)

**4F008　植種の希釈が集積培養後の微生物相に与える影響について**

◦羽鳥伸太郎，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治　(東農大)

**4F009　共培養法を適用したセルロース分解菌の探索**

◦北村俊貴，大西章博，藤本尚志，鈴木昌治　(東農大)

**4F010　共培養時に観察される *Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上因子の同定**

◦若林　佑[1]，清水　哲[2]，中村　顕[2]，伊藤政博[1]　([1]東洋大学大学院・生命科学研究科，[2]筑波大学・生命環境科系)

**4F011　固化剤濃度および呼吸機能関連遺伝子が大腸菌のコロニー形成に及ぼす影響**

◦伊藤俊輔[1]，佐藤寛美[1]，古寺和人[1]，中島加奈子[2]，林真由美[1]，野村一樹[1]，山口利男[3]，井口晃徳[1]，重松　亨[1]　([1]新潟薬大・応生科，[2]新潟薬大・産学連携セ，[3]新潟薬大・薬)

**4F012　低温飢餓条件でのコロニー形成能の低下を抑える大腸菌遺伝子の解析**
◦福嶋凡子，西尾優宏，高丸玲子，小川哲弘，日高真誠，正木春彦（東大農）

**4F013　複数の受容菌存在下で接合伝達の成立に影響を及ぼす因子の探索**
◦作田郁子[1]，水口千穂[1]，橋本詢子[2]，小曾根郁子[2]，小松　護[3]，新家一男[2]，池田治生[3]，岡田憲典[1]，野尻秀昭[1]（[1]東大生物工学セ，[2]産総研，[3]北里大・北里生命研）

**4F014　*Methylobacterium* 属細菌の Ca を葉上シグナルとする PQQ 分泌機構の解析**
◦三井亮司，矢野裕之，一小路貴士，田中美知留，田中三男（岡山理大理）

**4F015　花に生息する嫌気性細菌に関する研究**
◦平井昂二郎[1]，板橋貴智[1]，石毛太一郎[2]，岩田絢子[1]，田川可琳[1]，千葉　誠[1]，新村洋一[1]，川崎信治[1]（[1]東農大バイオ，[2]ゲノム解析センター）

**4F016　重油分解微生物コミュニティの *de novo* メタトランスクリプトーム解析**
◦佐藤由也[1]，堀　知行[1]，小池英明[2]，松尾和幸[1]，柳澤真紀[1]，ナバロロナルド[1]，羽部　浩[1,3]，尾形　敦[1]（[1]産総研・環境管理，[2]産総研・生物プロセス，[3]産総研・機能化学）

**4F017　窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* を *Pseudomonas* 属非窒素固定細菌と共培養した際の窒素固定活性の強化，持続化に関する研究**
◦中村弘輝，正木春彦，日高真誠（東大院農生科・応生工）

**4F018　反射顕微鏡法による微生物腐食の新規観察手法**
◦渡辺宏紀[1]，稲葉知大[2,3]，豊福雅典[2]，宮野泰征[4]，野村暢彦[2]（[1]筑波大・生命環境，[2]筑波大院・生命環境，[3]産総研・環境管理，[4]秋田大・工学研究科）

**4F019　ゲノム配列に基づく Rhodococcus 属細菌の超低栄養性の比較**
◦小林亮太[1]，矢野嵩典[1]，鈴木智大[2]，道羅英夫[2]，金原和秀[1]，新谷政己[1]，吉田信行[1]（[1]静岡院，[2]静大，グリーン研）

**4F020　アラスカ永久凍土氷楔由来放線菌の休眠に関わる遺伝子特定の試み**
◦池　晃祐[1]，寺島美亜[2]，北川　航[1,3]，加藤創一郎[1,3]，鎌形洋一[1,3]，浅野行蔵[1]（[1]北大院農，[2]北大低温研，[3]産総研生物プロセス）

**4F021　水素酸化細菌の培養特性と独立栄養代謝活性の解析**
◦近藤晃一郎[1]，飯塚久美子[1]，白神清三郎[2]，石井正治[3]，西原宏史[1]（[1]茨城大・農・資生科，[2]味の素・バイオ・ファイン研，[3]東大院・農生科・応生工）

**4F022　Physiological and molecular analyses of yeasts isolated from Toddy in Sri Lanka**
◦Maduka Subodinee Ahangangoda Arachchige, Hirohide TOYAMA（Dept. of Biosci. Biotech,, Fac. of Agri., Univ. of Ryukyus.）

**4F023　溶存酸素がビール酵母生育に及ぼす影響に関する研究**
◦宮澤拓巳[1]，金内　誠[1]，チャールズ.W.バンフォース[2]（[1]宮城大学食産業学部大学院，[2]カリフォルニア大学デービス校）

**4F024　奈良八重桜の花から分離された Torulaspora delbrueckii 株のストレス耐性**
◦岩口伸一[1]，角井理衣[1]，高橋達治[2]，坪井　誠[2]（[1]奈良女大理生物科学，[2]一丸ファルコス株式会社）

**4F025　ラクチュロース-ラフィノース-ガラクトオリゴ糖の組み合わせが新生仔マウス消化管に与える影響の検討**
◦江原達弥，津田宗哉，松原　毅，和泉裕久，中里友紀，岩本　洋，武田安弘（森永乳業(株)栄養科学研究所）

**4F026　光変換型蛍光蛋白質で細胞極を標識した大腸菌の観察と光変換条件の最適化**
◦陶山哲志，水野敬文（産総研）

**4F027　出芽酵母の細胞壁 β-1,6-glucan の合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定**
◦東　亮介[1,2]，足立博之[1]，依田幸司[1]，鎌倉高志[2]，野田陽一[1]（[1]東大院・農生科・応生工，[2]東理大・理工）

**4F028　麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテーゼ AdmA, AdmB の局在解析および発現解析**
◦小林拓嗣，大岩達郎，前田　浩，竹内道雄，山形洋平（東農工大院）

**4F029　*Aspergillus oryzae csrA* 遺伝子の natural antisense RNA は sense RNA と結合し，sense RNA 量と分生子の発芽を制御する**
◦辻井　雅，竹内道雄，山形洋平（東京農工大学）

**4F030　麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 の局在解析**
◦菊間隆志，有岡　学，北本勝ひこ（東大院・農生科・応生工）

**4F031　乳酸菌由来 S-layer タンパク質が示す免疫学的特性**
◦鈴木駿也[1]，梶川揚申[2]，田中尚人[3]，岡田早苗[2]（[1]東農大院･農化，[2]東農大・生応科，[3]東農大・菌株）

**4F032　酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン代謝におけるオキシステロール結合タンパク質ホモログ Osh6p の機能解析**
◦岩間　亮，堀内裕之，福田良一（東大院・農生科・応生工）

**4F033　アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質 CAP と相互作用する Csh3**
◦川向　誠[1]，山本孝治[2]，大岡妥世[1]，周　国雷[3]（[1]島大生資，[2]郵政省情報通信研，[3]アーカンサス大）

**4F034　*In vitro* 再構成系を用いた出芽酵母胞子壁におけるジチロシン層形成機構の解析**
◦中西秀樹，ベムナレオ，ムカマオマール，高　暁冬（江南大・生物工程）

**4F035　Characterization of a new cold-adapted Shewanella sp. to develop a system for secretory production of proteins.**
◦Chen CHEN[1]，Soichiro KAWAI[1]，Jun KAWAMOTO[1]，Tomoya IMAI[2]，Tatsuo KURIHARA[1]（[1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University）

**4F036　*Sphingomonas* 菌株から産生された五糖型スフィンゴ糖脂質の糖鎖構造解析**
◦川原一芳，串間由里奈，有路沙織，高橋希恵，飯田博一（関東学院大理工生命）

**4F037　低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の解析**
◦横山文秋[1]，川本　純[1]，今井友也[2]，小川拓哉[1]，栗原達夫[1]（[1]京都大学 化学研究所，[2]京都大学 生存圏研究所）

**4F038　高圧によって引き起こされる細胞小器官損傷の GFP 酵母を用いた観察**
◦三輪晃久，岩橋　均（岐阜大）

**4F039　細胞極性制御因子による微小管制御機構の解析**
◦金子さゆり[1]，水沼正樹[1]，平田　大[1,2]，久米一規[1]（[1]広島大・院先端研，[2]朝日酒造）

**4F040　*Aspergillus nidulans* におけるリン酸基中間因子 YpdA の発現抑制に伴う HogA 経路の持続的な異常活性化と致死性について**
◦吉見　啓[1]，福間泰之[2]，萩原大祐[3]，古川健太郎[4]，緑川裕良[2]，中山真由美[2]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大・未来研，[2]東北大院・農，[3]千葉大・真菌医，[4]新潟大・医歯学）

**4F041　枯草菌二成分制御系 WalKR の制御における糖脂質の影響**
◦松岡　聡，松本幸次，朝井　計，原　弘志（埼玉大院　理工研）

**4F042　酵母 *Pichia pastoris* のメタノール培養時に誘導される新規トランスポーターの解析**
◦芝田桃子[1]，大澤　晋[1]，由里本博也[1]，寶関　淳[2]，阪井康能[1,2]（[1]京大院農，[2]京大・生理化学）

**4F043　希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子べん毛回転停止に必須な遺伝子 *ftgA* の機能解析**
◦木村知宏，種村裕幸，手塚武揚，大西康夫（東大院農生科・応生工）

**4F044　HKR1 の部分発現による Saccharomyces cerevisiae の HM-1 耐性獲得機構**
◦鈴木宇香，笠原　紳（宮城大食産業）

**4F045　撹拌条件下における接合伝達性プラスミドの動態解析**
◦孕石　明[1]，中澤駿介[2]，福田洸平[3]，金原和秀[1,2,3]，新谷政己[1,2,3]（[1]静大工，[2]静大院，[3]静大創造院）

**4F046　非運動性グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* における付着因子とバイオフィルム形成の解析**

◦吉田圭太朗，豊福雅典，尾花　望，野村暢彦　（筑波大院・生命環境）

**4F047　Bacterial Two-Hybrid 法による二成分制御系のヒスチジンキナーゼ間の相互作用の探索**

◦羽田朋子[1]，江川広紀[1]，江口陽子[2]，内海龍太郎[1]　（[1]近大農，[2]近大生物理工）

**4F048　植物病原菌 *Pantoea ananatis* の病原性遺伝子領域の発現制御における Quorum Sensing 機構の解析**

◦佐藤隆亮，池田　宰，諸星知広　（宇都宮大院工）

**4F049　蜂蜜酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の高糖度耐性遺伝子の探索**

◦田村倫子[1]，笠原浩司[2]，桑村麻由里[1]，阿久澤さゆり[1]，村　清司[1]（[1]東農大応生科・健康，[2]東農大・アイソトープ）

**4F050　枯草菌の抗シグマ因子 YhdL と YhdK によるシグマ M の活性制御機構の解析**

◦朝井　計，佐俣友理，吉本祥子　（埼玉大理工）

**4F051　全ゲノム解析による実験室進化 *Saccharomyces cerevisiae* の熱適応戦略の分子解析**

◦里村　淳[1,2]，三浦夏子[1]，黒田浩一[1]，植田充美[1,3]　（[1]京大農，[2]日本学術振興会特別研究員，[3]京都バイオ計測センター）

**4F052　ホールトランスクリプトーム解析によるカロテノイド生産乳酸菌の酸化ストレス応答因子の探索**

◦萩　達朗，小林美穂，野村　将　（農研機構・畜草研）

**4F053　油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* の光応答メカニズムの解明**

◦宮田淳史[1]，　志田洋介[1]，　山崎晴丈[2]，　正木和夫[3]，　森　一樹[4]，久原　哲[4]，高久洋暁[2]，小笠原渉[1]　（[1]長岡技科大生物，[2]新潟薬科大応，[3]酒総研，[4]九大院農）

**4F054　炭酸と不飽和脂肪酸による連鎖球菌の増殖と莢膜多糖生合成の制御**

松本裕子，中西猛志，◦三宅克英　（石川県大資源研）

**4F055　酵母に対する酸化イットリウムナノ粒子の影響評価**

◦森山章弘[1]，高橋淳子[2]，堀江祐範[2]，岩橋　均[1]　（[1]岐阜大，[2]産総研）

**4F056　プラスミド保持に伴い宿主の生育負荷を引き起こす染色体上転写単位の解析**

◦杉山大介[1]，　水口千穂[1]，　高橋裕里香[2]，　岡田憲典[1]，　野尻秀昭[1]（[1]東大生セ，[2]富県大生工科・生工セ）

**4F057　麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ insulysin の機能解析**

◦鈴木遥香，吉永良平，前田　浩，竹内道雄，山形洋平　（東農工大農）

**4F058　接合菌 *Mucor circinelloides* の二形性メカニズムの解析**

◦岩倉　遼[1]，寺山結香[1]，高野真希[2]，星野一宏[2]　（[1]富大工，[2]富大院理工）

**4F059　*Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの同定**

◦伊賀俊貴[1]，加藤純一[2]，谷　明生[1]　（[1]岡山大植物研，[2]広島大院先端物質科学）

**4F060　植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼを用いた糸状菌におけるエチレン応答性人工シグナル伝達系の創製とその応用**

◦中山真由美[1,2]，古川健太郎[3]，吉見　啓[1]，阿部敬悦[1,2]　（[1]東北大・未来研，[2]東北大・院農，[3]新潟大・院医）

**4F061　自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌の特性と変異部位の決定**

◦御厨真幸[1]，松村吉信[2]　（[1]関大院化生工，[2]関大化生工）

**4F062　*Paenibacillus alvei* No. 14 株の有する光反応機構の解明**

◦末崎和弥[1]，吉原周佑[2]，村上周一郎[2]　（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・農化）

**4F063　*Shewanella oneidensis* MR-1 株における異化的代謝系の電極電位応答機構**

◦廣瀬篤弥，高妻篤史，渡邉一哉　（東薬大生命）

**4F064　酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 のエタノール発酵における生理的役割**

◦北　侑子，渡辺大輔，高木博史　（奈良先端大バイオ）

**4F065　ロドコッカス属細菌の凝集形態は Nonribosomal peptide synthetase によって制御される**

◦茂木亮介[1]，　長田啓司[1]，　菊子拓真[1]，　稲葉知大[2]，　尾花　望[3]，豊福雅典[3]，野村暢彦[3]　（[1]筑波大院・生命環境，[2]産総研・環境管理，[3]筑波大・生命環境系）

**4F066　真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質（AstaP）ホモログの機能解析**

◦加藤聖子，荒木花梨，岡田和隆，新村洋一，川崎信治　（東農大バイオ）

**4F067　真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質（AstaP）ホモログの微細藻類における分布**

◦宮田彩実，　淺野朋美，　望月晧平，　宮崎貴章，　新村洋一，川崎信治　（東農大バイオ）

**4F068　D-malic acid Chemoreceptors in *Ralstonia solanacearum* and Their Ligands Specificity**

◦MATTANA TUNCHAI，　Akiko HIDA，　Shota OKU，Takahisa TAJIMA，Yutaka NAKASHIMADA，Junichi KATO　（Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.）

**4F070　長鎖 AHL に応答する *Chromobacterium violaceum* のクオラムセンシング機構の解析**

◦島村裕子[1]，豊福雅典[1]，諸星知広[2]，池田　宰[2]，野村暢彦[1]　（[1]筑波大・院生命環境，[2]宇都宮大・院工）

**4F071　*Clostridium perfringens* の毒素産生を制御するクオラムクエンチング機構の解明**

◦安達桂香[1]，　大谷　郁[2]，　河野道生[1]，　ラビンドラパルシン[1]，園元謙二[1]，中山二郎[1]　（[1]九大院農，[2]ミヤリサン製薬）

**4F072　*Lactobacillus plantarum* 4 株のストレス耐性に及ぼす培地の影響**

◦矢島冬紗子[1]，杉本　咲[2]，水上優里奈[2]，佐々木泰子[2]　（[1]株式会社ピックルスコーポレーション，[2]明治大学）

**4F073　放線菌 *Streptomyces griseus* 自己調節因子受容体 ArpA と A-factor の共結晶化条件スクリーニング**

◦和田英嗣[1]，稲葉龍生[2]，加藤雄己[1]，夏目　亮[1,2]　（[1]東電大・院・工，[2]東電大・工）

**4F074　酵母のプロリン合成系酵素 Pro1 はリボソームの選択的なオートファジーに関与する**

◦立橋祐樹，渡辺大輔，高木博史　（奈良先端大）

**4F075　細胞極性制御因子・Mor2 とスピンドルチェックポイントとの機能的関連性の解析**

◦西川健二[1]，　金子さゆり[2]，　水沼正樹[2]，　平田　大[2,3]，　久米一規[2]（[1]広島大・工，[2]広島大・院先端研，[3]朝日酒造）

**4F076　アミノ酸排出輸送体 YtfF の基質排出メカニズムに関する研究**

◦勝部　哲，　金　世怜，　齊藤康平，　安藤太助，　磯貝恵美子，米山　裕　（東北大学）

**4F077　麹菌 *A. oryzae* の新規宿主を用いたハイドロフォービン遺伝子群の機能解析**

◦朽方康裕，　中野宏軌，　菊池遥香，　辻　華奈，　利根川唯，森谷翔太，中島春紫　（明治大・農・農化）

**4F078　アグロバクテリウムを用いた担子菌スエヒロタケの形質転換**

◦吉田佳奈子[1]，鷲見あずさ[1]，山口美咲[1]，野澤貴洋[1]，下坂　誠[2]，千　菊夫[1]　（[1]信州大・農・応生科，[2]信州大・繊維・応生科）

**4F079　好熱性アーキア Sulfolobus acidocaldarius の制限酵素 SuaI 遺伝子欠損株の構築と直鎖状 DNA を用いた相同組換え効率の評価**

◦鈴木匠爾，黒沢則夫　（創価大）

**4F080　ビフィズス菌プロモーターの機能解析**

◦小酒井智也，野村　泉，鈴木　徹　（岐阜大・応生）

**4F081　*Corynebacterium glutamicum* におけるメカノセンシティブチャネル欠損による抗生物質の感受性の変化**

◦野畑和宏，　鬼熊友美，　鄭　芳珍，　山崎早苗，　橋本賢一，川崎　寿　（東京電機大学）

**4F082　株内セルフクローニング法による *PDE2* 遺伝子を高発現する冷凍耐性パン酵母の構築**

◦望月千里，荻原宏幸，中川洋史，山村英樹，早川正幸　（山梨大院・医工総・生命）

**4F083　イネいもち病菌突然変異体 Ina168m95-5 株における *AVR-Pik* の欠失機構**

◦富田有貴[1]，　船引麻衣[1]，　中馬いづみ[2]，　浅野行蔵[1]，　曾根輝雄[1]

（[1]北大農，[2]神戸大農）

**4F084　*Thermus thermophilus* HB27 株を用いた $t^6A$ 修飾関連遺伝子の機能解析**

◦川端祐佳[1]，澤田泰平[1]，北原一正[1]，小野瀬晃由[1]，星野貴行[1]，吉澤聡子[2]，朝原治一[3]，中村　顕[1]（[1]筑波大院生命環境，[2]CNRS-I2BC，[3]NEB）

**4F085　Thermus thermophilus HB27 株における VapBC toxin-antitoxin システムの解析**

◦Fan Yuqi[1]，星野貴行[2]，中村　顕[2]（[1]筑波大学生命環境科学研究科，[2]筑波大学生命環境系）

**4F087　Characterization of lytic enzymes from thermophilic bacteriophage $\phi$ OH2**

◦Mina Kim[1]，Hindra MARTONO[1]，Yuko NAGAYOSHI[1]，Junpei MAEDA[1]，Toshihisa OSHIMA[2]，Yasuhiro FUJINO[1]，Katsumi DOI[1]（[1]Kyushu Univ.，[2]Osaka institute of technology Univ.）

**4F088　各種ガン細胞におけるファージ由来溶菌酵素 Holin の効果とアポトーシス誘導**

◦千羽啓太，黒木未知瑠，原田額郎，片倉喜範，土居克実（九大農）

**4F089　糸状菌 Trichoderma reesei におけるセロビオース応答性セルラーゼ転 写活性化因子の機能解析**

◦高橋圭太郎，会田宏樹，平沢大樹，塩屋幸樹，志田洋介，小笠原渉（長岡技科大，生物）

**4F090　枯草菌のリンゴ酸酵素遺伝子 *ytsJ* および 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素遺伝子 *gndA* の調節因子の探索**

◦夏目文音，田中耕生，竹中慎治，吉田健一（神戸大院農学研究科）

**4F091　標準 RNA を用いた抽出 RNA のクオリティーコントロール**

◦長谷川丈真[1]，高橋淳子[2]，岩橋　均[1]（[1]岐阜大学，[2]産総研）

**4F092　恐怖記憶形成に対する断眠処置の影響**

◦堺　大樹[1]，喜田　聡[1,2]（[1]東農大・応生科・バイオ，[2]科学技術振興機構・CREST）

**4F093　高速 DNA シークエンシングを用いた糸状菌転写制御ネットワークのゲノムワイド解析システム**

◦兒島孝明[1]，國武絵美[2]，井原邦夫[3]，小林哲夫[2]，中野秀雄[1]（[1]名大院・生命農・生命技術，[2]名大院・生命農・生物機構，[3]名大・遺伝子実験施設）

**4F094　プラスミドが宿主に与える影響の比較**

◦片岡大亮[1]，鈴木智大[2]，道羅英夫[2]，金原和秀[1]，新谷政己[1]（[1]静大院，[2]静大，グリーン研）

**4F095　新規共存プロテオーム解析法による病原性真菌 *Candida albicans* の免疫細胞マクロファージとの相互作用解析**

北原奈緒[1]，◦青木　航[1,2]，森坂裕信[1,2]，黒田浩一[1]，植田充美[1,2]（[1]京大農，[2]KISTIC）

**4F096　異化的ヒ酸還元細菌のヒ素ストレス応答の網羅的解析**

◦土屋達哉[1]，笠原康裕[2]，天知誠吾[1]（[1]千葉大院園芸，[2]北海道大低温科学研究所）

**4F097　Protein lysine acetylation profile of a plasmid-free and pCAR1-harbouring *Pseudomonas putida* KT2440**

◦Delyana VASILEVA[1]，Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1]，Saori KOSONO[1]，Minoru YOSHIDA[2]，Kazunori OKADA[1]，Hideaki NOJIRI[1]（[1]The Univ. of Tokyo，[2]RIKEN CSRS）

**4F098　PacBio RS II を用いた Lactobacillus curvatus FBA2 ゲノム完全長配列の構築**

◦鈴木チセ[1]，中野和真[2]，保日奈子[2]，小川智子[3]，木元広実[1]，小林美穂[1]，守谷直子[1]，青木玲二[1]，佐藤万仁[2]，照屋邦子[2]，平野　隆[2,4]（[1]農研機構・畜草研，[2]沖縄綜研，[3]生物研，[4]沖縄科技セ）

**4F099　ランダム変異による超好熱菌温度感受性株の単離と解析**

◦福居俊昭[1]，二石涼平[1]，金子　瑛[1]，折田和泉[1]，今中忠行[2]，中村　聡[1]（[1]東工大院・生命理工，[2]立命館・生命科学）

**4F100　海洋性好酸性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のゲノム解析**

◦金尾忠芳，スルタナシャーミン，上村一雄（岡山大院・環境生命）

**4F101　ピロリ菌の適応形質を支配する DNA メチル化系ネットワークの発見**

◦矢野大和[1,2]，アラムゾバイドル[1]，林原絵美子[3]，古田芳一[1,2]，鈴木　穣[1]，菅野純夫[1,2]，柴山恵吾[3]，小林一三[1,2]（[1]東大新領域，[2]東大医科研，[3]国立感染研）

**4F102　酵母 *Kluyveromyces marxianus* の交配による耐熱性遺伝子の探索**

◦廣田潤哉[1]，矢野晴也[2]，星田尚司[2]，赤田倫治[2]（[1]山口大・工・応化，[2]山口大院・医系・応用分子生命）

**4F103　環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索**

◦中村祐哉，森　宙史，黒川　顕，中島信孝（東工大）

**4F104　スウェーデン北部の U 字谷 Karkevagge の土壌微生物群集の解析と植生の関連性**

◦礒田玲華[1]，Giesler Reiner[2]，橋床泰之[1]（[1]北大院農，[2]Umea Univ.）

**4F105　セルロースを混合した土壌における微生物生態系の変遷**

◦小林慶紀，林田英里香，横山和平，藤井克彦（山大農）

**4F106　殺ボウフラ活性を示す *Bacillus thuringensis* TK-E6 株がもつ巨大プラスミドの殺虫タンパク質遺伝子群の構成**

◦植田　翔，冨田佳捺衣，稲盛香織，野田麻友，東　慶直，武部　聡（近大生物理工）

**4F107　大腸菌で継代培養を繰り返した際にゲノム配列に生じる突然変異の網羅的解析**

◦下平　潤，細山　哲，内野佳仁，山副敦司，藤田信之（製品評価技術基盤機構）

**4F108　ベタニン摂取ワラジムシ（*Porcellio scaber*）に特徴的な腸内微生物叢の解析**

◦浅野純一[1]，橋床泰之[2]（[1]北大農，[2]北大院農）

**4F109　DNA 配列表示ツール SeqView**

◦大坪嘉行，永田裕二，津田雅孝（東北大院生命）

**4F110　*Streptomyces coelicolor* A3(2)M145 の NO 恒常性制御機構の解析**

◦小川翔大，草間慎一朗，杉浦　遼，伊藤晋作，矢嶋俊介，祥雲弘文，佐々木康幸（東農大）

**4F111　*Gluconobacter* 属酢酸菌における 5-ケトグルコン酸輸送体分子と資化能との関係**

◦西原　彬[1]，片岡尚也[2]，薬師寿治[2]，松下一信[2]，阿野嘉孝[1]（[1]愛媛大農，[2]山口大農）

**4F112　*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の高温適応耐熱化株 TH-3 の発現・機能解析から見える耐熱性機構**

◦松下一信[1,4]，松谷峰之介[1]，西倉慎顕[1]，秦野智之[1]，サイチャナナツラン[1]，マスードウライワン[1]，服部浩美[1]，貝沼(岡本)章子[2]，兼崎　友[3]，石川森男[2]，片岡尚也[1,4]，薬師寿治[1,4]（[1]山口大農・生物機能，[2]東京農大・応用科醸造，[3]東京農大・ゲノムセンター，[4]山口大・中高温微生物研究センター）

**4F113　増殖期と増殖停止期におけるイソプロピルアルコール生産大腸菌の $^{13}C$ 代謝フラッ クス解析**

◦岡橋伸幸[1]，吉川勝徳[1]，松田史生[1]，松本佳子[2]，白井智量[3]，和田光史[2]，清水　浩[1]（[1]阪大情報，[2]三井化学，[3]理研）

**4F114　*Enterococcus mundtii* QU 25 における Phosphoketolase 活性の翻訳後調節機構の解析**

◦鍋田啓介[1]，岩永美優[1]，渡辺　智[1]，千葉櫻拓[1]，門多真理子[5,1]，園元謙二[3,4]，吉川博文[1,2]（[1]東京農大・院・バイオ専攻，[2]東京農大・ゲノム解析セ，[3]九大院・農，[4]九大バイオアーク，[5]武蔵野大・環境）

**4F115　酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトン代謝に関する研究：ジヒドロキシアセトンリン酸化酵素**

平田花織，松谷峰之介，足立収生，片岡尚也，◦薬師寿治，松下一信（山口大農）

**4F116　Methylobacterium aquaticum 22A のメタノール脱水素酵素ホモログの機能解析**

◦中辻由加里，谷　明生（岡山大 植物研）

**4F117　解糖系フラックスセンサーを利用した高効率物質生産のための代謝制御手法の開発**

◦戸谷吉博，渡辺　祥，徳山健斗，吉川勝徳，松田史生，清水　浩（阪大院・情報・バイオ情報）

**4F118　Analysis of glucose repression in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042**

◦Mochamad NURCHOLIS[1]，Suprayogi[1]，Savitree LIMTONG[2]，Tomoyuki KOSAKA[3,4]，Mamoru YAMADA[1,3,4]（[1]Graduate School of Medicine，Yamaguchi Univ.，[2]Faculty of Science，Kasetsart

Univ., [3]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [4]RCTMR, Yamaguchi Univ.）

**4F119　*Thermus thermophilus* においてアセチル化を受ける CoA トランスフェラーゼの機能と制御機構の解析**

◦山本寛之，　吉田彩子，　富田武郎，　古園さおり，　葛山智久，西山　真　（東大生物工学セ）

**4F120　クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子破壊株の作製**

◦小林慶一，上田由佳，桐村光太郎　（早大理工・応化）

**4F121　*Burkholderia* sp. 5-2 株が有する L-glycerate 代謝経路の L-glycerate dehydratase の解析**

◦根岸真衣子[1]，中村　顕[2]　（[1]筑波大生命環境科学研究科，[2]筑波大生命環境系）

**4F122　液体クロマトグラフ質量分析計を用いた培養上清成分一斉分析手法の開発とその応用**

◦豊田健一[1]，　氏本貴仁[2]，　平丸大介[1]，　鈴木　崇[1]，　中西　豪[1]，大津厳生[2]　（[1]島津製作所 分析計測事業部，[2]奈良先端大・バイオ）

**4F123　吟醸酒品質優劣と極性代謝物及びタンパク質プロファイルはどう関係するか？**

◦高橋　圭，河野弘美　（酒総研）

**4F124　NMR メタボリックプロファイリングを利用した野菜ジュース中における乳酸菌の発酵特性解析**

◦冨田　理，　齋藤勝一，　中村敏英，　蔦　瑞樹，　関山恭代，亀山眞由美　（農研機構・食総研）

**4F125　ジアセチル低生産性酵母の育種**

◦山口泰広，高橋俊成，末野和男　（菊正宗酒造総研）

**4F126　脂質蓄積性出芽酵母形質転換株における糖新生と脂質蓄積の制御**

◦神坂　泰[1]，木村和義[1]，植村　浩[1]，Ledesma-Amaro Rodrigo[1,2]（[1]産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門，[2]サラマンカ大学）

**4F127　*Thermococcus kodakarensis* での ATPase 高発現により水素生産の細胞増殖依存性は部分的に解除される**

◦金井　保[1,2]，　Simons Jan-Robert[1,2]，　別府春樹[1]，　今中忠行[2,3]，跡見晴幸[1,2]　（[1]京大院工，[2]JST, CREST，[3]立命館大 , 総合科研）

**4F128　協会系酵母と系統が異なる清酒酵母の醸造特性**

◦高尾佳史[1]，　高橋俊成[1]，　赤尾　健[2]，　五島徹也[2]，　磯谷敦子[2]，福田　央[2]，末野和男[1]　（[1]菊正宗酒造総研，[2]酒総研）

**4F129　油脂酵母 *Lipomyces* のスクリーニング指標とした脂肪球と油脂生産との相関**

◦柳場まな，松本美穂，長沼孝文　（山梨大・院）

**4F130　アミノ酸高蓄積酵母 101H を用いた泡盛の酒質評価**

◦塚原正俊[1]，　伊波朋哉[1]，　塚原恵子[1]，　大城彩音[1]，　鼠尾まい子[1]，新里修一[2]，外山博英[3]，渡辺大輔[4]，高木博史[4]　（[1]バイオジェット，[2]新里酒造，[3]琉球大・亜熱生資，[4]奈良先端大・バイオ）

**4F131　油糧微生物 *Mortierella alpina* の標的遺伝子破壊による希少脂肪酸生産**

◦菊川寛史[1]，櫻谷英治[1,2]，安藤晃規[1,3]，小川　順[1,3]　（[1]京大院農・応生，[2]徳島大院・ソシオ，[3]京大・生理化学）

**4F132　醤油用麹菌 *Aspergillus sojae* KBN1340 株由来酸性ホスファターゼ(AsAphA)の酵素学的性質**

◦安田(吉野)庄子，小野奈津子，長谷川摂，間野博信　（あいち産科技総セ・食工技セ）

**4F133　*Lactobacillus.sakei* YK20 株中の脂肪酸ヒドロキシラーゼの役割に関する研究**

◦近藤彩夏，長田彩加，金内　誠，石田光晴　（宮城大食産）

**4F134　新規 MOA レダクターゼ A(MorA)を高発現させた麹菌を用いて製造した清酒の成分分析。**

◦栗本真希[1]，　山本竜也[1]，　岡部夏海[1]，　望月麻衣[1]，　船越吾郎[2]，安田(吉野)庄子[2]，三井　俊[2]，村野宏達[1]，志水元亨[1]，加藤雅士[1]（[1]名城大農，[2]あいち産業技総セ・食工技セ）

**4F135　泡盛麹菌 *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の諸性質と誘導条件**

◦眞榮田麻友美[1]，　渡嘉敷正司[2]，　渡嘉敷みどり[2]，　伊藤　進[1]，平良東紀[1]　（[1]琉大農，[2]石川種麹店）

**4F136　酢酸菌ファージを利用した染色体組み込み型ベクターの開発**

◦小俣行輝[1]，　日比徳浩[2]，　中野　繁[2]，　天野昭一[1]，　上田賢志[1]，高野英晃[1]　（[1]旧大生資科，[2]株式会社Mizkan Holdings 中央研究所）

**4F137　*Mortierella capitata* を用いた極長鎖モノ不飽和脂肪酸ネルボン酸の発酵生産**

◦夏原千怜[1]，　川見直也[2]，　竹村玲亮[2]，　倉田淳志[2]，　濱口翔平[3]，梅本宏樹[3]，塚原　智[3]，石黒　隆[3]，岸本憲明[2]　（[1]近畿大院農，[2]近大農，[3]ミヨシ油脂株式会社）

**4F138　清酒醸造におけるグアイアコール(4-VG 様フェノール臭原因物質)の生成**

今野真人[1]，　伊藤俊彦[1]，　志村洋一郎[1]，　渡邉誠衛[2]，　高橋　仁[2]，◦橋爪克己[1]　（[1]秋田県大，[2]秋田県総合食品研究センター）

**4F139　次世代 DNA シーケンサーを利用した清酒酵母のエタノール発酵力の QTL 解析**

◦渡部保容[1]，山田美和[1]，赤尾　健[2]，下飯　仁[1]　（[1]岩手 大・ 農，[2]酒総研）

**4F140　清酒酵母の接合型ホモ株の作成とそれを利用した交配育種**

◦長谷川悠太[1]，山田美和[1]，赤尾　健[2]，下飯　仁[1]　（[1]岩手大・農，[2]酒総研）

**4F141　生乳・漬物・赤ワイン滓由来の乳製品用乳酸菌の単離・同定・機能性評価**

◦根来雄哉，高屋朋彰　（小山高専物質）

**4F142　上面発酵酵母の発酵特性解析**

◦高橋沙織，稲留弘乃，太田　拓，吉崎成洋，善本裕之　（キリン・酒類研）

**4F143　カプロン酸エチル高生産性かつ遺伝的安定性を持つ自然発生的セルレニン耐性酵母の分離**

◦田村博康[1]，　岡田啓希[3]，　久米一規[2]，　五島徹也[4]，　中村　諒[1]，赤尾　健[4]，下飯　仁[5]，水沼正樹[2]，大矢禎一[3]，平田　大[1,2]　（[1]朝日酒造・研究開発，[2]広島大・先端研，[3]東大・新領域・先端生命，[4]酒総研，[5]岩手大）

**4F144　イオンビームによる耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 発酵変異株の構築およびリグノセルロースからの同時糖化発酵への応用**

◦山下聖樹[1]，高野真希[2]，畑下昌範[3]，星野一宏[2]　（[1]富大工，[2]富大院理工，[3]若狭湾エネ研）

**4F145　清酒に含まれるチオールの解析**

◦飯塚(古川)幸子，磯谷敦子，藤井　力　（酒総研）

**4F146　大腸菌による D-プシコースの高純度発酵生産法の開発**

◦島並祐子，林　幹朗，田畑和彦　（協和発酵バイオ）

**4F147　ニトロチロシン合成酵素の同定に向けた非リボソームペプチド rufomycin の生合成遺伝子クラスターの解析**

◦冨田宏矢[1,2]，勝山陽平[1,2]，大西康夫[1,2]　（[1]東大院・農生科・応生工，[2]JST, CREST）

**4F148　酵母によるグルコースからの有用イノシトール類縁体への変換**

◦荒　学志，山崎晴丈，高久洋暁　（新潟薬大・応生科）

**4F149　*Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 由来の推定ペプチド遺伝子の異種発現と抗菌活性の検討**

◦山口大志[1]，吉良将顕[2]，古中康平[2]，倉田淳志[2]，岸本憲明[2]　（[1]近畿大院農，[2]近畿大農）

**4F150　シアノバクテリアによるソルビトールの光合成生産**

◦陳　泰駿，池内昌彦　（東大）

**4F151　植物または植物性発酵食品由来乳酸菌の抗菌性について**

◦高倉麻菜美[1]，内野昌孝[2]，田中尚人[3]，高野克己[2]　（[1]東京農大院・農化，[2]東京農大応生・化学，[3]東京農大応生・菌株）

**4F152　紅麹水抽出物による石灰化促進に及ぼす骨形成マーカー遺伝子の発現変動**

◦安里雪乃，池尻真美，橘信二郎　（琉大農）

**4F153　麹菌細胞壁成分のコウジ酸生産への影響**

◦張　斯来, 田中瑞己, 新谷尚弘, 五味勝也　（東北大学 農学研究科）

**4F154　抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化の分子生物学的仕組みの解析**

◦下野和真[1]，　今井　優[1]，　田中幸徳[2]，　佐藤誠造[3]，　越智幸三[2]，保坂　毅[4]　（[1]信州大院農，[2]広工大生命，[3]日本水産中央研，[4]信州大先鋭領域融合研究群）

**4F155　*Streptomyces* 属放線菌のリファンピシン耐性変異株における二次代謝活性化機構の解析と抗生物質探索研究へのその応用**

◦長　大哲[1]，越智幸三[2]，保坂　毅[3]　（[1]信州大院農，[2]広工大生命，

[3]信州大先鋭領域融合研究群）

**4F156　抗生物質クロラムフェニコールのホルミシス効果による放線菌の潜在的二次代謝能の活性化**

◦石塚美咲[1]，　濱渦亮子[2]，　今井　優[1]，　長　大哲[1]，　佐藤誠造[3]，越智幸三[4]，保坂　毅[2]　（[1]信州大農，[2]信州大先鋭領域融合研究群，[3]日本水産中央研，[4]広工大生命）

**4F157　$F_O$ $F_1$ATP 合成酵素の機能変化が *Streptomyces* 属放線菌の生育と二次代謝能に及ぼす影響の解析**

◦丸山友子[1]，下野和真[2]，保坂　毅[3]　（[1]信州大農，[2]信州大院農，[3]信州大先鋭領域融合研究群）

**4F158　大腸菌を用いたモルヒネの発酵生産**

◦中川　明[1]，松村栄太郎[1]，片山高嶺[2]，小柳　喬[1]，山本憲二[1]，熊谷英彦[1]，佐藤文彦[2]，南　博道[1]　（[1]石川県大資源研，[2]京大院生命）

**4F159　Debaryomyces 属酵母が産生するフェノール代謝関連酵素 catechol 1,2-dioxygenase（C12O）の特徴と属内における C12O 遺伝子の分布**

◦栗原甘奈[1]，　前田剛志[2]，　加藤未来[1]，　能木裕一[3]，　浜本牧子[1,2]（[1]明治大農，[2]明治大院農，[3]JAMSTEC）

**4F160　変異型ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼの機能解析および応用**

◦大野　篤[1]，安川和志[1,2]，浅野泰久[1,2]　（[1]富山県大工・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**4F161　合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良―Ethylenome 最適化によるエチレンの高生産**

◦神藤定生[1]，林　茉依[2]，細田晃文[2]，田村廣人[2]　（[1]名城大・理工，[2]名城大・農）

**4F162　*Trichoderma reesei* における BGLII の生理学的役割**

◦中村彩奈[1]，　高橋真智子[1]，　松沢智彦[2]，　志田洋介[1]，　矢追克郎[2]，小笠原渉[1]　（[1]長岡技科大生物，[2]産総研）

**4F163　シロアリ腸内に共生する好アルカリ性細菌由来糖化遺伝子のリソース**

◦岸川昭太郎, 村田武英, 小幡裕一　（理研バイオリソースセンター）

**4F164　漢方薬配糖体成分の脱グリコシル化反応を担う乳酸菌由来新規 β-グルクロニダーゼの機能解析**

岸野重信[1]，　内堀良重[1,2]，　櫻間晴子[3]，　◦渡邊寛子[1]，　米島靖記[2]，小川　順[1]　（[1]京大院農・応用生命，[2]日東薬品工業，[3]京大院農・産業微生物）

**4F165　脂肪酸アシル CoA を脂肪族アルデヒドに変換する酵素に関する研究**

藤井宏祐[1]，　岸野重信[1]，　中谷友樹[1]，　◦宇佐美陸[1]，　伊藤正和[2]，村松正善[2]，小川　順[1]　（[1]京大院農・応用生命，[2]トヨタ自動車）

**4F166　高いプリン体代謝活性を有する乳酸菌の探索**

岸田奈弓[1]，　岸野重信[1]，　◦雑賀あずさ[1]，　米島靖記[2]，　小川　順[1]（[1]京大院農・応用生命，[2]日東薬品工業）

**4F167　基質結合による構造の安定化を利用した乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 AspT の基質探索手法の検討**

◦金ななせ[1]，　宮本あかり[1]，　鈴木聡美[1]，　七谷　圭[2]，　阿部敬悦[1,2,3]（[1]東北大・院・農・応用微生物，[2]東北大・院・農・微生物資源，[3]東北大・未来研）

**4F168　変異型キヌクリジノン還元酵素を用いた（*R*）-3-キヌクリジノール生産に関する研究**

◦李暁トウ，　品田　雅，　浦野信行，　松原　充，　藤本良美，片岡道彦　（阪府大院）

**4F169　微生物酵素を用いたアクリル酸生産に関する研究**

◦西本菜津紀，浦野信行，西川恵美，片岡道彦　（阪府大院・生環科・応生科）

**4F170　ショウガ活性 6-ジンゲロールの微生物反応による配糖体に関する研究**

◦松本里佳[1]，佐藤浩志[2]，上田　誠[1]　（[1]小山高専物質工学科，[2]日生バイオ株式会社）

**4F171　シークワァーサー由来フラボノイドメチル化酵素を利用したメチル化フラボノイド生産**

◦戸田　弘，早苗千晶，伊藤伸哉　（富県大生工研セ）

**4F172　*Sphingobium* sp. BD3100 株のベルベリン脱メチレン化酵素遺伝子の解析**

◦武田　尚[1]，　石川和樹[1]，　若菜大悟[1]，　福田雅夫[3]，　佐藤文彦[2]，細江智夫[1]　（[1]星薬大，[2]京大院生命，[3]長岡技大・生物）

**4F173　*Phialemonium* sp. AIU 274 由来 ω-アミノ基酸化酵素と *Pseudomonas* sp. AIU 362 由来アルデヒド酸化酵素によるジカルボン酸の合成**

◦大江光章, 山田美和, 北條　涉, 山下哲郎, 礒部公安　（岩手大農）

**4F174　*Hericium coralloides* 由来ラッカーゼ（Lcc2）の *A. oryzae* での効率的発現とポリフェノール変換反応**

◦伊藤伸哉，戸田　弘，高木伸也，黒川純司　（富山県大工）

**4F175　枯草菌を宿主とした L-glucose 生産系構築に向けた試み**

◦久住夏紀[1]，清水　哲[1]，吉田健一[2]，中村　顕[1]　（[1]筑波大・生命環境，[2]神戸大・農）

**4F176　土壌から分離した細菌の COS 分解活性及び COS hydrolase 遺伝子の分布**

◦小川貴弘[1]，加藤広海[2]，片山葉子[1]　（[1]農工大・農，[2]東北大・院生命）

**4F177　*Eggerthella sp. YY7918* の daidzein reductase の酵素学的性質**

◦川田結花[1]，五島智子[2]，横山慎一郎[3]，鈴木　徹[2]　（[1]岐阜大学連合農学研究科，[2]岐阜大学応用生物科学部，[3]岐阜県産業技術センター）

**4F178　ポリエチレンテレフタレート資化菌の分離・同定と分解機構の解明**

◦吉田昭介[1,2,5]，　平賀和三[2]，　竹花稔彦[3]，　谷口育雄[2]，　山地広尚[2]，前田康人[4]，豊原清綱[4]，宮本憲二[1]，木村良晴[2]，小田耕平[2]　（[1]慶應大，[2]京都工繊大，[3]株式会社 ADEKA，[4]帝人株式会社，[5]京大院工）

**4F179　土壌から分離された真菌の COS 分解活性及び *Trichoderma* sp. THIF20 株からの COS 分解酵素の精製**

◦正木啓仁[1]，影山　渓[2]，小澤理恵[3]，松下保彦[1]，片山葉子[1]　（[1]農工大，[2]国際石油開発帝石，[3]栗田工業）

**4F180　*N*-アセチルスクロサミンを原料として用いた新規オリゴ糖の酵素合成**

◦坂木洋平[1]，　加藤　萌[2]，　平野貴子[2]，　袴田　航[1,2]，　田代　充[3]，西尾俊幸[1,2]　（[1]日大院生資化・生物資源利用，[2]日大生資化・生命化，[3]明星大理工・総合理工）

**4F181　シアノバクテリアによるケトンの不斉還元への赤色パルス光照射が与える影響**

◦伊藤賢一[1]，村上雅彦[1]，青山　忠[1]，中村　薫[2]　（[1]日大理工，[2]神大発達科学）

**4F182　アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌の細胞反応によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産**

◦丸海老純也，油原かほり，小林慶一，桐村光太郎　（早大理工・応化）

**4F183　単細胞微生物用液-液界面バイオリアクターの開発**

◦小田　忍，馬場俊樹，中西真美，大箸信一　（金沢工大ゲノム研）

**4F184　酵素を利用した *myo*-inositol 合成法の開発**

◦藤澤智子[1]，跡見晴幸[1,2]　（[1]京大院・工，[2]JST, CREST）

**4F185　組換え枯草菌によるショ糖からの DFA IV 生産の向上にむけて**

村尾和樹，阿部　歩，浅野行蔵，◦曽根輝雄　（北大院農）

**4F186　フルオロ酢酸分解活性の向上したハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL 変異体の量子化学計算によるデザインと実験による検証**

◦福田昌寛[1]，山村眞輝[1]，中村　卓[1]，田中成典[2]　（[1]長浜バイオ大バイオサイエンス，[2]神戸大院システム情報）

**4F187　*Bacillus* 属細菌の至適生育 pH の違いによる $Na^+$駆動型べん毛モーター固定子 MotPS の中性環境におけるイオン透過性の差異の解明**

◦高橋優嘉[1]，野口有希奈[2]，伊藤政博[1,2]　（[1]東洋大・バイオナノ，[2]東洋大院・生命科学）

**4F188　バニリン添加時の選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* の菌体内タンパク質の発現解析**

◦渡邊崇人[1]，吉岡康一[2]，西村裕志[1]，渡辺隆司[1]　（[1]京大・生存研，[2]京府大院・生命環境）

**4F189　スエヒロタケ菌糸体によるエルゴチオネイン高生産培養法の確立**

◦鮫島由香，綿谷真未，田畑麻里子，松井徳光　（武庫女食栄）

**4F190　ジャトロファ種子搾油残渣の糸状菌発酵による有効活用～紅麹菌による抗酸化能の向上～**
◦仲眞弘樹[1]，名城　龍[1]，SUNTORNSUK WORAPOT[2]，橘信二郎[1]（[1]琉大農，[2]King Mongkut's University of Technology Thonburi）

**4F191　土壌肥沃度診断指標(SOFIX: Soil Fertile Index)を基盤とした水稲栽培の最適土壌条件の決定**
◦馬場崇誠，向　真樹，アディカリディネッシュ，荒木希和子，久保　幹（立命大生命）

**4F192　*Aspergillus* 属糸状菌におけるハイドロフォビン-クチナーゼ間のイオン的相互作用**
◦田中拓未[1]，高橋　徹[2]，中山真由美[2]，山形洋平[3]，阿部敬悦[1,2]（[1]東北大院 農，[2]東北大 未来研，[3]農工大院 農）

**4F193　水平伝播を利用した簡便で迅速な形質転換法の活用**
◦金子真也[1]，板谷光泰[2]（[1]東工大・生命理工，[2]慶應大・先端生命研）

## G：動物

**4G001　ピロロキノリンキノンとイミダゾロピロロキノリンの SK-N-SH 細胞と HepG2 細胞に対する効果の比較検討**
◦西居和哉，　中路昌志，　野村宏基，　久保航大，　延谷直哉，中西　慧，山田康枝（近畿大工）

**4G002　ウェルナー症候群モデルマウスにおけるテロメアの役割**
◦澁谷修一[1]，小山浩史[1]，横手幸太郎[2]，清水孝彦[1]（[1]千葉大院医先進加齢医学，[2]千葉大院医 細胞治療内科学）

**4G003　初乳摂取前後の新生子牛血清のメタボローム解析**
◦宮崎珠子，岡田啓司，佐藤　繁，山下哲郎，宮崎雅雄（岩手大学）

**4G004　胎児期と性成熟期の男性ホルモンの作用は膵 $\beta$ 細胞量を規定する**
◦原田直樹[1]，與田安紘[1]，甲木孝弘[1]，乾　　博[2]，山地亮一[1]（[1]大阪府大・生命環境，[2]大阪府大・栄養）

**4G005　FGF21 はアミノ酸欠乏性脂肪肝を抑制する**
丸山竜人[1]，◦清水　誠[1]，井上　順[1]，伊藤信行[2]，佐藤隆一郎[1]（[1]東大農，[2]京大国際）

**4G006　運動の動機形成における脳内報酬系の役割**
◦高谷亮典[1]，横山小夜香[1]，伏木　亨[2]，井上和生[1]（[1]京大農，[2]龍大農）

**4G007　視床での油脂摂取に伴う感覚情報の伝達/中継に関する解析**
◦森山智代[1]，後藤瑞貴[1]，伏木　亨[2]，井上和生[1]（[1]京大農，[2]龍大農）

**4G008　不活動症候群モデルラットにおける脂質代謝異常の統合オミクス解析**
◦半澤史聡[1]，松本知大[2]，ローラントマ[2]，梅木美樹[3]，望月　聡[3]，池田彩子[1]，小田裕昭[2]（[1]名古屋学芸大学・院・栄養科学，[2]名古屋大学・院・生命農学，[3]大分大学・教育福祉）

**4G009　大腸癌細胞にアノイキスを誘導する酸化コレステロールの比較検討**
齋藤瞭子[1]，守冨早織[1]，上原至雅[2]，◦田中亜路[1]（[1]安田女子大家政栄養，[2]岩手医科大薬）

**4G010　$\beta$-カロテンはレチノイン酸受容体 $\gamma$を介して骨格筋のタンパク質合成を促進する**
◦北風智也，原田直樹，山地亮一（大阪府大院生命環境）

**4G011　マウスでの日本食モデル飼料の摂取による持久運動能力の増大**
◦山口悟史，　彭　　蘭，　マニオマーククリスチャン，　松村成暢，井上和生（京大農）

**4G012　暗期の光曝露ストレスが血栓関連因子に及ぼす影響**
◦保田倫子[1]，　渡辺悠人[1]，　鈴木敬明[1,2]，　榊原啓之[3]，　下位香代子[1]（[1]静岡県大食，[2]静岡県工技研，[3]宮崎大農）

**4G013　シークヮーサー抽出液の血中尿酸値低下作用の検討**
◦多田一風太[1]，　要　　匡[2]，　柳久美子[2]，　山本憲国[3]，　池松真也[1]（[1]沖縄高専，[2]成育医療センター，[3]オキハム）

**4G014　日本料理がヒトの気分状態に及ぼす影響**
◦山崎英恵[1]，高橋拓児[2]，伏木　亨[1]（[1]龍谷大学農学部食品栄養学科，[2]龍谷大学農学部食の嗜好研究センター）

**4G015　運動性疲労が味覚嗜好性に及ぼす影響の検討**
◦冷水里穂子，林由佳子（京大農）

**4G016　14-3-3 から解離した DAPK2 はチューブリンとの結合を介してアポトーシスを誘導する**
◦湯浅恵造[1]，　一色衣香[1]，　太田玲奈[1]，　松田真弥[1]，　井上雅広[2]，辻　明彦[1]（[1]徳島大院・STS，[2]久留米大・医）

**4G017　PKGII は Raf1 の Ser43 のリン酸化を介して MAPK 経路を負に制御する**
◦小松弘明[1]，亀村典生[2]，辻　明彦[1]，湯浅恵造[1]（[1]徳島大・STS，[2]徳島大）

**4G018　HSP90 plays a critical role in lipid metabolism by stabilizing the SREBP-SCAP complex**
◦YEN-CHOU KUAN[1]，　Tsutomu HASHIDUME[1]，Takahiro SHIBATA[2]，　Koji UCHIDA[2]，　Makoto SHIMIZU[1]，Jun INOUE[1]，Ryuichiro SATO[1]（[1]The University of Tokyo，[2]Nagoya University）

**4G019　免疫老化における B 細胞機能変化および網羅的遺伝子解析に関する研究**
◦藤木　司[1]，片倉喜範[2]，岸原健二[1]（[1]長崎国際大院薬，[2]九大院農院）

**4G020　ミクログリアにおける GAPDH の非典型的放出機構と自然免疫応答調節**
◦竹之内敬人[1]，月本光俊[2]，佐藤　充[1]，木谷　裕[1]（[1]農生資研・動物生体防御，[2]東理大・薬）

**4G021　コラーゲン分解物の炎症誘導作用の解析**
◦村上庸人[1]，　藤野峻行[2]，　倉知遼太郎[1]，　篠原慶浩[1]，　早瀬文孝[2]，渡辺寛人[1]（[1]明治大農・生命科，[2]明治大農・農芸化）

**4G023　遺伝学的相補解析によるヒストンバリアント H2A.Z の機能ドメインと進化的保存性の解析**
◦高橋大輔，日下部将之，奥　裕之，原田昌彦（東北大農）

**4G024　がん細胞におけるクロモドメインタンパク質 CBX2 のアポトーシス制御機構の解析**
◦横山　翔[1,2]，　伊藤昭博[1]，　波多野稔子[1]，　浜本牧子[2]，　吉田　稔[1]（[1]理研，[2]明治大院）

**4G025　カイコガのフェロモン生合成活性化神経ペプチド(PBAN)とその受容体(PBANR)の結合解析および PBANR の結晶化用リガンド探索**
◦片山幸江[1]，　片山秀和[2]，　山口和也[1]，　河合岳志[1]，　夏目　亮[3]，千田俊哉[4]，　永峰俊弘[5]，　HULL J.Joe[6]，　松本正吾[5]，　長澤寛道[7]，永田宏次[1]，田之倉優[1]（[1]東大院農生科，[2]東海大工，[3]東京電機大工，[4]高エネ研，[5]理研，[6]米農務省農研局，[7]浙江大生科院）

**4G026　ヒスチジンリッチタンパク質/ペプチドの細胞膜透過機能に関する研究**
◦井上千穂，河野　強，岩崎　崇（鳥取大農）

**4G027　蛍光タンパク質を用いた抗体を得にくいタンパク質の機能解析法**
◦高田勇輝，松本諒哉，高木美香，高野勇太，田中眞人（東京電機大学）

**4G028　C2C12 筋管細胞における収縮依存性カルシウムシグナリングによる CCL5 分泌制御**
◦佐藤　整，石内友里，石井貴之，佐藤和典，根建　拓（東洋大生命）

**4G029　Characterization of Environmental RNA Interference in the Cotton Bollworm**
◦Keita MIYATA，Yasuhiko ITO（Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University）

**4G030　ヒト因子由来完全再構成型無細胞翻訳系の樹立**
◦重田友明，町田幸大，今高寛晃（兵庫県大院工）

**4G031　放線菌由来マシキノシン遺伝子の大腸菌での発現**
◦藤末優香[1]，浴野圭輔[2]，尾山　廣[1]（[1]摂南大，[2]熊本工大）

**4G032　摘出骨格筋をもちいた張力および糖取り込み測定系の構築**
◦真鍋康子，稲垣晶子，田村晃太郎，古市泰郎，藤井宣晴（首都大 人間健康）

**4G033　フザレノン X の摂食抑制メカニズムに関する研究**
◦富永美沙，　只石　幹，　市川沙織，　坂下文子，　百中佑果，横瀬ちひろ，服部一夫（東京農大応生科・栄養）

**4G034　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* におけるアラトスタチン B およびその受容体の同定**

◦塚本悠介，永田晋治 （東大院・新領域・先端生命科学）

**4G035　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における神経ペプチド CCHamide およびその受容体の同定**

◦土本真帆，永田晋治 （東大院・新領域・先端生命科学）

**4G036　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における AKH シグナリングによる摂食行動と脂肪酸組成の調節機構**

◦福村圭介[1]，小沼貴裕[2]，永田晋治[1] （[1]東大院・新領域・先端生命科学，[2]東大院・農生科・応生化）

**4G037　フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* とカイコ *Bombyx mori* における DHCR24 様タンパク質の生化学的解析**

◦藤盛春奈，永田晋治 （東大院・新領域・先端生命）

**4G038　ヒストン H1 はアレルギー増悪の新たな danger signal 分子として働く**

◦堀　采音[1]，藤村孝志[2]，手島愛子[1]，亀井力哉[2]，中野敏明[3,4]，後藤　茂[4]，後藤　武[5]，小埜和久[2,6]，河本正次[2] （[1]広大工，[2]広大先端，[3]台湾長庚大医，[4]台湾高雄長庚記念病院，[5]城西国際大看護，[6]広工大生命）

**4G039　抗ヒストン H1 抗体によるアレルギー炎症抑制効果の解析**

◦手島愛子[1]，藤村孝志[2]，堀　采音[1]，亀井力哉[2]，中野敏明[3,4]，後藤　茂[4]，後藤　武[5]，小埜和久[6]，河本正次[2] （[1]広大工，[2]広大先端，[3]台湾長庚大医，[4]台湾高雄長庚記念病院，[5]城西国際大看護，[6]広工大生命）

## H：植物

**4H001　ドラフトゲノムを用いたハナビシソウアルカロイド生合成に関わる 新規 P450 の探索**

◦堀健太郎，山田泰之，佐藤文彦 （京大院・生命）

**4H002　Isolation and functional characterization of carotenoid cyclase genes from sweetpotato plants**

◦Khan MUHMMAD ZUBAIR，Miho TAKEMURA，Jun-ichiro HATTAN，Motoyasu OTANI，Norihiko MISAWA （Ishikawa Pref. Univ.）

**4H003　シロイヌナズナのフラビン代謝制御に関与する新規因子の同定と機能解析**

◦戸田結奈[1]，西元里美[2]，小川貴央[2]，田茂井政宏[1,2]，吉村和也[3]，重岡　成[1,2] （[1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]中部大・応生・食栄）

**4H004　イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる CjWRKY1 の翻訳後制御機構の解析**

◦山田泰之，佐藤文彦 （京大院生命科学）

**4H005　果肉褐変の抑えられたモモ新品種の解析**

横谷尚起[1]，裏地美杉[1]，日原誠介[2]，畑中唯史[1]，◦小田賢司[1] （[1]岡山農総セ生科研，[2]岡山農総セ農研）

**4H006　トチュウ(*Eucommia ulmoides*)果実に蓄積する長鎖 *trans*-ポリイソプレンの局在解析**

◦梶浦裕之，鈴木伸昭，中澤慶久 （日立造船株式会社）

**4H007　除虫菊のピレスリン生合成に対する傷害誘導性揮発性化合物の作用：分化状態と脱分 化状態の比較**

◦阪森宏治，松田一彦 （近畿大院・農・応生化）

**4H008　ソルガムにおける Sorgomol synthase 遺伝子の同定および機能解析**

◦石輪俊典[1]，上野琴巳[1,2]，鈴木秀幸[3]，水谷正治[1]，杉本幸裕[1] （[1]神戸大院農，[2]鳥取大農，[3]かずさ DNA 研究所）

**4H009　エチレン様活性化合物の作用機構の解析**

◦北畑信隆[1]，渡辺健志郎[1]，鈴木優志[2]，浅見忠男[2]，朽津和幸[1] （[1]東京理科大，[2]東大院）

**4H010　ストリゴラクトン生合成経路の多様性の解析**

◦井関萌絵，水谷正治，滝川浩郷，杉本幸裕 （神戸大院・農）

**4H011　Identification of duckweed growth-promoting factor produced by bacteria**

◦Desi UTAMI[1]，Kyoko MIWA[1,2]，Hideyuki TAMAKI[2,3]，Masaaki MORIKAWA[1,2] （[1]Hokkaido University，[2]JST-ALCA，[3]AIST）

**4H012　イネにおいて過酸化水素プライミングは環境ストレスの抵抗性を付加する**

◦流石有希子[1]，三ツ井敏明[1,2] （[1]新大農，[2]新大院）

**4H013　塩ストレス応答時の植物根蛍光滲出物の解析**

◦菊地俊介，須山隆大，城所美紀，安保　充 （明大農）

**4H014　低温順化のバイオマーカーを利用した水稲苗の低温耐性強化方法の開発**

◦提箸祥幸，佐藤　裕 （農研機構・北農研）

**4H015　Exploring the biosynthetic pathway of phytocassane in rice by using feeding approach with 13C-labeled diterpene substrate.**

◦Zhongfeng YE[1]，Kazuya NAKAGAWA[2]，Hiroshi KAWAIDE[2]，Hideaki NOJIRI[1]，Kazunori OKADA[1] （[1]The Univ. of Tokyo，[2]Tokyo Univ. Agric. Technol.）

**4H016　異なる濃度の過酸化水素によって誘導される一過的酸化ストレスによるリーフレタスの $H_2O_2$ 濃度，CAT，APX 活性の経時変化**

◦森　直哉，渡邊博之 （玉川大院農）

**4H017　LED 光源藻類培養装置の開発及びラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の生育および光合成特性に及ぼす照射光波長の影響**

◦三根彩佳[1]，木口洋輔[1]，江口雄己[1]，原田京一[1]，田茂井政宏[2]，重岡　成[2]，雉鼻一郎[1] （[1](株)日本医化器械製作所，[2]近畿大・農・バイオ）

**4H018　ストレス応答に関与する低分子リン酸化合物の分析法の開発**

◦江口朋宏[1]，長谷部誉人[1]，戸澤　譲[2]，安保　充[1] （[1]明治大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻，[2]埼玉大学大学院 理工学研究科 戦略的研究部門）

**4H019　EF-Tu によって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索**

◦古川岳人[1]，武岡啓伍[2]，浅見忠男[3]，蔡　晃植[1,2] （[1]長浜バイオ大バイオ，[2]長浜バイオ大院バイオ，[3]東大院農生科）

**4H020　窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp. を共生させる蘚類 *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索**

◦西塚紘明[1]，Thomas DeLuca[2]，橋床泰之[1] （[1]北大院農，[2]Silver Museum, Sweden）

**4H021　キトサンオリゴ糖によるイネ根におけるアーバスキュラー菌根誘導性遺伝子の発現誘導**

◦秋山康紀，辰己雄亮 （阪府大院・生命環境）

**4H022　バイオ肥料微生物 *Bacillus pumilus* TUAT1 株芽胞接種がイネ幼苗期に与える生理的・遺伝学的影響**

◦伊藤(山谷)紘子[1]，大川泰一郎[2]，細野真弘[2]，外舘千尋[2]，寺内良平[3]，阿部　陽[3]，高木宏樹[3]，大津直子[2]，横山　正[2] （[1]日大生物資源，[2]農工大農学研究科，[3]岩手生工研）

**4H023　バッカクキン科真菌に幅広く保存されている輸送体候補遺伝子の解析**

◦稲葉尚子[1]，シュタイナーユーリケ[2]，ライストナーエックハルト[3]，杉山暁史[1]，矢崎一史[1] （[1]京大生存圏研究所，[2]INRES-Phytomedizin，[3]Institut fur Pharmazeutische Biologie）

**4H024　イネの病害抵抗性に関与する *OsPR7* と *OsPR8* の OsNTF1 転写調節因子による発現制御機構の解析**

◦奥山愛梨[1]，平井洋行[1]，宇野雄太[1]，堀家史哉[1]，國枝拓哉[2]，久保健一[3]，仲下英雄[4]，蔡　晃植[1] （[1]長浜バイオ大院，[2]長浜バイオ大，[3]奈良先端科学技術大院，[4]福井県大・生物資）

**4H025　タバコ細胞におけるショ糖飢餓に依存した TGN 局在タンパク質の減少とゴルジ装置の機能変換**

◦小田大和人[1]，浅妻　悟[2]，仲宗根弘晃[1]，Moses O Abiodun[2]，豊岡公徳[3]，松岡　健[1,2,4,5] （[1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]理研 CSRS，[4]九大生還セ，[5]九大オルガネラセ）

**4H026　ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 における光酸化的ストレス耐性へのカルビン回路調節因子 CP12 の関与**

◦田茂井政宏，松井伶真，重岡　成 （近畿大・農・バイオ）

**4H027　アメリカネムノキの就眠を制御する $K^+$チャネル SPORK2 の機能解析**

◦及川貴也[1]，石丸泰寛[1]，宗正晋太郎[2]，村田芳行[2]，鷲山研人[1]，浜本　晋[3]，魚住信之[3]，吉川信幸[4]，上田　実[1] （[1]東北大院理，[2]岡山大院環境生命，[3]東北大院工，[4]岩手大農）

**4H028　原始葉緑体が保持する細胞壁ペプチドグリカン結合型外膜チャネル**
◦児島征司[1,2]，村本光二[2]，草野友延[2]　([1]東北大・学際研，[2]東北大院・生命)

**4H029　農地の土壌環境と微生物叢の解析**
◦荒木希和子，アディカリディネッシュ，向　真樹，久保　幹　(立命大生命)

**4H030　シロイヌナズナにおけるクラスリン被覆タンパク質の積荷認識機構の解析**
高畑周平[1]，吉田昇平[2]，松波絵里香[2]，山内淳司[3,4]，地阪光生[1]，長屋　敦[1]，横田一成[1]，中川　強[2]，◦西村浩二[2]　([1]島根大・生物資源，[2]島根大・総科セ・遺伝子，[3]国立成育セ研・薬剤治療研，[4]東京医歯大院・医歯総研)

**4H031　*Populus trichocarpa* のオルト位水酸化酵素は caffeoyl CoA に対して触媒活性を示す**
◦稲葉暁佳里，清水文一　(東洋大生命)

**4H032　高温登熟乳白と酒米心白の生化学的比較解析による白濁化メカニズムの解明**
◦栗林なな子[1]，　佐々木麻衣子[1]，　鈴木浩武[1]，　流石有紀子[2]，金古堅太郎[2]，三ツ井敏明[1,2]　([1]新潟大院，[2]新潟大)

**4H033　アラビノガラクタンタンパク質前駆体に存在する GPI アンカー付加シグナルの意義**
◦杉田雄斗[1]，津野雄平[1]，松岡　健[1,2,3,4]　([1]九大院生資環，[2]九大院農，[3]九大生環セ，[4]九大オルガネラセ)

**4H034　シロイヌナズナ由来二量体型チロシル tRNA 合成酵素の機能解析**
◦豊田陽平[1]，　川島萌華[1]，　佐賀裕亮[1]，　和田美紀[2]，　伊藤耕一[3]，久城哲夫[1]　([1]明大農，[2]東大・医科研，[3]東大・新領域)

**4H035　オジギソウ由来ミモシナーゼ及びシスタチオニン *β*-リアーゼの酵素学的・分子進化的比較**
◦大貝茂希[1]，屋　宏典[2]，福田雅一[1]　([1]琉球大農，[2]琉球大熱生研)

**4H036　シロイヌナズナ由来カロテノイド異性化酵素の探索**
◦川名　誠[1]，　相馬史幸[1]，　小竹英一[2]，　都築和香子[2]，　長尾昭彦[2]，川上直人[1]，久城哲夫[1]　([1]明大農，[2]農研機構食総研)

**4H037　シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼの基質の探索と特異性の検証**
◦楠木賢太[1]，　星　雅子[1]，　石丸喜朗[1]，　阿部啓子[1,2]，　朝倉富子[1]　([1]東大院農生科・応生化，[2]神奈川科学技術アカデミー)

**4H038　モリンガ種子に含まれる多機能性タンパク質**
◦桝谷　滉[1]，尾山　廣[1]，杉村順夫[2]　([1]摂南大理工，[2]公益財団法人衣笠繊維研究所)

**4H039　Tobacco plants overexpressing UDP-Gal epimerase show Gal tolerance**
◦TAYEBEH ABEDI[1]，TOSHIHISA KOTAKE[2]，NOBOKAZU TANAKA[1]　([1]Hiroshima Univ.，[2]Saitama Univ.)

**4H040　CRISPR/Cas9 システムによる複合病害抵抗性遺伝子 *BSR1* のノックアウトイネ系統の作出**
◦神田恭和[1,2]，前田　哲[1]，鎌倉高志[2]，森　昌樹[1]　([1]農業生物資源研究所，[2]東理大院・理工)

**4H041　シロイヌナズナ HsfA2 を介した Hsf ファミリーの転写活性化機構の解析**
◦川端彬未[1]，　田部記章[2]，　藪田行哲[3]，　田茂井政宏[1,2]，　重岡　成[1,2]　([1]近畿大院・農・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]鳥取大・農・生資環)

**4H042　新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析**
◦鈴木愛芽[2]，川口雄正[2]，近藤真千子[1]，蔡　晃植[1,2]　([1]長浜バイオ大・バイオ，[2]長浜バイオ大院・バイオ)

**4H043　ヤマノイモ属のステロイドサポニン生合成に関わる CYP90B 遺伝子の機能解析**
◦宮地陽香[1]，　李ヒョンゼ[1]，　山村理恵[1]，　川崎　崇[1]，　中安　大[1]，遠城道雄[2]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]　([1]神戸大学院農，[2]鹿児島大農)

**4H044　アブラナ科植物の葯タペート組織で見られるヘテロクロマチン化の免疫組織化学的解析**
◦川又　奨[1]，木本剛彰[2]，岩野　恵[3]，高山誠司[2]，柴　博史[1]　([1]筑波大・院生命環境，[2]奈良先端大・バイオサイエンス研究科，[3]大阪大・工学研究科)

**4H045　RNA-seq 解析によるサツマイモ不定根原基形成機構の解明**
◦伊藤　茜[1]，田部記章[2,4]，田茂井政宏[1,2,4]，横田明穂[3,4]，重岡　成[1,2,4]　([1]近畿大・院・バイオ，[2]近畿大・農・バイオ，[3]奈良先端大・先端科技推進セ，[4]JST, CREST)

**4H046　形質転換ゼニゴケにおける外来遺伝子の発現に対する 5'-UTR の効果**
◦竹村美保，長屋進吾，木田　遥　(石川県大・資源研)

**4H047　遺伝子多重改変に対応したイネ用の新規ゲノム編集ベクターおよびインキュベーターを用いた簡便な高密度水耕栽培法**
◦黒田昌治[1]，山口知哉[1]，山川博幹[1]，池永幸子[2]　([1]農研機構・中央農研，[2]農研機構・東北農研)

**4H048　トマト新品種作出に有用な DNA マーカーの探索ならびにその活用**
平岡幸浩[1]，大畑宏史[1]，◦吉金　優[2]　([1]井上石灰工業(株)，[2]高知大土佐 FBC)

**4H049　公共データベースを利用した栽培品種シソのトランスクリプトーム解析**
◦谷垣悠介[1]，東　孝信[2]，福田弘和[1,3]　([1]大阪府大院・工，[2]大阪府大院・生命，[3]JST　さきがけ)

**4H050　イネ種子プロテインボディタイプ I 内部の特定部位へのワクチンモデル抗原の局在化に関する研究**
◦佐生　愛[1]，　大西真耶[1]，　齊藤雄飛[1]，　重光隆成[1]，　森田重人[1,2]，増村威宏[1,2]　([1]京都府立大学・生命環境，[2]京都府農技セ・生資セ)

## I：糖鎖生化学・糖鎖工学

**4I001　脂質ラフトの機能解明に向けた光反応性ガングリオシドプローブの開発**
◦河村奈緒子[1,2]，鈴木健一[2]，安藤弘宗[1,2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS)

**4I002　シアロ糖鎖の効率的合成に向けた 5-Ureido 型シアル酸供与体の開発**
◦棚瀬舞子[1]，　今村彰宏[1]，　安藤弘宗[1,2]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS)

**4I003　脂質ラフトの一分子イメージングに向けた GPI アンカープローブの合成研究**
◦小西美紅[1,2]，鈴木達哉[1,2]，パルリタ[1,2]，安藤弘宗[1,2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS)

**4I004　イトマキヒトデ由来ガングリオシド GP-3 の全合成**
◦後藤健太[1]，　澤　真希[1]，　玉井秀樹[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　今村彰宏[1]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS)

**4I005　*Ogataea minuta* 由来 endo-*β*-*N*-acetylhexosaminidase の変異酵素の解析**
◦喜多島敏彦[1]，賈　元苓[1]，高　暁冬[1]，千葉靖典[2]　([1]江南大学・生工学院，[2]産総研・創薬基盤)

**4I006　脂質ラフトの一分子観察に向けた脂質および糖鎖変換型蛍光 GM3 プローブの合成と機能評価**
◦山崎彩乃[1]，　河村奈緒子[1,2]，　鈴木健一[2]，　安藤弘宗[1,2]，　今村彰宏[1]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大，[2]京都大・iCeMS)

**4I007　糖供与体の反応性に及ぼす遠隔置換基効果の詳細検証**
◦堀　綾香[1]，　小西美紅[1,2]，　安藤弘宗[1,2]，　今村彰宏[1]，　石田秀治[1]，木曾　真[1,2]　([1]岐阜大学，[2]iCeMS)

**4I008　バイオレイヤー干渉法による糖鎖-タンパク質相互作用解析の検討**
◦小川淳矢[1]，　安藤弘宗[1,2]，　今村彰宏[1]，　石田秀治[1]，　木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS)

**4I009　DDS を指向したシアリルルイス X ミミック修飾リポソームの合成と機能評価**
◦大山龍太郎[1]，　植木章晴[1,2]，　Johan Unga[3]，　樋口ゆり子[3]，川上　茂[3]，　安藤弘宗[1,2]，　今村彰浩[1]，　石田秀治[1]，　山下富義[3]，橋田　充[2,3]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS，[3]京都大・薬)

**4I010　脂質ラフトの一分子観察に向けた蛍光ラクトシルセラミドの合成**
◦山口英利子[1]，　河村奈緒子[1,2]，　鈴木健一[2]，　安藤弘宗[1,2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1]，楠見明弘[2]，木曽　真[1,2]　([1]岐阜大・応用

生物，[2]京都大・iCeMS）

**4I011　マナマコ由来ガングリオシド SJG-2 の全合成研究**
◦真野寛之[1]，大山龍太郎[1]，坂本紘一[1]，安藤弘宗[1,2]，今村彰宏[1]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

**4I012　低分子型シアロ糖鎖クラスターの合成とウイルス架橋形成能評価**
◦尾形　慎[1]，小野田崇司[1]，朴　龍洙[2]，碓氷泰市[2]，鈴木哲朗[3]（[1]福島高専・物質工，[2]静岡大院・創科技，[3]浜松医大・医）

**4I013　ギランバレー症候群の発症機構解明に向けたリポオリゴ糖鎖の合成**
◦吉仲宏揮[1]，今村彰宏[1]，安藤弘宗[1,2]，石田秀治[1]，木曽　真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物，[2]京都大・iCeMS）

**4I014　多価性効果を利用した糖-タンパク質間相互作用を基盤とするオーガニックフレームワークの創成研究**
◦小宮　忍[1]，中川　篤[3]，蟹江　治[1,2,3]（[1]東海大学大学院工学研究科，[2]東海大学工学部生命多様性研究会，[3]東海大学糖鎖科学研究所）

**4I015　アノメリック水酸基の立体特異的 TMS 化反応**
◦河口優香[1,2]，蟹江　治[2,3]（[1]東海大学工学部，[2]東海大学工学部生命多様性研究会，[3]東海大学糖鎖科学研究所）

**4I016　*Asaia bogorensis* におけるセルロース合成関連タンパク質 CesD の機能解明**
◦永谷良騎[1]，水野正浩[1,2]，天野良彦[1]（[1]信大院理工，[2]信大 IFES）

**4I017　DOI 発酵液に含まれる 1-*epi*-DOI を原料とした 5a-カルバ-α-D-グルコースの合成**
◦伊藤祐介[1]，佐藤裕紀[2]，鯵坂勝美[2]，石黒正路[1,2]，宮崎達雄[2]（[1]新潟 BRP，[2]新潟薬大・応用生命）

**4I018　複合糖質合成マイクロバイオリアクターシステムの構築と応用**
◦大石岳史，羽田勝二，木村啓志，稲津敏行（東海大学）

**4J007　未利用資源であるオリーヴ枝の有効活用法の検討**
◦岩田佳奈[1]，内海淳彦[2]，岸本憲人[1]（[1]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所，[2]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴの森創生組合）

**4J008　ε-PL とアニオン性界面活性剤から成る抗菌性プラスチックの調製及び特性評価**
◦牛丸和乗，濱野吉十，片野　肇（福井県大）

**4J009　ポリフェノールの酸化架橋を利用した生体組織用ゼラチン接着剤**
◦山内朝夫，畠中芳郎（大阪市工研）

**4J010　連続生成系によるリポソームの調製および修飾**
◦牧野祥嗣，岩上千華，池田奈央，長森駿太朗，伊藤伸哉（富県大工）

**4J011　*Magnetospirillum magneticum* RSS-1 株における $Fe_3O_4$-$Sm_2O_3$コアシェルナノ粒子の形成**
◦下重裕一[1]，中島義賢[1]，柳澤圭一[1]，小林英城[2]，水木　徹[1]，島村　繁[2]，井上　明[1]，前川　透[1]（[1]東洋大，[2]海洋研究開発機構）

**4J012　バキュロウイルスを利用した *Neospora caninum* に対するワクチン作製**
◦朴　龍洙[1,2]，板垣滉平[1]，加藤竜也[1,2]，高坂哲也[1]（[1]静大農，[2]静大グリーン科学技術研究所）

**4J013　カイコを用いたインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンを提示させたウイルス様粒子の発現**
原田みづ帆[1]，◦加藤竜也[1,2]，朴　龍洙[1,2]（[1]静大農・応生化，[2]静大グリーン研）

**4J014　カタクチイワシ（*Engraulis japonicus*）における外来遺伝子発現系の構築**
◦坂口圭史[1]，長野直樹[1]，北野　載[1]，松山倫也[2]（[1]九大院農唐津水研セ，[2]九大院農）

## J：生物化学工学

**4J001　麹菌のハイドロフォービンを用いた重金属回収システムの構築**
◦中野宏軌[1]，中間　聖[1]，阿吹綾香[2]，加瀬明日香[2]，中島春紫[2]（[1]明治大院農・農化，[2]明治大農・農化）

**4J002　大腸菌コドン再定義株を用いた二種非天然型アミノ酸同時導入法の開発**
◦大竹和正[1]，春名健一[2]，坂本健作[1]（[1]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター，[2]味の素 イノベーション研究所）

**4J003　不凍タンパク質の構造を用いた，固体表面に結合する新規タンパク質の創出**
◦土井奨平，石田丈典，池田　丈，廣田隆一，黒田章夫（広大院先端物質）

**4J004　大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いたウサギモノクローナル抗体高速スクリーニング法の開発**
◦加藤晃代[1,2]，永井里美[2]，兒島孝明[2]，中野秀雄[2]（[1](公財)科技財団，[2]名大院生命農）

**4J005　微生物環境応答システムの速度論的解析と応用開発**
◦日高將文[1]，後藤愛那[1]，清水泰希[1]，南澤　究[2]，今村博臣[3]，内田隆史[1]（[1]東北大農，[2]東北大生命科学，[3]京都大生命科学）

**4J006　オリーヴ果実の乳酸発酵メカニズムの解析**
◦岸本憲人[1]，内海淳彦[2]（[1]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所，[2]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴの森創生組合）

## K：新技術

**4K001　アンビエントイオン化を利用したユリ香のリアルタイム分析**
◦坂倉幹始[1]，塩田晃久[1]，渡辺　淳[2]（[1]エーエムアール株式会社，[2]株式会社島津製作所）

**4K002　植物における質量分析イメージング法の最適化**
◦一瀬智美[1]，早川英介[1]，中村純也[3]，中家修一[2]，山崎雄三[2]，藤村由紀[1]，割石博之[1]，三浦大典[1]（[1]九大・レドックスナビ，[2]島津製作所，[3]九大院・生資環）

**4K003　イオンモビリティー質量分析法を用いた糖鎖解析**
◦伊奈隆年[1,2]，淺野泰久[1,2]（[1]富山県大・生工研セ，[2]JST, ERATO）

**4K004　非対称 PCR により増幅した一本鎖 DNA の HPLC による分析と表面プラズモン共鳴分析を用いる相補鎖との応答解析**
◦奥村史朗[1]，長井晴香[2]，冨岡寛治[2]，岩倉宗弘[3]，東　信哉[3]，井上國世[4]（[1]福岡県工技セ，[2]久留米工業高等専門学校，[3]九州計測器，[4]京大名誉教授）

**4K005　発汗代謝と表在微生物叢の変動に基づくヒトの体内外環境評価法**
◦筒井聡志[1]，三澤拓真[1,2]，伊達康博[1,2]，菊地　淳[1,2,3]（[1]横市大院，[2]理研　CSRS，[3]名大院）

**4K006　二次元セルブロット法の開発**
◦北田洋平[1]，ビンティムハンマドユソップシティマイサラ[2]，向井有理[1]，寺崎武夫[1]（[1]明大理工，[2]明大院電気）

発表番号：2A001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ポリアミド４の各種環境での生分解

# Biodegradation of polyamide 4 on various conditions

○山野 尚子、川崎 典起、中山 敦好 (産総研)
○Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, Atsuyoshi Nakayama (AIST)

【目的】
ポリアミド４(PA4)はナイロンの１種である高性能プラスチックであり、バイオマス由来のγ-アミノ酪酸を原料として生産可能なバイオベースポリマー[1] であると同時に環境中および生体内で生分解されるという性質を持つ[2]。我々は PA4 の生分解性の制御について検討し、長鎖脂肪酸を末端に付加することにより生分解性を抑制する技術を報告してきた[3]。本報告では、ステアロイル基を末端に付加し生分解性を抑制した PA4(C18PA4)を種々の条件下で分解した結果を報告する。
【方法】
PA4 は 2-ピロリドンを原料として開環重合により合成した。C18PA4 は開始剤に酸塩化物を用いることにより導入した。フィルムは溶媒キャスト法により、不織布は電界紡糸により作成した。ポリマーの生分解は JIS K6950 に記載されている無機培地に各種ポリマーを添加し、微生物源としては標準活性汚泥(化学物質評価研究機構)または　PA4 分解菌を使用し、BOD 測定装置（タイテック, BOD tester 200F）を用いて JIS K6950 に準拠した方法にて生分解に伴う酸素消費量を測定することにより生分解試験を行った。土壌分解はポットに入れた土壌中にポリマー試料を埋め一定時間毎に形状変化を観察した。海水分解試験は BOD 測定装置を用い海水による生分解を測定した。ポリマーの疎水性は接触角を測定することにより評価した。
【結果】
PA4 にステアロイル基を付加することにより生分解が抑制されることは活性汚泥による分解試験結果で既に報告している。 PA4 と C18PA4 の不織布を土壌に埋設しその分解を比較した結果、4 週間で PA4 はほぼ分解されたのに対して C18PA4 は形状を保っていた。海水による分解でも同じく PA4 は分解されたが C18PA4 は分解されなかった。接触角の値からステアロイル基を付加することによりポリマーの疎水性が変化することが生分解の抑制に繋がっていることが示唆されているため、界面活性剤共存下で生分解試験を行い、その影響を調べた。

1) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,21,528(2013)
2) Yamano *et al*, J.Polym.Environ.,16,141(2008)
3) Yamano *et al,* Polym.Degrad.Stab.,108,116(2014)

Polyamide, biodegradable polymer, bio-based

発表責任者：山野尚子（yamano.naoko@aist.go.jp）

発表番号：2A002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 脂肪族ポリエステル類の海水中での生分解

# Biodegradation of aliphatic polyesters in sea water

○中山 敦好、山野 尚子、川崎 典起、上垣 浩一 (産総研)
○Atsuyoshi Nakayama, Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, Kouichi Uegaki (AIST)

【目的】微生物産生型や化学合成型の脂肪族ポリエステルは土壌中や活性汚泥、コンポスト中で好気的に生分解されることが知られているが、海水中での生分解についての研究報告は少なく、また検討すべき因子も多い。例えば、都市部に近い海域や大きな河川の河口域というような地勢的な要因、潮の満ち引き、季節、塩濃度、水温などの因子が挙げられる。そこで本研究では、既存の生分解性樹脂を中心に実環境とラボにて海水中での生分解試験を行い、その分解挙動について調べた。

【方法】対象とした樹脂は PBS、PBSA, PBAT などの化学合成系ポリエステル、P3HB などの微生物産生型ポリエステル、その他の生分解性樹脂を粉末やキャストフィルム、電界紡糸による不織布として用いた。ラボ試験ではタイテック社製 BOD 測定装置を使い、表層から採取した海水を採取当日にただちに用いた。樹脂試料を添加し、一定温度下、撹拌を続け、生分解によって消費される酸素量をモニターして評価した。実環境試験は、2x3cm、厚さ 100μm 前後のフィルムもしくは厚さ 500μm 前後の不織布を 190x65x58mm の大きさで 8mm 径の孔を等間隔に全面に有する樹脂製コンテナ（3 室）に n=2 でセットし、海面下 1-1.5m 程度に浸漬し、一定期間ごとに試料を回収し、残存重量、分子量等を測定した。

【結果】ラボ試験は主として 27℃で 4 週間行った。P3HB は良好な生分解を示すのに対し、合成系樹脂では明確な生分解は示さなかった。P3HB の生分解性を大阪湾内の複数の場所から採取した海水にて比較したところ、大阪南港や大阪北港では分解は速かったが、六甲ｱｲﾗﾝﾄﾞや須磨港では分解が遅くなる傾向にあり、また、海水そのものの TOC と海水の生分解活性との間に一定の相関が認められた。一方で、大和川河口域（南港）にて干潮時から満潮時まで経時的に採取した海水の生分解性活性の変化も調べたが明確な傾向は認められなかった。採取時水温 29℃の海水を 27℃と 20℃とでラボ分解試験を行ったところ、低温では生分解速度は大きく低下した。次に、実環境試験として、海水浸漬試験を行った。微生物産生型の樹脂では 2 週間でも分解はかなり速く、重量減少率 50%を超えるものもあった。ラボ試験でも 2 週間で 50%近く分解したが、ラボ試験では 27℃で試験しているのに対し、海水温は 18℃前後であり、同一温度で比べると実環境の方が生分解速度が速いと予想される。ラボ試験では明確な生分解を示さなかった合成系樹脂も実環境では重量減少が確認された。ラボ試験と実環境試験との間の生分解速度の差は生物多様性が関係していると考えられる。

biodegradation, sea water, PHB

発表責任者：中山敦好（a.nakayama@aist.go.jp）

発表番号：2A003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 魚類の共代謝動態に基づく生態系評価法の構築

# Evaluation of aquatic ecosystems based on co-metabolic dynamics in diverse fish species

○朝倉 大河[1,2]、坂田 研二[2]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3] ([1]横市院・生医、[2]理研 CSRS、[3]名大院・生命農)
○Taiga ASAKURA[1,2], Kenji Sakata[2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. BioAgriSci., Nagoya Univ.)

【背景と目的】水圏の生物網は海水の循環や鉛直方向の変化などの周囲の環境により強く影響される。沿岸環境では特に顕著で、陸上からの栄養塩や有機物の流入により底泥生態系が大きく変動する。こういった環境変動に伴う沿岸生態系の変遷や相互関係を評価し、将来的な変動予測と生態系破壊の防止に役立てることのできる技術開発は重要であり、生態学に基づいた生物間の関係性評価に関する研究は盛んに行われているが、化学物質や共生細菌の相関性として、生態系ネットワークを可視化した報告はほとんどない。そこで我々は天然水圏の淡水（水田・河川）[1]、河口底泥[2]、海藻[3,4]および河口魚類[5,6]を用いて化学物質の相関性を可視化する解析技術を構築してきた。本研究では環境が極端に異なる 2 地域から採集した多様な生態を持つ天然魚類と底泥を用いて、化学物質の相関性に基づく生態系ネットワークの可視化を目的とした。
【方法】関東・東北それぞれの河口・沿岸域から生息環境や形態の多様な 24 種の魚類と底泥を採集した。採集した魚類の筋肉部位と腸内容物は解剖後凍結乾燥および粉末化処理を行い、$^{1}$H-および $^{13}$C-NMR により計測し、代謝物を同定した。同時に、ICP-OES による無機元素・ミネラルの解析、 次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA 遺伝子に基づく魚類腸内・底泥微生物群の計測を行った。得られた各種データは相関解析・主成分分析（PCA）等の多変量解析や機械学習により評価した。
【結果】魚類およびその生息環境底泥中の有機物・無機物・微生物群を総合的に解析した結果、魚類筋組織および腸内代謝プロファイルから運動性や食性、生息域の違いが判別可能であることがわかり、種や採集地域の特定が可能な代謝プロファイルに基づく予測モデルを構築した。また、筋肉組織および腸内細菌叢においてサイズによる相関関係を見出し、魚類の個体サイズと相関する物質群・微生物群を特定した。興味深いことに、24 種全体でサイズの増長に伴い特定の代謝物が相対的に増加し、腸内細菌叢の多様性指数が減少しており、これらの物質・多様度指数は魚種や生息域に依存しないことを明らかにした。さらに、異種計測統合データの相関係数に基づくネットワーク解析により、物質・微生物レベルでの関係性から生態系ネットワークにおけるサイズ依存性を可視化し、生息域や魚類の生態によって異なる相互関係を俯瞰的に特徴づけることに成功した。以上のように、化学物質の相関性から地域や生態、個体サイズ等の特徴を評価可能な生態系ネットワーク可視化法を構築した。
【参考文献】[1] Ogawa, et al., PLOS ONE (2014), [2] Asakura, et al., Anal. Chem. (2014), [3] Ito, et al., Anal. Chem. (2014), [4] Wei, et al., Anal. Chem. (2015), [5] Yoshida, et al., Sci. Rep. (2014), [6] Asakura, et al., PeerJ (2014)

NMR, coastal environment, ecological network

発表番号：2A004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 魚類代謝物および共生微生物複合系を特徴付けるデータサイエンス手法の構築
# Data science approach for metabolic analysis of fish and symbiotic complexity

○菊地 淳[1,2,3]、佐藤 有穂[2]、福地 実[2]、朝倉 大河[1,2]、坂田 研二[1]、魏 菲菲[1]、伊達 康博[1,2] ([1]理研環境資源、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○Jun KIKUCHI[1,2,3], Yuho SATO[2], Minoru FUKUCHI[2], Taiga ASAKURA[1,2], Kenji SAKATA[1], Feifei WEI[1], Yasuhiro DATE[1,2] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

日本は世界第４位の排他的経済水域体積を有するとされ、高低差の激しさや南北からの豊かな潮流の恩恵を受け、生物多様性のホットスポットとなっている。この多様性豊かな水産資源は世界無形文化遺産・和食の礎を支え、なおかつ世界でも健康嗜好より広く流通しつつある 1)。つまり生命・食・環境を旗印とする本学会において、魚介類や海藻類、さらにはこれらを育む海洋環境には重要課題が山積していると言えよう。

我々は着目する環境中から採取した各種生物および地理学的試料から、未精製試料を各種分析機器で得たビッグデータを統合解析し、時空間の特徴抽出を行う手法を構築してきた。現在までに、河口底泥 2)，水中プランクトン 3,4)、魚類と腸内細菌叢 5,6)、海藻類 7-9)や、さらに水産廃棄物の再資源化手法として作物成長促進の可能性 10)について、有機物群、無機物群および微生物群集の分析データを統合解析し地理的特性や“旬”としての季節特性を見出す手法を報告してきた。

ここでは、従来多用してきた線形的な相関関係あるいは分子および微生物ネットワークを記述する手法のみならず、supervised/unsupervised な機械学習手法、非線形解析手法等々、検討中の情報解析技術高度化について紹介する。また、これらの計算手法を活用した４桁数の魚類多検体解析について、１種に絞り深化したアプローチ 11)および、200 余の魚種多様性を鳥瞰するアプローチについて、本会にて紹介したい。

＜参考文献＞

1)菊地淳 (2014) ***バイオインダストリー***. 31, 77. 2)Asakura et al. (2014) ***Anal. Chem***. 86, 5425. 3)Ogawa et al. (2014) ***PLoS ONE*** 9, e110723. 4)Everroad et al. (2012) ***J. Vis. Exp***. e3163. 5)Yoshida et al. (2014) ***Sci. Rep***. 4, 7005. 6)Asakura et al. (2014) ***PeerJ***. 2, e556. 7)Date et al. (2014) ***Polymer J***. 44, 888. 8)Ito et al. (2014) ***Anal. Chem***. 86, 1098. 9)Wei et al. (2015) 87, 2819. 10)Ogura et al. (*provisionally accepted*) ***Metabolites***. 11) Wei et al. (in prep.)

Metabolome, Ionome, Microbiome

発表責任者：菊地　淳（jun.kikuchi@riken.jp）

発表番号：2A005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

Cooperative pyrene degradation by a microbial consortium obtained from mangrove sediments in Thailand

○ Felipe VEJARANO[1], Joydeep CHAKRABORTY[1], Masaki SHINTANI[2], Pagakrong WANAPAISAN[4], Chanokporn MUANGCHINDA[4], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kengo INOUE[3], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[4], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shizuoka Univ., [3]Univ. of Miyazaki, [4]Chulalongkorn Univ.)

**[Background]** Pyrene, a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) having four fused benzene rings, is a recalcitrant pollutant in soil, water and air that can be transformed into mutagenic and toxic metabolites and potentiate the mutagenic effects of other PAHs. Degradation of pyrene by *Mycobacterium vanbaaleni* PYR-1 starts with dioxygenation by a Rieske oxygenase (RO) and proceeds through the β-ketoadipate pathway to the TCA cycle. In a previous study, pyrene supplemented mineral medium was used to enrich a microbial consortium collected from mangrove sediments in central Thailand (Wongwongsee et al., 2013, Mar Pollut Bull, 74:95-104). In this study, we isolated each strain from the consortium and aimed to explore the individual contribution to the pyrene degradation pathway using whole genome sequencing.

**[Results and Discussion]** A total of five strains were isolated from the pyrene-degrading consortium: *Mycobacterium* sp. PO1 and PO2, *Novosphingobium* sp. PY1, *Ochrobactrum* sp. PW1 and *Bacillus* sp. FW1. Whole genome sequencing using the MiSeq platform followed by comparison with online databases showed that ROs necessary for the first dioxygenation step in the pathway were located only in *Mycobacterium* genomes, along with all the enzymes leading to the β-ketoadipate pathway. While no homologs for the upper degradation pathway gene of pyrene were found in *Ochrobactrum* sp. PW1 genome, KEGG analysis revealed an almost complete set of degradative genes of protocatechuate, one of the intermediate metabolites of pyrene degradation that proceeds to the β-ketoadipate pathway. In *Bacillus* sp. FW1 genome, no putative enzymes for pyrene degradation could be detected, instead genes encoding a putative biosurfactant were found. In *Novosphingobium* sp. PY1 genome, none of the identified RO homologs showed any similarity with known PAH dioxygenases and most of the sequences clustered within an uncharacterized group of ROs that might be involved in transformation of other PAHs. The results suggest that pyrene degradation in the consortium is started by the *Mycobacterium* strains while in latter steps strain PW1 (and PY1) contributes to the degradation. Also, the production of biosurfactants by *Bacillus* sp. FW1 may contribute to increase the bioavailability of the compound, increasing the degree of its biodegradation.

Biodegradation, Microbial consortium, Pyrene

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

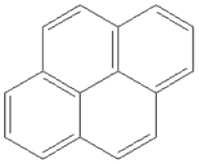
発表番号：2A006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ピレン分解菌の単離と比較ゲノム解析

# Isolation and comparative genome analysis of pyrene-degrading bacteria

○森田 知美[1,2]、ベハラノ フェリペ[1]、水口 千穂[1]、ワナパイサン パガクロン[3]、ムアンチンダ チャノクポーン[3]、岩田 健一[2]、岡田 憲典[1]、ピンヤコン オルタイ[3]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生セ、[2]芝工大シ生、[3]チュラーロンコーン大学)

○ Tomomi MORITA[1,2], Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Pagakrong WANAPAISAN[3], Chanokporn MUANGCHINDA[3], Kenichi IWATA[2], Kazunori OKADA[1], Onruthai PINYAKONG[3], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shibaura Institute of Technology, [3]Chulalongkorn Univ.)



【背景】多環芳香族炭化水素（PAHs）は化石燃料や廃棄物の燃焼過程で生成される環境汚染物質である。PAHs の一種であるピレンは 4 つの芳香環が結合した構造（右図）を持ち、それ自身が大気中、土壌、水から残留物質として検出されるほか、PAHs のバイオレメディエーションの手法を確立するためのモデル化合物としても使用されてきた。既知のピレン分解菌である *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 株ではピレン分解経路の詳細な解析が進んでおり、初発酸化酵素の terminal oxygenase をコードする遺伝子が *nidA* と *nidB*（それぞれα，βサブユニットをコード）であることが明らかとなっている。本研究ではピレン分解遺伝子群の多様性を調べるため、関東近郊から採取した土壌に含まれるピレン分解菌を単離しゲノム解析を行った。

【方法と結果】東京都内、千葉県内の計 5 箇所から土壌を採取し、ピレンを唯一の炭素源とする培地で集積培養を行った後、終濃度 1 g/L のピレン重層培地で分解菌の単離を行った。希釈段階を振って培養液を塗布した際に、LB 培地とピレンを唯一の炭素源とする培地に生育するコロニー数がほぼ一致するまで単離操作を繰り返した結果、ピレン分解菌 9 株（TS3, CS21, CS22, ES3, KM31, KM32, KM34, OA32, OA36）の単離に成功した。これら 9 株について MiSeq を用いた全ゲノムシーケンス解析を実施し、*de novo* アッセンブルを行ったところ、最も少ない株で 49（ES3 株)、多い株で 197 (OA36 株）の contig が得られた。TS3, CS21, CS22 株の 16S rRNA 遺伝子は *Mycobacterium gilvum* Spyr1 株のものに 99%一致し、これら 3 株間では 16S rRNA 遺伝子も NidA のアミノ酸配列も完全に一致した。同様に、OA32, OA36 株の 16S rRNA 遺伝子は *M. gilvum* Spyr1 株のものに 100%一致し、両株の NidA は 1 残基を除いて完全に一致していた。また KM31, KM32, KM34 株の 16S rRNA 遺伝子は *M. vanbaalenii* PYR-1 株のものに 100%一致しており、NidA のアミノ酸配列は PYR-1 株と 98%が一致（三者間では 100%一致）した。一方、ES3 株の 16S rRNA 遺伝子は *M. vanbaalenii* PYR-1 株のものと 99%一致しており、NidA のアミノ酸配列は PYR-1 株のものと 97%が一致した。なお *M. gilvum* Spyr1 株は染色体の他に 2 つのプラスミドを保持するが、*M. vanbaalenii* PYR-1 株はプラスミドを保持していない。このため、今回単離した分解菌がプラスミドを保持しているか、またプラスミドを保持する場合にはピレン分解遺伝子群が染色体とプラスミドのどちらに存在するかを明らかにするため、パルスフィールドゲル電気泳動によりプラスミドの有無を調べている。

biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbon, pyrene

発表責任者：野尻　秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2A007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# カルバゾール資化性新規海洋性細菌の探索と分解系遺伝子の取得
# Isolation and characterization of carbazole degradation marine bacteria

○森屋 純、岡崎 洋介、岩田 健一 (芝工大院シ)
○Jun MORIYA, Yousuke OKAZAKI, Kenichi IWATA (Shibaura Insititue of Technology)

【目的】海洋でのバイオレメディエーション(オーグメンテーション)に際して，環境浄化の発展，高塩濃度環境での微生物の応用の知見の蓄積のため，CAR 分解細菌の多様性を明らかにすることを目的とし,当研究室で所有する *Erythrobacter* 属 OC33S 株について諸性質の解析と,数種類の carbazole 分解能を有する新規海洋性細菌の単離・属種推定を行なった。
【方法】異なる塩濃度の 1.05～9.56%の液体培地を用意し，塩濃度耐性試験を行った.また､Carbazole 以外の異なる基質での生育基質特異性の確認をした. 基質は Carbazole, Naphthalene, Dibenzofuran, Pyrene, Phenanthrene, Anthracene の 6 種類を使用した.ガスクロマトグラフィー･質量分析法(GC-MS)による中間代謝物の確認を行った.既に代謝経路が明らかにされている Pseudomonas resinovorans CA10 株から代謝経路でアントラニル酸が生成しているかどうかの確認を行った.CAR 分解遺伝子に関わる遺伝子を所有するかを確認するため,数種類の primer(CS,AJ,pPAH,Rieske,IC177primer)[1]を用いて DNA 内に増幅が見られるかを PCR 行い,シーケンス解析をした.CAR 分解に関する遺伝子の取得を行うため,Shotgun cloning 法による CAR 分解に関わる遺伝子の取得を試みた[2]. Shotgun cloning 法を用いて transformation を行ったコロニーに 2,3-DHBP を散布し,car 遺伝子を持つコロニーの選別を行った.日本各地から海水を採取し,菌体を採取・単離を行い,属種推定をした.
【結果】塩濃度測定では,2 週間液体培養を行った結果,塩濃度 1.05～4.56%の培地での生育が見られた.それ以上の塩濃度での生育は見られなかった.生育基質特異性では,色変化・基質量から CAR, Naphthalene の分解能があると示唆された.OC33S について GC-MS による中間代謝物の確認した結果アントラニル酸の生成が見られた.そのため,CA10 株と同様の代謝経路であると考えられる.数種類の primer を用いて PCR をし,電気泳動した結果 AJ primer を用いた PCR のみ増幅が確認されたため,初発酸化に関する遺伝子配列である可能性が示唆された.Car 遺伝子の取得では,2,3-DHBP 散布後コロニーが黄色に呈していることから,メタ開裂が行われており,Car gene の取得ができたと考えられる.
12 個の菌を単離した.16S rDNA 解析を行った結果,*brevundiomonas, kokuria, Labrenzia, thalassospia* に属する菌体と 99%の相同性を示した.現在,その他の単離菌株について解析を行っている.

【参考文献】 [1]Maeda et al., 2009 (FEMS Microbiol Lett)
[2]Oba et al., 2014(Biosci Biotechnol Biochem)

bioaugmentation, Carbazole, *Erythrobacter*

発表番号：2A008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 多環芳香族化合物資化性新規海洋性細菌の探索

# Screening of new marine bacteria which was assimilated of polycyclic aromatic compounds

菅谷 優斗、○岩田 健一（芝工大シ生）
Yuto SUGAYA, ○Kenichi IWATA (Shibaura Institute of Technology)

【目的】石油は自然界では分解しきれず，土壌や海洋に蓄積し，生態系や環境に多大な被害をもたらす．石油中には多環芳香族化合物（PAHs）が含まれており，催奇形性，発癌性，変異原性などが確認されている．環境汚染物質が海洋に流出した際には拡散防止・除去が最も重要であり，これらを取り除く手法としては物理学的手法，化学的手法が用いられているが，高コスト，環境負荷の過多，効果範囲が狭いなどデメリットが多く，完全に環境汚染物質を除去することは不可能である．そのため，現在注目されているのが微生物を用いて環境汚染物質を分解除去するバイオレメディエーションである．バイオレメディエーションは低コスト，環境負荷が小さい，効果範囲が広いと多くのメリットがあり，従来の手法と併用することでより効果的な環境浄化が期待できる．本研究では，日本各地の海洋より採取した海水から，石油中に含まれる PHAs の一種である Phenanthrene（PHE）と Anthracene（ANTC）を分解する菌を単離し，その菌や菌の持つ分解系遺伝子を解明することで海洋におけるバイオレメディエーションの発展のための知見の蓄積を目的とする．
【方法】日本各地（東京・吉原・沼津・佐渡・金沢）から海水をサンプリングし，500 倍に濾過濃縮した海水を菌源とし，集積培養を行った．培地は天然海水培地（SEA 培地）と人工海水培地（ONR7a 培地）を用い，基質は PHE と ANTC を用い，1 つのサンプルに対し計 4 通りで行った．集積培養を繰り返し行い，集積の進んだ菌源を集積培養で得られた培地と同じ組成に Marine Broth を加え作成した平板培地に塗布し，30℃でコロニーが観察されるまで培養を行った．コロニーが観察されたらそれぞれのコロニーごとに液体培地で培養し，生育後平板培地に塗布し平板培養を行い，この操作を繰り返すことで菌株を単離した．単離菌株の total DNA を抽出し，PCR による 16S rDNA の増幅，ダイレクトシーケンス法での塩基配列の決定し，属種決定を行った．
【結果】日本各地からスクリーニングを行った結果，PHE 資化性菌 11 株と ANTC 資化性菌 11 株の合計 22 株を単離した．単離菌株を 16S rDNA の遺伝子を PCR で増幅し系統解析にて属種推定した結果，*Bacillus* 属を 7 株，*Erythrobacter* 属を 2 株，*Dokdonella* 属 1 株，*Arthrobacter* 属を 1 株，*Paenibacillus* 属を 1 株，*Phaeobacter* 属を 1 株，*Viridibacillus* 属を 1 株，*Jannaschia* 属を 1 株，*Pseudomonas* 属を 1 株，*Cobetia* 属を 1 株と推定した．また，吉原海岸から取得された OC46S 株は *Silanimonas* 属と相同性 94％を示し，新属と示唆されたため，OC46S 株について分解経路などの詳細な菌学的諸性質についても発表する予定である．

Phenanthrene, Anthracene, Silanimonas

発表責任者：岩田健一（iwaken@sic.shibaura-it.ac.jp）

発表番号：2A009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 海洋性キシレン分解菌の分離と解析

# Isolation and characterization of marine bacteria capable of utilizing xylene

○寺垣内 将也、岩木 宏明、長谷川 喜衛（関西大化学生命工）
○Masaya TERAGAITO, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

我々は、環境浄化の観点から、海洋性 BTEX 分解菌の分離とその分解過程や分解系遺伝子の解析を行っており、過去の本大会において、海洋性トルエン分解菌の分離と分解系遺伝子の構造について報告した。本研究では、海洋性キシレン分解菌の分離と解析について報告する。

【方法と結果】

越前沖および小笠原諸島の海水より、集積培養法で、*o*-キシレン分解菌を 2 株、*m*-キシレン分解菌を 2 株、*p*-キシレン分解菌を 3 株分離した。分離したキシレン分解菌の同定を行うため、16S rRNA 遺伝子配列の解析を行った。その結果、3 株が *Alteromonas* 属に、1 株が *Aestuariibacter* 属に、2 株が *Marinobacter* 属に帰属された。1 株（KU68F 株）は *Maricurvus nonylphenolicus* に近縁であったが、配列一致度が 92.6%と低く、帰属できなかった。以後の研究では、KU68F 株について解析を行った。KU68F 株はオキシダーゼ、カタラーゼ陽性の非運動性グラム陰性多形性桿菌であった。16S rRNA 遺伝子配列の解析に加え、生理学的、化学分類学的解析を行った結果、KU68F 株は新属・新種の海洋性細菌であると判明した。次に、KU68F 株のキシレン分解系について詳細に解析するため、PCR で初発酸化酵素遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、KU68F 株は陸棲細菌由来のキシレンモノオキシゲナーゼ（*xylA*）遺伝子と相同性を有する遺伝子を保持していることが明らかとなった。キシレン分解系遺伝子の全体像を明らかにするため、インバース PCR 法を利用したゲノムウォーキング法により、*xylA* 遺伝子周辺約 8kbp の領域を取得した。得られた領域の塩基配列の解析を行った結果、*m*-キシレンから 3-メチル安息香酸までの変換に関与すると推定される 4 個の ORF と、膜輸送タンパク質をコードすると推定される 1 個の ORF の配列が明らかとなった。現在、得られた ORF の機能を解析するため、大腸菌発現系の構築を試みている。

xylene, marine bacteria, biodegradation

発表責任者：岩木宏明（iwaki@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2A010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# *Corynebacterium cyclohexanicum* MU 株のシクロヘキサンカルボン酸分解系遺伝子の解析

Analysis of cyclohexanecarboxylate-degrading genes from *Corynebacterium cyclohexanicum* strain MU

○佐藤 ゆう、岩木 宏明、長谷川 喜衛 (関西大化学生命工)
○Yu SATO, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】

*Corynebacterium cyclohexanicum* MU 株は、シクロヘキサンカルボン酸（CHCA）を 4-ヒドロキシ安息香酸（4-HBA）及びプロトカテク酸（PCA）を経由する芳香族化経路により分解する菌株である。これまでに我々は 4-HBA 以降の分解に関与する遺伝子について報告している[1,2]。本研究では、CHCA から 4-HBA への変換に関与する遺伝子の探索を試みた。

【方法と結果】

CHCA から 4-HBA への変換に関与する遺伝子配列を解析するため、Kaneda らの方法[3]に従い精製した芳香族化酵素の N-末端アミノ酸配列を決定した。それをもとに、プライマーを設計し、TakaRa LA PCR in vitro Cloning Kit で芳香族化酵素遺伝子領域の増幅を試み、約 1kb の領域を取得した。得られた断片の塩基配列を解析した結果、3-Ketosteroid-Δ1-dehydrogenase と相同性を示す ORF（*chcC*）の一部が存在した。そこで *chcC* 全領域を取得するためにインバース PCR を行い、周辺域約 6kb を取得した。得られた領域の塩基配列を解析した結果、*chcC* 全領域が明らかになり、さらに CHCA から 4-HBA への変換に関与すると推定される 8 個の ORF が存在した。*chcC* の機能を確認するために、pET システムを用いて *chcC* 発現大腸菌を構築した。構築した *chcC* 発現大腸菌から調製した無細胞抽出液は、4-ケト CHCA を 4-HBA へ変換したことから *chcC* は 4-ケト CHCA から 4-HBA への芳香族化反応に関与する遺伝子であることが明らかになった。

1)Iwaki *et al.*,Microbes Environ.20:144-155 (2005)
2)佐治ら 2004 年度日本農芸化学会大会講演要旨集 p.34, 2A09p16
3)Kaneda *et al.*,Eur.J.Biochem. 218:997-1003 (1993)

*Corynebacterium*, cyclohexanecarboxylate, aromatization

発表責任者：岩木宏明（iwaki@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2A011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

*Burkholderia* sp. KU-46 株の 2,4-ジニトロフェノール分解系遺伝子の解析
Analysis of 2,4-dinitrophenol degradation genes from *Burkholderia* sp. strain KU-46.
○小早 希、岩木 宏明、長谷川 喜衛 (関西大化学生命工)
○Nozomi KOHAYA, Hiroaki IWAKI, Yoshie HASEGAWA (Kansai Univ.)

【目的】
*Burkholderia* sp. KU-46 株は 4-ニトロフェノール（4-NP）を経由する新規経路で 2,4-ジニトロフェノール（2,4-DNP）を分解するグラム陰性菌である。我々は、2013 年度の本大会において、4-NP モノオキシゲナーゼをコードすると推定される遺伝子（*npdA1A2*)の配列を報告している。本研究では、NpdA1A2 の機能解析と 2,4-DNP から 4-NP への変換に関与する酵素遺伝子の探索を行った。
【方法・結果】
4-NP モノオキシゲナーゼであると推定される NpdA1A2 の機能を解析するため、大腸菌発現系を構築した。NpdA1A2 発現大腸菌菌体を用いて、4-NP の変換活性を確認した結果、4-NP の減少とそれに伴うヒドロキノンおよび亜硝酸の生成が確認された。このことから NpdA1A2 は 4-NP モノオキシゲナーゼ活性を有することが明らかとなった。また、NpdA1、NpdA2 をそれぞれ単独で発現した大腸菌菌体は、4-NP 変換活性を有さないことから、活性発現には両サブユニットが必要なことが明らかとなった。
次に、2,4-DNP から 4-NP の分解に関与する酵素遺伝子を特定するため、*npdA1A2* 周辺に存在する候補 *orf* の大腸菌発現系を構築した。それぞれの ORF 発現大腸菌を用いた休止菌体反応による 2,4-DNP 変換試験を行った結果、変換に関与すると考えられる 2 つの遺伝子を見いだした。現在、それら遺伝子の 2,4-DNP 分解への関与を確認するため KU-46 株における遺伝子発現解析と遺伝子欠損株の造成を試みている。

2,4-dinitrophenol, 4-nitrophenol, degradation

発表責任者：岩木宏明（iwaki@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2A012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 非放射性同位体を用いた野菜等におけるセシウムの挙動解析

# Analysis of behavior of cesium in vegetables by laboratory cold tests with nonradioactive cesium

○本條 秀子、中山 和美（東京電力福島復興本社）
○Hideko Kambe-Honjoh, Kazumi Nakayama (Tokyo Electric Power Company)

【緒言】
野菜等農作物におけるセシウムの挙動を知る目的で、非放射性塩化セシウムを培地に添加した栽培による基礎試験を実施している。これまでに、小松菜等の葉物野菜の部位別のセシウム分布比較等に関する試験結果、およびキノコ子実体におけるセシウムの部位別濃度比較や塩類添加による移行抑制効果を報告した。今回は、結実野菜であるミニトマトおよび福島県特産物の一つであり若芽を食材とする野菜であるツルムラサキについての試験結果を加えて、野菜におけるセシウム挙動について考察する。キノコについては、カリウムによる移行抑制の実用化課題の解決に向けた試みを報告する。
【方法】
野菜については、水耕栽培の培養液またはプランター土壌に塩化セシウムを添加して生長させ、根・茎・葉・実などを採取し、試料を調製した。キノコについては、菌床等培養基に塩化セシウム溶液を浸み込ませ、その後に塩化カリウム溶液および被試験添加物を加え、定法に基づいて栽培し、発生した子実体を採取して試料を調製した。これら採取試料を乾燥し、硝酸分解により液化・希釈した後、ＩＣＰ-ＭＳ分析によりセシウムおよびカリウム濃度を測定、試料中濃度を算出した。
【結果と考察】
野菜水耕栽培に用いた培養液中成分と、採取した野菜試料中成分のＣｓ/Ｋ（濃度比）を比較したところ、いずれの野菜試料においても培養液＞根＞葉茎（＞実；ミニトマト）となったことから、植物はカリウムをセシウムよりも優位に用いる選択性を持つと考えられる。また、いずれも可食部分の方が非食部分よりもセシウム濃度が低かったことから、例えばトマト栽培中の選定枝など不要部分のセシウム濃度測定により、実など食用部分のセシウム濃度範囲を推定できる可能性が認められた。野菜の細かい部位別比較では、生長点を含む先端部分でのセシウム濃度が高い傾向があった。ツルムラサキの水耕栽培およびプランター栽培を行い、30 ㎝以上に伸長した若芽を採取し根元 15 ㎝を除き、生長先端の約 2 ㎝部分と残り部分の両者セシウム濃度を比較したところ、いずれも生長点を含む先端が２～３倍高く、Ｃｓ/Ｋも先端で高かった。詳細要因は不明であるが、シイタケ・ナメコでも生長が盛んと思われる傘辺縁部のセシウム濃度が高い結果を得ており、キノコにも共通する事象であることから普遍的な要因と推定され、今後の解析を検討中である。キノコについては、カリウムが、セシウム移行抑制と同時に、収量低減も引き起こす問題の解決に向けた試験について報告する。

nonradioactive cesium, uptake, vegetables

発表番号：2A013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# PCB/biphenyl 分解細菌株が有する新規 haloalkane dehalogenase 遺伝子の解析
# Novel haloalkane dehalogenase gene of PCB/biphenyl-degrading bacterium

○佐藤 あや華、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大学・院生命科）
○Ayaka SATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Touhoku Univ.)

【背景・目的】細菌由来の haloalkane dehalogenase（HLD）は、様々なハロアルカン類およびその関連物質に対する加水分解的脱ハロゲン活性を有し、一般に基質特異性が広いことから環境浄化や有用物質生産への応用が期待されている。HLD は、当初、ハロアルカン系環境汚染物質分解資化細菌のみが有する特殊性の高い酵素と考えられていたが、近年、ゲノム情報の蓄積により、比較的広範な細菌ゲノムにそのホモログ遺伝子が存在することが明らかになった。さらに、それらのうちいくつかのものについては、遺伝子産物の生化学的解析が行われ、実際に新規性の高い反応特性を有する HLD をコードすることが明らかになっている。しかし、これらゲノム情報から見出された HLD 遺伝子の生理的意義は未だ不明である。本研究では、*Betaproteobacteria* に属する PCB/biphenyl 分解細菌 *Acidovorax* sp. KKS102 株ゲノムに見出された新規性の高い HLD ホモログ遺伝子 *dahX* の機能解析を実施した。
【方法・結果および考察】KKS102 株の *dahX* は、HLD ホモログ (HLD domain) の N 末端側に tRNA の修飾に関与する deaminase (TadA) ホモログ (DAM domain) が繋がった融合タンパク質をコードする遺伝子である。同様の融合型遺伝子は KKS102 株と比較的類縁性の高い他の *Betaproteobacteria* 細菌株ゲノムにも見出され、少なくとも KKS102 株特異的な遺伝子ではない。また、これまでに PCB の分解への HLD の関与は知られておらず、その機能は不明である。まず、double crossover による相同組換えで *dahX* 遺伝子の破壊を行った。大腸菌において *tadA* は必須遺伝子であるが、KKS102 株では *dahX* の完全破壊株の取得が可能であった。ただし、破壊株は通常の栄養培地における生育が野生型株に比べて顕著に遅く、*dahX* は生育に重要な因子であると考えられた。さらに、本 *dahX* 破壊株への各種プラスミドを用いた相補実験から、HLD domain は通常の栄養培地での生育に関与せず、DAM domain が生育に重要である可能性が示唆された。一方、DahX 全長, DAM domain, HLD domain の C 末端に各々6xHis-tag を付与したタンパク質を大腸菌中で大量発現し、常法により精製を行った。各精製タンパク質について、遊離ハロゲンイオン濃度を比色定量することで HLD 活性を検討したところ、DAM domain は HLD 活性を示さなかったが、DahX 全長と HLD domain は、1,3-dibromopropane や 1-bromobutane などの臭化物に対して明確な HLD 活性を示した。現在、さらに様々な基質に対する HLD 活性を検討している。以上、KKS102 株が HLD 遺伝子を有すること、さらに、本 HLD 遺伝子は、HLD domain と生育に重要な DAM domain との融合タンパク質をコードするという新規性の高いものであることを明らかにした。

haloalkane dehalogenase, tRNA deaminase, fusion protein

発表責任者：永田裕二（aynaga@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：2A014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ハロアルカンデハロゲナーゼの細胞内酵素機能進化系の構築

# Construction of in vivo evolution system for enzymatic function of haloalkane dehalogenases

○小山 旺[1]、森内 良太[2]、大坪 嘉行[1]、永田 裕二[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大学・大学院生命科学研究科、[2]静岡大学・グリーン科学技術研究所)
○Akira KOYAMA[1], Ryota MORIUCHI[2], Yoshiyuki OHTSUBO[1], Yuji NAGATA[1], Masataka TSUDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【背景・目的】Haloalkane dehalogenase（HLD）は、近年のゲノム配列情報の蓄積により、比較的広範な細菌株が保持していることが明らかになると共に、様々なハロアルカン類およびその関連物質に対する加水分解的脱ハロゲン活性を有することから、環境浄化や有用物質生産への応用が期待されている。また、HLD は promiscuous な活性を有し、少ない変異で反応特性が大きく変化することが知られており、酵素の機能進化の実験材料としても優れている。有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) 分解資化細菌 *Sphigobium japonicum* UT26 株のγ-HCH 代謝に関与する LinB も HLD の一員であり、数アミノ酸残基の置換でβ-HCH 等に対する分解活性が劇的に変化する。一方、世界各地で多くのγ-HCH 分解細菌が単離されているが、解析された全ての株は *linB* 遺伝子を保持しており、γ-HCH 代謝における LinB 活性を代替できる他の HLD は存在しないのか、という点も興味深い。本研究では、酵素の機能進化に関する知見を得るために、HLD のγ-HCH 代謝における LinB 活性に着目し、本機能進化過程の追跡に適した *in vivo* 進化系を構築することを目的とした。、
【方法・結果および考察】UT26 株の *linB* 遺伝子を他の 4 種の HLD 遺伝子に置換した以下の 4 株を作製した：(1) UTBM1 株，β-HCH に対する強い分解活性を有する *Sphingobium* sp. MI1205 株由来の LinB_MI 遺伝子（LinB_UT と 7 アミノ酸残基の違い）、(2) UTBJ1 株，比較的嵩高い基質を好む根粒菌由来の DbjA 遺伝子、(3) UTLA1 株，LinB と配列上近縁のルシフェリンオキシゲナーゼとの共通の祖先と考えられている Hld_Rluc_anc 遺伝子、(4) UTMM1 株，既知の HLD の中で最も versatile な海洋メタゲノム由来の DmmA 遺伝子。これら 4 株について、γ-HCH 分解活性をガスクロ(ECD)で検討すると共に、γ-HCH を唯一の炭素源として添加した無機最小固体培地での生育を観察した。その結果、通常の菌体濃度では、UTBM1 株のみが野生型 UT26 株と同様の表現型を示し、他の 3 株では *linB* 欠失株 UTDB2 と同様に LinB 活性は検出されなかった。しかし、菌体濃度を通常の 5 倍程度にして検討した結果、UTLA1 株と UTMM1 株で、γ-HCH 分解において LinB 活性がないと検出されない 2,5-dichlorophenol が検出されると共に、γ-HCH 添加無機最小固体培地では、UT26 株や UTBM1 株よりも中間代謝産物の蓄積が少なく、むしろ良好な分解活性が観察された。以上、本研究において、LinB 以外にもγ-HCH 分解代謝に関与する潜在能力を有する HLD が存在することを示すと共に、条件によっては天然の株よりも優れた人工のγ-HCH 分解細菌株が創出できた。今後、UTLA1 株と UTMM1 株を出発点として、LinB 活性の機能進化の実験的追跡が可能であると考えている。

sphingomonads, haloalkane dehalogenase, in vivo evolution

発表責任者：永田裕二（aynaga@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：2A015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解能の向上と安定化

# Improvement on the degradation activity to environmental pollutants in *Sphingomonas bisphenolicum* AO1

○高 未麗[1]、松村 吉信[2]（[1]関大院 化生工、[2]関西大 化生工）
○Miryo KOH[1], Yoshinobu MATSUMURA[2] ([1]Grad. Kansai Univ., [2]Kansai Univ.)

【目的】ポリカーボネート（PC）樹脂やエポキシ樹脂などの原料として大量に生産されているビスフェノール A（BPA）は、内分泌撹乱物質として生態系に悪影響を及ぼすと強く示唆されている。また、一部の PC 樹脂から BPA が溶出する事例も報告され、カナダでは子供用の飲用ボトルへの PC 樹脂の使用が禁止されると共に工場からの BPA 排出規制も設けられている。当研究室では BPA を完全分解する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を単離し、BPA 分解の初発反応に関わるシトクロム P450 モノオキシゲナーゼシステムの構造遺伝子（*bisdAB*）が 4 種類のプラスミドの一つである pBAR1 にコードされていることを明らかにした。また、AO1 株は BPA 以外にビスフェノール類化合物やビスフェニル類、有機塩素系化合物なども分解できるため、広範な環境汚染物質分解菌として活用できると考えている。しかし、AO1 株から BPA 分解能を失った AO1L 株が単離され、AO1 株の分解能の不安定性が実用化への障害となっている。これまでの研究で、pBAR1 の遺伝子構造の不安定性がその一因であると確認された。本研究では、次世代シーケンサーを用いて AO1 株のゲノム構造を明らかにし、BPA を含む環境汚染物質分解関連遺伝子の特定と環境汚染物質分解能の向上並びにその安定化を目的とした。
【方法と結果】AO1 株のゲノム DNA を次世代シーケンサー（Roche 社製と Illumina 社製）で解析し、得た断片配列を Newblar（Roche 社）でアッセンブルした結果、総塩基数は 5,100,996 bp となり、98 個のコンティグに集約された。また、pBAR1 についてはこれまでのキャピラリー型電気泳動法での解析と次世代シーケンサーデータとの統合により総塩基数 80,317 bp と判明された。さらに、pBAR1 には 67 個の遺伝子が推定され、BPA 分解関連酵素遺伝子として、BPA の初発分解に関わる *bisd AB*、*adh*、*lsd*、*bisdF* が確認された。一方、有機塩素分解の初発反応に関わると示唆されている *had* も確認され、トランスポサーゼ遺伝子が 14 個、接合伝達に関わる遺伝子が 21 個も推定され、pBAR1 の遺伝子の約半数が DNA 断片の可動に関わるものであった。現在は、全自動アノテーションシステムである RAST server を使用し、全ゲノム遺伝子のアノテーションを進めている。次に、AO1 株の BPA 分解能の安定化を試みた。BPA 分解関連酵素遺伝子 *bisd AB*、*adh*、*lsd*、*bisdF* を保持するプラスミドを作製し AO1 株へ導入した結果、顕著な BPA 分解能の向上は確認できなかったが、AO1L 株へ導入した結果、BPA 分解能の回復は確認できた。今後は高発現プロモーターを用いた改良プラスミドを作製し、BPA 分解能の向上を試みる予定である。

bisphenol A, biodegradation, *Sphingomonas* sp.

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2A016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 低濃度水銀(II)イオン溶液における水銀減少機構の解明

# The mechanism of mercury loss from dilute mercuric solution.

○井村 祐己、渡辺 翔太、吉村 悦郎（東大院農生科）
○Yuki IMURA, Shota WATANABE, Etsuro YOSHIMURA (The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】

水銀(Hg)は様々な化学形態をとる。無機水銀としては、金属である $Hg^0$ の他、$Hg_2^{2+}$ や $Hg^{2+}$ などのイオンが知られている。また、メチル水銀などの、炭素-水銀結合を有する有機水銀化合物が存在している。これらは生物を介したプロセス、あるいは生物を介さない化学反応により、環境中で相互に変換されている。水銀の化学形態変化を理解することは、地球における水銀循環の理解をする上で重要となる。

薄い $Hg^{2+}$ の溶液は経時的に濃度が減少することが知られている。この現象は $Hg^{2+}$ が $Hg^0$ へ還元され、生じた $Hg^0$ が空気中へ放出されることが原因だと考えられる。本研究では $Hg^{2+}$ と過塩素酸のみを用いた実験系にて、この反応を理解しようと試みた。

【方法】

酸化水銀（II）を窒素バブリングした過塩素酸水溶液へ溶解し、25°Cの暗室に静置した。一定時間経過後、溶液の $Hg^0$, $Hg^{2+}$, 過酸化水素濃度をそれぞれ測定した。水銀の測定は冷蒸気原子吸光法で行った。バブリングすることで生成した $Hg^0$ を溶液から気化させ、原子吸光法により水銀濃度の測定を行った。続いて溶液に還元剤（$SnCl_2$）を加えることで、残存している $Hg^{2+}$ を $Hg^0$ へ還元し、同様に濃度測定を行った。過酸化水素の測定は p-ヒドロキシフェニル酢酸(POHPAA)の二量体化により行った。この方法ではペルオキシダーゼを用いて溶液中の過酸化水素を POHPAA と反応させ、蛍光性の POHPAA 二量体を生成することで測定を行う。

【結果と考察】

10 nM の水銀水溶液では、3 日のインキュベートで残存 $Hg^{2+}$ が初期添加量の 70%程度が消失した。この減少は高濃度の水銀溶液でも観察され、500 nM の溶液では 6%程度が消失した。一方、溶液中の $Hg^0$ はインキュベートにより初期値よりも増加した。減少した $Hg^{2+}$ と生成した $Hg^0$ の量は一致しなかったが、これは生成した $Hg^0$ の一部が気化して空気中へ放出されたことが原因だと考えられる。

また、500 nM の水銀溶液において、3 日のインキュベートで 17 nM の過酸化水素が発生した。これは低濃度の水銀溶液での過酸化水素発生量と比較して有意に高かった。本実験系は水と $Hg^{2+}$ および反応性の低い過塩素酸だけからなる。本研究の結果から、水が $Hg^{2+}$ を $Hg^0$ へ還元し、水は酸化されて過酸化水素が発生することが示唆された。

mercury reduction, cold vapor atomic absorption spectrometry, hydrogen peroxide production

発表責任者：井村祐己（aimuray@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2A017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 渡良瀬遊水地に生息する藻類の銅耐性解析

# Copper tolerance analysis of algae that live in Watarase basin

○清水 佑一[1]、川瀬 俊悟[2]、柏田 祥策[1,2,3]、長坂 征治[1,2,3] ([1]東洋大生命科学、[2]東洋大院生命科学、[3]東洋大学生命環境科学研究センター)
○Yuuichi Shimizu[1], Syungo Kawase[2], Shosaku Kashiwada[1,2,3], Seiji Nagasaka[1,2,3] ([1]Faculty of Life Sciences,Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences,Toyo Univ., [3]Research Center for Life and Environmental Sciences,Toyo Univ.)

【背景と目的】明治２０年代、足尾銅山から渡良瀬川に硫化銅等を含む廃棄物が流出し、下流域で水質汚染が引き起こされた。渡良瀬川の水が洪水によって氾濫し、周辺の田畑に鉱毒被害が生じたためその対策として作られたのが渡良瀬遊水地である。渡良瀬川の銅濃度は公害防止協定の締結や鉱山の閉山を受け 1960 年代から 70 年代にかけて大幅に減少し現在では低い濃度で保たれている。高濃度の重金属に曝された事により過去の渡良瀬遊水地では生物の多様性が失われていた可能性が高いが、現在ではその多様性は回復し豊かな生物相を維持している。本研究では人為的な汚染によって失われた多様性を渡良瀬遊水地内の生物群が取り戻すうえでどのような種の対応があったのか、藻類を対象にして解析に藻類の適応戦略を解明していく事を目的としている。
【方法】渡良瀬遊水地から単離した藻類の銅耐性と比較するため、まず対照としてモデル生物であるムレミカヅキモに対する銅の毒性評価を行った。培養液に 5 μM～500 μM の濃度で $CuSO_4$ を曝露し生育測定を行った。同様に曝露処理を行った細胞について、細胞内の金属含有量と酸化ストレスの測定を行った。細胞内の金属含有量は、培養したムレミカヅキモをメンブレンフィルターに回収し濃硝酸で湿式分解した後に ICP-MS により測定した。酸化ストレスの評価は、銅を曝露した藻細胞を回収した後に蛍光試薬 DCFH-DA を含む培養液に懸濁し蛍光強度の変化を測定することにより行った。渡良瀬遊水地で採取した環境水から限界希釈法とプレート植菌法により藻類を単離し、それぞれの藻類株について $CuSO_4$ の曝露による銅耐性評価を行った。
【結果、考察】ムレミカヅキモは低濃度の銅曝露条件（5,10 μM）では、コントロールと比べて 95%、80%程度の生育を示したが、25 μM では 30%、100 μM では 5%と高濃度になるに従い生育の影響が認められた。生育の認められた低濃度の銅曝露条件下で培養した藻類細胞においても、曝露開始から時間の経過とともに酸化ストレスが増加し、96 時間において急激に増加していた。酸化ストレスの変化は、生育に大きな阻害が認められない低濃度の曝露条件下でも上昇していたことから、生育阻害として顕在化する銅の毒性機構には酸化ストレスの他にも要因の存在が示唆された。一方で、渡良瀬遊水地の環境水からはミカヅキモ、イカダモの他、単細胞藻類が多く単離された。これらの藻類株の銅毒性試験の結果からは対照としたムレミカヅキモでは大きく生育が阻害されている銅濃度曝露条件下（100 μM）でも生育を示すものが認められた。渡良瀬遊水地の藻類が高い銅耐性を獲得している可能性が示唆されたことから、現在これらの藻類株について毒性影響の解析を進めている。

Green algae, Metal toxicity, Watarase basin

発表番号：2A018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Pseudomonas sp. YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL－フルオロ酢酸（MFA）複合体の分子動力学（MD）計算による構造解析

# Structural analysis of the complex of haloacid dehalogenase from Pseudomonas sp. YL with fluoroacetic acid by the molecular dynamics calculations

○中井 康太[1]、田中 成典[2]、中村 卓[1] ([1]長浜バイオ大学大学院、[2]神戸大学大学院)
○ Kouta NAKAI[1], Shigenori TANAKA[2], Takashi NAKAMURA[1] ([1]Nagahama Institute of Bio-Science and T, [2]Kobe University)

**（背景と目的）**

我々は、ハロ酸ゲハロゲナーゼスーパーファミリーに属する *Pseudmonas* sp. YL 由来のハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL の脱ハロゲン化反応機構を分子レベルで解明し、得られた知見を基に、有機ハロゲン化合物の中でも特に難分解性である有機フッ素化合物の炭素―フッ素結合の解離を効率よく行わせたいと考えている。これまでに、構造が簡単でかつ有害な物質であるモノフルオロ酢酸(MFA)を分解対象の基質として使用した結果、L-DEX YL は、MFA を低効率でしか分解できなかった。そこで、L-DEX YL が MFA を低効率でしか分解できない理由を明らかにするために、L-DEX YL－MFA 複合体の分子動力学（MD）計算を行った。

**（方法）**

L-DEX YL－MFA 複合体は、分子統合支援ソフト（MOE）の ASEDock を使用して作成した。MD 計算のプログラムには Amber12 を使用した。MFA のパラメータファイルについては、量子化学計算プログラム Gaussian09 を用いて計算した RESP 電荷とパラメータファイル作成プログラム antechamber により作成した。複合体周辺 15 Å に水分子の箱を用意し、周期境界条件により系のエネルギー極小化計算と 32 ns までの MD 計算を行った。また、同じ MD 計算を 3 回繰り返し、計算の再現性を確認した。MOE による立体構造表示から MFA と相互作用する L-DEX YL のアミノ酸残基を確認後、それらの残基と基質との原子間距離や角度の経時変化を調べた。

**（結果と考察）**

3 回の MD 計算の結果で再現性の見られた原子間距離を調べたところ、N119 の側鎖のアミド基の窒素原子と MFA のカルボキシ基酸素の原子間距離が 25 ns 以降、4Å付近で安定していた。また、K151 の側鎖のアミノ基の窒素原子と MFA のカルボキシ基酸素の原子間距離が 25 ns 以降、3～4Å で安定していた。さらに、脱離するハロゲン化物イオンを受容する R41 のグアニジル基と MFA のフッ素原子の距離が 5Å以上である時間が長く相互作用できる位置関係になかった。他の結果として、触媒水と仮定される水分子が、3 回の計算中 1 回しか活性部位付近に存在しないこと、MFA に求核攻撃を行う D10 の側鎖のカルボキシ基の酸素原子が、攻撃を受ける MFA の炭素原子と 3 回の計算中 1 回しか反応できる位置関係にないこともわかった。本大会では、比較対象として現在計算中の L-DEX YL ーモノクロロ酢酸（MCA、基質の一種）複合体の MD 計算解析結果についても報告する予定である。

haloacid dehalogenase, Structural analysis, fluoroacetic acid

発表番号：2A019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 海鳥における塩素化多環芳香族類の生体蓄積性
# Bioaccumulation of chlorinated polycyclic aromatics in seabirds

○高柳 茉友子、新妻 靖章、大浦 健（名城農）
○Mayuko TAKAYANAGI, Yasuaki NIIZUMA, Takeshi OHURA (Meijo Univ.)

【背景】近年、野生動物の都市化が進んでいる。例えば、札幌ではオオセグロカモメ（*Larus scgistisagus*）が都市の屋上で繁殖しており人間の生活と近くなりつつある。青森県蕪島に生息するウミネコ（*Larus crassirostris*）もまた人の生活に近い地点で営巣を行い繁殖している。蕪島のように人とウミネコが非常に近い環境は世界的に珍しく、多くの専門家が蕪島の環境を研究対象としている。しかし、これら人の生活圏に生息している野生動物に対する化学汚染物質の影響は解明されていない。これまで、化学汚染物質と野生動物の関係は、PCBs やダイオキシン類などの有機塩素化合物が主に検証されてきた。内分泌撹乱作用を持つとされる有機塩素化合物による生体への影響は、生殖異常、奇形などが挙げられる。最近、有機塩素化合物の一種である塩素化多環芳香族炭化水素類（ClPAHs）はダイオキシン類に構造が類似し、変異原性や内分泌撹乱作用を有することが明らかとなってきたが、生体への残留性については未知である。そこで本研究では、人間活動の影響が大きいと考えられる蕪島のウミネコにおける ClPAHs の生体蓄積性を評価した。
【方法】生体サンプルは青森県蕪島に生息するウミネコの成体 8 羽、雛鳥 16 羽の肝臓、腎臓、腸、肺などの臓器と成体の糞を用いた。生体サンプルの抽出方法は、1MKOH/メタノール溶液でアルカリ処理後、ヘキサンによる液-液抽出にて行った。生体サンプルにおける ClPAHs 分析はイオントラップ GCMS による MS/MS 分析にて行った。尚、本研究で使用したウミネコは既に死亡した個体を対象として行った。
【結果・考察】ウミネコの成体中の各臓器から数種の ClPAHs が確認された。また、ClPAHs の親化合物である PAHs も複数種確認することができた。一例として、ウミネコの成体（メス）の腎臓中から乾重量あたり約 700pg/g の総 ClPAHs 量を検出されたが総 PAHs の蓄積量は総 ClPAHs の約 1/4 程度であった。大気中の ClPAHs 濃度は一般的に PAHs よりも数百倍低濃度であることから、ClPAHs の生体蓄積性は PAHs に比べ極めて高いことが示唆された。

Seabird, bioaccumulation, ClPAHs

発表責任者：高柳茉友子（120563025@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

発表番号：2A020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Fps1 のキシロース資化性を示す組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の発酵に及ぼす効果

# Effect of Fps1 on ethanol production by recombinant xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*

○赤松 隆、田口 久貴（崇城大 生物生命）
○Takashi AKAMATSU, Hisataka TAGUCHI (Sojo Univ.)

【目的】キシロース資化能が向上する $Hex^+$変異，グリセロール蓄積が減少する *gpd1Δ gpd2Δ*変異，*Scheffersomyces stipitis* の *XYL1 XYL2* を持つ組換え酵母 *S. cerevisiae* でグルコースとキシロースから発酵を行うと主たる副産物はキシリトールである。本研究では，グリセロール輸送タンパク質 Fps1 の発酵に及ぼす効果を解析した。
【方法と結果】グルコース 85 g/L とキシロース 35 g/L を含む YPDX 培地 pH 5.0 で発酵試験を行った。温度 35℃で，親株 SCE1006−9B はグルコースを 8 時間，キシロースを 24 時間以内に消費し，グリセロール,キシリトール,エタノールの蓄積は，それぞれ 1.0 g/L，12.9 g/L，51.4 g/L であった。*FPS1* のプロモーターを *TDH3* に変えた酵母菌を作成し，発酵試験を行うと，グルコースとキシロースの消費速度はほとんど変わらないが，グリセロール,キシリトール,エタノールの蓄積は，それぞれ 0.9 g/L，11.9 g/L，53.1 g/L となり，キシリトールの減少とエタノールの増加が見られた。エタノールの収率は，全糖よりの理論収率当たり 87%となった。

Saccharomyces cerevisiae, bioethanol, Fps1

発表責任者：赤松　隆（akamatsu@bio.sojo-u.ac.jp）

発表番号：2A021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# キシロース資化性を示す組換え酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるキシリトール低蓄積を導く遺伝背景

# Effects of aquaporins on xylitol accumulation in recombinant xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*

○田口 久貴、赤松 隆（崇城大・生物生命）
○Hisataka Taguchi, Takashi Akamatsu (Sojo Univ.)

【目的】キシロース資化能が向上する $Hex^{+}$変異，グリセロール蓄積が減少する *gpd1Δ gpd2Δ* 変異，*Scheffersomyces stipitis* の *XYL1 XYL2* を持つ組換え酵母 *S. cerevisiae* でグルコースとキシロースから発酵を行うと主たる副産物はキシリトールであり，これを少なくする遺伝背景と培養条件を解析する。
【方法と結果】グルコース 85 g/L とキシロース 35 g/L を含む YPDX 培地 pH 5.0 で発酵試験を行った。温度 25℃で，親株 SCE1006−9B はグルコースを 24 時間，キシロースを 48 時間以内に消費し，グリセロール,キシリトール,エタノールの蓄積は，それぞれ 0.7 g/L，7.0 g/L，54.2 g/L であった。温度 35℃と比べるキシリトール蓄積が低く，エタノール濃度は高くなった（それぞれ，12.9 g/L，51.4 g/L）。このように温度が減少するとキシリトールの蓄積が少なくなった。グリセロールの排出に関わる fps1 を欠失させて発酵試験を行うと，キシリトールの蓄積は，6.3 g/L に、エタノール濃度は，55.4 g/L に上昇した。さらに，*fps1* のホモログである *yfl054C* も欠失させると，キシリトールの蓄積は少なくなり，エタノールの収率は，全糖よりの理論収率当たり 92.8%となった。このように，キシリトールの排出を抑えるとエタノール生産の向上が見られた。

xylitol, aquaporin, bioethanol

発表番号：2A022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 出芽酵母への高効率なキシロース資化能付与に資するキシロースイソメラーゼの開発

# Development of a xylose isomerase for efficient assimilation of xylose in yeast

清家 泰介[1,2]、藤森 一浩[1]、○佐原 健彦[1]、小林 洋介[1]、扇谷 悟[1]、鎌形 洋一[1]([1]産総研 生物プロセス、[2]国立遺伝学研究所)
Taisuke SEIKE[1,2], Kazuhiro E. FUJIMORI[1], ○Takehiko SAHARA[1], Yosuke KOBAYASHI[1], Satoru OHGIYA[1], Yoichi KAMAGATA[1] ([1]BPRI, AIST, [2]NIG)

【目的】キシロースからのバイオエタノール生産において、キシロースイソメラーゼ（XI）は、補酵素の不均衡や中間代謝産物であるキシリトールの蓄積が生じないため、高いエタノール生産効率が期待され、これまでに多くの微生物に由来する XI 遺伝子の発現が出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において試みられてきた。しかしながら、それらの発現の困難さや、キシロース代謝速度が遅いなど、未だ問題点を有している。本研究では、エタノール生産実用酵母 IR-2 株におけるキシロースからのバイオエタノール生産性の向上のため、これまでに出芽酵母において発現が確認されている 8 種類の XI 遺伝子を用いて、IR-2 株における各 XI のキシロース代謝性能を評価することによって、本宿主酵母株に最適な XI 遺伝子を選抜し、さらに進化分子工学的手法による変異導入によるキシロース代謝性能の向上を試みることで、キシロースからの高いエタノール生産能を IR-2 株に付与可能な変異型 XI 遺伝子を取得することを目的とした。
【方法・結果】出芽酵母において発現が確認されている 8 種類の XI 遺伝子について、コドンの最適化を行った人工遺伝子を合成し、IR-2 株に導入した。得られた各酵母株を、キシロースを単一の炭素源とした培地における好気条件下での生育試験と、85 g/L グルコースおよび 35 g/L キシロースを炭素源として含む疑似糖化液における微好気条件下での発酵試験において、最も高いキシロース資化能と発酵能を IR-2 株に付与可能な XI 遺伝子を選抜した。さらに、本 XI 遺伝子に進化分子工学的手法による変異導入を行ったライブラリーを構築し、より高濃度のキシロースを単一の炭素源とした培地におけるスクリーニングと疑似糖化液を用いた発酵性能評価を行った。その結果、野生型 XI と比較して、IR-2 株に高いキシロース資化能を付与可能な 2 種類の変異型 XI 遺伝子を同定した。これらの変異型 XI 遺伝子を導入した IR-2 株は、疑似糖化液を用いた発酵試験(微好気条件, 30℃, 72 時間)において、野生型 XI を導入した IR-2 株と比較して約 2 倍のキシロース資化速度を示し、約 52.3 g/L エタノール(投入糖に対する理論エタノール収率:約 85.5%)を生成した。
本研究は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「バイオマスエネルギー技術研究開発／バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業／有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発」において行われた。

*Saccharomyces cerevisiae*, xylose, ethanol

発表責任者：佐原健彦（t-sahara@aist.go.jp）

発表番号：2A023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# セルロース系エタノール生産のための C5CC6 発酵酵母の開発：Xylose isomerase 遺伝子の改良と同時糖化発酵プロセスにおける利用

# Development of the C5C6 yeast strains for producing cellulosic ethanol: Improvement of the xylose isomerase and their utilization in the simultaneous saccharification and fermentation process.

○藤森 一浩、清家 泰介、小林 洋介、佐原 健彦、扇谷 悟、鎌形 洋一（産総研生物プロセス）
○Kazuhiro E. FUJIMORI, Taisuke SEIKE, YOSUKE KOBAYASHI, Takehiko SAHARA, Satoru OHGIYA, Yoichi KAMAGATA (BPRI, AIST)

【目的】 我々は、セルロース系バイオエタノールの商業生産に資する遺伝子組換え酵母の開発、すなわち、非可食バイオマスから ethanol を高効率で生産可能な C5C6 同時発酵酵母及びそれに関する基盤技術開発に取り組んでいる。この中で、バイオマスに含まれる xylose を効率良く ethanol に変換する技術が、商業化に向けた一つの重要な要素となっている。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) は xylose を効率良く資化することができないため、xylose 代謝遺伝子として、例えば xylose reductase、xylitol dehydrogenase 遺伝子や xylose isomerase (XI) 等の外来遺伝子の導入およびその安定した発現が必要である。これまでの研究で、我々は、工業用酵母 *S. cerevisiae* IR-2 において XI 遺伝子を安定的に発現させることに成功し、さらに、分子進化工学により2つの遺伝子変異 mut2 及び mut20 が酵素活性の向上に寄与することを見出した（清家他、同大会発表）。本研究では、XI 変異遺伝子のさらなる改良（第二世代 XI 変異遺伝子）を行い、この第二世代 XI 変異遺伝子導入株の発酵性能を実バイオマス糖化液を意識した組成の疑似糖化液 YPDX (glucose 85 g/L, xylose 35 g/L, yeast extract 10 g/L, peptone 20 g/L)を用いた発酵試験、さらに実際の工業プロセスを意識したラボスケール同時糖化発酵試験 (SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation) により発酵性能の評価を行った。

【方法・結果】 *Clostridium phytofermentans* 由来 xylose isomerase 遺伝子(CpXI)の分子進化工学により得られた有用変異 mut2/mut20 を重ねた CpXI 変異遺伝子を site-directed mutagenesis により作製し、*S. cerevisiae* 由来 *XKS1* 遺伝子発現カセットとともに pAUR101 plasmid vector に構成したものを工業用酵母 IR-2 haploid 株 (MATalpha *hoΔ::bleMX gre3::hphMX*) の AUR1 部位に染色体導入した SS120 株を構築した。SS120 株を用いた YPDX 発酵試験では、120h 以内に、C5C6 糖の大部分を消費し、約 53 g/L の ethanol を生産した。理論 ethanol 収率に対する変換効率は、それぞれ約 87%（投入糖）、約 92%（消費糖）であった。NaOH 処理バガスを用いたラボスケール SSF においても、推定糖化率約 85%, 120 g/L の糖を生産する条件において、72h 以内に約 53 g/L の ethanol を生産することができ、推定変換効率は約 91%であった。このように、第二世代 XI 変異遺伝子を実装した C5C6 同時発酵酵母は高いエタノール生産性能を示したが、今後、さらなる変換効率及び生産性の向上に向けた改良を進めていく予定である。

本研究は、国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）「バイオマスエネルギー技術研究開発／バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業／有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発」において行われた。

*Saccharomyces cerevisiae*, xylose isomerase, cellulosic ethanol

発表責任者：藤森一浩（k-fujimori@aist.go.jp）

発表番号：2A024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# セルロース系バイオエタノール生産実用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* IR-2 におけるペントースリン酸経路の最適化と耐熱化

# Optimization and thermophilization of the Pentose Phosphate Pathway genes for xylose utilization in an ethanologenic recombinant yeast, *Saccharomyces cerevisiae IR-2*

○小林 洋介[1]、藤森 一浩[1]、佐原 健彦[1]、鈴木 俊宏[2]、蒲池 沙織[2]、松鹿 昭則[2]、星野 保[1,2]、扇谷 悟[1]、鎌形 洋一[1] ([1]産総研 生物プロセス、[2]産総研 機能化学)
○ Yosuke Kobayashi[1], Kazuhiro E. Fujimori[1], Takehiko Sahara[1], Toshihiro Suzuki[2], Saori Kamachi[2], Akinori Matsushika[2], Tamotsu Hoshino[1,2], Satoru Ohgiya[1], Yoichi Kamagata[1] ([1]BPRI, AIST, [2]ISC, AIST)

【目的】 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)は、xylose を効率良く資化することができないが、xylose 代謝遺伝子を導入することにより xylulose 5-phosphate へ、さらに内在性のペントースリン酸経路（PPP: pentose phosphate pathway）および解糖系を介して ethanol を生産することが可能である。しかし、ethanol 生産性向上のためには PPP の代謝フローの改善が必要である。また、同時糖化発酵(SSF: Simultaneous Saccharification and Fermentation) プロセスにより ethanol 生産を行う場合、糖化酵素の至適温度が酵母の一般的な培養温度（30℃）より高温であることから、より高い温度条件下でも効率を落とすことなく ethanol 生産を行える酵母が必要不可欠である。本研究では、上記目的のために、*S. cerevisiae* に由来する PPP-4 遺伝子 (*TAL1*, *TKL1*, *RKI1*, *RPE*1)の発現強化と耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus*_DMB1 株(*K. marxianus*)に由来する PPP-4 遺伝子の *S. cerevisiae* における異種発現が ethanol 生産に及ぼす影響について検討を行った。
【方法・結果】 *XR*、*XDH*、*XK* を導入した *S. cerevisiae* IR-2 haploid 株の *PHO13* 領域に相同組み換えによって目的の遺伝子を挿入した株を作成し、比増殖速度および 60 g/L xylose を唯一の糖源とする培地 (YPX)を用いて ethanol 発酵性能を比較した。まず、xylose 代謝を最適化するために必要な *S. cerevisiae* 由来の PPP 遺伝子について検討した結果、PPP-4 遺伝子をすべて強化した場合に比増殖速度が最も早く ethanol 生産性も高いことを明らかにした。しかし、30˚C に比べて 36˚C での発酵条件下では、顕著な xylose 資化遅延、ethanol 生産遅延、発酵溶液中に残存する xylose 量の増大が認められた。そこで、*S. cerevisiae* より高い熱安定性を持つと期待される *K. marxianus* 由来の PPP 遺伝子を1つずつ導入した株を作成し、同様の方法で評価した。その結果、36˚C 条件下では、*TKL1* を除いて *K. marxianus* 由来の PPP 遺伝子を導入した株の方が、*S. cerevisiae* 由来の PPP 遺伝子を導入した株よりも xylose 代謝が優れていた。以上の結果から、最終的に *K. marxianus* 由来の *RKI1*、*RPE1*、*TAL1* と *S. cerevisiae* 由来の *TKL1* を PHO13 遺伝子領域に挿入した株を作成しエタノール生産性能を調べたところ、高温条件下で生育速度、ethanol 生産量の向上を確認し、*K. marxianus* 由来の PPP 遺伝子を用いることが SSF での ethanol 生産に有用であることを示した。

本研究は、バイオマスエネルギー技術研究開発/バイオ燃料製造の有用要素技術開発事業/有用微生物を用いた発酵生産技術の研究開発/C5C6 糖同時発酵微生物の開発 (NEDO)において行った。

*Saccharomyces cerevisiae*, xylose, ethanol

発表番号：2A025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# C5C6 糖類発酵酵母を用いたパイロットスケールにおける同時糖化併行複発酵

# Simultaneous saccharification and co-fermentaion in pilot-scale

○沖野 祥平、池應 真実、種田 大介（日揮）
○Shohei Okino, Makoto Ikeo, Daisuke Taneda (JGC CORPORATION)

【背景・目的】

日揮では、非食糧系バイオマスを原料とする第２世代バイオエタノール製造のための一技術として、シンプルなプロセス構成であり、かつ酵素糖化時の生成物阻害を回避可能な同時糖化発酵プロセスの開発を行っている。燃料用エタノールの商業生産においては、蒸留コストの観点から発酵後のエタノール濃度は５w/v%以上であることが必須であるため、反応槽内に仕込む基質濃度は高くなり、扱う系は高濃度スラリーとなる。ここでは高濃度スラリーの同時糖化発酵について、フラスコスケールから 30L、200L のパイロットスケールへの同時糖化発酵のスケールアップを検討した結果を報告する。

【結果・考察】

発酵阻害物質濃度、糖化性能、及びスラリー性質が異なる、ユーカリパルプ（パルプシート解砕処理）、アルカリ前処理バガス（1%NaOH、123℃、60 分処理）、及び希硫酸浸漬処理バガス（1% $H_2SO_4$ 浸漬処理後、1.3M, 7min 水蒸気爆砕処理）を同時糖化発酵の基質として用いた。これら基質を用い、フラスコスケール及び 30L, 200L のパイロットスケールにて、15%-25%(w/v)の基質濃度で C5C6 糖類利用遺伝子組換え酵母を用いた同時糖化発酵試験を行った。フラスコスケールでの同時糖化発酵におけるエタノール収率、濃度、生産速度は、パイロットスケールでもほぼ同様であることが認められた。

本研究は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託研究として実施した。

Simultaneous saccharification and fermentation, Pretreatment, Xylose

発表責任者：種田大介（taneda.daisuke@jgc.com）

発表番号：2A026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 水蒸気爆砕処理バガス、及びアビセル糖化時における、基質へのセルラーゼ各酵素の吸着脱離挙動の定量的解析

# Adsorption behavior of cellulase analyzed quantitatively during hydrolysis of steam-exploded biomass and microcrystalline cellulose

○豊澤 佳子、沖野 祥平、池應 真実、種田 大介（日揮）
○ YOSHIKO TOYOSAWA, SHOHEI OKINO, MAKOTO IKEO, DAISUKE TANEDA (JGC Corporation)

【背景・目的】酵素糖化におけるセルラーゼ構成酵素の実バイオマス基質への吸着や脱離の挙動は、不明な点が多い。そこで本研究では、水蒸気爆砕処理バガス、及びアビセルを基質とした酵素糖化時の、セルラーゼ構成酵素の基質への吸着脱離挙動を SDS-PAGE 法で定量的に解析した。
【方法】水蒸気爆砕処理バガス、及びアビセルを基質とし、酵素にはセルラーゼ SS（ナガセケムテクス社製）を用い、120rpm、50℃の条件で糖化を行った。また、セルラーゼ構成酵素の基質への非生産的吸着の抑制を目的として、セルラーゼ活性を持たないタンパク質であるリゾチームを添加して、糖化を行った。
【結果・考察】リゾチームの添加によって、水蒸気爆砕処理バガスでは糖化効率の向上が認められたが、アビセルでは認められなかった。リゾチームの添加によって、セルラーゼ構成酵素のリグニンなどへの非生産的吸着が抑制されたと考えられた。そこで、セルラーゼ構成酵素の吸脱着を調べるために、糖化液上清の SDS-PAGE 解析を行った。

アビセルの糖化の際は、リゾチームの有無に関わらず、糖化開始 24 時間後に、CBH1、 CBH2、 EG1、EG2 の上清中の濃度が大きく減少したことから、基質へ吸着していることが示唆された。その後糖化が進むにつれ、上清中の CBH1、EG1 の濃度は増加し基質から脱離することが認められた。EG2 は、いったん上清中の濃度が増加したものの、その後急激に濃度が減少し、CBH2 は上清中から消失したまま反応終了時まで濃度の増加は認められなかった。BGL は反応終了時点で 71.1%が上清中に残存していた。

水蒸気爆砕処理バガスの糖化の際は、リゾチーム非添加の場合は、アビセルと同様に糖化開始 24 時間後に CBH1, CBH2, EG1, EG2 の多くが上清中から消失し、その後 CBH1, EG1, EG2 の上清中の濃度が増加したものの、アビセルの場合と比較して低かった。また BGL は、アビセルの場合と異なり、糖化開始 24 時間後に添加量の 96.0%が上清中から消失し、糖化終了時まで濃度の変化は認められなかった。一方で、水蒸気爆砕処理バガスの糖化時にリゾチームを添加した際は、無添加の系と比較して、糖化開始後 24 時間以降の CBH1, EG1, EG2 の上清中の濃度が増加した。また、BGL の上清中の濃度も大幅に増加した。以上より、リゾチームのようなセルラーゼ活性を持たないタンパク質の添加は、実バイオマスに含まれるリグニンへのセルラーゼ構成酵素の非生産的吸着を抑制し、糖化を促進すると考えられ、酵素糖化プロセスにおける酵素使用量削減に寄与する可能性が示唆された。

本研究は国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)の委託研究として実施した。

Lignocellulose biomass, Enzymatic hydrolysis, Enzyme adsorption

発表責任者：種田大介（taneda.daisuke@jgc.com）

発表番号：2A027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ムコン酸生産の効率化に寄与する Protocatechuate decarboxylase 活性化機構の解析

# Characterization of the enhanced protocatechuate decarboxylation that contributes to muconic acid production efficiency.

○尾形 拓哉、菊地 晟弘、今 仁志、諸岡 深雪、園木 和典（弘前大学）
○Takuya OGATA, Akihiro KIKUCHI, Hitoshi KON, Miyuki MOROOKA, Tomonori Sonoki (Hirosaki Univ.)

【目的】

ムコン酸（MA）はポリエステルやポリアミドなどの樹脂原料として利用可能な基幹物質である。植物バイオマスを原料とした MA の生産においては、Protocatechuate decarboxylase（Pdc）反応がボトルネックとされてきた。我々はこれまでに、Pdc をコードする *aroY* と 4-hydroxybenzoate decarboxylase（KpdBCD）の B subunit をコードする *kpdB* を共発現させることが Pdc 反応を活性化させることを明らかにした。本研究では、活性化した Pdc の特性および AroY-KpdB 間の相互作用を解析し、脱炭酸反応が向上したメカニズムを明らかにすることを目的としている。本発表ではその解析結果を報告する。

【結果】

AroY と KpdB を共発現させた組換え大腸菌由来の粗酵素液は、AroY だけを発現させた粗酵素液に比べ約 20 倍高い Pdc 活性を示した。KpdB の発現にかかわらず、粗酵素液中の Pdc 活性の最適温度は 35℃、最適 pH は 5.5 であった。AroY と KpdB を含む粗酵素液を DEAE-イオン交換クロマトグラフィーに供した結果、AroY と KpdB は異なる画分に溶出された。AroY が溶出された画分の比活性は粗酵素液に比べて約 1/2 倍に低下し、KpdB が溶出された画分を混合しても回復しなかった。AroY と KpdB を含む粗酵素液中の Pdc 活性は氷上で 24 時間静置しても安定に検出されたが、透析（MWCO3,500）により著しく低下した。同粗酵素液を MWCO3,000 フィルターによる遠心濾過で調製した濾液を、透析後の粗酵素液に添加しても Pdc 活性は 5%程度しか回復しなかった。これらの結果から、AroY-KpdB 複合体が形成された可能性は低く、Pdc 反応には不安定な低分子の補因子が要求されることが示唆された。

本研究の一部は、野田産研研究助成、科研費の支援を受けて実施した。

muconic acid, protocatechuate decarboxylase

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

発表番号：2A028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# リグニン由来フェノール類を原料としたムコン酸生産

# Muconic acid production from lignin-related phenols

○菊地 晟弘、諸岡 深雪、尾形 拓哉、園木 和典 (弘前大・農生)
○Akihiro KIKUCHI, Miyuki MOROOKA, Takuya OGATA, Tomonori SONOKI (Fac. Agric. Life Sci., Hirosaki Univ.)

【目的】

*cis,cis*-ムコン酸（ccMA）は、アジピン酸やテレフタル酸などのポリアミドやポリエチレン合成の原料として展開できる基幹化合物の一つである。これまでに石油由来の安息香酸やトルエンといった芳香族化合物の分解経路や、植物由来の糖質を原料とした芳香族アミノ酸合成経路を利用した生産方法が提案されてきたが、原料の持続性や競合が予測できるため化石資源や糖質以外の原料から生産する方法も並行して開発することが必要である。そこで本研究では、地球上に豊富に存するもののその化学構造の複雑さから十分に利用されていないリグニンを原料としたムコン酸生産に取り組むこととした。

【方法・結果】

プロトカテク酸と ccMA の代謝能力を欠損させた *Pseudomonas putida* CBIK 株を宿主として、*P. putida* 由来の vanillate demethylase（*vanA*, *vanB*）および catechol-1,2-dioxygenase（*catA*）、*Klebsiella pneumoniae* 由来の protocatechuate decarboxylase（*aroY*, *kpdB*）を発現する組換え体を作出し、ミニジャーファメンターを用いて ccMA の生産能力を評価した。

pH6.5、30℃の条件下、guaiacyl-リグニン由来フェノール類の一つであるバニリン酸を原料とした ccMA 生産を評価した結果、約 80%(w/w)の収率で ccMA が生産された。さらに流下培養により生産の持続性を評価した結果、本研究で作出した微生物株は、約 70%(w/w)の収率で 50 時間以上 ccMA を生産することが可能であった。

さらに *p*-hydroxybenzoate hydroxylase（*pobA*）を組込んだ微生物株は、*p*-hydroxyphenyl-リグニン由来フェノール類の一つである *p*-ヒドロキシ安息香酸を原料として、約 90%(w/w)の収率で ccMA を生産した。

本研究の一部は、科研費、弘前大学若手・新任研究者支援事業の支援を受けて実施した。

muconic acid, lignin-related phenols

発表責任者：園木和典（sonoki@hirosaki-u.ac.jp）

発表番号：2A030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発(その 1)
# *Trichoderma reesei* 糖化酵素におけるセルラーゼ成分比とバイオマス糖化効率の関係解析
# Analysis of relationship between the proportion of *Trichoderma reesei* cellulases and biomass saccharification efficiency

○白井 晴奈[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、森川 康[2]、小林 良則[1] ([1]バイオインダストリー協会、[2]長岡技大)
○Haruna Shirai[1], Yousuke Shida[2], Wataru Ogasawara[2], Yasusi Morikawa[2], Yoshinori Kobayashi[1] ([1]JBA, [2]Nagaoka Univ. of Technology)

【目的】我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素を生産する菌株の創製を目指し基盤研究を行っている。*T. reesei* PC-3-7株はバイオマスを糖化する種々の成分酵素を生産していることが知られているが、これら各種成分酵素のバイオマス糖化における役割は十分解明されておらず、また、糖化の最適比率を求めることは極めて重要である。そこで、この糖化酵素に含まれる各種成分酵素の組成比率を網羅的、定量的に解析し、各種酵素活性や、バイオマス糖化能との関係を解析し、高機能糖化酵素の生産菌株創製への指針を得ることを目的として研究を行った。
【方法】*T. reesei* PC-3-7 株およびその変異株（PCD 株、CDU 株）、ならびに *A. aculeatus* 由来 BGL を導入し、バイオマス糖化性能を向上させた組換え株（JN11 株、JN13 株、JN24 株）を用い、アビセルおよびアビセル・キシラン培地で培養液を培養した。まず、これら培養液に含まれる糖化酵素の各種成分酵素を網羅的・定量的に解析する手段として、*T. reesei* PC-3-7 株の培養液を材料に iTraq nano-LC/MS/MS 法と 2D 法を比較検討した。次いで、これら培養液について各種酵素活性(FPU 活性、CMCase、BGL 活性、pNPLase、キシラナーゼ活性、キシロシダーゼ活性）を測定した。また、これら糖化酵素のバイオマス糖化能を評価する為、苛性ソーダ処理バガス等の 5 種類の前処理バイオマスを 80%糖化するに必要な酵素量を求めた。このようにして得られた各種酵素活性、糖化能、成分酵素の組成比率のこれら 3 者間にどのような関係が見られるかを解析した。
【結果】iTraq nano LC/MS/MS 法は、特定成分比率に異常値が見られ、不適当と判断された。2D 法は、発現量の少ない EG1,EG2,EG4 については他成分スポットとの分離が悪く再現性にやや問題があったが、主要成分である CBH1,CBH2 や XYN1,XYN2,XYN3 等についてはほぼ満足できる再現性が確認でき、定量解析に採用された。この結果、おおよそ CBH1:37%,CBH2:21%,EG1:4%,EG2:6%,EG4:4%,XYN1:5%,XYN2:3%,XYN3:5%というような組成比が得られた。これら主要成分については、CDU 株、PCD 株、JN11 株、JN13 株、JN24 株の間で組成比率にかなりの程度の差異が見られた。JN 系酵素に含まれる BGL と BXL については、組成比率と、酵素活性間に非常に良い相関が見られた。また、キシラナーゼ活性の強さは、組成比率の総量(XYN1+XYN2+XYN3)と良く相関していた。5 種類のバイオマス前処理物に対する糖化能と組成比率との関係を解析すると、いずれのバイオマス前処理物の場合も、糖化能に最も大きな影響を与える成分は BGL であり、3～5%程度あれば十分であった。苛性ソーダ処理物のような場合は、キシラナーゼ活性が強ければ糖化能がその分向上していた。一方、セルロース糖化の主役と言われる CBH1 については組成が多少変動しても殆ど、糖化能に影響を与えなかった。

biomass saccharification, proteome analysis

発表番号：2A031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発 Trichoderma reesei PC-3-7 株の生産する成分酵素組成比率の検討

# Investigation of combinatorial effects of (Hemi)cellulolytic enzymes from Trichoderma reesei PC-3-7

○千葉 史子[1]、白井 晴奈[1]、坂井 可南子[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、森川 康[1]、小林 良則[1]([1]JBA つくば研、[2]長岡技術科学大学)
○FUMIKO CHIBA[1], HARUNA SHIRAI[1], KANAKO SAKAI[1], YOUSUKE SHIDA[2], WATARU OGASAWARA[2], YASUSHI MORIKAWA[1], YOSHINORI KOBAYASHI[1] ([1]JBA Tsukuba Lab., [2]Nagaoka University of Technology)

【目的】我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創製を目指し基盤研究を行っている。バイオマス種やその前処理法により、最適な糖化酵素の特性は異なり、酵素のコスト低減の為には酵素組成のカスタマイズは重要である。我々は*Trichoderma reesei* PC-3-7 株の生産する糖化酵素を用いて研究を行っており、この糖化酵素には10数種の成分酵素が含まれている。これまで、それらの各種成分酵素の酵素化学的性質については多くの研究成果が報告されているが、特定のバイオマスに対するこれら成分酵素の役割については必ずしも詳細に解析されていない。そこで我々は、バガスの苛性ソーダ処理物を代表的な基質として取り上げ、この基質に対する糖化の基本情報を得るべく研究を行った。具体的には、まず、各種成分酵素の糖化における役割・作用機序の解析を行い、次いで、これらの組合せ比率と糖化能の関係を解析した。
【方法】*T. reesei* PC-3-7 株の持つ成分酵素（CBH1, CBH2, EG1, EG2, EG4, XYL1, XYN2, XYN3, BXL）と*Aspergillus aculeatus*由来BGLの遺伝子を*Aspergillus oryzae*にて異種宿主発現させ、培養液から精製酵素標品を作成した。バガスの苛性ソーダ前処理物を基準とし、比較用基質としての希硫酸処理物、水熱処理物も調製した。苛性ソーダ処理バガスに各種成分酵素の精製品を、単独あるいは組み合わせて作用させた場合の反応生成物を経時的にサンプリングし、イオンクロマト法で分析した。また、セルラーゼ系成分、ヘミセルラーゼ系成分の比率を変えて組み合わせた酵素カクテルを作成し、糖化能を比較評価した。その他、*T. reesei* PC-3-7 株の生産するマイナー成分である、SWO, XYN4, axe, ABF, cip, GLR, XG等についても糖化における役割を検証した。
【結果】単独成分酵素を苛性ソーダ処理バガスに作用させた場合、CBHIは従来の報告通り経時的にセロビオースを蓄積した。EG1は、著量のグルコース生成と共に、キシロース・キシロビオースの生成が確認され、この成分のセルロースとヘミセルロース両成分糖化への寄与が示唆された。キシラナーゼはXYN3>XYN2>XYN1の順でキシロビオースを生成し、キシロトリオースについてはXYN2>XYN1であったがXYN3は生成していなかった。CBH1, CBH2, EG1の構成比率を15～45％に変動させた組合せで苛性ソーダバガスに作用させたところ、この変動範囲内では糖化率に大きな差は見られなかった。次いで、CBH1を25％に固定し、CBH2とEG1の比率を5～45％に変動させたが、糖化率は大きく変動しなかった。これらの結果は、複合酵素系による糖化機構が複雑であることを示唆した。また、マイナー成分の評価を行ったところ、EG2, EG4, SWOもこの基質糖化において多少なりとも効果が認められた。

cellulase, Trichoderma reesei PC-3-7, biomass saccharification

発表番号：2A032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発（その３）バイオマス由来セルロースの構造解析および酵素糖化機構の解析

# Analysis of the structure and saccharification mechanism of the cellulose from biomass

○三橋 麻子[1]、今井 牧子[2]、杉山 淳司[2]、志田 洋介[3]、小笠原 渉[3]、森川 康[1]、小林 良則[1]([1]JBA つくば研、[2]京都大学生存圏研究所、[3]長岡技術科学大学)
○Asako Mihashi[1], Makiko Imai[2], Junji Sugiyama[2], Yousuke Shida[3], Wataru Ogasawara[3], Yasushi Morikawa[1], Yoshinori Kobayashi[1] ([1]JBA tsukuba lab., [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere,Kyoto University, [3]Nagaoka University of Technology)

【目的】我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素の創製と高効率糖化法の開発を目指し基盤研究を行っている。これらの目標を達成する為には、バイオマスの糖化機構、特に、糖化酵素の各種成分酵素とバイオマス成分のセルロース、ヘミセルロース、リグニンとのインターラクションを解析する必要がある。そこで、我々は、まず、セルロース成分に着目し、３種の異なる前処理バガスから調製したセルロース画分の構造解析を行い、各種糖化酵素及びそれらの主要成分酵素による酵素糖化パターンとの関係を解析することとした。

【方法】糖化反応に用いる基質として、バガス粉砕物を苛性ソーダ、希硫酸、水熱処理した前処理物を調製した。これらをまず Wise 処理によって可能な限りリグニンを取り除き、次いで、市販のヘミセルラーゼで処理し、セルロース含量率を高めた標品を調製した。これら 3 種のセルロース標品について X 線結晶構造解析、分子量、 重水素化率の測定を行い、物理化学的特性を解析した。一方、糖化酵素として市販酵素 Cellic CTec2、*A. aculeatus* 由来 BGL を *T. reesei* PC-3-7 株に導入して造成した糖化酵素 JN24 及び JN24H、並びに *T. reesei* 由来 CBH1, CBH2, EG1, EG2 を *A. oryzae* を用いて異種宿主発現させ精製した酵素標品を準備した。Cellic CTec2 と JN24 を各前処理物に作用させ、80%糖化に必要な酵素量を求めた。次いで、同様に各セルロース標品においても 80%糖化必要量を求め、それらを比較した。更に、これらのセルロース標品に CBH1,CBH2,EG1,EG を作用させ、糖化生成物を比較し、糖化パターンを解析した。

【結果】各前処理バガス由来セルロースの構造を解析した結果、前処理条件(溶媒・温度)によって、得られる前処理物中のセルロース構造（結晶性・分子量）が異なることが分かった。特に、高温条件下で処理することで、セルロースの結晶の乱れた部分が分解され、得られるセルロースの結晶性が相対的に高くなる。次に、これらのセルロースの 80%糖化に必要な酵素量をバガス前処理物を基質とした場合と比較すると、酵素量が最大 1/3 まで削減できることが分かった。この結果より、前処理物からリグニン、ヘミセルロースを取り除いたセルロース画分は前処理物に比べ、極めて糖化され易い状態となっており、これら 2 成分が糖化を大きく妨害していることが判明した。さらに、単一の成分酵素(CBH1,2,EG1,2)による糖化率を比較した結果、異なる前処理のバガスセルロースでは糖化率に差が見られた。特に、苛性ソーダ処理で EG1 の効果が大きい結果となり、これは、苛性ソーダ処理バガス中のヘミセルロースの存在や、セルロースの結晶性の低さ等が糖化効率に影響していると考えられる。セルロースの構造と成分酵素の糖化能との関係性について更に検討を行う。

cellulose, cellulase, saccharification

発表番号：2A033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

バイオ燃料事業化に向けた革新的糖化酵素工業生産菌の創製と糖化酵素の生産技術開発（その４）
*Trichoderma reesei* PC-3-7 株由来高機能糖化酵素生産菌株の培養条件検討
Optimization of culture conditions for cellulase production by *T.reesei* PC-3-7 mutants
○小林 良則[1]、古川 麻記子[1]、永岡 幸一郎[1]、山口 桂右[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、森川 康[1]（[1]JBA つくば研、[2]長岡技科大）
○Yoshinori KOBAYASHI[1], Makiko FURUKAWA[1], Koichiro NAGAOKA[1], Keisuke YAMAGUCHI[1], Yousuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Yasushi MORIKAWA[1] ([1]JBA Tsukuba Lab., [2]Nagaoka Tech. Univ.)

【目的】我々はセルロース系バイオマスからのエタノール生産に用いる高機能糖化酵素生産菌株の創製を目指し基盤研究を行っている。バイオエタノール生産用糖化酵素については当然ながら、高機能な酵素をできるだけ低コストで生産できる方法の開発が望まれている。我々はこれまでの研究において *Trichoderma reesei* PC-3-7 を親株として BGL 活性等を増強した生産菌株（各種 JN 株）を造成してきた。今回は、これら各種 JN 株を用いる酵素生産の最適培養条件を探索するに必要な実験手法の開発と、培地成分（炭素源、窒素源）の選定検討、および各種培養条件を変化させた場合に生産される糖化酵素の特性解析を行ったのでそれらの結果について報告する。
【方法】菌株として各種 JN 株を用い、2L 容ジャーを用いて種々の培養条件検討を行った。まず、培養時の諸条件を変動させた場合の培養パターンの変動と酵素生産性の関係をモニターする方法、セルロース含有培地中で菌体生育量を計測する方法と菌体を酵素溶解し培地中のセルロース濃度を定量する方法を検討した。また、与えた炭素源と窒素源がどのような生成物にどう配分されたかを解析する目的で、生成物後、元素分析し、物質収支を求める方法を検討した。
次いで、培地成分の炭素源（各種セルロース、前処理バイオマス）と窒素源（硫安、CSL、大豆カス等）の有効性を調べた。また、培養時の pH を 3.5～5.5 でコントロールした場合に生産された糖化酵素の特性を酵素活性、バイオマス糖化能、成分酵素の構成比（2D）の観点から評価した。
【結果】培養中の生菌体量を計測する方法として ABER 社製の生菌モニターを用いたところ、培養中の誘電性(CAP)と乾燥菌体重量間との間に高い相関性が見られ、その有効性が確認された。次いで、培地中のセルロースの濃度を定量する手法として、培養液の遠心分離残渣を凍結破砕した後に溶菌酵素(Yatalase)で処理し、次いで苛性ソーダ処理する方法が有効であった。培養中の発生炭酸ガス量はセンサーで計測し、菌体と酵素タンパク質を分離したのち炭素を元素分析し炭素の物質収支を求めたところ、JN24 株を微結晶セルロース 10%条件下で培養した場合には、炭酸ガスに 51%、菌体に 12%酵素タンパク質に 32%、その他 5%という値が得られた。これら各種実験手法の開発により最適培養条件設定への指針が得られた。炭素源としてはやはり微結晶セルロースの優位性が示され、バイオマス前処理物の中ではアルカリ処理物が有効であったが生産性はかなり劣った。窒素源としては、CSL や大豆カス等が有効であった。pH を変えた培養では pH が低いほど CBH、EG 系のセルラーゼ系が、高いほど XYN1、2、3 のヘミセルラーゼの比率が高く、バイオマス糖化能にも差が見られた。

cellulase, *Trichoderma reesei*, biomass

発表責任者：小林　良則（yn-kobayashi@aist.go.jp）

発表番号：2A034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# *Pseudomonas* sp. 61-3 の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子のクローニングと組換え大腸菌による共重合ポリエステルの生合成

# Cloning of (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA ligase gene in *Pseudomonas* sp. 61-3 and biosynthesis of copolymers by recombinant strains of *Escherichia coli*

○脇田 和[1]、倉富 優季[2]、外村 彩夏[3]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県立大院・環境共生、[2]熊本県立大・環境共生、[3]理研)
○Izumi WAKIDA[1], Yuki KURADOMI[2], Ayaka HOKAMURA[3], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]RIKEN)

【目的】微生物がエネルギー貯蔵物質として菌体内に合成・蓄積するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は生分解性プラスチックであり、環境に優しい環境調和型材料として期待されている。大腸菌 LS5218 株に *Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（*phaC1*$_{Ps}$）、脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットを供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*$_{Ps}$）、*Ralstonia eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子（*phbAB*$_{Re}$）、さらには *Pseudomonas aeruginosa* PAO の推定(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3HA-CoA）リガーゼ遺伝子を導入した組換え株をグルコースを唯一の炭素源として培養した結果、P(94.6% 3HB-*co*-5.4% 3HA) が 20 wt%合成された [1)]。したがって、脂肪酸合成経路から(*R*)-3HA-CoA を供給するには、PhaG 酵素だけでなく (*R*)-3HA-CoA リガーゼが必要であると考えられる。そこで本研究では、*Pseudomonas* sp. 61-3 の (*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子をクローニングし、その機能を明らかにすること、さらには、大腸菌の組換え株を作製して P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルをグルコースから合成することを目的とした。
【方法および結果】(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性有する *P. putida* KT2440 の PP0763 遺伝子の翻訳産物と相同性を示す近縁菌の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼのアミノ酸配列の保存領域を基にプライマーを設計し、*Pseudomonas* sp. 61-3 のゲノム DNA を鋳型とした degenerate PCR を行った結果、1.0-kb の増幅産物が得られた。その増幅産物の塩基配列を基にプライマーを作製し、カセットを用いた nested PCR を行って、3.5 kb *Sal*I-*Eco*RI 領域の塩基配列を決定した。その結果、*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼは 560 アミノ酸残基からなる推定分子量 62 kDa のタンパク質をコードしていると考えられた。*Pseudomonas* sp. 61-3 の推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を破壊したが、野生株と同様のモノマー組成からなる PHA を合成した。そのため、この推定(*R*)-3HA-CoA リガーゼ遺伝子を *phaC1*$_{Ps}$、*phaG*$_{Ps}$、*phbAB*$_{Re}$ とともに大腸菌に導入した組換え株を作製し、今回クローニングした遺伝子の翻訳産物が(*R*)-3HA-CoA リガーゼ活性を有するのかについて現在調査中である。

1) Hokamura *et al*., *J. Biosci. Bioeng*., 120, 305-310（2015）

polyhydroxyalkanoate, PHA, *Escherichia coli*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

発表番号：2A035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 組換え *Ralstonia eutropha* による糖からの P(3HB-*co*-3HA)共重合ポリエステルの生合成

# Bisynthesis of P(3HB-*co*-3HA) copolymers from sugar by recombinant strains of *Ralstonia eutropha*

○倉富 優季[1]、脇田 和[2]、外村 彩夏[3]、田中 賢二[4]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大・環境共生、[2]熊本県大院・環境共生、[3]理研、[4]近大・産理工)

○YUKI KURADOMI[1], IZUMI WAKIDA[2], AYAKA HOKAMURA[3], KENJI TANAKA[4], HIROMI MATSUSAKI[1,2] ([1]Fac. Environ. Sym. Sci. Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci. Pref. Univ. Kumamoto, [3]RIKEN, [4]Kinki Univ.)

【目的】環境に優しい高分子材料である生分解性プラスチックの一つに、微生物が菌体内で合成するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）がある。*Ralstonia eutropha* は代表的な PHA 合成細菌であるが、糖を唯一の炭素源として培養すると、炭素数 4 の 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）からなる P(3HB)ホモポリマーを合成する。これは、硬くて脆いため、より実用的な材料の合成を目指して、*R. eutropha* の組換え株を作製し、糖から炭素数 4～12 の 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニットからなる共重合ポリエステル P(3HB-*co*-3HA)を合成することを本研究の目的とした。

【方法および結果】大腸菌 LS5218 株に *Pseudomonas* sp. 61-3 の低基質特異性 PHA 重合酵素遺伝子（$phaC1_{Ps}$）、脂肪酸合成経路からの中鎖長 3HA ユニットを供給する(*R*)-3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（$phaG_{Ps}$）、*R. eutropha* の 3HB ユニット供給系酵素遺伝子（$phbAB_{Re}$）、さらには *Pseudomonas aeruginosa* PAO の推定(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3HA-CoA）リガーゼ遺伝子（PA3924)を導入した組換え株は、グルコースを唯一の炭素源として P(94.6% 3HB-*co*-5.4% 3HA) を 20 wt%合成する [1]。同様に、これらの遺伝子を PHA 合成能欠損変異株の *R. eutropha* PHB$^-$4 および PHA 重合酵素遺伝子破壊株の *R. eutropha* H16dC に導入した組換え株を作製し、フルクトースを唯一の炭素源として培養を行った。その結果、*R. eutropha* PHB$^-$4 を宿主とした場合、35 wt%の PHA が蓄積されたが、中鎖長 3HA ユニットの PHA 鎖中への取り込みはなかった。一方、*R. eutropha* H16dC を宿主とした場合、pRTcAA-GMCL(Pa) ($P_{lac}$, $phaG_{Ps}$, PA3924)と pJASc22 ($P_{Ps}$, $phaC1_{Ps}$)の 2 つのプラスミドを導入した株において、中鎖長 3HA ユニットが 6.2 mol%取り込まれた P(3HB-*co*-3HA) を 8.6 wt%合成した。現在、PHA 蓄積率の向上を目指し、さらなる *R. eutropha* の分子育種を進めている。

1) Hokamura *et al*., *J. Biosci. Bioeng*. 120, 305-310（2015）

polyhydroxyalkanoate, PHA, Ralstonia eutropha

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

発表番号：2A036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 組換え大腸菌による乳酸ユニットを含む新規モノマー組成からなる生分解共重合ポリエステルの生合成

# Biosynthesis of novel biodegradable copolyesters containing lactate unit by recombinant strains of *Eschericia coli*

○後藤 早希[1]、中上 美歩[2]、外村 彩夏[3]、田口 精一[4]、松本 謙一郎[4]、田中 賢二[5]、松崎 弘美[1,2] ([1]熊本県大院・環境共生、[2]熊本県大・環境共生、[3]理研、[4]北大院・工、[5]近大・産理工)
○ Saki GOTO[1], Miho NAKAUE[2], Ayaka HOKAMURA[3], Seiichi TAGUCHI[4], Ken'ichiro MATSUMOTO[4], Kenji TANAKA[5], Hiromi MATSUSAKI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [3]RIKEN, [4]Hokkaido Univ., [5]Kinki Univ.)

【目的】ポリ乳酸（PLA）は透明性にすぐれた生分解性プラスチックであり、通常、化学重合により合成されるが、重合の際に重金属を用いること、合成のステップが多いなどの問題がある。近年、改変したポリヒドロキシアルカン酸（PHA）重合酵素を利用して微生物菌体内で乳酸（LA）ユニットを含む共重合ポリエステルの合成が報告されている[1)]。本研究では、LA ユニットをはじめ、さまざまなモノマー組成からなる共重合ポリエステルを合成することを目的とした。
【方法および結果】LA ユニットを含む生分解性共重合ポリエステルを合成するため、本研究ではプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB[1)]から *Ralstonia eutropha* 由来のプロモーター（$P_{Re}$）を除いたプラスミド pTV118NpctC1(STQK)AB$dP_{Re}$、さらに、*Lactobacillus acetotolerans* HT の D-乳酸脱水素酵素遺伝子（*ldhD*）を挿入したプラスミド pTV118NpctC1(STQK)ldhDAB$dP_{Re}$を作製した。これらのプラスミドをそれぞれ大腸菌 DH5α、XL1-Blue、LS5218 株に導入した組換え株を作製し、グルコースを唯一の炭素源として培養すると、LA ユニットと 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットからなる共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB)を合成した。微嫌気的に培養すると、LA ユニットの分率が高まり、約 30 mol%だった。また、3 つの株の中で、XL1-Blue が最も蓄積率が高かった。さらに、脂肪酸合成経路から PHA 重合酵素の基質である中鎖長の(*R*)-3-ヒドロキシアシル CoA（(*R*)-3-HA-CoA）を得るため、3-ヒドロキシアシル ACP:CoA トランスフェラーゼ遺伝子（*phaG*）と *Pseudomonas aeruginosa* の 3-ヒドロキシアシル CoA リガーゼ遺伝子（PA3924）を含むプラスミド pRTcAA-GMCL(Pa)を作製した。これを、pTV118NpctC1(STQK)ldhDAB$dP_{Re}$とともに大腸菌 3 株に導入した結果、DH5α株および LS5218 株は、グルコースから LA ユニット、3HB ユニット、そして中鎖長 3-ヒドロキシアルカン酸（3HA）ユニット（$C_8$～$C_{12}$）からなる新規共重合ポリエステル P(LA-*co*-3HB-*co*-3HA)を合成した。特に、LS5218 株は DH5α株と比べて 3HA 分率が高い共重合ポリエステルを合成した。

1)Taguchi, S. *et al.*, *PNAS*, 105, 17323-17327(2008)

biodegradable plastic, polyhydroxyalkanoate, PHA

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

発表番号：2A037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 林地残材糖化液からの効率的な乳酸生産

# Effective lactic acid production from forest thinnings

○荒井 隆益[1]、李 霞[1]、池 正和[2]、徳安 健[2]、小杉 昭彦[1] ([1]国際農研、[2]農研機構)
○Takamitsu Arai[1], Xia Li[1], Masakazu Ike[2], Ken Tokuyasu[2], Akihiko Kosugi[1] ([1]JIRCAS, [2]NARO)

林地残材(間伐材)は国内最大の未利用資源であり、これらの残材からリグニンを抽出し高付加価値製品への転換を目指しており、その抽出課程で排出される多糖類副産物（セルロース、ヘミセルロース)の高度利用技術の開発を行っている。多糖類副産物由来の糖液を用い、乳酸製造技術を開発し乳酸オリゴマー化による肥効調節型機能性肥料の開発を最終目標に研究を行っている。本発表ではリグニンを抽出した後に発生するセルロース残渣の糖化液から生分解性プラスチックの原料となる乳酸の効率的生産方法の検討を行った。

当研究室で単離された *Bacillus coaglans* 169 株、191 株と菌保存機関から取得した *B. coaglans* 標準菌種と糖の利用能について比較した。169 株は他の菌種に比べて幅広い糖利用能があり、キシロース、マンノース、アラビノース、ガラクトース、セロビオースなどリグノセルロースを構成する単糖や二糖類多糖を利用することができた。林地残材を糖化した糖液は、グルコースやキシロースが主要な単糖であるために 169 株は糖化液からの乳酸発酵に最適であると思われた。そのため 169 株を林地残材糖化液の乳酸発酵に用いることに決定した。169 株の最適な乳酸発酵条件を決定した。乳酸発酵の至適温度は、55℃であった。乳酸発酵の至適 pH は 5.5 から 6 の範囲であった。乳酸発酵に最適な植菌量の決定を行った。前培養液を培地の体積に対して 0.5%から 1%の範囲で植菌を行うことが最適であった。乳酸発酵に最適な振とうスピードを調べた結果、最適な振とうスピードは 150rpm 以下であることが分かった。決定した最適な培養条件を基に林地残材をリグノセルロース分解酵素で処理した糖化液を用いて乳酸発酵を行った。糖濃度は、総グルコース 62.5mg/ml、総キシロース 2.2mg/ml であった。糖化液を 80℃、１時間インキュベートし糖化液中の酵素を失活させた。pH は 4.5 であったため NaOH で pH6.0 に調製した。糖化液にミネラル及び酵母エキスを加えた培地を作成して乳酸発酵を行った。25ml の培養液に植菌し 55℃、振とうスピードは 150rpm で乳酸発酵を行った。発酵 72h 後に乳酸濃度 6.25%に達し、対糖収率 96%であった。高濃度の糖化液に対応できるかを調べるために濃縮した糖液を作成した。10.5%まで濃縮した糖化液を用いて乳酸発酵を行った結果乳酸の濃度は 9.4%であった。濃縮した糖液を用いた糖化液においても対糖収率 90%であった。ことから糖化液中に乳酸発酵を阻害する濃度の阻害物質は含まれていないものと思われた。

本研究は、内閣府「戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)地域のリグニン資源が先導するバイオマス利用システムの技術革新」により実施された。

cellulose, lactic acid, biomass

発表番号：2A038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 付着安定性を有する新規ウキクサ成長促進微生物の単離とその特徴

# Isolation and characterization of new duckweed growth-promoting bacteria with attachment stability

○山川 祐介[1]、三輪 京子[1,2]、森川 正章[1,2]（[1]北大院・環境、[2]JST-ALCA）
○ Yusuke Yamakawa[1], Kyoko Miwa[1,2], Masaaki Morikawa[1,2]（[1]Grad. School Environ. Sci., Hokkaido Univ., [2]JST-ALCA）

【背景と目的】
人口の爆発的な増加に伴う、資源の枯渇・食糧問題・環境への負荷の増大は深刻な問題である。近年、その解決策としてバイオマス資源の利用が注目されている。当研究室では、未利用バイオマス資源である水生植物ウキクサに注目した研究を行っている。ウキクサは、他の植物同様、二酸化炭素削減に貢献するだけでなく、根から窒素やリンを吸収する事で水質浄化機能も有する。更に、家畜飼料やバイオエタノールへの利用も可能である。一方、ウキクサに付着した微生物には、植物の成長を促進するものや、難分解性環境汚染物質を分解するものがいる。私たちは、この両者を連動させた、「植物バイオマスの増産と環境浄化システムの同時構築」を目指した研究を行っている。これまでに、北海道大学付属植物園の池水に自生するウキクサより植物成長促進能及び環境汚染物質分解能を有した、*Acinetobacter calcoaceticus* P23 の単離に成功している(Yamaga *et al.* 2010)。本研究では、P23 株よりもさらに高い成長促進活性を持つ微生物の取得を目的とした。
【方法】
まず無菌ウキクサを植物園池水に浸漬することにより、高いウキクサ付着能を有する細菌株を単離した。次に、それぞれの細菌懸濁液に無菌ウキクサ 10 葉状体を植えて光照射下で 4 時間培養し細菌を付着させた。4 時間後、植物培地に 2 葉ずつ移植し光照射下で 10 日間培養した。10 日後、葉状体数を計測し成長促進活性を評価した。同時に、CFU（Colony Forming Unit）を指標として、ウキクサへの付着菌数を調べた。この際、ウキクサを根部と葉状体部に分離して別々に CFU を測定した。次に、単離した細菌と P23 株を共付着させた場合の成長促進効果についても検証した。
【結果】
今回、P23 株よりも高い付着能と成長促進活性を持つ *Pseudomonas* 属細菌の取得に成功した。また、P23 株は葉に優先的に付着する細菌であるのに対して、この *Pseudomonas* 属細菌は、根に特異的に付着する細菌である事がわかった。従って、P23 株とは異なった性質を持つ成長促進細菌の単離に成功したと考えられる。一方、本菌株と P23 株を共付着させても相加的な成長促進効果は認められなかった。現在は、本菌株の成長促進活性と付着能のさらなる持続性に関して評価している。

duckweed, biomass

発表責任者：山川祐介（yamakawa.hokudai@gmail.com）

発表番号：2A039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Development of a simple and rapid method to estimate decomposition rate of organic materials

○Nadda KHONGSAY, Kiwako S. ARAKI, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Motoki KUBO
(Ritsumeikan Univ.)

Organic materials are widely used in agriculture for growing plants. It can supply nutrients for plants by improving physical, chemical and biological conditions of soil. Since organic materials contain many types of organic compounds, their effect on soils may differ depending on the components in the materials. Thus, the characterization of organic materials is crucial in order to use them effectively.

After applying in soil, the organic materials are decomposed by microorganism and converted into inorganic compounds. The inorganic compounds released from the organic materials are used by the plants. If the decomposable organic compounds are higher, the growth of microorganisms is enhanced. Therefore the microorganisms can be used as an index to estimate the decomposability of organic materials in soil.

The aim of this study was to develop methods to measure decomposition rates of organic materials.

Five types of organic materials (rice husk, chicken manure, rapseed oil cake, cow manure, and bark manure) were used for estimating their decomposition rate in soil. Each organic material was mixed (3% w/w) in two types of soil (sandy soil and artificial soil). The soil-organic material mixture was inoculated with culture of *Bacillus subtilis* (natto) (1% v/w). Fully grown culture of *B. subtilis* (natto) in LB liquid medium was used. After incubating at 30 °C, samples were collected every 7 days for four weeks. The bacterial number in the sample was analyzed by the eDNA quantification method. The bacterial number was the highest in rapseed oil cake mixed soil followed by chicken manure, rice husk, cow manure, and bark manure. Similar tendency was observed in both soils, but the bacterial number was higher in artificial soil compared to that in sandy soil. Analysis of *B. subtilis* (natto) seems to be an effective method to evaluate decomposability of organic materials in soil.

Organic material, decomposition, Bacillus subtilis (natto)

発表番号：2A040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# スギリグニンを分解する新規菌類の探索

# Screening of fungi degrading Japanese cedar lignin

○土田 博子、松本 朋子、菊池 淳、松井 南（理研 CSRS）
○Hiroko Tsuchida, Tomoko Matsumoto, Jun Kikuchi, Minami Matsui (RIKEN CSRS)

【背景･目的】リグニンは植物系バイオマスの約２０−３０%を占める細胞壁の主成分の一つであり、林地残材においても約３０%はリグニンだが、その利活用は十分になされていない。本研究では、スギリグニンを対象とした菌類の分解を目的として、高分解菌の単離、解析を行う。
針葉樹リグニンはグアイアシル（G）リグニンのみを基本構造とし、広葉樹リグニンと構造が異なる。一般に、針葉樹リグニンは広葉樹リグニンより微生物分解されにくく、分解する白色腐朽菌は少ない。本研究では、菌類の宿主に注目し、スギリグニンの分解能が高いと予測される菌類を選抜した。それらの菌株のうち、カルチャーコレクションに保管されている、スギリグニンを分解する菌類のスクリーニングを行った。
【方法･結果】一次スクリーニング法として、難分解性色素である RBBR (Remazol Brilliant Blue. R) の分解活性の検定を行った。RBBR を含む PDA 培地で１４日以上培養し、分解活性を観察した。二次スクリニーングでは Sundman&Näse（1971）の方法を用いた。RBBR の分解速度を指標とし、スギソーダリグニンを含む固体培地で菌類を培養した後、リグニンの染色を行った。その結果、スクリーニングした４０菌株のうち、９菌株の白色腐朽菌と落葉分解菌がスギソーダリグニンを分解することが示唆された。
次に、菌類により分解されたスギソーダリグニン分解物の構造解析を行うため、NMR サンプル調製・計測・解析方法の検討を行った。サンプル調製は、菌類をスギソーダリグニンを含む固体培地で培養した後、培地を凍結乾燥、粉砕した後、アセトンと水で抽出し NMR で解析した。現時点では、プロトン 2DJ の測定結果から芳香族領域にいくつか新しい分解産物のシグナルが増えており、菌類によるリグニン分解物の存在が示唆されている。また、今後はスクリーニングされた菌類において、リグニン分解に関与する酵素の活性の特性と遺伝子群を解析する予定である。
【謝辞】本研究は、「地域リグニン資源が先導するバイオマス利用の技術革新」研究コンソーシアム：地域リグニン資源システム共同研究機関（SIP リグニン）の一環として実施した。

biomass, lignin, fungi

発表番号：2A041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 竹バイオマスのバイオリファイナリー
# Bamboo Biomass for Biorefinery

○椎葉 究[1]、新井 一斗[1]、安部 智子[1]、望月 瑠也[1]、関本 智登[1]、小笠原 武大[1]、吉田 周平[2]、内園 浩幸[2]、平木 純[2] ([1]東京電機大学、[2]JNC 株式会社)
○ Kiwamu SHIIBA[1], Kazuto AKAI[1], Tomoko ABE[1], Ryoya MOCHIDUKI[1], Tomotaka SEKIMOTO[1], Takehiro Ogasawara[1], Syuhei YOSHIDA[2], Hiroyuki Uchizono[2], Jun Hiraki[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]JNC Corporation)

竹はイネ科に属していて、国内では大量の繁茂が環境問題を引き起こすほどバイオマスとして多く存在しており、成長が早く、リグニンが木質と比較して少ない点から、バイオ資源として注目されている。実際、竹をバイオエタノール原料として研究が行われきたが、リグニンを分解する前処理方法の高エネルギー化や濃硫酸や高アルカリを用いるような糖化処理とセルラーゼ使用による高コスト化、廃液処理・残渣処理などの環境的な課題などにより、実用化には至っていない。本研究では、竹を高温（高圧力）処理することにより、ヘミセルロースの加水分解物（ＢＯＳ）を採取し、有価物成分として回収したのち、その残渣から強酸や強塩基を用いることなくホロセルロース部分を抽出・糖化しバイオエタノールを生産するバイオリファイナリー方法について検討してきた。今回、竹を温度条件のことなる高温（高圧）で処理したのち、有価物を回収後、1%塩酸水-高温処理により比較的容易に糖化し、特別に海洋から選抜した酵母を用いてエタノール化する方法を検討した。

（方法）

- 孟宗竹の粗粉砕物を水洗し、圧力と高温(120℃、150℃、180℃、5 分)により撹拌処理後、吸引ろ過と蒸留水による洗浄をそれぞれ 2 回行い、分離したろ液をヘミセルロース分解物(BOS)とした。
- BOS 中の成分の抗酸化能を DPPH 法により求めた。
- その残渣に 1%塩酸水を 1：5 の割合で加え、圧力と高温(180℃、5 分)で同様に攪拌処理後、吸引ろ過と蒸留水による洗浄をそれぞれ 2 回行い、水溶液(CBS)を回収した。
- CBS をエバポレータを用いて乾燥させた後培地調製し、海洋水から分離した *Candida parapsilosis* TK-101 株（5・6 炭糖をエタノール化可能な選抜株）を用いてエタノールの生産試験した。
- 液体サンプルの糖構成は 2N TFA で加水分解後、HPLC（LiChroCART ｶﾗﾑ、RI）により測定した。

（結果）

・高温で処理するほど抗酸化性が強く、180℃の場合、竹 25g からアスコルビン酸換算で 270μmol ASA 換算の抗酸化能をもつ BOS 成分が得られ、従来 120℃による方法の 5 倍程度高くなった。

・BOS 回収後の残渣、濃硫酸を用いず 1%塩酸水という比較的穏やかな条件で糖を抽出し、海洋から新たに単離した酵母を用いてエタノールの生産試験を行ったが、特定の夾雑化合物によりエタノール化が阻害された。しかし、その阻害物質を取り除くことで、BOS 抽出残渣から、強酸や強塩基を用いることなくバイオエタノールを生産する技術が確立された。

bamboo, bioethanol, antioxidant

発表責任者：椎葉　究（shiibak@mail.dendai.ac.jp）

発表番号：2A042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 海産バイオマス成分を利用可能なポリヒドロキシアルカン酸合成微生物の探索

# Isolation and screening of microorganisms for polyhydroxyalkanoate production from components of marine biomass

○幸田 有以、花角 優太、山田 美和、下飯 仁（岩手大農）
○Ai YUKITA, Yuta HANAZUMI, Miwa YAMADA, Hitoshi SHIMOI (Iwate Univ.)

【目的】

海藻をはじめとする海産バイオマスは、海に囲まれた島国である我が国において利用が期待される資源である。海藻の養殖が盛んな地元岩手県では、生産、加工の段階で廃棄される部分が大量に存在し、廃棄部位の有効活用が望まれている。微生物が生合成するポリヒドロキシアルカン酸（PHA）は、生分解性を有し、バイオマスを原料として合成できることから、環境低負荷型プラスチックとして注目されている。これまでに PHA 合成菌は多数報告されているが、海藻成分を原料とした PHA 合成の報告は少なく、特にアルギン酸を資化可能な PHA 合成菌は全く報告がない。そこで、本研究では、新規に自然界のサンプルからスクリーニングを行い、海藻に含まれる炭素源であるアルギン酸、セルロース、マンニトールを資化可能な PHA 合成菌の取得、および PHA 高蓄積条件の検討を目指した。

【方法・結果】

微生物サンプル源として、海藻成分を資化する微生物が豊富に存在していることを期待し、海藻を餌としているカイや海泥などを使用した。これらのサンプルと単一炭素源としてアルギン酸、セルロース、マンニトールを用いた PHA 合成用培地を pH4.0、7.0、9.0 で調製し、集積培養を行った。その後培養液を、ナイルレッド含有 PHA 合成用プレート培地に播種し、赤呈色を示したコロニーを PHA 合成菌候補として選抜した。結果、アルギン酸、セルロースを炭素源とした培地では赤呈コロニーが得られなかったが、マンニトールを炭素源として用いた際、106 株の PHA 合成菌候補が得られた。続いて、候補菌の液体培養を行って得られた培養菌体を凍結乾燥し、クロロホルム抽出を行ってポリマーを抽出した。抽出したポリマーを GC-MS 分析に供して PHA 合成を確認した結果、24 株の PHA 合成菌を取得した。取得菌のうち蓄積率が安定して高い 1 株を選抜し、合成した PHA の $^{1}$H-NMR 分析を行ったところ、本菌株が合成した PHA は、基本的な PHA であるポリヒドロキシブタン酸（PHB）であることが明らかとなった。さらに、本菌株の PHB 合成に適した培地中の炭素源濃度、pH および培養時間を検討したところ、マンニトール 10%、pH 5.0、3 日間の条件で培養した際に PHB 蓄積率が最も高くなった（43%）。また、本菌株は海洋サンプルから採取しため、培地中の塩濃度に関しても検討したが、NaCl 濃度が 3%以上では著しく PHB 蓄積率が低下し、NaCl 無添加の培地を用いた際に PHB 蓄積率が最も高くなることが確認された。

seaweed, polyhydroxyalkanoate, mannitol

発表番号：2A043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオ燃料電池のための好熱菌由来酵素を用いたアミノ酸人工代謝経路の構築

# Construction of amino acid artificial metabolic pathway using thermophilic enzymes for biofuel cell.

○田中 志乃[1]、里村 武範[2,3]、坂元 博昭[2]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[2,3] ([1]福井大学工、[2]福井大院工、[3]福井大生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大工)
○Shino TANAKA[1], Takenori SATOMURA[2,3], Hiroaki SAKAMOTO[2], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[2,3] ([1]Univ. Fukui, [2]Grade. Sch Eng., [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech)

[目的]

バイオ燃料電池は、酸化還元酵素を用いて基質である糖やアルコールなどが持つ化学エネルギーを電気エネルギーに変換するデバイスである。バイオ燃料電池は安全であり小型化、軽量化が可能といったメリットがある。しかしながら酵素の安定性の低さに起因する電池の低耐久性や酵素-電極間の電子伝達効率の低さに起因する低電池出力がデメリットになっている。そこで我々の研究室では、高い安定性を有する好熱菌由来酵素を複数利用し多段階の酸化反応を行うことで電池の耐久性と出力の低さを解決しようと試みている。本研究では L-プロリン、L-ヒドロキシプロリンを燃料とした多段階酸化反応を行う電極の開発を行った。

[実験・結果]

L-プロリン、L-ヒドロキシプロリンを燃料とした多段階酸化反応を触媒する代謝経路を構築するために *Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素、*Thermus thermophilus* 由来 NAD 依存性ピロリン-5-カルボン酸脱水素酵素、*Pyrococcus horikoshii* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素-NADH 脱水素酵素複合体、*Pyrobaculum islandicum* 由来 NAD 依存性グルタミン酸脱水素酵素の 4 種類の好熱菌由来酵素を大腸菌から組換えタンパク質として発現し精製した。これらの精製した組換えタンパク質を用いて L-プロリンの多段階酸化反応を分光光度計で測定したところ、4 種類の酵素での電子伝達が確認できた。

次に、これらの酵素をグラッシーカーボン電極に固定化し電気化学的な評価を行った。これら酵素混合液にナフィオン溶液を加えグラッシーカーボン電極に固定化した。電気化学測定は、作成した酵素-ナフィオン固定化電極を作用極とする 3 電極系によりサイクリックボルタンメトリー(CV)で評価した。その結果、*Aeropyrum pernix* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素と *Pyrococcus horikoshii* 由来色素依存性 L-プロリン脱水素酵素-NADH 脱水素酵素複合体を固定化した電極において、酵素の電子伝達が確認できた。現在、すべての酵素を固定化した電極での酵素の電子伝達を確認している。

biofuel cell, dye-linked dehydrogenase, NAD-dependent dehydrogenase

発表番号：2A044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ゲノム解析による微生物燃料電池での発電に関わる遺伝子の探索

# Comparative Genomic Analysis for Genes Involved in Power Production in Microbial Fuel Cells

○井上 謙吾[1]、河野 好裕[1]、小椋 義俊[2]、林 哲也[2]([1]宮崎大農、[2]九大医)
○ Kengo INOUE[1], Yoshihiro KAWANO[1], Yoshitoshi OGURA[2], Tetsuya HAYASHI[2] ([1]Univ. Miyazaki, [2]Kyushu Univ.)

【背景と目的】微生物燃料電池は微生物を用いて有機化合物の化学エネルギーを電気エネルギーに変換する装置である。微生物燃料電池での発電には、有機物分解に伴って生じる電子を電極に伝える発電菌の働きが必須である。発電菌には多様な微生物種が報告されているが、その中でも *Geobacter sulfurreducens* は特に高い発電能力を持ち、複合系の微生物燃料電池でもアノード表面でその近縁種が優占種となることが知られている。これまでに、*G. sulfurreducens* の標準株である PCA 株の他に、PCA 株よりも高い発電能力をもつ KN400 株のゲノムが明らかにされているが、微生物燃料電池で高い発電能力を発揮するために必要とされる遺伝子については、報告例は極めて少ないのが現状である。そこで、本研究では、高い発電能力に必要な遺伝子を同定することを目的として、宮崎県内から新たに分離した発電菌について全ゲノムを決定し、ゲノム既知の発電菌との比較ゲノム解析を行った。
【方法と結果】県内河川底泥を植種源として酢酸を唯一の電子供与体とする微生物燃料電池（単槽エアカソード微生物燃料電池）で運転し、負極（グラファイト棒）に付着したバイオフィルムより、9 株の発電菌を分離した。16S rDNA 配列を解析した結果、全て *G. sulfurreducens* であった。各株を *G. sulfurreducens* YM18、YM35、YM40、YM44、YM64、YM75、YM82、YM87、YM90 株と命名し、純粋培養系の微生物燃料電池での発電能力を検証した。その結果、9 株いずれも発電開始時期が PCA 株よりも早く、YM87 株を除いていずれも最大出力が PCA 株よりも高かった。9 株のうち YM18 株についてはその全ゲノムを決定し（フィニッシングまで完了）、他の 8 株についてはドラフトゲノムを得た。現在、既知の発電に関わる遺伝子の有無、および、KN400 株と YM18 株など高い発電能力を持つ株にのみに共通して見いだされる遺伝子の詳細を明らかにするために、比較ゲノム解析を進めている。

Geobacter, Microbial Fuel Cells, Bioelectrochemical System

発表責任者：井上謙吾（kinoue@cc.miyazaki-u.ac.jp）

発表番号：2A045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオ電池のための超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼを用いたバイオカソードの構築

# Construction of biocathode for biofuel cell using multicopper oxidase from hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*

○高村 映一郎[1]、坂元 博昭[1,3]、里村 武範[2,3]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3]（[1]福井大学院・工・繊維、[2]福井大学院・工・生物応用化、[3]福井大学・生命セ、[4]香川大農、[5]大阪工大）
○ Takamura Eiichirou[1], Hiroaki Sakamoto[1,3], Takenori Satomura[2,3], Haruhiko Sakuraba[4], Toshihisa Ohshima[5], Shin-ichiro Suye[1,2,3] ([1]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech.)

［緒言］

酵素をエネルギー変換素子とするバイオ電池は環境負荷のない次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や電子移動効率の問題があるため、未だ実用化には至っていない。本研究では、長期間高出力に駆動可能なバイオ電池の実現を目指し、耐熱性酵素と graphene nanoplatelets を交互積層した複合体を作製し、これを電極界面に修飾した。ここでは高い安定性を有する超好熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来マルチ銅オキシダーゼ (McoP) をバイオ電池のカソード触媒として用いた。そして、酵素-電極間の電子移動効率を高めるため、graphene nanoplatelets とメディエータである ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonicacid)) を一体化した複合材料 (graphene-ABTS) を用いてバイオカソード電極を構築した。

［実験］

McoP は組換体大腸菌より精製した。ABTS と graphene nanoplatelets を混合し 48 時間撹拌することで graphene nanoplatelets の分散を行なった。分散液を遠心分離した後、沈殿した graphene nanoplatelets を回収することにより未反応の ABTS を除去し、graphene-ABTS を得た。McoP と graphene-ABTS を Layer-by-Layer (LbL) 法により電極上に交互積層させた。電気化学測定は、作製した McoP/graphene-ABTS 交互積層電極を作用極とする３電極方式によりサイクリックボルタンメトリー(CV)で評価した。

［結果と考察］

graphene-ABTS の CV において ABTS に基づく酸化還元波が確認されたことから、graphene 表面へ ABTS が吸着し、電気化学反応していることがわかった。LbL 法によって McoP と graphene-ABTS を積層させたところ、積層数に応じて ABTS を介した酸素の還元電流が増大した。10 層の McoP/graphene-ABTS 交互積層電極の特性を評価したところ、酸素の還元における本電極の電流密度は 93.1 μA/cm$^2$ であった。今後、さらに積層数を増加させた電極の検討を行なう。また、今回の電極界面設計へ配向性を導入することにより電流密度向上を目指す。

biofuel cell, biocathode, carbon nano material

発表番号：2A046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来グルタミン酸脱水素酵素を用いたバイオアノードの電極表面解析

# Analysis of electrode surface of bioanode with glutamate dehydrogenase from hyperthermophile *Pyrobaculum islandicum*

○小松 丈紘[1]、山崎 晃司[2]、坂元 博昭[2]、里村 武範[1,3,6]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,3,6]
([1]福井大学・工・生物応用化、[2]福井大院・工・繊維、[3]福井大院・工・生物応用化、[4]香川大農、[5]大阪工大、[6]福井大学・生命セ)
○Tomohiro KOMATSU[1], Koji YAMAZAKI[2], Hiroaki SAKAMOTO[2], Takenori SATOMURA[1,3,6], Haruhiko SAKURABA[4], Toshihisa OHSHIMA[5], Shin-ichiro SUYE[1,2,3,6] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech., [6]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui)

## ［諸言］

現在、バイオ燃料電池 (BFC)には常温菌由来の酵素がアノード用触媒として多く用いられているが、酵素の長期安定性が低いことが電池寿命に影響しており実用化への課題となっている。本研究では超好熱菌 *Pyrobaculum islandicum* 由来 NAD 依存型グルタミン酸脱水素酵素 (Pis-GDH)と *Pyrococcus horikoshii* 由来 NADH 脱水素酵素をサブユニットに含むプロリン脱水素酵素複合体 (PDH)を用いて、連続酵素反応により燃料となるグルタミン酸を酸化し、NADH とメディエータを介して電極との電子伝達を行う BFC 用アノードの構築を検討した。

## ［実験］

**・自己組織化単分子膜 (SAM)を用いた 2 酵素の金電極上の固定化**　3 ニトリロ酢酸基 (NTA)とスクシンイミド基 (NHS)を末端に有したジスルフィド溶液をそれぞれ用いて金電極表面へ混合 SAM を形成した。その後 Pis-GDH を共有結合で固定化し、NTA 基に $Ni^{2+}$を配位させ PDH 末端部位に導入されたヒスチジンタグと $Ni^{2+}$との相互作用により PDH を電極に配向固定化した。電極表面において円滑な酵素反応を行うために混合 SAM に用いられる Dithiobis(succinimidyl undecanoate) (DSU)と Dithiobis($C_2$-NTA) ($C_2$-NTA)の混合モル比を変化させることで 2 酵素の固定化量比を制御した。水晶振動子マイクロバランス法 (QCM)により固定化された 2 酵素の比を算出した。

**・Pis-GDH と PDH2 の 2 酵素系における酵素反応の電気化学的評価**　Pis-GDH と PDH ともに上記の方法で電極に固定化し、メディエータとしてフェロセンカルボン酸を用いて作成した電極を作用極としてサイクリックボルタンメトリー (CV)を行い、酵素電気化学反応を評価した。

## ［結果・考察］

QCM により混合 SAM に用いられる DSU と $C_2$-NTA の混合モル比に従って Pis-GDH と PDH の固定化量比も変化した。この結果をもとに電気化学的評価を行った結果、DSU と $C_2$-NTA の混合モル比を調整して 1:4 とした際に 2 酵素がほぼ等モル固定化されることがわかり、この時に基質であるグルタミン酸の酸化に基づく電流応答も最大となった。このことより、2 酵素のモル比が等しい場合最も大きい電気化学的な触媒反応効率が得られることがわかった。

biofuel cell, bioanode, bio device

発表番号：2A047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 超好熱菌 *Pyrobaculum aerophilum* 由来のグルコース脱水素酵素を用いたバイオアノードの構築

# Construction of bioanode using glucose dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon, *Pyrobaculum aerophilum*

○殿岡 愛菜[1]、向當 綾子[2]、坂元 博昭[2,6]、里村 武範[1,3,6]、櫻庭 春彦[4]、大島 敏久[5]、末 信一朗[1,2,6]
([1]福井大・工・生物応用化、[2]福井大院・工・繊維、[3]福井大院・工・生物応用化、[4]香川大農、[5]大阪工大、[6]福井大・生命セ)
○AINA TONOOKA[1], AYAKO KOTO[2], HIROAKI SAKAMOTO[2,6], TAKENORI SATOMURA[1,3,6], HARUHIKO SAKURABA[4], TOSHIHISA OHSHIMA[5], SHIN-ICHIRO SUYE[1,2,6] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Kagawa Univ., [5]Osaka Inst. Tech., [6]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui)

[諸言] 酵素を触媒とする反応を用いて電気エネルギーを得るバイオ電池は環境負荷の少ない次世代エネルギーの一つとして注目されている。しかし、酵素の長期安定性や電流密度の問題から実用化には至っておらず、長期間利用可能で高出力なバイオ電池の実現が求められている。本研究では長期安定性を有する超高熱性アーキア *Pyrobaculum aerophilum* 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQ-GDH)を用いてアノードを構築した。基質と酵素間の反応を円滑にするため、酵素の電極表面に対する方向を制御して固定化することによりアノードの高出力化を目指した。

[方法]

**・His-tag 導入 PQQ-GDH の発現および精製** PQQ-GDH(His-tag)をコードするプラスミド pET15bPaeAsd を用いて *E. coli* を形質転換し、本菌株を大量培養し、菌体破砕、熱処理した。Ni キレーティングカラムを行い、PQQ-GDH を精製した。

**・PQQ-GDH 高配向固定化電極の作製** 100 mM 硫酸銅を含む 100 mM 塩化ナトリウム溶液中で 300 秒定電位印加(-0.3 V)することにより金電極表面に銅を電析させた。その後、SP 水で電極表面を洗浄し、PQQ-GDH(His-tag)溶液に浸漬し酵素分子の His-tag と銅のアフィニティーを利用して酵素を高配向固定化した。作成した電極上での酵素と基質の反応をサイクリックボルタンメトリー(CV)にて電気化学的に評価した。

**・PQQ-GDH 無配向固定化電極の作製** 5% 二クロム酸カリウムを含む 10% 硝酸溶液中で 10 秒定電位印加(-1.2 V)することによりグラッシーカーボン(GC)電極にカルボキシル基を導入した。Sulfo-NHS および EDC を含む溶液中に GC 電極を浸漬させ、導入したカルボキシル基を活性化させた。この電極を PQQ-GDH(His-tag)溶液に浸漬することにより PQQ-GDH 表面のアミノ基とカルボキシル基を反応させ共有結合により電極表面に PQQ-GDH(His-tag)を無配向固定化した。作成した電極上での酵素と基質の反応を CV で評価した。

[結果と考察] PQQ-GDH 固定化電極の CV の結果より、D-グルコースの存在下において-0.1V 付近に酸化波が現れ、メディエータの非存在下で PQQ-GDH と電極の間で直接電子移動が起きることが確認された。酵素を高配向固定化させた電極では無配向固定化電極と比較して 93 倍の電流密度を得た。これは、His-tag が酵素の基質結合部位の反対側に位置し、高配向固定化された酵素の基質結合部位がバルク側を向くことにより、基質の酵素へのアクセスが容易になったためだと考える。

bioanode, biofuel cell, direct electron stansfer

発表番号：2A048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# プローブ修飾ナノ粒子を用いたメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の電気化学的 DNA バイオセンシング

# Sensitive electrochemical DNA biosensing for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using nanoparticle modified probe

○中村 卓登[1]、澤井 崇行[2]、渡邊 和也[2]、坂本 博昭[2]、吉見 泰治[1,3]、里村 武範[1,3,4]、末 信一朗[1,2,3,4]
([1]福井大・工・生物応用化、[2]福井大院・工・繊維、[3]福井大院・工・生物応用化、[4]福井大・生命セ)
○ Takuto NAKAMURA[1], Takayuki SAWAI[2], Kazuya WATANABE[2], Hiroako SAKAMOTO[2], Yasuharu YOSHIMI[1,3], Takenori SATOMURA[1,3,4], Shin-ichiro SUYE[1,2,3,4] ([1]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Fac. Eng., Univ. Fukui, [2]Dept. Front. Fib. Technol. Sci., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [3]Dept. Appl. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [4]Res. Edu. Prog. Life. Sci., Univ. Fukui)

[背景]メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は院内感染を引き起こす有害微生物として知られており、感染症を未然に防ぐために MRSA をはじめとする有害微生物に対する迅速で簡便な検出方法が求められている。しかし、従来の検出方法では操作が煩雑で時間がかかる等の問題点が挙げられる。そこで、プローブと DNA のハイブリダイゼーションを用いた MRSA の電気化学的センシングシステムを考案した。MRSA 固有の塩基配列として知られる *mecA* 領域と相補的な塩基配列を持つ、2 つのプローブを金ナノ粒子(AuNP)、磁気ナノ粒子(MNP)にそれぞれ修飾した。また AuNP には電気的なシグナルを得るためにフェロセンも修飾した。これにより 2 種のナノ粒子に修飾したプローブが MRSA 由来ゲノム DNA とハイブリダイゼーションにより複合体を形成する。この複合体を磁気分離により回収し、AuNP 上のフェロセンの酸化電流を測定することで検出を行った。本法での検出限界は DNA レベルで 1pM であった。しかし MRSA の拡散リスクを考慮するとさらなる感度の向上が必要であると考えられる。そこで、本研究では、3 つのフェロセン分子を末端に有したデンドロン(以下、分岐フェロセンとする)を設計・合成し、AuNP に修飾されるフェロセンを増やすことにより検出感度向上を図った。
[方法]AuNP にフェロセン単体と分岐フェロセンを修飾させたものをそれぞれ作成した。修飾にはチオール基による Au-S 結合を用いた。電気化学測定には、作用極と対極を炭素、参照極を銀塩化銀とした 3 電極型スクリーンプリント電極を用いた。+250 mV を印加することでクロノアンペロメトリー法により測定サンプル中のフェロセンの酸化電流を測定し、フェロセンの酸化電流値の比較を行った。次に MRSA よりゲノム DNA を抽出し、熱処理によって 1 本鎖 DNA を得た。得られた 1 本鎖 DNA に修飾した AuNP、MNP を混合することでハイブリダイゼーションさせ、磁気分離によってハイブリダイゼーション産物を回収した。また、フェロセンの酸化電流を増幅するために D-グルコースとピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を用いた。
[結果及び考察]測定サンプルの電流応答を測定したところ、酸化電流値がフェロセン単体と比べて分岐フェロセンを修飾したものでは増大した。これにより検出感度が向上した。

nanoparticle, DNA sensor, magnetic separation

発表番号：2B001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# サナギタケ（*Cordyceps militaris*）由来の機能性化合物の探索

# Search for functional compounds from *Cordyceps militaris*

○邱 偉涛[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[3]、西田 浩志[4]、平井 浩文[1,3,5]、河岸 洋和[1,3,5]（[1]静大院・創造、[2]宇都宮大・バイオ、[3]静大農・応生化、[4]新潟薬科大・応生科、[5]静大・グリーン研）
○Weitao QIU[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[3], Hiroshi NISHIDA[4], Hirofumi HIRAI[1,3,5], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,5] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [2]University Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya Univ., [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [4]Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [5]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫に寄生し子実体を形成するキノコの総称であり、世界的に約 400 種が確認されている。その一種であるサナギタケ（*Cordyceps militaris*） は鱗翅目昆虫の蛹に対する病原体であり、北半球の大部分で発生する[1)]。サナギタケは東アジアにおいては、古くから栄養補助食品や漢方として広く利用されており、貴重な薬材として認識されている。以前の研究により、サナギタケ菌糸体から cordycepin などの nucleotide 類が単離されている[2)]。また、サナギタケ子実体からもこの化合物が単離されているほか、新規 steroid 化合物および数種の macrolide 化合物の単離が報告されている[3-5)]。その一方で、カイコに人工的に感染させて発生させたサナギタケ子実体から、cordycepin、adenosine および mannitol の単離が報告されているが、それ以外の研究はなされていない[5)]。そのため、我々はカイコから発生させたサナギタケ子実体からの生理活性を持つ機能性化合物の探索を目的とした。

【方法・結果】

サナギタケ子実体を EtOH、acetone により順次抽出を行った。抽出を減圧濃縮後、分液ロートを用いて順次液–液分配することによってそれぞれ *n*-hexane 可溶部、EtOAc 可溶部、*n*-BuOH 可溶部及び水可溶部にそれぞれ分画した。各種活性試験に供したところ、*n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部は癌細胞に対する増殖阻害活性、脂肪細胞に対する脂肪蓄積阻害活性などの活性を示した。その活性試験の結果を指標に、*n*-hexane 可溶部および EtOAc 可溶部を各種クロマトグラフィーに供し、化合物を単離した。現在、NMR や MS などの各種機器分析により、単離した化合物の構造解析を行う一方で、更なる化合物の単離を試みている。また、単離した化合物を各種活性試験に供することにより、その機能性を検討している。

1) Sung, G., *et al.*, *Studies in Mycology*, 57, 5 (2007).
2) Cunningham, K.G., *et al., Nature*, 166, 949 (1950)
3) Sun, J., *et al.*, *Chromatographia*, 63, 3464 (2015).
4) Rukachaisirikul, V., *et al.*, *Journal of Natural Products*, 67, 1953 (2004)
5) Wen, L., *et al.*, *Shipin Kexue*, 25, 155 (2004)

*Cordyceps militaris*, mushroom, compound isolation

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンとその結合物質の糖鎖構造解析

# A lectin from the mushroom *Cordyceps militaris* and sugar-chain structure analysis of its binding molecules.

○稲吉 里美[1]、竹島 愛乃[1]、鈴木 智大[2]、崔 宰熏[1]、道羅 英夫[3]、加藤 竜也[1,3]、朴 龍洙[1,3,4]、三家本 利之[5]、佐伯 潤[5]、小林 夕香[6]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,3,4] ([1]静大農・応生化、[2]宇都宮大・バイオ、[3]静大・グリーン研、[4]静大院・創造、[5]にちはら総研、[6]J-オイルミルズ)

○Satomi INAYOSHI[1], Yoshino TAKESHIMA[1], Tomohiro SUZUKI[2], Jae-Hoon CHOI[1], Hideo DOHRA[3], Tatsuya KATO[1,3], Enoch Y. PARK[1,3,4], Toshiyuki MIKAMOTO[5], Jun-David SAEKI[5], Yuka KOBAYASHI[6], Hirohumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]UniversityCenter for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [5]Nichihara Research & Development Laboratories Inc, [6]J-Oil mills INC)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称であり、世界的に約 400 種が確認されている。その 1 種 *Cordyceps militaris* はサナギタケと呼ばれ、栄養補助食品や漢方として広く利用されており、東アジアにおいては、中国医学で癌患者の治療薬として古くから用いられてきた。また、サナギタケが含有する化合物としては cordycepin や多糖類などが報告されている [1, 2]。しかし、この菌の感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明である。また、レクチンは糖結合能を有し、細胞間の相互作用など様々な働きを担っている。我々は既にサナギタケ由来レクチン（CML）の部分精製を行い、カイコ中に存在する CML に結合する物質が Sex-specific storage-protein 2 である可能性を報告している [3]。そこで本研究では、(1)サナギタケ由来レクチンの遺伝子クローニング・異種発現系の構築、(2) カイコ中に存在する CML に結合する物質の糖鎖構造解析を行なうことを目的とした。

【方法・結果】

(1)サナギタケ子実体を 10 mM リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で 4℃、2 時間抽出し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を各種クロマトグラフィーに供し精製を行った。得られた CML を LC-MS/MS に供した結果、15 kDa 付近のタンパク質がレクチンモチーフ(QXW)を有するレクチンであることが示唆されたため、遺伝子クローニングを行った。現在酵母（*Kluyveromyces lactis*）を用いた異種発現の構築を行っている。

(2)カイコの蛹をリン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で 4℃、2 時間抽出し粗抽出液を得た。得られた粗抽出液を各種クロマトグラフィーに供し Sex-specific storage-protein 2 を得た。得られたタンパク質を LC-MS/MS・MALDI-TOF-MS 解析に供し糖鎖構造解析を行った結果、*N* 型糖鎖・*O* 型糖鎖の存在およびその糖鎖付加部位を明らかにした。現在さらに詳細に解析を行うため、ヒドラジンを用いた糖鎖の切り出しを行っている。

1) Cunningham, KG., et al., *Nature*, 166, 949 (1950).
2) Yu, R., et al., *Fitoterapia*, 75, 465 (2004).
3）竹島ら、2015 年度農芸化学会大会講演要旨集

*Cordyceps militaris*, lectin, mushroom

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 高等菌類の子実体形成物質の探索

# Search for fruiting body-inducing compound(s) in higher fungi

○呉 静[1,2]、崔 宰熏[3]、平井 浩文[1,3]、河岸 洋和[1,3,4]（[1]静大・グリーン研、[2]JSPS、[3]静大農・応生化、[4]静大院・創造）
○Jing WU[1,2], Jae-Hoon CHOI[3], Hirofumi HIRAI[1,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]RIGST, Shizuoka Univ., [2]JSPS, [3]Grad. Sch. of Agric., Shizuoka Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ.)

【目的】多くの生物種は、特有のホルモンを有している。しかし、高等菌類であるキノコにおけるホルモンは全く明らかにされていない。キノコ（子実体）を発生させる高等菌類は、胞子から菌糸、菌糸から子実体、そして子実体から胞子という生活環を持っている。この生活環の各段階はキノコ共通のホルモンによって制御されているという仮説を持つに至った。本研究ではキノコ生活環制御ホルモン、特に子実体発生（発茸）ホルモンの発見を目的とした。
【方法および結果】当研究室ではフェアリーリングを引き起こすキノコであるコムラサキシメジから植物成長物質、2-azahypoxanthine(AHX)とimidazole-4-carboxamide(ICA)を発見した[3,4]。その後、植物体内でのAHXの代謝産物2-aza-8-oxohypoxanthine(AOH)を得た（AHX, ICA, AOHをフェアルー化合物、fairy chemicals, FCsと称する）。そして、AHXとAOHが普遍的に植物に内生していることを証明し、生合成経路の一部も明らかにした。さらにFCsで処理した全ての植物の成長が制御された。これらのことから、FCsが新しい植物ホルモンであることを示唆された[5)]。一方、FCsはもともとキノコから単離されたため、我々はFCsがキノコの中でも重要な役割を担うと考えた。そこでFCsがキノコ中に共通に存在するか否かをLC-MS/MSを用いて検討することにした。さらに、ブナシメジやエノキタケ菌糸体等を用いて、これらの化合物の菌糸成長、子実体発生に及ぼす影響を検討した。その結果、LC/MS/MSによって、AHXが得られたコムラサキシメジの他、エノキタケやマイタケなど分類学的に遠縁の14種のキノコでの内生を確認した。さらに、エノキタケに対して、ペーパーディスク上に0.3 mg、0.03 mgのAHXとAOHを添加したところ、子実体の発生が確認された。AHXとAOH溶液（50 μM, 10 mL）をエノキタケとブナシメジ菌糸体が蔓延したポットに注いだところ、2週間後に子実体発生誘導活性が確認された。また、生活環制御に関するアッセイを繰り返し、再現性、至適濃度などを検討する。

1) 呉静ら、平成26年度日本農芸化学会大会講演要旨集
2) 呉静ら、平成27年度日本農芸化学会大会講演要旨集
3) Choi et al: J. Agric. Food Chem., 58, 9956-9959, 2010
4) Choi et al: ChemBioChem, 11, 1373-1377, 2010
5) Choi et al: Angew. Chem. Int. Ed., 53, 1553-1555, 2014

fruiting body-inducing compound, fairy chemicals, mushroom

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

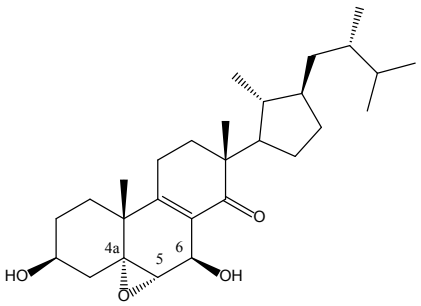
発表番号：2B004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

サケツバタケ(*Stropharia rugosoannnulate*)由来 strophastrol 類、新規機能性物質の探索
Search for strophasterols and biologically functional compounds from *Stropharia rugosoannnulate*

○清水 俊吾[1]、呉 静[2]、崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・グリーン研、[3]静大院・創造)
○ Shungo SHIMIZU[1], Jing WU[2], Jae-Hoon CHOI[1], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

[目的]

生物には、それぞれに特有なホルモンが存在する。しかし、キノコにおけるホルモンは一切明らかにされていない。キノコ（子実体）を発生する高等菌類は胞子から菌糸、菌糸から子実体、子実体から胞子という生活環を持っている。植物や動物にはステロイドホルモンが存在する。キノコは一般にステロイドを多種、多様に産生し、エルゴステロールはほとんどのキノコに大量に存在している。このことから、我々はキノコにもステロイドホルモンが存在するという仮説を持っている。本大会で発表した前例の無いステロイド骨格化合物 strophasterol A は菌糸から子実体を発生する物質として働く可能性が示唆されている[1)]。本研究ではサケツバタケ(*Stropharia rugosoannulate*)子実体からさらなる strophasterol 類化合物を単離・精製し、そして子実体発生物質の探索を目的とした。




strophasterol A

[方法および結果]

サケツバタケ子実体を 70%エタノール、アセトンで抽出し、ヘキサン、ジクロロメタン、酢酸エチル、水で順次抽出し、得られたヘキサンとジクロロメタン可溶部をフラッシュクロマトグラフィーや HPLC で分画し、strophasterol A と新規化合物 strophasterol E を含む各種化合物を単離した。Strophasterol E は MS により strophasterol A と分子量が同一であることが明らかとなり、各種 NMR スペクトルを比較したところ、ステロイド骨格 B 環の 4a, 5, 6 位の炭素でケミカルシフト値に著しい違いがあることから構造を推定した。現在、strophasterol E の構造と strophasterol C, D の絶対配置決定を試みている。さらに strophasterol 類化合物の子実体発生誘導活性を検討している。

1）呉 静ら、平成 26 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

Strophasterol, *Stropharia rugosoannulate*, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ヤマブシタケ(*Hericium erinaceus*)培養ろ液由来の生理活性物質の探索

# Search for biologically functional compounds from culture broth of *Hericium erinaceus*

○内田 和輝[1]、呉 静[2]、石神 洸太[1]、崔 宰熏[1]、徳山 真治[1]、西田 浩志[4]、平井 浩文[1,2,3]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大農、[2]静大院・グリーン研、[3]静大院・創造、[4]新潟薬科大・応生科)

○Kazuki UCHIDA[1], Jing Wu[2], Kouta ISHIGAMI[1], Jae-Hoon CHOI[1], Shinji TOKUYAMA[1], Hiroshi NISHIDA[4], Hirohumi HIRAI[1,2,3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Educational Division, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [4]Faculty of Applied Life Sciences, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences)

【背景および目的】

ヤマブシタケ (*Hericium erinaceus*) はサンゴハリタケ科サンゴハリタケ属の可食性のキノコである。広く北半球温帯以北に分布しており、夏の終わりから秋にかけて広葉樹の立木や枯木などに生える。過去に当研究室は、認知症の予防や治療への有効性が指摘されている神経成長因子の合成を促す物質として、hericenone類およびerinacine類を、それぞれヤマブシタケ子実体および菌糸体から発見した[1-6]。またHeLa細胞に対して増殖阻害活性を示す物質として、ヤマブシタケ培養ろ液からerinapyrone A、Bを単離したが、ヤマブシタケ子実体および菌糸体に比べ、培養ろ液に関する研究はあまり行われていない[7]。昨年度、培養ろ液の酢酸エチル可溶部から植物成長調節活性を示す化合物が単離されたことを報告した[8]。そこで本研究では、培養ろ液のヘキサン可溶部に由来する生理活性物質の単離、精製および構造決定を目的とした。

【方法および結果】

ヤマブシタケ培養ろ液を減圧濃縮後、ヘキサンおよび酢酸エチルで液-液分配を行った。得られたヘキサン可溶部をフラッシュクロマトグラフィー、HPLC等を用いて分画し、化合物の単離、精製を試みた。その結果、新規化合物を含む数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造はMS、IRおよび各種NMRスペクトルにより決定した。これらの化合物を各種活性試験に供し、生理活性について検討している。

1）Kawagishi H, et al : *Tetrahedron Lett*. 32, 4561-4364, 1991
2）Kawagishi H, et al : *Phytochemistry* 32, 175-178, 1993
3）Kawagishi H, et al : *Tetrahedron Lett*. 35, 1569-1572, 1994
4）Kawagishi H, et al : *Heterocycl. Commun*. 2, 51-54, 1996
5）Kawagishi H, et al : *Tetrahedron Lett*. 37, 7399-7402, 1997
6）Lee EW, et al : *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 64, 2402-2405, 2000
7）Kawagishi H, et al : *Chemistry Lett*. 2475-2476, 1992
8）近田ら、平成 26 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

*Hericium erinaceus*, biologically functional compound, structural determination

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 黒穂菌とマコモの共生に関する化学的研究

# Chemical studies on symbiosis between *Zizania latifolia* and *Ustilago esculenta*

○西山 祐貴[1]、小堀 一[2]、石神 洸太[3]、崔 宰熏[1]、徳山 真治[1]、平井 浩文[1,2,4]、河岸 洋和[1,2,4]（[1]静大農・応生化、[2]静大院・創造、[3]静大院農・応生化、[4]静大・グリーン研）

○ Yuki NISHIYAMA[1], Hajime KOBORI[2], Kota ISHIGAMI[3], Jae-Hoon CHOI[1], Shinji TOKUYAMA[1], Hirofumi HIRAI[1,2,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

マコモタケはイネ科マコモ属に属するマコモ (*Zizania latifolia*) が黒穂菌 (*Ustilago esculenta*) に感染することで、本来穂になる花茎の先端が肥大し生じる食材であり、中華料理では高級食材として知られている。この原理として、黒穂菌が感染するとオーキシンが盛んに分泌され、花茎での細胞分裂が活性化し、肥大化することで形成されるという説が存在する。これまでに、我々はオーキシン以外の肥大化誘導物質が存在すると仮定し、その原因物質の探索を試みた。現在までにマコモタケから6個の新規化合物を単離したが、植物に対する活性は見い出していない[1-3]。そのため本研究では黒穂菌培養ろ液から植物に対する成長調節活性を指標に化合物の探索を行い、黒穂菌とマコモの共生関係のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

黒穂菌を約1週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養することで得られた培養液を濾過し、菌体および培養ろ液に分けた。培養ろ液を*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、*n*-ブタノール可溶部、メタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。これらの可溶部を用いてレタス伸長活性試験に供したところ酢酸エチル可溶部に伸長阻害活性が見られたため、酢酸エチル可溶部の分画を進めた。現在、酢酸エチル可溶部から単離した化合物の構造解析を行っているほか、更なる化合物の探索も試みている。

1) J.-H. Choi, *et al*., *Tetrahedron Lett*. **55**, 3596-3599, (2014)
2) T. Suzuki, *et al*., *Bioorga. Med. Chem. Lett*. **22**, 4246-4248, (2012)
3) H. Kawagishi, *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **70**, 5481-5483, (2013)

*Zizania latifolia*, *Ustilago esculenta*, isolation

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ツチクラゲ(*Rhizina undulata*)培養ろ液由来の植物成長調節活性化合物の探索

# Search for plant growth regulating compounds from culture broth of *Rhizina undulata*

○加藤 理史[1]、小堀 一[2]、石神 洸太[3]、崔 宰熏[1,3]、徳山 真治[1,3]、平井 浩文[1,2,3,4]、河岸 洋和[1,2,3,4]
([1]静大院・総合農、[2]静大院・創造、[3]静大院・農、[4]静大・グリーン研)
○Satoshi KATO[1], Hajime KOBORI[2], Kota ISIGAMI[3], Jae-Hoon CHOI[1,3], Shinji TOKUYAMA[1,3], Hirofumi HIRAI[1,2,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,4] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】

ツチクラゲ（*Rhizina undulata*）はツチクラゲ科ツチクラゲ属のキノコで、温帯に広く群生し、たき火を行ったり山火事が発生したりした場所で急速に子実体を形成する[1)]。針葉樹に対する寄生性、病原性が高く、ツチクラゲ寄生による病害は「ツチクラゲ病」とよばれている。現在までにこの病害の原因となる物質は報告されていない。このことから、ツチクラゲが産生する植物成長調節物質の探索を行うことを目的とした。

【方法・結果】

ツチクラゲを約 4 週間、ポテトデキストロース培地によって液体培養することで得られた培養液をろ過し、菌糸体及び培養ろ液に分けた。培養ろ液を、分液ロートを用いて順次ヘキサン、酢酸エチル、エタノールおよび水で液-液分配した。得られた各可溶部をレタスに対する植物成長調節活性試験に供したところ、酢酸エチル可溶部、エタノール可溶部で根に対する伸長阻害活性を示した。この結果により、酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィーによって分画し、数種の化合物の単離に成功した。これらの化合物の構造は、MS および各種 NMR スペクトルデータの解析によって同定した。現在、これらの化合物を各種活性試験に供している。

*Rhizina undulata*, plant growth regulating compound, structure determination

発表番号：2B008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ナラタケ属の産生する他感作用物質に関する化学的研究
Chemical studies on allelopathic compounds from *Armillaria* sp.

○小堀 一一[1]、関谷 敦[2]、崔 宰熏[3]、平井 浩文[1,3,4]、河岸 洋和[1,3,4] ([1]静大院・創造、[2]森林総研、[3]静大農・応生化、[4]静大・グリーン研)
○ Hajime KOBORI[1], Atsushi SEKIYA[2], Jae-Hoon CHOI[3], Hirofumi HIRAI[1,3,4], Hirokazu KAWAGISHI[1,3,4] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Forestry and Forest Products Research Institute, [3]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】タマバリタケ科ナラタケ属に属する一連のキノコは、古くから世界中の広い地域で食用として利用されてきた。その一方で、ナラタケ属のキノコは生きている植物に対する影響が非常に強く、その病害は「ナラタケ病」と呼ばれている。しかし、「ナラタケ病」が発生するメカニズムの化学的解明は、これまでに一切なされていない。

我々はこれまでに、ナラタケ属のキノコからレタスの根や胚軸に対する成長調節活性物質を複数単離した[1,2]。それらのうち、melleolide類全体の構造を持つものは植物成長抑制活性 (右図青字)、melleolide類のセスキテルペン部分のみの構造を持つものは植物成長促進活性 (右図赤字) をそれぞれ示し、melleolide類の酸部分のみの構造を持つものは植物に対して活性を示さない (右図緑字) ことを明らかにした[3,4]。そこで我々は、同じ化合物の全体構造や部分構造同士で相反する活性を有することに興味を持ち、それらの構造活性相関の議論を目的とした。

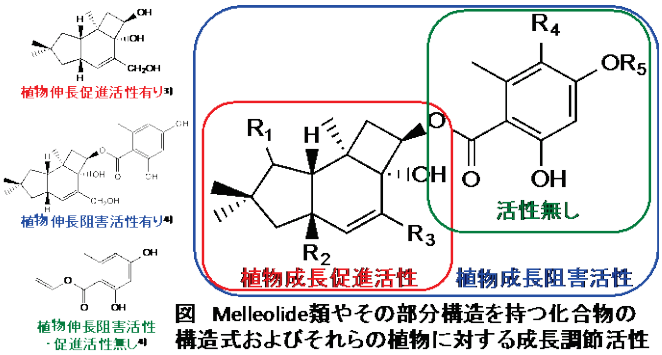


図 Melleolide類やその部分構造を持つ化合物の構造式およびそれらの植物に対する成長調節活性

【方法・結果】これまでに単離したmelleolide類の化合物の中で、収量や官能基の違いなどを考慮して選抜したmelleolide Dおよび5'-*O*-methylmelledonalをメタノリシスに供することによって、それぞれをセスキテルペン部分およびオルセリン酸部分に分解した。得られた反応液を、分液ロートを用いて液-液分配することにより酢酸エチル可溶部、*n*-ブタノール可溶部および水可溶部に順次分画した。それらのうち、酢酸エチル可溶部および*n*-ブタノール可溶部をHPLCに供することにより、各化合物のセスキテルペン部分およびオルセリン酸部分の構造を持つ分解産物を単離した。melleolide Dおよび5'-*O*-methylmelledonalと共に、得られた分解産物をレタスに対する成長調節活性試験に供している。

1) H. Kobori, *et al*., *Tetrahedron lett*. 2013, **54**, 5481-5483
2) H. Kobori, *et al*., *J. Nat. Prod*. 2015, **78**, 163−167
3) Y. Shiono, *et al*., *Z. Naturforsch B* 2005, **60**, 449-452
4) 小堀 一ら, 平成 27 年度日本農芸化学会大会講演要旨集

*Armillaria* sp., allelopathy, methanolysis

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 微生物代謝産物からの抗赤痢アメーバ物質の探索

# Search for inhibitors against Entamoeba histolytica produced by microorganisms

○柘植 聡志[1]、深澤 航[2]、森 美穂子[1,3]、野中 健一[1,3]、松本 厚子[1,3]、野崎 智義[4]、大村 智[3]、塩見 和朗[1,3] ([1]北里大院,感染制御、[2]北里大,理学部、[3]北里大,生命研、[4]感染研)
○ Satoshi TSUGE[1], Wataru FUKASAWA[2], Mihoko MORI[1,3], Kenichi NONAKA[1,3], Atsuko MATSUMOTO[1,3], Tomoyoshi NOZAKI[4], Satoshi OMURA[3], Kazurou SHIOMI[1,3] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci.,Kitasato Univ., [2]Dept. Sci., Kitasato Univ., [3]Kitasato Inst. Life. Sci., [4]Dept. Parasitol., NIID)

**【背景と目的】**赤痢アメーバ症は、単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が腸管に寄生して起こる疾患である。赤痢アメーバ症患者は世界に 5,000 万人存在し、死亡者数は年間 7~10 万人と推定されている。治療薬には主にメトロニダゾールが用いられるが、耐性原虫の出現に加え、催奇形性などの副作用があるため、新たな作用機構を持つ新薬の開発が望まれている。我々は新薬シーズを見出すことを目的に原虫を用いた評価系を構築し、微生物二次代謝産物から抗赤痢アメーバ物質の探索を行った。

**【方法】**赤痢アメーバの生育・生存にはシステイン（以下 Cys）が必須であり、ヒトとは異なる酵素を用いてセリンから Cys を合成する。そのため赤痢アメーバの Cys 生合成経路は創薬標的として適していると考え、Fig. 1 に示す評価系を構築した。一次スクリーニングでは Cys 非含有培地中で飼育した赤痢アメーバを死滅させるサンプルを選択した。二次スクリーニングでは Cys 含有培地中での抗赤痢アメーバ活性を調べた。Cys 含有培地では培地から Cys が供給されるため、赤痢アメーバを死滅させるサンプルは標的不明の抗赤痢アメーバ物質、死滅させないサンプルは Cys 生合成阻害物質と考えられるので選択した。また、二次スクリーニングで赤痢アメーバを死滅させたサンプルの中については、ヒト繊維芽細胞（MRC-5）に対して毒性を示さないものを選択した。

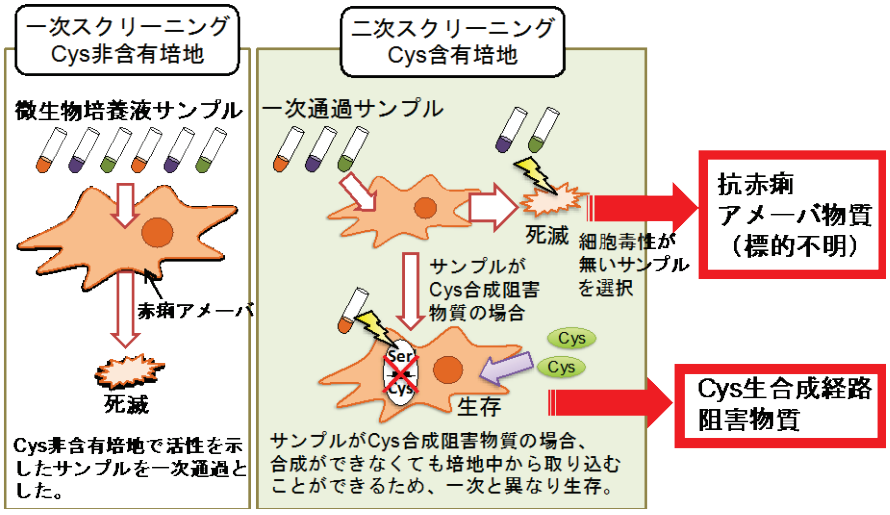


Fig. 1 抗赤痢アメーバ物質探索の評価系

**【結果】**北里天然化合物ライブラリーの 431 化合物を評価した結果、Cys 生合成阻害物質の可能性があるものとして 5 化合物、標的不明の抗アメーバ物質を 5 化合物見出した。次に糸状菌および放線菌計約 7,000 サンプルの培養液を評価した結果、Cys 生合成阻害物質を含むものを 11 サンプル、標的不明の抗アメーバ物質を含むものを 31 サンプル見出した。発表ではライブラリーおよび培養物から見出した化合物とその活性について報告する。

Entamoeba histolytica, antibiotics, cysteine synthetic pathway

発表責任者：柘植 聡志（mi14010@st.kitasato-u.ac.jp）

発表番号：2B010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# フェアリー化合物の新プリン代謝経路に関する化学的研究

# Chemical studies on novel purine metabolic pathway of fairy chemicals

○崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、稲井 誠[3]、菅 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大院農・応生、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○Jae-Hoon CHOI[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Makoto INAI[3], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]School of Pharmaceutical Sciences, Univ. of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ.)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHXが植物内で内生されていることも報告した[1,2]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される[3,4]。AICAは植物に内生していることが知られていることから、我々は化学合成と同様の経路で植物体内においてAICAからAHXが生合成されていると考え、その経路が存在していることを証明した[2]。図1のようにAICAからAHXへの合成あるいはAICAリボチド(AICAR)からAHXリボチド(AHXR)が、AHXRからAHXが生合成される可能性があることから、本研究ではAICA(あるいはAICAR)からAHX (あるいはAHXR)への合成酵素の同定を目的とした。

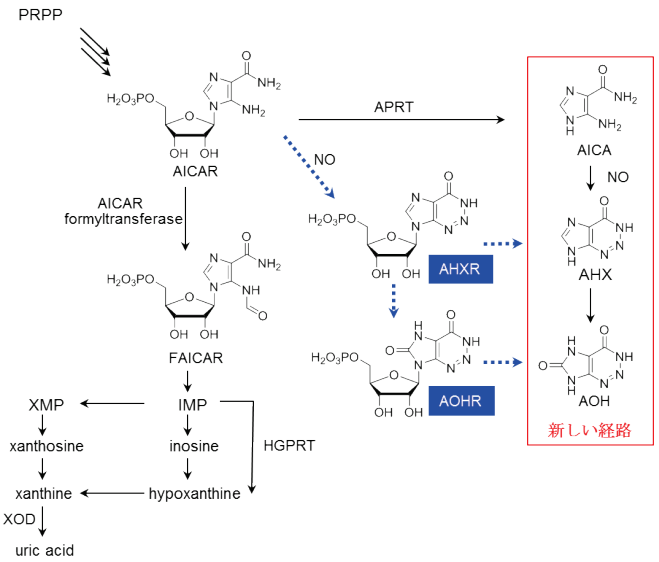



図 1 既知プリン代謝経路と新規フェアリー化合物生合成・代謝経路
（青色は推定生合成前駆体、破線は推定経路、赤枠内はこれまでに同定した新経路）

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネを地上部と根に分け、根をTris-HCl緩衝液(50 mM, pH 8.3)で抽出を行い、40%の濃度で硫安沈澱を行った。得られた画分を粗酵素液として透析後、これらにAICAリボチドを添加することで活性を確認した。その結果、40%硫安沈澱上清画分でAHXリボチドの生成がLC-MS/MS分析で確認できた。精製された活性画分から生合成経路に関わる酵素を精製、同定するために、イオン交換カラムを用いた分画を行った。現在イオン交換以降の精製方法の検討を行っている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1552-1555 (2014)
3) Y. Wang et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 185-188 (1996)
4) K. Ikeuchi et al. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3813-3815 (2014)

fairy chemicals, fairy ring, biosynthesis

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

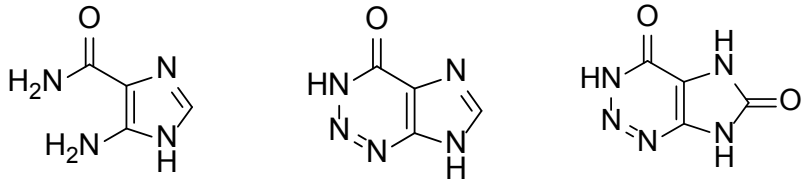
# イネにおけるフェアリー化合物 AOH の生合成経路に関する化学的研究

# Chemical studies on biosynthetic pathway of fairy chemical AOH in rice

○杉浦 輝[1]、崔 宰熏[1]、平井 浩文[1,2]、浅川 倫宏[3]、稲井 誠[3]、管 敏幸[3]、河岸 洋和[1,2,4] ([1]静大農・応生化、[2]静大・グリーン研、[3]静県大・薬、[4]静大院・創造)
○Hikaru SUGIURA[1], Jae-Hoon CHOI[1], Hirofumi HIRAI[1,2], Tomohiro ASAKAWA[3], Makoto INAI[3], Toshiyuki KAN[3], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4] ([1]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [3]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する2-azahypoxanthine (AHX) を単離し、AHXが植物内で内生されていることを明らかにした[1,2)]。また、AHXは化学合成法が既に知られており、5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) を前駆体として合成される。さらに、AHXをイネ科等の植物に投与すると、2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され、このAOHもまた植物成長調節作用を有することが確認されている[3,4)]。AOHは市販のキサンチンオキシダーゼの酵素反応によってAHXから合成が可能であるが、植物体内の代謝ではAHXからAOHへの変換のみを酵素が存在する可能性が示唆されている[2)]。この酵素についていくつか候補となるタンパク質を報告した[5)]。本研究では、AOH合成酵素および結合物質の同定を目的とした。



AICA　　AHX　　AOH

【方法・結果】

発芽させ、2週間培養したイネの根 (200 g)を50 mMリン酸緩衝液 (pH 6.0, 300 ml)で抽出し、AHXにスペーサーを導入し、それをリガンドとしたアフィニティーカラムに供し分画を行った。得られた0.25 M NaCl溶出画分を酵素液とし、脱塩・濃縮後、AHXを添加することでAOH合成活性を確認した。この画分をSDS-PAGEに供し、得られたバンドをトリプシン消化後、Mascot解析により確認したところ、再度候補となるタンパク質が検出された。このタンパク質の詳細な機能について研究を進めている。現在、担子菌*Phanerochaete sordida* YK-624株による異種発現系の構築を試みている。また、このアフィニティークロマトグラフィーにおいて高濃度のNaCl溶出画分をSDS-PAGEに供したところ、いくつかバンドが確認できたことから、これらの結合物質の同定を試みている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010), 2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014), 3) Y. Wang et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 185-188 (1996), 4) K. Ikeuchi et al. *Org. Biomol. Chem.*, 12, 3813-3815 (2014), 5) 崔ら、2015 年日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy ring, plant growth regulator, biosynthesis

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

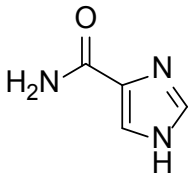
発表番号：2B012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

フェアリー化合物である ICA の代謝に関する化学的研究
Chemical studies on metabolism of fairy chemical ICA

○松崎 信生[1]、崔 宰熏[2]、平井 浩文[2,3]、近藤 満[3]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,3] ([1]静大院・創造、[2]静大院・農、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬)
○Nobuo MATSUZAKI[1], Jae-Hoon CHOI[2], Hirofumi HIRAI[2,3], Mitsuru KONDO[3], Tomohiro ASAKAWA[4], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3] ([1]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biochemistry, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, [3]Reserch Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka)

【目的】

フェアリーリングを引き起こす物質として、これまでにコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）から、2-azahypoxanthine (AHX) と imidazole-4-carboxamide (ICA) が単離されている[1-2)]。AHX は植物に内生する物質であり、また植物内で 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH) に代謝されて、植物の成長を促進することが明らかにされている[3)]。ICA は、主に植物の成長抑制に関わることが示されている[2)]。またイネの体内で、3 つの化合物に代謝されることを昨年の本大会で発表した[4)]。本研究では、未知の ICA 代謝産物の単離と、イネに対する成長調節活性およびイネ以外の様々な科の植物に対する ICA の影響を検討とイネにおける ICA と ICA 代謝産物の内生の確認を目的とした。



ICA

【方法・結果】

イネの種子を 3 日間前培養して発芽させた後、ICA 代謝産物の濃度を 50 μM, 100 μM に調整した培地に移し替えて、さらに 2 週間培養させた。培養したイネを回収し、地上部と根に分けて各々の長さを測定したところ、ICA 代謝産物処理イネでは、コントロールのイネとも、ICA 処理イネとも異なる有意な伸長の差を示した。のちに地上部と根をそれぞれエタノール、アセトン抽出し、抽出物を HPLC で分析したところ、ICA 代謝産物がイネの体内で代謝されることが判明した。さらに ICA を 1 mM に調節した培地で、イネ科以外の植物であるトマト、コマツナ、キュウリ、レタスを培養して、各々の植物体をエタノール抽出し、抽出物を HPLC で分析したところ、イネと同様の代謝を受けることが示唆された。また ICA で処理したレタス、トマトの抽出物の HPLC の分析結果からは、未知の ICA 代謝産物の存在が示唆された。ICA で処理していないイネの抽出物を LC-MS/MS によって分析したところ、ICA、ICA 代謝産物と同様のスペクトルが検出されたことから、イネにおける ICA、ICA 代謝産物の内生が示唆された。

1) Choi *et al*, *ChemBioChem,* 11. 1373-1377 (2010)
2) Choi *et al*, *J. Agric. Food Chem.*, 58. 9956-9959 (2010)
3) Choi *et al*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53. 1552-1555 (2014)
4) 松崎ら, 2015 年日本農芸化学会講演要旨集

fairy ring, metabolite, imidazole-4-carboxamide

発表責任者：河岸 洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

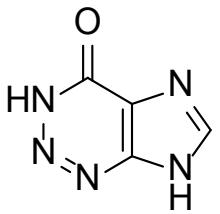
# フェアリー化合物 AHX の代謝に関する化学的研究

# Chemical studies on metabolism of fairy chemical AHX

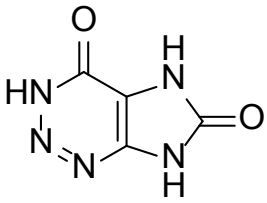
○澤田 梓[1]、近藤 遼一[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,3,5] ([1]静大院・総合農、[2]静大農・応生化、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬、[5]静大院・創造)
○Azusa SAWADA[1], Ryoichi KONDOH[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirohumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[4], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,5] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology, Shizuoka University, [2]Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々は以前、フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジの培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine（AHX）を単離した[1)]。AHX は植物に処理することにより 2-aza-8-oxohypoxanthine（AOH）に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有している[2)]。以前の研究で AHX あるいは AOH を処理したイネの抽出物から AOH のβ-グルコシドである化合物 3 種及び AHX のβ-グルコシドを単離した[3,4)]。



AHX



AOH

本研究では、AHX、AOH の植物体内におけるさらなる代謝産物の単離およびこれまでに単離された化合物の構造解析を目的とした。また、AOH は市販のキサンチンオキシダーゼの酵素反応によって AHX から合成が可能である[2)]。キサンチンオキシダーゼ阻害剤である allopurinol（APO）によるイネの代謝挙動に関する研究も行った。

【方法・結果】

AHX 処理したイネをエタノール、アセトンで順次抽出し、得られた可溶部を減圧濃縮後、HPLC による分析を行った。分析の結果、無処理のイネに見られない代謝産物の存在が示唆されたため、各種クロマトグラフィーに供し、精製を行い、その代謝産物を単離した。また、これまでに単離された化合物の糖部分の絶対配置を決定するため、加水分解および D-gluconolactone による酵素反応後、MS による分析を行った。APO に関する実験では、無菌条件下で 1 週間処理を行った後に MS および HPLC 分析を行い、代謝挙動を観察した。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew.Chem.Int.Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田翔伍ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨集
4) 澤田梓ら、2015 年日本農芸化学会大会講演要旨集

Fairy ring, metabolism, glycosides

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

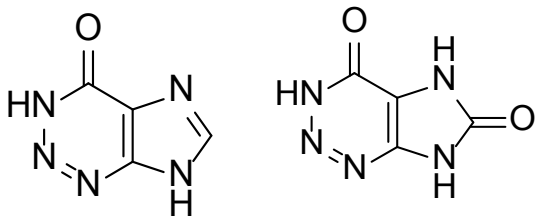
発表番号：2B014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

フェアリー化合物 AHX と AOH の糖転移酵素の化学的研究
Chemical studies on glucosyltransferase to form glucosides of fairy chemicals AHX and AOH

○近藤 遼一[1]、澤田 梓[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,3,5] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬、[5]静大院・創造)
○ Ryoichi KONDOH[1], Azusa SAWADA[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[4], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,5] ([1]Department of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Graduate School of Integrated Science and Technology , Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

我々はフェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養濾液から植物成長調節活性を有する 2-azahypoxanthine (AHX)を単離し、AHX が植物内で内生されていることを報告した[1,2]。また、AHX をイネ科等の植物に投与すると 2-aza-8-oxohypoxanthine (AOH)に代謝され、この AOH もまた植物成長調節活性を有することが確認されている[2]。さらに、2013 年度本大会において植物内から AHX 及び AOH の代謝産物が検出され、これらはβ-グルコシドであると報告した[3]。これらの化合物の生成には glucosyltransferase の関与の可能性が示唆された。本研究では、この酵素を同定することを目的とした。



AHX　　AOH

【方法・結果】

LC-MS/MS における AHX-グルコシド, AOH-グルコシドの最適な検出条件を検討した。また、イネの細胞を 25 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)で抽出を行い、40%と 70%の濃度で順次硫安沈殿を行った。70%硫安沈殿画分を弱陰イオン交換クロマトグラフィー(Macro-Prep DEAE)で分画後、各画分に [4-$^{13}$C, 2-$^{15}$N]AOH を添加し酵素活性試験を行った。これらを LC-MS/MS で分析したところ、一部の画分でグルコシドの生成が確認できた。この酵素活性を指標に活性画分を強陰イオン交換クロマトグラフィー(Macro-Prep High Q)、ゲル濾過クロマトグラフィー(Sephadex G-100)で分画した。活性画分を SDS-PAGE に供し、得られたバンドをトリプシン消化後 Mascot 解析により同定を試みている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.,* 53, 1553-1555 (2014)
3) 竹田 翔伍ら、2013 年日本農芸化学会大会講演要旨集

fairy ring, glucosyltransferase, biosynthesis

発表責任者：河岸　洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# コムラサキシメジにおけるフェアリー化合物の生合成に関する化学的研究

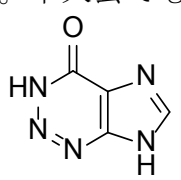
# Chemical studies on biosynthesis of fairy chemicals in *Lepista sordida*

○伊藤 彰将[1]、寺島 百合香[2]、崔 宰熏[1,2]、平井 浩文[1,2,3]、浅川 倫宏[4]、稲井 誠[4]、菅 敏幸[4]、河岸 洋和[1,2,3,5] ([1]静大農・応生化、[2]静大院・総合農、[3]静大・グリーン研、[4]静県大・薬、[5]静大院・創造)

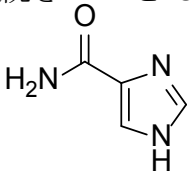
○Akinobu ITO[1], Yurika TERASHIMA[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Hirofumi HIRAI[1,2,3], Tomohiro ASAKAWA[4], Makoto INAI[4], Toshiyuki KAN[4], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,3,5] ([1]Department of Applied Biological Chemistry , Faculty of Agriculture , Shizuoka University, [2]Graduate School of Integrated Science and Technology , Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology , Shizuoka University, [4]School of Pharmaceutical Sciences , University of Shizuoka, [5]Graduate School of Science and Technology , Shizuoka University)

【目的】

フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養ろ液から単離された2-azahypoxanthine（AHX）とimidazole-4-carboxamide（ICA）は、分類学上の科に無関係に全ての植物に対して成長調節活性を有することが示され、またこれらの化合物は様々な植物に内生していることが明らかとなった[1-3]。以前の大会で、AHXとICA産生量はArgの添加によって増加することを報告した。また、同位体ラベルArgを添加してコムラサキシメジを培養し、この培養ろ液より分取したAHXとICAをNMRおよびLC-MS/MSに供したところ、AHXとICAのラベル化体が検出され、AHXとICAの生合成においてArgが関与していることを報告した[4]。本大会でも引き続きAHXとICAの生合成経路の解明を目的とした。



AHX



ICA

【方法・結果】

[1,2-$^{13}$C]Glyを培地に添加してコムラサキシメジを5週間培養し、培養ろ液をODSフラッシュクロマトグラフィーおよびHPLCで分画し、得られたAHX画分とICA画分をNMRおよびLC-MS/MSに供したところ、AHXおよびICAのラベル化体が検出され、Glyの取り込みが確認された。[ureido-$^{13}$C]citrullineを培地に添加して同様の実験を行いNMRおよびLC-MS/MSに供したところ、AHXのラベル化体が検出された。現在ICAについてもcitrullineが取り込まれているかを確認するべく実験を行っている。また、AHXの生合成にはNOが関与していると仮説を立て、NO発生剤・NO synthase (NOS) 阻害剤を培地に添加してコムラサキシメジを培養し、培養ろ液をHPLC分析に供してAHXの定量化を行ったところ、NOS阻害剤を添加した処理区においてAHX産生量が有意に減少した。この結果からAHX生合成にはNOが関与していることが示唆され、現在コムラサキシメジ菌糸体を用いて詳細な実験を行っている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9956-9959 (2010)
3) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)
4) 圓山ら、2014 年日本農芸化学会大会講演要旨集

plant growth regulator, fairy ring, nitric oxide

発表責任者：河岸洋和（kawagishi.hirokazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# コムラサキシメジのフェアリー化合物生合成酵素遺伝子の網羅的解析

# Comprehensive genetic analysis of enzymes related to biosynthesis of fairy chemicals from *Lepista sordida*

○寺島 百合香[1]、伊藤 彰将[2]、崔 宰熏[1,2]、鈴木 智大[3]、道羅 英夫[4]、平井 浩文[1,2,4]、浅川 倫宏[5]、稲井 誠[5]、菅 敏幸[5]、河岸 洋和[1,2,4,6]（[1]静大院・総合農、[2]静大農・応生化、[3]宇都宮大・バイオ、[4]静大・グリーン研、[5]静県大・薬、[6]静大院・創造）

○Yurika TERASHIMA[1], Akinobu ITO[2], Jae-Hoon CHOI[1,2], Tomohiro SUZUKI[3], Hideo DOHRA[4], Hirofumi HIRAI[1,2,4], Tomohiro ASAKAWA[5], Makoto INAI[5], Toshiyuki KAN[5], Hirokazu KAWAGISHI[1,2,4,6] ([1]Graduate School of Integrated Science and Technology , Shizuoka University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [4]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [5]School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, [6]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

フェアリーリング惹起物質としてコムラサキシメジ培養ろ液から単離された2-azahypoxanthine（AHX）およびimidazole-4-carboxamide（ICA）は、植物成長調節物質としての活性を有することが示された[1,2]。これらの生合成に関与する遺伝子群は未だ同定されていない。植物では5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranosyl 5'-monophosphate (AICAR)からAICA、AICAからさらにAHX、AOHへ代謝され、植物体内でAHXとAOHが内生していることが判明している[3]。一方、コムラサキシメジにおいてもAICARがAHXの生合成前駆体である可能性がある。そこで本研究では次世代シーケンサー（MiSeq）を用いて生合成に関わる遺伝子群の同定及び各種取り込み実験を行い生合成経路の解明を目的とした。

【方法および結果】

コムラサキシメジ菌糸体を12日間前培養した後、AICARを添加し経時的にサンプリングを行った。得られた培養液を破砕後HPLC分析に供した結果、AICAR添加検体においてAHX産生量が増加した。そこでAICAR添加及び未添加の菌体からtotal RNAを抽出しそれぞれライブラリーの作成を行った。作成したライブラリーは両末端150 bpのPaired-endシーケンスに供した。シーケンスによって取得したreadはTrinityを用いた*de novo*アセンブルに供し、得られたcontigに各検体のreadをマッピング後、RSEMおよびedgeRを用いたFPKM値の算出・発現差解析を行った。また、BLASTを用いた相同性検索も行い、取得した遺伝子情報のアノテーションを行い、AICAR添加によって発現が増加する遺伝子の絞込みを行った。また別途、AICAの推定生合成酵素であるadenine phosphoribosyltransferase（APRT）の遺伝子クローニング・リアルタイムPCRを用いた発現定量を行った。その結果、コムラサキシメジのAPRTはAICARの添加によって発現応答することを見出した。現在詳細に解析を行っている。

1) J.-H. Choi et al., *ChemBioChem*, 11, 1373-1377 (2010)
2) J.-H. Choi et al., *J. Agric. Food Chem.*, 58, 9956-9959 (2010)
3) J.-H. Choi et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 53, 1553-1555 (2014)

*Lepista sordida*, plant growth-regulation, biosynthetic pathway

発表責任者：河岸洋和（achkawa@ipc.shizuoka.ac.jp）

発表番号：2B017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ジャバラ果皮に含まれる抗肥満成分

# Antiobesity compounds from peel of *Citrus jabara*

○大田 時帆、奥野 祥治 (和歌山高専)
○Shiho OHTA, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

**【緒言】** 近年、生活習慣の欧米化により、肥満患者数の増加が大きな問題となっている。肥満は、高血圧、動脈硬化、糖尿病といったメタボリックシンドロームを引き起こす最大の要因と言われており、肥満を予防・改善する方法が求められている。その手段の1つとして、天然由来抗肥満活性物質の研究が盛んに行われている。

ジャバラ (*Citrus jabara*) は和歌山県北山村原産の香酸柑橘であり、果汁には花粉症予防効果が期待されている。ジャバラの化学成分として、ポリメトキシフラボノイドについて報告されているが、機能性に関する報告はほとんどされていない。我々の研究室ではこれまでに、ジャバラからアポトーシス誘導物質を単離し、その機能性について明らかにした。本研究では、ジャバラ果皮水抽出物が3T3-L1細胞に対して脂肪滴蓄積抑制効果を示したことから、ジャバラ果皮に抗肥満活性物質の探索およびその作用機構の解明を目的とした。

**【方法】** 抗肥満効果の検討は、マウス由来の3T3-L1前駆脂肪細胞を用いて行った。コンフルエントになった3T3-L1細胞を分化培地で2日間培養し、その後2日間サンプルを加えた培地で作用させた後、サンプルの入っていない培地に入れ替え、さらに4日間培養し、蓄積した脂肪滴量をOil red O染色により測定した。

**【結果】** ジャバラ果皮水抽出物をDIAION HP20を充填剤としたカラムクロマトグラフィーにより分画した。得られたfractionの内、脂肪細胞に対して活性が見られたEtOAc fraction をHexaneとEtOAcを溶出溶媒とした$SiO_2$カラムクロマトグラフィーにより分画し、3種類の活性物質**1-3**を得た。化合物**1-3**の構造は、$^1H$、$^{13}C$ NMRおよび文献値と比較することによりそれぞれ3,5,6,7,8,3′,4′-heptametoxyflavone (**1**)、3-hydroxy- 5,6,7,8,3′,4′-hexametoxyflavone (**2**)、3-hydroxy-5, 6,7,3′, 4′-pentametoxyflavone (**3**) であると決定した。

化合物 **1-3**の3T3-L1脂肪細胞に対する抗肥満効果を検討するためにまず、MTS試験により細胞増殖抑制効果を行った。その結果、今回用いた濃度 (100, 200 μM) において、3T3-L1脂肪細胞に対する細胞増殖抑制効果は見られなかった。化合物 **1-3**の3T3-L1脂肪細胞に対する脂肪滴蓄積抑制効果について検討したところ、コントロールと比較して、化合物**1**および**2**は200 μMでそれぞれ約1/2、化合物**3**は、200 μMで約1/7に脂肪蓄積を抑制した。現在、脂肪滴蓄積抑制効果の作用機構の解明を進めている。

*Citrus jabara*, Polymetoxyflavonoid, antiobesity

発表番号：2B018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 梅干しに含まれるアポトーシス誘導物質

Apoptosis-inducing components from *Prunus mume* Sieb. et Zucc

○和田 穂乃香[1]、奥野 祥治[1]、河野 良平[2]、野村 幸子[2]、前野 覚大[2]、宇都宮 洋才[2]（[1]和歌山高専、[2]和歌山医大）

○Honoka WADA[1], Yoshiharu OKUNO[1], Ryouhei KONO[2], Sachiko NOMURA[2], Akihiro MAENO[2], Hirotoshi UTSUNOMIYA[2]（[1]NIT. Wakayama college, [2]Wakayama Med.Univ.）

**[緒言]** がんは日本人の最も多い死因であり、各種のガン疾患に対して新たな抗がん剤の開発が行われている。がんの治療の有用な手段としてがん細胞に対するアポトーシス誘導があり、副作用の少ないがんの治療や予防効果が期待できると考えられている。近年、植物などから多くのアポトーシス誘導物質が報告されている。

梅 (*Prunus mume*) は中国中南部が原産のバラ科サクラ属の落葉樹で、和歌山県の特産品である。梅に含まれる機能性成分が注目されており、研究が盛んに行われている。我々の研究室でもヘリコバクターピロリ菌の運動能に対する抑制物質や抗肥満物質などを見出している。 本研究では梅のさらなる機能性解明を目的とし、梅干しに含まれるアポトーシス誘導物質の探索と構造決定について検討した。

**[実験操作]** 梅干し 3.86 kg をメタノール 4L (重量比 1:1) に 24 時間浸漬し、ろ過した。これを三回繰り返して MeOH 抽出液を得た。得られた抽出液を減圧濃縮することにより MeOH を除去し、水で懸濁後、各種溶媒で抽出し、Hexane (519 mg)、$CH_2Cl_2$ (1.43 g)、EtOAc (13.2 g)、$H_2O$ (372 g) 抽出物を得た。アポトーシス誘導物質の探索はヒト胃がん細胞株 (MKN45) に対する増殖抑制試験を指標として進めた。まず、96 ウェルプレートに MKN45 を $1\times10^4$ cell/well 分注し、37 ℃、5% $CO_2$ 条件下で 24 時間培養した。培養後、各濃度に調製した各サンプルを加え、同条件下で 48 時間培養した。その後、CellTiter 96 Aquious One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) を用いて増殖抑制効果を評価した。

**[結果と考察]** 梅干しから得た Hexane、$CH_2Cl_2$、EtOAc、$H_2O$ 抽出物の MKN45 に対する細胞増殖抑制試験の結果、Hexane 抽出物と $CH_2Cl_2$ 抽出物が 200 μg/mL において増殖抑制効果を示した。そこで、まず強い効果を示した Hexane 抽出物を $SiO_2$ カラムクロマトグラフィーにより分画し Fr. H1－H4 を得た。細胞増殖試験の結果、Fr. H3 が最も強い増殖抑制効果を示した。また、増殖抑制効果を示した $CH_2Cl_2$ 抽出物についても $SiO_2$ カラムクロマトグラフィーにより分画し Fr. C1－C8 を得た。細胞増殖抑制効果の結果、Fr. C3 に最も効果がみられたため、$SiO_2$ カラムクロマトグラフィーによって分画し Fr. C9－C12 を得た。さらに、効果の見られた Fr. C9 と Fr. C10 をあわせて $SiO_2$ カラムクロマトグラフィーにより分画し Fr. C13－C18 を得た。その結果、Fr. C14 に最も効果がみられた。現在、Fr. H3 および Fr. C14 からの活性物質の精製を行っている。

*Prunus mume* Sieb. et Zucc, apotosis, MKN-45

発表番号：2B019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 仏手柑に含まれるα－グルコシダーゼ阻害物質の探索

alpha-Glucosidase inhibitor from *Citrus medica* var. *sarcodactylus*

○高野 樹理、奥野 祥治 (和歌山高専)
○Juri TAKANO, Yoshiharu OKUNO (NIT, Wakayama College)

**[緒言]** 先進国において糖尿病は重大な疾病の一つであり、脳血管障害や、心臓病の要因であり、その予防と治療は世界的に重要な課題となっている。糖尿病には主に 1 型糖尿病と 2 型糖尿病があるが、遺伝的因子と環境因子が大きく関与して発症する 2 型糖尿病が約 90%を占めている。この 2 型糖尿病の治療薬としてα-グルコシダーゼ阻害薬が注目されている。α-グルコシダーゼ阻害薬は、小腸上皮膜に存在する二糖分解酵素であるα-グルコシダーゼの作用を阻害することで単糖類への分解を遅らせて、糖の小腸からの吸収を遅延させることで、食後の過血糖を抑制する。近年、植物からのα-グルコシダーゼ阻害成分の探索が盛んに行われている。

仏手柑 (*Citrus medica* var. *sarcodactylus*) はミカン科ミカン属の植物であり、その名称果実が合掌した手の類似したものである。インドが原産であり、日本では和歌山県、鹿児島県であわせて年間約 5 トン生産されているのみである。果肉部が退化し少ないため、生食には向かず、砂糖漬けにして食されたり、頭痛薬や風邪薬など漢方薬として用いられている。これまでに、仏手柑の根茎から抗炎症効果、抗酸化作用をもつ数種のクマリンが報告されている。しかし、仏手柑果実の化学成分および機能性についての研究はほとんどない。本研究では仏手柑の化学成分と機能性解明を目的とし、仏手柑に含まれるα-グルコシダーゼ阻害物質について検討した。

**[実験操作]** 仏手柑 1 kg をメタノール 2 L (重量比 1:2) に 24 時間浸漬し、ろ過した。これを三回繰り返して MeOH (306.9 g) 抽出液を得た。得られた抽出液から減圧濃縮により MeOH を除去した後、水で懸濁した後、各種溶媒で抽出し、Hexane (6.4 g)、$CH_2Cl_2$ (3.8 g)、EtOAc (3.8 g)、$H_2O$ (292.9 g) 抽出物を得た。α-グルコシダーゼ阻害物質の探索は Yeast 由来α -グルコシダーゼを用いた阻害試験を指標としてすすめた。まず、被験物質 DMSO 溶液 25 µL 、0.1 M リン酸緩衝液 475 µL、α -グルコシダーゼ ($4\times10^{-3}$ unit/mL) 250 µL、0.5 mM *p*-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシド 250 µL を試験管に加え、37 ℃で 30 分インキュベーションした後、0.2 M $Na_2CO_3$ 1 mL 加えることにより、反応を停止させた。405 nm の吸光度を測定し、阻害率を算出することでα -グルコシダーゼの阻害を評価した。

**[結果と考察]** 仏手柑から得られた MeOH, Hexane, $CH_2Cl_2$, EtOAc, $H_2O$ 抽出物のα-グルコシダーゼ阻害試験の結果、Hexane 抽出物が 50 µg/mL で 80% 以上の強いα-グルコシダーゼ阻害活性を示した。そこで強い活性を示した Hexane 抽出物を中圧分取液体クロマトグラフィーにより分画した。現在、Hexane 抽出物中の活性物質の精製を行っている。

*Citrus medica* var. *sarcodactylus*, alpha-Glucosidase, Inhibitor

発表番号：2B020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 新規麻痺性貝毒生合成関連化合物の同定

# Identification of a novel compound implicated in the biosynthesis of paralytic shellfish toxins

○土屋 成輝[1]、長 由扶子[1]、吉岡 廉平[1]、此木 敬一[1]、長澤 和夫[2]、山下 まり[1] ([1]東北大院農、[2]東京農工大院工)
○Shigeki Tsuchiya[1], Yuko Cho[1], Renpei Yoshioka[1], Keiichi Konoki[1], Kazuo Nagasawa[2], Mari Yotsu-Yamashita[1] ([1]Tohoku Univ. Agr., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Technol. Tech.)

【背景・目的】サキシトキシン(STX, **1**)を始めとする麻痺性貝毒 (PSTs)は、強力な電位依存性 $Na^+$ チャネルの阻害物質であり、食品衛生の観点からも重要な化合物群である。生産生物として、淡水産藍藻や海産渦鞭毛藻が知られている。これまでに、アミノ酸や酢酸ナトリウムのラベル体取り込み実験[1]や、淡水産藍藻(*Clyndrospermopsis raciborskii* T3, *Lyngbya wollei*)及び海産渦鞭毛藻(*Alexandrium fundyense*, *A. minutum*)のゲノム中からの STX 生合成遺伝子クラスターや相同遺伝子を見出した研究[2]が行われている。しかし、これら先行研究では生合成中間体を完全には同定しておらず、化学的証明が不十分であった。我々は、生合成中間体候補化合物(Int-A' (**3**), Int-C'2 (**4**), Cyclic-C' (**5**))を化学合成し、これら化合物を標品として LC-MS を行ったところ、いずれの化合物も藍藻有毒株 *Anabaena circinalis* (TA04)、渦鞭毛藻有毒株 *Alexandrium tamarense* (Axat-2)に含まれることを明らかにした[3]。さらに、$^{15}N$ を用いた各ラベル化中間体を用いた取り込み実験を行い、Int-A' (**3**), Int-C'2 (**4**)が生合成中間体であることを示した。一方、Cyclic-C' (**5**)は shunt product であることが示唆された[4]。

今回は、[$^{15}N_2$]Int-C'2 (**4**)を添加した結果、存在が示唆された新たな中間体について、精密質量から分子式を決定した。化学構造を推定し、麻痺性貝毒生産生物中に存在するか分析を行った。

【方法・結果】予想した化合物を化学合成し、HILIC-UPLC-Q-TOF-MS で *A. circinalis* (TA04)の細胞抽出液を分析したところ、保持時間、精密質量、MS/MS のパターンが標品と良い一致を示すピークが検出された。この化合物は、先行研究[1, 2]で提唱された生合成経路には存在しない化合物であり、我々の提唱している経路を支持する結果であった。

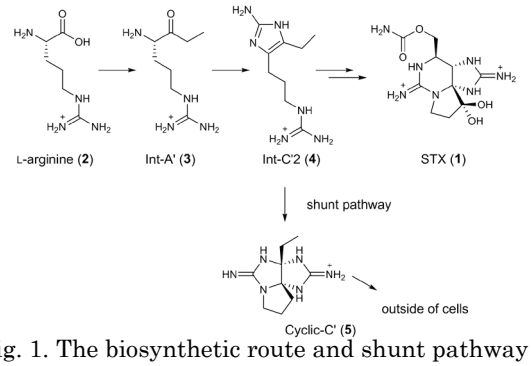



Fig. 1. The biosynthetic route and shunt pathway suggested in this study

[1] Y. Shimizu, *Chem. Rev.*, **1993**, *93*, 1685-1698.
[2] a) R. Kellmann, T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, *74*, 4044-4053.
b) A. Stüken, R. J. S. Orr, R. Kellmann, S. A Murray, B. A. Neilan, K. S.Jakobsen, *PLoS One*, **2011**, *6*, e20096.
[3] a) S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 3016-3020.
b) S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 7835-7840.
[4] 土屋 成輝, 長 由扶子, 此木 敬一, 長澤 和夫, 大島 泰克, 山下 まり, 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, **2015**, 2E11a11.

paralytic shellfish toxins, biosynthetic intermediate, saxitoxin

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

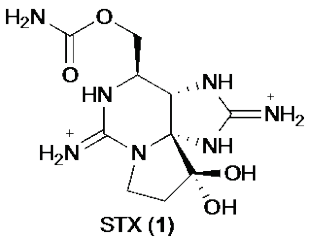
発表番号：2B021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

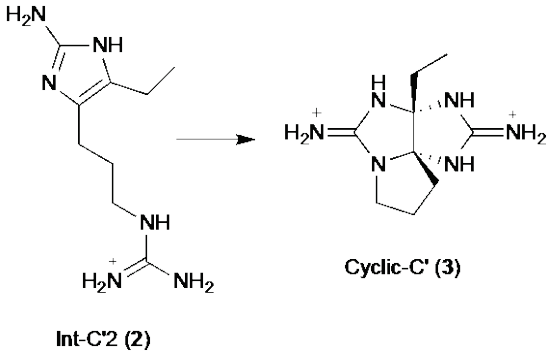
# 有毒藍藻の細胞破砕液を用いた新規麻痺性貝毒生合成中間体の探索

# Screening for the novel biosynthetic intermediates of paralytic shellfish toxins using cell extract from the toxic cyanobacterium

○美野輪 高之、土屋 成輝、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Takashi Minowa, Shigeki Tsutiya, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

【背景・目的】Saxitoxin STX (**1**)に代表される麻痺性貝毒は、強力な電位依存性$Na^+$チャネル阻害物質である。先行研究により生合成経路や中間体の推定が行われてきたが[1][2]、生合成中間体の完全な同定はできていなかった。我々は、推定された生合成経路の候補化合物であるInt-A', Int-C'2 (**2**), Cyclic-C' (**3**)を、藍藻有毒株*Anabaena circinalis* (TA04)および渦鞭毛藻有毒株 *Alexandrium tamarense* (Axat-2)から同定し[3][4]、ラベル化中間体取り込み実験により、Int-C'2 (**2**)が生合成中間体であることを示した。また、Cyclic-C' (**3**)はInt-C'2 (**2**)から生成することが示されたが、shuntであることが示唆され、STX類縁体はCyclic-C' (**3**)を介さない経路から生成すると考えられた[5]。本研究では、*A. circinalis* (TA04)の細胞破砕液に合成したInt-C'2 (**2**)を添加し、酵素変換反応でInt-C'2 (**2**)から生成する新規生合成関連物の探索を行った。




【方法・結果】*A. circinalis* (TA04)を液体培養し、集菌した細胞を破砕した。これに合成したInt-C'2 (**2**)を濃度可変で添加し、インキュベーションした。経時的に反応液を前処理して、LC/MSを用いてSTX生合成関連化合物を探索した。その結果、Cyclic-C' (**3**)と同じ分子式の未同定化合物の生成を確認した。この化合物は、MS/MSパターンも Cyclic-C' (**3**)と類似したが、一定のインキュベーション時間を越えると消失することから、別の化合物へ変化する生合成中間体と考えられた。この新規化合物の分離・精製法を確立できたので、さらに調製と精製を行い、NMRによる構造解析を行う。

[1] R. Kellmann, T. K. Mihali, Y. J. Jeon, R. Pickford, F. Pomati, B. A. Neilan, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2008**, *74*, 4044-4053.
[2] A. Stüken, R. J. S. Orr, R. Kellmann, S. A Murray, B. A. Neilan, K. S.Jakobsen, *PLoS One*, **2011**, *6*, e20096.
[3] S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 3016-3020.
[4] S. Tsuchiya, Y. Cho, K. Konoki, K. Nagasawa, Y. Oshima, M. Yotsu-Yamashita, *Chem. Eur. J.*,**2015**, *21*, 7835-7840.
[5] 土屋 成輝, 長 由扶子, 此木 敬一, 長澤 和夫, 大島 泰克, 山下 まり, 日本農芸化学会2015年度大会講演要旨集, **2015**, 2E11a11.

paralytic shellfish toxins, saxitoxin, cyanobacterium

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：2B022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Moorella thermoacetica* 由来テトラプレニル-β-クルクメン合成酵素ホモログのゲノムマイニング
# Genome mining of tetraprenyl-beta-curcumene synthase homolog from *Moorella thermoacetica*

○藤井 友里恵[1]、田中 勇真[2]、藤橋 雅宏[3]、三木 邦夫[3]、河合 優人[4]、中島田 豊[5]、品田 哲郎[6]、佐藤 努[1] ([1]新潟大学、[2]京大理、[3]京大院理、[4]広島大工、[5]広島大院先端物質、[6]阪市大院理)
○ Yurie Fujii[1], Yuma Tanaka[2], Masahiro Fujihashi[3], Kunio Miki[3], Yuto Kawai[4], Yutaka Nakashimada[5], Tetsuro Shinada[6], Tsutomu Sato[1] ([1]Niigata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Kyoto Univ. Grad., [4]Hiroshima Univ., [5]Hiroshima Univ. Grad., [6]Osaka city Univ.)

以前、我々は、*Bacillus* 属細菌のセスクアテルペン（$C_{35}$）の生合成研究から、新型のテルペン環化酵素（TS：tetraprenyl-β-curcumene synthase）を発見した[1)]。TS は、直鎖状のセスクアテルペンである Heptaprenyl diphosphate（HepPP） を tetraprenyl-β-curcumene に環化させる。TS は既知のテルペン環化酵素と相同性がないため、生化学的および構造生物学的手法によって新しい触媒機構の解明に取り組んでいる。また、TS ホモログは、機能未知タンパク質として *Bacillus* 属以外の様々な細菌にも存在している。すでに我々は TS のホモログのゲノムマイニングを行っており、好アルカリ性の *Bacillus clausii* から新規セスタテルペン（$C_{25}$）/トリテルペン（$C_{30}$）/セスクアテルペン（$C_{35}$）合成酵素（Bcl-TS）を発見した[2,3)]。Bcl-TS は、3 種の非環状新規テルペンを *in vitro* と *in vivo* で生成することを明らかにした。それにより、TS ホモログがセスクアテルペン（$C_{35}$）だけでなく $C_{25}$ や $C_{30}$ のような様々なテルペン合成酵素のファミリーであることが判明した。今回初めて、*Bacillus* 属以外の細菌由来の TS ホモログを解析し、新規セスクアテルペン 1 を見出したので報告する。

嫌気性の好熱性酢酸生産菌 *Moorella thermoacetica* の TS ホモログ(Moth-TS)をターゲットにした。Moth-TS 遺伝子を大腸菌発現系に導入後、精製 Moth-TS を $C_{15}$～$C_{35}$ のポリプレニル二リン酸とインキュベートしたところ、$C_{35}$ の HepPP 基質のみが反応して、今までに単離したことがない新規セスクアテルペン 1 が生成されることを見出した。*M. thermoacetica* は $C_{35}$ のイソプレノイド側鎖をもつ menaquinone-7 を生産することが知られており[4)]、矛盾がない。さらに、*M. thermoacetica* を 1.4 L 培養し、菌体の脂質を分析したところ、1 を天然物として検出することができた。現在、1 を単離・構造決定するため、精製 Moth-TS を大量調製して、ラージスケール反応にて 1 を合成している。

本研究により、*Bacillus* 属以外の細菌においても TS ホモログがテルペン合成酵素ファミリーとして機能していることを初めて明らかにすることができた。また、TS ホモログは他の様々な嫌気性細菌に存在しており、1 のようなテルペンの嫌気性細菌における生理機能も興味深いと考えている。

【文献】
1) T. Sato *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 133, 9734-9737 (2011). 2) T. Sato *et al. ChemBioChem.*, 14, 822-825 (2013). 3) D. Ueda *et al. ChemBioChem.*, 16, 1371-1377 (2015). 4) A. Das *et al. J. Bacteriol.,* 171, 5823-5829 (1989).

terpenoid, terpene synthase, anaerobic bacteria

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2B023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# スクアレンからアンブレインへの一段階酵素合成
# One step enzymatic synthesis of ambrein from squalene

○奥野 琴音、上田 大次郎、星野 力、佐藤 努 (新潟大学)
○Kotone Okuno, Daijiro Ueda, Tsutomu Hoshino, Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

アンブレインは龍涎香（りゅうぜんこう）と呼ばれるマッコウクジラの結石の主成分である。龍涎香は、古くから高級香料として世界各地で利用されていたが、商業捕鯨が禁止されてからは入手困難な「幻の香り」となっている。アンブレイン自身に香りはなく、酸化分解されて生成する 31 種類以上の香気成分が混ざり合うことで、特有の香気を示す。代用品として分解物の一つアンブロックスが販売されているが、香りは龍涎香本来のものとはほど遠く、アンブレインそのものの供給が待たれている。しかし、その化学合成は高コストで収率（1.3～3.8%）も低く、少なくとも数十億円の市場があると見込まれているにもかかわらず、産業化には至っていない。また、龍涎香は、漢方薬としての生理活性やリラックス効果・催淫効果との関連も示唆されている。しかし、天然から得ることに限界があるため、研究が進んでいない。アンブレインを供給することができれば、アンブレインの生物機能を探る研究にも貢献できるようになると考えられる。

最近、我々は、以前報告した変異型スクアレン-ホペン環化酵素と野生型 tetraprenyl-β-curcumene 環化酵素（TC）の２つを用いて、安価なスクアレンから２段階でアンブレインを合成することに成功した（JACS 2013、特許申請済）。しかし、２段階目の収率が低い（約 4%）問題点があった。加えて、将来、大腸菌や酵母などを宿主とした生物合成を行う場合、２つの酵素がスクアレンと反応するため、副生成物が生産される可能性が高い。今回、効率的合成法の確立を目指した研究について報告する。

まず、２段階目の収率を改善するため、様々な酵素反応条件を検討したが、一番有効なのは時間を長くすることであった。TC は５日目までアンブレインを継時的に生産した。

さらなる収率向上を目指し、新たな合成経路を試みた。以前は、単環を形成した後、二環を形成してアンブレインを合成していたが、今回、二環を形成した後、単環を形成してアンブレインを合成する経路を検討した。二環の特異的な合成は枯草菌由来 TC を用いれば可能であるが、二環→アンブレインを触媒する酵素が必要である。様々な TC の変異酵素を作成したところ、その一つが二環→アンブレインを触媒することがわかった。しかし、収率は向上しなかった。

一方、興味深いことに、その TC 変異酵素はスクアレンを基質とすると、単環と二環を形成した後、さらに反応していずれもアンブレインを合成することが判明した（特許申請中）。つまり、１種類の変異型酵素だけでスクアレンからアンブレインを一段階で合成できることを意味している。今後、生物合成を行う場合に極めて有利な系になることが期待される。

terpenoid, terpene cyclase, perfume

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2B024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 納豆菌におけるテトラプレニル-β-クルクメン環化酵素の新たな機能

# New function of tetraprenyl-beta-curcumene cyclase in *Bacillus subtilis* natto

○高橋 宏忠、高橋 秀長、佐藤 努（新潟大学）
○Hirotada Takahashi, Hidenobu Takahashi, Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

我々は、これまでほとんど研究されてこなかった $C_{35}$ の炭素数を有する、セスクアテルペン（我々が提案している分類名）の研究を行ってきている[1,2]。我々は、一連のセスクアテルペンの生合成酵素の同定・酵素機能解析研究の過程で、*Bacillus* 属細菌由来のテルペン環化酵素（TC）を用いると、$C_{35}$ の単環性の基質からは五環性セスクアテルペンが、$C_{30}$ のスクアレンからは二環性トリテルペンが得られることを明らかにした[3]。興味深いことに、TC は二環性トリテルペンのさらなる環化を触媒し、オノセロイド（スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペン）を与える。これにより、TC が $C_{35}$ と $C_{30}$ の基質から異なるモードの環化反応を触媒する、二機能性酵素であることを初めて示した[4]。今回、納豆菌（*B. subtilis* natto）細胞内において、TC はさらに別の基質を環化する機能があることを見出したので報告する。

納豆菌を市販の納豆から単離して、芽胞形成培地にて培養後、脂質成分を GC-MS 分析したところ、枯草菌などの他の *Bacillus* 属細菌（現在まで我々は 17 種類を分析）にはない 6 つの未知ピークを検出した。30 L 培養菌体から、その中で最も量が多かった未知物質を 4.8 mg 単離し、構造決定したところ、既知セスクアテルペンの(all-*E*)-ヘプタプレノール **1** であった。*Bacillus* 属から **1** を検出した例は我々の知る限り初めてである。

さらに、大腸菌組換え体の枯草菌 TC（納豆菌 TC の遺伝子配列を解読したが、枯草菌と 99%のアミノ酸配列相同性であった）を、化学合成した **1** とインキュベートし、生成物を GC-MS にて解析したところ、納豆菌の未知天然物 **2** と一致した。したがって、**1**（15 mg）を 10 L 培養由来の TC 発現した大腸菌無細胞抽出液とインキュベートして生成物 **2** を合成し、各種クロマトグラフィーによって純品 **2** を 0.38 mg 単離した。現在、構造解析中であり、合わせて報告する予定である。**1** が TC によって環化された構造をもつセスクアテルペンは我々の知る限り報告されておらず、新規化合物であると考えている。

既にゲノム解析が終了している納豆菌 BSET195 株の脂質成分も分析したが、化合物 **1** や **2** は検出されなかった。我々が単離した納豆菌は、育種の過程でゲノムに変異が導入されて、新しい生合成経路を生じ、TC に新たな機能が加わったのではないかと考えている。

【文献】1) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 9734. 2) T. Sato, *BBB*, 2013, 77, 1155. 3) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 17540. 4) D. Ueda, *et al.*, *JACS*, 2013, 135, 18335.

terpenoid, terpene cyclase, natto

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2B025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ポリプレニルアセトン類の生合成：活性酸素によるメナキノンの非酵素的開裂反応の提唱

# Biosynthesis of polyprenylacetone: proposal for non-enzymatic cleavage of menaquinone by reactive oxygen species

○上田 大次郎[1]、岡本 渉[1]、橋本 昌征[2]、佐藤 努[1] ([1]新潟大学、[2]成功大分子医学研)
○Daijiro Ueda[1], Wataru Okamoto[1], Masayuki Hashimoto[2], Tsutomu Sato[1] ([1]Niigata Univ., [2]National Cheng Kung Univ.)

最近、我々は *Bacillus* 属細菌からユニークなテルペノイドおよび生合成酵素を見いだしており[1-3]、さらなる探索を行っている。その中でポリプレニルアセトン類（$C_5 \times n + C_3$）である $C_{33}$ のファルネシルファルネシルアセトン（FFA）を天然物として初めて単離、同定した[4]。ポリプレニルアセトン類の中には、甲殻類ホルモンや昆虫フェロモンなどの生理活性物質も知られているが、生合成研究はほとんど行われていない。我々は、FFA を例にポリプレニルアセトン類の生合成経路の解明を目指すことにした。前回 FFA はメナキノン-7（MK-7）が活性酸素（スーパオキシドアニオン：$O_2^{-\cdot}$）によって開裂して非酵素的に生産されることを *in vitro* 実験によって証明した[4]。しかし、枯草菌内（*in vivo*）における生合成について証拠が不十分であったため、今回枯草菌破壊株を用いた *in vivo* 実験から、FFA の非酵素的生合成の解析を行ったので報告する。

MK-7 生合成経路の上流遺伝子の枯草菌破壊株（Δ*menA* とΔ*menB*）の脂質成分を分析したところ、両者から FFA を検出できなかった。したがって、枯草菌細胞内においても MK-7 が FFA の前駆体であることが強く示唆された。次に、$O_2^{-\cdot}$を分解する酵素（スーパーオキシドディスムターゼ：SOD）の遺伝子破壊株（Δ*sodA*）を高温度と低 pH のストレスにさらす実験を行った。つまり、ストレス時に発生する $O_2^{-\cdot}$を SOD が分解できないことにより FFA 量が増加するか解析した（両ストレスによって *Bacillus* 細胞内で電子伝達系から生じる $O_2^{-\cdot}$量が増加することは既に報告されている[5]）。その結果、30℃培養においてΔ*sodA* 株と野生株の菌体乾燥重量に対する FFA 量はほぼ同じであったのに対し、50℃培養においてΔ*sodA* 株の FFA 量が野生株の約 3 倍増加した。また、低 pH（pH5.0）ストレスでもΔ*sodA* 株の FFA 量が野生株の約 4 倍増加した。以上のことから *in vitro* 実験と同様に枯草菌細胞内においても $O_2^{-\cdot}$が MK-7 を攻撃して FFA を生産していることが示唆された。

加えて、甲殻類ホルモンのファルネシルアセトンと昆虫フェロモンのフィトンも各々MK-4 とフィロキノンのケン化処理（$O_2^{-\cdot}$発生）によって生成することも明らかにした。

今回と前回[4]の結果から、ポリプレニルアセトン類の生合成経路として電子伝達系にて生じる $O_2^{-\cdot}$によるメナキノン等のナフトキノン類の非酵素的開裂反応を提唱したい。

【文献】1) T. Sato *et al.*, *JACS 133*, 17540 (2011). 2) D. Ueda *et al*, *JACS 135*, 18335 (2013). 3) D. Ueda *et al*, *ChemBioChem 16*, 1371 (2015). 4) 日本農芸化学会 3E11p14(2015). 5) M. Mols, T. Abee, *Environ. Microbiol.*, *13*, 1387 (2011).

terpenoid, menaquinone, reactive oxygen species

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2B026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

テトロドトキシンの生合成経路解明を目指した有毒イモリからの推定生合成中間体の探索
Screening of the possible biosynthetic intermediates of tetrodotoxin from the toxic newts aimed at elucidating its biosynthesis

○工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

**[背景]** テトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**, Figure 1) は電位依存性ナトリウムチャネルに対する強力な阻害剤であり、フグを始めとする多種の海洋生物、陸棲の両棲類に含まれる。これまで TTX の生合成遺伝子を解析した例はなく、高度に架橋した構造がどのように生合成されるか未だに解明されていない。我々は有毒イモリから 4,9-anhydro-10-hemiketal-5-deoxyTTX (**2**, Figure 1) を発見し、その骨格構造がグアニジンと C10 単位から成ることに着目して、下記の経路を推定した (Figure 1)[1]。さらに、推定経路における中間体を探索し、昨年度の本大会にてイモリから得られた新規環状グアニジン化合物を報告した。本研究では、引き続き推定中間体を探索したので報告する。

**[方法]** オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) およびアカハライモリ (*C. pyrrhogaster*) の抽出物を HILIC-LC-MS および RP-LC-MS の二種の分析法で解析し、我々が想定する生合成中間体として妥当な分子式を示す成分を探索した。検出された 4 種の化合物をそれぞれ単離し、各種 NMR にて構造解析した。また有毒イモリ、無毒イモリの成分を LC-MS を用いて分析し、イモリにおける各化合物の分布を調査した。

**[結果]** 構造解析の結果、今回得られた 4 種の成分は含グアニジン 6 員環を有する二環性の新規化合物だと同定された。いずれもグアニジン基を有するモノテルペンが環化・酸化を経て生成したと推測される構造を有していた。得られた環状グアニジン化合物は複数の有毒イモリに含まれる一方で、無毒のイモリからは検出されず、これらの成分と TTX との関連が示唆された。これらの結果は TTX の生合成経路を解明する重要な手掛かりになると考えられる。

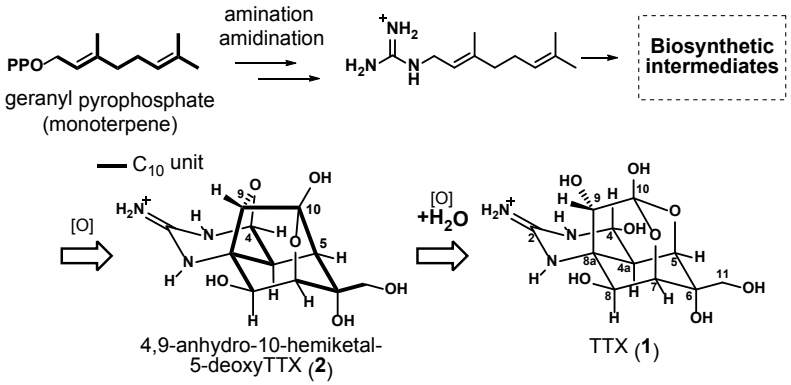



Figure 1. A proposed biosynthetic pathway of TTX based on the structure of **2**.[1]

**[References]** 1) Kudo, Y.; Yamashita, Y.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yasumoto, T.; Yotsu-Yamashita M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546–14549.

tetrodotoxin, biosynthesis, LC-MS

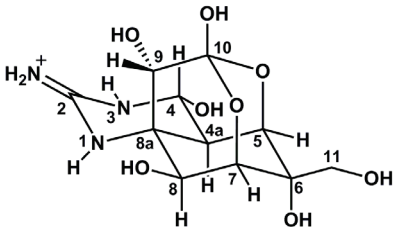
発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：2B027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# フグから得られた新規テトロドトキシン関連化合物の単離と構造
# Isolation and structure elucidation of novel tetrodotoxin related compounds from pufferfish

○上山 望、工藤 雄大、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Nozomi Ueyama, Yuta Kudo, Yuko Cho, Keiichi Konoki, Mari Yotsu-Yamashita (Tohoku Univ.)

[**背景**]フグ毒として知られるテトロドトキシン(Tetrodotoxin; TTX, **1**)は、電位依存性 $Na^+$チャネルの阻害活性を有する強力な神経毒である。TTX を含有する生物の分布は広く、タコ、カニ、巻貝などの多様な海洋生物の他、イモリやカエルなどの陸棲生物にも含まれていることがある。その一方で、生合成経路は未解明である。我々は生合成経路の解明のため、これまでに多くの新規 TTX 類縁体を構造決定してきた[1)]。その結果、イモリからは TTX がモノテルペン由来であることを示唆する 10-hemiketal 型 TTX 類縁体が単離された[2)]。 本研究では、海洋生物から TTX 関連化合物を探索し、新規化合物を単離したので報告する。



TTX(1)

[**方法**]高濃度の TTX を含有するフグの抽出物を LC-MS/MS により精査したところ、新規類縁体と推定される数種の微量成分が検出された。この微量成分のうち 2 成分を、各種カラムクロマトグラフィーにより単離し、HR-ESI-MS, NMR で構造を解析した。

[**結果**]HR-ESI-MS を用いて 2 成分の分子式を決定した。さらに、$^1$H NMR, COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY1D からグアニジンの $^{13}$C シグナルを除く、$^1$H および $^{13}$C シグナルを帰属した。これらの化合物は、どちらも TTX が高度に還元された構造をもつと推定された。

[**References**]

1 a) Yotsu-Yamashita, M.; Abe, Y.; Kudo, Y.; Riston-Williams, R.; Paul, V. J.; Konoki, K.;Cho, Y.; Adachi, M.; Imazu, T.; Nishikawa, T.; Isobe, M. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799–2813. b) Kudo, Y.; Finn, J.; Fukushima, K.; Sakugawa, S.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yotsu-Yamashita, M. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1000–1004.
2 Kudo, Y.; Yamashita, Y.; Mebs, D.; Cho, Y.; Konoki, K.; Yasumoto, T.; Yotsu-Yamashita M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14546 –14549.

tetrodotoxin, NMR, structure

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：2B028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ビール酵母由来の細胞壁成分によるイネ（*Oryza sativa*）の根張り向上効果と植物ホルモン応答性遺伝子の挙動

# Beer yeast cell wall extracts may change the behavior of phytohormone and promote root growth of rice

○森田 智也[1]、中道 貴也[1]、吉永 直子[1]、横尾 敬行[4]、高崎 智子[2]、北川 隆徳[2]、安原 貴臣[2]、新開 茂樹[3]、小林 優[1]、寺石 政義[4]、奥本 裕[4]、森 直樹[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]アサヒグループホールディングス、[3]東果大阪株式会社、[4]京大院農・農）

○Tomoya MORITA[1], Takaya NAKAMICHI[1], Naoko YOSHINAGA[1], Takayuki YOKOO[4], Tomoko TAKASAKI[2], Takanori KITAGAWA[2], Takaomi YASUHARA[2], Shigeki SHINKAI[3], Masaru KOBAYASHI[1], Masayoshi TERAISHI[4], Yutaka OKUMOTO[4], Naoki MORI[1]（[1]Kyoto Univ. Applied Life Sciences, [2]Asahi Group Holdings, [3]Toka Osaka, [4]Kyoto Univ. Agriculture）

【目的】

微生物由来の多糖は，植物防御応答を誘導する．その一方で，植物に生育促進作用をもたらすという報告もある．共同研究者らによって，β-1,3/1,6-glucan を含むビール酵母の細胞壁成分 (以下 CW1) をイネ (*Oryza sativa*) に処理すると，根張りが向上すると分かった．本研究は，植物ホルモンの挙動を遺伝子レベルで分析し，この現象のメカニズム解明を試みた．

【方法・結果】

第四葉展開イネ (日本晴) の根を，CW1 含有水耕液に浸した．1 週間後，CW1 処理区は対照区に対して根張りが向上し，根の乾燥重量は有意に増加していた．また，CW1 処理区では，側根数も増加していた．

植物ホルモン応答性遺伝子の発現量の経時的変化を CW1 処理区-対照区間で比較するため，上述の方法で処理したイネから RNA を抽出し，Real-time PCR 法により発現解析を行った．その結果，地上部では，処理後 7 日目で IAA 応答性遺伝子 (*OsIAA 1*) とエチレン応答性遺伝子 (*OsERF 1*) の発現量が増加した．根では，処理後 7 日目で IAA 応答性遺伝子 の発現量が増加し，5 日目からサイトカイニン応答性遺伝子 (*OsRR 6*) の発現量は低下した．このことから，CW1 処理は IAA・サイトカイニン・エチレンの挙動に影響を及ぼすと考えられた．ブラシノステロイド応答性遺伝子 (*OsBRI 1*) の発現量は地上部・根とも変化しなかった．次に，側根形成に関与する遺伝子 (*OsIAA 11*, *OsIAA 13*) の発現解析を行った．これらの発現量は，処理後 5 日目から増加していた．また，根において処理後 1 日目では，病害抵抗性遺伝子 (*OsPR 3*) の発現量が増加したが，2 日目以降には対照区と同等になった．このことから，CW1 処理の初期段階でイネは病害抵抗反応を示し，その後，IAA に対する反応へ移行すると考えられた．

phytohormone

発表番号：2B029
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ビール酵母由来の多糖によるシキミ酸経路の代謝変化とイネ(Oryza sativa)における根の生育促進効果との関連性

# Effects of beer yeast polysaccharide on the metabolites of shikimic acid pathway

○中道 貴也[1]、森田 智也[1]、吉永 直子[1]、横尾 敬行[4]、高崎 智子[2]、北川 隆徳[2]、安原 貴臣[2]、新開 茂樹[3]、小林 優[1]、西野 雄人[1]、宮下 正弘[1]、寺石 政義[4]、奥本 裕[4]、森 直樹[1]([1]京大院農・応用生命、[2]アサヒグループホールディングス、[3]東果大阪株式会社、[4]京大院・農)
○Takaya Nakamichi[1], Tomoya Morita[1], Naoko Yoshinaga[1], Takayuki Yokoo[4], Tomoko Takasaki[2], Takanori Kitagawa[2], Takaomi Yasuhara[2], Shigeki Shinkai[3], Masaru Kobayashi[1], Yuto Nishino[1], Masahiro Miyashita[1], Masayoshi Teraishi[4], Yutaka Okumoto[4], Naoki Mori[1] ([1]Kyoto Univ. Applied Life Sciences, [2]Asahi Group Holdings, [3]Toka Osaka, [4]Kyoto Univ. Agriculture)

【目的】
シキミ酸経路及び、その下流にある下記の 2 つの経路は植物において重要な役割を担っている。例えば、防御応答の際にはフェニルアラニン経路が活性化され，サリチル酸やリグニン類が生合成される．また，トリプトファン経路により、生合成されるインドール-3-酢酸（IAA）は根の生育促進に関与している．共同研究者らによって，β-1,3/1,6-glucan を含むビール酵母の細胞壁成分 (以下 CW1) をイネ (*Oryza sativa*) に処理すると，根張りが向上することが明らかにされている．多糖は，防御応答を誘導する一方で，植物に生育促進作用をもたらすという報告もある．本研究ではシキミ酸経路下流の代謝と上述の観察結果の関係を明らかにするため，代謝物の分析を行った．

【方法・結果】
第四葉が展開したイネ (日本晴) を水耕液に CW1 を添加して 1 週間, 栽培した．その後，根の乾燥重量を測定したところ，CW1 処理区は対照区に対して，有意に増加していた．

CW1 処理後 1, 3, 7 日目にイネを回収し 80%MeOH/$H_2O$ で抽出し，LC/MS で分析した．その結果, CW1 処理区は対照区に対して, フェニルアラニン及び, サリチル酸, リグニン類の一種であるフェルラ酸が有意に減少していた．一方で, IAA 生合成経路の上流にあるトリプトファンは 3, 7 日目で有意に増加していた。この結果から, CW1 は防御応答の経路ではなく, 根の生育促進に関与する経路を活性化していると示唆された．そこで, イネをアセトンで抽出し, 植物体の IAA を LC/MS/MS で定量した．その結果，処理後 3 日目から，IAA 濃度が増加していた．以上から, CW1 処理によって， 防御応答の経路が抑制され, トリプトファン経路が活性化されることで IAA 濃度が増加し, 結果として, 根張りが向上することが示唆された．

phytohormone

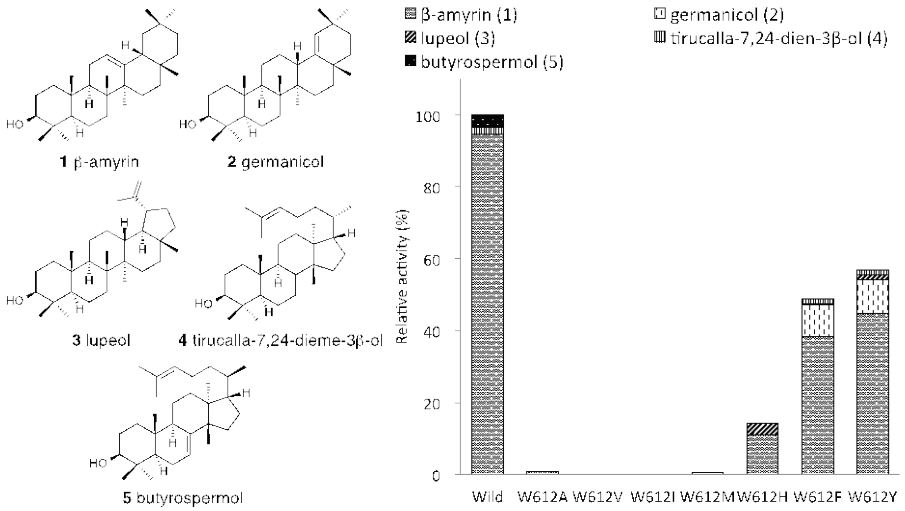
発表番号：2B030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ミドリサンゴ由来β-amyrin 合成酵素の W612 残基の機能解析

# Functional analysis of W612 residue of β-amyrin synthase from *Euphorbia tirucalli*

○相場 悠圭里[1]、仲野 千秋[1]、中川 和也[2]、伊藤 遼介[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○YUKARI AIBA[1], CHIAKI NAKANO[1], KAZUYA NAKAGAWA[2], RYOSUKE ITO[1], TSUTOMU HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】我々は *Euphorbia tirucalli* 由来のβ-amyrin 合成酵素 (EtAS) において、トリテルペン環化酵素で高度に保存されている芳香族アミノ酸残基の機能解析を行い、F728 が 4 環性および 5 環性カチオン、Y259 が 5 環性ルパニルカチオン、W257 が 5 環性オレアニルカチオンをカチオン−π 相互作用より安定化することを明らかにした[1, 2]。一方、B 環近傍に位置する F474 はカチオン−π 相互作用ではなく、そのバルクサイズにより基質の正確な折りたたみ形成に関与することを明らかにした[3]。EtAS の W612 はトリテルペン環化酵素にて高く保存されており、スクアレン−ホペン環化酵素の W489 では単環性カチオンの安定化と基質結合に、酵母ラノステロール合成酵素の W587 では単環性および 2 環性カチオンの安定化に関与する[4, 5]。EtAS の W612 の機能を検討した。【方法】QuikChange 法にて W612 残基を A、V、I、M、H、F、Y に置換し、*S. cerevisiae* GIL77 へ形質転換した。菌体内で生成する EtAS 量を western blot 法で、生産されたトリテルペンを GC で定量した。【結果】GC-MS 解析の結果、芳香族変異体の H、F、Y にてβ-amyrin **1** が生産された一方、脂肪族の A、V、I、M では **1** をほぼ生産しなかった。野生株に対する全プロダクトの相対活性は、A (0.9%)、V (0%)、I (0%)、M (0.7%)、H (14.1%)、F (48.7%)、Y (57.1%) であった。脂肪族変異体で活性が無く、芳香族では W>Y≃F>H の順に活性が高かった。これはカチオン−π 結合エネルギーの強さと一致する。さらにホモロジーモデリングより W612 は A/B 環近傍に位置すると予想されたことから、W612 残基はカチオン−π 相互作用による単環性および 2 環性カチオンの安定化に関与すると考えられる。A/B 環に位置するにも関わらず、芳香族変異株にて **2**, **3** が生産されたのは、バルクサイズが小さくなったことにより、4 環および 5 環性カチオンの安定化に関わる残基の位置が変化してしまった可能性が考えられる。




1) Ito R., *et al.*, *Chem. Eur. J.*, **19**, 17150, (2013). 2) 仲田ら, 2014 年度農芸化学会, 3A04a08. 3) Ito R., *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **12**, 3836, (2014). 4) Hoshino T. and Sato T., *Chem. Commun.*, 291, (2002). 5) Chang C.-H., *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 4214, (2013).

β-amyrin, triterpene cyclase, oxidosqualene

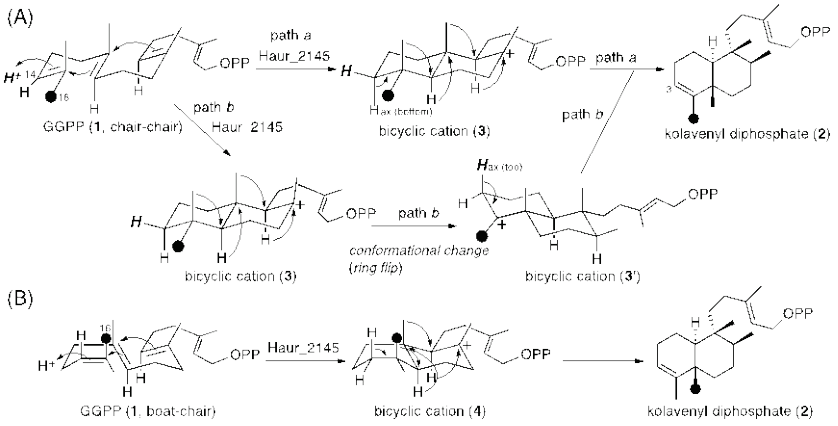
発表番号：2B031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Herpetosiphon aurantiacus* 由来の新規ジテルペン環化酵素の機能解析
# Functional analysis of a novel diterpene cyclase from *Herpetosiphon aurantiacus*

仲野 千秋[1]、○倉嶋 のどか[1]、井出 夕貴[2]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
Chiaki NAKANO[1], ○Nodoka KURASHIMA[1], Yuki IDE[2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【背景】我々は、以前緑色非硫黄細菌 *Herpetosiphon aurantiacus* に存在する新規ジテルペン生合成遺伝子群の機能解析を行い、Haur_2145 が GGPP **1** から kolavenyl diphosphate **2** への環化反応を担う新規ジテルペン環化酵素であることを明らかにした [1)]。今回、Haur_2145 の詳細な反応機構を明らかにするため、重水素ラベル化した基質や重水を用いた酵素反応および変異実験を行ったので報告する。

【方法・結果】**2** の構造から Haur_2145 の反応機構を推定した。まず、**1** が chair-chair (図 A) または boat-chair (図 B) に折りたたまれた後、末端二重結合のプロトン付加により環化が開始する。生じた bicyclic cation (**3** または **4**) にてハイドライドシフト、メチル基転移が起こり、脱プロトンにて反応が終結すると考えられる。A 環が chair 型か boat 型かを決定するため、**1** の 16 位のメチル基を重水素化した基質と Haur_2145 との酵素反応を行った。Phosphatase 処理によりアルコール体とした生成物を単離、NMR 解析した結果、16 位のメチル基は転移していなかったことから、A 環は chair 型で進行することが判明した (図 A)。続いて脱プロトン反応の機構を調べるため、重水中にて **1** との酵素反応を行った。末端二重結合の求核攻撃により取り込まれた重水素は、転移反応後、そのまま脱プロトンすると **2** の 3 位に残る（図 A path *a*）。一方、転移反応後、conformational change が起こり bicyclic cation **3'** になると、重水素が脱離する (図 A path *b*)。GC-MS 解析の結果、生成物に重水素は導入されていなかったことから、Haur_2145 は転移反応後、conformational change が起こり脱プロトンすることが判明した (図 A path *b*)。さらに、変異酵素を用いた機能解析を行った。シロイヌナズナ由来の *ent*-CDP synthase の T421 と N425 は、D379 と水素結合を形成し、環化開始を担うプロトンの供与を促進することが示唆された [2)]。また、E211 は $Mg^{2+}$を介して **1** の二リン酸と結合することが示唆された [2)]。*ent*-CDP の T421、N425、E211 はそれぞれ Haur_2145 の S355、R359、E125 に相当する。S355A、R359A、E125Q 変異株を作成し酵素反応を行った結果、変異株は失活することが判明した。現在、さらに変異株を作成しており、それぞれの残基の機能を明らかにする。




1) Nakano, C., *et al.*, *ChemBioChem*, **16**, 772, (2015).
2) Köksal, M., *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 431, (2011).

diterpene cyclase, *Herpetosiphon aurantiacus*, diterpene

発表番号：2B032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 抗生物質アラレマイシン生合成経路の解明

# Analysis of alaremycin synthetic pathway

○森 ひかる、岩井 伯隆、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Hikaru Mori, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

【背景・目的】アラレマイシンは *Streptomyces* sp. A012304 株から単離された抗生物質で、ヘムの前駆体である 5-アミノレブリン酸(ALA)と類似の構造を有している。アラレマイシンは、2 分子の ALA を重合してポルフォビリノーゲンを合成するポルフォビリノーゲンシンターゼの基質結合部位に結合してその活性を阻害する。ALA の生合成経路には、グルタミン酸から合成する C5 経路とグリシンとスクシニル CoA から合成する C4 経路（Shemin 経路）の 2 つの経路が知られている。C5 経路は植物や細菌の多くが、C4 経路は動物や一部の細菌が有しているが、両方の経路を持つ生物は稀である。アラレマイシン生産菌のゲノム解析を行ったところ、C5 経路の酵素をコードする *hemA* 遺伝子と、C4 経路の酵素をコードする *ALAS* 遺伝子の両方のホモログが見出された。大腸菌 Δ*hemA* 変異株の相補試験より、生産菌 *hemA* 遺伝子は ALA 合成活性を有するが、*ALAS* 遺伝子は ALA 合成活性を有していないことが明らかになった。アラレマイシンは ALA と構造が似ていることから、*ALAS* 遺伝子のアラレマイシン生合成経路への関与が示唆された。生産菌 *ALAS* 遺伝子の下流には、*N*-アセチルトランスフェラーゼ、オキシドレダクターゼ、MFS トランスポーターとアノテーションされた遺伝子が存在し、*ALAS* 遺伝子を含めたこれらの遺伝子群がアラレマイシン生合成を行っていると予想し、本研究ではアラレマイシン生合成の第一反応と考えている ALAS の機能解析を目的とした。
【方法・結果】pTrc99A に生産菌 *ALAS* 遺伝子を挿入したプラスミドを *E. coli* MG1655 Δ*hemA* 株に導入した。ALAS の本来の基質であるグリシンを加えて培養するとわずかではあるが生育回復が認められた。このことから生産菌 ALAS も活性は低いが ALA 合成活性を有すると考えられた。ALA とアラレマイシンの構造を比較すると C5 位のメチレン基がアラレマイシンに余分に付いている。このメチレン基は基質であるアミノ酸に由来すると考えると、グリシンにメチル基がついたアラニンが生産菌 ALAS の基質であると思われる。そこで M9 培地に IPTG とアラニンを加えて培養したところ、ベクターコントロールと比較して生育が抑制された。このことから生産菌 ALAS はアラニンを基質として反応すると生育を抑制する化合物を合成すると思われる。生産菌 *ALAS* 遺伝子を pET28b(+)に挿入したプラスミドを、*E. coli* BL21(DE3) 株に導入した。SDS-PAGE でタンパク質発現を確認したところ、可溶性画分にベクターコントロールには認められない 47 kDa 付近のタンパク質が発現しており、これを Ni レジンカラムにより精製することに成功した。今後は、培養液中の ALAS 代謝物の検出と *in vitro* 反応系の構築を行う予定である。

Alaremycin, 5-aminolevulinic acid synthase

発表責任者：和地　正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

発表番号：2B033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アラレマイシン生産放線菌 *Streptomyces* sp. A012304 のポルホビリノーゲン合成酵素の特性
# Characterization of porphobilinogen synthase from Alaremycin producing *Streptmyces* sp. A012304

上田 沙蘭、○岩井 伯隆、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
Saran UEDA, ○Noritaka IWAI, Masaaki WACHI (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

アラレマイシンはポルフィリン生合成の基質である 5-アミノレブリン酸と類似した構造を持つ抗生物質で、放線菌 *Streptomyces* sp. A012304 によって産生される。その作用標的は、5-アミノレブリン酸を基質としてポルホビリノーゲンを合成する酵素ポルホビリノーゲンシンターゼ（ PBGS ）であることが、緑膿菌 PBGS とアラレマイシンの複合体結晶構造解析から明らかとなった。PBGS は感染症を引き起こすマラリア原虫の酵素型や緑膿菌など細菌類の持つ酵素型がヒトの酵素型と異なることから、これら感染症治療における新しい薬剤標的として期待される。また天然物由来の PBGS 阻害剤はアラレマイシンが唯一の報告例である。本研究では、アラレマイシン生産菌のアラレマイシン耐性メカニズムが主に PBGS の違いに由来すると推測し、この違いを明らかにすることでアラレマイシンをより効果的な薬剤へと開発する上で有用な情報が得られると考えた。

まず、アラレマイシン生産放線菌 *Streptomyces* sp. A012304 株の PBGS 遺伝子を近縁種の PBGS 配列を元にしたプライマーにより部分的にクローニングし、インバース PCR 法により全配列を決定した。配列情報を近縁種のものと比較することで、耐性に寄与すると期待される相違点を見出した。次に、*in vitro* による活性評価系を構築するために組換え発現系の構築を試みたが、大腸菌を用いた発現系では可溶化した活性体を得ることはできなかった。そこで、広義の放線菌に属するコリネ型細菌を発現宿主として用いることで、可溶性の活性体 PBGS を得ることに成功し、精製酵素による PBGS 活性評価系の構築を達成した。そこで、アラレマイシン感受性 PBGS としてこれまでに使用してきた緑膿菌近縁種の PBGS とアラレマイシン生産放線菌 PBGS について、速度論的解析を行うことで、酵素の Km やアラレマイシンに対する Ki, IC50 を算出した。その結果、アラレマイシン生産放線菌はアラレマイシンに対して耐性な PBGS を有することで自己耐性となっていることを明らかにしたので報告する。

Alaremycin, porphobilinogen synthase

発表番号：2B034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アミノ酸キャリアタンパク質(AmCP)を介して生合成されるアミノ酸 DADH 修飾酵素の同定
# Identification of a modification enzyme of an amino acid (DADH) biosynthesized using amino acid carrier protein (AmCP)

○長谷部 文人、松田 研一、白石 太郎、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大・生物生産工学研究センター)
○ Fumihito HASEBE, Kenichi MATSUDA, Taro SHIRAISHI, Takeo TOMITA, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (Biotechnol. Res. Ctr., Univ. Tokyo)

【目的】一般に細菌はジアミノピメリン酸を経てリジンを生合成することが知られているが、*Thermus thermophilus*は細菌でありながらα-アミノアジピン酸(AAA)を経由してリジンを生合成する。この生合成の後半(AAAからリジンへの変換)はアルギニン生合成におけるグルタミン酸からオルニチンへの変換に似ているものの、生合成中間体のα-アミノ基をLysWタンパク質(Amino group carrier protein:AmCP)のC末端のグルタミン酸残基で保護したのちに、酵素群LysXZYJKによる反応が進行することが我々のグループにより明らかになっている。一方、放線菌*Streptomyces sahachiroi* が生産する抗腫瘍化合物であるAzinomycin Bの生合成遺伝子クラスター中に*lysWXZYK*ホモログ遺伝子が存在し、これらがazabicyclic ring骨格を有するアミノ酸骨格の生合成に関わることが示唆されている。さらに最近多数の放線菌ゲノム上に類似クラスターが発見され、アミノ基キャリアタンパク質を利用する新規なシステムが多くの二次代謝化合物の生合成に関わることが示唆された。本研究では、放線菌*Streptomyces* sp. SANK 60404（以下SANK 60404株）を用い、AmCPが関わる二次代謝産物の生合成についての研究を行った。我々はこれまでにSANK 60404株の有するAmCPが新規なアミノ酸(2*S*,6*S*)diamino-(5*R*,7)dihydroxy-heptanoic acid (DADH)の生合成に関わることを明らかにした。さらに、この生合成に必要な遺伝子を同定し、大腸菌を用いた異種生産やDADHを中間体として生合成される天然化合物(Vazabitide A, B)をLC-MSにより見出すことに成功している。今回は未決定であったVazabitide Aの構造決定を行い、DADHからVazabitide Aへの生合成に必要な遺伝子の同定を試みた。

【方法と結果】SANK 60404の培養上清からVazabitide Aを精製し、NMRによりその構造を決定し、azabicyclic ring骨格を有するアミノ酸とバリンから構成されるジペプチドであることを明らかにした。AmCPをコードする遺伝子近傍に存在する機能未知遺伝子である*vzb21*破壊株を作製し、その培養抽出液をLC-MSにより分析した。その結果、*vzb21*破壊株においてVazabitide Aの生産が消失することを見出した。さらにDADHを添加した培地で*vzb21*遺伝子を異種発現させた大腸菌を培養し、その菌体抽出液をLC-MSにより分析した結果、硫酸化されたDADHを検出した。Vzb21の組換え酵素を調製し、これとDADH、3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS)を混合し、30℃で反応させた。反応液をLC-MSに供した結果、硫酸化DADHへの変換を確認することが出来た。これによりVzb21がDADHを硫酸化する硫酸基転移酵素であることが明らかとなり、azabicyclic ring形成の一端が明らかとなった。

biosynthesis, amino acid, AmCP

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2B035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アミノ基キャリアタンパク質を指標とした新規天然化合物の探索及びその生合成に関する研究
# Identification and biosynthesis of AmCP-derived secondary metabolite

○松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、志波 優[2]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2]、新家 一男[3]、葛山 智久[1]、西山 真[1] ([1]東京大学、[2]東京農業大学、[3]産業技術総合研究所)
○Kenichi Matsuda[1], Fumihito Hasebe[1], Takeo Tomita[1], Yuh Shiwa[2], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[2], Kazuo Shin-ya[3], Tomohisa Kuzuyama[1], Makoto Nishiyama[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agric., [3]AIST)

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成において中心的な役割を担う LysW は、生合成中間体のアミノ基を結合・保護するキャリアタンパク質である。最近このアミノ基キャリアタンパク質(Amino group-carrier protein: AmCP)が放線菌にも見出され、*Streptomyces* sp. SANK 60404 においては、これを介して新規な非タンパク性アミノ酸 DADH が生合成されることが明らかになった。また DADH を生合成中間体とする天然化合物 Vazabitide A が発見され、放線菌における AmCP を介した二次代謝経路の存在が示された。その後行われた *amcp* 遺伝子を指標とした PCR スクリーニングとそれに続くドラフトシークエンスの結果、AmCP を介したシステムが放線菌に広く分布し、多様な二次代謝産物の生合成に関与することが示唆された。

PCR スクリーニングの結果見出された *amcp* 保持株 *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 において AmCP を介して生合成される天然物を探索するため、*amcp* 周辺領域約 70 kb を *Streptomyces lividans* TK23 に導入し、形質転換体の代謝物を高分解能 LC-MS を用いて分析したところ、新たに *m/z* 479.1555 の親水性化合物 s56-p1 を検出した。本化合物は親株の代謝物中にも微量ながら検出された。これを精製し、NMR による構造解析を行った結果、本化合物はグリシンと DADH 由来骨格からなるジペプチドであり、DADH 由来骨格に特異な hydrazone が付加した構造であることが分かった。本研究においてユニークな部分構造を有する新規天然化合物 s56-p1 が発見されたことから、AmCP を介して生合成される化合物群の構造多様性の一端が示された。

s56-p1 生合成遺伝子クラスターのデータベース検索を行ったところ、*orf37*～*orf44* からなるクラスターが放線菌や他の一部のバクテリアに分布していることが分かった。各 *orf* のノックアウト変異株は、s56-p1 の生産を失う一方で、hydrazone の部分構造を欠いた s56-p1 のコア構造の生合成能を依然として有していることが分かった。以上のことから本遺伝子クラスターが hydrazone ユニットの生合成に関与することが示唆された。

N-N 結合を有する天然化合物は現在までに 200 種類以上の報告例があり、多様な生物活性を示すことが知られている。いくつかの化合物については N-N 結合が生物活性に重要であることが示されているが、その形成機構は明らかにされていない。現在、s56-p1 の生合成における N-N 結合形成の鍵酵素と推定される ORF38 (N-monooxygenase)について機能解析を行っており、その結果についても発表する予定である。

Natural product, Streptomyces, Amino-group carrier protein

発表責任者：松田研一（kenichi.matsuda.1021@gmail.com）

発表番号：2B036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# II 型アミノ基キャリアタンパク質を介した二次代謝産物の生合成に関する研究
# Studies on the gene cluster including type-II amino group carrier protein

○内藤 一洋[1]、松田 研一[1]、長谷部 文人[1]、富田 武郎[1]、手塚 武揚[2]、大西 康夫[2]、志波 優[3]、吉川 博文[3]、新家 一男[4]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東京大学生物工学センター、[2]東京大学大学院農学生命科学研究科、[3]東京農業大学ゲノム解析センター、[4]産業技術総合研究所)
○ Kazuhiro NAITO[1], Kenichi MATSUDA[1], Fumihito HASEBE[1], Takeo TOMITA[1], Takeaki TEZUKA[2], Yasuo ONISHI[2], Yuh SHIWA[3], Hirofumi YOSHIKAWA[3], Kazuo SHIN-YA[4], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, Univ. Tokyo, [2]Grad. of Agric. and Life Science, Univ. Tokyo, [3]NGRC, Univ. of Agric., [4]AIST)

【背景と目的】放線菌 *Streptomyces* sp. SANK60404 が生産する天然化合物 Vazabitide A、B の生合成中間体である非タンパク性アミノ酸 (2*S*,6*S*)diamino-(5*R*,7)dihydroxy-heptanoic acid（DADH）は、アミノ基キャリアタンパク質（AmCP）を介した機構によって生合成されることが当研究室によって明らかとなった。この機構においては、まず AmCP-アミノ酸リガーゼによって、AmCP の C 末端に存在する保存モチーフ「EDWGE」の C 末端にある Glu 残基の γ-カルボキシル基と遊離のグルタミン酸の α-アミノ基がイソペプチド結合を形成し AmCP-γ-Glu が生成される。続いてこれが 6 つの酵素によって AmCP-γ-DADH へと変換された後に、カルボキシペプチダーゼによって DADH が AmCP から切り離される。一方で、*Streptomyces* sp. SpE090715LN-01（g11 株）のゲノム上に C 末端の保存モチーフが「RDWGQ」である AmCP（Type-II AmCP）が見出され、その周辺に存在する 16 個の ORF が複数の放線菌ゲノム上で高度に保存されたクラスターを形成していることが明らかとなった。この遺伝子クラスターは、DADH の生合成に必要な酵素ホモログの一部を欠いており、代わりに別の酵素を含んでいることから、DADH とは異なる化合物が生合成されていることが予想された。本研究は、Type-II AmCP を介して生合成される天然化合物を同定し、その生合成機構を解明することを目的とする。
【方法と結果】*type-II amcp* を含む遺伝子クラスターを有する 3 つの放線菌株に対して RT-PCR を行い、g11 株の遺伝子クラスター中に存在する AmCP-アミノ酸リガーゼのホモログ遺伝子が強く転写されていることを確認した。g11 株の形質転換法を確立し、遺伝子クラスター中の *hydrolase* ホモログ遺伝子の破壊株および相補株を作製した。LC-MS による網羅的な代謝物解析により、遺伝子破壊によって生産が失われ、遺伝子相補によって生産が回復する 2 種類の代謝物 g11-A、g11-B を見出した。これらを精製し NMR による構造決定を行った結果、g11-A、g11-B はいずれも 5 員環に水酸基、アミド基、カルボキシル基が付加した構造を有する新規化合物であることが明らかとなった。一方、Strep タグを付加した Type-II AmCP を発現する g11 株を作製し、その培養液から Type-II AmCP をアフィニティー精製した。この Type-II AmCP のトリプシン消化断片を LC-MS を用いて解析したところ、Type-II AmCP に特徴的な C 末端の Gln 残基が Glu 残基に変換されていることが明らかとなった。この結果から、Type-II AmCP の C 末端の Gln 残基を脱アミド化することによって、キャリアタンパク質としての機能を活性化する機構が存在することが示唆された。現在、g11 株から遺伝子クラスターを含むコスミドを取得しており、その異種発現の結果についても発表する予定である。

natural products, Streptomyces, amino group carrier protein

発表番号：2B037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# フェガノマイシン、レゾルシノマイシン類抗生物質の構造活性相関

# Structure and activity relationships of the anti-Mycobacterium antibiotics resorcinomycin and pheganomycin

○小笠原 泰志、藤盛 道子、雄谷 洸一、野池 基義、大利 徹（北大院工）
○Yasushi Ogasawara, Michiko Fujimori, Koichi Ooya, Motoyoshi Noike, Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

**【研究背景】**放線菌から単離されたペプチド系抗生物質であるフェガノマイシン類やレゾルシノマイシン類は特異的な抗 *Mycobacterium* 活性を示す。これらの化合物群は、何れもN-アミジノ化されたパラ置換-3,5-ジヒドロキシフェニルグリシン構造をN末端に有していることから、この部分構造が活性に重要であると考えられる。本研究では、フェガノマイシン類の生合成に関与し、N末骨格に各種ペプチド類を求核剤に用いてアミド結合形成を触媒するペプチドライゲースを利用した新規類縁体の合成を行い、構造活性相関を調べることを目的とした。

**【方法・結果及び考察】**各種N-アミジノフェニルグリシン誘導体として、N-アミジノ-２-フェニルグリシン（**1**）、N-アミジノ-２-(３,５-ジヒドロキシフェニル)グリシン（**2**）、N-アミジノ-２-(３,５-ジヒドロキシ-４-イソプロピルフェニル)グリシン（**3**）を合成的手法により調製した。これら基質と当研究室で最近見出した酵素であるペプチドライゲース(PGM1)を用いて**1**～**3**をフェガノマイシン由来のペプタペプチド（NVKDGPT）のN末端にアミド結合させ、それぞれ対応するオクタペプチド生成物（**1 A**～**3 A**）を得た。それぞれの化合物について *Mycobacterium smegmatis* を被検菌に用いた阻止円検定を行なった結果、化合物**3 A**にのみ活性が確認された。この結果は *N*-アミジノフェニルグリシン誘導体（**1**～**3**）のみでは活性を示さないこと、N末端基質についてフェニル基の３,５-ジヒドロキシ置換とパラ置換が共に必要なことを示している。本発表ではこれらの詳細について報告する。

(Ogasawara et al., *J. Antibiot.* in press, doi: 10.1038/ja.2015.88)

pheganomycin, peptide Ligase, structure and activity relationships

発表番号：2B038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

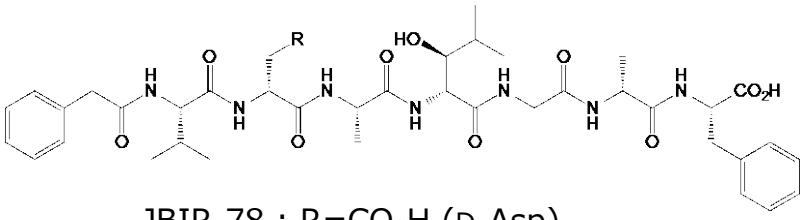
# ペプチド系天然化合物 JBIR-78 および 95 の生合成研究

# Biosynthesis of peptide antibiotics JBIR-78 and JBIR-95

○竹田 薫平[1]、佐藤 康治[1]、小笠原 泰志[1]、新家 一男[2]、大利 徹[1] ([1]北大工、[2]産総研)
○Kumpei TAKEDA[1], Yasuharu SATOH[1], Yasushi OGASAWARA[1], Kazuo SHIN-YA[2], Tohru DAIRI[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]AIST)

**【研究背景】**

JBIR-78 および JBIR-95 は放線菌 *Kibdelosporangium* sp. から単離されたヘプタペプチド化合物であり、*N* 末端にフェニルアセチル化されたバリン残基を有し、2 番目のアミノ酸残基に JBIR-78 では D-アスパラギン酸残基を、JBIR-95 では D-システイン酸残基を有する。その生合成に関しては、両化合物が非タンパク性アミノ酸残基を含むことから、ノンリボソーマルペプチド合成酵素 (NRPS) が関与すると予想されるが、NRPS により生成したペプチド骨格へのフェニルアセチル基の導入機構に関する報告はない。さらに NRPS が基質に用いる伸長単位のアミノ酸は、A ドメインの基質特異性により厳密に制御されていることを考慮すると、アスパラギン酸とシステイン酸の 2 種類の基質の取込機構にも興味が持たれる。そこで本研究では、JBIR-78 および JBIR-95 の生合成マシナリー解明を目的とした。




JBIR-78：R=$CO_2H$ (D-Asp)
JBIR-95：R=$SO_3H$ (D-Cysteic acid)

**【方法・結果及び考察】**

次世代シーケンサーにより取得した本生産菌のドラフトゲノム配列中に NRPS 遺伝子を探索した。その結果、NRPS 遺伝子の A ドメイン配列から推定される取り込み基質と JBIR-78 および JBIR-95 の構造中のアミノ酸配列が良く一致する NRPS 遺伝子を見出した。その周辺にはフェニルアセチル基形成およびシステイン酸合成に関与すると予測される遺伝子群も存在したことから、この遺伝子クラスターが JBIR-78 および JBIR-95 の両方の生合成に関与すると予想された。これを証明するため、クラスター中に見出された PLP 依存型システイン酸合成酵素オーソログの機能解析を試みた。組換え酵素を発現調製し活性試験した結果、ホスホセリンを基質としてシステイン酸を生成することを確認した。したがって、本クラスターは JBIR-78 および JBIR-95 の生合成遺伝子クラスターであること、また本 NRPS はアスパラギン酸およびシステイン酸の両方を認識する A ドメインを有することが強く示唆された。現在、フェニルアセチル基形成酵素群の解析を進めており合わせて報告する。

peptide antibiotics, non-ribosomal peptide synthethase

発表番号：2B039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# メナキノン新規生合成経路阻害剤の探索

# Isolation and structural determination of futalosine pathway inhibitors

○近藤 憲介、原田 立夏子、小笠原 泰志、大利 徹（北大院工）
○Kensuke Kondo, Rikako Harada, Yasushi Ogasawara, Tohru Dairi (Hokkaido Univ.)

**【研究背景】**メナキノンは人間にとっては血液凝固に必須のビタミン（ビタミン K）であり、また微生物では電子伝達系の補酵素として生育に必須な物質である。大腸菌や枯草菌におけるメナキノンの生合成は、コリスミ酸から *O*-スクシニル安息香酸を経る経路が既に明らかにされている。他方、当研究室では、胃がんの原因として知られているピロリ菌を含む一部の微生物では、既知経路とは異なる全く新規な経路（フタロシン経路）でメナキノンを生合成することを見出している。乳酸菌などの有用腸内細菌は既知経路でメナキノンを生合成することから、フタロシン経路の特異的阻害剤はピロリ菌に選択的に働く抗生物質になると期待される。本研究では天然物からフタロシン経路阻害剤の探索を行い、候補化合物の単離および構造決定を行った。

**【方法・結果及び考察】**阻害剤のスクリーニングを行う際、当研究室ではピロリ菌を扱うことができない。そこで互いに近縁の 2 種のバチルス属細菌を用いてフタロシン経路阻害剤のスクリーニングを行った。*Bacillus subtilis* は既知経路でメナキノンを生合成するのに対して、 *Bacillus halodurans* はフタロシン経路でメナキノンを生合成する。したがって、*B. subtilis* には活性を示さず *B. halodurans* には生育阻止活性を示すサンプルが候補化合物を含むと考えられる。そこで両菌株を被検菌に用い、微生物やカビの培養物、香辛料をサンプルに用いて阻止円検定により探索した結果、複数の候補サンプルを見出すことができた。次いで、候補サンプルが実際にフタロシン経路を阻害していることを確認するため、メナキノン添加により生育阻害が回復することを指標に絞り込みを行った。候補サンプルの一つである唐辛子の活性成分については、各種クロマトグラフィー等で精製を進め活性成分の構造を決定した。現在その他の候補サンプルについても活性成分の精製と構造解析を進めており、発表ではこれらの結果についても報告する。

menaquinone biosynthesis, futalosine pathway, inhibitor

発表番号：2B040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Xanthomonas oryzae* に見出した新規アミノ酸異性化酵素

Novel enzyme responsible for D-glutamate biosynthesis in *Xanthomonas oryzae*

○馮 若茵、佐藤 康治、大利 徹（北大工）
○Ruoyin FENG, Yasuharu SATOH, Tohru DAIRI (Hokkaido Univ.)

**【研究背景】**

多種多様な微生物のゲノム配列が決定されるにつれ、生物個体の維持・増殖に必須で普遍的に存在すると考えられてきた一次代謝経の生合成遺伝子が欠落している微生物の存在が認知されるようになった。これらのうち、生育に必須な補酵素やビタミンの生合成遺伝子を欠失している場合は、ゲノムデータに既知経路の相同遺伝子（オーソログ）が見いだされず、新規経路で供給される可能性が高い。実際に我々は、ピロリ菌に代表される一部の微生物では、電子伝達成分であり生育に必須なメナキノンが、従来から知られている経路とは全く異なる経路で生合成されること（***Science***, **321**, 1670, 2008）、また、葉酸の構成成分であるパラアミノ安息香酸の生合成に関与する新規遺伝子（酵素）も見出した（***J. Biosci. Bioeng***., **117**, 178, 2014）。今回、D-グルタミン酸の生成に関与する新規酵素の同定を試みた。

微生物細胞壁のペプチドグリカンには、非タンパク性アミノ酸である D-グルタミン酸が含まれる。これは生育に必須であり、これまでにグルタミン酸ラセマーゼと *Bacillus* 属細菌における D-アラニンから 2-ケトグルタル酸へのアミノ基転移による供給系が知られている。しかし、詳細なゲノム解析により、*Xanthomonas* 属の微生物は両遺伝子のオーソログを持たず、他の新規酵素・経路で生合成されると考えられたことから解明を試みた。

**【方法及び結果】**

新規生合成酵素・経路の探索は、D-グルタミン酸要求大腸菌を宿主としたショットガンクローニングで行った。*Xanthomonas oryzae* のゲノム DNA を制限酵素 *Sau*3AI で部分消化し約 5 kbp DNA 断片を調製、pUC19 ベクターへライゲーションし要求株を形質転換した。スクリーニングは D-グルタミン酸を含まない LB 培地で行った。

その結果、数株の相補クローンの取得に成功した。それらクローンには何れも共通の DNA 領域が含まれていた。現在、詳細な解析を進めており、その結果について報告する。

*Xanthomonas oryzae*, D-glutamate

発表番号：2B041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 *Streptomyces rochei* の遺伝子変異株における二次代謝産物プロファイルの解析
# Analysis of secondary metabolite profile in the mutants of *Streptomyces rochei*

○勝賀瀬 夏実、NINDITA Yosi、木梨 陽康、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Natsumi SHOUGASE, Yosi NINDITA, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は三つの線状プラスミド pSLA2-L, -M, -S を有し、抗生物質ランカサイジンおよびランカマイシンを生産する。両抗生物質の生合成遺伝子(*lkc, lkm*)は線状プラスミド pSLA2-L 上にあり、また本プラスミドは、Ⅱ型 PKS クラスターやカロテノイド生合成遺伝子(*crt*)クラスター等の二次代謝遺伝子クラスターも有していた。さらに本菌の染色体ゲノム配列も解読し、33 個以上の二次代謝生合成遺伝子クラスターの存在が示唆された。我々は本菌のラージスケール培養液の抽出物において、橙黄色化合物の蓄積を確認した。本研究ではこの化合物の解析を通して、*crt* 生産物を含めた潜在的二次代謝産物を獲得することを目的とした。

【方法・結果】

まず 7434AN4 株および当研究室で作製したそのプラスミド変異株 [51252 株(L+,M-,S-), K3A12 株(L-,M+,S-), 2-39 株(L-,M-,S-)など] を YM 培地において 28℃、3 日間振盪培養を行った。培養液の酢酸エチル抽出物について TLC 解析を行った結果、$R_f$ = 0.42 (acetone-hexane = 3:7)の位置に橙黄色のスポットがみられた。本化合物は 454 nm に極大吸収波長をもち、カロテノイドなどのポリエン構造の存在が示唆された。しかしこれらの化合物は pSLA2-L をもたない株でも検出され、本菌の染色体上の *crt* クラスターや他の二次代謝遺伝子による可能性が考えられた。さらに様々な制御遺伝子変異株の代謝産物についても調べたところ、コロニーが橙色を呈した KA80 株(オートレギュレーターレセプター遺伝子ホモログ 2315-013 の破壊株)においてこの橙黄色化合物が高蓄積していることが明らかとなった。APCI-MS による解析の結果、本化合物の分子量は 584、組成式は $C_{32}H_{40}O_{10}$ であることが示唆された。

現在は本化合物の同定のため、HPLC 分取および MS 解析、NMR 解析を行っている。また、染色体上の *crt* クラスターと本化合物との関連性を明らかにするため、*crt* 遺伝子変異株の構築も行っている。本発表ではその経緯について報告する。

*Streptomyces*, secondary metabolite

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2B042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

Secondary metabolites production of plasmidless mutants of *Streptomyces rochei* 7434AN4

○Yosi NINDITA[1], Kuninobu INADA[2], Haruyasu KINASHI[1], Kenji ARAKAWA[1] ([1]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ., [2]N-BARD, Hiroshima Univ.)

*Streptomyces rochei* 7434AN4 produces two structurally unrelated polyketide antibiotics, lankacidin (LC) and lankamycin (LM). This strain carries three linear plasmids, pSLA2-L (211 kb), pSLA2-M (113 kb), and pSLA2-S (18 kb), whose nucleotide sequences have been determined. Previous study showed that three plasmidless mutants of this strain, 2-39, YN-P7, and YN-P145, had lost their chromosomal telomere. Recently we demonstrated that *tap-tpg* gene pair of pSLA2-M functions to maintain the linear topology of chromosome in *S. rochei* 7434AN4. Based on draft nucleotide sequence data of *S. rochei* 7434AN4 chromosome, chromosomal terminal deletion in strain 2-39 was found to be 1.5 Mb in total. Southern hybridization analysis showed that chromosomal telomere deletion in each of plasmidless strains is various in sizes.

In order to compare the metabolites production profile of plasmidless mutants, each strain was cultivated in different medium (YM, R1M, and oatmeal medium) for five days. Secondary metabolites were extracted using ethyl acetate, and analyzed by HPLC and TLC. Although each of the plasmidless mutant exhibit different metabolite profiles compared to those of wild type *S. rochei* 7434AN4, strain YN-P145 showed additional UV-active spot when grown in YM and oatmeal medium. This UV-active compound, named as YN-P145A, was purified using Sephadex LH-20 and silica gel chromatographies. According to ESI-Mass spectrometry analysis, molecular formula of YN-P145A was established to be $C_{14}H_{16}N_2O_2$. Further structural analyses for YN-P145A will be described.

*Streptomyces*, secondary metabolites, circularized chromosome

発表責任者：Kenji Arakawa（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2B043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ランカサイジン生合成における補酵素ピロロキノリンキノンの機能解析

# Functional analysis of coenzyme pyrroloquinoline quinone in lankacidin biosynthesis

○梅代 亜紗子、山内 佑介、藪内 優、鈴木 敏弘、木梨 陽康、荒川 賢治（広島大院・先端研）
○Asasko UMESHIRO, Yusuke YAMAUCHI, Yu YABUUCHI, Toshihiro SUZUKI, Haruyasu KINASHI, Kenji ARAKAWA (Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は線状プラスミド pSLA2-L、-M、-S をもち、ポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）を生産する。pSLA2-L 上には LC 生合成遺伝子（*lkc*）クラスターが存在し、その中には補酵素ピロロキノリンキノン（PQQ）生合成遺伝子（*lkcK-lkcO*）が含まれている。また、その近傍に PQQ 要求性デヒドロゲナーゼと高い相同性を示す遺伝子 *orf23* を見出した。PQQ 生合成遺伝子 *lkcL* およびデヒドロゲナーゼ遺伝子 *orf23* の遺伝子破壊株はいずれも lankacidin C を生産せず、補酵素 PQQ もしくはその等価体（以下“PQQ 様分子”と記載）の関与が示唆された。これはグラム陽性菌における初めての報告例であるが、本菌の PQQ 様分子の構造および酵素の機能は不明であった。そこで本研究では、(1) Orf23 酵素の生化学的諸性質の解明、(2) LC 生合成におけるキノン補酵素の機能と構造決定、を目指した。

【方法および結果】

(1) Orf23 の生化学的諸性質を明らかにするため、Orf23 酵素を放線菌にて発現し、基質変換反応を行った。PQQ 存在下において、基質 lankacidinol が lankacidin C へと有意に変換された。lankacidinol C の $C_{23}$-$C_{25}$ 位側鎖はピルビン酸であるのに対し、lankacidinol の側鎖は乳酸であることから、Orf23 は C-24 位の酸化反応に関与していることが強く示唆された。さらに、本反応には $Ca^{2+}$などの二価金属が必須であることもわかった。

(2) FS7 株（*ΔlkcL*）の代謝産物解析を行ったところ、lankacidin C を生産しておらず、LC 生合成中間体（lankacidinol A）の生成が認められた。本株に PQQ を系外から添加したところ lankacidin C 生産は回復し、その最小誘導濃度は 8.02 nM であることが明らかになった。そこで本株を PQQ 様分子検定菌とし、LC 非生産株である KA61 株（LC 生合成活性化因子 *srrY* 破壊株）との共培養を行ったところ、lankacidin C の生産が確認できた。このことから KA61 株は PQQ 様分子を生産し、これが FS7 株に取り込まれて lankacidin C 生産が回復したことが強く示唆された。そこで KA61 株の培養上清と酢酸エチル抽出物についてバイオアッセイを行ったところ、培養上清にのみ PQQ 様分子が含まれることを確認した。さらに、本菌における PQQ 様分子の構造決定を行うため、培養上清を濃縮し、イオン交換クロマトグラフィーによる分画後バイオアッセイを行い、PQQ 様分子が含まれるフラクションを取得した。現在、大量培養により PQQ 様分子の単離と構造解析を進めている。

pyrroloquinoline quinone, *Streptomyces*, antibiotic

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2B044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 *Streptomyces rochei* の多重変異株が生産するアゾキシアルケン型化合物の生合成機構の解析
# Analysis of biosynthesis of azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*

○岸本 拓也[1]、國武 博文[2]、NINDITA Yosi[2]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[1,2] ([1]広大・工、[2]広大院・先端研)
○Takuya KISHIMOTO[1], Hirofumi KUNITAKE[2], Yosi NINDITA[2], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Fac. Eng., Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM, Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌は抗生物質を含む多種多様な二次代謝産物を生産する土壌細菌であり、一般的に一株あたり２０種以上もの二次代謝生合成遺伝子クラスターを有する。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、通常培養において主に２つのポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）、ランカマイシン（LM）を生産するが、LC、LM 生合成遺伝子および転写リプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株(*ΔsrrB ΔlkmE ΔlkcF-KR1*)ではアゾキシアルケン型化合物 KA57-A の生産が確認できた。KA57-A は通常培養では検出されない化合物であり、遺伝子工学による休眠二次代謝の覚醒に成功した。本化合物はアゾキシ結合を有するが生合成遺伝子は同定されておらず、アゾキシ結合の形成メカニズムは不明なままであり、大変興味深い。

【方法・結果】

本化合物は $C_{10}H_{20}N_2O_3$ のアゾキシアルケン化合物であり、標識酢酸やアミノ酸などの取り込み実験から本化合物の生合成起源は ①Hexylamine と Serine の縮合, ②酢酸 C-2 位で serine 分子との縮合, ③C-3 位の脱水あるいは脱リン酸を介して C-3, 4 位での二重結合の形成, ④C-4 位での還元、脱水反応, ⑤C-1', 2'位での二重結合の形成という一連の流れでアゾキシアルケン化合物が生合成されることがわかった。また、次世代シークエンサー解析を行ったところ、*S. viridifaciens* 由来のアゾキシ化合物 valanimycin 生合成クラスター(*vlm*)と高い相同性を示すクラスターが *S.rochei* 染色体上に検出できた。そこで KA57-A 生合成経路に関与する遺伝子の破壊株を構築し、代謝産物解析を試みた。Hexylamine の酸化への関与が考えられる SR2_0035-0226 遺伝子(*vlmH* ホモログ)の破壊を行ったところ、本遺伝子産物の生合成への関与が明らかとなった。現在は他の遺伝子破壊も進めており、本発表ではその経緯について報告する。

*Streptomyces*, secondary metabolite, azoxyalkene

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2B045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 *Streptomyces rochei* 変異株で見出された抗カビ化合物ペンタマイシンとシトレオジオールの生合成遺伝子の解析

# Analysis of biosynthetic genes for the anti-fungal compound pentamycin and citreodiol produced by a gene disruptant of *Streptomyces rochei*

○山手 直貴[1]、片岡 憂祐[2]、NINDITA Yosi[2]、木梨 陽康[2]、荒川 賢治[1,2] ([1]広島大・工、[2]広島大院・先端研)

○ Naoki YAMATE[1], Yusuke KATAOKA[2], Yosi NINDITA[2], Haruyasu KINASHI[2], Kenji ARAKAWA[1,2] ([1]Fac. Eng, Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM,Hiroshima Univ.)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は主に 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン（LC）およびランカマイシン（LM）を生産し、LC, LM 生合成遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L にコードされている。当研究室では、LC 生合成研究の一環で生合成遺伝子の破壊株を多数構築している。その中で *lkcA* 遺伝子破壊株(FS18 株)は LC を生産せず、ポリエンマクロライド抗生物質ペンタマイシン（分子式:$C_{35}H_{58}O_{12}$, 分子量:693.38）とシトレオジオール（分子式:$C_{11}H_{18}O_4$, 分子量:214.26）を過剰生産していた。しかし、これらの生合成遺伝子はプラスミド上に確認できなかったため、染色体上にコードされていることが示唆された。そこで本研究では、両化合物の生合成遺伝子クラスターの特定と遺伝子改変による構造多様化を目指した。

【方法・結果】

当研究室では塩基配列決定により、ペンタマイシン生合成遺伝子クラスターを見出した。このペンタマイシン生合成遺伝子クラスターは 15 個の ORF からなり、全長が 81.5 kb であることが判明した。また、*Streptomyces avermitilis* が生産する構造類似体フィリピンⅢ（分子式:$C_{35}H_{58}O_{11}$, 分子量:677.39）の生合成遺伝子（13 個の ORF）と比較したところ、P450 水酸化酵素遺伝子 *pemI* と ferredoxin 遺伝子 *pemJ* が、フィリピンⅢ→ペンタマイシンにおける 14 位水酸化に関与していると考えられた。そこでペンタマイシン高生産株 FS18 株から *pemI* 破壊株を構築し、代謝産物の構造を高分解能 ESI-MS で解析した。その結果、代謝産物の分子式は $C_{35}H_{58}O_{11}$（分子量:677.39）と判明し、酸素原子が 1 原子分減少していることがわかった。また、本化合物を HPLC により解析したところ、フィリピンⅢ標品と同一の保持時間に溶出ピークが検出された。さらに、$^1$H-NMR において、ペンタマイシンにおける 14 位のシグナルが高磁場シフトしていた。これらのことから、P450 水酸化酵素遺伝子 *pemI* は 14 位水酸化に関与していることが強く示唆された。標識メチル基の取り込み実験から、シオレオジオールの生合成には 3 分子の S-アデノシルメチオニンの関与が考えられ、*S. rochei* 上のポリケチド合成酵素（PKS）遺伝子クラスターを精査したところ、C-メチルトランスフェラーゼが含まれる PKS 遺伝子クラスターを 2 つ見出した。現在破壊株を構築しており、本発表では詳細を報告する。

*Streptomyces*, secondary metabolite, polyketide

発表責任者：荒川賢治（karakawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2B046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Rhodococcus jostii* RHA1 株のカテコール異化経路における CatC の役割

# Functional analysis of CatC in catechol catabolic pathway of *Rhodococcus jostii* RHA1

○山梨 智也[1]、原 啓文[2]、鮒 信学[1] ([1]静県大食栄、[2]マレーシア工科大マ日国際工科環境)
○ Tomoya YAMANASHI[1], Hirofumi HARA[2], Nobutaka FUNA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Universiti Teknologi Malaysia, MJIIT)

【目的】

*Rhodococcus jostii* RHA1 株は protocatechuate および catechol を異化し、TCA 回路の基質である acetyl-CoA および succinyl-CoA に分解する。本異化経路はβ-ケトアジピン酸経路と呼ばれ、protocatechuate branch および catechol branch から構成される。我々は以前、protocatechuate branch の PcaHG、PcaB、PcaL の *in vitro* 再構築に成功した[1)]。本研究では、catechol branch の CatA、CatB、CatC の反応を *in vitro* で再構築することを目的とした。

【方法】

大腸菌 *E. coli* BL21 株または *R. jostii* RHA1 株を用いて組換え CatA、CatB、CatC を調製した。基質、cathecol および *cis*,*cis*-muconate は市販品を用いた。(*S*)-muconolactone は CatB 組換え大腸菌を用い *cis*,*cis*-muconate から調製した。各生成物は HPLC および LC-MS を用いて解析した。また、(*S*)-muconolactone の光学異性は旋光度およびキラルセルカラムを用いた順相 HPLC により決定した。

RHA1 株における *catC* 遺伝子を破壊したΔ*catC* 株を作製した。1/5 LB 培地で定常期まで生育させた両株の菌体を Tris-HCl buffer に再懸濁し、1 mM の catechol を加えて 30℃で培養した。培養上清の酢酸エチル抽出物を HPLC で解析することによって、RHA1 株およびΔ*catC* 株の catechol 異化能の差異を検討した。

【結果および考察】

これまで CatC は(*S*)-muconolactone からβ-ketoadipate enol-lactone への異性化反応を触媒すると考えられていたが、その逆反応が正反応より速やかに触媒されることが明らかとなった。加えて、CatB または CatC の反応で生成する muconolactone は *S* 体であるのに対し、protocatechuate branch における PcaB 反応後に生成する muconolactone は *R* 体であることが明らかとなった。

また、catechol 異化実験において、*R. jostii* RHA1 株は catechol を速やかに異化するため、異化中間体を HPLC 分析で検出できなかった。一方、Δ*catC* 株では、異化中間体(*S*)-muconolactone が蓄積したのちに、それが次第に減少することが明らかになった。この結果から、*R. jostii* RHA1 株において(*S*)-muconolactone の異化に関与する未知経路の存在が示唆された。

【文献】

1) Yamanashi, T., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **79**, 830-835 (2015).

β-ketoadipate pathway, *Rhodococcus*, muconolactone isomerase

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2B047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 *Streptomyces* sp.由来イソクマリン生合成経路

# Biosynthesis of isocoumarin in *Streptomyces* sp.

○中村 修人、曽根 祐輔、鮒 信学 (静県大食栄)
○Shuto Nakamura, Yusuke Sone, Nobutaka Funa (University of Shizuoka)

【目的】RppA は *Streptomyces griseus* 由来の III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）であり、5 分子の malonyl-CoA から 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene（THN）の合成を触媒する [1)]。本研究では *Streptomyces* sp. NRRL S-340 のゲノム情報から、*rppA* 様遺伝子を含む生合成経路の発掘研究を行った。具体的には、機能未知遺伝子 *IG64_RS22465*（以下、*65*）、*rppA* 様遺伝子 *IG64_RS22470*（*70*）、dehydratase 様遺伝子 *IG64_RS22475*（*75*）からなるオペロンの機能解析を行った。

【方法および結果】我々は、*S. coelicolor* M1146 株を用いて本オペロンの異種発現を行い、組換え体が蓄積する化合物を HPLC、NMR、HRMS を用いて解析した。その結果、*70*、*75* および *65* を発現させると 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin（isocoumarin）を蓄積した。*70* と *75* の共発現株でも isocoumarin を蓄積した。また、*70* 発現株および *65* と *70* の共発現株では、isocoumarin および flaviolin（THN の空気酸化物）の蓄積は僅かであった。

65、70、75 の大腸菌による組換え蛋白質を調製し、malonyl-CoA を基質として *in vitro* 反応を行った。反応の酢酸エチル抽出物を分析した結果、70 と 75 を用いた反応からは isocoumarin が検出された。また、70 単独の反応からは、isocoumarin および flaviolin が僅かに検出された。さらに、70 単独の反応の水層を HPLC で分析し、一部のピークを分取し HRMS 解析を行ったところ、70 の生成物と考えられる pentaketide-CoA が検出された。この結果から、70 は RppA とは異なる活性を有する酵素であることが明らかになった。さらに、pentaketide-CoA を 75 と反応させた結果、isocoumarin が検出された。なお、65 は、70 と 75 による isocoumarin 生成に直接関与しない可能性が示唆されており、65 の触媒機能は現時点で不明である。

【考察】70、75 は isocoumarin 生合成酵素である。まず、70 により 5 分子の malonyl-CoA が縮合され、pentaketide-CoA を生じる。続いて、pentaketide-CoA の環化を 75 が触媒することで、isocoumarin を与えると予想される。isocoumarin 生合成に III 型 PKS が関与するという報告はない。また、ポリケタイドの鎖状中間体と反応し、骨格の形成に寄与する酵素は olivetolic acid cyclase の発見 [2)]以来、2 例目である。70 と 75 の酵素学的特徴および反応機構に大変興味が持たれる。

【文献】

1) N. Funa *et al. Nature* **400**, 897-899 (1999)
2) S. J. Gagne *et al. PNAS* **109**, 12811-12816 (2012)

isocoumarin, *Streptomyces*

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2B048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

III 型ポリケタイド合成酵素 DpyA による閉環反応の機構解析
Mechanistic analysis of polyketide cyclization by DpyA, a type III polyketide synthase from *Streptomyces reveromyceticus*

○谷 美生夏[1]、小野寺 渓斗[1]、相澤 光輝[1]、高橋 俊二[2]、長田 裕之[2]、鮒 信学[1] ([1]静県大食栄、[2]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)
○Mioka TANI[1], Keito ONODERA[1], Teruki AIZAWA[1], Shunji TAKAHASHI[2], Hiroyuki OSADA[2], Nobutaka FUNA[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】III 型ポリケタイド合成酵素（PKS）は、主として単環性のポリケタイドの合成を触媒する。III 型 PKS の反応は、伸長反応と閉環反応から構成されている。伸長反応は Claisen 縮合であり、catalytic triad（Cys-His-Asn）が関与する。Claisen 縮合による phloroglucinol 骨格の形成、aldol 反応による resorcinol 骨格の形成など、閉環反応は多様である。我々は以前、放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* から alkyldihydropyrone の合成を触媒する III 型 PKS・DpyA を見出している[1)]。DpyA は、β-hydroxy 低級脂肪酸のチオエステルに対し、methylmalonyl-CoA を伸長することによりσ-hydroxy 鎖状中間体を生じる。続いて、σ-hydroxy 鎖状中間体の二級アルコールおよびチオエステル間の分子内ラクトン化により alkyldihydropyrone が形成される。一方、*S. reveromyceticus* の III 型 PKS・SRE_9488 はσ-keto 鎖状中間体のエノールとチオエステル間の分子内ラクトン化により alkylpyrone を生成する。本研究では DpyA の閉環反応の機構解明を目的に、DpyA の変異酵素の解析を行った。
【方法および結果】DpyA と SRE_9488 の組換え酵素をそれぞれ放線菌および大腸菌から調製した。また、σ-hydroxy 鎖状中間体のアナログを有機合成により調製した。本アナログと DpyA とを反応させたところ、alkyldihydropyrone を与えた。一方、SRE_9488 は本アナログとほとんど反応しなかった。DpyA と SRE_9488 の反応性の差異に起因するアミノ酸残基を同定するため、GCS の結晶構造を基にして DpyA のモデリングを行った。その結果、catalytic triad（Cys139、His271、Asn303）を含む、触媒ポケットを構成するアミノ酸残基を予想することができた。これらのアミノ酸残基の変異酵素を作製し中間体アナログと反応させたところ、反応性の差異を見出すことができた。以上より、DpyA はチオエステラーゼ活性を有し、特定のアミノ酸残基がラクトン化に関与すると予想できる。
【考察】III 型 PKS の閉環反応において、鎖状中間体のエノールからエノラート、活性メチレンからカルバニオンといった反応種の形成に、特定のアミノ酸残基が関与するといった報告はない。III 型 PKS は、反応性の高い鎖状中間体の折りたたみを制御していると考えられる。一方、DpyA によるラクトン化には二級アルコールの脱プロトン化が関与すると考えられ、特定のアミノ酸残基が反応種の形成に関与すると考えられる。
【文献】1) Aizawa, T., Kim, S.-Y., Takahashi, S., Koshita, M., Tani, M., Futamura, Y., Osada, H., and Funa, N. *J. Antibiot.,* **67**, 819-23 (2014)

polyketide, *Streptomyces*, polyketide synthase

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2B049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Saccharopolyspora erythraea* 由来 FabB/F 様ポリケタイド合成酵素の *in vitro* 解析

# *in vitro* analysis of FabB/F-like polyketide synthase from *Saccharopolyspora erythraea*

○天野 結香子、鮒 信学（静県大食栄）
○Yukako AMANO, Nobutaka FUNA (University of Shizuoka)

【目的】SACE_5946 は、放線菌 *Saccharopolyspora erythraea* のゲノム上にコードされる脂肪酸合成酵素 FabF/B の相同蛋白質である。*S. erythraea* において、脂肪酸合成を担う FabF は SACE_1523 であり、SACE_5946 の機能は不明である。放線菌では FabF/B ホモログが一菌株に複数存在することが多い。本研究では、SACE_5946 が新規タイプのポリケタイド合成酵素（PKS）であることを証明する。

【方法および結果】*Streptomyces coelicolor* A(3)2 の脂肪酸合成酵素（FabF と FabH）、*S. coelicolor* A(3)2 の type II PKS（actinorhodin KS と CLF）、type I PKS（erythromycin 合成酵素 eryA1 の KS）、 *S. griseus* の type III PKS（RppA）遺伝子および SACE_5946 に対し系統樹解析を行った。その結果、SACE_5946 は I 型、II 型、III 型 PKS および脂肪酸合成酵素とは異なるクレードを形成した。放線菌 *S. coelicolor* M1146 をホストとし、SACE_5946 を高発現させ、その培養上清を HPLC で分析した。その結果、空ベクターの形質転換体の培養上清にはない化合物のピークが 6 本検出された。また、これらの化合物は SACE_1523 の高発現株の上清にも存在しなかった。これらの化合物を順相および逆相クロマトグラフィーにより精製し、NMR および高分解能 MS 解析を行った。その結果、SACE_5946 の形質転換体が生産する化合物は 6-alkyl-4-hydroxy-3-methyl-2-pyrone 類であることが判明した。

SACE_5946 は放線菌生体内において β-ketoacyl-acyl carrier protein（ACP）エステルをスターター基質に用いると考えられる。そこで、3-oxooctanoic acid の ACP エステル（3-oxooctanoyl-ACP）を調製した。具体的には、*S. erythraea* の ACP・SACE_1524 を大腸菌由来の AcpS で holo 化し、生じた holo-ACP から大腸菌由来の MAT を用いて malonyl-ACP を調製した。本 malonyl-ACP と hexanoyl-CoA を基質として、*S. erythraea* の FabH・SACE_1525 と反応させることで 3-oxooctanoyl-ACP を調製した。スターター基質 3-oxooctanoyl-ACP と伸長鎖基質 methylmalonyl-CoA を SACE_5946 と共に反応させたところ、4-hydroxy-3-methyl-6-pentyl-2-pyrone を与えた。

【考察】ketosynthase（KS）による縮合反応が PKS の鍵反応であり、PKS は、KS の型と酵素全体の構造で分類されている。type I PKS はモジュール型・FabF/B 型であり、type II PKS はサブユニット型・FabF/B 型である。Type III PKS は単独型・FabH 型とサブユニット型・FabH 型の二種類がある。SACE_5946 は単独型・FabF/B 型であり、新規なタイプの PKS である。

polyketide, polyketide synthase, fatty acid synthase

発表責任者：鮒信学（funa@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2B050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 生合成エンジニアリングによるβ-lysine oligopeptide 生産菌の構築
# Construction of β-lysine oligopeptide producing strain by the biosynthetic engineering

○川崎 春香、丸山 千登勢、牛丸 和乗、濱野 吉十（福井県立大学）
○Haruka KAWASAKI, Chitose MARUYAMA, Kazunori USHIMARU, Yoshimitsu HAMANO (Fukui Pref. Univ.)

**【目的】**放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin（ST）は、その構造に 1～4 残基からなる β-lysine oligopeptide [oligo-(β-Lys)]を有している。これまでの研究で oligo-(β-Lys)の生合成は、α-Lys から β-Lys へのアミノ基転移反応を触媒する ORF15（L-lysine-2,3-aminomutase）と 3 つの新規ペプチド合成酵素（NRPS）、ORF5（A domain）、ORF19（A domain）、ORF18（T, C domain）が触媒することを明らかにしている[1)]。これまでに、これら NRPS 組換え酵素を用いた酵素合成にて得られた oligo-(β-Lys) 6 mer が枯草菌特異的な抗菌活性を示すことを明らかにし、医薬品のリード化合物としての有用性を見出した。そこで oligo-(β-Lys) を微生物生産するために、ε-poly-L-lysine（ε-PL）生産菌である *S. albulus* を宿主として用い、これら 4 つの遺伝子を導入した oligo-(β-Lys) 生産菌の分取育種を試みた。**【方法と結果】***S. albulus* は高い L-Lys 供給能力を有し、ポリカチオン性ポリマーである ε-PL を著量に生産・蓄積することから、oligo-(β-Lys) 生産菌に適していると予想された。ORF15 遺伝子を連結した ε-PL 合成酵素発現用ベクターを *S. albulus* に導入し、培養上清を分析したところ、標品である β-Lys に一致するピークを検出し、約 15mg/L の β-Lys 生産が確認された。従って ORF15 遺伝子が *S. albulus* においても発現可能であることが証明できた。次に、β-Lys の縮合反応（ペプチド合成）に重要な NRPS の発現について検証を行った。oligo-(β-Lys) 生合成酵素の一つである ORF18 は T domain を有しており、翻訳後に 4'-phosphopanthetenyl 基が付加されることによって活性型のホロ体になる。そこで異種宿主である *S. albulus* においても ORF18 T domain が活性化されるか検証するために、*S. albulus* を宿主として ORF18 組換え酵素の構築を行った。現在、C 末端 His タグ融合タンパクとして発現した本酵素が *in vitro* 反応にて oligo-(β-Lys) を生産するか検証している。

**【文献】**1) Maruyama, C. *et al.*, *Nature chemical Biology,* 8,791-797. (2012)

NRPS, peptide, β-amino acid

発表番号：2B051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

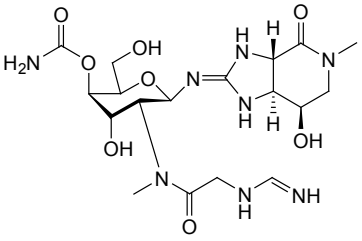
# BD-12 生合成における *N*-formimidoyl 基転移酵素の酵素学的諸性質

# Enzymatic properties of *N*-formimidoyl synthase in the BD-12 biosynthesis

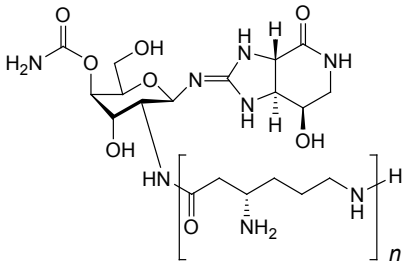
○新倉 春香[1]、丸山 千登勢[1]、泉川 美穂[2]、新家 一男[3]、濱野 吉十[1]（[1]福井県大・生物資源、[2]JBIC、[3]産総研）

○Haruka NIIKURA[1], Chitose MARUYAMA[1], Miho IZUMIKAWA[2], Kazuo SHIN-YA[3], Yoshimitsu HAMANO[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]JBIC, [3]AIST)

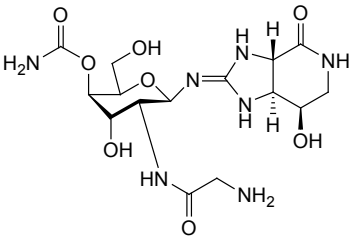
**【目的】**抗生物質 BD-12 は streptothricin（ST）類抗生物質の 1 つであり、放線菌 *Streptomyces luteocolor* NBRC 13826 によって生産される[1)]。その化学構造の特徴は、2 つの *N*-メチル基と *N*-formimidoyl-glycine 側鎖であり、生合成中間体である glycylthricin を経由して生合成されることを明らかにしている。BD-12 生合成遺伝子クラスター中に見出した ORF1 は、*N*-formimidoyl 基転移酵素[2)]に相同性を示したことから、glycylthricin を基質に *N*-formimidoyl 基を導入すると考えられた。そこで、本研究では、本酵素の酵素学的諸性質の解明とともに、その基質同定を行った。



BD-12



streptothricin (ST)



glycylthricin

**【方法と結果】***N*-formimidoyl 基転移酵素は、FAD 結合酵素であることが知られているが[2)]、大腸菌で発現した組換え ORF1（rORF1）に FAD との結合は観察されず、glycylthricin を基質とした酵素反応においても活性を検出することはできなかった。そこで、rORF1 を異種放線菌で発現させたところ、その精製酵素は FAD 酵素に特徴的な UV 吸収を示し、また、本酵素が既報の *N*-formimidoyl 基転移酵素[2)]と同じくホモ四量体であったことから、活性型酵素として発現していることが示唆された。そこで、glycylthricin を基質として酵素反応を行い、その反応液を HPLC/ESI-MS で分析したところ、*N*-formimidoyl glycylthricin の分子量 458 に一致する化合物の生成を観察し、本酵素の *N*-formimidoyl 化活性を検出することができた。さらに、本酵素の基質特異性を調べたところ、glycylthricin 以外にも ST が基質となることが判明したことから、これら基質を用いた反応速度論的解析の結果についても報告する。

**【文献】**

1) Furumai, T. *et al., J. Antibiot.* **21**, 283-289, 1968.

2) Dairi, T. *et al., Mol. Gen. Genet*. **236**, 49-59, 1992.

*N*-formimidoyl synthase, FAD, streptothricin

発表番号：2B052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# カプシエイト生合成前駆体、バニリルアルコールの ex vivo 生成系の確立

# Establishment of an ex vivo biosynthesis of vanillyl alcohol , the immediate precursor of capsiate

○丸山 将明、桐山 裕加、中谷 祥惠、古旗 賢二、和田 政裕（城西大薬）
○Masaaki Maruyama, Yuka Kiriyama, Sachie Nakatani, Kenji Kobata, Masahiro Wada (Josai Univ.)

【目的】

トウガラシの辛味成分カプサイシン（CAP）には体脂肪蓄積抑制作用等の報告があるが、その強烈な刺激のため機能性食品への利用は困難である。近年、CAP の類縁化合物として発見されたカプシエイト（CST）は、CAP と同様の生理作用を有しながらも刺激性が低いため、医薬品や機能性食品の新たな素材として有望視されている。トウガラシ果実内で、バニリン（V）から生成するバニリルアミン（$VNH_2$）を経由して CAP は生合成される。一方 CST は、V からバニリルアルコール（VOH）が生成することにより生合成されると考えられているが、V から VOH の生成メカニズムは明らかになっていない。本研究では、トウガラシにおける V から VOH への代謝に関わる要因を解明するために ex vivo による VOH 生成のモニタリング系の確立を目指した。

【方法】

薬草園で栽培したトウガラシの辛味品種ハバネロを用いた。新鮮な果実の表面を滅菌した後、クリーンベンチ内で胎座・隔壁部を摘出した。摘出した組織を ①「直接」 ②「ホモジナイズしたもの」、あるいは ③「プロトプラストにしたもの」に V（0.5~30mM）溶液を添加し 25℃でインキュベートした。V からの予想される代謝物である VOH、$VNH_2$ 量を HPLC を用いて測定した。

【結果・考察】

①、②の条件では V の添加により、VOH 生成が見られた。①の条件では $VNH_2$ の生成が見られたが②では見られなかった。また②では VOH 生成率が①より低値であった。③のプロトプラストからは VOH 生成が見られなかった。このことから、VOH 生成モニタリング系としては胎座・隔壁を直接使用した系が良いと考えられた。

Capsiate, pepper, vanillyl alcohol

発表責任者：丸山　将明（12.maruyama.0331@gmail.com）

発表番号：2B053
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

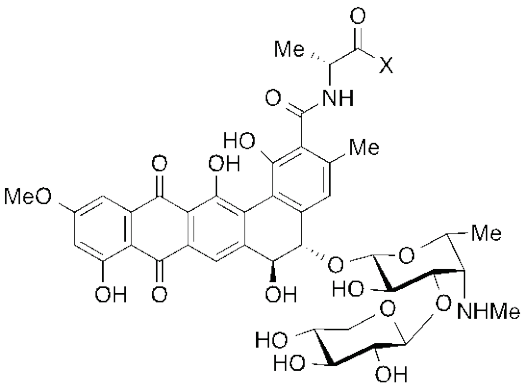
# プラディミシン A との結合における環内酸素原子の寄与

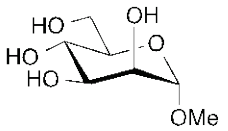
# Contribution of the endocyclic oxygen atom of D-mannose to binding to Pradimicin A

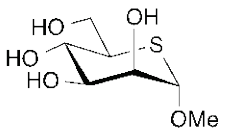
○渡邉 泰典[1]、中川 優[1,2]、都築 麗江[1]、菅原 貴弘[3]、相田 美砂子[3]、五十嵐 康弘[4]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]広大院・理、[4]富山県大・生工)
○Yasunori WATANABE[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Kazue TUZUKI[1], Takahiro SUGAWARA[3], Misako AIDA[3], Yasuhiro IGARASHI[4], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]REKEN, [3]Hiroshima Univ., [4]Toyama pref. Univ.)

【目的】 放線菌が産生する抗生物質 Pradimicin A (PRM-A) は, $Ca^{2+}$ 存在下で D-マンノース (Man) を認識する類稀な低分子化合物である．PRM-A との結合においては，Man の 2, 3, 4 位水酸基が重要であり，1 位および 6 位水酸基は重要ではないことが報告されているが，ピラノース環内酸素原子の寄与は明らかになっていない．そこで本研究では，methyl α-D-mannopyranoside (Man-OMe) の環内酸素原子を，水素結合能が低い硫黄原子に置換したアナログ **1** を用いて，PRM-A との結合における Man のピラノース環内酸素原子の役割を明らかにすることを目的とした.

【方法および結果】 アナログ **1** における硫黄原子の水素結合能を，水分子との相互作用をモデルとした DFT (密度汎関数) 法で計算化学的に評価したところ，水分子と **1** の硫黄原子との相互作用エネルギーは Man-OMe の環内酸素原子との相互作用エネルギーよりも小さいことが予測された. 一方で，ピラノース環のコンホメーションにおいては **1** と Man-OMe で大きな差はないことが予想され，本計算結果は **1** が Man-OMe と同様に PRM-A と結合して凝集体を形成することからも支持された．そこで，PRM-A に対する両者の結合活性を比較するため，同濃度の **1** と Man-OMe の共存下で PRM-A との凝集体を形成させ，凝集体中の **1** と Man-OMe の含有量を評価した．その結果，**1** と Man-OMe は凝集体に等モル量取り込まれていることが明らかになり，PRM-A に対する **1** と Man-OMe の結合活性は同程度であることが示唆された. さらに，等温滴定カロリメトリー (ITC) を用いて，凝集性の低い PRM-A アナログである PRM-Amide に対する **1** と Man-OMe の結合活性を評価したところ, 両者の結合定数はほぼ同等であった. これらの結果は, Man のピラノース環内酸素原子は PRM-A との結合に重要な役割を果たしていないことを示唆するものである.




antibiotic, carbohydrate recognition, pradimicin

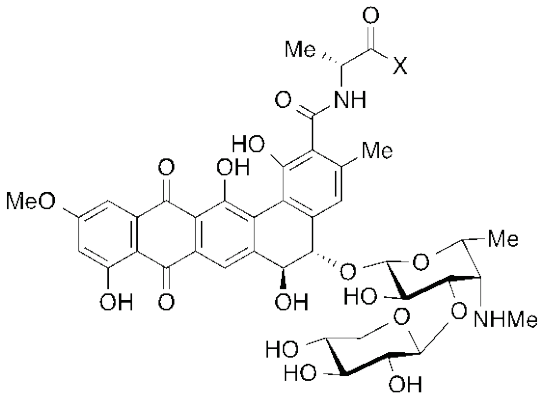
発表番号：2B054
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# プラディミシン A はアントラキノン部分でカルシウムと結合する
# Pradimicin A binds calcium ions through its anthraquinone moiety

○都築 麗江[1]、中川 優[1,2]、戸村 友彦[1]、土井 崇嗣[3]、竹腰 清乃理[3]、五十嵐 康弘[4]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1]（[1]名大院・生命農、[2]理研、[3]京大院・理、[4]富山県大・生工）
○ Kazue TSUZUKI[1], Yu NAKAGAWA[1,2], Tomohiko TOMURA[1], Takashi DOI[3], Kiyonori TAKEGOSHI[3], Yasuhiro IGARASHI[4], Yukishige ITO[2], Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Kyoto Univ., [4]Toyama Pref. Univ.)

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は，D-マンノース (Man) を含む糖鎖に結合して抗真菌活性を示すユニークな抗生物質である. PRM-A は $Ca^{2+}$ 非存在下では Man 結合能を示さず, $Ca^{2+}$ 存在下 PRM-A/$Ca^{2+}$ 複合体となることで Man と結合する．現在のところ，PRM-A における $Ca^{2+}$ 結合部位はカルボキシル基部分であると考えられているが，本仮説を実証した研究例はない．我々は，PRM-A を基にした研究用ツール分子および創薬リードの開発を検討している過程で，PRM-A のカルボキシル基をアミド化した新規アナログ **1** に Man 結合能が保持されていることを見いだした．そこで本研究では，**1** の Man 結合および抗菌作用における $Ca^{2+}$ 依存性を詳細に評価し, PRM-A の $Ca^{2+}$ 結合部位に関する新たな知見を得ることを目的とした.

【方法および結果】 アナログ **1** の Man 結合能を等温滴定カロリメトリー (ITC) で評価したところ，**1** は PRM-A と同様に $Ca^{2+}$ 非存在下では Man と結合せず，$Ca^{2+}$ 存在下でのみ Man 結合能を示すことが明らかとなった．さらに，**1** の *Candida rugosa* に対する抗真菌活性を評価したところ，PRM-A と同様に培地中への $CaCl_2$ の添加で抗真菌活性が上昇することが確認された．これらの結果は，PRM-A のカルボキシル基部分は $Ca^{2+}$ との結合に関与していないことを示唆するものである．カルボキシル基以外で $Ca^{2+}$ 結合部位の候補となるのは，様々な金属イオンと結合することが知られている 1-hydroxyanthraquinone (1-HAQ) を含む芳香環部分である．そこで，PRM-A が $Cd^{2+}$ 存在下でも Man を結合できることを考慮し，$Ca^{2+}$ のサロゲートとして $Cd^{2+}$ を用いた固体 $^{113}$Cd-NMR 解析により，PRM-A と 1-HAQ の $Cd^{2+}$ 結合様式を比較した．その結果，PRM-A/$Cd^{2+}$ および 1-HAQ/$Cd^{2+}$ 複合体の固体 $^{113}$Cd-NMR スペクトルは，シグナルのケミカルシフトおよび線幅ともにほぼ一致しており，両者の $Cd^{2+}$ 結合様式は同様であると考えられた．これらの結果は，PRM-A における $Ca^{2+}$ 結合部位はカルボキシル基部分ではなく，アントラキノン部分であることを強く示唆するものである.




PRM-A : X = OH
**1** : X = $NHCH_2CH_2OH$

pradimicin, antibiotic, solid-state NMR

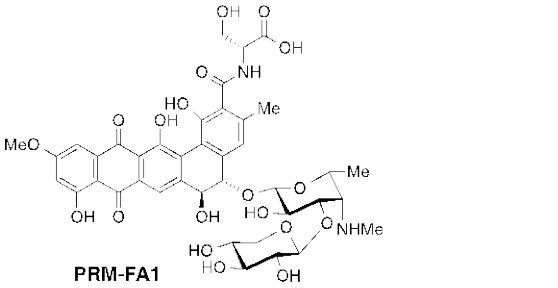
発表番号：2B055
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

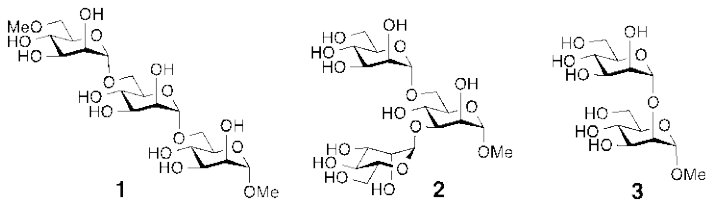
# プラディミシンと *Candida* 属真菌の細胞壁マンナンとの結合解析
# Binding analysis of Pradimicin to *Candida* cell wall mannans

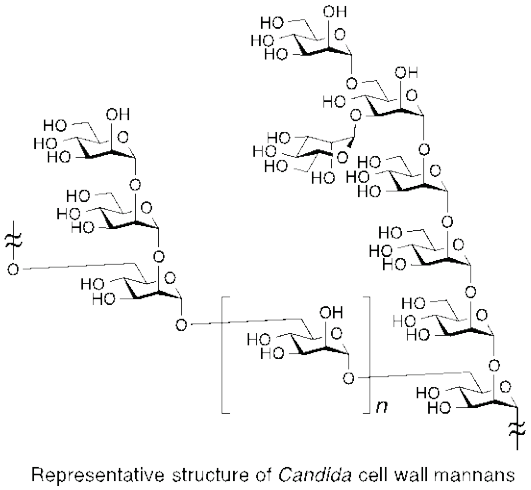
○山地 史哉[1]、中川 優[1,2]、渡邉 泰典[1]、五十嵐 康弘[3]、伊藤 幸成[2]、小鹿 一[1] ([1]名大院・生命農、[2]理研、[3]富山県大・生工)
○Fumiya Yamaji[1], Yu Nakagawa[1,2], Yasunori Watanabe[1], Yasuhiro Igarashi[3], Yukishige Ito[2], Makoto Ojika[1] ([1]Nagoya Univ., [2]RIKEN, [3]Toyama Pref. Univ.)

【目的】 Pradimicin 類 (PRM) は，真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示すユニークな抗生物質群である．PRM のマンナンに対する結合親和性は D-マンノース (Man) に比べて数百倍高いことから，PRM はマンナン中のオリゴ糖構造を強く認識していると考えられる．そこで本研究では，*Candida albicans* の細胞壁マンナンの部分構造であるマンノオリゴ糖を化学合成して PRM に対する結合親和性を比較することにより，PRM が認識するマンナン部分構造を特定することを目的とした．

【方法および結果】 *Candida albicans* の細胞壁マンナンは，Man が α-1,6 結合で連結した主鎖に様々な構造のマンノオリゴ糖が側鎖として付加した櫛形構造を基本骨格としている．そこで，主鎖の部分構造として **1** を，側鎖の代表的な部分構造として **2** および **3** をそれぞれ化学合成し，PRM との結合試験を行なった．糖と結合することで凝集体を形成する PRM-FA1 の沈殿生成を指標として結合親和性を評価した結果，分岐構造を有する **2** は，Man や直鎖構造を有する **3** よりも 50 倍以上，主鎖の部分構造である **1** よりも約 10 倍低い濃度で沈殿を生じた．本結果は，PRM が糖鎖構造を識別していることを示すものであり，マンナンの主鎖や直鎖構造の側鎖よりも分岐構造を有する側鎖に強く結合することを示唆するものである．




antibiotic, cell wall mannan, pradimicin

発表番号：2B056
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Thapsigargin の C1 ドメインに対する結合能と結合選択性の評価
# Evaluation of binding activity and selectivity of Thapsigargin for C1 domains

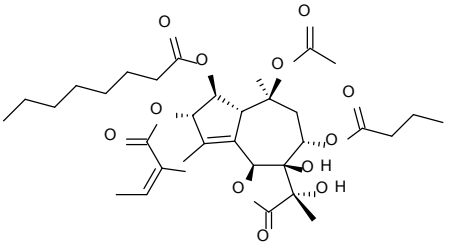
○高橋 知世[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2]、入江 一浩[3] ([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]京都大院農)
○Chise TAKAHASHI[1], Ryo YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyoto Univ.)

〈背景・目的〉

C1 ドメインは、約 50 残基の亜鉛フィンガー様モチーフを持つタンパク質ドメインであり、セカンドメッセンジャーである 1,2-diacyl-*sn*-glycerol (DAG) と結合する。C1 ドメインを含むタンパク質の中では、protein kinase C (PKC) ファミリーが最もよく研究されているが、近年 PKC 以外にもヒトにおいて 50 種類以上の C1 ドメイン含有タンパク質が存在することが明らかにされてきた。これらの C1 ドメイン含有タンパク質には、細胞のがん化など重要な細胞機能に関わるものも多数存在することから、それぞれのタンパク質の機能解析を行うための特異的リガンドの開発が求められている。C1 ドメインは、12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) に代表される天然の発がんプロモーターの標的としても知られているが、既知の発がんプロモーターはタンパク質間での C1 ドメイン選択性をあまり示さない (*Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4575) 。そこで本研究では、発がんプロモーターである TPA や teleocidin B が、未知タンパク質 Cytosolic-nuclear Tumor Promoter-specific Binding Protein (CN-TPBP) に結合し、セリ科植物由来のセスキテルペンラクトン thapsigargin (Tg) も CN-TPBP に結合するという橋本らの報告に着目し (*J. Cancer Res.* **1991**, *82*, 665) 、各 C1 ドメインに対する Tg の結合能と、そのタンパク質間の選択性を評価した。

〈方法・結果〉

[$^3$H]PDBu 結合阻害試験によって、化学合成した数種類の C1 ペプチドに対する Tg の結合能を評価した。その結果、Tg は PKCδ C1B ドメインには全く結合せず、Ras guanyl-releasing protein (RasGRP) 4 を含む数種類の C1 ドメインに対しては中程度の結合能を示した。RasGRP はがん原遺伝子産物 Ras を特異的に活性化させるタンパク質であり、Ras が関与するがん化メカニズムは未だ不明な点が多い。したがって Tg は、RasGRP の機能解析や、Ras のがん化メカニズム解析に有用な、新規リガンドのリード化合物として期待できる。さらに数種類の Tg 誘導体の C1 ドメイン結合能についても報告する。



Thapsigargin (Tg)

C1 domain, Thapsigargin, RasGRP

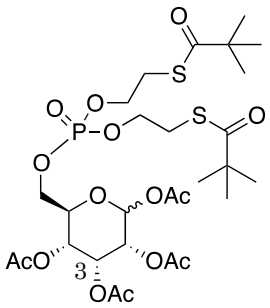
発表番号：2B057
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

膜透過性 D-allose-6-phosphate 誘導体の合成とヒト白血病 MOLT-4F 細胞増殖抑制活性
Synthesis of membrane-permeable D-allose-6-phsophate derivatives and its anti-proliferative activity against MOLT-4F cell line.

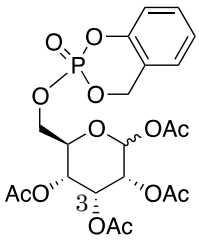
○石山 大展[1]、小橋 克哉[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2] ([1]香川大院農、[2]香川大農)
○ Hironobu ISHIYAMA[1], Katsuya KOBASHI[1], Ryo YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ.)

[**背景と目的**] D-Glucose の C-3 位エピマーである D-allose は天然に稀にしか存在しない希少糖の一つであり，様々ながん細胞株に対して増殖抑制活性を示すことが明らかにされている．また，D-allose は正常細胞に対して毒性を示さないことから，副作用の少ない抗がん剤候補化合物として注目されている．しかし，D-allose が増殖抑制活性を示すためには，mM オーダー以上の比較的高い濃度が必要であり，医薬品としての応用には絶対的な活性の向上が必要である．D-Allose のがん細胞増殖抑制活性には代謝物である D-allose-6-phosphate (A6P) が重要であることが報告されている．したがって，A6P は D-allose よりも低濃度で活性を示すことが期待でされるが，イオン性の A6P は細胞膜を容易に透過出来ないと考えられる．本研究では，膜透過性を付与し生物活性を向上させた A6P 誘導体の開発を目的とした．

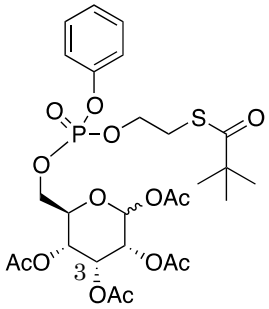
[**方法と結果**]リン酸基またはホスホン酸基を有した活性本体を持つ薬剤は，親水性が高いため吸収効率が低い．このような場合，細胞内で酵素的，非酵素的に切断される疎水性基でリン酸基またはホスホン酸基を保護するプロドラッグ化が有効である．A6P の場合，糖部位とリン酸基の両方を保護する必要があると考えられた．そこで，A6P の C-1 位から C-4 位水酸基をアセチル基で保護し，リン酸基を *S*-acylthioethyl (SATE) 基，cyclosaligenyl (cyclosal) 基，あるいは mixed-SATE 基で保護した誘導体 **1-3** を合成した．これらの誘導体のがん細胞増殖抑制活性は，D-allose に対し高い感受性を示すヒト白血病がん細胞株 MOLT-4F に対する増殖阻害試験により評価した．合成した全ての A6P 誘導体は，D-allose よりも高い活性を示し，その中でも cyclosal 基でリン酸基を保護した誘導体 **2** は D-allose の約 350 倍高い活性を示した．化合物 **2** は，A6P プロドラッグのリードとして期待できる．




**1**




**2**




**3**

rare sugar, D-allose, prodrug

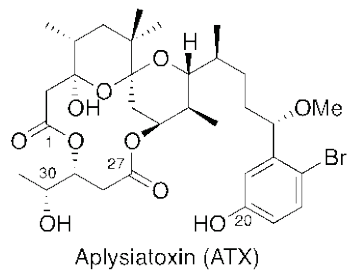
発表番号：2B058
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 分子モデリングによる Aplysiatoxin とプロテインキナーゼ C C1 ドメインとの結合様式の予測
# Prediction of the binding model of aplysiatoxin with protein kinase C C1 domains using molecular modeling

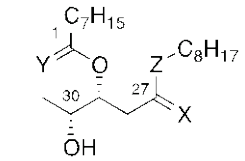
○芦田 能基[1]、柳田 亮[2]、川浪 康弘[2]、入江 一浩[3] ([1]香川大院農、[2]香川大農、[3]京大農)
○Yoshiki ASHIDA[1], Ryo YANAGITA[2], Yasuhiro KAWANAMI[2], Kazuhiro IRIE[3] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Univ., [3]Kyoto Univ.)

**[背景・目的]** アメフラシから単離される Aplysiatoxin (ATX) は, 細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) の C1 ドメインに結合し, PKC を活性化することで, がん細胞増殖抑制活性や発がんプロモーション活性を示す. 最近, 我々の研究グループは, がん細胞増殖抑制活性を保持したまま, 発がんプロモーション活性を除去した ATX 誘導体の開発に成功しており, ATX は新たな抗がん剤シードとして注目されている (*Chem. Rec.* **2014**, *14*, 251). 現在, より優れた誘導体の開発が進められているが, 誘導体の設計を合理的に行うために ATX と PKC C1 ドメインとの結合様式の解明が求められている. 我々は, 昨年度大会 (2015 年度岡山大会) において ATX の鎖状単純化誘導体 (**1-4**) および内因性リガンドである 1,2-diacyl-*sn*-glycerol (DAG) の誘導体 (**5-7**) の構造活性相関研究から, ATX 単純化誘導体 **1** の 27 位カルボニル基および 30 位水酸基が PKC との水素結合に重要であることを報告した. この結果をもとに, 本研究ではドッキングシミュレーションおよび分子動力学 (MD) シミュレーションを用いて ATX と PKC C1 ドメインとの詳細な結合様式の推定を行った.

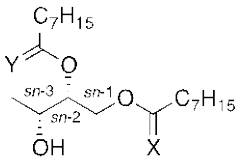
**[方法・結果]** PKC C1 ドメインの立体構造情報は PKCδ C1B ドメインと phorbol-13-acetate の共結晶構造 (PDB code: 1PTR; *Cell*, **1995**, *81*, 917) を, ATX の配座情報は既報の ATX の結晶構造 (*J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 2484) を用いた. 分子モデリングシミュレーションソフト AutoDock4 によるドッキングシミュレーションの結果, ATX の 30 位水酸基と C1 ドメインの Thr-242 (-NH) および Leu-251 (-C=O), ATX の 27 位カルボニル基と C1 ドメインの Gly-253 (-NH)が水素結合するモデルが最安定モデルとして得られ, 構造活性相関の結果と一致した. 加えて, ATX の 20 位フェノール性水酸基が C1 ドメインの Met-239 (-C=O) と水素結合していることが示唆された. その他, ATX と C1 ドメインとの詳細な相互作用を MD シミュレーションの結果とともに報告する.



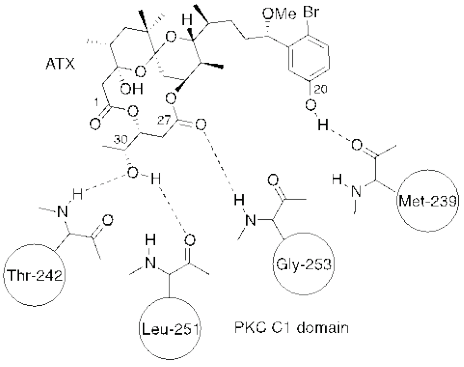
Aplysiatoxin (ATX)



**1** : X = Y = O, Z = O
**2** : X = $H_2$, Y = O, Z = O
**3** : X = O, Y = $H_2$, Z = O
**4** : X = $H_2$, Y = O, Z = $CH_2$



**5** : X = Y = O
**6** : X = $H_2$, Y = O
**7** : X = O, Y = $H_2$




Aplysiatoxin, protein kinase C, molecular dynamics

発表番号：2B059
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 久慈産琥珀の超臨界流体による分解・抽出物の単離精製、構造、並びに生物活性

# Isolation, structure elucidation and biological activity of the supercritical fluid extracts from Kuji amber

○川村 哲晃[1]、越野 広雪[2]、清水 栄作[3]、丸山 美紅[1]、上杉 祥太[4]、永澤 佳之[5]、七尾 英孝[5]、白井 誠之[5]、木村 賢一[1,3,4]（[1]岩手大・農、[2]理研・CSRS、[3]岩手大院・農、[4]岩手大院・連合農、[5]岩手大院・工）

○Tetsuaki KAWAMURA[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Eisaku SHIMIZU[3], Miku MARUYAMA[1], Shota UESUGI[4], Yoshiyuki NAGASAWA[5], Hidetaka NANAO[5], Masayuki SHIRAI[5], Ken-ichi KIMURA[1,3,4] ([1]Fac. of. Agri., Iwate Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [4]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ., [5]Grad. Sch. of Eng., Iwate Univ.)

【目的】琥珀は、数千万年～数億年前の植物の樹液が化石化したもので、大部分が溶媒に溶解しない高分子ポリマーであり、代表的な構造は communic acid や communol を主とするポリラブダノイド（クラス I）である。我々は、約 8500 万年前（中生代白亜紀後期）の久慈産琥珀のわずか 3～5%のアルコール可溶性画分から、新規抗アレルギー物質 kujigamberol 類を $Ca^{2+}$シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の生育回復活性で単離精製し、またその有機合成にも成功した [1,2]。今回、久慈産琥珀に超臨界流体による分解・抽出の手法を用い、通常ではアルコールに不溶である高分子ポリマー部分を構成する成分を単離精製し、その構造と活性を解析することを目的とした。

【方法・結果】久慈産琥珀粉末 1.0 g にメタノール 3 ml を加え、350℃、30 分間の超臨界条件で分解・抽出を行ったところ、214.8 mg のメタノール可溶性画分が得られた。メタノール可溶性画分は、これまでの通常のメタノール抽出による可用性画分と比較し、約 4.6 倍収量が増加した。次に、久慈産琥珀メタノール抽出物と超臨界抽出物を ODS カラムで HPLC 分析（4.6 $\phi$ x150 mm、85% MeOH、1 ml/min）を行ったところ、メタノール可溶性画分の kujigamberol（7.0 分）のピークが消失した代わりに、新たに保持時間の早い方から A～D の 4 成分のピークが認められた。そこで、それぞれのピークを HPLC で直接分取し単離精製したところ、A (4.5 分、3.0 mg)、B (7.5 分、1.7 mg)、C (10.9 分、1.6 mg)、並びに D (12.3 分、1.4 mg)が得られた。$Ca^{2+}$シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母株に対して、A～D 全てにおいて生育回復活性が認められた一方で、kujigamberol と比べて遺伝子変異酵母に対する活性は低下傾向が認められた。

1) K. Kimura, *et al.*, Fitoterapia, *83*, 907-912 (2012).
2) Y.-Q. Ye, *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., *22*, 4259-4262 (2012).

Kuji amber, supercritical fluid, polylabdanoid

発表責任者：川村 哲晃（a8212009@iwate-u.ac.jp）

発表番号：2B060
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 久慈産琥珀メタノール抽出物と kujigamberol の抗アレルギー活性

# Anti-allergic activity of the methanol extract of Kuji amber and kujigamberol

○丸山 美紅[1]、清水 栄作[2]、小林 幹[2]、大川 佑介[2]、内田 武史[2]、上杉 祥太[3]、木村 賢一[1,2,3] ([1]岩手大・農、[2]岩手大院・農、[3]岩手大院・連合農)
○ Miku MARUYAMA[1], Eisaku SHIMIZU[2], Miki KOBAYASHI[2], Yusuke OKAWA[2], Takeshi UCHIDA[2], Shota UESUGI[3], Ken-ichi KIMURA[1,2,3] ([1]Fac. of Agri., Iwate Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Iwate Univ., [3]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ.)

【目的】$Ca^{2+}$シグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母 YNS17 株（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）の、生育回復活性を有する久慈産琥珀メタノール抽出物(MEKA)と主要な新規生物活性物質 15,20-dinor-5,7,9-labdatrien-18-ol (kujigamberol) [1] は、ラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 細胞における脱顆粒を抑制すると共に、動物レベルで抗アレルギー活性を有することを 2014 年度の本大会で報告した[2]。今回、MEKA と kujigamberol のそれぞれの活性の濃度依存性を詳細に調べると共に、MEKA に含まれる kujigamberol 量を定量し活性との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】YNS17 株は 0.3 M $CaCl_2$ を含む YPD 培地で 28℃、3 日間培養し、サンプルの生育回復活性の有無を調べた。MEKA 中の kujigamberol の定量は、逆相 HPLC を用いた該当ピークの面積値計算により行った。RBL-2H3 細胞における抗 DNP-IgE・DNP-BSA (Ag)、thapsigargin (Tg)、並びに A23187 刺激による脱顆粒 (ß-hexosaminidase 放出)と細胞内 $Ca^{2+}$流入の抑制作用を測定した。動物試験は、モルモット遅発型鼻炎モデルにおいて抗原惹起 30 分前にサンプルを 20 µl ずつ左右に点鼻して鼻腔抵抗(nRaw)を測定し、ステロイド系の医薬品モメタゾンと比較した。
【結果】YNS17 株に対する MEKA の活性は、kujigamberol 含量に比べ約 15 倍の強さを示した。また、Ag 刺激による脱顆粒抑制活性は、MEKA と kujigamberol いずれも弱く、$IC_{50}$>50 µg/ml と $IC_{50}$> 50 µM であった。一方、Tg 刺激並びに A23187 刺激における脱顆粒抑制活性は、それぞれ $IC_{50}$=15.0 µg/ml、$IC_{50}$=29.1 µM、並びに $IC_{50}$=19.6 µg/ml、$IC_{50}$=24.9 µM を示し、Tg 刺激において MEKA の活性は、kujigamberol 含量に比べ約 75 倍の強さを示した。さらに $Ca^{2+}$流入試験では、Ag、Tg、並びに A23187 刺激において、MEKA は 50 µg/ml でそれぞれ 47%、85%、86%の阻害を、また kujigamberol は 50 µM で 41%、100%、94%の阻害を示した。同じく動物試験では、MEKA 並びに kujigamberol の 2 µg 投与で、10 分後の nRaw において同程度(約 74%)の低下作用が認められ、それはモメタゾン 10 µg 投与の場合と同程度であった。MEKA は、kujigamberol の含量に比べ約 150 倍の強さを示した。そこで、RBL-2H3 細胞を用いて他の脱顆粒抑制活性物質の探索を行ってみたが、kujigamberol 以外の主要成分は確認できないことから、MEKA の活性は kujigamberol を中心としたいくつかの成分により相乗的に発現している可能性が考えられる。

1) K. Kimura, *et al.*, Fitoterapia, *83*, 907-912 (2012).
2) 小林幹ら、2014 年度日本農芸化学会講演要旨集、2A05p09

Anti-allergy, Kuji amber, RBL-2H3 cells

発表責任者：丸山　美紅（a8212032@iwate-u.ac.jp）

発表番号：2B061
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

*Aspergillus* 属のアフラトキシン生産を阻害する dioctatin の作用機構に関する研究
Studies on the mode of action of dioctatin that inhibits aflatoxin production of *Aspergillus* species.
○古川 智宏[1]、片山 秀和[2]、市川 琢万[2]、木村 太一[1]、飯村 九林[1]、山本 利義[1]、根岸 瑠美[3]、鈴木 道生[1]、作田 庄平[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東海大・工・生化、[3]東大・分生研)
○Tomohiro FURUKAWA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Takuma ICHIKAWA[2], Taichi KIMURA[1], Kurin IIMURA[1], Toshiyoshi YAMAMOTO[1], Rumi NEGISHI[3], Michio SUZUKI[1], Shohei SAKUDA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]IMCB)

【目的】*Aspergillus* 属の生産するアフラトキシン (AF)による農作物の汚染は世界的に深刻な問題であり、AF 汚染を制御する効果的な防除法の開発が望まれている。当研究室では、早期耐性菌蔓延の懸念が少ない特異的 AF 生産阻害物質による防除法に着目し、AF 生産阻害物質に関する研究を行っている。これまでに、*Streptomyces* sp. SA-2581 の生産する dioctatin A について、$IC_{50}$ 4.0 μM で *Aspergillus parasiticus* の AF 生産を阻害するとともに、AF 生産関連遺伝子の転写量の減少、分生子形成の抑制を引き起こすことを見出した[1]。dioctatin A はヒトジペプチジルペプチダーゼ (DPP) II の阻害剤として知られるが、調べられた他の DPP 阻害剤に AF 生産を阻害する物質はなく、また *A. parasiticus* の近縁種である *A. flavus* のゲノムにはヒト DPP II と配列類似性の高いタンパク質の遺伝子は存在しない。dioctatin のような特異的 AF 生産阻害物質の作用機序の解明は、AF 生産分子機構のより深い理解と、効果的な AF 防除法の開発に貢献できると考えられる。そこで本研究では、dioctatin の AF 生産阻害機構の解明を目指した。

【方法および結果】スペーサーの末端にエチニル基を導入した dioctatin 誘導体とアジド基をもつナノ磁性化ビーズを反応させ、dioctatin 固定化ビーズを調製した。2 日間培養した *A. flavus* 菌体を糸状菌細胞壁溶解酵素で処理してプロトプラスト化し、これを破砕して *A. flavus* 抽出タンパク質を得た。抽出したタンパク質溶液に対し dioctatin 固定化ビーズによる精製を行ったところ、SDS-PAGE 上で 27 kDa 付近にビーズに結合し SDS 存在下で加熱溶出されるバンドが見出された。段階的に濃度を変えた dioctatin により競合阻害を行ったところ、27 kDa バンドは dioctatin の濃度が上昇するに従って消失した。更に、抽出タンパク質と dioctatin 固定化ビーズの反応後、過剰量の dioctatin により溶出を行ったところ 27 kDa バンドのタンパク質が溶出され、dioctatin との特異的な結合が示唆された。現在、バンドを切り出し LC/MS/MS によるタンパク質の同定を試みている。

【謝辞】本研究は農林水産省委託プロジェクト研究「カビ毒の動態解明と産生低減技術の開発(カビ毒動態)」として行われているものである。

[1] Yoshinari et al, Microbiology, **153**, 2774-2780 (2007)

target identification, aflatoxin, *Aspergillus flavus*

発表責任者：作田庄平（asakuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2B062
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

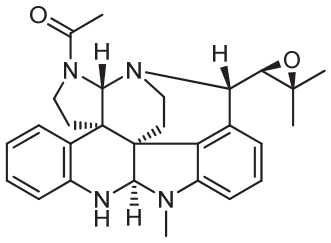
# コムネシンの殺虫活性発現機構に関する研究：ターゲットの候補に関する電気生理学的研究

# Mode of insecticidal actions of communesins: Electrophysiological studies on mode of actions on their target candidates in insects

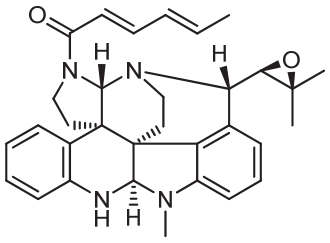
○橋本 杏樹[1]、橋本 真宜[1]、古谷 章悟[1]、甲斐 健次[2]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1]（[1]近畿大農、[2]阪府大院・生命環境）
○Anju HASHIMOTO[1], Masaki HASHIMOTO[1], Shogo FURUTANI[1], Kenji KAI[2], Makoto IHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【目的】

コムネシン類は*Penicillium expansum*等の糸状菌が産生する隣接4級不斉炭素をもつインドールアルカロイドである。これまでに大阪府立大学の林らはコムネシンをカイコガに対する殺虫活性物質として単離したが、その原因は不明であった。演者らは、コムネシンは神経活性物質と推測し、電気生理学的手法を用いてコムネシンの作用機構を解析した結果、抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）が標的候補であることを見出した。しかし、GluCl には数種のバリアントがあり、それぞれのバリアントに対する作用機構が同等かどうか、また、標的候補での構造活性相関が殺虫活性での構造活性相関と一致するのか不明であった。そこで本研究では、数種の GluCl バリアントに対するコムネシン類の作用について調べ、それらと殺虫活性との相関について調べたので報告する。



Communesin A



Communesin B

【方法と結果】

カイコガ幼虫の神経細胞を脳から調製し、一昼夜 25ºC で培養したのち、パッチクランプ法による電気生理学的測定に供した。膜電位を-60 mV に固定した条件で、コムネシン類はカイコガ神経細胞に対して単独で内向きイオン電流を誘起した。本イオン電流誘起活性は B が最も高く、試験したコムネシン類の殺虫活性の順位と一致した。コムネシンが誘起するイオン電流の逆転電位は塩素イオンの平衡電位と一致し、細胞外の塩素イオン濃度を上げることで脱分極側にシフトしたことから、神経細胞でリガンド作動性塩素チャネルを活性化していることが示唆された。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた exon 3a、3b および 3c の GluCl バリアントに対するコムネシン類の活性化作用に関する半数効果濃度 $EC_{50}$ 値も、神経細胞での塩素電流誘起活性と同様に殺虫活性と正の相関を示した。

GluCl, Bombyx mori, Communesin

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：2B063
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 海産生物由来物質 eudistomin C の作用機構解析
# Studies of mode of action of Eudistomin C

○工藤 駿[1]、吉田 圭佑[1]、南雲 陽子[1]、山田 諒介[2]、海原 浩辰[2,4]、横島 聡[2]、福山 透[2]、小林 淳一[3]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境、[2]名大創薬科学、[3]北大薬、[4]東大薬)
○ Shun KUDO[1], Keisuke YOSHIDA[1], Yoko NAGUMO[1], Ryosuke YAMADA[2], Hirotatsu UMIHARA[2,4], Satoshi YOKOSHIMA[2], Tohru FUKUYAMA[2], Junichi KOBAYASHI[3], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Nagoya Univ., [3]Hokkaido Univ., [4]Univ. Tokyo)

**【背景・目的】**カリブ海産ホヤ *Eudistoma olivaceum* から単離された eudistomin C (EudiC) は、強い抗ウイルス活性や抗腫瘍活性を示すことが報告されていた化合物であるが[1-3]、その標的分子、作用機構は不明である。我々は多剤超感受性酵母[4]を用いて EudiC が示す細胞毒性の標的分子、及び作用機構の解明を行っており、これまでに 40S リボソーム小サブユニットの構成タンパク質 Rps14 の変異が EudiC 耐性を付与すること、また EudiC が翻訳阻害活性を有することを報告してきた[5]。Rps14 は 40S リボソーム小サブユニットの構成タンパク質であると同時に、18S リボソーマル RNA (rRNA) プロセシングを介して 40S リボソームサブユニットの成熟にも必要であることが知られている。このため EudiC が、直接成熟リボソームに作用することで翻訳阻害するのか、あるいは 40S サブユニットの成熟を阻害することで翻訳阻害するのかについては不明であった。そこで本研究では EudiC が有する翻訳阻害活性の作用機構解明をおこなった。

**【方法・結果】** EudiC の 18S rRNA プロセシングへの影響を検討した。対数増殖期の出芽酵母に薬剤を処理し、成熟型の 25S、18S rRNA、及び 18S rRNA プロセシング中間体である 20S rRNA の細胞内量変化を経時的に検討したが、EudiC 処理によって 20S rRNA 蓄積は見られなかった。このことから、EudiC は 40S リボソーム小サブユニット成熟を阻害しないと考えられる。次に biotin 化 EudiC を用いて細胞抽出液から pull-down assay を行い、EudiC 結合タンパク質の検出を試みた。その結果 biotin 化 EudiC は Rps14 を含む 40S リボソーム小サブユニットと同時に、60S リボソーム大サブユニット構成タンパク質を共沈させた。一方、Rps14 と複合体を形成し 18S rRNA プロセシングに関わる Fap7 は検出されなかった。以上より、EudiC は 80S リボソームと結合することで、翻訳阻害活性を示すと考えられる。

1) Rinehart Jr., K. L. *et al., J. Am. Chem. Soc.,* **106**, 1524-1526 (1984)
2) Rinehart Jr, K. L. *et al., ibid,* **109**, 3378-3387 (1987)
3) Lake, R. J. *et al., Aust. J. Chem.,* **42**, 1201-1206 (1989)
4) Chinen, T. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)
5) 2013 年日本農芸化学会大会（公園番号: 2C21p15）

Eudistomin C, Rps14A, Protein translation

発表責任者：臼井　健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2B064
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

γ- チューブリン特異的阻害剤 gatastatin の抗腫瘍活性検討
Studies of the antitumor activities of γ- tubulin specific inhibitor gatastatin
○恵比須 春菜[1]、知念 拓実[1]、塩田 秀也[2]、早川 一郎[3]、木越 英夫[2]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境、[2]筑波大数理物質、[3]岡山大自然科学)
○Haruna EBISU[1], Takumi CHINEN[1], Shuya SHIODA[2], Ichiro HAYAKAWA[3], Hideo KIGOSHI[2], Takeo USUI[1] ([1]Univ. Tsukuba Life and Environmental Science, [2]Univ. Tsukuba Pure and Applied Sciences, [3]Okayama Univ.)

**【背景・目的】**微小管作用薬は増殖が速いがん細胞の細胞周期を分裂期で停止させ、細胞死を誘導することから抗がん剤として用いられている。しかしながら、既存の多くの微小管作用薬は間期の微小管に対しても作用するため、時として抹消神経痛を始めとする副作用を引き起こす。このため副作用の少ない分裂期特異的阻害剤が求められている。我々は、微小管核形成時に足場として働く γ- チューブリンの特異的阻害剤として gatastatin を見出し、昨年度本大会[1)]や論文[2)]等で報告してきた。本化合物は、既存の微小管阻害剤とは異なり、間期細胞の微小管骨格に対し形態的影響を示さずに分裂期紡錘体形成を阻害することから、副作用の少ない分裂期特異的作用薬となる可能性が期待される。そこで本研究では、gatastatin の細胞増殖阻害活性とその阻害機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

**【方法・結果】**様々の細胞を用いて gatastatin の細胞増殖阻害活性を検討したところ、一部の細胞に対しては 100 μM でも増殖を阻害せず、また阻害が見られる細胞に対しても、その効果は弱いものであった。そこで様々な分裂期作用薬と gatastatin を共処理したところ、有糸分裂の亢進に必須なキナーゼのひとつである polo-like kinase1 (Plk1) に対する阻害剤 BI2536 が、gatastatin の細胞毒性を増強することを見出した。HeLa 細胞を用い、gatastatin と BI2536 の共処理の細胞毒性増強メカニズム解析を行ったところ、それぞれ単独では細胞毒性を示さない濃度の gatastatin/ BI2536 共処理により、G2/M 期での細胞周期進行阻害が見られた。さらに、抗体免疫染色法を用い細胞の形態観察、及び中心体間の距離を計測したところ、gatastatin と BI2536 の共処理が分裂期中期細胞の中心体間距離を短縮し、単極紡錘体形成を誘導することが明らかになった。以上より、gatastatin と BI2536 の共処理は単極紡錘体を誘導し細胞周期を停止させることで細胞を死滅させることが示唆された。現在、gatastatin/ BI2536 共処理による細胞死誘導メカニズムの解析を行っているところであり、合わせて報告する予定である。

1) 2015 年日本農芸化学会大会（講演番号: 2D12p19）
2) Chinen T. *et al.*, The γ-tubulin-specific inhibitor gatastatin reveals temporal requirements of microtubule nucleation during the cell cycle, *Nat. Commun.*, **6**, 8722 (2015)

γ- tubulin, gatastatin, antitumor activity

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2B065
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Sialidase による可逆的 Tight junction 開口作用機構解析

# Analyses of the mechanism of reversible tight junction opening by sialidase

○山崎 洋平、神田 祐輔、南雲 陽子、臼井 健郎（筑波大生命環境）
○Youhei YAMASAKI, Yuske KANDA, Yoko NAGUMO, Takeo USUI (Tsukuba Univ.)

**【背景・目的】**上皮細胞間接着構造の一つであるタイトジャンクション（Tight Junction (TJ)）は、細胞同士を強く接着させることで細胞間を介した異物や病原菌の侵入を防ぐバリア機能を担っていると同時に、バイオ医薬品など高分子物質の投与障壁となっている。このため、バイオ医薬品をはじめとする高分子薬剤の投与は、静脈注射や点滴といった侵襲的な投薬方法に頼らざるを得ない。TJ を可逆的に開口することができれば、経口や経皮など患者の負担が少ない投薬が可能になり、患者の QOL 向上が期待できると考えられる。我々は、種々の可逆的 TJ 開口物質の作用機構解析を行う過程で、糖蛋白や糖脂質糖鎖末端から α-グリコシド結合シアル酸残基を脱離する糖分解酵素である sialidase (neuraminidase) に可逆的 TJ 開口活性を見出した。そこで sialidase による可逆的 TJ 開口機構を明らかにすることを目的に研究を行った。

**【方法・結果】**これまで我々は MDCKII 細胞を用いて capsaicin の可逆的 TJ 開口作用機構を解析し、TJ 開口には細胞内への $Ca^{2+}$ 流入を引き金とした cofilin の活性化と actin の局在変化、及び occludin の減少が重要であることを報告してきた [1, 2]。今回、sialidase の TJ 開口作用機構を capsaicin による TJ 開口機構と比較することによって解明を試みた。Western blotting により cofilin の活性化と TJ タンパク質量の変化を観察するとともに、F-actin の局在変動を観察、及び $Ca^{2+}$ 蛍光プローブ Fluo-8 を用いた $Ca^{2+}$ 流入活性を経時計測した。その結果、sialidase 処理は capsaicin と同様に、細胞内への $Ca^{2+}$ 流入を引き起こし、cofilin を活性化させるものの、actin の局在は変化が見られなかった。一方、capsaicin 処理時より顕著な occludin 減少が観察されたことから、sialidase は capsaicin と比較して、主に occludin の分解を介した TJ 開口を引き起こしていると考えられる。現在、より詳細な sialidase の作用機序について解析をおこなっており、合わせて報告を行う予定である。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 355, 520-525 (2007)
2) *PLoS ONE,* 8, e79954 (2013)

Sialidase, Tight junction, Occludin

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2B066
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

γ-tubulin 特異的阻害剤 gatastatin を用いた分裂期γ-tubulin 機能の解析
Analyses of γ-tubulin functions in mitosis by using γ-tubulin specific inhibitor gatastatin

○知念 拓実[1,2,3]、塩田 秀也[4]、PAGEL Judith[3]、SCHIEBEL Elmar[3]、早川 一郎[5]、木越 英夫[4]、臼井 健郎[2] ([1]理研 QBiC、[2]筑波大院・生命環境、[3]ハイデルベルグ大学・分子生物学研究所、[4]筑波大院・数理物質、[5]岡山大院・自然科学)
○ Takumi CHINEN[1,2,3], Shuya SHIODA[4], Judith PAGEL[3], Elmar SCHIEBEL[3], Ichiro HAYAKAWA[5], Hideo KIGOSHI[4], Takeo USUI[2] ([1]Riken, QBiC, [2]Grad. School of Life and Environmental Sciences, Univ. Tsukuba, [3]ZMBH, Heidelberg Univ., [4]Grad. School of Pure and Applied Sciences, Univ. Tsukuba, [5]Grad. School of Natural Science and Technology, Okayama Univ.)

**【背景・目的】**微小管細胞骨格は中心体に局在するγ-tubulin 複合体を足場としてα/β-tubulin ヘテロダイマーが重合して形成される繊維状の構造体であり、紡錘体形成をはじめとする様々な細胞内機能を担っている。γ-tubulin 複合体は微小管形成初期段階の微小管核形成を促進しており、γ-tubulin のノックダウンは二極紡錘体形成を阻害して細胞周期進行を分裂期前中期で停止させることから、微小管核形成は特に分裂期進行に重要であることが示されている。しかしながら分裂期前中期以降の二極紡錘体維持や分裂期後期の紡錘体伸長等へのγ-tubulin の寄与は不明であった。この理由として分裂期中期・後期特異的にγ-tubulin 機能を阻害する手法が無かったことが挙げられる。

これまでに我々はγ-tubulin 特異的阻害剤 gatastatin を見出し、昨年度本大会[1)]や論文[2)]等で報告してきた。そこで本研究では、gatastatin を用いてγ-tubulin 複合体による微小管核形成の二極紡錘体維持、及び分裂後期の紡錘体伸長への寄与を検討することを目的として研究を行った。

**【方法・結果】**γ-Tubulin 複合体による分裂期中期の二極紡錘体維持機構を解析するため、Eg5 阻害剤 S-Trityl-L-cysteine (STLC) 処理で分裂期前中期に停止させた後、STLC 除去とともにプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理することで、二極紡錘体を維持した状態で分裂期後期への移行を阻害した。この条件下、gatastatin の二極紡錘体形態への作用を検討したところ、gatastatin は HeLa 細胞の紡錘体の長さを短縮することが示された。また伸長微小管先端に集積する EB3-EGFP を発現した HeLa Kyoto 細胞を用いて、二極紡錘体の微小管ダイナミクスに対する gatastatin の作用を検討したところ、gatastatin は伸長微小管の数やその速度を低下させることが示された。

続いて分裂期後期から終期でのγ-tubulin 複合体の機能を検討するため、上記の方法で分裂期中期に停止させた細胞から MG132 を除くとともに、分裂期チェックポイント因子である MPS1 の阻害剤 reversine を処理することで強制的に分裂期後期へ移行させた。EGFP-α-tubulin/mCherry-H2B 発現 HeLa 細胞を用いて gatastatin の作用を検討したところ、gatastatin 処理細胞では分裂期後期から終期への移行が遅れ、また紡錘体形態も異常になることが示された。以上の結果からγ-tubulin 複合体の機能は、分裂期前中期のみならず分裂期全体を通して必要であることが示唆された。

1) 2015 年日本農芸化学会大会（講演番号: 2D12p19）
2) Chinen T. *et al*., *Nat. Commun.*, doi: 10.1038/ncomms9722.

γ-Tubulin functions in mitosis, γ-Tubulin specific inhibitor, Gatastatin

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2B067
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 11-oxoTTX をハプテンとしたポリクローナル抗体の作製と TTX 誘導体の生理活性

# Preparation of polyclonal antibody using 11-oxoTTX as the hapten, and biological activities of TTX derivatives

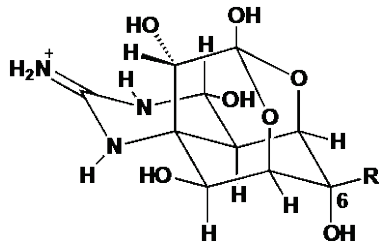
○猿橋 祥吾[1]、長 由扶子[1]、此木 敬一[1]、西川 俊夫[2]、山下 まり[1]([1]東北大院農、[2]名大院生命農)
○ Shogo SARUHASHI[1], Yuko CHO[1], Keiichi KONOKI[1], Toshio NISHIKAWA[2], Mari YOTSU-YAMASHITA[1] ([1]Tohoku Univ Agri., [2]Nagoya Univ Life Sci.)

【目的】抗テトロドトキシン抗体は、ELISA によってテトロドトキシン (Tetrodotoxin, TTX, **1**)を簡便に検出するのに有用である。TTX (**1**)は、電位依存性 $Na^+$チャネル($Na_v$)を強力かつ特異的に阻害する神経毒であり、フグによる食中毒の原因物質として広く知られている。Kawatsu ら[1]は、TTX (**1**)のグアニジン基と担体タンパク質のリジンの側鎖アミノ基をホルムアルデヒドによって結合させ、TTX 単体に対し高い特異性をもつモノクローナル抗体を作製した。我々は、これまで TTX (**1**)の 11 位側を修飾してタンパク質と結合し、抗 TTX 抗体を開発することを目指して種々検討してきた。前回は 11-norTTX-6,6-diol (**2**)を用いて抗体作製を行ったが、有用な抗体は得られなかった。そこで本研究では、TTX (**1**)の 11 位にアルデヒド基をもつ 11-oxoTTX (**3**)に bifunctional なリンカーを結合して担体タンパク質と結合し、それを抗原としてポリクローナル抗体を作製する方法を検討した。

また、抗体作製の過程で得られた修飾体など、数種の TTX 類縁体を用いて、マウス神経芽細胞腫 Neuro2A を用いた方法[2]で、電位依存性 $Na^+$チャネル($Na_v$)に対する阻害活性を評価し、構造活性相関研究への寄与を目指した。

【方法・結果】フグから 11-oxoTTX (**3**)を抽出、精製し、11 位アルデヒド基にリンカーを結合し、その誘導体の構造を NMR と高分解能 ESI-MS で確認した。それを KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin)及び BSA (Bovine Serum Albumin)と結合させ、抗原を作製した。SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS によって、TTX 誘導体が BSA に結合したことを確認した。作製した抗原 TTX-KLH conjugate をウサギに免疫し、抗 TTX ポリクローナル抗体の作製を試みる。

また、フグから精製した TTX 類縁体や TTX から化学誘導した C4, C6 または C11 の修飾体を、Neuro2A と ouabain, veratridine を用い[2]、$Na_v$ 阻害活性試験を行った。その結果、類縁体の活性は TTX (**1**)の 100~2100 分の 1 に減少し、C4、C6 の構造変化により活性が大きく低下することを確認した。さらに、C11 のみを修飾した上記のハプテンについても活性を調べる。




TTX (**1**) R=$CH_2OH$
11-norTTX-6,6-diol (**2**) R=OH
11-oxoTTX (**3**) R=CHO

[1] Kawatsu, K. *et al.*, *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 1997, 50, 133-150.
[2] Yotsu-Yamashita, M. *et al.*, *Toxicon*, 2003, 42, 557-560.

tetrodotoxin, antibody, 11-oxotetrodotoxin

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

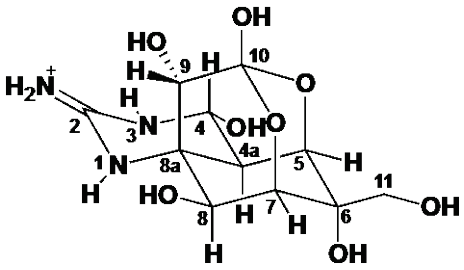
発表番号：2B068
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# トラフグ属（Takifugu）以外の属のフグ血漿中の PSTBP 類似タンパク質の解析

# Analysis of PSTBP-related proteins in the plasma of the pufferfish other than genus Takifugu

○長岡 佑真、長 由扶子、此木 敬一、山下 まり（東北大院農）
○Yuuma NAGAOKA, Yuko CHO, Keiichi KONOKI, Mari YOTSU-YAMASHITA (Tohoku Univ Agri.)

【背景・目的】


TTX

我々はこれまで、トラフグ属（*Takifugu* 属）のフグは共通して血漿中にサキシトキシン、テトロドトキシン結合タンパク質 (Pufferfish Saxitoxin and Tetrodotoxin Binding Protein, PSTBP) を有することを明らかにし、このタンパク質は tetrodotoxin (TTX), saxitoxin (STX) のフグの体内輸送に関わると考えられた [1)]。PSTBP は、タンパク質部分 42 kDa、糖鎖部分 62 kDa のモノマーが 2 つ結合した 208 kDa の糖タンパク質である [2)]。最近、橋口らは [3)]、DNA の PCR 解析から PSTBP 類似タンパク質は、*Takifugu* 属のフグにのみ存在する可能性を示した。しかし、*Takifugu* 属以外のフグも TTX を高濃度に有する。そこで本研究では、PSTBP 類似タンパク質が *Takifugu* 属以外にも存在するのかどうかを、各種フグ血漿と抗 PSTBP 抗体を用いて調べた。

【方法・結果】

沖縄産コクテンフグ（*Arothron nigropunctatus*）、サザナミフグ（*A. hispidus*）、オキナワフグ（*Chelonodon patoca*）、インド産トパーズパッファ（*Tetraodon fluviatillis*）の生体より血液を採取し、それぞれ血漿タンパク質 1 µg を 15% SDS-PAGE に供し、Western blotting で、PSTBP 類似タンパク質を検出し、分子量を比較した。一次抗体には、PSTBP のタンパク質部を抗原として作製した抗 PSTBP 抗体 [4)] を用いた。その結果、各血漿にヒガンフグ（*Takifugu pardalis*）の PSTBP（104 kDa）と分子量が異なる陽性バンドが検出され、*Arothron* 属の 2 種は 140-180 kDa、*C. patoca* と *T. fluviatillis* は 55 kDa 付近にバンドを与えた。次に、*N*-glycopeptidase F で糖鎖を切断し、同様に Western blotting で解析したところ、全ての種で糖鎖の切断が確認され、*Arothron* 属 2 種では 80-100 kDa、*C. patoca* と *T. fluviatillis* は 25 kDa 付近にバンドを与え、4 種とも *Takifugu pardalis* と分子量が異なった。今後、陽性バンドを示すタンパク質を精製し、アミノ酸配列を決定する予定である。

1) M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Toxicon*, **72**, 23-28, 2013.
2) M. Yostu-Yamashita, *et al., Eur. J. Biochem,* **268**, 5937-5946, 2001.
3) Y. Hashiguchi, *et al.*, *J . Evol. Biol.*, 2015, doi: 10.1111/jeb.12634
4) M. Yotsu-Yamashita, *et al.*, *Toxicon*, **55**, 1119-1124, 2010.

tetrodotoxin, saxitoxin, pufferfish

発表責任者：山下まり（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：2B069
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# DHA によるメラノーマ細胞増殖抑制
# Suppression of melanoma cell growth by DHA

○山田 秀俊、箱崎 真友佳 (岩手生工研)
○Hidetoshi YAMADA, Mayuka Hakozaki (IBRC)

【背景】
エイコサペンタエン酸（EPA）・ドコサヘキサエン酸（DHA）には抗腫瘍効果が報告されているが、標的分子を含めた作用分子メカニズムは未解明のままである。ヒトメラノーマ細胞株においても、DHA が細胞周期の停止と細胞死を引き起こすこと、DHA 感受性と Rb のリン酸化状態に相関が見られることが報告されている [1)]。本研究では、DHA によるメラノーマ細胞増殖抑制作用に着目し、分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

【方法と結果】
マウスメラノーマ細胞株（B16F10）を対象として、DHA の抗腫瘍効果について検討した。始めに、DHA の B16F10 細胞株に対する増殖抑制効果について検討するため、5x10^5 / dish で播種した B16F10 細胞を 25μM の DHA 添加した培地で 48 時間培養し、細胞数を評価した。コントロールの細胞は 2.1x10^6 まで増殖していたのに対して、DHA を添加した B16F10 細胞数は 1.6x10^6 に抑制された。そこで、DHA による B16F10 細胞のアポトーシス誘導について検討するため、DNA の断片化についてフローサイトメトリーを用いて解析したが、DHA 添加培地で培養した B16F10 細胞において DNA の断片化は観察されなかった。次に、DHA が B16F10 の細胞周期に与える影響について検討するため、BrdU の取り込みを指標にした細胞周期解析を行った。DHA を添加して培養した B16F10 において、DNA 複製期（S 期）細胞の割合が低下していた。さらに、DHA が細胞の倍加時間に与える影響について検討するため、蛍光色素の退色を指標にした細胞分裂解析を行ったところ、DHA 添加によって B16F10 細胞の倍加時間の延伸が観察された。以上の結果から、DHA は B16F10 の細胞分裂を遅延させることで増殖抑制に働いていると考えられる。現在は、DHA の細胞増殖抑制効果を複数のメラノーマ細胞株を用いて、分子メカニズムの解明に取り組んでいる。

参考文献
1) Albino AP, et al. *Cancer Res.* 2000; 60(15):4139-45.

DHA, Melanoma, Cell cycle

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

発表番号：2B070
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 脂肪酸によるメラニン合成制御機構の解明

# Regulatory effect of fatty acids on melanogenesis

○箱崎 真友佳[1]、山下 哲郎[2]、山田 秀俊[1] ([1]岩手生工研、[2]岩手大・農)
○Mayuka HAKOZAKI[1], Tetsurou YAMASHITA[2], Hidetoshi YAMADA[1] ([1]IBRC, [2]Iwate Univ.)

【目的】

メラニンは皮膚の基底層や毛髪の毛母にあるメラノサイト（色素細胞）で合成され、合成されたメラニン顆粒は角質細胞等に移行し、紫外線防御に働く。メラニンはチロシナーゼを基質として、メラニン合成酵素によって合成される。Tyrosinase（Tyr）はチロシンを L-DOPA、DOPAquinone に代謝し、Tyrosinase-related protein 2(TRP2)が DOPAquinone を 5,6-dihydroxyindole-2-carbolic acid (DHICA)に代謝する。DHICA は TRP1 によって indorle-5,6-quinone に代謝される。インドール化合物が重合することで、ユーメラニンやフェオメラニンが形成される。TRP1 および TRP2 はインドール化合物の重合過程においても機能している。

これまでに、リノール酸によってメラノーマ細胞中のメラニン量が低下し、パルミチン酸によってメラニン量が増加することが報告されていたが、そのメカニズムは明らかにされていなかった。そこで、本研究では、飽和脂肪酸によってメラニン合成が促進され、不飽和脂肪酸によって抑制されるメカニズムの解明に取り組んだ。

【方法】

B16F10 マウスメラノーマ細胞株（B16F10）を用いて研究を行った。脂肪酸によるメラニン合成の促進および抑制効果を検討するため、25μM の脂肪酸を培地に添加し、24、48、72 時間後の細胞内のメラニン量、遺伝子発現、蛋白質発現、蛋白質の細胞内局在を解析した。

【結果】

パルミチン酸等の飽和脂肪酸によるメラニン増加、および EPA 等の不飽和脂肪酸によるメラニン減少が観察された。そこで、脂肪酸によるメラニン合成制御機構について検討するため、Tyr の mRNA 量および蛋白質量、細胞内局在を解析したが、変化はみられなかった。つまり、脂肪酸は Tyr の発現および細胞内局在に影響しないと考えられた。次に、TRP1 の局在について検討したところ、パルミチン酸によって細胞膜近傍に存在する TRP1 が増加し、EPA によって減少することが明らかとなった。現在は、脂肪酸による TRP1 局在制御機構について解析を行っている。

melanin, fatty acids, tyrosinase-related protein 1

発表責任者：山田秀俊（hyamada@ibrc.or.jp）

発表番号：2B071
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 微生物フラクションライブラリーより単離した新規ネオアンチマイシン類縁体ウナンチマイシン A の構造

# Unantimycin A, a new neoantimycin analogue isolated from a microbial metabolite fraction library

○野川 俊彦[1]、リム チュン・リャン[1,2]、岡野 亜紀子[1]、二村 友史[1]、川谷 誠[1]、高橋 俊二[1]、ダーラ イブラヒム[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]マレーシア科学大）
○ Toshihiko NOGAWA[1], Chung Liang LIM[1,2], Akiko Okano[1], Yushi Futamura[1], Makoto Kawatani[1], Shunji Takahashi[1], Ibrahim Darah[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]USM, Malaysia)

**【目的】**放線菌や糸状菌などの微生物は、多様な構造と活性を有する二次代謝産物を生産することで知られている。それら代謝産物は医薬品や農薬、そしてそれらのリード化合物として利用されているものが多い。このような有用代謝産物を効果的に探索するために、我々の研究室では粗精製物（フラクション）から構成されるフラクションライブラリーとその DAD-LC/MS 分析結果を利用したオリジナルのスペクトルデータベース NPPlot（Natural Products Plot）を作製してきた。そしてこの方法を用いて新規化合物を探索・単離し、本学会においてもその有用性を報告している。今回、放線菌 *Streptomyces* sp. RK85-1355 のフラクションライブラリーより NPPlot を用いて新規化合物の探索を行うこととした。
**【方法】**放線菌 *S.* sp. RK85-1355 の 30 L 培養液より酢酸エチル抽出物を調製した。抽出物をシリカゲル中圧クロマトグラフィー、逆相 HPLC により連続的に分画することでフラクションライブラリーを作製した。各フラクションを DAD-LC/MS で分析し、含有成分の UV およびマススペクトルデータを収集した。UV クロマトグラムで検出されたピークの保持時間と対応する *m/z* の値を横軸および縦軸に取り化合物を二次元プロットすることで NPPlot を作成した。化合物は二次元上にドットとして表示され、それらの特徴的な分布パターンより新規化合物の探索を行った。見出した化合物は、対応するフラクションライブラリーより逆相 HPLC を用いて精製を行った。
**【結果】***S.* sp. RK85-1355 のフラクションライブラリーより作成した NPPlot の保持時間 27 分前後、*m/z* 650 前後の領域に類似の UV スペクトルパターンを示す化合物群を見出した。それら化合物群より新規 neoantimycin 類縁体、化合物 **1** を既知類縁体 SW-163A とともに単離した。化合物 **1** の UV スペクトルは、290 nm に極大吸収、240 nm にショルダーを有し、neoantimycin 類縁体であることを示唆した。マススペクトルから分子量は 625 であることが示され、高分解能質量分析より分子式を $C_{33}H_{39}NO_{11}$ と決定した。詳細な構造は二次元 NMR を含む NMR スペクトルの検討より決定した。その結果、化合物 **1** の構造を新規 neoantimycin 類縁体、unantimycin A と決定した。化合物 **1** は、antimycin 類の特徴である 2-hydroxy-3-formylbenzoic acid の代わりに 3-hydoroxybenzoic acid を有していた。このような置換パターンを有する benzoic acid を有する antimycin 類は天然物として初めての例である。化合物 **1** は各種がん細胞に対して細胞毒性を示した。

unantimycin, neoantimycin, fraction library

発表番号：2B072
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# RK-144171, a new benadrostin derivative produced by Stretomyces sp. RK88-1441

○Jun-pil JANG[1,2], Toshihiko Nogawa[1], Shunji Takahashi[1], Jong Seong Ahn[2], AhnHiroyuki Osada[1,2] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Chemical Biology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Korea)

**[Purpose]**

Secondary metabolites from microorganisms continue to provide a diverse and unique source of biologically active substances for drug discovery. The genus *Streptomyces* has played an important role as a major source of lead compounds, and numerous useful bioactive compounds have been isolated from this extraordinary genus and the *Streptomyces* genus, have also served as a promising source of novel compounds that is now receiving special attention. Thus, our research purpose is to discover novel bioactive metabolites from *Streptomyces* strains. Recently, we found a new benadrostin derivative from the culture extract of *Streptomyces* sp. RK88-1441. We report the discovery, isolation, and structures of a new benadrostin derivative, along with five known compounds.

**[Method]**

A 10 L of culture broth of *Streptomyces* sp. RK88-1441 was filtered and partitioned with same volume of ethyl acetate two times. Ethyl acetate-soluble layer was concentrated to afford 1.6 g of a crude extract. The EtOAc extract (1.6 g) was subjected to a silica gel column chromatography using a gradient of $CHCl_3$-MeOH (from 50:1 to 0:1) to yield ten fractions (Frs. 1~10). All fractions were analyzed by PDA-LC/MS to obtain UV and mass spectra of each metabolites within the fractions.

**[Results]**

In our continuing search for structurally unique metabolites based on PDA-LC/MS analysis, we found possible new compounds in the culture extract of *Streptomyces* sp. RK88-1441. The related fractions were purified by $C_{18}$-HPLC to afford a new benadrostin derivative, RK144171 (**1**), together with five known compounds (**2**−**6**). The structures of **1**−**6** were elucidated on the basis of the interpretation of NMR and MS spectroscopic data. RK144171 (**1**) was determined to be a new derivative of benadrostin bearing a rhamnose unit. The configuration of the rhamnose in **1** was decuded by the optical ration value of **1** ( $[\alpha]_D^{25}$ -54.1°) in comparison with the literature.

RK-144171, benadrostin derivative, Stretomyces sp. RK88-1441

発表番号：2B073
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 真菌の形態変化を指標とした抗真菌物質の探索研究

# Exploration of novel antifungal substances base on cell morphological changes

○山本 甲斐[1,2]、二村 友史[1]、植木 雅志[3]、鈴木 龍一郎[2]、白瀧 義明[2]、長田 裕之[1]([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー研究グループ、[2]城西大学、[3]理研・ナノ医工学)
○Kai YAMAMOTO[1,2], Yushi FUTAMURA[1], Masashi UEKI[3], Ryuichiro SUZUKI[2], Yoshiaki SHIRATAKI[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Josai Univ., [3]Nano Medical Engineering, RIKEN)

【目的】真菌はヒトや農作物に感染し様々な病気や被害を引き起こす。これまでに amphotericin B や polyoxin 等が有効な抗真菌剤として開発されてきたが、近年、これら既存薬に対する耐性菌の出現が問題となり、新薬の開発が強く求められている。本研究では真菌の形態変化に着目した独自のスクリーニング系を構築し、微生物代謝産物から新規抗真菌物質を発見することを目的とした。
【方法・結果】真菌は添加された化合物の作用によって様々な形態変化を示すことから、作用と形態を対応づけたカタログがあれば新しい作用を有する抗真菌剤を効率良く発見することが出来ると考えた。そこで我々は *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Magnaporthe oryzae*(シノニム:*Pyricularia oryzae*)の 3 種類の真菌に対して作用既知薬剤が誘導する形態変化を網羅的に収集・分類したカタログを構築した。実際に既存の抗真菌剤は特異的な形態変化を誘導し、容易に判別することが可能であった。スクリーニングでは阻止円を指標に抗真菌活性を示すサンプルを絞り込み、動物細胞への影響と比較することで真菌選択性を評価した。微生物培養液 3600 サンプルの活性評価を行い、真菌に特異的に毒性を示す 226 株を見出した。活性を示したサンプルについては 2 次スクリーニングとして形態の観察を行い、ユニークな表現型を示すサンプルを選定した。その結果、*C. albicans* の形態を酵母から菌糸へと変化させる RK13-A276 株を見出した。本菌株の培養液を各種クロマトグラフィーにより精製し、活性物質として RK13276-1 を単離した。RK13276-1 は *C. albicans* に対して優れた抗真菌活性を示し、その $IC_{50}$ は 560 pg/mL であった。また 1 ng/mL 以上で顕著な菌糸誘導活性を示した。
【結論】我々は真菌の形態変化を指標とした独自のスクリーニング系を構築し、*C. albicans* に菌糸形成を誘導する化合物 RK13276-1 を見出した。本化合物は *C. albicans* の菌糸形成機構を解明するユニークなバイオプローブとなる可能性が期待できる。

antifungal substance, microbial origin, morphology

発表番号：2B074
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 登熟中のオオムギ種子に蓄積する hordatine A β-D-glucopyranoside の特性と赤カビ病菌に対する効果

# Properties of hordatine A beta-D-glucopyranoside accumulated in barley seed during maturation and the effect on pathogen of *Fusarium* head blight

○神山 紀子[1]、平八重 一之[2]、小野 裕嗣[3]([1]農研機構作物研、[2]農研機構九州研、[3]農研機構食総研)
○Noriko Kohyama[1], Kazuyuki Hirayae[2], Hiroshi Ono[3] ([1]NARO NICS, [2]NARO KARC, [3]NARO NFRI)

【背景・目的】オオムギ種子には多くのフェノール性成分が含まれているが、未同定の成分も多く、その生理的役割について十分に解明されていない。発芽前の完熟種子に共通的に検出される成分の一つを単離精製し構造解析したところ、麦芽由来の抗菌成分である hordatine A β-D-glucopyranoside と同定された[1)]。そこで、登熟過程における本化合物の消長、搗精による局在性、品種間差及びオオムギの重要な病害菌である赤カビ病菌の胞子発芽に対する効果を調べた。
【方法】オオムギ完熟種子の全粒粉 1.0kg を 75%アセトン 3L で抽出し、濃縮後ヘキサンで脱脂し、カラムクロマトグラフィー（Sephadex LH-20、μBondapak C18、RP-Amide）で hordatine A β-D-glucopyranoside を精製した。開花後 5 日ごとに 5～40 日の種子をサンプリングし、hordatine A β-D-glucopyranoside と prodelphinidin B3 の 1 粒当たりの含有量を HPLC で定量した。完熟種子を小型搗精機（サタケ TM-05C）で 85、70、55％の歩留まりに搗精し、粉砕後、hordatine A β-D-glucopyranoside、phytate、prodelphinidin B3 の含有量を求めた。また皮麦 6 品種と裸麦 4 品種の完熟種子における含有量を調べた。赤カビ病菌（*Fusarium graminearum* H3、*Fusarium asiaticum* ZEA1）の胞子 $3x10^5$ cells/ml を含む液体培地に hordatine A β-D-glucopyranoside 溶液を濃度を変えて添加し、25℃で培養し 3 及び 6 時間後に顕微鏡で観察した。
【結果・考察】カラムクロマトグラフィーにより 6.1mg の hordatine A β-D-glucopyranoside を得た。hordatine A β-D-glucopyranoside は開花 20 日後から検出され 35 日後に 1 粒当たりの含有量が最大となり、10 日後から検出され 30 日後に最大となる prodelphinidin B3 に比べて登熟の遅い時期に蓄積した。搗精歩留まりと含有量の関係では、hordatine A β-D-glucopyranoside は phytate と同様に 85%から 70%の間で激減し、アリューロン層か胚に局在することが示唆された。品種間では 103～254nmol/g の変異があり、六条オオムギに比べ二条オオムギに有意に多く含まれていた。*F. graminearum* に対しては 0.01～0.5mM の濃度で、*F. asiaticum* に対しては 0.1～0.5mM の濃度で胞子発芽や菌糸伸長の阻害効果が観察され、hordatine A β-D-glucopyranoside が赤カビ病菌に対しても抗菌効果をもつこと、登熟後期以降の赤カビ病抵抗性に寄与する可能性が示唆された。

[1)] Kohyama and Ono (2013) *J. Agric. Food Chem.* 61, 1112-1116.

barley, hordatine, phytoanticipin

発表責任者：神山紀子（norikok@affrc.go.jp）

発表番号：2B075
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ダイズ葉焼病菌に対して活性をもつ抗菌ペプチド D 型フェニルセプチンの細胞膜との相互作用の解析

# Analysis of membrane interaction of antimicrobial peptide D-Phenylseptin for *Xanthomonas axonopodis pv glycines*

○川村 出、松尾 雄大、金田 志穂、北橋 由貴（横浜国立大学）
○Izuru KAWAMURA, Yuta MATSUO, Shiho KANEDA, Yuki KITAHASHI (Yokohama Natl. Univ.)

ダイズ葉焼病菌はダイズの葉を枯らし、ダイズの収穫量や品質に深刻な被害を与える。ブラジルやアルゼンチンのようなダイズ生産量が高い南米に生息するブチアマガエル *Hypsiboas punctatus* 由来の抗菌ペプチドである D 型フェニルセプチンは 2 残基目に D 体のフェニルアラニンを有し、様々な細菌に対して抗菌活性を持つが、特にダイズ葉焼病菌 *X. axonopodis pv. Glycines* に対して、全て L 体のアミノ酸残基で構成されている L 型フェニルセプチンよりも 8 倍程度強い抗菌活性を持つことが報告された(D-フェニルセプチン; MIC= 4.1 μM) [1]。抗菌活性発現の分子メカニズムを明らかにすることで、D 体アミノ酸を含むペプチド性の農薬開発研究が進み、ダイズ葉焼病菌からの被害を抑制することが期待される。

本研究の目的は抗菌活性の反応場のひとつとして考えられる細胞膜に注目し、フェニルセプチンと細菌模倣膜との相互作用を明らかにすることである。D 型フェニルセプチンのアミノ酸配列を以下に示す。18 残基のペプチドであり、2 残基目に L 体の Phe を有する L-フェニルセプチンはカエルの皮膚に存在するイソメラーゼによって翻訳後修飾を受けて、D-フェニルセプチンに変換されると考えられている。

D 型フェニルセプチンのアミノ酸配列

Phe-(D 体 Phe)-Phe-Asp-Thr-Leu-Lys-Asn-Leu-Ala-Gly-Lys-Val-Ile-Gly-Ala-Leu-Thr-$NH_2$

本発表では CD 測定や水晶発振子マイクロバランス(QCM)法などを用い、抗菌ペプチドと生体膜の分子間相互作用を観測し、D 型と L 型フェニルセプチンの膜親和性の違いを調べた。ペプチド合成機によって合成した 2 つのペプチドについて HPLC 分析を行ったところ、それらの保持時間は 3 分ほど異なり、D 型フェニルセプチンはさらに疎水性度が高いことが判明した。この傾向は、同じく D 体アミノ酸残基をもつボンビニン H4 においても観測している[2]。また、QCM の電極に固定化した DMPC 膜との相互作用解析の結果、どちらのフェニルセプチンも細胞膜に結合するが、解離定数 Kd に差が生じた。これらの結果の解釈として、フェニルセプチンの N 端から 3 残基目までは Phe が連続し、2 残基目のフェニルアラニンの立体異性によって N 端部分の疎水性が大きく変化し、細胞膜との相互作用に対して変化をもたらしていることが示唆された。発表ではさらに細菌模倣膜との相互作用、CD 測定や固体 NMR 測定によるペプチドの膜結合構造についても議論し、ダイズ葉焼病菌に対しての抗菌メカニズムについての理解を深めたい。

[1] M.T.Q. de Magalhaes et al. (2013) *PlosONE* 8, e59255.
[2] I. Kawamura et al. (2015) *Proceeding of Peptide Science 2015,*

Antimicrobial peptide, *Xanthomonas axonopodis pv glycines*, D-amino acide

発表責任者：川村出（izuruk@ynu.ac.jp）

発表番号：2B076
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

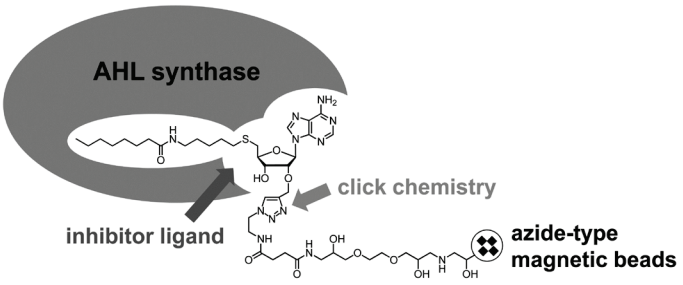
# アシルホモセリンラクトン合成酵素のプルダウンによる精製・同定法の開発

# An acyl-SAM analog as an affinity ligand for identifying quorum sensing signal synthases

○山田 将太、赤川 貢、甲斐 建次（阪府大院・生命環境）
○Shota YAMADA, Mitsugu AKAGAWA, Kenji KAI (Osaka Prefecture Univ.)

【目的】細菌はフェロモン様の低分子化合物を産生・分泌し，その濃度をモニターすることにより同種の菌密度を感知し，遺伝子発現や物質生産を調節している。この機構はクオラムセンシング（QS）と呼ばれ，グラム陰性細菌において最も一般的な QS シグナル分子は *N*-acylhomoserine lactone（AHL）である。AHL 類は，LuxI タイプの合成酵素によって，アシル–アシルキャリアータンパク質（acyl ACP）と *S*-adenosylmethionine（SAM）から合成される。SAM アミノ基のアシル化により反応中間体として acyl SAM が生じ，続いてメチオニン部分がラクトン化する反応機構であることが示唆されている。細菌 QS 機構を解明するには，AHL 合成酵素の同定が必須である。しかし，その迅速・簡便な手法は確立されておらず，変異株・DNA ライブラリーのスクリーニングやゲノム解析などの時間とコストがかかる手法しかない。そこで本研究では，acyl SAM をミミックした化合物をデザイン・化学合成し，クルードタンパク質溶液から AHL 合成酵素をプルダウン精製できるアフィニティープローブの作製を行った。

【方法・結果】AHL 合成酵素には，植物病原細菌 *Burkholderia glumae* 由来の TofI を His タグ融合タンパク質として大腸菌 BL21(DE3) 株で発現したものを用いた。はじめに，AHL 合成酵素のアフィニティー精製を可能にするためのリガンドとして，TofI の基質認識部位にフィットする acyl-SAM アナログ ASI-1 をデザイン・合成した。ASI-1 は，$K_i$ 110 nM で TofI を競合阻害する活性を示した。ドッキングシュミレーションにより，阻害剤 ASI-1 のアデノシン部分は TofI からわずかに飛び出た形で結合することが予想された。つまり，ASI-1 のアデノシン部分にリンカーを導入すると，阻害剤の酵素に対する結合を低下させずに，ビーズに ASI-1 を結合できることが期待された。そこで，リボースの 2′または 3′位ヒドロキシ基にアルキンタグを導入し，ASI-1 とアジド型磁気ビーズをクリック環化反応により結合し，アフィニティービーズを作製した。本ビーズを大腸菌クルードタンパク質溶液に供したところ，ビーズ吸着画分には TofI が SDS-PAGE 上で単一バンドとして含まれていた。このことは，我々が作製した ASI-1 固定化ビーズが高い TofI 結合特異性をもつことを示唆した。現在，より高い特異性と収量で AHL 合成酵素を得られるよう，リンカー部分の構造の最適化を進めている。




quorum sensing, *N*-acylhomoserine lactone synthases, affinity ligand

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

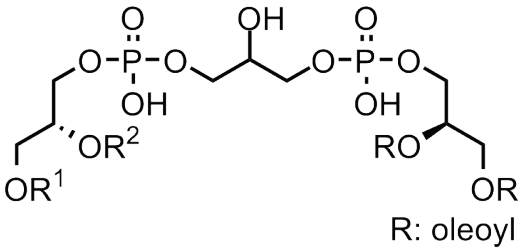
発表番号：2B077
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 出芽酵母 tafazzin によるカルジオリピンのリモデリング機構に関する研究

# Mechanism of the remodeling of acyl chain composition of cardiolipin catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* tafazzin

○長谷川 裕以、安部 真人、奥 公秀、阪井 康能、三芳 秀人（京大農）
○Yui HASEGAWA, Masato ABE, Masahide OKU, Yasuyoshi SAKAI, Hideto MIYOSHI (Kyoto Univ.)

**【背景】**カルジオリピン（CL、図1）はミトコンドリア内膜に局在するリン脂質であり、種々の電子伝達系酵素やトランスポーターの活性発現に必須である。CL は2つのリン酸基とグリセロール部から構成される極性頭部と、4 本の脂肪酸鎖から成る脂肪酸部を有している。CL の脂肪酸部の構成成分は、生物種や器官によって大きく異なっており、リモデリング系と呼ばれる機構で制御されることによって、脂肪酸部は特異性を獲得（成熟）する。しかし、リモデリング系を担う酵素群や個々の酵素のメカニズムに関してはいまだに不明な点が残されている。




CL (C18:1) : $R^{1,2}$ = oleoyl (C18:1)
*sn*-1-MLCL : $R^1$ = H, $R^2$ = oleoyl (C18:1)
*sn*-2-MLCL : $R^2$ = H, $R^1$ = oleoyl (C18:1)

図 1　本研究に用いた CL および MLCL

**【目的】**本研究では、CL の脂肪酸部に対するアシルトランスフェラーゼとされる、tafazzin の基質特異性を解明することを目的とした。ヒトにおける tafazzin の変異は、心骨格筋の異常を伴うバース症候群の原因と考えられている。

**【方法と結果】**Tafazzin は、CL が脱アシル化したモノリゾ CL（MLCL、図1）をアシルアクセプター、生体膜の主要成分であるホスファチジルコリン（PC）をアシルドナーとしたトランスアシラーゼだと考えられているが、詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、種々の MLCL 類を合成し、それらの基質特異性を比べることとした。MLCL の再アシル化反応は、PC と MLCL を含有するリポソーム（平均粒径 110 nm）を用いて行った。Tafazzin はグルタチオン *S*-トランスフェラーゼ融合タンパクとして大腸菌に発現させたものをアフィニティ精製して用いた。

MLCL の脱アシル化部位については、*sn*-1 位または *sn*-2 位についてそれぞれ考える必要がある。このため、標品とする MLCL の合成のために、*sn*-1 位または *sn*-2 位に対する特異的な脱アシル化反応を検討して合成方法を確立した。また、tafazzin による再アシル化反応の評価に先立ち、HPLC-ELSD（蒸発散乱光検出）による CL および MLCL の定量方法を構築した。オレイン酸を主成分とする MLCL 含有リポソームを用いて tafazzin の再アシル化反応をモニターしたところ、対応する CL の生成が確認できた。今後、脂肪酸組成を変化させたモノリゾ CL 類についても同様の実験を進めて、tafazzin の基質特異性を明らかにする。

cardiolipin, tafazzin, transacylase

発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2B078
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

Isoarborinol 合成酵素の *boat* 型コンフォメーション制御に関わる残基の同定
Identification of residues important for controlling *boat* conformation in isoarborinol synthase

○柿原 麻衣[1]、楢木 真吾[1]、中根 孝久[2]、高野 昭人[2]、鈴木 秀幸[3]、久城 哲夫[1] ([1]明大農、[2]昭和薬大、[3]（財）かずさ DNA 研)
○ MAI KAKIHARA[1], SHINGO NARAKI[1], TAKAHISA NAKANE[2], AKIHITO TAKANO[2], HIDEYUKI SUZUKI[3], TETSUO KUSHIRO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Showa Pharm.Univ, [3]Kazusa DNA Res.)

イネ科の多年草植物であるチガヤはその根茎が生薬ボウコンとして利用されており、利尿消炎作用がある。チガヤの主成分は arundoin と cylindrin と呼ばれるトリテルペン化合物であり、この２つの化合物は平面構造が同一だが 6 箇所の立体化学が異なるジアステレオマーである。これらは、oxidosqualene が環化する際に、B 環部分のみが *boat* 型の *chair-boat-chair* のコンフォメーションをとると isoarborinol を経て cylindrin が生成されるのに対し、*chair-chair-chair* のコンフォメーションをとると fernenol を経て arundoin が生成される。B 環のみが *boat* コンフォメーションで環化する反応は数多く存在する oxidosqualene 環化酵素（OSC）の中でも lanosterol 合成酵素などごく一部でしか見られず大変珍しい例である。そこで、これらトリテルペンを生成する OSC に注目し、両酵素のどのような違いにより異なったコンフォメーションが生じるのかを明らかにするため、チガヤ由来の isoarborinol 合成酵素 Ip-OSC1 と fernenol 合成酵素 Ip-OSC5 を用いて変異導入実験を行った。

両酵素のアミノ酸配列の比較により環化の際の B 環コンフォメーション形成に重要と考えられる候補アミノ酸残基を選び、これらの残基を相互に入れ替えた変異体を作成し、lanosterol 合成酵素欠損酵母 GIL77 株を用いて機能解析を行った。計 44 種類の変異体を作成したところ、Ip-OSC1 変異体の中では Ip-OSC1-Q414H 、 Ip-OSC1-V480S,C483S,T484S 、 Ip-OSC1-T530S,Y531F 、 Ip-OSC1-Q414H,V480S,C483S,T484S の 4 つの変異体において isoarborinol の生成とともに fernenol の生成が確認された。また、Ip-OSC5 変異体の中では Ip-OSC5-S479V,S482C,S483T,S527T,F528Y 変異体において fernenol の生成とともに isoarborinol の生成が確認された。

これらの結果から、Ip-OSC1 の V480、C483、T484、T530、Y531 残基と対応する Ip-OSC5 の S479、S482、S483、S527、F528 残基を入れ換えることである程度 B 環部分のコンフォメーションを変換できることが明らかとなり、これらの残基が oxidosqualene の環化の際の B 環コンフォメーションの制御に重要なアミノ酸残基であることが判明した。また、Ip-OSC1 の Q414 残基も B 環の *boat* コンフォメーション形成に重要であることが明らかとなった。これらのアミノ酸残基の側鎖の嵩高さに注目すると、Ip-OSC1 のアミノ酸残基は Ip-OSC5 の残基よりもすべて嵩高く、B 環が *boat* 型でフォールディングされる場合はこれらの嵩高い残基により基質のコンフォメーションが厳密に制御されていると考えられる。

triterpene synthase, isoarborinol, fernenol

発表責任者：柿原麻衣（ef21078@meiji.ac.jp）

発表番号：2B079
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アミロイドβの毒性コンホマーにきわめて特異的な抗体の開発とアルツハイマー病診断への応用

# Monoclonal antibody recognizing specifically a toxic conformer of amyloid ß42 and its diagnostic application to Alzheimer's disease

○村上 一馬[1]、徳田 真樹[1]、鈴木 天志[1]、入江 由美[1]、花木 瑞穂[1]、柳田 亮[2]、物部 容子[3]、赤木 謙一[3]、石井 亮太郎[4]、建部 陽嗣[4]、徳田 隆彦[4]、前田 雅弘[5]、久米 利明[6]、泉尾 直孝[7]、清水 孝彦[7]、入江 一浩[1]（[1]京大院農、[2]香川大農、[3]医薬基盤研、[4]京府医大、[5]免疫生物研、[6]京大院薬、[7]千葉大院医）

○Kazuma MURAKAMI[1], Maki Tokuda[1], Takashi Suzuki[1], Yumi Irie[1], Mizuho Hanaki[1], Ryo, C. Yanagita[2], Yoko Monobe[3], Ken-ichi Akagi[3], Ryotaro Ishii[4], Harutsugu Tatebe[4], Takahiko Tokuda[4], Masahiro Maeda[5], Toshiaki Kume[6], Naotaka Izuo[7], Takahiko Shimizu[7], Kazuhiro Irie[1] ([1]Grad. Agri., Kyoto Univ., [2]Kagawa Univ., [3]NIBIO, [4]Kyoto Pref. Univ. Med., [5]IBL, [6]Grad. Pharma., Kyoto Univ., [7]Chiba Univ.)

**【背景と目的】** アルツハイマー病（AD）の原因物質と考えられているアミロイド□β□タンパク質（Aβ42）は，オリゴマー化することによって神経細胞毒性を示す．これより，抗 Aβ オリゴマー抗体は，AD の診断・予防・治療において有望視されている．これまでに我々は，Aβ42 の Glu22, Asp23 付近での「毒性ターン」構造を特徴とした毒性配座理論を提唱している [1)]（下図：毒性コンホマーからなる 2, 3 量体を基本単位とした毒性オリゴマー形成の推定機構．毒性コンホマーは，毒性オリゴマーを形成しやすい）．近年，本研究者らは，Aβ42 の毒性コンホマーを標的とした立体構造特異抗体（11A1）を開発した [2)]．11A1 は，従来抗体では認識が困難であった細胞内毒性オリゴマーを顕著に検出した一方で，毒性コンホマーをあまり形成しない野生型 Aβ42 の単量体およびアミロイド線維にも反応したことから，毒性コンホマーに対する特異性がより高いクローンを再探索した．

**【方法と結果】** 11A1 開発時に得られた 7 種のモノクローンの特性を，酵素免疫法で評価した結果，11A1 と比べて，毒性コンホマーに約 10 倍強く結合し，野生型 Aβ42 にあまり反応しないクローン（24B3）を見いだした．24B3 の E22P-Aβ42（毒性コンホマー固定アナログ）に対する解離定数（$K_D$）は 3.1 nM であり（11A1 : 22.9 nM），E22P-Aβ42 の神経細胞毒性も強く抑制した．また，24B3 は Aβ42 および Aβ40[3)] の 2 量体モデルペプチドにより強く反応することが判明し，ドッキング計算から Aβ の毒性ターンならびに隣接した分子間 β シート形成領域を認識していることが示唆された．さらに，24B3 と N 末抗体（82E1）を組み合わせた ELISA を構築し，脳脊髄液を解析したところ，AD 患者において毒性コンホマーを有する毒性オリゴマー量の全 Aβ42 量に対する割合は，健常人に比べて有意に高かった．以上より，24B3 は AD 診断の新しいツールになる可能性がある．

1) Murakami, K. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, *78*, 1293.
2) Murakami, K. *et al., ACS Chem. Neurosci.* **2010**, *1*, 747.
3) Murakami, K. *et al., BBRC* **2015**, *466*, 463.

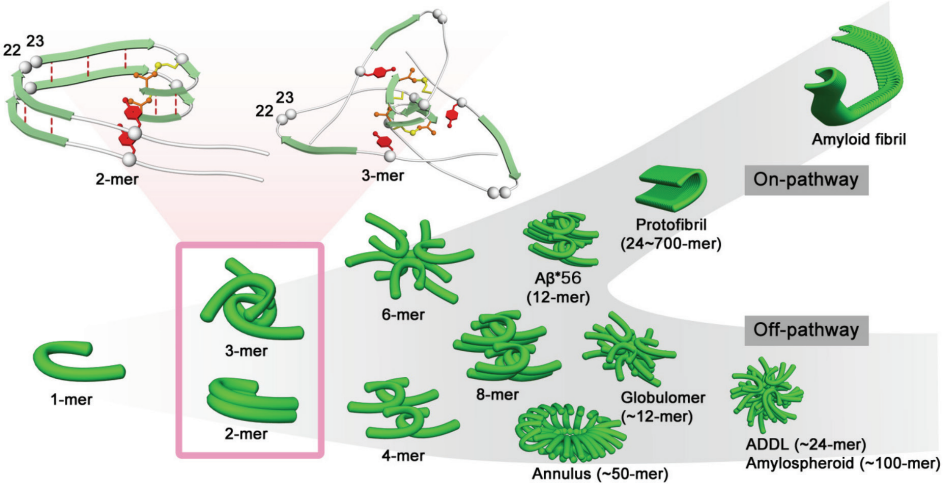



図　Aβ42 の毒性配座理論 [1)]

amyloid ß, aggregation, antibody

発表責任者：入江一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2B080
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Chemical array screening of matrix metalloproteinase inhibitors

○ Yasumitsu KONDOH, Makoto KAWATANI, Kaori HONDA, Tomomi SEKINE, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【Background and Purpose】Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases that degrade extracellular matrix components and that have been implicated in a wide range of pathological processes including tumor metastasis. Although many small-molecule MMP inhibitors have been developed, there are some problems related to specificity and side effects. In addition, recent studies have shown that several MMPs have nonproteolytic and tumor-suppressing functions depending upon the stage of cancer progression. Thus, much work remains for the elucidation of each MMP function and the development of new MMP inhibitors. Chemical array represents a powerful new platform for facilitating target-based screens. Thousands of small molecules are arrayed on a slide glass and used to screen for protein-small molecule interactions in a high-throughput manner. We have developed unique photo-cross-linked chemical arrays, which enable the immobilization of a variety of small molecules on a solid support in a functional group-independent manner using a photoaffinity reaction. In this study, we screened MMP-9 inhibitors using the photo-cross-linked chemical arrays.

【Methods and Results】The array slides with compounds of the RIKEN NPDepo chemical library were probed sequentially with His-Myc-tagged human recombinant MMP-9, anti-His antibody, and a Cy5-labeled secondary antibody, and then scanned with a microarray scanner. The fluorescence signals from two slides treated with and without His-Myc-tagged MMP-9 were quantified. We obtained 27 hit compounds among 24,275 compounds; 2 of the identified compounds (isoxazole compound 1 and naphthofluorescein) inhibited MMP-9 enzyme activity *in vitro*. We further explored 17 analogs of compound 1 and found that compound 18 showed the strongest inhibitory activity against MMP-9, with an $IC_{50}$ value of 3.8 μM. Compound 18 inhibited the enzyme activities of MMP-2, MMP-12, and MMP-13, as well as MMP-9 and MMP-9/ΔHemopexin, with almost identical potency, but showed no inhibition against MMP-1 and MMP-7. The biological potency of compound 18 was confirmed in a wound-healing scratch assay, where compound 18 significantly inhibited cell migration of human fibrosarcoma HT1080 cells with no cell toxicity at 10 μM. These results suggest that compound 18 is a broad-spectrum MMP inhibitor. Our study has shown that the photo-cross-linked chemical arrays are useful for high-throughput drug screening.

chemical array, matrix metalloproteinase, MMP-9

発表番号：2B081
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

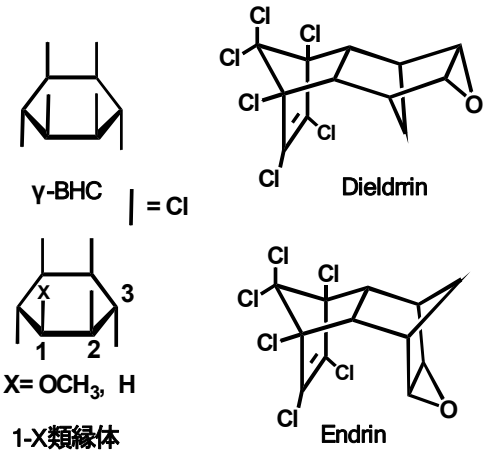
# Dieldrin 抵抗性イエバエ（OCR 系）に対する Dieldrin、Endrin、γ-BHC 類縁体の殺虫活性、GABA アンタゴニスト活性類縁体の殺虫活性、GABA アンタゴニスト活性

# Insecticidal and GABA antagonist activities of dieldrin, endrin and γ-BHC analogues against dieldrin resistant house fly(OCR strain)

○高市 成美[1]、田中 啓司[2]、松田 一彦[1]、尾添 嘉久[3]（[1]近畿大農、[2]近畿大農/名古屋大 IMass 研、[3]島根大生物資源）
○Narumi Takaichi[1], Keiji Tanaka[2], Kazuhiko Matsuda[1], Yoshihisa Ozoe[3] ([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ./Nagoya Univ., [3]Shimane Univ.)

## 【目的】

γ-BHC（BHC、Hexachlorocyclohexane）は昆虫の抑制性神経伝達物質である GABA の受容体に対して GABA のアンタゴニストとして作用し、その殺虫活性を発揮していることが知られているが、どうして 8 種類存在する BHC 立体異性体の中でγ-BHC にのみ殺虫活性が存在するのかは不明であり、報告者らは、その解明に取り組むことにより、GABA 受容体を通しての抑制性神経伝達のより深い理解に迫ろうとしている。OCR 系イエバエはγ-BHC や Dieldrin に対して高い抵抗性を示し、これら化合物に交差抵抗性を示すことが知られている。




OCR 系イエバエの膜貫通領域（M2）部分での GABA 受容体アミノ酸配列は、感受性系統のイエバエ GABA 受容体のアラニンからセリンにポイント変異していることが報告されている。

## 【方法】

Dieldrin、Endrin、1-$OCH_3$、1-H のγ-BHC 類縁体を供試し、感受性および抵抗性イエバエ（OCR）、ハスモンヨトウ、チャバネゴキブリに対する殺虫活性、イエバエ頭部やラット脳から調製した神経膜画分（P2 fr.）対する[$^3$H]EBOB 結合阻害活性の評価を行った。

## 【結果および考察】

Dieldrin、Endrin、1-$OCH_3$、1-H のγ-BHC 類縁体の、感受性、抵抗性イエバエに対する殺虫活性比（抵抗性比）は、化合物ごとに大きな違っていた。　作用部位を共有すると考えられている化合物間で、この様に大きな違いが見られることは興味深い。これらの殺活性と、GABA 受容体に対する活性（[$^3$H]EBOB 結合阻害活性評価など）の測定結果との関連で報告する。ずかな活性差が認められた。

Dieldrin, Ebdrin, BHC

発表責任者：田中啓司（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

発表番号：2B082
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

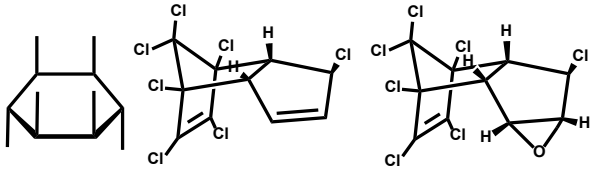
# 光学活性な Heptachlor、Heptachlorepoxide、γ-BHC 類縁体の各エナンチオマー間の GABA アンタゴニスト活性

# GABA antagonist activities of enaitiomers of heptachlor, heptachlor epoxide and1-substituted γ-BHC analogues

○田中 啓司[1]、木下 泰輔[2]、松田 一彦[2]、尾添 嘉久[3]([1]近畿大農/名古屋大 IMass 研、[2]近畿大農、[3]島根大生物資源)
○Keiji Tanaka[1], Taisuke Kinoshita[2], Kazuhiko Matsuda[2], Yoshihisa Ozoe[3] ([1]Kinki Unv. /Nagoya Univ., [2]Kinki Univ., [3]Shimane Univ.)

## 【目的】

γ-BHC（BHC、Hexachlorocyclohexane）の 1 位の Cl 原子を他の置換基で置換したγ-BHC 類縁体は光学活性であり、これら光学活性な類縁体の各鏡像体間での昆虫 GABA 受容体に対する活性を調べ、その結果をこれまで本学会で報告してきている。今大会では、γ-BHC と同様に GABA 受容体に作用し、その殺虫活性を発揮することが知られている Cyclodien 系殺虫剤の中で光学活性である Heptachlor や Heptachlor epoxide の各鏡像体の GABA 受容体に対する活性について報告する。




γ-BHC　Heptachlor　Heptachlor epoxide

## 【方法】

Heptachlor や Heptachlor epoxide を供試し、これらの各鏡像体分割には HPLC 用キラルカラムを用いた。各鏡像異性体のイエバエ頭部やラット脳から分画した神経膜画分（P2 fr.）を用い、この分画に対する[$^3$H]EBOB 結合阻害活性評価を行った。

## 【結果および考察】

昆虫（イエバエ）の GABA 受容体はβサブユニットのホモ 5 量体であるが、一方、ラット脳の GABA 受容体はα、β、γサブユニットからなるヘテロ 5 量体で構成されていることが知られている。イエバエ頭部から調製した神経膜画分に対する[$^3$H]EBOB 結合阻害実験では、Heptachlor や Heptachlor epoxide の鏡像体間で、1-$OCH_3$-γ-BHC 類縁体、１-OH 類縁体、1-H 類縁体での場合同様に、いずれの鏡像体も、その阻害活性にはほとんど活性差は認められなかったが、ラット脳ではわずかな活性差が認められた。

GABA receptor, heptachlor, heptachlor epoxide

発表責任者：田中啓司（tkeiji@nike.eonet.ne.jp）

発表番号：2B083
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 植物葉由来の氷核形成阻害物質の探索

# Study on anti-ice nucleation activities in leaves of various plants for prevention of freezing damage

○鈴木 伸吾、福田 怜、福士 幸治、荒川 圭太（北大農）
○Shingo SUZUKI, Satoshi FUKUDA, Yukiharu FUKUSHI, Keita ARAKAWA (Hokkaido Univ.)

【目的】　成長期の植物は低温や凍結に対する感受性が高く、傷害を受けやすい。木本植物では特に春先の開芽直後の葉や花、晩秋の果実が、また草本植物では十分に成長していない春先の苗などが霜による被害（霜害）を受けやすい。霜害は、春先や晩秋の気温が氷点下温度付近まで下がった時に、植物の葉などに霜が降りて凍結することで発生する。霜が降りるメカニズムのひとつとして、葉などの表面に存在する氷核形成細菌（*Pseudomonas* 属、*Erwinia* 属など）が比較的高い氷点下温度（-2～-3℃程度）で氷核形成を促して水を凍結させるものと考えられている。

これまでに、樹木の木部組織から氷核形成細菌の氷核活性を阻害する物質が見つかっている。これらは氷核形成阻害物質（または過冷却促進物質）と呼ばれ、フラボノール配糖体や加水分解性タンニンの一種が同定されている。フラボノール配糖体などは一般に抗酸化物質として知られており、様々な植物に含まれている。そのため、樹木の木部以外の組織や草本植物に含まれる物質にも氷核細菌の氷核活性を阻害することが十分に期待される。

そこで我々は植物抽出液がどの程度効果的に霜害を防止できるかを検証するため、様々な植物の抽出液を用いて氷核細菌の氷核形成阻害活性を比較した。

【方法および結果】　2015 年の 6～9 月に採取した植物葉などを粉砕し、試料生重量の約 10 倍量の溶媒（アセトン：水＝1：1）で抽出、乾固することで各種植物の抽出物を得た。

54 種類の植物材料から得られた抽出物の氷核形成阻害活性を、抽出物水溶液（生鮮重 0.1 g 相当/mL）に氷核細菌（*Erwinia ananas*）を加えた液滴（2 μL）を 0.2℃/分で冷却して凍結温度を測定するドロップレット凍結法で評価した。その結果、クマイザサやセイヨウタンポポなどは比較的活性が高く、凍結温度を約 3℃下げた。また、比較的高い活性があった試料についてシャーレの中にヤマグワ葉切片などを並べ、そこに上記と同様の試料 10 μL を切片上にのせた。これを暗所の一定の氷点下温度（-3, -4, -5, -6℃）で 3 時間保持した。その結果、ドロップレット凍結法で比較的高い活性のあった試料は葉切片上でも凍結を抑制し、葉の凍結傷害が抑制された。

今後は、氷核形成阻害活性の高い植物抽出物について氷核形成阻害物質の単離、精製を進めると共に、これらの抽出物を用いた農作物の凍霜害防止への応用を目指している。

anti-ice nucleation activity, supercooling, plant frost damage

発表責任者：鈴木伸吾（shinsuzu@for.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2B084
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Gallic acid 誘導体の抗真菌活性に関する研究

Effect of alkyl gallates on plant pathogenic

○須嵜 大祐、谷澤 悟、伊藤 晋作、佐々木 康幸、矢嶋 俊介（東農大・応生科・バイオ）
○Daisuke SUZAKI, Satoru Yazawa, Shinsaku Ito, Yasuyuki Sasaki, Shunsuke Yajima (Tokyo Univ. of Agric)

【背景】

Gallic acid とは加水分解型タンニンの 1 つで、抗酸化作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用、抗真菌活性など様々な生理活性を有していることが知られている。これまでの研究から gallic acid の抗真菌活性の強さは炭素鎖長に依存し、nonyl gallate で最も強い抗真菌活性を示すこと、また gallic acid 誘導体と類似の構造を有する alkyl paraben が complexⅡ の基質であるユビキノンと競合阻害の関係にあることを明らかにしてきた。そこで gallic acid 誘導体も同様に競合阻害の関係にあるという仮説を立てた。我々はユビキノンと構造類似性のある gallic acid 誘導体(geranyl gallate, nenyl gallate, ß-citronellyl gallate, 3,7-dimetyl-1-octyl gallate)を合成し、植物病原菌に対する抗真菌活性、及び呼吸鎖に対する作用を検討した。

【方法】

抗真菌活性の測定は *Fusarium solani* に対する MIC 値を測定する事により行った。酸素消費の測定は gallic acid 誘導体で処理した *F. solani* 酸素消費量を酸素電極によって測定した。ComplexⅡ阻害活性試験は *F. solani* から抽出したミトコンドリア画分を用いて、gallic acid 誘導体による酵素反応の阻害を測定した。

【結果】

Alkyl paraben での知見と同様に gallic acid 誘導体もユビキノンとの競合阻害の関係にあることを明らかにした。さらに、gallic acid 誘導体による抗真菌活性と酸素消費の阻害活性から nonyl gallate より強い阻害活性を示した。

gallic acid, plant pathogenic fungi, respiratory chain complexes

発表番号：2B085
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 化合物アレイを用いたアフラトキシン生産阻害物質の探索（その 2） － PacC 結合物質の探索 ―
# Screening of Aflatoxin production inhibitors with chemical array technology (Part 2) - Search for PacC binding compounds -

○影本 貴大[1]、山本 利義[1]、飯村 九林[1]、高城 景子[1]、近藤 恭光[2]、本田 香織[2]、長田 裕之[2]、作田 庄平[1] ([1]東大・院・応生化、[2]理研 CSRS)
○TAKAHIRO KAGEMOTO[1], TOSHIYOSHI YAMAMOTO[1], KURIN IIMURA[1], KEIKO TAKAGI[1], YASUMITSU KONDO[2], KAORI HONDA[2], HIROYUKI OSADA[2], SHOHEI SAKUDA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]RIKEN CSRS)

アフラトキシン(AF)は既知天然物中で最も強い発癌性を有する化合物である。AF の農作物への汚染はヒトの健康や家畜の成育に影響を与え、また大きな経済的被害をもたらす為に、その防除方法の確立が急がれている。

AF の生産では pH 調整に関与する転写因子 PacC の機能が重要であると考えられているため PacC に結合しその機能に影響を与える物質は AF 生産を抑制する可能性を持つ。そこで本研究ではスライドガラス上に数千の化合物を固定した化合物アレイを用いてリコンビナント His-PacC に結合する物質のスクリーニングを行い、得られた PacC 結合物質についてそれらの AF 生産に対する効果と作用機構を明らかにし、AF 汚染防除に有効な薬剤の開発を目指すことを目的とした。

［方法および結果］

化合物アレイを用いたスクリーニングによって 6xHis タグを付加したリコンビナントタンパク質(His-PacC)に結合する化合物が 43 種得られた。これらヒット化合物の AF 生産に対する影響を *Aspergillus parasiticus* を用いて解析したところ、AF の生産を阻害する化合物として 5-fluorouracil（5-FU）が得られた。5-FU および類縁体（5-fluorouridine , 2-deoxy-5-fluorouridine）の AF 生産阻害活性を調べたところ、100 μM、10 μM において 3 種の化合物全て AF 生産を阻害したが、5-FU は菌体の成育に大きな影響を与えなかったのに対し、他の化合物では菌体の成育阻害と AF 生産阻害がパラレルであった。

また、5-FU 固定化ビーズを作成し、His-PacC への結合の確認を行ったところ、結合が確認された。現在定量 PCR により、AF 生産に関与する転写因子（PacC, FacB, LaeA, AflR）および AF 生合成酵素（AflC, AflM）をコードする遺伝子の発現に対する 5-FU および類縁体の影響を調べている。

［謝辞］
本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

aflatoxin, inhibitor

発表責任者：影本貴大（3763712636@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2B086
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 沖縄産ミナミソゾから得られた殺虫活性物質ローリンテロール

# Insecticidal activity of laurinterol from the Okinawan red alga *Laurencia nidifica*

○長嶺 匠[1]、ウィン ガオ クェン ビン[2]、多和田 眞吉[1]、石井 貴広[1]（[1]琉球大学、[2]鹿児島大学大学院連合農学研究科）
○Takumi Nagamine[1], Binh Nguyen Cao Quan[2], Shinkichi Tawata[1], Takahiro Ishii[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]United graduate school of agricultural sciences kagoshima university)

【背景・目的】

イギス目フジマツモ科に属する紅藻ソゾ（*Laurencia*）は、現在までに 100 を超える種が報告されており、世界中に広く分布する海藻の一つである。また、ハロゲンを含む多種多様な二次代謝産物を産生する特性があり、様々な生物活性物質を含有することが知られている。例えば、亜熱帯地域に多く生息するソゾノハナ（*L. brongniartii*）より単離されたブロモインドール系化合物には、有望な抗 MRSA 活性を示すことが報告されており、今後も特異的な生物活性をもつ化合物が見出される可能性を秘めている。沖縄県では多くの種類のソゾの生息が確認されており、亜熱帯産の紅藻ソゾより新しい機能性を有する化合物の取得を目指している。

【方法・結果】

2014 年 5 月、沖縄県うるま市津堅島で採集したミナミソゾ（*L. nidifica*）の乾燥藻体（167.8 g）を室温にてメタノールで 1 週間抽出した。粗抽出物について酢酸エチルと水で二層分配を行い、酢酸エチル可溶画分（9.36 g）を得た。続いて、脂溶性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、ヘキサンおよび酢酸エチル混合溶媒で溶出して 7 個の画分を得た。

各画分をブラインシュリンプ毒性評価試験に供したところ、主要画分（ヘキサン/酢酸エチル＝8/2 溶出部）に高い活性がみられた。分取用薄層クロマトグラフィーにより活性画分から 4 つの化合物を単離した後、NMR 等を用いて構造解析した結果、既知物質の laurinterol、isolaurinterol、aplysin および α-bromocuparene であると同定した。中でも主要成分の laurinterol に高い殺ブラインシュリンプ活性が認められた。

さらに、取得した化合物について各種生物試験を用いて活性評価を行った結果、laurinterol がコクゾウムシに対する忌避活性試験ならびにシロアリに対する殺蟻活性試験においても高い活性を示した。Laurinterol については、これまでに抗菌活性、光老化防止、抗酸化、付着珪藻やフジツボに対する付着阻害、細胞毒性などの活性をもつことが知られているが、殺虫活性に関する報告はなく、本研究によって新たな知見が得られた。現在、laurinterol の作用機序を調べるためにも、殺虫剤の主なターゲットとなっているアセチルコリンエステラーゼおよびチロシナーゼを用いた酵素阻害活性試験による評価を行っている。

*Laurencia*, Laurinterol, Insecticidal activity

発表責任者：石井貴広（ishiit@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：2B087
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# タバココナジラミの EcR の全配列決定とコンピューターシュミレーションによる EcR-リガンド結合様式予測

# Sequencing of *B. tabaci* EcR and *in silico* prediction of EcR-Ligand interaction

○南 沙紀[1]、石塚 千遥[1]、横井 大洋[1]、水口 智江可[2]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]名大院農)
○ SAKI MINAMI[1], CHIHARU ISHIZUKA[1], TAIYO YOKOI[1], CHIEKA MINAKUCHI[2], YOSHIAKI NAKAGAWA[1], HISASHI MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】昆虫の脱皮は，脱皮ホルモン 20-hydroxyecdysone(20E)によって制御されており，20E が脱皮ホルモン受容体(EcR)に結合することで，脱皮が始まる．脱皮ホルモンアゴニストは昆虫生育制御剤として利用でき，既にジアシルヒドラジン型化合物（DAH）やイミダゾール型化合物（IMD）を始めとする非ステロイド型アゴニストが報告されている．ただし 20E が昆虫種を問わず活性を示すのに対し，DAH や IMD は鱗翅目の EcR に対してのみ高い結合活性を示す．EcR は，DNA 結合領域（DBD）や，リガンド結合領域（LBD）を始めとする６つの領域からなり，様々な昆虫において，全アミノ酸配列が明らかにされている．また，鱗翅目，甲虫目，半翅目のいくつかの昆虫 EcR については，X 線結晶構造解析によりその３次元構造が解明されているものもある．このうち半翅目昆虫であるタバココナジラミ（*Bemisia tabaci*）に関しては，LBD の３次元構造が明らかにされている一方で，他の領域のアミノ酸配列は解明されていない．*B. tabaci* は近年，既存の殺虫剤に対して強い抵抗性を示す bio-type の出現が世界中で報告されており，効果的な薬剤の探索が急務となっている．本研究では，*B. tabaci* に対して特異的に作用する脱皮ホルモンアゴニストの創製を目指して，BtEcR の全長配列を明らかにし，さらにホモロジーモデリングにより，種々の非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストの BtEcR に対する結合様式を予測することを目的とした．

【方法】既に報告されている BtEcR の一部配列（EF174329.1）を基に RACE-PCR を行い，BtEcR の全配列を決定した．また，他の昆虫の EcR と比較することでアミノ酸配列を解析した．さらに，In-Silico Science 社製タンパク質モデリングソフト Isolated FAMS を用いて EcR のホモロジーモデリングを行った．この時，DAH の一種である BYI06830（PDB:１R20）及び IMD の一種である BYI08346（PDB:3IXP）が結合したタバコガ(*Heliothis virescens*) EcR（HvEcR）の結晶構造を鋳型として用いた．続いて，OpenEye 社製のソフトウェア FRED をもちいてドッキング解析を行い，それぞれの非ステロイド型アゴニストの BtEcR に対する結合様式を予測した．

【結果】BtEcR の推定アミノ酸配列を他の昆虫のものと比較したところ， DBD においては相同性が 88%～99%と非常に高かった． LBD のアミノ酸配列は，他の半翅目や甲虫目の EcR との間に 79～80%の相同性を示したが，鱗翅目やハエ目 EcR との間の相同性は 58～63%であった．ドッキング解析の結果，DAH の BtEcR に対する結合様式は，HvEcR に対する結合様式と全く異なることが分かったが，IMD の結合様式は，HvEcR に対する結合様式と類似していることが分かった．

ecdysone receptor, Bemisia tabaci, docking simulation

発表番号：2B088
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

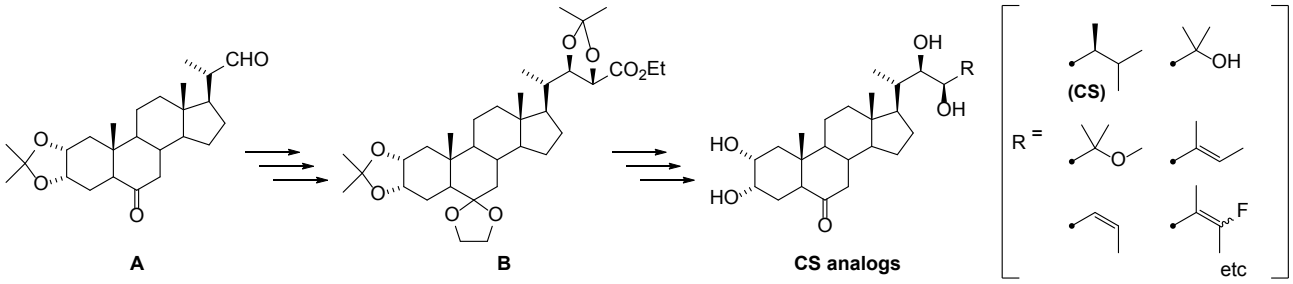
# ブラシノステロイドの側鎖部分の構造と活性の関係

# Structure-activity relationship of brassinosteroids with varied side chains

○横井 大洋[1]、山本 修資[1]、杉浦 愛理[1]、渡辺 文太[2]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]京大化研)
○ Taiyo YOKOI[1], Syuji YAMAMOTO[1], Airi SUGIURA[1], Bunta WATANABE[2], Yoshiaki NAKAGAWA[1], Hisashi MIYAGAWA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]ICR, Kyoto Univ.)

**【目的】**ブラシノライド（BL）はセイヨウアブラナの花粉抽出物より単離・構造決定された植物ステロイドホルモンで，植物に対して極微量で伸長生長や維管束分化の促進・ストレス耐性の向上など様々な生理活性を示す．カスタステロン（CS）をはじめとする BL の類縁体も多数発見されており，これらはブラシノステロイド（BR）と総称されている．BR は植物の生長促進剤として魅力的な活性を有しているが，ステロイド骨格や側鎖部分の連続する 4 つの不斉点など複雑な構造を持つために莫大な合成コストがかかることから，農業利用は困難であった．そこで我々の研究室ではより構造の単純な BR 様活性化合物をデザインすべく，BR の構造活性相関研究を行い，活性向上にとって重要な構造因子の同定を進めてきた．本研究では BR の側鎖末端部分の構造を変化させた種々の類縁体を合成して活性評価を行い，構造活性相関について検討した．

**【方法】**本研究では合成を簡略化するため，ステロイド B 環部分にラクトン構造を持たない CS 型化合物を合成することとした．まず既知のアルデヒド（**A**）より，HWE 反応，Sharpless 不斉ジヒドロキシル化および官能基の保護を経て鍵中間体（**B**）を得た．この化合物の側鎖エステル部分を足掛かりとしてさらなる炭素鎖伸長および官能基導入を行い，CS の側鎖末端部分を変換した化合物を種々合成した．各々の化合物に対してイネの葉身屈曲試験を行い，最大応答の 50%の屈曲率を与える薬量 $ED_{50}$ (mol) を薬量応答曲線より求め，その逆対数値 ($pLD_{50}$) を BL 様活性の指標とした．




**【結果と考察】**側鎖部分を CS より短くした類縁体や，アルコールやエーテルといった酸素官能基を導入した類縁体では CS と比較して活性が低下した．このことから，側鎖末端部分における疎水性が活性増大に寄与していると考えられる．24 位のメチル基を欠く類縁体では活性が低下したが，この結果はこれまでの構造活性相関研究とも合致するものであった．また，二重結合を持つ類縁体やフッ素原子を導入した類縁体でも高い活性が維持された．

Brassinosteroids, Structure-activity relationship, Lamina inclination

発表番号：2B089
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# シロイヌナズナの根の伸長に対する殺菌剤イソプロチオランの影響

# Phytohormone signaling in the root growth promtoting action of isoprothiolane

○草島 美幸、井上 真依、仲下 英雄（福井県大生物資源）
○MIYUKI KUSAJIMA, MAI INOUE, HIDEO NAKASHITA (Fukui Pref Univ.)

イソプロチオラン（diisopropyl 1,3-dithiolan-2-ylidenemalonate; IPT）は日本農薬（株）から殺菌・植物成長調節剤として販売されているフジワンの有効成分である。フジワンはイネいもち病防除活性だけでなく、根の伸長促進などの植物成長制御活性を有している。イネにおける IPT による根の伸長促進効果の解析から、この作用にはエチレン（ET）の生成量の増加およびオーキシンが関与することが報告されている。しかし、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、IPT による植物の生育制御のメカニズムを明らかにすることを目指して、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて IPT による根の成長促進効果における植物ホルモンの役割について解析を行った。

シロイヌナズナ（Col-0）野生株、ET シグナル欠損株（*ein2*）、JA シグナル欠損株（*jar1*）、二重変異株（*jar1/ein2*）を解析に用いた。IPT を添加した 1/2MS 培地にシロイヌナズナ種子を無菌的に播種し、経時的に根の伸長を測定した。また、各植物ホルモンの阻害剤として、ET 生合成阻害剤（AVG）、JA 生合成阻害剤（イブプロフェン, IBP）を添加した培地も用いて解析を行った。

根の伸長を測定した結果、野生株では IPT 添加量が 12.5μg/ml 付近では伸長促進効果が見られたが、高濃度では抑制効果が見られた。*ein2* では、野生株で伸長促進効果が見られた濃度において伸長抑制効果が確かめられ、より低濃度においても伸長抑制が認められた。また、IPT 添加培地においても *jar1* では生育促進効果が野生株に比較して減少しており、*jar1/ein2* では *jar1* と *ein2* の中間的な伸長抑制効果が見られた。また、生合成阻害剤を用いて解析した結果、AVG および IBP は IPT による根の伸長促進効果を抑制した。遺伝子発現解析を行った結果、IPT 処理は ET 応答性遺伝子（*ERF1*）と JA 応答性遺伝子（*VSP2*）の発現を誘導することが明らかになった。IPT と AVG の共処理は *ERF1* の発現誘導を抑制すると同時に *VSP2* 遺伝子の発現を抑制した。

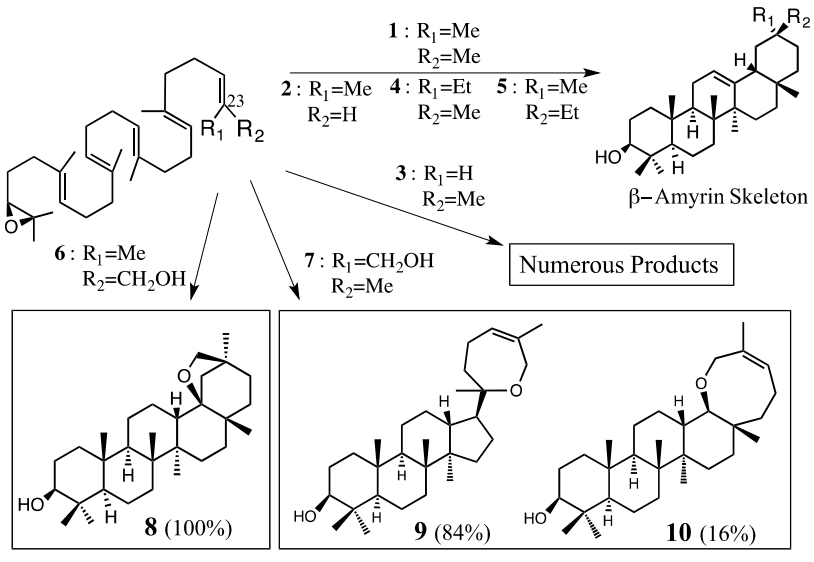
以上の結果から、IPT による根の生育に及ぼす効果にはジャスモン酸とエチレンシグナルが関与することが示唆された。現在、高濃度の IPT が根の伸長を抑制する効果についても解析を進めている。

phytohormone, Arabidopsis, plant growth regulator

発表番号：2B090
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

β-アミリン合成酵素：基質末端メチル基の疎水性相互作用による環化制御
β-amyrin synthase: The hydrophobic interaction between the 23*Z*-Me and its binding site is crucial for enforcing the normal folding conformation.
○金子 一輝[1]、笹川 智弘[2]、仲野 千秋[1]、星野 力[1,2] ([1]新潟大院自、[2]新潟大農)
○Ikki KANEKO[1], Tomohiro SASAGAWA[2], Chiaki Nakano[1], Tsutomu Hoshino[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ., [2]Fac. Agri., Niigata Univ.)

【目的】オキシドスクアレン環化酵素(OSC)は鎖状の **2,3**−オキシドスクアレン **1** を基質として様々な環状トリテルペンを合成する酵素群であり、生物界に広く存在している。OSC の一種である β−アミリン合成酵素(β−AS)は、植物界に広く存在しているが、その機能解析はこれまで報告例が少なかった。今回、C-23 位に種々の置換基を導入した基質アナログを合成し、β−AS との酵素反応で得た産物を同定して、基質末端 Me 基が環化反応に与える影響を調べた。我々は既に基質 **2**,**3**,**4**,**5** の酵素反応結果を報告してきた[1,2]。【方法】C27 アルデヒドと 2-ホスホノプロピオン酸トリエチルとの Wittig 反応等によって基質アナログ **6**,**7** を合成した。β−AS との酵素反応産物を GC-MS により確認し、$SiO_2$ カラムクロマトグラフィーや HPLC を用いて単離、精製を行い、NMR で構造決定した。




【結果と考察】
**2**,**5** より、E-Me($R_2$)は欠損しても、嵩高い Et 基へと置換しても正常な 6/6/6/6/6-環を持つ β−アミリンと同一の骨格をもつプロダクトを産生し、環化に大きな影響は与えなかった。一方、**3**,**4** より、Z-Me($R_1$)は体積が大きくなっても正常な環化を妨げないが、欠損すると異常環化が起こり、*Z*-配向のアルキル基の存在が環化に必須だった[1,2]。今回、基質末端アルキル基を極性官能基へと置換した基質アナログ **6**,**7** を化学合成し、β−AS と酵素反応させた。*E*-Me を-$CH_2OH$ 基へと置換した **6** は、環化が 6/6/6/6/6-環まで進行し、基質のフォールディングは正常に行われた。一方、**7** からは環化途中の 6/6/6/5-環や 6/6/6/6-環のカチオンが-OH 基にトラップされた産物が得られ、酵素による基質末端の正確な捕捉が行われなかったことが示唆された。本研究により、基質の Z-配向のアルキル基と β−AS の基質認識部位の疎水性残基とが疎水性相互作用によって基質末端を正確な位置にフォールディングしている可能性が示された。1) T. Hoshino, Y. Miyahara, M. Hanaoka, K.Takahashi, and I. Kaneko,*Chem. Eur. J.* **2015**, *25*, 15769-15784　2) 金子ら TEAC 討論会要旨 **2014** 2PIII-1

β-amyrin synthase, ß-amyrin, oxidosqualene cyclase

発表責任者：金子一輝（f14d017e@mail.cc.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2B091
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

スクアレンーホペン環化酵素：末端メチル基をヒドロキシメチル基に置換した基質アナログの酵素反応
Squalene-hopene cyclase：Enzymatic reaction of substrate analogs that possess hydroxymethyl group at the terminal 23-position
○寺澤 有里、金子 一輝、仲野 千秋、星野 力（新潟大院自）
○YURI TERASAWA, IKKI KANEKO, CHIAKI NAKANO, TSUTOMU HOSHINO (Graduate school of Science and Technology, Niigata Univ.)

【目的】前演題で末端メチル基を極性官能基 $CH_2OH$ に置換した基質アナログの β―アミリン合成酵素反応生成物は、*E*-CH2OH 体と *Z*-体とでは、反応様式が大きく変わること及び基質の *Z*-配向基は疎水性残基が必須であることを実証した。同じく 5 環性トリテルペンのスクアレンーホペン環化酵素(SHC)の場合の環化様式との違いを検討した。【方法・結果】前演題とほぼ同じ経路で基質アナログ **4** と **6** を合成し、大腸菌で発現した SHC の cell-free を酵素源とした。一晩の反応液からヘキサン抽出物を得て、$SiO_2$ カラムで粗分画した後、順相 HPLC で精製した。主に NMR 解析で構造決定した。SHC はスクアレン **1** から **2** と **3** をほぼ 5:1 の比率で生成する。アナログ **4** からほぼ **5** のみを生成した。

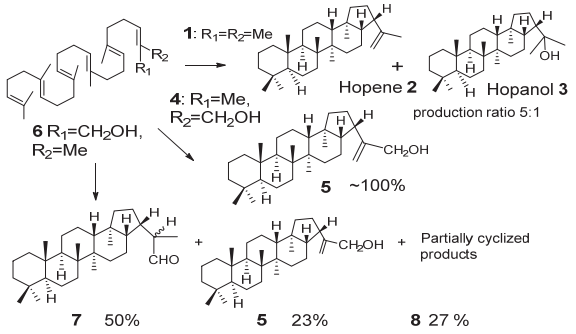



**図１．** SHC による **1**, **4**, **6** の環化産物の構造

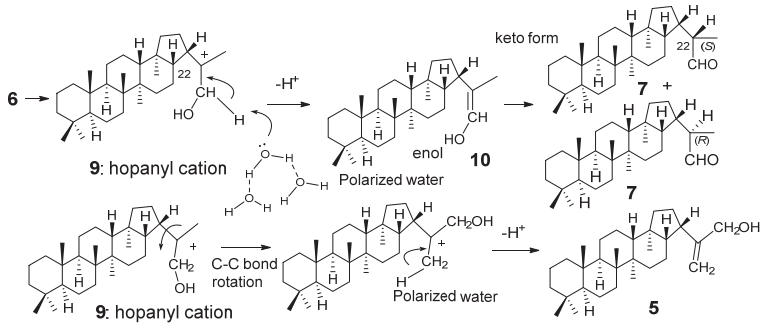



**図２．** 基質 **6** から各産物の生成メカニズム

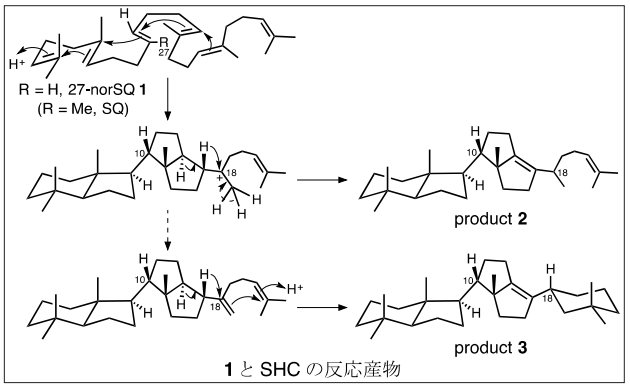
一方、基質 **6** の場合は、**6** と同じ産物も得られたが主要な生成物はアルデヒド官能基を持つ **7** であった。**4** から **5** の生成は、**1**→**2** と同じ機構で起きたことを表している（図２）。即ち、**2** の生成は水分子の水素結合ネットワークで塩基性が増加した水分子が *Z*-Me から脱プロトンを行うと同じ機構で進行する。**6** から **5** の生成は、図 2 で示した C-C 結合の回転が起きて *E*-Me が *Z*-配向に位置し、この *Z*-Me から脱プロトンしたためと考えられる。カチオン **9** の寿命が長くかつ $CH_2OH$ が $CH_3$ よりも嵩高いため回転が起きたと考えた。なお、**7** の NMR 解析から、類似物質が 2 種混合していることが分かった（10:4）。また、$\delta_H$ 9.55 (d, *J*=4.0)と $\delta_H$ 9.40 (d, *J*=4.0)及び$\delta_C$ 204.2 (d)と $\delta_C$ 203.2 (d)を観測し、CH=O を確認した。更に NOESY を含む詳細な 2 次元 NMR 解析から C-22 位の立体化学が異なる混合物であることを明らかに出来た。**7** の生成機構を図 2 の上段に示した。*Z*-配向の $CH_2$ から脱プロトンした enol form **10** が keto form に異性化して CH=O 官能基が生成したと考えられる。この異性化の際、22 位の立体化学が異なる物質 **7** と **7'**が生成したと考えた。**7** と **7'**の分離には、現在成功してない。

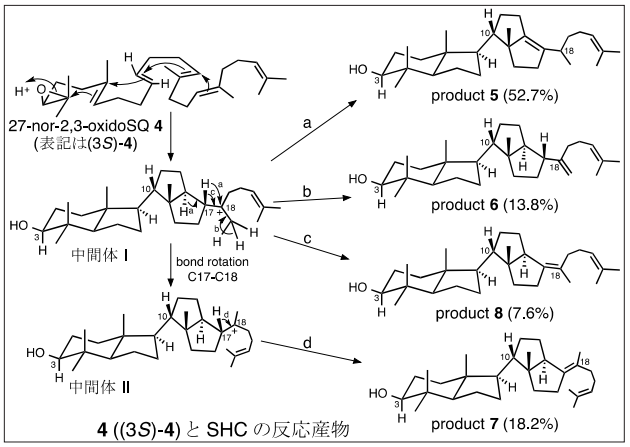
squalene, hopene synthase, polycyclization

発表番号：2B092
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

スクアレン-ホペン環化酵素による 27-noroxidosqualene の酵素反応産物
Enzymatic products of 27-noroxidosqualene by squalene-hopene cyclase
仲野 千秋 [1]、○渡辺 拓海 [1]、南野 舞 [2]、星野 力 [1,2] ([1] 新潟大院自、[2] 新潟大農)
Chiaki NAKANO[1], ○Takumi WATANABE[1], Mai MINAMINO[2], Tsutomu HOSHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. Technol., Niigata Univ, [2]Fac. Agri., Niigata Univ)

【目的】スクアレン–ホペン環化酵素 (SHC) は鎖状の squalene (SQ) から 6/6/6/6/5-環系のホペンとホパノールを生産する。以前当研究室にて、SQ の 27 位のメチルを欠損した 27-norSQ **1** との酵素反応を行い、6/5 + 5/5 + (6) 環性の新規異常環化産物 **2**, **3** が得られた [1)]。しかしながら、NMR 解析では 10 位および 18 位の絶対立体配置を決定できなかった。本環化機構の更なる考察を行なうため、今回 27-nor-2,3-oxidoSQ **4** を合成し、SHC との酵素反応により異常環化産物を得た後、誘導化、結晶化、X 線結晶構造解析により絶対立体配置の決定を試みることにした。【方法・結果】SQ を原料として得た C19-Br 体と epoxy geranylphenylsulfone とのカップリング反応等により **4** を合成した。SHC と 29 mg の **4** との酵素反応を行い、TLC および GC-MS 解析した結果、3α-および 3β-OH 体プロダクトの生産が確認できた。$SiO_2$ カラムにて 3β-OH 体プロダクト混合物を分取した後、キラルカラム HPLC および 3% $AgNO_3$/$SiO_2$ カラムにて product **5** (全 3β-OH 体プロダクトの 52.7%)、**6** (13.8%)、**7** (18.2%) を得た。NMR 解析の結果、**5** は **2** の 3β-OH 体、**6** と **7** は環化反応後の中間体 I および II から脱プロトンした産物であった。また、GC-MS 解析より、**5**～**7** の 3α-OH 体の生産も確認できた。目的とした立体化学を持つ **5** が得られたことから、誘導化および結晶化を試みた。SHC と 77 mg の **4** との酵素反応を行い、$SiO_2$ カラムにて 3β-OH 体プロダクト混合物を得た後、*p*-bromobenzoyl chloride にて誘導化し、キラルカラム HPLC にて **5** の *p*-bromobenzoate (*p*-BrBz) 体を 6 mg 単離した。また、この単離作業の過程で中間体 I から脱プロトンした product **8** (7.6%) の *p*-BrBz 体を得た。**5** の *p*-BrBz 体を種々の溶媒、温度条件にて結晶化を試みたが、X 線結晶構造解析に適した単結晶を得ることができなかった。現在 *p*-bromophenyl isocyanate にて *p*-bromophenyl urethane 体を作成したので、結晶化条件を検討している。




1) Hoshino, T. and Ohashi, S., *Org. Lett.*, **4**, 2553-6, (2002).

squalene-hopene cyclase, substrate analog, triterpene

発表番号：2B093
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

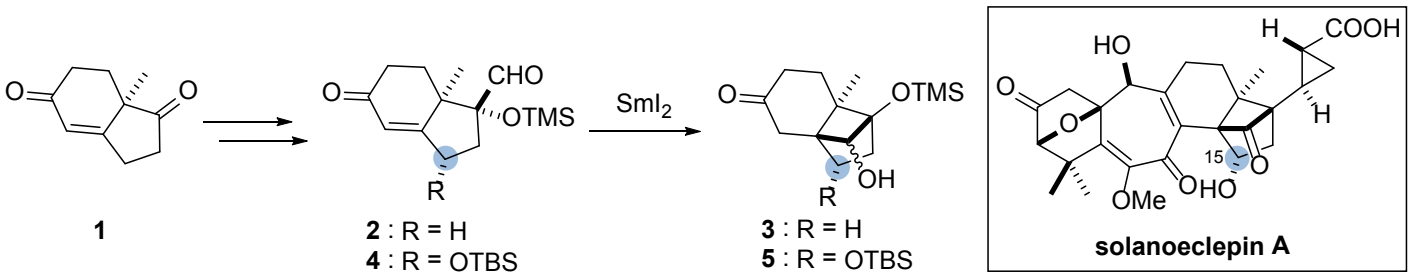
# ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピンA右側部分の合成研究

# Synthetic Studies on Right Part of Solanoeclepin A

○宮澤 悠、駒田 武馬、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○ Yu MIYAZAWA, Takema KOMADA, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya University)

【目的】ソラノエクレピン A は、ジャガイモ水耕栽培液から単離されたジャガイモシスト線虫の孵化促進物質であり、農薬のリード化合物として注目されている。本研究では、ソラノエクレピン A の全合成と未だ不明な構造活性相関の解明を目的として、右側部分に相当する高度に歪んだシクロブタンを含むトリシクロ[5.2.1.$0^{1,6}$]デカンの合成を検討した。

【方法および結果】多官能基化されたトリシクロデカン骨格の構築は、ソラノエクレピン A の合成において最大の課題である。当研究室では、光学活性な Hajos-Parrish ケトン **1** から誘導したアルデヒド **2** に対するヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応によって、シクロブタン構築を鍵とするトリシクロデカン **3** の合成に成功している [1)]。今回、化合物 **1** から天然物の 15 位に相当する位置に TBS エーテルを有するアルデヒド **4** を合成し、本手法を適用した結果、期待通り反応は速やかに進行し、トリシクロデカン **5** を収率良く合成することに成功した。




**1**
**2** : R = H
**4** : R = OTBS
**3** : R = H
**5** : R = OTBS

1) Komada, T.; Adachi, M.; Nishikawa, T. *Chem. Lett.* **2012**, *41*, 287.

natural product synthesis, cyclobutane, radical cyclization

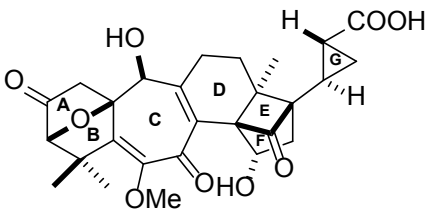
発表番号：2B094
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ジャガイモシスト線虫孵化促進物質ソラノエクレピン A 左側部分の合成研究

# Synthetic Studies on Left Part of Solanoeclepin A

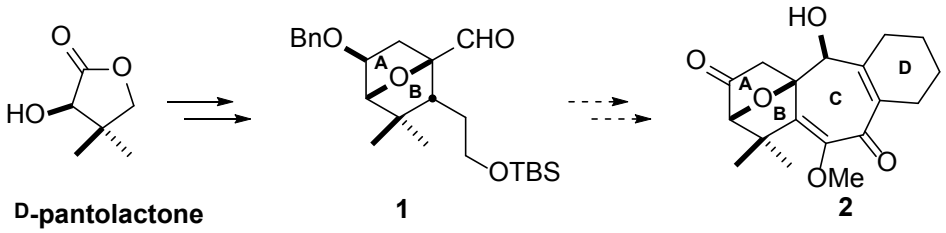
○長谷川 耕太、鳥居 真衣、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Kota HASEGAWA, Mai TORII, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya University)

【目的】ソラノエクレピン A は、ジャガイモシスト線虫孵化促進活性を持つ天然有機化合物であり、農薬の新規リード化合物として期待されている。しかし、天然からは極微量しか得ることができないため、作用機序や構造活性相関は未だ明らかになっておらず、化学合成による量的供給が必要とされている。本研究では、ソラノエクレピン A の全合成に向け、七員環（C 環）の構築法の確立を目的として、ABCD 環からなる四環性化合物の合成を検討した。



**solanoeclepin A**

【方法および結果】我々は収束的な合成法によりソラノエクレピン A を全合成するため、オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタノン骨格を持つ左側セグメントとトリシクロ[5.2.1.0$^{1,6}$]デカン骨格を持つ右側セグメントを連結後、合成終盤で七員環(C 環)を構築する合成法を計画した。当研究室では既に、D-パントラクトンからラジカル環化とヨードエーテル化によって、アルデヒド **1** の合成に成功している [1]。そこで、七員環の構築法を確立するため、オキサビシクロ[2.2.1]ヘプタノン骨格を含む ABCD 環からなる四環性化合物 **2** を設定した。現在、アルデヒド **1** に対して D 環に相当するシクロヘキセン誘導体を導入し、遷移金属触媒を用いた環化反応を検討している。



**D-pantolactone** **1** **2**

1) Adachi, M.; Torii, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2015**, *26*, 965.

cyclization, natural product synthesis, oxabicyclo

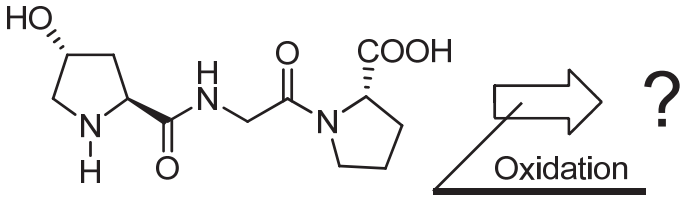
発表番号：2B095
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# コラーゲンペプチド酸化体の化学合成と生理活性評価

# Chemical synthesis of the oxidation products of collagen peptide and their biological activity

○三井 美彩、三田 千鶴、木村 駿介、寺内 達彦、蕪山 由紀人、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○ Misa MITSUI, Chizuru MITA, Syunsuke KIMURA, Tatsuhiko TERAUCHI, Yukihito KABUYAMA, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

コラーゲンは，動物の体内に最も多く含まれるタンパク質である．その構成アミノ酸として，グリシンが 30%以上を占め，他にプロリン，アラニンおよびヒドロキシプロリンが多く含まれる．通常のタンパク質はアミノ酸まで消化されるが，コラーゲンは酵素により完全には分解されず，体内でオリゴペプチドとして吸収される場合が多い．それらのコラーゲンペプチドは，骨吸収の抑制作用やアンギオテンシン変換酵素の阻害など種々の生理活性を持っており，化粧品，医薬品および健康補助食品などの素材として利用可能である．




コラーゲンペプチドの 1 つであるヒドロキシプロリルグリシルプロリン($P^h$-G-P)は，ラジカル消去活性や脂質過酸化抑制活性を示すことが知られている．しかしながら，なぜこのような抗酸化活性を示すのかは明らかではない．本研究では $P^h$-G-P からジヒドロピロール含有ペプチドが生成し，さらにピロール含有ペプチドに至る変換過程が生じ，$P^h$-G-P の抗酸化活性が発揮されているのではないかと予測した．そこで，この変換仮説の検証のため，それらのペプチドおよび関連化合物の有機合成を行い，抗酸化性を評価した．

ヒドロキシプロリンから，セレノキシド脱離反応などを経由し，ジヒドロピロールカルボン酸に導いた．さらにそのカルボン酸の C 末端を伸長し，10 段階，総収率 48%でジヒドロピロール含有トリペプチドを合成した．この合成経路の中間体を用いて，ヒドロキシプロリンから 9 段階，総収率 57%でジヒドロピロール含有ジペプチドを得た．また，ピロールカルボン酸から 4 段階，総収率 22%でピロール含有トリペプチドを合成し，さらに，2 段階，総収率 71%でピロール含有ジペプチドを得た．抗酸化性を評価した結果，脂質過酸化抑制活性は，ピロール含有ペプチド，ジヒドロピロール含有ペプチドおよび $P^h$-G-P の順に強くなり，逆にラジカル消去活性はその順に弱くなることが明らかになった．

proline, peptide, selenoxide elimination

発表番号：2B096
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

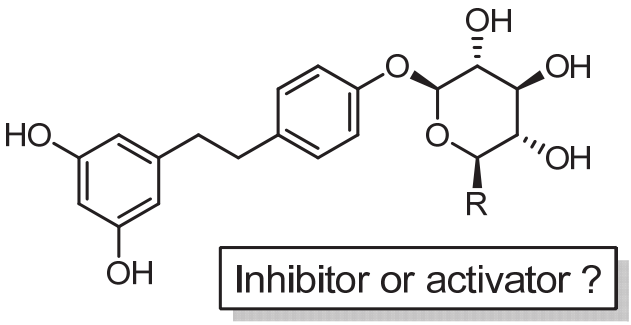
# ジヒドロレスベラトロールグルクロニドおよび関連誘導体の化学合成と，メラニン形成調節作用

# Chemical synthesis of dihydroresveratrol glucuronide and its derivatives, and their regulatory effect on melanogenesis and their biological activity

○大出 知里[1]、島田 亙[2,3]、横田 真理子[3]、二瓶 賢一[1,2] ([1]宇都宮大農、[2]農工大院連農、[3]ニッコール株式会社コスモステクニカルセンター)
○Chisato OODE[1], Wataru SHIMADA[2,3], Mariko YOKOTA[3], Ken-ichi Nihei[1,2] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [3]Nikkol group Cosmos technical center Co., Ltd.)

ジヒドロレスベラトロールグルコシドは，ツバキ科植物の *Camellia oleifera* から単離された天然配糖体である．その構造中には，既存の強力なメラニン形成阻害剤に見出されるレゾルシノール骨格が含まれる．そこで，新しいメラニン形成阻害剤の開発を目指し，天然物およびその構造をさらに単純化したキシロシド誘導体の化学合成を行い，それらの生理活性を評価した．その結果，天然グルコシドはメラニン形成を阻害するのに対し，合成キシロシドはメラニン形成を促進することが明らかとなった(Oode, C. et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *87*, 862-867).

このような正反対の生理活性は，糖構造の差異に起因する．詳細な構造-活性相関の解析のため，二糖構造を有するセロビオース誘導体およびキシロビオース誘導体を化学合成したが，いずれもメラニン形成を促進することが分かった．従って本研究では，グルコシド誘導体の 5" 位に着目し，その近傍の構造が変化したグルクロン酸誘導体およびキノボース誘導体の化学合成を行い，メラニン形成に対する活性を評価することを計画した．




グルクロン酸メチルの全ての水酸基をアセチル化し，次にアノメリック位の選択的な脱保護とトリクロロアセトイミデート化により，グルクロン酸型糖供与体を得た．Wittig 反応を経由して合成したジヒドロレスベラトロール骨格に対して，この糖供与体による配糖体化を行い，さらに全ての保護基を除去して，グルクロン酸誘導体およびグルクロン酸メチル誘導体を得た．また，ベンジル化したグルコースの 6 位を還元し，キノボース型糖供与体に導いた後，ジヒドロレスベラトロール骨格とのカップリングを行うことで，キノボース誘導体を化学合成した．現在，得られた誘導体の生理活性の評価を行っている．

dihydroresveratrol, glycosylation, melanogenesis

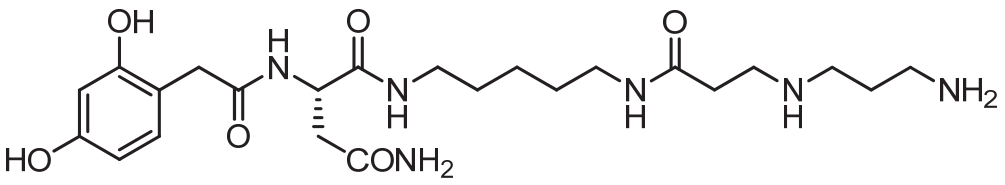
発表番号：2B097
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# スパイダミン類の化学合成とチロシナーゼ阻害活性評価

# Chemical synthesis of spidamines and their tyrosinase inhibitory activity

○舞木 鏡徳、小木 万梨子、二瓶 賢一（宇都宮大農）
○Akinori MOUGI, Mariko OGI, Ken-ichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

スパイダミンは 1994 年にジョロウグモから単離されたアシルポリアミンである．その生理活性として，グルタミン酸レセプターに対する不可逆阻害活性や殺虫作用などが知られている．一般的に，クモ毒アシルポリアミンの構造は，フェノール性クロモフォア，ペプチド性骨格およびアミン性テールから構成されている．スパイダミンには，クロモフォアとして 2,4-ジヒドロキシフェニルアセチル基が含まれている．




Spidamine

一方，2007 年にイチジクから，強いチロシナーゼ阻害活性を示す 2,4-ジヒドロキシジヒドロ桂皮酸が単離・構造決定された．この桂皮酸と，クロモフォアとの構造類似性から，スパイダミンはチロシナーゼ阻害活性を示すのではないかと予測される．しかしながら，現在までクモ毒アシルポリアミンのチロシナーゼ阻害活性に関する研究は行われていない．そこで本研究では，官能基の選択的な保護および Michael 付加を鍵反応として，スパイダミンおよびその誘導体の化学合成を行い，得られた化合物のチロシナーゼ阻害活性を評価することを計画した．

出発物質のベンズアルデヒド誘導体を増炭することで，クロモフォア部分を 4 段階，収率 31%で得た．カダベリンのアミノ基の一方に，選択的に保護基を導入した後，アスパラギン誘導体とのカップリングを行い，ペプチド性骨格部分を 4 段階，収率 18%で合成した．また，1,3-プロパンジアミンの保護体に対して，アクリル酸メチルを使用した Michael 付加を行い，得られた二級アミンを保護した後，エステルを加水分解することで，アミン性テール部分を 5 段階，収率 21%で合成した．縮合剤を用いて，得られたクロモフォア部分，ペプチド性骨格部分およびアミン性テール部分をカップリングし，全ての保護基を除去して，スパイダミンの化学合成を達成した．現在，スパイダミン誘導体の合成とそれらのチロシナーゼ阻害活性評価について検討を行っている．

polyamine, tyrosinase, michael addition

発表番号：2B098
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

植物の気孔分化を調節する stomagen の効率的生産
Functional expression of stomagen by *Brevibacillus choshinensis*.
○近藤 竜彦、能瀬 遥、根岸 佑香里、小鹿 一 (名大院・生命農学)
○Tatsuhiko KONDO, Haruka NOSE, Yukari NEGISHI, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】
植物は陸上に進出する際に、体表面からの水分消失を防ぎ、ガス交換や蒸散を効率よく行うために気孔を発達させた。その機能は植物の生存に必須であり、気孔は植物の生存環境に応じて、適切な密度で形成される。この過程は、ペプチドホルモンを介した精密なパターン形成機構によって制御されていることが近年のシロイヌナズナを用いた研究から明らかになってきている。我々は気孔分化を正に制御する分泌型ペプチドホルモンとして stomagen を同定した。さらに、生理活性をもつ成熟型 stomagen の構造は、3 対のジスルフィド結合を有するアミノ酸 45 残基であることを明らかにした。本研究では、大量のタンパク質を菌体外に分泌する *Brevibacillus* 発現システムを用いることで、stomagen の効率的な生産を行うことを目的とする。

【方法・結果】
*STOMAGEN*遺伝子の成熟型ペプチドに対応する配列を pNCMO2 に挿入して stomagen 発現用ベクターを作成した。このベクターを用いて *Brevibacillus choshinensis* を形質転換し、形質転換体のコロニーを得た。形質転換体を TM および 2SY 培地で培養し、その培養上清を希釈して MALDI-TOFMS を測定した結果、成熟型 stomagen に対応するシグナルを検出した。さらに、ペプチド生産に適した培地について検討を行い、ペプチド生産量が高い Chemically defined medium を見いだした。
形質転換体の培養上清に生産されたペプチドが、天然 stomagen と同様の立体構造を有しているかを明らかにするために、天然物と同じ構造を有することがわかっている化学合成 stomagen と、得られた組換えペプチドをプロテアーゼ消化し、得られた消化物の MALDI-TOF MS および MS/MS スペクトルを比較した結果、組換えペプチドの 3 対のジスルフィド結合の結合様式は天然物と同じであることが明らかになった。生物検定の結果から、組換えペプチドは天然物と同等の気孔密度上昇活性を有することも明らかにした。

stomagen, peptide hormone, Brevibacillus

発表責任者：近藤竜彦（kontatsu@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2B099
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ネコブセンチュウの誘引現象に関与する宿主根由来物質の精製（第二報）

# Studies on the attraction of root-knot nematode toward the host root (Part 2)

○樋口 侑夏、西川 博崇、小川 舞、村瀬 潤、近藤 竜彦、小鹿 一（名大院・生命農）
○Yuuka HIGUCHI, Hirotaka NISHIKAWA, Mai OGAWA, Jun MURASE, Tatsuhiko KONDO, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【目的】

ネコブセンチュウは、約 700 種以上の植物に感染する内部定着性の植物寄生性線虫の一種である。ネコブセンチュウが農作物に感染すると作物の収量低下が引き起こされることから、感染による農業被害は非常に深刻な問題となっている。しかし、ネコブセンチュウが植物の根を認識し接近、感染する機構は明らかとなっていない。

ネコブセンチュウは植物由来の誘引物質を感知し根に接近すると考えられている。この誘引物質について研究する過程で、我々はある土壌細菌がネコブセンチュウに対する誘引物質を生産することを発見した。また植物根から調製した浸出液には、この細菌に対して有意に増殖活性を示す活性物質が含まれていることを明らかにした。これらの結果は、宿主根から分泌される活性物質により細菌が根の周囲で増殖し、増殖した細菌が生産する誘引物質を線虫が感知する、という新しい線虫誘引モデルの存在を示唆している。本研究では、この植物根由来の細菌増殖刺激物質（Root-Exudates-derived Microbe-growth Stimulating factor, REMS factor）の化学的本体を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

細菌の増殖刺激活性については、細菌培養液に検定試料を加えた際の濁度の上昇で評価した。この生物検定を指標とした精製によって、アルファルファ根浸出液の陽イオン交換カラム吸着画分より、REMS factor として複数のアミノ酸を同定したことを昨年の本大会において報告した。今回、我々は陽イオン交換カラム素通り画分にも強力な REMS 活性が観察されることを見いだし、同様の生物検定を指標として精製を行った。HILIC カラムを用いた分取により、4 つの活性画分が得られ、それぞれの画分についてさらなる精製を行っている。本大会では各画分に含まれている REMS factor の精製と構造解析の結果について報告する予定である。

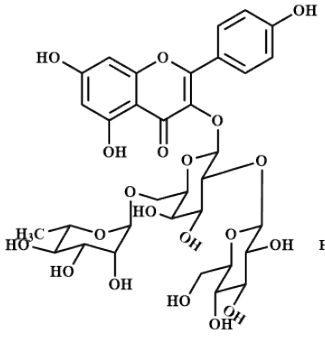
root-knot nematode, bacteria, growth factor

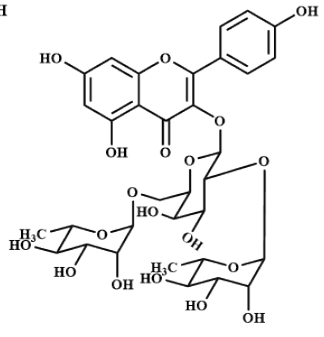
発表番号：2B100
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ダイズ葉毛茸のハスモンヨトウ食害抵抗性への化学・物理的な寄与
The chemical and physical contribution of the trichomes on soybean leaves to the resistance for *Spodoptera litura* herbivory

○中田 隆[1]、木村 有希[1]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、寺石 政義[1]、Eric SCHMELZ[2]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校)
○Ryu NAKATA[1], Yuki KIMURA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Hajime ONO[1], Masayoshi TERAISHI[1], Eric SCHMELZ[2], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]UCSD)

[目的・背景]
植物は様々な方法で病原菌や植食者から身を守る．その生物間相互作用を明らかにし，植物保護技術に利用することは有効な手法である．これまでに，ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫の食害に応答してダイズ (*Glycine max*) の葉と毛茸 (trichome) に蓄積する flavonoids が食害抵抗性に寄与する可能性を示した．本研究で用いるダイズは重要な作物であり，広食性の植食者であるハスモンヨトウ幼虫に食害される．一方，ダイズには IAC100 やヒメシラズなどのハスモンヨトウに対する食害抵抗性品種が知られており，その抵抗性の分子メカニズムの解明を目指す．本研究では，食害抵抗性の要素の一つと考えられている葉の毛茸について，化学・物理的な両側面から研究を行った．
[方法・結果]
①IAC100・ヒメシラズの葉の毛茸の食害抵抗性への寄与を調べるため，ハスモンヨトウ幼虫の摂食選好性試験を行った．非抵抗性品種を対照区とし， IAC100・ヒメシラズを供試区として試験すると，幼虫は対照区を好んで摂食した．そこで供試区の毛茸を剃刀で除去した上で同様に試験したが，供試区の摂食程度が若干大きくなるにとどまった．摂食選好性は毛茸の物理的な効果に加えて化学物質の寄与も大きいと考え，両側面から検討することとした．
②食害抵抗性品種の IAC100・ヒメシラズの葉の毛茸の物理的性質に注目し，3D レーザー顕微鏡を用いて毛茸の長さ・太さ・角度を計測した．その結果，対照区として供試した非抵抗性品種に比べ，両抵抗性品種の毛茸の角度が大きいことがわかった．長さと太さには，抵抗性との相関は見られなかった．
③食害抵抗性品種の IAC100 の葉の毛茸に蓄積する 2 種類の物質を新たに単離・精製し，構造を決定した．NMR, GC-MS, LC-IT-TOF-MS により kaempferol 3-(2$^{Gal}$-glucosylrobinoside) (Comp. A) と kaempferol 3-(2$^{Gal}$-rhamnosylrobinoside) (Comp. B) を同定した．昨年に報告した kaempferol 3-(2$^{G}$-glucosylrutinoside) と併せてハスモンヨトウ幼虫に対する生理活性を試験した．


Comp. A


Comp. B

trichome, 3D Measuring Laser Microscope, biological interaction

発表責任者：中田隆（nakata.ryu.85a@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2B101
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 伊江島産月桃精油の抗酸化活性とその香気特性

# Antioxidant activity and aroma profiles of essential oil from *Alpinia zerumbet grown in the Ie Island*

○山城 瑠唯、藏屋 英介、仲田 志奈、當山 瑛子、伊東 繁（沖縄高専）
○Rui YAMASHIRO, Eisuke Kuraya, Shina Nakada, Akiko Toyama, Shigeru Itoh (National Institute of Technology, Okinawa College)

【緒言】

九州南端から沖縄地域に生育する月桃（*Alpinia zerumbet*）は、ショウガ科ハナミョウガ属の多年草植物で、沖縄県内では昔から食品等に利用されてきた。月桃の精油は、独特な芳香を持ち抗酸化活性を呈する。しかし、これまでの調査によりその香気と抗酸化活性は各個体間によって異なることが明らかになった。近年、台湾における*Alpinia*属のいくつかの種間交雑が起こっていることが報告され日本でも同様な交雑の可能性が示唆されている。また、株ごとに得られる精油において、香気の残留特性が大きく異なることも明らかになってきた。本研究では、沖縄島内に自生する株と近接する伊江島の株から得られる精油の抗酸化活性とその香気特性について比較、検討を行った。

【実験方法】

月桃葉から得られる精油の評価にあたり、沖縄島(名護市内二見地区の2地点)と伊江島（島内の2地点）より、それぞれ同一地下茎からなる株を選定して月桃葉を採取した。採取した月桃葉は、定温乾燥機にて含水率が10～20 %程度となるまで40 ℃にて乾燥したのち、水蒸気蒸留を行った。得られた精油は、芳香蒸留水と分離して収量を求め、香気成分の分析ならびに機能性の評価に供した。月桃の精油成分は、GC/MS（GC/MS: GCMS- QP2010Plus, column: DB-WAX 60 m×0.32 mm i.d., 0.25 μm）によりその香気成分について分析を行った。月桃精油の機能性評価として、安定ラジカルである1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用い、ラジカル捕捉能を指標とする抗酸化活性をTrolox当量で算出した。

【結果及び考察】

名護市二見産と伊江島産の精油収量ならびに抗酸化活性を比較したところ、それぞれ 3.64、1.11 g/kg DW ならびに 1.53、7.24 μmol TE/g oil となった。伊江島産の精油収量は、二見産に比べ 30 %程度であったが、精油の抗酸化活性は 4.7 倍を示した。それぞれの精油の成分組成の解析より、名護市二見産と伊江島産の精油組成は大きく異なり、特に伊江島産の精油にはセスキテルペンを多く含んでいることが明らかとなった。以上の結果から、伊江島の株から得られる月桃精油の香気特性と抗酸化活性は、名護市二見で得られたものと大きく異なり、伊江島産の月桃は、精油収量は少ないものの非常に高い抗酸化活性の精油が得られることが明らかとなった。本発表では、季節による抗酸化活性の変化ならびにその他の地点で得られた株との比較についてもあわせて報告する。

Essential oils, Antioxidant activity, Aroma profile

発表責任者：山城瑠唯（br121440@edu.okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：2B102
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# クマリンーカルコン複合分子の合成と構造活性相関

# Synthesis of coumarin-chalcone hybrid and structure activity relationship

○栗原 崇史[1]、川井 悟[1]、常盤野 哲生[2]、吉澤 結子[2] ([1]東電大理工、[2]秋田県大生資料)
○Takashi KURIHARA[1], Satoru KAWAI[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yuuko YOSHIZAWA[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Akita Prefectural Univ.)

【目的】これまで、生理活性発現部位は分子中に一つだけであることを前提に創薬が進められた結果、新規構造の枯渇が問題となっている。そこでこれまで明らかにされている生理活性発現部位を複数組み合わせた複合分子を合成し，新たな生物活性の発現や活性増強を探索する研究に注目が集まっている。本研究では、クマリン骨格とカルコン骨格を有する複合分子について検討することとした。

クマリン類は 2H-1-benzopyran-2-one の縮合二環性骨格を基本とする化合物群である。セリ科、ミカン科、マメ科などの天然資源中に多様な構造が見出されている他に、高機能性分子合成のための足場化合物として多様なクマリン類が作り出されている。また、クマリン類は抗菌活性、抗腫瘍活性、細胞増殖抑制活性などの多様な生物活性を示すことが報告されている。一方、カルコン類は 1,3-diphenylprop-2-ene-1-one の孤立二環性骨格を基本とする化合物群であり、フラボノイドの化学合成／生合成中間体として重要な化合物である。カルコン類自身も抗酸化活性、細胞増殖抑制活性などの生物活性を示すことが報告されている。例えば、ホップに含有されるキサントフモールには抗酸化活性、抗炎症活性、細胞増殖抑制活性などを示すことが報告されている。しかし、それぞれに興味深い生物活性を示すクマリン類とカルコン類から構成される複合分子についての知見は少ない。そこで、本研究ではクマリンーカルコン複合分子を系統的に合成し、その前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性を調べることで、その構造活性相関に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】本研究では、出発物質であるサリチルアルデヒド類を EtOH 溶媒中ピペリジン触媒下で β-ケトエステル類と処理することで、Knoevenagel 反応によりクマリン骨格 3 位にアセチル基を有するアセチルクマリン類を合成した。これを EtOH 溶媒中 KOH 触媒下ベンズアルデヒド類と処理することで Claisen-Schmidt 反応により、クマリンーカルコン複合分子であるシンナモイルクマリン類を合成した。合成したクマリン-カルコン複合分子については、前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性によりその生物活性を評価した。

【結果】本研究では、クマリンーカルコン複合分子に種々の官能基を導入した化合物を中心に、数十種類の関連化合物を合成した。各化合物について活性評価を行ったところ、シンナモイルクマリン類では単純クマリンに比較して若干の活性増強が認められた。また、併せて合成したベンゾイルクマリン類では 6 位にハロゲン基を導入することで、活性増強が認められた。

coumarin-chalcone hybrid, structure activity relationship, HL-60

発表番号：2B103
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 新規低毒性 X 線応答物質の探索

# Screening for new non-toxic X-ray responsive substance

○外山 実千留[1]、森 崇[1]、溝脇 由衣[1]、高橋 淳子[2]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大応用生物、[2]産総研)
○ Michiru TOYAMA[1], Takashi MORI[1], Yui MIZOWAKI[1], Junko TAKAHASHI[2], Hitoshi IWAHASHI[1] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

【背景・目的】

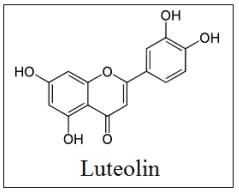
X 線のエネルギーによって何らかの応答を示す物質が存在する。このような物質を X 線応答物質と定義する。例を挙げると、タングステン酸カルシウム、酸化チタン、ポルフィリンは X 線応答物質であり、X 線照射によって蛍光を発する、また活性酸素種（ROS）を生成する。この中でポルフィリンは生体物質であり毒性が低く、放射線治療において治療効果を高めることが示された。医療分野への応用が期待され、現在複数の医療研究機関で前臨床試験が行われている。このようにポルフィリンへの期待は大きいがすべての腫瘍に適用できるとは限らない。そこで新たな低毒性の X 線応答物質が期待されている。本研究ではポルフィリン以外の低毒性 X 線応答物質の発見を目的とし、低毒性であると考えられる植物由来の成分から探索を行った。

【方法】

薬理・生理活性物質ライブラリー（植物由来）セレクション（Sigma Aldrich）に含まれる 40 種類の化合物に UV または X 線を照射し、ROS の増加量を測定した。ROS の検出には蛍光試薬であるジヒドロエチジウム（DHE）を使用した。DHE は ROS と反応し、エチジウムを生成することで赤色の蛍光を発する。UV または X 線照射後、生成されたエチジウムの蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定した。

【結果・考察】

UV 照射で 17 種類、X 線照射で 13 種類の物質においてエチジウムによる蛍光強度の増加が確認された。中でもフラボノイドの一種であるルテオリン（右図）は X 線照射によって特に蛍光強度の増加が顕著であり、すでに X 線応答が認められているプロトポルフィリンよりも同濃度で強い蛍光強度を示した。



Luteolin

以上の結果は低毒性 X 線応答物質がポルフィリン以外にも存在することを示唆している。さらに詳細なルテオリンの X 線応答メカニズムを解明するため、生成する ROS の種類について解析を行っている。

【参考文献】

Takahashi J *et al.* (2013) 5-Aminolevulinic acid enhances cancer radiotherapy in a mouse tumor model, SpringerPlus 2013, 2:602

Radiosensitizer, Porphyrin, Luteolin

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

発表番号：2B104
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

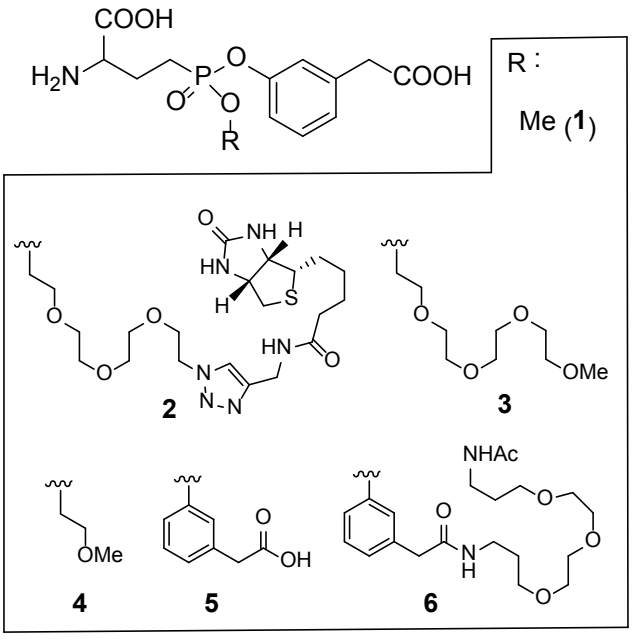
# ヒト γ－グルタミルトランスペプチダーゼ阻害剤を応用した分子プローブの開発

Synthesis of mechanism based inhibitor, targeted molecular probes.

○黒田 航、斎藤 慎吾、苗代 和樹、渡辺 文太、平竹 潤（京大化研）
○Kou KURODA, Shingo SAITOU, Kazuki NAESHIRO, Bunta WATANABE, Jun HIRATAKE (Kyoto Univ)

**【背景・目的】**γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、グルタチオンの加水分解および転位反応を触媒する、細胞膜に結合した大小 2 つのサブユニットからなるヘテロダイマー型の酵素であり、活性中心は細胞外に位置する。GGT は、抗癌剤耐性や強い転移活性を示す癌細胞に多く発現していることが知られており、癌の化学療法のターゲットとして注目を集めている。我々はこれまでに、GGT を選択的に阻害する強力な阻害剤 **1** を開発している。しかし、GGT 阻害剤により酵素の機能を抑えるだけでは癌細胞を殺傷できないことが、先行研究により明らかとされた。そこで本研究では、阻害剤 **1** が GGT の活性中心と共有結合を形成することに着目し、**1** をリードとした抗体依存性細胞応答傷害 (ADCC) を引き起こすことのできる分子プローブの開発を目的とした。ADCC とは、標的細胞を抗体でラベルすることで、免疫細胞による攻撃を誘導する手法である。本研究では、**1** のメチルエステル部位にポリオキシエチレン型のリンカーを導入し、末端に抗原となりうるビオチンを結合した **2** を分子設計し、その合成を行った。

**【方法・結果】**末端にアジド基を導入したポリオキシエチレン型のリンカーを調製し、ホスホン酸ヘテロジエステルを合成した。次に、プロパルギルアミンと縮合したビオチンとの間で Huisgen 環化反応を行うことで化合物 **2** を合成した。しかし、GGT を用いて酵素試験を行ったところ、阻害活性はほぼ消失する結果となった。そこで、阻害活性の極端な低下の原因がビオチンによるものかリンカーによるものかを調べるために、ビオチンを持たない化合物 **3** およびリンカー鎖長を最短にした化合物 **4** を合成した。また、リンカーの導入位置の妥当性を検討するため、化合物 **1** とほぼ同程度の阻害活性を持つ化合物 **5** の C 末端カルボキシ基のリンカーを導入した化合物 **6** を合成した。大会では、これらの化合物の GGT 阻害活性についても報告する予定である。




γ-glutamyl transpeptidase, mechanism-based inhibitor, molecular probe

発表番号：2C001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 動物細胞外マトリックス（グリコサミノグリカン）を基質とする病原性細菌 ABC トランスポーター
# A pathogenic bacterial ABC transporter involved in the import of animal extracellular matrix, glycosaminoglycan

○老木 紗予子[1]、丸山 如江[2]、三上 文三[1]、村田 幸作[2]、橋本 渉[1]（[1]京大院・農、[2]摂南大・理工）
○ Sayoko OIKI[1], Yukie MARUYAMA[2], Bunzo MIKAMI[1], Kousaku MURATA[2], Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Setsunan Univ.)

【背景と目的】グリコサミノグリカン（GAG）はウロン酸とアミノ糖の二糖を基本単位とする多糖であり、動物細胞外マトリックスの主要な構成要素の一つである。GAG を定着や感染の標的とする細菌において、GAG の細胞外での断片化および細胞内での分解と代謝に関わる酵素群は同定されているが、GAG 断片化物（二糖）の細胞内への取り込みに関する分子レベルでの解析は行われていない。これまでに、当研究室を始めとして、連鎖球菌（*Streptococcus*）の遺伝子クラスターにコードされるフォスフォトランスフェラーゼ系（PTS）が GAG 二糖の輸送に関わることを示唆している。PTS は糖質のヒドロキシメチル基（C6 位水酸基）をリン酸化し輸送するが、コンドロイチン硫酸やヘパリンなどの GAG では C6 位水酸基が硫酸化されているため、硫酸化 GAG は PTS の基質には不向きである。最近、基質を修飾することなく輸送する結合タンパク質依存 ABC トランスポーターを病原性連鎖桿菌（*Streptobacillus*）の遺伝子クラスターに見出し、基質結合タンパク質が GAG 二糖と結合すること並びにその複合体の立体構造を明らかにした。本発表では、GAG 輸送体の実体を明らかにするため、ABC トランスポーターの発現系と *in vitro* 測定系を構築し、その GAG の輸送能を解析した。
【方法と結果】クラスター解析により、連鎖桿菌 ABC トランスポーターは、膜貫通ドメイン（ヘテロ二量体 Smon0121（34 kDa）-Smon0122（33 kDa））および ATPase ドメイン（ホモ二量体 Smon0120（42 kDa）-Smon0120）からなる会合体（四量体）を構成することが示唆される。Smon0120-0121-0122 のオペロン遺伝子を大腸菌発現ベクターに組み込み、Smon0122 に His タグを導入した ABC トランスポーターの大腸菌内での発現を試みた。組換え大腸菌の細胞膜をドデシルマルトシドで可溶化し、金属アフィニティーとゲル濾過の各カラムクロマトグラフィーに供した結果、該当する分子サイズの三つのタンパク質を含む ABC トランスポーター会合体が精製されていることを確認した。本トランスポーターをリポソームに再構成し、基質結合タンパク質（Smon0123（57 kDa））存在下で各種オリゴ糖を添加したところ、硫酸化体も含む GAG 二糖に特異的に ATP 加水分解活性の上昇が認められた。また、C6 位が硫酸化されたコンドロイチン硫酸二糖と基質結合タンパク質との複合体の立体構造を分解能 1.8 Å で決定し、硫酸基認識に関わる構造要因を明らかにした。
【考察】基質結合タンパク質が GAG 二糖と結合し、それに伴い ABC トランスポーターの ATPase 活性が昂進することから、本トランスポーターは硫酸化体を含む GAG 二糖の細胞内取り込みに機能することが示唆された。本研究成果は、病原性細菌の GAG 輸送体の実体と分子機構の解明に繋がる。

ABC transporter, glycosaminoglycan, *Streptobacillus*

発表責任者：橋本渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2C002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインの機能構造解析
# Functional conformer of c-Myb DNA binding domain

○稲葉 理美、織田 昌幸（京府大・院生命環境科学）
○Satomi Inaba, Masayuki Oda (Kyoto. Pref. Univ.)

【背景・目的】生体内に広く存在する蛋白質は，各々固有の立体構造と機能を有しており，「生物学的な揺らぎ」により，個々のダイナミックな機能が発揮される。昨今，蛋白質の構造機能相関解明を目指し，数多くの蛋白質の立体構造がＸ線やNMR 等により決定されているが，これらは「揺らぐ」蛋白質の最安定構造や平均構造であり，「揺らぎ」の寄与を含む蛋白質の「実像」解明には至っていない。すなわち，ポストゲノムの重要課題である蛋白質の構造機能相関の解明には，溶液中での揺らぎ―動的構造―に関する知見獲得が必須である。本研究では，転写因子 c-Myb DNA 結合ドメインを対象とし，特に生理的条件下に焦点を当てて，生物が生み出すユニークな構造揺らぎを解析し，機能との相関解明を目指した。c-Myb は造血細胞の分化増殖に関わる転写調節因子で，N 末端側に DNA 結合領域を，C 末端側に転写活性化および負の制御領域を有する分子量約 7 万の蛋白質である。DNA 結合領域は，アミノ酸配列の異なる 3 つのリピート（R1，R2，R3）より構成され，このうちR2R3 がDNAと特異的に結合する。各リピートの立体構造は類似しているが，アミノ酸配列や物性，役割は大きく異なる。今回，生理的条件下での動態を探るべく，様々な物理化学的手法により「構造揺らぎ」を含む機能構造の詳細な解析を行った。
【結果・考察】まず，生体内環境に近い条件下での動的構造を明らかにすべく，主に NMR を用いて原子レベルで解析したところ，蛋白質全体の熱転移中点温度よりも低い 35°C 付近における，顕著な構造揺らぎが観測された。また，変異体を用いた実験から，この特異的な揺らぎは R2 に存在するキャビティによりもたらされるものであり，これが機能発現に非常に重要であることが明らかとなった[1]。次に，異なる pH 条件下（pH 4.0～7.5）での構造安定性を解析したところ，pH 5.0 での熱安定性が最も高く，pH 上昇とともに低下した。一方，二次構造を指標とした構造安定性でみると，pH 6.5 においてα-helix 含量が最も大きくなり，蛋白質の構造形成に関わる熱力学量は，エンタルピー変化量として反映されることが示された[2]。さらに興味深いことに，生体内 pH に近い条件下においては，いずれの熱力学量も最大にはならず，少なからず「不安定」でかつ「大きく揺らいだ」状態で存在することが明らかとなった。以上より，巧妙に制御された「生物学的な揺らぎ」が，蛋白質のユニークな機能発現には重要であることを示した。

【参考文献】[1] Inaba *et al*., Functional conformer of c-Myb DNA-binding domain revealed by variable temperature studies, FEBS J., 282, 4497-4514, (2015). [2] Inaba *et al*., Folding thermodynamics of c-Myb DNA-binding domain in correlation with its α-helical contents, Int. J. Biol. Macromol., in press.

structural dynamics, structure-function relationship, thermodynamics

発表責任者：織田昌幸（oda@kpu.ac.jp）

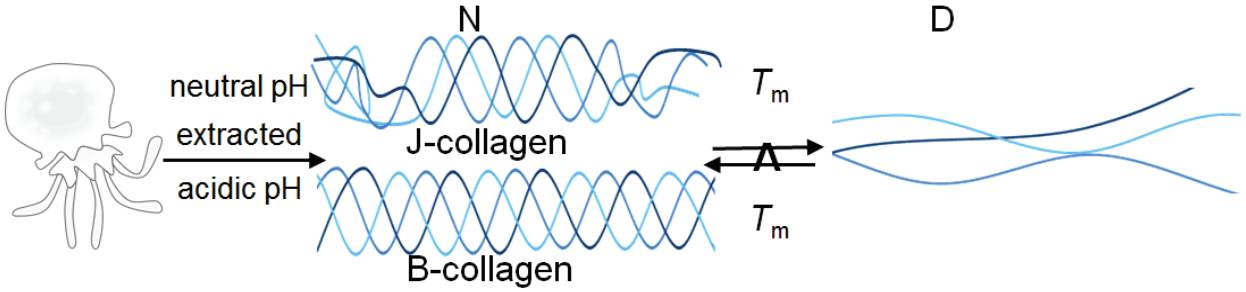
発表番号：2C003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# クラゲ由来コラーゲンの酸性および中性条件における熱安定性解析
# Thermal stability analysis of jellyfish collagens under acidic and neutral pH conditions

○三木 彩子[1]、稲葉 理美[1]、馬場 崇行[2]、木平 孝治[2]、深田 はるみ[3]、織田 昌幸[1]([1]京都府大・院生命環境科学、[2]海月研究所、[3]大阪府大・院生命環境科学)
○Ayako MIKI[1], Satomi INABA[1], Takayuki BABA[2], Koji KIHIRA[2], Harumi FUKADA[3], Masayuki ODA[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Kyoto Pref. Univ., [2]Jellyfish Research Lab., Inc., [3]Grad. Sch. of Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

コラーゲンは、細胞間結合組織に存在する線維状タンパク質である。Gly-X-Y の繰り返し配列からなるポリペプチド鎖が 3 重らせん構造を形成し、その両端にテロ領域をもつ。X、Y にはそれぞれ Pro、ヒドロキシ Pro（Hyp）が位置することが多く、1 つの鎖にある Gly のアミド水素と隣の鎖の X の位置のカルボニル酸素が水素結合し、3 本鎖を形成する。Hyp のヒドロキシ基も隣の鎖との水素結合に関わるが、海洋性生物であるクラゲ由来のコラーゲンは、Hyp の含有量が少ないため熱安定性が低いといわれている。中性条件で不溶化するため、多くのコラーゲンは、酸抽出、または酸性条件下で酵素抽出される。我々は、ミズクラゲ由来のコラーゲン（J-collagen）が中性で抽出され、中性での溶解度が極めて高いことを発見した（1）。本研究は、J-collagen と酸性条件下で酵素抽出したビゼンクラゲ由来コラーゲン（B-collagen）を対象とし、酸性、中性両条件下で、円二色性分散計（CD）、示差走査熱量計（DSC）を用いて熱安定性を評価した。

CD 測定により、J-collagen、B-collagen ともに 3 本鎖らせん構造に特徴的なスペクトルを得た。上記抽出方法では、J-collagen はテロ領域をもつが、B-collagen は除去されている。CD 測定のような低濃度条件では、中性においても両コラーゲンは溶解しており、テロ領域が CD スペクトルに及ぼす影響は極めて小さいといえる。CD、DSC 測定より得た変性中点温度（$T_m$）はほぼ一致し、B-collagen（中性）、J-collagen（中性）、B-collagen（酸性）、J-collagen（酸性）の順で高い $T_m$ を示した。酸性では、水素結合により 3 本鎖らせん構造が安定化されるが、中性では、静電的な相互作用が加わり、より安定化すると考えられた。SDS-PAGE より、B-collagen はテロ領域が除去されているのも関わらず J-collagen より分子量の高い分子種の存在比率が高いことがわかっている。これは、3 重らせん構造部分の分子量と熱安定性の相関を示唆する。コラーゲンは組織工学において注目されており、本研究はクラゲ由来コラーゲンの応用の可能性も示したといえる。




(1) Miki et *al.*, Structural and physical properties of collagen extracted from moon jellyfish under neutral pH conditions. BBB. 79, 1603-1607, 2015.

secondary structure, thermal stability, pH dependency

発表番号：2C004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# カイコバキュロウイルス発現系による急性骨髄性白血病に特異的な FLT3/ITD タンパク質の効率的な生産

# Efficient production of recombinant FLT3/ITD from acute myeloid leukemia using the silkworm baculovirus expression system

○開 俊樹[1]、菊池 次郎[1]、喜多 俊介[2]、前仲 勝実[2]、古川 雄祐[1]、柴山 修哉[1]（[1]自治医大、[2]北大院薬）
○Toshiki Hiraki[1], Jiro Kikuchi[1], Shunsuke Kita[2], Katsumi Maenaka[2], Yusuke Furukawa[1], Naoya Shibayama[1] ([1]Jichi Medical Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【目的】FMS 様チロシンキナーゼ 3（FLT3）は正常な幼若造血細胞の細胞膜上に存在し、造血幹細胞の生存・増殖・分化に重要な役割を果たしている。一方で、FLT3 はその恒常的活性化変異体が急性骨髄性白血病（AML）の主要な発症原因の１つとして注目されている。中でも、AML 患者の約 25%にみられる活性化型遺伝子内縦列重複変異体（FLT3/ITD）は、極めて有望な創薬ターゲットとして国内外で精力的に研究が行われている。しかし、構造生物学の分野では FLT3/ITD に関して、殆ど直接的な研究の進展が見られない。そこで我々は FLT3/ITD タンパク質の X 線結晶構造解析を目指し、カイコ-バキュロウイルス発現系を用いて効率的なリコンビナントタンパク質の発現系を構築した。
【方法と結果】我々は UniProt に登録されている *Homo sapiens* FLT3 (P36888)のアミノ酸配列を基に、リコンビナントタンパク質の遺伝子を人工合成した。594 残基目に AML 患者に最も高頻度でみられる８アミノ酸残基（PQYFYVDF）を挿入し、細胞内ドメインのみを ThermoFisherSCIENTIFIC 社の GeneArt サービスに発注し合成した。合成した遺伝子の Codon usage は *Spodoptera frugiperda* に合わせ、バキュロウイルス発現系用プラスミド（pFastBacDual）にサブクローニングした。組み換えプラスミドを抽出し、再度 BmDH10Bac（北海道大学大学院 生体分子機能学研究室 前仲勝実教授から譲受）に形質転換を行い、組み換えバクミドを調製した。同時に我々は、FLT3/ITD に特異的に働くコシャペロン CDC37 に着目し、同様の手法によって組み換えバクミドを構築・調製した。調製した組み替えバクミドは、DMRIE-C REAGENT を用いてカイコ５齢幼虫に感染させた。注射から１週間後にカイコ幼虫の脂肪体を解剖分離し、バイオスマッシャー（株式会社アシスト）で組織を破砕して、リコンビナントタンパク質を抽出した。FLT3/ITD タンパク質は単独で発現させた場合、全くリコンビナントタンパク質を得る事が出来なかった。しかし CDC37 と共発現させる事によって、有意に発現量が向上し、可溶性リコンビナントタンパク質を得る事が出来た。変異が入っていない天然型 FLT3 は単独で十分な発現が確認されている為、FLT3/ITD の可溶性発現には分子シャペロンが非常に重要な役割を演じている事が判明した。これらの知見を基に、今後研究を進展させ AML 発症の引き金となるキナーゼ活性恒常化の分子論的機序を明らかにする。

FMS-like tyrosine kinase 3, acute myelogenous leukemia, silkworm-baculovirus expression system

発表責任者：開　俊樹（hiraki@jichi.ac.jp）

発表番号：2C005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# *Shewanella livingstonensis* Ac10 における多価不飽和脂肪酸プローブの機能評価

Functional assessment of a polyunsaturated fatty acid probe in *Shewanella livingstonensis* Ac10

○徳永 智久、渡辺 文太、川本 純、栗原 達夫（京大化研）
○Tomohisa TOKUNAGA, Bunta WATANABE, Jun KAWAMOTO, Tatsuo KURIHARA (Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.)

【背景・目的】エイコサペンタエン酸（EPA）はシス型二重結合を 5 つ有するω-3 系多価不飽和脂肪酸であり、抗炎症作用や抗腫瘍作用、動脈硬化や高脂血症といった血管性疾患の予防作用など様々な効能を持つ生理活性物質として、近年、大きな注目を集めている。EPA は脂質メディエーターの前駆体として機能するとともに、リン脂質のアシル鎖として生体膜の生理機能発現に重要な役割を担っていると考えられている。EPA の生理機能を解析するために、ω末端にエチニル基（-C≡CH）を持つω-エチニル型 EPA（cEPA）が有用であると考えた。エチニル基は炭素数 2 の非極性官能基であり、生体直交性に優れている。また、他の官能基とほとんど反応しないが、アジド基（$-N_3$）とは環化付加反応が効率良く進行するため、この反応はクリックケミストリーに用いられる。cEPA を用いることにより、クリックケミストリーを用いた化学修飾が可能であり、EPA の挙動解析や EPA 修飾タンパク質の探索など、様々な解析に応用可能であると期待される。また、エチニル基が特徴的なラマンシグナルを持つことから、ラマン顕微鏡を用いた可視化も可能であると期待される。本研究室では、cEPA の合成法の確立に成功している。南極海水より単離された EPA 生産性細菌である *Shewanella livingstonensis* Ac10 は、低温下において EPA 含有リン脂質を生合成し、本菌の EPA 生合成酵素を欠損させた EPA 欠損株（ΔEPA）は低温で生育速度が遅延し、異常に伸長した細胞を形成する。このΔEPA を天然型 EPA 含有培地で生育させると、これらの生育阻害が抑制される。本研究では、*S. livingstonensis* Ac10 のΔEPA を用いて、cEPA 添加時の生育速度や細胞形態などを解析することにより、cEPA の生理機能を評価した。

【結果】ΔEPA において、cEPA を外部添加して生育させた場合、ΔEPA でみられた生育遅延や異常な細胞の伸長（図 1）が抑制された。また、ESI-MS や GC-MS を用いた解析により cEPA 含有リン脂質が検出され、外部添加した天然型 EPA と同様に cEPA がリン脂質のアシル鎖として取り込まれていることが分かった。

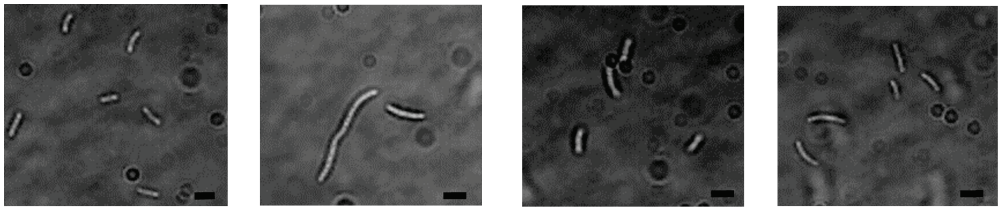



図 1. cEPA 添加が *S. livingstonensis* Ac10 の形態におよぼす影響

eicosapentaenoic acid, Shewanella livingstonensis Ac10, click chemistry

発表責任者：徳永智久（t.tokunaga@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2C006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

バイセルを利用したインビトロ機能型膜タンパク質合成系
Bicelles-based in vitro protein systhesis system for the preparation of functional membrane proteins
○武井 里美[1]、戸澤 譲[2] ([1]埼大理、[2]埼大院理工)
○Satomi TAKEI[1], Yuzuru TOZAWA[2] ([1]Saitama Univ. Fac.Sci., [2]Saitama Univ. Grad. school Sci. Eng)

我々のグループでは、反応液組成を自在に改変することを許容するインビトロ翻訳系の「開放系」としての性質を利用し、多様な技術的修飾を試み、機能型膜蛋白質の調製法の構築を進めてきた。本大会では、新たに見出したディスク状の脂質二分子膜構造体として知られているバイセル（bicelles）を共存させた翻訳反応系について紹介する。バイセルは、ディスク部に DMPC などの長鎖アルキル基を持つ脂質を、リム部に CHAPSO などの界面活性剤または DHPC など短鎖アルキル基を持つ脂質を配置する構造物であり、水溶液中では同質量の脂質で構成されるベシクル型構造体に比べ、露出する表面積が相対的に大きい。このシンプルな物性に着目し、我々はコムギ胚芽抽出液を用いたバイセル共存下でのインビトロ翻訳系の構築を進め、翻訳と共役した膜蛋白質の再構成系構築を目的に実験を行った。添加物による翻訳活性の阻害が起こらないことを確認するために、翻訳活性確認の指標として蛍光蛋白質である GFP を用いた。モデル膜蛋白質としては、7 回膜貫通領域を有しポリペプチド内へのレチナールの正しいアッセンブリーをプロトンポンプ機能に必須とするバクテリオロドプシン（bR）を利用した。バイセルとしては、DMPC/CHAPSO ならびに DMPC/DHPC を基本組成とする混合液を翻訳反応液への添加剤として試験し、GFP 合成を確認できた条件において、レチナール組込みによる紫色の呈色を bR 蛋白質のフォールディングの指標として膜蛋白質合成系としての条件至適化を図った。コムギ無細胞翻訳系に添加する混合液の組成、濃度ならびに温度の各条件を設定し、機能型 bR 合成効率の検証を進めた。その結果、試験したいずれのバイセル混合液においても、機能型 bR 合成が可能であることを確認した。さらに、DMPC/CHAPSO バイセル系と比べ、より広い濃度および温度領域で安定にディスク構造を保持することで知られる DMPC/DMPG/CHAPSO バイセルの添加により、安定な液性を維持した状態で機能型 bR 蛋白質の調製を可能にすることを明らかにした。以上の結果より、バイセルの共存翻訳反応系がモデル膜蛋白質 bR の合成に有効であることを確認し、最終的により幅広い反応条件で利用可能なバイセルの組成を見出すことができた。現在、さらに他の複数の膜蛋白質についても機能型構造の構築にバイセル添加合成が有効であるか否かを確認している。

bicelles, in vitro translation, membrane protein

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

発表番号：2C007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# ヨメガカサガイの卵巣から新たに見いだされたΔ9,15 ジエン酸の構造と分布特性

# A novel Δ9,15-dienoic fatty acid in ovaries of the archaeogastropod limpet *Cellana toreuma*

○川島 英城（岩手県立大宮古短大部）
○Hideki Kawashima (Miyako Coll., Iwate Pref. Univ.)

【目的】これまでに、原始腹足類のカサガイ類（生殖腺）に存在する新規不飽和脂肪酸の構造的多様性について、その一部を明らかにしてきた。[1] 今回は、岩手県大槌湾に生息する優占種のひとつであるヨメガカサガイ（*Cellana toreuma*）の卵巣から、新たに見いだされたΔ9,15 ジエン酸の構造とその分布特性に関する知見が得られたので、その結果を報告する。[2]

【方法】常法に従って、採取した *C. toreuma* の卵巣から全脂質を抽出後、分取用 TLC を用いて中性脂質・極性脂質にそれぞれ分画した。これらの画分を methyl ester 誘導体に調製後、不飽和度に応じて硝酸銀 TLC で不飽和脂肪酸の分取を行い、目的のジエン酸画分を得た。さらに、二重結合の位置を決定するために、得られた画分を 3-pyridylcarbinol ester 誘導体に調製し、EI-MS（70 eV）によるこれら誘導体の構造解析を行った。なお、ジエン酸における分枝鎖の有無は、接触還元の結果に基づき、決定した。

【結果】*C. toreuma* の卵巣から、Δ9,15 ジエン酸として、新規 21:2Δ9,15 及び既知の 22:2Δ9,15, 23:2Δ9,15, Δ24:29,15 が初めて同定された。これらのジエン酸は、すべて中性脂質・極性脂質に分布していたが、21:2Δ9,15, 23:2Δ9,15 及び 24:2Δ9,15 の占める割合は中性脂質の方が高かった。これまでに、*Collisella dorsuosa* の卵巣から 22:2Δ9,15 及び 24:2Δ9,15、*Cellana grata* の卵巣から 22:2Δ9,15, 23:2Δ9,15 及び 24:2Δ9,15 が既に見いだされている。[3] 前駆体となる 17:2Δ5,11 及び 19:2Δ7,13 は現在未同定であるが、Fig.1 から、今回同定された 4 種のΔ9,15 ジエン酸は、モノエン酸のΔ5 不飽和化後、Δ7,13 ジエン酸の C2 ユニット伸長により、生成されたと推定できる。本研究の結果から、これらΔ9,15 ジエン酸は新たなバイオマーカーとして、沿岸海洋環境の解析や評価に有用かもしれない。

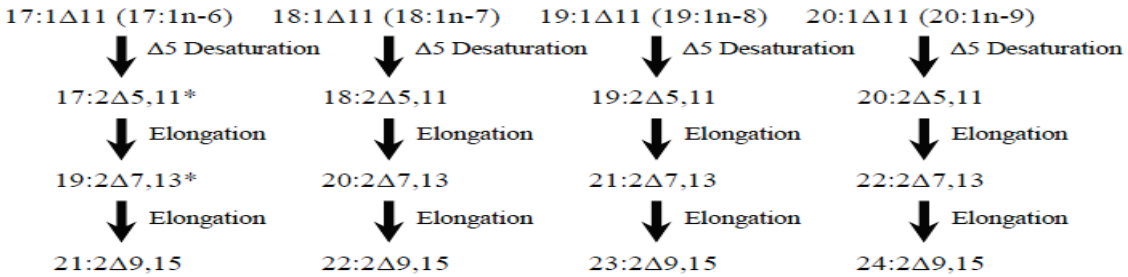



**Fig. 1** Possible biosynthetic pathways for dienoic FA with Δ9,15 unsaturation (C-21 to C-24)
An asterisk not found in organisms

[1] New Food Industry 56 (4), 1–8 (2014). [2] Lipids 51, in press. [3] Lipids 43, 559–567 (2008)

Δ9,15-dienoic fatty acid, archaeogastropod, limpet

発表責任者：川島英城（ajoe@iwate-pu.ac.jp）

発表番号：2C008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 海洋微生物ラビリンチュラ類における PUFA 含有ステロールエステルの合成機構

# The synthetic pathway of PUFA-containing sterol ester in thraustochytrids

石丸 真由、○石橋 洋平、渡邉 昂、沖野 望、伊東 信（九大院農）
Mayu ISHIMARU, ○Yohei ISHIBASHI, Takashi WATANABE, Nozomu OKINO, Makoto ITO (Kyushu Univ.)

ラビリンチュラ類は、高い脂質蓄積能力と優れた増殖能を持ち、ドコサヘキサエン酸（DHA、22:6n-3）やパルミチン酸（16:0)などを生産する海洋性油糧微生物である。そのため機能性脂質やバイオ燃料などの新規供給源として期待され、産業的にも注目を集めている。LC-MS/MS によるラビリンチュラ類の脂質分子種の網羅的解析の結果、DHA はアシル CoA、ホスファチジルコリン（PC）やホスファチジルエタノールアミン（PE）などのリン脂質、ジアシルグリセロール（DG）やトリアシルグリセロール（TG）などの中性脂質、そしてステロールと結合したステロールエステル（SE）の形で存在することが分かった。本発表では、ラビリンチュラ類 *Aurantiochytrium limacinum* より見いだされた SE 合成酵素について報告する。出芽酵母において SE はアシル CoA とステロールを前駆体として Sterol *O*-acyltransferase（Are1p, Are2p)によって合成される。一方、植物では SE はアシル CoA 非依存的に、リン脂質の脂肪酸をステロールに転移させる Phospholipid:sterol acyltransferase (PSAT)によって合成される。*A. limacinum* のドラフトゲノムを用いて、*are1*、*are2*、*psat* 遺伝子に相同性を示す配列を探索した結果、唯一 *psat* の相同配列（以下 *alpsat*）のみが存在することを見いだした。FLAG-tag の配列を付与した *alpsat* とマーカー遺伝子を組込んだラビリンチュラ用発現コンストラクトをエレクトロポレーション法によって *A. limacinum* に導入し、対応する抗生物質含有培地で形質転換体を選択した。抗 FLAG タグ抗体を用いたイムノブロット解析によって ALPSAT 高発現株を選抜後、抽出した全脂質を LC-MS/MS によって解析した。その結果、培養の後期において、*alpsat* 過剰発現株は野生型株と比較して DHA やドコサペンタエン酸（DPA、22:5n-6）などの PUFA を含む SE が大幅に増加することが判明した。PSAT によってリン脂質からステロールに脂肪酸が転移すると、SE と共にリゾリン脂質が生成する。*alpsat* 過剰発現株では、PUFA 含有 SE の増加とともに、PUFA を含む PC の減少と、リゾ PC の増加が認められた。一方、興味深いことにパルミチン酸を含む SE の量に顕著な変化はなかった。以上の結果から、ALPSAT は PUFA を含む PC を脂肪酸供与体として選択的に利用し、PUFA 含有 SE の合成を触媒する酵素であることが強く示唆された。今回得られた知見は PUFA を含む SE の機能解明や産業利用に繋がることが期待される。

本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して行われた。

Polyunsaturated fatty acids, Sterol ester, thraustochytrids

発表番号：2D001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好熱性古細菌由来ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ及びメバロン酸 3-キナーゼの変異解析
# Mutagenic analysis of diphosphomevalonate decarboxylase and mevalonate 3-kinase from thermophilic archaea.

○本山 賢人[1]、服部 愛[1]、海野 英昭[2]、吉村 徹[1]、邊見 久[1] ([1]名大院生命農、[2]長崎大院工)
○Kento MOTOYAMA[1], Ai HATTORI[1], Hideaki UNNO[2], Tohru YOSHIMURA[1], Hisashi HEMMI[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Nagasaki Univ.)

自然界で最も種類の多い化合物群であるイソプレノイドには、呼吸鎖キノンやステロイドホルモンなどの生命活動に重要な化合物が含まれる他、医薬品や香料の原料として利用される有用二次代謝産物が多く含まれる。これらイソプレノイド化合物は総じて、炭素数 5 の活性イソプレン単位であるイソペンテニル二リン酸（IPP）及びジメチルアリル二リン酸から生合成されており、真核生物や古細菌、一部の真正細菌では、生体内におけるそれらの供給源としてメバロン酸（MVA）経路が知られている。近年、真核生物などが有する古典的 MVA 経路の一部酵素が置換され、異なる中間体を形成する様になった変形 MVA 経路が、一部の古細菌や真正細菌から見出されている。

最近我々は、好熱性古細菌 *Thermoplasma acidophilum* から新奇酵素であるメバロン酸 3-キナーゼ（M3K）を同定した。同酵素は、古典的 MVA 経路中の酵素の一つであるジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ（DMD）に配列相同性を示すにも関わらず、それらの酵素が触媒する反応は大きく異なっている。DMD の触媒反応では先ず、基質である(*R*)-メバロン酸-5-二リン酸（MVA-5-PP）の 3 位水酸基がリン酸化される。その後、3 位リン酸基の脱離に伴った脱炭酸反応が起こり、IPP が生じる。これに対し、M3K の触媒反応では、(*R*)-メバロン酸（MVA）が基質となり、その 3 位水酸基がリン酸化されて(*R*)-メバロン酸-3-リン酸（MVA-3-P）が生じる。しかし DMD の触媒反応とは異なり、その後の脱リン酸及びそれに付随する脱炭酸反応は起こらない。このような基質特異性や触媒反応における差違の原因を探るべく、DMD と M3K の結晶構造を比較したところ、興味深い幾つかの相違点が見られた。①DMD の活性部位近傍のアミノ酸配列に広く保存されている Lys/Asp ペアが、M3K では Leu/Thr ペアに置き換わっている。②M3K の活性部位では、基質である MVA の 5 位水酸基と近接する位置に Glu が保存されているのに対し、DMD の活性部位中の対応する位置には Gly が保存されている。

以上を踏まえ我々は、DMD と M3K における構造機能相関を明らかにするため、両酵素の変異解析を試みた。酵素活性の有無は、放射標識した MVA 経路中間体を基質として酵素反応を行った後、TLC により生成物を分析することで検証した。その結果、いくつかの変異体で機能改変が確認され、一例として DMD 活性を持つ M3K 変異体の構築に成功するなど、M3K と DMD の触媒機構の違いを説明する知見が得られたので報告したい。さらに、構造未知な生成物を与える変異体が得られており、それら生成物の構造を現在解析中である。

Isoprenoid, Mevalonate pathway, Archaea

発表番号：2D002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Bacteroidetes 門バクテリア *Flavobacterium johnsoniae* のメバロン酸経路

# Mevalonate pathway of *Flavobacterium johnsoniae*, a member of phylum Bacteroidetes

○祖父江 史明、吉村 徹、邊見 久 (名大院生命農)
○Fumiaki SOBUE, Tohru YOSHIMURA, Hisashi HEMMI (Nagoya Univ.)

〈背景と目的〉メバロン酸（MVA）経路とは、イソプレノイド生合成における基本構成単位であるイソペンテニル二リン酸（IPP）およびジメチルアリル二リン酸を与える生合成経路である。同経路ではアセチル CoA を出発物質として、MVA を経由して IPP が生合成される。真核生物において同経路の全貌は明らかにされており、これは古典的 MVA 経路と呼ばれている。古典的 MVA 経路の後半部分において、メバロン酸キナーゼ（MVK)、ホスホメバロン酸キナーゼ（PMK)、ジホスホメバロン酸デカルボキシラーゼ(DMD)の働きにより、MVA は 2 段階のリン酸化と 1 段階の脱炭酸を経て IPP に変換される。一方で、一部のバクテリアやほぼ全てのアーキアは大半の MVA 経路遺伝子を有するにも関わらず、PMK と DMD のオルソログ遺伝子の両方、もしくは一方を欠いている。最近になって、Chloroflexi 門のバクテリアと高度好塩性アーキア、および *Thermoplasma* 属の好熱性アーキアから、イソペンテニルリン酸キナーゼ（IPK）によりイソペンテニルリン酸（IP）から IPP を合成する変形 MVA 経路が見出されている。

非メバロン酸経路を持たず、かつ IPK のオルソログ遺伝子を持たない Bacteroidetes 門のバクテリア *Flavobacterium johnsoniae* は、古典的メバロン酸経路を利用していると考えられる。しかし、同菌は MVK と DMD を含む全ての古典的 MVA 経路関連酵素のオルソログ遺伝子を保有しているにも関わらず、PMK のオルソログ遺伝子を持たない。よって本研究では *F. johnsoniae* の MVA 経路の解明を目的とした。

〈実験方法と結果〉放射標識した古典的 MVA 経路/変形 MVA 経路の代謝中間体を *F. johnsoniae* の無細胞抽出液と反応させた結果、5-ホスホメバロン酸および 5-ジホスホメバロン酸から IPP への変換が観察された。一方で、同菌におけるオルソログ遺伝子の存在状況と一致して、IP から IPP への変換は検出されなかった。また、大腸菌内で発現させ、精製した *F. johnsoniae* の MVK、DMD オルソログはそれぞれ MVK、DMD 活性のみを示した。これらの結果は既知酵素とは構造の異なる新型の PMK の存在を支持するものである。この新型 PMK については現在酵素学的な検証を進めており、その結果についても報告したい。

Mevalonate pathway, isoprenoid, Flavobacterium

発表番号：2D003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# カイコで発現したヒトアセチル CoA カルボキシラーゼの脱リン酸化とクエン酸による重合化に関する研究

# Studies on the dephosphorylation and polymerization by citrate of human acetyl CoA carboxylase expressed in silkworm

○當真 和也[1]、牧島 悠[1]、鈴木 智大[2]、加藤 竜也[1,3]、Park Sungjo[4]、Terzic Andre[4]、朴 龍洙[1,3] ([1]静大農・応生化、[2] 宇都宮大・バイオサイエンス教育センター、[3] 静大・グリーン研、[4] メイヨー医科大)

○Kazuya TOMA[1], Yu MAKISHIMA[1], Tomohiro SUZUKI[2], Tatsuya KATO[1,3], Sungjo Park[4], Andre Terzic[4], Enoch Y. Park[1,3] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Center for Bioscience Research and Education, Utsunomiya University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [4]Mayo Clinic college of Medicine)

【目的】近年、高脂質な食事の増加や、テクノロジーの発達による慢性的な運動不足などにより、肥満やそれに伴う糖尿病などといった生活習慣病の増加が大きな社会問題となっている。Acetyl-CoA carboxylase (ACC)は、アセチル CoA からマロニル CoA を生成する反応を触媒する酵素であり、生体内の脂肪酸代謝に深く関与している。哺乳動物細胞では ACC1 と ACC2 が存在し、ACC の生体内における活性は、クエン酸やリン酸化など複数の要因によってアロステリックに調節されている。本研究では、大腸菌とカイコ *Bombyx mori* のシャトルベクターである BmNPV バクミドを用いて発現させたヒト ACC1 および ACC2 のリン酸化部位を同定するとともに、ACC リン酸化部位を変異させた変異体 ACC を構築して、リン酸化による ACC の酵素機能の調節機構を解析することを目的とした。
【方法】ヒト ACC1 および ACC2 を BmNPV バクミド-カイコ発現系を用いて発現、精製して、そのリン酸化部位を LC/MS/MS によって同定した。得られた結果から、部位特異的変異によりリン酸化部位のセリン残基をグリシン残基に置換した変異 ACC を構築した。それら変異 ACC の活性測定および Native-PAGE と原子間力顕微鏡(AFM)によってクエン酸による重合化解析を行った。
【結果】LC/MS/MS の結果、カイコで発現させた ACC1 は Ser80 が、ACC2 は Ser222 がリン酸化されていた。この 2 つのリン酸化部位は 2 つのアイソザイムに共通して存在する同じ部位であり、ヒト ACC の活性調節に最も重要とされている部位である。この結果から、ヒト細胞と同様に、カイコでも ACC の同じ部位がリン酸化されることが確認できた。次に同定されたリン酸化部位のアミノ酸をそれぞれグリシンに置換した ACC1 S80G と ACC2 S222G を精製して、活性測定を行ったところ、S80G が ACC1 の活性と比較して約 4 倍活性が上昇していた。また、Native-PAGE および AFM の結果から、ACC1 S80G はクエン酸非存在下でも ACC1 に比べ重合化が確認され、ACC1 S80G および ACC2 S222G のリン酸化部位への変異は、クエン酸に対する感受性の増加をもたらした。これらの結果より、ACC の脱リン酸化は重合化を引き起こし、活性を上昇させると推測された。

Acetyl-CoA carboxylase, Phosphorylation, Polymerization

発表責任者：當真和也（deepblueshade80771@yahoo.co.jp）

発表番号：2D004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# コリネ型細菌由来アセチル CoA カルボキシラーゼ ε サブユニットの生化学的機能
# Biochemical function of acetyl-CoA carboxylase ε subunit from *Corynebacterium glutamicum*

○栃木 夢丸[1]、山内 健太郎[1]、今村 未央[2]、川崎 寿[1,2]、夏目 亮[1,2] ([1]東電大院・工、[2]東電大・工)
○Yumemaru Tochigi[1], Kentaro Yamauchi[1], Mio Imamura[2], Hisashi Kawasaki[1,2], Ryo Natsume[1,2]
([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki univ., [2]Sch. of Eng., Tokyo Denki univ.)

【背景および目的】コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* のアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC)は、Acc α 、Acc β 、Acc ε の 3 種類のサブユニットで構成されると考えられている。Acc α は C 末端領域にビオチンを有するビオチンタンパク質であるとともに、そのビオチン上へ炭酸基を固定するビオチンカルボキシラーゼである。Acc β は Acc α 上のビオチンに固定された炭酸基をアセチル CoA へと転移しマロニル CoA を合成するカルボキシルトランスフェラーゼである。Acc ε に関して具体的な生化学的機能は明らかにされていないが、Acc ε には、Acc α と Acc β のいずれか、あるいは双方と相互作用することで ACC 構造を安定化させ、ACC 反応を調節する機能があるのではないかと考えている。この点を明らかにする目的で、Acc ε に対する Acc α 、Acc β の相互作用を解析した。

【方法および結果】Acc α 、Acc β については、N 末端に His-Tag を融合させた His-Acc α 、His-Acc β を組換え発現させ、個別に Ni-アフィニティー精製したものを試料とした。Acc ε については、N 末端に His-GST タグを融合させた His-GST-Acc ε を組換え発現させ、変性条件下で Ni-アフィニティー精製後、リフォールディングさせた後に、非変性条件下で GST-アフィニティー精製して得られたものを試料とした。GST-プルダウンアッセイの結果、Acc ε に対して Acc α と Acc β のそれぞれが直接相互作用すること、さらに Acc α -Acc ε -Acc β 三者複合体が形成されることが明らかになった。これまでの我々の研究では Acc α -Acc β 間に直接的な強い相互作用が観察されなかったことと考え合わせると、Acc ε には、Acc α と Acc β の双方と相互作用することで三者複合体形成を安定化させる機能があることが示唆される。Acc α -Acc ε 複合体に対して Acc β を相互作用させるよりも、Acc ε -Acc β 複合体に対して Acc α を相互作用させた方が、より安定な Acc α -Acc ε -Acc β 三者複合体が形成されるという興味深い結果も観察された。Acc α 及び Acc β との相互作用に寄与する Acc ε 上の残基を同定するために、Acc ε 点変異体を用いて GST-プルダウンアッセイを行った。これまでに作成した 7 種類の点変異体のうち、Val35Ala は Acc α に対してのみ結合量が減少し、Trp58Ala は Acc β に対してのみ結合量が減少した。同様の影響が現れるかどうか、別の変異体の作成に取り組んでいる。また、ACC の活性測定ならびに構造解析に向けて、ACC 複合体の共発現、共精製を試みている。

*Corynebacterium glutamicum*, acetyl-CoA carboxylase, interaction analysis

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

発表番号：2D005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 大豆リポキシゲナーゼ T756R・dG 変異体の酵素学的性質と結晶構造解析

Structural and functional analyses for T756R and dG mutants of Soybean-Lipoxygenase

○日置 友輔、長屋 敦、三上 文三、高橋 延行、水谷 公彦（京大農）
○ Yusuke HIOKI, Tsutomu NAGAYA, Bunzo MIKAMI, Nobuyuki TAKAHASHI, Kimihiko MIZUTANI (Kyoto Univ.)

【目的】Lipoxygenase(以下 LOX) は多価不飽和脂肪酸の 1-cis,4-cis-ペンタジエン構造を認識し、二重結合を持ついずれかの炭素原子に酸素分子を導入してヒドロペルオキシ酸を生成する。ダイズ LOX には 3 つのアイソザイム(L1、L2、L3)が知られており、特に L1 の至適 pH はL2、L3 とは異なっている。本研究では、L1 に特徴的なアミノ酸残基(Thr756 と Gly807)に着目し、各種変異体を調製し、酵素活性の解析と X 線結晶構造解析を行った。
【方法と結果】酵素の表面に位置する 756 番目の残基は L2、L3 を含む他の多くの LOX で Arg 残基であり、807 番目の Gly 残基は欠失している。L1 の野生型、T756R(756 番目を Thr から Arg へ変異)、dG807(807 番目グリシンを欠失したもの)、T756R+dG、および L2 野生型の 5 種の組換え体を調製し、各々の酵素学的性質を調べた。*K*m の pH 依存性は L1 野生型と T756R で逆転した挙動を示した。そこで、T756R の結晶化と X 線結晶構造解析を行った。SPring-8 の BL26B2 の CCD デテクターを用いて回折データを測定し、2.1Å分解能で精密化した T756R の構造を報告されている L1 野生型の構造と比較したところ、L1 の構造との r.m.s.d 値は 0.3Åと全体構造の変化は小さく、主な構造の相違は 756 番目の残基部分に限定されていた。これらの結果から *K*m の pH 依存性の相違はタンパク表面にある 756 番目の Thr から Arg への変化による側鎖の相違に起因していることが示唆された。

Lipoxygenase, Structure, Oxygenase

発表責任者：三上文三（mikami@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2D006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# リゾプラズマローゲン特異的ホスホリパーゼ D の機能解析

# Characterization of lysoplasmarogen-specific phospholipase D

○杉森 大助[1]、柏原 奈々[1]、小山 貴之[1]、酒瀬川 信一[2]、松本 英之[2]([1]福島大理工、[2]旭化成ファーマ)
○Daisuke Sugimori[1], Nana Kashiwabara[1], Takayuki Oyama[1], Shin-ichi Sakasegawa[2], Hideyuki Matsumoto[2] ([1]Fukushima Univ., [2]Asahi Kasei Pharma Corp.)

【緒言】プラズマローゲンは*sn*-1位にアルケニルエーテル結合を有するエーテル型グリセロリン脂質で認知症や癌のバイオマーカーとして注目され、その酵素測定法の開発が期待されている。これまでに、発表者等は放線菌ホスホリパーゼ$A_1$がプラズマローゲンの*sn*-2位アシルエステル結合を加水分解できることを見出し、さらに生じたリゾ型プラズマローゲン（LysPls）に特異的に作用する新規ホスホリパーゼD（LysPls-PLD)を放線菌*Thermocrispum* sp. RD004668株が分泌生産することを発見した。さらに、昨年度、LysPls-PLDの精製と諸性質解析、大腸菌を用いた組換え発現について報告した。そこで本発表では、本酵素の触媒作用メカニズムの解明を目指した速度論解析ならびに部位特異的変異解析について得られた知見を報告する。

【方法・結果】*E. coli* BL21 (DE3)と pET24a(+)を用いて組換え発現した LysPls-PLD を用いて LysPls に対する速度論的解析を行ったところ、コリン型 LysPls（LysPlsCho）に対して $k_{cat}$=7.86 $\times 10^{-2}$ $s^{-1}$, $K_m$=0.162 mM を得た。これらの結果および基質特異性試験結果より、本酵素は基質ヘッドグループと *sn*-1 位アルケニルエーテル鎖を認識していると考えられた。

本酵素のアミノ酸配列を HHpred サーチした結果、本酵素の立体構造モデル作成の鋳型として *Thermoanaerobacter tengcongensis* 由来 glycerophosphodiester phosphodiesterase（ttGDPD と略す、Protein Data Bank code: 2pz0)が適していることがわかり、ttGDPD を鋳型として本酵素の立体構造モデルを作成した。その結果、典型的な TIM バレル構造を有することが予測された。さらに、本酵素の中心部に位置する $\beta$ バレルの底部に高度に保存されたアミノ酸残基（H46, E73, D75, H88, E175, F211, W282）が観察された。これらアミノ酸残基が基質結合部位と活性中心を形成するものと予測し、ttGDPD の触媒作用機序を参考にして H46 と H88 が触媒残基、E73, D75, E175 が $Ca^{2+}$結合サイトであると推定した。また、基質類似化合物とのドッキングシミュレーションにより、基質類似化合物のヘッドグループコリンの近傍に存在する A55, N56 が基質認識・結合に関与すると考えられた。そこで、これら残基に関して部位特異的変異解析を行った。その結果、E175 変異体以外はいずれも発現せず、E175R は発現したが活性が認められなかった。A55D/E/N, N56E/D/Q 変異体のうち、N56Q がリゾ型基質に対する活性が低下した。その一方で、エタノールアミン型 Pls に対する活性が向上した。このことから、N56 が基質ヘッドグループ、2 位アシル基のどちらか、あるいは両方を認識していると考えられた。

lysoplasmalogen, phospholipase D, functional analysis

発表責任者：杉森大助（sugimori@sss.fukushima-u.ac.jp）

発表番号：2D007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ナツメグに含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分の探索

# Identification of 5-lipoxygenase inhibitors in Nutmeg

○川上 祐生、森 香子、岡本 憲典、大河内 脩史、金山 友紀、金子 由季、神崎 圭太、山本 登志子、木本 眞順美、山下 広美、伊東 秀之、高橋 吉孝（岡山県大保福）
○Yuki KAWAKAMI, Yoshiko MORI, Kensuke OKAMOTO, Shuji OKOCHI, Yuki KANAYAMA, Yuki KANEKO, Keita KANZAKI, Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO, Masumi KIMOTO, Hiromi YAMASHITA, Hideyuki ITO, Yoshitaka TAKAHASHI (Okayama Pref. Univ.)

アラキドン酸に 5-リポキシゲナーゼが作用すると、アラキドン酸の 5 位に酸素が添加され、5-ヒドロペルオキシ酸（5-HPETE）が生成し、この 5-HPETE にロイコトリエン（LT）$A_4$ 合成酵素が作用して $LTA_4$ が生成するが、$LTA_4$ 合成酵素は 5-リポキシゲナーゼそのものであることが知られている。$LTA_4$ から生成される $LTB_4$、$LTC_4$、$LTD_4$、$LTE_4$ は炎症や免疫などの生体防御反応に関わる強力な生理活性脂質であり、それぞれの受容体を介して、白血球遊走作用や平滑筋収縮、血管透過性亢進などの活性を示す。5-リポキシゲナーゼを阻害することができれば、LT の生成を抑えることにより、気管支喘息のようなアレルギー疾患を予防できることが期待できる。ナツメグをはじめ香辛料は、その機能性が注目され、抗アレルギー作用を有するとされる研究報告もある。しかし、これまでナツメグがアレルギーに関与する 5-リポキシゲナーゼを阻害する報告はない。本研究では、ナツメグに 5-リポキシゲナーゼを阻害する成分が含まれているかどうかを調べた。

ナツメグの 50%エタノール抽出物は 5-リポキシゲナーゼを濃度依存的に阻害し、その $IC_{50}$ は 1.9 μg/ml であった。また、この抽出物は、5-リポキシゲナーゼを高いレベルで発現しているラット好塩基球性白血病細胞による 5-リポキシゲナーゼ産物の生成を濃度依存的に阻害した。この抽出物に含まれる阻害成分を探索するために、逆相 HPLC を用いてメタノール 30%から 100%のリニアグラジエントにて分画したところ、溶出時間 38 分～40 分と 46 分～48 分の画分に比較的強い 5-リポキシゲナーゼ阻害効果が認められた。このうち、溶出時間 46～48 分の画分に含まれる 5-リポキシゲナーゼ阻害成分は、$^1$H-NMR、高分解能マススペクトロメトリー、UV スペクトルによる各種スペクトル解析を行ったところ、Malabaricone C であることが分かった。この Malabaricone C は 5-リポキシゲナーゼのほか、血小板型 12-リポキシゲナーゼ、白血球型 12-リポキシゲナーゼを阻害したが、シクロオキシゲナーゼ-1 およびシクロオキシゲナーゼ-2 はほとんど阻害しなかった。また、5-リポキシゲナーゼの $LTA_4$ 合成活性を濃度依存的に阻害した。

Arachidonic acid, Lipoxygenase, Nutmeg

発表番号：2D008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

麹菌 *Aspergillus oryzae* 由来分泌型ホスホリパーゼ $A_2$ オルソログの持つ新奇な酵素学的性質
Novel enzymatic properties of secretory phospholipase $_2$ ortholog in *Aspergillus oryzae*

○高柳 亜由美[1]、宮川 拓也[2]、大塚 淳[2]、吉野 龍ノ介[1]、寺田 透[1,3]、田之倉 優[2]、有岡 学[1] ([1]東大院 農生科 応生工、[2]東大院 農生科 応生化、[3]東大院 農生科 アグリバイオ)
○Ayumi TAKAYANAGI[1], Takuya MIYAKAWA[2], Jun OHTSUKA[2], Ryunosuke YOSHINO[1], Tohru TERADA[1,3], Masaru TANOKURA[2], Manabu ARIOKA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]Agricultural Bioinformatics Research Unit, The Univ. of Tokyo)

【背景】ホスホリパーゼ $A_2$ ($PLA_2$) はグリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解する酵素であり、その局在やカルシウム依存性などから分泌型 (secretory $PLA_2$; $sPLA_2$)、細胞質型 ($cPLA_2$)、カルシウム非依存型 ($iPLA_2$) などに大別される。$sPLA_2$ については、動物では脂質を介した情報伝達系の契機を担う酵素としての重要性から盛んに研究が行われているが、微生物においては酵母が $sPLA_2$ 遺伝子を持たないため知見が乏しい。我々は以前麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つ 2 つの $sPLA_2$ オルソログである sPlaA と sPlaB について酵素学的性質の解析を行い、sPlaA は配列から予測された通り $PLA_2$ 活性を持つのに対し、sPlaB が予想外にも $PLA_1$ 活性を持つことを明らかにした。$cPLA_2$ や $iPLA_2$ では $PLA_1$ 活性を持つ酵素の報告があるが、$sPLA_2$ は厳格な *sn*-2 位特異的分解活性を持つ酵素として知られており、$sPLA_2$ オルソログのうち $PLA_1$ 活性を示すものは本研究の sPlaB が初めてである。本発表では sPlaB の $PLA_1$ 活性責任配列の同定を目的として、キメラタンパクや分子モデリングに基づく変異体の作製を行い、酵素活性測定を行った。

【結果と考察】大腸菌で生産した組換え sPlaA および sPlaB について、様々なヘッドグループやアシル鎖を持つリン脂質を基質として用いたアッセイを行い、マススペクトロメトリーによる測定を行った。その結果、いずれの基質に対しても sPlaA では $PLA_2$ 活性に由来する 1-アシルリゾリン脂質のピークが検出されたのに対し、sPlaB では $PLA_1$ 活性に由来する 2-アシルリゾリン脂質のピークが検出された。また、sPlaA の活性中心付近の 37 アミノ酸を sPlaB 由来の配列で置換したキメラ sPlaA を作製し、酵素活性測定を行ったところ、$PLA_1$ 活性を示すことが明らかとなった。このことから sPlaB の $PLA_1$ 活性がこの 37 残基に起因することが示された。より詳細な $PLA_1$ 活性責任残基の予測を目的として分子モデリングを行ったところ、sPlaA-R152 と sPlaB-Q94 の違いが基質ポケットの大きさの違いを生み、sPlaB の $PLA_1$ 活性に寄与していると推測された。そこで、実際にこれらの残基を交換した sPlaA-R152Q および sPlaB-Q94R 変異タンパク質を作製し、酵素活性測定を行った。その結果、sPlaB-Q94R は野生型 sPlaB とほとんど変化がなかったが、sPlaA-R152Q では $PLA_1$ 活性が認められるようになることがわかった。これらの結果から、sPlaB-Q94 が sPlaB の $PLA_1$ 活性に寄与していること、また sPlaB-Q94 以外にもその $PLA_1$ 活性を担保する残基が存在することが示唆された。現在、sPlaB 様の配列を持つ $sPLA_2$ オルソログである *Magnaporthe oryzae* 由来の 2 つの $sPLA_2$ オルソログの生産を行っており、それらが $PLA_1$ 活性を示すかどうかを検討する予定である。

phospholipid, filamentous fungi, protein structure prediction

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2D009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 大豆油分解高温リアクターから単離した好熱菌とその耐熱性リパーゼの特性解明

# Isolation of a thermophilic bacterium from a high-temperature fermentation reactor and the enzymatic properties of its thermostable lipase

○山田 千早[1]、澤野 孝太[1]、岩瀬 徳康[1]、松岡 真生[1]、西田 茂雄[2]、伏信 進矢[1]([1]東大院・農生科・応生工、[2]環清技研エンジニアリング)
○Chihaya Yamada[1], Kota Sawano[1], Noriyasu Iwase[1], Masaki Matsuoka[1], Shigeo Nishida[2], Shinya Fushinobu[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Kanseigiken Engineering)

【背景と目的】

リパーゼは油脂の加水分解反応やエステル交換反応を触媒する酵素である。そのため廃水処理や油脂の性質改変、バイオディーゼル燃料生産といった分野おいて産業利用されており、有用な酵素として知られている。特に耐熱性の高いリパーゼは、構造の安定性が高く熱や有機溶媒による変性が生じにくいことから応用利用に適している。我々は、大豆油を分解する好熱菌を単離し、それが産生するリパーゼの耐熱性などの酵素学的特徴および立体構造的特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

廃大豆油を添加した高温リアクターを単離源とし、2%の廃大豆油または大豆油を添加した液体培地に接種して、50°C で集積培養をおこなった。その培養液を 2%廃食用油またはトリブチリン含有寒天培地に塗抹して、油脂分解の指標となるクリアハローを形成したコロニーを単離した。16S rRNA 遺伝子解析により *Bacillus thermoamylovorans* に近縁であると同定した。大腸菌を用いて単離株が産生するリパーゼを発現・精製し、酵素学的な諸性状を調べた。酵素活性を測定する際に、基質として 4-ニトロフェニルパルミチン酸を用いて至適温度および至適 pH を調べた結果、至適温度が 60℃、至適 pH が 8 であった。また基質特異性について、炭素鎖（C2-C18）の 4-ニトロフェニル基質を用いて酵素活性を測定した結果、長鎖の脂肪酸（C14, C16）に対して高い活性を示した。大豆油を実際に分解するかどうかの確認およびその大豆油分解過程を明らかにするために、経時的に酵素反応中間産物をサンプリングし、TLC により分析した。その結果、大豆油が分解されジアシルグリセロール、モノアシルグリセロール、脂肪酸が段階的に生成されるという分解過程が明らかになった。

構造的な特徴について議論するために、アミノ酸配列を用いてホモロジーモデリングにより構造予測し、他の耐熱性リパーゼの構造と比較解析した。その結果、活性部位を覆う lid ドメインを構成するαヘリックスが短くなっていることが示された。

本研究は環境省環境研究総合推進費（K122014）および公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団の助成を受けて遂行された。

thermostable lipase, thermophilic bacteria, lipid degradation

発表責任者：伏信　進矢（asfushi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2D010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

深海好圧性微生物由来酵素における高圧適応の分子、構造メカニズム
Molecular mechanisms for pressure adaptation in the deep-sea enzymes from the piezophilic bacteria.

○加藤 千明[1]、濱島 裕輝[1,2]、永江 峰幸[3]、渡邉 信久[3]、大前 英司[4]、今井 竹夫[2]、山田 康之[2] ([1]海洋機構多様性、[2]立大生命、[3]名大工、[4]広大数理)
○Chiaki KATO[1], Yuki Hamajima[1,2], Takayuki Nagae[3], Nobuhisa Watanabe[3], Eiji Ohmae[4], Takeo Imai[2], Yasuyuki Yamada[2] ([1]JAMSTEC, [2]Rikkyo Univ., [3]Nagoya Univ., [4]Hiroshima Univ.)

深海環境に生息する好圧性微生物の酵素は、高水圧環境に適応しており加圧下でもその活性が高いことが知られている。しかしながら、こうした深海酵素の圧力適応についての分子メカニズムに関しては、また多くの部分が謎のベールにつつまれており、耐圧性酵素の構造的な特徴についても未知な部分が多い。そうした中、近年、加圧下での酵素活性を測定するツール（高圧分光計、高圧蛍光計など）や、加圧条件下で X 線結晶構造解析を可能にする装置などが開発され、次第に高圧条件下における酵素タンパク質の挙動について明らかとなりつつある。本研究では、そうした手法を駆使して、ロイシン生合成系の必須酵素であるイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素(IPMDH)を材料に、マリアナ海溝深度 10,898 m から分離された絶対好圧菌 *Shewanella benthica* DB21 MT-2 由来の深海型酵素(SbIPMDH)と、常圧菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 由来の常圧型酵素(SoIPMDH)との比較を行い、その活性と構造との相関について解析し、本酵素における高圧適応のメカニズムについて考察した。

これまでの実験から、常圧型酵素 SoIPMDH の活性中心の裏側に位置する 266 番目の Ser を深海型酵素の Ala に 1 アミノ酸置換することで、加圧下の活性が大幅に上昇する変異酵素を得ることができた。また反対に、深海型酵素 SbIPMDH の 266 番目のアミノ酸を Ala から常圧型酵素の Ser に置換すると、加圧下の活性が顕著に減少した。これらの結果は、266 番目のアミノ酸の性質が酵素の耐圧性に関与していることを示している。そこで、これらの変異酵素を含めて、加圧下での立体構造比較を検討するため、高圧 X 線結晶構造解析を行った。その結果、常圧型酵素では、高圧下において活性中心残基の裏側の Ser266 付近に 3 つの水分子の侵入が見られるのに対して、深海型変異酵素ではこうした水分子の侵入が起こらないことが観察された。深海型酵素では、Ala266 が、水分子の浸入を阻害しているものと思われた。

本酵素の活性中心裏側の構造では、活性中心に結合した基質や補酵素を反応終了後に生産物として排出する（オープン構造）際、フランジとして、この部分がクローズド構造となることが考えられるが、常圧型酵素の場合、加圧条件下ではこの部分に水分子が挿入されて、スタッキングするために活性が阻害される。深海型酵素では、この部分に疎水性アミノ酸 Ala226 が存在するため、水分子の挿入が起こらず、加圧下でもフランジの動きがスムーズに働き、耐圧性を示すと考察された。こうした活性中心近傍のアミノ酸の性質のちがいが、深海酵素に一般的な性質がどうか解明するためには、更なる検討が必要である。

pressure adaptation, piezophilic bacteria, enzyme structure

発表責任者：加藤千明（kato_chi@jamstec.go.jp）

発表番号：2D011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# シロウリガイ共生細菌由来イソプロピルリンゴ酸脱水素酵素の活性

# 3-isopropylmalate dehydrogenase activity from *Calyptogena* simbiotic bacterium.

○濱島 裕輝[1]、山田 康之[1]、加藤 千明[2] ([1]立教大、[2]海洋研究開発機構)
○Yuki Hamajima[1], Yasuyuki KATO-YAMADA[1], Chiaki Kato[2] ([1]Rikkyo Univ., [2]JAMSTEC)

我々は、深海微生物の至適生育圧力と酵素の高圧下の活性の関係を明らかとするため、*Shewanella* 属由来のイソプロピルリンゴ酸脱水素酵素（IPMDH）を材料に、その加圧下の活性について研究を行い、その結果、同属間の比較では至適生育圧力と酵素の高圧下の活性は、比例関係にあり、至適圧力が高い微生物の酵素ほど高圧下での活性も高く、また、その高圧下での高い活性は、活性中心残基近傍の１アミノ酸の違いに起因していることを明らかとしてきた。

深海に生息する化学合成生態系生物の一つであるシロウリガイ(*Calyptogena* 属)は、水深と分布により種が分化し、それぞれ独自の進化を遂げてきている。そのようなシロウリガイは、消化器官が退化し、かわりに鰓細胞内にそれぞれ独自の硫黄細菌を共生させている。この硫黄細菌は、宿主であるシロウリガイに細胞分裂を制御されており、ゲノムの一部が宿主に移行しているが、アミノ酸合成系の遺伝子などは共生細菌内に保持されており、共生細菌内で転写・翻訳され酵素活性を持つと考えられる。

そこで、生育深度が違うシロウリガイの共生細菌の持つ酵素を材料に、加圧下の活性を調べ、生育深度との関係を明らかにすることで、細胞内共生と進化の関係を明らかにすることができないかと考え、共生細菌内の酵素の加圧下の活性を調べることにした。加圧下の活性を調べるにあたり、すでに加圧下の活性について研究が進んでいる IPMDH を材料に選ぶことにした。これまでに、シロウリガイ由来の共生細菌のゲノムから IPMDH の遺伝子をショットガン法により、大腸菌発現プラスミドに逆方向クローニングすることに成功している。しかし、その後発現プラスミドに転写の正方向にクローニングし発現させるため、様々なベクターを試みたものの、正方向にはクローニングすることができず、大腸菌内で本酵素を発現させることができなかった。

今回、これまで発現させることができなかったシロウリガイ由来の IPMDH を、C 末端側に His-Tag をつけることで正方向に発現用プラスミドにクローニングすることに成功し、大腸菌内で活性のないインクルージョンボディの状態としてではあるが、初めて本酵素の発現を確認することができた。現在、リフォーリングや別の方法を用いた活性回復を試みており、加圧下での活性の測定を可能とすることを目的に研究を進めている。

simbiotic bacterium, pressure adaptation, IPMDH

発表責任者：加藤　千明（kato_chi@jamstec.go.jp）

発表番号：2D012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# オフタルミン酸の新規発酵生産法の開発

# Fermentative Production of Ophtalmic Acid

○伊藤 智和、所 真衣子、山内 綾子、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Tomokazu ITO, Maiko TOKORO, AYAKO YAMAUCHI, Hisashi HEMMI, Tohru Yoshimura (Nagoya Univ.)

*Escherichia coli* 由来 YggS はピリドキサール 5'リン酸(PLP)結合性の機能未知タンパク質であり、そのホモログは微生物からヒトに至る様々な生物で高度に保存されている。我々は、*E. coli yggS* 欠損株(Δ*yggS* 株)が L-Ile、L-Val 代謝に関与し、最少培地の菌体内や培地中に高濃度の L-Val や L-2-aminobutyrate (2-AB)を蓄積することを報告している。また最近、Δ*yggS* 株が、オフタルミン酸(γ-Glu-2-AB-Gly)を菌体内に高蓄積することを見出した。オフタルミン酸はグルタチオン(γ-Glu-Cys-Gly)アナログであり、水晶体のレンズ中に見出される。また、急性肝障害時の血中に高濃度見出されるバイオマーカーとして報告されている。また最近、甘味、塩味、うま味などの基本味を増強させるこく味物質としても注目されている。しかしながら、オフタルミン酸は現在、化学合成品のみが利用可能であり、高価である。我々は、オフタルミン酸の生理的意義の解明や産業利用を可能とする目的で、Δ*yggS* 株をプラットフォームとして用いた新規発酵生産法の確立を目指している。

オフタルミン酸の発酵生産に向け、(1)分解酵素(GGT)の欠損、(2)合成酵素(GshA および GshB)の過剰発現、(3)培地組成の最適化、について検証した。(1)作製した Δ*yggS*Δ*ggt* 二重変異株は、オフタルミン酸の蓄積量が定常期においてもほとんど減少しなかった。(2)GshA および GshB の各々の過剰発現により、オフタルミン酸の蓄積量は増加し、両酵素の共発現で、生産量は顕著に増大した。(3)オフタルミン酸構成アミノ酸の添加が、オフタルミン酸の蓄積量の増大に効果的であった。最終的に、上記(1)～(3)によって、野生株の約 900 倍のオフタルミン酸を培養液中の主要なアミノ酸として蓄積させることに成功した。現在、2-AB 生合成経路の増強や菌体外へのオフタルミン酸の排出について更なる検討をおこなっている。

ophtalmic acid, pyridoxal 5' phophate, glutathione

発表責任者：伊藤智和（ito-t@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2D013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *E.coli* YggS による Ile、Val 代謝制御機構の解析

# YggS mediated regulation of Ile and Val metabolism in *E.coli*

○山内 綾子、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹 (名大院生命農)
○Ayako YAMAUCHI, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagya Univ.)

*Escherichia coli* 由来 YggS は、高度に保存されたピリドキサール 5'-リン酸 (PLP)結合性機能未知タンパク質である。先行研究から、YggS は *E. coli* 菌体内で、2-aminobutyrate (2-AB)、2-ketobutyrate (2-KB)の代謝制御を介して Ile、Val 代謝に関与する可能性が示唆されているが、その詳細はよくわかっていない。

2-AB、2-KB に加え、L-Thr、L-Met、L-Homoserine (Hser)を培地に添加し、最少培地における *E. coli* 野生株、*yggS* 欠損株生育を観察したところ、L-Hser 存在下で *yggS* 欠損株に顕著な生育遅延を認めた。この生育の遅延は、*yggS* や *Saccharomyces cerevisiae*、*Bacillus subtilis*、*Homo sapiens* 由来の *yggS* ホモログ遺伝子の導入により回復した。一方、PLP 結合残基変異体である YggS K36A の発現では相補されなかった。L-Hser 存在下で培養した菌体内のアミノ酸を分析したところ、*yggS* 欠損株では、野生株に比べて、菌体内の L-Thr、L-Val、L-Ile 濃度が顕著に高いことが明らかとなった。同様の菌体内アミノ酸組成の変化は L-Thr、2-KB を添加して培養した際にも認められた。$^{14}$C で標識された L-Hser の無細胞抽出液を用いたトレーサー実験から、野生株、*yggS* 欠損株とも L-Hser から L-Thr への変換能には差がないことが示された。 以上の結果、YggS が 2-KB から L-Ile へ向かう代謝フラックスを負に制御することが予想された。

pyridoxal 5'-phosphate, amino acid

発表番号：2D014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Thermococcus litralis* DSM 5473 由来アスパラギナーゼの X 線結晶構造解析

# X-ray crystal structure of asparaginase from *Thermococcus litralis* DSM 5473

○山内 貴恵[1]、藤井 知実[1]、加藤 志郎[2]、老川 典夫[2,3]、畑 安雄[1] ([1]京大・化研、[2]関大・先端科学技術推進機構、[3]関大・化生工)
○Takae YAMAUCHI[1], Tomomi FUJII[1], Shiro KATO[2], Tadao OIKAWA[2,3], Yasuo HATA[1] ([1]ICR, Kyoto Univ., [2]ORDIST, Kansai Univ., [3]Faculty of Chemistry, Materials and Biotechnology, Kansai Univ.)

【目的】アスパラギナーゼはアスパラギン側鎖のアミド基を加水分解しアスパラギン酸を生成する酵素であり、生体内におけるアスパラギン代謝の主要な経路を担っている。これまでに様々な生物種由来のアスパラギナーゼについてその諸性質が報告されている。また、アスパラギナーゼは抗腫瘍効果を発揮することから急性リンパ性白血病の治療薬として、また食品製造時に食品中のアスパラギンに由来するアクリルアミドの発生を抑える抑制剤として実際に応用もされている。80 °C 以上で生育可能な偏性嫌気性菌である超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来のアスパラギナーゼ (TlASNase) は、L-Asn だけではなく D-Asn にも高い活性を有する新規な I 型の L-asparaginase である(1)。本研究では TlASNase の立体構造を明らかにすることを目的に結晶構造解析を行った。

【方法】大腸菌により発現させた TlASNase は、菌体を超音波破砕後その菌体抽出液を熱処理し、陰イオンクロマトグラフィーにより精製した。結晶化条件のスクリーニングを行ったところ、20 °C で 0.1 M Tris-HCl pH 8.5, 0.25 M ammonium acetate, 30% 2-propanol を沈殿剤溶液とするシッティングドロップ蒸気拡散法で六角柱形の良質な結晶を得ることができた。結晶を 30% glycerol を含むクライオプロテクタント溶液に約 1 分間浸漬し、高エネルギー加速器研究機構・放射光科学研究施設において X 線回折実験を行った。その結果、分解能 2.2 Å、$R_{merge}$ = 5.6%の X 線回折強度データを収集することができた。

【結果】TlASNase 結晶の晶系は六方晶系で空間群 $P6_122$ に属し、格子定数 $a = b = 69.6$ Å, $c = 558.2$ Å であった。自己回転関数の計算結果から結晶の非対称単位中には二量体分子が 1 個含まれていることが示唆された。初期モデルとして *Pyrococcus furiosus* 由来アスパラギナーゼの PDB 登録座標を使用して分子置換法により位相を決定し、モデルの修正と構造精密化を繰り返すことで最終的に 2.3 Å の分解能で TlASNase の結晶構造を決定することができた。

(1) 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集, 4D01a15 (2014)

X-ray crystal structure, asparaginase

発表番号：2D015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* 由来の二種類のアラニン脱水素酵素の機能解析

# Functional analysis of two alanine dehydrogenases from a thermophile, *Geobacillus kaustophilus*.

○安達 泰志、大森 勇門、大島 敏久（大阪工業大学大学院）
○Taishi ADACHI, Taketo OHMORI, Toshihisa OHSHIMA (Osaka Institute of Technology)

【目的】アラニン脱水素酵素（AlaDH, EC1.4.1.1）は、$NAD^+$を補酵素として L-Ala のピルビン酸への可逆的な脱アミノ反応を触媒する酵素である。これまでの知見では、本酵素は主に *Bacillus* 属細菌に存在しており、胞子の発芽時に L-Ala の分解に機能することが報告されている。最近、我々は、好熱菌 *Geobacillus* 属細菌のゲノム情報から、それらの細菌は総じて遺伝子上に二種類の AlaDH 推定遺伝子を有することを見出した。*G. kaustophilus* の場合は GK2752（1119 bp）と GK3448（1134 bp）がそれにあたる。一つの生物種のゲノム上に AlaDH 遺伝子が複数存在することは非常に珍しい。また、これらの AlaDH 推定遺伝子で構成される二つの遺伝子クラスターの構成は全く異なっていることから、代謝上の機能の違いがあることが予想できる。そこで本研究では、大腸菌を宿主とした *G. kaustophilus* 由来の二つの AlaDH 推定遺伝子の発現産物の AlaDH としての機能同定と精製酵素の特徴を明らかにし、生理的機能の違いの解明を進めることを主目的とした。

【方法および結果】*G. kaustophilus* よりゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として PCR にて GK2752 と GK3448 の遺伝子を増幅させた。これらの遺伝子断片を pET19b ベクターに挿入し、発現用大腸菌を形質転換した。目的タンパク質を大量発現させた後、菌体を超音波破砕して粗酵素液を調製した。その後、熱処理と Ni アフィニティクロマトグラフィーに供することで、目的タンパク質を均一に精製し、以降の実験に使用した。酵素活性測定の結果、GK2752 と GK3448 がコードする遺伝子産物は、どちらも $NAD^+$を補酵素とする明確な AlaDH 活性を示した。この結果から、*G. kaustophilus* のゲノム上には二種類の AlaDH 遺伝子が存在することが明らかになった。二種の AlaDH の相違点を明らかにするために、両酵素をそれぞれ高度に精製し、酵素学的特徴の解析を行った。その結果、GK2752 由来、GK3448 由来の両酵素とも類似した至適温度を示したが、耐熱性に関しては後者が前者よりわずかに高い耐性を示した。また、至適 pH に関しては両酵素とも類似した性質を示した。

次に、LB 培地で培養した *G. kaustophilus* から調製した粗酵素液を用いて、L-Ala を基質とした活性染色を行ったところ、AlaDH 由来の活性バンドは 1 種類しか検出されず、その移動度の比較から LB 培地での増殖時には GK3448 に由来する AlaDH のみが発現し、GK2752 由来の酵素は発現していないと推定できた。現在、タンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行って、通常の培養で発現する AlaDH の遺伝子の同定を進めている。

alanine dehydrogenase, *Geobacillus kaustophilus*, Functional analysis

発表番号：2D016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Sulfolobus solfata r icus* P2 のグルタミン酸脱水素酵素推定遺伝子、SSO2044 の機能解析
Functional analysis of putative glutamine dehydrogenase gene SSO2044 from*Sulfolobus solfataricus* P2
○谷口 健太郎、大森 勇門、大島 敏久（大阪工業大学大学院）
○Kentaro TANIGUCHI, Taketo OHMORI, Toshihisa OHSHIMA (Osaka Institute of Technology Graduate School)

【目的】L-グルタミン酸脱水素酵素(GDH)は、NAD(P)依存的に L-グルタミン酸の 2-オキソグルタル酸への可逆的な脱アミノ反応を触媒し、窒素代謝と炭素代謝をつなぐ重要な役割を担っている。GDH は補酵素の特異性から、NAD 依存性(EC 1.4.1.2)、NADP 依存性(EC 1.4.1.4) 、NAD(P)依存性(EC 1.4.1.3)の 3 種類が存在し、細胞内機能が異なっている。近年ゲノム解析が進む中で、2 種類以上の GDH 推定遺伝子を持つ微生物が見つかっている。超好熱性アーキアにおいては好気性 *Pyrobaculum calidifontis* が 2 種類の GDH 遺伝子を持ち、それらの遺伝子発現産物の生化学的特徴から、両者はそれぞれ機能の異なる NAD 及び NADP 依存性の GDH であることを、既に報告している（Wakamatsu et al., Extremphiles, 2013）。その他の超好熱アーキアでのゲノム情報から、好気・好酸性の超好熱 *Sulfolobus solfataricus* P2 はゲノム中に 4 種類の GDH 推定遺伝子（SSO1457、SSO1907、SSO1930、SSO2044）を持つことが分かった。すでに、V. Consalvi らは 1998 年に *S. solfataricus* P2 の培養細胞の破砕液から NAD (P)依存性の GDH を見出し、精製酵素の生化学的特徴と全アミノ酸配列を報告している。この酵素は、アミノ酸配列が SSO1907 のコードするタンパク質のアミノ酸配列と完全に一致することから、NAD(P)依存性 GDH であることが分かった。この SSO1907 由来の GDH のアミノ酸配列と他の 3 つの GDH 推定遺伝子からのアミノ酸配列の相同性は、SSO1457 が 83%、SSO1930 が 83%、SSO2044 が 95%であった。本研究では、まず、SSO1907 由来 GDH と最も高い相同性を示す SSO2044 のコードするタンパク質を対象にして、その遺伝子の大腸菌での発現、その発現産物の GDH 活性の同定と酵素化学的特徴の解析を行い、V. Consalvi らが見出した SSO1907 由来 GDH の特徴との相違を分析した。

【方法】*S. solfataricus* P2 からゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として PCR にて SSO2044 を増幅させた。この目的遺伝子断片を pET21a に挿入し、大腸菌 BL21(DE3)を形質転換させた。発現した目的タンパク質を熱処理と Ni アフィニティーカラムにより均一に精製した。精製タンパク質の動力学定数の決定、熱安定性や pH 安定性などの酵素学的特徴の解析を行った。

【結果・考察】大腸菌で発現させた組換え産物は、高い耐熱性を持ち、GDH 活性を示したので、SSO2044 は GDH をコードする遺伝子であることが分かった。この SSO2044 由来の GDH は NADP よりも NAD に高い補酵素を示したので、NAD よりも NADP により高い補酵素活性を有する SSO1907 由来の GDH とは補酵素依存性が異なることが明かになった。その他に、SO2044 由来の GDH が、耐熱性、基質特異性と基質の Km 値などの酵素化学的性質においても、SSO1907 由来 GDH とは、異にすることも分かった。今後、残り 2 つの SSO1457 と SSO1930 遺伝子の機能解析を進め、これら GDH の *S. solfataricus* P2 の細胞内における役割分担などを解明する予定である。

*Sulfolobus solfataricus* , Functional analysis, Glutamine dehydrogenase

発表番号：2D017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

Clostridium phytofermentans 由来 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼの機能構造解析
Structural and functional analysis of 1,2-ß-oligoglucan phosphorylase from Clostridium phytofermentans

○小堤 悠生[1]、古川 那由多[1]、田中 信清[1]、宮永 顕正[4]、伏信 進矢[3]、中井 博之[2]、中島 将博[1]、田口 速男[1]([1]東理大理工、[2]新潟大農、[3]東大院農、[4]東工大)
○Yuki KOZUTSUMI[1], Nayuta HURUKAWA[1], Nobukiyo TANAKA[1], Akimasa MIYANAGA[4], Shinya HUSHINOBU[3], Hiroyuki NAKAI[2], Masahiro NAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]Niigata Univ., [3]Tokyo Univ., [4]Tokyo Institute of Technology)

【目的】β-1,2-グルカンは主に一部のグラム陰性菌の分泌する環状糖としての存在が知られており、宿主との共生や宿主免疫系からの回避などに重要である。しかし、β-1,2-グルカン分解酵素に関する知見は極めて少ない。近年、私たちは *Listeria innocua* より 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ(OGP)を発見し、その酵素機能を明らかにした。しかし、同じ糖質加水分解酵素（GH）ファミリー94 に属する構造既知のホスホリラーゼと比較すると、アクセプターの糖を認識する残基が保存されておらず、また、N 末に 250 残基ほどの付加配列を有している点が異なっている。そのため、OGP の基質認識、反応機構の理解には立体構造が不可欠である。本研究では、*L. innocua* 由来 OGP(LiOGP)のホモログである土壌細菌 *Clostridium phytofermentans* 由来 OGP（CpOGP)の機能解析及び構造解析を行った。
【方法・結果】大腸菌を用いた CpOGP の組み換え酵素を解析に用いた。ソホロース（Glc-β-1,2-Glc）とグルコース-1-リン酸(G1P)を基質とした合成反応を用いて本酵素の温度、pH 依存性を調べた。活性はモリブデンブルー法による遊離リン酸の定量により測定した。その結果、CpOGP は至適 pH は 7.0 であり、pH7.0～7.5 で安定であった。また、至適温度は 40℃であり、0～37℃で安定であった。次に本酵素のβ-1,2-グルコオリゴ糖（ソホロオリゴ糖）に対する鎖長特異性を調べるため、合成反応における各アクセプターの基質飽和曲線を作成した。その結果、CpOGP はグルコースにほとんど活性を示さず、2 糖以上のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対して同程度の反応速度論量を示した。これは LiOGP と同様の傾向であった。また、CpOGP の G1P 反応速度論量も LiOGP と同程度であった。触媒残基を置換した変異体（D760N）は活性を示さなかった。次に、CpOGP の X 線結晶構造解析を行った。位相はセレノメチオニン置換体を用いた SAD 法により決定し、分解能 2.0Åの構造を決定した。CpOGP の N 末付加配列は同じ GH ファミリーに属する *Cellulomonas uda* 由来セロビオースホスホリラーゼ(CuCBP)の N 末ドメインと類似の構造を有していた。その結果、CpOGP の全体構造は、CuCBP の 2 量体の片方のサブユニット全体ともう片方のN末ドメインを合わせた構造と類似していた。そのためサブサイト+2が、安定配座のソホロトリオースの分解反応における生産的結合に必要と考えられる位置とは異なっていた。ソホロトリオースをソーキングした構造を取得したところ、サブサイト+1 と+2 のみに明確な基質由来の電子密度が確認された。サブサイト+3 には基質由来の弱い電子密度が観察されたが、サブサイト-1 には基質由来の電子密度が確認されなかった。

β-1,2-glucan, 1,2-ß-oligoglucan phosphorylase, Clostridium phytofermentans

発表責任者：中島将博（m-nakajima@rs.tus.ac.jp）

発表番号：2D018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# β-1,2-グルコオリゴ糖に作用するβ-グルコシダーゼの機能構造解析

# Structural and functional analysis of ß-glucosidase acting on ß-1,2-glucooligosaccharides

○石黒 陸斗[1]、前田 拓磨[1]、田中 信清[1]、宮永 顕正[2]、中井 博之[3]、中島 将博[1]、田口 速男[1]([1]東理大理工、[2]東工大、[3]新潟大)
○Rikuto ISHIGURO[1], Takuma MAEDA[1], Nobukiyo TANAKA[1], Akimasa MIYANAGA[2], Hiroyuki NAKAI[3], Masahiro NAKAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo Univ of Science., [2]Tokyo Institute of Technology., [3]Niigata Univ.)

【目的】

近年、我々はβ-1,2-グルカン代謝関連酵素として *Listeria innocua* 由来の加リン酸分解酵素（LiOGP）とβ-グルコシダーゼ（LiBGL）を報告している。LiBGL は LiOGP によるβ-1,2-グルカンの分解残渣であるソホロース（Glc-β-1,2-Glc）の分解酵素であり、3 糖以上のβ-1,2-グルコオリゴ糖（ソホロオリゴ糖）には低い活性しか示さない。それにもかかわらずソホロトリオースの入りうる特徴的な基質ポケットを有している。本研究では、β-1,2-グルカン代謝関連のβ-グルコシダーゼの機能構造相関の解明を目指し、LiBGL のホモログである *Bacteroides thetaiotaomicron* 由来β-グルコシダーゼ（BtBGL）の機能と構造を解析し LiBGL との比較を行った。

【方法、結果】

大腸菌を宿主として生産した組換え BtBGL を解析に用いた。BtBGL の温度、pH 依存性を調べたところ、BtBGL は至適温度 40℃、至適 pH5.5 であり、0～50℃、pH5～10 の範囲で安定であった。β結合を有するグルコ 2 糖を基質として結合位置特異性を調べた結果、ソホロース(β-1,2)とラミナリビオース(β-1,3)に高い活性を示し、セロビオース(β-1,4)とゲンチオビオース(β-1,6)には活性を示さなかった。そこで鎖長特異性を調べるために、BtBGL のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対する反応速度論量を決定したところ、BtBGL はソホロースよりも 3 糖以上のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対して明らかに高い触媒効率を示した。一方で、ラミナリトリオース(β-1,3)に対してはラミナリビオースよりも顕著に低い活性を示した。この結果から BtBGL はβ-1,2-グルコオリゴ糖に作用する酵素であり、LiBGL は鎖長特異性が異なる事が示唆された。次に機能構造相関を明らかにするために、BtBGL の X 線結晶構造解析を行った。分解能 1.4 Åにて構造決定した結果、LiBGL と非常に近い基質ポケットを有していた。そこで、基質認識に関する知見を得るために、求核触媒残基の変異体 D286A とソホロテトラオースとの複合体構造を決定した。サブサイト+2 において基質は Asn81 との水素結合可能な位置にあり、基質特異性に重要と推測された。Asn81 を LiBGL の対応する残基である Gly に置換した変異体についてβ-1,2-グルコオリゴ糖に対する活性を調べた。その結果、ソホロースに対する活性は変化せず、3 糖以上のβ-1,2-グルコオリゴ糖に対する活性がソホロースと同程度にまで顕著に低下していた。したがって、BtBGL において Asn81 が鎖長特異性に重要な残基であることが明らかとなった。

β-Glucosidase, ß-1,2-Glucan, Bacteroides thetaiotaomicron

発表責任者：中島　将博（m-nakajima@rs.tus.ac.jp）

発表番号：2D019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Listeria innocua* 由来ソホロオリゴ糖に特異的な ABC トランスポーター基質結合タンパク質の機能と構造

# Function and structure of a solute-binding protein of ABC transporter specific for sophorooligosaccharides from *Listeria innocua*

○阿部 紘一[1]、中島 将博[2]、砂川 直輝[1]、石田 卓也[1]、五十嵐 圭日子[1]、鮫島 正浩[1]、宮永 顕正[3]、中井 博之[4]、田口 速男[2]、荒川 孝俊[1]、伏信 進矢[1] ([1]東大院農生科、[2]東理大院理工、[3]東工大院理工、[4]新潟大院自然科)

○ Koichi ABE[1], Masahiro NAKAJIMA[2], Naoki SUNAGAWA[1], Takuya ISHIDA[1], Kiyohiko IGARASHI[1], Masahiro SAMEJIMA[1], Akimasa MIYANAGA[3], Hiroyuki NAKAI[4], Hayao TAGUCHI[2], Takatoshi ARAKAWA[1], Shinya FUSHINOBU[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. Sci., [3]Tokyo tech., [4]Niigata Univ.)

β-1,2-グルカンはある種のグラム陰性菌が産生する環状糖として主に知られているが、その分解代謝系は未解明な部分が多い。近年、我々は *Listeria innocua* において β-1,2-グルカンの代謝に関与すると思われる遺伝子クラスターを発見した。そのクラスター内には糖質加水分解酵素(GH)ファミリー 94 に属する 1,2-β-オリゴグルカンホスホリラーゼ(EC 2.4.1.333, LiOGP)および GH3 β-グルコシダーゼ(EC 3.2.1.21, LiBGL)がコードされている。LiOGP は 3 糖以上のソホロオリゴ糖(β-1,2-グルコオリゴ糖)を特異的に分解し、LiBGL は 2 糖のソホロース(Glc-β-1,2-Glc)を好んで分解する。これらの酵素は菌体内でのソホロオリゴ糖の協同的な分解に関わっていると思われる。また、同じクラスター内には推定 ABC トランスポーターの基質結合タンパク質(LiSBP)および膜貫通タンパク質もそれぞれコードされていることから、*L. innocua* は ABC トランスポーターを介して β-1,2-グルカンまたはソホロオリゴ糖を取り込んでいると思われる。しかし、*L. innocua* は多糖である β-1,2-グルカンでの生育例がないことから、ソホロオリゴ糖を取り込んでいるのではないかと推測されるが、LiSBP とソホロオリゴ糖との結合を調べた例はなく、その立体構造も未知である。そこで、本研究では LiSBP の熱力学的な相互作用解析および X 線結晶構造解析を行った。

大腸菌 BL21(DE3)を宿主として $His_6$-tag 融合 LiSBP を生産・精製し、精製タンパク質を用いて等温滴定熱量測定(ITC)および結晶化を行った。ITC による相互作用解析の結果、LiSBP はラミナリトリオース(β-1,3)、セロトリオース(β-1,4)、ゲンチオオリゴ糖(β-1,6)、マルトトリオース(α-1,4)には結合せず、ソホロトリオース、ソホロテトラオース、ソホロペンタオースにのみ結合した。各 $K_d$ 値はそれぞれ 10.7 μM、0.735 μM、1.19 μM であった。また、結合プロセスはエンタルピー駆動型であった。一方、2 糖のソホロースには結合しなかった。この結果は LiOGP が 3 糖以上のソホロオリゴ糖に作用することと対応している。作製した LiSBP の結晶を用いて KEK PF-AR にて X 線回折実験を行い、*Xanthomonas citri* 由来の推定マルトース/トレハロース結合タンパク質を鋳型とした分子置換法を適用した結果、分解能 2.2 Å でリガンドフリー状態の構造決定に成功した。LiSBP の全体構造は、他の基質結合タンパク質で良くみられる二つの球状ドメインから構成されており、これらのドメイン間でソホロオリゴ糖を結合するのではないかと思われる。また、他のタンパク質と立体構造を比較したところ、特に Open 構造のマルトース結合タンパク質とよく重なった。

β-1,2-glucan, sophorooligosaccharides, solute-binding protein

発表番号：2D020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 担子菌 Coprinopsis cinerea 由来タンパク質 CcGH131B の X 線結晶構造解析
# Crystal structure of CcGH131B from a basidiomycete, Coprinopsis cinerea

○奥山 舜朔[1]、林 昌宏[1]、砂川 直輝[2]、石田 卓也[2]、五十嵐 圭日子[2]、吉田 誠[1]、西河 淳[1]、殿塚 隆史[1] ([1]東京農工大院農、[2]東大院農)
○Shunsaku OKUYAMA[1], Masahiro HAYASHI[1], Naoki SUNAGAWA[2], Takuya ISHIDA[2], Kiyohiko IGARASHI[2], Makoto YOSHIDA[1], Atsushi NISHIKAWA[1], Takashi TONOZUKA[1] ([1]Tokyo Univ. A&T, [2]U of Tokyo)

【目的】Glycoside Hydrolase family (GH) 131 は、2012 年に設けられた酵素ファミリーである。子嚢菌 *Podospora anserina* 由来酵素（PaGluc131A）は β-グルカンを分解する活性があると報告されているものの、GH131 に属する酵素の構造や機能は未知な点が多い。我々は、担子菌 *Coprinopsis cinerea* のバイオマス分解酵素の研究を行っている。*C. cinerea* には２つの GH131 をコードする遺伝子 CC1G_07166 および CC1G_15039 が存在し、これらの遺伝子産物を CcGH131A および CcGH131B と命名して研究を行っている。

CcGH131B は、PaGluc131A や CcGH131A に存在する糖結合モジュール（CBM）が存在せず、相同性はこれらと約 30%と低いため、新規な機能を有するタンパク質であると推定される。本研究では、CcGH131B の立体構造を決定したので報告する。

【方法】CcGH131B の cDNA を取得し、N 末端側のシグナル配列を除いた配列を pET21a(+)に組み込むことでベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3)株を用いて C 末端側に His-tag を融合させた CcGH131B を発現させた。アフィニティークロマトグラフィーにより精製を行い、SDS-PAGE で単一バンドになったことを確認した後、ハンギングドロップ蒸気拡散法による結晶化を行った。位相の決定は、GH131 に属する構造既知のタンパク質を用いた分子置換法によって行い、リガンドなしの構造を 1.9-Å 分解能で、キシロオリゴ糖との複合体の構造を 2.0-Å 分解能で決定した。

【結果と考察】

CcGH131B の全体構造は、2 枚の逆平行 β シートから構成される β-ゼリーロールフォールド構造を有していることが明らかになった。これは他の GH131 にも共通する構造である。GH131 は、触媒残基が未だ不明であるが、サブサイト-1 及び+1 と推定される部位のアミノ酸残基は GH131 間で保存されているが、サブサイト+2 より還元末端側に存在すると推定されるアミノ酸残基は、CcGH131B が PaGluc131A や CcGH131A と比較し、相同性が低いことが明らかになった。

キシロオリゴ糖との複合体の構造解析では、推定サブサイト-2,-1 と+1,+2 の両方にキシロビオースと考えられる糖の電子密度が確認された。また、トリプトファン残基を指標とした蛍光光度測定において、キシランの滴定によって蛍光強度が減少したことから、本タンパク質はキシランおよびその関連多糖に特異的であると推定された。

GH131, Xylan, Coprinopsis cinerea

発表番号：2D021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Aspergillus oryzae* が生産する GH3 に属するイソプリメベロース生成酵素の解析

Identification and characterization of *Aspergillus oryzae* GH3 isoprimeverose-producing enzyme

○松沢 智彦、矢追 克郎（産総研 生物プロセス）
○Tomohiko MATSUZAWA, Katsuro YAOI (AIST BPRI)

＜背景＞

キシログルカンは植物細胞壁や種子に広く分布している多糖類であり、β-1,4 グルカンの主鎖にα-1,6 結合のキシロース側鎖が高頻度に枝分かれした構造をとっている。イソプリメベロース生成酵素（IPase, EC 3.2.1.120）はキシログルカンオリゴ糖からイソプリメベロース（α-D-Xyl*p*-(1→6)-D-Glc*p*）を遊離させるユニークなβ-グルコシダーゼであり、これまでに、バクテリア（*Oerskovia* sp.）において本酵素及びそれをコードする遺伝子が同定されている。また、糸状菌 *Aspergillus oryzae* も IPase を生産することが知られているが、IPase をコードする遺伝子は未同定であった。本研究では *Aspergillus oryzae* の IPase をコードする遺伝子の同定を試みた。

＜結果・考察＞

*Aspergillus oryzae* から精製した IPase の部分アミノ酸配列を解析し、本酵素をコードする遺伝子の同定に成功した。*Aspergillus oryzae* IPase (IpeA)はそのアミノ酸配列から Glycoside Hydrolases family 3 (GH3)に属していると考えられた。本酵素をコードする遺伝子を *Pichia pastoris* で異種宿主発現し、酵素学的諸性質の解析を行った結果、IpeA はキシログルカンオリゴ糖をその非還元末端側からイソプリメベロース単位で分解した。IpeA は厳密な基質特異性を有しており、非還元末端のキシロース側鎖が酵素活性に必須であるなど、極めてユニークな特徴を有していることが明らかになったので報告する。

xyloglucan, glycoside hydrolase family 3, *Aspergillus oryzae*

発表番号：2D022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# メタゲノム由来 ß－グルコシダーゼ Ks5A7 の性状解析

# Characterization of ß-glucosidase Ks5A7 retrieved from the metagenome

○内山 拓[1]、矢追 克郎[2]、宮崎 健太郎[2] ([1]東大院農、[2]産総研)
○Taku UCHIYAMA[1], KATSUROU YAOI[2], KENTAROU MIYAZAKI[2] ([1]The Univ. Tokyo, [2]AIST)

［目的］*β*-グルコシダーゼは、セルロースオリゴ糖をグルコースに加水分解する酵素である。また本酵素は自身の酵素活性で生じた分解生成物、すなわちグルコースによりその酵素活性が阻害される生成物阻害を起こすことが知られている。この現象はセルロースの酵素糖化プロセスにおけるボトルネックの一つと考えられており、生成物阻害を受けにくい*β*-グルコシダーゼの獲得が求められている。我々は以前からメタゲノムライブラリーのスクリーニングをおこない、グルコースによる生成物阻害を受けにくい*β*-グルコシダーゼの獲得を試み、成功している[(1)]。今回我々は、くさや汁由来メタゲノムライブラリーをスクリーニングし、生成物阻害を受けにくい*β*-グルコシダーゼ、Ks5A7のクローン化に成功した。そしてKs5A7の詳細な性状解析をおこなったので、これについて報告する[(2)]。
［結果］くさや汁由来メタゲノムをライブラリー化し、10% (w/v)グルコース存在下においても *p*-nitrophenyl *β*-D-glucoside (pNPGlc) 加水分解活性を失わない 7 つのクローンのスクリーニングに成功した。これらの塩基配列を決定したところ、これらは全て、Glycosyl hydrolase family 1 に属する同じグルコシダーゼ遺伝子を保持していた。本酵素を Ks5A7 と名付け、その大量発現系を構築し、性状解析をおこなった。至適温度は 45°C、至適 pH は 5.5 であり、~750 mM グルコース存在下においても、その pNPGlc 加水分解活性が阻害されることはなかった。また既知のグルコース耐性型グルコシダーゼと比較して、pNPGlc やセロビオースに対し、低い Km と高い Vmax を示した。またトリコデルマ由来セルラーゼ製剤と Ks5A7 を混合し、アルカリ処理済稲わらを処理したところ、グルコースの生成量が 2 倍に上昇した。このように本酵素は、セルロースの酵素糖化プロセス効率化に貢献できると期待される。

（1）Uchiyama, T., Miyazaki, K., Yaoi, K. *J. Bio. Chem.*, 288, 18325-18334 (2013)
（2）Uchiyama, T., Yaoi, K., Miyazaki, K. *Front. Microbiol.*, 6, e548 (2015)

Glucosidase, Metagenome, Saccharification

発表責任者：内山拓（takuwan111@gmail.com）

発表番号：2D023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Eisenia fetida* 由来のキチン分解関連酵素遺伝子クローニングと発現
Cloning and expression of the gene encoding chitin-degrading enzymes from *Eisenia fetida*

○上田 光宏[1]、中土井 啓[1]、塩山 岳志[1]、中澤 昌美[1]、阪本 龍司[1]、尾形 善之[1]、平野 優[2]、玉田 太郎[2] ([1]阪府大院生環科、[2]原子力研究開発機構)
○Mitsuhiro Ueda[1], Kei Nakadoi[1], Takeshi Shioyama[1], Masami Nakazawa[1], Tatsuji Sakamoto[1], Yoshiyuki Ogata[1], Yu Hirano[2], Taro Tamada[2] ([1]Osaka Prefecture University, [2]Japan Atomic Energy Agency)

「目的」キチンは，*N*-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合した多糖である．キチン分解に関連する酵素の研究は微生物由来に関する報告が多く，動物特に無脊椎動物由来のキチン分解酵素に関する研究例は比較的少ない．そこで，環形動物門貧毛目に属する生物でこれまで生理・生化学的にほとんど研究されてこなかったシマミミズ（*Eisenia fetida*）の酵素に着目する事とした．ミミズは有機物を分解する能力が高いことから，コンポスト化に利用されている．そこで糖質分解酵素の活性を測定したところ，キチナーゼの他にもアミラーゼ，セルラーゼ，β-1,3 グルカナーゼなどの活性が見られた．これまでに，これらの酵素遺伝子をクローニングし，発現にも成功している．キチナーゼは GH Family 18 に属し，触媒ドメイン，リンカー，キチン結合ドメインから構成されていた．不溶性キチンから $(GlcNAc)_2$ を生成した．現在，キチナーゼの構造と機能を明らかにするために X 線結晶構造解析を行っている．

次に，*E. fetida* におけるキチン分解に関わる酵素系を明らかにするためにトランスクリプトーム解析から構築した EST データベースをもとに，キチンオリゴ糖を単糖にまで分解するβ-N-アセチルヘキソサミニダーゼ遺伝子のクローニングと異種宿主発現を試みた．

「方法・結果」キチナーゼの立体構造を明らかにするために，全長体（触媒ドメイン＋リンカー＋キチンバインディングドメイン）を用いて結晶化を試みたが，結晶を得ることができなかった．現在，結晶を得るための条件を検討している．

トランスクリプトーム解析から構築した EST データベースをもとに、 *E. fetida* 由来のβ-N アセチルグルコサミニダーゼ遺伝子(EF-NAH)で発現量のもっとも高い contig No.7074 遺伝子のクローニングを行った。取得した遺伝子（1521 bp, 507aa）はβ-N アセチルヘキソサミニダーゼをコードし、その酵素はシグナル配列、zincin like fold ドメイン，リンカー，触媒ドメインから構成されていた．アミノ酸配列の相同性を調べたところ，*Xenopus laevis* や *Felis catus* といった GH family 20 に属する動物由来のβ-N アセチルヘキソサミニダーゼと 50%以上の相同性が見られた．大腸菌を用いて酵素遺伝子の発現を試みた．発現ベクターには pCold ベクターを用い mature 配列を挿入後，低温誘導し発現を試みた．現在，発現産物の確認を行っている．

chitinase, Eisenia fetida, beta-N-acetylglucosaminidase

発表責任者：上田光宏（mueda@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2D024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Trichoderma reesei* キシラナーゼ III（XynIII）の高機能化

Improbement of a xylanase III from *Trichoderma reesei*

○矢追 克郎[1]、松沢 智彦[1]、金子 哲[2]([1]産総研生物プロセス、[2]琉球大農)
○Katsuro Yaoi[1], Tomohiko Matsuzawa[1], Satoshi Kaneko[2] ([1]AIST, [2]Univ. Ryukyus)

【目的】今日まで、セルロース系バイオマス糖化用酵素の開発が国内外で盛んに行われている。セルラーゼを生産する微生物は数多く知られているが、そのなかでも糸状菌 *Trichoderma reese* は最も強力なセルラーゼ生産微生物の一種である。*T. reese* は長年にわたってセルラーゼ生産菌として育種・改良されてきたが、国内で開発された PC3-7 株は非常に高い酵素生産性を示し、各種酵素の糖化能力も高い極めて優れたセルラーゼ製剤生産菌株である。また近年、NEDO プロジェクトにおいてさらなる改良が進められ、欧米の酵素メーカーのセルラーゼ製剤を凌駕する純国内産菌株として研究開発が行われている。本菌株の特徴の一つに、セルラーゼだけではなくキシラナーゼ III（XynIII）の高発現があげられ、優れたキシラン分解能に寄与している。しかし、XynIII は耐熱性などの安定性が低く、糖化反応中に失活してしまうことがこれまでの研究で明らかなってきた。また、不溶性キシランへの分解活性が低いといった弱点も知られている。そこで本研究では、進化工学的手法による耐熱化と、糖結合能力の付与による不溶性キシラン分解活性増強による XynIII の高機能化を行った。
【方法と結果】まず、XynIII にランダムな変異を導入し、耐熱性が向上した変異株を選抜する進化工学的手法で耐熱化を行った。XynIII 遺伝子にエラープローン PCR でランダム変異を導入し、変異ライブラリーを作成した。このライブラリーを大腸菌に発現させ、発現した XynIII に熱処理を行った。熱処理後にも残存活性が高い変異酵素の選抜を行い、選抜された変異酵素にさらなる変異を導入した結果、野生型 XynIII に比べて、耐熱性が約 10℃向上した変異型 XynIII の獲得に成功した。さらに、選抜された変異型 XynIII の変異アミノ酸部位に対して Saturation 変異を導入し、より耐熱性の向上した変異型 XynIII の取得に成功した。

つぎに、不溶性キシランへの分解活性向上を試みた。野生型の XynIII は触媒ドメインのみで構成されており、キシランへの結合能力は低い。そこで、XynIII にキシラン結合ドメインなどを付与して、不溶性キシランへの結合性向上を行った。放線菌由来の XBD（キシラン結合ドメイン）を触媒ドメインの C 末端側に付与したキメラ酵素を作製した。その結果、XBD 付与によりキシランへの結合能が向上し、不溶性キシランへの分解活性も向上した。本酵素をバガスの酵素糖化に供した結果、糖化能力の向上が認められた。現在は、XBD 以外のタイプの糖結合ドメインの付与についても検討を行っている。

Trichoderma reesei, xylanase, directed evolution

発表責任者：矢追克郎（k-yaoi@aist.go.jp）

発表番号：2D025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# セルロース分解性嫌気性細菌 *Ruminiclostridium josui* 由来のアラビナンを分解するモジュラー酵素 Abn43A の酵素特性

# Characterization of arabinan-degrading modular enzyme Abn43A from anaerobic cellulolytic bacterium *Ruminiclostridium josui*

○山田 和伸、粟冠 真紀子、木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
○Kazunobu YAMADA, Makiko SAKKA, Tetuya KIMURA, Kazuo SAKKA (Mie Univ.)

【目的】*Ruminiclostridium josui* はセルロース分解性嫌気性細菌であり、セルロソームと呼ばれるセルラーゼ複合体を形成する。バイオマスの分解にはセルラーゼとともにキシラナーゼやアラビナナーゼなどが重要な働きをしている。*R. josui* のゲノム解析の結果、12 個のファミリー43 に属する糖質分解酵素の遺伝子を確認した。そのうちの *abn43A* 遺伝子は３つの GH43 触媒モジュールを含む分子質量 20.4 kDa の巨大なタンパク質をコードする。Abn43A は、N 末端側から順に Laminin_G_3、DUF、GH43、Laminin_G_3、Big_4、GH43、GH43、ドックリンの各モジュールからなるモジュラー酵素であると予想され、ドックリンを含むことからセルロソームの構成成分であると考えられた。今回、３つの GH43 を含む領域を、大腸菌を用いて別々に発現させ[RjGH43-1 (Laminin_G_3-DUF-GH43)、RjGH43-2 (Laminin_G_3-Big_4-GH43)、RjGH43-3 (GH43)]、それらの性質を調べた。
【方法】RjGH43-1、 RjGH43-2、および RjGH43-3 の領域をコードする DNA 断片を PCR 法により増幅し、発現ベクターpET28aΔN-His に連結して、組換えプラスミドを得た。これを大腸菌 BL21(DE3)に導入して目的タンパク質を発現させ、Ni-NTA アフィニティーカラムで精製した。
【結果】RjGH43-1、 RjGH43-2、および RjGH43-3 の発現に成功し、その酵素特性を調べた。RjGH43-1 のライ麦アラビノキシラン、バーチウッドキシラン、ビーチウッドキシラン、 サトウダイコンアラビナンおよびポテトβ-1,3-ガラクタンに対する分解活性を調べたところ、サトウダイコンアラビナンに対してのみ活性（2.2 U/mg、182.6 U/μmol）を示したことから、RjGH43-1（１番目の GH43）はエンド型のアラビナナーゼ活性（EC 3.2.1.99）を持つことが分かった。RjGH43-1 の至適 pH は 5.5、至適温度は 45℃、pH 安定性は 4.0～8.0、熱安定性は 50℃までであった。RjGH43-2 は、サトウダイコンアラビナンに対してはわずかな活性しか示さなかったが、アラビノオリゴ糖をよく分解し、アラビノースを遊離した。*p*NP-アラビノフラノシドを基質とした時の比活性は 23.4 U/mg（1790U/μmol）であった。このことから、RjGH43-2（２番目の GH43）はアラビノオリゴ糖のα-1,5-L-アラビノフラノシド結合をエキソ的に切断するアラビノフラノシダーゼであると考えられる。一方、RjGH43-3（３番目の GH43）は、上記のいずれの基質に対しても分解活性を示さなかった。現在、各 GH43 酵素について、詳細な酵素特性の解析を行っている。

*Ruminiclostridium josui*, arabinanase, arabinofuranosidase

発表責任者：山田　和伸（514m117@m.mie-u.ac.jp）

発表番号：2D026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Trichoderma reesei* 由来β-グルコシダーゼの糖転移生成物の解析

Analysis of transglycosylation products by β-glucosidase from *Trichoderma reesei*

○前川 滉大[1]、田村 真澄[1]、二階堂 望[1]、中島 将博[2]、中井 博之[3]、戸谷 一英[1] ([1]一関高専・物化工、[2]東理大院・理工、[3]新潟大・農)

○ Koudai MAEKAWA[1], Masumi TAMURA[1], Nozomi NIKAIDO[1], Masahiro NAKAJIMA[2], Hiroyuki NAKAI[3], Kazuhide TOTANI[1] ([1]Nation. Inst. Tech., Ichinoseki Coll., [2]Sci. & Tech., Tokyo Univ. Sci., [3]Facul. Agric. Niigata Univ.)

【背景および目的】

糸状菌 *T. reesei* の β-glucosidase (BGL)は 10 種類以上の遺伝子が存在し、セルロースを炭素源とした場合、Cel3A (BGL I)、Cel1A (BGL II)、Cel3C の 3 種が発現する。我々は菌体外に存在する BGL I がオリゴ糖だけでなく β1,3-グルカンに高い活性を持つ β1,3-グルカナーゼであることを明らかにした [1)]。一方、菌体内に存在する BGL II は、セルラーゼによるセルロース分解で生じたセロビオース(Cel2)を Glc に分解する主要経路と推定されている。この BGL II は高濃度の Cel2 や Glc から強いセルラーゼ誘導能を持つソホロース（Sop2、Glcβ1→2Glc）を生成することが知られている [2, 3)]。我々は BGL II による糖転移生成物を詳細に解析することで新たなセルラーゼ誘導剤の探索を試みている。本研究では、大腸菌で発現した *T. reesei* BGL II を使用して Cel2 を基質とした糖転移反応を行い、糖転移生成物の分離と構造解析を行った。また、糖転移生成物によるセルラーゼなどの誘導能を検討した。

【方法】

*T. reesei* 由来の BGL II 遺伝子を組み込んだプラスミド pET22bs を大腸菌 Rossettagami B で発現、超音波で溶菌し、His tag 精製 Kit などにより精製した。BGLII を用いて Cel2 を基質とした糖転移反応を行い、反応生成物を LC-MS (ELSD)、MALDI-TOF/MS、NMR で分析した。生成物は活性炭カラムクロマトグラフィーで分離し、それぞれの画分をさらに HPLC (Intakt Unison UK-Amino)でピークごとに分取して NMR による構造解析を行った。これらの糖転移生成物を使用して *T. reesei* におけるセルラーゼ等の誘導試験を行った。

【結果】

*T. reesei* BGL II は、Cel2 を基質とした糖転移により β1→2, β1→3, β1→4 結合した 2 糖、3 糖、4 糖、5 糖を生成し、反応初期は 3 糖が主成分であることが分かった。Cel2 0.6 g からの糖転移生成物の収量は、全体でおよそ 40%であった。糖転移生成物のセルラーゼ等の誘導活性について報告する。

1) 佐藤大輔ら、日本農芸化学会 2015 度大会要旨集 3E32a14
2) Mandels M. et al., *J. Bacteriol.* **83**(2), 400-408 (1962)
3) Saloheimo M. et al., *Appl. Environment. Microbiol.*, **68**(9), 4546-4553, (2002)

Trichoderma reesei, β-glucosidase, cellulase

発表番号：2D027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# オミクス解析を利用した微細藻類ユーグレナのパラミロン合成・分解関連酵素遺伝子の探索

# Identification of genes encoding enzymes related to paramylon metabolism in *Euglena gracilis* using omics analysis

○田中 優史[1,2]、後藤 京[1]、石川 孝博[1,2]（[1]島根大・生物資源、[2]JST/CREST）
○Yuji TANAKA[1,2], Kyo GOTO[1], Takahiro ISHIKAWA[1,2]（[1]Fac. Life Env. Sci. Shimane Univ., [2]JST/CREST）

微細藻類ユーグレナ（*Euglena gracilis*）は、好気環境下で貯蔵多糖パラミロンを合成・蓄積し、その貯蔵量は細胞の乾燥重量に対して最大約 50%にまで達する。パラミロンは、β-1,3-グルカンから成る高い結晶構造率を持った均一な顆粒（平均グルコース重合度 700）を形成しており、バイオフィルムやバイオプラスチックの原料として有用なほか、細胞内では嫌気環境下においてバイオ燃料としての利用が期待されているワックスエステル生産のための前駆体として利用されている。パラミロンは非常に強固な構造のため、*in vitro* では希アルカリ処理をしない限り酵素分解できないにもかかわらず、細胞内では嫌気や強光などのストレス環境下で容易に分解されるが、その代謝酵素やメカニズムについては未解明の問題である。

そこで本研究では、好気/嫌気に応答したパラミロンの合成/分解機構の解明を目的に、ユーグレナ発現遺伝子情報およびプロテオーム解析によるパラミロン代謝関連酵素の同定を試みた。RNA-seq 解析により、2 種類のパラミロン合成酵素候補遺伝子(PAramylon Synthase 1 と 2)を見出した。両 PAS 遺伝子は複数回膜貫通タンパク質をコードし、N 末端側にグルコシド加水分解ドメインを、C 末端側にグルカン合成ドメインを有する特徴的な構造を持っていた。二本鎖 RNA 導入による PAS の遺伝子発現抑制の結果、PAS2-knockdown 株においてパラミロンの蓄積量が著しく減少した。このことから、PAS2 がパラミロン合成を担っていることが示唆された。また、嫌気条件に応答したパラミロン分解系の解明を目的に、好気及び嫌気処理を 4 時間処理したユーグレナからパラミロン画分を調製し、この画分から可溶化したタンパク質を「パラミロン会合タンパク質」とし、これらタンパク質を nanoLC-ToF/MS により網羅的に同定・比較した。その結果、ペプチドカウント数が嫌気処理 4 時間で特異的に増加する 60 タンパク質が見いだされ、この中には endo-1,3(4)-β-glucanase が含まれていた。このグルカナーゼは Glucoside hydrolase 81 ファミリーに属しており、シグナル配列と膜貫通ドメインを持った新奇グルカナーゼであることが示された。同遺伝子の発現抑制を行った結果、嫌気処理後のパラミロン分解が有意に抑制されたことから、今回見出したグルカナーゼはパラミロン分解に関与することが強く示唆された。

microalga, glycometabolism, Euglena

発表番号：2D028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 海洋性子嚢菌由来 4-*o*-methyl glucuronoyl esterase の精製及び新規エステル基質の合成

# Purification of a 4-*o*-methyl glucuronoyl esterase from marine fungus and synthesis of a novel ester substrate

○高 相昊[1]、水野 正浩[1,2]、大川 浩作[2]、天野 良彦[1] ([1]信大院理工、[2]信大 IFES)
○Sangho KOH[1], Masahiro MIZUNO[1,2], Kousaku OHKAWA[2], Yoshihiko AMANO[1] ([1]Shinshu Univ., [2]IFES, Shinshu Univ.)

【目的】 植物細胞壁の主要成分はセルロース、キシランなどのヘミセルロース、リグニンであり、多糖類とリグニンの界面には、Lignin carbohydrate complex (LCC) と呼ばれる領域が存在している。リグニンは、LCC 中で多糖類といくつかの化学結合を介することにより保持されているため、これらの結合の加水分解酵素は、微生物による細胞壁分解において重要な役割を果たしていると考えられる。Carbohydrate esterase family 15 に分類される 4-*o*-methyl glucuronoyl esterase (GE) は、リグニンとキシランの架橋エステルの加水分解酵素であるとされている。そこで、本研究は海洋性子嚢菌 *Pestalotiopsis* sp. AN-7 由来 GE (PesGE) のクローニング及び単一酵素の取得を行った。さらに本酵素が有する本来の活性を簡易的に評価するため、天然の LCC をミミックした基質の合成を行ったので報告する。
【方法と結果】 小麦ふすまを炭素源とした培養した *Pestalotiopsis* sp. AN-7 からトータル cDNA を調製し、これを鋳型に用いた PCR により、PesGE の ORF 領域の増幅断片を得た。PesGE の cDNA 配列から推定されるアミノ酸配列は、17 残基からなるシグナル配列を含む 394 残基のタンパク質をコードしていることが明らかとなった。アミノ酸配列の相同性比較を行った結果、既報の GE である *Myceliophthora thermophila* 由来 StGE2 と 63%、*Hypocrea jecorina* 由来 Cip2 と 52%の相同性を示した。続いて、シグナル配列を除いた PesGE をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を発現宿主として用い、発現を試みた結果、培養液中に PesGE の分泌が確認された。rPesGE は、疎水性相互作用液体クロマトグラフィーにより、SDS-PAGE の結果から、38.7 kDa 付近に単一酵素として精製されたことが認められた。また、新規エステル基質の合成を行うため、初発原料としてキシロトリオースの非還元性末端キシロピラノースの 2 位水酸基がグルクロン酸の 1 位水酸基とグリコシド結合したグルクロノキシロオリゴ糖 （UXX） を選定し、市販の Birchwood xylan より酵素分解法で調製した。エステルの合成反応は、C. D'Errico らによる合成法に従った[1)]。ジメチルスルホキシド溶液中の UXX にベンジルブロミドとテトラブチルアンモニウムフルオリドを反応させてベンジル基を導入した。分析は HPLC にて行った。検出は UV 255 nm で行い、上記の化合物ピークの減少により反応の進行を確認した。現在は、エステル化反応後の生成物の同定ならびに精製酵素を用いて、本合成基質に対する rPesGE の活性評価を行っている。

1) D'Errico et al., *Biotechnol.Bioeng.*, **112**: 914-922 (2015)

carbohydrate esterase, lignin carbohydrate complex, plant cell wall

発表責任者：高相昊（15tm409j@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：2D029
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

CE-14 family デアセチラーゼの基質認識
Substrate recognition in CE-14 family deacetylases
○中村 努[1]、新山 真由美[1]、井田 くるみ[1,2]、大嶋 真紀[1]、森田 潤司[2]、上垣 浩一[1] ([1]産総研、[2]同志社女子大)
○Tsutomu NAKAMURA[1], Mayumi NIIYAMA[1], Kurumi IDA[1,2], Maki OSHIMA[1], Junji MORITA[2], Koichi UEGAKI[1] ([1]AIST, [2]DWCLA)

古細菌のキチン代謝系では、キチナーゼの分解産物である二糖が N,N´-diacetylchitobiose deacetylase (Dac)により脱アセチル化される。Dac は Carbohydrate Esterase 14 Family に属し、非還元末端側の N-acetylglucosamine (GlcNAc)のアセチル基を加水分解する亜鉛依存型酵素である。我々は *Pyrococcus horikoshii* 由来 Dac (Ph-Dac)の立体構造を明らかにし、基質アナログとの複合体構造解析によって基質認識機構を明らかにしたので、報告する。

Ph-Dac 結晶の非対称単位には 3 分子含まれ、対称操作によりバレル型の六量体構造(dimer of trimers)が明らかになった。三量体を形成する分子間に大きなクレフトがあり、その奥に亜鉛を含む活性部位が存在することが確認された。Ph-Dac の結晶構造では、結晶化溶液に含まれるリン酸イオンが亜鉛に配位するとともに、触媒残基のアスパラギン酸およびとなりの鎖のヒスチジンと相互作用していた。我々はこのリン酸イオンが脱アセチル化反応の中間体である四面体型オキシアニオンを模倣するとみなし、分子間クレフトにおいて両方の鎖のアミノ酸側鎖が触媒に関与するメカニズムを提唱した。次に、単糖基質の GlcNAc のアセチル基を四面体型リンに置換した化合物(2-deoxy-2-methylphosphoramido-D-glucose, MPG)を設計・合成し、阻害活性と複合体結晶構造を明らかにした。MPG は等モル(1 μM)で不可逆的に Ph-Dac を阻害した。複合体の立体構造では、Ph-Dac の構造は MPG 非存在下とほぼ不変で、MPG のリンに結合した酸素が、先の構造のリン酸と同様に Ph-Dac の触媒残基と相互作用していた。MPG の糖の部分の 3 つの水酸基(3´, 4´, 6´-OH)は、Ph-Dac のアルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジンと相互作用していた。一方、もう一つの水酸基(1´-OH)は分子間クレフトに向いており、酵素との相互作用は見られなかった。Dac の反応が非還元末端特異的であることは、これらの相互作用から説明できる。MPG と相互作用するアミノ酸残基は CE-14 family の酵素で空間的に保存されているため、Ph-Dac において見られた基質認識機構は CE-14 family に共通すると考えられる。

CE-14 family, deacetylase, chitinolytic pathway

発表責任者：中村　努（nakamura-t@aist.go.jp）

発表番号：2D030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 枯草菌細胞壁合成に関与する酵素による新規ペプチド合成反応における反応機構解析

# Mechanism of novel peptide synthesis by a *Bacillus* enzyme

○安部 智子[1]、橋本 義輝[2]、荘 葉[2]、熊野 匠人[2]、葛 寅[2]、小林 達彦[2] ([1]東電大・理工、[2]筑波大院・生命環境)
○Tomoko ABE[1], Yoshiteru HASHIMOTO[2], Ye Zhuang[2], Takuto KUMANO[2], Yin Ge[2], Michihiko KOBAYASHI[2] ([1]School of Sci. and Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Grad. School of Life and Environm. Sci., the Univ. of Tsukuba)

ニトリル分解菌のニトリル遺伝子クラスター下流に存在するアシル CoA 合成酵素（AcsA）は、ニトリルから生じる短鎖脂肪酸の代謝に関与する酵素である[1)]。AcsA は脂肪酸と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する。本酵素において、CoA の代わりに、同じくチオール基を持つ化合物である L-Cysteine を基質として反応させたところ、アミド結合を持った産物である *N*-Acyl-L-cysteine が生産され、本来のチオエステル結合（-CO-S-）形成だけではなく、アミド結合（-CO-NH-）形成をも触媒することがわかった[2)]。このアミド結合形成反応はアセチル CoA 合成酵素やルシフェラーゼにも見られ、Adenylate-forming superfamily に属する酵素が普遍的に持つ活性であると考えられた。しかしながら、本酵素においてなぜこのような全く異なる反応が可能であるのか、本新規アミド結合形成反応のメカニズムは明らかにされていなかった。

枯草菌などの一部のグラム陽性菌は、ペプチドグリカンとともに細胞壁を構成するテイコ酸に D-Alanine を結合する一連の反応に関わる *dlt* オペロンを持つ。本オペロン中に存在する DltA は D-Alanine:D-alanyl carrier protein ligase であり、アシル CoA 合成酵素と同様に Adenylate-forming superfamily に属する。DltA は、キャリアタンパク質である DltC に結合したホスホパンテテイン補欠分子族のチオール基に D-Alanine を付加する反応を触媒する。近年、我々は DltA における新規ペプチド合成反応を発見し、報告した[3)]。さらに、基質特異性を比較することにより、本反応機構の解析を行った。その結果、DltA の本来の酵素反応により *S*-Acyl-L-cysteine を合成し、その後、アシル基の自発的な分子内転移反応が起こることにより *N*-Acyl-L-cysteine が合成されることが判明した。我々が発見したペプチド/アミド合成反応は、酵素反応と化学反応がカップリングしたユニークな反応で進行することを明らかにした。

1) *J. Biol. Chem.* **280**, 8660 (2005); 2) *J. Biol. Chem.* **283**, 11312 (2008); 3) *J. Biol. Chem.* (In press)

adenylate-forming enzymes, peptide bond, thioester bond

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2D031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Adenylate-forming superfamily 酵素における新規ペプチド/アミド合成の反応機構解析

# Generality of the mechanism of a novel peptide/amide synthesis by members of superfamily of adenylate-forming enzymes

○橋本 義輝[1]、安部 智子[2]、熊野 匠人[1]、荘 葉[1]、葛 寅[1]、小林 達彦[1] ([1]筑波大院、[2]東電大)
○ Yoshiteru Hashimoto[1], Tomoko Abe[2], Takuto Kumano[1], Ye Zhuang[1], Yin Ge[1], Michihiko Kobayashi[1] ([1]the Univ. of Tsukuba, [2]Tokyo Denki Univ)

アシル CoA 合成酵素は、本来脂肪酸と CoA のチオエステル結合形成を触媒してアシル CoA を合成する酵素であるが、CoA の代わりに、同じくチオール基を持つ化合物である L-Cysteine を基質として反応させたところ、アミド結合を有する *N*-Acyl-L-cysteine が生産されることが分かった。すなわち、本来のチオエステル結合（-CO-S-）形成だけではなく、アミド結合（-CO-NH-）形成をも触媒することが証明された[1)]。このアミド結合形成反応はアセチル CoA 合成酵素やルシフェラーゼでも確認され、さらに D-alanine:D-alanyl carrier protein ligase である DltA においては新規ペプチド合成反応が確認された。以上のことから、本新規ペプチド/アミド合成反応は Adenylate-forming superfamily に属する酵素が普遍的に持つ活性であると考えられたが、本酵素においてなぜこのような異なる反応が可能であるのか、反応メカニズムは明らかにされていなかった。しかしながら近年、我々は Adenylate-forming superfamily に属する酵素のひとつである DltA を用いることによって、本新規反応のメカニズムの解明に成功した[2)]。本研究では、アシル CoA 合成酵素とアセチル CoA 合成酵素を用いて、アミド合成反応の反応機構解析を行った。アミノ基を持たないシステイン類似体を基質とした時は S-アシル化合物が産物として確認でき、チオール基を持たないシステイン類似体を基質とした時は反応が進まず、チオール基と一部保護されたアミノ基を持つシステイン類似体を基質とした時は *S*-Acyl 化合物と *N*-Acyl 化合物の両方が産物としてできた。これらの結果より、DltA と同様に、(i) 本来の酵素反応により *S*-Acyl-L-cysteine を中間体として合成し、(ii) 化学的な S→N アシルシフト反応により *N*-Acyl-L-cysteine 合成で、アミド化合物を合成することが判明した。我々が発見した酵素反応と化学反応がカップリングしたユニークなペプチド/アミド合成反応は Adenylate-forming superfamily に属する酵素が普遍的に持つ活性であることが示唆された。

1) *J. Biol. Chem.* **283**, 11312 (2008); 2) *J. Biol. Chem.* (In press)

adenylate-forming enzymes, peptide bond, thioester bond

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2D032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Grimontia hollisae1706B 由来コラゲナーゼの触媒機構に関与する活性解離基の熱力学的解析
# Thermodynamic analysis of ionizable groups involved in the catalytic mechanism of collagenase from Grimontia hollisae 1706B

耿 紅敏[1]、銭 鈞[1]、田中 啓友[2]、服部 俊治[2]、滝田 禎亮[1]、○保川 清[1]([1]京大農、[2]（株）ニッピ・バイオマトリックス研究所)
Hongmin Geng[1], Jun Qian[1], Keisuke Tanaka[2], Toshiharu Hattori[2], Teisuke Takita[1], ○Kiyoshi Yasukawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Nippi Research Institute of Biomatrix)

【目的】*Grimontia* (*Vibrio*) *hollisae* は耐熱性溶血毒を産生し、胃腸炎を引き起こすグラム陰性菌である。*G. hollisae* 1706B が産生するコラゲナーゼは、*Clostridium* 属コラゲナーゼ（ColG、ColT、ColH 等）よりも高い活性と安定性を有し、細胞分散剤やデュピュイトラン拘縮の治療薬としての応用が期待されている。近年、本コラゲナーゼ遺伝子が単離され、シグナルペプチド（アミノ酸残基 1-87）、亜鉛結合モチーフ HEXXH (492-496) を含む触媒領域 (88-615) およびプレペプチダーゼ C 末端配列 (688-749) を含む 767 アミノ酸残基から成るタンパク質をコードすることが報告された [1)]。本コラゲナーゼは *Clostridium* 属コラゲナーゼと異なり、collagen binding domain（CBD）と polycystic kidney disease-like domain（多発性嚢胞腎様ドメイン、PKD）を欠き、コラーゲンとの結合および分解の詳細な機構は不明である。本研究では、熱力学的解析により触媒機構に関与する活性解離基を推定した。
【方法】 1. 組換えコラゲナーゼの調製 : 成熟型領域（88-767、74 kDa）を *Brevibacillus* 発現系で発現させた。培養上清から硫安分画および DEAE セファロースカラムクロマトグラフィーにより、プロセシングを受け 60 kDa となった酵素標品を得た。2. 酵素活性の測定 : 蛍光基質 MOCAc-KPLGL(Dpa)AR 分解活性（$k_{cat}/K_m$）を各温度（25, 35, 45, 55ºC）および各 pH（3.6－10.4）で測定した。3. 活性解離基の推定 : 各温度における活性解離基の酸性側および塩基性側の解離定数（$K_{e1}$ および $K_{e2}$）を求め、van't Hoff プロット（p$K_e$ の温度変化）からプロトン解離に伴うエンタルピー変化（$\Delta H^o$）を求めた。これを、Asp、Glu、His、Cys、Tyr、Lys、Arg の側鎖のプロトン解離に伴う $\Delta H^o$ の報告値 [2)] と比較した。
【結果】蛍光基質分解活性はいずれの温度でも pH 6－7 をピークとしたベル型曲線を示した。活性解離基の $\Delta H^o$ は、酸性側が -5.7 ± 10.5 kJ/mol、塩基性側が 56.8 ± 15.2 kJ/mol であった。アミノ酸の $\Delta H^o$ との比較により、活性解離基は酸性側は Asp または Glu、塩基性側は Tyr と考えられた。
【考察】*Clostridium* 属コラゲナーゼの結晶構造解析により、ColH（HEXXH が 445-449）では Glu456 と Tyr538、ColT（455-459）では Glu466 と Tyr548 が活性部位に存在し、両側鎖が相互作用していることが報告された [3)]。このことから、*G. hollisae* コラゲナーゼの酸性側活性解離基は Glu493 と考えられた。一方、塩基性側活性解離基については、本コラゲナーゼが ColH および ColT とアミノ酸配列の相同性が低いため、推定できなかったが、同様の Tyr 残基が存在する可能性が示唆された。
【文献】1. Teramura, N. *et al.* (2011) *J. Bacteriol.* **193**, 3049-3956; 2. Takeharu, H. *et al.* (2011) *Biochim. Biophys. Acta* **1814**, 1940-1946; 3. Eckhard, U. *et al.* (2013) *J. Biol. Chem.* **288**, 20184-20194

collagen, collagenase, ionizable residue

発表責任者：保川清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2D033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 原核微生物由来 D-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ（パエニダーゼ）ホモローグの構造と活性
# Structures and activities of paenidase (D-aspartic acid endopeptidase) homologues

○韮澤 悟[1]、高橋 砂織[2] ([1]国際農研、[2]秋田県総食研セ)
○Satoru NIRASAWA[1], Saori TAKAHASHI[2] ([1]JIRCAS, [2]ARIF)

【目的】 これまで、一部の細菌の細胞膜に D 型アミノ酸の存在することが知られていたが、近年、哺乳類の生体内にも遊離の D 型アミノ酸や D 型アミノ酸を含有するタンパク質の存在することが見出されている。さらに、これらの D 型アミノ酸が様々な病態と関連することが示唆されている。特に、D-アスパラギン酸が注目されており、アミロイド $\beta$タンパク質ではアスパラギン酸残基の D 型変異がアミロイドタンパク質の凝集を引き起こすことが示唆されている。高橋らはD-アスパラギン酸エンドペプチダーゼ生産菌（*Paenibacillus* sp. B38 株）を分離するとともに、産生する酵素を paenidase（パエニダーゼ） と命名し、その性質を明らかにした [1)]。今回我々は、paenidase のアミノ酸配列と相同性をもつ各種ホモローグをクローニングし、大腸菌における発現を行うとともに、それらの酵素活性を調べた。

【方法】 アミノ酸配列の相同性解析にはBLAST 及びMEROPS データベースを用いた。大腸菌における各種遺伝子の発現には、pET-28a 及び *Escherichia coli* BL21(DE3)株を用いた。酵素活性測定は高橋らの方法で行った [1)]。ホモロジーモデリングは MOE（Molecular Operating Environment、CCG 社、カナダ）を用いた。

【結果】 Paenidase のアミノ酸配列の相同性を解析したところ、種々の $\beta$-lactamase、penicillin-binding protein、 D-Ala-D-Ala carboxypeptidase と 35～50%の相同性があることが明らかになった。これらのうち、全長カバー率及びアミノ酸残基一致率の高い 3 種類のホモローグ（D14、DF、JDR）を選択し、遺伝子合成を行った。つぎに、大腸菌においてこれらのホモローグを発現させたところ、全てにおいて可溶性組換え酵素を得ることに成功した。つづいて、得られた組換え酵素について、suc-D-Asp-MCA 分解活性を検討した結果、D14 は活性を示したが、DF 及び JDR は活性を示さなかった。さらに、paenidase、D14、DF、JDR のホモロジーモデリングを行い、活性部位近傍5 Å に位置するアミノ残基について解析した。その結果、paenidase 及び D14（D-Asp 基質分解活性あり）においてアミノ酸残基が一致し、なおかつ DF 及び JDR（D-Asp 基質分解活性なし）においてアミノ酸残基が異なるものは、6 カ所存在することが明らかとなった。また、DF 及び JDR には paenidase 及び D14 に無い構造が 1 カ所存在することが明らかとなった。以上の結果は、paenidase の基質認識機構を考察するうえで、有力な手掛かりになると考えられる。

【文献】 1) S. Takahashi *et al., J. Biochem.* **139**, 197-202 (2006)

D-amino acid, D-aspartic acid, endopeptidase

発表番号：2D034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株由来新規メタロアミノペプチダーゼの性状解析
# Characterization of a novel metalloaminopeptidase from *Streptomyces cinnamoneus* TH-2

○万 クン、裏地 美杉、畑中 唯史（岡山県生物科学研究所）
○Kun WAN, Misugi URAJI, Tadashi HATANAKA (RIBS, Okayama)

[背景と目的] 当研究グループでは、次世代シーケンサーによって当グループ取得放線菌 *Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株のゲノムを解読し、約 6.3Mbp のゲノム情報（90%程度）を得、国立遺伝研 MiGAP によるアノテーションで、多様な酵素をコードする塩基配列を予測した。それらの中に、3 種のメタロアミノペプチダーゼを見出した。メタロアミノペプチダーゼとは、金属が関与する触媒機構によって、ペプチドの N 末端から加水分解し、アミノ酸を生じる酵素である。Signal P 4.1 Server の分析によって、全て 3 種に、分泌シグナルペプチドの存在が、推測された。それら 3 種を、推測されたシグナルペプチドをコードする塩基配列を外して、大腸菌発現用 pET-24b(+)ベクターにそれぞれクローンし、大腸菌 BL21(DE3)を宿主に発現させたところ、1 種(TH2-M1-3)のみが、発現し、これの性状解析を行った。また、*Streptomyces lividans* 1326 株を宿主としても、リコンビナントを作成した。

[結果と考察] 人工基質 L-Leu-*p*NA を用いて調べたところ、TH2-M1-3 の基本性質は、最適 pH: 6.5 (トリスーマレイン酸緩衝液)、最適温度:43ºC、30 分加熱で活性が半減する温度: 57ºC であった。また、TH2-M1-3 の活性は、pH: 6.5 - 7.7 のトリスーマレイン酸緩衝液で、安定な活性を示した。最後に、放線菌で発現して、作製したリコンビナントを用いて、カゼインの加水分解プロファイルを分析した。その結果、カゼインをエンドペプチダーゼで処理することによって得たペプチドの N 末端疎水性アミノ酸 Met、Leu、Tyr、Phe、Val に対して、良い加水分解効率を示した。この結果から、TH2-M1-3 は、苦味ペプチドの除去に有用であることが期待される。

Streptomyces, Metalloaminopeptidase, Casein

発表責任者：万　クン（wankun@bio-ribs.com）

発表番号：2D035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# シイタケ培養菌体内プロテアーゼ遺伝子群の発現解析

# Expression analysis of protease genes from mycelia of *Lentinula edodes*

○福田 泰久、白坂 憲章（近大農）
○Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

近畿大学農学部・寺下らは，酸性プロテアーゼの特異的阻害剤である S-PI（Streptomyces-Pepsin Inhibitor）をきのこ培養基に添加すると子実体の形成を促進し，金属プロテアーゼの阻害剤である Talopeptin，Phosphoramidone，EDTA 等を培養基に添加すると子実体の形成阻害を示す現象を，いくつかの食用きのこ（シイタケ，ブナシメジ，エノキタケなど）で発見し，きのこの子実体形成にはプロテアーゼ群が深く関与していることを報告した。シイタケのプロテアーゼ群は，酸性プロテアーゼと金属プロテアーゼがそれぞれ菌体外，培養菌糸体内，子実体内より精製され，その酵素化学的諸性質が解明されているが，1 次構造は未解明である。本研究では，FeorestGEN シイタケゲノムデータベースより，プロテアーゼ様遺伝子群 16 種（Eqolisin 様遺伝子 4 種，Pepsin 様遺伝子 7 種，Metallo protease 様遺伝子 5 種）を抽出し，それぞれの遺伝子発現量を栄養生長菌糸期と子実体原基形成期で相対定量した。リファレンス遺伝子には，シイタケの生活環において定常的に発現しているとされる，GAPDH 遺伝子（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase；g2113 遺伝子）を用いた。ForestGEN シイタケゲノムデータベースより抽出したプロテアーゼ遺伝子群の発現量を解析したところ，栄養生長菌糸期では g866 遺伝子（Pepsin-A like protein）が顕著に発現していた。また，子実体原基形成期では g10056 遺伝子（Eukaryotic aspartic protease），g584（peptidase family M28），g1220（peptidase family M28），g4055（peptidase family M13）の発現量が増加したが，対照的に，菌糸期に顕著に発現していた g866 遺伝子はその発現量が制御されていた。また，子実体原基形成期では，g7597，g10028，g867，g2267 遺伝子の発現量が相対的に制御されていた。今後，子実体形成期に変動が確認された遺伝子群について，異種遺伝子発現後にタンパクの機能解析を行う予定である。

本研究は，JSPS 科研費 26870730 ならびに，私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1512004）の助成を受けたものである。

protease, *Lentinula edodes*, fruit body fromation

発表番号：2D036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ブナシメジ栽培工程における,アミノペプチダーゼ群の活性の変動

# Changes of amino peptidase activities in culture medium during fruit-body formation period of *Hypsizygus marmoreus*

○大庭 将矢、福田 泰久、白坂 憲章（近畿大院・農）
○Masaya OBA, Yasuhisa FUKUTA, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

【背景と目的】

きのこ類微生物における，栄養菌糸の状態から子実体形成という大きな形態的変化の生化学的なメカニズムは，現在でも未解明のままである．寺下らは，ブナシメジ（*Hypsizygus marmoreus*）の栽培工程におけるプロテアーゼ活性の変動と，プロテアーゼ阻害剤（Phosphoramidon, 1,10-Phenanthroline など）で活性を阻害した際の子実体生育への影響を調べ，子実体の生育に菌体外および菌体内のプロテアーゼ群（カルボキシプロテアーゼ，メタルプロテアーゼ）が重要な役割を果たすことを報告した．

本研究では，ブナシメジ栽培工程における 6 種のアミノペプチダーゼ群の活性の変動を調べ，阻害剤による活性への影響を検討した．

【材料と方法】

菌まわし終了後の菌床を，菌かき，低温移動させ，13℃で 25 日間，明所（約 200lux）で栽培した．栽培工程中における，芽出し処理後のアミノペプチダーゼ活性の経時変化と Phosphoramidon，1,10-Phenanthroline による活性への影響を測定した．

各種アミノペプチダーゼの基質には Alanine-p-nitroanilide, Glutamic acid-p-nitroanilide, Leucine-p-nitroanilide, Methionine-p-nitroanilide, Proline-p-nitroanilide, Valine-p-nitroanilide を用いた．

酵素反応液の組成は，5mM 各基質，0.5M Tris-HCl buffer (pH8.0) ，水，酵素とし，37℃で 30 分反応させ，遊離する nitroanilide の発色によって酵素活性を算出した．

【結果と考察】

子実体形成に伴い各アミノペプチダーゼ活性は上昇し，プロリンアミノペプチダーゼ，次いでメチオニンアミノペプチダーゼ，アラニンアミノペプチダーゼ，ロイシンアミノペプチダーゼの活性が他のアミノペプチダーゼと比較して高い傾向が見られた．子実体のアミノペプチダーゼ活性はメチオニンアミノペプチダーゼ活性が最も高かった．

また，各アミノペプチダーゼ活性は 1,10-Phenanthroline による活性の低下が確認された．

本研究は，JSPS 科研費 26870730 の助成を受けたものである．

*Hypsizygus marmoreus*, amino peptidase, 1,10-Phenanthroline

発表番号：2D037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Thermus thermophilus* 由来アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼホモログの機能解析

Functional analysis of homologs of adenine phosphoribosyltransferase from *Thermus thermophilus*

○富田 武郎、西山 真（東京大学生物工学センター）
○Takeo Tomita, Makoto Nishiyama (BRC, The Univ. of Tokyo)

（目的）アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(APRT)はアデニンと PRPP から AMP への変換を触媒するプリンサルベージ経路の酵素である。*T. thermophilus* のゲノム上には APRT ホモログをコードする *TTC1249* と *TTC1250* が並んで存在しているがそれらの機能は明らかにされていない。一方、我々はこれまでに *T. thermophilus* 由来グルタミン酸脱水素酵素(GDH)遺伝子 *gdhA* と *gdhB* はゲノム上で並んで存在しており、GdhA は調節サブユニット、GdhB は触媒サブユニットとしてヘテロ複合体を形成し、ロイシンによって活性化を受けることを見出している。このことから TTC1249 と TTC1250 も細胞内でヘテロ複合体を形成し機能している可能性が考えられた。これまでに我々は両タンパク質の組換えタンパク質を調製し、TTC1250 はアデニンを PRPP と結合させ AMP を生成する APRT 活性を有することを示す一方で TTC1249 はプリン塩基に対して活性を示さないことを明らかにしてきた。また、これらの間の相互作用は確認できておらず、TTC1249 と TTC1250 は別々に機能していることが示唆されている。組換え TTC1249 の溶液はうすい黄色を呈し、フラビン化合物のスペクトルを示した。MS 分析の結果、FMN が結合していることが示唆され、ITC 分析の結果 18 μM の解離定数で結合することが示された。以上の結果から、TTC1249 は PRT 活性を持たず、FMN をリガンドとしたシグナル伝達因子である可能性が示唆されていた。

（方法と結果）TTC1249 と相互作用するタンパク質を探索するために N 末端に Strep タグとヒスタグを融合した TTC1249 を高発現するような *T. thermophilus* の変異株を作製した。本株を培養後、Strep-tactin アフィニティーカラムにより精製した。SDS-PAGE の結果、タグ付きの TTC1249 に加え、44, 43 kDa の位置に新たなバンドが存在することが確認された。これらのバンドの MALDI-MS 分析の結果 44 kDa のバンドは GdhB、43 kDa のバンドは GdhA であることが確認された。精製タンパク質を用いて GDH 活性を測定した結果、GdhA/GdhB 組換え酵素と同様のプロファイルを示し、ロイシンによる顕著な活性化を受けることがわかった。また、TTC1249 の細胞内の機能を探るために遺伝子破壊株と高発現株を作製した。最小培地である MM 培地にて生育させた結果、TTC1249 遺伝子破壊株で生育遅延が観察されたのに対し、相補株ではその回復が見られた。このことから、TTC1249 が細胞内で代謝調節における重要な役割を担っていることが示唆された。現在、TTC1249 による GdhA/GdhB の活性調節について解析を進めており、大会ではその詳細についても発表する予定である。

Thermus thermophilus, Adenine phosphoribosyltransferase, Glutamate dehydrogenase

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2D038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# A novel endonuclease responsible for damaged DNA repair in archaeal order *Thermococcales*

○MIYAKO SHIRAISHI[1,2,3], SONOKO ISHINO[1], YURIKO EGASHIRA[1], SHINICHI KIYONARI[1], TAKESHI YAMAGAMI[1], ISAAC CANN[2,3], YOSHIZUMI ISHINO[1,2] ([1]Grad. Sch. of Bioresource & Bioenvironmental Sci., Kyushu Univ., Japan, [2]Inst. for Universal Biology, NASA Astrobiology Inst., [3]C.R. Woese Inst. for Genomic Biology, Univ. of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL 61801, USA)

DNA is always under threat to change or lose the genetic information by endogenous or exogenous influences. One of the predominant DNA damages is base deamination. Deamination of cytosine, adenine, and guanine gives rise to uracil (U), hypoxanthine (Hx), and xanthine (X), respectively. If these bases remain in DNA, they lead to point mutations during DNA replication generating pair. To maintain genome integrity for their offspring, and to prevent disorder of a cell system, all living organisms have evolved DNA repair systems. Besides the well-conserved DNA repair systems, organisms that thrive under extreme environments are expected to have developed some efficient repair systems, since harsh conditions such as high temperature and ionizing radiation promote DNA damages. Here, we report the detection of a novel activity that cleaves the 5′ side of Hx from the cell extracts of the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, and identification of the corresponding gene. The novel endonuclease, designated as Endonuclease Q (EndoQ), recognized U, AP site and X, as well as Hx, and cuts the phosphodiester bond at their 5′ sides. The homolog of the *P. furiosus* EndoQ from *Thermococcus kodakarensis* (TkoEndoQ) also exhibited the same properties. EndoQ is conserved in the *Thermococcales* and some methanogens in Archaea. Furthermore, the EndoQ activity was enhanced by the cognate proliferating nuclear antigen (PCNA). PCNA is known to play an essential role in DNA metabolism. The physical interaction between the two proteins, through a PIP-motif of EndoQ and the toroidal structure of PCNA, are critical for the stimulated endonuclease activity. These foregoing findings provide us with clues to elucidate the mechanism underlying a unique DNA repair system in Archaea.

Archaea, Endonuclease, DNA repair

発表番号：2D039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Purine biosynthesis pathway as a new drug target for *Trypanosoma congolense* infection

○Albertus SARWONO[1], Keisuke SUGANUMA[2], Shinya MITSUHASHI[1], Kengo SHIGETOMI[1], Marcin JĄKALSKI[3], Tadashi OKADA[2,4], Molefe NTHATISI[2], Junya YAMAGISHI[1], Noboru INOUE[2], Makoto UBUKATA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Obihiro Univ. Agric. Vet. Med., [3]Univ. of Münster, Germany, [4]Chubu Univ.)

Nagana is one of the most widespread diseases among African animals. The responsible pathogen, *Trypanosoma congolense*, infects the mammalian host by the bite of vector tsetse flies. The disease greatly obstructs the agricultural progress in sub-Saharan Africa by decimating productive cattle and other economically important animals.

For the last 50 years, chemotherapy against nagana is carried out mainly by three compounds: diminazene aceturate, isometamidium chloride, and homidium. Unfortunately, numerous cases of drug-recalcitrant *T. congolense* strains have been reported. In consequence, new therapeutic compounds or drug targets against *T. congolense* are urgently needed.

Our assay group recently isolated and enzymatically identified inosine 5'-monophosphate dehydrogenase (TcIMPDH) and guanosine 5'-monophosphate reductase (TcGMPR) from *T. congolense*. Along with guanosine 5'-monophosphate synthetase (GMPS), these enzymes regulate the purine nucleotide biosynthesis of *T. congolense*. Furthermore, we also found that IMPDH inhibitor mycophenolic acid (MPA) inhibits the proliferation of *T. congolense in vitro*. This inhibition could be alleviated by the supplementation of guanosine, suggesting that the growth arrest was resulted from the depleted nucleotide pool in the protozoan cells.

Interestingly, against our expectation MPA and two of its derivatives showed slight inhibition specificity to *T. congolense* cell than to mammalian K562 cell. This finding implies that MPA might have other inhibitable receptor other than IMPDH. Therefore, the inhibitory activity of MPA to the enzymatic activity of TcIMPDH and TcGMPR isolates, along with other relevant enzyme kinetics parameters, will be discussed in detail.

*Trypanosoma congolense*, inosine monophosphate dehydrogenase, guanosine monophosphate reductase

発表責任者：Makoto Ubukata（m-ub@for.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2D040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ペプチドのマルチサイト分子内架橋形成を触媒するラジカル SAM 酵素の反応機構

# Reaction mechanism of radical SAM enzyme QhpD catalyzing formation of intrapeptidyl crosslinks at multi-sites

○岡島 俊英[1]、中井 忠志[1]、小林 一雄[1]、高橋 康弘[2]、堀 洋[3]、鍔木 基成[3]、谷澤 克行[1]([1]阪大産研、[2]埼玉大理工、[3]神戸大理)

○Toshihide Okajima[1], Tadashi Nakai[1], Kazuo Kobayashi[1], Yasuhiro Takahashi[2], Hiroshi Hori[3], Motonari Tsubaki[3], Katsuyuki Tanizawa[1] ([1]Osaka Univ., [2]Saitama Univ., [3]Kobe Univ.)

*Paracoccus denitrificans* などの細菌に由来するキノヘムプロテインアミン脱水素酵素(QHNDH)では、その 9 kDa サブユニット QhpC において、３つの分子内チオエーテル架橋が、酸性残基側鎖のメチレン基と Cys 残基側鎖の間に存在しており、何らかの翻訳後修飾によって形成されていると考えられている。このような多重な架橋構造は、抗菌性ペプチドなどに見出されることがあるが、他のタンパク質には例がない。我々は、遺伝子破壊実験によって、QHNDH 生合成オペロン（*qhp* オペロン）にコードされた QhpD が分子内チオエーテル架橋に関わることを解明してきた。QhpD は、鉄硫黄クラスターを含有するラジカル SAM スーパーファミリーに属しており、本酵素群は *S*-アデノシルメチオニン(SAM)から作り出されたアデノシルラジカルによって、化学的に困難な反応を含む多様な反応を触媒することが知られている。ゲノムデータの蓄積により 11 万 3 千ものラジカル SAM 酵素が見つかっており、生物の主要なラジカル駆動酵素であると考えられている。本研究では、試験管内反応系を構築し、架橋形成反応に関してタンパク質レベルの解析を進めたので報告する(Nakai *et al.*, *J. Biol. Chem.* **290** (2015)**,** 11144–11166)。

QhpD-QhpC 共発現系を用いることによって、基質 QhpC 複合体として精製した QhpD は、鉄硫黄クラスターの再構成を行った後、各種の実験に使用した。ESR スペクトル測定及び鉄硫黄含量の定量の結果に基づいて、QhpD には３つの[4Fe-4S]クラスターが存在することが判明した。他のラジカル SAM 酵素との比較から、その内の最も N 末端側に存在するクラスターは、共通の反応駆動力を生み出す SAM の還元的分解に、他のクラスターは、Auxiliary クラスターとも呼ばれ、QhpD に特有な架橋形成反応に関わっていると推測された。QhpD の架橋形成能は、SH 基と反応するヨードアセトアミドあるいは *N*-(9-Acridinyl)maleimide (NAM)などの蛍光修飾剤で処理することによって、質量分析と蛍光分析に基づいてアッセイすることができた。また、ジチオナイト存在下、QhpD は定常的な SAM の分解活性を持つことが明らかとなった。加えて、基質 QhpC の架橋部位への変異実験の結果、QhpD は、QhpC の N 末から C 末へスライドしながら連続的に架橋を形成していくと考えられた。QhpD のホモロジーモデルに基づいて、結合した QhpC 架橋酸性残基の近傍にアデノシルラジカルが形成され、それが側鎖メチレン基に転移されたのちに Cys 残基と反応するチオエーテル架橋の形成メカニズムを予測した。３つの[4Fe-4S]クラスターの機能についても、ホモロジーモデルと変異型タンパク質の活性に基づいて考察する。

S-adenosylmethionine, iron-sulfur cluster, thioether bond

発表責任者：岡島　俊英（tokajima@sanken.osaka-u.ac.jp）

発表番号：2D041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Kinetic and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) study on the interaction of halide inhibitors with polyphenol oxidase (PPO)

○Giselle Grace LIM, Yuki Imura, Michio Suzuki, Etsuro Yoshimura (The University of Tokyo)

**Introduction** Polyphenol oxidase (PPO) is a type-3 copper metalloenzyme. The active site contains two copper (Cu) ions, and each Cu is bound to three histidine residues (binuclear copper center). Although PPO is widely distributed in nature (in plants, animals, microorganisms), amino acid sequence homology is low. However, it is observed that the amino acid sequences of the copper-binding domain are highly conserved across all organisms. Cu, being an electroactive species, exists in two oxidation states. Most studies mention the dependence of ligand affinity to PPO on the oxidation state of Cu in the active site. Likewise, this study suggests that halide binding to PPO varies according to the Cu oxidation state. Understanding a detailed mechanism of PPO inhibition can provide new methodology for preventing melanin formation, for practical use in the food industry.

**Experiment** Kinetic analysis was performed by monitoring the rate of oxidation of catechol to quinone by PPO. Variables such as substrate concentration, inhibitor concentration, and pH were tested to see the effect on PPO activity. Multinuclear NMR measurement was performed to observe the interaction between PPO and halides.

**Results and Discussion** From the results of kinetic analysis, PPO activity was inhibited by halides and by excess concentration of substrate. Moreover, inhibition is most prominent at acidic pH, suggesting that halide binds to copper to cause inhibition. The affinity of halide to the copper center is dependent on the Cu oxidation state. From NMR results, it is observed that iodide preferably binds to the reduced PPO form, conforming to the principles of Hard and Soft Acids and Bases (HSAB) rule.

polyphenol oxidase, type-3 copper metalloenzyme, enzyme inhibition

発表責任者：Etsuro Yoshimura（ayoshim@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2D042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# アナモックス菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析とシトクロム *c* との電子伝達反応

# Structure of copper-containing nitrite reductase and its electron transfer reaction with cytochrome *c* from an anammox bacterium strain KSU-1

○松村 光紗、北村 龍史、平 大輔、藤井 隆夫 (崇城大応生命)
○Misa MATSUMURA, Ryuji KITAMURA, Daisuke HIRA, Takao FUJII (Sojo Univ.)

【目的】ある種の細菌が行う、嫌気的にアンモニアを酸化する（anaerobic ammonium oxidation：anammox）反応が知られている。anammox 反応では、亜硝酸が酸化剤となり、アンモニアと亜硝酸の窒素原子由来の窒素ガスが嫌気的に生じる。この反応過程においてヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株についての研究から、銅型亜硝酸還元酵素（CuNIR）が亜硝酸の一酸化窒素への還元を触媒することを明らかにしている[1)]。本研究では、X 線結晶構造解析により anammox 菌 KSU-1 株の CuNIR の立体構造を解明すること、CuNIR への電子伝達反応について解明することを目的とした。
【方法】構築済みの大腸菌発現系により CuNIR を発現させ、各種カラムクロマトグラフィにより精製し、透析により銅中心の構築を行った。蒸気拡散法により精製した CuNIR の単結晶を調製し、SPring-8 で X 線回折データ収集を行い、 立体構造の解明を行った。また、KSU-1 株から精製される低分子量シトクロム *c* を用いて、CuNIR への電子伝達反応が可能であるか調べた。
【結果】蒸気拡散法により、2% (w/v) PEG4000, 200 mM Lithium sulfate, 100 mM Tris (pH 8.5)の条件で CuNIR の単結晶を得ることに成功した。X 線回折データをもとに、分子置換法により CuNIR の立体構造を決定した。KSU-1 株の CuNIR は脱窒菌由来の既知 CuNIR と同様、Greek key *β* バレルからなる単量体構造を形成し、Type 1 Cu と Type 2 Cu からなる活性中心を有することが確認された。また、既知 CuNIR と類似するホモ 3 量体を形成していることも明らかとなったが、3 量体 2 つが 3 本の S-S 結合により tail-to-tail 型で結合し、ホモ 6 量体構造を形成していた。このような S-S 結合による多量体形成は既知 CuNIR では報告例がなく、anammox 菌の CuNIR に特有の構造と考えられた。さらに、電子受容部位である Type 1 Cu の上部には酸性アミノ酸残基が多数配置されており、電子供与体との相互作用に寄与すると思われた。また、KSU-1 株から精製される低分子量モノヘムシトクロム *c*（遺伝子番号 *b_428*）を還元して用いると、生理的に十分な速度でシトクロム *c* から CuNIR への電子供与反応が確認できた。現在、反応速度論的解析を進めている。

[1)] Hira D., Toh H., Migita C T., Okubo H., Nishiyama T., Hattori M., Furukawa K., Fujii T. FEBS Lett. 586(11), P1658-1663 (2012)

anammox, copper-containing nitrite reductase, electron transfer

発表責任者：平　大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

発表番号：2D043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis*glycerol-3-phosphate dehydrogenase の機能解析
Functional study of glycerol 3-phosphate dehydrogenase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1

○高野 築、小林 淳、小西 香菜子、鈴木 誠志、清野 智史、大政 健史、古賀 雄一（阪大工）
○ Kizuku TAKANO, ATSUSHI KOBAYASHI, KANAKO KONISHI, MASASHI SUZUKI, SATOSHI SEINO, TAKESHI OMASA, YUICHI KOGA (Osaka Univ.)

【目的】
*Thermococcus kodakarensis* 由来の Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Tk-GlpA) は、Glycerol-3-phosphate(G3P) を酸化し解糖系の中間代謝物である DHAP を生成する酸化還元酵素（G3PDH)である。Tk-GlpA をコードしている遺伝子は、超好熱古細菌に特有の遺伝子構造をしており、それぞれ NADH オキシダーゼ(NOX) とモリブドプテリン依存型酸化還元酵素(MOX) をコードする遺伝子とオペロンを形成している。また、これらの酵素は同時に発現していることがわかっている。Tk-GlpA は単量体でも G3PDH として機能することができるが、NOX、MOX との共存下では、比活性や酵素反応生成物が変化することから、これらの３者は複合体を形成していることが予想される。しかし、またこれらの３酵素がどのような条件でどのような状態の複合体を形成するのかも明らかになっていない。本研究では Tk-GlpA が形成する複合体の構造学的、生化学的解析を行った。
【方法・結果】
各酵素を調製し、G3PDH 活性を複合体の存在下、非存在下で測定した。Tk-GlpA は G3P の酸化において FAD を補酵素として利用する。還元された $FADH_2$ は Tk-GlpA と NOX、MOX を混在させたときのみ硫黄を電子受容体として FAD に再酸化することが確認できた。
また、それぞれの組換えタンパク質を適当な濃度（0.18～0.33 mg/ml）で混合し、HPLC を用いて会合状態を分析した。それぞれのタンパクの終濃度を変えて測定した結果、タンパク質濃度依存的に複合体の割合が高くなること、また、複合体の形成と乖離は平衡になっていることが明らかになった。複合体フラクションを単離し、SDS-PAGE で複合体の組成を検討した所、MOX：NOX：Tk-GlpA = 1：2：2 であることが分かった。
複合体の酵素学的特性解析を行うために、MOX、NOX、Tk-GlpA の混合液に disuccinimidyl suberate（DSS）を加え、サブユニット間をクロスリンクし、複合体の安定化を行った。（クロスリンクの条件）でクロスリンクを行った結果、複合体の単離に成功した。本発表ではこの複合体を用いて単量体との活性比較など酵素学的解析を行った。

Thermococcus kodakarensis, glycerol 3-phosphate dehydrogenase, complex

発表番号：2D044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ニワトリ脂肪肝で特異的に発現する NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素の研究

# Function analysis of NAD(P)H-dependent carbonyl reductase specifically expressed in thyroidectomized chicken fatty liver

○福田 雄大[1]、曽根 孟起[1]、荒木 朋洋[1]、仁木 隆博[1]、櫻庭 春彦[2]、大島 敏久[3]、芝田 猛[1]、米田 一成[1]（[1]東海大・農、[2]香川大・農、[3]大阪工大・工）

○ Yudai Fukuda[1], Takeki Sone[1], Tomohiro Araki[1], Takahiro Niki[1], Haruhiko Sakuraba[2], Toshihisa Ohshima[3], Takeshi Shibata[1], Kazunari Yoneda[1] ([1]Tokai University, Agri, [2]Kagawa University, Agri, [3]Osaka Institute of Technology, Engn)

【目的】ニワトリの脂肪肝で特異的に発現するタンパク質には 3 種類のベタイン-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ(BHMT;45 kDa)、機能未知タンパク質(27 kDa)の合計 4 種類のタンパク質が確認されている。本研究ではこの 27 kDa の機能未知タンパク質に着目し、研究を行った。本機能未知タンパク質の機能、立体構造解析を行うことで、ニワトリ脂肪肝中での機能未知タンパク質の生理的意義解明や脂肪蓄積メカニズムの基礎的な解明を行うことを目的としている。脂肪蓄積メカニズムの解明は動物生産及び肥満における代謝異常改善、低脂肪計の作出につながると考えられる。

【方法・結果】外科的甲状腺除去により人工的に脂肪蓄積亢進させたニワトリを作成し、このニワトリの脂肪肝由来タンパク質を 2 次元電気泳動で分離後、正常肝と比較し、肝臓において脂肪蓄積亢進とともに発現が増強するタンパク質を検出した[1)]。ニワトリのゲノム情報から脂肪肝特異的に発現するタンパク質をコードする機能未知遺伝子(NCBI-XP_414028)を同定後、本遺伝子の合成を行い、大腸菌発現用ベクターpET15b に挿入し、大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株を用いて IPTG による遺伝子の発現を行った。アミノ酸配列から機能を予測し、酵素活性測定を行い、NAD(P)H 依存性カルボニル還元酵素(CR)活性の検出に成功した。さらに基質特異性、阻害剤などの酵素化学的性質についても明らかにした。また、精製酵素を用いて本酵素の結晶化を試み、PEG5000 を沈殿剤として NADPH との複合体結晶を取得し、高エネルギー加速器研究機構において X 線解析実験を行った[2)]。分子置換法により CR-NADPH-エチレングリコールの 3 者複合体を分解能 1.98 Å で構造決定に成功した。本酵素は非対称単位中に 2 分子存在し、A サブユニットの基質結合部位にのみクロイオプロテクタントであるエチレングリコールが結合していた。AB サブユニットの構造を比較すると基質結合ループに存在する Y172 の側鎖が 103.7°回転することにより基質結合部位に蓋をする役割があることが推察された。他の生物種由来の CR にはこの Y172 に相当するアミノ酸残基が全く保存されておらず、ニワトリ CR に特有の新規な知見であると考えられ、この仮説を検証するため Y172 の変異体を作成し、酵素活性測定を行ったところ、Y172 変異体は基質に対する $K_m$ 値が野生型の酵素に対して約 10 倍になっていたことから、この Y172 は基質結合をより強固なものにするための役割を担っていると考えられる[3)]。

1) Shibata, T., et al. Poultry Science 82 (2003), 207-213.

2) Yoneda, K., et al. Acta Crystallographica Section F 68 (2012), 1568-1570.

3) Fukuda, Y., et al. FEBS Journal 282 (2015) 3918–3928.

NAD(P)H-dependent carbonyl reductase, crystal structure, short-chain dehydrogenase/reductase family

発表番号：2D045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 麹菌由来チロシナーゼと阻害剤複合体の結晶構造解析

# Crystallographic analysis of the inhibitor complex of koji mold tyrosinase

○藤枝 伸宇、馬越 恭平、伊東 忍（阪大院工）
○Nobutaka FUJIEDA, Kyohei Umakoshi, Shinobu ITOH (Osaka Univ.)

チロシナーゼはヒトを初めとするありとあらゆる生物に存在するユビキタスな銅酵素であり、メラニン合成経路における初発反応を触媒する。また、化粧品における美白効果を初め、食品の品質を低下させる褐変現象の防止や色素沈着が原因となる疾患（大腸メラノーシス等）の症状改善など、メラニンの生成を抑えることで質が向上する事象は数多く有り、チロシナーゼ阻害剤の開発が古くから続けられてきた。しかし、最近まで、阻害強化の指針となるチロシナーゼ–阻害剤複合体の結晶構造は、これら事象とはあまり関連のない原核生物由来のチロシナーゼに関するものしか得られていなかった。事実、阻害剤のリード化合物として利用されてきたコウジ酸との複合体も報告があるものの、コウジ酸が活性中心とは別の部位に結合しており、真核生物由来のチロシナーゼにおいて速度論的解析から考えられていた拮抗阻害型と不一致が見られる。一方で、マッシュルーム由来チロシナーゼ–阻害剤(トロポロン)複合体の構造が別のグループから報告されたが、分解能が低く（2.8 Å）詳細な結合様式は未だ不明瞭なままである。以前から、我々は真核生物（麹菌）由来のチロシナーゼ前駆体に関して、ほぼ原子レベルの分解能（1.39 Å）で結晶構造を報告してきた。そこで、本研究ではこのチロシナーゼについて活性制御ドメインを除去した活性型、さらに、これと阻害剤であるコウジ酸の複合体について高分解能で結晶構造を決定し、その結合様式を明らかにすることを目的とした。

大腸菌発現系から得た麹菌チロシナーゼの前駆体をトリプシンで処理し、ゲルろ過クロマトグラフィーによって活性制御ドメインを除去した活性型を調整した。野生型は活性が非常に強く、自身のチロシンと反応し重合する。そのため、野生型から少し活性を下げた C92A 変異体を用いて結晶化を行った。銅の入っていないアポ体を 20%の PEG3350 を含む沈殿剤と混合することで結晶が得られた。銅を浸漬後、データ測定をおこなったところ、分解能 1.5 Å で構造決定に成功した。全体構造は以前報告した野生型前駆体のものとほとんど変わらず、二核銅中心にも大きな構造変化は見られなかった。さらに、コウジ酸を浸漬した結晶では分解能 1.6 Å で構造が得られた。コウジ酸は銅に配位したヒスチジンの一つにスタックし、活性中心に貫入していた。コウジ酸のカルボニル基と並んだ水酸基が片側の銅に配位しており、その銅はコウジ酸が結合していない結晶に比べて 1 Å 程度移動していることが明らかとなった。今回の成果は真核生物由来のチロシナーゼに対する効果的な阻害剤を設計合成するための大きな一歩であり、その結合様式が得られたことで基質認識を含めた反応機構解明に新たな知見を与えるものと期待される。

melanin biosynthesis, tyrosinase, crystal structure

発表責任者：藤枝伸宇（fujieda@mls.eng.osaka-u.ac.jp）

発表番号：2D046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Sphingobium* sp. TCM1 株ホスホジエステラーゼの特徴解析とクローニング

Characterization and identification of phosphodiesterase from *Sphingobium* sp. strain TCM1

○阿部 勝正、向井 奈緒子、牧野 剛、高橋 祥司、解良 芳夫 (長岡技科大工)
○Katsumasa ABE, Naoko MUKAI, Takeshi MAKINO, Shouji TAKAHASHI, Yoshio KERA (Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】Tris(2-chloroethyl) phosphate(TCEP)および tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP)などのハロアルキル有機リン酸トリエステル類は可塑剤や難燃材として世界各地で使用されてきた．しかし近年，これら化合物が発ガン性等の毒性を有していることが示唆されており，本化合物による生態系への影響が懸念されている．当研究室ではこれまで，上記化合物を分解可能なハロアルキル有機リン酸分解菌 *Sphingobium* sp. TCM1 株を単離し，その初発分解に関わる haloalkylphosphorus hydrolase (HAD)について主に解析を行ってきたが，本酵素下流の分解酵素に関する知見はほとんど得られていない．本研究では，有機リン化合物分解酵素の中でも，2 段階目の加水分解反応に関わると考えられるホスホジエステラーゼ（PDE）に着目し，本酵素の精製，諸特性解析及びクローニングを行った．

【方法及び結果】Bis（*p*-nitrophenyl）phosphate（B*p*NPP)分解活性を指標として，TCEP を唯一のリン源とした培地で培養した TCM1 株から各種カラムクロマトグラフィーを用いて PDE を均一にまで精製した．本酵素は，B*p*NPP に対する PDE 活性と共に *p*-nitrophenyl phosphate に対するホスホモノエステラーゼ活性を示し，前者の活性は後者の活性の約４倍であった． B*p*NPP に対する至適 pH は pH 9.5，至適反応温度は 55℃であり，金属キレート剤の添加により活性が減少したことから，本酵素は補因子として金属を有する可能性が考えられた．本酵素は B*p*NPP の他にハロアルキル有機リン酸トリエステルに由来する bis 体も分解可能であった事から，本酵素が TCM1 株中でハロアルキル有機リン酸トリエステル分解に関与している可能性が強く示唆された．また，本酵素の N 末端アミノ酸配列解析を行い，既に得られている TCM1 株ドラフトゲノム配列との相同性解析を行ったところ，本酵素と思われる遺伝子が推定された．推定 *pde* 遺伝子は全長 1326 bp であり 441 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしている事が明らかになった．推定アミノ酸配列から算出された分子質量は 48.7 kDa であり，TCM1 から生成された本酵素の分子質量 48.6 kDa とほぼ一致した．現在，pET システムを用いた本酵素遺伝子の大腸菌発現系を構築し解析を行っている．

phosphodiesterase, organophosphorus compounds, Sphingobium

発表責任者：阿部勝正（katsuabe@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2D047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好熱性放線菌由来クチナーゼの表面アミノ酸残基の選択的改変による高活性変異体の取得

# Enhancement of Thermobifida fusca JCM3263 cutinase activity by site-selective mutagenesis of surface residues.

○亀谷 貴仁、大門 結花、伊藤 貴文、日ビ 隆雄（福井県大・生物資源）
○Takahito Kametani, yuka Daimon, Takafumi Itoh, Takao Hibi (Fukui Prefectural Univ.)

【目的】

植物の葉の表面は、クチンを主要な構成成分とするクチクラ層で覆われている。クチンは常温で固体の長鎖脂肪酸エステル化合物であるが、葉の表面に存在する一部の微生物は、エステル結合を加水分解するクチナーゼを産生し、このクチンを分解し侵入する。一方、脂肪酸由来の生分解性プラスチックは微生物によって分解される環境負荷の少ない資材とされているが、環境中では分解速度が遅いため十分に分解されず、期待通りのリサイクルは行われていない。強力な分解能力をもったクチナーゼを創出することができれば、生分解性プラスチックのさらなる普及につながることが予想される。

そこで、本研究では、基質との親和性の最適化や活性化エネルギーの減少を伴う高活性化を期待し、酵素の柔軟性を増大させるよう立体構造表面に存在するアミノ酸残基を他の残基に置換した変異体を取得し、その活性を評価した。

【方法・結果】

好熱性放線菌 *Thermobifida fusca* JCM3263 由来クチナーゼ (Tf クチナーゼ) の N 末端にヒスチジンタグ (6 x His) が付加されるように発現プラスミドを調製した。さらに、構造既知の立体構造モデル (*Thermobifida alba* AHK119 由来クチナーゼ, PDB: 3VIS, アミノ酸配列の相同性 83%) とホモロジーモデリングを利用して、Tf クチナーゼの立体構造モデルを構築した。作製したモデルに基づいて、表面に存在し、活性部位を形成していないループ中の根元のヒンジ部分に位置するアミノ酸残基 14 ヶ所を抽出した。調製した発現プラスミドを鋳型として、抽出したアミノ酸残基に対して部位特異的な飽和変異 (変異部位に対して NNN となるようなプライマーを作製) を行い、大腸菌 BL21Gold(DE3)を形質転換することで、変異体ライブラリーを作製した。変異体ライブラリーからコロニーを選抜し、ディープウエルプレートを用いて培養した。培養菌体から、タンパク質を抽出後、4-nitrophenyl butyrate を基質として活性の高い変異体を選抜した (一次スクリーニング)。次に、一次スクリーニングで選抜した変異体の精製を行い、4-nitrophenyl butyrate を基質として比活性を求めた (二次スクリーニング)。その結果、野生型よりも有意に活性が 20～30%増加した変異体を 3 種類取得した。得られた変異体の熱安定性を Thermal shift assay によって評価したところ、熱安定性に大きな影響を与えなかった。

cutinase, site-selective mutagenesis, surface engineering

発表責任者：日び隆雄（hibi@fpu.ac.jp）

発表番号：2D048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis 由来分岐鎖ポリアミン合成酵素の構造と機能
Structure and function of the branched-chain polyamine synthase from a hyperthermophilic archaeon, Thermococcus kodakarensis

○木村 成吾[1]、Carman Ka Man Tse[2]、秀瀬 涼太[1]、溝端 栄一[2]、井上 豪[2]、藤原 伸介[1] ([1]関学大理工、[2]阪大院工)
○Seigo Kimura[1], Ka Man Tse Carman[2], Ryota Hidese[1], Eiiti Mizobata[2], Tsuyoshi Inoue[2], Shinsuke Fujiwara[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ., [2]Osaka Univ.)

**[目的]** ポリアミンは、分子中にアミノ基を二つ以上含む脂肪族化合物で、すべての生物に普遍的に存在している。一方、長鎖や分岐鎖ポリアミンは（超）好熱菌にのみ見られる。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は、分岐鎖ポリアミン $N^4$-アミノプロピルスペルミジンと $N^4$-ビス（アミノプロピル）スペルミジンを有している。これらは、*T. kodakarensis* の高温での生育にとって重要な役割を担う(1)。$N^4$-ビス（アミノプロピル）スペルミジンは、新規アミノプロピル基転移酵素 *Tk*-BpsA の二段階の触媒作用によりスペルミジンから $N^4$-アミノプロピルスペルミジンを経て生成される。本研究では、本酵素の触媒反応機構の解明及び二段階反応の機構解明を目的とした。
**[方法と結果]** N 末端側に His-tag を付加した組み換え *Tk*-BpsA を大腸菌で発現し、精製した。*Tk*-BpsA-$N^4$-アミノプロピルスペルミジン-メチルチオアデノシン三者複合体の X 線結晶構造を 1.8 Å 分解能で決定した。三者複合体の X 線結晶構造解析の結果から、活性部位残基は 159 番目のアスパラギン酸残基(Asp159)と予測された。QuikChange 法により、これをアラニン残基に置換した D159A 変異型酵素は完全に活性を失った。速度論的解析により、本酵素はピンポン Bi Bi 機構で反応が進行すると予想された。つまり、Asp159 のカルボキシル基が脱炭酸 *S*-アデノシルメチオニンのアミノプロピル基のメチレン炭素を求核攻撃することで、Asp159 がアミノプロピル化される。そして、スペルミジン及び $N^4$-アミノプロピルスペルミジンの $N^4$ 位のアミノ基がアミノプロピル化された Asp159 を求核攻撃することで反応が進行すると考えられた。次に、三者複合体構造から $N^4$-アミノプロピルスペルミジンの分岐したアミノプロピル基の結合に必須と考えられるいくつかのアミノ酸残基（Tyr316, Glu259, Asp126）をアラニン残基に置換した変異型酵素を作成した。そのうち、D126A 変異型酵素において、スペルミジンに対する活性は野生型酵素のそれと比べて同等であったが、$N^4$-アミノプロピルスペルミジンに対する活性は顕著に減少した。この結果は、$N^4$-アミノプロピルスペルミジンの分岐したアミノプロピル基と Asp126 との結合こそが、活性発現に重要であることを示唆している。以上の結果を踏まえ、二段階反応で予想される触媒機構を考察する。

(1) Okada et al., J. Bacteriol., 196,1866-1876（2014）

Polyamine, Hyperthermophile, Catalytic mechanism

発表番号：2D049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis 由来 SF2 ヘリカーゼの機能解析
Functional analysis of SF2 helicases from a hyperthermophilic arhaeon, Thermococcus kodakarensis

○川戸 克展[1]、藤原 綾子[1]、秀瀬 涼太[1]、保川 清[2]、藤原 伸介[1]([1]関学大理工、[2]京大農)
○Katsuhiro KAWATO[1], Ayako FUJIWARA[1], Ryota HIDESE[1], Kiyoshi YASUKAWA[2], Shinsuke FUJIWARA[1] ([1]Kwansei-Gakuin Univ, [2]Kyoto Univ)

【目的】スーパーファミリー２（SF2）の DNA/RNA ヘリカーゼとは、Asp-Glu-Ala-Asp の保存配列(DEAD 配列)もしくは Asp-Glu-Ile-His の保存配列 (DEIH 配列)と ATPase 活性を有するタンパク質ファミリーであり、いくつかで RNA/DNA のアンワインド活性が確認されている。超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis*（60℃から 95℃で生育）にはゲノム内に 9 種類の SF2 ヘリカーゼ遺伝子のオルソログが存在するが、その多くは機能解明されていない。本研究では、これら遺伝子の系統的、機能的位置づけを明確にすることを目的とし、各遺伝子を組換え体として取得し、機能比較を試みた。
【方法と結果】SF2 ヘリカーゼの役割を予測するため、類縁菌 *Pyrococcus* 属（70℃から 103℃で生育）での SF2 ヘリカーゼの存在を調べたところ、TK0306 は *Pyrococcus* には存在しないことが示された。これは *T. kodakarensis* の低温域で核酸二次構造を解消し、生育に関与していることが示唆される。実際 TK0306 遺伝子の破壊は、本菌の 60℃での生育を著しく阻害する(1)。次に TK0306 (*Tk*-DeaD)、TK0566 (*Tk*-DhpA)、TK0928、TK0460、TK0521 及び TK0450 に関し、大腸菌の高発現系を用いて組換え体の取得を試みた。*Tk*-DeaD、*Tk*-DhpA、TK0450、TK0460、TK0928 は発現され、可溶性画分にその存在が認められた。これらの ATPase 活性を検証したところ、*Tk*-DeaD、TK0566、TK0460、TK0928 で活性が認められた。アンワインド活性を比較するために、合成オリゴヌクレオチドを組み合わせて、各種二本鎖基質を調製し、特異性を精査した。*Tk*-DeaD は分子内に形成された二次構造を解消した。TK0566 は両端が平滑末端の dsDNA や 5’末端が突出した dsDNA に対しては作用しなかったが、3’末端が突出した dsDNA 及び両端が突出した dsDNA に対してアンワインド活性を示した。一方、TK0460 は両端が平滑末端の dsDNA や 3’末端が突出した dsDNA に対しては作用しなかったが、5’末端が突出した dsDNA 及び両端が突出した dsDNA に対してアンワインド活性を示した。つまり、TK0566 は 3’突出末端側から作用しているのに対し、TK0460 は 5’突出末端側から作用していると予想される。両者は DEIH 配列、ATPase の保存配列を除き、一次構造に顕著な保存性は認められない。本ポスターでは TK0566 と TK0460 の触媒活性の特徴・作用機序を考察したい。

(1)Nagaoka et al., J.Bacteriol, 195, 3442 (2013)

Helicase, Hyperthermophile, DEAD-box type

発表責任者：川戸　克展（aid89468@kwansei.ac.jp）

発表番号：2D050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ヒト tRNA ($m^2_2G$) methyltransferase (hTRM1) の酵母での発現系の構築

# Human tRNA ($m^2_2G$) methyltransferase：Construction of expression system in yeast

○久野 翔平、粟井 貴子、石塚 盛雄 (中央大学)
○Shohei Kuno, Takako Awai, Morio Isizuka (Chuo Univ.)

DNA に塩基配列として保存された遺伝情報は、DNA から mRNA に転写され、mRNA に相補的な tRNA が運ぶアミノ酸どうしが順に結合することで翻訳が行われている。このように、tRNA は DNA の遺伝情報をアミノ酸に対応させる非常に重要な役割を持っている。tRNA は、mRNA と同様に DNA から転写されることで前駆体 tRNA として合成される。しかし、転写されたばかりの前駆体 tRNA はまだ本来の機能を持っていない。RNA 修飾やスプライシングなど様々な編集や加工を経ることで、前駆体 tRNA が成熟し機能を持つ。また、tRNA の修飾ヌクレオシドは非常に種類が多く、これまでに 93 種類が発見されている。tRNA 修飾は種類や位置によって、コドン認識能の改変、フレームシフトの防止、tRNA 構造の安定化などタンパク質合成の制御のための機能を持つことに加え、RNA のオルガネラへの輸送などにも重要な役割を持つことが明らかになっており、生命活動を維持するために必須の因子である。

私達が研究対象としている human tRNA ($m^2_2G26$) methyltransferase (hTRM1) は、知的障害の原因遺伝子として指摘されており、本研究はその発症メカニズムの解明を目標として hTRM1 の機能解析を行う。そこで、まず始めに hTRM1 がメチル化する tRNA の部位を明らかにしたいと考えている。tRNA ($m^2_2G26$) methyltransferase は、tRNA の 26 位のグアニンのジメチル化である $m^2_2G26$ の形成を触媒する修飾酵素として知られているが、*Aquifex. aeolicus* の tRNA ($m^2_2G26$) methyltransferase は 26 位だけでなく 27 位もメチル化することが確認されている。ヒトやウシの $tRNA^{Tyr}$ では、$m^2_2G26$ を持つだけでなく、$m^2_2G27$ も持つことが発見されているが、27 位のメチル化酵素はいまだに発見されていない。そのため、私達はヒト及びウシの tRNA の 27 位も TRM1 によってメチル化されているのではないかと考えている。

これまでに、大腸菌を用いて hTRM1 を発現させ tRNA のメチル化部位を調べた研究が報告されている。その報告では、hTRM1 により tRNA の 26 位はメチル化したがその活性は低く、27 位に関してはメチル化は確認されていない。そこで私達は、より活性の高い hTRM1 を用いることで 27 位のメチル化を確認できるのではないかと考え、ヒトと同じ真核生物である酵母を用いることにした。私達は、hTRM1 の酵母での発現系を既に構築しており、現在精製法の確立を行っている。

RNA modification, RNA editting, nervous system disease

発表責任者：粟井貴子（awai.81w@g.chuo-u.ac.jp）

発表番号：2D051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Aspergillus oryzae* 由来α-L-ラムノシダーゼの酵素学的諸性質

Characterization of an α-L-rhamnosidase from *Aspergillus oryzae*

○石川 真衣、塩野 義人、小関 卓也 (山形大農)
○Mai ISHIKAWA, Yoshihito SHIONO, Takuya KOSEKI (Yamagata Univ.)

【目的】α-L-ラムノシダーゼはナリンギンやルチン等のフラボノイド配糖体の末端に存在するα-L-ラムノースを加水分解し、グレープフルーツジュースなど柑橘類の苦味を減少させる目的等で工業的に利用されている。柑橘類の加工に重要な役割を担っているα-L-ラムノシダーゼ遺伝子は *Aspergillus oryzae* にも複数保有することが考えられるが、これまで特徴付けされたものはごくわずかである。また、*A. oryzae* 由来の推定されるα-L-ラムノシダーゼはアミノ酸配列により CAZy の GH78 および GH13 ファミリーに分類される。今回はその GH78 ファミリーに属するα-L-ラムノシダーゼの酵素学的諸性質について報告する。

【方法】*A. oryzae* のゲノム配列を基に GH78 のラムノシダーゼと推定される遺伝子 (AO090003001291) をクローン化し、*Pichia pastoris* GS115 を用いて発現させた。リコンビナント酵素は各種クロマトグラフィーにより精製し、精製酵素を用いて特徴付けを行った。ラムノシダーゼ活性は合成基質として *p*-ニトロフェニル-α-L-ラムノピラノシド、天然基質としてナリンギン、ルチン、ヘスペリジン等を用いて測定した。

【結果】分子量は SDS-PAGE より 90 kDa-130 kDa のスメアなバンドを示したが、エンドグリコシダーゼ H 処理により、70 kDa の一本のバンドを示した。最適 pH は pH4 で pH5-9 の範囲で安定だった。最適温度は 60℃で、60℃で 4 時間経過後も 75%の活性を保持していた。アミノ酸配列の相同性が高い *A. kawachii* 由来α-L-ラムノシダーゼでは、最適 pH および温度はそれぞれ pH5 および 60℃で、pH3-11 の広範囲で安定であったが、60℃で 4 時間経過後の活性は 70%を下回るといった違いが見られた。基質特異性に関しては、合成基質の pNP-α-L-ラムノピラノシドに対する特異性が高く、他の pNP 基質に対してはほとんど活性を示さなかったため、ラムノピラノシドに特異的であると考えられる。天然基質のヘスペリジンに対しては、合成基質よりも高い活性を示したが、ナリンギンやルチンに対する活性は合成基質よりも低く、またナリンギンよりもルチンの方がやや低かった。これはアグリコンとの結合様式が関係しており、3-*O*-グリコシド結合よりも 7-*O*-グリコシド結合に特異性が高く、また、ラムノースのα-L-(1→2)結合よりも、α-L-(1→6)結合に基質特異性が高いことが示唆された。

*Aspergillus oryzae*, α-L-rhamnosidase, *Pichia pastoris*

発表番号：2D052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Aspergillus oryzae* 由来タイプ D フェルラ酸エステラーゼの基質識別に関わるアミノ酸残基の特定

Identification of amino acid residues involved in substrate discrimination of type-D feruloyl esterase from *Aspergillus oryzae*

○半田 暖尚、塩野 義人、小関 卓也（山形大農）
○Haruhisa HANDA, Yoshihito SHIONO, Takuya KOSEKI (Yamagata Univ.)

**【目的】**フェルラ酸エステラーゼは植物細胞壁ヘミセルロースに存在するフェルラ酸と糖のエステル結合を加水分解する酵素で、効率的なバイオマス分解、特徴ある醸造物の製造、生理活性物質として有用なフェルラ酸の抽出などに寄与している。フェルラ酸エステラーゼは合成基質のフェルラ酸メチル(MFA)、*p*-クマール酸メチル(MpCA)、カフェ酸メチル(MCA)およびシナピン酸メチル(MSA)に対する特異性とアミノ酸配列の相同性に基づいてタイプ A-D の 4 つに分類されている。これまでに、*Aspergillus oryzae* の遺伝子情報から、*A. clavatus* および *Coprinopsis cinerea* 等のタイプ D フェルラ酸エステラーゼと相同性のある遺伝子(AO090701000884)を発現させ、リコンビナント酵素の諸性質を報告した。今回、基質識別に関わるアミノ酸残基を特定するとともに、新たな知見を報告する。

**【方法】***Pichia pastoris* GS115 を用いて発現させたリコンビナント酵素は上記の 4 つの基質に反応せず、小麦フスマから酢酸を遊離したことから、基質特異性からアセチルキシランエステラーゼ（AoAxeD）として、以前報告した。リパーゼ、エステラーゼ等のセリン酵素は GXSXG の共通のモチーフを有する。*A. clavatus* および *C. cinerea* 等のタイプ D フェルラ酸エステラーゼは GFSYG、GFSWG、GWSYG であったが、本酵素のモチーフのみが GWSWG であった。そこで、２つの Trp 残基が基質特異性に関わっているのではないかと考え、W142F および W144Y の変異酵素を *P. pastoris* を用いて発現させ、それぞれのリコンビナント酵素は各種クロマトグラフィーにより精製し、精製酵素を用いて酵素学的諸性質を調べた。

**【結果】**W142F および W144Y の最適 pH および最適温度は、それぞれ pH7.0 および 45℃で、野生型酵素と同様であった。フェルラ酸エステラーゼの指標に用いられる MFA、MpCA、MCA、MSA に対する活性は野生型酵素では全く示さなかったが、W142F および W144Y 変異酵素はそれぞれの基質に対して活性を示し、特に、MSA に対して高い活性を示した。小麦アラビノキシランからのフェルラ酸遊離活性では、野生型酵素もフェルラ酸を遊離し、2 つの変異酵素は野生型酵素よりも高いフェルラ酸遊離活性を示した。また、キシラナーゼを添加することにより、エステラーゼ単一よりもフェルラ酸の遊離量が増加し、キシラナーゼの相乗効果が示された。よって、本酵素はフェルラ酸エステラーゼ活性の指標に用いられる 4 つの基質に対して活性を示さないものの、アラビノキシランからフェルラ酸を遊離する新規なタイプ D に分類されるフェルラ酸エステラーゼで、AoFaeD と変更した。また、本酵素の基質識別に関わるアミノ酸残基を特定した。

*Aspergillus oryzae*, feruloyl esterase, site-directed mutagenesis

発表番号：2E001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 活性炭を触媒とする糖縮合反応のメカニズム解析

# Polycondensation reaction analysis of saccharides with activated carbon

○濱口 徳寿[1]、西村 祐一[1]、平井 宏和[1]、山本 敏寛[1]、小川 浩一[1]、小林 広和[2]、福岡 淳[2]([1]日本食品化工(株)、[2]北大触媒研)
○ NORIHISA HAMAGUCHI[1], YUICHI NISHIMURA[1], HIROKAZU HIRAI[1], TOSHIHIRO YAMAMOTO[1], KOICHI OGAWA[1], HIROKAZU KOBAYASHI[2], ATSUSHI FUKUOKA[2] ([1]NIHON SHOKUHIN KAKO CO., LTD., [2]Institute for Catalysis, Hokkaido University)

【目的】グルコースをはじめとする各種単糖やオリゴ糖は、一定の条件で加熱すると縮合（多糖化）することが古くから知られている。我々は活性炭が本反応において触媒作用を有することを見出し、水溶性食物繊維素材である難消化性グルカンの開発を進めてきた。糖の縮合反応は、塩酸やリン酸といった酸を触媒として用いられることが既に知られており、活性炭表面の酸性官能基が触媒活性の本体であると考えられている。しかし、活性炭を触媒として用いた場合、それらと比較して反応物の着色度が顕著に低くなることから、活性炭は単純なプロトン供与型の酸触媒ではないことが示唆された。そこで本研究では、活性炭の縮合反応における触媒メカニズムの一端を解明することを目的とし、種々の検討を実施した。
【方法】難消化性糖の調製は、原料の糖に活性炭又は各種化合物（触媒）を添加し、１７０℃で加熱することで行った。活性炭表面の官能基のモデルとして、フェノール、安息香酸、サリチル酸、３－ヒドロキシ安息香酸、４－ヒドロキシ安息香酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸を用いた。また、本研究では活性炭の酸性官能基量と糖との吸着性が縮合反応に及ぼす影響についても検討した。良好な触媒能を示す市販活性炭を空気中２００℃～４５０℃で２時間加熱して得られた空気酸化活性炭を用い、活性炭の酸性官能基量、糖との親和性（Kads）及び反応性を測定することで評価した。
【結果】モデル化合物を用いた試験の結果、カルボキシル基及びフェノール基が隣接した構造を持つサリチル酸やフタル酸は高活性な触媒となることが判明した。一方で、カルボキシル基及びフェノール基が離れて存在する場合（4-ヒドロキシ安息香酸）や、安息香酸、フェノールといった官能基が一つである化合物は低活性であった。この結果から、求核的な置換基が一方のグルコース分子を補足し、隣接したカルボニル基が酸触媒として他方のグルコースに作用することで、結果的に隣接したグルコース間で、縮合反応が効率良く進行した可能性が高いと考えられた。
　空気酸化処理を行った活性炭の検討では、処理温度に依存して酸性官能基量が増加した一方、グルコースと活性炭の親和性は低下した。本活性炭を用いて、縮合反応を検討した結果、２００～３８０℃では温度依存的に触媒活性は低下するが、３８０～４５０℃では触媒活性が再び上昇することが明らかとなった。このことから、活性炭を用いた縮合反応には、酸性官能基と共に、糖との親和性も深く寄与していることが推察された。また、親和性を一定以上に維持しつつ空気酸化処理を行うことで、触媒活性の高い活性炭を得られる可能性が示唆された。

activated carbon, polycondensation reaction of saccharides, Resistant glucan

発表番号：2E002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 難消化性グルカン組成物の安全性評価と整腸作用

Safety evaluation and intestinal regulation effect of Resistant Glucan Mixture.

○平井 宏和、尾藤 寛之、濱口 徳寿、山本 敏寛、小川 浩一（日本食品化工（株））
○HIROKAZU HIRAI, HIROYUKI BITO, NORIHISA HAMAGUCHI, TOSHIHIRO YAMAMOTO, KOICHI OGAWA (NIHON SHOKUHIN KAKO CO.,LTD.)

【目的】近年、健康志向の増大から、低カロリー食品や特定保健用食品の開発に食物繊維が広く利用されている。我々はこれまでに、グルコースシラップを活性炭共存下で加熱して得られる難消化性グルカン（水溶性食物繊維）の調製方法について報告してきた。今回、難消化性グルカン組成物（ＲｅｓｉｓｔａｎｔＧｌｕｃａｎＭｉｘｔｕｒｅ　以下、ＲＧＭ）の安全性試験およびヒトにおける生理機能試験を実施したので報告する。

【方法】ＲＧＭは、グルコースシラップを原料に活性炭共存下、適温で加熱して糖縮合反応させ、水に溶解後、珪藻土ろ過、活性炭による脱色、イオン交換樹脂による脱塩を行った後、乾燥させて得られたものを被験サンプル（日本食品化工㈱製　フィットファイバー＃８０Ｐ）とした。安全性試験は、細菌を用いた復帰突然変異原性試験、ラットを用いた単回経口投与毒性試験、ラットを用いた９０日反復投与毒性試験、ヒトにおける下痢に対する最大無作用量(許容量)試験を実施した。生理機能試験は、一般的な食物繊維として効果が認められる整腸作用確認試験を実施した。整腸作用確認試験は、被験者は２０歳以上６０歳未満の排便日数が週２～４日の女性６０名を対象とし、プラセボ対照ランダム化単盲検並行群間比較法で評価を実施した。被験者は、被験食品であるＲＧＭをそれぞれ３．３ｇ、６．６ｇ、１３．２ｇ／ｄａｙ（食物繊維として２．５ｇ、５．０ｇ、１０．０ｇ/ｄａｙ）又は、対照食品（マルトデキストリン１３．２ｇ）を２週間摂取し、便通に対するアンケートは、排便日数、排便回数、排便量及び便性状に応じて分析を行った。

【結果】被験サンプルは、酵素－ＨＰＬＣ法による食物繊維含量測定では８０％であった。復帰突然変異原性試験、単回経口投与毒性試験、９０日反復投与毒性試験において、いずれも異常は認められなかった。ヒトにおける最大無作用量は体重ｋｇ当たり０．９ｇ（無水物換算）以上であり、安全性に問題は認められなかった。整腸作用確認試験は、排便日数、排便回数、排便量においてⅠ期（対照食品摂取期）に比べ有意に高い値（$p$＜０．０５）を示し、排便日数（中用量群、高用量群)、排便回数（低用量群、中用量群、高用量群）は対照食品群に比べ用量依存的な増加傾向を示した。以上のことから、ＲＧＭは、食品として十分な安全性が確認され、便通改善に有用な水溶性食物繊維素材であることが明らかになった。

Resistant glucan

発表番号：2E003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 植物の葉部における有用脂質の含量

# Determination of useful lipid contents in plant leaves

○高桑 直也[1]、木下 幹朗[2]、宮下 和夫[3]([1]農研機構・北海道農研、[2]帯畜大、[3]北大院水)
○Naoya TAKAKUWA[1], Mikio KINOSHITA[2], Kazuo MIYASHITA[3] ([1]NARO, [2]Obihiro Univ. Agri. Vet. Med., [3]Hokkaido Univ.)

**【背景】**乾燥粉末化した野菜・植物葉部は、飲料水に懸濁して摂取するなどして、野菜の摂取不足を補うための食材として広く利用されている。粉末野菜の市場規模は現在 800 億円(小売ベース)で安定成長を続け、健康食品を代表する素材である。ケール、大麦若葉など数十種類の原料が市販化されており、それぞれ食物繊維、ミネラル、カロテノイド等の含量の差によって独自のセールスポイントをアピールしている。しかしながら脂質に関しては、総脂質含量などは明らかにされているものの、各脂質成分の組成については不明な部分が多い。

α-リノレン酸(ALA)は、DHA 変換の基質となるなど、脂質代謝改善作用が認められる有用な脂肪酸である。また、グルコシルセラミド(GlcCer)は、肌の保湿機能成分が認められる有用なスフィンゴ糖脂質であり、各種植物からの抽出物は化粧品や健康食品に配合されている。本研究ではこれらの有用脂質に注目し、市販の粉末野菜・植物葉部における含量を調査した。

**【方法】**供試試料は葉物野菜を中心に、原料そのものを粉末化させた市販の素材を計 55 種使用した。各試料にメタノール性 KOH 等を添加し、メタノリシス後の脂肪酸メチルエステル(FAME)を抽出した。TLC-デンシトメトリー法により、当該 FAME の濃度を測定することによって、総脂肪酸含量を推定した。また、当該 FAME を GC に供することで、ALA などの脂肪酸含量を明らかにした。また、各試料からアルカリ安定脂質画分を抽出し、TLC-デンシトメトリー法(Takakuwa, N. et al., *Bioresour. Technol.*, **96**, 1089-1092 (2005))によって GlcCer 含量を推定した。

**【結果および考察】**供試試料における総脂肪酸量は、2.6～59.8 mg/g の範囲で含まれており、大麦若葉が最も高濃度であった。各試料の総脂肪酸中の ALA は 5.8～65.7 wt%の範囲で含まれており、大麦若葉が最も高濃度であった。従って、今回の供試試料の中では大麦若葉が最も豊富に ALA を含むと推定され、その含量は 39.3 mg/g と試算された。一方、GlcCer 含量は、オリーブの葉において極めて高く(27.0 mg/g)、その他の試料は 0.2～3.7 mg/g の範囲であった。現行の植物 GlcCer 製造工程では、植物体中のステロール配糖体(SG)が GlcCer の高純度精製を困難にしており、SG は供試試料において 0.3～4.7 mg/g の範囲で含まれていた。オリーブの葉では GlcCer / SG 含量比が 5.7 (w/w) で、GlcCer に対する SG の割合が供試試料の中でも最も少ないため、GlcCer の高純度精製が容易な原料として利用できると考えられた。

α-linolenic acid, ceramide, sterol glucoside

発表番号：2E004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸管炎症に与える食餌性植物由来グルコシルセラミドの効果

# Effect of dietary Glucosylceramide on colon inflamentation

○木下 幹朗[1]、荒井 克仁[1]、菱木 拳史郎[1]、櫻井 梨帆[1]、山下 慎司[1]、間 和彦[2]、大西 正男[3]([1]帯広畜大・食品科学、[2]日本製粉・中研、[3]藤女子大・人間環境)
○ Mikio KINOSHITA[1], KATSUHITO ARAI[1], Kenshiro HISHIKI[1], Riho SAKURAI[1], Shinji YAMASHITA[1], Kazuhiko AIDA[2], Masao OHNISHI[3] ([1]Obihiro Univ., [2]Nippon Flour Mill, [3]Fuji Women's Univ.)

緒言：発表者らの研究室では，植物や真菌類のスフィンゴ脂質の化学特性を明らかにするとともに，上記由来スフィンゴ脂質の生体機能について報告してきた[1]。その中で，食餌性植物由来ｸﾞﾙｺｼﾙｾﾗﾐﾄﾞ(GlcCer)は 1,2 ジメチルヒドラジン塩酸塩(DMH)誘導大腸腺腫発症を抑制することを報告した[2,3]。本実験過程において,DMH 投与により進行する大腸の内部損傷を GlcCer 摂取が抑制することを観察した。そこで今回の研究では,GlcCer 摂取が炎症刺激に対するサイトカインの量に与える影響について調査した。

材料・方法：試験食は植物(トウモロコシ) 由来の GlcCer を AIN-76 配合飼料に添加して作製し，腸管炎症への刺激は①DSS は BALB/c 雌マウスへ飲料水に添加(2%)して投与（期間は 2 週間）② DMH を BALB/c 雄マウスの腹腔内へ 7 日おきに投与（期間は 7 週間） にて行い。試験飼育の後，大腸を摘出・固定・包埋の後切片を作製し，トルイジンブルー染色を行い，大腸組織の形態を顕微鏡下で観察し，腸管損傷の定量的なマーカーとして，MPO をウェスタンブロット法で定量した。またサイトカインの異同は抗体アレイを用いて，網羅的に解析した。

結果・考察　腸管において，両者の刺激によって腸管傷害が認められた。また食餌性 GlcCer はこれらの状態を改善した。一方サイトカインについて，刺激群は Blank 群と比較して炎症性サイトカインを一様に微増させ，また，食餌性 GlcCer はこれらを Blank 群に近似させる傾向を示した。以上の結果より食餌性 GlcCer は様々な炎症抑制作用有し，この機能が大腸腺腫発症等を抑制する可能性が示唆された。

1.大西正男，オレオサイエンス 9， 543-552 (2009) 2. Aida, K. et al., J.Oleo Sci. 54, 45-49 (2005) ３. Kinoshita, M. et al., J. Food Lipids 16, 200-208 (2009)

Cerebroside, Sphingolipid, Cytokine

発表番号：2E005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LC-MS/MS による脂肪酸ヒドロペルオキシドの新規異性体解析法の構築

# LC-MS/MS analysis of fatty acid hydroperoxide isomers

○伊藤 隼哉[1]、水落 俊介[1]、加藤 俊治[2]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[3,4] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]日本医科大・糖尿病内分泌代謝内科、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)

○ Junya ITO[1], Shunsuke MIZUOCHI[1], Shunji KATO[2], kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[3,4] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Division of Endocrinology and Metabolism, Department of Medicine, Nippon Medical School, [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [4]Food and Health Science Research Unit, Tohoku University)

【目的】加齢や疾患、あるいは食品劣化に関わる脂質過酸化のメカニズム解明は重要である。しかし、生体や食品中において、酵素酸化や自動酸化、一重項酸素酸化のいずれにより脂質過酸化が進行しているのかは未だ不明な点が多い。この解明には、脂質過酸化で生じる脂質ヒドロペルオキシドの詳細構造解析（ヒドロペルオキシド基の位置や二重結合の幾何異性の分析）が有用と考えられるが、そのための簡便な分析法はない。脂質、とくに脂肪酸ヒドロペルオキシド（FAOOH）異性体を分析できれば、様々な種類の過酸化脂質に適応可能と考えられる。そこで本研究では、リノール酸とアラキドン酸ヒドロペルオキシド（HPODE と HPETE）異性体を瞬時に解析できるアルカリ金属を用いた LC-MS/MS 法の開発に取り組み、従来ほとんど知られていない生体や食品の酸化機構の解明を目指した。

【方法】リノール酸とアラキドン酸を、光増感剤（ローズベンガル）存在下で光酸化させ（光照下、4℃、24 h）、リノール酸光酸化物からは 6 種の HPODE、アラキドン酸光酸化物からは 8 種の HPETE を単離した。それぞれを 5 mM 酢酸アンモニウム、または、0.1 mM 酢酸ナトリウムに溶解させ標品とした。これらの標品と飛行時間型質量分析計を用い、アルカリ金属を用いた LC-MS/MS 分析により[1]、HPODE と HPETE の位置異性体の解析が可能であるかを検討した。

【結果と考察】5 mM 酢酸アンモニウムを含むメタノールで調製した標品では、positive mode でプロトン付加体[M+H]+、negative mode で脱プロトン体[M-H]-の親イオンが検出された。しかし、これらを親イオンとしたプロダクトイオンマススペクトルには、構造解析に有用な特徴的なフラグメントイオンは検出されなかった。一方、ナトリウムを含むメタノール溶液で調製した標品を positive mode で測定すると、ナトリウム付加体[M+Na]+が親イオンとして検出され、プロダクトイオンマススペクトルには特徴的なフラグメントイオンが現れた。したがって、HPODE と HPETE の親イオンとフラグメントイオンをもとにした 新規 SRM（selective reaction monitoring）ペアを構築でき、この SRM を用いて LC-MS/MS 分析することで、簡便な FAOOH の高感度・高選択的な詳細構造解析法が可能となった[2]。本法により生体や食品における過酸化脂質の生成機構（酵素酸化、自動酸化、一重項酸素酸化）を解明でき、それらの予防法を構築することで、生体老化や食品劣化の抑制に寄与できると期待される。

[1] S. Kato, et al., Anal. Biochem., 471:51-60 (2015), [2] J. Ito, et al., Anal. Chem., 87:4980-4987 (2015)

lipid hydroperoxide, LC-MS/MS, HPODE HPETE

発表責任者：伊藤隼哉（junyaito@g-mail.tohoku-university.jp）

発表番号：2E006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 炊飯条件における呈味成分の変化と食味の関係

# Relationship of taste component change and eating quality in cooking conditions.

○横野 一歩[1]、高津 地志[2]、藤田 明子[2]、渡邉 義之[1]、岡田 芳治[1]、野村 正人[1] ([1]近畿大・シス工、[2]株式会社サタケ)
○Kazuho YOKONO[1], Kunimoto TAKATU[2], Akiko FUJITA[2], Yoshiyuki WATANABE[1], Yoshiharu OKADA[1], Masato NOMURA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Taste Research Lab. Engi. Div. Satake Co.)

【目的】

米は世界三大穀物の一つであり，アジア地域で多く栽培されている．日本人は米を主食としており，米に関する物理化学的及び調理学的研究を行ない，おいしさについて追及している．特に米飯の食味は，硬さ，粘り，香り，外観，甘味及びうま味などの様々な因子により決定されている．これらは，品種，産地，栽培条件，貯蔵条件，鮮度及び炊飯条件による要因に大きく影響を受けている[1)]．また，米飯の嗜好は個人あるいは地域により様々であり，一概に表すことは難しい．そのため，一般的においしいとされる米は，どのような米なのか数値で表すための新たな指標が必要となっている．これまでの研究では品種及び成分組成が米の食味の指標として報告されている[2)]．しかし，米は食すまでに複数の加工条件と環境条件が存在するため，これらの条件による成分変化と食味の関係についての研究報告例は少ない．本研究では米中の呈味成分（糖及びアミノ酸）に着目し，炊飯条件における成分変化と食味の関係について検討したので報告する．

【方法】

試料として，平成 25 年度収穫米であるコシヒカリ（魚沼産），きらら 397（北海道産），ヒノヒカリ（広島産），あきたこまち（秋田産）及びにこまる（長崎産）の精白米と炊飯米(炊飯条件:加水量 1.35 倍，浸漬時間 30 分，炊飯時間 30 分，蒸らし 10 分)を用い比較した．また，精白米と炊飯米を粉砕した後，それぞれ 2.5 g に 50% EtOH50 mL を加え，超音波洗浄機で 30 分間処理した．その後，試料調製として，吸引ろ過し濃縮乾固を行ない，超純水 5.0 mL を添加したものを陰イオンクロマトグラフィーで精白米とその炊飯後の米中の糖含有量を比較した．官能試験の評価項目は香り，外観，味，硬さ，粘り及び総合評価の 6 項目を用いた．また，炊飯食味計，硬さ・粘り計，シンセンサの 3 機種（食味鑑定団）を用いる食味評価についても行なった．

【結果】

精白米とその炊飯後の糖含有量を比較したところ，特にグルコースの含有量は炊飯後に多く含まれていることを確認した．一方，糖含有量が食味へどのように影響を及ぼしているかについて検討した結果，官能試験の味評価との間に正の相関性があることも確認した．今回行なった結果からは，糖含有量は味を評価する指標にできるものと考察した．

文献 1)馬橋，日本調理学会誌，**42**，369-377(2009)．2)狩野・田島，実践女子大学，生活科学部紀要（41），86-90（2004）．

eating quality, taste component, sugar content

発表責任者：横野一歩（1533850013m@hiro.kindai.ac.jp）

発表番号：2E007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# α-グルコシダーゼにおけるα-EG 生産性とα-EG 分解性

# α-EG productivity and α-EG degradability in α- glucosidase

○櫻井 楓[1]、兼重 知尚[1]、戸倉 慶大[1]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学)
○Kaede SAKURAI[1], Tomotaka KANESIGE[1], Keita TOKURA[1], Masataka UCHINO[2], Katumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

エチル-α-グルコシド(以下α-EG)は、消臭効果や味質改善効果などの機能性が認められており有用性の高い物質である。清酒中では *Aspergillus oryzae* 由来α-グルコシダーゼにより生産されるが、生産効率の高い *Aspergillus* 属菌由来酵素を用いたα-EG 生産は行われていない。加えて、*Aspergillus* 属菌由来酵素はα-EG を生産と同時に加水分解している可能性も示唆されている。本研究では *Aspergillus* 属菌由来α-グルコシダーゼによるα-EG 生産性の向上を目指し、異なる起源をもつα-グルコシダーゼを用いたα-EG 生産性試験と負の要因であるα-EG 分解性について試験を行う。これによりα-EG 生産性についてα-グルコシダーゼの加水分解性とあわせて考察することを目的とした。

【方法】

*A. oryzae* NRIC1225、*A. niger* NBRC31012 と *Oryza sativa*(SIGMA 社製)を起源とする 3 種のα-グルコシダーゼを用いた。試料菌体は MYP 培地で培養、凍結乾燥させ、Yatalase 処理や硫酸アンモニウム塩析にて粗酵素液を調製した。*Oryza sativa* 由来酵素は 0.1U/ml に調整し、酵素液のタンパク質量は UV 法にて、α-グルコシダーゼ活性は PNPG 法にて測定した。α-EG 生産試験の反応液は終濃度が基質(マルトース)0.3M、エタノール 3M、酵素 0.1U/ml に調整し、30℃で 24 時間反応させた。α-EG 分解性試験はエタノール非存在下条件にて、反応液をα-EG0.3M を基質、酵素 0.1U/ml として 30℃で 24 時間反応させた。反応停止後、TLC にて半定量試験を行った。アセトニトリル:水=7:3 にて展開後、5%硫酸を噴霧し 120℃15 分間焼成したものを画像解析し、数値化を行った。

【結果および考察】

α-EG 生産試験の結果、*A. oryzae* NRIC1225、*A. niger* NBRC31012 と *Oryza sativa* のすべてにおいてα-EG 生産が確認された。その量は、*A. niger* NBRC31012 が 159μg/Unit と最も高い結果となり、ついで *A. oryzae* NRIC1225、*Oryza sativa* と生産が確認された。α-EG 分解性試験では、*Oryza sativa* のみ分解が確認されず、*A. oryzae* NRIC1225、*A. niger* NBRC31012 ではそれぞれグルコースが 140μg/Unit、143μg/Unit となった。*A. niger* NBRC31012 が生産性に最も優れることが確認されたが、同時に分解性も高いことが確認された。このことから両反応を考慮した生産試験を検討することでより高生産の反応系につながることが示唆された。

α-glucosidase, α-ethylglucoside

発表番号：2E008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# DART-MS による食品中の油脂の迅速分析法の開発

# Method development of high throughput lipid analysis in foods by DART-MS

○渡辺 淳[1]、坂倉 幹始[2]、塩田 晃久[2] ([1]株式会社島津製作所、[2]エーエムアール株式会社)
○Jun WATANABE[1], Motoshi SAKAKURA[2], Teruhisa SHIOTA[2] ([1]Shimadzu Corporation, [2]AMR Inc.)

【目的】
食品に含まれるアシルグリセロールは、風味や栄養といった食品機能に重要な役割を果たす。アシルグリセロールの分析には、複雑な前処理やキャリーオーバーといった問題があり、大量のサンプルを迅速に分析することが不可能であった。本研究では、リアルタイム直接分析イオン源（Direct Analysis in Real Time）および質量分析装置を利用し、アシルグリセロールを含むサンプルを前処理なく直接分析し、特徴的な成分の検出及び製品の判別が可能か検討を行った。
【方法】
測定には、リアルタイム直接分析イオン源 DART-OS（IonSense, Inc., Saugus, MA, USA）を装備した質量分析装置 LCMS-2020（島津製作所）を用いた。サンプルは市販の豆乳、バター、マーガリン等を用いた。清浄なガラス棒にサンプルを少量付着させ、DART イオン源に 15 秒ほどかざすことによってサンプルの測定を行った。なお、サンプルは前処理せずに分析に供した。今回使用した質量分析装置は高速極性切り替え（15msec）が可能であり、また、スキャンスピードが高速（最速 15000u/sec）であるため、ポジティブ、ネガティブ両極性の MS スペクトルを、スキャン幅 10-1000u という広い質量領域に設定しているにも関わらず Loop time 1 秒以内に設定してデータ取得することが可能であった。
【結果】
DART イオン源を用いて各種サンプルを測定した結果、豆乳、マーガリンのような植物性の食品の場合、ポジティブイオンモードではオレイン酸やパルミチン酸を主成分とするトリグリセリドやジグリセリド由来のピークが複数検出された。ネガティブイオンモードではグリセリドを構成する遊離脂肪酸が観測された。これらの結果は従来他の手法で行われていた報告と一致する。牛乳、バターのような動物性食品を測定した場合、長鎖脂肪酸に加え、中鎖脂肪酸からなるトリアシルグリセリド、ジアシルグリセリドが検出され、植物油脂とは異なるスペクトルパターンを示した。超高速極性切り替え可能な質量分析計と DART イオン源の組み合わせによって油脂含有食品の迅速測定を行い、油脂のプロファイリングを迅速に行うことができた。

Lipid, Triglyceride, DART-MS

発表責任者：渡辺　淳（jun_wtnb@shimadzu.co.jp）

発表番号：2E009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 糖化リン脂質を基材とする新規リポソームの調製

# Preparation of liposomes using glycated lipids for therapeutic purposes

○上吉原 怜奈[1]、仲川 清隆[1]、張替 敬裕[1]、宮澤 大樹[2]、木村 ふみ子[1]、宮澤 陽夫[3,4] ([1]東北大院農・機能分子解析、[2]タフツ大、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター、[4]東北大院農・食の健康科学ユニット)
○Reina KAMIYOSHIHARA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Takahiro HARIGAE[1], Taiki MIYAZAWA[2], Fumiko KIMURA[1], Teruo MIYAZAWA[3,4] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Vascular Biology Laboratory, Jean Mayer USDA Human Nutrition Research Center on Aging, Tufts University, [3]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [4]Food and Health Science Research Unit, Tohoku University)

【目的】リポソームはリン脂質からなる閉鎖小胞で、薬物伝達システム (DDS) に活用されている。リポソームのリン脂質は主にホスファチジルコリン (PC) であるが、生体内における分解性などの挙動の改変を目的に、他のリン脂質 (ホスファチジルエタノールアミン (PE) など) の利用も検討されている。その一方で、当研究室では PE のアミノ基を糖化させ、メーラード産物であるアマドリ型糖化 PE の調製に成功した 1-3) 。そこで、本研究では糖化 PE を用いて、新たな物性 (粒径、極性) を持つリポソームの開発を目指した。なお、リポソームには機能性成分としてクルクミン (CUR) を封入した。

【方法と結果】①予備試験として、量比が異なる PC と PE、CUR を用いてリポソームを作製した。PC にその 1/3 量まで PE を加えても、CUR を十分量含む均一サイズの単層リポソーム (SUVs) が調製できた。そこで、この量比で PC と糖化 PE から SUVs 作製を試みた。②SUVs 作製に用いる糖化 PE は、PE を糖 (グルコースまたはラクトース) と反応 (55 度、48 時間) させ、Folch 法で脂質を抽出して調製した。また、糖を加えずに同じ条件で調製したものを未糖化 PE とした。本糖化条件では PE の半分以上が糖化 PE となった。③これらの糖化 PE あるいは未糖化 PE を、上述の比で PC と混ぜて SUVs を作製した。その結果、糖化 PE を用いても未糖化 PE と同様に、SUVs の平均粒径は約 200 nm であり、CUR の封入率も約 10%となった。しかし、糖化 PE を用いた SUVs は、未糖化 PE から調製した SUVs に比べて、ゼータ電位の負電荷が顕著に増加した。したがって、糖化リン脂質を基材とすることで、新たな性質を持つリポソームを調製できることが示唆された。リポソームのゼータ電位の変化は、リポソームに含有される成分 (本研究では CUR) の細胞への取り込み量に影響すると考えられる。そこで、現在はこの可能性を培養細胞試験で評価している。

1) J. Oak, K. Nakagawa, T. Miyazawa, UV analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in foods and biological samples. J. Lipid Res., 43, 523-529 (2002)
2) K. Nakagawa, J. Oak, T. Miyazawa, Ion-trap tandem mass spectrometric analysis of Amadori-glycated phosphatidylethanolamine in human plasma with or without diabetes. J. Lipid Res., 46, 2514-2524 (2005)
3) N. Shoji, K. Nakagawa, T. Miyazawa, LC-MS/MS analysis of carboxymethylated and carboxyethylated phosphatidylethanolamines in human erythrocytes and blood plasma. J. Lipid Res., 51, 2445-2453 (2010)

glycated lipids, liposomes, Maillard reaction

発表番号：2E010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 味噌の発酵・貯蔵過程におけるマンニノトリオース含有量の変化について

# Change of manninotriose content in the fermentation and storage process of miso

○石川 千秋[1]、兒玉 しずさ[2]、森光 康次郎[1,2] ([1]お茶大生活科、[2]お茶大院ライフ)
○ Chiaki ISHIKAWA[1], Shizusa KODAMA[2], Yasujiro MORIMITSU[1,2] ([1]Ochanomizu Univ., [2]Ochanomizu Univ. Graduate School)

【目的】マンニノトリオースは、大豆発酵食品に含まれているガラクトオリゴ糖である。これまで、市販大豆発酵食品中のマンニノトリオース含有量を比較､報告してきた。しかし、発酵過程や発酵後の貯蔵期間におけるオリゴ糖含有量の変化、大豆使用量や発酵に用いられる微生物の違いなどについての検討はなされていない。そこで大豆発酵食品として味噌を調製し、貯蔵期間中のマンニノトリオースをはじめとするオリゴ糖類の経時的変化や、大豆使用量あたりのマンニノトリオース含有量を明らかにすることを本研究の目的とした。また、大豆以外の雑豆類についてもマンニノトリオース含有量を測定し、大豆との比較を行った。

【方法】国産大豆 2 種類(フクユタカ、ユキホマレ)およびアメリカ産大豆 1 種類を原料とし、食塩、RO 水、米麹(伊勢惣)を用いて麹歩合の異なる甘口味噌、辛口味噌の 2 種類ずつを調製した。これらの味噌は、原料を混合した後、小分けにしてプラスチック製の容器に詰め、30℃の恒温室で 6 か月間発酵・熟成を行った。所定の貯蔵期間を経過した味噌は-40℃の冷凍庫に移し、発酵を停止させ、凍結乾燥したのちにミルサーで粉砕し、乾燥粉末試料とした。試料 1g を熱水抽出し、遠心分離にて得られた上清を凍結乾燥した。上清の凍結乾燥物 200mg を MQ 水で 1ml に定容した後に遠心限外ろ過し、HPLC 分析に供した。 大豆以外の雑豆類(アズキ、ササゲ、レンズマメ、ヒヨコマメ)や、未熟種子および莢を食べる豆類(ジュウロクササゲ)のマンニノトリオース含有量についても、市販品の乾物または凍結乾燥したものを用い、同様に測定した。

さらに、マンニノトリオースの腸管における動態および機能性についても、Caco-2 細胞を用いて作成した腸管膜モデルを用いて、透過性やカルシウム欠乏後のタイトジャンクション再構築促進効果を評価した。

【結果】現在、マンニノトリオースおよびスタキオース、メリビオース、ラフィノースについての HPLC 分析を実施中である。本研究の結果から、味噌の貯蔵熟成期間中のオリゴ糖含有量の変化が明らかになることが期待される。

また、マンニノトリオース添加は Caco-2 細胞においてカルシウム欠乏後のタイトジャンクション再構築を促進する傾向が認められた。

manninotriose, galacto-oligosaccharide, soybean fermented food

発表番号：2E011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# デンプン粒の表層がデンプンの糊化開始に与える影響について

# Effect of starch granule surface on gelatinized starch

○野口 治子[1]、丸山 慶輔[2]、芳原 章太[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[1]（[1]東農大応生、[2]東農大院農、[3]東農大食加技セ）
○Haruko NOGUCHI[1], Keisuke MARUYAMA[2], Syouta YOSHIHARA[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[1] ([1]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agri., [2]Graduate school of Agri., Tokyo Univ. Agri., [3]Food processing center, Tokyo Univ. Agri.)

【背景および目的】　デンプン粒は糊化過程においては粒を一つの単位として膨潤が進行し、これに伴い粘度は上昇する。やがてデンプン粒が崩壊することで粘度は低下し、デンプン粒内部からアミロースやアミロペクチンが溶出し、温度低下とともにデンプン分子内で水素結合が再形成され老化する。このようなデンプンの糊化・老化の特性は植物起源により異なり、デンプンの分子構造や結晶性など様々な要因に影響を受けている。デンプンを原料した食品およびエネルギー利用において、糊化過程の効率化は課題の一つである。本研究においては、糊化がデンプンの吸水と膨潤より始まることから、デンプン粒の表面に存在する因子は糊化開始に大きく影響すると考え、各種デンプンを用いて比較検討を行った。

【実験方法】　試料には小麦、コメ、トウモロコシ、ジャガイモ、タピオカおよびサツマイモのデンプンを用いた。各試料を乾物換算で 8%（ジャガイモは５％）となるよう調製したのち、ラピッドビスコアナライザーに供し、各種粘度特性を測定した。各デンプンの糊化開始温度付近にて定温加熱処理（60 分）を行い、粘度変化を測定した。また、測定後の糊液にヨウ素染色液を滴下し、デンプン粒の形状を光学顕微鏡にて観察した。尿素（終濃度 0.1～４M）の添加および SDS 溶液で洗浄処理を行い、処理前後の糊化特性の変化と CBB による染色度合いを比較した。

【結果】　各デンプンを糊化開始温度付近で加熱したところ、いずれのデンプンも糊化開始温度に近づくにつれ粘度が上昇した。ジャガイモ、タピオカ、サツマイモでは温度ごとに最高粘度の値が異なり、加熱温度依存的に最大粘度と粘度上昇速度が増加した。ジャガイモとサツマイモでは糊化開始温度付近でブレークダウンが観察された。コメ、小麦、トウモロコシでは粘度増加速度は前 3 試料に比べて緩やかであり、糊化開始温度より低温（-1～3℃）でも加熱時間の経過に伴い最大粘度に近づく傾向を示した。各試料に尿素を添加し糊化挙動を測定したところ、尿素濃度の増加とともに糊化開始温度が低下し、ジャガイモを除いた 5 種では最大粘度も増加した。デンプン粒を CBB にて染色したところ、コメ＞トウモロコシ＞小麦＞タピオカ、サツマイモ、ジャガイモの順で濃い青色が観察され、これらを SDS 処理したところ、コメ、トウモロコシ、小麦では顕著に青色が薄くなり、表面タンパク質の除去が観察された。小麦、トウモロコシとコメでは SDS 処理により、糊化開始温度の低下と最高粘度が上昇した。

starcu, starch granule suraface, geratinization

発表責任者：野口治子（h3noguch@nodai.ac.jp）

発表番号：2E012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Preparation of a fluid agar from Gelidium amansii by acid hydrolysis

○Hyeon-JIn SUN[1], Suk-Min KO[1], Yousung OH[2], Changgeun CHOI[2], Hyo-Yeon LEE[1] ([1]Jeju National Univ., [2]JEJUAGAR Co., Ltd)

Agar is an edible polysaccharide which is easily extracted with hot water from red seaweed, and has been used as a food and gelling agent in Asian countries for several hundred years. It consists of agarose and agaropectin. Agarose is the main component of the polysaccharide. Recent reports have demonstrated that the agarooligosaccharides and neoagarooligosaccharides prepared from agar possess many biological functions such as prebiotic, anti-oxidation, anti-inflammation, moisturizing and whitening effects. Because of these functional effects, there has been an increasing interest in these compounds. The structure of agarooligosaccharides and bioactivity relationship study revealed that the activities are correlated to the degree of polymerization(DP). The aim of this study was to develop a method for the preparation of fluid agar, with low molecular weight and without gelling power at a high concentration, from agar by hydrolysis. Enzyme and acid are the hydrolytic agents which give agarooligosaccharides by fragmentation of agar. Enzymatic process has some problems for industrial application such as low activity and low stability. However, acid hydrolysis can be used for industrial production owing to its simplicity and low cost. Thus, the fragmentation of agar into fluid agar was performed by partial acid hydrolysis.
In the present work, we used three kinds of acids to hydrolyze agar, and the hydrolysates were analyzed by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis(FACE). The distribution of DPs of the hydrolysates was dependent on the concentration of acid and reaction time. Agar containing foods have been developed by adding agar to various foods. However, agar itself could not uniformly mix with other edible or drinkable foods to a satisfactory degree. The fluid agar developed in this study easily mixed with any other foods uniformly at a high concentration. These results demonstrate that the fluid agar can be a good strategy to enhance the availability of agar as a new type of food additive.

Agar, partial acid hydrolysis, fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis

発表番号：2E013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# タンパク質と 3-デオキシキシロソンの反応による架橋型メイラード反応後期段階生成物の同定
# Identification of cross-linked advanced glycation end products in proteins with 3-deoxyxylosone.

○岡部 脩平[1]、鳥海 春香[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Shuhei OKABE[1], Haruka TORIUMI[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【背景・目的】

メイラード反応とは、アミノ化合物とカルボニル化合物との間で起こる非酵素的褐変反応である。メイラード反応の後期段階で生成する advanced glycation end products（AGEs）の中には、二つのアミノ基の間に架橋構造を形成する架橋型 AGEs が存在する。近年、当研究室において架橋型 AGEs の一種である 3-deoxyxylosone-derived lysine dimmer（XOLD）が同定された。XOLD は 3-deoxyxylosone（3DX）と formaldehyde（FA）などのアルデヒド共存下で生成することがアミノ酸を用いたモデル系において証明されている。しかし、タンパク質上における XOLD の生成は確認されていない。本研究では、タンパク質を用いたモデル系における XOLD の生成に検討を加えた。

【実験方法・結果】

(1) リボヌクレアーゼ A（RNase）を 5 mg/mL、3-deoxyxylosone（3DX）と FA をそれぞれ 10 mM になるように 200 mM のリン酸バッファー（pH 7.4）に溶解し、37℃で 6-240 時間インキュベートした。また、FA を添加しない溶液も同様に調製した。この反応溶液を限外ろ過（MWCO 3 kDa）により脱塩後、凍結乾燥して糖化タンパク質サンプルを得た。糖化タンパク質サンプル 1 mg を 6N 塩酸によって酸加水分解し LC-ESI-Q-TOF-MS および MS/MS 分析に供した結果、FA を添加したサンプルにおいてのみ XOLD が生成した。糖化タンパク質サンプル中の XOLD は 6 時間から 240 時間まで経時的に増加した。

(2) RNase, 3DX, FA とアミノ酸アナログである 6-aminohexanoic acid（EAHA）を 200 mM のリン酸バッファー（pH 7.4）に溶解し、37℃で 5 日間インキュベートした。限外ろ過（MWCO 3 kDa）により脱塩後、SDS-PAGE により分離したモノマーバンドを切り出し、SH 基の還元・アルキル化後、トリプシン消化を行った。この反応溶液を LTQ-Orbitrap に供し配列解析を行った結果、31 番目と 37 番目のリジン残基において、リジン残基側鎖と EAHA のアミノ基を架橋した XOLD による修飾と一致する分子量シフトが確認された。以上の結果から、XOLD は 31 番目と 37 番目のリジン残基を修飾し分子間架橋に寄与する可能性が示唆された。

Advanced glycation end products, cross-linked AGE, 3-deoxyxylosone

発表番号：2E014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# タンパク質間を架橋するメイラード反応後期段階生成物の推定

# Estimation of the cross-linked advanced glycation endproducts formed in proteins.

○鳥海 春香[1]、岡部 脩平[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Haruka TORIUMI[1], Shuhei OKABE[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【背景・目的】

メイラード反応の中間体として知られるα-ジカルボニル化合物（α-DC）は、グルコースなどに比べて反応性が高く、タンパク質の分子間や分子内の架橋に大きく関与する重要な化合物である。タンパク質とα-DC を反応させることにより、様々なメイラード反応後期段階生成物（AGEs）が生成するが、タンパク質の分子間を架橋する AGEs の特定には至っていない。本研究では、ribonuclease A（RNase A）及びアミノ酸アナログ（6-aminohexanoic acid（EAHA), creatine）とα-DC（glyoxal（GO）, 3-deoxyxylosone （3-DX), 3-deoxyglucosone（3-DG))、を反応させることにより、タンパク質分子間に生成する AGEs 構造の特定を試みた。

【実験方法・結果】

(1) RNase A（1 mg/mL）及び creatine（40 mM）とα-DC（20 mM）を 0.2 M リン酸バッファー（pH 7.4）に溶解し、37℃で 10 日間インキュベートした。この反応溶液を限外ろ過（MWCO 3 kDa）により脱塩し、SDS-PAGE でモノマーバンドのみを切り出し、SH 基の還元・アルキル化後、ゲル内にて酵素消化（trypsin, lysyl endopeptidase）を行った。これにより得られたペプチドを LTQ-Orbitrap に供し、配列解析を行った。また、RNase A（5 mg/mL）及び EAHA（50 mM）とα-DC（50 mM）のモデル反応溶液も同様にして分析を行った。
その結果、creatine を用いた実験より、α-DC の種類に関わらず imidazolinone にアミノ基が結合した形で分子間架橋を生成することが推測された。また、EAHA を用いた実験でも同様な架橋が確認できた。

(2) RNase A とα-amylase を 1 mg/mL、GO または 3-DG を 20 mM となるように 0.2M リン酸バッファー（pH 7.4）で溶解し、37℃で 10 日間インキュベートした。この反応溶液を SDS-PAGE により分離して異種タンパク質のダイマーバンドを切り出した。これを(1)と同様にして LTQ-Orbitrap に供し、配列解析を行った。
解析結果より、α-amylase のアルギニン残基と RNase A のリジン残基が imidazolinone にアミノ基が結合した構造を介して分子間で架橋したことが明らかとなった。

Cross-linked AGEs, advanced glycation endproducts, dicarbonyl

発表番号：2E015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 甘味タンパク質ソーマチンの甘味強化

# A Hypersweet sweet-tasting protein, thaumatin

○桝田 哲哉[1]、太田 圭介[1]、小代 奈央子[1]、村田 一輝[1]、三上 文三[1]、谷 史人[1]、Temussi Piero[2]、北畠 直文[3]（[1]京大院農、[2]Universita' di Napoli Federico II、[3]ノートルダム清心女大）
○Tetsuya Masuda[1], Keisuke Ohta[1], Naoko Ojiro[1], Kazuki Murata[1], Bunzo Mikami[1], Fumito Tani[1], Piero Temussi[2], Naofumi Kitabatake[3] ([1]Kyoto Univ., [2]Universita' di Napoli Federico II, [3]Notre Dame Seishin Univ.)

【目的】精製されたタンパク質は無味無臭であるが、例外的に甘味を呈するタンパク質が存在する。ソーマチンの甘味閾値は 50 nM であり、ショ糖に比べモル比で 10 万倍と非常に強い甘味を呈する。これまでのソーマチン部位特異的変異体に対する甘味活性評価の結果から、クレフト面に存在する塩基性アミノ酸残基が甘味発現に重要な役割を果たすこと、中でも K67、R82 が重要な役割を果たすことが明らかとなっている（１，２）。一方酸性アミノ酸残基の変異体については、その多くが甘味に影響を与えないが、甘味が強化された変異体も存在する結果が得られている。そこで本研究では、ソーマチンの甘味発現機構及び甘味強化機構の詳細を明らかにすることを目的とした。
【方法】ソーマチン変異体は酵母 *Pichia pastoris* を用いた発現系により作製し、培養上清を透析後、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。精製ソーマチン変異体について CD スペクトル、蛍光スペクトルにて構造変化の有無を評価した。変異体の中でも、甘味に影響を与えた変異体については、さらに X 線結晶構造解析を試みた。回折データの収集は大型放射光施設 SPring-8 にて行った。甘味強度は三点識別法を用いたヒト官能検査により評価した。
甘味受容体のモデル構造は、構造が既知である mGluR1 の構造を用いて、ClustalX による配列のアライメント後、ホモロジーモデリングを行い構造の構築を行った。この甘味受容体モデル構造を用いてソーマチン(PDB:3AL7, (3))とのドッキングシミュレーションを行った。
【結果】CD スペクトル、蛍光スペクトルの結果より変異導入による顕著な構造変化は確認できなかった。甘味が強化された変異体については結晶化を試み、正方晶の結晶が得られた。放射光での解析により、分解能が１Åを切る高分解能データの取得に成功した。
ドッキングシミュレーションの結果から、ソーマチンの甘味に係わる塩基性アミノ酸残基は、受容体上の酸性残基と相互作用している知見が得られ、甘味タンパク質と甘味受容体の相互作用には静電相互作用が重要役割を果たすことが示唆された。

（１）Ohta, K., Masuda, T., Ide, N. & Kitabatake, N., *FEBS J.* **275**, 3644–3652 (2008).
（２）Ohta, K., Masuda, T., Tani, F. & Kitabatake, N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* **413**, 41–45 (2011).
（３）Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B. & Kitabatake, N., *Acta Crystallogr. Sect.,* **F67**, 652–658 (2011).

sweet, electrostatic interaction, docking simulation

発表責任者：桝田哲哉（t2masuda@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2E016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

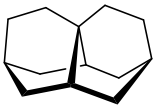
# ジバレラン骨格を有する新規香料化合物の創製とその香気特性

# Synthesis and properties of novel Odorants containing Dibarrelane skeleton

○和田 善行[1]、鈴木 孝洋[2]、吉田 啓[1]、鈴木 真也[3]、中西 健太[4]、佐久間 克也[1]、作田 圭亮[1]、谷野 圭持[2]、清水 功雄[3] ([1]小川香料株式会社、[2]北海道大学大学院理学研究院、[3]早稲田大学大学院先進理工学研究科、[4]北海道大学大学院総合化学院)

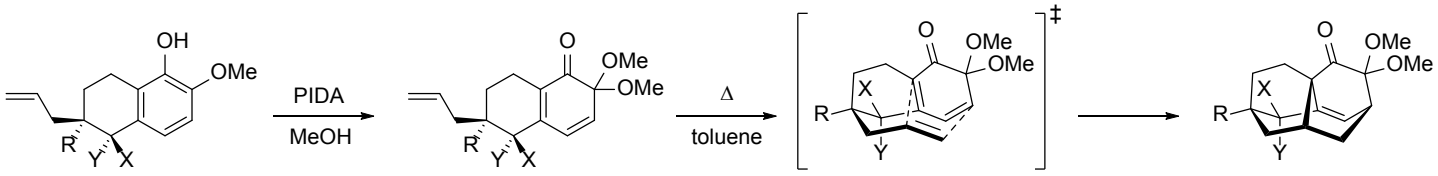
○ Yoshiyuki WADA[1], Takahiro SUZUKI[2], Hiromu YOSHIDA[1], Shinya SUZUKI[3], Kenta NAKANISHI[4], Katsuya SAKUMA[1], Keisuke SAKUDA[1], Keiji TANINO[2], Isao SHIMIZU[3] ([1]Ogawa & Co., Ltd., [2]Faculty of Science, Hokkaido Univ., [3]Faculty of Science and Engineering, Waseda Univ., [4]Graduate School of Chemical Sciences and Engineering, Hokkaido Univ.)

【目的】ジバレラン **1** は $C_{2V}$ 対称性の 4 員環性かご型炭化水素である。その高い対称性から構造的特性のみならず合成化学的にも極めて興味深い化合物である。その骨格は天然界にはトリカブト属の植物 *Aconitum hemsleyanum* から単離・構造決定されたジテルペンであるアトロプルプラン中に見いだされている。一方、香料分野においては消費者の多様なニーズに応えるべく常に新規な骨格の探索が行われ、これまで多くの化合物が香料物質として使用されている[1)]。ジバレランは炭素数 13 であり香料としてよく使われるセスキテルペンに近い。そこで、今回我々は香料物質としての可能性を秘めた新規かご型骨格であるジバレランに着目した。



**1**

【方法・結果】これまでに我々は、逆電子要請型 Diels-Alder 反応(REDDA)を鍵反応とする効率的なジバレラン骨格構築法を報告している[2)]。そこで、本法を種々の香料物質を指向したジバレラン誘導体の合成に適用することとした。実際に、テトラロンから誘導した化合物を酸化的脱芳香族化することで masked *o*-benzoquinone(MOB)を調製し、続く加熱条件下での分子内 REDDA によって中心骨格の構築に成功した。本法を適用して各種ジバレラン誘導体を合成し、その香気特性について検討中である。




1) Kraft, P.; Bajgrowicz, J. A.; Denis, C.; Frater, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 2980-3010.

2) (a) Suzuki, T.; Sasaki, A.; Egashira, N.; Kobayashi, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 9177-9179. (b) Suzuki, T.; Okuyama, H.; Takano, A.; Suzuki, S.; Shimizu, I.; Kobayashi, S. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 2803-2808.

odorant, Dibarrelane

発表番号：2E017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 時間経過による赤米の濃色化現象機構の解明

# A study on the color deepening in red rice during storage

○林 咲那、柳瀬 笑子（岐大）
○Sakina HAYASHI, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】赤米とは古代米の一種であり，種皮または果皮にプロアントシアニジンというタンニン系の赤色色素を含む品種である。プロアントシアニジンはカテキンが連なった高分子化合物であり，抗酸化，抗がんなどさまざまな生理活性があると報告されている。赤米は収穫後，貯蔵期間中に赤みを増すという濃色化現象が起こる。この現象については詳しく解明されておらず，また赤米が新たに色素成分を合成しているとは考えにくいため，この変化は既存成分の変化であると推測される。そこで本研究では，赤米中の成分の時間経過による変化を調査し，濃色化現象の機構の解明を目的とした。
【方法と結果】サンプルとして，貯蔵期間がそれぞれ 0，1，2，3，5 年の赤米を使用した。まず，それぞれの赤米サンプルを水，メタノールの順で溶媒抽出をし，各種機器分析を行ったところ，水抽出物で顕著な違いが表れた。貯蔵期間 0 年の水抽出物では 2-9 量体のプロアントシアニジンが含まれていたが，貯蔵期間 3，5 年の水抽出物にはほとんど含まれていないことから，濃色化には時間経過によるプロアントシアニジン類の変化が関与していることが示唆された。次に，濃色化現象の原因について考察するために，貯蔵期間 0 年の赤米に LED ライトを長時間照射することでその変化を経時的に観察した。その結果，100 時間を超えると濃色化が確認された。照射時間を 0-196 時間に割り振り，それらを水抽出し，HPLC 分析を行ったところ，照射時間が長くなるにつれてプロアントシアニジン類が減少していることが確認された。以上のことから濃色化現象は，酵素による生体反応ではなく空気酸化によるプロアントシアニジン類の化学的変化に起因することが強く示唆された。

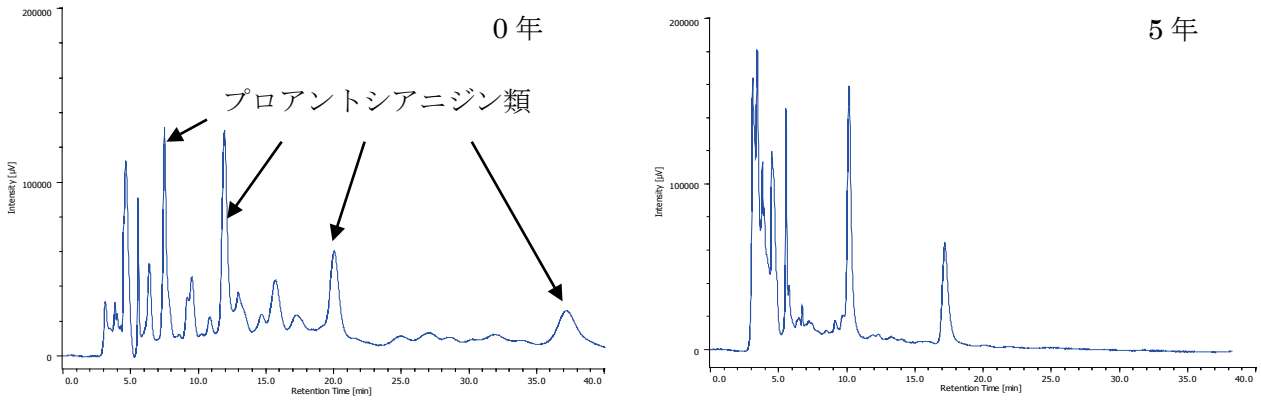



図　水抽出物の HPLC チャート(280nm)

Proanthocyanidins, Red rice, Color deepening effect

発表責任者：柳瀬笑子（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

発表番号：2E018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アズキ種皮色素の分解反応による構造解析

# Characterization of the red pigments from adzuki beans

○河上 若菜、大島 綾華、柳瀬 笑子 (岐大応用生物科学)
○Wakana KAWAKAMI, Ayaka OSHIMA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】アズキ(*Vigna angularis*)はマメ科ササゲ属の植物であり、古くから高い抗酸化活性や肝臓保護作用などの種々の生理作用があることが知られている。アズキは豆類の中でも特にポリフェノール含量が多く、ルチン等のケルセチン配糖体、カテキン類、アントシアニン類が含まれることが報告されている。しかしながら、アズキ種皮色素の大半は縮合型タンニン様の高分子ポリフェノールであるといわれており、複雑な混合物であることからその詳細は明らかになっていない。そこで高分子ポリフェノールの構造解明を目的とし、アズキ抽出物高分子画分の詳細な分析及び分解反応を用いた構造解析を行ったので報告する。

【方法・結果】市販のアズキを 35℃ の水に浸し、5.5 時間、35℃ に保温しながら撹拌させ、水抽出を行った。得られた水抽出物には、糖やタンパク質、サポニンなどの水溶性の物質が多く含まれていた。水抽出後、得られた残渣を 2%TFA, 80%MeOH in $H_2O$ に浸し、室温で 2 回抽出した。得られた抽出物を減圧濃縮後、HP20SS カラムにて分画し、画分 1～5 を得た。この内、画分 1 と 4 が濃い赤茶色を示しており、さらに逆相及び Hilic カラムを用いた HPLC 分析により高分子の高極性化合物が含まれていることが明らかになった。また、画分 1 については、縮合型タンニンの構造解析法の一つであるチオール分解反応を行った。画分 1 をチオエタノールで処理し、反応混合物の HPLC 分析を行った結果、反応前には見られなかった 6 ピークが新たに検出された。そのうち 1 つについて単離・構造解析を行ったところ、エピカテキンの 4 位にチオエタノールが付加した化合物であることが明らかとなった。現在その他のピークに関しても構造解析を行っており、あわせて報告する。

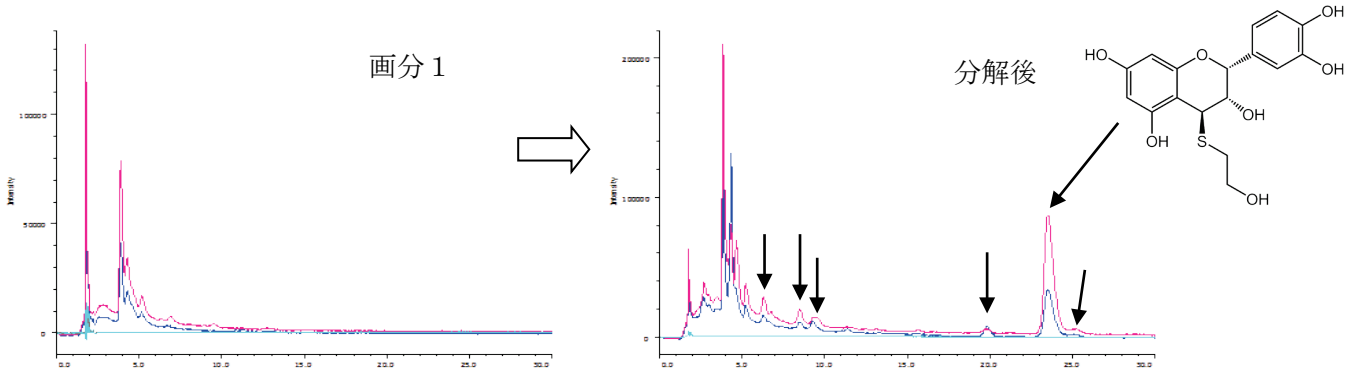



図 チオール分解反応による HPLC の変化

adzuki beans, thiolysis, procyanidin

発表番号：2E019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# D-キシロース-グリシン系メイラード反応へのジカルボニル化合物による影響

# Effects of Dicarbonyl Compounds to D-Xylose-Glycine Model Maillard Reaction.

○泉 雄斗、横関 俊昭、渡辺 寛人、早瀬 文孝 (明治大農・農化)
○Yuto IZUMI, Toshiaki YOKOZEKI, Hirohito WATANABE, Fumitaka HAYASE (Meiji Univ.)

【目的】食品の加工、貯蔵、調理の際には、タンパク質や糖質をはじめとする食品成分間の反応が起こる。その一つとして知られるメイラード反応は、カルボニル化合物とアミノ化合物間の非酵素的褐変反応であり、食品の品質形成や劣化に関する重要な反応である。その最終生成物の褐色色素メラノイジンは難分解性の高分子化合物であり、構造や生成経路について未だ不明な点が多い。我々は D-キシロース―グリシンモデル系において、主要生成物である Blue-M1[1]を始めとする Blue-M1～M10 までの青色色素化合物を同定してきた。これらの青色色素化合物は単独で褐変することから、メラノイジン生成の重要な中間体であると考えられる。本研究では、D-キシロース―グリシンモデル系で生成するグリオキサール(GO)及びメチルグリオキサール(MGO)をモデル系に添加し、生成物を同定することにより詳細な生成経路の解明を試みた。

【方法】D-キシロース(1 M)とグリシン(0.1 M)を炭酸水素ナトリウム(0.1 M)含有 60%エタノール溶液(pH 8.1)中で 26.5℃にて 24 時間インキュベートし､GO または MGO を添加後 24 時間インキュベートした。この反応溶液を各種クロマトグラフィーにて精製し、生成した化合物について逆相 HPLC、LC-ESI-Q-TOF-MS による解析を行った。

【結果】反応生成物を陰イオン交換クロマトグラフィー、固相抽出にて精製後、逆相 HPLC により分析を行った。GO 添加サンプルではコントロールと比較して有意に増加した青色色素化合物が認められた。MGO 添加サンプルでは極大吸収波長を 330 nm に有する化合物が検出された。

LC-ESI-Q-TOF-MS による質量解析と組成演算の結果、GO 添加サンプルで増加した色素化合物はキシロース 4 分子とグリシン 4 分子が脱炭酸によって縮合した Blue-M5[2]であると同定した。これは Blue-M1 と比べてヒドロキシル基が一つ少なく、左右対称な構造を持つピロロピロールダイマーである。

[1] F. Hayase, et al, Biosci.Biotechnol.Biochem, 63, 1512-1514 (1999)
[2] F. Hayase, et al, Ann.N.Y.Acad.Sci, 1126, 53-58 (2008)

Maillard Reaction, Pigments, Dicarbonyl Compounds

発表番号：2E020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 栽培方法の相違が樹成り熟成不知火の品質に及ぼす影響

# Influence of Difference in Cultivation Method on Fruit Quality of Fully Ripened Citrus 'Shiranuhi'

○山口 千紘[1]、吉村 歩奈美[2]、森 英里奈[2]、桐原 智美[2]、山元 涼子[2]、白土 英樹[1,2]（[1]熊本県大院環境共生、[2]熊本県大環境共生）
○Chihiro YAMAGUCHI[1], Honami YOSHIMURA[2], Erina MORI[2], Tomomi KIRIHARA[2], Ryoko YAMAMOTO[2], Hideki SHIRATSUCHI[1,2] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto., [2]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto.)

【背景・目的】

熊本県特産の中晩生柑橘‘不知火’は樹上で越冬完熟させることで優れた果実品質を得ることができると言われている。しかしながら樹勢が弱いため、甘夏などの強勢樹を台木として栽培されることが多く、接木により育成した果実は苗木で育成したものよりも減酸が悪いといわれている。そこで本研究では、不知火の苗木から育成された果実と接木により育成された果実の樹上完熟果および追熟果について栽培方法の相違がその品質へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

試料は苗木から栽培した木に着果させた果実（苗木果）と甘夏台の接木に着果させた果実（接木果）を用いた。苗木果、接木果ともに、1 月中旬の収穫後に 2 ヶ月間追熟させたものを追熟果、3 月中旬に収穫したものを完熟果とし、完熟苗木、追熟苗木、完熟接木、追熟接木の 4 群について検討した。これらの果実について、果実成分として糖度、酸度，糖含量、有機酸含量、アスコルビン酸含量およびアミノ酸含量の分析を行った。また、香気成分については、果皮は水蒸気蒸留法によって得られた果皮油を、果汁はジクロロメタンを抽出溶媒とする連続液―液抽出法により得られた香気濃縮物を、GC ならびに GC-MS により同定・定量した。官能評価は熊本県立大学の 20 代の女子学生 10 名をパネルとし、香りと味について 5 段階の評価法で評価した。

【結果および考察】

糖度は追熟接木で最も低く、糖含量においても同様の傾向が認められた。酸度は完熟果、追熟果ともに接木で高い傾向にあり、接木栽培では減酸しにくいことが示唆された。糖酸比は完熟苗木で最も高く、これは官能評価で「美味しいか」の評価で完熟苗木が最も高いことと一致していた。また、こくを形成し味覚上重要であるアミノ酸は、総量が完熟果に多い傾向にあった。さらに、香気成分分析では果皮油 77 個、果汁 240 個の定量可能ピークが得られ、果皮油では 50 成分、果汁では 93 成分がマススペクトルと保持指標の一致により同定あるいは推定された。官能評価において香気では果皮、果汁ともに完熟苗木の評価が高い傾向にあった。香気成分組成から、果皮ではグリーンなカンキツ様の香りに関与すると考えられるテルペン系炭化水素類、果汁では甘いカンキツ様の香りに関与すると考えられる含酸素テルペン類とアルコール類の影響が大きいと考えられた。

Shiranuhi, cultivation, fruit quality

発表責任者：白土英樹（hideki-s@pu-kumamoto.ac.jp）

発表番号：2E021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# トマト加工食品に含まれるカフェ酸配糖体とカフェオイルキナ酸類について

# About caffeoyl glucoside and caffeoylquinic acid included in tomato processed foods

○榊原 彩加、飯島 陽子（神奈川工科大院工）
○Ayaka SAKAKIBARA, Yoko IIJIMA (Kanagawa It)

【背景・目的】

これまでの研究で、トマト果実の成熟依存的に発現が増大するカフェ酸配糖化酵素遺伝子の機能同定を行い、生成物が Caffeoyl 4-*O*-β-D-glucoside（C4Glc）であることが分かっている。また、C4Glc のトマト果実での成熟段階別、部位別の蓄積変化をみると、成熟に伴って増大し、ゼリー部に多い傾向にあった。さらに、実際に流通している様々な成熟トマト果実においても C4Glc の蓄積を調べたところ、ゼリー部に多く存在する傾向にあった。また、トマト果実には C4Glc の他にクロロゲン酸などのカフェオイルキナ酸類（ジカフェオイルキナ酸、トオリカフェオイルキナ酸）も含まれることが知られている。我々はこれまでに生のトマトについて C4Glc およびカフェオイルキナ酸類の定量を行ってきた。しかしトマト果実は実際には生食だけではなく、ソースやジュースなど加工して食されることも多い。そこで今回は、日常的によく食されているトマト加工食品に関して、C4Glc やカフェオイルキナ酸類の定量を行うこととした。

【方法・結果】

市販のトマトジュースを分析サンプルとした。凍結乾燥し、その後、サンプル 100 mg を秤量し内部標準として formononetin を含む 70 %メタノール 300 µL で 2 回抽出を行い、得られた抽出液に関して UPLC-TOFMS を用いて ESI-negative モードで分析を行った。その結果、トマトジュース中には C4Glc やクロロゲン酸などのカフェオイルキナ酸類は生食トマト果実に比べて少なくなる傾向にあった。また、トマトジュース以外にもトマトピューレー、トマトケチャップ、トマトソース、ホールトマトなどのトマト加工食品に関しても分析を行ったので報告する予定である。

tomato, caffeoyl glucoside, caffeoylquinic acid

発表番号：2E022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *Lactobacillus brevis* SBC8803(SBL88)によるセロトニン分泌促進効果に関する研究

Study on stimulating effect of serotonin secretion by *Lactobacillus brevis* SBC8803(SBL88)

○寺島 健仁、田端 佐和子、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東京農大院・食品）
○Takehito Terajima, Sawako Tabata, Kouichi Sugaya, Junichi Onose, Naoki Abe (Dept. of Nutr. sci , Tokyo Univ. of Agri.)

[目的]乳酸菌は植物や動物と共生しており自然界に広く存在し、発酵食品を中心とした食品中にも存在しており、また、生体内ではいわゆる善玉菌として働いている。乳酸菌のもたらす効果は広く知られており、免疫力の向上や腸内細菌叢の改善など、人々の健康維持・増進に関係し、また、その安全性の高さ、さらに発酵食品への応用などの観点から食品・医薬品業界から非常に注目される存在である。これまでに、ビール原料の大麦に由来する植物性乳酸菌の一種である *Lactobacillus brevis* SBC8803(以下、SBL88)の加熱菌体にストレス性の睡眠障害改善効果があることが、また、胃迷走神経遠心枝の活動及び腸迷走神経求心枝の活動を亢進していることも報告されている[1)]。さらに、SBL88 が腸クロム親和性細胞(EC 細胞)などからのセロトニン分泌を促進していることも明らかとなり[2)]、これら作用にセロトニン受容体 3 が関与することが示唆された。以上の報告から、SBL88 は腸内でのセロトニン分泌を引き起こし、自律神経を介してストレス性の睡眠障害改善などの効果を発揮すると考えられる。しかし、SBL88 加熱菌体中のセロトニン分泌促進作用を有する物質は明らかとなっていない。本研究では SBL88 加熱菌体中に含まれるセロトニン分泌促進物質の探索を目的とした。

[方法・結果]SBL88 を含む数種の乳酸菌加熱菌体の水抽出物を調製し、水抽出物を EC 細胞のモデルである RIN-14B 細胞を用いたセロトニン分泌活性試験に供したところ、セロトニン分泌活性は SBL88 に特有の効果であることが示唆された。続いて、各菌体の水抽出物を HPLC 及び LC/MS を用いて分析を行ったところ、SBL88 に UV 吸収を持つ主要な 2 つのピークが検出された。SBL88 加熱菌体の水抽出物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで分画し、分取用 HPLC にて精製・単離した。MSMS 分析、$^{1}$H-NMR 分析、$^{13}$C-NMR 分析を行ったところ、これらはヌクレオシドである adenosine 及び guanosine と同定した。さらに、セロトニン分泌活性試験に供したところ、adenosine は活性を示し、guanosine は活性を示さなかった。また、HPLC を用いて SBL88 加熱菌体中の adenosine 含量を測定したところ、加熱菌体 1 g あたり 3.5 mg 含有されていることが明らかとなった。

1) Y Horii et al. *Neuroscience Letters* **539**, 32-37(2013)
2) Y Nakakita et al. *Food and Nutrition Sciences* **4**, 767-771(2013)

*Lactobacillus brevis* SBC8803, serotonin, adenosine

発表責任者：阿部尚樹（abe@nodai.ac.jp）

発表番号：2E023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 果汁飲料の品質劣化に対する新規抗酸化製剤の作用

# Effect of Antioxidative Formulation against Quality Degradation of Fruit Juice

○門脇 章夫、大久保 茉見、檜山 真一郎、大久保 泰宏（太陽化学株式会社）
○Akio KADOWAKI, Mami OKUBO, Shinichiro HIYAMA, Yasuhiro OKUBO (TAIYO KAGAKU Co. Ltd.)

【目的】飲食品の製造および販売の場面において、熱や光が食品にダメージを与え、食品の嗜好的品質や栄養価値の低下を引き起こすことが知られている。特に繊細な風味が特徴の食品が日光や蛍光灯の照射下にさらされる場合、機能性成分の減衰や、異臭の発生などの風味劣化が問題となる場合がある。このような食品の変化は、食品中に含まれる脂質やフレーバー成分の酸化劣化が原因の一つとなっている。我々はこれまでに、独自の乳化技術で脂溶性抗酸化素材と水溶性抗酸化素材を一剤化した抗酸化製剤（TS）を開発するとともに、乳化粒子径制御による効率的な抗酸化効果の発現を確認し、乳製品の光劣化やレトルト殺菌時の熱劣化に対する酸化防止効果を報告した [1-3]。本年度は果汁飲料の光劣化、熱劣化について分析を行い、果汁成分の劣化に対する TS の効果について検証を行った。

【方法】脂溶性抗酸化素材（トコフェロール、カロテノイド色素）、水溶性抗酸化素材（茶抽出物、酵素処理ルチン）を一剤化し、乳化粒子径を微細に制御した TS（平均粒子径：0.1 μm）、および通常乳化品（平均粒子径：0.5 μm）を調製した。それぞれ各種果汁飲料に添加し、蛍光灯照射あるいは 37℃保存による虐待試験を行った。各試料は、官能評価、および各種機器分析により劣化物の測定を行った。

【結果】リンゴ果汁飲料に対する試験では、試料から揮発性成分を抽出、GC/MS で劣化物質を分析した。その結果、光照射時の劣化臭原因物質として、1-octen-3-one を確認した。光照射前に TS をリンゴ果汁飲料に添加したところ、これら劣化臭原因物質の生成は有意に減少した。また、官能評価においても通常乳化品と比較し、TS 添加区で高い劣化防止効果が認められた。同様に、オレンジ果汁飲料やブドウ果汁飲料においても、果汁色素やフレーバーなど果汁成分に対する劣化防止効果が認められた。また、通常乳化品は果汁ポリフェノールによる乳化破壊の影響を受け、経時的に濁りを生じたのに対し、TS は果汁ポリフェノールに対する安定性に優れることを確認した。

1） 日本農芸化学会 2013 年度大会 要旨集 2A16p20
2） 日本農芸化学会 2014 年度大会 要旨集 2B03p03
3） 日本農芸化学会 2015 年度大会 要旨集 2F26a02

antioxidant, emulsion, fruit

発表番号：2E024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 泡盛もろみ中から分離した乳酸菌を用いた泡盛醸造

# Brewing Awamori to use lactic acid bacteria isolated from Awamori mash

○新川 翔也[1]、宮平 勝人[2]、宮城 誠[1]、池松 真也[1]、玉城 康智[1]([1]沖縄工業高等専門学校、[2]北大大学院環境科学院)
○SHOYA ARAKAWA[1], MASATO MIYAHIRA[2], MAKOTO MIYAGI[1], SHINYA IKEMATSU[1], YASUTOMO TAMAKI[1] ([1]NIT, Okinawa College, [2]Grad. Sch. Environ. Sci. Hokkaido Univ.)

**【背景・目的】**

泡盛製造における、もろみの発酵工程では、麹菌や酵母以外にも乳酸菌など様々な微生物が関与しており、その菌叢の違いは泡盛酒質に大きな影響を与えると考えられている。しかし、麹菌と酵母以外の微生物が泡盛酒質に及ぼす影響について、その詳細は明らかにされていない。

一方、泡盛は熟成工程により「古酒化」し、その特徴的な香気成分の一つにバニリンが知られている。先行研究において、バニリンの前駆体である 4-ビニルグアヤコール（4-VG）を高い効率で変換する乳酸菌株（4-VG 変換乳酸菌）が単離されたことから、もろみ中の乳酸菌が泡盛酒質に影響を与えていることが示唆された。

本研究では､泡盛もろみから単離された 4-VG 変換乳酸菌を実際に使用して泡盛醸造を行い､｢高 4-VG 泡盛」を醸造し、この泡盛を熟成させることにより「高バニリン泡盛」の醸造を試みた。さらに、4-VG 変換乳酸菌が泡盛酒質に及ぼす影響を特に香気成分に着目し評価した。

**【実験方法】**

乳酸菌はアルコール耐性が低いため、酵母を 1 日ずつ最長 3 日まで遅らせて添加した場合について酒質の検討を行った。さらに、酵母添加の遅れによる泡盛酒質への影響を考慮し、乳酸菌を添加せずに酵母の添加を 1 日ずつ遅らせた場合についても同時に検討を行った。もろみ成分と蒸留後の泡盛の評価項目として、バニリンとその前駆体である 4-VG およびフェルラ酸、低沸点香気成分、アルコール濃度と有機酸を定量した。

**【結果・考察】**

バニリンの前駆体となる 4-VG は、酵母の添加遅れおよび乳酸菌の添加により 4-VG 含有量が最大で約 4 倍高くなる傾向が確認された。このことから、4-VG 変換乳酸菌を用いた泡盛醸造は十分可能なことが分かった。4-VG は熟成中の酸化によってバニリンへと変化するため、高 4-VG 泡盛を一定期間熟成させることで、本研究の目的である高バニリン含有の泡盛を製造することができると考えた。

Awamori, lactic acid bacteria, vanillin

発表責任者：玉城康智（tamaki@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：2E025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LC-MS による光照射柑橘果汁飲料の網羅的分析

# global analysis of citrus beverage exposed to light using LC-MS

○大木 伽耶子、隅谷 栄伸（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Kayako OGI, Hidenobu SUMITANI (TOYO INSTITUTE OF FOOD AND TECHNOLOGY)

【目的】

食品は温度、酸素、光といった外的要因により品質が変化する恐れがある。総合的な品質評価に色調測定や官能試験が用いられるが、個々の成分の変動を把握することができない。そこで、食品成分の変動を調べる手法として、ノンターゲット網羅的成分分析法が有用と考えている。

コンビニエンスストア等の 24 時間営業により、透明容器詰め食品が光に長期間晒される傾向にある。各種果汁飲料製品は長期間光照射により褐変や退色が生じる場合があり、成分が変化しているが、色調測定や官能試験ではそれらの挙動を明らかにできない。本研究は LC-MS 網羅的成分分析法を用いて、光照射が柑橘果汁飲料製品中の内容成分に及ぼす影響を調べた結果を報告する。

【方法】

試料として市販の PET ボトル詰め 100％柑橘果汁飲料を用い、25℃の暗所と明所（約 4,000Lx）で、4 週間まで保存し各経時でサンプリングした。分析に供するまで 4℃暗所に保存した。それらを LC-MS（三連四重極型）分析して得られたベースピークイオンクロマトグラムを多変量解析ソフト Pirouette（Infometrix 製）で主成分分析し変動成分を抽出した。LC-qTOFMS（四重極-飛行時間型）分析により得た精密質量から変動成分の組成式を推定するとともに、物質同定のため各種分析を行った。

【結果】

試料を LC-MS 分析し、そのクロマトグラムを主成分分析した結果、Scores より明所と暗所で明確に区分され、Loadings により変動する 2 成分を発見した。光照射により変動する成分のうち、一つの化合物（成分 B）は元々果汁に存在する成分で経時的に減少する。もう一方の化合物（成分 A）は生成・増加していた。LC-qTOFMS 分析により、両成分の組成式が共に $C_{14}H_{20}N_2O_3$ で構造異性の関係にあると予想された。化学物質データベースや文献から推察された Feruloylputrescine（以下、FP と称す）を LC-MS および LC-MS/MS 測定した結果、成分 B と一致した。更に FP（70％EtOH 溶液）を光照射した結果、予想通り成分 A の生成を確認でき、成分 B が FP であるとの確証が得られた。現在、成分 A の単離・同定を進めている。

global analysis, light exposure, citrus beverage

発表番号：2E026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 登熟温度が米胚乳酵素活性量に及ぼす影響

# Ripening temperature affects rice endosperm enzyme activity

○風見 真千子[1]、辻井 良政[1]、後藤 元[2]、浅野目 謙之[2]、高野 克己[1]([1]東京農大応生、[2]山形県農総研)
○Machiko KAZAMI[1], Yoshimasa TSUJII[1], Hajime GOTO[2], Noriyuki ASANOME[2], Katsumi TAKANO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

【目的】

近年、米の生産現場では登熟温度の高温化が問題となり、高温登熟による白未熟粒が増加し、2010 年には全国的に 1 等米比率が大きく低下した。登熟温度は米の外観品質のみならず、米飯食味の評価に関する理化学的特性値のタンパク質含量、アミロース含量およびアミロペクチンの鎖長分布などに影響を及ぼすことが知られている。しかし、米飯食味、米胚乳酵素活性量および登熟温度の関係性についてはこれまで検証が行われていない。そこで、登熟温度が米胚乳酵素活性量および食味官能値に及ぼす影響について解析することを目的として以下の研究を行った。

【方法】

試料は 2009 年から 2013 年に生産された産地特定が可能な玄米サンプル 139 点を用いた。登熟時の気象情報は、国土交通省気象庁の「過去の気象データ検索」より、各地点の 8 月の平均気温を利用した。食味官能試験は、「はえぬき」を基準米として用い、試験は山形県農業総合センターのパネル 20～30 人で行った。米胚乳酵素活性の測定は、α-およびβ-アミラーゼ、α-グルコシダーゼなど 8 種類の酵素について行い、得られた各酵素活性量を変数として、統計解析ソフト Pirouette（シーエルサイエンス社）を用いてケモメトリックス解析を行った。

【結果】

玄米サンプル 139 点を解析した結果、米胚乳中の酵素活性量の変動係数（標準偏差/平均値）は、0.466（β-ガラクトシダーゼ）～0.174(β-グルカナーゼ)となり登熟温度により各酵素活性量に差異があった。登熟温度と米胚乳中の酵素活性量との間にはα-アミラーゼ（r=-0.749）、β-アミラーゼ（r=-0.519）およびα-グルコシダーゼ（r=-0.730）と負の相関（$p<0.05$）が得られた。β-グルカナーゼ、α-マンノシダーゼおよびβ-キシラナーゼに関しても負の相関の傾向がみられた。すなわち、登熟温度が低いと米胚乳中の酵素活性量が大きいということが示唆された。各試験年に実施した食味官能値の総合値と米胚乳酵素活性量間には、α-アミラーゼ（r=0.392～0.535）と 4 ヵ年で正の相関がみられ（$p<0.05$）、次いでα-マンノシダーゼ（r=0.162～0.542）およびβ-グルカナーゼ（r=0.209～0.495）に正の相関関係がみられた。これらの結果、登熟温度は米胚乳酵素活性量の様相に影響を及ぼし、結果的に米の品質ひいては米飯食味に影響を及ぼすことが明らかになった。

Ripening temperature, Rice endosperm enzyme activity, Principal component analysis

発表番号：2E027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 糯蒸米の良食味評価に及ぼす糯精米の理化学的特性-2014 年産糯米の場合-

# Physical and chemical characteristics of the glutinous rice for the good steamed glutinous rice in Japan 2014

○守屋 実奈[1]、芥子 薫[2]、辻井 良政[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Mina MORIYA[1], Kaoru KESHI[2], Yoshimasa TSUJII[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】 我々は、粳米飯の食味の要因となる米の理化学特性を解明するため一連の研究を行っている。一方、糯米は餅としての加工されるため粒の状態で食する糯米飯「おこわ(蒸米)」の食味に関する解析は少なく、餅に対する加工特性から判断した性状が当てはまらないことが多い。「おこわ」は一般的に「硬く、粘りが強い物性」が良食味とされる。我々は、その物性について澱粉の糊化の状態だけでなく、タンパク質含量や蒸煮中の米胚乳の酵素作用および細胞壁の崩壊が影響することを報告している。今回は 2014 年産のモチ米を調査対象として、その蒸米特性や食味の違いを調べた。

【試料および方法】 2014 年産の風の子もち、きたゆきもち、きぬのはだ、こがねもち、滋賀羽二重糯、たつこもち、ときめきもち、はくちょうもち、ヒメノモチ、ヒヨクモチ、まんげつもち、みやこがねもち、もちみのり、およびわたぼうしの国産モチ米 14 品種、35 点の玄米を用い、精米歩留り 90±0.2%に搗精した後 4℃で保存し試験に供した。「おこわ」(蒸米)は、精白米を洗米し水に浸漬後、15 分蒸煮後、蒸煮後の水分含量が 52%なるよう調製し、さらに 10 分蒸煮した。食味官能試験は、選別、訓練を経た 8～10 人のパネルで行い、アルファ化糯米 (アルファー食品社製) の蒸米を基準とし、総合評価、主観的な粘りおよび硬さ、客観的な粘りおよび硬さ、粒感、甘味などの 7 つの項目を評価した。蒸米の物性は、テンシプレッサー(タケトモ電気社製)にて硬さ、粘り、付着性を測定した。

また、モチ精白米から常法にて酵素液を調製し、各合成基質を用いて 9 種類の糖質分解酵素およびプロテアーゼの活性量を求めた。

【結果】 食味官能試験の総合値および粘りで、ヒメノモチ(山形)の評価が最も高かった。硬さはまんげつもち(茨城/筑西)が最も高く、粒感はきたゆきもち(北海道/北見)の評価が最も高かった。食味官能試験の総合値を目的変数として、物性値、酵素活性量、タンパク質含量、登熟温度および糊化粘度特性値を変数とし PLS 解析を行った。その結果、回帰ベクトルのモデル係数について、食味を示す総合値を目的変数としたとき、タンパク質含量は 0.39、中心の粘りは 0.38、最低および最高粘度はそれぞれ 0.26 および 0.18、登熟温度は 0.08、β-キシラナーゼ活性量は-0.12、α-アミラーゼ活性量は-0.13 となり、タンパク質含量や登熟温度も食味評価に関与するとこと、酵素活性量は負の要因になる可能性が示唆された。

glutinous rice, cultivars characteristics, physical properties of steamed rice

発表番号：2E028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 網羅的解析手法を用いた製パン工程での低分子化合物の挙動解析

# Behaviour analysis of low molecular compounds in the Bread Making process with comprehensive analysis method.

○吉川 知宏[1]、辻井 良政[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2]（[1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]東京農大応生・食化技セ）
○Tomohiro YOSHIKAWA[1], Yoshimasa TSUJII[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[2]（[1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [3]Fac.Biosci.,FPC,Tokyo Univ.Agric）

## 【背景・目的】

製パンでは、小麦粉と副原料が混合、混捏され、小麦粉内在酵素の作用や酵母による発酵、焼成時における加熱の影響など、多くの物理化学変化を受ける。この過程中で化合物の構造や量的変化はパンの風味に大きな影響を及ぼすことが考えられる。そこで本研究では、製パン工程での糖、アミノ酸、有機酸など化合物の変化を GC/MS を用いた網羅的解析手法にて定性された化合物から製パン工程中の様相を検討することを目的とした。

## 【方法】

試料として市販強力粉である「カメリア」（日清製粉社）を用い、糖質や脂質を用いないフランスパン様の配合で製パンし、小麦粉、発酵前後の生地、クラム、クラストを試料とした。各試料から含水メタノールにて抽出、乾固後、TMS-オキシム誘導化した。内部標準物質としてラムノース添加して抽出し、乾固時にリビトールを加えた。GC は 7890B、MS は 5977（いずれもアジレント・テクノロジー社）、カラムは Inert Cap 5MS/NP（GL サイエンス社）を用いて分析を行った。データの解析は、Metalign(Lommen, 2009)にてクロマトグラムと MS スペクトルのアライメント処理を行い、AIoutput2(Yuji Tsugawa, RIKEN)を用いて 561 化合物ライブラリー(GL サイエンス社)と照合した。定性された化合物を変数とし、統計解析ソフト Pirouette(GL サイエンス社)を用いてケモメトリックス解析を行った。

## 【結果】

製パンの各工程で共通に定性された化合物は、糖 8 種、アミノ酸 14 種、有機酸 7 種および糖アルコール 3 種であった。これらの化合物を変数として主成分分析を行った結果、各工程における低分子化合物の挙動には様相に違いがみられた。小麦生地を混捏することによりマルトースが増加し、その後の発酵工程で減少し、焼成によって再度増加した。また、グルタミン酸をはじめとした主要なアミノ酸は生地混捏によって増加し、発酵で減少したが焼成過程での増加はみられなかった。クラムに比べクラストの糖やアミノ酸が少ない傾向を示した。

GC-MS, Metabolomics, Bread

発表責任者：吉川知宏（44415025@nodai.ac.jp）

発表番号：2E029
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米飯食味に関わる低分子化合物の解析

# Analysis of low-molecular weight compounds related to tastes of cooked rice

○三木 崇広[1]、辻井 良政[2]、飯島 健[3]、堀 清純[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]生物研)
○ Takahiro Miki[1], Yoshimasa Tsujii[2], Ken Iijima[3], Kiyosumi Hori[3], Katsumi Takano[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric, [3]National Institute of Agrobiological Sciences)

【目的】 日本晴は昭和初期に日本で最も多く作付されていた品種である。極良食味品種であるコシヒカリの誕生以降、日本晴からコシヒカリへ主要な生産品種は移り変わった。コシヒカリは日本晴と比べアミロース含量は少なく、柔らかく、また粘りがある米飯となるのが特徴である。このコシヒカリの良食味に関わる遺伝子をみつけるため、コシヒカリと日本晴との交雑体に日本晴の戻し交雑を行った置換系統(NSL)およびコシヒカリの戻し交雑を行った置換系統(KSL)を作出した。食味官能試験によって、食味評価が日本晴よりも向上した NSL、コシヒカリよりも同評価が低下した KSL のアミロース含量を調べたところ、NSL は日本晴、KSL はコシヒカリと大きく変化していなかった。そこで、アミロース含量以外で食味に影響する要因について検討することを目的とした。今回は低分子化合物の網羅的解析より、米飯の食味に関与する要因について、若干の知見が得られたので報告する。
【試料および方法】 2014 年に茨城県つくば市で栽培し成熟期に収穫された日本晴、コシヒカリ、NSL3 種および KSL5 種を試料とした。これらの精白米を用いて、食味官能試験、見かけのアミロース含量およびタンパク質含量を測定した。また、炊飯米に含まれる低分子化合物を GC/MS (GC:7890B, MS:7693 アジレントテクノロジー社製)を用いた網羅的解析を行い、食味官能試験の味値との関係性を検討した。
【結果】官能試験による味値では日本晴は-1.06、コシヒカリは-0.02 を示したが、NSL は-0.58～-0.40、KSL は-0.39~-0.11 を示した。見かけのアミロース含量測定では、日本晴は 19.72%、コシヒカリは 15.76%を示し、大きな違いがみられたが、NSL では日本晴、KSL ではコシヒカリと約 1%程度の変動と大きな違いは確認されなかった。タンパク質含量においては、どの試料においても 5.31～5.90 の間の値を示し、タンパク質含量に関しても大きな変動はみられなかった。これらのことから、アミロース、タンパク質含量以外の要因が食味に影響を及ぼしている可能性が示唆された。GC/MS では、30 種の低分子化合物が定性され、糖類、アミノ酸類および有機酸類が、それぞれ 13、6 および 7 種検出された。これらの定性結果を変数とした主成分分析の第 1 および 2 主成分のスコア分布において、食味の変化がみられた NSL および KSL 共に日本晴とコシヒカリの間に分布し、NSL はコシヒカリ、KSL は日本晴の特性に近づいていることが確認された。これら低分子化合物の含量の変化と良食味との関係性について、解析を進めている。

Koshihikari, GC/MS, low molecular weight compound

発表番号：2E030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 茶飲料における天然吸着剤のカフェイン吸着特性解析

# Analysis of Caffeine Adsorption Properties of Natural Adsorbent in Tea Beverages

○河合 淳一郎[1]、山本 研一朗[1]、今田 七洋[1]、四元 祐子[1]、西田 武央[2]、松尾 諒[2]、岡 宏匡[2]、横山 寛行[2]、塩野 貴史[1]([1]キリン（株）飲料技術研究所、[2]キリンビバレッジ（株）商品開発研究所)
○Junichiro KAWAI[1], Kenichiro YAMAMOTO[1], Nanami IMADA[1], Yuko YOTSUMOTO[1], Takehisa NISHIDA[2], Ryo MATSUO[2], Hiromasa OKA[2], Hiroyuki YOKOYAMA[2], Takashi SHIONO[1] ([1]Kirin Company, [2]Kirin Beverage Company)

【目的】

緑茶や紅茶、コーヒーなどの嗜好飲料にはカフェインが含まれており、これらの嗜好飲料ユーザーは日常的にカフェインを摂取している。一方で、厚生労働省から発信された「健康づくりのための睡眠指針 2014」などで、特定の飲用シーンや体質・体調に応じてカフェイン摂取を控えることが推奨されており、低カフェインでありながら良好な香味が維持された飲料が求められている。本研究では、茶抽出液中のカフェイン吸着特性について解析し、茶飲料中のカフェイン除去における天然吸着剤（活性炭やモンモリロナイト）の有効性を評価した。

【方法】

試験液としてカフェイン溶液および緑茶抽出液を用い、活性炭あるいはモンモリロナイトを添加し、接触前後のカフェインおよびカテキン類濃度を測定した。得られた結果より、カフェイン吸着等温線を作成し、吸着剤による吸着特性の違いを解析した。また、モンモリロナイトについて茶抽出液との接触時の温度および pH を変化させ、接触条件がカフェイン吸着特性に及ぼす影響を評価した。さらに、紅茶および烏龍茶においてもカフェイン吸着等温線を作成し、茶種の違いがモンモリロナイトのカフェイン吸着特性に及ぼす影響についても解析した。

【結果および考察】

活性炭処理では緑茶抽出液中のカフェインだけでなく、カテキン類も同時に低減した。それに対し、モンモリロナイト処理ではカフェインは低減したが、カテキン類はほとんど低減しなかった。特に、高いカフェイン除去率で差は顕著で、カフェイン除去率が 96.5%のとき、活性炭処理ではカテキン類残存率が 46.4%に低減したのに対し、モンモリロナイト処理ではカテキン類残存率は 93.3%と維持されていた。したがって、モンモリロナイトは活性炭に比べてカテキン類を吸着しにくく、緑茶中のカフェインを選択的に吸着すると考えられた。また、モンモリロナイトによるカフェイン吸着能は、接触温度 5～35℃、接触 pH4～8 の範囲ではカフェイン吸着能が概ね一定であったことから、カフェイン除去は接触条件に対して比較的安定であると推察された。さらに、紅茶および烏龍茶においても、モンモリロナイトによるカフェイン吸着は緑茶と同様に観察されたことから、幅広い茶飲料のカフェイン除去に活用できるものと期待される。

caffeine, montmorillonite, tea

発表責任者：塩野貴史（takashi_shiono@kirin.co.jp）

発表番号：2E031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 天然吸着剤の改質処理が低カフェイン茶飲料の品質に及ぼす影響

# Effects of Modification Treatment of Natural Adsorbent on Quality of Decaffeinated Tea Beverage

○山本 研一朗、四元 祐子、塩野 貴史（キリン（株）飲料技術研究所）
○KENICHIRO YAMAMOTO, YUKO YOTSUMOTO, TAKASHI SHIONO (Kirin Company)

【目的】

天然吸着剤であるモンモリロナイトは、シリカやアルミナを主成分とした層状構造を有しており、各種カチオンと層間イオンとのイオン置換処理や焼成処理によって、構造や吸着特性が変化することが報告されている。これまでに我々は、モンモリロナイトが茶飲料において選択的にカフェインを吸着することを報告している。本研究では、主にイオン置換処理によるモンモリロナイトの改質がカフェイン吸着や茶飲料の品質に及ぼす影響について検討した。

【方法】

モンモリロナイトの改質処理として、イオン置換処理を実施した。モンモリロナイトに各種カチオン（K、Ca、Mg、$NH_4$）溶液を接触させ、遠心分離によってペレットを回収し、洗浄、乾燥、粉砕をして粉末状のイオン置換モンモリロナイトを調製した。得られたイオン置換モンモリロナイトを茶抽出液に添加して接触後、固液分離して茶飲料を調製した。この茶飲料について、カフェイン、金属イオン、シュウ酸イオン濃度および濁度を測定し、改質処理がモンモリロナイトのカフェイン吸着特性および処理後の茶飲料の品質に及ぼす影響を評価した。

【結果および考察】

モンモリロナイト処理した茶飲料は、カフェインが低減していたが、保存中に濁度が上昇した。この濁りを遠心分離によって回収し、FT-IR 分析に供したところ、シュウ酸 Ca の結晶が検出された。また、Ca 置換モンモリロナイトでは処理後の茶飲料の濁度が顕著に上昇したことからも、モンモリロナイト由来の Ca イオンと茶由来のシュウ酸イオンによるシュウ酸 Ca 結晶が析出することで濁度が上昇したと考えられた。これに対して、K、Mg および $NH_4$ 置換モンモリロナイトでは処理後の茶飲料の濁度上昇は認められなかったことから、モンモリロナイトの層間イオンの置換によって処理後の茶飲料におけるシュウ酸 Ca の析出が抑制されたと考えられた。また、これらのイオン置換モンモリロナイトでは、カフェイン吸着能の変化は認められなかったことから、モンモリロナイトのイオン置換による改質処理によってカフェイン吸着と茶飲料の外観品質は両立が可能であることも示唆された。現在、その他の改質処理として焼成処理がモンモリロナイトのカフェイン吸着特性および処理後の茶飲料の品質に及ぼす影響についても評価している。

caffeine, montmorillonite, ion exchange

発表責任者：塩野貴史（takashi_shiono@kirin.co.jp）

発表番号：2E032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コーヒーにおける天然吸着剤のカフェイン吸着特性解析

# Analysis of Caffeine Adsorption Properties of Natural Adsorbent in Coffee

○塩野 貴史、山本 研一朗、四元 祐子（キリン（株）飲料技術研究所）
○Takashi SHIONO, Kenichiro YAMAMOTO, Yuko YOTSUMOTO (Kirin Company)

【目的】

カフェインが含まれるコーヒーや茶などの嗜好飲料では、低カフェインでありながら良好な香味を維持するために、選択的なカフェイン除去技術の開発が望まれている。これまでに我々は、茶飲料における選択的なカフェイン除去において、天然吸着剤である活性炭およびモンモリロナイトの吸着特性について解析してきた。本研究では、コーヒー中のカフェイン除去における天然吸着剤（活性炭やモンモリロナイト）のカフェイン吸着特性について解析し、その有効性を評価した。

【方法】

試験液としてカフェイン溶液およびコーヒー抽出液（アラビカ種コーヒー豆使用）を用い、活性炭あるいはモンモリロナイトを添加し、接触前後のカフェイン濃度を測定した。得られた結果より、吸着剤の単位重量当たりのカフェイン吸着量を算出し、カフェイン吸着等温線を作成し、コーヒー抽出液におけるカフェイン吸着特性を解析した。さらに、モンモリロナイトについて、産地および品種の異なるコーヒー豆においてもコーヒー抽出液におけるカフェイン吸着等温線を作成し、コーヒー豆の違いがカフェイン吸着特性に及ぼす影響を解析した。

【結果および考察】

活性炭処理およびモンモリロナイト処理によって、コーヒー抽出液のカフェインが低減した。カフェイン溶液とコーヒー抽出液におけるカフェイン吸着等温線を比較したところ、活性炭処理ではコーヒー抽出液におけるカフェイン吸着量が顕著に低下したのに対し、モンモリロナイト処理ではカフェイン吸着量の僅かな低下に留まっていたことから、コーヒー抽出液中のカフェイン吸着において、モンモリロナイトは活性炭に比べて選択性が高いことが示唆された。また、活性炭およびモンモリロナイトによるカフェイン吸着は、単分子層吸着モデルである Langmuir の吸着等温式によって近似できることから、吸着サイトによる吸着であると推察された。さらに、コーヒー抽出液におけるモンモリロナイトのカフェイン吸着等温線は、コーヒー豆の産地や品種に依らず同様であったことから、モンモリロナイトによるカフェイン吸着は、コーヒーにおけるカフェイン除去技術としても幅広く活用できるものと期待される。

caffeine, montmorillonite, coffee

発表責任者：塩野貴史（takashi_shiono@kirin.co.jp）

発表番号：2E033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Encapsulation of flavor in yeasts by spray drying

○ Afroza SULTANA[1,2], Ayaka MIYAMOTO[1], Quynh Lan HY[1], Yusuke TANAKA[3], Yoshiya FUSHIMI[3], Hidefumi YOSHII[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Chittagong Veterinary and Animal Sciences Univ., [3]Fuji Foods Corp.)

【Purpose】 Flavor encapsulation is important to protect the volatility of flavors, increase the stability during processing and improve the handleability. Flavor encapsulation is done by physical, chemical and/or cell methods. By using cell such as yeast, flavor could be encapsulated inside lipid bilayer membrane. Yeast cells were recognized as suitable carrier in 1973. The lipid bilayer membrane of yeast cell acts as liposome during microencapsulation and stabilizes oil droplets inside the cell. β-glucans are complex, high molecular (100 – 200 kDa) polysaccharides and have wide range of applications in food production such as thickening agent, fat substitute, and emulsifier. But β-glucan extracted yeast can be used beneficially as it has food grade value, low cost and also can increase the permeation of flavor during encapsulation. The encapsulation of *d*-limonene and ethyl hexanoate into yeast by spray drying was investigated. The study is focused on the effect of spray drying conditions on flavor retention.

【Materials and Methods】 Yeast cells, *Saccharomyces cerevisiae* (Fuji Foods Corporation, Yokohama, Japan) which was extracted β-glucan and drum-dried, were used as core material. *d*-Limonene and ethyl hexanoate were used as model flavor. Yeast cells were incubated with water and flavor by the incubator (BR-13UM, Taitec Co., Saitama, Japan) at 250 rpm shaking speed and 40ºC for 0-8 hr. Encapsulation was done by the Mini Spray Dryer B-290（Büchi, Nihon Büchi K.K., Japan）at various spray-drying conditions. Twenty mg of Spray-dried yeast cells and 300 μL of distilled water were mixed in the test tube and vortex-mixing for 10 min. Hexane with cyclohexanone as internal standard was added and vortexed for 30 min at room temperature. After the centrifugation at 3000 rpm for 10 min, the supernatant of hexane phase was used to measure the flavor content in yeast cells by using gas chromatography with a flame ionization detector (GC 14A, Shimazu, Kyoto, Japan). Scanning Electron Microscope, SEM（JSM 6060, JEOL Co. Ltd., Akishima, Japan）was used to observe the spray-dried yeast cells.

【Results and discussion】 Encapsulation efficiency (the retention) of *d*-limonene in yeast cells became the maximum value of *d*-limonene content for 4 h incubation at 40ºC. Encapsulation rate of *d*-limonene was about 0.63 $h^{-1}$. *d*-Limonene or ethyl hexanoate could be encapsulated in yeast cells by spray drying. The flavor contents in yeast cells were 0.17wt% for *d*-limonene and 0.23wt% for ethyl hexanoate respectively. Solid content and the weight ratio of flavor to yeast cells affected the encapsulation efficiency. The inlet air temperature did not affect the encapsulation efficiency. Spray-dried yeast cells were aggregated as bubble-shaped aggregates.

Yeast, Flavor, Encapsulation

発表責任者：Hidefumi YOSHII（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：2E034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Encapsulation of squalene oil by spray drying

○Asmaliza ABD GHANI[1,2], Keisuke MATSUMURA[3], Atsuki YAMAUCHI[3], Hirokazu SHIGA[4], Shuji ADACHI[5], Hidefumi YOSHII[1,3] ([1]Ehime Univ., [2]Univ. Sultan Zainal Abidin, [3]Kagawa Univ., [4]Kyoto Gakuen Univ., [5]Kyoto Univ.)

【Purpose】 Squalene oil (SQ) is a useful model compound for polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in fish oil as functional food because SQ has six unconjugated double bonds with trans geometry and could be analyzed using gas chromatography. Encapsulation of emulsified SQ by spray drying was investigated to improve the stability of PUFAs. Recently, emulsification technology has been progressed with the formation of small oil-droplets called nano-emulsion. Using a high-pressure homogenizer, spray-dried powders with nano oil droplets could be produced, but the effect of oil-droplet diameter on spray-dried powder stability remained unknown. In this study, effect of oil-droplet diameter and content of sodium caseinate as an emulsifier on stability were investigated in order to form stable emulsified SQ by spray drying.

【Materials and Methods】 Maltodextrin, (MD, Dextrose Equivalent (DE) =19) and sodium caseinate were used as wall material and emulsifier, respectively. These were solubilized with distilled water. SQ was added to the solution and formed solution with 40 wt% solid content. Emulsions were pre-mixed with a Polytron homogenizer for 3 min at 8000 rpm with 30 s intervals after every minute. The coarse emulsions were homogenized using a high-pressure homogenizer (LAB 2000; SMT, Tokyo, Japan) at 20 and 50 MPa and a Starburst Mini (HJP-25001K; Sugino, Uozu, Japan) to maintain pressure at 100 MPa for two cycles. SQ emulsions were spray dried in a pilot plant spray dryer (Ohkawara L-8; Ohkawara Kakohki Co., Ltd., Yokohama, Japan). Spray drying was as follows: atomizer speed, 30,000 rpm; emulsion flow rate, 25 mL/min; airflow rate, 110 kg/h; inlet temperature, maintained at 140°C; and outlet temperature, 80 to 90°C. To evaluate the stability of emulsified SQ in spray-dried powder, volatile compounds of the headspace gas in the incubated powder at 105 and 50ºC were measured with GC-MS using solid-phase microextraction method.

【Results and Discussion】Homogenization at 100, 50 and 20 MPa of SQ resulted in unimodal distribution of oil droplet diameter in powder. Volatile gases of oxidation compounds of SQ could be detected as the indication of SQ oxidation. Acetone, 3-butenal, and alphatic ketone were used as main target compounds. Stability of SQ in spray-dried powder was affeted with oil-droplet diameter and also with the content of sodium casinate. Increase of sodium caseinate in the powder decreased the formation of those volatile compounds.

squalene, stability, sodium caseinate

発表責任者：Hidefumi YOSHII（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：2E035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 海洋性発光細菌を利用した防ばい剤のバイオアッセイ技術

# Bioassay technology of fungicide using the marine luminous bacteria

○長浜 千夏[1]、桑原 眸[1]、二宮 純子[1]、森田 洋[2]([1]北九大院国際環境工、[2]北九大国際環境工)
○Chinatsu NAGAHAMA[1], Hitomi KUWAHARA[1], Junko NINOMIYA[1], Hiroshi MORITA[2] ([1]Grad Sch Univ. Kitakyushu, [2]Univ. Kitakyushu)

〔目的〕
海洋性発光細菌は自然界に広く分布し、海水中や特定の魚介類の体表や腸管内などに生息し、自然界に広く分布している。海洋性発光バクテリアである *Allivibrio fischeri* は海洋性のグラム陰性桿菌であり、490nm 付近に極大を示す青緑色の光を発する。その発光量の変化を利用して毒性物質等の存在を検出するセンサーとしての研究が進められているが、毒性物質の検出限界が比較的高濃度にある点などの問題があり、発光の増強と安定化が求められている。本研究では、蚕繭由来のタンパク質であるフィブロインを使って作成した膜をコンディショニングフィルムとして利用することを考え、*A. fischeri* の膜への固定化及び、発光の安定化を試みた。さらに、防ばい剤として利用されている食品添加物（チアベンダゾール及びイマザリル）が海洋性発光細菌の消光反応を引き起こすのか検討することを目的とした。
〔方法〕
蚕繭から得られたフィブロイン溶液にグリセロール（終濃度 0.2 % ）を添加し 30 ℃ 、70 % RH の条件下で乾燥させることにより、不溶化フィブロイン膜を作製した。供試菌である *Allivibrio fischeri* ATCC 7744 は、温度 26 ℃ 、70 rpm で 16 時間振とう培養後、不溶化フィブロイン膜に固定を行った。作成したフィブロインチューブに異なる濃度の毒性物質（今回は食品添加物（防ばい剤）として利用されているチアベンダゾールとイマザリルを毒性物質として選定）を接触させ、発光量の測定を行った。また、同様の方法で *A. fischeri* を固定化させたガラスチューブも毒性物質を接触させ、フィブロインチューブとの発光量の比較を行った。
〔結果〕
*A. fischeri* を固定化させたフィブロインチューブはガラスチューブに固定化させたものに比べ、倍以上の高い発光量を示したことから、フィブロイン膜はコンディショニングフィルムとして有用であるという結果が得られた。また毒性試験の対象として選定したイマザリルは食品添加物として利用できる濃度が 5 ppm と定められている。本研究結果では接触 15 分でイマザリルの濃度が食品添加物の基準値以下である 1 ppm で相対発光量 50 % 以上を示し、基準値を超える 10 ppm 以上の濃度では相対発光量 50 % 以下を示したことから *A. fischeri* は防ばい剤として使用されている食品添加物のバイオセンサーとしての可能性が示唆された。

*Allivibrio fischeri*, TBZ, IMZ

発表番号：2E036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 脂肪酸塩の *Cladosporium cladosporioides* と *Dermatophagoides farinae* に対する抑制効果
# Inhibitory effects of fatty acid salts against *Cladosporium cladosporioide*s and *Dermatophagoides farinae*

○奥野 結衣[1]、惠良 真理子[1]、川原 貴佳[2]、完山 陽秀[2]、森田 洋[3]（[1]北九大院国際環境工、[2]シャボン玉石けん（株）、[3]北九大国際環境工）
○ Yui OKUNO[1], Mariko ERA[1], Takayoshi KAWAHARA[2], Takahide KANYAMA[2], Hiroshi MORITA[3] ([1]Grad. Sch. Univ. Kitakyushu, [2]Shabondama Soap Co., Ltd., [3]Univ. Kitakyushu)

【目的】

*Cladosporium cladosporioides* は、室内で最もよく見られるカビであり、住環境や食品の汚染・劣化を引き起こす。*Dermatophagoides farinae* は、室内の主要ダニアレルゲンであり、室内で発生するダニの中で最も問題となっている。本研究では、石けんの主成分であり、近年細菌類に対する抗菌効果が報告されている脂肪酸塩に着目し、*C. cladosporioides* に対する抗カビ効果と *D. farinae* に対する殺ダニ効果の検討を行った。

【方法】

抗カビ試験は、検定菌として *C. cladosporioides* NBRC 30314 を選定した。胞子懸濁液（約 3.0×$10^4$ spores/mL）400 μL と脂肪酸塩（終濃度：175 mM）400 μL を加えた後、ツインミキサーでかく拌を行いながら、10・60・180 分接触後にサンプリングを行い、PDA 培地上に 100 μL 塗布し、30 ℃で 10 日間培養を行った。結果は寒天培地上に現れたコロニー数を計測することで、残存生菌数を算出した。殺ダニ試験は、*D. farina* の雌成虫（20 匹）に脂肪酸塩（175 mM）を 1 匹ずつ 2 μL 滴下し、1 分間後にろ紙に筆を用いて移した。ろ紙は二つ折りにして、二方をクリップで留めて固定した。これらを 25 ℃、65 %RH の条件下で保存し、48 時間後に致死判定を行った。

【結果】

9 種類の炭素鎖の異なる脂肪酸カリウムを用いて抗カビ試験を行った結果、C10K、C12K、C14K は *C. cladosporioides* に対して接触 10 分で 4 オーダー（99.99 %）の高い抗カビ効果を示した。MIC（最小生育阻止濃度）測定を行うと、C12K が 0.7 mM と最も低濃度で菌の発育を阻止した。

一方、殺ダニ試験では、いずれの脂肪酸塩においても *D. farinae* に対して全く殺ダニ効果を示さず、処理から 48 時間経過した後も活発な動きが観察された。

これらの結果より、脂肪酸塩は *C. cladosporioides* に対して高い抗カビ効果を有することが明らかとなり、脂肪酸塩の防かび剤としての利用可能性が広がった。

Fatty acid salt, Antifungal effect, Acaricidal effect

発表番号：2E037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小麦粉・米粉混成パン生地における米タンパク質のグルテン形成に及ぼす影響

# Influence of the rice seed protein to give to the gluten-formation in the wheat, rice flour combined dough.

○北村 奈生子[1]、喜村 美穂[1]、佐生 愛[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2]（[1]京府大・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ）
○ Naoko KITAMURA[1], Miho KIMURA[1], Ai SASOU[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Prefectural Univ., Life Env. Sci, [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol. Cent., Biotechnol. Res. Dept.)

【背景・目的】

小麦粉・米粉混成パンは独特の食感や香りから、近年注目を集めているが、小麦粉 100%のパンに比べて膨張性や安定性が劣っている。この原因は、混成パンにおけるグルテン形成が米由来の貯蔵タンパク質によって阻害されるからだと考えられている。これまでの研究で、米の貯蔵タンパク質であるプロラミンはグルテン形成に関与せず、グルテリンあるいはグロブリンが関与することが示唆されていたが、その詳細は明らかになっていなかった。本研究では、タンパク質変異米（低グルテリン米、グロブリン欠損米など）を用いて、グルテリンおよびグロブリンがグルテン形成へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

実験材料には低グルテリン米の「春陽」、グロブリン欠損米の「増 13」、低グルテリンかつグロブリン欠損米の「ゆめふわり」、「こなだもん」、「中国糯 194 号」、コントロールとして「コシヒカリ」の米粉を用いた。小麦粉に米粉をそれぞれ 30%混ぜた粉で焼成試験を行い、膨張性を比較したところ、小麦粉 100%パンと「こなだもん」米粉入り混成パンでは有意差がなかった。「こなだもん」に次いで、「春陽」および「ゆめふわり」米粉入り混成パンで高い膨張性が見られた。「コシヒカリ」と「増 13」を用いた場合は有意に低い膨張性を示した。焼成前のパン生地を採取し、走査型電子顕微鏡、光学顕微鏡を用いて生地中のグルテン様構造体を観察した。その結果、低グルテリン品種の米粉を加えた場合、長いグルテン様構造体が観察された。グルテン様構造体の長さ、太さ、面積を数値化するため光学顕微鏡観察像を用いて画像解析を行った。その結果、低グルテリン品種の米粉を加えたパン生地において、グルテン様構造体の長さおよび面積が増大していた。さらに、グルテン形成を阻害している米の貯蔵タンパク質を特定するために、パン生地を用いた免疫蛍光顕微鏡観察を行ったので、その結果についても報告する。

glutenin, glutelin, globulin

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

発表番号：2E038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酒造原料米（11 種類）を対象としたプロテオーム解析

# proteomic analysis of rice seeds (11 varieties) for sake brewing

○北 和海[1]、森川 拓磨[1]、佐生 愛[1]、森田 重人[1,2]、渡部 邦彦[1]、増村 威宏[1,2]（[1]京府大生命環境、[2]京都農技セ 生資セ）
○ Kazuumi KITA[1], Takuma MORIKAWA[1], Ai SASOU[1], Shigeto MORITA[1,2], Kunihiko WATANABE[1], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Prefectural Univ. Life Env. Sci, [2]Kyoto Prefect. Agri. Forest. Fish. Technol. Cent., Biotechnol. Res. Dept.)

## 背景・目的

米は清酒の主原料の 1 つでありその重要性は認識されているが，清酒の製造時に米のタンパク質が過剰に含まれると，雑味の原因となる．そのため，清酒の製造時には外周部を削る精米という行程があり，米由来のタンパク質の含有量を減少させる手法がとられている．本研究では，清酒の主原料である米に着目し，品種や産地が異なる酒造好適米 6 種類，酒造原料米 5 種類を対象として，2 次元電気泳動法を用いて，タンパク質スポットの量的な変動を解析し，変動量の差が大きいタンパク質の同定を行うことを目的とした．

## 方法・結果

酒造好適米（6 種類），酒造原料米（5 種類）について玄米および 60%精白米（外周部を 40%削った米）を材料として，タンパク質を抽出した．抽出したタンパク質を 1 次元目に非平衡等電点電気泳動による分離を行い，2 次元目に SDS-PAGE による分離を行った．その結果，11 種類の試料において，グルテリン分子種の中で量的に大きな変動が観察される分子種を見出した．続いて，変動量が大きかったグルテリン分子種の同定を PMF 解析により行った．2 次元電気泳動後のタンパク質スポットを切り出し，脱色，還元アルキル化，トリプシン消化を行い，ペプチド断片化した．そのサンプルを MALDI-TOF-MS，MASCOT 解析によって，タンパク質の同定を行った．その結果，グルテリン分子種間で変動の大きいグループと差の少ないグループに分類することができた．また，同じ試験米を用いて醸造した清酒について，その酒粕からタンパク質を抽出し，2 次元電気泳動を行ったところ，酒粕には主にプロラミンが残存しており，清酒の製造時には，主にグルテリンが消化されることが明らかとなった.以上の結果より，原料米に含まれるグルテリン分子種に量的な差があり，その違いが清酒の成分へ影響する可能性があることが示唆された．

rice, glutelin, sake

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

発表番号：2E039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# キサンタンガム添加が液状食品のレトロネーザル香へ与える影響

# Effects of Xanthan gum of the retronasal aroma released from liquid foods

○武井 友里恵[1]、松宮 健太郎[1]、林 和寛[2]、杉山 真悟[2]、松村 康生[1]([1]京大院農、[2]味の素（株）食品研)
○ Yurie Takei[1], Kentaro Matsumiya[1], Kazuhiro Hayashi[2], Shingo Sugiyama[2], Yasuki Matsumura[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ajinomoto Co., Inc. Institute of food sciences & technologies)

**【背景と目的】**食品を咀嚼・嚥下すると、口腔内で食品から放散された香気性化合物が呼気流にのって鼻腔へ達し、香りとして受容される。この香りをレトロネーザル香といい、鼻孔から吸引されることによって感じられる香りとは区別される。レトロネーザル香には、香気成分の物理化学的特性のほか、食品中の様々な成分およびそれら成分によって形成される構造が影響を与えると考えられているが、これらの要因とレトロネーザル香の関係は未だ十分に明らかになっていない。本研究では、現在介護食品などにも広く用いられている増粘多糖類であるキサンタンガムを用いて、その添加が液状食品からの嚥下後香気放散に与える影響を調べることを目的とした。

**【材料と方法】** 増粘剤としてキサンタンガム（XG）を用いた。香気成分として、Hexanal, Octanal, Decanal, Linalool, 2-Methyl pyrazine, Ethyl benzoate, D(+)-Limonene の計 7 種を用いた。純水 100 mL に、1.5g の XG を溶解させ、XG 水溶液（1.5% w/v）を作製した。また、各香気成分を食品添加物グレードのプロピレングリコール（PG）に 100μL ずつ混合・溶解したものを調製し、それを純水および XG 水溶液で 1000 倍に希釈することにより、XG を 0 %もしくは 1.5% w/v 含む 100 ppm の香料溶液を調製した。この香料溶液を 5 mL 摂取した直後の呼吸 10 回分の鼻呼気を、陽子移動反応質量分析計（Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry；PTR-MS）を用いてリアルタイム分析を行った。$I_{max}$（最大強度）もしくは AUC（曲線下面積）、および放散曲線の回帰分析により、各香気成分の放散特性を比較した。

**【結果と考察】** 各香気成分の $I_{max}$ および AUC と *Log*P との間には、XG を含まないときに中程度の相関がみられたが、XG を 1.5%含むときには相関がみられなかったことから、XG 添加が香気放散特性に対して影響を与えると考えられた。また、XG 添加により最大強度および総放散量は低下する傾向にあり、特にアルデヒド類の化合物ではその傾向が顕著であった。このことから、XG には嚥下後の香気放散を抑制する効果があることが示唆された。さらに、嚥下直後の香気放散曲線の回帰分析により、各香気成分の香気放散初速度等を算出したところ、化合物によりキサンタンガム添加の影響が異なることが明らかになったことから、XG 添加が香気放散速度へ及ぼす影響は香気成分の物理化学的特性によって異なる可能性が示唆された。

retronasal aroma, xanthan gum, liquid foods

発表責任者：武井友里恵（takei.yurie.56w@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2E040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Espresso coffee の crema を構成する主成分は特定のペプチドではない

# Main component of espresso coffee crema is not a specific peptide

○有井 康博[1]、横山 晴菜[1]、山根 早紀子[1]、西澤 果穂[2] ([1]武庫女大、[2]武庫女大院)
○Yasuhiro Arii[1], Haruna Yokoyama[1], Sakiko Yamane[1], Kahn Nishizawa[2] ([1]Mukogawa Women's Univ., [2]Mukogawa Women's Univ. Graduate School)

【目的】Espresso coffee 愛好家の間では抽出時に液相表面に生じる泡相（crema）の出来が espresso coffee の抽出の良し悪しを決めると言われており、嗜好性飲料である espresso coffee における crema の食品学的価値は高い。しかし、crema の形成に関する分子レベルの研究はほとんど行われていない。その一因として、素人には安定した良質な crema の作製が難しく、実験室における再現性高い研究の実施が困難であることが挙げられる。また、espresso coffee はこれまでは地域性が高い飲料であったために、研究も特定の地域でしか行われてこなかった。我々は簡易で安定に良質な crema を作製できる方法を選定し、crema 研究を再現性高く世界中で実施可能にすることを目的に、本研究に取り組んだ。
【方法】Espresso coffee の抽出には Nespresso 社製の U を用いた。また、抽出カプセルは同社製の volluto（*arabica* 種）を選択した。自動抽出設定で 40 mL 抽出に設定し、タンクに蒸留水を入れて抽出した。抽出液を 50 mL あるいは 100 mL 容の錘型液量計に採取し、液相と crema の容量を測量し、抽出後の crema の割合を経時的に測定した。また、crema の強度を測定するために、3 g のグラニュー糖を crema に乗せ、グラニュー糖が crema 上から消えるまでの時間を測定した。Crema の有無による抽出後の液相の温度変化について調べることで、crema の役割の一つである液相の保温性を明らかにした。さらに crema の構成成分を調べるために、２種類のポリアクリルアミド電気泳動を試みた。
【結果と考察】抽出した espresso coffee の液相（33.2 ± 3.1 mL）と crema（14.6 ± 2.7 mL）の割合は、69.5 ± 6.5%および 30.5 ± 5.6%となり（$n = 29$）、crema の割合が全量の約 3 割であり、espresso における crema 量の基準（10%以上）を大きく上回ることが分かった。生じた crema は抽出後 40 分で半減し、その後ゆっくりと消失していった。グラニュー糖の crema 上の保持時間は全体にまんべんなく添加した時は 22.3 ± 6.4 秒、中央に添加した時は 13.8 ± 1.7 秒、縁に添加した時は 29.7 ± 4.0 秒となり（$n = 3$）、縁側の crema 高い強度を生み出すことが分かった。抽出直後の液相の温度は、crema の有無によって crema がない場合は 62.6 ± 2.8℃、ある場合は 67.3 ± 0.7℃となり、顕著な差が観られた（$p < 0.005$, $n = 5$）。抽出後の液部の温度変化の半減期は crema がある方（928 ± 54 秒）がない場合（763 ± 54 秒）よりも有意に長くなった（$p < 0.01$, $n = 5$）。液相と crema を濃縮してポリアクリルアミド電気泳動に供したが、いずれにもペプチド性の明確なバンドは観察されなかった。以上の結果から、本抽出方法は簡易で再現性が高く、良質な crema を生み出すことから、crema 研究の発展に有用であると考えられた。また、crema の構成主成分が特定のペプチドではない可能性が示唆された。

crema, espresso

発表責任者：有井康博（arii@mukogawa-u.ac.jp）

発表番号：2E041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品高分子溶液の粘度に与える NaCL の電気粘性効果

# Electroviscous effect of NaCL on viscosity of food macromolecules in water

○佐藤 之紀[1]、岩本 あやこ[2]、尾野 絵里奈[2]、七森 由麻[2]、宮脇 長人[3]([1]北見工大工、[2]県立広島大生命環、[3]石川県大生資環)
○Yukinori Sato[1], Ayako Iwamoto[2], Erina Ono[2], Yuma Nanamori[2], Osato Miyawaki[3] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Prefectural Univ. of Hiroshima, [3]Ishikawa Prefectural Univ.)

【目的】高分子水溶液構造は，共存する低分子の影響を受けている。そこで，高分子の無限希釈状態での極限粘度[η]および高濃度（2%，ただし，キサンタンガムの場合は 0.5%）での回転粘度に与える溶媒の電気粘性効果の比較を試みた。
【方法】ポリエチレングリコール(PEG35000)など高分子非電解質 4 種類，キサンタンガムなど高分子電解質 4 種類を 0.01-0.03 g/dL の各濃度の NaCL 水溶液（0.1M 以下）に溶解させた。キャノンフェンスケ粘度計（Shibata）で動粘度を調べ，精密密度計（DMA4500, Anton Paar）で密度を求めて，粘度（η）を算出した。さらに，Huggins の式を用いて，極限粘度[η]を求めた。一方，各高分子濃度が高い系での溶媒の電気粘性効果の追跡には，回転粘度計でずり速度 16.8 $s^{-1}$ での粘度（$\eta^a$）を用い（PEG35000 と DexT40 を除く），PEG35000 と DexT40 には動粘度と密度の積で求めた粘度を用いた。
【結果】溶媒の NaCL 濃度を高くすると，ペクチン(リンゴ由来)，ペクチン(シトラスフルーツ由来)，アルギン酸ナトリウム，キサンタンガムに示される高分子電解質の 25℃での[η]は減少した。これは，高分子上のネットチャージが減少したことを意味している。これを定量化するために，[η]-log(NaCL concentration)の関係を調べたところ，NaCL 濃度 0.1-0.00001M の広い範囲で直線に表すことが可能であった。この関係の傾き Δ[η]/ΔNaCL concentration を比較したところ，キサンタンガム（17.6）＞アルギン酸ナトリウム>ペクチン(シトラスフルーツ由来)>ペクチン(リンゴ由来)（2.5）の順であり，高分子非電解質である PEG35000, DexT40, グアガム，ローカルトビーンガムの値は 0.2 以下であった。また，高分子電解質の Stiffness parameter として知られている[η]-1/√I 直線の傾き S（[η]√I）を求めたところ（ただし，I はイオン強度），1/√I<30 以下ではほぼ直線に近似でき，S は Δ[η]/ΔNaCL concentration と対応していた。しかし，1/√I が 30 を超える広い範囲では，直線に近似できなくなり，S を算出できなくなった。一方，Δ[η]/ΔNaCL concentration の直線性は NaCL 濃度が希薄になっても，直線性を維持していた。高分子濃度が高濃度の場合に受ける溶媒の電気粘性効果をずり速度 16.8 $s^{-1}$ の $\eta^a$ で比較したところ，NaCL 濃度が 0.1 M 以下の場合，高分子電解質，高分子非電解質を問わず，$\eta^a$ はほとんど変化しなかった。さらに，5-40℃での $\eta^a$ の活性化エネルギー（*Ea*）を比較したところ，ほとんど蒸留水を溶媒とする場合の *Ea* と変わらなかったことから，溶媒の電気粘性効果は認められないと判断された。これらのことから，高分子濃度によって溶媒の電気粘性効果が異なり，高濃度の高分子存在下では溶媒の電気粘性効果は極端に低下すると考えられた。

instrinsic viscosity, viscosity, macromolecule

発表責任者：佐藤之紀（yukisato@mail.kitami-it.ac.jp）

発表番号：2E042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 破壊機構の異なるタピオカと馬鈴薯澱粉の混合ゲルの物性と構造の解析

# The analysis of mechanical properties and microstructure in tapioca/potato starch mixed gels with different fracture mechanism

○李 超、中村 卓 (明治大院農)
○Chao LI, Takashi Nakamura (Meiji Univ.)

【目的】食感は食品のおいしさにおいて重要な要因である。望む食感を付与するために、澱粉が広く使用されている。食感は、咀嚼過程で食品構造が破壊されることにより発現すると考えられるため、破壊過程の解析が重要である。これまでの研究では、食感の異なる各種澱粉と大豆分離タンパクの共存ゲルを用いて、一噛み目のモデルとしての澱粉ゲルの破壊機構は伸展破壊機構（タピオカ）と亀裂破壊機構（馬鈴薯）二つに分けることを明らかにした。しかし、澱粉を混合した場合の破壊過程での食感の発生と食品の構造との関係はまだ明らかになっていない。そこで、今回は破壊機構の異なるタピオカと馬鈴薯澱粉を用い、混合澱粉の食感を破壊機構から解析し、破壊物性と構造の関係を明らかにし、食感を構造から制御することを目的とした。
【方法】澱粉はタピオカ澱粉、馬鈴薯澱粉を用い、大豆タンパク質は大豆分離タンパク質を用いた。最終濃度が澱粉30%、大豆タンパク質4%の懸濁液を95℃で10分間加熱、氷水中で10分間冷却し、6℃の冷蔵庫で一晩保存してゲルを作製した。作製したゲルを高さ5㎜の円柱に切り出し、クリープメータにて破断強度試験を行った。同時にその様子をデジタルカメラで撮影し、解析した。また、クリープメータで99%に圧縮したゲルを化学二重固定し、走査型電子顕微鏡にて微細構造を観察した。
【結果】破断強度試験の結果から混合澱粉の破壊機構は単独ゲル破壊機構の足し算ではないことが明らかになった。混合澱粉の物性測定結果と撮影から得た表面変化結果は加算効果に従う部分と従わない部分両部分があることが明らかになった。その原因を微細構造観察から解析した。加算効果に従わない部分として、単独澱粉の割合と関係なく、混合澱粉ゲルの破断強度曲線の高歪（＞60%）部分はほぼ同じ荷重となった。これは、混合後の澱粉の破壊機構はそれぞれの澱粉の破壊機構の足し算ではなく、それぞれの澱粉の微細構造の形と関係あり、破壊の発生かどうかということで決まると考えられる。混合澱粉中の片方の澱粉の量が少ない場合に、その澱粉の微細構造が破壊しないと考えられた。この場合に、混合澱粉は量の多い澱粉の破壊機構に従った。一方、加算効果に従う面として、まず、澱粉の総量と関係なく、同じ単独澱粉ゲルの破断点はほぼ同じ歪率で現れるが、混合澱粉の破断点がより高い歪率に生じた。これはタピオカの伸展破壊機構と馬鈴薯の亀裂破壊機構が共同に作用した結果だと考えられる。また、表面変化が個々の澱粉の量とともに変化する原因は違う破壊機構において生じた異なる亀裂の影響と考えられる。以上の様に、物性試験と同時に構造変化を観察する事により破壊物性と構造変化の関係を明らかにする事ができた。

starch, fracture mechanism, microstructure

発表番号：2E043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 製粉方法の異なる米粉の紛体特性

# Powder properties of rise flours milled by different methods

○澤 いくみ、石川 大太郎、藤井 智幸 (東北大農)
○Ikumi SAWA, Daitaro ISHIKAWA, Tomoyuki FUJII (Tohoku Univ.)

【緒言】わが国の主要な国産農作物である米の消費拡大のため米粉としての利用を促進するためには、米粉の粉体特性を把握しその類型化を図ることが重要である。そこで、米粉の基礎的な品質特性を構成するパラメータの中から適切なものを選び出して指標とし、加工適性との相関関係を明確にすることを目的として、米粉の粉体特性の関係性を評価し、米粉の構造や親水性について検討を加えた。
【実験方法】米粉は、ひとめぼれ（平成 26 年、宮城県産）を原料とし、製粉方法の異なる４種の試料と対照として糊化した後粉砕したα化米粉を用いた。米粉の粒子径分布は、レーザー回折式粒度分布測定装置（セイシン、LMS-2000e）を用いて、体積基準の平均値を平均粒子径とした。結晶性の評価は、X線回折装置（PHILIPS、X’pert MPD）を用いてX線回折カーブを求めて行った。デンプン損傷度は Megazyme 社製キットを用いて測定した。水分収着挙動は、過剰の塩で一定湿度にしたガラス製密閉容器に米粉を入れ 25℃で３日間水分を収着させ、105℃乾燥法によって含水率 q [g-water/g-d.s.]を求めた。得られた水分収着等温線に GAB 式を適用して GAB パラメータ $q_m$、ｃ、ｋを算出した。吸水挙動については、吸水測定装置（はつらつ、TU-01）を使用し、得られた吸水量の経時変化から Washburn の式を用いて吸水パラメータを算出した。本研究では、米粉粒子間隙の有効毛細管半径ｒが吸水中に変化しないと仮定してｒcosΘを算出した（Θ：接触角）。
【結果と考察】４種の米粉のデンプン損傷度は 4-14%の範囲となり、平均粒子径はおおよそ 120-380 μm であった。製粉により米粉の構造が物理的に変化し、内部構造の異なる米粉が得られたと考えられた。これらの米粉の水分収着特性を評価したところ、単位質量当たりの水分子の吸着量である $q_m$ はほとんど差が認められなかった。米粉の主成分であるデンプンの内部構造が異なっていても水分子の吸着サイトの数がそれほど変わらないことが示され、馬鈴薯デンプンの表面構造を物理的に変換しても水分収着挙動が変わらなかったという先行研究[1)]を支持する結果となった。表面の親水性を表すパラメータと考えられるｒcosΘについては４種の米粉間で差が認められ、親水性の異なる表面が形成されていることが示された。また、α化米粉については、デンプン損傷度は 14%程度、$q_m$ は４種の米粉の値よりも小さくなり、X線回折カーブにはピークが認められず結晶部がないことが示された。この結果から、α化米粉は糊化後の冷却過程でデンプンの非晶質ドメイン構造が形成され、そのドメイン領域は酵素作用を受けにくく、水分子の吸着サイトが減少していることが示唆された。

１）T. Nagai and T. Yano, J. Food Sci., 55, 1334-1337 (1990).

water sorption, crystallinity, rice flour

発表番号：2E044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 超音波測定による油脂結晶化の評価

# Evaluation of fat crystallization by ultrasonic measurement

○森 大奨[1]、勝野 那嘉子[2]、増子 朝貞[3]、松浦 傳史[3]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・応生、[2]岐阜大・応生、[3]三菱化学フーズ（株））
○Daisuke MORI[1], Nakako KATSUNO[2], Tomosada MASUKO[3], Tsutashi MATSUURA[3], Takahisa NISHIZU[2] ([1]Graduate School of Applied Biological Sciences,GIFU UNIV., [2]GIFU UNIV., [3]MITSUBISHI-KAGAKU FOODS CORPORATION)

【目的】油脂を含有する食品の乳化安定性，テクスチャー，そして低温保存中の品質変化には油脂の結晶化が影響する。食品添加物である乳化剤や安定剤を添加することによって，油脂の結晶化をある程度制御できることが知られているが，それらの効果を定量的に評価することは難しい。そこで本研究では超音波位相速度及び振幅の測定から，温度変化に伴う油脂の結晶化挙動の簡便かつ定量的な評価法について検証した。

【方法】硬化ヤシ油に添加する乳化剤として，ショ糖ステアリン酸エステル，ショ糖オレイン酸エステル，ショ糖ラウリン酸エステル(S-170, O-170, L-195, 三菱化学フーズ製)を用いた。70 ℃まで加温し完全に融解させた硬化ヤシ油に，乳化剤をそれぞれ 0.5 wt%添加し，ホモジナイザーで攪拌して乳化剤を均一に分散させた後，再び 70 ℃まで加温したものを試料として用いた。
1．調製した試料を用いて降温過程，昇温過程における超音波測定を行った。測定中は経路長 10 mm の石英セルに試料を入れ，温度を経時的に変化させた。パルサー(ユタカ電子製作所製・特注品)からの信号を超音波送波子に入力し，セル内の試料中を伝播してきた超音波振動信号を受波子経由でオシロスコープ(LeCroy 製・wavesurfer24Xs)に取り込んだ。得られた測定データを FFT 解析し，1～1.5 MHz の位相速度および振幅強度を算出した。
2．ペルチェ式冷却加熱ステージ(リンカム社製・10021 型)を取り付けた偏光顕微鏡を用いて，試料の温度を変化させながら油脂の結晶化と融解の挙動を観察した。得られた画像を解析し各温度における油脂の結晶化度を算出した。

【結果・考察】降温過程において油脂結晶の生成，粗大化に伴い超音波位相速度が増加し，振幅強度は減少した。昇温過程においては油脂の融解に伴い位相速度が減少した。
ショ糖脂肪酸エステルを添加することにより油脂結晶の粗大化抑制，結晶化開始温度の低下が観察された。添加したショ糖脂肪酸エステルの種類によって結晶化温度が異なることが観察され，同一温度における結晶化率と超音波位相速度には正の相関が得られた。
以上のことから，超音波位相速度測定によって温度変化，乳化剤添加に伴う油脂結晶化の挙動を推定可能であると考える。

Phase Velocity, Fat Crystallization, Emulsifier

発表番号：2E045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 超音波位相速度を用いたミルクコーヒーの沈殿発生予測に関する研究

# A prediction of milk-added coffee precipitation by using ultrasonic phase velocity

○田丸 竜万[1]、勝野 那嘉子[2]、西津 貴久[2]([1]岐阜大院・応生、[2]岐阜大・応生)
○Ryuma TAMARU[1], Nakako KATSUNO[2], Takahisa NISHIZU[2] ([1]Graduate School of Applied Biological Sciences, GIFU UNIV., [2]GIFU UNIV.)

【目的】ミルク入りの缶コーヒーは自動販売機内で凝集沈澱を生じる場合がある。工業的生産においてはカゼインナトリウムをはじめとする安定剤の適正量添加により沈澱を抑制することが行われている。沈澱の発生有無の確認には 1 ヶ月程の時間が必要になることもあり，より短時間で安定性を確認する手法の確立により缶コーヒーの製品開発期間が短縮されることが期待される。当研究室では超音波位相速度を利用した沈澱評価法を検討してきた。カゼインナトリウムを添加したミルクコーヒーにおいて加熱殺菌前後の超音波位相速度の変化から沈澱の発生を評価する方法を報告した。本研究では沈澱を増加させることが分かっているアニオン性界面活性剤を添加した場合の沈澱発生評価の可能性について検討した。

【実験方法】安定剤としてカゼインナトリウムおよびアニオン性界面活性剤の添加量をそれぞれ異なる範囲に調製した未加熱のミルクコーヒー，およびレトルト殺菌処理を施したミルクコーヒーを調製し，超音波位相速度を測定した。またあわせて振動 U 字管式密度計により試料密度を測定した。

【結果・考察】加熱処理により全ての試験区でミルクコーヒーの超音波位相速度は増加した。沈澱発生を抑制するカゼインナトリウムを添加した試験区では沈澱発生量が少ないほど加熱前後の超音波位相速度差が小さくなった。沈澱発生を促進させるアニオン性界面活性剤を添加した試験区では沈澱発生量が多いほど加熱前後の超音波位相速度差が大きくなった。

加熱による沈殿の発生が見かけの圧縮率を減少させ超音波位相速度を増加させると考えられる。実験結果より添加剤の種類が異なる場合でも沈殿の発生量と加熱による超音波位相速度増加量の関係は変わらないことから，加熱による超音波位相速度差は沈澱発生の評価に有効である。

ultrasonic phase velocity, coffee precipitation, heating

発表番号：2E046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 凍結が与える乳酸菌に対する損傷に関する研究

# Effect of freezing damage for Lactbacillus delbrueckii subsp.bulgaricus

○関口 由起、鈴木 徹、渡辺 学（東京海洋大学）
○YUKI SEKIGUCHI, TORU SUZUKI, MANABU WATANABE (Tokyo University of Marine Science and Technology)

【背景・目的】

微生物の凍結死滅に関わる要因は凍結濃縮による浸透圧脱水、細胞内外氷結晶の生成による細胞内の物理的損傷など、様々な要因が考えられているが、その詳細については未だ明らかにされていない部分がある。しかしながら、微生物の凍結死滅メカニズムを解明することは、食品に使用されるスターターとしての乳酸菌の保存効率や医療等、様々な面において重要である。

本研究では、乳酸菌を試料として、凍結による微生物の死滅メカニズムを解明するために、『共存物質の凍結濃縮による浸透圧脱水』と『細胞内氷結晶の生成による細胞内物理的損傷』について着目し、生菌数測定と合わせて蛍光顕微観察，SEM による観察を行い凍結が乳酸菌に与える影響を検討した。

【方法・結果】

『共存物質における凍結濃縮による浸透圧脱水』について検討するために、常温下における共存塩類(塩化ナトリウムおよび塩化カルシウム，他)を用いて浸透圧の段階的変化を与え、浸透圧変化速度や共存塩類の違いによるダメージを生菌数測定と蛍光試薬による二重染色、電子顕微鏡による高倍率観察により調べた。その結果、蛍光試薬による観察から浸透圧による膜の損傷が凍結死滅の主要因であることを示唆する結果が得られた。さらに、浸透圧変化が急激なほど生残率が低下し、細胞膜が損傷しているということが示唆された。

また、『細胞内氷結晶の生成による細胞内ダメージ』について検討をするために、急速および緩慢凍結させた凍結乳酸菌試料をそれぞれ凍結粉砕法により割断し、電子顕微鏡を用いて凍結乳酸菌の断面観察を試みた。その結果、一部の乳酸菌において、細胞内氷結晶が生成されたことが示唆される画像を得ることが出来た。

これら得られた結果は，凍結による微生物の死滅メカニズムの詳細について検討する上で，有用な研究手法を提起していると考えられる。

Freezing damage, Osmotic pressure, Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus

発表責任者：鈴木徹（toru@kaiyodai.ac.jp）

発表番号：2E047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高分解能 LC-MS を用いたフモニシンと二糖類の反応物の検出

# Formation of new modified fumonisins and detection by high-resolution LC-MS

○松尾 洋輔[1]、高原 健太郎[2]、佐合 由紀[1]、久城 真代[1]、長嶋 等[1]、中川 博之[1]([1]農研機構・食総研、[2]（株）サーモフィッシャーサイエンティフィック)
○Yousuke MATSUO[1], Kentaro Takahara[2], Yuki Sago[1], Masayo Kushiro[1], Hitoshi Nagashima[1], Hiroyuki Nakagawa[1] ([1]NFRI-NARO, [2]Thermo Fisher Scientific)

【目的】かび毒（マイコトキシン）は一部の糸状菌が産生する二次代謝産物であり、各種の農作物においてその汚染が問題になる。また、一部のかび毒についてはモディファイドマイコトキシンと呼ばれる誘導体の存在が近年報告されている[1]。演者らはその一つとして、赤かび病菌として知られるフザリウム属菌が産生するかび毒フモニシン（FB）の糖誘導体(NDfrc-FB)をアメリカ産かび毒汚染トウモロコシ粉末試料から検出した[2]。この NDfrc-FB の生成機構は、グルコースの還元末端が FB のアミノ基と反応する、メイラード反応型の縮合反応と考えられている。FB の糖誘導体はこれまでにグルコースについてのみ存在が報告されていることから、本研究ではグルコース以外の糖に対する FB 誘導体の生成や、相当する化合物のかび毒汚染トウモロコシ 粉末試料中における存在を調べた。
【方法】FB としては一連の類縁体の中で最も重要視されているフモニシン B1（FB1）を選択した。FB1 および各種還元糖のメタノール溶液を窒素ガスで乾燥した後、100℃で加熱処理し縮合反応させた。反応生成物の検出には、液体クロマトグラフ-高分解能質量分析装置（LC-Orbitrap MS）を用いた。イオン化には electrospray ion source（ESI）を使用し、正および負イオン化条件による測定を行った。LC における移動相は酢酸および酢酸アンモニウムを添加した水/アセトニトリル混合溶液を用い、C18 逆相カラムを用いて分離を行った。分析結果の解析は、予想される組成式から精密質量を算出し、マスクロマトグラム上の反応物ピークからスクリーニングを行った。さらに候補化合物のマススペクトルにおいて、FB1 と共通するフラグメントイオン（断片イオン）を検出することで確認を行った。
【結果】FB1 と各種還元糖との反応物のスクリーニングを行ったところ、例えばマルトースやセロビオースなどの還元末端を持つ二糖を基質として用いた時に FB1 糖誘導体と推定される化合物の生成が確認された。一方、還元末端を持たないスクロースなどの二糖を用いた場合には、FB1 糖誘導体と推定される化合物は検出されなかった。このことから、FB1 糖誘導体の生成は還元末端のある糖に特徴的であることが確認された。これらの反応が確認された FB1 糖誘導体の一部については、相当する化合物がかび毒汚染トウモロコシ粉末試料中にも存在するか比較検討を行った。

1) 内閣府食品安全委員会 第 36 回かび毒・自然毒等専門調査会（2015 年 10 月 22 日）
https://www.fsc.go.jp/fsciis/meetingMaterial/show/kai20151022ks1
2) Matsuo Y et al., Toxins, 7(9), 3700-3714 (2015)

Fumonisin, Modified Mycotoxin, Orbitrap-MS

発表責任者：松尾洋輔（ymatuo@affrc.go.jp）

発表番号：2E048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ポモル酸の 3T3-L1 脂肪細胞に対する効果

# Pomolic acid influences adipogenesis in 3T3-L1 cells

○甲木 孝弘、井土 良一（（公財）東洋食品研究所）
○Takahiro Katsuki, Ryouichi Izuchi (Toyo Institute of Food Technology)

【背景・目的】

カキ果皮は干し柿製造時に大量に発生するが、未利用のまま廃棄されている。しかし、カキ果皮にはポリフェノールなど様々な機能性成分が含まれており、機能性食品素材として利用が期待できる。これまでに、カキ果皮から 3T3-L1 由来脂肪細胞に対して脂肪蓄積を抑制する成分を探索し、トリテルペノイド類のポモル酸を見出した。ポモル酸の機能性として抗がん作用などが報告されているが、脂肪細胞分化や肥満に対する効果は報告されていない。そこで、3T3-L1 を用いてポモル酸が脂肪細胞への分化、および脂肪蓄積に及ぼす影響、さらにその機構を調査した。

【実験方法】

3T3-L1 を Dulbecco's Modified Eagle Medium で 6 well plate にコンフルエントまで培養し、その 2 日後に分化誘導培地(10 μg/ml insulin 、 250 nM dexamethasone 、 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine 添加)で脂肪細胞へ分化誘導した(0 日目)。(１)分化誘導時(0－3 日目)、(２)分化誘導後(3－8 日目)にポモル酸(5 μM)処理を行った。また、分化誘導を行わない未分化細胞にもポモル酸処理(0－3 日目)を行った。3 日ごとに誘導後培地（5 μg/ml insulin 含有）に交換し、8 日目に脂肪合成に関与するグリセロール-3-リン酸脱水素酵素（GPDH）の活性と、脂肪細胞分化の指標となる PPARγ、C/EBPα遺伝子の発現量を測定した。

【結果】

（１)の条件で脂肪細胞への分化に対するポモル酸処理の影響を検討したところ、GPDH 活性と PPARγ遺伝子の発現はポモル酸処理により有意に上昇したが、C/EBPα遺伝子の発現は変化がなかった。また、未分化細胞へのポモル酸処理でも GPDH 活性は有意に上昇した。(２)の条件で脂肪蓄積に対する影響を検討したところ、GPDH 活性はポモル酸処理で低下する傾向が見られた。これらの結果から、ポモル酸は、分化後の脂肪細胞に対して脂肪蓄積を抑制することが、一方で、脂肪前駆細胞に対しては脂肪分化を促進することが示唆された。これら作用には PPARγの発現上昇が関与している可能性がある。

pomolic acid, triterpenoid, 3t3-l1

発表責任者：甲木　孝弘（takahiro_katsuki@shokuken.or.jp）

発表番号：2E049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 3T3-L1 脂肪細胞に対するポモル酸の脂肪蓄積抑制機構の解明

# Mechanisms of fat accumulation inhibition by pomolic acid in 3T3-L1 adipocyte

○井土 良一[1]、甲木 孝弘[1]、豊田 集[2]、石島 智子[2]、岡田 晋治[2]([1]（公財）東洋食品研究所、[2]東大院農生科・応生化)
○Ryoichi IZUCHI[1], Takahiro KATSUKI[1], Tsudoi TOYODA[2], Tomoko ISHIJIMA[2], Shinji OKADA[2]
([1]Toyo Institute of Food Technology, [2]Tokyo Univ.)

【背景・目的】3T3-L1 由来脂肪細胞に対して脂肪蓄積を抑制する成分をカキ果皮から探索したところ、トリテルペノイド類のポモル酸を見出した。3T3-L1 を脂肪細胞に分化誘導した後、ポモル酸処理を行うと脂肪蓄積が抑制されるが、その作用機構を解明するために DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。
【実験方法】コンフルエントに達した 3T3-L1 を分化誘導培地（インスリン、DEX、IBMX 添加）で 3 日間培養して脂肪細胞に分化させた後、ポモル酸を添加した DMEM 培地（インスリン添加）に交換して 3 日間培養した。培養後に total RNA を抽出して、DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を実施した。データの正規化には DFW、２群比較には Rank products 法を用いた。さらに抽出した発現変動遺伝子について DAVID を用いた pathway 解析を行った。
【結果と考察】発現変動遺伝子群を pathway 解析した結果、発現増加遺伝子は‘glycolysis’、‘amino sugar and nucleotide sugar metabolism’、‘galactose metabolism’などの糖代謝、‘DNA replication’などの細胞分裂、発現減少遺伝子は‘valine, leucine and isoleucine degradation’、‘glycerophospholipid metabolism’、‘fatty acid metabolism’などアミノ酸や脂質代謝に関わる遺伝子を多く含んでいた。さらに、PPAR signaling pathway 関連遺伝子群は、発現増加および減少のどちらも多く含まれていた。以上から、ポモル酸は PPAR signaling pathway を介して、エネルギー代謝を活性化することにより脂肪蓄積を抑制すると推定されたため、現在さらに解析を進めている。

triterpenoid, pomolic acid, 3T3-L1

発表番号：2E050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LC-ESI-MS/MS を用いた脂肪酸アミド化合物の検出定量法の確立

# The establishment of a policy to detect and determine the quantity of fatty acid amides by using LC-ESI-MS/MS

○岡本 拓也、柴田 貴広、内田 浩二（名古屋大学名古屋大学大学院生命農学研究科）
○Takuya OKAMOTO, Takahiro SHIBATA, Kouji UCHIDA (Nagoya Univ.)

［背景、目的］生体内には様々な脂質由来の生理活性分子が存在し、生体の恒常性の維持や様々な細胞応答に対するメディエーターとして作用している。このような脂肪酸由来のメディエーターのひとつとして脂肪酸アミドが知られている。脂肪酸アミドは、睡眠誘導、鎮痛など様々な生理作用を有し、生命活動に大きな影響を与える内因性分子として知られている。そこで本研究では、特に脂肪酸アミド化合物に注目し、質量分析装置を用いた検出、定量法の確立を行い、マウス血清や細胞培養上清中における脂肪酸アミドの検出を試みた。
［方法、結果］8 種類の脂肪酸アミドについて質量分析装置による高感度検出方法の確立を行った。各種脂肪酸アミドの標品を作製後、その脂肪酸アミドについて、UPLC-ESI-MS/MS を用いた MRM モードによる検出法を確立した。まず、肥満および 2 型糖尿病モデルマウスである ob/ob マウスの血中の脂肪酸アミドの測定を行ったところ、特にオレイン酸のアミド誘導体であるオレアミドが顕著なピークとして検出された。そこで、オレイン酸の安定同位体標識物からオレアミドの安定同位体標識内部標準物質を作製し、安定同位体希釈法による定量法を確立した。ob/ob マウスの血中オレアミド濃度の測定を行ったところ、コントロールマウスと比較して有意な上昇が認められた。次に、マウス繊維芽細胞由来でありアディポサイトへの分化能を有する 3T3-L1 細胞を用いて検討を行った。その結果、培養上清を分析したところ分化前では脂肪酸アミドは見られなかったが、インスリンを投与し脂肪細胞へ分化した後の細胞の培養上清からは数種類の脂肪酸アミドの存在を確認した。またこの分化後の細胞にリポ多糖 (LPS) を投与したところ、いくつかの脂肪酸アミドの中でもオレアミドの産生量が上昇していることが明らかとなった。またこの応答について経時的なオレアミドの産生量を測定した結果、比較的早い段階で LPS 刺激によるオレアミドの生成が確認された。これらの結果から、脂質メディエーターであるオレアミドがアディポサイトにより産生されることが明らかとなった。

fatty acid amide, UPLC-ESI-MS/MS, adipocyte

発表番号：2E051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 魚油による脂質代謝変動における farnesoid X receptor の関与
# Involvement of farnesoid X receptor in fish oil-mediated alteration of lipid metabolism

○新野 耕平、坂口 大輔、木下 佑一、杉浦 義正、宮田 昌明（水大校）
○KOHEI SHINNO, DAISUKE SAKAGUCHI, YUICHI KINOSHITA, YOSHIMASA SUGIURA, MASAAKI MIYATA (National fisheries Univ.)

**【目的】**魚油の摂取は心血管疾患や脂肪性肝疾患などの予防に効果があると考えられている。近年、魚油中の主成分の n-3 系多価不飽和脂肪酸（n-3 PUFA）が脂質代謝に影響を及ぼし肝臓、血中の脂質レベルを低下させるとされている。胆汁酸をリガンドとする核内受容体の farnesoid X receptor (FXR)は、生体内の脂質代謝の調節に関与し、肝臓・血中の脂質レベルに影響を与えることが知られている。しかしながら、n-3 PUFA による脂質低下作用における FXR の関与については明らかになっていない。そこで本研究では *Fxr* 欠損マウスと野生型マウスを用い FXR の有無による魚油摂取での脂質代謝への影響の違いを明らかにすることで魚油による脂質代謝の変動に対する FXR の関与について解明することを目的とした。

**【方法】**10~12 週齢の雌型 *Fxr* 欠損マウス及び野生型マウスに 4 週間にわたり、3%魚油＋1%コーン油含有精製飼料（魚油群）及び 4%コーン油含有精製飼料（コーン油群）を与え、血液、小腸ならびに肝臓を採取した。肝臓中の脂肪酸組成は、gas chromatography を用いて分析した。肝内と血清中の triglyceride(TG)、free fatty acid (FFA) 及び total cholesterol (TC)濃度は市販のキットで測定した。肝臓の mRNA レベルの測定は、SYBR Premix Ex Taq Ⅱを用いた定量 PCR で実施した。

**【結果と考察】**魚油群の *Fxr* 欠損マウス及び野生型マウスの n-3 PUFA 肝内比率はコーン油群と比較して有意に高値を示し、そのレベルは同程度だった。野生型マウスの魚油群の血清中 TG、TC、FFA レベルはコーン油群と比較して有意に低値を示し、肝内の TC、FFA レベルも有意に低値を示したが、*Fxr* 欠損マウスでは差異は認められなかった。コレステロールや脂肪酸合成に関係する遺伝子の肝内 mRNA レベルが野生型マウスの魚油群で有意に低値を示したが、*Fxr* 欠損マウスでは差異は認められなかった。また野生型マウスで、小腸及び肝内の FXR ターゲット遺伝子の発現は両群で差異は認められなかった。このことから魚油成分が FXR と直接関与している可能性は低く、*Fxr* 欠損マウスで肝臓と血中の TG 及び TC レベルの変動がみられなかったのは、FXR の欠損による二次的な影響の可能性が考えられた。

FXR, fish oil, lipid metablism

発表責任者：新野耕平（buntapon1999@yahoo.co.jp）

発表番号：2E052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アリルイソチオシアネート代謝物が肝細胞の脂肪蓄積に及ぼす影響に関する研究

# Effects of allyl isothiocyanate metabolites on lipid metabolism in hepatocytes

○網野 紗与、橋本 堂史、中村 紫乃、藍原 祥子、水野 雅史 (神大農)
○ Sayo AMINO, Takashi HASHIMOTO, Shino NAKAMURA, Yoshiko AIHARA, Masashi MIZUNO (Kobe Univ.)

【目的】アブラナ科植物に含まれる辛味成分であるアリルイソチオシアネート（AITC）は高脂肪食による脂肪肝形成を抑制することが報告されている。一方、経口摂取された AITC は短時間で肝臓においてグルタチオン抱合を受けメルカプツール酸経路を介して代謝されることが知られている。しかし AITC の代謝物の経時的な肝臓への蓄積量や脂肪肝形成の抑制に関する詳しい機序は明らかとなっていない。本研究では AITC 代謝物の蓄積量および肝細胞内への脂肪蓄積におよぼす影響について調べた。

【方法】AITC の代謝物としてグルタチオン抱合体（AITC-GSH）、システイニルグリシン抱合体（AITC-Cys-Gly）、システイン抱合体（AITC-Cys）、*N*-アセチル-L-システイン抱合体（NAC-AITC）を合成した。6 週齢の雌性 ICR マウスに AITC を 100 mg/kg 体重となるように単回経口投与し、0、0.5、1、2、3、4、6、12 および 24 時間後の血漿及び肝臓における各代謝物の蓄積量を、HPLC を用いて測定した。次に 0.5 mM オレイン酸を添加した DMEM 培地でヒト肝癌由来 HepG2 細胞を 24 時間培養し、細胞内への脂肪蓄積におよぼす AITC およびその代謝物の影響をオイルレッド O 染色により評価した。また、脂質代謝制御を担う転写因子 sterol regulatory element binding protein-1（SREBP1）の発現量やその活性に関わる Akt とその下流の GSK3β のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングにより調べた。

【結果】AITC 投与後の血漿及び肝臓中の代謝物の蓄積量を測定した結果、AITC 代謝物の総量の Tmax および Cmax は血漿でそれぞれ 30 分および 0.26 μM、肝臓では 1 時間および 0.65 μmol/g 肝重量であった。蓄積した代謝物のうち、NAC-AITC の割合が最も多く、Tmax 時には血漿で 59%、肝臓では 90%を占めていた。次に、AITC およびその代謝物の HepG2 細胞への脂肪蓄積におよぼす影響を調べた結果、NAC-AITC が最も高い脂肪蓄積阻害効果（30%抑制）を示した。これらのことから、先行研究で報告されている AITC 摂取による脂肪肝抑制効果には NAC-AITC の寄与が大きいと考えた。また、15 μM NAC-AITC で処理した HepG2 細胞において活性型 SREBP1 の発現量が有意に抑制されており、その発現量に関与する Akt とその下流の GSK3β のリン酸化も有意に抑制されていた。以上のことから、AITC の脂肪肝抑制効果はその代謝物である NAC-AITC が大きく寄与しており、NAC-AITC は肝細胞において Akt による GSK3β のリン酸化を抑制することにより、活性型 SREBP1 量を減少させ、細胞内の脂肪蓄積を阻害すると考えた。

allyl isothiocyanate metabolites, lipid metabolism, HepG2 cells

発表責任者：網野紗与（sayo53304@gmail.com）

発表番号：2E053
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高脂肪食摂取マウスにおける乳脂肪球皮膜摂取による脂質代謝への影響

# Effect of milk fat globule membrane intake on the lipid metabolism in high fat diet induced obesity mice

○廣瀬 彰人[1]、山田 潔[1]、蕪山 由己人[1]、元島 英雅[2]、東 徳洋[1]（[1]宇都宮大農、[2]よつ葉乳業株式会社中央研究所）
○AKITO HIROSE[1], KIYOSHI YAMADA[1], YUKIHITO KABUYAMA[1], HIDEMASA MOTOSIMA[2], NORIHIRO AZUMA[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]R&D Center Research Division Yotsuba milk products CO.,LTD.)

【目的】近年ライフスタイルの欧米化に伴って、日本においても肥満を中心とするメタボリックシンドロームやそれに伴う合併症が大きな社会問題となっている。内臓脂肪蓄積を伴う肥満症の特徴として脂肪組織で慢性炎症が生じており、糖尿病や高血圧、高脂血症、動脈硬化、心疾患などのリスクの因子であるとされる。我々の研究では、このメタボリックシンドロームを抑える食品候補としてバター製造過程で排除される乳脂肪球皮膜(MFGM)に着目した。これまでに *in vitro* で MFGM が脂肪の取り込み、蓄積に影響を及ぼすことを示す結果を得ており、今回は MFGM 摂取による脂質代謝への影響を検討した。MFGM 摂取によりどの時点でどのような効果が現れるのか、またそのメカニズムを解明できることが期待される。よって実験 1 として肥満進行時マウスを、実験 2 として肥満モデルマウスを用いて MFGM 摂取の効果の検討を行った。

【方法】雄の C57BL/6J マウス 4 週齢を用いて、実験 1 としてマウスを 3 群に分け、1 群を普通食群（CON 群)、2 群を高脂肪食群（HF 群)、3 群を高脂肪食＋MFGM 群（MFGM 群）として 8 週間飼育を行った。また実験 2 として 8 週間高脂肪食を与えた肥満マウスを 2 群に分け、1 群を HF 群、2 群を MFGM 群としてさらに 8 週間飼育を行った。飼育中体重・摂食量を測定し、飼育終了時に解剖を行い、体重推移の変化、各種血漿成分濃度、肝臓および各脂肪の重量、肝臓の中性脂肪の定量、肝臓凍結切片作製による脂肪蓄積の観察、リアルタイム PCR による炎症性サイトカイン遺伝子発現の定量の測定などを行い、肥満に起因する症状に対する MFGM 摂取の効果の検討を行った。

【結果】実験 1 において、HF 群と比較して MFGM 群で有意に体重の減少がみられ、腎臓周囲・腸間膜周囲・精巣周囲の脂肪細胞のすべての重量が有意に減少した。また、肝臓中脂質においても中性脂肪濃度および遊離脂肪酸濃度が有意に減少した。実験 2 においては、HF 群と比較して MFGM 群で腸間膜周囲の脂肪細胞の重量が有意に減少した。また血漿中の遊離脂肪酸濃度が有意な減少をしめした。よって実験 1 において、MFGM の 8 週間摂取により体重増加の抑制効果があることが示された。また実験 1 および実験 2 のどちらのフェーズにおいても MFGM 摂取により内臓脂肪の蓄積が抑制されることが示された。肝臓においては、実験 1 では脂肪蓄積の抑制が認められた。この結果は MFGM には、脂肪の吸収を抑制する効果、もしくは体内に吸収されて脂質代謝に影響を及ぼし、さらには炎症を抑えている可能性が考えられる。よって現在、糞中の胆汁酸および中性脂肪排出量と脂肪細胞中の炎症性サイトカイン発現について調べ、このメカニズムを解明中である。

milk fat globule membrane, lipid metabolism, high fat diet induced obesity mice

発表責任者：廣瀬彰人（ma158129@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

発表番号：2E054
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酒粕由来の HMG－CoA 還元酵素抑制物質
# HMG-CoA reductase inhibitors from sake cake

○大浦 新[1]、入江 元子[1]、久保 緋紗子[2]、山本 康子[2]、堤 浩子[1]、齋藤 邦明[2,3]、秦 洋二[1] ([1]月桂冠・総研、[2]京大院・医学研究科、[3]藤田保健衛生大院)
○Shin OURA[1], Motoko IRIE[1], Hisako KUBO[2], Yasuko YAMAMOTO[2], Hiroko TSUTSUMI[1], Kuniaki SAITO[2,3], Yoji HATA[1] ([1]Research Institute Gekkeikan Sake Co., Ltd, [2]Kyoto University Graduate School of Medicine, [3]Fujita Health University Graduate School of Medicine)

【背景】日本人の食生活の変化から、動物性タンパク質と脂質の摂取が増加傾向にあり、それに伴い血液中の総コレステロール量の平均値は年代・性別に関係なく上昇している。コレステロールは主に肝臓で新生されるが、肝臓におけるコレステロール合成に必要な酵素（律速酵素）が HMG-CoA 還元酵素であると言われている。よって、この酵素を特異的に抑制すれば、肝臓ではコレステロール生成が抑制され、肝細胞内で欠乏が生じる。これを補うために、血液から肝臓へコレステロールの取り込みが増加することで、主に血中 LDL コレステロールを低下させることができる。現在、高コレステロール血症の治療薬として、スタチン系の薬剤が多く用いられているが、疾病予防という観点からは、HMG-CoA 還元酵素抑制成分を食品から摂取し、体内のコレステロール量を適正に保つことが望ましい。

【目的】清酒醸造の副産物である酒粕に対し、酵素処理などを行ったものから、HMG-CoA 還元酵素抑制作用を有する素材を探索した。また有効成分の特定とその大量生産を目指すことによって、コレステロール抑制機能を有する食品開発の可能性を探った。

【方法および結果】酒粕を各種プロテアーゼで分解した反応液、あるいは酒粕を乳酸菌で発酵させた懸濁液について、遠心上清を凍結乾燥した粉末をサンプルに用いた。これらをヒト肝細胞 HepG2 の培地に添加して培養し、HMG-CoA 還元酵素の発現量を測定した。その結果、酒粕のプロテアーゼ分解物において、HMG-CoA 還元酵素のmRNA 発現を抑制するサンプルを得た。さらにウェスタン・ブロッティングに供したところ、タンパク質レベルでも本酵素の発現抑制が確認できた。
　現在、有効成分を特定するともに、これらを更に増やすような酒粕の酵素処理条件を検討中である。

sake cake, cholesterol, HMG-CoA reductase

発表番号：2E055
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 褐色脂肪細胞化を誘導する食品由来因子とその機序解明

# Induction of brown-like adipocytes formation by dietary-derived factors and its molecular mechanism

○西川 翔、青山 広樹、神谷 美沙、樋口 潤、加藤 愛子、河合 妙子、曽我 実、津田 孝範（中部大応生）
○Sho NISHIKAWA, Hiroki Aoyama, Misa Kamiya, Jyun Higuchi, Aiko Kato, Taeko Kawai, Minoru Soga, Takanori Tsuda (Chubu Univ.)

【目的】　褐色脂肪組織は、体熱産生を行いエネルギー消費を促進する。近年の研究から環境条件により、白色脂肪組織中で「誘導型」褐色脂肪細胞が増加（褐色脂肪細胞化）し、熱産生によりエネルギー消費が増加して体脂肪が減少することが明らかになった。このような背景を踏まえて本研究では、褐色脂肪細胞化を促す食品由来因子を解明し、その機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】　マウス由来 C3H10T1/2 細胞株及びマウス皮下白色脂肪組織より得た Stromal vascular fraction を用いた初代培養細胞系を用いた。いずれも脂肪細胞への分化誘導時に各種検定試料を投与し、褐色脂肪細胞マーカー発現を測定した。見出した食品由来因子については、さらにその褐色脂肪細胞の分化誘導機序の解明を試みた。

【結果】　検定試料の添加により、C3H10T1/2 及び初代培養細胞のいずれも UCP1 をはじめとする褐色脂肪細胞化マーカーの mRNA 発現が著しく増加した。この上昇には濃度依存性が認められ、UCP1 タンパク質の発現も同様な上昇が認められた。
次にこの試料の褐色脂肪細胞への分化誘導機序の解明を試みた。その結果、褐色脂肪細胞化へのシフトに必須の転写制御因子（PRDM16）タンパク質の分解が試料の投与により抑制されることが明らかとなった。現在、引き続き動物個体での作用立証を進めている。

Brown-like adipocytes, UCP1, PRDM16

発表責任者：津田　孝範（tudat@isc.chubu.ac.jp）

発表番号：2E056
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食餌脂肪酸の腸内細菌代謝物摂取は肥満に伴う代謝異常症を改善する

# Fatty acid metabolites by gut microorganisms improve obesity-induced metabolic abnormalities

○古薗 智也[1]、後藤 剛[1,2]、山國 加成衣[1]、金 英一[1]、金 みんじ[1]、北村 苗穂子[3]、朴 時範[3]、岸野 重信[3]、内田 邦敏[4,5]、高橋 信之[1,2]、小川 順[2,3]、富永 真琴[4,5]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]京大院農・応用生命、[4]岡崎統合バイオ（生理研）・細胞生理、[5]総研大・生理科学)

○Tomoya FURUZONO[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Kanae YAMAKUNI[1], Young-il KIM[1], Minji KIM[1], Nahoko KITAMURA[3], Si-Bum PARK[3], Shigenobu KISHINO[3], Kunitoshi UCHIDA[4,5], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], JUN OGAWA[2,3], Makoto TOMINAGA[4,5], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Div. Applied Life Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Div of Cell Signaling, OIIB (NIPS), [5]Dept of Physiol Sci, SOKENDAI)

【背景】

近年、腸内細菌叢と肥満およびそれに伴う生活習慣病との関連に注目が集まっている。最近では、腸内細菌自身に加え、腸内細菌が生成する代謝産物が肥満およびそれに伴う生活習慣病を抑制する効果を有することが報告されている。我々はこれらの代謝産物のエネルギー代謝調節機構の鍵を握る分子としてカプサイシン受容体である Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) に着目した。TRPV1 は交感神経活性化を介してエネルギー代謝を亢進することから、肥満や生活習慣病の予防において有効な標的分子であると考えられており、近年では他の食品成分によっても活性化されることが報告されている。そこで、本研究では食餌脂肪酸の乳酸菌代謝物の TRPV1 活性化能及び、それを介した生体内でのエネルギー消費亢進作用について検討した。

【方法・結果・考察】

TRPV1 活性化作用について、培養細胞を用いたカルシウムイメージングにより評価したところ、食餌脂肪酸乳酸菌代謝物のうち、リノール酸由来の代謝物、10-keto-12c-18:1 (ketoA) が最も強い活性化能を有することが示唆された。そのため、以後は ketoA に焦点を当てて検討を行ったところ、ketoA はパッチクランプにおいても TRPV1 を活性化することが明らかとなった。また、TRPV1 の主な発現部位である感覚神経節から単離した神経細胞においても ketoA は TRPV1 を活性化することが認められた。そこで次に動物個体レベルでの作用を検討するため、食餌誘導性肥満モデル動物である C57BL/6 マウスに対する 10 週間の混餌投与を行った。その結果、0.1% ketoA 摂取群において、体重増加抑制・体脂肪蓄積抑制作用およびインスリンやレプチンなどの血中パラメータの改善が認められた。また、酸素消費量および直腸温の上昇が認められたため、褐色脂肪組織などにおいてエネルギー消費に重要な脱共役タンパク質 1 (UCP1) 発現量について検討したところ、ketoA 摂取群において、鼠径部白色脂肪組織における UCP1 発現量の増加が認められた。一方、TRPV1 KO マウスでは ketoA 摂取による上記の変化はいずれも認められなくなった。従って、ketoA 摂取は TRPV1 活性化を介してエネルギー消費を亢進させることが示唆された。

以上の結果から、ketoA は TRPV1 に対する活性化作用を有しており、ketoA 摂取は肥満に伴う代謝異常症の予防・改善作用を示すことが示唆された。

energy expenditure, gut microorganisms, TRPV1

発表責任者：河田照雄（fat@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2E057
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 魚油摂取が脂肪組織における UCP1 発現誘導に及ぼす影響

# Effects of fish oil intake on the induction of UCP1 in adipose tissue

○KIM Minji[1]、後藤 剛[1,2]、内田 邦敏[3,4]、富永 真琴[3,4]、狩野 百合子[5]、高橋 信之[1,2]、河田 照雄[1,2] ([1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]岡崎統合バイオ（生理研）・細胞生理、[4]総研大・生理科学、[5]神戸女子大学家政)
○Minji KIM[1], Tsuyoshi GOTO[1,2], Kunitoshi UCHIDA[3,4], Makoto TOMINAGA[3,4], Yuriko KANO[5], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]Div. of Cell Signaling, OIIB (NIPS), [4]Dept. of Physiol. Sci., SOKENDAI, [5]Kobe Women`s Univ.)

【研究背景・目的】ヒトには 2 種類の脂肪組織が存在する。白色脂肪組織(White Adipose Tissue, WAT)と褐色脂肪組織(Brown Adipose Tissue, BAT)であり、それぞれ異なる機能を有する。特に、BAT は脂肪を分解し熱を産生することで体温を維持すると共に、全身のエネルギー代謝調節に関わる。この作用は BAT のミトコンドリア内膜に特異的に存在する脱共役タンパク質 1(uncoupling protein 1, UCP1)によるものであり、UCP1 の発現を高めることが抗肥満に効果的であると考えられる。近年の研究によって、成人においても BAT が存在することが報告され、BAT のエネルギー代謝調節機能や抗肥満への作用が重要と考えられてきている。魚油による体脂肪蓄積の改善は知られているが、詳細な作用機構は未だ明らかではない。本研究は、UCP1 を介した脂肪・エネルギー代謝を活性化させる食品成分として魚油に着目し、脂肪組織における UCP1 の発現誘導機構について探ることを目的とした。
【方法】C57BL/6 マウスに、高脂肪食または高脂肪食に魚油を 1.2%あるいは 2.4%で置換えた魚油添加食を 10 週間摂食させ、体重、酸素消費量、交感神経活動、肩甲骨間 BAT および鼠径部 WAT における褐色脂肪細胞関連遺伝子発現量を検討した。
【結果・考察】魚油摂食実験を行った結果、高脂肪食群に比べ、魚油群では酸素消費量が上昇し、体重増加及び体脂肪蓄積が抑制された。そして、BAT および WAT での UCP1 と β3 アドレナリン受容体の遺伝子発現量、さらには褐色脂肪細胞関連遺伝子発現量が増加した。次に、魚油が交感神経活動に及ぼす影響を調べるために、尿中カテコールアミン量を定量した結果、魚油群において尿中カテコールアミン分泌量が増加した。さらに、迷走神経切離したマウスに魚油を投与した結果、魚油による脂肪組織での UCP1 発現誘導は認められなくなった。魚油による交感神経活性化の作用点として、UCP1 発現誘導をもたらすトウカラシの辛味成分であるカプサイシンの受容体として知られている Transient Receptor Potential Vanilloid 1(TRPV1)に着目し、TRPV1 欠損(KO) マウスを用いた魚油摂食実験を行った。その結果、TRPV1 KO マウスの魚油群は、魚油摂取による体重増加や体脂肪蓄積の抑制、酸素消費量の上昇、BAT と WAT における UCP1 発現誘導が認められなくなった。以上の結果から、魚油によるエネルギー代謝の上昇は、胃・小腸に分布する TRPV1 を介した交感神経活性化により誘導される UCP1 発現誘導によるものであることが示唆された。

thermogenesis, interscapular BAT, inguinal WAT

発表番号：2E058
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# db/db マウスが等カロリー条件下の高脂肪食で肥満する機構の探索

# Studies on mechanisms of isocaloric high fat diet-induced obesity in db/db mice

○池田 英介、井上 奈穂、池田 郁男（東北大院農）
○Eisuke IKEDA, Nao INOUE, Ikuo IKEDA (Grad. Sch. Agric. Sci. Tohoku Univ.)

【目的】高脂肪食は肥満を誘発すると考えられているが、その機構は明確とはなっていない。C57BL/6J マウスに、大豆油を用いた低脂肪高炭水化物食と等カロリーの高脂肪低炭水化物食を与えた実験では、4 週間の飼育で、14%脂肪群は 7%脂肪群より腹腔内脂肪重量の増加が認められたが、9 週間の飼育ではその差が認められなかった。また、このマウスでは摂食開始直後から食餌組成に応じた脂肪および炭水化物消費量の変化が見られた。本実験では、レプチン受容体を遺伝的に欠損する db/db マウスを用いて 4 週間および 9 週間の飼育を行い、エネルギーおよび脂質代謝への影響を調べた。
【方法】試験には 5 週齢雄性 db/db マウスを用いた。試験食は AIN93G に準じて大豆油を 7%添加した低脂肪高炭水化物食(7%群)と、大豆油を 14%添加し、等カロリーとなるように炭水化物量を減らし、セルロースで重量調整した高脂肪低炭水化物食(14%群)とした。予備飼育 8 日間はすべてのマウスに 7%食を与え、試験開始時に 2 群に分け、一方には 7%食、他方には 14%食を 4 および 9 週間与えた。本飼育へのエサの切り替え前後と飼育 3 および 7 週目に生体ガス質量分析計を用いてエネルギー代謝量を算出した。最終日に絶食をせずに屠殺した。
【結果】総摂食量に有意な差はなかったが、14%群では 7%群より体重増加量および摂食効率は高かった。4 週間の飼育では腹腔内脂肪重量の有意な増加はなかったが、9 週間の飼育では有意差が認められた。エサの切り替え前では、両群共にエネルギー消費量に差がないものの、脂肪消費量は極めて低く、エサの切り替え後、14%群でも脂肪消費量は有意に上昇しなかったことから、このマウスは、高脂肪食に適応できていないことが示唆された。飼育 3 および 7 週目では、摂食開始直後よりも脂肪消費量は増加し、14%群で 7%群よりも脂肪消費量が高く、炭水化物消費量は低く、高脂肪食への適応が見られた。9 週間の飼育では、血清トリアシルグリセロール濃度は群間で差がなかったが、肝臓トリアシルグリセロール濃度は 14%群で 7%群より高かった。肝臓の脂肪酸生合成系酵素である脂肪酸合成酵素(FAS)の活性は 14%群で 7%群より低かったが、β酸化系酵素の活性はほとんど影響が認められなかった。糞中脂肪酸排泄率は群間で差はなかった。
【考察】db/db マウスでは、 9 週間の飼育でエネルギー消費量に差がないものの、高脂肪食による腹腔内脂肪重量の増加が観察され、C57BL/6J マウスとは異なる結果となった。db/db マウスは脂肪燃焼能が低いと考えられ、このことが高脂肪食による体脂肪蓄積に関わると考えられた。

db/db mice, energy metabolism, high fat diet

発表番号：2E059
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ビワ葉水抽出物による糖・脂質代謝改善作用

# Improving effect of water extracts of *Eriobotrya japonica* leaves on glucose and lipid metabolism.

○神田 尚幸[1]、平井 静[1]、熊野 未佳子[1]、大江 靖雄[2]、江頭 祐嘉合[1]([1]千葉大院園芸応生化、[2]千葉大院園芸食資)
○Naoyuki KANDA[1], Shizuka HIRAI[1], Mikako KUMANO[1], Yasuo OHE[2], Yukari EGASHIRA[1] ([1]Chiba University, [2]Chiba Univ.)

【目的】

千葉県ではビワ（*Eriobotrya japonica*）の果樹栽培が盛んであるが、ビワ葉は、一部がお茶として飲用されているものの、有効活用が課題となっている。ビワ葉は古くから東洋医学において咳止め薬などに利用されてきた歴史を持ち、様々な薬理効果が期待されている。本試験では、ビワ葉の茶としての利用を考え、ビワ葉水抽出物が高脂肪食誘導性肥満マウスの糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】

＜ビワ葉水抽出物の調製＞ 2015 年 7 月に収穫したビワ葉を洗浄後、速やかに凍結乾燥させた。破砕後、80℃ の蒸留水で 3 時間抽出し、遠心分離（12,000 rpm、5 分）により上清を回収し、凍結乾燥したものを供試材料とした。

＜動物実験＞ 6 週齢の C57BL/6J 雄マウスを順化後、平均体重が等しくなるように 3 群に分けた。それぞれの実験群のマウスには、AIN93G を基本とした 45% kcal 高脂肪食に、ビワ葉水抽出物を 0、2、または 5% 添加した実験食を給餌した。11 週目に経口糖負荷試験を実施し、マウスの耐糖能を評価した。12 週目に解剖を実施し、心臓より血液を採取後、各組織を摘出し、その重量を測定した。血液から血漿を分離後、生化学的パラメーターを測定した。また、肝臓における脂肪酸の同化および異化関連遺伝子発現量を測定した。

【結果と考察】

マウスの体重はビワ葉水抽出物の添加濃度依存的に減少した。体重変化と同様に、肝臓および白色脂肪組織重量も、ビワ葉水抽出物添加群で減少し、ビワ葉水抽出物 5% 群では有意な低下が認められた。ビワ葉水抽出物は糖代謝にはあまり影響しなかったものの、血漿中中性脂肪濃度は 2、5% 群で有意に減少し、肝中中性脂肪含量についても、同様の傾向が認められた。肝臓における遺伝子発現を解析したところ、脂肪酸 β 酸化に関与する Carnitine palmitoyltransferase Iα mRNA 発現量が有意に増加した。以上の結果より、ビワ葉水抽出物の摂取により、肝臓における脂肪酸 β 酸化が亢進し、肝臓および白色脂肪組織重量の減少が誘導されるメカニズムが推察された。

lipid metabolism, *Eriobotrya japonica*, leaves

発表責任者：江頭祐嘉合（egashira@faculty.chiba-u.jp）

発表番号：2E060
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# カフェインは緑茶カテキンの内臓脂肪蓄積抑制作用に影響するのか？
# Effects of caffeine and green tea catechins on abdominal fat deposition in mice

○池田 郁男、伊藤 知美、井上 奈穂（東北大院農）
○Ikuo Ikeda, Tomomi Itoh, Nao Inoue (Tohoku Univ.)

緑茶カテキン飲料には内臓脂肪蓄積抑制作用が報告されている。そのメカニズムとして、エネルギー消費や脂肪燃焼の増加が報告されているが、我々のガレート型カテキンを用いた試験ではこれらの増加は認められず、脂肪酸生合成抑制や脂肪吸収遅延を観察した。このような作用機構の違いの一因として、カテキン飲料に一緒に含まれ、熱産生増加作用が知られるカフェインの影響が考えられた。我々が用いたガレート型カテキンにはカフェインは含まれていない。そこで、ガレート型カテキンとカフェインをマウスに与え影響の違いを調べた。

【方法】

4 週齢雄性 ICR マウスを 4 群に分けた。食餌は Control 群=10%ハイオレイックサフラワー油食（対照食）、ガレート型カテキン（GC）群=対照食に 0.5%GC 添加、カフェイン（CF）群=対照食に 0.05%CF 添加、GC+CF 群=対照食に 0.5%GC+0.05%CF 添加とした。対照食で 6 日間予備飼育後、それぞれの食餌で 6 週間飼育した。4 週目に生体ガス質量分析装置を用い、エネルギー代謝を測定した。最終日は絶食せずに屠殺した。データは二元配置分散分析で解析した。

【結果】

エネルギー消費量はカフェインで有意に増加したが、カテキンの影響はなかった。カフェインでの増加は炭水化物燃焼の増加によると考えられ、脂肪燃焼は亢進しなかった。摂食量はカテキン摂取で低下したが、成長や摂食効率はカフェイン摂取で低かった。腹腔内脂肪重量はカフェイン摂取で有意に低く、カテキンでは低い傾向にあった。肝臓トリアシルグリセロール濃度は、カフェイン摂取で有意に低く、カテキン摂取で低い傾向にあった。肝臓の β 酸化系酵素である acylCoA oxidase はカフェイン摂取で低かったが、カテキンの影響は見られなかった。carnitine palmitoyltransferase 活性はカテキン摂取で低い傾向にあったが、カフェイン摂取の影響はなかった。

【考察】

以上の結果より、本実験条件下ではカフェインはカテキンよりも強い内臓脂肪蓄積抑制作用を示した。カフェインはエネルギー消費を亢進したが、それは炭水化物燃焼の増加によると考えられた。従って、カテキン飲料で観察される脂肪燃焼増加の原因は、同時に含まれるカフェインの影響ではないと考えられた。なお、ほとんどのパラメータにおいてカテキンとカフェインで交互作用は観察されず、これらは相加的に作用すると考えられた。

catechin gallates, caffeine, energy metabolism

発表責任者：池田郁男（iikeda@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：2E061
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 低アルギニン食による肝脂肪蓄積メカニズムの解析

# Study on the mechanism of liver fat accumulation by low arginine diet

○赤坂 優太[1]、小山 彩香[1]、大谷 りら[1]、佐藤 正幸[1]、高橋 伸一郎[2]、加藤 久典[1]([1]東大院・総括・食と生命、[2]東大院・農生科・応動科)
○ Yuta AKASAKA[1], Ayaka KOYAMA[1], Lila OHTANI[1], Masayuki SATO[1], Shinichiro TAKAHASHI[2], Hisanori KATO[1] ([1]Food for Life, The Univ. Tokyo, [2]Grad. School. Agr. Life Sci., The Univ. Tokyo)

【目的】我々はラットに低タンパク質相当食あるいは低アルギニン食を給餌すると、肝臓への中性脂肪（TG）の蓄積が増加することを報告し、両者の機序は異なる可能性が示されている。これら 2 つの脂肪肝モデルの脂肪蓄積機序を調べるために、DNA マイクロアレイを行い、その解析結果から肝臓からの脂質放出抑制に着目した。また、脂肪肝形成によるフィードバックの影響を排除し、脂肪肝形成が開始される段階での変化を調べるため、5 時間のみの短時間給餌を行ったラットを用い、低タンパク質相当食と低アルギニン食による脂肪肝誘導機序の比較検討を行った。
【方法】〈15 日間給餌実験〉6 週齢の雄性 Wistar ラットにアルギニンのみを対照群の 3 分の 1 になるよう調製した飼料（低アルギニン食）、及び総アミノ酸含量の低い飼料（低タンパク質相当食）を 15 日間与えた。なお、対照群には 15%カゼインと類似した組成のアミノ酸ミックスを用いた。他の組成は AIN76 組成に準じて調製した。給餌開始から 15 日目に解剖を行い、得られた肝臓より抽出した Total RNA を群ごとにプールし, DNA マイクロアレイ解析に供した（GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array；Affymetrix）。
〈5 時間給餌実験〉明期に摂食させるために制限給餌による馴化を行った後、7.5 週齢の雄性 Wistar ラットに低タンパク質相当食及び低アルギニン食を 5 時間与えた。直ちにイソフルラン麻酔下尾静脈より採血を行った後、同じく尾静脈より Tyloxapol を 0.2mg / g BW になるよう投与した。Tyloxapol 投与後 0.5、1、2、4 時間後に尾静脈より採血を行い、血漿を得た。その後開腹し、肝臓を得た。血漿中のインスリン、グルコース、TG、総コレステロール、HDL コレステロール及び遊離脂肪酸濃度を測定し、また、ホルチ法によって肝臓から脂質を抽出し、TG を測定した。
【結果】〈15 日間給餌実験〉DNA マイクロアレイ解析の結果、低タンパク質を与えた群（LP 群）では脂質合成に関わる遺伝子発現が亢進していたのに対し、低アルギニン食を与えた群（LA 群）では発現が低下していた。このことから LA 群では脂質放出が抑制されていると結論した。
〈5 時間給餌実験〉Tyloxapol 投与 2、4 時間後において LA 群の血漿中 TG 濃度が有意に減少していたことから、LA 群では肝臓からの脂質放出が抑制されていることが確認できた。以上の結果から、LP 群ではインスリンシグナルの変動が先行して脂肪肝が形成されるが、LA 群では肝臓からの脂質放出抑制が先行していると考えられた。本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」を活用して行った。

Arginine, fatty liver, protein restriction

発表番号：2E062
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 年齢および性の違いによる酸化コレステロールの代謝の変化

# Change of the metabolism of oxidized cholesterol by the difference age and sex.

○関原 花会、古木 葵、長田 恭一 (明治大農)
○HANAE SEKIHARA, AOI FURUKI, KYOUICHI OSADA (Meiji Univ.)

【目的】動物性加工食品に含まれるコレステロールの一部は、加熱調理や保存の過程で酸化し、酸化コレステロール(Oxc)となる。食事により摂取された Oxc は、生体内で徐々に蓄積され、動脈硬化等の加齢と関連する疾患の発症要因になることが知られている。Oxc の代謝経路については過去の研究においていくつか報告されているが、年齢や性の違いによる Oxc 代謝への影響は不明な点が多い。そこで本研究では、種々の Oxc の中でも動脈硬化の進展に深く関与すると考えられている 7-Ketocholesterol(7-KC)に着目し、その代謝の年齢および性の違いによる変化を検討した。

【方法】Exp.1　5 週齢(Young 群)、24 週齢(Old 群)の Wistar 系雄性および雌性ラット(n=4-5)を 3 日間予備飼育した後、12 時間絶食させ、Oxc を 100mg 含むエマルションを経口投与した。投与後は、脂質成分を含まない AIN76 純化飼料を自由摂食させ、24 時間後に腹部動脈により採血死させた。その後採取した血液、肝臓、糞便中の Oxc レベルおよび肝臓において 7-KC を 7β-hydroxycholesterol(7β-OHC)に変換すると考えられている 11β-HSD1 の mRNA 発現量を測定した。
Exp.2 5 週齢(Young 群)、18 週齢(Old 群)の Wistar 系雄性および雌性ラットの肝臓から調製したミクロソーム画分に 7-KC を添加し、0、0.5、1、3、6 時間反応させた後、GCMS を用いて 7-KC および 7β-OHC レベルを測定した。

【結果・考察】血漿の 7-KC レベルは、他群と比べ Old 雌群で有意に高くなった。また、肝臓の 7-KC レベルは雌群に比べ雄群で低くなる傾向があり、二元配置分散分析の結果から、性の違いによる影響が有意であることが確認された。さらに、肝臓の 11β-HSD1 mRNA レベルは雌群に比べ雄群で有意に高くなり、肝臓の 7-KC レベルと同様、性の違いによる影響が有意であった。以上の結果から、ラットの場合、雄は雌に比べ 7-KC が代謝されやすいのではないかと考えられた。しかし、Oxc は外因性のものに加え、生体内の酸化ストレスにより生成する内因性のものも存在する。したがって、外因性の 7-KC が実際に 11β-HSD1 により 7β-OHC へと変換されていること、さらにはその代謝への年齢および性の違いによる影響を、現在 in vitro で検討中である。

oxidized cholesterol, metabolism, 11ß-Hydroxysteroid dehydrogenase 1

発表番号：2E063
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 嫌気性細菌によるエピラクトース代謝の多様性

# The variety of epilactose metabolism in anaerobes

○坂井 未悠、佐分利 亘、森 春英（北大院農）
○Miyu SAKAI, Wataru SABURI, Haruhide MORI (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ.)

【背景と目的】エピラクトース（Gal β1→4 Man）は加熱牛乳中に微量存在する難消化性のオリゴ糖である．ラットへの経口摂取試験により腸内細菌叢改善効果とそれに伴う二次胆汁酸生成の抑制およびミネラル吸収の促進が示され，食品素材として期待される．エピラクトースで増殖する腸内細菌は一部明らかにされているが，腸内細菌によるエピラクトースの代謝は明らかでない．本研究では各種細菌の培養試験および生化学的解析を行い，エピラクトース代謝の多様性を明らかにした．

【結果と考察】腸内細菌を含む 65 菌株を 2%D-グルコース，ラクトースまたはエピラクトースのいずれかの糖質を含む栄養制限培地を用いて 37℃にて 24 時間嫌気培養した．菌体増殖を $A_{600}$ により測定し，培養上清の糖残量を HPLC で測定した．培養上清，無細胞抽出液および細胞破砕残渣懸濁液の 3 画分を調製し，エピラクトース分解活性を検出した．その結果，エピラクトースでの増殖とラクトースでの増殖には概ね正の相関が得られた．またエピラクトースで増殖が高い株ではエピラクトース分解活性が高い傾向が見られた．しかし高増殖・高分解活性の株群であっても分解活性の局在には多様性がみられた．例えば *L. casei* JCM1134 は無細胞抽出液にのみ，*B. catenulatum* JCM1194 は無細胞抽出液と細胞残渣に，*B. callitrichos* JCM17296 は培養上清，無細胞抽出液および細胞残渣の全てに分解活性を示した．*B. kashiwanohense* JCM15439 等の株では細胞残渣にエピラクトースからフルクトースの生成も見られ，分解活性だけでなく異性化活性も認められた．また培養上清に分解物であるガラクトースおよびマンノースを蓄積する株，マンノースのみを蓄積する株，どちらも蓄積しない株が見られた．以上の結果から，エピラクトースの代謝経路の多様性が予想される．またこれとは別にエピラクトースで低増殖・高分解活性の株，逆に高増殖・低分解活性の株も観察された．このうち *B. reuteri* JCM17295 および *L. saniviri* JCM17471 は低増殖であり糖消費も示さないが，無細胞抽出液には分解活性が認められた．従って，細胞内へのエピラクトース取り込みにおける障害が考えられる．またラクトース培養ではエピラクトース分解活性の局在が異なる株があり，エピラクトースはラクトースとは異なる誘導シグナルとして働く可能性が示された．一方，*B. longum* subsp. *infantis* JCM1222 では培地の糖質によらずエピラクトース分解活性が検出された．さらにこの株が持つ 9 種類のβ-ガラクトシダーゼ様遺伝子の発現量を半定量 RT-PCR により解析すると，培地の糖質によらず同種のβ-ガラクトシダーゼの発現が見られたことから，恒常的に発現するβ-ガラクトシダーゼがエピラクトースの分解に関わることが示唆された．

prebiotics, epilactose, metabolism

発表番号：2E064
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

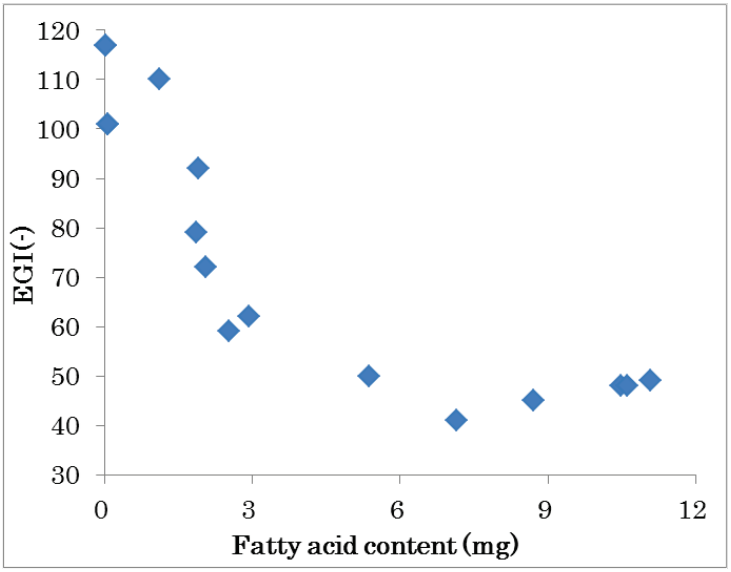
# パルミチン酸およびリノール酸の添加加熱による澱粉の消化性制御

# Digestion control by fatty acid adding and heating

○森 大輝[1]、中嶋 奎太[2]、大堀 翔子[2]、石川 匡子[1,2]、張 函[1,2]、陳 介余[1,2]、藤田 直子[1,2]、秋山 美展[1,2] ([1]秋田県大院生物資源、[2]秋田県大生物資源)
○Daiki MORI[1], Keita NAKASHIMA[2], Shoko OHORI[2], Kyoko ISHIKAWA[1,2], Han ZHANG[1,2], Jieyu CHEN[1,2], Naoko FUJITA[1,2], Yoshinobu AKIYAMA[1,2] ([1]Akita Pref. Grad. Sch., [2]Akita Pref. Univ.)

【目的】食後血糖値の上昇抑制に効果が期待される新しい難消化性澱粉素材の開発を目的として研究を進めている。澱粉の消化性をコントロールするために、馬鈴薯澱粉に脂肪酸を添加し加熱する簡便で消費者受容性の高い方法によって澱粉に難消化性を付与することが可能であることを報告した[1)]。パルミチン酸およびリノール酸を添加し加熱した澱粉の消化性が低下するメカニズムを明らかにするために実験を行った。

【方法】澱粉の水分を 11, 20%に調整し、脂肪酸（パルミチン酸, リノール酸）を 0, 3, 5, 7%(w/w) 添加混合し、これを試料とした。試料をステンレス製の密閉容器に封入し、140℃のオイルバス中で加熱処理後、ただちに氷水中で急冷した。澱粉消化性の評価は Goni[2)] らの方法を一部改変し、森ら[1)]の方法によって酵素分解グリセミック指数（EGI）として算出した。また、同じ試料について澱粉と複合体を形成した可能性のある脂肪酸量を定量し、EGI と澱粉-脂肪酸複合体量との関係について調べた。




【結果】図 1 に澱粉と複合体を形成したと考えられる脂肪酸量と EGI との関係を示す。縦軸は EGI、横軸は脂肪酸量である。両者の関係には、強い負の相関（r = 0.84）があり、加熱処理中に脂肪酸が澱粉らせん構造内部に侵入、もしくは澱粉分子鎖と複合体を形成することによって、EGI が低下することが示唆された。このように澱粉と脂肪酸が複合体を形成することにより、疎水性が獲得されるため、アミラーゼの澱粉鎖への接近が阻止され、澱粉の消化性が低下したものと考えられる。

図 1　複合体形成脂肪酸量と EGI との関係

【文献】1)森大輝ほか, 日本食品科学工学会東北支部大会要旨 (2014)
2) Goni *et al. Nutrition Research,* Vol. 17, No. 3, 427 - 437（1997）

Resistant starch, Fatty acid

発表責任者：秋山美展（aki10396@akita-pu.ac.jp）

発表番号：2E065
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 微生物を用いたアザ糖 1-デオキシノジリマイシンの高生産培養
# Production of 1-deoxynojirimycin from microorganisms

○高須 蒼生[1]、山岸 賢治[2]、小野瀬 晋二[1]、伊藤 隼哉[1]、池田 亮一[3]、木村 俊之[4]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[5,6]([1]東北大院農・機能分子解析、[2]食品総合研究所、[3]旭松食品(株)、[4]中央農業総合研究センター、[5]東北大・未来科学技術共同研究センター、[6]東北大院農・食の健康科学ユニット)
○So TAKASU[1], Kenji YAMAGISHI[2], Shinji ONOSE[1], Junya ITO[1], Ryoichi IKEDA[3], Toshiyuki KIMURA[4], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[5,6] ([1]Food and Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]National Food Research Institute, [3]Asahimatsu Foods Co., LTD., [4]NARO Agricultural Research Center, [5]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [6]Food and Health Science Research Unit, Tohoku University)

【目的】アザ糖 1-デオキシノジリマイシン（DNJ）は、α-グルコシダーゼの阻害活性を有し、食後の血糖上昇を抑制する 1)。そのため DNJ を含む食品には、糖尿病の予防効果が期待されている。DNJ は桑葉に特徴的に含まれ、桑葉 DNJ の食品展開が進められているものの、供給量が限られることが課題としてあげられる。一方、枯草菌や放線菌は DNJ を生産することが知られており 2)、こうした微生物による DNJ の高生産 3）が実現すれば、新たな供給源となると考えられる。DNJ を含む食品については安全性の検証（例えば、短期間大量摂取や長期間継続摂取した場合の DNJ やその誘導体の組織への蓄積の有無の確認、等）が重要である。そこで本研究では、[1] *Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 を用いて DNJ の高生産培養を試みるとともに、[2] 安全性検証実験に有用な $^{15}$N ラベル化 DNJ の調製を行った。
【方法と結果】[1] 炭素源の種類と濃度、窒素源（硫酸アンモニウム）の濃度を変えた種々の条件で DSM7 を 5 日間培養した。培地に炭素源としてラクトースが 2.5%、窒素源が 0.4%となるよう加えた時、DNJ の生産量が最大（1.2 g/L 培地）となることがわかった。[2] そこで、$^{15}$N ラベル化硫酸アンモニウムを用いて培養し、上清（4 L）をイオン交換樹脂に供し、乾燥させて、3.8 g の粉末を得た。この粉末を LC-MS/MS で解析した結果、DNJ（$^{15}$N ラベル化 DNJ）の純度は約 90%で、DNJ の前駆体（2-アミノ-2-デオキシ-D-マンニトールやノジリマイシン）も少量含まれていることがわかった。なお、DNJ の異性体である 1-デオキシマンノジリマイシンは、検出されなかった。このように $^{15}$N ラベル化 DNJ の調製に成功したため、今後はこれを用いて、安全性の検証（体内動態試験、等）を行う予定である。
【参考文献】1) Asano, N., et al. Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron Asymmetry*, 11, 1645-1680 (2000)
2) Stein, D. C., et al. Characterization of *Bacillus subtilis* DSM704 and its production of 1-deoxynojirimycin. *Appl Environ Microbiol*, 48, 280-284 (1984)
3) Onose, S., et al. Production of the α-glycosidase inhibitor 1-deoxynojirimycin from *Bacillus* species. *Food Chem*, 138, 516-523 (2013)

1-Deoxynojirimycin, Microbial production, α-Glucosidase

発表番号：2E066
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小麦グルテン加水分解物の血糖上昇抑制効果

# Lowering effects of wheat gluten hydrolyzate on the rise in blood glucose in rats.

○嵯峨根 里穂[1]、三矢 沙貴奈[2]、竹森 久美子[1,2]、米谷 俊[1,2]([1]近大院・農・応生化、[2]近大・農・食栄)
○Riho SAGANE[1], sakina MITSUYA[2], Kumiko TAKEMORI[1,2], Takashi KOMETANI[1,2] ([1]Kinki Univ. graduate school, [2]Kinki Univ.)

【目的】近年、グルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)を利用した糖尿病治療が行われている。GLP-1 は血糖値が高い場合にインスリン分泌刺激作用を示すため、低血糖を引き起こす可能性が低い利点を持つ。アミノ酸の一つであるグルタミンはアミノ酸の中で最も強い GLP-1 分泌刺激作用を持つと報告されているが、溶解性、安定性に問題があった。本研究では、小麦タンパク質であるグルテンをタンパク質分解酵素で処理し、溶解性を高めた小麦グルテン加水分解物(Gln-pep)を用い、血糖上昇抑制効果を検討した。
【方法】実験① 経口糖負荷試験：高血圧と糖代謝異常を併発する脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いた。生後 8 週齢雄性 SHRSP に 20%グルコース溶液(Control 群)、15%Gln-pep 溶液(Gln-pep 群)、または 6%グルタミン溶液(グルタミン群)を経口投与後、血糖値、血漿インスリン濃度を測定した。実験② 腸管灌流試験：生後 7 週齢雄性 Sprague-Dawley(SD)ラットをイソフルラン吸引麻酔下で開腹し、注射用水(Water 群)、リン酸緩衝生理食塩水(PBS 群)、10%グルコース溶液(グルコース群)、12.5%Gln-pep 溶液(Gln-pep 群)、5%グルタミン溶液(グルタミン群)を十二指腸に直接投与した。投与後、十二指腸静脈から経時的に採血を行い、血漿 GLP-1、インスリン濃度を測定した。
【結果】① SHRSP に対する経口糖負荷試験：Control 群に比べグルタミン群の血糖値は 1/2 の値で推移し、Gln-pep 群の血糖値はグルタミン群よりさらに低い値を示した。また、Control 群の血漿インスリン濃度の推移に比べ、グルタミン群では 1.5 倍、Gln-pep 群では 2 倍高くなり、有意に高値を示した($p$ <0.05)。② SD ラットに対する腸管灌流試験：PBS 群、Water 群の血漿 GLP-1 濃度は、試料投与刺激にともなう変化がみられなかった。一方、グルタミン群、Gln-pep 群の血漿 GLP-1 濃度は試料投与直後から上昇し始め、グルタミン群は投与 120 分においても分泌量が上昇し続けた。一方、Gln-pep 群は投与後 15 分まで上昇した後、120 分までほぼ一定の値を示した。また、PBS 群、Water 群の血漿インスリン濃度は GLP-1 と同様に、試料投与刺激にともなう変化がみられなかったのに対し、グルタミン群の血漿インスリン濃度は試料投与 30 分以降上昇し続け、5 群間で最も高い推移を示した。なお、Gln-pep 群の血漿インスリン濃度はグルタミン群の 1/2 の推移を示した。
【結論】以上の結果より、Gln-pep は GLP-1 とインスリンの分泌を促進し、またその分泌を持続させることで血糖上昇抑制をもたらすことが示された。

Wheat gluten hydrolyzate, Glucagon-like peptide-1(GLP-1), Insulin

発表番号：2E067
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# リグナン腸内細菌代謝物エンテロラクトンの抗糖尿病作用とその機構解析

# Antidiabetic effect of enterolactone, a metabolite of lignans by enterobacterial flora, and its modes of action in vitro and in vivo

○矢ヶ崎 一三[1,2]、周 芳[2]、古橋 慶亮[2]、孫 銘辰[2]、豊崎 美紅[1]、吉澤 史昭[1,3]、三浦 豊[2]([1]宇都宮大バイオセ、[2]東農工大農、[3]宇都宮大農)
○Kazumi Yagasaki[1,2], Fang Zhou[2], Keisuke Furuhashi[2], Myoung Jin Son[2], Miku Toyozaki[1], Fumiaki Yoshizawa[1,3], Yutaka Miura[2] ([1]Utsunomiya Univ. CBRE, [2]Tokyo Univ. Agr. Tech, [3]Utsunomiya Univ.)

【目的】リグナンを経口摂取すると、腸内細菌によってママリアンリグナンに変換され、最終的に体内へ移行することが知られている。私たちはリグナンの一種ハイドロキシマタイレシノールと同様にエンテロラクトン（ENL）に強い肝癌細胞増殖抑制作用があることを細胞培養系および担肝癌ラットで見出し報告した。近年、リグナン代謝物とくに ENL の尿中濃度と２型糖尿病（T2D）の発症リスクとの間に負の相関性のあることがヒトで報告されている。そこで本研究では、培養筋細胞と T2D モデルマウスを用いて ENL の抗糖尿病作用の有無と作用機構について検討することを目的とする。
【方法】まず、L6 筋芽細胞を仔牛胎仔血清 FBS 含有 DMEM 培地中で培養・増殖後、L6 筋管細胞へ分化させ、グルコース取り込み能に対する ENL の作用を検討した。次に、阻害剤を用いて AMPK の関与を推定後、AMPK の活性化（=リン酸化）を Western blotting（WB）法で確認した。さらに、グルコース輸送体（GLUT4）の細胞膜移行を WB 法および免疫細胞化学法で検討した。T2D モデルマウスとして、６週齢の雄 db/db マウスを用いて 3 群に分けた。20%カゼインを含む AIN-93 処方基本食（20C, CNT 群)、これに ENL を 0.001% （ENL-L 群）または 0.01%（ENL-H 群）を添加した実験食を６週間摂取させた。正常マウス（(m/m) に 20C を同様に摂取させ正常群（NOR 群）とした。毎週、3 時間絶食後に尾静脈より採血して血糖値を測定し、空腹時血糖（FBG)）とした。また、飼育５週目に耐糖能試験（IPGTT）を行った。飼育６週後に FBG 測定用血液採取後に全採血して血清を調製し、インスリン、グルコース、脂質濃度等を測定した。さらに、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR を算出した。
【結果】ENL はインスリン非存在下で L6 筋管細胞によるグルコース取り込みを用量依存的に促進した。この促進作用は AMPK 阻害剤である Compound C によって消去され、ENL の作用発現に AMPK が関与することを示唆した。そこで AMPK の活性化の有無を検討したところ、ENL が AMPK のリン酸化を促進することが認められた。また、ENL が GLUT4 の細胞膜移行を促進することが WB 法および免疫細胞化学法の両者で認められた。NOR マウスにくらべ、T2D モデルマウス（CNT）の血糖値、HOMA-IR、血清トリグリセリドと過酸化脂質（TBARS）濃度は有意に上昇したが、ENL はこれらの上昇を有意に抑制するかその傾向を示した。IPGTT の結果、ENL-H は耐糖能異常を有意に改善することが認められた。
【考察】ENL は低用量（0.01%）で２型糖尿病予防的ないし軽症化的に作用すること、その機構の一つは AMPK の活性化を介した GLUT4 の細胞膜移行の促進による筋細胞への血中からのグルコース取り込み増加によること、ENL はリグナンの抗糖尿病作用を示す化学的実体の一つであることが考えられる。

diabetes, AMPK, GLUT4

発表番号：2E068
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コーヒーの STZ 誘発性膵β細胞死に対する効果の解析

# The protective effect of coffee on STZ-induced pancreatic beta cell death

○倉田 貴生、小林 美里、浜名 芳輝、村井 篤嗣、堀尾 文彦（名古屋大院生命農・応用生命）
○Takao KURATA, Misato KOBAYASHI, Yoshiki HAMANA, Atsushi MURAI, Fumihiko HORIO (Nagoya Univ.)

【背景】2 型糖尿病はインスリン抵抗性とインスリン分泌不全を主因として発症する。我々はこれまでに 2 型糖尿病モデルマウスを用いて、コーヒー摂取が末梢組織でのインスリン抵抗性を改善することを見出し報告した[1, 2]。しかし、コーヒー摂取がもたらすインスリン分泌能への影響は明らかにされていない。そこで、コーヒーを摂取する C57BL/6J マウスに膵β細胞を特異的に破壊する薬剤のストレプトゾトシン（STZ）を投与し、その後もコーヒー摂取を継続させたところ、高血糖の発症が抑制された。このことにより、コーヒーは STZ 誘発性膵β細胞死に対する保護作用を有することが示唆された。本研究では、コーヒーの STZ 誘発性糖尿病発症抑制効果における作用機構の解析を目的として、STZ 投与に対するコーヒー摂取のタイミングを変えることでコーヒーの作用点の検討を行った。

【方法】実験 1 ：C57BL/6J マウス（7 週齢、雄）を 2 群に分け、水（water 群）あるいはコーヒー2.5 倍希釈液（coffee 群）を飲水として与えた。4 週間の飲水投与の後、STZ を腹腔内投与（165mg/ kg BW）し、6 時間後に解剖を行って膵臓切片の TUNEL 染色により膵β細胞死の程度を測定した。
実験 2：C57BL/6J マウス（8 週齢、雄）に STZ を腹腔内投与し、その 6 日後に血糖値を測定して糖尿病発症個体のみを選抜して 2 群に分け、水（water 群）あるいはコーヒー2.5 倍希釈液（coffee 群）を飲水投与した。その後 25 日目まで経時的に両群の血糖値を測定して解剖した。

【結果】実験 1 : water 群と coffee 群において、細胞死を起こした膵β細胞の割合は同等であり、STZ 投与前のコーヒー摂取による膵β細胞の STZ 耐性は観察できなかった。
実験 2：コーヒー摂取開始後の血糖値は、coffee 群では water 群より有意に低い値が継続して観察された。また、解剖時の膵臓のインスリン含量は有意ではないものの、coffee 群で高い傾向を示した。

【考察】STZ 誘発性糖尿病に対するコーヒーの発症抑制作用は、STZ 投与後の膵β細胞の破壊進展の段階で発揮されていると考えられた。今後はマウスの膵β細胞株を用いて STZ 投与下でのコーヒーの膵β細胞の機能維持作用の検討を行う予定である。

[1]*J. Agric. Food. Chem.* 58: 5597; 2010　[2]*J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 58: 408; 2012

coffee, pancreatic beta cell, diabetes

発表責任者：小林美里（misatok@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2E069
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 細胞内 *de novo* セリン合成系欠損による酸化ストレス脆弱性惹起と炎症関連遺伝子発現誘導

# Genetic ablation of intracellular *de novo* L-serine synthesis increases vulnerability to oxidative stress and inflammation-related gene expression in mouse embryonic fibroblasts

○濱野 桃子[1]、佐矢野 智子[2]、有本 八潮[2]、川野 裕輝[2]、鵜殿 美弥子[2]、片倉 喜範[2]、小川 拓哉[3]、加藤 久典[4]、平林 義雄[5]、古屋 茂樹[2,5] ([1]福岡女子大、[2]九大、[3]奈良先大、[4]東大、[5]理研)
○ Momoko HAMANO[1], Tomoko SAYANO[2], Yashiho ARIMOTO[2], Yuki KAWANO[2], Miyako UDONO[2], Yoshinori KATAKURA[2], Takuya OGAWA[3], Hisanori KATO[4], Yoshio HIRABAYASHI[5], Shigeki FURUYA[2,5] ([1]Fukuoka Women's Univ., [2]Kyushu Univ., [3]NAIST, [4]Tokyo Univ., [5]RIKEN)

セリン合成酵素 3-Phosphoglycelate dehydrogenase (*Phgdh*) 遺伝子が不活化されたノックアウト (KO) マウスは、脳形態形成異常を伴った著しい発達遅滞を呈し、胎生致死となる。我々は分子レベルでの *de novo* セリン合成の栄養生理学的意義の解明を目的に、*Phgdh* KO マウス胚より線維芽細胞 (KO-MEF) を樹立し、セリン欠乏に対する細胞応答の解析を行ってきた。

セリンを添加した条件及びセリンを制限した条件にて KO-MEF を培養した後に DNA マイクロアレイ解析を行った結果、制限条件によりチオレドキシンの阻害因子である Thioredoxin-interacting protein（*Txnip*）や、Txnip により発現誘導され炎症反応を惹起する酵素である Prostaglandin-endperoxide synthase 2（*Ptgs2*）の顕著な mRNA レベルの増加を検出した。また、これらの発現誘導は定量 RT-PCR 法にて再現性を確認したことをこれまでに報告している。しかし、セリン欠乏が誘導する *Txnip* および *Ptgs2* の発現制御機構は未だに分かっていない。そこで、細胞内セリン欠乏による両遺伝子の発現制御機構について酸化ストレスと関連細胞内情報伝達系に着目して検討を行った。

KO-MEF をセリン制限条件で培養すると細胞内レドックスを制御する総グルタチオン濃度が有意に減少し、過酸化水素添加による酸化ストレス負荷に脆弱になっていた。セリン制限による *Txnip* の発現誘導は抗酸化剤 N-アセチルシステインの添加により抑制されたことから、細胞内セリン欠乏は酸化ストレス惹起を介して *Txnip* を誘導することが示唆された。次いで、セリン欠乏により活性化されるストレス関連 MAPK シグナリングの寄与を阻害剤によって評価したところ、両遺伝子いずれも JNK 阻害剤の添加により発現が有意に低下し、*Ptgs2* は p38MAPK の阻害下においても抑制された。その一方で Atf4 ノックダウンは両遺伝子の発現にほとんど影響を与えなかった。

以上の結果より、細胞内セリン欠乏は酸化ストレスを惹起し、細胞外からのセリンを制限した条件では *de novo* セリン合成系が酸化ストレス防御に不可欠の代謝経路であること、また、細胞内セリン欠乏は複数の情報伝達系を活性化して炎症反応を惹起する可能性が示唆された。

L-serine, Oxidative stress, Thioredoxin-interacting protein

発表番号：2E070
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

SHRSP の血管障害に対するカツオ動脈球由来エラスチンペプチドの効果
Effects of an elastin peptide derived from the bulbus arteriosuson vascular dysfunction in SHRSP
○竹森 久美子[1]、堀内 喜高[2]、赤星 保光[2]、米谷 俊[1]([1]近大農、[2]近大ライフサイエンス)
○Kumiko TAKEMORI[1], Yoshitaka HORIUCHI[2], Yasumitsu AKAHOSHI[2], Takashi KOMETANI[1]
([1]Kinki Univ., [2]Kinki Univ.Life science)

【目的】エラスチンは弾性線維の主要な構成蛋白で、血管や靱帯、軟骨、肺、皮膚など多くの組織に存在しており、生体の弾力性に重要な役割を果たしている。加齢や様々な疾患の進行にともない弾力性は低下の一途をたどり重要な機能障害がもたらされるが、その予防や改善に有効な方策は見出されていない。我々は動脈や皮膚などにおける弾力性低下に対する食品成分の予防効果の検索においてエラスチンペプチドに着目し、その中でも日本人の食習慣に馴染みのある魚類より得られ、且つ安全性が確認されているカツオ動脈球由来エラスチンペプチドの効果を検討している。本研究では、脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）を用い、エラスチンペプチドの慢性投与による動脈機能や高血圧性臓器障害におよぼす影響を検討した。
【方法】生後 12 週齢の雄性 SHRSP を 2 群に分け、うち 1 群にエラスチンペプチド（林兼産業）を 600mg/kg/day となるように、朝夕に 1 日 2 回経口投与した（Elastin 群）。他の 1 群を非投与 Control 群とした。実験期間中、飼料（船橋 SP 飼料）・飲料水は自由摂取させ、血圧（tail-cuff 法）・体重を週 1 回測定した。4 週間投与後、脳、心臓、腎臓の組織的学的観察とともに走査型電子顕微鏡(SEM)観察により大動脈内腔面の傷害程度をスコア化し、正常血圧の Wistar-Kyoto rat（WKY）と比較した。また胸部大動脈を用いて血管反応性をマグヌス法で検索するとともに、realtime PCR 法により eNOS および ICAM-1 の発現解析を実施した。
【結果】SHRSP Control 群と Elastin 群の血圧と体重は同様の推移を示し、血管反応性も同様で、エラスチンペプチド投与による影響は認められなかった。脳、心臓の形態学的所見にも両群間に差は見られなかったが、典型的な高血圧性血管病変である腎臓の細小動脈における血管壊死の頻度は Control 群に比べ Elastin 群で有意に低値を示した（$p<0.05$）。また、胸部大動脈の SEM による観察では、Control 群の内腔面は著しく粗糙で内皮細胞にはクレーター様構造が多数観察されたのに対し、Elastin 群では平滑でクレーター数も少なく、内皮細胞障害の有意な抑制が認められた。内皮細胞における eNOS の発現には差が認められなかったが、ICAM-1 の発現は有意に低値であった。
【結論】以上のように、魚類由来エラスチンペプチドには SHRSP における重症高血圧に対する抑制効果は認められなかったが、高血圧性血管障害に対する抑制作用がある可能性が示された。その機序は不明であるが、今後有効ペプチドの同定や動脈における Elastin receptor ならびにシグナル伝達機構の解明を実施するとともに、弾力性低下防止の方略を追及する予定である。

SHRSP, elastin peptide

発表責任者：竹森久美子（kuriman@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：2E071
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 卵黄由来新規育毛素材のヒト育毛効果検証試験

# Pilot study of a novel diet treatment for female pattern hair loss using egg yolk-derived hair growth ingredients.

○原田 清佑[1]、中村 紀夫[1]、山村 春男[2]、金 武祚[1] ([1](株)ファーマフーズ、[2](株)シャルレ)
○Seiyu HARADA[1], Toshio NAKAMURA[1], Haruo YAMAMURA[2], Mujo KIM[1] ([1]Pharma Foods International Co., Ltd., [2]CHARLE CO.,LTD.)

【目的】鶏卵から孵化したヒナは、羽毛をまとっている。このことは、ヒナの発生過程で羽毛の成長を促す未知の育毛成分が卵黄中に含まれる可能性を示唆している。そのような生理活性成分を追究し、新規育毛素材への応用を考案した。今般、脱脂卵黄粉末から適切な条件で調製されたペプチド画分 GPF(Growth Promoting Fraction)が、育毛系モデルマウスに対して経口摂取により発毛促進作用を示すことが見出された。組織標本において皮下に太い毛幹や深部に定着した毛根が観察され、ヘアサイクル成長期を促すことが示唆された。そこで本研究では、GPF の摂取によるヒトへの育毛作用の検証を目的として、薄毛に悩む 40～50 代の健常女性を対象とした育毛試験(pilot study)を実施した。

【方法】試験設計は二重盲検比較試験とし、合計 24 名の被験者を平均年齢が等しくなるように無作為に 2 群に割付けた。試験群(50.5±3.4 歳)では GPF を、プラセボ群(51.0±4.6 歳)ではデキストリンをそれぞれ 250 mg/day の用量で 4 週間摂取した。摂取前後に被験者の頭頂部の毛髪を 1 cm 四方に刈り、フォトトリコグラムにより毛直径を計測した。この際、日本人女性の平均毛直径とされる 80 μm 以上の毛髪を健康な硬毛とし、その頻度を解析した。さらに、Visual Analog Scale(VAS)アンケートを用いて、毛髪に関する被験者の体感や外見への印象を調査した。

【結果】GPF 摂取群では毛刈りした計測部位において、休止期から成長期へ移行した毛髪や、毛直径が増加して硬毛化した毛髪が観察された。さらに、GPF 摂取群では、摂取前に比べて硬毛頻度が有意に増加した。このような傾向はプラセボ群では観察されなかったことから、硬毛頻度の増加は GPF の摂取に起因した生理現象である可能性が示唆された。一方で、頭部以外の産毛が硬毛化したり、健康不良を伴う事例は観察されなかった。さらに、VAS アンケートの結果から、GPF 摂取による抜け毛の軽減について明瞭な体感が示された。「抜け毛が気になる」との設問に対して、両群ともに摂取前のスコアは高値を示したが、GPF 摂取群では摂取後に半減した。プラセボ群における摂取後のスコアと比較しても有意な減少であり、硬毛頻度の増加に付随した抜け毛の軽減が示唆された。現在、経口摂取による新しい育毛アプローチの実現に向けて、大規模なヒト試験を進行している。

hair growth, egg yolk, female pattern hair loss

発表番号：2E072
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラットにおける高タンパク質食の満腹感効果に及ぼすグルタミン酸ナトリウムの影響

# Effect of monosodium glutamate on satiety induced by high protein diets in rats

○真柳 佑希、後藤 知子、白川 仁、駒井 三千夫（東北大院農）
○Yuki MAYANAGI, Tomoko GOTO, Hitoshi SHIRAKAWA, Michio KOMAI (Tohoku Univ.)

タンパク質は、三大栄養素の中で単位カロリーあたりの満腹感効果が最も強く、高タンパク質食の給餌下では摂食量が減少することが知られている。また、近年では旨味物質であるグルタミン酸ナトリウム (MSG; monosodium glutamate) がタンパク質の満腹感効果を増強する可能性が示唆されており、タンパク質および MSG の効果的な摂取は摂取カロリーを低減させる可能性が考えられる。しかしながら、これまでの研究では満腹感の解析として数時間の追跡に留まっており、高タンパク質食および MSG 摂取が長期に渡り食餌性肥満形成の抑制につながるか否かの確証は得られていない。そこで本研究ではラットを用いて、タンパク質含量の異なる高脂肪食を長期間給餌した際の摂食量および体重等の変化を追跡するとともに、MSG 添加による効果についても検討することとした。

SD 系雄ラット 4 週齢を用い、5 日間の馴化後、実験食を給餌した。実験群は、高脂肪 14%タンパク質食 (Con) 群、高脂肪 30%タンパク質食 (P30) 群、高脂肪 45%タンパク質食 (P45) 群、高脂肪 60%タンパク質食 (P60) 群の 4 群を設けた。P30、P45、P60 の各実験食は炭水化物源をタンパク質源に置き換えることによって調製し、飼料重量あたりのカロリーが等しくなるようにした。各実験食を 6 週間給餌した後に解剖し、解析に供した。その結果、飼育期間中の摂食量はタンパク質含量依存的に減少し、P60 群では解剖時体重が顕著に低値を示した。P60 群では Con 群に比較して内臓脂肪重量が有意に低く、高タンパク質食給餌は食餌性（高脂肪食給餌誘導）の肥満形成を抑制できる可能性が示唆された。しかしながら、P60 群では他群に比較して血中尿素窒素濃度が有意に高かったことから、P45 群を用いて MSG 添加による効果を検討することとした。実験には、Con 群および P45 群に 1%含量の MSG を添加した Con + MSG 群、P45 + MSG 群を設け、各実験食を 6 週間給餌した。その結果、飼育 4 週目において P45 + MSG 群では P45 群に比べ有意に摂食量が減少し、解剖時体重も減少傾向を示した。一方、Con 群に対する MSG 添加の影響は認められなかった。以上の結果から、①タンパク質には高脂肪食で誘発される摂食量・体重・体脂肪の増加を抑制する効果があること、②旨味物質である MSG はタンパク質の効果を増強する可能性があること、が明らかとなった。旨味成分とタンパク質を上手く組み合わせることで、食餌性（高脂肪食誘導）肥満形成の抑制効果を上げることが可能かもしれない。

monosodium glutamate, high protein diet, diet induced obesity

発表番号：2E073
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 魚肉タンパク質摂取による筋重量増増加－他のタンパク質源との比較およびアルギニンの関与の検討－

# Increasing effect of fish protein on skeletal muscle weight -comparison with other proteins and contribution of arginine content-

○岸田 太郎[1]、原 由真[1]、澤井 真梨子[1]、山本 晋平[1]、速水 耕介[2]、韓 力[3]、岡田 晋治[4]([1]愛媛大農、[2]横浜薬大薬、[3]日本水産株式会社、[4]東京大農)
○Taro Kishida[1], Yuma Hara[1], Mariko Sawai[1], Shinpei Yamamoto[1], Kosuke Hayamizu[2], Li Han[3], Shinji Okada[4] ([1]Ehime Univ., [2]Yokohama Univ. of Pharmacy, [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [4]Tokyo Univ.)

【背景・目的】魚肉タンパク質は多量に摂取されている重要なタンパク質源であるにもかかわらず、疾病予防効果等に関する知見は少ない。そこで我々は蒲鉾や魚肉ソーセージ等広く利用されているスケトウダラの魚肉タンパク質（APP）に着目し、その機能性について検討している。脂質代謝への影響を検討する中で、APP を含む食餌性肥満食をラットに与え、運動負荷をかけずに 8 週間摂取させたところ、カゼイン摂取と比較して骨格筋重量が有意に増加することを見出した。この現象は通常食・短期間飼育においても同様に見られ、さらに骨格筋組織切片の観察により、APP は筋肉径を太くしていることが示唆された。タンパク質分解に関わる Atrogin-1 および MURF-1 の骨格筋遺伝子発現が有意に低下し、筋肥大抑制に関わる Myostatin の遺伝子発現も低下し、APP がタンパク質の合成・分解に働きかけている可能性が示唆された。本研究では様々なタンパク質と APP の筋重量増加効果を比較し、作用機構に関わるパラメータも含めて評価した。また、アルギニンの摂取は成長ホルモンの分泌を促進し，筋肥大を導くことが知られているが、タンパク質源のアミノ酸組成において APP のアルギニン含量がカゼインの約 2 倍であった。そこで，カゼインをタンパク質源とした飼料に APP と等量のアルギニンを添加し飼料のアルギニン含量が筋肉に与える影響についても検討した。
【方法】実験1：6週齢，SD系の雄ラットにAIN-93G組成に基づくタンパク質源がカゼイン，APP，ホキタンパク質（HP），ホエイ，大豆，卵白である飼料を与え7日間飼育した。
実験2：実験1と同様にタンパク質源がカゼインまたはAPPの飼料，タンパク質源がカゼインでAPPと等量のアルギニンを添加した飼料を与え7日間飼育した。
【結果・考察】カゼイン摂取と比較してAPP，HP摂取では有意な筋重量の増加がみられたが，ホエイ，大豆，卵白の摂取では筋重量に差はみられなかった。ひふく筋における遺伝子発現では，APPまたはHP摂取によりタンパク質分解促進因子であるMuRF1とatrogin-1の減少がみられた（実験1）。カゼイン摂取と比較してAPP摂取では有意な筋重量の増加がみられたがアルギニンを添加した飼料では差はみられなかった（実験2）。

本研究（の一部）は，総合科学技術・イノベーション会議のSIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施された。

Skeletal muscle, Fish protein, Rat

発表責任者：岸田　太郎（kishida@agr.ehime-u.ac.jp）

発表番号：2E074
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 分岐鎖アミノ酸(BCAA)が皮膚機能に及ぼす影響

# Effects of Branched-chain amino acids on skin function

○森岡 由夏[1]、岩槻 健[1]、大石 祐一[1]、北浦 靖之[2]、下村 吉治[2]、山根 拓実[1] ([1]東農大応生科、[2]名大院生命農)
○ Yuka MORIOKA[1], Ken IWATUKI[1], Yuichi OISHI[1], Yasuyuki KITAURA[2], Yoshiharu SHIMOMURA[2], Takumi YAMANE[1] ([1]Tokyo Univ.Agriculture, [2]Nagoya Univ.)

【目的】

これまでに我々は皮膚の機能維持に重要な働きを持つ分子であるコラーゲンやヒアルロン酸がタンパク質栄養やアミノ酸によって影響を受けることを報告してきた [1)]。しかし、具体的に個々のアミノ酸がどのようにしてこれら皮膚構成成分に影響を及ぼすのかはわかっていない。今回我々が着目した分岐鎖アミノ酸(BCAA)は皮膚に存在するアミノ酸の一つであり、骨格筋や肝臓において様々な有効性を発揮しているが、皮膚での生理作用における報告は多くはない。そこで本研究ではアミノ酸の中でも BCAA の皮膚中での生理的作用に着目し、皮膚線維芽細胞を用いて BCAA 濃度の低下が皮膚構成成分に及ぼす影響を検討した。

【方法】

皮膚線維芽細胞は E-MEM 培地を用いて培養した。サブコンフルエントに達するまで培養した後、96 穴プレートに細胞を播種した。その後、Branched-chain α-keto acid dehydrogenase kinase（BDK）の阻害剤を添加した。BDK を阻害すると BCAA の代謝が亢進され続け、結果として BCAA 低下状態となる。本研究では無添加群をコントロール群、BDK 阻害剤添加群を BCAA 低下群とした。BDK 阻害剤添加下で 24h 培養後、上清を回収して I 型トロポコラーゲン量を Western　blotting 法にて測定した。また、I 型コラーゲン遺伝子である *COL1A1* の発現をリアルタイム PCR 法にて測定した。ヒアルロン酸量は ELISA 法にて測定した。

【結果・考察】

BCAA 低下群において、I 型トロポコラーゲン量とその遺伝子である *COL1A1* は有意に減少した。一方、ヒアルロン酸量については変化が見られなかった。　以上の結果から、皮膚中 BCAA 濃度の低下は I 型コラーゲン合成を抑制し、皮膚機能を低下させることが示唆された。

1)Yamane et al. 2015, Food Sci. Technol.Res. *in press*.

BCAA, skin, collagen

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

発表番号：2E075
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# IL-12 産生を誘導する *Lactobacillus crispatus* 由来菌体成分の特性付け

# Characterization of *Lactobacillus crispatus*-derived cell components which induces interleukin-12 production from macrophages

○渡邉 樹、飛田 啓輔（株式会社キティー）
○Itsuki WATANABE, KEISUKE TOBITA (Kitii Co., Ltd.)

【背景】*Lactobacillus crispatus* KT-11 株（KT-11）は、マウス細胞培養系において Th1 を強く誘導する乳酸菌株として健康な乳幼児の糞便から分離された[1)]。これまでに、演者らは加熱処理した KT-11 をマウスに経口投与すると、アトピー性皮膚炎やアレルギー性鼻炎などのアレルギー性疾患を改善に導くこと[1, 2)]、インフルエンザウイルスの感染による体重減少を抑制すること[3)]、あるいは *Porphyromonas gingivalis* の口腔内感染が招く歯周病を予防すること[4)]を報告した。これらの KT-11 による免疫調節作用は、マウス由来マクロファージを用いた試験により、トール様受容体 2 を介して NFκB や ERK を活性化することで、インターロイキン 12 (IL-12) の産生を導くことに起因することが明らかになっている。しかしながら、IL-12 産生誘導に関与している KT-11 の菌体成分は明らかになっていない。そこで、本研究では KT-11 の免疫調節作用のメカニズムを明らかにする事を目的として、IL-12 産生誘導に関与する KT-11 菌体成分の特性付けを行った。

【方法】MRS 培地で 37℃、20 hr、静置培養した KT-11 を試験に供した。まず、各種酵素（リゾチーム、プロテアーゼ K、DNAse、および RNAse）で処理した KT-11 の IL-12 産生誘導能を測定した。IL-12 産生誘導能の測定は、マウス由来マクロファージ様株化細胞である J774.1 に、凍結乾燥した KT-11 を添加して培養し、得られた上清中の IL-12 量を ELISA で測定した。また、グアニジン塩酸塩および尿素に暴露した菌体についても同様に IL-12 の産生誘導能の測定を行った。KT-11 のグアニジン塩酸塩や尿素抽出物については IL-12 産生誘導能を調べるとともに、SDS-PAGE による分子量の推定を行った。

【結果および考察】KT-11 による IL-12 産生誘導能は、無処理と比較してプロテアーゼ K 処理により有意に低下した。また、グアニジン塩酸塩や尿素で処理した菌体の IL-12 産生誘導能は、無処理と比較して低下するとともに、菌体から得られたグアニジン塩酸塩や尿素抽出物は IL-12 産生誘導能を示した。なお、SDS-PAGE の結果において尿素抽出物には複数のバンドが検出されたことから、KT-11 の IL-12 産生誘導能には、グアニジン塩酸塩や尿素により抽出されるタンパク質の関与が示唆される。

[1)] Tobita *et al.*, J. Agric. Food Chem. (2009), [2)] Tobita *et al.*, Anim. Sci. J. (2010), [3)] 飛田, 日本食品科学工学会, (2015), [4)] Taguchi *et al.*, Int J Oral-Med Sci. (2015).

*Lactobacillus crispatus*, interleukin-12, cell component

発表責任者：渡邉樹（itsuki_watanabe@kitii.co.jp）

発表番号：2E076
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *in vitro* においてラット脳内キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸の検索

# Screening of amino acids to suppress kynurenic acid production in rat brain *in vitro*

関根 愛莉、岡本 美沙希、金谷 侑香、佐野 光枝、柴田 克己、○福渡 努（滋賀県大人間文化）
Airi SEKINE, Misaki OKAMOTO, Yuka KANATANI, Mitsue SANO, Katsumi SHIBATA, ○Tsutomu FUKUWATARI (Univ. of Shiga Pref.)

【目的】トリプトファン代謝産物キヌレン酸は生理的濃度で NMDA 受容体およびα7 ニコチン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストとして作用する．脳内キヌレン酸濃度の上昇はドーパミンやグルタミン酸などの神経伝達物質の放出を抑制し，認知機能など高次脳機能の低下を招く．キヌレン酸前駆体キヌレニンの輸送は中性アミノ酸輸送体を介し，キヌレン酸合成反応を触媒する酵素はさまざまなアミノ酸も基質にすることから，アミノ酸がキヌレン酸産生に拮抗する可能性が考えられる．本研究では，キヌレン酸産生を抑制するアミノ酸を明らかにすることを目的として，ラット大脳皮質を用いた *in vitro* スクリーニングによってキヌレン酸産生を抑制するアミノ酸を網羅的に検索した．
た．の輸送，アミノ基転移反応と共通することに着目した．
【方法】タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち，トリプトファンを除く 19 種類を検索の対象とした．7～10 週齢の Wistar 系雄ラットの大脳皮質から 1 mm 角の組織切片を作成し，2 μmol/L キヌレニンおよび 1 mmol/L の各アミノ酸を含む緩衝液中で 37°C，2 時間処理した．KYNA 産生の指標として緩衝液中のキヌレン酸濃度を，脳内へのキヌレニンの取込みの指標として組織中のキヌレニン濃度を測定した．
【結果・考察】19 種類のアミノ酸のうち，ロイシン，イソロイシン，フェニルアラニン，メチオニン，チロシン，システイン，アラニン，グルタミン，グルタミン酸，アスパラギン酸の 10 種がキヌレン酸産生を抑制した．これらすべてのアミノ酸は生理的濃度の範囲でキヌレン酸産生を部分的に抑制した．10 種類のうちロイシン，イソロイシン，フェニルアラニン，メチオニン，チロシンは組織中のキヌレニン濃度を低下させた．これらのアミノ酸は中性アミノ酸輸送体の基質となることから，脳へのキヌレニン取込みを競合阻害したことによってキヌレン酸産生を抑制したことが示唆された．他の 5 種類のアミノ酸については，キヌレン酸合成反応の阻害によってキヌレン酸産生を抑制したことが示唆された．以上の結果より，キヌレン酸産生制御を介した高次脳機能を調節するうえで，アミノ酸が有効なツールとなることが期待できる．
（Sekine *et al*., *SplingerPlus*, 2015, 4:48)

Amino acids, Dopamine, Brain

発表責任者：福渡　努（fukkie@shc.usp.ac.jp）

発表番号：2E077
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# タンパク質栄養の悪化による滲出液の成分変化が創傷治癒に与える影響

# Effects of component changes of the wound fluid on wound healing in protein malnutrition rats

○志村 茉里、岩槻 健、大石 祐一、山根 拓実（東農大応生科）
○Mari SHIMURA, Ken IWATSUKI, Yuichi OISHI, Takumi YAMANE (Tokyo Univ. Agriculture)

【目的】
創部から分泌される滲出液には成長因子や炎症誘発物質など創傷治癒に関わる因子が存在している。また、タンパク質栄養の悪化は創傷治癒の遅延を招くことが知られているが、滲出液成分をどのように変化させるかは未だ解明されていない。我々はこれまで、タンパク質栄養を悪化させたラットの滲出液が真皮線維芽細胞の増殖を抑制することで創傷治癒を遅延させることを明らかとした。本研究では、真皮線維芽細胞の増殖を抑制する浸出液成分を解明することを目的とした。
【方法】
5 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いて 1 週間の馴致後、CO 群(20%カゼイン食)、PF 群(無タンパク質食)を設け、2 週間飼育した。その後、ラットを除毛し、両側腹部に筋膜まで至る全層欠損創を 1 ヶ所ずつ作成し、創傷被覆材を貼付した。毎日、創洗浄を行い新しい創傷被覆材と交換した。また、創面積の差が認められた日の滲出液を回収し、サイトカインアレイに供して治癒関連分子の変動を解析した。次に、サイトカインアレイにおいて CO 群に比して PF 群で顕著に増加した FGF21 が真皮線維芽細胞に及ぼす影響について検討した。正常ヒト真皮線維芽細胞を用いて、FGF21 を終濃度 1μg/ml，0.1μg/ml，0.001μg/ml，0.0001μg/ml となるよう培地に添加し、24 時間培養後 WST-1 にて生存細胞数を測定した。
【結果及び考察】
創面積の差が認められた日の滲出液をサイトカインアレイで測定した結果、FGF21、IGFBP-1 は CO 群に比して PF 群で顕著に増加し、IGF-1 は顕著に減少した。FGF21、IGFBP-1 及び IGF-1 は主に肝臓で合成され、タンパク質栄養の悪化により血中濃度が変動することが報告されている。FGF21 を真皮線維芽細胞に添加したところ生存細胞数に変化はなく、FGF21 は直接的に真皮線維芽細胞の増殖に作用しない可能性が示唆された。IGF-1 は創傷治癒において重要な因子であり、真皮線維芽細胞の増殖を促進させることがわかっている。また、IGFBP-1 は IGF-1 と相互作用することで、*in vitro* では真皮線維芽細胞の増殖を促進し、*in vivo* では創傷治癒過程における肉芽形成を促すことが報告されている。このことから、タンパク質栄養の悪化が滲出液中の IGF-1 を減少させ、真皮線維芽細胞の増殖を低下する可能性が示唆された。

Protein malnutrition, Wound healing, FGF21

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

発表番号：2E079
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米胚乳タンパク質の血清尿酸値低下効果（第 3 報）

# The lowering effect of rice endosperm protein on serum urate level (Third report)

○藤井 幹夫[1]、樋口 裕樹[1]、近藤 葉月[1]、杉浦 孝宏[2]、北林 大侑[3]、渡邊 令子[4]、細島 康宏[5]、牧野 利明[3]、斎藤 亮彦[5] ([1]亀田製菓、[2]日本バイオリサーチセンター、[3]名市大院・薬、[4]新潟県大、[5]新潟大・医)

○Mikio FUJII[1], Yuki Higuchi[1], Hazuki Kondo[1], Takahiro Sugiura[2], Daisuke Kitabayashi[3], Reiko Watanabe[4], Michihiro Hosojima[5], Toshiaki Makino[3], Akihiko Saito[5] ([1]Kameda Seika Co.,Ltd., [2]Nihon Bioresearch Inc., [3]Grad. Sch. Pharm. Sci., Nagoya City Univ., [4]Univ. Niigata Pref., [5]Med. Niigata Univ.)

【目的】米胚乳タンパク質（以下 REP と略す）の摂取が成人男性のやや高めの尿酸値を低下させることを複数の臨床試験により見出している（2014 年度、2015 年度日本農芸化学会）。今回、動物試験ならびに *in vitro* 試験により、その作用メカニズムを推定することを目的に各種検討を行った。

【方法】＜動物試験１＞6 週齢の SD 雄ラットに REP またはカゼイン Na を 1 g/kg で 1 日 1 回 4 日間強制反復投与し、最終投与日にオキソン酸(250 mg/kg)を頸部皮下注射することにより高尿酸血症を誘発させた。オキソン酸投与前、投与後 2, 4, 6 時間で採血するとともに、オキソン酸投与前から投与後 6 時間までの尿につき尿酸値を測定した。＜動物試験２＞6 週齢の SD 雄ラットに REP またはカゼイン Na を同様に 4 日間強制反復投与し、最終投与 2 時間後に全血を採血し、血清を用いてヒト尿酸トランスポーター(URAT)1 阻害活性、バターミルク由来キサンチンオキシダーゼ(XOD)阻害活性、Caco-2 細胞での尿酸排泄トランスポーターABCG2 発現誘導による尿酸排泄促進活性を測定した。＜動物試験３＞カゼインまたは REP を含む AIN93G に酵母 RNA を 3%添加した餌で 5 週齢の Wistar 系雄ラットを 5 日間飼育し、飼育後に血清および尿中の尿酸とアラントインを、また糞中の RNA 量を測定した。＜RNA の吸着試験＞REP ならびに各種食品タンパク質と酵母 RNA とを混合後にペプシンおよびパンクレアチンを用いて人工消化を行い、未消化の不溶性 RNA 量を測定した。

【結果および考察】＜動物試験１＞オキソン酸により高尿酸血症が誘発されたが、REP の投与による血清および尿中尿酸値への影響は確認できなかった。＜動物試験２＞REP 投与動物の血清には、URAT1 阻害活性、XOD 阻害活性、尿酸排泄促進活性は認められなかった。＜動物試験３＞REP 投与による血清尿酸値の有意な変動は認められなかったが、血清アラントイン値が有意に($P < 0.01$)低下した。また糞中の RNA 量が増加する傾向($P = 0.086$)を示しており、REP が RNA の吸収を抑制した可能性が示唆された。一方、尿中アラントイン値に差は認められなかったが、REP 摂取群で尿中尿酸値が有意に($P < 0.05$)増加しており、尿酸の尿への排出促進（再吸収抑制）作用の可能性も示唆された。＜RNA の吸着試験＞REP は RNA との不溶性凝集体を形成し、消化酵素による RNA の可溶化を部分的に阻止した。この作用は REP 中のグルテリン画分で強く、グロブリン、アルブミン、プロラミンの順に低下した。一方、カゼインや大豆タンパク質、ゼインでの作用は低かった。以上の結果より、REP による尿酸低下作用は RNA（およびプリン体）吸着による吸収抑制が関与している可能性が示唆された。尿酸の尿への排出促進作用については今後詳細に検討する予定である。

rice endosperm protein, uric acid, animal study

発表責任者：藤井幹夫（m_hujii@sk.kameda.co.jp）

発表番号：2E080
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コレステロール酸化物が生体に与える影響及びその腸管吸収特性

# Effect of cholesterol oxidation products on the body and its intestinal absorption properties

○多田 篤生[1]、荻原 琢男[2]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]高崎健大院薬・薬、[3]KAST)
○Atsuki TADA[1], Takuo OGIHARA[2], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. Agri. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Dept. Pharm., Grad. Sch. Pharm. Sci., Takasaki Univ. Heal. Welf., [3]Kanagawa Acad. Sci. Tech.)

【目的】食品の調理・加工過程において生成されるコレステロール酸化物（cholesterol oxidation products; COP）は生体に悪影響を及ぼす可能性が報告されている。しかしながら、COP 摂取が生体に与える影響については不明な点が多い。また COP はコレステロールと同様にコレステロールトランスポーター（Niemann-pick C1 Like 1, NPC1L1）を介して腸管から吸収されることが示唆されているものの、その輸送方法は明らかにされていない。本研究では、COP を摂取させたラットの肝臓を用いたトランスクリプトミクスにより COP が生体の代謝に与える影響を解明すること、さらに培養細胞を用いて、COP の詳細な吸収特性を解析することを目的とした。
【方法】COP はコレステロールを 200℃で 6～12 時間熱して作製し、GC/MS でその組成を測定した。また 7 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、AIN93G を基本とした普通食群、0.3%コレステロール負荷食群、0.3%COP 負荷食群に分けて 21 日間自由摂食にて飼育した。解剖後、血中・肝臓中のコレステロールとトリグリセリド（TG）を測定すると共に、肝臓 total RNA を抽出し DNA マイクロアレイに供した。さらに食品中の代表的な COP である 7β-hydroxycholesterol（7βHC）を用いて、ヒト腸管上皮モデル細胞 Caco-2 及び *hNPC1L1* を強制的に発現させたヒト胎児腎由来細胞 HEK293T への取り込み量を測定した。
【結果及び考察】GC/MS 分析より COP の組成は 96.9%がコレステロール、2.5%が COP であった。COP 食群はコレステロール食群に対し血中コレステロールの低下、さらに肝臓中コレステロール及び TG の低下傾向が見られた。肝臓 RNA のマイクロアレイ解析及びリアルタイム PCR より、COP 食群はコレステロール食群に対し、コレステロール合成関連遺伝子では *Mvk*、脂肪酸合成関連遺伝子では *Fasn* と *Srebp1* の発現の低下傾向があった。以上の結果より、COP はコレステロール合成及び TG 合成を調節する因子である可能性が考えられた。Caco-2 を用いた取り込み試験では、NPC1L1 阻害剤であるエゼチミブは 7βHC の吸収を阻害せず、逆に吸収促進効果を示した。また以前我々の検討によりコレステロールの吸収を抑制したポリフェノール 11 種によっても、7βHC の吸収は抑制されなかった。さらに *hNPC1L1* 強制発現 HEK ではコレステロールの吸収量は増加した一方 7βHC の吸収量は変化しなかった。これらの結果より、7βHC はコレステロールとは異なる輸送経路で腸管上皮細胞に取り込まれる可能性が考えられた。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

cholesterol oxidation products, 7β-hydroxycholesterol, DNA microarray

発表番号：2E081
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# テアフラビンおよび関連物質が胆汁酸吸収トランスポーター活性に与える影響

# Effects of theaflavin and related compounds on the activity of intestinal bile acid transporters

○石川 和樹[1]、石井 剛志[2]、小川 真奈[1]、阿部 啓子[1,3]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]神戸学院栄、[3]神奈川科学技術アカデミー)
○Kazuki ISHIKAWA[1], Takeshi ISHII[2], Mana OGAWA[1], Keiko ABE[1,3], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]Grad.Sch.of Agricultural and Life Sciences,Tokyo Univ., [2]Kobe Gakuin Univ., [3]KAST)

【目的】食後胆管を通じて腸管に排出される胆汁酸の 95%は、小腸下部に発現する胆汁酸トランスポーター(apical sodium-dependent bile acid transporter , ASBT)から再吸収され、肝臓へと運ばれて、再び腸管へ分泌される（腸肝循環）。肝臓で生合成される胆汁酸はコレステロールを原料とするため、腸管からの胆汁酸の再吸収抑制はコレステロールからの胆汁酸への変換を促進し、血中コレステロールの低下をもたらす。現在、胆汁酸を吸着し血中コレステロールを低下させる薬剤としてコレスチラミンがあるが、ASBT を直接阻害し、血中コレステロールを低下させる成分はほとんど報告されていない。本研究は、ASBT を阻害し、脂質異常症を改善させる成分を食品素材の中から探索すること、およびその阻害機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】小腸上皮のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。食品成分として、脂質異常症を改善するなどの疫学的知見の多いポリフェノールに着目した。Caco-2 細胞をそれぞれのポリフェノールでプレインキュベートした後、[$^3$H]タウロコール酸を添加し、一定時間後 Caco-2 細胞に取り込まれたタウロコール酸量を液体シンチレーションカウンターで測定した。阻害活性の最も高かった化合物については、時間依存性および濃度依存性などの速度論的解析により阻害様式を明らかにした。また、活性成分の水酸基が一部メチル化された化合物を用いて、構造活性相関を検討した。
【結果・考察】食品中に含まれる代表的なポリフェノール 40 種類をスクリーニングした結果、14 種のポリフェノールが有意に胆汁酸の取り込みを阻害した。中でもカテキン類の重合体であるテアフラビン 2 種が最も高い活性を示した。これらのテアフラビンは、プレインキュベーション後にウオッシュアウトしても活性を保持していたことから、基質ではなく ASBT に作用していることが示唆された。さらにこれらのテアフラビン濃度を一定にし、基質の濃度依存阻害活性を Hanes-Woolf plot により解析した結果、*V*max は低下した一方、Km は変化しなかったことから、これらのテアフラビンは ASBT に対し、基質と同じ部位に結合する可能性が示唆された。一方、テアフラビンの前駆体であるカテキン類の中ではエピガロカテキンガレート（EGCg）のみが活性を示した。3'、4'、3''、および 4''位の水酸基がそれぞれメチル化された EGCg を用いた阻害試験では、3'および 4'位のメチル化体での活性が消失したことから、これらの水酸基の存在が活性に必須であることが示唆された。現在テアフラビンについても構造活性相関を検討中である。本研究の一部は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

theaflavin, bile acid, Asbt

発表番号：2E082
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 海産物由来スフィンゴ脂質セラミドアミノエチルホスホン酸の消化
# Digestion of ceramide 2-aminoethylphosphonate, a marine sphingolipid

○友永 奈美、真鍋 祐樹、菅原 達也（京大院農）
○Nami TOMONAGA, Yuki MANABE, Tatsuya SUGAWARA (Kyoto Univ.)

【目的】

スフィンゴ脂質であるセラミドアミノエチルホスホン酸（CAEP）は主に海産無脊椎動物に認められており、特徴的なトリエン型のスフィンゴイド塩基を有するものも知られている。また CAEP は、ほ乳動物にはほとんど認められない C-P 結合（炭素原子とリン原子が共有結合した構造）を有する。頭足類や貝類にも CAEP は多く含まれることから、豊富な食経験が認められるものの、食品成分としてほとんど評価されていない。その理由のひとつとして、消化管吸収機構が十分に解明されていないことが挙げられる。一方、動物に主要なスフィンゴリン脂質の一種であるスフィンゴミエリンは、小腸内においてアルカリ性スフィンゴミエリナーゼによってセラミドへと分解され、さらにスフィンゴイド塩基へと分解された後、吸収されることが知られている。そこで本研究では、CAEP の消化を調べるためにマウス小腸における CAEP の分解をスフィンゴミエリンと比較検討した。

【方法】

アメリカオオアカイカの皮から抽出した総脂質をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、CAEP を精製した。得られた CAEP をマウス小腸粘膜ホモジネートと反応させた。CAEP の分解活性は、光散乱検出器を備えた HPLC を用いて解析した。また、CAEP の分解産物であるセラミド及びスフィンゴイド塩基の生成について、それぞれ LC-MS 及び *o*-フタルアルデヒド誘導体化を利用した蛍光 HPLC 法を用いて確認した。

【結果】

CAEP はスフィンゴミエリンと同様に、マウス小腸粘膜ホモジネートによって分解され、分解産物であるセラミド及びスフィンゴイド塩基が生成された。アルカリ性スフィンゴミエリナーゼの至適反応条件（pH 9.0）では、CAEP とスフィンゴミエリンの分解効率に変化はなかった。一方、中性条件（pH 7.2）において、CAEP はスフィンゴミエリンよりも速やかに分解された。したがって、CAEP の分解にはアルカリ性スフィンゴミエリナーゼ以外の酵素も関与している可能性が考えられた。

sphingolipid, digestion, sphingomyelinase

発表責任者：菅原達也（sugawara@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2E083
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 炭水化物の分子種の差がラットの食後血糖の推移に与える影響

# Comparison among dietary carbohydrates on effects to postprandial blood glucose levels of rats

○田中 愛健[1]、高橋 清美[1]、加藤 順一[1]、澤崎 愛[1]、赤坂 泰輝[1]、藤田 直子[2]、齊藤 雄飛[3]、城内 文吾[1]、佐藤 匡央[1]（[1]九大院・農、[2]秋田県立大・生物資源科、[3]亀田製菓（株））
○Yasutake Tanaka[1], Kiyomi Takahashi[1], Jun-ichi Kato[1], Ai Sawazaki[1], Taiki Akasaka[1], Naoko Fujita[2], Yuhi Saito[3], Bungo Shirouchi[1], Masao Sato[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Akita Prefectural Univ., [3]KAMEDA SEIKA CO., LTD.)

【背景・目的】2 型糖尿病は運動不足や肥満によってインスリン感受性が低下した結果、高血糖状態が続く疾患である。この高血糖状態が続くことで腎症や神経障害といった重篤な合併症を招く。そのため、食後などにおける血糖値の上昇を抑えることが 2 型糖尿病の予防および治療において重要である。食品中にはさまざまな形態で糖・炭水化物が含まれているが、その分子種の違いが食後血糖値の推移にどのような影響を与えるかを同時に評価した報告はこれまでない。本研究では、ラットに対して単糖・二糖類および穀物粉としてデンプンを負荷し、負荷後の血糖を測定することで、それぞれの血糖値に与える影響を比較・評価した。
【実験方法】16 時間絶食させた 5～7 週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに対して、単糖（グルコース）、二糖類（マルトース、スクロース、ラクトース）もしくは穀物粉（米 7 品種、強力粉、薄力粉、デュラム小麦粉、大麦粉、ライ麦粉、β-コーンスターチ）を 2.0 g/kg 体重（グルコースのみ半量負荷および倍量負荷を実施）となるように経口負荷した。負荷後、0～300 分までの血糖値をグルコメーターによって測定した。測定した血糖値に基づき、0～30 分までおよび 30～90 分までの時間-血糖曲線下面積（$iAUC_{0-30}$ および $iAUC_{30-90}$）を算出した。その後、各 iAUC 平均値を用いてクラスター解析に供し、サンプルを分類した。
【結果・考察】解析の結果、19 のサンプルを過剰糖クラスター（EM21・倍量グルコース）、低クリアランスクラスター（薄力粉・日本晴・インディカ米）、吸収促進クラスター（夢十色・ラクトース）、低グルコースクラスター（半量グルコース・スクロース）、平均クラスター（その他サンプル）の 5 つへと分類した。本試験において iAUC を一律に 30 分で分割したことで、負荷グルコース量の少ない群を分離することができたが、含有グルコース量が同じはずのラクトースは低グルコースクラスターに分類されなかった。このことから、二糖類において、グルコース分子に結合する糖分子の違いが負荷後の血糖に多大な影響を与えうることが示唆された。また、穀物デンプン間で iAUC を比較すると、麦などのサンプルと比較して、米サンプルは比較的高吸収・低クリアランスな結果を示すものが多かった。これは食味を重視した品種改良によって米デンプンが分枝鎖状でより消化されやすい形態であるアミロペクチンの多いものへと改良されてきた結果であると考えられる。この結果は、血糖コントロールにおける食品中のデンプン構造の重要性を改めて示すものであった。（本研究は平成 25 年度農林水産省農食研究推進事業 25033AB により行われた。）

dietary carbohydrates, postprandial blood glucose levels, rats

発表番号：2E084
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# フラクトオリゴ糖による腸内細菌叢修飾の Biogeographic 解析

# Biogeographic analysis of changes in gut microbiota by FOS

○宮内 栄治、大野 博司 (理研 IMS)
○Eiji MIYAUCHI, Hiroshi OHNO (RIKEN IMS)

**【背景】**腸内細菌の構成は小腸・大腸で異なり、宿主免疫系への作用機序はそれぞれ異なる。また、管腔・粘膜付近といった空間的局在によっても菌構成は異なり、腸管免疫活性化における粘膜付着菌の重要性などが示されてきた。このように、腸内細菌と宿主の相互作用を理解するうえで、腸管部位や空間的的局在といった各菌の分布（Biogeography）情報の重要性が強調されてきている。ある種の食品成分が腸内細菌叢を修飾することが多く示されてきたが、その多くは糞便による解析であり、修飾される菌の腸管部位や空間的局在といった情報は乏しい。本研究では、フラクトオリゴ糖（FOS）を摂取した際の腸内細菌叢の変動について、腸管各部位および管腔・粘膜に分けて解析を行った。
**【方法】**マウスに FOS を経口投与し、0、4、24 時間後に空腸・回腸・盲腸・大腸の管腔・粘膜面の菌叢を回収した。RNA および DNA を精製し、16S rRNA および 16S rDNA シーケンシングを行った。この際、16S rRNA/16S rDNA の値から代謝活性の高い菌を予測した。各菌種の相関係数から 7 つの Co-abundance groups（CAGs）に分け、各パートに特徴的な菌の特定を試みた。また、各パートにおける腸内細菌叢および代謝活性の変動を PCoA plot または Wiggum plot などにより可視化した。
**【結果】**Weigted Unifrac distances を算出した結果、空腸・回腸と盲腸・大腸で菌叢が大きく異なること、また、管腔と粘膜面の菌叢は有意に異なることが示された。また、CAG 解析の結果から、盲腸・大腸で多くみられる *Bacteroidetes*、*Porphynomonadaeae* を中心とする CAG が小腸粘膜にも多く存在することが示された。これらの菌は大腸管腔にも多く存在することから、食餌由来の難消化性多糖とともに宿主ムチンを炭素源とすることが予想された。一方、*Lachonospiraceae* および *Bacteroides* を中心とする CAG は小腸に比べ大腸の管腔・粘膜に多く存在し、食餌由来の難消化性多糖を炭素源とすることが予想された。また、FOS に対する菌の代謝活性変動を解析した結果、上記の食餌由来難消化性多糖を炭素源とすると予想された CAG の代謝活性が主に jejunum で増加することが明らかになった。一方、盲腸・大腸ではこれらの CAG の代謝活性増加は確認されず、*Erypirotorichaceae* および上記とは異なる *Lachnospiraceae* 科の菌の代謝活性が増加した。このことから、これらの菌は FOS の二次代謝産物の影響を受けることが示唆された。以上のように、FOS は jejunum の菌により代謝され、その代謝産物が腸管下部の腸内細菌に影響を与えることが示唆され、FOS 長期投与による糞便細菌叢の変動はこれらの変動の蓄積を反映すると推測された。
現在、上記変動と FOS 投与による宿主免疫応答変動との関係を解析中である。

microbiota, fructooligosaccharides, 16S rRNA

発表番号：2E085
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高脂肪食摂取ラットの盲腸内菌叢の変化における腸内細菌の胆汁酸耐性の寄与

# Contribution of bile acid tolerance of intestinal bacteria to the alteration of cecal microbiota composition on a high-fat diet in rats

○渡辺 真通[1]、萩尾 真人[2]、李 慈英[1]、小椋 義俊[3]、林 哲也[3]、清水 英寿[4]、石塚 敏[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]（[1]北大院農、[2]東洋大生命科学、[3]九大院医、[4]島根大生物資源）
○Masamichi WATANABE[1], Masahito HAGIO[2], Ja-Young LEE[1], Yoshitoshi OGURA[3], Tetsuya HAYASHI[3], Hidehisa SHIMIZU[4], Satoshi ISHIZUKA[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Toyo Univ., [3]Kyusyu Univ., [4]Shimane Univ.)

【背景および目的】西欧食の特徴である高脂肪が腸内細菌叢に与える影響の解明は、メタボリックシンドロームの発症との関連から注目を集めているが、菌叢変化の要因には不明な点が多い。当研究室ではこれまで胆汁酸が腸内の菌叢変化に寄与する事を見出し、高脂肪食摂取においても脂質吸収に必須な胆汁酸量が増大し、菌叢変化の要因となる「胆汁酸仮説」を提唱している。前回大会までに、長期のラット高脂肪食投与試験により胆汁酸分泌の増大と共に Firmicutes/Bacteroidetes の割合が増加することを示した（2015 年度本大会）。本研究では次世代シークエンサーを用いたメタ 16S 菌叢解析の結果に基づき、高脂肪食摂取により増加すると考えられる菌種を単離・同定し、単離株の胆汁酸耐性試験を行うことで胆汁酸仮説をさらに検証した。
【方法】2 週間予備飼育した 5 週齢の雄 WKAH ラットを 2 群に分け、デキストリン食（Control）、デキストリン-高ラード食（HL）の長期投与試験（8 週間）を行った。各群の盲腸内容物を採取し、1 mM DCA 添加もしくは未添加の EG 培地および Brucella 培地に接種後、嫌気培養した。生育したコロニーを GAM+MOPS 液体培地に接種して嫌気培養後、GAM 寒天培地による簡易的な DCA 耐性試験により DCA 耐性株もしくは DCA 感受性株を選抜した。単離株について 16S rDNA の部分配列決定による菌種同定後、メタ 16S 菌叢解析の operational taxonomic unit（OTU）の配列データとの相同性解析により、単離株の OTU への帰属を行った。これらの単離株について 0、0.5、0.75、1.0 および 1.5 mM DCA を添加した GAM+MOPS 液体培地にて嫌気培養し、DCA 耐性試験を行った。
【結果および考察】HL 群において増加する Firmicutes 門細菌として *Blautia*、*Clostridium* および *Lactobacillus* 属細菌を、Control 群において増加する Bacteroidetes 門細菌として *Bacteroides* および *Parabacteroides* 属細菌をそれぞれ単離・同定した。単離株の DCA 耐性試験の結果、Firmicutes 門細菌ではほとんどの株が 1 mM DCA 存在下で生育を示した一方で、Bacteroidetes 門細菌では 0.5 mM で生育阻害が見られた。これらの結果より、*in vitro* 試験においても Firmicutes 門細菌が Bacteroidetes 門細菌よりも有意に高い胆汁酸耐性を示し、このことは高脂肪食摂取により増加する胆汁酸の抗菌活性が選択圧となり菌叢バランスが崩れる胆汁酸仮説を支持した。現在、生理条件下でラット盲腸内の腸内細菌の生育を阻害し、菌叢構成に影響することが示唆されているω-ムリコール酸（ωMCA）、β-ムリコール酸（βMCA）およびデオキシコール酸（DCA）（2015 年度北海道支部会にて発表）に着目し、これら 3 種の胆汁酸量と単離株の配列から帰属された OTU との相関解析を行っている。

high-fat diet, bile acid, gut microbiota

発表番号：2E086
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腎臓における糖再吸収トランスポーターSGLT2 活性の安定評価系の構築

# Development of evaluation system to assess SGLT2 activity responsible for reabsorption of glucose in the kidney

○武田 博士、鈴木 大斗、薩 秀夫（前橋工大工）
○Hiroshi Takeda, Hiroto Suzuki, Hideo Satsu (Maebashi Institute Tech.)

【目的】近年世界的に肥満や糖尿病患者が増えており、日本でもその増加が懸念されている。糖尿病はⅠ型とⅡ型に分けられ糖尿病患者の約 95%がⅡ型糖尿病であるとされるが、Ⅱ型糖尿病の主な原因として遺伝的要因に加え環境的な要因が大きく関係しており、その一つに食生活における過剰な栄養摂取が考えられている。それに対して糖尿病の新たな治療薬も開発され、最近では腎臓におけるグルコース再吸収トランスポーターである $Na^+$/グルコース共輸送担体 2(SGLT2)の阻害剤が開発・承認されている。しかしながら、SGLT2 活性を阻害する食品成分については全く報告されていないのが現状である。そこで本研究では、SGLT2 活性を抑制する食品因子を探索・解析することを目的として SGLT2 活性の安定な評価系を構築することとした。

【方法】ヒト SGLT2 発現ベクターをチャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 にリポフェクション法にてトランスフェクションした後、抗生物質を添加して培養を続けた。薬剤選抜後さらに限界希釈法を用いて、得られたシングルクローンの中から SGLT2 活性の高いクローンを選択した。細胞株への SGLT2 取込活性は、グルコースアナログである 2-デオキシグルコース（2-DG）を用いた。2-DG を含んだバッファーで細胞を一定時間インキュベートした後細胞を可溶化し、酵素法を用いて細胞内に取り込まれた 2-DG 量を測定することで細胞への 2-DG 取込活性とした。

【結果】CHO-K1 細胞へのトランスフェクション条件などを検討し、最適な条件を決定した。決定した条件を用いて SGLT2 発現ベクターを CHO-K1 細胞に遺伝子導入し、薬剤選抜、限界希釈後に得られたシングルクローンの 2-DG 取込活性を測定した。その中で高い 2-DG 取込活性を示したクローンのうち、2 種類のクローンにおいてナトリウムイオン依存的な 2-DG 取込活性の増加がみられた。さらにこれら 2 クローンの 2-DG 取込活性は、SGLT 阻害剤であるフロリジンによって顕著に抑制された。またこの 2 種類のクローンについて RNA を抽出し RT-PCR をおこなったところ、ヒト SGLT2 の mRNA 発現が確認された。現在得られたこれらのクローンについて、SGLT2 活性測定の最適条件など検討を進めており、さらに SGLT2 活性を抑制する食品成分を探索する予定である。

SGLT2, transporter, diabetes

発表番号：2E087
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 自然薯のプロスタグランジン $E_2$ 合成系抑制と含有成分ジオスゲニンの効果

# Effects of *Dioscorea japonica* extract and diosgenin on prostaglandin $E_2$ synthetic pathway

○目賀 拓斗[1]、戸田 圭祐[1]、津嘉山 泉[1]、伊東 秀之[2]、川上 祐生[2]、高橋 吉孝[2]、木本 眞順美[2]、荒川 俊哉[3]、山本 登志子[2]([1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科、[2]岡山県立大学保健福祉学部栄養学科、[3]北海道医療大学歯学部生化学)

○Takuto MEGA[1], Keisuke TODA[1], Izumi TSUKAYAMA[1], Hideyuki ITO[2], Yuki KAWAKAMI[2], Yoshitaka TAKAHASHI[2], Masumi KIMOTO[2], Toshiya ARAKAWA[3], Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Health Welfare Sci., Okayama Pref. Univ., [2]Dept. Nutr. Sci., Okayama Pref. Univ., [3]Dept. Biochem., Sch. Dent., Health Sci. Univ. Hokkaido)

【背景・目的】炎症性脂質メディエーターのプロスタグランジン(PG)$E_2$ は，生体内において様々な恒常性の維持のみならず，炎症や癌をはじめとする種々の病態に関与し，慢性炎症の素因となることが知られている。これまでに，$PGE_2$ の合成阻害薬として，非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)が広く臨床応用されているが，胃粘膜障害や心血管障害などの副作用があり，予防的な長期服用は難しい。そこで我々は，$PGE_2$ 合成系をターゲットとした，副作用の少ない慢性炎症予防のための食品機能性の探索を行っている。その中で，我が国原産の自然薯に誘導型 $PGE_2$ 合成系酵素のシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 とミクロソーム PGE 合成酵素(PGES)-1 を抑制する効果を見出した。

【方法】自然薯の $PGE_2$ 合成系酵素の発現に対する効果について，炎症モデルの LPS 刺激マウスマクロファージ様 RAW264 細胞，肺癌モデルのヒト非小細胞肺癌 A549 細胞を用いて検証した。自然薯低温乾燥粉末から 50%エタノール抽出物を調製して，それぞれの細胞に添加し，定量 PCR 法による各種遺伝子の発現動態，酵素活性，酵素免疫法による細胞からの $PGE_2$ 産生量を解析した。また，RAW264 細胞では炎症性サイトカインの発現動態を，A549 細胞では抗アポトーシス因子である Bcl-2 の発現と *in situ* アポトーシス検出 TUNEL 法で癌細胞のアポトーシス誘導を解析した。さらに，効果を有する物質を明らかにするために，各種クロマトグラフィーを行い，機能性成分の単離同定を試みた。

【結果・考察】RAW264 細胞や A549 細胞において，自然薯抽出物は COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制し，それぞれの酵素活性と $PGE_2$ 産生量の低下を示した。さらに，自然薯抽出物添加によって，RAW264 細胞では，炎症性サイトカインの IL-1βと IL-6 の発現抑制，A549 細胞では，Bcl-2 の発現抑制と TUNEL 陽性細胞数に増加が確認された。次に行った機能性成分の単離において見出された植物性ステロイド系サポニンのジオスゲニンは，COX-2 に対しては，自然薯抽出物よりは効果が弱いものの抑制効果を示したが，mPGES-1 には有意な効果を示さなかった。また，COX-2 発現に関与する分子シグナルにおいて，ジオスゲニンはグルココルチコイド受容体へ作用することによって COX-2 発現を抑制することが明らかとなった。以上の結果より，自然薯は COX-2 と mPGES-1 の発現を抑制し，抗炎症・抗腫瘍効果を有することを実証した。さらに，その機能性成分の一つとしてジオスゲニンが COX-2 の発現抑制効果を有することを示した。これらのことは，自然薯が慢性炎症予防の効果を有する高機能性食材であることを示唆するものである。

*Dioscorea japonica*, prostaglandin $E_2$ synthetic pathway, chronic inflammation

発表責任者：山本登志子（toshiko@fhw.oka-pu.ac.jp）

発表番号：2E088
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 皮膚癌モデルマウスにおける自然薯の抗炎症・抗腫瘍効果

# Anti-inflammatory and anti-tumor effects of *Dioscorea japonica* on squamous cell carcinoma of mouse skin

○津嘉山 泉[1]、武田 泰典[1]、戸田 圭祐[1]、目賀 拓斗[1]、川上 祐生[2]、高橋 吉孝[2]、木本 眞順美[2]、山本 圭[3,4]、村上 誠[3,5]、山本 登志子[2]([1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科、[2]岡山県立大学保健福祉学部栄養学科、[3]東京都医学総合研究所、[4]徳島大学生物資源産業学部、[5]AMED-CREST)
○ Izumi TSUKAYAMA[1], Yasunori TAKEDA[1], Keisuke TODA[1], Takuto MEGA[1], Yuki KAWAKAMI[2], Yoshitaka TAKAHASHI[2], Masumi KIMOTO[2], Kei YAMAMOTO[3,4], Makoto MURAKAMI[3,5], Toshiko SUZUKI-YAMAMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Health Welfare Sci., Okayama Pref. Univ., [2]Dept. Nutr. Sci., Okayama Pref. Univ., [3]Tokyo Metropolitan Insti. Med. Sci., [4]Tokushima Univ., [5]AMED-CREST)

【背景・目的】私達の研究室では，慢性炎症予防を目指して，その素因となる脂質メディエーターのプロスタグランジン(PG)$E_2$の合成系をターゲットとした食品機能性を探索している。その中で，我が国原産の自然薯に $PGE_2$ 合成抑制効果を見出した。炎症や癌のモデル細胞を用いた実験において，自然薯抽出物は，種々の病態惹起に関わる誘導型酵素のシクロオキシゲナーゼ(COX)-2 とミクロソーム PGE 合成酵素(mPGES)-1 の発現を抑制し，過剰な $PGE_2$ 合成を低下させた。それにより，炎症性サイトカインの発現抑制と癌細胞のアポトーシス誘導が認められた。本研究発表では，このような自然薯の新規機能性について *in vivo* 検証を行うために，化学物質誘導型の炎症を伴う皮膚癌モデルマウスを用いて実験を行った結果を報告する。
【方法】本研究では，7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene (DMBA)と 12-*O* -tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)の二段階誘発皮膚癌モデルマウスを用いて自然薯の効果を検証した。皮膚癌誘導コントロール群と比較するために,10%自然薯粉含有食の経口投与群(自然薯含有食群)と自然薯粉の 50%エタノール抽出物塗布群(自然薯抽出物塗布群)を作製し，21 週経過後に，各群のマウスにおける腫瘍の数と体積を計測し，病理組織化学的な観察を行った。加えて，定量 PCR 法により COX-2 と mPGES-1 ならびに炎症性サイトカインの IL-1β と IL-6 の遺伝子発現を解析し,高速液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS/MS)により，皮膚中の脂質メディエーター含有量の分析を行った。
【結果・考察】皮膚癌誘導コントロール群に比べて，自然薯含有食群と自然薯抽出物塗布群のいずれにおいても，有意な腫瘍サイズの減少が認められた。病理組織観察では，自然薯処理の 2 群で癌化した角化細胞の増殖による表皮の肥厚が抑制されており，癌組織周辺への炎症性細胞の浸潤抑制も認められた。遺伝子発現解析の結果では，COX-2，mPGES-1，IL-1β，IL-6 の発現抑制が確認され，LC-MS/MS による脂質メタボローム解析より，$PGE_2$ と $PGD_2$ の産生量の低下が認められた。免疫組織化学的解析のから，本モデルの皮膚癌における COX-2 の発現は，増殖した癌細胞のみならず表皮樹状細胞のランゲルハンス細胞に強く，mPGES-1 は，癌細胞に発現するが，ランゲルハンス細胞では検出されないことが明らかとなった。また，いずれの酵素も，自然薯処理により免疫染色の陽性強度の低下が認められた。以上の結果から，自然薯は $PGE_2$ 合成系酵素の発現を抑制し，抗炎症・抗腫瘍効果を有することが示された。

*Dioscorea japonica*, squamous cell carcinoma, prostaglandin $E_2$ synthetic pathway

発表責任者：山本登志子（toshiko@fhw.oka-pu.ac.jp）

発表番号：2E089
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

嚥下調整食開発に向けた自然薯低温乾燥粉末の物性ならびに嚥下機能評価
Evaluation system of physical property and swallowing function of *Dioscorea japonica* for development of a dysphagia-preventing diet

○田中 充樹[1]、大野 智子[2]、野村 奈央[1]、津嘉山 泉[1]、戸田 圭祐[1]、目賀 拓斗[1]、川井 恵梨佳[2]、中村 孝文[2]、木本 眞順美[2]、山本 登志子[2]（[1]岡山県立大学大学院保健福祉学研究科、[2]岡山県立大学保健福祉学部）
○Mitsuki TANAKA[1], Tomoko OHNO[2], Nao NOMURA[1], Izumi TSUKAYAMA[1], Keisuke TODA[1], Takuto MEGA[1], Erika KAWAI[2], Takabun NAKAMURA[2], Masumi KIMOTO[2], Toshiko YAMAMOTO[2] ([1]Grad. Sch. Health Welfare Sci., Okayama Pref. Univ., [2]Fac. Health Welfare Sci., Okayama Pref. Univ.)

【背景・目的】少子高齢化を迎えた我が国において，高齢者の低栄養状態や誤嚥性肺炎を回避し，生活の質の向上のために，良質な高齢者嚥下調整食の開発は必須である。最近，私達は，自然薯が炎症性脂質メディエーターのプロスタグランジン $E_2$ の合成を抑制し，抗炎症・抗腫瘍効果を有することを明らかにした。これまでにも，自然薯は，含有するムチンによる胃粘膜保護作用や，アミラーゼによる消化促進作用などの機能性を有することが知られている。また，物性特性としても特徴的な粘りを有する食品である。我々は，このような自然薯の特徴を利用して，嚥下調整食への応用を考えた。そこで，利便性や汎用性を考慮し，自然薯の低温乾燥粉末を用いた嚥下調整食を目指すこととした。本研究では，まずは，自然薯の嚥下調整食への適合性を評価するために，テクスチャー解析とレオロジー解析による物性評価と，嚥下時の嚥下音や筋電図を用いた評価系による嚥下機能評価を行った。
【方法】本研究では，比較のために，生自然薯，生長芋，自然薯低温乾燥粉末を用いて解析を行った。嚥下調整食としての評価として，次の 3 種類の解析を行った。1）テクスチャー解析：クリープメータを用いて「硬さ」「付着性」「凝集性」の項目について分析し，厚生労働省の示す「えん下困難者用食品の許可基準」の規格に従って評価した。2）レオロジー解析：レオメータを用いて，各濃度の自然薯粉末ペーストの動的粘弾性を測定し，既知の嚥下調整食との比較から，その適合性を評価した。3）嚥下機能評価：嚥下時の体表面から測定する嚥下音波形と嚥下時筋電図から，嚥下難易度の異なる食材と比較し，自然薯粉末ペーストの適合性を評価した。
【結果・考察】テクスチャー解析の結果から，厚生労働省の許可基準（Ⅰ（嚥下難易度 重度）～Ⅲ（軽度））に従って評価したところ，30%自然薯粉末ペーストは「硬さ」「付着性」「凝集性」のいずれの指標においても基準 II に該当した。また，自然薯粉末の濃度や調整温度により，各項目の値が変化し，許可基準の適合性を調整することが可能であることが示された。レオロジー解析の結果から，生自然薯と 20–30%自然薯粉末ペーストはいずれも分子濃厚溶液として特徴づけられ，この解析結果より推測される咽頭部流速は，一般的な嚥下調整食モデルとされるヨーグルトに近似し，自然薯粉末ペーストの適合性が示された。さらに，嚥下機能評価においても，嚥下時音の波形より解析した値は，市販の嚥下補助食（とろみ剤・増粘剤）と同程度の適合性を示した。以上の結果から，自然薯低温乾燥粉末は，高機能性を付加した嚥下調整食として有効であることが示された。

*Dioscorea japonica*, dysphagia-preventing diet, physical property

発表責任者：山本登志子（toshiko@fhw.oka-pu.ac.jp）

発表番号：2E090
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

*Lactobacillus gasseri* OLL2809 の抗原提示細胞に対するサイトカイン産生誘導メカニズムの解明
Elucidation of induction mechanism of cytokine production from the antigen-presenting cells of *Lactobacillus gasseri* OLL2809

○大西 一政、佐藤 麻子、古市 圭介、浅見 幸夫 ((株) 明治　研究本部本　食機能科学研究所)
○KAZUMASA ONISHI, ASAKO SATO, KEISUKE FURUICHI, YUKIO ASAMI (Food Science Research Laboratories R&D Division Meiji Co., Ltd)

【背景】Interleukin(IL)-12 は NK 細胞の活性化や、ナイーブ T 細胞を Th1 細胞へ分化誘導する機能をもつ、免疫反応の中で重要な役割を担うサイトカインであり、マウス脾臓細胞の IL-12 産生誘導能が高い株として、*Lactobacillus gasseri* OLL2809(MG2809)を選抜した。MG2809 加熱菌体を被験物としたヒト試験において、スギ花粉症等のアレルギー抑制効果、子宮内膜症の改善効果、高強度運動後やストレス負荷後に見られる免疫力の低下を抑制する効果が得られることを確認している。しかし、抗原提示細胞に対する、MG2809 の IL-12 産生誘導メカニズムは明らかになっていない。
【目的】MG2809 が抗原提示細胞のサイトカイン産生を誘導するメカニズムを解明する。
【方法】本研究では、MRS 培地で培養した MG2809 乳酸菌を加熱した、MG2809 加熱菌体を用いて以下の検討を行った。①サイトカラシン B を用いた貪食阻害の阻害が、IL-12 産生に与える影響。②ヌクレアーゼで核酸を分解した MG2809 を用いた、マクロファージ様株化細胞 J774.1 に対する、IL-12 産生誘導活性への影響。③J774.1 に Toll 様受容体(TLR)7 および 9 のアンタゴニストを作用させた際の、MG2809 の J774.1 に対する IL-12 産生誘導活性。④MG2809 から抽出した DNA および RNA を、トランスフェクション試薬で J774.1 に導入した際の、IL-12 産生誘導。
【結果】①J774.1 の貪食を阻害することで、MG2809 の J774.1 に対する IL-12 産生誘導活性が消失した。②MG2809 の核酸を分解することで、J774.1 に対する IL-12 産生誘導活性が完全に消失した。③J774.1 の TLR7 および TLR9 をアンタゴナイズし、MG2809 が持つ核酸の認識を阻害することで、J774.1 に対する IL-12 産生誘導が阻害された。④MG2809 から抽出した DNA および RNA を、トランスフェクション試薬を用いてそれぞれ J774.1 に導入することで、J774.1 からの IL-12 産生を誘導した。
【結論】J774.1 の IL-12 産生を誘導する活性本体は、MG2809 の DNA および RNA であることを明らかとした。すなわち、J774.1 の IL-12 産生誘導メカニズムは、「貪食した MG2809 の DNA、RNA を、J774.1 内部に局在する TLR9、7 がそれぞれ認識することで、IL-12 産生を行う」と結論づけられた。

probiotics, DNA/RNA, Toll like receptor

発表責任者：大西一政（kazumasa.ohnishi@meiji.com）

発表番号：2E091
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸菌体の加熱処理による免疫賦活機能の変化とそのメカニズムの解明

# Change in immunostimulation of lactic acid bacteria by heat treatment, and elucidation of its mechanism

○佐藤 麻子、大西 一政、古市 圭介、浅見 幸夫 ((株)明治　研究本部本　食機能科学研究所)
○ASAKO SATO, KAZUMASA ONISHI, KEISUKE FURUICHI, YUKIO ASAMI (Food Science Research Laboratories, R&D Division, Meiji Co., Ltd.)

【背景】マウス脾臓細胞の Interleukin(IL)-12 産生誘導能が高い株として、*Lactobacillus gasseri* OLL2809(MG2809)を選抜し、同株を被験物としたヒト試験において、アレルギー抑制効果、子宮内膜症の改善効果、免疫力の低下を抑制する効果が得られることを確認している。一方、MG2809 の IL-12 産生誘導活性は加熱することで顕著に高まることも明らかにしており、これは、抗原提示細胞に対する作用に、加熱によって生じる MG2809 の変化が重要な役割を果たしていることを意味している。また、乳酸菌は株ごとに、免疫賦活・調節機能が異なることが報告されており、乳酸菌の免疫賦活・調節機能に関わる因子を明確にできれば、乳酸菌の持つ健康機能をより効果的に享受できると考えられる。そして、MG2809 の加熱処理前後での変化と IL-12 産生誘導活性の関連性を明確にすることは、乳酸菌の免疫賦活・調節機能に関わる因子の検証法の 1 つと成り得る。
【目的】MG2809 の加熱処理前後での変化と、IL-12 産生誘導活性の関連を解明する。
【方法】本研究では、MRS 培地で培養した MG2809 生菌体と、同乳酸菌を加熱した、MG2809 加熱菌体を用いて以下の検討を行い、加熱処理前後の違いを検証した。①抗原提示細胞に対するサイトカイン産生誘導の活性本体である、核酸の定量、および分子サイズ。②トランスフェクション試薬を用いて、抽出した核酸をマクロファージ様株化細胞 J774.1 に導入した際の、IL-12 産生誘導活性。③フローサイトメトリーを用いた、J774.1 による両菌体の貪食率。④ヒト胎児腎細胞の表面に Toll 様受容体(TLR)2 を発現させた、HEK293-TLR2 を用いた、TLR2 活性化能。
【結果】①IL-12 産生誘導活性が低い生菌体の方が、加熱菌体に比べて、核酸の保持量が多かった。また、加熱菌体の核酸は生菌体の核酸と比較して、低分子化していることを確認した。②両菌体から抽出した核酸の IL-12 産生誘導活性に、大きな差は認められなかった。③生菌体は加熱菌体に比べて、J774.1 に貪食されにくいことを確認した。④生菌体の TLR2 の活性化能は、加熱菌体と比べて、高いことを確認した。
【結論】MG2809 の加熱処理前後で、核酸の保持量、分子サイズが異なることを確認したが、それらは IL-12 産生誘導活性に与える因子ではないことが示唆された。加熱処理前後に生じた“貪食され易さ”の差が、IL-12 産生誘導活性の差であることが示唆された。加熱によって、MG2809 の表面構造に変化が生じ、それに伴い、抗原提示細胞が認識・貪食しやすい形態になったと推察する。また、J774.1 による MG2809 の貪食には、TLR2 は関与していないことが示唆された。

lactic acid bacteria, heat treatment, phagocytosis

発表責任者：大西一政（kazumasa.ohnishi@meiji.com）

発表番号：2E092
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおけるイソマルトデキストリンの効果（１）

# Effects of Isomaltodextrin intake on DSS-induced colitis in mice.(1)

○高柿 了大、谷口 美文、宮田 聡美、高山 和江、櫻井 岳夫、新井 成之、渡辺 光、福田 恵温 ((株)林原　研究開発本部)
○ Ryodai TAKAGAKI, Yoshifumi TANIGUCHI, Satomi KOYA-MIYATA, Kazue TSUJI-TAKAYAMA, Takeo SAKURAI, Shigeyuki ARAI, Hikaru WATANABE, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO.,LTD.,R&D Center)

【目的】
イソマルトデキストリン（IMD）は、澱粉に *Paenibacillus* 属細菌が産生する 2 種類の酵素を作用させて調製する多分岐α-グルカンであり、水溶性食物繊維としての利用が期待される。本報では、まず *in vitro* 腸管バリアに対する IMD の作用を検討した。次に大腸炎に対する IMD の効果をデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）誘導潰瘍性大腸炎モデルマウスで検討した。

【方法】
1. *in vitro* 試験. ヒト結腸癌細胞株（Caco-2）を 24 well 用 Insert cup に $1\times10^5$ cells 播種して 14 日間培養し、上皮様単層培養状態にした。Insert cup 外側に 10%FCS 含有 D-MEM 培地を、内側に①1%IMD、②2%IMD、③4%IMD を含有する培地を添加して、経時的に経上皮電気抵抗値（TER）を測定した。
2. *in vivo* 試験. ICR マウス（雌、７週齢）を 12 日間予備飼育後、試験群 3 群（各 10 匹）に群分けした。試験群には①水、②1%IMD 水、③2%IMD 水を与えた。1 週間後、試験群の飲水に DSS を 5%添加し、潰瘍性大腸炎を誘発した。Murthy らの方法[1)]に従って大腸炎症状の症状スコアを記録した。さらに大腸を DSS 投与 6 日目に採取し組織中の炎症性サイトカイン IL-1β を測定した。

【結果と考察】
1. *in vitro* 試験. IMD の濃度に依存して、TER 値が上昇することが確認された。
2. *in vivo* 試験. 2%IMD 摂取群で 4 日目以降、大腸炎症状スコアが有意に抑制された。特に血便症状が緩和されるとともに、組織中の IL-1β 量が 2%IMD 投与群で水群に比べ有意に低い値を示した。

以上のことから、IMD は大腸上皮においてタイトジャンクションのバリア機能を増強することで、炎症誘導が緩和され、症状軽減につながったと考えられる。

1) Murthy SN, Cooper HS et al. Dig Dis Sci. 1993 Sep;38(9):1722-34.

Isomaltodextrin, Caco-2 cell, DSS colitis

発表番号：2E093
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# DSS 誘導性大腸炎モデルマウスにおけるイソマルトデキストリンの効果（2）

# Effects of Isomaltodextrin intake on DSS-induced colitis in mice.(2)

○櫻井 岳夫、新井 千加子、谷口 美文、新井 成之、吉實 知代、渡辺 光、福田 恵温（（株）林原 研究開発本部）
○ Takeo SAKURAI, Chikako ARAI, Yoshifumi TANIGUCHI, Shigeyuki ARAI, Chiyo YOSHIZANE, Hikaru WATANABE, Shigeharu FUKUDA (HAYASHIBARA CO.,LTD.,R&D Center)

【目的】イソマルトデキストリン（IMD）のデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）大腸炎に対する作用について、我々は前報において 5%DSS で誘発した大腸炎に対する作用をマウスを用いて検討し、大腸炎の症状緩和効果が認められた。本報では、前報より大腸炎症状が緩和な試験系である 2.5%DSS 誘発大腸炎モデルに対する作用検討を行い、*in vivo* での大腸タイトジャンクション（TJ）に対する作用についても検討した。

【方法】BALB/c マウス（雌、9 週齢）に精製飼料（AIN-93G）を与えて 1 週間馴化後、体重の均等な 2 群に分けた。そして飲料として水（対照群）あるいは 2%IMD 水溶液を給水瓶で与えて 2 週間飼育した。2 週間後に①2.5%DSS 添加水または②2%IMD＋2.5%DSS 添加水を与えた。DSS 摂取 1 日目～6 日目まで、症状スコアを判定した。最終日に結腸の長さを測定した後、組織標本を作成した。組織は、腸粘膜の炎症の程度をスコア化するとともに TJ 関連蛋白の Claudin-3 と ZO-1 の発現量を抗体染色によりスコア化した。また、ウェスタンブロッティングにより Claudin-3 および ZO-1 発現量を比較した。

【結果】

1. IMD 摂取で症状スコアが水群に比べ有意に低下し、大腸炎症状が軽減されていた。また、IMD 摂取によって、結腸の短縮が有意に抑制された。
2. 結腸全体および遠位結腸において IMD 群で水群に比べ、有意に病理組織スコアが低かった。
3. 免疫染色では、中間位および遠位結腸の Claudin-3 の発現が水群に比べ、有意に高かった。ZO-1 は中間位結腸で水群に比べ有意に発現が高く、遠位結腸においても発現維持の傾向が認められた。
4. 遠位結腸のウェスタンブロッティングでは IMD 群の Claudin－3 発現や ZO-1 発現が水群に比べ、有意に高かった。

【考察】IMD の飲水摂取により、大腸炎症状スコアおよび結腸病理組織スコアが低下した。一方で TJ 関連タンパク質の発現は水群に比べ有意に高かった。これらのことから、IMD は大腸に到達し、DSS 腸炎の状態でも TJ 関連タンパク質の発現を維持していることが示唆された。その結果、TJ のバリア機能が維持され、DSS によるダメージを軽減すると考えられた。

Isomaltodextrin, DSS colitis, TJ

発表番号：2E094
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Application of comprehensive extraction coupled to NMR based metabolomics to identify immune-modulatory compounds from Indonesian Plectranthus amboinicus Lour.

○ Dewi Yuliana Nancy[1,2], Masao Goto[2], Jun Watanabe[2], Yasuyo Sekiyama[2], Rizal Martua Damanik[1], Yuko Takano-Ishikawa[2] ([1]Bogor Agricultural University Indonesia, [2]National Food Research Institute)

**Introduction:** *Plectranthus amboinicus* Lour (PA) is one of Indonesian medicinal plants originated from North Sumatra. Its main traditional use is to be served as a soup to stimulate lactation for breastfeeding women. PA was also reported to have anti-inflammatory activity, however a research on compounds responsible for the bioactivity has not been reported yet. We have established a comprehensive extraction method coupled to NMR-based metabolomics for high throughput screening of functional compounds. We tried to apply this method to rapidly and effectively identify immune-modulatory compounds from PA.

**Method:** A mixture of freeze-dried PA powder (1 g) and sea sand was put in a metal column (*l*=5.0 cm, d 2.0 cm) for extraction. Three solvents combination (n-hexane, acetone, water) was delivered in gradient using a pump into the column to provide 15 PA fractions with different polarity. The extraction was repeated three times and each fraction was divided into two; for NMR analysis and for immune-modulating effects estimation. For immune-modulating effects estimation, splenocytes from DO11.10 mice which expressing transgenic T-cell receptors that recognize OVA peptide 323-339 were stimulated with OVA in the presence of dried compounds from each fractions. The secreted antigen-specific cytokines concentrations (IL-2, IL-5, IL-12p40 and IFN-gamma) in culture supernatant were then measured by ELISA. Both data was analyzed using orthogonal projection to the partial least square (OPLS) (SIMCA ver. 14.0, Umea, Sweden). By using OPLS, correlation between the plant's NMR chemicals profile and bioactivity profile was observed. From OPLS' S-plot, NMR signals contributing the most to the separation between active and non-active fractions were selected. Thus, the active compounds can be elucidated.

**Results:** Nonpolar fractions were found to effectively suppress antigen-specific IFN-gamma secretion from splenocytes. OPLS analysis indicated that NMR signals from triterpene acids strongly correlate with IFN-gamma inhibitory activity of these fractions. Further confirmation about the active compounds structures by means of 2D NMR is currently under progress.

Inflammatory, Comprehensive extraction, Metabolomics

発表責任者：Masao Goto（masaogot@affrc.go.jp）

発表番号：2E095
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# プロシアニジンは解糖系を阻害することで活性化 CD4+T 細胞のエフェクター機能を抑制する

# Oligomeric procyanidins suppress effector functions of activated CD4 +T cells by interfering with glycolysis

○後藤 真生[1]、若木 学[1]、庄司 俊彦[2]、石川（高野） 祐子[1] ([1]農研機構 食総研、[2]農研機構 果樹研)
○Masao GOTO[1], Manabu Wakagi[1], Toshihiko Shoji[2], Yuko Takano-Ishikawa[1] ([1]NFRI, [2]NIFTS)

【目的】フラボノイドの一種であるプロシアニジン類はカテキン類の種類や重合度の異なる混合物であり、リンゴなど多くの植物に含まれている。プロシアニジンのアレルギーや自己免疫疾患などに対する効果が示唆されているが、重合度による活性の差や作用機序については未だ解明されていない。そこで演者らは重合度の異なるプロシアニジン類の免疫系への作用を解析するにあたり、CD4+T 細胞の活性化に及ぼす影響を *in vitro* で解析した。
【方法】リンゴ由来プロシアニジン（APCs）、および APCs から分離した 1～5 量体のオリゴマーそれぞれを試料として用いた。それらを卵白アルブミン（OVA） 特異的な T 細胞レセプターを発現する DO11.10 マウス由来の脾臓細胞を OVA で刺激する培養系、および同脾臓細胞から MACS により分離した CD4+T 細胞を 抗 CD3ε 抗体で刺激する培養系に添加して、サイトカイン産生および細胞増殖への影響を解析した。特に 5 量体については、抗 CD3ε 抗体で刺激した CD4+T 細胞における解糖系代謝への影響を、解糖系代謝の最終産物である L-乳酸の培養上清中の量、および細胞のグルコース取り込み量によって評価した。
【結果】APCs は、濃度依存的に脾臓細胞の抗原特異的増殖を抑制したが、IL-2 産生は抑制しなかった。脾臓細胞から分離した CD4+T 細胞を抗 CD3ε 抗体で刺激した系において同様の結果が得られたことから、APCs は CD4+T 細胞への直接作用により脾臓細胞の抗原特異的免疫応答を修飾していることが強く示唆された。次に、各重合体を用いて、CD4+T 細胞に対する免疫応答修飾活性を検討したところ、重合度が高いものほど細胞増殖および IFN-γ や IL-6 などのサイトカイン産生を強く抑制したが、いずれの重合体も IL-2 の産生は抑制しなかった。近年、T 細胞の活性化において、IL-2 の産生はミトコンドリア代謝に依存し、それに対し IFN-γ・IL-6 などのサイトカイン産生や細胞増殖などのエフェクター機能の発揮は解糖系代謝に依存することが明らかにされた。そこで、5 量体について解糖系代謝への影響を評価したところ、CD4+T 細胞への添加によって活性化 T 細胞のグルコース取り込み、および培養上清中の L-乳酸量が低下した。これらの結果から、プロシアニジンオリゴマーは、CD4+T 細胞に直接作用し、IL-2 産生に影響を与えることなく、解糖系代謝を阻害することによって、エフェクター機能を抑制することが示唆された。この作用機序は他の多くのフラボノイドの示す免疫応答修飾の機序とは異なる、ユニークなものと考えられる。

procyanidin, T cell, glycolysis

発表番号：2E096
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# メチル化カテキンは脂肪組織において RNF216 依存的に TLR4 の発現を低下させインスリン抵抗性を緩和する

# EGCG3"Me suppressed TLR4 expression through increase of RNF216 expression and ameliorated insulin resistance.

○山下 麻衣、中村 友紀、熊添 基文、立花 宏文（九大院農院・生機科）
○MAI YAMASHITA, YUKI NAKAMURA, MOTOFUMI KUMAZOE, HIROFUMI TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】Toll-Like Receptor 4（TLR4）を介した慢性炎症はインスリン抵抗性の要因とされており、TLR4 KO マウスにおいて食餌性のインスリン抵抗性が誘導されないことが報告されている。当研究室ではこれまでに、緑茶カテキン(−)-epigallocatechin-3-*O*-gallate（EGCG）がマクロファージにおいて TLR4 発現量を低下させ、炎症応答を抑制することを見出している。そこで本研究では、EGCG の TLR4 発現低下機構の解明及び高吸収性 EGCG 類似体(−)-epigallocatechin-3-*O*-(3-*O*-Methyl)-gallate (EGCG3”Me) が食餌性の炎症及びインスリン抵抗性に及ぼす影響を評価した。

【方法】 マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 において、免疫沈降法を用いて EGCG による TLR4 のユビキチン化を評価した。RNA 干渉法によりユビキチンリガーゼ Ring Finger Protein 216 (RNF216) をノックダウンし EGCG 処理による TLR4 発現量を測定した。また、EGCG の TLR4 発現低下作用おける cGMP の関与を検討した。

Balb/c マウスに EGCG を投与し、腹腔内マクロファージにおける RNF216 及び TLR4 の発現量を測定した。C57BL/6J マウスに普通食（Control 群）、高脂肪高ショ糖食（HF/HS 群）、高脂肪高ショ糖食+EGCG3”Me (EGCG3”Me 群) を摂食させ、炎症因子及びインスリン抵抗性に及ぼす影響を評価した。

【結果及び考察】 RAW264.7 細胞株において EGCG は TLR4 のユビキチン化を促進し、RNF216 ノックダウンにより EGCG の TLR4 発現低下作用が消失した。EGCG の TLR4 発現低下作用は cGMP 合成酵素阻害剤によって抑制され、cGMP 合成酵素活性化剤は RNF216 の発現を上昇させた。

Balb/c マウスにおいて EGCG 投与により腹腔内マクロファージ及び脾臓細胞における TLR4 発現量の低下及び RNF216 発現量の増加が認められた。EGCG3”Me の摂取は脂肪組織における TLR4 発現量低下及び RNF216 発現量増大を誘発するとともに、高脂肪高ショ糖食摂食による炎症性サイトカインの増大を抑制した。また、EGCG3”Me 摂取により高脂肪高ショ糖食誘導性のインスリン抵抗性の増大を緩和した。

以上の結果から、EGCG は cGMP 及び RNF216 依存的に TLR4 の発現を抑え、EGCG”Me は高脂肪高ショ糖飼料摂食による炎症及びインスリン抵抗性を緩和することが示された。

TLR4, EGCG, insulin resistance

発表番号：2E097
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 動物培養細胞を用いた NF-κB 転写活性評価系の構築

# Development of evaluation system to assess NF-κB-dependent transcriptional activity using animal culture cell line

○相田 美緒、薩 秀夫（前橋工大工）
○Mio Aida, Hideo Satsu (Maebashi Institute Tech.)

【目的】近年食生活の欧米化に伴い消化器疾患、中でも炎症性腸疾患の患者数が増加していることが報告されている。炎症性腸疾患は潰瘍性大腸炎およびクローン病に大別されるが、中でも潰瘍性大腸炎は大腸がんのリスクファクターであり、大腸がんを予防する観点からも炎症性腸疾患の予防・改善が期待される。演者らはこれまで食品成分による炎症性腸疾患の予防・改善作用について検討を進め、クロロゲン酸などいくつかの食品成分が DSS 誘導大腸炎モデルマウスの腸炎症状を軽減することを報告してきた。またこれらの食品成分の作用メカニズムとして、炎症のマスターレギュレーターである転写因子 NF-κB を阻害することも見出してきた。そこで本研究では NF-κB を分子標的として、NF-κB 転写活性を阻害する食品成分をさらに探索することを目的とし、動物培養細胞を用いて NF-κB 転写活性を安定に測定する評価系を構築することとした。
【方法】NF-κB 依存的な転写活性の指標として、ルシフェラーゼ酵素活性を測定するレポーターアッセイを用いることとした。ルシフェラーゼ遺伝子上流に NF-κB 応答配列を含んだレポーターベクターを CHO-K1 細胞および Hela 細胞にリポフェクション法を用いて遺伝子導入し、抗生物質で選択をおこなった。抗生物質選択後さらに限界希釈法を用いて、シングルクローンを取得した。得られたシングルクローンに TNF-α を添加し 3 時間インキュベート後、基質を加えてルシフェラーゼ活性を測定した。なお TNF-α は NF-κB 依存的な転写活性を亢進することが知られるポジティブコントロールとして用いた。
【結果】CHO-K1 細胞および Hela 細胞へのトランスフェクション条件および抗生物質濃度を検討した後、まず CHO-K1 細胞に NF-κB 応答ルシフェラーゼベクターを遺伝子導入した。限界希釈後に得られたクローンについて TNF-α に対する応答性を検討したところ、最も応答の良いクローンでも 1.2 倍程度のルシフェラーゼ活性の増加しかみられなかった。そこで次に Hela 細胞を用いて同様に NF-κB 応答ルシフェラーゼベクターを遺伝子導入したところ、薬剤選択後の Hela 細胞では TNF-α の濃度依存的な増加がみられ、100ng/mL 添加で約 5 倍程度の応答が確認された。現在さらに応答性の高いシングルクローンを取得するために限界希釈をおこない、得られたシングルクローンの応答性を検討中である。

NF-κB, anti-inflammation, Luciferase

発表番号：2E098
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸管保護成分ポリリン酸を高蓄積した乳酸菌菌体の生理活性評価

# A lactobacillus mutant capable of accumulating long-chain polyphosphate alleviated DSS-induced colitis in mice by enhancing intestinal barrier function.

○斎木 朝子[1]、石田 康晃[2]、廣田 隆一[2]、瀬川 修一[1]、中村 剛[1]、黒田 章夫[2] ([1]サッポロビール株式会社、[2]広島大院先端物質・分子生命)
○Asako SAIKI[1], Yasuaki ISHIDA[2], Ryuichi HIROTA[2], Shuichi SEGAWA[1], Takeshi NAKAMURA[1], Akio KURODA[2] ([1]Sapporo Breweries Ltd., [2]Hiroshima Univ.)

【背景・目的】プロバイオティクスの一つである乳酸菌は、古くから発酵食品に利用されており、腸管の恒常性維持に寄与することで、ヒトの健康にさまざまな有益な作用をもたらすことが知られている。しかしその生理活性物質や作用機構についての報告は現在でも少なく、不明確な点が多く残っている。我々は乳酸菌 *L. brevis* SBC8803 株の培養液から腸管バリア機能を強化する物質を分離精製した結果、ポリリン酸がその生理活性を示すことを報告した[1)]。多量のポリリン酸を蓄積した乳酸菌菌体を作製することにより、より高い腸管保護作用を持つ高機能性乳酸菌が開発できると考えられる。また、一昨年の本大会にて、乳酸菌のポリリン酸合成酵素遺伝子破壊株（Δ*ppk* 株)は、野生株と同等の増殖を示すが、菌体内のポリリン酸蓄積が認められないことを報告した。このことから、ポリリン酸蓄積の意義と生理活性への寄与度についてさらに関心が持たれた。
そこで本研究では、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性腸炎モデルマウスを用いて、ポリリン酸を高蓄積した乳酸菌の経口摂取による生理活性を評価し、野生株およびΔ*ppk* 株との比較を行った結果について報告する。
【方法】実験動物には 7 週齢雄性 C57BL/6J マウスを用いた。乳酸菌は 75 mg/ml 菌体懸濁液を 100 μl 胃ゾンデで毎日経口投与した。乳酸菌事前投与期間以降は、飲水を DSS 溶液に切り替えて自由摂取させ、大腸炎を惹起した。炎症抑制効果の評価は、飼育期間中の体重変化、および生存率の評価によって行った。
【結果・考察】Δ*ppk* 株の投与群では、事前投与期間中に死亡や大幅な体重減少が認められ、Δ*ppk* 株菌体摂取により生体に負の影響が出たと推察された。ポリリン酸高蓄積菌体（ポリリン酸 100 μg/day）投与群では、通常菌体（同 1 μg/day）摂取群と比較して、4%DSS 投与 4~5 日時点の体重減少、および DSS 投与期間中の生存率が有意に改善していた。
以上の結果から、乳酸菌のポリリン酸が腸管保護に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、ポリリン酸を高蓄積した乳酸菌菌体の経口摂取により、腸炎の抑制効果があることが明らかになった。DSS による腸炎は非常に強い炎症が惹起されるが、そのような系でも炎症抑制効果が認められたことで、ポリリン酸には高い生理活性があることが確かめられた。

1) Segawa S, *et al.,* PLoS ONE 6(8): e23278 (2011).

polyphosphate, intestinal barrier function, *Lactobacillus*

発表責任者：斎木　朝子（asako.saiki@sapporobeer.co.jp）

発表番号：2E099
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ゼラニウム精油とその主成分であるシトロネロールの抗アレルギー効果

# Inhibitory effects of geranium oil and its major component, citronellol, on degranulation and cytokine production by mast cells

○実宝 智子[1]、小林 優子[1]、佐藤 晴美[1]、頼田 美佳[1]、中山 博登[2]、宮里 博成[2]、杉本 圭一郎[2] ([1]千里金蘭大学、[2]長岡香料株式会社)
○Tomoko Jippo[1], Yuko Kobayashi[1], Harumi Sato[1], Mika Yorita[1], Hiroto Nakayama[2], Hironari Miyazato[2], Keiichiro Sugimoto[2] ([1]Senri Kinran Univ., [2]Nagaoka Perfumery Co.)

（目的）近年、日本ではアトピー性皮膚炎、花粉症、気管支喘息、食物アレルギーなどの即時型 I 型アレルギーが増加している。この I 型アレルギーは抗原刺激を受けたマスト細胞が脱顆粒して、顆粒に含まれていたヒスタミンやセロトニンなどの生理活性物質が体内に放出されることによって起こる。そこで私たちはマスト細胞の脱顆粒を抑制する物質の検索を行うことにより抗アレルギー効果を有する物質の検索を行った。
(方法と結果) マウスの骨髄細胞から樹立した培養マスト細胞 (CMC) に対して免疫グロブリン(Ig)E と抗原を作用させて脱顆粒を誘導した。その際にあらかじめゼラニウム精油を作用させておくと脱顆粒が抑制されることを見出した。このゼラニウム精油は CMC の生存率に対しては影響を示さなかった。次にゼラニウム精油の成分分析を行った結果、シトロネロール、ギ酸シトロネリル、ゲラニオール、イソメントン、イソレデンなどが含まれており、シトロネロールが主要な成分であることが分かった。このシトロネロールは CMC の脱顆粒を濃度依存的に抑制した。一方、生存率に対する低下作用は認められなかった。
　マスト細胞が脱顆粒すると、腫瘍壊死因子 (TNF-α) が産生され、この TNF-αによってアレルギー性の炎症反応がますます促進される。そこで、IgE で CMC を刺激したときに産生される TNF-αの量を ELISA で測定した結果、シトロネロールはこの TNF-αの産生を抑制していた。TNF-αの産生には MAP キナーゼの活性化が必要である。MAP キナーゼのリン酸化に対するシトロネロールの影響を調べたところ、シトロネロールは ERK のリン酸化を抑制していることが分かった。
(結論) 抗アレルギー効果のある物質をマスト細胞の脱顆粒抑制効果を指標として検索したところ、ゼラニウム精油及びその主成分であるシトロネロールが見出された。これらの物質はマスト細胞の生存率は抑制しなかった。また、シトロネロールは炎症性サイトカインである TNF-αの産生も抑制しており、そのメカニズムとしては ERK のリン酸化を抑制していることが推察された。ゼラニウム精油及びシトロネロールは抗アレルギー作用を有するものとして期待される。

anti-allergic effet, citronellol, mast cell

発表責任者：実宝智子（k-jippou@cs.kinran.ac.jp）

発表番号：2E100
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

ガーリック由来香気成分が外因系凝固に及ぼす影響
The effect of flavor compounds derived from garlic on extrinsic coagulation pathway
○矢口 真実、荒木 彩花、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎（日本大院・生資科・応生科）
○Manami Yaguchi, Asyaka Araki, Sachiko Okue, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad. School)

【目的】我が国の血栓性疾患による死亡者数の総計は、死因の第一位であるがんによる死亡者数にほぼ匹敵し、予防法の確立が急務とされている。脳梗塞や心筋梗塞などのアテローム性動脈硬化を基盤とした血栓性疾患は、外因系凝固の惹起因子 Tissue Factor (TF) が起点となっており、TF の発現と活性化の抑制は血栓性疾患の予防の鍵となることが考えられる。ガーリックは抗血栓作用、抗炎症作用、抗肥満作用など様々な薬理作用を有することが報告されており、これらの作用にはガーリック由来のスルフィド類が重要な役割を果たしている。本研究では、これまでの研究により強力な血小板凝集抑制作用を確認した diallyl tirsulfide (DATS) が TF の発現と活性に及ぼす影響を明らかにし、ガーリックの抗血栓作用メカニズムを解明することを目的とした。
【方法】ヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL60 に PMA を添加培養して TF の発現を誘導した。この HL60 細胞を酸化剤である $HgCl_2$ を処理することにより、TF にアロステリックジスルフィド結合を形成し活性化した。活性化 TF に DATS 存在下、非存在下で血漿を添加し、フィブリンクロット形成時間を測定することで DATS が外因系凝固に及ぼす影響を評価した。また、血管内皮細胞のモデルとして、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いた。まず DATS の HUVEC に対する毒性を評価する目的で、20% FBS と FGF 含有の M199 培地でコンフルエントになるまで HUVEC を培養後、終濃度 100 μM までの各種濃度の DATS を添加した 2% FBS 含有 M199 培地に交換して 16 時間培養し、培養上清中の LDH 活性を測定した。さらに DATS を 30 分間前処理した HUVEC に TNF-α を添加培養して TF 発現を誘導し、各種遺伝子の発現と TF タンパク質の発現をリアルタイム PCR 法とウエスタンブロッティング法を用いて解析した。
【結果】HL60 細胞由来の活性化 TF により惹起されるフィブリンクロット形成は、DATS により濃度依存的に抑制された。HUVEC において TF の遺伝子発現は、TNF-α 添加後 2 時間で最大となり、TNF-α 無添加時と比較して約 40 倍増加した。この TNF-α による TF の発現増加は、DATS の前処理に約 16%にまで減少した。また TF のタンパク質は TNF-α 添加後 2 時間から発現が上昇し、4 時間で最大なり、TNF-α 無添加時と比較して約 2 倍に増加した。この TF の発現増加は、DATS の前処理により約 30%にまで減少した。
【結論】ガーリック由来香気成分 DATS は TF の発現と活性を抑制することにより、抗血栓作用を示すことが示唆された。

Garlic, Tissue factor, Thrombosis

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：2E101
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食物アレルギー性皮膚炎モデルにおける CD4+ T 細胞応答の解析

# Analysis of CD4+ T cell response in a food allergic skin inflammation model.

○平出 恵利華[1]、足立（中嶋） はるよ[1]、戸村 道夫[2]、北村 紀子[3]、上滝 隆太郎[1,4]、神沼 修[3]、廣井 隆親[3]、八村 敏志[1,4]（[1]東大院農生科・食の安全研セ、[2]大阪大谷大学・薬、[3]東京都医学総合研・花粉症プロ、[4]東大院農生科・応生化）

○Erika HIRAIDE[1], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[1], Michio TOMURA[2], Noriko KITAMURA[3], Ryutaro KOTAKI[1,4], Osamu KAMINUMA[3], Takachika HIROI[3], Satoshi HACHIMURA[1,4] ([1]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [2]Lab. Immunology Faculty Pharmacy, Osaka Ohtani Univ., [3]Pollen Allergy Proj., Tokyo Metropol. Inst. Med. Sci., [4]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo)

[目的]食物アレルギーの臨床症状では、皮膚炎が最も多いと報告されている。しかし、原因食物の摂取により皮膚炎が発症するメカニズムは分かっていない。そこで本研究ではこれまでに、OVA23-3 マウスを用いて CD4+ T 細胞と好酸球の浸潤を伴う Th2 型の食物アレルギー性皮膚炎を発症するモデルを作製し、現在はそのメカニズムの解明に取り組んでいる。OVA23-3 マウスは卵白アルブミン（OVA）に特異的な T 細胞抗原レセプターを発現するマウスであり、OVA 含有飼料（EW）の摂取のみで腸炎症、Th2 応答が誘導される。本大会では、食物アレルギー性皮膚炎発症時の腸間膜リンパ節（MLN）CD4+ T 細胞において皮膚へのホーミングに関わる CCR4 の発現解析の結果を報告する。また、細胞の組織間の移動解析に適した KikGR マウスを用いた解析についても報告する。

[方法] OVA23-3 マウスに食物アレルギー性皮膚炎を誘導するために EW を摂取させ、その後 OVA を浸み込ませた脱脂綿を皮膚に接触させた（EW/OVA 群とする）。対照群として、OVA の代わりに PBS を皮膚接触させた群（EW/PBS）、EW の代わりに通常食である CE-2 で飼育した後に OVA（CE-2/OVA）または PBS（CE-2/PBS）を皮膚接触させた群を設けた。その後、MLN の CD4+ T 細胞の CCR4 の発現をフローサイトメトリーにより解析した。また皮膚所属リンパ節（DLN）CD4+ T 細胞を培養し、増殖応答とサイトカイン産生量を測定した。さらに、細胞の移動解析を行うため、OVA23-3 マウスと KikGR マウスを交配し、OVA-KikGR マウスを作製した。OVA-KikGR マウスは紫色光を照射すると緑色から赤色に光変換する KikGR タンパク質を全身に発現するマウスである。

[結果] CD4+ T 細胞の浸潤が認められ、Th2 優位な皮膚炎が誘導される EW/OVA 群の DLN において、IL-4 産生量が他群と比較して有意に高くなることはなかった。また、増殖応答に関しても、CE2/OVA 群と同程度であった。以上の結果から、EW/OVA 群において、DLN 以外からも CD4+ T 細胞が皮膚に浸潤している可能性が示唆された。そこで、MLN CD4+ T 細胞において CCR4 の発現を解析したところ、他群と比較して高いことが分かり、MLN から皮膚に CD4+ T 細胞が移動している可能性が示唆された。次に、実際に細胞が移動しているかを調べるために、OVA-KikGR マウスを用いた。OVA-KikGR マウスにおいても OVA23-3 マウスと同様に食物アレルギーモデルとなるかどうかを調べるために、卵白食の摂取を行ったところ、体重減少、腸炎症、Th2 応答の誘導が認められた。現在、OVA-KikGR マウスを用いて MLN から皮膚に細胞が移動するかどうか解析を行っている。

food allergy, skin inflammation, CD4+ T cell

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2E102
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸菌が産生する菌体外多糖(Extracellular polysaccharides: EPS)の腸管細胞を介した免疫賦活性試験

# *in vitro* evaluation of immunological properties of extracellular polysaccharides (EPS) produced by lactic acid bacteria

○岸本 真奈、水野 雅史、大澤 朗（神大院農）
○Mana KISHIMOTO, Masashi MIZUNO, Ro OSAWA (Kobe Univ.)

【目的】乳酸菌の機能性は広く研究されており、多くの乳酸菌株で整腸作用や免疫賦活作用が報告されている。近年では、乳酸菌が産生する物質についても注目が集まっており、特に、乳酸菌が産生する菌体外多糖(Extracellular polysaccharides: EPS)の構造・機能性に関する報告は多数なされている。EPS の構造は菌株によって多様であり、また、機能性も株特異的であることが報告されているが、EPS の腸管細胞を介した免疫刺激応答に関する報告数は少なく、また、EPS を認識する腸管細胞の受容体に関する報告は少ないのが現状である。そこで、本研究では、*in vitro* で腸管を擬似した腸管モデルを用いて、食品由来乳酸菌が産生する EPS の腸管細胞を介した間接的な宿主の免疫システムへの影響の差異の検証を行った。

【方法】当研究室でヨーグルトから *Lactobacillus delbrueckii* TU-1 株、漬物から *L. plantarum* KM-9 株を分離し、EPS の精製を行った。EPS の構造を明らかにするために、HPLC による EPS の単糖構成および陰イオン交換クロマトグラフィーによる多糖の分画を解析した。免疫賦活性の検討において、EPS をヒト小腸上皮様 Caco-2 細胞とマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた擬似腸管モデル(Transwell®)で調べた。具体的には粗精製 EPS を管腔側に添加して 6 時間培養後、基底膜側の上清を回収し、Killing Assay 法による TNF-α産生量測定、また、上記細胞を回収し Real time PCR 法による目的遺伝子発現量測定を行った。なお添加した粗精製 EPS の濃度は上記システムにおいて RAW264.7 細胞の TNF-α産生量が最大を示した際の濃度を用いた。

【結果と考察】TU-1 株・KM-9 株が産生する EPS は、ともに Glucose と Galactose から構成されるが、モル比が異なっていた。陰イオン交換クロマトグラフィー分画においても異なるピークがみられたことから、繰り返し単位が異なる EPS であることが示唆された。免疫賦活性試験においては、KM-9 株と比較すると TU-1 株が産生する EPS で高い免疫賦活性がみられ、TNF-α産生量の増加・IL-12, IL-18 mRNA 発現量の増加を示した。また、TU-1 株が産生する EPS は炎症誘起能を示す LPS とは異なるサイトカインの発現傾向がみられており、炎症を誘起するのではなく、Th1 側の免疫傾向へ促すことが示唆された。上記所見より、EPS のわずかな構造の違いを腸管上皮細胞が認識して、その下層の免疫担当細胞にシグナルを送っていることが示唆された。

intestinal immunity, lactobacillus, extracellular polysaccharides

発表番号：2E103
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 緑茶カテキン EGCG は細胞表面セラミド量を増加させることで脂質ラフトの崩壊を誘導し増殖因子受容体活性を抑制する

# The green tea polyphenol EGCG induced cell membrane ceramide accumulation leading to lipid raft disruption and RTK inhibition

○黄 宇慧、塚本 俊太郎、熊添 基文、山田 脩平、山下 修矢、立花 宏文（九州大学大学院農学研究院）
○Yuhui HUANG, Shuntaro TSUKAMOTO, Motofumi KUMAZOE, Shuhei YAMADA, Shuya YAMASHITA, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

我々はこれまでに、緑茶カテキンの一種である Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG)が多発性骨髄腫細胞において高発現する EGCG 感知受容体 67-kDa laminin receptor (67LR)を介して酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)/セラミド産生経路を活性化することで正常細胞を傷害することなく、多発性骨髄腫特異的にアポトーシスを誘導することを見出した。しかしながら、生理的低濃度における EGCG のアポトーシス誘導活性は低い。そこで本研究では、ASM/セラミド産生経路を増強することで EGCG のアポトーシス誘導活性を増強できるのではないかと考え、セラミド分解促進因子であるスフィンゴシンキナーゼ 1(SphK1)の阻害効果を検討した。

多発性骨髄腫患者由来の細胞及び細胞株において、SphK1 の発現量は正常細胞に比べ高発現することを見いだした。そこで、EGCG と SphK1 の特異的阻害剤である Safingol の併用効果を *in vitro* 及び *in vivo* にて評価した。多発性骨髄腫患者由来の細胞及び細胞株において、Safingol は EGCG のアポトーシス誘導作用を増強した。ヒト多発性骨髄腫細胞株 U266 において ASM の活性化がセラミド蓄積に起因する脂質ラフトの崩壊を誘導し EGFR や IGFR をはじめとする様々な増殖因子受容体の活性化を阻害したが、Safingol はこうした EGCG の作用を増強した。また、マウス骨髄腫細胞株 MPC-11 を移植したマウス腫瘍モデルにおいて、EGCG/Safingol の併用は肝毒性を示すことなく腫瘍成長を顕著に抑制した。

以上の結果より、スフィンゴシンキナーゼの阻害は EGCG 誘導性の ASM/セラミド産生経路の活性化を維持することで、骨髄腫細胞特異的かつ強力な致死作用を誘導することが示された。

green tea polyphenol EGCG, cell membrane ceramide accumulation, lipid raft disruption

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2E104
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# スイカスプラウトによるヒト白血病細胞株 Jurkat 細胞の増殖抑制機構について

# Inhibitory effects of watermelon-sprout on Jurkat cell growth.

○伊藤 智広[1]、小野 暁人[1]、寺岡 沙也可[1]、川口 かおり[1]、原田 万葉[1]、安藤 正史[1]、塚正 泰之[1]、橋詰 利治[2] ([1]近大農、[2]（株）萩原農場生産研究所)
○Tomohiro ITOH[1], Akihito ONO[1], Sayaka TERAOKA[1], Kaori KAWAGUCHI[1], Mayo HARADA[1], Masashi ANDO[1], Yasuyuki TSUKAMASA[1], Toshiharu HASHIZUME[2] ([1]Kinki Univ., [2]Hagihara Farm Co., Ltd)

【目的】近年，もやし，カイワレ大根，アルファルファ，ブロッコリースプラウト，豆苗，紅タデなど様々なスプラウトの機能性研究が盛んに行なわれ，発芽後のビタミン C の産生が抗酸化能に強く寄与することが報告されている。スイカスプラウトには，リコペンとカロテンを含む果実の部分よりも強い抗酸化能を示すことが明らかとなっているが、これ以上の機能性に関する情報がない。そこで本研究では，この古代エジプト人も栽培していた野菜であるスイカの機能性を見出すことを目的に，スイカスプラウトヒト白血病細胞株 Jurkat 細胞の増殖抑制効果について検討した。

【方法】ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞にスイカスプラウトヘキサン抽出物（WSH Fr.）を添加し，処理後 72 時間までの生細胞数を24時間毎にトライパンブルー色素排除法により計数した。細胞死の誘導機構を明らかにするために，核およびミトコンドリア膜電位を Hoechst33342 および Mito Tracker Red によりそれぞれ染色後，蛍光顕微鏡下にて観察を行った。また、DNA の断片化を 2%アガロース電気泳動法，細胞周期解析を Muse® Cell Analyzer にてそれぞれ解析した。さらに，*in vivo* 系でのスイカスプラウトのガン細胞増殖抑制活性を実証するために，ヌードマウスにヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞を移植後，WSH Fr.，活性物質である phytol および陽性対照として CTX（cyclophosphamide）をそれぞれ 8 週間投与し，腫瘍サイズの変化を観察した。

【結果および考察】ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞に WSH Fr.を添加し，増殖抑制活性を検討したところ，強い増殖抑制活性を確認した（$IC_{50}$=4.7 $\mu$g/mL）。次にこの WSH Fr.処理による増殖抑制機構を検討したところ，DNA の断片化や細胞膜が破綻した細胞等が観察されなかった。この結果から，WSH Fr.処理による細胞死はアポトーシスやネクローシスの誘導によることではないことが示唆された。そこでさらに Muse® Cell Analyzer にて細胞周期解析を行った結果，WSH Fr.処理時間依存的に S 期の細胞数が増加し，G2/M 期の細胞が減少した。このことから，この WSH Fr.処理による増殖抑制機構は S 期における細胞周期停止によるものと考えられた。また，この WSH Fr.に含まれる活性成分を単離したところ，phytol および lutein が細胞死の関与成分として考えられたが，WSH Fr.おける phytol の含有量が多いこと，S 期における細胞周期の停止を phytol が示したことから，phytol が主要な活性成分であると同定した。現在，ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞を移植したヌードマウスへのヘキサン抽出物，phytol，および CTX の効果を検証している。

watermelon sprout, Jurkat cell, cell cycle arrest

発表責任者：伊藤智広（titoh@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：2E105
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 玄米米糠麹(FBRA)のアポトーシス誘導活性成分の探索

# Isolation of apoptosis-induced active substances from "fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae*"

○堀江 裕紀子[1]、伊藤 麻里[1]、小坂 弘明[1]、池川 繁男[2] ([1](株)コーケン、[2](株)玄米酵素)
○ Yukiko HORIE[1], Mari ITOH[1], Hiroaki KOSAKA[1], Shigeo IKEGWA[2] ([1]Koken Co., Ltd., [2]Genmaikoso Co., Ltd.)

日本を初めとするアジアやアフリカ諸国では、玄米の糠は除去した白米が主食として食べられている。しかしながら、玄米の表皮と胚芽部分には豊富なビタミン・ミネラル・食物繊維の他、γ-オリザノールやフェルラ酸などの健康の維持に有益とされる多種多様な機能性成分が数多く含まれている。このため、日本のみならず欧米各国においても和食を基本とする玄米食が健康の維持・向上に多くの注目が寄せられている。しかしながら、玄米は消化能に乏しいばかりか食味にも優れないため、玄米は摂食されず、精米した白米を食し、上述した機能性成分は米からは摂取されていない。

玄米米糠麹（FBRA）は玄米と米糠の混合物を黄麹菌で発酵させて製造される健康補助食品であり、糖質、タンパク質、脂肪 、ビタミン、ミネラルなどの栄養素とフェノール化合物や食物繊維などの健康を維持する機能性成分を摂取する事ができるものと考えられている。

先に我々はFBRAの水縣濁液をオートクレーブ(120℃、30分間)処理して得られた水抽出液が大腸癌細胞株HCT116を死滅させ、アポトーシスを誘導することを明らかにした[1)]。また、低温下での超音波によるFBRAの水抽出液がヒト急性T細胞性白血病細胞株Jurkatに対してデスレセプター経路を介したアポトーシス誘導作用を示し、未発酵原料である糠の水抽出液にはアポトーシスが認められないことを明らかにした。これらの知見は、FBRAの水抽出液中には、従来知られる玄米や米糠中のガン細胞に対するアポトーシス誘導成分とは異なり、黄麹菌との発酵によって産生される新たな機能性成分の存在が推測される。

そこで今回、アポトーシス誘導活性を有する機能性成分を単離し、その構造を明らかにすべく、FBRAの水縣濁液を超音波処理後、遠心分離して得られる上清をエタノールによって除蛋白した後、アポトーシス誘導活性を指標としてSephadex G-50を用いるサイズ排除クロマトグラフィー、さらにはカラムにTSKgel ODS-80TM (5 μm、250×4.6 mm ID)、移動相に水：アセトニトリルを用いるUV検出(215nm)高速液体クロマトグラフィーによって、機能性成分の単離進めている。本会では、機能性成分の分離プロセスとともにFBRAに含まれている生理活性成分の発酵による変化についても併せて報告する。

1)M. Itoh, N Nishibori, T. Sagara, Y, Horie, A Motojima, and K. Morita, Phytother. Res., 30, 2379-2384 (2012).

rice bran, *Aspergillus oryzae*, apoptosis

発表番号：2E106
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酵素消化低分子化フコイダン抽出物と抗ガン剤の併用処理による 抗腫瘍作用の増強

# Combined use of enzymatically digested low-molecular weight fucoidan extract and an anti-cancer drug enhance their anti-tumor effects

○楠本 啓博[1]、加治佐 真吾[1]、江藤 博[2]、吉田 年宏[3]、白畑 實隆[1,4]、照屋 輝一郎[1,4]([1]九大院生資環、[2]第一産業(株)、[3]吉田クリニック、[4]九大院農院)
○Yoshihiro KUSUMOTO[1], Shingo KAJISA[1], Hiroshi ETO[2], Toshihiro YOSHIDA[3], Sanetaka SHIRAHATA[1,4], Kiichiro TERUYA[1,4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ, [2]Daiichi Sangyo Co. Ltd, [3]Yshida clinic, [4]Fac. Agr., Kyushu Univ)

【目的】
フコイダンはコンブやモズクなどの褐藻類に多く含まれる粘性硫酸化多糖類であり、様々な生理活性が報告されている。現在の抗ガン剤を用いた治療では、薬剤耐性や副作用が問題となっており、その解決策が求められている。当研究室では、酵素消化低分子化フコイダン抽出物（LMF）がガン細胞株の細胞死を誘導することを確認した。本研究では、医療現場で治療に用いられている抗ガン剤と LMF との併用によるガン細胞死誘導効果を確認し、LMF の補完代替医療への有用性の検討を目的とした。
【方法】
LMF は第一産業株式会社から提供されたトンガ王国産モズクより調製したものを使用した。抗ガン剤は臨床の現場で広く使用されている 5-Fluorouracil（5-FU）と Carboplatin（CBDCA）を使用した。LMF、5-FU、そして CBDCA をガン細胞や正常細胞に単独処理を行った場合と LMF と 5-FU、また LMF と CBDCA を併用処理した場合において WST-1 法により細胞生存能力を評価した。また Hoechst 33342 にて核染色を行った後、細胞数解析を行った。
【結果・考察】
ガン細胞において LMF、5-FU、そして CBDCA はそれぞれ単独処理で細胞数の低下が確認された。その効果は LMF と抗ガン剤の併用処理により増強された。正常細胞における LMF 単独処理は細胞数の変化はほとんど見られず、LMF の正常細胞に対する細胞毒性は低いことが確認された。一方で、LMF と抗ガン剤との併用処理では抗ガン剤単独処理の場合よりも細胞生存率の上昇が認められた。以上のことから LMF はガン細胞に対して抗ガン剤の抗腫瘍効果を増強させるだけではなく、正常細胞に対しては抗ガン剤の細胞毒性軽減作用を持つことが示唆され、抗ガン剤治療の副作用軽減に役立つ可能性が考えられた。

fucoidan, anti-cancer

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2E107
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# キクイモ塊茎に含まれる白血病細胞増殖抑制成分の解明

# Elucidation of the compounds which inhibit the proliferation of leukemia cells from a Jerusalem artichoke tuber

○小林 悠生、高橋 優佳、五十嵐 大輔、白岩 雅和 (茨大農　資生科)
○YUSEI KOBAYASHI, YUKA TAKAHASHI, DAISUKE IGARASHI, MASAKAZU SHIRAIWA (Ibaraki Univ.)

【目的】キクイモ(*Helianthus tuberosus*)はキク科ヒマワリ属の多年草であり、地中に形成する塊茎が可食部とされている。キクイモ塊茎は血糖値上昇抑制作用を示すイヌリンを豊富に含み、糖尿病を緩和させる食材として知られている。近年、キクイモ塊茎を摂取したガン患者の症状改善が報告され、キクイモ塊茎に含まれる抗ガン活性成分の存在が予想された。これまでに当研究グループはキクイモ塊茎由来の複数の疎水性画分が、マウス白血病細胞 P388 に対して細胞増殖抑制作用を示し、その画分の一つはリノール酸やオレイン酸の脂肪酸混合画分であることを報告した。今回は以前報告した画分と異なる、より抗がん活性の強い画分から抗がん活性成分を分画し解析したので報告する。
【方法】キクイモ塊茎粉末から 70 %(v/v)エタノールを用いて成分抽出を行い、得られた抽出液を濃縮乾固後、水とブタノールで分配し、得られたブタノール層を画分 A、水層を画分 B とした。次に、画分 A をクロロホルム：メタノール：水＝75 ： 25 ： 10 の下層に終濃度 0.1 %(v/v)となるように酢酸を添加した溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、4 つの画分を得た。続いて、4 画分中最も活性の高かった画分を、ヘキサン：酢酸エチル＝5 ： 95 の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供して細分画し、最終的に 20 の画分を得た。全ての画分を DMSO に溶解し、生細胞由来の脱水素酵素によって還元された発色試薬の生成量を指標とした評価法により、マウス白血病細胞 P388 に対する細胞増殖抑制作用を評価した。また、正常細胞であるマウス繊維芽細胞 BALB/3T3 cloneA31 に対する毒性についても同様の方法で評価した。さらに、アクリジンオレンジ/エチジウムブロマイドで二重染色後に形態観察を行い、アポトーシス誘導作用を評価した。
【結果】画分 A より分画した画分に対して網羅的に白血病細胞増殖抑制試験を行ったところ、画分 A2CD が最も高い活性を示し、未処理対照の生細胞数を 100%としたときその半数阻害濃度は 2.16 μg/ml であった。当研究グループが以前報告した脂肪酸混合画分の半数阻害濃度は 39.2 μg/ml であり、画分 A2CD は白血病細胞に対するより強い増殖抑制作用を有することが確認された。加えて、画分 A2CD は白血病細胞への増殖抑制作用を示した全濃度において、正常細胞の増殖をほとんど抑制せず、細胞毒性が低いことが明らかとなった。さらに、画分 A2CD で処理した細胞を蛍光染色し形態観察したところ、アポトーシスに特有のクロマチン凝縮およびクロマチン断片化が観察されたことから、画分 A2CD はマウス白血病細胞 p388 に対してアポトーシス誘導作用を持つことが示唆された。現在、画分 A2CD から活性成分の精製および化学構造解析を行っている。

Jerusalem artichoke, anticancer, leukamia

発表番号：2E108
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# MK を指標とした神経芽腫細胞に対するジャボチカバ葉のエタノール抽出液の抗腫瘍活性評価

Evaluation of jabuticaba's leaf ethanol extract for antitumor activity, against neuroblastoma cells, as an indicator of the MK activity.

○城間 博紹[1]、折田 光希[1]、坪田 庄真[2]、岸田 聡[2]、千葉 俊明[1]、門松 健治[2]、池松 真也[1]([1]沖縄高専、[2]名大医)

○Hirotsugu SHIROMA[1], Mitsuki ORITA[1], Shouma TSUBOTA[2], Satoshi KISHIDA[2], Shunmei CHIBA[1], Kenji KADOMATSU[2], Shinya IKEMATSU[1] ([1]NIT, Okinawa college, [2]Nagoya Univ.)

**【背景・目的】**

癌で特異的に発現している MK は、アポトーシスを抑制し、癌の発生や進展に関与している。小児癌の一種である神経芽腫でも MK は発現しており、予後の悪い神経芽腫患者の血漿中の MK の発現量は高く、予後の良い患者の血漿中の発現量は低い傾向にあることが確認されている。神経芽腫に有効な薬剤を探索するため、先行研究では、沖縄の亜熱帯性生物資源から株化された神経芽腫細胞の MK 分泌抑制作用をもつ成分をスクリーニングし、ジャボチカバ葉エタノール抽出液に可能性を見出した。本研究では神経芽腫細胞に対するジャボチカバ葉エタノール抽出液の抗腫瘍活性の評価を行い、神経芽腫の治療薬の候補になり得るかどうかに関する基礎データを収集することを目的とした。

**【実験方法】**

抗腫瘍活性の評価として、ヒト神経芽腫株化細胞の一種である SK-N-SH 細胞を使用し、細胞にジャボチカバ葉エタノール抽出液を希釈し濃度を変えて添加し、(1)細胞増殖能、培養上清中の MK タンパク質分泌量、(2)MK 遺伝子の mRNA の発現量、カスパーゼ活性を測定した。

(1)細胞増殖能試験、培養上清中の MK 分泌量の定量

抽出液添加から 24 時間後、48 時間後に培養上清を回収後、WST-1 assay を行い、細胞増殖能を評価した。ELISA 法を用いて回収した培養上清中の MK タンパク質の分泌量を定量した。

(2)MK 遺伝子の mRNA の発現量、カスパーゼ活性の測定

抽出液添加から 24 時間後の細胞から RNA を抽出し MK 遺伝子の mRNA の発現量を定量した。また、同条件下でカスパーゼ活性を測定した。

**【結果・考察】**

抽出液を希釈し濃度を変えて SK-N-SH 細胞に添加し、WST-1 Assay を行ったところ、抽出液の 50%の濃度までほぼ全ての細胞が死滅することを確認した。また、抽出液の濃度依存的に細胞増殖抑制作用が確認された。さらに、抽出液添加から 24 時間後のカスパーゼ活性を測定したところ、抽出液の濃度依存的にその活性が高くなっていることが明らかになった。以上のことから、ジャボチカバ葉エタノール抽出液はアポトーシスを誘導していることが示唆された。また、MK 遺伝子の mRNA の発現量と培養上清中の MK タンパク質の分泌量も抽出液の濃度依存的に減少したため MK 遺伝子のシグナル伝達系に作用し細胞増殖・アポトーシスを抑制していることが考えられた。

Midkine, Jabuticaba, Neuroblastoma

発表番号：2E109
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ショウジョウバエを用いた新規ながん予防食品探索法の開発

# Development of a new method discovering foodstuffs for cancer prevention, using Drosophila

○永長 一茂、前多 隼人（弘前大）
○Kaz NAGAOSA, Hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

【背景と目的】

がんは無限増殖能と転移能を獲得したがん細胞の出現が発症の起点となる疾患で、日本人の死因の約 3 割を占める。2014 年のがんによる死者は 37 万人に近く、依然としてがん予防への期待は大きい。効果的ながん予防策としては、がん細胞増殖の抑制とともにがん細胞そのものの出現の抑制が挙げられる。がん細胞は染色体 DNA の損傷が蓄積することで出現するため、そこに至る過程を抑える複数のがん細胞出現予防機構が存在する。具体的には、1)DNA 損傷の抑制、2)損傷 DNA の修復、3)DNA 損傷細胞への細胞死誘導、4)DNA 変性細胞の排除、5)がん細胞の増殖抑制・排除といった機構である。各過程に対する研究は盛んに行われているものの、4)に対する研究は殆ど行われてこなかった。その理由は、適切な解析法が存在しなかったことによる。

近年、DNA 変異細胞の排除に関する研究が活発に行われはじめた。中でも、ショウジョウバエを利用した「細胞競合」を対象とする研究がその中心となっている。細胞競合は「性質の異なる細胞同士が隣接すると一方が他方を排除し、空きスペースに増殖する」現象で、がん細胞の元となると DNA 変異細胞はこの仕組みで排除されると予想される。本発表では、細胞競合を観察する in vivo 実験系を用い、細胞競合を促進する食品、すなわち新規ながん予防食品候補を見出したので報告する。

【結果と考察】

ショウジョウバエは主に果物を摂取する昆虫である。幅広い食品のがん予防効果の評価には、それらを摂取した動物が死なないことが必須である。まず、ショウジョウバエが海藻存在下で成育可能かを検証した。エゴノリ、イシモズク、マツモを含む飼料でショウジョウバエを飼育し、急性毒性、および発生への影響を観察した。高濃度のイシモズクでは胚から蛹への成長がやや遅れたものの、他の条件では発生異常も見られず、すべての海藻で急性毒性が見られなかったことから、ショウジョウバエによる海藻の評価が可能だと判断した。次に、エゴノリおよびイシモズクを含む飼料で飼育したショウジョウバエを観察し、細胞競合の程度を検証したところ、イシモズクは細胞競合を促進する、すなわちがん予防効果を示し得ることがわかった。また、80%エタノールでイシモズクを分画して活性を示す画分を調べたところ、細胞競合促進成分は不溶性画分に含まれることがわかった。

以上より、本研究で用いた手法により、がん予防食品の探索が有用である可能性が示唆された。現在、細胞競合促進能を指標とした、多様な食品素材のスクリーニングを計画している。

cancer prevention, Drosophila, seaweed

発表責任者：永長一茂（knagaosa@hirosaki-u.ac.jp）

発表番号：2E110
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Flavan 3-ols の循環刺激作用は交感神経刺激を介して発現する

# Sympathetic nerve system is involved in the hemodynamic changes following oral dose of flavan-3-ols

○齊藤 晃子、稲川 広大、深瀬 忍、江部 力彦、柴田 政廣、越阪部 奈緒美（芝工大　生命）
○Akiko SAITO, Koudai INAGAWA, Shinobu FUKASE, Rikihiko EBE, Masahiro SHIBATA, Naomi OSAKABE (Shibaura Inst. of Tech.)

我々はこれまでに flavan 3-ols（FL）単回投与後に血圧・心拍が一過性に上昇すること [1]、また投与 2 時間後において血中アドレナリン濃度が上昇することを見出している [2]。本研究では，循環系に対する flavan 3-ols の用量反応性の確認し，またその作用メカニズムの解明を目的にアドレナリン受容体ブロッカーを用いた検討を実施した.

実験動物には wistar 系雄性ラット（8-10 週令）を用い、血圧・心拍数は tail cuff 法により投与後 60 分間の変動をモニターした。全ての測定終了後、麻酔下で大動脈を摘出し、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)のリン酸化を western blot 法で測定した。

用量反応性試験では FL1, 10, 100 mg/kg のいずれの用量においても心拍数の有意な上昇が認められたが、その効果は 10mg/kg が最も強かった。血圧においては FL1, 10mg/kg 投与直後から有意な上昇が確認されたが, FL100 mg/kg ではこの作用が見られなかった。FL10mg/kg と非選択的ブロッカーである carvedilol を併用投与したところ、血圧・心拍数の上昇は認められなかった．循環動態の変動が見られなかった FL100mg/kg とα1 ブロッカーである prazosin を併用投与したところ, 心拍数の著しい上昇と血圧の有意な低下が見られた．β2ブロッカーである butoxamine を前投与し FL100mg/kg を投与したところ，血圧・心拍数に変動は認められなかった。一方、FL100mg/kg とα2ブロッカーである yohimbine を併用投与したところ，血圧・心拍数が顕著に上昇した．eNOS のリン酸化は、FL10mg/kg 単独投与あるいは FL100mg/kg と yohimbine 併用投与の場合、すなわち血圧が上昇した場合にのみ観察された。

これらのことから、flavan 3-ols は交感神経を刺激し，交感神経終末から放出されたカテコールアミンが心臓・血管に分布するアドレナリン受容体に結合することで循環刺激作用が発現すること、また動脈リン酸化 eNOS の上昇は血管内皮に対するメカニカルストレスによって誘導されることが明らかとなった。

参考文献

1) Inagawa K *et al.* PLoS One. 2014 April 16;9(4)：e112180
2) Matsumura Y *et al.* PLoS One. 2014 Nov 6;9(11)：e94853

flavan 3-ols, adrenaline receptor, blood pressure

発表責任者：越阪部奈緒美（nao-osa@sic.shibaura-it.ac.jp）

発表番号：2E111
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Flavan 3-ols の廃用性筋萎縮抑制効果の検証

# Flavan 3-ols retarded disuse atrophy by hindlimb suspension in mice

○伊藤 麻央、工藤 直人、中村 将広、三宅 勇司、越阪部 奈緒美（芝工大　生命）
○Mao ITO, Naoto KUDO, Masahiro NAKAMURA, Yuji MIYAKE, Naomi OSAKABE (Shibaura Inst. of Tech)

＜背景＞筋萎縮はロコモティブシンドロームを誘発する運動器疾患の一つであり、ユビキチン・プロテアソーム経路の活性化によって引き起こされる。これまでに我々は、flavan 3-ols（FL）の単回投与が血中アドレナリン濃度を上昇させることを見出した[1)]。同時に FL 単回投与は骨格筋中の PGC-１α mRNA 発現量を上昇させること、またこの上昇はアドレナリン受容体阻害剤の前処置によって消失することから[2)]、FL の交感神経刺激作用が示唆されている。一方で、β2 アドレナリン受容体アゴニストは筋タンパク合成系を活性化した筋肥大を起こすことが報告されている[3)]。そこで本研究では、マウスにおける FL 投与の廃用性筋萎縮モデルに対する効果を検証することを目的に実験を行った。
＜実験方法＞17-19 週齢の C57BL/6J 雄性マウスを使用し、ランダムに定常状態群(N)と後肢懸垂群(H)の二群にわけた。さらに各群を精製水投与群(V)と FL 投与群(F)にわけて最終的に、NV、NF、HV、HF の 4 群を実験群とした。NV と HV には精製水を、NF と HF には FL(50mg/kg)を 2 週間投与した。その後解剖し、腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋、長趾伸筋を摘出し、重量測定およびユビキチンリガーゼである muscle ring finger (MuRF)-1 と muscle atrophy F-box (MAFbx)、タンパク質合成関連タンパクである p70S6 kinase (p70S6K)の発現量を western blotting 法により測定した。
＜結果＞HV 群の腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋の筋重量は定常状態群と比較し有意に減少した。しかし、長趾伸筋においては筋重量の低下は確認されなかった。一方、FL を投与した HF 群では腓腹筋、ヒラメ筋、前脛骨筋において、HV 群で見られた重量の減少は抑制されていた。さらに長趾伸筋においては、FL 投与群の NF と HF で NV と HV と比較して重量の増加が確認された。ヒラメ筋における MuRF-1 と MAFbx の発現量は、定常状態群と比較し HV 群で有意に上昇したが、HF 群では定常状態群との差は確認されなかった。ヒラメ筋の p70S6K の発現量は HV 群と比較し HF 群で有意に上昇した。
＜結論＞Flavan 3-ols は廃用性筋萎縮モデルの遅筋・中間筋における筋重量の低下を抑制した。この効果はユビキチンリガーゼ発現抑制および p70S6K 発現上昇によるものであることが示唆された。また速筋である長趾伸筋においては筋重量の増加が認められた。以上の作用は flavan 3-ols の交感神経刺激作用によって発現することが推測された。

１）　Matsumura Y. et al. PLoS One. 2014 6;9(11):e112180
２）　Kamio N. et al. Submitting
３）　Joassard OR. et al..Int J Biochem Cell Biol. 2013 ;45(10):2309-21

Flavan 3-ols, muscle atrophy, sympathetic nerves

発表責任者：越阪部　奈緒美（nao-osa@sic.shibaura-it.ac.jp）

発表番号：2E112
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 一重項酸素吸収能測定法の妥当性確認およびパプリカの抗酸化能評価

# Inter-laboratory validation study of single oxygen absorption capacity assay method and determination of antioxidative activities of paprika

○若木 学、渡辺 純、石川（高野） 祐子（農研機構・食総研）
○Manabu WAKAGI, Jun WATANABE, Yuko TAKANO-ISHIKAWA (National Food Research Institute, NARO)

[背景]一重項酸素吸収能測定法(single oxygen absorption capacity; SOAC)はカロテノイド類等の抗酸化能を測定できる方法である[1]。更に、24 穴プレートで測定可能に改良されたことにより、従来法に比べて多くの検体を測定することが可能となった[2]。本研究では、この改良法に関して妥当性を確認するために室間共同試験を行った。また、パプリカに関して、改良法を用いて収穫時期や品種による変動解析を行った。

[実験方法]室間共同試験の試料として、抗酸化物質溶液試料 3 種(astaxanthin, zeaxanthin, capsanthin)と野菜抽出物試料 3 種(パプリカ、ニンジン、トマト)を用意し、作業手順書と共にそれぞれの試料を非明示で 2 反復ずつ 14 試験室に配布した。得られた分析結果は生データとして報告してもらい、Cochran および Grubbs 検定により外れ値検定を行った後、中間相対標準偏差($RSD_{int}$)、室間相対標準偏差($RSD_R$)、および HorRat 値を算出した。また、パプリカの抗酸化能測定に関して、赤パプリカ（サッポロ、フェラーリ）、黄パプリカ（ヘルシンキ、コレッティ）、および橙パプリカ（グローリー）を対象に、9 月から 12 月に収穫されたものを凍結乾燥後、粉砕した。高速溶媒抽出機(ASE-350)を用いて凍結乾燥粉末を SOAC 法測定溶媒（クロロホルム：エタノール：重水＝50: 50: 1）を用いて抽出し、抗酸化能測定を行った。

[結果・考察] 室間共同試験の結果、抗酸化物質溶液試料において $RSD_{int}$ は 6.3-9.9%、$RSD_R$ は 7.5-14.0%で、野菜抽出物試料において $RSD_{int}$ は 4.3-5.7%、$RSD_R$ は 7.4-9.1%の範囲であった。また、それぞれの測定試料における HorRat 値は 1.03-1.97 であり、HorRat 値が 0.5<HorRat≦2 の範囲内に収まったことから、改良法の妥当性が確認された。次に、妥当性が確認された改良法を用いてパプリカの 抗酸化能を測定したところ、サッポロは 17.5 ± 2.2 から 26.9 ± 0.3 μmol α-Toc/g FW、フェラーリは 15.8 ± 1.4 から 44.1 ± 4.6 μmol α-Toc/g FW、ヘルシンキは 5.3 ± 1.8 から 14.5 ± 8.3 μmol α-Toc/g FW、コレッティは 6.3 ± 1.7 から 9.6 ± 1.8 μmol α-Toc/g FW、グローリーは 15.4 ± 1.8 から 20.1 ± 3.1 μmol α-Toc/g FW の範囲であった。また、赤パプリカの抗酸化能は収穫時期によって変動したが、黄および橙パプリカの抗酸化能は収穫時期による違いは認められなかった。また、パプリカの抗酸化能は、品種よりも果肉の色の違いによる影響が大きく、赤、橙、そして黄色の順に抗酸化能が高い傾向にあった。

[1] Ouchi et al. (2010) J. Agric. Food Chem., 58, 9967.
[2] Takahashi et al. (2015) J AOAC Int., in press.

single oxygen absorption capacity assay, antioxidant, validation study

発表責任者：若木学（mana5998bu@affrc.go.jp）

発表番号：2E113
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 宮城県産パプリカトマトの抗酸化能の品種、収穫時期による変動

# Seasonal changes of anti-oxidant activities on paprika and tomato in Miyagi

○石川(高野) 祐子、若木 学、後藤 真生、荻田 佑、渡辺 純 (農研機構　食総研)
○ Yuko ISHIKAWA-TAKANO, Manabu WAKAGI, Masao GOTO, Tasuku OGITA, Jun WATANABE (National Food Research Institute, NARO)

【目的】近年、生活習慣病をはじめとする様々な疾病に生体内酸化ストレスが関与しており、生体の抗酸化機構が老化等によって機能低下することにより、疾病罹患リスクが高くなるという知見が蓄積されている。これを受けて、抗酸化能を有する食品の摂取によって生体の抗酸化機構を補完し、疾病を予防する技術開発への期待が高まりつつある。一方、被災地の復興を農林水産業によって下支えする方策として、現地の特産野菜の高付加価値化が有効である。そこで、抗酸化能を付加価値と捉え、品種や栽培方法の違いが抗酸化能に与える影響を明らかにするため、宮城県産農作物について酸素ラジカル吸収能（ORAC）の評価を行った。
【材料及び方法】2014 年度宮城県産のパプリカの赤肉品種（サッポロ、フェラーリ)、黄肉品種（ヘルシンキ、コレッティ)、橙肉品種（グローリー)、およびトマト（桃太郎ヨーク、れいか他,慣行栽培と高糖度栽培処理）について 9 月から 12 月に収穫された果実を試料とした。5 果 x3 反復とし、縮分後、直ちに液体窒素により凍結し、凍結乾燥粉末を作成した。凍結乾燥粉末約 1g を精秤し、高速溶媒抽出機(ASE-350：日本ダイオネクス)を用いてヘキサン：ジクロロメタン=1:1 および酢酸酸性メタノール（メタノール：酢酸:水=90:0.5:9.5）による連続抽出を行い、それぞれを L-ORAC, H-ORAC 測定用試料とした。ORAC 測定法については、Watanabe らの方法[1], [2]に準じて行ない、Trolox 当量として評価した。
【結果及び考察】パプリカは品種によって L-,H-ORAC 値が異なったが、特にフェラーリの H-ORAC は 703.3~823.8 μmol TE/100gFW（以下同じ）, L-ORAC は 174.6~227.3 という値を示し、いずれの収穫時期においても、同一収穫日の他の品種よりも抗酸化能が高いことが認められた。L-ORAC 値は一般に H-ORAC 値よりも収穫時期による変動が大きかったが､比較的変動が大きい品種(L-ORAC:サッポロ、フェラーリ、コレッティ、H-ORAC:フェラーリ、ヘルシンキ）と、変動が少ない品種が存在した。同じ品種の同一収穫日のトマトでは、塩ストレスを負荷する高糖度栽培の方が慣行栽培よりも L-ORAC, H-ORAC ともに高くなる傾向が認められた。

本課題は、農水省委託プロ「被災地の復興のための先端技術展開事業」により行なった。
[1] Watanabe et al., Anal Sci., 28(2), 159-65 (2012)
[2] Watanabe J. et al. Anal. Sci. 印刷中

ORAC, paprika, antioxidant

発表番号：2E114
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品素材由来 1 型コラーゲン産生促進物質の探索

# Search for type-1 collagen production enhancer from food material

○須賀 久世、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○Hisayo SUGA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Graduate school of agriculture, Hokkaido University)

〔研究背景〕

人間の真皮は主にコラーゲンで構成されており、そのほとんどが 1 型コラーゲンである。深いシワの形成された肌では 1 型コラーゲン量が減少していることが知られているため、皮膚線維芽細胞に 1 型コラーゲンの産生を促す食品素材はシワの予防や改善に寄与すると考えられる。そこで本研究では食品由来 1 型コラーゲン産生促進成分の探索を行うこととした。

〔試験法の検討及び結果〕

試験にはヒト皮膚線維芽細胞株 NB1RGB を用いた。食品素材抽出物を添加した無血清培地で一定期間培養し、培養上清中に放出された 1 型コラーゲン量をスロットブロット法により測定することで評価することとした。

まず検出条件を最適化するため、ウェスタンブロッティング法により I 型コラーゲンを良好な感度と選択性で検出可能な条件を決定した。次に、この条件をスロットブロット法に適用して、培養上清に含まれる 1 型コラーゲンの測定範囲を確認した。その結果、培養上清 2.5～10μL の範囲で検量線を引くことが出来たため、測定には上清 5μL を使用することとした。

次に試験条件について検討した。培養日数について検討した結果、3 日間の培養により上清中の 1 型コラーゲン量が最大に達することが分かったため、培養期間は 3 日間に決定した。また 1 型コラーゲンの産生には L-アスコルビン酸が必須であることが知られており、培地中の L-アスコルビン酸濃度の影響を受ける。そこで、食品素材抽出物に含有された L-アスコルビン酸の影響を排除するため、培地に L-アスコルビン酸を添加することとした。L-アスコルビン酸添加量を検討した結果、培地中の濃度 12.5μg/mL 以上で 1 型コラーゲン合成量が飽和したため、L-アスコルビン酸 12.5μg/mL 含有の無血清培地を用いて試験することとした。

現在はこれら最適化した活性評価試験条件を用いて、食品素材のスクリーニングを行っている。

type-1 collagen, anti-aging, skin fibroblasts

発表責任者：須賀久世（hyr-74@eis.hokudai.ac.jp）

発表番号：2E115
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ハブソウ（*Cassia torosa* L.）中の有効成分の検索と生理活性

# Physiological Activities and Utilization of *Cassia torosa* L. Seeds

○元矢 倫子[1]、元矢 知志[2]、岡田 芳治[1]、元矢 雅彦[3]、野村 正人[1]（[1]近畿大・シス工、[2]島根大・医、[3]三幸食品工業（株））
○Michiko MOTOYA[1], Tomoyuki MOTOYA[2], Yoshiharu OKADA[1], Masahiko MOTOYA[3], Masato NOMURA[1] ([1]Kinnki Univ., [2]Shimane Univ. Med., [3]Sanko Shokuhin Kogyo Co., Ltd.)

【緒言】

近年，漢方医学と西洋医学を互いに取り入れようという東西医学結合の流れが広まっている．この流れを受け，漢方やその原料となる生薬，さらには世界各地で伝承的に効果を持つとされる植物などの成分分析や，効能を科学的に実証するための研究が盛んに行なわれている．

本研究で取り上げたハブソウ（*Cassia torosa* L.）は，マメ科カワラケツメイ属の一年草であり，原産地は熱帯アジアである．現在では，主に東南アジアで栽培されている．また，中国では古くから栽培されており，日本には薬用として江戸時代に渡来した．茎は直立し，1～1.5 m にまで成長する．葉は互生し偶数羽状複葉で，長い卵形をしており，先端が尖っている．夏季に茎頂および葉腋に総状花序を出し，数輪の黄色い五弁花を咲かせる．莢は短い子房柄をそろえ，先端の鈍い円柱形をしている．種子は略々円盤状で一方に小突起がある．この種子は望江南と呼ばれる生薬の一つで，煎じたものを沸騰させ煮出す．これがハブソウ茶として人々に親しまれている．

ハブソウ茶には，Emodin を始めとするアントラキノン系の化合物が多く含まれていることから緩下，強壮薬として利用されている．民間伝承によると健胃や創傷，口内炎に対する効果があるとされている．しかし，含有成分の生理活性に関する詳細な研究報告は少ない．そこで今回，ハブソウの種子について抽出を行ない，有効成分の検索と生理活性について検討した．

【実験方法と結果】

岐阜県産のハブソウ（葉取用）種子 20 g に 80 °C のお湯を 200 mL 加え，30 分間加熱しながら抽出した．得た熱水抽出部を凍結乾燥後，ヘキサン，クロロホルム，酢酸エチルおよびブタノールの順に溶媒分画を行なった．各分画部を濃縮し，水層部は凍結乾燥した．その後，熱水抽出部とそれぞれの分画部および水層部に対して DPPH ラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験を行なった．その結果，活性酸素阻害試験において，酢酸エチル分画部およびブタノール分画部に高い活性を確認した（64.6%および 58.1%）．

また，凍結乾燥後の試料を酸加水分解し，ヘキサン，クロロホルム，酢酸エチルを用いて溶媒分画を行なった．加水分解後の試料および各分画部に対して，前述した DPPH ラジカル消去効果試験および活性酸素阻害試験を行なった結果，DPPH ラジカル消去効果試験においてクロロホルム分画部および酢酸エチル分画部に高い活性を確認した（93.7%および 92.8%）．

*Cassia torosa* L., Emodin, Physiological activity

発表責任者：野村　雅人（nomura@hiro.kindai.ac.jp）

発表番号：2E116
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 完全合成培地中での希少糖 D-プシコースの線虫寿命延長効果

# lifespan-extending effect of D-psicose in *Caenorhabditis elegans* cultured in a chemically defined medium

○佐藤 正資[1]、砂古口 博文[1]、吉原 明秀[2]、新谷 知也[3]、大隈 一裕[3]、何森 健[2]（[1]香川大農、[2]香川大・希少糖研究セ、[3]松谷化学工業(株)）
○Masashi Sato[1], Hirofumi Sakoguchi[1], Akihide Yoshihara[2], Tomoya Shintani[3], Kazuhiro Okuma[3], Ken Izumori[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Reseach Center, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chemical Industry CO.,LTD)

【背景・目的】摂取カロリーの制限により寿命が延長することが，ショウジョウバエ，マウス，サル，線虫など多くの実験動物で知られている。ヒトにおいてもカロリー制限は，加齢性疾患の発症を遅らせ，寿命を延ばすと考えられている。しかし，生涯にわたってカロリー制限食を続けるのは困難である。そこで，摂取することによりカロリー制限と同等の効果を得ることができる物質，カロリー制限模倣物質の開発が注目されている。我々はノンカロリー甘味料である希少糖 D-プシコースがカロリー制限模倣物質として働き，動物の寿命を延長する効果があるのではないかと考え，老化研究のモデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて研究を行い，D-プシコースの寿命延長・抗老化効果をすでに報告している。

今まで行ってきた寿命試験法は，液体培地中に餌として大腸菌を共存させる二者培養 (monoxenic culture) の条件下のものであった。しかし，この monoxenic 条件では，培地の栄養条件を自由に変えることが出来ず，また，D-プシコースの活性発現において大腸菌が影響している可能性を排除できない。そこで，我々は，完全合成培地 CeMM (*Caenorhabditis elegans* maintenance medium) を用いて無菌培養 (axenic culture) の条件下で線虫寿命試験を行うことを考えた。本研究では，CeMM で線虫寿命試験を行うための条件検討を報告する。

【方法】同調培養によって得られた *C. elegans* 第一期 (L1) 幼虫を CeMM で培養し，成虫を得た（培養期間：20℃，7 日，25℃，5 日）。得られた成虫をアッセイに用いた。試験容器は 96well カルチャープレートを用い，1well あたり 100μl の CeMM に成虫一頭を入れ，静置培養を行った。2,3 日おきに線虫の生死を観察，記録した。すべての線虫が死ぬまで培養を続け，寿命曲線を作成した。1) 培養温度（25℃あるいは 20℃），2) 炭素/エネルギー源である D-グルコースの濃度について検討を行った。

【結果・考察】D-グルコース 90mM を含む CeMM での線虫寿命は，培養温度 20℃, 25℃で median survival (MS) がそれぞれ，30 日，27 日であった。そこに D-プシコース 25mM を加えたところ，MS はそれぞれ 41 日，30 日と有意に寿命が延長した（Log-rank test）。この結果から D-プシコースの活性発現において，大腸菌の影響を除外することができた。現在，D-グルコースの濃度を低下させ，D-プシコースの必要量が変化するか検討を行っている。

lifespan-extending effect, D-psicose, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：2E117
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Tyrosinase 反応で生成する・OH に対する機能性成分の低減効果

# Alleviation effects of functional ingredients on hydroxyl radical generated through tyrosinase reaction

○多田 美香[1]、河野 雅弘[2]、庭野 吉己[3]([1]東北工学　共通教育センター、[2]東工大　大学院生命理工、[3]東北大歯)
○Mika TADA[1], Masahiro Kohno[2], Yoshimi Niwano[3] ([1]Tohoku Tech., [2]Tokyo Tech., [3]Tohoku Univ.)

【緒言】Tyrosinase は動植物や菌類に含まれる酵素で 2 種のメラニン色素の形成を触媒する。近年，ユーメラニンが光感受性物質として働き UVA によって酸化ストレスの原因になること，悪性黒色腫ではメラニンの反応中間体である dopaquinone と抗酸化作用をもつ cysteine との結合によって黄色のフェオメラニンが盛んに合成される，など生体内で悪影響を及ぼすことも知られている[1]。我々はメラニン形成の初期反応である tyrosine - tyrosinase 反応過程において，酸化ストレス因子であるヒドロキシルラジカル（•OH）などのフリーラジカルが生成することを確認した[2]。本研究では，tyrosinase 反応での•OH 生成に注目し，機能性成分と•OH 生成の関係を定量的に議論していく。
【方法】実験試薬として，基質の L-tyrosine，酵素の tyrosinase（from mushroom），tyrosinase 阻害剤として汎用されている arbutin，スピントラップ剤の 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide（DMPO）を用いた。ESR スペクトルの測定は，X-バンド ESR 装置 （JES-FA100，および FR30，日本電子㈱）で行った。
【結果及び考察】Tyrosinase 反応開始から 45 秒後に観測した•OH の DMPO スピンアダクト（DMPO-OH）の ESR 信号は，基質および tyrosinase 濃度にしたがって増大した。DMPO-OH の生成量と酵素，または基質との間に濃度依存性が認められたことから•OH は tyrosinase によるオキシゲナーゼ反応で生成したことが示唆された。次に，arbutin が及ぼす DMPO-OH 生成へ及ぼす影響を調べた。Arbutin 濃度とともに DMPO-OH の ESR 信号強度が減少した。ESR 計測から 1 時間後，arbutin フリーの反応液は橙色の dopachrome から更に黒色に変化した。一方，arbutin を加えた反応液は褐色に変化したが黒色までには至らなかった。本研究から，arbutin には tyrosine-tyrosinase 反応で形成されるユーメラニンの色味を薄くしながら•OH 生成を抑制する効果（抗酸化能）が認められた[3]。
【結言】Tyrosine-tyrosinase 反応系で起こるラジカル反応を ESR スピントラップ法で分析することは，美白化粧料の効能評価，食品の褐変防止効果など機能性評価に役立つことが期待される。
【謝辞】H25 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（S1312001）の助成によるものです。

*Reference*

[1] M. Brenner and V J. Hearing, *Photochem Photobiol.*, 84(3), 539-549 (2008)
[2] M. Tada, M. Kohno, S. Kasai, Y. Niwano, *J.Clin.Biochem.Nutr.*, 47, 162-166 (2010)
[3] M. Tada, M. Kohno, Y. Niwano, *BMC Biochemistry,* 15,23 (2014)

hydroxyl radical, tyrosinase, antioxidant

発表責任者：多田美香（mika_tada@tohtech.ac.jp）

発表番号：2E118
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ヨモギ乾燥粉末添加による食用油の酸化安定性と嗜好性への影響

# Effect of dried Artemisia powder on both antioxidative stability and preferable flavour of plant oil.

○平松 直子[1]、吉田 和利[2]、辻 美乃里[1]([1]兵庫県立大、[2]兵庫県立工業技術センター)
○Naoko HIRAMATSU[1], Kazutoshi YOSHIDA[2], Minori TSUJI[1] ([1]Univ. of Hyogo, [2]Hyogo Pref. Inst. of Tec.)

【目的】ヨモギは薬草や食材として古来より利用されてきた日本の伝統的なハーブである。本研究室ではこれまで、ヨモギの抗変異原性やヒト LDL 抗酸化能などの機能性について報告してきた。また、ポリフェノール量や活性酸素消去能の季節変動や加工処理条件の影響を検討し、アク抜きや乾燥処理によってもポリフェノール量の低下は比較的少なく高い抗酸化能を期待できることを明らかにした。そこで本研究では、ドレッシングやソース類などの油脂を使う食品への応用を視野に入れ、ヨモギの乾燥粉末添加による食用油の酸化安定性や嗜好性への影響を検討した。
【方法】ヨモギ試料は兵庫県姫路市で栽培されたヨモギを用いた。予備試験によりオリーブ油はオレイン酸含量が高くサラダ油と比べると酸化期間を通して POV ならびに TBARS の上昇がゆるやかで酸化しにくい油であることが改めて確認されたため、試料油にはリノール酸含量の比較的高い市販のサラダ油を用いた。ヨモギは採取後、水洗・アク抜き・乾燥・粉砕し冷蔵保存した。試料油重量に対して 0%（対照）、1%、3%、5%のヨモギ乾燥粉末を添加して約 1 か月間 50℃で保存し酸化を促進した。その間、過酸化物価(POV)、チオバルビツール酸反応性物質(TBARS)、カルボニル価（CV）の経時変化を 5 日毎に 25 日間測定した。また、油脂の酸化による臭気成分の変化についても、官能試験と GC-MS 分析により酸化期間中 5 日毎に確認した。抗酸化標準物質として市販のクロロゲン酸とカフェ酸を用いて同様の観察を行った。
【結果】対照となるヨモギ粉末 0%の酸化試料油の POV の経時変化は 10 日頃まで低値を示した後､徐々に上昇を始め、酸化 15～20 日頃は急激に上昇し、25 日目にはほぼ最大値に達した。ヨモギ添加による POV 上昇抑制効果がそれぞれ 15 日ごろから観察され、20 日目以降は対照と比べてヨモギ 3%、5%添加によって有意に酸化抑制効果を示した（$p<0.01$）。また、TBARS は、酸化 20 日目以降に上昇し始め 25 日目急激に上昇するが、その間、ヨモギ 1～5%添加による酸化抑制効果が顕著に認められた（$p<0.01$）。更に、CV も、酸化 20 日目以降に上昇し始め 25 日目に急激に上昇するが、ヨモギ 5%添加条件で有意に CV の抑制効果を示した（$p<0.01$）。油脂の酸化の進行に伴い生じる臭気成分は酸化 20 日目頃、対照（ヨモギ 0%）における官能試験においても顕著になるが、ヨモギ添加により臭気成分の生成が抑制されることが官能試験と GC-MS 分析結果から確認された。

Artemisia, antioxidation, edible plant oil

発表責任者：平松直子（hiramats@shse.u-hyogo.ac.jp）

発表番号：2E119
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 黒麹菌培養物が有する抗酸化能の解析

Analysis of antioxidants from *Aspergillus saitoi*

○岩倉 翔太、加藤 朝子、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大院農）
○Shota IWAKURA, Asako KATO, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】魚油に豊富に含まれるドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸は ω-3 poly unsaturated fatty acid ( PUFA )として知られるヒトにとって必須の栄養素である。PUFA は分子内に複数の不飽和結合を持つため非常に酸化しやすく、魚油に含まれる PUFA が酸化される過程で生じる低分子カルボニル化合物は魚特有の不快臭の原因となっていることが知られている。麹菌は、多種多様な酵素や二次代謝産物を分泌することが知られており、これを用いた発酵食品に消臭効果がある事は、古くから経験的に知られていた。そこで本研究は、麹菌培養物に含まれる抗酸化物質を探索・同定し、PUFA に対して示す抗酸化機構を解明することを目的とした。また、PUFA に対する新規の酸化抑制方法を確立し、食品への応用を目指した。

【方法・結果】我々の研究室が保持している麹菌の中から脂肪酸の酸化分解物であるマロンジアルデヒドの変化量を指標としてスクリーニングを行った。麹菌の培養物を魚油に添加し、その影響を検証した結果、黒麹菌 *Aspergillus saitoi* NK0709 株が優れていることが明らかとなった。次に、同株の培養物に含まれる抗酸化活性を有する物質の解析を行った。70% エタノールを用いた溶媒抽出を行い、抽出液の抗酸化能を検証した。培養物抽出液と PUFA を混合し、その影響を検証したところ、抽出液を添加したサンプルはコントロールと比較し、マロンジアルデヒド量の低下が確認された。このことから抽出液成分が PUFA の酸化抑制に作用していることが示唆された。また DPPH ラジカル消去活性試験から、抽出液は脂肪酸の酸化分解に関与するラジカル分子を消去する活性を持つことも明らかとなった。さらに解析を進めるため、固相抽出法を用いた分画を行ったところ、PUFA の酸化を抑制する画分とラジカル消去活性を有する画分に分離された。このことから、脂質ラジカルを消去することで酸化を抑制する機構とは異なる機構で脂質の酸化を抑制している可能性が示唆された。また、高速液体クロマトグラフィーを用いて分画したサンプルの抗酸化活性を測定したところ、多数のピークから PUFA 酸化抑制活性およびラジカル消去活性が確認されたことから、培養物に含まれる複数の化合物が抗酸化活性に寄与している可能性が示唆された。

antioxidant, *Aspergillus*, lipid oxidation

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：2E120
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 焙煎コーヒー酢酸エチル可溶画分のキサンチンオキシダーゼ阻害物質－ピロガロールおよびその変化物について－

# Xanthine oxidase inhibitory compounds from the ethyl acetate-soluble fraction of coffee - Activity of pyrogallol and its oxidation product -

○本田 沙理[1,2]、増田 晃子[3]、増田 俊哉[2] ([1]徳島大院・総合、[2]大阪市大院・生活、[3]四国大・生活)
○Sari HONDA[1,2], Akiko MASUDA[3], Toshiya MASUDA[2] ([1]Tokushima Univ., [2]Osaka City Univ., [3]Shikoku Univ.)

【目的】2007 年，米国の Choi 等は，コーヒーを飲用することにより痛風発症が減少することを報告した。痛風は古くからある病気であるが，最近の食生活の変化により急激に罹患数が増えている生活習慣病である。痛風の原因は，過剰な血清尿酸によるものであり，Choi 等は，コーヒーがこの尿酸量を減少させることを報告している。しかしながら，現在までに，コーヒー中のどのような成分が，尿酸量を減少させ，痛風の軽減に寄与しているか明らかになっていない。我々は，尿酸生成はキサンチンオキシダーゼによることから，コーヒーのキサンチンオキシダーゼ阻害活性(XOI)について検討し，その活性が焙煎したコーヒーのみに見られ，さらに焙煎コーヒー豆の特徴成分であるクロロゲン酸ラクトン（CL）が XOI 活性を有することを報告した[1)]。また，昨年度の本大会では，焙煎コーヒーの活性物質は熱水抽出物の酢酸エチル可溶部に集中し，その分画には，上記 CL 以外にも XOI 活性に寄与する物質が存在する可能性を報告した。本研究では，焙煎コーヒー豆熱水抽出物のうち酢酸エチル可溶画分を ODS 分取クロマトに供し,CL より先に溶出した分画の活性物質について検討することにした。

【方法と結果】焙煎豆熱水抽出物の酢酸エチル可溶画分の ODS カラムを用いた MPLC において，CL が溶出するまでを１０フラクションに分画して，各画分の XOI 活性を測定した。その結果，３つのフラクションに有意な活性を認めた。そのうちとりわけ活性が強かった画分（Fr.2）をさらに ODS カラムを用いた HPLC や Sephadex LH-20 により精製を繰り返して活性物質の単離を試みた。結果として Fr.2 の強力な活性を示す成分としてピロガロールを確認した。なお,同時に単離されたヒドロキノンや HMF には強い活性は認められなかった。また，類縁のトリヒドロキシベンゼンやジヒドロキシベンゼン類の XOI 活性についても別途，活性を測定したが，顕著な活性は認められなかった。ピロガロールの強力な XOI 活性については報告があるが，今回その活性発現機構を検討したところ，実際に活性を示すのはピロガロール本体ではなく，ピロガロールから酸化的に生成したプルプロガリンであることが示唆された[2)]。現在，焙煎コーヒー豆抽出物にプルプロガリンが存在するか確認中である。

１） Honda, S. et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **78**, 2110—2116, 2014
２） 本田，増田. *化学と生物*, **53**, 442—448, 2015.

roasted coffee beans, xanthine oxidase inhibitor, pyrogallol

発表番号：2E121
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸内環境の酸性化は腸内細菌由来の生理活性物質であるポリアミンを増加させる
# Acidification of intestinal environment induces microbial polyamine production

○北田 雄祐[1]、栗原 新[2]、村松 幸治[1]、松本 光晴[1] ([1]協同乳業・技術開発、[2]石川県大・生資環)
○ Yusuke Kitada[1], Shin Kurihara[2], Koji Muramatsu[1], Mitsuharu Matsumoto[1] ([1]Research Laboratories, Kyodo Milk Industry Co., Ltd., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

**〈背景・目的〉**腸内では 100～200 種類／個体の腸内細菌が環境に適応し相互に影響しつつ共存している。プロバイオティクスの摂取は腸内環境を変化させ、それに応じて腸内細菌が産生する代謝産物も変化する。多くの腸内細菌由来の代謝産物の中でもポリアミン（PA）は生命活動に不可欠であり、加齢に伴い減少するなど健康との関わりが強い。我々は *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 の摂取による腸内 PA 濃度の適正化がもたらす保健効果について明らかにしてきたが、腸内での PA 産生機構は未解明であった。様々な検討の結果、単独の PA 産生菌種ではなく、中間物質を介した複数菌種による PA 産生系の存在を見出した。具体的には、*Escherichia coli* のアルギニン（Arg）を利用し副産物としてアグマチン（Agm）を放出する耐酸性機構と、*Enterococcus faecalis* の Agm を利用し副産物としてプトレッシン（PA の一種、Put）を放出する ATP 合成機構が組み合わさった PA 産生系である（Fig.1）。本研究では、LKM512 摂取による腸内環境の酸性化が上記 Put 産生経路のトリガーとなり、腸内 PA 濃度の上昇を誘導する可能性を検討した。

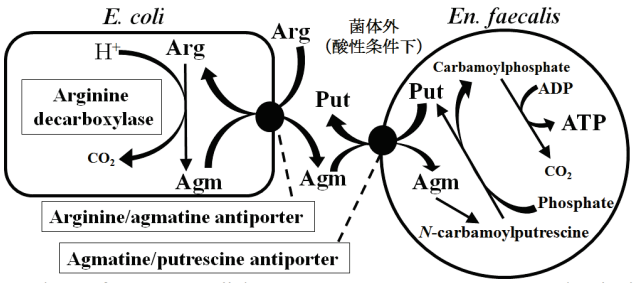


**Fig. 1** 酸性環境によって誘導される*E. coli*と*En. faecalis*による**Put**産生経路

**〈方法〉**アルギニン含有培地を用いて、*E. coli* + *En. faecalis* 共培養群と *E. coli* + *En. faecalis* + LKM512 共培養群を 24h 嫌気培養し、培養液の pH と Put 濃度を測定した。次に、無菌マウスに *E. coli* と *En. faecalis* を定着させたノトバイオートマウス（2 菌種群）と *E. coli*、*En. faecalis* 及び LKM512 を定着させたノトバイオートマウス（3 菌種群）を用意し、糞便中の pH と Put 濃度を測定した。最後にヒト糞便を pH4.2~pH7 の緩衝液に懸濁し、37℃で 24h 嫌気培養を行い、培養液の pH と Put 濃度を測定した。

**〈結果と考察〉***E. coli* + *En. faecalis* + LKM512 共培養群は *E. coli* + *En. faecalis* 共培養群と比較し、pH が有意に低下し、Put 産生量が有意に増加した。ノトバイオートマウス試験では 2 菌種群と比較し、3 菌種群では糞便の pH が有意に低下し、Put 産生量は増加傾向を示した。ヒト糞便試験でも、酸性液（pH6.2 以下）に曝すだけで腸内細菌の PA 産生が誘導されることが示された。以上の結果より、腸内環境の酸性化は腸内細菌の代謝系に作用し生理活性物質ポリアミンを産生させることが認められた。これは、従来論じられてきた酸性化に伴う蠕動運動促進作用等とは異なるプロバイオティクスによる腸内環境酸性化の新たな意義と考えられる。

Polyamine, Anti-aging, Probiotics

発表責任者：北田雄祐（y-kitada@meito.co.jp）

発表番号：2E122
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# イミダゾールジペプチド(アンセリン/カルノシン)の中高齢者における記憶機能に対する作用

# The effects of imidazole dipeptide (Anserine/Carnosine) on memory function in elderly people

○金子 順、貴田 潤平、澤田 翔、白井 隆貴、久恒 辰博 (東大新領域)
○Jun KANEKO, Junpei KIDA, Syou SAWADA, Ryuki SHIRAI, Tatsuhiro HISATSUNE (Tokyo Univ.)

**【序論】**高機能食品成分による脳の機能老化ひいては認知症の予防に期待が寄せられている。当研究室の先行研究により高脂質飼料(High Fat Diet, HFD)を Alzheimer's Disease(AD)モデルマウスに食餌することにより、早期にアルツハイマー病の症状である記憶機能の低下を誘導することを報告した。さらに、この AD モデルマウスを用いた研究から肉類、特に鶏肉に多く含まれるイミダゾールジペプチドである Carnosine (Car)、Anserine(Ans)が記憶機能の低下を抑制する効果があることを見出してきた。

本研究ではマウスを用いた実験により得られた、これらの Ans および Car が記憶機能に対する効果が、実際に人においても脳機能の低下抑制に対して作用し得るのかを検証することを目的とした。

**【方法】**60 歳から 80 歳の健康な中高齢者を所属研究室 HP 等により公募し、説明と同意の元、所属機関及び共同研究先機関の倫理規定に基づいて研究を行った。また試験食(Ans/Car)群、プラセボ群の割付は第三者機関により行い、3 ヵ月間、試験成分および、プラセボ成分を 1 日 2 回摂取して頂いた。脳機能の評価方法として、初回検査及び 3 ヵ月後に、CANTAB、MMSE、ADAS、ウェクスラー論理記憶検査を行った。これらの検査方は認知症を始めとする、種々の神経疾患における、認知機能評価に使用されるものである。また同時に抑うつ度を評価する BDI、健康関連の QOL の調査等を行い、心理面に関する検査も行った。

**【結果】**Ans/Car 群とプラセボ群の脳機能を比較したところ、3 ヵ月間の投与により Ans/Car 群ではウェクスラー論理記憶検査の遅延再生のパートにおいて有意な低下抑制効果が見られた。この検査は、短い文章を検査者が読み上げ、被験者に直後、及び 30 分後(遅延)に再生して頂き、内容の記憶程度を評価するものである。この遅延再生のパートにおいて、認知記憶機能の低下抑制効果が見られた。

**【考察】**中高齢者において、イミダゾールジペプチドである Ans、Car の 3 ヵ月間の継続的な投与は、脳機能の低下に対して抑制効果があることが示唆された。さらに、この作用は、脳内の炎症を抑制する事によって誘導されている可能性が示唆された。脳内の炎症は脳機能の低下を引き起こすことが知られており、Ans、Car の作用はマウスの研究を考慮すると、イミダゾールジペプチドの抗炎症作用を介して脳機能の低下を抑制していると考えらえる。

cognitive impairment, imidazole dipeptide, inflammation

発表番号：2E123
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 2 型糖尿病併発型アルツハイマーモデルマウスにおけるイミダゾールジペプチドの認知機能障害に対する予防作用

# The preventive effects of imidazole dipeptide on cognitive impairment in a type 2 diabetes-Alzheimer's disease model mice.

○栃木 真美、金子 順、塩谷 秋子、久恒 辰博（東大新領域）
○Mami Tochigi, jyun Kaneko, Akiko Enya, Tatsuhiro Hisatsune (Tokyo Univ)

**【序論】**高機能食品成分による脳の機能老化ひいては認知症の予防に期待が寄せられている。当研究室の先行研究では、高脂質飼料(High Fat Diet, HFD)を Alzheimer's Disease(AD)モデルマウスに食餌することにより、早期に認知機能の低下を誘導することを報告した。さらに、このモデルマウスを用いた研究から肉類、特に鶏肉に多く含まれる Imidazole dipeptide である Carnosine (Car)が記憶機能の低下を抑制する効果があることを見出してきた。本研究ではこの認知機能低下を抑制する機構を明らかにする事を目的としている。この抑制効果が Car 特異的な物か、Imidazole dipeptide の特性に起因するものかを検証するため、Car と同様に Imidazole dipeptide である Anserine(Ans)を使用して、記憶機能低下に対する効果を検討し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。
**【方法】**AD モデルマウスの遺伝的背景を持つ Tg マウスに 4 か月齢から 2 ヶ月間、HFD を投与した。Ans の投与は HFD 投与開始時期の 2 週間後から開始し、Ans 溶液(100 mg/l)を自由摂取させた。そして Morris Water Maze(MWM)試験により、空間記憶機能を評価した。また、血圧を tail cuff 法により測定し併せて体重も測定した。
**【結果】**遺伝的背景に加え、HFD による認知記憶機能の低下が MWM 試験においても見られた。また、Ans を投与する事により、この誘導された認知記憶機能の低下に対してある程度低減する効果が見られた。さらに学習時において、HFD に誘導される学習速度の低下も、Ans の投与によって影響を受けた。さらに、高脂質飼料群では血圧の有意な上昇が見られ、MWM 試験に続いて、血圧の変化を比較すると、Ans 投与群では徐々に血圧の低下が見られ、8 ヵ月齢では有意な血圧の低下が見られた。
**【考察】**Ans も Car と同様に HFD による認知記憶機能障害を低減する効果がある程度見られ、Imidazole dipeptide の機能としてあげられるものが、この機能低下に対する抑制効果を示している可能性が高い。さらに血圧の上昇は動脈硬化、脳梗塞や出血を引き起こす原因の一つである。これら血管系の障害が脳内に炎症を引き起こし、記憶機能の低下を誘起していると考えられる。そのため血圧の上昇の抑制は、血管障害の抑制を介して、認知機能低下の抑制を誘導している事が示唆される。これは Car の投与においても炎症性サイトカインの発現量の比較から、炎症の抑制が示唆されている事とも一致している。これらの Imidazole dipeptide は、脳内で生じた炎症に起因する脳機能の低下を抑制している事を示唆していると考えられる。

Imidazole dipeptide, Alzheimer's disease, inflammatory

発表番号：2E124
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高齢者の記憶機能低下に対するイミダゾールジペプチドの緩和メカニズムの解明

# The effect of imidazole dipeptide on cognitive function in elderly people

○谷川 輝虎[1]、金子 順[1]、倉重 宏樹[1]、今林 悦子[2]、松田 博史[2]、久恒 辰博[1] ([1]東大新領域、[2]国立精神神経医療研究センター)
○Kitora Tanigawa[1], Jun Kaneko[1], Hiroki Kurashige[1], Etsuko Imabayashi[2], Hiroshi Matsuda[2], Tatsuhiro Hisatsune[1] ([1]Tokyo Univ, [2]National Center of Neurology and Psychiatry)

**【序論】**近年、高齢化社会に伴い認知症患者が増加している。2012 年の時点で、認知症患者が 462 万人、その予備群である軽度認知機能障害（MCI）者は 400 万人と算定された。この数は今後 10 年間に 1.5 倍増えると推定された。MCI になると、五年後にその半数が、認知症になる。一端、認知症が発症すると症状の進行は遅らせても、治療することはできない。そのため MCI の時期に認知症の発症を食い止める方法を開発することが希求されている。当研究室では、これまでにアルツハイマー病モデルマウスや高齢者臨床研究を通じて、記憶機能の低下を抑制する高機能食品成分に関する研究を行い、肉類食品に広く含まれるイミダゾールジペプチド（アンセリンやカルノシン）に、高齢者の記憶機能低下を緩和する作用があることを見出してきた。さらに、マウスを用いた研究で、イミダゾールジペプチドによる細動脈の硬化を予防する作用を発見した。本研究では、ヒトにおいてイミダゾールジペプチドに脳血流改善効果があるのではないかと考え、MRI で脳血流量の変化を解析し、作用機序の推定を行った。

**【方法】**本研究では、鶏肉より抽出したアンセリンとカルノシンを３対１で配合した試験食（日本ハム製）を使用した。被験者の方には、イミダゾールジペプチド食（１日１ｇ）あるいはプラセボ食を三ヶ月間摂取して頂いた。イミダゾールジペプチドの作用メカニズムを解明するために、32 チャンネルコイルを用いた 3T MRI を使用した。MRI の撮像方法として、脳内の血流量を抽出する ASL(Arterial Spin Labeling)を用いた。ASL は、血液中に含まれるプロトンを内因性造影剤として用いることで非侵襲的かつ、放射線被曝することなく、脳血流量を測定することができる。MRI の撮影は、試験食摂取直前、試験食摂取 3 ヶ月後に行った。MRI データは MRI 解析ソフトである SPM12 で分析した。

**【結果・考察】**イミダゾールジペプチド群、プラセボ群の MRI データを解析した結果、イミダゾールジペプチド群では、脳内の後部帯状回領域の血流が改善していることが判った。この領域は、記憶や空間把握に関わる機能を司っており、加齢に伴い同部位の血流量が低下することが知られている。そのため、アンセリン、カルノシンなどのイミダゾールジペプチドによる認知機能の低下緩和効果は、後部帯状回領域の血流を改善しているためであると示唆された。

Imidazole dipeptide, Alzheimer's disease

発表番号：2E125
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 粉餌あるいは固形餌を長期間摂取させたラットの脳内発現遺伝子の比較解析

# Global gene expression analysis of cerebral regions in rats with long-term feeding of powdery diet or chow diet

○小川 真奈[1]、永井 俊匡[2]、齊藤 美佳[2]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]高崎健大・栄養)
○Mana OGAWA[1], Toshitada NAGAI[2], Mika SAITOU[2], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Takasaki Univ of Health and Welfare.)

【背景・目的】咀嚼は、顎や舌、顔面の筋肉が協調してリズミカルな収縮を行うことで、食物を噛み砕き、唾液と混合し、嚥下に適した食塊を形成する運動であり、口腔顔面領域の求心性の感覚情報を基に中枢神経機構により調整されている。近年の食品の軟食化、朝食の欠食と孤食の増加、高齢化などにより、咀嚼が疎かになり、健康に多大な影響を及ぼすことが懸念されている。健康への関心が高まる中、脳の活性化、ストレス解消、肥満抑制など、生命の維持にきわめて重要かつ広範な作用を持つとされる咀嚼が注目されている。咀嚼と脳の活性化については、咀嚼によって視床を含む多くの脳領域で血流量が増加することが報告されている。また、咀嚼の減少や咬合不正によって、空間記憶が低下し、海馬の神経細胞が減少することが示されている。しかし、咀嚼に関する遺伝子レベルでの研究は少ない。そこで本研究では、咀嚼頻度の異なる粉末飼料あるいは固形飼料をラットに与え、DNA マイクロアレイによりラット脳内発現遺伝子を網羅的に解析し、咀嚼が脳に与える効果の一端を明らかにすることを目的としている。
【方法・結果】3 週齢の Wistar 系雄性ラットを予備飼育として 4 日間、粉末飼料を自由摂食させたのち、粉末飼料群、固形飼料群に分け、15 週間飼育をした。これらの飼料は栄養学的に等価であり、体重と摂食量は両群で有意な差は無かった。また、肝機能、コレステロール、血糖値などの血液生化学的解析でも差はなく、咀嚼による刺激以外の栄養学的要素の影響はないことが示された。解剖で得られた視床・視床下部・海馬・小脳から全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を用いて qFARMS 法により正規化をし、クラスタリングを行ったところ、視床でのみ粉末飼料群および固形飼料群が異なるクラスターを形成した。Rank products 法を用いて 2 群間比較を行い、FDR<0.05 のプローブセットを有意に発現変動した遺伝子（DEG）として 2322 プローブセットを抽出した。DAVID を用い、Benjamini<0.05 の GO term を抽出し、Quick GO でそれらを階層化した。抽出された 16 個の GO term は、5 つのグループに分類された。最下層の GO term には、神経伝達物質の輸送、およびニューロンの分化・形成に関わる分子群が含まれていた。また、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いた DEG の機能解析からは、EIF2(Eukaryotic Initiation Factor-2)signaling が最も変動するパスウェイとして抽出され、視床においてタンパク質合成が亢進している可能性が示された。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

Mastication, Brain function, DNA microarray

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2E126
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

咀嚼頻度の異なる餌を摂取させたラットの行動および脳内発現遺伝子の比較解析
Analysis of behavior and cerebral gene expression of rats after feeding of diets with different frequencies of mastication

○田熊 彩子[1]、永井 俊匡[3]、石丸 喜朗[2]、阿部 啓子[2]、朝倉 富子[2]([1]東大農、[2]東大院農生科・応生化、[3]高崎健大・栄養)
○Ayako TAKUMA[1], Toshitada NAGAI[3], Yoshiro ISHIMARU[2], Keiko ABE[2], Tomiko ASAKURA[2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The Univ. of Tokyo, [3]Takasaki Univ. of Health and Welfare)

[背景・目的] 先行研究において、咀嚼が脳機能に与える影響を調べるために、咀嚼頻度の異なる固形飼料あるいは粉末飼料をラットに与えて 15 週間の飼育を行った。視床、視床下部、海馬、小脳の各部位の発現遺伝子を網羅的に調べた結果、視床においてのみ 2 群間で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかになった。しかしこの長期間の飼育では金網のケージを用いたために、粉末飼料群でのみケージを噛む行動が見られ、飼料以外を咀嚼する影響も考えられた。そこで飼料以外の咀嚼が最小限となる飼育方法を構築し、8 日間という短期間での飼育を行った。異なる咀嚼頻度がラットの行動に与える影響を調べるために行動実験を行い、また脳内発現遺伝子の解析を行って長期飼育のものと比較し、飼育期間が異なる場合でも同様の結果が得られるかを検証した。
[方法] 離乳直後の Wistar 系雄性ラットを AIN-93G 粉末飼料で 2 日間予備飼育したのち、AIN-93G に準じた組成の固形飼料群と粉末飼料群で群分けして 8 日間本飼育を行った。ラットが噛めない特別なプラスチックケージを作製し、吸水させたスポンジを用いて給水瓶の吸い口を噛まずに飲水する方法を確立した。本飼育 7 日目に新奇な環境下でのラットの自由な行動を観察するのに一般的なオープンフィールドテストを行った。ラットが自由に動き回れるように明るさなどを配慮した部屋で 90 cm 四方の箱内にラットを置き、10 分間のビデオ録画による行動観察を行った。本飼育 8 日目にイソフルラン麻酔下で解剖を行って採取した視床を、Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。統計ソフト R を用いて qFARMS 法で正規化したのち 2 群間比較を行った。有意に発現変動した遺伝子として FDR<0.05 の遺伝子を抽出し、DAVID を用いて Benjamini<0.05 の GOterm を抽出し、Quick GO でそれらを階層化した。
[結果] 行動実験においては総移動距離、フィールド内の場所別の滞在時間、ラットの行動速度、回転回数等に群間の差は見られなかったが、立ち上がり回数と伸びの回数はいずれも固形飼料群の方が少ないという結果になった。視床における発現遺伝子解析においては、長期飼育同様 2 群間で遺伝子発現プロファイルが異なることが明らかになり、有意に発現変動した遺伝子として 3338 のプローブセットが抽出された。GOterm の階層表示を通して、神経新生、タンパク質合成、神経伝達の大きく 3 つのグループに属する遺伝子群が発現変動していることが示唆された。
[謝辞] 本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

mastication, brain function, behavior

発表責任者：朝倉富子（asakura@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2E127
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

ローズマリー精油の神経分化促進作用を介した抗ストレス作用
*Rosmarinus officinalis* L. essential oil shows anti-stress effect via promoting neuronal differentiation

○池谷 亜有美[1]、ネファティ モハメド[2]、礒田 博子[1,3]（[1]筑波大院・生命環境、[2]チュニジア国立乾燥地研究所、[3]北アフリカ研究センター）
○Ayumi IKEYA[1], Mohamed NEFFATI[2], Hiroko ISODA[1,3] ([1]Univ. Tsukuba Life and Env. Sci., [2]Institute of Arid Rand, [3]Alliance for Research on North Africa)

【背景】慢性的なストレスはうつ病、記憶障害などの疾患の一因となることが知られるが、処方箋である抗鬱薬、抗不安薬には重篤な副作用があり、新薬開発によっても未だ克服されていないことが問題とされている。このことから、脳、神経機能に対して効果を示す一方副作用の克服された代替医療法が注目されている。近年植物由来精油は脳、神経機能に作用する一方で副作用を示さないことが報告されており、抗鬱作用、抗不安作用が一部の精油で報告されている。本研究では、伝承薬効として明晰作用、集中力、認知機能改善作用が知られるローズマリー(*Rosmarinus officinalis* L.)精油に関して、動物モデルを用いた精油吸入を行い抗ストレス作用の評価を行うとともに、神経分化モデル細胞を用いた神経分化促進作用について調査した。
【方法】動物モデルにおいて、ローズマリー精油吸入の抗ストレス作用を検証するため、毎日３０分間の精油吸入と尾部懸垂試験を継続し 14 日間行った。血清および脳を回収し、ストレス関連ホルモン濃度、脳内神経伝達物質濃度を測定した。また、ローズマリー精油の処理による神経分化促進作用について、神経分化モデル細胞である PC12 細胞を用いて検証した。神経分化の指標として、神経伝達物質分泌能、神経突起伸長能に関して評価した。
【結果】ローズマリー精油を吸入した動物モデルにおいて、尾部懸垂試験における行動的指標、ストレス関連ホルモン値、神経伝達物質濃度に作用がみられた。また、精油処理を行った神経分化モデル細胞において、神経伝達物質分泌促進作用、神経突起伸長促進作用がみられた。
【考察】結果より、ローズマリー精油は吸入により、ストレス関連ホルモン分泌調整、神経伝達物質分泌調節作用を示すことにより抗ストレス作用を示した。PC12 細胞において、神経伝達物質分泌促進作用、神経突起形成、伸長作用により神経分化促進作用を示した。ここからローズマリー精油の神経分化促進作用と抗ストレス作用が示唆された。現在、ヒト嗅上皮細胞を用いたローズマリー精油の神経分化時における遺伝子発現変動についてマイクロアレイ法を用いて解析中である。今後は、ローズマリー精油が作用する神経伝達物質分泌系に着目し、詳細な作用メカニズムについての検証を計画している。

Essential oil, Anti-stress, *Rosmarinus officinalis* L.

発表責任者：礒田博子（isoda.hiroko.ga@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2E128
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸内細菌脂肪酸代謝物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)による腸管ホルモン分泌系を介した代謝改善機能評価

# Metabolic benefits by a gut microbial metabolite of linoleic acid and gut hormone secretion

○宮本 潤基[1]、長谷川 沙恵[1]、粕渕 真由[1]、岸野 重信[2]、米島 靖記[3]、菅原 達也[2]、小川 順[2]、木村 郁夫[1] ([1]東京農工大農、[2]京大農、[3]日東薬品工業株式会社)
○Junki MIYAMOTO[1], Sae HASEGAWA[1], Mayu KASUBUCHI[1], Shigenobu KISHINO[2], Yasunori YONEJIMA[3], Tatsuya SUGAWARA[2], Jun OGAWA[2], Ikuo KIMURA[1] ([1]Tokyo University of Agriculture and Technology, [2]Kyoto University, [3]Nitto Pharmaceutical Industries)

## 【背景・目的】

細胞膜上の脂肪酸受容体の発見は、食事由来の脂肪酸が単なるエネルギー源としてだけではなく、生体においてシグナル伝達分子としてエネルギー代謝制御に重要な役割を果たすとの認識を広めた。特に、食用油で不飽和脂肪酸に属する必須脂肪酸のリノール酸や α-リノレン酸、そして魚油の EPA や DHA のような生理活性長鎖脂肪酸による作用は重要であり、我々は現在までにこれらの脂肪酸受容体を介した生体における抗肥満分子メカニズムを明らかにしてきた [1)]。この中で、近年の腸内細菌研究の進展により、食事と腸内細菌叢変化が、宿主のエネルギー調節や栄養摂取などのエネルギー恒常性維持に深く関与する結果、肥満や糖尿病などの病態に影響を及ぼすことが明らかになった。この過程で、腸内細菌代謝酵素によりリノール酸から変換される新規脂肪酸代謝物 HYA が見出されたが [2)]、我々は独自にこの HYA の長鎖脂肪酸受容体に対する高親和性に着目し、腸内細菌と脂肪酸代謝物が関与する腸管バリア保護作用を明らかにした [3)]。本研究では、次なる展開として、腸内細菌による脂肪酸代謝物群の長鎖脂肪酸受容体を介したエネルギー代謝に与える影響について検討を行った。

## 【方法】

マウス由来腸内分泌細胞株 STC-1 細胞を用いて、リノール酸代謝物群の腸管ホルモン分泌誘導能とそのメカニズムを解析した。また、C57BL/6J マウスにリノール酸および HYA をそれぞれ投与し、各種代謝パラメータの測定を行った。

## 【結果・考察】

STC-1 細胞を用いた腸管ホルモン分泌に対するリノール酸代謝物群の網羅的活性評価系により、我々は HYA が腸管ホルモンおよび血中インスリンの高分泌能を有することを見出した。そしてその結果、HYA の経口投与による血中脂質等の代謝パラメータの有意な減少と、それに伴う代謝機能の改善作用が確認できた。今後、より詳細に、HYA を始めとする新たな機能性脂肪酸代謝物の代謝機能への影響評価を行うことにより、既存の食用油に代わる機能性油の創出、さらには脂肪酸代謝物の創薬応用も視野に入れた肥満・糖尿病予防への脂肪酸代謝物応用を目指す。

1) Ichimura *et al.*, 2012. *Nature.* 483 (7389): 350-354.
2) Kishino *et al.*, 2013. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110 (44): 17808-17813.
3) Miyamoto *et al.*, 2015. *J Biol Chem.* 290 (5): 2902-2918

gut microbial metabolites, gut hormone, GPCR

発表責任者：宮本潤基（d142212@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2E129
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# L-シトルリンがヒトの認知機能に与える効果の精神生理学的検討

# Psychophysiological evaluation of the effect of L-citrullin on human cognitive function

○小長井 ちづる[1]、鈴木 貴視[2]、森田 匡彦[2]、古賀 良彦[3]([1]新渡戸文化短大生活、[2]協和発酵バイオ、[3]杏林大医)
○Chizuru KONAGAI[1], Takashi SIZUKI[2], Masahiko MORITA[2], Yoshihiko KOGA[3] ([1]Nitobebunka college, [2]Kyowa Hakko Bio, [3]Kyorin University School of Medicine)

【目的】 L-シトルリンに関する先行研究において、800mg/d の経口摂取により注意集中が自覚的に改善されたという報告や、中高年男性が 5600mg/d を経口摂取した場合、血管の弾性を表わす baPWV 値が改善したという報告がみられる。しかし、これまでに、ヒトを対象として認知機能への効果を精神生理学的に検証した研究はみられない。そこで、われわれは近赤外線スペクトロスコピー（near-infrared spectroscopy: NIRS）ならびに脳波解析の一方法である事象関連電位（event-related potential: ERP）という 2 つの非侵襲的な脳機能測定法を用い、ヒトの脳機能に対する L-シトルリンの効果を客観的に評価することとした。
【方法】 対象は平均年齢 53.9±2.4 歳の健康男女 45 名とした。ヘルシンキ宣言に基づき、事前に研究目的について文書および口頭にて説明し、研究参加に同意を得た。試験デザインは、二重盲検並行群間比較試験法を採用した。被験者を、L-シトルリン 800mg/d 摂取群、5,600mg/d 摂取群、プラセボ（結晶セルロース）摂取群の 3 群にランダムに割り付け（各群 15 名）、試験食品摂取開始直前、初回摂取 60 分後、摂取開始 8 日目の摂取 60 分後に、視覚オドボール課題およびワーキングメモリー課題施行中の脳機能を、近赤外線スペクトロスコピー（near-infrared spectroscopy: NIRS）による酸化ヘモグロビン濃度変化および事象関連電位（event-related potential: ERP）の同時測定により評価した。なお、本研究は、医療法人社団進興会セラヴィ新橋クリニック試験審査委員会の承認を得て行なわれた。
【結果および考察】 被験者 45 名のうち、摂取期間終了までに 2 名が途中脱落したため、解析対象者は 43 名となった。視覚オドボール課題遂行中の酸化ヘモグロビン濃度変化は、L-シトルリン 800 mg 群では、1 日目摂取 1 時間後に比し、8 日目では有意に酸化ヘモグロビン濃度が低下していた。ワーキングメモリー課題施行中の酸化ヘモグロビン濃度変化については、L-シトルリン 800 mg 群では、1 日目摂取 60 分後において、プラセボ群に比し酸化ヘモグロビン濃度が有意に高値であった。事象関連電位 P300 に関しては、L-シトルリン 800 mg 群では、1 日目摂取 1 時間後に比し 8 日目摂取 1 時間後では頂点潜時が有意に短縮していた。なお、課題遂行成績は群間に差異はみられなかった。以上より、低用量 L-シトルリンはワーキングメモリーが関わる情報処理過程を賦活する可能性があることが示唆された。

L-citrulline, brain, psychophysiology

発表責任者：小長井ちづる（konagai@fc.jwu.ac.jp）

発表番号：2E130
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# CYP27B1 ノックアウトマウスにおける 25-ヒドロキシビタミン D3 の代謝解析
# Metabolism of 25-hydroxyvitamin D in CYP27B1 knockout mice

○西川 美宇[1]、安田 佳織[1]、高松 将士[1]、青木 健悟[1]、生城 真一[1]、中川 公恵[2]、津川 尚子[3]、岡野 登志夫[2]、榊 利之[1] ([1]富山県大、[2]神戸薬科大、[3]大阪樟蔭女子大)
○ Miyu NISHIKAWA[1], Kaori YASUDA[1], Masashi TAKAMATSU[1], Kengo AOKI[1], Sinichi IKUSHIRO[1], Kimie NAKAGAWA[2], Naoko TSUGAWA[3], Toshio OKANO[2], Toshiyuki SAKAKI[1] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]Kobe Pharma. Univ., [3]Osaka Shoin Women's Univ.)

従来、1α, 25-ジヒドロキシビタミン $D_3$ (1,25D3)が活性型ビタミン $D_3$ であり、25-ヒドロキシビタミン $D_3$ (25D3) はプロホルモンであると考えられてきたが、近年、25D3 自身がホルモン作用を示す可能性が示されている。我々はこれまでに、ヒト前立腺由来培養細胞 PZ-HPV-7 の細胞増殖抑制に 25D3 がビタミン D 受容体(VDR) のリガンドとして直接作用することを示し[1]、1,25D3 は強いホルモン、25D3 は弱いホルモンであり、ビタミン D の生理作用は両者の総和という考えを示唆してきた。本研究では CYP27B1 ノックアウトマウス(KO マウス)を用いて 25D3 の直接作用を検証すると共に、25D3 由来代謝物の解析を行った。

KO マウスの血中には 1,25D3 が検出されず、骨形成不全、子宮形成不全などが見られることから、これらの表現型には 1,25D3 が重要な役割を果たすことが推察された。離乳直後の KO マウスに 250μg/kg/day の 25D3 を連日投与したところ、骨密度が回復し、メスの生殖機能が正常化することで KO マウスの交配による次世代作出に成功した。腎臓におけるビタミン D 応答遺伝子の発現変化を mRNA レベルで解析したところ、25D3 投与により CYP24A1 の発現が著しく亢進し、25D3 が VDR リガンドとして作用している可能性が示された。CYP24A1 は 25D3 の連続的な代謝反応を行うため、血中の 25D3 およびその代謝物を解析したところ、CYP24A1 による代謝物である 24,25-ジヒドロキシビタミン D3(24,25D3)が顕著に上昇していることが明らかになり、24,25D3 以外にも CYP24A1 による数種の 25D3 由来代謝物が確認された。25D3 投与による KO マウスの表現型回復には、25D3 のみでなく 25D3 由来代謝物の生理作用も併せて考える必要があると考え、現在詳細な解析を行っている。

1] Munetsuna et al., Mol. Cell. Endocrinol. 381, 960-970 (2014)

vitamin D, CYP27B1

発表番号：2E131
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# L-アスコルビン酸 2-グルコシド共存下でのアントシアニンの安定性の検討

# Stability of anthocyanin in the presence of L-ascorbic acid 2-glucoside

○犬伏 光、安田 亜希子、内田 智子、金子 啓祐、丸田 和彦、吉田 憲史、三皷 仁志、有安 利夫、福田 惠温（（株）林原）
○ Hikaru INUBUSHI, Akiko YASUDA, Satoko UCHIDA, Keisuke KANEKO, Kazuhiko MARUTA, Kenshi YOSHIDA, Hitoshi MITSUZUMI, Toshio ARIYASU, Shigeharu FUKUDA (Hayashibara. Co., Ltd)

【目的】アントシアニン（AN）色素は果実や野菜に含まれる赤紫色素であり、食品に含まれる。AN は一酸化窒素（NO）の合成を促進することで毛様体筋の緊張を緩和し、眼精疲労を改善する。アスコルビン酸（AsA）は活性酸素を消去することで NO の減少を抑制し、AN の眼精疲労改善効果を高めることが期待される。両者は水溶液中において安定に共存できないことが問題である。L-アスコルビン酸 2-グルコシド（AG）は AsA にグルコースを付加した安定型ビタミン C で、食品に用いられる。AG はヒトが経口摂取すると小腸のα-グルコシダーゼで AsA へ分解された後、AsA の形で吸収され機能を発揮する。本研究では AN に対して AG を共存させ、それぞれの安定性を検討した。
【方法】AN 色素としてブドウ由来の食用色素を用いた。0.1 mol/L クエン酸緩衝液（pH 3.5）にて AN 色素溶液（シアニジン 3-グルコシド換算 87 mg/L）を調製し、この溶液を無添加群とした。無添加群に AG または AsA を 3 mmol/L となるように添加し、それぞれ AG 群、AsA 群とした。各群を 85℃の湯浴で 30 分加熱した後、25℃または 40℃の恒温槽で遮光保存した。経時的に、AN の残存量を pH-differential 法にて、AG および AsA の残存量を HPLC 法にて測定した。
【結果と考察】AN は加熱後、無添加群で 88%、AG 群で 86%、AsA 群で 81%残存した。25℃保存での AN は、保存 28 日で無添加群では 74%、AG 群では 74%残存したのに対し、AsA 群では残存量の低下が速く 15 日で 28%まで低下した。40℃保存での AN は、保存 15 日で無添加群では 54%、AG 群では 51%残存したのに対し、AsA 群では残存量の低下が速く 7 日で 15%まで低下した。AN は、AsA が共存すると不安定になるのに対し、AG が共存しても安定性に影響がないことが明らかになった。
ビタミン C 成分について、加熱後、AG 群では 100%残存したのに対し、AsA 群では 79%に低下した。25℃保存でのビタミン C 成分について、AG 群では安定であり保存 28 日でも 100%であったのに対し、AsA 群では保存 15 日で 2%まで低下した。40℃保存でのビタミン C 成分について、AG 群では保存 28 日で 79%残存したのに対し、AsA 群では 4 日で 2%まで低下した。AN 共存下において、AG は AsA よりも顕著に安定であることが明らかになった。
本研究から、AG は AsA と異なり、水溶液中で AN と共存すると、AG は AN を不安定化せず、AG 自身も安定であることが分かった。AG を用いれば AN とビタミン C 成分を組み合わせ、機能性に優れた食品の設計が可能になると期待できる。光安定性についても同様に検討している。

L-Ascorbic acid 2-glucoside, Anthocyanin, Ascorbic acid

発表責任者：犬伏　光（hikaru.inubushi@hb.nagase.co.jp）

発表番号：2E132
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵および非発酵ルイボスティーの抽出条件による影響

# Effects of extraction conditions on the mineral contents of unfermented and fermented rooibos teas

○村上 香、田尾 祐一郎、道垣内 貴斗、岡 聡子（広島工業大）
○ Kaori Murakami, Yuichiro Tao, Takato Dogochi, Satoko Oka (Hiroshima institute of technology)

【目的】

ルイボスは南アフリカ原産のマメ科植物で、その葉と茎を発酵したものはルイボスティーとして飲用される。近年、非発酵ルイボス茶葉を用いたグリーンルイボスティーも日本において飲用されるようになった。発酵および非発酵ルイボスティーはカフェインを含まず、ミネラルを含み、抗酸化活性を有することが知られている。我々はこれまでに、抽出条件による抗酸化活性への影響を調べ、500 ml の熱水（95℃）に対して 1.5～10 g の茶葉では、総ポリフェノール量、ルイボス特有のポリフェノール；アスパラチン量および抗酸化活性は用いた茶葉量に正の相関関係にあることを示した*。しかし、抽出条件とミネラル量の関係は明らかにされていない。本研究では、抽出時の茶葉量と有用ミネラル量との関係を検討した。

【方法】

発酵または非発酵ルイボス茶葉 1.5～10 g を 500 ml の熱水（95℃）で 10 分間抽出して、氷水で急冷し、冷凍保存した。解凍後、2,000×g、5 分間の遠心分離により不溶物を取り除いたものをルイボスティーおよびグリーンルイボスティー試料とした。原子吸光分析器を用いてナトリウム（Na）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）、マグネシウム（Mg）、鉄（Fe）、亜鉛（Zn）、銅（Cu）およびマンガン（Mn）の含有量を測定した。

【結果】

ルイボスティーでは茶葉量と Na、K、Ca、Mg、Fe および Mn 含量において、正の相関関係を示した（$R^2$>0.9）。Cu 含量においても、本実験の最大量 10 g の茶葉を用いたもの（2.0 g 茶葉/100 ml）が最大となった。一方、Zn 含量では、ルイボスおよびグリーンルイボスティーのいずれも、5.0 g の茶葉を用いたもの（1.0 g 茶葉/100 ml）が最大値となった。また、グリーンルイボスティーでは、ルイボスティー同様に、K、Mg および Mn 含量と正の相関関係が確認され（$R^2$>0.9）、他の元素も最大量 10 g の茶葉を用いたもの（2.0 g/100 ml）で最大値を示した。さらに、Fe 含量は茶葉量が多い場合、Cu 含量は全ての条件において、グリーンルイボスティーよりルイボスティーが有意に多かった。

*Effects of various extraction conditions on the antioxidant activity of unfermented and fermented rooibos teas. K. Murakami et. al., *12th Asian Congress of Nutrition Abstract Book* p. 345 (2015)

Rooibos tea, Green rooibos tea, Mineral

発表責任者：村上　香（k.murakami.tf@it-hiroshima.ac.jp）

発表番号：2E133
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LS180 細胞を用いた PXR を介した栄養素ー医薬品間相互作用の解析

# Analysis of PXR mediated nutrient-drug interaction in human LS180 cells

○加藤 綾華、白川 仁、後藤 知子、駒井 三千夫（東北大院農）
○Ayaka Kato, Hitoshi Shirakawa, Tomoko Goto, Michio Komai (Tohoku Univ.)

【目的】

高齢化社会および健康志向が高まる現代、医薬品やサプリメントの併用機会が増加しており、医薬品と栄養素の相互作用に関心が持たれている。生体内に摂取された医薬品などの化学物質は異物代謝系を介して代謝されているが、この代謝系に関与する一部の酵素群の遺伝子発現は受容体型転写因子の 1 つである PXR ( pregnane X receptor )によって制御されている。医薬品のほか、栄養素も PXR のリガンドとして働き、これらの遺伝子発現を調節している。本研究では、PXR のリガンドであるビタミン K2 に着目し、栄養素-薬物間相互作用を培養細胞を用いて解析することを目的とした。

【方法】

LS180 細胞は PXR の発現が見られるヒト結腸腺がん由来細胞株である。LS180 細胞をビタミン K2 で処理し、薬物代謝酵素の mRNA 量、タンパク質量を定量 RT-PCR、ウェスタンブロッティングによりそれぞれ測定した。また、ヒト MDR1 遺伝子の転写調節領域を含むレポーター遺伝子を用い、ビタミン K2 によるレポーター活性への影響を解析した。さらに、医薬品との相互作用を解析するため、LS180 細胞をリファンピシン( Rif )とビタミン K2 で共処理し、薬物代謝酵素の mRNA 量を測定した。

【結果・考察】

ビタミン K2 の 1 つであるメナキノン - 4 ( MK-4 )の処理によって、PXR の標的遺伝子であり、薬物代謝第一相の CYP3A4 や第三相の MDR1 の mRNA 量およびタンパク質量が有意に増加した。また、MK-4 処理によるレポーター活性の上昇も観察された。以上の結果より、MK-4 は PXR の活性化を介して、薬物代謝酵素遺伝子の発現誘導に関わることが確認された。次に、PXR の典型的なリガンドである Rif の前処理後に MK-4 で処理すると、Rif や MK-4 単独処理時より MDR1 や CYP3A4 mRNA 量が増加した。また、レポーター活性についても同様の上昇が観察されたことから、PXR の活性化において、Rif と MK-4 は相乗効果を示すことが示唆された。以上のことより、Rif をはじめとした PXR アゴニストとなる薬物を服用している場合、MK-4 などの栄養素によって、薬物代謝遺伝子の発現量が増加し、薬効の減退や過多が生じる可能性が示唆された。

Vitamin K, PXR, nutrient-drug interaction

発表番号：2E134
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食餌中亜鉛含量が SD 系ラットの糖溶液嗜好性に及ぼす影響

# The effect of zinc deficiency on sugar solution preference in SD rats.

○今野 美帆、後藤 知子、白川 仁、駒井 三千夫（東北大院農）
○Miho Konno, Tomoko Goto, Hitoshi Shirakawa, Michio Komai (Tohoku Univ.)

【背景・目的】亜鉛は、生体内で種々の生理機能を調節する必須微量元素である。亜鉛が欠乏すると、食欲不振、成長遅延、味覚障害などが引き起こされることが知られている。ラットを用いた検討では、亜鉛欠乏食給餌により、三大栄養素の中で炭水化物の嗜好性が低下したと報告された。この炭水化物食は高スクロース含有であったことから、亜鉛欠乏食給餌が糖の嗜好性に影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで本研究では、亜鉛欠乏食給餌による糖溶液嗜好性の変化を経日的に追跡して、そのメカニズムを解明することを目的とした。
【方法・結果】SD 系オスラット（4 週齢）を 3～4 日間馴化後、各実験食を自由摂食させた。実験群は、亜鉛欠乏食（食餌中亜鉛含量 1.4 mg Zn/kg diet）群、低亜鉛食（同 3.6 mg Zn/kg diet）群、亜鉛添加食（同 38.7 mg Zn/kg diet）群とした。また、亜鉛欠乏食群の摂食量と同量の亜鉛添加食を 1 日遅れで給餌する Pair-fed 群を設けた。実験食給餌期間（16 日間）中、0.3 M マルトース溶液と 0.3 M スクロース溶液を同時に呈示し、選択摂取させる二瓶選択嗜好実験を行った。さらに、上記と同様の方法で亜鉛欠乏食を給餌し、給餌 9 日目から亜鉛添加食へ切り替える亜鉛欠乏回復群の糖溶液嗜好性を追跡した。実験食給餌 16 日後、24 時間絶食後に解剖し、膵臓、小腸、血液を採取した。膵 α-アミラーゼ活性と小腸マルターゼ活性を測定した。
　亜鉛欠乏食群・低亜鉛食群は、実験食給餌 4 日目以降に摂食量が低下し、体重は亜鉛添加食群と比較して有意に低値となった。血漿中亜鉛濃度は、亜鉛添加食群と比較して亜鉛欠乏食群・低亜鉛食群で有意に低下した。亜鉛添加食群・Pair-fed 群と比較して亜鉛欠乏食群・低亜鉛食群は、スクロース溶液に比べてマルトース溶液の嗜好率が高く、亜鉛欠乏食群では 4 日目以降、低亜鉛食群で 6 日目以降に有意な高値を示した（嗜好率 80 % 前後）。亜鉛欠乏回復群では、亜鉛欠乏食から亜鉛添加食へ切り替えた直後に摂食量が亜鉛添加食群と同程度まで増加した。また、マルトース溶液の嗜好率は、亜鉛添加食群・Pair-fed 群と同程度（55～65 % 前後）まで急激に低下した。膵 α-アミラーゼ活性は Pair-fed 群と比べて亜鉛欠乏食群で低値となった。マルターゼ活性は群間で差がなかった。
【考察】亜鉛欠乏食群・低亜鉛食群では、亜鉛添加食群・Pair-fed 群に比べて、スクロース溶液よりもマルトース溶液の嗜好性が高くなった。さらに、亜鉛添加食への切り替えによりマルトース溶液の嗜好性は速やかに低下したことから、食餌中亜鉛含量の低下がマルトースの嗜好を上昇させる可能性が示された。これらの糖溶液嗜好性変化には糖質消化酵素が関与していないと考えられるが、今後更なる検討が必要である。

zinc, sugar preference

発表番号：2E135
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クワの実凍結乾燥粉末摂取による肥満抑制効果の検討

# Mulberry freeze dried powder inhibits lipid accumulation in vitro and obesity in vivo.

○畑生 俊光[1]、渡邉 智[1]、藤原 崇子[2]、大西 直規[2]、村田 芳行[1]、舟橋 弘晃[1] ([1]岡大農、[2]岡山県青果物販売株式会社)
○Toshimitsu HATABU[1], Tomo WATANABE[1], Takako FUZIWARA[2], Naoki OONISHI[2], Yoshiyuki MURATA[1], Hiroaki FUNAHASHI[1] ([1]Okadai Univ., [2]Okayama Seikabutsu Hanbai co.ltd.)

【目的】　肥満は、高血圧や脂質異常症、糖尿病などの様々な疾患の原因とされ、これら疾患のリスクファクターとされる。近年、野菜や果物など食品に含有されるポリフェノールの生理的効能が着目されている。ポリフェノールの中でも、アントシアニンやレスベラトロール等は、様々な生理学的効果を有することが報告され、肥満抑制効果などが期待されている。クワの実は、アントシアニンやレスベラトロールをはじめとするポリフェノールを多く含むことが知られているが、クワの実の肥満抑制効果についての詳細な機構はまだ解明されていない。そこで、本研究はクワの実摂取による肥満抑制効果について検討した。
【材料・方法】　試験試料は、クワの実濃縮ジュースを凍結乾燥粉末（MFP）にしたものを用いた。供試動物は C57BL/6 マウス（雄、4 週齢、20 匹）を用い、1 週間予備飼育後、5～17 週齢の 12 週間を実験飼育とした。実験群は、餌の種類と MFP の有無によって、4 群（標準食（ND）群、ND+MFP 群、高脂肪食（HFD）群、HFD+MFP 群）設定した。実験飼育中、水は自由摂取させ、給餌量を 4 g/day/mouse とした。実験期間中、週に 1 回体重測定、週に 2 回の給餌と摂餌量測定を行った。実験飼育終了後、血液、肝臓、精巣上体周囲脂肪の採取を行った。血液は血糖値測定後、アディポネクチン、総コレステロール、トリグリセリドの血漿中濃度の分析を行った。肝臓は、HE 染色による組織学的観察と脂肪酸代謝関連因子の遺伝子発現解析に用いた。精巣上体周囲脂肪は、HE 染色による組織学的観察を行い、ImageJ による脂肪細胞の面積比較を行った。また、MFP による脂肪滴蓄積抑制試験は、3T3-L1 細胞を用いてオイルレッド染色をしたのち吸光度測定を行い評価した。
【結果・考察】　ND+MFP 群では、HFD 群と比べ、11 週齢から 16 週齢まで有意な体重増加抑制が認められ、血糖値の有意な低下も確認された。HFD 群と HFD+MFP 群間で脂肪組織重量差は認められなかったが、ImageJ による脂肪細胞・組織の面積比較では、HFD 群＞HFD+MFP 群＞ND+MFP 群＝ND 群となり、脂肪細胞の大きさに有意差が認められた。肝臓の組織学的観察より、HFD 摂取により肝臓組織構造の破壊傾向があるが、HFD＋MFP 群においてその軽減傾向が観察されたことから、MFP による肝臓組織傷害抑制効果が推測された。3T3-L1 細胞の脂肪滴蓄積抑制試験では、MFP 濃度依存的な脂肪滴蓄積抑制効果が認められた。以上より、長期かつ持続的な MFP 摂取が、血糖値上昇抑制・脂肪細胞肥大化の抑制・肝組織傷害抑制を誘導することで肥満を抑制すると推察された。血漿分析および遺伝子発現については現在解析中である。

mulberry, antiobesity, adipocyte

発表責任者：畑生俊光（hatabu@okayama-u.ac.jp）

発表番号：2E136
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クワの実は上皮細胞死を抑制することでインドメタシン誘発性胃潰瘍発症を阻止する

# Mulberry prevents indomethacin-induced gastric ulcer formation by epithelial cell death inhibition.

○定兼 侑里[1]、藤原 崇子[2]、大西 直規[2]、村田 芳行[1]、舟橋 弘晃[1]、畑生 俊光[1]（[1]岡大農、[2]岡山県青果物販売）
○Yuri SADAKANE[1], Takako FUJIWARA[2], Naoki OONISHI[2], Yoshiyuki MURATA[1], Hiroaki FUNAHASHI[1], Toshimitsu HATABU[1]（[1]Okayama Univ., [2]Okayamaken Seikabutsu Hanbai co. ltd.）

【目的】非ステロイド性抗炎症薬（NSAIDs）は、鎮痛、抗炎症、解熱作用を有する汎用薬である。しかし、NSAIDs は、副作用として胃潰瘍が多く報告されている。NSAIDs 誘発性胃潰瘍の最も一般的な形成機構は、Cyclooxygenase（COX）依存性経路と呼ばれる COX の酵素活性阻害による Prostaglandin（PG）産生減少の結果生じる胃の攻防バランスの破綻と考えられている。近年、NSAIDs 誘発性胃潰瘍形成機構には、COX 非依存性の、胃粘膜細胞死を伴う機構の存在が多数報告されている。我々は、クワの実凍結乾燥粉末（MFP）が、NSAIDs の一つである Indomethacin による胃潰瘍形成を濃度依存的に抑制すること、MFP の投与が Indomethacin による胃粘膜上皮の PAS 陽性細胞数の減少を抑制すること、を前回の本学会で報告した。このことから、MFP は、胃粘膜細胞死を抑制することで Indomethacin 誘発性胃潰瘍形成を抑制する、との仮説を立て検証した。
【材料・方法】実験 1, 2 は Wistar ラット（7 週齢 雄）を用いて行った。実験 1 は、Indomethacin 誘発性胃潰瘍形成を経時的に観察する為に、Indomethacin 投与後 0, 0.5, 1, 2, 3 時間のラットの胃を採取し、肉眼的観察と組織学的観察（HE, PAS 染色、TUNEL）、COX-1, 2 の遺伝子発現について検討した。実験 2 は、アポトーシス抑制機構への MFP の関与を検討する為に、MFP 投与 2 時間後に Indomethacin を投与し、その 4 時間後にラットの胃を採取し、実験 1 と同様に観察・解析した。実験 3 は、Indomethacin 誘発性アポトーシスに対する MFP の抑制効果を検証する為に、HepG2 細胞を用いて検討を行った。
【結果・考察】実験 1 において Indomethacin 投与 1 時間後から、経時的な潰瘍形成を確認した。また胃粘膜層の厚さを測定した結果、Indomethacin 投与後 0.5 時間以降の群では、Indomethacin 投与後 0 時間のものと比較して粘膜層が薄くなっていた。これらのことから、Indomethacin 投与後 0.5~1 時間で胃粘膜損傷が起こり始めると考えられた。COX-1, 2 は、Indomethacin 投与後 0~3 時間の胃において全て発現していた。Indomethacin 添加後 24 時間培養した HepG2 細胞において、DNA 断片化を確認したが、MFP 添加による DNA 断片化抑制効果は確認できなかった。今回、実験 3 における MFP の添加最高濃度が、0.2 mg anthocyanin/mL であり、前回の in vivo 実験に比較して低濃度の MFP 添加のために細胞死を抑制できなかったと考えられた。MFP 添加濃度による効果、胃粘膜組織の細胞死検出、MFP 投与による遺伝子発現への影響等について現在詳細に検討中である。

gastric ulcer, cell death, mulberry

発表責任者：畑生俊光（hatabu@okayama-u.ac.jp）

発表番号：2E137
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 複合サプリメント『カロリミット®』(ギムネマ酸，桑の葉エキス，緑茶エキス，キトサン，インゲン豆エキス含有)摂取による食後血糖値上昇抑制効果検証試験-無作為化二重盲検クロスオーバー試験-

# Effects of multiple dietary supplement containing gymnemic acid, mulberry leaf extract, green tea extract, chitosan, and kidney bean extract on the postprandial blood glucose level -A randomized, double-blind, cross-over study-

○清水 良樹[1]、北野 嶺[1]、松岡 小百合[1]、由井 慶[1]、海老原 淑子[2]、細井 孝之[3]、折茂 肇[3] ([1]株式会社ファンケル 総合研究所、[2]チヨダパラメディカルケアクリニック、[3]医療法人財団健康院 健康院クリニック)

○Yoshiki SHIMIZU[1], Rei KITANO[1], Sayuri MATSUOKA[1], Kei YUI[1], Shukuko EBIHARA[2], Takayuki HOSOI[3], Hajime ORIMO[3] ([1]FANCL Research Institute, [2]Chiyoda Paramedical Care Clinic, [3]Kenkoin Clinic)

目的：本試験では、ギムネマ酸、桑の葉エキス、緑茶エキス、キトサン、インゲン豆エキスを含有する複合サプリメント『カロリミット®』摂取による食後血糖値上昇抑制効果を検証することを目的とした。

方法：試験デザインは、無作為化二重盲検クロスオーバー試験とした。食後血糖値が 130 mg/dL 以上の 30 歳から 59 歳の男女 20 名に対し、摂取 I 期として、複合サプリメント（ギムネマ酸 9.4 mg、桑の葉エキス 200 mg、緑茶エキス 200 mg、キトサン 100 mg、インゲン豆エキス 4.8 mg を含有）または機能成分を含有しないプラセボを摂取させ、負荷食品として米飯 200 g を摂取させた。血糖値およびインスリン値は、負荷前、負荷食品摂取後（負荷後）30 分、60 分、90 分、120 分に測定をした。摂取 II 期は複合サプリメントを摂取した被験者はプラセボを、プラセボを摂取した被験者は複合サプリメントを摂取させ、同様に検査を行った。本試験における主要評価項目は負荷前からの変化量の食後血糖値 AUC（Area under the curve）とした。なお、数値は平均値±標準誤差で示し、検定の有意水準は両側 5 %とした。

結果：主要評価項目である負荷前からの変化量の血糖値 AUC は、プラセボ摂取時(60.7±4.9 mg・h/dL)と比較して、複合サプリメント摂取時(44.0 ±3.2 mg・h/dL)に有意な低値を示した（$p < 0.05$）。同様に、負荷後のインスリン値の AUC についても、プラセボ摂取時(53.13±6.41 μU・h/mL)と比較して、複合サプリメント摂取時(46.27±4.68 μU・h/mL)に有意な低値を示した（$p < 0.05$）。さらに、負荷後 30 分の血糖値とインスリン値についても、プラセボ摂取時と比較して、複合サプリメント摂取時に有意な低値を示した（$p < 0.05$）。

まとめ：以上の結果より、ギムネマ酸 9.4 mg、桑の葉エキス 200 mg、緑茶エキス 200 mg、キトサン 100 mg、インゲン豆エキス 4.8 mg を含有する複合サプリメント『カロリミット®』摂取は、食後の血糖値の上昇を抑制することが示され、食後血糖値のコントロールに有用であることが示唆された。

Postprandial blood glucose level, Multiple dietary supplement, Impaired glucose tolerance

発表番号：2E138
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 複合サプリメント『カロリミット®』(ギムネマ酸，キトサン，緑茶エキス，桑の葉エキス，インゲン豆エキス含有)摂取による食後血中中性脂肪値上昇抑制効果検証試験-無作為化二重盲検クロスオーバー試験-

# Effects of multiple dietary supplement containing gymnemic acid, chitosan, green tea extract, mulberry leaf extract, and kidney bean extract on the postprandial serum triglyceride level -A randomized, double-blind, cross-over study-

○北野 嶺[1]、清水 良樹[1]、松岡 小百合[1]、由井 慶[1]、高野 和彦[2] ([1]株式会社ファンケル　総合研究所、[2]医療法人北武会 美しが丘病院)
○Rei KITANO[1], Yoshiki SHIMIZU[1], Sayuri MATSUOKA[1], Kei YUI[1], Kazuhiko TAKANO[2] ([1]FANCL Research Institute, [2]Medical Corporation Hokubu-kai Utsukushigaoka Hospital)

目的：本試験では、ギムネマ酸，キトサン，緑茶エキス，桑の葉エキス，インゲン豆エキスを含有する複合サプリメント『カロリミット®』摂取による食後血中中性脂肪値上昇抑制効果を検証することを目的とした。
方法：試験デザインは、無作為化二重盲検クロスオーバー試験とした。空腹時血中中性脂肪値が正常値からやや高め（空腹時血中中性脂肪値の範囲は 102～191 mg/dL）の 24～64 歳の男女 36 名に対し、摂取 I 期として、複合サプリメント（ギムネマ酸 9.4 mg、キトサン 100 mg、緑茶エキス 200 mg、桑の葉エキス 200 mg、インゲン豆エキス 4.8 mg を含有）または機能成分を含有しないプラセボ食品を摂取させ、負荷食品として総脂質量を 40.0 g に調整したコーンクリームスープを摂取させた。血中中性脂肪値、レムナント様リポ蛋白コレステロール（RLP-C）値は、負荷食品摂取前および負荷食品摂取後 2、3、4、6 時間に測定した。摂取 II 期では、摂取 I 期に複合サプリメントを摂取した被験者はプラセボを、プラセボを摂取した被験者は複合サプリメントを摂取させ、同様に検査を行った。本試験における主要評価項目は負荷食品摂取前からの食後血中中性脂肪値の変化量 AUC（Area under the curve）とした。なお、数値は平均値±標準誤差で示し、検定の有意水準は両側 5 %とした。
結果：負荷食品摂取後 2、4 時間での血中中性脂肪値は、プラセボ摂取時よりも複合サプリメント摂取において有意に低値であった（$P<0.01$）。主要評価項目である負荷食品摂取前からの血中中性脂肪値の変化量 AUC は、プラセボ摂取時(533.3±32.2 mg・h/dL)と比較して、複合サプリメント摂取時(423.9±35.0 mg・h/dL)に有意な低値を示した（$p < 0.001$）。また、負荷食品摂取前からの RLP-C 変化量 AUC についても、プラセボ摂取時(28.99±1.78 mg・h/dL)と比較して、複合サプリメント摂取時(22.02±1.89 mg・h/dL)に有意な低値を示した（$p < 0.001$）。
まとめ：以上の結果より、ギムネマ酸 9.4 mg、キトサン 100 mg、緑茶エキス 200 mg、桑の葉エキス 200 mg、インゲン豆エキス 4.8 mg を含有する複合サプリメント『カロリミット®』の摂取は、食後の血中中性脂肪値および RLP-C 値の上昇を抑制することが示され、食後血中中性脂肪値のコントロールに有用であることが示唆された。

Postprandial serum triglyceride level, remnant-like lipoprotein particle cholesterol, multiple dietary supplement

発表番号：2E139
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ツボクサが脂肪細胞分化と機能に与える影響

# Effect of *Centella asiatica* on the differentiation and fanction of adipocytes

○原田 洸輔[1]、飯塚 佑菜[1]、仁科 淳良[2]、只石 幹[1]、清水 誠[1]、服部 一夫[1]（[1]東農大応生科、[2]日大理工）
○ Kosuke HARADA[1], Yuna IIZUKA[1], Atsuyoshi NISHINA[2], Miki TADAISHI[1], Makoto SHIMIZU[1], Kazuo HATTORI[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Nihon University)

【背景・目的】
現在の日本において大きな問題となっているⅡ型糖尿病の発症には脂肪細胞が深く関わっている。脂肪細胞機能には中性脂肪の蓄積の他に生理活性物質の分泌がある。脂肪細胞が分泌するアディポネクチンはインスリン抵抗性を改善し、抗糖尿病作用を示すことが知られている。つまり、脂肪細胞機能の改善は糖尿病の改善につながると考えられる。本研究では、脂肪細胞機能に影響を及ぼす食品を探索するために、3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いてスクリーニングを行った。その結果、セリ科の植物であるツボクサ（*Centella asiatica*）を見出した。ツボクサの脂肪細胞に対する影響は詳しくは不明である。そこで今回は、ツボクサが脂肪細胞の分化や機能に与える影響について検討を行った。
【方法】
3T3-L1 前駆脂肪細胞にツボクサの根のメタノール抽出物（CA）1 μg/ml、10 μg/ml、100 μg/ml)を分化誘導時から 8 日間添加した。ポジティブコントロールには rosiglitazone を用いた。分化 8 日後に Oil Red O 染色法を用い、脂肪細胞分化の評価を行った。ツボクサの細胞毒性は MTT assay 法を用いて評価した。また、Real-time PCR 法により、アディポネクチン遺伝子の発現量を調べた。さらに、PPARγに対するリガンド作用を調べるために Binding assay を行った。
【結果・考察】
MTT assay 法により、CA は細胞生存率に影響を及ぼさないことが示された。また、Oil Red O 染色法により CA による脂肪滴の増加が確認できた。このことから、ツボクサには脂肪細胞の分化を促進する作用があることが示された。さらに、CA 添加によりアディポネクチン mRNA 発現量が有意に増加した。CA が脂肪細胞の分化やアディポネクチンの制御に関わる転写因子の PPARγに結合するか否かを検討するために、Binding assay を行ったところ、CA は PPARγのリガンドとしてではなく、他の経路を介して脂肪細胞の分化やアディポネクチンの発現増加に寄与することが示唆された。

*Centella asiatica*, adipocyte differentiation, adiponectin

発表番号：2E140
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 3T3-L1 脂肪細胞に及ぼすヒハツ茎メタノール抽出物の影響

# The effects of methanol extracts from *Piper longum* stem on 3T3-L1 adipocytes

○宮本 夏子[1]、原田 洸輔[1]、飯塚 佑菜[1]、池田 萌[1]、佐々木 桃佳[1]、仁科 淳良[2]、只石 幹[1]、清水 誠[1]、服部 一夫[1] ([1]東農大応生科、[2]日大理工)
○Natsuko MIYAMOTO[1], Kosuke HARADA[1], yuna IIZUKA[1], Moe IKEDA[1], Momoka SASAKI[1], Atsuyoshi NISHINA[2], Miki TADAISHI[1], Makoto SHIMIZU[1], Kazuo HATTORI[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】現在、日本では 5 人に 1 人が糖尿病もしくはその疑いがあると推測されており、大きな社会問題となっている。糖尿病の大半はⅡ型糖尿病であり、その病態には脂肪細胞が深くかかわっている。そのような背景から、我々は脂肪細胞機能に影響を及ぼす食品を探索し、その食品の抗糖尿病作用について研究を行ってきた。本研究では、コショウ科の植物の一種であるヒハツ（*Piper longum*）に着目した。ヒハツは東南アジア原産で香辛料や生薬として使用されてきた植物だが、糖尿病に対するヒハツの効果は未だ不明な点も多い。そこで今回は、3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて、ヒハツの茎のメタノール抽出物が脂肪細胞の分化に及ぼす影響について検討を行った。
【方法】3T3-L1 前駆脂肪細胞にヒハツの茎のメタノール抽出物を添加し、分化誘導を行った。分化誘導 8 日後に Oil red-O 染色法と GPDH assay を行い、脂肪細胞分化に関するヒハツの茎のメタノール抽出物の影響を評価した。また、脂肪細胞分化のレギュレーターである Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ（PPARγ）や CCAAT/enhancer-binding protein α（C/EBPα）とアディポネクチンの mRNA 発現量をリアルタイム PCR により測定した。
【結果・考察】3T3-L1 脂肪細胞の分化誘導 8 日後の Oil red-O 染色の結果、ヒハツ抽出物添加群において成熟脂肪細胞数が増加した。GPDH assay においても、ヒハツ抽出物添加群で GPDH 活性が有意に上昇した。以上から、ヒハツの茎は脂肪細胞の分化促進作用を有することが示された。また、3T3-L1 脂肪細胞の分化誘導 8 日目において PPARγ、C/EBPα、アディポネクチンの mRNA 発現量が有意に増加した。以上の結果から、ヒハツの茎のメタノール抽出物には脂肪細胞の分化に関わる転写因子の発現量を増加させ、アディポネクチンの遺伝子発現も上昇させることが示された。これらのことから、ヒハツは糖尿病の予防・改善に寄与する食品となりうる可能性が示された。現在は *in vivo* におけるヒハツ茎メタノール抽出物の抗糖尿病作用について検討を行っている。

adipocyte differentiation, diabetes, *Piper longum*

発表番号：2E141
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ブルーベリー葉抽出物（BLEx）摂食がアルコール代謝とアルコール性肝障害に与える影響
# Effect of dietary blueberry leaf extrat (BLEx) on alcohol metabolism and alcoholic liver injury.

○山崎 楓[1]、長友 宏賢[2]、菅本 和寛[3]、甲斐 孝憲[4]、亀長 浩蔵[4]、竹下 正彦[5]、菊地 幸治[5]、松浦 靖[6]、柚木崎 千鶴子[6]、西山 和夫[1,2]、山崎 正夫[1,2]（[1]宮大院農応生科、[2]宮大農応生科、[3]宮大工環応化、[4]（株）なな葉コーポレーション、[5]南日本酪農協同（株）、[6]宮崎県食品開発センター）
○Kaede YAMASAKI[1], Hirotaka NAGATOMO[2], Kazuhiro SUGAMOTO[3], Takanori KAI[4], Kozo KAMENAGA[4], Masahiko TAKESHITA[5], Yukiharu KIKUCHI[5], Yasushi MATSUURA[6], Chizuko YUKIZAKI[6], Kazuo NISHIYAMA[1,2], Masao YAMASAKI[1,2] ([1]Grad. sch. of Agri., Univ. of Miyazaki, [2]Faculty of Agri., Univ. of Miyazaki, [3]Faculty of engineering, Univ. of Miyazaki, [4]Nanaha Co., Ltd, [5]Minami Nippon Dairy Co-op Co., Ltd, [6]Miyazaki prefecture foods development center)

飲酒は健康障害のリスク要因であるが、社会生活を送る上で飲酒を避けることは難しい。飲酒による健康障害を緩和する方法として、Ethanol やその代謝物である Acetaldehyde の毒性から肝臓を保護しつつ、アルコール代謝を亢進させて Ethanol やその代謝物を生体内で速やかに分解することが重要である。そこで本研究では肝臓保護作用が報告されているブルーベリー葉抽出物（BLEx）に注目し、Sprague-Dawley（SD）ラットにおけるアルコール代謝亢進作用およびアルコール性肝障害抑制作用を評価した。

SD ラットに BLEx 粉末を 3%含む食餌を 2 週間摂食させた。24 時間絶食後、2.0 mg/g Body weight になるように 40% Ethanol 水溶液を経口投与し、0、30、60、120、240、360 分後に尾採血を行った。その後、心採血により屠殺し、肝臓を摘出した。血清 Ethanol 濃度を Head Space-GC-MS で測定し、肝臓 Alcohol dehydrogenase（ADH）および Aldehyde dehydrogenase（ALDH）活性と血清 Glutamic Oxaloacetic Transaminase（GOT）および Glutamic Pyruvic Transaminase（GPT）活性を比色法、肝臓 ADH1、ALDH2、Cytochrome P450 2E1（CYP2E1）の遺伝子発現を real-time PCR で測定した。

血清 Ethanol 濃度は、BLEx 摂食群は非摂食群と比較して低値を示す傾向が見られ、120 分時点では有意な低値を示した。また、血清 Ethanol 濃度-時間の曲線下面積（AUC）も BLEx 摂食群は非摂食群と比較して有意な低値を示した。肝臓 ADH 活性は BLEx 摂食群で増加する傾向が認められた。また、肝臓 ALDH 活性は Ethanol 投与で減少傾向にあったものが、BLEx 摂食によって緩和される傾向が見られた。血清 GOT および GPT 活性は、Ethanol 投与によって増加傾向にあったものが、BLEx 摂食によってその増加傾向が抑制される傾向が認められた。肝臓 ADH1 と ALDH2 の遺伝子発現は Ethanol 投与によって減少傾向にあったものが、BLEx 摂食によって緩和される傾向が見られた。肝臓 CYP2E1 の遺伝子発現は Ethanol 投与によって減少傾向にあったものが、BLEx 摂食によってさらに減少する傾向が示された。以上のことから、BLEx はアルコール代謝関連分子の発現および活性調節を介してアルコール代謝を亢進させて、Ethanol やその代謝物を生体内で速やかに分解する作用があることが期待される。

Blueberry leaf extract (BLEx), Alcohol metabolism, Alcoholic liver injury

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

発表番号：2E142
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ブルーベリー葉抽出物（BLEx）によるインスリン抵抗性改善作用

# Blueberry leaf extract (BLEx) improves insulin resistance .

○濱田 健作[1]、田里 博之[2]、荒川 輝晃[2]、甲斐 孝憲[3]、亀長 浩蔵[3]、松浦 靖[4]、柚木崎 千鶴子[4]、西山 和夫[1]、山崎 正夫[1] ([1]宮大院農応生、[2]備前化成（株)、[3]（株）なな葉コーポレーション、[4]宮崎県食品開発センター)

○Kensaku HAMADA[1], Hiroyuki TARI[2], teruaki ARAKAWA[2], Takanori KAI[3], Kozo KAMENAGA[3], Yasushi MATUURA[4], Chizuko YUKIZAKI[4], Kazuo NISHIYAMA[1], Masao YAMASAKI[1] ([1]Grad. sch. of Agri., Univ. of Miyazaki, [2]Bizen Chemical Co.,LTD, [3]Nanaha Co., Ltd,, [4]Miyazaki prefecture foods development center)

2 型糖尿病におけるインスリン抵抗性惹起の要因に、肥大化した脂肪細胞から分泌される TNF-α等が筋肉でのインスリンシグナルを阻害することが関与している。ブルーベリー葉抽出物（BLEx)は宮崎県における JST 地域結集型共同研究事業で着目され、これまで、本研究チームではブルーベリー葉による肥満マウスでの血糖低下作用を明らかとした。そこで、本研究では骨格筋細胞を用いて、BLEx によるインスリン抵抗性改善作用の評価を行った。

マウス筋芽細胞 C2C12 を常法で骨格筋細胞に分化後、実験に用いた。糖取り込み試験では、BLEx 24 時間処理後、グルコース誘導体である 2-NBDG(2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-2-deoxyglucose)の取り込みをインスリン刺激および無刺激下で評価した。このとき、TNF-α刺激によってインスリン抵抗性を惹起させた細胞での評価も行った。また、BLEx 24 時間処理後、インスリンシグナル経路の活性化の指標として Akt のリン酸化レベル、インスリンシグナル非依存的に糖取り込みを促進する AMPK のリン酸化レベルを Western blotting により検出した。また、同様に前駆脂肪細胞 3T3L-1 を常法で分化させた脂肪細胞、成熟させた成熟脂肪細胞での糖取り込みも評価した。

糖取り込み試験の結果、50 μg/ml BLEx はインスリン存在下での糖取り込みを有意に増加させた。また、TNF-α刺激によりインスリン抵抗性を惹起させた細胞においても BLEx によって糖取り込み能を改善させる傾向が見られた。50 μg/ml BLEx はインスリン存在下で Akt のリン酸化レベルを有意に増加させた。同様に脂肪細胞、成熟脂肪細胞においてもインスリン存在下で糖取り込みを有意に増加させた。

これらの結果より、骨格筋細胞において BLEx は AMPK 経路には関与せず、インスリンシグナルを増強することで糖取り込みを促進し、脂肪細胞、成熟脂肪細胞においても糖取り込みを促進させることが明らかとなり、インスリン抵抗性改善作用があることが示唆された。

Blueberry leaf extract (BLEx), Insulin resistance, Iinsulin signaling

発表責任者：山崎正夫（myamasaki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

発表番号：2E143
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Neuro2a APPswe 細胞が産生するアミロイドβによるリン酸化 Tau レベル亢進の FACS 解析
# FACS analysis of intracellular hyperphosphorylated tau induced by amyloid-beta secreted from Neuro2a APPswe cells

○原 崇[1]、池内 健[2]、徳武 孝允[3]、佐藤 佳太[4]、中村 澄子[1]、城 斗志夫[1]、西澤 正豊[2]、山崎 彬[5]、小林 篤[5]、大坪 研一[1]（[1]新潟大農、[2]新潟大脳研、[3]新潟大医歯学総合病院、[4]新潟大院自然科学、[5]越後製菓）
○ Takashi HARA[1], Takeshi IKEUCHI[2], Takayoshi TOKUTAKE[3], Keita SATOH[4], Sumiko NAKAMURA[1], Toshio JOH[1], Masatoyo NISHIZAWA[2], Akira YAMAZAKI[5], Atsushi KOBAYASHI[5], Kenichi OHTSUBO[1]（[1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [3]Med. & Dent. Hosp., Niigata Univ., [4]Grad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [5]Echigo Seika Co., Ltd.）

【目的】アルツハイマー病は，脳組織に凝集・沈着したアミロイドβ（Aβ）により神経細胞の Tau が過剰リン酸化し，神経原線維変化により機能障害を引き起こすことが病理学的特徴とされる。しかし，細胞培養実験系における Tau のリン酸化亢進には，生理的条件下とはかけ離れた高濃度の Aβの添加が必要である。近年，Aβ 40/42 を産生する Neuro2a APPswe 細胞とヒト Tau を発現する Neuro2a MAPT 細胞とを共培養することにより，Neuro2a MAPT 細胞内のヒト Tau のリン酸化亢進が確認された [1)]。本研究では，認知症予防効果を有する食品由来候補成分の一次スクリーニング系構築を目的とし，Neuro2a APPswe 細胞の培養実験系，または Neuro2a APPswe 細胞と Neuro2a MAPT 細胞の共培養実験系を用い，細胞内リン酸化 Tau レベルを FACS 解析により評価した。
【方法】Neuro2a APPswe 細胞と Neuro2a MAPT 細胞は，マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞にそれぞれアミロイド前駆タンパク質のスウェーデン型変異体（APP695 $^{K595N/M596L}$）とヒト Tau（4N1R）を安定発現させた細胞である [1)]。本研究では，①Neuro2a APPswe 細胞を単独で用いた培養実験系と②Neuro2a APPswe 細胞と Neuro2a MAPT 細胞の共培養実験系について，抗 Tau 抗体および抗リン酸化 Tau 抗体を用いた細胞内染色による FACS 解析を実施した。
【結果及び考察】
①Neuro2a APPswe 細胞培養実験系
Neuro2a APPswe 細胞は，Neuro2a 細胞より高い細胞内リン酸化 Tau レベルを示した。この結果は，産生された Aβが持続的に影響を及ぼし内因性のマウス Tau が過剰リン酸化されていると推察される。
②Neuro2a APPswe 細胞と Neuro2a MAPT 細胞の共培養実験系
Neuro2a APPswe 細胞と Neuro2a MAPT 細胞を共培養し，抗ヒト Tau 抗体（Tau 5）を用いて両者を識別することができ，Tau 5陽性細胞，つまり Neuro2a MAPT 細胞における細胞内リン酸化 Tau レベルの亢進を確認することができた。
現在，①と②の実験系により見出された生姜抽出物など，認知症予防効果が期待される食品およびその抽出物の認知症関連マーカーに及ぼす影響について，マウス経口投与試験を実施中である。本研究は，SIP「次世代機能性農林水産物・食品の開発」の一環として実施された。

1) T. Tokutake et al.: J. Biol. Chem., 287:35222-35233 (2012)

tau, amyloid-beta, FACS

発表責任者：原　　崇（harata@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2E144
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品素材による認知症予防効果の予備検討及び機能性パンの試作

# Preliminary test for dementia prevention by foodstuff and preparation of functional bread

中村 澄子[1]、西澤 正豊[2]、池内 健[2]、山崎 彬[3]、小林 篤[3]、原 崇[1]、城 斗志夫[1]、前田 英郎[4]、○大坪 研一[1] ([1]新潟大農、[2]新潟大脳研、[3]越後製菓、[4]農研機構)
Sumiko NAKAMURA[1], Masatoyo NISHIZAWA[2], Takeshi IKEUCHI[2], Akira YAMAZAKI[3], Atsushi KOBAYASHI[3], Takashi HARA[1], Toshio JOH[1], Hideo MAEDA[4], ○Kenichi OHTSUBO[1] ([1]Niigata Univ, [2]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [3]Echigo Seika Co., Ltd., [4]Nat. Agric. Food, Res. Org.)

【目的】
本研究では、認知症予防に有望な機能性成分および農林水産物を探索し、それらの認知症予防に関する科学的検証を行い、認知症予防に有効な食品素材を選定し、それらを添加した米飯あるいは米加工品を開発し、それらの認知症予防効果について医学的検証を行うことを目的としている。
【方法】
各種の食品素材を対象に、抗酸化性（ORAC 値）、アセチルコリンエステラーゼ阻害能、β-セクレターゼ阻害能などの評価を行い、米加工品の好適副原料を探索した。また、脳研究所で開発したモデルヒト培養細胞によるアミロイドβ産生への影響を調べた。米加工品として、米粉添加パンを試作し、老齢マウスによる動物試験を行った。
【結果及び考察】
H-ORAC 値では、ソバの芽、バジル、紫黒米のぬか、春菊などが高い値を示し、L-ORAC 値では、生姜、ソバの芽などが高い値を示し、高圧処理によって、生姜や春菊の ORAC 値はさらに増加した。アセチルコリンエステラーゼ阻害活性では、ソバの芽、生姜などが高く、高圧処理によってわずかに増加した。バジルおよびレッドキャベツは高圧処理によって顕著に増加した。β-セクレターゼ阻害活性では、紫黒米のぬか、バジル、ソバの芽、鮭などが高く、高圧処理後、バジルは阻害活性を失い、紫黒米のぬか、ソバの芽、鮭などは阻害活性を維持していた。食後血糖上昇抑制能では、アミロペクチン長鎖型の「こなゆきの舞」（農研機構育成）が高い値を示した。培養細胞（3T3-L1）による脂肪蓄積率では、「こなゆきの舞」がきわめて低い値を示し、紫黒米とともに、コシヒカリとは脂肪酸組成がやや異なることを示した。培養細胞によるアミロイドβ産生への影響では、紫黒米のぬかが弱い産生抑制を示し、生姜が強い産生抑制を示した。現在、「こなゆきの舞」玄米添加米粉パン、「こなゆきの舞玄米＋紫黒米のぬか」あるいはソバの芽・生姜・鮭添加「こなゆきの舞」米粉パンを試作し、老齢マウスによる試食試験を実施中である。
本研究は、ＳＩＰ「次世代機能性農林水産**業創造技術**」の中で実施された。

rice, amyloid-beta, dementia

発表責任者：大坪研一（ohtsubok@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2E145
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ゴボウスプラウトのポリフェノール成分とアセチルコリンエステラーゼ阻害活性

# Polyphenolic components and acetylcholinesterase inhibitory activity of burdock sprout

○城 斗志夫[1]、高橋 亮祐[2]、原 崇[1]、中村 澄子[1]、池内 健[3]、西澤 正豊[3]、小林 篤[4]、山崎 彬[4]、大坪 研一[1]([1]新潟大農、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大脳研、[4]越後製菓)
○ Toshio JOH[1], Ryosuke TAKAHASHI[2], Takashi HARA[1], Sumiko NAKAMURA[1], Takeshi IKEUCHI[3], Masatoyo NISHIZAWA[3], Atsushi KOBAYASHI[4], Akira YAMAZAKI[4], Kenichi OHTSUBO[1] ([1]Fac. Agric., Niigata Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Tech., Niigata Univ., [3]Brain Res. Inst., Niigata Univ., [4]Echigoseika Co., Ltd.)

【目的】食による疾病の予防・改善を目指し、様々な保健機能を持った食品が研究・開発されている。その中で機能性が注目される食品の一つにブロッコリースプラウトに代表されるスプラウトがある。発芽野菜であるスプラウトは発芽過程でエネルギーが消費されるため低カロリーであり、種子にはないビタミン類等が合成されるため栄養価も高い。また、一部のスプラウトでは発芽により抗酸化作用や抗ガン作用等を持つ物質が増加すると報告されており、高い機能性が期待される。演者らは、優れた機能性を持つ新たなスプラウトを探索することを目的に、これまで種々の植物の発芽野菜を栽培し、それらの機能性を評価してきた。その結果、一般に市販されていない新規なスプラウトであるゴボウスプラウトが非常に高い抗酸化能を持つことを見いだした。そこで本研究では、ゴボウの代表的抗酸化成分であるポリフェノールに着目し、ゴボウスプラウトに含まれるポリフェノール成分を LC/MS/MS を用いて同定した。また、ゴボウスプラウトの新たな機能として、アルツハイマー型認知症の発症に関与するアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の阻害活性を調べた。
【方法及び結果】ゴボウスプラウトを凍結乾燥後、80% メタノール水溶液でポリフェノールを抽出し、ODS カラムを用いた逆相 HPLC で分析した。その結果、主要な 4 種類の化合物が検出された。ゴボウの食用部位である根に加え、葉と葉柄、種子のポリフェノール成分についても分析したところ、スプラウトで検出された 4 種類の化合物うち 2 種類は根および葉と葉柄には含まれておらず、これらはスプラウトと種子に特異的であることが明らかとなった。それらスプラウトと種子に特異的な 2 種類の化合物を分取し、抗酸化能を DPPH ラジカル消去活性により測定した結果、1 種類は非常に高い抗酸化能を示した。次に、LC/MS/MS 分析によりゴボウスプラウトのポリフェノール成分の同定を試みた。その結果、スプラウトとゴボウの根、葉と葉柄、種子に共通して存在する 2 種類の化合物はクロロゲン酸、1,5-ジカフェオイルキナ酸と同定された。また、スプラウトと種子に特異的に存在する 2 種類の化合物はアルクチンとアルクチゲニンと同定された。アルクチゲニンは認知症の発症に関与する AChE の活性を阻害することが報告されている。そこで、ゴボウスプラウトを含む 10 種類の野菜の AChE 阻害活性を調べた。その結果、10 種類の野菜の中でゴボウスプラウトが最も高い阻害活性を示した。現在、認知症の改善効果が期待されるゴボウスプラウトが認知症関連マーカーに及ぼす影響について、老齢マウスを用いた経口投与試験を実施中である。

なお、本研究は、SIP「次世代機能性農林水産業創造技術」の中で実施されたものである。

burdock sprout, polyphenol, acetylcholinesterase

発表責任者：城　斗志夫（joh@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2E146
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 清酒酵母による睡眠の質の向上作用について－ヒト臨床試験－

# Sake Yeast Improved Sleep Quality in Clinical Study

○物井 則幸[1]、松野 あゆみ[1]、永盛 友樹[1]、内山 章[1]、裏出 良博[2]([1]ライオン(株)、[2]筑波大 WPI-IIIS)
○Noriyuki Monoi[1], Ayumi Matsuno[1], Yuki Nagamori[1], Akira Uchiyama[1], Yoshihiro Urade[2] ([1]Lion Corporation, [2]WPI-IIIS, University of Tsukuba)

【背景および目的】

成人の 5 人に 1 人が睡眠不満を有し、その社会的経済損失も大きい。我々は睡眠不満の改善を目指し、睡眠の質に重要な深睡眠を誘導する天然食品素材を探索した。具体的には、脳内の睡眠関連領域におけるアデノシン $A_{2A}$ 受容体の活性化により深睡眠が誘導されることから、１）アデノシン $A_{2A}$ 受容体を活性化する素材の探索を行った。さらに、２）最も活性が高かった素材（清酒酵母）について、ヒトでの睡眠の質改善作用を検証した。

【方法】

１）深睡眠は、脳内 $A_{2A}$ 受容体の活性化により誘導されることが知られているため、80 種の食品素材の $A_{2A}$ 受容体活性能を検証した。具体的には、食品素材を $A_{2A}$ 受容体発現 HEK 細胞に作用させ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法にて、細胞内 cAMP 濃度を測定した。さらに、cAMP 濃度上昇が認められた素材については、$A_{2A}$ 受容体の選択的拮抗薬（ZM241385）存在下でも同様の測定を行った。

２）ヒト試験は二重盲検クロスオーバー法を用い、睡眠不満を抱える健康な成人 68 名に清酒酵母 GSP6 含有粉末（以下、清酒酵母）500mg を含むタブレットおよびプラセボタブレットを摂取させた。摂取期間中には、脳波計を用いて深睡眠の指標である脳波デルタパワー値や中途覚醒の測定、起床時の尿中成長ホルモンの測定および OSA 睡眠調査票を用いた主観評価を実施した。

【結果】

１）80 種の食品素材の中で、清酒酵母が最も高いアデノシン $A_{2A}$ 受容体活性化能を示した。すなわち、清酒酵母は最も低濃度で、アデノシン $A_{2A}$ 受容体高発現 HEK 細胞の cAMP 濃度を上昇させ、その作用は $A_{2A}$ 受容体の選択的アンタゴニスト（ZM 241385）によって用量依存的に阻害された。

２）脳波解析の結果から、清酒酵母摂取によりデルタパワー値が有意に上昇し（$p<0.05$）、ヒトにおいて深睡眠が誘導されること、さらには早朝の中途覚醒回数が減少すること（$p<0.05$）が明らかとなった。また、清酒酵母摂取群で、身体の機能維持に役立つ成長ホルモン量の増加（$p<0.05$）が認められた。主観評価（OSA 睡眠調査票）においても、起床時の眠気（$p<0.05$）および疲労感（$p<0.1$）が改善した。なお、試験期間中に清酒酵母摂取に起因する有害事象は発生しなかった。

【結論】

１）*in vitro* 評価により、アデノシン $A_{2A}$ 受容体の活性化能の高い素材として、清酒酵母を見出した。

２）清酒酵母は、ヒトにおける客観的および主観的評価において、睡眠の質を向上させた。

sleep, yeast, growth hormone

発表責任者：物井　則幸（monoi1@lion.co.jp）

発表番号：2E147
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 清酒酵母の長期摂取時の機能性・安全性評価－ヒト臨床試験－
# Effect of Long-term Intake of Sake Yeast

○永盛 友樹[1]、上野 聡子[1]、高橋 千晶[1]、物井 則幸[1]、内山 章[1]、裏出 良博[2]([1]ライオン(株)、[2]筑波大 WPI-IIIS)
○Yuki Nagamori[1], Satoko Ueno[1], Chiaki Takahashi[1], Noriyuki Monoi[1], Akira Uchiyama[1], Yoshihiro Urade[2] ([1]Lion Corporation, [2]WPI-IIIS, University of Tsukuba)

【背景および目的】

睡眠不満は、日本人の 5 人に 1 人が抱える問題であり、生活の質を低下させる一因である。睡眠不満の解決に向け、睡眠の質を向上させるアデノシン $A_{2A}$ 受容体を活性化する食品素材を探索した結果、清酒酵母に $A_{2A}$ 受容体の活性化能を見出した。さらに、清酒酵母の睡眠に対する機能をヒト臨床試験にて確認した結果、清酒酵母 GSP6 含有粉末 （以下、清酒酵母）500mg を 4 日間摂取することで、睡眠の主観・客観評価に有意な改善が認められ、清酒酵母の摂取は睡眠の質を向上させることが分かった。また、清酒酵母の安全性は、食経験および細胞・動物での安全性評価試験によって確認されていた。本研究では、清酒酵母を長期摂取した際の機能性および安全性を、ヒト臨床試験によって検証することを目的とした。

【方法】

睡眠不満のある被験者として、睡眠の質を評価するピッツバーグ睡眠質問票（PSQI）の得点が 5 点以上の者を対象とし、二重盲検並行群間試験を実施した。各群 20 名の被験者に、清酒酵母を 500mg 含有する食品または清酒酵母を含有しないプラセボを 12 週間摂取させ、摂取開始時、摂取中の 4 週、8 週、12 週および摂取終了後（16 週目）に検査を実施した。検査項目は、清酒酵母摂取の機能性を PSQI で評価し、安全性をバイタルサイン（体重、BMI、血圧、脈拍数)、血液学検査、血液生化学検査、尿検査、自他覚症状および有害事象で評価した。

【結果】

PSQI による機能性評価において、清酒酵母群はプラセボ群と比較して 4 週目の PSQI が有意に改善し、睡眠の質の向上が確認された。摂取中の 8、12 週目の PSQI も 4 週目と同等の低値を示し、清酒酵母による睡眠の質向上機能は少なくとも長期摂取によって減衰しないことを確認した。また、PSQI の質問項目毎に解析した結果、清酒酵母を摂取することで、中途覚醒や日中の眠気に関連する質問項目の点数がプラセボ群と比較して有意に改善していた。安全性の評価では、清酒酵母群とプラセボ群の間で殆どの項目について統計学的な有意差がないこと、または有意差があった項目も生理的な変動の範囲内であった。また、試験食品に起因する有害事象は認められなかった。これらの結果より、安全性に問題がないことが確認された。

【結論】

清酒酵母の長期摂取は、中途覚醒や日中の眠気を減少させ、睡眠不満の改善に寄与することが明らかとなった。さらに、清酒酵母の長期摂取安全性がヒト試験においても確認された。以上のことから、清酒酵母の摂取は、日々の睡眠の質を向上させる有効な手段と考えられる。

sleep, yeast, adenosine

発表番号：2E148
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# メダカを用いた新規経シナプス性トレーサーの開発

# Development of novel trans-synaptic tracers using medaka fish

○横井 京子、池永 直弥、三坂 巧、岡田 晋治（東大院農生科・応生化）
○Kyoko YOKOI, Naoya IKENAGA, Takumi MISAKA, Shinji OKADA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【背景・目的】

食品中に含まれる味物質は、口腔や咽頭などの上皮層に存在する味蕾という器官で受容される。味情報は味蕾に投射する味神経を介し、中枢へと伝達され、味として認識される。われわれが感じる５つの基本味（甘味、旨味、苦味、酸味、塩味）は、味蕾では別々の細胞（味細胞）集団で受容することが知られているが、その味情報が味神経から中枢までどのように伝達され、中枢で認識されているかについては未だ明らかになっていない。このような味の受容・伝達・認識システムを研究するため、近年、経シナプス性トレーサーである小麦胚芽レクチン（WGA）をトランスジーンとして用い標的細胞を起点とする神経回路を可視化する技術が使用されている。この技術を用いて、5 基本味それぞれの情報伝達経路については解明が進んできた。しかし、各経路の相関は不明であり、これを明らかにするためは 2 種類以上の経路を区別して可視化できる新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンの開発が望まれていた。そこで、本研究では、2012 年度本大会で発表したメダカを用いた新規経シナプス性トレーサー探索系を用い、新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンを開発することを目的とした。

【方法・結果】

2012 年度本大会で発表したメダカを用いた新規経シナプス性トレーサー探索系に則って実験を行った。まず、メダカ PLC-β2 プロモーター下流にトレーサー候補 DNA を接続したトランスジーンコンストラクトを作製し、眼球レンズ特異的に蛍光タンパク質を発現するレポーター遺伝子発現トランスジーンとともにメダカ受精卵に微量注入してトランスジェニック（Tg）メダカを作出した。得られた Tg メダカのうち、眼球レンズで蛍光が観察された個体を選抜し、受精後 14 日齢まで育てた。その稚魚の薄切切片を作製し、免疫組織化学法によって味蕾におけるトレーサータンパク質の発現や味神経へのトレーサー輸送を観察することで、トレーサーの輸送活性の評価を行った。その結果、新規の経シナプス性トレーサー・トランスジーンの候補を得ることに成功した。

medaka fish, tracer, taste

発表番号：2E149
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小型魚類を用いた味覚情報伝達・処理のイメージング解析

# Imaging analysis of neural taste processing using small model fish

○若泉 宏樹[1]、川崎 隆史[2]、弓場 俊輔[2]、阿部 啓子[1]、岡田 晋治[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]産業技術総合研究所)
○Hiroki WAKAIZUMI[1], Takashi KAWASAKI[2], Shunsuke YUBA[2], Keiko ABE[1], Shinji OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

【背景・目的】食品中に含まれる味物質は、味蕾中の味細胞に受容され、味情報へと変換（エンコーディング）される。その味情報は味神経を介し、中枢へと伝達され、そこで処理（デコーディング）されて、味の識別・認識が行われる。末梢の味蕾での味情報エンコーディングの機構については解明が進んできた一方で、味神経・味覚中枢での味情報伝達・処理の機構については未詳の部分が多い。神経活動解析においては、古典的に個々の神経活動の電気的応答を記録する電気生理学的解析が行われ、一定の成果を挙げてきたが、近年、顕微鏡観察によって多数の神経活動を同時に記録する *in vivo* イメージングの手法が開発され、大きな成果をもたらしている。

脊椎動物のモデル生物の 1 つである小型魚類メダカは、体の透明性が高く、延髄の味覚一次中枢が脳表層部において発達しているため、そこでの神経活動の非侵襲的な解析に適していると考えられる。

本研究では、メダカをモデルとして用いて、*in vivo* イメージングによって味覚一次中枢の神経細胞活動を記録・解析する手法を確立し、味情報のコーディング機構の解明につながる知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】神経細胞活動を記録するため、$Ca^{2+}$感受性蛍光タンパク質 GCaMP を味覚一次中枢の神経細胞に発現誘導した遺伝子改変メダカ（TG メダカ）を作出した。発現誘導には Growth-associated protein 43 (Gap43) プロモーター (Fujimori K. *et al.*, 2008) を用いた。体の透明度が高い See-Through II 系統バックグラウンドとした。得られた TG メダカ稚魚を特に刺激を与えていない定常状態で観察したところ、味覚一次中枢領域において、検出に十分な強度の蛍光が観察された。さらに、TG メダカ稚魚の薄切切片を作製し、Nissl 神経細胞染色と抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色の二重染色によって、味覚一次中枢領域の神経細胞における GCaMP タンパク質の発現頻度を調べたところ、多くの神経細胞が GCaMP タンパク質を発現していた。これらの結果から、作出した TG メダカは目的とした *in vivo* イメージングに有用であることが示唆された。

次に、かん流システムの構築と、メダカ保定方法の検討を行った。麻酔濃度やアガロースゲルの扱いを検討し、かん流中にメダカ脳神経細胞を安定して観察できる系の構築に成功した。

現在、各種の味溶液によって TG メダカを刺激し、味覚一次中枢神経細胞の応答プロファイルの解析を行っているところである。

medaka fish, taste, imaging

発表番号：2E150
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発芽玄米酒粕の ACE 阻害活性

# Angiotensin I-converting Enzyme Inhibitory Activity of Pre-germinated Brown Rice Sake-lees

○小木曽 加奈[1]、岡崎 光雄[2]([1]長野県短期大学、[2]岡崎酒造)
○Kana KOGISO[1], Mitsuo OKAZAKI[2] ([1]Nagano Prefectural Col., [2]Okazaki Brewery Co.)

【目的】

発芽玄米酒粕とは発芽玄米を使用して作成した清酒の残さである。我々は糠や胚芽や胚乳などの産業廃棄物の排出を抑えること、また廃棄物再利用の面から発芽玄米酒粕の有効利用方法を検討してきた[1)]。我々は製パン時に発芽玄米酒粕を 10%添加した場合、膨らみが大きく、柔らかさが持続し、良い焼き色になるという物性の利点を見いだした。そのほか、パンの「コク味」と「塩味」が強くなる傾向と、さらにパンの香気性の向上がなされることを見いだした。以上の利点のうち、現在はパンの付加価値をより高めるような検討を行っている。今回は将来的に減塩でかつ血圧降下作用を有するパンを作成するために発芽玄米酒粕の血圧降下作用を考慮し、ACE 阻害能を測定した。ACE 阻害については発芽玄米酒粕だけでなく、発芽玄米酒、発芽玄米ではない清酒についても測定を行った。これらの測定から ACE 阻害能を有する成分の由来も検討した。

【方法】

サンプルは発芽玄米酒粕のほか、発芽胚芽米酒、同様の製法を行っている清酒についてそれぞれ測定を行った。それぞれの酒は蒸留水で希釈し使用した。発芽玄米酒粕は遠心分離後の上澄み液を使用した。ACE 阻害活性は Dojindo 社製 ACE Kit - WST を用いて *in vitro* における阻害能を測定した。

【結果と考察】

発芽玄米酒粕、発芽胚芽米酒、清酒の ACE 阻害活性は IC50 値でそれぞれ 0.15mg/ml、1.15 mg/ml、1.55 mg/ml であった。清酒より発芽胚芽米酒が ACE 阻害活性は高かったことから、発芽玄米由来成分が ACE 阻害活性を示すことがわかった。また、発芽胚芽米酒よりも発芽玄米酒粕の方が ACE 阻害活性は高かったことから、酒中よりもしぼった残渣である酒粕中に阻害活性成分が残ることが示された。

なお、本研究は科研費（26750033）の助成を受けたものである。

1)発芽玄米酒粕の食品利用方法についての検討，牛越 静子，小木曽 加奈，長野県短期大学紀要、第 65 号，13-18（2010）

Sake-lees, ACE, Inhibitory activity

発表責任者：小木曽加奈（kf-kana@nagano-kentan.ac.jp）

発表番号：2E151
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LC/MS による ACE 阻害活性ペプチドの簡易探索法の検証

# Software assisted the targeted analysis using LC/MS for ACE inhibitory activity peptide

○古田 一匡[1]、小木曽 加奈[2] ([1]富士通株式会社、[2]長野県短期大学)
○Kazumasa FURUTA[1], KANA KOGISO[2] ([1]Fujitsu Limited, [2]Nagano Prefectural College)

【目的】

昨今では付加価値の高い新しい食品に対する需要の拡大から、食品を扱う研究において「機能性」を持つ成分をできるだけすばやく、確実に見いだすことが、喫緊の重要課題となっている。一方、食品中の機能性を探索するには、簡単に見積もっても試料を粉砕・抽出した後、濃縮後に精製、測定し、未知の成分、既知の成分を分取し同定と作業が必要になる。研究を行う部署では毎回、充実したマンパワーのほか、その都度お金と時間が充分に掛けられるとは限らない。そのため今回はできるだけ簡便な方法で機能性成分を探索するため、今までに多くの研究がなされ、知られている ACE 阻害について検討を行うことにした。酒粕中には ACE 阻害を有するペプチドが各種存在することが知られているが、特殊な製法で作成された発芽玄米酒粕には今までこれらの阻害があるかどうか検討されたことはない。そこで ACE 阻害能を有するジペプチドについて発芽玄米酒粕中に存在するかどうかを検討した。

【方法】

LC-MS データを ACD/MS Workbook Suite の IntelliTarget 機能により、分子イオンピークが確認されるピークを判別後、ジペプチドに該当する質量数を持つピークを判別した。ジペプチドに該当すると判別されたピークは、同質量数のジペプチドが判別されている。このうち、ACE 阻害活性があると考えられているジペプチドが判別された一連のピークについて、シングルマススペクトルを抽出し、Auto Assignment 機能により、構造式から予測されるフラグメントパターンとシグナルの一致度からピーク成分を推定した。

【結果と考察】

IntelliTarget 機能により、ジペプチドに相当する質量数を持つ 57 ピークが判別された。そのうち Formula Fit Quality index 値が 0.99 以上のものは 8 ピークであった。それらのうち ACE 阻害活性ジペプチド（Val-Pro、Ala-Phe、Ile-Phe、Leu-Phe、Tyr-Pro）が判別された 8 ピークのシングルマススペクトルを抽出し、一連のジペプチド間の予測フラグメントとシグナルの一致度を比較した。最終的に 7.7min の成分が ACE 阻害活性ジペプチド Val-Pro と推定された。

なお、本研究は科研費（26750033）の助成を受けたものである。

ACD/Labs, LC/MS, ACE

発表責任者：古田一匡（furuta.kazumasa@jp.fujitsu.com）

発表番号：2E152
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# エクオールのチロシナーゼ阻害活性に関する研究

# Potent tyrosinase inhibition by equol, an intestinal metabolite of soy isoflavone

○丹羽 利夫[1]、秋山 治菜[1]、越川 まどか[1]、横山 慎一郎[2]、望月 美佳[3]、大澤 俊彦[3] ([1]修文大健康栄養、[2]岐阜県産業技術セ、[3]愛知学院大心身科学)
○Toshio Niwa[1], Haruna Akiyama[1], Madoka Echikawa[1], Shinichiro Yokoyama[2], Mika Mochizuki[3], Toshihiko Osawa[3] ([1]Shubun Univ., [2]Gifu Industrial Technology Center, [3]Aichi Gakuin University)

【目的】近年大豆イソフラボノイドの腸内細菌代謝産物であるエクオールの生理作用が着目されている。そこで本研究では大豆イソフラボノイドの作用として知られるチロシナーゼ阻害についてエクオールの影響を調べることとした。
【方法】96 穴プレート上でチロシンを基質として市販マッシュルームチロシナーゼを反応させた。ここに大豆イソフラボノイドならびに代謝産物を添加し、30 分間室温で反応させたのちプレートリーダーにより 492 nm の吸光度を測定した。
【結果と考察】エクオールにはゲニステインやコウジ酸よりも強い酵素抑制作用が見られた。しかしゲニステインの腸内細菌代謝産物である 2-(4-hydroxyphenyl)propionic acid(*1*)では活性は見られなかった。またエクオール産生菌 YY7918 株(*2*)より得られた(*S*)-エクオールと市販ラセミエクオールを用いた比較では、エクオールの光学活性に由来するチロシナーゼ阻害作用に有意な差は見られなかった。

さらに、エクオールの作用メカニズムを明らかにするため、エクオールとマッシュルームチロシナーゼを反応させたところ新たな生成物が TLC 上に検出された。photo diode array 検出器による HPLC をおこなったところ、生成物の UV スペクトルがエクオールのスペクトルとよく似ていたことから、この生成物がエクオールに由来することが示唆された。

現在この生成物の化学構造解析を進めている。

(1) Niwa *et al*., *Food Chem*., **138**, 122 (2013).
(2) Yokoyama and Suzuki, *Biosci. Biotechnol. Biochem*., **72**, 2660 (2008).

equol, tyrosinase

発表責任者：丹羽　利夫（niwato@shubun-ac.jp）

発表番号：2E153
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 月桃(*Alpinia zerumbet*)由来 5,6-dehydrokawain によるマウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の分化促進作用

# 5,6-dehydrokawain from *Alpinia zerumbet* promotes differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells

○熊谷 百慶[1,2]、三嶋 隆[1]、渡辺 章夫[1]、原田 哲平[1]、井出 将博[1]、小泉 慶子[1]、吉田 泉[1]、藤田 和弘[1]、渡井 正俊[1]、多和田 真吉[3]、西川 慶祐[2]、森本 善樹[2]([1]日本食品分析センター、[2]阪市大院理、[3]琉大農)

○ Momochika KUMAGAI[1,2], Takashi MISHIMA[1], Akio WATANABE[1], Teppei HARADA[1], Masahiro IDE[1], Keiko KOIZUMI[1], Izumi YOSHIDA[1], Kazuhiro FUJITA[1], Masatoshi WATAI[1], Shinkichi TAWATA[3], Keisuke NISHIKAWA[2], Yoshiki MORIMOTO[2] ([1]Japan Food Research Laboratories, [2]Osaka City Univ., [3]University of the Ryukyus)

【目的】骨粗鬆症は骨強度低下によって骨折の危険性が高まった病態であり、その治療および予防は健全な長寿社会を実現するために不可欠である。日常的に摂取できる食品成分にその予防効果を見出すことができれば、機能性表示食品などの開発につながる可能性がある。月桃は亜熱帯および熱帯地域に広く分布し、沖縄では様々な疾病に対して効果があるとして親しまれている食品素材である。本研究では月桃の根茎から単離した 2 種の化合物の骨芽細胞分化促進活性を評価した。

【方法と結果】マウス頭蓋冠由来 MC3T3-E1 細胞をアスコルビン酸およびβグリセロホスフェートの存在下にて DMSO（コントロール）もしくはサンプルを添加して 7 日間培養後、アルカリホスファターゼ（ALP)活性を評価した。月桃根茎のメタノール抽出物について ALP 活性を指標として分画を行い、活性物質として 5,6-dehydrokawain（DK)と dihydro-5,6-dehydrokawain（DDK)を同定した。単離した DK と DDK は、共に細胞増殖に影響を与えずに ALP 活性を上昇させた。次に上述の条件で 13 日間細胞を培養し、沈着したカルシウムをアリザリンレッド S で染色し定量したところ、DK、DDK 処理ともにカルシウム沈着の上昇を認めた。分化促進効果の高かった DK について上述の条件で 2 日間培養した細胞から全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法にて *Runx2*、*Osterix*、*Dlx5* など骨細胞分化に関与する転写因子の mRNA 発現量を測定したところ、有意な発現上昇を認めた。また同時に *Alpl* や *Bglap* といった分化マーカーの mRNA 発現も有意に上昇した。さらなる作用機序解明にむけて MAPK 経路をウエスタンブロット法で解析したところ、DK 処理により p38 リン酸化レベル上昇および ERK リン酸化レベル低下が観測された。以上の結果から、月桃に含まれる DK は骨芽細胞の分化を促進し骨粗鬆症の予防および治療に有効である可能性が示された。現在、*in vivo* における DK の効果を検証するために卵巣摘出ラットを用いた試験を行っており、その結果も合わせて報告する予定である。

*Alpinia zerumbet*, MC3T3-E1, osteoporosis

発表責任者：熊谷百慶（kumagaim@jfrl.or.jp）

発表番号：2E154
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酒粕ペプチドのアセトアミノフェン誘導肝障害抑制作用

# Hepatoprotective effect of sake lees peptides against acetaminophen induced damage

○川上 賀代子[1]、加藤 春華[1]、垣内 紗恵子[1]、守谷 智恵[1]、藤田 明子[2]、川上 晃司[2]、畑中 唯史[3]、洲崎 悦子[1]、坪井 誠二[1] ([1]就実大薬、[2](株)サタケ、[3]岡山生物研)
○Kayoko KAWAKAMI[1], Haruka KATO[1], Saeko KAKIUCHI[1], Chie MORITANI[1], Akiko FUJITA[2], Koji KAWAKAMI[2], Tadashi HATANAKA[3], Etsuko SUZAKI[1], Seiji TSUBOI[1] ([1]Shujitsu Univ., [2]SATAKE Co., Ltd., [3]RIBS, Okayama)

**【目的】**グルタチオンは生体内で産生される抗酸化物質であり、酸化ストレスに対する防御をはじめ、細胞内の酸化還元状態の制御、毒物や薬物の解毒など様々な生理作用を有している。よって、グルタチオンの細胞内濃度を上昇させることにより、酸化ストレスを軽減し、さまざまな疾病の予防することができると考えられる。これまでに細胞内グルタチオン量上昇作用をもつ食品を検索した結果、酒粕ペプチドに細胞内グルタチオン量上昇作用があることを見出した。アセトアミノフェン（APAP）は解熱鎮痛剤として市販薬にも含まれている成分であるが、過剰に摂取すると肝臓中のグルタチオンが枯渇し、急性肝障害を引き起こすことが分かっている。そこで、マウスを用いて酒粕ペプチドの APAP 誘導肝障害抑制作用について検討した。
**【方法】**雄町米酒粕（室町酒造）をデナチーム AP（ナガセケムテックス）で処理し、遠心分離後に上清を凍結乾燥して酒粕ペプチドを調製した。ヒト肝がん細胞 HepG2 を $1.5\times10^5$ cells/ 6 well plate で播種し、48 時間培養した。その後、酒粕ペプチドを添加し 24 時間後に細胞を回収して、細胞内グルタチオン量を測定した。次に酒粕ペプチドの肝障害抑制作用について検討した。ICR 雄性マウスに 7 日間、酒粕ペプチドを 0、250、500 mg/kg 経口投与した。18 時間絶食後に APAP を 700 mg/kg 腹腔内投与し急性肝障害を誘導した。6 時間後に解剖を行い、血液と肝臓を採取した。肝機能のマーカーである血清 AST、ALT、ALP および LDH と肝臓中のグルタチオン量を測定した。また、肝臓はホルマリンで固定後、HE 染色により病理学的評価を行った。さらに、肝臓中のグルタチオン生合成の律速酵素であるγ-GCS のタンパク発現量をウエスタンブロッティングを用いて検出した。
**【結果】**HepG2 細胞内グルタチオン量は、酒粕ペプチドを添加することにより濃度依存的に上昇し、終濃度 20 mg/ml でコントロールに比べ 1.9 倍に有意に上昇した。マウスに APAP を腹腔内投与することにより、血清中の AST、ALT、ALP および LDH は有意に上昇し、肝臓中のグルタチオン量は顕著に減少していた。一方、酒粕ペプチドを摂取することにより、血清中の AST、ALT、ALP および LDH の上昇が有意に抑制された。また、肝臓中のグルタチオン量は APAP 投与群と比較して、酒粕ペプチド摂取群では有意に上昇していた。さらに、酒粕ペプチドの摂取により中心静脈周囲の肝細胞の壊死の抑制がみられた。次に、グルタチオン合成の律速酵素であるγ-GCS の発現量を調べたところ、酒粕ペプチド摂取によりγ-GCS 発現の誘導が見られた。以上の結果から、酒粕ペプチドは肝細胞内グルタチオンを上昇させることにより APAP 誘導肝障害の抑制作用を示すことが示唆された。

glutathione, sake lees, hepatoprotective effect

発表番号：2E155
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小麦ふすまの短期摂取による腸内環境の変化に関する機能性解析

# Effect of short term intake of wheat bran on mouse intestinal environment.

○岩井 克機[1]、吉川 悠子[1]、三好 規之[1]、大橋 典男[1]、福富 竜太[2]、浅田 憲一[2]([1]静岡県立大食品栄養、[2]日清ファルマ株式会社)
○KATSUKI IWAI[1], YUKO YOSHIKAWA[1], NORIYUKI MIYOSHI[1], NORIO OHASHI[1], RYUTA HUKUTOMI[2], KENICHI ASADA[2] ([1]Univ.Shizuoka, [2]Nisshin Pharma Inc.)

【目的】小麦の製粉過程の副産物である小麦ふすまは、豊富な食物繊維やミネラルを含むことから有効活用が望まれているが、独特の食味が好まれず、あまり利用されていないのが現状である。また、小麦ふすまの機能性についても不明な点が多い。そこで本研究では、小麦ふすまの機能性について、食味の改善も視野に入れ、異なる粒径を有する小麦ふすまの短期間かつ反復摂取による腸内環境への影響を調べた。

【方法】8 週齢の雄性 Balb/c マウスに普通食(AIN-93G)と小麦ふすま試験食(AIN-93G の食物繊維を等量の食物繊維を含む小麦ふすまで置換したもの)を 1 週間ずつ交互に与え、これを 2 回繰り返し、計 4 週間の飼育を行った。小麦ふすまは平均粒径 53 μm(粉食群:n = 5)と平均粒径 350 μm(粒食群:n = 6)の 2 種類を用い、コントロール(普通食群:n = 5)には AIN-93G のみ与えた。各週の摂餌 6 日目に糞便を採取し、GC/MS により短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)量を測定した。また、各週の摂餌最終日に採取した糞便から DNA を抽出し、腸内細菌叢の構成細菌について 16S rDNA を標的としたメタゲノム解析を行った。さらに、4 週間の試験最終日にマウスから結腸および盲腸を採取し、結腸での GLP-1 の発現と盲腸内容物中の分泌型 IgA 量を測定した。

【結果および考察】小麦ふすま摂取群では、いずれの粒径においても試験食摂取後の糞便中の短鎖脂肪酸量が増加し、その後、普通食に変更すると試験食摂取前と同程度まで減少することが判った。特に、酪酸産生量においては、粉食群は粒食群と比べても有意な増加が見られた。また、腸内細菌叢のメタゲノム解析から、両粒径の小麦ふすま摂取群において、Phylum(門)レベルでは Bacteroidetes 門の割合が増加し、Family(科)レベルでは Bacteroidetes 門の S24-7 および Prevotellaceae 科の割合が増加していた。さらに、試験最終日における結腸中の GLP-1 の発現量は、小麦ふすま摂取により増加する傾向が見られ、盲腸内容物中の IgA 量は、小麦ふすま摂取群で増加傾向にあり、特に粉食群では有意に増加した。これらの結果から、小麦ふすまを粉砕したことで Prevotellaceae 科に属する酪酸産生菌の食物繊維の利用が向上し、粉食群での酪酸産生量が有意に増加したことが考えられ、その短鎖脂肪酸量の増加により、結腸における GLP-1 発現および盲腸での IgA 産生が誘導されたものと推測された。さらに、小麦ふすま摂取群では体重増加の抑制傾向もみられ、腸内細菌叢の変化とともに、肥満マウスのカロリー制限時の変化と類似していることが判った。以上、本研究により小麦ふすまの新たな機能性が明らかとなったと考える。

food fiber, intestinal flora, short fatty acid

発表責任者：岩井克機（s15207@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2E156
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ニコチアナミンの定量方法の検討と沖縄県産植物のニコチアナミン定量評価

# A Study of Quantitative Determination Method of Nicotianamine and Analysis of Nicotianamine Contents among Okinawan plants

○長嶺 伸、高良 健作、和田 浩二 (琉大農)
○Shin NAGAMINE, Kensaku TAKARA, Kouji WADA (Ryukyu Univ.)

【目的】ニコチアナミン（NA）は非タンパク性アミノ酸で、植物体内で鉄や亜鉛、マンガンなどの金属輸送体として機能するとされている。一方で NA にはアンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性を有し、ヒトで血圧上昇抑制効果が期待されていることから、本研究では食用植物全般の網羅的定量を試みた。NA 定量法は一般にアミノ酸分析システムや LC-MS を用いた例があるが、迅速かつ汎用性のある定量方法ではない。そこで本研究ではハイスループットな NA 定量法による野菜や果物の NA 含有量を調べた。

【方法】NA を 9-fluorenyl methoxycarboxyl chloride(FMOC-Cl)で蛍光ラベル化するプレカラム法を採用した。本法は市販 NA 標品（Toronto Research Chemicals）を用いて検量線を作成する外部標準法で定量した。分析に使用した野菜および果物は直売所で購入し、速やかに実験に用いた。材料は水で適当な希釈量となるように加えホモジナイズし、逆相カートリッジに通液した後の一部を pH8 のホウ酸緩衝液中で FMOC-Cl と 60℃で反応後蛍光ラベル体とし、この濃度を HPLC で分析した。

【結果】 HPLC の条件を最適化した結果、NA 蛍光誘導体は溶出時間 12.2 分付近に良好なピークとして得られ、1 サンプルあたりの分析時間は 30 分で完了できた。市販の NA 標品 0.1μg/ml から 20μg/ml の範囲内で検量線を作成したところ、$R^2$＝0.9936 の良好な直線関係が得られた。検出限界は 0.14μg/ml、定量限界は 0.22μg/ml となった。このときの NA 20μg/ml を用いた繰り返し実験（n=4）を行ったところ平均に対する相対標準偏差は 0.041%であった。さらにインゲンマメ抽出試料に 1μg/ml、2μg/ml および 5μg/ml の NA をそれぞれ添加した場合の添加回収率を求めたところ 84.1～108.0%であった。本法により野菜、果物（52 品目；92 サンプル）を材料に NA 定量を行なったところ 48 品目；86 サンプルで NA を検出した。生鮮重量 1g あたりの NA 量はインゲン(種子;180.04μg/g)、インゲン(ビックリジャンボ種子;160.56μg/g)、ナタマメ(種子;152.03μg/g)、カボチャ(外皮;117.44μg/g)、カボチャ(種子;114.22μg/g)の順で高かった。マメ科(5 品目;10 サンプル)では全ての品目でサヤより種子の NA 量が高かった。一方、部位別で定量したウリ科 6 品目では、種子が高いタイプと、果髄が高いタイプも見られた。現在、更なる野菜・果物の NA 定量を継続している。

nicotianamine

発表番号：2E157
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# オリーブ葉が養殖ブリの肉タンパク質に与える影響

# Effect of olive leaf on protein in yellowtail meat

○日比 光磨[1]、二宮 成美[1]、野崎 智絵[1]、赤澤 隆志[1]、吉田 大地[1]、早川 茂[1]、小川 雅廣[1]、大山 憲一[2]（[1]香川大農、[2]香川県水産試験場）
○Koma HIBI[1], Narumi NINOMIYA[1], Chie NOZAKI[1], Takashi AKAZAWA[1], Daichi YOSHIDA[1], Shigeru HAYAKAWA[1], Masahiro OGAWA[1], Kenichi OYAMA[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Kagawa Prefectural Fisheries Experimental Station)

【目的】オリーブ葉の乾燥粉末を 2%含む飼料で養殖したブリが香川県の特産品として生産され、年々出荷量を伸ばしている。オリーブ葉給餌ブリは、オリーブ葉を与えていないブリと比べて、脂濃さが少なくさっぱりとした味わいであることや血合筋の褐変が抑制されるといった特長をもち、オリーブ葉給餌による肉質の改善効果が示されている。オリーブ葉に多量に含まれるオレウロペイン等のポリフェノール（PP）が血合筋中でミオグロビンの酸化を防止することで、褐変が抑制されていると考えられている。しかし、それ以外についての知見は少なく、特にブリの肉組織に関する科学的評価は不足している。肉質の良さは歯ごたえの強さが重要な因子であり、その歯ごたえに結合組織や筋原線維が大きく関わっている。そこで、本研究ではオリーブ葉給餌ブリのコラーゲンや筋原線維タンパク質の性状について調べた。
【方法】全長 63.0～69.5 cm、体重 3.18～4.74 kg のオリーブ葉給餌ブリ（3 個体）とオリーブ葉を与えていないブリ（3 個体）を海上生簀から捕獲し、船上で即殺した後、3 枚に下ろし、腹肉普通筋を採取した。筋肉からのコラーゲンは佐藤らの方法[1)]（1986）により抽出した。筋原線維は Yang らの方法[2)]（1970）を改変した方法で調製した。酸可溶性コラーゲンはシリウスレッドを用いて、筋原線維タンパク質はビューレット法を用いて定量した。
【結果】オリーブ葉を添加した試験区のブリは対照区と比較して、普通筋の酸可溶性コラーゲン量が有意に高いことが分かった。一方、筋原線維量に関しては、試験区と対照区で有意な差は見られなかった。このことから、オリーブ葉は、筋原線維よりも結合組織に影響を及ぼしていることが示唆された。オリーブ葉によるコラーゲン遺伝子発現やコラーゲナーゼ等のプロテアーゼ活性への影響を報告する予定である。

1) K. Sato, R. Yoshinaka, M. Sato and S. Ikeda: Bulletin of Japanese Society of Scientific Fisheries, **52**, 889-893 (1986).
2) R. Yang, A. Okitani and M. Fujimaki: Agricultural and Biological Chemistry, **34**, 1765-1772 (1970).

Olive, Yellowtail, Polyphenol

発表責任者：日比光磨（maukobihiuma@yahoo.co.jp）

発表番号：2E158
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ケルセチン配糖体代謝物の新規タグフリープローブの開発

# Development of a tag-free probe for detecting molecular targets of quercetin catabolites

○中島 清花、劉 哲、山口 佑也、齋木 俊也、中村 俊之、宗正 晋太郎、村田 芳行、中村 宜督（岡山大学院・環境生命）
○ SAYAKA NAKASHIMA, ZHE LIU, YUYA YAMAGUCHI, SHUNYA SAIKI, TOSHIYUKI NAKAMURA, SHINTARO MUNEMASA, YOSHIYUKI MURATA, YOSHIMASA NAKAMURA (Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)

【目的】Quercetin は植物に遍在するフラボノイドの一つであり、植物中では主に配糖体として存在する。Quercetin-4′-glucoside (Q4′G) はタマネギに存在する quercetin 配糖体の一つであり、近年その機能性に注目が集まっている。Q4′G の一部は小腸で吸収されるが、未吸収のまま大腸に到達した Q4′G は、腸内細菌叢によって、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、protocatechuic acid などの分裂代謝物へと変換されて吸収される。我々はこれまでに、1) DOPAC の第二相薬物代謝酵素誘導活性は Q4′G 代謝物の中で最も強力であること、2) DOPAC は求電子性物質への酸化的変換を介してタンパク質の SH 基を修飾すること、を明らかにしてきた。そこで本研究は、DOPAC 標的タンパク質の同定を目的として、DOPAC の新規タグフリープローブを開発し、その有用性を評価した。
【方法・結果】本研究ではアルキンとアジドの特異的結合反応である、copper(I)-catalyzed azide alkyne cycloaddition (CuAAC) 反応を利用した、いわゆる “click chemistry” プローブを設計した。DOPAC へのアルキル基の導入は、フィッシャーエステル化法による DOPAC と 2-propyn-1-ol の縮合により行った。合成した DOPAC propalgyl ester (DPE) のタンパク質 SH 基修飾作用、第二相薬物代謝酵素誘導作用を評価した結果、DOPAC と同等であることを確認した。続いて、培養細胞（マウス肝がん細胞 Hepa1c1c7）に DPE 処理を施し、細胞内に蓄積した DOPAC 修飾タンパク質の検出を行った。細胞からタンパク質を抽出し、CuAAC 反応による DPE 修飾タンパク質のビオチンラベル化、電気泳動を行った後、標識ストレプトアビジンビオチン (LSAB) 法を用いて検出したところ、様々な分子量の DPE 修飾タンパク質が確認された。また、DPE 修飾タンパク質の生成は、DOPAC との共処理により抑制されたことから、DPE が DOPAC と同一のタンパク質を標的とすることが示唆された。現在、DOPAC 標的タンパク質同定を目指して研究を進めている。

quercetin glucoside, molecular probe, click chemistry

発表責任者：中島清花（ag422064@s.okayama-u.ac.jp）

発表番号：2E159
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# マウス行動学実験に基づいたレバウディオサイド A の甘味増強作用評価

# Estimation of sweet enhancing effects of rebaudioside A by the mice ethological method.

○河合 崇行、日下部 裕子（農研機構　食品総合研究所）
○Takayuki KAWAI, YUKO KUSAKABE (NFRI, NARO)

レバウディオサイドはキク科植物“ステビア”に含まれるステビオール配糖体であり、甘味度 40-500 の甘味成分である。時間に対する甘味強度特徴が砂糖に似ているため、砂糖の代替物甘味料として使われてきている。演者は、マウスの行動学に基づいた研究手法により、甘味の強さを客観的に評価する研究を報告してきた。本研究では、レバウディオサイドと従来の甘味料を組み合わせて使った場合に、相乗作用などの増強効果が見られるかどうかを検討した。
濃度の異なる甘味溶液を用意し、それぞれにレバウディオサイド A（Sigma 社製）を 0.001~0.01%加えた混合液を用意し、マウスに 10 秒ずつ呈示した。10 秒間にサンプル溶液を舐めた回数を測定することにより、マウスが感じている甘味強度を推定した。マウスの甘味受容体を発現した細胞による応答実験では、0.1%レバウディオサイドは、3mM アセスルファム K の半分程度の反応性を示す。しかし、行動学実験においては、レバウディオサイド単独溶液を呈示した場合、0.2%以下では水呈示の場合と行動量に差は認めれなかった。今回添加した量は、その 10 分の 1 以下濃度である。アセスルファム K にレバウディオサイドを添加した場合には、0.001%添加により 1.01 倍、0.01%添加により 1.90 倍の甘味増強を引き起こしていることが分かった。スクラロースにレバウディオサイドを添加した場合には、0.001%添加により 1.07 倍、0.01%添加により 2.43 倍の甘味増強を、スクロースにレバウディオサイドを添加した場合には、0.001%添加により 1.18 倍、0.01%添加により 1.81 倍の甘味増強を引き起こしていることが分かった。
ヒトの甘味受容体を発現した細胞による応答実験では、0.1%レバウディオサイドは、3mM アセスルファム K と同程度の反応性を示す。ヒトにおいても、レバウディオサイド添加による相加効果以上の甘味増強作用が起こっているものを推察される。

taste, sweet, rebaudioside

発表責任者：河合　崇行（gust@affrc.go.jp）

発表番号：2E160
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 疑似スズメバチ幼虫由来アミノ酸混合溶液投与による肝臓および脂肪組織におけるトランスクリプトームの協調調節

# Coordinated regulation of hepatic and adipose tissue transcriptomes by the oral administration of an amino acid mixture simulating the larval saliva of *Vespa* species

○篠崎 文夏[1]、阿部 岳[2]、亀井 飛鳥[1]、渡部 由貴[1]、安岡 顕人[1]、嶋田 耕育[1]、近藤 香[1]、荒井 綜一[1,3]、熊谷 弘太[4]、近藤 隆[1]、阿部 啓子[1,5]（[1]神奈川科学技術アカデミー、[2]Hornet Research Center、[3]東農大総研、[4]協和発酵バイオ、[5]東大院農生科・応生化）

○Fumika SHINOZAKI[1], Takashi ABE[2], Asuka KAMEI[1], Yuki WATANABE[1], Akihito YASUOKA[1], Kosuke SHIMADA[1], Kaori KONDO[1], Soichi ARAI[1,3], Kota KUMAGAI[4], Takashi KONDO[1], Keiko ABE[1,5] ([1]KAST, [2]Hornet Research Center, [3]Tokyo Univ of Agri, [4]KYOWA HAKKO BIO., LTD, [5]The Univ of Tokyo)

【目的】近年、アミノ酸は肥満をはじめとするメタボリックシンドロームの改善や健康維持に役立つサプリメントとして活用されている。しかしながら、アミノ酸は基本的に食物から摂取可能であることから投与したアミノ酸の通常時の機能を検出しがたく、運動時や病態モデルなどで検証される場合が多い。スズメバチ(*Vespa*)幼虫が分泌する栄養液に含まれる特異な組成のアミノ酸混合液 VAAM は、他の組成のアミノ酸混合液よりも効果的に運動時の持久力を向上させる。また、単離脂肪細胞において VAAM はカテコールアミンなどの刺激物の非存在下で中性脂肪の分解を惹起すると報告されていることから、特に刺激がない条件においても何らかの機能を発揮すると推測された。本研究は刺激の少ない平常時の VAAM の作用を検証することを目的として行った。

【方法】動物はマウス(ddY、雄、5 週齢)を用い、通常飼料および水を自由摂取させ、脱イオン水もしくは VAAM をそれぞれ 1 日 1 回の合計 5 回、胃ゾンデを用いて経口投与した。VAAM の対比アミノ酸混合液としてはカゼイン組成のアミノ酸混合液(CAAM)を投与した。アミノ酸溶液投与 4 時間後に肝臓、白色脂肪組織（WAT）および褐色脂肪組織（BAT）を摘出し、DNA マイクロアレイ解析を行った。

【結果】VAAM および CAAM 投与群と脱イオン水投与群を比較し、それぞれの変動遺伝子を抽出したところ、いずれの組織においても VAAM と CAAM に共通して変動する遺伝子よりもそれぞれに特異的な遺伝子変動の方が多く、アミノ酸組成比によって変動遺伝子は大きく異なることが明らかとなった。次に VAAM 特異的に変動した遺伝子ついて Gene Ontology に基づいた機能的解析を行った。その結果、肝臓では糖や脂質に関連する代謝系、WAT では細胞接着分子、脂肪酸代謝、BAT では制御に関連が多く変動していた。パスウェイ解析結果からは肝臓では解糖、脂質酸化が低下し、糖原生アミノ酸利用等が上昇、WAT ではリン脂質合成が上昇すると考えられた。また、変動遺伝子の上流因子解析では 3 組織に共通して活性化されているであろう因子が 1 個、2 組織に共通するものが複数あった。

以上の結果から、VAAM 摂取は特に刺激がない平常時でも様々な組織の遺伝子発現に影響することが明らかとなった。平常時の VAAM 摂取で肝臓では糖原生のアミノ酸利用が活性化し、WAT では脂肪酸は中性脂肪よりもリン脂質に変換される可能性があり、BAT に対する影響は少ないと示唆された。上流因子解析の結果は VAAM 摂取時に複数のシグナル因子が介在することを示唆し、VAAM の代謝に対する作用機序理解への一助となると考えられた。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

amino acids mixture, transcriptome, mice

発表番号：2E161
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# エピガロカテキンガレートとケルセチン含有食のマウス血清コレステロール値に及ぼす影響

# Influence of epigallocatechin gallate and quercetin contained diet on serum cholesterol value in mice.

○八巻 幸二、高橋 陽子（農研機構食総研）
○Kohji YAMAKI, Yoko TAKAHASHI (NFRI)

［背景・目的］

日常生活で摂取される機会の多いエピガロカテキンガレート(EGCG)とケルセチン(QU)はその健康効果が期待されているが、比較的長期間の摂取やその複合効果に関する資料は少ない。そこでこれらのフラボノイドを単独であるいは複合でマウスに摂取させ、健康に関するパラメータ特にコレステロールに関する値を測定した。

［実験方法］

C57BL/6J の雄性マウスに、EGCG 添加食、QU 添加食、それらの混合食で 4 週間飼育した。飼育終了後、血液を採取し、コレステロールに関する各種パラメータ（総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール）を測定した。

［結果・考察］

EGCG 単独食（含量 0.01-1.0%）で飼育したマウスは、最終体重では用量依存的な低下を示したが、有意な差ではなく、その減少は 1%食でも-5.5%であり、ほとんど無視できる範囲と思われた。同時に肝臓重量を測定した結果では、重量の減少は全くなかった。QU 単独食（含量 0.01-1.0%）では、最終体重は、有意な変化はかったが、1%含有食で２％程度の増加が認められた。また同時に肝臓重量を測定した結果では、1.0%含有食で、有意な重量の増加が確認された。総コレステロール値に関しては、EGCG 単独摂取ではほとんど変化は確認されず、QU 単独摂取では 0.1%摂取群で約 11％の上昇があったが、有意ではなかった。HDL の結果は、単独摂取群ではほとんど変化はなかったが、LDL は高い用量で有意ではないが上昇傾向を示した。その結果、動脈硬化指数（AI）を計算すると上昇傾向が認められた。そこで、コレステロールに関してこれらの複合効果を 0.03%と 0.1%含有食で再度検討した結果、0.03%含有複合食で、有意な AI 値の低下が確認された。このことは EGCG と QU の複合効果でより低い用量で動脈硬化を予防できる可能性を示唆する結果であった。以上の結果より、単独では効果の少ない２つのフラボノイドを併用すると、より予防効果が期待できると推察される。

flavonoid, cholesterol

発表番号：2E162
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# タモギダケ由来グルコシルセラミドの皮膚機能性評価

# The skin functionality of Tamogi-take Mushroom glucocylceramide

○鈴木 健[1,5]、関口 博太[2,6]、酒井 祥太[3]、高橋 環奈[1,5]、松本 聡[2]、勝又 亮祥[4]、五十嵐 靖之[3]（[1]日生バイオ株式会社、[2] 株式会社エル・エスコーポレーション、[3] 北海道大学先端生命科学研究院、[4]株式会社エクサム、[5]NPO 法人遺伝子栄養学研究所、[6] 株式会社ライフサイエンス研究所）
○TAKESHI SUZUKI[1,5], HIROTAKA SEKIGUCHI[2,6], SHOTA SAKAI[3], KANNA TAKAHASHI[1,5], SATOSHI MATSUMOTO[2], RYOSHOU KATSUMATA[4], YASUYUKI IGARASHI[3] ([1]Nissei Bio Company, [2]L・S corporation, [3]Hokkaido University, [4]EXAM CO.,LTD, [5]Gene Trophology Institute, [6]Life Science Institute Co. Ltd)

【目的】タモギダケ由来グルコシルセラミドの皮膚に対する機能性評価を目的に 3 次元ヒト皮膚モデルを用いた角質バリア改善効果試験及びヒトモニター経口摂取による肌質改善効果の評価（保湿効果改善を主とした検討及び安全性の確認）の試験を実施した。
【方法】3 次元ヒト皮膚モデル試験：人工コラーゲン線維ゲル上培養法、気−液界面培養法によりヒト正常線維芽細胞（NHDF）とヒト正常角化細胞（NHEK）の細胞シート 2 層からなる真皮−表皮の 3 次元ヒト皮膚モデルを作成した。人工胃液腸液処理を行ったタモギダケ由来グルコシルセラミド素材の上清を 3 次元ヒト皮膚モデルの下部培地に添加した。2 日後に 3 次元ヒト皮膚モデルを回収し、ヒトセラミド組成解析を HPLC 分析で行った。
ヒトモニター試験：33 名の被験者（女性　40～65 歳）に、タモギダケ由来セミラド含有ドリンク 1 本（グルコシルセラミド 0.6mg 含有）を 1 日 1 回夕食後に 12 週間摂取させた。被験者には摂取期間中、試験品の摂取時間、自覚症状および生活習慣について毎日日誌を記入させた。摂取開始日(0 週)、6 週目および 12 週目に、医師診察・肌質測定（水分、蒸散、弾力、マイクロスコープ、ＶＩＳＩＡ）・臨床検査（血液・尿）等の検査を行った。
【結果・考察】
3 次元ヒト皮膚モデル試験：角質層に存在し、角質バリア機能の重要な因子である極長鎖脂肪酸セラミド量（C24−C30）が増加し、タモギダケ由来グルコシルセラミド素材の角質バリア改善機能が示唆された。
ヒトモニター試験： VISIA 紫外線シミスコアが 6 週目および 12 週目で有意に減少した。試験品摂取により産生されたメラニンあるいは蓄積したメラニンの排出が促された結果である可能性が考えられた。マイクロスコープにおけるキメ評価でも、6 週目および 12 週目で摂取開始日と比較しキメが整う方向に推移していることから、乱れていた皮膚ターンオーバーを正常な皮膚ターンオーバーに戻す作用があるのではないかと考えられた。角質水分量は、前腕内側部において 12 週目に増加することが認められた。自覚アンケートにおいて、本試験品摂取による体質改善質問項目（むくみ・疲労感等）において、摂取開始日と比較し変化が認められなかったが、肌質は改善している実感を被験者はもっている結果であった。以上の結果、タモギダケグルコシルセラミド素材は、摂取での安全性に問題なく、肌質改善有効性では乱れた皮膚ターンオーバーを整える作用があるものと考えられた。

glucocylceramide, Tamogi-take Mushroom, skin

発表番号：2E163
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 緑茶に含まれる機能性関与成分エピガロカテキンガレート（EGCG)による LDL コレステロール値の低下の機能に関する研究レビュー

# The systematic review of green tea epigallocatechin gallate (EGCG) on lowering LDL cholesterol

○百瀬 祐子、山本 万里、鍋谷 浩志（農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)
○ Yuko MOMOSE, Mari YAMAMOTO, Hiroshi Nabetani (National Agriculture and Food REsearch Organization National Food Research Institute)

エピガロカテキンガレート（EGCG）は、緑茶に最も多く含まれるカテキンであり、LDL コレステロール値を低下させることが報告されているが、これらの報告には、LDL コレステロール値の軽症域を超えるもの、病者、投薬患者なども含まれており、対象者を健常者から LDL コレステロール値軽症域まで絞ったヒト介入試験の研究レビューは確認できなかった。そこで、健常者及び LDL コレステロール値が境界域から軽症域までの者において、緑茶に含まれる EGCG の継続的な摂取が、対照群と比較して LDL コレステロール値を低下させるかを検証するため、定性的研究レビューを実施した。
リサーチクエスチョン「健常者及び LDL コレステロール値が境界域から軽症域までの者において、緑茶に含まれる EGCG の継続的な摂取は、対照群と比較して LDL コレステロール値を低下させるか？」に基づいて、3 つのデータベース（PubMed、JDreamⅢ、医中誌 Web）よりヒト介入試験の文献検索を実施し、検索により特定された文献のうち、対象者を未成年者、妊産婦、授乳婦は除く健常者及び LDL コレステロール値が境界域から軽症域までの者で、肥満度 1 以上の方を含まない（概ね BMI 値が 25 未満)、特定保健用食品のヒト試験対象者の範囲である LDL コレステロール値が境界域（120 mg/dl ～139 mg/dl）から軽症域（140 mg/dl ～159 mg/dl）まで、血中中性脂肪は正常高値域からやや高め（120 mg/dl ～199 mg/dl）までとし、試験期間は 2 週間以上、さらに適格基準に基づいて採用文献を選別した後、「研究の質の評価」研究レベル精査し、一定の基準以上であるものを採用条件とした。
「結果」適格基準に合致した 7 報の文献を採用した。7 報の文献のうち質が中～高の高いものが 6 報あった。肯定的な「効果あり」文献は 5 報で、1 報は健常者、3 報が境界域者、1 報が軽症域者を対象としたもので、「効果なし」の 2 報はいずれも対象者が健常者であった。このことから緑茶由来 EGCG 135.4mg/日以上の摂取により、健常者及び LDL コレステロール値が境界域から軽症域までの者において、LDL コレステロール値を低下させることが示唆された。2013 年度より実施されている独理行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構「機能性食品開発プロジェクト」における研究レビュープロトコールに従い、5 名の学識経験者からなる農林水産物の機能性評価委員会がエビデンスの強さを評価した結果は、【科学的根拠レベル総合評価】: B、【「研究タイプ、質、数」の目安】: B、【一貫性の目安】: B であった。
「結論」緑茶由来 EGCG　135.4mg～498.6mg/日の 4～12 週間の継続的な摂取は、「LDL コレステロール値を低下させる」機能を有すると考えられた。

epigallocatechin gallate (EGCG), LDL sholesterol

発表番号：2E164
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# A very low carbohydrate ketogenic diet increases hepatic glycosphingolipids related to regulation of insulin signaling

○Tetsuya OKUDA, Naoki MORITA (AIST)

Gangliosides, a class of acidic glycosphingolipids, were recently identified as a novel modulator involved in the regulation of cellular insulin signaling. We report here that a low carbohydrate ketogenic diet (KD) increases hepatic gangliosides in mice. KD produces several ameliorating effects against metabolic abnormalities found in obese (*ob/ob*) mice. We found that the *ob/ob* mice had low liver ganglioside content, whereas feeding KD increased this to approximately equivalent levels observed in wild-type mice. On the other hand, feeding KD specifically increased insulin resistance-related monosialoganglioside GM3 in wild-type mice. These results indicate that KD improves the low level expression of gangliosides in *ob/ob* mouse liver, but provokes abnormal increases of GM3 in normal liver. This work revealed novel aspects of safe use of KD for both healthy individuals and obese patients.

Low carbohydrate diet, Insulin signaling, Glycosphingolipid

発表番号：2E165
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 短時間吸水小麦のアミラーゼ類およびグルテン形成タンパク質に関わる遺伝子の発現変動

# Changes in expression of genes encoding amylases and gluten-forming after short-term imbibition of wheat

○胡 雪亭[1]、田村 倫子[1]、阿久澤 さゆり[1]、荒井 綜一[2]、村 清司[1]([1]東農大応生科・栄養、[2]東農大総研)
○Setuteyi KO[1], Tomoko TAMURA[1], Sayuri AKUZAWA[1], Souyichi ARAYI[2], Kiyoshi MURA[1]([1]Tokyo Univ. of Agri., [2]Tokyo Univ. of Agri. Research Institute)

**【目的】**小麦種子を吸水させると、種子の代謝が急激に変動し、食品としての機能性が変化する。我々は 2013 年度大会で、小麦を吸水させるとγ-アミノ酪酸が増加する一方で加工特性は低下することを報告した。また、吸水小麦のトランスクリプトーム解析により吸水 16－24 時間にタンパク質の分解と糖の代謝が大きく変化することも示唆した。本大会では、物性が損なわれずに食品の機能性が向上した小麦加工食品を得ることを目指し、吸水後の amylase および gluten 形成タンパク質の遺伝子発現変動および活性を明らかにすることを目的とした。また、機能性成分に関わる遺伝子の発現変動も調べた。**【方法】**小麦（農林 61 号）を 25℃、恒暗条件下において、湿潤した脱脂綿上で吸水させた。吸水後 0、8、16、24、32、40、48 時間の種子を試料とした。全 RNA は小麦の胚から QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit を用いて抽出し、cDNA を合成した後、α-amylase、β-amylase、limit dextrinase、α-gliadin、γ-gliadin、glutenin、ferritin、agglutinin の RT-PCR を行った。α-amylase 活性はキッコーマンバイオケミファの合成基質 N3-G5-β-CNP を用いて測定し、β-amylase 活性と limit dextrinase 活性は Megazyme 社の BETAMYL-3 および limit dextrizyme を用いて測定した。また amylase の組織における発現を明らかにするため、*in situ* hybridization を行った。Gluten は、吸水させた小麦から小麦粉を作製した後に得て、タンパク質量は Pierce BCA Protein Assay Kit を用いて測定した。
**【結果・考察】**α-Amylase の mRNA は吸水後 24 時間までは大きな変動がなく、それ以降大きく増加した。活性は 24 時間から徐々に増加した。一方、β-amylase の mRNA は吸水後徐々に増加し、32 時間で最大になったが、活性は吸水 48 時間まで一定であった。Limit dextrinase の遺伝子発現は吸水を通して一定であり、活性も変動がなかったが、吸水 48 時間トルで初めて活性が増加した。組織においてはどの糖質分解酵素も同一の細胞に発現したが、吸水前は胚全体とアリューロン層に局在したのに対し、吸水 16 時間以降は胚盤とアリューロン層に局在した。Gluten タンパクの量と gluten 形成タンパク質をコードする遺伝子の発現量は 0、16、24 時間で変化なかった。鉄イオンを吸着するタンパク質で貧血予防に用いられる ferritin 1 をコードする遺伝子発現は吸水 16 時間までは一定であったが、24 時間で有意に低下した。一方、小麦のアレルゲンとして知られる agglutinin をコードする遺伝子は、吸水 16 時間で有意に減少した。以上の結果から、吸水により変動するものは貯蔵タンパク質というよりむしろ糖質分解酵素の発現と活性であることを示唆した。また加工面では、gluten の形成に影響がなく、機能性が向上する吸水 16 時間が有効であると考えられる。

wheat, short-term imbibition, amylase

発表番号：2E166
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 水溶性食物繊維であるイヌリンの整腸効果に関するシステマティックレビュー
# Systematic review for inulin on bifidogenic effect

○原 健二郎[1]、和田 正[1]、辻 修一[2]、磯村 達也[3]、近藤 文[4]、鈴木 貞夫[4]、若林 敬二[2]([1]フジ日本精糖、[2]静岡県大院食環、[3]CLINICAL STUDY SUPPORT、[4]名市大院医)
○Kenjirou HARA[1], Tadasi WADA[1], Shuichi TUJI[2], Tatuya ISOMURA[3], Fumi KONDOU[4], Sadao SUZUKI[4], Keiji WAKABAYASHI[2] ([1]Fuji nihon seito, [2]Univ. Shizuoka, [3]CLINICAL STUDY SUPPORT, [4]Nagoya City Univ.)

背景・目的：水溶性食物繊維であるイヌリンはヒトでの臨床試験において様々な生理機能性が報告されているが、その中でも特に整腸効果に関する研究報告が多い。これは、イヌリンが腸内発酵性に優れ、ビフィズス菌や乳酸菌などの善玉菌によく利用されることにより腸内環境を整えるためであると考えられる。これらのことから、イヌリンはヒトに対し整腸効果が有ることが示唆される。本研究では、イヌリンの整腸効果に関する臨床研究を網羅的に検索し、これまでの研究結果を統合することで、総合的な観点からイヌリンに整腸効果があるかどうかを評価した。また、本研究は、今年度より始まった機能性表示食品制度にイヌリンが対応可能かどうかを検証するために実施した。

方法：本研究では、網羅的、総合的に評価するシステマティックレビュー（以下、SR）により評価した。リサーチクエスチョンは「イヌリンは整腸効果を持つか？」とし、PICO を P(Patient)：健常成人、I(Intervention)：イヌリンの経口摂取、C(Comparison)：プラセボ、O(Outcome)：整腸効果、のように設定した。上記 PICO を元に検索式と除外基準を立案し、Pubmed、CENTRAL、医中誌を用い論文を検索した。検索した文献は、除外基準により採用文献と除外文献に選別し、採用文献から PICO に対応した項目の情報を抽出した。採用文献について研究の質ならびに非直接性などを評価し、文献全体に対してエビデンス総体を評価した。

結果：検索により 71 件の文献を特定後、除外基準による選択と研究の質を評価した結果、定性評価できる論文は 22 報であった。このうち、肯定的な論文は 20 報であった。評価指標別の結果としては、ビフィズス菌数増加効果、βグルクロニダーゼ活性を低下させる効果は「機能性について明確で十分な根拠がある」、乳酸菌数増加効果、排便習慣改善効果は「機能性について肯定的な根拠がある」であった。また、今回のレビューでは 4-34g/日の用量が使用されていたが、この容量の範囲ではいずれの用量でも有効性が示されており、安全性に問題は認められなかった。

結論：評価に供した論文の多くがイヌリンによる腸内環境改善を示すものであったことから、総合的な観点で、イヌリンには整腸効果に関して肯定的な科学的根拠があると判断した。以上のことから、イヌリンは今年度よりスタートした機能性表示食品制度へ対応可能な素材であることが示唆された。

inulin, systematic review, bifidogenic

発表責任者：原　健二郎（kenjirou.hara@fnsugar.co.jp）

発表番号：2E167
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 持久性運動後におけるラットへのイソマルチュロース投与が筋グリコーゲン量に及ぼす影響
# Effect of isomaltulose on muscle glycogen contents after the endurance exercise in rats.

○石川 修平[1]、笹川 克己[1]、櫻井 美仁[2]、能見 祐理[2]、越中 敬一[3]、佐藤 眞治[2] ([1]ブルボン健康科学研、[2]新潟薬大応生、[3]新潟医療福祉大健康科学)
○ Shuhei ISHIKAWA[1], Katsumi SASAGAWA[1], Misato SAKURAI[2], Yuri NOMI[2], Keiichi KOSHINAKA[3], Shinji SATO[2] ([1]Bourbon Institutes of Health, [2]NUPALS, [3]NUHW)

【背景/目的】グリコーゲンは運動時の重要なエネルギー源であり、運動前に骨格筋中にグリコーゲンを多く蓄積させることが運動パフォーマンスの向上につながると考えられている。インスリンはグリコーゲン合成を促進することによりグリコーゲン蓄積に寄与することが知られているが、スクロースの構造異性体であるイソマルチュロース(6-*O*-D-glucopyranosyl-D-fructose)はゆっくりと消化、吸収されるため、急激な血糖値の上昇を引き起こさず、インスリン分泌が少ない。そこで本研究では、インスリン低刺激性の糖質であるイソマルチュロースが持久性運動後の筋グリコーゲン蓄積に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】 Wistar 系雄性ラットを、非運動群、運動群、運動－スクロース群、運動－イソマルチュロース群の 4 群に分けた。全群に 10 日間のトレッドミル走行練習を課し、11 日目に非運動群以外のラットに自走不能になるまでトレッドミル走（25m/分、斜度 0°）を負荷した。運動群は運動直後に組織を摘出した。運動－スクロース群、運動－イソマルチュロース群は、運動直後、30 分後、60 分後に、スクロースまたはイソマルチュロースをそれぞれ 3.0g/kg-BW（計 9.0g/kg-BW）経口投与し、運動終了 8 時間後に組織を摘出した。グリコーゲン量の測定は、組織を 0.3M 過塩素酸でホモジネートし、上清をグルコアミラーゼで加水分解させ、グルコース量を測定することにより行った。

【結果】非運動群に比べ、運動群、運動－スクロース群、運動－イソマルチュロース群の肝臓グリコーゲン量は有意に低値を示した。運動－スクロース群、運動－イソマルチュロース群の腓腹筋、足底筋グリコーゲン量は、非運動群に比べ有意に増加した。ヒラメ筋グリコーゲン量は、非運動群に比べ運動－イソマルチュロース群でのみ有意に増加した。

【考察/結論】持久性運動後にイソマルチュロースを投与することにより、スクロースを投与した群と同様に筋グリコーゲンの超回復が認められた。このことから、インスリン刺激が少ない糖質であってもグリコーゲンローディングに有用である可能性が示唆された。

Isomaltulose, Glycogen, Exercise

発表番号：2E168
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵大麦エキス（FBE）の抗炎症作用の解析および活性成分の同定

# Analysis of anti-inflammatory effect of fermented barley extract (FBE) and identification of its active components.

○青山 薫英[1]、Islam Jahidul[1]、外薗 英樹[2]、白川 仁[1]、駒井 三千夫[1]（[1]東北大・院農、[2]（株）三和酒類）
○Yukihide Aoyama[1], Jahidul Islam[1], Hideki Hokazono[2], Hitoshi Shirakawa[1], Michio Komai[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Sanwa Shurui Co., Ltd.)

【目的】発酵大麦エキス(FBE)は大麦焼酎副産物から得られる水溶性の画分である。大麦焼酎はリキュールや本格焼酎など幅広く人気を博しているが、その消費量の多さゆえに大麦焼酎粕と呼ばれる副産物の処分が問題視されてきた。大麦焼酎粕の用途はこれまで、家畜の飼料や農業用の肥料に限られてきたが、高付加価値的な再利用に向けて研究が進められると大麦焼酎粕由来の FBE が様々な生理作用を持つことが明らかとなった。当研究室においても、FBE が大腸菌の膜成分であるリポポリサッカライド(LPS)誘発性の肝障害および炎症性サイトカインの発現を抑制することが明らかとなり [1)]、FBE は機能性食品素材としての利用も期待されている。本研究では FBE を分画することで得られた各フラクションの抗炎症作用についてマクロファージ様培養細胞を用いて解析し、FBE 中の抗炎症成分の単離同定およびその作用機構の解明を目指した。
【方法】FBE をスチレン系吸着材を用いて分画し、10%エタノール溶出で得られたフラクションを P-10、P-10 をイオン交換クロマトグラフィーに供し、得られたサブフラクションを P-10-S1 とした。マウス由来マクロファージ様細胞(RAW264.7 細胞)を P-10-S1 (S1 と略) と LPS で一定時間処理した後、Total RNA を回収、定量 RT-PCR 法により炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定した。また、転写因子 Nuclear-factor κB(NFκB)の結合配列をプロモーター領域に有するレポータージーンを細胞にトランスフェクションし、S1 と LPS で処理した。一定時間後に細胞を回収し、レポーター活性を測定した。細胞内への LPS 取り込みに与える影響を解析するため、蛍光標識 LPS と S1 で RAW 細胞を一定時間処理し、細胞内の LPS 量を測定した。
【結果】RAW 細胞を LPS で刺激することで誘発される炎症性サイトカイン(IL-1β、IL-6、TNFα)の mRNA 発現量は 24 時間の S1 前処理により有意に抑制され、LPS 誘発性の炎症応答を抑制していることが示唆された。また、S1 処理により LPS 誘発性の NFκB レポーター活性は有意に低下し、RAW 細胞中への蛍光標識 LPS の取り込みは S1 処理により有意に低下した。以上より、S1 は LPS とマクロファージの相互作用を阻害することで下流のシグナル伝達を抑制し、炎症応答を抑制していると推定された。抗炎症成分の単離同定のため、S1 を HPLC 分析に供し、1 成分を同定した。この成分と LPS で RAW 細胞を一定時間処理し、その後 RT-PCR 法により炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定したところ、IL-1β、IL-6 の mRNA 発現量が有意に減少した。この結果から S1 の炎症応答抑制には少なくとも本成分が関与していることが示唆された。

fermented barley extract, lipopolysaccharide, inflammation

発表番号：2F001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Pseudomonas stutzeri* 17-6-2 株の分離と $N_2O$ 還元能に関する研究
Study on nitrous oxide-reducing *Pseudomonas stutzeri* 17-6-2 isolated from soil
○窪田 江里、濱口 曜子、村上 周一郎（明治大・農化）
○Eri KUBOTA, Yoko HAMAGUCHI, Shuichiro MURAKAMI (Meiji Univ.)

【目的】一酸化二窒素（$N_2O$）は、$CH_4$ に次いで多く発生している温室効果ガスであり、$CO_2$ の約 300 倍もの温室効果を持っている。$N_2O$ は脱窒や硝化の過程で発生し、発生場所としては窒素肥料を施用する畑地や水田等が挙げられる。本研究は、発生する $N_2O$ を削減するために耕作地に散布する $N_2O$ 還元菌のスクリーニングと $N_2O$ 還元能を調べることを目的としている。

【方法】0.45% D-glucose および 28 mM $NH_4Cl$ を含む 7 mL の液体培地に土壌懸濁液を加え、ヘッドスペースを $N_2O$ で置換した $N_2O$ 培地で振とう培養し、生育の見られた培養液を純粋分離して $N_2O$ を還元している可能性のある菌株を得た。分離した菌株の $N_2O$ 還元能を確認するために、$N_2$ または $N_2O$ 存在下で培養し、生育を比較し、菌株を選抜した。選抜した菌株を同定するために、遺伝学的、形態学的、生理学的、および生化学的試験に供した。次に本菌の $N_2O$ 還元能を調べるために、好気条件で前培養した後、8 mL の $N_2O$ 培地で培養した。また、増殖に与える pH の影響を調べるために、pH を 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 に調整した $N_2O$ 培地で本菌を培養した。さらに、$N_2O$ の消長に与える $N_2O$ reductase の誘導の影響を調べるために、前培養の培地に $NaNO_3$ を加えて静置培養し、指数増殖期および定常期に達した菌体を用いて本培養を行った。
【結果】54 種の土壌サンプルを用いてスクリーニングした結果、30℃から 103 菌株、45℃から 50 菌株を分離した。30℃から分離された菌株のうち、5 株において $N_2$ 存在下での生育と比較して $N_2O$ 存在下での生育が良好であり、その中で最も生育が良好であった 17-6-2 株を $N_2O$ 還元菌として選抜した。同定試験の結果、本菌はグラム陰性桿菌、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性で、運動性があり、極鞭毛、硝酸還元能を有した。また 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析したところ、*Pseudomonas stutzeri* の同配列と 99.7%の同一性を示したことから、本菌を *P. stutzeri* と同定した。$N_2O$ 存在下で培養した結果、培養 29 日で 432 μmol の $N_2O$ を還元し、660 nm における濁度で測定した生育量は 0.69 であった。また、本菌は pH 6.0～7.5 の条件で良好な生育および $N_2O$ 還元が見られた。脱窒関連酵素を誘導した条件で前培養し、定常期に本培養に移行したところ、培養 17 日で 112 μmol の $N_2O$ を還元し、生育量は 0.25 であった。一方、指数増殖期に本培養に移行した場合、培養 4 日で 416 μmol の $N_2O$ を還元し、生育量は 0.80 であった。以上の結果から、本菌の $N_2O$ reductase の誘導は、脱窒に関連する窒素化合物が枯渇した条件下ではすぐに停止することが示唆された。

nitrous oxide, denitrification, greenhouse effect gas

発表責任者：村上周一郎（smura@meiji.ac.jp）

発表番号：2F002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 嫌気性メタン資化性菌の分離

# Isolation of anaerobic methane-assimilating bacteria

○橋間 千紗[1]、高橋 結[1]、伊藤 亮至[2]、登尾 浩助[3]、村上 周一郎[1] ([1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化、[3]明治大農・農)

○ Chisa HASHIMA[1], Yui TAKAHASHI[1], Ryoji ITO[2], Kosuke NOBORIO[3], Shuichiro MURAKAMI[1] ([1]Department Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture Meiji Univ., [2]Department Agricultural Chemistry, School of Agriculture Meiji Univ., [3]Department Agriculture , Faculty of Agriculture Meiji Univ.)

【目的】地球温暖化に影響を及ぼす温室効果ガスとして、二酸化炭素の他に、メタン、一酸化二窒素およびフロン類などが挙げられる。この中でメタンは、同じ放出量における温室効果が二酸化炭素の約 23 倍あることが知られており、その主な発生源は家畜や湿地、池、水田などである。本研究では、微生物を用いて水田からのメタンの発生を抑制させることを目指し、水田土壌から嫌気性メタン資化性菌のスクリーニングを行った。

【方法】第一次スクリーニングでは、ヘッドスペースに唯一炭素源としてメタンガスを封入し、唯一窒素源として 12.5 mM $NaNO_3$ を含む液体培地に、水田から採取した土壌の懸濁液の上清を植菌し、2 ヶ月間、30℃および 37℃で振とう培養した。ガスクロマトグラフにより気体組成を、イオンクロマトグラフにより陰イオンを分析し、メタンおよび硝酸イオンの消費を確認した。第二次スクリーニングでは、メタンの減少がみられた集積培養物を平板培地に塗布し、メタンで置換した密閉ジャー内で 1 ヶ月嫌気的に培養し、純粋分離した。得られた分離株を、メタンガスまたは窒素ガスを封入した斜面培地に植菌、1 か月培養し、嫌気条件下、唯一炭素源がメタンである培地で、より生育する菌株を選抜した。第三次スクリーニングでは、硝酸呼吸条件下で培養し、得られた菌体を唯一炭素源としてメタン、窒素源として 12.5 mM $NaNO_3$、5 mM $NH_4Cl$ を含む培地に移し、各種分析により嫌気条件下でのメタンの消費を確認した。

【結果】第一次スクリーニングにおいて、座間、黒川およびタイの水田土壌から得られた 48 種の集積培養物を分析した結果、メタンおよび硝酸イオンが減少し、窒素ガスが増加した培養物は 14 種であった。その中で最もメタンが減少した培養物では、培養 2 ヶ月でメタンが 7.51 µmol、硝酸イオンが 25.20 µmol 減少し、窒素ガスが 7.11 µmol 増加した。第二次スクリーニングにおいて、純粋分離によって得られた菌株は 56 株であり、その中で、嫌気条件下、唯一炭素源としてメタンでより生育する菌株は 23 株であった。第三次スクリーニングでは、第二次スクリーニングで得られた全ての菌株がメタンを有意に減少させた。また、2 株で酸素の増加が観察された。以上の結果より、最終的に嫌気条件下でメタン酸化を行う微生物が 23 株得られた。現在、形態観察、生理学的試験および、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析を行い、菌株の同定を試みている。

anaerobic methane assimilation, denitrification, greenhouse gas

発表番号：2F003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# プロテオタイピングによる新規な微生物識別ソフト「Strain Solution」

# Novel software "Strain Solution" can discriminate the isolated bacteria and their mixtures at strain level

○田村 廣人[1,2]、山本 奈保美[1]、加藤 晃代[2]、島 圭介[3]、船津 慎治[3]（[1]名城大農、[2]科学技術交流財団、[3](株）島津製作所）
○Hiroto Tamura[1,2], Naomi Yamamoto[1], Teruyo Kato[2], Keisuke Shima[3], Shinji Funatsu[3] ([1]Meijo Univ., [2]ASTF, [3]Shimadzu)

【背景および目的】

MALDI-TOF MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化- 飛行時間型質量分析計）による微生物の同定・分類は、サンプル調製が簡便である事や多検体の迅速分析等の特長から新しい手法として注目されているが、通常用いられるフィンガープリント法では属、種の決定にとどまり、血清型や株の識別が困難である。従来、血清型等の詳細な識別を行う際、分子生物学的手法がよく用いられるが、これらは試験日数を要し、操作に熟練を要するなどの課題がある。

我々は細菌に共通に存在する *S10-spc-alpha* オペロンにコードされているリボゾームタンパク質に着目し、タンパク質の理論質量と MALDI-TOF MS 測定からデータベースを構築する理論的根拠に基づいた高精度の細菌識別、*S10*-GERMS 法を構築してきた。この方法を基盤とし、愛知県科学技術交流財団の産学行政連携の共同開発プロジェクト『「知の拠点あいち」重点研究プロジェクト　食の安心・安全技術開発プロジェクト』にて愛知県科学技術交流財団、株式会社島津製作所、名城大学で血清型や株の識別を可能とする MALDI-TOF MS 高精度細菌識別ソフトウェア（Strain Solution）の開発を目的とし研究を行った。

【方法・結果および考察】

*S10-spc-alpha* オペロン上のリボゾームタンパク質の理論質量と MALDI-TOF MS のスペクトルを照合し、亜種、血清型、株レベルでの識別が行えるマーカータンパク質を予めソフトウェアへ登録しておき、対象菌の MALDI-TOF MS 測定データの一致／不一致を判定することにより識別を行った。

Strain Solution は、従来の MALDI-TOF MS フィンガープリント法では識別が困難であった血清型や株識別を対象として、コンピューターによる自動識別によって操作担当者の技術・経験を必要とせず、より高精度・信頼度の識別結果を提供し、また、混合菌中での対象株の検出にも有効であった。さらに、Strain Solution は、16S rRNA 配列解析では判別が難しい類縁菌間の細菌識別においても、*S10-spc-alpha* オペロン上の遺伝子の塩基配列の違いを反映したバイオマーカーにより、培養した細菌を直接分析する whole cell の MALDI-TOF MS 分析で迅速・簡便に行えることを可能にした。

本プロジェクトにおいて *S10*-GERMS 法の原理に基づいて開発した Strain Solution は、従来法では困難であった血清型や株の自動識別を可能にした。今後多検体を同時に識別し、デンドログラムで結果を視覚的に判断する等、ユーザフレンドリーなソフトウェアとして更なる性能の向上に努める。

MALDI-TOF MS, S10-GERMS, Ribosomal protein

発表番号：2F004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *S10*-GERMS 法に基づく MALDI-TOF MS を用いたプロテオタイピングによる *Listeria monocytoegens* 血清型の迅速簡便な識別

# Proteotyping of *Listeria monocytoegens* serovars by MALDI-TOF MS based on the *S10*-GERMS method

○山本 奈保美[1]、加藤 晃代[2]、中山 淳子[1]、田村 廣人[1] ([1]名城大農、[2]（公財）科技財団)
○Naomi YAMAMOTO[1], Teruyo KATO[2], Junko NAKAYAMA[1], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijo Univ., [2]ASTF)

【背景および目的】

*L. monocytogenes* は、しばしば食肉や乳製品、野菜などの身近な非加熱喫食調理済み食品（Ready-to-eat 食品）を介してヒトに感染し食中毒アウトブレイクの原因となっている。また、重篤なリステリア症を引き起こすことが知られており、特に免疫不全者は発症しやすく重症化する場合も多い。妊婦では流産や早産、死産の原因となる。本菌種は 13 の血清型（1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4a、4ab、4b、4c、4d、4e、7）が知られ、集団発生事例では血清型 4b が最も多く、1/2b 及び 1/2a も報告されている。更に本菌種は遺伝的に 4 つ進化系統、lineage Ⅰ、Ⅱ、ⅢおよびⅣ に分類することができ、lineage ⅠおよびⅡには、それぞれ感染したヒトから単離されることの多い血清型 1/2b、3b、3c、4b（Ⅰ）および 1/2a、1/2c、3a（Ⅱ）が属し、ⅢおよびⅣには、ヒトからの単離例が少なく主に反芻動物から検出される 4a, 4b, 4c （Ⅲ、Ⅳともに）が分類される。

このように、*L. monocytogenes* はヒトに危害を与える食中毒細菌として食品ならび医療分野で迅速な検出ならびに同定識別技術の開発が必要とされている。これまでに、リステリア属ならびに *L. monocytogenes* の血清型を識別する方法として PAGE 法、MLST 法、マイクロアレイ法等が報告されている。しかしながら、これらの手法は煩雑な操作が必要で時間がかかるという課題がある。

我々はゲノミクスとプロテオミクスを融合した *S10*-GERMS 法(S10-spc-alpha operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum method)を基盤としたホールセルを用いた MALDI-TOF MS によるプロテオタイピングから、*L. monocytogenes* の lineage 及び血清型を迅速に識別する事を目的とした。

【方法および結果】

はじめに *S10-GERMS* 法に基づき、識別の指標となるバイオマーカータンパク質(リボゾームタンパク質)を選出し、データベースを構築した。続いてこのデータベースを用いて愛知県科学技術交流財団の産学行政連携の共同開発プロジェクト『「知の拠点あいち」重点研究プロジェクト　食の安心・安全技術開発プロジェクト』にて愛知県科学技術交流財団、株式会社島津製作所、名城大学で共同開発を進めている MALDI-TOF MS 高精度細菌識別ソフトウェア(Strain Solution 改良試作版)にて *L.monocytogenes* の lineage、血清型自動識別を行った。更に検証実験により、新たな *L.monocytogenes*16 株を 100%の識別率で、lineage I, II 及び血清型 4a、4c へ識別することに成功した。これらの結果から、この手法が *L.monocytogenes* の識別に有効である事が示された。

Listeria monocytogenes, MALDI-TOF MS, S10-GERMS method

発表責任者：田村　廣人（hiroto@meijo-u.ac.jp）

発表番号：2F005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

# Development of the method for screening of microbes producing vinyl compounds using thiol-ene reaction

○黒田 ひかり [1]、佐野 芽生 [1]、小原 仁実 [1]、安藤 寛 [2]、松本 圭司 [2]、麻生 祐司 [1] ([1] 京都工繊大、[2]（株）カネカ)
○Hikari KURODA[1], Mei SANO[1], Hitomi OHARA[1], Hiroshi ANDO[2], Keiji MATSUMOTO[2], Yuji ASO[1] ([1]KIT, [2]Kaneka Corp.)

【目的】ある種の微生物は末端二重結合を有するビニル化合物を生産する。それらはラジカル重合によりポリマー化できるため、再生可能なポリビニル原料として有用である。しかし、既知のビニル化合物生産菌の種類は限られている。自然界からビニル化合物生産菌を分離する場合、分光分析が有効であると考えられるが煩雑な操作を要するため、ハイスループットな手法の開発が待たれる。そこで本研究では、ビニル化合物生産菌を土壌からコロニーとして寒天培地上で直接分離する新たな手法の開発を行った。その手法には、末端二重結合とチオールの付加反応である Thiol-ene 反応を用いた。すなわち、微生物によって生産されたビニル化合物と培地に添加したチオグリセロール（TG）との付加反応により、抗菌物質である TG の濃度が低下し、ビニル化合物生産菌のコロニーを優先的に形成させ分離することができる。
【方法】Thiol-ene 反応の進行を確認するために、ラジカル開始剤として 0~50 mM VA-044、ビニル化合物のモデルとして 0~100 mM イタコン酸、50 mM TG を水を溶媒として酸素存在・非存在下でそれぞれ 30℃、96 時間反応させた。反応の進行は Ellman 試薬を用いて残存 TG を定量することで確認した。次に、50 mM TG と 0~5 mM VA-044 を含むポテトデキストロース寒天培地に、イタコン酸生産菌 *Aspergillus terreus* NBRC 6123、イタコン酸非生産菌 *Aspergillus niger* NBRC 33023 および *Aspergillus oryzae* NBRC 30113 をそれぞれ接種後、30℃、10 日間培養し、コロニーの形成速度を比較した。さらに、NBRC 6123 の胞子懸濁液を土壌に添加したものを同培地に接種後、30℃、10 日間培養することで、土壌からの NBRC 6123 の再分離を試みた。
【結果と考察】Thiol-ene 反応の進行を確認した結果、100 mM イタコン酸を用いて酸素非存在下で反応させたとき、反応率は約 50%であった。一方、酸素存在下で反応させたとき、反応率は著しく低下した。よって、Thiol-ene 反応は酸素非存在下で進行することが示唆された。次に、コロニーの形成速度を比較した結果、用いた 3 株はいずれも 50 mM TG によりコロニー形成が阻害されたが、5 mM VA-044 ではコロニー形成は阻害されなかった。一方、50 mM TG と 0.5 mM VA-044 を培地に添加した場合、NBRC 33023 および NBRC 30113 と比べて NBRC 6123 は優先的にコロニーを形成した。さらに、NBRC 6123 の胞子懸濁液を土壌に添加し再分離を試みた結果、一般土壌微生物と比べて NBRC 6123 は優先的にコロニーを形成した。以上の結果より、ビニル化合物生産菌の分離に Thiol-ene 反応が有効であることが示唆された。

thiol-ene reaction, vinly compounds, screening

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

発表番号：2F006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

# Development of the method for screening of microbes producing vinyl compounds using Heck reaction

○佐野 芽生[1]、黒田 ひかり[1]、小原 仁実[1]、安藤 寛[2]、松本 圭司[2]、麻生 祐司[1]（[1]京都工繊大、[2]（株）カネカ）
○Mei SANO[1], Hikari KURODA[1], Hitomi OHARA[1], Hiroshi ANDO[2], Keiji MATSUMOTO[2], Yuji ASO[1] ([1]KIT, [2]Kaneka Corp.)

【目的】近年、石油由来のプラスチックをバイオプラスチックで代替する試みが盛んである。ある種の微生物はビニル化合物を生産する。それらは末端二重結合を持ち容易にポリマー化するためプラスチック原料として有用である。しかし、ビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するための手法はなく、これまでに報告されているビニル化合物は糸状菌 *Aspergillus terreus* によって生産されるイタコン酸など数種類にとどまる。そこで本研究では、イタコン酸をビニル化合物のモデルとして用い、末端二重結合とハロゲン化アルキルの付加反応である Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発を行った。

【方法】［①イタコン酸の蛍光ラベル化］21 mM ヨードベンゼンを用いて、水および Czapek-Dox（CD）液体培地に添加した 42 mM イタコン酸を Heck 反応により蛍光ラベル化した。62 mM 炭酸カリウムを塩基、83 μg/ml 酢酸パラジウムを触媒、50% DMSO 水溶液を溶媒として用い、50℃、1 時間反応させた(1)。濃塩酸を添加して反応を停止後、蛍光ラベル化の進行を HPLC により確認した。また、Heck 反応により生じるヨウ素イオンをヨウ素デンプン反応により検出することで、Heck 反応の進行を確認した。ヨウ素デンプン反応では、反応停止前の反応液に 10%亜硝酸ナトリウム水溶液、10%可溶性デンプン水、濃塩酸の混合液（7:7:1）を加えて呈色した。なお、一連の反応は 96 穴マイクロチューブを用いて行った。

［②イタコン酸生産菌の分離］土壌菌 500 株を CD 液体培地で培養後、培養液を①の条件で Heck 反応に供し呈色することで、ビニル化合物の生産の有無を確認した。呈色を示した培養液のラベル化物を LC-MS を用いて質量解析した。

【結果と考察】HPLC の結果より、Heck 反応でイタコン酸を蛍光ラベル化できることを確認した。また、Heck 反応の進行をヨウ素デンプン反応による呈色で確認できた。なお、呈色が確認できるイコタン酸の最低濃度は 7.5 mM であった。次に、土壌菌培養液を Heck 反応後、ヨウ素デンプン反応により呈色した結果、ビニル化合物生産菌 2 株を得た。LC-MS を用いてこれらの培養液の蛍光ラベル化物を解析した結果、共に分子量は 206.058、組成は $C_{11}H_{10}O_4$ であった。これらは、イタコン酸の蛍光ラベル化物であるベンジリデンコハク酸のそれらと一致した。よって、分離した 2 株はイタコン酸生産菌であることが示された。以上の結果から、本手法はビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するために有効な手法であることが示された。

(1) Sano *et al., J. Planar Chromatogr.,* 28 (1) 12–16 (2015)

Heck reaction, vinyl compounds, screening

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

発表番号：2F007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 東京・荒川から発見した新たなマルセイユウイルス科「*Tokyovirus*」に関する報告

# Discovery of a new giant virus, *Tokyovirus*, a member of *Marseilleviridae* from a water sample of Arakawa river in Tokyo

○武村 政春[1,2]、笠谷 竜太[2] ([1]東京理科大・理、[2]東京理科大・院・科学教育)
○Masaharu TAKEMURA[1,2], Ryuta KASATANI[2] ([1]Fac. Sci., Tokyo Univ. Sci., [2]Grad. Sch. Math. Sci. Edu., Tokyo Univ. Sci.)

**【背景・目的】**近年、「巨大ウイルス」と呼ばれる粒子径 200 nm 以上、ゲノムサイズ 300 kb 以上の大型 DNA ウイルスが世界各地の水環境などから発見されている。とりわけマルセイユウイルス科（*Marseilleviridae*）に属する巨大ウイルスは、水環境のみならず、ヒトの腸内細菌叢など、様々な環境に生息していることが明らかとなっているが、我が国からの報告例はなかった。そこで本研究では、水圏生態系におけるその生物学的意義を解明することを目指し、東京の水環境から巨大ウイルスを単離することを目的とした。**【方法】**荒川、外堀など淡水圏の泥水を採集した後、上清をろ過し、ろ液を 96 ウェルマイクロプレートに培養した *Acanthamoeba castellanii* に添加し、細胞の生育遅延もしくは細胞溶解を指標としてアメーバ感染性ウイルスの単離を試みた。培養液には、ウイルス以外の微生物のコンタミを防ぐため抗生物質を 3 種添加した。荒川由来のろ液を添加したアメーバに生育遅延が見られたため、その培養液の新しいアメーバ細胞株への移植を繰り返し、そこにいると思われるウイルスを増殖させた。これを添加して 8 時間後のアメーバ細胞株を透過型電子顕微鏡（TEM）で観察した。その後ウイルスをクローニングし、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を用い、*Marseillevirus* DNA ポリメラーゼ遺伝子に対するプライマーを用いた PCR による増幅と PCR 産物のシークエンス解析を行い、さらに全ゲノム解析を行うこととした。また、DAPI 染色によるウイルス工場（VF）の経時的変化を解析した。**【結果・考察】**TEM 解析の結果、*Marseilleviridae* に特徴的な大きさの粒子ならびにアメーバ細胞内形態をもつウイルスが確認された。PCR 産物の塩基配列につき、Blastn によりホモロジー検索を行ったところ、*Marseilleviridae* に属する *Cannes 8 virus*、*Senegalvirus* と 82%の相同性、*Marseillevirus* と 75%の相同性をもつことがわかった。このことから、本ウイルスが *Marseilleviridae* に属する新規ウイルスである可能性が高まり、命名の慣習に則り暫定的に「*Tokyovirus*」と命名した。*Tokyovirus* の VF は、他の *Marseilleviridae* と同様、時にはアメーバ細胞核より巨大であり、感染後 10 時間あたりから最大となることが示唆された。VF の TEM 観察では、ウイルス DNA が大量に存在すると考えられる領域の中心部に、成熟粒子が多数見られる領域が見られた。現在、*Tokyovirus* の全ゲノム解析ならびに *Marseilleviridae* 内での系統関係を解析中である。

Giant virus, Marseilleviridae, NCLDV

発表責任者：武村政春（takemura@rs.kagu.tus.ac.jp）

発表番号：2F008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 日本の淡水・海水から発見した新規ミミウイルス科「*Origamivirus*」に関する報告

Study of a new giant virus, *Origamivirus*, the first member of *Mimiviridae* discovered from Japan

○室野 晋吾[1]、武村 政春[1,2] ([1]東京理科大・院・科学教育、[2]東京理科大・理)
○Shingo MURONO[1], Masaharu TAKEMURA[1,2] ([1]Grad. Sch. Math. Sci. Edu., Tokyo Univ. Sci, [2]Fac. Sci., Tokyo Univ. Sci.)

**【背景・目的】**近年の研究で見つかった「巨大ウイルス」と呼ばれるウイルスは、核細胞質性巨大 DNA ウイルスに属し、それまでのウイルス粒子径が概ね 200 nm 以下であるのに対して、200 nm から大きいもので 1,500 nm 程の大きさを持つ。特に、粒子径 500 nm を超える *Mimivirus* は研究が最も進んでおり、世界各地から発見されている。巨大ウイルスは今までのウイルス概念を変える存在という点で関心が高まっているが、我が国から粒子径 500 nm を超える巨大ウイルスの報告はない。そこで本研究では、こうした巨大ウイルスの生物学的・生態学的な意義と、我が国の生態系における巨大ウイルスの役割を明らかにすることを目的として、ミミウイルス科（*Mimiviridae*）に属するウイルスを日本の淡水・海水から単離することを試みた。**【方法】**淡水・海水合わせて 5 ヶ所由来の水または二枚貝から、細胞の変性効果（CPE）を指標としたアメーバ感染性の巨大ウイルス単離を試みた。①水サンプルは、rice media 法を用いて 1 か月冷暗所に保存後、96 ウェルマイクロプレートに培養したアメーバ（*Acanthamoeba castellanii*）に添加した。②二枚貝サンプルは、すり潰した後、遠心分離（1,110 × *g*・15 min・4℃）を行い、上清を回収しアメーバに添加した。コンタミを防ぐために 3 種の抗生物質を加え、継代培養を繰り返してウイルスを増幅させた。ウイルス感染 8 時間後の細胞を DAPI 染色することでウイルス工場（VF）を観察し、透過型電子顕微鏡で詳細な観察を行った。さらにウイルスのクローニングを行った後、ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型とし、*Mimivirus* DNA ポリメラーゼ遺伝子に対する特異的プライマーを用いて、PCR による一部遺伝子の増幅と PCR 産物のシーケンス解析を行った。**【結果・考察】**CPE が確認された細胞において、DAPI 染色でアメーバの核よりも大きな強い蛍光を発する VF を観察することができた。その後、電子顕微鏡で観察した結果、この VF やウイルス粒子の形態は *Mimivirus* と極めて類似しており、*Mimiviridae* に特徴的な表面繊維が観察できたことから、*Mimiviridae* に属するウイルスであることが推測された。DNA ポリメラーゼ遺伝子の一部塩基配列は、blastn による相同性解析により *Mimiviridae* に属する *Mimivirus, Sambavirus* などと 99%の相同性を持つことがわかった。このことから、本研究で発見された巨大ウイルスが *Mimiviridae* の新種である可能性が高まり、ウイルス粒子が作られる過程が折り紙を折る形に似ていることから暫定的に「*Origamivirus*」と命名した。**【展望】**今後はより広範囲にわたって、国内における巨大ウイルス分布調査を淡水・海水に分けて行っていきたいと考えている。

Giant virus, Mimiviridae, NCLDV

発表責任者：武村政春（takemura@rs.kagu.tus.ac.jp）

発表番号：2F009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 散水濾床から分離された新規 *Bosea* 属細菌の生理学的および系統的特徴

# Physiological and phylogenetic characteristics of *Bosea* sp. nov. isolated from trickling filter process

○藤平 卓也、荒瀧 元明、井原 奏太、坂本 拓郎、谷川 大輔、木村 善一郎（呉高専）
○ Takuya FUJIHIRA, Motoaki ARATAKI, Souta IHARA, Takuro SAKAMOTO, Daisuke TANIKAWA, Zen-ichiro KIMURA (NIT, Kure college)

【目的】散水濾床法は、汚泥の返送が不要、温度管理が容易である等の長所を有する省力型廃水処理プロセスである。著者らの研究グループにおいては、同法を用いた省力型窒素除去プロセスの構築に取り組んできている。当プロセスは硝化細菌による異化的アンモニア酸化と植物による同化的硝酸除去を組み合わせた手法である。当プロセスにおいて、異化的硝酸除去（脱窒）は、設計上想定外の代謝であるが、系内の窒素収支への影響は未調査である。そこで筆者らは当プロセスを用いたリアクターに対し、固体培養法による微生物種の分離・同定を行い、リアクター内の微生物叢と窒素収支との関連を調査している。本発表においてはリアクターから純粋培養株を獲得し、窒素収支への影響及び系統分類に関する調査結果について報告する。
【方法】散水濾床内に存在する微生物群集を分離源とし、希釈平板培養法による微生物菌種の分離・同定を行った。採取した微生物群集は適宜滅菌食塩水を用いて段階希釈し通常の5倍濃度に希釈したR2A固体培地（1/5R2A固体培地）に塗抹し室温で培養した。この際ゲル化剤として、ゲランガムを用いた。得られた微生物コロニーは複数回の画線培養による純化を経てDNA抽出を行った。更に16SrRNA遺伝子全長を標的（univ27F及びuniv1492Rプライマー）とするPCRを行い、精製後に塩基配列を解析した。
【結果】分離株から一部の株を選出し分離・同定した結果、*Bosea*属の新種と考えられる微生物が見出された。当該株（MTK2株と命名）は最類縁種基準株との16SrRNA遺伝子相同性が98.6%であり、種レベルで新規の微生物であることが示唆された。現在は当該株の生理学的（特に硝化・脱窒活性について）・系統学的性質（新種か否か）について詳細に検討中であり、発表においてはその結果を合わせて報告する。

Isolation, trickling filter process, new species

発表責任者：木村善一郎（z-kimura@kure-nct.ac.jp）

発表番号：2F010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# タイ由来のアルコール飲料用スターターの微生物叢の解析とアルコール生産糸状菌の探索

# Analysis of microbial community in Thai alcohol starters and screening of alcohol fermenting fungi

○三澤 涼太[1]、米田 英伸[1,2]、高橋 裕里香[1]、西田 洋巳[1]、H-Kittikun Aran[3]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST,ERATO、[3]Prince of Songkla University）
○RYOTA MISAWA[1], HIDENOBU KOMEDA[1,2], YURIKA TAKAHASHI[1], HIROMI NISHIDA[1], Aran H-Kittikun[3], YASUHISA ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ, [2]ERATO,JST, [3]Prince of Songkla University)

【目的】タイなどの東南アジアでは、蒸米などのデンプン原料からアルコール飲料を製造するために団子状のスターターが広く用いられている。これらのスターターには糖化や発酵に関わる微生物が含まれており[1)]、アルコール生産のための微生物源として有用であると考えられる。本研究では PCR-DGGE 法(DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)や次世代シークエンサーによる配列解析によって、タイの各地で収集されたスターターの微生物叢を解析するとともに、各種糖源（D-グルコース、D-キシロース、L-アラビノース）からのアルコール生産に利用可能な微生物を取得することを目的とした。

【方法と結果】23 種のスターターから DNA を直接抽出し、細菌の 16S 及び酵母、糸状菌の D1/D2 領域を PCR により増幅し、DGGE を行った。得られた増幅 DNA バンドの塩基配列を決定した結果、各種細菌や乳酸菌及び糖化や発酵に関わる酵母、糸状菌の存在が確認できた。また、一部のスターターを蒸米に加えて、10 日間発酵を行い、定期的にサンプリングしてエタノールの生成を確認した。さらにそのサンプルから DNA を抽出し、次世代シークエンサーにより遺伝子解析を行うことで、アルコール発酵中の微生物叢の変遷を確認することができた。細菌に関しては、発酵開始時には様々な菌種が確認され、その後乳酸菌が急激に増加し、その他の細菌の割合が減少していった。酵母や糸状菌の解析結果もあわせて報告する。また 3 種類の栄養寒天培地を用いてスターターから微生物を単離し、液体培地を用いて好気的条件下、次いで半嫌気的条件下で培養し、各種糖源の消費とアルコールの生産性を調べた。その結果、*Rhizopus oryzae*、*Rhizopus microspores*、*Mucor indicus* などのアルコール生産糸状菌を得ることができた。

１）村越ら、日本農芸化学会 2015 年度大会

PCR-DGGE, Next-generation sequencer, fermentation starter

発表番号：2F011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 循環型汚水浄化槽内の細菌叢変遷とタンパク質分解に関わる代謝系の解析

# Analyses on the transition of microbial flora and the metabolism of protein decomposition in lab-scale wastewater treatment system

○増子 幸佑[1]、有見 芳樹[1]、鈴木 智順[1,2]（[1]東理大　応生、[2]東理大　総研）
○KOSUKE MASUKO[1], YOSHIKI ARIMI[1], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 汚水処理における微生物の役割の１つに、有機物やリン、窒素などの元素を含む化合物の分解・除去が挙げられる。しかし、微生物によって普遍的に利用されるタンパク質は生活排水に多く含まれ、また窒素源としての利用が考えられるにもかかわらず、汚水処理におけるタンパク質代謝系に関わる研究はほとんど行われていない。当研究室の先行研究で、タンパク質分解過程と微生物群集構造に関する研究が行われていたが、未解析な部分が多い。本研究では、タンパク質の分解過程において、微生物群集構造やその浄化作用の遷移を追跡し、それらの関係を解明することを目的とした。
【方法】 本研究では、好気槽と嫌気槽を有したラボスケール循環型汚水浄化槽を構築した。この装置は、空中浮遊微生物を担持させるためにスポンジキューブが充填されており、生活排水を模した人工汚水を常に循環させ、微生物の培養を行っている。本実験では、上記の汚水浄化槽に通常時の 5 倍濃度の人工汚水を投入し、時間毎にサンプリングを行い、時間経過による挙動を見た。タンパク質分解過程を明らかにするため、時間経過ごとに各槽の汚水から微生物の回収および細胞外、細胞内酵素の抽出を行い、タンパク質分解酵素（Aminopeptidase、Trypsin、Chymotrypsin 型の計 3 種類）の活性について MCA 基質を用いて測定を行った。細菌叢の解析については 16S rDNA-PCR-DGGE 法、代謝活性の高い細菌叢を解析するためには 16S rRNA-RT-PCR-DGGE 法を行った。これらの解析については、先行研究で得られたサンプルを解析し、タンパク質分解と微生物群集構造との関係の解明を試みた。
【結果】 浄化槽全体のプロテアーゼ活性は時間経過とともに増加する傾向にあった。プロテアーゼ活性は好気槽、嫌気槽とも常に細胞内の方が細胞外よりも 3 倍以上高く、また、大きなピークが先に来ていた。この傾向は特に好気槽で顕著に現れていた。今回のタンパク質分解酵素の種類については、細胞内外、好気槽嫌気槽、どちらにおいても常に Aminopeptidase 型が半分以上を占めていた。Aminopeptidase 型は徐々に増加していき、72 h - 144 h でピークに達し、その後減少した。Trypsin、Chymotrypsin 型のタンパク質分解酵素については挙動がともに似ており、12 h - 24 h で一度ピークに達し、その後 144 h 以降で再びピークが確認された。このことは先行研究でも同様な傾向が見られた。これらの結果から、浄化槽内では先にタンパク質の断片化が優先的に行われ、そして徐々にタンパク質断片を端から分解していくことが示唆された。16S rDNA-PCR-DGGE 法と 16S rRNA-RT-PCR-DGGE 法による解析を行った結果も併せて報告する予定である。

protein decomposition, wastewater treatment, protease

発表番号：2F012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 循環型汚水浄化槽から単離した細菌株の有機物分解能解析

# Evaluation of the ability for organic matter decomposition by bacterial isolates from the lab-scale wastewater treatment system

○田中 裕介、榊原 健太、鈴木 智順（東理大　応生）
○Yusuke TANAKA, Kenta SAKAKIBARA, Tomonori SUZUKI (Tokyo univercity of science)

【目的】 浄化槽や汚水処理場などの排水処理施設では、生物学的処理が主要なプロセスとして行なわれている。これまでの研究は、生物学的処理における主要な微生物群を特定し、微生物群全体で浄化能を評価することがほとんどで、個々の微生物が生物学的処理に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では、細菌・真菌・原生生物など様々な生物が定着しており、種々の有機物分解を行っている循環型汚水浄化槽の個々の細菌株の役割に着目した。そして、循環型汚水浄化槽から単離した細菌株を用い、統計学的に実験計画を組んで分離株を組み合わせることによって、個々の細菌が生物学的処理の有機物分解に与える影響を解明することを目的とした。

【方法】 循環型汚水浄化槽から単離した細菌、41 株を基に、http://iq148.com/tools/orthogonal_table/から取得した $L_{128}(2^{127})$直交配列表を用いた部分実施実験を計画した。分離株、41 株を直交配列表に従って、2 水準間で 50 倍の細菌数差が出るように各種組み合わせ、L 字管内の人工汚水培地に接種し、ミクロ生態系を構築した。そして、一定時間培養後、TOC 値を測定した。得られたデータから、各々の株（列）について第一水準の和、第二水準の和、および列平方和を算出し、分散分析表にまとめた。そして、要因効果が無いと判断した株を誤差にプーリングし、再び分散分析表を作成、判定することによって分離株一株ごとにミクロ生態系内の有機物分解に与える影響を評価した。

【結果】 $L_{128}(2^{127})$直交配列表による 128 通りのミクロ生態系について測定を行なった結果、41 株中 9 株が水準の違いで複合系内の有機物分解に影響を与えることが示唆された。特に、*Ochrobactrum oryzae* に近縁な PAO 1 株が、ミクロ生態系内の有機物分解に大きく正の影響を与えていることが示唆された。またそれとは逆に、*Arthrobacter* 属細菌に近縁な AAO 2 株が、ミクロ生態系内の有機物分解に大きく負の影響を与えていることが示唆された。有機物分解の過程において正の影響を与えた株のみでミクロ生態系を構築した場合や、負の影響を与える株を浄化槽内から排除した場合などについて、ミクロ生態系を構築して有機物分解能の変化を報告する予定である。さらに、これらミクロ生態系内の細菌叢の継時的変化や相互作用についての考察も併せて報告する予定である。

lab-scale wastewater treatment system, TOC, organic matter decomposition

発表番号：2F013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 汚水浄化における真菌および細菌の有機物分解メカニズム解析

# Organic matter decomposition mechanism analysis of eukaryotes and bacteria in the wastewater purification

○永井 茜、鈴木 智順（東理大）
○Akane NAGAI, Tomonori SUZUKI (Tokyo University of Science)

【目的】 本研究室では、複合微生物による有機物分解のモデルとしてラボスケールの循環型汚水浄化槽を構築し、微生物生態学的に研究を行っている。浄化槽内には、細菌、真菌、原生生物などの微生物の定着が確認されているが、それらの相互作用に関しては未だ大部分が解明されていない。本研究ではその中でも特に細菌と真菌に着目し、それらの有機物分解における役割を明らかにする事を目的としている。

【方法】 上記目的を達成するため、循環型汚水浄化槽とは別に 6 種類のミクロ生態系を構築し、それぞれの有機物分解能の比較と微生物叢の解析を行った。ミクロ生態系とは、人工的に汚水を模して作った培地の入ったフラスコに、微生物を接種し培養したものである。今回は、好気条件・嫌気条件それぞれにおいて、細菌と真菌の共培養（「浄化槽微生物群」）・細菌のみ培養（「細菌群」）・真菌のみ培養（「真菌群」）の計6つの条件のミクロ生態系を構築した。ミクロ生態系に用いた微生物については、「浄化槽微生物群」には浄化槽から採取した微生物を、「細菌群」に浄化槽から採取した微生物のうちメンブレンフィルターで真菌を除去したものを、「真菌群」に循環型モデル浄化槽から単離した純粋分離株を用いた。有機物分解能の比較は、各ミクロ生態系の培養液を経時的にサンプリングして、TOC、アンモニア態窒素、pHを測定する事で行った。また、微生物叢の代謝活性量を解析するため、ミクロ生態系からサンプリングした培養液から抽出したrRNA を用いて RT-DGGE を行い、主要なバンドを切り出してシークエンス解析を行った。

【結果】 TOC の結果から、好気条件、嫌気条件共に「浄化槽微生物群」 ＞ 「細菌群」 ＞ 「真菌群」の順に有機物分解能が高かったが、「浄化槽微生物群」と「細菌群」との差はほとんどなかった。このことから、循環型汚水浄化槽においての有機物分解の主役は細菌であり、真菌はあまり有機物分解には関与していないということが示唆された。さらに、RT−DGGE の結果から、好気条件、嫌気条件共に「浄化槽微生物群」の方が「細菌群」よりもバンドパターンの変化が大きいため、真菌との相互作用により細菌の代謝活性に変化が起きた可能性も示唆された。また、今回実験で用いた人工汚水には栄養源としてタンパク質とセルロースが含まれていたのだが、セルロースの分解に関する知見はまだ得ることが出来ていない。真菌がセルロースの分解に関与している可能性もあるので併せて報告する予定である。

wastewater, microcosmos, eukaryote

発表責任者：鈴木智順（chijun@rs.noda.tus.ac.jp）

発表番号：2F014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# PCR-DGGE 法による熟成チーズにおける乳酸菌の検出条件の検討

# Optimization of PCR-DGGE method to detect lactic acid bacteria in cheeses

○松下 紘士、貝沼（岡本） 章子、大西 章博、小泉 幸道、石川 森夫（東京農大・応生科醸造）
○Hiroto MATSUSHITA, Akiko OKAMOTO-KAINUMA, Akihiro OHNISHI, Yukimichi KOIZUMI, Morio ISHIKAWA (Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】ナチュラルチーズの乳酸菌相は多様であり、スターター菌種の他にも多くの乳酸菌種が存在することが知られている。その中で、演者らは複数種のチーズにおいて好塩性・好アルカリ性という特徴的な生理を有する *Marinilactibacillus* 属や *Alkalibacterium* 属乳酸菌が主要な乳酸菌相を構成することなどを明らかにしている [1)]。しかし、チーズ熟成時における非スターター乳酸菌種の役割は不明な点が多く、その理解には乳酸菌相の全体像を明らかにすることが必要と考えられる。そこで、本研究ではチーズ熟成時の乳酸菌の検出手法の確立を目指し、PCR-DGGE 法による条件検討を行った。
【方法】2%クエン酸三ナトリウム溶液に懸濁した各種市販チーズから CTAB 法にて DNA を抽出した。これらを鋳型として、16S rRNA 遺伝子の可変領域を増幅するプライマーセットを用い、得られた PCR 産物を PCR-DGGE 解析に供し、バンドパターンの比較および塩基配列解析を行った。併せて、食塩含有、アルカリ性条件の培地を用いた培養法による分離を行い、PCR-DGGE の解析結果と比較した。
【結果】細菌のユニバーサルプライマーを用いた場合、多くのチーズからスターター菌種の *Lactococcus lactis* が検出された一方、その他の乳酸菌種は殆ど検出されず、一部の乳酸菌相のみが検出されたものと考えられた。そのため、単一のプライマーセットによる乳酸菌相全体の同時検出は困難と判断し、乳酸菌分類群を二群に大別して増幅可能な二つのプライマーセット [2)] を改変し用いることでより幅広い乳酸菌種の同時検出を試みた。各種チーズについて解析を行った結果、プライマーセット（Lac3/Lac2）を用いた場合、*Lactococcus* 属，*Streptococcus* 属などのスターター乳酸菌種に加え、*Enterococcus* 属や *Vagococcus* 属の構成種が検出された。もう一方のプライマーセット（New Lac1/Lac2）では、*Lactobacillus* 属，*Leuconostoc* 属，好塩性・好アルカリ性乳酸菌 *Marinilactibacillus* 属，*Alkalibacterium* 属の構成種が検出され、また一部のチーズからは *Staphylococcus* 属細菌が検出された。さらに、好塩性・好アルカリ性乳酸菌を検出したチーズにおいて、同乳酸菌が主要な乳酸菌相を構成することが培養法でも示され、両法での結果に相関が見られることを確認した。以上より、これら二つのプライマーセットを用いることでチーズ中に存在する多様な乳酸菌を PCR-DGGE 法により同時検出できることを確認し、本法を適用することで、チーズ熟成中における乳酸菌相の変遷や種類の違いによる多様性を包括的に解析できる可能性が示唆された。

1) Ishikawa *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol.* **44**, 308 (2007).
2) Endo and Okada, *J. Biosci. Bioeng.* **99**, 216 (2005).

Cheese, PCR-DGGE, Lactic acid bacteria

発表番号：2F015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

奥塩原新湯温泉から分離した新規好熱性アーキアの分離と培養性状
Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel thermophilic archaeon, isolated from a terrestrial hot spring in Nasu, Japan

○長森 麻衣[1,2]、大西 真史[1,2]、加藤 真悟[2]、高品 知典[1]、伊藤 隆[2]、大熊 盛也[2]([1]東洋大院・生命科学、[2]理研 BRC-JCM)
○Mai NAGAMORI[1,2], Masahumi OHNISHI[1,2], Shingo KATO[2], Tomonori TAKASHINA[1], Takashi ITOH[2], Moriya OHKUMA[2] ([1]Toyo Univ., [2]RIKEN BRC-JCM)

〈背景・目的〉

近年、培養に依存しない分子生態学的手法の発展にともない、温泉環境には多種多様な未培養微生物が存在することが明らかになった。アーキアにおいては、*Sulfolobales* 目、*Thermoproteales* 目、*Thermoplasmatales* 目など *Crenarchaeota* 門・*Euryarchaeota* 門に属するアーキアが分離培養されているが、*Korarchaeota* 門、*Thaumarchaeota* 門、*Aigarchaeota* 門、*Geoarchaeota* 門など、前アーキア 2 門とは異なるアーキア系統群も存在することが示されている。これらの中にはメタゲノム解析などによってゲノム解析が行われておおよその培養性状が推測されているものも存在するが、生理学的性状や生態学的機能をより詳細に検討していくためには培養株を得ることが望ましい。我々は新たに、栃木県奥塩原新湯温泉水の試料(57℃、pH2.2)から新規好熱性微生物の分離を試みた。これによって *Crenarchaeota* 門および *Euryarchaeota* 門のいずれにも属さない新規なアーキア株を分離培養することに成功した。本報告では本アーキア菌株の分離とその培養性状について報告する。

〈方法・結果〉

上記試料について、*Thermoplasma* 培養用の改変 TPL 培地をベースに気相、培養温度、pH、栄養条件を変えて 30 通りの多様な条件を設定して集積培養を行った。培養が確認できた場合には 16S rRNA 遺伝子クローン解析によってその菌叢を解析した。これより一つの培養条件下において未だ培養株の存在しない HTC2(Hot Thaumarchaeota - related Clade 2)に属するアーキアが存在していることが明らかとなった。しかし本培養中には *Thermocladium modestius* 様のアーキアも混在しており、最終的に新規アーキアの純粋培養系を得ることはできなかった。その後も時期を変えて試料採集と集積培養・純化作業を繰り返した結果、この新規アーキアの分離培養に成功し、本菌株を“NAS-02 株”と命名した。本菌株は弱酸性で生育する従属栄養性・嫌気性・中等度好熱性の不整形球菌であり、硫黄や硫黄酸化物、Fe(Ⅲ)化合物を電子受容体として利用していると思われた。対数増殖期の倍加時間は 36h であり、定常期の細胞数はおよそ $1.0\times10^{7}$cells/ml であった。

現在、NAS-02 株についてゲノム解析を行っており、今後はゲノム情報から推測される表現性状と実際の表現性状との比較を行っていく予定である。

Archaea, terrestrial hot spring, Hot Thaumarchaeota-related Clade

発表責任者：長森　麻衣（s39101500234@toyo.jp）

発表番号：2F016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# PCR-DGGE による水田土壌中のメタン生成古細菌の群集解析
# Analysis of methanogenic archaeal communities in paddy field soil by PCR-DGGE

○徳永 岳[1]、高杉 幸大[1]、常重 友佑[2]、梶原 明日香[3]、小関 詩穂[3]、登尾 浩助[3]、村上 周一郎[1] ([1]明治大農（農化）、[2]明治大院農（農）、[3]明治大農（農））
○Gaku TOKUNAGA[1], Koudai TAKASUGI[1], Yusuke TSUNESHIGE[2], Asuka KAZIWARA[3], Shiho KOSEKI[3], Kousuke NOBORIO[3], Shuichiro MURAKAMI[1] ([1]Dep. agricultual chemistry, Fac.Agric., Meiji Univ., [2]Dep. agricultur, Sch.Agric., Meiji Univ., [3]Dep. agricultur, Fac.Agric., Meiji Univ.)

【背景、目的】現在、温室効果ガスにおける地球温暖化は大きな問題になっている。特に湛水によって土壌が嫌気条件になる水田では、二酸化炭素の約 23 倍の温室効果を有するメタンがメタン生成古細菌によって生成される。このことから水田から放出されるメタンの抑制方法として、水稲の生成期に湛水と落水を繰り返す間断灌漑などの水管理法を取り入れることが有効であると考えられている。そこで本研究では、ライシメーターで通常の水管理（湛水）と間断灌漑を実施し、メタン生成古細菌群集へ与える水管理の影響を PCR-DGGE 法によって調査した。

【方法】ライシメーターには灌水前、灌水、中干しの後に間断灌漑を実施した試験区と、湛水にした状態で維持したコントロール区を設け、10 cm と 30 cm の 2 種の深さで計 7 回土壌を採取し、DNA を抽出した。抽出した DNA からメタン生成古細菌の 16S rDNA に特異的なプライマーを用いて nested PCR 法により DNA 断片を増幅した。増幅断片をエタノール沈殿により濃縮後、PCR-DGGE 法に供した。分離した DNA 断片を切り出し、PCR 法により増幅後、シークエンシングに供し、決定した塩基配列と同一性を示す配列をデータベースで検索した。

【結果】土壌から DNA を回収したところ、いずれの試料においても約 23 kbp の位置に DNA を検出した。次にメタン生成古細菌をターゲットとした PCR 法を行ったところ、全ての水管理、サンプリングした深さにおいて DNA 断片が検出された。さらに増幅断片を PCR-DGGE 法により解析したところ、全ての試料において複数のバンドが確認され、その中でも主要な 4 本のバンドはいずれの条件においても存在していた。これらの結果は、ライシメーターには複数種のメタン生成古細菌が存在しており、少なくとも 4 種の微生物が 1 年を通して優占して存在していることが明らかになった。またいくつかのバンドが中干し期、間断灌漑時において消失したことから、ある種のメタン生成古細菌は酸素の影響を大きくうける可能性が示唆された。一方、土壌中のメタン濃度を計測したところ、サンプリングした深度に関わらずコントロール区と比べて、間断灌漑を取り入れた試験区の方において生成量が減少していた。従って、間断灌漑により消失したバンドに由来する微生物が多くのメタンを生成していることが示唆された。増幅した DNA 断片のシークエンシングの結果、解析できた全ての DNA 断片はメタン生成古細菌が含まれる Euryarchaeota 門に属する古細菌由来であることが明らかになった。

PCR-DGGE, Methanogenic archaea, Euryarchaeota

発表番号：2F017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# II 型糖尿病を誘起する未知腸内細菌の系統と生理機能の解明

# Phylogenetic and physiological characterization of novel *Lachnospiraceae* bacterium contributing to the development of type II diabetes

○草田 裕之[1]、亀山 恵司[2]、孟 憲英[1]、鎌形 洋一[1]、玉木 秀幸[1] ([1]産総研、[2]味の素（株））
○Hiroyuki KUSADA[1], Keishi KAMEYAMA[2], Xian-Ying Meng[1], Yoichi KAMAGATA[1], Hideyuki TAMAKI[1] ([1]AIST, [2]Ajinomoto Co., Inc.)

ヒトの健康と腸内フローラとの関連性は比較的古くから議論されてきたが、近年の環境ゲノム解析技術の進展により、かつてないほどの規模でヒトの腸内細菌群集の組成、多様性、時空間分布、健康や疾患との関連性が明らかにされつつある。特に、現代人に身近な II 型糖尿病等の成人病は腸内フローラにより誘起されている可能性が示唆されており、国内外で極めて大きな関心を集めている。一方で、これまでの研究では、健常者と糖尿病患者の腸内フローラに違いがあることや、糖尿病患者に特異的に多く検出される細菌群 (*Lachnospiraceae* 科細菌群) がいることは分かっているものの、それが糖尿病の原因となっているのか、または糖尿病になった結果を反映しているだけなのかは全く不明であった。近年、亀山らにより高血糖性肥満マウスから新規 *Lachnospiraceae* 科細菌 AJ110941 株が分離され、同株を無菌マウスの腸内に定着させると、マウスの糖尿病発症が顕著に誘導されることが明らかとなり、糖尿病という重要な疾患がある特定の細菌株によって引き起こされ得ることが実証された。そこで本研究では、本株の分子系統学的解析ならびに生理機能の解析を行った。

本分離株 AJ110941 株は糖類や Yeast extract、ペプトン等を基質として従属栄養的に生育するグラム陽性の偏性嫌気性細菌であった。生育温度は 15-40℃（至適温度 37℃）、生育 pH は 6.5-8.0（至適 pH 8.0）、0.5% (w/v)の耐塩性を示した。GC 含量は 41.1%、主要キノンは MK-5(H4)、主な脂肪酸組成は $C_{18:1}$ *cis*9, $C_{16:0}$, $C_{18:1}$ *trans*9 or *cis*6 であった。次に、16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統学的解析を行ったところ、同株は確かに *Firmicutes* 門の *Lachnospiraceae* 科に属するが、本分類群に属するいずれの既知種とも相同性が低く（<92.5%）、分子系統学的に大きく異なることが明らかとなった。さらに、AJ110941 株は、偏性嫌気性の発酵性グラム陽性細菌であること、また主要な脂肪酸組成等が *Lachnospiraceae* 科細菌種と類似性を示す一方で、細胞形態や主たる発酵産物等の生理学的諸性質が同科内の近縁種と大きく異なっていた。特に、既知の類縁菌種は直径が<10μm 程の桿菌や球菌であるのに対して、AJ110941 株は最大で直径 62.5μm の巨大な紡錘形である等、近縁種には見られない特有の細胞形態を有しているが明らかとなった。

以上の形態学的・生理学的・分子系統学的解析の結果から、AJ110941 株は *Lachnospiraceae* 科の新属新種として提案され得るものであり、現在、'*Fusimonas intestini*'gen. nov., sp. nov.として新学名の提案を行っている。

Family *Lachnospiraceae*, Intestinal flora, Type II diabetes

発表責任者：玉木秀幸（tamaki-hideyuki@aist.go.jp）

発表番号：2F018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 中東石油基地スラッジ処分地の微生物叢解析と好熱菌単離の試み

# Attempt of microbial flora analysis and isolation of thermophilic bacteria from oil sludge disposal sites in Middle East petroleum base

○宮平 勝人[1]、加藤 雄大[1]、田崎 雅晴[2]、森川 正章[1] ([1]北大院・環境、[2]清水建設・技術研究所)
○Masato MIYAHIRA[1], Takahiro KATO[1], Masaharu TASAKI[2], Masaaki MORIKAWA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Inst. Technol. Shimizu Corp.)

【背景と目的】

これまでに、油田環境から様々な微生物が菌叢解析あるいは単離され、アルカンや芳香族炭化水素化合物などの石油分解活性を持つ有用な微生物も報告されている。このような微生物の単離源として石油と共に取り出される随伴水や石油汚染土壌などが一般的である。本研究では石油精製の際に廃棄物として処分されるスラッジに注目し、日中気温が 40℃を越える中東石油基地由来のスラッジ処分地から好熱菌の単離と菌叢解析を目的とした。スラッジは難分解性炭化水素のアスファルテンやレジンを含む物質であり、これまで好熱性微生物の単離報告例は少ない。

【方法】

3 種類の中東石油基地由来のスラッジ処分地試料を単離源とし、肉エキス培地、改良 R2A 培地を用いて炭素源、温度、気相の異なる条件下で集積培養を行った。微生物の増殖が確認された培地においてはロールチューブ法、限界希釈法で単離を行い、16SrRNA 遺伝子配列に基づく簡易な菌種同定を行った。菌叢解析においては各サンプルから DNA を抽出し、16S rDNA-クローンライブラリー法にてスラッジ汚染土壌中の微生物の群集構造を解析した。

【結果】

70℃の培養条件で増殖が確認されたサンプルで微生物の単離と遺伝子解析を行った結果、*Coprothermobacter* sp.及び *Thermoanaerobacter* sp.であることが判明した。菌叢解析においては 3 つのスラッジサンプルのうち、最も DNA 抽出量が多かったサンプルについてバクテリアを対象に行ったところ、41 クローンが得られた。現在までに 24 クローンの解析が終了し *Thermotogae*、*Chloroflexi*、*Deferribacters*、*Bacteroidetes*、*Proteobacteria*、*Formicutes*、*Synergistetes* の 7 つの門を有する菌叢であることが明らかとなった。現在アーキアを対象とした菌叢解析を進めている。

thermophilic bacteria, microbial flora analysis, oil sludge

発表番号：2F019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 広島県土壌から分離された新規 *Dyella* 属細菌の生理学的および系統的特徴

# Physiological and phylogenetic characteristics of *Dyella* sp. nov. isolated from soil of Hiroshima Prefecture

○牛尾 幸航、岡田 大輝、松村 紫穏、栗山 大輝、木村 善一郎（呉高専）
○ Sakkaa USHIO, Hiroki OKADA, Shion MATSUMURA, Hiroki KURIYAMA, Zen-ichiro KIMURA (NIT, Kure College)

【目的】土壌中には極めて多種多様な分類群に属する微生物が存在することが知られているが、その多くはVBNC状態にあると考えられており、分離株が得られていない状況にある。過去に分離された有用微生物同様に、これら難培養性微生物にも有用な資源が存在していることは容易に想像できることである。言い換えれば極めて多種多様な微生物資源は未利用のまま土壌中に存在していると言える。

現在までにメタゲノムスクリーニング等、培養を経ることなく難培養性微生物の遺伝子資源にアクセスする手法が開発され利用されているが、これらの技術により環境中から得られた遺伝子が何らかの産業に利用された例は未だ存在せず、有用遺伝子のスクリーニングは分離株から行うことが最も効率が良い。このように分離培養技術は今後においても重要な技術であると考えられる。

筆者らの研究グループは、環境中からの新規微生物の分離・同定、及び難培養性微生物を対象とする新規分離培養技術開発に取り組んでおり、利用可能な微生物資源の拡大を目指している。本発表においては、広島県内から採取した土壌を接種源とした分離株の獲得に取組み、得られた分離株群の中から見出した新規微生物*Dyella* sp. ZMK-1株の生理学的性質及び系統分類に関する調査結果について報告する。

【方法】広島県内で採取した土壌を接種源とし、希釈平板培養法による微生物菌種の分離・同定を行った。採取した微生物群集は適宜滅菌食塩水を用いて段階希釈し通常の5倍濃度に希釈したR2A固体培地（1/5R2A固体培地）に塗抹し室温で培養した。この際ゲル化剤として、ゲランガムを用いた。得られた微生物コロニーは複数回の画線培養による純化を経てDNA抽出を行った。更に16SrRNA遺伝子全長を標的（univ27F及びuniv1492Rプライマー）とするPCRを行い、精製後に塩基配列を解析した。

【結果】分離株から一部の株を選出し分離・同定した結果、*Dyella*属の新種と考えられる微生物（ZMK-1株）が見出された。当該株は最類縁種基準株との16SrRNA遺伝子相同性が97.5％であり、種レベルで新規の微生物であることが示唆された。現在は当該株の生理学的・系統学的性質について詳細に検討中であり、発表においてはその結果を合わせて報告する。

Isolation, soil, new species

発表責任者：木村善一郎（z-kimura@kure-nct.ac.jp）

発表番号：2F020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*P. aeruginosa* の進化動態変化をもたらす共存細菌 *S. aureus* との種間相互作用
Changes in evolutionary dynamics of *P. aeruginosa* conferred by interspecies interaction with *S. aureus*

○山本 京祐[1]、草田 裕之[1]、鎌形 洋一[1]、玉木 秀幸[1,2] ([1]産総研生物プロセス、[2]東大生物生産工学研究センター)
○Kyosuke YAMAMOTO[1], Hiroyuki KUSADA[1], Yoichi KAMAGATA[1], Hideyuki TAMAKI[1,2] ([1]AIST, [2]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】生物の進化には共存種間の相互作用が大きく影響するため、進化動態の理解には種間相互作用を含めた生態プロセスの理解が極めて重要である。本研究では、感染創等の実環境中で共存する二種の病原性細菌、緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa*（PA）と黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus*（SA）による実験室進化系を用い、各々の表現型進化や個体群動態に対する種間相互作用の影響、さらには進化による種間相互作用の変化を解析することで、これらの病原菌の進化過程における種間相互作用の寄与を明らかにすることを目的とした。これまでの研究で、PA が SA の生育阻害物質を産生し、SA を駆逐することが知られている。一方で、PA による阻害作用に対して SA が耐性を獲得し残存可能となるケースも報告されており、SA が PA の挙動に対して何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されている。そこで本研究では、SA の存在が PA の個体群および進化動態に及ぼす影響に注目して解析をおこなった。

【結果】
静置培養条件で PA 純粋培養系（*P. aeruginosa* PAO1）と PA-SA 共培養系（PAO1 株と *S. aureus* Newman 株および *S. aureus* Mu50 株）の継代培養（24 時間ごとに 1% [v/v]植継ぎ）をおこない、生菌数（CFU）およびコロニー形態の変化した株（Colony Morphology Variants, CMVs）の割合を経時的に測定した。全ての進化実験系において実験開始から 3~5 日後には PA の CMVs が検出され始め、時間経過とともにその種類も増加していった。また、PA に比べて個体群サイズは数オーダー低いものの、継代期間を通じて SA は残存し続けた。約 3 週間に亘って培養をおこなった結果、全ての系において祖先型のコロニー形態を示す PA は淘汰され、Wrinkly タイプや Smooth タイプ等の CMVs が優占した。PA 純粋培養系と比較して、PA-SA 共培養系では培養初期における Smooth タイプの急激な増加とそれに伴う PA CMVs の多様性の低下がみられた。このように、SA が共存することで PA の進化動態が変化することが明らかとなった。また、各種 CMVs について全ゲノムリシークエンスや各種生理学試験をおこなった結果、Smooth タイプの CMV の特徴として運動性（twitching）の欠失がみられた。発表では、運動性欠失の適応効果等と合わせて両種間の生態－進化フィードバックについて議論する。

eco-evolutionary dynamics, adaptive radiation, biofilm

発表責任者：山本京祐（k.yamamoto@aist.go.jp）

発表番号：2F021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 汚水浄化システムにおける細菌の物質的依存関係の解析

# Analysis of bacteria which require metabolites of others in Lab-scale wastewater treatment system

○島田 紘帆[1]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大 応生、[2]東理大 総研)
○Hiroho Shimada[1], Tomonori Suzuki[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 微生物は有機物の最終分解者として自然界の物質循環を支えている。それを汚水の浄化に利用したシステムが浄化槽であり、当研究室ではそれを模した循環型汚水浄化槽を用い、内部で活動する微生物群集の解析を行ってきた。これまでの研究により、浄化槽内で生育する微生物には、現在単離されていない細菌が含まれることが明らかになっている。このような未培養細菌の増殖には、他の微生物の存在も重要であると考えられ、微生物による浄化システムを複雑化している。
そこで本研究では、特定の細菌(ヘルパー株)の代謝産物を増殖に必要とする細菌(代謝産物要求株)を単離し、その系統関係の解析を行い、浄化槽内で結ばれている物質的な依存関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】 代謝産物要求株の単離には処理水培地を用いた。培地に用いた処理水は人工汚水を投入後 1 週間経過した時点で浄化槽を循環している処理水を熱による変性を避けるため、遠心分離を行った後に上清を濾過滅菌した。処理水培地上にコロニーを生じた株のうち、人工汚水培地において増殖が確認されなかった株を代謝産物要求株とした。また、人工汚水培地で増殖が確認されたものをヘルパー株の候補として選択した。これらの株は 16S rDNA の塩基配列に基づいて同定を行った。
ヘルパー候補株を各々人工汚水に植菌し、培養濾液を調製した。この培養濾液培地に代謝産物要求株を植菌し、増殖が確認された培養濾液を生産したヘルパー候補株をヘルパー株として選定した。

【結果】 現在までに *Pseudomonas* 属 5 株(3C, 5B, 5D, 5E, 6B)、*Alcanivorax* 属 1 株(5F)を代謝産物要求株として単離した。また、3C 株のヘルパー株として *Pseudomonas* 属 3 株(9C, 9E, 10D)、*Brevibacterium* 属 1 株(JS5)、*Proteus* 属 1 株(JS9)を取得した。また、ヘルパー株の培養濾液と人工汚水の混合物では、培養濾液の比率を下げると一定比率までは 3C 株の増殖が向上し、一定以下になると増殖が見られなくなった。この事から、3C 株が必要とする代謝産物には活性を持つための閾値が存在する事が明らかとなった。
今後はこの培養濾液に含まれる増殖因子を分離し、特定する予定である。

Symbiosis of bacteria, metabolic products, wastewater

発表番号：2F022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 有機物感受性を示す *Acidithiobacillus* 属新規単離株の単離と生理学的性質の解析

# Isolation and physiological characterization of an organics-sensitive new isolates affiliated with the genus *Acidithiobacillus*

○上岡 永佳、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Nagayoshi UEOKA, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】

*Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌は好酸性の独立栄養細菌であり、バイオリーチングに利用されるなど産業的に重要な微生物である。そのため、これらの菌は古くから研究されており、これまでに多くの株が単離されている。一方、単離された菌株は生理学的、分子系統的に似た性質を有しており、*Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌の多様性が十分に理解されているとは言い難い。既知菌株より高い増殖能力や鉄酸化能力を持つ菌株が単離され、その性質が明らかになれば、バイオリーチングの高効率化にもつながる可能性がある。本発表では、*Acidithiobacillus* 属の鉄酸化細菌の生存戦略や鉄酸化機構の多様性に着目した研究の過程における新しい株の単離、その生理学的特徴付け、およびゲノム解析について報告する。

【方法・結果】

菌株保存機関から取り寄せた *A. ferrooxidans* の基準株（ATCC23270 株）を継代培養する過程で、植え継ぎを重ねると共に最大菌体密度が増加した。コンタミネーションの確認のためコロニー分離を試みたが、アガロースで固化した平板培地にはコロニーが出現しなかった。一方、無機物であるコロイダルシリカで固化した平板培地を試したところコロニーが出現し、培養菌株の生育がアガロースによって阻害されることが示唆された。単離されたコロニーの 16S rRNA 遺伝子を解析した結果、ATCC23270 株とは異なる菌株が培養液中で優占化していたことが示された。これら単離株の一つを *Acidithiobacillus* sp. NU-1 株と命名し、生理学的諸性質の解析およびゲノム解析を行った。16S rRNA 遺伝子に基づく分子系統解析の結果、NU-1 株は最近新種登録された *A. ferriphilus* に近縁であることが明らかになった。しかし、この株の鉄酸化に関与するラスチシアニン遺伝子は *A. ferriphilus* のものとは分子系統学的に大きく異なっており、既知の *Acidithiobacillus* 属細菌のどの株とも異なる特殊な鉄酸化機構を持っている可能性が示唆された。また、NU-1 株は本来の ATCC23270 株と比較して、低い濃度のグルコースやグリセロールで増殖阻害を受けることも明らかとなった。一方、2 価鉄を含む無機液体培地 (pH 2.0) における増殖能を他の株と比較した結果、NU-1 株はどの既知株よりも高い増殖能を示した。この結果は、NU-1 株がバイオリーチングにおいて高いポテンシャルを示す可能性を示唆している。これらの結果は、環境中には有機物耐性が低いために検出・単離できなかった高活性の *Acidithiobacillus* 属鉄酸化細菌が存在する可能性を示唆している。

*Acidithiobacillus*, Iron-oxidizing bacteria, isolation

発表責任者：上岡 永佳（s106023@toyaku.ac.jp）

発表番号：2F023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ワックス分解に関する環境微生物の挙動解析

# Analysis of wax degradation by environmental microorganisms in soil

○植田 雄仁、荒木 希和子、向 真樹、アディカリ ディネッシュ、久保 幹 (立命館大学)
○Yuto UEDA, Kiwako S. Araki, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

【目的】

自然界に存在する炭素の豊富な有機物の 1 つにワックスがあげられる。ワックスは高級脂肪酸と高級アルコールのエステルあるいは中性脂肪を主とした長鎖の炭化水素を有した物質である。天然のワックスは、植物の葉や茎、動物の体毛に含まれており体内への水分や有害物質が浸透するのを防ぐ役割を持つ。これらのワックスが含まれる物質は環境中に残留していないことから、ワックスは環境中で分解されていると考えられる。しかし、環境中のワックスの具体的な存在量や分布、分解経路は明確になっていない。そこで、自然界での存在量に基づくワックスの分布の解析とワックスと土壌微生物との関係について研究を行ってきた。これまで、環境中のワックスは植物の生育する土壌に普遍的に存在し、また、ワックスは土壌微生物によって分解されていることが明らかとなり、さらなる詳しい情報としてワックスの分解と土壌微生物の挙動にどのような関係があるかを解析する必要がある。そこで本研究では、それぞれの環境中に存在するワックスの分解と環境微生物の挙動を好気環境と嫌気環境に着目し、解析することを目的とする。

【方法・結果】

野外から採取した土壌サンプル 200 g にワックスを 1 %(w/w)になるように加え、各土壌サンプルから 1 週間おきにサンプリングを行った。各サンプルを好気環境下と嫌気環境下で 4 週間静置した。サンプリングした土壌の 30 g をクロロホルム・メタノール溶液(3:1)を用いて油分抽出し TLC-FID 法で解析した。また、1 g を用いて土壌中の総細菌数を解析した。解析の結果、好気環境下で 62.0 %、嫌気環境下で 40.0 %のワックスが分解されており、土壌中の微生物数は好気環境下で 2 週目でピークに達し嫌気環境下で 1 週目でピークに達した。これらの結果から好気環境下でも嫌気環境下でもワックスの分解は行われることがわかった。この結果をもとに、土壌微生物の中の有機物の分解に関与している微生物の種類を確認するために real time PCR による定量を行った。

wax degradation, microorganisms, soil environment

発表責任者：植田 雄仁（y.ueda.flumpool@gmail.com）

発表番号：2F024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 海洋からのセルロース分解微生物の分離

# Isolation of cellulolytic microbes from marine environments

○江水 秀之、時川 鴻希、藤井 克彦（山大農）
○Hideyuki Kozui, Koki Tokikawa, Katsuhiko Fujii (Yamaguchi Univ)

【目的】

セルロースは地球上で最も豊富なバイオマスであり、多くのセルロース分解微生物がこれまでに陸上（土壌等）から分離されてきた。他方、海洋に棲息するセルロース分解微生物については、陸上のそれと比較して分離例が少ない。そこで本研究ではセルロース分解能を持つ海洋微生物を探索した。

【実験方法】

山口県の瀬戸内海側および日本海側の沿岸から砂、海藻、漂流物等の試料を採取し、探索源とした。ろ紙、NO3、K2HPO4 をそれぞれ炭素源、窒素源、リン源として加えた人工海水を培養液（以下、ろ紙海水培地）として用いた。上記の採集試料をブレンダーで攪拌（20,400 rpm）した後に、ろ過し、9,000× *g* の遠心分離で集菌した。このようにして得られた微生物画分を少量の人工海水で懸濁、培養液に接種し、145rpm、23℃で 4 週間培養した。微生物の増殖が観察された培養サンプルについて、分解微生物の分離を行うとともに、セルラーゼ活性を検討した。セルラーゼ活性では、培養液を 15,000 × g で遠心分離して得た上清を酵素液として用い、Avicelase 活性と Carboxy methyl cellulase（以下、CMCase）活性を測定した。

【結果】

ろ紙海水培地で集積培養した結果、12 種類の培養サンプルのうち、5 種類で微生物の増殖が観察された。これらのサンプルから微生物の分離を試みたところ、8 種の細菌株が分離できた。分離株をろ紙海水培地で純粋培養したところ、2 株（1-1 株および 12-2 株）で生育及び培養上清の CMCase 活性が他と比較して高かった。Avicelase の活性は極めて低く、分離株はろ紙繊維中の非晶質部位を主に分解していると示唆された。CMCase 活性と酵素反応温度の関係を検討したところ、1-1 は 45℃、12-2 は 37℃付近で高い活性を示し、それ以上の温度になると酵素活性が著しく低下した。

その一方で、1-1 株を寒天培地上で長期間培養すると、これまで純粋分離株（以下、1-1a 株）と思われていたコロニーに加えて、形態学的に異なる別種コロニー（以下、1-1b 株）が出現した。再分離を試みたが、1-1a 株は単独での分離はできず、1-1b 株は純粋分離ができた。そこで再度、ろ紙を含む培養液で培養を行ったところ、両株の混合培養ではろ紙分解と酵素活性が認められたが、b 株単独ではろ紙の分解が観察されなかった。従って、1-1a および 1-1b の両株はセルロース分解に関して共生関係にあることが示唆された。

cellulase, microbe, marine environment

発表番号：2F025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酸性イオウ泉試料を種菌として用いた集積培養液におけるアーキア群集構造の変化

# Archaeal community structures in various enrichment cultures derived from an acidic hot spring

○酒井 博之、黒沢 則夫（創価大院工）
○HIROYUKI SAKAI, NORIO KUROSAWA (Soka Univ.)

【背景と目的】

集積培養法は、微生物の分離を行う際の伝統的な手法の一つであり、新規好熱菌を分離する際にも好んで使用される。しかしながら、集積培養を行った結果どのような微生物が選択されたのかについては、最終的に単離された微生物種を除いて不明である事が多い。今回我々は、集積培養法を用いて多様な好熱菌を分離する際の培養条件の設定に対して有用な情報を得ることを目的として、温泉試料をさまざまな条件下で集積培養し、それら培養液中の微生物群集構造を明らかにした。

【材料と方法】

箱根大涌谷で採取した温泉試料（68、pH 1.4）を種菌として用いた。基本培地として MBS 培地を使用し、温度を 3 点（53˚C, 68˚C, 83˚C）、pH を 4 点（1.4, 4, 6, 8）、炭素源として加える酵母抽出物濃度を 3 点（0.01%, 0.1%, 1%）設定し、合計 36 系列で集積培養を行った。集積培養後、微生物の増殖が確認された培養液の微生物群集構造を、16S rDNA クローン解析法を用いて明らかにした。同様の方法により、種菌として用いた元の温泉試料中のアーキア群集構造についても明らかにした。

【結果と考察】

合計 36 の集積培養系列のうち、16 系列で微生物の増殖が確認された。pH 8 および酵母抽出物を 1%となるように加えた集積培養系列では、いずれの系列においても微生物の増殖は確認されなかった。元の温泉試料と同じ温度と pH を用いた集積培養液からは、温泉試料中に検出された系統群が複数検出されたが、他の集積培養条件下では、元の温泉試料中には検出されなかった系統群が集積された。この結果は、培養温度や培地 pH を元の環境とは異なる条件に設定した場合、元の環境中では非常に低い割合で存在していた種だけが集積されてくる事を示唆している。興味深い事に、今回、一般的な培地と培養方法を用いたにも関わらず、Sulfolobales 目に帰属する、少なくとも属レベル以上で新規性の高いアーキアが 2 種、新種のアーキアが 1 種、集積培養液中に検出された。Sulfolobales 目では、1998 年に *Sulfurisphaera* 属が提唱されて以来、新属の提唱は行われていない。以上の結果は、集積培養条件をうまく設定する事ができれば、特殊な培地や培養方法を用いなくとも新規性の高い微生物を分離できる可能性を示唆している。現在われわれは、凍結保存しておいた集積培養液から、上記 3 種の新規好熱性アーキアの分離を試みている。

Themrophiles, 16S rRNA gene clone analysis, Enrichment culture

発表責任者：酒井博之（sakaih1986@gmail.com）

発表番号：2F026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Arthrospira* 属の食用シアノバクテリアの凍結保存方法

Cryopreservation of the edible cyanobacteria *Arthrospira platensis* and *A. maxima*

○白石 英秋、田玉 翔太郎、廣田 翔平、坂井田 彩野（京大生命）
○Hideaki SHIRAISHI, Shotaro TADAMA, Shohei HIROTA, Ayano SAKAIDA (Kyoto Univ.)

*Arthrospira* 属のシアノバクテリアは、アフリカや中米のアルカリ塩湖を原産地としており、それらの地域で古くから食用にされてきた微細藻である。栄養価が高く、屋外での単藻培養や収穫が容易にできることから、現在は世界各地で大規模な商用生産が行われ、食品・飼料や食品添加物の原料として世界中で利用されている。この生物種は以前は *Spirulina* 属に分類されていたため、製品としては、古い学名に基づいた「スピルリナ」という名称で流通している。

*Arthrospira* 属のシアノバクテリアは、さまざまな採取地からさまざまな株が単離されていて、株ごとに形態的な特徴や生理学的・生化学的性質が少しずつ異なっている。一般に、多様な微生物株を保存する際には凍結保存が行われる。これは、植え継ぎの繰り返しに伴う突然変異の蓄積を防ぐためである。*Arthrospira* でもこれまでに凍結保存が試みられてきたが、凍結を行うと細胞が死滅してしまうため、この生物種は凍結保存が困難であるとされてきた。そのため、現在、*Arthrospira* の多様な株は、一般に植え継ぎによって系統保存されている。しかしながら、植え継ぎによる系統保存では、突然変異によって有用な形質が失われてしまうリスクがある。そこで本研究では、これらの株を微生物資源として安定的に保存するため、凍結保存方法の検討を行った。

株としては、*A. platensis* NIES-39 株をモデル系として用い、凍害防止物質としてはジメチルスルホキシド（DMSO）とグリセロールを使用した。冷却方法としては、液体窒素による急速冷却と、イソプロピルアルコールを温度緩衝剤とした凍結保存容器での低速冷却（冷却速度：約 -1˚C/min）を用いた。後者の低速冷却の方法は、動物の培養細胞の凍結保存の際によく用いられる手法である。

実験の結果、凍害防止物質としてグリセロールを使った場合はいずれの条件でも細胞が死滅してしまったが、DMSO を用いた場合はさまざまな条件で細胞の生存が確認された。特に、10% (v/v) DMSO の存在化で低速で冷却した際に、効率良く凍結保存することができた。凍結融解後の増殖曲線を対照サンプルの増殖曲線と比較した結果、この条件では、細胞の 65%以上が凍結融解後も生き残っていると見積もられた。他の株でも同様に凍結保存の条件を検討したところ、至適条件が株ごとに異なっていた。いくつかの株でその株に適した条件を決定し、高い効率での凍結保存に成功した。

調べた株の中では *A. platensis* NIES-39 が、最も凍結融解に対する寛容性が高かった。これは、分子遺伝学的な研究で多数の株を扱う際に有利な形質であり、この系統の株が、*Arthrospira* の基礎研究を行う際に、モデル系として利用するのに優れていることが示唆された。

*Arthrospira*, Spirulina, Cryopreservation

発表責任者：白石 英秋（siraisi@kuchem.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 乳酸菌と大腸菌の酵母接着特性の類似性

# Similarity of yeast adhesion properties of *Lactobacillus plantarum* and *Escherichia coli*

○渡辺 恭平、平山 悟、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Kyohei WATANABE, Satoru HIRAYAMA, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

乳酸菌や大腸菌など多くの細菌細胞が酵母細胞に接着する現象が知られているが、その機序については不明な点が多い。当研究室では、福山酢分離乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下 ML）が酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741（以下 BY）に対し強い接着性を示すことを見出している。一方、大腸菌 *Escherichia coli* BW25113（以下 BW）が BY に対して接着性を示すことを確認している。そこで本研究では、様々な条件下で、乳酸菌 ML および大腸菌 BW の酵母 BY への接着性を共凝集性を指標として比較することによって、大腸菌と乳酸菌の酵母接着因子の特性を解析し、原核細胞の細菌と真核細胞の酵母の間の異種間細胞接着の理解に役立つ知見を得ることを目的とする。

【方法】

1M リン酸緩衝生理食塩水(pH7.4)で洗浄・懸濁した ML または BW と BY の二代培養菌体同士をミニシャーレ中で 100 rpm で 2 分間撹拌後、形成された共凝集塊を目視あるいは顕微鏡にて観察することで細胞接着性を評価した。BW の線毛関連欠損株 3 株や BY のマンナン合成関連遺伝子欠損株 12 株も用いた。また、熱で処理した ML や BW を用いた評価や、接着阻害物質の添加条件下での評価も行った。さらに BY に対する ML と BW の接着性の強さを比較解析すべく評価方法の検討を行った。

【結果・考察】

BW の線毛関連遺伝子株 Δ*fimA*、Δ*fimH* やBY のマンナン合成関連遺伝子欠損株 *mnn2*Δ をもちいた場合接着性を示さなかった。また ML、BW のいずれも熱処理によって酵母接着性を失った。また、接着はマンノースやレクチンの Concanavalin A で阻害された。これらの結果より、BW も ML の場合[1)]と同様、マンナンの分岐鎖部分を認識して酵母に接着する可能性が示唆された。また大腸菌 K12 系統の菌株の酵母接着因子は線毛先端の FimH と報告されていることから[2)]、FmH に類似した接着因子が ML にも存在する可能性が考えられた。さらに、ML と BW の BY に対する接着が競合することを示唆する定性的な所見が得られたため、接着性を定量的に解析する方法を検討中である。

【参考文献】

[1)] Hirayama *et al*., BBRC (2012)
[2)]Mark A. Schembri *et al*., J. Infect. Dis. 183: S28-S31(2001)

*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Escherichia coli*

発表番号：2F028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母接着性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 の有する *msa* 遺伝子の解析

# Analysis on *msa* gene of yeast-adhesive strain *Lactobacillus plantarum* ML11-11.

○平山 悟、森永 康（日大・生資科）
○Satoru HIRAYAMA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】鹿児島県の伝統発酵食品である福山酢より分離した乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* と共存することにより、顕著な複合バイオフィルム形成や共凝集性を示す。これらの現象は両者間の細胞接着に基づくものであり、乳酸菌 ML11-11 細胞表層のレクチン様タンパク質と酵母細胞表層のマンナンを介していることをこれまでに明らかにしてきた。本研究ではこれら相互作用メカニズムの解明を目的に、*L. plantarum* ML11-11 の酵母への接着因子の同定を目指している。*L. plantarum* では mannose-specific adhesin (Msa)をコードする遺伝子が WCFS1 株に見出されており、酵母への接着に機能することが報告されている(Pretzer *et al.* 2005)。しかしながら WCFS1 株は酵母との複合バイオフィルム形成能は有しておらず、共凝集活性も ML11-11 株に比較すると非常に弱いため、ML11-11 株の有する接着因子は WCFS1 株と異なることが推察される。ML11-11 株も Msa を有しているのか、またそれが酵母への接着にどの程度寄与しているのかは明らかになっていないため、ML11-11 株の *msa* 遺伝子の構造を明らかにして WCFS1 株と比較解析することを目的とした。

【方法と結果】*L. plantarum* WCFS1 株の *msa* (*lp_1229*)に特異的なプライマーを用いて、ML11-11 株より *msa* に相当する DNA を増幅した。増幅が確認された DNA は WCFS1 の *msa* と比較して約 600 bp 大きく、大きな変異が生じていることが推察された。塩基配列、及び推定される ORF 領域のアミノ酸配列について WCFS1 と比較すると、概ね相同性が高いものの、所々で塩基配列が異なっており、アミノ酸配列の変異が多数集中している領域が確認された。また最大で約 300 bp に及ぶ塩基配列の挿入が確認され、複数箇所にアミノ酸配列の挿入が見出された。生じた変異については詳細を解析中である。またドメイン解析の結果、ML11-11 の Msa にも WCFS1 のそれにみられる N 末端のシグナルペプチドや C 末端の LPxTG アンカードメイン、また MucBP や Concanavalin A-like lectin/glucanase ドメインが存在し、ドメイン構造は極めて類似していた。これらのことから、ML11-11 株も Msa を有しており、酵母への接着に寄与していることが考えられる。ML11-11 株が有する Msa の構造詳細は解析中だが、WCFS1 以外の *L. plantarum* 既知株の情報とも比較しながら、その配列や変異について考察する。

*Lactobacillus plantarum*, mannose-specific adhesin

発表番号：2F029
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母と酵母接着性乳酸菌の共生関係の解析

Analysis of symbiotic relationships between yeast and yeast-adhesive lactic acid bacteria

○牧 大剛、平山 悟、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○HIROTAKE MAKI, SATORU HIRAYAMA, SOICHI FURUKAWA, YASUSHI MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】　当研究室では、福山酢由来乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11（以下 ML）が福山酢由来酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Y11-43（以下 Y）や実験室酵母 *S. cerevisiae* BY4741（以下 BY）と細胞間接着して、顕著な複合バイオフィルム（以下 BF）形成や共凝集性を示すことを見出した。さらに、乳酸菌と酵母の共存意義を明らかにするため、乳酸菌の生育に必要な栄養素が酵母から供給されている可能性について検討してきた。これまでに、ML が一部のアミノ酸（Glu、BCAA、Met、Cys）やビタミン（ビオチン、パントテン酸カルシウム)を要求することを明らかにし、酵母 BY との共培養系でこれら栄養素、特に Cys が ML に供給され、生育や BF 形成を促進している可能性を示唆する結果を得てきた。一方、最近グルタチオン（以下 GSH）の乳酸菌における役割が注目されている。また酵母が GSH を生産することは良く知られている。本研究は、ML の栄養素欠落培地での生育や BF 形成に及ぼす酵母 BY または Y の影響を精査するとともに GSH 添加の影響を解析した。

【方法】　要求栄養素を 1 つずつ除いた田村・角田培地(農化、26 巻、464-470、1952、以下 TT 培地)を用いて、BY や Y との共培養による ML の生育変化を評価した。両菌が直接触れ合うことがないように、膜（Millicell cell culture inserts、Millipore 社製）を隔てて共培養した。さらに、Cys 欠 TT 培地に Cys や GSH を添加した時の ML の生育や BF 形成を評価した。また、GSH 濃度を Northwest Life Science Specialties、LLC の GSH 測定キットを用いて定量した。

【結果・考察】　野生酵母 Y と共培養することで、Cys、Glu、Ile、Leu、Met、ビオチンの各欠落 TT 培地での ML の生育が顕著に促進されたが、Leu、Met 要求性酵母 BY との共培養では、これらの各欠落培地における ML の生育促進は認められなかった。こうした結果より、共培養系で酵母がこれら栄養素を ML に供給していることが明らかとなった。一方、Cys 欠落 TT 培地における ML の生育、BF 形成のどちらも、GSH の添加濃度に依存して促進された。このことから、酵母の産生する GSH が ML の要求物質である Cys の供給源となっている可能性やストレス環境を緩和して BF 形成を促進している可能性が示唆された。以上により、酵母と酵母接着性乳酸菌の共培養系においては、酵母から乳酸菌に対し栄養素が供給され、乳酸菌にとって棲みやすい環境下に変化したと考えた。なお、BY、Y の GSH 生産や細胞外への分泌については現在解析中である。

lactic acid bacteria, yeast, symbiotic relationships

発表番号：2F030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 乳酸菌の共存が酢酸菌の生育・代謝活性に及ぼす影響

# Effect of coexistence of lactic acid bacteria on the growth and metabolic activity of acetic acid bacteria

○東垂水 彩乃、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Ayano HIGASHITARUMIZU, Soichi FURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】鹿児島県で古くから製造されている福山酢では、複数の微生物の作用により糖化、アルコール発酵、酢酸発酵が一部併行しながら進行する。当研究室では、福山酢由来の酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* と乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11 の共培養により、酢酸菌のバイオフィルム（ペリクル）形成が促進されることを見出し、酢酸菌・酵母の 2 菌種共培養系に、さらに乳酸菌を加えた 3 菌種共培養系では、乳酸菌の共存によって、酢酸生成が高まることを報告してきた。本研究では、酢酸菌と乳酸菌の共培養系において乳酸菌が酢酸菌にどのような影響を及ぼすかを、溶存酸素計をもちいたエタノール代謝活性測定とリアルタイム PCR 法による菌数測定により解析した。
【方法】①エタノール代謝活性測定：一代培養した酢酸菌 *A. pasteurianus* IF03283（以下 IFO）または福山酢由来酢酸菌 *A. pasteurianus* A11-10（以下 A）と乳酸菌 *L. plantarum* ML11-11（以下 ML）を YPD 培地に、酢酸菌単独、乳酸菌単独、酢酸菌+乳酸菌複合を接種し 30℃、24～48 h 培養した。遠心分離で菌体を回収し、Tris-HCl buffer pH5.0 で洗浄、同 buffer30 ml に懸濁後、50 ml ファルコンチューブに移した。溶液内を空気で曝気後、エタノールを 1.0%となるよう添加し、酸素測定装置(東亜 DKK 社製)にて、溶存酸素濃度の変化を測定した。上記の条件に加え、酢酸菌単独培養菌体にエタノールや乳酸を添加した場合や、別途単独培養した酢酸菌と乳酸菌の菌体を共存させた場合も検討した。②リアルタイム PCR 法菌数測定：6 穴タイタープレートで培養した酢酸菌単独、酢酸菌と乳酸菌複合培養から DNA を MonoFas ゲノム DNA 抽出キットⅦ(ジーエルサイエンス社製)で抽出し、リアルタイム PCR にて生菌数を算出した。同時に塗抹による解析も行った。
【結果】①エタノールを基質とする酸素消費に関し、IFO＋ML あるいは A＋ML のいずれの組合せにおいても、共培養して得られた菌体は、単独培養で得られた菌体を大幅に上回る高い値を示した。一方、IFO または A の単独培養菌体と ML の単独培養菌体を単に共存させただけでは、A 単独に比べ、酸素消費の上昇は認められなかった。これらの結果より、酢酸菌は乳酸菌が共存する条件下で生育することによって、エタノール代謝活性が高まるものと考えられた。②酢酸単独培養と酢酸菌+乳酸菌複合培養の生菌数については、現在リアルタイム PCR 法と塗抹法をもちいて精査中である。
以上のことから、福山酢の製造工程では、酢酸菌が乳酸菌の共存下に生育することで、酵母が産生するエタノールを活発に酢酸へと代謝可能になる結果、安定した酢酸発酵が成立していることが示唆された。

acetobacter, cocultivation, acetic fermentation

発表番号：2F031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高塩濃度環境での酵母と乳酸菌の相互作用に関する研究

# Interaction of yeasts and lactic acid bacteria in the high salt environment

○佐藤 有紗、古川 壮一、森永 康（日大院・生資科）
○Arisa SATOU, Soichi HURUKAWA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】伝統的な発酵には、酵母と乳酸菌が共に関わっている例が多く知られている。当研究室では、鹿児島県の伝統発酵食品である福山酢の製造工程から分離された乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* ML11-11(以下 ML)と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BY4741（以下 BY）を共培養すると顕著に複合バイオフィルム(以下 BF)が形成されることを見出した。醤油や味噌の発酵工程についても乳酸菌と酵母の関わりが良く知られているが、これらの微生物のもろみ中での生態や相互作用の研究例は少ない。醤油や味噌のもろみは、高塩濃度・低 pH の環境でかつ半固体状態である。そのような環境では、微生物と固体原料の間や共存する微生物の間にさまざまな相互作用があるものと推察される。そこで本研究では、食塩添加培地での共培養における BF 形成量を評価することや、食塩添加条件下での共凝集試験による細胞接着性を評価することによって、醤油・味噌から分離された耐塩性酵母と好塩性乳酸菌の相互作用について解析することを目的とした。
【方法】食塩添加培地中において、保存機関から入手した好塩性乳酸菌（醤油・味噌に由来する 5 株）と耐塩性酵母（醤油・味噌等の食品に由来する 19 株）を組み合わせて共培養して BF 形成量を評価した。また、BF 高形成を示した菌株の組合せについては、共凝集試験を行った。対照株として福山酢分離乳酸菌 ML と実験室酵母 BY を用いた。30℃・144 h 培養の前培養菌液を、単独ないし組み合わせて食塩を 0～15%添加した YPD 培地に 1/100 量ずつ接種し、それらをマイクロタイタープレート(96 well)に分注した。30℃・144 h 培養後形成された BF を洗浄し、クリスタルバイオレット法により BF 形成量を評価した。共凝集試験では、二代培養菌液の菌体を遠心分離にて回収後、YPD あるいは食塩添加 YPD で洗浄・懸濁し、凝集試験用サンプルとした。酵母・乳酸菌の菌液サンプルをそれぞれ 1.0 ml ずつミニシャーレに加え混合後、100 rpm、2 min 振とうし、凝集体を目視で観察した。
【結果】好塩性乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* JCM 20260 は単独培養では食塩濃度を高めても殆んど BF を形成しなかったが、耐塩性酵母 *Debaryomyces hansenii* NBRC 0855 は単独培養でも BF を形成し、その量は食塩濃度に応じて増大した。ところが、両者を共培養すると BF 形成量が食塩濃度に依存して大幅に増大し、食塩 15%において各菌株の組合せの中で最も高い BF 値を示した。 一方、JCM 20260 は ML と同様に NBRC 0855 や BY との間で共凝集性を示したことから、好塩性の JCM 20260 も ML と類似した酵母接着機構を有し、それが BF 形成の要因となっている可能性が考えられた。現在、食塩濃度が異なる環境におけるこれらの菌株の細胞接着の挙動について精査中である。

biofilm, co-aggregation, high salt environment

発表番号：2F032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 伝統的パン種の発酵機構に関する研究

# Fermentation mechanism of traditional leaven

○山本 暁久[1]、石川 春佳[1]、伊藤 惠介[2]、伊藤 円香[2]、藤本 章人[2]、藤田 善樹[2]、井藤 隆之[2]、古川 壮一[1]、森永 康[1] ([1]日大院・生資科、[2]MC フードスペシャリティーズ)
○ Akihisa YAMAMOTO[1], Haruka ISHIKAWA[1], Keisuke ITO[2], Madoka ITO[2], Akihito FUJIMOTO[2], Yoshiki FUJITA[2], Takayuki ITO[2], Soichi FURUKAWA[1], Yasushi MORINAGA[1] ([1]Nihon Univ., [2]MC Food Specialties)

【目的】パン種は穀物や果実などに付着する酵母や乳酸菌をはじめとする複数の微生物を利用して作られる発酵食品であり、パンの品質向上を目的に利用される。パン種の一つであるサワー種はライ麦粉・水を混ぜて発酵し、小麦粉と水を継ぎ足し種継ぎすることで、最終的に乳酸菌と酵母が優占化される。これまでサワー種発酵工程の発酵初期に出現するグラム陰性菌が種継ぎにより消滅して、最終的に乳酸菌や酵母が優占化することを確認してきた。また RW 培地（穀物由来の液体培地）を用いて、グラム陰性菌が乳酸菌・酵母の生育に与える影響を検討してきた。しかし、その発酵工程において、グラム陰性菌がその後の乳酸菌や酵母の優占化に果たす役割は明らかではない。本研究ではサワー種における微生物挙動と成分挙動の関連性、また原料である穀物由来とされるグラム陰性菌がサワー種の性状に与える影響について解析することを目的とした。

【方法及び結果】仕込は、ライ麦粉 150 g、滅菌水 180 g、モルト 3 g を混合し、24 h ・30℃培養した。1～4 日目には前日作製したサワー種、小麦粉、滅菌水を 150 g ずつ加え、さらに 24 h・30℃培養した。その過程で pH 測定、生菌数測定、成分分析を行った。pH 測定は仕込み時に 6.5 前後を示し最終的には 3.5 前後まで減少した。生菌数測定は、1 日培養後にグラム陰性菌数及び乳酸菌数が $10^{8\sim9}$CFU/ml に増加し、乳酸菌は一定の生菌数を保ったものの、グラム陰性菌は減少・消滅、培養 2~4 日目には酵母が出現した。1 日培養後の成分を見ると有機酸はクエン酸、リンゴ酸が減少、コハク酸、乳酸などが増加し、糖はフルクトース、グルコースが減少した。アミノ酸では Asp、Ser、Lys が顕著に減少した。1 日培養後の成分の減少や増加は、グラム陰性菌または乳酸菌による消費や生成の結果と考えられた。さらに 1 日培養後の乳酸菌とグラム陰性菌の生菌数はほぼ同数に増加していたが、仕込時の乳酸菌はグラム陰性菌よりはるかに少ないことから、両者の生育速度に大きな差があると考えた。そこで、仕込後 4h ごとにサワー種発酵初期の菌数測定を行い、両者の生育速度を解析した。その結果、乳酸菌の生菌数は仕込時グラム陰性菌に比べ 1000 分の 1 以下であったが、16h でグラム陰性菌と同等の生菌数となり、グラム陰性菌に比べ乳酸菌の生育速度が高いことが分かった。また、グラム陰性菌と乳酸菌のいずれが先に優先化するかは実験のたびに異なった。原料や実験操作の微妙な違いは発酵初期の菌叢形成に大きく影響すると考えられる。またグラム陰性菌が乳酸菌の生育に与える影響については、原料中のグラム陰性菌を圧力処理や薬剤の添加による殺菌、静菌することでグラム陰性菌の存在しない仕込生地を調製し、その存在意義を解析できないか検討中である。

Sourdough, Lactic acid bacteria, Gram negative bacteria

発表番号：2F033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヒト大腸フローラモデルを用いたプレバイオティクス効果の検証

# High throughput evaluation of prebiotics effect using the human large intestinal microbiota model

○高木 理沙[1]、佐々木 建吾[2]、佐々木 大介[2]、福田 伊津子[1]、大澤 朗[1]（[1]神戸大院農、[2]神戸大自然科学系）
○Risa TAKAGI[1], Kengo SASAKI[2], Daisuke SASAKI[2], Itsuko FUKUDA[1], Ro OSAWA[1]（[1]Kobe Univ., [2]Organization of Advanced Science and Technology Kobe Univ.）

【目的】近年、ヒトの健康に有益とされる機能性成分を含んだ食品が市場に多く流通しているが、経口摂取された食品成分は宿主の消化酵素や腸内細菌などにより様々な代謝を受けることが知られており、機能性成分のヒト体内での動態を把握する事は容易ではない。一般に、食品成分の機能性評価は、実験動物への経口投与試験にて行われているが、実験動物とヒトとでは腸内細菌叢を含む生体の構造が根本的に異なるため、実験結果をそのままヒトについても得られる結果と翻訳することが困難である。そこで今回、我々はヒト腸内細菌叢バランスを培養器の中で再現し、そこに種々の機能性成分を投入する事で簡便に腸内細菌叢の変動や代謝変換をモニターできる「ヒト大腸フローラモデル」を確立した。機能性成分が腸内細菌叢構成に影響を与える例として、有用細菌の増殖を特異的に向上させるプレバイオティクスが挙げられる。そこで、すでに有益効果が報告されている種々のプレバイオティクスを本モデルに投入し、主要な有用細菌であるビフィズス菌を含めた腸内細菌叢の変動を調べることで、本モデルの有用性を検証した。

【方法】ヒト大腸フローラモデルの基礎培地として GAM 培地を使用した。培養器内に窒素ガス及び炭酸ガスを曝気する事で嫌気状態を保ち、pH は一定になるようコントロールした。本モデルに、健康な成人の糞便のみを投入したコントロール、及び糞便とフラクトオリゴ糖（FOS）、ガラクトオリゴ糖（GOS）、イソマルトオリゴ糖、キシロオリゴ糖（XOS）、ラフィノース、ラクツロース、またはラクトスクロースをそれぞれ投入した試験群において、0、6、24 時間後の培養液を採取し、定量 PCR 法によって *Bifidobacterium* 属を含めた腸内細菌叢の菌数測定を行い、さらに HPLC による短鎖脂肪酸（SCFA）測定も行った。試験回数は 6 人のボランティアの方々に協力してもらい、合計 6 回行った。

【結果・考察】コントロールにおいては、細菌数及び SCFA 組成が投入した糞便に近似しており、本モデルはヒトの腸内細菌叢を再現できていると考えられる。またプレバイオティクス添加群においては、42 回試験中において 35 回のビフィズス菌増殖促進効果がみられた。このことからヒト介入試験においても報告されているような有益効果が本モデルにおいても同様に得られることが示唆された。よって本モデルはヒト介入試験に先立った試験に有用であることが示唆された。今後は次世代シーケンサーによって網羅的な解析を行うことで、細菌叢の変動について詳細に検証する予定である。

Human large intestinal microbiota, Prebiotics, Bifidobacterium

発表責任者：大澤朗（tamie@opal.kobe-u.ac.jp）

発表番号：2F034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物表層に棲息する *Methylobacterium* 属細菌におけるビタミン B 群要求性の解析

# Analysis of B vitamins-auxotrophy of *Methylobacterium* sp. living in the phyllosphere

○吉田 裕介[1]、井口 博之[2]、由里本 博也[1]、阪井 康能[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京都学園大・バイオ環境）
○Yusuke YOSHIDA[1], Hiroyuki IGUCHI[2], Hiroya YURIMOTO[1], Yasuyoshi SAKAI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ.)

【緒言】*Methylobacterium* 属細菌は、メタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として生育できるグラム陰性細菌であり、コロニーが特徴的なピンク色を示すことから pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM)とも呼ばれている。PPFM は、植物の葉上微生物の優占種となっており、中には植物に対して生長促進効果を発揮する菌株も報告されている。この生長促進や共生のメカニズムの解明は、新しい農作物増産技術の開発および自然界における植物－微生物相互作用のさらなる理解につながると期待される。植物表層に棲息する PPFM は、植物上で取得できる限られた化合物のみを利用して生育していると考えられる。通常、PPFM の培養にはビタミン B 群を含む培地が用いられるが、植物表層の PPFM におけるビタミン B 群の要求性および植物上でのやり取りについては明らかとなっていない。本研究では、当研究室で植物試料から単離した株を含む PPFM について、生育に必要なビタミン B 類を特定した。

【実験方法および結果】当研究室で植物試料より単離した 10 株、水田の水から単離した 1 株、および Type strain など比較対象として用意した 6 株の計 17 株の PPFM について、チアミン ($B_1$) 、ナイアシン ($B_3$) 、パントテン酸 ($B_5$) 、ピリドキシン ($B_6$)、ビオチン ($B_7$) 、コバラミン ($B_{12}$) 、イノシトール ($B_h$)、*p*-アミノ安息香酸 ($B_x$) の要求性を調べた。うち 8 株がビタミン B 群を生育に必要とし、さらにその 8 株のうち 6 株がパントテン酸のみを必要とし、ほかの 2 株はピリドキシンおよびビオチンの両方を必要とすることがわかった。また、パントテン酸を必要とする PPFM は、すべて植物試料より単離した株であった。次に、パントテン酸要求性ではなく、全ゲノムが明らかになっている *M. extorquens* AM1 について、パントテン酸合成遺伝子のうち、 (*R*)-パントイン酸と β-アラニンとを脱水縮合させるパントテン酸シンターゼをコードする *panC* を欠損させた破壊株を得た。メタノール培養時における *ΔpanC* 株, およびその他のパントテン酸要求性 PPFM について、生育に必要なパントテン酸の濃度を調べたところ、パントテン酸要求性 PPFM は、0.4 μg/mL の濃度で生育することができた一方、*ΔpanC* 株は、10 μg/mL 以下の濃度では生育できなかった。これらの結果より、植物表層の PPFM は、パントテン酸を生育に必要とする株であっても、植物からパントテン酸を得て生育することができること、またこれらのパントテン酸要求性 PPFM は、パントテン酸を自身で合成できる株と比べ、より低濃度のパントテン酸を利用できることが示唆された。

*Methylobacterium* sp., B vitamins, plant-microbe interaction

発表番号：2F035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Methylobacterium* sp. strain OR01 の可視化によるアカシソ上での動態観察

# Dynamics of GFP-expressing *Methylobacterium* sp. strain OR01 on red perilla

○片山 志織、由里本 博也、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Shiori KATAYAMA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【背景】

Pink-pigmented facultative methylotroph (PPFM) として知られる *Methylobacterium* 属細菌は、植物から放出されるメタノールを利用して植物上に棲息している。PPFM は植物から一方的に恩恵を受けているわけではなく、生長促進作用を植物に与えることが知られている。我々は以前、アカシソ（*Perilla frutescens crispa* (Thunb.) Makino）の葉と種子に *Methylobacterium* sp. strain OR01 が優占的に存在することを発見し、さらにアカシソと OR01 株が土地や環境によらず強い共生関係にあることを見出した[1)]。植物上 PPFM は、土地や周辺環境に由来するという説と、予め種子に存在していた PPFM が植物全体に広がるという説が唱えられている。アカシソと OR01 の関係は後者にあたると考えられるが、植物上での PPFM の分布や、種子からの定着過程等は未だ解明されていない。そこで今回、*mxaF* プロモーターの支配下で GFP が発現する OR01-GFP 株を作成し、アカシソ上での動態観察を試みた。

【結果】

殺菌処理した種子に OR01-GFP 株を接種後、無菌またはオープンエアでアカシソを生育し、共焦点顕微鏡および蛍光実体顕微鏡観察で継時的に観察した。アカシソ発芽直後では種子と芽の境界に OR01-GFP 株が密集する場が確認され、種子の表面から植物体表面に菌が移動する可能性が示唆された。播種 11 日目では、子葉、茎頂部分に OR01-GFP 株は少なかったが、茎では表皮細胞間の間隙に整然と OR01-GFP 株が並ぶ様子が確認された。数 mm 程度の本葉が見られる播種後２週間では、本葉の基部に菌が多く、３週間では本葉の先端や周辺部に多く存在することがわかった。またアカシソが生長し新葉や脇芽が出ると、細胞分裂の盛んな新葉、脇芽、茎頂部から OR01-GFP 株が非常に多く検出された。さらに花の周辺部や実った種子懸濁液からも OR01-GFP 株が検出され、PPFM が植物の次世代へと伝搬されることが強く示唆された。また子葉、本葉の詳細な観察では、腺鱗などのトリコーム周辺を起点に菌叢を形成しているものや、気孔から葉内へと侵入したと考えられる菌叢が多数見られた。OR01-GFP 株に見られた動態は *E. coli* GFP 発現株ではほとんど確認されなかった。

1) Mizuno et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1533-1538 (2013)

plant-microbe interaction, methylotroph, plant

発表番号：2F036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌抗酸化システム多重欠損株を用いたアミノ酸生合成系の酸化損傷の解析

# Analysis of oxidative damage against amino acid biosynthesis in *Escherichia coli* multiple mutants defective in antioxidative systems

○坂元 仁[1]、古田 雅一[1,2]、土戸 哲明[1] ([1]大阪府大・放射線研究センター、[2]大阪府大院工)
○Jin Sakamoto[1], Masakazu Furuta[1,2], Tetsuaki Tsuchido[1] ([1]Rad. CRes.Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Pref. Univ.)

〔目的〕実験生物、物質生産用の宿主として汎用される通性嫌気性細菌である大腸菌においても、さまざまな活性酸素の傷害から自己を防御するための多重に張り巡らされた防御システムを備えている。我々は、これまでに主要な抗酸化システムの代表として SOD 系、過酸化水素消去系、レドックス制御系を選択し、これらの大腸菌多重遺伝子セット欠損株を構築して、種々の薬剤ストレスや、高温ストレス下での二次的な活性酸素の影響と生存性への関連を調査してきた [1,2]。これらの株を用いれば、どの活性酸素が細胞内で発生し、どの生合成系が傷害を受けているかを増殖能の比較から推定できる。そこで抗酸化システム多重欠損株の特定栄養源添加下の表現型の解析からの酸化ストレス損傷の全貌解明を試みた。
〔方法〕大腸菌 K12 W3110 のプロリン要求性の派生株 NBRC 106482 を親株（通称 OW6）として用いた。スーパーオキシド消去系の主要遺伝子群の *sodA*/*sodB*/*sodC* セット、過酸化水素消去系の主要遺伝子群 *katE*/*katG*/*ahpCF* セット、細胞質内の酸化還元制御系の主要因子群 *trxA*/*trxB*/*trxC*/*gor* セットについて選択し、これらの単独、二重、三重各セット欠損株群を用いて L-Pro 含有 M9 最少合成培地を基に各種のアミノ酸などの栄養源を添加し、希釈スポット法を用いて 30℃でコロニーを形成させ、増殖能を評価した。
〔結果〕SOD については Touati(1986)らが *sodA*/*sodB* 二重欠損株を用いて、特定のアミノ酸グループを除いた最少液体培地での増殖能を比較し、L-Val、L-Ile などの分岐鎖脂肪酸族アミノ酸の欠乏での増殖阻害から、これらの生合成系がスーパーオキシドで損傷すると報告している。一方、我々の実験系は、SOD 完全欠損株、特定のアミノ酸グループの除去ではなく要求性以外の単一アミノ酸の添加系、液体培地ではなく酸化ストレスの影響を強く受ける寒天培地の点で評価系が異なっている。この系では、SOD セットの欠損を含む株において特にコロニー形成の阻害が確認された。SOD 完全欠損株では脂肪酸族アミノ酸の添加で増殖改善はなく、L-Val 添加では全ての株で、K-12 株で知られるカタボライト抑制により完全にコロニー形成が阻害された。コロニー形成能が大幅に改善されたアミノ酸は L-Met＞Gly の順であった。L-Cys や D-Met の添加では改善しなかったことから SH 基を含むアミノ酸の還元作用によるものではなく、L-Met 生合成系へのスーパーオキシサイドの攻撃が主要な損傷であると示唆された。〔文献〕1) 坂元ら, 第 42 回 日本防菌防黴学会年次大会要旨集(2015) 2Pp-22、2) 坂元ら, 第 67 回 日本生物工学会大会要旨集(2015) 2P-16

oxidative stress, ROS, amino acid biosynthesis

発表責任者：坂元 仁（sakamoto.jj@gmail.com）

発表番号：2F037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌芽胞のコアのタンパク質変性および加熱・放射線耐性におけるジピコリン酸の役割

# Role of dipicolinic acid in *Bacillus subtilis* spore for stability of a protein expressed in the core and spore resistance to heat and gamma radiation treatments

○前田 伸彦[1]、坂元 仁[2]、土戸 哲明[2]、古田 雅一[1,2]（[1]大阪府大院工、[2]大阪府大・放研セ）
○ Nobuhiko Maeda[1], Jin Sakamoto[2], Tetsuaki Tsuchido[2], Masakazu Furuta[1,2]
([1]Grad.Sch.Eng.Osaka Pref Univ., [2]Rad.CRes.Osaka Pref Univ)

［目的］ 細菌芽胞は熱や薬剤などの物理・化学処理に対して高い抵抗性を示すことから、食品衛生上その対策が常に問題になっている。この抵抗性の基盤的要因は、芽胞のコア内の低水分化であることが推定されている。芽胞コア脱水の要因として、コルテックスによるコアの締め付け[1)]や、芽胞内に局在するジピコリン酸（DPA）の蓄積などの説が挙げられている。本研究では、前報[2)]に続いて枯草菌芽胞の熱、ガンマ線耐性における DPA の役割を明らかにするため、親株とその DPA 合成酵素欠損株に耐熱性蛍光タンパク質を芽胞コア内に発現させ、そのコア内タンパク質の変性挙動とその芽胞の生存性への関与を調査した。
［方法］ *Bacillus subtilis* 168 株とその *spoVFAB*（DPA 合成酵素遺伝子）欠損株に対して、挿入組み換えプラスミドを用いて耐熱性蛍光タンパク質 YFP3.2 を芽胞コア内で発現させた株を供試菌とした。Schaeffer 芽胞形成培地にて芽胞を調製し、DPA 合成欠損株では芽胞形成培地に各濃度の DPA を添加して系を用いてコア内 DPA 濃度を変化させた。50mM リン酸カリウム緩衝液（pH7.0、以下 KPB と略す）中で各コア内蛍光タンパク質発現芽胞の蛍光を蛍光光度計で測定し、生存性は平板法により評価した。加熱処理およびガンマ線処理は KPB 中で行った。
［結果］ 芽胞コア内に蓄積した DPA が、加熱処理およびガンマ線照射下におけるコア内タンパク質の安定性、生存性に関与するかどうかを検討した。加熱処理においては、DPA 合成欠損株に対し DPA の濃度を変化させて添加することにより、コア内発現蛍光タンパク質の消光は抑制され、生存率が上昇した。このことから、DPA 蓄積によるコアの脱水化・自由水の減少によるコア内タンパク質変性の低下により、死滅が抑制されたと推察された。一方、ガンマ線照射では、DPA の蓄積に依存したコア内発現蛍光タンパク質の消光抑制はなく、親株と同様の消光挙動を示した。また、168 株と DPA 合成欠損株の死滅速度に顕著な違いはなかった。このことから、ガンマ線はコア内発現蛍光タンパク質を失活させること、DPA の蓄積およびそれにともなうコアの脱水化はガンマ線照射に対してはコア内タンパク質の保護能力はなく死滅の抑制効果もないことが明らかとなった。
［文献］1）D. Popham et al. (1999) J. Bacteriol., vol. 181 p.126-132.
2）前田ら（2015）日本防菌防黴学会要旨集、1Ap-10

Bacillus subtilis spore, resistance, dipicolinic acid

発表責任者：前田伸彦（k464870@gmail.com）

発表番号：2F038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

出芽酵母の *SSG1-1* 長寿変異株における新規寿命制御機構の解析
The analysis of the regulatory mechanism of lifespan in longevity mutant of budding yeast
○小川 貴史[1]、椿山 諒平[1]、金井 宗良[2]、藤井 力[2]、平田 大[3]、水沼 正樹[1] ([1]広島大院・先端研・分子生命、[2]酒総研、[3]朝日酒造・研究開発)
○Takafumi OGAWA[1], Ryouhei TSUBAKIYAMA[1], Muneyoshi KANAI[2], Tsutomu Fujii[2], Dai HIRATA[3], Masaki MIZUNUMA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]National Research Institute of Brewing, [3]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co.)

老化・寿命は誰もが避けることができない生命現象である。老化は動脈硬化、糖尿病、癌など様々な疾病とも関連が深く、これまでにモデル生物を用いて精力的に解析が行われてきた。その過程で寿命制御機構は単細胞生物の酵母から多細胞生物の哺乳類まで高度に保存されることが明らかとなった。しかし、その詳細は未だ不明な点が多い。メチオニン代謝経路の *S*-アデノシルメチオニン(SAM)はメチル化反応のメチル基供与体として利用される。SAM はメチル基転移後、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)となり、*S*-アデノシルホモシステイン水解酵素(*SAH1*)によって分解される。我々は、出芽酵母の *SAH1* における変異株 *sah1-1* を取得した。SAH は SAM のメチル化反応を阻害するため、速やかに分解される必要があるが、*sah1-1* 変異株は SAH 分解の遅延により、顕著な増殖遅延と短命を示した。

新規寿命制御因子取得のため、*sah1-1* 変異株の示す増殖遅延の回復を指標にしてスクリーニングが実施され、抑圧変異株が 1 種類取得された。我々は取得された変異株を *SSG1-1* (Spontaneous Suppressor of the Growth-delay of the *sah1-1*) と命名した。*SSG1-1* は優性変異で、原因遺伝子は機能未知の *YHR032W* であった。*SSG1-1* 変異株の経時的寿命を測定すると、*sah1-1* 変異株の短命を抑圧するだけでなく、野生株よりも長寿となることが分かった。さらに *SSG1-1* 変異株は SAM を高蓄積した。このことから SAM の蓄積が寿命制御に関与すると予想し、*SSG1-1* 変異株の寿命延長機構を解明することを目的とした。

*SSG1-1* 変異株において SAM 合成酵素 *SAM1/2* を破壊し、寿命の解析を行った。その結果、*SSG1-1* 変異株の寿命延長効果は野生株程度にまで抑圧されることが分かった。さらに、*SAM1/2* を野生株に過剰発現すると、寿命延長が観察された。これにより SAM 合成の寿命制御への関与が予想された。また、遺伝子マイクロアレイ法により、遺伝子発現の解析を行った。その結果、*SSG1-1* 変異株では、メチオニン代謝およびグルコース代謝に関与する遺伝子が高発現していることが明らかとなった。メチオニン代謝に関与する遺伝子は SAM 合成が関与すると予想した。グルコース代謝に関与する遺伝子に着目すると、ヘキソキナーゼ *HXK1* や高親和性グルコーストランスポーター*HXT4* などカロリー制限で転写量の上昇が報告されている遺伝子（*Mol. cells, 26, 299-307, 2008*)を多数含んでいることが明らかとなった。このことから、*SSG1-1* 変異株はカロリー制限模倣株と予想され、SAM が関与する寿命制御機構の詳細を解析中である。

*Saccharomyces cerevisiae*, lifespan, *S*-adenosylmethionine

発表責任者：小川貴史（d152762@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2F039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

出芽酵母の液胞膜に局在する寿命制御因子 Ssg1 の機能解析
Functional analysis of vacuolar membrane protein Ssg1, which may involved in longevity in *Saccharomyces cerevisiae*
○竹内 悠人、小山 哲也、久米 一規、水沼 正樹（広島大学　先端研　分子生命）
○Yuto TAKEUCHI, Tetsuya KOYAMA, Kazunori KUME, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

近年、酵母などの真核モデル微生物を用いた老化・寿命研究が世界中で活発に行われており、多くの寿命制御因子が同定されてきたが、その分子機構については不明な点も多い。当研究室では、$Ca^{2+}$シグナルの生理的機能を解析する過程において、$Ca^{2+}$シグナルが寿命制御に関与することを発見した。特に、出芽酵母 *Δzds1* 株が示す $Ca^{2+}$感受性を抑圧する *scz* 変異株のうち、*S*-アデノシルホモイステイン (SAH)水解酵素の変異株 *sah1-1* (*scz7*)変異株では著しく寿命が短縮されていることが分かっている。さらに、*sah1-1* 変異株の寿命短縮や増殖遅延を抑圧する株を取得し、この抑圧変異を *SSG1* (**S**pontaneous **S**uppressor of Growth-delay of the *sah1-1*)変異と命名した。また、*SSG1* の原因遺伝子を同定したところ、*YHR032W* 遺伝子内における変異だと分かった。*sah1-1* 変異株の寿命が短縮するのに対し、*sah1-1 ssg1* 二重変異株や *ssg1* 変異株では野生株よりも寿命が延長した。また、*ssg1* 変異株は、メチル基供与体として様々な生体分子のメチル化に必須である *S*-アデノシルメチオニン (SAM)を高蓄積する。本研究では、Ssg1 の機能解析を通して、新規な寿命制御機構を明らかにすることを目的とする。

Ssg1 のアミノ酸配列から、膜タンパク質と予想され、野生型の Yhr032W よりも膜貫通領域が 2 カ所増えていることが分かった。そこで Ssg1 の機能を明らかにするため、Ssg1 の細胞内局在を調べた。その結果、野生型の Yhr032W は明確な局在が観察されなかったが、Ssg1 は対数増殖期初期において液胞膜に局在した。*SSG1* 変異により延長したアミノ酸配列のどの領域が液胞膜局在や寿命延長に重要か調べることにした。そこで、まず Ssg1 の C 末端側の膜貫通していない最後の 20 個のアミノ酸部分を欠失させた変異株を作成した。EGFP-Ssg1 と作成した EGFP-Ssg1-⊗20a.a.についてそれらのタンパク量を Western 解析したところ、Ssg1 と Ssg1-⊗20a.a.ではタンパク量に変化が無いことが分かった。また、Ssg1-⊗20a.a.の対数増殖期初期における局在を観察したところ、Ssg1 と同様に、液胞膜に局在することが分かった。しかし、増殖に対する影響を観察したところ、*SSG1* 変異による *sah1-1* 変異株の増殖遅延の抑圧が、*SSG1-⊗20a.a.*変異では消失することが明らかとなった。そこで、*sah1-1* 変異株の増殖遅延の抑圧には、Ssg1 の C 末端側の 20 個のアミノ酸が必要であると予想し、現在それについて解析中である。

*Saccharomyces cerevisiae*, lifespan, Ssg1

発表番号：2F040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母の高浸透圧シグナルによる寿命制御機構の解析

# Analysis of the regulation of lifespan in response to high osmotic stress

○米北 久美子、小山 哲也、久米 一規、水沼 正樹（広島大院・先端研・分子生命）
○Kumiko YONEKITA, Tetsuya KOYAMA, Kazunori KUME, Masaki MIZUNUMA (Hiroshima Univ. Grad. Sch. of AdSM)

老化・寿命研究において、様々なモデル生物を用いて寿命制御のメカニズムの研究が行われている。出芽酵母は最もシンプルなモデル生物であり、カロリー制限に代表される寿命制御機構は生物間で高く保存されている。そのため出芽酵母から得た知見がヒトの健康寿命の延長の手がかりになることが期待されている。これまでに我々は、$Ca^{2+}$シグナルの生理的機能を明らかにするため、*Δhog1* 株が示す $Ca^{2+}$感受性を抑圧する変異株を取得し、その抑圧変異を *sgh* (**s**uppressor of $Ca^{2+}$-induced **g**rowth arrest of ***h**og1)*と命名した。*sgh* は 6 つの遺伝子座に分類され、*sgh3* は *tup1*、*sgh5* は *sko1*、*sgh6* は *cyc8* とそれぞれ同一であった。興味深いことに、*sgh3~6* 変異は *Δhog1* 株の示す浸透圧感受性も抑圧した。この事から、*SGH3~6* が高浸透圧のストレス応答に関与することが示唆された。またこれまでに、高浸透圧存在下では複製的寿命 (新生細胞の分裂回数によって定義される寿命)が延長することが報告されている。そのメカニズムは、高浸透圧による Hog1 活性化がグリセロールの生合成を促進し、それに伴う NAD の増加と Sir2 の活性化が重要であると報告された。またこれは、Sir2 の活性化による寿命延長という点において、カロリー制限の効果と類似すると示唆されている。しかし、経時的寿命 (定常期以降の細胞の生存期間)と高浸透圧シグナルとの関係は不明である。そこで、本研究では *sgh3~6* 変異株を用いて、浸透圧シグナルによる経時的寿命の分子機構について解明することを目的とした。

まず、ソルビトールを添加することにより高浸透圧条件下における野生株の経時的寿命を調べた。その結果、高浸透圧条件下において、経時的寿命が 2 倍程度延長することがわかった。またこれまでの解析から、*Δhog1 tup1*、*Δhog1 sko1* および *Δhog1 cyc8* 二重変異株において、通常は高浸透圧シグナルによって誘導される遺伝子が、シグナルがない場合においても恒常的に発現することが明らかとなっている。そこで、浸透圧シグナル特異的な遺伝子が発現している *Δhog1 tup1*、*Δhog1 sko1* および *Δhog1 cyc8* 二重変異株を用いて、高浸透圧を加えない条件における経時的寿命を解析した。その結果、*Δhog1* 株は野生株と比べ短寿命となったが、二重変異株は *Δhog1* 株の短寿命を抑圧した。次にこれらの二重破壊株を用いて経時的寿命を測定した。その結果、二重破壊株は変異株同様、*Δhog1* 株の短寿命を抑圧した。さらに *Δsko1* 単独破壊株で経時的寿命を解析した結果、野生株と比較して高い生存率を維持した。これらの結果から、高浸透圧シグナル応答が経時的寿命を延長していることが示唆され、現在その詳細について解析中である。

Yeast, Lifespan, Osmotic stress

発表番号：2F041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母の寿命制御に関わるメチル基転移酵素の探索

Screening of methyltransferase gene(s) related to lifespan extension in budding yeast

○橋本 沙也加、小川 貴史、久米 一規、水沼 正樹（広島大学　先端研　分子生命）
○SAYAKA HASHIMOTO, TAKAFUMI OGAWA, KAZUNORI KUME, MASAKI MIZUNUMA (Hiroshima Univ.)

老化、寿命の研究において、最もシンプルなモデル生物が出芽酵母である。近年、出芽酵母などのモデル生物を用いた研究により、高等生物にまで高く保存される寿命制御に関与する遺伝子やその分子メカニズムが明らかにされてきた。しかし、寿命制御機構は不明な点も多い。

メチオニン代謝経路の *S*-アデノシルメチオニン(SAM)は、生体内の主要なメチル基供与体であり、タンパク質、脂質、核酸などのメチル化反応を行う。一方、*S*-アデノシルホモシステイン(SAH)は SAM のメチル化反応によって生じる。SAH は、SAM の構造アナログであり、SAH が蓄積されると、SAM のメチル化反応が阻害されるため、速やかに分解される必要がある。我々の研究室では、*S*-アデノシルシステイン水解酵素(*sah1-1*)の変異株を取得した。*sah1-1* 変異株は増殖遅延、短寿命を示し、テロメア長も短くなった。そこで長寿遺伝子の取得を目的として、*sah1-1* 変異株の増殖遅延を抑圧する変異株の取得を試みた。その結果、優性変異株 *SSG1*(**S**pontaneous **S**uppressor **G**rowth-delay of the *sah1-1*) が取得され、実際 *SSG1* 変異株は、野生株よりも長寿命となり、テロメア長も野生株程度の長さに戻った。さらに *SSG1* 変異株は、SAM を高蓄積した。このことから、細胞増殖や寿命制御にはメチル化反応が重要な役割を果たすことが予想された。しかし、メチル化反応が寿命に与える影響については、ほとんど明らかにされてない。本研究では、*SSG1* が関わる細胞増殖や寿命制御と機能関連するメチル基転移酵素を探索し、その分子機構について解明することを目的とした。

*SSG1* と機能関連するメチル基転移酵素を探索するため、*sah1-1 SSG1* 変異株を利用して、この二重変異株とメチル基転移酵素との三重変異株を構築し、その増殖が *sah1-1* 程度にまで緩慢となるものをスクリーニングすることにした。出芽酵母メチル基転移酵素は 75 遺伝子存在している。そのうち、必須遺伝子、破壊株ライブラリー、推定のものを除く 41 遺伝子の破壊株を取得した。取得した三重変異株の増殖を調べた結果、*sah1-1* 程度に増殖遅延した株が 12 株見つかった。それらの遺伝子は、*SSG1* 変異による増殖制御や寿命に関与している可能性があると示唆された。そこで今回、それらうちの 4 株について経時的寿命およびテロメア長を測定した。その結果、全て短寿命を示した。さらに、テロメア長を測定したところ、*sah1-1* 程度まで短くなる株が 3 株存在することが分かった。このことから、*SSG1* が関わる細胞増殖や寿命、テロメア長に重要な役割を果たすメチル基転移酵素の存在が明らかとなった。現在、取得した残りの三重変異株についても順次解析を進めている。

*Saccharomyces cerevisiae* , lifespan, methyltransferase

発表番号：2F042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Volvox 目緑藻の進化におけるアミノ酸とアラニンラセマーゼ
# Amino Acids and Alanine Racemase in the Evolution of Volvocine Green Algae

○二重作 和宏[1]、平戸 祐喜[1]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○Kazuhiro Futaesaku[1], Yuki Hirato[1], Mayumi Oda[1], Minoru Tanigawa[1], Katsushi Nishimura[1,2]
([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior College)

【緒言】

Volvox 目緑藻は単細胞で生活する *Chlamydomonas* 属から群体を形成する *Gonium* 属, *Pandorina* 属, *Eudorina* 属，*Pleodorina* 属を経て，細胞数約 2000 の群体を形成する *Volvox* 属に進化したと考えられている．Volvox 目緑藻の進化の過程で, アミノ酸耐性と Alanine racemase 活性がどのように変化してきたのかを調べることがわれわれの目的である．本研究では，Volvox 目緑藻を培養し，アミノ酸耐性と Alanine racemase 活性を調べた．

【方法】

*Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) と *Gonium pectorale* (*G. pectorale*) は Tris Acetate Phosphate (TAP) Medium を用いて，*Pandorina morum* (*P. morum*)，*Eudorina elegans* (*E. elegans*)，*Pleodorina californica* (*P. californica*)，*Volvox carteri* (*V. carteri*) は Standard Volvox (SV) Medium を用いて，また TAP 培地あるいは SV 培地に各種 10 mM のアミノ酸を加えた培地を用いて，それぞれの緑藻を培養した. 培養後, 生育観察を行った. また TAP 培地あるいは SV 培地に 1 g/L D-Ala または L-Ala を加えた培地を用いて，それぞれの緑藻を培養した．培養後，集めた細胞を超音波破砕し，遠心分離した後の上清を無細胞抽出液とした．得られた無細胞抽出液中の Alanine racemase 活性を DAO と Peroxidase を用いて調べた．

【結果】

Volvox 目緑藻間には，アミノ酸耐性に違いが見られた．*C. reinhardtii* は，Cys，Try に対して生育阻害を起こし，Ile，Lys，Leu，Met，Phe，Pro，Ser，Thr，Val は *C. reinhardtii* の生育を促進した．*G. pectorale* は，Arg，Asn，Asp，Cys，Gln，Glu，His，Trp，Tyr に対して生育阻害を起こし，Ile，Leu，Val は *G. pectorale* の生育を促進した．一方，Val は *V. carteri* の生育を促進し，Ala，Arg，Asn，Asp，Cys，Gln，Glu，His，Ile，Leu，Lys，L-Pro，Ser，Trp は生育を阻害した．

*C. reinhardtii*, *G. pectorale*, *P. morum*, *E. elegans* は, Alanine racemase 活性を示した. また, *C. reinhardtii* と *G. pectorale* は，D 型 L 型どちらの Ala を加えた場合にも Alanine racemase 活性の上昇がみられた．*P. morum*，*E. elegans* は D-Ala を加えた場合にのみ活性が上昇した．

Volvocine green algae, Alanine racemase, Evolution

発表番号：2F043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# バイオフィルム中に形成される芽胞は浮遊細胞由来芽胞とは異なる耐性を有する

# The spores derived from the biofilm cells have different resistance to the spores derived from the planktonic cells

○横山 佳奈[1]、尾花 望[1]、久保田 浩美[2]、富山 大輔[2]、蓮見 基充[2]、野村 暢彦[1]([1]筑波大生物資源、[2]花王安全性科学研)
○Kana YOKOYAMA[1], Nozomu OBANA[1], Hiromi KUBOTA[2], Daisuke TOMIYAMA[2], Motomitsu HASUMI[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kao Corp.)

【背景・目的】多くの細菌は実環境中において菌の集合体であるバイオフィルムを形成している。バイオフィルム細胞は浮遊細胞と比べ高い付着性や耐性を有するため、食品製造現場において原料や製造機器等に付着し、残存することで食品腐敗の原因となりうる。また、*Bacillus, Clostridium* 属細菌に代表されるグラム陽性の芽胞形成細菌は、その芽胞の高い耐性ゆえ古くから食品腐敗の原因として知られており、適切な制御が求められている。芽胞形成細菌である *Paenibacillus* 属細菌は、その芽胞が他種の芽胞形成細菌と比較して強力な殺菌剤である過酢酸に対してより高い耐性を持つことや、低温でも増殖可能であるという特性を持つことから、食品腐敗危害菌として近年着目されてきている。そのため本菌においてはバイオフィルム及び芽胞の制御が重要であるが、その知見は乏しい。そこで本研究では、*Paenibacillus* 属細菌のバイオフィルムや芽胞の詳細な解析を行うこととした。前報では、高いバイオフィルム形成能を有する *P. glucanolyticus* と *P. polymyxa* において、成熟したバイオフィルム中の細胞は浮遊細胞と比べより多くの芽胞が形成されていたことを報告した。今回はそれらの芽胞の形態や耐性について解析したため報告する。

【方法・結果】*P. polymyxa* ATCC 39564 において浮遊細胞から形成される芽胞と、バイオフィルム細胞から形成される芽胞を精製し、それらを位相差顕微鏡及び電子顕微鏡にて比較したところ、バイオフィルム中ではより長い芽胞が形成され、より厚い Outer coat を有することが明らかとなった。次に、浮遊細胞由来及びバイオフィルム細胞由来芽胞の耐熱性及び過酢酸耐性を比較したところ、いずれもバイオフィルム細胞由来の芽胞がより高い耐性を有することが明らかとなった。さらに、両芽胞の発芽効率を継時的に観察したところ、バイオフィルム細胞由来芽胞は浮遊細胞由来芽胞と比較して発芽に要する時間が長かったことから、より高い休眠性を持つことが示唆された。Outer coat は芽胞の薬剤耐性に関与しており、高い休眠性を有する芽胞は高い耐性を有するという報告がある。本研究の結果より、バイオフィルム細胞由来芽胞は浮遊細胞由来芽胞と比較してより厚い Outer coat や高い休眠性を有することから、高い耐性を獲得していることが示唆された。*Paenibacillus* 属細菌を含む多くの芽胞細菌は実環境中においてバイオフィルムを形成していることから、バイオフィルムに形成される芽胞の性質を解析する必要性が示された。

spore, biofilm, *Paenibacillus*

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# フルクトフィリック乳酸菌 *Lactobacillus kunkeei* の比較ゲノム解析から見える乳酸菌の環境適応
# Genomic Characterization of Fructophilic Lactic Acid Bacterium, *Lactobacillus kunkeei*, to Study Niche-Specific Adaptation of the Organism

○前野 慎太朗[1]、谷沢 靖洋[2,3]、兼崎 友[4]、久保田 恵理[4]、矢嶋 俊介[4]、SALMINEN SEPPO[5]、中川 純一[1]、有田 正規[3,6]、遠藤 明仁[1] ([1]東京農業大学 生物産業学部、[2]東京大学 新領域創科学研究科、[3]国立遺伝学研究所 生命情報センター、[4]東京農業大学 生物資源ゲノム解析センター、[5]トゥルク大学 食品機能性フォーラム、[6]理化学研究所環境資源科学研究センター)
○SHINTARO MAENO[1], YASUHIRO TANIZAWA[2,3], YUH KANESAKI[4], ERI KUBOTA[4], SYUNSUKE YAJIMA[4], SEPPO SALMINEN[5], JYUNNICHI NAKAGAWA[1], MASANORI ARITA[3,6], AKIHITO ENDO[1] ([1]Department of Food and Cosmetic Science, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [3]Center for Information Biology, National Institute of Genetics, [4]Genome Research Center, NODAI Research Institute, Tokyo University of Agricalture, [5]Functional Foods Forum, University of Turku, [6]RIKEN center for Sustainable Resource Science)

【目的】
乳酸菌は動物の消化管や乳製品、植物性発酵食品などの様々な環境中に生息し、その生息場所ごとにゲノムレベルでそれぞれの環境に適応している。フルクトフィリック乳酸菌はフルクトースを好む乳酸菌群の総称で、昆虫の消化管や花・果物といったフルクトース豊富な環境中から多く見いだされる。*Lactobacillus kunkeei* は 180 菌種以上が分類される *Lactobacillus* 属の中で、唯一のフルクトフィリック乳酸菌である。その *L. kunkeei* は、近年個体数が減少しているミツバチ腸内の最優勢菌であることが報告されており、ハチプロバイオティクスとして注目されている。そこで、本研究では *L. kunkeei* のゲノムを様々な *Lactobacillus* 属のゲノムと比較解析することにより、*L. kunkeei* の遂げた環境適応による独自の進化を明らかにすることで、多様性を持つ乳酸菌の進化の一端を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】
まず、ハチプロバイオティクス候補菌株である *L. kunkeei* FF 30-6 株のドラフトゲノムを決定した。また、NCBI/DDBJ/EMBL から 4 株の *L. kunkeei* と比較対象である 38 菌種の *Lactobacillus* 属のゲノムデータを取得した。これらのゲノムデータについて一般的なゲノムの特徴に着目した後、代謝経路予測データベースや、ゲノムから推測されるタンパク質が持つ機能ごとの分類に着目し解析を行った。*Lactobacillus* 属は平均ゲノムサイズが 2.16 Mbp で平均遺伝子数が 2014 個であったのに対し、*L. kunkeei* のゲノムサイズは 1.56 Mbp しかなく（$P < 0.001$）、遺伝子数は 1378 個と有意に少なかった（$P < 0.001$）。*L. kunkeei* は *Lactobacillus* 属と比べ、特に糖の代謝に関わる遺伝子が少なく（$P < 0.001$）、全遺伝子数に対する割合も小さいことが分かった（$P < 0.001$）。また、*L. kunkeei* はゲノムサイズが小さいことから、*Lactobacillus* 属のゲノムサイズの小さい菌種のみ（n = 23）と比較したところ、やはり糖代謝に関わる遺伝子が有意に少なく（$P = 0.008$）、*L. kunkeei* はフルクトース豊富な環境適応により、他の糖代謝に関わる遺伝子を特異的に欠失していることが明らかになった。
フルクトフィリック乳酸菌の代表である *Fructobacillus* 属菌種は *adhE* 遺伝子を欠損しており、そのためにフルクトフィリックな特徴を有する事が、我々の研究により示唆されている。一方、解析を行った *L. kunkeei* は 5 株中 2 株で *adhE* の全欠損が確認され、残りの 3 株は alcohol dehydrogenase のドメインのみを有しており、acetaldehyde dehydrogenase のドメインを欠損していた。この 3 株に見られた部分的な *adhE* は発現しておらず、*Fructobacillus* 属と同様に *adhE* の全/部分欠損がフルクトフィリックな特徴を持たせている要因であると強く示唆された。

Lactobacillus, comparative genomics, fructophilic characteristics

発表責任者：遠藤 明仁（a3endo@bioindustry.nodai.ac.jp）

発表番号：2F045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 葉上細菌 *Methylobacterium* 属の光応答性の挙動解析

# Analysis of the light-responsive phenotype in the epiphyte *Methylobacterium* sp.

○井口 博之（京都学園大・バイオ環境）
○Hiroyuki IGUCHI (Kyoto Gakuen Univ.)

【背景】

植物葉上には、多数の多様な細菌が生息しており、植物の生長や健康に影響する重要な働きをしている。微生物の生息場所として見ると、葉上は大気と植物に接する特殊な環境であり、利用可能な栄養が乏しく、太陽光や風雨、植物に由来するストレスに曝される。そうした葉上の過酷な環境において、葉上の主要な細菌であり、植物生長促進作用を持つメタノール資化性細菌 *Methylobacterium* 属は、制御因子 PhyR を介した一般ストレス耐性の誘導や、葉から放出されるメタノールを資化により、有利に生育していることが報告されている。

植物葉上は、微生物の生息場所の中でも、とりわけ光を受ける環境でもある。微生物にとって光は、エネルギー、シグナル、傷害と様々な意味を持つことが知られている。しかし、葉上細菌が光に対してどう応答しているかは不明である。*Methylobacterium extorquens* AM1 のゲノム中には、光感知に関与する BLUF、LOV、Phytochrome といったタンパクドメインやバクテリオクロロフィル色素が存在し、本菌が光に対して多様な応答を持つことが予想された。そこで本研究では、*M. extorquens* AM1 の光照射下での挙動の解析を行った。

【結果】

*M. extorquens* AM1 を光照射（青・赤色蛍光灯）の有無の下で培養し、各種表現型を解析した。その結果、光照射下ではいくつかのストレスへの耐性能が向上した。また、液体培地での生育や、バイオフィルム形成にも影響が見られた。本結果より、本菌は光をストレスと同義あるいは予兆としてとらえ、ストレスに対する備えをしているのではないかと考えられた。

続いて現在、ゲノム中に存在する光センサータンパク質のうち、光への応答が見られた挙動、さらには植物定着に関与するものを明らかにするため、遺伝子破壊株を用いた表現型解析を行っている。

plant, photosensor, methylotroph

発表番号：2F046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母液胞膜タンパク質 Ypq3 のアミノ酸輸送活性及び発現調節

# Amino acid transport activity and regulation of a vacuolar membrane protein Ypq3 in *Saccharomyces cerevisiae*

○池田 紘一[1]、真鍋 邦男[1]、山縣 里奈[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1] ([1]愛媛大農、[2]愛媛大学術支援センター)
○ Koichi IKEDA[1], Kunio MANABE[1], Rina YAMAGATA[1], Miyuki KAWANO-KAWADA[1,2], Takayuki SEKITO[1], Yoshimi KAKINUMA[1] ([1]Fac. Agr., Ehime Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の液胞は細胞全体の 70-90%の塩基性アミノ酸（リジン、ヒスチジン、アルギニン）を蓄積する。我々は単離液胞膜小胞を用いたアミノ酸輸送活性測定により、Amino Acid/Auxin Permease superfamily に属する Avt1 が液胞ヒスチジン／$H^+$アンチポーターであることを報告し(1)、Transporter-Opsin-G protein coupled receptor (TOG) superfamily に属する Ypq1 が液胞へのリジンとアルギニンの取り込み、また、Ypq2 がアルギニン/ヒスチジン交換輸送にそれぞれ機能することを見出している(2)。出芽酵母ゲノムには Ypq1 と 68%の相同性を有する TOG タンパク質 Ypq3 がコードされており、その GFP 融合タンパク質は液胞膜に局在することが示されている(3)。本研究では Ypq3 のアミノ酸輸送活性とアミノ酸飢餓に伴う細胞内レベルの変化について検討した。
【方法】フィコールを用いた遠心分離により液胞膜小胞を単離し、0.5 mM ATP 存在下／非存在下での 0.1 mM $^{14}C$ 標識アミノ酸の取り込み活性を測定した。Ypq3-HA[3] の細胞内レベルは塩基性アミノ酸要求性株（*lys2-801*, *his3-Δ200*, *arg1Δ*）に Ypq3-HA[3] 発現ベクターを導入し、各塩基性アミノ酸欠損培地で 4 時間培養後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。
【結果と考察】*ypq3*Δ株由来の液胞膜小胞は ATP 依存的なヒスチジンの取り込みが部分的に低下した一方、他の塩基性アミノ酸（リジン、アルギニン）およびチロシンの取り込みに大きな変化はなかった。*avt1*Δ*ypq1*Δ*ypq2*Δ*ypq3*Δ株由来の液胞膜小胞は各塩基性アミノ酸の ATP 依存的取り込みがほぼ消失したが、*YPQ3* を *GPD* プロモーターより過剰発現するとヒスチジンの取り込みのみが検出された。この Ypq3 依存的なヒスチジン取り込みは未標識ヒスチジンの添加によって顕著に阻害されたが、他の未標識アミノ酸添加では阻害されなかった。また、Concanamvcin A、CCCP、Nigericin 添加によっても大幅に阻害された。以上の結果は、Ypq3 がプロトン濃度勾配に依存してヒスチジンを特異的に液胞内へと取り込むことを示唆する。さらに、Ypq3-HA[3] の細胞内レベルはヒスチジン飢餓によって増加したがリジンおよびアルギニンの飢餓では大きく変化しなかったことから、Ypq3 はその輸送基質によって発現制御を受けることが示唆された。
【参考文献】
1) Tone J. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.,* (2015) 79:782-789.
2) Sekito T. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, (2014) 78: 969-975.
3) Jézégou A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, (2012) 109: E3434-3443.

transporter, vacuole, *Saccharomyces cerevisiae*

発表番号：2F047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母におけるリジンに応答した TORC1 活性の変化

# Change in the TORC1 activity by addition of lysine to the culture medium in *Saccharomyces cerevisiae*

○山口 翔吾[1]、國米 春香[1]、兵頭 美波[1]、村尾 奈美[1]、河田 美幸[1,2]、関藤 孝之[1]、柿沼 喜己[1]（[1]愛媛大農、[2]愛媛大学術支援センター）
○ Shogo YAMAGUCHI[1], Haruka KOKUMAI[1], Mina HYODO[1], Nami MURAO[1], Miyuki KAWANO-KAWADA[1,2], Takayuki SEKITO[1], Yoshimi KAKINUMA[1]（[1]Fac. Agr., Ehime Univ., [2]ADRES, Ehime Univ.）

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の生育は、プロリンを唯一の窒素源とした培地（SD+Pro 培地）へのリジン添加によって阻害される。細胞内のリジン、アルギニン、ヒスチジンといった塩基性アミノ酸の大部分（70-90%）は液胞に存在しており、我々は液胞から塩基性アミノ酸を排出するトランスポーターAvt4 を欠損するとこの生育阻害が顕著化することを見出した。本研究では、液胞内アミノ酸の生理機能を明らかにするため、リジン添加による生育阻害の分子機構解明を目指した。
【方法】対数増殖初期（$O.D._{660}$ =1.0）の細胞を SD+Pro 培地（0.17% Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate, 2% glucose, 10 mM proline）、もしくはさらにリジンを添加した SD+Pro+Lys 培地（リジン濃度: 固形培地 0.2 mM、液体培地 0.4 mM）に移し 30˚C で培養した。*ADH* プロモーターより発現させた Put4-GFP を蛍光顕微鏡によって観察し、細胞内／液胞内アミノ酸含量はアミノ酸自動分析計により測定した。Sch9-$HA^6$ のリン酸化は 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid 処理によって生じた C 末端側断片をウエスタンブロットにより検出し、Image J プログラムにより解析した。
【結果と考察】出芽酵母はリジンを窒素源として利用できないことが報告されている。我々はこれまでにプロリンを細胞内に取り込むトランスポーターPut4 が、SD+Pro+Lys 培地での培養 6 時間後には液胞内腔へと移行し、唯一の窒素源であるプロリンの細胞内含量が低く抑えられることを見出している。また、恒常的に細胞膜に局在する変異型 Put4 を発現すると、リジン存在下でも細胞内プロリン含量が増加し、生育が回復したことから、Put4 の液胞内腔への移行による細胞のプロリン取り込みの低下が生育阻害の原因であることが示唆された。さらに、野生株では SD+Pro+Lys 培地での培養 2 日目に Put4-GFP の細胞膜局在が回復した一方、*avt4*Δ株では回復しなかった。グルタミンなど資化しやすい窒素源存在下での Put4 の液胞内腔への移行には、Tor complex1（TORC1）の活性化が関与することが示唆されている。TORC1 の基質である Sch9 はリジン添加直後ではリン酸化され、野生株ではやがて脱リン酸化されたのに対し、*avt4*Δ株ではリン酸化されたまま維持される傾向が見られた。また、TORC1 の活性化に必要な *GTR1* および *GTR2* を破壊すると SD+Pro+Lys 培地における生育が回復した。これらは TORC1 がリジン添加によって活性化し、生育阻害を引き起こすことを示唆する。さらに SD+Pro+Lys 培地で細胞内に取り込まれたリジンの 50%以上は液胞内に存在し、*avt4*Δ株では細胞内リジン含量が高いまま維持されることを見出した。現在、液胞内でのリジン蓄積と TORC1 活性との関係について解析を進めている。

*Saccharomyces cerevisiae*, transporter, TORC1

発表番号：2F048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* における RhoGAP タンパク質 FipB とその標的 GTPase の細胞損傷応答

# Cell wounding response of FipB, a RhoGAP protein, and target Rho GTPases in *Aspergillus oryzae*

○原田 堅伍、矢萩 大貴、丸山 潤一、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Kengo HARATA, Daiki YAHAGI, Jun-ichi MARUYAMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* は多細胞生物であり、隔壁には隔壁孔という小さな穴があいており、隣接する細胞はこれを介して連絡している。この細胞間連絡は、菌糸が損傷すると隣接する細胞に溶菌が伝播する危険をはらんでいる。糸状菌に特異的に存在するオルガネラ Woronin body は隔壁孔をふさぎ溶菌の伝播を防ぐが、溶菌の伝播を防いだ後の細胞修復の機構は未解明な部分が多い。当研究室では以前、MAP キナーゼのひとつである AoFus3 が隔壁孔を囲む局在を示し、溶菌後の再生長に関与することを報告している [1)]。さらに、AoFus3 と相互作用するタンパク質として同定した FipB も、隔壁孔を囲む局在を示し、溶菌後の再生長に関与する。FipB は、Rho GTPase を不活性型（GDP 結合型）にする RhoGAP (Rho GTPase-activating protein)ドメインをもち、AoCdc42 を標的とすることが示唆された [2)]。本研究では、*A. oryzae* において FipB と AoCdc42 の菌糸損傷時の局在応答を解析した。
【方法と結果】AoCdc42 の局在を観察したところ、野生型株では隔壁孔周辺に顕著な局在はみとめられなかったが、*fipB* 破壊株や *Aofus3* 破壊株において隔壁孔を囲む局在を示す菌糸が多くみられた。パルスレーザーを用いて菌糸を損傷させたところ、野生型株では AoCdc42 は菌糸損傷後 2 分までに AoCdc42 が隔壁孔の中心に現れる菌糸が多く観察された。*fipB* 破壊株や *Aofus3* 破壊株においては、隔壁孔を囲む局在が菌糸損傷後も継続してみとめられた。一方で、AoFus3 と FipB の局在を解析したところ、菌糸損傷前も損傷後も隔壁孔周辺の局在を示す菌糸が多く観察された。

以上の結果から、隔壁孔を囲む局在を示す AoFus3 と FipB が、菌糸損傷時に AoCdc42 が隔壁孔中心へ局在するよう制御していることを明らかにした。哺乳動物では細胞損傷部位に Cdc42 が集まって細胞修復に関与することが報告されている [3)]。本研究では糸状菌においてもこれと同様の現象があることを示したことから、AoFus3 と FipB が AoCdc42 の局在を制御することによって菌糸損傷時の再生長に関与することが考えられた。

1) 矢萩大貴ら、2013 年度農芸化学会大会講演要旨 4B13a07
2) 原田堅伍ら、2015 年度農芸化学会大会講演要旨 3A41a15
3) Sonnemann *et al*. (2011) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 27:237-63

*Aspergillus oryzae*, RhoGAP, GTPase

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* における糸状菌特異的な新規細胞融合関連タンパク質の解析
# Functional analysis of a novel cell fusion-related protein in *A. oryzae*

○片山 琢也[1]、Ozgur Bayram[2]、竹本 大吾[3]、Gerhard H. Braus[4]、北本 勝ひこ[1]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]アイルランド国立大学、[3]名大院・生命農学、[4]ゲッティンゲン大学)
○Takuya KATAYAMA[1], Ozgur BAYRAM[2], Daigo TAKEMOTO[3], Gerhard H. BRAUS[4], Katsuhiko KITAMOTO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. of Biol., Maynooth Univ., [3]Grad. School Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [4]Dept. of Mol. Microbiol., Georg-August-University Gottingen)

【背景】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の接合は細胞融合のモデルとしてよく研究されてきた。*S. cerevisiae* の接合はフェロモンに応答するシグナル伝達経路によって制御されるが、このうち MAP キナーゼ Fus3 とその下流の転写因子 Ste12 が中心的に働くことが示されている。糸状菌においても Fus3 オルソログが細胞融合に必要であることが報告されており、当研究グループでも麹菌 *Aspergillus oryzae* の Fus3 オルソログ AoFus3 が細胞融合に必須であることを示している[1)]。しかし、糸状菌では有性生殖時だけでなく栄養生長時にも細胞融合が起こること、Ste12 オルソログの細胞融合への寄与が種によって異なることが示されており、糸状菌の Fus3 オルソログ下流の細胞融合制御メカニズムは酵母と異なると考えられる。本研究では糸状菌の Fus3 オルソログによる細胞融合制御機構の解明を目的とし、*A. oryzae* の AoFus3 と相互作用するタンパク質の細胞融合における機能について解析した。

【結果】

これまでに当研究グループでは AoFus3 と相互作用するタンパク質を複数同定している[2)]。このうち、未解析であった Ste12 オルソログ AoSte12 と機能未知タンパク質 FipC (Fus3-Interacting Protein C) を、細胞融合に関与する可能性のある因子として選択した。

FipC は子嚢菌門の糸状菌にのみ保存されている 474 アミノ酸からなるタンパク質であるが、特徴的なドメインは見られなかった。*fipC* 破壊株の表現型観察を行ったところ、FipC が生育、分生子や菌核の形成に関与することが示された。次に、*fipC* 破壊株と *Aoste12* 破壊株に異なる 2 つの栄養要求性を付与し、その相補を指標として細胞融合能を定量的に解析した。その結果、*fipC* 破壊株の細胞融合効率は野生型株の 1/60 程度まで著しく低下し、*Aoste12* 破壊株では 1/3 程度に低下した。このことから、FipC が新規細胞融合制御因子であること、*A. oryzae* の Ste12 オルソログも細胞融合に寄与することが示された。また、酵母ツーハイブリッド解析によって、AoFus3、FipC、AoSte12 のいずれの組み合わせにおいてもタンパク質間相互作用が確認された。さらに、FipC の細胞内局在観察の結果、FipC が AoFus3 や AoSte12 と同様に核に局在することが示され、AoFus3、FipC、AoSte12 が複合体を形成して協調的に細胞融合を制御する可能性が考えられた。

1) Tsukasaki *et al.* (2014) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 1254-62
2) 矢萩大貴ら、2013 年度日本農芸化学会大会講演要旨: 4B13a07

filamentous fungi, *Aspergillus oryzae*, cell fusion

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糖脂質酵素 MPIase に依存するタンパク質膜挿入反応は YidC により促進される
# YidC stimulates glycolipozyme MPIase-dependent integration into membranes.

○志水 優子[1]、佐々木 優[1]、Ross Dalbey[2]、西山 賢一[1] ([1]岩手大寒冷バイオ、[2]オハイオ州立大)
○Yuko SHIMIZU[1], Masaru SASAKI[1], Ross Dalbey[2], Ken-ichi NISHIYAMA[1] ([1]Iwate Univ. CRC, [2]OSU)

大腸菌の内膜へのタンパク質膜挿入には、大きく分けて SRP（シグナル認識粒子）やタンパク質膜透過チャネル SecYEG に依存する経路と依存しない経路が存在する。SRP、SecYEG に依存しない膜タンパク質は自発的に膜挿入すると考えられてきた。しかし、大腸菌膜構成成分ジアシルグリセロール（DAG）を組み込んだリポソームでは自発的膜挿入は完全に抑制された。したがって、DAG により自発的膜挿入が抑制された状態では、Sec/SRP 非依存の膜挿入でも何らかの因子が必要である。膜挿入因子を探索した結果、糖脂質酵素 MPIase (*M*embrane *P*rotein *I*ntegr*ase*) を同定した。一方、YidC は変異体解析からタンパク質膜挿入に関与することが明らかになった因子であり、一連の Sec/SRP 非依存の膜タンパク質は YidC に依存して膜挿入すると考えられている。しかし、YidC のみを再構成したプロテオリポソームでは、膜挿入活性がまったく検出されない。そのため、プロテオリポソームを用いた *in vitro* 解析と YidC 変異体を用いた *in vivo* 解析では矛盾が生じていた。Pf3 coat は Pf3 ファージの主要コートタンパク質であり、その膜挿入は YidC の影響を受けると考えられているが、放射性メチオニンのみを用いて発現させた *in vitro* 実験系では MPIase にのみに依存して膜挿入する。一方、Pf3 coat の合成量を大幅に増加させたとき、Pf3 coat の膜挿入は YidC により数倍促進された。Pf3-Lep は Pf3 coat タンパク質のペリプラズム領域と Lep の TM1 以降をつなげた融合タンパク質である。この融合タンパク質は YidC 変異体でも膜挿入が影響を受けないが、ペリプラズム領域の一部をバリンからアスパラギン酸に変える（V15D）と YidC 依存性を示す(1)。Pf3-Lep、V15D Pf3-Lep の膜挿入を調べたところ、どちらも膜挿入反応は MPIase に依存して起こった。MPIase/YidC プロテオリポソームを用いたとき、MPIase リポソームを用いたときに比べて膜挿入活性は上昇したが、変異体における YidC 依存性の有無には対応していなかった。一方、タンパク質合成系に非標識メチオニンを加えて基質膜タンパク質の発現量を大幅に増加させたとき、Pf3-Lep、V15D Pf3-Lep の膜挿入に MPIase が必須であることには変化がなかったものの、V15D Pf3-Lep で YidC による膜挿入の促進が観察された。これらの結果は、MPIase による膜挿入速度が一定のレベル以下になり、かつ基質タンパク質が大量に存在するとき、YidC の重要性が増すことを示している。したがって、MPIase は膜挿入反応初期過程、YidC は後期過程で作用してそれぞれ膜挿入反応を触媒していると考えられる。

(1) Zhu, L., Wasey, A., White, S.H., Dalbey, R.E. (2013) *J. Biol. Chem.* 288:7704-7716

MPIase, YidC, membrane protein integration

発表番号：2F051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 膜小胞を産生する *Meiothermus ruber* H328 株によるトリ羽毛分解に関する研究 ～ケラチン分解性プロテアーゼ遺伝子破壊株の作成とトリ羽毛分解の検討～

# Studies on fether degradation by *Meiothermus ruber* H328 to produce membrane vesicles

○清水 歩[1]、西 海斗[1]、俣野 明日香[1]、森川 拓磨[1]、増村 威宏[1]、佐生 愛[1]、川崎 一則[2]、茂里 康[2]、渡部 邦彦[1] ([1]京都府大、[2]京都市産業技術研究所)
○ Ayumu SHIMIZU[1], Kaito NISHI[1], Asuka MATANO[1], Takuma MORIKAWA[1], Takehiro MASUMURA[1], Ai SASO[1], Kazunori KAWASAKI[2], Yasushi SHIGERI[2], Kunihiko WATANABE[1] ([1]Kyoto. Pref. Univ., [2]AIST)

【背景・目的】

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株は、ケラチン分解性プロテアーゼを分泌しトリ羽毛を強力に分解する。このケラチン分解性プロテアーゼは巨大分子複合体を形成し[1)]、プロテオームとゲノムデータを用いた構成タンパク質の同定解析から、機能未知タンパク質 Protein A (MrH_0843)と、その 4 bp 下流に位置するセリンプロテアーゼ Protein B (MrH_0844)の存在が明らかとなっている[2)]。一方で、H328 株は細胞外に膜小胞を産生しており、これら 2 つのタンパク質が膜小胞上にも存在することが免疫電顕観察から確認されている[3)]。本研究では、相同組換えを用いてこれらの遺伝子破壊株を作成し、トリ羽毛分解も含めケラチン分解活性への影響について研究を行った。

【方法・結果】

遺伝子破壊は耐熱化されたカナマイシン (Km)耐性遺伝子(HTK)をマーカーとして用いて 1 ステップの相同組換えにより行い、目的遺伝子の上流および下流領域各 1 kb、そして HTK 遺伝子を含むプラスミドを構築して実施した。また、野生株および得られた遺伝子破壊株の調製サンプルに対して、活性の調査、および Western blotting 解析を行った。*protein A* および *B* 遺伝子破壊のために構築したプラスミドを用いた組換え実験により、~$10^{-5}$ の効率で Km 耐性を示すコロニーの形成が確認された。得られたコロニーを用いて、PCR 解析により *protein A* および *protein B* 遺伝子の破壊が確認された。次に野生株、⊿*protein A* 株、および⊿*protein B* 株を 55℃で 24 h 培養した後の培養上清を用いてケラチン分解活性の比較を行った。その結果、両遺伝子破壊株は野生株に比べて~30%まで活性が低下し、このことからこれら 2 つの遺伝子がケラチン分解に大きく関わることが示された。しかし、ケラチン分解活性の低下にも関わらず、培養時の羽毛分解には WT と大きな差異が確認できなかった。そこで別途トリ羽毛主成分であるケラチンの頑強なジスルフィド結合の分解についても検討を加え、チオール-ジスルフィドオキシドレダクターゼ (TDOR)活性を持つ遺伝子破壊株を作成し調査等を行っている。加えて、⊿*protein B* について他のケラチン分解性プロテアーゼの探索も行っている。

【文献】

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:2973–2980 (2014)
2) *Genome Announc.* 1: e00176–13 (2013)
3) *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 78:1623-1625 (2014)

outer membrane vesicles, keratinolytic proteinase, gene disruption

発表番号：2F052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状性細菌 *Thiothrix fructosivorans* における鞘伸長および細胞分裂パターン

# Patterns of sheath elongation and cell proliferation in a filamentous bacterium, *Thiothrix fructosivorans*

○河崎 雄太[1]、遠藤 智友樹[1]、藤原 篤男[1]、近藤 敬子[2]、片平 正人[2]、佐藤 道夫[3]、武田 穣[1]([1]横国大工、[2]京大エネルギー理工研、[3]明治大農)
○ Yuta KAWASAKI[1], Tomoyuki ENDO[1], Atsuo FUJIWARA[1], Keiko KONDO[2], Masato KATAHIRA[2], Michio SATO[3], Minoru TAKEDA[1] ([1]Yokohama National Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Meiji Univ.)

【背景・目的】γ-プロテオバクテリア綱に属する糸状性硫黄酸化細菌である *Thiothrix fructosivorans* は水圏に広く分布し、細胞列を囲むマイクロチューブ状構造体（鞘）を形成するという特徴を有する。末端部の細胞は露出しておらず両末端での鞘の閉塞が SEM 観察で認められることから、*T. fructosivorans* の鞘は正確にはマイクロチューブ状ではなく細長い嚢状の微細構造体である。鞘形成は水性糸状性細菌においてはしばしば認められる現象であるが、その形成機構に迫った例は少ない。鞘形成とは、内包される多数の細胞が連携してあたかも細胞群体を成す現象であり、細胞外高分子物質の自発的かつ自律的な凝集現象でもある。すなわち、生態学的および高分子化学的に特異な現象といえる。これまでの分析によって、*T. fructosivorans* の鞘形成高分子は β-1,4-グルコサミノグルカン（GG）を基本骨格とし、骨格中のグルコース残基の 3 位にはフコースと *N*-ラクチルペロサミンから成る 2 糖の側鎖が施されていることが判明している。GG 中のアミノ基の *N*-アセチル化度は 50%であることから、静電的反発力ゆえに主鎖の接近とこれを介した会合は期待できず側鎖間の相互作用が鞘形成の要因と推察される。鞘形成高分子に秘められた形態形成能を理解すべく、今回は鞘およびこれに内包された細胞列の伸長パターンを視覚的に捉えることを試みた。
【方法・結果】前述のように、鞘にはアミノ基が豊富に存在する。これを利用して菌体をアミノ基ビオチン化試薬で処理することによって鞘表面をビオチンで標識した。標識を施した菌体を培養した後に蛍光標識化抗ビオチン抗体を作用させ、落射蛍光顕微鏡観察に供した。培養前の菌体の抗体染色では全体が強い蛍光を発したのに対し、培養後は全体的に蛍光が減衰していた。短時間の培養を経た後の抗体染色では縞模様のような蛍光の強弱が観察された。これらの結果は鞘の伸長が鞘内随所で起こったことを示している。さらに細胞列の伸長パターンを調べるため、毒性の低い細胞膜蛍光染色剤を菌体に作用させた後に経時的に蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、鞘の場合と同じく培養に伴って菌体全体での蛍光の減衰が認められたことから、細胞分裂も鞘内随所で進行することが示された。また、鞘の膜厚は最大約 0.2 μm で場所によって異なることが TEM 観察によって明らかとなった。膜厚の薄いところでは波打つような変形が認められ、膜厚減少に伴う強度低下が示唆された。膜厚のばらつきは、溶菌処理を経て調製した鞘の SEM 観察でも確認できた。これらの結果に基づき、鞘形成に関する下記の仮説を立てるに至った。すなわち、鞘は鞘内随所で伸長しつつある細胞の直近において一時的な膜厚低下を伴いながら伸長し、当該個所で鞘形成高分子は規則的に会合・積層する。

*Thiothrix fructosivorans*, Sheath, Elongation

発表番号：2F053
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* の株系統と細胞融合における不和合性との関連の解析

# Analysis of relationship between phylogeny and cell fusion incompatibility in *A. oryzae*

○岡部 知弥[1]、中村 英淳[1]、岩下 和裕[2]、藤井 郁雄[3]、丸山 潤一[1]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]酒総研、[3]阪府大院・理)
○Tomoya OKABE[1], Hidetoshi NAKAMURA[1], Kazuhiro IWASHITA[2], Ikuo FUJII[3], Jun-ichi MARUYAMA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NRIB, [3]Osaka Pref. Univ.)

【目的】

糸状菌は栄養生長時に細胞融合を行い、菌糸どうしのネットワークを形成する。また、細胞融合は有性生殖および疑似有性生殖での第一段階であり、交配育種を行ううえで重要な過程である。さらに、細胞融合に関連して不和合性という現象が存在し、アカパンカビ *Neurospora crassa* などでは、特定の株の組み合わせにおいて融合体が存在できないことが知られている。

我々は最近、麹菌 *Aspergillus oryzae* において BiFC (bimolecular fluorescent complementation)法により細胞融合を可視化する方法を確立し、不和合性となる株の組み合わせが存在する可能性を示した[1)]。*A. oryzae* には日本酒や醤油、味噌などの製造に使用される実用株をはじめ多数の株が存在し、これらの株は比較ゲノムハイブリダイゼーション解析によって 13 系統に分類されている[2)]。そこで本研究では、*A. oryzae* の株間の不和合性を解析し、系統との関連を検討することを目的とした。

【方法と結果】

*A. oryzae* 菌株群から異なる系統に属する株を選抜し、さらに野生株 RIB40 と同じ系統である日本酒用株 RIB81 および味噌用株 RIB319 を選んで、BiFC 法により細胞融合能を解析した。細胞融合能が確認できた株について、異なる株との組み合わせで混合培養を行った。その結果、RIB40 株とその同系統株との組み合わせで細胞融合が観察された。一方、異なる系統の株どうしの組み合わせでは細胞融合が観察されず、不和合性である可能性が示された。

混合培養において細胞融合が観察されなかった組み合わせが、融合体として存在できない不和合性であることを確かめるため、プロトプラスト融合を行った。それぞれの株をプロトプラスト化して強制的に融合させ、融合体の有無を BiFC 法により観察した。その結果、混合培養の実験の結果と同様に、RIB40 株とその同系統株との組み合わせで融合体が観察された。一方、異なる系統の株どうしでの組み合わせでは融合体が観察されなかった。このことから、*A. oryzae* において特定の株の組み合わせで融合体が存在できない不和合性が示された。

以上より、*A. oryzae* の不和合性が株の系統と関連する可能性が示された。このことから、*A. oryzae* の株の系統と生理的性質が一致するという現象を初めて見出だした。

1) 岡部知弥ら 2015 年度日本農芸化学会大会講演要旨 4B21p14
2) 岩下和裕 (2009) 化学と生物 Vol. 47, 329-338

*Aspergillus oryzae*, incompatibility, phylogeny

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F054
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# プリオンが新しい栄養環境での酵母細胞の生存を可能にする
# Prion enables yeast cells to survive in a new growth condition

田中 秀樹[1]、村田 幸作[2]、○河井 重幸[1] ([1]京大院農、[2]摂南大)
Hideki TANAKA[1], Kousaku MURATA[2], ○Shigeyuki KAWAI[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Setsunan Univ.)

**【背景】**プリオンはタンパク質による遺伝因子であり、繊維状凝集体（アミロイド）が自らを鋳型として可溶性タンパク質を凝集させることによって自己複製を行い、伝播・感染すると考えられている[1)]。ほ乳類では狂牛病などのプリオン病の病因とされている。他方、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、プリオンは病因として機能するだけでなく、寧ろ積極的に何らかの細胞機能を発揮しているという説も提唱されている[1)]。酵母プリオンの伝播は Hsp104 シャペロンの活性に依存しているため、Hsp104 の ATPase 活性の阻害剤である塩酸グアニジン（GuHCl）で処理（5 mM GuHCl を含む固体培地上で培養）すると当該プリオンにより引き起こされる表現型は「消失」する。

マンニトールは大型褐藻類に著量含まれる単糖であり、今後の利用拡大が期待されている。筆者らは、マンニトールを本来は資化しない出芽酵母 $10^6$～$10^7$ 個をマンニトール含有培地に塗布するとマンニトール資化能（Mtl+）獲得株が単離されること、Mtl+獲得は転写コリプレッサーTup1-Cyc8 遺伝子への自然変異によることを明らかにしている[2)]。しかし、Tup1-Cyc8 遺伝子への変異無しに Mtl+を獲得した株（MK4010、MK4437）も得られている。両株は固体培地上での 8 回の継体培養で Mtl+を喪失するため、エピジェネティクスな効果による Mtl+獲得機序が想定されたが、その詳細は不明であった[2)]。一方で、Cyc8 の C 末領域（Gln リッチ配列を含む）の出芽酵母内での強制発現による Cyc8 のプリオン化も報告されている[3)]。

**【結果・考察】**MK4010 および MK4437 両株（共に軽微な細胞凝集も示す）を 5 mM GuHCl で処理すると、両株の Mtl+ならびに細胞同士の凝集性が消失することを見出した（MK4437 株の場合は大小のヘテロなコロニーが発生し、大コロニーの場合のみこれらが消失した）。GuHCl 処理後の細胞の rho+も確認した。資化能が消失した両株を GuHCl 非含有固体培地で培養すると、MK4010 株のみ Mtl+が「回復」した。Tup1-Cyc8 の機能不全が細胞凝集も引き起こすこと[2)]を考え併せると、以上の知見はマンニトール含有培地という新しい栄養環境への適応ならびに同環境での生存能獲得に、Cyc8 のプリオン化が決定的な役割を演じる可能性を示した。

1) 鈴木、田中 *化学と生物* **51**: 228-233 (2013), Suzuki *et al. Science* **336**:355-359 (2012). 2) Chujo *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **81**:9-16 (2015). 3) Patel *et al. Nat. Cell Biol.* **11**:344-349 (2009).

prion, *Saccharomyces cerevisiae*, mannitol

発表責任者：河井重幸（kawais@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F055
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Legionella pneumophila* に見出した MazE-MazF toxin-antitoxin system の機能解析

# Functional analysis of MazE-MazF toxin-antitoxin system in *Legionella pneumophila*

○釋 真緒[1]、山口 良弘[1,2] ([1]阪市大・理、[2]阪市大・複合先端研)
○Mao SHAKU[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2] ([1]Osaka city Univ., [2]OCARINA)

【目的】

ほぼすべての原核生物は toxin-antitoxin (TA) system を有している。TA system は、ストレス条件下で細菌の生育を停止させ休眠状態に移行させるために重要と考えられている。非ストレス条件下では toxin と antitoxin は複合体を形成しており、toxin の毒性は antitoxin によって中和されている。一方、ストレス条件下ではストレス誘導性プロテアーゼによって antitoxin が分解され、その結果 toxin は複合体から遊離し毒性を示す。TA 複合体を阻害する化合物を発見出来れば、抗生物質のように利用できると考えられる。*Legionella pneumophila* は温泉などでアメーバを宿主として増殖し、感染力は弱いものの一旦感染すると劇症型レジオネラ肺炎を引き起こす。現段階では *Legionella* 属に有効なワクチンはなく、また、人口環境での殺菌は困難である。今回我々は *Legionella pneumophila* に、原核生物で広く保存されている toxin の一つで、配列特異的 RNA 分解酵素である MazF の homologue (MazF-lp) を発見し、諸性質を解析したので報告する。

【方法および結果】

MazF-lp の毒性を調べるために pBAD24-*mazF-lp* を構築し、MazF-lp 発現後の大腸菌の生育を測定した。その結果、MazF-lp 誘導後 90 分で生育は完全に阻害された。*L. pneumophila mazF* 遺伝子の 13 bp 上流に 233 bp からなる ORF を同定し、これが antitoxin として機能していると考えた。そこで、本 ORF を pET28a ベクターに組み込み、MazF-lp と共発現させた結果、MazF-lp の毒性は中和された。よって、この ORF は MazE-lp antitoxin であり、MazF-lp toxin と TA system として機能していることが明らかとなった。次に、MazF-lp の作用標的の同定を行った。MazF-lp は、大腸菌 MazF と 27%の同一性および 50%の相同性を有しており、他の MazF と同様に配列特異的 RNA 分解酵素であると考えられた。そこで、MazF-lp 誘導後の total RNA を継時的に抽出し、Northern blotting によって mRNA の安定性を解析した。その結果、*ompA* および *ompF* mRNA は、MazF 誘導後に分解された。一方、*lpp* mRNA は MazF-lp 誘導後も分解産物は確認されず安定して存在することが明らかとなった。この結果より、MazF-lp はある特定の塩基配列を認識し切断する配列特異的 RNA 分解酵素であることが示唆された。現在、MazF-lp の切断配列を解析中である。

MazF, toxin-antitoxin system, Legionellae

発表番号：2F056
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌 MqsR-YgiT toxin-antitoxin system の MqsR toxin の諸性質の解明

# Characterization of MqsR from the MqsR-YgiT toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*

○山口 良弘[1,3]、井上 正順[2] ([1]阪市大・複合先端研、[2]米国ラトガース大、[3]阪市大・理)
○Yoshihiro YAMAGUCHI[1,3], MASAYORI INOUYE[2] ([1]OCARINA, [2]The Rutgers Univ., [3]Osaka City Univ.)

【目的】

アポトーシスは真核生物において細胞の分化に必須である。近年、原核生物も細胞死を引き起こす自殺遺伝子を有することが明らかとなった。**Toxin-antitoxin (TA) system** は、原核生物において自殺遺伝子（toxin）を制御するシステムである。Toxin はストレス環境下で誘導され、 生育を停止し休眠状態にすることで細胞のストレス耐性に寄与することが示唆されている。TA system は病原菌の宿主内生存のようなストレス下での生存戦略の中心を担っていると考えられ、現在注目されている。バイオフィルムは固体表面及び界面で形成される付着微生物集合体の総称である。バイオフィルム細胞の抗生物質耐性は浮遊細胞に比べて数百倍高く、これは代謝活性および分裂速度の低下（休眠状態）によると考えられている。また、バイオフィルム内部はほぼ死細胞だが、その細胞死誘導機構及び生理的役割は不明である。バイオフィルム細胞特有の性質の解明は、多剤薬剤耐性菌を抑制するために非常に重要である。

MqsR は大腸菌のバイオフィルム形成促進因子として同定された。我々は、MqsR と下流の YgiT 遺伝子が TA system であり、MqsR toxin が新規 GCU 配列特異的 RNA 分解酵素であることを証明した。今回我々は、MqsR の RNA 分解機構及びその諸性質について解析したので報告する。

【方法及び結果】

MqsR の基質特異性について合成 RNA を用いて *in vitro* で解析した結果、GCU のみならず GCC および GCA 配列も GCU と同程度認識・切断することが明らかとなった。Mass-spectrometry により MqsR による RNA 切断部位は 5’-OH および 3’-phosphate を生じることを見出した。さらに、MqsR は single-strand RNA を特異的に分解し、double stranded RNA および tRNA は分解しなかった。これらの結果は、MqsR と相同性を持たない ACA 配列特異的 RNA 分解酵素である大腸菌 MazF toxin と一致していた。これまで、MqsR toxin の過剰発現が運動性を誘導し、結果としてバイオフィルム形成を促進することが報告されていた。しかし、我々は MqsR ではなく YgiT antitoxin が運動性を誘導しバイオフィルム形成を促進することを見出した。これは、"antitoxin の機能は toxin 毒性の抑制のみである”という定説を覆す antitoxin の新規機能の発見である。現在、YgiT antitoxin による運動性誘導機構を解析中である

Toxin-antitoxin system, E.coli, mRNA interferase

発表番号：2F057
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌における新規 YjjJ-HipB toxin-antitoxin system の同定
# Identification of YjjJ-HipB toxin-antitoxin system in *Escherichia coli*

○前田 有紀[1]、成谷 宏文[3]、山口 良弘[1,2] ([1]阪市大・理、[2]阪市大・複合先端、[3]香川大・医)
○Yuki MAEDA[1], Hirofumi NARIYA[3], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,2] ([1]Osaka city Univ., [2]OCARINA, [3]Kagawa Univ.)

【目的】

近年、原核生物において自らの生育および細胞死 (アポトーシス) が toxin-antitoxin (TA) system と呼ばれるシステムを介して制御されていることが提案されてきた。一般的に TA system は、宿主自身に毒性を示す toxin およびその毒性を中和する antitoxin の２つのタンパク質から構成される。細菌は増殖を停止し、休眠状態になることで薬剤など様々なストレスに強い耐性を示す。最近、TA system の一つである *hipA-hipB* TA system が、この休眠の誘導に重要であることが報告された。しかし、休眠を引き起こす経路は未だ不明な点が多く、*hipB-hipA* TA system 以外の TA system 遺伝子も休眠状態に関与している可能性が高い。今回我々は、HipA toxin と相同性を持つ *yjjJ* 遺伝子を発見し、1) YjjJ が toxin であること、2) YjjJ の毒性は HipA toxin と同様に HipB antitoxin によって抑制されること、3)YjjJ は HipB と TA system を構成すること、4) YjjJ の過剰発現は DNA 合成を阻害することを見出したので報告する。

【方法および結果】

YjjJ の生育への影響を調べるために、pET28a-*yjjJ* を構築した。0.1 mM IPTG を含む M9 寒天培地で大腸菌の生育は強く阻害されることが分かった。YjjJ 誘導後、生菌数は 0.0046%減少したことから、YjjJ は大腸菌に対して殺菌的に作用することが明らかとなった。YjjJ は HipA toxin の N 末端および C 末端ドメインと相同性を有する。そこで YjjJ は HipA と同様に HipB antitoxin と TA system として機能していると推測された。pET28a-*yjjJ* および pBAD24-*hipB* 両プラスミドを持つ大腸菌を用いて YjjJ および HipB を共発現させた結果、YjjJ の毒性は HipB によって中和された。よって YjjJ は HipB と TA system して機能することが明らかとなった。YjjJ の標的を同定するために YjjJ 発現後の DNA および RNA 合成を *in vivo* で解析した。その結果、YjjJ 誘導 60 分後に DNA 合成は完全に阻害された。また、YjjJ アミノ酸一次構造を元にモチーフ検索 (GenomeNet) を行った結果、helix-turn-helix モチーフを有していたことから、YjjJ は DNA 結合タンパク質であることが示唆された。そこで YjjJ の DNA 結合能を解析した結果、YjjJ は DNA の特異的な配列に結合することが示唆された。現在 DNA 結合配列を同定中である。

Toxin-antitoxin system, Persister, Escherichia coli

発表番号：2F058
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大気圧低温プラズマに対する出芽酵母応答機構の解析

# Analysis of yeast cellular response to the cold atmospheric pressure plasma

○糸岡 洸樹、高橋 和生、井澤 真吾（京工繊大・工芸科学）
○Koki ITOOKA, Kazuo TAKAHASHI, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

現在、微生物の殺菌方法として高圧蒸気や放射線、酸化エチレンガスなどが広く用いられている。しかし、高温や照射に伴う材質の劣化、有害物質の残留といった問題点を有しているため、生鮮食品などの熱に弱く安全性が求められる物への活用は困難である。これらの問題を解決する上で、大気圧低温プラズマ(Cold Atmospheric pressure Plasma: CAP)が近年注目を集めている。CAP による殺菌は、プラズマの発生に伴って生じる活性酸素種が大きく寄与するとされているが、酵母細胞に対する CAP の作用機構についての知見は少ない。そこで本研究では、CAP が出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)に及ぼす影響について検討した。CAP による照射は 9.28 kV・11 kHz、サンプルとの距離は 3 cm、アルゴンガスの流量は 0.8 L/min の条件で行った。また、殺菌処理に伴う食品の乾燥を防ぐことを想定して、噴霧状にした水(ミスト)を加えて CAP を発生させた CAMP についても検討を行った。

培地プレート上に塗布した酵母細胞(dry condition)および培養液中の酵母細胞(wet condition)に対して CAP あるいは CAMP 照射を行い、コロニー形成数を測定することで死滅率の比較を検討した。その結果、どちらの条件下でも CAP および CAMP の照射で大半の酵母が死滅するとともに、培地プレート上ではミストの追加によって殺菌効果の向上が認められた。

次に、CAP の照射による酵母細胞内での変化を観察するために、培養液中の酵母細胞を CAP 処理した後、顕微鏡解析を行った。その結果、酸化的ストレス応答性の転写制御因子 Yap1 の核への移行、ミトコンドリアの断片化や活性酸素種の蓄積および熱ショックタンパク質の発現誘導・凝集が観察された。このことから CAP によって酵母細胞内で酸化的ストレスが誘導されていることに加えてタンパク質の変性が生じていると考えられた。また、小胞体ストレス応答性因子である Ire1 の局在変化や、翻訳抑制に伴って生じることが知られている P-body や stress granule の形成なども確認された。これらの応答は真核生物特有のものであり、細菌などを用いたこれまでの研究では得られなかった新たな知見だと考えている。以上の解析結果から、CAP は酸化的ストレスの誘導以外にも様々な影響を引き起こすことで酵母細胞を死滅させることが示唆された。

Cold atmospheric pressure plasma, Stress response, Yeast

発表責任者：糸岡洸樹（narara511512@gmail.com）

発表番号：2F059
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# エタノールによる翻訳抑制下でも優先的に翻訳される酵母遺伝子の同定とその応用

# Identification of preferential expressed genes in yeast under severe ethanol stress

山内 雪菜、○井澤 真吾（京工繊大・工芸科学）
Yukina YAMAUCHI, ○Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

アルコール発酵によって生じるエタノールは、酵母自身が作り出すにもかかわらず高濃度になると深刻な影響を酵母細胞に及ぼす。10% v/v 以上のエタノールストレスは転写パターンの変化だけでなく bulk poly(A)$^+$ mRNA 核外輸送や翻訳活性の抑制、P-body や stress granule などの細胞質 mRNP granule の形成などを誘導し、酵母の mRNA flux にも大きな影響を与える(Izawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2010)。そのため、グルコース枯渇条件下で既に報告されているような、大部分の遺伝子の発現は抑制され一部の遺伝子のみが翻訳される「選択的な翻訳」が高濃度エタノールストレス下でも行われていると考えられている。しかし、これまでどの遺伝子が優先的に翻訳されているかは不明であったため、エタノール耐性に関与する遺伝子を中心にその同定を試みた。

v-SNARE 結合タンパク質をコードする *EXP7* 遺伝子の破壊株はエタノール感受性を示し、酵母のエタノール耐性獲得に於いて Exp7 が重要な役割を担うと推測されている(Yang *et al*., *Biotechnol. Bioeng.*, 2011)。高濃度エタノールストレス下での *EXP7* 遺伝子の発現について検討を行ったところ、10%エタノールによって mRNA レベルのみならずタンパク質レベルでも増加が認められ、*EXP7* mRNA の選択的・優先的な翻訳が強く示唆された。一方、遺伝子のプロモーター領域が転写効率だけでなく翻訳抑制条件下における「選択的な翻訳」にも重要な役割を担うことが近年報告されている(Zid and O'Shea, *Nature*, 2014)。そこで、*EXP7* のプロモーター領域を用いて *GPX2* などの遺伝子を発現させたところ、高濃度エタノールストレス下で翻訳が抑制される遺伝子でもタンパク質レベルが顕著に上昇することが確認された。また、*EXP7* のプロモーター領域に作用する転写調節因子の欠損株の中には、*EXP7* の発現レベルが著しく変化する株も存在した。これらの結果から、翻訳活性が抑制される高濃度エタノールストレス下でも *EXP7* 遺伝子は選択的･優先的に翻訳され、その効率的な翻訳にはプロモーター領域及びそこに作用する転写調節因子が重要であることが明らかとなった。現在、*EXP7* プロモーターを使った発現系を用いて、酵母のエタノール耐性や発酵効率の改善に取り組んでいる。

Ethanol stress, Yeast, Translation repression

発表責任者：井澤真吾（thioredoxin@kit.ac.jp）

発表番号：2F060
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

翻訳抑制ストレス下における *BDH2* の優先的発現とバニリン耐性への寄与
Preferential expression of the *BDH2* gene and its contribution to the tolerance to severe vanillin stress
○石田 陽子、NGUYEN Trinh、井澤 真吾（京工繊大・工芸科学）
○Yoko ISHIDA, Trinh NGUYEN, Shingo IZAWA (Kyoto Inst. Technol.)

廃材や稲藁などをはじめとするリグノセルロース系バイオマスから生産される第二世代バイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源の有効活用という点で、今後の規模拡大が期待される再生可能エネルギーである。しかし、バイオマスの糖化前処理の過程でバニリンなどの発酵阻害物質が副産物として生じてしまい、酵母の生育や発酵能を著しく抑制・阻害することが問題となっている。発酵効率や製造コストなどの面でバニリンが大きな障害となっているため、バニリンに対する酵母の応答機構の解明や耐性能の改良が強く求められている。高濃度バニリン存在下では、酵母細胞内で翻訳抑制や mRNP granule の形成が誘導され、一部の限られた遺伝子のみが優先的に翻訳されると考えられている(Iwaki *et al*., *PLoS One*, 2013)。そこで我々は、高濃度バニリン存在下でも優先的に翻訳される酵母遺伝子の探索・解析をおこなった。バニリンを還元・解毒する Adh6 は構成的に発現しているものの、翻訳抑制が誘導される高濃度のバニリン存在下では新たな発現が抑制された。一方、*ADH6* のパラログである *ADH7* は、高濃度バニリン存在下でも効率的に翻訳されその発現が顕著に誘導された。また、*ADH7* promoter を用いた発現系は、高濃度バニリンで翻訳が抑制されてしまう遺伝子の発現も誘導することが可能であった(Nguyen *et al.*, *Frontiers Microbiol*., 2015)。

本研究では、Adh6/Adh7 と同じ medium-chain dehydrogenase/reductase family に属する Bdh1 とそのパラログである Bdh2 に注目して解析を行った。Bdh1/ Bdh2 ともにアセトンを還元することは知られているものの、バニリンの還元・解毒に寄与するのかは不明である。そこで、*BDH1*/*BDH2* 両遺伝子の発現を高濃度バニリン存在下で検討したところ、*BDH1* はバニリンの濃度にかかわらず構成的に発現する一方で、*BDH2* は高濃度バニリンによって著しく誘導され、バニリンが減少すると共にタンパク質レベルも速やかに低下した。加えて、*BDH2* promoter を用いてバニリンで翻訳が抑制される遺伝子の発現を検討したところ、高濃度バニリン存在下でも翻訳されることが確認された。以上の結果から、*ADH7* と同様に、*BDH2* promoter を用いた発現系を利用することで、酵母のバニリン耐性や発酵効率が改善できるのではないかと考えている。

vanillin, translation repression, BDH2

発表番号：2F061
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵素合成グリコ―ゲンはヒト正常皮膚細胞において UVB 照射によるダメージを抑制する
# Enzymatically-synthesized glycogen inhibits UVB-induced cellular damages in normal human skin cells.

○吉岡 泰淳[1]、三谷 塁一[2]、古屋敷 隆[3]、芦田 均[2]([1]神戸大自然科学、[2]神戸大院農、[3]江崎グリコ(株)健康科学研究所)
○Yasukiyo YOSHIOKA[1], Takakazu MITANI[2], Takashi FURUYASHIKI[3], Hitoshi ASHIDA[2] ([1]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [2]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ., [3]Ezaki Glico Co., Ltd., Institute of Health Sciences)

【目的】
酵素合成グリコーゲン（ESG）は、免疫賦活活性や食物繊維様作用を有することが報告されている。近年、ヒト正常皮膚角化細胞（NHEK）において、ESG は保湿効果を高めることがあきらかとなったが、紫外線（UV）に対する効果は知られていない。そこで本研究では、UVB 照射による NHEK の細胞障害に対する ESG の防御効果を調べることを目的とした。

【方法】
ESG を NHEK に 24 時間作用させた後、UVB（20 mJ/cm$^2$）照射により細胞障害を誘導した。細胞内の活性酸素（ROS）の蓄積は、UVB 照射 30 分後に、2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate（DCF）法を用いて定量した。UVB による炎症への影響を観察するため、照射 6 時間後に、インターロイキン-6（IL-6）および腫瘍壊死因子（TNF-α）の発現量を測定した。さらに、アポトーシスの指標である caspase の活性化、DNA 断片化、ならびに細胞増殖の抑制は、UVB 照射 24 時間後に測定した。また、ESG を 24 時間作用させた後、抗酸化タンパク質の発現をウエスタンブロット法にて測定した。

【結果】
NHEK に UVB を照射すると、ROS の蓄積、炎症性サイトカインの発現、caspase-3 の活性化、DNA の断片化、ならびに細胞増殖の抑制が認められた。ESG は、これらの細胞障害を有意に抑制した。また、ESG は、抗酸化タンパク質である heme oxygenase-1（HO-1）と NAD（P)H: quinone oxidoreductase 1（NQO1）の発現を上昇させた。HO-1 と NQO1 をノックダウンさせた細胞を用いて、ROS の蓄積を測定したところ、ESG による ROS の蓄積抑制効果がキャンセルされた。そこで、HO-1 と NQO1 の転写因子である NF-E2-related factor 2（Nrf2)のリン酸化を調べたところ、ESG は Nrf2 のリン酸化を促進させることがわかった。

【結論】
これらのことから、ESG は、Nrf2 をリン酸化させることで安定化し、抗酸化タンパク質である HO-1 と NQO1 の発現を増加させることで、UVB 照射による細胞内の ROS の蓄積を抑制することで細胞障害を防御することがわかった。このように、ESG は、UVB 照射による皮膚障害を軽減する有効な化合物であることが強く示唆された。

ESG, UVB, ROS

発表責任者：芦田均（ashida@kobe-u.ac.jp）

発表番号：2F062
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Quercetin and isorhamnetin at the physiological concentration increase glucose uptake via insulin-, AMPK-, and JAK/STAT-pathway in L6 myotubes.

○Hao Jiang[1], Yasukiyo Yoshioka[2], Yoko Yamashita[1], Hitoshi Ashida[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Sci., Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.)

**Purpose:** Diabetes mellitus, which is an important global health issue. Insulin resistance is involved in the onset of diabetes mellitus and following serious complications. Insulin-, AMPK-, and JAK/STAT-pathways play a pivotal role in cellular energy homeostasis including carbohydrate metabolism. Activation of these pathways promote the translocation of glucose transporter 4 (GLUT4) to the plasma membrane and incorporation of glucose into muscle cells, resulting in decrease the blood glucose level in the plasma. Flavonoids have been reported to ameliorate insulin resistance and diabetes mellitus. Quercetin is a major flavonoid in human diet, while isorhamnetin is one of the metabolites of quercetin. It has been reported that these flavonols at a high concentration range possess various health beneficial effects, including amelioration of insulin resistance. However, the effect of quercetin and isrohamnetin at the physiological concentration range on the prevention of diabetes mellitus is unclear yet. In this study, we investigated whether these flavonols at the physiological concentration promote glucose uptake via GLUT4 translocation to the plasma membrane of L6 myotube.

**Methods and results:** To assess the effect on glucose uptake in muscle cells, we examined 2-deoxyglucose (2DG) uptake in L6 myotubes by enzymatic method. The cells were treated with quercetin and isorhamnetin at various concentrations and subjected to the 2DG uptake assay. Quercetin at 0.1 and 1 nM and isorhamnetin at 1 nM significantly promoted 2DG uptake accompanied by the translocation of GLUT4 to the plasma membrane of L6 myotubes. To elucidate the mechanism of these flavonols on glucose uptake, we examined activation of insulin-, AMPK-, and JAK/STAT-pathways. Quercetin and isorhamnetin accelerated the phosphorylation of IR, IRS-1, Akt, PKCζ/λ, AMPK, JAK2, and STAT3 in L6 myotubes.

**Conclusion:** Taken together these data, we concluded that quercetin and isorhamnetin at the physiological concentration range increased glucose uptake through the activation of insulin-, AMPK-, and JAK/STAT-pathways in L6 myotubes. Thus, quercetin and isorhamnetin are effective dietary compounds for prevention and treatment of diabetes mellitus.

Diabetes mellitus, Flavonoids, L6 myotubes

発表責任者：Hitoshi Ashida（ashida@kobe-u.ac.jp）

発表番号：2F063
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 3 成分制情報伝達システムによる病原性因子トロポロンの生産制御

# A three-component system controls production of the phytotoxin tropolone in Burkholderia plantarii

○三輪 瞬平[1]、吉岡 誠訓[1]、紀平 絵梨[1]、仲曽根 薫[2]、五十嵐 雅之[3]、波多野 和樹[3]、吉川 博文[4,5]、兼崎 友[5]、江口 陽子[1]、内海 龍太郎[1]([1]近大院農バイオ、[2]近大工、[3]微化研、[4]東京農大応生化バイオ、[5]東京農大ゲノム解析セ)
○ Shunpei MIWA[1], Akinori YOSHIOKA[1], Eri KIHIRA[1], Kaoru NAKASONE[2], Masayuki IGARASHI[3], Kazuki HATANO[3], Hirofumi YOSHIKAWA[4,5], Yuu KANESAKI[5], Yoko EGUCHI[1], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Dept.of Biosci.,Grad.Sch.of Agric., Kinki Univ., [2]Dept. of Biotechnol and Chem.,Faculty of Engeneering Kinki Univ., [3]Inst. Microb. Chem.(BIKAKEN), [4]Tokyo Univ. of Agriculture, [5]Tokyo Univ. of Agriculture Genome research center)

イネ苗立枯病は,イネ苗立枯細菌病菌 *Burkholderia plantarii* によって生産される植物毒素,トロポロンが主病原因子と考えられている。しかし、*B.plantarii* におけるトロポロン生産制御について,明らかにされていない。我々は,*B.plantarii* の全ゲノム解析情報をもとに、遺伝子破壊法を用いて,トロポロン生産制御に関する遺伝子として、二成分情報伝達(TCS)に関与する, ヒスチジンキナーゼ(*TroK*), レスポンスレギュレーター (*TroR1, TroR2)*を明らかにしてきた。本研究において、通常の TCS と異なり(*TroK, TroR1, TroR2*)の三成分からなるトロポロン合成制御システムの解明を目的にした。TroK の自己リン酸化活性、リン酸化 TroK から TroR1, TroR2 へ のリン酸転移を確認するために、それぞれの遺伝子を発現ベクターpET21a にクローニング後、大腸菌 Rosetta-gami において,発現後,histag アフィニティーカラム Ni-NTA を用いて精製した。精製後,[γ-$^{32}$P] ATP を用いた自己リン酸化及び,リン酸基転移実験を行った。TroK の自己リン酸化部位の His ならびに TroR1,2 のリン酸基転移部位の Asp を、相同解析により推定した H253, D52, D46 をアラニン置換した変異株を用いて,トロポロン生産やリン酸化実験、リン酸基転移実験を行った。最後に、これらの変異株から、RNA を採取し、次世代シーケンサーを用いて、RNAseq 解析を行った。

精製された TroK, TroR1, TroR2 ならびに TroKH253A, TroR1D52A, TroR2D46A 変異体を用いた自己リン酸化,リン酸基転移実験の結果,TroK の自己リン酸化、TroKH253-P から TroR1D52, TroR2 D46 へのリン酸基転移の活性が確認され、3 成分制御系であることが確認された。*TroK/TroR1/TroR2* 欠損株における相補実験の結果 *TroK/TroR1/TroR2* すべての遺伝子が相補された場合のみトロポロン産生が回復し、*TroK/TroR1/TroR2*, 三種類の遺伝子がトロポロン産生に必要であることが示された。

TroK のリン酸化部位である H253, TroR1, TroR2 のリン酸化部位である D52, D46 をアラニンに変異したプラスミドを用い、相補実験を行った。*TroKH253-A, TroR1D52-A, TroR2D46-A* 変異プラスミドは、各変異株のトロポロン生産を回復させることはできなかった。RNAseq 解析実験の結果, TroK-TroR1, TroK-TroR2 制御下のトロポロン合成に関与する遺伝子群が存在することが明らかになった。また *TroK, TroR1, TroR2* の各変異体においてイネ苗を用いた実験により病原性が消失しているのが確認された。これらの結果から *B. plantarii* において,トロポロン合成には,*TroK, TroR1, TroR2* の 3 遺伝子が必須で,TroKH253→ TroR1D52, TroKH253→TroR2D46 への三成分が関与する His-Asp リン酸化リレーによるトロポロン合成制御システムの存在が明らかにされた。

Burkholderia plantarii, Troplone, three component system

発表番号：2F064
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌のヒスチジンキナーゼに対する H-box 阻害剤 waldiomycin の作用機構
# Waldiomycin targets the H-box of histidine kinases in Bacillus subtilis

○植田 修平[1]、犬飼 洋一[1]、江口 陽子[2]、大島 拓[3]、清水 莉子[1]、岡島 俊英[4]、木下 英司[5]、木下 恵美子[5]、五十嵐 雅之[6]、梅北 まや[6]、内海 龍太郎[1] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大院・生物理工・食品衛生管理学研、[3]奈良先端大、[4]阪大・産研、[5]広島大、[6]微化研)
○Shuhei UEDA[1], Yoichi INUKAI[1], Yoko EGUCHI[2], Taku OSHIMA[3], Riko SHIMIZU[1], Toshihide OKAJIMA[4], Eiji KINOSHITA[5], Emiko KINOSHITA[5], Masayuki IGARASHI[6], Maya UMEKITA[6], Ryutaro UTSUMI[1] ([1]Dept.of Biosci, Grad.Sch.of Agric.Kinki Univ, [2]Faculty of Biology.Kinki Univ, [3]Nara Institute of Science and technology, [4]Osaka Univ, [5]Hiroshima Univ, [6]Institute of Microbial Chemistry (BIKAKEN))

現在、医療現場において様々な種類の抗生物質が使用されている。しかしながら、それらの抗生物質の乱用により、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）やメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）などの複数の抗生物質に対して耐性をもつ多剤耐性菌の出現が脅威となっている。そこで新規の抗生物質の開発が急務とされているが、既存の抗生物質を化学変化または、修飾したものを開発しても、それに対する耐性菌が新たに出現してしまう交叉耐性と呼ばれる現象が問題となっている。

当研究室では、多剤耐性菌に対しても有効な既存の抗生物質とは全く異なる標的に作用する新規抗生物質の開発を目指した。これまでの既存の抗生物質は DNA 合成、RNA 合成、細胞壁合成といった細菌の代謝生合成を阻害するものが多い。そこで当研究室が目指すものは、細菌の情報伝達機構である二成分制御系（TCS）を標的とするものである。TCS とは、ヒスチジンキナーゼ（HK）とレスポンスレギュレーター（RR）と呼ばれる、二つのタンパク質から成る情報伝達機構である。HK は外部から環境シグナルを感知し ATP 依存的に自己リン酸化し、RR へとリン酸基転移を行う。リン酸基を受け取った RR は二量体を形成し、特異的に遺伝子のプロモーター領域へと結合、遺伝子の発現を制御する。TCS は病原性発現、細菌増殖、バイオフィルム形成、薬剤耐性などの遺伝子発現の制御を担っている。その TCS の一つである WalK（HK）/WalR（RR）は枯草菌、VRE、 MRSA といった低 GC グラム陽性細菌に多く保存されている。WalK（HK）/WalR（RR）は細胞壁代謝に関与する遺伝子の制御を担っており、細胞増殖に必須であることが明らかとなっている。

そこで、当研究室では、この WalK/WalR を標的とした新規抗生物質 waldiomycin を放線菌の代謝物より単離精製した。この waldiomycin の作用部位を含む、より詳細な作用機構を明らかにすることで、これを元とした、選択毒性の高い化合物の合成等が可能になると期待できる。waldiomycin は HK である WalK の自己リン酸化活性を阻害することで、その制御下の遺伝子発現と、それに伴う細胞壁代謝異常による、細胞分裂・増殖阻害を引き起こすことが明らかとなった。また、waldiomycin は WalK だけでなく、他の HK にも作用し、自己リン酸化を阻害することが明らかとなった。立体構造が明らかとなっている大腸菌の HK である EnvZ の実験結果を元に waldiomycin の作用部位の特定を、枯草菌の WalK を用いて行った。

本研究を行う上で、枯草菌 WalK の H-box のアミノ酸に変異を導入した変異体タンパク質を 17 種類精製した。精製試料を RI 標識された ATP を用いて自己リン酸化させ、それらに対する waldiomycin の自己リン酸化阻害濃度（IC50）を評価した。その結果、枯草菌 WalK 変異体 S385A と P391A は野生型と比較して waldiomycin の IC50 が約 3 倍以上に上昇した。以上の結果より、大腸菌 EnvZ と同様に枯草菌 WalK においても H-box の Ser385、P391A に waldiomycin が作用し、自己リン酸化反応を阻害することが示唆された。

現在、*in vivo* において、waldiomycin に対して耐性化を示した変異を用いて、Phos-tag や qPCR 等での実験を進めている。

Histidine Kinase, Bacillus subtilis, waldiomycin

発表番号：2F065
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 土壌細菌 *Burkholderia multivorans* における Fur 制御下の機能未知遺伝子 *hemP* の解析

# Analysis of the *hemP* gene involved in the Fur-dependent iron homeostasis in *Burkholderia multivorans*

○佐藤 拓哉、湯原 悟志、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大　院生命）
○Takuya SATO, Satoshi YUHARA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

鉄は生物にとって必須元素であるが、鉄の過剰な細胞内取込みは細胞に有害なヒドロキシラジカルを始めとする活性酸素種の誘発に繋がる。多くの細菌では、Ferric uptake regulator (Fur)が高濃度鉄存在下で活性化し、鉄獲得に関わる遺伝子の発現を抑制することで、鉄恒常性維持の中心的な役割を担っていると考えられているが、Fur により発現制御される遺伝子は多様であり、未解明な鉄恒常性維持機構の存在が強く示唆される。我々は、物質代謝能に優れた土壌細菌 *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株を対象として、Fur が関与する新規な鉄恒常性維持機構の解明を目的とした研究を進めている。

本株の *fur* 欠失株(DF1 株)を用いたマイクロアレイ解析及び-RNA-seq 解析を実施したところ、hemin uptake protein をコードするとアノテイトされているが、実際の機能は未知である *hemP* 遺伝子が著しく高発現していた。そして、定量 RT-PCR 解析で、DF1 株における *hemP* 転写量は野生型株と比較して約 800 倍増加していることが判明した。次に、鉄制限条件(M9 培地に 2,2'-Dipyridyl を 100 μM 添加)あるいは鉄高濃度条件(M9 培地に $FeCl_3$ を 30 μM 添加)において野生型株を培養した際の *hemP* 転写量を比較したところ、*hemP* の転写量は、鉄高濃度条件で約 1/200 に減少していた。以上の結果から *hemP* は Fur に転写制御されていることが示唆された。そこで Fur を介した *hemP* 発現機構を明らかにするために詳細な解析を試みた。第 2 世代シーケンサー（Illumina 社 MiSeq）を用いて、本株の遺伝子の転写開始点の網羅的な解析を実施したところ、*hemP* の転写開始点が判明し、本転写開始点の数塩基上流には推定 Fur 結合配列が *hemP* のプロモータ配列とオーバーラップする形で存在していた。さらにゲルシフトアッセイから *hemP* 上流配列に Fur が結合することが明らかとなっており(湯原 2008)、鉄高濃度時に活性化した Fur が推定 Fur 結合配列に結合することで直接 *hemP* の転写を抑えていることが強く示唆された。

さらに *hemP* 高発現株を作製し、鉄高濃度条件における生育能を野生型株と比較したところ、*hemP* 高発現株では生育にわずかな遅れがみられた。*hemP* 高発現株を用いた RNA-seq 解析ではヘム鉄合成に関与する遺伝子群の転写に変動がみられ、定量 RT-PCR 解析でこれら遺伝子の発現量を測定したところ、ヘム鉄合成の第一ステップに関与する推定 *hmuL* 遺伝子の転写量が約 1/7 に減少していた。これらの結果から、*hemP* がヘム鉄の合成に関与していると推測された。現在 *hemP* 破壊株を用いた表現型解析及び、精製 HemP を用いた *in vitro* 系での機能解析を行っている。

ferric uptake, Fur, hemin

発表責任者：佐藤拓哉（t_sato@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：2F066
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Burkholderia multivorans* における鉄硫黄クラスター合成系遺伝子群の転写制御機構の解析

Analysis of Transcriptional regulation of genes involved in iron-sulfur cluster biosynthesis machinery in *Burkholderia multivorans*

○野々山 翔太、佐藤 拓哉、岸田 康平、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命科）
○Shota NONOYAMA, Takuya SATO, Kohei KISHIDA, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku univ.)

鉄硫黄クラスターは様々なタンパク質のコファクターとして利用され、本クラスターを含んだ様々なタンパク質は代謝や遺伝子の発現制御といった生命活動の根幹を担っている。主に大腸菌を用いた解析により、鉄硫黄クラスターを合成する機構には複数のタンパク質が関わっており、これらをコードする遺伝子はオペロンを形成していることが明らかとなっている。本研究に用いた *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 株(以下 ATCC 17616 株)では多種多様な芳香族系化合物を示す土壌細菌であり、推定鉄硫黄クラスター生合成オペロン(*isc* オペロン)を一つ有している。当研究室のこれまでの解析から、ATCC 17616 株の鉄応答性転写制御因子 Fur を破壊すると多様な表現型を示すことが明らかとなっているが、推定 *isc* オペロンの上流には推定 Fur 結合配列を有しており、*fur* の破壊がもたらす多様な表現型に鉄硫黄クラスターが関与している可能性が考えられる。加えて推定 *isc* オペロンの先頭には発現制御を担っている *iscR* と推定される遺伝子が存在し、推定 IscR 結合配列も存在している。このことから、推定 *isc* オペロンの転写調節に Fur と IscR 二つの因子が関与している可能性が示唆された。そこで、本研究では推定 *isc* オペロンの発現機構解明を目的とし、Fur と IscR に着目した解析を行った。

まず、ATCC 17616 株における推定 *iscR* に関する派生株を作製し、定量 RT-PCR により鉄硫黄クラスター生合成において硫黄の供給を担う *iscS* の転写量を測定した。その結果、*iscR* の完全欠失株は野生株と比較して *iscS* の転写量が大幅に上昇していた。一方で野生株に *iscR* 高発現プラスミドを導入したところ、野生株と比較して *iscS* の転写量が減少していた。この結果から、IscR がオペロンの転写調節に関与していることが強く示唆された。現在、推定 *isc* オペロン内の他遺伝子の発現制御への IscR の関与を解析している。次に、Fur titration assay (大腸菌の Fur を用い、任意の配列に Fur が結合するかを評価する手法)により、*iscR* 上流の推定 Fur 結合配列に Fur が結合するか解析したところ、大腸菌の Fur が ATCC 17616 株の推定 *isc* オペロン上流に結合することが明らかとなり、鉄硫黄クラスター生合成への Fur の関与が強く示唆された。さらに、*iscR* 完全欠失株を用い、鉄のキレート剤の添加によって培地中の鉄濃度を制限した条件で本変異株の生育能を調べた。その結果、野生株では生育能が低下するキレート剤の濃度において *iscR* 破壊株は生育能が上昇することが確認された。現在、この表現型と *isc* オペロンの過剰発現との関連性を解析している。

iron-sulfur cluster, Ferric uptake regulator (Fur), Transcriptional regulation

発表番号：2F067
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* CP4 の耐熱化株における耐熱化変異の解析

# Analysis of genes related to thermal adaptation in *Zymomonas mobilis* CP4

○加藤 舜[1]、白丸 優貴[1]、山下 舞子[2]、村田 正之[2]、松谷 峰之介[1]、高坂 智之[1,3]、山田 守[1,2,3]（[1]山口大農、[2]山口大院医、[3]山口大中高温微生物セ）
○Shun KATO[1], Yuki SHIROMARU[1], Maiko YAMASHITA[2], Masayuki MURATA[2], Minenosuke MATSUTANI[1], Tomoyuki KOSAKA[1,3], Mamoru YAMADA[1,2,3] ([1]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [2]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

[目的] エタノール生産微生物の耐熱性獲得による高温発酵は、冷却コストの削減や発酵操作の簡便化などにより、安価なエタノール生産を可能にすると期待されている。我々は、生育速度が速くエタノール発酵効率の良い菌として知られるグラム陰性通性嫌気性細菌*Zymomonas mobilis*のCP4株を親株として、高温で継代培養する適応育種により、高温生育限界温度を2 ºC上昇させた耐熱化株Z4-80a, Z4-80b, Z4-80c, Z4-80dの4株を単離した。本研究では、これら耐熱化株の生理学的特徴を解析するとともに遺伝的変異も解析することで、*Z. mobilis* を耐熱化する機構を明らかにすることを試みた。

[方法・結果] まず、単離された耐熱化株の生理学的解析を行ったところ、全ての耐熱化株において高温での活性酸素種の蓄積と細胞の伸長が抑制されていた。加えて、Z4-80aとZ4-80c、もしくはZ4-80bとZ4-80dがそれぞれ似た表現型を示すことが分かった。次に、全ゲノム解析により予測された耐熱化株の変異箇所を特定するため、ダイレクトシーケンスによる変異箇所の同定を行った。この同定された変異箇所のうち、いずれの遺伝子変異が耐熱化の獲得に寄与しているかを明らかにするため、親株に遺伝子変異を1か所ずつ移した変異株を作製し、耐熱性を評価した。これまでの解析結果、RNAポリメラーゼをコードする*rpoB*の変異を導入した株で耐熱性の向上が確認されたことから、少なくとも*rpoB*の変異がCP4株の耐熱化に寄与することが明らかとなった。

*Zymomonas mobilis*, thermal adaptation, mutations

発表番号：2F068
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Mutator を利用した *Zymomonas mobilis* のさらなる耐熱化

# Further thermotolerance of *Zymomonas mobilis* by using mutators

○吉田 咲紀[1]、村田 正之[1]、高坂 智之[2,3]、兼崎 友[4]、吉川 博文[4,5]、山田 守[1,2,3]（[1]山口大院医、[2]山口大農、[3]山口大中高温微生物セ、[4]東京農大 生物資源ゲノム解析セ、[5]東京農大）
○Saki YOSHIDA[1], Masayuki MURATA[1], Tomoyuki KOSAKA[2,3], Yu KANESAKI[4], Hirofumi YOSHIKAWA[4,5], Mamoru YAMADA[1,2,3] ([1]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ., [2]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ., [4]NGRC, Tokyo Univ. of Agriculture, [5]Tokyo Univ. of Agriculture)

【目的】耐熱性微生物を用いた高温発酵は、冷却コストの削減や発酵操作の簡素化などにより安価なエタノール生産を可能にすると期待されている。グラム陰性通性嫌気性菌のエタノール生産性細菌である *Zymomonas mobilis* は、一般的にエタノール発酵に用いられる酵母よりも糖の資化速度が速く、高いエタノール生産能を有することが知られている。しかし、一方で耐熱性酵母と比較して耐熱性が低く、40 ºC 以上で安定に発酵できる菌株の獲得が急務である。
そのために当研究室では、高温側の生育限界温度が 38 ºC の *Z. mobilis* TISTR 548 株を用いて、従来の耐熱化方法である高温での連続培養による高温適応を行った。その結果、200 回培養を繰り返したところで、生育限界温度が 40 ºC の *Z. mobilis* 200M 株を単離している。しかし、従来の方法では 2 ºC を超えて耐熱性が向上しなかったため、高温での連続培養による生育限界温度の改変は限界であると推察されていた。そこで本研究では、遺伝子変異を誘発しやすい菌株（mutator）を用いて限界温度での高温適応実験を行えば、2 ºC の壁を打ち破る耐熱化株が得られるのではないかと考えた。mutator は変異の頻度が高いことから変異株獲得に広く利用されており、本研究では、ミスマッチ修復系の遺伝子を利用した mutator を用いて耐熱化を試み、耐熱化の限界を知ることを目的とする。
【方法・結果】ミスマッチ修復系において重要な働きを担うタンパク質である MutS と MutL をコードする遺伝子の欠損株を Gateway 法の BP 反応を用いて、親株を *Z. mobilis* 200M 株として mutator を作製した。自然突然変異率を測定したところ、親株と比較して 6 倍程度の変異率が上昇していることが確認されたので、mutator としての効果が期待できると考え、高温適応実験を行った。mutator を用いて高温での連続培養を 80 回繰り返した結果、耐熱性・エタノール生産能が 1 ºC 向上した株の単離に成功した。この結果から、ミスマッチ修復系の mutator により生育限界温度を 1 ºC 改変したことが示された。また、変異頻度を高めたことで獲得された耐熱性関連遺伝子を特定するため、単離された耐熱化株の遺伝子変異を次世代シーケンスで確認したところ、RNA 代謝、タンパク質分解酵素、炭素源の中心代謝に関与する３つの遺伝子への変異が確認された。これらの変異の耐熱性への関与について考察するとともに、菌株の耐熱化の限界について議論したい。

*Zymomonas mobilis*, mutator, thermotolerance

発表責任者：山田　守（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：2F069
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 抗酸化遺伝子の高発現による *Zymomonas mobilis* の耐熱化

# Enhancement of thermotolerance by expression of antioxidative genes in *Zymomonas mobilis*

○高坂 智之[1,3]、城戸 啓佑[1]、青木 浩介[1]、村田 正之[2]、山田 守[1,2,3] ([1]山口大農、[2]山口大院医学系研究科、[3]山口大中高温微生物セ)
○ Tomoyuki KOSAKA[1,3], Keisuke KIDO[1], Kousuke AOKI[1], Masayuki MURATA[2], Mamoru YAMADA[1,2,3] ([1]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [2]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

【目的】高温発酵には冷却コストの削減や雑菌混入の抑制などのメリットがあり、物質の発酵生産に関わるコスト削減技術として期待されている。しかし、高温発酵には高温条件に適した発酵微生物が必要であり、有用な発酵微生物の耐熱化を可能にする育種及び開発法が求められている。これまでの解析で、発酵微生物が高温限界での生育において活性酸素種を細胞内に蓄積することを観察してきている。そこで、抗酸化活性を有する酵素遺伝子を発現させることで、微生物の耐熱性を向上できると推察した。本研究では、耐熱性を示すエタノール生産性細菌 *Zymomonas mobilis* TISTR548 において抗酸化遺伝子であるペルオキシレドキシン(*ahpC*)、カタラーゼ(*cat*)、サイトクローム *c* ペルオキシダーゼ (*cyt*)、スーパーオキシドディスムターゼ(*sod*)、そして鉄依存性ペルオキシダーゼ(ZMO1573)を発現させ、耐熱性への影響を解析した。
【実験・結果】まず、5 つの抗酸化遺伝子(*ahpC*, *cat*, *cyt*, *sod*, ZMO1573)の発現ベクターを大腸菌-ザイモモナス菌のシャトルベクターである pZA22 を基に構築した。各遺伝子は発現プロモーターとしてピルビン酸脱炭酸酵素(PDC)のプロモーターを結合して pZA22 に組み込んだ後、エレクトロポレーションにより TISTR548 に導入した。得られた菌株の生育を比較したところ、39℃においてプラスミド導入株が親株より生育が向上していた。しかし、41℃では ZMO1573、*cyt*、そして *cat* の場合のみ、耐熱性の向上が見られた。また、これらプラスミド導入株の過酸化水素耐性を比較したところ、cyt 以外の遺伝子において過酸化水素耐性の向上が確認され、そのうち ZMO1573 を導入した株が最も高い耐性向上を示した。これらの結果より、抗酸化遺伝子を発現させることにより *Zymomonas mobilis* の耐熱性が向上することが示された。次に、これら抗酸化遺伝子の安定的な発現を目指してゲノムへの挿入を試みた。まず、TISTR548 ゲノムへの遺伝子挿入による耐熱性の影響を避ける為、トランスポゾン挿入により耐熱性及びエタノール生産性に影響のない遺伝子を探索し、破壊により影響が見られない遺伝子を見出した。そして、この遺伝子領域をターゲットとして抗酸化遺伝子をゲノムに導入し耐熱性を分析したところ、39℃において全ての抗酸化遺伝子導入株は親株と比べて耐熱性が向上していることが示された。

*Zymomonas mobilis*, antioxidative genes, thermotolerance

発表責任者：高坂智之（tkosaka@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：2F070
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* の持つホスホリパーゼ AoplaA の機能解析

# Functional analysis of phospholipase AoPlaA in *Aspergillus oryzae*

○伊澤 翔、高柳 亜由美、駒井 紀之、小谷 昌平、北本 勝ひこ、有岡 学（東大院・農生科・応生工）
○Sho IZAWA, Ayumi TAKAYANAGI, Noriyuki KOMAI, Shohei KOTANI, Katsuhiko KITAMOTO, Manabu ARIOKA (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

【背景と目的】グリセロリン脂質の *sn*-2 位のエステル結合を加水分解し、脂肪酸と 1-アシルリゾリン脂質を生成する酵素はホスホリパーゼ $A_2$ ($PLA_2$) と総称される。$PLA_2$ のうち細胞質型 $PLA_2$ ($cPLA_2$) と呼ばれる一群の酵素は、哺乳類では $cPLA_2\alpha$、β、γ、δ、ε、ζ の 6 つのアイソザイムが知られているが、このうちヒト $cPLA_2\alpha$ が非常に良く研究されている。$cPLA_2\alpha$ はリン酸化や細胞質 $Ca^{2+}$の上昇を受けて活性化して細胞質からゴルジ体膜などのオルガネラ膜に移行し、アラキドン酸を選択的に遊離することで脂質メディエーターであるエイコサノイド類の生成を誘起する。また、$PLA_2$ 活性だけでなくリゾホスホリパーゼ活性も示す。我々は麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノム配列から $cPLA_2\alpha$ との相同性を示す唯一のタンパク質 AoPlaA を見出し、その生理機能の解明を目指した研究を行ってきた。AoPlaA は $cPLA_2\alpha$ が持つ、$Ca^{2+}$依存的にリン脂質に結合する C2 ドメインを持たず、N 末端にミトコンドリア局在シグナルを有し、ミトコンドリア内膜と外膜の間の膜間スペースに局在することが示唆されている*。従って AoPlaA は哺乳類 $cPLA_2$ とは異なる役割を持つと考えられる。本研究では AoPlaA の機能に関してより詳細な検討を行った。

【方法と結果】大腸菌で組換え生産した AoPlaA の各種リン脂質に対する分解活性を調べたところ、ホスファチジルエタノールアミン (PE) に対してのみ活性を示し、ホスファチジルコリンなど他のリン脂質に対しては作用しないことがわかった。また、PE 分解活性は $Ca^{2+}$非依存的であった。一方、AoPlaA は 1-アシル型リゾ PE の *sn*-1 位を切断するリゾホスホリパーゼ活性も示し、これは $Ca^{2+}$依存的であった。ヒト $cPLA_2\alpha$ から予想された活性中心残基である Arg238 と Ser266 をそれぞれ Ala に置換した R238A および S266A 変異体の活性を測定したところ、R238A は野生型の 50%程度の PE 分解活性を示したが、S266A は活性を失っていた。我々の以前の研究で、野生型 AoPlaA および R238A 高発現株で生育遅延が見られ、S266A 高発現株では生育遅延が見られないという結果が得られていたが、上記の酵素活性測定の結果はこれとよく相関し、生育遅延が過剰な AoPlaA 活性に起因するものであることが示唆された。また、AoPlaA 高発現株のミトコンドリアでは PE が特異的に減少することが明らかとなっていることから、AoPlaA はミトコンドリア膜間スペースに局在し、PE とリゾ PE を特異的に分解することで PE 代謝およびミトコンドリア機能に関わる酵素であることが示唆された。

*Takaya *et al*., FEMS Microbiol. Lett. 301, 201-209 (2009)

cytosolic phospholipase $A_2$, lysophospholipase, phosphatidylethanolamine

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F071
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母の持つ細胞質型ホスホリパーゼ $A_1$ 様タンパク質の機能解析

# Functional analysis of intracellular phospholipase $A_1$-like protein in *S. cerevisiae*

○浦藤 喬生、有岡 学（東大院・農生科・応生工）
○Kyosei URAFUJI, Manabu ARIOKA (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】ホスホリパーゼはグリセロリン脂質を加水分解して脂肪酸とその他の親油性物質を生じる酵素であり、その分解産物は細胞間やオルガネラ間のシグナル伝達において重要な役割を果たすことが知られている。ホスホリパーゼ $A_1$（$PLA_1$）はその中でもグリセロリン脂質の *sn*-1 位アシル鎖のエステル結合を加水分解し、脂肪酸と 2-アシルリゾリン脂質を生じる酵素であり、真核生物において広く保存されている。哺乳類においては分泌型の $PLA_1$（$sPLA_1$）が 6 つと細胞質型の $PLA_1$（$iPLA_1$）が 3 つ知られており、とりわけ PA-$PLA_1$、p125、KIAA0725p の 3 つの $iPLA_1$ は比較的最近発見された。興味深いことに、これらはそれぞれ酵素活性や細胞内における局在が大きく異なり、その生理学的機能も異なると考えられている。モデル真核微生物である出芽酵母においては、PA-$PLA_1$ と 36%のアミノ酸配列相同性を示す唯一の $iPLA_1$ オルソログである YOR022C が見出されている。YOR022C は哺乳類の $iPLA_1$ と同様にリパーゼのコンセンサス配列（GXSXG）や DDHD ドメインを有することが明らかとなっているが、その酵素学的性質や生理学的機能はほとんど明らかとなっていない。本研究では出芽酵母における $iPLA_1$ オルソログである YOR022C の酵素学的性質の解析や局在解析を通した生理学的機能の解明を目的としている。

【手法と結果】YOR022C 遺伝子をクローニングし、出芽酵母において高発現させて生育を観察したところ、30°C の最少培地上での培養においてコントロール株と比較して生育に大きな差は見られなかった。大腸菌で組換え生産した YOR022C を $Ni^{2+}$-NTA カラムを用いて粗精製し、[$^3$H]オレイン酸標識した大腸菌膜画分を基質とした活性測定を行ったところ、活性が認められた。活性は $Ca^{2+}$非存在下でも認められたが、高濃度の $Ca^{2+}$存在下では活性の上昇が観察された。また、$PLA_1$ において広く保存された活性中心残基であるセリンをアラニンに置換した S501A 変異体も同様に生産、精製し活性測定を行ったところ、活性が認められなかった。したがって、YOR022C が他の $PLA_1$ と同様にセリンを活性中心残基としてもつことが示唆された。さらに、野生型および変異体を用いて円偏光二色性測定を行ったところ、どちらも α ヘリックス様のスペクトルが得られたため、両組換え体ともに二次構造を有した状態で精製されていることが確認された。今後は質量分析計を用いた詳細な活性測定を行っていく予定である。また、アミノ酸配列の解析から N 末端にミトコンドリア移行シグナルを有することが示唆されたため、GFP 融合タンパク質を用いた蛍光顕微鏡観察による局在解析や細胞分画実験を行うことを計画している。

*Saccharomyces cerevisiae*, phospholipid, phospholipase

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F072
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する新規デカルボキシラーゼ遺伝子の機能解析

# Functional analysis of novel decarboxylase genes involved in the catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○三宅 恭平[1]、高橋 健司[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、梶田 真也[3]、片山 義博[4]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1]（[1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]東農工大院・BASE、[4]日大・生資科）
○ Kyohei MIYAKE[1], Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Shinya KAJITA[3], Yoshihiro KATAYAMA[4], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]Tokyo Univ. Agric. Tech., [4]Nihon Univ.)

【緒言】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来の二量体化合物を唯一の炭素源・エネルギー源として生育できる (Masai et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2007)。SYK-6 株の多様なリグニン由来化合物の分解酵素遺伝子は、リグニンからの有用物質生産や脱リグニンが容易な植物を作出するためのリグニン構造の改変に利用可能と期待される。本研究ではリグニン生合成において主要な二量体として生成し、高分子リグニン中で約 3-10%を占めるフェニルクマランの代謝遺伝子に着目した。SYK-6 株においてフェニルクマラン型化合物の dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)は、初めに B 環側鎖 Cγ位がカルボン酸に酸化された DCA-C に変換される。次に A 環側鎖 Cγ位がカルボン酸に酸化されて DCA-CC を生成し、脱炭酸を受け DCA-S に変換された後、Cα-Cβ開裂を受けて代謝される。これまでに DCA から DCA-CC までの変換に関与する酵素遺伝子を明らかにしてきた。本研究では DCA-CC の脱炭酸に関与するデカルボキシラーゼ遺伝子を同定し、機能を明らかにすることを目的とした。
【方法】SYK-6株の遺伝子ライブラリーから*E. coli* にDCA-CC変換能を付与する*phcF*, *phcG*, *phcH* を同定した。相同組換えにより遺伝子破壊株を作製し、各破壊株の休止細胞を用いてDCA-CC変換活性を調べた。His-tagを付加した*phcF*と*phcG*を*E. coli* で発現させ、Ni affinity chromatographyにより精製し、精製酵素を用いて酵素学的諸性質を調べた。DCA-CC変換活性の測定及び変換産物の同定はHPLCとLC-MSを用いて行った。
【結果】SYK-6株の遺伝子ライブラリーから、DCA-CC変換能を宿主に与えた*phcF, phcG, phcH* を単離した。各遺伝子破壊株のDCA-CC変換能を野生株と比較したところ、*phcF* 破壊株と*phcG* 破壊株において変換活性が顕著に低下したのに対して、*phcH* 破壊株では野生株と同等であった。これらの結果から、*phcF* と*phcG* がDCA-CC変換に関与することが明らかとなった。精製したPhcF及びPhcGはDCA-CCを脱炭酸し、DCA-Sに変換する活性を有するが、両酵素の反応において約半分のDCA-CCが残存することが示された。キラルカラムを用いたHPLC分析により、基質に用いたDCA-CCは(+)-DCA-CCと(-)-DCA-CCの等量混合物であることが示された。PhcFとPhcGの基質に対する立体選択性を調べるために、それぞれの酵素によってDCA-CCが半分まで変換された時点で、PhcFまたはPhcGを添加し、DCA-CC変換を調べた。その結果、反応開始時と異なる酵素を加えた場合において、DCA-CCが完全に変換されたことから、PhcFとPhcGは互いに異なる立体選択性を持つことが明らかとなった。また両酵素の至適温度は40℃、至適pHは6.0であることが示された。

lignin, decarboxylase, *Sphingobium*

発表責任者：政井英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F073
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Sphingobium* sp. SYK-6 株におけるフェニルクマラン型化合物代謝に関与する lignostilbene α,β-dioxygenase 遺伝子の同定
Identification of lignostilbene α,β-dioxygenase genes involved in the catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○廣瀬 優作[1]、高橋 健司[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、片山 義博[3]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]日大・生資科)
○ Yusaku HIROSE[1], Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Yoshihiro KATAYAMA[3], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]Nihon Univ.)

【緒言】*Sphingobium* sp. SYK-6 株は､様々なリグニン由来二量体化合物を分解することが可能であり、当研究グループでは本株のリグニン代謝系遺伝子を単離、解析してきた。これらのリグニン代謝系遺伝子は、リグニンからの有用物質生産や、植物への導入によりリグニン構造を易分解性に改変することに利用できると期待される。本研究では、リグニン生合成初期に生成し、高分子リグニン中で約 3-10%を占めるフェニルクマランの代謝に着目した。SYK-6 株においてフェニルクマラン型化合物 dehydrodiconiferyl alcohol (DCA)は、初めに B 環側鎖 Cγ位がカルボン酸に酸化された DCA-C に変換され、その後、A 環側鎖 Cγ位が酸化されて DCA-CC が生成する。続いて DCA-CC の Cγ位が脱離することで DCA-S が生成し、Cα-Cβ開裂によって 5-formylferulate と vanillin に変換されて代謝される。これまでの研究で、DCA から DCA-CC への代謝に関与する酵素遺伝子を明らかにしてきたが、DCA-S 変換酵素遺伝子は同定されていない。DCA-S 変換酵素については *Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 株において唯一報告があり、4 種の lignostilbene α,β-dioxygenase (LSD)が DCA-S 変換活性を有することが示されている (Kamoda *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.,* 2005)。本研究では、SYK-6 株において DCA-S の変換に実際に関与する酵素遺伝子を明らかにすることを目的とした。
【方法】SYK-6 株に存在する LSD 様遺伝子を相同組換えによって破壊し、各破壊株の休止細胞及び細胞抽出液を用いて DCA-S 変換活性を調べた。また、pET16b、pColdI をベクターに用いて各 LSD 様遺伝子を *E. coli* において発現させた。可溶化した酵素については His-tag 精製の後、DCA-S 変換活性を測定した。変換活性の測定及び変換産物の同定は HPLC 及び LC-MS 分析によって行った。
【結果】TMY1009 株由来の LSD 遺伝子と相同性をもつ遺伝子を SYK-6 株ゲノムにおいて検索した結果、8 つの LSD 様遺伝子の存在が示された。これら遺伝子の破壊株を作製し、各破壊株の休止細胞及び細胞抽出液を用いて DCA-S 変換活性測定した。その結果、野生株と比較して *lsdB*、*lsdD*、*lsdE* 破壊株の変換能に顕著な低下が見られた。このことから、SYK-6 株における DCA-S の変換にこれら 3 つの遺伝子が関与することが示唆された。また、*E. coli* を宿主に用いて 8 つの *lsd* 様遺伝子をそれぞれ大腸菌で発現させ、LsdB と LsdD を含む 5 つについて精製酵素を得た。精製 LsdD と DCA-S を反応させたところ、DCA-S の変換が認められた。現在、各精製酵素の DCA-S 変換活性を測定するとともに、*lsdB*、*lsdD*、*lsdE* 遺伝子について多重破壊株の作製を行っている。

lignin, dioxygenase, *Sphingobium*

発表責任者：政井 英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F074
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Sphingobium* sp. SYK-6 株における β-1 型リグニン由来化合物代謝に関わる立体選択的脱水素酵素の解析

# Identification and characterization of stereospecific dehydrogenases involved in a ß-1-type biaryl in *Sphingobium* sp. stain SYK-6

○小林 将大[1]、南保 美姫[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、政井 英司[1] ([1]長岡技科大・生物、[2]森林総研)
○Shota KOBAYASHI[1], Miki NAMBO[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI)

**【緒言】** *Sphingobium* sp. SYK-6 株は、様々なリグニン由来の二量体及び単量体化合物の代謝系を有しており、これら代謝系の解明はリグニンからの有用物質生産系の構築に重要である。これまでに SYK-6 株のβ-アリールエーテル及びビフェニルの代謝系遺伝子が明らかにされてきたが、ジアリールプロパン型化合物である 1,2-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propane-1,3-diol (HMPPD)の代謝系に関する知見はほとんど得られていない。HMPPD の代謝経路については、*Sphingomonas paucimobilis* TMY1009 株で報告があり、HMPPD は Cα位の脱ヒドロキシル化を伴う Cγ位脱ホルミル化の後、Cα-Cβ開裂を受けて代謝されると予想されている (Habu et al., *Mokuzai Gakkaishi*, 1989)。また副産物として HMPPD の Cα位が酸化された HMPPD-keto が生成し、keto 体の生成に Cα-dehydrogenase が関与することが示唆されている (Kishi et al., *Agric. Biol. Chem.*, 1991)。本研究では SYK-6 株における HMPPD の代謝経路と本経路に関わる酵素遺伝子を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** SYK-6 株の細胞抽出液 (1 mg/ml)を用い、500 μM $NAD^+$の存在下及び非存在下での 200 μM HMPPD の変換能を調べた。Cα-dehydrogenase をコードする *ligD*、*ligL*、*ligN*、*ligO* を発現させた大腸菌と SYK-6 株の *ligD*、*ligL*、*ligN*、*ligO* 破壊株の休止細胞を用いて HMPPD 変換能を調べた。HMPPD 変換能と反応産物は HPLC 及び LC-MS 分析によって解析した。

**【結果と考察】** SYK-6 株における HMPPD の代謝経路を推定するために、SYK-6 株の細胞抽出液を用いて HMPPD 変換能を調べた。その結果、$NAD^+$存在下でのみ HMPPD の変換が観察され、反応産物として HMPPD-keto が生成した。本反応とβ-アリールエーテルの Cα酸化との類似性から HMPPD の変換に Cα-dehydrogenase が関与すると推定し、*ligD*、*ligL*、*ligN*、*ligO* を発現させた大腸菌休止細胞による HMPPD 変換能を調べた。その結果、すべての組換え体が HMPPD を HMPPD-keto に変換した。また、LigD/LigO と LigL/LigN が異なる立体選択性を持つことが示唆された。各遺伝子の破壊株の解析から、*ligL* が SYK-6 株における HMPPD の片方の異性体の変換に主要な役割を持ち、もう一方の異性体の変換には *ligD* と SYK-6 株においてβ-アリールエーテルの変換には関与しない *ligO* が働いていることが推定された。現在、キラル HPLC カラムを用いた立体選択性のさらなる解析と LigD、LigL、LigN、LigO の精製酵素を用いた HMPPD 変換実験を進めている。

Lignin, stereoselectivity, Dehydrogenase

発表責任者：政井英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F075
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Sphingobium* 属細菌におけるリグニン由来化合物の外膜輸送システム

# An outer membrane transport system for lignin-derived aromatics in *Sphingobium* sp. strain SYK-6

○藤田 雅也、森 光佑、上村 直史、笠井 大輔、福田 雅夫、政井 英司（長岡技科大・生物）
○Masaya FUJITA, Kosuke MORI, Naofumi KAMIMURA, Daisuke KASAI, Masao FUKUDA, Eiji MASAI (Nagaoka Univ. Tech.)

【背景・目的】植物の細胞壁を構成するリグニンは、地球上で最も豊富に存在する芳香族化合物であるが、その構造の複雑さ故に有効な利用方法が限定されている。そのような中、近年、微生物機能を利用したリグニンの有用物質変換が注目されている。*Sphingobium* sp. SYK-6 株はさまざまなリグニン由来の二量体や単量体化合物を炭素源として生育できるグラム陰性菌であり、当研究グループにより代謝経路遺伝子と転写制御系が明らかにされてきた。しかし、リグニン由来芳香族化合物の細胞内への取り込みに関する知見はほとんど得られておらず、リグニンの有用物質変換系を構築する上でその解明が望まれる。グラム陰性菌である SYK-6 株では、基質は外膜と内膜を通過して細胞質へと輸送される。グラム陰性菌の外膜輸送の一つとして TonB-dependent receptor (TBDR)が関与する TonB システムが報告されている。TBDR は、内膜局在性の TonB、ExbB、ExbD 複合体から伝達されるプロトン駆動力由来のエネルギーを利用して外膜における分子輸送を行うことが知られており、現在までにシデロフォアやビタミン B12、金属イオンなどの輸送を行うことが報告されている。しかし芳香族化合物の外膜輸送に TonB システムが関与することを示した例は見受けられない。本研究ではリグニン由来芳香族化合物の外膜輸送への TonB システムの関与について解析を行った。
【方法・結果】リグニン由来芳香族化合物の存在下及び非存在下で培養した SYK-6 株から単離した全 RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、ビフェニル化合物である 5,5′-dehydrodivanillate (DDVA)の代謝系遺伝子群の近傍に存在し、TBDR をコードすると推定される *tbtA* が DDVA 培養時に特異的に誘導されることが示された。また、β-アリールエーテル、フェニルクマラン、ピノレジノール等のリグニン二量体化合物によって誘導される TBDR 遺伝子が存在した。SYK-6 株のゲノム中には、TonB システムと相同性を示す遺伝子が *tonB* について 3 つ、*exbB* では 1 つ、*exbD* で 2 つ見出された。3 つの *tonB* 及び *tbtA* の破壊株を作製し、リグニン由来芳香族化合物での生育能を SYK-6 株と比較した。その結果、*tonB2* 破壊株において DDVA、バニリン酸、シリンガ酸、フェルラ酸、及びアセトバニロンで生育の遅延が見られた。一方、*tbtA* 破壊株は DDVA での生育能を欠損していた。*tonB2* 破壊株及び *tbtA* 破壊株にそれぞれ *tonB2* と *tbtA* をプラスミドで相補したところ、生育能又は分解能が野生株と同等までに回復した。以上のことから、DDVA の細胞内への取り込みには、TBDR である TbtA を外膜輸送体とする TonB システムが関与していることが強く示唆された。また、TonB2 がリグニン由来芳香族化合物代謝に重要な役割を担うことが示された。

*Sphingobium*, membrane transport, aromatic compound

発表責任者：政井英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F076
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コニフェリルアルデヒド二重結合還元酵素のアラニンスキャニング変異体の解析

# Alanine Scanning Mutagenesis of Coniferyl Aldehyde Double Bond Reductases

○渡辺 眞悟[1]、上村 直史[1]、菱山 正二郎[2]、笠井 大輔[1]、福田 雅夫[1]、梶田 真也[3]、政井 英司[1]（[1]長岡技科大・生物、[2]森林総研、[3]東農工大院・BASE）
○Shingo WATANABE[1], Naofumi KAMIMURA[1], Shojiro HISHIYAMA[2], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1], Shinya KAJITA[3], Eiji MASAI[1] ([1]Nagaoka Univ. Tech., [2]FFPRI, [3]Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】木質バイオマスからバイオ燃料や化学工業原料を生産する際に、酸やアルカリ処理等の前処理がリグニンを除去するために必要である。当研究グループは、易分解性リグニンを有する植物の開発を目指し、有用なリグニンモノマー変換酵素遺伝子の探索と解析を行ってきた。これまでに、コニフェリルアルデヒド (CALD)の側鎖二重結合を還元する alkenal double bond reductase (DBR)に着目し、既知の *Arabidopsis thaliana* 由来 DBR (AtDBR; Youn et al., *J. Biol. Chem.*, 2006)と比較して CALD 変換における $V_{max}$ が高い *Parvibaculum lavamentivorans* 由来の DBR (PlDBR)を見出した。さらに、PlDBR において基質ポケットの形成に関わると推定されたアミノ酸残基を置換し、野生型よりも $V_{max}/K_m$ が 2.0 倍高い V268I-G269Y 変異酵素を取得した。本研究では DBR の酵素活性に重要なアミノ酸残基を同定することを目的として、AtDBR の立体構造情報に基づいて PlDBR および AtDBR のアラニンスキャニング変異体の解析を行った。
【方法】PlDBR および AtDBR 遺伝子発現プラスミドを鋳型に用いて、site-directed mutagenesis により基質ポケット周辺に位置すると推定されたアミノ酸残基をアラニンに置換した変異酵素遺伝子を作製した。*E. coli* BL21(DE3)株で His-tag 融合型の変異型酵素を生産させ、金属アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製酵素 (100 μg/ml 又は 25 μg/ml)と CALD (10, 20, 50, 80, 100, 200, 500, 1000 μM)を 500 μM NADPH 存在下で混合し、pH 7.0 (PlDBR)または pH 6.25 (AtDBR)および 30°C で 3 分間反応を行い、CALD の減少量を HPLC 分析により調べた。
【結果・考察】PlDBR の基質ポケット周辺に位置すると推定された 8 つのアミノ酸残基をアラニンに置換し、得られた変異型酵素の CALD 変換における動力学的性質を調べた。その結果、Y51、G75、M130、Y252、V268-G269 の変異型酵素において CALD 変換活性が野生型と比較して顕著に低下した。AtDBR においても 6 つのアミノ酸残基の変異型酵素について解析した結果、Y53、Y260、I275、Y276 の変異型において CALD 変換活性が顕著に低下した。AtDBR において Y53 と Y260 は、それぞれ CALD との芳香環間π-πスタッキングと側鎖アルデヒドとの水素結合を形成することが示されている。DBR のアライメント解析から、これらは PlDBR を含め植物および細菌において高度に保存されていた。また、AtDBR の Y81 は基質の 4 位 OH 基と水素結合を形成することが示唆されているが、本アミノ酸をアラニンに置換した結果、CALD 変換の $V_{max}/K_m$ が野生型よりも 9.4 倍に増大した。
【謝辞】本研究は JST-ALCA (先端的低炭素化技術開発)の助成を受けて行われたものである。

lignin engineering, alkenal double bond reductase, coniferyl aldehyde

発表責任者：政井英司（emasai@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F077
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゴム分解性土壌放線菌のゴム分解酵素の機能解析と比較
# Characterization of Rubber Degradation Enzyme from Actinomycete

○久保木 紗哉[1]、笠井 大輔[1]、米山 史紀[2]、今井 俊輔[2]、Dao Viet Linh[1,3]、田端 理朗[1]、上村 直史[1]、政井 英司[1]、福田 雅夫[1] ([1]長岡技科大院・生物、[2]住友理工(株)、[3]ハノイ工科大)
○Saya KUBOKI[1], Daisuke KASAI[1], Fuminori YONEYAMA[2], Shunsuke IMAI[2], Viet Linh Dao[1,3], Michiro TABATA[1], Naofumi KAMIMURA[1], Eiji MASAI[1], Masao FUKUDA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]Sumitomo Riko Co., Ltd., [3]Hanoi Univ. of Sci. Technol.)

【目的】

poly(*cis*-1,4-isoprene)を主成分とする天然ゴムならびに合成ゴムは、広範な分野で利用される不可欠な資源であり、近年の世界的な経済成長に伴う急速な需要の拡大が予想されている。そして将来的に増大すると考えられる廃棄ゴムは、一般に焼却や埋立てにより処理されており、温室効果ガスの増加や環境負荷が懸念されている。従って、微生物を用いた低環境負荷な処理技術の確立が望まれている。

これまでにゴム分解能を持ついくつかの放線菌が単離されており、天然ゴムを含む寒天培地上での生育時にコロニー周辺にクリアーゾーンを形成するタイプ A とクリアーゾーンを形成しないが、天然ゴムを含む液体培地での生育に優れているタイプ B の 2 種類の分解菌が報告されている。これら分解菌は、いずれも poly(*cis*-1,4-isoprene)を末端にアルデヒド基を持つイソプレンオリゴマーへと低分子化する菌体外ゴム分解酵素 Lcp を有しているが、両タイプの Lcp の関わりは明確にされていない。本研究では、両タイプのゴム分解菌が持つ Lcp の機能を解析し、比較することで分解様式への関わりを明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】

タイプ A の *Actinoplanes* sp. OR16 株とタイプ B の *Nocardia farcinica* NBRC 15532 株の Lcp を特定するために、各株の *in silico* 解析を行った。その結果、各株はそれぞれ 3 つ (*lcp*$_{16}$*1*、*lcp*$_{16}$*2*、及び *lcp*$_{16}$*3*) と 1 つ (*lcp*$_{15532}$)の *lcp* ホモログを有することが示された。Lcp の機能解析を行うために、ヒスチジンタグを融合させた各遺伝子を大腸菌で発現させた後、Ni アフィニティカラムを用いて目的タンパク質を精製した。OR16 株由来の 3 種類の各 Lcp (Lcp$_{16}$1、Lcp$_{16}$2、及び Lcp$_{16}$3)と天然ゴムを含むラテックスとを反応させた際の酸素消費活性を測定した結果、Lcp$_{16}$1>Lcp$_{16}$2>Lcp$_{16}$3 の順で高い活性を示した。さらに反応の至適条件にも違いが認められた。現在、Lcp$_{15532}$ の酵素活性を測定し、酵素学的性質の比較を行っている。

OR16 株における *lcp*$_{16}$*1*、*lcp*$_{16}$*2*、及び *lcp*$_{16}$*3* のゴム分解への関与を明確にするために、定量的 RT-PCR 解析を用いて各遺伝子の転写誘導性を評価した。その結果、全遺伝子がラテックスでの生育時に誘導され、特に *lcp*$_{16}$*3* が顕著に高い誘導性を示した。以上の結果から、OR16 株においては、全ての *lcp* ホモログがゴム分解に関与していることが示唆された。

Actinomycete, Oxygenase, Rubber

発表責任者：笠井大輔（dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F078
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Rhizobacter gummiphilus* NS21 株のゴム分解酵素遺伝子の異種宿主発現と解析
Expression and Characterization of Rubber Degrading Enzyme Gene of *Rhizobacter gummiphilus* NS21

○浅野 翔太[1]、笠井 大輔[1]、今井 俊輔[2]、田端 理朗[1]、上村 直史[1]、政井 英司[1]、福田 雅夫[1]([1]長岡技科大院・生物、[2]住友理工（株））
○Shota ASANO[1], Daisuke KASAI[1], Shunsuke IMAI[2], Michiro TABATA[1], Naofumi KAMIMURA[1], Eiji MASAI[1], Masao FUKUDA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]Sumitomo Rico Co., Ltd.)

【目的】

パラゴムノキ (*Hevea brasiliensis*)から採取される天然ゴムや、ナフサを原料に作られる合成ゴムは、poly(*cis*-1,4-isoprene)を主要骨格としており、広範な分野で利用されている。将来的には需要がさらに拡大することが予想されており、それに伴う廃棄物の排出量も増大すると考えられる。ゴム廃棄物は、一般に焼却や埋立て等の環境負荷の大きい手法で処理されていることから、微生物ならびにその酵素系を利用した省エネルギーかつ低コストな廃棄物処理技術の確立に期待が寄せられている。

これまでに、ゴム分解能を持つ土壌細菌として放線菌等のグラム陽性細菌が多く解析されており、グラム陰性細菌のゴム分解に関する知見は少ない。グラム陰性ゴム分解細菌 *Rhizobacter gummiphilus* NS21 株は、天然ゴムを含むラテックスの資化能を持つ。NS21 株のゲノム解析と遺伝子破壊株の解析より、poly(*cis*-1,4-isoprene)から末端にアルデヒド基を持つイソプレンオリゴマーへの低分子化に関わる酵素遺伝子 *latA1* 及び *latA2* が特定された。しかしこれら遺伝子の転写誘導性や遺伝子産物の機能解析はなされていない。本研究では、*latA1* 及び *latA2* のゴム分解における明確な役割を明らかにすることを目的として、これら遺伝子の転写誘導性を評価するとともに、異種宿主発現したゴム分解酵素の機能解析を行った。

【方法と結果】

*latA1* 及び *latA2* の転写誘導性を評価するために、ラテックス存在下または非存在下で培養した NS21 株から全 RNA を調製し、各遺伝子の内部領域を特異的に増幅するプライマーを用いて定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、両遺伝子ともラテックス存在下での生育時に転写誘導されることが示された。*latA1* 遺伝子産物 (LatA1)の機能解析を行うために、*latA1* の N 末端領域のシグナル配列を削除した後、ヒスチジンタグとトリガーファクターを付加して大腸菌を宿主に発現させた。得られた組換え体の粗酵素抽出液から Ni アフィニティカラムを用いたカラムクロマトグラフィーにより目的画分を精製した。得られた精製酵素とラテックスを反応させた際の酸素消費活性を測定した結果、有為な酸素消費が観察されたことから、LatA1 が poly(*cis*-1,4-isoprene)に酸素を添加して低分子化する反応を触媒することが明らかとなった。現在、反応温度、pH 等の至適条件を含む酵素学的性質の解析を行っている。

Rhizobacter, Oxygenase, Rubber

発表責任者：笠井大輔（dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F079
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Characterization of the latex-clearing protein from a *Rhodococcus* rubber degrading bacterium

○Viet Linh DAO[1,2], Lan Huong NGUYEN[2], Kim Anh TO[2], Michiro TABATA[1], Daisuke KASAI[1], Masao FUKUDA[1] ([1]Nagaoka University of Technology, [2]Hanoi University of Science and Technology)

Rubber waste such as scrap tires causes environmental burden and requires environmental conscious treatment. Microbial decomposition is expected to be a future treatment technique after improvement of degradation enzyme system. In addition, rubber-degrading enzyme is expected to be used in chemical modification of rubber polymer, poly(*cis*-1,4-isoprene) to form a new polymer. In order to establish an advanced rubber-degradation system, rubber-degrading bacteria were screened from the wastes of a rubber-processing factory in Vietnam and the *Rhodococcus* sp. strain E2 was selected for further study. The initial step enzyme gene responsible for rubber degradation was identified in the genome sequence of the strain E2. It had low identity to the latex-clearing-protein (*lcp*) gene reported previously in *Streptomyces* sp. strain K30. To investigate the rubber-degradation function, the E2 *lcp* gene was cloned in a expression vector and was heterologously expressed in *E. coli* BL21(DE3) carrying the plasmid pET21a::*lcp*. In pET21a::*lcp*, the *lcp* gene was expressed under the control of the IPTG-inducible T7 promoter. The cell extract of the IPTG-induced recombinant strain decomposed poly(*cis*-1,4-isoprene) in the deproteinized-natural rubber overlay agar plates to low molecular aldehyde intermediates, which was detected by staining with Schiff's reagent. The same results were obtained when the Lcp protein purified from the cell extract was used. These results indicate that the Lcp protein degrades poly(*cis*-1,4-isoprene) to low molecular aldehyde intermediates and is responsible for rubber degradation in strain E2. To the best of our knowledges, this is the first report to characterize the *lcp* gene from *Rhodococcus*.

rubber degradation, latex-clearing protein, *Rhodococcus*

発表責任者：Masao Fukuda（masao@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F080
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Rhodococcus jostii* RHA1 株の 2,6-ジヒドロキシ安息香酸代謝遺伝子群の転写制御機構

# Transcriptional regulation of 2,6-dihydroxybenzoate catabolic genes in *Rhodococcus jostii* RHA1

○儀武 菜美子、笠井 大輔、吉川 翔太、上村 直史、政井 英司、福田 雅夫（長岡技科大院・生物）
○Namiko GIBU, Daisuke KASAI, Shota YOSHIKAWA, Naofumi KAMIMURA, Eiji MASAI, Masao FUKUDA (Nagaoka Univ. of Tech.)

【目的】

医農薬中間体として有用な 2,6-ジヒドロキシ安息香酸 (26DHBA)は、化学合成では構造異性体が副産物として生成する。一方で、細菌由来の 26DHBA デカルボキシラーゼは、安価な 1,3-ジヒドロキシベンゼンを基質として 26DHBA を特異的に生成できると期待される。

*Rhodococcus jostii* RHA1 株は、ビフェニル、ベンゼン、エチルベンゼン、フタル酸等の様々な芳香族化合物の資化能を持ち、26DHBA を唯一の炭素源・エネルギー源として利用できる。これまでに、本株の 26DHBA デカルボキシラーゼ遺伝子 (*tsdA*)を含む 26DHBA 代謝遺伝子群 (*tsd* 遺伝子群)の同定と解析がなされている。そして *tsd* 遺伝子群の転写は、遺伝子群に存在する IclR 型転写制御因子 (TsdR)により制御されることが示唆されているが、TsdR が関与する転写制御機構は明らかにされていない。本研究では、26DHBA 生産に有効な 26DHBA デカルボキシラーゼの効率的発現系の確立を目指して、TsdR が関与する *tsd* 遺伝子群の転写制御機構の解析を行った。

【方法と結果】

*tsd* 遺伝子群の転写誘導性を評価するために、26DHBA の存在下または非存在下で培養した RHA1 株の全 RNA を用いて定量的 RT-PCR 解析を行った。その結果、各遺伝子の転写は 26DHBA での生育時に誘導されることが示された。一方、*tsdR* 遺伝子破壊株では、26DHBA 非存在下で、26DHBA 誘導時と同等の転写量を示した。以上の結果から、TsdR が *tsd* 遺伝子群の転写を負に制御することが強く示唆された。

TsdR の機能解析を行うために、大腸菌を宿主としてヒスチジンタグ融合 TsdR (His-TsdR)を生産させ、Ni アフィニティカラムを用いて His-TsdR を精製した。His-TsdR の DNA 結合能を評価するため、Gel mobility shift assay を行った結果、His-TsdR は *tsd* 遺伝子群に存在する 2 つの推定プロモーター領域に特異的に結合することが明らかとなった。また各プロモーター領域には、TsdR が結合すると考えられる共通の inverted repeat 配列が存在しており、これらの配列が転写制御に重要な役割を果たすと推察された。さらに His-TsdR の結合能は、26DHBA 存在下で抑制されたことから、*tsd* 遺伝子群の転写は、プロモーター配列への TsdR の結合により負に制御されることが示唆された。現在は、推定の inverted repeat 配列の重要性や TsdR の結合様式を明らかにするために、各プロモーターの変異配列を用いた TsdR の結合解析を行っている。

IclR type, Inverted repeat, EMSA

発表番号：2F081
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Pseudomonas stutzeri* PTH10 株の新規フタル酸ジオキシゲナーゼの機能解析
Characterization of Novel Phthalate 2,3-Dioxygenase in *Pseudomonas stutzeri* strain PTH10

○阿部 篤季[1]、笠井 大輔[1]、荒木 直人[1]、岩崎 卓己[2]、西 達也[2]、高橋 健司[1]、上村 直史[1]、政井 英司[1]、福田 雅夫[1] ([1]長岡技科大院・生物、[2](株)ジナリス)
○Atsuki ABE[1], Daisuke KASAI[1], Naoto ARAKI[1], Takumi IWASAKI[2], Tatsunari NISHI[2], Kenji TAKAHASHI[1], Naofumi KAMIMURA[1], Eiji MASAI[1], Masao FUKUDA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]Genaris, Inc.)

【目的】

幅広い分野で利用されるフタル酸類やそのエステル化合物は、高い安定性を持つことから、その廃棄物処理が問題となっている。*Pseudomonas stutzeri* PTH10 株は、フタル酸 (OPA)を唯一の炭素源、エネルギー源として生育する。PTH10 株は既知の OPA 分解菌とは異なり、OPA の 2,3-位を水酸化して 2,3-ジヒドロキシ安息香酸 (23DHBA)を経由する極めてユニークな OPA 代謝経路を有する。PTH10 株の *in silico* 解析から、既知の芳香環水酸化酵素のオキシゲナーゼ成分の大および小サブユニット、フェレドキシン成分、及びフェレドキシンレダクターゼ成分とアミノ酸レベルで相同性を示す遺伝子群(*opaAaAbAcAd*)が見出されているが、それらの OPA 分解への関与は明らかにされていない。本研究では、PTH10 株のユニークな OPA 代謝経路の全容解明を目的として、OPA から 23DHBA への変換に関与する OPA 2,3-ジオキシゲナーゼの機能解析を行った。

【方法と結果】

OPA 2,3-ジオキシゲナーゼを特定するために、推定の水酸化酵素の成分をコードすると考えられる *opaAaAb*、*opaAc*、及び *opaAd* をそれぞれ His-tag 融合遺伝子として *Escherichia coli* BL21(DE3)株で発現させた。得られた組換え体細胞から、Ni アフィニティカラムクロマトグラフィーにより各成分を精製し、混合した後、NADH の存在下で 100 μM の OPA と反応させた。HPLC を用いて反応液を分析した結果、OPA の減少と 23DHBA の生成が観察された。この結果から、*opaAaAbAcAd* が PTH10 株の OPA 2,3-ジオキシゲナーゼをコードすることが強く示唆された。また 23DHBA は、OPA 反応産物と予想されるジヒドロジオール体から自発的に生成したと推定された。各成分の混合比においては、オキシゲナーゼ：フェレドキシン：フェレドキシンレダクターゼのモル比が 1:30:1 の時に最大の活性値を示した。また、至適温度及び至適 pH はそれぞれ 35°C および pH 6.5 であり、OPA に対する $K_m$ 値および $V_{max}$ 値は、それぞれ 248.9 μM および 38.9 U/mg であった。種々の芳香族酸を基質として水酸化活性を測定した結果、本酵素は OPA に特異的であることが示唆された。さらに金属依存性を調べた結果、既知の芳香環水酸化ジオキシゲナーゼと同様に、反応に 2 価の鉄イオンを要求することが明らかとなった。フェレドキシンレダクターゼをコードする OpaAd の機能解析を行った結果、1 分子の OpaAd に 1 分子の FAD が含まれること、OpaAd 活性は NADH 依存的であることが示された。

Phthalate, Dioxygenase, 2,3-Dihydroxybenzoate

発表責任者：笠井大輔（dkasai1@vos.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：2F082
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 腸内生存に寄与するビフィズス菌遺伝子の探索系の構築

# Development of a screening system for bifidobacterial genes that contribute to the intestinal survival.

○中川路 伸吾[1]、阪中 幹祥[2]、横田 篤[1]、吹谷 智[1] ([1]北大農、[2]石川県大)
○ Shingo NAKAKAWAJI[1], Mikiyasu SAKANAKA[2], Atsushi YOKOTA[1], Satoru FUKIYA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

＜目的＞

プロバイオティクスとして摂取したビフィズス菌がヒトに有用効果を与えるためには，腸内まで生きて到達し，腸内で生存状態を維持する必要がある．そのため，これらの生存の分子機構を解明することは非常に重要である．そこで我々は，ビフィズス菌の腸内生存に寄与している遺伝子を特定することを目指している．その方法として，トランスポゾン変異導入系を用いて作製したビフィズス菌の変異株ライブラリーをマウスに投与し，INSeq (Insertion-sequencing) 法 [1)]を用いて投与後のライブラリー中の各変異株の増減を評価することで，腸内生存に寄与するビフィズス菌遺伝子を探索することとした．本研究では探索系の構築に向けて，様々な生物種で利用されている転移因子 Himar1C9 を用いたトランスポゾン変異株ライブラリーの作製を検討した．

＜実験方法＞

*Bifidobacterium longum* 105-A（105-A 株）を宿主株としてトランスポゾン変異株の取得を行った．

Himar1C9 の転移酵素遺伝子を含むビフィズス菌で複製可能なベクターを 105-A 株に導入し，培養することで転移酵素の発現を誘導した. この菌体に「転移酵素の標的配列である逆位反復配列（Inverted Repeat, IR）にスペクチノマイシン耐性遺伝子（$Sp^R$）が挟まれたトランスポゾン（IR-$Sp^R$-IR）」を含むビフィズス菌で複製されないベクターを導入し，スペクチノマイシン含有寒天培地で IR-$Sp^R$-IR が 105-A 株のゲノム上に転移した変異株（トランスポゾン変異株）を選抜した．

＜結果＞

IR-$Sp^R$-IR を含むベクターを導入した結果，50～200 変異株/μg DNA の効率でトランスポゾン変異株の取得に成功した．いくつかの変異株について，105-A 株のゲノム上のどの領域へ IR-$Sp^R$-IR が転移したのかを決定したところ，ランダムな領域に転移したことが示唆された．

以上から，本トランスポゾン変異導入系は，105-A 株の遺伝子に網羅的に変異が導入された変異株ライブラリーの作製に適していると判断した．現在は本トランスポゾン変異導入系を用いてトランスポゾン変異株ライブラリーを作製しており，完了し次第，INSeq 法を用いて腸内生存に寄与しているビフィズス菌遺伝子を特定する予定である．

＜関係文献＞

1) Goodman *et al*., *Cell Host Microbe*, **6,** 279–289 (2009).

bifidobacteria, transposon mutagenesis, INSeq

発表責任者：吹谷　智（s-fukiya@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2F083
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌バイオフィルムを分解するファージタンパク質の解析

# The analysis of phage protein involved in *Bacillus subtilis* biofilm distribution

○山本 達也、野村 暢彦（筑波大学生命環境）
○Tatsuya YAMAMOTO, Nobuhiko NOMURA (Univ. of Tsukuba.)

環境中で細菌は細胞外マトリックスに覆われたバイオフィルムを形成し、集団で生息している。多くの産業においてバイオフィルムは微生物汚染源として知られており、その制御方法が求められている。水処理過程ではバイオフィルムによる水処理膜のファウリングが問題とバイオフィルム中の菌体は薬剤耐性が高く、ファージによる対処が期待されているが、バイオフィルム中の細菌に対するファージの感染については不明な点が多い。*Bacillus* 属細菌は様々な環境に広く存在し、また、そのバイオフィルム形成は水処理膜のファウリングの原因にもなっており、本属菌のバイオフィルムに対するファージ感染機構の解明及びファージによるバイオフィルム制御方法の確立が求められている。*Bacillus* 属では枯草菌においてバイオフィルム研究が進められており、気液界面にペリクルバイオフィルムと呼ばれる特徴的なバイオフィルムを形成する。しかしながら、これまでこのようなペリクルバイオフィルムに対するファージ感染については研究がなされてこなかった。

SP10 ファージという枯草菌ファージが枯草菌のペリクルバイオフィルムを分解するタンパク質を持っていることが明らかとなっている。このタンパク質はファージ粒子中には含まれず、感染後に培地中に放出される。しかしながら、これまでにこのタンパク質がファージ感染のどの時期に、枯草菌細胞中で合成され、どの時期に培地中に放出されるかは明らかではなかった。そこで、ウェスタンブロットにより、このバイオフィルム分解タンパク質を検出したところ、ファージ感染後期の感染後 30 分から細胞中で検出され、溶菌が始まる感染後 45 分から培地中で検出された。従って、このタンパク質は感染後期に細胞で合成され、溶菌に伴って培地中に放出されることが明らかとなった。バイオフィルムを形成している菌体は細胞外マトリックスに覆われているため、ファージの感染が困難になっていると考えられる。そのため、バイオフィルム分解タンパク質はバイオフィルムを分解することで、菌体をバイオフィルムから遊離させ、ファージの感染を容易にしていると考えられる。そこで、ファージ分解タンパク質を持つファージと持たないファージに対して、バイオフィルムを形成している菌体に対する感染効率を測定したところ、ファージ分解タンパク質を持つファージの方が高い感染効率を見せた。以上の結果から、SP10 ファージは菌体に感染後、バイオフィルム分解タンパク質を菌体に合成させ、溶菌と共に放出し、周囲のバイオフィルムを分解することでバイオフィルムを形成している菌体に対し、効率的な感染を可能にしていると示唆される。

*Bacillus subtilis*, biofilm, bacteriophage

発表番号：2F084
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母の胞子細胞膜形成開始に関わる新たな因子 Spo45 の解析

# Analysis of the novel factor Spo45 involved in the initiation of forespore membrane formation in fission yeast

○新美 柊子、中村 太郎（阪市大院理）
○Toko NIIMI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

【背景、目的】

分裂酵母は栄養源が枯渇すると、減数分裂を伴って細胞内に胞子を形成する。この過程における興味深い現象の 1 つとして胞子細胞膜の形成が挙げられる。胞子細胞膜は動物細胞の中心体に相当するスピンドル極体（SPB）を起点として細胞内で新たに形成される。我々はこれまで、SPB に局在する胞子細胞膜形成開始に必須な因子（以下、SPB 因子と呼ぶ）をいくつか取得してきた（Spo2、Spo13、Spo15 など）。Spo15 は栄養増殖時から SPB に局在するが、減数分裂時に Spo2、Spo13 が発現し、SPB の細胞質側に局在する。これらの因子が正常に局在することで胞子細胞膜形成が開始すると考えられる。このようにこの現象に関わる因子が複数取得されているが、その分子メカニズムはまだ不明な点が多い。昨年、胞子細胞膜形成開始に関わる新たな SPB 因子として Spo45 を取得した（2015 農芸化学会）。本研究では、Spo45 を解析することで胞子細胞膜形成開始のより詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

【結果】

今回、Spo45 に関して以下のことを明らかにした 1. Spo45 は SPB と核膜に局在した　2. 1 の局在には膜貫通領域が必須であった　3. Spo45 は SPB の中でも Spo13 よりも核側に局在した　4. Spo45 は Spo2、Spo13、Spo15 の SPB への局在に必要であるが、Spo45 の正常な局在に Spo2、Spo13、Spo15 は必要ではなかった。

以上の結果から、Spo45 は SPB 因子の中でも最も核側に局在し、そこで Spo15 などの他の SPB 因子を正常に局在させることにより、胞子細胞膜形成の開始を制御する可能性が考えられる。

fission yeast, spore membrane, spindle pole body

発表責任者：新美柊子（csl.sp.lb.holly@gmail.com）

発表番号：2F085
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母胞子壁の最外タンパク質層（Isp3 層）構築に関わる遺伝子の取得と解析

# Isolation and analysis of genes involved in the outermost layer (the Isp3 layer) construction of the fission yeast spore wall

○酒井 崇史、中村 太郎（阪市大院理）
○Takafumi SAKAI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

目的

分裂酵母の胞子は、凸凹とした構造を持つ強固な胞子壁に包まれている。また、胞子は高温やエタノール、有機溶媒など、様々なストレスに対して耐性を持っている。我々はこれまで、分裂酵母胞子壁の最外層が Isp3 というタンパク質によって形成されていること（Isp3 層）、Isp3 が胞子のストレス耐性に重要な役割を持っていることを明らかにしている（Fukunishi et al., 2014）。Isp3 は、形成中の胞子の細胞質で発現、蓄積した後に、胞子の外へと輸送され、胞子壁表層に集合して最外層を形成すると考えられている。本研究は、Isp3 層の構築に関わる遺伝子を取得・解析し、胞子壁最外層構築の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

方法及び結果

我々は、胞子形成時に Isp3 が特異的かつ大量に発現することから、Isp3 に関係するタンパク質も同時期に発現量が上昇すると考えた。そこで、胞子形成と共に起こる減数分裂時にその発現量が上昇する *mug*$^{+}$遺伝子と *meu*$^{+}$遺伝子に注目した。192 の *mug* 遺伝子破壊株と 34 の *meu* 遺伝子破壊株で Isp3-GFP を発現し、蛍光顕微鏡下で Isp3-GFP の局在観察を行った。その結果、Isp3-GFP の局在に異常を示す 5 つの遺伝子破壊株が得られた。現在、その中の 1 つで、パルミトイル転移酵素をコードする *mug142*$^{+}$ に注目し、機能の解析を進めている。

Fukunishi et al. Mol. Biol. Cell 25, 1549-1559 (2014)

fission yeast, spore wall, Isp3

発表責任者：酒井　崇史（fumi20fumi@gmail.com）

発表番号：2F086
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* における明暗および温度の周期的変化に対する応答機構の解析

# Analysis of response to periodic change of light and temperature conditions in *Aspergillus oryzae*

○山本 実侑[1]、川田 純毅[2]、溝上 豊[1]、松尾 花枝[1]、丸山 潤一[2]、北本 勝ひこ[2] ([1]横浜サイエンスフロンティア高等学校、[2]東大院・農生科・応生工)
○Miyu YAMAMOTO[1], Junki KAWADA[2], Yutaka MIZOKAMI[1], Hanae MATSUO[1], Jun-ichi MARUYAMA[2], Katsuhiko KITAMOTO[2] ([1]Yokohama Science Frontier High School, [2]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】

光や温度は主要な環境因子であり、自然界においてこれらの環境因子は 1 日の昼夜の繰り返しによって周期的に変化する。麹菌 *Aspergillus oryzae* は、古くから日本の伝統的な醸造産業に用いられてきた糸状菌である。*A. oryzae* は祖先の糸状菌より家畜化されたとされているが、光や温度変化への応答が認められることから、自然界の環境変化への応答機構が残されていると考えられる。しかし、*A. oryzae* における環境条件の周期的変化に対する応答については、あまりわかっていない。本研究では、*A. oryzae* の明暗および温度の周期的変化に対する応答を調べるとともに、その分子機構の解析を行った。

【方法と結果】

*A. oryzae* 野生株 RIB40 を寒天培地中央にスポットし、明暗あるいは温度を、12 時間ごとに周期的に変化させる条件で培養を行った。その結果、いずれの条件においても、分生子形成の促進・抑制を周期的に繰り返すことによる同心円状のコロニーが形成された。さらに、分生子形成が促進されている領域では菌糸密度が上昇しており、菌糸生育の制御にも影響を与えていることがわかった。このことから、*A. oryzae* は明暗および温度の周期的変化に対して、分生子形成のみならず菌糸生育の制御を行っていることを明らかにした。

我々は以前 *A. oryzae* において、青色光受容体 AoLreA が光依存的な分生子形成の抑制に関与することを明らかにしている[1)]。これをコードする遺伝子 *AolreA* の破壊株について、明暗を周期的変化させた条件で培養を行った結果、分生子形成が常に促進されるとともに菌糸密度が一様な、同心円状でないコロニーが形成された。このことから、明暗の周期的変化による応答に AoLreA が関与しており、AoLreA が分生子形成のみならず、菌糸生育の制御にも関与することが明らかになった。次に、*AolreA* 遺伝子破壊株について温度を周期的変化させた条件で培養を行ったところ、同心円状のコロニーが形成された。このことから、温度の周期的変化により形成される同心円状のコロニーが、AoLreA とは異なる因子によるものであることが示された。

以上の結果から、明暗および温度の周期的変化は、*A. oryzae* の分化および菌糸生育の制御に影響を及ぼすことを明らかにし、明暗条件変化への応答に関与する因子を特定した。

1) Dietrich *et al.* 日本生物工学会 2014 年度大会要旨集 p. 23

*Aspergillus oryzae*, light, temperature

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F087
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌実用株におけるゲノム編集と非相同組換え修復欠損を用いた高効率遺伝子操作技術の開発

# Development of highly efficient gene modification technique using genome editing and defective non-homologous end joining in *Aspergillus oryzae* industrial strains

○中村 英淳[1]、片山 琢也[1]、岡部 知弥[1]、岩下 和裕[2]、藤井 渉[3]、有岡 学[1]、北本 勝ひこ[1]、丸山 潤一[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]酒総研、[3]東大院・農生科・応動)

○ Hidetoshi NAKAMURA[1], Takuya KATAYAMA[1], Tomoya OKABE[1], Kazuhiro IWASHITA[2], Wataru FUJII[3], Manabu ARIOKA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1], Jun-ichi MARUYAMA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]NRIB, [3]Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* における遺伝子破壊は、非相同組換えに関わる遺伝子 *ku70* や *ligD* の欠失により効率よく行われるようになった。しかし、このような *ku70* や *ligD* の欠失は野生株 RIB40 などの一部の株に限定されており、醸造に利用されている麹菌株では同様の欠失操作が困難であることから、遺伝子操作による育種開発の障害となっていた。最近、我々は *A. oryzae* において、ゲノム編集技術のなかでも最も簡便かつ低コストである CRISPR/Cas9 システムを確立し、変異導入に有効であることを示した[1)]。このことから、CRISPR/Cas9 システムが、*A. oryzae* 実用株での *ligD* 遺伝子の変異導入に利用できることが期待された。本研究では、*A. oryzae* 実用株において、CRISPR/Cas9 システムを利用することにより高効率の遺伝子破壊を可能にしたうえで、それらの株に特有の性質を改変することを試みた。

【方法と結果】*A. oryzae* 実用株である日本酒用の RIB128 株、醤油用の RIB915 株、吟醸酒用の RIBOIS01 株を使用した。まず、CRISPR/Cas9 システムを利用して変異導入を行うことで、上記の株をもとに *ligD* 遺伝子変異株の取得に成功した。さらに、マーカーリサイクリングにより多重の遺伝子操作が可能な *pyrG* マーカーを利用するため、同遺伝子を破壊しウリジン/ウラシル要求性株を得た。

*A. oryzae* において見つかっていない有性生殖を誘導するためには、有性生殖器官を内部につくる菌核の形成を促進する必要があると考えられる。しかし、*A. oryzae* 実用株では菌核を全く形成することができないため、これらの株を用いて有性生殖を誘導するのは困難である。一方、*A. oryzae* で菌核形成能をもつ野生株 RIB40 においては、転写因子をコードする遺伝子 *ecdR* を破壊すると菌核形成が増加することが報告されている[2)]。そこで、各株の菌核形成能を促進するため *ecdR* の破壊を試みたところ、数株の形質転換体を得るだけで目的の破壊株を取得することができた。そして、RIB128 株および RIB915 株においては、*ecdR* 遺伝子の破壊により、菌核形成の初期段階とみられる気中菌糸が絡まった構造が観察されるようになった。

以上により、*A. oryzae* 実用株において、従来は困難であった遺伝子操作を効率よく行う技術を確立した。この技術を用いることにより、*A. oryzae* の実用株における産業利用を目的とした機能開発が効率化することが期待される。

1) 片山琢也ら、第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集 p89 (2015)
2) Jin *et al*., *Fungal. Genet. Biol*., 48, 1108-1115 (2011)

*Aspergillus oryzae*, genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：丸山潤一（amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F088
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達関連遺伝子 traDEF の解析

# Analysis of Conjugative Transfer-Related traDEF Genes of Naphthalene-Catabolic Plasmid NAH7

○岸田 康平、井上 慧、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大・院生命科）
○Kohei Kishida, Kei Inoue, Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達による遺伝子の水平伝播は微生物の多様な環境への適応進化に大きく貢献している。自己伝達性プラスミドの伝達装置は共通した 2 つのシステムにより成り立つと理解されている。その 2 つは、Relaxase を中心とした供与菌内で接合伝達開始領域である oriT から一本鎖 DNA (ssDNA)を生成する Dtr (DNA transfer and replication)システム、供与菌と受容菌細胞同士を連結する接合対を合成する Mpf (mating-pair formation)システムであり、それらの分子メカニズムは詳細に解析されている。だが、接合伝達頻度や宿主域はプラスミドによって多様であり、これら共通遺伝子群の機能だけでは説明が付かない部分が多い。さらに共通遺伝子群周辺には機能未知遺伝子が存在しており、接合伝達に関与していることが明らかとなっている。

我々の研究室では、*Pseudomonas putida* G7 株が有するナフタレン分解プラスミド NAH7 の接合伝達関連機能未知遺伝子群 *traDEF* オペロンの機能解析を行ってきた。本オペロンは広宿主域性プラスミドでシンテニーが保存されているが、これまでの研究で、(1) *traDEF* を破壊した NAH7 誘導体(以下、NAH7 Δ*traDEF*)は著しく接合伝達頻度を低下すること、そして、(2) TraD が細胞質、TraE はペリプラズム、TraF は細胞膜に局在することを明らかにしてきた。本研究では、TraDEF が接合伝達にどのように関与し、接合伝達頻度に影響を与えているかを明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】NAH7 Δ*traDEF* の接合伝達頻度を低下する原因として Dtr と Mpf に関わる遺伝子の発現量の減少が考えられたが、*dtr* と *mpf* の両オペロンの各プロモーター活性は、*traDEF* の存在の有無で変動しなかった。このことから、TraDEF の接合伝達への直接的な関与が示唆された。次に、各タンパク質を精製し、*in vitro* 実験を行った。TraD は DNA 結合ドメインを有していたことから、TraD が *oriT* に結合すると推測した。TraD と PCR 増幅した *oriT*、competitor DNA を用いたゲルシフトアッセイでシフトバンドが出現し、TraD の *oriT* への特異的結合が判明した。一方、Relaxase によって *oriT* は ssDNA となるが、TraD は ssDNA の *oriT* には結合しないことが明らかとなった。また、TraE は単独では *oriT* に結合しないが、TraD-*oriT* のシフトバンドは TraE 存在下で更に増加することが示されたことから、TraE は *oriT* 上の TraD に結合していることが示唆された。以上の結果より、*oriT* 上の TraD がペリプラズムに局在する TraE と結合することで、プラスミドを接合対まで輸送する働きがある可能性が考えられた。現在、クロマチン免疫沈降法を用いて NAH7 Δ*traDEF* と接合対の相互作用を検討している。

Plasmid, Horizontal gene transfer, Pseudomonas

発表責任者：岸田康平（kishida@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：2F089
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌の Cre 組換え酵素直接導入法における応用開発

# Applied development of modified Cre-loxP Recombination in Aspergillus oryzae by Direct Introduction of Cre Recombinase

○利田 賢次[1]、林 梨咲[1]、五味 勝也[2]、山田 修[1]、水谷 治[1] ([1]酒類総合研究所、[2]東北大院農・生物産業創成)
○Kenji TOSHIDA[1], Risa HAYASHI[1], Katuya GOMI[2], Osamu YAMADA[1], Osamu MIZUTANI[1] ([1]National Research Institute of Brewing, [2]Tohoku Univ.)

Cre-*loxP* システムは *loxP* 配列によって挟まれた領域を選択的に除去できる遺伝子組み換え技術である。マーカーとして利用できる遺伝子が限られる麹菌 (*Aspergillus oryzae*) において、多重遺伝子変異株を造成するためには、マーカー回収技術が重要であり、Cre-*loxP* システムはその一つとして利用されている。近年、我々は、麹菌プロトプラスト細胞に DNA を酵素キャリアとして用いることで、市販されている Cre 組換え酵素を菌体外から核内に導入する手法を開発し、発現ベクターを用いた従来の手法より簡便、且つ迅速に Cre-*loxP* システムを利用できるようになった(1)。しかし、本手法は酵素キャリアに DNA を使う為、非相同で麹菌染色体に組込まれる等の問題点があげられる。そこで本研究では、DNA 以外の酵素キャリアの検討や Cre 組換え酵素のみで高効率に直接導入が出来るかを検討した。

DNA 以外の酵素キャリアの検討を行うために、*loxP* 配列に挟まれた *sC* 遺伝子を麹菌ゲノム上の *ligD* 遺伝子と置換した株 (*ΔligD*::loxPsC) を造成した。酵素キャリアとしては、DNA に類似した性質を持つと思われるリボソーマル RNA (rRNA : 大腸菌由来) 等を選択し、マーカー遺伝子の除去を試みた。その結果、rRNA において、DNA を酵素キャリアとした時よりも得られるマーカー遺伝子除去候補株は、75% 程減少するが、得られた候補株の 90% 以上において、マーカー遺伝子が除去されていた。また、本実験時に市販 Cre 酵素のみでも極僅かではあるが、マーカー遺伝子除去が確認された。そこで、Cre 組換え酵素単独で細胞内に効率良く直接導入を行う為に、酵素の電荷に注目した。負電荷である細胞膜と相互作用をより引き起こしやすくするために、反応条件下で正電荷をもつ His タグ配列を導入したリコンビナント Cre 組換え酵素 (rCre-His) を大腸菌にて発現させ、精製を行った。その結果、rCre-His は、タグ配列無しのリコンビナント Cre 組換え酵素と比較して、僅かではあるがマーカー遺伝子回収効率が上昇した。加えて、高濃度の rCre-His を用いることで、酵素キャリアを用いたときと同定度の効率でマーカー遺伝子回収が行えることを明らかにした。

(1) Mizutani et al., Appl. Environ. Microbiol., 2012, 78:4126-4133.

Cre-loxP system, marker rescue, cell-penetrating protein

発表責任者：水谷治（mizutani@nrib.go.jp）

発表番号：2F090
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

緑膿菌における高酸素親和性 *cbb*$_3$ 型末端酸化酵素の機能解析
Functional analysis of high-oxygen-affinity *cbb*$_3$-type cytochrome *c* oxidase of *Pseudomonas aeruginosa*
○酒井 義瑛、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Yoshiaki Sakai, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (The University of Tokyo)

【目的】緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は環境中に広く存在する好気性細菌であり、多くの動植物に対して病原性を示す日和見性の病原菌である。緑膿菌は好気呼吸に利用する末端酸化酵素を 4 種類(*bo*$_3$, CIO, *aa*$_3$, *cbb*$_3$)持っており、生育環境に応じてこれらを使い分けることで環境適応していると考えられている。*cbb*$_3$ 型酸化酵素は酸素親和性の高い末端酸化酵素であり、他の菌では低酸素条件で誘導されることが知られている。緑膿菌は主要サブユニットの異なる 4 タイプの *cbb*$_3$ を持ち、N1 型は構成的に発現するのに対し、N2 型は低酸素条件、N3 型は亜硝酸存在条件、N4 型はシアン存在条件で発現誘導されることが知られている。N1 型と N2 型は *Pseudomonas putida* など多くの *Pseudomonas* 属細菌が持っているが、緑膿菌以外では N1 型の発現条件は不明であり、N1 型と N2 型の酵素学的特徴の違いも知られていない。そこで、本研究では N1 型と N2 型酵素について発現制御、酵素学的特徴の違いを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】N1 型酵素遺伝子の発現制御を調べるために、緑膿菌と同種の末端酸化酵素を持つ *P. putida* を用いて N1 型酵素遺伝子の転写活性を *lacZ* との転写融合を用いたプロモーターアッセイにより調べた。結果、N1 型酵素遺伝子は酸化ストレス発生剤であるパラコート添加条件で発現上昇した。このことから、N1 型酵素は酸化ストレスに強い性質を持つ可能性が考えられた。全ての末端酸化酵素遺伝子を破壊した緑膿菌変異株に N1 型酵素遺伝子群(*cco*1)または N2 型酵素遺伝子群(*cco*2)を相補した株を用いて、パラコート存在下における生育を測定したところ、*cco*2 を相補した株では *cco*1 相補株に比べてパラコートによる生育阻害が大きかった。また、*cco*1 または *cco*2 を相補した株を培養し得られた膜画分を室温でインキュベートし、時間経過による酸素消費活性の減少率を測定した結果、*cco*2 遺伝子産物は *cco*1 遺伝子産物に比べて活性の減少率が大きかった。これらの結果から、N2 型酵素は N1 型酵素に比べて酸素または活性酸素に対する感受性が高く、N1 型酵素は酸化ストレス条件で発現、機能することが示唆された。

*Pseudomonas aeruginosa*, terminal oxidase, oxidative stress

発表番号：2F091
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 緑膿菌の新規シアン応答転写調節因子による好気呼吸酵素遺伝子の転写制御解析

# Regulation of the terminal oxidase genes by the novel cyanide-responsive regulator in *Pseudomonas aeruginosa*

○多田羅 圭、石井 正治、新井 博之（東大院農生科・応生工）
○Kei Tatara, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (The University of Tokyo)

【目的】緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は環境遍在性の日和見細菌で、低酸素環境において末端酸化酵素を阻害するシアンを排出するなどの特徴を持っている。末端酸化酵素は呼吸鎖から電子を酸素に受け渡す酵素で、好気呼吸におけるエネルギー生産に重要な役割を担っている。緑膿菌は高度に分岐した呼吸鎖を持っており、4 タイプの末端酸化酵素(*bo*$_3$、CIO、*aa*$_3$、*cbb*$_3$)を環境に応じて使い分けている。このうち、*cbb*$_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素は、従来は 2 種類(*cbb*$_3$-1、*cbb*$_3$-2)と考えられていたが、最近の研究により、複数のイソサブユニットの組み合わせにより、4 タイプ(N1、N2、N3、N4)、16 種類のアイソフォームを形成することがわかっている。N4 型アイソフォームはシアンに対する耐性が高く、その主要サブユニット遺伝子 *ccoN4* は、新規に見つかったシアン応答転写因子 PA4132 により発現誘導される。本研究では、*ccoN4* と同様にシアンの存在により転写が促進されている CIO (cyanide-insensitive oxidase)をはじめとした、他の末端酸化酵素遺伝子の発現制御に対する PA4132 の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】PA4132 欠損株(ΔPA4132)における、各末端酸化酵素遺伝子の転写活性を、*lacZ* 遺伝子との転写融合を用いたプロモーターアッセイにより測定した。その結果、ΔPA4132 では *bo*$_3$ と CIO 遺伝子の転写量が上昇し、*cbb*$_3$-2 遺伝子の転写量が減少した。この *bo*$_3$ と CIO、*cbb*$_3$-2 遺伝子の転写量の変化は小さいことから、PA4132 を欠損させたことによる副次的な影響であると考えられた。*bo*$_3$ と *cbb*$_3$-2 の遺伝子は、酸素応答調節因子 ANR により、それぞれ負および正に制御されている。ANR 依存性合成プロモーターの転写活性を *lacZ* アッセイにより測定したところ、ΔPA4132 では、ANR の活性が低下していた。このことから、*bo*$_3$ と *cbb*$_3$-2 遺伝子の転写量の変化は ANR の活性低下によるものと考えられた。ΔPA4132 では、シアン耐性の高い N4 型アイソフォームが発現しないため、生成したシアンにより酸素親和性の高い *cbb*$_3$ 型酵素が阻害され、低濃度の酸素が消費されないことが ANR 活性の低下の原因と予想される。CIO 遺伝子の発現は、呼吸鎖の電子フローを感知すると考えられている RoxSR により制御されている。ΔPA4132 による CIO 遺伝子の転写量の上昇は、シアンによる *cbb*$_3$ 型酵素の阻害により、電子のフローが低下し、RoxSR が活性化されたためと予想された。

*Pseudomonas aeruginosa*, terminal oxidase, cyanide

発表番号：2F092
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌胞子形成のトリガー遺伝子 *kinB* の転写制御
# Transcriptional regulation of a trigger gene *kinB* for *Bacillus subtilis* sporulation

○藤田 泰太郎、仁井 里美、広岡 和丈 (福山大生命工)
○Yasutaro Fujita, Satomi Nii, Kazutake Hirooka (Fukuyama Univ.)

枯草菌胞子形成のトリガー遺伝子 *kinB* の転写は、転写開始点のアデニン塩基種に依存する正の緊縮転写の下にあることを以前に報告した（１）。*kinB* のプロモーター領域（塩基-95/+10、転写開始点+1）をレポーター遺伝子 *lacZ* に融合し、上流からの *kinB* プロモーターの欠失解析を行ったところ、塩基-65 までの欠失は *kinB* プロモーター活性に影響を与えなかったが、さらなる塩基-55 までの欠失は *kinB* プロモーター活性をかなり高めた。このことは、未知の転写リプレッサーが *kinB* プロモーター領域（塩基-65/-55）に結合して、*kinB* の転写を抑制していると考えられた。この未知のリプレッサーの同定を試みたところ、*kinB* の発現に影響すると報告されている CodY や AbrB は塩基-65/-55 に位置するシスエレメントを通じた *kinB* の抑制には関係なく、バイオフィルム形成のリプレッサーである SinR がこの *kinB* の転写抑制に関与していることが明らかになった。SinR のシスエレメントを検索したところ、TAAAGG（塩基-65/-60 と-49/-44）のダイレクトリピートが見つかった。そこで、塩基-45 のグアニンをアデニンに置換すると SinR による *kinB* の抑制を解除することができ、ダイレクトリピート TAAAGG が SinR による *kinB* の抑制のシスエレメントであることを確認できた。興味深いことに、*kinB* 発現の正の緊縮転写制御はこのダイレクトリピートが破壊されても見られるが、*ΔsinR* の遺伝的背景ではこの正の緊縮転写制御は起こらなかった。このことから、SinR が正の緊縮転写制御を引き起こす ATP 増加につながる過程に関与していることが示唆された。

1. Tojo et al. J. Bacteriol. 195:1656-1665 (2013)

*Bacillus subtilis*, sporulation, *kinB* regulation

発表番号：2F093
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌のラムノース資化に関わる遺伝子群の発現と機能の解析

# Analysis of expression and function of the genes involved in rhamnose catabolism in *Bacillus subtilis*

○広岡 和丈、藤田 泰太郎（福山大生命工・生物工）
○Kazutake HIROOKA, Yasutaro FUJITA (Fukuyama Univ.)

枯草菌は植物根圏にも普遍的に存在し、根から滲出する種々の有機化合物を栄養源としている。我々は、枯草菌ゲノムからラムノース異化に関わる酵素群とその発現制御を担う転写因子をコードする *rhaEWRBMA*（*yuxG-yulBCDE*）オペロンを見出し、その機能解析を行っている。ラムノースは、細胞壁ペクチン・根から分泌される粘液質・フラボノイド配糖体などの植物由来物質の構成成分であるので、根圏土壌中には比較的豊富に存在しており、枯草菌はこのオペロンを発現させてラムノース資化を行っていると考えられる。

これまでの研究から、DeoR ファミリーに属する RhaR 転写因子がオペロン上流の 9 bp の保存モチーフ（CAAAAAWAA）の繰り返しから成る領域に結合することでレプレッサーとして機能し、ラムノースが存在するとオペロンにコードされる酵素群によってラムノースから生じたラムノース-1-リン酸がエフェクター分子として作用し、RhaR による抑制を解除することが明らかにされた。

オペロンにコードされる酵素群に関して、組換えタンパク質を用いた活性測定等から、RhaA がラムノースをラムヌロースに異性化し、これを RhaB がリン酸化し、さらに RhaEW が開裂して乳酸とジヒドロキシアセトンリン酸に変換すると考えられた。また、配列情報から RhaM はラムノースアノマーの相互変換を促進するムタロターゼであると推定された。これら一連の酵素群が実際に枯草菌細胞内でラムノース資化に機能するかを、各遺伝子破壊株をラムノースを唯一の炭素源とする培地で培養して生育を調べた。その結果、*rhaR* と *rhaM* の各遺伝子破壊株では野生株と同程度の生育が観察されたが、残り３つの遺伝子破壊株では生育が認められず、RhaA、RhaB、および RhaEW が枯草菌のラムノース資化に必須であることが確かめられた。

大腸菌のラムノース輸送体である RhaT との相同性検索から、枯草菌では GlcU がラムノースの取り込みを担うと推定された。また、枯草菌でペクチンの糖鎖分解に働く遺伝子群内には、その産物が ABC 輸送体の構成成分であると推定されるもの（YesOPQ および YteQ）も含まれており、これらもラムノース取り込みに関わる可能性が考えられた。これらの各遺伝子破壊株についても、ラムノース資化実験を行う予定である。また、これらの遺伝子群の推定制御領域には RhaR 結合領域に類似した保存モチーフが見出されたので、遺伝子発現がラムノースによって誘導されるかについても検討を行っている。

rhamnose catabolism, gene expression, *Bacillus subtilis*

発表責任者：広岡 和丈（hirooka@bt.fubt.fukuyama-u.ac.jp）

発表番号：2F094
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# cell wall integrity pathway によるメタノール誘導性遺伝子発現制御

# Regulation of methanol-inducible gene expression by cell wall integrity pathway

○大澤 晋、由里本 博也、阪井 康能（京都大院農・応用生命科学農・応用生命科学)
○Shin OHSAWA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、異種遺伝子高発現のための宿主として利用される。我々はこのメタノール誘導性プロモーターを用いた有用タンパク質生産ならびに、メタノール誘導性遺伝子発現に関連する転写制御因子についての研究を進めている。一方、メタノール誘導性に関わるシグナル伝達に関してはまったく研究が進んでいなかった。我々は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisae* においてストレスセンサーとして知られる Wsc ファミリータンパク質のメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* におけるホモログ(PpWsc1, PpWsc2)がメタノール誘導性遺伝子発現に関連していることを明らかにした。しかしながら、下流のシグナル伝達経路とその機構に関しては不明であった。*S. cerevisiae* において Wsc ファミリータンパク質が細胞表層のストレスセンサーとして働く場合、Cell wall integrity (CWI) pathway にシグナル伝達することが知られている。そこで、本研究では、メタノール資化性酵母のメタノール誘導性遺伝子発現と CWI pathway との関連について解析をおこなった。

【方法・結果】まず CWI pathway の構成因子 small GTPase Rho1 について解析を行った。メタノール資化性酵母 *P. pastoris* において PpRho1 の活性型変異(PpRho1Q68H)を発現させ、メタノール誘導性遺伝子発現量を qRT-PCR によって測定すると非発現株と比べて著しく低下することが分かった。さらに、CWI pathway における Rho1 の下流のシグナル伝達因子 Pkc1 のホモログ(PpPkc1)の活性型変異を発現させた場合も同様にメタノール誘導性遺伝子発現が抑制されることが分かった。これらのことから CWI pathway おける Rho1-Pkc1 のシグナル伝達経路はメタノール誘導性遺伝子発現を負に制御することが示された。次に、CWI pathway において Pkc1 よりさらに下流のシグナル伝達因子である MAP キナーゼ Mpk1 や転写因子 Rlm1 の破壊株作製し、PpRho1Q68H を発現させたときのメタノール誘導性遺伝子発現量を測定した。*mpk1* 破壊株と *rlm1* 破壊株それぞれに PpRho1Q68H 発現させてもメタノール誘導性遺伝子発現量は著しく低下していた。このことから、Rho1 の活性化によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制には Mpk1 や Rlm1 が大きく関与することがないことが示唆された。

CWI pathway, methanol-inducible gene expression, methylotrophic yeast

発表番号：2F095
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# エタノール代謝産物によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制機構

# Repression Mechanism of Methanol-inducible Gene Expression by Ethanol Metabolite

○西田 晋、大澤 晋、由里本 博也、阪井 康能（京大農）
○Susumu NISHIDA, Shin OHSAWA, Hiroya YURIMOTO, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノール資化性酵母はメタノールを単一の炭素源として生育することができる。また、メタノール誘導性のプロモーターを有しており、それを利用した異種遺伝子発現系が構築されている。我々はこの強力かつ特異的なメタノール誘導に関わる転写制御因子ならびにシグナル伝達経路因子についての研究を進めてきた。メタノール誘導性遺伝子発現はメタノールによって誘導されるが、エタノールによって抑制されることが知られている。これはメタノール資化性酵母がメタノールとエタノールを区別して認識することを示している。しかし、そのメカニズムは不明であった。そこで本研究では、メタノール誘導をエタノールが抑制する機構に関わる因子を探索した。スクリーニングの結果、エタノール代謝がメタノール誘導性遺伝子発現抑制に関連していることが分かった。そこで本研究では、メタノール資化性酵母においてエタノール代謝系と、遺伝子発現抑制との関連について解析を行った。

【方法・結果】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* のメタノール誘導性遺伝子 *AOX1* のプロモーター支配下で GFP を発現させた株 (YSP1 株)のコロニーは、メタノール培養時に蛍光を観察することができる。Restriction Enzyme Mediated Integration 法を用いて、YSP1 株の染色体にゼオシン耐性遺伝子(*Zeo*$^{r}$)カセットをランダムに挿入したライブラリーを作成した。そのライブラリーについて、エタノール、メタノール両方を含む培地上でコロニーの GFP 蛍光を観察したところ、エタノールによるメタノール誘導の抑制が解除され、GFP 蛍光が観測される株が得られた。これらの株において、*Zeo*$^{r}$ カセットが挿入された染色体上の位置調べたところ、アルコールデヒドロゲナーゼ II、アルデヒドデヒドロゲナーゼ IV をコードする *ADH2*, *ALD4* に挿入されていることが分かった。そこで、エタノール代謝産物とメタノール誘導の抑制について解析を進めた。YSP1 株にメタノールとエタノール代謝産物であるアセトアルデヒドもしくは酢酸を加えると、アセトアルデヒドと酢酸の両方で、エタノールと同様にメタノール誘導の抑制が生じていることが分かった。さらに *adh2* 破壊株 (*adh2Δ*)、*ald4* 破壊株 (*ald4Δ*) を作製し、GFP 蛍光を観察したところ、エタノールによるメタノール誘導の抑制は解除されていた。また、*adh2Δ* 株では、アセトアルデヒド、酢酸において、メタノール誘導は抑制されていた。さらに *ald4Δ* 株ではアセトアルデヒドでは抑制は解除されていたが、酢酸ではメタノール誘導は抑制されていた。以上の結果から、酢酸以降のエタノール代謝産物がメタノール誘導性遺伝子発現の抑制に関与していることが示唆された。

methanol-inducible gene expression, ethanol metabolism, methylotrophic yeast

発表番号：2F096
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌 EF-Tu のアシル化修飾機構および制御機構の解析

# The functional analysis of lysine acylation in elongation factor Tu in *Bacillus subtilis*

○鈴木 祥太[1]、吉田 稔[2]、西山 真[1]、古園 さおり[1,2] ([1]東大・生物工学セ、[2]理研 CSRS)
○Shota SUZUKI[1], Minoru YOSHIDA[2], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]RIKEN)

アセチル化に代表されるリジン残基のアシル化修飾は、進化的に保存された翻訳後修飾として注目されている。当研究室で実施された枯草菌アシローム解析から、多様な機能に関わるタンパク質がアセチル化及びスクシニル化修飾の標的となっていることが明らかとなり、特に翻訳伸長因子 Tu（EF-Tu）が強くアセチル化されることを見出した。アシル化修飾による翻訳制御の例はあまり知られていない。本研究は EF-Tu を対象に翻訳関連因子におけるアシル化修飾の役割を明らかにすることを目的とした。

枯草菌野生株を LB 培養の各増殖期で集菌し、抗アセチルリジン抗体と抗スクシニルリジン抗体を使ったウェスタンブロットでアシル化修飾の検出を行った結果、EF-Tu は対数増殖期でアセチル化、定常期では脱アセチル化とスクシニル化の増加が観察された。アシローム解析の結果、EF-Tu の GTPase ドメインや tRNA 相互作用ドメインに 11 カ所のアセチル化部位と 6 カ所のスクシニル化部位が見出されている。これらのアシル化修飾の機能を明らかにするため、EF-Tu 遺伝子（*tufA*）のオリジナル遺伝子座において各アシル化部位に KR 変異（非修飾模倣）、KQ 変異（アセチル化模倣）、KE 変異（スクシニル化模倣）を導入した変異株を作成した。その結果、domain-3 のスクシニル化模倣変異株（KE3）で増殖に遅延がみられた。Domain-3 は tRNA の相互作用に重要な部位であるため、スクシニル化模倣変異により tRNA との相互作用が阻害されて翻訳機能の低下が引き起こされたと考えた。KE3 株より調製したリボソーム画分を用いた *in vitro* 翻訳アッセイの結果、翻訳活性が野生株に比べて 34%まで低下しており、一方対応する非修飾模倣変異株（KR3）では翻訳活性の低下が見られなかった。したがって、EF-Tu の domain-3 におけるスクシニル化修飾が翻訳活性を負に制御することが示唆された。一方、GTPase ドメインに存在する主要なアセチル化部位変異体については、KQ/KR 変異の両方で増殖および翻訳活性への影響は見られなかった。枯草菌よりアフィニティー精製した EF-Tu を用いた *in vitro* アッセイから、EF-Tu は低濃度のスクシニル CoA によって非酵素的にスクシニル化され、また高濃度のアセチル CoA やアセチルリン酸によってアセチル化されることを見出した。現在、KDAC（AcuC と SrtN）が上記のスクシニル化やアセチル化を脱アシル化できるかどうかを検討中である。

lysine acylation, elongation factor Tu, Bacillus subtilis

発表番号：2F097
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌 ECF シグマ因子 SigX のグルコース依存的な活性化に関わる RNA ポリメラーゼ のアセチル化

# Analysis of lysine acetylation of RNA polymerase involved in glucose-dependent activation of the Bacillus subtilis ECF sigma factor SigX

○米沢 祐大[1]、小倉 光雄[2]、鈴木 祥太[1]、吉田 彩子[1]、朝井 計[3]、吉田 稔[4]、西山 真[1]、古園 さおり[1,4] ([1]東大・生物工学研究セ、[2]東海大・海洋研、[3]埼玉大・分子生物、[4]理研 CSRS)
○Yudai YONEZAWA[1], Mitsuo OGURA[2], Syota SUZUKI[1], Ayako YOSHIDA[1], Kei ASAI[3], Minoru YOSHIDA[4], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,4] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokai Univ., [3]Saitama Univ., [4]RIKEN)

【目的】アセチル化に代表されるタンパク質のアシル化修飾は、栄養や代謝シグナルに応答したタンパク質の機能調節に関わる生物に普遍的な翻訳後修飾として近年注目されている。この反応はアシル化酵素（KAT : Lysine acyltransferase）と脱アシル化酵素（KDAC : Lysine deacylase）によって可逆的に制御されており、最近ではアセチルリン酸、アセチル CoA、スクシニル CoA による非酵素的なアシル化も報告されている。近年のアシローム解析により、細菌でも代謝酵素を初めとする様々なタンパク質にアシル化修飾が見出され、炭素源などの栄養条件によって修飾量が変化することが明らかにされている。アシル化修飾は RNA ポリメラーゼやリボソームなど転写や翻訳の基本装置にも起きており、アシル化修飾が栄養シグナルに応じた転写や翻訳の制御に関わる可能性に興味がもたれる。本研究では、枯草菌 ECF シグマ因子である SigX のグルコース依存的な活性化と RNA ポリメラーゼのアセチル化修飾との関連を明らかにすることを目的とした。
【結果】SigX プロモーターのみを含む *sigX-lacZ* カセットを導入した枯草菌株を用いた検討から、SigX の活性は 1×S 培地条件で 2%グルコース添加により上昇することが見出された。SigX 活性を誘導する炭素源について検討したところ、アセチル化を誘導する炭素源パターンと類似していたことから、グルコース依存的な SigX 活性化にアセチル化が関与する可能性が考えられた。グルコース添加・非添加条件で培養した菌体から RNA ポリメラーゼを精製し LC-MS/MS 解析を行ったところ、RNA ポリメラーゼのα、β、β’、ωサブユニットにアセチル化が検出された。アセチル化部位はグルコース添加によって増加しており、グルコース最少培地で検出されたアセチル化部位とは異なる部位もあったことから、培地条件によってアセチル化部位は異なると考えられた。また、RNA ポリメラーゼ精製画分に SigA や SigB などシグマ因子が検出され、その存在量はグルコース添加・非添加条件で大きな差は見られなかったが、SigX はグルコース添加条件でのみ検出された。SigX にアシル化修飾は検出されなかったことから、シグマ因子と相互作用するβおよびβ’サブユニットのアセチル化が関与する可能性を考え、リジン残基のアセチル化および非修飾を模倣した KQ、KR 変異体を作成し、LacZ アッセイによって SigX 活性化に影響を及ぼすアセチル化部位変異のスクリーニングを行っている。また、精製した RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写アッセイにより、グルコースによる SigX 依存的な転写誘導とアセチル化の関係について解析を進めており、それらの結果を合わせて発表する予定である。

Lysine acetylation, RNA polymerase, Bacillus subtilis

発表番号：2F098
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌における ECF シグマ因子 σ C のレギュロンの同定

# Identification of the σ$^{C}$ regulon in *Corynebacterium glutamicum*

○豊田 晃一 [1]、乾 将行 [1,2] ([1]RITE、[2] 奈良先端大・バイオ)
○Koichi TOYODA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】RNA ポリメラーゼのサブユニットの一つであるシグマ因子の中で、extracytoplasmic function (ECF)シグマ因子ファミリーに属するものは、様々な環境ストレスに応答に関与することが知られている。アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のゲノム上には 5 つの ECF シグマ因子 σ$^{C}$、σ$^{D}$、σ$^{E}$、σ$^{H}$、σ$^{M}$ がコードされている。このうち、σ$^{E}$ は細胞表層ストレス応答 [1]、σ$^{H}$ はヒートショックや酸化ストレス応答 [2,3]、σ$^{M}$ はジスルフィドストレス応答に関与することが報告されている [4]。一方、σ$^{C}$、σ$^{D}$ の生理学的能については明らかとなっていない。本研究では σ$^{C}$ の制御下にある遺伝子(レギュロン)の同定および同定した遺伝子機能を元にした σ$^{C}$ の生理学的機能の同定を目的とした。
【方法と結果】ChIP-chip 解析を行うことで *in vivo* におけるゲノム上の σ$^{C}$ 結合領域を 8 か所同定した。領域内の保存配列から σ$^{C}$ の認識プロモーターを決定した。このプロモーター配列近傍には cytochrome *bd* 型 quinol oxidase、heme *a* 生合成酵素、機能未知の膜タンパク質をコードする遺伝子が位置していた。σ$^{C}$ の過剰発現によるこれら遺伝子の発現上昇を確認するとともに、決定したプロモーターの-10 領域内に変異を導入することで σ$^{C}$ 依存的な発現誘導が消失することを確認した。また、cytochrome *bc*$_1$ complex をコードするオペロン上流の antisense 鎖にも σ$^{C}$ 認識プロモーター配列を見出し、このプロモーター配列が σ$^{C}$ 依存的なこのオペロンの発現抑制に必要であることを明らかにした。*C. glutamicum* の呼吸鎖における menaquinol 酸化経路は cytochrome *bc*$_1$ complex を経由し cytochrome *aa*$_3$ 型 cytochrome *c* oxidase を通る経路と cytochrome *bd* 型 quinol oxidase を通る経路がある。σ$^{C}$ レギュロンは cytochrome *aa*$_3$ サブユニットの遺伝子破壊や活性阻害によって誘導された。一方、cytochrome *bc*$_1$ complex サブユニットの遺伝子破壊や活性阻害では誘導されなかった。以上より、σ$^{C}$ は cytochrome *aa*$_3$ の活性阻害（低下）によって活性化され、cytochrome *bd* の遺伝子発現の活性化および cytochrome *aa*$_3$ への heme *a* の供給により、両末端酸化酵素の合成を促進させるとともに、cytochrome *bc*$_1$ complex の発現を抑えることで、呼吸鎖に由来する活性酸素の発生を抑制すると考えられる。

1. Park SD., *et. al.*, Microbiology **154(3)**, 915-23, (2008)
2. Ehira S., *et. al.*, J. Bacteriol. **191(9),** 2964-72, (2009)
3. Toyoda K., *et. al.*, J. Bacteriol. **197(3)**, 483-96, (2015)
4. Nakunst D., *et. al.*, J. Bacteriol. **189(13)**, 4696-707, (2007)

sigma factor, ChIP-chip, promoter

発表番号：2F099
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Adaptive Laboratory Evolution によるコリネ型細菌高温耐性株の育種

# Adaptive Laboratory Evolution conferred tolerance to thermal stress to *Corynebacterium glutamicum*

○生出 伸一[1]、郡司 渉[1]、茂木 康弘[1]、山本 省吾[1]、須田 雅子[1]、城島 透[1]、湯川 英明[1]、乾 将行[1,2] ([1]地球環境産業技術研究機構、[2]奈良先端大・バイオ)
○Shinichi Oide[1], Wataru Gunji[1], Yasuhiro Moteki[1], Shogo Yamamoto[1], Masako Suda[1], Tohru Johjima[1], Hideaki Yukawa[1], Masayuki Inui[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】
産業レベルの物質生産において、微生物は pH 変動、温度変動などの多様なストレスにさらされる。このため、微生物のストレス耐性は生産性を決定する一要素となる。我々はグルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* のストレス耐性改善による物質生産能の向上を目標とし、*C. glutamicum* 高温耐性株の育種ならびに耐性獲得の分子機構の解明を試みた。

【手法と結果】
我々は Adaptive Laboratory Evolution (ALE)とよばれる手法を用いて *C. glutamicum* ストレス耐性株の作出ならびに解析を行った。ALE とは特定の環境下で生物の継代培養を行い、自然変異によりその環境に順応した個体を選抜していく実験手法であり、本研究では *C. glutamicum* を高温下で約２カ月にわたり継代培養し、３株の高温耐性株を取得した。耐性株の表現型を解析する過程で、３株の耐性株はイソブタノールに対する交叉耐性を獲得していることが判明した。次世代シークエンス技術を用いて耐性株中の全変異を検出し、さらに遺伝子組換え株の作製・表現型解析を行い、各変異がストレス耐性に及ぼす影響を評価した。一連の実験により、３株の耐性株に共通する２１の変異のうち３変異が高温耐性の獲得に関与していることが明らかになった。さらに、３変異のうち解糖系酵素 pyruvate kinase および phosphofructokinase の構造遺伝子の欠損は高温耐性のみならずイソブタノール耐性の向上にも寄与していることが判明した。本研究の結果から *C. glutamicum* におけるエネルギー代謝とストレス応答の密接な関係が示唆された。

Oide et al., Appl. Environ. Microbiol. **81(7)**:2284-2298 (2015).

adaptive laboratory evolution, trehalose, stress

発表責任者：乾　将行（mmg@rite.or.jp）

発表番号：2F100
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌における RNase J 遺伝子及び RNase E/G 遺伝子の発現解析

# Analysis of expression of ribonuclease J and ribonuclease E/G genes in Corynebacterium glutamicum.

○濱本 渚[1,2]、田中 裕也[2]、竹本 訓彦[2]、前田 智也[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Nagisa HAMAMOTO[1,2], Yuya TANAKA[2], Norihiko TAKEMOTO[2], Tomoya MAEDA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* はアミノ酸をはじめとする様々な有用物質を生産する工業微生物である。これまで *C. glutamicum* における遺伝子発現制御の解析は転写開始制御が中心であり、転写後制御についての報告は少ない。しかし細胞内の mRNA 量は、転写、および分解により調節されているため、分解制御の解析は重要である。
*C. glutamicum* には、大腸菌、枯草菌において mRNA 分解の主要な酵素である RNase E/G と RNase J の各々に相同性を有するタンパク質が一つずつ存在する。本研究ではこの両者の遺伝子発現制御について解析を行った。
【方法と結果】我々は、RNase J 遺伝子 *rnj* が Dihydrodipicolinate synthase 遺伝子 dapA とオペロンを形成しており、RNase E/G による分解制御、および自己制御を受けているということを明らかにしてきた。本研究では、RNase J による RNase E/G 遺伝子 *rneG* の mRNA の分解制御について検討を行った。定量リアルタイム PCR 解析の結果から、*rnj* 破壊株において *rneG* 遺伝子の発現上昇が観察された。リファンピシンを用いて、*rneG* mRNA の安定性を検討したところ、*rneG* 遺伝子の mRNA が *rnj* 破壊株において安定化していることが分かった。さらに、*rneG* プロモーター領域と、*lacZ* を融合させたレポーターアッセイの解析から、*rneG* 遺伝子破壊株において P*rneG-lacZ* の遺伝子発現上昇を観察した。以上の結果から、*rneG* 遺伝子は RNaseJ および RNaseE/G の両者によって複雑に制御されている可能性が示唆された。
これらの結果は mRNA の分解を制御する 2 つの RNA 分解酵素同士が相互に制御するという制御モデルを示唆するものである。

*Corynebacterium glutamicum*, RNase J, post-transcriptional regulation

発表番号：2F101
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌におけるピリミジン新規合成経路遺伝子の発現制御解析

# Regulation of the expression of *de novo* pyrimidine biosynthesis genes in *Corynebacterium glutamicum*

○田中 裕也[1]、寺本 陽彦[1]、乾 将行[1,2]（[1]（公財）地球環境産業技術研究機構、[2]奈良先端大・バイオ）
○Yuya TANAKA[1], Haruhiko TERAMOTO[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は有用工業微生物 *Corynebacterium glutamicum* を用いて様々な物質生産に取り組んでいる。核酸の細胞内レベルの適切な制御は、DNA 複製、転写のみならず様々な細胞内機能に重要であるが、*C. glutamicum* における制御機構は未解明である。そこで我々はピリミジン新規合成経路について遺伝子発現制御機構の解析を行った。

【方法と結果】 *C. glutamicum* のピリミジン新規合成経路遺伝子群の発現はウラシルの添加により減少した。また *lacZ* レポーター系の解析から *Mycobacterium smegmatis* の RNA 結合型制御因子、PyrR の結合モチーフの相同配列がウラシル応答に必要であることを確認した。しかし、ウラシル応答は *pyrR* 遺伝子の欠損株でも観察された。このことは PyrR の結合モチーフ付近の配列に作用する他の制御因子の存在を示唆していると考えられた。我々は、転写終結因子 *rho* の破壊株で *pyr-lacZ* の発現が上昇することを観察し、さらに *pyrR* と *rho* の二重破壊株ではウラシル応答が消失することを見出した。以上の結果から、*C. glutamicum* のピリミジン新規合成経路遺伝子群の発現制御が PyrR と Rho を介した２つの異なる機構によって行われていると結論した[1]。

1. Tanaka Y., *et. al.*, J. Bacteriol **197(20)**, 3307-3316, (2015)

Corynebacterium glutamicum, pyrimidine de novo biosynthesis, post-transcriptional regulation

発表責任者：田中裕也（tanakayu@rite.or.jp）

発表番号：2F102
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌を宿主とする構成型分泌発現ベクターの機能解析

# Functional analyses of a constitutive secretory expression plasmid for actinomycetes

○土屋 杏那、橋本 義輝、齋藤 結希、松本 雅子、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大）
○Kyona TSUCHIYA, Yoshiteru HASHIMOTO, Yuki SAITOH, Masako MATSUMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Univ. of Tsukuba)

放線菌の一種である *Streptomyces* 属は、抗生物質をはじめとした各種有用物質および酵素タンパク質等の生産菌として工業的に広く利用されており、今日の応用微生物学上、極めて重要な菌群である。本属放線菌を対象とした遺伝子組換え技術の開発の重要性を鑑みて、我々は本属放線菌で機能する新規高発現系の開発を行っている。我々の先行研究において、ニトリル分解性放線菌 *Rhodococcus rhodochrous* J1 株の有する強力なタンパク質発現機構[1, 2]を基に本属放線菌で機能する誘導型高発現ベクター[3]および構成型高発現ベクターの開発に成功している。さらに、タンパク質の細胞外への分泌発現を目的として、スクリーニングで得られた本属由来の分泌タンパク質のシグナル配列を本構成型高発現ベクターに付与した構成型分泌発現ベクターを複数構築した。本研究では、この構成型分泌高発現ベクターの機能を解析することを目的とした。

レポータータンパク質として、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、アーキア由来の 5 種の酵素遺伝子を使用した。それぞれ、分泌発現ベクターのマルチクローニングサイトを利用してシグナル配列と *in frame* に組み込んだベクターを構築し、これを用いて *Streptomyces lividans* TK24 株の形質転換を行った。得られた形質転換体を、誘導剤を含まない培地で培養し、プレートアッセイ、培養上清の活性測定や SDS-PAGE による発現試験を行った。その結果、5 種全ての酵素について細胞外への分泌発現および酵素活性の検出に成功し、本構成型分泌発現ベクターの有用性が示唆された。

【文献】

(1) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10572 (1996)
(2) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 4267 (1996)
(3) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 14031 (2004)

Streptomyces, Constitutive expression, Secretory expression

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F103
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Rhodococcus* を宿主とする構成型大量発現シャトルベクターの機能解析

# Characterization of a constitutive expression vector for *Rhodococcus*

○松本 雅子、橋本 義輝、劉 瑞、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院）
○Masako MATSUMOTO, Yoshiteru HASHIMOTO, Rui LIU, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Univ. of Tsukuba)

*Rhodococcus* 属放線菌は独特の代謝経路や酵素活性を示すとともに、有機溶媒耐性と強い酸化還元能を有することから特殊なバイオプロセス環境下における次世代宿主として期待されている。我々はこれまでに、*Rhodococcus rhodochrous* J1 菌由来のニトリラーゼ発現機構を用いて *Streptomyces* 属放線菌で機能する誘導型発現ベクターの構築に成功している [1)]。*Rhodococcus* 属放線菌で機能する構成型発現ベクターの開発には、*R. rhodocrous* J1 菌由来の高分子量型ニトリルヒドラターゼ（H-NHase）発現機構を利用した。H-NHase 遺伝子クラスター中の調節遺伝子およびプロモーター領域を含む断片にマルチクローニングサイトを付加し、*Rhodococcus-E. coli* シャトルベクターと連結して、*Rhodococcus* および *Escherichia coli* で複製可能な新規構成型発現ベクターを構築した。

構築した構成型発現ベクターにニトリルヒドラターゼ、ニトリラーゼ、カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ、イソニトリルヒドラターゼおよび GFP の 5 種類の遺伝子をレポーター遺伝子として組み込んだプラスミドを、*E. coli* を宿主として構築した。調製したプラスミドを用いて *Rhodococcus erythropolis* PR4 を形質転換し、得られた形質転換体を誘導剤非添加で培養した。集菌後、無細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE で発現の確認を行った。その結果、目的タンパク質の発現が確認でき、本構成型シャトルベクターがグラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌由来のタンパク質発現にも利用できることが示唆された。さらに、*R. erythropolis* PR4 以外の *Rhodococcus* 属放線菌においても目的タンパク質の発現が確認でき、複数の宿主で利用可能な有用な発現系であることも示唆された。

*Rhodococcus*, shuttle plasmid, constitutive expression

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F104
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌多糖分解酵素生産におけるキメラ転写因子の利用技術開発

# Chimeric transcription factors for process improvement in production of fungal polysaccharide-degrading enzymes

○國武 絵美、山口 楓絵、金丸 京子、木村 真、小林 哲夫（名大院・生命農）
○ Emi KUNITAKE, Kaede YAMAGUCHI, Kyoko KANAMARU, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

【目的】糸状菌の多糖分解酵素の生産は、高分子基質に由来する低分子誘導物質とこれに応答する特異的転写活性化因子に依存して誘導生産される。それぞれの特異的転写因子は $Zn(II)_2Cys_6$ 型であり、N 末端側に存在する DNA 結合ドメイン（DBD）により標的遺伝子群が決定される。誘導物質への応答や転写活性化は残りのドメイン（調節ドメイン；RD）が担う。本研究では、DBD の入れ替えによる誘導物質と標的遺伝子群との対応関係の人為的改変を目指した。また、多くの場合特異的転写因子による発現誘導には誘導物質依存的な転写因子自身の活性化が必要である。そこで DBD に VP16 の転写活性化ドメインを融合した構成的活性型転写因子の構築についても検討した。
【方法・結果】転写制御メカニズムについて知見の多い AmyR（アミラーゼ）、XlnR（キシラナーゼ）、ClrB（セルラーゼ）を対象とし、DBD と RD の由来が異なる各種キメラ転写因子を構築した。これらを野生型の各転写因子遺伝子を破壊しないようにモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* に導入した。これまでに AmyR::XlnR によるキシランに応答したアミラーゼ生産に成功していることから、今回はそれ以外の組み合わせである ClrB::XlnR、XlnR::AmyR、ClrB::AmyR、XlnR::ClrB、AmyR::ClrB について検討した。その結果、ClrB::XlnR 導入株でキシランに応答したセルラーゼ生産の増強、及び AmyR::ClrB 導入株でセルロースに応答したアミラーゼ生産の増強が確認された。これらの株におけるキシラナーゼ生産量及びセルラーゼ生産量はそれぞれ野生株と同等であったため、単一条件での複数のタイプの多糖分解酵素の同時生産が可能となったといえる。一方、AmyR RD を融合したもの及び XlnR::ClrB については野生株と酵素生産性に違いは見られず、機能しないことが明らかとなった。
XlnR はキシラン存在下で翻訳後修飾されることより転写活性化能を獲得すると考えられている。そこで XlnR の DBD 及び全長に強力な VP16 由来転写活性化ドメインを融合し、高発現させた。その結果、XlnR DBD::VP16 導入株ではキシランだけでなく、ペプトン（非誘導）やグルコース（抑制）を炭素源とした場合にもキシラナーゼの生産が見られた。また全長に VP16 を融合させたものはそれよりも顕著に高いキシラナーゼ活性を示し、特にキシラン誘導条件では野生株の 10 倍以上、野生型 XlnR 高発現株の 2 倍以上の活性が確認できた。
本研究で示したキメラ転写因子の利用により任意の培地条件で目的の酵素生産が可能となったことから、生物工学分野での新たな応用展開が期待される。
本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

chimeric transcription factor, plant biomass-degrading enzymes, Aspergillus nidulans

発表番号：2F105
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌の新規 sirtuin アイソザイムの定常期から死滅期における機能

# The function of novel fungal siruin involved in the stationary phase and the death phase.

○伊藤 英里子、高谷 直樹（筑波大）
○Eriko ITOH, Naoki TAKAYA (Tsukuba Univ.)

sirtuin はヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）クラスⅢに分類される $NAD^+$依存的 HDAC であり生物界に広く保存されている。我々は，糸状菌 *Aspergillus nidulans* の sirtuin A (SirA)が $NAD^+$依存的にヒストン H4K16 を脱アセチル化することによって二次代謝の生合成遺伝子発現とその生産を抑制することを見出した。しかし， SirA 以外の sirtuin タンパク質の機能については不明である。本研究では，sirtuin のアイソザイムである SirE (AN1226) をコードする遺伝子の遺伝子破壊株を作製し，その形態を観察した。その結果，固体培養および液体培養時に，*sirE* 遺伝子破壊株（ΔSirE）は野生株と比べて培養初期での成長速度が遅いものの最大菌体重量は同程度になり，液体培養の場合は培養後期に得られる菌体量が多かった。そこで，液体培養に伴う生細胞数の変化を解析したところ，ΔSirE は野生株よりも長期にわたって生存することが判明したことから，ΔSirE では培養後期に見られる菌糸の自己溶菌が起こりにくいことが示された。さらに，ΔSirE では自己溶菌の際に分泌量が多くなるとされる加水分解酵素群のうち，chitinase，α-glucosidase，β-glucosidase，*N*-acetyl-β-D-glucosaminidase, cellulase, β-galactosidase, β-xylosidase, および β-mannnosidase の活性が野生株と比較して低下した。これらのうち，chitinase，β-glucosidase および *N*-acetyl-β-D-glucosaminidase をそれぞれコードする遺伝子 *chiB*, *engA*, *nagA* の発現量は，ΔSirE で野生株と比べて培養後期で有意に減少しており、これは酵素活性の強度と一致した。一方，ΔSirE では野生株と比べ分生子の着生が少なく，分生子形成関連遺伝子の発現も減少していることが明らかになった。これらの結果から，SirE は培養後期に起こる自己溶菌や分生子形成を制御することが明らかとなった。

*Aspergillus nidulans*, sirtuin, autolysis

発表番号：2F106
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

プラスミド保持に伴う遺伝子発現の一細胞レベルでの多様性の解析
Heterogeneous gene expression of plasmid-harboring cells at single cell level
○高比良 早紀[1]、水口 千穂[1]、宮崎 亮[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]産総研)
○ Saki TAKAHIRA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Ryo MIYAZAKI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]AIST)

【背景・目的】プラスミドは宿主に薬剤耐性や難分解性物質分解能などの新規形質を付与する一方で、宿主染色体の転写様式や細胞内環境の変化を引き起こす。また同一プラスミド上の遺伝子も宿主ごとに異なる転写制御を受けることが知られている。当研究室では、カルバゾール分解プラスミド pCAR1 と 3 種の *Pseudomonas* 属細菌を用い、pCAR1 保持・非保持株の経時的トランスクリプトーム解析結果を比較することで、pCAR1 保持に伴い転写プロファイルが変化する宿主染色体上の遺伝子の存在、及び、宿主によって異なる転写プロファイルを示す pCAR1 上の遺伝子の存在を明らかにした (Takahashi *et al.*, 2015, *Environ. Microbiol.*, 17: 134-155)。この結果は、プラスミドと宿主は互いの機能に影響を及ぼし合っており、その相互作用は宿主によって異なることを示唆している。しかし、上述の実験はプラスミドを安定に保持しているクローン細胞集団を対象に行われたものであり、実際には同一のゲノムを有する細胞でも、プラスミドと宿主染色体の間に生じる相互作用は一細胞ごとに異なることが予想される。そこで本研究では、*Pseudomonas putida* KT2440 株と pCAR1 をモデルとして、プラスミドの保持に伴う遺伝子発現の変化を一細胞レベルで解析することを目的とした。
【方法・結果】過去に行われたトランスクリプトーム解析において、宿主染色体上の遺伝子のうち pCAR1 保持に伴い恒常的に転写が誘導される *mexE*（トランスポーターをコード)、PP_4858（機能未知)、及び pCAR1 保持に伴い定常期での転写プロファイルが変化する PP_1905（機能未知）を標的遺伝子として選択した。また pCAR1 上の遺伝子のうち、宿主ごとに異なる転写プロファイルを示す *pmr*、*phu*、*pnd*（核様体タンパク質をコード）も標的遺伝子とした。これらの標的遺伝子のプロモーター領域下流に *gfp* を組み込んだ遺伝子カセットを作製し、ベクター上から発現させたところ、*mexE*、PP_4858 のプロモーターを用いた場合には、pCAR1 保持株で緑色蛍光が観察され、非保持株では蛍光が見られなかった。一方、その他のプロモーターを用いた場合には pCAR1 の保持に関係なく緑色蛍光が観察され、いずれの結果も過去の知見と合致していた。しかし、*mexE*、PP_4858 プロモーターを含む遺伝子カセットを KT2440 の染色体上に組み込んだところ、コピー数が少ないためか pCAR1 保持株でも緑色蛍光は観察されなかった。このため現在はベクター上から GFP を発現させ、蛍光強度をフローサイトメーターで測定することで遺伝子発現のばらつきを調べている。同時に、標的遺伝子の経時的な転写プロファイルをより正確に評価するため、短時間で分解される GFP (Anderson *et al.,* 1998, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 :2240-6) の使用も検討している。

*Pseudomonas*, single-cell, heterogeneity

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F107
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Aspergillus* 属菌の休眠胞子および発芽胞子のトランスクリプトーム解析

# Comparative transcriptome analysis in resting conidia and germinated conidia of three *Aspergillus* species

○萩原 大祐、高橋 弘喜、楠屋 陽子、川本 進、亀井 克彦、五ノ井 透（千葉大真菌センター）
○Daisuke HAGIWARA, Hiroki TAKAHASHI, Yoko KUSUYA, Susumu KAWAMOTO, Katsuhiko KAMEI, Tohru GONOI (Chiba Univ.)

*Aspergillus* 属菌の無性胞子は，環境ストレス（高温，UV，乾燥など）に対して一般的に高い耐性を示す。その要因にトレハロースなど適合溶質を胞子内に蓄積することが知られているが，その他の耐性機構はほとんど明らかにされていない。本研究では，休眠胞子のストレス耐性能および胞子発芽の分子機構に関する新しい知見の取得を目指し，三種の *Aspergillus* 属菌（*A. fumigatus, A. niger, A. oryzae*）を対象に，RNA-seq による比較トランスクリプトーム解析を行った。菌糸，休眠胞子，発芽胞子（1h）における発現値の比較から，休眠胞子特異的（Af：687 個；An：694 個；Ao：812 個）または発芽胞子特異的（Af：766 個；An：1241 個；Ao：749 個）な発現遺伝子を各菌において選抜した。

次に，*Aspergillus* 属に共通した現象を見出すため，対象とした三種の菌で保存されたオーソログ遺伝子に着目した。BLAST 解析により 6172 個のオーソログ遺伝子セットが見つかり，そのうち 91 個が胞子特異的，391 個が発芽胞子特異的な発現を全ての菌種で示していた。胞子特異的遺伝子セットには胞子ストレス能の制御に関連する AtfA 転写因子の制御下遺伝子が多数含まれていた。興味深いことに，*A. fumigatus* の *atfA* 遺伝子破壊株の休眠胞子では複数の発芽特異的遺伝子の発現上昇が観察され，AtfA がストレス耐性能の制御のみならず，発芽の抑制にも機能することが示唆された。実際，*atfA* 破壊株の休眠胞子は，発芽時に見られる sterol rich domain の形成や代謝活性が観察されたことから，AtfA が胞子の適切な発芽を制御していると考えられる。今後更なるデータを取得し，*Aspergillus* 属菌胞子の休眠/発芽切り替えにおける AtfA の機能について詳細に解析していく。

*Aspergillus*, conidia, germination

発表番号：2F108
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌のロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子（*lapA*）のプロモーター解析

Promoter analysis of leucine aminopeptidase gene (*lapA*) in *Aspergillus oryzae*

○高見 英輝、豊島 快幸、茂木 喜信（ヤマサ醤油）
○Hideki TAKAMI, Yoshiyuki TOYOSHIMA, Yoshinobu MOGI (Yamasa Corporation)

【目的】

醤油醸造において、麹菌 *Aspergillus oryzae* は炭水化物やタンパク質を分解する酵素源として非常に重要な役割を果たしている。醤油麹において麹菌が生産する主要酵素の一つであるロイシンアミノペプチダーゼ（LAP）は、タンパク質の可溶化・アミノ酸化に寄与し、歩留まりや醤油の質の向上のために重要とされている。製麹中では、原料、温度、水分活性など様々な環境因子が存在するが、これらの環境因子に対する応答機構については未だ不明な点が多く残されている。

我々は、低水分環境下において LAP 活性が増加する結果を得ており、本研究では、その応答機構を転写レベルで明らかにするため、*lapA* についてプロモーター解析を行った。

【方法・結果】

製麹環境に近い条件で培養するため、小麦と大豆の抽出液を培地として使用し、水分活性低下剤として食塩を使用した。まず、*lapA* プロモーター領域下流で大腸菌由来のレポーター遺伝子である *uidA* を発現する株を作製し、*uidA* がコードしている β-グルクロニダーゼ（GUS）の活性を定量することで、水分活性に対する応答性を検証した。その結果、食塩を含まない培地で 2 日間前培養した後、水分活性を変えた培地に移して 4 時間培養した後では、水分活性の低い条件下で GUS 活性が増加していた。これは、低水分環境下において LAP 活性が増加する結果と対応していた。

さらに、プロモーター領域を部分的に欠損した株を複数作製し、同様にレポーターアッセイを行った結果、GC-box を含む配列を欠損した場合において、水分活性の程度に関わらず、GUS 活性が顕著に減少した。このことから、GC-box が *lapA* の発現に必須なシスエレメントであり、水分活性に対する応答も GC-box を介して制御されていることが示唆された。また、発現を抑制するシスエレメントの存在も示唆されており、現在、そのシスエレメントを同定するためのレポーターアッセイ系を新たに構築し、詳細な解析を行っている。

*Aspergillus oryzae*, *lapA*, water activity

発表番号：2F109
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* の転写制御因子の解析
Transcriptional regulators of hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*
○福田 青郎[1]、内田 圭亮[1]、ジャジリ アブドル アジズ[1]、市村 瑞葉[1]、何 あゆみ[1]、金井 保[2,3]、跡見 晴幸[2,3]、今中 忠行[1,3]（[1]立命館大生命、[2]京都大院工、[3]CREST）
○Wakao FUKUDA[1], Keisuke UCHIDA[1], Abdul Aziz JAZIRI[1], Mizuha ICHIMURA[1], Ayumi GA[1], Tamotsu KANAI[2,3], Haruyuki ATOMI[2,3], Tadayuki IMANAKA[1,3] ([1]Ritsumeikan Univ., [2]Kyoto Univ., [3]CREST)

【研究背景・目的】生命は細胞内外の状況に応じて転写・翻訳量を調節し、必要なタンパク質を合成する。この転写調節は生命の定義の一つともいえる「恒常性維持」にとって非常に重要であり、現在までに様々な生物の転写調節に関する研究報告がなされてきた。しかしながら超好熱菌の持つ転写制御因子の中で働きが明らかになっているものはほんの一部であり、大部分の転写因子の役割は不明である。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* においても、ゲノム解析より 82 個の転写制御因子の存在が予想されているが、他のアーキアと同様にその働きが明確な転写制御因子はほんのわずかである。そこで本研究では超好熱菌 *T. kodakarensis* を題材とし、遺伝子破壊により網羅的に各転写因子の細胞内における働きを解明することで、超好熱菌の転写調節について広範囲の知見を得ることを目的とした。
【結果】これまでに 64 種類の転写制御因子について遺伝子破壊を試みた。その結果、48 個の転写調節因子について遺伝子破壊に成功し、16 個については遺伝子破壊株が得られなかった。破壊できなかった遺伝子は、少なくとも今回の遺伝子破壊株単離条件において生育に必須であると考えられた。またこれまでに得られた遺伝子破壊株に関してマイクロアレイ解析を行い、遺伝子破壊が転写制御に与える影響の解析を行った。その結果、野生株に比べ大きな転写産物量変動が見られた遺伝子があり、これら遺伝子は破壊した各転写制御因子の制御下にあると予想された。本発表ではこれら遺伝子破壊株の性質について、その一部を紹介する。
遺伝子破壊株のうちの一つ ΔTK2263 株は鞭毛や走化性関連遺伝子の転写産物量が最大 1/100 に減少していた。これらの遺伝子群の転写は他の、転写制御因子遺伝子破壊株などでも変動が比較的よくみられるものの、ΔTK2263 株では特に変動量が大きいことから推定転写因子 TK2263 はこれらの遺伝子を直接正に制御している可能性が高い。またこの結果を受け実際に ΔTK2263 株の運動性を確認したところ、野生株よりも運動性が低下していた。TK2263 と走化性関連遺伝子の転写について関連があると予想された。また別の遺伝子破壊株である ΔTK1285 株は野生株に比べリシン生合成遺伝子群の転写産物量が 10～50 倍程度増加していた。さらに組換え型 TK1285 を作製し、リシン生合成遺伝子群の上流配列（推定プロモーター領域）を含む DNA 断片と混合した所、DNA-タンパク質の結合が確認された。これらの結果から、TK1285 はリシン生合成系関連遺伝子群を直接負に制御している可能性が高いと考えられた。

Transcriptional regulator, Hyperthermophilic archaea, Extremophile

発表番号：2F110
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# デオキシニバレノールのアセチル化体が酵母細胞にもたらす毒性影響の違い

# Acetylated products cause different gene expression changes compared to that of deoxynivalenol in Saccharomyces cerevisiae.

○鈴木 忠宏、岩橋 由美子（農研機構・食総研）
○Tadahiro SUZUKI, Yumiko IWAHASHI (NARO, NFRI)

**背景・目的：**小麦赤カビ病の原因となるフザリウム属菌の中には、人畜に有害な二次代謝産物であるデオキシニバレノール（DON）を産生するものが存在する。これらの菌によって作物の DON 汚染が引き起こされ、食品や飼料の汚染に繋がる。最終産物である DON の生合成過程において菌体内でアセチル化 DON が生成されるため、多くの汚染試料において DON と共に 3 アセチル DON(3ADON)や 15 アセチル DON（15ADON)による共汚染が報告されている。そのためアセチル DON の毒性評価も重要であるが、生体内において脱アセチル化が生じるため、最終産物の DON としてのリスクに焦点が当てられている。しかし、腸管上皮付近において、アセチル DON の曝露リスクを完全に排除することは出来ない。そこで、本研究では脱アセチル化酵素を持たない真核細胞のモデル生物である酵母を用いて DON とアセチル DON の毒性を評価し、毒性影響の違いを検討する。

**材料・方法：***Saccharomyces cerevisiae* BY4743 の *PDR5* 遺伝子欠損株の培養液(YPD, 0.01% SDS, 6ml, $A_{650}$=0.8~1.0)に DMSO で溶解した DON, 3ADON, 15ADON を終濃度 5, 10, 25, 50, 100mg/kg となるよう添加し、0mg/kg として DMSO のみを添加したサンプルを準備し、試験管で 150rpm, 25℃, 2h 培養を行った。培養した細胞を基に RNA を抽出して cDNA を合成し、リアルタイム PCR による半定量の結果から遺伝子発現量の変化を比較した。

**結果・考察**：濃度依存的な遺伝子発現量の変化から求めた近似線による比較を実施したところ、細胞膜表層に局在する鉄還元酵素ファミリーを構成する *FRE* 遺伝子の発現に変化が観察された。*FRE* は 3 つのファミリーから構成され、本研究では *FRE1*, *FRE7* から成るグループ II が、グループ I および III とは異なる発現制御を受けている可能性が示唆された。また、ミトコンドリアの転写活性化因子をコードする *MSS51* や MAPK 遺伝子の *FUS3* は 15ADON のみに特異的な誘導を示し、糖のトランスポーターをコードする *HXT2* および *HXT4* は、DON, 3ADON, 15ADON の曝露によってそれぞれ異なる発現傾向を示した。このように、DON とそのアセチル化体の曝露試験は、酵母細胞の遺伝子発現制御に関する新たな知見をもたらすだけでなく、それぞれのマイコトキシンが細胞に対して異なる毒性影響を及ぼすことを示唆している。そのため、アセチル化体に対する毒性評価も引き続き実施する必要がある。

Acetylated deoxynivalenol, toxicity, yeast

発表番号：2F111
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ビフェニル/PCB 分解能力を高頻度に転移・欠失する *Pseudomonas putida* KF715（NBRC 110667）株のゲノム再編成現象

# The genome of *Pseudomonas putida* KF715 (NBRC 110667) revealed phenotypic adaptation to the contaminated environment

○末永 光[1]、藤原 秀彦[2]、木村 信忠[1]、廣瀬 遵[3]、渡邊 崇人[4]、二神 泰基[5]、後藤 正利[6]、古川 謙介[2]([1]産総研生物プロセス、[2]別府大食物、[3]宮崎大工、[4]京大生存研、[5]鹿大農、[6]九大農)
○Hikaru SUENAGA[1], Hidehiko Fujihara[2], Nobutada Kimura[1], Jun Hirose[3], Takahito Watanabe[4], Taiki Futagami[5], Masatoshi Goto[6], Kensuke Furukawa[2] ([1]AIST, [2]Beppu Univ., [3]Miyazaki Univ., [4]Kyoto Univ., [5]Kagoshima Univ., [6]Kyushu Univ.)

【目的】ビフェニルで汚染された環境より単離された *Pseudomonas putida* KF715 株は、ビフェニル/PCB 代謝に関わる遺伝子群（*bph*）を有しているが、その形質は非常に不安定であることが報告されている。これまでの研究により、本菌株は接合伝達により他菌株に *bph/sal* 遺伝子群を高頻度に転移する能力を有していること、さらに、栄養培地で培養すると容易にビフェニル分解能を欠失することを明らかにしている。本研究では、これらの表現型の変遷をゲノム構造から明らかにするために、KF715 野生株と、*bph* 遺伝子群の欠失株（KF715Δbph）および *bph* 遺伝子が *P. putida* AC30(bph-)に転移した株（KF202）の比較ゲノム解析を行った。

【方法と結果】ゲノム配列解析の結果、KF715 株は、1 本の環状染色体 DNA と 4 本のプラスミド(pKF715A, pKF715B, pKF715C, pKF715D）を有し、*bph* 遺伝子群は pKF715A 上に存在していることが明らかとなった。次に、KF715 野生株に対して、欠失株 KF715Δbph と転移株 KF202 との比較ゲノム解析を行った。その結果、*bph* 遺伝子群の周辺領域には転移性遺伝子群が多数存在し、欠失現象には IS やトランスポゾンが関与していることが考えられた。また、pKF715A と染色体上に相同な領域が確認されたことより、本来は染色体上に存在した *bph* 遺伝子群を含む領域が、在来プラスミドに挿入された結果、pKF715A が構成されたことが示唆された。

Pseudomonas, comparative genomics, genetic mobile element

発表責任者：末永光（suenaga-hikaru@aist.go.jp）

発表番号：2F112
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Pseudomonas aeruginosa* KF702 のビフェニル・サリチル酸・安息香酸分解経路をコードするゲノミックアイランドの再編成

# Reconstitution of the genomic island coding for biphenyl/salicylate/benzoate degradation pathway of *Pseudomonas aeruginosa* KF702

○廣瀬 遵[1]、寺野 貴洋[1]、横井 春比古[1]、末永 光[2]、木村 信忠[2]、渡邊 崇人[3]、二神 泰基[4]、後藤 正利[5]、藤原 秀彦[6]、古川 謙介[6] ([1]宮崎大工・環境応用化、[2]産総研・生物プロセス、[3]京大・生存研、[4]鹿大・農、[5]九大院・農、[6]別府大・食物栄養)

○Jun HIROSE[1], Takahiro TERANO[1], Haruhiko YOKOI[1], Hikaru SUENAGA[2], Nobutada KIMURA[2], Takahito WATANABE[3], Taiki FUTAGAMI[4], Masatoshi GOTO[5], Hidehiko FUJIHARA[6], Kensuke FURUKAWA[6] ([1]Univ. Miyazaki, [2]AIST, [3]Kyoto Univ., [4]Kagoshima Univ., [5]Kyushu Univ., [6]Beppu Univ.)

【目的】 PCB およびビフェニル分解性を有する種々の *Pseudomonas* 属細菌のゲノム上で高度に保存されている *bph-sal* エレメントはビフェニル及びサリチル酸分解経路をコードし、生態系で接合伝達を経て水平伝播したと考えられている。本ポスター発表では次世代シーケンス解析で得られたビフェニル資化性細菌 *Pseudomonas aeruginosa* KF702 (NBRC 110665)のドラフトゲノム配列に基づいてビフェニル代謝経路(*bph* 遺伝子)、サリチル酸代謝経路(*sal* 遺伝子)および安息香酸代謝経路(*bza* 遺伝子)をコードする DNA 領域の解析を行った結果について報告する。

【方法と結果】*P. aeruginosa* KF702 のゲノムシーケンス解析により、*P. aeruginosa* の異なる 8 菌株のゲノム上には存在しない *bph* 遺伝子、*sal* 遺伝子および *bza* 遺伝子クラスターをコードする 126.7kb のゲノミックアイランドを確認した。*sal* 遺伝子の大部分と *bza* 遺伝子は重複してコードされており、それらはサリチル酸代謝系と安息香酸代謝系の共通の代謝酵素群をコードしていた(Fig.1)。また、他のビフェニル資化性細菌のゲノム配列との詳細な比較により、*sal* 遺伝子クラスターの *salD* の中間より下流域と相補鎖にコードされる *bza* 遺伝子クラスターの *bzaD* の中間より下流域をコードする約 51 kb の領域が反転していることが明らかとなった。以上の結果は、KF702 株の *bph*，*sal* および *bza* 遺伝子をコードするゲノミックアイランドが、内部での相同組換えによるダイナミックな再編成を起こしたことを物語っている。

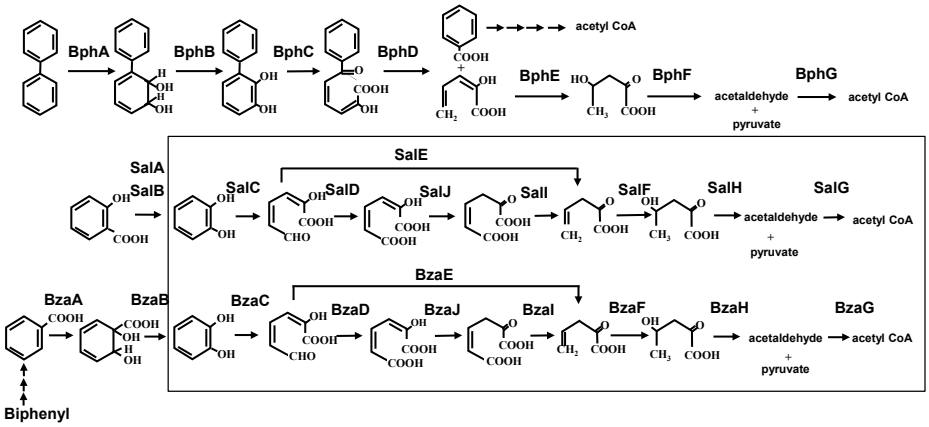



Fig.1 *P. aeruginosa* KF702 のビフェニル、サリチル酸、安息香酸代謝経路
枠内： *sal* 遺伝子と *bza* 遺伝子が共通にコードしている代謝酵素群

bph-sal element, genomic island, Pseudomonas

発表番号：2F113
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 富山湾海水中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立

# Extraction of intracellular DNA from seawater for characterization of the microbial and genetic diversity in Toyama Bay

○宮西 謙弥[1]、中野 椋太[1]、磯貝 泰弘[1]、畠 俊郎[2]、西田 洋巳[1]、高橋 裕里香[1] ([1]富県大生工科・生工セ、[2]富県大環工科)
○KENYA MIYANISHI[1], Ryota NAKANO[1], Yasuhiro ISOGAI[1], Toshiro HATA[2], Hiromi NISHIDA[1], Yurika TAKAHASHI[1] ([1]Dept. of Biotech. and Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. of Environ. Eng., Toyama Pref. Univ.)

富山湾は蜃気楼や埋没林といった多様な自然環境から“神秘の海”とも称され、2014 年には世界で 36 湾目となる「世界で最も美しい湾クラブ」への加盟も果たしている。急峻な海底地形が特徴で、最大水深は 1000 m を超え、日本海を北上する対馬暖流（表層水）と冷たい日本海固有水（深層水）が層をなす。そこへ標高 3000 m 級の立山連峰に源を発する栄養豊富な河川水が流れ込み、約 500 種の魚介類が生息する好漁場となっている。本研究では生物多様性を支える基盤となる細菌・微生物に着目し、富山湾の微生物相・遺伝子多様性の分布情報を得ることを目指している。

ところで従来の環境 DNA（メタゲノム）解析研究では、細胞内外を区別せずに直接 DNA 抽出を行っているが、海水や海底堆積物中には多量の裸の DNA が細胞外に存在することが知られており、従来法では細胞として存在していない微生物種も含めた菌叢解析結果を導く恐れがある。また細胞外 DNA はリンや炭素など栄養源としての役割だけでなく、再び細胞に取り込まれて遺伝子プールとして働く可能性があることが報告されている。そこで、その環境に真に棲息している微生物種を同定し、細胞内外の遺伝子多様性を評価するために、海水から細胞内・外を区別して DNA 抽出を行う方法の確立・検証を行った。

富山湾内（北緯 36°57’,東経 137°22’）の海面から採取した海水（表層水）から φ0.2 μm フィルターで細胞を捕集し（捕集物より細胞内 DNA を抽出）、φ0.02 μm フィルターでウィルス粒子を除去して、エタノール沈殿、透析、シリカカラム精製によって細胞外 DNA を精製した。海水 1 L あたりの収量は、細胞内 DNA が 60～183 ng (n=2)、細胞外 DNA が 2～9 ng (n=4)であった。同じ地点の海底堆積物では 1 g（湿重量）あたり、細胞内 DNA は 45 (±18) ng (n=3)、細胞外 DNA は 55 (±15) ng (n=3) 得られたことと比較すると（中野ら、本学会発表）、細胞内 DNA に対する細胞外 DNA 量の割合は海底堆積物よりも海水のほうが小さいことが示唆された。

コントロールとして、海洋性細菌 *Roseobacter litoralis* Och 149 株の菌体（$10^{11}$ cells 相当）を同じ海水に添加して同様に抽出したところ、細胞外 DNA の収量は 30.9 ng 未満であったことから、細胞内 DNA は抽出中にほとんどが細胞内にとどまっており、細胞外に漏れ出していないことが確かめられた。

現在得られた DNA を用いた 16S rDNA 菌叢解析を行っており、他の地点・水深の結果と合わせて発表する予定である。

seawater, intracellular DNA, Toyama Bay

発表番号：2F114
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 富山湾海底堆積物中の微生物相・遺伝子多様性の評価のための細胞内 DNA 抽出方法の確立
# Extraction of intracellular DNA from marine sediment for characterization of the microbial and genetic diversity in Toyama Bay

○中野 椋太[1]、宮西 謙弥[1]、磯貝 泰弘[1]、畠 俊郎[2]、西田 洋巳[1]、高橋 裕里香[1]（[1]富県大生工科・生工セ、[2]富県大環工科）
○Ryota Nakano[1], Kenya MIYANISHI[1], Yasuhiro ISOGAI[1], Toshiro HATA[2], Hiromi NISHIDA[1], Yurika TAKAHASHI[1] ([1]Dept. of Biotech. and Biotech. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. of Environ. Eng., Toyama Pref. Univ.)

[背景・目的] 富山湾は日本海側で最も深く大きな湾であり、水深 1000 m を超える深海が陸地近くまで迫り標高 3000 m 級の立山連峰との落差は約 4000 m にも及ぶ。魚類だけでも 500 種以上の生物種が生息しており、別名「天然のいけす」とも呼ばれている。我々は、富山湾の豊かさの一端は微生物叢の多様さに支えられているのではないかと考え、富山湾内の微生物相・遺伝子多様性の分布の評価を行うことを計画している。従来のメタゲノム抽出では細胞内外の両方の DNA が抽出されるが、富山湾の 300 m 以深には、年間を通して水温 2°C 以下で成分の変動も少ない日本固有水（海洋深層水）が存在するため、海底堆積物中の細胞外 DNA は他の環境に比べて安定に保存されている可能性がある。このような環境下では、細胞として存在していない微生物種も含めた菌叢解析結果を導く恐れがある。そこで、海底堆積物から細胞内・外を区別して DNA 抽出を行う方法の検証・改良を行った。

[方法・結果] 従来の方法（Corinaldesi *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 2005, **71:**46-50）では、海底堆積物に 0.1% SDS を含むリン酸ナトリウム緩衝液を加えて懸濁し、500 × g の遠心分離で鉱物粒子を除去した後、10,000 × g の遠心分離と φ0.2 μm フィルターで細胞を捕集し（捕集物より細胞内 DNA を抽出）、φ0.02 μm フィルターでウィルスを除去して、ろ液より CTAB 沈殿と Phe/Chl 抽出で細胞外 DNA を抽出している。しかし、我々が、海洋性細菌である *Roseobacter litoralis* Och 149 株の菌体（$5\times10^{10}$ cells 相当）から海底堆積物に対する操作と同じ手順で細胞外 DNA を粗抽出したところ、SDS を加えなかった際の収量が 466～506 ng (n=2)であったのに対して、0.1% SDS を加えた際には 6080～6540 ng (n=2) に増加したことから SDS によって細胞溶菌が引き起こされていることが判明した。これにより従来の方法では、一部の細胞内 DNA を細胞外 DNA として抽出している可能性が示唆された。

SDS を含まないリン酸ナトリウム緩衝液を用いて富山湾内（北緯 36°57', 東経 137°22', 水深 799 m）より採取した海底堆積物より抽出を行ったところ、1 g（湿重量）あたり、細胞内 DNA は 45 (±18) ng (n=3)、細胞外 DNA は 55 (±15) ng (n=3)が得られた。同じ地点の海水（表層水）では 1 L あたり、細胞内 DNA は 60～183 ng (n=2)、細胞外 DNA は 2～9 ng (n=4) 得られたことと比較すると（宮西ら、本学会発表）、細胞内 DNA に対する細胞外 DNA 量の割合は海水よりも海底堆積物のほうが大きいことが示唆された。

現在得られた DNA を用いた 16S rDNA 菌叢解析を行っており、他の地点の結果と合わせて発表する予定である。

marine sediment, intracellular DNA, Toyama Bay

発表番号：2F115
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# メタゲノム解析と環境ゲノムのビン詰めによるバイオオーグメンテーション中の微生物機能評価

# Functional analysis of microorganisms during bioaugmentation process using metagenome analysis and differential coverage binning

○三浦 隆匡[1]、関口 勇地[2]、沼田 充[1]、山副 敦司[1]、藤田 信之[1] ([1]NITE, NBRC、[2]産総研, バイオメディカル)

○Takamasa MIURA[1], Yuji SEKIGUCHI[2], Mitsuru NUMATA[1], Atsushi YAMAZOE[1], Nobuyuki FUJITA[1] ([1]NITE, NBRC, [2]AIST)

テトラクロロエチレン（PCE）やトリクロロエチレン（TCE）などの塩素化エチレン類により汚染された土壌・地下水の原位置浄化の際には、嫌気性細菌の脱塩素反応を利用したバイオレメディエーションの導入が期待される。これまでに、我々のグループでは、塩素化エチレン類を完全にエチレンまで脱塩素化できる *Dehalococcoides* 属細菌を含むコンソーシアを用いたバイオオーグメンテーション（BA）と栄養剤のみを投入したバイオスティミュレーション（BS）施工中に起きる実汚染現場の微生物叢の変化を 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析により明らかにしてきた。本研究では、BA あるいは BS 施工中に起きる微生物叢の変化を機能遺伝子に注目して評価するために、当該サンプルのメタゲノム解析を行った。

7 つの BA 井戸サンプル、4 つの BS 井戸サンプルについて Hiseq1000 を用いたショットガンシーケンスを行い、メタゲノムデータを取得した。解析には metaCV を使用した。KEGG と eggNOG へ assign された結果についてそれぞれ主成分分析を行ったところ、BA 井戸と BS 井戸では施工直後の機能変化の様子が異なった。しかし、時間が経つにつれて、それぞれの微生物機能は施工前の状態に近づくことが示された。これは 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシーケンス解析による微生物叢解析の結果に類似した傾向であり、コンソーシアや栄養剤の投入による影響は一時的であることが、メタゲノム解析の結果からも推測された。

一方で、個々の構成微生物がもつ機能情報を取得するため、メタゲノムデータを基に differential coverage binning 法による構成微生物のポピュレーションゲノムの再構築を試みた。その結果、*Dehalococcoides* 属細菌のほか、微生物叢解析で BA 井戸に比較的高い割合で検出された *Bacteroidales* 目に属する細菌や *Synergistaceae* 科に属する細菌などのポピュレーションゲノムが抽出された。現在、各構成微生物がバイオレメディエーションに果たす役割などを明らかにするために、いくつかのポピュレーションゲノムについて解析を進めている。

metagenome, population genome binning, bioaugmentation

発表番号：2F116
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細菌叢構造のメタ 16S 解析による土壌汚染評価の試み

# Evaluation of soil contamination by 16S amplicon-based bacterial flora structure

○高橋 咲[1]、姜 天龍[2]、黄 光偉[3]、齊藤 玉緒[1] ([1]上智大理工、[2]上智大院理工、[3]上智大院地球環境)
○Saki TAKAHASHI[1], Tenryu KYO[2], Guangwei HUANG[3], Tamao SAITO[1] ([1]Sophia Univ., [2]Grad. Sch. of Sci. Tech., Sophia Univ., [3]Grad. Sch. of Glob. Env., Sophia Univ.)

【目的】現在アジアは世界の 6 割の人口を抱え、このまま人口増加が進めば、2050 年にはアジアに約 50 億人もの人が暮らすことが予想されている。そのため食糧増産が求められているが、開発途上国の農業において、灌漑水質の悪化や過度の窒素肥料使用による農作物の汚染とそれによる健康被害が問題になっている。高品質な作物を生産し、人々が安心して生活を営むことができる安心安全な社会を実現するために、まず農地の土壌環境を正確に把握する必要がある。しかし、従来の土壌診断テストは、化学性と物理性の診断だけに留まっていた。今回の研究では、使用している灌漑水の違いによる土壌細菌叢構造変化を評価し、従来の土壌テストでは確立されていなかった、土壌細菌についての情報を示すことによって水質及び土壌環境改善のための新しい指針の一つとして提案することを目的とする。
【手法】特に窒素肥料使用量が多い中国の黒河中流域付近を調査地に、生活排水、地下水、水質の良い河川水を灌漑水として使用しているそれぞれの畑土壌から、培養を介さずに直接 DNA を抽出した。その後、NGS を用いてメタ 16S 解析を行い、それぞれのサンプルの OTU (Operational taxonomic unit) 数から菌種数を推定し多様性を比べた。また、UniFrac 解析によってそれぞれの細菌叢構造がどの程度異なっているのかを調べた。
【結果】門レベルでの主な構成細菌はいずれも *Proteobacteria*、*Planctomycetes*、*Gemmatimonadetes*、*Acidobacteria* などで、その比率にも大きな差はみられなかった。しかし、生活排水を灌漑水として使用している畑土壌よりも、河川水を利用している畑土壌の菌種数の方が有意に多く、多様性が高いことが示された。また、UniFrac 距離に基づく主座標分析によって、その 2 つの土壌間の細菌叢構造は異なっているという結果がでた。地下水の水質については明確な情報はないが、菌種数は生活排水を使用している土地と差はなかった。このことから、地下水を使用していても、生活排水を使用している畑のすぐ隣の農地では、その影響を受けて細菌の多様性は低くなる、または、使用している地下水が過度の窒素肥料使用で汚染されているのではないかと推定した。しかし、土壌細菌叢の違いを灌漑水の水質だけで判断することはできないので、今後、窒素肥料の実際の施肥量、土壌硝酸含有量、農作物の収量などのデータも合わせて考察し、窒素肥料使用量適正化にも役立つ情報を提示していきたい。また、窒素肥料過度使用によって硝化脱窒作用の働きに変化があるのかをメタゲノム解析で明らかにしていく予定である。

Soil bacterial flora, Analysis of 16S amplicon, Soil contamination

発表責任者：高橋　咲（love-bio@sophia.ac.jp）

発表番号：2F117
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高温環境メタゲノムの大規模解析と超耐熱性β－キシロシダーゼの スクリーニング

# Massive Analysis of Metagenomic Sequences from High-Temperature Environment and Discovering Hyperthermophilic ß-Xylosidases

佐藤 大[1]、須田 みぎわ[1]、大熊 二郎[2]、加藤 友彦[1]、広瀬 佳嗣[2]、西村 明日香[2]、近藤 康弘[2]、○柴田 大輔[1] ([1]かずさ DNA 研、[2]ホンダ・リサーチ・インスティチュート・ジャパン)
Masaru SATO[1], Migiwa SUDA[1], Jiro OKUMA[2], Tomohiko KATO[1], Yoshitsugu HIROSE[2], Asuka NISHIMURA[2], Yasuhiro KONDO[2], ○Daisuke SHIBATA[1] ([1]Kazusa DNA Res. Inst., [2]Honda Research Institute Japan)

【目的】 高温環境下に生育する微生物菌叢より得られるメタゲノムは耐熱性酵素の有用な遺伝資源として期待される。このような高温環境メタゲノムから酵素活性スクリーニングを基盤として、既に多様な耐熱性酵素が見出されている。近年は DNA シークエンサーの超高性能化により Gbp レベルの大規模メタゲノム DNA 配列情報が容易に得られるようになり、遺伝子配列レベルでの新規耐熱性酵素のアノテーションが進められている。本研究では、Gbp レベルで得られる高温環境メタゲノムの有用性を評価するため、バイオマスの糖化酵素の 1 つであるβ−キシロシダーゼをモデルとして耐熱性酵素のスクリーニングを実施した。
【方法】 メタゲノム解析の試料として国内温泉地 2 地点より土壌を採取した。この土壌より DNA 抽出キット(ISOIL Large for Beads ver.2, NIPPON GENE)を使用してメタゲノム DNA を調製した。DNA シークエンスには、Roche GS FLX Titanium、Illumina GA2x、および Illumina Hiseq 2000 を使用し、得られたリードから CLC Genomics Workbench ver.5.4.8 を用いて *de novo* アッセンブリングを実施した。β−キシロシダーゼ候補遺伝子の抽出には BLAST および HMMER アルゴリズムを適用した。抽出された遺伝子を PCR によってメタゲノム DNA より増幅し、Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits を用いて大腸菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) Star に導入した。当該組換え大腸菌より調製した無細胞抽出液を用いて活性スクリーニングを実施し、高い耐熱性を示した酵素の詳細な活性測定には、発現系の検討の後、カラムクロマトグラフィーにて精製した酵素を使用した。
【結果および考察】 2 地点より採取した土壌 DNA のシークエンスによりメタゲノム配列 AR19M と OJ1M（それぞれ総リード長 81Gbp および 65Gbp）を得た。配列解析により AR19M と OJ1M から、それぞれ 196、331 種類の完全長β−キシロシダーゼ候補遺伝子配列が得られた。このうち AR19M 由来では変異体を含む 85 酵素が 50℃以上の反応温度で活性を示した。これらの耐熱性β−キシロシダーゼの中でも ORF AR19M-311-2 は既知遺伝子との相同性が 70%程度と低い新規遺伝子であった。当該遺伝子にコードされた酵素は反応最適温度が 90°C と高く、最適条件下において $k_{cat}$ $1.30 \times 10^2$ $s^{-1}$、$K_m$ 0.872 mM であった。さらに、OJ1M より得られた ORF OJ1M-273-1 にコードされた酵素は、これまでに報告されている耐熱性β−キシロシダーゼの中で最も高い反応最適温度である 105°C を示す超耐熱性酵素であることが明らかとなった。

metagenome, thermostable enzyme, ß-xylosidase

発表責任者：柴田大輔（shibata@kazusa.or.jp）

発表番号：2F118
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 主要な好熱性糸状菌類の菌体外酵素生産と培養特性

# Typical thermophilic filamentous fungi in the culture and the extracellular enzyme production

○島村 麻美子、デ オリベイラ ポルシウンクラ ジュリアーノ、安宅 花子、西嶋 桂子、紙野 圭（(独)製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター)
○Mamiko SHIMAMURA, Juliano de Oliveira Porciuncula, Hanako Ataku, Keiko Nishijima, Kei Kamino (NITE)

非可食バイオマスからのバイオエタノール生産や化成品原料生産へ向けたバイオリファイナリーの根幹として糖化技術がある。糸状菌由来の糖化酵素系が現状の技術では重要な役割を担う。自然界の分解者たるこれら微生物の位置づけがそれを裏付けしているが、同時にカビの菌体外酵素生産性の高さも実際には非常に重要な因子のひとつである。それら微生物や酵素に関わる基盤がこの機に底上げされてきた。糖化関連酵素の分子機構の理解、関連モデル菌株の分子生物学、カビやキノコのゲノム情報の蓄積、木材腐朽の分子機構の理解促進などが例として挙げられる。一方でこのブームは、これら微生物の持つ酵素全般の利用を促進する良い機会でもある。
カビやキノコは、バクテリアやアーキアと比べると極端な環境では生息できない。そのため好熱性という観点でもやや見劣りする感じがある。キノコでは好熱性と認められる株は知られておらず、またカビでは５０～６０℃がせいぜいである。しかし産業利用におけるカビの高い酵素生産性や近年の各種基盤の底上げを考えると、魅力的であり今後の展開が期待される。NBRC では昨年度より好熱性糸状菌ライブラリーの整備を進めている。それらライブラリーの中から好熱性として知られる種から１０菌株を選定し、それらの菌株および菌体外酵素の性状を解析した。

千葉県の堆肥施設より分離した菌株の中から、*Chaetomium* sp.、*Thermoascus* sp.、*Corynascous* sp.、*Thielavia* sp.、*Myceriophthora* sp.、*Thermomyces* sp.、*Scytalidium* sp.、*Rhizopus* sp.に属する菌株を選び、それらの前培養および酵素誘導条件（誘導基質や pH、他の菌株由来の物質や微量金属名等）と菌体外酵素生産について、プロテオームや酵素活性測定、顕微鏡下の形態などを中心に調べたので報告する。

なお、本研究の一部はバイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（NEDO）の一貫として行われた。

Thermophilic fungi, Enzyme, Saccharification

発表番号：2F119
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 系統解析と分子動力学計算に基づく[NiFeSe]ヒドロゲナーゼの環境適応モデル
# Molecular evolution of [NiFeSe]Hase based on 3D structure modeling

○田村 隆[1,2]、恒川 直樹[3]、根本 理子[1]、平野 敏行[3]、佐藤 文俊[3]、稲垣 賢二[1] ([1]岡山大農、[2]JST さきがけ、[3]東大生産技)
○Takashi Tamura[1,2], Naoki Tsunekawa[3], Michiko Nemoto[1], Toshiyuki Hirano[3], Fumitoshi Sato[3], Kenji Inagaki[1] ([1]Okayama Univ., [2]JST PRESTO, [3]Univ. Tokyo)

【目的】 *Desulfovibirio* 属細菌に代表される硫酸還元菌(Sulfur-Reducing Bactria)は，硫酸イオンを電子受容体とする硫酸呼吸で生育する偏性嫌気性細菌である。SRB は，さまざまな無機・有機物を呼吸基質としており，とくに水素($H_2$)を利用するために複数のヒドロゲナーゼ(Hase)をペリプラズム空間に常備している。Hase は活性中心に存在する Fe と Ni で可逆的に水素の酸化/還元反応を触媒する能力を持つが，分子状酸素に高い感受性を持つ。近年，ある種の SRB において活性中心 Ni-Fe を支える Cys 残基の 1 つがセレノシステイン(Sec)残基に置換した酸素耐性 [NiFeSe]Hase が発見されて注目された。 [NiFeSe]Hase の結晶構造から活性中心と分子の表面にかけて巨大な穴(Gas Cavity)を持つという特徴も報告された。このトンネルは水素の取込みには有利であるが酸素の侵入を許すデメリットもあり環境適応における厳しいトレードオフを経て形成されたと考えられる。本研究ではこの Cavity の分子進化を理解するために系統解析と分子動力学(MD)計算を行った。【方法・結果】*Desulfovibrio vulgaris* 由来の[NiFeSe] Hase をクエリ配列として *D. alaskensis, D. africanus, D. salexigens, D. piger* など 9 つの近縁 SRB ゲノムに新たなホモログ遺伝子の存在が示された。最尤法で系統樹解析した結果， [NiFeSe]Hase は[NiFe] Hase から派生した共通祖先を持つことが示唆された。[NiFeSe]Hase をもつ SRB 宿主は陸生由来(うち 2 株は，ヒト腸内細菌)と海生由来に大別できた。海生由来にも絶対嫌気的な海底熱水噴出口由来と微好気環境の海底堆積物由来で異なる系統分化を示した。興味深いことに[NiFeSe]Hase, [NiFe]Hase, そしてセレンタンパク質合成に関わる *selA, selB, selC* 遺伝子産物の系統関係が極めて高い相似形に同調しており，発現産物の分子間相互作用が共進化を促していることが示唆された。これらの遺伝子群はそれぞれの宿主ゲノム内に散在していたので，この Hase 関連遺伝子群は宿主細菌の「種の系統」を反映する貴重な指標となることが示唆された。GUIDANCE でアライメントを検定した後に ANCESCON で祖先型遺伝子配列の予測を行ない，祖先型配列および現存配列の立体構造のホモロジーモデリングを行った。さらに GPGPU を装備したクラスター計算機による MD 計算を 12Åの深さの周期境界水において，11 ナノ秒間，300 K，1 気圧下の条件で最適化した。この MD 計算では Ni-Fe 活性中心や鉄硫黄クラスター構造も密度汎関数に基づく力場を導入した。膨大な計算と詳細な Cavity 解析により，活性中心に Sec 残基を獲得した最初の共通祖先酵素から分岐して分子進化に伴うガスキャビティ構造の深化過程を再現した。さらに種の系統が経てきた環境適応とキャビティ構造の深化はアミノ酸残基の非同義置換によって駆動されたことも示唆された。

Hydrogenase, Selenium, Molecular Dynamics

発表責任者：田村　隆（tktamura@okayama-u.ac.jp）

発表番号：2F120
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 腸内細菌叢変化を介したヒト生体機能の調整：次世代シーケンサーを用いた腸内細菌叢解析と遺伝子発現解析結果との関連性

# Control of human biofunction through regulating intestinal microbiota: Relation between intestinal microbiota analysis by the next generation sequencer and gene expression analysis

○小田 由里子[1]、井上 亮[2]、植田 文教[1]、亀井 飛鳥[3]、宇津山 正典[4,5]、阿部 啓子[3,6]、廣川 勝いく[4,5]（[1]富士フイルム（株）、[2]京府大院生命環境科学、[3]KAST、[4]（株）健康ライフサイエンス、[5]東医科歯科大、[6]東大院農）
○Yuriko ODA[1], Ryo INOUE[2], Fumitaka UEDA[1], Asuka KAMEI[3], Masanori UTSUYAMA[4,5], Keiko ABE[3,6], Katsuiku HIROKAWA[4,5] ([1]FUJIFILM Corp., [2]Kyoto Prefectural Univ., [3]KAST, [4]Inst. for Health & Life Science, [5]Tokyo Medical & Dental Univ., [6]The Univ. of Tokyo)

【目的】デチンムル科のサラシア属植物の有効成分（サラシノール等）は、小腸のα-グルコシダーゼ活性を阻害し、吸収抑制された糖類は消化管内で腸内環境改善効果をもたらす。我々はサラシア属植物エキス（以下サラシア）の腸内細菌叢変化を通じた生体調整作用に着目し、動物モデルを用いて、サラシアの免疫亢進効果を確認してきた。また、近年、糖尿病や炎症など様々な疾病に腸内細菌が関与していることも明らかになってきた。今回はヒトに対するサラシアの作用を確認するため、健常成人を対象とした二重盲検試験を実施し、サラシアのヒト免疫及び腸内細菌叢に対する作用を評価した。
【方法】生活習慣が類似した 50～59 歳の健常男性を対象としたスクリーニングを行い、廣川らが開発した『免疫力測定検査』において免疫スコアが低めの被験者 30 名を選出し、無作為に 2 群（サラシア摂取群、プラセボ摂取群）に振り分け、二重盲検並行群間比較法にて試験を実施した。1 日 3 回（毎食前）、4 週間の被試験食摂取を行い、摂取前と摂取後の末梢血液・糞便を採取した。採取した血液・糞便を用いて【1】免疫機能評価（各種免疫細胞数、サイトカイン産生量、血液の遺伝子発現解析等）、【2】腸内細菌叢測定を実施した。腸内細菌叢に関しては、T-RFLP にて菌叢の構成を把握した後、次世代シーケンサーを用いて詳細な検証を行った。
【結果・考察】プラセボ摂取群との群間比較の結果、サラシア摂取群において、【1】T 細胞増殖係数の向上、$CD4^+$ Naïve T 細胞の増加傾向、IL-6 の低下傾向、細胞性免疫関連遺伝子発現の増加、炎症関連遺伝子発現の低下【2】*Bifidobacterium* の有意な増加と *Clostridium* の顕著な減少を確認した。具体的な菌種としては、*B. longum*、*B. adolescentis* の顕著な増加、T 細胞増殖作用を有する *L. plantarum* 類縁菌の増加を確認した。また、*Fusobacterium* や *Desulfovibrio* など大腸がんや炎症に関わる菌、及び糖尿病を誘発する報告がある *Lachnospiraceae* 類縁菌が減少していた。以上の結果から、サラシアはヒトにおいても腸内細菌叢の変化を介して、免疫機能調整及び糖尿病の予防に作用している可能性が示された。サラシア摂取による免疫作用の向上は、*Bifidobacterium* や *L. plantarum* などの免疫機能を誘導する菌の増殖による免疫亢進だけでなく、*Fusobacterium* や *Desulfovibrio* などの炎症に関わる菌の減少による生体内の炎症抑制も関わっていると考えられる。さらに、サラシアはこれまで糖の吸収を抑制することにより糖尿病を予防すると考えられてきたが、腸内細菌叢変化も糖尿病の予防に関与する可能性が示された。

intestinal microbiota, gene expression analysis, immune

発表責任者：小田由里子（yuriko.oda@fujifilm.com）

発表番号：2F121
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 食物アレルギー発症児と非発症児の乳幼児期における腸内細菌叢の比較解析

# Comparative analysis of the gut microbiota in infancy between children with and without food allergy

○田中 優[1]、東 佳那子[1]、山本 麻寿紗[1]、本田 倫子[1]、百田 理恵[1]、清原 千香子[2]、園元 謙二[1,3]、鷲尾 昌一[4]、中山 二郎[1] ([1]九大院・農、[2]九大院・医、[3]九大・バイオアーク、[4]聖マリア学院大学)
○masaru TANAKA[1], kanako HIGASHI[1], azusa YAMAMOTO[1], noriko HONDA[1], rie MOMODA[1], chikako KIYOHARA[2], kenji SONOMOTO[1,3], masakazu WASHIO[4], jiro NAKAYAMA[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Medicine, Kyushu Univ., [3]Bio-Arch, Kyushu Univ., [4]St. Maria College)

【背景】ヒト腸内細菌叢は、乳幼児期のダイナミックな変化を経緯して成人型の安定したフローラに落ち着く。よって、乳幼児期の腸内細菌叢は宿主の腸管免疫系の発達に多大な影響を与え、後のアレルギーなどの免疫疾患の発症に関連すると考えられる。そこで、世界的に、乳幼児期のアレルギー発症と腸内細菌叢の関連性を解析する前向きコホート試験がいくつか行われているが、これまでのところ統一した見解は得られていない。我々のグループでも過去に前向きコホート調査を実施してきたが、今回、近年技術進歩の目覚しいメタ 16S 解析の手法を取り入れて、過去のサンプルを綿密に解析し、新たな知見を得るに至ったので発表する。
【方法】本研究は、平成 20 年から 23 年の間に、福岡県久留米市聖マリア病院で出生した計 69 名の新生児の糞便サンプル（生後 1、2、6、12 ヶ月時)、出生前後の診療記録、そして生後 3 年間のアレルギー発症に関するアンケート調査データを用いて行った。糞便メタ 16S 解析は、糞便サンプルから抽出した全細菌ゲノム DNA から、バーコード付きユニバーサルプライマーを用いて 16S rDNA V1V2 領域を増幅させ、Illumina 社 Miseq によりペアエンド配列解析することで行った。得られた配列データから Uparse により OTU を作成し、QIIME を用いて系統解析を行い、各サンプルの細菌叢プロファイルを作成した。生後 3 年後までに食物アレルギーの罹患歴を有する被験者をアレルギー発症群(n=22)、アレルギー罹患歴のない被験者を健常群(n=33)として細菌叢の比較解析を行った。
【結果】生後 2 および 12 ヶ月において、細菌叢の系統的多様性の指標である PD whole tree が食物アレルギー群で有意($p<0.05$ in U test)に低かった。また生後 2 ヶ月時において、アレルギー群で、乳酸菌である *Leuconostoc* 属、*Weissella* 属、*Lactococcus* 属および乳酸資化菌である *Veillonella* 属が有意に少なかった。生後 12 ヶ月では、Unclassified *Clostridium* 属、Enterobacteriaceae 科、Unclassified Enterococcaceae 科がアレルギー群で有意に多かった。これらの項目に関して食物アレルギーの発症リスク Odds 比をロジスティック回帰分析で計算した結果、PD whole tree は生後 2 ヶ月時に 0.228 倍、生後 12 ヶ月時で 0.374 倍、Unclassified *Clostridium* 属は 3.06 倍であった。
【結論】生後 2 ヶ月と 12 ヶ月時の両方で細菌叢多様性は食物アレルギーの発症に負に相関していた。また、生後 2 ヶ月における有機酸生産菌、生後 12 ヶ月における Unclassified *Clostridium* 属および Enterobacteriaceae 科の存在比が食物アレルギー発症にそれぞれ負及び正に相関していた。以上、これらは食物アレルギー発症の予知あるいは診断マーカーとなる可能性が示唆された。

gut microbiota, infants, food allergy

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2F122
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 佐鳴湖から採取された新規微生物の生理活性解析およびゲノム解析

# Physiological activity and genomic analyses of novel bacteria isolated from Lake Sanaru

○村口 雄亮[1]、久志本 晃弥[2]、佐藤 安里紗[1]、福田 洸平[3]、大坪 嘉行[4]、鈴木 智大[5]、道羅 英夫[5]、金原 和秀[1,2,3]、新谷 政己[1,2,3] ([1]静大工、[2]静大院、[3]静大創造院、[4]東北大院生命科学、[5]静大グリーン研)
○Yusuke MURAGUCHI[1], Koya KUSHIMOTO[2], Arisa SATO[1], Kouhei HUKUDA[3], Yoshiyuki OTSUBO[4], Tomohiro STUZUKI[5], Hideo DOURA[5], Kazuhide KIMBARA[1,2,3], Masaki SHINTANI[1,2,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad.Sch.Shizuoka Univ., [3]Grad.Sch.Sci.Technol,Shizuoka Univ., [4]Grad.Sch.Life Sciences,Tohoku Univ., [5]Shizuoka Univ.RIGST)

【背景と目的】静岡県浜松市にある佐鳴湖は，水深が浅く，川で連結された下流の浜名湖から，海の潮汐の影響で塩濃度の高い水が遡上するため、滞留時間の長い（40 日前後）汽水湖である．この自然条件から，本湖は富栄養化の進んだ化学的酸素要求量（COD）の高い汽水湖として知られている（2014 年は 7.3-11 mg/L）．我々は，佐鳴湖のこのような特徴から，特殊な微生物生態系が存在する可能性が高いと考え，佐鳴湖を単離源として微生物の探索を行ってきた．その結果，佐鳴湖から，孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過できる小さな細菌 125 株の単離に成功した．これらの菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を解読して系統分類学的解析を行ったところ，一部は新属あるいは新種に属することが示唆された[1)]．そこで，その特徴を深く理解することを目的として，生態学的および生理学的解析を行うとともに，ゲノム配列を解読して，近縁種との比較を行った．

【実験方法】新種・新属候補株として 2014 年 4 月 28 日に佐鳴湖から単離された，M8-2 株，M15，M34 株を用いた．これらの菌株は，それぞれ *Algoriphagus*，*Aquiflexum*，*Flavobacterium* 属に近縁であった．これらの候補株については，市販のアピキットを用い生理活性を調べ，近縁種と比較した．また，候補株の total DNA を抽出し，次世代シーケンサーMiSeq（Illumina）により全塩基配列を決定した．このうち，M8-2 株は総コンティグ数が 10 個と少なかったため，大坪らの開発した Finishing ツール[2,3)]を利用してギャップクロージングを行った．その後，MiGAP，PGAP と，Prokka を利用してアノテーションを行い，GenomeMatcher を用いて開始コドン位置の修正を行った．

【結果と考察】生理活性調査の結果，対象の 3 株は，いずれも近縁種とは異なる基質を代謝可能で，特に M15 株が，近縁種より多くの基質を代謝できることが示唆された．また，M34 株は近縁種よりも糖を分解する酵素活性を示すものが少なかった．3 株のゲノム配列は，それぞれ 3.88 Mb，GC 含量 41.4%（M8-2 株），4.89 Mb，GC 含量 41.6%（M15 株），2.91 Mb，GC 含量 36.7%（M34 株）であり，それぞれの近縁種と比べると，ゲノムサイズは比較的小さな値であった．また，これらの 3 株いずれとも，rhodopsin をコードすると推定される遺伝子を有しており，特に M8-2 株と M15 株の遺伝子は，まだ機能解析されていない *Cyclobacteriaceae* 科細菌由来の rhodopsin をコードする遺伝子と類似していた．現在，これらの rhodopsin の機能解析を行っており，それらの結果も合わせて報告する．

1)久志本ら，日本農芸化学会 2015 年度大会
2)Ohtsubo et al., 2012, J. Bacteriol. 194:6970-6971.
3)Ohtsubo et al., 2008, BMC Bioinformatics 9:376.

filterable bacteria, genome, brackish lake

発表番号：2F123
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 低希土類や Ca を要求しない新規な *Methylobacterium* 属細菌のスクリーニングとそのメタノール脱水素酵素の性質について

# Screening of *Methylobacterium* strains that require newly metal ions for their methanol growth.

○王 倫、濱田 昂志、日比野 歩美、早川 享志、中川 智行（岐阜大院応生）
○ LUN WANG, KOJI HAMADA, AYUMI HIBINO, TAKASHI HAYAKAWA, TOMOYUKI NAKAGAWA (Gifu Univ.)

【目的】

*Methylobacterium* 属細菌はメタノールを唯一の炭素源として生育できるメチロトローフ細菌である。近年, *Methylobacterium* 属細菌が Ca の代わりに軽希土類に依存したメタノール生育能を持つことが見いだされ，その鍵酵素が La を補因子とする新規なメタノール脱水素酵素（MDH）であることが明らかとなった [1)]。しかし，これまでレアアース依存的メタノール生育が報告されている *Methylobacterium* 属細菌は原子量が小さい軽希土類でのみメタノール生育を示し，原子量が比較的大きい重希土類はメタノール生育に要求しないことが示されている。つまり，Ca および軽希土類以外の金属イオンをメタノール生育に要求する *Methylobacterium* 属細菌は報告されておらず，その存在は不明である。

そこで，本研究では Ca および軽希土類以外の金属イオン，特に重希土類をメタノール生育に利用でき，その金属イオンを新たな補因子とする新規なメタノール脱水素酵素の探索を目的とした。

【方法・考察】

重希土類依存的にメタノール生育が可能な *Methylobacterium* 属細菌株のスクリーニングを行ったところ，メタノール/Lu 培地でピンク色のコロニーを形成する GM41 株を得ることができた。本菌株を 16S rRNA 配列を用いて同定したところ，GM41 株は *M. zatmanii* であった。GM41 株は，確かに Lu をはじめ希土類金属イオンをそれぞれ添加したメタノール培地に生育可能であったが，希土類および Ca を含まないメタノール培地でも同様に生育できた。すでに軽希土類依存的メタノール生育を示すことが知られている *M. extorquens* AM1 株は Ca と希土類を含まない同様の条件では全くメタノール生育を示さないことから，GM41 株は，（1）希土類や Ca 以外の何らかの金属イオンをメタノール生育に要求する，（2）Ca などの金属を完全に取り除いた培地の作成は困難であることから，極少量混在した Ca や希土類でも生育できる，ことなどが考えられる。*M. extorquens* AM1 株において希土類と Ca を必要とする代謝因子は MDH であることがすでに示されているため，*M. zatmanii* GM41 株の金属イオン依存性を調べるには MDH タイプを解析するのが近道であると考えた。現在，GM41 株のメタノール生育における金属イオンの特異性について，金属を含まない培地で生育させた GM41 株から MDH を精製し，その酵素科学的諸性質を検討中である。

1) Nakagawa T *et al*. (2012) *PLoS One*. 7:e50480.

*Methylobacterium zatmanii*, methanol dehydrogenase, rare-earth elements

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

発表番号：2F124
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Methylobacterium extorquens* AM1 のメタノール脱水素酵素 XoxF1 のレアアースに対する発現応答と性質

# Response to rare-earth elements and characterization of XoxF1 in *Methylobacterium extorquens* AM1.

○菅沼 宗矢[1]、日比野 歩美[1]、海老原 章郎[1]、岩本 悟志[1]、谷 明生[2]、三井 亮司[3]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大応生、[2]岡山大植物研、[3]岡山理大理)
○Soya SUGANUMA[1], Ayumi HIBINO[1], Akio EBIHARA[1], Satoshi IWAMOTO[1], Akio TANI[2], Ryoji MITSUI[3], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Okayama Univ., [3]Okayama Univ. Sci.)

【目的】

メタノールを唯一の炭素源として資化できる *Methylobacterium* 属細菌は，植物葉上から蒸散されるメタノールを生育に利用し，植物ホルモン等を供給している植物共生細菌である。つまり，メタノール代謝系は *Methylobacterium* 属細菌の植物共生にとって重要な鍵機能のひとつであり，その共生能力を最大限に引き出すことで「植物生育促進」への応用が期待できる。一方，我々のグループでは *Methylobacterium* 属細菌がレアアース（REE）である La 依存的な新規メタノール代謝系を持つことを示し[1)], 自然界における REE 依存型メタノール代謝が植物共生能の鍵を解く糸口になると考えている。そこで，本研究では *M. extorquens* AM1 株を用いて，REE 依存的に誘導される因子をプロテオーム解析し，REE により特異的に誘導される *xoxF1* の特徴について詳細に解析した。

【方法・結果】

メタノール/Ca および La 培地に生育した *M. extorquens* AM1 株のタンパク質誘導パターンを解析するため，二次元電気泳動を行った。両メタノール培地で生育した AM1 株は，ほぼ同じ電気泳動パターンを示したが，Ca 生育細胞と La 生育細胞でそれぞれ 31，19 スポットの特異的に誘導されるタンパク質スポットを検出した。La 誘導型タンパク質は，XoxF1，malyl-CoA lyase/β-methylmalyl-CoA lyase, serine-glyoxylate aminotransferase であった。

次に，最も顕著に La 誘導された XoxF1 について，他の REE による誘導を観察したところ，La, Ce，Pr，Nd で誘導され，その誘導は転写レベルで制御されていた。そこで，メタノール/Nd および La 培地に生育した Δ*xoxF2* 株から，それぞれ XoxF1（Nd-MDH および La-MDH）を精製し，その諸性質を検討した。両酵素はそれぞれ Nd および La を補因子として持ち，至適 pH は La-MDH が 9.0, Nd-MDH が 9.5，最適温度は共に 45ºC を示した。しかし，La-MDH は 60ºC において最適温度の 60% 以上の活性が残存していたのに対し，Nd-MDH は 55ºC で急激に活性が低下し，60ºC では最適温度の 8%しか活性が残っていなかった。そこで両精製酵素の変性中点温度（$T_m$）を測定したところ, Nd-MDH は La-MDH に比べ著しく低 $T_m$ 値を示した。

以上のことから, XoxF1 は REE でのみ誘導される REE 依存型 MDH であり, それぞれ十分メタノール代謝経路において機能する能力を持ち，植物共生においても重要な機能を持つことが推察される。

1) Nakagawa T *et al*. (2012) *PLoS One*. 7:e50480.

*Methylobacterium extorquens*, methanol dehydrogenase, rare earth elements

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

発表番号：2F125
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Corynebacterium glutamicum* 由来 ODH/PDH-E2 サブユニットのアセチル 化部位の機能解析
The functional analysis of lysine acetylation in the E2 subunit of the ODH/PDH complex in *Corynebacterium glutamicum*

○阿部 理乃[1]、久保 翔世[1,2]、永野 愛[1,3]、川崎 寿[2]、吉田 稔[4]、西山 真[1]、古園 さおり[1,4]([1]東大・生物工学セ、[2]東京電機大、[3]協和発酵バイオ、[4]理研 CSRS)
○Ayano ABE[1], Syosei KUBO[1,2], Megumi NAGANO[1,3], Hisashi KAWASAKI[2], Minoru YOSHIDA[4], Makoto NISHIYAMA[1], Saori KOSONO[1,4] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Denki Univ., [3]Kyowa Hakko Bio, [4]RIKEN CSRS)

アセチル化をはじめとするアシル化修飾は、生物種を超えて保存された翻訳後修飾として近年注目されており、アシル化修飾が代謝酵素の活性調節に関わる例が報告されている。*Corynebacterium glutamicum* は Tween40 添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰に生産する。グルタミン酸の過剰生産には、TCA 回路中で 2-オキソグルタル酸からスクシニル CoA への反応を触媒する 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ(ODH)の活性低下が重要と言われている。*C. glutamicum* では ODH 活性を担う E1o サブユニットとピルビン酸デヒドロゲナーゼ(PDH)活性を担う E1p サブユニットが共局在しており、これに E2, E3 サブユニットを加えた 4 種類のサブユニットで構成される超複合体を形成していると考えられている。当研究室で実施されたアシローム解析により、ODH/PDH 複合体のサブユニットにアセチル化やスクシニル化修飾が見出されており、グルタミン酸生産と相関した修飾量の変化が観察されている。本研究では、グルタミン酸生産の鍵酵素である ODH/PDH 複合体のアシル化修飾に着目し、特に複合体のコアを形成し、他の 3 種類のサブユニットと相互作用する E2 サブユニットのサブユニット結合ドメイン(PSBD)におけるアセチル化部位について詳細な解析を行った

PSBD 領域に見出された 2 カ所のアセチル化部位に対し非アセチル化模倣(KR)変異及びアセチル化模倣(KQ)変異を導入した株を作成したところ、K391R 変異株において野生型に対し 26%のグルタミン酸生産量の増加が見られたことから、このアセチル化部位はグルタミン酸生産に関与することが示唆された。対応する K391Q 変異株ではグルタミン酸生産量への影響はより小さかった。細胞破砕液を用いた PDH 活性測定の結果、K391R 変異株ではピルビン酸に対する見かけの Km が野生株よりも小さくなっており、見かけの触媒効率の指標である Vmax/Km は 2 倍程度上昇していた。また、K391R 変異株の培養液中のピルビン酸蓄積量は減少しており、PDH フラックスが増加していることが示唆された。一方、ODH 活性についても 2-オキソグルタル酸に対する見かけの Km の低下と Vmax/Km の上昇が見られたことから、グルタミン酸生産量の増加には ODH フラックスの低下が必須でないと考えられた。プルダウンアッセイによりサブユニット間の結合状態を調べた結果、ODH 及び PDH の触媒効率との間に相関は見られなかった。

以上の結果から、K391 部位は酵素活性に何らかの役割を有しており、K391R 変異による PDH フラックスの上昇がグルタミン酸生産量の増加に寄与した可能性を考えている。現在は、ODH/PDH 複合体の他のアシル化部位についても解析を進めている。

lysine acetylation, *Corynebacterium glutamicum*, ODH/PDH

発表番号：2F126
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Corynebacterium glutamicum* 由来ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(PEPC)のアセチル化制御はグルタミン酸生産に重要である

# Lysine acetylation of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is involved in glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*

○永野 愛[1,2]、山田 鮎果[1]、水野 裕太[2]、菊地 正樹[3]、白水 美香子[3]、梅原 崇史[3,4]、吉田 彩子[1]、吉田 稔[5]、西山 真[1]、古園 さおり[1,5]([1]東大・生物工学セ、[2]協和発酵バイオ、[3]理研 CLST、[4]JST さきがけ、[5]理研 CSRS)
○megumi nagano[1,2], ayuka yamada[1], yuta myzuno[2], masaki kikuchi[3], mikako shirouzu[3], takashi umehara[3,4], ayako yoshida[1], minoru yoshida[5], makoto nishiyama[1], saori kosono[1,5] ([1]Tokyo Univ., [2]Kyowa Hakko Bio, [3]RIKEN CLST, [4]JST Sakigake, [5]RIKEN CSRS)

アセチル化に代表されるタンパク質のアシル化修飾は、細菌からヒトまで進化的に保存された翻訳後修飾として近年注目されている。アシル化修飾が代謝酵素調節に関わる例が真核・原核の両方で見いだされており、これを標的とした代謝改変や育種への応用が期待される。*Corynebacterium glutamicum* は、Tween 40添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰生産することが知られている。上記の刺激は細胞膜張力に変化を与え、グルタミン酸排出を担うメカノセンシティブチャネルを開口させると同時に、代謝フラックスをグルタミン酸合成方向に変化させることが知られているが、代謝フラックス変化が上記の刺激により誘発されるメカニズムについては明らかにされていない。当研究室におけるこれまでの検討では、中央代謝経路の多くの酵素においてグルタミン酸生産誘導と相関したアセチル化及びスクシニル化修飾の変化を観察しており、これらのアシル化修飾が代謝フラックス変化に関わる可能性を考えている。本研究では、補充経路のホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC)に着目し、グルタミン酸生産に関わるアシル化修飾の機能解析を行った。

これまでの検討により、PEPC は *C. glutamicum* ATCC13032 株においてオキサロ酢酸供給の主要な補充経路として機能し、Tween 40 添加によりその比活性が増加することから翻訳後修飾等の質的制御を受けることが示唆されている。加えてアシローム解析から、PEPC-K653 のアセチル化修飾量は Tween 40 添加により減少し、またこの残基のアセチル化模倣 KQ 変異はグルタミン酸生産を顕著に低下させることを明らかにしている。今回は、大腸菌で発現・精製した変異体酵素を用いて詳細な酵素学的パラメータを評価した。その結果、KQ 変異体では WT や非アセチル化模倣 KR 変異体と比較して $k_{cat}$/Km が大きく低下していた。また、KR 変異体は WT や KQ 変異体よりもアスパラギン酸に対して低い感受性を示した。更に K653 にアセチルリジンを導入した PEPC(PEPC-K653Ac)を *in vitro* で調製し、K653 アセチル化の影響をより直接的に調べた。その結果、PEPC-K653Ac の活性はコントロールであるアセチル化非導入 PEPC と比較して著しく低下したことから、K653 のアセチル化は PEPC 活性を負に制御することが示された。

以上の結果から、Tween 40 添加によるグルタミン酸生産条件では、PEPC-K653 の脱アセチル化により PEPC 活性及びオキサロ酢酸供給を維持することがグルタミン酸生産にとって重要である可能性が示唆された。現在は Tween 40 添加の刺激がアシル化修飾の変化に繋がるメカニズムを解明するために、PEPC-K653 のアセチル化制御機構を調べている。

lysine acetylation, *Corynebacterium glutamicum*, phophoenolpyruvate carboxylase

発表番号：2F127
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌におけるエネルギー代謝の切り替え機構

# Mechanism for energy metabolic transition in a bacterium *Escherichia coli*

○島田 友裕、田中 寛（東工大資源研）
○Tomohiro SHIMADA, Kan TANAKA (TITech)

代謝系は全ての生物に普遍性が高く、自在にその流れを変えながら、様々な局面で重要な生命現象を引き起こしている。しかし、代謝制御に関わる知見が蓄積した今日でも、代謝フローの方向性を細胞が操る機構は明確でなく、任意の人為操作が可能となる目処も立っていない。私たちは研究の背景となる情報に富んだ大腸菌を材料とし、代謝フローの転換を引き起こす分子機構の「枠組み」を明らかにすることを目的として研究を進めている。

これまでの研究で、グルコースを主要な炭素源とした最小培地でのバッチ培養系を用い、代謝ステート（Metabolic States）が順次遷移していく実験系を確立した。さらに、グルコース酸化により解糖系を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート（State I）から、酢酸やアミノ酸を利用して TCA を中心にエネルギーを獲得する代謝ステート(State II)への切り替えの際に Acetyl-CoA を酢酸へ変換する代謝ステート(Metabolic Transition State)が存在する事を発見した。

本発表では、その分子機構の解明について得られてきた結果を報告する。Phosphate acetyltransferase（*pta*）または Acetate kinase（*ackA*）を欠損させると Metabolic Transition State において、細胞増殖が著しく停滞することが観察された。*pta* 欠損株において Coenzyme A(CoA)の前駆体であるパントテン酸を添加することにより、増殖の停滞が部分的に回復したため、細胞内の CoA 類の濃度を定量したところ、野生株では State II においてフリーの CoA の濃度が一過的に上昇していることが観察された。その一方で *pta* 欠損株においては CoA 類の総量は野生株と同等であるものの、フリーの CoA の濃度の上昇は観察されなかった。また、Pyruvate dehydrogenase（PDH）または 2-Oxoglutarate Dehydrogenase（OGDH）の特定のサブユニットを過剰発現させることで増殖の停滞が部分的に回復した。そこで、これら二つの酵素の活性を経時的に測定したところ、野生株では Metabolic Transition State を境に PDH 活性が低下し、OGDH 活性が上昇していたが、*pta* 欠損株においては PDH 活性が低下しない一方で、OGDH 活性が増殖停滞の間に上昇していた。これらの事から PDH に対する OGDH の活性比が一定以上になることが State II への遷移を規定している事が示唆された。さらに、野生株において PDH（AceEF-Lpd)および OGDH(SucAB-Lpd)の各サブユニットの細胞内濃度を観察したところ、Metabolic Transition State の前後では顕著な発現量の変化は観察されなかったが、Lpd の複合体形成相手は AceEF から SucAB へと遷移していた。これらの結果から、エネルギー代謝遷移を引き起こすための分子機構、およびその生理的な意義について議論したい。

Energy metabolic transition, *Escherichia coli*

発表番号：2F128
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌新規リボゾーム結合タンパク質 ElaB における N 末端セリンアセチル化修飾の同定と解析

# Identification and analysis of the N-terminal serine acetylation of a ribosome-binding protein ElaB in *Escherichia coli*

○鷹巣 全希、島田 友裕、田中 寛（東工大資源研）
○Masaki TAKASU, Tomohiro SHIMADA, Kan TANAKA (TITech)

リボゾームはタンパク質の合成を司る細胞内小器官である。細胞は増殖活性に合わせて、タンパク質の合成活性を調節する必要があり、リボゾームの翻訳活性と細胞増殖活性との間には密接な相関があると言える。しかし、翻訳と増殖に関する分子機構は個々に研究が進められてきており、それらを統合する制御機構については不明な点が多い。そこで本研究では、大腸菌をモデル生物として、細胞増殖活性と翻訳活性を協調的に制御する因子を探索することを目的に、生育状態に応じて変化するリボゾーム構成タンパク質の検索を行った。

グルコースを単一炭素源とする M9 最少培地で大腸菌を培養し、増殖相の変化に沿って経時的にリボゾームを調整した。得られたリボゾームについて、RFHR 二次元電気泳動を行ったところ、増殖相に依存して一部のタンパク質の量に変化が観察された。そこで、MALDI-TOF-MS を用いてそのタンパク質の同定を行った結果、対数増殖期から定常期への移行に伴い、機能未知のタンパク質である ElaB のリボゾームへの結合量が増加していることが明らかとなった。さらに、ElaB は N 末端セリンアセチル化型と非アセチル化型の二つの状態で存在し、定常期への移行に伴いアセチル化型の割合が増加していた。アミノ酸配列からは、ElaB には N 末端にリボゾーム結合ドメイン、C 末端には内膜貫通ドメインが予想されている。また、*elaB* 遺伝子の 5’上流の *elaA* 遺伝子は、N 末端アセチル基転移酵素活性をコードすることがアミノ酸配列解析から予測されている。そこで、*elaA* 遺伝子欠損株を用いて ElaB の修飾パターンを解析した結果、定常期における ElaB のアセチル化型の割合が欠損株で著しく減少していることを見出した。従って、ElaA が ElaB の N 末端セリンを定常期特異的にアセチル化することが示唆される。

真核生物において、タンパク質の N 末端アセチル化は頻繁に観察される翻訳後修飾である。しかし、原核生物においては稀な修飾と考えられ、大腸菌ではこれまでに数例しか報告されていない。また、その生理的な役割については未知のままである。アセチル化は炭素源代謝活性を反映することが報告されているため、本研究で発見されたリボゾーム結合タンパク質 ElaB の N 末端アセチル化修飾は、炭素源代謝活性とリボゾームの局在を介した翻訳活性を共役させている新規の分子機構である可能性が考えられる。本発表ではこれらの結果から、ElaB に関する分子機構や生理的な役割について議論したい。

N-acetylated ElaB, Escherichia coli, Ribosome

発表番号：2F129
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 網羅的解析による *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株が有する新奇 $CO_2$ 固定経路の推定

# Estimation of a unique $CO_2$ fixation pathway in *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 by comprehensive analyzes

○矢野 嵩典[1]、高木 博史[2]、吉田 信行[1] ([1]静大院、[2]奈良先端大バイオ)
○Takanori YANO[1], Hiroshi TAKAGI[2], Nobuyuki YOSHIDA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

**【背景と目的】**備蓄原油中より単離された*Rhodococcus erythropolis* N9T-4株は，炭素源無添加の完全無機塩からなる固体培地で良好に生育するという超低栄養性を示す．本菌は低栄養生育時に$CO_2$を要求することから，本菌は新奇な「低エネルギー型$CO_2$固定系」を有していると予想し，研究を進めてきた．これまでにランダム変異導入ライブラリーを用いて低栄養性が失われた変異株を取得し，遺伝学的な解析を行った結果，本菌の低栄養生育にはグリオキシル酸経路及び糖新生経路が必須であることを明らかにした（*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**: 5627, 2015）．加えて，菌体から調製した無細胞抽出液中にα−ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼの活性が検出されないことから，N9T-4株のTCA回路においてはα−ケトグルタル酸からコハク酸セミアルデヒドを経てコハク酸に至るバイパス経路を含む可能性が示されている．以上の二つの知見は本菌の炭素代謝の特徴を示すものであるが，N9T-4株の低栄養生育，$CO_2$要求性を直接説明できるものではない．そこで今回，低栄養条件で特異的に発現する遺伝子の網羅的な解析を試みた．

**【実験方法】**通常、低栄養条件での培養には炭素源無添加で窒素源を $NaNO_3$ とした BM 培地，富栄養条件での培養には LB 培地を用いている．まず LB 液体培地で生育させた菌体を集菌，洗浄し，それを BM または LB 液体培地に再懸濁して，短時間の振とうによる遺伝子の発現誘導を行った．その後, 低栄養条件で誘導した菌体から調製した RNA を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った. また，メタボローム解析はキャピラリー電気泳動/質量分析により行った．

**【結果および考察】**トランスクリプトーム解析の結果，低級アルデヒドの酸化還元に関与するアルデヒドディスムターゼ，アルデヒドデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（*mnoA* および *aldA*）が低栄養条件では富栄養条件に比べて 300 倍程度高発現していることが明らかとなった．その他，アセチル−CoA シンテターゼ，アセチル−CoA カルボキシラーゼをコードする遺伝子（*acs* および *acc*）の高発現が見られた．以上のことから，低級アルデヒド（アセトアルデヒド）から脂質合成に至るまでの酵素遺伝子が低栄養条件で高発現していることが分かった. つまり, 本菌の $CO_2$ 要求性はアセチル−CoA カルボキシラーゼが触媒する $CO_2$ 固定反応に起因するものと考えられた．これらの仮説を証明するために， $^{13}C$ でラベルされたアセトアルデヒドを基質として用い，BM 液体培地中で休止菌体反応を行い，メタボローム解析を行った．その結果，$^{13}C$-アセチル−CoA が有意に生成していることが確認できた．

$CO_2$ requirement, oligotroph, *Rhodococcus erythropolis*

発表責任者：吉田信行（tnyoshi@ipc.shizuoka.ac.jp）

発表番号：2F130
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の細胞内糖質の分析
Analysis of intracellular carbohydrates in an extremely oligotroph, *Rhodococcus erythropolis* N9T-4

船水 悠平[1]、矢野 嵩典[2]、○吉田 信行[1,2] ([1]静大工、[2]静大院)
Yuhei FUNAMIZU[1], Takanori YANO[2], ○Nobuyuki YOSHIDA[1,2] ([1]Fac. Eng., Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Shizuoka Univ.)

**【背景と目的】***Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は $CO_2$ 要求性の超低栄養性細菌であり，特別のエネルギーを添加することなしに，炭素源無添加の無機塩固体培地（BM 培地）に良好に生育する．さらに最近，N9T-4 株は炭素源のみならず，窒素源および硫黄源においても低栄養性を示すことが明らかとなり，このうち窒素源については大気中の微量アンモニアを利用している可能性を示した．我々はこれまでに低栄養性に必須な遺伝子，高発現する遺伝子を同定し，N9T-4 株の炭素および窒素代謝の多様性を明らかにしてきた [1)]．現在は，N9T-4 株を初めとしてこれまで我々が単離してきた超低栄養性細菌の有効利用を模索している．栄養源が極めて低い条件で生育するわけであるから，低コストで生産可能な「微生物バイオマス」となり得る．そこで本研究では，N9T-4 株の細胞内糖類を分析し，バイオマスとしての利用可能性を評価することを目的とした．

**【実験方法】**N9T-4 株の形質転換系において親株として用いているΔ*ligD* 株，無機ポリリン酸の合成・分解系遺伝子を破壊したΔ*ppk1* 株，Δ*ppk2* 株を BM 培地上で 5 日間培養し，菌体を回収した．菌体をガラスビーズにより破砕し，遠心分離によって得られた無細胞抽出液をサンプルとし，薄層クロマトグラフィー（TLC）による糖質の解析に用いた．糖質の定量は各種酵素法により行った．

**【結果および考察】**TLC 展開後，糖発色を行うことによって，トレハロースと同様の Rf 値を示すスポットと，原点に留まっているスポットの２つが顕著に検出できた．無細胞抽出液をトレハラーゼで処理後，グルコースを定量することにより，トレハロースの同定と定量を行った．その結果，親株で 0.28 g/g 乾燥菌体のトレハロースが検出できた．無細胞抽出液をグルコアミラーゼで処理した後に TLC 分析に供した結果，原点のスポットが薄くなり，グルコースに相当するスポットが新たに検出できた．これはグリコーゲンが蓄積されていることを示唆するものである．菌株間でのトレハロースとグリコーゲンの量には逆相関性が見られ，Δ*ligD* 株，Δ*ppk1* 株，Δ*ppk2* 株の順にトレハロースの量は増加した．Δ*ppk2* 株ではΔ*ligD* 株の約 2 倍のトレハロースの蓄積が確認できた（0.54 g/g 乾燥菌体）．また，栄養豊富な培地（LB 培地）で培養した菌体においては，トレハロース，グリコーゲンは検出できなかった．これらの結果から，低栄養条件で生育させた N9T-4 株内においては，トレハロース，グリコーゲン，ポリリン酸の代謝が相関していることが示唆された．

1) 吉田ら，バイオサイエンスとインダストリー, 73, 215-219 (2015)

*Rhodococcus erythropolis*, trehalose, oligotroph

発表責任者：吉田信行（tnyoshi@ipc.shizuoka.ac.jp）

発表番号：2F131
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 化学物質の微生物に対する毒性を評価するフロー式蛍光計測システムの開発

# Development of a flow type fluorescence measuring system for evaluating microbial toxicity chemicals

○櫻井 琢磨[1]、尾崎 愛[2]、新谷 政己[1,2]、木村 元彦[1,2]、金原 和秀[1,2] ([1]静大院、[2]静大工)
○ Takuma SAKURAI[1], MANA OZAKI[2], MASAKI SHINTANI[1,2], MOTOHIKO KIMURA[1,2], KAZUHIDE KIMBARA[1,2] ([1]Grad.sch.Eng.Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.)

【目的】化学物質の微生物の呼吸活性に対する影響を解析し、毒性を評価することは、環境中における化学物質の動態を考えるうえで重要な基盤情報である。そこで、微生物の基本生命活動の一つである転写に着目し、mRNA 量を計測することで、微生物に対しての化学物質を評価する手法の開発を行った。

【方法】バイオフィルム観察用多流路型デバイス用い、その流路上に形成した細胞の蛍光を簡易的かつ経時的に観察する計測装置を作製した。LED によって励起させた蛍光を、フィルターを通して蛍光波長のみをピックアップし、フォトダイオードによって検出した。蛍光検出には mRNA に結合し、蛍光を発するチオフラビン T (ThT)を用いた。1/3 に希釈した LB(1/3LB)寒天培地上に形成した *E.coli* DH5 α のコロニーを 1/3LB 液体培地に植菌し、37℃、200 rpm で 3 時間程振盪させ $OD_{600}$ = 0.6 に調整した。調整した培養液を同様の培地で 10 倍に希釈し、希釈した菌液 1 mL をシリンジによって滅菌した多流路型デバイスに流し込み、1 時間ほど静置させ、細胞をデバイスの底面に定着させた。細胞の定着後、ThT が終濃度 10 μM になるように添加した 1/6LB 培地の入った供給ビンと、多流路型デバイスを滅菌したタイゴンチューブとルアーキャップによって接続し、蛍光計測装置に組み上げたデバイス一式を 37℃のインキュベータに入れた。ポンプを用いて培地を連続供給し、蛍光変化を 2 時間おきに 1 分間連続計測した。測定開始から 12 時間後に 0.1 μm フィルターを通して滅菌した毒性物質をシリンジで注入し、48 時間後まで継続して蛍光計測を行った。計測データの収集は Labview ソフトウェア(National Instruments™)を用いてプログラムを作成し、自動計測により行った。

【結果】毒性物質の添加が無い場合は、培地供給開始からは 4 時間後まで蛍光強度の増加が見られなかったが、6 時間後から 24 時間後まで直線的に上昇していった。その後、蛍光強度は定常化した。培地供給開始から 12 時間後に毒性物質を添加すると、毒性物質添加後から蛍光の減少が見られた。最終的に初期値と同程度になった。このことから、本手法で測定することで、微生物に対する毒性物質の影響が測定可能であると示唆された。今後は微生物に対して毒性の作用が判明している化学物質を添加して蛍光量を計測し、影響の数値化を試みる予定である。

Toxicity, Thioflavin T, Fluorescence

発表番号：2F132
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヒト腸内細菌 *Bacteroides thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成に関与するカルボキシスペルミジン脱炭酸酵素

# Carboxyspermidine decarboxylase involved in spermidine biosynthesis of *Bacteroides thetaiotaomicron*, intestinal bacteria in humans

○阪中 幹祥[1]、杉山 友太[1]、北方 彩[1]、片山 高嶺[1,2]、栗原 新[1] ([1]石川県大、[2]京大院生命)
○Mikiyasu SAKANAKA[1], Yuta SUGIYAMA[1], Aya KITAKATA[1], Takane KATAYAMA[1,2], Shin KURIHARA[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ポリアミンは 2 つ以上のアミノ基を含む脂肪族炭化水素の総称であり，代表的なものとしてプトレッシン，スペルミジン，スペルミンが挙げられる．また，ポリアミンは生物の様々な部位に高濃度に存在しており，ヒト等の大腸腸管内腔においても数百 μM のポリアミンが含まれている．近年，腸管内のポリアミン濃度が上昇すると生物の寿命が伸長すること，さらにこのポリアミンの大半は腸内細菌によって生合成されていることが明らかになり，腸内細菌を介して腸管内ポリアミン濃度を制御することの重要性が高まっている．しかし，腸内細菌のポリアミン生合成経路は，大腸菌などの腸管内で優勢でない一部の菌種を除き殆ど解明されていない．そこで本研究では，ヒト腸管内で優勢な細菌種 *Bacteroides thetaiotaomicron* のポリアミン生合成経路を解明することを目的として研究を行った．

【方法・結果】

*B. thetaiotaomicron* のポリアミン生合成経路を解明するために，まず，本菌がどのようなポリアミンを生合成するのかを HPLC により解析した．その結果，ポリアミンを含まない最少培地で培養した *B. thetaiotaomicron* は，菌体内にスペルミジンを大量に蓄積することが明らかになった．このスペルミジンは，カルボキシスペルミジン脱炭酸酵素（CASDC）によりカルボキシスペルミジンから変換されたものであると *in silico* 解析から推測された．そこで，この推測を検証するために，CASDC をコードする遺伝子の欠損株（Δ*casdc* 株）とその相補株（Δ*casdc*::*casdc*$^{+}$株）を作出し，それらの株の菌体内スペルミジン濃度を測定した．その結果，Δ*casdc* 株は菌体内にスペルミジンを殆ど蓄積しなかったが，Δ*casdc*::*casdc*$^{+}$株は親株と同程度の濃度のスペルミジンを菌体内に蓄積していた．また，各株の培養菌体から調製した粗酵素液を用いて，カルボキシスペルミジンからスペルミジンが合成されるかを解析したところ, 親株または Δ*casdc*::*casdc*$^{+}$株由来の粗酵素液を用いた場合はスペルミジンが合成されたのに対し，Δ*casdc* 株由来の粗酵素液ではスペルミジンが合成されなかった．さらに，Δ*casdc* 株はポリアミンを含まない最少培地では親株や Δ*casdc*::*casdc*$^{+}$株よりも生育能が低かった．以上の結果より，CASDC は *B. thetaiotaomicron* のスペルミジン生合成および生育に寄与していることが明らかになった．CASDC をコードする遺伝子のホモログは多数の腸内細菌ゲノムに保存されているため，今回得た知見は *B. thetaiotaomicron* だけでなく腸内細菌全体のスペルミジン生合成経路を理解するうえで重要であると考えられる．

CASDC, gut bacteria, polyamine

発表責任者：栗原 新（kuri711@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：2F133
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母のアルギニン代謝における *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 依存的な新規経路の解析

# Analysis of a novel pathway mediated by *N*-acetyltransferase Mpr1 in the yeast arginine metabolism

○乗船 沙紀、関口 春菜、那須野 亮、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○SAKI NORIFUNE, HARUNA SEKIGUCHI, RYO NASUNO, HIROSHI TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】当研究室において、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Σ1278b 株に見出した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、プロリンアナログの L-アゼチジン-2-カルボン酸（AZC）を *N*-アセチル化により解毒する。しかし、AZC は自然界では一部の植物のみに存在するため、Mpr1 は AZC の *N*-アセチル化以外に酵母細胞内で何らかの生理機能を有していると考えられる。我々はこれまでの遺伝学的解析により、Mpr1 が *N*-アセチルグルタミン酸（*N*-Ac Glu）または *N*-アセチルグルタミルリン酸（*N*-Ac GluP）を供給することで、新規の経路によるアルギニン（Arg）合成に寄与することを明らかにしている。しかしながら、Arg 代謝経路における Mpr1 の基質や生成物の同定、触媒反応については解析が進んでいない。そこで本研究では、Mpr1 の細胞内における基質と生成物の同定、及び触媒反応を含め、Mpr1 依存的な Arg 合成経路を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】Arg は、酵母細胞内ではグルタミン酸（Glu）を出発物質として Arg2（*N*-Ac Glu シンターゼ）、Arg6（*N*-Ac Glu キナーゼ）、Arg5（*N*-Ac GluP レダクターゼ）とその後数段階の酵素反応により合成される。Mpr1 の Arg 合成経路における生成物が *N*-Ac Glu もしくは *N*-Ac GluP のどちらであるかを明らかにするため、Arg6 活性が野生型株の 1/1,000 に低下した *arg6* 株に、Mpr1 の過剰発現プラスミドを導入し、Arg 非含有培地における生育を評価した。その結果、*arg6* 株は Arg 非含有培地において著しく生育が悪化したが、Mpr1 を過剰発現させてもこの生育悪化は改善されなかった。Mpr1 が Arg6 の生成物である *N*-Ac GluP を供給する場合、Mpr1 の過剰発現によって *arg6* 株の生育悪化は改善されると考えられる。従って、Mpr1 は *N*-Ac Glu の供給により Arg 合成に寄与することが示唆された。しかし、Mpr1 の Glu に対する *N*-アセチル化活性の測定を行ったところ、活性は検出できなかった。そこで、Arg 代謝に関連するアミノ酸や、既知の基質である AZC と構造の類似するアミノ酸を用いて基質のスクリーニングを行った。その結果、興味深いことに pH8.0-9.0 の条件において Mpr1 のプロリン（Pro）に対する *N*-アセチル化活性を検出した。また、LC-MS を用いた解析により、Mpr1 は *in vitro* において Pro を *N*-アセチル化することにより *N*-アセチルプロリン（*N*-Ac Pro）を合成することが明らかになった。以上の結果から、Mpr1 依存的に合成された *N*-Ac Pro が Arg 合成の中間代謝物質となる可能性、Arg 代謝酵素の制御分子として機能する可能性が考えられることから、現在、*N*-Ac Pro の Arg 代謝経路における機能の解析を含め、Mpr1 依存的な Arg 合成経路の全容解明に取り組んでいる。

arginine metabolism, *N*-acetyltransferase Mpr1, yeast

発表番号：2F134
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* における Coenzyme A 生合成制御機構の解明

# Coenzyme A biosynthesis and its regulation in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*

○下坂 天洋[1]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大院・工、[2]JST, CREST)
○Takahiro SHIMOSAKA[1], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST)

[背景] 真核生物とバクテリアにおいて coenzyme A (CoA) の生合成は pantothenate kinase (PanK) に対する CoA や acetyl-CoA などの CoA 誘導体からのフィードバック阻害により制御されている。一方 PanK ホモログを有さないアーキアにおいては、ketopantoate reductase (KPR) に対するフィードバック阻害により CoA 生合成は制御される。一部の生物は KPR ホモログを有しておらず、これらの生物においては分枝鎖アミノ酸生合成酵素である ketol-acid reductoisomerase (KARI) が KPR 反応を触媒すると考えられる。

PanK はその一次構造から三種類に分類される。Type I PanK と type II PanK はそれぞれフィードバック阻害の対象になるが、type III PanK は CoA などにより阻害を受けないことが明らかとなった。

超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* はゲノム上に KPR ホモログを有さず、KARI ホモログ (TM0550) のみを有することから、KARI が KPR 反応を触媒すると考えられる。また type III PanK ホモログを単独で有することから、本菌において CoA 生合成は PanK に対するフィードバック阻害によっては制御されない可能性がある。そこで *T. maritima* においても、アーキアと同様に KPR 反応がフィードバック阻害の対象になり、CoA 生合成が制御されている可能性を検討した。

[結果] 精製 TM0550 は acetolactate に対して高い KARI 活性を示すとともに、様々な 2-オキソ酸の還元反応に対しても活性を示した。速度論的解析の結果から、活性測定に用いた 2-オキソ酸の中で ketopantoate が最も良い基質であることが示唆された。また *T. maritima* の無細胞抽出液において KPR 活性を確認した。この無細胞抽出液を陰イオン交換カラムで分画し、高い KPR 活性を示したフラクションに対して抗 TM0550 抗体を用いたウェスタンブロット解析をおこない KPR 活性が TM0550 に由来することを確認した。さらに TM0550 の KPR 活性に対する CoA および acetyl-CoA の影響を検討したところ、TM0550 は CoA と acetyl-CoA のどちらからもフィードバック阻害を受けない事が明らかとなった。以上の結果より *T. maritima* において KPR 活性は TM0550 によって触媒されるが、TM0550 はフィードバック阻害の対象ではなく *T. maritima* において CoA 生合成は他の何らかの機構によって制御される可能性が示唆された。

coenzyme A, feedback inhibition, *Thermotoga maritima*

発表番号：2F135
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における NAD+熱分解産物の代謝機構
Thermal degradation products of NAD+ and their metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○蜂須賀 真一[1]、佐藤 喬章[1,2]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大工、[2]JST, CREST)
○Shin-ichi HACHISUKA[1], Takaaki SATO[1,2], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST)

超好熱菌を含めた全ての生物にとって、nicotinamide adenine dinucleotide（$NAD^+$）は酸化（還元）酵素の反応において重要な補因子の 1 つである。しかし、$NAD^+$は高温で不安定であり分解されやすいことが知られている。そのため 80℃以上を至適生育温度とする超好熱菌のような高温環境で生育する生物は、生体内の $NAD^+$濃度を維持するような機構や、$NAD^+$の熱分解産物を代謝するような機構を有すると考えられる。そこで本研究では、至適生育温度が 85℃である、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* を対象として、$NAD^+$の熱分解に対応する機構を解明することにした。

まず、85℃において $NAD^+$を熱処理し、その分解産物を解析した。その結果、$NAD^+$の熱分解産物が nicotinamide および ADP-ribose であることを同定した。ADP-ribose は糖化と呼ばれる反応で生体内のタンパク質に対して非酵素的に結合し、細胞毒性を示すと言われている。そこで、この ADP-ribose を代謝する可能性のある酵素を *T. kodakarensis* のゲノム上から探索したところ、その候補として ADP-ribose pyrophosphatase (ADPR-PPase）と推定される TK2284 遺伝子を見出した。ADPR-PPase は一般に、ADP-ribose を ribose 5-phosphate (R5P)および AMP に分解する酵素である。そこで TK2284 組換え型タンパク質を調製し、ADP-ribose を含めた様々なヌクレオシド二リン酸誘導体に対して基質特異性を検討したところ、ADP-ribose および ADP-glucose に対して有意な活性を示した。この 2 つの基質に対して、速度論的解析を行ったところ、ADP-ribose に対する $k_{cat}/K_m$ 値は ADP-glucose に対する値よりも約 53 倍高いことが示された。よって、TK2284 タンパク質の生理的基質は ADP-ribose である可能性が高いと考えられた。また、$NAD^+$の熱分解以外にも副反応ではあるものの ADP-ribose の産生に寄与し得る酵素を同定した。Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase (NMNAT)は一般的に、nicotinamide mononucleotide (NMN)と ATP から $NAD^+$を生成する酵素である。本菌において NMNAT と推定される TK0067 の組換え型タンパク質を調製し、活性測定を行ったところ、本来の NMN と ATP から $NAD^+$を生成する活性と比べて低いながらも、R5P と ATP から ADP-ribose を生成する活性も示した。以上の結果から、高温環境に生育する本菌において、$NAD^+$の熱分解や TK0067 タンパク質の副反応から ADP-ribose が生じてしまい、それを TK2284 タンパク質が再利用可能な R5P や AMP に分解していることが予測された。

$NAD^+$, ADP-ribose, Thermal degradation

発表番号：2F136
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母における炭素源の厳密な選択に関与する Fmp12 の機能解析

# Functional analyses of Fmp12 involved in strict selectivity of carbon source in yeast

○西田 郁久、渡辺 大輔、河野 祐介、大津 巌生、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Ikuhisa NISHIDA, Daisuke WATANABE, Yusuke KAWANO, Iwao OHTSU, Hiroshi TAKAGI (Grad. Sch. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Tech.)

【目的】発酵産業などにおいて広く用いられている出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、炭素源としてグルコースを好むため、アミノ酸を単一の炭素源として利用し、増殖することはほとんどないと考えられている。一方、キシロース発酵性酵母 *Scheffersomyces stipitis* などアミノ酸を炭素源として資化できる酵母も存在するため、*S. cerevisiae* には炭素源としてのアミノ酸の利用を抑制する未知のメカニズムが存在するものと推測される。本研究では、ミトコンドリアにおける機能未知遺伝子の *FMP12* がプロリンの炭素源としての代謝に関わることを新たに見出したため、その機能解明を目的とした。
【方法・結果】難資化性アミノ酸であるプロリンの新規な代謝に関与する遺伝子を探索するために、ミトコンドリアの機能未知タンパク質をコードする *FMP* 遺伝子群に着目し、遺伝子破壊株の表現型を解析した。その結果、プロリンを単一の炭素源とする培地（SD-C+Pro）において、*FMP12* 遺伝子破壊株が野生株に比べて良好に生育することを見出した。一方、*FMP12* を過剰発現させると、SD-C+Pro 培地における生育が低下し、Fmp12 がプロリンの炭素源としての代謝に対して抑制的な役割を担っていることが示された。また *FMP12* 過剰発現株では、グルコースを炭素源とした際のエタノール発酵速度の低下も認められた。BLAST 検索の結果、Fmp12 は *Candida* 属酵母やヒトなどのα-ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼと相同性を有しており、α-ケトグルタル酸からコハク酸へ至る TCA 回路のバイパス経路を触媒する可能性が考えられた。そこで、SD-C+Pro 培地での生育が向上した *FMP12* 遺伝子破壊株において、TCA 回路上のα-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼサブユニット Kgd1 をコードする遺伝子を破壊したところ、その表現型は抑圧された。しかしながら、プロリンからグルタミン酸を経て TCA 回路に至ると考えられる代謝経路のうち、他種の酵母においてアミノ酸の炭素源としての代謝に関わると報告されているグルタミン酸デヒドロゲナーゼ Gdh1/2/3 およびグルタミン酸デカルボキシラーゼ Gad1 をコードする 4 遺伝子を同時に破壊しても SD-C+Pro 培地上での生育に影響を及ぼさなかった。その代わりに、グルタミン酸からα-ケトグルタル酸への変換は、アラニントランスアミナーゼ Alt1 が担っていることを明らかにした。以上の結果から、*FMP12* 遺伝子破壊株がプロリンを炭素源として利用するためには、プロリンをグルタミン酸に分解する経路に加え、Alt1 および TCA 回路のα-ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼの活性が必要であることが明らかになった。このような代謝経路は、*S. cerevisiae* において、Fmp12 のα-ケトグルタル酸依存型ジオキシゲナーゼ活性を介して阻害されており、厳密な炭素源の選択に寄与しているのではないかと考えられる。

proline metabolism, carbon source, yeast

発表責任者：西田郁久（i-nishida@bs.naist.jp）

発表番号：2F137
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# メチロトローフ酵母の $C_1$ 固定の鍵因子キシルロース 5-リン酸供給系の解析

# Analysis of xylulose 5-phosphate biosynthesis pathway on $C_1$ metabolism of the methylotrophic yeast

○川瀬 貴斗[1]、福岳 寛隆[1]、由里本 博也[2]、奥 公秀[2]、阪井 康能[2]、早川 享志[1]、中川 智行[1]([1]岐阜大応生、[2]京大院農)
○Takato KAWASE[1], Hirotaka FUKUOKA[1], Hiroya YURIMOTO[2], Masahide OKU[2], Yasuyoshi SAKAI[2], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]kyoto Univ.)

【目的】

メチロトローフ酵母は，次世代エネルギー源であるメタノールを出発原料とした低環境負荷型物質生産系への応用が期待される産業用酵母である。しかし，本酵母は高メタノール環境で著しい生育阻害を示すという大きな欠点を持つため，発酵産業への応用に向けて，いかに効率よく高メタノール環境下で代謝・発酵を行えるように分子育種するかが大きな課題のひとつである。

メチロトローフ酵母のメタノール代謝は，ペルオキシソーム（Ps）内のアルコールオキシダーゼ（AOX）によるメタノール酸化により開始し，生じたホルムアルデヒドをジヒドロキシアセトンシンターゼ（DAS）がキシルロース 5-リン酸（Xu5P）に $C_1$ 固定することで，メタノール由来炭素を資化経路へと導く。律速段階である DAS による $C_1$ 固定はメタノール代謝の最重要ステップであるが，その鍵基質 Xu5P の供給系に関してはこれまでほとんど詳細な解析がされてこなかった。Xu5P 供給系の改良はメチロトローフ酵母の高メタノール代謝株の分子育種への近道であると考え，本研究では *P. pastoris* の Xu5P 供給系に関与する遺伝子群を同定し，その詳細を解析することにした。

【結果・考察】

メタノール資化経路への Xu5P 供給には，糖新生のフルクトース-1,6-P アルドラーゼ（FBA），フルクトース-1,6-P ホスファターゼ（FBP），ペントースリン酸経路（PPP）のトランスアルドラーゼ（TAL），トランスケトラーゼ（TKL）の関与が考えられる。そこでこれらの遺伝情報を *P. pastoris* ゲノムデータベースから探索したところ，FBA，TAL をコードする遺伝子は 2 コピー，FBP と TKL は 1 コピーずつゲノム上に存在した。*TAL1, TAL2*, *TKL1* の遺伝子欠損はメタノール生育にほとんど影響を示さなかったが，*fbp1*Δ 株はメタノール生育を示さず，非発酵炭素源であるグリセロールとオレイン酸でも著しい生育低下が確認された。また，これら遺伝子の発現応答をプロモータアッセイにより調べたところ，*FBA2*，*FBP1*，*TAL2* は共にメタノール誘導性であり，*FBA1* と *TAL1*，*TKL1* は構成的発現を示した。一方，Fba2p および Tal2p は，C 末端に Ps 輸送シグナル PTS1 を持ち，GFP を付加した両タンパク質はともに Ps に局在し，Tal2p は細胞分画においても Ps に局在することが明らかとなった。

これらのことは，メタノール誘導型 Tal2p が Ps 内において TKL 活性を持つ Das1p とともに Xu5P 供給に関与している可能性を示しており，Xu5P の供給は細胞質局在の PPP 以外に Ps でも行われている可能性が示唆された。

*Pichia pastoris*, xylulose 5-phosphate, peroxisome

発表責任者：中川 智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

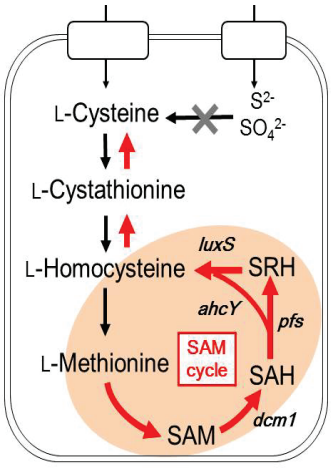
発表番号：2F138
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Bifidobacterium longum* 105-A のメチオニン利用性に関与する *S*-アデノシルメチオニン回路の解析

# Analysis of *S*-adenosylmethionine cycle involved in methionine utilization in *Bifidobacterium longum* 105-A

○松本 菜々恵[1]、小松 一喜[1]、阪中 幹祥[2]、鈴木 梓[1]、吹谷 智[1]、横田 篤[1]、和田 大[1]（[1]北大院農、[2]石川県大）
○Nanae MATSUMOTO[1], Kazuki KOMATSU[1], Mikiyasu SAKANAKA[2], Azusa SUZUKI[1], Satoru FUKIYA[1], Atsushi YOKOTA[1], Masaru WADA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】ビフィズス菌は健康増進効果を持つが、その作用機構の解析は遅れている。その解明にはビフィズス菌の代謝研究の充実が必要であるが，アミノ酸代謝、特に含硫アミノ酸に関する知見は極めて少ない。そこで我々はビフィズス菌の必須アミノ酸であると考えられてきたシステイン (Cys) に注目した。これまで、ビフィズス菌は有機硫黄源として Cys を要求するとされてきたが、一部の菌株は Cys の代わりにメチオニン (Met) を単一硫黄源として生育可能であり、Met を Cys へ代謝する逆流硫黄経路を持つ(1)。本研究では、同経路の一部である *S*-アデノシルメチオニン (SAM) 回路に着目し、遺伝子破壊実験及びプラスミドによる相補実験を行った。SAM 回路は、代謝中間体として SAM、*S*-アデノシルホモシステイン (SAH)、*S*-リボシルホモシステイン (SRH) を経由するが、SAH からホモシステインへの反応をバイパスする経路も存在する (図参照)。
【方法と結果】逆流硫黄経路を有する *Bifidobacterium longum* 105-A 株を用いて、*S*-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ (AhcY) をコードする *ahcY* の欠損株及びその相補株を作成した。欠損はプラスミドを用いた挿入変異導入により行い、相補株には *ahcY* ORF およびその上流の推定プロモーター領域を連結したベクターを導入した。その後、Cys 及び Met をそれぞれ単一硫黄源とする最少培地で培養したところ、いずれの硫黄源でも野生株と欠損株の生育に明確な差はなかった。そこで、SAH から SRH を経由してホモシステインへと代謝する経路に着目し、*S*-リボシルホモシステインリアーゼ (LuxS) をコードする *luxS* の欠損株及びその相補株を二重相同組換え法(2)及び上記の方法を用いて作成した。さらに，*luxS* 欠損株に *ahcY* 欠損を導入した二重欠損株も作成した。同様に培養したところ、*luxS* 欠損株では Met を単一硫黄源とする最少培地において、大幅な生育の低下がみられた一方、*luxS* 相補株は野生株と同程度の生育を示した。また二重欠損株ではほとんど生育がみられなかった。このことから、本株の Met 利用において SAM 回路が重要な役割を果たしていること、AhcY よりも LuxS が SAM 回路において主に機能していることが示唆された。



Cys/Met metabolism in *B. longum* 105-A

(1) 鈴木ら、2014 年度日本農芸化学会、講演番号 : 3A15p17
(2) Hirayama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78** (2012) : 4984-4994

bifidobacteria, *S*-adenosylmethionine cycle, sulfur amino acid metabolism

発表責任者：和田大（wada@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2F139
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 環境常在細菌におけるアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子 *adhX* 関与の普遍的低栄養環境適応戦略

# General strategy of environmental bacteria for adaptation toward oligotrophic conditions, in which putative alcohol dehydrogenase gene *adhX* is involved

○稲葉 慎之介、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大・院生命科）
○ SHINNOSUKE INABA, YOSHIYUKI OHTSUBO, YUJI NAGATA, MASATAKA TSUDA (Tohoku Univ.)

【背景・目的】好気性従属栄養細菌で *Alphaproteobacteria* に属する *Sphingobium japonicum* UT26 株は、環境汚染物質である有機塩素系殺虫剤γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH) を唯一炭素源として生育できる。我々は、本株のγ-HCH 分解資化能に関する研究過程で、有機炭素源非添加の無機寒天培地で $CO_2$ 固定を伴ってコロニー形成する（oligotrophic 表現型）突然変異株を複数取得した。これら突然変異株の解析から、変異による推定 Zn-dependent alcohol dehydrogenase (ADH) 遺伝子 (*adhX*) の高発現が本表現型の要因のひとつであることが示唆された。さらに、UT26 株に *adhX* 高発現プラスミドを導入した株も本表現型を示したことから、少なくとも *adhX* の高発現が本表現型の直接の要因となり得ると結論した。本研究では、*adhX* 産物の機能解明と *adhX* 関与の機構の普遍性の検討を目的とした。
【方法・結果および考察】*adhX* 完全欠失株 UT26DAX に *adhX* 高発現プラスミドを導入しても oligotrophic 表現型を示した。同様に AdhX の $NAD^+$結合モチーフに変異を導入した *adhX*_C42A, *adhX*_H43R, *adhX*_T44A 遺伝子を UT26DAX に導入高発現させたところ、*adhX*_H43R 導入株は野生型遺伝子導入株より弱い oligotrophic 表現型を示したのに対して、*adhX*_C42A と *adhX*_T44A 導入株は当該表現型を示さなかった。この結果は、大腸菌で高発現・精製した野生型 AdhX およびその変異型酵素の ethanol に対する ADH 活性の強さと相関関係があり、AdhX の ADH 活性が oligotrophic 表現型に直接関係している可能性が示唆された。また、UT26 株由来 *adhX* 高発現プラスミドを他株に導入したところ、*Alphaproteobacteria* のみならず、*Betaproteobacteria* に属する株でも oligotrophic 表現型が観察された。一方、UT26 株の *adhX* は chromosome 1 上のトランスポゾンに囲まれた領域に存在している。また、*adhX* を含む当該領域は UT26 類縁菌株にも存在し、他株ではプラスミド上に存在している場合が多く、*adhX* 領域が水平伝播しやすい領域であると示唆される。さらに、UT26 株では spontaneous な oligotrophic 突然変異株が比較的容易に取得され、不均衡変異導入法（DNA 複製のエラーを校正する機能を欠如したポリメラーゼによる高い突然変異を導入する手法）により変異率を高めた状態では、高頻度で oligotrophic 突然変異株が取得されるが、UT26DAX 株では、変異率を高めた状態でも oligotrophic 突然変異株は全く検出されなかった。以上の結果は、*adhX* が水平伝播し、かつ、高発現変異が起こりやすいことを示唆している。現在これら仮説についてさらなる検証を進めているが、*adhX* 関与の oligotrophic 表現型が環境常在細菌が有する普遍的な低栄養環境適応戦略のひとつの可能性が高いと考えている。

sphingomonads, oligotroph, carbon fixation

発表番号：2F140
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Zymomonas mobilis* の呼吸鎖の塩耐性への関与に関する解析

Analysis on involvement in salt tolerance of the respiratory chain of *Zymomonas mobilis*

○林 毅[1,2]、加藤 加藤　剛士[2]、渡壁 理志[1]、宋 原準[1]、相川 靖穂[1]（[1]別府大・食栄科、[2]別府大院・食栄研）

○Takeshi HAYASHI[1,2], Tsuyoshi KATO[2], Satoshi WATAKABE[1], Wonjoon SONG[1], Shizuho AIKAWA[1] ([1]Facul. Food Nut., Beppu Univ., [2]Grad. Sch., Food Sci. Nut., Beppu Univ.)

*Zymomonas mobilis* は通性嫌気性菌でエタノール発酵能と呼吸能を有する。これまで *Z. mobilis* の呼吸の能力が低下した呼吸欠損株（RDM 株）の単離に成功し、解析の結果 RDM 株は野生株と比較して好気や高温条件において増殖能が著しく上昇することを明らかにした。一方、以前より *Z. mobilis* 呼吸鎖は電子伝達やプロトン勾配形成の活性は十分に有するものの、それが ATP 合成に用いられていないことが知られていた。特に最近、*Z. mobilis* の複合体 V は解糖系で作った ATP を逆に加水分解しているという報告がなされた。以上の結果を勘案すると *Z. mobilis* にとって呼吸鎖は一見不要なものの様に感じるが、進化の過程で呼吸鎖が淘汰されていないことから、この呼吸鎖には呼吸以外の生理機能があるのではないかと予想した。従って本研究では *Z. mobilis* 呼吸鎖の新規生理機能の探索とそのメカニズムの解析を行った。

先ず呼吸鎖が何らかのストレス耐性付与にかかわっているのではないかと仮定し、様々なストレス存在下において RDM 株と野生株の増殖能を比較した。その結果、RDM 株は塩ストレス下において増殖能が低下していた。さらに詳細に評価するために、欠損した呼吸鎖遺伝子を RDM 株に戻し呼吸機能を補完した。すると RDM 株の塩耐性が野生株と同等のレベルに戻ったことから、*Z. mobilis* 呼吸鎖は塩耐性に関与していることが明らかとなった。そのメカニズムを解明するために、塩ストレス条件下における RDM-4 株（RDM-4 [pZA22]）とその呼吸鎖遺伝子補完株 (RDM-4 [pZANDH]) をメタボローム解析に供し、代謝産物を比較した。その結果一つの顕著な結果として、呼吸鎖の有無で酸化還元バランス（NADH/$NAD^+$比）が大きく変化していることが明らかとなった。そこで NADH/$NAD^+$比に関してさらに詳細に調べた結果、*Z. mobilis* は非ストレス下においてすべての株において NADH/$NAD^+$比が異常に低いことが分かった。一方で塩ストレス下では RDM 株の NADH/$NAD^+$比が上昇し、さらに呼吸鎖を補完するとその値が低下した。またリンゴ酸脱水素酵素の遺伝子を RDM 株に導入し人工的に細胞内の NADH 濃度を上昇させると、塩ストレス下において著しく増殖能が低下した。以上の結果から、*Z. mobilis* 呼吸鎖は塩ストレス等による酸化還元バランス（低 NADH/$NAD^+$比）の乱れを補正する役割があることが示唆された。

参考文献：　Hayashi, T. *et al*., *Microbiology*, in press.

*Zymomonas mobilis*, salt tolerance, NADH

発表責任者：林　毅（hayashi@nm.beppu-u.ac.jp）

発表番号：2F141
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# エタノールとグルコース存在下での *Acetobacter* 属酢酸菌の代謝特性

# Metabolic features of *Acetobacter* species in the presence of ethanol and glucose

○新井 博之、新井 凌、桜井 健太、石井 正治（東大院農生科）
○Hiroyuki ARAI, Ryo ARAI, Kenta Sakurai, Masaharu Ishii (Univ. of Tokyo)

【背景と目的】酢酸菌 *Acetobacter aceti* の野生株 NBRC 14818 は TCA 回路の補充経路であるグリオキシル酸経路を持つのに対し、食酢醸造に使用されている *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 等の菌株ではこの経路を欠失している。NBRC 14818 のグリオキシル酸経路遺伝子欠損株では、エタノールからの酢酸生産性は変わらないが、培地中に酢酸が長期間滞留し、酢酸生産には有利な形質となった。しかし、欠損株ではエタノールとグルコースが共存する条件で著しい生育阻害が起こった。同条件ではストレス応答遺伝子の発現が顕著に上昇しているため、何らかのストレスを生じていると考えられた。はじめからグリオキシル酸経路を持たない NBRC 14818 ではこのような生育阻害は起こらないため、食酢醸造株ではストレスを回避する仕組みが発達していると予想される。本研究では、NBRC 14818 と NBRC 3283 のゲノムおよびトランスクリプトームの比較解析により、エタノールとグルコース共存時の食酢醸造株の代謝特性を明らかにすることを目的とした。
【結果】*A. aceti* NBRC 14818、*A. pasteurianus* NBRC 3283 ともにエタノールの存在時にはグルコースの有無にかかわらず、TCA 回路関連遺伝子の発現が極度に低下した。NBRC 14818 ではピルビン酸をアセトアルデヒドに変換する pyruvate decarboxylase (*pdc*)の遺伝子発現がエタノールとグルコース共存時に顕著に上昇していたため、グルコース由来の炭素を、解糖系からピルビン酸、アセトアルデヒドを経由して酢酸に変換するオーバーフロー代謝が働いていると考えられた。グリオキシル酸経路欠損株では *pdc* の転写量がさらに増大しており、細胞内に蓄積するアセトアルデヒドがストレスの原因と予想された。NBRC 3283 では逆に、*pdc* の発現はエタノールとグルコース共存時に特異的に低下していた。NBRC 3283 のゲノムには、NBRC 14818 が持っていない pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, pyruvate oxidase, phosphotransacetylase, acetate kinase の遺伝子があり、アセトアルデヒドを経由せずにピルビン酸を酢酸に変換する経路を複数持っていた。これらの働きにより、グルコースからのオーバーフロー代謝により毒性の高いアセトアルデヒドを生成しないことが、食酢醸造株において生育阻害が起こらない原因の一つと予想された。

*Acetobacter*, glyoxylate pathway, overflow metabolism

発表責任者：新井博之（aharai@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F142
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 発酵温度と発酵期間が国産キムチの微生物群集構造に与える影響

# Effects of fermentation temperature and period on microbial community structures in Japanese Kimchi

○村岡 奈緒美[1]、天知 誠吾[1]、本間 崇[2]、中村 茉莉子[2]、柳澤 康平[2]、安藤 昭一[1]（[1]千葉大院園芸、[2]株式会社美山）
○Naomi Muraoka[1], Seigo Amachi[1], Takashi Honma[2], Mariko Nakamura[2], Kohei Yanagisawa[2], Akikazu Ando[1] ([1]Chiba Univ., [2]MIYAMA Co.,Ltd.)

【背景と目的】

キムチは白菜などの野菜を塩、唐辛子、ニンニク、魚介塩辛などと共に乳酸発酵させた食品である。キムチ中の乳酸菌は主に原材料の野菜や塩辛に由来し、原材料の種類や発酵温度、発酵期間など種々の因子が乳酸菌群集構造を変化させ、製品の味や品質に影響を与えるものと考えられる。キムチの発酵が進行すると乳酸菌が産生する乳酸により pH が低下する。しかしながら pH が 4.0 以下まで低下すると、酸味が強すぎ過発酵とされる。本研究では、より安定的なキムチの製造プロセスの確立を目的として、発酵温度と発酵時間が微生物群集構造に与える影響を解析した。

【方法】

3 種類の国産キムチ（A、B、C）を 4°C および 15°C で 4 週間発酵させた。適宜サンプリングを行い、pH 測定と乳酸菌の計数を行った。乳酸菌の単離は GYP 培地を用いて 15 °C で行った。単離した乳酸菌は、16S rRNA 遺伝子に基づき簡易同定を行った。また培養に依存しない方法として、PCR-DGGE による群集構造解析も行った。

【結果】

15 °C で発酵させたキムチでは発酵の進行と共に pH が急速に低下し、1～2 週間で pH4.0 を下回った。一方、4 °C で発酵させた場合は発酵期間を通じて pH4.8 程度を維持し、過発酵は認められなかった。キムチの pH 低下と乳酸菌数には相関があり、15 °C で発酵させたキムチでは 1 週目で $10^8$ CFU $g^{-1}$ と高い乳酸菌数が確認されたが、4 °C 発酵では 4 週目でも $10^4$～$10^5$ CFU $g^{-1}$ 程度と顕著に低い乳酸菌数が維持されていた。PCR-DGGE 解析の結果、15°C 発酵では 1 週目に多数の明瞭なバンドが確認されたのに対し、4°C 発酵では 3 週目まで明瞭なバンドが現れなかった。発酵最終日までに、いずれの発酵温度においても *Lactobacillus plantarum, Lb. sakei, Lb. curvatus* の優占が確認された。また、15°C 発酵させたものでは *Lb. brevis* の優占も確認された。培養法により、PCR-DGGE において優占が確認された乳酸菌の他に *Leuconostoc citreum* や *Lb. coryniformis* が単離された。以上の結果より、キムチの発酵温度は乳酸菌の存在量とキムチの品質に大きく影響を与えることがわかった。特に、4°C で発酵させた国産キムチは比較的高い pH を維持し続け、過発酵を引き起こさないことが明らかとなった。

Kimchi, Lactic acid bacteria, Over fermentation

発表番号：2F143
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 国産キムチの容器膨張・白点化に及ぼす酵母の影響

# Effect of yeasts on the expansion of packages and the white colony formantion in Japanese Kimchi

○鈴木 彩香[1]、大宮 亜沙美[1]、天知 誠吾[1]、本間 崇[2]、中村 茉莉子[2]、柳澤 康平[2]、安藤 昭一[1]（[1]千葉大院・園芸、[2]美山）
○AYAKA SUZUKI[1], Asami Omiya[1], Seigo Amachi[1], Takashi Honma[2], Mariko Nakamura[2], Kohei Yanagisawa[2], Akikazu Ando[1] ([1]Chiba Univ., [2]MIYAMA Co., Ltd.)

【背景と目的】キムチは白菜などの野菜を塩、唐辛子、魚介塩辛などと共に乳酸発酵させた食品である。キムチ中の微生物は主に原材料の野菜に由来し、原材料の種類や発酵温度、発酵期間など種々の因子が群集構造を変化させ、製品の味や品質に影響を与えるものと考えられる。キムチ中には乳酸菌と共に酵母も普遍的に存在し、風味や香気成分の産生に貢献する一方で、ガス発生による容器の膨張、白色コロニー（白点化）やバイオフィルムの形成など望ましくない現象の原因ともなっている。しかしこれら現象の原因となる酵母の同定や優占メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、キムチの容器膨張と白点化に着目し、原因となる酵母の特定とキムチ中での優占メカニズムの解明を試みた。
【方法】保存中に容器の膨張したキムチから YPD 培地を用いて酵母の分離を行った。また培養に依存しない方法として、26/28S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域をターゲットとした PCR-DGGE を行い、優占種の推定を行った。人為的にキムチの白点化を再現するため、3 種類の国産キムチを調製後、4℃または 15℃で最大 8 週間発酵させた。白点化やバイオフィルムの形成が認められたキムチから直接酵母を単離し、26/28S rRNA 遺伝子に基づき簡易同定を行った。
【結果】容器の膨張したキムチから分離した 10 株の酵母は、全て *Kazachstania exigua* と同定された。*K. exigua* の優占は PCR-DGGE でも確認された。一方、調製した 3 種類の国産キムチを 4℃または 15℃で発酵させたところ、15˚C では 1 週目で酵母の生菌数が $10^6$ CFU $g^{-1}$ 以上となり白点化が確認された。また、白点化したキムチをさらに発酵させるとバイオフィルム形成が認められた。一方、4℃で発酵させると 4 週目までは低い生菌数（$10^3$ CFU $g^{-1}$ 以下）を維持したものの、その後急激な生菌数の増加が見られ、白点化・バイオフィルム形成する試料が現れた。15℃で発酵したキムチから酵母を分離・同定したところ *K. exigua* が多く分離された。一方、4℃で発酵したキムチでは白点化前には *Candida picinguabensis*、*Trichosporon middelhovenii*、*Debaryomyces hansenii* などが分離されたのに対し、白点化後は *C. pseudohumilis*、*C. sake* が多く分離された。純粋菌株を用いた生育実験より、K. exigua は低 pH や酸味料製剤への強い耐性を持つものの、4℃では生育できないことが明らかになった。以上のことより、キムチ製品の温度管理が不十分な時 *K. exigua* による容器膨張や白点化が発生することが示唆された。一方、低温で適正に管理された製品でも、保存期間が長期化すると低温耐性の酵母により白点化が起こると考えられた。

Kimchi, White colony fomation, Kazachstania exigua

発表番号：2F144
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Corynebacterium glutamicum* の native membrane におけるグルタミン酸排出チャネルの機能解析
Characterization of mechanosensitive channels for glutamate export in *Corynebacterium glutamicum* native membrane

中山 義敬[2]、○駒澤 光祐[1]、橋本 賢一[1]、川崎 寿[1]、Martinac Boris[2] ([1]東電大院・物質工、[2]Victor Chang Cardiac Research Institute)
Yoshitaka Nakayama[2], ○Kosuke Komazawa[1], Ken-ichi Hashimoto[1], Hisashi Kawasaki[1], Boris Martinac[2] ([1]Tokyo Denki Univ., [2]Victor Chang Cardiac Research Institute)

グルタミン酸の工業生産株である *Corynebacterium glutamicum* は、メカノセンシティブチャネルの一種である NCgl1221 チャネルを通じて細胞内で合成されたグルタミン酸を菌体外に排出する。メカノセンシティブチャネルは細胞膜張力により開孔することが知られている。このチャネルタンパク質は比較的大きな張力で開孔する MscL と、それより小さな張力で開孔する MscS に大別することができる。NCgl1221 チャネルは大腸菌由来の MscS と相同性があるが、C 末端側に機能未知のドメインが存在する為、特異な開孔機構を有する可能性がある。我々はパッチクランプ法を用いた電気生理学的解析により *C. glutamicum* の細胞膜を利用した NCgl1221 チャネルの開孔機構を解析することを可能とした。パッチクランプ法とは電極を内包したピペットに細胞膜を直接アクセスさせ、細胞膜を介したイオンの移動を電流値としてリアルタイムに記録する手法である。原核微生物を対象としたパッチクランプを行うためには、対象となる細胞の巨大スフェロプラストを調製する必要があるが、これまで *C. glutamicum* における巨大スフェロプラストは調製することができなかった。

我々は *C. glutamicum* にみられる特徴的な細胞表層構造であるミコール酸層の定着抑制剤を添加した条件で培養した細胞を、細胞壁加水分解酵素で処理することで巨大スフェロプラストを調製することに成功した。

インサイドアウトの状態で *C. glutamicum* の巨大スフェロプラスト由来の細胞膜をパッチピペットに固定し、ピペット内に陰圧をかけることで細胞膜に張力をかけたところ、NCgl1221 チャネル及び MscL と考えることができる二種類の圧力依存的な電流を記録した。NCgl1221 チャネルによる電流はピペット内に正の電圧をかけた場合の方が負の電圧をかけた場合よりも大きくなることから、NCgl1221 を介したイオンの移動には整流性があることが明らかとなった。また、NCgl1221 チャネル開閉の閾値変化が電圧に依存するか解析したところ、100 mV 以上の電圧をかけた条件では開孔速度と比較して閉孔速度が遅くなることが明らかとなった。

*C. glutamicum* における NCgl1221 チャネルはイオンの移動に整流性があり、電圧依存的に閉孔速度が遅くなる。これらの特性が *C. glutamicum* による高効率グルタミン酸生産に貢献していることが予想される。

*Corynebacterium glutamicum*, mechanosensitive channel, Patch clamp

発表番号：2F145
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分子動力学シミュレーションを用いた Tween 40 による Corynebacterium glutamicum のグルタミン酸過剰生成誘導機構における機械刺激応答の解析

# Analysis of mechanosensing mechanism in the induction mechanism of glutamate production using Tween 40 in Corynebacterium glutamicum using molecular dynamics simulations

○澤田 康之[1]、橋本 賢一[2]、中松 亘[2]、曽我部 正博[3]、川崎 寿[2] ([1]名大院医、[2]東京電機大工、[3]名大医メカノバイオロジー)
○Yasuyuki SAWADA[1], Ken-ichi HASHIMOTO[2], Tsuyoshi NAKAMATSU[2], Masahiro SOKABE[3], Hisashi KAWASAKI[2] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Denki Univ., [3]Mechano Biol. Nagoya Univ.)

【背景および目的】
工業的なグルタミン酸の生産に用いられているCorynebacterium glutamicumは通常の生育条件では細胞外にグルタミン酸を蓄積することはないが、界面活性剤Tween 40を添加することで生育が抑制され、細胞外にグルタミン酸を蓄積する。Tween 40添加によるグルタミン酸過剰生成条件では菌体の脂肪酸含量が低下していることなどが既に報告されているが、その作用点は未だ明確ではない。近年、この微生物のNCgl1221遺伝子がグルタミン酸の過剰生成に深く関与していることが示された。我々はこれまでの研究で、このNCgl1221遺伝子産物が膜張力に依存して開口するメカノセンシティブチャネルであること、ATPなどのエネルギーを使わず、濃度勾配のみによりグルタミン酸を通過させることを明らかにしてきた。本研究はこれまで明確に示されてこなかったTween 40の作用点を解析し、グルタミン酸過剰生成誘導との関係について検討することを目的とした。

【方法及び結果】
通常の生育条件下でのC. glutamicumの脂肪酸（残基）の95%以上はパルミチン酸とオレイン酸である。Tween 40添加によるグルタミン酸生産条件では非グルタミン酸生産条件と比較し、オレイン酸含量が約41%低下し、パルミチン酸とオレイン酸の含量の総量に関しても全体で約25%減少する結果となった。我々は、Tween 40添加が引き起こす脂肪酸組成変化ならびに脂肪酸の総量がグルタミン酸過剰生成に及ぼす影響を検討するため、脂肪酸総量を通常の濃度に対して25%減少させた細胞質膜のモデルを作成し、細胞質膜の脂肪酸総量が変化することでグルタミン酸排出担体であるメカノセンシティブチャネルの開口にどのような影響があるか分子動力学シミュレーションを行った。その結果、脂肪酸の総量を減らした脂質膜内の機械受容チャネルは減らす前の脂質膜内のそれより開口しやすくなった。さらにその開口挙動の差異は、パルミチン酸とオレイン酸の組成比の違いでより明確になる脂質膜物性の違いを考察できた。よって、メカノセンシティブチャネルは脂肪酸総量の違いで開口挙動が影響され、さらに組成比の違いがその差異を強調させると考えられる。

mechanosensitive channels, glutamate production, molecular dynamics simulations

発表責任者：澤田　康之（ysawada@med.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2F146
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 還元力高産生コリネ菌におけるリジン発酵中の NADPH/NADP$^+$比の測定

# Intracellular NADPH/NADP$^+$ ratio during lysine production by *Corynebacterium glutamicum* with *Streptococcus mutans* -type redox metabolism

○堀 一将[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Kazumasa HORI[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

ミュータンス菌（*Streptococcus mutans*）は、コリネ菌（*Corynebacterium glutamicum*）と異なり、ペントースリン酸経路で NADPH を産生できない。その代わり、解糖系で NADPH を産生できる。我々は、これまで、その特異な解糖系をコリネ菌内で構築してきた。具体的には、ミュータンス菌の NADP 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapN）で解糖を行うことができる菌株（RE2A$^{iol}$ 株）を造成した。この菌株は、自前の NAD 型グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GapA）を発酵の初期だけ補助的に発現させられるシステムも兼ね備えている。この RE2A$^{iol}$ 株の性能をリジン発酵で検証した結果、発酵の遅延なく、親株を有意に凌ぐリジン生産能が示された。さらに、その高いリジン生産能にペントースリン酸経路の酸化的代謝が不要であることも確かめられ、ペントースリン酸経路に依存しないリジン発酵が成立することも実証された。今回、その仕組みが、狙い通り、宿主の還元力高産生能によることを裏付けるため、リジン発酵中の菌体を用いて、細胞内の NADPH/NADP$^+$比を測定した。GapA で解糖を行う対照株のリジン発酵中の NADPH/NADP$^+$比が 0.3 付近であるのに対し、RE2A$^{iol}$ 株では 0.5～0.6 と有意に高い値を示した。さらに、その高値はペントースリン酸経路の遮断株（Δ*zwf*）でも維持されていた。従って、解糖系で還元力を産生する育種株の細胞内は、ペントースリン酸経路の代謝の有無に関わらず、対照株に比べて高い還元状態にあり、これがリジン高生産を可能にしていると考察された。

*Corynebacterium glutamicum*, Nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, NADPH/NADP$^+$ ratio

発表番号：2F147
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂肪酸合成経路に着目したビオチン生産菌の分子育種

# Metabolic engineering of the fatty acid-biosynthetic pathway for biotin production

○長島 尭[1]、大下 政一[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Takashi NAGASHIMA[1], Masakazu OHSHITA[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

我々はコリネ菌を題材に脂肪酸へのカーボンフローを高めるための技術開発を行っている。その狙いの一つは、脂肪酸のカーボンを下流にあるビオチンへ転換することである。これまでに我々は、ビオチン要求性微生物であるコリネ菌に異種細菌の *bioF*と *bioI*を導入することで、ビオチン要求性の解除に成功している。これを受け、今回、上流の脂肪酸合成経路上のカーボンフローをいかに高めることがビオチンの高生産に結びつくのか、その方法論を導くための分子育種を試みた。宿主は、野生株から育種したビオチン非要求性で、かつ、糖からビオチンバイタマーを微量ながら分泌する EBbio1L-1 株を用いた。野生株で脂肪酸合成のリプレッサー遺伝子 *fasR*を破壊すると脂肪酸合成系遺伝子群が同時に脱抑制されて遊離脂肪酸の分泌が起こることから（既報告）、まず、EBbio1L-1 株で *fasR* を破壊したところ、バイタマー生産量が逆に低下するという予想外の結果になった。この育種株は確かに脂肪酸を分泌するようになっていることから、遊離脂肪酸の生成が何らかの理由でビオチン合成に不利に働くのではと推察した。対策として、脂肪酸合成経路上の 2 種の鍵酵素、すなわち、アセチル-CoA カルボキシラーゼ（ACC)と脂肪酸合成酵素（FAS）を別々に増強することを考えた。ACC は複合タンパク質で、*accBC* 産物、*accD1* 産物、そして *accE* 産物の 3 種コンポーネントより構成されている。その内の主要遺伝子 *accBC* と *accD1* を構成発現型プロモーター支配下で発現するように多コピーベクターにクローン化して、各々、pCaccBC$^{PgapA}$、pCaccD1$^{PgapA}$を取得した。次いで、ACC のすべてのコンポーネント遺伝子を併有するプラスミド pCaccBCDE$^{PgapA}$ を造成した。もう一方の鍵酵素 FAS は巨大な多機能酵素であり、コリネ菌はそれを 2 種類もつ。その両遺伝子 *fasA* および *fasB* は共に全長 9 kb に及ぶ。これらをクローン化し、各々、pCfasA、pCfasB を得た。まず、野生株ベースで上記 5 種プラスミドの導入効果を検討したが、いずれにも遊離脂肪酸の生成は認められなかった。次いで、これらプラスミドのビオチンバイタマー生産に及ぼす影響を調べたところ、pCaccBCDE$^{PgapA}$、pCfasA、および pCfasB にバイタマーの明らかな増産効果が認められた。 これらのプラスミドは野生株に遊離脂肪酸の生成を惹起できなかったが、そのことが却ってビオチン合成には好都合に働いた可能性がある。以上の結果は、脂肪酸合成系の改良がビオチン生産に繋がることを示した初めての例である。

*Corynebacterium glutamicum*, Fatty acid biosynthesis, Biotin biosynthesis

発表番号：2F148
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ピメリン酸バイオアッセイ系の開発

# Pimelic acid-bioassay system using pimelic acid low-requiring mutants of *Corynebacterium glutamicum*

○川上 春佳[1]、加藤 崚介[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1]([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Haruka KAWAKAMI[1], Ryosuke KATO[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

前報で脂肪酸合成系の改良がビオチンバイタマー生産に繋がることを示したが、その生産量（μg/L オーダー）はコリネ菌が生産できる脂肪酸生産量（mg/L オーダー）と比べると著しく低い。従って、脂肪酸経路上のカーボンをいかにしてビオチン経路に流すかが次の課題である。脂肪酸経路からビオチン経路へのカーボン流入量をピメリン酸（ビオチン経路の入り口に位置するピメロイル-CoA の分解物）で評価できないかと考え、ピメリン酸を簡便に検出するためのバイオアッセイ系の開発を試みた。ポイントは、低濃度のピメリン酸で生育応答する指示菌の開発である。コリネ菌野生株に大腸菌の *bioF* を導入すると、ビオチンの要求性がピメリン酸で代替され、ピメリン酸要求性を示すが、ピメリン酸要求量は 10 g/L と極めて高く、バイオアッセイに供するには要求量を $10^{-4}$ 以下（1 mg/L 以下）に下げる必要があると判断された。自然変異でピメリン酸要求量の低下した変異株を順次誘導した結果、最終的に、ピメリン酸濃度 0.1 mg/L で生育する高感度な菌株を取得した。この菌株には、さらに、Δ*bioY* 変異および Δ*ppc* 変異を導入して、低濃度のビオチンやオレイン酸に反応しないよう工夫を加えた。本株を指示菌としたバイオアッセイのモデル実験で、ピメリン酸を 1 mg/L のオーダーまで定量できることを確認した。全ゲノム解析で本指示菌の変異点を同定した結果、ピメリン酸の効率的利用に繋がる新規変異を 3 種見いだした。これらの変異がピメリン酸要求量を低下させるメカニズムについても考察する。

*Corynebacterium glutamicum*, Pimelic acid, Bioassay

発表番号：2F149
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ菌におけるピメリン酸分泌株の取得

# Pimelic acid production by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum*

○加藤 峻介[1]、川上 春佳[1]、三橋 敏[2]、竹野 誠記[1]、池田 正人[1] ([1]信州大農・応生科、[2]協和発酵バイオ)
○Ryosuke KATO[1], Haruka KAWAKAMI[1], Satoshi MITSUHASHI[2], Seiki TAKENO[1], Masato IKEDA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Kyowa Hakko Bio)

一部の細菌では、μg/L のレベルながらピメリン酸が菌体外に蓄積するとの報告がある。従って、コリネ菌においてもピメロイル-CoA が細胞内に蓄積すれば、遊離のピメリン酸として菌体外へ排出されるのではと考えた。コリネ菌野生株から育種したビオチン非要求株 EBbio1L-1 はビオチンバイタマーを微量分泌するので、ピメロイル-CoA 直下の *bioF* を遮断すれば、ピメリン酸の分泌が起こる可能性がある。その検証を行ったが、前演者が開発したバイオアッセイでピメリン酸を検出できなかった。脂肪酸経路からピメロイル-CoA への供給能を高めるため、同反応に与る BioI 酵素に注目して、その発現を高める改良を試みた。*bioI* は枯草菌由来であるため、コリネ菌のレアコドンを多く含む。そこで、アミノ酸コドンを枯草菌型からコリネ菌型に最適化し、これをコリネ菌の強力プロモーター支配下に配したプラスミドを造成した。このプラスミドを上記 *bioF* 遮断株に導入し、グルコース培地で培養した上清をピメリン酸バイオアッセイに供したところ、ピメリン酸の分泌を示すハロが観察された。それがピメリン酸であることを LC/MS/MS 分析でも確認した。その蓄積量は過去の報告を上回る mg/L のレベルであった。以上から、コリネ菌は遊離のピメリン酸を、バイオアッセイで検出可能なレベルで糖から生産できることが示された。このピメリン酸分泌株の取得とバイオアッセイ系の開発により、脂肪酸経路からビオチン経路へのカーボン流束を、ピメリン酸をメルクマールに評価できる系を構築することができた。

*Corynebacterium glutamicum*, Pimelic acid production, BioI

発表番号：2F150
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# クエン酸シンターゼの活性低下が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響

# The effect of reduced citrate synthase activity on lysine production in *Corynebacterium glutamicum*

○愛甲 徹、柳瀬 真紀、佐藤 桃梨、和田 大、横田 篤（北大院農）
○Tohru AIKOH, Masaki YANASE, Tori SATOH, Masaru WADA, Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

【背景】オキサロ酢酸（OAA）はリジンやスレオニンを始めとしたアスパラギン酸属アミノ酸の前駆体である．我々は *Corynebacterium glutamicum* における OAA の供給増大に向けた代謝改変を行い，リジン生産の効率化を目指している．過去にランダム変異によって取得されたアスパラギン酸キナーゼ（AK）のフィードバック阻害（FBI）解除型（$AK^{fbr}$）のリジン生産株には，OAA の供給増大が期待できるピルビン酸キナーゼ（PYK）の欠失変異（ΔPYK），ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）の FBI 解除変異（$PEPC^{fbr}$），クエン酸シンターゼ（CS）の活性低下変異（$CS^{Low}$）が含まれていた [(1)]．そこで，我々は分子生物学的手法を用いて，*C. glutamicum* ATCC13032 へ $AK^{fbr}$ を導入した株を親株とし，ΔPYK および $PEPC^{fbr}$ がリジン生産に与える影響を解析した．その結果，ΔPYK は単独ではわずかなリジン生産の増加しかもたらさなかったが，$PEPC^{fbr}$ をバックグランドとした場合，明確にリジン生産の増加に寄与することを示した [(2)]．本研究では，さらなる OAA の供給増大に向けて，$CS^{Low}$ がリジン生産に与える影響を解析した．

【方法】*C. glutamicum* ATCC 13032 $AK^{fbr}$/ ΔPYK/ $PEPC^{fbr}$（DR2）株を親株として，二重相同組み換え法により，$CS^{Low}$ を導入し，*C. glutamicum* ATCC 13032 $AK^{fbr}$/ ΔPYK/ $PEPC^{fbr}$/ $CS^{Low}$（DRL2）株を構築した．これらを 2 L 容ジャーファーメンターを用いて培養し，発酵特性の解析を行った．

【結果】DRL2 株では生育が低下し，リジン生産量は約 20%増加した．$CS^{Low}$ の導入により，OAA およびピルビン酸が蓄積し，それらはリジン生合成に速やかに消費されたため，リジン生産が増加したと考えられた．したがって，$CS^{Low}$ は ΔPYK および $PEPC^{fbr}$ との共存でリジン生産の増加に寄与することが明らかになった．また，OAA 周辺の酵素活性を測定したところ，ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ（PEPCK）の活性は DR2 株と同様に低下していた．一方，DR2 株で見られたリンゴ酸：キノン酸化還元酵素（MQO）および呼吸活性の低下は DRL2 株では，観察されなかった．

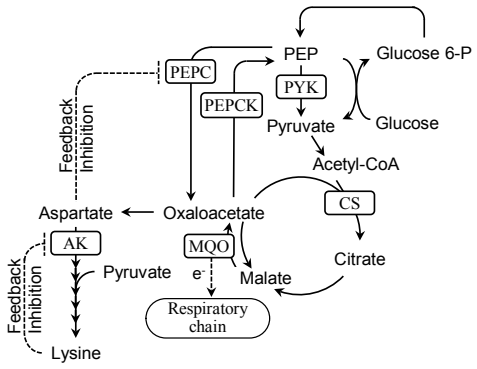



Fig. Lysine biosynthesis pathway in *C. glutamicum*

（1）Shiio, I., *et al*., *Agric. Biol. Chem*., **51**（1987）：2485‐2493
（2）横田ら，2015 年度　日本農芸化学会，講演番号：2A37p10

*Corynebacterium glutamicum*, Lysine production, Citrate synthase

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2F151
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# リンゴ酸デヒドロゲナーゼ欠失が *Corynebacterium glutamicum* のリジン生産に与える影響

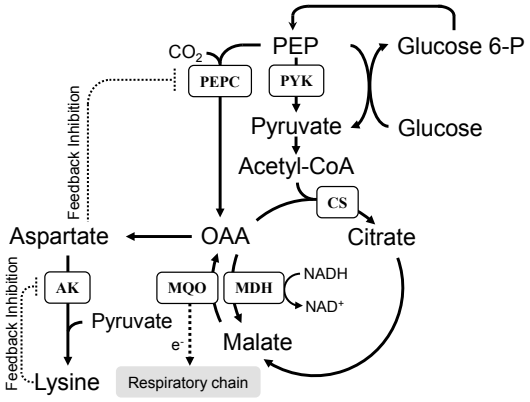
# The effects of malate dehydrogenase gene deletion on lysine production in *Corynebacterium glutamicum*

○佐藤 桃梨、柳瀬 真紀、愛甲 徹、和田 大、横田 篤（北大院農）
○Tori SATOH, Masaki YANASE, Tohru AIKOH, Masaru WADA, Atsushi YOKOTA (Hokkaido Univ.)

【目的】
オキサロ酢酸（OAA）はリジンやスレオニンを始めとしたアスパラギン酸属アミノ酸の前駆体であり，我々は *Corynebacterium glutamicum* において OAA 供給強化に向けた代謝改変を行い，物質生産の効率化を目指している．これまで我々は，OAA 供給を強化すると考えられる 3 つの変異，ピルビン酸キナーゼ欠失（ΔPYK）変異，ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼのフィードバック阻害解除（$PEPC^{fbr}$）変異，クエン酸シンターゼの活性低下変異（$CS^{low}$）に着目し，リジン生産の効率化を目指してきた．これらの変異をすべて組み合わせた三重変異株は，単変異株・二重変異株と比較して最も高いリジン生産能力を示し，OAA の供給強化はリジン生産に効果的であることが確認されている．本研究では更なる OAA 供給を目指し，新たにリンゴ酸デヒドロゲナーゼ（MDH）に着目した．MDH は TCA 回路で OAA からリンゴ酸への反応を触媒する酵素で， ΔMDH 変異の導入は OAA の流出を防ぐことができると考えられる．本研究では，ΔMDH 変異がリジン生産に与える影響を解析した．

【方法】
*C. glutamiucm* ATCC 13032 にアスパラギン酸キナーゼのフィードバック阻害解除（$AK^{fbr}$）変異を導入したリジン生産株（P 株）と，同生産株に ΔPYK 変異，$PEPC^{fbr}$ 変異，$CS^{low}$ 変異を導入した三重変異株（DRL 株）を親株として用いた．二重相同組換え法により ΔMDH 変異を導入し，構築した株をそれぞれ M, DRLM 株とした．これらの 4 株を 2 L 容ジャーファーメンターを用いて，リジン生産培地で培養し，その発酵特性の解析を行った．

【結果】
M, DRLM 株はそれぞれの親株と同等の生育・糖消費を示した．またリジン生産量についても大きな変化は見られず，ΔMDH 変異のリジン生産に対する寄与は小さいことが示唆された．MDH はリンゴ酸：キノン酸化還元酵素（MQO）とのカップル反応により，呼吸鎖と連動した NADH の再酸化系を形成していることが報告されている．現在は ΔMDH 変異が生育・糖消費・リジン生産に大きな影響を与えなかった原因について，呼吸との関連も含め解析中である．



The central metabolism pathway leading to lysine formation in *C. glutamicum*

*Corynebacterium glutamicum*, Lysine production, Malate dehydrogenase

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2F152
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

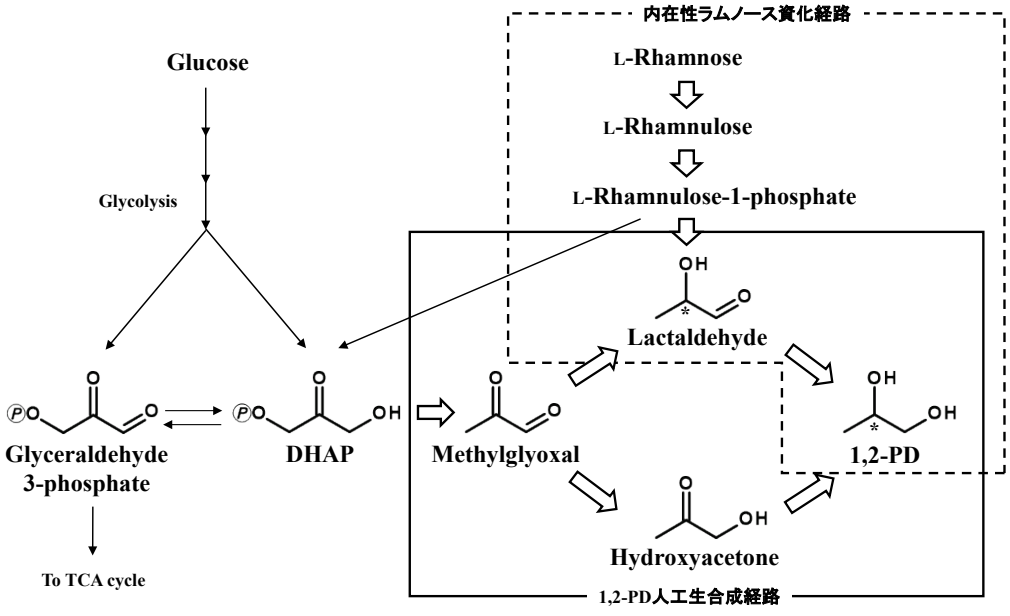
# 組換え大腸菌を用いたキラルな 1,2-プロパンジオール発酵生産に関する研究

# Fermentative production of chiral 1,2-propanediol using recombinant *Escherichia coli*

○河済 真也、松原 充、山田 尚平、鳴滝 藍、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Shinya KAWASUMI, Mitsuru MATSUBARA, Shohei YAMADA, Ai NARUTAKI, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】近年のエネルギー問題を受けて、化石資源依存型社会から資源循環型社会への変革を目指し、バイオマスから燃料や化成品を生産する試みが行われている。1,2-プロパンジオール (1,2-PD) は不斉炭素原子を有する化合物であり、*R* 体は液晶や医薬品、抗菌剤の重要合成原料として用いられている。現在、キラルな 1,2-PD は石油資源から得られているが、バイオマスからの生産が可能になれば、再生可能資源の有効利用、$CO_2$ 排出量の削減という面において、大きな効果が期待できる。そこで本研究では、*Escherichia coli* を用いてグルコースあるいはラムノースを出発原料としたキラルな 1,2-PD 生産を目指した。

【方法と結果】ラムノースは未利用バイオマスの一つであるペクチンの構成糖であり、*E.coli* の内在性ラムノース資化経路 (下図) によって 1,2-PD とジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) に変換される。従って、野生株の *E.coli* を用いたラムノースを出発原料とした 1,2-PD 発酵生産を行ったところ、好気的な培養において光学純度 > 99.9 %ee の(*S*)-1,2-PD の生産が確認された。一方、野生株の *E.coli* はグルコースから 1,2-PD を生産することができないため、グルコースを出発原料とする場合は DHAP から 1,2-PD へ至る人工生合成経路 (右図) の導入を検討した。1,2-PD 人工生合成経路を導入し、さらに 1,2-PD 収率低下の原因となる酵素遺伝子を破壊した組換え *E.coli* を用いて好気的な培養を行ったところ、光学純度 95.1 %ee の (*R*)-1,2-PD の生産が確認された。現在、光学純度および 1,2-PD 生産量・収率を高めるための種々の生産培養条件を検討している。




metabolic engineering, 1,2-propanediol, *Escherichia coli*

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2F153
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 組換え大腸菌を用いたグルコースを出発原料とする 1-プロパノール発酵生産に関する研究

# Metabolic engineering of *Escherichia coli* for fermentative production of 1-propanol from glucose

○山田 尚平、松原 充、浦野 信行、藤居 実咲、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○ SHOHEI YAMADA, MITSURU MATSUBARA, NOBUYUKI URANO, MISAKI FUJII, MICHIHIKO KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】1-プロパノール(1-PrOH)は、多目的な溶媒や汎用ポリマーであるポリプロピレンの原料として利用できる化合物である。微生物を用いて、バイオマスから 1-PrOH を生産することができれば、ポリプロピレンをバイオマスから得ることが可能になる。
先行研究により、下図のようなグルコースを出発原料とし、解糖系中のジヒドロキシアセトンリン酸から 1-PrOH へ至る人工生合成経路を導入した組換え大腸菌を用いることにより、グルコースから 1-PrOH の発酵生産が可能になった。本研究では、1-PrOH 発酵生産において、収率低下の原因と考えられる大腸菌内在性の酵素遺伝子を破壊した変異株を用いて、培養における通気条件が 1-PrOH 生成量・対糖変換率にどのように影響するかを調べた。
【方法・結果】通気条件の検討として、培地量を変えた試験管培養を行った。その結果、NPA105(*ΔgloA*, *ΔaldA*, *ΔldhA*, *ΔtpiA*)変異株を用いた嫌気条件において 1-PrOH 対糖変換率は最も高くなった。しかし、嫌気条件下では生育が悪く、グルコース消費量が減少した。好気条件では、生育度が高くグルコース消費量が増加したが、1-PrOH 対糖変換率は低下し、同時に、1-PrOH 生合成経路中間物質であるヒドロキシアセトンの蓄積が見られた。次に 300 ml 容のジャーファーメンターを用い、空気と窒素ガスを一定の比率に設定して通気しながら培養を行った。その結果、空気のみを通気した条件では多量のヒドロキシアセトンの蓄積が見られ、1-PrOH 対糖変換率も低くなった。また、窒素のみを通気した条件では菌体の生育が悪く、グルコース消費量が少なかった。そこで、空気と窒素を様々な比率で混合して通気したところ、空気が多い通気条件において 1-PrOH 生成量が最も高くなった。以上のことから、1-PrOH 発酵生産には培養時の通気条件が大きな影響を与えることが示された。

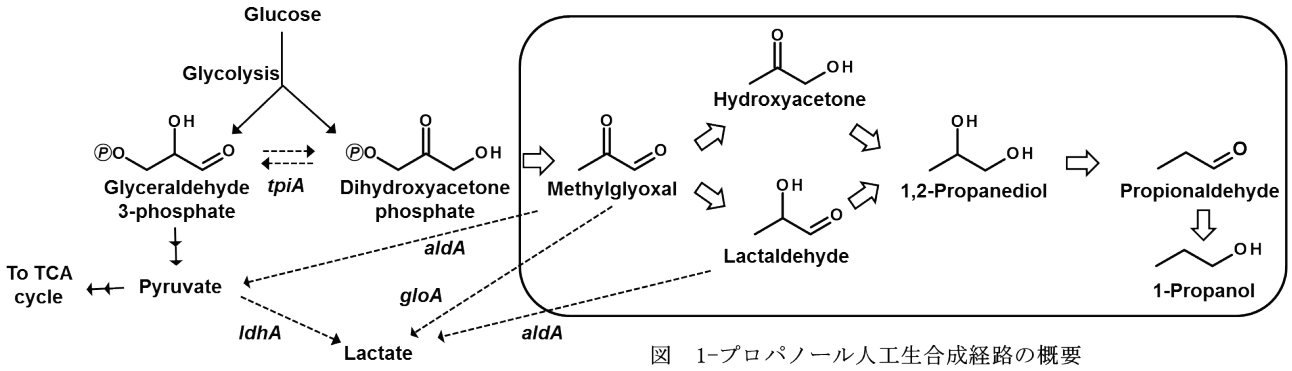


図　1-プロパノール人工生合成経路の概要

metabolic engineering, 1-propanol, *Escherichia coli*

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2F154
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

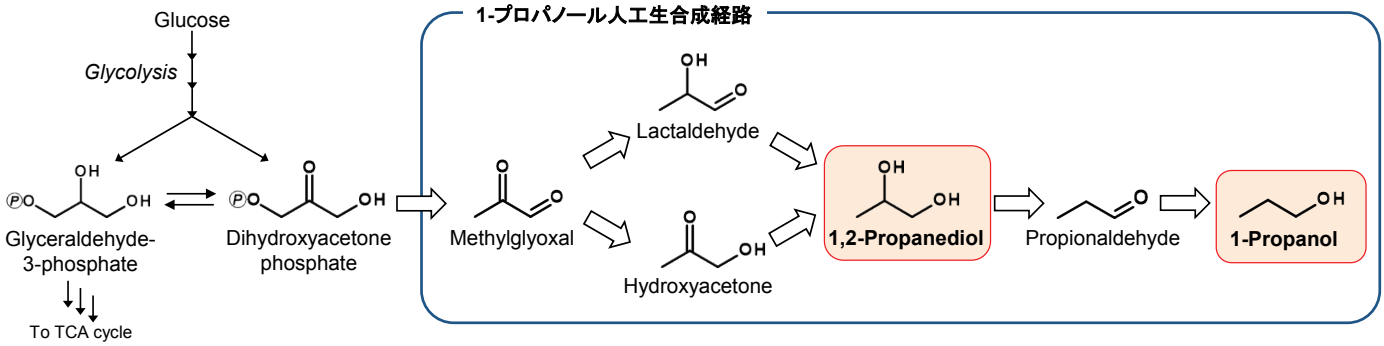
# 1-プロパノール発酵生産のための酵素遺伝子発現系の解析

# Analysis of enzyme gene expression systems for the 1-propanol fermentation

○松原 充、浦野 信行、山田 尚平、藤居 実咲、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Mitsuru MATSUBARA, Nobuyuki URANO, Shohei YAMADA, Misaki FUJII, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】1-プロパノールは代表的な汎用ポリマーであるポリプロピレンの単量体であるプロピレンに容易に変換できる化合物であり、近年、バイオポリマー原料としての価値が注目されている。これまでの研究により、人工的に設計した生合成経路（下図）を導入した組換え *Escherichia coli* によって、グルコースからの 1-プロパノール発酵生産が可能となった。しかし、継代的な培養を繰り返すことで 1-プロパノール生成量が減少し、生合成経路の中間物質である 1,2-プロパンジオール（1,2-PD）の蓄積が観察された。そこで本研究では、安定した 1-プロパノール生産を可能にすることを目的とし、1,2-PD から 1-プロパノールへの変換反応を触媒する酵素の発現系に関する解析を行った。

【方法と結果】本生合成経路は 2 つのプラスミドから構成され、一方は解糖系中のジヒドロキシアセトンリン酸から 1,2-PD への変換反応を、もう一方は 1,2-PD から 1-プロパノールへの変換反応を触媒する酵素遺伝子群を含むプラスミドである。1,2-PD の蓄積の原因を特定するため、本研究では 1,2-PD から 1-プロパノールへの変換反応を触媒する酵素遺伝子群を含むプラスミドのみを *E. coli* に導入した。得られた複数のクローンを 1,2-PD を含む培地で培養したところ、1-プロパノールを生成する株と生成しない株が見られた。そこで、各株が保持するプラスミドの塩基配列を解析したところ、1-プロパノール生成の可否に関わらず、いくつかの株の保持するプラスミドに対してトランスポゾン *Tn1000* の挿入が確認された。さらなる解析の結果、トランスポゾン *Tn1000* の挿入はプラスミド上の TA 含量の多い領域で無作為に発生し、特に 1,2-PD からプロピオンアルデヒドへの変換を触媒するジオール脱水酵素遺伝子内に挿入が生じた場合、酵素の発現が正常に行われず、1,2-PD から 1-プロパノールへの変換能力を消失することが明らかとなった。現在、プラスミドに対するトランスポゾン *Tn1000* の挿入を回避した発現系の構築を検討中である。




metabolic engineering, 1-propanol, *Escherichia coli*

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2F155
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Halomonas* sp. KM-1 を用いた(*R*)-3-ヒドロキシ酪酸およびピルビン酸生産における代謝シフトに関する検討

# Analysis on metabolic shift of *Halomonas* sp. KM-1 in (*R*)-3-hydroxybutyrate and pyruvate productions.

○西村 拓[1]、松下 功[1]、坪田 潤[1]、河田 悦和[2] ([1]大阪ガス、[2]産総研・バイオメディカル)
○Taku NISHIMURA[1], Isao MATSUSHITA[1], Jun TSUBOTA[1], Yoshikazu KAWATA[2] ([1]Osaka Gas Co., Ltd., [2]Biomed. Res. Inst., AIST)

我々は好塩、好アルカリ性細菌 *Halomonas* sp. KM-1 株を用いたバイオ素材の生産技術開発に取り組んでいる。好気条件下、グルコースを炭素源、硝酸塩あるいは尿素を窒素源として本菌株の培養を行うと、菌体内に生分解性プラスチック poly-(*R*)-3-hydroxybutyrate (PHB)を蓄積する。この PHB を蓄積した菌体を好気条件から微好気条件にシフトすると、PHB は速やかに分解され、その構成モノマーである(*R*)-3-hydroxybutyrate (3HB)に変換され菌体外に分泌される(1)(2)。一方、硝酸塩を窒素源とした好気培養時において、過剰量の硝酸塩を培地に供給することにより、PHB の蓄積が抑制され、代わりにピルビン酸が菌体外に分泌するユニークな現象を見出している。このような非組み換え菌を用いた培養条件の違いによる 3HB とピルビン酸の選択的生産は他に例が無く、その代謝調節メカニズムに興味が持たれる。
本研究では、これら代謝シフトのメカニズムを明らかにすることを目的として、好気条件における PHB 蓄積時、微好気条件における 3HB 分泌時、好気条件におけるピルビン酸生産時の細胞における糖代謝、ピルビン酸代謝、PHB 合成経路、硝酸・亜硝酸代謝等に関与する酵素遺伝子群の発現比較解析、また、これら生産条件間における主要代謝物質の分析を行った結果について報告する。

(1) Kawata Y, Ando H, Matsushita, I, Tsubota J., Bioresour Technol. 2014 156:400-403.
(2) Kawata Y, Nojiri M, Matsushita, I, Tsubota J., Lett Appl Microbiol. 2015 61(4):397-402.

*Halomonas*, (*R*)-3-hydroxybutyrate, pyruvate

発表番号：2F156
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

異なる窒素供給下の *Halomonas* sp. KM-1 によるピルビン酸の分泌生産
Effective secretion of pyruvate from *Halomonas* sp. KM-1 under different nitrogen condition
○河田 悦和[1]、坪田 潤[2]、松下 功[2]、西村 拓[2]([1]産総研・バイオメ、[2]大阪ガス・エネ技研)
○Yoshikazu Kawata[1], Jun Tsubota[2], Isao Matsushita[2], Taku Nishimura[2] ([1]AIST, Biomed. Res. Inst., [2]OSAKA GAS CO., LTD., Energy Technol. Lab.)

（概要）我々は好塩好アルカリ・*Halomonas* sp. KM-1 株を用いて、化成品中間体を生産する研究を実施している。KM-1 株は、培養に酵母エキス等を要せず、Ｃ５糖や廃グリセロールを資価し、中程度の高塩濃度、pH9-10 で好適に生育するため、雑菌の混入が生じにくく、大量のエネルギーが必要な培地などの滅菌が不要です。今回、菌体中にバイオプラスチックＰＨＢ合成を促進する過程で、ＰＨＢ合成が抑制され、ピルビン酸を分泌する条件を見出したので報告する。
（方法と結果）炭素源としてグルコース、窒素源として、硝酸ナトリウム、尿素をそれぞれ用い、33℃、37℃、40℃で培養し、菌体および培地組成を分析した。尿素を用いた場合、すべての培養温度で、菌体内にＰＨＢが蓄積し、上清には、40℃においてピルビン酸の分泌が見られた。一方、硝酸ナトリウムを用いた場合は、33℃では、尿素と同じく菌体内にＰＨＢの蓄積が見られ、ピルビン酸分泌は見られなかった。一方、37℃及び 40℃では、培養初期は、ＰＨＢの蓄積が見られたが、その後、ＰＨＢの蓄積が停滞し、代わってピルビン酸を 48 時間の培養で、63.3 g/L の濃度、1.32 g/L·h の生産速度で分泌することを見いだした。ハロモナス菌において、ピルビン酸生産の報告はなく、また、好塩・好アルカリ微生物による有機酸の生産は、その生理メカニズムの観点からも興味深いものと思われ、現在その生産メカニズムについて、代謝物の変化も含め検討を行っている。

*Halomonas*, Pyruvate, Biorefinery

発表責任者：河田悦和（y-kawata@aist.go.jp）

発表番号：2F157
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Halomonas* sp. KM-1 とその変異体を用いたピルビン酸生産の検討
Optimization of pyruvate production by *Halomonas* sp. KM-1 and its mutants

○岡本 成平[1,2]、中薗 沙也佳[1]、武井 靖子[1,2]、倉本 華歩[1]、辻 彩花[1]、新川 悠一[1]、西村 拓[3]、松下 功[3]、坪田 潤[3]、河田 悦和[4]、東 慶直[1]([1]近大・生物理工、[2]JST・ALCA、[3]大阪ガス、[4]産総研・バイオメディカル)
○Naruhei OKAMOTO[1,2], sayaka Nakazono[1], Yasuko TAKEI[1,2], Kaho KURAMOTO[1], Ayaka TSUJI[1], Yuichi NIIGAWA[1], Taku NISHIMURA[3], Isao MATSUSHITA[3], Jun TSUBOTA[3], Yoshikazu KAWATA[4], Yoshinao AZUMA[1] ([1]BOST Kindai Univ., [2]JST・ALCA, [3]Osaka Gas Co., [4]Biomed. Res. Inst., AIST)

好塩好アルカリ性細菌の一種であるハロモナス菌 *Halomonas* sp.KM-1 は、スピルリナ培養時のコンタミ菌として分離された(1)。本菌は好気条件で菌体内に生分解性プラスチック Polyhydroxybutyrate(PHB)を高効率で生産し蓄積する。好気条件から微好気条件へと酸素供給量をシフトさせると、PHB のモノマーである 3-Hydroxybutyrate(3HB)が培養液中に高濃度に蓄積する (2)。本菌の培養には炭素源となる糖以外にはアミノ酸やビタミンなどの有機物が不要であり、高アルカリ条件下において速やかに増殖し、OD600 が 100 程度までの高密度となる。本菌の培養では、通常の発酵生産で必要とされる滅菌処理が不要であり、物質生産においては低コスト・低エネルギーでの産業化が期待される。また、通常では資化困難な C5 糖キシロースやアラビノースでの生育、3HB の生産も可能であることが分かってきた(3)。

一方、この *Halomonas* sp.KM-1 菌を好気的条件で培養した場合、培養液中に高濃度のピルビン酸が蓄積することが確認された。ピルビン酸はファインケミカルの重要な中間体であり、現在は、酒石酸を硫酸水素ナトリウム存在下で加熱乾留する化学工業的方法などにより製造されている。本研究では、ピルビン酸を環境への負荷の少ない微生物発酵で、より安価に生産する方法の開発を目的として、ピルビン酸合成における最適な培養条件を検討するとともに、*Halomonas* sp.KM-1 菌の変異株ライブラリーを作製し、ピルビン酸の高効率生産菌の分離を試みた。まず、簡便な培養条件では、10%グルコースを炭素源とすると約 2 日間の好気培養で 2%程度のピルビン酸が培地中に蓄積し、続く 2 日間の培養でほぼ消失した。炭素源とする糖の選択や培養温度の検討により、ある炭素源を利用した場合にはグルコースでは増殖困難な 45 度でも増殖が可能で、同時に 5%以上のピルビン酸を蓄積した。この条件下で、温度感受性変異体や糖代謝変異体など約 100 株の変異体を用いてピルビン酸合成の最適化を検討した。本研究大会では具体的な本発酵条件を紹介し、環境への負荷の少ないピルビン酸などの発酵に関してご議論頂きたい。

(1)Kawata Y and Aiba S. Biosci Biotechnol Biochem.2010;74(1):175-7.
(2)Kawata Y, Ando H, Matsushita I, Tsubota J. Bioresour Technol. 2014 ;156:400-403.
(3)Kawata Y, Nojiri M, Matsushita I, Tsubota J. Lett Appl Microbiol. 2015 ;61(4):397-402.

*Halomonas*, pyruvate, (*R*)-3-hydroxybutyrate

発表番号：2F158
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* の非イオン性界面活性剤添加培養による遊離脂肪酸の高効率分泌

# High Efficient Secretion of Free Fatty Acids from *Aspergillus oryzae* by Supplementation of Non-Ionic Surfactants to the Culture Medium

○玉野 孝一、三浦 愛、小池 英明、神坂 泰、梅村 舞子、町田 雅之（産総研生物プロセス）
○Koichi TAMANO, Ai MIURA, Hideaki KOIKE, Yasushi KAMISAKA, Myco UMEMURA, Masayuki MACHIDA (AIST)

微生物の生産する遊離脂肪酸やその誘導体は、医薬品・バイオ燃料・農薬やその原料等に利用が期待される。そこで我々は、物質分解と合成の能力に優れた麹菌を用いて、代謝工学的な遺伝子改変を駆使することにより、遊離脂肪酸を高生産する技術開発を進めてきた。その結果、アシル CoA 合成酵素遺伝子を破壊することで、野生型の 9.2 倍に遊離脂肪酸生産性を向上させることができた。しかし、遊離脂肪酸は菌体内に蓄積されるため、実際にこれを利用するには多大な労力と費用をかけて菌体を破砕する必要があった。一方、もし遊離脂肪酸が分泌されれば、菌体破砕は行わなくて良い。そこで、麹菌に遊離脂肪酸を分泌させる技術開発に取り組んだ。
酵母では、アシル CoA 合成酵素遺伝子を破壊すると、標準的な液体培地での培養で遊離脂肪酸は分泌されるようになる。そのため、麹菌の当破壊株も、例えば細胞膜の透過性を高めるといった細胞表層に作用する可能性のある何らかの刺激を与えると、遊離脂肪酸は分泌されるようになるのではと推察した。このような考えで複数の条件を麹菌当破壊株で試した結果、非イオン性界面活性剤存在下での培養の間、菌は正常に生育すると共に、遊離脂肪酸が培地に分泌されるようになることを見出した。この分泌量は、遊離脂肪酸の全生産量の 80%以上に相当した。しかし、この分泌化は麹菌野生株でも共通して行われたことから、遺伝子破壊と無関係であった。現在、この分泌化の機構を解析している。

Free fatty acid secretion, Non-ionic surfactant, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：玉野　孝一（tamano-k@aist.go.jp）

発表番号：2F159
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 2,3-ブタンジオール高生産出芽酵母株の構築

# Construction of metabolically engineered Saccharomyces cerevisiae strains producing 2,3-butandiol

○松田 史生[1]、伊田 賢吾[3]、木下 翔平[1]、森田 啓介[1]、石井 寛子[1]、富田 淳美[1]、石井 純[2]、近藤 昭彦[1]、清水 浩[3] ([1]阪大情報、[2]神戸大自科、[3]神戸大工)
○Fumio Matsuda[1], Kengo Ida[3], Shohei Kinoshita[1], Keisuke Morita[1], Hiroko Ishii[1], Atsumi Tomita[1], Jun Ishii[2], Akihiko Kondo[1], Hiroshi Shimizu[3] ([1]Osaka Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の優れた特性を生かした有用物質生産を行うには、*S. cerevisiae* の代謝経路を改変して、エタノール生合成経路を遮断し、有用物質生合成経路を活性化する必要がある。そこで本研究では、2,3-ブタンジオール生産株の構築を目指して、鍵反応となるアセト乳酸合成酵素 (ALS) の選抜を行い、さらにピルビン酸脱炭酸酵素 (PDC) およびエタノール脱水素酵素 (ADH) をコードする遺伝子を多重欠損したエタノール非生産株への導入を行った。
【方法】*S. cerevisiae* YPH499 株、PDC 欠損変異株(YSM046, YPH499 *MTH1-ΔT pdc1Δ pdc5Δ pdc6Δ*実験室進化株), ADH 欠損変異株 (S149, BY4739 *adh1Δ adh2Δ adh3Δ adh4Δ adh5Δ sfa1Δ*)に酢酸リチウム法を用いてベクターを導入した形質転換体を構築した。ALS 活性はクレアチン及び 1-ナフトールを用いた比色法で行なった。発酵性試験は 20 g/L のグルコースを炭素源とする 5 mL の SD 培地を用い、30℃、150rpm で培養を行った。培養開始から 72-96 時間目の培養液を回収し、ガスクロマトグラフィーで 2,3-ブタンジオール濃度を測定した。中心代謝物濃度はイオンペア LC-MS 法を用いて測定した。
【結果】PDC および ADH をコードする遺伝子を多重欠損したエタノール非生産株の中心代謝中間体濃度を計測した。その結果、2,3-ブタンジオール生合成前駆体であるピルビン酸の蓄積が起きていなかったことから、2,3-ブタンジオール高生産には、高活性な ALS を用いてピルビン酸を引き抜く必要があると推測した。そこで、原核細菌由来を中心とする計 16 種類の ALS から高活性なものをスクリーニングした。他生物種由来の ALS を発現した *S. cerevisiae* YPH499 株から粗酵素液を調整し、ALS 活性を比較したところ、*Lactobacillus plantarum* 及び *Thermobifida fusca* 由来の ALS (AlsLp、Als1Tf) の活性が高く、とくに ALSLp が極めて高い活性を示した。そこで、コドン最適化した *ALSLpOp* 遺伝子を導入した YPH499 株を構築し、発酵試験を行なったところ 403 mg/L の 2,3-ブタンジオール生産が見られた。さらに *L. lactis* 由来のアセト乳酸脱炭酸酵素（ALDC）をコードする *ALDCLlOp* 遺伝子および酵母由来の *BDH1* 遺伝子を追加導入した株は、810 mg/L の 2,3-ブタンジオールを生産した。そこで、PDC および ADH 欠損株に、これらの遺伝子を導入した YHI030 および YHI041 株を構築した。粗の結果、発酵開始 96 時間後の 2,3-ブタンジオール濃度は 7.7g/L および 3.1g/L まで大幅に向上した。YHI030 株は高密度培養条件下で 50g/L のグルコースから 20 g/L 以上の 2,3-ブタンジオールを生産した。本研究の一部は NEDO 若手グラントの支援を受けた。

Saccharomyces cerevisiae, 2,3-butandiol, metabolic engineering

発表責任者：松田史生（fmatsuda@ist.osaka-u.ac.jp）

発表番号：2F160
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 紙パルプの同時糖化発酵によるカフェ酸の微生物生産

# Microbial production of caffeic acid by simultaneous saccharification and fermentation of kraft pulp

○川口 秀夫[1]、勝山 陽平[2]、ト タンヤオ[2]、鶴田 祥子[1]、南 博道[3]、荻野 千秋[1]、大西 康夫[2]、近藤 昭彦[1] ([1]神戸大院・工、[2]東大院・農生命科学、[3]石川県大・資源研)
○ Hideo KAWAGUCHI[1], Yohei Katsuyama[2], Danyao Du[2], Sachiko Nakamura-Tsuruta[1], Hiromichi Minami[3], Chiaki Ogino[1], Yasuo Ohnishi[2], Akihiko Kondo[1] ([1]Kobe Univ., [2]Univ. Tokyo, [3]Ishikawa Pref. Univ.)

【背景と目的】フェニルプロパノイドなどの芳香族化合物は、ポリエステルなど従来の脂肪族ポリマーより高い耐熱性と物理強度を有する、芳香族バイオポリマーの構成原料として注目されている。フェニルプロパノイドの一種であるカフェ酸は、遺伝子組換え菌によるグルコースからの発酵生産がすでに報告されているが、再生可能資源であるバイオマスからの発酵生産についてはこれまでに報告がない。そこで本研究では、セルロース系バイオマスを原料とするカフェ酸の生産プロセスを構築することを目的に、カフェ酸代謝経路を導入した組換え大腸菌を作製し、紙パルプをモデルバイオマスとする糖化後発酵（separate hydrolysis and fermentation, SHF）と同時糖化発酵（simultaneous saccharification and fermentation, SSF）によるカフェ酸生産を検討した。

【結果と考察】チロシン高生産型大腸菌を宿主に、放線菌由来のアンモニアリアーゼと *Pseudomonas* 属由来のモノオキシゲナーゼの発現ベクターを導入し、グルコースを基質とするカフェ酸の生合成経路を構築した。ろ紙と紙パプルを用いて酵素糖化溶液を調製し、作製した組換え大腸菌によるカフェ酸の SHF を検討した。96 時間培養後のカフェ酸濃度は、紙パルプ糖化液を炭素源とした場合は 3 mg/L であり、ろ紙糖化液を炭素源とした場合（6 mg/L）の半分であった。紙パルプ糖化液の SHF では、カフェ酸の前駆体であるクマル酸がろ紙糖化液の SHF よりも顕著に蓄積しており、紙パルプ原料における発酵阻害の可能性が示唆された。そこで、この発酵阻害を軽減するため、SSF によるカフェ酸の生産を検討した。SSF では、セルラーゼを 2.5 FPU/g biomass の濃度で添加した際、SHF よりも顕著に高いカフェ酸の生産性が認められた（約 250 mg/L）。SSF におけるカフェ酸の収率は、セルラーゼの添加濃度に反比例して顕著に低下した。そこで、バッチ培養における初期グルコース濃度がカフェ酸収率に与える影響を調べた結果、グルコース濃度とカフェ酸収率は負の相関関係を示した。以上の結果より、セルロース系バイオマスからカフェ酸を効率的に発酵生産するためには、SSF で認められるグルコース供給の律速条件を設定することの有効性が明らかとなった。

【謝辞】本研究は、科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業（CREST）「二酸化炭素資源化を目指した植物の物質生産力強化と生産物活用のための基盤技術の創出」および、文部科学省「植物 CO2 資源化研究拠点ネットワーク（NC-CARP）」の支援を受けて実施した。

*E.coli*, caffeic acid, simultaneous saccharification and fermentation

発表責任者：近藤　昭彦（akondo@kobe-u.ac.jp）

発表番号：2F161
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 希少糖が *Acetobacter aceti* による酢酸発酵に及ぼす影響

# Effect of rare sugar on acetic fermentation of *Acetobacter aceti*

○吉田 大地、小川 綾子、小川 雅廣、早川 茂（香川大農）
○Daichi YOSHIDA, Ayako OGAWA, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA (Kagawa Univ.)

**1. 目的**：希少糖は自然界に微量にしか存在しない単糖及びその誘導体である。希少糖に様々な機能が見出されている。D-Fructose（D-Fru）の C-3 エピマーである D-Psicose（D-Psi）はノンカロリーであり、食後血糖値上昇抑制、抗う蝕作用といった健康機能を有している。D-Glucose（D-Glu）の C-3 エピマーである D-Allose（D-All）は活性酸素生産抑制作用や抗癌作用などの健康機能が報告されている。このような健康機能から希少糖は食品への応用が期待されている。しかし、希少糖が発酵食品の製造において中心的な役割を果たす発酵微生物に対してどのような影響を及ぼすか、その基礎的な知見が不足している。先行研究において D-Psi は酵母菌が行うアルコール発酵に対しては影響を及ぼさなかったが、酢酸菌が行う酢酸発酵は阻害したことを示した。本研究では D-Psi 他の希少糖が酢酸発酵に対してどのような影響を及ぼすかを調べた。

**2. 方法**：酢酸発酵には *Acetobacter aceti*（NBRC14818）を用いた。実験に用いた希少糖は D-Psi および D-Tagatose（D-Tag）、D-Sorbose（D-Sor）、L-Sorbose（L-Sor）、D-All である。また、対照として *A. aceti* が資化できない D-Fru を用いた。酢酸発酵におけるこれらの糖の影響を調べるために、各糖の終濃度を 5 または 10%になるように添加した培養液（酵母エキス、ハイポリペプトン、エタノール）に *A. aceti* を播種し、28℃で 5 日間、往復振盪培養を行った。また、糖濃度 0%のものを Ct として用意した。培養後の酢酸生成量、糖濃度、エタノール残存量を調べた。

**3. 結果**：酢酸発酵において D-Fru および、いずれの希少糖も資化されず残存していた。糖濃度 5%においては、いずれの糖においても酢酸生成量において Ct と比較して 80%以上の酢酸生成量が確認された。また、エタノールは残存していないことも確認された。しかし糖濃度 10%においては D-Fru では Ct の 95%の酢酸生成量が確認されたが、D-Psi では 56%、D-Tag では 48%、D-Sor では 72%、L-Sor では 39%、D-All では 13%の生成量しか確認されなかった。また、エタノールは D-Fru では残存していなかったが希少糖ではいずれも残存していることが確認された。以上の結果より *A. aceti* は希少糖を資化しないことが分かった。そして、培養液中に希少糖が 10%存在すると酢酸発酵が阻害されることが確認された。また、希少糖の種類によって発酵阻害の程度が異なることが明らかになった。

Rare sugar, *Acetobacter aceti*, acetic fermentation

発表責任者：吉田大地（5.daichi.0817@gmail.com）

発表番号：2F162
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 簡易型サイロにおける酸素濃度とサイレージ発酵品質の検討

# Investigation between oxygen concentration and silage fermentation quality on small rice grain silo

○木村 俊之[1]、大澤 玲[2]、川野 和男[3]、上垣 隆一[4] ([1]中央農業総合研究センター、[2]埼玉県農業技術研究センター、[3]日本化薬フードテクノ（株)、[4]動物衛生研究所)
○Toshiyuki KIMURA[1], Ryo OSAWA[2], Kazuo KAWANO[3], Ryuichi UEGAKI[4] ([1]NARO Agricultural Research Center, [2]Saitama Agricultural Technology Research Center, [3]Nippon Kayaku Food Techno Co., Ltd., [4]NARO National Institute of Animal Health)

【目的】現在、サイレージ等の発酵飼料は、ロールベールやフレコンバック、ドラム缶等の簡易型サイロで調製・貯蔵することが主流となっている。これらは完全な密閉状態を保つことが困難な事から若干の外気が進入している。そのために、現状はサイレージの不良発酵やかびの発生などが生じ、商品価値と栄養価が大きく損なわれ問題となっている。演者らは飼料用米サイレージ作成において、サイロ中の酸素濃度と発酵品質をモニターし、発酵品質を高め、カビの発生を抑制する技術開発を行ったので報告する。

【方法と結果】2014 年に茨城県つくばみらい市で完熟期に収穫された「べこあおば」の籾米を飼料用カッターにて破砕し、籾米の破砕物を調製した。水分量が 30 重量%になるように加水し乳酸菌（*L. planturum* chikuso-1）接種しよく混合した。これを 1L 容のポリプロピレン製広口ボトルに①満杯につめたもの、②上部から 8 割程度つめたものを作成し、a)各々フタをしっかりしたもの、b)フタにピンホールを開けた条件を分け、さらに各条件にたいし、i)無添加 、ii)エタノール製剤、iii)脱酸素剤、iv)エタノール製剤＋脱酸素剤　を添加した系で（①、②）、（a、b）、（i、ii、iii、iv）の組み合わせの条件を各 3 本、計 48 本を調製し 20℃で、57 日間発酵、貯蔵を行った。貯蔵期間中、毎日目視によりカビの発生を観察し、酸素濃度をモニターした。貯蔵終了後開封し、発酵破砕米（サイレージ）容器上部表面部と容器内部からサンプリングし、pH、微生物数、有機酸濃度を測定した。その結果、容器上部に空間を設け、エタノール製剤、脱酸素剤を添加したものはカビを抑制し、乳酸／酢酸比、並びに pH を指標とする発酵品質が向上、安定化することが分かった[1,2]。また現場を想定し、25L 規模のドラム缶、フレコンバッグでの実証試験を行った結果も報告する。

1）**木村ら、発酵飼料の製造方法、**特願 2015-158301
2）**木村ら、発酵飼料製造用改善剤、及び発酵飼料の製造方法、**特願 2015-158307

rice grain silage, mildew-proof, deoxygenating agent

発表責任者：木村俊之（kmr@affrc.go.jp）

発表番号：2F163
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 超音波洗浄器を用いた米麹中の各種酵素の迅速抽出

# Extraction of enzymes contained in rice koji using ultrasonic cleaner

○三木 功次郎、中谷 美智、石丸 裕士、北村 誠 (奈良高専)
○Kojiro Miki, Misato Nakatani, Hirohito Ishimaru, Makoto Kitamura (Natl. Inst. Tech. Nara Col.)

【目的】国税庁所定分析法において固体麹からの酵素の抽出は，固体麹に塩化ナトリウム溶液を加えて，一定時間静置する静置抽出法とワーリングブレンダーにより抽出するホモジナイズ抽出法がある。本研究では，超音波洗浄器を用いて，簡便かつ迅速な米麹からの酵素抽出を試みた。

【方法】超音波抽出法として，バイアル瓶に米麹と0.5%NaCl含有酢酸ナトリウム緩衝液(10 mM, pH5.0)を入れ，超音波洗浄器(本多電子，W-113 MK-Ⅱ，100 W，発振周波数24 kH)で一定時間超音波処理した。これをろ過したものを酵素液とした。また，従来法である国税庁所定法による静置抽出法は，米麹に上記と同様に酢酸ナトリウム緩衝液を加え，20℃でときどき振り混ぜながら3時間静置して，ろ過したものを酵素液とした。α-グルコシダーゼ活性は，我々が開発したα-アルブチン(ヒドロキノン-α-D-グルコピラノシド)を基質とする電気化学的測定法を用いた[1)]。糖化力，アミラーゼ活性，酸性カルボキシダーゼ活性は，キッコーマンバイオケミファ(株)製の測定キットを用いた。

【結果】各種麹をサンプルとして，超音波抽出法で抽出されるα-グルコシダーゼ活性を指標として，超音波処理時間を検討した。α-グルコシダーゼ活性一定となるまでに必要な時間は60分であった。超音波処理する際，超音波洗浄器槽内のバイアル瓶の位置による抽出効率の変化は約5%であった。また，60分の超音波処理により，槽内の水温は約15℃上昇した。この程度の温度上昇は酵素活性に影響がなかった。20種類の米麹について，超音波抽出法と静置抽出法により抽出したα-グルコシダーゼ活性との相関を調べたところ，両者にはよい相関があった。糖化力，アミラーゼ活性，酸性カルボキシダーゼ活性についても同様によい相関が得られた。超音波洗浄器を使用することで，国税庁所定法(20℃，3時間静置抽出)と比べて抽出時間を1/3に短縮することが可能であった。

1) 三木功次郎他，分析化学，55，p. 925～929(2006)

rice Koji, ultrasonic cleaner, extraction

発表責任者：三木功次郎（miki@chem.nara-k.ac.jp）

発表番号：2F164
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 清酒麹における混合培養系を用いたグルコアミラーゼ生産

# Glucoamylase production of co-culture system on sake brewing

○竹藤 春香[1]、二宮 純子[1]、森田 洋[2]([1]北九大院、[2]北九大)
○Haruka TAKEFUJI[1], JUNKO NINOMIYA[1], HIROSHI MORITA[2] ([1]Grad. Sch. Univ. kitakyushu, [2]Sch. Univ. kitakyushu)

【目的】

一般的に、黄麹菌*Aspergillus oryzae* を使用して清酒醸造が行われる。清酒醸造は、麹菌の糖化酵素による原料デンプンの糖化と酵母によるアルコール発酵が同時に進行する並行複発酵式をとるため、糖化酵素のなかでもグルコアミラーゼ(GA)活性の大小が、モロミ発酵速度大きな影響を与える。さらに、吟醸酒などの高品質な清酒を醸造する場合には、麹の GA 活性が高いことが必要である。そこで、モロミ中のグルコース濃度が高濃度に保たれると香気成分の生成が促進されるからである。しかし、*Aspergillus* 属菌は一般的に α-アミラーゼ生産性が高い一方で、GA 生産性は低い。そこで、これまでに日本の麹造りには用いられてこなかったGA生産が高い菌株として知られる*Rhizopus* 属菌に着目し、本研究では、*Aspergillus* 属菌 と *Rhizopus* 属菌の混合培養を行うことによる GA 活性の増強を目的として研究を行った。

【実験方法】

麹の製造は原料米に精米率 70 %の酒造好適米( 山田錦、熊本 ) 300 g を用い、使用菌株は氷上吟醸タイプ No. 6081B ( *A. oryzae* ,株式会社 秋田今野商店)と *Rhizopus oryzae* NBRC 4716 とした。それぞれの胞子懸濁液 15 mL ( 終濃度 $2.5\times10^4$ spores/substrate ) を蒸米に同時に接種した。始めの 20 h は温度 31 ℃、湿度 90 %で培養し、培養 25 h 以降は温度 38 ℃、湿度 85 %で培養した。

GA 活性は GOD 法を用いて測定した。可溶性デンプンから 40 ℃で 60 min に 1 mg のグルコースを生成する活性を 1 U と定義した。

【結果】

培養 45 h において、混合培養麹の GA 活性は *A. oryzae* 純粋培養麹の GA 活性より低い活性を示した。そこで、培養時間を延長したところ混合培養麹の GA は最大活性 88 U/g-substrate を示し、*A. oryzae* 純粋培養麹の最大活性より、増強した( *A. oryzae* : *R. oryzae* = 1:1, 70 h )。続いて、*Aspergillus* 属菌と *Rhizopus* 属菌の最適初発胞子数比を検討した。結果、*A. oryzae* : *R. oryzae* = 1 : 1 または 1 : 10 の最大活性が *A. oryzae* 純粋培養麹の最大活性よりも高い活性を示した( *A. oryzae* : *R. oryzae* = 1 : 10, 70 h, 57 U/g-substrate )。混合培養による初発胞子数比は酵素生産に影響し、最適な混合比により酵素活性が増強する可能性を示した。

glucoamylase, Rhizopus, co-culture

発表番号：2F165
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 米及び麦を培養基質とした液体麹における白麹菌の培養条件の構築

# Construction of liquid culture condition for white *koji* mold using rice or barley as culture substrate

○井 菜々子[1]、三貝 咲紀[1]、二宮 純子[1]、森田 洋[2]([1]北九大院、[2]北九大)
○Nanako I[1], Saki Mikai[1], Junko Ninomiya[1], Hiroshi Morita[2] ([1]Grad. Sch. Univ. Kitakyushu, [2]Univ. Kitakyushu)

【目的】

焼酎麹製造で、原料には米や麦が用いられ、原料の違いは糖化や発酵に影響を及ぼす。また、一般的に麹菌には *Aspergillus kawachii* が用いられる。麹菌の培養方法は、原料に菌の胞子を接種する固体培養法、および原料と栄養源を添加した液体培地に菌の胞子を接種する液体培養法がある。しかし、液体培養法ではアルコール発酵に必要な耐酸性 α-アミラーゼ( Aα-A )の生産性が著しく低く、醸造分野においては多種多量の酵素を生産できる固体培養法が選択されている。そこで本研究では、液体培養法に着目し、米及び麦を培養基質とした牛乳添加した場合における *A. kawachii* の Aα-A 活性の増強について検討を行った。

【方法】

菌株に *A. kawachii* NBRC 4308 を使用した。この菌株の胞子懸濁液( $1.0\times10^7$ spores/ g-substrate )を改変 SLS 液体培地（基本培地組成：米粉 1 %、$K_2HPO_4$ 0.1 %、KCl 0.1 %、トリプトン 0.6 %、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 0.05 %、$FeSO_4\cdot7H_2O$ 0.001 %、$ZnSO_4\cdot7H_2O$ 0.0003 %、$CaCl_2$ 0.021 %、クエン酸 0.33 % ）に接種し、30 ℃、200 rpm で 72 h 振とう培養を行った。また液体培地の米粉を粉砕した麦に置換した培地も同様に培養した。培養後、培養液 100 mL をろ過し、ろ液は粗酵素液とした。粗酵素液の Aα-A の測定を α-アミラーゼ測定キット（キッコーマンバイオケミファ株式会社）を用いて分析し、1 min に培養液 1 mL が 1 μmol の CNP を遊離した時を 1 単位( U )として定義し、基質 1 g あたりの酵素活性( U/g-substrate )に換算した。

【結果】

米粉を培養基質として牛乳を添加した液体培地により *A. kawachii* の培養を行った結果、Aα-A は 964 U/g-substrate と高い活性が得られた。また、大麦（精麦歩合 85 % ）を培養基質とした場合でも Aα-A は 547 U/g-substrate と高い活性が得られた。そこで、Aα-A 活性の増強因子の探索を行った結果、米粉を培養基質とした培地で $K_2HPO_4$ を 1.0 g /100 mL-substrate、KCl を 0.1 g/100 mL-substrate を添加した場合で 690 U/g-substrate の高い活性が認められた。また、大麦（精麦歩合 85 % ）を培養基質とした培地でも $K_2HPO_4$ を 1.5 g /100 mL-substrate、KCl を 0.1 g/100 mL-substrate を添加した場合で 525 U/g-substrate の高い酵素活性が認められた。以上のことから本液体培地を使用した焼酎製造の技術開発の可能性が示唆された。

*Aspergillus kawachii*, liquid culture, saccharification

発表番号：2F166
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 改変大腸菌によるプトレッシンの生産

# putrescine production by engineered *Escherichia coli*

○入江 加奈子、鈴木 秀之（京都工繊大院応生）
○Kanako IRIE, Hideyuki SUZUKI (Kyoto Institute of Technology Univ.)

【目的】2012 年で US 220 億ドルだったポリアミドの世界市場は年々増加傾向にあり、2018 年には 270 億ドルに届くと見込まれる。ポリアミンの一種であるプトレッシン（1, 4-ジアミノブタン）は、4 つの炭素をもつ直鎖ジアミンであり、その構造の特徴から、ナイロン 4, 6 やナイロン 4, 10 のようなポリマーの合成に利用することができる。現在、プトレッシンは主として化学合成法によって作られているが、従来の合成法では、有限な資源である石油を原料としている点、猛毒物質や高圧水素を用いるために生産に危険が伴う点が問題点であった。本研究ではこれらの問題点を克服すべく、大腸菌 *E. coli* を用いたプトレッシンの発酵生産を目指した。大腸菌の細胞内には元々プトレッシンが数十 mM という高濃度で存在する。代謝工学的手法を用いて大腸菌のプトレッシン合成能を向上させることを目的として、プトレッシンの合成に関わる酵素の発現条件を検討した。

大腸菌におけるプトレッシンの合成経路には、オルニチンを基質とする経路とアルギニンを基質とする経路が知られている。本研究では、アルギニンがアグマチン、プトレッシンに変換される経路に着目した。アルギニン脱炭酸酵素（SpeA）とアグマチン分解酵素（SpeB）の発現条件を比較検討するとともに、グルタミン酸を *N*-アセチルグルタミン酸に変換する *N*-アセチルグルタミン酸合成酵素（ArgA）のアルギニンによるフィードバック阻害の解除を試みた変異をもつ *argA* を多コピープラスミドから発現させることについての効果を調べた。また、同じプラスミド上から SpeC も発現させることで細胞外プトレッシン濃度が高くなると予想して、この仮説についても検証した。

【方法】プトレッシンがコハク酸やスペルミジンへ代謝されないように、各代謝経路の遺伝子（*patA potE puuA speD speG*）を欠損させた。多コピープラスミドを用いて、強力な T5 プロモーターもしくは穏やかな *lacI* プロモーターから、アルギニン脱炭酸酵素 SpeA とアグマチン分解酵素 SpeB を発現させた。同じプラスミド上に、アルギニンによるフィードバック阻害を脱感作した *argA* をクローニングした。作成した菌株を LB 培地で培養し、培養液を経時的にサンプリングして HPLC に供した。

【結果】T5 プロモーターから SpeA、SpeB、脱感作 ArgA を発現するプラスミドをもった菌株では、IPTG を終濃度 0.02 mM となるように加えたとき、培養開始後 48 時間で約 3.2 mM の細胞外プトレッシン濃度を得ることができた。さらに SpeC も発現できるようにしたところ、IPTG を終濃度 0.01 mM となるように加えたときが最も細胞外プトレッシン濃度が高かったものの、予想に反して SpeC を発現しないときよりも低く、培養開始後 48 時間の細胞外プトレッシン濃度は約 2.2 mM であった。

*Escherichia coli*, polyamine, putrescine

発表番号：2F167
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゴードスポリンの酵素的全合成

# Enzymatic total synthesis of goadsporin

○山下 湖奈[1]、尾崎 太郎[1]、浅水 俊平[1]、後藤 佑樹[2]、菅 裕明[2]、尾仲 宏康[1]（[1]東大院農、[2]東大院理）
○Kona YAMASHITA[1], Taro OZAKI[1], Shumpei ASAMIZU[1], Yuki GOTO[2], Hiroaki SUGA[2], Hiroyasu ONAKA[1] ([1]Department of Biotechnology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, [2]Department of Chemistry, Graduate School of Science, The University of Tokyo)

【目的】ペプチド系二次代謝産物の一群を成す RiPPs (Ribosomally-synthesized and post-translationally modified peptides) は、リボソームで合成された前駆体ペプチドが酵素による翻訳後修飾を受けて生合成される。前駆体ペプチドが構造遺伝子として染色体上にコードされていることから、その塩基配列の書き換えにより様々な前駆体アナログを生合成経路に供給することが可能であり、これを利用した類縁体創製は創薬研究における有望な技術であると考えられている。我々が放線菌から単離した RiPPs であるゴードスポリンは構造遺伝子 *godA* が転写・翻訳によって合成された後、アゾール環及びデヒドロアラニンの形成、リーダー配列の除去、N 末端のアセチル化などの翻訳後修飾を受けることで産生する。既に変異型 *godA* 遺伝子の導入による *in vivo* での類縁体生産が可能であることを報告しているが [1]、各生合成酵素の基質認識について酵素レベルでの知見は得られていない。そこで *in vitro* での機能解析によってこれを明らかにし、新たな有用物質の創製へつなげることを目的として研究を行った。

【方法と結果】前回大会では大腸菌のリボソーム再構成系を利用した *godA* の *in vitro* での転写・翻訳による基質の調製、および GodD, GodE によるアゾール環の形成反応について報告した（山下ら、2015 年農芸化学大会）。ゴードスポリンに 2 残基存在するデヒドロアラニンの形成は GodF によるセリン残基へのグルタミン酸の付加、および GodG によるグルタミン酸の脱離によって進行すると推測されていた [2]。今回、GodF と、GodG ホモログである LazF の組換え蛋白質を用いて酵素反応を行い、MALDI-TOF-MS によって反応産物を分析した。その結果、GodF によるグルタミン酸の付加、および GodF と LazF によるデヒドロアラニン形成に対応するシグナルを検出することができた。また、GodF は GodA に直接グルタミン酸を付加することはできず、アゾール環形成反応と同時に反応を行うことで初めて活性が検出できた。このことから、アゾール環の形成がデヒドロアラニンの形成に先行することが明らかとなった。さらに、アゾール環とデヒドロアラニンの形成後、GluC により不要な N 末端領域を消化し、アセチル基転移酵素と推測された GodH による反応を行うことで、ゴードスポリンが生成することを LC-MS により確認した。本研究は前駆体ペプチドの合成とその翻訳後修飾反応をすべて酵素的に行って、構造遺伝子より RiPPs を全合成した初めての例である。現在、本系を利用して修飾酵素の基質認識に関する解析や類縁体創製に関する研究を進めている。

1) Onaka, H. *et al*, *Microbiology* 2005, 151, 3923-33. 2) Ozaki, T. *et al.*, *ChemBioChem* 2015, *in press*

RiPPs, goadsporin, secondary metabolite

発表番号：2F168
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 二次代謝誘導物質ゴードスポリン作用機構の解析
# Studies on the mode of action of goadsporin

○尾崎 太郎、浅水 俊平、尾仲 宏康（東大院農）
○Taro OZAKI, Shumpei ASAMIZU, Hiroyasu ONAKA (Univ. Tokyo)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. TP-A0584 が生産するゴードスポリンは、チアゾールやオキサゾールなどの複素芳香環や脱水アミノ酸を含む特徴的な構造を有する直鎖構造のペプチドである [1]。我々は、本化合物が様々な放線菌に対して抗菌活性や形態分化、二次代謝の誘導活性を示すことをこれまでに報告してきた。近年のゲノム解読の進展によって一株の *Streptomyces* 属放線菌には約 30 個もの二次代謝産物生合成遺伝子群が存在することが明らかとなり、抗生物質をはじめとする様々な生理活性物質の単離源として放線菌の重要性が高まっている。しかし、その一方で実験室における培養で実際に生産が確認されているのはその一部にすぎず、通常は休眠状態にあると考えられる生合成遺伝子群を効率的に活性化する手法が求められている。ゴードスポリンは、広範な範囲の放線菌に対して二次代謝産物の誘導活性を示すため、放線菌において休眠状態にある代謝経路の活性化法への応用も期待される化合物ではあるが、その作用機構の詳細は明らかではなかった。そこで、本研究ではゴードスポリン作用機構の解明を目指し、実験を行った。

【方法と結果】TP-A0584 株は、ゴードスポリン耐性遺伝子として *godI* を有している [2]。*godI* は signal recognition particle (SRP)の構成要素である Ffh と 78%の相同性を示す蛋白質をコードしている。通常の放線菌ゲノム上には *ffh* 遺伝子は 1 コピーしか存在しないが、TP-A0584 株は例外的に *godI* を含めて 2 コピーの *ffh* を有している。昨年の本大会では、ゴードスポリンが Ffh を標的とすることを、ビアコアを用いた相互作用解析、および遺伝学的な解析から報告した（尾崎ら、2015 年農芸化学会大会）。ゴードスポリンは Ffh には結合するが、GodI には結合しないことから、GodI はゴードスポリンと結合しない耐性型 Ffh であることが示唆される。SRP は蛋白質の N 末端に存在するシグナルペプチドを認識することで、細胞内で正しく局在させる機能を有しており、SRP が正常に機能することで蛋白質の分泌や膜への局在が正しく起こることが知られている。Ffh と GodI のドメインスワッピングの結果からは、ゴードスポリンが Ffh の C 末端に存在する M ドメインに結合することが示唆されていた。このドメインがシグナルペプチドの認識ドメインであることから、ゴードスポリンはシグナルペプチドの認識を阻害し、蛋白質の局在を攪乱することが予想されていた。実際にゴードスポリン存在下で *Streptomyces lividans* TK23 を培養したところ、培養上清から特定の蛋白質が消失することが明らかとなった。このことから、ゴードスポリンはシグナルペプチドの認識を妨げ、SRP の機能を阻害することで、蛋白質の局在を攪乱していることが強く示唆された。

[1]Onaka H. *et al. J. Antibiotics* 2001
[2]Onaka H. *et al. Microbiology* 2005

Goadsporin, signal recognition particle, Streptomyces

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F169
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 複合培養特異的に生産されるテトラヒドロキノリン生合成遺伝子の解析

# Studies on the biosynthesis of tetrahydroquinolines produced by combined-culture.

○下村 杜人[1]、尾崎 太郎[1]、杉山 龍介[2]、西村 慎一[2]、浅水 俊平[1]、掛谷 秀昭[2]、尾仲 宏康[1]([1]東大院農、[2]京大院薬)
○Morito Shimomura[1], Taro Ozaki[1], Ryosuke Sugiyama[2], Shinichi Nishimura[2], Shunpei Asamizu[1], Hideaki Kakeya[2], Hiroyasu Onaka[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

【目的】近年のゲノム解析によって *Streptomyces* 属放線菌は一株あたり約 30 種類の二次代謝産物の生合成遺伝子群を有していることが明らかになり、抗生物質をはじめとする生理活性物質の単離源としての放線菌の重要性は高まっている。一方で、実際に生産が確認されているものはそのうちのほんの一部にとどまるため、その他の発現していない遺伝子群を効率的に覚醒させる手法が求められている。これまでに我々は、ミコール酸を細胞表層に持つ細菌と放線菌を共培養することで、放線菌の二次代謝プロファイルが大きく変化する現象を見出し、これを複合培養と名付けた[1]。 2014 年の本大会では、*Streptomyces nigrescens* HEK616 株とミコール酸含有細菌である *Tsukamurella pulmonis* の複合培養より 8 種類の 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline 類（5aTHQs）を新規化合物として見出し、その生合成遺伝子群の同定について発表した(尾崎ら、2014 年農芸化学会大会)[2]。本発表では 5aTHQs の生合成遺伝子を破壊し、破壊株の代謝解析を行った結果について報告する。また、純粋培養、および複合培養それぞれにおける 5aTHQs 生合成遺伝子の転写状態を解析したので報告する。
【方法と結果】5aTHQs 生合成遺伝子クラスター内の二つのポリケチド合成酵素やアミノ基転移酵素、二つのケトリダクターゼをコードする遺伝子をそれぞれ異種発現に用いたベクター上で破壊し、*Streptomyces lividans* に形質転換した。各形質転換体の代謝物を LC-MS を用いて分析し、破壊株において 5aTHQs の生産が消失したことを確認した。破壊した遺伝子を相補したところ、5 つの遺伝子全てにおいて、5aTHQs の生産の回復が確認された。このことから破壊した 5 つの遺伝子が 5aTHQs 生合成に関与する遺伝子であることが確かめられた。

また、5aTHQs が複合培養時に特異的に生産される機構を明らかにするため、5aTHQs の転写の挙動を解析した。HEK616 株の純粋培養、およびミコール酸含有細菌である *Rhodococcus erythropolis* との複合培養を行い、培養開始から 12 時間後の菌体からそれぞれ RNA を抽出した。5aTHQs の生合成遺伝子クラスター内のポリケチド合成酵素遺伝子について qRT-PCR を行い、構成的発現遺伝子である *hrdB* の転写量を基準にして定量した。複合培養時のポリケチド合成酵素遺伝子の転写量が、純粋培養時の転写量に比べて多くなっていることから、複合培養によって 5aTHQs 生合成遺伝子の転写が上昇したことが明らかになった。現在、他の遺伝子についても解析を進めている。

1. Onaka H. *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 70, 400.
2. Sugiyama *et al. Org. Lett.* **2015,** 17.8, 1918.

Streptomyces, polyketide, biosynthesis

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F170
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# RNA-seq によるミコール酸含有細菌に対する Streptomyces coelicolor A3(2)の応答解析

# Transcriptomic response of Streptomyces coelicolor A3(2) to MACB

佐々木 槇子[2]、○浅水 俊平[1]、尾崎 太郎[1]、宮本 憲二[2]、尾仲 宏康[1] ([1]東大院農、[2]慶応・理工)
Makiko SASAKI[2], ○Shumpei ASAMIZU[1], Taro OZAKI[1], Kenji MIYAMOTO[2], Hiroyasu ONAKA[1]
([1]Univ. Tokyo, [2]Keio Univ.)

**【背景・目的】**我々のグループでは微生物間相互作用を介した放線菌の潜在的二次代謝産物生産の活性化機構に注目している。これまでにミコール酸含有細菌 (MACB) との共培養が様々な放線菌の二次代謝産物生産を効果的に活性化すること発見している (Onaka H, *et al*., *AEM*. 2011)。MACB : *Tsukamurella pulmonis* は放線菌 *Streptomyces lividans* の色素性抗生物質の生産を拡散性化学物質や細胞外膜ミコール酸層に対して非依存的に、つまり生細胞の物理的な接触を介して誘導する機構が示唆されている (Asamizu S, *et al*., *PloSONE*. 2015)。細菌における細胞間のコミュニケーションには、クオラムセンシングに代表されるような拡散性の化学物質を用いるものの他に、近年では大腸菌や粘性細菌などのグラム陰性細菌における接触に依存した同種間相互作用機構に関する知見も増えつつある。しかしながらグラム陽性細菌、特に異属細菌における接触に依存した相互作用機構に関する知見は全くなく、細菌において特異的に他者を認識し、それに応答する機構が存在することを分子レベルで明らかにすることは極めて重要な課題である。本研究では異属細菌 MACB の接触に対して放線菌がどう遺伝子発現レベルで応答するかを明らかにするために次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行ったので報告する。

**【実験方法・結果】**モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の単独培養時と複合培養時の遺伝子転写発現レベルでの応答機構を解析した。二菌間の接触頻度を多くするために菌体重量比、放線菌:MACB=3:1 で混合し、また、増殖等による培養条件の変化の影響を極力少なくために添加後 30 分の各サンプルの Total RNA を抽出した。定法に従いシーケンスサンプルを調整した後、Mi-seq を用いて RNA-seq 解析を行った。複合培養の相手として *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 と *Rhodococcus erythropolis* PR4 を用いた。得られたリードから TMM 正規化法（n=3）により発現変動遺伝子を予想し、その結果、30 分において [p-value < 0.01, fold > 2] の条件で *T. pulmonis* 株とでは 302 個、*R. erythropolis* PR4 株とでは 69 個、二つに共通の遺伝子として 53 個について統計的有意に mRNA 転写量が上昇することが明らかになった。現在、RNA-seq 解析により確認した発現変動遺伝子について遺伝学的解析を行っている他、更に非誘導株との比較 RNA-seq 解析を行い、特異的応答に重要な遺伝子の同定を試みており、併せて報告する。

bacterial interaction, transcriptomics, Streptomyces

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F171
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ATP 依存的に生合成される各種化合物群の効率的生産を実現する放線菌宿主-ベクター系の構築

# Development of a vector system for heterologous production of ATP-dependently biosynthesized molecules in an ε-PL producer, *S. albulus*

吉村 友宏[1]、柴田 展行[1]、濱野 吉十[2]、○山中 一也[3]（[1]JNC・横浜研、[2]福井県大・生物資源、[3]関西大・化生工）
Tomohiro YOSHIMURA[1], Nobuyuki SHIBATA[1], Yoshimitsu HAMANO[2], ○Kazuya YAMANAKA[3] ([1]JNC Corp., [2]Fukui Pref. Univ., [3]Kansai Univ.)

**【目的】**産業的､生理的に重要な化合物の中には ATP 依存性酵素が関与して生合成されるものも多い。しかし ATP は高価であるため、これらの *in vitro* 合成反応に ATP を基質として使用することは現実的ではない。一方、組換え微生物を利用した生産においても細胞内での ATP 供給が律速となり、十分な収量で化合物生産を達成することは困難である。我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* の主二次代謝産物である epsilon-poly-L-lysine（e-PL）生合成研究の過程で、e-PL 合成酵素(Pls)が誘導的に発現し、e-PL 生産が認められる対数増殖期後期に細胞内 ATP 濃度が著しく高まることを見出した。そこで、本研究では、*S. albulus* を ATP 依存的に生合成される各種化合物群の異種生産宿主として応用することを目的として、本菌における遺伝子発現系の構築及び更なる改良を行った。
**【方法】**本研究では、*S. albulus* の主生産物である e-PL の生合成遺伝子破壊株（*Δpls* 株）を異種発現宿主として用いた。発現ベクターは、既報の *E. coli – S. albulus* シャトルベクターに *pls* 遺伝子の発現を制御するプロモーターを導入することで構築した。本発現ベクターにクローン化した遺伝子は、*S. albulus* において細胞内 ATP 濃度が著しく高まる対数増殖期後期に特異的に発現する。このベクターに ATP 依存的に L-グルタミン 2 分子の縮合により青色素 indigoidine を生合成する酵素遺伝子をクローン化し、e-PL 生産時と同一の培養条件下で *S. albulus Δpls* 株形質転換体が生産する青色素量を指標として、本宿主-ベクター系の有用物質異種生産への応用の可能性を検証した。
**【結果】***pls* プロモーターを導入することで構築した原型の発現ベクターにおいても著量の青色素生産を導いたが、リボソーム結合部位(rbs)配列及びクローン化遺伝子開始コドンまでの距離を改変することにより、青色素生産量を大幅に高めることに成功した。改良型発現ベクターでは、培養条件の検討や生合成前駆体 L-グルタミンを流加することなく 130 mg/L/hr もの青色素生産性を示したことから、ATP 依存的に生合成される各種化合物の異種生産における *S. albulus Δpls* 株宿主及び改良型ベクターの有効性が示された。

Gene expression, Heterologous production, ATP

発表責任者：山中一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2F172
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ATP 高生産放線菌 *Streptomyces albulus* を宿主とした高分子量ヒアルロン酸及び 5-アミノレブリン酸の効率的異種生産

# Heterologous production of hyaluronic acid and 5-aminolevulinic acid in an e-PL producer, *S. albulus*

吉村 友宏[1]、○柴田 展行[1]、濱野 吉十[2]、山中 一也[3]（[1]JNC・横浜研、[2]福井県大・生物資源、[3]関西大・化生工）
Tomohiro YOSHIMURA[1], ○Nobuyuki SHIBATA[1], Yoshimitsu HAMANO[2], Kazuya YAMANAKA[3] ([1]JNC Corp., [2]Fukui Pref. Univ., [3]Kansai Univ.)

**【目的】**我々は、高い ATP 生産能を有する放線菌 *Streptomyces albulus* を ATP 依存的に生合成される各種化合物群の異種生産用宿主として応用することを目指し、本菌における遺伝子発現ベクターの構築とその改良を進めてきた。本研究では、改良型ベクターの組換え生産における有効性を確認することを目的として、医療用材料として利用される高分子量ヒアルロン酸(HA)及び近年抗がん剤や植物成長剤としても注目を集める 5-アミノレブリン酸(ALA)の異種生産を試みた。
**【方法及び結果】**HA 生産能を有する *Streptococcus* 属乳酸菌においては、その生産性及び分子量は細胞内 ATP 濃度依存的に増大することが報告されていることから、高い ATP 生産能を有する放線菌 *S. albulus* を宿主として利用することで、容易に高分子量 HA の効率的異種生産が達成できると予想された。しかしながら、予想に反して *Streptococcus* 由来の HA 合成酵素遺伝子(*hasA*)をクローン化した改良型ベクターを *S. albulusΔpls* 株へ導入しても HA は生産されなかった。*Streptococcus* 属と *Streptomyces* 属では遺伝子の使用コドンが大きく異なること、及び HA 前駆体糖の供給不足がその理由として考えられたため、コドン最適化した合成 *hasA* 遺伝子を複数の前駆体糖生合成遺伝子と共発現させたところ、期待した通り 2-MDa を超える高分子量 HA が著量（>6 g/L）生産された。一方、ALA の異種生産においても、*S. albulusΔpls* へ光合成細菌由来の ALA 合成酵素遺伝子(*hemA*)の導入そのものは ALA 生産を導かなかった。同様に前駆体供給が律速となっている可能性、及び生産物の細胞外への排出系の欠如がその理由として考えられたが、ALA 生合成前駆体であるグリシンの添加培地で培養することで、細胞外への顕著な ALA 生産蓄積(>50 mM）が確認された。
**【結論】**我々が開発した e-PL 生産菌を宿主とした異種生産システムは、e-PL 生産条件下において細胞内 ATP 濃度が著しく高まる対数増殖期後期に特異的にクローン化遺伝子の発現を誘導する。この宿主の ATP 生産特性及び *pls* プロモーターによる時期特異的発現誘導の組み合わせが、異種生産過程における細胞増殖と化合物生合成間の ATP 消費競合の回避に寄与し、異種生産物生合成経路への選択的 ATP 供給が実現される。このように、e-PL 生合成の制御機構を応用することで ATP 依存的に生合成される各種化合物を高い効率で異種生産することが可能となった。今後は、生理活性ペプチド及びポリケチド等の二次代謝産物の異種生産への応用も試みる予定である。

Heterologous production, ATP, Hyaluronic acid

発表責任者：山中一也（kazuyay@kansai-u.ac.jp）

発表番号：2F173
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# リーダーレスバクテリオシン生合成機構を利用した新奇抗菌ペプチドの創出・評価系の構築

# Development of the creation and evaluation system for novel antimicrobial peptides using the biosynthetic machinery of a leaderless bacteriocin

矢野 瑞季[1]、緒方 詩保[1]、石橋 直樹[1]、○善藤 威史[1]、園元 謙二[1,2] ([1]九大院・農、[2]九大・バイオアーク)

Mizuki YANO[1], Shiho OGATA[1], Naoki ISHIBASHI[1], ○Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【背景・目的】バクテリオシンは細菌のリボソーム上で合成される抗菌ペプチドであり、乳酸菌由来のバクテリオシンは食品保存料や医薬品としての利用が期待されている。その一方で、広範かつ継続的な利用に向けては耐性菌出現のリスクや特定の細菌種に偏った抗菌スペクトルなどの解決すべき課題もある。本研究の対象とした *Lactococcus lactis* QU 5 によって生産されるラクティシン Q は、N 末端にリーダー配列を持たないリーダーレスバクテリオシンで、強い抗菌活性と高い熱・pH 安定性を有する。リーダーレスバクテリオシンの生合成には、菌体内でのバクテリオシンの不活性化を担うリーダーペプチドの切断機構が不要な代わりに、菌体内での自己耐性機構が必要である。先の研究で、ラクティシン Q 生合成遺伝子群にある *lnqEF* が、QU 5 株が菌体内に発現・蓄積するラクティシン Q から自らを守る菌体内自己耐性に関与することが明らかとなった。本研究ではこの LnqEF によるラクティシン Q に対する菌体内自己耐性機構を利用し、ラクティシン Q を基にした新奇抗菌ペプチドの創出・評価系の構築を目的とした。

【方法および結果】ラクティシン Q の構造遺伝子 *lnqQ* を 9 つの領域に分け、NNK 法によって作製されたプライマーを用いたインバース PCR によりランダムに変異を与えた。この変異体構造遺伝子および *lnqEF* をそれぞれ発現する 2 種のプラスミドを *L. lactis* NZ9000 に導入し、ラクティシン Q 変異体発現株を構築した。ラクティシン Q 変異体は誘導物質の添加によって転写・発現が誘導され、細胞内で発現・蓄積する変異体の抗菌活性が元のラクティシン Q より強くなった場合、変異体発現株は菌体内自己耐性を担う LnqEF の存在下でも生育阻害を受けることが予想される。この機構を利用して種々の変異体（新奇抗菌ペプチド）を創出し、非誘導時と誘導時の生育を比較することで抗菌活性の評価を行った。作製したラクティシン Q 変異体ライブラリー（5448 株）を評価した結果、14 株で生育阻害が確認された。これらの株が生産するラクティシン Q 変異体の大半が C 末端側に変異を有していた。変異による抗菌活性や抗菌スペクトルへの影響を調べるために、新奇抗菌ペプチド生産候補株 14 株の菌体内画分の抗菌活性試験を行った。その結果、元のラクティシン Q と同様の抗菌スペクトルを持つもの、抗菌スペクトルが変化したものが得られたことが確認できた。以上のように、LnqEF によるラクティシン Q に対する菌体内自己耐性機構を利用することで、ラクティシン Q を基にした新奇抗菌ペプチドの創出・評価系を構築することができた。本創出・評価系を利用することで、作用機構や抗菌スペクトルをさらに改変した新奇抗菌ペプチドを得ることができると考えられる。

bacteriocin, antimicrobial peptide, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2F174
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 乳酸菌由来環状抗菌ペプチドの新奇生合成遺伝子群の同定と分泌発現系の構築

# Identification and expression of the novel biosynthetic gene cluster for a circular antimicrobial peptide from lactic acid bacteria

○高城 博也[1]、石橋 直樹[1]、沢 稔彦[1]、杉野 春貴[1]、善藤 威史[1]、園元 謙二[1,2]（[1]九大農・院、[2]九大・バイオアーク）
○Hiroya TAKI[1], Naoki ISHIBASHI[1], Naruhiko SAWA[1], Haruki SUGINO[1], Takeshi ZENDO[1], Kenji SONOMOTO[1,2] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Bio-Arch, Kyushu Univ.)

【背景・目的】バクテリオシンは細菌によってリボソーム上で合成される抗菌ペプチドで、食中毒菌等を含む広範な細菌種に対して抗菌活性を示す。*Lactococcus* 属等の乳酸菌由来のものは生産菌自体の安全性も高いため、とくに食品保存料や医薬品としての利用が期待される。その中でも、N 末端と C 末端がペプチド結合した特異な構造をもつ環状バクテリオシンは高い安定性を有し、とくに広い分野への利用が見込まれる。環状バクテリオシンの生合成には、リーダー配列の切断・環状化・菌体外分泌・自己耐性などの機構が必須と考えられているが、その詳細は不明である。本研究では、*Lactococcus* sp. QU 12 によって生産される環状バクテリオシン lactocyclicin Q[1)]（LycQ）の生合成機構の解明を目指し、異種発現系の構築およびそれを利用した LycQ 生合成関連遺伝子群の同定と機能解明を試みた。
【方法・結果】LycQ 構造遺伝子（*lycQ*）周辺領域の塩基配列を解析し、11 の推定 *orf* を発見した。それらの一部は LycQ 生合成への関与が予測される ABC トランスポーターや他の環状バクテリオシンに共通して見られる DUF95 スーパーファミリータンパク質などに相同性を示した。これらの推定生合成遺伝子群を $P_{32}$ プロモーター下流に様々な組合せで挿入した異種発現用プラスミドを *L. lactis* IL1403 に導入し、自己耐性能と分泌能を評価した。その結果、*orf6* を発現する株全てで LycQ に対する強い自己耐性が認められ、*orf6* が LycQ に対する自己耐性を単独で担うことが明らかとなった。一方、各異種発現株の培養液上清に分泌された LycQ の抗菌活性の検出を試みたところ、LycQ の分泌は認められず、その分泌量が非常に少ない可能性が考えられた。そこで、高密度菌体を用いて抗菌活性試験を行ったところ、pLY-*Q123456* 保持株において、分泌された LycQ による抗菌活性が観察された。次に、本株の培養液上清中の LycQ を陽イオン交換クロマトグラフィーと逆相 HPLC によって精製・濃縮したところ、ESI-TOF-MS によって環化された成熟型 LycQ の分泌が確認された。これは、*Lactococcus* 属由来の環状バクテリオシンでは、異種発現による分泌生産に成功した初めての例である。また、以上により、*lycQ, orf1, 2, 3, 4, 5, 6* の 7 つの遺伝子が LycQ 生合成を担う最小単位であることが示された。現在、同定した各遺伝子および *orf6* 下流に存在する遺伝子の機能解析をさらに進めている。本分泌発現系の利用により、環状バクテリオシンの環化機構およびそれに関わる遺伝子群の解明も期待される。

1) Sawa N., *et al, Appl. Environ. Microbiol.,* 2009

bacteriocin, circular peptide, lactic acid bacteria

発表責任者：善藤威史（zendo@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2F175
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゲノムマイニングに基づく *Streptomyces cattleya* の新規ラッソペプチドの単離

# Isolation of new lasso peptide cattlecin from *Streptomyces cattleya* based on genome mining

○小谷 真也[1,2]、菅井 翔吾[2]、亀山 眞由美[3]([1]静大・学術院・農、[2]静大・大学院・総、[3]農研機構・食総研)
○Shinya Kodani[1,2], Shogo Sugai[2], Mayumi Ohnishi-Kameyama[3] ([1]Shizuoka Univ. Acd. Agr., [2]Shizuoka Univ. Grad. Int., [3]NARO・NFRI)

[目的]放線菌は、多様な二次代謝産物の生産源として用いられてきた。近年、次世代シーケンサーによって放線菌のゲノム情報は数多く蓄積されており、ゲノムマイニング研究がさかんに行われるようになった。近年ゲノムマイニングによって sviceucin と命名された新規ラッソペプチドが異宿主発現を用いて単離されている(Li *et al.* ACS Chem. Biol. 2015)。発表者は sviceucin の生合成遺伝子に基づいて類似生合成遺伝子を有する放線菌の検索および生産試験を行った。その結果、*Streptomyces cattleya* が新規ラッソペプチド cattlecin を生産することを見出したので、その単離と構造決定に関して報告する。
[方法] *Streptomyces cattleya* NBRC14057 を ISP2 寒天培地によって 30℃、7 日間培養を行った。培養した気菌糸および胞子細胞をスパーテルで回収した。菌体に対して 2 倍量のメタノールで抽出を行い、抽出物を減圧濃縮後、疎水性樹脂 CHP20P を用いた溶媒分画に付した。10%、60%、100%の含水メタノールで溶出を行った。それぞれのフラクションを HPLC および ESI-MS によって成分の分析を行ったところ、60%メタノール画分に分子量約 2686Da の新規ペプチドが存在することが確認された。
[結果]cattlecin を加水分解後、PITC による誘導体化を行い、HPLC 分析によってアミノ酸の組成分析を行った。その結果、モル比で、Asp と His が 4 モル、Gly と Tyr が 3 モル、Ser が 1 モル出された。また、精密質量分析によって分子式は $C_{131}H_{139}N_{33}O_{32}$ と決定した。また、MS/MS の分析によって、C 末端部のアミノ酸配列は、WHHGWYGWWDD であることが明らかとなった。また、NMR を用いた構造解析を試みたが、溶解性が悪いため、解析に十分な解像度のスペクトルが得られなかった。しかしながら、cattlecin の構造遺伝子 catA(CCB72812.1)の配列から構造を推定した。Cattlecin の生合成遺伝子クラスターは catA および 3 つの修飾酵素 catB、catC、catD の 4 つの遺伝子から形成されていた。興味深いことに、ラッソペプチド生合成遺伝子でよく見られる細胞外に排出するための ABC トランスポーター遺伝子が近傍には存在しなかった。

peptide, biosynthesis, MS/MS analysis

発表責任者：小谷真也（kodani.shinya@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2F176
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Streptomyces* sp. No. 3 株が生産する抗菌物質に関する研究

Study on antimicrobial materials produced by *Streptomyces* sp. No. 3

○阿部 優依奈、清藤 結子、吉原 周佑、村上 周一郎 (明治大農)
○Yuina Abe, Seitou Yuiko, Yoshihara Shusuke, Murakami Shuichiro (Sch. Agric., Meiji Univ.)

【背景・目的】

近年、抗菌薬に対する耐性菌の出現と蔓延は、世界的な問題となっている。そのため、これまでにない作用機序に基づく新規抗菌物質の探索が必要とされている。本研究室では、別の研究のスクリーンニングの過程で見いだされた *Streptomyces* sp. No. 3 株を用いて新規抗菌物質の探索を行っている。現在までに、No. 3 株の生産する抗菌物質が幅広い微生物に対して活性を有すること、グルタミン、トレオニン、アスパラギン、グルコース、微量金属によって生産が促進されること、また本菌が複数種の抗菌物質を生産することを見出している[1)]。本研究では、目的抗菌物質の構造解析と特性評価を目的として、目的物質の分離を行った。

【方法・結果】

まず、陽イオン交換カラムと陰イオン交換カラムを用いた固相抽出による試料の精製方法を検討した。Am 培地(0.03% グルタミン、0.03% トレオニン、0.03% アスパラギン、1% グルコース、微量金属)で No. 3 株を培養し、その培養上清を各カラムに供し、溶出液をディスク拡散法による感受性テストにより抗菌活性を評価した。その結果、陰イオン交換カラムで溶出したものにのみ生育阻止円が観察された。このことより目的抗菌物質は陽イオン交換カラムに吸着することが判明したため、酢酸アンモニウムを用いて目的物質の溶出条件を検討したところ、0.1 M 酢酸アンモニウムでは溶出せず 2 M 酢酸アンモニウムでほぼ溶出することを見出した。以上より、培養上清を陰イオン交換カラム、陽イオンカラムの順で供した後、0.1 M 酢酸アンモニウムで不純物を除去、2 M 酢酸アンモニウムで目的物質を溶出することで、精製を行うこととした。

次に、HILIC カラムを用いた HPLC により目的物質の分離を試みた。アセトニトリルを 80%から 0%の濃度勾配で溶出した試料をピークごとに 13 のフラクションに分画し、目的抗菌物質の溶出時間に見当をつけることとした。その結果、リテンションタイム 5.70 (min) のピークを含む画分に抗菌活性が見いだされた。現在は、この抗菌活性を有するピークの精製を進めている。

1) 生物工学会 2015 年大会、講演要旨 P.196

antifungal antibiotics, *Streptomyces*

発表責任者：村上 周一郎（smura@meiji.ac.jp）

発表番号：2F177
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アラキドン酸含有脂質を蓄積する緑藻株の探索

# Screening of green algal strains accumulating arachidonic acid-containing lipids

○加藤 康夫[1]、木野 貴仁[1]、米田 有紗[1]、野村 泰治[1]、荻田 信二郎[1,2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]県立広島大・生命科学)
○ Yasuo KATO[1], Takahito KINO[1], Arisa YONEDA[1], Taiji NOMURA[1], Shinjiro OGITA[1,2] ([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】アシルグリセロールやリン脂質を構成する脂肪酸のうち、高度不飽和脂肪酸(PUFA)の一種であるアラキドン酸(ARA)は、様々な生理機能を有するプロスタグランジン等の生合成前駆体となるだけでなく、乳児や高齢者の脳や体の発達に不可欠である等、その機能性が注目されている。ARA を始め PUFA はヒトの体内では生合成できない必須脂肪酸であるため、それらを含む脂質はサプリメント等に配合されており、その供給法として *Mortierella* 属糸状菌である *M. alpina* 1S-4 株による発酵生産が知られている。しかし、この方法では製造コストや、ARA の効率的な工業的生産方法が唯一この方法のみであるため、市場での ARA の価格高騰の原因となっている。こうした問題点を解決すべく今回着目したのが、緑藻による ARA 含有脂質の生産である。緑藻は単位面積当たりの脂質生産力が高く、水、$CO_2$、太陽光のみで生育が可能であり、特に光合成により大気中の $CO_2$ を炭素源として利用できることから製造コスト上有利になると思われる。本研究では自然界から広く緑藻を単離し、各種栄養条件下にて培養後、ARA 含有脂質を蓄積する株を選抜した。
【方法及び結果】富山県内外の湖沼水、地面、植物体表面等よりサンプリングを行い（延べ 150 ヶ所）、抗細菌物質としてアンピシリン、セフォタキシム、クロラムフェニコール、ナリジクス酸を添加した無機塩のみからなる固体 C 培地上で緑藻株を単離した。得られた緑藻約 500 株を各々、Glucose、Glycerol 添加及び無添加の固体 C 培地上、明・暗の計 6 条件下にて培養し、生育特性を観察することで栄養要求性の検討を行った。このようにして培養した緑藻株中への ARA 含有脂質の蓄積を確認するため、加メタノール分解により構成脂肪酸をメチルエステル(FAME)化し、以後の分析に供した。まず 1 次スクリーニングとして、FAME を二重結合数 0-2 及び 3 以上で分離する簡易 TLC 分析を行い、後者を主に与える緑藻を 263 株選抜した。次に 2 次スクリーニングとして、Ag イオンをコートしたシリカゲル TLC により FAME を二重結合数で詳細に分離分析し、ARA メチルエステルと移動度が一致するものを与える 71 株を選抜した。3 次スクリーニングとして、FAME をキャピラリーガスクロマトグラフィー分析に供し、ARA 含有脂質を蓄積する目的株 20 株を選抜した。このうち最も高含量に ARA を蓄積する AY46 株について、単位培養液及び藻体当たりに ARA 含有脂質を最も良く蓄積する培養条件の検討と、蓄積する ARA の構造確認を行っている。

green algae, Arachidonic acid, lipids

発表責任者：加藤康夫（ykato@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：2F178
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Alteration of secondary metabolite production by primary metabolism inhibitors

○Dana Ulanova[1], Masashi Tsuda[2] ([1]Science Research Center, Kochi University, [2]Center for Advanced Marine Core Research, Kochi University)

Actinomycetes belong to the most important producers of clinically useful compounds. The genomic analyses have revealed that each actinomycetal strain is capable of biosynthesis of much more compounds than previously expected. However, many biosynthetic gene clusters are silent or low-level expressed under standard laboratory conditions, so their products remain undiscovered.

Recently, many approaches have been developed for activation of such silent gene clusters. The addition of primary metabolism inhibitors in subinhibitory concentrations affects primary biosynthetic pathways, which among all can result in increased production of secondary metabolites. Thus, such chemical perturbation has been suggested as an effective approach for natural product discovery.[1] However, less is known about the effect of inhibitor addition in different stages of bacterial growth. In this study we address this question and evaluate the timing effect of inhibitor addition on a set of soil and marine actinomycetes by LC-MS and NMR profiling.

References

1. A. Craney, C. Ozimok, S. M. Pimentel-Elardo, A. Capretta and J. R. Nodwell, *Chem Biol*, 2012, **19**, 1020-1027.

actinomycetes, secondary metabolism, primary metabolism

発表責任者：Dana Ulanova（ulanova@kochi-u.ac.jp）

発表番号：2F179
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素同族体生合成遺伝子の探索
Search for biosynthetic gene clusters of *Monascus* pigment homologues in *Penicillium purpurogenum*

○荻原 淳[1,2]、茂木 美樹[2]、小嶋 涼[2]、新居 鉄平[1]、岩田 悠志[1]、渡邉 泰祐[1,2]、春見 隆文[1,2] ([1]日大生物資源科学、[2]日大院生物資源科学)
○Jun OGIHARA[1,2], Yoshiki MOTEGI[2], Ryo KOJIMA[2], Teppei ARAI[1], Hisashi IWATA[1], Taisuke WATANABE[1,2], Takafumi KASUMI[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. Sch.)

目的）我々は，東アジアにて発酵微生物として利用されてきた子のう菌 *Monascus* と不完全子のう菌 *Penicillium* の生産する共通した二次代謝産物について解析している。不完全菌 *Penicillium* の有性世代は次第に明らかにされつつあるが，*Penicillium* と子のう菌 *Monascus* の間の生殖世代と代謝産物生合成遺伝子の水平伝播との関連性は不明である。そこで，本研究では *Penicillium purpurogenum* における *Monascus* 色素同族体生合成に関連した遺伝子を特定するために、*Penicillium purpurogenum* のもつポリケチド生合成遺伝子を検索し、*Aspergillus*、*Monascus*、*Penicillium*、*Talaromyces* 等他の糸状菌由来ポリケチド生合成遺伝子との比較およびドメイン構造の系統解析を行った。さらに、8 種類の *Penicillium purpurogenum* を用いて色素生産性とポリケチド生合成遺伝子の保存性との関連性を確認した。また、*Penicillium purpurogenum* IAM15392 株の色素生産時における mRNA の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析及びそのドメイン解析に基づいて色素生産関連ポリケチド生合成遺伝子の絞り込みを行った。
方法及び結果）当研究室において解析した *Penicillium purpurogenum* のゲノムドラフトシークエンスを用いて *Aspergillus, Penicillium* 等の糸状菌から見出されている既知のポリケチド合成関連遺伝子の塩基配列情報を基に、local BLAST search により検索した。その結果，26 個のポリケチド遺伝子の存在を確認した。さらに，確認できたドメイン構造のうち KS ドメインを対象に分子系統解析を行った。この結果、PKS/NRPS ハイブリッド型、Lovastatin nonaketide synthase、conidial yellow pigment biosynthesis PKS 等と相同性の高い 6 グループの特徴的なポリケチド生合成遺伝子の存在を確認した。本糸状菌由来 *Monascus* 色素同族体に特徴的な *n*-octanoyl 基、isoquinoline 骨格構造からポリケチド生合成遺伝子の絞り込みを行った。さらに、本糸状菌の色素生産時におけるトランスクリプトーム解析結果より、色素生産時特異的発現を示すポリケチド生合成遺伝子 PKS 920-2 の存在を確認した。8 種類の *Penicillium purpurogenum* を用いてそれぞれ PP-V(10*Z*-12-carboxyl-monascorubramine), PP-O(10*Z*-12-carboxyl-monascorubrin)の生産性を確認した結果、2 菌株を除いてこれら色素の生産性を確認した。PKS 920-2 の存在の有無を前記 8 種類の菌株のゲノム DNA に対して PCR 反応的に確認したところ、色素生産を確認した 6 菌株において PKS 920-2 と相同性の高い増幅断片を確認した。現在、交配型遺伝子について解析を進めているところである。

*Penicillium*, *Monascus*, polyketide

発表責任者：荻原　淳（j-ogihara@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：2F180
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ニバレノール生合成の分子生物学
Molecular biology of nivalenol biosynthesis
前田 一行[1]、田中 彰[2]、杉浦 涼介[1]、越野 広雪[3]、東海 武史[4]、佐藤 真之[4]、棚橋 和義[1]、中嶋 佑一[1]、金丸 京子[1]、小林 哲夫[1]、西内 巧[5]、藤村 真[4]、安藤 直子[2]、○木村 真[1] ([1]名大院生命農、[2]東洋大院理工、[3]理研、[4]東洋大院生命、[5]金沢大学際)
Kazuyuki Maeda[1], Akira Tanaka[2], Ryosuke Sugiura[1], Hiroyuki Koshino[3], Takeshi Tokai[4], Masayuki Sato[4], Kazuyoshi Tanahashi[1], Yuichi Nakajima[1], Kyoko Kanamaru[1], Tetsuo Kobayashi[1], Takumi Nishiuchi[5], Makoto Fujimura[4], Naoko Takahashi-Ando[2], ○Makoto Kimura[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Toyo Univ. E, [3]RIKEN, [4]Toyo Univ. L, [5]Kanazawa Univ.)

（目的） *Fusarium graminearum* のニバレノール（NIV）生合成では、トリコテセン骨格の形成後、*FgTri11*、*FgTri13*、*FgTri1* がコードするシトクロム P450 モノオキシゲナーゼ（CYP）がそれぞれ C-15 (B-ring)、C-4 (C-ring)、C-7/C-8 (A-ring) の 4 つの位置で水酸基を導入する。生合成遺伝子（*Tri* 遺伝子）の機能は T-2 toxin を生産する *Fusarium sporotrichioides* を中心に解明されたが、NIV 生産菌の *Tri* 遺伝子の機能はアミノ酸配列の相同性に基づいて推定されたに過ぎず、NIV 生合成経路は未だ解明されていない。本研究では、NIV 生合成のうち水酸化ステップを中心に解析する。また、8-deoxy 型のデオキシニバレノール[1)] のような C-8 位が水酸化、ケト化を受けない新たな NIV 型トリコテセンが進化の途上で出現する可能性について検証する。

（方法および結果） *FgTri11* 破壊体は正規の中間体 isotrichodermin (ITD) に加え shunt pathway 中間体 7-hydroxyisotrichodermin (7-HIT)、8-hydroxyisotrichodermin (8-HIT)、および少量の 4-acetylnivalenol (4-ANIV) を液体培地中で生産した。*FgTri11* と *FgTri1* の二重破壊体は 7-HIT、8-HIT を生産しなかった。このことから C-15 位水酸化酵素である FgTRI11 を機能相補する alternative hydroxylase が存在すること、*FgTri1* が A-ring を水酸化する唯一の遺伝子であることが示された。

*FgTri1* 破壊体および *FgTri1* と *FgTri13* の二重破壊体に蓄積するトリコテセン化合物の解析から、*F. sporotrichioides* の FsTRI13 の場合と異なり calonectrin (CAL) は FgTRI13 の基質にはほとんどならないこと、C-15 位の場合とは異なり *FgTri13* が C-4 位の水酸化に関わる唯一の酵素遺伝子であることが明らかとなった。

現在、*FgTri1* と *FgTri5* の二重破壊体に 7-HIT を feeding して 7-hydroxycalonectrin を生じる経路を構築し、新たな食の危害要因となり得る 8-deoxy-4,15-diacetylnivalenol (= 4,7-dihydroxycalonectrin) へどの程度の効率で変換されるかを LC-MS/MS を用いて解析しているところである。

1) Varga et al. (2015) New tricks of an old enemy: isolates of *Fusarium graminearum* produce a type A trichothecene mycotoxin. *Environ Microbiol* **17**: 2588-2600

trichothecene, Fusarium, mycotoxin

発表責任者：木村真（mkimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2F181
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヴィオラセイン化合物の抗菌活性

# Anti-bacterial activities of violacein compounds

○滝口 泰之、嶋田 純也、平野 沙耶、酒井 亜里沙、尾形 仁（千葉工大工）
○Yasuyuki TAKIGUCHI, Junya SHIMADA, Saya HIRANO, Arisa SAKAI, Hitoshi OGATA (Chiba Institute of Tech.)

[目的]グラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* の生産する青紫色の色素、ヴィオラセインの細菌に対する抗菌作用について検討した。
[方法]当研究室で茨城県の土壌より分離した *Chromobacterium violaceum* VP2 株[1)]をキング B 培地に接種し、30℃、48 時間、通気培養した。その培養液を遠心分離（16,000×g、4℃、10 分間）し、沈殿画分をメタノールにより色素を抽出した。エバポレーターで濃縮した抽出液に水を加えて色素を沈殿させ、凍結乾燥したものを粗ヴィオラセインとよぶ。さらに、粗ヴィオラセインを TOYOPEARL HW-40F カラムで精製し、ヴィオラセインおよびデオキシヴィオラセインを得た。また、VP2 株を 0.5% 5－ヒドロキシトリプトファンを添加したキング B 培地で培養した培養液から同様な精製方法でオキシヴィオラセインを得た。抗菌試験はヴィオラセインを含む培地に対象とした細菌、*Propionibacterium acnes* NBRC107605、*Escherichia coli* NBRC3301、*Staphylococcus aureus* NBRC3060、*Bacillus subtilis* NBRC13719 を 37℃で培養し、630nm の吸光度変化を測定することで行った。
[結果および考察]粗ヴィオラセインには約 20%のデオキシビオラセインが含まれていた。この粗ヴィオラセインを 5～80 μg/ml 含む培地で対象とした 4 種の細菌を 24 時間培養したところ、グラム陰性の *Escherichia coli* に対しては抗菌作用が認められなかったが、グラム陽性の *Propionibacterium acnes*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis* に対しては 10 μg/ml で抗菌作用を示した。このことより、ヴィオラセインにはグラム陽性細菌に抗菌性が強い、ペニシリンに類似した効果を持つことが明らかとなった。また、精製したヴィオラセインは *P. acnes* に対して 10 μg/ml で強い抗菌作用を示したが、精製したデオキシヴィオラセインおよびオキシヴィオラセインは *P. acnes* に対して 10～40 μg/ml の範囲で抗菌作用を示さなかった。今後、ヴィオラセインの抗菌性の作用機構について検討する予定である。

１）嶋田、滝口：日本農芸化学会 2011 年大会講演要旨 p.173.

violacein, Chromobacterium violaceum, antibacterial activity

発表責任者：滝口　泰之（takiguchi.yasuyuki@p.chibakoudai.jp）

発表番号：2F182
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Bacillus sp.No.1003 が生産するコリネ型細菌特異的生育阻害物質の精製
# Purification of an anti-corynebacteria agent produced by Bacillus sp. No.1003

○鶴岡 祐太、川崎 寿、中松 旦、夏目 亮（東電大・院・工）
○Yuta TSURUOKA, Hisashi KAWASAKI, Tsuyoshi NAKAMATSU, Ryo NATSUME (Grad. Sch. of Eng., Tokyou Denki univ.)

【背景および目的】

*Corynebacterium glutamicum* は、Biotin 制限、Tween 40 添加、Penicillin G 添加などの特定のストレス条件下でグルタミン酸を過剰生産することが知られている。これらのストレス条件に対するコリネ型細菌の応答で共通するのは、細胞分裂が阻害・抑制される点である。コリネ型細菌の生育を特異的に阻害する新たな物質が得られれば、コリネ型細菌の生理的特性の理解に繋がる新しいきっかけが得られるのではないかと考えられた。これまでに行われた研究で、抗コリネ型細菌物質生産菌として *Bacillus* sp. No.1003 株が単離されている。コリネ型細菌の生育を特異的に阻害すること、また、生育阻止円の中に非感受性コロニーが出現することが、本株が生産する物質の特徴である。本研究では、No.1003 株が生産する抗コリネ型細菌物質の精製・構造解析を目的としている。

【方法および結果】

No.1003 株の培養上清について、酸性条件下で酢酸エチル液相抽出した後に、塩基性条件下でクロロホルムとメタノールの混合溶媒液相抽出した。抗コリネ型細菌活性が検出された 2 段階目の液相抽出水層画分を濃縮してから、シリカゲルカラム精製した。活性画分の濃縮試料を ODS カラムで HPLC 精製した結果、保持時間が明らかに異なる 2 画分 A,B に強い活性が検出された。No.1003 株は共通骨格を有する 2 種類以上の抗コリネ型細菌物質を生産していると考えられる。クロマトグラムから活性画分 A よりも高純度だと考えられる活性画分 B について計 150 run 分の約 210 ml の試料をコンビニエバポ(Bio Chromato 社)で乾固し重量を測定したところ、1 mg 以下であった。活性画分 B を用いて寒天培地希釈法で抗コリネ型細菌物質による生育阻止効果が観察される最少濃度を見積もったところ、低濃度でも強い生理活性を示す物質であることが示唆された。各 HPLC 画分を濃縮し、TLC 展開後に UV あるいはニンヒドリンで検出した。非活性画分に HPLC 注入試料と同様のスポットが検出された一方で、活性画分 A には移動度が高い位置にスポットが検出され、B にはスポットが検出されなかった。TLC 展開後のシリカゲルを分画して掻きとり、抽出した試料について活性を評価した結果、抗コリネ型細菌物質はスポットが検出されない移動度の低い位置に含まれていることが分かった。抗コリネ型細菌物質は UV あるいはニンヒドリンで難検出な物質か、検出可能な濃度に達していないと考えられる。今後は HPLC 精製を重ねて活性画分 B を大量に回収するとともに、活性画分 A についても回収して TLC 精製で純度を高める計画である。

antibiotics, corynebacterium glutamicum, bacillus

発表番号：2F183
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 沖縄県本部産リュウキュウアイの機能性評価

# Functional evaluation of Strobilanthes cusia cultivated in Okinawa

○嶺井 凛[1]、嶺井 美枝子[2]、嶺井 政秀[2]、田中 博[1] ([1]沖縄高専・生物資源、[2]アイリーフ)
○Rin MINEI[1], Mieko MINEI[2], Masahide MINEI[2], Hiroshi TANAKA[1] ([1]NIT, Okinawa College, [2]Ai leaf)

【背景・目的】

リュウキュウアイ（*Strobilanthes cusia*）は、沖縄で染料の原料として利用されている。また、リュウキュウアイは中国では漢方薬として利用され、抗菌作用や抗酸化作用、抗がん作用が報告されている。一方、リュウキュウアイは食べることが可能であるという報告があるにも関わらず、沖縄県本部町での調査では食されていない。そこで、リュウキュウアイの抗菌作用に着目し、リュウキュウアイが染料から食への利用へと移り変わるきっかけを作ることを目的とする。

【材料・方法】

沖縄県本部町伊豆味で栽培されたリュウキュウアイを譲り受け、枝葉・根の各部位に分けた後、熱風乾燥を行い粉末化した。乾燥粉末試料 100 g に 70 %エタノール 1 L を加え、室温で 1 時間撹拌した。この抽出液を遠心分離後、上清を各抽出液とした。さらに生試料から抽出液を調製し、また、乾燥粉末試料または生試料を特定の乳酸菌で発酵させた後、同様の方法で抽出液を調製した。合計 10 種類の抽出液を調製した。抗菌活性評価の指標菌には、食品腐敗菌として *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*（JCM 1465)、*Escherichia col*i（JCM 20135)、また、う蝕菌として *Streptococcus mutans*（JCM 5175)、歯周病菌として *Treponema denticola*（JCM 8152)、*Tannerella forsythia*（JCM 10827）を使用した。各指標菌培養液を寒天培地に混釈した後、培地上にペーパーディスクを置き、各抽出液 30 µL を滴下して 37℃、24 時間培養後、生育阻止円を観察した。*Streptococcus mutans* に対するポジティブコントロールには乳酸菌由来のナイシン A（25 mg/mL）を用いた。

【結果・考察】

これまでの予備検討の結果から、リュウキュウアイのエタノール抽出液が *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*（JCM 1465）に対して抗菌活性を示すことが示唆された。一方、本研究において乾燥粉末試料ならびに生試料から調製したリュウキュウアイ抽出液については、*Streptococcus mutans*（JCM 5175)、*Treponema denticola*（JCM 8152)、*Tannerella forsythia*（JCM 10827）に対する抗菌活性は認められなかった。ナイシン A（25 mg/mL）は、*Streptococcus mutans*（JCM 5175）に対して抗菌活性を示した。本報告では、5 種類の指標菌に対する 10 種類のリュウキュウアイ抽出液の抗菌活性スペクトルを報告するとともに、抗インフルエンザウィルス活性についても報告する。また、抗菌活性成分、抗インフルエンザウィルス活性成分の定性・定量分析についても考察する。

Antimicrobial activity, Strobilanthes cusia, Okinawa

発表責任者：田中　博（h.tanaka@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：2F184
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH family 134 に属する β-1,4- マンナナーゼ (Man134A) の活性部位残基の探索

# Identification of active site residues of novel β-mannanase Man134A from *Aspergillus nidulans*.

○木本 紗蘭、山田 みゆき、酒井 杏匠、金子 優平、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Saran KIMOTO, Miyuki YAMADA, Kiyota SAKAI, Yuhei KANEKO, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

[目的]

我々は、*Aspergillus nidulans* が β-マンナンを唯一の炭素源とした際に細胞外に分泌する新規 GH ファミリー 134 に分類される β-マンナナーゼ (Man134A) を発見した。本酵素は Glycoside Hydrolase (GH) ファミリー 5 (GH5) および GH26 に属する既知の β-マンナナーゼのみならず、既知の糖質加水分解酵素と全く相同性を有していない。Man134A は、既知の GH5 に属する β-マンナナーゼ (Man5C) と比べて、反応産物として単糖を生成せずマンノオリゴ糖 (特にマンノトリオース) を多く生成する特徴を有していた (Shimizu *et al. J. Biol. Chem.* 2015, 290, 27914-27927)。また、Man134A は高い熱安定性を有していた。しかしながら、一般的な β-マンナナーゼの分子質量は 40-50 kDa であるのに対して、Man134A は 18 kDa と半分以下であること、GH5 および GH26 に属する β-マンナナーゼと全く相同性がないことから Man134A の活性部位残基については推定できなかった。本研究では、Man134A に部位特異的変異を導入することで活性部位残基の探索を行った。

[方法・結果]

Man134A を含む GH134 ファミリーに属する酵素のアラインメントを作成した結果、ホモログ間で高度に保存されたアミノ酸が 39 個存在していた。それらのアミノ酸の中から活性部位残基の候補として 9 アミノ酸を選抜し、それぞれに部位特異的変異を導入することで、大腸菌を宿主として変異型 Man134A を生産させた。Ni-NTA アフィニティーカラムにて精製後、β-マンナナーゼ活性を測定したところ、63 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した変異型 Man134A E63A では β-マンナナーゼ活性が消失した。このことから、63 番目のグルタミン酸は β-マンナナーゼ活性に必須であることが考えられた。また、106 番目のグルタミン酸をアラニンに置換した変異型 Man134A E106A のグルコマンナンに対する酵素学的パラメーターを算出した結果、*k*cat 値は 0.106 $s^{-1}$ であり、野生型 Man134A の *k*cat 値の約 4%までに顕著に低下していた。この結果より、106 番目のグルタミン酸は Man134A の反応に必須ではないものの、反応速度に大きく寄与していることがわかった。

今後、β-マンナナーゼとしてだけでなく、これまでに報告されているどの糖質加水分解酵素とも全く相同性を有さない Man134A の立体構造および活性部位残基を明らかにすることによって、ユニークな β-マンナン分解反応メカニズムが明らかになると考えられる。

active site residues, site directed mutagenesis, GH134

発表番号：2F185
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 新規 GH134 ファミリーに属する糖質加水分解酵素の機能解析

# Characterization of Man134A homologues belonging to a new Glycoside Hydrolase family 134

○酒井 杏匠[1]、新沢 祐大[1]、嶺澤 美帆[1]、山田 みゆき[1]、望月 麻衣[1]、神藤 定成[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]名城大理工)
○ Kiyota SAKSAI[1], Yuta SHINZAWA[1], Miho MINEZAWA[1], Miyuki YAMADA[1], Mai MOCHIZUKI[1], Sadanari JINDOU[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi Kato[1] ([1]Fac. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Meijo Univ.,)

【目的】

我々は、β-マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に細胞外に分泌される新規の β-1,4-マンナナーゼ (Man134A) を発見し、Man134A が既知の β-マンナナーゼが属する Glycoside Hydrolase family 5 (GH 5) および GH26 のみでなく、既知の糖質加水分解酵素ファリミーのいずれにも属さないことを示した (Shimizu *et al*. J. Biol. Chem. 2015, 290, 27914-27927)。このことから、Man134A が新規の GH family であることを提唱した。次に、GH134 ファミリーの分子系統樹を作成したところ、GH134 に属するタンパク質は植物病原菌を含む糸状菌および放線菌の一部にのみ分布しており、*A. nidulans* と同じ *Aspergillus* 属である *A. niger* のゲノムには GH134 に属する遺伝子はコードされていなかった。一方、*A. nidulans* のゲノムには Man134A と相同性を有する遺伝子が Man134A の他に 3 種類存在していた。本研究では、Man134A の 3 種類のパラログおよび他の菌類が有する GH134 に属するタンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

Man134A 以外の GH134 ファミリーに属するタンパク質すべてが β-マンナナーゼ活性を有するか、他の多糖類に対する加水分解活性を有するかは不明である。そこで、いくつかのオルソログおよびパラログのリコンビナントタンパク質を大腸菌 *E. coli* およびメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* にて異種発現させ、調製した。β-マンナンおよび他の多糖類（セルロース、キシラン、キチンなど）と反応後、TLC および HPLC にて反応生成物を分析することで、基質特異性を解析した。その結果、*A. nidulans* のパラログのうち 2 種類 (Man134B, Man134C; それぞれ Man134A との identity 71%, 54%) および *Aspergillus oryzae* のもの (Man134A と identity 70%) 、放線菌 *Streptomyces* 属のもの (Man134A と identity 61%) においては、β-マンナナーゼ活性が見られたが、それらのリコンビナント酵素の β-マンナンやオリゴ糖に対する酵素学的パラメーターおよび分解産物の生成パターンに違いが見られた。また、4 種類とも今回調べた多糖類についてはマンナナーゼ活性以外の加水分解活性は確認されなかった。現在、*A. nidulans* のゲノム中にある Man134A のパラログである Man134B, Man134C, Man134D (Man134A と identity 39%) の生理学的役割についても解析を行なっている。

β-mannanase, Glycoside Hydrolase, GH134

発表責任者：酒井杏匠（kiyota9356@gmail.com）

発表番号：2F186
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 *Aspergillus nidulans* および *Aspergillus oryzae* 由来の新規 GH134 に属するβ-マンナナーゼの酵素学的性質

# Thermostability of the novel β-1,4-mannanase belonging to GH134 family in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus oryzae*.

○嶺澤 美帆[1]、酒井 杏匠[1]、新沢 祐大[1]、望月 麻衣[1]、山田 みゆき[1]、木本 紗蘭[1]、金子 優平[1]、石原 紗彩耶[1]、小林 哲夫[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]名古屋大院農学)
○Miho MINEZAWA[1], Kiyota SAKAI[1], Yuta SHINZAWA[1], Mai MOCHIZUKI[1], Miyuki YAMADA[1], Saran KIMOTO[1], Yuhei KANEKO[1], Saaya ISHIHARA[1], Tetsuo KOBAYASHI[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Nagoya Univ.)

【目的】

β-マンナン（グルコマンナンおよびガラクトマンナン）は様々な植物に含まれる難分解性多糖で、環境中に存在する未利用バイオマスの一つであるため、バイオリファイナリーの原料として注目を集めている。本研究室において、β-マンナンを炭素源にした際に *Aspergillus nidulans* が細胞外に分泌する既知のβ-マンナナーゼとは全く相同性を有さない新規β-マンナナーゼ *An*Man134A を世界で初めて発見し、新しい Glycoside Hydrolase ファミリー134 (GH134) を創設した。さらに、*An*Man134A は、既知のβ-マンナナーゼ (アミノ酸配列から、既知の糸状菌が有するβ-マンナナーゼはすべて GH5 および GH26 に分類されている) と比べて異なる基質特異性を持つことも明らかにした (Shimizu *et al. J. Biol. Chem.* 2015, 290, 27914-27927)。

本研究では、*A. nidulans* の *An*Man134A および産業利用の面で重要な麹菌 *Aspergillus oryzae* が有する *Ao*Man134A の機能解析および熱安定性について検討した。

【方法・結果】

*Escherichia coli* および *Pichia pastoris* を宿主にして、*An*Man134A および *Ao*Man134A のリコンビナント酵素を調製した。GH5 に属するβ-マンナナーゼ (*An*Man5C) も同様に調製し、対照試料とした。*Ao*Man134A について、グルコマンナン、ガラクトマンナン、β-マンナンおよびマンノオリゴ糖に対する基質特異性および酵素学的パラメーターを検討した。その結果、*An*Man134A と同様の性質を有することが明らかとなった。次に *An*Man134A、*Ao*Man134A および *An*Man5C の熱安定性を検討した。それぞれ 3 種のβ-マンナナーゼを 70℃、80℃、90℃ で 0～120 分間インキュベート後、グルコマンナンを基質に用いてβ-マンナナーゼ活性を測定したところ、*An*Man5C に比べて *An*Man134A および *Ao*Man134A は高い熱安定性を有していた。80℃ で 30 分間インキュベートした場合、*An*Man5C のβ-マンナナーゼ活性はほとんど検出されないのに対して、*An*Man134A および *Ao*Man134A では 90℃ で 30 分間インキュベート後でも約 40% の活性が残存していた。これらのことから、GH134 に属するβ-マンナナーゼは高い熱安定性を有していることが明らかとなり、高い温度でのプロセスなどの産業利用にも極めて有用であることが示された。

Thermostability, GH134, β-mannanase

発表番号：2F187
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 β-1,4-マンナナーゼ Man134A の β-マンナン分解における役割

# Novel β-1,4-mannanase Man134A is involeved in β-mannan degradation.

○新沢 祐大[1]、酒井 杏匠[1]、嶺澤 美帆[1]、望月 麻衣[1]、山田 みゆき[1]、金子 優平[1]、石原 紗彩耶[1]、神藤 定生[2]、小林 哲夫[3]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]名城大理工、[3]名大院生命農)
○Yuta SHINZAWA[1], Kiyota SAKAI[1], Miho MINEZAWA[1], Mai MOCHIZUKI[1], Miyuki YAMADA[1], Yuhei KANEKO[1], Saaya ISHIHARA[1], Sadanari JINDOU[2], Tetsuo KOBAYASHI[3], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Fac. Agric., Meijo Univ., [2]Fac. Sci. Technol., Meijo Univ., [3]Nagoya Univ.)

【目的】

我々は、β-マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に生産された細胞外タンパク質中に、Glycoside Hydrolase family 5 (GH5) および GH26 に属する既知の β-マンナナーゼとは全く相同性を有さない新規 GH family 134 に分類される β-1,4-マンナナーゼ (Man134A) を見出した [1)]。Man134A は、既知の GH5 に属する β-マンナナーゼ (Man5C) と比べて、反応産物として単糖を生成せずマンノオリゴ糖（特にマンノトリオース）を多く生成する特徴を有していた。また、Man134A は高い熱安定性を有していた。

本研究では、*A. nidulans* における Man134A の生理学的な役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】

メタノール資化酵母 *Pichia pastoris* を宿主として、GH5 に属する既知のβ-マンナナーゼ (Man5C) および Man134A のリコンビナントタンパク質を調製し、β-マンナンを基質としたときの酵素学的性質を調べた。Man134A および Man5C の至適 pH はそれぞれ、6.0 および 4.0 であった。次に、*man134A* の遺伝子破壊株 (*Δman134A* 株) を作製した。β-マンナンのみを炭素源として生育させた際、野生株 (WT 株) と比較して *Δman134A* 株の生育が低下したことから、Man134A は、β-マンナンの資化に関わっていることが示唆された。次に、培地中の pH が生育に与える影響について WT 株と *Δman134A* 株で比較した。その結果、培地の pH が中性付近の場合、WT 株と比較して *Δman134A* 株は生育が有意に遅くなっていた。さらに、pH4.0 と 6.5 において、グルコマンナン分解に対する Man5C および Man134A の相乗効果を検討したところ、 pH6.5 において高い相乗効果が示された。以上の結果より、Man134A は、主として中性付近における β-マンナンの分解に関与していることが示された。現在、 WT 株 および *Δman134A* 株の培養上清において、唯一の炭素源として加えた β-マンナンから生じた分解産物について詳細な解析を進めている。

1) Shimizu M, Kaneko Y, Ishihara S, Mochizuki M, Sakai K, Yamada M, Murata S, Itoh E, Yamamoto T, Sugimura Y, Hirano T, Takaya N, Kobayashi T, Kato M. Novel β-1,4-mannanase belonging to a new glycoside hydrolase family in *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 27914-27927.

GH134, β-mannanase, *Aspergillus nidulans*

発表責任者：新沢祐大（n6d1j7@gmail.com）

発表番号：2F188
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヘミセルロース応答的に生産さ れる糸状菌 *Aspergillus nidulans* の細胞外プロテオーム解析

Secretome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* grown on hemicelluloses.

○鈴木 梨央、糀谷 紗季、村田 俊輔、酒井 杏匠、河合 竜治、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Rio SUZUKI, Saki KOJIYA, Shunsuke MURATA, Kiyota SAKAI, Tatsuya KAWAI, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus nidulans* はデンプン、セルロース、ヘミセルロース分解能を有しており、それら多糖類の分解に関わる細胞外酵素およびそれらの転写制御について盛んに研究が行われている。最近、本研究室において、*A. nidulans* が β-マンナンを唯一の炭素源とした際に細胞外に分泌する、Glycoside Hydrolase (GH) ファミリー 5 (GH5) および GH26 に属する既知の β-マンナナーゼと全く相同性を示さない新規 GH ファミリー 134 に分類される β-マンナナーゼ (Man134A) を発見した (*Shimizu et al. J. Biol. Chem.* 2015, 290, 27914-27927) 。Man134A は GH5 に属する一般的な β-マンナナーゼ (Man5C) と比べて、反応産物として単糖を生成せずマンノオリゴ糖（特にマンノトリオース）を多く生成する特徴を有していた。このような背景から、今回見出した β-マンナナーゼのみでなく、アミノ酸配列レベルで既知の酵素と全く相同性を示さない未知の分解酵素は多数存在していると考えられた。さらに、それらの酵素の中には新規性の高い酵素も含まれていると考えられる。そこで、本研究では、β-マンナンおよびキシランのみをそれぞれ炭素源として生育させた際に *A. nidulans* が分泌するタンパク質をプロテオミクスの手法にて網羅的に解析した。

【方法・結果】

グルコース、グルコマンナンおよびキシランのみを炭素源とした培地で *A. nidulans* を生育させた後、菌体をろ別した。得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した後、二次元電気泳動によってタンパク質を分離した。染色後、検出されたタンパク質スポットを切り出しトリプシン処理後 MALDI-TOF/TOF-MS にてタンパク質を同定した。グルコースを炭素源にして生育させたものと比較して、グルコマンナンを炭素源にした場合、多数のタンパク質が生産されていた。GH5, GH134 に属する β-マンナナーゼ (ANID_06427, ANID_02710) および GH2 のマンノシダーゼ (ANID_03368) の他に、プロテアーゼ (ANID_02366) が同定された。また、既知の酵素とはアミノ酸配列レベルで全く相同性を示さない機能未知のタンパク質も生産されていた。キシランのみを炭素源とした場合ではキチナーゼ (ANID_04871) に加え、機能未知タンパク質も同定された。現在、グルコマンナンおよびキシラン応答的に分泌されていた機能未知タンパク質の機能について解析を進めている。

Secretome, Proteomics, *Aspergillus nidulans*

発表番号：2F189
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物由来香気成分の微生物資化に関わる酵素

# Microbial enzyme involved in the metabolism of the botanical volatile compounds

○土居 志織、橋本 義輝、富田 千晶、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○ Shiori DOI, Yoshiteru HASHIMOTO, Chiaki TOMITA, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. of Tsukuba)

ピペロナールはヘリオトロープの花の精油の主要成分であり、その独特の甘い芳香のために昔から香水として利用されてきた。現在では合成法が開発されたこともあり、食品や化粧品の香料として、また、農薬や向精神薬の原料としても頻繁に用いられている。植物由来の香気成分として、他に、シナモンに含まれるシナモアルデヒドや、バニラに含まれるバニリンなどが有名である。しかし、これら天然に存在する香気成分の生理学的な意義は、昆虫を誘引する作用、抗菌作用などが一部報告されているものの、未だよくわかっていない。そこで我々は、ピペロナール代謝微生物を土壌より探索し、ピペロナールの自然界での代謝、それに関わる酵素を同定した。

我々は土壌より単離・同定したピペロナール代謝微生物である *Burkholderia* sp. (CT39-3 株)から既にピペロナール代謝酵素を精製するとともに、反農産物の同定と反応のストイキオメトリーを決定することで、ピペロナール代謝酵素の触媒する反応を同定した。また、本酵素の吸収スペクトルを解析するとともに、
原子吸光度計や高速液体クロマトグラフィーにより、本酵素が含有する補酵素の検討を行った。さらに、ピペロナールだけでなく、バニリンなどを含むさまざまなピペロナール類似化合物を用いて、*in vitro* および *in vivo* での本酵素の応答について検討した。

metabolism, enzyme, volatile compounds

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F190
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物によるセサミン代謝における新規なメチレン基転移酵素の発見
# Discovery of the novel methylene transferase from microorganisms

○熊野 匠人、藤木 恵津子、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Takuto Kumano, Etsuko Fujiki, Yoshiteru Hashimoto, Michihiko Kobayashi (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】セサミンはゴマなどに多く含まれ、抗酸化活性、エストロゲン様作用など、ヒトにとって有用な生理活性が多く知られている。そのため、最近ではサプリメントとして販売もされている。

天然化合物の微生物による代謝を調べることは、新規酵素活性や希少な代謝中間体化合物の発見につながることもある（Ref. 1）。ヒトなどにおいてはセサミンが体内に取込まれると、肝臓の CYP450 によって酸化的に脱メチレン化し、より強い抗酸化活性を示すカテコール体となることが知られている。一方で、微生物によるセサミン代謝はこれまで酵素、遺伝子レベルでは未解明である。そこで、本研究ではセサミンを資化する微生物を土壌よりスクリーニングし、その代謝に関わる酵素・遺伝子の特定と新規な代謝経路の解明を目的とした。

【方法・結果】セサミンを単一炭素源とする培地にゴマ畑周辺を含む各地より採取した土壌を接種し、28°C で数日間振盪培養した。その後、新鮮な培地への植継ぎを繰り返すことで集積培養を行い、適当な倍率（$10^3$~$10^5$）で希釈してから同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、３３株を単離した。

それぞれの菌を単独培養し、細胞破砕液および、無細胞抽出液を調製しセサミンとの反応を試みた。細胞破砕液においては 7 株でセサミンの代謝産物と考えられる新たなピークを HPLC において検出したが、無細胞抽出液ではその中の 1 株（以下本株）でのみ活性を検出できた。

次に本株よりセサミン代謝酵素を各種クロマトグラフィーによって SDS-PAGE 上で単一バンドにまで単離精製し、酵素学的諸性質の解析を行った。精製したセサミン代謝酵素は補酵素依存的にセサミンを脱メチレン化し、セサミンモノカテコール、セサミンジカテコールへ変換した。さらに、セサミンから脱離したメチレン基は補酵素に転移しており、本酵素がユニークなメチレン基転移酵素であることがわかった。本酵素はゲル濾過クロマトグラフィーでの解析から 3 量体であり、セサミンに対する $K_m$ は 32 μM、$k_{cat}$ は 7.9 $s^{-1}$ であった。また、pH5.5～10.0、30°C 以下で安定であり pH7.5～8.0、40°C が至適反応条件であった。

Ref. 1. Hassaninasab, A., Hashimoto, Y., Tomita-Yokotani, K., Kobayashi, M. Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 6615-6620 (2011).

microorganism, catabolism, methylene transferase

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F191
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Heterologous expression in Pichia pastoris and characterization of an imidazole sensitive beta-glucosidase from the gregarious wood-feeding cockroach Panesthia angustipennis

○Yihai LI[1], Gaku Arakawa[2], Gaku Tokuda[3], Hirofumi Watanabe[2], Manabu Arioka[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]Nat. Inst. Agrobiol. Sci., [3]Univ. of the Ryukyus)

β-glucosidase (BG) is considered to be the rate-limiting enzyme in the biodegradation of the recalcitrant cellulose. Wood feeding insects possess a variety of lignocellulolytic enzymes to thrive on plant matters, and could be prominent natural resources for exploitation of high efficiency cellulases. Here, we report the heterologous expression, purification, and biochemical characterization of an imidazole-sensitive glycoside hydrolase family 1 (GHF1) PaBGI from the wood-feeding cockroach *Panesthia angustipennis*. C-terminally hexahistidine and myc-epitope tagged PaBGI was expressed in *Pichia pastoris* and purified through three successive steps including ammonium sulfate precipitation, $Ni^{2+}$-affinity and anion exchange chromatographies. PaBGI demonstrated a relative higher affinity and catalytic efficiency towards cellobiose with $K_m$ and $k_{cat}/K_m$ values of 4.8 mM and 153.3 $mM^{-1}$ $s^{-1}$, respectively. Although both imidazole and Tris were strong competitive inhibitor of PaBGI, with $K_i$ values of 4.3 mM and 5.9 mM at pH 5.5, respectively, imidazole exhibited a rather potent inhibition at pH 8.0. Glycine was found to stimulate the activity of PaBGI at high pH, which might be a characteristic possessed by a variety of GHF1 or even GHF3 BGs. Collectively, our work suggests sophisticated interactions of inhibitors and an enhancer with PaBGI.

beta-glucosidase, wood-feeding cockroach, heterologous expression

発表責任者：有岡　学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F192
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

麹菌 *A. oryzae* を宿主としたシロアリ腸内共生原生生物由来セロビオヒドロラーゼの生産
Production of cellobiohydrolase from a symbiotic protist in the gut of the termite using *Aspergillus oryzae* as a host

○北本 真理奈[1]、川田 純毅[1]、丸山 潤一[1]、小田切 正人[2]、守屋 繁春[2]、有岡 学[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]理化学研究所)
○Marina KITAMOTO[1], Junki KAWADA[1], Jun-ichi MARUYAMA[1], Masato OTAGIRI[2], Shigeharu MORIYA[2], Manabu ARIOKA[1] ([1]Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN)

【目的】

シロアリは高い木質系バイオマス分解能力を持つ昆虫として知られている。下等シロアリにおいては、腸内に共生する原生生物群がセルラーゼを生産することがわかっており、これが宿主の高い資化効率に寄与すると考えられている。このような酵素はバイオエタノール生産におけるバイオマス糖化の効率化に貢献する可能性があると期待される。これまでシロアリの腸内に共生する原生生物群に由来するセルラーゼの機能解析を目的とした組換え生産が試みられてきたが [1-3]、結晶性セルロースの分解に重要な役割を持つセロビオヒドロラーゼ (CBH) の生産は現在のところ報告されていない。今回、高いタンパク質分泌能力を持つ麹菌 *Aspergillus oryzae* を用い、オオシロアリの腸内に共生する原生生物由来の CBH の生産に成功したため、これを報告する。

【方法及び結果】

オオシロアリ *Hodotermopsis sjostedti* の腸内に共生する *Eucomonympha* 属原生生物から単離された cDNA がコードする CBH (以下、EuCBH) は、分子系統解析により GH ファミリー7 に属する CBH と近縁であると予想された。さらに、そのアミノ酸配列中に GH ファミリー7 の CBH が持つ触媒残基が保存されていたことから、EuCBH は CBH 活性を持つと予想された。*A. oryzae* を用いた生産のため、EuCBH を α-アミラーゼ AmyB との融合タンパク質として発現させるプラスミドを作製した。発現後に両者が分離できるように、AmyB と EuCBH の間に Kex2 様プロテアーゼ切断配列を挿入し、さらに検出・精製のため EuCBH の C 末端側に HA-$His_6$ タグを付加した。この発現プラスミドを用いて *A. oryzae* 株の形質転換を行ったのち、得られた株を培養し、菌体および培地画分のタンパク質について HA 抗体を用いたウエスタン解析を行った。その結果、菌体画分においては AmyB と EuCBH の融合タンパク質の発現が確認された。一方、培地画分については濃縮および Ni-NTA 樹脂による精製を行ったのち、同様にウエスタン解析を行った。その結果、目的タンパク質のサイズと考えられるバンドが検出された。以上の結果から、EuCBH の生産に成功したと考えられた。現在、生産された EuCBH について、酵素活性など機能に関する検討を行っている。

1) Sasaguri *et al.* (2008) *J Gen Appl Microbiol.* 54:343-51.
2) Todaka *et al.* (2010) *Appl Biochem Biotechnol.* 160:1168-78.
3) Otagiri *et al.* (2013) *Appl Biochem Biotechnol.* 169:1910-8.

*Aspergillus oryzae*, heterologous expression, cellulase

発表責任者：有岡学（arioka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2F193
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 文化財修復に有用な *Pseudomonas vesicularis* 由来ポリビニルアルコール分解酵素の生産性の向上に向けた検討

# Examination of improving the production of polyvinyl alcohol-degrading enzymes produced by *Pseudomonas vesicularis*, useful for the conservation of cultural properties

○山中 勇人[1]、駒 大輔[1]、森芳 邦彦[1]、酒井 清文[2]、早川 典子[2]、川野邊 渉[2]、大本 貴士[1] ([1]阪市工研、[2]東文研)
○ Hayato Yamanaka[1], Daisuke Koma[1], Kunihiko Moriyoshi[1], Kiyofumi Sakai[2], Noriko Hayakawa[2], Wataru Kawanobe[2], Takashi Ohmoto[1] ([1]OMTRI, [2]NRICPT)

【目的】 ポリビニルアルコール(PVA)は過去の一時期に、文化財修復において絵の具の剥落止めなどの目的に使用されたが、経年劣化による白化などにより文化財に悪影響を及ぼすことが問題となっている。このため、作品本体を汚損することなく劣化 PVA を選択的に除去する技術の開発が望まれていた。我々は、*Pseudomonas vesicularis* が生産する PVA 分解酵素を用いて、文化財上の劣化 PVA を安全かつ効果的に除去する方法の開発に成功している[1)]。*Pseudomonas vesicularis* による PVA の分解には、第 2 級アルコールオキシダーゼとβ-ジケトンハイドロラーゼの二つの酵素が関与しているが、本方法の実用化に向けてこれらの酵素の量産化が課題となっているため、酵素の生産性の向上を目的に検討を行った。

【方法と結果】 *Pseudomonas vesicularis* は 1000 mg/L PVA および酵母エキスを含む無機塩培地において 27℃で振とう培養した。培養上清の酵素活性を以下の方法により測定した。第 2 級アルコールオキシダーゼ活性は、PVA2000（けん化度 99-100 mol%）を基質とし、30℃、pH 7.0 の条件で酵素液を作用させ、生成する過酸化水素を定量することにより求めた。β-ジケトンハイドロラーゼ活性は、β-ジケトン構造を有する 3,5-ヘプタンジオンを基質とし、30℃、pH 7.0 の条件で酵素液を作用させ、生成するメチルエチルケトンを定量することにより求めた。

培養時に添加する培地成分について種々検討を行った結果、炭素源として使用する PVA の種類が酵素の生産性に影響を及ぼすことがわかった。概ね、けん化度が小さいほうが、また重合度が小さいほうが、酵素の生産量は増加した。また現在、*Pseudomonas vesicularis* を変異処理することにより酵素の生産性を改善することにも取り組んでおり、その検討結果についても述べる。

【謝辞】 本研究の一部は JSPS 科研費 26282071 の助成を受けて行った。

[1)] 特開 2013-116959.

polyvinyl alcohol, polymer-degrading enzymes, *Pseudomonas vesicularis*

発表責任者：山中勇人（yamanaka@omtri.or.jp）

発表番号：2F194
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 可溶性糖質を原料とした *Trichoderma reesei* セルラーゼの半連続生産

# Semi-continuous production of *Trichoderma reesei* cellulases using soluble carbon sources.

○池 正和、田伏 美峰、徳安 健（農研機構・食総研）
○Masakazu IKE, Mine TABUSE, Ken TOKUYASU (NARO, NFRI)

【目的】我々は、繊維質資源の有効活用による地域活性化を目指し、繊維質の酵素糖化及び糖液からの有価物への変換技術の開発を行っている。この中で、大きな課題となっている酵素糖化コスト低減については、糖化酵素の質・利用技術の改良・最適化や酵素製造技術開発等に関して総合的に取り組んでいる。酵素製造に関しては、これまでに、セルラーゼ生産微生物 *Trichoderma reesei* のグルコース抑制解除株を用いた可溶性炭素源からの効率的酵素生産基盤技術を構築している [1), 2)]。本技術は、可溶性糖質原料の組成・添加量等をコントロールしつつ酵素生産培養を行うことで、高生産速度維持及び酵素組成制御を可能とするものである。現在、上記培養系の特性を活かした糖化酵素の長期安定製造について重点的に検討を進めている。本研究では、可溶性糖質を原料とした半連続培養時における *T. reesei* セルラーゼ生産特性の評価を目的とした。

【方法・結果】グルコース存在下でも効率的なセルラーゼ生産が可能な *T. reesei* M2-1 株を用いて、主要炭素源としてのグルコース（G)、セルラーゼ誘導物質としてのセロビオース（C2）及びヘミセルロース誘導物質としてのキシロース(X)・アラビノース（A）の糖混合液（総糖濃度 12%）を連続的に添加しつつ酵素生産培養を行った。この際、基本培養液量は３L、糖の添加速度は約 16 g-sugar/L/day とし、１日毎に増加体積分の培養液を抜き取ることで液量を管理した。その結果、酵素生産培養（糖液フィード）開始後約１週間で、培養液中タンパク量・セルラーゼ活性が頭打ちになり、その後はほぼ一定となった。このことから、上記培養条件において、酵素生産開始約１週間で定常状態に達したと推察された。以降、培養終了までのおよそ 10 日間に渡り定常状態が維持され、この間（半連続生産期間）の投入糖質あたりのセルラーゼ生産効率は、220-260 FPU(濾紙分解活性)/g-sugar 程度であり、同組成糖液（GXAC2）での連続フィード培養（約 250-280 FPU/g-sugar）と比較してほぼ同等であった。本発表では、他条件での半連続培養酵素生産結果についても報告すると共に、長期安定生産に関する取り組みについても併せて紹介する。

1) Ike M, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 2059-2066 (2010)
2) Ike M, *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77, 161-166 (2013)

cellulase, enzyme production, *Trichoderma reesei*

発表責任者：池　正和（mikegogo@affrc.go.jp）

発表番号：2F195
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# キチン由来ヘテロ 2 糖による *Shewanella baltica* のキチン分解酵素生産誘導

# Induction of chitinolytic enzyme production by heterodisaccharide derived from chitin in *Shewanella baltica*

○池嶋 聖史[1]、平野 貴子[2]、白石 晴香[1]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）
○ Masafumi IKEJIMA[1], Takako HIRANO[2], Haruka SHIRAISHI[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresourse Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. of Bioresourse Sciences, Nihon Univ.)

【目的】一般に海洋細菌はキチナーゼを分泌し、キチンから *N,N'*-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］を生産し、栄養源とするが、一部の Vibrio 属細菌は更にキチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD）を分泌し、$(GlcNAc)_2$ から β-*N*-acetyl-D-glucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生産する。これまでにこのヘテロ 2 糖が COD 生産性 Vibrio 属細菌に対して、キチナーゼ生産誘導因子や遊走性因子として働くことを明らかにした[1, 2)]。また最近我々は、*Shewanella woodyi* と *Shewanella baltica* も COD 遺伝子を持つことを発見し、それらの酵素化学的性質を報告した[3, 4)]。いずれの COD も、酵素化学的性質は Vibrio 属由来の COD と概ね類似しており、$(GlcNAc)_2$ に最大の活性を示して、GlcNAc-GlcN を生成した。このことから、Shewanella 属細菌に対しても本ヘテロ 2 糖が COD 生産性 Vibrio 属細菌と同様に上記の生理機能を示すのではないかと考え、前年度大会で Shewanella 属細菌の培養液に GlcNAc-GlcN を加えると、*S. baltica* では培養上清中のキチン分解活性が上昇することを報告した[5)]。そこで本研究では、*S. baltica* を用いて本ヘテロ 2 糖により生産誘導されるキチン分解酵素の同定を行った。

【方法・結果】GlcNAc-GlcN や $(GlcNAc)_2$ が添加された培地と糖無添加の培地で *S. baltica* を培養し、培養上清を回収した。そこに *p*NP-$(GlcNAc)_2$ を加え反応を行い、生成物を TLC で確認することでキチン分解活性がどの酵素に起因するものか推定した。その結果、GlcNAc-GlcN により生産誘導される酵素は β-*N*-アセチルヘキソサミニダーゼではなく、キチナーゼであることがわかった。さらに、*S. baltica* のゲノム配列上に存在する 2 つのキチナーゼのうち、どちらのキチナーゼが生産誘導されているのか調べるため、GlcNAc-GlcN が添加された培地と糖無添加の培地で本菌を培養し、培養上清中の全タンパク質を LC-MS/MS により分析した。そしてデータベース上の配列から生産酵素の同定を行い、MS/MS 分析で得られたシグナルを比較することで発現量を半定量的に比較した。その結果、GlcNAc-GlcN により発現が誘導された酵素は Gene ID 125998489 のキチナーゼであることがわかった。

1) Hirano T. *et al., Glycobiology*, **19,** 1046-1053 (2009), 2) Hirano T. *et al.*, *Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161-166 (2011), 3) Hirano T. *et al., J. Appl. Glycosci.*, **62**, 153-157 (2015), 4) 白石晴香ら, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 講演番号 2D02p21, 5) 白石晴香ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 講演番号 3A32a07

chitinase, chitin oligosaccharide deacetylase, induction of enzyme production

発表番号：2F196
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Brevibacillus* 分泌発現系を利用したカラギーナン分解酵素の精製

Purification of carrageenan-degrading enzyme using *Brevibacillus* secretion system

○大西 浩平、笹岡 美波、高橋 亮（高知大農）
○Kouhei OHNISHI, Minami SASAOKA, Ryo TAKAHASHI (Kochi Univ.)

【目的】*Bacillus* 属細菌 KLC17 は紅藻キリンサイの細胞外硫酸多糖であるカラギーナンを分解する細菌であり、カラギーナン分解酵素を菌体外に分泌する。これまでに我々はカラギーナン分解酵素遺伝子 *cglA* をクローニングし大腸菌を利用した発現系を構築している。この系では、CglA は菌体内で発現され、タンパク質分解を受ける。そこで、本来の局在場所である菌体外に分泌させ、より分解の少ない組換え酵素を得ることを目的とした。プロテアーゼ活性があまり見られないことや操作が容易などの利点を持つ *Brevibacillus* を利用する系を用いて CglA の分泌発現系を構築し、菌体外から酵素の精製を行うこととした。【方法】カラギーナン分解酵素 CglA は分子量 100 kDa を超える巨大タンパク質であり、酵素活性に必須な領域は中央部分であることがこれまでに明らかとなっている。そこで全長遺伝子を含め、異なる遺伝子領域を持つ 7 種類の c*glA* 遺伝子断片を C 末端側に His タグを付加した構造となるよう PCR により増幅し、*Brevibacillus* 用分泌ベクターpNCMO2 にクローニングした。得られたプラスミドを *Brebibacillus* に導入後、培養上清中の分泌タンパク質を硫安沈殿により回収後、ニッケルカラムを用いて CglA を精製した。酵素活性は基質のカラギーナンと反応させた後、生じた還元糖の量を DNS 試薬により定量することで測定した。【結果及び考察】CglA は大まかに N 末端シグナル配列(S)、N 末端推定カラギーナン結合領域(B)、触媒領域(CD)、C 末端細胞壁アンカー領域(A)、C 末端推定切断配列(C)からなる。C 配列を含む全長遺伝子の C 末端側に His タグを付加した(CglA58)ところ、ニッケルカラムに吸着しなかったことから、C 配列は切断されていることが強く示唆された。C 配列欠失(CglA61)、S 配列欠失(CglA31)、S 配列・C 配列欠失(CglA41)、B 領域欠失(CglA71)、A 領域欠失(CglA81)、B 領域・A 領域欠失(CglA91)の各酵素遺伝子を持つプラスミドを運ぶ *Brevibacillus* をネオマイシン含有 TM 培地もしくは 2SY 培地で培養した。TM 培地では CglA の分泌が確認されなかったことから、2SY 培地を用いた。原因は不明であるが、CglA31、CglA61、CglA91 を含む *Brevibacillus* は増殖しなかった。CglA58、CglA41、CglA71、CglA81 を含む *Brevibacillus* の培養上清を SDS-PAGE と CglA に対するポリクローナル抗体を用いた Western Blotting により解析したところ、いずれも CglA の分泌が確認された。B 領域を欠失した CglA71 は著しい分解を受けていたが、それ以外は分解はほとんど見られず、*Brevibacillus* 分泌発現系の優位性が証明された。最も高発現であった CglA81 を含む *Brevibacillus* を大量培養し、培養上清から酵素を精製した。比活性は、報告されている全長 CglA より低く、A 領域を欠失したことによる活性低下が推察された。

carrageenan, Brevibacillus, secretion

発表責任者：大西浩平（kouheio@kochi-u.ac.jp）

発表番号：2F197
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Bacillus circulans* KA-304 由来α-1,3-グルカナーゼに含まれる機能未知ドメインの役割

Role of uncharacterized domain in α-1,3-glucanase from *Bacillus circulans* KA-304

○残間 寿美香[1]、矢野 成和[1]、若山 守[2] ([1]山形大院理工、[2]立命館大生命科学)
○Sumika ZANMA[1], Shigekazu YANO[1], Mamoru WAKAYAMA[2] ([1]Yamagata univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】α-1,3-グルカンは不溶性の高分子多糖であり、口腔内に棲息する *Streptococcus* 属細菌が生産する菌体外高分子（ムタン）として、あるいは真菌類の細胞壁構成多糖として存在する。α-1,3-グルカンを加水分解する酵素α-1,3-グルカナーゼは、グリコシドヒドラーゼファミリー(GH)分類より、GH71 型と GH87 型に大別される(1)。GH71 型酵素は、*Trichoderma* 属、*Aspergillus* 属、*Penicillium* 属や *Schizosaccharomyces* 属などの真菌類にその存在が報告されており、真菌類型酵素と言うことができる。一方、GH87 型酵素は、*Paenibacillus* 属や *Bacillus* 属などに由来する細菌型酵素である。*Bacillus circulans* KA-304 は GH87 型に属するα-1,3-グルカナーゼ(Agl-KA)を生成する。本酵素は、N-末端から、Discoidin ドメイン I(DS1)、Carbohydrate binding Module 6 型ドメイン(CB6)、Discoidin ドメイン II(DS2)、機能未知ドメイン(UCD)、触媒ドメインで構成されている。前報で、DS1、CB6、DS2 ドメインの各々がα-1,3-グルカン結合活性を持つこと、それらが協働することで結合力が高まることを報告した(2)。本酵素の加水分解反応における各ドメインの役割や反応機構を解明するためには、機能未知ドメインを解析する必要がある。本報では、α-1,3-グルカナーゼの機能未知ドメインの解析に向けて、α-1,3-グルカナーゼの機能未知ドメイン欠損変異酵素(Agl ΔUCD)の作製、Agl-KA と Agl ΔUCD の加水分解活性の比較した結果を報告する。

【方法と結果】Agl-KA と Agl ΔUCD は、pET ベクター系を用いて、*Escherichia coli* Rosseta-gami (DE3)で発現させた。酵素の精製は、培養液を超音波破砕で無細胞抽出液を調製し、DEAE cellulofine A-500 カラムクロマトグラフィーと Butyl Toyopearl 650M カラムクロマトグラフィーで高純度に精製できた。両酵素の至適 pH は 8-9 と同じで、両酵素の熱安定性と pH 安定性にほとんど差がなかった。α-1,3-グルカン加水分解活性、α-1,3-グルカン結合活性や細胞壁溶解活性に関しても、ほとんど差が見られなかった。以上のことから、UCD ドメインは、活水分解活性や結合活性に影響を及ぼさないと考えられる。さらに、大腸菌宿主発現系での Agl-KA と Agl ΔUCD の発現量を比較した。培養時間や培養温度を変化させて無細胞抽出液のα-1,3-グルカナーゼ活性を測定したところ、Agl ΔUCD の発現量が多い傾向にあった。

(1) 化学と生物、53 巻、3 号、pp. 179-185、2015 年
(2) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、77 巻、3 号、pp. 639-647、2013 年

α-1,3-Glucanase, Fungal cell-wall

発表番号：2F198
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 変異導入による $Ca^{2+}$活性化 PET 分解酵素の基質認識部位の特定

# Specification of substrate recognition site of $Ca^{2+}$-activated PET-hydrolysing enzyme by site-directed mutagenesis

○山上 由莉[1]、三木 彩子[2]、川端 猛[3]、神谷 成敏[4]、織田 昌幸[2]、河合 富佐子[5]([1]京府大・生環、[2]京府大院・生環科、[3]阪大・蛋白研、[4]理研・AICS、[5]京工繊大・繊科セ)
○Yuri YAMAGAMI[1], Ayako MIKI[2], Takeshi KAWABATA[3], Narutoshi KAMIYA[4], Masayuki ODA[2], Fusako KAWAI[5] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Grad.Sch.Kyoto Pref. Univ., [3]Osaka Univ., [4]RIKEN, [5]Kyoto Inst. Technol.)

【背景・目的】ポリエチレンテレフタレート（PET）はペットボトルなどの容器、フィルム、繊維など幅広く活用されている代表的なポリエステルである。しかし、PET はその特性から極めて生分解され難い。そこで我々は PET を分解する可能性がある酵素として、クチナーゼ Cut190 遺伝子を好熱性放線菌 *Saccharomonospora viridis* AHK190 から単離し、同タンパク質を発現させた。Cut190 は $Ca^{2+}$により活性や熱安定性が上昇するなど、他の類似クチナーゼとは異なる興味深い知見が得られており、PET 分解の産業的利用が大いに期待できる。また、今後の構造研究にはクチナーゼの基質認識機構の解明が必要不可欠である。本研究では、既知の Cut190 S226P 変異体の X 線結晶構造解析の情報をもとに、基質複合体のモデリングや分子動力学シミュレーションを行い、基質認識に関わるアミノ酸残基を推定した。その結果に基づき、各種 Ala 変異体を作製し、活性を評価することで、基質認識アミノ酸残基の特定を試みた。

【方法・結果】基質 PET オリゴマーとの複合体モデルは、活性部位 Ser176 と基質の切断部位が近接するよう拘束をかけて作成した。各種 Ala 置換変異体の調製は以下のように行なった。Cut190 の耐熱化変異体（S226P/R228S）を鋳型として PCR により部位特異的変異 DNA プラスミドを作製し、大腸菌 Rosetta-gami B（DE3）に導入して IPTG 誘導により各種の変異体を可溶性酵素として発現させた。発現酵素は N 末端に His タグを有しており Ni-NTA affinity chromatography により精製した。酵素活性はポリマーの基質として poly butylene succinate-*co*-adipate（PBSA）を用い、変異体酵素と 37°C で 30 分間反応させ、吸光度により分解を測定した。結果、芳香族アミノ酸を置換した変異体酵素で、活性が顕著に低下し、基質との相互作用が示唆された。また、触媒トライアド（Ser176, Asp222, His254）近傍や、約 10Å 離れた残基の変異で活性が上昇したことから、基質のポリマー鎖が酵素と相互作用する方向が示唆され、高活性化酵素取得の道筋も示された。

PET-hydrolysing cutinase, molecular dynamics simulation, $Ca^{2+}$-activated cutinase

発表番号：2F199
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Lactobacillus plantarum* H78 株におけるタンナーゼ遺伝子のクローニングと配列解析及びタンナーゼの特徴

# Cloning and Sequence Analysis of the Tannase Gene in *Lactobacillus plantarum* H78 Strain and Characteristics of the Tannase.

○松田 麻李[1]、金内 誠[1]、戸塚 昭[2]、笠原 紳[1]（[1]宮城大食産、[2]感性科学研究所）
○MARI MATSUDA[1], MAKOTO KANAUCHI[1], AKIRA TOTSUKA[2], SHIN KASAHARA[1]（[1]Miyagi Univ, [2]Res.Inst.of Kansei Sci.）

【目的】タンナーゼ(tannase, tannin acyl hydrolase, EC 3.1.1.20)はタンニン酸や没食子酸エピガロカテキンなどタンニン類のエステル結合の加水分解を触媒する。食品工業では、主に真菌類由来のタンナーゼにより、茶飲料のクリームダウン(白濁防止)や、ワインやビールなど飲料の混濁防止や清澄剤として用いられている。さらに、タンニン汚染した工場の排水や農業廃棄物の処理など幅広く利用されている。これまでに、スクリーニングにより、タンナーゼ高活性乳酸菌 H78 株を選抜し、*Lactobacillus plantarum* と同定した。そこで、H78 株由来のタンナーゼの分子生物学的特性および酵素学的特性について明らかにし、既知の *Lactobacillus* 属タンナーゼと比較することとした。
【方法】タンナーゼ（Tan）遺伝子(*tan*)を PCR で増幅後に大腸菌用ベクター(pMD20-T vector)へ挿入したプラスミド(pTanH78)を作製し、大腸菌コンピテントセルに導入した。得られた形質転換体は、没食子酸メチル濃度の異なる LA 培地 (IPTG を含む)で培養し、生育を観察した。また、*tan* 遺伝子の塩基配列は自動 DNA シークエンサーを用いて決定し、既知の *L.plantarum* のタンナーゼと比較した。さらに、pCold I ベクターを用いて構築した pHis-TanH78 により、発現させたタンナーゼをアフィニティークロマトグラフィーで精製した。この酵素の基質特異性は、没食子酸メチル、没食子酸カテキン、没食子酸エピカテキン、没食子酸エピガロカテキン、タンニン酸を用いて行った。
【結果】プラスミド(pTanH78)を導入した大腸菌は、0.04%没食子酸メチル存在下における LA 培地で、クリアゾーンを形成した。また、0.08%没食子酸メチル下では、タンナーゼを持たない非形質転換体では生育できなかったが、タンナーゼを発現する形質転換体では生育が可能であった。このことより、菌体は、タンナーゼ（TanH78）を発現することで、タンニンに対する耐性を取得すると考えられた。次に、タンナーゼ（TanH78）の基質特異性について検討した。TanH78 は、没食子酸メチルに対し、最も高い反応を示した。次に高い反応を示したのは、没食子酸エピカテキンで、没食子酸メチルの 30%程度の活性であった。一般的に、*Aspergillus* 属のタンナーゼは、没食子酸エピガロカテキンを分解することが知られている。また、既知 *Lactobacillus* 属由来のタンナーゼは没食子酸エピガロカテキンおよび没食子酸エピカテキンが作用すると報告されている。本酵素は、既知の乳酸菌タンナーゼとは、異なる基質特異性を持つことが明らかとなった。さらに、金属および阻害剤の検討した結果、Ca イオンで阻害を受け、これまでの報告と異なった。一方、*tan* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列は、既知報告の *L.plantarum* と高い相同性を示した。

tannase, *Lactobacillus plantarum*, cloning

発表番号：2F200
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アラビノキシラン利用コリネ型細菌の構築

# Engineering *Corynebacterium glutamicum* for arabinoxylan utilization.

○久下 貴之[1,2]、渡邉 彰[2]、寺本 陽彦[2]、乾 将行[1,2]([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Takayuki KUGE[1,2], Akira WATANABE[2], Haruhiko TERAMOTO[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸やリジン等のアミノ酸の工業生産に古くから利用されてきた高 GC グラム陽性細菌である。当研究室は、本菌を用いたバイオプロセスの生産性向上を目指して、様々な糖代謝関連遺伝子の機能解析及び導入を行い、糖利用能の強化・付与を進めてきた。本研究では、ヘミセルロース中の主要構成成分であるアラビノキシランの利用能を *C. glutamicum* に獲得させることを目指している。

【方法と結果】*Corynebacterium alkanolyticum* のキシロオリゴ糖取り込み遺伝子（*xylEFG*）が、側鎖を持たないキシロオリゴ糖だけでなく、これまで報告のなかった側鎖にアラビノースが結合したアラビノキシロオリゴ糖の取り込み体としても働く事を明らかにし、本遺伝子及び β-キシロシダーゼ遺伝子（*xylD*）の導入によって、*C. glutamicum* はキシロオリゴ糖の利用能を獲得する。しかし、アラビノキシロオリゴ糖を資化するには、細胞内で働く α-アラビノフラノシダーゼ遺伝子を導入する必要があった[1]。従って本研究では、まずアラビノキシロオリゴ糖利用に向けて α-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の探索とその機能解析を進めた。遺伝子源である *C. alkanolyticum* から α-アラビノフラノシダーゼ遺伝子を同定する為に、近縁のバクテリアの遺伝子情報を基に縮重プライマーを設計して PCR を行い、2 種類の推定 α-アラビノフラノシダーゼ遺伝子の全長配列を決定した。両遺伝子産物から α-アラビノフラノシダーゼ活性を検出し、至適 pH・温度条件等の酵素学的性質を調査した。この他に、アラビノキシランの完全利用には、細胞外で作用するキシラナーゼ遺伝子の導入が必要である為、*C. alkanolyticum* ゲノム上で *xylEFGD* の近傍に位置する推定キシラナーゼ遺伝子（*xylI*）の機能を調べた。大腸菌で発現・精製した XylI からキシラナーゼ活性を検出し、本遺伝子をアラビノキシラン利用株構築に有用な遺伝子として利用できる事を確認した。

1. Watanabe A., et. al., Appl Environ Microbiol. 81(12), 4173-83, (2015)

Corynebacterium glutamicum, Xylanase, Arabinofuranosidase

発表番号：2F201
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌由来 phenol 2-monooxygenase の機能解析

# characterization of phenol 2-monooxygenase from *Corynebacterium glutamicum*

○前田 淳哉[1,2]、平賀 和三[2]、久保田 健[2]、乾 将行[1,2] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]RITE)
○Junya MAEDA[1,2], Kazumi HIRAGA[2], Takeshi KUBOTA[2], Masayuki INUI[1,2] ([1]NAIST, [2]RITE)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* は、フェノール資化能を有している。*C. glutamicum* におけるフェノール資化の第一反応は、phenol 2-monooxygenase (EC 1.14.13.7) によって触媒され、フェノールに水酸基を付与してカテコールを生成すると推察されるが明確に証明されていない。応用の視点から本酵素は、バイオレメディエーション分野においてはフェノール汚染の浄化に、バイオリファイナリー分野においては有用化学品であるカテコールの生産に利用が期待される。こうした背景のもと、本研究は応用を目指した基礎研究として、*C. glutamicum* 由来の phenol 2-monooxygenase を生化学的・生理学的に解析し、その性質や役割を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】*C. glutamicum* R 株由来の phenol 2-monooxygenase 遺伝子としてアノテートされた *cgR_2584* 遺伝子を破壊した結果、フェノール資化能が大幅に低下し、次に破壊株で本遺伝子を高発現させると形質が回復したことから、本遺伝子はフェノールを炭素源に用いる増殖に必須であることが明らかとなった。C 末端側に 6xHis タグを付加した融合タンパク質を、大腸菌を宿主として発現させて精製した結果、目的とする活性が検出された。これを SDS-PAGE 解析に供した結果、推定分子量と一致する約 71 kDa に単一のバンドが検出された。一方、N 末端側にタグを付与した場合は弱い活性しか得られなかった。酵素反応の至適温度、及び至適 pH はそれぞれ 50°C、pH 9.0 であった。バクテリア由来の phenol 2-monooxygenase としては珍しく単一コンポーネントで構成され、酵素活性を示すことが明らかとなった。ネイティブな分子量は解析中である。HPLC によって反応産物を分析した結果、フェノールを基質とした場合の反応産物はカテコールであり、他の反応産物は認められなかった。本酵素の基質特異性や、反応速度パラメーターについても併せて報告する。

*Corynebacterium glutamicum*, phenol, catechol

発表番号：2F202
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌による 4-ヒドロキシ安息香酸の高生産

# Production of 4-hydroxybenzoate by *Corynebacterium glutamicum*

○平賀 和三[1,2]、橋本 龍馬[1,2]、北出 幸広[1,2]、須田 雅子[1,2]、乾 将行[1,2]（[1]RITE、[2]グリーンフェノール開発（株））
○Kazumi HIRAGA[1,2], Ryoma HASHIMOTO[1,2], Yukihiro KITADE[1,2], Masako SUDA[1,2], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]Green Phenol Development Co.,Ltd)

【目的】

4-ヒドロキシ安息香酸は、液晶やパラベンの原料として汎用されている有用な芳香族化合物であり、現在は石油を原料としてコルベ・シュミット反応によって工業的に製造されている。また、4-ヒドロキシ安息香酸は、脱炭酸反応によって様々な合成樹脂原料となるフェノールへとバイオ変換可能である。我々は、*Corynebacterium glutamicum* を宿主として用い、非可食バイオマス由来の糖を原料として環境に優しく 4-ヒドロキシ安息香酸を高生産するため、高活性、且つ、生成物阻害耐性なコリスミ酸 ピルビン酸リアーゼ(*ubiC*)の検索と 4-ヒドロキシ安息香酸の生産を検討した。

【方法と結果】

*C. glutamicum* R を宿主としての優位性を評価するため、既に 4-ヒドロキシ安息香酸生産の宿主として報告されている *Pseudomonas putida* S12、*Escherichia coli*, *Rhodobacter sphaeroides* との間で増殖に対する 4-ヒドロキシ安息香酸の濃度効果を比較した。その結果、*C. glutamicum* R のみが 200 mM の高濃度条件でも増殖し、比較した中では最も 4-ヒドロキシ安息香酸耐性に優れていた。

次に *C. glutamicum* R を宿主として糖から一気通貫によってコリスミ酸を経由して 4-ヒドロキシ安息香酸を高生産させるため、様々な微生物由来の遺伝子を該宿主に導入・高発現させ、高活性、且つ、生成物阻害耐性な UbiC を検索した。その結果、目的に叶う高活性、且つ生成物阻害耐性な UbiC を取得することに成功した。該遺伝子を *C. glutamicum* R に導入・高発現した組換え株は、糖原料から目的とする 4-ヒドロキシ安息香酸を生産した。更に、大腸菌 UbiC の酵素・基質複合体の立体構造をヒントにデザインした高活性な変異体解析についても併せて報告する。

Corynebacterium glutamicum, 4-hydroxybenzoic acid, chorismate pyruvate-lyase

発表責任者：平賀　和三（khiraga@rite.or.jp）

発表番号：2F203
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌における糖消費速度の大幅な向上をもたらす *pfkB1* 破壊の解析と物質生産への応用

# Analysis of *pfkB1* deletion in *Corynebacterium glutamicum* that resulted in considerably increase in glucose consumption and which use for production of useful chemicals

○長谷川 智[1]、田中 裕也[1]、須田 雅子[1]、城島 透[1]、乾 将行[1,2]([1]RITE、[2]奈良先端大・バイオ)
○Satoshi HASEGAWA[1], Yuya TANAKA[1], Masako SUDA[1], Toru JOJIMA[1], Masayuki INUI[1,2] ([1]RITE, [2]NAIST)

【目的】我々は *Corynebacterium glutamicum* が還元条件下で増殖非依存的に糖を代謝する性質を利用した RITE バイオプロセスによる効率的な物質生産法の開発を進めており、これまでに有機酸、エタノール、アミノ酸などの高効率生産について報告を行ってきた。本プロセスでは、まず好気条件下で培養を行って菌体を調製し、次にその菌体を用いて通気を行わない還元条件下で物質生産反応を行う。その一方で *C. glutamicum* の糖代謝経路の発現制御機構の解析において、フルクトース代謝酵素の一つであるフルクトース-1-リン酸キナーゼの遺伝子 *pfkB1* の破壊株（ΔpfkB）では、フルクトースを炭素源として培養した際には、還元反応におけるグルコース消費・有機酸生産速度が野生株に対して 2 倍以上と大幅に向上することを見出した。そこで本研究では、本株を解析して糖代謝増大に寄与していると考えられる遺伝子候補を探索し、さらにそれらの高発現組換え株を作製して還元反応におけるグルコース消費・物質生産速度の評価を行った。
【結果と考察】ΔpfkB 株について LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行ったところ、フルクトースを用いた好気培養時にはフルクトース-1-リン酸（F1P）の著量の蓄積が確認された。この結果は PTS 糖取り込み系により生成した F1P が *pfkB1* 破壊により代謝出来なくなったことが原因と考えられる。また DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析では、グルコースで培養した野生株に比べて PTS、解糖系、乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）などの遺伝子について転写量の増大が確認された。F1P はグローバルレギュレーターである SugR に対する最も強力な阻害物質と考えられており、またフルクトース培養ΔpfkB 株において転写量の増大が確認された遺伝子の多くが SugR 制御下の遺伝子群と一致した。したがってフルクトース培養ΔpfkB 株の高い糖消費速度は、F1P 蓄積によって SugR の転写抑制が解除されて高発現した糖代謝酵素が原因と推測できる。次に上記の解析結果より糖代謝増大に有効と考えられる遺伝子群を推定し、それらの高発現株を作成して還元反応による糖消費速度の評価を行った。その結果、PTS、解糖系、LDH の高発現により、フルクトース培養ΔpfkB 株と同等となる、野生株の約 2.5 倍までグルコース消費速度は向上した。また本高発現株に対して、コハク酸生成に関わる *ppc* 遺伝子の破壊を行い乳酸生産株としてその生産性を評価したところ、48 時間反応におけるグルコース消費量と乳酸生産量は *ppc* 破壊野生株の 2.6 倍、2.7 倍と大幅に増大した。本研究成果は糖消費速度の制御メカニズムの一端を明らかにするものであり、また乳酸以外の物質の生産性向上にも応用が期待される。

glycolysis, transcriptional regulation, Corynebacterium glutamicum

発表番号：2F204
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 好塩性細菌の PHB 合成における塩濃度の影響

# Effect of NaCl concentration on synthesis of PHB for halophilic bacteria

○世嘉良 宏斗[1]、花城 隆二[1]、合田 雅浩[1]、照屋 盛実[1]、常盤 豊[2] ([1]沖縄県工技セ、[2]グリーン・プロダクツ・ラボ)
○Hiroto YOKARYOU[1], Ryuji HANASHIRO[1], Masahiro GODA[1], Morimi TERUYA[1], Yutaka TOKIWA[2] ([1]Okinawa Ind. Tech. Cent., [2]Green Products Lab.)

【目的】*Halomonas* 属細菌は海水や天然藍染め液等から分離される好塩性・好アルカリ性細菌で、ポリヒドロキシ酪酸（PHB）生産菌としても知られている。我々はこれまでに藍染め液中の *Halomonas* 属細菌の分離や *Halomonas* 属細菌の PHB 生産に対する培地中 NaCl 濃度の効果について報告した[1, 2]。このうち PHB 生産と塩濃度の関係については、NaCl 濃度が 0.8M までは塩濃度の増加とともに PHB 生産量が増加するが、1.0M 以上の NaCl 含有培地では生育が良好な一方で PHB 生産量は低下することを示した。今回は培地中の塩濃度変化が *Halomonas* 属細菌の PHB 合成に関わる代謝にどのような影響を与えるのか調べた。
【方法】*H. venusta* NBRC 102221 株を用いた培養試験では、酵母抽出物やスクロース、NaCl を含む培地を 10N KOH で pH9 に調整した培地を使用した。フラスコ又はジャーファーメンターに分注した培地に対して 1～5%の前培養液を接種した後、30℃で好気的に培養した。3～4 日間の培養期間中に培養液の一部を分取して、培地中の菌体外成分や菌体内の PHB 含量等を分析した。PHB 合成酵素活性試験では、NBRC 102221 株の菌体から調整した無細胞抽出液と NADPH、緩衝液、NaCl の混合液にアセトアセチル CoA を加えて反応させ、NADPH の消費量を経時的に測定した。
【結果】低塩濃度培地（0.2M NaCl）と高塩濃度培地（0.8M NaCl）で比較したところ、48 時間後の生菌数は $1.6 \times 10^9$ CFU $ml^{-1}$ と $1.4 \times 10^9$ CFU $ml^{-1}$ で同程度だったが、PHB は高塩濃度培地で 2.8 g/L 生産し、低塩濃度培地の 1.4 倍多かった。またこのとき乾燥菌体重量から PHB 含量を差し引いた重量も高塩濃度培地の方が 1.6 倍多いことから、菌体の浸透圧調整に関わる適合溶質が多く蓄積していることが示唆された。代謝物として菌体外に排出されたピルビン酸や乳酸は、PHB 合成が活発な高塩濃度培地よりも低塩濃度培地で多く検出された。PHB 合成酵素活性については、0～0.8M NaCl の範囲で比較したところ、0.4～0.6M のとき NADPH の消費速度が最大となった。

1) 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, 1P-188, p135 (2015)
2) 第 66 回日本生物工学会大会講演要旨集, 2P-153, p145 (2014)

Halomonas, PHB, metabolite

発表番号：2F205
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 天然の藍染料を用いた藍染め液の微生物
# Microbes in indigo dyeing solution using natural indigo dyes

○常盤 豊[1]、角 寿子[2]、ノームホルム アタポン[3]、世嘉良 宏斗[4] ([1]グリーン・プロダクツ・ラボ、[2]北の藍染織工房、[3]アジア工科大学院、[4]沖縄県工業技術センター)
○ Yutaka TOKIWA[1], Hisako SUMI[2], Athapol NOOMHORM[3], Hiroto YOKARYO[4] ([1]Green Products Laboratory Ltd., [2]North-Indigo Textile Art Studio, [3]Asian Institute Technology, [4]Okinawa Industrial Technology Center)

【目的】植物からの藍染料（沈澱藍やスクモ）を用いた伝統的な藍染めは、アルカリ環境において、微生物が藍染料を還元することにより行われている。

我々はすでに、リュウキュウアイ（キツネノマゴ科）の泥藍（沈澱藍）やタデアイ（タデ科）の播磨産スクモを用いた藍染め液には、*Alkalibacterium* 属、*Enterococcus* 属、*Amphibacillus* 属、*Oceanobacillus* 属などインジゴ還元能を持つ好アルカリ性乳酸菌や好気性の *Halomonas* 属細菌がいることを報告した[1,2)]。今回、インドアイ（マメ科）の沈澱藍や徳島産スクモを用いた藍染め液などの微生物について調べたので報告する。

【方法】インドアイの沈澱藍とその藍染め液は、タイ国チェンマイ市の Naenna 工房で使われているものを 2011 年 1 月 5 日、タデアイからの徳島産スクモを用いた藍染め液は、小樽市の藍染織工房で使われているものを 2013 年 11 月 18 日に採取した。微生物の分離は、グルコース、酵母エキス、ペプトン等を含む寒天平板培地を用いて、30 ℃で培養して行った。分離した微生物については、16SrRNA 遺伝子解析による簡易同定を行った。

【結果】インドアイの沈澱藍および徳島産スクモを用いた藍染め液の生菌数は、pH10 ではそれぞれ $7.7 \times 10^7$ CFU $ml^{-1}$、$2.7 \times 10^6$ CFU $ml^{-1}$ であった。インドアイの沈澱藍からは *Microbacterium* 属や *Bacillus* 属の細菌が分離されたが、その藍染め液からは *Alkalibacterium* 属、*Cellulomonas* 属などの細菌が分離された。

一方、徳島産スクモを用いた藍染め液からは、スクモから分離される *Ornichinibacillus* 属のほかに、*Alkalibacterium* 属、*Amphibacillus* 属、*Enterococcus* 属などインジゴ還元能を持つ好アルカリ性乳酸菌が分離された。

さらに、藍染料と藍染め液の微生物の関係について考察を行った。

1) 沖縄県工業技術センター研究報告書, 15, 13-21 (2013)
2) 第 67 回日本生物工学会大会講演要旨集, 1P-187, p135 (2015)

indigo dyeing, alkaliphilic, Enterococcus

発表責任者：常盤　豊（y.tokiwa@grplab.co.jp）

発表番号：2F206
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌ゲノム縮小株における代謝工学によるポリグルタミン酸の生産性向上

# Enhanced production of poly-glutamate by metabolic engineering of *Bacillus subtilis* genome reduced strain.

○増田 健太[1]、劉 生浩[1]、戸谷 吉博[2]、平沢 敬[2,3]、森本 拓也[1]、影山 泰[1]、吉田 健一[4]、清水 浩[2]、小笠原 直毅[5]、尾崎 克也[1]、萩原 浩[1]([1]花王・生科研、[2]阪大院・情報・バイオ情報、[3]東工大院生命理工・生物プロセス、[4]神戸大・農、[5]奈良先端大院・バイオ)

○ Kenta MASUDA[1], Shenghao LIU[1], Yoshihiro TOYA[2], Takashi HIRASAWA[2,3], Takuya MORIMOTO[1], Yasushi KAGEYAMA[1], Ken-ichi YOSHIDA[4], Hiroshi SHIMIZU[2], Naotake OGASAWARA[5], Katsuya OZAKI[1], Hiroshi HAGIHARA[1] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch.IST, Osaka Univ., [3]Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Tech., [4]Dept. Agrobiosci., Kobe Univ., [5]Grad. Sch. Bio. Sci., NAIST)

【目的】我々は、グラム陽性菌のモデル生物であり、優れた蛋白質分泌生産能をもつ枯草菌において、蛋白質生産に不要なゲノム領域を大規模に削除し、組換え蛋白質の生産性が大きく向上したゲノム縮小株（MGB874 株）を構築した（1)。セルラーゼ生産系において、枯草菌ゲノム縮小株は、野生株と比較してセルラーゼ遺伝子の転写レベルや細胞内グルタミン酸濃度が向上すること（2)、ペントースリン酸経路や TCA 回路のフラックスが上昇することを明らかにしてきた（3)。更に、ゲノム縮小株の多様な物質生産への展開を目的に、ポリアクリル酸の環境調和型代替素材として期待されるポリグルタミン酸（PGA）及び生分解性の高いキレート剤やバイオプラスチック原料としての利用が考えられるジピコリン酸（DPA）の生産系で評価した結果、ゲノム縮小株は、野生株と比較してそれぞれ高い生産性を示すことを確認した（4)。本研究では、ゲノム縮小株をベース株として高効率に物質生産する細胞を構築するため、代謝工学的アプローチを行ったので報告する。

【方法・結果】ゲノム縮小株を元に構築した PGA 生産株の更なる生産性向上を目的とした代謝改変を実施するため、グルコースを炭素源とする培地系における菌体外代謝物を解析した結果、主要な副産物としてアセトインが生産されていることを確認した。本知見に基づき、アセトイン合成遺伝子群 *alsSD* の欠失変異による代謝改変を行った結果、構築した変異株ではアセトイン合成が抑制され、PGA 生産性が 1.3 倍に向上することを確認した。以上、菌体外代謝物解析により主要副産物を同定し、高生産につながる細胞内の代謝経路改変を実施できた。今後は、PGA の更なる生産性向上を目的とした合理的代謝改変に向け、中枢代謝経路の代謝フラックス解析などを行い、PGA 生産時の代謝フラックス分布に基づいた代謝デザイン及び遺伝子改変を実施したいと考えている。

(1) Morimoto T. *et al.*, *DNA Res.* 15, 73-81, 2008
(2) Manabe K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8370-8381, 2011
(3) Toya Y. *et al.*, *J. Bacteriol.* 179, 42-49, 2014
(4) 増田ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨　2A10a03

*Bacillus subtilis*, poly-glutamate, metabolic engineering

発表番号：2F207
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 代謝フラックス解析に基づいた枯草菌ゲノム縮小株 MGB874 のジピコリン酸生産性の向上

# Metabolic engineering for the dipicolinic acid production of genome reduced *Bacillus subtilis* strain MGB874 based on 13C-metabolic flux analysis

○劉 生浩[1]、増田 健太[1]、戸谷 吉博[2]、平沢 敬[2,3]、森本 拓也[1]、影山 泰[1]、吉田 健一[4]、清水 浩[2]、小笠原 直毅[5]、尾崎 克也[1]、萩原 浩[1]([1]花王・生科研、[2]阪大院・情報・バイオ情報、[3]東工大院生命理工・生物プロセス、[4]神戸大・農、[5]奈良先端大院・バイオ)

○Shenghao Liu[1], Kenta Masuda[1], Yoshihiro Toya[2], Takashi Hirasawa[2,3], Takuya Morimoto[1], Yasushi Kageyama[1], Ken-ichi Yoshida[4], Hiroshi Shimizu[2], Naotake Ogasawara[5], Katsuya Ozaki[1], Hiroshi Hgihara[1] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch.IST, Osaka Univ., [3]Dept. Bioeng., Tokyo Inst. Tech., [4]Agrobioscience, Kobe Univ., [5]Grad. Sch. Bio. Sci., NAIST)

我々は枯草菌ゲノムから 874kbp（20.7%）を大規模削除したゲノム縮小株 MGB874 株を構築し、セルラーゼ等の酵素生産性が大きく向上することを報告している（１）。また、多様な物質生産への展開を目的に、ポリグルタミン酸またはジピコリン酸（DPA）の生産系を導入した場合も、それぞれ元株より生産性向上を示すことを明らかにした（２）。本研究では生分解性の高いキレート剤やバイオプラスチック原料としての利用が考えられる DPA の生産性向上を目的に定常期における代謝フラックス解析に基づいた代謝改変を実施した。DPA 生産において合理的な代謝改変をデザインするため、枯草菌ゲノム縮小株を元にした DPA 生産株をグルコースとグルタミン酸を炭素源として培養し、定常期における中枢代謝経路のフラックス分布を解析した結果、ピルビン酸からアセトインの合成反応のフラックスが非常に大きいこと、およびピルビン酸カルボキシラーゼによるピルビン酸からオキサロ酢酸の合成反応のフラックスが非常に小さいことが判明した（３）。この結果から、アセトイン合成の遮断およびオキサロ酢酸合成の強化が DPA 生産に有効に働くことが予測された。検証するために、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *pycA* の発現強化株を構築し、DPA の生産性評価を行った結果、1.2 倍に生産性が向上した。以上より、代謝フラックス解析に基づいた２つの合理的な代謝改変によりそれぞれ DPA 生産性の向上が認められ、本手法の有効性を確認できた。今後、更なる DPA 生産性向上を目指し代謝の最適化を行う。

(1) Morimoto T. *et al.*, *DNA Res.* 15, 73-81, 2008
(2) 増田ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨 2A10a03
(3) 戸谷ら、日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨 2A10a04

*Bacillus subtilis*, dipicolinic acid, metabolic flux

発表番号：2F208
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アミノ酸ラセミ化能を有する乳酸菌の探索

# Screening of lactic acid bacteria showing amino acid-racemizing activity

○岡田 奈津実、岸野 重信、小川 順（京大院農・応用生命）
○Natsumi OKADA, Shigenobu KISHINO, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

アミノ酸には L 体と D 体の光学異性体が存在するが、生物界は主に L-アミノ酸で構成されている。D-アミノ酸は天然には希少なアミノ酸であり、細菌のペプチドグリカンや微生物の産生する抗生物質等に含まれるにすぎないと考えられてきた。しかし近年、分析技術の発展により、ヒトを含む高等生物体内にも複数の遊離型 D-アミノ酸が存在していることが明らかとなった。さらに遊離型 D-アミノ酸はさまざまな生理機能を有することも見いだされてきた。

そこで本研究では、プロバイオティクスとしての利用を考慮して、L-アミノ酸から D-アミノ酸へのラセミ化能を有する乳酸菌を探索した。

【方法・結果】

本研究室に保存されているさまざまな菌種の乳酸菌を対象に、タンパク質を構成する主な L-アミノ酸をそれぞれ基質として、ラセミ化能を有する微生物のスクリーニングを行った。乳酸菌を 10 ml の MRS 培地で 24 時間、30℃、120 rpm で振とう培養した後、集菌・洗浄し、得られた洗浄菌体を 1 ml の 20 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で懸濁した。L-アミノ酸を終濃度 0.2%になるようにそれぞれ添加し、24 時間 30℃で嫌気的に振とう反応を行った。反応終了後、GITC を用いて誘導体化し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC) 分析により L 体から D 体への変換能を評価した。その結果、複数のアミノ酸に対しラセミ化能を有する乳酸菌を見いだした。また、反応時における PLP や $NAD^+$、$NADP^+$ の有無、酸素の影響等によるラセミ化能の相違についても検討した。

Amino acid, racemization, lactic acid bacteria

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F209
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 乳酸菌の生育に対する D-アミノ酸の影響

# Effects of D-amino acids on the growth of lactic acid bacteria

○坂口 貴之、岡田 奈津実、竹内 道樹、岸野 重信、小川 順（京大院農 応用生命）
○Takayuki SAKAGUCHI, Natsumi OKADA, Michiki TAKEUCHI, Shigenobu KISHINO, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

光学異性体を分離分析する技術の発達に伴い, 微生物以外の高等生物にも広く D-アミノ酸が存在することが明らかにされている。近年、食品中にも D−アミノ酸が含まれていること、ならびに、腸内細菌により腸管内において D-アミノ酸が生成される可能性が報告されてきており、これらの D-アミノ酸の腸内細菌叢に対する影響ならびにその代謝に注目が集まってきている。本研究では、腸内細菌のモデルならびにプロバイオティクス候補としての乳酸菌に着目し、乳酸菌の生育に対する D-アミノ酸の影響を L-アミノ酸の影響との比較において検討した。

グリシンと 19 種の L-アミノ酸および 19 種の D-アミノ酸について、研究室乳酸菌保存株 40 株（*Lactobacillus* 属 24 種、*Leuconostoc* 属 4 種、*Enterococcus* 属 4 種、*Streptococcus* 属 4 種、*Pediococcus* 属 2 種、*Bifidobacterium* 属 1 種、未同定 1 種）の生育に対する影響を評価した。培養には MRS 培地を用い、微好気条件下、30℃における培養において、10 mM の各種アミノ酸の添加効果を生育の経時変化をモニターすることにより観察した。96 ウェルプレートを用いて上記条件にて乳酸菌を培養し、プレートリーダーで経時的に 600 nm の吸光度により濁度を測定したところ、研究室乳酸菌保存株 40 株のうち、*Pediococcus pentosaceus* 1 株において D-Leu 添加による増殖曲線の変化が観察された。すなわち、10 mM の D-Leu を含有する MRS 培地における対数増殖開始の遅延と定常期における最大濁度の上昇が観察された。48 時間培養時の本菌の生育は、10 mM の D-Leu の添加により、MRS 培地培養時と比較して 1.2 倍に上昇した。一方。L-Leu の添加は、*P. pentosaceus* の生育に影響を与えなかった。現在、D-Leu 濃度の影響、本菌の脂肪酸組成の分析やアミノ酸代謝の解析により、*P. pentosaceus* に対する D-アミノ酸の影響を詳細に検討している。

lactic acid bacteria, D-amino acids, *Pediococcus pentosaceus*

発表責任者：岸野 重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F210
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

乳酸菌由来水和酵素を活用したリノール酸含有油脂からの水酸化脂肪酸生産
Production of hydroxy fatty acid from linoleic acid-containing oils using a delta9 hydratase from *Lactobacillus plantarum*

○朴 時範[1]、岸野 重信[2]、竹内 道樹[2]、米島 靖記[3]、小川 順[2]([1]京大院・農・産業微生物、[2]京大院・農・応用生命、[3]日東薬品工業)
○Si-Bum Park[1], Shigenobu Kisino[2], Michiki Takeuchi[2], Yasunori Yonejima[3], Jun Ogawa[2] ([1]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch., Agric., Kyoto Univ., [3]Nitto Pharm.)

【背景・目的】　我々は、腸内細菌の一つである乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a における不飽和脂肪酸リノール酸の飽和化代謝経路を解明し、様々な官能基を有する中間体として水酸化脂肪酸やオキソ脂肪酸、共役脂肪酸などの脂肪酸を見いだしている[1)]。また、本代謝の中間体である水酸化脂肪酸 HYA（10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid）は、腸管上皮バリア一機能の改善作用、抗炎症作用を示す有用な生理活性物質であることも報告している[2)]。本代謝の初発反応を触媒する CLA-HY は、Δ9 位に二重結合を有する C18 の遊離型脂肪酸を基質として認識し、10 位に水酸基を導入する水和活性を有している。本研究では、リノール酸を含有する油脂（トリアシルグリセロール型）を用いた水酸化脂肪酸生産を試みた。
【方法】　*L. plantarum* AKU 1009a由来水和酵素CLA-HYを大量発現する形質転換大腸菌を作製し、LB培地にて培養、IPTGによる導入タンパク質の誘導を行った。培養・誘導後、遠心分離により集菌したのち洗浄することにより洗浄菌体を取得した。また、リノール酸含有油脂に対するリパーゼの加水分解能をTLCにて評価し最適なリパーゼ及びリパーゼ濃度を決定した。油脂、洗浄菌体の共存下においてリパーゼを添加し反応時間ごとに水酸化脂肪酸の生産量を評価した。
【結果・考察】　リノール酸を含有する油脂を基質とし、7種類のリパーゼの加水分解能を調べた結果、Lipase AY 30が最も高い加水分解能を示した。1 mlの反応系において、小麦胚芽油500 mg、洗浄菌体（湿菌体200 mg）の共存下Lipase AY 30の添加量が水酸化脂肪酸の生産に与える影響を調べた。その結果、Lipase AY 30を0.5 mgを添加した時に水酸化脂肪酸の生産量が最大となった。上記の反応条件において反応温度37℃さらに4℃と変化させることにより、リノール酸含有油脂から変換率88%（対リノール酸変換率）でHYAを得た。以上のことからリパーゼを共存させることにより油脂から直接水酸化脂肪酸生産が可能であることが明らかとなった。

1) Kishino, S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110 (44), 17808-17813 (2013)
2) Miyamoto, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 290(5), 2902-2918 (2015)

lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, HYA

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F211
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Pediococcus* 属乳酸菌による水酸化脂肪酸生産

Production of hydroxy fatty acids by *Pediococcus* sp.

田辺 香緒里、岸野 重信、○北村 苗穂子、竹内 道樹、小川 順（京大院農・応用生命）
Kaori TANABE, Shigenobu KISHINO, ○ Nahoko KITAMURA, Michiki TAKEUCHI, Jun OGAWA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】
我々は腸内細菌による不飽和脂肪酸飽和化代謝の全容を世界に先駆けて解明し、その代謝中間体であり特異な構造を有する脂肪酸（共役脂肪酸、水酸化脂肪酸、オキソ脂肪酸など）に様々な生理活性を見いだしている。
また既に、リノール酸を効率よく共役リノール酸(CLA)へと変換する乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a において、本代謝に機能する 4 つの酵素（水和脱水酵素、酸化還元酵素、異性化酵素、飽和化酵素）を同定している[1)]。
本菌は、リノール酸を飽和化する際の初発反応として、リノール酸を水和し水酸化脂肪酸を生成することが明らかとなっている。本研究では、乳酸菌を対象に新たな水酸化脂肪酸生産能を有する微生物を探索し、その結果得られた様々な不飽和脂肪酸を水酸化脂肪酸へと変換する乳酸菌 *Pediococcus* sp. AKU 1080 について報告する。
【方法・結果】
乳酸菌 *Pediococcus* sp. AKU 1080 をリノール酸(*cis*-9,*cis*-12-octadecadienoic acid)を基質とする反応に供したところ 3 種類の水酸化脂肪酸が生成した。得られた水酸化脂肪酸を分取・精製し、GC-MS, NMR 分析等に供した結果、10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid、13-hydroxy-*cis*-9-octadecenoic acid 及び 10,13-dihydroxy-octadecanoic acid と同定した。本反応を詳細に検討したところリノール酸のΔ9 位を水和する酵素とΔ12 位を水和する酵素の異なる 2 つの水和酵素の関与が示唆された。
また、本菌はリノール酸同様に分子内にΔ9 位とΔ12 位のシス型二重結合を有するα-リノレン酸、γ-リノレン酸、ステアリドン酸にも作用し、それぞれに対応した水酸化脂肪酸を生成する事を明らかにした[2)]。
【参照】
1) Kishino, S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110(44), 17808-17813 (2013)
2) Takeuchi, M., *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 115(4), 386-393 (2013)

lactic acid bacteria, hydroxy fatty acid, lipid metabolism

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F212
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

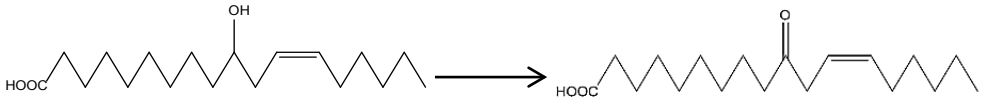
# 脂質代謝異常症改善に有用な 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid を生産する微生物の探索

# Screening of 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid-producing bacteria useful for improvement of dyslipidemia

○中辻 亮太[1]、岸野 重信[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]日東薬品工業)
○Ryota NAKATSUJI[1], Shigenobu KISHINO[1], Yasunori YONEJIMA[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div.Appl. Life Sci., Kyoto Univ., [2]Nitto Pharmaceutical Industries.)

【目的】

当研究室では、乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a におけるリノール酸飽和化代謝を明らかにしており、本代謝中間体としてオキソ脂肪酸 10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA) の存在を見いだしてしている [1)] 。さらに、KetoA が脂質代謝異常症改善や脂肪肝改善など多彩な生理機能を有することも報告している [2)] 。KetoA は、リノール酸の水和産物 10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA) を酸化することにより得られるが、HYA を効率良く KetoA へと変換する微生物の取得には至っていない。そこで、本研究では HYA から KetoA への高い変換活性を有する微生物の探索を行った。




10-hydroxy-*cis*-12-octadecenoic acid (HYA)　　10-oxo-*cis*-12-octadecenoic acid (KetoA)

【方法・結果】

HYA から KetoA への高い変換活性を有する微生物を獲得するため、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析を KetoA 検出法とするスクリーニング系を構築した。571 株の様々な菌株の風乾菌体と MRS 培地にて培養した 162 株の乳酸菌をそれぞれ HYA を含む反応液に懸濁し、好気条件下、28˚C にて 24 時間振とう反応した。反応後、TLC 分析に供することにより、風乾菌体反応では乳酸菌 6 株、菌体反応では乳酸菌 23 株において HYA を KetoA に変換する活性を見いだした。さらに、風乾菌体で HYA を KetoA に変換していた 6 株を MRS 培地にて培養し、得られた洗浄菌体を上記と同様の反応に供しガスクロマトグラフィーにより生成物を評価した結果、6 株全てが HYA を KetoA に変換することを明らかにした。また、本反応の補酵素に関して、$NAD^+$もしくは $NADP^+$の関与を明らかにした。

1) Kishino, S., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 110, 17808-17813 (2013).
2) Goto, T., *et al*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 459, 597-603 (2015).

lactic acid bacteria, oxo fatty acid, dyslipidemia

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F213
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ラッカーゼ-メディエーターシステムが触媒する酸化的開裂反応による水酸化脂肪酸及びオキソ脂肪酸からのジカルボン酸の生産

# Production of dicarboxylic acids from hydroxy and oxo fatty acids by laccase-mediator system-catalyzing oxidative cleavage

○竹内 道樹[1]、岸野 重信[1]、北村 苗穂子[1]、日比 慎[2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物）
○ Michiki TAKEUCHI[1], Shigenobu KISHINO[1], Nahoko KITAMURA[1], Makoto HIBI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

ナイロン 6,10 の原料である炭素数 10 のジカルボン酸（セバシン酸）は、非可食性バイオマス（トウゴマ）から得られるヒマシ油の主成分（リシノール酸）より生産されることから、カーボンニュートラルなポリマー原料として注目を集めている。しかし、このヒマシ油からのセバシン酸生産プロセスは、アルカリ条件下で、高温・高圧を必要とすることから、環境にやさしいプロセスの開発が望まれている。我々はこれまでに乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* AKU 1009a の不飽和脂肪酸飽和化代謝経路を明らかにしており、本代謝経路の中間体としてヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸を見いだしている。さらに、本代謝経路に関与する酵素群を用いることで、炭素数 18 の不飽和脂肪酸からのヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸の生産を可能としている。これらのヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸は、分子内に二重結合に近接する水酸基あるいはオキソ基を有することから、ラッカーゼ-メディエーターシステムによる酸化的開裂反応によりセバシン酸等のジカルボン酸を生成すると期待される。そこで本研究では、ラッカーゼ-メディエーターシステムを活用し、様々なヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸をジカルボン酸へと変換するバイオプロセスの構築を目指した。約 20 種類のヒドロキシ脂肪酸やオキソ脂肪酸をラッカーゼ-メディエーターシステムによる酸化的開裂反応に供したところ、12 種のヒドロキシ脂肪酸あるいはオキソ脂肪酸が、セバシン酸や 4-decenedioic acid などへと変換されることを見いだした。さらに、メディエーターの検討や、反応条件の検討を行い、ジカルボン酸生産の最適条件を決定した。

laccase, dicarboxylic acid, fatty acid

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2F214
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# レスベラトロール資化微生物の探索

# Screening of microorganisms catabolizing a natural compound

○瀧下 友理、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○ YURI TAKISHITA, TAKUTO KUMANO, YOSHITERU HASHIMOTO, MICHIHIKO KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

【目的】レスベラトロールは赤ワインなどに多く含まれ、抗酸化活性、エストロゲン様作用、サーチュイン遺伝子（長命遺伝子）の活性化や認知症の予防にも効果があるなど、ヒトにとって有用な生理活性が多く知られている。そのため、最近ではサプリメントとして販売もされている。

天然化合物の微生物による代謝を調べることは、新規酵素活性や希少な代謝中間体化合物の発見につながることもある（Ref. 1）。一方でこれまでレスベラトロールを資化する微生物の報告はない。そこで、本研究ではレスベラトロールを資化する微生物を土壌よりスクリーニングし、その代謝に関わる酵素・遺伝子の特定と新規な代謝経路の解明を目的とした。

【方法・結果】レスベラトロールを単一炭素源とする培地にぶどうの樹周辺を含む各地より採取した土壌を接種し、28°C で数日間振盪培養した。その後、新鮮な培地への植継ぎを繰り返すことで集積培養を行い、適当な倍率（$10^3$~$10^5$）で希釈してから同組成の寒天培地に植菌した。生育してきたコロニーをさらに植継ぎ、菌の単離を行った。

次にそれぞれの菌を単独培養し、無細胞抽出液を調製しレスベラトロールとの反応を試みた。その結果、単一炭素源培地より単離した菌のうち、９株で HPLC による分析においてレスベラトロールの減少と新たなピークを検出した。

本研究により、レスベラトロールを資化する微生物を単離することができた。

Ref. 1. Hassaninasab, A., Hashimoto, Y., Tomita-Yokotani, K., Kobayashi, M. Discovery of the curcumin metabolic pathway involving a unique enzyme in an intestinal microorganism. Proc. *Natl. Acad. Sci. USA*. **108**, 6615-6620 (2011).

polyphenol, screening, catabolism

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F215
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ニトリル前駆体アナログの微生物代謝

# Microbial degradation of a nitrile-analog compound

○石上 佳奈、橋本 義輝、熊野 匠人、小林 達彦（筑波大院・生命環境）
○Kana ISHIGAMI, Yoshiteru HASHIMOTO, Takuto KUMANO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environm. Sci., Univ. of Tsukuba)

我々は、ニトリルの合成・分解・利用系に関わるプロモーター・酵素・機能性タンパク質の機能解明を目的として研究を行ってきた。微生物によるニトリルの合成に関しては、シアノバレルアミド工業生産菌由来のアルドキシムデヒドラターゼ(OxdA)を対象とし[1-3]、炭素-窒素(C-N)二重結合を持つアルドキシムを脱水して炭素-窒素(C-N)三重結合を持つニトリルを形成する触媒反応の全貌を解明した[4]。C-N 二重結合の代謝に関しては、アルドキシムデヒドラターゼ以外ではヒドラゾンデヒドロゲナーゼの報告があるだけで、その知見は非常に限られている。

本研究では、OxdA やヒドラゾンデヒドラターゼの基質とはなりえないアルドキシムアナログを対象としてスクリーニングを行った。グリセロールを炭素源として添加し、アルドキシムアナログを単一窒素源とした培地を作成し、２００カ所以上の土壌サンプルを加えて 28℃で振盪培養を行った。本培養液を新しい液体培地に植え継ぎ、同条件で 3 回の集積培養を行った。その培養液を同組成の寒天培地に塗布し 28℃で培養した。単離した菌株を上述の液体培地で培養し、生育してきた菌株について休止菌体反応を行い、高速液体クロマトグラフィーにより残存するアルドキシムアナログを定量した。その結果、アルドキシムアナログ分解活性を保持する 2 株のスクリーニングに成功した。さらに、ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフィー質量分析法により反応生成物を分析した結果、2 株とも OxdA 反応産物やヒドラゾンデヒドラターゼ反応産物とは異なる化合物を反応産物として生成することが判明した。これらの結果より、この 2 株においてアルドキシムアナログの分解には OxdA やヒドラゾンデヒドラターゼとは異なる酵素が関与していることが示唆された。さらに、この 2 株における中間産物が一部異なることから、両株は異なるアルドキシムアナログ代謝経路を保持することが示唆された。

(1) ***JBC,* 278,** 29600 (2003); (2) ***JBC,* 279,** 47619 (2004); (3) ***PNAS,* 103,** 564 (2006); (4) ***PNAS,* 110,** 2810 (2013)

microorganism, screening, degradation

発表責任者：小林達彦（sec-mmb@agbi.tsukuba.ac.jp）

発表番号：2F216
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物変換能力を利用した金属廃棄物からの革新的な水素生産技術

# Novel hydrogen production from metal waste by microbial conversion

○若井 暁[1]、伊藤 公夫[2]、原山 重明[3] ([1]神戸大自然、[2]新日鐵住金、[3]中央大理工)
○Satoshi WAKAI[1], Kimio ITO[2], Shigeaki HARAYAMA[3] ([1]Kobe Univ., [2]Nippon Steel Smitomo, [3]Chuo Univ.)

微生物が金属材料の腐食に関与することは微生物腐食現象として知られている。微生物腐食は、鉄鋼材料で作られた様々な構造物を劣化・破損させ、時には二次災害として石油や化成品の環境漏えいを引き起こすかなり問題のある現象である。金属腐食に係るコストは、日本国内で年間 5 兆円を超し、アメリカでは年間 2760 億円を超えるため大きな経済的損失をもたらすと言われている。

鉄腐食性メタン生成菌は、我が国の石油備蓄タンクの底に溜まっている水から分離された微生物腐食の原因菌の一つである。本菌は、金属鉄を腐食（溶出）させながらメタンや水素を生成する。我々は、このガス生産能に注目した。特に、培養後期では、メタン生成から水素生成に切り替わることに注目し、金属廃棄物からバイオガスとしてメタンや水素を生産できる可能性を見出した。水素は燃焼させても二酸化炭素を発生しない次世代のクリーンエネルギーとして注目されており、ガス生産の切り替わる条件を特定し、本菌を用いて効率的に水素生産させることを目指した。

鉄腐食性メタン生成菌が金属腐食を生じる場合、腐食生成物として炭酸鉄（$FeC0_3$）を生じることを X 線回折から明らかにしている。これは、溶出した二価鉄が培地中の炭酸イオンと結合して生じると予想している。発生したメタンガス、溶出鉄量、初期に添加した炭酸濃度の関係から、メタン生成から水素生産に切り替わる時、炭酸イオンが枯渇することで水素生産に切り替わると推定した。炭酸濃度を変えた培養試験により、炭酸イオンの枯渇のタイミングと水素生産開始時期がほぼ一致していた。したがって、炭酸イオンの供給を制限することで、優先的に水素を生産させることが可能である。

また、ガス生産速度に基づいて金属鉄からの電子流失速度を見積もった結果、本菌がメタン生成を行いながら鉄腐食反応を進めている時、同条件で化学的な要因で進行する時よりも約 36 倍の速度で電子が流失していることが明らかとなった。さらに、炭酸イオンが枯渇後に水素を生産しながら腐食反応を進めているときは、メタン生成時の約 1/5 に留まることが分かった。炭酸イオン枯渇後とメタン生成時の電子流失速度の差の原因を解明できれば、金属鉄からの水素生産をより効率的に進めることができるだろう。

本研究では、微生物による金属腐食という社会問題を逆手にとって、金属廃棄物などからクリーンガスとなる水素を生産する技術の開発に成功した。また、金属からの電子流出速度すなわち腐食速度に炭酸イオン濃度が関係していることが明らかとなり、微生物腐食を低減させる方法として炭酸イオンという環境因子を制御することも有効であることを明らかにした。

hydrogen, metal, biocorrosion

発表責任者：若井暁（wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp）

発表番号：2F217
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# クロストリジウム属由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼを発現させた組換え大腸菌の菌体反応による水素生産と光触媒反応への応用

# Application of Whole Cell Reaction of Recombinant *Escherichia coli* Expressing Clostridial [FeFe]-Hydrogenase and Its Maturase Genes to Photocatalytic Hydrogen Production

○本田 裕樹[1]、萩原 英久[1,2]、伊田 進太郎[1,2]、石原 達己[1,2] ([1]九大 I2CNER、[2]九大院工)
○Yuki HONDA[1], Hidehisa HAGIWARA[1,2], Shintaro IDA[1,2], Tatsumi ISHIHARA[1,2] ([1]I2CNER, Kyushu Univ., [2]Fac. Eng., Kyushu Univ.)

【目的】光触媒を用いた水分解による水素生産系の確立は、持続可能なエネルギー社会の実現において重要な課題である。演者らは、水素生産に利用可能な生体触媒（[FeFe]-ヒドロゲナーゼ, EC 1.12.7.2 等）と、光触媒としての無機半導体を組み合わせた反応系に注目している。従来の生体触媒を得る方法として、①抽出精製した酵素を用いる方法、②水素発生能を示す微生物菌体を用いる方法が挙げられる。一方、これらの方法では、ヒドロゲナーゼの酸素感受性や微生物の生育速度等の問題から煩雑な操作が要求され、実用化においてはより簡便に生体触媒を得る手法が必要となる。そこで演者らは、高活性かつ異種発現が可能なヒドロゲナーゼ遺伝子を発現させた組換え大腸菌の菌体を直接生体触媒として反応系に供する方法を考案した。本発表では、*Clostridium acetobutylicum* NBRC 13948 由来[FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子群（*hydAEFG*）を導入した組換え大腸菌の菌体反応による水素生産が可能であることを明らかにし、さらに当該組換え大腸菌の菌体と酸化チタンを混合した反応系に対する光触媒反応について検討した。

【方法および結果】*C. acetobutylicum* NBRC 13948 のゲノムより関連遺伝子 4 種（*hydAEFG*）を PCR で増幅し、pETDuet-1 および pCDFDuet-1 へと連結して 2 種類のベクターを作製した（pEHydEA および pCHydFG）。当該ベクターを大腸菌 BL21(DE3)へと導入し、所定の方法で培養後に嫌気条件下で発現誘導した。水素生産活性測定は、窒素を充填したアルミシールバイアル内で 100 mM Tris-HCl (pH 7), 150 mM NaCl, 5 mM メチルビオロゲン(MV), 25 mM 亜ジチオン酸ナトリウムと精製酵素あるいは菌体を混合しヘッドスペース中の水素量を GC 分析することで実施した。精製した組換え HydA における水素生産比活性は 420 μmol-$H_2$/min/mg-HydA と算出され、一連の操作で成熟型 HydA が得られることを確認した。さらに BL21(DE3)/pEHydEA+pCHydFG の湿菌体を用いた際の活性は 869 μmol-$H_2$/min/g-wet cell と算出された。一方、空ベクターを導入した BL21(DE3)からは水素生成は検出されなかった。以上の結果、還元型 MV 存在下において、*hydAEFG* を導入した組換え大腸菌の菌体を細胞破砕や酵素抽出をせずに生体触媒として直接利用可能であることが明らかになった。さらに、BL21(DE3)/pEHydEA+pCHydFG の湿菌体 0.1 g と酸化チタン 50 mg、MV を含む溶液に対し、Xe ランプにより光照射したところ、反応は少なくとも 15 時間持続し 216 μmol の水素が生産されることを確認した。遺伝子操作が容易で生育速度の大きい組換え大腸菌を直接反応系に供する本手法は、生体触媒と無機半導体を組み合わせた光触媒反応による水素生産の実現に有効であると考えられる。

hydrogenase, photocatalyst, whole cell reaction

発表番号：2F218
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# メタノール資化性細菌の C1 代謝酵素反応を利用した新規メタノール生成経路の構築

# Construction of the novel methanol-generating pathway using C1 compound-utilizing enzymatic reactions of methylotrophic bacteria

○竹谷 友之、由里本 博也、藤澤 健斗、阪井 康能（京大院農・応用生命）
○Tomoyuki TAKEYA, Hiroya YURIMOTO, Kento FUJISAWA, Yasuyoshi SAKAI (Kyoto Univ.)

【目的】メタノールは、石油・石炭に替わるエネルギー・炭素資源として、さらには低環境負荷型・循環型物質生産体系の基幹物質として注目されている。本研究では $CO_2$ やバイオマスからメタノールへのバイオプロセス変換法を開発するために、カルビンサイクルやバイオマス分解代謝の過程で生じるフルクトース 6-リン酸（F6P）からのメタノール生成経路の構築を目的とした。メタノール資化性細菌はメタノールを始めとする $C_1$ 化合物を炭素源およびエネルギー源として利用する代謝経路を有している。そのホルムアルデヒド固定経路のひとつであるリブロースモノリン酸（RuMP）経路では、ヘキスロース 6-リン酸シンターゼ（HPS）と 6-ホスホ-3-ヘキスロイソメラーゼ（PHI）によってホルムアルデヒドがリブロース 5-リン酸に固定され、異性化を経て F6P が生じる。我々はこれまでに、HPS-PHI 人工融合酵素を作製し、触媒効率の向上と異宿主への遺伝子導入の簡便化を可能にした [1)]。HPS-PHI はホルムアルデヒド固定の逆反応、すなわち F6P からリブロース 5-リン酸（Ru5P）とホルムアルデヒドを生成する反応を触媒することができ、一部のアーキアではこの反応が生育に必須となっている [2)]。この HPS-PHI によるホルムアルデヒド生成反応とメタノールデヒドロゲナーゼ（MDH）の逆反応（ホルムアルデヒド還元反応）を組み合わせることで、F6P からのメタノール生成経路の構築を試みた。

【方法・結果】一部の好熱性メタノール資化性細菌の MDH は $NAD^+$依存型で、特殊な補因子を必要とせず、逆反応の触媒活性を示すことが報告されている [3)]。そこで、好熱性メタノール資化性細菌 *Bacillus brevis* S1 株の $NAD^+$依存型 MDH をクローニングし、大腸菌での発現と逆反応の触媒活性を確認した。次に、F6P からのメタノール生成経路を構築するため、この MDH と前述の HPS-PHI を同時発現する大腸菌株を作製した。この菌株に対し発現誘導を行い、無細胞抽出液で MDH および HPS-PHI の発現と触媒活性を確認した。さらに F6P を基質とし、HPS-PHI と MDH との連続反応の活性も確認した。さらにこの発現株の休止菌体反応により、F6P からのメタノール生成を確認した。

1) Orita *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 439-445 (2007)
2) Orita *et al.*, J. Bacteriol. 188: 4698-4704 (2006)
3) Arfman *et al.*, Arch. Microbiol. 152: 280-288 (1989)

methanol, formaldehyde, $C_1$ metabolizm

発表番号：2F219
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌におけるエステル合成経路の代謝工学

# Metabolic engineering of Escherichia coli for bio-ester production

○田代 洋平[1]、DESAI Shuchi H.[2]、渥美 正太[2] ([1]理研、[2]カリフォルニア大学デイビス)
○Yohei TASHIRO[1], Shuchi H. DESAI[2], Shota ATSUMI[2] ([1]Riken, [2]UC Davis)

低炭素社会実現のため，大腸菌や酵母といった微生物を用いて，グルコースなどの再生可能なバイオマスから有価化合物を生産する研究が盛んに行われている。近年では、所望の化合物を大量かつ選択的に作らせるために、酵素反応を組合せ、出発物質から目的化合物までの代謝経路を宿主細胞にデザインする技術が主流となっている。いわゆる代謝工学によって、多彩な化合物がバイオ生産可能になった。

エステルは、化学的にはアルコールと有機酸を脱水縮合して得られる化合物であり、その物性はアルコールと有機酸の組合せで決まる。炭素数 4 から 12 のエステルは揮発性を持ち、果実や花弁から発せられる芳香の主成分である。揮発性エステルは、香料や香味料だけでなく、溶剤として工業的に広く利用されている重要な化合物群である。側鎖が長く、揮発性の低いエステルも、潤滑剤やワックス、ディーゼル燃料など様々な需要がある。発表者らは、アルコール-*O*-アシル転移酵素をアルコール合成経路へ組み込むことによって、様々なエステルの大腸菌生産を可能にした（Rodoriguez, GM *et al*, *Nat Chem Biol* (2014)）。その中でも、特に酢酸イソブチル（IBA）の生産性は高く、約 6 g/L/day で酢酸イソブチル生産が可能であった。

発表者らは、IBA の生産性だけでなく、炭素収率の観点から IBA 合成経路の更なる代謝工学を行った。IBA は、イソブタノールとアセチル CoA から合成される化合物であり、グルコースを単一炭素源にした場合、IBA の理論最大炭素収率は 67%である。発表者らは、酢酸をアセチル CoA の前駆体として用いることで、ピルビン酸デヒドロゲナーゼの脱炭酸反応を回避する経路をデザインした。グルコースと酢酸の２つを炭素源として利用するこの経路では、IBA の理論最大炭素収率は 75%となる。発表者らは、提案する戦略が IBA の炭素収率を向上させること（35%から 59%）を実験的に証明した（Tashiro, Y *et al*, *Nat Commun* (2015)）。バイオ生産において、アセチル CoA は主要な代謝中間体であり、同様の戦略は、テルペノイドや脂肪酸、アルコールなど IBA 以外の化合物生産にも有効である。

本大会では、実験から得た知見を共有し、“バイオでモノづくり”の貢献度や可能性を今後さらに高めるために、現状の課題や求められている技術についても議論を深めたい。

Metabolic Engineering, Carbon yield, Ester

発表責任者：田代　洋平（yohei.tashiro@riken.jp）

発表番号：2F220
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# タモギタケの針葉樹と広葉樹における腐朽特性の差異

# Difference of Rotting Characteristics on Softwood and Hardwood by *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*

○大城 幸太、田邊 俊朗（沖縄高専・専・生資工）
○Kouta OOSHIRO, Toshiaki TANABE (NIT Okinawa Col.)

タモギタケは主に北日本で食用に栽培されるキノコであり、針葉樹と広葉樹の両方を腐朽することができる。シイタケが広葉樹、ブナシメジが針葉樹を好んで腐朽するように、担子菌は一般に広葉樹か針葉樹のどちらかを好むことから、タモギタケは特別な木材の腐朽特性を持っていると考えられる。本研究では、タモギタケによるリュウキュウマツ材とブナ材の腐朽に関するリグニン分解酵素活性の測定、培地重量分析を行うことでリグニン分解酵素の制御因子を明らかにし、効率的なバイオマス変換の可能性を検討する。

white rot, *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus*, biomass conversion

発表責任者：田邊　俊朗（tanabe@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：2F222
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

液胞膜 $H^+$-ATPase サブユニットへの結合を起点とするポリミキシン B の真菌液胞膜破壊作用
Fungal vacuole disruption by polymyxin B via its binding with a subunit of vacuolar-type $H^+$-ATPase

○飯田 真希[1]、山口 良弘[2]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]（[1]阪市大院・ 理、[2]阪市大・複合先端研、[3]阪市大・健康研セ）
○Maki IIDA[1], Yoshihiro YAMAGUCHI[2], Akira OGITA[1,3], Kenichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1]
([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]OCARINA, Osaka City Univ., [3]Res. Centr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【目的】グラム陰性細菌の細胞膜障害剤として知られる環状ペプチド抗生物質 polymyxin B (PMB) は、細胞壁リポ多糖への結合を介して同菌の細胞膜リン脂質に作用する。[1)] 一方、PMB は「液胞膜障害」に起因する殺真菌作用を発揮することが明らかになっている。[2)] 液胞膜表層にリポ多糖のような分子は存在しないが、PMB の液胞膜への作用を媒介する何らかの高分子成分が存在する可能性がある。PMB をリガンドとするカラムを用いて、真菌モデル細胞である *S. cerevisiae* の細胞破砕液から PMB 親和性タンパク質を単離したところ、その 1 つが液胞膜 $H^+$-ATPase を構成する細胞質側サブユニット Vma1p と同定された。本研究においては、PMB の真菌液胞膜障害作用における Vma1p の役割を明らかにしようとした。

【方法】主として *S. cerevisiae* BY4741 株および本株に由来する遺伝子欠損変異株を用いた。これら菌株の培養はすべて YPD 培地、30℃ の条件で行った。また、生菌数の測定はコロニーカウント法によって行った。液胞膜の観察は蛍光試薬 FM4-64 にて処理した細胞を用いて行った。

【結果】PMB 親和性タンパク質として単離、同定されたタンパク質の遺伝子欠損株の中で、*Δtsa1* 株および *Δrack1* 株は親株と同程度の PMB 感受性を有していた。一方、唯一 *Δvma1* 株が PMB の致死作用に耐性を示すことが判った。本 PMB 耐性株においては、PMB 処理による液胞膜の破壊はほとんど認められなかった。親株において PMB の液胞膜障害作用を増幅する allicin を共存させた条件でも、*Δvma1* 株は PMB の液胞膜障害作用に対する耐性を維持していた。これらの結果より、PMB が Vma1p への結合を介して液胞膜に作用する可能性が示唆された。次いで、親株を *VMA1* 遺伝子の発現ベクターで形質転換した株に PMB を作用させたところ、形質転換株が PMB 耐性を示すことが判った。PMB 耐性の獲得は、Vma1p が細胞質内で発現したことにより、本タンパク質に結合した PMB が液胞膜に結合できなかったためと考えられる。PMB が液胞膜 $H^+$-ATPase の Vma1p を含む領域に結合したのち、どのようにして液胞膜を破壊するのか目下検討中である。

1. Daugelavicius, R., Bkiené, E., and Bamford, DH. (2000). Stage of polymyxin B interaction with the *Esherichia coli* cell envelope. *Antimicrob*. *Chemother*. 44: 2969-2978.
2. Ogita, A., Fujita, K., and Tanaka, T. (2012). Enhancing effects of the vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B. *Front*. *Microbiol*. 3, 100.

Polymyxin B, Vacuole, Fungal

発表番号：2F223
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母のイソアミルアルコール誘導偽菌糸における Kar9 の役割

# Role of Kar9 in isoamyl alcohol-induced pseudohyphal formation of budding yeast.

○村田 和加惠[1,2]、山口 良弘[1,4]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1] ([1]阪市大院理、[2]米子高専物質、[3]阪市大・健康研セ、[4]阪市大複合先端)
○Wakae MURATA[1,2], Yoshihiro YAMAGUCHI[1,4], Akira OGITA[1,3], Ken-ichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Yonago Natl. Coll. Technol., [3]Res. Center. Urban Health Sports, Osaka City Univ., [4]OCARINA)

出芽酵母はイソアミルアルコール(IAA)の存在下で偽菌糸を形成する。偽菌糸形成時に、細胞骨格にダイナミックな変動が起こっていると想定される。IAA によって偽菌糸が誘導される際に、アクチンの細胞内レベルには変動が見られず、微小管の構成分子であるα-およびβ-チューブリンのレベルが低下する現象をウェスタン解析によって、また、細胞周期の遅れもフローサイトメトリーにより、すでに明らかとなっている。さらに、アクチンおよび微小管の分布について蛍光顕微鏡を用いて調べた結果、アクチンについては細胞周期の遅れに伴って細胞の先端に凝集し続けた。また微小管については、核微小管の配向異常を示す細胞が観察された。一方、核微小管の配向が正常であり、かつ伸長している細胞も含めて、IAA 存在下では、細胞質微小管は娘細胞の先端まで伸長していない細胞が数多く存在することが明らかとなった。また、共焦点顕微鏡を用いて観察した結果、偽菌糸形成細胞の細胞質微小管は正常細胞より細かった。

以上より、微小管の配向や伸長に関わる微小管結合タンパク質と、それらと相互作用するアクチン結合タンパク質との相互作用に何らかの異常があるのではないかと考え、今回、出芽酵母においてアクチンと微小管をつなぐタンパク質である微小管結合タンパク質である Bim1 と Myo2 結合タンパク質である Kar9 に着目し、研究をすすめた。

蛍光顕微鏡を用いて、GFP-Bim1 および GFP-Kar9 の局在を観察したところ、IAA 誘導偽菌糸における Bim1 の配向異常が観察され、Kar9 においては、正常細胞ではほぼ見られない細胞の内部への局在が多く観察された。この結果に基づいて、Δ*bim1* およびΔ*kar9* を用いて形態観察を行ったところ、意外にも親株とほとんど変わらない形態が維持されていた。蛍光顕微鏡観察の結果、Kar9 において、正常細胞では、娘細胞の細胞内部と細胞分裂面の 2 箇所でしか観察されなかったのに対し、IAA 誘導偽菌糸形成細胞では細胞内部に複数の局在が観察された。これらの結果を受けて、Bim1 および Kar9 過剰発現株を作成し、その形態を観察した。その結果、Kar9 過剰発現株で、IAA 非存在下においても親株よりも細胞が伸長しているという結果が得られ、微小管伸長不全に Kar9 が関与していることがわかった。これらの結果より、偽菌糸形成機構として、kar9 が異常となり細胞質微小管の伸長不全がおこることによって、細胞質分裂が正常に完了せず、細胞の先端にアクチンが凝集し続け、先端成長し続けることによって、偽菌糸が形成されるのではないかという仮説をうちたてた。

*Saccharomyces cerevisiae*, microtubule, pseudohyphae

発表番号：2F224
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 非イオン性界面活性剤ジグリセリルラウリルエーテルの真菌液胞膜障害作用

# Structural damage of fungal vacuole membrane induced by non-ionic surfactant diglyceryl lauryl ether

○池側 智香子[1]、土井 剛志[2]、熊澤 史貴[2]、荻田 亮[1,3]、藤田 憲一[1]、田中 俊雄[1]（[1]阪市大院・理、[2]太陽化学、[3]阪市大・健康研セ）

○ Chikako IKEGAWA[1], Takeshi DOI[2], Fumitaka KUMAZAWA[2], Akira OGITA[1,3], Kenichi FUJITA[1], Toshio TANAKA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Osaka City Univ., [2]Taiyo Kagaku Co., [3]Res. Centr. for Urban Health & Sports, Osaka City Univ.)

【目的】*C. albicans* などの病原性真菌に対する amphotericin B (AmB) の殺菌作用はアリシンや *N*-methyl-*N''*-dodecylguanidine (MC12) の共存下で顕著に増幅される。[1)] それらの増幅効果は真菌の細胞膜障害剤として知られる AmB に潜在する「液胞膜破壊作用」の増幅に起因することが明らかになっている。乳化剤などに使用される非イオン性界面活性剤 monoglyceryl lauryl ether が AmB の殺真菌作用を増幅する薬剤因子として以前から知られている。[2)] アルキルグリセリンを構成するグリセリンの分子数と上記の増幅効果の関係を明らかにしようとしたところ、新たにグリセリン 2 分子から成る diglyceryl lauryl ether (DLE) 自身に液胞膜障害を伴う殺真菌作用があることを見いだした。本研究においては、DLE など非イオン性界面活性剤による液胞膜障害作用の発現機序を AmB のそれと比較、解析した。

【方法】真菌モデル細胞として *S. cerevisiae* W303 株、BY4741 株、および本株に由来する遺伝子欠損変異株を用いた。致死作用の検定は麦芽末培地、YPD 培地、水、およびコハク酸緩衝液中、30℃の条件で行い、生菌数の測定はコロニーカウント法によって行った。細胞膜障害の指標として、細胞内 $K^+$ の漏出を測定した。液胞膜の観察は蛍光試薬 FM4-64 によって処理した細胞を用いて行った。

【結果と考察】DLE は、真菌モデル細胞である *S. cerevisiae* に対して濃度依存的な致死作用を発揮したが、その致死作用は AmB の場合とは異なって培地組成およびイオン強度など環境因子の影響を受けなかった。生細胞数が 1%以下となる条件で、AmB 処理細胞からは $K^+$ の著しい漏出が認められたが、DLE 処理細胞からの漏出は微弱であった。次いで、DLE 処理細胞の液胞を観察したところ、著しい断片化、もしくは小胞化が観察されたが、この種の構造変化は AmB 処理の場合に観察される膜構造の無秩序な破壊とは異なっていた。同じく非イオン性界面活性剤に分類される Triton X-100 および Tween 20 には殺真菌作用ならびに液胞膜障害作用は全く見られなかった。一方、DLE と同様の液胞膜障害作用がグリシンやキトサンとともに食品の日持向上剤として使用される diglyceryl laurate にも認められた。オートファジーによって AmB を液胞内に輸送することができないために AmB 耐性となる Δ*atg18* 株が DLE に対する感受性を維持していることから、液胞への輸送様式においても DLE と AmB との間に違いが見られた。

1. Ogita, A., Fujita, K., and Tanaka, T. (2012). *Front. Microbiol*. 3, 100
2. Haynes, M. P. *et al*., (1994). *Antimicrob. Agents Chemother*. 38, 1523-1529

*S. cerevisiae*, non-ionic surfactant, vacuole

発表番号：2F225
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# $Cu^{2+}$および $Mn^{2+}$がγ-ポリグルタミン酸の発酵生産に与える影響

# The effects of $Cu^{2+}$ and $Mn^{2+}$ on microbial production of poly-γ-glutamic acid

冨山 敬史[1]、中野 太一[1]、西山 聖[2]、堀邊 英夫[2]、高橋 良輔[3]、北村 進一[3]、山口 良弘[1,4]、荻田 亮[1,5]、田中 俊雄[1]、○藤田 憲一[1] ([1]阪市大院・理、[2]阪市大院・工、[3]阪府大院・生命環境、[4]阪市大・複合先端、[5]阪市大・健康・研セ)

Takashi Tomiyama[1], Taichi Nakano[1], Takashi Nishiyama[2], Hideo Horibe[2], Ryosuke Takahashi[3], Shinichi Kitamura[3], Yoshihiro Yamaguchi[1,4], Akira Ogita[1,5], Toshio Tanaka[1], ○Ken-ichi Fujita[1] ([1]Grad. Sch. of Sci., Osaka City Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Osaka City Univ., [3]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [4]OCARINA, Osaka City Univ., [5]Research Center for Urban Health and Sports, Osaka City Univ.)

【背景】納豆の糸引き成分の一つである γ-ポリグルタミン酸（PGA）は、免疫賦活効果や水質浄化作用などを示す高機能性バイオポリマーで、主として *Bacillus* 属細菌によって生産される。先行研究により、これらの機能性は分子量の増大により向上することが報告されている。一方、ほとんどの *Bacillus* 属細菌が生産する PGA の分子量は、菌の種類によりほぼ一定であり、その生産能も不安定である。

【目的】そこで本研究では、PGA の生産量改善および超分子量化に関与する因子の探索を行った。

【方法】 PGA 合成関連遺伝子群 *pgsBCAE* を用いる高発現系を有する大腸菌において、$Zn^{2+}$や $Mn^{2+}$などの２価金属イオン存在下で PGA を生産させると、その生産性が向上する。そこで本研究では、*B. subtilis* 168 株および *Bacillus* sp. F-2-01 株由来の PGA 合成関連遺伝子を用いる高発現系を非 PGA 生産枯草菌へそれぞれ構築し、様々な 2 価金属イオンを培地に添加して、PGA の生産に与える影響を調べた。

【結果】その結果、テストした２価金属イオンの中で最も生産量の増加に寄与したのは $Mn^{2+}$であった。すなわち、168 株由来の PGA 合成関連遺伝子を用いる発現系では 2 mM $Mn^{2+}$の添加で最大の生産量を示し、生産量は非添加の場合の約 1.7 倍となった。加えて F-2-01 株由来の遺伝子を用いる発現系では、0.2 mM $Mn^{2+}$の添加により生産量は非添加の場合の約 1.3 倍となった。次いで、アガロースゲル電気泳動により PGA の最大分子量を相対的に見積もった。最も分子量の増大に寄与したのは $Cu^{2+}$であった。すなわち、168 株由来の PGA 合成関連遺伝子を用いる発現系では 2 mM $Cu^{2+}$の添加が最も効果的となり、分子量は非添加の場合の約 16 倍となった。加えて F-2-01 株由来の遺伝子を用いる発現系では、2 mM $Cu^{2+}$の添加により分子量は非添加の場合の約 4 倍となった。また、$Mn^{2+}$は $Cu^{2+}$よりは弱いが 168 株由来遺伝子を用いる発現系では分子量の増大効果が認められた。相対分子量の増大が認められたサンプルについては、各種ポリマー分子量測定法を用いた場合も分子量の増大を確認することができた。さらに、F-2-01 野生株を用いて同様の実験を行った場合においても、上記と同様に、$Cu^{2+}$添加時には分子量の増大を確認することができ、より詳細なデータについては、現在、検討を行っている。

【考察】以上の結果より、２価金属イオンである $Mn^{2+}$や $Cu^{2+}$の添加によって、従来得られているものよりも高分子の PGA を得ることができた。得られた超高分子 PGA は免疫賦活効果や水質浄化作用などの機能性が向上していると期待される。

poly-γ-glutamic acid, *Bacillus subtilis*, biopolymer

発表責任者：藤田　憲一（kfujita@sci.osaka-cu.ac.jp）

発表番号：2F226
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Paenibacillus* 属細菌のもつ機能未同定べん毛モーター固定子の機能解析

Functional analysis of flagellar motors of unknown function from *Paenibacillus* species

○今澤 陸[1]、高橋 優嘉[2]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大院・生命科学、[2]東洋大・バイオナノ)
○Riku Imazawa[1], Yuka Takahashi[2], Masahiro Ito[1,2] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo univ., [2]Bio-Nano Electronics Research Centre, Toyo univ.)

**【研究背景・目的】**

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を用いて、自身の生育に有利な環境へと移動する。べん毛は、モーターに相当する基部体、プロペラに相当するべん毛繊維、そして、両者を繋ぐフックから構成されている。基部体は回転子と固定子からなり固定子内に $H^+$や $Na^+$といった一価のカチオンが流入することによって、べん毛が回転すると考えられている。現在、べん毛モーター固定子の共役イオンとして、一価のカチオンである $H^+$、$Li^+$、$Na^+$、$K^+$、$Rb^+$が報告されている。大腸菌やサルモネラ菌など多くの細菌では、$H^+$駆動型固定子 MotAB を有しており、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や海洋性 *Vibrio* 属細菌などは $Na^+$駆動型固定子 MotPS や PomAB を有している。これら固定子のイオン選択性には、MotB 型サブユニットの膜貫通領域が重要であると考えられている。しかしながら、固定子のイオン選択機構の詳細については明らかになっていない。

最近、我々は $Mg^{2+}$や $Ca^{2+}$といった二価のアルカリ土類金属イオンを生育に要求する *Paenibacillus* sp. TCA20 株を自然界より分離した。本菌株のもつ固定子遺伝子とその機能は明らかとなったが、*Paenibacillus* 属細菌の持つ固定子の研究は進んでおらず、その機能とアミノ酸比較によるイオン選択性に重要なアミノ酸残基の同定は困難であった。そこで、本研究では、様々な *Paenibacillus* 属細菌の固定子遺伝子をクローニングし、機能解析とアライメントを行うことによって、固定子のイオン選択性に重要なアミノ酸残基を同定することを目的とした。

**【方法・結果】**

本研究では、4 種類の *Paenibacillus* 属細菌（*Paenibacillus lactis*、*Paenibacillus barengoltzii* 、*Paenibacillus mucilaginosus*、*Paenibacillus* sp. oral taxon 786）の機能未同定固定子遺伝子を研究対象とした。これら 4 種類の固定子遺伝子の機能を解析するために、遺伝子工学的手法が容易な枯草菌の系を用いた。まず、枯草菌固定子欠損株（運動性なし）に固定子（PL-MotAB、PB-MotAB、PM-MotAB、PO-MotAB）をそれぞれ発現する株（PL-AB 株、PB-AB 株、PM-AB 株、PO-AB 株）を作製し、この株の運動性が回復するかどうか軟寒天培地上で確認した。その後、液体中での運動性解析や遊泳阻害実験を行った。結果の詳細は、ポスターで報告する。

Flagellar motor, *Paenibacillus*, Ion selectivity

発表番号：2F227
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂肪酸カリウムによる抗アメーバ効果と形態観察

# Anti-amoeba activity by fatty acid potassium and morphological observation

○田中 彩[1]、惠良 真理子[1]、川原 貴佳[2]、完山 陽秀[2]、森田 洋[3]([1]北九大院、[2]シャボン玉石けん(株)、[3]北九大)
○ Aya TANAKA[1], Mariko ERA[1], Takayoshi KAWAHARA[2], Takahide KANYAMA[2], Hiroshi MORITA[3] ([1]Grad. Sch. Univ. Kitakyusyu, [2]Shabondama Soap Co., Ltd., [3]Univ. Kitakyusyu)

*Hartmannella vermiformis* とは、淡水中に生息するアメーバの一種である。水道水中にも生息し、一般家庭の水回り、特に浴槽において他のバクテリアと共にバイオフィルムを形成する一因としても知られている。また、レジオネラ感染症の原因菌である *Legionella pneumophila* の宿主とも成りうることが知られている。先述した問題点は、バイオフィルムの形成の一因でもある *H. vermiformis* を制御することで問題の軽減がなされると考えられる。そこで、本研究では脂肪酸塩に着目した。脂肪酸塩は界面活性剤の一種で石けんの主成分であり、細菌への高い抗菌効果の報告もなされている。しかし、*H. vermiformis* 単体に対する脂肪酸塩による抗アメーバ効果の報告は少ない。以上のことから、*H. vermiformis* の制御は家庭内、特に浴槽の環境改善につながると考え、脂肪酸塩による抗アメーバ効果の評価を行った。

抗アメーバ試験には、脂肪酸塩である、酪酸カリウム（C4K)、カプロン酸カリウム（C6K)、カプリル酸カリウム（C8K)、カプリン酸カリウム（C10K)、ラウリン酸カリウム（C12K)、ミリスチン酸カリウム（C14K)、オレイン酸カリウム（C18:1K)、リノール酸カリウム（C18:2K)、リノレン酸カリウム（C18:3K）を用いた。脂肪酸塩の濃度は 350 mM であり、pH は 10.5 とした。また、比較対象として pH を 10.5 に調整した pH 調整水を用いた。検定アメーバは、*Hartmannella vermifomis* ATCC 50599 を選定した。アメーバは培養 3 日目のものを用い、細胞数は $3.0\times10^4$ cells/mL となるように調整した。5 mL チューブに脂肪酸塩（終濃度：175 mM）とアメーバ懸濁液を加えた後、30 ℃で静置した。0、10、60、180 分接触後にサンプリングを行い、トリパンブルーにて染色後 5 分置き、プランクトン計数板を用いて目視で計数を行った。次に、2 倍希釈系列の濃度の脂肪酸塩を用いて、抗カビ試験と同様の操作を行い、寒天培地上にコロニーが現れなかった濃度を各脂肪酸塩の MIC 値とした。また、顕微鏡観を用いた脂肪酸塩接触時の *H. vermifomis* の形態観察を行った。

*H. vermiformis* に対する脂肪酸塩の抗アメーバ効果の結果は、C12K、C18:1K、C18:3K が高い抗アメーバ効果を示し、10 分の接触で 4 オーダーの抗アメーバ効果が認められた。高い抗アメーバ効果を発揮した脂肪酸塩に対して MIC 測定試験を行った結果、C12K=1.36 mM、C18:1K=0.17 mM、C18:3K=0.34 mM となった。また、形態観察の結果、C12K、C18:1K、C18:3K に関しては、栄養体・シストともに死滅している様子が見てとれた。以上のことから、バイオフィルム形成の一因である *H. vermiformis* に対する脂肪酸塩の利用可能性が示唆された。

Fatty acid potassium, Anti-amoeba activity, *Hartmannella vermiformis*

発表責任者：森田　洋（morita@kitakyu-u.ac.jp）

発表番号：2F228
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂肪酸塩及び脂肪酸によるアカントアメーバの不活化

# Anti-Acanthamoeba Effect of Fatty Acid Salts and Fatty Acids

○増田 愛実[1]、惠良 真理子[1]、川原 貴佳[2]、完山 陽秀[2]、森田 洋[3]([1]北九大・院、[2]シャボン玉石けん（株）、[3]北九大)
○Manami MASUDA[1], Mariko ERA[1], Takayoshi KAWAHARA[2], Takahide KANYAMA[2], Hiroshi MORITA[3] ([1]Grad. Sch. Univ. Kitakyusyu, [2]Sabondama Soap Co., Ltd, [3]Univ. KItakyusyu)

【目的】

アカントアメーバは土壌、海水、淡水などに普遍的に存在する自由生活アメーバである。近年、洗浄不足などによりコンタクトレンズに付着したアカントアメーバが角膜の傷から侵入することによって感染するアカントアメーバ角膜炎が問題となっている。これは、現在市場に出回っているソフトコンタクトレンズ消毒剤（マルチパーパスソリューション）の抗アメーバ活性が非常に低いことに起因している。一方で、石けんの主成分である脂肪酸塩は、細菌に対して抗菌効果を有していることが知られている。そこで、本研究では脂肪酸塩を用いてアカントアメーバの栄養体及びシストに対する抗アメーバ効果を検討することを目的とした。

【方法】

検定アメーバには、*Acanthamoeba castellanii* ATCC 30010 株を選定した。サンプルには炭素鎖の異なる 9 種類の脂肪酸カリウム塩(濃度 350 mM、pH 10.5）及び脂肪酸塩の原料である脂肪酸（濃度 350 mM）を用いた。抗アメーバ試験は、脂肪酸塩 1 mL とアメーバ懸濁液 1 mL（終濃度：約 3.0 ×104 cells/mL）を接触させ，30 ℃で静置培養した。この試料を 10、60、180 分後にサンプリングし、トリパンブルーと混釈し死細胞を染色後、プランクトン計数板を用いて光学顕微鏡で形態観察及び生細胞数の算出を行った。

【結果】

脂肪酸塩による抗アメーバ試験（栄養体）の結果、C8K、C10K、C12K は 180 分接触で 4 オーダーの抗アメーバ効果を示した。さらに、最小発育阻止濃度（MIC）測定試験を行った結果、C10K と C12K が 2.7 mM と最も低濃度で抗アメーバ効果を示した。また、脂肪酸塩の原料である脂肪酸を用いて、栄養体に対する抗アメーバ試験を行った結果、C4、C6、C8、C18:2、C18:3 が 4 オーダーの抗アメーバ効果を発揮した。また、MIC 測定試験を行った結果、C4 が 2.7 mM と最も低濃度で抗アメーバ効果を示した。次に、シストに対する脂肪酸塩の抗アメーバ試験を行ったが、抗アメーバ効果は認められなかった。これらの結果から、アカントアメーバ栄養体に対しては C10K、C12K、C4 が高い抗アメーバ効果を示し、抗アメーバ剤としての利用可能性が広がった。

Fatty acid salt, *Acanthamoeba*, anti-amoeba effect

発表番号：2F229
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌のバイオフィルム細胞と浮遊細胞の細胞内遊離アミノ酸プロファイル
# Intracellular free amino acids profile in biofilm cells and planktonic cells of *Escherichia coli*

○森永 康[1]、太田 瑛美[1]、島崎 純次[1]、古川 壮一[1]、唐川 幸聖[2]、岩畑 大悟[2] ([1]日大院　生資科、[2]味の素(株)イノベーション研)
○Yasushi Morinaga[1], Emi Ota[1], Junji Shimazaki[1], Furukawa Soichi[1], Sachise Karakawa[2], Daigo Iwahata[2] ([1]Nihon Univ., [2]Ajinomoto Co., Inc.)

【目的】バイオフィルム（BF）は固体表面上に形成される微生物集落であり、良好な環境では浮遊型として生活している細胞が環境劣化に応答して形成するものと考えられる。BF 形成を誘発する環境劣化の要因として栄養的な欠乏が考えられる。本研究では大腸菌の浮遊細胞と BF 細胞の細胞内遊離アミノ酸組成を比較することによって、BF 形成とアミノ酸欠乏の関係を明らかにすることを目的としている。

【方法】大腸菌 BW25113（以下 BW）およびそれ由来の Trp 合成欠損株を含む BF 高形成性の各種変異株を LB 培地にて 30℃、24h 静置培養し、BF を形成している同じ培養系から浮遊細胞と BF 細胞を回収し、冷生理食塩水にて 2 回洗浄後、冷 50%MeOH と冷 $CHCl_3$ を等量加え、MeOH 層に移行してくる細胞内遊離アミノ酸を抽出して、アミノ酸分析計で定量解析した。

【結果】BF 細胞と浮遊細胞の遊離アミノ酸濃度を比較した結果、野生型株 BW では両細胞の Total アミノ酸濃度の間に大きな差は見られなかったが、BF 高形成性変異株では BF 細胞の Total アミノ酸濃度が浮遊細胞に比して低い傾向を示した。遊離アミノ酸の含有比率を比較した結果、いずれの菌株の場合も、BF 細胞の Glu、Lys、Gln、Thr の比率が浮遊細胞に比べ上昇したのに対し、BCAA ほか多くのアミノ酸の比率が低下し、特に Pro や Met の低下が顕著だった。Trp は浮遊細胞でも含量が少なかったが、BF 細胞では殆んど検出されず、欠乏状態にあると考えられた。こうした Trp 欠乏は、Trp 合成欠損株の BF 細胞以外に、野生型株や他の変異株の BF 細胞でも観察された。

【考察】BF 細胞における遊離 Total アミノ酸濃度の低下は、アミノ酸生合成活性の低下を示唆している。また BF 細胞において、Glu などの生合成経路の短いものの含有比率が上昇するのに対し、生合成経路の長いアミノ酸の多くの含有比率が低下することも、BF 細胞におけるアミノ酸生合成活性の低下を裏付けている。中でも生合成経路が特に長い Trp は、BF 細胞中ではほとんど検出されず、BF 形成環境で最も欠乏しやすいアミノ酸と考えられる。これまでの報告で、Trp 合成欠損株が Trp 欠乏により BF を高形成すること、および、L-Trp の添加によって BF 形成の抑制や既形成 BF の崩壊が起こることを明らかにしてきたが[1)]、今回の結果から、大腸菌は、Trp 合成欠損株以外の株も含めて一般的に、BF 形成環境において Trp 欠乏状態にあることが明らかとなり、Trp 欠乏が BF 形成の重要な誘因であることが確認された。

[1)] *Biochem. Biophys. Res. Com.,* 419, 715-718 (2012)

biofilm, intracellular amino acid, L-tryptophan

発表責任者：森永　康（morinaga@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：2F230
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# トリプトファンの欠乏や過剰は大腸菌のバイオフィルム形成を誘発する

# Deficiency or excess in intracellular tryptophan induces biofilm formation by *Escherichia coli*

○太田 瑛美[1]、臼井 有美[1]、古川 壮一[1]、上野 聡子[2]、梶浦 貴之[2]、森永 康[1] ([1]日大院・生資科、[2]味の素(株)イノベーション研)
○Emi OTA[1], Yumi USUI[1], Soichi FURUKAWA[1], Satoko UENO[2], Takayuki KAJIURA[2], Yasushi MORINAGA[1] ([1]Nihon Univ., [2]Ajinomoto co., Inc.)

【目的】当研究室では、大腸菌の Trp 合成欠損株がバイオフィルム（BF）を高形成し、L-Trp の添加で BF が抑制、崩壊することを報告してきた。また、Trp 過剰と考えられる Trp 分解欠損株 Δ*tnaA* が BF を高形成することを見いだしている。これらの結果は、大腸菌の BF 形成と Trp の細胞内濃度が重要な関連性をもっていることを示唆している。そこで、これら変異株の BF 形成環境における細胞内遊離アミノ酸濃度を測定して Trp の存在状態を確認するとともに、培地に Trp やインドールを添加した際の BF 形成や細胞内遊離アミノ酸の変化について解析した。
【方法】大腸菌 BW25113（野生型株）および Trp 合成欠損株 Δ*trpC*、Trp 分解欠損株 Δ*tnaA* を用いた。LB 培地あるいは 1 mM の L-Trp または 0.5 mM インドールを添加した LB 培地にて 30℃、24 h 静置培養して得た浮遊細胞と BF 細胞を冷生理食塩水にて 2 回洗浄後、冷 50%MeOH と冷 $CHCl_3$ を等量加え、MeOH 層に移行してくる細胞内遊離アミノ酸を回収し、アミノ酸分析計、質量分析計を併用して定量解析した。BF 形成量評価は crystal violet 法で行った。
【結果・考察】BF 形成環境における野生型株細胞中で、Trp は最も低濃度のアミノ酸の一つであった。また、BF 高形成を示す Δ*trpC* の BF 細胞内の Trp は野生型株に比べ著しく低濃度で、検出不可能なレベルにまで低下しており、BF 細胞が極度の Trp 欠乏にあることが確認された。さらに、Δ*trpC* の BF 形成は L-Trp とインドールのいずれの添加によっても有意に抑制された。L-Trp の添加による BF 細胞の Trp の上昇は確認できなかったが、浮遊細胞の Trp 上昇が確認できた。一方、インドールを添加した場合には、浮遊細胞と BF 細胞のいずれでも Trp の上昇が確認された。なお Δ*trpC* において、インドールはトリプトファナーゼによって L-Trp に変換されると考えられた。以上の結果より、L-Trp やインドールの添加によって細胞内 Trp の欠乏が解消されることで BF 形成が抑制されることが示唆された。一方、トリプトファナーゼが欠損している Trp 分解欠損株 Δ*tnaA* も BF を高形成したが、Δ*trpC* とは逆に、細胞内 Trp 濃度が異常に高く、Trp 過剰状態と考えられた。L-Trp やインドールを添加すると細胞内 Trp 濃度は更に上昇し、Trp 過剰は解消されず、BF 形成は抑制されなかった。これらの結果より、Trp 過剰も BF 高形成の原因であることが明らかとなった。また、インドールそのものは Δ*tnaA* の BF 形成を抑制しないことから、BF 形成の支配因子はインドールではなく Trp であることが確認された。以上の結果から、細胞内 Trp の欠乏や過剰という栄養バランスの失調がバイオフィルム形成の誘導要因となっていることが示唆された。現在、遺伝子発現解析など行い、検討を続けている。

biofilm, amino acids, L-tryptophan

発表番号：2F231
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高圧二酸化炭素を用いたバイオフィルムの殺菌

# Sterilization of biofilm by high-pressure carbon dioxide

○長木 健太郎、佐々木 陽平、古川 壮一、荻原 博和、森永 康（日大院・生資科）
○ Kentaro NAGAKI, Yohei SASAKI, Soichi FURUKAWA, Hirokazu OGIHARA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【背景・目的】

バイオフィルム（BF）は浮遊細胞に比べ熱や薬剤に耐性があり、近年医療現場における感染症の原因や食品製造現場における微生物汚染源として注目されている。食品製造工程での BF 形成制御は重要な課題であり、形成されてしまった BF の洗浄・殺菌はさらに重要である。現在は薬剤を用いた洗浄が広く行われているが、薬剤の使用により食品中への残存や洗浄作業者の安全が懸念されている。一方、加圧した二酸化炭素（高圧二酸化炭素、以下 HPC）は、高い殺菌効果を有することが知られており、数 MPa の HPC 処理により、ほとんどの細菌栄養細胞を殺菌可能なことが報告されている。そこで本研究では、食品媒介病原細菌を含む食品関連微生物の形成した BF を HPC 処理によって殺菌することを目的として、基本的な検討を行ったので報告する。

【方法】

供試菌株として *Escherichia coli* K-12 BW25113、*Staphylococcus aureus* A7510、*Bacillus subtilis* IAM1026、*Lactobatillus fructivorans* NBRC 14747 などの食品関連微生物を用いた。微生物を所定の培地・培養温度で培養して、担体のビーズ（セルロース、ステンレスまたはプラスチック）表面に BF を形成させた。BF 形成後、ビーズを生理食塩水で軽く洗浄後、高圧二酸化炭素処理装置（AKICO 社製）を用いて、生理食塩水中で 3 MPa・37 ℃・30 min の条件で HPC 処理を行った。処理後、超音波処理によりビーズ上の BF を剥離し適宜希釈後、生菌数を平板法で測定した。同時に浮遊細胞への HPC 処理も行い、対照実験として加熱殺菌処理（63 ℃、30 min）の影響も検討した。

【結果・考察】

HPC 処理は供試菌の浮遊細胞だけでなく BF 細胞に対しても殺菌効果を示したが、菌種によって効果が異なった。また、担体の種類によって殺菌効果は異なり、ステンレスビーズのような平滑な担体には BF が形成されにくく、HPC 処理による殺菌効果も高いのに対し、凹凸のあるセルロースビーズには BF が形成されやすく、殺菌効果も低かった。セルロースビーズに形成した BF を超音波処理で剥離しても相当数の生菌がビーズに残存していたことから、ビーズの内部に細胞が侵入していることが明らかとなった。これらの結果より、セルロースのような凹凸のある担体の内部に侵入した細胞に対しては、$CO_2$ が浸透しづらいため、殺菌効果が低下したものと考えられた。

carbon dioxide, biofilm, sterilization

発表番号：2F232
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 香辛料からのバイオフィルム形成阻害物質の探索

# Screening of biofilm inhibitor from spices

○柳原 希枝子、古川 壮一、松藤 寛、荻原 博和、森永 康（日大院・生資科）
○ Kieko YANAGIHARA, Soichi FURUKAWA, Hiroshi MATSUFUJI, Hirokazu OGIHARA, Yasushi MORINAGA (Nihon Univ.)

【目的】

バイオフィルム (以下 BF )とは、微生物が固体・液体界面上に付着し形成する高次構造体で、薬剤や洗浄処理に対して耐性が高い。形成された BF の除去には強酸や強アルカリによる洗浄法が用いられるが、作業の安全面で課題があり、またこうした過酷な洗浄法が適用し難い場合もある。したがって、BF の形成を未然に防止することが望ましい。しかし、形成阻害技術は十分検討されていない。当研究室では BF の形成阻害剤を安全性の高い食品添加物から探索した結果、ショ糖脂肪酸エステルが高い BF 形成阻害活性を有することをみいだした。本研究は、ショ糖脂肪酸エステルのように BF 形成阻害活性を有する物質を食品である香辛料の中から探索し、BF 形成阻害機構を解明することを目的としている。

【方法】

供試菌株としては、モデル微生物として *Escherichia coli* MG1655, 有害微生物として *Pseudomonas aeruginosa* NBRC106052, *Staphylococcus aureus* A7510, *Streptococcus mutans* MT8148 を用いた。

約 60 種類の香辛料を 95～98℃の蒸留水に 3% (W/V)となるよう懸濁・撹拌後、3 min 抽出し、熱水抽出物を得た。熱水抽出物をろ過滅菌し、2 倍濃度の培地に同量添加した。ここに、前培養菌液を 1/100 量接種し、96 well microtiter plate に分注した。30℃、24 h 静置培養後、Crystal Violet 法にて BF 形成量を測定した。試料による生育阻害の有無は、BF 形成時の培養液を平板培地に塗抹・培養し、生菌数を測定することにより行った。

【結果】

約 60 種類の香辛料の熱水抽出物中に、供試菌株の BF 形成を阻害する効果を示すものがいくつか見出された。しかし、*P. aeruginosa* の BF 形成を阻害するものはポアブルローゼ(*Schinus molle* L.)の熱水抽出物のみであった。本抽出物は無添加区に比べ、生育を阻害することなく、BF 形成を 20%程度にまで低下させた。一方、*E. coli* に対しても同様な BF 阻害効果を示したが、*S. aureus*、*S. mutans* には効果がなかったことから、グラム陰性菌の BF 形成を特異的に阻害する可能性が考えられた。次いで、ポアブルローゼ中の活性成分を精製するため、酢酸エチルで液液分配したところ、水層が BF 形成阻害活性を示した。現在、カラムクロマトグラフィーにてさらに分画を行い BF 形成阻害活性成分の精製を行っている。

biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *Schinus molle* L.

発表番号：2G001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# AgRP 神経の活動が味嗜好性に与える影響の解析

# Orexigenic AgRP neurons modulate taste sensitivities in mice

○傅 欧、岩井 優、成川 真隆、三坂 巧、中島 健一朗 (東大農)
○Ou FU, Yu IWAI, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA, Kenichiro NAKAJIMA (Tokyo Univ.)

[背景]摂食は動物にとって、自身の生存や子孫の繁殖のために重要な行動である。このうち味覚は食物の価値の判断基準として機能する。例えば、糖質、アミノ酸、脂質など、好ましい味の食物は高栄養価であるため多く摂取される一方、腐敗物や毒物は強い酸味や苦味を呈し忌避される。これまでの研究から、脳は味覚と栄養の情報を別々の伝導路を介して受け取り、身体全体の活動を制御することが明らかになった。

近年、摂食をコントロールする役割のある脳部位のうち視床下部弓状核に局在するアグーチ関連ペプチド産生神経（AgRP 神経）が、絶食時に脳内で最初に興奮し、摂食亢進に必要な神経ネットワークの活動を引き起こすことが示された。しかし、なぜ満腹・空腹といった生理状態の違いにより味の感じ方や食物の好みが変化するのかは依然として不明である。

[目的]通常、空腹状態では AgRP 神経をはじめとして中枢の多くの神経の活動が変動するうえ、末梢の臓器の分泌するホルモンレベルも大きく変化する。そこで本研究では、神経活動の人工制御システムとして近年開発されたデザイナー受容体(DREADD)を用いて AgRP 神経を選択的に活性化し、いわば人工的に空腹状態を再現したうえで AgRP 神経の活動が味嗜好性に及ぼす影響を評価した。

[方法]脳定位装置を用いて AgRP-ires-Cre ノックインマウスの視床下部にアデノ随伴ウイルスをインジェクションし AgRP 神経特異的に興奮性 DREADD を発現させた。次にこの受容体のリガンドである人工化合物 Clozapine-N-Oxide(CNO)をマウスの腹腔内に投与し、味溶液に対する感度が通常から変化するかを brief access test により検証した。

[結果と考察]AgRP 神経特異的に DREADD を発現するマウスに CNO を投与したところ普段はエサを摂取しない時間帯でも絶食時と同様に大量のエサを摂取することを確認した。そこで、このマウスの味覚感受性を評価したところ、CNO 投与によりショ糖溶液に対する感度が通常より上昇することが明らかになった。この感度上昇はマウスを絶食させた場合にも同程度観察された。また、AgRP 神経の活性化に伴う甘味感受性の増加はカロリーのない人工甘味料を用いた場合にも生じた。以上より、AgRP 神経を起点とした神経ネットワークが活性化されると摂食が誘導されるだけでなく、味覚感受性が調節されることが明らかになった。

本研究は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

hunger, taste sensitivity, DREADD

発表番号：2G002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 橋結合腕傍核における味神経の分子マーカーの発現解析

# Molecular markers of gustatory neurons in the parabrachial nucleus in mice.

○岩井 優、傅 欧、三坂 巧、中島 健一朗（東大院農生科・応生化）
○ Yu IWAI, Ou FU, Takumi MISAKA, Kenichiro NAKAJIMA (Dept.Appl.Biol.Chem.,The Univ.Tokyo)

[背景]味覚は甘・旨・酸・塩・苦の 5 つの基本味から構成され、食物の価値の判断基準として機能する。例えば、栄養豊富な食物に含まれる糖やアミノ酸は甘味や旨味を呈し好まれるのに対し、腐敗物や毒物は酸味や苦味を呈し忌避される。一方、味の感じ方は常に一定ではなく満腹や空腹などエネルギー状態の違いによって変化することが経験的に知られている。しかし、その原因は未だよくわかっていない。
[目的]結合腕傍核(PBN)は脳幹の橋に存在する神経核で複数の亜核から構成される。その一部は舌→味神経節→脊髄孤束核の順に伝わる味覚伝導路の次の中継点として働く。また過去の報告から、PBN の味応答神経は内臓・体性感覚を味覚情報と統合して伝達する可能性が示唆されている。そこで、本研究では生理状態に依存して味覚の変化が生じるメカニズムの解明のため、PBN の味神経に注目した。
[方法]PBN の中の waist area とよばれる領域に味物質に応答する神経が密集しているという報告を参考にし、この部位の神経の分子マーカーを免疫組織染色により検討した。また、刺激依存的な神経活動マーカーである転写因子 c-fos の発現量が味刺激後に上昇するかどうかも同時に評価した。そのため、様々な味溶液をマウスに経口投与して 30 分から 2 時間待機した後、脳を潅流固定した。その後、PBN を含む脳切片を作製し蛍光免疫 2 重染色を行うことで、発現パターンを解析した。
[結果]味溶液の種類に関わらず、転写因子 SatB2 が PBN の waist area を中心に発現していることを確認した。また、c-fos の発現は waist area だけでなく他の亜核でも上昇する事、味溶液の種類に応じてその部位が変化することを確認した。また、1 晩絶食したマウスで同様の実験を行ったところ、味刺激後の PBN における c-fos 陽性神経の数が減少することを見出した。一方、SatB2 は空腹状態でも waist area のマーカー分子となりうることが明らかになった。また、c-fos の発現量は味刺激後の時間に応じて変化し、味質に応じて発現のピークや持続時間が異なる事が示唆された。
[考察]PBN の神経の味物質に対する応答は味質の種類に応じて異なることが明らかになった。また、空腹時には PBN の味神経の活動は全般的に弱まることが考えられる。今後は空腹が実際の味認識行動に及ぼす影響や SatB2 発現細胞の役割をさらに明らかにしたい。
本研究は，総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」およびロッテ重光学術賞の助成により実施された。

taste, parabrachial nucleus, immunohistochemistry

発表番号：2G003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 好中球からのサイトカイン産生におけるミエロペルオキシダーゼの役割

# Myeloperoxidase negatively regulates the expression of proinflammatory cytokines and chemokines by zymosan-induced mouse neutrophils.

○遠藤 大樹、荒谷 康昭 (横浜市大・院・生命ナノシステム科学)
○Daiki ENDO, Yasuaki ARATANI (Yokohama City Univ.)

【目的】

白血球の一種である好中球は様々な活性酸素を産生して生体防御を担っている。ミエロペルオキシダーゼ(MPO)は好中球のみに存在し、過酸化水素から次亜塩素酸への反応を触媒する。我々は、MPO 欠損($MPO^{-/-}$)マウスに酵母細胞壁成分のザイモザンを経鼻投与すると、野生型マウスよりも重篤な好中球性肺炎を誘発することを見いだし、$MPO^{-/-}$好中球からの MIP-2 の過剰産生がその肺炎重篤化の一因であることをすでに明らかにしている。本研究は、その他の炎症性サイトカイン類の発現量を野生型好中球と $MPO^{-/-}$好中球とで比較解析することを目的とした。

【方法と結果】

野生型および $MPO^{-/-}$マウスにザイモザンを経鼻投与し、24 時間後の肺組織中の MIP-1α、MIP-1β、IL-1α、IL-1β、および TNF-α の分泌量を ELISA で測定すると、いずれも $MPO^{-/-}$マウスで有意に高値を示した。このことから、これらの炎症性サイトカイン・ケモカインの過剰産生も $MPO^{-/-}$マウスの肺炎重篤化に寄与していることが示唆された。その産生源を知るために、腹腔からの単離好中球にザイモザンを添加して 3 時間後の培養上清中への分泌量を ELISA で測定したところ、いずれのサイトカイン・ケモカインも $MPO^{-/-}$好中球の方が野生型好中球よりも有意に高値を示した。また、$MPO^{-/-}$好中球におけるこれらの過剰産生は遺伝子発現レベルで制御されていることがリアルタイム PCR 法で示された。NF-κB、p38 MAPK、および ERK1/2 のいずれを阻害しても、すべての発現が顕著に低下したことから、p38/ NF-κB 経路と ERK/NF-κB 経路の両方が関わっていることが示された。ザイモザン添加時これらのシグナル伝達系の活性化度をウェスタンブロット法で解析したところ、興味深いことに、ERK1/2 は $MPO^{-/-}$好中球の方が野生型好中球よりも強く活性化することが明らかになった。

【考察】

以上の結果から、MPO の欠損によってより強く活性化された ERK/NF-κB 経路が、種々のサイトカイン類の過剰発現を誘発し、$MPO^{-/-}$マウスの炎症重篤化を助長している可能性が示された。

Myeloperoxidase, Neutrophil, Cytokine

発表責任者：荒谷康昭（yaratani@yokohama-cu.ac.jp）

発表番号：2G004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 好中球のザイモザン貪食能におけるミエロペルオキシダーゼの役割

# Myeloperoxidase-deficient neutrophils enhance phagocytosis of zymosan

○藤本 健太、荒谷 康昭（横浜市大・院・生命ナノシステム科学)
○Kenta FUJIMOTO, Yasuaki ARATANI (Yokohama City Univ.)

【目的】

好中球に存在するミエロペルオキシダーゼ(MPO)は過酸化水素から次亜塩素酸を生成する反応を触媒する。MPO 欠損($MPO^{-/-}$)マウスから単離した好中球をザイモザンで刺激すると、野生型好中球に比較して、非常に高いザイモザン貪食能を示すことをすでに明らかにしている。そこで本研究では、MPO を欠損することによって貪食能が亢進するメカニズムを探った。

【方法と結果】

野生型および$MPO^{-/-}$マウスの大腿骨骨髄から単離した好中球に FITC 標識されたザイモザンを添加し、2 時間培養後のザイモザン貪食能を顕微鏡下とフローサイトメーターで解析したところ、$MPO^{-/-}$好中球の方が野生型好中球よりも顕著に高い貪食能を示した。ERK1/2、p38MAPK、および PI3K のいずれを阻害しても貪食能が抑制されたことから、これらのキナーゼの活性化が貪食能を制御していることが強く示唆された。p38MAPK や、PI3K の下流に位置する Akt は、野生型好中球も$MPO^{-/-}$好中球もザイモザンの刺激によって同程度に活性化されたが、興味深いことに、ERK1/2 は $MPO^{-/-}$好中球の方が強く活性化されることがウエスタンブロット解析によって明らかとなった。さらに、補体受容体 CR3 の構成要素である CD11b の発現量が、$MPO^{-/-}$好中球の方が野生型好中球に比較して高いことも明らかとなった。

【考察】

以上の結果より、MPO が欠損することによる貪食能の亢進は、ERK1/2 の過剰活性化がその一因であり、CD11b が $MPO^{-/-}$好中球の膜表面に多く発現することによって ERK1/2 が過剰に活性化する可能性が考えられた。

Myeloperoxidase, Neutrophil, Phagocytosis

発表責任者：荒谷康昭（yaratani@yokohama-cu.ac.jp）

発表番号：2G005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

胆汁酸受容体 TGR5 は骨格筋を肥大化し、肥満に伴うインスリン抵抗性を改善する
Bile acid receptor TGR5 promotes muscle hypertrophy and improves obesity-induced insulin resistance
○佐々木 崇、三田 萌子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Takashi SASAKI, Moeko MITA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【研究の背景と目的】摂食に応じて消化管に分泌される胆汁酸は、脂溶性食品成分や脂溶性ビタミン類の消化吸収を助けるばかりでなく、それ自体がシグナル分子として働くことで様々な代謝変動を引き起こすことが知られている。とりわけ胆汁酸は食後に血中濃度が大きく上昇することから、摂食シグナルを伝達する因子と考えられている。胆汁酸受容体として発見された G タンパク質共役型受容体 TGR5 は様々な組織に発現が認められ、活性化により抗肥満効果や糖代謝改善効果を発揮する。これらの作用は褐色脂肪組織での熱産生亢進や小腸での GLP-1 分泌亢進により説明されているものの、TGR5 の機能については未知の部分も多い。特に、人体で最大の糖・脂質代謝の場である骨格筋における TGR5 の機能に関しては知見が乏しく、詳細な解析が望まれていた。そこで本研究では、骨格筋における TGR5 の機能解明を試みた。

【方法と結果】骨格筋特異的に TGR5 を過剰発現するトランスジェニック（Tg）マウスを作出し、そのフェノタイプを解析した。Tg マウスは同腹仔の野生型（WT）マウスと比較して、摂食量は同じであったが体重がわずかに重かった。そこで組織重量を測定したところ、興味深いことに Tg マウスは骨格筋重量が増加していることが明らかになった（腓腹筋：9.5%, 大腿四頭筋: 14.6%）。また筋重量の上昇に伴い、筋繊維横断面積や筋力（握力）の有意な増加が認められた。さらに骨格筋において TGR5 が抗肥満、糖代謝改善に寄与するかを明らかにするため、100 日間に及ぶ長期高脂肪食負荷実験を行った。その間、Tg および WT マウス間で体重や摂食量に差は認められなかったが、糖負荷試験やインスリン負荷試験の結果、肥満に伴い発症するインスリン抵抗性が改善することが明らかになった。

【考察】Tg マウスを用いた実験より、胆汁酸受容体 TGR5 が新たな筋肥大誘導因子であることが明らかになった。この結果は、胆汁酸が摂食行動を骨格筋に伝達し、TGR5 を介して筋量増大を誘導するという合理的なシステムの存在を示唆している。また骨格筋はインスリン誘導性糖取り込みの 70%以上を担う臓器であることから、インスリン抵抗性改善の原因のひとつは筋量増大にあると推測される。超高齢化社会を迎えた我が国では、加齢に伴う筋量の低下（サルコペニア）や、種々の生活習慣病が深刻な問題となっており、高齢者の QOL 低下や医療費の増大を招いている。本研究結果より、骨格筋 TGR5 に着目したアプローチがこれらの問題解決に貢献すると期待される。

bile acid, skeletal muscle, tgr5

発表責任者：佐々木　崇（atsasaki@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2G006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 胆汁酸受容体 TGR5 の柑橘成分ノミリンによる活性化機構解析

# Structural analysis of TGR5 activation mechanism by citrus limonoid Nomilin.

○三田 萌子[1]、佐々木 崇[1]、清水 誠[1]、井上 順[1]、石黒 正路[2]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大院農、[2]新潟薬大応生)
○Moeko MITA[1], Takashi SASAKI[1], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Masaji ISHIGURO[2], Ryuichiro SATO[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Niigata Univ. of Pherm. and Applied Life Sciences)

【目的】TGR5 は胆汁酸をリガンドとして活性化する GPCR であり、生体内において抗肥満効果・糖代謝改善効果を発揮する。その代謝改善効果から、近年 TGR5 リガンド活性能を有する機能性食品の開発が期待されている。我々の研究グループでは、柑橘類に含まれる食品成分ノミリンが TGR5 リガンド活性能を有することを見出し、さらに食餌性肥満マウスへのノミリン投与により高脂肪食負荷による体重増加や血糖値の上昇が抑制されることを確認している。本研究では、TGR5 リガンド活性能を有するノミリンと TGR5 の結合様式を明らかにすることで、ノミリンによる TGR5 活性化機構の解明を試みた。

【方法】我々は過去にヒト TGR5 とマウス TGR5 のノミリンに対する応答性が異なることを見出しており、ヒト TGR5 のノミリンへの応答性は実にマウス TGR5 の 10 倍以上にも及ぶことを示している。そこで、ノミリンの種特異的な TGR5 リガンド活性を利用し、ヒト TGR5 とマウス TGR5 のアミノ酸残基を相互に入れ替えた変異型 TGR5 発現プラスミドを作製し、そのノミリンへの応答性をルシフェラーゼアッセイにより評価することでノミリンと TGR5 の相互作用に重要なアミノ酸残基を特定した。また、その結果をもとに分子モデリングを用いてノミリンと TGR5 の複合体モデルを推定した。

【結果】ノミリンと TGR5 の相互作用に重要なアミノ酸残基は、マウス TGR5 には保存されていない、ヒト TGR5 に特異的な特定の 3 つのアミノ酸残基であることを明らかにした。したがって、TGR5 を構成する 300 以上ものアミノ酸残基のうち、わずか 3 つのアミノ酸残基がヒト TGR5 とマウス TGR5 のノミリンへの応答性の差異を決定づけていることが示唆された。さらに、分子モデリングにより、ノミリンは TGR5 の細胞外ループ近傍で TGR5 と相互作用することが推測された。

tgr5, Nomilin, anti-obesity

発表番号：2G007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 環境温度条件がマウスにおけるカプサイシン摂取による体温変化に与える影響

# Thermal conditions decide the changes in body temperature by capsaicin in mice

○森 紀之、浦田 朋実、福渡 努（滋賀県大人間文化）
○Noriyuki MORI, Tomomi URATA, Tsutomu FUKUWATARI (the Univ. of Shiga Prefecture)

【背景・目的】カプサイシンはトウガラシの辛味成分であり、摂取により灼熱感とともに様々な生理作用を引き起こす事が報告されている。カプサイシン摂取による生理作用として、血圧の上昇、発汗、体熱産生の亢進および体表温度の上昇などが報告されており、カプサイシンの摂取は体温調節機構へ影響を与えることが考えられる。また、カプサイシンは温度受容体である TRPV1（＞43ºC を受容）を活性化すること、カプサイシン摂取による体温変化は TRPV1 を介した反応であることが報告されており、カプサイシン摂取による体温調節機構への影響は TRPV1 の受容する温度域に基づいた生体の合目的な反応であることが考えられる。しかしながら、これまでの検討では温度が安定した条件のみで行われており、実際に温度刺激に応答している体温調節機構に対して、カプサイシンの摂取がどのような影響をおよぼすかについては詳細な検討がなされていない。そこで本研究では環境温度の変化により既に体温調節機構が動員されている状況下でのカプサイシンの投与が体温調節に与える影響を明らかにすることを目的とし、麻酔下のマウスを用いた検討を行った。
【方法】動物には C57BL/6J、♂、7 週齢のマウスを用いた。マウスを 2 時間絶食させた後、ウレタン麻酔し（1.4 g/kg）、温度プローブを装着した。温度測定は肩甲骨間褐色脂肪組織周辺（IBAT）、直腸、尻尾静脈周辺の三カ所で行った。試料投与用に開腹し胃にカニューレを挿入し、恒温槽内でマウスの体温が安定した後に投与を開始した。投与試料としてカプサイシン（10、15 mg/kg）を投与し、投与後 3 時間の体温変化を測定した。一定温度環境としてコントロールの直腸温が±0.3ºC となるように環境温度を調節した。また寒冷環境としてコントロールの直腸温度が-0.2 ºC/h で低下するように恒温槽内の温度を設定した。暑熱環境では同様に直腸温度が+0.3 ºC/h で増加するように設定した。
【結果・考察】一定温度環境下ではカプサイシン投与により尻尾温が上昇し、直腸温および IBAT 温が濃度依存的に低下した。寒冷環境下ではカプサイシン投与による尻尾温の上昇量が一定温度環境下に比して増加し、直腸温、IBAT 温の低下量は増加した。暑熱環境下ではカプサイシン投与による尻尾温の上昇量が一定温度環境時より減少した。直腸温の低下量は減少し、10 mg/kg での投与時の直腸温および IBAT 温はコントロール群に比して上昇した。以上の結果からカプサイシン投与による尻尾での熱放散の亢進は環境温度に影響されず、カプサイシンの投与量依存的に作用することが明らかになった。また暑熱環境下ではカプサイシンによる熱産生の亢進のため、投与濃度によっては必ずしも行うべき体温調節に対して正の方向に作用するわけではないことが示された。

capsaicin, mice, thermoregulation

発表番号：2G008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 食品成分由来 TRPA1 アゴニスト摂取による体温変化の作用機序の検討

# The mechanisms of change in temperature by TRPA1 agonist from foods

○浦田 朋実、森 紀之、福渡 努（滋賀県大人間文化）
○Tomomi URATA, Noriyuki MORI, Tsutomu FUKUWATARI (the Univ. of Shiga Prefecture)

【背景と目的】生体内での温度受容に関与する受容体として TRPV1(>43°C)、TRPM8(<25°C)、TRPA1(<17°C)が報告されている。興味深いことにこれらの受容体は温度だけでなく特定の食品成分によっても活性化されることが知られている。これまでに食品成分由来の TRPV1、TRPM8、TRPA1 アゴニストのマウスへの胃内投与により、各受容体が受容する温度域に応じた熱産生や熱放散の調節を介した体温変化が生じることが報告されている。TRPV1 アゴニストに関しては、ノックアウトマウスを用いた検討から TRPV1 を介して熱産生の亢進や熱放散の亢進を生じさせることが明らかになっており、食品成分の摂取による TRP チャネルを介した体温調節機構が存在することが考えられる。TRPA1 は感覚神経細胞で TRPV1 と同じ細胞に発現が認められていることから、TRPA1 アゴニスト摂取による体温変化には TRPV1 と同様の作用機序が存在する可能性が考えられるが、未だ詳細な検討が行われていない。そこで本研究は、TRPA1 アゴニスト摂取による体温変化への TRPA1 チャネルの関与およびその作用機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】実験動物には C57BL/6J マウス♂、7 週齢を用いた。マウスを 2 時間絶食させた後、ウレタン（1.4g/kg）で麻酔した。熱産生効果器である肩甲骨間褐色脂肪組織周囲(IBAT)、熱放散効果器である尻尾の皮膚血管周囲、深部体温を反映する直腸の 3 カ所に温度センサーを取り付けた。マウスの胃内または頚静脈内に試料投与用のカニューレを挿入した。処置後のマウスを恒温槽に入れて体温を安定させ、胃内または頚静脈内に TRPA1 アゴニスト溶液を投与した。投与後 180 分間の各部位の温度変化を測定した。投与試料として、シナモンの香気成分であるシンナムアルデヒド(20mg/kg for i.g., 10mg/kg for i.v.）を用いた。恒温槽の温度は、マウスの直腸温が±0.3℃で一定となるように調節した。

【結果と考察】シンナムアルデヒドの胃内投与により IBAT 温および直腸温がコントロール群に比較して上昇した。尻尾温の変化に有意な差は認められなかった。シンナムアルデヒドの静脈内投与により、IBAT 温および直腸温が胃内投与時と同様にコントロール群と比較して上昇した。以上の結果から、TRPA1 アゴニストであるシンナムアルデヒドの胃内投与は熱産生を亢進させること、さらにその作用部位は消化吸収後に存在している可能性が考えられた。現在 TRPA1 のアンタゴニストである HC-030031 および TRPA1 ノックアウトマウスを用いた検討を行い、TRPA1 アゴニスト摂取により生じる体温変化への TRPA1 の関与について検討中である。

TRPA1, cinnamaldehyde, thermoregulation

発表番号：2G009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ミナミコメツキガニ由来酸化還元酵素の探索

# Search of Oxidoreductase from *Mictyris brevidactylus*

○富永 昇、田邊 俊朗（沖縄高専・専・生資工）
○Sho TOMINAGA, Toshiaki TANABE (NIT Okinawa col.)

【緒言】

ミナミコメツキガニ（*Mictyris brevidactylus*）はエビ目・ミナミコメツキガニ科に属し、東南アジア熱帯域の干潟に生息する小さなカニの一種である。甲羅の部分が青灰色をしており、球に近い丸い体をしている。河口域の干潟に生息し、潮が引いた砂浜で大きな群れを作り、砂泥中のプランクトン・デトリタスなどを食べる。

ところで、植物は細胞質をヘミセルロースやセルロースで作られた細胞壁で取り囲み、さらにリグニンで補強している。このリグニンは難分解性の物質であり、自然界では白色腐朽菌が分解できることが知られている。

ミナミコメツキガニは砂泥中のプランクトンやデトリタスを捕食するが、その中に川や海岸から流出した植物片が含まれているとすれば、ミナミコメツキガニはリグニンのような難分解性の物質を分解できる酵素や機構を持っていることが考えられる。そこで、ミナミコメツキガニの組織からリグニン消化に関わっている可能性のある酸化還元酵素を探索することを目的とし、ミナミコメツキガニの採集と酵素抽出・活性測定を検討した。

【材料と方法】

酵素抽出の為に、沖縄県名護市周辺の干潟から、ミナミコメツキガニの成体をおよそ 100 匹採集した。ミナミコメツキガニの各個体を水道水で洗浄し干潟の泥をよく落とした後、液体窒素で凍結しホモジナイズした。これに 0.05 M リン酸緩衝液 pH6.8 を加えて懸濁後、遠心分離した上清を粗酵素液とした。粗酵素液を用いて、代表的なリグニン分解酵素であるラッカーゼ、リグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ、非マンガンペルオキシダーゼについて活性測定した。また、活性が見られた酵素については各種カラムクロマトグラフィーを用いて分離精製する予定である。

【結果と考察】

活性測定の結果、ミナミコメツキガニ抽出液にはリグニンペルオキシダーゼおよびマンガンペルオキシダーゼについて弱い活性がみられた。今後は活性がみられた二種の酵素について分離精製を行っていく。ミナミコメツキガニからリグニン分解酵素が見出され、ミナミコメツキガニがもたらす海の浄化能力の一端を解明することができれば、ミナミコメツキガニが生物資源としてより重要であることが証明できるのではないかと考えている。

*Mictyris brevidactylus*, oxidoreductase

発表責任者：田邊俊朗（tanabe@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：2G010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について

# The vigilance behaviors provoked by various kinds of alkylpyrazine analogues to mice

○長田 和実[1]、宮園 貞治[2]、柏柳 誠[2]([1]北医療大歯、[2]旭川医大医)
○ Kazumi OSADA[1], Sadaharu MIyazono[2], Makoto Kashiwayanagi[2] ([1]Health Sci. Univ. of Hokkaido, [2]Asahikawa Medical Univ.)

以前の研究より、オオカミ尿中で見いだされた一群のアルキルピラジンはマウスおよびエゾシカに対して 忌避行動、恐怖誘発行動を引き起こすことを見いだした。 そこで本研究では、16 種類のアルキルピラジンを用い、その化学構造とマウスに対して引き起こす各種警戒行動（不動時間, におい探索行動時間,行動量変化、Y 字型迷路によるにおい忌避行動） との構造活性相関を検討すると同時に、各種警戒行動間の相関関係についても検討した。マウスは C57BL/6j の雌(2～5 ヶ月齢)を用いた。各種ピラジンとの接触は 1 回のみとし、3 種類の警戒行動を同時に測定した。各警戒行動間において、不動時間と、行動量およびにおい探索行動の間に有意な負の相関性が見られた。16 種類の化合物のうち、2,3-diethylpyrazine （DEP） は不動時間の延長、におい探索時間の短縮、総行動量の低下に対して最も強い活性を示した。それに加え、 3-ethyl-2,5-dimethyl pyrazine （3EDMP), 5-ethyl-2,3-dimethylpyrazine （5EDMP） and 2,3,5-trimethyl pyrazine （TMP） にも有意な不動時間の延長が見られた。Y 字型迷路によるにおい忌避行動に関しては 3EDMP と DEP で有意な忌避作用が観察され、忌避反応の経時的変化のパターンが化合物によって異なることを見出した。これらの結果を総合すると、1)官能基の総炭素数が 3-4 個程度で、2)官能基の種類がメチル基およびエチル基であり、3)官能基の配置が左右非対称のアルキルピラジンが警戒行動を強く引き起こすことが示唆された。

pyrazine analogue, kairomones, vigilance behaviour

発表責任者：長田和実（osadak@hoku-iryo-u.ac.jp）

発表番号：2G011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# PDXD1_Human はヒト Phe decarboxylase の有力な候補である
# PDXD1_Human is a probable candidate of the human Phe decarboxylase.

○安藤 秀[1]、鈴木 良雄[1]、中村 顕[2] ([1]順大院スポーツ健康科学、[2]筑波大生命環境系)
○Suguru ANDO[1], Yoshio SUZUKI[1], Akira NAKAMURA[2] ([1]Grad. Sch. Health and Sports. Sci., Juntendo Univ., [2]Fac. Life Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】タンパク合成は生体内のアミノ酸バランスに依存し、制限アミノ酸がある場合には、利用されなかった必須アミノ酸は分解される。必須アミノ酸である Phe は、その分解過程で最初に脱炭酸されフェネチルアミンとなるが、ヒトの代謝経路(hsa00360 in KEGG pathway)では、この反応は EC4.1.1.28 [DOPA decarboxylase (DDC)]もしくは EC4.1.1.53 [phenylalanine decarboxylase (PheDC)]が触媒するとされている。しかし、ヒトを含む動物界では、PheDC は同定されていない。

一方、ラットで DDC を特異的に阻害した実験から、DDC 以外の酵素が Phe の脱炭酸を行っている可能性が示唆されている。さらに植物では Phe を選択的に脱炭酸し、次いで phenylacetaldehyde まで酸化する酵素 phenylacetaldehyde synthase (PAAS)が確認されているが、この酵素のオルソログも動物界では確認されていない。そこで本研究ではヒト PheDC の同定を目的とした。

【方法・結果】PAAS のアミノ酸配列を 20 残基ずつに区切った配列を query として、ヒト PheDC 候補を Blast 検索で *in silico* スクリーニングし、ヒットした 108 個の候補の中から重複および機能既知のものを除いた上で、decarboxylase に共通する pyridoxal-dependent decarboxylase motif を含む機能未知のものとして hsa23042, hsa102724985 を見出した。これら 2 つは PDXDC1（UniProt; Q6P996）の splicing variant であったため、PDXDC1 をヒト PheDC の候補とした(PAAS_Rosa との相同性は部分的に 23%)。PDXDC1 が発現している細胞として HEK293 細胞を選択し、同細胞由来の cDNA を鋳型とした PCR により PDXDC1 の発現を確認したが、DDC の発現は確認できなかった。この細胞の lysate を用いて Phe 分解活性を検討した結果、フェネチルアミンの生成を確認した。次に siRNA を用いて PDXDC1 をノックダウンしたところ、Western blotting で PDXDC1 から予想される約 87 kDa の大きさで anti-PDXDC1 により認識されるタンパクが減少し、同時に細胞 lysate による Phe の分解も 11.3%に抑制された。

【考察】以上の結果から PDXDC1 がヒト PheDC であると考えられるが、DDC が Phe 分解に関与している可能性も完全には否定できない。そこで、現在 DDC のノックダウンおよび cloning した PDXDC1 の活性について検討を行っており、その結果も併せて報告したい。生体内のアミノ酸濃度にはそれぞれに標準範囲がありアミノ酸バランスが保たれているが、その機構は明らかになっていない。一方、Phe の脱炭酸は、指標アミノ酸酸化法による必須アミノ酸必要量の測定に利用されており、制限アミノ酸がある場合に分解が起こることが知られている。したがって、PheDC の調節機構の解明は、生体内のアミノ酸バランス認識・調節機構の解明につながると期待される。

IAAO, amino acid, requirement

発表番号：2G012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト唾液中には酸性で活性化するプロテアーゼがある

# Human saliva contains protease that is activated under acidic condition.

○鈴木 雄大、鈴木 良雄 (順大院スポーツ健康科学)
○Yudai SUZUKI, Yoshio SUZUKI (Grad. Sch. Health and Sports. Sci., Juntendo Univ.)

唾液アミラーゼの分泌には，直接神経作用による制御系統が存在する。これにより、唾液アミラーゼ分泌が亢進される場合には,応答時間が 1～数分と短く、ストレス指標とされてきた血中コルチゾール濃度に比べて格段に反応が早いため、ストレス測定の指標としての有用性であるとされ、広く利用されている。また、唾液アミラーゼ活性は、唾液の凍結融解を繰り返しても、24 時間室温に保持しても測定に支障がないとの報告もある。

2013 年に長野県・長野市内の小学生より唾液を採取しアミラーゼ活性を測定した際、コットンにクエン酸を含む唾液採取用チューブを用いて採取した唾液のうち、pH3 以下のものは活性を測定することができないことを経験した。

アミラーゼは酸性で抑制されるが、中性に戻すことで活性を取り戻すとの報告がある。そこで、活性が測定できなかったクエン酸含有唾液を中性とし、再度唾液アミラーゼ活性を測定したが、活性は測定できなかった。また、抗アミラーゼ抗体を用いた ELISA Kit でもアミラーゼは検出されなかった。そこで SDS-PAGE により確認を行ったところ、活性の測定できなかった唾液では、唾液タンパクの分解が生じていることが確認された。

そこで、一般成人男性を対象にクエン酸含有および非含有の唾液採取チューブで唾液を採取し、比較を行ったところ、クエン酸含有チューブで採取した唾液では、抗アミラーゼ抗体を用いたウエスタンブロッティングにおいてアミラーゼの分解が確認され、さらに SDS-PAGE では、タンパクの分解が明瞭に確認された。

クエン酸非含有唾液採取チューブで採取した唾液に、50 mM となるようにクエン酸を添加して 30℃で 6 時間までインキュベートすると、インキュベート後 60 分でアミラーゼの分解物が確認でき、以後は SDS-PAGE でも明瞭に唾液タンパクの分解が観察された。しかし、50mM クエン酸 Na とした場合には、アミラーゼも、その他の唾液タンパクの分解も観察されなかった。また、クエン酸非含有の唾液を 95℃、30 分間熱処理した後に、50 mM となるようにクエン酸を添加して同様にインキュベートを行ったところ、アミラーゼもその他のタンパクの分解も確認できなかった。

以上より、唾液中には酸性で活性化するプロテアーゼが存在する可能性が示唆された。現在は唾液中に存在するプロテアーゼの同定を行っており、その結果についても発表当日に報告したい。

digestive juice, protein degradation, amylase

発表番号：2G013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

アスコルビン酸の LPS 誘発性炎症での救命作用の機構解析
Mechanism of the protective effect of ascorbic acid against LPS-induced inflammation
○辻野 祥伍、川出 野絵、徳田 優希、小林 美里、松田 幹、村井 篤嗣、堀尾 文彦（名古屋大院生命農・応用生命）
○Shogo TSUJINO, Noe KAWADE, Yuki TOKUDA, Misato KOBAYASHI, Tsukasa MATSUDA, Atsushi MURAI, Humihiko HORIO (Nagoya Univ.)

【目的】アスコルビン酸（AsA）生合成不能の ODS ラットに AsA 無添加飼料を与えると、血中の炎症性サイトカイン濃度や肝臓での炎症関連因子の発現上昇などの炎症様変化が起こる。これらより AsA が抗炎症作用を有すると推論して、ODS ラットの AsA 無摂取群と AsA 摂取群とに炎症・敗血症誘発モデルである LPS（Lipopolysaccharide）投与を行ったところ、AsA は摂取量に依存して段階的にラットの生存率を改善した。この AsA の効果の要因として、炎症性サイトカイン（TNFα、IL-1β）の血中濃度上昇の抑制が考えられた。そこで本研究では、上記の AsA の抗炎症・救命作用の機構を探ることを目的として、AsA 摂取が白血球での LPS 誘発性 TNFα 産生を抑制するかを検討した。
【方法】ODS ラット（雄、6 週齢）を用いて、AsA 無添加飼料群（欠乏群）、通常要求量の AsA を摂取する AsA300mg/kg 添加飼料群（対照群）、高用量の AsA を摂取する AsA3,000 mg/kg 添加飼料群（AsA 高摂取群）を設けた。飼育期間は欠乏群でも炎症様変化が検出されない 8 日間とし、 各群から末梢血単核球（PBMCs）を分離して培養した。実験 1 では、上記 3 群の PBMCs の培地に LPS（0.1 μg/ml）を添加して 16 時間培養し、培地中の TNFα 濃度を継時的に測定した。実験 2 では、欠乏群から得た PBMCs の培地に AsA を添加（100、250 および 500μM）した後、LPS を添加して実験 1 と同様に 16 時間培養した。
【結果】実験 1 ：培地中の TNFα 濃度は LPS 添加により顕著に上昇し、4 時間後以降において欠乏群に対して対照群および AsA 高摂取群で有意な低値を示した。この要因の一つとして、AsA 摂取が LPS 投与による TNFα mRNA レベルの上昇を抑制することが明らかとなった。 実験 2 ：LPS 添加後の培地中の TNFα 濃度を比較すると、AsA 無添加群に比べて 100、250 および 500μM AsA 添加群で TNFα 濃度が有意に低下した。各群の TNFα mRNA レベルの変動については現在解析を進めている。
【考察】個体レベルでの通常要求量およびその 10 倍量の AsA の摂取が PBMCs の LPS 誘発性 TNFα 産生増加を抑制することが明らかとなり、このことが LPS を in vivo で投与した際の AsA の抗炎症効果の一つの要因と考えられた。また、PBMCs 培地中への in vitro での AsA 添加も LPS 誘発性 TNFα 産生を抑制することを見出した。 これらの結果から、AsA の LPS 投与に対する救命作用の機構の一つとして、白血球での過剰な炎症応答の抑制が示唆された。

Ascorbic acid, inflammation, LPS

発表責任者：堀尾文彦（horiof@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2G014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 抗 CD98 依存性細胞融合に対するホスファターゼ阻害剤の効果

# Effects of Phosphatase inhibiters on anti-CD98 antibody-induced cell fusion

○鵜飼 容子[1]、青山 友果[1]、伊藤 守弘[2]、禹 済泰[1]、中川 大[1]、大西 素子[1] ([1]中部大学応用生物学研究科、[2]中部大学生命健康科学部)
○Yoko UKAI[1], Yuka AOYAMA[1], Morihiro ITO[2], Je-Tae WOO[1], Hiroshi NAKAGAWA[1], Motoko OHNISHI[1] ([1]Department of Biological Chemistry,Chubu Univ, [2]Department of Biomedical Sciences,Chubu Univ)

【目的】CD98 は、T 細胞活性化抗原として見出された重鎖と、アミノ酸輸送体である軽鎖からなる膜タンパク質である。ヒト末梢血単球に抗 CD98 重鎖(CD98hc)モノクローナル抗体を添加して培養すると、多核で骨吸収活性を持つ破骨細胞様細胞が形成されることから、CD98 は破骨細胞の細胞融合に関与すると考えられている。融合ペプチドとして HIV gp160 を発現するヒト単球由来細胞株 U2ME-7 細胞は、抗 CD98hc 抗体で刺激すると迅速に複数のタンパク質のリン酸化が起きるとともに、数時間のうちに細胞融合が誘導されることが報告されている。そこで本研究では、抗 CD98hc 抗体によって誘導される細胞融合のメカニズムを明らかにするため、U2ME-7 細胞を用いた新たな細胞融合評価系を構築するとともに、これを用いて細胞融合を阻害するプロテインホスファターゼ阻害剤を探索したので報告する。

【方法・結果】　96well plate に U2ME-7 細胞を播種した後、抗 CD98hc モノクローナル抗体を加えて 1 時間培養すると、凝集塊中に融合細胞が形成される。この融合細胞は、単核の細胞に埋もれているため、その数を直接計測することができない。そこでまず、凝集塊から融合細胞を単離するために、培養時間を変えて検討を行った。その結果、抗体添加後 30 時間培養すると、ピペッティングによって凝集塊からほとんどの融合細胞が単離し、その数は 36 時間まで変わらなかった。そこで U2ME-7 細胞は抗体添加 36 時間培養した後、ピペッティングによって融合細胞を単離した。得られた細胞懸濁液は細胞どうしが重ならないように 96well plate から 48well plate に移した後、ホルムアルデヒドを加えて遠心分離し、細胞を固定した。この評価系を用いて、既知のホスファターゼ阻害剤による抗 CD98hc モノクローナル抗体依存性細胞融合への阻害効果を検討した。その結果、CD45 の阻害剤である RWJ-60475(AM)3 および dioxophenanthrene は細胞融合を阻害し、PTEN の阻害剤である shikonin は細胞の凝集と融合の両方を著しく阻害することがわかった。これらの阻害剤の $IC_{50}$ を算出した結果、それぞれ 3.41μM、1.14μM および 2.12μM であった。

　これらの結果から、抗 CD98 モノクローナル抗体依存性細胞融合には PTEN 及び CD45 が関与していることが示唆された。

CD98, cell fusion, protein phosphatase

発表責任者：大西　素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

発表番号：2G015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒトミトコンドリアマトリクスに局在するプロテアーゼ Lon の特異的基質の探索

# Proteomic Analysis of new substrate proteins of mitochondrial Lon protease

○松島 雄一、高橋 和也、瀬戸山 大樹、康 東天 (九州大医)
○Yuichi Matsushima, Kazuya Takahashi, Daiki Setoyama, Dongchon Kang (Kyushu Univ.)

ミトコンドリアマトリクスには Lon、ClpXP、m-AAA の 3 種のプロテアーゼが存在し、これらはバクテリアからヒトまで広く保存されている。Lon、ClpXP はミトコンドリアマトリクスに局在し、m-AAA はミトコンドリア内膜の膜タンパク質でマトリクス側にプロテアーゼ活性をもつ。これらたった 3 種のプロテアーゼがミトコンドリアマトリクスタンパク質を分解することでタンパク質の異常な蓄積などを防ぎ、ミトコンドリア機能を正常に保っていると考えられている。ミトコンドリアマトリクスに存在するタンパク質は 500 種類を超えるが、その多くはこれら 3 種のプロテアーゼによって非特異的に分解されると考えられている。しかし、一部のタンパク質は特定のプロテアーゼによって特異的に分解されることが知られているが、その例は未だ少ない。また最近では、これらプロテアーゼの遺伝子変異がそれぞれ異なる疾患を引き起こすことも明らかになってきた。

我々は Lon が特異的に分解している新たなタンパク質を探索するため、siRNA により Lon をノックダウンした HeLa 細胞を用いて実験を行った。質量分析装置を用いた網羅的特異的基質探索の結果、Lon をノックダウンした HeLa 細胞では多くのミトコンドリアリボソームタンパク質が数多く蓄積することが明らかになった。またこれらミトコンドリアリボソームタンパク質が特異的に分解される条件下において Lon をノックダウンするとこの分解が阻害されること、さらに ClpXP のプロテアーゼサブユニットである ClpP のノックダウンではその分解が阻害されないことから、ミトコンドリアリボソームタンパク質は Lon により特異的に分解されていることが示唆された。

mitochondria, protease, proteomics

発表責任者：松島雄一（matsush5@cclm.med.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：2G016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# SAA3 プロモーターを利用した慢性炎症の in vivo imaging、および C/EBP β の役割

# In vivo imaging model for adipose inflammation and pathologic role of C/EBPβ for chronic inflammation

○佐竹 里香[1]、真田 洋平[2]、山本 岳史[2]、仮屋 大志[1]、Fons A.J. van de Loo[3]、加藤 範久[2]、矢中 規之[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏科学、[3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)
○Rika Satake[1], Yohei Sanada[2], Takafumi Yamamoto[2], Taishi Kariya[1], van de Loo Fons A.J.[3], Norihisa Kato[2], Noriyuki Yanaka[2] ([1]Faculty of Applied Biological Sci., Hiroshima Univ., [2]The Graduate School of Biosphere Sci., Hiroshima Univ., [3]Radboud University Nijmegen Medical Centre)

〈研究背景、および目的〉内臓脂肪型肥満によるメタボリックシンドロームでは白色脂肪組織に軽度の慢性炎症が見られ、Ⅱ型糖尿病などの他疾患と深く関連している。慢性炎症を呈した白色脂肪組織では単球・マクロファージなどの免疫細胞の浸潤が認められ、脂肪細胞との相互作用が重要な病態シグナルであると考えられている。以前、慢性炎症時の脂肪組織で高感度で発現応答する serum amyloid A3 (SAA3)遺伝子に着目し、SAA3 のプロモーター領域に luciferase 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を挿入することで慢性炎症を非侵襲的に可視化するマウス（SAA3-luc マウス）の作製を進めている。脂肪組織における SAA3 の発現は慢性炎症の鋭敏な病態マーカーであると考えられるが、SAA3 プロモーター領域内には CCAAT-enhancing binding proteinβ (C/EBPβ) element を 3 カ所含んでいる。そこで、C/EBPβ は脂肪組織の慢性炎症に応答して SAA3 をはじめとする炎症性遺伝子の転写を活性化することで、肥満白色脂肪組織の慢性炎症を制御する重要な転写因子として着目し、本研究では SAA3 プロモーター活性化への C/EBPβ の関与を検証した。さらに、以前作製した SAA3-luc マウスは大腸炎などの他慢性炎症モデルとして非侵襲な食品素材の評価系として利用を試みた。〈研究方法、および研究結果〉マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞において siRNA 法により C/EBPβ をノックダウンし、マウス単球 RAW264.7 細胞と共存培養したところ、C/EBPβ の発現抑制によって luciferase 活性が低下した。また、C/EBPβ をヒト胎児腎 HEK293 細胞に過剰発現させたところ、SAA3-luc による luciferase 活性が著しく上昇した。C/EBPβ が SAA3 の転写活性化に関与するとともに、脂肪細胞のマクロファージの共存培養における SAA3 のプロモーター活性の増加には C/EBPβ が重要であると考えられた。次に、SAA3 の転写活性化における C/EBPβ 依存性を検証するために、site-directed mutagenesis 法により SAA3 プロモーター領域内の 3 カ所の C/EBPβ element に 変異導入した SAA3 のプロモーター変異体を作製し、 RAW264.7 細胞と共存培養におけるプロモーター活性を解析する予定である。さらに、Dextran sulfate sodium (DSS) 誘導性の DSS 腸炎は大腸炎のモデルとして広く利用されているが、SAA3 の発現は DSS 腸炎モデルの大腸において著しく発現上昇することから、DSS 大腸炎モデル luciferase 活性を *in vivo* imaging などによって解析を行う予定である。

in vivo imaging, serum amyloid A3, adipose tissue

発表責任者：佐竹　里香（b125455@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2G017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 接着斑タンパク質ビンキュリンは細胞外マトリックスの硬さに応じた転写因子 YAP の挙動を制御する

# Focal adhesion protein vinculin regulates the behaviour of YAP

○黒田 美都 [1,3]、植田 和光 [1,2]、木岡 紀幸 [1] ([1] 京大農、[2] 京大 iCeMS、[3] 日本学術振興会特別研究員 DC)
○Mito KURODA[1,3], Kazumitsu UEDA[1,2], Noriyuki KIOKA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, [3]JSPS Research Fellow DC)

[背景・目的]

間葉系幹細胞は脂肪細胞や骨芽細胞などの様々な細胞に分化する多能性幹細胞である。間葉系幹細胞の分化には、TGFβなど液性因子による調節だけでなく「細胞外マトリックス(ECM)の硬さ」という物理的な要因による調節も受けている。例えば脂肪組織のように軟らかい ECM (2.5~5 kPa)上で、幹細胞は脂肪細胞へと分化しやすくなる。さらに、ECM の硬さに応じた分化方向性の調節には転写因子 YAP が関与している。

私たちは、細胞と ECM の接着部位に局在するタンパク質ビンキュリンは、ECM の硬さに応じてアクチンとの親和性を変化させることによって、ECM の硬さの感知に関与していることを明らかにしてきた。さらにビンキュリンが ECM の硬さに応じた間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を制御していることも明らかにしている。しかし、ビンキュリンがどのように脂肪細胞への分化を制御しているかは不明であった。そこで本研究では「ビンキュリンが転写因子 YAP の局在を制御することによって ECM の硬さに依存した脂肪細胞への分化を制御している」という仮説を立てこれを検証した。

[方法・結果]

マウス骨髄由来間葉系幹細胞株である ST2 細胞をモデル細胞として用いた。培養基板には、ビスアクリルアミドの混合率を変えることで硬さ可変なポリアクリルアミドゲルを用い、表面にはコラーゲンコートを施した。初めに 1.5~8.7 kPa の硬さのゲル基板上で細胞を培養し、免疫染色により YAP の細胞内局在を調べた。その結果、硬い基板上では YAP の核局在が増加した。このことから ST2 細胞においても ECM の硬さが YAP の核局在を制御していることが分かった。次にビンキュリンが YAP の核局在に与える影響を調べるために、ビンキュリンの発現抑制細胞をまず硬い培養基板上で培養し、YAP の核局在を調べた。その結果、ビンキュリンの発現抑制細胞では、コントロール細胞に比べて YAP の核局在が減少していた。さらにビンキュリン発現抑制細胞を硬さの異なるゲル基板上で培養したところ、軟らかい基板上ではコントロール細胞に比べて YAP の核局在に差はなかった一方で、硬い基板上では YAP の核局在が減少しており、YAP の核局在の硬さ依存性は低下していた。これらの結果から、ビンキュリンは ECM の硬さに応じて YAP の核局在を制御していることが明らかになった。このことは、ビンキュリンが硬い ECM 上での YAP の核局在の促進を介して、ECM の硬さに依存した脂肪細胞への分化を制御していることを示唆している。

vinculin, adipocyte differentiation, mesenchymal stem cell

発表責任者：黒田 美都（mkuroda@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2G018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 脂肪肝発症に対する細胞老化因子 SMARCD1 の寄与

# Involvement of senescence-associated factor, SMARCD1, in pathogenesis of hepatic steatosis

○杉原 由佳[1]、児崎 智美[1]、井上 千聡[1]、鵜殿 美弥子[1]、片倉 喜範[2] ([1]九大院・生資環、[2]九大院・農院)
○ Yuka SUGIHARA[1], Tomomi KOZAKI[1], Chisato INOUE[1], Miyako UDONO[1], Yoshinori KATAKURA[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【目的】
当研究室ではこれまでに、SWI/SNF ファミリータンパク質の一種である SMARCD1(BAF60a)を細胞老化因子として新たに同定している。これまでに SMARCD1 は、ミトコンドリア機能を制御する PGC1-α と複合体を形成し、 肝臓の脂肪酸β酸化遺伝子の転写を活性化することが報告されている。そこで本研究では、細胞老化因子 SMARCD1 の脂肪肝発症に対する寄与について明らかにすることを目的とした。

【方法】
遺伝子の発現解析は定量 RT-PCR 法により、SMARCD1 のノックダウンおよび強制発現はレトロウイルス発現系により行った。細胞老化表現型および肝細胞表現型は、各種マーカーを用いて IN Cell Analyzer 1000 を用いて定量的な評価を行った。

【結果と考察】
ヒト肝がん由来の HepG2 細胞に対しパルミチン酸処理を行った結果、脂肪滴合成の亢進とともに、SMARCD1 の発現低下が観察された。このことから、SMARCD1 の発現低下が脂肪肝発症に関わることが示唆された。次に、SMARCD1 をノックダウンした HepG2 細胞を作製し、IN Cell Analyzer 1000 を用いて評価した結果、SMARCD1 ノックダウン細胞では、脂肪酸β酸化関連遺伝子の発現低下による脂肪滴の蓄積と各種細胞老化マーカーの活性・発現低下が観察された。つまり、SMARCD1 の発現低下が、細胞老化と脂肪滴蓄積を誘導するものと考えられた。さらに、高脂肪食を与えたマウスの肝臓において、脂肪滴の蓄積、SMARCD1 の発現低下、老化マーカーの発現増加、炎症系サイトカインの発現増加が確認された。以上の結果から、SMARCD1 は細胞老化および脂肪滴蓄積をともに規定する因子であることが明らかとなった。

SMARCD1, senescence, Fatty Liver

発表責任者：杉原由佳（mr3.asxx@gmail.com）

発表番号：2G019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

ABCA1 による細胞遊走の制御
Modulation of cell migration by ABCA1.
○伊藤 志帆[1]、松尾 道徳[2]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,3]([1]京大院・農・応用生命、[2]京女・食物栄養、[3]京大 iCeMS)
○Shiho Ito[1], Michinori Matsuo[2], Noriyuki Kioka[1], Kazumitsu Ueda[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Women's Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】
ABCA1(ATP-Binding Cassette A1)は、細胞内の余剰コレステロールをリン脂質とともに、血液中の脂質アクセプターであるアポリポプロテイン A-I(apoA-I)へ受け渡し、善玉コレステロール(HDL)を産生するトランスポーターであり、細胞内コレステロール恒常性の維持に重要な役割を果たす。さらに、ノックアウトマウスを用いた実験から ABCA1 は細胞増殖や炎症反応など細胞機能の制御にも関与することが報告されている。しかし、ABCA1 がどのようなメカニズムで細胞機能を調節するのかは未だ不明である。近年、細胞中のコレステロール量によって細胞遊走が制御されることが報告された。そこで、ABCA1 は膜脂質を膜中で動かすことによって、シグナル伝達のプラットホームとなる脂質ラフトなどの膜脂質ドメインの状態を変化させ、その下流で起こるシグナル伝達を調節することで細胞遊走を制御しているという仮説を立てた。本研究は、この仮説を検証することを目的とした。
【方法・結果】
マウス繊維芽細胞(MEF)を用いて、ABCA1 が細胞遊走能に与える影響をスクラッチアッセイによって検討した。MEF 細胞に転写因子 LXR/RXR のリガンドを添加して ABCA1 の発現を誘導し、細胞遊走能を調べた。その結果、ABCA1 の発現を誘導した細胞では誘導していない細胞と比較して遊走能が低下した。apoA-I の培地への添加は、細胞遊走能に変化を与えなかった。次に、shRNA 発現レンチウイルスを用いて ABCA1 発現抑制 MEF 細胞株(ABCA1 KD-MEF)を樹立し、同様に細胞遊走能を検討した。その結果、ABCA1KD-MEF 細胞では mock 細胞と比較して遊走能が上昇した。現在、ABCA1KD-MEF の ABCA1 強制発現株を樹立し、ABCA1 の細胞遊走能に与える影響を検証している。ABCA1 による細胞外へのコレステロール排出は apoA-I の添加に依存するため、以上の結果は、ABCA1 は細胞内または細胞膜中でコレステロールを移動させることによって細胞遊走能に影響を与えていることを示唆している。さらに、蛍光プローブを用いて脂質ラフトドメインを染色することによって、ABCA1 が膜脂質ドメインに与える影響を検討している。

ABC transporter, cell migraion, cholesterol

発表責任者：植田和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2G020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# カルシウム結合タンパク質 ALG-2 による初期分泌経路調節タンパク質 TFG の細胞内局在制御

# The calcium-binding protein ALG-2 regulates subcellular localization of TFG, a modulator of the early secretory pathway

○京 卓志[1]、桑田 啓子[2]、高原 照直[1]、牧 正敏[1]、柴田 秀樹[1]（[1]名大農、[2]名大 ITbM）
○Takashi KANADOME[1], Keiko KUWATA[2], Terunao TAKAHARA[1], Masatoshi MAKI[1], Hideki SHIBATA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]WPI-ITbM., Nagoya Univ.)

【背景と目的】

ALG-2(apoptosis-linked gene 2)はカルシウム結合モチーフである EF-hand を５つ連続して有するタンパク質である。二量体を形成することに加えて、カルシウム依存的に様々なタンパク質と相互作用することから、ALG-2 はカルシウム依存的に二者のタンパク質間の相互作用を仲介するアダプタータンパク質として機能することが想定されている。これまでにカルシウム依存的な相互作用タンパク質を足掛かりとした機能解析によって、ALG-2 は細胞内小胞輸送や RNA スプライシングなど様々な生理現象に関わっていることが明らかになってきた。本研究では ALG-2 が関与する新たな生理現象を見出すべく、ALG-2 の新規相互作用タンパク質の探索を行った。

【方法と結果】

カルシウムとの親和性が低下した変異体 FLAG-ALG-2 と野生型 ALG-2 を共発現させた HEK293 細胞溶解液からカルシウム存在下で抗 FLAG 抗体による免疫沈降を行い、EGTA で溶出した。この方法によってカルシウム依存的に FLAG-ALG-2/ALG-2 二量体の相互作用タンパク質の取得を目指した。溶出産物の LC-MS/MS 解析によって、TFG(Trk-fused gene)が新規 ALG-2 相互作用タンパク質候補として同定された。カルシウム存在下における抗 ALG-2 抗体を用いた免疫沈降によって TFG が共沈降したことから、内在性タンパク質どうしの相互作用が確認された。これまでに複数の ALG-2 相互作用タンパク質の相互作用領域の類似性比較により、ALG-2 の結合するモチーフ（ALG-2 binding motif, ABM）は二種類（ABM-1, ABM-2）存在することが考えられている。TFG には ABM-2 に相当する配列が存在し、ABM-2 を欠損させた TFG は ALG-2 との相互作用が著しく低下することが分かった。

TFG の動態における ALG-2 の関与を調べるために、FLAG-ALG-2 を HeLa 細胞に発現させて TFG の局在を観察した。その結果、FLAG-ALG-2 発現細胞では、発現していない細胞に比べ、細胞質に観察される TFG 陽性のドット状のシグナルが顕著に増強した。さらに GFP-TFG と mCherry-ALG-2 を共発現させた HeLa 細胞の生細胞観察を行った。Thapsigargin を処理することで細胞質のカルシウムを上昇させたところ、GFP-TFG と mCherry-ALG-2 が共局在するドットにおいて、両者の蛍光シグナルが増強した。最後に、GFP-TFG の FRAP（fluorescence recovery after photobleaching）解析を行った。ABM-2 を欠損させた GFP-TFG は ERES 膜に安定に局在する割合が野生型に比べて少なくなることが分かった。以上の結果から ALG-2 が TFG の局在を調節していることが明らかになった。

calcium, protein secretion, protein-protein interaction

発表責任者：柴田秀樹（shibabou@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2G021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 細胞外基質の硬さに応じた乳腺上皮細胞の嚢胞・管腔形成に与えるビンキュリンの効果

# The effect of vinculin in cyst/tubule formation of mammary epithelial cells dependent on ECM stiffness

○今井 まり子[1]、市川(長里) 彩花[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京大院農、[2]京大 iCeMS)
○ MARIKO IMAI[1], AYAKA ICHIKAWA NAGASATO[1], KAZUMITSU UEDA[1,2], NORIYUKI KIOKA[1] ([1]Kyoto univ., [2]iCeMS, Kyoto univ.)

## 目的

生体内で上皮細胞は頂底の極性と中空構造をもつ球状の嚢胞やチューブ状の管腔を形成し機能している。嚢胞から管腔への転換はがんの転移とも関連することから注目を集めている。この嚢胞・管腔形成は wnt3 や上皮細胞増殖因子などの液性因子によって制御されているほか、コラーゲンやラミニンのような細胞外基質(ＥＣＭ)の構成分子の種類によっても制御されている。これらに加えてＥＣＭの硬さなどの物理的性質も嚢胞・管腔形成に影響を与えることが報告されつつあるが、その詳細は不明である。私たちはこれまでに、ＥＣＭの硬さに応じたマウス繊維芽細胞の細胞遊走の調節や、間葉系幹細胞株の脂肪細胞への分化の調節に接着斑タンパク質ビンキュリンが関わっていることを明らかにしてきた。そこで本研究ではＥＣＭの硬さが乳腺上皮細胞の嚢胞・管腔形成に及ぼす影響について調べるとともに、ＥＣＭの硬さに応じた嚢胞・管腔形成に与えるビンキュリンの効果について検討した。

## 方法・結果

コラーゲンのゲルの濃度を変えることで軟らかいゲル(1.0mg/ml)と硬いゲル(2.4mg/ml)を作製し、そのゲルの中にヒト乳腺上皮細胞 MCF10A を埋め込んで 14 日間培養した。培養を始めてから 3 日でゲルの硬さによらず細胞集塊が形成されはじめ、その後培養を続けると 10 日で軟らかいゲル内で管腔様構造が、硬いゲル内で嚢胞様構造が形成された。これらの細胞塊においてアクチンや基底膜マーカーであるラミニンの染色を行ったところ、頂底の極性と中空構造が観察された。次にこのコラーゲンゲルの硬さに応じた嚢胞・管腔形成におけるビンキュリンの機能を調べるために CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によりビンキュリンノックアウト(KO)MCF10A を作製した。また、この KO 細胞に GFP-ビンキュリンを再発現させた細胞も作製した。これらの細胞をゲル内で培養をしたところ、ビンキュリン KO 細胞は硬いゲル内では野生型細胞と同様に嚢胞を形成したが、軟らかいゲル内では管腔様構造は形成せず枝分かれ構造を多くもつ細胞塊が形成された。ビンキュリン再発現細胞では野生型と同様に硬いゲルで嚢胞が、軟らかいゲルで管腔が形成された。これらのことから乳腺上皮細胞はＥＣＭの硬さに応じて嚢胞と管腔を形成し、ビンキュリンがこの硬さに応じた形態形成に関わっていることが明らかとなった。

tubulology, extracellular matrix, vinculin

発表番号：2G022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ビネキシンαとホスファチジン酸の相互作用解析

# The analysis of the interaction of vinexin α with phosphatidic acid

○伊藤 有亮[1]、市川 尚文[1]、木村 泰久[1]、植田 和光[1,2]、木岡 紀幸[1] ([1]京都大学、[2]iCEMS)
○YUSUKE ITO[1], Takahumi Ichikawa[1], Yasuhisa Kimura[1], Kazumitsu Ueda[1,2], Noriyuki Kioka[1] ([1]Kyoto Univ., [2]iCEMS)

【背景・目的】

近年、動物細胞を取り囲むコラーゲンなどの細胞外マトリックス（ECM）の硬さは、細胞の増殖や遊走、分化などの運命を制御することが明らかになってきた。細胞は、ECM との接着部位である接着斑を介して ECM の硬さを感知していると考えられており、その詳細なメカニズムに注目が集まっている。当研究室の先行研究により、接着斑タンパク質ビンキュリンとビネキシンαは ECM の硬さに依存して自身の挙動を変化させ、細胞運動を制御するメカノセンサーとして機能することがわかっている。また、ビンキュリンやビネキシンαが、コレステロールやスフィンゴミエリンを豊富に含む微小膜ドメインである脂質ラフトに局在することがメカノセンサーとしての機能に必要である。このうち、ビンキュリンの脂質ラフト局在にはビネキシンα及びホスファチジルイノシトール二リン酸（$PIP_2$）との結合が必要であることもわかっている。しかし、ビネキシンαの脂質ラフト局在化の仕組みや脂質との結合性については不明である。そこで本研究では、ビネキシンαが脂質と直接結合する可能性について検証した。

【結果・考察】

まず、様々な種類の脂質を固定したポリフッ化ビニリデン（PVDF）膜と精製 GST-ビネキシンαを混合し、Lipid overlay assay を行った。その結果、ビネキシンαは酸性リン脂質であるホスファチジン酸(PA)との特異的な結合が検出された。一方で、別の酸性リン脂質であるホスファチジルセリンや $PIP_2$ とは結合は見られなかった。さらに、PA を含むリポソームを作製し、精製 GST-ビネキシンαとの共沈降実験を行ったところ、ビネキシンαは PA を含むリポソームと共沈降した。ビネキシンβは、ビネキシンαの N 末端側領域を欠失したビネキシンαのスプライシングバリアントである。また、ビネキシンβは ECM の硬さ感知に関与せず、さらに脂質ラフトへ局在する割合がビネキシンαよりも低いことが分かっている。そこで、ビネキシンβについても同様に Lipid overlay assay やリポソーム共沈降実験を行ったところ、ビネキシンβと PA との結合は検出されなかった。以上の結果からビネキシンαは、ビネキシンβには含まれない N 末端側領域を介して PA と特異的に結合することが示唆された。現在、ビネキシンαの様々な領域を欠損させた変異体を用いて、PA との結合領域の絞り込みを行うことを検討している。

focal adhesion, vinexin, phosphatidic acid

発表番号：2G023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# HDL 産生を担う ABCA1 の 1 分子解析

# Single-molecule analysis of ABCA1 responsible for HDL generation

○永田 紅[1]、石神 正登[2]、笠井 倫志[3]、吉村 安寿弥[1]、永岩 耕太[2]、HEUSER John[1]、楠見 明弘[1,3]、植田 和光[1,2] ([1]京大 iCeMS、[2]京大院農、[3]京大再生研)
○Koh NAGATA[1], Masato ISHIGAMI[2], Rinshi KASAI[3], Azumi YOSHIMURA[1], Kota NAGAIWA[2], John HEUSER[1], Akihiro KUSUMI[1,3], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]iCeMS, Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. of Agri., Kyoto Univ., [3]Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ.)

【研究の背景と目的】ABCA1(ATP-binding cassette protein A1)は、善玉コレステロールとして知られるHDL(high density lipoprotein)産生に必須の膜タンパク質である。ABCA1はATP加水分解依存的に細胞内の過剰なコレステロールやリン脂質を動かし、細胞外の脂質受容体であるapoA-I(apolipoprotein A-I)へ受け渡すことでHDL産生の初期段階を担う。私たちは、ABCA1がHDL産生初期段階において細胞膜上でダイマー化することを見出しているが、その生理的意義は不明である。本研究では、生細胞の細胞膜上でのABCA1やABCA1変異体の動態とオリゴマー化を1分子解析し、また産生HDLの大きさを評価することにより、ABCA1ダイマー化の生理的重要性について議論し、ABCA1によるHDL産生メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】野生型 ABCA1、ATP 加水分解活性をもたず脂質輸送能のない非機能性変異型 ABCA1-MM、ABCA1 の C 末端に含まれるロイシンジッパー様モチーフを破壊した変異型 ABCA1-3LA と mEGFP との融合タンパク質を HeLa 細胞で一過的に発現させ、全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いて 1 分子イメージングを行った。各蛍光輝点の拡散係数を算出するとともに、それらの段階退色を調べることによりオリゴマー形成を検討した。ABCA1 同様 apoA-I へコレステロールやリン脂質を受け渡し、その機能異常がアルツハイマー病のリスクを増大させる ABCA7 についても同様の解析を行い、ABCA1 と比較した。また、ゲルろ過クロマトグラフィーおよび電子顕微鏡観察により、産生される HDL の大きさを評価した。
【結果】1) apoA-I 非存在下では、野生型 ABCA1 輝点の運動性は低く、約 7 割が静止した。一方、ABCA1-MM、ABCA1-3LA、ABCA7 では静止した輝点の割合が減少し、多くの分子が拡散した。2) 輝点の段階退色解析により、静止 ABCA1 分子の約 9 割はダイマーを形成しているが、ABCA1-MM、ABCA1-3LA、ABCA7 の拡散分子はモノマーであることが示唆された。このことから、ABCA1-MM、ABCA1-3LA、ABCA7 はダイマーを形成しにくいことが明らかになった。3) HDL 粒子の大きさを解析したところ、ABCA1 が直径の異なる大小 2 種類の HDL 粒子を産生したのに対し、ダイマーを形成しにくい ABCA1-3LA、ABCA7 では大きな HDL 粒子の産生が減少した。以上の結果より、ABCA1 のダイマー化は大きな HDL 粒子産生のために重要であることが示唆された。

ABCA1, HDL, single-molecule imaging

発表番号：2G025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 軟骨細胞のアポトーシスにおけるカルシウム及びリンの役割

# The role of calcium and phosphorus in apoptosis of chondrocytes

○上田 博也、河田 歩美、中谷 祥恵、古旗 賢二、和田 政裕（城西大薬）
○Hiroya UEDA, Ayumi KAWATA, Sachie NAKATANI, Kenji KOBATA, MAsahiro WADA (Josai Univ.)

【目的】長管骨の発生には成長板軟骨細胞が分化後に石灰化することが必須である。軟骨細胞の石灰化は、細胞外カルシウム（Ca）及びリン（P）濃度が上昇し、細胞のアポトーシスが誘導されることが引き金になっていると考えられている。近年、高濃度の細胞外 P は P トランスポーター（Pit-1）を介して軟骨細胞のアポトーシスを誘導することが報告された。また、低濃度の細胞外 Ca 及び P 単独ではアポトーシスを誘導しないが、共存するとアポトーシスを誘導することが報告されている。しかし、細胞外 Ca によるアポトーシス誘導メカニズム及び、細胞外 Ca と P の共役関係については分かっていない。そこで、本研究では軟骨細胞のアポトーシスにおける細胞外 Ca 及び P 共役関係を検討した。
【方法】前駆軟骨細胞株（ATDC5）に終濃度 2 mM または 4 mM の Ca、P を単独及び混合で添加し、培養した。石灰化の指標として石灰化をアリザリンレッド染色、アポトーシスをフローサイトメーター、Ca センシングレセプター（CaSR）及び Pit-1 の関与をアンタゴニストを用いて評価した。また、CaSR と Pit-1 の共役関係を細胞内リン濃度の測定及び CaSR アゴニストによる強制作動を用いて評価した。
【結果】軟骨細胞の石灰化及びアポトーシスは Ca 及び P 単独の添加よりも Ca と P を混合で添加することでより顕著に誘導された。CaSR 及び Pit-1 の阻害はそれぞれ Ca と P の混合添加が誘導したアポトーシスを完全に阻害した。細胞内 P 濃度は Ca 及び P の単独添加で上昇傾向が見られ、Ca と P を混合添加することで有意に上昇した。また、CaSR のアンタゴニスト添加は細胞内 P 濃度を有意に上昇させた。
【考察】Ca と P を混合することでアポトーシス誘導作用が顕著に観察されたことから、Ca と P の共役関係が確認された。細胞外 Ca は CaSR を介して、軟骨細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになった。また CaSR を強制作動させると細胞内 P 濃度が上昇したことから、細胞外 Ca を感知した CaSR は Pit-1 を活性化すると考えられる。以上のことから、軟骨細胞のアポトーシスにおける細胞外 Ca 及び P 共役メカニズムは、CaSR の作動による Pit-1 活性化を介した細胞内 P 濃度の上昇であることが示唆された。今後、CaSR の作動が Pit-1 を活性化させるメカニズムを検討する必要がある。

chondrocytes, apoptosis, phosphorus

発表番号：2G026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 神経幹/前駆細胞におけるプログラニュリン依存的な Col3a1 発現調節

# Pgrn-dependent regulation of Col3a1 in neural progenitor cells

○佐藤 和典[1]、田中 良法[2]、松脇 貴志[3]、西原 真杉[3]、根建 拓[1]([1]東洋大院生命、[2]東京都医学総合研究所、[3]東大院農)

○ KAZUNORI SATO[1], YOSHINORI TANAKA[2], TAKASHI MATSUWAKI[3], MASUGI NISHIHARA[3], TAKU NEDACHI[1] ([1]Toyo Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, [3]Univ. of Tokyo)

プログラニュリン (Progranulin：PGRN)は神経保護、腫瘍形成、細胞増殖等に関与する成長因子であり、神経変性疾患の一種である前頭側頭葉変性症 (Frontotemporal labor degeneration：FTLD)の原因遺伝子として注目を集めている。成熟ニューロンやミクログリアにおける PGRN の生理作用は広く研究されているが、神経幹/前駆細胞 (Neural progenitor cells：NPCs)における生理作用については知見が少ない。我々は、これまでに NPCs における PGRN の生理的役割として、PGRN 欠失(PGRN KO) NPCs において野生型 (WT) NPCs と比べて基底状態の細胞死が増加し細胞脆弱性が増大していることを明らかにしている。そこで、本研究では NPCs における PGRN 依存的な細胞死抑制機構を理解することを目的とした。

まず、PGRN KO NPCs の細胞脆弱性のメカニズム解明のため、E 16.5 マウス胎仔海馬より採取した WT NPCs 及び PGRN KO NPCs について､マイクロアレイ解析を用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、Gene ontology (GO) analysis により PGRN KO NPCs では Death や Extracellular region に関連する遺伝子群の発現が上昇している可能性、逆に、Developmental process、Cell proliferation、synapse、synapse part に関連する GO を持った遺伝子群の発現は減少している可能性が示唆された。さらに同データを用いて Pathway analysis も行った結果、PGRN KO NPCs では Focal Adhesion、ACE inhibitor、Endochondral Ossification、Senescence and Autophagy、Inflammatory Response Pathway に含まれる遺伝子発現が上昇しており、逆に G1 to S cell cycle control、Cell cycle Pathway については遺伝子発現が減少しているという結果が得られた。次に、PGRN KO NPCs において唯一有意な発現量増加が認められた Col3a1 に着目し、その生理的意義を調べた。まず、siRNA 処理により Col3a1 の遺伝子発現量を低下させた PGRN KO NPCs において細胞生存率の検討を行った。その結果、scRNA 処理した NPCs と比べて基底状態での細胞死率が約 1.3 倍に上昇する事が明らかとなった。また、PGRN KO NPCs においては多くの酸化ストレス関連遺伝子の発現低下が見られていたことから、細胞内外の酸化ストレスが増大しているという仮説を立て、細胞に $H_2O_2$ を用いた酸化ストレス負荷を行い、Col3a1 の遺伝子発現制御について検討を行った結果、Col3a1 は $H_2O_2$ 依存的に遺伝子発現が上昇する事が明らかとなった。

これらの結果から、PGRN KO NPCs ではストレス脆弱性が増すと同時に Col3a1 発現上昇を促進して代償性細胞保護機構を稼働している可能性が示唆された。

NPC, PGRN, Col3a1

発表責任者：佐藤和典（kazunori6226@yahoo.co.jp）

発表番号：2G027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# C2C12 細胞における収縮依存的な IP-10 分泌制御について
# Contraction reduces IP-10 secretion in C2C12 myotubes

○石内 友里、柴垣 拓也、佐藤 整、根建 拓（東洋大生命）
○Yuri ISHIUCHI, Takuya SHIBAGAKI, Hitoshi SATO, Taku NEDACHI (Toyo Univ.)

運動は骨格筋において代謝促進や筋発達などの生理変化を引き起こすとともに、脳神経系、免疫系をはじめとする体全体の機能を調節する。近年、運動によって骨格筋由来分泌タンパク質（マイオカイン）の発現が変化し、この運動依存的なマイオカイン制御が他の組織や器官の機能変化の少なくとも一部を仲介する可能性が示唆されてきた。運動に応答して分泌が変化するマイオカインの種類は極めて多いことが分かってきたが、全てのマイオカインの同定は未だ完了しておらず、さらに運動に応答したマイオカインの発現機構、生理作用などの詳細は未だ明らかになっていない。本研究ではマウス骨格筋由来 C2C12 細胞を用いて運動により分泌制御されるマイオカインの網羅的同定を行い、さらに同定された新規マイオカインのひとつである CXCL10 (Interferon gamma inducible protein 10; IP-10)について、その発現制御機構と生理作用を明らかにすることを目的とした。

まず、分化 C2C12 筋管細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS)を負荷して収縮を誘導し、得られた培養上清について抗体アレイ法を用いた解析を行ったところ、IP-10 を含む２つのマイオカインの産生が減少していることが分かった。さらに、C2C12 筋管細胞に 24 時間の EPS 処理を行い、IP-10 分泌量と遺伝子発現量を ELISA 及び real time PCR を用いて解析したところ、IP-10 の分泌量だけでなく遺伝子発現量も減少することが明らかとなった。すなわち、EPS 処理による IP-10 分泌量の減少は遺伝子発現を介していることが示唆された。次に運動依存的に活性制御される AMP kinase (AMPK)及び MAP kinase (MAPK)が IP-10 の発現に関与しているかを調べた。AMPK あるいは MAPK 阻害剤の存在下、C2C12 筋管細胞に EPS 処理を行って IP-10 の発現を解析したところ、運動依存的な AMPK 活性化は IP-10 発現減少に関与していなかったが、MAPK の一部が IP-10 の発現に関与していることが示唆された。これまで IP-10 は、Interferon gamma (IFNγ)や Tumor necrosis factor alpha (TNFα)などの炎症性サイトカインの刺激により単球やマクロファージなどで分泌され、活性化 T 細胞の遊走を惹起すること、さらに血管新生の強力な阻害因子であることも知られている。これらの既報を併せると、運動による骨格筋からの IP-10 産生減少によって、骨格筋周辺での免疫反応が抑制されるとともに血管新生が促進されている可能性が考えられた。

skeletal muscle, contraction, myokine

発表責任者：根建　拓（nedachi@toyo.jp）

発表番号：2G028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 自己抗体反応性ピロール化タンパク質と相互作用する血清タンパク質
# A serum protein interacting with autoantibody-reactive pyrrolated proteins

○廣瀬 冴美[1]、日沖 裕介[1]、中村 哲彰[1]、宮下 宙士[1]、近澤 未歩[1]、柴田 貴広[1]、町田 幸子[2]、内田 浩二[1] ([1]名大院生命農、[2]食総研)
○ Sayumi HIROSE[1], Yusuke HIOKI[1], Tessho NAKAMURA[1], Hiroaki MIYASHITA[1], Miho CHIKAZAWA[1], Takahiro SHIBATA[1], Sachiko MACHIDA[2], Koji UCHIDA[1] ([1]Grad. Sch. of Bioagr. Sci., Univ. of Nagoya, [2]National Food Research Institute)

【背景・目的】
自己免疫疾患の一つである全身性エリテマトーデス(SLE) は、DNA に対して交差性を示す自己抗体の産生が大きな特徴として知られている。当研究室ではこれまでに、SLE 患者およびモデルマウス血清中の自己抗体が DNA のみならず、脂質過酸化由来アルデヒドによって修飾されたタンパク質に対しても交差性を示すことを明らかにしている。自己抗体が DNA と修飾タンパク質の両方を認識することから、修飾タンパク質中において DNA と類似した構造が存在するのではないかと考え、核酸染色試薬を用いた検討を行ったところ、その構造基盤としてγ-ケトアルデヒドによるタンパク質中のリジン残基のピロール化を見出した(Miyashita et al.,Sci.Rep.,2014)。LC-MS/MS を用いた生体内からのピロールリジンの検出定量により、血清中にピロール化タンパク質が存在することを確認した。そこで、血清中のピロール化タンパク質と相互作用する分子が存在すると考え、Pull down assay を行ったところ、ピロール化タンパク質と相互作用する血清分子として apolipoprotein E(apoE) を同定した。本研究では、生体内におけるピロール化タンパク質の役割について解明するべく、ピロール化タンパク質と apoE との相互作用に焦点を当てて検討を行った。

【方法・結果】
ビオチン標識したウシ血清アルブミンとγ-ケトアルデヒドの最小単位である 1,4-butanedial を 24 時間反応させ、ビオチン標識ピロール化タンパク質を作製した。ビオチン標識ピロール化タンパク質を用いた ELISA、Ligand blotting を行ったところ、ピロール化タンパク質と apoE の特異的な相互作用を確認した。そこで、ELISA にて apoE とピロール化タンパク質を相互作用させる際の buffer の条件を変化させ検討を行ったところ、塩濃度の上昇に伴って相互作用が阻害されること、ピロールリジンにより相互作用が阻害されることから、apoE はピロール化タンパク質の陰性荷電およびピロール構造を認識している可能性が明らかとなった。また、apoE をトロンビンにより酵素消化した apoE 断片について Ligand blotting を行ったところ、apoE の N 末端ドメインがピロール化タンパク質と相互作用することが明らかとなった。現在、apoE のピロール化タンパク質結合部位のさらなる絞り込みを行っている。さらに、in vivo サンプルにおけるピロール化タンパク質と apoE の発現変動を検討することによって、その生体内における機能性について解析を行っている。

autoantibody, pyrrolation, apolipoprotein E

発表責任者：廣瀬　冴美（hirose.sayumi@d.mbox.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2G030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ネオニコチノイドの活性発現機構に関する研究：ハイブリッド型ニコチン性アセチルコリン受容体のオルトステリック部位との相互作用の解析

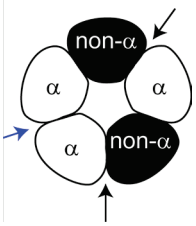
# Studies on mode of actions of neonicotinoids: Interactions with the orthosteric site of hybrid nicotinic acetylcholine receptors

○伊原 誠、松井 孝太郎、坂元 美史、山口 彰啓、松田 一彦（近畿大農）
○Makoto IHARA, Kotaro MATSUI, Mifumi SAKAMOTO, Akihiro YAMAGUCHI, Kazuhiko MATSUDA (Kinki Univ.)

【目的】ネオニコチノイド系殺虫剤はコリン作動性の興奮性シナプス伝達において重要な役割を担うニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に作用し、食害抑制あるいは致死作用を発揮するため、各種の害虫防除に使用されている。一方、有益昆虫や鳥類に対するネオニコチノイドの毒性が報じられ、その選択性に疑問が持たれている。これまでに演者らは、ネオニコチノイドがアセチルコリンとオルトステリック部位（Orthosteric Site, OS）に結合するが、アセチルコリンとは異なるアミノ酸残基と相互作用することを示してきた。特に演者らは、アセチルコリン結合タンパク質（AChBP）との複合体の X 線結晶構造をもとに、α サブユニットと non-α サブユニットがつくる OS のみならず、隣接する α サブユニット間ともネオニコチノイドが相互作用する可能性を指摘した。本研究ではショウジョウバエ α1 サブユニット（Dα1 サブユニット）とヒヨコ β2 サブユニットがつくるハイブリッド nAChR (Dα1β2 nAChR)を用いて、この仮説について検討したので報告する。

【結果と考察】

野生型および変異を有する Dα1β2 nAChR をアフリカツメガエル卵母細胞に機能発現させ、そのアセチルコリンとネオニコチノイドに対する電気生理学的応答を二電極膜電位固定法で測定した。Dα1 サブユニットどうしがつくる OS においてネオニコチノイドとの相互作用に影響すると推察されたアミノ酸を脊椎動物の α4 サブユニットにおける相同のアミノ酸へと置換した。それぞれの化合物の Dα1β2 nAChR に対する応答の濃度依存関係を調べたところ、α サブユニットが non-α サブユニットサブユニットよりも過剰に存在すると、α サブユニットに導入したアミノ酸置換は有意に受容体のネオニコチノイド感受性を低下させた。しかし、当該変異はアセチルコリンの濃度応答関係に対しては顕著な影響をおよぼさなかった。以上の結果から、Dα1β2 nAChR ではネオニコチノイドは隣接する α サブユニットがつくる OS と相互作用している可能性があると推察された。



nAChR におけるオルトステリック部位 (OS)

Neonicotinoid, Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), Insecticide

発表責任者：伊原誠（makoto_i@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：2G031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# M23 メタロペプチダーゼフォールドをもつヘパトカイン LECT2 の機能進化の構造基盤

# Structural basis for the functional evolution of hepatokine LECT2 with an M23 metallopeptidase fold

○宮川 拓也[1]、鄭 海[1]、澤野 頼子[1,2]、山越 智[3]、田之倉 優[1] ([1]東大院・農生科、[2]東京医歯大・教養、[3]国立感染研)

○ Takuya MIYAKAWA[1], Hai ZHENG[1], Yoriko SAWANO[1,2], Satoshi YAMAGOE[3], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Col. Lib. Arts Sci., Tokyo Med. Dent. Univ., [3]Natl. Inst. Inf. Dis.)

LECT2（Leukocyte cell-derived chemotaxin 2）は好中球の走化性因子として T 細胞系癌細胞 SKW-3 細胞の培養上清から最初に単離されたが、最近の研究では肝臓から分泌されてインスリン抵抗性を誘導するヘパトカインとして機能することが示されている。LECT2 の転写は AMPK の下流で制御されており、AMPK のリン酸化により LECT2 発現が亢進され、血中に分泌された LECT2 は JNK 経路を介して骨格筋のインスリン抵抗性を高める。成熟型 LECT2 は 133 残基からなる塩基性タンパク質であり、分子内に 3 対のジスルフィド結合をもつ。LECT2 のアミノ酸配列は、真正細菌がペプチドグリカンを切断するために有する M23 メタロペプチダーゼと類似性が高く、ペプチダーゼ活性に必須な亜鉛イオンを結合する $HX_nD$, HXH モチーフが保存されている。しかしながら、LECT2 には *c*-Met や CD209 などの受容体が報告されており、LECT2 の機能においては受容体タンパク質との分子間相互作用が重要である。

本研究では、M23 メタロペプチダーゼに属する LECT2 の機能進化とそれを説明する構造基盤を明らかにするため、LECT2 の *in vitro* における機能解析と X 線結晶構造解析をおこなった。高圧リフォールディング法により封入体から調製した LECT2 は M23 メタロペプチダーゼの典型的な基質であるペンタグリシンの切断活性を示さなかったが、表面プラズモン共鳴（SPR）法による解析で *c*-Met の細胞外ドメインとの相互作用が確認された。次に LECT2 の結晶構造を分解能 1.94 Å で決定し、LECT2 が M23 メタロペプチダーゼに類似のフォールドを形成し、$HX_nD$, HXH モチーフで亜鉛イオンを結合していることが明らかになった。一方、構造既知の M23 メタロペプチダーゼである LasA（*Pseudomonas aeruginosa* 由来, PDB code 3IT7）及び LytM（*Staphylococcus aureus* 由来, PDB code 2B13）との構造比較により、LECT2 に特有の 2 つの構造的特徴が明らかになった。LasA 及び LytM における触媒残基の His 残基は LECT2 では Tyr 残基（Y86）に置換されており、この置換が加水分解反応における水分子の脱プロトン化に影響する可能性が示唆された。もう一方の特徴として、2 つのループ（L1 及び L3）間に形成される基質結合クレフトに IC ループと名付けた付加的なループが見出された。LasA 及び LytM においてペプチド基質の結合に重要な P2 サイトが IC ループにより塞がれることで、LECT2 では基質ペプチドが触媒部位の亜鉛イオンに適切なコンホメーションで結合できないことが示唆された。LECT2 の Y86H 変異体においても M23 メタロペプチダーゼ活性が回復しないことから、IC ループが機能進化の主要な構造基盤であると考えられる。

X-ray crystallography, hepatokine, insulin resistance

発表番号：2G032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト甘味受容体の膜貫通領域における甘味物質相互作用部位の探索
# Investigation of the interaction sites on transmembrane domain of human sweet taste receptor

○松谷 拓弥[1]、中北 智哉[1]、広川 貴次[2]、三坂 巧[1] ([1]東大農、[2]産総研)
○Takumi Matsuya[1], Tomoya Nakagita[1], Takatsugu Hirokawa[2], Takumi Misaka[1] ([1]Univ. Tokyo, [2]AIST)

【背景・目的】

Class C GPCR に属する T1R2 及び T1R3 は、ヘテロダイマーを形成し、甘味受容体として機能することが知られている。キメラ受容体や点変異体を用いた解析により、複数のリガンド結合部位の存在が明らかとなっている。その中で、T1R3 の膜貫通領域（TMD）には、甘味増強物質及び甘味抑制物質の双方が作用することが報告されており、国内において香料として使用が認められているネオヘスペリジンジヒドロカルコン（NHDC）は、ここへ作用する甘味増強物質の一つである（Winnig *et al.*, 2007, Fujiwara *et al.*, 2012）。

我々は、ヒト T1R3 の TMD において、甘味増強物質が相互作用する部位を新たに探索するという試みを行っている。近年、T1Rs と同じく class C GPCR に属する代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1 の TMD の不活性型構造が解かれたことで(Wu *et al.*, 2014)、T1R3 の TMD の高精度なホモロジーモデルを構築できるようになった。このモデルに対し、リガンドとして NHDC をドッキングし分子動力学計算を行ったところ、既に相互作用が確認されている残基に加えて、NHDC と相互作用している可能性のある残基が、膜深部において新たに複数個提示された。そこで、これらの残基をターゲットとした点変異体を作製し、リガンドに対する応答を測定・解析することで、これらの残基の、リガンドとの相互作用の有無を検討することとした。

【方法・結果】

ヒト甘味受容体 hT1R2 / hT1R3 の点変異体およびキメラ G タンパク質 Gα16gust44 を共発現するような発現プラスミドを構築し、Flp-In システムを用いてこれらを安定的に発現する培養細胞を作製した。野生型あるいは点変異を導入した甘味受容体安定発現細胞に蛍光カルシウム指示薬を取り込ませた後リガンドを投与し、甘味受容体活性化に伴う $Ca^{2+}$濃度上昇を、蛍光強度の増加を計測することで検出した。点変異導入による NHDC あるいはその類縁体に対する応答性の変化を評価し、結果を分子モデルと比較検討して考察するとともに、NHDC の相互作用部位について検証を行う。

sweet taste receptor, neohesperidin dihydrochalcone, site-directed mutagenesis

発表責任者：松谷拓弥（5301314372@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2G033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト ABCB6 に存在する機能未知膜ドメイン(TMD0)の解析

# Analysis of functional role of the TMD0 of human ABCB6

○西澤 奈美[1]、木村 泰久[2]、大貫 元[2]、木岡 紀幸[2]、植田 和光[2,3]([1]京大・農・応用生命、[2]京大院・農・応用生命、[3]京大・iCeMS)
○Nami NISHIZAWA[1], Yasuhisa KIMURA[2], Hajime OHNUKI[2], Noriyuki KIOKA[2], Kazumitsu UEDA[2,3] ([1]Div.Appl.Life Sci., Fac.of Agri., Kyoto Univ., [2]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [3]iCeMS., Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ABCB6 は ATP 結合、加水分解エネルギーを利用して基質を輸送する ABC タンパク質の一つであり、ミトコンドリアに局在し、ポルフィリン化合物をミトコンドリア内に輸送すると考えられてきた。しかし、リソソームへの局在や多剤輸送体としての可能性が示唆され、その機能や局在についてはまだ謎が多いのが現状である。また ABCB6 には、ATP 加水分解、基質輸送を行うコアドメインの他に、機能未知の膜貫通ドメイン(TMD0)が存在する。ABC タンパク質にはコアドメインの他に膜貫通ドメインを持つものが多く存在するが、そのほとんどについて機能は明らかにされていない。ABCB6 の TMD0 の機能を明らかにできれば、他の ABC タンパク質の膜貫通領域の機能についても重要な知見が得られると考えられる。そこで本研究では ABCB6 の輸送基質を特定して生理機能を明らかにする事、TMD0 欠損変異体の解析によって TMD0 の機能を明らかにする事を目的とした。

【方法】

浮遊状態で培養可能な HEK293 細胞(FreeStyle293-F 細胞)を用いて、C 末側に精製用タグを導入した野生型 ABCB6 と TMD0 欠損変異体を発現させた。細胞を界面活性剤(0.8% DDM)で可溶化し、抗 FLAG 抗体を用いて ABCB6 を精製した。銀染色によって精製を確認し、リポソームに再構成して ATPase 活性を測定した。続いて、野生型と TMD0 欠損変異体の ATPase 活性を様々な antimycin 濃度のもとで測定しミカエリス・メンテン式に当てはめ、基質への親和性を評価した。

【結果】

野生型、TMD0 欠損変異体を一過性に発現させた結果、両タンパク質の発現量に差は見られないことが明らかとなった。このことから TMD0 を欠損させても全体の構造は保持されていることが示唆された。ついで FLAG タグによって精製し、純度約 43%での精製標品を得た。1 L 培養あたりの精製標品の収量は野生型で 0.36mg、TMD0 欠損変異体で 0.12mg であった。ついで精製標品をリポソームに再構成し、antimycin 存在下での ATP 加水分解活性を評価したところ、TMD0 欠損変異体は野生型に比べて約 1.5 倍の活性を示すことが明らかとなった。Antimycin 依存的な ATP 加水分解活性を酵素化学的に評価した結果 TMD0 欠損変異体では Vmax が約 2 倍に更新しているものの Km 値も約 2 倍に上昇しており、antimycin への親和性が低下していることが明らかとなった。以上の結果より、TMD0 は薬物の認識に関与する事が示唆された。

ABC transporter, purification, functional analysis

発表責任者：植田和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2G034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# クモ糸の氷核活性と構成タンパク質の MALDI・TOFMS 測定

# Ice nucleation activity of spider silk and MALDI-TOFMS measurement of its costituent protein

○山田 寛生、佐竹 祐之介、杉山 優介、田中 眞人、村勢 則郎（東電大理工）
○Hiroki YAMADA, Yunosuke SATAKE, Yusuke SUGIYAMA, Masato TANAKA, Norio MURASE (Tokyo Denki Univ.)

【背景・目的】

これまでにコクサグモ（*Agelena opulenta*）の糸に氷核活性があることを明らかにしてきた。しかし、クモの糸の氷核活性に関与しているタンパク質の構造に関してはわかっていない。本研究では、クモの糸の氷核活性を確認し、関与しているタンパク質の構造（アミノ酸組成および配列）を明らかにする目的で、質量分析による解析を行なった。

【方法】

低温顕微鏡（顕微鏡：Olympus BX50、冷却装置：Linkam LK-600PM）を用いて、クモの糸を添加した純水の凍結挙動を観察した。また、MilliQ 水、エタノール、アセトンで洗浄したクモの糸を塩酸とプロピオン酸の容量比１：１の混合液を用いて、70℃で加熱溶解した。溶解させたクモ糸タンパク質は SDS-PAGE で分画し、ゲル内トリプシン消化後、揮発性緩衝液を用いて抽出し、ZipTip C18 で脱塩後、MALDI・TOFMS 測定（Bruker autoflexⅡ）を行なった。

【結果】

コクサグモの糸を添加した水滴（10μl）の凍結温度は約-7℃、添加しない場合の凍結温度は約-14℃で、コクサグモの糸の氷核活性が確認された。さらに、クモの糸を湿潤させると乾燥状態の場合と比較して、凍結温度は約 1℃上昇した。

質量分析の結果からは、塩酸とプロピオン酸混合液で加熱溶解処理するだけで、部分的な加水分解が起こり、比較的小さなペプチドに由来する顕著なシグナルピークが観測された。SDS-PAGE 後のゲル内トリプシン消化によって、さらに加水分解すると新たな質量のペプチドのピークが観測された。トリプシン消化を行なっても行なわなくとも、複数の強度の高いピークが出現することは、繰り返し構造の存在を強く示唆している。今後はさらに詳しく解析を進め、氷核活性につながるアミノ酸の配列構造を明らかにしていく予定である。

Spider silk, Ice nucleation activity, Maldi tofms

発表責任者：村勢則郎（nmurase@mail.dendai.ac.jp）

発表番号：2G035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 原子間力顕微鏡(AFM)観察に向けた ABC タンパク質サンプルの最適化
# Optimization of ABC transporter for high speed AFM analysis

○山原 一晃[1]、木村 泰久[2]、柴田 幹大[3]、内橋 貴之[3,4]、安藤 敏夫[3,4]、木岡 紀幸[2]、植田 和光[2,5]([1]京大・農・応生、[2]京大院・農・応生、[3]金沢大・理工、[4]金沢大・バイオ AFM、[5]京大・iCeMS)
○Kazuaki Yamahara[1], Yasuhisa Kimura[2], Mikihiro Shibata[3], Takayuki Uchihashi[3,4], Toshio Ando[3,4], Noriyuki Kioka[2], Kazumitsu Ueda[2,5] ([1]Div.Appl.Life Sci., Fac.of Agri., Kyoto Univ., [2]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [3]Col.of Sci.and Engi.,Kanazawa Univ., [4]Bio.AFM., Kanazawa Univ., [5]iCeMS., Kyoto Univ.)

【背景・目的】
多剤輸送体(MDR1、ABCB1)は、ATP を用いて能動的な基質輸送を行う膜輸送体であり、様々な生体異物や基質の細胞外への排出を行う。MDR1 は有害な化合物からの生体防御に重要な役割を果たすと共に、投与薬物の体内動態にも強く影響するため、MDR1 の基質輸送機構の解明は適切な投薬等の重要な指針になると期待される。複数の結晶構造解析研究の結果から、MDR1 を含む ABC タンパク質は細胞膜上で内向き・外向きの構造変化（パワーストローク運動）を繰り返すことで基質輸送を行っているというモデルが示唆されている。本研究では原子間力顕微鏡によってこのパワーストローク運動を直接捕らえることを目的とした。先行研究においてヒト MDR1 の熱安定性が低く、物理化学的解析には適していないことが確認されていたため、本研究ではヒト MDR1 のほかに、温泉に生息する好熱性紅藻(シゾン：*Cyanidioschyzon merolae*)由来のホモログ遺伝子(CmABCB1)も併用して解析を行うこととした。CmABCB1 は基質特異性がヒト MDR1 と類似しており、耐熱性のみが大きく異なることから、物理化学的実験において優れたモデルタンパク質である。

【方法・結果】
野生型のヒト MDR1、CmABCB1 を原子間力顕微鏡によって観察したところ、ヒト MDR1 では明確な運動が観察できず、CmABCB1 ではパワーストローク様の構造変化と思われる動きが観察できたものの、周辺部を移動する粒子状の構造物によって解析に支障があることが明らかとなった。CmABCB1 の N 末端部分には 100 アミノ酸からなる機能未知の領域が存在する。そこで、この領域が粒子状の構造として見えていると考え、この領域を欠損させた変異体を作成した。CmABCB1 の N 末端を 90,96,102 アミノ酸欠損させた変異体を FreeStyle293-F 細胞に発現させ、フロサイトメーターを用いて輸送基質である Calcein—AM の輸送活性を評価した。その結果 90、96 残基欠損変異体では野生型と同程度の基質輸送活性が見られたが、102 残基欠損変異体では輸送活性が低下することが明らかとなった。次いで、精製タンパクの ATP 加水分解活性を測定したところ、N 末 96 残基を欠損させた変異体は輸送基質依存的な ATP 加水分解活性の促進が野生型と同等に見られることが明らかとなった。本変異体は動作解析に適した標品と期待される。

ABC transporter, Conformational change, AFM

発表番号：2G036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マダニ由来抗菌ペプチド persulcatusin のバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性
# Antimicrobial activity of tick antimicrobial peptide persulcatusin against vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

○三好 就英、磯貝 恵美子（東北大農）
○Naruhide MIYOSHI, Emiko ISOGAI (Tohoku Univ.)

【目的】マダニをはじめとする節足動物は自然免疫のみで病原体から身を守っており、抗菌ペプチドはその一端を担っている。我々はシュルツェマダニ由来抗菌ペプチド(persulcatusin;IP)が微生物選択性を有し、媒介病原体や中腸共生細菌には抗菌活性を示さない一方、黄色ブドウ球菌、特に院内感染症として問題視されているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)に対して強力な抗菌活性を持つことを明らかにしてきた。今回は MRSA に加えバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(VRSA)に対して、他のマダニ抗菌ペプチドとの抗菌作用の比較およびそのメカニズムの検討を行い、新規抗菌薬としての可能性を探ることを目的とした。
【方法】IP とその他のマダニ由来抗菌ペプチド(IR、OMBAC、HAE)は固相法でペプチド合成し HPLC で精製した。菌株として、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌(MSSA)、MRSA、バンコマイシン低度耐性黄色ブドウ球菌(VISA)、および VRSA を用いて MIC 試験を行った。抗菌メカニズムの検討としてカルセイン漏出アッセイを行った。さらに走査型電子顕微鏡（SEM)による IP 処理後の菌体膜の観察を行った。
【結果】MRSA に対する IP の MIC 値は 2 μg/ml、バンコマイシンは 1 μg/ml であった。他のマダニ抗菌ペプチドでは IR が 16 μg/ml、OMBAC が 8 μg/ml であり、HAE に関しては 32 μg/ml でも効果が見られなかった。またバンコマイシンの MIC が 32 μg/ml 以上である VRSA に対し IP の MIC 値は 2 μg/ml であった。カルセイン漏出アッセイでは膜孔形成作用がある Nisin と同様、MRSA と VRSA の両者で IP 処理によりカルセイン漏出率の増加が見られた。また SEM による菌体膜の観察によって IP 処理による細菌膜の障害が確認された。
【考察】今回用いたマダニ由来抗菌ペプチド IP は黄色ブドウ球菌に強い抗菌作用を示し、他のマダニ由来抗菌ペプチドと比較した場合も MRSA および VRSA に対する抗菌活性が最も強いことが分かった。抗菌メカニズムに関しては Nisin 同様、膜孔形成の可能性が示唆された。今回 IP が MRSA だけでなく VRSA に対しても、耐性化しにくい物理的な膜障害による抗菌作用を持つことが分かり、IP の新規抗菌薬への応用は重要であると考えられる。
なお本研究は順天堂大学医学部微生物学との共同研究で行った。

antimicrobial peptide, persulcatusin, vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*

発表責任者：三好就英（naru76344@gmail.com）

発表番号：2G037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヌクレオチド依存的な ATP 感受性カリウムチャネルチャネルの構造変化
# Nucleotide-induced structural change of ATP-sensitive potassium channel

○木村 泰久[1]、菅野 亮[2]、松尾 道憲[3]、加藤 博章[4]、光岡 薫[5]、植田 和光[1,6]（[1]京大院・農・応用生命、[2]福島医大、[3]京女大・家政、[4]京大院・薬、[5]阪大・超高圧電顕センター、[6]京大・iCeMS）
○Yasuhisa KIMURA[1], Ryo KANNO[2], Michinori Matsuo[3], Hiroaki Kato[4], Kaoru Mitsuoka[5], Kazumitsu Ueda[1,6] ([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]Fukushima Med. Univ., [3]Home Econ., Kyoto Woman's Univ., [4]Grad.Sch.of Pharm., Kyoto Univ., [5]Osaka Univ., UHVEM, [6]iCeMS., Kyoto Univ.)

＜目的＞ATP 感受性カリウムチャネル($K_{ATP}$ チャネル)は細胞膜上のカリウム選択的なチャネルであり、細胞内の ATP、ADP 濃度の変化を感知してチャネルの開閉を行う。この為、$K_{ATP}$ チャネルは細胞の代謝レベルセンサーとして重要であり、関わる反応にはインスリンの分泌や虚血時の細胞保護等の重要な生理反応が含まれる。$K_{ATP}$ チャネルは分子量が 800 kDa を超える巨大な膜タンパク質複合体で、精製が困難であることから構造生物学的知見はほとんど得られておらず、実際にチャネルがどの様な構造変化を介して ATP や ADP によって制御されているかは不明であった。我々はヒト培養細胞を用いて機能的な $K_{ATP}$ チャネル複合体を精製し、単粒子解析によって立体構造の決定を行ったことをこれまでに報告してきた。本発表ではヌクレオチド依存的な構造変化について報告する。
＜方法・結果＞$K_{ATP}$ チャネルはチャネル孔サブユニット Kir6.2 と制御サブユニット SUR1 が 4 分子ずつ結合した複合体である。本研究では効率的に複合体を形成させるため、1 つのプラスミドに両遺伝子を導入し、浮遊培養が可能なヒト培養細胞(FreeStyle 293F 細胞)に一過的に発現させ、複合体を形成させた。発現細胞を $C_{12}E_8$ で可溶化し、FLAG-Tag によって精製を行った。これにより精製純度約 90%の精製標品を得た。精製標品は ATP 結合能を有しており、8 量体構造を維持していたことから、精製標品は機能的構造を保持していることが示唆された。精製標品の負染色電子顕微鏡画像から単粒子解析法によって投影像を再構成し、チャネル複合体の全体構造を決定した。この結果、チャネルの中心部に 4 分子のチャネル孔サブユニットが存在し、それを取り囲む様に制御サブユニットである SUR1 が位置している様子が確認できた。ついで精製チャネル複合体を ATP あるいは非加水分解性の ATP アナログである AMP-PNP と混合し、同様に単粒子解析によって投影像を再構成し、ヌクレオチド非結合型の構造と比較した。その結果、ヌクレオチドの添加によりチャネル孔サブユニットが約 8 度回転し、チャネル孔が約 11Å開くことが明らかとなった。ATP は $K_{ATP}$ チャネルの活性を阻害することから、本研究で得られたヌクレオチド結合型の投影像はチャネルの閉鎖状態を反映していると考えられる。イオンの透過においてチャネル孔の直径は厳密に制御されている必要があることから、ヌクレオチドは $K_{ATP}$ チャネルに結合してチャネル孔の直径を大きくすることで、チャネル孔のイオン透過を制限している可能性が示唆された。

ATP-sensitive potassium channel, single particle analysis, conformational change

発表責任者：木村　泰久（ykimura@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2G038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト ABCG4 に存在するコレステロール認識配列の機能解析

# Functional analysis of the cholesterol recognition sequence in the transmembrane helix of human ABCG4

○見月 俊吾[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、松尾 道憲[2]、植田 和光[1,3]([1]京大院・農・応用生命、[2]京女・家政・食物栄養、[3]京大・iCeMS)
○Shungo Mitsuki[1], Yasuhisa Kimura[1], Noriyuki Kioka[1], Michinori Matsuo[2], Kazumitsu Ueda[1,3]([1]Div.Appl.Life Sci., Grad.Sch.of Agri., Kyoto Univ., [2]Kyoto Women's University., [3]iCeMS., Kyoto Univ.)

＜背景・目的＞ABCG4 は ABC タンパク質ファミリーに属する膜タンパク質で、ATP 加水分解エネルギーを用いてコレステロールを輸送する。ABCG4 は 1 分子内に膜貫通ドメインと ATP 結合・加水分解ドメインを一つずつ持ち、ダイマーを形成して機能する。ABCG4 の生理的機能はほとんど明らかにされていないが、ABCG4 は巨核球前駆細胞で血小板の産生を制御していることや、脳のアストロサイトや中枢神経系の神経細胞に多く発現して、アルツハイマー病などの神経変性疾患と関連することが報告されている。近年、コレステロール認識配列として CRAC 配列(L/V-$X_{1-5}$-Y-$X_{1-5}$-K/R)が同定された。配列解析の結果、ABCG4 の第 6 膜貫通ヘリックス(TM6)にも CRAC 配列が存在することが明らかとなった。本研究では、ABCG4 の TM6 に存在する CRAC 配列に着目して解析を行い、コレステロール認識に CRAC 配列が関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。
＜方法・結果＞CRAC 配列の中ではチロシンとアルギニンがコレステロール認識に重要であるため、チロシンをアラニンに、アルギニンをセリンにそれぞれ置換したヒト ABCG4 の変異体を作製した。これらの変異体を HEK293 細胞に過剰発現させ、排出されるコレステロール量を測定したところ、変異体のコレステロール排出活性は野生型に比べて有意に低下することが明らかとなった。続いて基質認識に与える影響を詳細に解析するため、ABCG4 を精製し活性評価を行った。発現系は浮遊培養が可能な HEK293 細胞の派生株(FreeStyle293 細胞)を用い、可溶化には界面活性剤(Digitonin)、精製には FLAG タグを用いた。ABC タンパク質の ATP 加水分解活性は輸送基質によって促進されることが多い。そこで精製 ABCG4 を様々な脂質組成からなるリポソームに再構成して活性を検討した。その結果、DOPS からなるリポソームにコレステロールを添加すると、コレステロールの含量依存的に野生型 ABCG4 の ATP 加水分解活性が上昇することが明らかとなった。このとき変異体の ATP 加水分解活性はコレステロールによって誘導されなかった。これらの結果から、ABCG4 の TM6 に存在する CRAC 配列が ABCG4 のコレステロール輸送において重要であることが明らかとなった。また、コレステロールをほとんど含まないブタ脳由来の極性脂質から成るリポソームに再構成した場合には、野生型が高い活性を示すのに対し、CRAC 配列の変異体の活性は低いことが明らかとなった。このことから、脳由来の極性脂質中に ABCG4 の輸送基質が存在し、その認識にも CRAC 配列が関与していることが示唆された。

ABC transporter, ABCG4, cholesterol

発表責任者：植田和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2G039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ドリコールサイクルにおけるヒト RFT1 蛋白質の物理的相互作用に関する解析

# Analyses on physical interactions of human RFT1 protein in dolichol cycle

○高橋 哲夫、田中 智恵美（東海大工生命化学）
○Tetsuo Takahashi, Chiemi Tanaka (Tokai Univ.)

【目的】

真核細胞の粗面小胞体(rER)膜において *N*-グリカンの前駆体としてオリゴ糖がドリコールピロリン酸(Dol-PP)に結合した構造を有するドリコール(Dol)中間体(dolichol-linked oligosaccharide; DLO)が生合成される過程は、Dol サイクルと呼ばれている。この Dol サイクルでの DLO 組立てには、11 種類の糖転移酵素が直接関わっているが、他にも必要とされる酵素や蛋白質が同定されている。その中で rER 膜に局在する RFT1 蛋白質は、rER 膜の細胞質側で生合成された半分長の DLO である $Man_5GlcNAc_2$-PP-Dol の内腔側へのフリッピングに関与するものとして出芽酵母で最初に同定されたものの、その正確な機能については不明のままである。そこで本研究では、酵母 split-ubiquitin システムを用いてヒト RFT1 蛋白質(hRFT1)の物理的相互作用の解析を行い、この蛋白質のドリコールサイクルにおける役割について考証を加えることにした。

【方法、結果及び考察】

N 末端または C-末端に Cub/転写因子を付加した hRFT1 を発現するためのベイトコンストラクト(pBT-N-hRFT1 または pBT3-C-hRFT1)と、N 末端または C-末端に NubG を付加した蛋白質 x(x は任意の蛋白質)を発現するプレイコンストラクト(pPR-N-x または pPR-C-x)を作製した。これらを組み合わせて酵母 NMY51 株を形質転換し、得られたベイト/プレイ共発現株についてレポーター検出培地上での増殖性を試験することで、相互作用の有無を検討した。その結果、hRFT1 は、DLO 組立ての前期に働く各糖転移酵素とは物理的に相互作用しないことが判明した。次に DLO 組立ての後期に働く各糖転移酵素との相互作用を解析した結果、hAlg9 及び hAlg10 との相互作用が検出された。さらに他の Dol サイクル関連酵素の中では、ヒトドリコールリン酸マンノース合成酵素(hDPMS)の膜貫通サブユニットである hDPM3、ヒトドリコールリン酸グルコース合成酵素 hDPGS、ヒトドリコールピロリン酸ホスファターゼ hDPP などとの相互作用が検出された。現在、これらの相互作用の確認を行うとともに、hRFT1 の欠失ベイトや相互作用する酵素の欠失プレイを用いた同様な試験を行い、各相互作用に必要な領域の限定を試みている。

RFT1, dolichol cycle, physical interaction

発表責任者：高橋哲夫（tetsuo@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp）

発表番号：2G040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウスキトトリオシダーゼの大腸菌のペリプラズムでの発現

# Expression of mouse chitotriosidase in periplasmic space of Escherichia coli

○木村 将大、脇田 悟誌、石川 晃太朗、関根 一孝、吉川 聡、佐藤 章、樫村 昭徳、坂口 政吉、菅原 康里、小山 文隆（工学院大学）
○Masahiro KIMURA, Satoshi WAKITA, Kotarou ISHIKAWA, Kazutaka SEKINE, Satoshi YOSHIKAWA, Akira SATO, Akinori KASHIMURA, Masayoshi SAKAGUCHI, Yasusato SUGAHARA, Fumitaka OYAMA (Kogakuin Univ.)

キチンは *N*-アセチル-D-グルコサミンの重合体で, 甲殻類や昆虫の外骨格, 寄生虫のミクロフィラリアや真菌の細胞壁の主要な構成要素である。キチンはセルロースに次いで自然界に二番目に豊富に存在する多糖である。キチナーゼはキチンを加水分解する。ほ乳類は自身でキチンを合成していないにもかかわらず，キトトリオシダーゼ(chitotriosidase, Chit1) と酸性ほ乳類キチナーゼ (acidic mammalian chitinase, AMCase) の二種類のキチナーゼを発現している。両酵素は GH18 ファミリー (Glycoside hydrolase family 18) に属している。Chit1 は，ほ乳類で初めて精製され，クローン化されたキチナーゼである。Chit1 は分子質量約 50 kDa の分泌タンパク質であり， N 末端に触媒ドメイン，ヒンジ領域，C 末端にキチン結合領域を有している。また、この酵素は、ゴーシェ病、慢性閉塞性肺疾患(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD) ，アルツハイマー病と密接に関係している。近年、我々はマウス AMCase を大腸菌のペリプラズムに Protein A-mouse AMCase V5-His の融合タンパク質としての発現に成功した。Chit1 の生物医学的役割を解明するため, 我々はマウス Chit1 cDNA を pEZZ18 ベクターに挿入し，大腸菌 BL21 を用いて Chit1 を Protein A との融合タンパク質として大腸菌で発現させた。融合タンパク質 Protein A-マウス Chit1-V5-His は大腸菌のペリプラズムに可溶性タンパク質として発現した。合成基質を使用した場合，大腸菌で発現した Protein A-mouse Chit1-V5-His のキチナーセ活性は，CHO 細胞で発現した mouse Chit1-V5-His に匹敵し、至適 pH は 5.0, その条件下での至適温度が 50 °C であった。また, Chit1 は pH 4.0~8.0 でコロイダルキチンおよび六量体 [$(GlcNAc)_6$] を分解し,主として二量体 [$(GlcNAc)_2$] を遊離した。

Mammalian Chitinases, Chitinolytic activity, Expression

発表責任者：木村　将大（bm15016@ns.kogakuin.ac.jp）

発表番号：2G041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウス IgE 抗体への結合活性が上昇したヒト Fc ε RI α サブユニット改変体の作製

# Generation of human FcεRIα subunit mutant exhibiting higher binding affinity against mouse IgE antibody

○山本 真也[2]、中野 信浩[1]、八代 拓也[2]、笠倉 和巳[2]、奥村 康[1]、西山 真[3]、西山 千春[2]([1]順天堂大院・医、[2]東京理科大・基礎工生物工、[3]東大・生物生産工)
○Masanari YAMAMOTO[2], Nobuhiro NAKANO[1], Takuya YASHIRO[2], Kazumi KASAKURA[2], Ko OKUMURA[1], Makoto NISHIYAMA[3], Chiharu NISHIYAMA[2] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Science, [3]The Univ. of Tokyo)

【背景】高親和性 IgE 受容体(FcεRI)は IgE 抗体を介した即時型アレルギー反応において重要な役割を果たしており、主な発現細胞にマスト細胞と好塩基球が知られていたが、最近、ヒト末梢血中の樹状細胞(DC; dendritic cell)にも顕著な発現が見出された。DC は生体内へ侵入した抗原を取り込み T 細胞へ提示する役割を担っており、DC における FcεRI の生理的な役割は判明していない。通常、FcεRI はα鎖、β鎖、γ鎖の 3 種類のサブユニットがαβ$\gamma_2$の四量体を形成して細胞表面に発現する。ヒト FcεRI の場合はα$\gamma_2$三量体としても受容体を形成できるためβ鎖を持たない DC 表面に発現できるが、マウス FcεRI はβ鎖がなしでは表面発現できず、マウス DC に発現は見られない。従って、DC における FcεRI の機能はヒト末梢血由来細胞の試験管内反応での解析や、ヒトα鎖遺伝子を導入したマウス個体において IgE 抗体と FcεRI の親和性の点から制限された実験系となっている。これらを改善するためマウス IgE 抗体との親和性が高くマウス DC に発現可能な三量体 FcεRI の開発が有効であると考えられる。
【目的】マウス IgE が結合可能な FcεRI 発現 DC を持つトランスジェニックマウスを作製し、生体内での免疫応答を解析することを目指す。本研究では、ヒト FcεRIα鎖の IgE 結合部位のアミノ酸配列に変異を加え、マウス IgE 結合能を高めたα鎖を作製することを試みた。
【方法】ヒトとマウスのα鎖のアミノ酸配列を比較し、ヒトα鎖の立体構造情報から IgE 結合に影響すると考えられた 4 か所のアミノ酸に変異を加え、ヒトα鎖変異体を作製した。ヒトα鎖やその変異体、マウスα鎖の cDNA をヒトγ鎖 cDNA と共に 293T 細胞に導入して FcεRI を強制発現させた。これらの細胞についてフローサイトメトリー法を用いて、FcεRI 発現量やマウス IgE 結合能を評価した。
【結果】3 種類のヒトα鎖変異体 S110Q、W154S、W181R/L183V 発現ベクターを作製し、293T 細胞に導入した。いずれの変異体も野生型とほぼ同程度の FcεRI を細胞表面に発現していることが確認され、マウス IgE 結合能については、いずれの変異体も野生型より高いことが判明した。次に複数の変異を導入し、S110Q/W154S、W154S/W181R/L183V、S110Q/W181R/L183V、と 4 アミノ酸とも変異を導入した変異体を作製した結果、4 か所すべてに変異を導入した変異体が最も高い IgE 結合能を有していた。
【結論】注目した 4 アミノ酸のうち 1 か所でも変異を導入すれば、マウス IgE との親和性が高くなり、4 カ所への変異導入によりマウス IgE 結合能が最も高くα$\gamma_2$として細胞表面に発現し得るヒトα鎖変異体が作製できた。

FcεRI, IgE, Point mutation

発表責任者：西山千春（chinishi@rs.tus.ac.jp）

発表番号：2G042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 樹状細胞の活性化反応における核内受容体型転写因子 NR4a3 の機能解析

Role of NR4a3 in activated dendritic cells

○八代 拓也、長岡 雅典、笠倉 和巳、西山 千春（東京理科大・基礎工）
○Takuya YASHIRO, Masanori NAGAOKA, Kazumi KASAKURA, Chiharu NISHIYAMA (Tokyo Univ. of Sci.)

樹状細胞（DC: Dendritic Cells)は、TLR (Toll-like receptor )などのパターン認識受容体を介して外来抗原を認識すると活性化し、抗原提示分子である MHC class II や補助刺激分子である CD80 と CD86 を高発現するようになる。加えて、炎症性サイトカインである IL-6 や IL-12 を大量に産生することでエフェクターT 細胞の分化を促し、抗原特異的な免疫応答を惹起する。我々は、これらの樹状細胞機能に重要な分子群の発現に転写因子 PU.1 が関与していることを明らかにしてきたが、今回、新たな PU.1 標的遺伝子として NR4a3 を見出した。NR4a3 は核内受容体型転写因子 NR4a family に属し、T 細胞やマクロファージでの機能が報告されているが、DC での機能は未知である。そこで本研究では、DC における NR4a3 の機能解析を行った。

マウスの骨髄細胞を、GM-CSF (Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)存在下で培養することで BMDC (Bone marrow-derived DC)を分化誘導し、その過程における NR4a3 の発現量の変化を解析した。その結果、分化誘導後期に DC マーカーである CD11c や MHC class II とともに NR4a3 の発現が著しく増加してくることが明らかとなり、NR4a3 が DC において重要な役割を担っていることが示唆された。BMDC において特異的 siRNA を用いて NR4a3 をノックダウンした後、TLR4 リガンドである LPS (Lipopolysaccharide)で刺激して、活性化 DC における遺伝子発現変化を qPCR とフローサイトメトリー、ELISA にて解析した。その結果、NR4a3 ノックダウンにより、LPS 刺激による CD80 や CD86、IL-6、IL-12b の発現亢進が抑制されることが明らかとなった。これらの発現上昇の抑制は、TLR3 や TLR9 のリガンドを使用して同様の実験を行った際にも確認されたことから、NR4a3 が DC の活性化シグナルに関わる共通分子の発現や機能を制御していることが示唆された。一方、蛍光標識された Dextran の取り込み能を解析したところ、NR4a3 をノックダウンしても取り込み量に変化は見られなかったことから、NR4a3 は DC の抗原認識や取り込みには関与しないことが示された。

以上の結果から、NR4a3 は、DC 活性化時の補助刺激分子や炎症性サイトカインの発現誘導に関与していることが明らかとなり、DC による T 細胞活性化に影響していることが示唆された。

NR4a3, dendritic cells

発表番号：2G043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 肝特異的転写因子とリポタンパク質産生能の関係

# The effect of hepatocyte nuclear factors on lipoprotein production.

○佐々木 玲[1,3]、木村 文子[2]、三浦 瑞穂[2]、高橋 純一郎[2]、小林 正之[3]、畠 恵司[1] ([1]秋田県総食研、[2]（株）スカイライト・バイオテック、[3]秋田県大院生資)
○Akira SASAKI[1,3], Fumiko KIMURA[2], Mizuho MIURA[2], Junichiro TAKAHASHI[2], Masayuki KOBAYASHI[3], Keishi HATA[1] ([1]Akita Res. Inst. Food & Brew., [2]Skylight Biotech Inc., [3]Akita Pref. Univ.)

【目的】リポタンパク質は、リン脂質、コレステロールおよびそのエステル、中性脂肪ならびにアポリポタンパク質からなる球状粒子である。肝臓は、各組織への脂質（主に中性脂肪とコレステロール）の供給ならびに余分な脂質の回収を担うために VLDL(Very Low Density Lipoprotein)、LDL(Low Density Lipoprotein)、HDL(High Density Lipoprotein)の主要 3 種のリポタンパク質を合成する。我々は昨年度、肝細胞の分化ステージとリポタンパク質産生に高い相関があることを報告し、リポタンパク質が肝細胞の新たな分化マーカーとして使用できる可能性を示した。幹細胞から成熟肝細胞への分化誘導法は数多く報告されているが、リポタンパク質を指標に評価した例はない。そこで、本研究ではリポタンパク質産生能を指標に、幹細胞へ肝特異的転写因子を導入して得られた肝細胞様細胞を評価し、肝特異的因子とリポタンパク質産生能の関係を検討した。
【方法】ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 UE7T-13 細胞に肝特異的転写因子 FOXA2、HNF4a および HNF1a を導入し、それぞれ安定的に発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞株について、細胞内に蓄積および細胞外に分泌した中性脂肪およびコレステロールを定量した。また、これら細胞株の脂質代謝関連遺伝子群の発現量を Real-time RT-PCR で定量した。
【結果】FOXA2、HNF4a および HNF1a いずれの安定株発現株においても細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌は認められなかったが、HNF1a 安定発現株では細胞内への中性脂肪およびコレステロールの蓄積傾向が認められた。遺伝子発現量解析の結果、HNF4a の発現により VLDL/LDL の主要アポリポタンパク質である APOB の発現量が増加傾向であること、HNF1a の発現により VLDL の会合・分泌に関与するミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 MTP の発現量が増加傾向であることがそれぞれ判明した。しかしながら、APOB および MTP の発現量が十分でなかったため、HNF4a および HNF1a の各安定発現株で細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌が認められなかったと推測した。

現在、HNF4a および HNF1a を安定的に共発現する細胞株を樹立し、細胞外への中性脂肪およびコレステロールの分泌を検討するとともに、リポタンパク質合成に関与する脂質代謝関連遺伝子の発現量解析を進めている。

lipoprotein, hepatocyte nuclear factor

発表番号：2G044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

Stabilon 融合タンパク質を用いた iPS 細胞分化誘導
Differentiation of iPS cells by Stabilon-fused protein

○峰岸 紋子[1,2]、相原 絵理[1]、細野 崇[1,2]、舛廣 善和[2]、花澤 重正[2]、関 泰一郎[1,2]（[1]日本大・生資科・生命化、[2]日本大院・生資料・応生科）
○ Ayako Minegishi[1,2], Eri Aihara[1], Takashi Hosono[1,2], Yoshikazu Masuhiro[2], Shigemasa Hanazawa[2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ, [2]Nihon Univ. Grad. School)

[目的]
2009 年に iPS 細胞が樹立されて以来、世界中で iPS 細胞に関する研究が行われている。2014 年には加齢黄斑変性症の患者に対して iPS 細胞由来の細胞を用いた治療が行われた。しかし iPS 細胞の維持や特定の機能を有する細胞への分化誘導のためのコストは高く、iPS 細胞を用いた再生医療を普及させる上での障壁となっている。したがって、造腫瘍性の克服などの安全性の確保に加えて、簡便、高効率、そして低コストで iPS 細胞を分化誘導する方法の確立が急務である。本研究では操作が簡便なタンパク質添加による iPS 細胞の分化誘導法に着目し、タンパク質の安定化モチーフ Stabilon と、細胞膜透過性モチーフを付与したタンパク質を作製し、これらのタンパク質を用いて iPS 細胞の分化誘導を試みた。
[方法]
タンパク質発現系には pET system を用い、内胚葉分化にかかわる転写因子 Sox17 と、肝細胞分化にかかわる転写因子 Hnf3β の N 末端側に Stabilon, C 末端側に細胞透過性モチーフを付与したコンストラクトを作製した。これを大腸菌(BL21[DE3])に導入して LB 培地にて培養後、終濃度 0.1 mM となるよう IPTG を添加し、目的タンパク質を発現させた。発現タンパク質はグアニジン塩酸を用いて変性させ、Ni レジンを用いて精製した。精製後、0.5 M arginine buffer と PBS に対して精製タンパク質を透析し、リフォールディングを行った。12 well plate に $6.0\times10^4$ cells/well となるようにマウス由来 iPS 細胞を播種し、24 時間無血清培養後、1 日おきに Sox17-MTM, Stabilon-Sox17-MTM をそれぞれ 10 μg/ml となるよう添加し、3 日間培養した。その後、細胞を回収し RT-PCR により各種マーカー遺伝子の発現を確認した。
[結果]
iPS 細胞に精製 Sox17 タンパク質を 10 μg/ml の濃度で添加培養したところ、iPS 細胞よりも小さな球形の細胞が出現した。RT-PCR によりこれらの細胞の遺伝子発現を解析したところ、造血幹細胞マーカーである C-kit, CD34 の発現が見られた。
[結論]
iPS 細胞への Sox17 タンパク質の添加は、iPS 細胞を造血幹細胞へ分化誘導することが明らかになった。

iPS cells, Stabilon, Sox17

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：2G045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

ヒト cyclinD1、CDK4、TERT の導入によるウシ腸管細胞株の樹立
Immortalization of Fetal Bovine Colon Epithelial Cells by Expression of Human Cyclin D1, Mutant CDK4, and TERT

○黒田 健吾[1]、清野 透[2]、磯貝 恵美子[1]、増田 みずき[1]、成田 萌[1]、奥野 克哉[1]、小柳 友佳子[1]、福田 智一[1] ([1]東北大学大学院農学研究科、[2]国立がん研究センター 発がん機構研究グループ)
○Kengo KURODA[1], Tohru KIYONO[2], Emiko ISOGAI[1], Mizuki MASUDA[1], Moe NARITA[1], Katsuya OKUNO[1], Yukako KOYANAGI[1], Tomokazu FUKUDA[1] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Division of Carcinogenesis and Cancer Prevention, National Cancer Center Research Institute)

【目的】
牛は経済的に重要な家畜であり、生産されるミルクや肉などの産物は我々の生活に欠かせないものである。これらの生産効率は感染症によって著しく低下し、腸管病原性を有する細菌による致死的感染を被ることもあることから、病態解明は感染症のコントロールのために非常に重要である。我々は牛腸管上皮と病原細菌との相互作用を in vitro での細胞培養のシステムで評価することは有効な手段であると考え、細胞周期調整因子である cyclin D1, mutant cyclin dependent kinase 4 (CDK4)、および telomerase reverse transcriptase (TERT)の 3 因子を牛初代培養腸管上皮細胞に導入することで細胞の不死化を試み、サルモネラの感染実験を行った。
【方法】
細胞としては黒毛和種５か月齢の胎児腸管上皮の初代培養を行った。この細胞に cyclin D1、CDK4 および TERT を導入し、細胞を不死化した。*Salmonella* Typhimurium および Enteritidis を感染後、細胞付着率と侵入率を継時的に観察した。
【結果および考察】
樹立した細胞株は初代培養細胞の増殖が止まった後も安定した増殖を繰り返し、上皮細胞のマーカーの発現が確認できた。さらに導入した cyclin D1, CDK4 および TERT の発現を確認した。これまで、SV40T や E6/E7 といった発がん性タンパクによって細胞の不死化が多く試みられてきたが、このような方法はゲノム不安定性を引き起こすだけでなく、初代細胞が持っていた本来の性質を変え、染色体の異常を起こすことが知られている。本研究で得られた不死化細胞は正常な染色体像を示すことから初代培養細胞の性質を残す株が樹立できたと考えた。樹立した細胞株の Toll 様受容体(TLR)の発現を定量 RT-PCR にて確認したところ、TLR1、TLR2、および TLR3 の発現を認めた。さらに、樹立した細胞を細菌の感染モデルとして用いるために、サルモネラの感染実験を行ったところ、*Salmonella* Typhimurium が *Salmonella* Enteritis に比べ、高い細胞付着率と侵入率を示した。血清型 Typhimurium は牛での感染、血清型 Enteritis はトリでの保菌が問題となることが多いことから、付着と侵入率の違いはそれぞれの血清型の宿主細胞への親和性の違いによる可能性が示唆された。
我々が今回樹立した牛腸管上皮細胞株は細菌感染やウイルス感染の分子メカニズムを明らかにする上で有効なツールになりうる。今後、様々の微生物感染モデルとして利用したい。

Cattle, Colon epithelial cells, immortalization

発表番号：2G046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウス腸管上皮細胞株からの腸管オルガノイド誘導の試み

# Attempt to generate intestinal organoids from a mouse intestinal epithelial cell line

○長尾 淳史[1]、青木 綾子[2]、清水 誠[3]、岩槻 健[4]、戸塚 護[2]([1]東大農・生命化学工学、[2]東大院・農生科・応生化、[3]東京農大応生・栄養、[4]東京農大)
○Atsushi NAGAO[1], Ayako AOKI[2], Makoto SHIMIZU[3], Ken IWATSUKI[4], Mamoru TOTSUKA[2] ([1]Facul. Agric.,The Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric., [4]Tokyo Univ. Agric.)

【背景・目的】近年、腸管の陰窩から腸管オルガノイドという腸管上皮の組織体を培養する技術が開発された。腸管オルガノイドは吸収上皮細胞、杯細胞、腸管内分泌細胞など複数の分化細胞を組織体に有しているため、Caco-2 などの一様な腸管上皮細胞株に比べ、腸管の機能を総合的に評価する上で優れていると考えられる。腸管上皮細胞の幹細胞マーカーとしては Lgr5 が知られており、Lgr5 陽性細胞は単細胞から腸管オルガノイドを誘導できる。また、Lgr5 陽性細胞が傷害されたときには、Bmi1 陽性細胞が幹細胞として働くことが報告されている。一方、我々の研究室では、これまでに BALB/c マウスの小腸および大腸の上皮細胞を不死化させることで腸管上皮細胞株を樹立してきた。これら樹立した腸管上皮細胞株から腸管オルガノイドを誘導できれば、遺伝子改変も容易に行えるなど、食品成分の評価において有用なツールとして活用できることが期待される。そこで本研究では、当研究室で樹立した腸管上皮細胞株を用いて腸管オルガノイドを誘導できる可能性について検討した。

【方法】当研究室で樹立したマウス小腸上皮細胞株 MoS13 および aMoS7, マウス大腸上皮細胞株 MoC5 および aMoC1 から RNA を抽出し、cDNA を合成した。Real-time PCR により、Lgr5、Bmi1 の発現を解析した。次に、4 種類の腸管上皮細胞株を腸管オルガノイド誘導用培地（腸管上皮細胞の増殖因子である EGF、幹細胞の分化抑制に働く BMP の阻害タンパク質である Noggin、幹細胞の自己複製において重要な増殖因子である Wnt シグナルを活性化する R-spondin1 を含んだ培地）を用い、マトリゲル中で、37℃、8 日間培養した。8 日目に細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、Lgr5、Bmi1 の発現量をリアルタイム PCR により解析した。

【結果・考察】使用したいずれの株も DMEM 培地での培養条件下では Lgr5 の発現は低かったが、Bmi1 の発現はすべての細胞で認められた。腸管オルガノイド誘導用の培地で培養したところ、培養 3 日目に aMoC1 の形態に変化が見られ、スフェロイド状の組織構造をとった。培養 8 日目に aMoC1 組織体を回収し、遺伝子発現解析をしたところ、DMEM 培地で培養した aMoC1 に比べて Lgr5 を高発現していることが確認された。他の細胞株では形態変化および Lgr5 発現増加は認められなかった。以上のことから、aMoC1 から腸管オルガノイドが誘導できる可能性が示唆された。今後、杯細胞や内分泌細胞などの分化細胞が誘導されているか確認する予定である。

organoid, Lgr5, intestinal epithelial cell

発表責任者：青木綾子（aokiaya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2G047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ROCK 阻害剤は PI3K を介して ES 細胞から神経細胞への分化を促進する

# ROCK inhibitor promotes neuronal differentiation of ES cells via phosphatidylinositol 3-kinase

○上芝原 佑[1]、川口 英夫[1]、清水 範夫[2] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大バイオ・ナノエレクトロニクス研究センター)
○Yu KAMISHIBAHARA[1], Hideo KAWAGUCHI[1], Norio SHIMIZU[2] ([1]Toyo Univ., [2]Bio-Nano Electronics Research Center)

[目的]

胚性幹（embryonic stem：ES）細胞は、自己複製能及び様々な細胞に分化する多分化能を保持していることから、創薬のための細胞源や移植を目的とした再生医療分野への応用が期待されている。しかし、ES 細胞の分化メカニズムには不明な点が多く、様々な研究機関で特定の細胞に分化する物質の探索が行われている。我々は、血管平滑筋弛緩薬として合成された ROCK 阻害剤が ES 細胞から神経細胞への分化を促進させることを見出した。そこで、ROCK 阻害剤の添加が神経細胞の生存、増殖や分化に関わることが知られている ERK シグナル伝達経路、PI3K シグナル伝達経路、PLC シグナル伝達経路にどのような影響を与えるかを検討し、ROCK 阻害剤による神経細胞への分化促進メカニズムを解明することを本研究の目的とした。

[方法]

ROCK 阻害剤の ES 細胞から神経細胞への分化における ERK のリン酸化に対する影響を、ウェスタンブロッティング法により測定した。さらに、ROCK 阻害剤及び各経路の阻害剤を添加して 12 日間分化培養をした後、βIII-tubulin（神経細胞マーカー）の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、神経細胞への分化割合を検討した。

[結果]

ROCK 阻害剤による ERK の活性化について検討した結果、無添加の場合に比較して、リン酸化 ERK 量が高くなった。Ras 阻害剤（lovastatin）、Raf 阻害剤（GW-5074）、MEK 阻害剤（U0126）を添加して分化培養をした場合、ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進は見られなかった。さらに、PI3K 阻害剤（LY294002）と PKC 阻害剤（bisindolylmaleimide I）及び Cdc42/Rac dual 阻害剤（AZA1）を添加した場合においても ROCK 阻害剤による ES 細胞から神経細胞への分化促進は見られなかった。一方、TrkA 阻害剤（k252a）及び PLC 阻害剤（U-73122）を添加して分化培養をした場合、ROCK 阻害剤による分化促進が見られた。

以上の結果から、ROCK 阻害剤は、Ras/Raf/MEK、PI3K 及び PKC と Cdc42/Rac を介して ERK を活性化させることで ES 細胞から神経細胞への分化を促進させていると考えられる。

ROCK inhibitor, ES cell, PI3K

発表番号：2G048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# プロトン透過性膜タンパク質を利用した細胞外 pH 低下検出系の開発

# Development of genetically encoded sensor to detect extracellular acidification using proton channels

○三島 誠、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○Makoto MISHIMA, Takumi MISAKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

【目的】真核生物の細胞にとって、pH は非常に大切な環境要因の一つであり、細胞内外の pH 変化は細胞に対して様々な影響を及ぼすことが知られている。一般に生体内の細胞外 pH は 7 付近に保たれていることが多いが、口腔内や消化管などの上皮細胞では、摂食物や消化液などにより細胞外の pH が大きく変化することがある。味覚受容体をはじめとしたタンパク質の機能を研究する手法の一つとして蛍光イメージングが挙げられるが、この際培養細胞周辺の局所 pH 変化をモニターすることが出来れば、周辺 pH とタンパク質の詳細な機能解析が可能となる。しかしながら培養細胞の直径は数十μm 程度であり、従来用いられているガラス電極や素子では大きくて正確に測定できないという問題がある。そこで本研究では培養細胞そのものを用いることに着目し、検討を行ってきた。

我々は、昨年度の本大会において pH 感受性蛍光タンパク質である EGFP を細胞質に安定発現させ、膜透過性の酢酸を与えた際の蛍光強度変化から細胞外の pH 低下が検出できることを報告した。しかしながら、プロトンは細胞膜を直接透過することが出来ないため塩酸を用いた細胞外 pH 低下は検出出来なかった。そこで本発表では、培養細胞にプロトン透過性膜タンパク質および EGFP を共発現させた細胞を用いることで、塩酸刺激によりプロトンが流入し細胞内の EGFP 蛍光強度変化から細胞外の pH 低下の検出が可能になると考え、検証を行った。

【方法と結果】プロトンチャネルおよび EGFP を一過的に共発現させた HEK293T 細胞を作製し、細胞外 pH を塩酸により低下させた際の経時的な蛍光強度変化をプレートリーダーあるいは蛍光顕微鏡下で測定した。前回までの方法では蛍光強度変化の見られなかった塩酸を用いた場合でも、細胞外 pH 依存的な EGFP 蛍光強度の減少が観測された。この結果からプロトンチャネルを利用すればより幅広い種類の酸による pH 低下の検出が可能となることが示唆された。今後はより精度の高い測定系を開発すべく、細胞ごとのプロトンチャネルおよび EGFP 発現量を均一化するため Flp-In System を用いて安定発現細胞株の構築を行っていく予定である。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

Fluorescent imaging, EGFP, pH

発表番号：2G049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウス生体位およびオルガノイドにおける回腸および結腸の機能性遺伝子発現の比較

# Comparison of functional gene expression between murine ileum and colon *in vitro* and *in vivo*

○斉藤 伸一[1]、尾崎 洋輔[2]、濱田 晃弘[2]、園山 慶[1]([1]北大・院・農、[2]北大・院・生命)
○Shinichi SAITO[1], Yosuke OSAKI[2], Akihiro HAMADA[2], Kei SONOYAMA[1] ([1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Life Science, Hokkaido Univ.)

【背景・目的】腸管上皮は、栄養素および水分の吸収ならびに微生物の侵入に対する障壁の役割を担っている。これらの機能は主にパネト細胞、腸内分泌細胞、吸収上皮細胞、杯細胞といった分化細胞によって担われており、これら全ての分化細胞は陰窩底部に存在する腸管上皮幹細胞から生み出されている。「腸管オルガノイド」は、生体の小腸または結腸から単離した陰窩を特定の条件下で培養することにより、分化した腸粘膜上皮細胞を含む上皮組織を再構成させたものである。しかしながら、腸管オルガノイドにおいて、それぞれの分化細胞に特異的な機能性遺伝子の発現に関する情報は限られている。そこで本研究では、マウスの小腸および結腸のオルガノイドを作製し、それぞれの分化細胞に特徴的ないくつかの遺伝子の発現を解析した。
【方法・結果】マウスの回腸および結腸の粘膜、ならびに先行研究（Sato *et al.* Nature 2009, Sato *et al.* Gastroenterology 2011, Miyoshi *et al.* Nature Protocols 2012）を参考にして作製した回腸および結腸のオルガノイドから分離した総 RNA を鋳型とした RT-qPCR により、分化細胞における機能性遺伝子の発現レベルを比較した。パネト細胞の機能性遺伝子 Defa1 および吸収上皮細胞の機能性遺伝子 Fabp2 の発現レベルは、粘膜およびオルガノイドともに回腸に比して結腸で低値を示した。逆に、腸内分泌細胞の機能性遺伝子 Pyy ならびに杯細胞の機能性遺伝子 Atp12a および分化因子 Klf4 の発現レベルは、粘膜およびオルガノイドともに回腸に比して結腸で高値を示した。しかしながら、腸内分泌細胞の機能性遺伝子 Gip の発現は、粘膜においては回腸に比して結腸で高く、オルガノイドにおいてはその逆であり、杯細胞の機能性遺伝子 mAChR4 の発現は、粘膜においては回腸に比して結腸で低く、オルガノイドにおいてはその逆であった。
【考察】先行研究にしたがってマウスの回腸および結腸の粘膜から作成したオルガノイドは、分化した細胞を含むと考えられるが、それぞれの分化細胞に特異的な機能性遺伝子の発現レベルは、回腸と結腸との比較においては必ずしも生体位を反映しない。これには、オルガノイドにおいて間質系細胞や腸内細菌叢からのシグナルが欠如していることが関与する可能性がある。すなわち、オルガノイドの発現レベルが粘膜のそれを反映した Defa1、Fabp2、Pyy、Atp12a および Klf4 は、内因性の遺伝子発現調節プログラムに支配され、一方、反映しなかった Gip および mAchR4 は、間質系細胞や腸内細菌叢からのシグナルの影響を強く受けるものと推察した。

ex vivo culture technology, intestinal organoid, gene expression analysis

発表番号：2G050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# CHO 細胞において均一な発現レベルを示すプロモーターの検討

# Promoter insensitive to position effects in CHO cells

○西島 謙一[1]、森 孔明[1]、金岡 英徳[1]、上平 正道[2]、大政 健史[3]、飯島 信司[1] ([1]名大院工、[2]九大院工、[3]阪大院工)
○Ken-ichi Nishijima[1], Komei Mori[1], Hidenori Kaneoka[1], Masamichi Kamihira[2], Takeshi Omasa[3], Shinji Iijima[1] ([1]Nagoya Univ, [2]Kyushu Univ, [3]Osaka Univ)

［目的］ チャイニーズハムスター由来の CHO 細胞は様々な変異体が細胞生物学の基礎研究に用いられる一方、抗体をはじめとするタンパク質性医薬品の主要な生産細胞として広く用いられている。外来遺伝子導入細胞が用いられるが、望む発現量を示す細胞株を多くのクローンから選択するのが常法である。本研究では、発現量のばらつきに着目して CHO 細胞での遺伝子発現に適したプロモーターの選択を試みた。
［方法］ レポーターとして eGFP を発現するレンチウイルスベクターを低 MOI (multiplicity of infection) で感染させることにより、染色体中に 1 コピーの導入遺伝子を持つ CHO 細胞を作製した。得られた細胞をフローサイトメータにて測定し、eGFP 発現強度を定量した。
［結果と考察］ 動物細胞で多用される CMV プロモーターは、比較的高発現の細胞から中程度の発現レベルの細胞まで幅広い蛍光強度の細胞が存在した。一方、ヒト EF-1α プロモーターを用いた場合、発現のばらつきが小さかった。平均蛍光強度は EF-1α プロモーターの方が高かったが、最大発現レベルは 2 つのプロモーター間で差が見られなかった。一方、ニワトリアクチンプロモーターは、発現レベルが低かった。Hela 細胞でも同様にウイルス感染実験を行ったところ、CMV プロモーターの発現が他の 2 種のプロモーターより高く (約 6-7 倍)、蛍光強度のばらつきについてもプロモーター間で大きな差は認められなかった。
以上のことより、EF-1α プロモーターは CHO 細胞において位置効果を受けにくく、一定の発現レベルの遺伝子導入細胞を作製しやすいプロモーターであることが示唆された。
［謝辞］本研究の一部は、JSPS 科研費 26249125 および経済産業省の「平成２５年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」 及び 平成２６年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた。

CHO, promoter, expression

発表責任者：西島謙一（nishijma@nubio.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2G051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 幹細胞の培養因子としてのセリシン加水分解物の有用性

# Utilization of sericin hydrolysate as culture supplement for stem cells

○寺田 聡[1]、奥本 光軌[1]、松田 庄平[1]、神道 紀志[1]、佐々木 真宏[2]、高橋 潤[2] ([1]福井大工、[2]セーレン)
○Satoshi Terada[1], Koki Okumoto[1], Shouhei Matta[1], Noriyuki Shindo[1], Masahiro Sasaki[2], Jun Takahashi[2] ([1]Univ. Fukui, [2]Seiren)

無限に増幅が可能で、かつ多分可能を持つ幹細胞を用いた再生医療が実現されつつある。臨床応用される場合の課題の一つが、増幅目的で細胞培養される段階で、哺乳動物由来因子を用いること無くこれまで以上に安定した培養を実現することである。われわれは絹から得られるセリシン加水分解物（以下、セリシン）に着目し、培地に添加することで多様な細胞の無血清培養を改善できることを示してきた。本研究では、iPS 細胞培養への効果を検討した。さらに、セリシンの細胞内シグナル伝達経路を検討した。

ヒト由来の iPS 細胞に対しては、増幅段階の培養で、アルカリフォスファターゼ（AP）活性の保持で評価した。対象の培養は１ヶ月を経ると AP 活性が低下したが、セリシンを添加することで対照に比べてより長期間、細胞が未分化状態を保持して増殖し、細胞形態などに大きな影響を与えないことを見いだした。

セリシンの細胞内シグナル伝達経路については、EGF 依存性のケラチノサイトを用いて検討を行った。このケラチノサイトでは、セリシンを添加することで十分な細胞増殖が認められた。そこで、EGF の MAP キナーゼカスケードを阻害する阻害因子を用いると、セリシンによる細胞増殖促進作用が EGF の場合と同様に、緩和された。このことからセリシンの増殖シグナルは EGF と同様に、MAP キナーゼカスケードを介していると考えられる。

しかし一方で、EGF による増殖促進は PI3K 阻害剤では緩和されないのに対して、セリシンによる増殖促進は緩和された。このことから、セリシンは EGF 受容体に加えて、EGF 受容体以外の他の受容体をもあわせて活性化しているのではないかと考えられる。

iPS, xeno-free, sericin

発表責任者：寺田 聡（terada@u-fukui.ac.jp）

発表番号：2G052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ニワトリシアル酸転移酵素の解析

# Analyses of chicken sialyltransferases

○木溪 俊介、金岡 英徳、西島 謙一、飯島 信司（名大院工）
○Shunsuke KIDANI, Hidenori KANEOKA, Ken-ichi NISHIJIMA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

高病原性鳥インフルエンザの世界規模での発生と、それに伴う新型インフルエンザ発生への強い懸念が続く中、インフルエンザの予防と制御への取り組みが求められている。インフルエンザウイルスは感染の際、細胞表面の糖鎖構造を認識する。ヒトインフルエンザウイルスの場合、糖鎖構造末端のα2,6-結合型シアル酸を認識する一方、トリインフルエンザウイルスはα2,3-結合型シアル酸を認識する。この違いが、ウイルスの感染性に大きな影響をもたらす。

トランスジェニック技術の応用により、ニワトリの糖鎖構造を改変できれば、インフルエンザウイルスの感染性をコントロールできる可能性がある。そこで糖鎖構造の末端にシアル酸を付加するニワトリシアル酸転移酵素の解析を行った。

【方法・結果】

細胞表面の糖鎖構造末端のシアル酸はシアル酸転移酵素（Sialyltransferase; ST）により付加される。トリインフルエンザウイルスのレセプターとなるα2,3-結合型シアル酸を付加するニワトリ ST の解析をするために、まずニワトリにいくつか存在する ST3Gal 遺伝子をクローニングし、活性測定を行った。ニワトリ ST 遺伝子を培養細胞（293FT cells）に強制発現し、その cell lysate を用いて CMP-シアル酸 $^{14}C$ の転移反応を行った。その結果、N 型糖鎖基質に対し chicken ST3Gal3, 6 が活性を示し、O 型糖鎖基質に対しては chicken ST3Gal1, 2 が活性を示した。次に、ニワトリの各臓器から取得した cDNA を定量 PCR により解析した結果、N 型糖鎖形成に関わる遺伝子と O 型糖鎖形成に関わる遺伝子の間で特徴的な発現パターンが観察された。

transgenic chicken, sialyltransferase

発表責任者：金岡英徳（kaneoka@nubio.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2G053
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 線虫 *C.elgans* の幼虫休眠を制御する短鎖ペプチドの探索

# Search for a short peptide regulating larval daipouse in *C.elgans*

○嵯峨 聖月、岩崎 崇、河野 強（鳥取大院）
○Mizuki SAGA, Takashi Iwasaki, Tsuyoshi Kawano (Tottori Univ.)

【背景・目的】線虫 *Caenorhabditis elegans* は生育環境の悪化（餌の枯渇・生育密度の上昇・高温）に応答して、一時的に生育を停止し幼虫休眠する。環境因子は頭部神経細胞で認識され、並立する TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを経由して、ステロイドホルモンシグナルに変換され休眠制御に至る [1)]。現在、環境因子が如何にして TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御するのかその詳細は不明である。本研究はこの作用機序を明らかにすること通じて、休眠制御の全容解明に迫ることを目的とする。我々は頭部神経細胞のうち休眠誘導ならびに休眠打破に関与する ASJ 神経細胞 [2)]に着目した。ASJ 神経細胞では 3 種の C 末端アミドペプチドをコードする *nlp-3* が発現するとの報告があり [3)]、これらのペプチドが TGF-β様分子ならびにインスリン様分子の合成・分泌を制御するとの作業仮説に立った。本大会では、*nlp-3* の解析結果について報告する。

【方法・結果】まず、レポーター遺伝子 (*nlp-3p*;*nlp-3*;*mrfp*)を導入した線虫を観察し、*nlp-3* が ASJ 細胞を含む複数の頭部神経細胞で発現することを確認した。次いで、*nlp-3* 破壊株の表現型を観察したところ、休眠誘導率の上昇ならびに休眠打破率の低下が認められた。よって、*nlp-3* は通常生育の維持に寄与することが推定された。さらに、*nlp-3* が TGF-β様シグナルならびにインスリン様シグナルを制御する可能性を検証するために、エピスタティック解析を行った。その結果、*nlp-3* は TGF-β様シグナルを制御しており、インスリン様シグナルを制御する可能性は極めて低いことが明らかとなった。現在、*nlp-3* が DAF-7（TGF-β様シグナルのリガンド）の合成・分泌を制御する可能性を検証している。また、*nlp-3* がコードするペプチドのうち、どのペプチドが休眠制御に寄与するのかを検証している。

参考文献
1. Hu PJ. WormBook (www.wormbook.org/chapters/www_dauer/dauer.html), (2007).
2. Bargmann CI and Horvitz HR. Science, 251:1243-1246 (1991).
3. Harris G et al. J. Neurosci., 30:7889-7899 (2010).

C.elegans, larval daipouse, short peptide

発表番号：2G054
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 初代培養細胞を用いた線虫 *C. elegans* インスリン様分子の評価系構築

# Evaluation of *C. elegans* insuiln-like peptides using primary cultured cells

○河野 強、藤森 匠、小松 真希、岩崎 崇（鳥取大院・農）
○Tsuyoshi KAWANO, Takumi FUJIMORI, Maki KOMATSU, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景と目的】線虫 *Caenorhabditis elegan*s の insulin/IGF-1signaling (IIS) 経路は幼虫休眠・成虫寿命・ストレス耐性など種々の生命現象を制御する。線虫のインスリン様ペプチドは複数存在し、唯一のインスリン受容体様タンパク DAF-2 を介してシグナルを制御する。これまで演者らは、個々のインスリン様遺伝子の破壊ならびに過剰発現を行うことを通じて**個体レベル**でのインスリン様分子の機能解析を行ってきた[1-3]。しかしながら、線虫個体には複数のインスリン様分子が存在することから、表現型を見る限りでは他のインスリン様分子の影響を排除できないことが問題であった。そこで本研究では、個々のインスリン様分子の機能を個別に評価できる**細胞レベル**の系を構築することとした。
【方法と結果】線虫の IIS 経路の下流には転写因子 DAF-16（FOXO オーソログ）が存在し、シグナルが亢進した場合には DAF-16 がリン酸化され核から細胞質に移行する。この現象に着目した。DAF-16::GFP を恒常的に発現する線虫 TJ356 株[4]より初代培養細胞を調製し、遺伝子工学的手法を用いて調製したインスリン様分子 INS-6 を添加して DAF-16::GFP の細胞質移行を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。大腸菌の発現系を用い、アフィニティー精製した MBP::INS-6 にリフォールディングを施し、プロテアーゼ処理により遊離させた INS-6 を逆相 HPLC にて精製した。次いで、MALDI-TOF-MS ならびにペプチドマッピングにより 4 対の S-S 結合の形成を確認した。この INS-6 を初代培養細胞に添加したところ、核内に局在していた DAF-16::GFP（この状態では IIS は亢進していない）が細胞質に移行した。一方、ヒトインスリンを添加した場合には細胞質への移行は認められなかった。よって、本系は**インスリン様分子を種特異的に評価**できると考えた。興味深いことに、リフォールディング済みの MBP::INS-6 を添加した場合にも細胞質への移行が認められた。このことから、線虫のインスリン様分子の活性部位は C 末端側にあると推定した。さらに、INS-6 が DAF-2 受容体を介して DAF-16::GFP の細胞質移行に寄与したことを証明するために、***daf-2* RNAi** 処理した線虫より初代培養細胞を調製して INS-6 を添加した。その結果、RNAi 処理により DAF-16::GFP の細胞質移行が消失したことから、INS-6 は DAF-2 受容体を介して IIS を亢進することが明らかとなった。

1. Matsunaga Y, Kawano T et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 423:478-483 (2012).
2. Matsunaga Y, Kawano T et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76:2168-2172 (2012).
3. Matsunaga Y, Kawano T et al. Nat. Commun. accepted (2015).
4. Henderson ST & Johnson TE. Curr Biol. 11:1975-1980 (2001).

insulin, *C. elegans*, primary cultured cell

発表責任者：河野　強（kawano@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：2G058
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

ミズクラゲ幼生の変態に対するリソソーム酵素の関与
Involvement of lysosomal enzymes in metamorphosis of the moon jellyfish larvae.
○辻田 菜摘[1]、今井 つかさ[1]、小山 寛喜[1]、辻 敏之[2]、矢中 規之[1]、小路 淳[1]、荒川 賢治[3]、国吉 久人[1] ([1]広島大院・生物圏、[2]長浜バイオ大・バイオサイエンス、[3]広島大院・先端研)
○Natsumi TSUJITA[1], Tsukasa IMAI[1], Hiroki KOYAMA[1], Toshiyuki TSUJI[2], Noriyuki YANAKA[1], Jun SHOJI[1], Kenji ARAKAWA[3], Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]Dept. Biosci., Nagahama Inst. Bio-Sci. Tech., [3]AdSM Hiroshima Univ.)

【背景】ミズクラゲ(*Aurelia* sp.)は、その生活史において、有性世代であるクラゲと無性世代であるポリプを繰り返す。ポリプからクラゲへの転換期においては、海水温の低下にともなって、ポリプの胴部に口丘側から足盤側へ向けて数個～十数個の分節を生じる（分節形成期ストロビラ幼生)。その後それぞれの分節は形態を変え（形態形成期ストロビラ)、エフィラ幼生となって海水中に泳ぎ出る。この分節の形成からはじまる一連の変態過程はストロビレーションと呼ばれ、成体クラゲの個体数を決定する上で非常に重要なステップとなっている。演者らのグループでは、ストロビレーションの分子機構の解明を目指し、ポリプとストロビラで発現量が異なる遺伝子群の探索をおこなってきた。昨年度大会においては、リソソーム加水分解酵素の一種である *Aspartylglucosaminidase* が変態中に発現上昇すること、リソソーム機能阻害剤の投与によりエフィラへの変態が部分的に阻害されることを報告した。本大会では、リソソーム機能阻害剤の投与による表現型について、さらに詳細に調べた結果を報告する。また、次世代シーケンサーを用いた transcriptome 解析を実施し、現在、変態中に発現するリソソーム加水分解酵素遺伝子群の網羅的同定と発現解析を進めている。
【方法・結果】以下のリソソーム機能阻害剤の投与実験をおこなった。①強力なストロビレーションの開始誘導剤である 5-methoxy-2-methylindole (MMI)とリソソーム機能阻害剤[Chloroquine (CQ)または Bafilomycin A1]をポリプに同時投与した結果、先端部にポリプ様組織が残った。②MMI を用いてストロビレーションを誘導した後、各変態ステージのストロビラに CQ を投与した。その結果、分節形成期に投与した場合にはポリプ様組織が残ったが、形態形成期での投与では正常にエフィラへと変態した。③分節形成期ストロビラの口丘側から 2 分節を含む部分を切り出して CQ を投与した。その結果、先端の第 1 分節のエフィラへの変態が起きずに、ポリプ様組織の状態が維持された。以上の結果から、第 1 分節のエフィラへの変態には、分節形成期におけるリソソーム活動が必要であることが明らかとなった。

ポリプと分節形成期ストロビラからそれぞれ mRNA を調製し、HiSeq™ 2000 (Illumina 社)を用いて transcriptome 解析をおこなった。その結果、それぞれ 5G 塩基の配列情報が得られ、assembly によって 48,925 種の遺伝子配列に集約された。さらに、bioinformatics 解析から、51 種のリソソーム関連遺伝子を見出し、その中からリソソーム加水分解酵素を 19 種同定した。現在は、これらの遺伝子について詳細な発現解析を進めている。

lysosome, jellyfish, metamorphosis

発表責任者：国吉久人（hkuni@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：2G059
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# バイオ医薬品生産を可能とする「スーパーミミズ」の開発

# Development of super earthworms that enable production of biological medicine

○町田 悠、菊入 祐生、小田 陽介、赤澤 真一（長岡高専物質工）
○Yu MACHIDA, Yusei KIKUIRI, Yousuke ODA, Shin-ichi AKAZAWA (Dept. Mat. Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll.)

【目的】バイオ医薬品であるヒトインスリンは大腸菌を宿主として生産されているが，貧血治療薬であるエリスロポエチンのような翻訳後修飾を必要とする糖タンパク質は大腸菌で生産することが出来ず，動物細胞が利用されている．しかしながら製造コストが高価であるといった課題がある．そこで我々は，これらの問題を解決するための新規宿主生物としてシマミミズ *Eisenia feida* に注目した．既に我々は本ミミズを用いた健康食品を開発しており，安全性も確かめられているため，本ミミズを用いれば組換えタンパク質をミミズごと食して摂取する事も可能である．しかしながら，本ミミズの遺伝子工学的手法は全く報告されていないため，我々は遺伝子導入法の構築を行った．その結果，世界で初めて *E. fetida* の遺伝子導入に成功した[1)]．しかし，遺伝子導入後の生存率及び遺伝子導入効率が低いことが問題となっている．そこで，本研究では生存率及び遺伝子導入効率の向上を目指し，基層素材の検討及び雑菌の混入による遺伝子導入効率の影響について検討した．また，導入遺伝子が実際に *E. fetida* に取り込まれたかどうかを PCR 法で簡易的に検証した．

【方法】基層素材の検討は，*E. fetida* 体内の土を排出させ切断し，その後の生存率及び再生の様子を観察した．その後，基層培地に抗生物質を添加し雑菌が遺伝子導入効率に及ぼす影響について検討した．*E. fetida* への遺伝子導入は，*E. fetida* 体内の土を排出させ切断し，切断した尻尾側の部位の切断面に，ルシフェラーゼ遺伝子をマイクロインジェクションとエレクトロポレーションを併用することによって行った．遺伝子導入の確認は，ミミズを破砕・溶解し，ルシフェラーゼの発光強度を計測することにより行った．また，遺伝子導入を行った *E. fetida* からゲノムを抽出し，ルシフェラーゼ遺伝子の確認を PCR 法で検証した．

【結果・考察】*E. fetida* の生育には寒天培地が適していることが分かった．この結果より，基層培地を寒天培地にし，抗生物質を用いた雑菌の除去を行ったところ，生存率及び遺伝子導入効率が大幅に向上した．また, PCR により, 導入したルシフェラーゼ遺伝子の増幅が確認された．遺伝子導入を行っていない *E. fetida* から抽出したゲノム DNA からは増幅が確認されなかった．今後は完全体に再生する頭部側の形質転換を試み，形質が子孫に境内するのかを検証する．本研究の一部は JSPS 科研費挑戦的萌芽研究 15K14713 の助成を受けて実施された．

[1]赤澤真一，町田悠，加島徳人，若月夕佳，村山隼人．日本生物工学会．2015 年 10 月．ポスター番号 1P-028．鹿児島．

earthworm, transformation, biological medicine

発表責任者：赤澤真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

発表番号：2H001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# カンキツ類の傷害応答反応における二次代謝物質の変動解析
# Fluctuation analysis of wound induced secondary metabolites in Citrus plants

○伊佐木 芳、松川 哲也、浅井 智紀、梶山 慎一郎（近畿大生物理工）
○Kaoru ISAKI, Tetsuya Matsukawa, Tomonori Asai, Shinichiro Kajiyama (Kinki Univ.)

[目的]

カンキツ類は古くから世界各地で生育・栽培されている果樹である。その商業的価値の高さから、収穫後の果実の機能性や保存に関する研究が多く行われてきた。しかしながら実験生物として扱いにくい為、生育途中の葉や枝に関する生理学的・生化学的な知見は乏しい。このような背景の中、我々は植物の生育過程における環境ストレスの一つである物理的傷害に着目し、防御反応に関する研究を行ってきた。これまでに本大会において、ハッサク葉の傷害応答時に誘導されるプレニル化フロフランリグナンの一種である biscitrusnin-A を新規に報告しており、カンキツ類の傷害応答反応において二次代謝が何らかの役割を果たしていることを見出した。そこで本研究では、カンキツ類の傷害応答反応における二次代謝の変動に関する知見を得るため、LC/TOF-MS を用いて複数のカンキツ系統に対して傷害葉の二次代謝物質のプロファイルを解析した。

[方法および結果]

植物材料として、近畿大学附属湯浅農場に保存されているカンキツ系統の葉を用いた。採種後の葉を 5㎜ 角に切断し、蒸留水に浮かべてインキュベートした試料を傷害処理葉とした。処理後の葉を液体窒素中で破砕したのち、抽出溶媒としてメタノールを加えて懸濁した。懸濁液を遠心分離した後、その上清を回収し粗抽出液とした。また、対照として採取後すぐに抽出を行ったものを未処理葉抽出液とした。これらの抽出液を、LC/TOF-MS を用いて分析した。傷害処理葉および未処理葉のクロマトグラムを比較した結果、傷害処理によって二次代謝プロファイルが変動していることがわかった。また傷害処理葉に特異的に存在するピークも存在し、これらのピークがカンキツ類の傷害応答に関与することが示唆された。現在、傷害応答によって変動が見られたピークの同定を進めており、その結果も併せて報告する。

Citrus plant, Wound induced compounds, Fluctuation analysis

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：2H002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# カンキツ葉中の一次代謝物質の環境ストレス応答における代謝変動解析

# Analysis of primary metabolite changes in *Citrus* leaves against environmental stress

○浅井 智紀、松川 哲也、梶山 慎一郎（近畿大院生物理工）
○Tomonori Asai, Tetsuya Matsukawa, Shinichiro Kajiyama (Kinki Univ.)

[目的] カンキツ類はアジアを起源とし、世界各地に生育、栽培される果樹である。その果実は多くの機能性成分を含有し、生食用としての需要に限らず、加工品や医薬品としても利用されている。一方カンキツ類は、育種上高耐病性･耐虫性品種への改良が重要な課題であるにもかかわらず、その生体防御機構に関する知見は乏しいのが現状である。本研究では、耐病性･耐虫性品種育種への手がかりを得るため、近畿大学付属湯浅農場に管理される 7 種の代表的カンキツを対象として、物理的傷害および、環境応答関連の植物ホルモンであるジャスモン酸(JA)、サリチル酸(SA)処理に応答するアミノ酸や有機酸、糖等の一次代謝物質の代謝変動プロファイルを解析した。

[方法および結果] 採取後のカンキツ葉(*Citrus sinensis*, *C. limon*, *C. paradisi*, *C. unshiu*, *C. kinokuni*, *C. grandis*, *C. hassaku*)に 6 mm 間隔で刺傷を与え、蒸留水に浮かべて 25°C、常光下で一定時間インキュベートした試料を傷害処理葉とした。また、JA および SA 処理葉は、0.2 mM の JA および SA 溶液に浸した状態でインキュベートしたものを用いた。また、コントロールとしては採取後の葉を蒸留水に浸してインキュベートした葉を用いた。処理直後の葉を液体窒素により凍結後、凍結乾燥により完全に水分を除いた。乾燥葉 15 mg をボールミルにより破砕後、methanol/$H_2O$/chloroform(2.5:1:1 v/v/v)の混合溶媒 1 ml および内部標準である ribitol 水溶液 (0.4 mg ml-1) を 60 μl 加えた後、thermomixer を用いて 37° C, 1,200 rpm, 30 分間で抽出した。遠心分離により得られた上清に水を加え、分離した極性相中の methanol を遠心減圧濃縮により除去後,凍結乾燥により水分を除去した。乾燥試料に TMS 誘導体化試薬を加えて反応させた後、GC-MS 分析に供した。得られた GC-MS データを多変量解析に供して、ストレス処理による一次代謝物質の変動解析を行ったところ、tryptophan や serine などのアミノ酸において試験した種に共通する応答性が見られた。このことから、これらの代謝物がカンキツのストレス応答反応におけるバイオマーカー候補となる可能性が示唆された。

*Citrus*, metabolomics, environmental stress

発表責任者：梶山慎一郎（kajiyama@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：2H003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# チューリッポシド変換酵素による 1-チューリッポシド A の酵素合成法の確立

# Enzymatic synthesis of 1-tuliposide A using tuliposide-converting enzyme

○野村 泰治[1]、山口 航平[1]、荻田 信二郎[1,2]、加藤 康夫[1] ([1]富山県大・生工研セ、[2]県立広島大・生命科学)
○Taiji NOMURA[1], Kohei YAMAGUCHI[1], Shinjiro OGITA[1,2], Yasuo KATO[1] ([1]Biotechnol. Res. Center, Toyama Pref. Univ., [2]Dept. Life Sci., Pref. Univ. Hiroshima)

【目的】チューリップ組織中には、6-アシルグルコースである 6-チューリッポシド（6-Pos）類（6-PosA、6-PosB）が主要二次代謝産物として蓄積している。6-PosA および 6-PosB はチューリップ組織内在の PosA 変換酵素および PosB 変換酵素によって、ラクトン化体である抗菌活性物質、チューリッパリン（Pa）A および PaB へとそれぞれ変換される。一方、1-アシルグルコースである 1-PosA は、6-Pos 類の異性体として数種のチューリップ原種に存在していることが報告されているが、その含有量は微量で、なおかつ化学合成が困難なために、物性や生物活性が明らかにされないまま現在に至っている。ごく最近、我々は Pos 変換酵素が本来の基質である 6-Pos 類だけでなく、1,6-ジアシルグルコースである PosD や PosF を基質として受け入れ、6 位アシル基のみを特異的に Pa 類に変換、除去することで、1-PosA を生成することを見いだした。本研究では、この反応を利用した 1-PosA の酵素合成法を確立することを目的とした。
【方法と結果】1,6-ジアシル型 Pos 類である PosD および PosF は、これらを著量含むことが報告されているアルストロメリアおよびチューリップ原種の組織からそれぞれ精製した。組換え PosA 変換酵素（TgTCEA1）および PosB 変換酵素（TgTCEB1）は、成熟ポリペプチド領域の N 末端に His タグを付加した形で大腸菌内に可溶性タンパク質として発現させた後、金属アフィニティークロマトグラフィー、トロンビンによるタグ切断処理、ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した。精製酵素を用いて、PosD および PosF に対する反応速度論解析を行ったところ、TgTCEA1 は PosF よりも PosD に対して約 7 倍高い反応効率（$k_{cat}/K_m$）を示したのに対して、TgTCEB1 は PosD よりも PosF に対して約 9 倍高い反応効率を示した。PosD および PosF の 6 位アシル基は、それぞれ 6-PosA および 6-PosB のアシル基と構造が一致しており、TgTCEA1 が PosD を、TgTCEB1 が PosF をよい基質としたことから、1 位アシル基の有無に関わらず、6 位アシル基の構造が Pos 変換酵素の基質認識には重要であることが示唆された。次に、PosF を基質とした TgTCEB1 による酵素反応をスケールアップし、1-PosA の単離を試みた。50 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）中、PosF 300 mg（0.77 mmol）、TgTCEB1（1,800 U/mL）0.8 mL を含む 77 mL の反応液を室温で 10 分間撹拌することで酵素反応を行った。反応液の 1/10 量の 1 N HCl を加えて酵素反応を停止し、PosF の完全消費と 1-PosA、PaB の生成を確認後、活性炭カラムクロマトグラフィーおよび逆相系分取 HPLC による精製に供した。その結果、1-PosA を 160 mg（0.58 mmol、収率 75%）単離することに成功し、その構造を各種分光学的手法により確認した。

1-tuliposide A, tuliposide-converting enzyme, tulipalin

発表責任者：野村泰治（tnomura@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：2H004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# タキサジエンの 10 位を水酸化する新規シトクロム P450 遺伝子の単離と機能解析

# Molecular cloning and characterization of a cytochrome P450 taxadiene 10ß-hydroxylase

○小森 彩[1]、竹村 秀史[1]、久保 崇[2]、石井 純[4]、町田 雅之[3]、近藤 昭彦[5]、播本 孝史[1]、鈴木 宗典[1] ([1]神戸天然物化学、[2]高機能遺伝子デザイン技術研究組合、[3]産総研・生プロ、[4]神戸大・自科・研究環、[5]神戸大院・工・応化)

○Aya KOMORI[1], Hideshi TAKEMURA[1], Takashi KUBO[2], Jun ISHII[4], Masayuki MACHIDA[3], Akihiko KONDO[5], Takashi HARIMOTO[1], Munenori SUZUKI[1] ([1]KNC Laboratories Co., Ltd., [2]TRAHED, [3]BPRI, AIST, [4]Org.Adv.Sci.Technol., KobeUniv., [5]Dept.Chem.Sci.Eng.,Grad.Sch.Eng., Kobe Univ.)

パクリタキセルは、イチイ樹木が生産する優れた抗腫瘍活性を持つジテルペノイドである。パクリタキセルの生合成は、ジテルペノイド共通の前駆体であるゲルニルゲラニル二リン酸（GGPP）より約 18 ステップの反応が関与すると予想されているが、酸化反応を含む複数ステップに関与する酵素遺伝子が明らかにされていない。本研究では、イチイ樹木の地上部・地下部の代謝産物の比較ならびに遺伝子発現解析を行い、シトクロム P450（P450）をターゲットとして新規パクリタキセル生合成関連酵素遺伝子の単離を試みた。

ニホンイチイ樹木の地上部および地下部の代謝産物分析を行った結果、地上部に比べ地下部においてパクリタキセルならびにその生合成中間体が多く蓄積していた。この結果は、既知生合成関連酵素遺伝子の RT-PCR 結果とも一致した。そこで、地上部および地下部における RNA シーケンス解析を行い、地下部で多く発現している遺伝子配列の抽出を行った。さらに、タキサン類を酸化する既知 P450 はお互いに高いアミノ酸配列相同性を持つことから、地下部で多く発現する候補遺伝子配列から既知 P450 と相同性が高い配列を選定、単離した。単離した 19 種の推定新規 P450 遺伝子それぞれを GGPP 合成酵素遺伝子、タキサジエン合成酵素遺伝子、NADPH-シトクロム P450 還元酵素遺伝子とともにファルネシル二リン酸高生産大腸菌に導入し、その代謝産物を GC/MS を用いて分析した。その結果、19 種中 1 種においてタキサジエン酸化物と推定される新たなピークが確認された。さらに、コドンを大腸菌に最適化した配列を用いて N 末端配列の改変を行った結果、改変前と比べ培養液当たりの新規産物が約 10 倍増加した。得られた新規産物は、各種スペクトルによる構造解析の結果から、タキサジエン 10 位の水酸化物であることがわかった。

パクリタキセル生合成関連酵素遺伝子として、これまで複数の P450 が報告されている。しかし、パクリタキセル生合成出発物質であるタキサジエンを基質とする酸化酵素の報告はタキサジエン 5 位水酸化酵素のみであった。今回タキサジエン 10 位水酸化酵素を発見したことにより、タキサジエンから分岐する新たな経路の存在が予想された。

RNA シーケンスデータ解析を行うに当たり、解析ソフトの改良等のご協力を賜りましたインシリコバイオロジー株式会社に心より感謝いたします。また、この研究は、経済産業省委託事業『革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発』の一部として実施されました。

Paclitaxel, Cytochrome P450, Diterpenoid

発表責任者：鈴木　宗典（m_suzuki@kncweb.co.jp）

発表番号：2H005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）由来フラボノイド *C*-配糖化酵素の機能解析

# Functional analysis of flavonoid *C*-glucosyltransferases from *Medicago truncatula*

○小柳 祐輔[1]、伊藤 崇充[1]、山本 菜摘[2]、田口 悟朗[2]（[1]信州大院・理工学系、[2]信州大・繊維）
○Yusuke KOYANAGI[1], Takamitsu ITO[1], Natsumi YAMAMOTO[2], Goro TAGUCHI[2] ([1]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shinshu Univ., [2]Textile Sci. and Tech., Shinshu Univ.)

【研究背景】

植物が合成する配糖体の大部分は糖とアグリコンが酸素原子を介して結合した *O*-配糖体であるが、糖のアノメリック炭素とアグリコンが炭素-炭素結合した *C*-配糖体も広く存在する。*C*-配糖体はその特徴的な結合のために、酸や glucosidase による加水分解を受けないなど、化学的に安定な化合物で、生体内で *O*-配糖体と異なった代謝特性や生理活性を示すことから近年注目されている化合物である。

マメ科のモデル植物であるタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）はフラボノイド、イソフラボノイドなどの生理活性の高い化合物を生合成し、その配糖体として蓄積する。本研究ではタルウマゴヤシから獲得したフラボノイド *C*-配糖化酵素（MtrCGT1、MtrCGT2）について詳細な酵素学的解析を行い、*C*-配糖化酵素に関する知見を深めることを目的とした。

【方法】

大腸菌で異種宿主発現させて精製した酵素を、フラボノイド関連基質と反応させ、生成物を HPLC/MS で解析した。また、高い反応性を示した基質に対する反応速度論的解析を行い、酵素の反応性について考察した。

【結果及び考察】

MtrCGT1 は多種類のフラボノイド関連基質に対し高い *C*-配糖化活性を示したが、イソフラボンや C 環の開環構造をとらない化合物には *C*-配糖化活性を示さなかった。また、MtrCGT1 はアグリコンに、糖を 1 つ結合する mono-*C*-配糖化活性と mono-*C*-配糖体に糖をもう 1 つ結合する di-*C*-配糖化活性の両方を有していた。一方で、MtrCGT2 は mono-*C*-配糖化活性および di-*C*-配糖化活性ともに、極めて低い値を示した。これまでに我々が調査したダイズの *C*-配糖化では mono-*C*-配糖化、di-*C*-配糖化にそれぞれ別の酵素が作用していると推測されたのに対し、タルウマゴヤシでは mono-*C*-配糖化、di-*C*-配糖化に同じ酵素が作用すると考えられた。これらの結果は、同じマメ科植物においても異なるタイプの配糖化酵素が存在していることを示しており、その差異が生じる要因について興味が持たれた。現在、新たに見いだされたタルウマゴヤシの *C*-配糖化酵素（MtrCGT3）遺伝子の単離を行っており、その結果についても合わせて報告したい。

*C*-glucosyltransferase, flavonoid, *Medicago truncatula*

発表責任者：田口悟朗（gtagtag@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：2H006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ウメの品種間代謝物プロファイリング

# Metabolic profiling of Japanese apricot (*prunus mume* Sieb. et Zucc.) fruits

○松川 哲也[1]、平山 幸千[1]、北村 祐人[2]、竹中 正好[2]、梶山 慎一郎[1] ([1]近畿大生物理工、[2]和歌山県うめ研)
○Tetsuya MATSUKAWA[1], Sachi HIRAYAMA[1], Yuto KITAMURA[2], Masayoshi TAKENAKA[2], Shinichiro KAJIYAMA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Wakayama Pref.)

[目的]ウメはバラ科サクラ属スモモ亜属に属する中国原産の果樹作物であり，古来より日本でも栽培されてきた果樹である。ウメは同じスモモ亜属に属するスモモやアンズと交雑種を形成することから，これまでに多くの品種が育種・栽培されてきた。ウメは生食に供されず，加工を経て食されるという他の果樹作物とは大きく異なる特性があり， そのために加工品に適した特性をもつ品種が選抜されてきた。新ウメ品種「露茜」はニホンスモモ「笠原巴旦杏」とウメ「養青梅」から育種された種間雑種であり，果皮だけでなく果肉まで鮮紅色に着色するため，赤色飲料の原料として期待される品種である。しかし，本品種に含まれる成分に関しては未だに不明な点も多いのが現状である。そこで，「露茜」を中心として種々のウメ品種の果実に含まれる物質を網羅的に解析し，ウメ品種の化学特性を明らかにすることを目的として研究を行った。
[方法および結果]植物材料として、和歌山県うめ研究所圃場内に栽培されているウメ品種 18 種を用いた。ウメ果実の果肉部を 15 mg 秤量し，凍結乾燥に供した。乾燥後の果肉を Lysing Matrix A を含むボールミルチューブに移し，FastPrep を用いて破砕した。チューブに MeOH/ $H_2O$ /$CHCl_3$ (2.5:1:1 v/v/v)の混合溶媒 1 ml および内部標準 ribitol 水溶液を加え，30˚C で 30 分間振とう抽出した。懸濁液を遠心分離後，上清を得た。得られた上清に $H_2O$ を加えたのち，遠心分離に供して一次代謝物質を含む極性層を得た。極性層を乾燥後，methoxyaminehydrochloride pyridine 溶液を用いて 30˚C で 90 分間振とう後，*N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide により 37˚C で 30 分間振とうすることにより誘導体化を行った。分析には GCMS-QP2010 Ultra（島津）を用い，カラムには CP-SIL 8CB MS を用いた。イオン化は EI で行い，*m/z* = 85–500 の範囲で検出した。クロマトグラムパターンを比較したところ，分析に供した 18 種の品種の一次代謝プロファイルは複数のグループに分類された。現在，より詳細な解析を行うため，ピークの同定および多変量解析を進めており，その結果もあわせて報告する。

Japanese apricot, metabolic profiling, GC/MS

発表責任者：松川哲也（tmatsu@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：2H007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# レモン花器由来カフェインシンターゼ遺伝子の単離と機能解析

# Characterization of caffeine synthase from *Citrus limon* flower

佐藤 裕子[1]、梅澤 沙貴[1]、常盤野 哲生[1]、鈴木 秀幸[2]、吉澤 結子[1]、○水野 幸一[1] ([1]秋田県大生物資源、[2]かずさ DNA 研バイオ開発)
Yuko SATO[1], Saki UMEZAWA[1], Tetsuo TOKIWANO[1], Hideyuki SUZUKI[2], Yuko YOSHIZAWA[1], ○Kouichi MIZUNO[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]Azusa DNA Res. Inst.)

［目的］ミカン科ミカン属は花器にのみカフェインを含むことが報告されている。また、ミツバチがカフェインを摂取することで記憶力が上がり花蜜の採取が活発になるという報告もあり、カフェインと虫媒の関係が議論されている。しかしそのカフェイン生合成経路、酵素遺伝子、植物体内における働きなど、詳細は不明な点が多い。本研究ではミカン属の中でも高濃度にカフェインを含有することが知られているレモン（*Citrus limon*）を実験試料として用い、そのカフェインシンターゼの単離およびその機能解析を目的とした。
［方法］レモンつぼみより抽出した mRNA を試料として、次世代シーケンサーを用いた大規模発現遺伝子解析を行った。次に RT-PCR により候補遺伝子を単離し、大腸菌を用いた発現系を構築し組換え型タンパク質を得た。これを用いてカフェイン前駆体である種々のキサンチン誘導体を基質として反応させ、生成物を液体シンチレーションカウンター、TLC、および LC-MS により検出した。
［結果・考察］レモンつぼみ由来 mRNA の次世代シーケンサーによる発現遺伝子解析を行った結果、合計 50,030 contigs、約 3,800 万塩基の配列の解析に成功した。これらについて BLAST 検索を行い、メチルトランスフェラーゼと相同性の見られる遺伝子を選抜した。さらに、それらのうち高い発現量を示す酵素遺伝子に注目し単離を試みた。その結果、それぞれ 1,076 塩基 358 アミノ酸をコードしている、非常に類似した 3 種類の酵素遺伝子の単離に成功した。これらについて組換え型酵素を生産し、メチル基に $^{14}$C の放射活性を有する *S*-アデノシルメチオニンをメチル基供与体として活性測定を行ったところ、反応性は低いもののキサンチン誘導体を基質とすることが判明した。その生成物の TLC からカフェインに相当するシグナルを検出した。以上よりこれらを *Citrus limon* caffeine synthase (ClCS)と命名し、それぞれ ClCS1a、ClCS1b および ClCS2 とした。ClCS1a について詳しく調べたところ、LC-MS 分析より、7-メチルキサンチンを基質とした場合にパラキサンチンとカフェインの生成を確認した。しかし ClCS 群は、コーヒーやチャから単離されているカフェインシンターゼとの相同性は低く、推定立体構造もこれらが属するモチーフ B'-MT ファミリーと異なることから、新規の *N*-メチルトランスフェラーゼである可能性が提示された。一方で相互にアミノ酸配列の高い相同性を有しながら基質特異性が異なることから、現在それらの至的条件（pH および温度安定性）の検討と関与する配列の同定を試みている。

methyltransferase, caffeine, secondary metabolism

発表責任者：水野幸一（koumno@akita-pu.ac.jp）

発表番号：2H008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 大根葉に含まれる抽だい抑制化合物の生物有機化学的研究

# Functions of anti-bolting compounds in plants

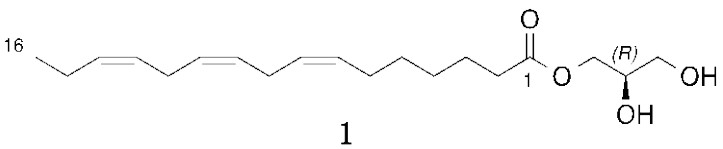
○荻原 毅、天野 就基、藤野 介延、高橋 公咲、松浦 英幸（北大農）
○ Tsuyoshi OGIHARA, Naruki AMANO, Kaiei FUJINO, Kosaku TAKAHASHI, Hideyuki MATSUURA (Hokkaido Univ.)

【背景・目的】ダイコン（*Raphanus sativus*）やシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）などの冬型一年草の多くは，冬季の低温条件と春季の長日条件により花芽を誘導し，この生物現象は抽だいと呼称されている．春蒔きのダイコン、ビート等に抽だいが生じると食用となる根や葉の生育に悪影響を及ぼすため，これを抑制する技術は高品位の作物生産を実現するために重要である．植物の抽だい抑制物質として，2,3-dihydroxypropyl (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-hexadeca-7,10,13-trienoate(**1**)が報告されている．しかし，その絶対配置は未決定である．そこで，本研究ではその絶対配置を決定することを目的とした．更に TLC 上で **1** に近似な Rf 値を示す化合物が複数認められたため，その単離と構造決定を目的に研究を行った．

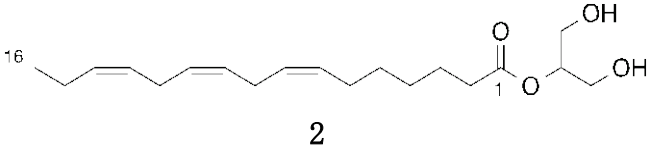
【方法・結果】

《新規化合物とその類縁体の構造決定》種々の機器分析データおよび化合物 **1** の $^{1}$H-, $^{13}$C-NMR および DEPT データの比較により，**2** の化学構造を 1,3-dihydroxypropan-2-yl (7*Z*,10*Z*,13*Z*)-hexadeca-7,10,13-trienoate と決定した．化合物 **2** は **1** の脂肪鎖の結合位置が異なる化合物で，文献未記載の新規化合物であった．また，脂肪鎖の鎖長が異なる化合物 2,3-dihydroxypropyl (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadeca-9,12,15-trienoate (**3**)，1,3-dihydroxypropan-2-yl (9*Z*,12*Z*,15*Z*)-octadeca-9,12,15-trienoate (**4**)も同様に単離，構造決定をした．現在，それらの生理活性について検討中である．

《化合物 **1**，**3** の絶対配置の決定 》大根葉から抽出した抽だい抑制化合物 **1** の glycerol 部分の 3 位炭素の水酸基に保護基を導入した後，2 位炭素の水酸基を(*R*)，(*S*) MTPA エステル化し，改良 Mosher 法を適用することにより 2 級炭素の不斉を (*R*) と決定した．同様に **1** の類縁体である **3** の 2 級炭素の不斉を(*R*)と決定した．




**1**




**2**

bolting, absolute configuration, radish

発表責任者：松浦英幸（matsuura@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2H009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 器官特異性を示すジベレリン受容体制御剤の作用機構解析

Characterization of sitespecific inhibitors for gibberellin receptor

○都外川 識志、宮崎 翔、尹 禎敏、安装 卓也、福井 康祐、大谷 征史、PARK SEUNG-HYUN、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○SATOSHI TOTOKAWA, SHO MIYAZAKI, JUNG-MIN YOON, TAKUYA ANDO, KOUSUKE FUKUI, MASATO OTANI, SEUNG-HYUN PARK, MASATOSHI NAKAJIMA, TADAO ASAMI (Dept. Appl. Biol. Chem.,Univ. of Tokyo)

【目的】

ジベレリン（GA）は種子発芽や茎部伸長、花芽形成など植物の様々な生長に関わる植物ホルモンで、その信号伝達は受容体からの直接の相互作用により負の制御因子 DELLA へ伝わり、その相互作用に伴う DELLA 因子の機能低下に連動して下流へ伝えられる。演者らは、酵母 2H 系を用いた化合物選抜を展開し、GA 受容体と DELLA 因子間の相互作用を制御する化合物を報告している。今大会では、それら選抜した化合物の制御範囲として器官特異性を示すものを見出し、その構造類縁体の器官特異性を調べるとともに、将来的に器官部位毎の微量の植物材料を用いても実施可能となる定量分析系の整備を行った。

【方法・結果】

受容体制御剤の一つ TY-25 は、シロイヌナズナ幼植物体の根には比較的強く作用する一方、地上部への作用は強くない。これはすでに報告している TY-13 が植物体のあらゆる器官でほぼ一様の強度で作用するのとは対照的な作用様式を示す。そこで、TY-25 の構造類縁体を有機化学的に合成し、市販品と合わせて活性試験に供した。それら構造類縁体の器官別の活性を調べた結果、構造の僅かな違いにより TY-25 同様の器官特異性を維持したグループ以外に、TY-13 同様に器官特異性を喪失したグループが存在することが明らかとなった。2 グループの代表化合物 TY-25・TY-13 のうち、特に TY-25 が示す器官特異性の発現機構解明の一助とすべく、器官別の内生 GA 量および関連植物ホルモン量の一斉把握が可能となるように、すでに幾つか存在する報告例に従って適当な誘導体化と LC/MS/MS の利用を現在検討中であり、その結果も合わせて報告したい。

gibberellin, receptor, inhibitor

発表責任者：都外川識志（6totokawa9@gmail.com）

発表番号：2H010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ジベレリン代謝制御剤 CBTC の構造展開と活性評価

# Growth-controlling by Gibberellin Metaborlism Regulators

○下尾 純平、大谷 征史、宮崎 翔、下高原 宏明、尹 禎敏、PARK Seung-Hyun、中村 英光、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Junpei SHIMOO, Masato OTANI, Sho MIYAZAKI, Hiroaki SHIMOTAKAHARA, Jung-min YOON, Seung-Hyun PARK, Hidemitsu NAKAMURA, Masatoshi NAKAJIMA, Tadao ASAMI (Dept.Appl.Biol.Chem., Univ. of Tokyo)

【目的】

植物ホルモンのジベレリン(GA)には、種子の発芽、茎部伸長、花芽形成、花器官や種子の発達など様々な制御機能が知られており、果実の落下防止や着花促進に対する生長調節剤として農業上利用されている。演者らは、植物内生のジベレリン量の制御に直接関わる不活性化代謝反応に興味を持ち、化学的制御に必要な化合物の探索を行っている。これまでの成果として、市販の化合物ライブラリーを用いてシロイヌナズナ GA 代謝酵素(GA 2-oxidase)の機能制御剤 CBTC の選抜に成功しており、既に本大会で報告している。CBTC はシロイヌナズナの種子発芽や芽生えの生長を促進させる効力がある。今回は、有機化学的手法を用いて CBTC の構造展開を図り、GA 2-oxidase 酵素に対する阻害活性と分子構造との相関性を評価するとともに、阻害活性の特異性についても検討した。

【方法および結果】

種々のアニリン誘導体を用いて CBTC 構造類縁体 10 数種を調製し、大腸菌発現系を用いて調製したシロイヌナズナ GA 2-oxidase 酵素、および、比較の対照として GA の生合成に関わる GA 3-oxidase 酵素の各リコンビナントタンパク質を用いた試験管実験系に添加して、各酵素反応に対する阻害状況を評価した。結果、CBTC と同様に GA 2-oxidase が触媒する酵素反応特異的に阻害活性を示すもの、GA 2-oxidase・GA 3-oxidase 両酵素とも阻害活性を示すもの、そして、CBTC と異なり GA 3-oxidase が触媒する酵素反応特異的に阻害活性を示すもの、が複数種含まれることが判明した。これら CBTC 構造類縁体が示す阻害のスペクトル傾向について、単子葉植物を用いた検討結果も合わせて報告する予定である。

gibberellin, dioxygenase, biosynthetic enzyme

発表番号：2H011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# オーキシン・ブラシノステロイド信号伝達同時制御剤の作用解析

# Analysis of compounds regulating auxin and brassinosteroid signalings

○TANAKA-JAROENSANTI Naiyanate[1]、尹 禎敏[1]、大谷 征史[1]、白井 郁也[1]、Park Seung-Hyun[1]、林 謙一郎[3]、中井 雄二[2]、中嶋 正敏[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]弘前大・食料研、[3]岡山理大・生物化学)
○ Naiyanate TANAKA-JAROENSANTI[1], Jung-Min Yoon[1], Masato Otani[1], Ikuya Shirai[1], Seung-Hyun Park[1], Ken-ichiro Hayashi[3], Yuji Nakai[2], Masatoshi Nakajima[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo., [2]Inst.Food.Sci., Hirosaki Univ., [3]Dept. Biochemistry, Okayama Univ. of Science.)

［目的］

植物に生じる様々な生理現象の多くは、その体内で生産される複数の植物ホルモンが相互に作用しあうことにより制御されている。こうした相互作用は、各植物ホルモンの生合成や信号伝達の過程で発生すると予想されるが、それを裏付ける分子レベルでの知見はまだそれほど多く蓄積されてはいない。本研究では、二種の植物ホルモン、ブラシノステロイドとオーキシンとの間の、特に両者の信号伝達過程における相互作用の解析に向けた化学ツールの取得を目的とし、すでに前回の発表において両植物ホルモンの信号伝達をいずれも制御すると考えられる化合物群を市販ライブラリーの中から選抜したことを報告した。そこで今回の発表では、選抜した化合物群の作用解析を進めるため、それぞれの構造類縁体を用いて再評価するとともに、網羅的に遺伝子の発現状況を探査することにより当該化合物の投与で発現量が変化する遺伝子群に関する情報収集を試みた。

［方法および結果］

スクリーニングにより選抜された化合物群は、シロイヌナズナ幼植物体を用いる二つの投与試験系に対していずれも阻害的な作用を示した。すなわち、①オーキシンの量的な変動の影響をほとんど受けず、ブラシノステロイドの量的変化特異的に応答して形態が変わる暗所胚軸伸長応答系において、投与濃度依存的に伸長応答が阻害された。同様に、②ブラシノステロイドの量的変動の影響をほとんど受けず、オーキシンの量的変化によって重力への応答性が変わる評価系においても、投与濃度依存的に重力への応答性の喪失が認められた。そこで、各化合物の構造類縁体を用いて、上記①・②の両試験に供して各応答性への影響を調べたところ、選抜化合物の一つ NJ15 について両試験系に対する阻害強度に高い相関が認められた。そこで、以降は本化合物に重点をおいて検討した。NJ15 の作用点を把握するために当該化合物をシロイヌナズナ幼植物体に投与し、植物体における遺伝子の発現状況について網羅的な解析を実施し、その情報を元に NJ15 の制御様式や相互作用点に関して推測を試みた。

Auxin, Brassinosteroid, Crosstalk

発表番号：2H012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

新規化合物 FPX によるカルス誘導活性、植物成長促進活性およびブラシノステロイド情報伝達における分子機構
Molecular function of novel compound FPX as plant growth regulator

○田中 翔太[1,2]、藤岡 昭三[1]、久城 哲夫[2]、長田 裕之[1]、篠崎 一雄[1]、浅見 忠男[3,4]、中野 雄司[1,4]（[1]理研・CSRS、[2]明治大院・農芸化学、[3]東大院・農生科、[4]JST CREST）
○Shota Tanaka[1,2], Shozo Fujioka[1], Tetsuo Kushiro[2], Hiroyuki Osada[1], Kazuo Shinozaki[1], Tadao Asami[3,4], Takeshi Nakano[1,4] ([1]RIKEN, CSRS, [2]Dep. Agric. Chem., Meiji Univ., [3]Dep. Biol. Sci., Univ. of Tokyo, [4]JST CREST)

【背景・目的】 新規な植物成長調節剤(PGRs)の探索は、植物における未知の成長メカニズムを解明する為の有用なツールとなり得るだけでなく、実用作物への応用展開も期待出来る。本研究では、植物成長の様々なステージで促進的な活性を持つブラシノステロイド（BR）の情報伝達経路に特異的に作用する化合物の発見を目的として、アラビドプシス BR 情報伝達変異体の胚軸伸長を指標にし、理化学研究所のケミカルライブラリーNPDepo から生理活性化合物のスクリーニングを行った。
【方法・結果】 BR 情報伝達因子の機能獲得型変異体 *bil* 群を、ライブラリー化合物含有培地上で暗所発芽させ、7 日目の胚軸伸長を指標に化合物の活性を解析した。その結果、野生型には胚軸伸長阻害活性を示しながら、BR 情報伝達変異体(*BRI1-OX*、*bil5*、*bil8*)は耐性を示す低分子化合物 FPX が得られた。これらの機能より FPX は BR 情報伝達因子の抑制剤としての機能を持つと考察された。

FPX 存在下において、野生型アラビドプシスを明所発芽させた結果、カルス形成が引き起こされることが明らかとなった。このカルスの内生成分について GC-MS で解析した結果、植物体において FPX が加水分解を受け、CPX と PPG に代謝されることが明らかとなった。そこで胚軸切片による活性解析を行った結果、CPX 単剤で細胞初期化活性のオーキシン活性持つことに加え、CPX/PPG 共処理条件でカルス形成が促進される傾向が観察され、PPG はカルスの増殖促進活性を持つと考察された。

PPG 単剤存在下の明所条件で野生型アラビドプシスを発芽させた結果、ロゼッタ葉面積が約 200%、側根数が約 200%に増加する植物成長の明瞭な促進活性が観察された。PPG は既知の植物ホルモン、植物成長促進剤とは全く異なる化学構造を持つ化合物であること、その活性が植物の形態を歪にさせることなく大きくする活性を持つことは、PPG が植物成長の新たなメカニズムを明らかにするための有用なツールとなるだけでなく、実用的にも有用な機能を持つ化合物であることを期待させる。現在、発現応答性遺伝子の RT-PCR 解析、ケミカルビーズ法によるターゲットタンパク質の探索の試行などを開始し、PPG の作用機作についての解析を進めている。

FPX と BR 情報伝達の関係性において、代謝産物 CPX と PPG による胚軸伸長阻害活性は、野生型と BR 情報伝達変異体での胚軸伸長阻害に差は確認されなかった。このことから、代謝前の FPX 本体の活性が重要であると考え、代謝されにくいと考えられる FPX 類縁体 S11 による解析を行ったところ、野生型では胚軸伸長阻害を示し、BR 情報伝達変異体は S11 に対して非常に強い耐性を示した。したがって S11 は BR 情報伝達特異的な阻害活性を持つ化合物であると示唆された。

Plant growth regulator, Brassinosteroid, Target protein

発表責任者：中野雄司（tnakano@riken.jp）

発表番号：2H013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ブラシノライド様化合物の探索と活性評価

# Screening and activity evaluation of brassinolide-like compounds

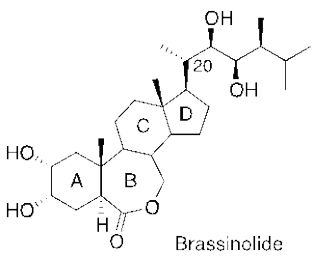
○杉浦 愛理[1]、瀧本 征佑[1]、山上 あゆみ[2]、中野 雄司[2]、中川 好秋[1]、宮川 恒[1] ([1]京大院農、[2]理研 CSRS)
○Airi Sugiura[1], Seisuke Takimoto[1], Ayumi Yamagami[2], Takeshi Nakano[2], Yoshiaki Nakagawa[1], Hisashi Miyagawa[1] ([1]Kyoto Univ., [2]RIKEN)

**【目的】**ブラシノライド（BL）を代表とする植物ステロイドホルモンであるブラシノステロイド（BR）は，極微量で伸長成長や細胞分裂を促進することから，作物の収穫量を増加させる植物生長促進剤として利用が期待できる．また，様々なストレス耐性を誘導することから，寒冷地などにおける作物栽培の応用も期待されている．しかし BR の高い合成コストが実用化の障壁となっている．一方，昆虫やほ乳類のステロイドホルモンについては，非ステロイドアゴニストが開発され農薬，医薬として実用化されている．単純な構造を持つ BL 様活性化合物を見いだすことができれば，BL 様活性化合物を実用化へ導くことが可能と思われる．近年になって，汎用コンピューターの計算能力の向上より，バーチャルなリード（あるいはヒット）化合物の探索手法（インシリコスクリーニング）が開発され，医薬品開発の中心となってきている．2013 年に BRI1 と補助受容体 SERK1 との複合体立体構造[1]が X 線解析によって解明され，受容体の構造に基づいた分子設計が可能になってきた．我々はこれまでにインシリコスクリーニングにより BL 様活性化合物の探索を行い，いくつかの候補化合物を見出してきた．今回はそれらの活性をさらに詳細に検討した結果を報告する．

**【方法】**インシリコスクリーニングソフトウエア LigandScout（inte:ligand 社）を用いてファーマコフォアに基づいたスクリーニングとイネの葉身屈曲試験法により見出された 3 つの化合物について双子葉類における活性を調べるため，化合物を単独処理，ブラシノステロイド生合成阻害剤（Brz）と共処理した培地でシロイヌナズナを生育し，胚軸の長さを測定して BR アゴニストおよびアンタゴニスト活性を求めた．また，薬剤処理を行った植物標本から RNA を抽出し，BR 応答遺伝子の発現量をリアルタイム PCR によって測定し，化合物の有無による遺伝子の発現量の変化を調べた．

**【結果および考察】**

イネの葉身屈曲試験に BL 阻害活性を示した 3 つの化合物は，シロイヌナズナを用いた試験系においても BL の作用を阻害した．またイネの葉身屈曲試験では活性が見られなかった化合物の中にもシロイヌナズナに対する BL の活性を阻害する化合物が新たに 2 つ見つかった．これらの化合物は BL により誘導される BR 応答遺伝子も阻害していたため，BL の受容体結合部位に作用するアンタゴニストとして働いていると考えられる．



Brassinolide

[1] Santiago et al., 2013, *Science*, 6148, 889-892

brassinolide, brassinosteroid, in silico screening

発表番号：2H014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物成長促進剤である酢酸コリンを処理したシロイヌナズナにおいて早期に発現変動する遺伝子の解析

# Gene expression analysis in *Arabidopsis thaliana* after treatment with plant growth promoter, choline acetate

○神村 麻友[1]、小林 毅[2]、蔡 晃植[1] ([1]長浜バイオ大、[2]アグロ カネショウ (株))
○ Mayu KAMIMURA[1], Takeshi KOBAYASHI[2], Fang-Sik CHE[1] ([1]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]AGRO-KANESHO)

酢酸コリンは、植物の成長を促進することが知られており、実際にネギ、タマネギ、ニンニクなどの生育促進剤として使用されている。しかし、この酢酸コリンによる植物生長促進機構については光合成の促進と関与しているという報告があるだけで、その分子機構はほとんど明らかになっていない。そこで、本研究では酢酸コリンによる植物成長促進の分子機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナに酢酸コリンを処理したときに早期に発現変動する遺伝子について調べた。まず、酢酸コリン処理によってシロイヌナズナにおいても成長促進が認められるのかを調べた。酢酸コリンを含む MS プレートにシロイヌナズナを播種し、2 週間 23℃で生育させたところ、10 ppm の酢酸コリンを含む培地で生育させたシロイヌナズナでは、コントロールのシロイヌナズナに比べて葉の枚数や葉の大きさについて差は見られなかったが、乾重量については約 10%の増加が認められた。一方、100、1000 ppm の濃度で酢酸コリンを処理したシロイヌナズナではコントロールに比べて生育の抑制が認められた。次に、シロイヌナズナ T87 培養細胞への酢酸コリン処理による生育促進についても調べたところ、10 ppm の酢酸コリン処理後 8 日目の細胞において、未処理の培養細胞に比べて約 10%の細胞量の増加が認められた。以上のことから、酢酸コリンはシロイヌナズナとその培養細胞に対して生育促進を誘導することが示された。そこで、シロイヌナズナ T87 培養細胞に酢酸コリンを処理し、処理後 1 日、2 日の遺伝子発現プロファイルを 44K オリゴマイクロアレイで解析した。その結果、酢酸コリン処理 1 日目で 4 倍以上発現変動している遺伝子は 1565 個であり、その中で発現上昇している遺伝子は 816 個、発現減少している遺伝子は 749 個であった。さらに、この発現上昇している遺伝子の中で細胞増殖に関わる遺伝子を Gene ontology 解析によりピックアップしたところ、16 遺伝子であった。これらの中には、生育促進を誘導する *COBRA-like protein 10* や根の成長、植物体重量に関与する *Phospholipase D epsilon* などが含まれていた。さらに、光合成に関与する *Aldolase1* などの 5 遺伝子も含まれていた。今後これらがコリンによる成長促進に寄与しているかを調べていく予定である。

plant growth promoter, transcriptome

発表番号：2H015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ヒメツリガネゴケ原糸体の分化に関与するジベレリン様成長制御物質の探索

# Purification and identification of endogenous regulators that metabolites from *ent*-kaurenoic acid in *Physcomitrella patens*

○宮崎 翔[1]、Yang Che-Dong[1]、Park Seung-Hyun[1]、川出 洋[2]、林 謙一郎[3]、浅見 忠男[1]、中嶋 正敏[1] ([1]東大院農生科、[2]東京農工大院農、[3]岡山理大理)
○Sho MIYAZAKI[1], Che-Dong Yang[1], Seung-Hyun Park[1], Hiroshi Kawaide[2], Ken-ichiro Hayashi[3], Tadao Asami[1], Masatoshi Nakajima[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Inst. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Fac. Sci., Okayama Univ. of Sci.)

【背景・目的】　ジベレリン(GA)は植物が生産するジテルペノイド化合物であり、種子発芽や茎の伸長などを制御する植物ホルモンである。コケ植物であるヒメツリガネゴケ（*Physcomitrella patens*）は *ent*-カウレン合成酵素（PpCPS/KS）と *ent*-カウレン酸化酵素により、顕花植物と同様に GGDP から *ent*-カウレン酸までの生合成能を有している。しかし、顕花植物とは異なり *ent*-カウレン酸酸化酵素以降の GA 合成酵素群が欠如しており、活性型 GA も検出されない。*ent*-カウレン酸以降の代謝物を解析するために作出した PpCPS/KS 欠損型変異体は、赤色光下において原糸体の分化過程が抑制される形質を認めた。この抑制形質は *ent*-カウレンあるいは *ent*-カウレン酸の投与により回復傾向を示すのに対して、活性型 GA の投与では回復を示さなかった。これらのことから、ヒメツリガネゴケの原糸体では顕花植物でみられる GA の生合成が *ent*-カウレン酸で中断されるかわりに、未同定の *ent*-カウレン酸代謝産物が生合成され、分化誘導を制御していると考えられる。演者らはこの GA 様新奇生長制御物質に興味を持ち、その生合成過程および信号伝達制御機構の解明を主な目的として、*ent*-カウレン酸からの代謝物質を追跡してきた。

【方法・結果】　逆相 HPLC を基本とする破砕抽出物の精製を経て得られた画分について、生物活性試験を行い分化誘導活性を評価したところ、*ent*-カウレン酸より高極性の活性物質が存在することを確認した。分子構造に関する情報を得るため当初 ESI モードによる LC-MS/MS に供したところ、*ent*-カウレン酸などの低極性物質を LC-MS/MS で検出および定量を試みようとすると、特異的かつ感度の良いフラグメントイオンが認められないために MRM モードでの測定は難しく、SIM モードを用いた LC-MS/MS もしくは GC-MS による測定に頼らざるを得なかった。この状況を打開するため、ESI モードによる LC-MS/MS 測定においてフラグメントイオンを生じにくい化合物の特徴を活かし、Q1 と Q3 が同一の MRM チャンネルを設定することで選択性を高め、SIM モードによる測定を上回る *ent*-カウレン酸の高感度 MRM 測定系を構築した。この方法を用いることで植物破砕抽出物から *ent*-カウレン酸の微量検出が可能となった。現在、同方法を分取した精製画分に適用し、*ent*-カウレン酸由来の代謝物を分析している。

Gibberellin, Physcomitrella, diterpene

発表番号：2H016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネのストリゴラクトン生産におけるリンとサイトカイニンの影響

# Effects of phosphate and cytokinin on strigolactone production in rice

○米山 香織、米山 弘一、野村 崇人（宇都宮大学）
○Kaori YONEYAMA, Koichi YONEYAMA, Takahito NOMURA (Utsunomiya Univ.)

[背景および目的]
根から分泌されるストリゴラクトン（SL）は、根寄生植物の発芽刺激活性物質および内生共生を形成するアーバスキュラー菌根（AM）菌の菌糸分岐誘導物質として作用する。一方植物体内では、地上部枝分かれを抑制する植物ホルモンとして機能する。リン（P）欠乏条件で前培養したイネの根にサイトカイニン（CK）を与えると、根の SL 含量が低下する。また、P は SL 生産に対して抑制的に作用することが明らかになっている。そこで本研究では、イネの SL 生産における P と CK の影響を詳細に解析した。
[結果および考察]
培地中の P と CK の濃度の上昇に従って、イネの根の SL 含量が減少した。そこで、SL 生産を 70%程度阻害する濃度の P と CK を同時に与えたが、相加的あるいは相乗的阻害効果は認められなかった。この結果から、P と CK は SL 生産・分泌調節に関わる同じ（あるいは極めて近い）部位を制御していることが示唆された。次に、根分け法を用いて P と CK がイネの根の SL 含量に与える影響を調べたところ、P はシステミックに、一方、CK は局所的に SL 含量を低下させた。P が CK 生合成/シグナル受容・伝達経路に与える影響も併せて報告する。

strigolactone, phosphate, cytokinin

発表責任者：米山香織（kaoriyoneyama@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

発表番号：2H017
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# A 環が水酸化された CL の MAX1 酵素及び植物による変換産物の解析

# Analysis of the conversion products of A-ring-hydroxylated carlactones by MAX1 and in roots.

○森 愛美[1]、米山 香織[2]、謝 肖男[2]、野村 崇人[2]、米山 弘一[2]、秋山 康紀[1]([1]阪府大院・生命環境、[2]宇都宮大学バイオサイエンス教育研究センター)
○Narumi Mori[1], Kaori Yoneyama[2], Xiaonan Xie[2], Takahito Nomura[2], Koichi Yoneyama[2], Kohki Akiyama[1] ([1]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Ctr. Biosci. Res. & Educ., Utsunomiya Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（strigolactone, SL）は植物の枝分かれを抑制するホルモンであり，アーバスキュラー菌根菌や根寄生雑草に対する根圏情報物質としても作用する。SL 生合成において，D14, CCD7, CCD8 酵素により β-カロテンからカーラクトン（carlactone, CL）が生成する。シロイヌナズナとイネのシトクロム P450 酵素である AtMAX1 と Os900 はそれぞれ CL を CLA(carlactonic acid, CLA)と 4-デオキシオロバンコール（4-deoxyorobanchol, 4DO）に変換する。昨年度の本大会で，我々はミヤコグサ（*Lotus japonicus*）の根を用いた取り込み実験において $^{13}$C 標識 CL と CLA がどちらも 5-デオキシストリゴール（5-deoxystrigol, 5DS）に変換されるにもかかわらず，ミヤコグサ MAX1 を発現させた酵母菌体を用いた反応では CL は CLA までしか変換されないことを報告した。ミヤコグサには MAX1 ホモログが一つしか存在しないことを考え合わせると，LjMAX1 による 5DS 生成において CL が真の基質ではない可能性や MAX1 によって作られた CLA が MAX1 以外の酵素によってストリゴール型 SL に変換される可能性が考えられる。Al-Babili らは Os900 による CL の 4DO への変換では CLA の 18 位のメチル基が水酸化された 18-HO-CLA が反応中間体として生成するという仮説を提唱している。また，Bruno らは CCD7 がゼアキサンチンやルテインなどの水酸化修飾されたカロテノイドも切断することを明らかにし，水酸化 CL が存在する可能性を示している。以上のことは，構造多様性に富む SL の生合成を解明する上で A 環が水酸化修飾された CL が鍵化合物であることを強く示唆している。そこで本研究では，18-及び 4-ヒドロキシカーラクトン（18- and 4-hydroxycarlactone, 18- and 4-HO-CL）とそれらの $^{13}$C 標識化合物をそれぞれ合成し，それらを基質としてミヤコグサ，ワタ及びイネの MAX1 による変換実験を行うとともに，ミヤコグサとワタの根への取り込み実験に供することにより，水酸化 CL が MAX1 酵素及び植物体それぞれでどのような変換を受けるのかについて検討したので報告する。
【方法及び結果】ミヤコグサとワタの MAX1 遺伝子をガラクトース誘導性酵母発現ベクターpYeDP60 に組み込み，シロイヌナズナの NADPH-P450 還元酵素遺伝子がゲノムに挿入された酵母 WAT11 株に形質転換した。形質転換酵母の菌体からミクロソーム画分を調製し，NADPH と基質を添加したリン酸バッファー中で酵素反応を行った。生成物を酢酸エチルで抽出した後，LC-MS/MS により分析した。LjMAX1 と GhMAX1 の変換実験では CL から CLA を，また 4-HO-CL から 4-ヒドロキシカーラクトン酸と推測される化合物を検出したが，ストリゴールは検出されなかった。現在，取り込み実験に用いる $^{13}$C 標識 4-HO-CL 及び 18-HO-CL の合成を行っている。

strigolactone, MAX1, carlactone

発表責任者：森 愛美（sv201042@edu.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2H018
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネ属におけるファイトアレキシン生産能の進化動態
# Evolutionary dynamics of phytoalexin productions in wild rice genus *Oryza*

○明石 翔大[1]、宮本 皓司[2]、藤田 雅丈[3]、Matthew Shenton[3]、古海 弘康[3]、倉田 のり[3]、豊増 知伸[4]、山根 久和[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・理工、[3]遺伝研、[4]山形大・農)
○ Shota AKASHI[1], Koji MIYAMOTO[2], Masahiro FUJITA[3], Shenton Matthew[3], Hiroyasu FURUUMI[3], Nori KURATA[3], Tomonobu TOYOMASU[4], Hisakazu YAMANE[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]National Institute of Genetics, [4]Yamagata Univ.)

【背景・目的】イネは外敵から身を守るために病虫害抵抗性物質であるファイトアレキシンを生産することが知られている。栽培イネの *Oryza sativa* は 17 種のファイトアレキシンを生産するが、そのうちジテルペン型のファイトカサン類、モミラクトン類は、生合成遺伝子群がイネゲノムの 2 番染色体と 4 番染色体上でそれぞれ遺伝子クラスターを形成し、病虫害応答時に同調的な発現誘導を示す。すなわち、栽培イネにおけるファイトアレキシンの生産誘導は、イネと人の両者にとって重要な有用形質であると言える。栽培イネは祖先種の野生イネから人の手で約 1 万年の育種期間を経て得られたが、祖先種の *Oryza* 属におけるファイトアレキシン生産や遺伝子クラスターの存在については未解明であった。本研究では、主に生合成遺伝子がクラスターを形成しているファイトカサンとモミラクトンと、フラボノイド型ファイトアレキシンであるサクラネチンを対象に、*O. sativa* に近縁の *O. rufipogon* (AA ゲノム)から遠縁の *O. brachyantha* (FF ゲノム)までの様々な野生イネについて、ファイトアレキシンの生産能の進化的動態を追った。
【方法・結果】野生イネの材料としては、AA ゲノムの *O. rufipogon*、*O. meridionalis*、*O. glumaepatula*、*O. longistaminata*、BB ゲノムの *O. punctata*、CC ゲノムの *O. officinalis*、FF ゲノムの *O. brachyantha* を用いた。また *Oryza* 属の近縁他属として *Leersia perrieri* についても解析を行った。播種後 1 ヶ月程度のイネの葉身切片を 0.5 mM 塩化銅水溶液中で 3 日間浸漬処理することでファイトアレキシンの生産を誘導し、80%メタノールで抽出後、LC/MS/MS で分析した。その結果、分析した全ての AA ゲノムの種では、ファイトカサン、モミラクトンともに生産の誘導が確認されたが、サクラネチンについては種により生産性が異なっていた。BB ゲノムの *O. punctata* では、モミラクトンのみ生産されており、ファイトカサンとサクラネチンの蓄積は認められなかった。CC ゲノム以降の野生イネでは既知のファイトアレキシン生産は認められなかった。興味深いことに *Oryza* 属より前に分岐した *L. perrieri* では特定のファイトカサン類の生産が認められた。ゲノム情報と照らし合わせるとジテルペン型ファイトアレキシンの生産能と遺伝子クラスターの存在には相関が認められた。また、サクラネチンについては現存する AA ゲノム内においても生産の有無が多様であり、生合成遺伝子への変異の蓄積が起こりやすいことが推察された。

*Oryza* , phytoalexin, gene cluster

発表番号：2H019
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネのジテルペン系フィトアレキシン生合成遺伝子クラスターの進化過程

# Evolutionary trajectory of diterpene phytoalexin biosynthetic gene clusters in rice

宮本 皓司[1]、藤田 雅丈[2]、Shenton Matthew[2]、坂井 亜莉里[3]、菅原 千都[3]、川出 洋[4]、長谷川 守文[5]、三橋 渉[3]、山根 久和[1]、倉田 のり[2]、岡田 憲典[6]、○豊増 知伸[3]（[1]帝京大バイオ、[2]遺伝研、[3]山形大農、[4]農工大農、[5]茨城大農、[6]東大応生セ）

Koji Miyamoto[1], Masahiro Fujita[2], Matthew Shenton[2], Arisa Sakai[3], Chizu Sugawara[3], Hiroshi Kawaide[4], Morifumi Hasegawa[5], Wataru Mitsuhashi[3], Hisakazu Yamane[1], Nori Kurata[2], Kazunori Okada[6], ○Tomonobu Toyomasu[3] ([1]Teikyo Univ., [2]NIG, [3]Yamagata Univ., [4]Tokyo Univ. of Agric. Technol., [5]Ibaraki Univ., [6]Univ. of Tokyo)

【背景・目的】栽培イネ *Oryza sativa*（Os）が生産するジテルペン系フィトアレキシンのファイトカサンとモミラクトンの生合成遺伝子は､2 番染色体と 4 番染色体でクラスターをなすことが知られている（それぞれ Os02g､Os04g クラスターと命名）。これは、同じジテルペノイドである植物ホルモン・ジベレリンの生合成遺伝子が染色体上に点在することと対照的である。Os02g クラスターはジテルペン環化酵素遺伝子 *OsCPS2*、*OsKSL5, 6, 7*、P450 遺伝子 *CYP76M5～8*、*CYP71Z6, 7* を含み、Os04g クラスターは *OsCPS4*、*OsKSL4*、*CYP99A2, 3*、脱水素酵素ファミリーに属する momilactone A synthase（MAS）遺伝子 *OsMAS1, 2* を含む。本研究では、この 2 種のクラスターの形成機構について野生イネゲノム情報を利用した比較ゲノム学により追究することを目的とした。

【方法・結果】Os と同じ AA ゲノム種の野生イネについてはほぼ同じ遺伝子構成であったので、本研究では、BB ゲノム種の *Oryza punctata*（Op）、遠縁の FF ゲノム種の *Oryza brachyantha*（Ob）、*Oryza* 属の近縁他種 *Leersia perrieri*（Lp）のゲノム情報を用いた。データベース情報を精査した結果、Op では 02g クラスターでは 2 種の P450 以外ほとんどの遺伝子が欠落していたが、04g クラスター内の遺伝子は全て保存されていた。Ob では、それぞれのクラスターで *CYP76M* ホモログが 4 種、*CYP99A* ホモログが 2 種みられただけであった。Lp では 04g クラスターは存在しなかったが、02g クラスターでは Os とは座乗様式が異なるが相同遺伝子がクラスター化していた。以上より、Os02g クラスターの原型は *Oryza* 以前から存在していたものの、途中 Ob や Op のように系統によっては欠落したものもあり、Os に至るまでに再編されて完成したと考えられ、一方で 04g クラスターは *Oryza* 属誕生後に CYP99A 先祖遺伝子獲得を端緒にして遅くとも BB ゲノム種派生までに構築された可能性が示唆された。本発表では、CPS と MAS の組換え酵素を用いた機能解析の結果についてもあわせて考察する予定である。

diterpene biosynthesis, rice, evolution

発表責任者：豊増知伸（toyomasu@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：2H020
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ダイズ耐塩性に関わる機能未知タンパク質 GmTDF-5 のユビキチンープロテアソームによる制御
# Regulation of a function-unknown protein GmTDF-5 involved in soybean salt tolerance through the ubiquitin-proteasome degradation

○小川 佳祐、木村 愛、佐藤 光朗、小島 俊雄（茨城大農）
○Keisuke Ogawa, Ai Kimura, Mitsuaki Sato, Toshio Kojima (Ibaraki Univ.)

ダイズの塩ストレス応答遺伝子 *GmTDF-5*（*Glycine max Transcript-Derived Fragment-5*）は、367 アミノ酸残基からなる機能未知なタンパク質をコードしている。GmTDF-5 はタンパク質との結合性を示すアルマジロリピート構造を形成しており、N 末端側にはロイシンジッパーモチーフ、C 末端側にはホモログ間で高度に保存された領域(約 60 アミノ酸長)を有している。これまでの研究で、*GmTDF-5* の過剰発現がシロイヌナズナの耐塩性を高めること、塩ストレス処理したダイズでは 24 時間以内に多くの組織で転写されることから、GmTDF-5 はダイズ耐塩性機構の活性化プロセスで重要な役割を果たしていると推察された。一方で、同遺伝子の転写が確認された組織ではタンパク質が検出されず、タンパク質レベルでの機能制御や組織分布が不明なままであった。近年、GmTDF-5 がプロテアソーム阻害剤である MG-132 で処理したダイズのタンパク質抽出液中で検出され、同タンパク質の機能発現に選択的なタンパク質分解系として知られるユビキチン–プロテアソームが作用していることが示唆された。

そこで本研究では、GmTDF-5 タンパク質の発現がユビキチン–プロテアソームによりどのように制御されているかを明らかにするため、Lys 残基を Ala 残基に置換した変異型 GmTDF-5 タンパク質を用いて、ユビキチン化の標的となる Lys 残基を特定することにした。先行研究*で、GmTDF-5 の N 末端側 100 残基以内にユビキチン–プロテアソームが作用する Lys 残基が存在すると推測されたことから、同領域内に存在する 4 つの Lys 残基（$^{8}$K、$^{20}$K、$^{38}$K、$^{65}$K）をそれぞれ Ala 残基に置換した変異型 N 末端タンパク質を作製した。100 mM NaCl で 24 時間処理したダイズ幼個体全組織から調製したタンパク質抽出液に、GST を融合した変異型 N 末端タンパク質を添加し、Lys 残基の変異が GmTDF-5–N 末端タンパク質の分解性に及ぼす影響を解析したところ、塩ストレス処理・未処理抽出液のいずれにおいても、$^{20}$K を変異させたタンパク質が分解されにくくなることを突き止めた。この結果は、$^{20}$K がユビキチン化の標的となる Lys 残基であることを示唆している。現在、$^{20}$K 変異型 GmTDF-5–全長タンパク質を用いた同様の解析を進めており、これらの結果と合わせて、ユビキチン–プロテアソームによる GmTDF-5 の発現制御メカニズムを考察したい。

*木村愛ら、日本農芸化学会 2014 年度大会発表

Salt stress, Armadilo repeat, Ubiquitin-proteasome

発表番号：2H021
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ダイズ塩ストレス応答における機能未知遺伝子 GmTDF-5 の転写制御機構

Transcriptional regulation of *GmTDF-5*, a soybean gene of function unknown, in response to high-salt stress.

○須藤 弘樹、鈴木 美緒、木村 愛、野口 和斗、小島 俊雄（茨城大農）
○Koki SUTO, Mio SUZUKI, Ai KIMURA, Kazuto NOGUCHI, Toshio KOJIMA (Ibaraki Univ.)

ダイズ遺伝子 *GmTDF-5*（*Glycine max* Transcript-derived Fragment-5)は、アルマジロリピート構造を有する機能未知なタンパク質をコードしている。同遺伝子の過剰発現はシロイヌナズナの耐塩性を向上させており、GmTDF-5 タンパク質がダイズの塩ストレス応答・耐性機構で重要な役割を果たすことを示唆している。一方、*GmTDF-5* の塩ストレス応答は、ダイズ上葉、下葉、茎、根のいずれの組織でも確認されており、特に地上部器官で強い応答が観察されている。原子吸光分析により各ダイズ組織に蓄積した $Na^+$イオン量との関連を調べたところ、*GmTDF-5* の転写は $Na^+$イオンの蓄積に伴い増加しており、組織（もしくは細胞内）の $Na^+$イオン濃度に対して敏感に応答できることが推察された。また、乾燥や高浸透圧、アブシジン酸に対しても転写誘導されており、*GmTDF-5* の分子機能は広範な水分ストレス応答に関与していることが明らかとなった。

そこで本研究では、塩ストレスに応答する *GmTDF-5* の転写調節機構を明らかにするため、同遺伝子上流、隣接遺伝子までの約 4.8 kb をプロモーター領域とし、詳細な構造解析を行った。まず、蛍光プライマー伸長法により *GmTDF-5* の転写開始点 TSS を決めたところ、主要な TSS が開始コドンから上流-43 bp に存在することが明らかとなった。TSS 近傍には TATA ボックス様の塩基配列が見られないことから、*GmTDF-5* は TATA-less 型のコアプロモーターをもつと推察された。次に、*GmTDF-5* プロモーター領域 4.8 kb の塩基配列をもとに、他の植物ホモログ遺伝子のプロモーター領域に対する塩基配列の相同性、及び PLACE による植物シス因子の分布を調べたところ、遺伝子上流-2,900 bp 付近と-2,600 bp 付近に 100 bp 長ほどの高度保存領域が存在すること、水分ストレス応答を制御する複数のシス因子が座乗していることが明らかとなった。これらの保存領域・シス因子群と *GmTDF-5* の転写との関連を明らかにするために、長さが異なる *GmTDF-5* プロモーター8 領域で制御されるルシフェラーゼ発現プラスミドを構築し、パーティクルガンを用いたプロモーター解析を実施した。その結果、各プロモーターのルシフェラーゼ活性から、遺伝子から上流-0.2 kb 以内に *GmTDF-5* の塩ストレス応答性を高める基本的な転写制御領域の存在が示唆された。同領域には、塩ストレスや病原菌に対する迅速な転写誘導に関わるシス因子 GT-1 モチーフ（GAAAAA）が存在しており、*GmTDF-5* の塩ストレス応答が GT-1 シス因子と GT-1 様転写因子の相互作用により制御されている可能性が示された。

Luciferase-based promoter analysis, *cis* -elements, Conserved Non-coding Sequences

発表番号：2H022
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 継続的な End-of-day 光照射はタバコのニコチン含有量に影響を与える

# Effects of successive treatments of end-of-day light irradiation on nicotine contents in tobacco

○伊藤 隼[1]、雨木 若慶[2]、渡邊 博之[1] ([1]玉川大院農、[2]東農大農)
○Jun ITO[1], Wakanori AMAKI[2], Hiroyuki WATANABE[1] ([1]Tamagawa Univ., [2]Tokyo Univ. Agri.)

[目的] 植物において、光環境により二次代謝が変化することは既知であり、光受容体が二次代謝調節に関与している可能性が示されている。本実験では、赤色光（R:660 nm）と遠赤色光（FR:730 nm）の受容体であるフィトクロムに着目し、End-of-day 赤色光照射（EOD-R）および End-of-day 遠赤色光照射（EOD-FR）処理期間とタバコのニコチン蓄積の関係について調査した。本報における EOD 光照射は、低強度（5 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$）、短時間（5 分間）の光を栽培明期の終わりに照射し、フィトクロムの生理応答を誘導する方法である。

[方法および結果] 白色蛍光灯下（16 時間明期／8 時間暗期、光強度 100 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$）で育苗したタバコ（*Nicotiana tabacum* ‘Samsun’）に、設定された期間中は毎日、上記の条件で EOD 光処理を行った。全体の栽培期間を 4 週間とし、育苗期間を 4、3、2、1 週間、EOD 光照射期間を 0、1、2、3 週間とする 4 処理区（4＋0、3＋1、2＋2、1＋3 処理区）を設定した。4 週間の栽培終了後に生育調査を行い、総乾物重、葉柄長、茎長、節間長を測定した。タバコは根で合成したニコチンを葉に蓄積することが知られており、各器官別にニコチン含有量を測定した。

EOD 光処理期間の増加に伴い、EOD-FR 区で葉柄長、茎長、節間長が増加した。2＋2 処理区の EOD-R と EOD-FR 照射において各器官のニコチン含有量に有意な差は認められなかった。1＋3 処理区では、葉におけるニコチン含有量が EOD-R 区で高く、茎や根では EOD-FR 区に比べ EOD-R 区で低かった。これらの結果より、1 週間以上の EOD 光処理が光形態形成を誘導し、2 週間を超える EOD-R 照射はニコチンの根から葉への輸送活性を促進したが、EOD-FR 処理では EOD-R 処理で認められたような輸送活性の促進は誘導されないことが示唆された。一方で、1＋3 処理区における EOD-R および EOD-FR 処理での株あたりの総ニコチン含有量は、4+0 や 2+2 処理区における総ニコチン含有量よりも高かった。このことから、R、FR の光質に関わらず、EOD 光照射がニコチンの生合成を促進する可能性が示唆された。

EOD-R 処理がニコチンの輸送に与える影響が、EOD-R 処理直後の FR 照射によって打ち消されるかどうかを調査するために、5 分間の EOD-R 処理後さらに 5 分間の FR 処理を行った（EOD-R-FR 区）。その結果、EOD-R-FR 区における葉のニコチン含有量は、EOD-R 区よりも高いことが判明した。このことから、EOD-R 処理によって生じると考えられるニコチン輸送促進のシグナルは、その後に与えられる FR のシグナルによって打ち消されず、優先的に伝達する可能性が示唆された。

Photomorphogenesis, Phytochrome, Secondary metabolism

発表責任者：渡邊 博之（watahiro@agr.tamagawa.ac.jp）

発表番号：2H023
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

異なる光質と光強度下で栽培したリーフレタスのメタボローム解析
Metabolome analysis on lettuce grown under different light quality and intensity
○福山 太郎[1]、内田 笙太郎[2]、三ツ木 智子[2]、草野 都[3]、七夕 高也[4]、渡邊 博之[1]([1]玉川大院農、[2]玉川大農、[3]筑波大生、[4]理研 CSRS)
○Taro Fukuyama[1], Shotaro Uchida[2], Noriko Mitsugi[2], Miyako Kusano[3], Takanari Tanabata[4], Hiroyuki Watanabe[1] ([1]Graduate school of Agriculture, Tamagawa Univ., [2]Faculty of Agriculture, Tamagawa Univ., [3]Faculty of Life and Envionental Sciences, Tsukuba Univ., [4]RIKEN CSRS)

【背景および目的】
光環境が植物の代謝物に及ぼす影響についての網羅的研究は、モデル植物では多く行なわれているがレタスに代表されるような葉菜類では研究例が少ない。そこで本研究では、様々な光質および光強度下で栽培した２種類の異なるレタスのメタボローム解析を行い、光環境がレタスの代謝物に与える影響について調査を行った。本発表では、植物の一次代謝物が多く含まれる GC-MS の解析結果について報告する。
【材料および方法】
材料はリーフレタス（*Lactuca sativa*）で、赤く着色するレッドファイアー（RF）、赤く着色しないグリーンウェーブ（GW）の 2 品種を用いた。光質条件は、LED を用いた赤単色（R）、青単色（B）、赤青混合（RB、赤:青=7:3）および白色蛍光灯（FL）とした。光強度条件は、R、B および RB、それぞれ 150 および 300 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ の 2 条件とし、FL については 150 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ の 1 条件とした。光周期は 24 時間明期条件とした。白色蛍光灯下で育苗を行い、本葉第 5、6 葉が出葉した苗を光処理区に定植した。光処理 21 日後にサンプリングを行った。分析サンプルは、老化葉として本葉の第 5、6 葉、若葉として新葉から数えて 6–9 番目の葉を用いた。GC-TOF-MS を用いて、メタボローム解析を行った。測定データは、JMP11 を用いて品種ごとに主成分分析（PCA）および階層クラスタリングを行った。
【結果および考察】
PCA の結果、第 1 主成分および第 2 主成分は、RF、GW に共通した傾向が認められた。第 1 主成分は、葉齢の影響が見られた。第 2 主成分は、光質の影響が認められた。RF の第 3 主成分は、R、B と RB、FL で分離しており、これは単色光と混合光の差に起因していると考えられた。他方で、GW の第 3 主成分では、特徴的な傾向は認められなかった。これらの結果から、光質の変化による代謝物への影響は GW にくらべ RF で大きいと推測された。また、光強度の影響は PCA で観察されなかったことから、葉齢や光質に比べて影響が小さいと推測された。
階層クラスタリングの結果、RF では最上位のクラスターが老化葉と若葉でそれぞれ形成された。この下の階層では赤色光を含む光質（R、RB、FL）と赤色光を含まない光質（B）で別のクラスターが形成された。この結果から、RF において赤色光の代謝物に対する影響力は、青色光に比べて強い可能性が示唆された。

Leaf age, Plant factory, Oxidant stress

発表責任者：福山太郎（fkymt8sa@agrs.tamagawa.ac.jp）

発表番号：2H024
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

イネにおけるストレス誘導的なジャスモン酸生産への malondialdehyde の関与
Involvement of malondialdehyde in stress-induced production of jasmonic acid in rice

○石田 翼[1]、田代 裕也[1]、鶴見 明彦[1]、宮本 皓司[1]、見目 凌[1]、酒澤 智子[1]、湯本 絵美[1]、柴田 恭美[1]、朝比奈 雅志[1]、横田 孝雄[1]、飯野 盛利[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[1]（[1]帝京大バイオ、[2]大阪市大院理、[3]東大生物工学セ）
○Tsubasa Ishida[1], Yuya Tashiro[1], Akihiko Tsurumi[1], Koji Miyamoto[1], Ryou Kenmoku[1], Tomoko Sakazawa[1], Emi Yumoto[1], Kyomi Shibata[1], Masashi Asahina[1], Takao Yokota[1], Moritoshi Iino[2], Kazunori Okada[3], Hisakazu Yamane[1] ([1]Teikyo Univ., [2]Osaka City Univ., [3]The Univ. of Tokyo)

【背景と目的】
植物ホルモンの一種であるジャスモン酸(JA)は、傷害、重金属への暴露および病原菌の感染などの様々なストレスによって早期に誘導され、それらのストレスに対する植物の防御応答において重要な機能を果たしている。植物がストレスを受容すると、まず少量の JA の生産が誘導され、生成した JA により JA 生合成系がさらに活性化する正の feedback 制御が機能していると考えられるが、その詳細はほとんど未解明の状態である。一方、植物や動物などにおいて、様々な環境ストレスに応答して活性酸素種が生成することが知られている。生成した活性酸素種は多価不飽和脂肪酸の非酵素的な酸化分解を引き起こし、malondialdehyde (MDA)などの反応性の高いカルボニル化合物が生成する。カルボニル化合物はタンパク質などに化学的に結合し細胞毒性を示すことが知れているだけでなく、ストレスに対する植物の防御応答を誘導するシグナル分子として機能する可能性が報告されている。そこで、本研究においては、イネにおけるストレス応答的な JA の初期生産にカルボニル化合物が関与する可能性について検討した。
【方法と結果】
まず、MDA がイネにおいて JA の生産を誘導する活性を持っているかについて検討を行った。密閉容器内にイネ葉身切片を静置し、0 から 200 μM までの 6 段階の濃度で MDA の気相暴露を行った。暴露後 4 時間における JA および JA-Ile の内生量の定量を行った結果、MDA 濃度依存的に JA および JA-Ile の蓄積が誘導された。また、100 μM の MDA を暴露した後の JA および JA-Ile の内生量の経時変化を解析したところ、JA および JA-Ile ともに処理後 1 時間から内生量の増加が見られ、4 時間まで内生量が増加し続けた。次に、ストレス処理により MDA の蓄積が誘導されるか検討を行った。イネ葉身切片に塩化銅処理を行い、処理後の MDA の蓄積を解析した結果、処理後 30 分から 2 時間にかけて MDA の蓄積量の増加が見られた。これらのことからイネにおいて塩化銅処理後に MDA が生成し、MDA が JA の生産誘導を誘導するシグナル分子として機能している可能性が考えられる。現在は、傷害処理後における MDA の内生量の定量を行うとともに、活性カルボニルが化学的に結合したタンパク質の内生量の定量も行っている。さらに、(*E*)-2-ヘキセナール、(*E*)-2-ペンテナール、クロトンアルデヒド、アクロレインなどのカルボニル化合物についても同様の解析を行っており、これらの結果についても報告する予定である。

rice, environmental stress, oxylipins

発表責任者：宮本　皓司（miyamoto@nasu.bio.teikyo-u.ac.jp）

発表番号：2H025
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アブシジン酸により発現誘導されるシロイヌナズナ MAPKKK の機能解析
# Function of ABA inducible MAPKKKs in Arabidopsis

○松岡 大介、南森 隆司（神戸大自然科学系先端融合研究環）
○Daisuke MATSUOKA, Takashi NANMORI (Kobe Univ.)

アブシジン酸（ABA）は環境ストレス応答や発生、成長において重要な役割を担っている植物ホルモンである。ABA のシグナル伝達には受容体である PYR/PYL/RCAR、脱リン酸化酵素である PP2C、プロテインキナーゼである SnRK2 を介したシグナル伝達系が報告されている。またそれ以外にも三量体 G タンパク質、セカンドメッセンジャー、MAPK MAPKK MAPKKK の 3 種のリン酸化酵素からなる MAPK カスケードの関与も知られているがその詳細については不明な点も多い。

MAPK カスケードは植物の生物的・非生物的ストレス応答や植物ホルモンに対する応答、細胞分裂の制御など様々な細胞機能の制御過程において重要な役割を果たすシグナル伝達系である。シロイヌナズナゲノムには、それぞれ 20 種（MAPK）、10 種（MAPKK）、80 種（MAPKKK）の遺伝子が存在し、そのことからもこのシグナル系を植物が発達させてきたことが分かる。我々は酵母の two-hybrid system を利用したタンパク質間相互作用解析により ABA で発現誘導される MAPKKK の 1 種である MAPKKK18 が MAPKKK18-MKK3-MPK1/2/7 カスケードを形成することを明らかにし、同経路が ABA シグナル伝達系において機能する可能性を示した（Matsuoka *et al.* Plant Mol. Biol. 2015）。

また MAPKKK18 およびキナーゼ不活性型 MAPKKK18 を過剰発現するシロイヌナズナを作出し、その成長を解析したところ MAPKKK18 過剰発現植物では葉の老化が促進され小型化し、一方不活性型 MAPKKK18 過剰発現植物では老化が抑制されることにより活発な成長が観察された。さらに水分損失や ABA 依存的な老化に対するこれら植物の応答性から MAPKKK18 過剰発現植物で見られた表現型は ABA シグナルが促進されたことで生じ、また不活性型 MAPKKK18 過剰発現植物では ABA シグナルが阻害されることで活発に成長すると考えられた。さらに MAPKKK18 と同様に ABA により発現誘導される MAPKKK17 についてもその過剰発現植物を作製し、その成長を解析した。MAPKKK17 過剰発現植物では MAPKKK18 と同様に成長が抑制され、またキナーゼ不活性型の MAPKKK17 過剰発現植物では活発な成長が観察された。以上の結果は ABA により発現誘導されるこれらの MAPKKK 遺伝子が植物の成長を調節する重要な遺伝子であることを示している。これらの研究成果を踏まえ、ABA シグナル伝達における MAPK カスケードの役割について議論したい。

MAPKKK, ABA, Growth regulation

発表責任者：松岡　大介（matsuoka@people.kobe-u.ac.jp）

発表番号：2H026
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ孔辺細胞におけるジャスモン酸とエチレンのシグナルクロストーク

# Signal crosstalk between jasmonate and ethylene in Arabidopsis guard cells

○宗正 晋太郎[1]、平尾 友加里[2]、田浪 かすみ[2]、中村 宜督[1]、村田 芳行[1] ([1]岡山大院・環境生命、[2]岡山大・農)
○ Shintaro MUNEMASA[1], Yukari HIRAO[2], Kasumi TANAMI[2], Yoshimasa NAKAMURA[1], Yoshiyuki MURATA[1] ([1]Okayama Univ. Graduate School of Environmental and Life Science, [2]Okayama Univ. Faculty of Agriculture)

植物の葉の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞から成る小孔であり、開閉運動を行うことで二酸化炭素の取り込みや蒸散による水分放出を調節する働きを持つ。ジャスモン酸とエチレンは、植物の発達や病傷害応答などを含む様々な生理学的過程の制御を行う植物ホルモンである。最近の研究によって、ジャスモン酸とエチレンは、気孔開閉運動の制御にも関与することが明らかとなった。発達や病傷害応答の制御系において、ジャスモン酸とエチレンのシグナル伝達クロストークが存在することが明らかとなっている。しかしながら、気孔開閉運動の制御、すなわち孔辺細胞内においてもジャスモン酸とエチレンのシグナル伝達クロストークが存在するか否かは不明である。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、孔辺細胞におけるジャスモン酸とエチレンのシグナル伝達クロストークについて調査した。

シロイヌナズナ野生株において、エチレン前駆体である 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸（ACC）またはエチレン発生剤エテホンの前処理によって、ジャスモン酸メチルが誘導する気孔閉口が抑制されことから、気孔閉口応答を制御するジャスモン酸とエチレンのシグナル伝達の間には、拮抗的な相互作用があることが明らかとなった。ジャスモン酸とエチレンのシグナル伝達クロストークの分子機構を明らかにするために、ジャスモン酸誘導気孔閉口に関与する Open Stomata 1（OST1）タンパク質キナーゼの活性、また原形質膜 S 型陰イオンチャネルの活性についても調査した。

Guard cell, Jasmonate, Ethylene

発表番号：2H027
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネとシロイヌナズナに存在する異なるフラジェリン認識機構のキメラ受容体を用いた分子解析
# Molecular analysis of two distinct flagellin recognition systems using chimeric receptors

○片山 貴等[1]、村上 孝彦[1]、河合 美咲[2]、高井 亮太[2]、蔡 晃植[2]([1]長浜バイオ大学院バイオ、[2]長浜バイオ大学バイオ)
○ Katayama Takara[1], Takahiko Murakami[1], Misaki Kawai[2], Ryota Takai[2], Fang-Sik Che[2] ([1]Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

イネは植物病原細菌である *Acidovorax avenae* の非病原性菌株の鞭毛タンパク質フラジェリンを認識し、活性酸素の発生や防御関連遺伝子の転写活性化などの免疫応答を誘導する。シロイヌナズナでは、フラジェリンの N 末端に存在する共通配列である flg22 を受容体型キナーゼである FLS2 で認識し免疫反応を誘導することが明らかになっている。我々は、イネは flg22 を認識せず、フラジェリンの C 末端領域に存在する CD2−1 を認識して免疫反応を誘導することと、CD2-1 が FLS2 と同じ受容体型キナーゼである Flagellin-induced Receptor Kinase 2 (FliRK2) によって認識されることを報告した。そこで、FliRK2 による CD2-1 の分子認識機構を明らかにするため、FliRK2 と FLS2 のキメラタンパク質を作成し CD2−1 と flg22 の認識能について調べた。FliRK2 の細胞外領域と膜貫通領域を FLS2 の細胞内領域と融合させたキメラ受容体（キメラ 1）、FLS2 の細胞外領域と膜貫通領域を FliRK2 の細胞内領域と融合させたキメラ受容体（キメラ 2）を発現するベクターをそれぞれ作製し、これらをシロイヌナズナ *fls2* 変異体に一過的に発現させ、flg22 または CD2-1 に対する認識能を防御関連遺伝子のひとつである *AtWRKY29* のプロモーターの転写活性を指標に調べた。その結果、キメラ 1 を発現させた *fls2* 変異体は CD2-1 処理で *AtWRKY29* のプロモーター活性が上昇したが、flg22 ではこの様な転写活性化は認められなかった。一方、キメラ 2 を発現させた *fls2* 変異体では flg22 および CD2-1 の両方に対する認識能が認められなかった。これらのことから、FliRK2 の細胞外領域は CD2-1 の特異的な結合に関与することが明らかになると共に、イネとシロイヌナズナではフラジェリン認識情報の細胞内伝達機構が異なるということが明らかになった。

Pathogen recognition, Immune response, Flagellin

発表責任者：片山　貴等（b110033@nagahama-i-bio.ac.jp）

発表番号：2H028
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アレロパシー物質モミラクトンに対するイネの自己耐性機構の解明

# Self-resistance mechanisms to momilactone in rice

○富田 啓介、藤原 薫、野尻 秀昭、岡田 憲典（東大・生物工学セ）
○Keisuke TOMITA, Kaoru FUJIWARA, Hideaki NOJIRI, Kazunori OKADA (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】主要なジテルペン型ファイトアレキシンのひとつとして知られるモミラクトンは、数種の *Oryza* 属イネ（栽培種 *O. sativa* や野生種 *O. rufipogon* など）と蘚類ハイゴケ（*Hypnum plumaeforme*）において生合成される。その生理機能としては、抗菌活性以外にも周囲の植物の生育を阻害するアレロパシー活性が知られているが、モミラクトン生産植物であるイネやハイゴケ自身は生育阻害を受けにくい。このことは、これらの植物にモミラクトンに対する何らかの自己耐性機構が存在することを示している。この耐性機構を明らかにすることができれば、モミラクトンを利用した雑草防除など、環境保全型農業に利用できるシーズとなる可能性があり非常に興味深い。そこで本研究では、モミラクトンの持つアレロパシー活性について、野生植物や作物など幅広い植物種に対するモミラクトンの効果を調べると共に、モミラクトンに対する自己耐性機構の解明を目的としてシロイヌナズナにモミラクトン耐性を付与するイネ遺伝子のスクリーニングを進めた。
【方法・結果】スクリーニングに必要なモミラクトン B をイネの乾燥もみ殻 6 kg からメタノール抽出し、酢酸エチルによる液液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、C18 逆相 HPLC により精製し、約 8 mg のモミラクトン B を得た。まず、シロイヌナズナに対するモミラクトン B のアレロパシー効果を調べたところ、過去の報告と同等の約 2 μM での生育抑制効果を認めた。そこで、コムギ、エンドウ、ブロッコリー、キャベツなどの作物植物の芽生えに対する効果を調べた。その結果、2 μM のモミラクトン B に対し、エンドウやブロッコリー、キャベツなどにおいては生育抑制効果が認められる一方、コムギにおいては生育抑制効果が認められないなど、植物種によって影響の程度が様々であることがわかった。対象とする植物種を増やして実験を行い、その結果も報告する予定である。現在、イネの遺伝子を過剰発現させたシロイヌナズナ系統（FOX line）を用いることで、2 μM のモミラクトン B に対し耐性を示す形質転換シロイヌナズナをスクリーニングしており、その原因となるイネ遺伝子を探索中である。また、イネにおけるモミラクトン耐性能保持の起源の解明を目的に、*O. punctata* や *O. officinalis* などのモミラクトンの生産能が異なる数種の野生イネを用いたモミラクトン耐性能の評価も行っており、その結果についても併せて報告する予定である。

allelopathy, self-resistance, rice

発表責任者：富田啓介（2709243819@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：2H029
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 有機肥料及び化学肥料の施肥による連作土壌の細菌叢変化

# Effect of continuous cropping on bacteria community in soil under organic or chemical fertilizer management systems

○宮崎 恭之介、アディカリ ディネッシュ、向 真樹、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Kyonosuke MIYAZAKI, Dinesh ADHIKARI, Masaki MUKAI, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】連作には農地や農作物の組み合わせの管理が容易な利点がある反面、連作障害という問題が生じる。連作障害の原因として、主に病原性糸状菌の土壌伝染が挙げられる。特定の病原菌は、作物の根が出す分泌物に特異的に集積するため、作物の種類により宿主特異的な病原菌のみが著しく増加する。その病原菌が増加しすぎると他の競合する微生物が抑制され、特定の種に偏った多様性の低い細菌叢となる。特に、化学肥料を施肥した農地では、微生物の餌となる有機物が供給されず、病原菌が増殖して偏った菌叢になることが多い。一方、有機肥料を施肥した農地では、有機物を栄養源として様々な微生物が旺盛に増加し、微生物同士が競合することで特定の菌のみの増殖が抑えられると考えられている。また、微生物の多様性が豊かになると、様々な物質の循環が促進され、作物の栄養の過不足が抑えられる。このように連作障害の原因である病原性糸状菌の動態は、使用する肥料と共存する微生物に影響されることが示唆されている。そこで本研究では、土壌細菌多様性の変化と連作障害の関係を明らかにすることを目的とし、異なる施肥を施した土壌で連作を行い、その土壌における総細菌数、細菌叢の経時変化を解析した。

【手法・結果】有機肥料（鶏糞堆肥及び牛糞堆肥）で全炭素 30,000 mg/kg-soil と全窒素 2,000 mg/kg-soil に調整した有機土壌または、化学肥料（N: 70, $P_2O_5$: 90, $K_2O$: 70 mg/kg）を施肥した化学土壌の 2 種類の土壌を作製した。ホウレンソウを 4 週間栽培し、栽培後の土壌の総細菌数、細菌叢の解析を行った。総細菌数は、採取した土壌から slow-stirring 法を用いて環境 DNA（eDNA）を抽出し、定量した。抽出した eDNA を 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR-DGGE に供した。その結果、総細菌数は、栽培前の土壌で約 $5.9\times10^8$ cells/g-soil であったが、連作を行った有機土壌では約 1.4 倍に増加し、化学土壌では約 1/4 に減少していた。DGGE クラスター解析の結果、栽培前と栽培後で細菌叢の変化が見られ、有機土壌よりも化学土壌での変化が大きかった。また、栽培前と後の DGGE バンドを確認すると、栽培後にいくつかの新たな DGGE バンドが有機土壌及び化学土壌の同位置及び別の位置で現れた。ホウレンソウを栽培することで、それぞれの施肥条件で異なる菌叢変化が見られるとともに、同じ菌種も出現することが確認された。このことから連作による菌叢変化は施肥によって異なることが明らかになった。

continuous cropping, bacteria, 16S rRNA gene PCR-DGGE

発表番号：2H030
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物種間における異なるフラジェリン認識システムの分布
# Diversity of two flagellin recognition systems in plant species

○村上 貴彦[1]、片山 貴等[1]、高井 亮太[2]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大院・バイオ、[2]長浜バイオ大・バイオ)
○Takahiko Murakami[1], Takara Katayama[1], Ryouta Takai[2], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Graduate School of Bio-science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

植物は、細菌の鞭毛構成タンパク質であるフラジェリンを認識し免疫反応を誘導する。これまでの研究で、シロイヌナズナやトマト、タバコなどではフラジェリンの N 末端領域に存在する 22 個のアミノ酸から成る共通配列である flg22 を認識し免疫反応を誘導することが明らかになっている。一方、イネは flg22 を認識せず、フラジェリンの C 末端領域に存在する CD2-1 を認識部位とし免疫反応を誘導することが明らかとなり、同一分子の異なる領域を認識するシステムの存在が示された。そこでまず、CD2-1 認識システムがイネ科植物内でどのように分布しているかを明らかにするために、CD2-1 をミナトカモジグサ、シコクビエ、ソルガム、ライムギの植物体に処理し、免疫反応の 1 つである活性酸素の発生とカロース沈着の誘導を調べた。その結果、シコクビエ、ソルガム、ライムギに CD2-1 を処理した時は、免疫反応の誘導は認められなかったが、ミナトカモジグサに処理した場合はイネと同様の免疫反応が誘導されることが示された。このことから、イネ科植物では、少なくともミナトカモジグサに CD2-1 を認識するシステムが存在することが示された。次に、単子葉植物やそれ以外の植物の培養細胞を用いて CD2-1 認識システムの分布について調べた。単子葉類であるイネ、ハチク、アスパラガス、ミナトカモジグサと双子葉類であるシロイヌナズナ、タバコ、トマト、ミヤコグサの培養細胞に CD2-1 と flg22 を処理し、活性酸素の発生を指標に免疫反応誘導を調べた。その結果、CD2-1 認識システムを有する植物は、イネとミナトカモジグサ、アスパラバスであることが明らかになった。また、flg22 認識システムを有する植物は、シロイヌナズナ、タバコ、トマト、ハチク、ミヤコグサ、アスパラガスであることが明らかになった。これらのことから、双子葉植物は、flg22 認識システムのみを持っているが、単子葉植物には、flg22 認識システムと CD2-1 認識システムが混在しており、アスパラガスでは両方のシステムを持っていることが明らかになった。

Flagellin, PAMP, PTI

発表番号：2H031
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 酸化チタン光触媒を用いた *Microcystis aeruginosa* の不活化
# Inactivation of *Microcystis aeruginosa* by $TiO_2$ Photocatalysis

○金川 海人[1,2]、鞆 達也[3]、寺島 千晶[2]、勝又 健一[2]、池北 雅彦[1,2]、藤嶋 昭[2]、中田 一弥[1,2] ([1]東理大理工、[2]東理大総研光触媒セ、[3]東理大理)
○ Kaito KANAGAWA[1,2], Tatsuya TOMO[3], Chiaki TERASHIMA[2], Kenichi KATSUMATA[2], Masahiko IKEKIYA[1,2], Akira FUIISHIMA[2], Kazuya NAKATA[1,2] ([1]Tokyo University of Science, Department of Science and Technology, [2]Tokyo University of Science, Research Institute for Science and Technology, Photocatalytic International Research Centar, [3]Tokyo University of Science, Faculty of Science)

*Microcystis aeruginosa* はアオコを引き起こす藍藻類(シアノバクテリア)の一種である。アオコとは湖沼の富栄養化で藍藻類が大発生する現象と、それを作り出している原因の藍藻類の両方の意味をしめす。*Microcystis* は microcystin と呼ばれる肝臓毒を産生する有毒株が知られており、アオコが大発生した湖や河の水を飲んだ家畜や野生動物が死亡するという報告が北米、ヨーロッパ、南アフリカなどで数多く記録されている。アオコはその有毒性と湖沼の無酸素化、太陽光の遮断により、日本のみならず世界的に環境問題となっている。

近年、環境浄化材料として広く使用されている光触媒は光照射により高い酸化分解能をしめすことから揮発性有機化合物の分解や抗菌などに応用されている。そこで本研究では、$TiO_2$ 光触媒が *Microcystis aeruginosa* に与える影響とそのメカニズムについて検証した。

光触媒による *Microcystis aeruginosa* への影響を調べるにあたり、*Micocyistis aeruginosa* (NIES-44：国立環境研究所)を 4 週間培養し、培養液を PBS で洗浄後、細胞数を約 $3\times10^6$ cells/mL になるように細胞濃度を調節した。また超音波処理により細胞群を単一の細胞に分散させる操作を行った。20 mL 希釈カップに撹拌子(攪拌速度：1000 rpm)と椅子型の $TiO_2$ 担持メッシュ(15 mm×35 mm)を入れ、*Micocyistis aeruginosa* 懸濁液を 15 mL 分注し、UV 照射(UVA ランプ：1.0 mW/cm$^2$)を 15 時間行った。その後、96 ウェルプレートリーダー(Multiskan GO：Thermo Fisher Scientific)による吸光度測定とフローサイトメーター(FACSCalibur：BD)による自家蛍光測定を行った。

シアノバクテリアは光合成色素としてクロロフィルと色素タンパク質であるフィコシアニンを有しており、それぞれ 440, 680 nm 付近の波長に吸収ピークをしめす。また同時に赤色の蛍光を発する。*Microcyistis aeruginosa* に光触媒処理を行った際 440, 680 nm の付近の吸光度が光触媒処理後で減少したことから、クロロフィルおよびフィコシアニンの分解が示唆された。次に、自家蛍光による細胞死判定を行うために、フローサイトメーターによる測定を行った。光触媒処理を行ったサンプルでは、暗所や UV 照射のみのサンプルに比べて緑色の蛍光が強くなり、赤色の蛍光が小さくなることが分かった。赤色の蛍光が弱くなった理由として、クロロフィルやフィコシアニンの分解が起きたためと考えられる。一方、緑色の蛍光が強くなった原因として、シアノバクテリアの死細胞は緑色に蛍光することが知られており、本実験で同様な結果が得られたことから、光触媒処理を行うことで、*Microcystis aeruginosa* が不活化することが示唆された。

Cyanobacteria, Photocatalysis, Water bloom

発表責任者：中田一弥（nakata@rs.tus.ac.jp）

発表番号：2H032
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

C4 光合成の炭酸固定酵素と脱炭酸酵素の C3 植物への導入による代謝系の改変：水ストレス耐性の向上とその基盤のメタボローム解析

Metabolic engineering of C3 plant by introduction of $CO_2$-fixation and decarboxylation enzymes of C4 photosynthesis: Improved drought tolerance and its basis revealed by metabolome analysis

○西村 隆秀[1]、高木 祐子[2]、中山 泰宗[3]、傳寶 雄大[3]、福崎 英一郎[3]、蘆田 弘樹[4]、陀安 一郎[5]、秋田 求[1,2]、泉井 桂[2]([1]近畿大院生物理工、[2]近畿大先端技術研、[3]阪大院工、[4]神大院人間環境、[5]京大生態研究セ)

○Takahide NISHIMURA[1], YUKO TAKAGI[2], YASUMUNE NAKAYAMA[3], YUDAI DEMPO[3], EIICHIRO FUKUSAKI[3], HIROKI ASHIDA[4], ICHIRO TAYASU[5], MOTOMU AKITA[1,2], KATURA IZUI[2] ([1]Kinki Univ., [2]INST.ADV.TECH.,Kinki Univ., [3]Osaka Univ., [4]Kobe Univ., [5]Kyoto Univ.)

【研究背景】世界人口の増加に伴う食糧不足が懸念され、作物の生産性の飛躍的増強と地球環境の変動による種々のストレスに対して高い耐性をもつ作物の作出が求められている。われわれは植物の光合成能の強化による生産性の向上を目指して研究を行ってきた。イネなど大部分の植物は C3 光合成を行うが、トウモロコシなど一部の植物は C4 光合成を行い、その光合成能は C3 植物より約 2 倍も高い。それは、C4 植物では葉緑体内の $CO_2$ 濃度を高めて Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco)のオキシゲナーゼ活性を抑制するためとされている。われわれは C4 光合成の炭酸固定酵素である Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC)と脱炭酸酵素である Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK)を同時に C3 植物の葉緑体において発現させて、Rubisco の真の基質である $CO_2$ の濃度を高めることによる光合成能の増強を目指してきた(*cf.* J. Exp. Bot. 59: 1811-1818 (2008))。得られた遺伝子組換えタバコの光合成能は顕著な増強をみせず、$\delta^{13}C$ の値からも期待された“C4 化”の兆候を示さなかったが、水ストレスや高温ストレスに対する耐性の増強を示唆する知見が得られたので、その分子的基盤を探るために、メタボローム解析を中心に行った。

【実験結果】(i) ストレス耐性：ポリエチレングリコール(PEG, 4k, 6k)による浸透圧ストレス（水ストレス）に対して、組み換え体（TF）は野生株（WT）より高い耐性を示した。また NaCl による塩ストレスに対する耐性の増強も見られた。さらに、予備的ではあるが、高温ストレス耐性の向上を示唆する知見も得られた。すなわち、今夏は例年より暑く、温室での栽培中に、設定温度の 30℃を越えて 39℃にも達した日が 1 週間近く続いた。その後、設定温度に戻ったが、生育の度合いに大きな差が観察され、TF が WT より背丈が 1.5 倍程度大きくなっていた。(ii) メタボローム解析：播種後 3 ヵ月の WT と TF 株に、10% PEG 4k を与えて 24 時間後の真昼時に葉を採取して、解析試料とした。135 種類のメタボライトのレベルの相対比が得られた。ストレスなしのときに、Calvin 回路の中間体は TF の C3 化合物が顕著に減少した以外は大きく変化しなかった。クエン酸回路の中間体のレベルおよび Glu, Pro, Arg, His などは総じて TF で高く、すでに浸透圧ストレス耐性が高められているようであった。また TF では Trp, NADPH, ATP のレベルが高かったことは注目される。ストレス下ではストレスなしのときに比べて、上記のメタボライトのレベルがさらに増加する傾向がみられた。

【考察】本研究の知見は育種に有用なストラテジーを提起し、他方では C4 光合成の進化の初期の選択圧として水ストレスが働き、これに PEPC の高発現が適応的に獲得されたとする説を支持する。

C4-mimetic engneering, Stress tolerance, Metabolome analysis

発表責任者：泉井桂（izui@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：2H033
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

マツタケ菌根が生産する抗菌性アルミニウム錯体の生態学
Ecology of the antimicrobial aluminium complex produced by matsutake mycorrhiza
西野 勝俊[1]、城 美沙緒[1]、大泉 一也[1]、大倉 龍起[1]、藤田 徹[2]、山口 宗義[3]、山田 明義[4]、田中 千尋[1]、笹森 貴裕[5]、時任 宣博[5]、○平井 伸博[1] ([1]京大院農、[2]京都府農水技セ、[3]森林総研、[4]信州大農、[5]京大化研)
Katutoshi Nishino[1], Misao Shiro[1], Kazuya Oizumi[1], Ryuki Okura[1], Toru Fujita[2], Muneyoshi Yamaguchi[3], Akiyoshi Yamada[4], Chihiro Tanaka[1], Takahiro Sasamori[5], Norihiro Tokitoh[5], ○Nobuhiro Hirai[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Pref. Agric. Forest. Fish. Tech. Ctr., [3]Dept. Appl. Mcrobiol., FFPRI, [4]Fac. Agric., Shinshu Univ., [5]ICR, Kyoto Univ.)

【目的】マツタケ（*Tricholoma matsutake*）の子実体はフェアリーリングを形成する。リング部分はマツタケ菌の生育が旺盛で菌根量も多く、活性菌根帯と呼ばれている。リングは毎年 10-15 cm ずつ外側に拡大して行く。リングを含む内側の領域は「シロ」と呼ばれる。シロの内側と外側の微生物密度は高いのに対して、リング部分の微生物密度は低いことから、菌根が抗菌物質を生産することが示されている。半世紀近くこの抗菌物質は不明であったが、我々はこの抗菌物質がシュウ酸アルミニウム錯体であることを明らかにした（昨年度大会で発表）。シュウ酸アルミニウム錯体は、菌根が分泌したシュウ酸と土壌中の不溶性リン酸アルミニウムが反応し可溶性リン酸を生じることに伴う副生成物と考えられる。したがってシュウ酸アルミニウムのシロ内外における分布は、マツタケ菌糸量および抗菌活性、微生物密度、可溶性リン酸濃度などと相関していると予想される。そこで、シロ内外におけるシュウ酸アルミニウム濃度とそれらの相関について分析した。シュウ酸のアルミニウムへの配位数と抗菌活性の相関についても調べた。
【方法】抗菌活性試験には被験菌として枯草菌を用いた。シュウ酸 1 分子配位、2 分子配位、3 分子配位のアルミニウム錯体は、シュウ酸ナトリウムと塩化アルミニウムの比率を調整することによって調製し、抗菌活性は微量液体希釈法によって測定した。以下の試料（SF, SI, SO）を京都府坂井研究林において子実体形成時期の 10 月 10 日に採取した。SF：活性菌根帯に相当するシロ先端の土壌、SI：シロ先端より 30 cm 内側の土壌、SO ：シロ先端より 30 cm 外側の土壌。いずれも約 10 cm の深さの土壌を 10 g 採取した。これらの土壌試料を水抽出し、以下の分析に用いた。マツタケ菌糸量は定量的 PCR 法、シュウ酸アルミニウム濃度は $^{27}$Al NMR、シュウ酸濃度は HPLC、抗菌活性はペーパーディスク法、微生物密度は平板希釈法、pH は pH メーター、リン酸濃度はブレイ第二法により分析した。
【結果と考察】シュウ酸アルミニウムの抗菌活性は、シュウ酸 1 分子配位と 2 分子配位が強く 3 分子配位は弱かった。このことは、アルミニウムが単にシュウ酸の抗菌活性を増強しているのではなく、シュウ酸と錯体を形成することによって独自のメカニズムで抗菌活性を発現していることを示唆している。SF, SI, SO を分析した結果、マツタケ菌糸量に対してシュウ酸アルミニウム濃度および抗菌活性の強さ、シュウ酸濃度、リン酸濃度は正の相関を示し、微生物密度と pH は負の相関を示した。この結果は予想通り、シュウ酸アルミニウムがシロの拡大と維持に重要であることを示唆している。シュウ酸の分泌はリン酸の欠乏によって誘導されると考えられる。

Tricholoma matustake, antimicrobial substance, aluminum oxalate complex

発表責任者：平井伸博（hirai@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2H034
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# エンバク根に含まれるアベナシンの他感作用
# Action of avenacins in oat roots as allelochemicals

○鶴嶋 鉄[1]、宮川 恒[2]、Osbourn Anne[3] ([1]阪南大、[2]京都大院農、[3]John Innes Centre)
○Tetsu Tsurushima[1], Hisashi Miyagawa[2], Anne Osbourn[3] ([1]Hannan University, [2]Kyoto Univ., [3]John Innes centre)

【目的】野生エンバクは、コムギ圃場の侵略的な雑草として知られ、根からのアレロケミカルの放出が推定されてきた。これまで、エンバクの主要アレロケミカルはスコポレチンであると周知されてきた。しかし、抗菌性アベナシンもエンバク根から放出されることが明らかになったので、エンバク(*Avena stringosa*)根の抽出液および根の滲出液中の抗菌性物質と植物生育抑制物質の検討を行った。また、活性物質の関与を検討するために、エンバクのイネに対するアレロパシー効果を調べた。
【方法と結果】TLC と生物検定を組み合わせた方法を考案し、エンバク根のアレロケミカルを探索した。エンバク根を液体窒素中で磨砕し、メタノールで抽出した。この抽出液を TLC プレートにチャージし、クロロフォルム:メタノール:水（13:6:1, v/v/v）で展開した。溶媒除去後に、ウリ類炭そ病菌(*Colletotrichum orbicular*)分生胞子の懸濁液と混合した PDA 溶出液をプレート上に噴霧した。２日後に、プレート上のアベナシン部位に抗菌スポットが検出されたが、他の部位にはスポットは認められなかった（図 1)。また、抽出液を TLC プレートにチャージし、溶媒で展開後に 1%寒天溶出液をプレート上に粉霧した。その後、レタスの発芽種子を寒天上に均等に配置した。アベナシン部位は、レタスの生育を抑制したが、他の部位は抑制しなかった（図２)。根の浸出液の抗菌性検定も、アベナシン部位に明白な抗菌スポットが検出されたが、スコポレチン部位の活性は弱かった。以上より、抽出液および浸出液中の主要な抗菌性物質と生育抑制物質がアベナシンであることが明らかになった。

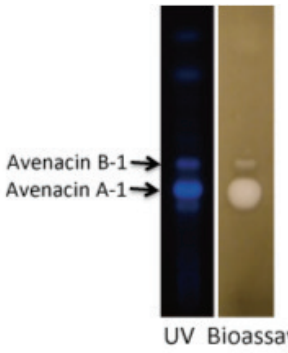


図1. エンバク根抽出液のTLC上での抗菌性検定

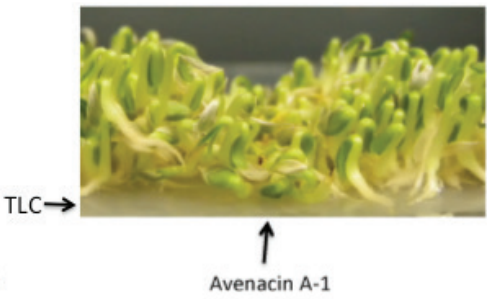


図2. エンバク抽出液のTLC上でのレタスに対する生育抑制検定

次に、1 日催芽させた 7 粒のエンバク種子（野生型とアベナシン非生産の *sad1* 変異体）を、9cm ペトリ皿中央に置かれた 1cm 幅の寒天上に並べ、その下側に水を含んだ半円形の濾紙を配置して、湿室・光照射下で 4 日間生育させた。このエンバク子苗の間に、根が約 0.5～0.8cm に伸びたイネの発芽種子を置き、28℃光照射下で 3 日間生育させた。野生型エンバクは、*sad1* 変異体よりものイネの生育を抑制した。これは、アベナシンがエンバクの主要なアレロケミカルとして機能していることを示す。

Oat, Avenacins, allelochemical

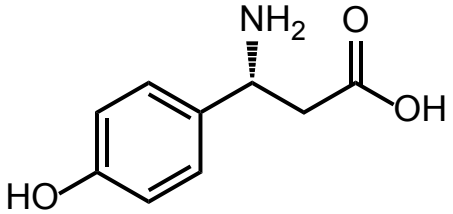
発表責任者：鶴嶋鉄（tsuru@hannan-u.ac.jp）

発表番号：2H035
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

β-Tyrosine のイネ品種間における含量の比較と生理活性の探索
β-Tyrosine production in rice cultivars and effect of β-tyrosine on Arabidopsis root growth
○網干 貴子[1]、松本 ふう香[2]、Yan Jian[3]、寺石 政義[2]、奥本 裕[2]、Jander Georg[4]、森 直樹[2] ([1]山形大農、[2]京大院農、[3]華南農業大、[4]ボイス・トンプソン研究所)
○Takako Aboshi[1], Fuuka Matsumoto[2], Jian Yan[3], Masayoshi Teraishi[2], Yutaka Okumoto[2], Georg Jander[4], Naoki Mori[2] ([1]Yamagata Univ., [2]Kyoto Univ., [3]South China Agricultural Univ., [4]Boyce Thompson Institute)

【目的】
我々はイネ幼苗（品種：日本晴）から、ジャスモン酸噴霧により誘導される化合物として非タンパク性アミノ酸のβ-tyrosine を同定した。β-Tyrosine はこれまでに植物からの報告がない。そこで、イネのコアコレクションを用いて、本化合物がどのような品種に含まれているのか調べるとともに、本化合物が持つ生理活性を探索した。

【方法・結果】
世界のイネのコアコレクション（全 69 品種）では、7 品種からβ-tyrosine を検出した。このうちジャスモン酸噴霧によりβ-tyrosine の蓄積量が増加したのは、日本晴のみであった（$p$<0.05）。一方、日本在来品種のコアコレクション（全 50 品種）では、33 品種からβ-tyrosine を検出した。このうちジャスモン酸処理によりβ-tyrosine 蓄積量が増加したのは、信州と宝満神田稲の 2 品種であった（$p$<0.05）。β-Tyrosine は日本在来の品種に多く含まれる化合物であり、ジャスモン酸噴霧により体内でβ-tyrosine の蓄積を増加させる品種は、誘導されない品種より少ないことが明らかとなった。
また、本化合物をシロイヌナズナの栽培培地に添加すると、シロイヌナズナの根の成長を抑制した。根の成長を 20%抑制する $IC_{20}$ は 0.6 μM であった。様々な植物を用いて、β-tyrosine による根の成長抑制活性を比較したところ、タバコ *Nicotiana tabacum*、タルウマゴヤシ *Medicago truncatula*、オオムギ *Hordeum vulgare*、アワ *Setaria italica* に対する $IC_{20}$ がそれぞれ 0.8 μM、2.7 μM、154 μM、382 μM であった。なお、イネに対してはジャポニカ米の日本晴、インディカ米のカサラス両方において、400 μM まで添加しても根の成長は抑制されなかった。β-Tyrosine は単子葉植物よりも双子葉植物に対して低濃度で根の成長を抑制するが、イネ自体の成長はほとんど抑制しないことが明らかとなった。



β-Tyrosine

rice, amino acid, allelopathy

発表番号：2H036
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 生物の代謝産物としてキュウリで初めて見つかったリボフラビン（ビタミン B2）誘導体とその分布
# Identification of 4'-ketoriboflavin from *Cucumis sativus* and its distribution in *Cucurbitaceae*

○佐藤 純一[1]、越野 広雪[2]、関野 滉太[1]、金子 元優[1]、伊藤 晋作[1]、勝田 亮[3]、武田 晃治[4]、吉村 悦郎[5]、新町 文絵[6]、川崎 信治[1]、額田 恭郎[3]、新村 洋一[1]（[1]東農大応生科・バイオ、[2]理研 CSRS、[3]東農大応生科・醸造、[4]東農大・教職、[5]東大院農生科・応生科、[6]日大短大・生物資源）
○Junichi SATOH[1], Hiroyuki KOSHINO[2], Kouta SEKINO[1], Motohiro KANEKO[1], Shinsaku ITO[1], Ryo KATSUTA[3], Kouji TAKEDA[4], Etsuro YOSHIMURA[5], Fumie Shinmachi[6], Shinji KAWASAKI[1], Tomoo NUKADA[3], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agric., [2]RIKEN CSRS, [3]Dept. of Fermen. Sci., Tokyo Univ. of Agric., [4]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric., [5]Dept. of App. Biol. Chem. , The Univ. of Tokyo, [6]Dept. of Bioresource Science, Junior College, Nihon University)

【背景・目的】フラビンにはリボフラビン（Rf）、FMN、FADが含まれる。細胞内でFMN、FADはタンパク質に結合し酸化還元酵素の補因子として機能する。タンパク質非結合型のFMNとFAD（遊離FMN、遊離FAD；遊離フラビン）が関与する種々の反応が知られているが、細胞内における遊離フラビンの実態は不明であった。我々は細菌*Amphibacillus xylanus*の細胞内から遊離FADを見いだし(Ohnishi et al. 1994)、その生理機能を解析してきた。遊離フラビンは非光合成生物の細菌の細胞内に存在するが（木俣ら 本会2015年度大会）、光合成生物である数種の双子葉植物では鉄欠乏条件下で根の細胞外にフラビン化合物を分泌することが知られている。数種の双子葉植物を鉄欠乏条件下で栽培すると、ウリ科のキュウリが最も多くフラビン化合物を分泌することが見いだされている(新町ら 1994)。そこで我々はキュウリ水耕液を鉄十分条件下、鉄欠乏条件下でHPLC分析にて比較したところ、鉄欠乏条件下の水耕液からRfと共にRfとは異なる新たな未知化合物のピークを検出した。本報告では、検出された未知化合物の同定を試み、この化合物のウリ科植物における分布を調査した。
【方法】キュウリを鉄欠乏条件下で水耕栽培し、黄色化した水耕液をC-18カラム、diode array detector（DAD）を用いてHPLC分析を行った[1)]。次に鉄欠乏条件下の水耕液中に存在した未知化合物の同定を行うため、同水耕液をロータリーエバポレーターにて濃縮した。濃縮した水耕液を脱塩後、C-18カラムを用いて未知化合物の分取を行った。単離した化合物の化学構造をLC-MS、NMRにより同定した[1)]。ウリ科植物における分布調査のため、マクワウリ、ゴーヤ、カボチャの水耕液をHPLCで分析した。
【結果】鉄欠乏条件下でキュウリ水耕液中に分泌された新たな未知化合物はフラビン化合物であることがDAD解析により示唆された。このフラビン化合物は分泌された全フラビン類の64%であることが、クロマトグラムの蛍光強度より見積もられた。LC-ESI-TOFMS解析の結果、MS/MSデータからフラビン化合物の分子式は$C_{17}H_{18}N_4O_6$と決定された。このフラビン化合物とRfのMS/MSデータから、同化合物は酸化されたリビトール鎖を持つケトフラビンであると示唆された。そこでNMR解析を行い、このケトフラビンは4’-ケトリボフラビン(4’-ketoRf)であると構造決定された[1)]。4’-ketoRfはRfの光分解や水耕液中の微生物存在下では生成されなかったため、同フラビンは生物の代謝産物としてキュウリで初めて見つかったリボフラビン誘導体である。新町らは数種のウリ科植物からフラビン分泌を報告している。4’-ketoRfの分布をウリ科植物にて調査した結果、鉄欠乏条件下の水耕液からもRfと共に4’-ketoRfの分泌が観察された。1) Satoh et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* 2015 in press

flavin, iron deficiency

発表番号：2H037
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 低分子量ダイズ PDI ファミリーPDIL6 の同定及びその酵素学的性質の解析

# Identification and analysis of the enzymatic properties of the smallest member of soybean protein disulfide isomerase family, GmPDIL6

○奥田 綾、松崎 元紀、増田 太郎、裏出 令子 (京大院農・農学)
○Aya OKUDA, Motonori MATSUSAKI, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

**【目的】**真核細胞の粗面小胞体で生合成されるタンパク質の大部分は分子内あるいは分子間ジスルフィド結合を有しており,これらはフォールディングと立体構造の安定化に重要な役割を果たしている.細胞小胞体には複数の Protein Disulfide Isomerase (PDI)ファミリーが存在し,それらの多くがジスルフィド結合形成を伴うフォールディング（酸化的フォールディング）活性を有するが,反応には Ero1 などの他の酸化酵素からのジスルフィド結合の供給が必要である.PDI ファミリーの酵素学的性質や作用機構については哺乳動物や酵母で研究が先行し,植物の PDI ファミリーについては未解明な部分が多い.本研究では, 新規なダイズの PDI ファミリーPDIL6 を同定し,その酵素学的性質を明らかにすることを目的とした.

**【方法・結果】**ダイズ全ゲノム配列データベース上でのホモロジーサーチによりダイズ PDIL6 遺伝子(*GmPDIL6*)を見いだし,ダイズ葉から調製した mRNA を用いて RT-PCR により cDNA をクローニングした.GmPDIL6 は,N 末端シグナル配列を有し,活性中心が CKHC であるチオレドキシン様配列を一つ含む 147 アミノ酸残基のタンパク質であることが cDNA の塩基配列から推定された. *GmPDIL6* cDNA を用いて,シグナル配列を除いたリコンビナント GmPDIL6(rGmPDIL6)の大腸菌発現系を構築し, 精製標品を調製した. 遊離チオール基の Maleimide PEG 修飾法により測定した GmPDIL6 活性中心チオール基の酸化還元電位は 175.3mV であった.この値から,GmPDIL6 は還元変性タンパク質のシステイン残基を酸化しジスルフィド結合を形成する活性があることが推定された.そこで, システイン残基を 2 個含む decapeptide を基質として rGmPDIL6 のチオール基の酸化活性を測定し,これまでに同定された 6 種類のダイズPDI ファミリーと同等の活性があることを明らかにした.しかし, rGmPDIL6 はPDI ファミリータンパク質の活性化酵素である GmEro1 には全く酸化されないことがグルタチオン, NADPH, NADPH レダクターゼとのカップリング系による測定で明らかとなった.また,還元変性 RNaseA を基質とした酸化的リフォールディング活性は, ほとんど検出されなかった.一方,リアルタイム RT-PCR により測定した GmPDIL6 mRNA は小胞体ストレス下で発現量が大幅に増加すること,さらに,GmPDIL6 mRNA はダイズ組織に普遍的に発現し,特に登熟過程の種子の子葉において種子貯蔵タンパク質の生合成が盛んな時期に高い発現があることから,GmPDIL6 は小胞体における新生種子貯蔵タンパク質の立体構造形成に寄与する可能性が示唆された.以上の結果から, GmPDIL6 は Ero1 以外の未知のドナーから酸化等量を受け取りもっぱらタンパク質にジスルフィド結合を導入する役割を担っていると推定される.

Protein Disulfide Isomerase, Disulfide bond, Ero1

発表番号：2H038
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

ダイズにおける Ero1-PDI 経路による種子貯蔵タンパク質のジスルフィド結合形成メカニズム
Mechanism of disulfide bond formation on the seed storage protein by Ero1-PDI family pathway
○松崎 元紀、奥田 綾、河野 慧一、土 雄一朗、廣瀬 明歩、成尾 由理香、小石原 克典、三田 竜太、増田 太郎、裏出 令子（京大院農・農学）
○Motonori MATSUSAKI, Aya OKUDA, Keiichi KONO, Yuichiro TSUCHI, Akiho HIROSE, Yurika NARUO, Katsunori KOISHIHARA, Ryuta MITA, Taro MASUDA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

**【背景と目的】**主要作物の一つであるダイズは栄養源として、種子貯蔵タンパク質であるグリシニンおよびβ-コングリシニンを蓄積する。これらの貯蔵タンパク質の蓄積には、子葉細胞小胞体でのジスルフィド(S-S)結合を伴ったフォールディング(酸化的フォールディング)が必須である。酵母および動物細胞の主要な酸化的フォールディング経路は Ero1-Protein Disulfide Isomerase (PDI)経路であり、この経路では S-S 結合のドナーである Ero1 から PDI 分子内の 2 つの触媒ドメインのうち片方だけに S-S 結合が転移し、基質タンパク質へ受け渡される。我々はこれまでに、植物(ダイズ)の Ero1 オーソログ(GmEro1)が 5 種のダイズ PDI ファミリーを酸化することなどを明らかにしてきた。これらのうち 4 種が、分子内に 2 つの活性中心を有する。また、*in vivo* では複数の PDI ファミリーが貯蔵タンパク質のフォールディングに関与していること見いだしたが、一つの基質に複数の PDI ファミリーが同時に作用する機構の詳細は不明である。本研究では複数の PDI ファミリーによる酸化的フォールディングの分子メカニズムの解明を目指して、GmEro1 による PDI ファミリー酸化のドメイン選択性と酸化的フォールディングとの関係に着目し研究を行った。**【方法と結果】**GmEro1、野生型および活性中心変異型ダイズ PDI ファミリーを大腸菌発現系を用いて大量発現し純化した。GmEro1 による酸化反応は、酸素消費速度あるいはグルタチオンレダクターゼをカップリングさせた NADPH 消費速度により測定した。その結果、PDI オーソログである GmPDIL-1 は酵母や動物とは異なり、2 つの活性中心が両方とも GmEro1 に酸化されることが明らかとなった。さらに、GmPDIM (ドメイン構造: **a-a'-b**) は **a'** ドメインが、GmPDIS-1、GmPDIS-2 は **a** ドメインが選択的に酸化されることが明らかとなった。一方、GmPDIL-2 は GmEro1 により酸化されないにもかかわらず、GmPDIM との共存下で GmEro1 による GmPDIM の酸化速度を増強することを見いだした。さらに、酸化速度の増強は GmEro1 によって酸化された GmPDIM が GmPDIL-2 を酸化することで生じていることを明らかにした。すなわち、S-S 結合の転移を妨げる変異を導入した GmPDIM の **a** ドメインと GmPDIL-2 の活性中心間で分子間 S-S 結合が形成された中間体を非還元と還元 SDS-PAGE の 2 次元電気泳動で検出した。これらの結果から、GmEro1 によって GmPDIM の **a'** ドメインに形成された S-S 結合が **a** ドメインを経由して GmPDIL-2 の両方の活性中心へ渡り、酸化的フォールディング活性を高めていることが示唆された。さらに、生理的な基質であるグリシニン A1aB1b の大腸菌発現系を確立し、これを基質として GmEro1 と複数のダイズ PDI ファミリーによる酸化的フォールディングの解析を進めている。

protein disulfide isomerase, Ero1, folding

発表責任者：裏出令子（urade@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2H039
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究 1 ：新規不可逆阻害剤の合成展開

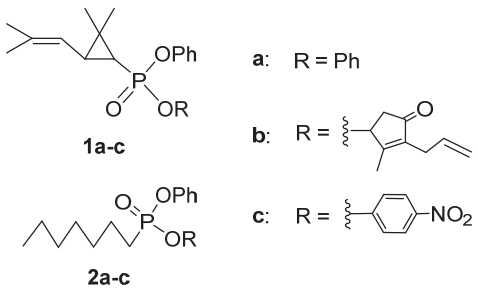
# Research of GDSL lipase involved in pyrethrin biosynthesis (1) -Design and synthesis of phosphonate mechanism-based irreversible inhibitors-

○明石 拓也[1]、山崎 智穂子[2]、宇都宮 麻衣[2]、伊原 誠[2]、松田 一彦[2]、平竹 潤[1] ([1]京大化研、[2]近畿大院・農・応生化)

○Takuya AKASHI[1], Chihoko YAMASAKI[2], Mai UTSUNOMIYA[2], Makoto IHARA[2], Kazuhiko MATSUDA[2], Jun HIRATAKE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kinki Univ.)

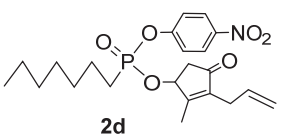
【背景・目的】

除虫菊(*Tanacetum cinerariifolium*)のピレスリン生合成の最終段階を触媒する酵素 (TcGLIP) は、セリン残基を活性中心とする脂質分解酵素 GDSL リパーゼの一種である。すなわち、TcGLIP は、活性セリン残基による菊酸 CoA チオエステルへの求核攻撃ののち、アシル酵素中間体を生成、ピレスロロンによる脱アシル化を経る二段階のエステル交換反応によりピレスリンを生成する。その反応機構は、セリンプロテアーゼときわめて類似しており、そのため、有機リン酸エステルによりセリン残基をリン酸化することで不可逆的な阻害が可能であると考え、昨年の本大会ではホスホン酸ジエステル型阻害剤 **1a** および **1b** を合成し、発表した。しかしながら、いずれも阻害活性が見られなかったため、脱離基に着目し、phenyl 基に比べより良い脱離能を持つ *p*-nitrophenyl 基の入った阻害剤 **1c** を合成した。また、TcGLIP の菊酸部分の構造認識を検証するため、菊酸と同様の炭素数のヘプチル構造を持つ阻害剤 **2a-c** の合成を行った。




【方法・結果】

ホスホン酸ジエステル **1a-c** および **2a-c** の合成経路の概略は次の通りである。Benzyl carbamate と paraformaldehyde および $P(OPh)_3$ を $Ac_2O$ の存在下で縮合させアミノホスホン酸誘導体を合成した。接触水素化分解によりアミンにした後、sodium nitrite、無水 $CH_2Cl_2$ 溶媒、0 ˚C、AcOH 触媒という条件下でジアゾ化合物を得た。これと 2,5-dimethylhexa-2,4-diene を銅粉触媒存在下、$CH_2Cl_2$ 溶媒中 Ar 気流下で加熱環流することによりシクロプロパン化し、ジフェニルエステル **1a** を得た。化合物 **1a** を NaOH で加水分解し、モノフェニルエステルを定量的に得た後、縮合剤 PyBOP および塩基 DIPEA の存在下、**b** および **c** のアルコールと室温で 24 hr 反応させ、ホスホン酸ヘテロジエステル **1b, c** を合成した。また、DBU を用いて 1-iodoheptane および diphenyl phosphite を縮合させて化合物 **2a** を合成した。これを用いて、**1b, c** と同様の方法により **2b, c** を合成した。また、*p*-nitrophenyl 基を脱離基とし、天然型の基質を参考にしたシクロペンチル構造を持つ **2d** を合成して、これらの TcGLIP に対する阻害活性を評価し、本大会で発表する予定である。




pyrethrin, GDSL lipase, enzyme inhibitor

発表番号：2H040
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究 (2)：不可逆阻害剤存在の活性評価

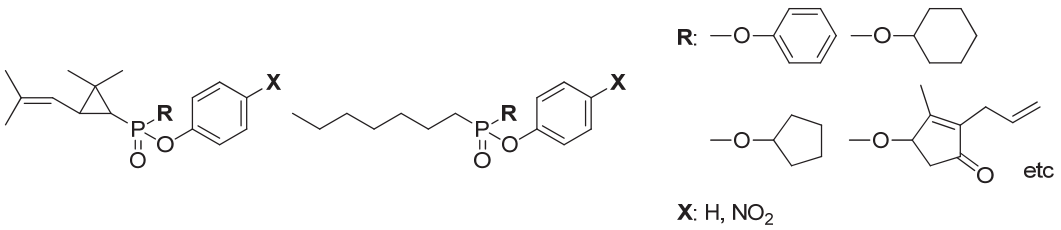
# Research of GDSL lipase involved in pyrethrin biosynthesis (2)Characterization of the phosphonate inhibitors

○山崎 智穂子[1]、宇都宮 麻衣[1]、伊原 誠[1]、明石 拓也[2]、平竹 潤[2]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院農、[2]京大化研)

○ Chihoko YAMASAKI[1], Mai UTSUNOMIYA[1], Makoto IHARA[1], Takuya AKASHI[2], Jun HIRATAKE[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

除虫菊は葉や花部（子房）でエステル化合物である天然殺虫剤ピレスリンを生合成し、蓄積する。これまでに我々はピレスリンのエステル結合を形成する酵素として GDSL リパーゼの一種を同定し、TcGLIP と命名した。除虫菊によるピレスリン生合成における本酵素の重要性を証明する方法として、遺伝学的手法が開発されていない除虫菊では特異的阻害剤を用いた研究手法が有効である。TcGLIP は活性中心に触媒三残基をもち、それらを変異させるとピレスリン合成活性を失う。この知見をもとに、我々は TcGLIP のセリンにより求核アシル置換反応を受け、フェノールを遊離するとともに、TcGLIP をリン酸エステル化するホスホネート型阻害剤を合成した。本研究では大腸菌でマルトース結合蛋白質（MBP）として発現させた TcGLIP に対する本阻害剤群の構造活性相関と阻害様式について検討したので報告する。




【方法と結果】

大腸菌で発現させた TcGLIP の MBP 融合タンパク質は、アミロースレジンと陰イオンカラムを用いて高度に精製した。本融合タンパク質に対して無置換フェノキシ基をもつ阻害剤を作用させたところ、10 μM で酵素を阻害したものの、その程度は弱かった。そこで、p-$NO_2$ フェノキシ基をもつ阻害剤を新たに合成して TcGLIP に対して試験したところ、1 μM の濃度で本酵素のピレスリン合成活性を顕著に阻害した。また、化合物の種類によらず、阻害は処理濃度と時間に依存して進行した。

ピレスリン合成活性のみならず、ピレスリン合成とともに基質である菊酸 CoA から遊離する CoASH を経時的かつ連続的に計測する方法によっても阻害剤の作用様式を調べた。TcGLIP と菊酸 CoA との反応によって生じる CoASH の遊離速度は、阻害剤の処理後時間依存的に低下したことから、試験した化合物の阻害様式は不可逆的であることが確かめられた。

pyrethrin, GDSL lipase, enzyme inhibitor

発表責任者：松田　一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：2H041
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ピレスリン生合成に寄与する GDSL リパーゼに関する研究 (3)：不可逆阻害剤存在下での結晶化
# Research of GDSL lipase involved in pyrethrin biosynthesis (3) Co-crystallization of TcGLIP with the phosphonate inhibitors

○宇都宮 麻衣[1]、山崎 智穂子[1]、伊原 誠[1]、明石 拓也[2]、平竹 潤[2]、松田 一彦[1] ([1]近畿大院農、[2]京大化研)
○ Mai UTSUNOMIYA[1], Chihoko YAMASAKI[1], Makoto IHARA[1], Takuya AKASHI[2], Jun HIRATAKE[2], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】

ピレスリンは除虫菊に含まれる殺虫成分で菊酸と 2 位に 3 種の置換基をもつ 4-ヒドロキシ-3-メチル-シクロペンテノンが縮合したエステル化合物である。我々は他に先駆けてこのエステル結合の形成を触媒する酵素が GDSL リパーゼの一種であることを解明し TcGLIP と命名した。TcGLIP は、絶対配置を含めて基質を厳密に認識するが、そのメカニズムは未だに明らかにされていない。本研究では、TcGLIP の基質認識と触媒機構を解明するため、結晶化に適した TcGLIP の調製方法と阻害剤との共結晶化の条件について検討したので報告する。

【方法と結果】

TcGLIP のペリプラズム移行シグナル配列をマルトース結合タンパク質（MBP）と置換した MBP 融合タンパク質発現コンストラクトを作成した。このとき、MBP タグを容易に除去できるように HRV3C プロテアーゼ認識配列を MBP と TcGLIP の間に挿入した。大腸菌 BL21 株をはじめ数種の大腸菌株をもちいて、過剰発現に適した株の選抜を行ったところ、OrigamiB 株が最も多くの可溶性タンパク質を与えた。しかし、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーと電子顕微鏡分析によって、MBP 融合 TcGLIP はその大部分が凝集体を形成することが判明した。そこで TcGLIP の会合状態とピレスリン合成活性との関係を調べたところ、単量体が最も高いピレスリン合成活性を示すことが明らかとなった。

TcGLIP を単量体として調製するため、大腸菌での発現誘導は低温で行い、精製にはアミロースレジンを用いた。アフィニティ精製と 2 種類の担体を用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを組み合わせることで、単量体として単分散のゲルろ過カラムクロマトグラムを与えるタンパク質として、MBP 融合 TcGLIP を得た。さらに、本融合タンパク質を HRV3C プロテアーゼで処理することにより MBP タグを切断した TcGLIP の精製を試みた。その結果、MBP タグを切断した TcGLIP は単量体として挙動し、しかも MBP 融合タンパク質と変わらない同等の反応速度パラメータを示した。

このようにして精製した TcGLIP を、独自に設計したホスホネートタイプ構造をもつ不可逆阻害剤とともに一定時間処理した後、結晶化条件を探索した。その結果、いくつかの条件で TcGLIP は阻害剤非存在下では見られない結晶を与えた。

pyrethrin, GDSL lipase, enzyme inhibitor

発表番号：2H042
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 乾ノリ由来色素体リボソームのプロテオーム解析

# Proteomic analysis of the plastid ribosome of dried nori (*Pyropia yezoensis*)

○山口 健一[1,2]、山脇 萌美[2]、桑野 和可[1,2]、小田 達也[1,2] ([1]長大水、[2]長大院水環)
○Kenichi YAMAGUCHI[1,2], Moemi YAMAWAKI[2], Kazuyoshi KUWANO[1,2], Tatsuya ODA[1,2] ([1]Fac. Fish., Nagasaki Univ., [2]Grad. Sch. Fish. Sci. Env. Studies, Nagasaki Univ.)

【目的】乾ノリは、養殖スサビノリの板ノリ加工の後、80℃の熱風で脱水処理がなされ流通する。我々は、市販されている乾ノリ中の色素体リボソームが 70S の形状を保ったまま存在することを見出し、なぜ色素体リボソームが高温下の脱水過程で崩壊せずに超分子複合体として保たれるのかに興味を抱いた。そこで、スサビノリ色素体リボソームの耐乾熱性機構解明の一端として、プロテオーム解析を行った。

【方法】試料としてリボソーム調製に適した高タンパク質・低糖質の市販有明産乾ノリ（上級品）を用い、ショ糖密度勾配超遠心分離法により 70S 画分を単離した。続いて、SDS-PAGE で分離した 70S 由来タンパク質のゲル内消化物を MALDI-QIT-TOF 質量分析に供し、タンパク質を同定した。

【結果および考察】これまでに大腸菌リボソームタンパク質のオーソログ 21 種（S3, S4, S5, S7, S19, S20, L1, L2, L3, L4, L5, L6, L9, L13, L14, L16, L18, L27, L28, L31, および L32）とフェリチンを 70S 画分から同定した。一方、好熱菌や陸上植物葉緑体に特異的なリボソーム安定化タンパク質(Thx および PSRP)のホモログや紅藻色素体特異的リボソームタンパク質は見出されていない。スサビノリ色素体リボソームは、常温菌様のタンパク質組成を有し、耐乾熱性にはストロマ中の未同定因子が関与するものと推察した。

plastid ribosome, proteomics, *Pyropia yezoensis*

発表責任者：山口健一（kenichi@nagasaki-u.ac.jp）

発表番号：2H043
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ステロイドグリコアルカロイド生合成遺伝子 SGA3 をターゲットとしたゲノム編集トマトの解析
# CRISPR/CAS9 genome editing of tomato glycoalkaloid biosynthetic gene *SGA3*

○秋山 遼太[1]、中安 大[1]、李 栄宰[1]、刑部 敬史[2]、刑部 祐里子[2]、梅基 直行[3]、村中 俊哉[4]、斉藤 和希[3,5]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院農、[2]徳島大、[3]理研、[4]大阪大院工、[5]千葉大院薬)
○Ryota Akiyama[1], Masaru Nakayasu[1], Hyoung-Jae Lee[1], Keishi Osakabe[2], Yuriko Osakabe[2], Naoyuki Umemoto[3], Toshiya Muranaka[4], Kazuki Saito[3,5], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]Kobe Univ., [2]Tokushima Univ., [3]Riken, [4]Osaka Univ., [5]Chiba Univ.)

ナス科植物であるジャガイモやトマトにはそれぞれα-solanine、α-tomatine というステロイドグリコアルカロド（SGA）が多く含まれている。SGA はコレステロールを前駆物質とし、16、22、26 位の水酸化、26 位のアミノ基転移、E,F 環形成、3 位水酸基への糖転移を経て生合成されることが推定されている。我々はこれまでに 3 種の P450（*SGA1, SGA2, SGA3*）、アミノ基転移酵素（*SGA4*）、2OGD（*16DOX*）の各位遺伝子の機能解析を行い、SGA1, SGA2, 16DOX がそれぞれ 26, 22, 16 位の水酸化、SGA4 が 26 位へのアミノ基転移を触媒することを明らかとした。*SGA3* は RNAi ノックダウンすることで内生 SGA 量が大きく低下することから SGA 生合成への関与が示唆されているが、その酵素機能は不明である。本発表では *SGA3* を標的とした Crispr/Cas9 システムによるゲノム編集について報告する。SGA3-ORF からデザインした gRNA を含む Crispr/Cas9 発現ベクターで形質転換した *Agrobacterium rhizogenes* を用いてトマト毛状根を作成した。得られた形質転換毛状根からゲノム DNA を抽出後, 標的配列を含むゲノム DNA 断片を PCR により増幅し、HMA（Heteroduplex mobility assay）法により標的配列へのゲノム編集効率を確認したところ、変異が導入されたと思われる毛状根形質転換ラインが多数得られた。これら毛状根ラインについて、編集部位のシークエンス解析結果、および、内生 SGA 量の分析結果を報告する。同様に、*A.tumefaciens* を用いた形質転換個体の結果についても合わせて報告する予定である。

Genome editing, CRISPR/CAS9, tomato

発表番号：2H044
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 次世代シーケンス解析に向けた高純度のイネ葉緑体 DNA 精製法

# Protocol: High purity chloroplast DNA extraction from rice for Next-Generation Sequencing

○高松 壮[1]、大西 孝幸[2]、猪俣 拓也[1]、及川 和聡[1]、木下 哲[2]、三ツ井 敏明[1] ([1]新大自然研、[2]横市大木原研)
○ Takeshi Takamatsu[1], Takayuki Ohnishi[2], Takuya Inomata[1], Kazusato Oikawa[1], Tetsu Kinoshita[2], Toshiaki Mitsui[1] ([1]Niigata Univ., [2]Yokohama City Univ.)

イネ葉緑体ゲノムはおよそ１３万５千塩基対からなり、１０８*遺伝子*、４１個の *tRNA*、８個の *rRNA*がコードされている。しかし、３０００近くの品種や野生種がゲノムシーケンスされている核ゲノムに比べて、イネ葉緑体ゲノムにおける多様性の知見は極めて乏しい。葉緑体ゲノムの品種間差を調べることは、葉緑体の機能を理解する手がかりを得るとともに、葉緑体ゲノムを標的とした新たな育種開発に活用でき、現在、我々はイネの葉緑体ゲノム解析に着手している。核ゲノムやミトコンドリアゲノムには葉緑体ゲノムと配列が一致する領域が数多く存在する。次世代シーケンス解析において、これらの領域に由来するリードは葉緑体由来のリードと区別することが難しく、ノイズとしての悪影響が懸念される。この点で、純度の高い葉緑体ＤＮＡを精製することは、次世代シーケンスの費用効果を向上させるだけでなく、より精度の高い変異解析が期待できる。そこで、本研究ではイネ葉緑体ゲノムの次世代シーケンス解析に向けて高純度の葉緑体ＤＮＡ精製法の確立を行った。まず、Ｆｒｅｅｚｅ　Ｄｒｙｉｎｇ法、Ｈｉｇｈ　Ｓａｌｔ法、Ｐｅｒｃｏｌｌ法の３法でイネのシュートから葉緑体ＤＮＡを抽出し、リアルタイムＰＣＲで純度を定量評価した。その結果、Ｆｒｅｅｚｅ　Ｄｒｙｉｎｇ法が最も高純度に葉緑体ＤＮＡが濃縮されており、葉緑体ＤＮＡが核ＤＮＡの２０００倍強、ミトコンドリアＤＮＡの２００倍弱のコピー比で存在した。この存在比は、核・ミトコンドリアゲノムに存在する類似配列数（領域によって核ゲノム中に２－２５箇所、ミトコンドリアゲノム中に０－５箇所）よりもはるかに大きいため、ノイズの悪影響を極めて軽微に抑えられると期待できる。実際、Ｆｒｅｅｚｅ　Ｄｒｙｉｎｇ法で抽出したコシヒカリ葉緑体ＤＮＡとコシヒカリ全ゲノムＤＮＡをそれぞれ次世代シーケンスし、リファレンス配列（日本晴の葉緑体ゲノム）にマッピングして比較すると、検出される変異領域の大部分は共通するものの、一部異なる領域も見られた。このことは、変異検出において、サンプルの葉緑体ＤＮＡ純度に影響を受ける領域が一部存在することが考えられる。

rice chloroplast genome, freeze drying method, Next-Generation Sequencing

発表責任者：高松　壮（ttakamatsu@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：2H045
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ $F_1$ 雑種の発生過程で見られる種々の雑種強勢現象の解析

# Analysis of heterosis at different stages of development of *Arabidopsis thaliana* $F_1$ hybrids

○山口 貴史[1]、中川原 真澄[2]、円谷 徹之[3]、高山 誠司[4]、柴 博史[2] ([1]筑波大院生命環境科学研究科、[2]筑波大・生命環境系、[3]阪大院工学研究科・生命先端工学、[4]奈良先端大・バイオサイエンス)
○Takafumi Yamaguchi[1], Masumi Nakagawara[2], Tetsuyuki Entani[3], Seiji Takayama[4], Hiroshi Shiba[2] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, [3]Department of Biotechnology, The University of Osaka, [4]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology)

【背景・目的】

雑種強勢を示す $F_1$ 雑種では、成長段階に併せて様々な形質が見られるが、それぞれの成長段階でどのような遺伝子発現制御がおこなわれているか不明である。モデル植物であるシロイヌナズナでは雑種強勢を示す $F_1$ 雑種を作成すると、ロゼット葉の発達といったバイオマスの増大と共に顕著な開花遅延を引き起こす事例が知られている。この場合、開花遅延がバイオマスの増大あるいは収量増加に関わっている可能性があり、単純に両親系統と $F_1$ 雑種を比較しても生殖成長期で特異的におこる雑種強勢現象は見られない。そこで本研究では、相互交配時に顕著な雑種強勢を示す 2 種のシロイヌナズナ近交系に開花制御因子 *FT* 遺伝子を導入して親系統およびその $F_1$ 雑種の開花時期を同調させることで、栄養生長時および生殖生長時における雑種強勢現象を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

本研究ではシロイヌナズナの種内系統の組み合わせの中でも顕著な雑種強勢を示す Col-0 株と C24 株とを両親系統に用いた。本研究では、植物内で構成的な発現をすることが知られているカリフラワーモザイクウィルス由来のプロモーター(CaMV 35Spro)の下流に、開花を正に制御する因子として知られる *FT* 遺伝子(FLOWERING LOCUS T)を導入した Col-0 株と C24 株を交配し、*FT* 遺伝子を導入した $F_1$ 雑種を作成したところ、$F_1$ 雑種においても親と同等の開花時期にすることに成功した。そこで上記 $F_1$ 雑種とその両親系統である *FT* 遺伝子を導入した Col-0 株と C24 株とを詳細に比較・観察した。その結果、$F_1$ 雑種では栄養成長段階においてロゼット葉の増大が観察された。現在、1 鞘あるいは 1 個体あたりの種子数など生殖成長期に見られる雑種強勢を詳細に観察しており、本演題では上記 $F_1$ 雑種における栄養生長時および生殖生長時における雑種強勢現象の実態を紹介したい。

Heterosis, FLOWERING LOCUS T, Reproductive stage

発表番号：2H046
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

様々な植物種における生体内ポリアミン分析
Polyamine analysis from various plant species
○高橋 芳弘[1]、ベルベリッヒ トーマス[2] ([1]九産大、[2]BiK-F)
○Yoshihiro TAKAHASHI[1], Thomas BERBERICH[2] ([1]Kyushu Sangyo Univ., [2]BiK-F)

ポリアミンは第１級アミノ基を２つ以上含む脂肪族炭化水素の総称であり、代表的なポリアミンとして、ジアミンのプトレッシン、トリアミンのスペルミジン、テトラアミンのスペルミンが挙げられる。これらのポリアミンは動植物問わず幅広く存在しており、核酸と相互作用して核酸・タンパク質合成を促進する細胞増殖因子として働くほか、植物においては、形態形成、花器官の発育、老化制御など、植物の生長をつかさどる様々な生理過程に影響を与える分子である事が知られていると共に、ジアミンもしくはトリアミンが合成できない植物体では致死となる事から、これらのポリアミンは生命維持に必要不可欠な分子である事が明らかとされている。さらに近年の研究から、スペルミンの構造異性体であるサーモスペルミンが発見され、サーモスペルミンは維管束分化に関わる事からサーモスペルミン合成酵素遺伝子が欠損した植物体では強い矮性を示す事、また、サーモスペルミン合成酵素遺伝子はコケ植物を含む様々な植物種に広く保存されている事が示された。一方、サーモスペルミンよりも生体内蓄積量が数倍高いとされているスペルミンに関しては、塩、乾燥、病原菌感染時の防御反応などの様々な環境ストレス耐性に寄与する事が知られているものの、スペルミン合成酵素遺伝子が欠損した植物体の表現型は野生型と見分けがつかず、また、スペルミン合成酵素遺伝子は被子植物のみに保存されている事が明らかとされている。そこで本研究では、コケ植物、シダ植物を含む様々な植物種のポリアミンを分析した結果、本解析に使用した全ての植物体内からスペルミンが検出された。これらの結果から、スペルミン合成酵素遺伝子もサーモスペルミン合成酵素遺伝子同様、様々な植物種に広く保存されている事が示唆された。

polyamine, plants

発表番号：2H047
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ナンノクロロプシス由来β-ケトアシル ACP シンターゼの一種は中鎖脂肪酸の生産に関与する
# Characterization of beta-ketoacyl ACP synthase from *Nannochloropsis*.

○杉原 慎二、尾崎 達郎、遠藤 寛子、斎藤 猛、東條 卓人、瀧村 靖、萩原 浩（花王・生科研）
○Shinji SUGIHARA, Tatsurou OZAKI, Hiroko ENDOU, Takeshi SAITOU, Takuto TOUJOU, Yasushi TAKIMURA, Hiroshi HAGIHARA (KAO corp. Bio. sci. lab.)

界面活性剤などの原料として使用されるラウリン系油脂(炭素数 12, 14 の中鎖脂肪酸)の生産は、ヤシ油やパーム核油に依存しており、環境問題などの観点からサステナブルな生産系への転換が求められている。そこで、高い油脂生産能を有し環境負荷が少なく食糧と競合しない微細藻類に着目し、微細藻類によるラウリン系油脂の生産について研究している。

微細藻類によるラウリン系油脂生産の実現には、ヤシ油やパーム核油と同等以上の生産性が求められる。そのため、高い油脂生産性と生産株の脂肪酸組成がラウリン系油脂高含有である必要がある。微細藻類の脂肪酸生合成は植物と同様、葉緑体において II 型脂肪酸合成酵素によって行われるとされ、鎖長決定因子としてはチオエステラーゼ(TE)やβケトアシル ACP-シンターゼ(KAS)が重要と考えられている。これまで中鎖脂肪酸含量を向上させる酵素としてカリフォルニアベイ由来の中鎖型 TE や、クフェア種由来の中鎖脂肪酸特異的な KAS(KASIV)が報告されている。特に KASIV はクフェア種以外の生物からの報告はなく、極めて特殊な KAS と考えられる。

本発表では微細藻類の脂肪酸組成改変技術として、真正眼点藻である *Nannochloropsis* より新規 KASIV を取得したことを報告する。なお本遺伝子を *Nannochloropsis* にて中鎖型 TE と共発現させたところ、藻体における中鎖脂肪酸含量の増加が確認され、本遺伝子は微細藻類によるラウリン系油脂の生産に有用であることが分かった。

beta-Ketoacyl ACP synthase, *Nannochloropsis*, Medium chain fatty acid

発表責任者：杉原慎二（sugihara.shinji@kao.co.jp）

発表番号：2H048
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ココヤシの中鎖脂肪酸蓄積関連遺伝子の探索

# Identification of medium-chain fatty acid biosynthesis related genes in *Cocos nucifera* L.

○東條 卓人、杉原 慎二、漁 慎太郎、瀧村 靖、萩原 浩（花王・生科研）
○Takuto Tojo, Shinji Sugihara, Shintaro Ryo, Yasushi Takimura, Hiroshi Hagihara (Kao corp. Bio. Sci. Lab.)

【目的】

ココヤシ(*Cocos nucifera* L.)の果実から採取されるヤシ油は、洗浄用界面活性剤などに適する炭素数 12 の中鎖脂肪酸(C12)を豊富に含んでおり、食品用途のみならず工業用原料としても非常に重要な植物油である。多くの植物が C16～18 の長鎖脂肪酸を主成分とする油脂を蓄積する一方で、ヤシのように中鎖脂肪酸を高度に蓄積する植物種は限定されており、その脂質蓄積機構は大変興味深い。我々は以前ココヤシより脂肪酸生合成時の鎖長の決定因子とされる Acyl-ACP チオエステラーゼ(TE)を取得したが、その TE は C12 よりも C14 に高い基質特異性を有していた(2012 年度大会にて報告)。このことから、ヤシの C12 リッチな脂質組成は TE 以外の因子の影響を強く受けている可能性が示唆されている。今回 TE 以外のココヤシの脂肪酸鎖長制御系の遺伝子を解析したので、その結果について報告する。

【方法】

ココヤシはゲノム情報が公開されていないため、遺伝子情報の取得も目的としてココヤシ果実内の胚乳より得られた RNA を用いた RNA-seq 解析を行い、胚乳で発現している脂質生合成関連遺伝子の抽出を行った。得られた配列情報に基づいて各遺伝子をクローニングし、ココヤシ TE(CTE)を発現するシロイヌナズナ系統に追加導入し、形質転換種子中の脂質の脂肪酸組成を確認した。

【結果】

RNA-seq 解析の結果、C14 特異性を持つ CTE が胚乳で高発現していることが確認され、CTE 以外の因子が C12 リッチな脂質組成の構築に大きく影響していることが強く示唆された。そこで胚乳で高く発現しており、かつ脂肪酸鎖長に影響する可能性を有する脂質生合成遺伝子として胚乳で発現している ACP、KAS、LACS、DGAT 様配列を取得し、CTE 発現シロイヌナズナへと導入した。その結果、C12 蓄積に影響を与えた遺伝子は KAS と DGAT であり、本検討より、ココヤシの中鎖脂肪酸蓄積の一端をこれらが担っている可能性が示唆された。

coconut, fatty acid biosynthesis, RNA-seq

発表責任者：東條卓人（toujou.takuto@kao.co.jp）

発表番号：2H049
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネの転写因子 DPF による根でのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子及び共発現遺伝子の転写制御機構の解析

# Transcriptional regulation of biosynthesis genes of diterpenoid phytoalexins and co-expressed genes with *DPF* by a rice transcription factor DPF in root

○山村 千紘[1,2]、水谷 恵美[1,2]、田中 惇訓[1,2]、福島 説子[1]、鎌倉 高志[2]、岡田 憲典[3]、山根 久和[4]、高辻 博志[1]、森 昌樹[1] ([1]生物研、[2]東理大・理工、[3]東大・生物工学セ、[4]帝京大・バイオ)
○Chihiro YAMAMURA[1,2], Emi MIZUTANI[1,2], Atsunori TANAKA[1,2], Setsuko FUKUSHIMA[1], Takashi KAMAKURA[2], Kazunori OKADA[3], Hisakazu YAMANE[4], Hiroshi TAKATSUJI[1], Masaki MORI[1] ([1]NIAS, [2]Fac. Science and Tech., Tokyo Univ. of Science, [3]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [4]Department of Biosciences, Teikyo Univ.)

我々はイネのジテルペン型ファイトアレキシン（DP）生合成を制御する、bHLH 型転写因子 DPF(Diterpenoid Phytoalexin Factor)について研究を行っている。これまでに *DPF* が通常、根及び出穂後の穂で高レベルに発現していることや、葉ではいもち病感染、塩化銅処理、UV 照射等により発現が誘導されること、過剰発現イネでは DP 生合成酵素遺伝子群の転写レベルが上昇するとともに、DP であるモミラクトン及びファイトカサンの蓄積量が増大することを報告している。また、*DPF* ノックダウン（KD）系統においては DP 蓄積量が、根及び籾で WT に比べ激減していることを示した。*DPF*-KD イネでは DP 生合成酵素遺伝子 12 種の転写レベルが全て低下していたことから、DPF は DP 生合成遺伝子群の転写を制御することで、根や籾における DP の蓄積を制御していることが明らかになっている。

*DPF* と共発現する遺伝子を RiceFREND データベースにより検索したところ、DP 生合成遺伝子以外でも候補遺伝子が見いだされた。今回これらの遺伝子について *DPF*-KD イネの根での発現量を調べたところ、少なくとも 5 つの候補遺伝子で発現量が有意に低下していたことから、これらは DPF により制御される共発現遺伝子と考えられた。そのうち 2 つは、Δ12 脂肪酸不飽和化酵素(OsFAD2)と相同なタンパク質をコードしており、これらの遺伝子がリノール酸合成に関わることで JA 生合成に間接的に関与している可能性が考えられた。他の 2 つは、病原菌の感染や非病原性ストレスによって誘導される PR タンパク質の中で、PR10 ファミリーに属する PR10b と RSOsPR10 であった。また、残り 1 つは ABC トランスポーターOsABCG43/OsPDR5 で、抗菌性物質等の輸送に関わる可能性が考えられた。これらのことから DPF は DP 生合成遺伝子だけでなく、防御機構に関与している可能性の高い共発現遺伝子の発現も制御していることが明らかになった。さらに、DP の共通の基質は非メバロン酸（MEP）経路を介して生合成されることが報告されていることから、MEP 経路に関与する 4 種類の遺伝子の発現量を調べたところ、3 種で *DPF*-KD イネにおける発現量が低下していた。従って DPF がこれら MEP 経路遺伝子の発現量を制御する可能性も考えられた。

抵抗性誘導剤 BTH を葉に処理することで *DPF* の発現が誘導され、この誘導は WRKY45 に依存することが報告されている。非処理の根における *DPF* の発現も WRKY45 に依存しているかどうかを明らかにする目的で、*WRKY45*-KD イネの根における *DPF* の発現レベルを WT と比較したところ、顕著な差は認められなかった。よって、根における *DPF* の発現は WRKY45 の制御を受けていないことが示唆された。

phytoalexin, rice, transcription factor

発表番号：2H050
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネの bHLH 型転写因子 DPF によるファイトアレキシン生合成遺伝子 *OsCPS2* の発現誘導機構の解析

# Transcriptional regulation in phytoalexin biosynthesis by direct binding of rice bHLH transcription factor DPF to the *OsCPS2* promoter

○田渕 雄夢[1]、堤 涼[1]、根本 圭一郎[2]、澤崎 達也[2]、森 昌樹[3]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]（[1]東大・生物工学セ、[2]愛媛大・工、[3]農業生物資源研）
○Yumu TABUCHI[1], Ryo TSUTSUMI[1], Keiichiro NEMOTO[2], Tatsuya SAWASAKI[2], Masaki MORI[3], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Ehime Univ., [3]NIAS)

【背景・目的】イネにおける防御応答の一つとして、抗菌性化合物であるファイトアレキシンの生産誘導が知られている。bHLH 型転写因子 DPF は、イネ植物体においていもち病菌感染時に誘導的に発現し、ジテルペン型ファイトアレキシンであるモミラクトンやファイトカサンの生産を正に制御する転写因子である。これまでに、DPF の過剰発現と抑制によって、全てのジテルペン型ファイトアレキシン生合成遺伝子の発現が影響を受けることが明らかになっている。さらに、ファイトカサン生合成遺伝子の *OsCPS2* とモミラクトン生合成遺伝子の *CYP99A2* については、上流域に存在するシスエレメントの N-box（CACGAG）が、DPF による転写活性化に必要であることが示されている[1)]。しかし、これらの遺伝子の発現誘導が DPF の N-box に対する直接的な結合により引き起こされているのかどうかについての証拠は得られていなかった。そこで本研究では *OsCPS2* の上流域に存在する N-box への DPF の結合について *in vitro* におけるタンパク質-DNA の分子間相互作用解析を行った。
【方法・結果】タンパク質-DNA の分子間相互作用評価には AlphaScreen（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay Screen 法）を用いた。ビオチン標識 DNA プローブとの相互作用の検出のため、まず、N 末 FLAG タグ付き DPF を発現するコンストラクトを作製し、コムギ胚芽無細胞翻訳系によって FLAG-DPF の試験管内合成を行った。目的タンパク質の発現は、FLAG 抗体と DPF ペプチド抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した。次に、ビオチン標識 DNA プローブとして *OsCPS2* の上流域に存在する N-box を含む 54 bp の DNA 領域を相補的な 2 本の DNA オリゴプライマーのアニーリングにより作製した。プローブには N-box に変異（CCCGGG）を導入したものも準備した。これらの相互作用を AlphaScreen で解析した結果、N-box プローブとの相互作用を示すシグナル強度は、変異プローブを用いた場合と比較して約 2 倍高い値となった。さらに、ビオチン未標識プローブを加えたコンペティションアッセイを行ったところ、変異プローブを用いた場合にはシグナル強度の変化はほとんど認められないのに対し、N-box プローブを用いた場合にはシグナル強度の低下が見られたことから、DPF と DNA プローブとの相互作用は N-box 依存的であると言える。これらの結果は、DPF が *OsCPS2* の上流域に存在する N-box に直接結合することでその発現を制御していること示唆する。現在、DPF が N-box 配列へ結合する際の結合力及び安定性など規定する新たな因子の探索を進めている。

（1）Yamamura et al., (2015) The Plant Journal : doi: 10.1111/tpj.13065.

rice, transcription factor, phytoalexin

発表番号：2H051
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 高等植物スプライシングにおけるエキソンスキップと短鎖 RNA の関係性

# Exon exclusion is enhanced by the presence of siRNAs harboring the flanking intronic sequences in higher plants

○中川原 咲恵、児玉 浩明（千葉大学）
○Sakie NAKAGAWARA, Hiroaki KODAMA (Chiba Univ.)

（目的）

RNA サイレンシングは短鎖RNA(siRNA)に起因する遺伝子発現抑制機構である。中でもSense-transgene induced post-transcriptional gene silencing(S-PTGS)は、過剰発現を目的として遺伝子を導入した植物の中に観察される、導入遺伝子および塩基配列が相同な内在性遺伝子の発現が同時に抑制される RNA サイレンシングである。α - リノレン酸合成酵素遺伝子(NtFAD3)の S-PTGS では、内在性 NtFAD3 遺伝子のスプライシング異常が起きている(Shin et al.,2014)。そこで、今回、NtFAD3 遺伝子のイントロンを標的とした RNA サイレンシング株を作出し、これらの siRNA がスプライシングに与える影響について調べた。昨年の日本農芸化学会2015年度岡山大会にて、イントロン領域の配列を有する siRNA がスプライシング効率に影響を与え、エキソンスキップが生じることを示した。今回は、エキソンスキップが生じるために必要とされる配列についてさらに研究を行った。

（方法と結果）

NtFAD3 遺伝子の、イントロン 1、エキソン 2、イントロン 2 の配列を標的とした RNAi 植物を作出し、それぞれ、TPIR-in1、TPIR-ex2、TPIR-in2 株とした。内在性 NtFAD3 遺伝子のエキソン 1～3 を含むゲノム配列から成るスプライシング効率を調べるコンストラクト pE1-(I1)-E2-(I2)-E3 （E はエキソン、I はイントロンを示す） を作成した。導入後、転写産物のスプライシング効率を調べたところ、野生株へ導入した場合とは異なり、TPIR-in1 株、および TPIR-in2 では、エキソン 2 がスキップされた産物が検出された。このエキソンスキップには、エキソンとそれに隣接するイントロンのどちらの配列がより重要なのかを調べるために、エキソン 2 を NtFAD3 遺伝子のエキソン 6 に置換した pE1-(I1)-E6-(I2)-E3、およびイントロン 1 を NtFAD3 遺伝子のイントロン 8 に置換した pE1-(I8)-E2-(I2)-E3、を作成しスプライシング効率を調べたので、その結果を報告する。

Shin et al.,(2014) PLoS ONE 9:e87869

RNA silencing, splicing, siRNA

発表番号：2H052
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アラビドプシスにおいてスプライシング効率を上げるタバコ由来のイントロン配列
# A tobacco intronic sequence improves the splicing efficiency in arabidopsis

○太田 小百合[1]、中川原 咲恵[2]、児玉 浩明[2] ([1]千葉大園芸、[2]千葉大融合)
○Sayuri OHTA[1], Sakie Nakagawara[2], Hiroaki Kodama[2] ([1]Chiba Univ.Fac.Horticulture, [2]Chiba Univ.Grd.Adv.Integr.Sci.)

（目的）
植物を含むさまざまな生物において、pre-mRNA に含まれるシスエレメントがスプライシング効率の調節や、選択的スプライシングに関わることが知られている。我々の研究グループでは、ゲノム配列をレポーターに接続した発現コンストラクトをパーティクルガンによりタバコ葉切片に導入することで簡易的にスプライシング効率を調べることができる in vivo splicing アッセイ系を確立している。タバコのα-リノレン酸合成酵素遺伝子（NtFAD3）のエキソン 1～エキソン 3 のゲノム配列について、in vivo splicing アッセイ系によりスプライシング効率を調べたところ、エキソン 2 のスキップが生じることがわかった。今回、アラビドプシスを材料として、in vivo splicing アッセイ系を確立し、アラビドプシスにおけるタバコ NtFAD3 遺伝子のスプライシング効率を調べた。

（方法と結果）
アラビドプシスでの in vivo splicing アッセイ系を確立させるために、アラビドプシス葉の導入面（向軸面 or 背軸面）、前培養の有無、遺伝子導入圧力、導入後の培養時間等の検討を行った。このようにして決められた条件下で NtFAD3 遺伝子のスプライシング効率について調べた。導入したコンストラクトは以下のとおりである。
①エキソン 1～エキソン 3 領域（E1-I1-E2-I2-E3）
②エキソン 1～エキソン 2 領域（E1-I1-E2）
③エキソン 2～エキソン 3 領域（E2-I2-E3）
④エキソン 1～エキソン 3 領域からイントロン 1 を抜いたコンストラクト（E1-E2-I2-E3）
この 4 種のコンストラクトを導入した結果、①と②からは、正常にスプライスされた転写産物のみが検出されたが、③と④からは正常にスプライスされた転写産物とスプライスされていない転写産物が検出された。タバコでのアッセイ結果とは異なり、アラビドプシスではエキソン 2 のスキップは観察されなかった。これらの結果から、NtFAD3 遺伝子のイントロン 1 の配列がアラビドプシスにおいては Intronic splicing enhancer として機能している可能性が示唆された。

splicing, intronic splicing enhancer, arabidopsis

発表責任者：児玉浩明（kodama@faculty.chiba-u.jp）

発表番号：2H053
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

植物色素ベタレインによる活性窒素依存性脂質過酸化反応及びタンパク質ニトロ化反応の抑制
Betalain, a plant pigment, inhibits peroxynitrite-induced lipid peroxidation and protein nitration.
○林 寛容[1]、布施 茜[2]、羽馬 大輔[1]、橋本 誠[3]、橋床 泰之[3]、崎浜 靖子[3] ([1]北大院農、[2]北大農、[3]北大院農学研究院)
○Hiroyo Hayashi[1], Akane Fuse[2], Daisuke Haba[1], Makoto Hashimoto[3], Yasuyuki Hashidoko[3], Yasuko Sakihama[3] ([1]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, [2]School of Agriculture, Hokkaido University, [3]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

【背景】ペルオキシナイトライト（$ONOO^-$）は活性窒素種の中でも最も毒性の強い分子種であることが知られている。活性窒素は活性酸素と同様に反応性が高く、重要な細胞構成成分である DNA、タンパク質、脂質を酸化・ニトロ化することにより、細胞機能障害を引き起こす。水溶性含窒素植物色素であるベタレインは、$ONOO^-$消去能を持ち、DNA 損傷及びチロシンのニトロ化を抑制することが *in vitro* において報告されている。しかし、活性窒素による脂質過酸化及びタンパク質ニトロ化に対するベタレインの抑制効果はほとんど報告例がない。そこで、本研究では、モデル脂質として卵黄由来レシチンリポソーム及びモデルタンパク質としてウシ血清アルブミン（BSA）を用い、$ONOO^-$依存性の脂質過酸化反応並びにタンパク質ニトロ化修飾に対するベタレインの影響を調べた。
【方法】脂質過酸化反応: 5% (w/v) のリポソームを含む 100 mM リン酸バッファー（pH 7.0）に $ONOO^-$を添加し、30 秒間撹拌後 5 分間室温で静置することで、脂質過酸化反応を誘導した。過酸化脂質量は汎用法であるチオバルビツール酸（TBA）比色法を用い、TBA 反応産物（TBARS）として定量した。
タンパク質ニトロ化反応: 1 μg BSA を含む 100 mM リン酸バッファー（pH 7.2）に 2 mM $ONOO^-$を加え、30 秒間撹拌後、5 分間室温で静置し、タンパク質のニトロ化を誘導した。タンパク質のニトロ化は、SDS-PAGE 及びニトロチロシン抗体を用いたウェスタンブロット法により、検出・定量した。
ベタレインとしてアカビートから精製したベタニンを用いた。また、代表的抗酸化剤であるアスコルビン酸、α–トコフェロール、トロロックス、フェルラ酸それぞれの阻害活性をベタニンのものと比較した。
【結果及び考察】リポソームの TBARS 量は $ONOO^-$濃度依存的に上昇し、1 mM $ONOO^-$添加によって $ONOO^-$無添加時の 2.6 倍に上昇した。同様に、70 μM ベタニン存在下で 1 mM $ONOO^-$を添加したところ、TBARS 増加量はベタニン無添加時の 5%以下に有意に抑制された。$ONOO^-$依存性の脂質過酸化を 50%抑制する化合物濃度（$IC_{50}$）を他の抗酸化物質と比較した結果、アスコルビン酸は 239.8 μM、α–トコフェロールは 191.2 μM、トロロックスは 274.7 μM であったのに対してベタニンは 36.0 μM と非常に高い抗酸化能を示した。タンパク質のニトロ化抑制効果についても、ベタニンは 2 mM $ONOO^-$によって引き起こされるニトロ化を 25 μM で約 30%、100 μM で検出限界以下に有意に抑制した。このベタニンのニトロ化阻害能は、フェルラ酸の約 4 倍高かった。以上の結果から、アカビートベタレインは、$ONOO^-$による DNA 損傷だけでなく、脂質やタンパク質の酸化・ニトロ化修飾からも保護する能力を有することが明らかになった。

reactive nitrogen species, plant secondary metabolites, nitrosative stress

発表責任者：崎浜　靖子（sakihama@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：2H054
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ナカジマナ(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*)から単離した ACE 阻害物質の同定

# Determination of ACE inhibition substance isolated from Nakajimana(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*).

○根古谷 竜[1]、加藤 美佳[2]、下村 講一郎[1,3] ([1]東洋大院生命、[2]三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 香料基礎研究室、[3]東洋大食環境)
○RYO NEGOYA[1], MIKA KATO[2], KOICHIRO SHIMOMURA[1,3] ([1]Graduate school of Life science, Toyo Univ., [2]San-Ei Gen F.F.I.,Inc., [3]Toyo Univ.)

【目的】

アブラナ科ツケナ類に属するナカジマナ(*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*)は、石川県七尾市中島町で古くから栽培されている伝統野菜である。ナカジマナは ACE 阻害活性をもつことから、近年注目されている。これまでに、ナカジマナには ACE 阻害ペプチドの存在が示唆され、アミノ酸組成が報告されているが、アミノ酸配列は同定されていない。そこで本研究では、ACE 阻害活性を示すペプチドの単離およびそのアミノ酸配列の同定を目的とした。

【材料および方法】

石川県産ナカジマナを JA 能登わかばより購入し材料とした。生鮮品を凍結乾燥後、粉末にした試料約 25 g に 50%アセトン水溶液を加え、超音波抽出を行った。遠心分離後、上澄を吸引濾過し、エバポレーターで濃縮、凍結乾燥した。乾燥した抽出物を Milli-Q 水を用いて溶解し、この抽出液を Sephadex LH-20 カラムで分離した。最も高い ACE 阻害活性を示したフラクションを Preparative C18 カラム(Waters)で分画した。分画したフラクションで最も ACE 阻害活性が高かったフラクションを限外濾過後、RP-HPLC を用いて精製を行った。ACE 阻害活性が高い粗精製のフラクションを LC-MALDI MS/MS(AB SCIEX)を用いてアミノ酸配列の同定を行った。同定できたペプチドを合成し、数種の消化酵素と反応させた。消化酵素処理後も ACE 阻害活性が高かったペプチドのアミノ酸配列を同定した。さらに、消化酵素処理で得られたペプチド断片の阻害タイプの検討を行った。本研究では、ACE 阻害活性および阻害タイプの決定は、ACE-Kit WST(Dojindo Inc.)を用い、$IC_{50}$ を算出して比較した。

【結果】

ナカジマナに含まれる ACE 阻害活性を示す物質が 11 個のアミノ酸の阻害ペプチドであることを明らかにした。また、合成したペプチドも ACE 阻害活性を持つことを確認した。さらに、本ペプチドの消化酵素処理によって得られたペプチド断片からもさらに高い ACE 阻害活性が確認された。今回の結果により伝統野菜の機能性がさらに注目され、伝統野菜の重要性が再認識されることが期待される。

*Brassica rapa* L. cv. *nakajimana*, ACE inhibition activity, peptide

発表番号：2H055
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 生分解性プラスチック分解酵素と植物病原菌を利用した除草効果

# Mixed inoculation of non-pathogenic yeast's biodegradable plastic-degrading enzymes and pathogens showed synergistic herbicidal activity.

○植田 浩一[1]、黒瀬 大介[2]、釘宮 聡一[1]、渡部 貴志[1]、光原 一朗[3]、田端 純[1]、小板橋 基夫[1]、北本 宏子[1] ([1]農環研、[2]ＣＡＢＩ、[3]生物研)
○HIROKAZU UEDA[1], DAISUKE KUROSE[2], SOUICHI KUGIMIYA[1], TAKASHI WATANABE[1], ICHIROU MITSUHARA[3], JUN TABATA[1], MOTOO KOITABASHI[1], HIROKO KITAMOTO[1] ([1]NIAES, [2]CABI, [3]NIAS)

植物葉面には、様々な非病原性の微生物が存在している。これまでに我々は、このような葉面常在菌の酵母や糸状菌から、生分解性プラスチック（生プラ）と植物表層の構造が部分的に類似していることに着目し、生プラ分解活性を持つエステラーゼ（生プラ分解酵素）を単離している。生プラ製農業資材の分解処理剤として、イネ常在性の酵母（*Pseudozyma antarctica*）から、強力な生プラ分解酵素（PaE）を大量生産することにも成功した。PaE を含む培養ろ液が植物へ与える影響を調べた結果、培養ろ液は、植物表面のクチクラ層に作用して、植物を乾燥させることで枯死を誘導することを昨年の大会で報告した。

今回我々は、この培養ろ液の除草剤として応用する可能性を調べるため、検討を行ったので報告する。まず、培養ろ液を野外の植物へ散布したところ、植物に乾燥を誘導すると共に、病害に罹病した植物体が増える様子が観察された。このことから、培養ろ液処理によって、植物が罹病しやすくなっているのかを、トマトとトマトの病原菌である灰色カビ病菌（*Botrytis cinerea*）をモデルとして解析を行った。トマトの葉に、培養ろ液処理と共に灰色カビ病胞子を処理すると、胞子単独処理に比べて、発病率や発病度がより高くなった。これは、培養ろ液による植物表層の分解によって、カビが植物内に侵入しやすくなったためと考えられた。カビ胞子処理後 3 日目の葉切片を顕微鏡観察した結果、培養ろ液で前処理した葉では、菌糸の組織内への進入が高頻度で観察されたが、対照区の失活酵素を前処理した葉では、大部分の菌糸は葉表面に留まっていた。菌の増殖程度は、葉から抽出されるカビの DNA 量からも確認できた。

これらの結果から、培養ろ液を除草剤として単独で使用するよりも、病原菌と混合処理することで、より高い除草効果が得られると考えられた。その際、混合使用する病原菌には、標的とする植物特異的な病原菌を用いることで、選択的な除草効果が期待できる。欧米で問題になっている難防除雑草であるイタドリに対して、生物農薬の候補であるイタドリ特異的な、さび病菌（*Puccinia polygoni-amphibii* var. *tovariae*）との併用効果を調べた。その結果、さび病菌胞子の単独処理に比べて、培養ろ液を併用処理したイタドリでは、早い時期から落葉が観察され、除草剤へ利用できる可能性が示された。

biodegradable plastic-degrading enzyme, herbicide, microbial formulation

発表番号：2H056
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 周期的な暗期パルスを用いたレタスの概日時計制御環境下における生育評価
# Growth evaluation of lettuce by controlling circadian clock through dark-pulse perturbations.

○東 孝信[1]、竹岡 真梨[2]、青木 考[1]、福田 弘和[3] ([1]阪府大院生命、[2]阪府大工、[3]阪府大院工)
○Takanobu HIGASHI[1], Mari TAKEOKA[2], Koh AOKI[1], Hirokazu FUKUDA[3] ([1]Osaka Pref. Univ. Grad. Sch. Sci., [2]Osaka Pref. Univ. Sch. Eng., [3]Osaka Pref. Univ. Grad. Sch. Eng.)

野菜の生産現場において，栽培の安定性は利益率に影響する重要な要素である．近年第 6 次産業として注目を集めている植物工場では，大規模化が進むほど栽培環境を均一化することが難しくなり，生育のばらつきによる利益率の低下が大きな問題となっている．ここで我々は，生育のばらつきを生み出す要因の一つとして概日時計の機能が関係しているのではないか，と考えた．

概日時計はほぼ全ての生物が持つ生体機能であり，植物の概日時計は気孔の開閉や花成誘導など様々な生理現象を調節していることが知られている．また，概日時計から生み出される約 24 時間周期の概日リズムは，光や温度などの外環境の刺激に対して自身のリズムを調節することで生理現象を最適化していることが知られており，実際に環境刺激で概日リズムを調節することで，植物の生長や病害虫抵抗性に効果があることも報告されている．本研究では，周期的な暗期パルスによって植物の概日リズムが外環境へ同期できない環境を構築し，「概日リズムが外環境に同期できない場合，生重量の低下や生育のばらつきが生じるのではないか」という仮説を立て，実証試験を行った．

供試植物はレタス(*Lactuca sativa* L., c.v. Frill ice)とし，最大で 250 株を一度に栽培できる多段式水耕栽培システムにて，温度 22℃，相対湿度 50%，二酸化炭素濃度 1000 μmol $mol^{-1}$ とした．光質は LED (R：G：B = 120：40：40)を用いており，光周期は連続明期(LL)，周期的な 30 分暗期(L：D = 23.5：0.5; DP30)，周期的な 15 分暗期(L：D = 23.75：0.25; DP15)の 3 条件とした．ここで，DP30 はレタスの概日リズムが外環境へ同期できる/できない臨界点の環境，DP15 はレタスの概日リズムが外環境へ同期できない環境として設定した．

栽培試験の結果，地上部生重量は LL で最大，DP15 で最小となり，その差は約 2 倍程度あることが明らかとなった．一般に明期時間が長くなるほど光合成量が増え生重量は増加する傾向にあるが，それにも関わらず DP15 の方が DP30 よりも生重量が有意に小さくなった. これは, 生重量の低下が，概日リズムが外環境に同期できないことに起因していることを示唆する重要な結果である．また，地上部生重量の分布についても解析を行った．それぞれの光条件で得られた生重量のヒストグラムについて正規分布との適合度検定を行った結果，LL と DP30 では有意に正規分布と適合しているのに対し，DP15 では有意差を得ることができなかった．つまり，概日リズムが外環境に同期できない環境では，その生重量は正規分布に従わない分布を取り，他の光条件と比較して生育にばらつきがでることが示唆された．以上の結果から，先の仮説の正当性が示された．

Circadian clock, dark-pulse perturbations, entrainment

発表番号：2H057
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# クラミドモナス(*Chlamydomonas reinhardtii*)に対するアルギン酸オリゴマーの銅イオンストレス軽減効果

# Alleviative effect of alginate oligomer on copper ion stress in *Chlamydomonas reinhardtii*

○上野 幹憲、山口 健一、小田 達也（長崎大院水・環）
○Mikinori UENO, Kenichi YAMAGUCHI, Tatsuya ODA (Grad. Sch. Fish. Sci. Environ. Stud., Nagasaki Univ.)

【目的】酵素分解により得られるアルギン酸オリゴマーは魚介類養殖の餌料として用いられる海洋性植物プランクトンであるナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* やキートセロス *Chaetoceros gracilis* に対し、増殖促進作用を示す。ナンノクロロプシスでは、銅イオン存在下での重金属ストレスを軽減することが報告されている。また、アルギン酸オリゴマーは淡水性プランクトンであるクラミドモナス *Chlamydomonas reinhardtii* に増殖促進作用を示すが、重金属ストレスへの報告はない。本研究では、アルギン酸オリゴマーのクラミドモナスに対する銅イオン存在下でのストレス軽減効果を検討した。

【方法】アルギン酸オリゴマーはアルギン酸ナトリウム(1000-cps)をアルギン酸リアーゼにより分解した。クラミドモナスは CC-3395(cell-wall deficient; arginine-requiring)株を TAP 培地で培養した。48-well plate にアルギン酸オリゴマー及びクラミドモナスを添加し、200 μmol photons/$m^2$/$s^1$、100 rpm/min の条件で培養を行い、アセトン抽出したクロロフィルからクラミドモナスの細胞数を計測した。クラミドモナスから AGPC 法により total RNA を抽出し、遺伝子発現をリアルタイム PCR により解析した。クラミドモナス細胞内の活性酸素は CM-$H_2$DCFDA を用いた蛍光法により測定した。

【結果及び考察】酵素分解により得られたアルギン酸オリゴマーの平均重合度は 4 であった。アルギン酸オリゴマーはクラミドモナスに対し濃度依存的に増殖促進を示した。培養上清中のウロン酸量は培養開始後と 4 日間培養では差がみられず、クラミドモナスはアルギン酸オリゴマーを資化しないことが示唆された。また、アルギン酸オリゴマー存在下で細胞周期に関わるサイクリン B の遺伝子発現が上昇した。銅イオン存在下ではクラミドモナスの増殖が抑制されたが、アルギン酸オリゴマーを添加することにより、生育が改善された。加えて、銅イオン存在下でクラミドモナス細胞内の活性酸素は上昇するが、アルギン酸オリゴマーの添加により減少した。以上の結果から、アルギン酸オリゴマーはクラミドモナスの増殖を促進すると共に銅イオンストレスを軽減することが明らかになった。

Alginate oligomer, Copper ion stress, *Chlamydomonas reinhardtii*

発表番号：2I001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# カイコ絹糸腺で発現させたインターフェロンγの *N*-型糖鎖構造解析

# *N*-Glycan analysis of interferon gamma expressed in the silk gland of silkworm

○杉村 理恵[1]、立松 謙一郎[2]、瀬筒 秀樹[2]、大橋 貴生[1]、三崎 亮[1]、藤山 和仁[1] ([1]大阪大、[2]農業生物資源研)
○ Rie SUGIMURA[1], Ken-ichiro TATEMATSU[2], Hideki SEZUTSU[2], Takao OHASHI[1], Ryo MISAKI[1], Kazuhito FUJIYAMA[1] ([1]Osaka Univ., [2]Natl. Inst. Agrobio. Sci.)

バイオ医薬品の多くはこれまでの医薬品生産への実績から宿主に哺乳類培養細胞を用いた生産が行われているが、複雑な翻訳後修飾が可能である一方で、生産の際の高コスト化を避けることができない。本研究ではより安価で安定した生産方法の確立を目指し、生産宿主としてカイコに注目した。カイコを用いた医療用タンパク質生産は、スケールアップが容易であり、数万頭を省スペースで飼育することができる。また、これらの特徴を持つカイコは稀少疾病医薬品等の多品種少量生産を可能にし、医療ニーズに幅広く対応できる。さらに、カイコはタンパク質の糖鎖修飾に対して大きな利点を有する。カイコは高い外来タンパク質生産能力を持ち、特にカイコ中部絹糸腺で発現させた糖タンパク質に存在する糖鎖は哺乳動物で生産した IgG の糖鎖構造に非常に近い構造であり、アレルギー反応を誘導することが示唆されるフコース残基の含量が低い。そこで、カイコにおいて高品質な医療用タンパク質を生産することを目指し、本研究ではカイコにおいてインターフェロンγ (IFNγ) を生産し、その糖鎖構造を解析することで、カイコ糖鎖修飾に関する基本的知見の収集を行うことを目的とした。

IFNγは活性化Tリンパ球によって生産される生物学的応答調節物質であり、マクロファージやNK細胞を活性化する能力をもつ。C 末端に His-tag をもつ IFNγの遺伝子を導入した組換えカイコを農業生物資源研究所で作出した。この組換えカイコより摘出した中部絹糸腺に含まれる IFNγを Ni カラムクロマトグラフィーで精製した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製タンパク質を分離し、ゲル内消化によってペプチド断片に分解後、nanoLC-MS/MS で糖ペプチド断片の検出、およびその糖鎖構造を推定した。

検出できた糖鎖の多くは、哺乳動物細胞の複合型に近い $GNM_3$ 型、昆虫特有の少マンノース型 である M3 型およびハイマンノース型である M5 型構造であった。IFNγ には *N*-結合型糖鎖付加部位が 2 ヶ所 (Asn25, Asn97)存在するが、その糖鎖構造は糖鎖付加部位により大きく異なった。Asn25 では複合型および少マンノース型糖鎖がそれぞれ 40%以上検出されたのに対し、Asn97 では複合型糖鎖は 15%で、少マンノース型およびハイマンノース型が約 80%を占めた。以前発表した、カイコ絹糸腺由来アンチトロンビン III の糖鎖構造解析では、複合型糖鎖が 16%を占め（2015 年度日本生物工学会)、この結果からもカイコ絹糸腺では一定量の複合型糖鎖が合成できるといえる。

なお、 本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を得て実施した。

silkworm, interferon gamma, *N*-glycan

発表番号：2I002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# アライグマ（食肉目イヌ亜目）とチーター（食肉目ネコ亜目）のミルクの糖質分析

# Milk caorbohydrates of raccoon and cheetah

○大島 岳晴[1]、山口 英美[1]、ホワイトハウス キャサリン[2]、オフテダル オラフ[3]、福田 健二[1]([1]帯広畜産大、[2]ノッチンガムトレント大、[3]スミソニアン環境研)
○Takeharu OSHIMA[1], Emi YAMAGUCHI[1], Katherine WHITEHOUSE[2], Olav OFTEDAL[3], Kenji FUKUDA[1] ([1]Obihiro Univ., [2]Nottingham Trent Univ., [3]Smithsonian Environmental Institution)

[目的] 哺乳動物の乳に含まれる糖質は、真獣類ではラクトースを主要糖質としミルクオリゴ糖も含まれるのに対し、単孔類と有袋類ではミルクオリゴ糖の方がラクトースよりも優先的である。一方真獣類の中でクマ、アザラシ、スカンクなどの食肉目イヌ亜目の種の乳ではミルクオリゴ糖がラクトースよりも優先的である。本研究では食肉目イヌ亜目種と食肉目ネコ亜目種をそれぞれ代表して、アライグマとチーターの乳に含まれるラクトースとミルクオリゴ糖の分離と構造解析を行い、特徴的な違いを明らかにした。
[方法] アライグマの乳は外来種駆除プロジェクトの一環として、殺傷処分とした泌乳中のメス個体の搾乳によって得られた。チーターの乳は、海外の動物園で飼育されている個体より搾乳によって得られた。乳中の糖質はクロロホルム/メタノール抽出によって分離され、ゲル濾過クロマトグラフィーでラクトースと中性・酸性オリゴ糖に分離した。各中性オリゴ糖はグラファイトカーボンカラムを使用した高速液体クロマトグラフィーによって、分離・精製した。酸性オリゴ糖は、イオン交換クロマトグラフィーの後、Amide-80 カラムによる順相系 HPLC で分離・精製した。精製した各オリゴ糖は 1H-NMR と MALDI-TOFMS に供して構造決定した。
[結果と考察] アライグマの乳においては、ラクトースは少量成分でミルクオリゴ糖の方が圧倒的に量は多かったが、チーターの乳では優先的な糖質としてのラクトースとともにミルクオリゴ糖の存在も示された。アライグマのミルクオリゴ糖としては、ラクトースやラクト-N-ネオテトラオース、ラクト-N-ネオヘキサオースの非還元末端ガラクトースに Fuc(α1-2)結合した構造が決定された。チーターのミルクオリゴ糖としては、ラクト-N-ネオヘキサオースやラクトース 3’-O-硫酸、Gal(α1-3)Gal(β1-4)Glc（イソグロボトリオース）や Gal(β1-6)Gal(β1-4)Glc が発見された。それ以外のオリゴ糖の化学構造は現在解析中である。

milk oligosaccride, raccoon, cheetah

発表番号：2I003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリアⅠ

# 鹿茸に含まれるコンドロイチン硫酸の分析

Analysis of chondroitin sulfates in deer antlers

○武田 尚子[1]、上村 明寿美[2]、井之上 侑雅[2]、鎌田 和[2]、杉田 大輝[2]、田村 純一[2]([1]鳥取大・産学連携、[2]鳥取大・地域環境)
○ Naoko TAKEDA[1], Asumi UEMURA[2], Yuga Inoue[2], Nodoka KAMATA[2], Daiki SUGITA[2], Jun-ichi TAMURA[2] ([1]Regional Industrial Academic Cooperation, Tottori Univ., [2]Regional Environ., Tottori Univ.)

[目的]シカの角は一年間で生え変わることが知られている。シカの角は毎年春先から生え始め、秋ごろには成長が止まり、骨化後、冬の終わりに落角する。そのため、シカの角は人間などに比べ非常に速い速度で軟骨組織から骨へと変化する特徴をもつ。骨形成や細胞の分化、増殖の調整の役割を担う一つに細胞外マトリックスがある。細胞外マトリックスの主要成分の一つであるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（CSPG）は、骨化に関与し、ニワトリの肢や翼を形成する際、胚の間充織で CS の硫酸化パターンが変化することが知られている。CS は、D-グルクロン酸と N-アセチル-ガラクトサミンの二糖単位の繰り返しによって構成された直鎖多糖であり、硫酸基の結合する位置や数によってＡ型やＣ型などに分類されている。天然に存在する CS は、複数の硫酸化パターンで構成されたヘテロな構造である。非常に速い速度で成長するシカの角で CS の硫酸化パターンや含有量を明確にできれば、骨化における CS の役割を分子レベルで明らかにでき、医薬品開発に重要な知見を与えると考えた。本研究では成長初期段階にあるシカの角（鹿茸）中の CS の含有量と組成を明らかにすることを目的とした。

[方法・結果]成長初期段階のシカの角（鹿茸）を細断し、脱脂した後、減圧乾燥させた。脱脂乾燥物のタンパク質をプロテアーゼによって分解し、エタノールを用いて糖鎖を沈殿させ、糖鎖を得た。得られた糖鎖は、コンドロイチナーゼで二糖単位にまで分解し、HPLC を用いて糖鎖の硫酸化パターンと含有量を明らかにした。

chondroitin sulfate, deer antler, analysis

発表責任者：田村　純一（jtamura@rs.tottori-u.ac.jp）

発表番号：2I004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 異なる環境に生息する魚類に含まれるコンドロイチン硫酸の分析

# Analytical studies of chondroitin sulfates derived from fish living in different environments

○田村 純一[1]、上田 健人[1]、武田 尚子[2] ([1]鳥取大・地域環境、[2]鳥取大・産学連携)
○Jun-ichi Tamura[1], Kento Ueda[1], Naoko Takeda[2] ([1]Regional Environment, Tottori Univ., [2]Regional Industrial Academic Cooperation, Tottori Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸は医薬品やサプリメントとして注目されており、近年需要が増加している。現在市販されているものの多くはサメやブタ由来であるが、サメは保護動物として原料の安定供給が困難になる可能性がある。また、陸上動物は感染症の危険があるため、他の代替資源の探索が必要である。コンドロイチン硫酸は主としてグルクロン酸と N–アセチルガラクトサミンで構成される二糖の繰返し構造からなり、水酸基がしばしば硫酸化されている。この硫酸化パターンがさまざまな生化学的機能発現に重要であり、由来生物特異的な硫酸化パターンを見いだすことは医薬品の開発にもつながる。今回我々は、異なる環境に生息する数種類の魚介類について、コンドロイチン硫酸の単離精製を行い、その含有量と硫酸化パターンを解析したので報告する。
【方法と結果】天然と養殖など、異なる環境に生息する数種類の魚介類について、部位別に粉砕、脱脂、タンパク質の分解などを行い、コンドロイチン硫酸を単離精製した。得られた精製糖鎖をコンドロイチナーゼ ABC によって二糖単位にまで分解し、HPLC で得た不飽和二糖ピークから硫酸化パターンと含有量を求めた。

Chondroitin sulfate, Glycosaminoglycan, Fish

発表責任者：田村純一（jtamura@rs.tottori-u.ac.jp）

発表番号：2I005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# ER alpha-1,2 mannosidase I の一塩基多型による特性への影響
# Effects on properties of ER alpha-1,2 mannosidase I by SNP

○相川 順一[1]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研、[2]ERATO-JST)
○Junichi Aikawa[1], Yukishige Ito[1,2] ([1]RIKEN, [2]ERATO-JST)

「目的」

ER α-1,2 mannosidase I(ERManI)は、動物細胞内では粗面小胞体、ゴルジ体あるいは Quality Control Vesicle に存在する糖鎖分解酵素である[1)]。特に、ハイマンノース型 N-glycan の B 鎖上にあるマンノースに対して ERManI は高い選択性を示す。これまでに、我々は大腸菌で発現させたヒト ERManI を用いて、ERManI が①グルコースを含む糖蛋白質糖鎖からもマンノースを遊離し、かつ②変性状態の糖蛋白質からより多くのマンノースを遊離することを明らかにした[2)]。従って、ERManI 自身がフォールデイング途上にある糖蛋白質の立体構造を直接センシングすると考えられた[2)]。

一方、ヒト ERManI をコードする遺伝子の変異の中には、Type II congenital disorder of glycosylation の疾病を引き起こすものが報告されており[3)]、ERManI の変異とその影響に関する網羅的な理解が必要と考えられた。そこで我々は昨年度の大会で一部報告しているが、一塩基変異により missense mutaion を誘起する SNP(single Nucleotide Polymorphism)に着目し、それらの変異とその影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

「方法」

組換え型ヒト ERManI による、１）変性処理した糖蛋白質を基質とした反応、及び、２）蛍光糖鎖を基質とした反応を行い、その特性の評価を行った。

「結果」

作成したヒト ERManI 変異体７種のうち、D293N により、変性大豆凝集素を基質とした反応で活性の低下が見られた。他の５種の変異では、同反応での活性の低下は見られなかった。以上の結果から、活性に影響を及ぼす SNP が他にも存在する可能性が示された。D293N によるヒト ERManI の構造への影響も考察する。

1) Bischoff J. & Kornfeld R. J. Biol. Chem. 258, 7907 (1983), Pan S. et al. Mol. Biol. Cell 22, 2810 (2011), Benyair R. et al. ibid. 26, 172 (2015)
2) Aikawa, J. et al. Glycoconj. J. 29, 35 (2012), Aikawa, J. et al. J. Biochem. 155, 375 (2014)
3) Rafiq MA. et al. Am. J. Hum. Genet. 89, 176 (2011)

Mannosidase, Glycoprotein, Quality control

発表責任者：相川　順一（aikawa@riken.jp）

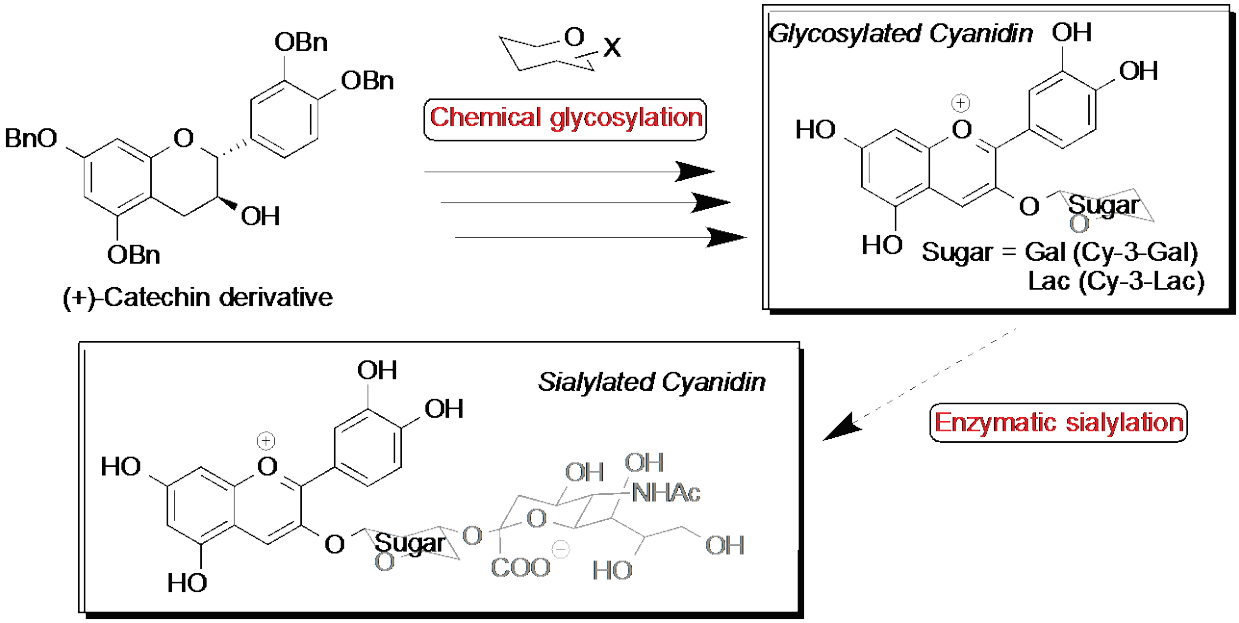
発表番号：2I006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 非天然型シアニジン配糖体の合成研究

# Synthesis of unnatural glycosylated cyanidin

○吉村 弥生、松尾 一郎（群馬大理工）
○Yayoi YOSHIMURA, Ichiro MATSUO (Gunma Univ.)

【目的】シアニジンはフラボノイド系の植物色素分子であり、多くの配糖体型が確認されている。シアニジン-3-グルコシドに代表されるシアニジン配糖体は抗酸化作用等の生理活性を有しており、その構造中の糖分子の存在が生理機能や分子の安定性の向上に寄与していることが報告されている。本研究では、シアニジンの生物活性の向上を目指し、化学的におよび酵素的にシアニジンに非天然型の糖分子を導入した新しいシアニジン配糖体の合成とその抗酸化作用の解析を行っている。
【方法・結果】合成ターゲットとして、シアリルガラクトースもしくはシアリルラクトースがシアニジン上の 3 位水酸基に修飾された配糖体を設定した。まず、シアニジン-3-グルコシドの既知の合成報告[1]をもとに、シアニジン-3-ガラクトシド（Cy-3-Gal）およびシアニジン-3-ラクトシド（Cy-3-Lac）を合成した。現在、Cy-3-Gal および Cy-3-Lac を基質として α-2,3-sialyltransferase を用いたシアル酸転移反応の検討をしている。




[1] Kondo T. et al., *Organic Lett.*, **2006**, *8*, 3609-3612.

Cyanidin, glycosylation

発表番号：2I007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 昆虫におけるシアル酸単糖の生合成と分解酵素
# Metabolism of sialic acid monosaccharide in insect

○北島 健[1,2]、熊澤 慎介[1,2]、呉 迪[1,2]、濱口 香代[1,2]、藤田 明子[1]、郷 慎司[1,2]、水口 智江可[2]、池田 素子[2]、小林 迪弘[2]、佐藤 ちひろ[1,2] ([1]名大・生物機能セ、[2]名大・生命農学)
○Ken KITAJIMA[1,2], Shinsuke KUMAZAWA[1,2], Di WU[1,2], Kayo HAMAGUCHI[1,2], Akiko FUJITA[1], Shinji GO[1,2], Chieka MIZUGUCHI[2], Motoko IKEDA[2], Michihiro KOBAYASHI[2], Chihiro SATO[1,2] ([1]Nagoya Univ. BBC, [2]Nagoya Univ. Grad. Sch. Bioagr. Sci.)

シアル酸（Sia）は動物界の後口動物において広く存在する。一方、前口動物における存在分布については未解明な部分が多いが、近年、前口節足動物の昆虫にシアル酸の存在が明らかにされている。シアル酸は食餌から摂取される場合もあるが、様々な組織で新規合成される。まず、遊離の単糖シアル酸である N-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac）またはデアミノノイラミン酸（Kdn）は、その 9-リン酸化物がシアル酸 9-リン酸合成酵素（SPS）によって N-アセチルマンノサミン（ManNAc）またはマンノース（Man）の 6-リン酸化物からそれぞれ合成され、その後、脱リン酸化されて生合成される。また、Neu5Ac または Kdn は、これらをピルビン酸と ManNAc または Man へと分解するシアル酸ピルビン酸リアーゼ（SPL）によって、その逆反応経路を通じて生合成される場合もある。このようにシアル酸の新規合成には ManNAc および Man の供給が必要である。Man の供給は脊椎動物でも昆虫でも Man 代謝系を通じて行われる。一方、ManNAc の供給は、脊椎動物ではその合成に必須な UDP-GlcNAc 2-エピメラーゼ/ManNAc キナーゼ（GNE）によって主に担われている。しかし、昆虫には GNE 遺伝子が存在せず、シアル酸の de novo 合成経路は完全には整っていないように思われる。本研究は、シアル酸の新規合成経路の進化の特徴を探る目的で、その経路に関わる SPS と SPL に着目して、昆虫と脊椎動物の酵素の構造と活性を比較検討した。具体的には、それらの点変異体を大腸菌で発現、調製して活性を測ることによって基質特異性の変化を調べた。まず、ハエ SPS にはマウス SPS と同様、Kdn-9-P 合成能は無く Neu5Ac-9-P 合成能があったが、その比活性はマウス SPS の 65% 程度であった。一方、4 種の鱗翅目 SPS はいずれの活性も消失しており、その原因は、二価陽イオンの配位に関わる His-215 が Gln に変異したためであった。次に、昆虫 SPL については、鱗翅目 4 種とハエにはその遺伝子が存在せず、セイヨウミツバチに見出された。ヒト SPL は Kdn より Neu5Ac を良い基質とするのに対して、セイヨウミツバチ SPL は Neu5Ac を基質とせず Kdn を基質とした。この原因として、ヒト SPL の 200-Val、202-Glu、218-Ser が、セイヨウミツバチ SPL ではそれぞれ Tyr、Gln、Thr に変異したことが関与していることが推定された。以上の結果から、昆虫においてはシアル酸の新規合成に関与する 2 つの酵素ともに Neu5Ac 新生に対する活性が消失あるいは著しく低下する変異が起こっていることがわかった。

sialate pyruvate lyase, sialic acid 9-phosphate synthase, insect

発表責任者：北島健（kitajima@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：2I008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# マンノース-6-リン酸を有する糖ペプチドの合成

# Synthesis of glycopeptide containing mannose-6-phosphate structure

○山本 直幸、朝比奈 雄也、北條 裕信（阪大蛋白研）
○Naoyuki YAMAMOTO, Yuya ASAHINA, Hironobu HOJO (Inst. Protein Res, Osaka Univ.)

小胞体で高マンノース型糖鎖の付加を受けたリソソーム酵素は、シスゴルジ網でマンノース-6-リン酸（M6P）構造が形成される。その後、トランスゴルジ網表面に存在するマンノース-6-リン酸受容体（MPR）によって認識されると、その酵素はリソソームへと輸送されることが知られている[1]。すなわち、これら M6P はリソソームへ物質を輸送するための重要な目印となっている。しかしながら、M6P を有する糖タンパク質の化学合成例はこれまでなかった。本研究では、M6P を有する糖タンパク質の合成を目指して、まずそのフラグメントである糖ペプチドの合成と、細胞内動態（リソソームへの輸送過程）の検証を試みることとした。

合成戦略としては、Asn 側鎖に M6P を修飾した糖アミノ酸誘導体を液相合成によって調製し、得られた誘導体を Fmoc 固相合成法に用いることで糖タンパク質を得ることにした。また、対応する糖誘導体の水酸基の保護には、我々が有用性を見出した 4-メチルベンジル基（MBn 基）を用いることにした。MBn 基は、糖鎖の構築の際には保護基としての安定性を有しているが、ペプチド鎖伸長後に用いられる TFA カクテルによって、ペプチド側鎖の脱保護と同時に除去することが可能である[2]。そこで実際に、無保護のマンノースを出発原料とし、水酸基をアセチル保護した後、1 位ブロモプロピル化を経てアジド化した。続いてアセチル基を脱保護した後、6 位のみをトリチル化し、残る水酸基を MBn 化した。6 位のトリチル基を脱保護し、リン酸化した後、アジドの還元と Asp 誘導体との縮合を行い、計 9 段階で MBn 保護した M6P を側鎖に有する糖アミノ酸誘導体を 19%の収率で得た。得られた糖アミノ酸誘導体を、一般的な Fmoc 固相合成法に用い、リソソーム酵素であるサポシン C の部分配列（12-31）を合成したところ、ペプチド鎖の伸張及び保護基の脱保護は問題なく進行し、目的とした M6P を有するサポシン C（12-31）を効率よく合成することに成功した。

今後は、合成した M6P を有する糖ペプチドの細胞内動態を、蛍光基を用いて検討していく予定である。

References
[1] Satoh T., et al., *Trends Glycosci. Glyc.*, **2012**, 24, 193-202
[2] Asahina Y., et al., *J. Carbohydr. chem.*, **2015**, 34, 12-27

chemical synthesis, mannose-6-phosphate, lysosome enzyme

発表番号：2I009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 植物細胞壁ペクチンの生合成に必要な UDP-アピオースの単離法の開発

# Preparation of UDP-apiose required for biosynthesis of pectin in plant cell wall

○松田 諒子、鈴木 真未、石水 毅（立命館大生命）
○Ryoko MATSUDA, Mami SUZUKI, Takeshi ISHIMIZU (Ritsumeikan Univ.)

〈背景〉

植物細胞壁ペクチンには、ラムノガラクツロナンⅡ(RG-Ⅱ)という構造単位が含まれる。RG-Ⅱの構成単糖のアピオース残基は、ホウ素原子とホウ酸ジエステル結合することでペクチンを架橋しており、ペクチンの構造形成に重要な役割を果たしている。この RG-Ⅱ生合成については、アピオース転移酵素をはじめ、約 20 種類の糖転移酵素が関与する。しかし、ほとんどの酵素が未同定である。その理由の一つに糖転移酵素の基質の調製が困難なことがあげられる。アピオース転移酵素の基質 UDP-アピオースは、アルカリ条件下で 2 位の水酸基が隣接するリン原子を求核攻撃することで容易に UMP に分解されるため、これまでに単離されていない。本研究は、UDP-アピオースが溶液中で分解されにくい条件を探索し、UDP-アピオースの単離法を開発することを目的とした。

＜方法・結果＞

大腸菌で発現させた UDP-アピオース/UDP-キシロース合成酵素(AXS1)とその基質である UDP-グルクロン酸、補酵素 $NAD^+$、緩衝液を混合して 25℃で反応させた。このとき、生成した UDP-アピオースの分解を防ぐために、正電荷を持つかさ高い緩衝剤として、トリエチルアミンや *N,N*-ジメチルシクロヘキシルアミンを用いた。反応生成物を逆相 HPLC で分析すると、UDP-アピオースと思われる反応生成物が生成していた。この化合物は、pH9.0 で UMP が定量的に生成した。また、この化合物を 4M トリフルオロ酢酸で処理すると、アピオースが生成していた。さらに、この化合物を逆相 HPLC で分取し、MS 分析をしたところ、UDP-アピオースの分子量と一致する質量が観察された。以上より、UDP-アピオースを初めて単離することに成功した。今後は UDP-アピオースを基質として安定に利用できる条件を検討し、アピオース転移酵素の同定に向けて実験を進めていく予定である。

plant cell wall, pectin, nucleotide sugar

発表番号：2I010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 植物ゴルジ体膜局在ペクチン合成酵素複合体の解析

# Analysis of biosynthetic protein complexes localized at Golgi apparatus in plant cell

○高田 和拓、加藤 大詞、平岡 誉登、石水 毅（立命館大生命）
○Kazuhiro Takada, Hirotsugu Kato, Takato Hiraoka, Takeshi Ishimizu (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

植物の細胞壁は一次細胞壁と二次細胞壁に分けられ、ペクチンは一次細胞壁の主要な構成成分である。ペクチンの生合成には約 60 種類の酵素が関与しており、その多くがゴルジ体に局在していると考えられている。また、ペクチンの複雑な構造を生体内で効率的に合成するために、これら酵素が複合体を形成しているとも考えられている。しかし、その生合成機構については不明な点が多く、これまでにゴルジ体局在の膜タンパク質複合体が網羅的に解析された例もない。その理由として、ゴルジ体における酵素の発現量が他の細胞小器官に発現するタンパク質と比べて少なく、解析を行うために必要な酵素量を得ることが困難であることが挙げられる。そこで、本研究では一次細胞壁合成の盛んなアズキ上胚軸を材料とし、ゴルジ体を多く含んだサンプルを得る方法の検討を行った。さらに、タンパク質複合体を変性させずに分析できる Blue Native(BN)-PAGE によりペクチン生合成関連酵素における複合体形成の有無を調査した。

【方法・結果】

ゴルジ体の分画および濃縮はスクロース密度勾配遠心法を含む 3 回の超遠心により行った。アズキ上胚軸から抽出したオルガネラ混合物を超遠心(100,000 × *g*)することで沈殿としてオルガネラ膜画分を得た。次に、懸濁したオルガネラ膜画分をスクロース密度勾配溶液(20-55 %)の上に重層し、超遠心(100,000 × *g*)によりオルガネラの分画を行った。ゴルジ体に富んだ画分について、再度超遠心(100,000 × *g*)を行い、沈殿としてゴルジ体濃縮画分を得た。このゴルジ体濃縮画分をジギトニンで可溶化し、BN-PAGE を行うことで、いくつかのタンパク質複合体を検出することに成功した。このうち、分子質量 900 kDa 付近のタンパク質複合体にペクチン成分ポリガラクツロン酸の合成活性を検出した。

結論として、スクロース密度勾配遠心法と BN-PAGE を組み合わせることによりゴルジ体膜局在タンパク質複合体の解析を可能とした。また、本実験によって分子質量 900 kDa 付近のタンパク質複合体からペクチン合成酵素の一種であるポリガラクツロン酸合成酵素の活性を検出した。今後は、分子質量 900 kDa 付近のタンパク質複合体とポリガラクツロン酸合成酵素の対応関係をより詳細に解析し、ペクチン合成酵素複合体構成タンパク質の同定を行う。

plant cell wall, protein complex, glycosyltransferase

発表責任者：高田　和拓（sb0020kf@ed.ritsumei.ac.jp）

発表番号：2I011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 植物細胞壁ペクチンの生合成に関与するガラクトース転移酵素の生化学的解析と超活性化
# Characterization and hyperactivation of galactosyltransferase involved in biosynthesis of pectin in plant cell wall

○松本 直樹、上原 洋平、田村 峻佑、高田 和拓、柳生 健太、石水 毅（立命大生命）
○Naoki MATSUMOTO, Youhei UEHARA, Shunsuke TAMURA, Kazuhiro TAKADA, Kenta YAGYU, Takeshi ISHIMIZU (Ritsumeikan Univ.)

植物細胞壁成分のペクチンは 12 種類の単糖から構成されている多糖であり、その構造は非常に複雑である。またペクチン生合成には約 50 種類の糖転移酵素が関与すると考えられている。しかしこれらの酵素遺伝子はほとんど同定されていない。そこで酵素遺伝子の同定のためには、酵素の活性測定法を構築する必要がある。ペクチン構成成分の一つであるラムノガラクツロナン I は、主鎖にガラクツロン酸とラムノースの二糖繰り返し構造をもつ。この主鎖のラムノース残基にガラクトースを構成単位とするガラクタンが側鎖として結合している。ラムノース残基にガラクトースを転移させるガラクトース転移酵素は未だ同定されていない。本研究では、このガラクトース転移酵素の活性測定法を構築し、生化学的性質を解析した。

ドナー基質の UDP-ガラクトースは市販品を用いた。アクセプター基質の蛍光標識ラムノガラクツロナンオリゴ糖は、市販のラムノガラクツロナン I を TFA により加水分解し、生成した各オリゴ糖を 2-アミノピリジンにより蛍光標識した。アズキ上胚軸の粗抽出物を酵素源にして、ラムノガラクツロナンオリゴ糖と UDP-ガラクトースを反応させると、HPLC 上で新たな生成物が観察された。この生成物は、ESI-MS により解析すると、ラムノガラクツロナンオリゴ糖にガラクトースが転移した化合物であることが分かった。本酵素によるガラクトース転移反応は、反応時間ならびに酵素量に依存して定量的に進行した。本酵素の至適温度は 30℃、至適 pH は 7.0 であった。スクロース密度勾配遠心法を用いた細胞内局在解析により、本酵素がゴルジ体に局在することが分かった。また 3.0 mM マンガンイオン存在下で高い活性を示した。アクセプター基質特異性を調べたところ、ラムノガラクツロナンオリゴ糖の 9 糖以上を特異的に認識することが分かった。陽イオン界面活性剤である CTAB や塩化ベンザルコニウムなどの存在下で、本酵素の活性が約 20 倍上昇し、酵素の超活性化が観察された。塩化ベンザルコニウム存在下では $K_m$ 値が減少し、$V_{max}$ 値が増加した。また NaCl 存在下では塩化ベンザルコニウムや CTAB による酵素の超活性化が阻害された。これらのことより、陽イオン界面活性剤が陰イオンに帯電した酵素あるいは基質と静電相互作用し、酵素の超活性化が起こったと考えられる。

glycosyltransferase, hyperactivation, plant cell wall

発表番号：2I012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 分枝鎖を有するβ-グルカンオリゴ糖の合成と endo-β-1,3-グルカナーゼの加水分解特異性解析

# Analysis of hydrolysis specificity of endo-ß-1,3-glucanase by synthetic branched ß-glucan oligosaccharide probes

○宮川 淳[1]、三木 彩子[2]、織田 昌幸[2]、山村 初雄[1]（[1]名工大院工、[2]京府大院生命環境科学）
○Atsushi MIYAGAWA[1], Ayako MIKI[2], Masayuki ODA[2], Hatsuo YAMAMURA[1] ([1]Nagoya Inst. of Tech., [2]Kyoto Pref. Univ.)

【背景・目的】細菌や真菌は植物に感染した際に、植物から分泌されるβ-1,3-グルカナーゼによりその細胞壁であるβ-グルカンが加水分解され、分解されたβ-グルカンは高等植物において免疫賦活化分子として重要な役割を演じている。また、哺乳動物においてもβ-グルカンは、樹状細胞やマクロファージに発現するレクチン Dectin-1 によって認識され、免疫を活性することで生体防御機能に深く関わっており、ガン治療や健康食品として実用化されている。しかし、菌類からの抽出物であるβ-グルカンを精製し、構造均一なβ-グルカンを得ることは容易ではない。そのため、β-グルカン加水分解酵素である endo-β-1,3-グルカナーゼの糖鎖認識特異性に関する詳細な構造活性相関研究は、行われていない。そこで、本研究では化学合成により構造明確な分岐鎖を有するβ-グルカンオリゴ糖を得た後、グルカナーゼの加水分解特異性を評価し、その認識特異性を明らかにすることを目的とした。
【結果と考察】endo-β-1,3-グルカナーゼが加水分解できる最小単位である直鎖 3 糖を基礎骨格とし、分岐鎖の長さおよび結合位置が異なるグルカンオリゴ糖を構築した。構築方法は、主鎖である直鎖 3 糖を構築した後、主鎖のグルコースの 6 位に分岐鎖として 1～2 糖を導入し、分岐鎖の長さおよび結合位置が異なるβ-グルカンオリゴ糖誘導体を得た。さらに合成したオリゴ糖を連結させることで、8 糖および 16 糖のβ-グルカンオリゴ糖誘導体を得た。最後にアグリコンに蛍光物質を導入し、蛍光プローブとした。このプローブを用いて *Cellulosimicrobium cellulans* DK-1 由来の endo-β-1,3-グルカナーゼの糖加水分解反応を行い、HPLC を用いた微量分析により、その加水分解特異性の評価・解析を行った。反応には酵素の加水分解ドメインおよび全長酵素（加水分解ドメイン＋糖鎖認識ドメイン）をそれぞれ用いて行った。その結果から明らかになった分岐鎖の位置により異なる切断特性および糖鎖認識サブサイトの構造ついて、その詳細を報告する。

β-glucan, glucanase, hydrolysis

発表責任者：宮川　淳（miyagawa.atsushi@nitech.ac.jp）

発表番号：2I013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# シアリルリン酸ドナーを用いたシアリルガラクトース誘導体の合成とメタセシス反応による蛍光基の導入

# Synthesis of sialyl galactose derivatives using sialyl phosphate donor and introduction of fluorescence group by cross metathesis reaction

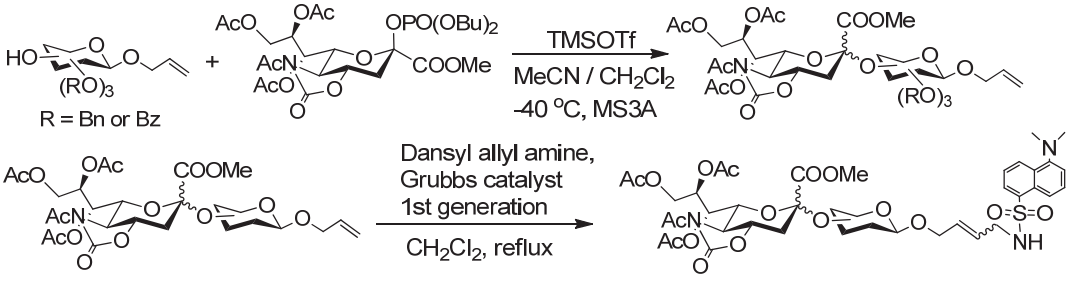
○栗本 健太、山村 初雄、宮川 淳（名工大院工）
○Kenta KURIMOTO, Hatsuo YAMAMURA, Atsushi MIYAGAWA (Nagoya Inst. of Tech.)

【目的】

シアリダーゼは様々な生物に存在し、糖脂質や糖タンパク質上の糖鎖からシアル酸を切断することにより、細胞増殖・分化やアポトーシス等の生体機能を調節する。シアル酸含有糖鎖においてシアル酸残基は主に非還元末端に存在し、ガラクトースに対してα(2→3)またはα(2→6)結合を形成している。シアリダーゼはこの結合位置の違いを認識し、選択的に切断する。本研究では、シアル酸の結合位置の違いに着目し、シアリダーゼがシアリルガラクトース構造をどれほど厳密に区別しているか解明することを目指した。そのために、化学合成により天然型・非天然型の異なる結合位置でつながったシアリルガラクトース異性体の合成を行い、それらを蛍光プローブへと誘導した後、シアリダーゼの加水分解特異性を評価する。

【方法・結果】

官能基変換のためにアリル基をアグリコンにもつガラクトシドアクセプターとのシアリル化において、チオフェニルシアロシドドナーの活性化剤に NIS/TfOH 系を用いると反応は進行しなかった。そこで、TMSOTf 系で活性化可能なリン酸基を脱離基に有するシアリルリン酸ドナー用い、ガラクトース内のそれぞれの水酸基に対するシアリル化の反応性・立体選択性を調査した。ガラクトシドアクセプターはベンジル基またはベンゾイル基で保護することで、シアリル化におけるアクセプター保護基の効果も同時に調査した。結果として、*N*-アセチルオキサゾリジノン保護したリン酸ドナーとのシアリル化では反応が進行し、それぞれの結合位置で結合したシアリルガラクトース結合位置異性体を得た。次に、アリル基をメタセシス反応によって効率よく変換し蛍光標識を導入した。以上のシアリル化、機能化とその応用例を報告する。




Ref：Kurimoto, K.; Yamamura, H.; Miyagawa, A. *Carbohydr. Res.*, **2015**, *401*, 39–50.

sialylation, sialyl phosphate donor, carbohydrate

発表番号：2I014
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 植物 N 型糖鎖分解に関与するシロイヌナズナ液胞 α-マンノシダーゼの同定

# Identification of vacuolar α-mannosidases associated with N-glycan degradation in *Arabidopsis thaliana*

○川原 悠太郎、石水 毅（立命大生命）
○Yutaro KAWAHARA, Takeshi ISHIMIZU (Ritsumeikan Univ.)

植物 N 型糖鎖は最終的に液胞で分解される。2004 年に植物液胞酵素エンド-β-マンノシダーゼが発見され、植物特有の N 型糖鎖分解経路が存在することが判明した。エンド-β-マンノシダーゼの基質特異性は特徴的で、液胞α-マンノシダーゼがハイマンノース型糖鎖に作用し生成する糖鎖に作用する。しかしこれまでに、シロイヌナズナ液胞α-マンノシダーゼは同定されていない。この酵素が同定されると、その機能解析を行うことができる。そこで本研究は、シロイヌナズナ酵素の遺伝子を同定することを目的とした。

これまで知られている液胞α-マンノシダーゼは糖質加水分解酵素ファミリーGH38 に分類される。シロイヌナズナ由来の GH38 に分類される遺伝子は 4 種類存在し、既知の液胞α-マンノシダーゼとの相同性やシロイヌナズナ液胞プロテオーム解析結果から、3 つの遺伝子をシロイヌナズナ液胞α-マンノシダーゼの候補遺伝子とした。

候補遺伝子を酵母発現用ベクターpPICZαに挿入し、発現コンストラクトを作製した。そして、メタノール資化性酵母 *Pichia pastris* KM71H 株に形質転換し、各候補遺伝子がコードする His タグ付きタンパク質の発現を試みている。

これらのうち、いくつかのタンパク質は発現し、*p*NP-α-D-マンノピラノシドに対する活性を有していた。これらをニッケルカラムにより精製し、N 型糖鎖である $Man_5GlcNAc_2$ に対して作用させたところ、既知の液胞α-マンノシダーゼと同様の活性を示した。

Glycosyl hydrolase, N-glycan, Vacuole

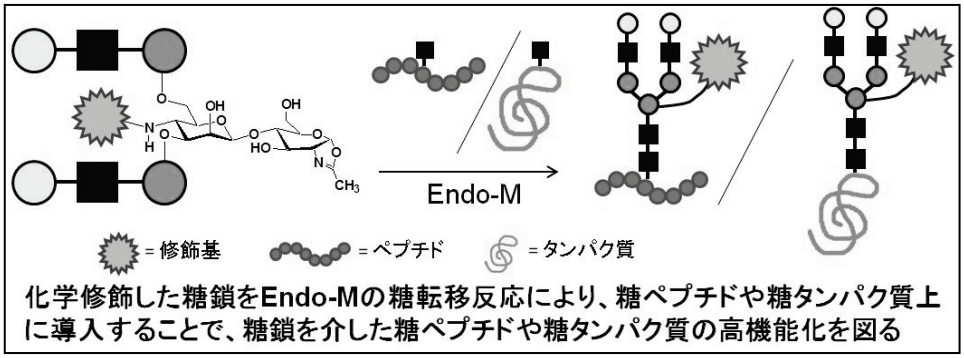
発表番号：2I015
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 化学修飾した糖鎖を基質とした Endo-M の糖転移反応

# Transglycosylation reaction of Endo-M using chemical modified glycans

○石井 希実[1]、須永 千恵[1]、吉村 弥生[1]、熊田 純一[2]、松崎 祐二[2]、松尾 一郎[1] ([1]群馬大院理工、[2]東京化成工業株式会社)
○ Nozomi ISHII[1], Chie SUNAGA[1], Yayoi YOSHIMURA[1], Jyunichi KUMADA[2], Yuji MATSUZAKI[2], Ichiro MATSUO[1] ([1]Gunma Univ., [2]TCI)

【背景】エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）は、糖タンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖を切り出す糖加水分解酵素である。近年では ENGase が有する糖転移活性を利用した糖ペプチドや糖タンパク質の合成研究がすすめられている[1]。本研究では、ENGase による糖タンパク質糖鎖リモデリング技術の応用として、化学修飾した糖鎖を基質とした ENGase の糖転移反応により糖鎖を介したタンパク質の化学修飾や糖ペプチドプローブの高機能化の可能性を検証した。




【方法】我々は既にアスパラギン結合型糖鎖コア分岐部分の水酸基の配向が異なる 4 糖基質を系統的に化学合成し、Endo-M を用いた糖転移反応をおこなうことで、*β*-マンノシド残基の C-4 位部分は糖転移活性に影響を与えないことを見いだしている[2]。そこで、糖残基への化学修飾基の導入位置として*β*-マンノシド残基の C-4 位部分を選択し、修飾基導入の足掛かりとするためにアミノ基を導入した。すなわち、ラクトサミン誘導体のガラクトース残基の 3，6 位にマンノース残基を導入後、遊離の 2 位および 4 位水酸基に脱離基としてトリフルオロメタンスルホニル基を導入した。得られたジトリフラート体の 4 位選択的にアジド基を導入後、2 位水酸基の立体を反転することで C-4 位にアジド基を有する*β*-マンノシド体へと導いた。得られた 4 糖誘導体の脱保護およびアジド基をアミノ基へと変換することで 4 糖誘導体を合成した。4 糖誘導体のアミノ基に対して *N*-メチルアントラニル（Nma）基を導入、還元末端部分をオキサゾリン化することで化学修飾糖供与体へと導いた。グルコサミン誘導体を糖受容体基質とした Endo-M による糖転移反応は、糖転移生成物である蛍光標識 5 糖誘導体を収率よく与えた。以上の結果より、Endo-M を利用することにより糖鎖を介した糖タンパク質や糖ペプチド修飾が可能であることを見いだした。

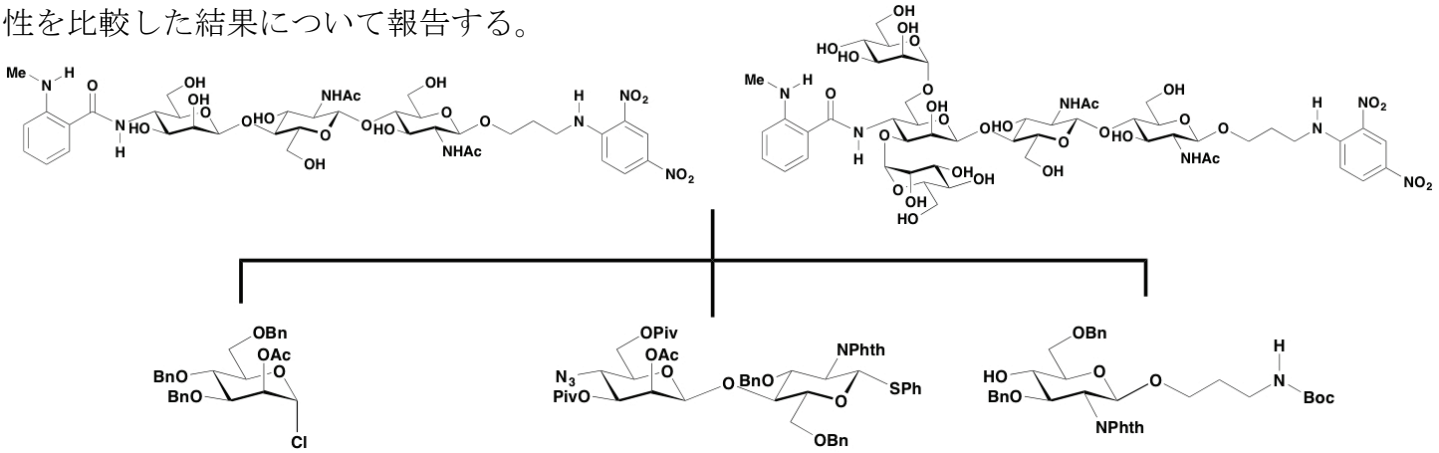
[1] i) M. Umekawa *et al*., *J. Biol. Chem.*, 2010, *285*, 511-521., ii) TCI メール, No.151, http://www.tcichemicals.com/ja/jp/support-download/tcimail/application/15http1-14.html; [2] 第 33 回日本糖質学会年会, P-012.

Endo-*β*-*N*-acetylglucosaminidase(ENGase), transglycosylation, synthesis

発表番号：2I016
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

ENGase 活性検出に向けた糖鎖分子プローブの合成
Synthesis and evaluation of glycan probes for detecting ENGase activity
○須永 千恵、石井 希実、吉村 弥生、松尾 一郎（群馬大院・理工）
○Chie SUNAGA, Nozomi ISHII, Yayoi YOSHIMURA, Ichiro MATSUO (Gunma Univ.)

【背景】エンド-*β*-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase）は，糖タンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖を *N*-アセチルグルコサミン 1 残基を残して切り出すエンド型の糖加水分解酵素である。ENGase の糖加水分解活性は，糖タンパク質からの脱糖鎖反応を SDS-PAGE で解析する方法や蛍光標識した糖鎖や糖ペプチドを基質として，HPLC や TLC によって反応を追跡することが一般的である。この様な背景のもと我々は，多サンプルを一度に処理することが可能なアッセイ系の開発を試みている。ハイスループット性に優れたアッセイ系を構築することで，ENGase 阻害剤の探索や新規 ENGase の探索研究が容易になると期待している。
【方法・結果】簡便かつハイスループット性に優れたアッセイ系として，ENGase によって加水分解されると発光する FRET 型の基質をデザインした。具体的には，ENGase が切断するキトビオース構造を有し，非還元末端部分の β-マンノシド残基にアミノ基を介して蛍光性置換基を，還元末端部分にアミノプロピル基を介して消光性置換基を導入した 3 糖および 5 糖分子プローブをデザインした。非還元末端部分にアジド基を有する 2 糖供与体を合成後，Boc 基で保護したアミノプロピル基を有する糖受容体と反応することで 3 糖誘導体へと導いた。糖部分の保護基を変換後，水素雰囲気下，脱ベンジル化と同時にアジド基をアミノ基へと変換した。得られたアミノ体に対して，蛍光性置換基として *N*-メチルアントラニル（Nma）基を導入した。その後，脱 Boc 化を行い，生じたアミノ基に対してジニトロフェニル（Dnp）基を導入した。得られたプローブの Nma 基の蛍光は Dnp 基によって消光されることを確認した。本発表では，3 糖および 5 糖分子プローブの合成と ENGase によるプローブの切断活性を比較した結果について報告する。




ENGase, molecular probe, synthesis

発表番号：2J001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# TetR 型転写因子のリガンド結合特異性改変のための新規なスクリーニング手法の開発

# Development of a novel screening system for alteration of ligand-binding specificity of a TetR type repressor

○室井 太木、勝山 陽平、大西 康夫（東大院・農生科・応用工）
○Taiki MUROI, Yohei KATSUYAMA, Yasuo OHNISHI (The University of Tokyo)

【背景と目的】

TetR 型転写因子ファミリー（TFR）は原核生物に普遍的に存在し、最も始原的な遺伝子制御を担う最大のタンパク質ファミリーである。TFR は特定の化合物（リガンド）を認識し、それに応じて DNA と結合・解離することで、細胞内の環境に応じた遺伝子発現制御を行う。合成生物学の発展とともに、TFR は特定の化合物を検知するためのセンサーとして利用価値があると考えられるようになった。TFR のオペレーターの下流に（蛍光タンパク質や薬剤耐性遺伝子等の）レポーター遺伝子を挿入することで、リガンドを検知する簡便なバイオセンサーを構築することができる。しかし TFR は種類こそ多く知られているものの、それらが認識するリガンドは未知であるものも多く、あらゆる化合物を包括しているとは言い難い。そこで我々は TFR のリガンド特異性を改変するための新規なハイスループットスクリーニング手法を考案した。このシステムを確立することで、任意の化合物を TFR により検知することが可能になると考えられる。

【方法と結果】

本手法ではクロラムフェニコール耐性遺伝子 *CmR* と、最少培地で宿主の生育を抑制する致死遺伝子 *sgrS* を利用する。標的となる TFR が制御するプロモーターの下流に *CmR*、*sgrS* をそれぞれ挿入し、宿主である大腸菌に導入する。次いでその大腸菌に標的 TFR の変異ライブラリーを導入する。このとき留意すべきなのが、変異導入により結合能を喪失した変異 TFR が生じる可能性がある点である。この偽陽性を排除するためにまず大腸菌群を最少培地中で培養する。すると結合能を持たない TFR を持つ株では、*sgrS* が発現するため死に至る。生き残った菌株群は次に目的化合物及び抗生物質を含む選択培地で培養する。すると変異導入により目的化合物をリガンドとして認識するようになった変異 TFR を持つ株は、薬剤耐性遺伝子の抑制が解除されるため選択培地中での生育が可能となる。こうして望ましいリガンド結合特異性を有する変異 TFR を持つ株を優先的に取得することができる。

TFR としては Quercetin 等のフラボノイド類をリガンドとして認識する QdoR[1]をモデルとして研究を進めた。最少培地中では結合能を有する QdoR を持つ株が優位に生育すること、及び Quercetin と抗生物質を含む選択培地では宿主が生育可能となることを実験的に確かめた。現在天然型の QdoR が認識しないフラボノイドをリガンドとして認識可能な変異 QdoR のスクリーニングに着手している。

[1] Hirooka K. *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75** (7), 1325-1334 (2011).

protein engineering, directed evolution, TetR type repressor

発表番号：2J002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 耐熱性 *Rhizopus* 属糸状菌を用いた高温同時糖化発酵によるセルロース系バイオマスからの乳酸生産
Lactic acid production by high-temperature SSF from cellulosic biomasses with thermotolerant *Rhizopus* sp.

○高野 真希[1]、山下 聖樹[2]、星野 一宏[1] ([1]富大院理工、[2]富大工)
○Maki TAKANO[1], Satoki YAMASHITA[2], Kazuhiro HOSHINO[1] ([1]Grad. Univ. Toyama, [2]Univ. Toyama)

【目的】*Rhizopus* 属糸状菌は古くから食品製造等に用いられてきた菌種であり、好気条件下で乳酸、嫌気条件下でエタノールを生産する特徴をもつ。また、本糸状菌は安価な培地で増殖でき、腐性菌であるため多様な糖質を資化できる可能性がある。これらのことから、本糸状菌はバイオリファイナリーのひとつであるセルロース系バイオマスからの乳酸生産に適した有用な菌種であるといえる。一方、バイオマスの糖化と発酵を単一槽内で行う同時糖化発酵(SSF)において、糖化に用いるセルラーゼと発酵微生物との至適温度には差があり、微生物の増殖温度に合わせざるを得ない。そのため酵素活性が低く、この反応が律速となるため、高温発酵が可能な菌株が求められている。本研究では耐熱性 *Rhizopus* 属糸状菌を選択し、本菌株の乳酸生産特性を明らかにするとともに、セルロース系バイオマスからの効率的乳酸生産について検討した。
【方法・結果】本研究室保有の *Rhizopus* 属糸状菌 55 株を 40℃において好気培養した結果、40 株が増殖可能であることがわかった。このうち、乳酸生産株は 22 株であった。これらの菌株の乳酸生産能を比較した結果、*R. oryzae* NBRC 5384 を耐熱性乳酸生産糸状菌として選択した。本菌株は 28℃において培養した場合、120 g/L の Glucose から 79 g/L の乳酸を生産できた。この生産量は 40℃の培養においても低下することなく、同様の培養で乳酸生産量は 83 g/L に達し、乳酸収率は 69%であった。また、単糖、二糖、多糖類を基質として本菌株を 40℃で培養したところ、Glucose、Galactose、Mannose、Fructose、Xylose、Arabinose、および Sorbitol で乳酸生産が確認でき、６炭糖のみならず５炭糖や糖アルコールからも資化および乳酸生産が可能であることがわかった。さらに、Maltose、Cellobiose、Soluble Starch も乳酸へ変換できたことから、アミラーゼや β-グルコシダーゼなどの加水分解酵素を分泌していると考えられる。さらに、セルロース系バイオマスからの乳酸生産を検討するため、セルロース繊維であるペーパースラッジ(PS)を基質として用いた SSF を行った。PS は NaOH-HCl 処理により無機物や添加剤などを除去して用いた。この処理 PS に最適なセルラーゼ剤を適用し、SSF による 5384 株の乳酸生産について検討した結果、50 g/L の PS から 96 h で 9.3 g/L の乳酸が生産され、対糖収率は 25%と低かった。この原因は、PS の繊維塊に菌糸が増殖し、菌糸への酸素供給が不十分となり、乳酸生産が抑制されたと考えられる。現在、この問題を解決するため、撹拌速度など培養法を検討し、セルロース系バイオマスからの効率的な乳酸生産について検討中である。

lactic acid, *Rhizopus*, thermotolerant

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

発表番号：2J003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 有用酵素の基質特異性改変とバイオイソプレン生産への応用

alternation of substrate specificity for Bio-isoprene production

○折下 涼子、白井 智量、近藤 昭彦（理化学研究所）
○RYOKO ORISHIMO, TOMOKAZU SHIRAI, AKIHIKO KONDO (RIKEN)

イソプレンはナフサ熱分解の副生成物として工業的に生産され、自動車タイヤなどの原料として使われる合成ゴム（ポリイソプレンゴム）の原料として使用される。バイオマス原料からの発酵によるイソプレン生産が可能となれば、石油への依存度低減、地球温暖化の原因とされる二酸化炭素削減が期待できる。

イソプレンは天然ゴム（ポリイソプレン）のモノマーとして、また、二次代謝産物の構造単位として幅広い生物の細胞内に存在しうる物質であるが、その代謝経路は多くの酵素と ATP を必要とするため、効率のよい発酵生産のためには新たな生合成経路の導入が望まれる。

横浜ゴム、日本ゼオン、理研では「in silico 代謝設計技術」（コンピュータで微生物の代謝経路をゲノムスケールで設計する技術）を用いて人工代謝経路を設計し、メバロン酸を経由し効率よくイソプレン発酵生産を行うための生合成経路を見出した。メバロン酸からイソプレンを生産するためには本来 5 つの酵素と 3 つの ATP が必要であるが、当グループの見出した生合成経路を用いれば 2 つの酵素と 1 つの ATP だけでイソプレンの生合成が可能になる。そこで、当グループでは経路に沿った反応を行う酵素の探索と酵素の基質特異性の改変を行った。

その結果、酵母由来の有用酵素において、野生型酵素に比べイソプレン生産能力の高い変異体を見出したのでここに報告する。

isoprene, mevalonate, substrate specificity

発表番号：2J004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 耐熱性酵素を用いたキチンからの有用物質生産
# *In vitro* conversion of chitin to useful metabolites using thermophilic enzymes

○木村 圭佑、岡野 憲司、本田 孝祐（阪大工）
○keisuke kimura, Kenji Okano, Kousuke Honda (Osaka Univ.)

【目的】
我々のグループでは、好熱菌由来の耐熱性酵素を自在に組み合わせ、物質生産に特化した人工代謝経路を *in vitro* で構築する新規技術の開発と高度化を進めている。本手法では、用いる耐熱性酵素の組み合わせにより、任意の出発物質から多様な代謝物質を作り出すことが可能である。本研究では、未利用バイオマス資源のひとつとして注目されるキチンを出発物質とし、様々な代謝産物の合成前駆体となるピルビン酸の生産を目指した。

【方法と結果】
*Thermococcus kodakarensis* 由来キチン分解酵素群[1-4]と先行研究で構築された ATP 非生産型キメラ解糖経路[5,6]をカップリングさせることで、キチンからのピルビン酸生産経路の構築を行った。この際、*Thermus thermophilus* 由来 glucokinase が ATP 依存的にグルコサミンのリン酸化を触媒することを見出した。そこで、キチン分解酵素群のひとつである ADP 依存型 glucosamine kinase を *T. thermus* 由来の glucokinase に置換することで経路内での ATP 収支の一致を図った。
デザインされた経路で所望のピルビン酸生産速度を達成するため、NADPH の増減を指標とした吸光度測定により各酵素の反応速度を定量し、経路構築に必要な酵素量の調整を行った。キチンからキトビオースへの加水分解を触媒するキチナーゼについては、分解に伴う還元末端濃度の上昇を測定することで反応速度を定量した。これらの結果、生産速度約 0.1 mmol $L^{-1}$ $h^{-1}$ でキチンからのピルビン酸を生産することに成功した。現在、生産速度および収率の向上を目指し、さらなる反応条件の最適化を進めている。

1) Tanaka T et al, Appl Environ Microbiol, 65: 5338-5344 (1999)
2) Tanaka T et al, J Biol Chem, 185: 5175-5181 (2003)
3) Tanaka T et al, J Biol Chem, 279: 30021-30027 (2004)
4) Tanaka T et al, J Bacteriol, 187: 7038-7004 (2005)
5) Ye X et al, Microbial Cell Fact, 11: 120 (2012)
6) Ninh PH et al, Biotechnol Bioeng, 112: 189-196 (2015)

chitin, pyruvate, thermophilic enzyme

発表番号：2J005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# アルギニン誘導体が示す歯周病原因子の抑制効果

# Inhibitory effect of arginine derivatives to factor for periodontal disease

○恒原 由佳[1]、有馬 二朗[2] ([1]鳥大院農、[2]鳥大農)
○Yuka TSUNEHARA[1], Jiro ARIMA[2] ([1]Grad. School of Agric. Tottori Univ., [2]Fac. of Agric. Tottori Univ.)

【背景・目的】歯周病は、歯を失う二大原因の一つであり、高齢者の多くが重度の歯周病を発症している。また、糖尿病や誤嚥性肺炎等、全身疾患にも関与していると報告されている。主な歯周病原菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* は偏性嫌気性細菌であり、歯周ポケットに存在する。本菌は糖を資化できず、ヘムやペプチド、アミノ酸を栄養源として取得するため、様々なペプチダーゼを産生する。これらのペプチダーゼの阻害は、菌の生育や、歯周組織、赤血球破壊の抑制につながると考えられる。非タンパク質性アミノ酸やアミノ酸誘導体、非タンパク質性アミノ酸から成るペプチド類の中には、*P. gingivalis* の栄養源とならず、ペプチダーゼの阻害活性をもち、歯周病予防に効果を発揮する物質の存在が期待される。我々はこれまで、ペプチド結合形成反応を触媒する酵素を用いて、多彩なアミノ酸誘導体や短鎖ペプチド類から成る酵素反応液ライブラリーを作成した。本研究では、歯周病予防物質の取得に向け、作成したライブラリーから *P. gingivalis* のペプチダーゼや溶血活性の阻害物質を探索した。

【方法と結果】歯周病原因子の評価法として、溶血、赤血球凝集、アゾカゼイン分解、Bz-DL-Arg-pNA 分解を選択した。*P. gingivalis* を液体培養及び寒天培養後、培養外液と菌体破砕液を調製して各評価法に供した結果、溶血活性とアゾカゼインの分解活性は寒天培養後の菌体破砕液沈殿が強く、赤血球凝集活性は寒天培養後の菌体破砕液上清、Bz-DL-Arg-pNA 分解は液体培養菌体の破砕液沈殿において、強い活性が認められた。そこで、それぞれの評価法に適したサンプルを使用し、酵素反応液ライブラリーから阻害活性を有する反応液の選抜を行った。その結果、Bz-DL-Arg-pNA 分解活性において、L-Arg-OMe と L-homoArg から阻害活性が確認された。それぞれの Bz-DL-Arg-pNA 分解活性における $IC_{50}$ 値は、0.12 mM(L-Arg-OMe)及び 0.53 mM(L-homoArg)であり、共に赤血球凝集の阻害活性や *P. gingivalis* の生育の抑制活性も保持していることが明らかとなった。これに加えて、L-Arg-OMe は溶血の阻害活性も保持していた。次に、L-Arg-OMe や L-homoArg と構造が似ている化合物について、ペプチダーゼや溶血、血液凝集、生育に対する阻害を評価したところ、L-Arg-OEt、L-homoArg-OMe、L-homoArg-OEt、Bz-L-Arg-$NH_2$、Bz-L-Arg-OEt、TAME にも Bz-DL-Arg-pNA 分解、及び *P. gingivalis* の生育の阻害活性が確認され、L-Arg-OEt、Bz-L-Arg-$NH_2$、Bz-L-Arg-OEt、TAME からは赤血球凝集の阻害活性、L-Arg-OEt からは溶血の阻害活性も確認された。これらの結果から、L-Arg の類似構造を有する物質は *P. gingivalis* のペプチダーゼ活性を阻害し、歯周病を予防する機能が備わっている可能性が示唆された。

Porphyromonas gingivalis, peptidase, arginine

発表番号：2J006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 封入体を形成する組換え酵素のアミノ酸置換による可溶性生産

# Soluble production of recombinant enzyme forming inclusion body by amino acid substitution

○松井 大亮[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST ERATO)
○Daisuke MATSUI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

**【目的】**異種発現系で酵素遺伝子を発現させた場合、封入体の形成で活性を示さないことが多く、この点が異種宿主による酵素の発現において問題となっている。われわれは、大腸菌で封入体を形成する植物キャッサバ由来ヒドロキシニトリルリアーゼ (EC 4.1.2.37) や海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 L-リシンε-酸化酵素 (EC 1.4.3.20) を、アミノ酸置換により活性を持つ酵素としての発現に成功している[(1, 2)]。これらの結果を基に本研究では、大腸菌で封入体を形成する高等生物由来の酵素を用いて、アミノ酸置換で活性を持つ酵素としての発現を検討し、その変異箇所の可溶性生産へ影響の解明を目的とした。

**【方法】**高等生物由来の酵素遺伝子を挿入した発現プラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換し、プレート培養した。得られたコロニーを培養後破砕し、SDS-PAGE で発現確認を行った。遺伝子修復能を欠損した大腸菌 XL1-Red を用いて、封入体を形成する酵素遺伝子のランダム変異ライブラリーを構築した。得られた変異ライブラリーを大腸菌 BL21 (DE3) で発現させ、活性を示す変異型酵素遺伝子を単離し、シーケンス解析により変異箇所を特定した。

**【結果と考察】**節足動物由来のマンデロニトリル酸化酵素 (*Ch*MOX, EC 1.1.3.-) では、Val455 が Ala に置換されて活性を持つ酵素として発現していることを見出した。変異箇所の飽和変異導入の結果、Val455 が Ala 以外に Glu や Gln、Asp、Asn に置換されることで、活性を示すことを明らかにした。また、シロイヌナズナ由来 L-アルギニン脱炭酸酵素 (*At*ADC, EC 4.1.1.19) では、Arg430 が Leu に置換されて活性を持つ酵素として発現しており、Arg430 への飽和変異導入の結果、Leu 以外に Ala や Val に置換されることで、活性を示すことを明らかにした。構造モデリングの結果、これらの残基は基質ポケット付近に存在おらず、精製後の変異型酵素が同じ比活性を示すことから、変異導入によって酵素活性の向上に影響する可能性は低いと考えられた。リフォールディング実験の結果、野生型酵素と比較して、変異型酵素が高いフォールディング効率を示したことから、この変異が翻訳後のフォールディングに影響することが示唆された。

**【参考文献】**

1) Y. Asano, M. Dadashipour, M. Yamazaki, N. Doi, and H. Komeda: *Protein Eng. Des. Sel.*, **24**, 607 (2011).
2) D. Matsui, and Y. Asano: *Biosci Biotechnol Biochem.*, **79**, 1473 (2015)

inclusion body, directed evolution, solubilization

発表番号：2J007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# INTMSAlign を用いた組換えタンパク質を可溶化させるホットスポット同定法の開発

# Development of INTMSAlign based method to assign aggregation hot-spot of recombinant protein

○中野 祥吾[1,2,3]、松井 大亮[2,3]、モハマド ダダシプール[2,3]、三好 規之[1]、伊藤 創平[1]、浅野 泰久[2,3]（[1]静岡県大・食栄、[2]富山県大・生工研セ、[3]JST・ERATO）
○Shogo Nakano[1,2,3], Daisuke Matsui[2,3], Dadashipour Mohammad[2,3], Noriyuki Miyoshi[1], Sohei Ito[1], Yasuhisa Asano[2,3] ([1]Univ. of Shizuoka, [2]Toyama Pref. Univ., [3]ERATO JST)

[研究の目的] 近年のバイオテクノロジーの進展により、産業上有用なタンパク質を組換えタンパク質発現系を用いて、大量に得ることが可能となった。一方で発現系を用いて異種発現させたタンパク質の多くが、不溶化するという問題も生じている。現在、タンパク質発現系として大腸菌が広く用いられているが、真核生物由来タンパク質の約 15%しか可溶化タンパク質として得られないという報告もある（Chi-Hao Luan *et al.*, *Genome Res.*, 2004 **14**: 2102-2110）。不溶性タンパク質を可溶化する技術は、タンパク質の基礎・応用研究にブレークスルーを生むことが期待される。本研究ではタンパク質の不溶化に関与するアミノ酸残基、いわゆる aggregation hot-spot を同定し、部位特異的変異により可溶化する手法の開発を目的とした。
[方法] aggregation hot-spot の同定には、発表者が開発したタンパク質一次配列解析ソフトウェア、INTMSAlign を用いた（S. Nakano and Y. Asano, *Sci. rep.*, 2015, doi: 10.1038/srep08193）。本研究では hot-spot 同定のため、“HiSol score”を新たに定義した。HiSol score は INTMSAlign の出力ファイルと、20 種類のアミノ酸の疎水性度を示すパラメータ、Hydropathy Index から算出されるスコアである。HiSol score は解析対象となるタンパク質の各アミノ酸残基について算出され、正の値を持つ時はその残基を親水性残基に、負の値を持つ時はその残基を疎水性残基に変異することで可溶性を向上できることが期待できる。本スコアを基に、3 種の酵素（*S*-hydroxynitrile lyase from *Manihot esculenta* [*Me*HNL]、L-Phenylalanine dehydrogenase from *Sporosarsina ureae* [*Su*PDH]及び DHRS2 dehydrogenase/reductase from *Homo sapiens* [hep27]）ついて配列解析を行い、hot-spot の同定を行った。
[結果と考察] HiSol score を用いて *Me*HNL の解析を行った。解析の結果、*Me*HNL の配列中で His103 が負の最も大きな値を持つことが判明した。過去の研究から、*Me*HNL の His103 を疎水性残基（Leu, Ile, Val など）に変異させることで可溶性を向上できることが示されている（Y. Asano et al., *PEDS*, 2011, **24**: 607-616）。よって HiSol score が hot-spot を予測できていることが確認できた。次に不溶性タンパク質、*Su*PDH の配列解析を行い hot-spot の同定と部位特異的変異の導入を行った。解析の結果、Q225V と Q225V/Q337I 変異体が可溶化することを比活性測定から確認した。加えて hep27 についても配列解析を行い、可溶化を進めている。本研究結果から、HiSol score から hot-spot を高い精度で予測できることを確認した。

assignment of aggregation hot-spot, rational design, consensus design

発表番号：2J008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# アミノ酸置換によるコメ由来ペプチドの多彩な生理活性の増強の試み

# Effect of substitution of amino acids on multifunctional activities and mechanism of action of an octadecapeptide derived from rice

○齊藤 健吾、金子 陽徳、生江 俊樹、豊田 竜、落合 秋人、田中 孝明、谷口 正之（新潟大自然研）
○Kengo Saito, Akinori Kaneko, Toshiki Namae, Ryu Toyoda, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka, Masayuki Taniguchi (Grad. Sch. of Sci. Technol., Niigata Univ.)

**【目的】**当研究室ではコメα-アミラーゼ由来ペプチド（Amy I -1-18）が，抗菌作用，抗炎症作用，創傷治癒作用などの多彩な生体防御機能を有することを見出している[1, 2]。そこで本研究では，本ペプチドの生体防御活性を増強するために，５種類の１残基アミノ酸置換体を化学合成し，ヒト病原微生物に対する抗菌活性，リポ多糖（LPS）刺激によって誘導されるマクロファージの一酸化窒素（NO）産生に対する抑制効果，および血管内皮細胞の管腔形成促進作用について検討した。また，これらの置換体の各活性を発揮するための作用機構を解明することを試みた。

**【実験方法】**本研究では，18 残基のアミノ酸からなる AmyI-1-18 中の 1 残基のアミノ酸をアルギニンまたはロイシンに置換した５種類の置換体を化学合成した[2]。各置換体の歯周病菌，アクネ菌，日和見感染真菌などに対する抗菌活性を比較した。また，LPS 刺激したマウスマクロファージ(RAW264 細胞)による NO の産生量から各置換体の抗炎症活性を比較した。すわなち，各置換体と 100 ng/ml の LPS を RAW264 細胞に添加し, Griess 試薬を用いて産生される NO 量を測定し, 比較した[2]。次に，各置換体のエンドトキシン中和活性を，リムルステスト（生化学工業(株)）を用いて測定し，50%有効濃度($EC_{50}$)を比較した[2]。さらに，各置換体のヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）の管腔形成促進作用を比較した[2]。

**【結果】**各被験菌に対する置換体の抗菌活性は，親ペプチド（AmyI-1-18）と比較して向上する傾向が観察された。また，いくつかの抗菌活性が増大した置換体の細胞膜損傷作用は，AmyI-1-18 よりも強くなった。４つの置換体の抗炎症作用は，AmyI-1-18 に比べて高くなる傾向が観察され，エンドトキシン中和活性も３つの置換体において向上した。現在，各置換体の HUVEC による管腔形成に対する促進作用に関して検討している。

1) M.Taniguchi *et al.*: ***Peptide Science,*** Vol.104, p.73-83 (2015).
2)谷口ら：平成 27 年度日本生物工学会大会(鹿児島)，講演要旨集，1 P-272 (2015).

amino acid substitution, antimicrobial peptide, multifunctional peptide

発表番号：2J009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# コメ糠タンパク質酵素加水分解物からのカチオン性ペプチドの精製とその生理活性の解明

# Purification of cationic antimicrobial peptides from rice bran protein and elucidation of their bioactivities

○谷口 正之、亀田 光裕、落合 秋人、田中 孝明（新潟大自然研）
○Masayuki Taniguchi, Mitsuhiro Kameda, Akihito Ochiai, Takaaki Tanaka (Grad. Sch. of Sci. Technol, Niigata Unv.)

**【目的】**当研究室では，これまでにコメタンパク質の部分配列から抗菌ペプチドを見出しており，それらのペプチドは，分子量が 1, 000～3, 000 Da 程度であること，正味の正電荷を持つこと，等電点が８以上のカチオン性であることなどの共通の特性を有していることを報告している[1, 2]。また，抗菌ペプチドは，抗炎症や創傷治癒などの生理活性を兼ね備えていることを報告している[3]。そこで本研究では，コメ糠タンパク質のペプシン加水分解液を等電点電気泳動によって分離し，カチオン性ペプチドを調製した。得られた画分の生理活性を明らかにするために，ヒト病原微生物に対する抗菌活性を測定した。また，抗菌活性を有する画分に含まれるペプチドを精製し，質量分析計を用いて同定した。さらに，同定したペプチドを化学合成し，それらの抗菌活性とその他の生理活性について検討した。

**【実験方法】**本研究では，ペプシンを用いてコメ糠タンパク質を加水分解し，ペプチドサンプルを調製した。得られたペプチドサンプルを，調製用等電点電気泳動装置（BioRad, Rotofor）を用いて 20 の画分に分画した。各画分の歯周病菌，アクネ菌，日和見感染真菌などに対する抗菌活性を測定した。次に，逆相クロマトグラフィーを用いて活性を検出できた画分からペプチドを精製し，飛行時間型質量分析計（MALDI TOF-MS）を用いて各画分に含まれるペプチドを同定した。同定したペプチドを化学合成し，それらの抗菌活性を，既に報告している方法[1, 2]を用いて測定した。また，同定したペプチドの他の生理活性について，既に報告している方法[3]を用いて検討した。

**【結果】**ペプシンを用いてコメ糠タンパク質を加水分解した後，等電点電気泳動によって 20 画分に分画した。反応条件によって各画分の pH と収量が異なっており，各画分の抗菌活性も異なっていた。これまでの結果から，ペプシンを用いて米糠タンパク質を 5 時間加水分解したサンプル中のカチオン性ペプチド画分が最も高い抗菌活性を示し，歯周病菌，アクネ菌，日和見感染真菌などに対して抗菌活性を発揮することを確認した。現在までに，等電点が高い 3 つの画分から，等電点が 9 以上の約 20 種類のペプチドを同定した。現在，カチオン性ペプチドの同定をさらに進めるとともに，同定できたペプチドの抗菌活性を測定中である。また，カチオン性ペプチドの抗菌活性以外の生理活性についても検討する予定である。

1) M.Taniguchi *et al.*, ***Peptides,*** Vol.48, p.147-155 (2013).
2) M.Taniguchi *et al.*, ***Peptide Science,*** Vol.104, p.73-83 (2015).
3) S.Takayama *et al.*, ***Microbial Pathogenesis,*** Available online 28 August (2015).

rice bran protein, cationic peptide, bioactive peptide

発表番号：2J010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 緑膿菌 OprM LOOP2 に対するモノクローナル抗体遺伝子の塩基配列の取得と単鎖抗体遺伝子の構築
# Molecular cloning of anti-*Pseudomonas aeruginosa* OprM LOOP2 monoclonal antibody variable regions and construction of single-chain antibody

○矢野 遥香、良原 栄策、小島 直也、笹川 昇（東海大学）
○Haruka YANO, Eisaku YOSHIHARA, Naoya KOJIMA, Noboru SASAGAWA (Tokoi Univ.)

【目的】緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の多剤耐性能には多剤排出ポンプが関与している。これは 3 種のタンパク質(MexA、MexB、OprM）により構成され、菌体内に入った薬剤を直接細胞外に排出する。この緑膿菌の多剤排出ポンプの機能抑制が可能になれば、緑膿菌感染症の治療法開発に繋がると期待される。これを踏まえ、多剤排出ポンプの構成要素である OprM タンパク質に対するモノクローナル抗体遺伝子の可変領域(VH、VL)をクローニングし、塩基配列の取得を行った。さらに取得した VH、VL をリンカーでつないだ単鎖抗体遺伝子の構築を行い、これを大腸菌に発現させることを目的として実験を行った。

【方法】今回用いたハイブリドーマは、緑膿菌 OprM タンパク質のうち細胞外に面している領域(LOOP2)のアミノ酸配列をエピトープとしたものである。このハイブリドーマから全 RNA を抽出し、オリゴ dT プライマーを用いた逆転写反応により cDNA を合成した。これを鋳型として 5'-RACE 法を用いて抗体遺伝子の可変領域(VH 及び VL)をクローニングすることとした。標的配列を増幅させるために PCR または nested-PCR を行った。目的の長さに増幅した PCR 産物を精製し、アデニンの付加を行った後、T ベクターpMD20 と連結し、大腸菌(DH5α)に形質転換させた。陽性クローン選別後、目的の増幅産物を持つと思われるものに対しシークエンス解析を行い、得られた塩基配列が偽陽性ではなく IgG 由来のものであることを確認した。

次に、取得した VH、VL がリンカーを挟んで順番に連結された発現コンストラクトの構築に着手した。サブクローニングに用いるプライマーには制限酵素認識配列またはリンカー配列(GGGGSGGGGSGGGGS、(G4S)3 と略す)の一部を付加したものを用い、PCR を行った。これらプライマーを用いて増幅した VH、VL にはリンカー配列の一部が導入され、かつ、リンカー配列のうち 15 塩基が VH、VL 同士で相補的に重複している。これを利用し、それぞれの増幅産物を混ぜ合わせたのちに再度 PCR を行いうことで VH、VL の断片同士を重複部位で融合させ、VH-(G4S)3-VL もしくは VL-(G4S)3-VH という並びの断片を取得した。これをタンパク質発現ベクターである pET-16b に導入することで、VH-(G4S)3-VL/pET-16b、VL-(G4S)3-VH/pET-16b 各発現コンストラクトを構築する作業を行った。

【結果・考察】既にハイブリドーマから VH、VL の塩基配列を取得することに成功しており、現在はこの VH と VL を(G4S)3 リンカーを介して融合させた発現コンストラクトの構築および陽性クローンの選別を行っている。目的のクローンが得られ次第、遺伝子組み換え単鎖抗体の発現実験に移行していく予定である。

single-chain antibody, biotechnology, recombinant protein

発表番号：2J011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 酵素合成したシステインエチルエステルとグルタミン酸ジエチルエステルの共重合ペプチドの脱エステル

# De-esterification of enzymatically synthesized copolymers of cysteine ethylester and glutamic acid diethylester.

○奈良井 朝子、澁谷 明大、嘉戸 俊輔、中山 勉（日獣大　応生科）
○Asako NARAI, Akihiro SHIBUYA, Syunsuke KADO, Tsutomu NAKAYAMA (Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】

L-システイン(Cys)エチルエステルと L-グルタミン酸(Glu)ジエチルエステルを混合した緩衝液にα−キモトリプシンを添加し、凍結下で反応させると、両基質が共重合したペプチドを不溶性生成物として回収できる。演者らはこれまでに、共重合ペプチド内の Cys と Glu の構成比は初濃度比を反映していること、等濃度で反応した際のペプチドの重合度は 6～10 で両アミノ酸がランダムに配列していると予想されることを発表した（2015 年度本学会関東支部大会）。Cys:Glu 共重合ペプチドの Glu 側鎖に存在するエステルを除去できれば、植物等に存在が知られる重金属捕捉ペプチド phytochelatin（(γGlu−Cys)n−Gly, n≧2）に類似したペプチドを簡便に合成することができる。しかし、アルカリを用いた脱エステル処理では Cys 残基の SH 基を十分に保持できない。そこで、酸を用いた脱エステル処理について検討した。

【方法と結果】

まず、Glu ジエチルエステルを 1 M 塩酸中、60℃でインキュベートし、エステルの安定性を確認したところ、α位のエステルよりもγ位のエステルが脱エステルされやすいことを見出した。次に、酵素合成した不溶性の Cys:Glu 共重合ペプチドを 1 M 塩酸に懸濁し、60℃でインキュベートした。可溶性画分中の遊離 SH 基を Ellman’s 試薬にて定量したところ、経時的な SH 基の増加が認められ、Cys を含む可溶性ペプチドが生成されていることが示唆された。可溶性画分を MALDI-TOFMS 分析に供して検出された m/z 値からは、完全に脱エステルされたペプチドあるいは 1 残基分のエステルを有するペプチドが生成していることが明らかとなった。今後、MALDI-TOFMS で検出できなかったペプチドも含めて、LC-MS(LC-MS/MS)による解析をおこなうとともに、脱エステルされた Cys:Glu 共重合ペプチドの重金属捕捉活性について測定をおこなっていく。

peptide synthesis, phytochelatin, cysteine

発表番号：2J012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 近赤外発光ホタルルシフェリンアナログの水溶性向上への挑戦

# Challenge to innovate the high water solubility NIR luciferin for in vivo imaging

○盛満 玲[1]、木山 正啓[1]、齊藤 亮平[1]、北田 昇雄[1]、大塚 智史[1]、東 翔子[1]、岩野 智[2]、丹羽 治樹[1]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1] ([1]電気通信大学、[2]理研)

○Rei Morimitsu[1], Masahiro Kiyama[1], Ryouhei Saito[1], Nobuo Kitada[1], Satoshi Otsuka[1], Syouko Higashi[1], Satoshi Iwano[2], Haruki Niwa[1], Takashi Hirano[1], Syouzirou Maki[1] ([1]UEC, [2]RIKEN)

当研究室では、ホタル生物発光系を用いた *in vivo* 発光イメージング材料の開発を行っている。ホタルは基質ルシフェリンと酵素ルシフェラーゼの反応により黄緑色に発光する。我々は基質ルシフェリンの構造改変を行うことで、可視光領域をほぼ網羅する多彩な発光波長を持つルシフェリンアナログを創製しており、同時に構造と波長の相関データも取得している。

*in vivo* 光イメージングは生体内を可視化することで生きたまま生体機能を解明するツールとして一般的に広く用いられている。しかしながら現行の技術において、生体組織による光の吸収と散乱の影響により生体内深部の観測は容易ではない。

我々は、「生体の窓」と呼ばれる生体透過性の高い近赤外領域の波長に着目し、独自の構造と波長の相関データを用いて、近赤外領域に発光を示すルシフェリンアナログを開発することに成功し、すでに市販化している(アカルミネ®、和光純薬工業)。

アカルミネ®は、*in vivo* 光イメージング材料として主流であるホタルルシフェリンと比較し、深部観測において良好な結果が得られている。一方、アカルミネは難水溶性であり、動物実験の際に高濃度投与ができない。基質の濃度と発光輝度は相関関係があり、基質を高濃度で投与できることが望ましい。そこで水溶性の向上を目的とした。アカルミネの構造に窒素を導入した結果、水溶性が向上したことから、今回新たなアカルミネの構造を改変した含窒素新規ルシフェリンアナログを新たに合成した。本会ではこの新規ルシフェリンアナログの性能を評価し、その結果の詳細を報告する。

in vivo imaging, luciferin, firefly

発表責任者：牧　昌次郎（s-maki@uec.ac.jp）

発表番号：2J013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 高速処理精製可能な抗体医薬品精製用分離剤

# Separation media for high throughput antibody purification.

○野崎 晋也[1,4]、與田 祥也[1,4]、徳永 和彦[1,4]、安田 則幸[1,4]、福田 義人[1,4]、小原 祥平[1,4]、砥綿 正人[1,4]、伊藤 望[1,4]、渡邉 理紗[2,4]、宮地 正悟[2,4]、足立 正[3]（[1]三菱化学・開発研、[2]三菱化学・経営戦略部門、[3]三菱化学・イオン交換樹脂事業部、[4]次世代バイオ医薬品製造技術研究組合）
○Shinya NOZAKI[1,4], Shoya YODA[1,4], Kazuhiko TOKUNAGA[1,4], Noriyuki YASUDA[1,4], Yoshito FUKUDA[1,4], Shouhei OHARA[1,4], Masato TOWATA[1,4], Nozomi ITOU[1,4], Risa WATANABE[2,4], Seigo MIYACHI[2,4], Tadashi ADACHI[3] ([1]Mitsubishi Chemical Corp. R&D Center, [2]Mitsubishi Chemical Corp., [3]Mitsubishi Chemical Corp. Separation Materials Department, [4]Manufacturing Technology Association of Biologics)

【背景と目的】バイオ医薬品製造プロセスの上流である培養プロセスの生産性は近年、急速に向上しており、下流の精製プロセスもさらなる生産性の向上が求められている。代表的なバイオ医薬品である IgG 型抗体製造のダウンストリームプロセスでは、分離剤として Protein A リガンドのアフィニティ分離剤、および複数種類のイオン交換分離剤が用いられるのが主流である。しかし既存の分離剤が高価であること、また高流速運転に耐えられないことが製造コストを押し上げる一因となっている。ダウンストリームプロセスの生産性向上を目指し、高流速適用性、高吸着容量、高選択性などを兼ね備えたアフィニティ分離剤、イオン交換分離剤の開発を行った。
【方法】分離剤の基本特性を支配する基剤設計を改良し、高流速に耐えうる機械的強度、高吸着容量、高選択性を確保するために最適な細孔径、細孔容積を検討した。さらにアフィニティ分離剤については Protein A リガンドへの弱酸性溶離性、耐アルカリ性、高吸着性を付与する検討を行い、イオン交換分離剤についてはイオン交換基の導入法についても選択性、高吸着性を付与するため最適化検討を行った。分離剤の評価は吸着容量、選択性などの基本性能の他、実生産プロセスへの適応性も勘案して行った。
【結果と考察】アフィニティ分離剤：Protein A 改変体として耐アルカリ性及び弱酸性溶離性を有するドメインを多量体化することで、抗体結合能が向上することを確認した（新規リガンド）。一方、細孔容積と比表面積を同時に大きくした基剤の新規合成方法を開発した（新規基体）。新規リガンドと新規基体の組み合わせについて固定化方法を検討し、高流速通液可能で且つ吸着量の低下が少ない、高速処理精製可能なアフィニティ分離剤を得た。
イオン交換樹分離剤：強酸性陽イオン交換分離剤を例に述べると、新規基体、新規官能基導入法を適用することでヒト抗体に対する動的吸着容量は 150g/L を超えたほか、広範な分子量のタンパク質で高い吸着容量を実現した。まず複数のモデルタンパク質間の分離度を指標に、既存分離剤との比較で高い分離性能を示すことを実証した。
トータルプロセス：新規に開発したアフィニティ分離剤とイオン交換分離剤を用いて抗体産生細胞培養液から目的抗体を精製し、実プロセスでの性能を評価した。新規に構築した、高速化によるコスト削減効果と高選択性を併せ持ったプロセスについて、発表において言及する。

Purification, Antibody, High throughput

発表責任者：野崎　晋也（nozaki.shinya@md.m-kagaku.co.jp）

発表番号：2K001
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# An ultrasensitive near-infrared quinternary alloyed quantum dot-molecular beacon nanodiagnostic bioprobe for influenza virus RNA

○Oluwasesan Adegoke[1], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Y. Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. Department of Applied Biological Chemistry)

Epidemic caused by influenza virus infection remain an imminent threat to public health worldwide. An estimated 200,000 – 500,000 hospital admissions and annual deaths in their hundreds of thousands have been caused by influenza virus-related illnesses. Presently, there are various techniques that have been reported for the detection of influenza virus H1N1, but these techniques are limited in their output efficiency. Hence, diagnostic probes that can offer robust detection qualities such as elimination of false positive data, high sensitivity, rapid detection and specificity for influenza virus are urgently needed.

The near-infrared (NIR) range is an attractive spectral window due to low photon absorption by biological tissues, hence well-constructed fluorescent biosensors that emit within the NIR window can offer improved limit of detection (LOD). Here we demonstrate the exploitation of a newly synthesized NIR quinternary alloyed CdZnSeTeS quantum dots (QDs) as an ultrasensitive fluorescence reporter in a conjugated molecular beacon (MB) assay to detect extremely low concentrations of influenza virus H1N1 RNA.

quantum dots, biosensor, influenza virus RNA

発表責任者：Enoch Y. Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2K002
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# ナノ粒子表面の局所表面プラズモン共鳴効果を利用したレプチン・GLP-1 の高感度・迅速検出
# Rapid and super sensitive detection of Leptin, GLP-1 using Localized Surface Plasmon Resonance of CdSeTeS core quantum dots-AuNPs hybrid solution

○竹村 謙信[1]、オルワセサン アデゴケ[2]、加藤 竜也[1,2]、池本 圭輔[3]、稲垣 貴之[3]、朴 龍洙[1,2]([1]静大農　応生化、[2]静大グリーン科技研、[3]株式会社コスミックコーポレーション)
○Kenshin Takemura[1], Adegoke Oluwasesan[2], Tatuya Katou[1,2], Keisuke Ikemoto[3], Takashi Inagaki[3], Enoch Park[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., [2]Green Sci. & Technol. Shizuoka Univ., [3]Cosmic Corporation Co., Ltd.)

【背景・目的】ペプチドホルモンであるレプチンはヒト体内における食欲と代謝の調節に重要な役割を示す。また消化管ホルモンであるグルカゴン様ペプチド(GLP-1)は膵臓からのインスリン分泌促進の機能を有している。これらのホルモンは肥満や糖尿病に密接に関連していると考えられており、世界中でこれら２つのホルモンを用いた研究が行われている。中でも早期診断は病気の治療に欠かすことのできないため、高感度で検出できるシステムの確立が求められている。本研究では蛍光性半導体ナノ粒子(quantum dot, QD)と金ナノ粒子(AuNP)を用いた局所表面プラズモン共鳴効果によるレプチンおよび GLP-1 の高感度・迅速検出を試みた。
【方法】本研究室で作成を行った CdSeTeS core quantum dot (QD)と金平糖型金ナノ粒子 (AuNP)粒子にレプチン抗体または GLP-1 抗体を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)- N-hydroxysulfosuccinimide sodium salt (NHS)を用いた EDC/NHS カップリングによって修飾を行った。抗体修飾粒子を遠心分離により精製し、抗体修飾ナノ粒子を混合して検出液とした。この検出液にレプチンまたは GLP-1 を加え、蛍光強度を測定した(励起光 450 nm、蛍光 636 nm)。
【結果】作製した QD は 636 nm の蛍光波長を有し、非常に高い蛍光を有していた。量子効率は 67%であり、蛍光物質として扱うのに適した値であった。DLS を用いた粒径測定より平均粒径は 10.6 nm であった。また、作製した金ナノ粒子は 280 nm 吸光波長を有し、TEM を用いて粒子の形状が金平糖型であることを確認した。DLS を用いた粒径測定より平均粒径は 45.3 nm であった。本検出系を用いた場合、被験体を検出液に加えてから 5 分以内に検出でき、既存の診断キットに比べて飛躍的な検出時間を短縮することができた。検出限界は、レプチンでは 6.7 pg/ml、GLP-1 では 8.8 ng/ml で、濃度依存的な蛍光増強が確認できた。またレプチンの検出感は市販の検出キットに比べ、およそ 8 倍高かった。GLP-1 の検出感度は非常に高感度であるが、レプチンよりも感度が低下した。原因としては GLP-1 の分子が非常に小さいため、抗体修飾ナノ粒子の結合が理想的な状態になっていないことが考えられる。今後現在用いている金ナノ粒子のサイズをより小径なものに変更し、GLP-1 検出感度の向上を図る必要がある。

quantum dot, AuNP, Leptin

発表責任者：竹村　謙信（kenpi901@yahoo.co.jp）

発表番号：2K003
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 熱測定法による嫌気性菌の増殖過程の測定

# Calorimetric studies of the growth of anaerobic microbes

○青木 奈緒子[1]、三宅 英雄[2]、前田 有希子[1]、石川 卓[2]、田中 晶善[2] ([1]三重大生資、[2]三重大院生資)
○Naoko AOKI[1], Hideo MIYAKE[2], Yukiko MAEDA[1], Takashi ISIKAWA[2], Akiyoshi TANAKA[2] ([1]Fac. Bioresour., Mie Univ., [2]Grad. Sch. Bioresour., Mie Univ.)

【背景・目的】微生物の増殖量を測定する方法として、光学密度(OD)測定や ATP 測定が一般的である。しかし、OD 測定では、菌体が均一に存在している必要があり、凝集して沈殿するような微生物に対しては測定が困難である。さらに嫌気性菌の場合は、嫌気状態を維持したまま測定用の試料を採取する必要があり、煩雑な作業が必要である。本研究では、微生物の発熱量を測定する微生物熱測定法に着目し、産業利用としても注目されているブタノール生産性嫌気性菌 *Clostridium acetobutylicum* と *Clostridium beijerinckii*、およびセルロソーム生産性嫌気性菌で凝集特性を示す *Clostridium cellulovorans* と *Clostridium thermocellum* を培養し、発熱を指標として増殖過程を測定することを試みた。

【方法・結果】嫌気性菌として、4 種類の *Clostridium* 属（*C. acetobutylicum*、*C. beijerinckii*、*C. cellulovorans*、*C. thermocellum*）を用いた。容積 50 mL の密栓できるバイアルにグルコースもしくはセロビオースを含む 20 mL の培地を加えて嫌気状態にし、植菌したものを測定試料とした。これを直ちに多試料等温型熱量計に収容し、嫌気条件下で菌の増殖に伴う発熱過程を測定した。得られたサーモグラムを解析して、発熱過程を特徴づけるパラメータを求めた。

初菌量が異なる *C. acetobutylicum* と *C. beijerinckii* の増殖過程について熱測定を行ったところ、植菌量が小さいほど発熱開始時間および発熱速度のピークに達する時間は遅くなった。発熱速度のピークに達する時間と植菌量は高い負の相関を示した。次に熱測定によって得られたサーモグラムがこれら嫌気性菌の増殖過程を反映しているかを調べるために、測定試料と同じ試料を用意し、任意時間における OD と ATP 濃度を測定することで菌体量の経時変化を調べた。ブタノール生産菌である *C. acetobutylicum* と *C. beijerinckii* では、サーモグラム、OD、ATP 濃度の間に高い相関が見られた。セルロソーム生産菌で凝集特性を示す *C. cellulovorans* と *C. thermocellum* ではサーモグラムと OD の間に相関が見られなかったが、サーモグラムと ATP 濃度の間には高い相関が見られた。これらの結果から、嫌気性菌や菌体が凝集する菌においても、熱測定法を用いることで増殖過程を簡便で精度よく測定できる。以上のことから、熱測定法は様々な菌種を対象とした増殖過程の測定法として有望である。

calorimetry, anaerobes, Clostridium

発表責任者：三宅英雄（miyake@bio.mie-u.ac.jp）

発表番号：2K004
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 酵素/蛋白質の進化工学的改良における宿主の影響
# Host factors and guest factors in directed protein evolution

○河原崎 泰昌[1,2]、坂上 稔典[1]、伊藤 圭祐[1,2] ([1]静県大院薬食生命総合学府、[2]静県大食)
○Yasuaki KAWARASAKI[1,2], Toshinori SAKAUE[1], Keisuke ITO[1,2] ([1]Univ. Shizuoka, GSIPNS, [2]Univ. Shizuoka, SFNS)

【背景及び目的】進化工学は組換え蛋白質・酵素の機能改良（収量改善を含む）に用いられる技術体系であり、主として大規模変異導入、宿主形質転換体の大規模機能スクリーニング、有効変異集積（適応歩行）の 3 つの基盤技術により構成される。一方、組換え蛋白質の発現には、転写・翻訳・翻訳後修飾・分解の各段階において多数の宿主因子が関与するため、活性型生産物の収量は発現宿主の選択により大きく左右される。そこで我々は、「進化工学的手法を用いた組換え蛋白質の収量改善において、発現宿主の選択がどの程度影響を与えるか評価する」ことを目的として研究を行った。
【方法】オワンクラゲ由来緑色蛍光蛋白質（GFP）を収量改善対象の分子とした。野生型 GFP は、高温（37℃）で発現させるとミスフォールディングをおこし、不活性な不溶性蛋白質として産生される。GFP 遺伝子に対する大規模変異導入は、エラープローン PCR（epPCR）により行った。発現宿主として大腸菌（DH5aFT）または出芽酵母（INVSc1）を用いた。遺伝子の発現誘導は 37℃で行い、有効変異体発現クローンの選抜は励起光（352 nm）照射下におけるコロニー目視および菌体懸濁液の蛍光測定（Ex=390 nm、Em=510 nm）により行った。有効変異の集積には DNA シャフリング法を用いた。
【結果と考察】上記変異導入・スクリーニング・有効変異集積を複数回繰り返し、大腸菌および出芽酵母発現系のそれぞれで活性型発現量が改善（野生型の数十倍）した GFP 変異体群を得た。大腸菌内で“進化”した GFP 変異体群は、F64L と V163A の二重アミノ酸置換とともに、高頻度で E124V および特定の同義置換変異が付随した。出芽酵母内で“進化”した GFP 変異体群も同様に F64L と V163A の二重アミノ酸置換をコンセンサスとし、これに H25R、S30R、V224I および複数の同義置換変異が付随した。これらの“進化”により集積した変異をそれぞれ単独で持った GFP 一アミノ酸置換体の発現系を構築し、大腸菌および出芽酵母で発現させた。その結果、F64L 変異体発現株は野生型配列発現株に比べ 7-14 倍、V163A 変異体発現株は 7-16 倍の蛍光強度を有していた。酵母発現系で得られた有効アミノ酸置換（H25R、V224I）は、大腸菌発現系においても概ね同程度（野生型の 1.2-4.8 倍）の有効性を示し、大腸菌発現系で得られた有効アミノ酸置換（E124V）も、酵母発現系において同程度（野生型の 2.6 倍）の有効性を示した。これらより（少なくとも高温高フォールディング型 GFP 変異体の取得においては）、宿主因子は、“進化”の結果到達するアミノ酸配列に顕著な影響を及ぼさないことが示された。

directed evolution, protein folding, host factor

発表責任者：河原崎泰昌（kawarsky@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：2K005
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# MMLV 逆転写酵素の無細胞タンパク質合成系の構築とマイクロアレイへの応用

# Expression of Moloney murine leukemia virus reverese transcriptase in a cell-free protein expression system and its application to microarray technology

○片野 裕太[1]、久好 哲郎[2]、久世 郁美[1]、岡野 啓志[2]、伊東 昌章[3]、西垣 功一[4,5]、滝田 禎亮[1,2]、保川 清[1,2] ([1]京大農、[2]京大院農、[3]沖縄高専、[4]埼玉大、[5]産総研)

○ Yuta Katano[1], Tetsro Hisayoshi[2], Ikumi Kuze[1], Hiroyuki Okano[2], Masaaki Ito[3], Koichi Nishigaki[4,5], Teisuke Takita[1,2], Kiyoshi Yasukawa[1,2] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]National Institute of Technology, Okinawa College, [4]Saitama Univ., [5]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

【目的】逆転写酵素（RT）は分子生物学的研究や臨床診断において必要不可欠な酵素である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)RT が使用されているが、RNA の二次構造をなくし、反応効率を向上させるために耐熱化が求められている。近年、我々[1)]および他のグループ[2)]が大腸菌を宿主として、部位特異的変異により耐熱性が向上した MMLV RT を作製した。しかし、その耐熱性は PCR に使用されている耐熱型 DNA ポリメラーゼと比較すると著しく低い。無細胞タンパク質合成系は、大腸菌等の宿主を用いる組み換えタンパク質発現系と比較して、目的タンパク質を迅速に合成・解析できる。本研究では MMLV RT を無細胞タンパク質合成系で発現させ、その性状を解析した。また、近年開発された移送式マイクロアレイ MMV[3)]への応用について検討した。

【方法】1. MMLV RT の発現：昆虫無細胞合成系（島津製作所）により、C 末端に Strep-tag（WSHPQFEK）を付加させた野生型 MMLV RT(WT)および耐熱型 MMLV RT E286R/E302K/L435R/D524A（MM4）を発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより部分精製した。2. DNA 合成活性：37℃における poly(rA)-p(dT)$_{15}$ への dTTP 取込み反応およびモデル RNA を用いた RT-PCR（cDNA 合成反応は 45℃）を行った。3. RNase H 活性：3’-fluorescein 修飾 18 塩基の RNA（5’-GAUCUGAGCCUGGGAGCU-3’）と 5’Dabcyl 修飾 18 塩基の DNA（5’-AGCTCCCAGGCTCAGATC-3’）から成る RNA/DNA 二本鎖を基質として反応を 37℃で行った。4. 移送式マイクロアレイでの反応：MMV チップを用い、0.5 μl の容量で反応を行った。

【結果】dTTP 取込み反応における $T_{50}$（10 分間の熱処理で活性が 50%に減少する温度）は WT では 45℃以下だったが、MM4 では 52℃だった。RT-PCR では、WT は 54℃の熱処理で活性を失ったのに対し、MM4 は 60℃でも活性を有した。WT は RNase H 活性を有したが、RNase H 活性の触媒残基 D524 に変異を有する MM4 は活性がなかった。無細胞合成反応、cDNA 合成反応および PCR はいずれも MMV チップで進行した。

【考察】無細胞タンパク質合成系で発現させた場合、大腸菌で発現させた場合と同様に、MM4 が WT よりも高い耐熱性を有した。MMLV RT のさらなる耐熱化には、MMLV RT 遺伝子にランダム変異を導入し、本発現系と移送式マイクロアレイを組み合わせて合成およびスクリーニングを行う方法が有効であると考えられる。

【文献】1. K. Yasukawa *et al.* (2010) *J.Biotechnol.* **150**, 299-306
2. B. Arezi and H. Hogrefe (2009) *Nucleic Acids Res.* **37**, 473-481
3. H. Sharma *et al.* (2014) *BMC Biotechnol.* **14**:78

cell-free protein synthesis, reverse transcriptase, microarray technology

発表責任者：保川　清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：2K006
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

Plasmonic signal detection of H1N1 virus using immunoassay with magnetic nano particle
○ Dong-kyu LEE[1,2], Tatsuya Kato[1,2], Enoch Park[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Green&Science Technology)

Influenza is acute respiratory disease caused by influenza virus. This virus mutates every year and occurs disease annually. Influenza A/H1N1 2009 is one of pandemic virus occurred in Beijing. More than 214 countries and territories had reported laboratory-confirmed cases, and over 18,449 deaths had been attributed to this virus.
In this study, we tried to make a rapid, convenient and quantitative detection system of H1N1 virus based on magneto phoretic assay. This magnetophoretic assay system is composed of magnetic nanoparticles (MNPs) and gold nanoparticles (AuNPs) as the basis of sandwich-type colorimetric sensor. Magnetic nanoparticles with 200 nm diameter were synthesized by hydrothermal method and used for effective separation for rapid quantitative detection. Schematically if we add unknown amount of H1N1 virus solution in this solution system, AuNPs which is functionalized by anti-hemagglutinin (AuNPs@Ab1) and MNPs functionalized by anti-neuraminidase (MNPs@Ab2) grabs hemagglutinin and neuraminidase of H1N1 virus then it will make sandwich structure. If we give external magnetic field on this solution AuNPs that grabs H1N1 virus with MNPs will precipitates and non-binded AuNPs will remained in supernatent solution. By checking the uv-vis absorbance of the supernatent solution we can detect the amount of AuNPs that precipitatd. By using this method we can figure out the amount of H1N1 virus. Furthermore by using this system we can also identify type and amount of unknown virus.

Biosensor, Magnetophoretic assay, Influenza virus

発表責任者：Dong-kyu Lee（no3_answer@naver.com）

発表番号：2K007
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# Detection of influenza virus using bio-mimic enzymatic reaction of gold nanoparticles

○SYED RAHIN AHMED[1], Enoch Y Park[1,2] ([1]Research Institute of Green Science and Technology, Shizuoka University, [2]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

**Abstract:** Modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with nanomaterials is an effective and powerful method to amplify the signal and reduce the cost for detecting and measuring trace biomarkers or proteins. In this study, a simple and ultra-sensitive colorimetric immunoassay is designed and demonstrated for detection of influenza viruses by using positively charged gold nanoparticles ((+) AuNPs) as a role of bio-mimic inorganic enzymes. This method allowed us to detect target influenza virus A (H1N1) with a linear range up to 10 pg $mL^{-1}$ and clinically isolated influenza A (H3N2) up to 10 plaque forming units (PFU) $mL^{-1}$, where its sensitivity improved 500-fold higher than commercial virus kits. These results revealed that (+) AuNPs-based colorimetric immunoassays could be suitable for lab-on-a-chip devices and open new opportunities for clinical protein diagnostics.

Colorimetric Detection, Influenza Virus, Positively Charged Gold Nanoparticles

発表責任者：Enoch Y Park（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

発表番号：2K008
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 植物の概日時計評価におけるハイパースペクトルデータの有用性
# Effectiveness of Hyperspectral Data for Evaluation of Circadian Clock in Plants

○長野 将吾[1]、谷垣 悠介[1]、福田 弘和[1,2] ([1]大阪府・大院・工、[2]JST さきがけ)
○Shogo NAGANO[1], Yusuke Tanigaki[1], Hirokazu Fukuda[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng. Osaka. Pref. Univ., [2]JST PRESTO)

【背景・目的】

野菜生産の現場では，「朝採り野菜」や「夕採り野菜」のように，収穫する時刻が野菜の品質を評価する重要な指標の一つとなっている．この時刻に関わる植物の生体機能として，体内時計がある．植物の体内時計は，遺伝子発現や花成誘導など様々な生理現象を調節しており，生育や病害耐性に影響を与えることが報告されている．体内時計の機能にも関わっている時刻情報を解析する手法としては RNA-Seq 解析やメタボローム解析などが挙げられる．これらは植物を破砕する必要があり，野菜生産という観点からは不向きである．そこで我々は，非破壊計測をするために、二次元の画像情報に加えてスペクトル情報を取得できるハイパースペクトルカメラを用いた．

本研究では，異なる 6 点の時刻で収穫したシソに対してハイパースペクトルデータを取得し，スペクトルデータから収穫時刻の推定を行った．

【結果・考察】

ハイパースペクトルカメラから得られる時刻情報と収穫時刻との間の相関を明らかにするためにスペクトル強度と収穫時刻の相関比を確認した．相関比を 5 nm 毎に算出した結果，特に可視光域(380 nm～780 nm)において比較的高い相関を示すことが明らかとなった．しかしながら，相関比が最も高い波長でも 0.4 未満であったことから，線形近似のような簡易的な手法では正確な収穫時刻の推定が困難だと考えられる．よって推定精度の向上を目指し，収穫時刻の二次元推定モデルによって評価した．収穫時刻の二次元推定モデルとは，機械学習によって各時刻で推定された時刻を一周が 24 時間の単位円上にプロットし，そのベクトル和の平均から収穫時刻を推定するモデルである．推定された時刻と実時間との差は最小で 3 分，最大で 89 分であった．このことから，6 点の時刻に分割した時刻の範囲内(目標時刻±2 時間)で時刻の推定を行うことができた．

本研究ではシソの葉をハイパースペクトルカメラで撮影し，機械学習を用いた収穫時刻の二次元推定モデルによって非破壊・非接触で推定した．その結果，収穫時刻を目標時刻±2 時間で推定することができ，収穫時刻を推定することができた．今後は環境を自由に制御できる植物工場でより精度の高いモデルを構築し，これを利用して最適な収穫時刻の推定を目指す．

hyperspectral imaging, machine learning, circadian clock

発表番号：2K009
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# Qualitative analysis of *Botryococcus braunii* lipids by $^{1}$H-Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy($^{1}$H-DOSY)

○ Yuu Minamida, Suguru Yanagiya, Hiroshi Matsuura (National Institute of Technology, Asahikawa College)

[Aim of study]

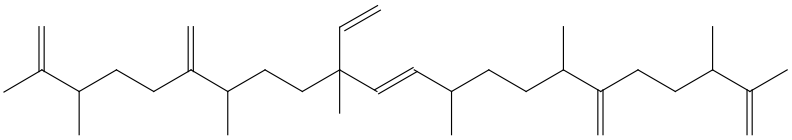
Green alga, *Botryococcus braunii*, is a microalga producing hydrocarbon by photosynthesis. *B. braunii* is subclassified into three chemical races; A-race, B-race, and L-race. NIES-836 is classified under B-race, and produces triterpenoid, botryococcene. Currently, extraction methods such as the Folch method are used to extract hydrocarbon. However, the extract contains not only hydrocarbon but also other lipids at the same time. Therefore, the purification is needed to analyze the hydrocarbon qualitatively. In this study, we focus on $^{1}$H-DOSY(Diffusion-Ordered NMR Spectroscopy) method, one of the nuclear magnetic resonance (NMR) measuring methods. With this method, it is possible to analyze each ingredient substance independently. In this research, we analyzed the hydrocarbon sample extracted from the *B. braunii* NIES-836 strain by the $^{1}$H-DOSY method.

[Methods]

The *B. braunii* NIES-836 strain from the National Institute for Environmental Studies was cultivated for 30 days in the medium of AF-6 with the temperature of 25.0 [ºC] and the light intensity of 56.1 [μmol/m$^{2}$· s]. Freeze dried cells were extracted by Folch method. Purified hydrocarbon was used for the determination of $^{1}$H-DOSY parameters: relaxation time, 90[deg]-pulse width, diffusion time and magnetic gradient pulse width. After the determination of parameters, crude extract was measured by using the $^{1}$H-DOSY method.

[Results and discussions]

Hydrocarbon that the NIES-836 strain produced was $C_{34}H_{56}$ botryococcene (**1**). Using the $^{1}$H-DOSY method, the crude extract was separated into some components according to diffusion coefficient. It was suggested that one was the hydrocarbon. The other components are now being determined.



(**1**)

NMR, DOSY, hydrocarbon

発表責任者：松浦裕志（matsuura@asahikawa-nct.ac.jp）

発表番号：2K010
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# フラグメント集積法による代謝混合物の構造生成と計算化学による推定構造の総合評価

# Structure construction in metabolic mixtures by fragment-assembly approach and evaluation of estimated structure by computational chemistry

○伊藤 研悟[1,2]、小松 功典[1,2]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3]（[1]横市院、[2]理研 CSRS、[3]名大院）
○Kengo Ito[1,2], Takanori Komatsu[1,2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]Yokohama City Univ., [2]RIKEN CSRS, [3]Nagoya Univ.)

NMR は代謝混合物群の網羅的な解析に非常に有効であるが、複雑な代謝混合物のシグナルを帰属することは容易ではなく、従来の帰属手法に頼らない理論計算に基づく帰属方法の発展が期待されている。本研究では、$^{13}$C 標識率約 99%の 20 種類の標品混合物と $^{13}$C 標識率約 40%の緑藻類のヘライワズタ(*C. brachypus*)を用いて多様な NMR 計測を行い、理論計算に基づく新規帰属法の構築を試みた。NMR 計測では、C-H 相関、H-H 相関及び C-C 相関を検出するため、HSQC、HSQC-TOCSY、DQS、INADEQUATE、COSY、TOCSY を用いた。さらに、スピン結合定数の $^{1}J_{CH}$、$^{n}J_{HH}$ 及び $^{1}J_{CC}$ は、CLIP/CLAP-HSQC、2DJ 等を用い、拡散係数は 2D 及び 3D-DOSY の計測から得た。各計測は不均一サンプリング法を適用し、網羅的・高感度・高速な計測を行った。まず、$^{13}$C 標準試料混合物を用いてフラグメント集積法による構造生成及び構造評価法の構築を行った。相関シグナルの官能基結合情報に対してネットワーク理論に基づいた自動連鎖帰属により、20 標品全てのシグナルを成分ごとのピーク群に分離し、化合物の骨格を決定した。クラスタ化したネットワークの各シグナルに対して当研究室で開発した SpinAssign ツール等のデータベース検索を行い、得られた化合物に対してグラフ同型理論に基づいた解析を行い、部分及び全体構造を予測し、$^{3}J_{HH}$ を用いた解析により立体構造を予測した。推定構造の妥当性を検証するため、量子化学に基づく化学シフト及びスピン結合定数、分子動力学法に基づく自己拡散係数の理論値を算出し、二乗平均平方根偏差(RMSD)と両側検定により評価した。これらの計算では、理研のスーパーコンピュータ HOKUSAI に実装されている Gaussian 及び Gromacs を使用した。各理論値の RMSD の平均は 0.32ppm($\delta^{1}$H)、7.20ppm($\delta^{13}$C)、11.29Hz($^{1}J_{CH}$)、5.13Hz($^{1}J_{CC}$)、1.33Hz($^{n}J_{HH}$)及び $5.98\times10^{-10}$m$^2$/s(*D*)となり、両側検定では、ほぼ全ての理論値が採択域に入った。予測された全体構造が正しい化合物と異なる場合、構造情報を反映する理論化学シフト及びスピン結合定数は実験値と異なるため、推定した全体構造の妥当性の評価に有効であると考えられた。同様の帰属方法を海藻のシグナルに適用した結果、19 の代謝物において隣接する全ての相関シグナルが確認でき、30 の代謝物の部分的な相関シグナルが確認された。19 の代謝物の構造予測を行い、実測値と理論値の比較を行った。各理論値の RMSD の平均はそれぞれ 0.34ppm($\delta^{1}$H)、5.44ppm($\delta^{13}$C)、12.97Hz($^{1}J_{CH}$)、7.41Hz($^{1}J_{CC}$)、1.05Hz($^{n}J_{HH}$)及び $4.63\times10^{-10}$m$^2$/s(*D*)であった。以上のことから、フラグメント集積法により代謝混合物群の各化合物の構造を推定でき、推定された全体構造の妥当性は化学シフト、スピン結合定数及び拡散係数の理論値から評価が可能であった。

quantum chemical calculation, spin-spin coupling constant, diffusion coefficient

発表番号：2K011
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# Utility of Energy-Resolved Tandem Mass Spectrometry in Structural Characterization of Small Molecules

○Takemichi NAKAMURA[1], Futoshi SATO[2] ([1]RIKEN CSRS, [2]Nihon Waters K.K.)

High-resolution, high-accuracy mass spectrometers with LC/MS capability have become widely accessible in the past few years and now deduction of molecular formulae of small molecules has become a routine procedure. However, molecular formula is only a part of molecular ID and structural assignment of an LC/MS peak is still a big challenge for mass spectrometry since a number of isomeric structures can exist for each molecular formula. As soft ionization methods used with LC/MS (e.g. electrospray) often lack fragmentation, tandem mass spectrometry ($MS^2$) combined with soft ionization has been used for structural analysis of organic molecules since the middle of 1980s. In the early days of practical applications of $MS^2$, high-energy collision-induced dissociation (CID) with tandem sector instrument played a major role for obtaining structural information of ions of interests. In the meantime, tandem mass spectrometers with rf-confining collision cells had been developed and soon became main stream instrumentation for $MS^2$ with the proliferation of electrospray ionization and LC/MS. $MS^2$ experiments with rf-confining device are commonly called low-energy CID. Although the terms "high-energy" and "low-energy" are quite vague, it is evident that product ion spectral patterns are collision-energy dependent as fragmentation is energy dependent chemical process. Usually, to obtain reasonable product ion spectra, collision energy is set at a value known to be optimum for the class of analyte or switched between a few values somewhere around. Alternatively, collision energy can be scanned through a wide range to systematically examine energy-dependent dissociation processes. Although the potential of such energy-resolved (ER) experiments in ion chemistry studies had been very well recognized since early days of $MS^2$, the method has scarcely been used as a real-life tool for structural characterization due to limitations in speed and sensitivity. The situation has changed with the recent advancements in high-throughput/high-sensitivity capability of Q-TOF-type instrumentation; now it became realistic to acquire ER-CID-$MS^2$ dataset within timescale of routine LC/MS experiments. We've explored utilities of ER-$MS^2$ in structural characterization of small organic molecules; a few examples including isomer-differentiation in common metabolites will be discussed.

ER-$MS^2$, Low-energy CID, Fragmentation

発表責任者：Takemichi Nakamura（takemi@postman.riken.go.jp）

発表番号：2K012
発表日時：3 月 28 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 多次元 HPLC 手法を用いた脂質化合物の分子種分析

# molecular species analysis of lipid compound using multidimension HPLC

○高橋 良輔、小谷口 美也子、中屋 慎、北村 進一（大阪府大院　応用生命）
○Ryosuke TAKAHASHI, Miyako KOTANIGUCHI, Makoto NAKAYA, Shinichi KITAMURA (Osaka Prefecture Univ.)

生体内の脂肪酸をもつ脂質化合物は、生体膜を構成するホスファチジルコリン（PC）や貯蔵物質であるトリアシルグリセロール（TAG）など、機能や構造の異なる多数の脂質クラスに類別され、さらに結合する脂肪酸によって複数の分子種が存在する。

脂質化合物の分子種組成比は、摂取した脂質化合物によって変動することが知られており、動脈硬化や高脂血症といったメタボリックシンドロームに大きく関係していることが知られている。さらに近年、血中リン脂質の特定の分子種が、アルツハイマー症と関連することが見出されるなど、脂質化合物の分子種分析は、疾患バイオマーカー探索手法としても有力視されている。

脂質化合物の分子種分析手法として逆相 HPLC-MS が用いられるが、幅広い極性をもつ脂質クラスを逆相条件により一斉分離することは難しく、膨大な分子種を分離・識別することは極めて困難である。そのため、クルードな試料から目的の脂質クラスのみを分画して分子種を分析する必要があるが、煩雑な分画工程は、試料中の不飽和脂肪酸の酸化や、微量な生体試料のロスなど分析結果に悪影響を与える。

今回、我々は脂質クラスと分子種を一斉に分析可能な系として、順相 HPLC を 1 次元目、逆相 HPLC を 2 次元目とし、これらをスイッチングバルブとトラップカラムを介して連結させた多次元 HPLC システムを構築した。本システムは検出器にコロナ荷電化粒子検出器と MS を並列して備えており、ピークの同定と定量を同時に行うことができる。本システムを用いて、市販の大豆レシチンの PC を分析したところ、大豆レシチンは 1 次元目の順相カラムによって、PC 以外にリゾ PC、ホスファチジルエタノールアミン（PE）、リゾ PE、さらに少量の TAG やセラミドのピークとして分離された。さらに 2 次元目の逆相カラムによって、PC 画分は 21 の分子種ピークに分離できた。保持時間と各 $m/z$ 値からピークを同定したところ、大豆レシチン中の PC 組成はリノール酸 2 分子からなる DLPC が 35.7%と最も多く含まれ、次いで、パルミチン酸とリノール酸からなる PLPC、オレイン酸とリノール酸からなる OLPC が多く含有することが明らかとなった。また、同定したピークの面積値から算出した PC の脂肪酸組成は、ガスクロマトグラフィー分析によって得られた分析値と一致した。同様に大豆レシチン中の TAG を分析したところ、TAG 画分は 30 の分子種ピークに分離し、こちらも同定することができた。本会では大豆レシチンの他、高度不飽和脂肪酸を豊富に含む魚油由来の脂質分析値についても報告する。

Multidimension hplc, Phospholipid, Molecular species analysis

発表責任者：北村進一（skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：2K013
発表日時：3 月 28 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 超臨界流体クロマトグラフィーと液体クロマトグラフィーの融合技術を用いたステロイド一斉分析法の構築

# Development of a simultaneous steroid analysis method by bridging supercritical fluid chromatography and liquid chromatography

○田口 歌織[1]、福崎 英一郎[1]、馬場 健史[2]([1]阪大院・工、[2]九大・生体防御医学研)
○Kaori TAGUCHI[1], Eiichiro FUKUSAKI[1], Takeshi BAMBA[2] ([1]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., [2]Med. Inst. Bioregulation, Kyushu Univ.)

ステロイドは Cyclopentanoperhydrophenanthrene を基本骨格とした化合物であり，数千に及ぶ天然，合成ステロイドは，この構造をコアとした誘導体化合物となっている．自然界に存在するステロイド化合物はその基本構造によって estranes, androstanes, pregnanes, cholanes, そして cholestanes といった基本炭化水素に分類される．これら多環式母体骨格では，構造中の第二級炭素原子に単結合する水素原子または置換基の数に多様性があるだけでなく，それらには$\alpha$または$\beta$配置が存在する．この平面構造多様性に加え，三次元構造，不飽和結合や官能基の位置や特性にも多様性が存在している．さらに，官能基には水酸基やカルボニル基などの他，アミノ酸や硫酸，グルクロン酸などの誘導体が結合する抱合体が存在し，これらの官能基によってステロイドの極性は大きく変化することが知られている．このような構造多様性はホルモンレセプターや代謝酵素との特異的相互作用に寄与しており，生体内におけるステロイドの代謝を詳細に解析するためには，包括的にステロイドプロファイルを明らかにする必要がある．しかしながら，ステロイドのプロファイリングにおいては，コレステロールのような疎水性の高い化合物から，グルクロン酸や硫酸基などの高極性官能基が導入された抱合体まで幅広い極性範囲の化合物をターゲットとして分析を行う必要がある．これまでステロイドの分析には GC や LC が使用されてきたが，近年，代替え手段として Supercritical fluid chromatography (SFC)の可能性が示され注目を集めている．SFC は通常，超臨界二酸化炭素を主成分として Modifier と呼ばれる極性溶媒を添加した移動相を用いて分離を行う．超臨界二酸化炭素の溶解性は *n*-hexane と同程度であるが，アルコールなどの極性 Modifier と溶解することで，その溶媒強度が大きく変化する.従って SFC は幅広い化合物の一斉分析に適した分離技術であると言える一方で，高極性官能基を有する抱合体まで含めた一斉分析法は示されていなかった．そこで本研究では，超臨界二酸化炭素の特性に着目し，幅広い化合物の一斉分析を可能とする新たな分離戦略として SFC と LC を融合させた Unified chromatography (UC)を用いて，これまで SFC では困難であったステロイド一斉分析法の構築を行った.

本発表では，UC を適用することで，コレステロールからグルクロン酸や硫酸抱合体までのステロイド一斉分析が達成されることを示すとともに，その分離特性が分子全体の極性だけでなく，分子内の部分的な電荷の偏りに影響を受けていたことから，UC によるステロイド分析が部分的な構造認識能の高い分離手法であることを示す.

steroid, supercritical fluid chromatography, unified chromatography

発表責任者：馬場健史（bamba@bioreg.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3A001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# バイオオーグメンテーション法が塩素化エチレン類汚染土壌の浄化現場の生態系へ与える影響評価手法の開発

# Ecological impact assessment of a bioaugmentation site on remediation of trichloroethylene and *cis*-1,2-dichloroethylene

○綿引 沙織[1,2]、木村 信忠[1,2]、山副 敦司[3]、三浦 隆匡[3]、野田 尚宏[4]、松倉 智子[4]、高畑 陽[5]、野尻 秀昭[6]、福田 雅夫[7] ([1]産総研・生プロ、[2]筑波大院・生、[3]NITE、[4]産総研・バイオメディカル、[5]大成建設(株)、[6]東大・生セ、[7]長岡技大・生物)
○Saori Watahiki[1,2], Nobutada Kimura[1,2], Atsushi Yamazoe[3], Takahiro Miura[3], Naohiro Noda[4], Satoko Matsukura[4], Yoh Takahata[5], Hideaki Nojiri[6], Masao Fukuda[7] ([1]BPRI,AIST, [2]Tsukuba Univ., [3]NITE, [4]BMRI,AIST, [5]TAISEI Corp., [6]Tokyo Univ., [7]Nagaoka Univ. of Technology)

【目的】環境浄化の手段として微生物機能を利用したバイオレメディエーションが注目されている。本研究では、有機性揮発化合物であるトリクロロエチレン（TCE）及び *cis*-1,2-ジクロロエチレン（*cis*-1,2-DCE）で汚染された土壌・地下水を対象にした TCE/*cis*-1,2-DCE 分解菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 を導入するバイオオーグメンテーション法の実証試験を行い、次世代シークエンサー（NGS）を利用した微生物生態系への影響評価を行った。また、導入した RHA1 株の消長と TCE/*cis*-1,2-DCE 分解に関与すると推定される遺伝子の発現量の変化を解析するための手法の確立を目指した。
【実験方法】TCE/*cis*-1,2-DCE により汚染されたサイトに注入井戸 1 か所及び観測井戸 3 か所の設置を行った。ファーメンターによる通気攪拌条件で RHA1 株の純粋培養を行った。培地には消泡剤を添加した LB 培地 150 L を用い、遠心分離で菌体を回収した。その後、リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁した RHA1 株(約 $1.0\times10^{14}$ 個)を十分に曝気した水道水と共に注入井戸へ導入し、注入直後、注入 1 日後、6 日後、19 日後に注入井戸より地下水 1L をサンプリングした。また、コントロールとして注入 30 日前に同様に地下水をサンプリングした。採取したサンプルから RNA 及び DNA の抽出を行い、さらに RNA については Ribosomal RNA を除去し、cDNA の合成を行った。塩基配列の決定は、Illumina 社 Hiseq 1000 system により実施した。微生物叢の解析は、メタゲノム解析サーバーである MG-RAST を利用した。また、RHA1 株の発現量解析については、CLC genomics workbench (CLC Bio Japan 社）により実施した。
【結果・考察】NGS 解析によって得られた約 300 万リードの塩基配列情報を利用して微生物叢及び RHA1 株の発現量解析を行った。まず、メタゲノム解析による PCoA 解析 (Principal Coordinates Analysis) を行ったところ、注入直後において急激な微生物叢の変化が観察されたが、時間の経過とともに RHA1 株の菌数が減少し、それに伴い微生物叢が添加前の状態へ回復する傾向が観察された。また、メタトランスクリプトーム解析により遺伝子発現量の継時変化について検証を行った結果、RHA1 株において TCE/*cis*-1,2-DCE 分解に関与すると推定されるビフェニル酸素添加酵素群 *bphA1,etbA1,ebdA1* の高い発現が確認され、溶存酸素量の低下とともに遺伝子の発現量が低下することが観察された。以上の結果より、バイオレメディエーション法を実施した浄化現場の微生物叢及び導入した微生物の挙動を高精度にモニタリングすることができ、環境影響評価に利用するための手法のプロトコールの確立を行うことができた。

Metagenome, Metatranscriptome, Bioaugmentation

発表番号：3A002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 自然止水域における対流型水処理装置の浄化効果

# Efficiency of circulation-based water purification system in a natural pond

○脇 孝典、アディカリ ディネシュ、向 真樹、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Takanori WAKI, Dinesh ADHIKARI, Masaki MUKAI, Kiwako S. ARAKI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Uinv.)

【背景・目的】

止水域では落ち葉等の有機物が流入する。しかし、有機物は対流によって底土に運ばれ、微生物に分解される。止水域ではこのような自浄作用と呼ばれる水を浄化する能力により、水質が一定に保たれている。つまり有機物中の炭素源は好気性細菌による脱炭酸反応を経て、二酸化炭素として大気に放出される。また、窒素源は嫌気性微生物による脱窒反応を経て、窒素として大気に放出される。このように、好気環境微生物、嫌気環境微生物及び対流が、自浄作用において重要な役割を担っている。

人為的な開発により、止水域での有機物の流入量が微生物による分解量を上回り、未分解有機物が底土に蓄積されている。その結果、酸素と微生物の接触頻度が低下し、自浄作用が妨げられるため水質悪化が生じている。そこで、我々は止水域内の水質浄化を目指した物質循環の効率を上げる装置を開発し、2014 年から稼働させている。この装置は、池の水を吸い上げ、離れた場所に放流させることで疑似的な対流を作り出している。また、装置内のカラムに微生物吸着担体を充填し、吸い上げた水をカラム内に通過させることにより、担体中で池の微生物を増加させている。カラム内の水を再放流することで池の微生物量が増加し、自浄作用を促進させる効果をもたらす。

本研究では、装置による浄化効果を評価するため、装置の稼働による水質の経時変化と、底土環境へ与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

2014 年 7 月 7 日に、滋賀県草津市の北野新池（$1.72\times10^{3}$ $m^{2}$）において装置による浄化実験を開始した。装置稼働後、池の水を週 1 回採取し、化学的酸素要求量(COD)、全炭素量(TC)、全窒素量(TN)、溶存酸素濃度(DO)、電気伝導度(EC)、pH、色度、濁度、循環頻度を測定した。また、四季ごとに池の水と底土を池全体から採取し、水の分析項目に加えて、底土の TC、TN、総細菌数を測定した。その結果、装置の稼働前には 1 年に 12 回水が循環していたのに対し、稼働後は、180 回に増加した。水分析の結果、DO の値は 1 年を通じて約 4.0 mg/L 以上を維持した。また、同時期での装置稼働後 1 年目と 2 年目の COD の値を比較すると COD 値は減少していることが分かった。池全体の水と底土の分析結果から、対流が大きいと推測される場所で底土の TC が低い値を示した。以上の結果から、本装置には止水域の DO を高水準に維持させる効果があることが明らかになった。また、装置を継続的に使用することによって水質が浄化されることが示唆された。

water purification, environmental bacteria, water circulation

発表責任者：脇　孝典（sb0034ik@ed.ritsumei.ac.jp）

発表番号：3A003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Effect of circulation-based water purification system on environmental bacteria in a pond sediment

○IMA YUDHA PERWIRA, DINESH ADHIKARI, MASAKI MUKAI, ARAKI KIWAKO S., MOTOKI KUBO (Ritsumeikan Univ.)

A circulation-based water purification system was developed to improve water quality of ponds. This system consists of a slow water circulation along with two types of bacterial columns. Water was circulated by pumping the water from the pond. Columns containing relatively aerobic bacteria were created by water flow through the columns continuously, and columns containing relatively anaerobic bacteria were created by water flow through the columns for 15 minutes in every one hour. All of the columns were filled with polyvinyl alcohol (PVA) sponge attaching bacteria. In order to evaluate the ability of this new water purification system, this study investigated decomposition of organic materials, bacterial number, and bacterial diversity of sediment in naturally polluted aquatic environments. An experiment was carried out in a pond located in Kusatsu, Shiga, Japan (area: 1,716 $m^2$) from spring to autumn 2015. Sediments were collected from the pond area highly influenced by the water treatment system (highly influenced area) and less influenced by the water treatment system (less influenced area) during spring, summer, and autumn seasons. Total nitrogen (TN), total carbon (TC), total bacterial number, total nitrogen-fixing bacterial number, and diversity of bacteria were analyzed. TN was analyzed by using Kjeldahl digestion method, TC was analyzed by using TC analyzer, nitrogen-fixing bacterial number was estimated by using quantitative PCR, and diversity of bacteria was analyzed by using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). TC, TN, and nitrogen-fixing bacteria were low level at highly influenced area, at the same time total bacterial number was lower at less influenced area. The tendency was similar in every season. Aerobic and anaerobic bacterial columns combined with slow water circulation seem to be effective for increasing the number of bacteria and decomposition of organic materials for treatment of the polluted aquatic environment.

environmental bacteria, aquatic environment, water circulation

発表番号：3A004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

*Rhodococcus jostii* RHA1 におけるジクロロエチレンの分解
Degradation of dichloroethylenes by *Rhodococcus jostii* RHA1

○木内 勇貴[1]、米塚 健太[1]、荒木 直人[1]、千野 加奈子[1]、笠井 大輔[1]、上村 直史[1]、山副 敦司[2]、下平 潤[2]、藤田 信之[2]、高畑 陽[3]、政井 英司[1]、福田 雅夫[1]([1]長岡技科大院・生物、[2]NITE(NBRC)、[3]大成建設（株））
○Yuuki KINOUCHI[1], Kenta YONEZUKA[1], Naoto ARAKI[1], Kanako CHINO[1], Daisuke KASAI[1], Naohumi KAMIMURA[1], Atsushi YAMAZOE[2], Jun SHIMODAIRA[2], Nobuyuki FUJITA[2], Yoh TAKAHATA[3], Eiji MASAI[1], Masao FUKUDA[1] ([1]Nagaoka Univ. of Technol., [2]NITE(NBRC), [3]Taisei corp.)

【背景】
塩素化エチレン類のトリクロロエチレン（TCE）やシス-ジクロロエチレン（cDCE)、トランス-ジクロロエチレン（tDCE）は人に対する毒性や発がん性が認められた環境汚染物質である。各地で土壌の汚染が確認されていることから効果的な浄化手段の開発が求められている。その一つの方法として微生物の代謝系を利用したバイオレメディエーションの提案がされている。これまでに我々はポリ塩化ビフェニルおよびビフェニル(BPH)分解菌として単離された *Rhodococcus jostii* RHA1 株において、TCE 分解能に対する BPH ジオキシゲナーゼの関与を明らかにしてきた。本研究では、RHA1 株の cDCE および tDCE 分解において関与する分解酵素遺伝子について調べた。

【方法】
誘導培養の影響を調べるために、20mM コハク酸を含む W 無機塩培地で 24 時間培養した RHA1 株に誘導基質を添加して 24 時間の誘導培養した。分解試験では回収、洗浄を行った RHA1 懸濁液 20 ml（$OD_{600}$=10）をバイアル瓶に入れて分解基質を終濃度 1.5 μM/Vial となるよう添加し、ゴム栓およびアルミキャップによって密栓し、30℃、120 rpm で振盪した。基質減少量はバイアル瓶の気層部分 400 μl を経時的に採取してガスクロマトグラフによって測定を行った。

【結果と考察】
TCE およびプロパンで誘導した RHA1 株では、非誘導の RHA1 株と比較して、TCE、cDCE、tDCE に対する分解活性が上がった。また、RHA1 株の BPH ジオキシゲナーゼ遺伝子群の転写制御遺伝子 bphST 破壊株では誘導条件でも TCE に対する分解活性は完全に失われた。一方で TCE で誘導した bphST 破壊株による cDCE と tDCE の分解活性は若干低下したものの保持されていた。しかし、プロパンで誘導した bphST 破壊株では cDCE の分解が野生株と同等、tDCE の分解は野生株を上回った。このことから TCE 分解には bphST による転写誘導を受ける BPH ジオキシゲナーゼが関与し、cDCE と tDCE の分解には BPH ジオキシゲナーゼと異なるプロパンで誘導される酵素が関与することが示唆された。

Dichloroethylene, Dioxygenase, Rhodococcus

発表番号：3A005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# EMS 変異による油脂高分解活性菌株の取得

# High activity stnain of oil-cleyradiny microorganism by EMS mutation

○稲垣 泰治[1]、倉根 隆一郎[1]、稲川 顕嗣[2]、平野 達也[2] ([1]中部大学、[2]シーシーアイ株式会社)
○Yasuharu INAGAKI[1], Ryuichiro KURANE[1], Akitsugu INAGAWA[2], Tatsuya HIRANO[2] ([1]Chubu Univ., [2]CCI company)

## 背景

厨房施設や食品工場等から排出される排水には高濃度の動植物油脂が含まれ、多量の油が下水道の管路閉塞や悪臭発生、浄化槽の処理機能低下、処理水の水質悪化等の問題を引き起こす。下水道等に油が直接流出することを防ぐため、排水中の油を除去する除害施設（グリーストラップ等）の設置が法律により義務付けられている。
しかしながら、グリーストラップ等の小型の除害施設では，計画値を大幅に超える油の流入や，管理不良等の問題で，適切な処理が行われていないのが現状である。また，グリーストラップや加圧浮上装置は，油を水との比重差を利用して分離する施設であり，分離された油泥（油と汚泥の固まり）を産業廃棄物として処分しなければならない。
この厨房廃水等に含まれる油の除去に現行のグリーストラップ等施設中において油分解能を有する微生物（油分解菌）を導入し、利用するシステムは，油を分解するという点で，環境に配慮したシステムであり、かつ結果としてコスト削減に繋がる。
本研究室では高濃度油脂分解微生物の探索を行い、菌の取得に成功した。この菌株の油脂分解能力を向上させることは実際の現場で投入した際、現在より多くの油脂を分解し、グリーストラップ内の環境をより良い状態に保つことが期待できる。

## 方法

取得した菌株を 1 昼夜培養し、EMS 変異を行った。
その後突然変異株について油脂分解能力についてノルマルヘキサン抽出法によって評価した。

## 目的

本研究では取得していた菌株に EMS 変異を行い、油脂分解能力の向上結果について報告する。

environmental cleanup, grease trap, oil resolution

発表番号：3A006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 極低濃度の VOC 含有空気浄化のための光触媒反応器の開発

# Development of a photocatalytic reactor for purifying air containing VOC at a very low concentration

○田之上 祐太[1]、古藤 俊昭[2]、伴野 豊[1]、白石 文秀[1] ([1]九大院農、[2]九大農)
○Yuta TANOUE[1], Toshiaki KOTO[2], Yutaka BANNO[1], Fumihide SHIRAISHI[1] ([1]Kyushu Univ. Grad., [2]Kyushu Univ.)

**【目的および背景】**環境中の VOC 濃度は一般に 1ppm 以下であり、このような極低濃度 VOC の分解処理は一見簡単なように思われるが、実際には高濃度の場合よりもはるかに難しい。また、屋内の空気汚染は、養蚕施設などの空間においても深刻な問題である。しかしながら、現在までにこれらの問題を解決できる確実な浄化技術はない。そこで、演者らは安全性や分解可能物質の多様性の点から、常温で様々な揮発性有機化合物（VOC）などを非選択的に酸化分解する酸化チタン光触媒（$TiO_2$）の利用を検討してきた。その結果、これまでに光触媒近傍に発生する境膜拡散抵抗が分解速度を大きく低下させており、これを除去すれば分解性能が飛躍的に増大すること、また VOC はその濃度が 1 ppm 付近まで低下すると急激に分解困難になるが、単位表面積当たりの UV 強度を高くすることにより数十 ppb 以下の検出限界まで分解可能であることを明らかにした。本研究ではさらに性能が高く、実用性の高い装置の開発を目的として、ステンレスメッシュと $AC/TiO_2$ を使用した新規光触媒反応器を作製し、その VOC 処理特性を検討した。

**【実験方法】**所定量の活性炭粒子（平均径 2 mm）を過酸化チタン水溶液に浸漬した後、120℃で 30 分間乾燥させた。この工程を数回繰り返し、最終的に粒子表面が過酸化チタンで覆われた $AC/TiO_2$ を得た。内径 3cm のガラス管の中に、管状に成形したステンレスメッシュを挿入した後、これらの間にできた管状路内に $AC/TiO_2$ 粒子を積層させた。この管の中心に 6W 殺菌灯を挿入・固定したものを 1 ユニットとし、この 9 本を 3 行 3 列に並べ、その上部にファンを固定した。これを密閉した $1m^3$ 空間に設置した後、所定量のホルムアルデヒド（HCHO）を揮発させ、反応器のスイッチを入れて分解実験を開始した。所定時間に一定量の空気を採取し、数十 ppb の濃度でも測定できるようにするため、HCHO は $1m^3$ 空間内空気を所定時間に純水にバブリングさせた後､HCHO 検出試薬を加えて発色させ、分光光度計で濃度を決定した。$CO_2$ は、$CO_2$ 測定器（Testo 製）を使って測定した。

**【結果および考察】**いずれの初濃度においても HCHO は検出限界の濃度まで迅速に低下した。また、初濃度が 5ppm 以下のとき $CO_2$ 生成率がほぼ 100%となった。これは HCHO 濃度が低い場合、活性炭により迅速に引き寄せられた HCHO が酸化チタン膜を通過する際に光触媒により完全に分解されたことを意味する。以上の結果から、新規光触媒反応器が高い性能を持つことがわかった。

photocatalytic reactor, volatile organic compound, air purification

発表責任者：白石　文秀（fumishira@brs.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3A007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 挿入型 2 subunits メタ開裂酵素の発現機構の解明

Analysis of expression mechanism of 2 subunits meta-cleavage enzyme, CarBa and CarBb.

○山本 寛樹、岩田 健一（芝工大院シ）
○HIROKI YAMAMOTO, KENICHI IWATA (Shibaura Institute of Technology)

【目的】

Carbazole(CAR)は、石油製品などの生産過程で生じる難分解性の副産物であり、発癌性を呈することから、適切な処理が求められている。現在、CAR 分解能を保有する *Pseudomonas resinovorans* CA10 株の CAR 分解経路に関する遺伝子及び酵素群は研究が進んでいる。また、芳香族化合物の分解に関与する殆どのメタ開裂酵素は単一のタンパク質から構成されるが、CAR 分解経路に関わるメタ開裂酵素 CarBaBb は、 活性部位の CarBb と安定化に関わる CarBa の 2 つの subunit で構成されている。しかしながら、2 subunits メタ開裂酵素に関する詳細な情報は不明であるため、ヘテロ酵素複合体の会合様式、及び、会合による活性のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

大腸菌 BL21(DE3)の alkaline phosphatase (ALP, *phoA*)は、耐熱性及び安定性に優れていることから spacer DNA として用いることとした。そして、CA10 株由来の *carBaBb* の遺伝子を持つ *pUC*A500-h の *carBa* と *carBb* の間に *phoA* を挿入した plasmid を *pUC*BaALPBb-h とした。また、両群の *carBb* の末端には 6 残基の Histidine (His-tag)が付加するように設計した。この各群を BL21 (DE3)にて目的酵素の大量発現を行い、粗酵素を抽出した。その後、His-tag を付加した目的酵素を metal-chelate affinity chromatography にて精製し、さらに、きょう雑のタンパク質を除去するために gel filtration chromatography による精製を行った。その後、Tricine SDS-PAGE により、CarBaBb が精製されていることを確認した。また、比活性の測定では、基質に 2,3-dihydroxybiphenyl (2,3-DHBP)を用い酵素活性を測定し、Michaelis-Menten curve を求め比較した。

【結果】

アガロースゲル電気泳動結果から、*pUC*BaALPBb-h は *carBaBb* 1083bp の間に *phoA* 1416bp が挿入されたことが確認できた。また、His-tag 精製による結果は、*pUC*A500-h は、0.56M imidazole, 10.4min で 276mAU の peak が得られた。一方、*pUC*BaALPBb-h は 0.65M imidazole,11.8min で 263mAU の peak が得られた。その後、各群の peak 間を回収し、CarBaBb が精製されていることを Tricine SDS-PAGE により確認した。今後は、精製後の CarBaBb の比活性の測定を各群にて実施する予定である。

Carbazole, 2 subunits meta-cleavage enzyme, CarBa and CarBb

発表責任者：山本寛樹（mf15079@shibaura-it.ac.jp）

発表番号：3A008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 消石灰散布による土壌微生物への殺菌効果と影響評価

# Microbicidal efficacy and impact assessment of the soil microorganisms by slaked lime spraying

○南 純一、中谷 剛、高橋 和樹、坂上 吉一、森 美穂 (近大農)
○Junichi MINAMI, Thuyoshi MAKAYA, Kazuki TAKAHASHI, Yoshikazu SAKAGAMI, Miho MORI (kindai Univ.)

【背景と目的】

消石灰は家畜伝染病が発生した際、家畜伝染病予防法に従い畜舎やその周辺の環境中へ大量に散布される。このような消毒目的の消石灰散布は同法の施行以来、60 年以上行われてきた。しかし、散布実績がある一方、野外における消石灰散布の殺菌効果を評価した例は非常に少なく、明確な散布方法・基準や上限値は示されてこなかった。さらに、これまで消毒による消石灰散布が環境中に与える影響を詳細に調査した研究例は存在しない。本研究では *in vitro* 試験、疑似野外試験、野外試験の 3 種の試験を通して消石灰散布の野外環境中での殺菌効果と土壌微生物に及ぼす影響評価を行なった。

【方法と結果】

*in vitro* における飽和消石灰溶液の殺菌試験を行なった。飽和消石灰溶液は殺菌評価試験でよく用いられる細菌に対しては 1 min 未満で 3 log 以上の高い殺菌効果を示したが、真菌に対しては 60 min の処理においても殺菌効果はみられなかった。また本実験で土壌から単離同定した細菌と真菌に対しても顕著な殺菌効果は認められなかった。

野外土壌を滅菌ガラス瓶に加え、消石灰（0～1000 g/$m^2$）あるいは市販消毒剤 3 種の散布を行なった。家畜のサルモネラ症に対する待ち受け消毒を想定し、その上から *Salmonella* Typhimurium を均一に接種した。一定期間静置後、0.1 M リン酸緩衝液（pH 7.0）で中和・希釈した後、ES サルモネラ寒天培地Ⅱに塗抹し、培地上に現れた黒色コロニー数から殺菌効果を算出した。また、土壌微生物への影響に関しては上記と同様の処理の後にシクロヘキシミド添加 LB 培地とクロラムフェニコール添加 PDA 培地によって生菌数を計測した。密閉状態の試験では、消石灰は散水・散布量の増加に伴い殺菌効果が向上し、他の市販薬剤と比較して持続殺菌効果が高かった。しかしながら、散水後に通気した条件では 7 日目までに殺菌効果を失った。土壌細菌数と真菌数は、消石灰の散布量と散水量、通気条件に関わらず未散布区との顕著な違いはみられなかった。

キャンパス内の野外土壌に 0～1000 g/$m^2$ の消石灰を単回散布あるいは複数回散布した。経時的に土壌を採取し pH 測定、生菌数測定、交換性陽イオン（Na, Mg, K, Ca）測定、および可給態リン酸およびアンモニア態窒素の測定を行った。結果、pH と CEC（$Ca^{2+}$）は 900 日以上経過後も散布による影響が見られたが、生菌数とその他の測定項目に関しては散布区と未散布区の間に顕著な差はなかった。

Soil bacteria, Slaked lime, PCR-DGGE

発表番号：3A009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 好気条件における黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* RIB2604 株によるセレンオキサニオン変換とセレン回収

# Selenite reduction and selenium recovery by a black koji mold, *Aspergillus luchuensis* strain RIB2604 under aerobic conditions

○阪口 利文[1,2]、永岡 美優[2]、有馬 寿英[2]、木村 博美[2] ([1]県立広大生命科、[2]県立広大環境科)
○Toshifumi SAKAGUCHI[1,2], Miyu Nagaoka[2], Toshi-Hide Arima[2], Hiromi Kimura[2] ([1]Pref. Univ. of Hiroshima, Dept. of Life Sci., [2]Pref. Univ. of Hiroshima, Dept. of Environ. Sci.)

【背景及び目的】麹菌は日本の伝統的発酵・醸造産業において、最も有効に利用されている糸状菌の一つである。黄麹菌は清酒・味噌・醤油などの製造に用いられ、黒麹菌はクエン酸や泡盛の製造などに用いられている。演者らはこれまで黄麹菌 *Aspergillus oryzae* RIB40 株の亜セレン酸還元、元素体セレンの回収について研究を進めてきた。その結果、RIB40 株は好気的条件で亜セレン酸を還元する能力を持っており、還元した亜セレン酸は元素体セレンとして回収できることを明らかにしてきた。そこで、本研究では焼酎、泡盛などの蒸留酒の醸造産業で用いられている黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を用いた亜セレン酸の元素体セレンへの変換、回収の可能性について検討した。
【方法及び結果】本研究では黒麹菌 *A. luchuensis* RIB2604 株を用いて好気的な条件での亜セレン酸の変換、元素体セレンへの回収実験を行った。まず RIB2604 株の分生子をポテトデキストロース(PD)寒天培地上に形成させ、PD 液体培地に植菌・培養後、粒状の菌糸凝集体を形成させた。この粒状菌体を用いて、様々な初発濃度における亜セレン酸の還元、元素体セレン微粒子の変換・形成について調査した。その結果、初発濃度が 0.1mM の亜セレン酸の場合、好気的条件での還元が可能で、添加から約 1 時間で培養液中の亜セレン酸イオンのほぼ全てが無くなることが判明した。また、亜セレン酸添加後、菌糸凝集体は白色から赤色に変化し、元素体セレン粒子に変換できることが明らかになった。本株は黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 株に比して、低濃度での迅速な亜セレン酸の還元、セレン回収に有効であった。また、セレンを含有する菌体は遠心などの煩雑な分離操作を必要としない単純濾過による簡便な分離が可能であった。

*Aspergillus luchuensis*, Elemental recovery, Selenite reduction

発表責任者：阪口利文（sakaguchi@pu-hiroshima.ac.jp）

発表番号：3A010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 炭素繊維強化プラスチック分解菌の探索

# Screening of microorganisms for biodegradation of carbon fiber reinforced plastic

○渡邉 みちる[1]、河合 盛進[2]、山田 美和[1]、下飯 仁[1] ([1]岩手大農、[2]トヨタ紡織　基礎研)
○Michiru WATANABE[1], Sung-Jin KAWAI[2], Miwa YAMADA[1], Hitoshi SHIMOI[1] ([1]Iwate Univ., [2]TOYOTA BOSHOKU CORP. RESEARCH LAB.)

【目的】

炭素繊維強化プラスチック(Carbon Fiber Reinforced Plastic: CFRP)は、高い強度と軽さを有することから、近年需要が増加している資材であり、CFRP 関連の廃材もまた、将来的には大量に発生すると予測されている。資材としては優れた性質を有し、今後の需要の増大が見込まれている CFRP であるが、廃棄法においては現状、高温高圧の高エネルギーおよび有機溶剤が必須であるため環境への負荷が懸念されている。よって、環境負荷を与えない新たな CFRP 処理法の構築は急務であるといえる。このような背景のもと、本研究では、CFRP の低環境負荷型処理法の確立を最終目的とし、CFRP を分解可能な微生物の取得を目指した。

【方法】

CFRP もしくは CFRP を主に構成する樹脂であるポリアミド(PA66)の粉末を主な栄養源とした培地（PA66CF20 培地、PA66 培地）を pH 4.0、7.0、9.0 に調製し準備した。作製した培地を用いて、自然界の土壌をスクリーニング源とし、30ºC で約 2 週間、集積培養を行った。その後、培養液を同組成のプレート培地に播種し、形態の異なるコロニーを単離した。単離した各菌株を、PA66CF20 および PA66 顆粒を主な栄養源とした液体培地で約 1 ヶ月間培養し、培養後の顆粒表面を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察、樹脂表面に菌体の付着が確認できた菌株を分解候補菌として選抜した。

【結果】

集積培養後、PA66CF20 培地で 62 株（pH4.0 17 株、pH 7.0 24 株、pH 9.0 21 株）、PA66 培地で 65 株（pH4.0 25 株、pH 7.0 15 株、pH 9.0 25 株）の形態の異なる菌株を単離した。続いて各菌株を、PA66CF20 および PA66 顆粒を主な栄養源とした液体培地で培養し、培養後の顆粒を SEM により観察した結果、PA66CF20 培地で 9 株（pH4.0 1 株、pH 7.0 5 株、pH 9.0 3 株）、PA66 培地で 7 株（pH4.0 4 株、pH 7.0 2 株、pH 9.0 1 株）の菌株を用いた際に、樹脂顆粒に明らかな菌の付着が観察された。現在、選抜された分解候補菌を用いて再び約 1 ヶ月間培養し、1% SDS、0.2 M NaOH 溶液に 1 晩浸した後 1 時間の超音波処理を加えることで顆粒に付着した微生物の除去を行い、培養前後の顆粒の重量変化を調べている。

biodegradation, Carbon Fiber Reinforced Plastic, screening

発表番号：3A011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 有機塩素系農薬クロロタロニルの汚染土壌微生物による分解

# Degradation of chlorothalonil by contaminated soil samples.

○松原 光悦、八田 貴（岡山理大工）
○Kouetsu MATSUBARA, Takashi HATTA (Okayama Univ. of Sci.)

【目的】有機塩素系農薬のダコニール [2,4,5,6,-tetrachloroiso phthalo nitrile （ＴＰＮ)] は広範囲の作物の病気に防除効果を示す総合殺菌剤で、4 つの塩素原子を含む芳香族有機化合物である。世界的に使用されており、中国では有機塩素系農薬としては最も多く使用され、日本でも一般家庭で園芸作物の病気に対して広く使用される。しかし、雨水にともなって河川などに流れでた場合は魚介類に対し強い毒性を示す。発がん性については国際がん研究機構 IARC の group2B に属している。本研究では、中国・インド・東南アジア等の土地が平坦で雨水や河川によって流出されにくく、ＴＰＮ を多量に使用している汚染圃場のＴＰＮの分解除去を目的として微生物を含む土壌を用いた分解性と分解菌の単離を試みた。
【方法】長期間 TPN を使用していた畑から土壌サンプルを採取した。30 ml 容サンプルチューブに採取した土壌と固体のＴＰＮを 0.5 mg 加え、1 ヶ月以上集積培養を行った。100 ml 容バッフル付き三角フラスコを用いて、無機塩培地（25 ml）に 50 PPM のＴＰＮと 3%の畑の土を加え、30℃で振盪培養した。チオンシアン酸水銀法を用いてＴＰＮから分解遊離した塩素イオンを定量することにより分解性を調べた。また、畑の土以外に、赤玉土、鹿沼土、バーミキュライト、パーライトを培養液に加えた場合での分解実験も行った。
塩素イオンが増加した培養液を R2A 寒天培地にプレーティングしコロニーの違いから分類し菌株の同定を行った。
【結果】採取した土壌から塩素イオンの増加がみとめられたため、分解菌の存在が確認された。また、畑の土以外ではバーミキュライトのみが TPN の分解が見られ、他の土では分解が見られなかった。分解培地中には 2 種類の菌株が R2A 培地で見出され、分解性の検討を行ったので報告する。

chlorothalonil, TPN, degradation

発表番号：3A012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# トリクロロフェノール分解菌 *Ralstonia pickettii* の 後期 3 代謝遺伝子の役割

# Role of three kinds of trichlorophenol degradation genes by *Ralstonia pickettii*

○畢 貞、八田 貴（岡山理大工）
○ZHEN BI, TAKASHI HATTA (Okayama Univ. of Sci.)

**【目的】**ダイオキシンは日本ではその処理が確立しており今では少なくなっているが、世界各国で発がん性等の原因物質となっている。クロロフェノールの中でも、2,4,6-トリクロロフェノール（2,4,6-TCP）は重合することによってテトラクロロダイオキシンとなり、ダイオキシン類でも最も毒性の高いものになる。*Ralstonia pickettii* DTP0602 株は 2,4,6-TCP を完全分解するが、3-オキソアジピン酸を経て TCA サイクルへ代謝することが分かっている。*R. pickettii* DTP0602 の全ゲノム解析の結果から、ゲノムの 3 ヶ所に 3-オキソアジピン酸を代謝する遺伝子 *(hadEF)* が存在していることが明らかとなっている。今回の研究ではこれら 3 遺伝子が主に何の分解に関与している遺伝子なのかを各破壊株を用いて予想した。

【方法】*R. pickettii* DTP0602 の各遺伝子の破壊は pK18mobSacB を用い、抗生物質耐性遺伝子を挿入することによって取得した。遺伝子破壊の確認は PCR 法を用いた。これらの破壊株を芳香族化合物での生育を調べ、分解にどのように関わっているのかを調べた。また、*hadE1F1* 株、*hadE2F2* 株、*hadE3F3* 株を相補することによって確認した。

**【結果】初期分解遺伝子** *hadRXABC*、*hadSYD* 及び *hadEF* が染色体 2 の 400Mb 以内に存在していたが、この位置は分解性と関係しないことが予想された。一方、染色体 1 に存在する *hadE2F2* はチロシン、フェノール、フェニルアラニン、2,4,6-TCP の分解に関わっていることが予想された。染色体 2 に存在する *hadE1F1* は安息香酸、フェノールの分解に関わっており、染色体 3 に存在する *hadE3F3* は 2,4,6-TCP の分解にも関わっていることが示唆された。

今回の研究では、3-oxoadipate から TCA サイクルへの分解に関わる *hadEFG* は類似の遺伝子 3 コピーが染色体 1,2,3 にそれぞれ存在しており、別々の芳香族化合物の分解に関わっていることが明らかとなった。これらの相補実験を行い、更に 2,4,6-TCP の分解速度が親株より速くなることを確認した。

trichlorophenol, Ralstonia pickettii, chlorophenol

発表番号：3A013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 生物学的処理および光触媒・boron-doped diamond 電極ハイブリッド式汚水浄化システムの構築と解析

# Analyses of hybrid wastewater purification system using biological treatment, photocatalyst and boron-doped diamond electrode

○佐藤 俊貴[1]、落合 剛[2,3]、森戸 祐幸[4]、藤嶋 昭[2,3]、鈴木 智順[1,2]([1]東理大　応生、[2]東理大　総研、[3]神奈川技術アカデミー、[4]ユーヴィックス株式会社)
○ Toshiki SATOU[1], Tsuyoshi OCHIAI[2,3], Yuko MORITO[4], Akira FUJISHIMA[2,3], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science, [3]KAST, [4]U-vix corporation)

【目的】生活汚水による生態系への悪影響などを防ぐため、一般にさまざまな汚水処理の技術が存在するが、処理に要するコストが高いことやトリハロメタン等の有害物質を発生させてしまうといった問題が指摘されている。これらの問題を解決する手段として、光触媒や boron-doped diamond (BDD)電極を利用した化学的処理技術が注目されている。そこで本研究では、汚水に含まれる有機物を生物学的に処理し、その後、光触媒および BDD 電極を用いて、残存有機物や微生物を処理することで、より環境への負荷の少ないハイブリッド式汚水浄化システムを構築することを目的とした。

【方法】まず、殺菌性能を評価するために、*Escherichia coli* IAM12118$^T$ 懸濁液に対して、光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに細菌懸濁液を回収し、コロニー計数法により経時的な *E. coli* 生菌数の変化を計測した。次に、当研究室に設置している循環型汚水浄化装置の処理水を 10 倍希釈し、希釈した処理水 200 mL に対して、光触媒反応および BDD 電極をそれぞれ作用させ、一定時間ごとに COD および TOC を測定し、有機物分解能を評価した。さらに、どのような細菌が本研究で構築したハイブリッド式汚水浄化システムで殺菌、除去されているのかを調べるために、16S rRNA 遺伝子を用いた PCR-DGGE 法を行った。最後に、有害物質発生の要因とされる塩素が本システムでどの程度発生するのかを調べるために、0.9%生理食塩水に対して本システムを作用させ、一定時間ごとに生成塩素量を測定した。

【結果】本研究では、光触媒反応および BDD 電極による電気分解反応を併用した生物学的処理水の最終浄化システムの構築に向けた殺菌性能および有機物分解能の評価を行った。その結果、殺菌性能の評価において、光触媒と BDD 電極を併用した場合は反応開始 1 時間後に約 99.9 %の *E. coli* が死滅した。さらに、有機物分解能の評価において、特に、光触媒と BDD 電極を併用した場合に高い有機物分解能を示した。以上の結果から、本併用システムが、より高い殺菌性能および有機物分解能を発揮することが示唆された。さらに、循環型汚水浄化装置の処理水に対してこのシステムを作用させた後、PCR-DGGE 法により細菌叢を解析した結果、*Enterococcus* 属細菌が本併用処理に耐性を持つことが示唆された。最後に、本システムで生成する塩素量を測定した結果、安定して 0.5 ppm 以下であることがわかり、一般の汚水処理で使用される 3 ~ 5 ppm よりも大幅に少ないことが確認された。

wastewater purification, photocatalyst, boron-doped diamond electrode

発表番号：3A014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 微生物を利用した汚泥減容化に関する研究

# Sludge volume reducing microorganisms

○杉村 寿將、佐藤 駿、倉根 隆一郎（中部大応生）
○Hisanobu SUGIMURA, Takashi SATOH, Ryuichiro KURANE (Chubu Univ.)

「目的」2011 年 3 月 11 日に発生した東日本大震災による大津波の被災地である東北地方のある都市では、下水道施設の壊滅的被害を受け、また、仮設住宅の建設によりし尿処理施設に負担が集中し長期化していることから、し尿処理の更なる高効率化が求められている。現在、同施設で活性汚泥中の微生物相制御技術により汚泥削減等が行われている。本研究では、微生物相解析を行うことにより、汚泥削減効果を発現させている可能性のある活性汚泥中の微生物を推定し、本微生物を利用して汚泥の減容化を図るシステムを構築することを目的とした。
「方法」し尿処理施設における硝化槽、返送汚泥槽、調質槽汚泥を供試汚泥とした。各汚泥に 80℃、30 分間ヒートショックを与え、各汚泥の上清含有の平板培地にて菌の分離を実施。その後、宿主を汚泥由来菌、グラム陰性菌、陽性菌として、性状が異なる各菌を上清含有平板培地において培養し、生じたコロニーの周辺にハローとみられる透明帯の形成によりハロー形成判定を行った。また、そのハロー形成を示す菌の酵素活性を測定した。
「結果」各汚泥からハロー形成を示す菌を取得した。ハローと見られる透明帯の形成は、最短 2 日間でシャーレ広範囲まで行き渡るほどの強い反応を示す菌を取得し、酵素活性に関しても報告する。
今後、ハロー形成を一目で可視化する手法や、処理済み汚泥を更に減容化するような実験手法などを検討している。

active sludge

発表番号：3A015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 放射能汚染土壌の光合成細菌による除染と食用基準内の野菜栽培

# Radioactive removal of poluted soil by photosynthetic bacteria and vegetables cultivation in edible standard

○佐々木 慧、中村 薫、岡川 眞和、竹野 健次、新川 英典、佐々木 健 (広島国際学院大学)
○ Kei SASAKI, Kaoru NAKAMURA, Masakazu OKAGAWA, Kenji TAKENO, Hidenori SHINKAWA, Ken SASAKI (Hiroshima Kokusai Gakuin University)

## 緒言

福島第一原子力発電所事故による土壌の放射能汚染は、今なお深刻である。我々は、事故以来光合成細菌による、福島市中のプールの水、ヘドロ、及び南相馬市、浪江町での放射能除染活動を行ってきた[1, 2)]。光合成細菌による放射能除染は、簡便で大きな設備が不要で、除染後の菌体が 97%以上減容出来るため、中間保管場所が不要の利点がある。また、除染後のヘドロや土壌が農業生産に再利用できる利点もある[2)]。そこで我々は光合成細菌を用いた土壌の除染と、除染後土壌の野菜栽培への応用を行い、光合成細菌による放射能汚染土壌での安心安全な野菜栽培の可能性を検討した。

## 方法

光合成細菌は *Rhodobacter sphaeroides* SSI 株(SSI)を用いた。培養は GM 培地で、嫌気明条件で 4 日間行った[1)]。固定化は前報通り、約 1 cm のビーズ状に固定化した。放射能汚染土壌約 30 kg を 60 L コンテナに入れ、水を 40 L、乳酸菌培養液[1)]を 10 L 添加し、ビーズを 200 個入れたメッシュ袋を約 10 袋、あるいはビーズの代わりに、SSI 培養液を 10L 投入し、グルコーズ、ペプトン等栄養源を少量[1)]を添加して、約 1.0 vvm で好気処理(除染)を行った。除染後土壌を水洗してプランターに移し、小松菜とチンゲン菜をハイポネックスを肥料とした通常の栽培方式で、約 1 ヶ月間屋外栽培した。土壌の放射能の測定はベクレルモニター（Becquerel Monitor LB200、Berthold Technologies 社製造）を用いた。

## 結果および考察

南相馬市、浪江町の種々の汚染土壌を約 10 日間光合成細菌で除染したところ、光合成細菌ビーズでは除染率が 59.5-73.0%の除染結果を得た。特に、高放射能汚染土壌である、浪江町の 36,490Bq/kg の汚染土壌では最大 73.0%の除染率が得られた。これらは他のゼオライト。化学薬品での 1 回の処理とほぼ同等かやや少ない除染率であった[2)]。さらに種々の除染後土壌で小松菜やチンゲン菜を栽培したところ、いずれも 100Bq/kg 以下の、食用基準値以下の野菜栽培に成功した。また、ビーズ除染と土壌の水による洗浄を比較したところ、前者の除去率が 64.9%に対し、後者では 30%と明確な差が出た。このように光合成細菌による放射能汚染土壌の農業への再生利用の可能性が見いだされた。

1) Sasaki, K. et al:Biosci. Biotechnol. Biochem., 76(4) 859-862 (2012)
2) 佐々木健他：生物工学、91(8), 432-446 (2013)

radioactive removal, photosynthetic bacteria, safe vegetable cultivation

発表責任者：佐々木　慧（j.sasaki@hkg.ac.jp）

発表番号：3A016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 一槽式アナモックスリアクターのパイロシーケンス解析

# Pyro-tag sequencing analysis of single-stage anammox reactors

○石川 秀、多田羅 昌浩、上野 嘉之 (鹿島技術研究所)
○Shu ISHIKAWA, Masahiro TATARA, Yoshiyuki UENO (Kajima Tech. Res. Inst.)

【目的】アナモックス菌を用いた窒素除去は低環境負荷型の廃水処理技術として有望視されているが、菌の培養が困難なため、従来型の硝化・脱窒プロセスに比べて普及例は少ない。アナモックス反応を用いた窒素除去では、廃水中のアンモニアの約半分を亜硝酸に酸化し、さらにこの亜硝酸をアンモニアで還元することで窒素ガスを生ずる一槽式プロセスが注目されている。昨年度、一槽式アナモックスリアクターのバイオフィルムを 16S rRNA 遺伝子を標的としたパイロシーケンシスにより解析し、バイオフィルム表層部にアンモニア酸化細菌(AOB)が、深層部にアナモックス菌が優占化していることを報告した。本発表では、連続運転中のリアクターにおけるアナモックス菌の安定性とバイオフィルム菌叢の遷移について報告する。
【方法】固定床として塩化ビニリデン製紐状担体を用いた一槽式アナモックスリアクター（0.5Ｌ）に、独自に集積したアナモックス菌 KA-01 を含む汚泥をシードし、窒素源がアンモニアのみの無機塩人工廃水、および実廃水(醸造廃棄物のメタン発酵処理液)を、それぞれ 1.2、0.55 kg-窒素/m3/日の窒素負荷量で連続的に通水した。連続運転期間中、固定床上に生成したバイオフィルムを採取し、ビーズ破砕法で DNA を抽出、これを鋳型に約 0.3kb の 16S rRNA 遺伝子の部分配列を増幅し、454 GS-FLX (Roche) でパイロシーケンシング解析を行った。
【結果】約 1 年間の連続運転において、人工廃水のバイオフィルム深層部では、シードした KA-01 がほぼ単一種で優占化しており、その存在率は 1 年間変化しなかった。表層部では未培養の *Nitrosomonas* 近縁菌が確認されたが、その主要構成種は時間とともに変化した。一方、実廃水では、バイオフィルムの菌叢が多様化し、人工廃水では見られなかった Verrucomicrobia が検出された。また、Chlorobi、Bacteroidetes の存在率が顕著に増加した。これは実廃水中に含まれる有機物等、基質の多様化に起因するものと考えられた。アナモックス菌は人工廃水と同様に、シードした KA-01 がほぼ単一種で存在し、KA-01 が実廃水においても、脱窒活性を維持していることが確認された。その存在率は時間とともに低下する傾向を示したが、この間、窒素除去率は 75～80％で安定であったことから、窒素除去に必要な菌量は保持されているものと考えられた。

anammox, wastewater treatmenmt, pyrosequencing

発表責任者：石川　秀（ishikaws@kajima.com）

発表番号：3A017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 炭素鋼の微生物腐食と炭素鋼表面に形成されたバイオフィルムの関係
# Relationships between microbial corrosion activity and biofilm developed on carbon steel

○平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫（電中研）
○Shin-ichi HIRANO, Toru NAGAOKA, Norio MATSUMOTO (CRIEPI)

【背景及び目的】 設備劣化を引き起こす金属腐食は主に化学・材料の側面から研究されてきたが、化学的な腐食を受けづらい環境（中性・常温・常圧、嫌気）で生じる急速な腐食や局所腐食などでは、「微生物腐食」として固体金属を電子供与体とする微生物による金属の溶解（減肉）作用の影響が明らかとなってきている。設備保全の観点から微生物の側面から適切な腐食抑制・対策の確立が急務であるが、金属腐食を誘引する微生物種やその腐食メカニズムなどの情報は限定的であり、対策立案の基盤となる知見が不足している。そこで、金属腐食を引き起こす微生物の知見を拡充するため、我々のグループではこれまでに、一般的な嫌気環境である湖沼底泥より炭素鋼片を顕著に腐食する微生物群集の獲得に成功し、その微生物叢解析を実施している。微生物叢解析からは Clostridium 属を含む 30 以上の属の存在が示されたが、これらの中でどの微生物が腐食に寄与しているかなど、その腐食メカニズムは依然として不明である。そこで、本研究ではこの腐食性微生物群集を炭素鋼片存在下で培養し、経時的に培養液成分、腐食活性及び微生物群集を解析することにより、腐食メカニズムの解明に資することを目的とした。
【方法及び結果】嫌気条件下（$N_2$:$CO_2$=80:20）、炭素鋼片（SS400, 8mm 角） 1 枚を浸漬した VM-I 培地に鉄腐食性微生物群集を摂取し、30℃で 1 カ月培養を行った（植菌区、無菌区それぞれ 21 本）。腐食活性と微生物作用の相関を明らかにするため、0, 3, 7, 10, 14, 21, 30 日目に植菌区、無菌区それぞれ 3 本の試料を開封、培養液成分の分析を行うとともに、炭素鋼片を取り出し、表面観察および炭素鋼片の重量測定を行った。その結果、培養開始から 7 日後に腐食による炭素鋼片の重量減少が始まり、30 日間連続的に重量減少が継続した。この重量減少は植菌区においてのみ見られたものであり、鉄腐食性微生物群集によって促進された腐食と考えられる。また、腐食が見られた 7 日目以降では炭素鋼表面にバイオフィルムの形成が観察され、金属表面で進行する腐食反応とバイオフィルムの関連性が推定された。そこで、各サンプリングポイントにおいて培養液と炭素鋼表面のバイオフィルムを分けて採取し、それぞれに含まれる微生物群集構造解析を次世代シーケンスおよび定量 PCR 法によって行った。その結果、培養液・バイオフィルムともに全菌体密度おいて腐食の開始前後で大きく変化がなかったのに対して、バイオフィルムでは腐食開始後に顕著なメタン菌の増加が検出され、メタン菌の腐食への関与が示唆された。本発表では、上記結果及びバイオフィルム内の微生物叢解析を踏まえた炭素鋼腐食メカニズムについて考察する。

microbiologically influenced corrosion, biofilm, carbon steel

発表責任者：平野 伸一（s-hirano@criepi.denken.or.jp）

発表番号：3A018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 放射能汚染牛および下水汚泥の好気性高温発酵処理堆肥の特徴

# Characteristics of high temperature aerobic compost which treated dead bodies of radioactive cattle and sewage sludge

○吉井 貴宏[1]、矢野 紘子[1]、古井 義博[1]、杉原 孝文[1]、森屋 利幸[1]、志村 有通[1]、吉川 泰弘[2]、大島 泰郎[1]（[1]共和化工・環境微生物研、[2]千葉科学大学・危機管理）
○Takahiro Yoshii[1], Hiroko Yano[1], Yoshihiro Furui[1], Takafumi Sugihara[1], Toshiyuki Moriya[1], Arimichi Shimura[1], Yasuhiro Yoshikawa[2], Tairo Oshima[1] ([1]Inst. of Environ. Microbiol., Kyowa Kako Co., Ltd, [2]Risk Manag., Chiba Inst. of Sci.)

【目的】堆肥化は焼却よりも省コストで有機性廃棄物を処理することができ、かつ処理物を肥料として再利用できる等、環境負荷の小さい廃棄物処理技術である。近年、開発された好気性高温堆肥発酵は従来の堆肥発酵よりも高温（100℃以上）で発酵が進行するため、有機物の分解が非常に速やかに速く、かつ放射性物質の飛散の心配がないことから、福島第一原発事故で拡散した放射性核種に汚染された汚泥ならびに家畜等の死体の処理への活用が期待されている。原発事故後、我々は福島県内の下水処理場に保管された下水汚泥を堆肥化処理し、放射性 Cs を含む処理物を得た。また北里大学獣医学部が中心となって実施した放射能汚染牛の調査研究 [1)]において、牛の解剖残渣の好気性高温堆肥発酵による減容化処理が実施され、放射能汚染処理物が得られた。今回、我々はこれらの処理物の放射性 Cs 溶出試験を行い、それぞれの放射性 Cs の動態について調べた。また農作物栽培試験を行い、放射性 Cs 濃度への影響について検証した。
【方法】栽培試験に供する処理物の特性を調査するため、成分分析（放射性 Cs 濃度、pH、含水率）並びに放射性物質の溶出試験（JIS K0058-1）を行った。溶媒は蒸留水、1N HCl とした。農作物栽培試験はプランターにてコマツナ、ジャガイモおよびコスモスを栽培し、コマツナとジャガイモは 2 連作を実施した。基本土壌は市販の黒土と赤玉土を 1：1 で混合した。処理物の施用量は基本土壌の 10%、50%（重量比）とし、各作物体の放射性 Cs 濃度を分析した。
【結果および考察】下水汚泥処理物は水分 29.2%、放射性 Cs 濃度 1120 Bq/kg であった。牛残渣処理物の水分は 33.0%、放射性 Cs 濃度は 3440 Bq/kg であった。下水汚泥処理物は放射性 Cs が溶出されず、牛残渣処理物中の放射性 Cs は 1N HCl によって 17.48%が溶出された。そこで放射性 Cs の溶出が見られた牛残渣処理物を施肥して作物を栽培したところ、50%施用区のコマツナやジャガイモ、コスモスにおいても 10 Bq/kg 以下であった。牛残渣処理物の放射性 Cs は、土壌中で不溶態となり、植物へ移行する割合が極めて低くなったと考えられた。

1）日本獣医師会雑誌 65(9), 645-652, 2012-09-20

radioactive cesium, compost, cultivation of crops

発表責任者：吉井貴宏（takahiro.yoshii@kyowa-kako.co.jp）

発表番号：3A019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 果実廃棄物のコンポスト化状況の解析

# Analysis of a composting process for fruit waste

○早瀬 伸樹[1]、安野 秀瑛[1]、中川 克彦[1]、豊田 英昭[2] ([1]新居浜高専、[2]関西化工(株))
○Nobuki Hayase[1], Hideaki Yasuno[1], Katsuhiko Nakagawa[1], Hideaki Toyata[2] ([1]Niihama NCT, [2]KansaiKako Co.,Ltd.)

［目的］

様々な果実が収穫され、同時に廃棄物として果皮等が大量に廃棄されている。この果実廃棄物の多くは有効利用されず、埋め立て、焼却によって処理される。一方、果実廃棄物を原料としてコンポストを製造する試みが一部実施されている。果実廃棄物のコンポスト化においては、果実廃棄物を微生物が分解し、減量、コンポスト化が進行する。しかし、果実廃棄物中の各種成分の分解状況については完全に明らかになっていない。そこで、コンポスト化の過程の各種成分の分解状況の解析を行うため、水分、灰分、有機可溶分、セルロース様物質の測定を行なった

［方法及び結果］

果実廃棄物のみ、コンポストのみ、果実廃棄物とコンポストを 2：7 で混合したものをビーカー中に調製した。38 日間 60℃の恒温器で静置し、定期的に重量の変化を計測した。また、試験終了後に、水分、灰分、有機可溶分、セルロース様物質を測定し、分解状況の解析を行なった。その結果、コンポスト化によって有機可溶分の含有量は大きく減少するが、一方セルロース様物質の含有量は大きく増加していることが明らかになった。次に、果実廃棄物とコンポストを混合しただけのコンポスト化前の状態と 60℃で 38 日間コンポスト化した果実廃棄物コンポストにおいて、コンポスト化前後で灰分の量が変化しないと仮定して、各種成分の重量減少率を求めた。その結果、有機可溶分は大きく減少しているが、セルロース様物質については、大きな変化は認められなかった。本実験結果から、有機可溶分はコンポスト化の過程において分解されやすく、セルロース様物質は比較的分解されにくいと考えられた。

また、60℃で 38 日間コンポスト化した果実廃棄物コンポストにおいてコンポスト化前後での各種成分の減少量を求めたところ、コンポスト化前後において含水率はあまり大きく減少しないが、水分の減少はコンポスト化による重量減少の多くを占めていることが明らかになった。

composting process, fruit waste

発表責任者：早瀬伸樹（hayase@chem.niihama-nct.ac.jp）

発表番号：3A020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Enzymatic investigation in autothermal thermophilic aerobic treatment process of human excreta

○Huijun Cheng, Yuki Okugawa, Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai (Fac. Agric., Kyushu Univ.)

【Introduction】

In Chikujo town, Fukuoka Prefecture, Japan, human excreta (HE) have been transformed into a sanitary and stable liquid fertilizer via autothermal thermophilic aerobic treatment (ATAT) process after addition of fermentation stimulator (FS). However, the detailed working mechanism of the ATAT process is not elucidated yet. This study aims to perform autolysis assay and extracellular enzymatic assays of the full-scale ATAT process for elucidation of the working mechanism.

【Materials and Methods】

Autolysis assay was performed by incubations of the fresh ATAT samples collected on 0, 3 and 6 day at 30°C, 45°C and 54°C, respectively. The optical density at 610 nm ($OD_{610}$) and total cell numbers were measured during the incubations and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was also operated to monitor the changes of bacterial community structure. Protease assay was performed at 37 °C for 30 min with azocasein as the substrate. β-1,4-glucanase assay was measured as the producing rate of reducing sugars from carboxymethylcellulose sodium (CMC-Na) at 40°C for 30 min. Lipase assay was performed with *p*-nitrophenylpalmitate (p-NPP) as the substrate. 1,3:1,4-β-glucanase activity was measured as the producing rate of soluble dyed β-glucan fragments from azo-barley glucan at 40°C for 30 min.

【Results and discussion】

$OD_{610}$ and total cell number of 0-day sample increased during incubation and the decreases of $OD_{610}$ and total cell number were observed in 3-day sample and 6-day sample. DGGE results showed that some bands of 0-day sample and 3-day samples disappeared and some new bands appeared during incubation. The bacteria community structure changed drastically during ATAT process, which would result from some enzymes. Although FS showed positive activities in terms of protease, β-1,4-glucanase, lipase and 1,3:1,4-β-glucanase, all the extracellular fractions of ATAT samples did not showed high activities except for lipase. From these results, it was suggested that FS should not contribute to change of bacterial community structure in ATAT process. In future the other hydrolysis factor should be investigated to elucidate the mechanism during ATAT process.

enzymatic assay, autothermal thermolphilic aerobic treatment, human excreta

発表責任者：酒井謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3A021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 地下環境褐炭から取得した微生物群による嫌気条件下での腐植物質分解。

# Anaerobic decomposition of humic substances by a bacterial consortium obtained from the deep subsurface lignite.

○上野 晃生[1]、清水 了[1]、玉村 修司[1]、荒牧 憲隆[1]、山本 愼一[2]、重吉 八郎[2]、長沼 毅[3]、金子 勝比古[1] ([1]幌延地圏環境研究所、[2]三菱マテリアル株式会社、[3]広島大院・生物圏科学)
○ Akio UENO[1], Satoru SHIMIZU[1], Shuji TAMAMURA[1], Noritaka ARAMAKI[1], Shin-ichi YAMAMOTO[2], Hachirou SHIGEYOSHI[2], Takeshi NAGANUMA[3], Katsuhiko KANEKO[1] ([1]H-RISE, [2]Mitsubishi Material Co. Ltd., [3]Hiroshima University)

【研究背景】

堆積物・堆積岩をはじめとする地殻内において、有機炭素の一つである腐植物質は嫌気的な地下環境で非常に安定した難分解性有機物として存在する[1)]。地球表層に代表される好気条件下においては、木質腐朽菌や放線菌が関わる腐植物質分解についての報告が数多くあり、地球の炭素循環に重要な役割を果たしていると考えられる[2-4)]。炭素存在量の観点から炭素循環を見た場合、陸域生物圏および土壌中の全有機炭素存在量は 2.0-2.3×$10^3$ Pg C (1 Pg＝$10^{15}$ g)である一方、地殻内有機炭素量は上記に比べ 1.25×$10^7$ Pg C と量的にはるかに大きく[5)]、深部地下環境で生じる腐植物質分解も考慮に入れなければならないと考えられる。我々は、嫌気条件下で腐植物質を分解する微生物の探索と分解能に関する研究を行っているが[6)]、好気条件下での腐植物質分解研究と比較し、嫌気条件下での微生物による腐植物質分解に関する研究は殆ど行われていない。本研究では、腐植物質の一画分であるフミン酸(humic acids; HA)を用い、HA 分解嫌気性細菌の探索と特徴付け、および HA 分解能の検証を行った。

【方法および結果】

天北猿払炭鉱でのボーリング調査において採取した褐炭を、Aldrich HA 入りの培養液に接種し、嫌気条件下で集積培養を行った。集積培養を試みた数種類の培養液のうち、DSMZ 579 *Geobacter* 培地において、HA 分解指標の 1 つである褪色を引き起こす集積培養物を得た(Sarufutsu lignite No. 4 Seam; Sal-4)。既報に従い[6)]、培養液より HA を抽出し、高速サイズ排除クロマトグラフィーにより分析を行った。その結果、HA の分子質量の減少が確認され、HA 分解が生じていることが分かった。Sal-4 より細菌の単離を試みたが、HA 分解を生じさせる細菌を単離することができず、数種類の微生物が混在している可能性が考えられた。16S rRNA 遺伝子 V3 領域を標的とした PCR-DGGE 法による微生物群集構造解析の結果、主要な 3 本の DNA バンドが検出され、それらのバンドはいずれも腸内細菌科の細菌に由来することが分かった。本研究より、Sal-4 による嫌気条件での HA 分解には、個々の細菌ではなく、少なくとも 3 種類の腸内細菌科由来の細菌が協同的に働くことが考えられた。

【参考文献】

[1)]Stevenson (1994) Humus chemistry; [2)]Grinhut *et al.* (2011) Environ Sci Technol 45:2748-2754; [3)]Yanagi *et al.* (2008) Microbes Environ 23:44-48; [4)]Steffen *et al.* (2002) Appl Environ Microbiol 68:3442-3448; [5)] Sundquist and Visser (2014) The Geologic History of the Carbon Cycle in Treatise on Geochemistry 2nd edn.; [6)]Ueno *et al.* (2015) Sci Rep in press.

humic substances, subsurface environment, global carbon cycle

発表責任者：上野　晃生（akio.ueno@h-rise.jp）

発表番号：3A022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# アクチノイドの回収を目的とした新規フルオラス金属抽出剤の設計と合成
# Synthesis of novel fluorous metal extractant for actinides.

○中川 洸希、稲津 敏行（東海大学）
○Koki Nakagawa, Toshiyuki Inazu (Tokai University)

近年、フルオラス化学がグリーンケミストリーの１つとして注目されている。フルオラス溶媒は化学的に不活性で酸や塩基に対して安定であり、水や有機溶媒とも混和せず第三の層を形成する。また、高度にフッ素化された化合物を選択的に抽出する性質がある。

本研究室ではすでに、王水中からアミン型金属抽出剤で金属抽出に成功している。また、チオール型やスルフィド型金属抽出剤を用いてフッ化水素酸からの金属抽出に成功している。

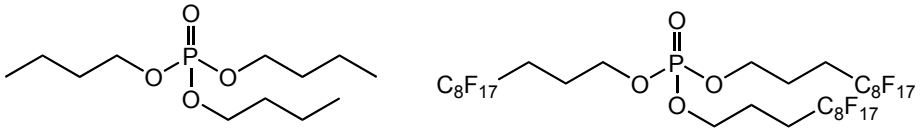
ところで、核燃料は濃硝酸に溶解されたのちにリン酸トリブチルにより回収、リサイクルされている。しかし、このリン酸トリブチルは放射線や硝酸で徐々に分解され、ジブチルリン酸、モノブチルリン酸やリン酸に変換される。これらの分解物は、抽出率の低下をまねくため取り除く必要がある。これらの分解物の除去には、アルカリ洗浄法が用いられているが、界面沈殿物の発生等の問題点を有している。

そこで、王水やフッ化水素酸といった強酸に対して安定なフルオラス金属抽出を濃硝酸中で行われているアクチノイド系元素

のリサイクルに応用することとした。

そこで、抽出剤の分子設計としてリン酸トリブチルのブチル基の代わりにフルオラス性を有するパーフルオロアルキル基に置換することとした。この抽出剤を用いれば、フッ素含有量の低い分解物が生じたときにときに、フッ素含有量によって化合物の分離ができるフルオラスカラムクロマトグラフィーにより容易に分解物を除去することが出来ると期待できる。

まず、塩化ホスホリルとパーフルオロオクチルプロパノールと反応させ、目的のホスフェート型抽出剤を収率 47%で得た。その後、種々の有機溶媒とフルオラス溶媒とで分配抽出を行い、高いフルオラス性を有していることを確認した。




リン酸トリブチル　　ホスフェート型抽出剤

Fig.1 抽出剤の構造

Fluorous chemistry, Metal extraction, Actinides

発表番号：3A023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 重希土元素による巨大菌生育速度の増加とポリ - γ - グルタミン酸の増産

# Novel microbial response for dysprosium: increased growth rate and poly-γ-DL-glutamate synthesis

○白米 優一[1]、松村 歩梨[2]、柴田 由香[2]、尾池 翔太[1]、芦内 誠[1,2] ([1]高知大院、[2]高知大)
○ Yuichi Hakumai[1], Ayuri Matsumura[2], Yuka Shibata[2], Shota Oike[1], Makoto Ashiuchi[1,2] ([1]Grad.Sch.of Integrated Arts Sci., kochi Univ., [2]Kochi Univ.)

レアメタルとバイオメタルの接点を探り、新産業技術の創出に繋げようとする試みが始まっている。例えば、ヒトの糖尿病予防にバナジウムが有効性を示すこと等、これまで非生物的で毒性を示す重金属類が主体と考えられてきたレアメタルに対し、より深い理解が求められるようになった。ここでは、永久磁石の必須元素として有名なディスプロシウム（Ｄｙ）に対する新たな微生物応答を発見したので報告する。具体的には、堆肥中に常在する微生物のうち、耐熱・耐塩・耐カチオン性色素（抗菌剤）を示すコロニーから、Ｄｙ存在下で生育速度が増す微生物を見いだした。最近、Ｄｙ応答性を示した微生物が土壌常在、かつコンポスト細菌としても有名な「巨大菌」の一種であることが判明した。本菌は「納豆の糸」の主成分として知られるポリ-γ-グルタミン酸（ＰＧＡ）を合成するが、Ｄｙ添加に伴い、その合成量は明らかに増大した。我々の知る限り、このようなＤｙ応答現象はこれまで全く知られていないものであった。ＰＧＡは、天然高分子でありながら、化成ナイロンと同一の主鎖構造と化成アクリル酸類似の側鎖周辺構造をあわせ持つことから、石油化学合成高分子を代表する両者のハイブリット高分子と見なすことができる。化成アクリル酸は多用途性機能材料として知られ、なかでも金属イオン吸着材料としての可能性は注目に値する。ＰＧＡにも同様の応用展開が期待されていたことから、Ｄｙをはじめとするレアメタルへの吸着能を調べた。結果、化成アクリル酸をはるかに凌ぐ性能であったことから、既存材料の中でも最強クラスの吸着材料になり得るとの結論を得た。また、細菌型ＰＧＡには一般に D-グルタミン酸が含まれやすいという傾向が認められることから、ＰＧＡの立体化学性とレアメタル吸着挙動にかかる相関分析の進展が待たれる。

Poly-γ-dl-glutamic acid, Dysprosium, Bacillus megaterium

発表責任者：白米優一（yuichi.haku@gmail.com）

発表番号：3A024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 大気中窒素ガスを N 源とした枯草菌―紅色非硫黄細菌共生系の増殖評価

# Evaluation of co-cultures of *Bacillus subtilis* and purple non-sulfur bacteria growth ability with nitrogen gas in air as sole N source

○前田 勇、久下沼 匠（宇都宮大院農）
○Isamu MAEDA, Takumi KUGENUMA (Grad. Sch. Agric. Sci., Utsunomiya Univ.)

農業生産において窒素肥料は欠くことができないにもかかわらず、その生産は化石資源に依存している。そのため、エネルギー消費の少なく環境への負荷が少ない窒素肥料の生産手法の開発が求められている。生物学的窒素固定は大気中の窒素ガスをアンモニアに変換する過程であり、窒素固定反応を利用することで省エネルギー型の窒素肥料の生産が実現する可能性を秘めている。そこで、酸素非発生型の光合成に伴い窒素固定を行うことができる紅色非硫黄細菌生細胞を触媒とした、光駆動性の窒素固定ならびに増殖を持続させる研究を行った。窒素固定を触媒するニトロゲナーゼは、酸素ガスあるいはアンモニアによって阻害される。このため、大気中の窒素ガスを基質とした無機態窒素への変換を持続させることを目的として、酸素分子を選択的に取り除き窒素分子を供給することとした。

実験には、*Rhodopseudomonas palustris*、*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodobacter sphaeroides* の 3 種の紅色非硫黄細菌を用いた。96 穴マイクロプレートのウェルに各菌株を植菌した、アンモニア添加あるいは非添加の無機塩培地を分注後、マイクロプレートを三菱ガス化学社製アネロパックに密封し、光嫌気条件下にて培養を行った。その結果、無機態および有機態窒素を含まない培地での増殖が確認され、この培養液の同培地への継代を繰り返したところ増殖が持続した。このことから酸素ガスの除去が窒素固定において有効に機能していると考えられた。そこで上述の紅色非硫黄細菌 3 種と、化学合成細菌である枯草菌 *Bacillus subtilis* の 2 株との共培養を試みた。空気封入下、無機態および有機態窒素を含まない培地での共生系の増殖能の有無を調べた。その結果、*Rhodopseudomonas palustris* あるいは *Rhodobacter sphaeroides* と、2 株の *Bacillus subtilis* との組み合わせにおいて 2 継代後も共生系の持続的な増殖が確認された。顕微鏡観察の結果、形成されたバイオフィルム中に紅色非硫黄細菌と枯草菌が互いに近接して増殖する様子が観察された。

このように、枯草菌―紅色非硫黄細菌共生系で大気中窒素ガスに依存した持続的な増殖が認められたことから、枯草菌による酸素ガス消費が紅色非硫黄細菌の窒素固定の持続において有効に機能していることが示唆された。

photosynthetic bacterium, nitrogen fixation, *Bacillus subtilis*

発表責任者：前田勇（i-maeda@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

発表番号：3A025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# CaCCO プロセス由来固形残渣からのアルカリ可溶性リグニン抽出条件最適化

# Optimization of extraction efficiency of alkali soluble lignins from solid residue derived from CaCCO process.

○山岸 賢治[1]、趙 鋭[1]、池 正和[1]、関 笛[1]、我有 満[2]、徳安 健[1] ([1]農研機構食品総合研究所、[2]農研機構九州沖縄農業研究センター)
○Kenji Yamagishi[1], Rui Zhao[1], Masakazu Ike[1], Guan Di[1], Mituru Gau[2], Ken Tokuyasu[1] ([1]NARO National Food Research Institute, [2]NARO Kyusyu Okinawa Agricultural Research Center)

【目的】水酸化カルシウム前処理後に $CO_2$ 中和を行うことを特徴とした CaCCO(Calcium Capturing by Carbonation($CO_2$))プロセスは、草本原料を前処理した後の繊維質洗浄、薬液分離が不要で、澱粉や蔗糖を含む稲わら中の糖源を逃さない糖化工程を有する。我々は本技術とバイオマス糖化酵素のオンサイト生産技術を組み合わせて、地域資源を活用した糖液、バイオエタノール生産産業を創出することを目指している。

一方、本プロセスにおいては未分解繊維、リグニン、中和反応によって生じる炭酸カルシウム等を含む固形残渣が発生するため、その処理法が解決すべき課題の一つとなっている。そこで本研究においては、固形残渣中に含まれるリグニンに着目した。リグニンは現在のところ、工業原料として安定的に供給できる体制が整っていないこと、その特性を活かした製品の展開が未確立であることから十分に活用されていないが、近年、精力的に用途開発が進められている。本研究では、固形残渣の利活用とリグニン供給系を構築することを目的として、アルカリ可溶性リグニン抽出条件の最適化を行った。

【方法と結果】エリアンサスの CaCCO 法前処理物（糖化後残渣）、及びエタノール発酵後残渣を材料として抽出を行った。アンモニア、THF、NaOH 等を検討した結果、NaOH により室温～70℃の条件下で残渣中リグニン(クラーソンリグニン)の約 50%が溶出し、鉱酸によって沈殿した。60mM～1000mM の範囲で NaOH 濃度とリグニン抽出量の関係を調べたところ、100mM～400mM の範囲内で固形残渣中のリグニンが 50%前後抽出されたが、それ以上の高濃度 NaOH を用いても抽出量は変化しなかった。

本試験において抽出されたリグニンの成分組成は、クラーソンリグニン＋酸可溶性リグニン率が 88%であり、グルコース、キシロースの混在は僅か（グルコース:0.3%、キシロース:0.6%）であった。一方、エリアンサスを粉砕して直接アルカリ抽出したリグニンは、7%程度のキシランを不純物として含んでいた。原料を直接利用するプロセスと比較して、カスケード利用を行う方が高品質の精製物を与えるという可能性を示す物と考える。

※本研究は、農林水産省委託プロジェクト　地域資源を活用した再生可能エネルギー等の利活用技術の開発（草本を利用したバイオエタノールの低コスト・安定供給技術の開発）によって行われた。

CaCCO process, Alkali soluble lignins, Solid residue derived from saccharification/fermentation process

発表責任者：山岸賢治（yamagisi@affrc.go.jp）

発表番号：3A026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 緑藻 *Actinastrum* sp.ならびに *Chlorella* sp.における脂肪酸合成能の評価

# Assessment of ability for fatty acid synthesis in green algae *Actinastrum* sp. and *Chlorella* sp.

○井上 麻衣、大浦 健（名城大院農）
○Mai INOUE, Takeshi OHURA (Meijo Univ.)

【背景】産業革命以降、化石燃料の大量消費により、近年石油・石炭の枯渇化が危惧されている。そこで、太陽光やバイオマスから作られる再生可能エネルギーであるバイオ燃料が注目され始めた。バイオ燃料の原料としてトウモロコシやサトウキビなどの可食植物が主に使用されている。しかし現在、世界では食糧不足問題が言われており、可食植物の燃料への使用が問題となっている。一部の植物プランクトンは、バイオ燃料として利用できる高級脂肪酸を生産することが知られており、これらのエネルギー問題を改善するための代替原料として期待されている。また近年、植物プランクトンはヒトの必須脂肪酸であるω3・ω6 脂肪酸を合成することがわかり、食品への応用にも期待されている。以上より、本研究では高級脂肪酸を合成する植物プランクトンの単離を試み、培養条件による脂肪酸合成能を評価することを目的とした。
【方法】サンプルとなる植物プランクトンは愛知県日進市の愛知池より採取し、BG-11 培地により培養・単離した。培養は CO2 添加もしくは大気下で行い、経時的にクロロフィル a 濃度測定・脂肪酸分析を行った。脂肪酸分析は採取した植物プランクトンを凍結乾燥し、メタノールとクロロホルムで抽出後、メチルエルテル化を行い GC/MS に供した。
【結果】今回単離した植物プランクトンは、*Actinastrum* sp.が 1 種・*Chlorella* sp.が 2 種(A 種、B 種)の計 3 種の緑藻と推定できた。成長速度は、種間で異なる傾向が見られた。また、CO2 添加培養において、大気下培養と比較し、3 種全てで乾重量あたりの脂肪酸含量が多い傾向が見られた。*Actinastrum* sp.と *Chlorella* sp. A 種は、各培養条件において脂肪酸組成が異なり、CO2 添加培養では飽和脂肪酸が多く、大気下培養ではω3 脂肪酸量が最も多かった。これより、これらの種は培養条件により食品・燃料両方の利用が期待できる。*Chlorella* sp. B 種は CO2 添加培養において、乾重量あたりの脂肪酸含量が全 3 種のうち最多であった。しかし、培養約 5 日目において細胞の凝集が確認され、成長の停止傾向が見られた。また、CO2 添加・大気下両培養条件において、*Chlorella* sp. B 種の脂肪酸含量の増加は同程度であり、脂肪酸組成の変動も比較的一定であった。
今後は、窒素源の有無、CO2 濃度等培養条件を変化させ、緑藻が合成する脂肪酸のより高い生産性条件を検討する予定である。

Green algae, Bio fuel, Higher fatty acid

発表番号：3A027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)を分解するメタン発酵プロセスの構築と微生物群集構造

# Microbial community structures in methane fermentation processes degrading Poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)

○重松 亨[1]、帆苅 萌子[1]、千葉 有紀[1]、本間 辰也[1]、林 真由美[1]、井口 晃徳[1]、坪田 潤[2]、菅谷 剛彦[3]、松本 圭司[4] ([1]新潟薬大・応生科、[2]大阪ガス・エネルギー技術研、[3]カネカ・GP 事業開発部、[4]カネカ・R&D 企画部)
○Toru SHIGEMATSU[1], Moeko HOKARI[1], Yuki CHIBA[1], Tatsuya HONMA[1], Mayumi HAYASHI[1], Akinori IGUCHI[1], Jun TSUBOTA[2], Takahiko SUGAYA[3], Keiji MATSUMOTO[4] ([1]Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Energy Technol. Lab., Osaka Gas, [3]GP Business Develpment Div., Kaneka, [4]Corporate R&D Planning and Administration Div., Kaneka)

【目的】生ゴミのメタン発酵によるサーマルリサイクル技術は，その価値が注目されながら，我が国での実用化・普及は進んでいるとは言い難い。植物油脂等を原料に微生物生産できるポリエステル系バイオポリマーPoly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBH)は，短鎖長 Polyhydroxyalkanoate (PHA)と中鎖長 PHA の特性を併せ持ち, 2 つの hydroxyalkanoates の共重合比率を制御することにより，硬質から軟質まで幅広い物性を付与することができる。生ゴミを PHBH 製のゴミ袋と一緒にメタン発酵する技術が開発できれば，ゴミ袋の分別工程を回避でき，生ゴミのメタン発酵の実用化・普及の促進に寄与できると考えられる。しかし，PHBH を分解するメタン発酵についての報告例は無い。そこで, 本研究では PHBH を分解するメタン発酵プロセスを構築し, その微生物群集構造を明らかにした。
【方法】粉末状の PHBH と酢酸塩を炭素濃度比で 2:8 または 3:7 とし，有機態炭素濃度を 8,000 mg/L とする合成廃水を調製した。この 2 種類の合成廃水を実容積 1.0 L の完全混合型リアクター(CSTR)に水理学的滞留時間(HRT) 20 d または 40 d で連続供給することで，合計 4 基の連続式メタン発酵プロセスを構築した。槽内温度は 37℃とし，微生物源には生ゴミのメタン発酵汚泥を用いた。定常状態の槽内液から DNA を抽出し，16S rRNA 遺伝子配列の系統分類に基づいて微生物群集構造を解析した。また，バイアル瓶に槽内液，無機塩培地，そしてシート状の PHBH 断片を添加し，密閉後 37℃で嫌気的回分培養を行うことで，シート状の PHBH の分解性を評価した。
【結果・考察】全ての CSTR において，97－99%の可溶性 $COD_{Cr}$ 除去率，87－96%の全 $COD_{Cr}$ 除去率で，28 ヶ月安定して連続運転を行えており，粉末状の PHBH を分解・無機化する微生物群が集積できた。*Archaea* の 16S rRNA 遺伝子を解析した結果，全ての CSTR において *Methanosarcina* 属のメタン生成古細菌に分類されるクローンが高頻度に検出された。*Bacteria* の解析結果は 4 基の CSTR ごとに異なっており，得られたクローンはのべ 9 つの門に分布した。その中でも *Firmicutes* 門に分類されるクローンが，全ての CSTR に共通して高頻度に検出された。*Firmicutes* 門の中でも *Clostridia* 綱に分類されるクローンが多く検出された。以上の結果から，*Methanosarcina* 属を優占古細菌とし，*Clostridia* 綱に分類される細菌を優占細菌とする微生物群集が，PHBH の分解を担っていることが示唆された。CSTR により集積した微生物群集によるシート状に加工した PHBH の分解性を嫌気的回分培養で評価した。4 基の CSTR の槽内液をそれぞれ添加した回分培養の結果，全ての槽内液において PHBH シートの分解が認められた。CSTR で集積した微生物群集がシート状の PHBH も分解することが判明した。

Biodegradation, Methane fermentation, 3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate

発表責任者：重松　亨（shige@nupals.ac.jp）

発表番号：3A028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# エタノール生産コスト削減のための耐熱性微生物による高温発酵技術

# High-temperature fermentation technology for low-cost bioethanol

○村田 正之、高坂 智之、山田 守（山口大・中高温微生物セ）
○Masayuki MURATA, Tomoyuki KOSAKA, Mamoru YAMADA (RCTMR., Yamagucni Univ)

［目的］地球温暖化の原因となっている二酸化炭素の排出レベルを抑制するためにバイオマスの活用が求められいるが、バイオエタノールを含むバイオ燃料の生産量は年々上昇していることから、安価な生産技術の開発が不可欠である。現在、バイオエタノールの生産は酵母によって 30℃程度で行われているが、夏場は気温上昇により温度管理が困難となり発酵不良となるケースが存在することから温度管理とそのためのコストは発酵生産において重大な課題である。耐熱性微生物を用いた高温発酵技術は、この問題を解決する有効な手段の一つとして期待されている。また、発酵と蒸溜を同時に行うことができれば、さらなるバイオエタノールの生産コストの削減が期待できる。

本研究では、低コストでのバイオエタノール生産を行うために耐熱性発酵性細菌や耐熱性酵母を用いた温度非制御や高温発酵減圧蒸留によるエタノール生産の検討を行った。

［実験・結果］タイで単離された耐熱性発酵性細菌 *Zymomonas mobilis* TISTR548 株や耐熱性酵母 *Kluyveromyce marxianus* DMKU3-1042 株による温度非制御や４０℃での高温発酵を検討したところ、３０℃での発酵と同じレベルのエタノール生産を示した。高温発酵は発酵と減圧蒸留の連結が可能なことから、同一培養槽において発酵と減圧蒸留を行う高温発酵減圧蒸留装置を考案し、*Z. mobilis* の高温育種株や DMKU3-1042 株を用いた４０℃での高温発酵減圧蒸留によるエタノール生産を検討した。１０％ YPD 培地や YP-２０％米（米加水分解）培地にて検討した結果、*Z. mobilis* の高温育種株や DMKU3-1042 株は減圧下でも死滅せずエタノールを生産し、同一培養槽での発酵→減圧蒸留の過程を繰り返すことにより６０％程度のエタノールを回収することができた。これらの結果、高温条件下での耐熱性発酵性微生物を用いた連続発酵蒸溜によるエタノール生産や生産コストの削減の可能性が示された。

High temperature fermentation, low-cost bioethanol, thermotolerant fermentative microbe

発表番号：3A029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 新規熱溶菌糸状菌の糸状菌バイオマスへの変換率とグルコース量の比較

# Comparison of conversion rate to fungal biomass and glucose quantity in new heat lytic fungi.

○森 慶太、荒木 希和子、向 真樹、アディカリ ディネッシュ、久保 幹（立命館大学）
○ Keita MORI, Kiwako S. ARAKI, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ)

【背景・目的】食料と競合しないエネルギー資源として期待される木質バイオマスは、分解が困難であり、再資源化がほとんど行われていない余剰バイオマスである。木質バイオマスに生育し、高温で熱溶菌する糸状菌の探索を行ってきたところ、木質バイオマスを基質とし旺盛に生育する *Fusarium* sp. 72-1（以降、72-1 株）が分離・同定された。この菌株は熱を加えると自己溶解する熱溶菌性糸状菌であり、オオカナダモの葉と米ぬかを 3：5 で配合した培地（C/N 23、C/P 9）で生育させたときに、培地 1 g あたり 30 mg のグルコースを放出した。本研究では、新規の熱溶菌性糸状菌を様々な土壌から単離し、そのグルコース量と菌体量を測定した。

【方法・結果】糸状菌の生育には培地に含まれる炭素、窒素、リンの割合を調節することが重要であると考え、余剰バイオマスであるオオカナダモ、米ぬかを 1：3 で配合し、（C/N 16、C/P 10）糸状菌の生育培地を調整した。作製した培地で糸状菌を培養し、50 mM リン酸バッファーに添加し、55℃で 1 時間振盪後、グルコース定量キット（大阪）を用いて放出されたグルコース量を測定した。さらに、糸状菌バイオマスへの変換率を測定するため、real-time PCR を用いて培地中に含まれる糸状菌の菌体量を測定した。この結果、72-1 株では 15 日間培養した時に、より多くのグルコース（33 mg）を放出した。そして、新規熱溶菌糸状菌の中では 37-1 株から最大のグルコース（51 mg）が放出された。また、37-1 株においては、使用した培地の 9.8%が糸状菌バイオマスに変換され、5.1%がグルコースに変換されたことがわかった。

glucose, fungal biomass, heat lytic biomass

発表番号：3A030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# アルコールの添加が希硫酸前処理の効率に与える影響の解析

# Analysis of effect of alcohol addition to dilute acid pretreatment.

○寺村 浩[1]、佐々木 建吾[2]、白井 智量[3]、川口 秀夫[1]、荻野 千秋[1]、菊地 淳[3]、佐塚 隆志[4]、近藤 昭彦[1] ([1]神大工、[2]神大院自然科学、[3]理研・CSRS、[4]名大農)
○Hirishi Teramura[1], Kengo Sasaki[2], Tomokazu Shirai[3], Hideo Kawaguchi[1], Chiaki Ogino[1], Jun Kikuchi[3], Takashi Sazuka[4], Akihiko Kondo[1] ([1]Grad. Sch. Eng., Kobe Univ., [2]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [3]CSRS, RIKEN, [4]Biosci. Biotechnol. Ctr., Nagoya Univ.)

植物バイオマスは微生物発酵を活用した物質生産の原料として注目されている。しかし、植物バイオマスは、多糖及びリグニンからなる複雑な構造を有しているため、微生物発酵の原料として利用するためには、前処理及び酵素糖化などの工程を必要とする。特にバイオマス中のリグニンは、酵素糖化を阻害することが明らかになっている。そのため、バイオマス中のリグニンを効率的に除去できる前処理法の開発が求められている。これまでの研究結果から、アルコール前処理はリグニンを高効率で除去できることが明らかになっている。しかし、アルコール前処理には多量のアルコール(30~80 v/v%)が必要である。多量のアルコールは、前処理コストの増加につながるため、使用するアルコール量の削減が求められている。

本研究では、少量(12.5 v/v%)の 5 種類のアルコール（エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、ペンタノール）を希硫酸前処理に添加し、前処理に与える影響の解析を行った。まず、前処理後のサンプルを遠心分離し、観察を行った。その結果、コントロール(希硫酸前処理)、エタノール、イソプロパノール、プロパノールでは、液体画分と固体画分の 2 画分のみが観察された。一方で、ブタノール、ペンタノールでは、上記の 2 画分に加え黒色の有機溶媒層が存在することが明らかになった。次に、これらの画分を分離し、詳細に解析した。その結果、ブタノール、ペンタノールの固体画分の重量は、他の前処理を行った場合と比較して、軽量であることが明らかになった。また、固体画分の組成解析を行ったところ、ブタノール、ペンタノールの固体画分のみ、リグニン含量が低下し、セルロース含量が上昇することが明らかになった。これらの結果は、他のアルコールと比較してブタノール及びペンタノールはバイオマスからリグニンを除去できる可能性を示している。また、効率的なリグニンの除去には、ブタノール及びペンタノールのみ観察された黒色の有機溶媒層がリグニンの除去に関わっている可能性が示唆された。そこで、黒色の有機溶媒層から沈殿を作出し、組成を 2D-NMR で解析した。その結果、沈殿中には多量のリグニンが含まれていることが明らかになった。これらの結果は、ブタノール及びペンタノールが、少量の添加で高効率にリグニンの分離ができる非常に有用な有機溶媒であることを示唆している。

Pretreatment, Cellulose, Lignin

発表番号：3A031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 膜分離プロセスによる稲わら水熱処理液からのリグニン回収

# Recovery of lignin from hydrothermally pretreated rice straw liquid using membrane separation

○佐々木 建吾[1]、白井 智量[2]、柘植 陽太[1]、近藤 昭彦[3] ([1]神戸大・自然科学、[2]理研・バイオマス、[3]神戸大院・工)
○Kengo SASAKI[1], Tomokazu SHIRAI[2], Yota TSUGE[1], Akihiko KONDO[3] ([1]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [2]RIKEN, CSRS, [3]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng, Kobe Univ.)

【背景と目的】バイオリファイナリーにおいてはリグノセルロース資源に前処理を施して酵素糖化性を高めてから利用している。稲わらに水熱前処理を施す事により、ヘミセルロースやリグニンの一部が液体画分中に移行する事が知られている。セルロースやヘミセルロースから得られる糖資源はバイオ化成品として利用される研究が進んではいるが、リグニンの回収に関する知見は乏しい。しかし、リグニンは熱源や機能性材料としての利用が試みられており、回収して利用する事が望ましい。一方、海水淡水化に利用されている圧力駆動型の高性能膜分離プロセスは低コストであり、物質の分離に有望な技術である。そこで本研究では、膜分離プロセスを適用して稲わらの水熱処理液中からのリグニンを回収する方法を構築する事を目的とした。さらに、得られたリグニンを含む画分を 2 次元核磁気共鳴(2D-NMR)分析に供することで、含有されている詳細なリグニンの組成を明らかにする事を試みた。
【結果と考察】稲わらの水熱処理液中から遠心分離により残渣を取り除いた後に、ナノフィルトレーション(NF)膜（分画分子量：150 Da）を使用して濃縮を行った。NF 膜の濃縮液にヘミセルラーゼを投与して生じたヘミセルロース糖を除き、不溶化したリグニンを回収した。本手法により、稲わら水熱処理液中の酸不溶性リグニンの大半が回収されており、回収した画分中のリグニン含量は 65.8wt%に達していた。2D-NMR 法により、回収した画分中にリグニンの基本骨格であるシリンギル・グアイアシル・*p*-ヒドロキシフェニルが含有されている事を確認した。一方で、主要な側鎖である β-O-4 結合や多糖類は失われている事も観察された。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。

lignin, membrane separation, lignocellulosic biomass

発表責任者：佐々木建吾（sikengo@people.kobe-u.ac.jp）

発表番号：3A032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 木質中のリグニン糖複合体とその酵素分解反応の解析

# Analyses of lignin-carbohydrate complexes in wood and those enzymatic degradations

○西村 裕志[1]、Baath Jenny Arnling[2]、永田 一真[3]、Klaubauf Sylvia[2]、Olsson Lisbeth[2]、Nylander Filip[2]、Westman Gunnar[2]、片平 正人[3]、渡辺 隆司[1]（[1]京都大生存圏研、[2]チェルマース工科大学、[3]京都大エネルギー理工学研）
○Hiroshi NISHIMURA[1], Jenny Arnling Baath[2], Kazuma Nagata[3], Sylvia Klaubauf[2], Lisbeth Olsson[2], Filip Nylander[2], Gunnar Westman[2], Masato Katahira[3], Takashi Watanabe[1]（[1]RISH, Kyoto Univ., [2]Chalmers Univ. Technol., [3]IAE, Kyoto Univ.）

【緒言・目的】
バイオマスを有効利用する上でリグニンと糖の分離は重要な課題となっている。植物細胞壁中で、リグニンはヘミセルロースと共有結合して Lignin Carbohydrate Complex（LCC）を形成しており、細胞壁の強度や分解性に大きな影響を与えている。 バイオマス変換において、このリグニン・糖間結合の切断を高効率で行えれば、主要 3 成分の分離効率は大きく上昇すると期待される。本研究では、リグニン・糖間結合を直接切断する酵素に着目して、エステル型 LCC モデル化合物の合成と酵素による分解反応を行い、LCC の分析と構造解析、酵素の反応特性と分解反応を詳細に解析するとともに、実際の植物細胞壁成分と反応させて起こる構造変換を NMR 法によって観測することを目的とした。

【方法と結果】
リグニン・糖間結合を直接切断する酵素に着目して、エステル型 LCC モデル化合物の合成と酵素による分解反応を行い、LCC の分析と構造解析、酵素の反応特性と分解反応を解析した。LCC の部分構造として、β-O-4 型リグニン二量体にグルクロン酸がエステル結合した LCC モデルの合成を行い酵素分解性について検討を行った。次に、実際の植物細胞壁成分と反応させて起こる構造変換への応用を見据え、その基盤として LCC 画分との反応解析を行った。まず、天然木材から LCC 画分を抽出し、エステル型構造を含む LCC フラクションの濃縮を行った。得られた LCC 画分について酵素処理前後における 2 次元 $^{1}H$-$^{13}C$ HSQC NMR 解析を行い、天然 LCC 結合に対する反応性を解析した。微生物由来の新規エステラーゼ処理の有無とヘミセルラーゼ処理の併用の効果について検討を行った。その結果、ヘミセルラーゼ処理後の LCC 画分にエステラーゼ処理を行った試料について、LCC エステル結合の消失が観測された。現在、酵素反応による分解過程について、低分子化による影響を含め、詳細な検討を行っている。

lignin, NMR, esterase

発表責任者：西村裕志（hiroshi_nishimura@rish.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3A033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 生乳由来プロピオン酸菌と乳酸菌の混合培養による産業廃棄物からの有機酸生産

# Organic acid production by co-cultivation of Propionibacteria and lactic acid bacteria isolated from raw milk using industrial wastes as carbon sources

○高屋 朋彰[1]、布川 玲奈[1]、松井 徹[2]、上田 誠[1] ([1]小山高専・物質、[2]東京工科大応生)
○Tomoaki KOUYA[1], Reina NUNOKAWA[1], Toru MATSUI[2], Makoto UEDA[1] ([1]NIT. Oyama Col., [2]Tokyo Univ. of Tech.)

【背景・目的】牛乳からチーズを製造する際，約 90%はホエーとして排出される．ホエーは BOD が高く（30,000～60,000 ppm），処理や有効利用には大型設備が必要であるため，いまだ産業廃棄物として廃棄されている現状がある．一方，バイオディーゼル燃料（BDF）製造のプロセスで副生する廃グリセロールもまた，未反応のアルカリを多く含んでおり精製にコストがかかるなどの問題から，その多くが廃棄されている．

本研究では，生乳から単離したプロピオン酸菌および乳酸菌の単独培養あるいは混合培養により，産業廃棄物であるホエーを炭素源, 廃グリセロールを pH 調整剤として用いた有機酸（プロピオン酸, 酢酸）の生産を目的とした．

【方法】微生物としてウシ生乳から単離・同定したプロピオン酸菌（*Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium peterssonii*）および乳酸菌を用いた．始めに，グリセロール，乳酸ナトリウム，ラクトースを炭素源（10 g/L）として，単離・同定したプロピオン酸菌の資化性試験を行った．次に，資化性試験で選別したプロピオン酸菌と乳酸菌を用いて，混合培養による有機酸生産を検討した．pH 4.6（pH 未調整）または pH 6.5（1M KOH もしくは廃グリセロールを用いて調整）のホエイを湿熱滅菌処理（121℃，20min）した．プロピオン酸菌および乳酸菌はそれぞれ集菌，再懸濁したのち，単独培養では各微生物の初期濁度が O. D. $_{660\,nm}$≒0.1，混合培養ではプロピオン酸菌の初期濁度が O. D. $_{660\,nm}$≒0.1, 乳酸菌の初期濁度が O. D. $_{660\,nm}$≒0.002 となるように播種した．培養期間中の pH 調整は 1M KOH もしくは廃グリセロールを用いて行った．ホエイ中の可溶性全糖濃度は，フェノール硫酸法を用いて測定した。各有機酸濃度は、Shim Pack SCR-102H カラム（島津製作所）と電気伝導度検出器（島津製作所）を備えた HPLC を用いて測定した。生菌数は寒天平板拡散法（プロピオン酸菌（YEL 寒天培地），乳酸菌（MRS 培地））を用いて測定し、cfu/mL として表した．

【結果】各炭素源の資化性試験を行った結果，4 種類のプロピオン酸菌（*P. thoenii*，*P. freudenreichii*, *P. peterssonii*）がラクトース，グリセロール，および乳酸 Na を炭素源として有機酸を生産した．選別したプロピオン酸菌（*P. thoenii* ONCT 1007）や乳酸菌を用いた単独培養，または 2 菌株を組み合わせて用いた混合培養を行った．その結果，混合培養（pH6.5）において pH 調整剤として 1M KOH または廃グリセロールのいずれを使用した場合でも，ホエイ中の炭素源を 30～40 g/L 消費して有機酸（プロピオン酸・酢酸）の生産が可能であった．

*Propionibacteria*, whey, co-culture

発表番号：3A034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 低分子リグニン類から生産されるベンゼン環を含まない新規有機蛍光物質の生成機構の検討

# Transformation of nonaromatic polymeric substances with fluorescent activities from low-molecular lignins

○坂野 優稀[1]、松藤 寛[2]、砂入 道夫[1]、岩淵 範之[1]([1]日大・生資科・応生科、[2]日大・生資科・食生科)
○Yuki SAKANO[1], Hiroshi MATSUFUJI[2], Michio SUNAIRI[1], Noriyuki IWABUCHI[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Nihon Univ., [2]Dept. Food Biosci. Biotechnol., Nihon Univ.)

【目的】

我々は、リグニンおよび低分子リグニンをバイオプロセスにより高付加価値物質へ変換する取り組を行っており、これまでに、低分子リグニンの一種であるシリングアルデヒド(SYAL)を変換、重合し有機蛍光物質を生産する菌株 *Pseudomonas* sp. ITH-SA-1 株を海水より単離している。本蛍光物質は、平均分子量が 7.2 kDa で Ex365、Em498 nm の蛍光スペクトル示す物質であり、NMR 分析等からベンゼン環由来のシグナルが全く検出されないことが示されている(特開 2014-166143)。一般に有機蛍光物質は剛直なπ電子共役系の供給源として分子内にベンゼン環を有しているが、上記結果は、本蛍光物質が希少な特徴を有していることを示唆している(Iwabuchi et al. 2015. ACS Sustainable Chem. Eng.)。

本発見以来、われわれは本蛍光物質の構造の検討を試みており、その過程で、SYAL の下流の代謝産物である 3-*O*-メチルガリック酸(3MGA)とトリプトンを反応させることにより、同様の性質を有する蛍光物質が生産されることを見出した(特願 2014- 167282)。この結果は、より単純化した系でも同様の蛍光物質が生産されることを意味しており、今後の構造決定の支援になると考えた。そこで本研究では、蛍光物質生産におけるトリプトンの各種成分の影響を検討した。

【方法、結果と考察】

トリプトンの主要成分は、カザミノ酸、カゼインダイジェスト、ラクトアルブミン水解物であることから、これらを個別に 3-MGA と反応させ、その蛍光スペクトル、蛍光強度を検討した。その結果、カゼインダイジェスト由来の蛍光物質が、トリプトン由来の蛍光物質に最も近い蛍光スペクトル、蛍光強度を示した。次に、カゼインダイジェストは核酸やペプチド、アミノ酸等と無機物の混合物であることから、この中でまず初めにアミノ酸に注目し、上記と同様の検討を行った。これまでに合わせて 15 種類のアミノ酸と 3-MGA との反応を検討した結果、リジンとアルギニンでのみ蛍光物質の生産が確認された。これらの過程で生産された蛍光物質の蛍光強度はトリプトン由来のものよりもやや弱く、また蛍光スペクトルはそれぞれに異なっていたが、より単純化した系でも生産されることが示された。また、両アミノ酸はアミノ基を 2 つ有していることから、この構造が、3MGA から蛍光物質生産に重要な役割を果たしているのではないかと考えられた。この反応について更なる検討を行うため、現在、アミン類について検討しており、その後、NMR 解析等を行う予定である。

lignin, fluorescence, biotransformation

発表責任者：岩淵範之（iwabuchi@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3A035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 好熱性菌由来ヒスチジンアンモニアリアーゼの性質

# Characterization of histidine ammonia-lyase from thermophile

○森芳 邦彦、駒 大輔、山中 勇人、大本 貴士 (阪市工研)
○Kunihiko MORIYOSHI, Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Takashi OHMOTO (OMTRI)

【目的】

近年、バイオマスを用いた物質生産に関する研究が積極的に行われている。我々は大腸菌の代謝を利用して、グルコースからさまざまな芳香族化合物を生産するための研究を行っている。しかし、発酵法のみによる生産方法では、生成物の抗菌性、生産条件の限定等により、生産が困難な場合もある。そこで酵素反応を利用した芳香族化合物の生産方法の開発を行っている。今回、ヒスチジンからウロカニン酸とアンモニアを生成する酵素であるヒスチジンアンモニアリアーゼのスクリーニングを行った。ウロカニン酸は、皮膚において紫外線による DNA 損傷を防止する作用を持っている。酵素反応によって物質生産を行う場合、耐熱性酵素を用いると、比較的高温で効率よく反応が行え、また、安定性が高いため酵素の長期間使用が可能になる。そこで、耐熱性の酵素を得るため、好熱性菌の中からスクリーニングを行った。

【方法および結果】

好熱性菌から芳香族アミノ酸アンモニアリアーゼと相同性のある遺伝子をクローニングし、大腸菌に形質転換し、酵素を発現させ、その性質について調べた。まず、好熱性の細菌およびアーキア 8種類の中から、芳香族アミノ酸アンモニアリアーゼ遺伝子と相同性のあるものについて選び出した。これらの遺伝子についてそれぞれプライマーを作製し、ＰＣＲで遺伝子を増幅したところ、目的遺伝子と同じ大きさのＰＣＲ産物が得られ、発現用のベクターpET-22b(+)にクローニングした。それぞれについて大腸菌に形質転換し、タンパク質を発現させた。酵素活性は、基質として 1 mMのヒスチジンを用い、反応後生成するアンモニアを定量して求めた。得られた酵素の活性を調べたところ、好熱性の細菌である*Caldanaerobacter subterraneus* subsp. *tengcongensis* 由来のもので活性が認められた。本酵素について反応の最適温度を調べたところ1 h 反応で 70℃付近であった。ここで、*Rattus norvegicus* 由来の同酵素の最適温度が 60℃であったことから、本酵素はより高温で反応できる新規な酵素と考えられた。また、1 mMの$Mg^{2+}$、$Ca^{2+}$、$Mn^{2+}$ イオン存在下で活性測定を行ったが、これらの活性への影響はなかった。現在、酵素の性質の詳細について検討を行っている。

ammonia-lyase, histidine, thermophile

発表番号：3A036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Mechanistic analysis of poly(lactate-*co*-3-hydroxybutyrate) degradation by soil bacterium depolymerase

○ Camila UTSUNOMIA[1], Jian SUN[1], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Toshihiko OOI[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

**[Purpose]**

Poly(D-3-hydroxybutyrate) [P(D-3HB)] is well-known as a biodegradable plastic degraded by enzymes excreted by a variety of soil bacteria. Such enzymes, named depolymerases (PhaZ), are able to hydrolyze polymer ester bonds resulting in water-soluble monomers and/or oligomers which can be assimilated by the soil microbiota. In contrast, P(D)-lactate (PDLA) is hardly biodegraded and only one natural enzyme degrading PDLA has been reported. Our group has developed the biosynthetic system for the hybrid copolyester of P(D-3HB) and PDLA, P(D-LA-*co*-D-3HB). This copolymer is produced in engineered *Escherichia coli* expressing LA-polymerizing enzyme and thought to be an attractive biobased material due to its semi-transparency and stretchy properties. The aim of this study was to isolate a bacterium degrading this unusual lactate-based polyester, and to investigate the degradation mechanism of the enzyme secreted by the bacteria.

**[Methods and results]**

The screening of P(LA-*co*-3HB)-degrading microorganisms was performed in 500 soil samples collected at Hokkaido University campus, and candidates from 216 locations were isolated. Among them, a Gram negative bacterium *Variovorax* sp. C34, which efficiently grew on P(LA-*co*-3HB) emulsion and generated a halo in agar plates containing the emulsion, was chosen and subjected to further analysis. The P(LA-*co*-3HB)-depolymerase purified from the culture supernatant of C34, designated as $PhaZ_{Vs}$, was able to solubilize both P(67 mol% D-LA-*co*-D-3HB) and P(D-3HB), but not PDLA homopolymer. Moreover, $PhaZ_{Vs}$ was able to hydrolyze trimers containing LA units, suggesting that $PhaZ_{Vs}$ does hydrolyze ester bonds between LA units, contradicting to the fact that $PhaZ_{Vs}$ did not degrade PDLA. In order to understand this phenomenon, PDLA oligomers (6-40 mer) were subjected to $PhaZ_{Vs}$ degradation assay. $PhaZ_{Vs}$ was able to degrade only oligomers shorter than 31 mer, revealing the degradation is size-dependent rather than site-specific. In conclusion, P(D-LA-*co*-D-3HB) can be enzymatically degraded if it does not contain long LA-clustering sequence.

Lactate-based polymer, Enzyme, Biodegradation

発表責任者：Seiichi Taguchi（staguchi@eng.hokudai.ac.jp）

発表番号：3A037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 粗粉砕草本系バイオマス含有リグニン分解酵素産生微生物の菌学的性質

# Some Physiological properties of lignin-degrading microorganism capable of degrading milled rice straw

○湯下 佳和、田中 菜月、伊藤 龍、伊藤 雅貴、倉根 隆一郎（中部大・応生）
○ YOSHIKAZU YUSHITA, NATSUKI TANAKA, RYU ITO, MASAKI ITO, RYUICHIRO KURANE (Chubu Univ.)

【背景・目的】

現在第 1 世代バイオエタノールの原材料として利用されているトウモロコシ、サトウキビ等は糖化までの処理が容易な反面、食料との競合がおこり、食糧問題や作物の価格上昇などが問題視されている。そこで未利用のセルロース系バイオマスとして、特に容易で安定して収集可能な草本系、木質系のバイオマスが注目を集めている。だが、現行の脱リグニン処理過程では、酸・アルカリ処理や、高熱処理などの過酷な処理を行う必要があり、これらの処理によって生じるリグニン含有排水が実用化までの大きな課題となっている。また、脱リグニン化を行う過程での使用エネルギー及びコストも無視できない問題となっている。そこで現行のような化学的脱リグニン処理ではなく、微生物による脱リグニン化を可能とすることによって、前述の廃液やエネルギー、コスト面での問題の克服が期待されている。

そのため、今回はリグニン分解に寄与すると考えられている酵素の活性を指標に 2.6-DMP 活性試験を行い、リグニン分解酵素生産微生物の探索を行った。
取得したリグニン分解菌株の菌学的性質等を明らかにする。

【方法及び結果】

粗粉砕杉を唯一の炭素源とした培地を用い、土壌より探索を行った。活性測定には 2.6-DMP を用い、強い活性が得られたものをリグニン分解菌とした。このスクリーニングより得られた菌体の菌学的諸性質等を検討し、その結果を報告する。

lignin, biomass, bioethanol

発表番号：3A038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 草食性甲殻類からのバイオマス分解細菌群の単離

# Isolation of the biomass-degrading bacteria from herbivorous crustacean

○裏 佳織[1]、柳井 清治[2]、三宅 克英[1] ([1]石川県大資源研、[2]石川県大環境)
○Kaori URA[1], Kiyoharu YANAI[2], Katuhide MIYAKE[1] ([1]Res,Ishikawa Pref. Univ, [2]Eni,Ishikawa Pref. Univ)

日本の海岸に面した森林、いわゆる水辺林では、アカテガニやヨコエビなどの生息がよく観察される。これらの甲殻類は落ち葉や木片などのバイオマスを食料として利用する。アカテガニやヨコエビは森林物質循環と河口域の生態系（特に魚類生産）の中で重要な役割を果たしているが、そのバイオマス分解メカニズムはほとんどわかっていない。本研究ではアカテガニとヨコエビの新規バイオマス分解システムを明らかにし、バイオマス有効利用技術への応用をはかることを目的としている。これらの甲殻類は木や葉といったバイオマスのみで生育可能であり、強力なバイオマス分解能力を持っている可能性が高い。本研究ではアカテガニとヨコエビから単離した細菌群のセルロースやリグニン分解能力について解析を行っている。

加賀地方や能登地方の水辺林に生息するアカテガニとヨコエビから新規バイオマス分解細菌を単離し、そのバイオマス分解能力を解析した。現在までにアカテガニ消化管由来細菌を 15 株、ヨコエビから 29 株取得することができた。バイオマス分解活性のスクリーニングはセルラーゼ活性に関しては CMC（カルボキシメチルセルロース)-congo-Red 法、リグニン分解活性に関しては Remazol Brilliant Blue R(RBBR)法もしくはリグニン含有 LB プレートを用いたプレート上でのハロの形成法を用いて一次スクリーニングを行った。結果として得られた菌株のほとんどがセルロース分解活性を示した。一方、RBBR 法ではアカテガニ由来細菌で 5 株、ヨコエビ由来細菌で 4 株、リグニン含有 LB プレートではアカテガニ由来細菌で 5 株、ヨコエビ由来細菌で 7 株ハロを形成するものが見つかった。これらの菌を同定するため、16S rRNA の塩基配列を決定し、同定を行った。*Bacillus licheniformis*、*Shewanella sp.* の 2 株がアカテガニ、ヨコエビのどちらからも検出され、しかも比較的強いリグニン分解活性を示した。これら 2 種の細菌は、甲殻類に共通して存在し、強いバイオマス分解能力によって宿主をサポートしている可能性がある。また、詳細なリグニン分解活性については、グアヤコール法及び HPLC を用いた低分子化の解析なども行っており、その結果についてもあわせて報告する予定である。

また、今後トランスポゾンを利用した変異株を取得し、分解酵素遺伝子のスクリーニングを行っていく予定である。

biomass, lignin degradation, Chiromantes haematocheir

発表番号：3A039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# インドネシアより単離されたキシロース資化性油脂生産新種酵母

# Novel oleaginous yeast species assimilating d-xylose isolated in Indoensia.

○小林 隆一[1]、Atit Kanti[2]、川崎 浩子[1] ([1]製品評価技術基盤機構・NBRC、[2]LIPI, Indonesia)
○Ryuichi Kobayashi[1], Atit Kanti[2], Hiroko Kawasaki[1] ([1]NITE-NBRC, [2]LIPI, Indonesia)

木質系バイオマスからのエネルギー生産及び有用物質生産を念頭に、五単糖を資化するインドネシア産酵母の探索を行ってきた。朽木を中心として試料を採取し、得られた酵母の 26S rRNA D1/D2 領域に基づく分子系統学的解析を行ったところ、その 90%は子嚢菌酵母であり、残りは担子菌酵母であった。

本研究において、26S rRNA の塩基配列を解析しそれを基に分子系統解析を行ったところ、担子菌酵母より 2 種の新種酵母を見出した。これら 2 種の新種酵母はそれぞれが *Rhodosporidium paludigenum* に近縁であることがわかった。

またこれらの酵母を 5% Malt extract 培地にて培養したところ、油状の物質が浮遊していたことから、細胞内で生産された油脂を分泌している可能性が考えられた。そこでその培養液中から油脂成分を抽出し、GC/MS を用いて解析を行ったところ、どちらも C16 及び C18 を主とした成分で構成されていることが明らかとなった。これらは炭素源をキシロースに変えた培地でも確認された。

本発表ではこれらの酵母の分子系統解析ならびに化学・生化学的各種解析結果を基に新種酵母の提案を行い、また本酵母の油脂生産能及びその分泌能についての解析結果について報告する。

本研究は地球規模課題対応国際科学技術協力事業(SATREPS)におけるインドネシア･LIPI との共同事業の下で実施されたものである。

Oleaginous yeast, Xylose utilization, Novel species

発表番号：3A040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 偏性嫌気性細菌 *Megasphaera elsdenii* の水素発酵能の評価と応用技術の開発

Comparative evaluation of hydrogen fermentation of *Megasphaera elsdenii* and development of applied technology.

○小林 邑弥、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Satomi Kobayashi, Akihiro Ohnishi, Naoshi Fujimoto, Masaharu Suzuki (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】

水素は次世代のエネルギー媒体として期待されており、その安価な製造方法として嫌気性細菌を用いた水素発酵法が注目されている。水素発酵の研究で主に用いられている *Clostridium* 属は、グルコースやデンプン等の糖類から高効率で水素生成するものの、雑菌汚染には脆弱であり、乳酸菌の共存下では著しく水素生成能力が低下することが報告されている。そのため、安定した水素発酵において基質や植種の熱処理が不可欠であるが、熱処理によるエネルギー投入は、得られる水素の燃料としての価値を低下させる要因となっている。この打開策として我々は、乳酸菌共存下でも安定して水素を生成する *Megasphaera elsdenii* を LU-HPB（Lactate Utilizing-Hydrogen Producing Bacteria）として提案した（*RSC Adv.*.2012,2, 8332）。*M. elsdenii* は乳酸を基質に収率 0.4～0.8mol-$H_2$/mol-hexose で水素生産を行うことが可能である。本研究では *M. elsdenii* の水素発酵能を評価し、実用化に向けた応用技術の開発を試みる。今回は水素発酵に関する諸条件を検討した結果について報告する。

【方法及び結果】

まず、炭素源として乳酸およびグルコースの初発濃度が *M. elsdenii* の水素発酵能に及ぼす影響を評価した。比較対象菌には一般的な水素発酵菌である *Clostridium butyricum* を用いた。125ml 容バイアル瓶に基質 25ml を充填して密封後、滅菌して実験に用いた。乳酸は 87~260mM、グルコースは 28~389mM の範囲で検討した。グルコースを基質とした場合、*C. butyricum* はいずれの濃度でも旺盛な水素生成を示した。これに対して、*M. elsdenii* が旺盛に水素生成可能な濃度は 28~278mM であった。また乳酸を基質とした場合、*C. butyricum* は水素生成を示さないのに対して、*M. elsdenii* は 87~243mM の範囲で旺盛な水素生成を示した。このように、*M. elsdenii* が旺盛に水素生成可能な最大基質濃度は、グルコースで 278mM、乳酸では 243mM であることが示唆された。次に、1.25L 容のジャーファーメンター（基質量 1.0L）を用いた回分実験により、水素発酵の至適条件を検討した。グルコース（初発濃度 28mM）を基質とした場合、pH 無制御下における *C. butyricum* の水素生成量は 1534ml、全糖消費率は 100%であった。これに対し、*M. elsdenii* の水素生成量は 813ml、全糖消費率は 60%であった。また、下限 pH を 6.0 に制御した場合、*M. elsdenii* の水素生産速度は大きく上昇し、水素生成量は 1451ml、全糖消費率は 79%であった。このように、初発グルコース濃度 28mM における至適 pH は 6.0 で、*C. butyricum* と同程度の水素生産能力を有することが示された。

*Megasphaera elsdenii*, Hydrogen fermentation, Lactate

発表番号：3A041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 酵母 *Issatchenkia orientalis* における耐酸性・耐塩性遺伝子の単離と解析

# Isolation and characterization of a novel *Issatchenkia orientalis* gene required for tolerance to acid and salt stress

○松鹿 昭則[1]、根宜 香奈子[1]、鈴木 俊宏[1]、五島 徹也[2]、星野 保[1]([1]産総研・機能化学、[2]酒総研)
○Akinori MATSUSHIKA[1], Kanako NEGI[1], Toshihiro SUZUKI[1], Tetsuya GOSHIMA[2], Tamotsu HOSHINO[1] ([1]ISC, AIST, [2]NRIB)

【目的】リグノセルロース系バイオマスを発酵原料とするエタノールや乳酸の生産には、酵母の酸耐性化が中和コスト低減や雑菌汚染防止等の観点から望まれる。酵母 *Issatchenkia orientalis* は酸や塩などのストレスに強い耐性を示す酵母である。本研究では、ストレス耐性形質を持つ有用酵母の分子育種を目的として、*I. orientalis* NBRC1279 株から酸耐性に寄与する遺伝子のスクリーニングを行った。

【方法と結果】NBRC1279 株のゲノムライブラリーを作製し、出芽酵母 BY4742 株に導入後、pH2.0 の培地で生育可能なクローンを取得した。得られたクローンは 7.5%の硫酸塩を含む pH2.5 の培地でも生育することができた。この株から酸耐性・塩耐性に関わる遺伝子（*IoGAS1*）を単離し、その塩基配列を決定した。この塩基配列より推定されるタンパク質（542 アミノ酸）は、出芽酵母において細胞壁の構成要素である β1,3-グルカンの合成に関与する GPI アンカー型タンパク質 Gas1 との高い相同性がみられた。低 pH（pH 2.0）又は高濃度硫酸塩（5.0%, pH2.5）のストレス条件下で、*IoGAS1* 過剰発現株は野生型株に比べてエタノール生産性が 58%以上増加した。また、*IoGAS1* の転写発現解析や出芽酵母 *gas1* 破壊株を用いた相補実験も併せて行い、*IoGAS1* によるストレス耐性化における役割も調べたので、その結果について報告する。

*Issatchenkia orientalis*, acid and salt tolerance, ethanol fermentation

発表番号：3A042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Trichoderma 属菌株の菌体外酵素生産の多様性
# Diversity of extra-cellular enzymes in Trichoderma sp.

○デ　オリベイラ　ポルシウンクラ ジュリアーノ、島村 麻美子、稲葉 重樹、鶴海 泰久、紙野 圭
(（独）製品評価技術基盤機構)
○Juliano de Oliveira Porciuncula, Mamiko Shimamura, Shigeki Inaba, Yasuhisa Tsurumi, Kei Kamino (NITE)

非可食バイオマスからのバイオエタノール生産や化成品原料生産へ向けたバイオリファイナリーの根幹として糖化技術の高機能化・高効率化がある。糸状菌由来の糖化酵素系が現状の技術では中心的な役割を担う。自然界の分解者たるこれら微生物の位置づけがそれを裏付けしているが、カビの菌体外酵素生産性の高さも実際には重要な因子である。特に糸状菌 *Trichoderma reesei* QM9414 株から派生する改良菌株の菌体外酵素生産性は顕著で、糸状菌酵素の多岐にわたる産業利用の可能性を感じさせる。一方、近年の非可食バイオマス利用促進を機にカビやキノコの基盤が底上げされてきた。糖化関連酵素の分子機構の理解、関連モデル菌株の分子生物学、カビやキノコのゲノム情報の蓄積、木材腐朽の分子機構の理解の促進などが例として挙げられる。このブームはこれら微生物の持つ酵素全般の利用を促進する良い機会でもある。

*Trichoderma* 属は多様な分類群ではあるが、上記 QM9414 派生株を中心とした研究に集約してきた傾向が強く、そのためその分類群全般の菌体外酵素やその誘導などの多様性の理解は十分とは言えない。NBRC では豊富な *Trichoderma* 属菌株ライブラリーを過去に構築してきている。そこで、そのライブラリーの中から分類上多様性のある菌株を選定し、それら菌株の菌体外酵素生産と培養条件について解析した。

*Trichoderma* 属の分類上のクレードに応じて菌株を選び、それらの糖化酵素遺伝子の有無と、前培養および酵素誘導条件と菌体外酵素生産について、プロテオームや酵素活性測定、顕微鏡下の形態などを中心に調べたので報告する。

なお、本研究の一部はバイオマスエネルギー先導技術開発／酵素糖化・効率的発酵に資する基盤研究（NEDO）の一貫として行われた。

Filamentous Fungi, Trichoderma, Enzyme

発表番号：3A043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 沖縄糖蜜を用いた発酵水素生産とその菌叢解析

# Fermentative Hydorogen Production from Okinawa's Molasses and Flora analysis

○佐久本 太一[1]、田邉 俊朗[1]、谷生 重晴[2]([1]沖縄高専、[2]水素バイオ株式会社)
○ Taichi SAKUMOTO[1], Toshiaki TANABE[1], Shigeharu Tanisho[2] ([1]NIT, Okinawa Col., [2]BioHydrogen Technologies, Inc)

【諸言】　近年、化石燃料の代わりとなる新たな再生可能エネルギーとして水素が注目されている。谷生らは、これまでにサトウキビを製糖した際に生ずる廃棄物である廃糖蜜を原料とする水素発酵のパイロットプラントを沖縄県糸満市に建設し、その運転結果やアルカリによる中和を必要としない新規のコスト低減型発酵菌叢について報告してきた。発酵槽内には種菌として単離された水素生産菌を投入するが、原料である廃糖蜜に含まれる微生物叢からどのような細菌類が増殖し、水素生産へどのように影響を及ぼすかは明らかではなかった。本報では、同プラントでの半回分培養における pH 変化及び水素生産量を追跡しており、水素発酵中の菌叢を次世代シーケンサーを用いて 16SrRNA メタゲノム解析し、どのような細菌が存在していたかを報告する。

【材料と方法】　発酵種菌には、谷生が 2004 年に発見した高速水素発酵バクテリア Clostridium 属 HN001 株[3)]をおよび糸満市で新たに見出した水素発酵菌叢を使用した。菌叢サンプルとして沖縄県糸満市に建造した水素発酵パイロットプラントで半回分培養中に発酵槽から抜き取った発酵液を用いた。水素発酵中に発酵液のｐH、水素ガス発生量をモニタリングし、かつ記録しているため、抜き取り時間から発酵液がどのような状態であったか追跡できる。発酵液を遠心分離し、得られた菌体から NucleoSpin Tissue（タカラバイオ社）を用いてＤＮＡ抽出を行った。抽出したゲノムＤＮＡを鋳型とし、16SrRNA 遺伝子のＶ４領域を対象としたプライマーを設計し、ＰＣＲで増幅した。Ilumina 社のマニュアルに従って増幅産物の精製・Index 配列とアダプター配列の付加を行い、Illumina 社の Miseq を用いてシーケンスを行った。得られたデータは MacQIIME1.9.1 にて解析を行った。

【結果】　採取した発酵液からゲノム DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子の可変領域を PCR 増幅したところ次世代シーケンスに供することができるクオリティと量の増幅断片が得られた。これらを MiSeq に供し、16S メタゲノム解析を行った。その結果、どの発酵液中においても種菌のみではなく、Enterococcus 属や Bifidobacterium 属など原料である廃糖蜜から混入したと考えられる菌が複数種存在していた。また発酵液ｐH が異なると優勢な菌種も異なっていた。これらの細菌は互いに共存または菌叢淘汰の状態にあり、互いの代謝産物の取り込みや代謝産物同士の中和反応などで発酵液のｐH 変化や水素生産量に少なからず影響を与えているものと考えられる。　以上のように、水素発酵中の発酵液についてそのメタゲノム解析を行えば、発酵液中の菌叢淘汰が追跡できる。発酵液の pH 測定データとひも付けすれば、廃糖蜜を用いた水素生産の効率化に貢献できると考えられる。

Hydrogen prodution, 16S Metagenomics, Next generation sequencing

発表責任者：田邊俊朗（tanabe@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：3A044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 大腸菌の 1,3-ブタンジオール高生産に向けた代謝改変

# Metabolic engineering for enhanced production of 1,3-butanediol in *Escherichia coli*

○片岡 尚也[1]、VANGNAI Alisa S.[2]、藥師 寿治[1]、加藤 純一[3]、和田 大[4]、横田 篤[4]、松下 一信[1]（[1]山口大農、[2]チュラロンコン大、[3]広島大院先端物質、[4]北大院農）
○Naoya KATAOKA[1], Alisa S. VANGNAI[2], Toshiharu YAKUSHI[1], Junichi KATO[3], Masaru WADA[4], Atsushi YOKOTA[4], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Chulalongkorn Univ., [3]Hiroshima Univ., [4]Hokkaido Univ.)

【目的】1,3-ブタンジオール (1,3-BD) は, 産業用ケミカルの原料やβ-ラクタム系抗生物質の重要中間体として広く用いられている炭素数 4 の光学活性ジオールである。また, 合成ゴムの中間体であるブタジエンに容易に化学変換できることから, 合成ゴム原料としても注目されている化合物である。我々はこれまでの研究で, *Ralstonia eutropha* の持つポリヒドロキシ酪酸生合成経路と *Clostridium* 属の持つブタノール発酵経路を組み合わせることで 1,3-BD 合成代謝経路を設計し, 大腸菌内で構築することで, グルコースから 1,3-BD を生産することに成功している (1, 2)。本研究では, 大腸菌での 1,3-BD 生産の更なる効率化に向けた代謝改変を検討したので報告する。

【方法・結果】我々の設計した 1,3-BD 合成代謝経路では, 1,3-BD は, アセチル CoA を中間代謝物として 3 段階の還元反応 (うち 1 反応は NADPH, 残りの 2 反応は NAD(P)H を還元力とする) を経ることで生成される。そのため, 生産の効率化の戦略として, アセチル CoA 及び還元力供給の強化が有効であると考えられた。PdhR は, ピルビン酸脱水素酵素複合体 (PDHc) をコードする *pdh* オペロンの負の転写制御因子であり, 大腸菌の *pdhR* 欠損変異株は, アセチル CoA 及び NADH 供給が増加した表現型を示すことが明らかにされている (3)。そこで, *pdhR* 欠損変異株 (Δ*pdhR* 株) を作製し 1,3-BD 生産を評価した。その結果 Δ*pdhR* 株での 1,3-BD 収量は, 親株と比較して 1.24 倍に増加した。またその時, Δ*pdhR* 株では, 著量のギ酸が副産物として生成していた。大腸菌においてギ酸は, ピルビン酸-ギ酸リアーゼによるピルビン酸のアセチル CoA への変換時に生成する。そのため, Δ*pdhR* 株では同じ反応を触媒する PDHc を避ける応答, すなわち, NADH 生成を弱める代謝制御をしていると考えられた。これは, 1,3-BD の高生産に NADH 供給の強化が重要でないことを示唆している。そこで, もう一つの還元力である NADPH 供給の強化が 1,3-BD 生産に及ぼす影響を評価することとした。ギ酸から NADPH を生じるギ酸脱水素酵素 (Fdh) をタンパク質工学的に作製し, 1,3-BD 合成代謝経路と共に Δ*pdhR* 株で発現させた。その結果, Fdh の共発現により 1,3-BD 収量はさらに 1.2 倍に増加した (親株と比較して 1.55 倍)。これらの結果は, 大腸菌における 1,3-BD 生産には, アセチル CoA 及び NADPH 供給の強化が有効であることを示している。

1) Kataoka *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **115**(5), 475-480 (2013).
2) Kataoka *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**(4), 695-700 (2014).
3) Iwabu *et al.*, 第 65 回 日本生物工学会大会, 2P-093 (2013).

1,3-butanediol, *Escherichia coli*, metabolic engineering

発表責任者：片岡 尚也（nkataoka@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：3A045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# サイズの異なる銀ナノ粒子の *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する毒性の違い

# Size of silver nanoparticles related to its toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*

○川瀬 俊悟[1]、清水 佑一[2]、薗田 諒[2]、柏田 祥策[1,2,3]、長坂 征治[1,2,3] ([1]東洋大院生命科学、[2]東洋大生命科学、[3]東洋大学生命環境科学研究センター)
○Syungo Kawase[1], Yuuichi Shimizu[2], Ryou Sonoda[2], Shosaku Kashiwada[1,2,3], Seiji Nagasaka[1,2,3] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [3]Research Center for Life and Environmental Sciences, Toyo Univ.)

【背景】古代から銀製品は水を腐敗させないなどの効果があることから身の回りで使用されてきた。近年になりナノテクノロジーの発展を背景に銀ナノ粒子の生産が増加している。銀ナノ粒子はより抗菌性が高く、低コストで生産できることから様々な生活用品に利用されている。銀ナノ粒子を用いた製品の生産拡大が進む一方で、銀ナノ粒子の環境中への流出による生態系への影響が懸念されている。しかし銀ナノ粒子の生物への毒性影響は未解明の部分が多く、生態系の生産者である藻類についても近年になり盛んに研究が行われている。そこで本研究では藻類に対する銀ナノ粒子の毒性機構の解明し、将来の生態系への影響予想に貢献することを目的とする。
【方法】供試生物としてムレミカヅキモを用いた。本試験に使用した細胞は 3 日間の前培養を 2 回行った後に細胞を培地に $1.0 \times 10^5$ cell/ml になるように加えて、2 種類の粒子径が異なる銀ナノ粒子(銀ナノ粒子 L:粒子径 45 nm、銀ナノ粒子 S:粒子径 10 nm)をそれぞれ曝露処理し毒性評価を行った。対照試験として硝酸銀を曝露して同様の毒性評価を行った。各銀種を曝露処理時の細胞内への銀の取込み量を比較するために金属含有量を測定した。細胞内の金属含有量の測定は曝露開始から 7 日後の細胞に濃硝酸を加えて湿式分解により金属を溶解したのち、ICP-MS で分析を行った。さらに蛍光試薬 DCFH-DA を用いて細胞内での酸化ストレスの変化を調べた。
【結果および考察】ムレミカヅキモの生育は曝露した各銀種において銀濃度の上昇に伴い阻害された。硝酸銀を曝露処理した細胞は 50 ppb の曝露処理濃度でほとんど生育が認められなかったが、銀ナノ粒子 L を曝露処理した細胞は 50 ppb で無処理区と比較して 68%程度の生育が認められた。一方で銀ナノ粒子 L 50 ppb を曝露処理した細胞と同じ程度に生育を阻害していた銀ナノ粒子 S の曝露濃度は 5 ppb であった。細胞内の銀含有量は曝露処理濃度の上昇に伴い高くなる傾向が認められたが、銀種間で増加の割合は異なっていた。これらの結果からは細胞内の銀濃度は細胞の生育阻害にあまり影響を及ぼしていないことが示唆された。また細胞内で発生している酸化ストレスの変化についても各銀種による差異が認められた。銀ナノ粒子 S を曝露処理してから 24 時間後の細胞においてはコントロール条件の細胞より約 8 倍高かったが培養時間経過に伴い酸化ストレスの減少が認められた。硝酸銀 25 ppb、銀ナノ粒子 L 50 ppb の濃度で曝露処理した細胞の酸化ストレスは曝露開始から 168 時間後に上昇していた。曝露処理した細胞の生育阻害と各銀種の細胞内の蓄積傾向、細胞内の酸化ストレスの変化の傾向が異なっていたことから各銀種における細胞への毒性影響は異なることが示唆された。

Silver nanoparticles, Green algae, Metal toxicity

発表番号：3A046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 単一細胞元素分析による微細藻類と金属ナノ粒子の相互作用解析

# Evaluation of interaction between microalgae and nanoparticles by single cell elemental analysis

○三橋 弘明[1]、宮下 振一[2]、藤井 紳一郎[2]、安保 充[1]、高津 章子[2]、日置 昭治[2]、稲垣 和三[2]([1]明大農、[2]産総研)
○Hiroaki Mitsuhashi[1], Shin-ichi Miyashita[2], Shin-ichiro Fujii[2], Mitsuru Abo[1], Akiko Takatsu[2], Akiharu Hioki[2], Kazumi Inagaki[2] ([1]Meiji Univ., [2]AIST)

【目的】

ナノ粒子は 1～100 nm サイズの粒子であり、現在、多くの工業製品や消費者製品に利用されている。バルク材料と異なる性質(光学特性や比表面積等)を有するため、革新的製品の開発および実用化への応用が期待されている。その反面、使用・廃棄後の排水等を通じた水圏環境への放出による生態系への悪影響が憂慮されている。現在、水圏環境における一次生産者である微細藻類に対する毒性に関して多くの研究が行われているが、影響発現の一因と考えられるナノ粒子の取り込み・吸着挙動については未解明な点が多い。本研究では、微細藻類における金属ナノ粒子の影響を明らかにすることを目的として、ナノ粒子を曝露した藻類細胞についてシングルパーティクル誘導結合プラズマ質量分析法（SP-ICP-MS）を用いた単一細胞元素分析を試みた。

【方法】

<u>微細藻類の培養と金属ナノ粒子の曝露</u>

紅藻 *Galdieria sulphuraria* を改変 Allen 培地（pH 2.5）で振とう培養して前培養液を調製した後、培養細胞に $ZrO_2$、Ag、Pt、Au ナノ粒子（いずれも粒子径 100 nm 以下）を 2 時間曝露した。また、ナノ粒子から溶出したイオンによる影響を知るため、対応する金属塩による曝露実験も行った。

<u>微細藻類と金属ナノ粒子の取り込み・吸着挙動解析</u>

ナノ粒子曝露後の藻類細胞に対して、SP-ICP-MS による単一細胞元素分析および従来用いられている ICP-MS によるバルク分析を行った。単一細胞元素分析では個々の曝露細胞の金属量分析を行い、バルク分析では多数の曝露細胞の総金属量の平均値分析を行った。

【結果】

金属ナノ粒子曝露後の藻類細胞に対して単一細胞元素分析を行った結果、$ZrO_2$ と Ag ナノ粒子は細胞と何らかの相互作用を起こしている可能性が高いことが分かった。Ag ナノ粒子曝露後の一細胞中に含まれている Ag 量を計算したところ、藻類細胞には溶解したナノ粒子または溶出したイオンが取り込み・吸着されたことが示唆された。

Nanoparticle, Microalga, Inductively coupled plasma mass spectrometry(ICP-MS)

発表番号：3B001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 深海底泥からの放線菌の分離、分類と代謝物の多様性
# Taxonomic and metabolic diversity of actinomycetes isolated from deep-sea sediment.

○波多野 和樹[1]、高橋 裕子[1]、澤 竜一[1]、五十嵐 雅之[1]、加藤 千明[2] ([1]微化研、[2]JAMSTEC)
○Masaki HATANO[1], Yuko TAKAHASHI[1], Ryuichi SAWA[1], Masayuki IGARASHI[1], Chiaki KATO[2]
([1]Inst. of Microbial Chemistry, [2]JAMSTEC)

【目的】放線菌は有用な微生物であり、医療分野や農業分野などに大きく貢献してきた。放線菌の分離対象は主に土壌であり、その分離頻度は *Streptomyces* 属が約 95%を占める。一方、深海は高圧や高熱といった特殊な環境条件で生態系が営まれていることから土壌由来の放線菌とは全く異なる属種の存在や、従来とは異なった生理活性物質を生産する放線菌の発見が期待される。そこで我々は深海底泥由来放線菌の多様性解析を目的とし、分類学的および代謝物の多様性について検討した。
【方法・結果】日本海溝、相模湾、沖縄トラフ等より回収した深海底泥サンプル（深度 800～5,000 m）30 検体を分離源として用いた。分離培地 4 種類を用い培養温度 27、30、37℃で培養を行い、合計 204 株の放線菌を分離した。得られた分離株の分類学的多様性は 16S rRNA 約 700 bp を解析することで評価した。その結果 *Streptomyces* 属が 28%、*Micromonospora* 属が 54%、その他に *Verrucosispora* や *Plantactinospora* といった種としての報告例が少ない希少放線菌を含む 12 属が 18%の割合で存在することが認められ、*Micromonospora* 属が優占種として分離されること、深海底泥が放線菌の分離源として有用であることが示唆された。*Micromonospora* 属についてさらに詳細な分類学的位置を決定するため *Micromonospora* 属と同定された 96 株の 16S rDNA 全長を対象として解析を進め、系統樹を作成した。その結果、一部の野生株は *M. aurantiaca* 基準株に対してクラスターを形成し（*M. aurantiaca* 基準株に対する 16S rRNA 塩基配列相同性 99.5～100%）、他の野生株は比較的分散して存在することが認められた。*M. aurantiaca* 基準株に対して近縁と判断された野生株の分類学的位置をより詳細に解析するため MALDI-TOF MS を用いた全菌体のマススペクトルパターンを取得し、クラスター解析を行った。その結果、16S rRNA 塩基配列解析より *M. aurantiaca* の近縁種と判断された野生株は MALDI-TOF MS 解析においても同様に *M. aurantiaca* を含むクラスターを形成した。*M. aurantiaca* 基準株に近縁の野生株を対象として NaCl 耐性の比較を行った。その結果、*M. aurantiaca* 基準株の NaCl 耐性は 3%であり、4%NaCl 濃度では生育が低下した。これに対して近縁である野生株の NaCl 耐性は 4%で生育することが認められた。陸上由来の *Micromonospora* 属 21 株と深海由来 *Micromonospora* 属 38 株を用い LC/MS による代謝物解析を行った。その結果、深海由来の *Micromonospora* 属は陸上由来株とは異なる代謝物を生産していることが確認された。現在人工海水添加の効果に着目し、人工海水添加、非添加培養における代謝産物の比較を深海由来および陸上由来 *M. aurantiaca* 近縁の野生株を対象として進めている。

actinomycetes, deep-sea sediment, isolation

発表番号：3B002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# MALDI-TOF MS を用いた放線菌の識別

# Identification of actinomycetes by MALDI-TOF MS

○高橋 裕子[1]、波多野 和樹[1]、五十嵐 雅之[1]、澤 竜一[1]、梅沢 洋二[1]、加藤 千明[2] ([1]微化研、[2]JAMSTEC)
○ Yuko TAKAHASHI[1], Masaki HATANO[1], Masayuki IGARASHI[1], Ryuichi SAWA[1], Yoji UMEZAWA[1], Chiaki KATO[2] ([1]Inst. of Microbial Chemistry, [2]JAMSTEC)

【目的】近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法（MALDI-TOF MS）を用いた微生物同定法が急速に普及してきており、その迅速性、行程の簡便さおよび低コストから、医療、品質管理現場で用いられている。MALDI-TOF MS を用いた微生物の同定は、微生物のタンパク質のスペクトルパターンをデータベースに照合して相同性解析を行う。本法を用いた放線菌の迅速識別への応用は、放線菌が医薬品などの有用物質探索資源として重要な微生物であることから、探索研究の一助となると考えられる。しかしながら、現在のデータベースでは、病原性を示す *Nocardia* 属以外ほとんど登録されていない。探索資源としての放線菌については新たにデータベースの構築が必須であるが、放線菌は複雑な生活環を有し各生育段階で異なるスペクトルパターンを示すことから、他の細菌に比べデータベース化は容易ではないと考えられる。この問題を解決するために、放線菌の培養条件および試料調製法の検討を行い、16S rRNA 塩基配列解析で同種とされた放線菌を用いて MALDI-TOF MS を用いた微生物同定法が適用できるか検証を行った。
【方法・結果】①培養条件の検討：寒天斜面培地で培養したコロニーを直接液体培地に植菌した培養では、生育状態にばらつきが生じスペクトルパターンも異なったが、一定時間培養した種母を用いて液体培地で培養をすることで、安定したスペクトルを得ることが可能になった。②試料調製法の検討：コロニーの直接塗布、エタノール・ギ酸抽出およびビーズ破砕抽出の 3 法を検討した結果、ビーズ破砕抽出法が、再現性の良いスペクトルを与えた。③測定条件の検討：非リボゾームタンパク質と考えられるピークが多く検出されるために、測定質量範囲を検討した結果、*m/z* 4000 以下のピークをカットすることで、菌株固有のリボゾームタンパク質を主成分とした再現性のあるスペクトルが得られた。④スペクトルのバリデーション：同一株について複数回測定を行い、得られた複数のスペクトルについて、平均値を算出して測定誤差のあるピークのアライメントを行うことで比較解析を可能にした。これにより出現率の高いピークを選抜し、菌株固有の有意なスペクトルパターンを登録する基準を設定した。⑤クラスター解析：放線菌 *Micromonospora* 属基準株と *M. aurantiaca* 基準株に対する 16S rRNA 塩基配列相同性 99.5～100％の深海底泥由来分離株を、上記①～④の条件を用いて MALDI-TOFMS を測定しクラスター解析を行った。その結果、分離株は近縁である *M. aurantiaca* を含むクラスターを形成し、MALDI-TOF MS を用いた微生物の同定技術は、探索資源としての放線菌 *Micromonospora* 属について種レベルでの識別が可能であることを示した。

MALDI-TOF MS, Microbial identification, Actinomycetes

発表番号：3B003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 深海底泥由来放線菌二次代謝産物からの新規シデロフォアの発見

# A novel siderophore from *Streptomyces fradiae*, isolated from deep-sea sediment.

○竹花 康弘[1]、澤 竜一[1]、五十嵐 雅之[1]、波多野 和樹[1]、梅北 まや[1]、梅沢 洋二[1]、加藤 千明[2] ([1]微化研、[2]JAMSTEC)
○YASUHIRO TAKEHANA[1], RYUICHI SAWA[1], MASAYUKI IGARASHI[1], MASAKI HATANO[1], MAYA UMEKITA[1], YOJI UMEZAWA[1], CHIAKI KATO[2] ([1]Inst. of Microbial Chemistry, [2]JAMSTEC)

【目的】　放線菌は有用な生理活性物質の生産菌として広く利用され、特に土壌より分離された放線菌において盛んに研究が行われてきたが、近年では新規生理活性物質の獲得効率は減少しつつある。深海底泥由来放線菌は、塩濃度や栄養条件といった生育環境の違いから土壌由来のものとは異なる二次代謝産物の生産性を有する放線菌として注目されている。本研究では、深海底泥由来放線菌からの新規生理活性物質獲得のために高精度 LC/MS によるメタボローム解析手法を用いた新規物質探索を行い、その過程で抗菌活性を示す新規シデロフォアの単離に成功したので、その単離精製、構造決定および生物活性について報告する。

【方法・結果】　種々の深海底泥由来放線菌培養物を LC-ESI/MS で分析し、ピーク抽出して得られた精密質量を Dictionary of Natural Products に掲載の既知化合物の精密質量と照合して一致が無いピークを探索した。本探索により、北緯 35 度東経 139 度の相模湾深度 806 m のシロウリガイ群集内底泥から分離した深海底泥由来放線菌 MM456M-mF7 株の培養物中に目的の化合物（MM456M-mF7 A および B）を見出した。MM456M-mF7 株は、16S rRNA 塩基配列解析（1426 bp）より *Streptomyces fradiae* NRRL B-1195 と 100％の相同性があったことから本菌株を *Streptomyces fradiae* MM456M-mF7 と同定した。本菌株の麦固体培養サンプル 600 g を EtOH で抽出し、LC/MS で *m/z* 435.2086 および *m/z* 449.2242 のピークを指標として精製を行った。CHP 20P カラムクロマトグラフィー、$C_{18}$ および HILIC HPLC を順次行い、10.5 mg の A 物質を単離した。また、CHP 20P カラムクロマトグラフィーの後に LH-20 ゲルろ過クロマトグラフィーを行い、187.3 mg の B 物質を単離した。本物質は、ESI/MS の精密質量からそれぞれ $C_{17}H_{30}N_4O_9$、$C_{18}H_{32}N_4O_9$ と決定し、TLC において第二塩化鉄陽性である点から、鉄のキレーターであるシデロフォアの一種と推定した。さらに NMR スペクトルの詳細な解析により、本物質は、クエン酸に A 物質は $C_4$ および $C_3$ の、B 物質は $C_5$ および $C_3$ のそれぞれ 2 種の直鎖ジアミンがペプチド結合し、末端に N ヒドロキシアセチル基を有する構造であると決定した。A 物質は新規化合物であったが、B 物質は甘味増強剤の特許既知化合物であることが判明した。*Clostridium difficile* および *Blautia hydrogenotrophicus* に対し、A 物質は 8~64 mg/L、B 物質は 4~16 mg/L で抗菌活性を示した。

deep-sea sediment, *Streptomyces*, novel bioactive compound

発表責任者：竹花　康弘（takehanay@bikaken.or.jp）

発表番号：3B004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

*Phytophthora infestans* 遊走子嚢の低温における直接発芽促進物質の探索
Screening for conpounds stimulating direct germination of sporangium at low temperature in *Phytophthora infestans*.

○奥野 照基、甲斐 建次、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院）
○Teruki OKUNO, Kenji KAI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUCHI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】卵菌 *Phytophthora infestans* はジャガイモやトマトに感染し疫病を引き起こす植物病原菌であるが、その遊走子嚢は生育至適温度より高温条件（18°C）では直接菌糸を伸長して再び遊走子嚢を形成する。一方、低温条件（<15°C）で遊走子嚢が夜露などにより濡れると遊走子を放出する。遊走子は走化的に植物へと泳ぎ、植物上でシストおよびアプレゾリアを形成し感染する。この低温における遊走子嚢分化が植物感染、疫病蔓延の主要経路である。本研究では温度に応答した遊走子嚢分化機構を解明することを目的に、各分化段階特異的に作用する化合物を放線菌二次代謝産物を対象に探索してきた。その過程で低温条件においても遊走子を放出せず、直接発芽を誘導するサンプルを取得した。このサンプルによる遊走子嚢分化への作用が *P. infestans* の植物感染に与える影響について解析したので報告する。
【方法・結果】フミン酸を単一炭素源窒素源とした培地を用いて放線菌を選択的に単離した。放線菌の培養液に等量のアセトンを加えて調製したサンプルを *P. infestans* 遊走子嚢懸濁液に添加し 10°C で 18 時間静置した後、遊走子嚢の形態を顕微鏡により観察した。約 680 株の培養液抽出サンプルについて活性を評価した結果、9 サンプルで低温における遊走子嚢分化が直接発芽へと誘導される活性を発見し、その中で最も誘導活性の高かった No. 258 株に着目して解析を進めた。No. 258 株の 16S ribosomal DNA 系統解析を行ったところ *Streptomyces flavogriseus* の近縁種であった。次にサンプルの植物感染へ与える影響について調べた。滅菌水に浸したトマトの葉から 1 cm 離れたところに遊走子嚢を滴下して 10°C に 2 時間静置することで遊走子放出を誘導後、18°C に移してサンプルの添加、非添加条件下での遊走子の拡散による植物感染の有無を経日的に観察した。その結果 6 日後では遊走子嚢のみを滴下した場合、トマトの葉に *P. infestans* の菌糸と共にトマトの葉の局所的な壊死が観察された。一方、No. 258 株抽出サンプルを添加した場合には感染の様子は観察されなかった。またトマトの葉に直接遊走子嚢を接種した場合では、サンプルの添加によって接種箇所でも葉の壊死は観察されなかった。このことから遊走子嚢の低温における分化を直接発芽へと誘導するサンプルによって *P. infestans* によるトマトの葉への感染が抑制されることが示された。そこで No. 258 株培養液より直接発芽促進物質の精製を試みた。まず、酢酸エチルによる抽出を試みたところ活性物質が水層に残った。この水層から Amberlite®XAD16N を用いて活性物質を濃縮し、Wakogel®100C18 を用いたオープンカラム、さらに ODS ( HPLC )を用いて活性物質を精製することとした。現在は活性物質の精製中である。

late blight, antioomycete, actinomyces

発表責任者：谷修治（shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3B005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

卵菌 *Phytophthora infestans* シスト発芽阻害物質の同定と作用解析
Identification and functional analysis of cyst germination inhibitor in *Phytophthora infestans*.
○西尾 尚尭、甲斐 建次、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大院）
○Naotaka NISHIO, Kenji KAI, Shuji TANI, Jun-ichi SUMITANI, Takashi KAWAGUTI (Osaka Pref. Univ.)

【目的】卵菌 *Phytophthora infestans* はトマトとジャガイモに感染し，疫病を引き起こす植物病原菌である。*P. infestans* の遊走子嚢は 15℃以上の環境では直接発芽し菌糸伸長する一方，15℃以下の水中では数時間の内に遊走子を放出する。遊走子は植物表層でシスト形成後、発芽し付着器を形成することで効率よく植物内へ侵入する。この低温に応答した形態分化を伴う植物感染が *P. infestans* 疫病蔓延の主原因である。本研究では低温条件下におけるシスト発芽機構の解明を目的として，シスト発芽を阻害する化合物を放線菌二次代謝産物から探索し，同定したので報告する。
【結果】種々の土壌サンプルからフミン酸培地で優先的に生育した放線菌を単離した。各放線菌の培養液に等量のアセトンを加えて調製したサンプルを *P. infestans* 遊走子嚢懸濁液に添加し，10℃で 18 時間静置後の遊走子嚢の形態を顕微鏡下で観察した。スクリーニングに供した 505 サンプルの内，シスト発芽を阻害したサンプルが 2 種見つかった。これらのサンプル中，単位培養液当たりの発芽阻害率の高かった No. 750 株からシスト発芽阻害物質を精製した。本菌培養液 76.4 L を酢酸エチル抽出後，各種クロマトグラフィーによりシスト発芽阻害物質 2.9 mg を取得した。精製標品の MSI-MS スペクトルにより分子量 536 の化合物であることが判明した。$^{1}$H-NMR，$^{13}$C-NMR スペクトル解析により精製標品の構造解析を進めた結果，精製標品とβ-rubromycin 標品のスペクトルが一致したため，精製した化合物をβ-rubromycin と同定した。β-rubromycin 標品を用いて遊走子嚢分化への影響を解析した。β-rubromycin を遊走子嚢に添加し，10℃に静置後の遊走子嚢の形態変化を観察したところ，濃度依存的にシスト発芽を阻害し，$IC_{50}$ は 36.8 nM であった。一方，β-rubromycin は高濃度でも 25℃における遊走子嚢からの直接発芽や至適温度における栄養成長は阻害しなかった。以上より，β-rubromycin は低濃度でシスト発芽のみを特異的に阻害することが示唆された。次にβ-rubromycin による *P. infestans* 植物感染への影響を解析した。*P. infestans* の遊走子 ($1\times10^5$ ～ $1\times10^6$ /ml) をトマトの葉に接種すると，表面だけでなく内部にも菌糸を伸長し遊走子嚢を形成するが，β-rubromycin を添加した場合は，葉の内部で僅かに菌糸が観察されたのみであり，β-rubromycin は *P. infestans* の植物感染も阻害することが示された。これまでに, β-rubromycin はヒトのテロメラーゼを阻害することが報告されているが，卵菌で観察されたシスト発芽阻害は異なる作用機序によるものと推測される。今後は，β-rubromycin によるケミカルジェネティクスによりシスト発芽阻害機構を解析すると共に，*P. infestans* における作用機序解析を解明する計画である。

antioomycete, biomolecule, sporangium development

発表責任者：谷　修治（shuji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3B006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 枯れ枝より分離した糸状菌 *Fusarium solani* T-13 株の生産する物質について

# Metabolites produced by *Fusarium solani* T-13 isolated from a dead branch

○塩野 義人[1]、Nanang Rudianto Ariefta[1]、Ruengrit Sappapan[1]、村山 哲也[1]、小関 卓也[1]、川村 哲晃[2]、上杉 祥太[3]、木村 賢一[2,3] ([1]山形大・農、[2]岩手大・農、[3]岩手大院・連合農)
○Yoshihito Shiono[1], Rudianto Ariefta Nanang[1], Sappapan Ruengrit[1], Tetsuya Murayama[1], Takuya Koseki[1], Tetsuaki Kawamura[2], Shota Uesugi[3], Ken-ichi Kimura[2,3] ([1]Fac. of Agri., Yamagata Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]The Unit. Grad. Sch. of Agri. Sci., Iwate Univ.)

【目的】我々のグループは、これまでに微生物の代謝産物に新しい骨格を持つ生理活性物質を求めて探索してきた。本発表では、採取した枯れ枝より分離した *Fusarium solani* T-13 株の代謝産物より得られた活性物質について報告する。

【方法と結果】枯れ枝より分離した糸状菌 *Fusarium solani* T-13 株の培養物のメタノール抽出物を、TLC 上での発色を指標に各種カラムクロマトグラフィーにより精製し、6 種の化合物を単離した。次に、NMR スペクトルや高分解能マススペクトルデータを中心に解析し、それぞれの構造を決定した。化合物 **1** は *β*-ラクトン環を有する既知の 1233A (L-659,699) で、**2** は **1** のラクトン環の加水分解物であった。化合物 **3** と **5** は、ベンゼン環を含む 12 員環マクロラクトン構造を有する既知の 8-*O*-desmethyllasiodiplodin とそのマクロラクトンが開環した誘導体であった。化合物 **4** は、**3** のマクロラクトン骨格に一つの水酸基が付加した新しい誘導体であり、**6** は **5** の新しい誘導物質であった。

次にそれぞれの生物活性を調べたところ、**1** は HL60 細胞に対して細胞毒性を示す（$IC_{50}$ = 1.1 $\mu$M）のに対し、*β*-ラクトンが開環した **2** は不活性（$IC_{50}$ > 20 $\mu$M）であった。一方、**3** ～ **6** については、カルシウムシグナル伝達に関わる遺伝子変異酵母（*zds1*Δ *erg3*Δ *pdr1/3*Δ）株に対し、**3** と **5** は阻止円を伴う生育回復活性を示したが、**4** と **6** は 5 $\mu$g/spot でも活性を示さなかった。

Fusarium solani, 1233A, Lasiodiplodin

発表責任者：塩野義人（yshiono@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：3B007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Streptomyces davawensis* JCM 4913 において新規亜硝酸生合成経路を用いて生合成される二次代謝産物の同定

# Identification of secondary metabolites that seem to be synthesized by utilizing the novel nitrous acid biosynthetic pathway in *Streptomyces davawensis* JCM 4913

○萩原 亮太、勝山 陽平、菅井 佳宣、尾仲 宏康、大西 康夫（東大院・農生科・応生工）
○ Ryota HAGIHARA, Yohei KATSUYAMA, Yoshinori SUGAI, Hiroyasu ONAKA, Yasuo OHNISHI (Grad. Sch. Agri. and Life Sci. Univ. of Tokyo)

【目的・背景】昨年、放線菌 *Streptomyces cremeus* が生産する抗生物質 cremeomycin のジアゾ基形成に、CreD、CreE が重要な役割を担っていることが明らかにされた（Sugai, Y. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.* in press)。CreE によりアスパラギン酸がニトロコハク酸に酸化され、CreD によってニトロコハク酸から亜硝酸が脱離し、生成した亜硝酸が 3-amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid のアミノ基と反応することでジアゾ基が形成される。データベース上を検索すると、*creD*、*creE* のホモログは放線菌に広く分布しており、二次代謝関連生合成遺伝子クラスターと思われる遺伝子座にオペロンを形成してコードされていた。これより、様々な放線菌で *creD*、*creE* ホモログが二次代謝産物の生合成に関わっていることが予想された。今回、放線菌 *Streptomyces davawensis* JCM 4913 ゲノム中に見出された *creD*、*creE* ホモログの機能解析を行った。
【結果・考察】*S. davawensis* の CreD、CreE ホモログの組換えタンパク質を調製し、*in vitro* で活性を試験した。その結果、これらの酵素がアスパラギン酸を基質に亜硝酸を生成することが確かめられた。次に、この亜硝酸を用いて生合成される化合物を同定するために *creE* ホモログの破壊株を作製したが、培地条件の検討にも拘らず野生株と破壊株の間で代謝物に有意な差を認めることはできなかった。目的生合成遺伝子クラスターが休眠状態であることが予想されたため、近年放線菌の休眠二次代謝関連遺伝子の活性化法として注目されている‘複合培養’を試みた。複合培養は、ミコール酸含有細菌（MACB）との共培養により *Streptomyces* 属の二次代謝を活性化させる手法である (Onaka, H. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 400-406, 2011)。MACB である *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 との共培養の結果、野生株と破壊株の間で代謝物に有意な差を認めることができた。野生株特異的にみられる化合物について培養液から抽出、精製、HR-ESI-MS と各種 NMR 解析による構造決定を行い、本化合物がシデロフォアである desferrioxamine B の N 末端が修飾された構造を有する新規化合物であることを明らかにした。しかしながら、予想とは異なりその構造中に N-N 結合は含まれていなかった。一方、*S. davawensis* ゲノム上で *creD*、*creE* ホモログとは離れた位置に存在する desferrioxamine B 生合成遺伝子クラスター（*des* クラスター）中の *desD* を破壊したところ、今回同定した化合物および desferrioxamine 類の生産が消失した。以上より、同定した新規化合物は、*des* クラスターによって生合成された desferrioxamine B が修飾を受けて生合成されることが示された。この修飾過程に CreD、CreE ホモログ由来の亜硝酸は関与すると考えられる。

*Streptomyces*, combined-culture, biosynthesis

発表番号：3B008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 微生物代謝産物からのマラリア原虫解毒酵素 *Pf*GlOI 阻害物質の探索

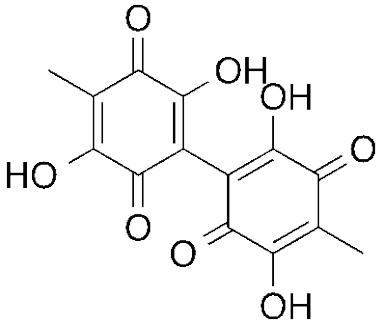
# Search for inhibitors against *Plasmodium falciparum* GlOI

○浮山 颯[1]、岩月 正人[1,2]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、大村 智[2]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研)
○So Ukiyama[1], Masato Iwatsuki[1,2], Kenichi Nonaka[1,2], Atsuko Matsumoto[1,2], Satoshi Oomura[2], Kazuro Shiomi[1,2] ([1]Grad. Sch. Infect. Control. Sci., kitasato Univ., [2]kitasato Inst. Life. Sci.)

【背景と目的】マラリアはマラリア原虫によって引き起こされる原虫感染症で、ハマダラカの媒介により感染域を拡大する。主に熱帯、亜熱帯に広く分布しており、世界三大感染症として数えられるほど深刻な感染症である。既存薬としてクロロキンやアルテミシニン等が治療に用いられているが、いずれも開発年が古く、耐性原虫が出現していることから新たな作用機序を持つ抗マラリア薬の開発が求められている。そこで演者はマラリア原虫解毒酵素 glyoxalase I（以下 *Pf*GlOI）に着目した。生物が普遍的にエネルギーを得る為に利用している解糖系では、最終生成物であるピルビン酸を合成する際に毒性物質 methylglyoxal が生産される。Methylglyoxal が蓄積するとタンパク質の機能や情報伝達経路が影響を受け、細胞死が誘導されることから、解毒酵素 GlOI は生物の生育に必須であると考えられている。さらに解毒酵素 GlOI の構造は種毎に大きく異なることから、その阻害剤は選択毒性の優れた薬剤であるとして期待されている。そこで新規抗マラリア薬の開発を目標に、マラリア原虫解毒酵素 *Pf*GlOI 阻害活性物質の探索を微生物代謝産物から行った。

【方法】*Pf*GlOI 阻害活性は、組み換え大腸菌で発現させた His タグ付の *Pf*GlOI を用い、酵素反応の進行に伴って増加する D-lactoylglutathione 由来の 240 nm の吸収を 96 穴プレート内で測定することで算出した。

【結果と考察】微生物培養液 5,412 サンプルのスクリーニングで選択した糸状菌 FKI-7514 株培養液について精製を行った結果、*Pf*GlOI 阻害活性物質として oosporein を同定した（下図）。Oosporein は強い *Pf*GloI 阻害活性（$IC_{50}$ = 6.6 μg/mL）を示し、ヒト GlOI（$IC_{50}$ >100 μg/mL）と 15 倍以上もの選択性を示した。Oosporein は mycotoxin 活性が報告されているが *Pf*GlOI 阻害活性は初の知見である。



Oosporein の構造

malaria, glyoxalase I, inhibitor

発表責任者：塩見和朗（shiomi@lisci.kitasato-u.ac.jp）

発表番号：3B009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 青枯病菌のクオラムセンシングシグナル分子は（*R*)-methyl 3-hydroxymyristate である

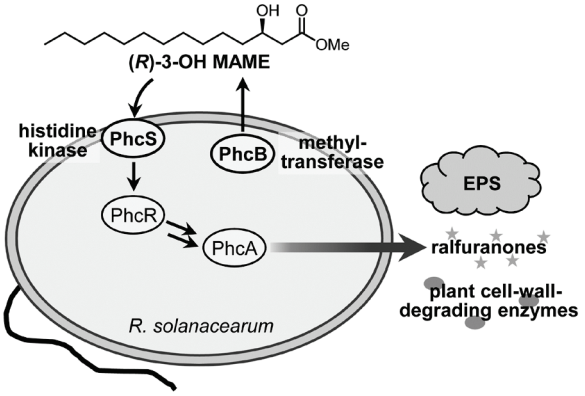
# Methyl 3-hydroxymyristate, a diffusible signal mediating quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*

○甲斐 建次[1]、大西 秀幸[1]、嶋谷 美香[1]、石川 詩歩[2]、森 友花[2]、木場 章範[2]、大西 浩平[3]、曳地 康史[2]（[1]阪府大院・生命環境、[2]高知大・農、[3]高知大・総研セ）

○Kenji KAI[1], Hideyuki OHNISHI[1], Mika SHIMATANI[1], Shiho ISHIKAWA[2], Yuka MORI[2], Akinori KIBA[2], Kouhei OHNISHI[3], Yasufumi HIKICHI[2] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Kochi Univ., [3]Kochi Univ. SRC)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は，200 以上の植物種に感染し萎凋・枯死を引き起こす重要病害細菌である。本病害の有効な防除法はなく，ナス科作物を中心に深刻な被害が世界各地で報告されている。そのため，本菌の病原性制御機構の解明とその知見に基づく優れた防除法開発が切望されている。根の傷口などから侵入した青枯病菌は，宿主の維管束内で爆発的に増殖し，大量の細胞外多糖（EPS）を産生する。蓄積した細菌細胞と EPS が維管束の通水が阻害するため，植物は急速に萎凋する。EPS などの病原力因子はレギュレータータンパク質 PhcA によって制御され，PhcA 活性はクオラムセンシング（QS）によって調節されている。約 20 年前に，methyl 3-hydroxypalmitate（3-OH PAME）が QS シグナル分子として AW1 株培養物から報告された。しかし，3-OH PAME を産生しない株が多く存在し，それらの株においては 3-OH PAME の活性が極めて弱いことから，未知の QS シグナル分子が機能していることが強く示唆されてきた。そこで本研究では，OE1-1 株培養物より活性を指標に QS シグナル分子を単離し，その化学構造を決定した。さらに，その合成酵素・受容体の同定を行ったので報告する。

【方法・結果】QS シグナル分子の推定合成酵素をコードする *phcB* 遺伝子の欠損株（Δ*phcB* 株）を用い，EPS 産生誘導を指標にして，野生株（OE1-1 株）の培養物から QS シグナル分子を単離した。NMR，MS および合成標品との比較により，QS シグナル分子を (*R*)-methyl 3-hydroxymyristate（3-OH MAME）と同定した。3-OH MAME は，EPS だけでなく，二次代謝産物 ralfuranone 類と細胞壁分解酵素 endoglucanase の産生を誘導した。*phcB* 遺伝子の相補実験と異種発現実験から，PhcB が 3-OH MAME 合成酵素であることを確認した。また，欠損株を使った実験から，ヒスチジンキナーゼ PhcS が受容体であることが強く示唆された。様々な野生株の PhcB と PhcS のアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成したところ，これらの系統樹は QS シグナル分子のタイプ（3-OH MAME か 3-OH PAME）に依存して 2 つのグループに分かれた。この結果は，今回同定した 3-OH MAME が 20 年近く未解明であった青枯病菌の QS シグナル分子であることを示すだけなく，本 QS 系を構成する Phc タンパク質のユニークな分子進化が青枯病菌で起きたことを示唆するものであった。




quorum sensing, *Ralstonia solanacearum*, structure elucidation

発表責任者：甲斐建次（kai@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3B010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 微生物二次代謝産物からの赤痢アメーバ特異的システイン合成酵素阻害化合物の探索

# Search for inhibitors of *Entamoeba histolytica*-specific cysteine synthase from microbial secondary metabolites

○森 美穂子[1,2]、深澤 航[3]、伯耆原 愛[3]、柘植 聡志[1]、野中 健一[1,2]、松本 厚子[1,2]、大村 智[2]、野崎 智義[4]、塩見 和朗[1,2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]北里大理、[4]感染研)
○ Mihoko MORI[1,2], Wataru FUKASAWA[3], Ai HOUKIBARA[3], Satoshi TSUGE[1], Kenichi NONAKA[1,2], Atsuko MATSUMOTO[1,2], Satoshi OMURA[2], Tomoyoshi NOZAKI[4], Kazuro SHIOMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ., [3]Kitasato Univ., [4]NIID)

【背景・目的】赤痢アメーバ症は単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ（*Entamoeba histolytica*）が腸管に寄生して起こる下痢症である。発展途上国を中心に罹患者は 5,000 万人、死者は原虫症の中ではマラリアに次いで多く、年 10 万人と推定されている。日本でも感染症法により届出が必要な寄生虫症であり、近年報告数が増加している。赤痢アメーバ症の治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、耐性を持つ赤痢アメーバの出現、催奇形性などの副作用があること、感染に関与するシスト状態の赤痢アメーバには効果がないこと等のため、異なる作用機構を持つ治療薬が求められている。

我々は赤痢アメーバに特異的なシステイン生合成経路を構成する二つの酵素、セリン-アセチル転移酵素およびシステイン合成酵素（EhCS）を阻害する化合物は新たな赤痢アメーバ症治療薬のシーズとなると考え、微生物二次代謝産物より探索している。本研究では赤痢アメーバが持つ 3 種類の EhCS のうち、アミノ酸相同性の低い EhCS1 と EhCS3 を阻害する微生物培養液をスクリーニングし、阻害活性を示す化合物の精製を進めた。

【方法】EhCS1 と EhCS3 はそれぞれ大腸菌で発現させたものを用いた。微生物培養液サンプルは 96 ウェルプレートに乾固し、50%DMSO 水溶液で溶解させた後基質溶液と酵素を加えて 37℃で 10 分反応させた。生成したシステインを酸ニンヒドリン試薬で検出し、阻害活性を調べた。糸状菌および放線菌の培養液は等量のエタノールを加えて抽出し、遠心分離して菌体を除いた上清をスクリーニングに用いた。化合物は各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。

【結果】微生物培養液 2,660 サンプル（糸状菌培養液 1,600 サンプル、放線菌培養液 1,060 サンプル）をスクリーニングした結果、125 サンプル（糸状菌培養液 65 サンプル、放線菌培養液 60 サンプル）にシステイン合成酵素阻害活性を見出した。この中から強い阻害活性を確認した糸状菌および放線菌の培養液を選択し、大量培養物より活性化合物の精製を進めた。また微生物培養液に加えて天然化合物ライブラリー134 化合物もスクリーニングし、9 化合物にシステイン合成酵素阻害活性を見出した。

Cysteine synthase, *Entamoeba histolytica*, Microbial metabolites

発表責任者：森　美穂子（morim@lisci.kitasato-u.ac.jp）

発表番号：3B011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

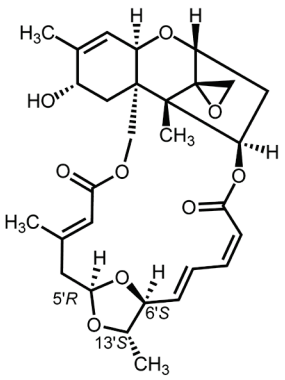
# 理論計算を併用した ECD による天然物の絶対配置決定

# Chiral judgement of natural products employing theoretical calculation supported ECD

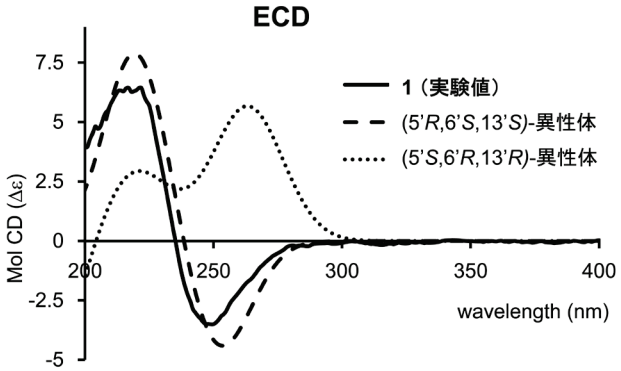
○橋本 勝[1]、伊藤 厚[2]、荒山 美紀[1]、本村 優奈[1]、根平 達夫[3] ([1]弘大農生、[2]岩手連農、[3]広島大総合科学)
○Masaru HASHIMOTO[1], Atsushi ITO[2], Miki ARAYAMA[1], Yuna HONMUTA[1], Tatsuo NEHIRA[3] ([1]Hirosaki Univ., [2]Iwate Univ., [3]Hiroshima Univ.)

我々は、津軽地域微生物を中心に新規生理活性天然物の探索研究を行っている。それらの絶対配置決定において、密度汎関数法を用いた分子軌道計算から電子円二色性（ECD）スペクトルを求める方法が有効であることを経験した。本ポスターでは、既知物質を含め昨年に行った検討結果を報告する。

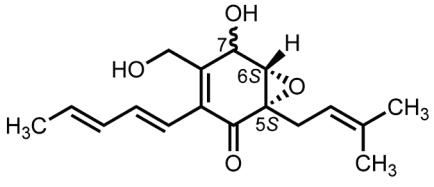
Roridin H (**1**)を白神山地に生育する真菌から単離した。ECD スペクトルでは明瞭な負のコットン分裂がみられた、そこで BHLYP/def-SVP により計算し、(5'*R*,6'*S*,13'*S*)-異性体ではよく一致することを見出した。この結果は、X 線結晶解析で求められた **1** のアセチル体（J. Clardy, *et al*., *J. Antibiot*. **2001**, 54, 517）のそれと一致した。Roridin 類は数多く報告されているが、trichodermin 母核から離れた不斉の絶対配置は NMR 手法で議論することは困難なため、多くの類縁体でほとんど言及されておらず、本手法の有効性を示すことができた。



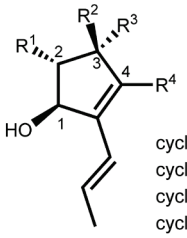
8-hydroxy-roridin H (**1**)




また、*Helminthosporium. velutinum*　TS28 から単離した homojesteron 類(**2**, **3**)、および *H. velutinum*　yone96 から単離した cyclohelmintol 類 (**4**-**7**)では、配座の自由度が高くまたコットン効果も弱いため天然物ではその絶対値に言及することはできなかったが、発色団の導入後により計算手法は十分に有効であることを見出した。ECD スペクトルの計算では、数多くの汎関数、基底関数が用いられているが、計算の精度、コストについて検討した。ポスターではこれらついても考察する。



*trans*-homojesteron (**2**): C6/C7-*trans*
*cis*-homojesteron (**3**): C6/C7-*cis*



cyclohelmintol I (**4**): $R^1$=H, $R^2$=$R^3$=O, $R^4$=H
cyclohelmintol II (**5**): $R^1$=H, $R^2$=$R^3$=O, $R^5$=Cl
cyclohelmintol III (**6**): $R^1$=H, $R^2$=OH, $R^3$=$R^5$=H
cyclohelmintol IV (**7**): $R^1$=H, $R^2$=OH, $R^3$=$R^5$=Cl

ECD, TDDFT calculation, Chiral judgement

発表番号：3B012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

アコヤガイ貝殻稜柱層の炭酸カルシウム結晶形成を制御する有機基質に関する研究
Studies on the organic matrices that regulate the crystallization of calcium carbonate in the prismatic layer of *Pinctada fucata*

○近都 浩之[1]、奥村 大河[2]、根岸 瑠美[3]、小暮 敏博[2]、作田 庄平[1]、鈴木 道生[1]（[1]東大院・農生科・応生科、[2]東大院・理学科・地惑科、[3]東大・分生研）
○ Hiroyuki KINTSU[1], Taiga OKUMURA[2], Lumi NEGISHI[3], Toshihiro KOGURE[2], Shohei SAKUDA[1], Michio SUZUKI[1] ([1]Agricultural and Life Sciences, the Univ. of Tokyo, [2]Science, the Univ. of Tokyo, [3]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the Univ. of Tokyo)

【目的】アコヤガイの貝殻は異なる構造の 2 層から形成されており、外側の層に炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成る稜柱層構造を有している。稜柱層では有機基質の枠組みで囲われた個々の柱状結晶は複数の単結晶性のカルサイト結晶で構成されているが、それらカルサイト結晶の内部には微量の有機物がネットワーク状に存在している。その微量有機物ネットワークに沿って結晶方位の微小な歪みが形成されることで、結晶が断裂するへき開を防ぎ、貝殻の強度を増していると考えられている。微量有機物にはキチンとタンパク質が含まれ、ネットワークを形成して結晶化を制御し、微小な結晶欠陥を持つ単結晶を形成すると考えられているが、微量有機物の構成成分や結晶への作用メカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、稜柱層カルサイト結晶の内部から有機物ネットワークを抽出し、その構成成分を同定することで形成メカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法】稜柱層の結晶を酢酸で脱灰して酸可溶性成分と酸不溶性成分に分離した。さらに酸不溶性画分を SDS/DTT 溶液で煮沸し、酸不溶性タンパク質抽出画分を得た。酸不溶性タンパク質抽出画分と酸可溶性画分を SDS-PAGE に供し、酸不溶性タンパク質抽出画分のみに見られたバンドから、LC/MS/MS を用いてタンパク質の同定を行った。次に、塩化カルシウムを含むキチンゲルを作製し、*in vitro* でのキチンゲル内での炭酸カルシウム結晶形成実験を行い、形成した結晶の電子顕微鏡を用いた観察及び、X 線回折測定を行った。
【結果】結晶内有機物の酸不溶性のタンパク質抽出画分からキチン分解関連酵素であるキチナーゼとキトビアーゼを同定した。このことからキチン分解酵素がキチン繊維を分解し細くすることで有機物ネットワークが結晶と相互作用しやすくなり微小な歪みが形成される可能性が考えられた。そこで、キチン分解酵素を作用させたキチンゲル内で炭酸カルシウム結晶を形成させ、キチンが結晶に与える影響を観察した。酵素処理なしのキチンゲル内では通常のカルサイト結晶であったが、酵素の濃度を 0.12 mg/mL, 1.2 mg/mL と上げるにつれて形が大きく変化した結晶が観察された。また結晶断面の電子回折パターンから、0.12 mg/mL の結晶は単結晶の中に部分的に小さな歪みが生じており、1.2 mg/mL の結晶はキチンを境に多結晶となっていた。
さらに結晶内の全体的な歪みを定量的に比較するため、粉末 X 線回折を行い、形成させた結晶の回折ピークから Williamson-Hall プロットを用いて結晶格子歪みを算出した。結晶内の歪みは、キチンゲルに作用させたキチン分解酵素の濃度依存的に大きくなる傾向が見られた。

bioineralization, calcite, pearl oyster

発表責任者：近都浩之（nichtkind@gmail.com）

発表番号：3B013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

マダラサソリ毒液に含まれる抗菌性ペプチドの探索と同定
Identification of novel antimicrobial peptides from the venom of the scorpion *Isometrus maculatus*
北中 淳史、焼尾 真緒、○宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
Atsushi KITANAKA, Mao YAKIO, ○Masahiro MIYASHITA, Yoshiaki NAKAGAWA, Hisashi MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【目的】有毒生物の毒液には、神経に作用する毒素だけではなく、抗菌性ペプチドも数多く含まれている。近年、薬剤耐性を持つ病原菌の出現と増加が問題となっているが、生物由来の抗菌性ペプチドは広範囲な抗菌活性を持ち、また細胞膜を作用点とするため、既存の抗菌剤よりも耐性が起こりにくいと考えられている。サソリの毒液にも抗菌性ペプチドが多く含まれていることが知られているが、その構造上の特徴として、13～56 残基程度の鎖長であることやジスルフィド結合を持たないものが多いということが挙げられる。また、塩基性アミノ酸や疎水性アミノ酸を多く含む両親媒性ペプチドであることが多い。我々はこれまでに、日本に生息しているマダラサソリ（*Isometrus maculatus*）の毒液から 56 残基の抗菌性ペプチド Im-1 を同定している。また、17 残基の抗菌性ペプチド imcroporin も報告されている。本研究では、マダラサソリ毒液に含まれる他の抗菌性ペプチドを探索した。さらに、得られたペプチドの一次構造を *de novo* シーケンシング法によって同定し、その活性を評価した。
【方法】抗菌性ペプチドの探索にあたっては、疎水性が高く、ジスルフィド結合を持たないことを条件とした。まず、逆相 HPLC を用いて、マダラサソリの毒液を分画し、最も保持時間の大きい画分を LC/MS 分析に供した。次に、同じ画分に対し、還元･アルキル化反応を行い、同様に LC/MS 分析を行った。還元･アルキル化反応の前後で質量の変化がないもの、つまりジスルフィド結合を持たないものについて、低エネルギー衝突誘起解離条件（LCMS-IT-TOF）および高エネルギー衝突誘起解離条件（MALDI-TOF/TOF）において MS/MS 分析を行い、プロダクトイオンスペクトルを得た。また、スペクトルから同質量のロイシンとイソロイシンを判別するために、プロトン親和力の高い構造をペプチド N 末端アミノ基に導入し、MALDI-TOF/TOF 分析における側鎖の解離を促進させた。
【結果】還元･アルキル化反応の前後で質量の変化がないペプチドがいくつか観測され、その内、存在量の多かった質量 1698.0、2803.7 および 1707.0 Da の 3 つのペプチド（それぞれ Im-4、Im-5 および Im-6 と名付けた）について、プロダクトイオンスペクトルを解析した。その結果、それぞれ 17、25 および 16 残基のアミノ酸によって構成されるペプチドであることが分かった。これらのペプチドの一次構造について、類似性検索を行った結果、Im-4 および Im-6 は既知のサソリ毒由来の抗菌性ペプチドと類似性が高く、Im-5 はアリ毒由来の抗菌性ペプチドと類似性が高いことが分かった。また、これら 3 つのペプチドを化学合成して、液体培地中での生育阻害を指標とした抗菌活性を評価し、顕著な活性を持つことを確認した。

scorpion toxin, antimicrobial peptide, mass spectrometry

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ヤエヤマサソリ毒液中に含まれる殺虫性ペプチド LaIT3 の単離・同定

# Isolation and identification of insecticidal peptide LaIT3 from the venom of the scorpion *Liocheles australasiae*

○十一 浩典、宮下 正弘、中川 好秋、宮川 恒（京大院農）
○Hironori Juichi, Masahiro Miyashita, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa (Kyoto Univ.)

【目的】

サソリは獲物を捕らえたり、外敵から身を守るために毒液を持つ。サソリの主な餌は昆虫であり、毒液には多くの殺虫成分が含まれるが、それらの中には昆虫に対して高い選択性をもつものも知られている。毒液中の殺虫性成分はペプチドであり、イオンチャネルに作用して神経毒性を示すものが多い。それらのターゲット分子に関する知見は、新たな殺虫剤の開発に有用であると考えられる。

我々は、日本に生息するヤエヤマサソリ（*Liocheles australasiae*）の毒液に着目し、これまでに 2 種類の殺虫性ペプチド（LaIT1、LaIT2）の単離・同定に成功している。本研究においては、ヤエヤマサソリ毒液に含まれる新たな殺虫性ペプチドの探索を目的として、その単離および構造決定を試みた。

【方法および結果】

沖縄県石垣島にてヤエヤマサソリを採集し、これらを継代飼育して毒液を繰り返し採取した。得られた毒液を RP-HPLC によって粗分画し、それぞれの画分をヨーロッパイエコオロギの若虫（45-55 mg）に注射することで昆虫毒性を評価した。殺虫性が認められた画分について、さらに RP-HPLC を用いた精製を繰り返すことにより分画し、最終的に単一の殺虫性ペプチド（LaIT3）を得た。

質量分析計による測定の結果、LaIT3 は 9195.76 Da の質量を持つことが分かった。さらに、ジスルフィド結合を還元・アルキル化した後、再度質量分析に供し、その質量差から 3 つのジスルフィド結合を含むことを明らかにした。続いて、このペプチドをエドマン分解法による配列解析に供し、N 末端から 44 残基目までの一次構造を決定した。次に、未決定部分の配列を決定するため、ペプチドを Lys-C あるいは Chymotrypsin を用いて断片化し、得られた断片ペプチドの配列を MS/MS 分析による *de novo* シークエンシング法を用いて決定した。以上の結果、LaIT3 は 83 残基のアミノ酸で構成され、含まれる 3 つのジスルフィド結合は、C 末端領域（一次構造上の後半部）にのみ局在していることが分かった。

また、LaIT3 の一次構造について類似性検索を行ったところ、サソリ毒液に含まれる構造グループの一つである β-KTx ペプチドと類似していることが明らかとなった。このことから LaIT3 は、イオンチャネルに作用する殺虫性ペプチドであることが示唆された。

insecticidal peptide, mass spectrometry, scorpion toxin

発表責任者：宮下 正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ヤマカガシ属ヘビ *Rhabdophis pentasupralabialis* におけるホタル毒の蓄積

# Structural analysis of defensive steroids accumulated by the Asian snake *Rhabdophis pentasupralabialis*

○吉田 達哉[1]、城野 哲平[2,4]、竹内 寛彦[3]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、丁 利[2]、唐 並忠[2]、森 哲[4]、森 直樹[1] ([1]京大農、[2]CIB、[3]京大フィールド研、[4]京大理)
○Tatsuya Yoshida[1], Teppei Jono[2,4], Hirohiko Takeuchi[3], Naoko Yoshinaga[1], Hajime Ono[1], Li Ding[2], Yezhong Tang[2], Akira Mori[4], Naoki Mori[1] ([1]Kyoto Univ. Department of Agriculture, [2]CIB, [3]fserc, [4]Kyoto univ. Department of Science)

[背景と目的] 日本に生息するヤマカガシ (*Rhabdophis tigrinus*) は口腔内に開口する毒腺とは別に、首の後ろにある頸腺に毒液を蓄積し、天敵に対する防御に役立てている。この毒液の主成分は bufadienolide と呼ばれるステロイドで、ヤマカガシはこの化合物を餌であるヒキガエルから摂取し、一部構造を改変して利用している。本研究対象である中国に生息するヤマカガシ属のヘビ *R. pentasupralabialis* はミミズを主食とするが、ヤマカガシと同様にヒキガエルから bufadienolide を、首から背中一面にかけて存在する頸背腺に蓄積する能力があることを前大会で報告した。さらに、多くの個体がヤマカガシのものより分子量の大きい未知の bufadienolide も蓄積していることを LCMS 分析により明らかにした。本研究ではこの *R. pentasupralabialis* が蓄積する未知の bufadienolide を精製し、構造解析を行った。
[方法と結果] *R. pentasupralabialis* の頸背腺液をキムワイプに採取し、それを MeOH で抽出して bufadienolide 粗抽出物を得た。この粗抽出物から HPLC 等を用いて *R. pentasupralabialis* に固有の未知 bufadienolide を単離した。各種 NMR による構造解析の結果、未知 bufadienolide の一つは xylose が 3 位に結合した配糖体 bufadienolide であると明らかになった。この化合物は アメリカの陸生ホタル *Lucidota atra* が持つ既知化合物と平面構造が一致した。Xylose 配糖体の bufadienolide は *L. atra* を含む一部の陸生ホタルのみでしか見つかっておらず、脊椎動物での報告は本研究が初めてである。また、Xylose 配糖体以外の *R. pentasupralabialis* に固有な bufadienolide のほとんどが、ホタルで報告のある bufadienolide の分子量と一致した。これらの結果から *R. pentasupralabialis* はヤマカガシと異なり、ホタルを供給源として bufadienolide を頸背腺に蓄積すると示唆された。

bufadienolide, snake, firefly

発表番号：3B016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アオイラガ幼虫分泌液由来の TRPV1 活性化物質の探索

# Search for TRPV1 activated substance from slug caterpillar (*Parasa consocia*) venoms

○青山 裕飛、平川 祥成、野呂 真奈美、勝崎 裕隆（三重大院・生資）
○Hiroto AOYAMA, Yoshinari HIRAKAWA, Manami NORO, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【目的】

アオイラガ（*Parasa consocia*）はチョウ目イラガ科の昆虫であり、幼虫の体表には多数の棘が存在する。この棘に皮膚が触れると非常に激しい痛みが引き起こされる。その原因はアオイラガ幼虫の棘の先端からの分泌液であると考えられているが、分泌液中のどの成分が痛みを引き起こすかは分かっていない。そこで、痛みと密な関連があると示唆されている transient receptor potential vanilloid receptor（TRPV1）に着目した。TRPV1 は非選択性陽イオンチャネルの一つであり、カプサイシンの刺激によって活性化され、$Ca^{2+}$を流入させる。今回はこの TRPV1 を発現させた HEK293 細胞を用いて、細胞内カルシウムイメージングを行うことで、アオイラガ幼虫分泌液に含まれる TRPV1 活性化物質を探索することを目的とした。

【方法・結果】

96 マルチウェルプレートに TRPV1 を発現した HEK293 細胞 $5.0\times10^4$ cells/mL を 100 µL ずつ、$CO_2$ インキュベーター内で一晩培養した。培養後、培地を除去し、蛍光試薬である Fluo4-AM を添加した測定用緩衝液を 100 µL ずつ加え、1 時間培養することで細胞内に Fluo4 を取り込ませた。蛍光顕微鏡に設置し、そこに対照として超純水、陽性対照としてカプサイシン溶液、試料溶液としてアオイラガ試料の 10 倍希釈溶液と 100 倍希釈溶液をそれぞれ 100 µL 添加し蛍光変化を観察した。その結果、カプサイシン溶液とアオイラガ試料の 10 倍希釈溶液において蛍光強度の上昇が見られた。

次にアオイラガ試料溶液を RP-HPLC によりピーク毎に分取し、計 122 画分を得た。保持時間 80 分～160 分の主要ピーク画分を超純水 100 µL に溶解し、さらに 10 倍希釈して、同様にカルシウムイメージングを行った。その結果、二つの画分 70 と 81 において蛍光強度の上昇が見られた。また、TRPV1 を発現していない HEK293 細胞に対しても、先ほどと同様にカルシウムイメージングを行ったところ、アオイラガ試料の 10 倍希釈溶液、画分 70、81 では蛍光強度の上昇は見られなかった。以上の結果より、蛍光強度の上昇が TRPV1 の活性化による $Ca^{2+}$流入によって引き起こされたと判断し、アオイラガ幼虫分泌液には TRPV1 を活性化させる物質が含まれていると推測した。また、保持時間 80 分～160 分の主要ピーク画分を Tricine-SDS-PAGE 分析に供したところ、画分 70、81 を含むいくつかの画分においてバンドが確認された。このことから、アオイラガ幼虫分泌液にはペプチドが含まれており、TRPV1 活性化物質もペプチドであると判断した。

pain, TRPV1, *Parasa*

発表番号：3B017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Screening of bioactive compounds in pufferfish and marine invertebrates from Solomon Islands

○ Clyde Gorapava PUILINGI, Yuta KUDO, Yuko CHO, Keiichi KONOKI, Mari YOTSU-YAMASHITA (Tohoku Univ.)

Natural toxins and bioactive compounds from marine environment have attracted much attention in food safety and as potential drug leads. In this study three pufferfish species, *Arothron hispidus, A. nigropunctatus* and *Diodon holocanthus* collected in Solomon Islands were investigated for the presence of tetrodotoxin (TTX) (Fig. 1), a fatal neurotoxin. LC-fluorescent detection (FLD) and LC-MS[1] analyses revealed both *Arothron* species to be toxic and share similar distribution profile with the same species from Okinawa, Japan.[2]

Attempt to explore bioactive compounds in marine invertebrates from Solomon Islands showed marine sponge *Melophlus sarasinorum*, possess a potentially new minor analogue under the sarasinoside series of compounds [3] with moderate cytotoxic activity against mouse neuroblastoma cell line, Neuro 2a. The distinct fragment patterns along with its molecular formula were obtained using HR-ESI-MS/MS. We believe that this analogue consists of sarasinoside $B_1$ (Fig. 2) type glycosides with slight variation in the aglycone moiety. Further isolation and structural confirmation using HPLC, LC/MS, MS/MS and NMR are currently under way.

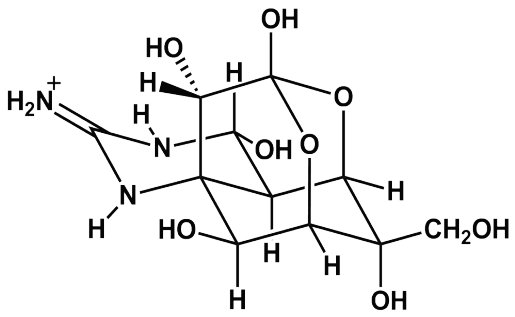



Fig. 1. The structure of TTX

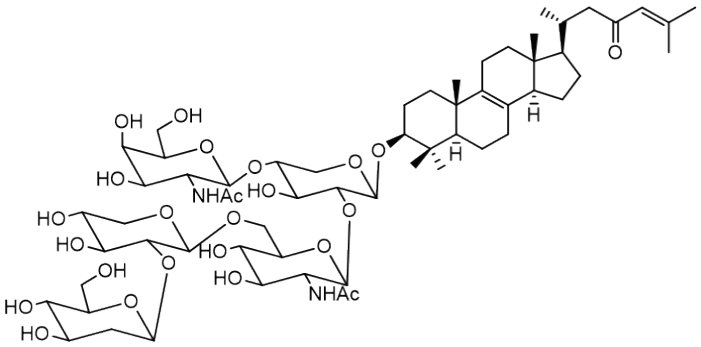



Fig. 2. Sarasinoside $B_1$

Ref. [1] Yotsu-Yamashita, M. *et al*., *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 2799−2813.
[2] Puilingi, C. G. *et al*., *Toxins* **2015**, *7*, 3436−3454.
[3] Kalinin, V. I. *et al*., *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 1671−1710.

sarasinoside, marine invertebrates, Solomon Islands

発表責任者：Mari Yotsu- Yamashita（myama@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：3B018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

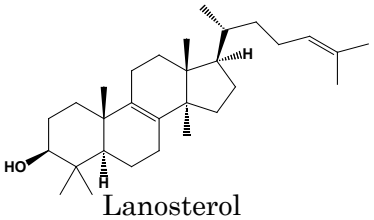
# 高純度ラノステロールの生産
# Preparation of extra pure lanosterol from lanolin.

○石野 暢好、松本 恵実、中塚 宏志、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○ Nobuyoshi ISHINO, Emi MATSUMOTO, Hiroshi NAKATSUKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

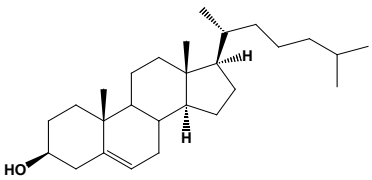
ラノステロールは動物や菌類中に存在するステロイドで、コレステロールなどの前駆体として重要な化合物である。また、最近になりラノステロールを含む点眼薬が白内障の治療または改善に有効である可能性が示されて注目を集めている(1)。白内障は加齢に伴い発症率が増加し、その主な治療法は手術療法によるものである。高齢化社会である現代において、より費用や時間のかからない点眼による治療・改善は重要で、ラノステロールの生理作用を解明が急がれている。

現在販売されているラノステロールの試薬は 93%以下と純度が低く、正確にその生理作用を解明するためにはより高純度の試薬が求められている。そこで本研究ではラノリン(羊脂)からラノステロールやコレステロールなどの動物ステロイドをオープンカラムや HPLC 等のクロマト分離と溶媒抽出、結晶化法などの組み合わせにより単離・精製法を検討した。精製した化合物は HPLC 分析及び $^{1}$H-NMR により純度確認を行ったところ、ラノステロールとコレステロールは純度 99.5%以上であった。また、ジヒドロラノステロールやコレステロールのデヒドロ体であるデスモステロールも 99%以上の純度に精製できた。

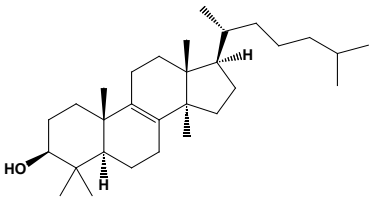
現在、ラノステロールやコレステロールなどの高純度品を 10g 単位で量産する方法を開発中であり、本研究がラノステロールなどの生理作用の解明と白内障の新たな治療法の確立に役立てたいと考えている。



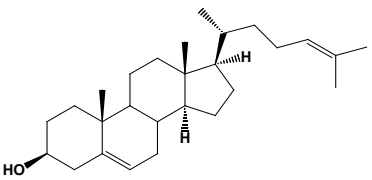
Lanosterol



Cholesterol



Dihydrolanosterol



Desmosterol

(1)：Ling Zhao *et.al.*, *Natur*e, **523**(7562), 607-611, 2015.

Lanosterol, Lanolin, Cholesterol

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

発表番号：3B019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ワイン成分のアンチエイジング効果とワイン圧搾残渣の有効利用
Anti-aging Effect of Wine constituent and the Utilization of Wine Compression Residue

○沢辺 昭義[1]、川村 晴希[1]、吉田 裕一[1]、竹田 竜嗣[1]、飯田 彰[1]、濱原 典正[2]、米虫 節夫[3]、川上 浩平[4]、頓宮 美樹[4]、山田 高也[4]（[1]近畿大農、[2]神戸みのりの公社、[3]大阪市大院工、[4]島根大総科研支援セ）
○Akiyoshi SAWABE[1], Haruki KAWAMURA[1], Hirokazu YOSHIDA[1], Ryuji TAKEDA[1], Akira IIDA[1], Norimasa HAMAHARA[2], Sadao KOMEMUSHI[3], Kohei KAWAKAMI[4], Miki TONGU[4], Takaya YAMADA[4] ([1]Fac. of Agri., Kinki Univ., [2]Municipal Kobe Winery, [3]Grad. Sch. of Engi., Osaka City Univ., [4]Center for Integrated Res. in Sci., Shimane Univ.)

【目的】
人々は健康に対し高い関心を持つようになり化粧品市場や健康食品市場は急激な成長を遂げている。また、自然派指向の高まりから合成系素材に代わる天然系素材の利用が求められており、新たな素材の探索は重要な研究課題となっている。そこで我々はアンチエイジングを目的とした天然由来成分の探索研究を行っている。ワイン圧縮残留物はワイン産業で最も重要な副産物である。そして、生理活性物質の良好な供給源と考えられる。本研究において、我々は産業廃棄物のワイン圧縮残渣に注目して、アンチエイジング効果としてラット血管平滑筋細胞とアポリポ蛋白質Ｅ欠損マウス（ApoE）におけるワイン圧縮残渣の AGE(最終糖化産物)阻害検査とアテローム性動脈硬化抑制効果を調べた。
【方法および結果】
先ず初めに動脈硬化に深く関係している糖化に着目し、糖化を抑制する天然物の探索を行った。数種の植物または材料についてスクリーニングした結果、ワインに高い抗糖化作用が認められた。この結果よりワイン業界で廃棄物として扱われているワイン圧搾残渣に我々は着目した。ワイン圧搾残渣は動脈硬化に効果的であるとされるポリフェノールを含有している種子や果皮を豊富に含んでいる。さらに、ワイン圧搾残渣はほとんどが破棄されておりその抽出物は十分に利用が可能である。そこで日本でも一般的に栽培されている品種であるシャルドネ、メルロー、カベルネ・ソーヴィニヨンのワイン圧搾残渣を用い抗糖化試験を行った。
その結果、ワイン圧搾残渣のカベルネ・ソーヴィニョンとメルロは、最も高い抗糖化作用を示し、そして、ラット血管平滑筋細胞では 50%以上の抑制を示した。3'-methoxy-procyanidin B2 と kaempferol のラット血管平滑筋細胞の阻害活性は、最も強かった。加えて、ApoE マウスにおいて 3'-methoxy-procyanidin B2 と kaempferol の有無で、14 週間 50mg/kg 投与を行った。14 週の繁殖試験終了の後、我々は肝臓と大動脈胸部病変領域（大動脈弓内膜肥厚程度）で LPO と TG を評価した。結論として、産業廃棄物のワイン圧縮残渣からアテローム性動脈硬化抑制効果があり顕著なアンチエイジングが見られたので、健康食品または化粧品としての利用が期待される。

Anti-aging Effect, Wine, procyanidin

発表責任者：沢辺　昭義（sawabe@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：3B020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

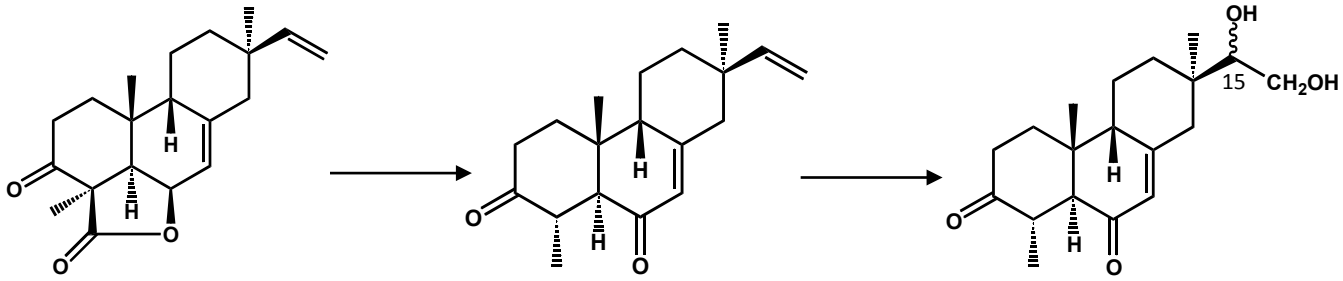
# イネフィトアレキシン モミラクトン A のイネいもち病菌による代謝産物の同定
# Identification of a metabolite of rice phytoalexin momilactone A by *Magnaporthe oryzae*.

○武山 恵典、平石 由貴、遠藤 尚、今井 卓也、戸嶋 浩明、長谷川 守文（茨大農）
○Keisuke TAKEYAMA, Yuki HIRAISHI, Naoto ENDO, Takuya IMAI, Hiroaki TOSHIMA, Morifumi HASEGAWA (Ibaraki Univ.)

主要なイネフィトアレキシンの一つであるモミラクトン A（MA）はイネいもち病菌によって，MA とほぼ同程度の抗菌活性をもつ 3,6-dioxo-19-nor-9β-pimara-7,15-diene（**1**）へと代謝変換されることがすでに明らかになっている（Imai et al., 2012）．したがって，**1** はイネいもち病菌による MA の解毒代謝中間体であり，さらに代謝変換を受けることによって抗菌活性が低下すると推定された．本研究では **1** のイネいもち病菌による代謝について検討を行い，**1** 由来の代謝産物を単離・同定したことを報告する．

イネいもち病菌を培養した液体培地に **1** を添加すると，24 時間以内に **1** が有意に減少することが LC-MS/MS 分析によって確認された．また，LC-MS 分析の結果，**1** 添加 9 時間後の試料において $[M+H]^+$ が *m/z* 321 と推定される化合物 **2** のピークが検出された．化合物 **1** 添加後，8 時間培養したイネいもち病菌培養培地にメタノールを加え，菌体濾過後に抽出液を減圧濃縮し，蒸留水を加え，酢酸エチルで抽出した．抽出物を分取 TLC により精製し，逆相 HPLC を用いて **2** を単離した．**2** の高分解能質量分析の結果から分子式は $C_{19}H_{28}O_4$ と推定した．また NMR スペクトルを用いた解析の結果，**2** は 15,16-dihydroxy-3,6-dioxo-19-nor-9β-pimar-7-ene であると決定され，15 位のエピマーが混在していることが明らかとなった．以上の結果より，イネいもち病菌は MA を **2** に代謝変換できることが示唆された．

引用文献：Imai T, Ohashi Y, Mitsuhara I, Seo S, Toshima H, and Hasegawa M, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 414–416 (2012).




モミラクトン A　　**1**　　**2**

phytoalexin, rice, *Magnaporthe oryzae*

発表責任者：長谷川 守文（morifumi.hasegawa.1@vc.ibaraki.ac.jp）

発表番号：3B021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

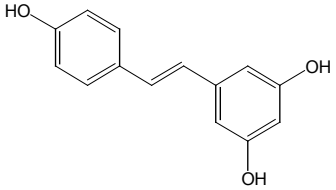
# ブドウ科植物における ε -viniferin の鏡像異性体の混在

# Enantiomeric mixture of ε-viniferin from Vitaceae

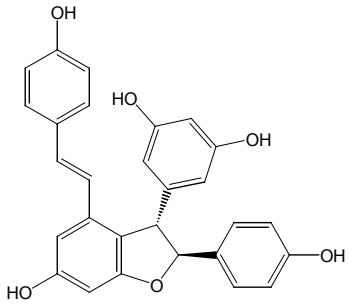
○山本 諭志、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Satoshi YAMAMOTO, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science co.,Ltd.)

Resveratrol を代表とする植物由来スチルベノイドが近年注目を集め、食品、化粧品等に配合がされている。Resveratrol が二量化した ε -viniferin は、ノルアドレナリン抑制作用や、血圧降下作用があるとされ、ブドウ科をはじめ、カヤツリグサ科等に含まれることが報告されている。ε -viniferin の化学構造は、ベンゾフラン環上に二つの立体中心を持つ。その絶対配置によって、(2*S*, 3*S*)の(+)-体、または(2*R*, 3*R*)の(-)-体に区別される。植物中において、スチルベノイドの二量化は、立体特異的な生合成経路により酸化縮合して、一つの鏡像異性体が生成していると考えられている。

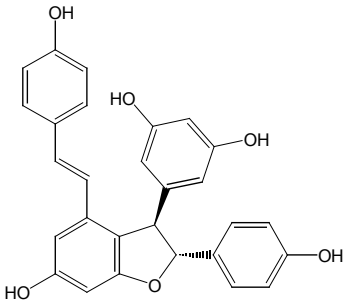
今回、市販のブドウ茎抽出物より ε -viniferin を単離し、キラルカラムにて分析したところ、(+)-体、(-)-体の混在が認められた。これを受け、天然ブドウ中における ε -viniferin は、一方の鏡像異性体のみであるのか、混在しているのかを確かめるため、ブドウ科植物より抽出、精製を行うこととした。品種の一つであるシャインマスカットの葉及び茎より ε -viniferin を単離し、キラルカラムによる分析を行った。結果、葉より得られた ε -viniferin は、およそ(+)-体：(-)-体＝85：15 であるのに対し、茎より得られたものは(+)-体：(-)-体＝30：70 であり、天然ブドウ中にも鏡像異性体の混在が確認できた。また、部位によってもその存在比に大差があることが判明した。
今後、他の部位及び品種についても調査を進めていく予定である。



Resveratrol



(+)-ε-viniferin



(-)-ε-viniferin

ε -viniferin, Vitaceae, Enantiomer

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

発表番号：3B022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# トチュウに含まれる癌幹細胞特異的阻害剤 Eucommicin A の同定

# Eucommicin A, a novel β-truxinate lignan from *Eucommia ulmoides*, is a selective inhibitor of cancer stem cells

○藤原 綾香[1]、西 真由子[2]、吉田 茂男[3]、長谷川 守文[1]、安間 智慧子[4]、梁 明秀[2]、鈴木 義人[1]（[1]茨大農、[2]横浜市大医、[3]理研、[4]碧山園）

○Ayaka FUJIWARA[1], Mayuko NISHI[2], Shigeo YOSHIDA[3], Morifumi HASEGAWA[1], Chieko YASUMA[4], Akihide RYO[2], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Yokohama City Univ., [3]RIKEN, [4]Hekizan-en)

癌幹細胞（Cancer stem cells: CSCs）は，癌細胞のうち多分化能をもつ幹細胞の性質をもった細胞であり，腫瘍組織中に少量存在する．自己複製能と造腫瘍能を有し，正常組織中に移入すると元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力を持ち，また，既存の抗癌剤が効かないため，癌の転移や再発の原因となっている．そのため，CSCs を排除する治療法は腫瘍の再発転移防止に大きく貢献するといえる．

本研究では癌幹細胞の特性を持つ培養細胞ライン iCSCL-10（文献 1 & 2）を用い，この細胞の細胞増殖および自己複製能に対する阻害活性を指標に，トチュウ葉由来の抗 iCSCL-10 活性物質を単離し，Eucommicin A と命名した．質量分析，各種 NMR 等の解析結果より，Eucommicin A の構造は図の様に決定され，新規の天然化合物であることが判明した．クロロゲン酸が二重結合部分で二量体化し，シクロブタン環を有するβ-truxinate lignan の一種である．Eucommicin A は乳腺癌細胞と比較して癌幹細胞により強い増殖抑制作用を示した．また，tumor sphere formation assay においても阻害作用を示し，癌幹細胞の自己複製能に対する抑制効果も認められた．一方，クロロゲン酸にはこれらの効果が検出されず，シクロブタン構造の形成が活性発現に必須であると考えられた．

トチュウにおける Eucommicin A の局在性について検討したところ，Eucommicin A の存在は器官特異的であることが明らかになった．また葉の中では葉の先端程含量が高くなるという傾向が確認された．

一方，その後の解析で，トチュウには Eucommicin A の立体異性体が複数種含まれていることが判明しており，これらの構造を決定した上で活性試験を行うことにより，構造と活性との相関性に関する知見を得る予定である．

文献 1：Nishi et al. (2014) Oncogene, 33, 643–652.
文献 2：Nishi et al. (2014) Oncotarget, 5, 8665–8680.

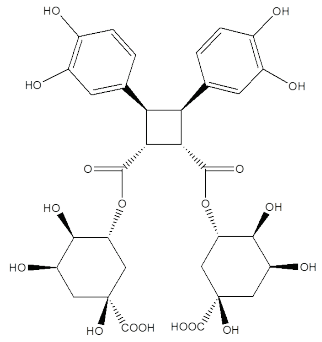


Fig. 1 Eucommicin A構造式

cancer stem cell, *Eucommia ulmoides*, β-truxinate

発表責任者：鈴木義人（yoshihito.suzuki.chemeco@vc.ibaraki.ac.jp）

発表番号：3B023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ミズナラ外樹皮由来の抗トキソプラズマ活性物質の単離・構造決定
Isolation and structure determination of antitoxoplasmic compounds from *Quercus crispula* Blume outer bark

○遠藤 麻理奈[1]、重冨 顕吾[2]、三橋 進也[2]、五十嵐 慎[3]、生方 信[2]([1]北大農、[2]北大院農、[3]帯畜大・原虫研)
○Marina ENDO[1], Kengo SHIGETOMI[2], Shinya MITSUHASHI[2], Makoto IGARASHI[3], Makoto UBUKATA[2] ([1]Hokkaido Univ. school of agriculture, [2]Hokkaido Univ. graduate school of agriculture, [3]Obihiro Univ. of Agriculture and Veterinary Medicine)

【背景・目的】

トキソプラズマ(*Toxoplasma gondii*)は偏性細胞内寄生原虫の一種であり、哺乳類や鳥類などに寄生する。トキソプラズマの感染により先天性トキソプラズマ症やトキソプラズマ脳炎を引き起こす可能性があり、死に至るケースも確認されている。現在トキソプラズマ症の治療薬としてはいくつか知られているが、日本国内では未認可もしくは保険適用外であるため、治療には高額の費用が必要とされる。よってより安価なリソースからの薬剤開発が必要とされている。

木材加工の際に廃材として発生する樹皮は、現在家畜飼料や敷料、燃料として利用されているが、樹皮の特性を活用した、より高位な利用法の開発が求められている。樹皮材の特徴として、木部と比べ高い割合で抽出成分が含まれることが挙げられる。我々はこの利点に着目して行った先行実験において、ミズナラ(*Quercus crispula* Blume)の外樹皮に抗トキソプラズマ活性を持つ抽出成分が存在することを見出した。

本研究では先行研究で得られた結果に基づき、ミズナラの外樹皮に含まれる抗トキソプラズマ症治療薬シード化合物の単離・構造決定を行うことを目的とした。

【方法と結果】

北海道大学苫小牧研究林にて採集したミズナラ外樹皮を用い、メタノール抽出、酢酸エチル抽出を順次行った。その後フラッシュ自動精製装置を用いて分画を行い、TLC で得られた結果から 12 の画分に分離した。得られた 12 画分を、サンドウィッチ ELISA 法を用いて活性評価したところ、画分 4、画分 9 でそれぞれ抗トキソプラズマ活性が見られた。さらに画分 4 に関して逆相 HPLC を用いた分画を試みた結果、溶離液組成 MeOH:$H_2O$=90:10 において 4–0 から 4–6 の 7 区分に分離した。このうち画分 4–4 と画分 4–5 において抗トキソプラズマ活性が見られたため、画分 4–5 を用いてスペクトル解析を行った。その結果、EI によるライブラリサーチによって画分 4–5 にはトリテルペノイドの一種である olean-12-en-28-oic acid 並びに構造異性体である olean-12-en-29-oic acid が約 1:2 の割合で含まれていることが示唆された。

今後は画分 4–5 に含まれる両異性体を HPLC を用いて分離し、抗トキソプラズマ活性を持つ物質を確定させる予定である。さらに、今回活性が見られた画分 9、画分 4–4 に関しても同様にさらなる分画を進め、活性物質の単離・構造決定を行う予定である。

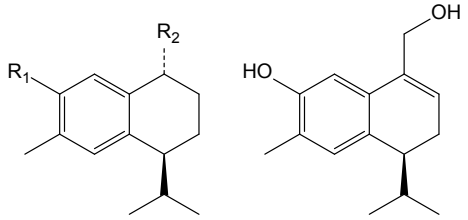
isolation, *Toxoplasma gondii*

発表番号：3B024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アレチオグルマ地上部滲出物に含まれるセスキテルペン類と誘導体の生物活性
# Phytotoxicity and insect antifeedant activity of sesquiterpenes from camphorweed exudate.

○森田 遼、森本 正則、松田 一彦（近大農院）
○Ryo Morita, Masanori Morimoto, Kazuhiko Matsuda (Kinki Univ.)

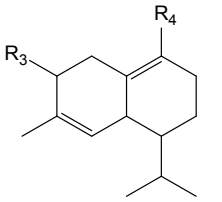
【目的】キク科植物アレチオグルマ（*Heterotheca suhaxillaris* (Lam.) Britt.& Rusby）は、アメリカ南部に分布する一,二年生草本で、九州に帰化が確認されている。これまでに本種地上部滲出物由来のカラメネン型セスキテルペンカルボン酸やその生合成前駆体と考えられるカジネン型セスキテルペン類の植物生長阻害活性と昆虫摂食阻害活性を報告した[1,2]。本研究では、新規カジネン型セスキテルペンの絶対立体配置を含む構造決定と構造活性相関を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】本種地上部をジクロロメタンで洗浄して得られた滲出物をからカラメネン型セスキテルペンカルボン酸（**1**~**3**）とアルコール（**4**, **5**）、カジネン型セスキテルペン（**6**~**10**）、ビザボロール（**11**）などを単離した。化合物 **8** と **9** の絶対立体配置は、改良モッシャー法と X 線結晶構造解析により 3*R*、6*R*、7*S* と決定した。化合物 **10** も同様に 3*R* と決定した。植物生長阻害活性試験においては、カラメネン型はカジネン型よりもレタス（*Lactuca sativa* L. cv. greatlakes）およびネズミムギ（*Lolium multiflorum* Lam. cv. wasefudo）幼苗に対して高活性を示したが、**6** と **7** はネズミムギに対してカラメネン型よりも高活性を示した。構造活性相関からカルボキシル基、α,β-不飽和カルボニル基、メトキシ基の存在が供試植物に対する植物生長阻害活性に大きく寄与する傾向が認められた。一方、ハスモンヨトウ（*Spodoptera litura* F.）3 齢幼虫に対する摂食阻害活性では、カラメネン型およびカジネン型で同様な活性が認められ、供試化合物中で **11** が最も高活性であった。特にアセチル基が存在するとこの昆虫摂食阻害活性を上昇させる傾向が認められた。



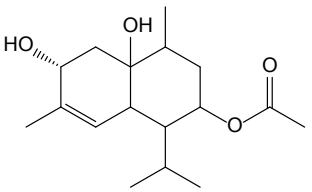

**1** $R_1$ = OH $R_2$ = COOH
**2** $R_1$ = OAc $R_2$ = COOH
**3** $R_1$ = $OCH_3$ $R_2$ = COOH
**4** $R_1$ = OH $R_2$ = $CH_2OH$



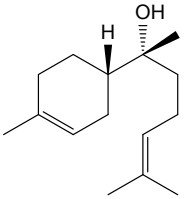

**5**




**6** $R_3$ = H $R_4$ = CHO
**7** $R_3$ = H $R_4$ = $CH_2OH$
**8** $R_3$ = OH $R_4$ = CHO
**9** $R_3$ = OH $R_4$ = $CH_2OH$




**10**




**11**

1) Morimoto, M. *et. al. Phytochemistry* **70**, 69-74 (2009)
2) 森田 遼ら：日本農芸化学会, 岡山, (2015)

Camphorweed, Sesquiterpene, phytotoxicity

発表責任者：森田遼（morita.ryo.0331@gmail.com）

発表番号：3B025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# プリン塩基の過冷却促進活性の検索とその諸性質

# The characteriztaion and screening of supecooling facilitating material of purine base

○田川 絵理、濱田 純、濱田 沙也加、河原 秀久（関西大化生工）
○Eri TAGAWA, Jyun HAMADA, Sayaka HAMADA, Hidehisa KAWAHARA (Kansai Univ.)

【緒言】

過冷却促進物質（抗氷核活性物質）とは氷核の形成を阻害する物質である。この物質を含有した場合、水溶液中の異物が氷核になりにくくなる。我々の研究室では、クローブやヒノキなどから分離したポリフェノールが抗氷核活性を有することを明らかにしてきた。過冷却促進され、冷凍された場合、冷凍食品中の氷結晶が細かくなることから、食品分野への応用が期待されている。しかし、これらの食品医療分野への応用を考慮すると安価に生産できることが困難であり、医療分野においては、単独の製剤としての利用が必要であった。本研究では、食品加工廃棄物であるコーヒー粕に着目し、そこに含まれる過冷却促進物質の同定とその化合物に関連した既知試薬物質の過冷却効果について検討した。

【実験方法】

コーヒー粕 100 g(乾燥重量)に 10 倍量の水を加え、熱水抽出処理(90℃、60 min)した。この抽出液は分子量 10,000 以下で分画し、その後 HCl を用いて pH 2.0 に調製した。さらに、抽出溶液に対して 2 倍量の酢酸エチルを用いて溶媒分画を行った。この酢酸エチル層は回収し、乾固後、水に 1 mg/ml になるように再溶解したものを過冷却促進物質含有エキスとした。過冷却促進活性（抗氷核活性）は微水滴凍結法を用いて測定した。1 mg/ml に懸濁したヨウ化銀溶液 0.9 ml に水あるいはサンプル 0.1 ml 添加し、十分に懸濁後、核形成温度を測定し、両温度差を抗氷核活性値(℃)とした。

【結果】

コーヒー粕エキス 1 mg/ml の抗氷核活性値は 2.6℃であった。そのエキスを逆相クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーで分離したところ、過冷却促進物質の一つが、カフェインであることが分かった。現在、他の活性成分（3 種）については分離し、構造解析中である。カフェインに過冷却促進効果を確認できたことから、カフェインと構造が類似しているプリン塩基関連物質に関しても抗氷核活性値を測定した。そのうちアデニンやグアニンの活性は各々3.4℃、1.9℃であった。他のプリン塩基（キサンチン、ヒポキサンチンなど）も活性を示し、抗酸化力の高い尿酸も約 1.8℃の活性を示した。このアデニンの活性は濃度 1 mg/ml 以上になるとその抗氷核活性値は約 3.4℃に一定になることが明らかになった。現在は、このプリン塩基の濃度および組み合わせによる抗氷核活性値についても検討を行っている。

supercooling facilitating material, coffee refuse, caffeine

発表責任者：河原秀久（kawahara@kansai-u.ac.jp）

発表番号：3B026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Eurycoma longifolia* からの脂肪分解促進物質の探索

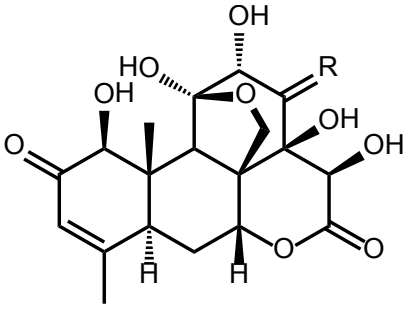
Isolation of lipolysis-promoting compounds from the root of *Eurycoma longifolia* Jack

○廣澤 亮太、ルーシー ラーリタ、加藤 英介、川端 潤（北大院農）
○ RYOTA HIROSAWA, Lucy Lahrita, Eisuke Kato, Jun Kawabata (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

**研究背景）** 肥満患者数は世界中で増加傾向にある。肥満対策研究の 1 つに、脂肪モデル細胞 3T3-L1 での脂肪蓄積量を指標とした天然素材からの脂肪蓄積抑制物質の探索がある。インドネシア産薬用植物をスクリーニングした結果、*Eurycoma longifolia* Jack の根抽出物に脂肪蓄積抑制活性を見出した[1]。そこで *E. longifolia* の根から活性物質の探索を行うこととした。

**方法）** 脂肪蓄積抑制活性には脂肪生合成の抑制もしくは脂肪分解の促進の 2 つの機序があるが、今回は後者に焦点をあてる事とした。脂肪分解の促進は、トリグリセリドの分解に伴うグリセロールの遊離量を定量する事で評価した。分化させた 3T3-L1 細胞に被験物質を添加し、24 時間後に培養上清中のグリセロールを定量し、コントロールのグリセロール遊離量との比較により被験物質の活性を算出した。

**結果）** *E. longifolia* の根 200 g を 50%メタノール水溶液で 1 日抽出後、得られた抽出物を水と酢酸エチル、1-ブタノールで溶媒分配を行い、それぞれについて活性試験を行った。活性が確認された 1-ブタノール可溶画分を各種カラムクロマトグラフィーに順次供した後、分取 HPLC により精製した。その結果、Eurycomanone (**1**)、およびその類縁体である 13β,21-Epoxyeurycomanone (**2**)、13β,21-Dihydroxyeurycomanone (**3**)を単離した。単離した 3 つの化合物をグリセロール遊離促進活性試験に供した結果、**1**、**2** において 6.25～200 μM の範囲で濃度依存的なグリセロール遊離量の増加が確認できた。また 25 μM 添加時にコントロールと比較して **1** では 236%、**2** では 280%のグリセロール遊離量の増加が見られエポキシ体 (**2**)の活性が **1** よりも強いことが確認された。さらに **1**-**3** の脂肪蓄積抑制作用を評価するため、分化させた 3T3-L1 細胞に各化合物を添加して 5 日間培養した後、蓄積された脂肪量を Oil Red O 色素により染色して評価した。その結果 25 μM 添加時に **1** では 90%、**2** では 77%まで脂肪量の抑制が見られた。また、分化した 3T3-L1 細胞に対し、各単離化合物は細胞毒性を示さなかった。現在、脂肪分解に関与する作用機序を検討中である。




**1**：R = $CH_2$
**2**：R = β-epoxide
**3**：R = OH, $CH_2OH$

1 Lahrita et al., *Journal of Ethnopharmacology ,* **2015**, 168, 229-236

*Eurycoma longifolia*, Lypolysis, Obesity

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3B027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ホオノキ（Magnolia obovata）の果実に含まれる高極性成分について

Highly polar chemical constituents from the fruits of Magnolia obovata

○武田 滉平、小松 翔、網干 貴子、塩野 義人、村山 哲也（山形大農）
○KOHEI TAKEDA, SYO KOMATSU, TAKAKO ABOSHI, YOSHIHITO SHIONO, TETSUYA MURAYAMA (Yamagata Univ)

【目的】当研究グループでは、高等植物に含まれる生理活性物質について研究してきた。本発表では、その一環として、ホオノキの果実に含まれる成分の高極性画分に着目し、配糖体成分を得たので報告する。
【方法と結果】山形県朝日村で採集したホオノキ（*Magnolia obovata*）の果実 1.78Kg をメタノールに浸漬した後、ヘキサンと酢酸エチルで分画した。残った水層はさらに DIAION HP-20 に付し、水、メタノール、クロロホルムで順次溶出させた。レタス幼植物を使った植物成長調節活性試験で地下部の成長を抑えたメタノール溶出画分について、TLC 上での発色をもとにシリカゲルクロマトグラフィーなどにより、二種の化合物１と２を単離した。化合物１の $^{1}$H-NMR から、シナピルアルコール等に特有のメトキシル基２本分のシグナルが 3.75ppm に、ベンゼン環上の対称な 2H 分のプロトンが 6.65ppm にシングレットとして観察された。また、$^{13}$C-NMR では 102.8ppm にアノメリックカーボンが１本観察されたことから、配糖体であることが示唆された。一方、シナピルアルコールに特有なトランス２重結合は $^{1}$H、$^{13}$C-NMR の両方から観察されなかったこと、六単糖由来以外の水酸基付け根のメチンカーボンとメチレンカーボン、橋頭由来と考えられるメチンカーボンが 53.8ppm に観察されたことから、シナピルアルコールの配糖体のプロピル基がフラン環を形成し、そのフラン環を介して二量体を形成した化合物であることが示唆された。化合物２の $^{1}$H-NMR から、7.10 と 7.24ppm に各々2H 分のオルトカップリングしたシグナルと、5.32ppm にアノメリックプロトンが観察されたことより、アルブチン様の *p*-ヒドロキノン配糖体であることが示唆された。

Magnolia obovata, glycoside, lignan

発表責任者：武田　滉平（a15014m@st.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：3B028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# マタタビ蔓に含まれる HL-60 増殖抑制物質の探索

# Search of the HL-60 increase inhibitor form a *Actinidia polygama* extract

○三浦 清宏[1]、常盤野 哲生[2]、中村 祐美子[2]、川井 悟[3]、吉澤 結子[2]([1]秋田県立大生資科院、[2]秋田県立大生資科、[3]東京電機大理工)
○ Kiyohiro MIURA[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Yumiko NAKAMURA[2], Satoru KAWAI[3], Yuko YOSHIZAWA[2] ([1]Akita Pref. Univ. Grad Sc., [2]Akita Pref. Univ., [3]Tokyo Denki Univ.)

【諸言】

薬用植物と呼ばれるもののなかには、効能が認められているものの有効成分が解明されていないものも多く、これらの解明によって、これら植物のより効果的な利用法の開発が期待される。生薬として利用されている植物の一つであるマタタビ（*Actinidia polygama*)の果実抽出物には、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制活性が確認されている。そこで本研究では、マタタビの植物体や乾燥生薬を材料とし、HL-60 増殖抑制活性を指標として活性成分の解明を目指した。

【実験方法】

*A. polygama* の果実、虫エイ付果実、葉、蔓、および、市販生薬である虫エイ付果実と蔓の乾燥品を材料として用いた。それぞれをメタノール浸漬し、不溶物をろ過した後に溶媒を減圧留去し、それぞれの粗抽出物を得た。HL-60 に対する活性試験は 10%牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地を用い 37℃、5%$CO_2$ 条件下で維持した HL-60 に、最終濃度が 50.0 ppm から始まる公比 4 倍の希釈系列で抽出物試料を添加し、72 時間培養した。その後、alamar Blue® 色素を添加し、さらに 24 時間培養し、吸光度を測定して $IC_{50}$ 値を求めた。生薬由来の蔓抽出物から、HL-60 増殖抑制活性試験を指標に各種クロマトグラフィーにて分画・精製を行い、単離した化合物は NMR 等の機器分析によって構造解析を行った。また、脂肪酸組成については、誘導体化の後に GC あるいは GC-MS にて定量した。

【結果】

当研究室の先行研究として､果実のエタノール抽出物に HL-60 に対するアポトーシス活性を見出し、また、HL-60 増殖抑制物質の一つとして 7-ヒドロキシクマリンを単離したが、これだけでは粗抽出物の活性を十分には説明できなかった。そこで、生薬として用いられているマタタビ蔓乾燥品のメタノール抽出物について有効成分の精製を試みたところ、活性のある分画は NMR 等の機器分析により脂肪酸が主成分であり、脂肪酸が活性に寄与していることが推察された。そこで、標品の脂肪酸で活性を精査するとともに、植物体から得られた果実、虫エイ付果実、葉、蔓、および、市販生薬の乾燥品果実と蔓の脂肪酸組成を調べ､活性への寄与について検討したので､それらの結果について報告する。

*Actinidia polygama*, HL-60, inhibition

発表番号：3B029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ピーチ由来の高純度グルコシルセラミドの精製

# Preparation of extra pure glucosylceramides from crude peach ceramides

○藤野 和孝、松本 恵実、牧岡 富広、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○ Kazutaka FUJINO, Emi MATSUMOTO, Tomihiro MAKIOKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co. Ltd.)

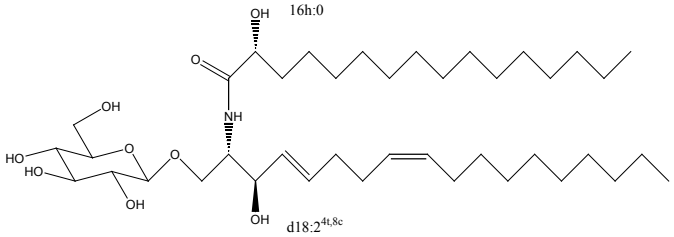
【目的】

植物の主要なスフィンゴ糖脂質である植物セラミド（グルコシルセラミド）は、保湿効果や抗アトピー効果が期待される機能性素材として注目され、抗腫瘍効果も報告されている。米、キノコなどから抽出された植物セラミドは健康食品、化粧品原料等として使用されているが含量 (3～5%) が低く、しかも植物種によって炭素鎖長等が異なる数十種類の類縁体混合物である。これらの詳細な機能解明には、各植物種に由来する純粋なグルコシルセラミド類の標準品と共に、それぞれの構成成分標準品の開発が必要である。これまで様々な植物セラミドを精製してきたが、今回注目したピーチセラミドは、皮膚中に含まれるセラミドの産生増加作用があり、皮膚の保湿効果・バリア機能を増加させることが示唆されており、さらなる研究発展のためにピーチグルコシルセラミド類[1),2)]の精製を検討した。

【方法・結果】

これまで独自に開発した分離精製技術を利用して米、たもぎ茸、舞茸、トウモロコシ、蒟蒻、大豆、小麦、ビートといった様々な植物由来のグルコシルセラミド類標準品を９９%以上の高純度かつ大量に精製することに成功した。同様の方法を用いてピーチのグルコシルセラミド類の精製を行い、高純度グルコシルセラミドを大量に得ることができた。

また、グルコシルセラミド類は順相 TLC 上において１スポットと表現されてきたが、ピーチセラミドの分離精製をしていた際に、そのスポットから外れた位置にグルコシルセラミド構造の化合物が検出された。これをさらに単離、構造解析を行っていきたい。




ピーチグルコシルセラミド主成分

*1) 杉森大輔、高瀬つぎ子、高桑直也, セラミド研究会　第一回学術集会(H20. 11. 21).*
*2) D. Sugimori and H. Suzuki, Kokai Tokkyo Koho(2010), JP 2010-120892.*

Glucosylceramide, Ceramide, Peach

発表番号：3B030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Isolation and biosynthesis of novel methylbenzene-containing polyketides from a Streptomyces that spontaneously acquired rifampicin resistance

○Wei li THONG, Makoto NISHIYAMA, Tomohisa KUZUYAMA (BRC, Univ. of Tokyo)

Actinomycetes are important microbial sources prominent for their capability of producing a wide range of naturally derived antibiotics used clinically. Despite the success of the microorganism as a source for drug discovery, conventional bioactive compounds screening have been deemed stagnant due to the high rates of rediscovery of known compounds. On the contrary, genome sequencing disclosed that each actinomycete has more than 20 biosynthetic gene clusters; many are classified as cryptic or orphan and predicted to encode different structural classes of secondary metabolites. To explore these potential novel compounds, we implemented a cryptic gene activation strategy by screening of mutants conferring rifampicin resistance. Screening of rifampicin-resistant (*rif*) mutants in 11 actinomycete strains generated 164 mutants. Comparative metabolic analysis of these *rif* mutants along with their wild-type strains has led to the identification of 2 unprecedented compounds by a mutant (TW-R50-13). Two distinct features are present in these novel compounds, namely, the $C_5N$ and methylbenzene moieties. Of these partial structures, the biosynthesis of the latter has not been reported. The gene deletion experiments showed that the genes for the methylbenzene moiety are located at a different locus than the genes for the $C_5N$ unit. A feeding experiment using $^{13}C$-labeled precursors demonstrated that the methylbenzene moiety is most likely synthesized by the action of polyketide synthase (PKS). *In silico* screening along with the gene deletion experiments revealed that a gene cluster containing discrete ketosynthases is responsible for the biosynthesis of the methylbenzene moiety. The biosynthetic mechanism of this possibly, a new type of PKS is currently unknown. Further investigations on the gene cluster are under way.

cryptic gene activation, secondary metabolites, polyketide synthase

発表責任者：THONG Wei li（serenethong@hotmail.com）

発表番号：3B031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ベンザスタチン類生合成に関与する新規ゲラニル二リン酸-6-メチル化酵素の機能解析

# Functional analysis of a novel geranyl diphosphate-6-methyltransferase in the pathway for the biosynthesis of benzastatins

○堤 隼馬[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]AIST)
○Hayama Tsutsumi[1], Youhei Katsuyama[1], Kazuo Shin-ya[2], Yasuo Ohnishi[1] ([1]Grad. Sch. Agri and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]AIST)

【背景・目的】ベンザスタチン類は様々な *Streptomyces* 属放線菌より単離されたアルカロイドであり、多種多様な構造や生理活性を有することから、その生合成には非常に興味が持たれる。[1)] これまでにベンザスタチン類生合成遺伝子クラスターの同定、遺伝子クラスターの異種発現、異種発現株での各生合成遺伝子の破壊により、ベンザスタチン類生合成が *p*-aminobenzoic acid (PABA) のゲラニル化、これにより生じたゲラニル化 PABA (7-hydroxyl benzastatin J (**1**)) の様々な修飾による直鎖状ベンザスタチン類の合成、直鎖状ベンザスタチン類の環化によるインドリン環、キノリン環を持つ環状ベンザスタチン類の合成により生じることが予測された。[2), 3)] このようにして、生合成経路の全体像は明らかとなったが、個々の反応の詳細は不明であった。このため、本研究では *in vitro* 解析により、さらに詳細な生合成経路の解明を試みた。
【結果】これまでの研究によりベンザスタチン類生合成経路において PABA のゲラニル化に続く反応が BezA (methyltransferase) によるメチル化反応であることが示唆された。そこで、BezA の組換えタンパク質を取得し、*in vitro* にて **1** のメチル化反応を試験した。その結果、予想外なことに **1** に対するメチル化反応は確認することができなかった。このとき、メチル基供与体である *S*-adenosyl methionine (SAM)のメチル基供与後の変換物である *S*-adenosyl-L-homocysteine (SAH) の蓄積も見られなかった。そこで、ゲラニル化の前にメチル化反応が生じると考え、geranyl diphosphate に対して同様のアッセイを行った。その結果、SAM の消費がみられ、SAH の蓄積が見られた。この結果と、**1** がメチル化された化合物の構造から、BezA は **1** ではなく、geranyl diphosphate を基質として受け入れること、この反応により 6-methylgeranyl diphosphate が合成されることが示唆された。これまでに、polyprenyl diphosphate の直接の修飾反応としては geranyl diphosphate の 2 位のメチル化反応のみが知られている。[4)] BezA は geranyl diphosphate の 6 位をメチル化する点でこのメチル基転移酵素とは異なる。BezA はテルペノイド代謝工学による新規テルペノイド生産のための有用なツールとなり得ると考えられる。現在、この酵素の基質特異性の解析などを進めている。

【文献】1) Motohashi, K, *et al. J. Antibiot* 64, 281 (2011); 2) 林ら, 2012 年度日本放線菌学会大会要旨集, 62 (2012) ; 3) 堤ら, 2015 年度日本放線菌学会大会要旨集, 97 (2015) ; 4) Komatsu, M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7422 (2008),

secondary metabolite, biosynthesis, terpenoid

発表番号：3B032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 13C 同位体を用いた微生物由来ジテルペノイド環化機構の解明

# Study of cyclization mechanism of microbial diterpene using 13C isotope

○中川 和也[1]、菅井 佳宣[1]、千葉 康隆[2]、三橋 渉[2]、夏目 雅裕[1]、豊増 知伸[2]、川出 洋[1] ([1]東京農工大院農、[2]山形大農)

○ Kazuya Nakagawa[1], Yoshinori Sugai[1], Yasutaka Chiba[2], Wataru Mitsuhashi[2], Masahiro Natsume[1], Tomonobu Toyomasu[2], Hiroshi Kawaide[1] ([1]Tokyo Univ. Agric. Technol., [2]Yamagata Univ.)

【研究背景・目的】

Fussicoccins の基本骨格である fusicocca-2,10(14)-diene の生合成遺伝子である *PaFS* は、N 末端側にジテルペン環化（CT）ドメイン、C 末端側にプレニルトランスフェラーゼ（PT）ドメインを持つユニークなキメラ型ジテルペン合成酵素（DS）をコードしている。今回我々は、*Aspergillus oryzae* のゲノム上にキメラ型 DS のホモログ（*AoDSL1*、*AoDSL2*）を新たに発見したため、その機能解析と触媒メカニズムの解明を目指した。

【実験方法と結果】

AoDS1、AoDS2 をそれぞれ大腸菌で異種発現し、組み換え酵素を用いて *in vitro* 試験を行った。その結果、AoDS1 は CT 活性のみを示したが、413 番目の終始コドンを Y に置換した変異体を作成し、同様に反応させたところ PT 活性も有することが示された。また AoDS2 は活性を示さなかった。次に AoDS1 プロダクトの構造解析を行うため、酵素カクテルを用いてプロダクトの炭素全てを $^{13}$C 同位体で標識し、一次元、多次元 NMR に供した。その結果、AoDS1 プロダクトは 5-5-9 員環の構造を有するジテルペンであった。また一部のイソプレンユニットのみを $^{13}$C で標識した isoprene unit isotopomers（IUI）を作成し、$^{13}$C NMR のスペクトル、カップリングパターンを比較したところ $^{13}$C15 体は C-11 が標識されていないことが示され、5-5 員環を形成するイソプレンユニットが開裂していることが明らかになった。これは生合成の過程で 2 回の炭素転移反応が起こっているためと考えられる。この転移反応を含む生合成反応は他の 5-5-x 員環構造を持つ微生物由来のジテルペノイド（Phomopsene、Conidiogenol）にも共通して存在すると推測される。

IUI を用いた反応メカニズムの解明は多様なイソプレノイド化合物に応用でき、$^{13}$C だけでなく重水素も組み合わせて使用することでヒドリドシフトなどを含む複雑な反応メカニズムの解明も可能であるため、現在実験に取り組んでいる。

diterpene, isotopomer, rearrangement

発表番号：3B033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 変異酵素を用いた非リボソームペプチド JBIR-34, -35 生合成の in vitro 解析

# In vitro analysis of the biosynthesis of nonribosomal peptides JBIR-34 and -35 using mutant enzymes

○曽根 薫[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]AIST)
○Kaoru SONE[1], Yohei KATSUYAMA[1], Kazuo SHIN-YA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]AIST)

背景・目的　JBIR-34 (**1**) ,-35 (**2**)は放線菌 *Streptomyces* sp. Sp080513GE-23 が生産する非リボソームペプチドであり、天然では非常に珍しい 4-メチルオキサゾリン構造をもつ[1]。**1**, **2** 生合成に関して以下のことが判明している。まず非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）FmoA2、A3、A4、A5 がそれぞれ 6-chloro-4-hydroxyindole-3-carboxylic acid（**2** の場合。**1** の場合は生合成遺伝子クラスター外にコードされた酵素によってインドール 5 位が *C*-メチル化されたものが用いられる。）、α-methyl-L-serine、D-alanine、L-serine を自身にロードする。ロードされた基質は上に示した順にペプチド結合を形成し、その過程でヘテロ環化、*N*-メチル化を受ける。最後にペプチド鎖が FmoA5 から遊離することで **1**, **2** が生成する。4-メチルオキサゾリン構造は α-methyl-L-serine が FmoA3 上でヘテロ環化することで形成されると予想される[2]。しかしながら、FmoA2、A3 がともにヘテロ環化（Cy）ドメインを有しており、これらの機能が未解明である。また、FmoA2、A4 はともにメチルトランスフェラーゼ（MT）ドメインを有するが、どちらが *N*-メチル化を触媒しているのかも明らかになっていない。以前、発表者らは FmoA2、A3、A4、A5 とそれらに対応する基質、SAM、ATP を用いて **2** の生合成を *in vitro* で再構成した。この方法を使って、**1**, **2** の生合成をより詳細に解析した。
結果・考察　既知の Cy ドメインとの配列比較に基づき、FmoA2、A3 の Cy ドメインのペプチド結合形成活性に必須な残基を予測し、これらのアミノ酸をアラニンに置換した変異 FmoA3 と FmoA2 を構築した。これらの変異タンパク質を用いて反応を行ったところ、FmoA2 の変異タンパク質を使用すると **2** が生成しなくなったが、FmoA3 の変異タンパク質を使用すると通常どおり **2** が生成した。このことから、FmoA2 の Cy ドメインのペプチド結合形成活性は **2** の生合成に必須であるが、FmoA3 の Cy ドメインのペプチド結合形成活性は必要でないことがわかった。同様の方法で FmoA2、A4 の各 MT ドメインを不活性化した変異タンパク質を調製し、これらを *in vitro* 生合成反応に用いた。その結果、FmoA2 の変異タンパク質を用いた場合は **2** の生成量が大幅に減少し、*N*-demethyl-JBIR-35 が生成した。一方、FmoA3 の変異タンパク質を用いた場合は、通常の FmoA3 を用いた場合と同様に **2** が生成した。このことから、*N*-メチル化は FmoA4 の MT ドメインではなく、FmoA2 の MT ドメインが触媒することが示された。現在、基質アナログを用いた解析や、他の活性部位に変異を導入することで、**1**, **2** 生合成機構のさらなる解析を行っている。

[1] Motohashi *et al.* (2010) *J. Nat. Prod.*, **73**, 226. [2] Muliandi *et al.* (2014) *Chem. Biol.*, **21**, 923.

biosynthesis, nonribosomal peptide, streptomyces

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3B034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# オオスカシバ幼虫のクチナシ防御物質に対する対抗適応機構

# Counter-adaptation mechanism of *Cephonodes hylas* larvae to defense substance of *Gardenia jasminoides*

○志野 真実子[1]、内藤 裕彬[1]、齊藤 準[2]、吉永 直子[1]、森 直樹[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京工繊大・応生）
○Mamiko SHINO[1], Hiroaki NAITO[1], Hitoshi SAITO[2], Naoko YOSHINAGA[1], Naoki MORI[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Institute of Technology)

[背景・目的]

アカネ科クチナシ *Gardenia jasminoides* の葉には, イリドイド配糖体 gardenoside (図. 1) が多量に含まれる．クチナシを食草としないハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 幼虫を用いた研究から，β-glucosidase によって遊離する gardenoside アグリコンに生育阻害活性があることが分かっている．このアグリコンは，幼虫腸管内に含まれるタンパク質と反応するため，ハスモンヨトウ幼虫に限らず，他の昆虫に対しても同様の生育阻害活性を持つと予想される．ところが，自然界にはクチナシを食草として生育するオオスカシバ *Cephonodes hylas* 幼虫が存在する．そこで本研究では，オオスカシバ幼虫におけるクチナシ防御物質に対する対抗適応機構の解明を目的として，クチナシを食草としないハスモンヨトウ幼虫を比較対象とすることで，新たな知見を得ようと考えた．

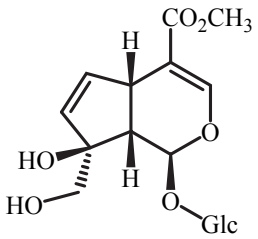


図. 1 Gardenoside の構造

[方法・結果と考察]

オオスカシバ幼虫に gardenoside アグリコン含有人工飼料を摂食させたところ，生育阻害が見られた. そこで, オオスカシバおよびハスモンヨトウの幼虫にクチナシの生葉と加熱葉を摂食させた後，糞中の gardenoside 濃度を LC/MS 分析により測定した．その結果，生葉摂食時における gardenoside 残存率を算出したところ，オオスカシバ幼虫では残存率が高くなった．このことは，オオスカシバ幼虫は，摂食した葉に含まれる gardenoside からアグリコンを生成させずに配糖体のまま排出しているものと考えられる．次に，生葉を摂食したオオスカシバ幼虫の体液とマルピーギ管を LC/MS で分析したところ，高濃度の gardenoside が検出された．一方，ハスモンヨトウ幼虫の体液中には，gardenoside は微量しか検出されなかった．これらの結果から，オオスカシバ幼虫は gardenoside を一度体液に吸収した後，マルピーギ管を通して排出しているものと考えられる．体液を介した経路をとれば, 腸管内に存在する β-glucosidase との反応で生じるアグリコン量を低下させることができる．このことから，オオスカシバ幼虫に特異的なクチナシ防御物質に対する対抗適応機構の一端が説明できる．

iridoid, *Gardenia jasminoides*, *Cephonodes hylas*

発表番号：3B035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# リンゴ果実に昆虫による食害で誘導される化合物群の動態の比較

# Comparison of dynamics between compounds induced in apple fruit by insect damage

○森田 沙代[1]、吉永 直子[1]、石栗 陽一[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]青森産技セ りんご研)
○Sayo MORITA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Yoichi ISHIGURI[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center)

【背景・目的】

リンゴ果実はモモシンクイガ幼虫の食害を受ける．樹に着果している果実に侵入した幼虫の生存率は樹から切り離した果実に侵入した幼虫の生存率と比べ低いことが報告されている[1)]．植物は二次代謝産物を合成して病害虫から身を守ることから，食害によって誘導される何らかの二次代謝産物がその要因となっていると示唆される．また，千雪，ふじ，春明 21 の 3 品種のリンゴの果実を比較すると品種によって幼虫に対する抵抗性に差が見られる．この差は品種間の二次代謝産物の組成の違いによると思われる．これらの抵抗性の要因となる化合物の探索を試みた．

【方法・結果】

健全リンゴ果実およびモモシンクイガ幼虫に食害されたリンゴ果実をメタノールで抽出し，LC/MS 分析に供した．健全果実には痕跡量あるいは少量しかなく，食害果実のみに誘導される複数の化合物がプロトン付加イオン $[M+H]^+$ として見られた．

食入部付近を約 3 mm 角の賽の目状に細かく切り分け，食害で誘導される化合物の分布の局在性を調べた．その結果，局在性が高く食害部のごく近傍のみに存在する化合物として，昨年度の大会で報告したトリテルペン 3-oxo-TA およびその類縁体が存在した．局在性が低く食害部周辺の広い範囲に分布する未知化合物 A (*m/z* 361)，B (*m/z* 559) も見られた．未知化合物 C (*m/z* 409)， D (*m/z* 520) は外果皮に誘導された．これらの化合物の誘導量について千雪，ふじ，春明 21 の 3 品種で比較したところ，抵抗性が低い千雪では多くの化合物の誘導量が少なかった．

局在性の違いは誘導機構の違いに起因する可能性があり，品種間における誘導量の違いも含めて，これらの化合物の病害虫抵抗への寄与を突き止める手掛かりとなると考えられる．

1) Ishiguri, Y., Toyoshima, S. Appl. Entomol. Zool., 41, 685-690, 2006

apple fruit, insect damage, induction

発表番号：3B036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ヒカゲノカズラ由来オノセリンおよびセラタン型トリテルペンの生合成遺伝子の同定
Identification of the cyclase genes involved in onoceroids biosynthesis in *Lycopodium clavatum*

○佐賀 裕亮[1]、荒木 健志[1]、丸上 萌々[1]、大高 潤之介[1]、荒谷 博[1]、斉藤 和季[2]、山崎 真巳[2]、鈴木 秀幸[3]、久城 哲夫[1]([1]明大農、[2]千葉大薬、[3]かずさ DNA 研)
○Yusuke SAGA[1], Takeshi ARAKI[1], Momo MARUGAMI[1], Junnosuke OTAKA[1], Hiroshi ARAYA[1], Kazuki SAITO[2], Mami YAMAZAKI[2], Hideyuki SUZUKI[3], Tetsuo KUSHIRO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Chiba Univ., [3]Kazusa DNA Res. Inst.)

トリテルペンは、高等植物から微生物まで幅広い生物群で生産される二次代謝産物であり、分子構造の多様性からもたらされる様々な生理活性を有する重要な化合物群である。なかでも onoceroids は、二環ずつ両端が環化した onocerane 骨格や、中央の C 環が 7 員環構造の serratane 骨格のような左右対称構造を有する特異なトリテルペンである。トリテルペンは、通常、oxidosqualene を基質にオキシドスクアレン環化酵素（OSC）によって生合成されるが、onoceroids はその特徴的な構造より dioxidosqualene を基質に両側の末端エポキシドからそれぞれ環化して生成することが推測されている。そこで本研究では、シダ植物であるヒカゲノカズラ（*Lycopodium clavatum*）より onoceroids 生合成酵素遺伝子の同定を試みた。これまでに、ヒカゲノカズラ由来の 3 種の OSC 様遺伝子（*LCA*、*LCB*、*LCC*）について lanosterol 合成酵素欠損（*erg7*）酵母変異株 GIL77 を用いた機能解析を行ったところ、*LCC* を発現させた酵母において、dioxidosqualene の片側の二環のみが環化した新規トリテルペン化合物（pre-α-onocerin）の生産が確認されたことを報告した。さらに、ヒカゲノカズラの EST データから得られたコンティグの OSC 配列を解析したところ、新たに 2 種の OSC 様遺伝子（*LCD*、*LCE*）が確認された。*LCD* と *LCC* を酵母内で共発現させたところ、onocerane 骨格をもつα-onocerin の生産が確認された。*LCD* 単独での発現では生成物が確認されなかったことから、LCC がα-onocerin 中間体である pre-α-onocerin を生成し、それを基質として LCD がα-onocerin の生成を行うことが示された。一方、*LCE* と *LCC* を酵母内で共発現させた結果、serratane 骨格を有する tohogenol ならびに serratenediol の生産が確認された。Serratane 骨格を生成する環化酵素は初めての報告である。*LCE* 単独の発現では生成物が確認されなかったことから、LCD と同様に LCE も pre-α□onocerin を基質とし、2 段階目の環化反応を触媒する酵素であることが明らかとなった。以上の結果より、ヒカゲノカズラ由来 onoceroids の生合成には 2 種類の異なる酵素が関与し、2 段階の環化反応をそれぞれ触媒することが明らかとなった。1 段階目の環化では、LCC が dioxidosqualene を基質として pre-α-onocerin を生成し、引き続く 2 段階目の環化において、pre-α-onocerin を共通の基質とする LCD 及び LCE が、骨格の異なる onoceroids を作り分けていることが初めて明らかとなった。

α-onocerin, Serratane, Triterpene

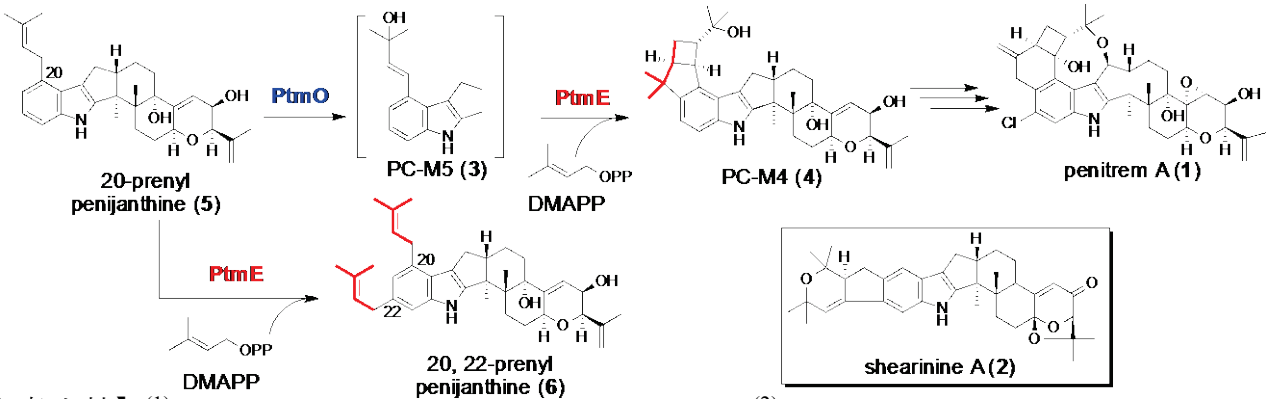
発表番号：3B037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# インドールジテルペン生合成における特異な骨格修飾酵素の機能解析
# Functional analysis of modification enzymes in the biosynthesis of indole diterpene

○劉 成偉[1]、南 篤志[1]、スコット バリー[2]、五味 勝也[3]、大利 徹[4]、及川 英秋[1]([1]北大院理、[2]Massey University、[3]東北大院農、[4]北大院工)
○Chengwei LIU[1], Atushi MIAMI[1], Barry SCOTT[2], Katsuya GOMI[3], Tohru DAIRI[4], Hideaki OIKAWA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Massey Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [4]Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【目的】糸状菌が生産するインドールジテルペンはインドールの骨格にポリプレニル鎖を付加した後、環化、水酸化、プレニル化など修飾を受け多くの誘導体が合成される。最近、我々はインドール環に連結した特徴的な 4/6 縮環構造を有する penitrem (**1**)の生合成研究を行うことで、プレニル基転移酵素(PtmE)と酸化酵素(PtmO)がその環構造の構築において重要であることを明らかにした。本発表では、**1** の生合成におけるプレニル基転移酵素 PtmE の精密機能解析に加え、shearinine (**2**)生合成遺伝子クラスター中に見出されたホモログ酵素の機能解析について報告する。

【方法・結果】**1** や **2** などインドールジテルペンはインドール環での骨格修飾様式によって多様性が見られる。我々は麹菌異種発現系と *in vitro* 反応を併用することで、**1** の全生合成経路を解明した[(1)]。興味深いのは、プレニル基転移酵素 PtmE は PC-M5 (**3**)を基質として特徴的な 4 / 5 員環を有する PC-M4 (**4**)を生成することが明らかにした。さらに、基質特異性を検討したところ、生合成中間体である 20-prenylpenijanthine (**5**)も基質となり、ジ-プレニル化体 20, 22-prenylpenijanthine（**6**）生成することが分かった。両基質の *kcat/Km* 値を測定した結果、**3** は **5** より 90 倍高かった。PtmE は一般的なプレニル基付加反応に対して、特徴な 4/5 員環形成するのは珍しい反応であることが分かった。類似の酵素は **2** の生合成クラスターにも見られた[(2)]。**1** の生合成知見から、こちらの酵素遺伝子は **2** の生合成におけるインドール環連結した 6/5 員環の修飾に関与すると考えられた。そこで、プレニル基転移酵素である JanD と FAD 依存型酸化酵素 JanO は大腸菌で発現させ、組換え酵素を調製し、*in vitro* 解析を行った、その詳細な結果について報告する。




【参考文献】(1) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 5748-52. (2) *Toxins (Basel).*, **2015**, *7*, 2701-22.

indole diterpene, penitrem, shearinine

発表番号：3B038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

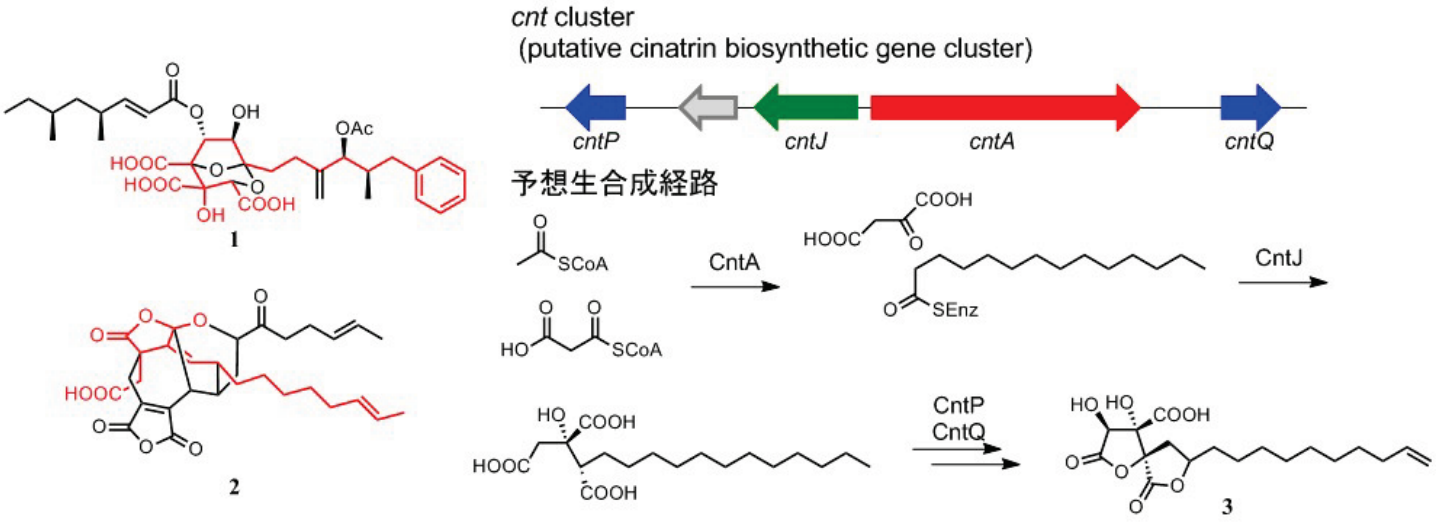
# アルキルクエン酸型天然物の生合成研究(1)

# Biosynthetic study of alkylcitrate natural products (I)

○竹内 一朗[1]、南 篤志[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農)
○Ichiro TAKEUCHI[1], Atsushi MINAMI[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

**【目的】** アルキルクエン酸型天然物は，クエン酸にアルキル鎖の結合した構造に由来する天然物群であり，zaragozic acid (**1**) や phomoidride (**2**) などが知られている．その生合成経路については，同位体標識前駆体の投与実験を通じて，ポリケタイド鎖とケト酸との縮合によって生合成されていると考えられていた．本研究室では **2** の生合成研究を行い，その生合成にはポリケタイド合成酵素，ケト酸との縮合酵素，脱水酵素が関与していることを明らかにした [1]．本研究では，類似した酵素の関与が予想される，cinatrin (**3**) の生合成機構を明らかにすることを目的とした研究を行った．

**【結果・考察】** 生産菌のドラフトゲノム解析により，ポリケタイド合成酵素 (CntA)，縮合酵素 (CntJ)，酸化酵素 (CntPQ) をコードする配列を含む cinatrin の生合成遺伝子クラスター (*cnt* cluster) を発見した．信頼性の高い麹菌異種発現系を利用し，CntA と CntJ の機能解析を行った結果，cinatrin の予想中間体と類似した化合物が生産されていることを確認した．また，骨格構築の鍵となる CntJ については，組換え酵素として調製し，in vitro での詳細な機能解析を行った．現在は cinatrin 生合成後期の酸化修飾酵素の検討と，より複雑な骨格を有する類縁化合物の生合成研究を行っており，合わせて発表予定である．




1) Fujii, R.; Matsu, Y.; Minami, A.; Nagamine, S.; Takeuchi, I.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5658–5661.

biosynthesis, cinatrin, heterologous expression

発表番号：3B039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 麹菌異種発現系を用いた Abscisic Acid の生合成研究（1）

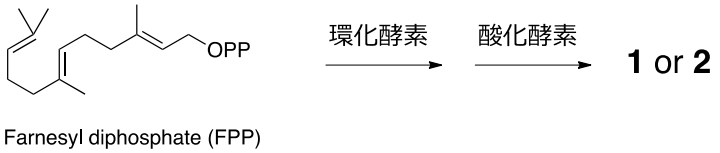
Biosynthetic study of Abscisic Acid utilizing *Aspergillus oryzae* heterologous expression system(1)

○小崎 拓登[1]、南 篤志[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大理、[2]北大院理、[3]東北大院農)
○Takuto KOZAKI[1], Atsushi MINAMI[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Sch. Sci., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】Abscisic Acid (ABA)は、植物の休眠や成長抑制に関与する重要な植物ホルモンである。植物では炭素数 40(C40)のカロテノイドの酸化的開裂を経由して生合成される一方、糸状菌では C15 のファルネシルニリン酸から生合成されることが知られており[1)]、その違いに対しては大きな興味が持たれている。後者については、ABA 生産菌 *Botrytis cinerea* における遺伝子破壊実験[2)]から、後期生合成の酸化的修飾を行う遺伝子群(シトクロム P450:*BcABA1*:*BcABA2*／酸化還元酵素:*BcABA4*)が同定され、以下に示す予想生合成経路が提案されている。しかしながら、蓄積した中間体の構造決定が行われていないことなど、その生合成経路には不明な点が多い。そこで、本研究では生合成後期の酸化的修飾反応を明らかにするために、導入した遺伝子が確実に機能する麹菌異種発現系を用いて酸化酵素の機能解析を行った。

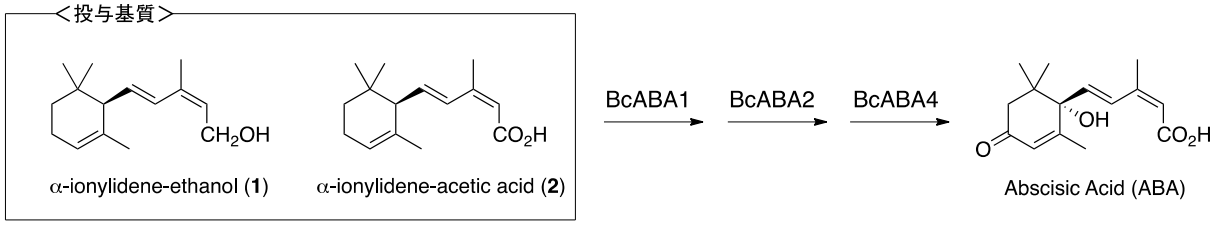
【方法・結果】*B. cinerea*からゲノムDNAを抽出し、3種類の酸化酵素遺伝子をクローニングした。続いてこれらの遺伝子を一挙に麹菌へと導入し、得られた形質転換体に対して化学合成した予想中間体の微生物変換を行った。その結果、三重形質転換体に対し**1**・**2**を投与したところABAの生産を確認できた。現在は酸化酵素が働く順序、及び生合成中間体の構造決定を行っており、本ポスターではその詳細を発表する予定である。

＜Step 1＞




Farnesyl diphosphate (FPP)

＜Step 2＞




α-ionylidene-ethanol (**1**)　α-ionylidene-acetic acid (**2**)　Abscisic Acid (ABA)

参考文献

1) Nambara, E. et al., *Annu. Rev. Plant. Biol*. **2005**, 56, 165

2) Siewers, V. et al., *Appl. Environ. Microbiol.,* **2004,** 70, 3868; **2006**, 72, 4619

Abscisic Acid, Biosynthesis, Heterologous expression

発表番号：3B040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

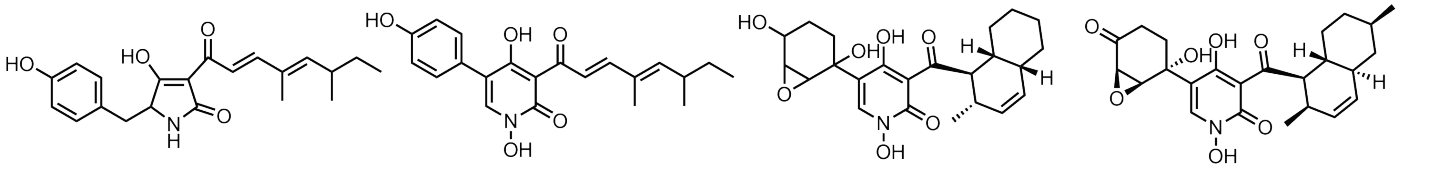
# 糸状菌異種発現系を用いた２－ピリドン系ポリケタイドの生合成研究

# Biosynthetic study of polyketides including 2-pyridone utilizing *Aspergillus oryzae* host

○鵜飼 孝大[1]、南 篤志[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大院農)
○Takahiro UGAI[1], Atsushi MINAMI[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】我々はこれまで、麹菌異種発現系を利用したポリケタイド系天然物の生合成研究を行ってきた。その結果、betaenone[1)]や solanapyrone[2)]の生合成経路の解明と天然物合成に成功している。ここで得た経験を生かして、特徴的な炭素骨格の形成機構を有すると予想されるアルタナル酸の生合成研究に着手した。その研究過程で PKS-NRPS 遺伝子が新規アシルテトラミン酸の構築に関与していることが判明した。PKS-NRPS 遺伝子の周辺に位置する修飾酵素遺伝子の機能解析と併せて、その詳細を発表する予定である。

【方法・結果】じゃがいも夏疫病菌 *Alternaria solani* A-17 株のドラフトゲノムシーケンス解析により、この菌株が 8 個の HR-PKS と 2 個の PKS-NRPS 酵素遺伝子を有することが判明した。cDNA をテンプレートとした PCR 反応により網羅的な発現解析を行うと、たった 1 つの PKS-NRPS と、周辺に位置する修飾酵素遺伝子の発現が確認された。発現していた PKS-NRPS と trans ER 酵素遺伝子を麹菌に導入し異種発現したところ、野生株の麹菌には見られない新たな天然物を生産していた。これを単離、構造決定すると、新規アシルテトラミン酸であることが確認された。新たに発見した遺伝子クラスターを、２－ピリドン系ポリケタイドである tenellin[3)]の生合成遺伝子と比較すると、ピリドン環の形成に関与するホモログ遺伝子を含む複数の修飾酵素遺伝子が見出された。現在、先に調製した形質転換体に修飾酵素遺伝子を導入し、本生合成遺伝子クラスターの最終産物の探索と生合成経路の検討を行っている。



pretenellin-A (*Beauveria bassiana*) | tenellin (*Beauveria bassiana*) | fischerin (*Neosartorya fischeri*) | didymellamide A (*Stagonosporopsis cucurbitacearum*)

参考論文

1) T. Ugai, *et al. Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1878-1881.

2) R. Fujii, *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* DOI: 10.1080/09168451.2015.1104234

3) L. M. Halo, *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 17988-17996.

Biosynthesis, Polyketides, Heterologous expression

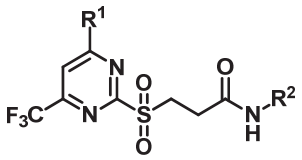
発表番号：3B041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 細胞分裂阻害剤の構造活性相関研究

# Structure-activity relationship study of a mitotic inhibitor

○清水 謙志郎[1,2]、清水 猛[1]、渡邉 信元[1]、真田 英美子[1]、Maria Pascual-Lopez Alberca[1]、篠崎 開[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東京電機大学大学院)
○Kenshirou SHIMIZU[1,2], Takeshi SHIMIZU[1], Nobumoto WATANABE[1], Emiko SANADA[1], Maria Pascual-Lopez Alberca[1], Hiraku SHINOZAKI[2], Hiroyuki OSADA[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Denki Univ.)

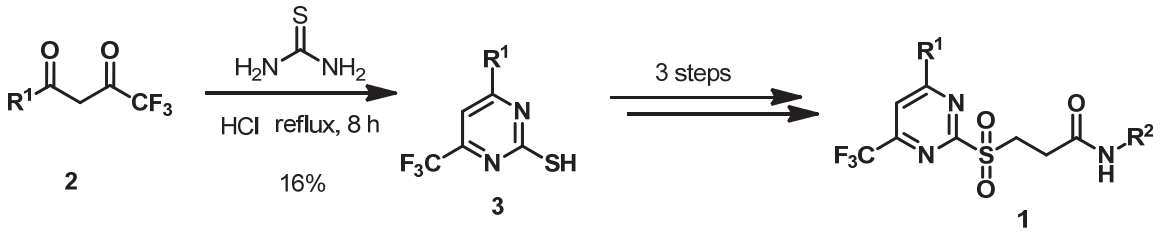
細胞分裂阻害剤は活発に分裂を行うがん細胞を正常細胞と区別して細胞死させる物質として古くから利用されてきた。特に、分裂に重要な役割を有する有糸分裂紡錘体形成に異常を引き起こす物質は、分裂中期以降の染色体分配に異常を誘導し細胞死を引き起こすので、有効ながん治療薬となる。チューブリンの重合・脱重合を阻害する物質はその代表例で、実際にがん治療に応用されている。しかし、チューブリン阻害物質には神経細胞に影響を与え副作用を引き起こすことが知られるので、チューブリン阻害薬以外の分裂阻害剤開発が期待されている。例えば、キネシンは真核生物の細胞質中に存在する微小管依存のモータータンパク質であり、ATP を加水分解することによるエネルギーで微小管に沿って運動する。キネシンファミリーメンバーは細胞分裂期、すなわち双極性紡錘体形成や染色体の整列、分離に重要である。その阻害は分裂装置に影響を与え、分裂異常を誘導するので、がん治療における分子標的のひとつとして期待されている。



1

我々は細胞分裂期の紡錘体形成に異常を誘導する物質の探索から、活性を示すピリミジン環を有する化合物 1 を見出した。そこで化合物 1 の合成展開を行い、構造活性相関の解明およびさらなる活性の向上を目的に研究を行った。

化合物 1 を合成するため、4, 4, 4-trifluoro-1, 3-butanedione を原料として thiourea との反応を行いチオール 3 を合成した。さらに 3 行程で化合物 1 を合成した。次に、スペーサー、芳香族アミンに着目し 1 の誘導体を合成した。合成した化合物について分裂阻害能や ATP 分解活性阻害能などを評価したので、その結果を報告する。



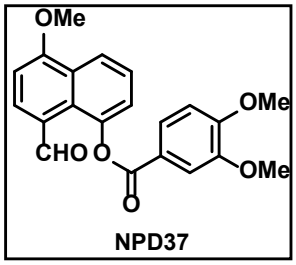

ATPase, chemical biology, SAR

発表番号：3B042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

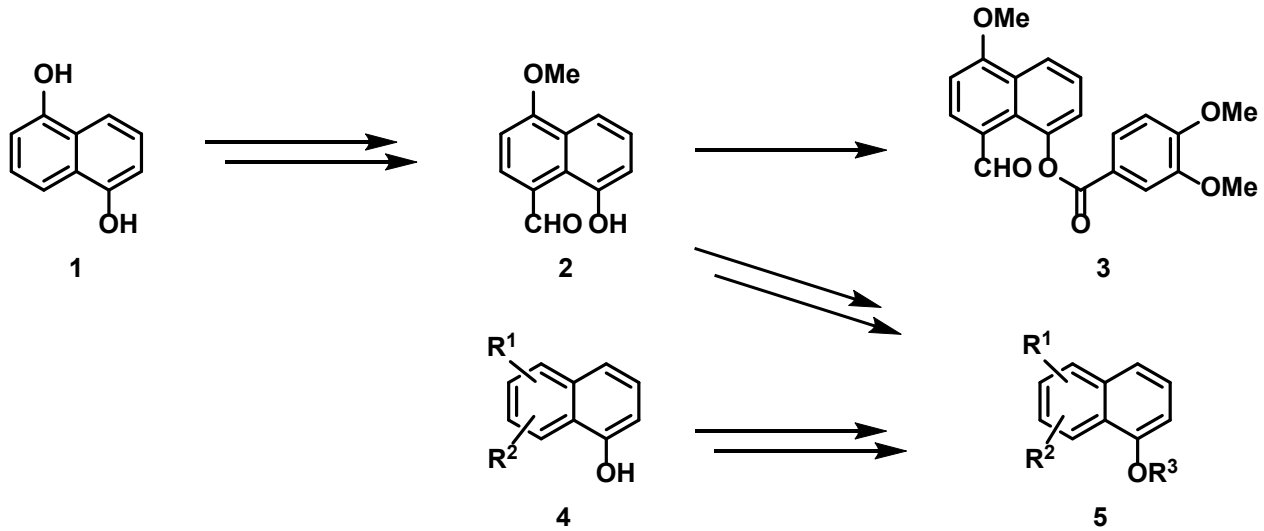
NPD37 の構造活性相関研究
Structure-activity relationship study of NPD37

○加藤 勇輝[1,2]、清水 猛[1]、二村 友史[1]、篠崎 開[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東京電機大学)
○Yuki Kato[1,2], Takeshi Shimizu[1], Yushi Futamura[1], Hiraku Shinozaki[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyodenki Univ.)

【目的】
我々は、B 型肝炎治療薬の探索過程で NPD37 (8-formyl-5-methoxynaphthalen-1-yl 3,4-dimethoxybenzoate) がヒト肝がん由来細胞 HepG2 に顕著な増殖阻害活性を示すことを見出した。さらに各種がん細胞に対する増殖阻害活性を評価し、本化合物が HepG2 細胞に特に強い細胞毒性を示すことを見出した。肝がん選択的な抗がん剤は肝炎劇症化以降の治療薬として期待できることから、さらなる活性の向上を目的とし、構造活性相関研究を展開することとした。




【方法および結果】
構造活性相関を展開するにあたって文献 [1]を参考に 1,5-dihydroxynaphthalene (**1**) よりホルミル体 (**2**)を合成した。まず、**2** よりエステル **3** ( = NPD37) を合成した。また、**2** およびナフトール誘導体 **4** より種々の誘導体 **5** を合成した。誘導体 **5** およびナフトール誘導体 **4** の HepG2 や各種がん細胞に対する増殖阻害活性を評価したのでその結果を報告する。




[1] Hanna, R.L.; Barber, R.B.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.*1979, *44*, 2153-2158

NPD37, HepG2 cell, SAR

発表番号：3B043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# チョウトウコウに含まれるウンカリン酸Cおよびその誘導体のアミロイドβ凝集阻害活性

# Inhibitory activity for amyloid ß aggregation by uncarinic acid C from Uncaria rhynchophylla and its derivatives

○吉岡 卓也[1]、村上 一馬[1]、花木 瑞穂[1]、緑川 諭弘[2]、谷脇 慎治[2]、郡司 祐樹[2]、入江 一浩[1]([1]京大農、[2]アルプス薬品)

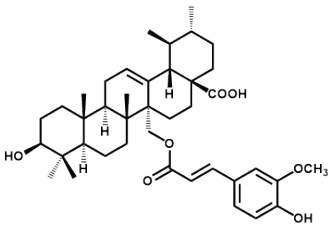
○Takuya YOSHIOKA[1], Kazuma MURAKAMI[1], Mizuho HANAKI[1], Satohiro MIDORIKAWA[2], Shinji TANIWAKI[2], Hiroki GUNZI[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Alps Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.)

## 【背景・目的】

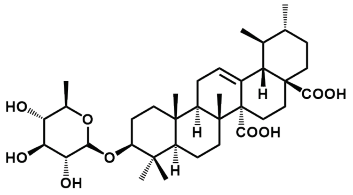
アルツハイマー病(AD)の原因物質と考えられているアミロイド β タンパク質（Aβ42）は、凝集を介して神経細胞毒性を示すことから、Aβ42 の凝集阻害剤の開発研究が盛んに行われている。Aβ42 の凝集過程は、毒性の高い Aβ42 オリゴマーからなる凝集核を形成する「核形成過程」と、それに引続く低毒性のアミロイド線維を形成する「線維伸長過程」に大別される。これより、核形成過程を阻害する薬剤は、有望な AD 予防薬になりうる。本研究グループは、AD 症状の改善作用を示す抑肝散の構成生薬であるチョウトウコウ（*Uncaria rhynchophylla*）から、Aβ42 の凝集阻害物質として uncarinic acid A~D（UAs）を単離・同定した。本研究では、UAs が Aβ42 の核形成過程を選択的に抑制することを明らかにするとともに、その構造活性相関を詳細に検討した。

## 【方法と結果】

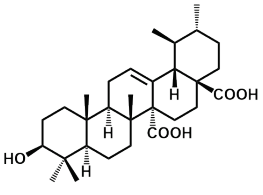
核形成過程への影響を詳細に調べるため、1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol 処理することによりモノマー化した Aβ42 を用いて、チオフラビン T 蛍光試験を行った。UAs の 4 種の立体異性体はほぼ同程度の凝集阻害活性を示したことから、誘導体が入手しやすい uncarinic acid C（図：UA-C）に着目した。チョウトウコウと同じアカネ科カギカズラ属である *Uncaria elliptica R.Br ex G.Don* から単離した saponin A を加水分解して得られる quinovic acid を出発物質として、UA-C の 28 位カルボキシ基をメチルアルコールに置換した誘導体 **1** 、および 27 位のフェルラ酸エステル部分を修飾した各種誘導体 **2** および **3** をそれぞれ合成し、ursolic acid とともに Aβ42 凝集活性への影響を評価した。その結果、UA-C の 28 位のカルボキシ基ならびに 27 位の芳香環部分は、いずれも核形成阻害に不可欠な構造因子であることが判明した。



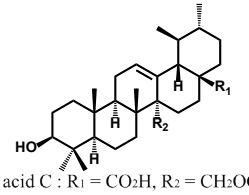
Uncarinic acid C



Saponin A



Quinovic Acid



Uncarinic acid C : $R_1 = CO_2H$, $R_2 = CH_2OCO(C_9H_9O_2)$
誘導体 **1** : $R_1 = CH_2OH$, $R_2 = CH_2OCO(C_9H_9O_2)$
誘導体 **2** : $R_1 = CO_2H$, $R_2 = CH_2OCOCH_3$
誘導体 **3** : $R_1 = CO_2H$, $R_2 = CH_2OH$
Ursolic acid : $R_1 = CO_2H$, $R_2 = CH_3$

uncarinic acid, amyloid ß, aggregation

発表責任者：入江 一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ChemProteoBase によるがん代謝作用薬の解析

Analysis of compounds affecting cancer metabolism by ChemProteoBase

○室井 誠、田中 美帆、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○Makoto Muroi, Miho Tanaka, Hiroyuki Osada (Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【目的】多くのがん細胞では解糖系を積極的に利用し、ATP の産生と細胞増殖に必要な生体高分子合成のバランスをとることによって、がん細胞の急速な増殖につなげている。これは、Warburg 効果として知られている。近年、がん細胞は代謝系をリプログラミングすることによって、解糖系だけでなく、環境に応じてグルタミノリシスなど別の代謝系を巧みに利用してエネルギーを得ると考えられるようになってきた。しかし、がんの代謝制御機序についてはいまだ不明な点が多く、がんの代謝に作用する化合物は、がん代謝の制御機構を明らかにすることに役立つ他、新規抗がん剤の創出につながることが期待される。一方、我々は、２次元電気泳動に基づくプロテオーム解析法を用いた薬剤作用解析システム ChemProteoBase を構築してきた。ChemProteoBase は 2-D DIGE を用いて薬剤処理 HeLa 細胞のプロテオーム解析を行い、296 スポットの発現量を既知薬剤と比較し、薬剤標的を推測するシステムである。296 スポットには、解糖系など代謝系に関与するタンパク質のスポットが含まれており、その増減が一度に解析できる。前年度の大会で、これらのスポットが低酸素状態、または、低酸素下で誘導される Hif-1 を活性化する化合物で、解糖系のスポットの発現量の増加傾向が見られることを示した。本会では、解糖系酵素の阻害剤、または、解糖系を制御するタンパク質の阻害剤を解析したので報告する。

【方法・結果】ChemProteoBase の 296 スポットのうち、PMF 法、または、LC-MS/MS を用いて同定したスポットについて、解糖系の酵素タンパク質２４スポット８タンパク質を抽出し発現量の増減の傾向を解析するシステムを作成した。常法どおり、１８時間薬剤処理した HeLa 細胞を用いて 2-D DIGE を用いてプロテオーム解析を行い 296 スポットの定量値を得た。解析の結果、GAPDH の阻害剤ヨード酢酸や、解糖系同様 ATP 合成に関与する呼吸の阻害剤であるアンチマイシン A ではいずれも、24 スポットの発現量について、増加傾向が観察された。また、Hif-1 の上流にある mTOR や PI3K の阻害剤を作用させた時には解糖系のスポットは減少傾向が認められた。また、mTOR を負に制御する AMPK 阻害剤である Compound C で処理した細胞では、解糖系のスポットの増加傾向が認められた。また、MAPK 経路を介して解糖系を制御することも知られているが、MEK の阻害剤でも減少傾向が認められた。本手法を用いることにより、がん代謝に及ぼす薬剤の作用情報が迅速に得られることが期待される。

Target identification, Proteome, Profiling

発表番号：3B045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 抗腫瘍活性を持つ化合物 SQAP の作用機構解明

# The action mechanism of the anti-tumor agent, SQAP

○川久保 悠史[1]、カルボネル ヘスス[1]、村田 寛[1]、佐原 弘益[2]、紙透 伸治[1]、菅原 二三男[1] ([1]東理大・理工、[2]麻布大・獣医)
○Hirofumi KAWAKUBO[1], Jesus CARBONELL[1], Hiroshi MURATA[1], Hiroeki SAHARA[2], Shinji KAMISUKI[1], Fumio SUGAWARA[1] ([1]Faculty of Sci. & Technol., Tokyo Univ. of Sci., [2]Vet. Med., Azabu Univ.)

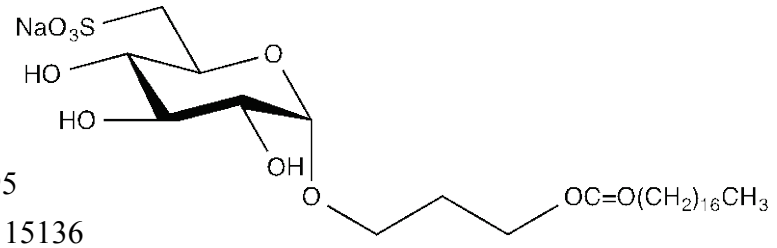
Sulfoquinovosylacylpropanediol (SQAP) は血管新生阻害活性と放射線増感作用を有している。[1)] 実際に前立腺由来癌を移植したマウスに対して、放射線との併用による治療効果が確認されており [2)]、新規放射線増感薬としての利用が期待されている。しかしながら、その作用機構は未解明のままである。そこで本研究では、SQAP の血管新生阻害活性及び放射線増感作用のメカニズムについて調べることとした。

ファージディスプレイ法を用いた解析によって、複数の SQAP の結合候補タンパク質を同定したことを 2013 年本大会で報告した。これら候補タンパク質のうち focal adhesion kinase (FAK) は、胚発生及び癌の進行中における、血管新生において重要な役割を果たしており、SQAP の血管新生阻害活性との関連が予想された。その後の解析により SQAP が FAK と結合し、そのリン酸化を阻害することで、血管新生阻害活性を示すことを明らかにした。[3)]

また SQAP の同様の活性を持つ類縁体、SQMG によって、複数の遺伝子発現量が変化することが示唆されており [4)]、本研究ではその中でもヒストンデアセチラーゼ 1 (HDAC1) に着目した。HDAC 発現量低下による細胞増殖、DNA 修復などの阻害およびクロマチンの弛緩 [5)] によって、SQAP が放射線増感作用を示すのではないかと考えた。

こうした背景を受け、今回演者は SQAP を肺癌由来細胞 A549、肝臓癌由来細胞 HuH-7 を用いて実験を行った。すると SQAP 処理を行った細胞では顕著なヒストンの高アセチル化がみられた。

これらの結果と先行研究より、SQAP による HDAC の阻害が示唆された為、今後、HDAC1 および HAT の発現量の変化、酵素阻害活性を確認し、SQAP 処理細胞におけるヒストンの高アセチル化メカニズムを詳しく調査する。




【参考文献】

[1)] 特許第 4435861 号
[2)] Sawada, Y. *et al.*, *Int. J. Urol.*, **2015**, *22*, 590-595
[3)] Izaguirre-Carbonell, J. *et al.*, *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 15136
[4)] Matsuki, K. *et al.*, *Cancer Sci.*, **2012**, *103*, 1546-1552
[5)] W., S., Xu *et al.*, *Oncogene*, **2007**, *26*, 5541-5552

sulfoquinovocylacylpropandiol, phage-display, histone deacetylase

発表責任者：川久保 悠史（6415609@ed.tus.ac.jp）

発表番号：3B046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

67LR 活性化剤は膵臓がんに対し抗がん作用を発揮する
67LR agonists suppress the tumor growth in pancreatic cancer
○熊添 基文[1]、高井 美佳[1]、山内 真麻[2]、高橋 孝志[3]、田中 浩士[2]、立花 宏文[1] ([1]九大院農院・生機科、[2]東京工業大学、[3]横浜薬科大学)
○Motofumi Kumazoe[1], Mika Takai[1], Maasa Yamanouchi[2], Takashi Takahashi[3], Hiroshi Tanaka[2], Hirofumi Tachibana[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Tokyo Institute of Technology, [3]Yokohama College of Pharmacy)

【目的】膵臓がんの 5 年生存率は 5%程度と非常に低く、新たな治療法の開発が望まれている。一方、我々は緑茶カテキンの一種 (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) ががん細胞の表面に高発現するタンパク質 67-kDa Laminin Receptor (67LR) に対するアゴニストとして cGMP 産生を誘導し、抗がん作用を発揮すること、また膵臓がん組織において 67LR が正常膵臓組織に比べ高発現していることを明らかにしている。そこで本研究では、67LR の活性化に基づく膵臓がんに対する治療効果について検討した。

【方法】cGMP 分解酵素であるホスホジエステラーゼ (PDE) の阻害剤と EGCG の併用がヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 の生細胞数に及ぼす影響を検討した。PDE3 の正常及び膵臓がん組織における発現を免疫染色により評価した。Panc-1 細胞株を皮下注射移植したマウスに EGCG と PDE3 阻害剤を投与し、腫瘍成長・転移を評価した。また、21 種類の EGCG 誘導体のスフェロイド形成阻害作用を評価した。67LR 活性化作用を Akt 活性化作用及び cGMP 産生誘導能により評価し、強い 67LR 活性化作用を有した EGCG 誘導体を選抜した。ヒト膵臓がん細胞株 Bx-PC3 細胞をガンマ線照射後のヌードマウスに移植し、病態に近い腹膜播種モデルにおける EGCG 誘導体の延命効果を評価した。

【結果】膵臓がんでは PDE3 が高発現しており、cGMP 分解酵素である PDE3 を阻害することで EGCG の抗がん作用を増強できることを見出した。また、EGCG と PDE3 阻害剤を投与したマウスにおいて強力な腫瘍成長阻害作用が認められた。さらに、がん既存薬 Gemcitabine は肝転移抑制作用を有しないのに対し、EGCG と PDE3 阻害剤併用は顕著な転移抑制作用を示した。そこで、67LR 活性化作用を指標に、単剤でも有効に抗がん作用を発揮できる誘導体を選抜し、腹膜播種モデルを用いて延命効果を評価した。その結果、EGCG アナログは強力な延命効果を発揮することを見出した。

【結論】膵臓がんに高発現する PDE3 が EGCG の抗がん作用を減弱させており、PDE3 阻害剤と併用することで EGCG の膵臓がん成長阻害作用が著しく増強されることを明らかにした。さらに、67LR を強力に活性化する EGCG アナログは延命効果を示した。以上のことから、膵臓がんに高発現する 67LR は膵臓がん治療における新たな治療標的となりえることが示された。

67LR, Pancreatic Cancer, EGCG

発表責任者：立花　宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3B047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# トシル化学によるミトコンドリア複合体-I のユビキノン結合部位の特異的メチル化
# Specific methylation of ubiquinone-binding pocket in mitochondrial complex I through tosyl chemistry.

○稲岡 宏幸、村井 正俊、桝谷 貴洋、油屋 駿介、青木 航、三芳 秀人（京大院農）
○HIROYUKI INAOKA, MASATOSHI MURAI, TAKAHIRO MASUYA, SYUNSUKE ABURAYA, WATARU AOKI, HIDETO MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素である NADH-ユビキノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元を担う親水性ドメインとプロトン輸送を担う膜ドメインから構成される膜タンパク質複合体である。好熱細菌（*Thermus thermophilus*）複合体-I の結晶構造を参照すると、ユビキノン結合ポケットは、内径約 8Å、奥行き約 30 Å の狭い洞窟様の構造をとり、ユビキノンが還元されることによってポケット内に構造変化が発生し、これがプロトン輸送の駆動力として膜ドメインに伝搬されることが示唆されている[*1*]。本研究では、阻害剤をリガンドとして利用することによって、ユビキノン結合ポケットを構成するアミノ酸残基を特異的にメチル化し、メチル化による酵素活性への影響を精査することを目的とした。

【方法】これまでに当研究室では、タンパク質修飾法である Ligand-Directed Tosyl Chemistry（トシル化学）に着目し、複合体-I 阻害剤のアセトゲニンをモチーフとしたリガンド（AL-1、図１）を合成し、ユビキノン結合ポケットを構成するアミノ酸残基に、任意のタグを導入する方法論を確立してきた[*2*]。ユビキノン結合ポケットのメチル化を意図した本研究では、スルホン酸メチルエステルを有する APM（図１）を新たに合成した。

【結果】ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）を材料として APM によって複合体-I をメチル化し、LC-MS/MS 解析を行ったところ、ユビキノン結合ポケットの最深部を構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 に最も顕著な修飾が観測され、水素結合のパートナーである His59 にもメチル化が観測された。両アミノ酸残基は保存性が非常に高く、ユビキノンの還元反応に深く関与すると考えられている。そこで、複合体-I の完全阻害に十分な量の APM でトシル化学に供し、メチル化に伴う酵素活性の影響を調べた。阻害の経時変化を観察したところ、メチル化の進行を反映するように、完全阻害されていた複合体-I の活性は徐々に回復し、およそ 5 時間で阻害剤非存在下での酵素活性の 6 割程度にまで回復した。このことは、Asp160 あるいは His59 は複合体-I の活性に寄与しているが、必ずしも決定的に重要なものではないことを示唆している。

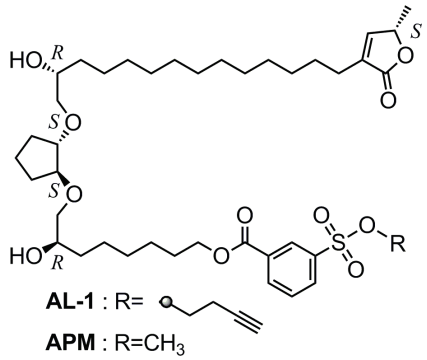


**図１．AL-1 と APM の構造**

1) Baradaran et al. (2013) *Nature* 494, 443-448.　2) Masuya et al. (2014) *Biochemistry* 53, 2307-2317; 7816-7823.

mitochondrial complex I, tosyl chemistry, protein modification

発表番号：3B048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

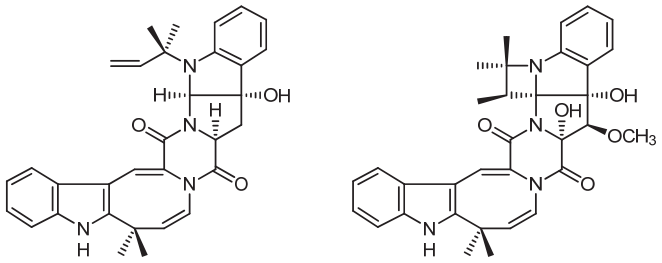
# 糸状菌が産生する昆虫制御物質オカラミンの活性発現機構に関する研究：選択的スプ ライシングによるターゲットの多様化と活性

# Mode of actions of okaramines, insect regulators produced by fungi: Splicing-induced target variantion and the actions on their targets

○古谷 章悟[1]、甲斐 建次[2]、伊原 誠[1]、松田 一彦[1] ([1]近畿大・農、[2]阪府大・生環科)
○Shougo FURUTANI[1], Kenji KAI[2], Makoto IHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Osaka Pref. Univ.)

【目的】

オカラミン類はカイコガに対する殺虫活性を指標に単離・構造解明された *Penicillium simplicissimum* が産生するインドールアルカロイドである。これまでにオカラミン A～R が見出され、活性発現には 8 員環のアゾシン環と 4 員環のアゼチジン環が重要な役割を担っていることが明らかにされている。我々は 1989 年に最初の報告がなされてから長年に渡り作用機構が不明であることに着目し、電気生理学的手法を用いてオカラミン類の標的解明を試みた。その結果、オカラミン類が昆虫を含めた無脊椎動物に特有の抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）に高選択的作用することを発見した。本研究では、選択的スプライシングにより生じる複数の GluCl バリアント間でのオカラミン類の作用機構を比較したので報告する。




【方法と結果】

カイコガ幼虫の脳および胸部第 3 神経節から調製した Total RNA から GluCl をコードする cDNA を単離したところ、エクソン 3 とエクソン 9 の選択的スプライシングにより計 6 種のバリアントが存在することが判明した。そのうちエクソン 3 から生じる 3b バリアントは全バリアントのうち最も高頻度で発現し、3c バリアントはアフリカツメガエル等の膜でもっとも高効率で受容体を形成することがわかった。3b バリアントに対するオカラミン類の活性化作用は、オカラミン B＞4’5’-ジヒドロオカラミン B＞ オカラミン Q＞ オカラミン I であった。一方、エクソン 3c バリアントにするこれらの化合物の活性も同じ順位で並び、3b バリアントに対する活性と良い相関を示したことからエクソン 3 がコードする領域はオカラミン類とは相互作用しないこと、また殺虫活性には両バリアントが寄与することが示唆された。

okaramine, glutamate-gated chloride channels

発表番号：3B049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

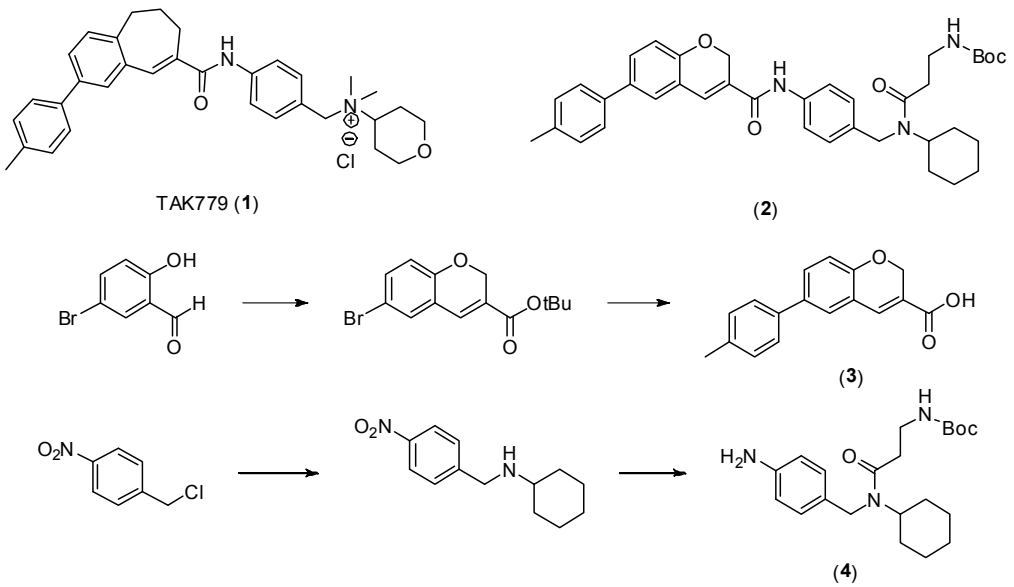
# ケモカインレセプターCCR5 阻害剤 TAK779 類縁体の蛍光標識化

# Synthesis of fluorescence labeling TAK779 analog, CCR5 antagonist

○山口 椋平、東海林 由憲、二階堂 由莉、今野 博行（山形大院理工・バイオ化学）
○Ryohei YAMAGUCHI, Yoshinori TOKAIRIN, Yuri NIKAIDO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

【目的】抗 HIV ウイルス剤開発の創薬ターゲットとして、膜タンパク質 CCR5 が知られている。そのリガンド RANTES を用いたアイソトープ誘導体[$^{125}$I]RANTES が CCR5 阻害評価のバイオプローブに用いられている。そのためアッセイに際しては放射性同位体を取り扱う設備や専門性が求められる。その一方で、蛍光標識を用いた評価法ならばより簡便に評価を行うことが可能であり、阻害剤探索が飛躍的に進展することが期待される。しかし、RANTES は巨大なタンパク質であり、その蛍光標識化は容易ではない。そこで我々は TAK779(**1**)に着目した。この化合物は副作用により臨床試験が中止された選択的非ペプチド性 CCR5 阻害剤であるが、CCR5 への強力な阻害能($IC_{50}$=2nM)は新規の阻害剤探索に利用できると思われる。そこでより簡便な CCR5 阻害剤アッセイ系の開発を目的として、阻害能が $IC_{50}$=200nM 程度の TAK779 類縁体(**2**)の蛍光標識化を検討した。

【方法と結果】TAK779 類縁体(**2**)の合成計画として、カルボキシル基を有するベンゾピラン誘導体(**3**)と蛍光色素を導入するためのスペーサーを持つアニリン誘導体(**4**)の脱水縮合を検討した。化合物 **3** の合成は 5-ブロモ-2-ヒドロキシ-ベンズアルデヒドにアクリル酸をロビンソン環化させ、続く鈴木・宮浦カップリングにより行った。化合物 **4** は、シクロヘキシルアミンの 4-ニトロベンジルクロリドへの求核置換を行い、スペーサーとしてβアラニンを縮合させた後、接触還元にて合成した。得られた化合物 **3**、**4** をカップリングさせることにより TAK779 類縁体(**2**)を得ることができた。現在、βアラニン、6-アミノヘキサン酸などを用いたスペーサー鎖長の検討、並びに蛍光色素の導入を検討中である。HEK293/CCR5 細胞の培養条件の確立と合成した化合物の細胞毒性評価についても、合わせて報告する。




bioprobe, CCR5 inhibitor, Anti-HIV agent

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：3B050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 5、7 位に位置選択的にガロイル基を導入したフラバン-3-オール類縁体の合成と構造-活性相関

# Regioselective synthesis of 5- or 7-galloyl modified flavan-3-ols and their structure-activity-relationship studies

○法島 太一[1]、米田 慎吾[2]、森 一起[1]、中島 範行[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電通大院工、[2]大阪電通大工、[3]富山県立大工)

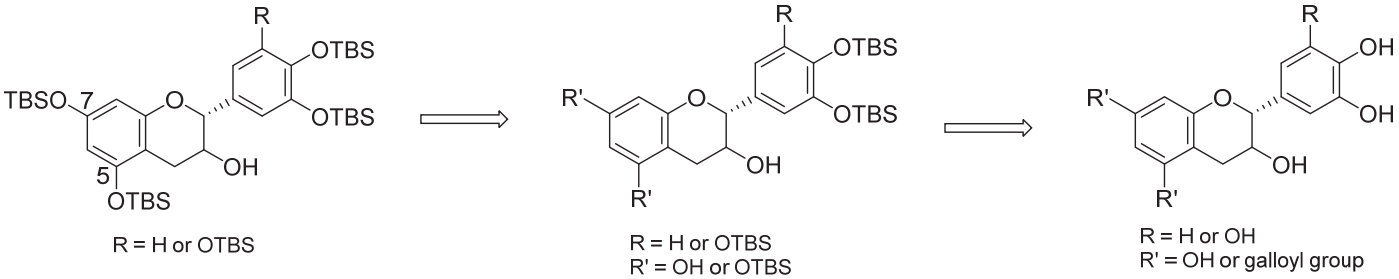
○Taichi HOJIMA[1], Shingo KOMEDA[2], Kazuki MORI[1], Noriyuki NAKAJIMA[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Graduate Scool of Engineering, OECU, [2]Facutly of Engineering, OECU, [3]Biotechnology of Research, TPU)

【目的】

フラバン-3-オール類は、様々な生物活性を有するポリフェノール化合物として知られている。緑茶カテキンとして知られているエピガロカテキンガレート (EGCG)もその一種であり、強い抗酸化活性や、ガン細胞選択的増殖活性等、様々な生物活性を持つ。我々は、フラバン-3-オールの構造-活性相関に興味を持ち、位置選択的修飾法の開発、及び、生物活性測定を進めてきた。これまでに 5 位選択的脱保護法を見出し、3、5 位にガロイル基を導入したフラバン-3-オール類の選択的合成に成功した。各種生物活性試験を行ったところ、2,3-*cis* 型のフラバン-3-オールが HeLa S3 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)に対して極めて強い活性を持つ一方で、2,3-*trans* 型は活性を持たないことを明らかにした。[1)]このようにフラバン-3-オール類は、その修飾位置や立体で大きく生物活性が変化する。この結果を受け、さらに 7 位の位置選択的修飾法の検討を進め、7 位を簡単に修飾できる方法を見出すことができ、さらなる構造-活性相関研究を行ったので報告する。

【方法と結果】

各種フラバン-3-オールを出発原料とし、フェノール性水酸基を TBS 基で保護した。これを塩基処理することによって、5 位、あるいは 7 位を脱保護した。数工程を経て位置選択的にガロイル基を導入したフラバン-3-オール誘導体を合成することに成功した(Scheme 1)。また、この方法を用いることで、位置選択的にリンカーの導入にも成功し生物活性を可視化可能なバイオプローブの合成も達成した。本発表では、合成した化合物を用いた構造-活性相関、及び、活性の可視化に向けた検討について報告する。




**Scheme 1.** Regioselective synthesis of 5- or 7- modified flavan-3-ols

1) K. Mori, *et al*. Natural Products Chemistry & Research, **3**, 172 (2015).

flavan-3-ol, synthesis, bioprobe

発表番号：3B051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 光反応性 2-propoxyanirine 誘導体の合成

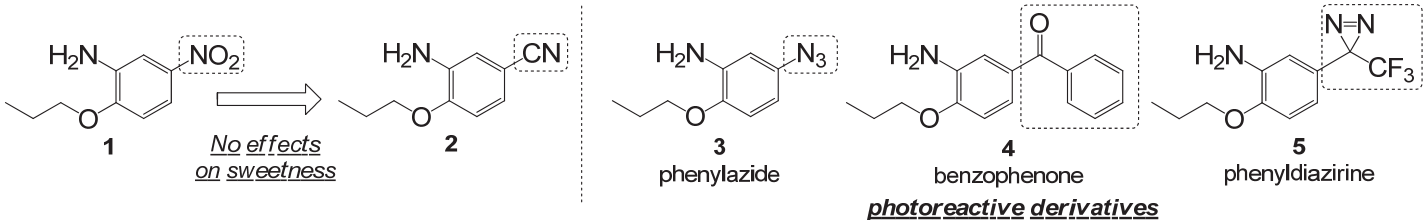
# Synthesis of photoreactive 2-propoxyanirine derivatives

○吉田 卓真[1]、村井 勇太[2]、橋床 泰之[1]、橋本 誠[1] ([1]北大院農、[2]北大院先端生命)
○ Takuma YOSHIDA[1], Yuta MURAI[2], Yasuyuki HASHIDOKO[1], Makoto HASHIMOTO[1] ([1]Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Advanced Life Science, Hokkaido Univ.)

【研究背景】5-nitro-2-propoxyaniline(**1**)は甘味受容体に受容され、甘味を呈すると考えられているが、受容体上の認識部位や詳細な分子機構は未だ解明されていない。光アフィニティーラベル法は生理活性物質とその標的となる生体高分子との相互作用の解析に有効な手法のひとつである。甘味化合物と受容体間に不可逆的な共有結合を形成することで、認識部位の同定や結合状態の解析が容易になる。甘味受容の分子機構解明により、食品の食味改善や食品添加物の開発につながると期待される。

**1** の nitro 基を cyano 基に置換した誘導体(**2**)も同等の甘味を呈する。この構造活性相関の結果を考慮し、4 位の nitro 基を光反応性基に置換した新規光アフィニティラベル用試薬の合成を検討した。

【方法・結果】受容体機能解析を指向する上で、それぞれの光反応性基の特性を考慮・選択し、実験系を構築することが必要であるため、phenylazide, benzophenone, phenyldiazirine の 3 種類の光反応性基を持つ誘導体群を合成した。phenylazide 誘導体(**3**)の合成を目指し、4-bromopropoxybenzene を nitro 化後、接触還元による nitro 基の還元を試みたが、bromo 基の脱離が観察された。そこで次亜硫酸ナトリウムにより選択的に nitro 基を還元し、続いて bromo 基を azide 基へ変換し、目的生成物(**3**)を得た。benzophenone 誘導体(**4**)は **3** の合成中間体から合成を試みたが、反応の各段階で複雑な生成物となったため、*N*-(2-hydroxyphenyl)acetamide の水酸基の propyl 化、続く Friedel-Crafts benzoylation による benzophenone 骨格構築・*N*-acetyl 基の脱保護反応によりいずれの反応とも 90%以上の高収率で目的生成物(**4**)を得た。phenyldiazirine 誘導体(**5**)を得るために、4-propoxybenzaldehyde 及び 4-methoxytrifluoroacetophenone を、それぞれ 4-propoxy-trifluoroacetophenone へと変換した。その後 propoxy 基 *o*-位を nitro 化、diaziridine 環を構築した。diaziridine 環の酸化により diazirine へと変換した後に nitro 基を還元した場合、還元条件下において diazirine 骨格の分解が観察されたが、nitro 基の還元後に diazirine へと変換することで、目的生成物(**5**)の合成に成功した。




【文献】Y. Murai, T. Yoshida, L. Wang, et al., *Synlett*, **in press**.

photoaffinity label, diazirine, sweet receptor

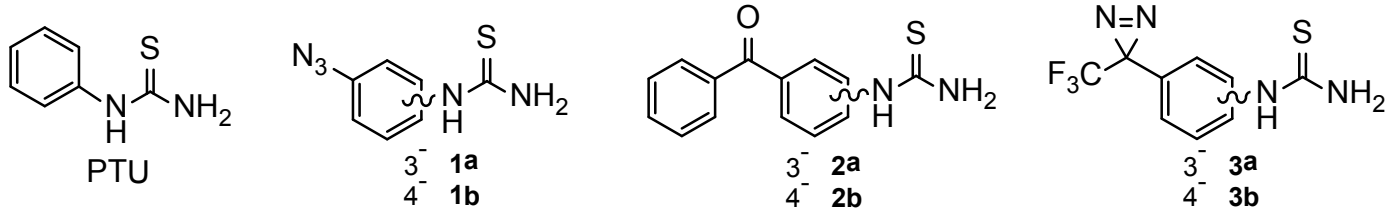
発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3B052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 光反応性 Phenylthiourea 誘導体とその性質
# Photoreactive Phenylthiorea Derivtives and their Properties

○石田 明子、橋床 泰之、橋本 誠（北大院農）
○Akiko ISHIDA, Yasuyuki Hashidoko, Makoto Hashimoto (Hokkaido Univ. Graduate school of Agriculture)

**研究背景）** phenylthiourea(PTU)は、苦味やチロシナーゼ阻害などの生理活性を有することが知られている。前者では苦味受容体 TAS2R38 に認識され、後者では活性部位において基質と競合阻害することが知られており、相互作用の研究に関心が寄せられている。そこで、PTU の生理活性機構を解明するため光アフィニティーラベル試薬合成を立案し、芳香環上 3-及び 4-位に光反応性基 azide、benzophenone、diazirine を導入した PTU 誘導体の合成と、チロシナーゼ阻害活性について検討した。




**方法・結果）** azide 型誘導体(**1a, 1b**)は、PTU のニトロ誘導体を還元しアニリン誘導体とした後、ジアゾ化、続くアジド化による合成が可能であった。benzophenone 型誘導体(**2a, 2b**)は、aminobenzophenone のアミノ基を NaSCN で処理しチオウレア基へ変換することで合成した。diazirine 型誘導体(**3a, 3b**)は diazirine 含有アニリン誘導体の効率的な合成法が確立されていないため、再検討を行った。3-diazirinyl aniline(**3a**)に関しては、①ニトロ誘導体への diazirine 構築経路、及び②Boc 保護したアニリン誘導体への diazirine 構築経路の２種類を比較検討し、さらに前者では diazirine 含有ニトロ誘導体の還元方法も合わせて検討した。最終的に、アニリン誘導体を合成した後、NaSCN と反応させることで diazirine 型 PTU 誘導体(**3a**)とした。4-diazirine aniline(**3b**)に関しては、４種の置換基でアミノ基への変換を検討したところ、フタルイミド基及び NHBoc 基の２種類で diazirine 含有アニリン誘導体の合成に成功し、その後穏和な条件下で PhCOSCN と反応させ PTU 誘導体(**3b**)とした。合成した光反応性 PTU 誘導体に関して、チロシナーゼ阻害活性試験を行った。チロシン及び DOPA を基質として用いた結果、全ての PTU 誘導体に阻害活性が確認されたが、立体障害の影響により、4-置換体に比べて 3-置換体において高い活性を示した。そこで、3-位に光反応性構造を有する PTU 誘導体及び母核の PTU に対して特有の波長の UV を当てたところ、構造の変化によると思われる活性の変化が見られた。現在、立体構造の変化に関する詳細な知見と、実際の光ラベルについて検討中である。

phenylthiourea, photoaffinity labeling, tyrosinase inhibition

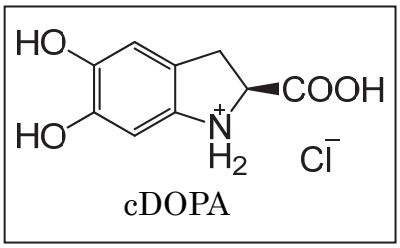
発表番号：3B053
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# チロシン代謝産物シクロドーパの化学的特性再検討及び重水素交換

# Chemical Stability of Tyrosine Metabolites (cyclo-DOPA) and Its Hydrogen-Deuterium Exchange

○中川 詩織、橋床 泰之、橋本 誠（北大院農）
○SHIORI NAKAGAWA, YASUYUKI HASHIDOKO, MAKOTO HASIMOTO (Hokkaido Univ.)

【研究背景】チロシンは水酸化酵素チロシナーゼによって代謝されると、植物体内でシクロドーパ(cDOPA)に変換されることが知られている。チロシンから別の代謝経路で生成されるベタラミン酸と cDOPA が縮合することで、植物四大色素の一種である赤紫色のベタレイン類が生成される。我々は植物色素ベタレイン類の部分構造かつ代謝中間体と推測されている cDOPA に着目した。cDOPA は水酸基が修飾を受けた形で植物体から単離されるが、cDOPA のみの単離は確認されておらず、その安定性について網羅的に検討されたことはない。今回文献における cDOPA 誘導体合成の再検討を行い、pH における化学的特性を検討した。



cDOPA

【方法・結果】L-ドーパ、もしくは L-ドーパメチルエステルをフェリシアン化カリウムにより酸化後、亜ジチオン酸ナトリウムによる素早い還元によって環化反応を行い、濃塩酸で反応液を酸性にし、cDOPA 骨格を構築した。単離が困難であったため、水酸基、及びアミノ基をアセチル保護することでトリアセチル cDOPA 誘導体を単離した。この cDOPA 誘導体を酸性条件下における脱保護によって cDOPA を獲得した。cDOPA 骨格構築において酸化、還元過程を素早く行う必要性があり、また生成後において高い pH 条件では cDOPA の分解が観察された事から、cDOPA を素早く酸性条件下にすることが重要であると明らかになった。これらの結果から、cDOPA の pH 安定性について詳細な検討を行った。その結果、cDOPA の安定性は pH に依存し、酸性で安定であり、中性付近において分解してしまうことが判明した。cDOPA の主な分解物は 5,6-ジヒドロ-キシインドリン-2-カルボン酸、及び 5, 6－ジヒドロ-キシインドールの 2 種類のジヒドロキシインドール化合物であり、pH 依存的に 2 種類の分解物の割合が異なっていた。水素・重水素交換は化合物に安定同位体を導入する効果的な手段であり、NMR、 質量分析などの手段で検知可能である。また、重水素効果によって、C-D 結合は C-H 結合より約 6－10 倍反応が遅くなる。これらの利点から、重水素を導入した化合物は反応機構・生合成経路・代謝経路などの調査に適した道具の一つであり、当研究室では重水素標識 triflic acid(TfOD)を利用し、低温度の反応によるアミノ酸の芳香環上への水素・重水素交換について報告している。cDOPA が酸性条件下において安定である事を利用し、cDOPA の水素・重水素交換を検討した。その結果、cDOPA の芳香環上の 4 位、7 位水素の重水素導入に成功した。各位の水素に対する重水素導入率は反応時間と温度によって制御可能であった。現在重水素導入した cDOPA を用いて cDOPA の抗酸化活性を検討中である。

cyclo-DOPA, pH stability, hydrogen-deuterium exchange

発表番号：3B054
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 植物病原菌感染因子コロナチンの COI1-JAZ 非依存的作用に関するケミカルバイオロジー

# Coronatine affects the virulence of plant pathogens through COI1-JAZ independent mode-of-action

○江越 脩祐[1]、山越 博幸[2]、闡闡 孝介[3]、岩下 利基[1]、鈴木 健史[1]、石丸 泰寛[1]、高岡 洋輔[1]、袖岡 幹子[3]、上田 実[1] ([1]東北大院理、[2]名市大院薬、[3]理研)

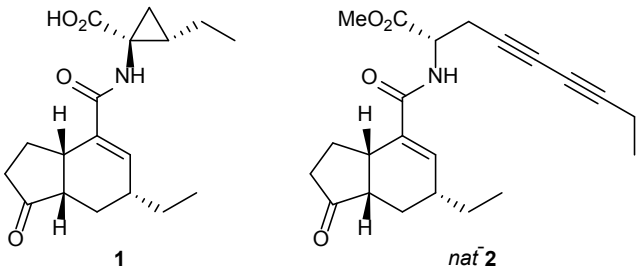
○Syusuke Egoshi[1], Hiroyuki Yamakoshi[2], Kosuke Dodo[3], Toshiki Iwashita[1], Takeshi Suzuki[1], Yasuhiro Ishimaru[1], Yousuku Takaoka[1], Mikiko Sodeoka[3], Minoru Ueda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nagoya City Univ., [3]RIKEN)

植物病原菌 *Pseudomonas syringae* が生産する植物毒素コロナチン（COR: **1**）は、植物の気孔を開口させる作用[1]をもつ。この病原菌は気孔から植物内に侵入し感染を成立させるが、病原菌に感染した植物は、気孔を閉鎖することで感染経路を遮断するという感染防御応答を示す。病原菌はこれに対抗し、**1** を分泌して気孔を開口させ感染経路を確保すると考えられている[2]。植物病原菌の感染に関する **1** の役割は、植物病理学の観点からも大きな注目を集めているが、詳しい作用機構は不明である。そこで我々は、COR の気孔開口作用メカニズムの解明を目指して研究を行った。

これまでに我々は、孔辺細胞における **1** の作用部位を明らかにするために蛍光基を導入したコロナチンプローブを合成した。しかし、その気孔開口活性は著しく減少し、実用に耐えなかった。これは、合成したプローブの分子サイズが非常に大きく、また細胞膜透過性が減少したためと考えられた。そこで我々は、生細胞イメージングが可能な小分子 Tag であり、Click 反応への応用も可能なアルキンを利用した Alkyne-Tag Raman Imaging 法[3]に着目した。我々は、過去に検討例のない植物生細胞でのラマンイメージングを用いるコロナチンの孔辺細胞作用部位探索研究を行った。

今回、我々は、Diyne[4]を Tag とし、天然物である **1** と同等の気孔開口活性を有する天然型コロナチンプローブ（*nat*-**2**）、および、気孔開口活性を持たない鏡像体型コロナチンプローブ（*ent*-**2**）を合成した。続く、シロイヌナズナ野生株を用いたラマンイメージング実験の結果より、*nat*-**2** のみで核周辺部に Diyne 由来のシグナルを検出することができたが、孔辺細胞内に存在する葉緑体の強い自家蛍光により、局在部位のイメージングはできなかった。そこで我々は、葉緑体形成が正常に機能しない植物体 *arc6-1* の孔辺細胞に着目し、葉緑体の存在しない孔辺細胞のラマンイメージングにより、*nat*-**2** が小胞体と思われる部位に局在していることを確認した。本発表では、植物遺伝学的検討の結果と合わせ、COR の気孔開口活性が既存のジャスモン酸作用機構と独立したものであることを報告する。

[1] *J. Am. Chem. Soc,* ***1977****, 99, 636.; Ann. Phytopath. Soc.Japan.,* ***1987****, 53, 53.* [2] *Cell,* **2006**, *126*, 969-980. [3] *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 6102-6105. [4] *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 20681-20689.




Coronatine, Stomatal Reopening, Raman Imging

発表番号：3B055
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 出芽酵母ミトコンドリア VDAC はユビキノンと特異的に結合する

# Mitochondrial voltage dependent anion channel of Saccharomyces cerevisiae specifically accommodates ubiquinone.

○奥田 絢香[1]、村井 正俊[1]、山本 武範[2]、篠原 康雄[2]、三芳 秀人[1] ([1]京大農、[2]徳島大疾患プロテオゲノム研究センター)
○Ayaka OKUDA[1], Masatoshi MURAI[1], Takenori YAMAMOTO[2], Yasuo SHINOHARA[2], Hideto MIYOSHI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Tokushima Univ.)

【背景・目的】ユビキノンに代表されるキノン類は、バクテリアから高等生物に至るまで幅広く分布する生理活性分子であり、その主な役割は呼吸鎖電子伝達系における電子伝達担体としてはたらくことである。また、近年の研究では、電子伝達には直接関与しないものの、ユビキノンを“補因子”として持つことで機能する「**ユビキノン結合性タンパク質**」の存在が幾つか示唆されている。ミトコンドリア外膜に存在する電位依存性アニオンチャンネル（VDAC）は、そうしたユビキノン結合性タンパク質の候補の一つであり、いわゆる膜透過性亢進と呼ばれるシトクロム *c* の細胞質への漏出など、アポトーシスの鍵現象に深く関与することが知られている。ユビキノンが膜透過性亢進の制御に関与するという報告は知られていたが、両者の相互作用を明確に実証した例はこれまでにない。本研究では、出芽酵母ミトコンドリアを実験材料として、独自に合成したユビキノンプローブを用いた光親和性標識実験を切り口に、VDAC とユビキノンの関係を明らかにすることを目的とした。

【結果】ユビキノンのキノン環とイソプレン側鎖末端に、アジド基とアルキンをそれぞれ導入したユビキノンプローブを合成した (UQ-1、図 1)。本化合物は光親和性標識実験後に、クリックケミストリー（[3+2]環化付加反応）を利用して任意のタグを導入し、様々な生化学解析に供することを意図して設計した。出芽酵母から単離したミトコンドリアを、UQ-1 によって光親和性標識し、クリックケミストリーによって各種タグ（図 1）を導入した。蛍光タグ（TAMRA）を導入したサンプルは、電気泳動後のゲルの蛍光観察を行なうことで、また、ビオチンタグを導入したサンプルは、アビジン沈降によるタンパク質の精製やウエスタンブロットを行なうことで、標識を受けたタンパク質の解析を進めた。その結果、ユビキノンが VDAC に対して特異的な結合親和性を示すことを初めて見出した。また、プロテアーゼ限定消化によって、UQ-1 の結合部位を C 末端付近の Phe221-Lys234 に限定することに成功した。

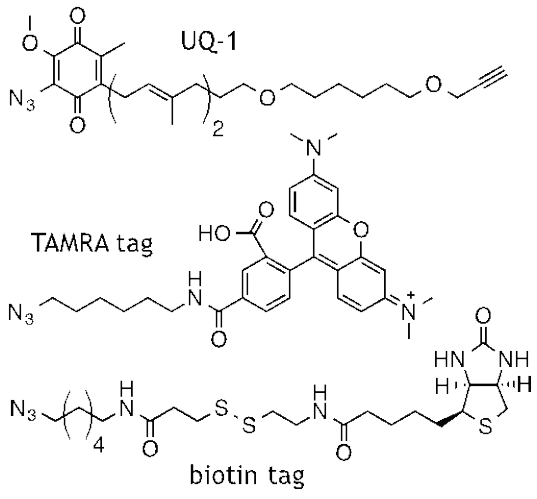



**図 1. ユビキノンプローブ（UQ-1）とタグの構造**

Ubiquinone, VDAC, Photoaffinity labeling

発表責任者：三芳秀人（miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B056
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 新規抗がん剤シード・10-Me-aplog-1 のがん細胞増殖抑制機構

# The mechanism of anti-proliferative activity of 10-Me-aplog-1, a new anti-cancer seed

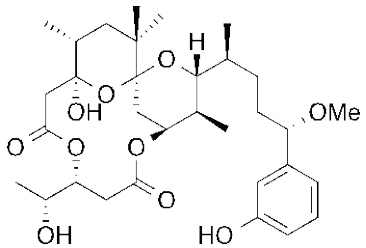
○花木 祐輔[1]、堀田 夏紀[1]、菊森 将之[1]、岡村 睦美[2]、旦 慎吾[2]、入江 一浩[1] ([1]京大農、[2]がん研)
○Yusuke HANAKI[1], Natsuki HOTTA[1], Masayuki KIKUMORI[1], Mutsumi OKAMURA[2], Shingo DAN[2], Kazuhiro IRIE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Cancer Chemotherapy Center)

【背景・目的】

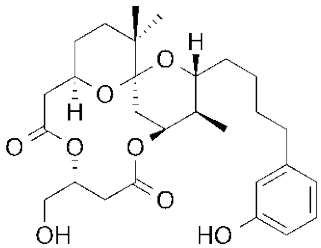
プロテインキナーゼ C（PKC）は細胞の増殖，分化，アポトーシスといった情報伝達の中枢を担っており，がん，アルツハイマー病，エイズといった難治性疾患の治療における標的酵素として注目されている．しかしながら，ホルボールエステルに代表される天然の PKC 活性化剤は，発がん促進ならびに炎症作用を示すため，薬剤としての利用は著しく制限されている．一方で，アメフラシ由来の炎症性物質・debromoaplysiatoxin（DAT）の単純化アナログである 10-Me-aplog-1（**1**）は，これらの副作用を示すことなく，数種のがん細胞株（A549，MDA-MB-231 など）に対して顕著な増殖抑制作用を示すユニークな化合物である（Kikumori, M. *et al*., *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614）．また，**1** のがん細胞株選択性は既知の抗がん剤とはまったく異なっていたことから，新規の作用機構を有する可能性が考えられる．最近，aplog 類の PKC アイソザイム結合能とこれらのがん細胞株に対する増殖抑制活性に相関があることを見いだした（Hanaki, Y. *et al*., *Tetrahedron* **2013**, *69*, 7636）．本研究では，**1** のがん細胞増殖抑制における PKC の寄与を明らかにするとともに，各種がん細胞株の aplog 感受性の違いに着目して増殖抑制に関与している PKC アイソザイムを同定することを目的とした．

【方法・結果】

肺がん由来の A549 細胞に対する増殖抑制試験（MTS 試験）を，PKC 阻害剤 Gö6983 存在下にて行ったところ，**1** の増殖抑制活性が消失した．これより，A549 細胞において PKC アイソザイムが増殖抑制に関与していることが示唆された．続いて，数種のがん細胞株における各 PKC アイソザイムの発現量をウエスタンブロットによって調べた結果，aplog 感受性株では非感受性株と比較して PKCα の発現量が顕著に高いことが判明した．さらに，siRNA によって A549 細胞における PKCα の発現をノックダウンしたところ，**1** の増殖抑制活性は有意に低下した．一方，アポトーシスに関与すると考えられている PKCδ のノックダウンは，増殖抑制にほとんど影響を与えなかった．以上より，aplog 類の特定のがん細胞株に対する増殖抑制作用は，主として PKCα の活性化を介していることが示唆された．



Debromoaplysiatoxin (DAT)



10-Me-aplog-1 (**1**)

protein kinase C, anti-proliferative, aplog

発表責任者：入江　一浩（irie@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B057
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

3-β-Methoxy-5-cholestene: オビヤスデ目ヤスデで普遍的に分布
3-β-Methoxy-5-cholestene, distributed commonly among Polydesmoid millipedes
○桑原 保正[1]、田辺 力[2]、浅野 泰久[1] ([1]富山県立大・生工科・生工研セ、[2]熊本大・教育・理科教育)
○Yasumasa Kuwahara[1], Tsutomu Tanabe[2], Yasuhisa Asano[1] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]Kumamoto Univ., Edu., Sci. Edu)

〔目的〕マンデロニトリルとその分解物及び反応物を主要な防御分泌成分とするオビヤスデ目Polydesmoideaのヤスデをヘキサン抽出し、GC/MS分析によりその成分を調べていたところ、高沸点部分にコレステロールではないステロイド成分の存在を知った。そのステロイドの同定と近縁種ヤスデでの分布を調べる。
〔材料及び方法〕タンバアカヤスデ*Nedyopus tambanus tambanus* (Attems)、オビヤスデ属sp. *Epanerchodus* sp、キシャヤスデ*Parafontaria laminate* (Attems)、ヘラバヤスデ*Parafontaria falcifera* (Verhoeff)、マクラギヤスデ*Niponia nodulosa* Verhoeff、ヤケヤスデ*Oxidus gracilis* (C. L. Koch)、ヤンバルトサカヤスデ*Chamberlinius hualienensis* Wangの計７種オビヤスデ目Polydesmidaと、対照としてヒメヤスデ目Juridaヘルヘフフジヤスデ*Anaulaciulus simplex*.(Verhoeff)を用いた。ヤスデを３分間ヘキサンに浸漬し、ヘキサン層（以下、抽出物と略）を直ちに、以下のGC/MS条件{(5975 Inert XL; Agilent, at 70 eV), HP-5MS capillary column (0.25mm x 30 m, 膜厚0.25 μm), He；1.00 ml/min, 温度条件 A: 60°C(2 min hold) -10°C/min - 290°C,で防御分泌成分を分析した。さらに温度条件 B: 200°C (2 min hold) - 10°C /min - 290°C (5 min hold)で、ステロイド成分を分析した。標準物質3β-methoxy-5-cholesteneは無溶媒下cholesterolとヨウ化メチルをRaoら(1999)の方法で反応させて調製した。
〔結果及び考察〕 温度条件 A による GC/MS 分析で、結果的に多くのヤスデで観察できた高沸点成分 $M^+$: m/z 400（$t_R$ 27.75 min、存在量 1%未満）は GC/MS データの検索から 3β-methoxy-5-cholestene (I)と推定し、合成により同定した。ヤスデ７種をそれぞれ抽出し、このエーテル(I)の存在を温度条件 B の GC/MS 分析で調べた結果、５種の主成分は当該エーテル(I)であった。特にヤケヤスデとキシャヤスデでは、100%近い純度であった。オビヤスデ属 sp.では 3β-cholesterol(II)との等量混合物、成虫時に一般的な防御成分を持たないマクラギヤスデ（Kuwahara et al., 2015）では、アルコール(II)が主成分、エーテル(I)は痕跡量であった。結果として、すべてのオビヤスデ目ヤスデにはエーテル(I) が検出でき、内５種では主成分であった。対照のヒメヤスデ目ヘルヘフフジヤスデからはステロイド成分は検出できなかった。オビヤスデ目の体表成分として、エーテル(I) は一般的に広く分布すると思われる。天然における著量のエーテル(I)の存在は藍藻 *Scytonema* sp.で報告されており、アルコール(II)及びその酢酸エステルとの混合物である（Rezanka et al., 2003）。

3-β-methoxy-5-cholestene in polydesmoid millipedes, cholesterol methyl ether from polydesmoid millipedes, cholesterol methyl ether as body surface component

発表責任者：桑原保正（kuwahara@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：3B058
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# β-catenin 変異型がん細胞選択的に細胞死を誘導する化合物の探索

# Screening of a Compound Selectively Induces Cell Death in ß-Catenin Mutated Tumor Cell Lines

○池田 拓慧、田代 悦、井本 正哉（慶大理工）
○Hiroaki Ikeda, Etsu Tashiro, Masaya Imoto (Keio Univ.)

<目的>

Wnt シグナル伝達経路は細胞増殖に関わるシグナル経路として知られており、β-catenin がその中心を担っている。β-catenin に活性型の変異が生じると Wnt シグナルが異常に活性化しがん化することが知られており、このような変異は大腸がんの約 10%に認められる。しかし、これまでに有効な治療薬は開発されていないのが現状である。そこで、β-catenin 変異型がん細胞選択的に細胞死を誘導することによって、副作用が少なくがんの縮退を見込める薬剤リード化合物の探索を試みた。

<方法と結果>

まず、β-catenin 変異型がん細胞 HCT116 細胞に対して細胞死を誘導し、β-catenin 野生型がん細胞 A375 細胞に対しては細胞死を誘導しない化合物を天然物ライブラリーより探索した。その結果、metacycloprodigiosin（mcPG)がそのような活性を有することを見出した。続いて、mcPG が V-ATPase を阻害するという報告がなされていたことから、他の V-ATPase 阻害剤も mcPG と同様の活性を示すか検証した。構造の異なる V-ATPase 阻害剤 Bafilomycin A1 および Concanamycin A も HCT116 細胞選択的に細胞死を誘導したことから、V-ATPase の阻害によって HCT116 細胞に対する選択的毒性が示されていることが分かった。さらに、V-ATPase 阻害剤が本当にβ-catenin が変異した細胞に対して選択的に細胞死を誘導するのか調べるため、β-catenin 野生型細胞に変異β-catenin を過剰発現させることにより感受性が変化するか評価した。その結果、変異β-catenin を過剰発現させた細胞に対して V-ATPase 阻害剤が有意に細胞死を誘導したことから、V-ATPase 阻害剤は変異β-catenin に依存して細胞死を誘導することが強く示唆された。

<結論>

mcPG がβ-catenin 変異型がん細胞選択的に細胞死を誘導することを見出した。また、mcPG を含む V-ATPase 阻害剤の誘導する細胞死は、変異β-catenin に依存した選択的な細胞死であることが示唆された。

β-catenin, Cell death, V-ATPase

発表番号：3B059
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 疫病菌交配ホルモンα2 は対ホルモンα1 のアンタゴニストである

# The *Phytophthora* mating hormone α2 is an antagonist of the counter-hormone α1

張 莉[1]、矢島 新[2]、○小鹿 一[1]([1]名大院生命農、[2]東農大応生科)
Li ZHANG[1], Arata YAJIMA[2], ○Makoto OJIKA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Tokyo Univ. Agric.)

## 背景・目的

農作物に甚大な被害を与える疫病菌 *Phytophthora* は有性生殖の際に交配ホルモン α1, α2 を利用し、異なる交配型の相手を認識する。これは一種の自家不和合性であり、交配相手が不在の時に無駄な自家和合を避けるシステムと考えられる。今回、α1（A1 交配型が分泌）により誘導された A2 交配型の有性生殖が、以外にも A2 交配型自身が分泌する α2（本来 A1 交配型の有性生殖を誘導するホルモン）により抑制されることを見出した。この予想しなかった現象の機構解明を目的とする。

## 方法・結果

*P. nicotianae* の A2 交配型にペーパーディスク法で α1（30 ng/disk）を投与すると、有性胞子である卵胞子が誘導される（図、写真中央）。このアッセイ法において α2（30, 100 ng/disk）を同時投与すると、卵胞子形成は有意に阻害された（図、写真右、+α2 100 ng/disk）。この阻害活性は高く、1:1 のモル等量でほぼ 50%阻害を示した。構造活性相関を調べるため 10 種類の α ホルモン類縁体の活性を評価したところ、1-OAc-α2、16-OAc-α2、1,16-di-OAc-α2 は α2 と同等の阻害活性を示したが、11-OAc-α2 および 2,3-dihydro-α2 は活性を消失したことから、α2 の 11-OH 基と二重結合が α1 活性阻害に必須であることが判った。これらの結果から、「α1 は A2 交配型のもつ α1 受容体に、α2 は A1 交配型のもつ α2 受容体に特異的に結合する」という従来の予想に加え、「α2 は α1 受容体にアンタゴニストとして結合できる」という新たな知見を得た。この現象を説明するための受容体認識モデルを提案する。

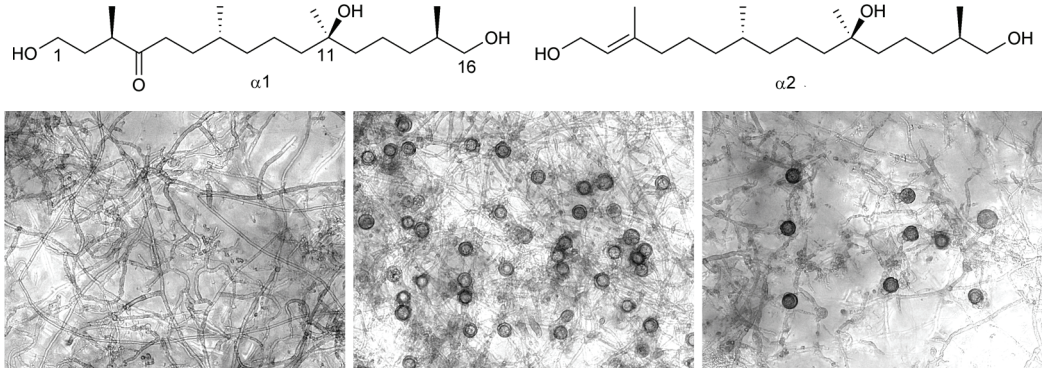



Fig. Interference of α1-induced sexual reproduction of *P. nicotianae* (A2 mating type) by α2. (From left) control, +α1 (30 ng), +α1(30 ng)+α2 (100 ng).

Phytophthora, mating hormone, sexual reproduction

発表責任者：小鹿 一（ojika@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3B060
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Inhibitory activities of deoxy-D-allose fatty acid esters on plant growth

○Md Tazul Islam Chowdhury[1], Hikaru Ando[2], Ryo C. Yanagita[2], Yasuhiro Kawanami[2] ([1]Ehime Univ., [2]Kagawa Univ.)

We have previously reported the regioselective syntheses of 6-*O*-decanoyl-2-dideoxy-D-allose (2-DOAll), 6-*O*-decanoyl-1,2-dideoxy-D-allose (1,2-DOAll) and 6-*O*-decanoyl-1,2-dideydro 1,2-dideoxy-D-allose (1,2-DHAll) and their biological activities on plant growth. Among them, 2-DOAll-C10 and 1,2-DHAll-C10 showed significant growth inhibitory activity on plant growth. In this study, we investigated the mechanism of action of 2-DOAll-C10 and 1,2-DHAll-C10 on rice growth comparing to known growth retardants daminozide.

We investigated the effect of co-addition of gibberellin (GA) on growth-inhibition by the deoxy-D-allose esters. Rice seeds (*Oryza sativa* L. cv. Nihonbare) were soaked in water for 2 days at 30 ºC under fluorescent light. Seven germinated seeds were transplanted into a tube containing the deoxy-D-allose ester and GA in 0.05% Tween 20 solution. After incubating for 7 days under light, the total length and length of the second leaf sheath of each rice seedlings were measured and the growth ratios to the control value were calculated. We also examined the effect of co-addition of GA on the inhibition by daminozide because known plant growth retardants such as daminozide which are structural mimics of 2-oxoglutaric acid are reported to block 3ß-hydroxilation of GA, the last step of GA biosynthesis.

In the experiment, we found the recovery of rice growth (135, 155 and 165%) when $GA_3$ (1 μM) was co-added with a solution of 2-DOAll-C10 (0.20 mM), 1,2-DHAll-C10 (0.40 mM), and daminozide (1.5 mM), respectively. These results implied that deoxy-D-allose esters might mainly inhibit gibberellin biosynthesis due to the similar behavior to daminozide.

rare sugar, D-allose, inhibitory activity

発表責任者：Yasuhiro Kawanami（kawanami@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：3B061
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 多剤超感受性酵母を用いたリードスルー活性評価系の構築

# Construction of readthrough activity evaluation system using multidrug sensitive yeast strain.

○岩本 亮介[1]、濱田 圭佑[1,2]、林 良雄[2]、臼井 健郎[1] ([1]筑波大生命環境、[2]東京薬大薬)
○Ryosuke Iwamoto[1], Keisuke Hamada[1,2], Yoshio Hayashi[2], Takeo Usui[1] ([1]Univ. Tsukuba, [2]Tokyo university of pharmacy and life sciences)

**【背景・目的】**ヒト遺伝性疾患の約 10~20%はエクソン内のナンセンス突然変異（未熟終止コドン、premature termination codon (PTC)）に起因すると言われている。近年その治療法の一つとして、mRNA 上の未熟終止コドンをリボソームでのタンパク質合成の段階で読み飛ばす（リードスルー）ことで、機能を持つタンパク質を発現させる方法が提唱されており[1]、リードスルーを引き起こす薬剤（リードスルー薬）の開発が進められている。しかしながら、通常細胞内では抑制されているリードスルーに関わる機構には不明な点が多いため、高い活性を示すリードスルー薬の開発は困難である。我々は薬剤排出系に関わる 12 遺伝子を破壊するとともに胞子形成能を向上させることで、高い遺伝学的解析能を維持した多剤超感受性酵母（12geneΔHSR）を構築し、本大会[2]や論文[3,4]等で報告してきた。今回、12geneΔHSR を用いてリードスルー薬の一つであるネガマイシン類縁体の活性評価系、並びに作用機能解析に有効な酵母株の構築を目的として研究を行った。

**【方法・結果】**細胞内でリードスルーを抑制する機構の一つとして nonsense-mediated mRNA decay（NMD）経路が知られている。ネガマイシン類縁体が NMD 経路の阻害を介してリードスルーを引き起こしているかを検討するため、NMD 関連遺伝子の一つである *UPF1* に aid タグを導入し、IAA 依存的にリードスルーを引き起こす多剤超感受性酵母を作成した。次に、この酵母株のリードスルー活性を検出するため、１）アデニン合成遺伝子 *ADE2* への PTC 変異導入、２）PTC 導入 *LacZ* 遺伝子プラスミド導入株を構築した。リードスルー薬の標的指向性を検討するために、*ade2-E64X (ochre*、*amber*、または *opal)* を 12geneΔHSR に導入した。これらの株はアデニンが不足した培地では赤い色を呈色するがリードスルーが起こると白くなり、*LacZ* の ß-galactosidase 活性によりリードスルー活性の定量が可能である。現在これらの株を用い、ネガマイシン類縁体の活性を検討しているところであり、合わせて報告する予定である。

1) Welch, E.M. *et al., Nature,* **447**, 87-91 (2007)
2) 2013 年日本農芸化学会大会（講演番号: 2C21p15)
3) Chinen, T. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1588-1593 (2011)
4) Chinen, T. *et al., J. Gen. Appl. Microbiol.*, **60**, 160-162 (2014)

Readthrough, Negamycin, Nonsense-mediated mRNA decay

発表責任者：臼井健郎（usui.takeo.kb@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：3B062
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

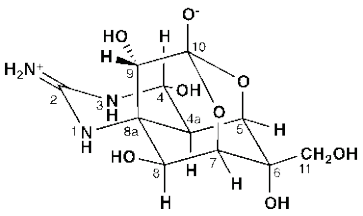
# 電位依存性ナトリウムチャネルに対するテトロドトキシンおよび類縁体の阻害活性評価

# Evaluation of tetrodotoxin and its analogues on inhibitory activities against the voltage-sensitive sodium channels

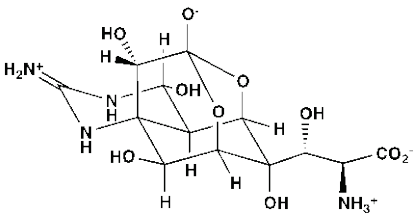
○塚本 匡顕[1]、千葉 雪絵[1]、安立 昌篤[2]、榊原 良[2]、所 聖太[2]、今津 拓也[2]、佐竹 佳樹[2]、長 由扶子[1]、西川 俊夫[2]、山下 まり[1]、此木 敬一[1] ([1]東北大農、[2]名大農)
○Tadaaki TSUKAMOTO[1], Yukie CHIBA[1], Masatoku ADACHI[2], Ryo SAKAKIBARA[2], Seita TOKORO[2], Takuya IMAZU[2], Yoshiki SATAKE[2], Yuko CHO[1], Toshio NISHIKAWA[2], Mari YAMASHITA[1], Keiichi KONOKI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Nagoya Univ.)

**【背景・目的】**

フグやイモリに含まれるテトロドトキシン（Tetrodotoxin, TTX）は電位依存性ナトリウムチャネル（$Na_v$）に対する特異的阻害剤である。$Na_v1$ 型には９つのサブタイプ（$Na_v1.1$~$Na_v1.9$）が存在し、$Na_v1.5$、$Na_v1.8$、$Na_v1.9$ は TTX 非感受性である。一般的に各サブタイプを選択的に認識する高結合性リガンドは、より副作用の少ない治療薬の開発において有用であるが、各 $Na_v$ サブタイプに対する TTX および TTX 類縁体の結合性は評価されていない。本研究ではパッチクランプ実験により $Na_v1$ 型単一サブタイプに対する TTX および TTX 類縁体の阻害活性を評価したので報告する。



Tetrodotoxin (TTX)



Chiriquitoxin (ChTX)

【計画・方法】本研究ではヒト型 $Na_v1.1$（$hNa_v1.1$）、$hNa_v1.3$、$hNa_v1.4$、$hNa_v1.7$ および TTX 非感受体である $hNa_v1.5$ を発現させた Hek293T 細胞を用い、Whole-cell patch clump 実験により阻害活性評価を行った。リン酸カルシウム法により $hNa_v$ 発現用プラスミドおよび CD8 発現用プラスミドを HEK293T 細胞に一過性導入し、CD8 抗体結合型ビーズを用いて $hNa_v$ 発現細胞を同定した。Whole-cell patch clamp system により同定した発現細胞の $Na^+$電流を測定した。また、文献記載の条件で TTX および TTX 類縁体の阻害活性を評価した。

【結果・考察】ホールセル記録の物理化学パラメーターより各サブタイプの発現を確認した。TTX 感受性を示すサブタイプに対する TTX の $IC_{50}$ 値はそれぞれ nM スケールであった一方、TTX 非感受性を示す $hNa_v1.5$ に対する $IC_{50}$ 値は 4.5 ± 0.73 μM であった。また、TTX 類縁体は TTX と比べて TTX 感受性のサブタイプに対して著しく弱い活性を示した。しかし、チリキトキシン (Chiriquitoxin, ChTX) は $hNa_v1.5$ に対して 2.9 ± 0.44 μM の $IC_{50}$ 値を示し、TTX よりも強い阻害活性を示した。これは 11 位から伸張したアミノ基とカルボキシル基が $hNa_v1.5$ の結合部位ポケットへと入り込んだためと考えられた。本講演では以上の詳細を説明する。

【参考文献】Catterall, W. A. *et al.* , *Pharmacal. Rev*. **2005**, *57*, 397-409.

Sodium channel, Tetrodotoxin, Patch clamp

発表責任者：塚本匡顕（tadaaki.tukamoto.q4@dc.tohoku.ac.jp）

発表番号：3B063
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による褐変機構の解明
# BROWNING MECHANISM ON THE ROOTS OF RICE PLANT ATTACKED BY RICE ROOT APHID, RHOPALOSIPHUM RUFIABDOMINALIS

○手林 慎一[1]、森 梓紗[1]、及川 彰[2]、佐々木 亮介[3]、斉藤 和季[4]、上手 麻希[5]、間世田 英明[5]、石原 亨[6] ([1]高知大農、[2]山形大農、[3]理研 PSC、[4]千葉大院薬、[5]徳島大 STS、[6]鳥取大農)
○Shinichi Tebayashi[1], Azusa Mori[1], Akira Oikawa[2], Ryosuke Sasaki[3], Kazuki Saito[4], Maki Uwate[5], Hideaki Maseda[5], Astushi Ishihara[6] ([1]Kochi Univ., [2]Yamagata Univ., [3]RIKEN PSC, [4]Chiba Univ., [5]Univ. Tokushima, [6]Tottori Univ.)

【目的】
我々の研究グループでは根寄生性害虫であるオカアボノアカアブラムシ（*Rhopalosiphum rufiabdominalis*） がイネ根に寄生すると、イネは２段階の防御機構を展開することを見出した。即ち、イネはアブラムシ幼虫の成長阻害活性を示すセロトニンを蓄積させることで化学的防御を発現し、その後、褐変とともに根を硬化させ物理的防御を発現することを見出した。現在までにこの褐変機構がコリスミ酸から始まる生合成系路全体の活性化により生じることと、この褐変がサリチル酸(SA)の処理により促進することを解明してきた。しかしこの時の植物体内での SA の動態については未解明のままであったため、本研究では SA の動態について検討した。

【方法】
播種4日後のイネの芽出しにアカアブラムシ有翅雌成虫を接種し、イネ根の褐変状態とアブムシの寄生状況を観察するとともに、イネ根を採取し各種分析に供した。イネ根はメタノールで抽出し、抽出液をLC-MS(MRM)で分析することSA及びSAGの定量を行った。遺伝子発現解析はqRT-PCRシステムを用いて行った。即ち、採取されたイネ幼根から、RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いてTotalRNA を抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAライブラリを作成した。これとプライマーもとに遺伝子発現量を定量した。

【結果】
イネ根に含まれる SA 量を測定すると､未処理の根では SA 濃度は減少する傾向であるのに対して SAG 濃度は増加する傾向が見られ、両者の合計濃度はほぼ一定であった。一方でアブラムシを寄生させると SAG 濃度は変化しないものの、SA 濃度は増加することが判明した。この増加が褐変の進行と一致することと、イネ根への SA 処理が褐変を促進する事実から、SA の蓄積がイネ根の褐変を制御しているものと考えられた。SA の生合成経路はコリスミ酸からイソコリスミ酸を経て SA が生合成される経路と、コリスミ酸からフェニルアラニンを経て SA が生合成される経路の二つが知られている。両者の最初の反応段階である *Isochorismate mutase* と *Chorismate mutase* の発現量は何れも大きく上昇していたが、後者に関わる *Phenylalanine ammonia lyase* や *Benzoic acid 2-hydroxylase* の発現変動は小さいことが判明した。これらのことからイネ根で褐変が生じる際には、主にイソコリスミ酸経路で SA 生合成され、その蓄積により制御されているものの想定された。

aphid, salicylate, rice

発表責任者：手林慎一（tebayasi@kochi-u.ac.jp）

発表番号：3B064
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# カイコ麻痺活性を示す環状ペプチド PF1171 類の三次元構造－活性相関

# 3D structure-activitiy relationship of PF1171s, cyclic hexapeptides with silkworm-paralytic activity

○増田 裕一[1,2]、田中 錬[2]、土井 隆行[2] ([1]三重大生物資源、[2]東北大薬)
○Yuichi MASUDA[1,2], Ren TANAKA[2], Takayuki DOI[2] ([1]Mie Univ., [2]Tohoku Univ.)

**【背景と目的】**環状ペプチド PF1171 類（図 A）はカイコに対して経口投与で麻痺を引き起こす．環状ペプチドは多様な立体配座を取ることから，作用機構の詳細な解明には活性立体配座を明らかにすることが重要である．本研究グループはこれまで，PF1171F の X 線結晶構造解析および NMR による三次元構造解析を行い，4 本の分子内水素結合が立体配座の維持に大きな役割を果たしていることを示唆した（図 B）．しかしながら，本立体配座と活性との関係は不明である．本研究では PF1171 類の活性立体配座の解明を目的として，PF1171F の類縁体を合成して活性を評価するだけでなく，その三次元構造を解析することにより，三次元構造－活性相関研究を行った．

**【方法と結果】**これまで確立した PF1171 類の合成法[1)]に基づき，固相法を用いたペプチド鎖の伸長と液相における環化反応によって，23 種類の PF1171F 類縁体を並行して合成した．これらの類縁体をカイコに血液注射して麻痺活性を評価するとともに，NMR による三次元構造解析を行った．その結果、$^1$H NMR スペクトルが PF1171F と類似している類縁体（図 C: D-*allo*-Ile→D-Ala など）では活性が維持されているのに対し，分子内水素結合の様式が変わってスペクトルが異なる類縁体（図 C: D-Ala→L-Ala など）では活性が失われる傾向が見られた．本結果は，結晶の立体配座（図 B）が麻痺活性の発現に深く関わっていることを示唆している．さらに，経口投与による麻痺活性試験を行ったところ，血液注射とは全く異なる結果が得られたので，三次元構造の観点から考察する．

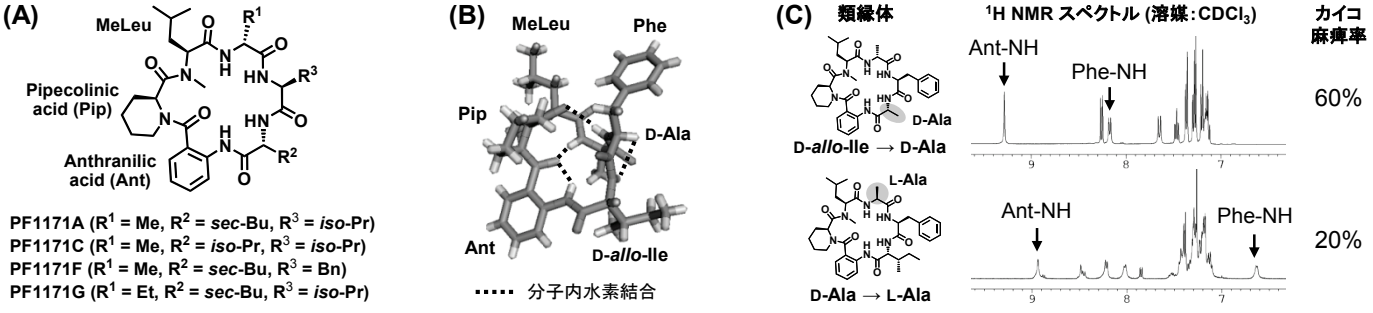



**図** (A) PF1171 類の化学構造．(B) PF1171F の結晶構造．(C) PF1171F の三次元構造－活性相関．

**【引用文献】**

1. Masuda, Y.; Tanaka, R.; Kai, K.; Ganesan, A. Doi, T. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 7844.

cyclic peptide, structure-activity relationship, silkworm

発表番号：3B065
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

スルホクリックを指向した発蛍光性光ラベル法の開発
Development of fluorogenic photoaffinity labeling by sulfo-click ligation
○森本 正大、千葉 順哉、畑中 保丸、友廣 岳則（富大薬）
○Shota MORIMOTO, Junya CHIBA, Yasumaru HATANAKA, Takenori TOMOHIRO (Toyama Univ.)

［研究背景・概要］
薬物および生体小分子の標的を同定することは、生物学的知見を得るためや創薬研究においても非常に重要である。そのための手法として、様々な生物学的手法の他にアフィニティーラベル法などの化学的手法を用いた標的同定法が開発されてきた。これらの化学的手法の内、光アフィニティーラベル法による同定手法は取り扱いの容易さやラベルの特異性の高さ、そして様々な系に適用できる汎用性の高さが特徴としてある。

近年、我々の研究室ではこの光ラベル法を基に、二種類の条件下で段階的に光照射を行うだけで標的をラベル化および蛍光化を行うことのできる *o*-ヒドロキシ桂皮酸骨格を含む光ラベルユニットを開発した。本ユニットを用いた手法は桂皮酸部位の光環化反応により標的を蛍光化、ラベル化標的を消化後 LC-MS および MS/MS を用いることで迅速にラベルペプチドの配列を同定することができる。また同時にこの蛍光化プロセスは切断性を有しており、リガンド及び精製用タグをパージする機能性部位として捉えることもできるため、ビオチン-アビジンシステムを用いたラベル化産物の選択的精製手法としても応用できる。

本研究では、この光ユニットをリガンドに導入する際にアシルスルホンアミドを介することで二種類の光反応をより選択的に行えるようになっただけでなく、スルホクリックを用いることで位置選択的に高収率でユニットを導入できるためにプローブ合成の容易化を行った。

［実験結果］
本ユニット結合部位のカルボン酸のチオエステル型を合成した。また、スルホクリックを指向した側鎖がスルホニルアジドであるアミノ酸を合成した。この２つのスルホクリック産物であるアシルスルホンアミド体に光照射を行った結果、pH 7 付近での光環化反応はほぼ進行せず、pH 10 条件では迅速に環化反応が進行した。また、ペプチドの Fmoc 固相合成法に適用できるスルホニルアジド体を開発し、これを組み込んだ合成ペプチドのスルホクリック反応によるプローブ化を行った。

スルホクリックを用いた本光反応性ユニットの導入は、光環化反応の制御の面だけではなく従来のアミド結合によるプローブ合成と比べても非常に容易にそして高収率で合成することに成功した。

photoafinity labeling, sulfo-click

発表番号：3B066
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 天然小分子化合物ゼルンボンによる分子シャペロン Hsp90 の活性化に関与するシステイン残基の同定

# Identification of cysteine residues that are involved in the enhancement of the Hsp90 ATPase activity by a naturally occurring small molecule zerumbone

○小松 太和、仲本 準 (埼玉大・理・分子)
○Taiwa KOMATSU, Hitoshi NAKAMOTO (Saitama Univ.)

【背景・目的】ハナショウガ(*Zingiber zerumbet* Smith)由来の小分子化合物 zerumbone は抗炎症作用や抗腫瘍活性など様々な生物活性を示す。zerumbone はシステイン残基などの求核性残基を介して標的タンパク質と結合する。真核生物において、分子シャペロン Hsp90 はシグナル伝達などに関与し、細胞の恒常性維持に関して中枢的な役割を担っている。原核生物では、シアノバクテリアの熱耐性の獲得に必須である。我々は、zerumbone が、原核生物や真核細胞に対して細胞毒性を示し、Hsp90 基質タンパク質の細胞内蓄積量を減少させることを明らかにして、最近の日本分子生物学会年会で報告した。本研究では、zerumbone による Hsp90 の修飾が、その機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。
【方法】シアノバクテリア(*Synechococcus elongatus* PCC 7942)の Hsp90 を精製し、実験に用いた。Hsp90 の ATPase 活性は、ピルビン酸キナーゼと乳酸脱水素酵素を共存させることで、ATP の加水分解と NADH の減少を共役させ、340 nm の吸光度減少速度から求めた。分子シャペロンの主要な機能である変性タンパク質の凝集阻止活性を求めるために、熱変性したリンゴ酸脱水素酵素の凝集塊の形成に伴う光散乱強度の増加を 360 nm の見かけの吸光度の増加として分光光度計を用いて経時的に測定した。また、zerumbone が、Hsp90 のシステイン残基に特異的に結合することを質量分析等によって明らかにしたので、シアノバクテリア Hsp90 のすべてのシステイン残基をアラニン残基に置換した Hsp90 変異タンパク質を構築・精製し、このアラニン置換 Hsp90 の ATPase 活性や凝集阻止活性に与える zerumbone の効果を解析した。
【結果】zerumbone は *S. elongatus* PCC 7942 の Hsp90 の ATPase 活性を濃度依存的に活性化し、凝集阻止活性も活性化した。また、アラニン置換 Hsp90 を用いた ATPase 活性測定により、Hsp90 の中間ドメインと C 末端ドメインに存在するシステイン残基が zerumbone による活性化に関与することが明らかになった。
【考察】ATP 結合部位の存在する N 末端ドメインとは離れた中間ドメインや C 末端ドメインに存在するシステイン残基への zerumbone の修飾は、ATPase 活性に対してアロステリックに影響すると考えられる。また、真核生物 Hsp90 のシステイン残基は様々な翻訳後修飾を受けることが明らかになっている。従って、本研究の結果は、Hsp90 の活性化に関与するシステイン残基が、Hsp90 の機能調節に関与していることを示唆している。

Hsp90, zerumbone, Molecular Chaperone

発表番号：3B067
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 5-リポキシゲナーゼ代謝産物による Nrf2 活性化機構

# Nrf2 activation mechanism by 5-lipoxygenase metabolites

○長洞 希、箱崎 真友佳、平田 優紀、白石 朗子、山田 秀俊（岩手生工研）
○Nozomi NAGAHORA, Mayuka HAKOZAKI, Yuki HIRATA, Akiko SHIRAISHI, Hidetoshi YAMADA (IBRC)

【背景・目的】

5-リポキシゲナーゼ（5-LOX）は、ω-6 多価不飽和脂肪酸のアラキドン酸（AA）を代謝し 5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸（5-HETE）やロイコトリエン A4 を生成する。これに対し、ω-3 多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）も 5-LOX により酸化され、5-ヒドロキシエイコサペンタエン酸（5-HEPE）およびロイコトリエン A5 に代謝される。動脈硬化の発生部位では、血管壁に侵入してきたマクロファージにおいて 5-LOX および 5-LOX 活性化タンパク質の発現が上昇し[1]、5-HETE, 5-HEPE, ロイコトリエン類の産生が誘導される。動脈硬化の病態形成の解明には、血管内皮細胞に対する 5-HETE, 5-HEPE, ロイコトリエン類の作用を明らかにする必要があるが、とりわけ 5-HETE, 5-HEPE の血管内皮細胞における生理作用は不明である。

転写因子 NF-E2-related factor（Nrf2）の活性化は酸化ストレスに対する保護機構の一つであり、炎症反応などで生じる過剰な活性酸素種（ROS）の消去に働く遺伝子群の発現を誘導する。本研究では 5-HETE および 5-HEPE による Nrf2 の活性化に注目し、血管内皮細胞に対する作用について検討した。

【方法・結果】

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）に対して、50μM の AA、EPA、5-HETE および 5-HEPE で刺激し、検討を行った。まず始めに、WST-1 法によって細胞毒性を検討したが、50μM 添加ではいずれの化合物も HUVEC に対する細胞毒性は示さなかった。5-HETE および 5-HEPE で刺激後 6 時間の細胞において、Nrf2 の核内移行（Nrf2 活性化）が観察された。さらに、Nrf2 によって転写が促進される抗酸化関連遺伝子 HMOX1 や SLC7A11 の発現を Real-time PCR 法で定量したところ、5-HETE および 5-HEPE 刺激による増加が観察された。これらの結果から、5-HETE および 5-HEPE によって Nrf2 の活性化が誘導されることが明らかになった。一方で、5-HETE および 5-HEPE 刺激 2 時間後の細胞において ROS が顕著に増加していたことから、5-HETE および 5-HEPE による Nrf2 活性化は ROS を介して起きていることが推察された。そこで、抗酸化剤の前処理により ROS 発生を抑制し、HMOX1 や SLC7A11 の遺伝子発現について検討したが、遺伝子発現は部分的にしか抑制されなかった。つまり、5-HETE および 5-HEPE による Nrf2 活性化には ROS 以外の機構が存在すると考えられる。現在、5-HETE および 5-HEPE による Nrf2 活性化経路について検討中である。

1. Rainer et al., *PNAS*, **100(3)**:1238-1243 (2003)

5-lipoxygenase, Nrf2, polyunsaturated fatty acid

発表番号：3B068
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

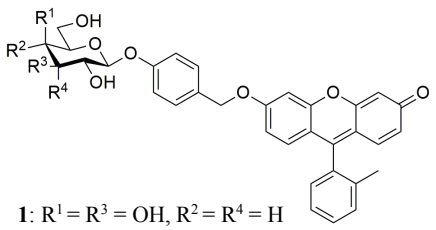
# ヒトβ-ガラクトシダーゼ（GLB1）のゴルジ体における新たな糖鎖修飾酵素としての可能性

# Possibility of human beta-galactosidase as novel glycan processing enzyme in Golgi apparatus

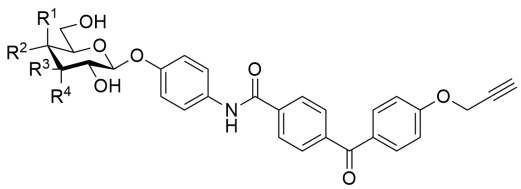
○三浦 一輝[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科、[2]日大生資科・生命化）
○Kazuki MIURA[1], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Chem. and Life Sci., College of Bioresource Sciences. Nihon Univ.)

【目的】ヒトβ-ガラクトシダーゼ (GLB1) は主にリソソームに局在し、またゴルジ体にも局在することが報告されている。しかし、ゴルジ体における GLB1 の機能は不明である。ここで、ゴルジ体における既知のタンパク質糖鎖修飾に着目すると、*N*-または *O*-結合型糖鎖末端にβ-ガラクトシド結合が現れることから、GLB1 がその結合を加水分解することにより糖鎖修飾に関与しているのではないかと考えた。そこで、ゴルジ体での GLB1 の活性蛍光イメージングと同定を行い、その機能を解明することを研究目的とした。

【方法と結果】GLB1 のイメージングのためには、本酵素を特異的にイメージング可能な蛍光基質が必要となる。そこで、GLB1 の立体構造 (PDB ID: 3THD) を用いたドッキングシミュレーションおよび我々が開発した QMC platform (*Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23, 73-79) を用いて精密に GLB1 の蛍光基質の分子設計を行い、蛍光基質 **1** を合成した。合成した蛍光基質 **1** をヒト細胞へ投与した結果、ゴルジ体に GLB1 の活性によると考えられるβ-ガラクトシダーゼ活性を確認した。さらに、GLB1 の基質特異性を明らかとするため、糖部分をアロースとした蛍光基質 **2** を合成し、細胞に投与した結果、ゴルジ体にβ-アロシダーゼ活性を見出した。そこで、蛍光基質 **1**, **2** を用いて染色部位を比較した結果、その染色部位が一致した。この結果は、ゴルジ体において GLB1 がβ-ガラクトシダーゼ活性とβ-アロシダーゼ活性を持つことを示している。次に、これら蛍光基質が GLB1 の基質となっているか同定するため、GLB1 を特異的にラベル化可能な蛍光基質に類似な構造を有する光アフィニティープローブ **3**, **4** を設計・合成し、それらを用いた光ラベル化により GLB1 の単離・同定を行った。その結果、プローブ **4** を用いた時、GLB1 を検出することができた。このことは、蛍光基質 **1**, **2** が GLB1 の基質となっており、GLB1 がゴルジ体においてβ-ガラクトシダーゼとして機能していることを示している。よって、GLB1 はゴルジ体において糖鎖末端のβ-ガラクトシド結合を加水分解する、新たな糖鎖修飾酵素であると考えられる。しかし、同定した GLB1 の質量分析における GLB1 カバレッジが十分ではなかったため、現在は上記問題点の解決を試みている。



**1**: $R^1 = R^3 = OH$, $R^2 = R^4 = H$
**2**: $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = R^4 = OH$



**3**: $R^1 = R^3 = OH$, $R^2 = R^4 = H$
**4**: $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = R^4 = OH$

glycan processing, galactosidase, photoaffinity label

発表責任者：三浦 一輝（kazuki.miura.bus@gmail.com）

発表番号：3B069
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ミトコンドリア複合体-I による合成ユビキノン QT の還元はプロトン輸送と共役しない

# Reduction of synthetic ubiquinone QT catalyzed by bovine mitochondrial complex I is decoupled with proton translocation.

○奥田 健司、村井 正俊、油屋 駿介、青木 航、三芳 秀人（京大院農）
○KENJI OKUDA, MASATOSHI MURAI, SHUNSUKE ABURAYA, WATARU AOKI, HIDETO MIYOSHI (Kyoto Univ.)

【背景・目的】ミトコンドリア電子伝達系の初発酵素である NADH-キノン酸化還元酵素（複合体-I）は、基質の酸化還元を担う親水性ドメインと、プロトン輸送を担う膜ドメインから構成される膜タンパク質複合体である。好熱細菌（*Thermus thermophilus*）複合体-I の結晶構造を参照すると、基質であるキノン結合部位は、内径約 8Å、奥行き約 30 Å の狭い洞窟様の構造をとることがわかっている［*1*］。これまでに当研究室では、タンパク質修飾法である Ligand-Directed Tosyl Chemistry（トシル化学）に着目し、特異的阻害剤をモチーフとした種々のリガンド分子を合成し、複合体-I のキノン結合部位に末端アルキンを導入する方法論を確立してきた[*2*]。本研究では、キノン還元反応のメカニズムを理解する一助とすべく、ユビキノンをモチーフとしたリガンド分子を合成し（QT, 図１）、複合体-I に対する修飾実験や QT 自身の電子受容活性の評価を行った。

【結果】ウシ心筋亜ミトコンドリア粒子（SMP）を QT と 37˚C で 24 時間インキュベートしたところ、複合体-I のキノン結合部位の最深部を構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 が特異的にアルキン化されることがわかった。一方、電子受容体としての QT の活性を評価したところ、天然型のユビキノンでは見られないユニークな特性がいくつか見出された。

QT の電子受容活性を評価したところ、速度論的パラメーターは短鎖ユビキノンの $Q_1$ と同等であるにも関わらず、ブラタシンやピエリシジンなどの特異的阻害剤に対して非感受性であった。また、触媒活性当たりの活性酸素の発生量を短鎖ユビキノン間で比較したところ、$Q_0$ などの親水性ユビキノンと比べて大幅に低いことから、QT はキノン結合部位から電子を受容していることが強く示唆された。さらに、基質の酸化還元に伴う膜電位形成を評価したところ、QT の還元は膜電位の形成を全く伴わないことがわかった。これは、QT の還元反応が膜ドメインでのプロトン輸送と共役しないことを意味するものである。QT は、キノンの還元が引き金となって駆動されるプロトン輸送のメカニズムを考察するための重要なツールとなることが期待される。

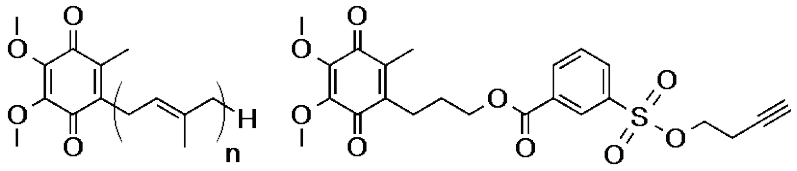


**図 1. ユビキノンの一般構造と QT の構造**

1)Baradaran et al. (2013) *Nature* 494, 443-448. 2) Masuya et al. (2014) *Biochemistry* 53, 2307-2317; 7816-7823.

mitochondrial complex I, ubiquinone, energy-coupling

発表責任者：三芳秀人（miyosi@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3B070
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Mechanism of lipid-suppressing activity of Eurycoma longifolia Jack in 3T3-L1 adipocytes

○Lucy LAHRITA, Eisuke KATO, Jun KAWABATA (Hokkaido University)

***Background:*** In previous study undertaken by the authors (Lahrita *et al.*, 2015), extracts *of Eurycoma longifolia* Jack (roots) demonstrated anti-lipidemic effects in 3T3-L1 adipocytes. Further studies on their molecular and cellular mechanisms are necessary to understand how the lipid metabolism is modulated by this medicinal plant.

***Aim of the study:*** To investigate the mechanism of lipid-suppressing activity of *E. longifolia* in 3T3-L1 adipocytes.

***Materials and methods:*** The roots of *E. longifolia* were extracted with a mixture of methanol and water. The differentiated 3T3-L1 adipocytes were serum-starved and then treated with *E. longifolia* extracts. For inhibitory study, cells were pre-treated with the respective inhibitors for 1 hour prior to the sample treatment. After incubation for 2 days, the supernatants were collected, and the amount of glycerol released into the medium was determined using Free Glycerol reagent (Sigma-Aldrich) and the absorbance was measured at a wavelength of 540 nm. Lipid accumulation on 3T3-L1 adipocytes was assessed using Oil Red O staining, in which tested extracts were added before differentiation for two days or on the forth day after differentiation. On day 9, the differentiated adipocytes were stained with Oil Red O and then the absorbance was measured at a wavelength of 520 nm. Protein expression was detected by western-blotting from cell lysate.

***Results:*** *E. longifolia* increased glycerol release from 3T3-L1 adipocytes in a concentration-dependent manner, thus representing an increase of triacylglycerol breakdown. Investigation on the target stage revealed that the plant suppressed lipid accumulation at the latter stage of lipid formation, but not at the early stage of adipogenic differentiation. Inhibitory studies demonstrated that *E. longifolia* activates triacylglycerol breakdown through PKA and ERK, but not JNK and p38 MAPK pathways. Immunoblot analysis confirmed the increase of phosphorylated protein of the target pathways.

Adipocytes, Eurycoma longifolia, Lipolysis

発表番号：3B071
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# セリ科植物由来ポリアセチレン化合物 falcarindiol の糖新生抑制機構と GSK-3β阻害作用

# Anti-diabetic effect and inhibition activity of GSK-3β by falcarindiol isolated from Apiaceae.

○吉田 潤[1]、西谷 直之[2]、伊藤 芳明[3]、木村 賢一[3]([1]岩手医大・教養教育セ・化学、[2]岩手医大・薬、[3]岩手大・農)
○Jun Yoshida[1], Naoyuki Nishiya[2], Yoshiaki Ito[3], Ken-ichi Kimura[3] ([1]Center Lib. Arts&Sci., Iwate Med. Univ., [2]Sch. of pharm., Iwate Med. Univ., [3]Fac. of Agri., Iwate Univ.)

【目的】グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3β(GSK-3β)は糖尿病やアルツハイマー病の疾患関連分子として注目されているセリン/スレオニンプロテインキナーゼで、GSK-3β阻害剤は 2 型糖尿病予防･治療剤の有効成分として期待されている。我々はこれまでに、$Ca^{2+}$超感受性の遺伝子変異酵母 YNS17 株を用いた薬剤スクリーニング系により植物天然資源から GSK-3β阻害物質を探索し、セリ科植物とウコギ科植物に主に含まれるポリアセチレン化合物の falcarindiol を活性物質として同定した。Falcarindiol は、*in vitro* でヒト GSK-3β を基質拮抗的に阻害し[1)]、ラット肝がん由来細胞株 H4IIE において糖新生刺激によるグルコース産生を抑制した。本研究では、falcarindiol の肝細胞における糖新生抑制効果の作用解析と *in vivo* における GSK-3β阻害活性を検討することを目的とした。
【方法】肝細胞における作用解析は、H4IIE 細胞を 12-ウェルプレートに $2\times10^5$ cells/ml で播種して 2 日間培養後、falcarindiol を作用させてインスリンシグナル伝達分子のタンパク質リン酸化レベルをウエスタンブロット法で調べた。*In vivo* GSK-3β阻害活性の検討は、ゼブラフィッシュ胚を用いた薬剤探索系[2)]にて Wnt/β-catenin 経路活性化による「眼の形成不全」を指標として評価した。受精後 4.5 時間のゼブラフィッシュ胚を 96-ウェルプレートに 5 胚/well で入れ、受精後 6 時間(シールド期)に falcarindiol または GSK-3β阻害剤 BIO を加えて 24 時間培養後、顕微鏡で眼の形成を観察した。
【結果】H4IIE 細胞における作用解析は、インスリン 10 nM を 1 時間作用させた時、Akt リン酸化(Ser473)および GSK-3β リン酸化(Ser9)の顕著な増加がみられた。同条件下で、falcarindiol 処理群は 20 μM で Akt リン酸化(Ser473)に変化がみられず、GSK-3β リン酸化(Ser9)の増加が認められた。一方、*in vivo* GSK-3β阻害活性の検討では、GSK-3β阻害剤 BIO をゼブラフィッシュ胚に作用させると 10 μM から「眼の形成不全」がみられた。同条件下で falcarindiol を作用させると、66 μM まで眼が形成され、100 μM で胚発生が抑制されたが、それぞれ活性を示さない濃度である falcarindiol 33 μM と BIO 0.5 μM を供処理したところ「眼の形成不全」がみられた。以上より、H4IIE 細胞における falcarindiol の糖新生抑制作用は、Akt の Ser473 リン酸化を介さない GSK-3β不活性化によることが示唆された。また、falcarindiol はゼブラフィッシュ胚において BIO と相乗的に Wnt/β-catein 経路を活性化する可能性が得られた。

1) Yoshida J., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 61(31), 7515-7521 (2013)
2) Nishiya N., *et al.*, *Chem. Biol.* 21(4), 530-540 (2014)

falcarindiol, GSK-3β, gluconeogenesis

発表責任者：吉田　潤（jyoshida@iwate-med.ac.jp）

発表番号：3B072
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# aldohexose 異性体の線虫成長阻害活性

# Growth inhibitory effects of aldohexose stereoisomers against *Caenorhabditis elegans*

○砂古口 博文[1]、佐藤 正資[1]、吉原 明秀[2]、新谷 知也[3]、大隈 一裕[3]、何森 健[2]（[1]香川大農、[2]香川大・希少糖研究セ、[3]松谷化学工業（株））
○Hirofumi SAKOGUCHI[1], Masashi SATO[1], Akihide Yoshihara[2], Tomoya Shintani[3], Kazuhiro Okuma[3], Ken Izumori[2] ([1]Kagawa Univ., [2]Rare Sugar Reseach Center, Kagawa Univ., [3]Matsutani Chemical Industry CO.,LTD)

【背景・目的】演者らは自然界に微量しか存在しない糖（希少糖）の生物活性を，モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて探索してきた。現在まで，ketohexose 異性体のなかから D-fructose の C-3 エピマーである D-psicose (D-allulose) を，また，aldopentose 異性体のなかから D-ribose の C-2 エピマーである D-arabinose に線虫成長阻害活性があることを報告した。本報告では，さらにスクリーニングを進め，aldohexose 異性体 全 16 種 D-, L-allose (All), altrose (Alt), glucose (Glc), mannose (Man), gulose (Gul), idose (Ido), galactose (Gal), talose (Tal) の成長阻害活性の比較を報告する。今まで行ってきたアッセイは，液体培地中に餌として大腸菌を共存させる二者培養 (monoxenic culture) の条件下のものであった (monoxenic assay)。しかし，この monoxenic assay では，試験物質の活性発現において大腸菌が影響している可能性を排除できない。そこで，本研究では，活性を認めた単糖について線虫用完全合成培地 CeMM (*Caenorhabditis elegans* maintenance medium) を用いて無菌培養 (axenic culture) の条件下でアッセイを行った (axenic assay)。また単糖の deoxy 誘導体，あるいは酵素阻害剤を添加した試験を行い，aldohexose の成長阻害メカニズムについて考察した。

【方法】Monoxenic assay: 同調培養によって得られた *C. elegans* 第一期 (L1) 幼虫をアッセイに用いた。試験容器には 24 ウェル細胞培養プレートを用い，試験する糖 (167 mM)，大腸菌を加えたＳ液体培地 200μＬ中に L1 幼虫 10-20 頭を移し，20℃で静置培養を行った。3 日後，各線虫個体の明視野顕微鏡画像を撮影した。ここから各個体の投影面積を計測し，それを成長の指標とした。Axenic assay: 培地は CeMM を使用し，培養期間は 7 日であること以外は monoxenic assay と同じ方法で行った。Deoxy 誘導体として 6-deoxy-D-All を，ヘキソキナーゼ (HXK) 阻害剤として 3-bromopyruvic acid (3-BPA)を用いた。

【結果・考察】Aldohexose 全異性体について monoxenic assay を行い，そのなかで希少糖 D-All, D-Tal, L-Ido が有意な成長阻害を示した。Axenic assay においても，これら 3 種の希少糖に阻害活性を認めた。6-Deoxy-D-All に活性が認められないこと，3-BPA 存在下では D-All 阻害活性が減弱することから，D-All の活性発現には HXK による 6 位のリン酸化が必要であることが示された。D-All, L-Ido はそれぞれ D-Glc の C-3,C-5 エピマーであり，D-Tal は D-Man の C-4 エピマー，D-Gal の C-2 エピマーである。以上を総合すると，D-All，D-Tal，L-Ido は線虫の糖代謝において antimetabolite として働いていることが推定された。

Growth inhibitory effect, aldohexose, *Caenorhabditis elegans*

発表責任者：佐藤正資（sato@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：3B073
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 中国産食用茸ツブイボタケ*(Thelephora vialis)*含有 vialinin A によるエキソサイトーシスを介した TNF-α放出阻害メカニズムの解明

# Inhibitory mechanism of exocytic TNF-α release by vialinin A, isolated form Chinese mushroom *(Thelephora vialis)*.

○菅谷 紘一[1]、並木 大輔[1]、吉岡 泰淳[2]、金田 紗耶香[1]、煙山 紀子[1]、小野瀬 淳一[1]、阿部 尚樹[1] ([1]東農大・応生・食品安全健康、[2]神戸大自然科学)
○ Kouichi SUGAYA[1], Daisuke Namiki[1], Yasukiyo Yoshioka[2], Sayaka Kaneta[1], Noriko Kemuriyama[1], Jun-ichi Onose[1], Naoki Abe[1] ([1]Dep. of Nutri. sci., and Food Saf., Faculty of Applied Bio Science, Tokyo Univ. of Agri, [2]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ)

【目的】
中国産食用茸ツブイボタケ(*Thelephora vialis*) 含有 *p*-terphenyl 化合物である vialinin A が抗原刺激したラット好塩基球系 RBL-2H3 細胞において TNF-αの産生と放出を 2 段階で阻害することが示唆されていることから、分子プローブを用いた標的分子の探索を行った結果、vialinin A 標的分子としてユビキチン分解酵素である ubiquitin-specific peptidase 5 (USP5)を同定し、さらにその酵素活性阻害が産生阻害と関連している可能性を明らかにした。しかし放出阻害作用に対する知見は得られていない。近年、TNF-α放出と同様な分泌小胞からの開口分泌に関与する分子として、脱 SUMO (small ubiquitin-related modifier)化を行う酵素の 1 種である SUMO-specific Protease 1 (SENP1)が報告されている。Vialinin A が USP5 の酵素活性阻害をすることから、ユビキチン様タンパク質である SUMO を加水分解する酵素に対しても阻害活性があるのではないかと考え、SENP1 に対する vialinin A の酵素阻害活性の検討を行い、阻害活性を有することを明らかにした。本研究では、SENP1 の発現制御により SENP1 と TNF-α放出との関連性を明らかにすることで、vialinin A による TNF-α放出抑制のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】
Vialinin A が SENP1 酵素活性阻害をすることから、細胞内での SENP1 発現抑制が TNF-α放出に及ぼす影響を検討するため、RNA 干渉の技法を用いた。RBL-2H3 細胞に、調整された siRNA をトランスフェクション試薬 Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入を行い、SENP1 mRNA レベルを PCR により発現減少を確認した。

【結論】
TNF-α放出と同様な分泌小胞からの開口分泌に関与する分子として報告されている SENP1 を、RBL-2H3 細胞において発現の減少を確認することができた。
現在、SENP1 を発現減少させた細胞において TNF-α放出量の検討を行っている。

TNF-α, SENP1, vialinin A

発表責任者：阿部 尚樹（abe@nodai.ac.jp）

発表番号：3B074
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Cisplatin 持続暴露による EMT 誘導機構

# Mechanism of Epithelial-mesenchymal transition induced by continuous exposure of Cisplatin

○今辻 紗也佳、大嶽 弘之、奈良部 進、田代 悦、井本 正哉（慶大理工）
○Sayaka Imatsuji, Hiroyuki Odake, Susumu Narabe, Etsu Tashiro, Masaya Imoto (Keio Univ.)

【目的】上皮間葉転換（EMT）は上皮細胞の形質が間葉細胞の形質へと転換する現象である。この現象は近年，がんの転移や抗がん剤耐性といったがんの悪性化に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。したがって，悪性度の高い間葉系がん細胞の形質を再び上皮系の形質に戻す，間葉上皮転換（MET）誘導物質はがんの悪性度を低下させる新たな抗がん剤シーズになることが期待される。そこで我々はこのような MET 誘導物質の探索，およびその誘導メカニズムの解析を試みた。

【方法と結果】我々は昨年の本大会で，上皮ヒト大腸がん LoVo 細胞に抗がん剤である Cisplatin(CDDP)を持続暴露することで得られた薬剤低感受性細胞 CDDP-LoVo 細胞では EMT が誘導されていることを報告した。そこでこの CDDP-LoVo 細胞に MET を誘導させる物質を，上皮マーカーE-cadherin の発現回復及び間葉マーカーN-cadherin の発現減少を指標に文科省・化学療法基盤支援活動班が配布している標準阻害剤キット SCADs から探索した。その結果， TGF-βR を阻害することが報告されている SB431542，TGF-βRI kinase inhibitorⅡ，および PP1 analog の 3 化合物に CDDP-LoVo 細胞に MET を誘導する活性があることを見出した。TGF-βは代表的な EMT 誘導因子の一つとして知られていることから，CDDP-LoVo 細胞では TGF-βシグナルが亢進しており，このことが EMT 誘導された原因と考えられる。そこで，LoVo 細胞と CDDP-LoVo 細胞の培養液中に含まれる TGF-β量を測定したところ，CDDP-LoVo 細胞の培養液中に含まれる TGF-β量が LoVo 細胞のそれに比べて約 5 倍多かった。また CDDP-LoVo 細胞で発現している TGF-βの mRNA 量が LoVo 細胞のそれよりも約 4 倍多かったことから，CDDP-LoVo 細胞では TGF-β産生量が亢進していることがわかった。さらには，LoVo 細胞に Cisplatin を添加すると 72 時間後に培養液中に含まれる TGF-β量が上昇することも見出した。

【結論】Cisplatin を持続暴露することで取得した CDDP-LoVo 細胞では CDDP 添加によって TGF-βが産生されて TGF-βシグナルが亢進しており，これによって EMT が誘導・維持されていること，また今回ヒットした TGF-βR 阻害剤は CDDP-LoVo 細胞で亢進している TGF-βシグナルを阻害することで MET を誘導していることが示唆された。

(1) Kajiyama H. *Int J Oncol* (2007) **2**, p277 (1) Kajiyama H. *Int J Oncol* (2007) **2**, p277

EMT, Cispatin, TGF-ß

発表番号：3B075
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

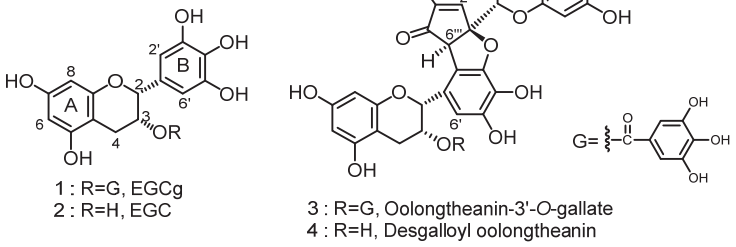
# 茶ポリフェノール類のコレステロールミセル溶解阻害活性とその分子機構に関する研究

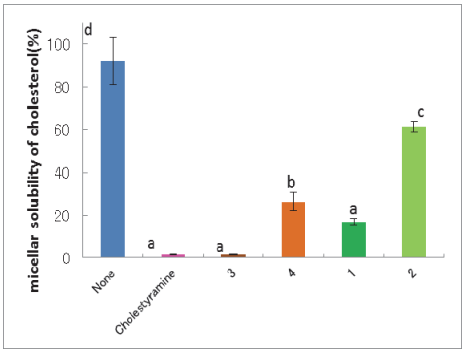
# Interaction between tea polyphenols and bile acids inhibits micellar cholesterol solubility

○小川 和樹、廣瀬 紗弓、内田 和宏、長岡 利、柳瀬 笑子 (岐大応用生物科学)
○Kazuki OGAWA, Sayumi HIROSE, Kazuhiro UTIDA, Satoshi NAGAOKA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】カテキン類には血中コレステロールを低下させる効果があり、特にガレート基を持つ EGCg(1)に強い活性があることが知られている。カテキン類のコレステロール吸収阻害メカニズムとしては、カテキン類が小腸中でコレステロールの胆汁酸ミセルへの溶解を阻害するためであるといわれており、ガレート型カテキンが PC と相互作用して複合体を作ることがその原因といわれている [1)]。しかし、複合体の証明には至っておらず、十分に明らかになっているとはいえない。そこで本研究ではカテキン類、ウーロンテアニン類について人工ミセルを用いたコレステロールミセル溶解試験を行い、相互作用についても明らかにすることとした。

【結果】カテキン類およびウーロンテアニン類についてガレート基がないものよりもガレート基があるものは強い阻害活性を示した。しかし、ガレート基を有さないデスガロイルウーロンテアニン(4)に関しても、比較的強い阻害活性がみられた。この結果から特徴的な 5-5-6 環構造が阻害活性の増強に寄与している可能性が示唆された [2)]。コレステロールの胆汁酸ミセルへの溶解性を下げる要因として、ミセル構成成分のいずれかあるいは複数と相互作用するためであると推測された。そのため、人工ミセルに対して **1, 3** を添加し、その上清部及び沈殿部の NMR 及び HPLC 分析を行った。その結果、**1, 3** は PC やコレステロールではなく、胆汁酸であるタウロコール酸ナトリウムと位置特異的に相互作用していることが強く示唆された。また、その相互作用にはステロイド骨格が重要であり、ガレート基が空間的に近い位置に配置されることが明らかになった。




1) Kobayashi, M.; *et al. J. Agric. Food. Chem.* 2014, 62, 2881-2890
2) Ogawa, K.; *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2015, 25, 749-752

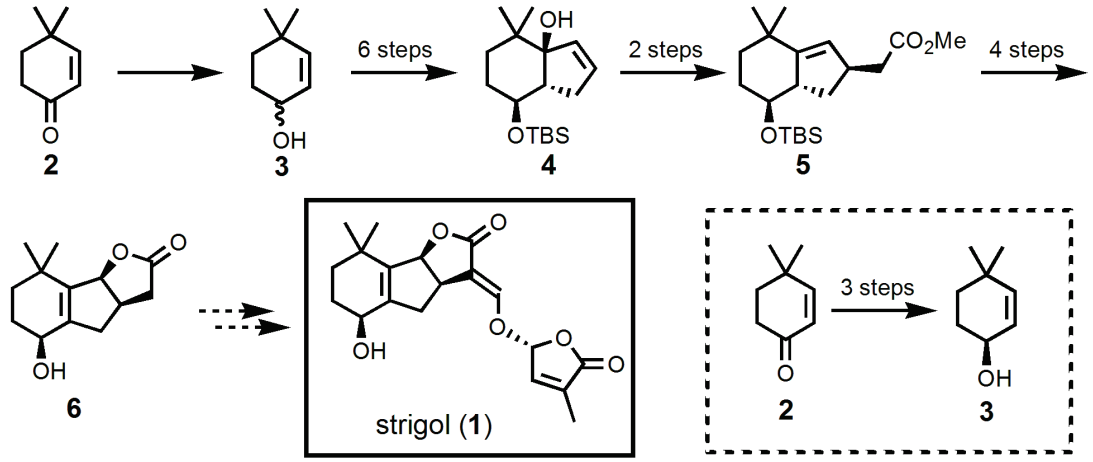
cholesterol, catechin, polyphenol

発表番号：3B076
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ストリゴールの全合成研究
# Synthetic Study on Strigol

○高橋 愛子、桑原 重文（東北大院農）
○Aiko TAKAHASHI, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】strigol (**1**)は植物ホルモンとして認知されつつあるストリゴラクトン類の一種であり、植物の枝分かれを抑制する作用に加えて、根に寄生する雑草の種子発芽を誘導する活性、および植物共生菌の宿主認識物質としての機能を併せ持つ。ストリゴラクトン類の研究は、植物の枝分かれの制御や栄養吸収の改善による品質向上および収穫量の増大や作物に甚大な被害を及ぼす根寄生雑草の防除法の確立につながる可能性がある。しかし、植物から得られるストリゴラクトン類は極めて微量であるため、合成による標品供給が求められている。本研究では、他のストリゴラクトン類の合成にも適用可能な **1** の効率的な不斉合成法の確立を目的とした。
【方法・結果】まず、ルート確立のためにラセミ体での合成を目指した。エノン **2** を出発原料とし、位置選択的な Grignard 反応、ビニル基挿入反応、分子内オレフィンメタセシス反応を含む 7 工程で **4** を合成した。得られた **4** に対して、シリルケテンアセタールとルイス酸を用いた炭素鎖の伸長を含む 2 工程で **5** を得ることに成功した。その後、ハロラクトン化を含む 4 工程で重要中間体 **6** へと導くことができた。また、エノン **2** から CBS 還元を含む 3 工程で光学活性体 **3** の合成にも成功した。今後は確立したルートにより光学活性体 **6** を合成し、strigol(**1**)の不斉全合成を行う予定である。




1) M. Umehara *et al*., *Nature* **2008**, *455*, 195-200. 2) C. E. Cook *et al*., *J. Am. Chem. Soc*. **1972**, *94*, 6198-6199. 3) K. Akiyama *et al*., *Nature* **2005**, *435*, 824-827.

total synthesis, strigolactone, strigol

発表番号：3B077
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

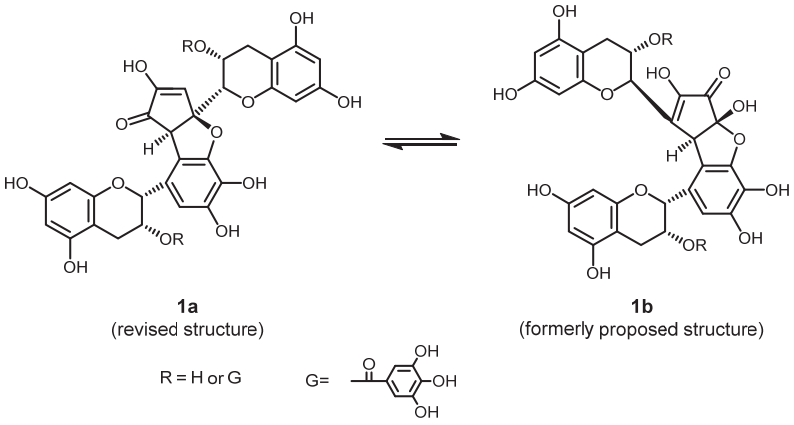
# ウーロンテアニン類の生成機構と平衡反応
# Formation Mechanism and Equilibrium Reaction of Oolongtheanins

○廣瀬 紗弓、小川 和樹、柳瀬 笑子（岐大）
○Sayumi HIROSE, Kazuki OGAWA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】茶(*Camellia sinensis*)は世界中で愛飲されている飲み物であり、近年の健康志向の高まりとともに、その生理的機能が注目されている。茶葉に含まれるポリフェノールの一種であるカテキン類は紅茶やウーロン茶の製造工程の発酵により酸化され、様々な重合体を形成する。oolongtheanin 類 (**1a**) は紅茶やウーロン茶に含まれる二量体であり [1)]、近年田中らによってその構造が訂正された。[2)] ウーロンテアニン類は様々な生理的機能が期待されているが、微量成分であるが故にその詳細な研究は行われておらず、またその生成機構も解明されていない。そこで本研究では、化学的アプローチからウーロンテアニン類の生成機構を解明することを目的とした。

【方法と結果】EGC または EGCg を 30% dioxane 水溶液に溶解し、塩化銅(Ⅱ)を用いて酸化し、中間体Ⅰを得た。その後中間体Ⅰを加熱することで中間体Ⅱが得られ、さらに中間体Ⅱを水と反応させることでウーロンテアニン類を得ることに成功した。これら 2 つの生成中間体については各種 NMR 測定及び MS 測定による構造決定を行い、中間体Ⅰは dehydrotheasinensin 類、中間体Ⅱは pro-oolongtheanin 類であると決定した。[3)] また、中間体Ⅱから **1a** への変換を $^1$H−NMR にて詳細に追跡を行い、もう一つ中間体(Ⅲ)を得ることに成功し、これについても構造決定を行った。以上の 3 つの中間体の構造から、ウーロンテアニン類の生成機構の証明に至った。

さらに反応追跡の過程において、ウーロンテアニン類の水溶液中での平衡反応の存在が明らかとなった。構造決定を行った結果、平衡体の構造は訂正前のウーロンテアニン類の構造(**1b**)であると判明した。




1) Hashimoto, F.; Nonaka, G.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, 32, 3755.
2) Matuo, Y.; Tadakuma, F.; Shii, T.; Saito, Y.; Tanaka, T. *Tetrahedron*, **2015**, 71, 2540.
3) Hirose, S.; Tomatsu, K.; Yanase, E. *Tetrahedron Lett.* **2013**, 54, 7040.

Oolongtheanin, Catechin, Oolong tea

発表責任者：柳瀬笑子（e-yanase@gifu-u.ac.jp）

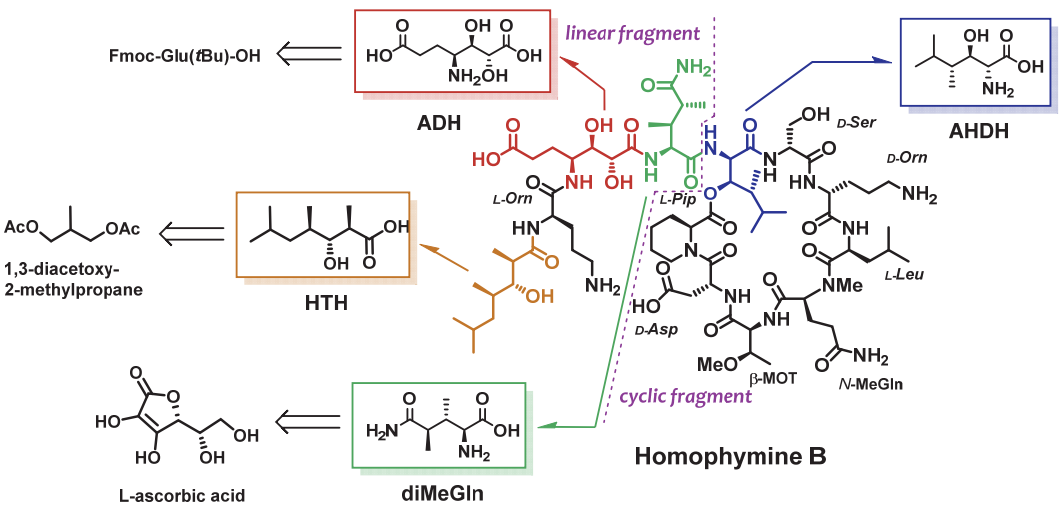
発表番号：3B078
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Homophymine B の全合成を目指した非タンパク性アミノ酸の合成

# Synthesis of non-proteinogenic amino acids for total synthesis of Homophymines

○東海林 由憲、吉野 諒、今野 博行（山形大院理工）
○Yoshinori TOKAIRIN, Ryo YOSHINO, Hiroyuki KONNO (Yamagata Univ.)

Homophymine 類 は Zampella らによって海綿より単離された、異常アミノ酸含有環状ウンデカペプチドである。本ペプチドは C 末端アミノ酸が分子内水酸基とマクロラクトン環を形成、さらに N 末端は脂肪酸でブロックされている特徴的な構造を有している。また、海洋天然物の例にもれず、幅広く強力な生物活性を示す。特に、重要な標的タンパク質であるケモカインレセプターCCR5 に対する阻害能が報告されている。CCR5 は HIV 感染時の第二受容体として知られており、本天然物は抗 HIV 薬開発に向けたリード化合物として魅力的な化合物群である。しかし、全合成例はいまだ示されていない。Homophymine 類の合成上の課題は、連続した不斉中心を持つアミノ酸類の調製とマクロラクトン環の構築である。我々は構造活性相関研究を容易にするために Fmoc 固相合成法を戦略に取り入れ、これまでに環状部を構成するアミノ酸である(2*R*,3*R*,4*R*)-2-amino-3-hydroxy-4,5-dimethylhexanoic acid (AHDH), β-methoxythreonine (β-MeOThr), *N*-methylglutamine (*N*-MeGln) の Fmoc 誘導体の合成と、固相上でのエステル結合形成による環状部の合成を達成した。今回は直鎖部分を構成するフラグメントの合成について報告する。直鎖部分には、脂肪酸である(2*R*, 3*R*, 4*R*)-3-hydroxy-2,4,6-trimethylheptanoic acid (HTH), と 2 つの非タンパク性アミノ酸である (2*R*, 3*R*, 4*S*)-4-amino-2,3-dihydroxyheptan-1,7-dioic acid (ADH) ならびに (2*S*, 3*S*, 4*R*)-3,4-dimethyl glutamine (diMeGln) が含まれる。HTH はメソジアセテート体のリパーゼによるキラル化と Roush のクロチル化を鍵反応に 3 つの不斉中心の構築に成功した。ADH は Fmoc-Glu(*t*Bu)-OH より cis 選択的な Horner-Wadswarth-Emmons olefination とオスミウムを触媒としたジアステレオ選択的なジヒドロキシル化により調製した。最後に、L-アスコルビン酸を適宜変換後、二度のジアステレオ選択的なメチル化により diMeGln の合成に成功した。一方で先に報告した AHDH の合成はラセミ体であった。そこで AHDH の光学活性体に関する合成も合わせて報告する。




CCR5 inhibitor, cyclic depsi peptide, non-proteinogenic amino acid

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：3B079
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

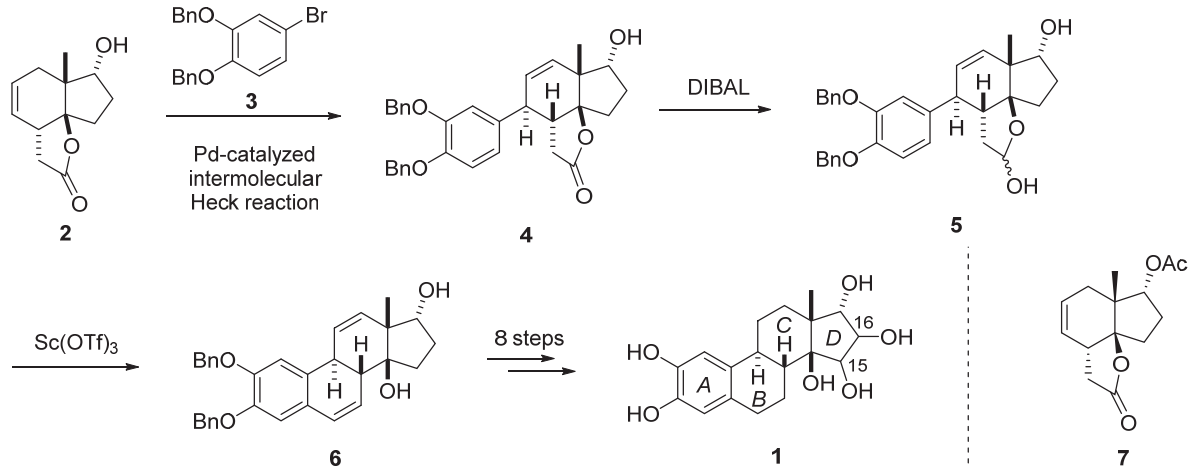
# Inagami-Tamura EDLF の合成化学的研究: 光学活性体の合成ルートの確立

# Synthetic studies on Inagami-Tamura EDLF: New synthetic route to enantioenriched candidates

○橋本 圭古、池田 藍、西川 俊夫、中崎 敦夫 (名大院生命農)
○Keiko HASHIMOTO, Ai IKEDA, Toshio NISHIKAWA, Atsuo NAKAZAKI (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) は 1987 年に稲上・田村らによってウシの副腎より単離された物質であり、$Na^+/K^+$-ATPase の阻害活性をもつことが明らかとなっているが、得られた量の少なさのため未だその構造は明らかになっていない[1]。1996 年には榊原らが推定構造（**1**）を提唱したが[2]、15,16 位の水酸基の実際の位置や立体化学は不明のままである。そこで我々は榊原らによって提唱された構造 **1** をもとに様々な候補物質を合成し活性評価を行うことにより、その真の構造を明らかにすることを目的として研究を開始した。既に我々は、ヒドロキシラクトン **2** とブロモアレーン **3** との分子間 Heck 反応の行うことで望む立体化学をもつラクトン **4** を合成し、続く 2 段階の反応を経て鍵中間体であるジエン **6** を得、さらに 8 段階の反応を経て候補物質の一つである 15,16-*cis*-ヘキサオール **1** のラセミ体を合成したことを報告した[3]。今回は **1** の光学活性体の合成を検討したので報告する。

リパーゼを用いたヒドロキシラクトン **2** の光学分割を行ったところ、望む絶対立体化学をもつアセテート **7** (99% ee) を得た。また、**7** と **3** を用いた分子間 Heck 反応と DIBAL 還元により、これまでの合成ルートの中間体であるラクトール **5** が得られた。現在、**1** の光学活性体の合成を検討中である。




References
1. Inagami, T. *et al*. *Biochem. Biophy. Res. Commun.* **1987**, *149*, 468.
2. Sakakibara, M. *et al*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 405.
3. 橋本圭古、池田藍、西川俊夫、中崎敦夫，2015 年度日本農芸化学会　中部支部・関東支部合同大会.

Endogenous Digitalis-Like Factor, intermolecular Heck reaction, enantioenriched candidates

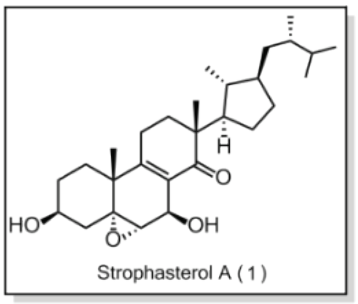
発表番号：3B080
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Strophasterol A の合成研究

# Synthetic studies on Strophasterol A

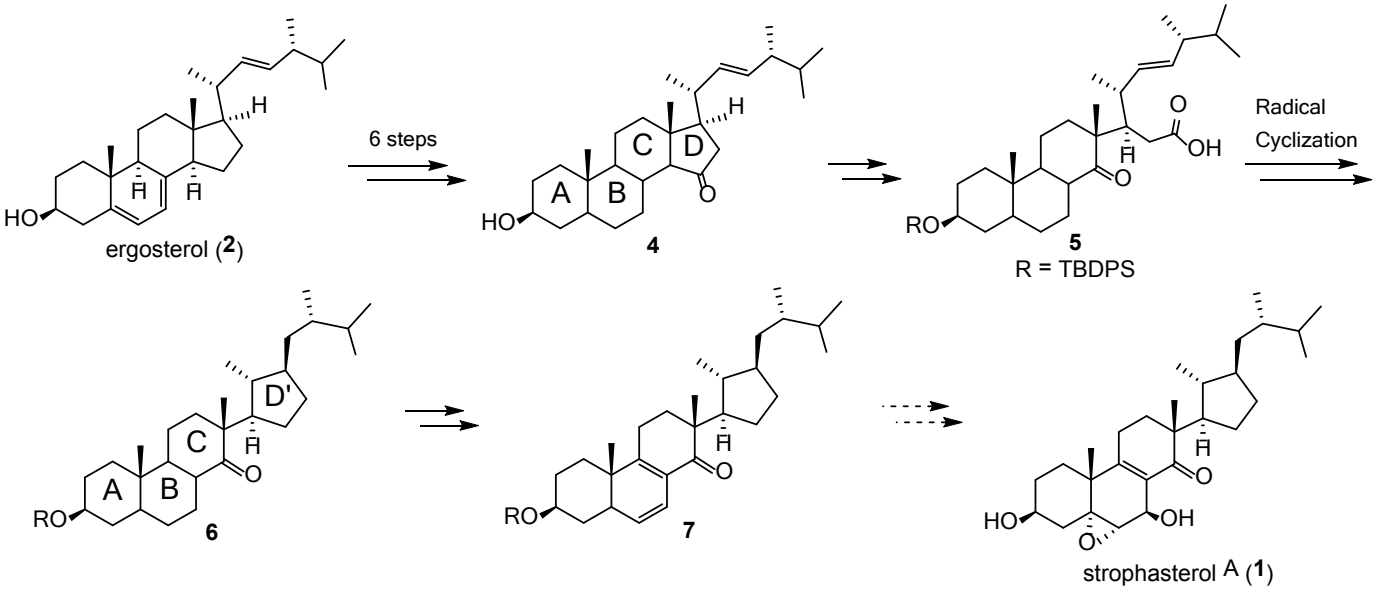
○佐藤 俊太郎、福田 裕紀、村上 真裕子、廣川 高史、桑原 重文（東北大農）
○SHUNTARO SATO, YUKI FUKUDA, MAYUKO MURAKAMI, TAKAFUMI HIROKAWA, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】Strophasterol A (**1**)は、2012 年に河岸らによって、食用のキノコであるサケツバタケ（*Stropharia rugosoannulata*）より単離・構造決定された新規ステロイド型の骨格を有するステロイド化合物である [1)]。**1** はキノコ菌糸体に対する子実体誘導活性を示し、また他に多くの種類のキノコより発見されていることから、世界で未だ明らかにされていないキノコのホルモンである可能性を秘めている [2)]。このように、特異な骨格と興味深い活性を有する **1** であるが、天然からわずかしか単離することができないため、本研究では **1** の初の全合成を目指した。




【方法・結果】出発原料であるエルゴステロール(**2**)から 6 工程を経てケトン **4** を合成した。**4** に対して Rubottom 酸化を施すことでα - ヒドロキシケトンへと変換した後に、Jones 試薬で処理すると D 環が開裂し、カルボン酸 **5** を得ることができた。**5** に対しラジカル環化と、続くカルボニル基の選択的除去を行うことにより、**1** に特徴的な D'環を有する **6** を得ることに成功した。

その後、**6** に対して数工程の変換を経てジエン **7** を合成することができた。今後は **7** に対し、種々の官能基変換を行い、Strophasterol A (**1**)の全合成を達成する予定である。




1) Kawagishi, H. *et al., Angew. Chem. Int. Ed.* **2012,** *51*, 10820-10822.
2) 呉静ら、第 55 回天然有機化合物討論会講演要旨集 567-572 (2013).

Strophasterol A, Synthetic studies

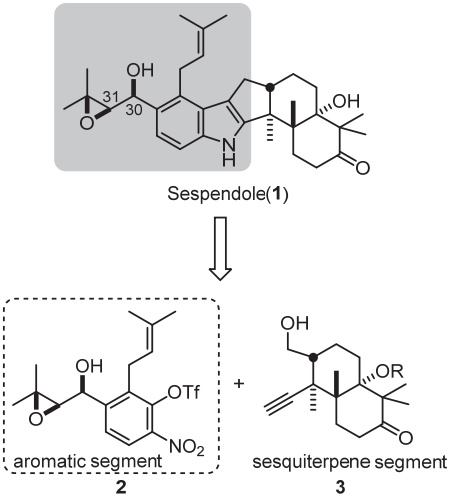
発表番号：3B081
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# セスペンドール芳香環部分の光学活性体の合成研究

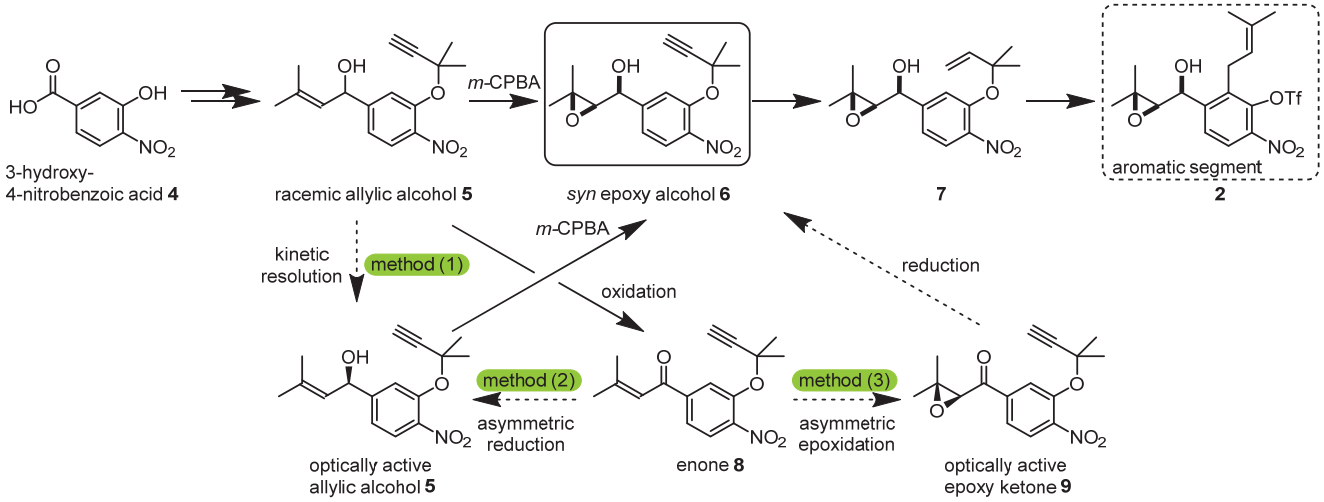
# Synthetic studies on optically active aromatic segment of sespendole

○植木 佳織、樋口 恵子、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大農)
○Kaori UEKI, Keiko HIGUCHI, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

【背景と目的】セスペンドール**(1)**は、糸状菌 *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 より単離されたインドールアルカロイドである [1]。我々は既にこの化合物の左側部分(網掛けの構造)の 2 つのジアステレオマーを合成しC-30位とC-31位の相対立体配置を決定した [2]。また、芳香環セグメント **2** とセスキテルペンセグメント **3** [3]のラセミ体の合成を報告した。本研究では芳香環セグメント **2** の光学活性体の合成を目的とする。




【方法と結果】ラセミ体の芳香環セグメント **2** は、ニトロ安息香酸 **4** からラセミ体のエポキシアルコール **6** を経由して合成可能である(スキーム上段)。今回、芳香環セグメント **2** を光学活性体として得るために、エポキシアルコール **6** の光学活性体の合成を試みた。アリルアルコール **5** の速度論的分割(method 1)、エノン **8** の不斉還元(method 2)、エノン **8** の不斉エポキシ化と続く立体選択的還元(method 3)の 3 つの方法を検討したのでその詳細を発表する。




References 1) Tomoda, H. and Ōmura, S. *et al. Mycoscience* **2004**, *45*, 9. 2) Adachi, M.; Higuchi, K.; Thasana, N.; Yamada, H. Nishikawa, T. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 114. 3) Sugino, K.; Nakazaki, A.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Synlett* **2011**, 647.

sespendole, indole alkaloid, natural product synthesis

発表番号：3B082
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

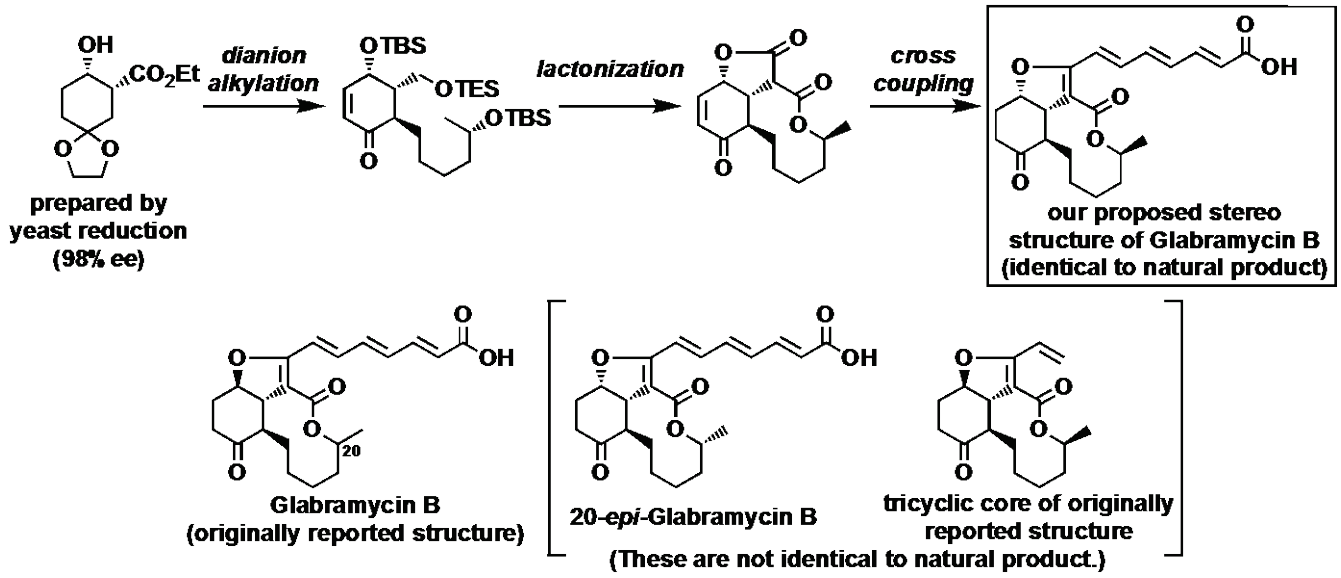
# Glabramycin B の合成と構造訂正

# Synthesis and structural revision of Glabramycin B

○山本 将起、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Masaoki YAMAMOTO, Ken ISHIGAMI, Hidenori WATANABE (Univ. of Tokyo)

（目的）Glabramycin B はカビ類 *Neosartorya glabra* の培養液から単離されたポリケチドである。本化合物はリボソームタンパク質 S4 を標的とするスクリーニングにより発見されたが、その詳細な作用機序は未解明である。また立体化学について $^1$H-NMR における結合定数により部分的な相対立体配置が提唱されているのみでありその詳細については決定されていない。我々は類縁化合物とのスペクトルデータの比較により、提唱構造とは異なる立体化学を有する Glabramycin B の構造を独自に推定した。本推定構造の合成による Glabramycin B の全立体化学の決定を目的として研究を開始した。

（方法・結果）パン酵母を用いた還元により得られる光学活性なヒドロキシエステルを出発原料とし、位置及び立体選択的なアルキル化、マクロラクトン化、クロスカップリング反応を用いて推定構造を有する化合物の合成を行った。合成した化合物の各種スペクトルデータは天然物のものと良い一致を示した。また、立体化学の未決定であった 20 位の異性体や、提唱されていた立体化学を有する三環性化合物も同様の方法にて合成を行ったが、これらのスペクトルデータは天然物のものと大きく異なっていた。以上の結果より、天然物の真の立体化学は、我々の提唱した化合物のものであると決定した [1]。




1) K. Ishigami, M. Yamamoto, H.Watanabe, *Tetrahedron Letters*, **2015**, *56*, 6290–6293

Glabramycin B, Total synthesis, Structural revision

発表番号：3B083
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Okundoperoxide の改良合成と絶対立体配置の決定
# Improved synthesis and determination of the absolute configuration of okundoperoxide

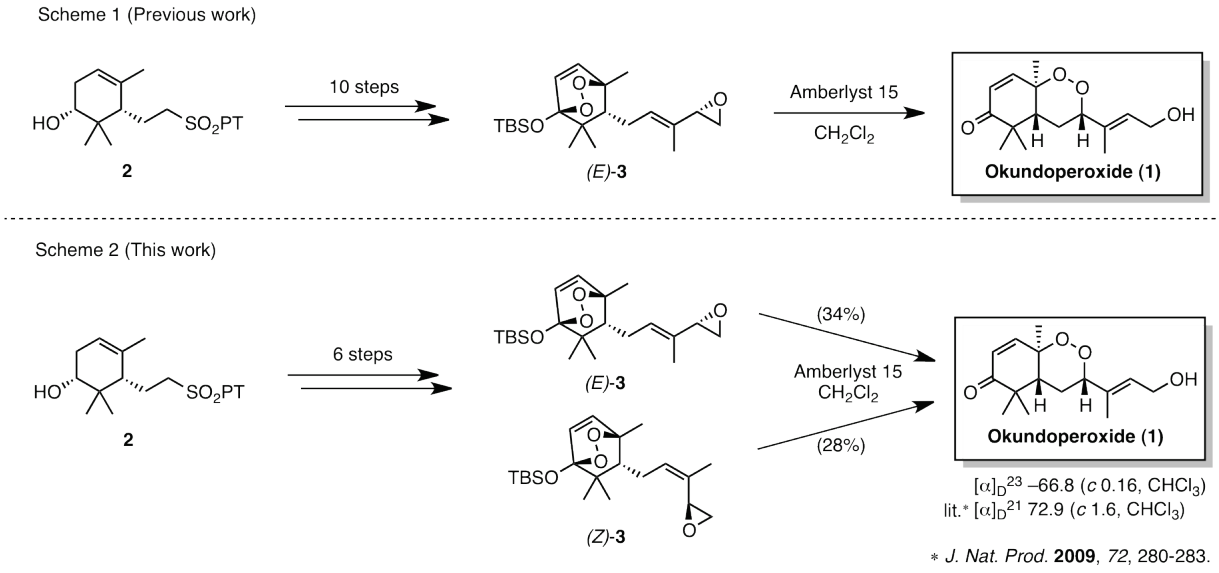
○森 直紀、迫田 大地、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Naoki MORI, Daichi SAKODA, Hidenori WATANABE (The Univ. of Tokyo)

【目的】

Okundoperoxide(**1** またはそのエナンチオマー)は 2009 年にカメルーンに生息するカヤツリグサ科の植物 *Scleria striatinux* の根より単離・構造決定された抗マラリア活性を有するセスキテルペンである。我々は本化合物の新規薬剤としての可能性を期待し、特徴的なエンドペルオキシド骨格の新規構築法の開発と絶対立体配置の決定を目的として全合成研究に取り組んだ。

【方法と結果】

2013 年度の本大会において発表した概要を Scheme 1 に示す。光学活性な中間体 **2** から 10 工程の変換で*(E)*-**3** へと導いた。*(E)*-**3** を Amberlyst 15 で処理すると、架橋ペルオキシドの開環と続くアリルエポキシドとの反応が一挙に進行し、okundoperoxide(**1**)が得られた。しかし得られた最終物は微量であったため絶対立体配置の決定には至らなかった。そこで本研究では合成の短工程化と絶対立体配置の決定に取り組んだ(Scheme 2)。検討の結果、共通中間体 **2** から*(E)*-**3** および*(Z)*-**3** をそれぞれ 6 工程で合成することに成功し、どちらの異性体からも最終物 **1** へと変換できることを見いだした。さらに比旋光度を比較することにより、天然物は今回合成した **1** のエナンチオマーであると決定した。




Okundoperoxide, endoperoxide, antimalarial

発表責任者：渡邉秀典（ashuten@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3B084
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

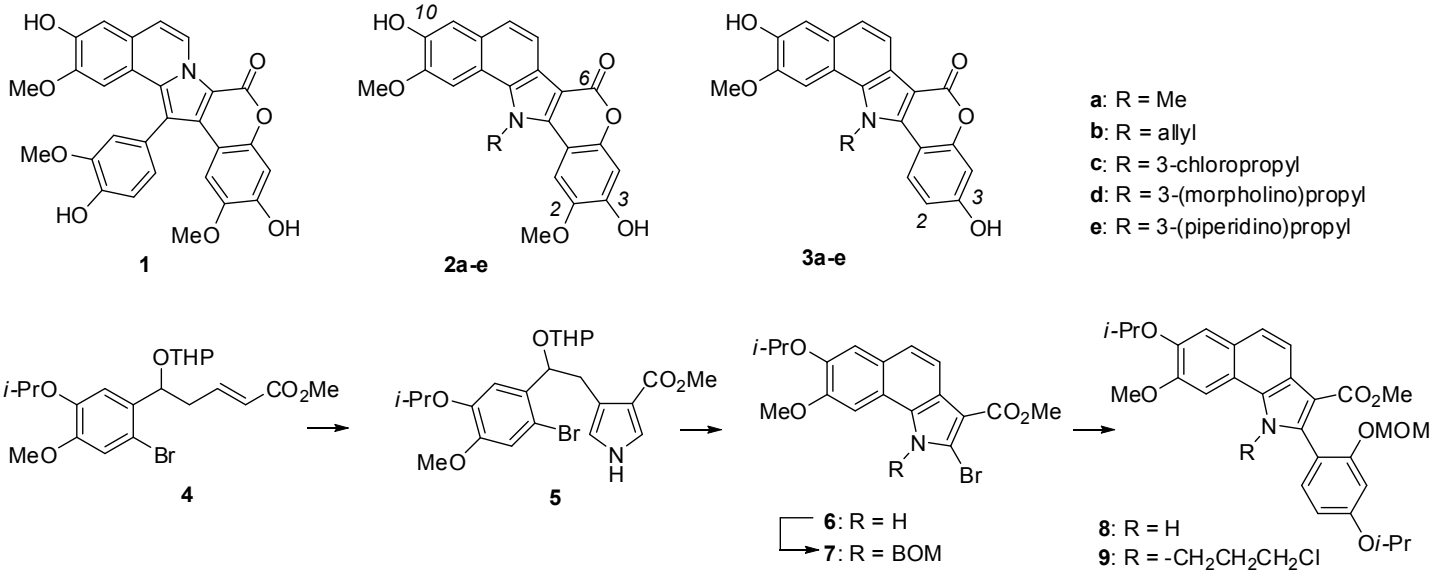
# ベンゾベンゾピラノインドール-6-オン型抗がん活性物質の合成と生理活性

# Synthesis and biological activity of benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indole-6(13H)-ones

○石橋 郁人[1]、松倉 一晃[1]、河野 将弘[1]、岩尾 正倫[2] ([1]長崎大・水産、[2]長崎大院・工)
○ Fumito ISHIBASHI[1], Kazuaki MATSUKURA[1], Masahiro KAWANO[1], Masatomo IWAO[2] ([1]Nagasaki Univ., [2]Nagasaki Univ., Faculty of Engineering)

［目的］ホヤやカイメンなどの海洋無脊椎動物から単離されるラメラリン類は、種々のがん細胞株に対してサブナノモーラーレベルの高い増殖抑制作用を示す。演者らは、ラメラリン D（**1**）のトポイソメラーゼ I 阻害作用機構に基づいて、新規なベンゾ[g][1]ベンゾピラノ[4,3-*b*]インドール-6(13*H*)-オン骨格を有する抗がん活性分子 BBPI（**2**）を創製した。本研究では、BBPI（**2**）の 2 位のメトキシ基の活性に対する影響を調べる目的で、2-デメトキシ体 **3a-e** の合成と、がん細胞株に対する増殖阻害活性を検討した。

［方法・結果］2-デメトキシ BBPI **3a-e** は、TosMIC によるピロール形成反応と分子内 Heck 反応を基盤とした方法で合成した。不飽和エステル **4** と TosMIC との付加環化反応によりピロール骨格を形成し、**5** とした。次いでこのものの分子内 Heck 反応及び NBS による 2 位の臭素化と脱水反応によりベンゾインドール **6** を得た。さらに、**7** の 2 位に Suzuki カップリング反応により A 環部分を導入し **8** とした。最後に、ピロール窒素原子上へのアルキル置換基の導入とラクトン化反応により、2-デメトキシ BBPI(**3a-e**)を合成した。HeLa 細胞に対する細胞毒性を調べた結果、メチル体 **3a** は $LC_{50}$ =28.9 nM、3-(モルフォリノ)プロピル体 **3d** の $LC_{50}$ 値は 30.8 nM と高活性であり、ラメラリン同様に BBPI においても、2 位のメトキシ基は活性発現に必須ではないことが確認された。



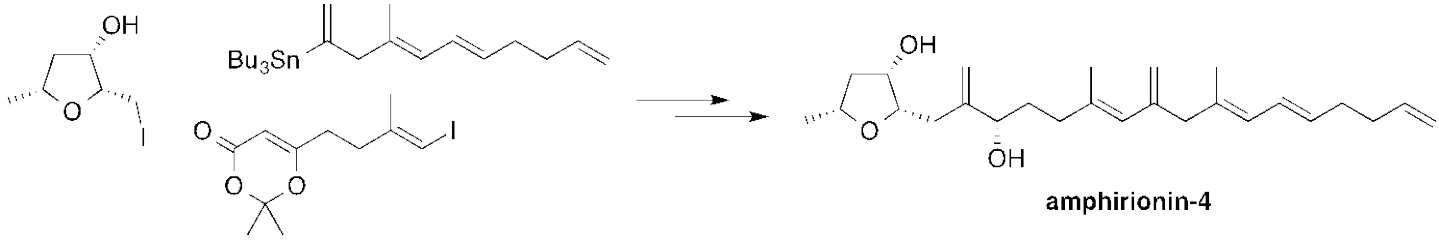

marine alkaloid, topoisomerase I inhibitor, anticancer compound

発表番号：3B085
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Amphirionin-4 の不斉全合成

# Asymmetric Total Synthesis of Amphirionin-4

○小倉 由資、佐藤 光、榎本 賢、桑原 重文 (東北大院農)
○ YUSUKE OGURA, HIKARU SATO, MASARU ENOMOTO, SHIGEFUMI KUWAHARA (Tohoku Univ.)




Amphirionin-4 は *Amphidinium* 属の渦鞭毛藻から単離構造決定されたポリケチドであり、マウス骨髄間質細胞 ST-2 を 0.1 ng/mL という低濃度で強力に増殖促進する (950%)[1]。更に本化合物は HeLa 細胞の増殖促進活性を示す (1 ng/mL で 127%増殖) という報告もされているが[2]、正常細胞に対する細胞毒性や HeLa 細胞に対する増殖阻害活性は高濃度においても認められていない。一方 Anphirionin-4 は、その分子内に４つの不斉炭素と６つの二重結合を有する類まれな構造を有しているため、有機合成化学的にも興味を惹かれる天然物である。我々は本化合物の生物活性と化学構造に興味を抱き全合成研究に着手した結果、既知の出発原料より 10 工程で Amphirionin-4 の不斉全合成を達成することが出来たので、その詳細について報告する。

1) Tsuda M., *et al. Org. Lett.* **2014**, *16*, 4858-4861.
2) 田中秀則他、第 57 回天然有機化合物討論会講演要旨集、2015、pp381-385.

Amphirionin-4, polyketide, proliferation activity on murine bone marrow stromal ST-2 cells

発表責任者：小倉由資（ysk.ogura@m.tohoku.ac.jp）

発表番号：3B086
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

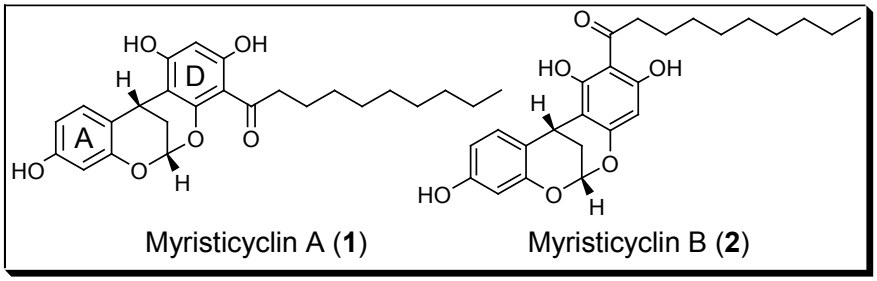
# 抗マラリア活性を有する Myristicyclin 類の合成研究

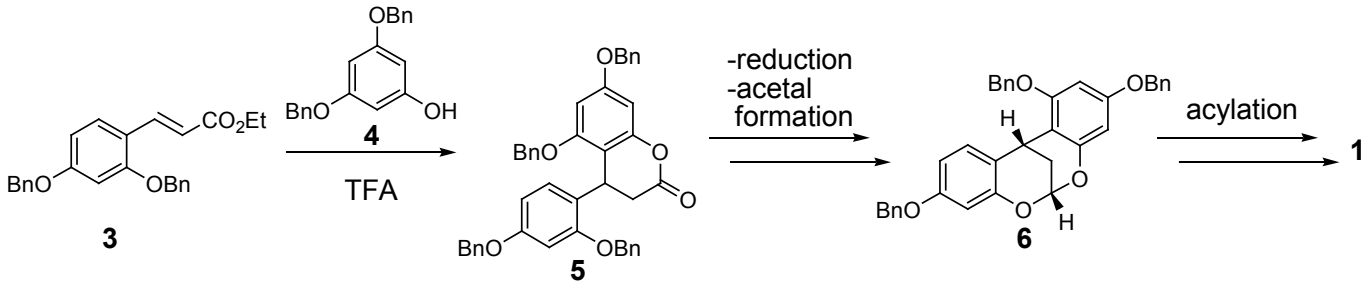
# Synthetic research of Myristicyclins

○久保 伸一郎、渡邉 秀典（東大院農生科）
○Shinichiro Kubo, Hidenori Watanabe (Univ. of Tokyo)

Myristicyclin A（**1**）及び B（**2**）は *Horsfieldia spicata* より単離された化合物であり、抗マラリア活性を有することが Ireland[1)]らにより報告されている。今回 **1** のラセミ体合成を達成したのでここに報告する。

不飽和エステル（**3**）に対して酸性条件下、Friedel-Crafts タイプの 1,4-付加反応を行うことにより、ベンジル位の炭素骨格を構築し、ラクトン（**5**）へと導いた。ラクトン環をラクトールへと還元した後、酸性条件に付すことで、[3,3,1]-ビシクロ環構造（**6**）へと変換した。合成の終盤において、酸塩化物の活性化に AgOTf を利用することにより、2 つのアリール基のうちより電子密度の高い D 環へアシル基を導入出来、その後保護基を除去することにより **1** のラセミ体合成を完了した。




1) Chris M. Ireland et al., *Org.Lett.* **2014**, *16*, 346

Myristicyclin

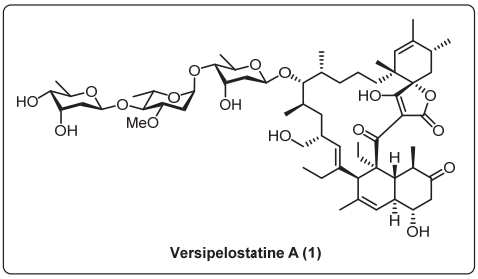
発表番号：3B087
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Versipelostatin A セグメントカップリングの検討

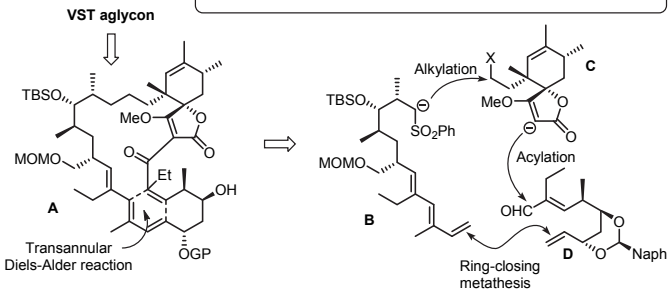
# Segment couplings on synthetic study of versipelostatin A

○藤川 祥汰[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Shota FUJIKAWA[1], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate school of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of Agriculture)

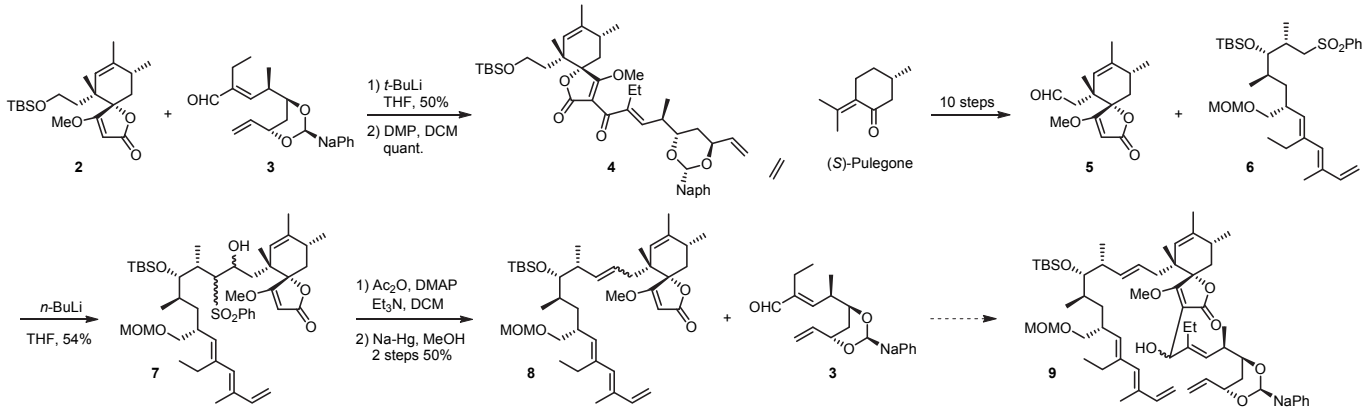
【目的】Versipelostatin A(VST A, **1**) は 2002 年、新家らにより単離された 17 員環ペンタデカケチド三糖配糖体である。本化合物は分子シャペロン GRP78 の選択的な誘導阻害活性を示すことから、固形癌に対し特異的に作用する副作用の少ない治療薬となることが期待されている。我々は VST の生物活性と特異的な構造に興味を持ち合成研究を行っている。




【方法】VST の合成戦略としてセグメント **B**,**C**,**D** を順次連結、閉環した後、化合物 **A** の渡環 Diels-Alder (TADA) 反応により置換オクタリン部を構築する集約的な戦略を立案した。これまでの農芸化学大会においてセグメント **B**,**C**,**D** の合成は既に報告したが、今回はセグメント **B**,**C** の合成法の改善と各セグメントのカップリング反応の検討を行ったので報告する。




【結果】セグメント **C** および **D** に相当するスピロラクトン **2** とアルデヒド **3** のカップリングを行い、続く酸化によりケトン **4** を得た。続いて、セグメント **B** および **C** 間でのカップリング反応のモデル実験では、(*S*)-pulegone から 10 段階で合成可能なアルデヒド **5** とスルホン **6** の Julia カップリングを行うことで、ヒドロキシスルホン **7** を得ることに成功した。続く Ac 化、ナトリウムアマルガムを用いた還元によりアルケン **8** を得た。現在は、アルケン **8** と、アルデヒド **3** のカップリングの検討を行っている。




Versipelostatin A, GRP78, synthesis

発表番号：3B088
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# コレステロール成合成阻害活性を有する Decarestrictine H 及び J の合成と立体化学に関する研究

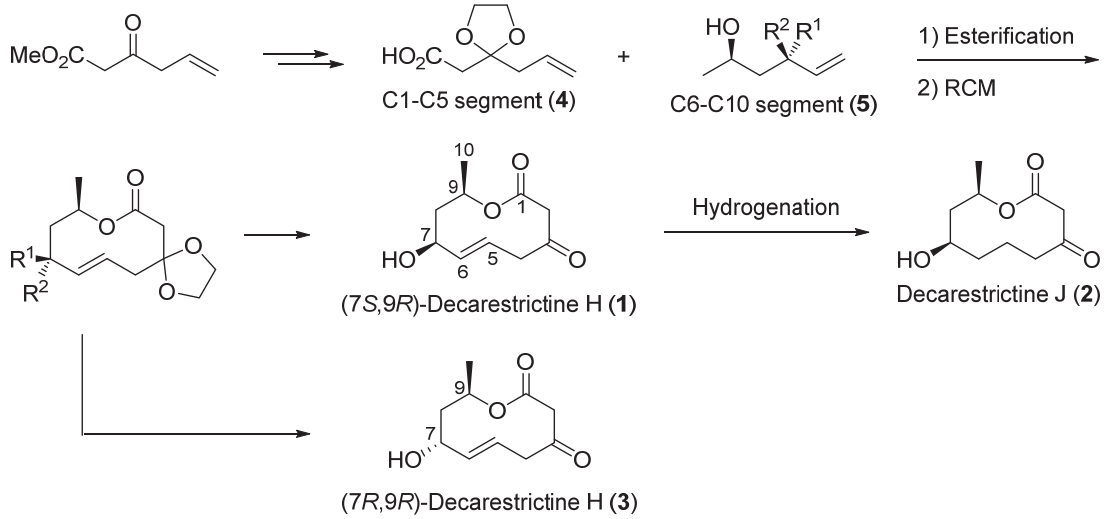
# Synthetic and stereochemical studies of decarestrictines H and J, inhibitors of cholesterol biosynthesis

○政田 尚子[1]、下平 雄一郎[1]、上田 彩恵子[1]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)

○Naoko Masada[1], Yuuichirou Shimodaira[1], Saeko Ueda[1], Ryo Katsuta[2], Arata Yajima[2], Tomoo Nukada[2] ([1]Graduate school of Adriculture, Tokyo University of Adriculture, [2]Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Adriculture)

【目的】Decarestrictine H (**1**)及び decarestrictine J (**2**)は 1992 年に *Penicillium* 属の培養液から単離、構造決定された 2 箇所の不斉点を持つ 10 員環ラクトンであり、コレステロール生合成阻害活性を有している[1, 2]。Decarestrictine 類は従来のコレステロール低下剤であるスタチン類と類似した部分構造を有しているが、詳細な作用機構は解明されていない。我々はこれまでにカルボン酸 **4** を共通中間体として本化合物群の合成及び、立体化学に関する研究を行ってきた[3]。Decarestrictine H は 7 位及び、9 位の立体化学が未決定である。我々は本化合物群の構造活性相関の解明及び decarestrictine H の立体化学の決定を目的とし、decarestrictine H 及び J の合成研究を行った。

【方法・結果】これまでに知られている本化合物群において 9 位の絶対立体配置はいずれも *R* であること[1, 2]から、decarestrictine H も(9*R*)-体であると推定し、(7*S*,9*R*)-及び(7*R*,9*R*)-体の合成を行った。C1-C5 カルボン酸 **4** と、(7*S*,9*R*)-及び(7*R*,9*R*)-C6-C10 アルコール **5** を山口法によりエステル化した後、閉環メタセシス反応を経由して(7*S*,9*R*)-及び(7*R*,9*R*)-decarestrictine H の合成を達成した。これらのうち(7*S*,9*R*)-体の $^{1}$H、$^{13}$C NMR スペクトルが天然物と一致した為、decarestrictine H の立体化学を 7,9-*anti* 体であると決定した。また、二重結合を水素化することにより decarestrictine J も合成したので併せて報告する。




参考文献 1) Zeeck, A. *et.al. J. Antibiot.* **1992**, *45*, 56-65.
2) Thiericke R., Zeeck, A. *et.al. J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1176-1181.
3) Katsuta, R.; Fujikawa, S.; Yajima, A.; Nukada, T. *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 3428-3432.
4) 政田尚子 他 2015 年度農芸化学会関東支部大会 講演要旨集 P-12.

synthesis, decarestrictine, cholesterol

発表番号：3B089
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ヒガンバナ科アルカロイド crinasiadine 類の短段階合成

# Short-step of *Amaryllidaceae* alkaroids crinasiadine and its derivatives

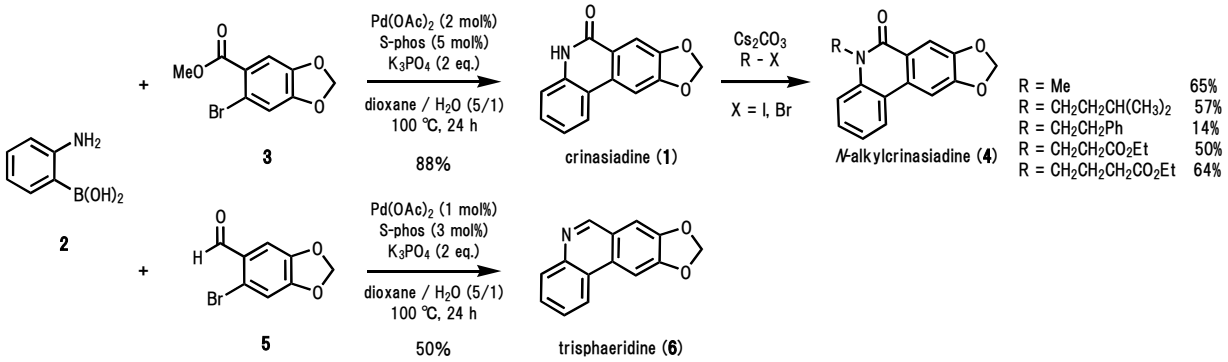
○桑田 祥幸、園田 素啓、谷森 紳治 (阪府大院生命環境)
○Yoshiyuki Kuwata, Motohiro Sonoda, Shinji Tanimori (Osaka Pref. Univ.)

【緒言】

Crinasiadine (**1**)は、ヒガンバナ科（*Amaryllidaceae*）の植物に含まれるフェナントリジノンを基本骨格とする四環性ラクタム構造を有するアルカロイドであり、様々な類縁体が単離、構造決定されている。これらには、抗炎症、抗腫瘍活性など興味深い生理活性を示すことから、その効率的な合成が望まれている。当研究室では以前、パラジウム触媒下、2-アミノフェニルボロン酸と 2-ハロ安息香酸エステルのドミノ型カップリング反応を利用した簡便なフェナントリドンの合成法を開発した[1)]。そこで、本研究では、その合成法を用いた crinasiadine(**1**)並びにその類縁体の短段階合成を行った。

【実験方法と結果】

2-アミノフェニルボロン酸 **2** とピペロナールからブロモ化、酸化、エステル化により調整した 6-ブロモ-1,3-ベンゾジオキソルカルボン酸メチル **3** を、酢酸パラジウム（2 mol%）、S-Phos（5 mol%）、リン酸三カリウム（2 等量）を用い、ジオキサンと水の混合溶媒中 100℃、24 時間で反応させたところ、crinasiadine(**1**)を収率 88%で合成することに成功した。さらに得られた(**1**)に対し、様々なハロゲン化アルキルを用い、アミド窒素にアルキル基を導入し、5 種類の *N*-alkylcrinasiadine(**4**)を収率 14%～65%で得ることができた。また、ボロン酸 **2** とアルデヒド **5** の反応では、trisphaeridine(**6**)が収率 50%で得られた。現在、2-アミノフェニルボロン酸を用いた他のカップリング反応について検討している。




1) Nakagawa, N.; Tanimori, S. *et al. Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 3712-3714.

total synthesis, *Amaryllidaceae* alkaroids, Crinasiadines

発表責任者：桑田祥幸（su202006@edu.osakafu-u.ac.jp）

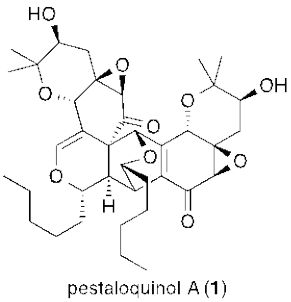
発表番号：3B090
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

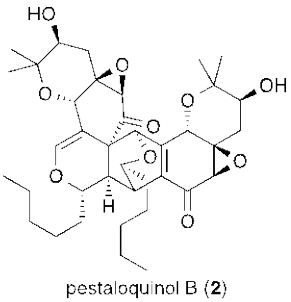
# ペスタロキノール類の合成研究

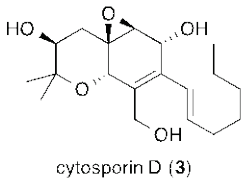
# Synthetic studies on pestaloquinols

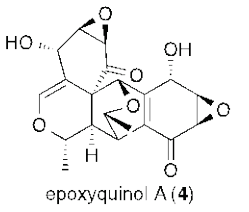
○廣川 高史、陰山 真将、桑原 重文（東北大院農）
○Takafumi HIROKAWA, Masayuki KAGEYAMA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】Pestaloquinol A (**1**)および B (**2**)は、針葉樹イヌマキに内生する子嚢菌（*Pestalotiopsis* 属）より単離・構造決定されたプレニル化エポキシキノール類であり、同時に単離された cytosporin D (**3**)の二量化により生合成されると考えられている[1]。HeLa 細胞に対する毒性を示すが（$IC_{50}$ = 8.8 μM）[1]、プレニル単位を持たない類似天然物 epoxyquinol A (**4**)には抗癌剤開発ターゲットの一つである血管新生を阻害する活性が知られていることから[2]、より詳細な活性の評価が待たれている。本研究では生合成を模倣した二量化反応による **1** および **2** の全合成の達成と、活性評価のための標品供給を目的とした。

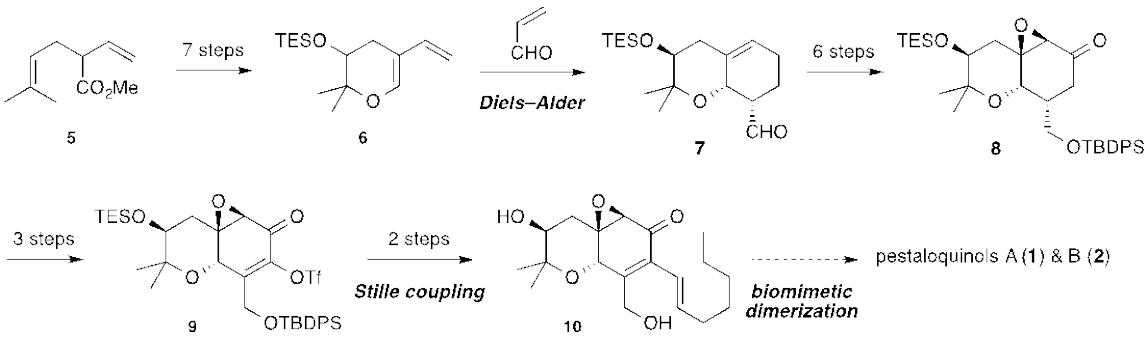



【方法と結果】合成経路確立のため、ラセミ体を用いて検討を行った。既知のエステル **5** を 7 工程でジエン **6** へと導き、アクロレインとの Diels–Alder 反応によりアルデヒド **7** を合成した。種々の官能基変換によりエポキシケトン **8** へと変換した後、ケトンα位に酸素官能基を導入してエノールトリフラート **9** を調製した。**9** に対して Stille カップリング反応による側鎖の導入と脱保護を行うことで、二量化反応の前駆体として設定した **10** を合成した。今後各工程の収率の改善および二量化反応の検討を行う。また不斉全合成の達成に向けて **6** の光学活性体の合成の検討も行っているので、ポスターでは合わせて報告する。




1）Ding, G.; Zhang, F.; Chen, H.; Guo, L.; Zou, Z.; Che, Y. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 286-291.
2）Kakeya, H.; Onose, R.; Koshino, H.; Yoshida, A.; Kobayashi, K.; Kageyama, S.; Osada, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3496-3497.

pestaloquinol, cytosporin, cytotoxicity

発表番号：3B091
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

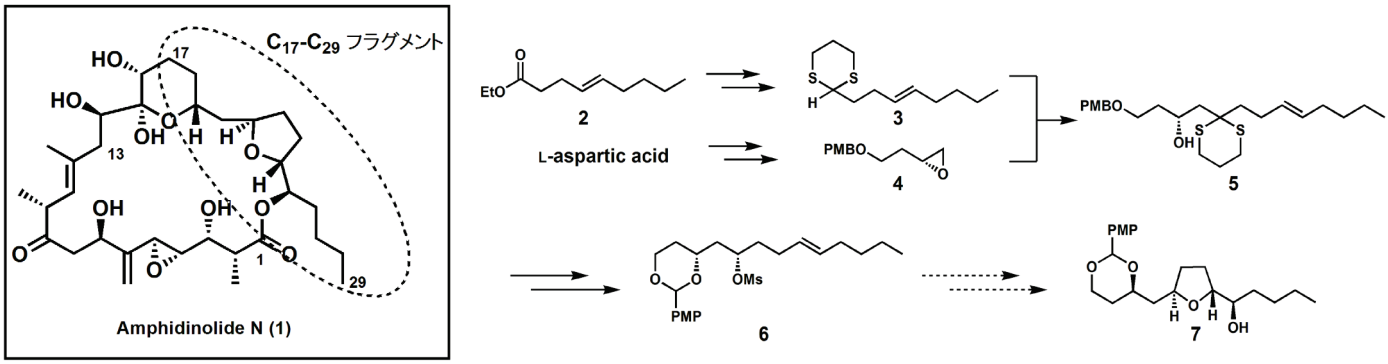
# Amphidinolide N の C17-C29 フラグメントの合成研究

# Synthetic Studies on the C17-C19 Fragment of Amphidinolide N

○藤島 悠記、福山 圭、小倉 由資、桑原 重文（東北大院農）
○Yuki Fujishima, Kei Fukuyama, Yusuke Ogura, Shigefumi Kuwahara (Tohoku Univ.)

【目的】Amphidinolide N(**1**)は *amphidinium* sp. Y-5 株より単離構造決定された 26 員環マクロライド化合物であり、非常に強力な細胞毒性を有する(マウス白血病細胞 L1210 及びヒト上皮癌細胞に対し、それぞれ $IC_{50}$ = 78 pM, 93 pM)[1),2)]。これは米国・国立がん研究所の抗がん剤スクリーニングにおいて最強レベルに分類されている spongistatin 1 や halichondrin B と同等以上であり、現在癌治療に用いられているビンブラスチンやタキソールを遥かに凌ぐ。一方、その化学構造はテトラヒドロフラン環、テトラヒドロピラン環、アリルエポキシドを含むとともに 13 個の不斉炭素を有しており、有機合成化学的にも挑戦的な化合物である。我々は、医薬化学、有機合成化学の両観点から非常に魅力的な amphidinolide N(**1**)の全合成を達成すべく、まずはテトラヒドロフラン骨格を有する $C_{17}$-$C_{29}$ フラグメント(**7**)の合成研究に着手した。

【結果】不飽和エステル **2** より導いたジチアン **3** と L-アスパラギン酸由来のエポキシド **4** との反応により **5** を、続いてチオアセタール基の除去、立体選択的な還元など数工程を経てベンジリデンアセタール **6** を得ている。今後シャープレス不斉ジヒドロキシ化、立体選択的なフラン環の形成を経て、**7** の合成を完了する予定である。本大会では立体選択的なフラン環形成の検討を含めた詳細を報告する。




1) Junichi Kobayashi. *et al., J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1994**, 1455-1456.
2) Junichi Kobayashi. *et al., J. Antibiot.* **2013**, *66*, 277-279.

Amphidinolide N, cytotoxic, macrolide

発表責任者：藤島悠記（teruhiko572@gmail.com）

発表番号：3B092
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 可溶性担体を用いたペプチド核酸の効率的な合成
# Efficient Synthesis of Peptide Nucleic Acid by Liquid Phase Method Using Hydrophobic Tag

○大神 啓介、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院）
○Keisuke OGAMI, Yohei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (TUAT)

ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid : PNA)とは *N*-(2-aminoethyl)glycine が連なった主鎖上に核塩基が導入された構造を持つ人工核酸アナログの一種であり、その配列特異性や酵素などに対する安定性の高さ、DNA や RNA との二重鎖形成能などから遺伝子検出プローブ、新規アンチセンス医薬品としての応用が期待されている。通常、PNA オリゴマーはペプチドの固相合成法を転用して合成されている。しかし固相法では反応の各段階において過剰量のモノマーが必要となってしまうこと、PNA モノマーが比較的高価であることなどからその合成コストの高さが大きな問題となっている。

一方、我々の研究室では疎水性のベンジルアルコール誘導体を担体として用いる液相ペプチド合成法（Tag method, Fig.1）を開発し、これまでに多くのペプチドを高収率高純度で合成してきた。本方法では担体が可溶な非極性溶媒中で反応を行い、反応終了後に極性溶媒へと溶媒置換することで担体のみが析出し濾過によって目的物を簡便に分離することができる。

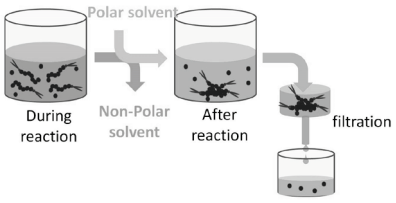
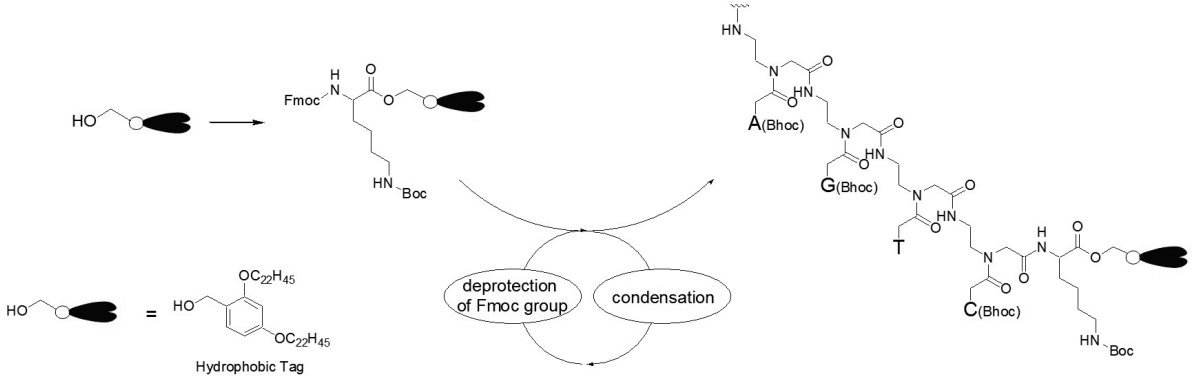



**Fig. 1, Tag method**

本研究ではこの Tag method を PNA オリゴマー合成へ応用することによって合成コストの低減を試みた。その結果、高収率高純度で目的物を得るとともに、オリゴマー合成時のモノマーと縮合剤の使用量を極少過剰量である 1.05 当量まで減らすことに成功した。




**Scheme 1, Synthesis of PNA by using tag method.**

Peptide nucleic acid, Hydrophobic Tag, Liquid phase synthesis

発表番号：3B093
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 希少糖含有糖脂質の合成
# Synthesis of rare sugar conjugated glycolipids

○平田 圭亮[1]、水木 徹[1,2] ([1]東洋大、[2]東洋大・バイオナノセンター)
○Keisuke HIRATA[1], Toru MIZUKI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]BNERC)

本研究では希少糖を含有した糖脂質を合成し、その諸性質を解析した。

希少糖とは自然界において微量に存在する単糖およびそれらの誘導体の事であり、血糖値抑制効果、がん細胞の成長抑制効果、活性酸素の産生抑制効果など生体に対し様々な有益な機能を有することが報告されている。一方、糖脂質とは糖を含んだ複合脂質であり、肌の保湿効果、DNA 増幅の阻害、ナチュラルキラーT 細胞への刺激など、様々な生体への影響を示す研究成果も複数報じられている。

我々はこれらを組み合わせた化合物がどのような特徴や生体への影響を示すのかという点に興味を持ち、本研究においては希少糖含有糖脂質の合成およびその諸性質の解析を目的とした。

ジエチルエーテルで硫酸とシリカを混合した後、デシケーターおよび乾熱機を用いてジエチルエーテルを除去することで硫酸担持シリカを調製した。グリセロールに糖（グルコース、リボース、アロース）および硫酸担持シリカを加え撹拌しながら 65℃で 1.5 時間加熱した後、室温で 12 時間反応させた。ジクロロメタンで膨潤化させたシリカと反応液を混合し反応物を吸着させた。段階的に濃度を変えたジクロロメタン-メタノールの混合液で洗浄・溶出した。

ピリジンに精製した糖-グリセロール、アクリル樹脂固定されたリパーゼ (NOVOZYME 435)、酪酸 2,2,2-トリフルオロエチルを加え、45℃で 1.5 時間撹拌した。エバポレーターで濃縮した後、シリカゲルカラムを用いて精製した。

反応液を TLC 分析（展開溶媒・ジクロロメタン：メタノール＝8:2）したところ、希少糖含有糖脂質と考えられるスポットが検出された。

一方、合成した糖脂質が生体に及ぼす影響を確認するため、まずは溶血性検査を行った。赤血球と希少糖含有糖脂質溶液を混ぜ 37℃でインキュベートした後、遠心分離し上清の O.D.540nm の値を測定することで溶血により溶出したヘモグロビンを検出した。1,3,5 時間インキュベート時に測定したが溶血活性は確認されなかった。本結果から合成した希少糖含有糖脂質は赤血球に対し高い親和性を持つことが示された。

現在、希少糖含有糖脂質がバクテリアやがん細胞などの増殖に対して及ぼす影響を解析中であり、その結果と合わせて発表する予定である。

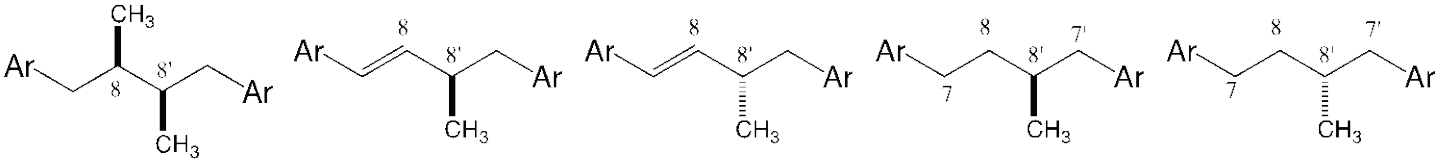
rare sugar, neoglycolipid

発表責任者：水木　徹（mizuki@toyo.jp）

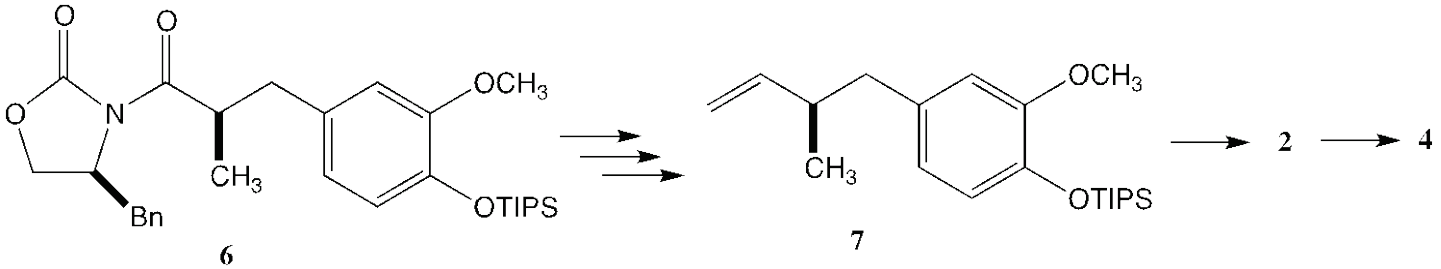
発表番号：3B094
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

9-norlignan の 7 位の phenyl 基上の構造と細胞毒性活性との関係
Structure-cytotoxic activity relationship of 7-phenyl structure of 9-norlignan
○庄司 有璃子、谷村 僚亮、西脇 寿、西 甲介、菅原 卓也、山内 聡 (愛大農)
○ Yuriko SHOUJI, Ryosuke TANIMURA, Hisasi NISHIWAKI, Kosuke NISHI, Takuya SUGAHARA, Satoshi YAMAUCHI (Ehime Univ.)

目的）これまでに、ブタン型リグナンである dihydroguaiaretic acid に細胞毒性活性を見出し、(*R, R*)−体 (**1**)の HL-60 及び HeLa 細胞に対する活性はそれぞれ 26 μM 及び 22 μM であった。本研究では、dihydroguaiaretic acid(**1**)のメチル基が活性に与える影響を明らかにするために、ブタン型リグナンのメチル基を 1 つ欠く、ノルリグナン骨格を有するインペラネン誘導体の立体異性体 (**2-5**)、及び誘導体を合成し、細胞毒性活性を調べた。




方法・結果）*S* 体の不斉補助基を有する、Evans の *anti* 不斉アルドール縮合を用いて立体構造を構築し **6** を得た後、還元、酸化、Wittig 反応によってアルケン **7** へ導いた。さらに、Grubbs 反応、脱保護により、シンナミル基を有する **2** を得、接触還元を行い **4** とした。一方、*R* 体の不斉補助基を用いて同様の合成方法により、**3** 及び **5** を得た。キラルカラムにより、99%ee 以上の光学純度を有する事を確認した。



得られた **2-5** のがん細胞 HL-60、HeLa 細胞および昆虫細胞 Sf9 に対する細胞毒性活性を調べたところ、**4** が最も高い活性を示し、それぞれの $IC_{50}$ 値は、6.1 μM、5.6 μM、12 μM だった。そこで、4 の構造と活性との関係を調べるため、4 の 7 位のフェニル基上の置換基を変換した誘導体を合成し、活性を調べた。その結果、7-(3,4-dimethoxyphenyl)誘導体が 4 と同レベルの活性を有する事が示された。この事から、7 位のフェニル基上の 4 位は小さいアルコキシ基に置き換えられる事が分かった。

Lignan, Norlignan, Cytotoxic activity

発表責任者：山内　聡（yamauchi.satoshi.mm@ehime-u.ac.jp）

発表番号：3B095
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

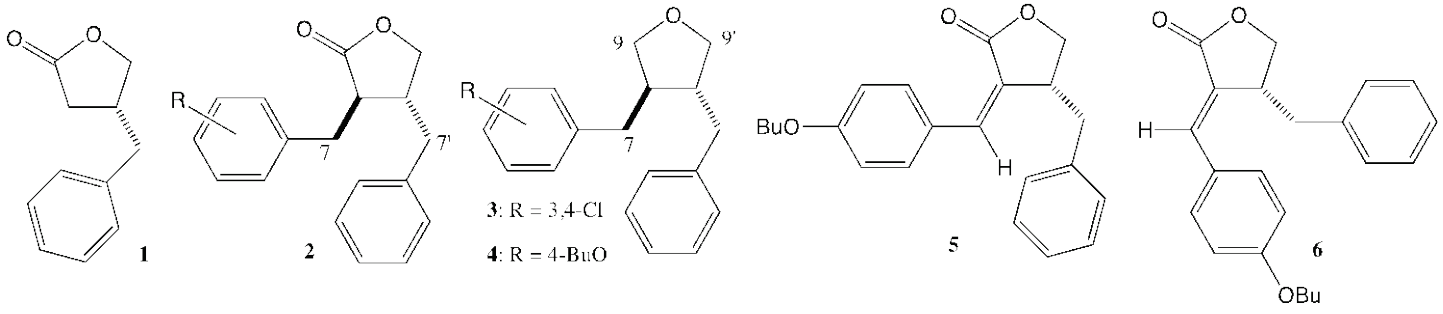
# マタイレジノール誘導体の細胞毒性活性

cytotoxic activity of matairesinol derivartives

○越智 吉明、トゥッティ ウキルサリ、西脇 寿、西 甲介、菅原 卓也、山内 聡 (愛大農)
○Yoshiaki OCHI, Wukirsari TUTI, Hisashi NISHIWAKI, Kosuke NISHI, Takuya SUGAHARA, Satoshi YAMAUCHI (Ehime Univ.)

目的）これまでに、ブタン型リグナン、４置換テトラヒドロフラン型リグナンの構造と細胞毒性活性との関係について調べてきたが、これらの化合物では、２つのベンゼン環上の置換基が 3-methoxy-4-hydroxy 基の場合にも HL−60 及び HeLa 細胞に対して $IC_{50}$ 値が 10−20 μM の細胞毒性活性が見られた。本研究は、活性が弱い（$IC_{50}$ = 74 μM）3-methoxy-4-hydroxyphenyl 基を有するブチロラクトン型リグナン（(−)−マタイレジノール）の誘導体を合成し、HL−60 及び HeLa 細胞に対する細胞毒性活性と構造との関係を調べることにした。今回は、7'位上の置換基を phenyl 基に固定し、7 位の phenyl 基上にさまざまな置換基を有する誘導体 **2** を合成した。

方法･結果）(−)−マタイレジノール誘導体は、L−グルタミン酸から調整したラクトン **1** に対するベンジル化を行って調整した。得られた誘導体を WST-8 法で HL-60、HeLa 細胞に対する細胞毒性活性を調べたところ 7-(dichlorophenyl)体及び 7-(butoxyphenyl)体が約 20 μM の活性を示した。また、これらの(+)-体の活性は、(+)-マタイレジノールの活性が $IC_{50}$ = 100 μM 以上であったのに対して、(-)-体の活性とほぼ変わらない強さだった。このことから、疎水性が活性に影響している事が示唆されたため、さらに高い疎水性を持つ誘導体の活性を調べたところ活性は低下したことから、Clog*P* 値が約 5 の時に最も高い活性が観察されることが分かった。次に、ラクトン **1** に対するベンジル化を行った後に $LiAlH_4$ 還元、TsCl 処理を行い、9,9'-epoxy 体 **3**, **4** を得た。さらに、ラクトン **1** に対する 4-butoxybenzaldehyde とのアルドール縮合、脱水により *Z*-体 **5** 及び *E*-体 **6** を得た。**3**-**6** の活性を比較したところ、9,9'-epoxy 体 **3**, **4** は、ラクトン体とほぼ同レベルの活性を示したが、*Z*-体 **5** の活性は半分以下に低下し、*E*-体 **6** の活性は $IC_{50}$ 値が 100 μM 以上であった。この事からブタン型リグナンの細胞毒性活性発現には、疎水性以外にも重要な要素がある事が示唆された。




matairesinol, lignan, cytotoxic activity

発表番号：3B096
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

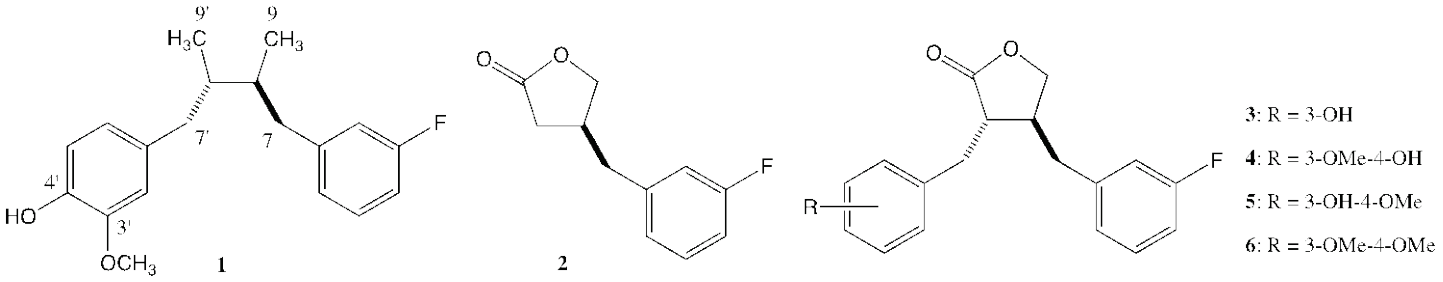
# 3-fluorophenyl 基と 3-fluoro-4-hydroxyphenyl 基をもつリグナン類の *Alternaria* 属に対する抗かび活性

# Antifungal activities of lignans bearing 3-fluorophenyl group and 3-fluoro-4-hydroxyphenyl group against *Alternaria* sp.

○中崎 翔子[1]、西脇 寿[1]、秋山 浩一[2]、山内 聡[1] ([1]愛大農、[2]愛大学術支援センター)
○Shoko NAKAZAKI[1], Hisashi NISHIWAKI[1], Koichi AKIYAMA[2], Satoshi YAMAUCHI[1] ([1]Ehime Univ., [2]Ehime Univ.ADRES)

目的) これまでの dihydroguaiaretic acid の構造と *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype に対する抗かび活性との関係解明研究から、(8*S*,8'*S*)-体の 7-(3-fluorophenyl)体 **1** が高い活性を示し、QSAR 解析により、7 位の phenyl 基上の 3 位に小さな電子吸引基を有する化合物が高い活性を示す事が示唆された (J. Agric. Food Chem., **61**, 8548, 2013)。そこで 7 位を 3-fluorophenyl 基に固定して、 7 '位上の phenyl 基の構造と活性との関係を調べる事にした。

方法・結果）D-glutamic acid から調整したラクトン **2** の α 位に対して様々なベンジルブロミドを反応させた後、$LiAlH_4$ 還元、得られた diol の dimethyl 体への還元、フェノール性水酸基を持つ化合物については、脱ベンジル化を行い誘導体を得た。得られた誘導体のうち 3'-hydroxy 体 **3** の活性が最も高く、*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype、*Alternaria citri*、*Alternaria alternata* apple pathotype に対する活性がそれぞれ 29 μM, 25 μM, 21 μM の $EC_{50}$ 値を示し、これらは、**1** よりも高い活性であった。3 位の水酸基をメトキシ基、フルオロ基、メチル基に変換すると $EC_{50}$ 値が 1000 μM 以上になった事から、３位の水酸基の重要性が示唆された。一方、２置換誘導体では、3'-hydroxy-4'-methoxy 体 **5** の *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype に対する活性が、3'-methoxy-4'-hydroxy 体 **4** ($EC_{50}$ = 20 μM)の約 1/5 であった事、3',4'-dimethoxy 体 **6** の活性は **4** の約 1/3 であった事から 4'位に水酸基、3'位に様々な置換基を有する誘導体の活性を調べた。また、ラクトン 2 の α 位にベンジル化を行った後得られるラクトン体と、このラクトン体の $LiAlH_4$ 還元、TsCl 処理によって得られる 9,9'-epoxy 体についても活性評価を行ったが、いずれも活性はかなり弱かった。さらに、基本構造中の ene 構造が活性に与える影響を調べるために、ラクトン **2** に対してベンズアルデヒド類とのアルドール縮合を行った後、$KHSO_4$ 処理またはアセチル化、DBU 処理によって、それぞれ *Z* 体及び *E* 体アルケンを得た。次に、DIBAL-H 還元、２つの水酸基の還元、水酸基の脱保護によって、ene 構造を有する誘導体を合成中である。




lignan, antifungal activity, dihydroguaiaretic acid

発表責任者：山内聡（syamauch@agr.ehime-u.ac.jp）

発表番号：3B097
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Novel cellulose pretreatment solvent: amino acid ionic liquid/cosolvent for enhancing enzymatic synthesis of methyl ß-D-glucoside from cellulose

○Noriyuki NAKAJIMA, Juan Tao, Masahiro Hamada, Takao Kishimoto (Toyama Prefectural Univ.)

**[Introduction]** Halogen-free amino acid ionic liquids (AAILs) are potentially ideal solvents for cellulose and are expected to be applicable to the further enzymatic hydrolysis of cellulose. So far, there are few reports about application of AAILs in cellulose pretreatment. In this study, tetrabutylphosphonium AAILs were synthesized as cellulose pretreatment solvent for enhancing enzymatic hydrolysis of cellulose and direct synthesis of methyl β-D-glucoside from cellulose.

**[Experiments]** Cellulose (Avicel PH-101) was pretreated by AAIL/cosolvent, and enzymatic hydrolysis of regenerated cellulose was conducted by cellulase (Onozuka-RS, Yakulto) in pH 4.5 acetate buffer with and without methanol. Glucose and methyl β-D-glucoside formed in the buffer solution were monitored by HPLC.

**[Results]** The AAIL/cosolvent pretreatment of cellulose was effective in enhancing enzymatic hydrolysis of cellulose. Especially when a new AAIL, tetrabutylphosphonium *N,N*-dimethylglycine ([TBP][DMGly]) with dimethyl sulfoxide (DMSO) was used, glucose yield reached 100%. Addition of methanol in the buffer solution resulted in the formation of methyl β-D-glucoside. Methyl β-D-glucoside was enzymatically formed from cellulose and methanol. The highest yield of 40% was obtained from cellulose pretreated by tetrabutylphosphonium glycine ([TBP][Gly])/DMSO, whereas the yield was less than 1% from untreated cellulose.

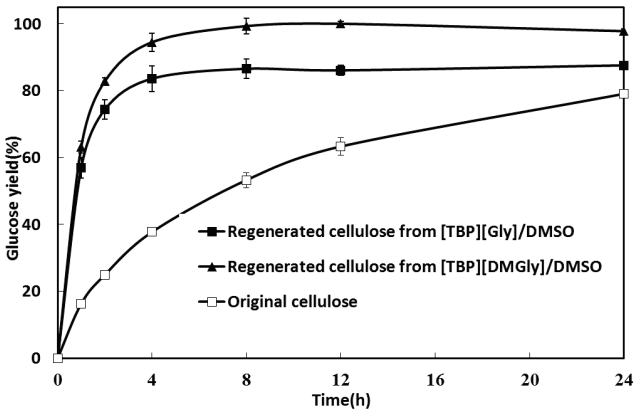


Fig.1 Enzymatic hydrolysis of cellulose

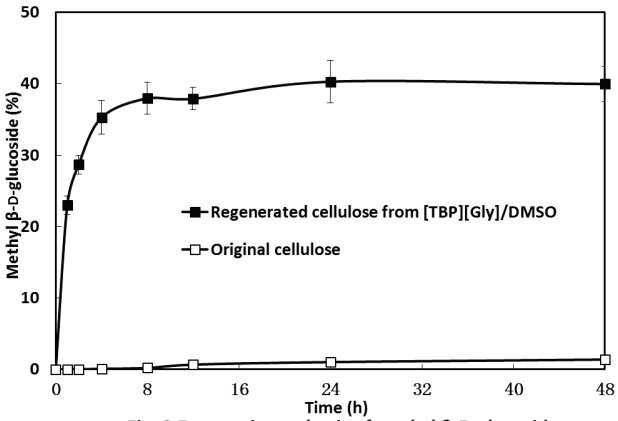


Fig. 2 Enzymatic synthesis of methyl β-D-glucoside

ionic liquid, cellulose, enzymatic hydrolysis

発表責任者：中島範行（nori@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：3B098
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

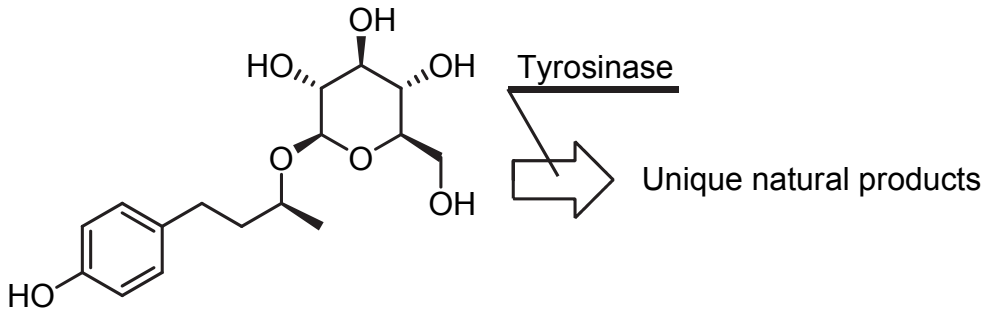
# *o*-ジフェノール配糖体類の化学合成，生理活性評価および探索

Chemical synthesis, biological evaluation and identification of *o*-diphenol glycosides

○岩舘 丈央[1]、二瓶 賢一[1,2] ([1]農工大院連農、[2]宇都宮大農)
○Takehiro IWADATE[1], Ken-ichi NIHEI[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Utsunomiya Univ.)

チロシナーゼ(ポリフェノールオキシダーゼ)は，自然界に広く分布する酸化還元酵素である．この酵素により，モノフェノールおよび *o*-ジフェノールは，*o*-キノンへと酸化される．生成した *o*-キノンは不安定な求電子種であり，様々な求核剤と容易に反応する．

シキミ酸経路などにより，植物は多くのフェノール類を生産する．それらのフェノール類がチロシナーゼにより酸化されることで，不安定な *o*-キノンが発生する．その一方で，植物には L-アスコルビン酸および NADH などの還元剤が普遍的に存在する．これらの還元剤の作用により，*o*-キノンは安定な *o*-ジフェノールへと変換される. すなわち, この酸化還元反応の過程を予測することで，新しい天然 *o*-ジフェノールを植物から見出すことができる.




一昨年の本大会で, ヒドロキシエピロドデンドリンの化学合成とそのラジカル消去活性とともに，チロシナーゼにより，メグスリノキ(*Acer nikoense*)の特徴的な成分であるエピロドデンドリンが *o*-キノンに酸化され，さらに L-アスコルビン酸により，*o*-キノンからヒドロキシエピロドデンドリンが生成することを報告した(岩舘，二瓶．日本農芸化学会 2014 年度大会).

本研究ではヒドロキシエピロドデンドリンが，*A. nikoense* の抽出物中に存在することおよび，ラジカル消去以外の生理活性を持つことの確認を行った．また，ヒドロキシエピロドデンドリンのエピマーであるヒドロキシロドデンドリンが, チロシナーゼと L-アスコルビン酸による酸化還元反応によって生成し，新しい生理活性が付与されることを明らかにした．さらに，本酸化還元反応に基づいた生合成予測により，種々のモノフェノールと *o*-ジフェノールの化学合成を行い，それらの生理活性の評価および天然物としての確認を行った.

polyphenol oxidase, tyrosinase, *o*-diphenol

発表番号：3B099
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

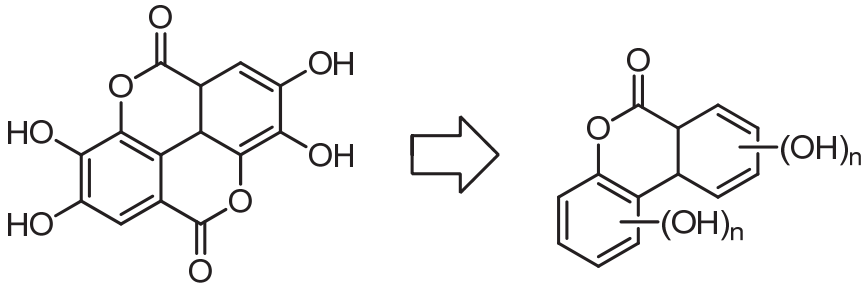
# ウロリチン類の化学合成

# Chemical synthesis of urolithin and its derivatives

○張間 紗希[1]、小松 渡[2]、矢ヶ崎 一三[3]、二瓶 賢一[1]([1]宇都宮大農、[2]獨協医大、[3]宇都宮大バイオ)
○Saki HARIMA[1], Wataru KOMATSU[2], Kazumi YAGASAKI[3], Ken-ichi NIHEI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Dokkyo Medical Univ., [3]Center for Bioscience Research and Education,Utsunomiya Univ.)

エラグ酸は，イチゴやラズベリーなどに含まれる抗酸化性ポリフェノールである．腸内細菌の働きにより，この化合物は，構造多様性に富むウロリチン類へと変換されることが知られている．また近年，腸内でウロリチン類から，様々な水溶性のグルクロン酸配糖体がさらに派生していることが示唆されている．

ポリフェノールであるウロリチン類には，エラグ酸と同様に，強い抗酸化性が期待できる．またこの化合物群は，チロシナーゼの活性中心に対して強い親和性を示すモノフェノール，*o*-ジフェノールおよびレゾルシノールの骨格を有し，チロシナーゼ阻害剤として働く可能性がある．抗酸化性とチロシナーゼ阻害活性は，抗老化や食品の鮮度保持などに密接に関与している．しかしながら，質量分析法により，その存在が確認されただけの微量なウロリチン類も存在し，それらの詳細な生理活性を評価するためには，有機合成による化合物の供給が必須である．そこで，ウロリチン類を効率的に化学合成し，既存の多様なウロリチン類の構造ライブラリーに対して，新たな生理活性情報を付け加えることを最終目標に本研究を行った．




Ellagic acid　　Urolithins

出発物質である市販のジヒドロキシ安息香酸に保護基を導入し，その *o* 位を，NBS もしくは他の臭素化剤を用いて，臭素化した．次に硫酸銅存在下，レゾルシノールとの Hurtley 反応を行い，種々のウロリチン保護体を得た．トリクロロアセトイミデート法によるその保護体に対する配糖体化反応および，保護基の除去反応を検討し，今後，ウロリチン類およびウロリチン配糖体の化学合成を目指す．

urolithin, polyphenol, glycoside

発表番号：3B100
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 磁性粒子を用いた効率的液相合成法の開発

# Development of efficient peptide synthesis using magnetic particles

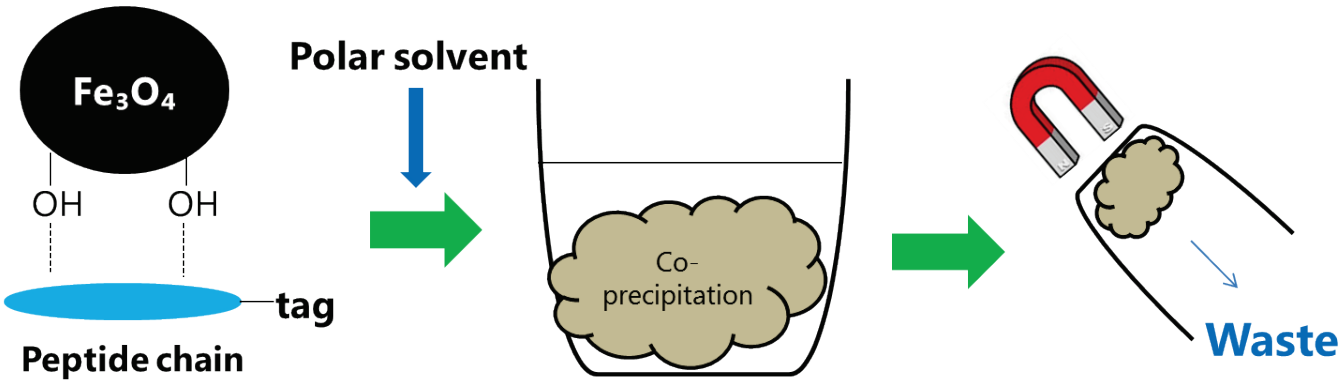
○谷口 大輔、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院）
○Daisuke TANIGUCHI, Youhei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

不溶性担体を用いた固相合成法は，生成物の分離・精製の迅速さから広く利用されている．特にペプチドや核酸の化学合成においては,非常に重要な役割を果たしている.

一方で, 我々は高い疎水性を持つ, ベンジルアルコール誘導体を可溶性担体として利用する液相ペプチド合成法を開発した. この合成法では, 各反応終了後に極性溶媒を加えることで, ペプチドに結合した担体が沈殿するため, 液相での高い反応効率に加えて, 濾過による簡便な分離精製が可能となる. 加えて我々は, この分離・精製操作をより簡便なものにするために, 表面を疎水性に化学処理をした磁性ナノ粒子を開発した. この磁性粒子は, 可溶性担体との疎水性相互作用によって, 担体と共沈殿するため, 生成物の磁的捕集操作が可能となり, より迅速かつ簡便に次の操作へと移ることが出来る.[1]

しかしながら, 開発した粒子は不安定であり, 反応の最中に表面疎水性が取れてしまう事が確認され, 新たな磁性粒子の探索が必要となった.

今回, 新たな磁性粒子材料としてマイクロサイズの粒径を持つ, 四酸化三鉄（$Fe_3O_4$）が有用である事を確認した.




本研究では, $Fe_3O_4$ を利用した磁的分離精製を用いて, 出発材料である Fmoc-A-TAG から, 同一容器内で連続的に反応させ, モデル基質である Fmoc-D(Otbu)-I-Y(Otbu)-A-TAG を 6step Crude 収率 86%（各 step 98%>）の高収率で合成・回収する事に成功した. $Fe_3O_4$ は, 表面にヒドロキシ基をもつため, ペプチド鎖と四酸化三鉄との水素結合によって, 共沈殿を起こすものと推察される.

(1) Motoyuki Iijima et al. *Langmuir* 2009, 25(18), 11043-11047

separation, magnetic particles, peptide

発表責任者：谷口　大輔（daisuke3960@gmail.com）

発表番号：3B101
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

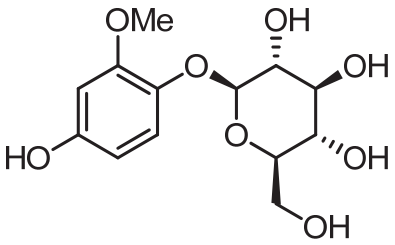
# タチノシドおよびその関連誘導体の化学合成と生理活性評価

# Chemical synthesis of tachinoside and related compounds and their biological evaluation

○松本 大志、中島 拓弥、二瓶 賢一（宇都宮大学農）
○Takashi MATSUMOTO, Takuya NAKAJIMA, Kenichi NIHEI (Utsunomiya Univ.)

タチノシドは，クマヤナギ(*Berchemia racemose*)から，1987 年に単離されたフェノール性配糖体である．その構造は，機能性化粧品の素材として用いられているアルブチンと，非常に類似している．タチノシドの生理活性としては，α-グリコシダーゼ阻害活性や酸素ラジカル消去活性などが知られているが，アルブチンが示すようなチロシナーゼ阻害活性に関する報告は，発表者らの知る限り存在しない．

当研究室では，以前，南アフリカに自生するヤマモガシ科植物の *Protea neriifolia* から単離・構造決定されたタチノシド類似のフェノール性配糖体の化学合成を行った．そのチロシナーゼ阻害活性を測定したところ，弱いながらもアルブチンより強い活性を示すことが分かった．本研究では，チロシナーゼ阻害活性とこれらフェノール性配糖体構造との相関解析を行うことを最終目的に，Baeyer-Villiger 酸化，トリクロロアセトイミデート法や選択的なメチル化などを鍵反応として，タチノシドおよびその関連配糖体の化学合成を計画した．




Tachinoside

出発物質であるジヒドロキシベンズアルデヒドの水酸基をベンジル化し，得られたベンズアルデヒドを用いて Baeyer-Villiger 酸化を行い，ベンゼントリオール誘導体に導いた．市販の糖から誘導した糖ドナーを使用し，トリクロロアセトイミデート法により，得られたトリオールの配糖体化を行い，保護配糖体を合成した．この配糖体上の全てのベンジル基を脱保護し，フェノール部分の 4 位選択的に TBS 基を導入した．次に，2 位に対するメチル化の条件を種々検討したが，この反応を最適化することはできなかった．そこで，糖部分のアセチル基を全て除去した後，2 位をメチル化し，最後に TBS 基を脱保護して，タチノシドの化学合成を初めて達成した．

Arbutin, Tyrosinase, Glycoside

発表番号：3B102
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

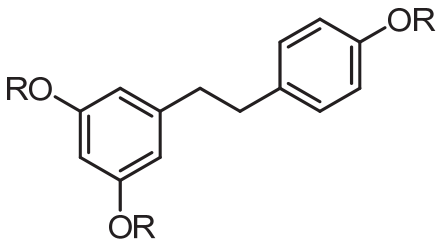
# ジヒドロレスベラトロールグリコシド類の化学合成とメラニン形成調節活性

# Chemical synthesis of dihydroresveratrol glycosides and their melanogenesis regulation activity

○島田 亙[1,2]、横田 真理子[2]、二瓶 賢一[3]（[1]農工大院連農、[2]コスモステクニカルセンター、[3]宇都宮大農）
○Wataru SHIMADA[1,2], MARIKO YOKOTA[2], Ken-ichi Nihei[3] ([1]Ustunomiya Univ, [2]COSMOS TECHNICAL CENTER CO.,LTD, [3]Tokyo University of Agriculture and Technology)

ブドウの果皮などに含まれる抗酸化性ポリフェノールであるレスベラトロールは，フレンチパラドックスおよび寿命延長効果との関連が示唆され，近年，有用な生理活性天然物として注目を集めている．しかしながら，光により容易に分解され，かつ水に溶けにくいため，その使用は制限されている．そこで当研究室では，レスベラトロールのオレフィン部分の還元により，光安定性のあるジヒドロレスベラトロールに導き，さらに相関移動触媒存在下に，グルコースドナーとのカップリングを行って，そのモノグルコシドおよびモノキシロシドの化学合成を行った．

得られたグルコシドとキシロシドは，B16 メラノーマ細胞培養系を用いた試験で，メラニン生産抑制およびメラニン生産促進の何れかの活性を示すことが明らかになった．しかしながら，単離収率はグルコシドでは 3%程度，キシロシドでは 10%程度と非常に低く，実用性に乏しかった．そこで，収率の向上および，より水に溶けやすいジグルコシドの化学合成と生理活性評価を目指し，本研究を行った．




R = H or Glc

グルコースドナーとしては，市販のグルコースペンタアセテートを使用した．天然のレスベラトロールから合成したジヒドロレスベラトロールと，このドナーをトルエンに溶かし，*p*-トルエンスルホン酸を触媒に用いて配糖体化反応を行った．反応温度を 105 ℃ に昇温したところ，この反応は進行し，ジヒドロレスベラトロールアセチルグルコシドが得られた．次にカラムと HPLC 分取で精製後，全てのアセチル基を除去し，その結果，2 種類のジヒドロレスベラトロールジグルコシドを単離できた．現在，これらジグルコシドの生理活性評価およびモノグルコシドの合成方法の検討を行っている．

Dihydroresveratrol

発表番号：3B103
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *in vivo* イメージングに適した新規ルシフェリンアナログの合成

# Innovation of New Luciferin Analogs for *in vivo* Imaging

○齊藤 亮平、木山 正啓、北田 昇雄、東 翔子、平野 誉、牧 昌次郎（電気通信大学　先進理工学専攻）
○Ryohei SAITO, Masahiro KIYAMA, Nobuo KITADA, Shoko HIGASHI, Takashi HIRANO, Shojiro MAKI (The Univ. of E.- Communication Dept. of Engineering Science)

当研究室では以前より有機合成の技術を用いて *in vivo* 光イメージングに使える材料開発を行っている。現在、*in vivo* 光イメージング技術は癌や再生医療といった先端医学研究分野において必要不可欠な技術である。この技術で細胞や臓器を観察できれば、今までよりも多くの知見を得られるようになるだろう。しかしながら、現状の光イメージングでは生体内深部の観察が難しいとされており、生体内深部を可視化できる新たな技術が待望されている。そこで、我々は生体内深部を可視化できる材料の開発に挑戦した。

生体内深部の観察が容易ではない主な原因は、生体組織による光の吸収・散乱である。現在光イメージングの主流で使われている可視光は生体内で吸収・散乱が強い。一方で、近赤外領域(NIR)の光は吸収・散乱が少なく、生体組織に対して透過性が高い。当研究室では、ホタルルシフェリンールシフェラーゼ発光反応系を応用した NIR 発光する標識材料の開発に取り組んだ。

この発光反応系は現在、光イメージングにおいて主に使われている。我々はこの発光反応系における基質ホタルルシフェリンのアナログを多種合成し、発光に対する構造活性相関を得てきた。これに基づき、NIR を発光色とする標識材料の開発に成功し、ルシフェリンアナログであるアカルミネ®(和光純薬工業)を市販化した。アカルミネ®は動物実験において天然の材料であるホタルルシフェリンに比べ、非常に良好な結果を得ている。

しかしながら、アカルミネ®は水溶性が低いという性質により濃度調整が難しい。そこで今回は、これまでの構造活性相関と核酸分子の構造を組み合わせることで、アカルミネ以上の溶解度を持つ新規化合物の合成を目指した。この新規化合物の発光能や物性の詳細を報告する。

*in vivo* imaging, luciferin luciferase, NIR luciferin analog

発表責任者：牧昌次郎（s-maki@uec.ac.jp）

発表番号：3C001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# コリネ型細菌由来 PDHc/ODHc 超複合体の活性制御機構の解析

# Analysis on the mechanism regulating the PDHc/ODHc ultra-complex activity in *Corynebacterium glutamicum*

○山内 健太郎[1]、栃木 夢丸[1]、古園 さおり[2]、川崎 寿[1]、夏目 亮[1]([1]東電大・院・工、[2]東大・生物生産工学研究センター)
○Kentaro Yamauchi[1], Yumemaru Tochigi[1], Saori Kosono[2], Hisashi Kawasaki[1], Ryo Natsume[1] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki univ., [2]Biotech. Res. Center, The univ. of Tokyo)

[背景及び目的]

ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDHc)及び 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体(ODHc)は、E1、E2、E3 の 3 種のサブユニットから構成される複合酵素である。両複合酵素による反応では、E1 サブユニットでの 2-オキソ酸の脱炭酸、複合体のコアとなる E2 サブユニットでのアシル CoA の合成、E3 サブユニットによる E2 サブユニット上のリポアミドの再生、が繰り返される。通常の生物では、PDHc と ODHc の E3 サブユニットが共通の遺伝子にコードされているのに対し、E1、E2 サブユニットはそれぞれ異なる遺伝子にコードされている。複合体のコアとなる E2 サブユニットが異なることから、PDHc と ODHc は別の複合体であると考えられている。だが、コリネ型細菌では、両酵素複合体の E3 サブユニットに加えて E2 サブユニットも共通の遺伝子にコードされている特徴があり、異なる遺伝子にコードされているのは両酵素の E1 サブユニットのみである。E2 サブユニットが一種類であるため、PDHc の E1 サブユニット(E1p)、ODHc の E1 サブユニット(E1o)、E2、E3 が超複合体を形成していると考えられる。本研究では、代謝フラックスの調節の要となる、PDHc/ODHc 超複合体の活性調節機構を明らかにすることを目的としている。PDHc/ODHc 超複合体を精製し、酵素活性の分析ならびに PDHc/ODHc 超複合体と共沈殿する因子の分析を行った。

[方法及び結果]

E1p あるいは E1o の C 末端に Flag-Flag-His-tag が融合した遺伝子組換え株 E1p-FFH 株及び E1o-FFH 株 2 種類を構築した。両組換え株から独立に PDHc/ODHc 超複合体を Flag-tag エピトープを利用した免疫沈降法でアフィニティ精製した。E1p-FFH 株由来の精製試料、E1o-FFH 株由来の精製試料どちらにおいても PDHc 活性と ODHc 活性の両方が検出された。両精製試料を電気泳動分析した結果、E1p、E1o、E2、E3 の 4 種類のサブユニット以外に複数のバンドが検出された。注目すべきことにその中には、ビオチンタンパク質が 2 種類含まれていた。コリネ型細菌のゲノム情報から、これら 2 種類のビオチンタンパク質は、それぞれ、ピルビン酸カルボキシラーゼとアセチル CoA カルボキシラーゼ α サブユニットであると考えられる。これらのことは、PDHc/ODHc 超複合体と空間的に近接している酵素の間で反応産物がリレーされるモデル、さらにいえば、相互作用する酵素の組合せによって代謝の方向が決まるモデルを想起させるものである。現在、PDHc/ODHc 超複合体と相互作用する因子の同定に取り組んでいる。

Pyruvate dehydrogenase complex, 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, ultra-complex

発表番号：3C002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 沖縄島産ハブ(Protobothrops flavoviridis)個体からの毒性成分 HR1B 検出

# Western Blot Analysis of HR1B in the Venom of Snake Okinawa Habu

○大城 聡子[1]、岩崎 公典[2]、平良 東紀[3]、盛根 信也[1]、泉水 由美子[1]、寺田 考紀[1]、久高 潤[1]([1]沖縄県衛生環境研究所、[2]琉球大学熱帯生物圏研究センター、[3]琉球大学農学部亜熱帯生物資源科学科)
○Akiko OSHIRO[1], Hironori IWASAKI[2], Toki TAIRA[3], Nobuya MORINE[1], Yumiko IZUMI[1], Koki TERADA[1], Jun KUDAKA[1] ([1]Okinawa Prefectual Institute of Health and Environment, [2]Tropical Biosphere Research Center University of the Ryukyus, [3]Faculty of Agriculture Department of Subtropical Biochemistry and Biotechnology)

【目的】沖縄諸島および奄美諸島に生息する、クサリヘビ科に属するハブ(*Protobothrops flavoviridis*)の毒には、出血活性、筋壊死、浮腫など多様な作用があり、これらを引き起こす毒性成分は、タンパクである。ハブ毒の主要成分と考えられる出血毒はメタロプロテアーゼであり、末梢血管の基底膜に作用し血液を血管外へ漏出させ、また致死作用の本体と言われる。ハブ毒には、出血毒 HR1（60kDa）が 2 種類存在し、HR1A と HR1B とよばれる。これまで沖縄島産のハブ毒には HR1A のみ存在し、HR1B は存在しない[1)]とされてきたが、沖縄島産のハブ毒にも HR1B が存在することが最近確認された[2)]。HR1B が確認されたハブ毒は、沖縄島で捕獲された複数個体のハブ毒の混合物であり、ハブ個体毎の HR1B 含有量および、地域差については不明である。本研究は HR1B の有無について、沖縄島産ハブ個体毎の分析を行うことを目的に、方法を検討した。
【方法】沖縄島の北部地域で捕獲されたハブ（以下、ハブ）個体毎に、毒を採取し、750×g で 10 分間、4℃で遠心処理後、上清をハブ粗毒とした。ハブ粗毒をゲルろ過クロマトグラフィー、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー、および FPLC（POROS S/20 陽イオン交換クロマトグラフィー）により HR1A および HR1B をそれぞれ分離した[2)]。FPLC の最終画分の SDS-PAGE により、60kDa 付近にバンドが確認され、かつ特異的基質によるプロテアーゼ活性のあった 3 画分に対し HR1A 特異的抗体、HR1B 特異的抗体でウエスタンブロッティングを行った。HR1A 特異的抗体及び HR1B 特異的抗体は、沖縄島産ハブより分離された HR1A 及び HR1B のペプチド配列をもとに作製した抗体であり、それぞれ HR1A 及び HR1B には反応しないことが確認されている。
【結果と考察】文献[2)]の通りに分離したハブ 1 個体の毒から得られた HR1A 画分及び HR1B 画分を、それぞれ両特異的抗体によるウエスタンブロティングを行った結果、それぞれ特異的抗体にのみ反応した。このことから、特異的抗体による HR1A および、沖縄島産ハブ 1 個体から HR1B を持つ個体が存在したことがわかった。また、上記抗 HR1A 特異的抗体及び抗 HR1B 特異的抗体によるウエスタンブロティングで、沖縄島産ハブ毒から HR1A 及び HR1B の検出が可能と示唆された。また、分離を行わずに粗毒から直接 HR1B を検出することが可能であることも示唆された。

1)Seiji Sadahiro and Tamotsu Omori-Satoh, Toxicon, 18:366-368(1980)
2)Nobuya Morine, Seiko Matsuda, Koki Terada, Hironori Iwasaki and Hirosuke Oku, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(2), 591-594(2008)

HR1B, *Protobothrops flavoviridis*, Western blotting

発表責任者：大城聡子（knjouak@pref.okinawa.lg.jp）

発表番号：3C003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# タンパク質の S-ニトロシル化修飾を標的とした食品機能性評価の可能性

# The Reduction Capacity of Food Components against S-nitrosylation: Proteomic Approach for Assessment of S-nitrosylated Proteins in vitro using Fluorescence Labeling Technique

○芳村 俊広[1]、黒木 勝久[1,2]、水光 正仁[1,2]、榊原 陽一[1,2]（[1]宮崎大学大学院農学工学総合研究科、[2]宮崎大学農学部応用生物科学科）
○ Toshihiro Yoshimura[1], Katsuhisa Kurogi[1,2], Masahito Suiko[1,2], Yoichi Sakakibara[1,2] ([1]Interdisciplinary Graduate School of Agriculture and Engineering, University of Miyazaki, [2]Department of Biochemistry and Applied Biosciences, University of Miyazaki)

【目的】生体内において一酸化窒素合成酵素 (NOS)によって産生される一酸化窒素 (NO)は血圧制御やシナプス伝達、炎症反応など生物学的システムにおいて重要な役割を果たすことが知られる。近年、タンパク質のシステイン (Cys)残基に NO が付加する S-ニトロシル (SNO)化と呼ばれる翻訳後修飾がタンパク質機能制御の新しいパラダイムとして注目されている。現在までの研究で SNO 化はタンパク質の機能を負に制御することによってパーキンソン病やアルツハイマー病などの神経変性疾患の一因となることが明らかになってきた。そこで、SNO 化を抑制することで SNO 化が関与する疾病の予防または治療に繋がると考えた。そこで、我々は以前より検討してきたタンパク質蛍光標識技術を用いた SNO 化タンパク質検出方法 (CyDye-switch 法)を利用することで SNO 化を抑制できる化合物のスクリーニングに応用できると考えた。我々は日々の食事より摂取できる食品成分中に SNO 化還元能を持つ成分があれば SNO 化による疾病を予防できるという観点から、本研究において SNO 化還元能を持つ食品成分のスクリーニングを試みた。
【方法】モデル化合物として S-ニトロソグルタチオン (GSNO)によって SNO 化を誘導した BSA を CyDye-switch 法によって特異的に検出できるか検討した。遊離の SH 基を N-エチルマレイミドを用いて不可逆的に保護し、アスコルビン酸ナトリウムと $Cu^{2+}$を用いて SNO 化部位を還元して遊離 SH 基を生成し、Cy5-マレイミドによって蛍光標識後、SDS-PAGE によって分離、蛍光イメージャー (Typhoon FLA9500)によって SNO 化タンパク質を可視化した。次に、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞ライゼートに S-ニトロソシステイン (CysNO)を処理し試験管レベルで SNO 化を誘導後、CyDye-switch 法還元ステップの化合物を抗酸化モデル化合物である Trolox に変更することで Trolox の SNO 化還元能の評価を行った。その後、11 種類の食品成分に関して同様の方法で SNO 化還元能の評価を行った。
【結果・考察】CyDye-switch 法は SNO 化タンパク質特異的に検出できることを示した。また、Trolox を用いた SNO 化還元能の評価では Trolox に SNO 化還元能を確認することができた。また、11 種類の食品成分を評価したところグルタチオン (GSH)， EGCG において非常に強い SNO 化還元能を検出することができた。本研究より CyDye-Switch 法は SNO 化を抑制できる食品成分の評価に利用可能であることを示し，GSH，EGCG は SNO 化による疾病の予防・治療に有効であることが示唆された。

S-nitrosylation, CyDye-switch method, Food components

発表番号：3C004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# KvAP カリウムチャネルの電位センサーの膜組込み機構
# Membrane insertion of voltage sensor domain in K channel, KvAP

三島 枝里子[1]、佐藤 陽子[1]、阪口 雅郎[2]、○魚住 信之[1] ([1]東北大院工バイオ、[2]兵庫県大院理)
Eriko Mishima[1], Yoko Sato[1], Masao Sakaguchi[2], ○Nobuyuki Uozumi[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Univ. Hyogo)

【目的】細胞内の主要陽イオンであるカリウムイオン(K)は，細胞内の浸透圧，膜電位の形成，細胞外の刺激や環境変化に応じて生体膜を介した情報伝達のシグナル物質として機能している。K チャネルや K トランスポーターが K の吸収と排出輸送を行っている。なかでも膜電位の変化に依存性して開閉する K チャネル（Kv）は，原核細胞と真核細胞に広く存在している。Kv チャネルは，6 回の膜貫通部位(S1～S6)を有しており，イオン選択孔(S5-P-S6)の N 末端側には，膜電位センサー(S1-S4)は，Kv チャネルに高く保存された負電荷を有する S2 および S3 と，正電荷残基が数個を有する S4 によって構成されている。S2 と S3 の負電荷アミノ酸は，S4 の正電荷アミノ酸と電気的に相互作用して，膜電位の変化にともなって S4 の正電荷が動きイオン選択孔の開閉が生じる。これまでに私たちは S4 が低い疎水性を持つにもかかわらず，膜貫通領域として存在する理由を検討してきた。シロイヌナズナの Kv チャネルの KAT1 は S3 と S4 の相互作用後に膜へ組込まれること，ショウジョウバエの Kv チャネル Shaker は S3 がその高い疎水性により自立的に組込まれ、S4 は通常の膜挿入機構で組込まれることを明らかにしてきた。一方，結晶構造が明らかとなっている古細菌の Kv チャネル KvAP の S4 は他のチャネルの S4 と比較してより高い疎水度を有している。本研究では、KvAP の膜電位センサーの組込み様式について，*in vitro* 翻訳系および *in vitro* 膜挿入系を用いて解析を行った。
【方法と結果】KvAP の S4 は N 末端からトランスロコンに挿入する機能(type I signal-anchor sequence ： SA-I）をもつことをこれまでに明らかにしている。今回，この SA-I 機能の強さをはかる目的で，DHFR および SBP などのタンパク質およびペプチドを S4 の N 末端側に付加して膜挿入能力を検討した。強い SA-I 機能をもつ synaptotagmin II 膜貫通領域(SytIITM)を対照に用いた。この結果，上記の配列が付与されると S４の膜挿入は阻害された。このことより，S4 内の正電荷アミノ酸が SA-I の機能を弱めている可能性が示唆された。次に，KvAP の S3-S4 ループが短いことが疎水性度合から推定されており，S3 と S4 の距離は両膜貫貫通領域の膜組込みに影響を与える。S3-S4 間に band 3 タンパク質にある N 型糖鎖修飾部位を有するループ配列(42 残基)を導入して， S3 と S4 ループが ER 内腔側に露出する長さを検討した。N 型糖鎖修飾を指標に検討したところ，8 アミノ酸が水溶性領域に露出しており，Kv チャネルとして比較的短いループで構成されていることがわかった。S3-S4 間の延長には限界があることも明らかとなった。以上のことから，KvAP の膜電位センサーは，S4 依存的に S3 が膜に組み込まれることが明らかとなった。

ion channel, membrane insertion, voltage sensor

発表責任者：魚住信之（uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp）

発表番号：3C005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 枯草菌芽胞形成制御因子 Spo0M タンパク質の構造と機能に関する研究
# Structural and functional analysis of a sporulation protein Spo0M from Bacillus subtilis

○園田 陽、水谷 公彦、三上 文三（京大農）
○Yo SONODA, Kimihiko MIZUTANI, Bunzo MIKAMI (Kyoto Univ.)

【目的】外部環境の変化に対する応答はすべての生物にとって生存に必須の機能であり、様々な応答機構が知られている。枯草菌（*Basillus subtilis*）は栄養分の枯渇を感知し、芽胞を形成する。Spo0M は芽胞形成制御因子の 1 つであり、芽胞形成初期に発現が誘導される。 *spo0M* 遺伝子破壊株或いは強制発現株では、芽胞形成に異常をきたすことが報告されており、また Spo0M はカタボライト制御因子である CcpA と複合体を形成する可能性が報告されている。さらに、アミノ酸配列より、Spo0M は真核生物のスキャッフォールドタンパク質であるアレスチンと相同性があることが報告されている。しかしながら、現在まで Spo0M の詳細な機能や構造に関する報告は無く、その役割や構造は不明である。よって本研究では、Spo0M の構造及び機能解析を実施した。
【方法と結果】Spo0M の機能の一部を明らかにするため、枯草菌ゲノミック DNA より *spo0M* 遺伝子をクローニングし、大腸菌 pET システムを用いて発現・精製した。表面プラズモン共鳴法（SPR 法）を用いた解析により、Spo0M が CcpA と直接結合すること、また Spo0M-CcpA 間の結合は、CcpA のエフェクタータンパク質である HPr-Ser-P によって亢進されることがわかった。さらに、Spo0M は濃度依存的に CcpA/HPr-Ser-P の DNA 結合を阻害した。次に、Spo0M の 3 次元構造を明らかにするため、最初に全長の野生型 Spo0M タンパク質（$Spo0M^{FL}$; 258 aa）を用いて結晶構造解析を試みたが、結晶は得られたものの、構造の決定には至らなかった。そこで、N 末端或いは C 末端に種々の欠損を有する変異体を複数作製し、Differential Scanning Fluorimetry (DSF) 法を用いて熱安定変異体をスクリーニングした。N 末端より 10 アミノ酸を欠失させた変異体（$Spo0M^{11\text{-}258}$）において、野生型よりも 9°C 高い変性温度を認め、$Spo0M^{11\text{-}258}$ の結晶から 2.3Å の分解能で構造を決定することに成功した。$Spo0M^{11\text{-}258}$ は N 末側及び C 末側にそれぞれドメイン構造を有し、N ドメインは哺乳類のアレスチンと高い構造相同性を有していることが分かった。さらに、C ドメインは哺乳類 PI31 プロテインの FP ドメインと高い構造相同性を有することが分かった。
【考察】相互作用解析より、芽胞形成初期に発現誘導を受けた Spo0M は、CcpA/HPr-Ser-P 複合体に結合し、CcpA/HPr-Ser-P 複合体の DNA 結合を阻害することによって、CcpA によるカタボライト抑制を解除する機能を有するという作業仮説が考えられた。また、X 線結晶構造解析より、Spo0M が哺乳類のアレスチンや FP ドメインと共通の祖先と類似した機能を有していることが示唆された。

Spo0M, CcpA, sporulation

発表責任者：園田陽（sonoda.yo.68v@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3C006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# β-キチンナノファイバーを基盤とするインフルエンザウイルス阻害

# Influenza virus inhibition based on the ß-chitin nanofibers

○戸谷 一英[1]、三浦 勇生[1]、二階堂 望[1]、末永 信[2]、長田 光正[2]、山下 和彦[3]([1]一関高専・物化工、[2]信州大・繊維、[3]ヤエガキ醗酵技研(株))
○Kazuhide TOTANI[1], Hayase MIURA[1], Nozomi NIKAIDO[1], Shin SUENAGA[2], Mitsumasa OSADA[2], Kazuhiko YAMASHITA[3] ([1]Nation. Inst. Tech., Ichinoseki Coll., [2]Facul. Textile Sci. & Tech., Shinshu Univ., [3]YAEGAKI Bio-industry, Inc.)

【背景および目的】　キチンは直径数 nm のミクロフィブリル（ナノファイバー、NF）の集合体であり、カニ殻等甲殻に含まれるαキチンとイカ中骨に含まれるβキチンに大別される。演者らは三陸産イカ中骨から除タンパク（NaOH）、脱灰（HCl）処理によりβキチンを調製し、蒸留水中でのウォータージェット（StarBurst）により解繊してβキチン NF を調製した。本 NF は高度なネットワーク構造や保水性、高粘性、アミノ基に由来する正電荷を有し様々な機能性物質（X）を担持可能と推測される。近年、銀ナノ粒子（Ag NPs）に幅広い抗菌・抗ウイルス作用が見いだされているが、銀ナノ粒子は高価で、細胞毒性や環境への流失も懸念されており使用量の低減が必要である。本研究では、NF の抗菌・抗ウイルス分野への展開の一環として、各種 NF に銀ナノ粒子（Ag NPs）を担持させた「ハイブリッド NF」を調製し、それらの物性およびインフルエンザウイルス阻害活性を評価した。また、βキチン NF の体内動態を占うためにキチナーゼによる NF の分解性も評価した。
【材料および方法】　イカ由来βキチン、カニ由来αキチン、キトサン、セルロースを㈱スギノマシン製 Star Burst を用いて解繊した。NF の物性は紫外・可視領域の透過率、粘度、分子量（HPLC）、SEM、TEM、急速冷凍ディープエッジ・レプリカ法にて評価した。各 NF に銀ナノ粒子（八千代工業㈱、イオンフレアー、平均φ5 nm）を感作し分散した。銀ナノ粒子吸着率は上清の吸光度から求めた。MDCK 細胞を使用したインフルエンザウイルス阻害試験を行った。NF のキチナーゼ・キトビアーゼ混合製剤による糖化率を HPLC で測定した。
【結果および考察】　酸処理で終了したβ-キチン由来の NF は透過率（透明度）、粘度、保水性が高く、直径 5～10 nm でナノ分散した 3 次元ネットワーク構造を有していた。アルカリ処理で終了したβ-キチン由来の NF やキトサン NF は透過率が低くファイバー径が大きかった。銀ナノ粒子はβキチン NF やキトサン NF へは 90%以上担持された。βキチン NF は銀ナノ粒子を担持させることでインフルエンザウイルスを完全に阻害した。NF の酵素分解試験においては、βキチンはαキチンと異なる挙動を示した。　*本研究は JST 復興促進プログラムで行われた。

β-chitin nanofiber, silver nanoparticle, Influenza virus

発表番号：3C007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# Renature-β-1,3-1,6-グルカン／シコニン複合体の安定性
# Stability of renature-β-1,3-1,6-glucan/shikonin complex

○児玉 歩夢[1]、中川 暁史[1]、鈴木 利雄[2]、谷口 泰造[3]、甲元 一也[1]（[1]甲南大 FIRST、[2]阪市大院工、[3]姫路獨大薬）
○Ayumu KODAMA[1], Akifumi NAKAGAWA[1], Toshio SUZUKI[2], Taizo TANIGUCHI[3], Kazuya KOUMOTO[1] ([1]Konan Univ., [2]Osaka City Univ., [3]Himeji Dokkyo Univ.)

【研究背景】

生薬として知られる紫根の有効成分シコニンには抗菌作用、抗炎症作用、抗腫瘍作用があることが明らかとなっている。しかし、シコニンは難水溶性であり、その検証実験においても、生体毒性のあるＤＭＳＯが用いられざるを得ない。そのため、シコニンの水への可溶化技術の開発が実用化に向けての不可欠な課題となっている。昨年の年次大会において我々は、我々の研究室で開発したＲｅｎａｔｕｒｅ－β－１，３－１，６－グルカン（ｒ－グルカン）法を用いることで、中性条件下にて、シコニンを水溶液中に可溶化できることを報告した。また、複合体を形成することで紫外線に対してシコニンが分解されにくくなることも明らかとした。本発表では、このｒ－グルカン／シコニン複合体の特性について、さらに詳細に検討を行ったので報告する。

【実験方法・結果】

ｒ－グルカンへのシコニンの包接は、ｒ－グルカン水溶液とシコニンのメタノール溶液との混合で行い、混合１５時間後、包接されなかったシコニン（沈殿）を取り除いた上清を、ｒ－グルカン／シコニン複合体溶液として実験に用いた。その際、シコニン、ｒ－グルカンの濃度はそれぞれ０．１ｍＭ、０．５mMとし、メタノールの体積は２．０ｖ／ｖ％になるように調整した。シコニンの包接複合体の安定性評価は、解離速度定数から求めた半減期の比較により行った。

まず、包接複合体の熱安定性について検討した。ｒ－グルカンに取り込まれたシコニンは時間経過と共に放出されていくが、その解離速度には温度依存性が確認された。３７℃、５０℃、６０℃における半減期はそれぞれ、１１．８時間、７．５時間、４．４時間と見積もられ、高い熱安定性を保持することが明らかとなった。アレニウスプロットより解離に関わる活性化エネルギーを見積もったところ、３７１ｋＪ・ｍｏｌ$^{-1}$と、分子間相互作用の値にしては非常に大きくなることが明らかとなり、シコニンがｒ－グルカンに強く包接され、安定化していることが示唆された。そのため、イオン、極性低分子、界面活性剤などを包接複合体に添加しても、その解離速度はコントロールと差異が確認されなかった。すなわち、高分子であるｒ－グルカンに包接されることで、複合体は強く安定化され、外部刺激による影響も受けにくい安定な包接複合体が形成されることが明らかとなった。講演では、これらの実験成果に加え、大腸菌を用いて抗菌作用について検証した結果についても報告する予定である。

β-1,3-1,6-glucan, Shikonin, inclusion complex

発表責任者：甲元一也（koumoto@center.konan-u.ac.jp）

発表番号：3C008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# Extracellular polysaccharides produced by *Acinetobacter calcoaceticus* P23 are novel plant growth-promoting factor for aquatic vegetation (*Lemna minor*)

○RAHUL JOG[1,2], MASAYUKI SUGAWARA[1,2], KYOKO MIWA[1,2], MASAAKI MORIKAWA[1,2]
([1]Hokkaido Univ., [2]JST-ALCA)

We have previously shown that *Acinetobacter calcoaceticus* P23 isolated from duckweed propagating in the pond of Hokkaido University botanical garden has capability of significantly increasing duckweed growth and its chlorophyll content. Plant growth promoting factor produced by this bacterium strain for aquatic vegetation was suggested to be different from that of soil rhizosphere bacteria and sparsely reported in literature. In the present study, we have demonstrated that purified extracellular polysaccharide (EPS) from P23, PGFAC23, has significant plant growth promoting activity. Furthermore, P23 draft genome analysis has indicated presence of unique novel gene cluster, *p23_2757-2761*, encoding potential glucosyl and mannosyl transferases that may play an important role in the production of PGFAC23. We have successfully transferred this novel gene cluster from P23 to a non plant growth-promoting *Acinetobacter baylyi* ADP1 using a broad host range vector (pBBR1-mcs2) and tested effect of resultant ADP1 transformants on duckweed growth. ADP1 novel gene cluster recombinants exhibited drastically high duckweed growth promotion as compared to ADP1 vector-only clones upon inoculation under sterilized hydroponic condition. Also purified EPS from ADPmcs-nov transformants showed plant growth-promoting activity comparable to PGFAC23 and was significantly higher than EPS from APDmcs2 or uninoculated control. Moreover, fluorescence staining of clones also indicated higher amount EPS produced by ADPmcs-nov clones as compared to EPS from ADP vector preparation. Finally, the EPS from ADPmcs-nov revealed to be comopsed of the sugars same as PGFAC23. Taking all results together we are allowed to conclude that *p23_2757-2761* are the genes responsible for producing PGFAC23, a novel plant growth-promoting EPS.

Extracellular polysaccharides, novel PGPF, *Lemna minor*

発表責任者：MASAAKI MORIKAWA（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

発表番号：3D001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* における D-アミノ酸脱水素酵素の役割

# Role of D-Amino Acid Dehydrogenase of the Acidophilic Sulfur-Oxidizing Bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○鈴木 里菜[1]、鍋倉 未香[1]、大崎 由美子[1]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日本大学、[2]日本大学短期大学部)

○Rina SUZUKI[1], Mika NABEKURA[1], Yumiko OOSAKI[1], Mayumi ODA[1], Minoru TANIGAWA[1], Katsushi NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior College)

【目的】好酸性鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans*（*A. ferrooxidans*）は，最適生育温度が 28℃で最適生育 pH が 2.0 の好気性の独立栄養細菌であり，$Fe^{2+}$ を $Fe^{3+}$ に酸化して生育する．本菌には遊離の D-Glu，D-Ser，D-Pro，D-Asp などが多く含まれていると報告されているが，D-アミノ酸の代謝についての知見はほとんどない．D-アミノ酸脱水素酵素（DAD）は，アミノ酸の α 位の水素を引き抜き 2-オキソ酸を生成する酵素である．*A. ferrooxidans* のゲノム上には，*Escherichia coli* の DAD 遺伝子と相同性の高い遺伝子が存在することがわかっているが，本酵素の *A. ferrooxidans* における生理的役割は未知である．本研究では，*A. ferrooxidans* の D-アミノ酸や DAD の役割を明らかにすることを目的とし，様々なアミノ酸が生育に与える影響と，DAD 活性を調べた．

*A. ferrooxidans* を，様々な濃度の D-，または L-アミノ酸（Ala，Asn，Asp，Glu，Leu，Pro，Ser，Val）を加えた Silverman 9K 培地に植えて，7 日間振盪培養を行った．*A. ferrooxidans* により生成する $Fe^{3+}$ の濃度をロダン塩法により測定し，生育の指標とした．

【方法及び結果】*A. ferrooxidans* を超音波およびフレンチプレスを用いて破砕した後，遠心分離によって無細胞抽出液を得た．無胞抽出液を超遠心分離し，沈殿（膜画分）を得た．膜画分を 1% Tween20 で可溶化し，超遠心分離によって得られた上澄みを可溶化膜画分とした．これをサンプルとして，DAD 活性を測定した．電子受容体として，2,6-Dichlorophenolindophenol を用いて DAD の最適 pH と最適温度を検討した．また DAD の基質特異性を調べた．D-アミノ酸が酸化される時に生じた過酸化水素をペルオキシダーゼ発色液を用いて定量することにより，D-アミノ酸酸化酵素（DAO）活性を測定した．

1 mM D-，L-Ala を含む培地では生育に変化が見られなかったが，10 mM D-，L-Ala の場合に生育の遅延が見られ，50 mM D-，L-Ala では生育阻害が見られた．1 mM D-，L-Ser を含む培地では，生育に遅延が見られ，10 mM および 50 mM D-，L-Ser では生育阻害が見られた．また，D-Pro では生育遅延が見られた．L-Pro ではすべての濃度で生育促進が見られた．

DAD 活性測定の結果，最適温度は 28℃，最適 pH は 8.5 を示した．基質特異性は，高い順に D-Ala，D-Glu，D-Ser，D-Asp，D-Val，D-Pro となった．DAO 活性は見られなかった．高濃度の D-Ala や D-Ser は生育に有害であると考えられるが，本菌の DAD の役割はこれら過剰な D-アミノ酸を分解し無害化することであることが示唆された．

D-Amino acid dehydrogenase, D-Amino acid, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

発表番号：3D002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Arthrobacter globiformis* 由来ヒスタミンオキシダーゼ Glu378 残基の役割

# The role of Glu378 residue of histamine oxidase from *Arthrobacter globiformis*.

○武山 航平[1]、竹島 大貴[1]、芦田 裕之[2]、石川 孝博[1]、澤 嘉弘[1] ([1]島根大 生資、[2]島根大 総合科学支援セ)
○Kohei Takeyama[1], Daiki Takeshima[1], Hiroyuki Ashida[2], Takahiro Ishikawa[1], Yoshihiro Sawa[1] ([1]Shimane Univ., [2]Dep.Mol.Func.Genomics, Interdiscipl.Cent.Sci.Res., Shimane Univ.)

【目的】*Arthrobacter globiformis* には、ヒスタミンオキシダーゼ(HAO)とフェニルエチルアミンオキシダーゼ(PAO)といった二つの銅含有アミン酸化酵素が存在し、両酵素のホモロジーは 58%と高いにも関わらず、基質特異性はかなり異なっている。すなわち、HAO はヒスタミン(HIS)に対して最も高い反応性を示すことに対し、PAO は芳香族アミンのフェネチルアミン(PEA)、チラミン(TYR)に対して高い反応性を示す。しかしながら、HAO の触媒効率（kcat/Km）は PEA や TYR の方が高いという特徴を持つ。また両酵素とも炭素数 6, 7 の直鎖アルキルアミンも良好な基質とし、HAO の方が活性は低く、芳香族アミンに対しより高い特異性を示す酵素である。このような特徴を持つ HAO と AO の 3D アライメント解析を行ったところ、両者は極めて類似した基質結合ポケットを持ち、1 残基 HAO:Glu378 - AO:Leu358)のみが異なっていることが明らかとなった。

そこで今回、HAO 基質認識における Glu378 の役割を明らかにすることを目的として、Glu378 変異酵素の解析を行ったので報告する。

【方法・結果】HAO ホモロジーモデルを用いたドッキングシミュレーションでは、Glu378 残基が疎水性ポケット内に負極性環境を与えることで、HIS イミダゾール環正電荷と静電的相互作用認識している可能性が示唆された。そこでインバース PCR 法を用いた変異導入により、HAO Glu378 位における飽和変異導入により網羅的アミノ酸変異体を作製し、酵素学的解析を行った。

ほとんどの変異体で HIS に対する親和性や触媒効率が低下した。触媒効率は E378L, E378M などの疎水性残基に置換した変異体が上位となり、塩基性残基に置換した E378K, E378H, E378R が下位となった。これら塩基性残基置換体が下位となるのはシミュレーションから予想通りであったが、HIS に対する Km 値の上昇はそれほど大きくなく 1.1 倍から 5 倍程度であった。最も親和性が低下したのは、意外なことに同じ負電荷を持つ E375D で、Km 値が約 10 倍も上昇した。こられの結果は、HIS の認識には静電的相互作用よりも基質結合ポケットサイズが重要である、もしくはその両方であることを示唆している。

Glu378 変異体の HIS, PEA, TYR 及びヘキシルアミンに対するカイネティクスパラメータの比較により、HIS 触媒効率と TYR, PEA の触媒効率の相関性は極めて高いことが明らかとなった。

現在、統合科学計算プログラム MOE の各種シミュレーション機能を用いて HAO, AO の多様な基質認識機構についての考察を行っている。

Histamine oxidase, saturated mutagenesis, substrate specificity

発表責任者：武山　航平（a159614@matsu.shimane-u.ac.jp）

発表番号：3D003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# アミノ基キャリアタンパク質を介したリジン生合成酵素 LysY の基質認識機構の構造基盤

# Structural basis for substrate recognition of LysY, amino group-carrier protein-mediated biosynthetic enzyme, LysY

○清水 哲、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○tetsu SHIMIZU, takeo TOMITA, tomohisa KUZUYAMA, makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

当研究室では高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* のリジン生合成経路が既知の細菌の経路とは異なり 2-オキソグルタル酸を出発物質として α-アミノアジピン酸(AAA)を経由し、キャリアタンパク質 LysW をアミノ基の保護基として用いる新奇な経路であることを明らかにしてきた。前回大会にて *T. thermophilus* の LysW を介したリジン生合成経路の 3 番目の反応を担う LysY と LysW-γ-AAA semialdehyde (LysW-AASA)複合体の結晶構造について報告したが、LysW 球状ドメイン(Met1-Pro46)の電子密度は観察されたものの C 末端ループ領域(Glu47-Glu54)および AASA の電子密度は観察されず、精密な結合様式の解明には至っていなかった。そこで今回、LysY の不活性変異体(C148A)と LysW-γ-AAA の複合体の結晶化を行うことで、LysW の C 末端が LysY の活性中心に挿入された結晶構造を決定することを試みた。

LysY(C148A)•LysW-γ-AAA 複合体の結晶化はハンギングドロップ蒸気拡散法により行い、最大分解能 1.7Å で回折データを取得した。LysY•LysW-AASA の結晶構造をサーチモデルとした分子置換法により LysY(C148A)•LysW-γ-AAA の結晶構造を決定した。結晶構造は非対称単位に 2 分子の LysY(C148A)と 1 分子の LysW-γ-AAA を含んでおり、LysW の C 末端ループ領域および Glu54 側鎖にイソペプチド結合した AAA、$NADP^+$の明瞭な電子密度が観察された。LysY による LysW の認識はホモダイマーを形成する 2 つの LysY 分子のうち片方が LysW の球状ドメインを認識し、他方の活性中心にイソペプチド結合した AAA を含む LysW の C 末端が結合していた。LysY の β11-α10 ループは LysW の結合に伴い構造変化して LysW 球状ドメインと主鎖原子間の水素結合を形成するとともに、LysW の C 末端ループ領域の保存されたアミノ酸残基を特異的に認識していた。

興味深いことに、LysY と相互作用する LysW 球状ドメインのアミノ酸残基は直前の反応を担う LysZ との相互作用残基とは反対の面に位置していた。このことから、LysZ、LysY が LysW を介して三者複合体を形成し、LysW の C 末端ループ領域がフレキシブルに動くことにより LysZ の反応産物である不安定なカルボニルリン酸中間体を LysY の活性中心へ効率的に運搬する新奇な基質運搬メカニズムの存在が示唆された。

Thermus, lysine, carrier protein

発表責任者：西山　真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3D004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Thermus thermophilus* における Stand-alone RAM ドメインタンパク質を介した新規トリプトファン生合成調節と生理的意義の解明

# Studies on novel regulatory mechanism of tryptophan biosynthesis by stand-alone RAM domain and physiological implication in *Thermus thermophilus*

○久保田 哲央、松下 創、富田 武郎、葛山 智久、西山 真（東京大学・生物工学センター）
○Tetsuo Kubota, Hajime Matsushita, Takeo Tomita, Tomohisa Kuzuyama, Makoto Nishiyama (The University of Tokyo, Biotechnology Research Center)

アミノ酸などを認識して、その情報を DNA 結合ドメインなど他の分子内ドメインへと伝達する RAM ドメインが存在する。通常 RAM ドメインタンパク質は他のドメインと融合しているが、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の *TTC0493* は RAM ドメインのみからなる Stand-alone RAM ドメインタンパク質（SraA）をコードしている。従って、SraA は他のタンパク質と相互作用することによって、結合したタンパク質の機能を制御する可能性が考えられた。これまでに我々はトリプトファン生合成の 2 番目の酵素 TTC1491 (Anthranilate phosphoribosyltransferase: TrpD)が SraA とヘテロ複合体を形成することを示すと同時に、SraA がトリプトファンによってオリゴマー状態を変化させることを明らかにした。また、TrpD は SraA とヘテロ複合体を形成しトリプトファン存在下で活性阻害を受ける予備的な結果を示してきた。

細菌のトリプトファン生合成は、TrpR やリーダーペプチドを介した転写調節、また初発酵素(Anthranilate synthase: TrpEG)のフィードバック調節により制御されることが知られている。*T. thermophilus* においては、TrpR ホモログは見出されないが、*trpE* の上流にリーダーペプチドをコードする領域が存在し、転写のアテニュエーションがあること、TrpEG のアミノ酸配列の保存性から、TrpEG がトリプトファンを認識し、活性調節を受けることが予想された。しかしながら、SraA によるトリプトファン生合成調節の生理学的意義を解明するためには、本菌においてトリプトファン生合成がどのように制御されるかを明らかする必要がある。そこで TrpEG および TrpD 組換えタンパク質を調製し、活性測定を行った結果、両酵素はトリプトファンで調節を受けるものの、TrpEG が TrpD よりごく低濃度のトリプトファンで、より強力な阻害を受けることがわかった。また、トリプトファン添加の有無の条件で本菌を培養し、total RNA を用いて *trpE* について qRT-PCR を行った結果、トリプトファン添加時に *trpE* の転写量が顕著に減少することがわかった。これらの結果から、本菌においてもリーダーペプチドを介した転写抑制や初発酵素のフィードバック阻害機構が存在し、TrpD の活性制御はトリプトファン生合成においてはマイナーチューニングであることが示された。

既知のフィードバック調節機構と比べ、SraA を介する活性調節は要求するトリプトファンの濃度が高く、そこでの阻害の効果も小さいことから、この調節はトリプトファン生合成量の調節以外の意義があると考えられる。本発表では、*T. thermophilus* におけるトリプトファン生合成調節の様式について発表すると共に、SraA を介した TrpD 活性調節の生理的意義について議論したい。

*Thermus thermophilus*, tryptophan biosynthesis, RAM domain

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3D005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus tokodaii* シスタチオニン γ - シンターゼの温度による活性中心の構造変化

# Structural change of the active center caused by temperature in cystathionine gamma-synthase from aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii*

○佐藤 暖[1]、水野 紗恵[1]、川村 あやか[1]、志波 智生[1]、稲垣 賢二[2]、原田 繁春[1]（[1]京都工繊大院応生、[2]岡山大院環境生命）

○Dan SATO[1], Sae MIZUNO[1], Ayaka KAWAMURA[1], Tomoo SHIBA[1], Kenji INAGAKI[2], Shigeharu HARADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Grad. Sch. Sci. and Technol., Kyoto Inst. Technol., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okyama Univ.)

古細菌 *Sulfolobus tokodaii* は高温・酸性下で硫化水素を代謝できることから、排気ガス処理に産業利用されている。また、そのタンパク質は高温下で機能すると考えられることから、農業・食品・医薬品など様々な応用が期待されている。メチオニンやシステインなどの含硫アミノ酸は全ての生物にとって必須の構成要素である。本生物は、無機硫化物とセリンから合成したシステインをメチオニンへ代謝する経路（トランスサルフレーション経路）を持ち、その代謝中間体であるシスタチオニンはホモセリン誘導体とシステインの縮合反応によって作られる。この反応は、pyridoxal 5'-phosphate (PLP) 要求性酵素であるシスタチオニン γ -シンターゼ (CGS) によって触媒される。 CGS は細菌や植物に見られるがほ乳類には存在しないため、抗生物質や除草剤のターゲットとして注目されている。

CGS の立体構造は大腸菌とタバコで解かれているが、反応中間体の構造が未解明であるため詳細な反応機構は不明である。多くの PLP 酵素の反応では、 PLP 近傍に位置するチロシン残基が基質のアミノ基からプロトンをひき抜いて基質-PLP 複合体の形成に進むと考えられるが、 StCGS ではこの残基がフェニルアラニンに置き換わっている。しかし十分な活性を示すことから他の酵素にはないユニークな反応機構が存在すると考えられる。本研究では、立体構造に基づいた構造・機能相関を明らかにするため、好熱好酸性古細菌 *S. tokodaii* のシスタチオニン γ -シンターゼ (StCGS) の X 線結晶構造解析を行った。

組み換え StCGS タンパク質を 20ºC で結晶化したところ、酸性（54 % (*v*/*v*) MPD, 0.2 M $MgCl_2$, 0.1 M 酢酸緩衝液 pH 3.6）および中性 (20% PEG3350, 0.2 M クエン酸ナトリウム, 0.1 M トリス塩酸緩衝液 pH 8.0）の両条件で結晶が得られ、さらに中性条件では酵素-基質複合体も得ることができた。しかし得られた複合体の構造を見ると、 PLP の配置が一般的な PLP 酵素とかけ離れており、反応機構を推測することが困難であった。今回、温度を変えて結晶化を試みたところ 25 - 30 ºC を境に結晶パッキングが変わり、より高温で得られた結晶では、 PLP の配向や活性中心を構成するアミノ酸残基が他の PLP 酵素と同様になることが判明した。このことは、高温に適応した酵素の反応機構を、低温で得られた構造で説明することの難しさを示している。この"正しい活性中心"を示す構造の詳細な解析と、この条件での反応中間体の作製を試みたので報告する。

Sulfur containing amino acid metabolism, PLP-enzyme, Thermophilic enzyme

発表番号：3D006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ラン藻由来アラニンラセマーゼの基質認識機構の解析

# Substrate recognition of alanine racemase from Synechocystis sp. PCC6803

○芦田 裕之[1]、村上 佳穂[3]、稲垣 賢二[3]、澤 嘉弘[2] ([1]島根大総科研センター、[2]島根大生資、[3]岡山大院環境生命)
○Hiroyuki Ashida[1], Kaho Murakami[3], Kenji Inagaki[3], Yoshihiro Sawa[2] ([1]Interdisciplinary Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [2]Fac. Life & Environ. Sci., Shimane Univ., [3]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】

アラニンラセマーゼ（EC 5.1.1.1）はピリドキサル 5'-リン酸（PLP）を補酵素とし、L-アラニンから D-アラニンへのラセミ化を触媒する酵素である。この D-アラニンは微生物の細胞壁に存在するペプチドグリカンの主要な構成成分であることから、アラニンラセマーゼは原核生物に必須の酵素である。

これまでにアラニンラセマーゼは基質としてアラニンに特異的であることが明らかとなっているが、乳酸菌由来リジンラセマーゼの活性中心構造に近づけることにより塩基性アミノ酸をラセミ化する *Geobacillus stearothermophilus* 由来アラニンラセマーゼ変異酵素が報告されている。本研究ではラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来アラニンラセマーゼの基質認識について解析を行った。

【方法・結果】

*G. stearothermophilus* 由来アラニンラセマーゼ（AlaR）とのアミノ酸配列比較から、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 由来 AlaR の基質認識に関与するアミノ酸残基を予測し（Met341, Leu252）、部位特異的変異導入法により他の 19 種類のアミノ酸に置換した。

*Synechocystis* AlaR Met341 のアミノ酸置換酵素においては、その遺伝子発現や酵素活性が検出できない変異酵素がみられた。しかし *Synechocystis* AlaR Met341 アミノ酸置換酵素のうち、わずかながら基質特異性が変化した酵素が得られた。このことは Met341 のアミノ酸置換が酵素の安定性や活性中心構造に影響を及ぼす可能性を示唆している。

一方、*Geobacillus* AlaR の Ile222 に対応する *Synechocystis* AlaR Leu252 をアミノ酸置換した変異酵素においては、アラニン以外にもリジン、アルギニン、メチオニンなど比較的長鎖のアミノ酸に反応性を示す変異酵素が得られた。このことから *Synechocystis* AlaR では Leu252 が基質の側鎖の長さを制限していると考えられる。

これら変異酵素について種々のアミノ酸に対する酵素科学的解析から、*Synechocystis* AlaR の基質認識機構について検討を行った。

alanine racemase, cyanobacterium, substrate specificity

発表番号：3D007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# D,L-セリンの酵素的分別定量法の開発とヒト尿中 D,L-セリンの動態解析

# Construction of enzymatic assay method of D- and L-serine, and analysis of urinary D- and L-serine

○安森 望、伊藤 智和、邊見 久、吉村 徹（名大院生命農）
○Nozomu YASUMORI, Tomokazu ITO, Hisashi HEMMI, Tohru YOSHIMURA (Nagoya Univ.)

D-セリンは、哺乳類脳内で NMDA レセプターのコアゴニストとして働き、記憶や学習などに関与する内因性のシグナル分子として機能する。これに関連し、種々の神経疾患における血清や脳脊髄液中の D-セリン量の変動が報告されている。また、D-セリンと腎障害との関連も指摘されており、腎不全患者では血清中の D-セリン／L–セリンの比が 20%以上にまで上昇すること、急性腎障害のモデルマウスでは同比が血清中で上昇し尿中で低下することが報告されている。

現在、D-セリンの定量は主に HPLC 法を用いて行われる。HPLC による分析法は、高感度で他のアミノ酸の同時分析もできる利点があるが、1 サンプルの分析時間が長く、多検体の分析には適していない。我々は、D-セリンに極めて高い特異性を有する出芽酵母由来 D-セリンデヒドラターゼと、セリンへの反応性を特異的に高めた好熱菌由来アラニンラセマーゼを利用した D-,L-セリンの同時分別定量法を報告してきた。今回、ヒト尿中の D-,L-セリンの動態を解析する目的で、D-セリンデヒドラターゼによって D-セリンから生じたピルビン酸をピルビン酸オキシダーゼとキシレノールオレンジ(XO)を用いて比色定量する D–セリン定量法を構築した。同法を 96 穴プレートを用いてキット化したことにより、数時間で数百サンプルの測定が可能となった。健常者の尿検体を分析したところ、尿中の D-セリン/L-セリン比や D-セリン/クレアチニン値が、日内、および 2 週間程度の期間において、各個人で一定に保たれる傾向が得られた。今後本法を用いて、腎障害患者などにおける尿中 D-セリン動態を解析する予定である。

D-serine, assay method, D-serine dehydratase

発表番号：3D008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 肝臓実質細胞特異的セリン合成酵素 Phgdh KO マウスは耐糖能異常を呈する

# Hepatocyte-specific deletion of Phgdh develops impaired glucose tolerance in mice

○毛利 紳哉[1]、森安 一樹[1]、江崎 加代子[2]、田代 康介[1]、平林 義雄[2]、古屋 茂樹[1] ([1]九州大学大学院　生物資源環境科学府、[2]理研・脳科学総合研究センター)
○ Shinya MOHRI[1], Kazuki MORIYASYU[1], Kayoko ESAKI[2], Kousuke TASHIRO[1], Yoshio HIRABAYASHI[2], Shigeki FURUYA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Riken BSI)

ヒト遺伝性セリン合成不全疾患およびセリン合成系初発酵素 *Phgdh* の KO マウスの表現型から、中枢神経系の発達と機能発現における非必須アミノ酸セリン生合成の必須性とその機能性について知見が集積している。その一方で近年、非アルコール性脂肪肝患者肝臓での合成酵素発現低下、高脂肪食給餌による肝臓セリン濃度の減少等、生体内アミノ酸の主要な代謝器官である肝臓でのセリンの機能性にも注目が集まり始めている。そこで我々は、肝臓におけるセリン生合成の生理的意義の解明を目的に、マウス個体レベルでの解析に着手した。

まず初めに、*Phgdh* をアルブミン（Alb）-Cre トランスジーンの導入により肝臓実質細胞特異的に不活性化した KO マウス（以下 LKO マウス）を作製した。LKO マウスは同腹正常対照群（floxed）マウスと同様に正常に出生し、生後発達にも影響は観察されなかった。LKO マウス肝臓では *Phgdh* mRNA の発現が低下していたが、肝臓および血清中のセリン濃度は floxed マウスと同程度に維持されていた。これは腎臓と筋肉での代償的なセリン生合成亢進によると考えられた。

LKO マウスにグルコース耐性試験を行ったところ、グルコース濃度低下が遅延する耐糖能異常を呈していた。そこで LKO マウス肝臓においてインスリンシグナルに異常が生じていると予想し、インスリン抵抗性の指標となる分子マーカーを Western blot 法で検討したところ、インスリンシグナル異常を見出した。更にマイクロアレイ及び定量リアルタイム PCR により肝臓での網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、インスリン抵抗性に寄与することが知られている *Egr-1* の顕著な RNA レベルの増加を確認した。加えて、解糖系の反応速度調節に寄与する酵素 *Pfkfb3*、*Pdk4* の mRNA 発現変動も見いだし、肝臓における解糖系反応の低下、糖代謝の異常も示唆された。以上の結果より、肝実質細胞特異的 *Phgdh* 不活性化は、肝臓セリン濃度へ影響を与えないが、インスリンシグナル異常や糖代謝異常を誘発し、マウス個体の耐糖能異常を惹起することが明らかとなった。

Phgdh, Liver, Impaired glucose tolerance

発表責任者：毛利　紳哉（mo-ris@brs.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3D009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Pseudomonas putida* 由来 D-リジントランスポーターの基質結合タンパク質の解析
Analysis of substrate-binding protein of D-lysine transporter in *Pseudomonas putida*
○山内 美咲、青木 志帆、近藤 和貴、佐藤 大起、戸部 隆太、三原 久明（立命大生命）
○Misaki YAMAUCHI, Shiho AOKI, Kazutaka KONDO, Taiki SATO, Ryuta TOBE, Hisaaki MIHARA (Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】 *Pseudomonas putida* の D-リジン代謝における初発酵素は、*amaD* (*PP_3596*) 遺伝子にコードされる D-リジンデヒドロゲナーゼ (AmaD) である。AmaD は D-リジンの還元的脱アミノ化反応を触媒し、$\Delta^1$-ピペリデイン-2-カルボン酸へと変換する。*amaD* 遺伝子は、ABC トランスポーター遺伝子と相同性を示す 4 つの機能未知タンパク質遺伝子群 (基質結合タンパク質: *PP_3593*、膜貫通ドメイン含有タンパク質: *PP_3594*、*PP_3595*、ヌクレオチド結合ドメイン含有タンパク質: *PP_3597*) および RpiR ファミリー転写制御因子遺伝子 (*PP_3592*) と共にオペロンを形成している (D-リジン異化代謝オペロン)。そのため、AmaD は転写制御因子を除くこれらタンパク質群と複合体を形成し、D-リジンの輸送-代謝複合体として機能することが考えられる。本研究では、基質の認識に関与すると推測される PP_3593 に注目し、その機能を解明することを目的とした。
【方法・結果】 PP_3593 の一次構造を基に SWISS-MODEL により、ホモロジーモデルを樹立し、立体構造や基質結合残基を予測した。また、これまでに構造が明らかにされている *Salmonella typhimurium* 由来のホモログであるリジン／アルギニン／オルニチン結合タンパク質との構造比較およびアライメント比較により、PP_3593 の構造的特徴を解析した。その結果、D-リジンの側鎖部分を Y32 と W70 が挟み込むように疎水性相互作用し、 E29、D48、S88、R95、T139、D179 が D-リジンの α-アミノ基や α-カルボキシル基、 ε-アミノ基の認識に関与していると予想された。また、SignalP 4.1 Server を用いた解析により、PP_3593 の N-末端 （1-21 アミノ酸残基）がペリプラズム移行シグナル配列であることが予想された。実際に、*P. putida* 野生株の各細胞分画に対し、抗 PP_3593 抗体を用いたウエスタンブロットによって *P. putida* における PP_3593 の局在を調べたところ、ペリプラズム空間に局在していることが明らかとなった。さらに、相同組換えによって *PP_3593* 遺伝子をテトラサイクリン耐性遺伝子に置き換えることで PP_3593 欠損株を作製した。生育試験の結果、本欠損株は野生株と比べて、D-リジンを唯一の窒素源および炭素源とした最少培地での生育が著しく低下することが示された。一方で、*P. putida* ゲノムを鋳型として *PP_3593* 遺伝子をクローニングし、*Escherichia coli* C43 (DE3) を宿主とした PP_3593 の高発現系を構築した。本リコンビナントタンパク質は、His タグおよび Strep タグとの融合タンパク質として発現するように設計されており、アフィニティーカラムを用いて精製したタンパク質の諸性質の解析を行った。

ABC transporter, substrate-binding protein, D-lysine

発表責任者：三原久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

発表番号：3D010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における Cys 生合成経路の解明
Identification of a novel Cys biosynthetic pathway in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*

○佐藤 喬章[1,3]、牧野 勇樹[1]、川村 弘樹[1]、今中 忠行[2,3]、跡見 晴幸[1,3] ([1]京大院工、[2]立命館大、[3]JST, CREST)
○Takaaki SATO[1,3], Yuki MAKINO[1], Hiroki KAWAMURA[1], Tadayuki IMANAKA[2,3], Haruyuki ATOMI[1,3] ([1]Kyoto Univ., [2]Ritsumeikan Univ., [3]JST, CREST)

[目的] 多くのアーキアにおいて Cys 生合成経路は不明であった。そこで、本研究では超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における Cys 生合成経路の同定を目指した。
[方法・結果] *T. kodakarensis* においてはそのゲノム情報から、3-phosphoglycerate（3-PGA）、Met、Ser のいずれかから Cys を生合成する可能性が考えられた。そこで、3-PGA および Met からの生合成経路で機能し得る遺伝子を破壊することにより、これら 2 つの経路を遮断した破壊株を作製した。しかし、いずれの破壊株も Cys 要求性を示さなかった。よって本菌において Cys は Ser から生合成されている可能性が示唆された。Ser からの Cys 生合成経路としては、Ser acetyltransferase（SAT）によるアセチル化の後、Cys synthase（CysK）により Cys に変換される経路が良く知られている。しかし、本菌のゲノム上において CysK ホモログは存在したのに対し、SAT の明確なホモログは見出せなかった。

CysK は上述のようにアセチル化された Ser を基質として Cys を生成するのが一般的だが、一部のアーキアやバクテリアの CysK は 3-PGA から Ser を介さずに合成された phosphoserine（Sep）を基質とする。各種 CysK のアミノ酸配列を比較したところ本菌の CysK は Sep を基質とする CysK に見られる挿入配列を有していた。この特徴から本菌の CysK も Sep を基質にするのではないかと予測した。しかし、前述のように 3-PGA から Sep を介して Cys を合成する経路を遮断した株も Cys 非要求性であった。よって、Sep が 3-PGA からではなく、Ser の直接的リン酸化で合成される可能性を考えた。

リン酸基供与体 ATP から産生する ADP を定量する方法で本菌の無細胞抽出液中から Ser 依存的な kinase 活性を示すタンパク質の精製を試みた。しかし、むしろ ADP の減少が観察され、探索しているタンパク質は ADP をリン酸基供与体としている可能性が考えられた。そこで無細胞抽出液中の活性を調べたところ、たしかに Ser 依存的な ADP からの AMP 産生活性を検出できた。この活性を指標に精製を進めたところ 3 つの候補タンパク質が得られ、これらを LC-MS により同定した。同定された 3 候補の各組換え型タンパク質を作製し、それらの Ser 依存的な AMP 産生活性を調べたところ、細胞分裂に関わる chromosome partitioning protein と推定されていたタンパク質が、ADP-dependent Ser kinase（SerK）活性を示すことが明らかになった。タンパク質中の Ser をリン酸化するプロテインキナーゼはよく知られているが、SerK は遊離の Ser をリン酸化する新規酵素であった。*serK* 遺伝子を破壊した株を作製し増殖特性を解析したところ、Cys を含まない培地において増殖の悪化が見られ、本遺伝子が確かに Cys 生合成に寄与することが明らかとなった。

Cys biosynthesis, Archaea, kinase

発表責任者：佐藤喬章（takaakisato@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3D011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 乳酸菌 *Lactobacillus otakiensi* における D-分岐鎖アミノ酸の局在と機能
# Localization and function of D-BCAA in *Lactobacillus otakiensi*

○十時 繁幸[1]、前田 純平[1]、牟田口 祐太[2]、大島 敏久[3]、土居 克実[1] ([1]九大農、[2]秋田県立大、[3]大工大)
○Shigeyuki TOTOKI[1], Junpei MAEDA[1], Yuta MUTAGUCHI[2], Toshihisa Oshima[3], Katsumi DOI[1] ([1]Kyushu University, [2]Akita Prefecture University, [3]Osaka Institute of Technology)

【目的】長年、生物界では L-アミノ酸が選択的に利用されていると考えられていたが、近年の分析技術の向上により、D-アミノ酸もまた生物環境中に多く存在していることが明らかとなった。特に、乳酸発酵食品中では、著量かつ多様な D-アミノ酸が見出されているが、乳酸菌における D-アミノ酸代謝経路については不明な点が多い。先行研究により、D-分岐鎖アミノ酸 (D-BCAA)を培地中に分泌する乳酸菌 *Lactobacillus otakiensis* から、新規アミノ酸代謝酵素である分岐鎖アミノ酸ラセマーゼ(BCAA-R)が見出された[1)]。本研究は、BCAA-R の特性解析、および、生産物である D-BCAA の *L. otakiensis* 細胞中での局在と生体内での役割を明らかにすることを目的とした。
【方法】*L. otakiensis* における D-BCAA の局在と機能を明らかにするために、まず、大腸菌を用いて発現させた組換え BCAA-R の特性解析、および、本遺伝子の経時的な転写解析を行った。次に、培養各段階の *L. otakiensis* 菌体および培養液を回収し、培養液上清を細胞外画分、菌体破砕物の遠心上清を細胞内画分とした。また、培養菌体破砕物より、ペプチドグリカン、テイコ酸を精製した。これら各画分の構成アミノ酸を UPLC により分析した。
【結果・考察】BCAA-R は BCAA に対して高い特異性を持ち、BCAA-R 遺伝子の転写レベルは、定常期では対数増殖期の約 2.5 倍に上昇した。各画分の構成アミノ酸の培養経時的な測定から、*L. otakiensis* の細胞外画分では、対数増殖期に D-*allo*-Ile, D-Leu, D-Val がそれぞれ増加する一方で、細胞内画分では定常期に D-*allo*-Ile, D-Leu, D-Val が減少した。また、テイコ酸に含有される D-アミノ酸は、これまでは D-Ala のみであると考えられていたが、D-Leu, D-Val も含まれていることが明らかとなった。これらの結果より、*L. otakiensis* は細胞壁支持体として D-Leu, D-Val を利用していると推察した。さらに今後、*L. otakiensis* の BCAA-R 遺伝子破壊株を作製し、表現型やゲノムワイドな転写プロファイルについて野生型株と比較を行い、D-BCAA の機能や代謝経路について詳細に解析していく予定である。

[1)]Mutaguchi *et al*, *Bacteriol*, 195, 5207-5215 (2013)

D-BCAA, racemase, localization

発表責任者：十時繁幸（toto.ksmk@gmail.com）

発表番号：3D012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# L-ピペコリン酸代謝系の解析および新規生体触媒スクリーニングへの応用

# Analysis of L-Pip metabolism and application to microbial screening for novel biocatalysts

○森川 直樹[1]、日比 慎[2]、森 亮輔[1]、三宅 良磨[3,4]、川端 潤[3,4]、高橋 里美[2]、小川 順[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・農・産業微生物、[3]三菱化学科学技術研究センター、[4]エーピーアイコー ポレーション）

○ Naoki MORIKAWA[1], Makoto HIBI[2], Ryosuke MORI[1], Ryoma MIYAKE[3,4], Hiroshi KAWABATA[3,4], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]MCRC, [4]API Corp.）

【背景】

L-ピペコリン酸（L-Pip）やその誘導体は抗生物質などの構造中に含まれており、医薬品などの原料として有用であり社会的需要の高い化合物である。しかし、L-Pip の微生物代謝に関する報告は類縁構造を持つ L-プロリン（Pro）と比べて少なく、L-Pip の代謝酵素に関する研究例もあまり多くない。本研究では微生物における L-Pip の代謝経路、代謝酵素、また中間代謝物などの網羅的な解析を実施し、さらに新規代謝酵素を利用した L-Pip 誘導体生産法の開発を目指した。

【方法・結果】

微生物における主要な L-Pip 代謝経路として知られるアミノアジピン酸経路を遮断するために、数種類の代謝酵素阻害剤を菌体反応液中に添加した。これにより、L-Pip の代謝に関してアミノアジピン酸経路とは異なる反応経路の利用が促され、新規な微生物代謝経路のスクリーニングが容易となる。これまでのスクリーニングの結果、*Fusarium oxysporum* c8D 株や *Aspergillus nidulans* FGSC A4 株など 15 株の糸状菌、および 8 株の細菌から L-Pip の水酸化活性を見出すことができた。興味深いことにその全てにおいて水酸化反応産物は *trans*-4-L-ヒドロキシピペコリン酸（*trans*-4-L-HyPip）であり、微生物の L-Pip 代謝において *trans*-4-L-HyPip が重要な代謝中間体となっていることが示唆された。そこで現在、微生物における *trans*-4-L-HyPip の代謝経路の解析を行っている。また、*F. oxysporum* c8D 株由来の L-Pip 水酸化酵素（*Fo*Pip4H）や *A. nidulans* FGSC A4 株由来の L-Pip 水酸化酵素（*An*Pip4H）に関して生体触媒としての利用を検討し、*trans*-4-L-HyPip の他、*cis*-4-D-HyPip や *trans*-4-L-ヒドロキシプロリンなどの物質生産法を新たに開発した。

Pipecolic acid, metabolic pathway, hydroxylation

発表責任者：小川　順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

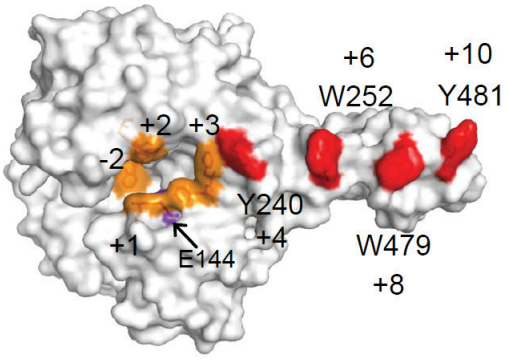
発表番号：3D013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Serratia marcescens* キチナーゼ B の結晶性キチン分解機構の解明　－触媒クレフト入口の芳香族アミノ酸残基の役割について－

# Studies on crystalline chitin hydrolysis by *Serratia marcescens* chitinase B -Roles of the aromatic amino acid residue at the catalytic cleft entrance-

○杉本 華幸[1,2]、出澤 有太[1]、猪浦 弾[1]、鈴木 一史[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新大院　自然研、[2]新大農　応生化）
○Hayuki SUGIMOTO[1,2], Yuta IDEZAWA[1], Hazumu INOURA[1], Kazushi SUZUKI[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agri., Niigata Univ.)

*Serratia marcescens* キチナーゼ B（SmChiB）は結晶性キチン分解活性の高い酵素の 1 つで、基質をプロセッシブに（連続的に）分解する。SmChiB は分子表面および触媒クレフトに 9 個もの芳香族アミノ酸残基が並んでおり（図）、これらが結晶性キチン分解において重要な役割を担っていると考えられる。分子表面に位置する 4 つの芳香族アミノ酸残基（Y240、W252、W479、Y481）は、ほぼ同一平面上に並んでおり、いずれの残基もキチンとの結合に重要であることがわかっている（Katouno *et al.* 2003）。特に、触媒クレフトの入口に位置する Y240 は、基質結合における重要性に加えて結晶性基質分解における重要性が示唆された（Sugimoto *et al.* 2015）が、その機能の詳細はわかっていない。そこで本研究では、Y240 の機能の詳細を明らかにするため、Y240 を種々のアミノ酸残基（Trp、Phe、Leu）へ置換した変異型酵素を作製し、本残基が基質結合および分解に及ぼす効果を調べた。




図：SmChiB の立体構造（PDB ID: 1EDQ）

赤色：分子表面の芳香族アミノ酸残基
橙色：触媒クレフト内部の芳香族アミノ酸残基
紫色：触媒残基　(E144)
数字はサブサイト番号を示す。

野生型 SmChiB および 3 種の変異型酵素（Y240L、Y240F、Y240W）について、3 種類の不溶性基質［α-キチン（パウダー状）、結晶性β-キチン、コロイダルキチン（非晶性）］に対する分解活性を調べたところ、Y240L の活性は野生型に比べて顕著に低下した。Y240L は野生型よりも各種基質に対する結合力が弱かったことから，分解活性の低下は基質との結合力が減少したためであると考えられた。Y240W、Y240F はいずれの基質に対しても野生型と同程度結合したが、分解活性は野生型と同等もしくは減少していた。特に結晶性β-キチンが基質の場合、野生型と Y240W の活性は同等であったが、Y240F の活性は低下した。他方、アセチル化度 61.2%、重合度 900-1400 の水溶性キトサンを基質に用いた場合、Y240L の分解活性が一番高く、そのあとに野生型、Y240F、Y240W の順に続いた。これらの結果から、触媒クレフト入口における基質との比較的強い相互作用が、不溶性基質分解には重要であることがわかった。特に，結晶性基質分解においては大きな共役系をもつ芳香環の存在が重要であることが示唆された。

chitinase, processive hydrolysis, *Serratia marcescens*

発表責任者：杉本華幸（hayuki@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：3D014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酢酸菌における複数の新規な PQQ-酵素の同定
# Identification of unknown quinoproteins in acetic acid bacteria

○足立 収生[1]、アワーズ ロケ A.[2]、赤壁 善彦[1]、阿野 嘉孝[3]、品川 惠美子[4]、片岡 尚也[1]、薬師 寿治[1]、松下 一信[1] ([1]山口大・農、[2]ラプラタ大学・発酵工学研、[3]愛媛大・農、[4]宇部高専・物質工学)
○ Osao ADACHI[1], Roque A. HOURS[2], Yoshihiko AKAKABE[1], Yoshitaka ANO[3], Emiko SHINAGAWA[4], Naoya KATAOKA[1], Toshiharu YAKUSHI[1], Kazunobu MATSUSHITA[1] ([1]Yamaguchi Univ., [2]CINDEFI・UNLP, [3]Ehime Univ., [4]Natl. Coll. Ube. Technol.)

【目的】酢酸菌には種々な酵素が細胞膜表層に局在して、産業的に重要な酸化発酵に機能している。酢酸菌細胞膜を EDTA 処理して失われた酵素活性が、PQQ と $Ca^{2+}$の添加によって回復することを PQQ-酵素の指標としてきた。これまでに酢酸菌細胞膜に新規なリボースやアラビノースの４位を酸化するアルドペントース酸化酵素 [1]、さらにペント酸(アルドン酸)を酸化するペント酸酸化酵素 [2] の存在を報告した。最近の研究から、果糖を酸化する新規な酵素を発見した。そこで、これらの酵素が PQQ-酵素である可能性を検討したので，その結果を報告する。【方法】*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3258 及び *Gluconobacter oxydans* NBRC12528 から分離した細胞膜、さらにそれを EDTA 処理した EDTA 処理膜、加えて、細胞膜から可溶化した酵素や部分精製した酵素を使用した。酵素活性測定には、フェリシアニド (FER) 及び PMS-DCIP を電子受容体として使用した。【結果と考察】細胞膜に見られるアルドペントース、ペント酸や、果糖に対する酸化活性は、細胞膜を EDTA 処理すると完全に消失し、$Ca^{2+}$と PQQ の添加によって回復した。そのことから、これら３種類の基質の酸化は PQQ-酵素によるものと推測し、それぞれをさらに詳細に検討した結果、これらは全て新規な PQQ-酵素との結論に到った。 (1) アルドペントース酸化酵素 本酵素はキシロースと反応せず、アルドペントースを酸化して 4-ケトアルドペントースを生成する。既報のグルコース脱水素酵素 (QGDH) [3] は、グルコース以外にキシロースの１位を酸化してキシロン酸を生成するが、アルドペントースを酸化しない。また、QGDH は EDTA でアポ酵素へ変換され難いが、本酵素は容易にアポ化されること、ゲル濾過から本酵素のサイズは QGDH より小さいことなど両者に明確な違いが見られた。 (2) ペント酸酸化酵素 本酵素はアラビノン酸とリボン酸を良好な基質として、両基質の４位を酸化して、4-ケトペント酸を生成する。可溶化すると FER との反応性は著しく低下するが、PMS-DCIP 活性は維持された。本酵素は既知のグルコン酸脱水素酵素やグリセロール脱水素酵素など、類似の酵素とは多くの点で明確な相違を示した。 (3) 果糖酸化酵素 本酵素は可溶化すると FER との反応性は低下するが、PMS-DCIP 活性は保持された。果糖の他にプシコースとも反応して、両基質の５位を酸化した。既知の果糖脱水素酵素 (EC 1.1.99.11, FDH) は *G. industrius* に限定的で、補欠分子族は結合型 FAD とヘムで、EDTA によって阻害されず、果糖のみに高い反応性を示す。一方、本酵素は *Gluconobacter* 属や *Gluconacetobacter* 属酢酸菌に普遍的に見られ、果糖代謝に重要な酵素と推測される。上記のような結果から、３つの新規な PQQ-酵素が酢酸菌に存在することを示す重要な結果が得られた。[1] *BBB*, **75**, 1801 (2011), [2] *BBB*, **75**, 2418 (2011), [3] *ABC*, **44**, 1505 (1980), *ABC*, **45**, 851 (1981)

acetic acid bacteria, oxidative fermentation, quinoprotein

発表責任者：足立収生（osao@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：3D015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Bifidobacterium adolescentis* 由来の GH27 β-L-アラビノピラノシダーゼ／α-D-ガラクトピラノシダーゼの機能解析

# Characterization of a GH27 ß-L-arabinopyranosidase/α-D-galactopyranosidase from *Bifidobacterium adolescentis*

○藤田 清貴、福元 諒、北原 兼文 (鹿児島大・農)
○Kiyotaka Fujita, Akira Fukumoto, Kanefumi Kitahara (Kagoshima Univ.)

【目的】我々は、Ⅱ型アラビノガラクタン（Ⅱ型 AG）に作用する *Bifidobacterium longum* 由来の GH43 exo-β-1,3-galactanase(BLLJ_1840)と、GH30 β-1,6-galactanase(BLLJ_1841)の性質決定を行い、*B. longum* におけるⅡ型 AG 分解代謝経路の全容を解明した(1)。また、BLLJ_1840 によって遊離されたⅡ型 AG オリゴ糖 Ara*p*β1,3Ara*f*α1,3-$Gal_3$ を切断できる GH27 β-L-arabinopyranosidase (BLLJ_1823)の大腸菌での発現と性質決定に成功した(2)。しかし、*B. longum* JCM1217 株の培養菌体からの β-L-arabinopyranosidase 活性は検出されず、BLLJ_1823 の転写量の増加も見られなかったため、JCM1217 株では機能しない酵素であると考えられた。そこで、他のビフィズス菌を調べたところ、*B. adolescentis* が酵素活性を有すること見出した。このため、本研究では BLLJ_1823 と 74%のアミノ酸配列同一性を示した *B. adolescentis* JCM1275 株由来の BAD_1525 のクローニングとその機能解析を目的とした。

【方法】BAD_1525 をクローニングし、大腸菌での発現と His-Tag を利用した精製を行った。また、基質認識に重要なアミノ酸である A75 及び G76 に対して変異導入を行った。酵素活性測定の基質としては、各種 *p*NP 基質及び、Ara*p*β1,3Ara*f*α1,3-$Gal_3$、カラマツ由来のⅡ型 AG、アラビアガムを用いた。

【結果】組換え BAD_1525 タンパク質は、*p*NP-β-L-arabinopyranoside と *p*NP-α-D-galactopyranoside に作用した。また、Ara*p*β1,3Ara*f*α1,3-$Gal_3$ 及びⅡ型 AG からは L-アラビノースが遊離し、アラビアガムからは L-アラビノースと D-ガラクトースが遊離した。本酵素の至適温度は 45℃、至適 pH は 5.0 であった。また、A75I と G76D の変異導入を行った結果、α-D-galactopyranosidase 活性が消失し、β-L-arabinopyranosidase 活性のみを示した。これより BAD_1525 は、β-L-arabinopyranosidase 活性とα-D-galactopyranosidase 活性を合わせ持つ酵素であることが確認された。

1) Fujita, K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 80, 4577 (2014).
2) Shimokawa, M. *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, 62, 1-6 (2015).

β-L-arabinopyranosidase, α-D-galactopyranosidase, Bifidobacterium adolescentis

発表番号：3D016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Vibrio parahaemolyticus* KN1699 由来キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素の機能解析

# Functional analysis of chitin oligosaccharide deacetylase from *Vibrio parahaemolyticus* KN1699

○神澤 沙耶[1]、平野 貴子[2]、中村 美緒[2]、小島 祐哉[2]、袴田 航[1,2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)

○ Saya KANZAWA[1], Takako HIRANO[2], Mio NAKAMURA[2], Yuya KOJIMA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresource Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci., Bioresource Sciences, Nihon Univ.)

【目的】キチンオリゴ糖脱アセチル化酵素（COD）は、キチン由来ホモ 2 糖である *N*, *N*’-diacetylchitobiose［$(GlcNAc)_2$］に作用し、β-D-*N*-acetylglucosaminyl-(1,4)-D-glucosamine（GlcNAc-GlcN）を生産する。本ヘテロ 2 糖は、COD 生産性細菌に対してキチナーゼ生産誘導などの作用を示すことから、COD は微生物シグナル生産酵素として重要であると言える[1, 2]。当研究室ではこれまでに、*Vibrio parahaemolyticus* KN1699 由来 COD の立体構造を解明し（PDB ID: 3WX7）[3]、前年度大会にて本酵素の推定反応メカニズムを報告した[4]。また、複数の COD の酵素化学的研究から、キチンホモオリゴ糖については 2 糖に最大活性を示し、重合度が増すにつれて活性は低下すること、いずれも非還元性末端側から 2 番目の GlcNAc を脱アセチル化することが分かっている[5-7]。しかし、キチンオリゴ糖以外の基質に対する特異性や脱アセチル化以外の作用については未だ分かっていない。そこで本研究では、COD の基質特異性と作用に着目し、特に 2 糖の結合様式による本酵素の反応性の違いについて調べ、さらに COD の脱アセチル化以外の作用として逆反応である Chitobiose［$(GlcN)_2$］のアセチル化反応を検討することにした。

【方法・結果】まず、非還元性末端側が Galactose（Gal）で還元性末端側が GlcNAc である 2 糖のうち、β-D-Gal-(1,4)-D-GlcNAc、β-D-Gal-(1,3)-D-GlcNAc、β-D-Gal-(1,6)-D-GlcNAc に COD を作用させ、それぞれの活性を TLC と HPLC 分析により調べた。その結果、Gal と GlcNAc から成る 2 糖のうち、β-D-Gal-(1,4)-D-GlcNAc でのみ、本来の基質と比較すると活性は低いが、生成物が確認できた。この生成物は、MS 分析結果から、脱アセチル化されていることが示唆され、β-D-Gal-(1,4)-D-GlcN であると考えられた。次に、COD による$(GlcN)_2$のアセチル化反応を試みた。酢酸ナトリウムバッファー(pH 5.2)を用いた反応では、生成物が確認できなかった。そこで、中性付近での反応を試みるため、リン酸バッファー(pH 7.0)の条件で酢酸ビニルのアセチル基転移反応を試みた結果、β-D-*N*-glucosaminyl-(1,4)-D-*N*-acetylglucosamine（GlcN-GlcNAc）と推定される糖の生産が確認できた。

1) T. Hirano. *et al., Glycobiology*, **19**, 1046-1053 (2009) 2) T. Hirano. *et al., Lett. Appl. Microbiol.*, **53**, 161-166 (2011)

3) T. Hirano. *et al., FEBS Lett.*, **589**, 145-151 (2015) 4) 神澤沙耶ら、日本農芸化学会 2015 年度大会、講演番号 2E32a14

5) K. Kadokura, *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 357-365 (2007)

6) Y. Sakamoto, *et al.*, *J. Appl. Glycosci.*, **56**, 273-276 (2009) 7) T. Hirano, *et al.*, *Chitin Chitosan Res.*, **19**, 321-324 (2013)

chitin oligosaccharide deacetylase, substrate specificity, functional analysis

発表番号：3D017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

ステロイドホルモン類に対する糖転移
Enzymatic transglycosylation to steroids
○木曽 太郎[1]、安居 弘樹[2]、湯口 宜明[2]、桐生 高明[1]、村上 洋[1]、中野 博文[1] ([1]阪市工研、[2]大阪電通大)
○Taro KISO[1], Hiroki YAUI[2], Yoshiaki YUGUCHI[2], Takaaki KIRYU[1], Hiromi MURAKAMI[1], Hirofumi NAKANO[1] ([1]OMTRI, [2]OECU)

【目的】ステロイドホルモンには精子形成に不可欠な雄性ホルモン，排卵や乳腺の発達に関与する雌性ホルモンといった性ホルモンや，糖質代謝の促進，抗炎症作用にかかわる糖質コルチコイドといった副腎皮質ホルモンが含まれている。これらの化合物、及び類縁体は生理機能が多様であり、薬学的にも重要視されて拮抗剤等の合成や薬理作用の研究が行われてきた。我々の研究室では糖質関連酵素を用いた糖質や配糖体の合成、改質を行ってきたことから、ステロイドホルモンの水溶性の向上や生理機能の調節を目的として、酵素を用いて糖を付加すること、すなわち配糖化を試みた。
【方法】ステロイドホルモンのうち、エストロゲンとしてβ-エストラジオールとエストリオール，雄性ホルモンとしてスタノロン，副腎皮質ホルモンとしてコルチゾール，コルチゾンを選択し、これらを糖転移反応の受容体とした。また、糖供与体としてはαCD を用い、複数種起源のシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ（CGTase）を作用させた。反応生成物は薄層クロマトグラフィー（TLC）で可視化した。転移反応の条件について検討するとともに、生成物については遠心分離，溶媒抽出，各種クロマトグラフィーによる精製を試みた。精製物については，TLC や質量分析装置で分析したのち、酵素分解及び NMR にて構造を推定した。
【結果】3 種の由来の異なる CGTase を用いることで、上記の各種ステロイドホルモンに対して糖転移反応が可能であることが示唆された。詳細に条件を調べてみると、CGTase によって糖転移の条件が異なることが分かった。特に市販の *B. macerans* の CGTase において TLC 上で，β-エストラジオール，コルチゾール，スタノロン，エストリオール，コルチゾンの配糖体と考えられるものが少量認められたため、スケールアップして生成物の構造推定に進むこととした。CGTase を作用させた後、*Rhizopus* 由来のグルコアミラーゼを用いて糖鎖を分解し、単糖のみ結合した配糖体を集めることとした。配糖体の可能性が高い生成物を部分精製し，質量分析装置で分析したところ，糖が一つ付加していることが示された。溶媒抽出，各種クロマトグラフィーによる精製を試みたところ、コルチゾールとエストリオールについては配糖化可能な水酸基が複数あることと整合的に、複数の配糖体が異性体として得られていることが示唆された。そこで、β-エストラジオール，スタノロン，コルチゾンの配糖化物について、NMR による構造推定に耐えうる程度の精製を行った。これらについて 2 次元 NMR を測定した結果、グルコシル基の結合位置を推定することができた。さらに、α-グルコシダーゼ消化によって、グルコースがα結合していることも分かった。

transglycosylation, steroid, cgtase

発表番号：3D018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Bacillus niacini* JAM F8 におけるグリコサミノグリカンの分解に関与するタンパク質の機能解明
Functional analysis of a protein involved in the glycosaminoglycan degradation in *Bacillus niacini* JAM F8

○平井 晴奈[1]、西村 みどり[2]、倉田 淳志[2]、小林 徹[3]、岸本 憲明[2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農、[3]海洋研究開発機構)
○Haruna HIRAI[1], Midori NISHIMURA[2], Atsushi KURATA[2], Tohru KOBAYASHI[3], Noriaki KISHIMOTO[2] ([1]Kinki Univ. Grad. Sch., [2]Kinki Univ., [3]JAMSTEC)

【目的】ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸は脊椎動物の細胞外マトリックスに見いだされるグリコサミノグリカンの構成成分である。グリコサミノグリカンの生理機能として細胞の分化、情報伝達、免疫反応の調節が見いだされており、グリコサミノグリカンの構造を解析するためにさまざまな分解酵素が開発されている。

本研究室では、伊豆・小笠原海溝の深海底泥（深度 2,759 m）から、グリコサミノグリカン分解性 *Bacillus niacini* F8 を単離している。コンドロイチン硫酸 C を添加したところ、培養液上清中にコンドロイチン硫酸 C の分解に関与すると示唆される 2 種類のタンパク質を見いだした。1 つ目のタンパク質の諸性質を検討したところ、ヒアルロン酸リアーゼ（BniHL）であり、ヒアルロン酸とコンドロイチン硫酸 A,C を分解した。この酵素の推定分子量は 123,888 であり、$CaCl_2$ 添加条件において、ヒアルロン酸分解酵素活性は増大した。一方、2 つ目のタンパク質（BniX）の諸性質は不明であるため、本研究では BniX の機能解明を目的とした。

【方法・結果】粗精製画分を用いて BniX の内部アミノ酸配列を決定した。*B. niacini* F8 のゲノム DNA（6,372,252 bp）はすでに解読済みである。そこで、BniX の内部アミノ酸配列を用いてゲノム DNA を探索した結果、BniX 遺伝子（塩基配列：3,570 bp、BniX 推定分子量：131,752）を見いだした。また、本酵素のアミノ酸配列を用いて BlastP 検索を行った結果、既知の酵素と相同性をほとんど示さなかった。一方、ドメイン検索を行った結果、BniX はグリコサミノグリカンリアーゼであると推定できた。そこで、BniX の機能解明を目的として、野生型 BniX 発現用 plasmid pET101-bniX-2 と、HisTag 付 BniX 発現用 plasmid pET101-bniX-HisTag-1 を構築した。各 plasmid を用いて *Escherichia coli* BL21(DE3)へ形質転換を行った。22℃、1 mM IPTG 添加、19 h 誘導し、形質転換体を得た。$A_{235}$ の増加により、コンドロイチン硫酸 C とヒアルロン酸の分解活性を検討した。野生型 BniX を含む菌体破砕液上清を用いたところ、コンドロイチン硫酸 C には分解活性を示さなかったが、ヒアルロン酸には分解活性（$1.9\times10^{-2}$ U/mg）を示した。したがって、BniX は BniHL と異なるヒアルロン酸リアーゼであると推定できた。HisTag 付 BniX を含む菌体破砕液上清を用いたところ、ヒアルロン酸分解活性（$1.3\times10^{-1}$ U/mg）を検出できた。そこで、HisTag 付 BniX の精製を試みた。

glycosaminoglycan, lyase, *Bacillus niacini* JAM F8

発表番号：3D019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Penicillium chrysogenum* 由来新規エキソーラムノガラクチュロナンリアーゼの反応特性解析および X 線結晶構造解析
Biochemical characterization and structural analysis of a novel exo-rhamnogalacturonan lyase from *Penicillium chrysogenum*

○國重 由花[1]、岩井 麻凛[1]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、多田 俊治[2]、西村 重徳[1]、阪本 龍司[1]([1]大阪府大・生命環境科学、[2]大阪府大・理)
○Yuika KUNISHIGE[1], Marin IWAI[1], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Toshiji TADA[2], Shigenori NISHIMURA[1], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture Univ., [2]Graduate School of Science, Osaka Prefecture Univ.)

【背景・目的】植物組織中においてペクチンは一次細胞壁および中葉に存在する非常に複雑な構造を有したヘテロ多糖であり、その構造は植物種や生育段階により多様であることから詳細については不明な点が多い。ペクチンの主鎖構造は主にホモガラクチュロナン（HG）領域とラムノガラクチュロナン（RG）領域から構成されており、HG 領域はガラクチュロン酸（GalA）のみから構成される比較的単純な構造をもつ。一方、RG 領域の主鎖は GalA とラムノース（Rha）の繰り返し構造を有し、さらに Rha 残基には種々の中性糖側鎖が結合した複雑な構造をもつ。これまでのペクチン分解系酵素の研究の結果、我々は真菌由来としては初めて *Penicillium chrysogenum* よりエキソ-RG リアーゼ（PcRGLX）を見出した。本発表では PcRGLX の反応特性および結晶構造について報告する。
【方法・結果】pMAL-c2X / *E. coli* BL21(DE3) の発現系により組換え型 PcRGLX を調製した。本酵素は直鎖 RG を β-脱離反応により末端から分解し、不飽和 GalA-Rha（ΔGR）の二糖のみを生成した。また、ガラクトース（Gal）側鎖をもつ RG に作用させると、Gal が結合した ΔGR の遊離が認められたことから、本酵素はバイパス活性を有することが明らかとなった。本活性を有するエキソ-RG リアーゼの報告例はなく、本酵素は RG 領域の糖鎖構造解析において強力なツールになると考えられる。
本酵素のアミノ酸配列は既存の Polysaccharide Lyase（PL）family に属するタンパク質との相同性が極めて低く、新規なファミリーに属することが示唆されたため、X 線結晶構造解析を行った。pET-22b / *E.coli* B834 の発現系によりセレノメチオニン化 PcRGLX を調製した。酢酸ナトリウム (pH 7.5) をリザーバー溶液に用いたシッティングドロップ蒸気拡散法により結晶化に成功し、SPring-8 BL26B2 にて分解能 2.85Å で X 線回折データを収集した。SAD 法による初期位相の決定を行った後、構造モデルの構築と精密化を行った。R 値および Rfree 値はそれぞれ 19.3%と 24.3%である。
本酵素は 2 つの分子が 2 回対称軸で関係付けられたホモ 2 量体を形成しており、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、溶液中でも本酵素は 2 量体を形成していた。各サブユニットは 3 つのドメインからなり、ドメイン A（N23-V114）は immunoglobulin fold、ドメイン B（S129-D500）は supersandwich 構造、ドメイン C（P501-S927）は (α/α)6 barrel 構造をしていた。PL family 4 に属する *Aspergillus acreatus* 由来エンド-RG リアーゼ / 基質複合体の立体構造と比較したところ、本酵素のドメイン B の supersandwich の片側に活性部位があることが予想された。今後は基質複合体の結晶を作製し、活性部位と基質との相互作用を解析予定である。

exo-rhamnogalacturonan lyase, x-ray crystal structure analysis, pectin

発表番号：3D020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Penicillium chrysogenum* 由来ペクチンメチルエステラーゼの異種発現と反応特性解析

Expression and biochemical characterization of a *Penicillium chrysogenum* pectin methylesterase

○久保 笙子[1]、吉田 靖彦[2]、中澤 昌美[1]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1] ([1]大阪府大生命環境科学、[2]不二製油株式会社)
○ Shoko KUBO[1], Yasuhiko YOSHIDA[2], Masami NAKAZAWA[1], Mitsuhiro UEDA[1], Tatsuji SAKAMOTO[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]FUJI OIL.,LTD.)

【背景・目的】ペクチンは植物一次細胞壁および中葉組織に多く含まれるヘテロ多糖であり、植物生体内では細胞壁強度の維持や細胞伸長の制御を担っている。ペクチンの主成分はガラクチュロン酸（GalA）のみから構成されるホモガラクチュロナン（HG）領域と、ラムノースと GalA の二糖繰り返し構造の主鎖に、アラビナンなど種々の中性糖側鎖が結合したラムノガラクチュロナン（RG）領域から構成される。HG 主鎖中の GalA 残基 C6 位のカルボキシル基は部分的にメトキシ(Me)化されており、GalA と Me 基のモル比は Me 化度（DM）で表される。DM が 50%以上のペクチンは酸性条件下で高濃度の糖が存在するとゲル化し、50%未満のものは $Ca^{2+}$などの多価イオンの存在下でゲル化する。植物細胞壁中では後者の作用によりペクチン分子間が架橋し、細胞壁に強度を与えている。一方、RG 主鎖中の GalA 残基が Me 化されているかは不明である。食品産業においてペクチンは酸乳飲料安定剤・ゲル化剤・増粘剤などとして広く利用されているが、その物性は分子量や DM 値により大きく影響を受ける。本研究ではペクチンの物性を改変することを目的に、ペクチン高分解菌である *Penicillium chrysogenum* 31B 株由来のペクチンメチルエステラーゼ（PME）遺伝子のクローニングおよび異種発現系の構築を行い、組換え酵素（rPME2）を用いて反応特性を解析した。

【方法・結果】 *P. chrysogenum* 31B 株のゲノムを鋳型とし、同種 Wisconsin 株のゲノム情報（*Pc20g13370*）を基にプライマーを設計して *pme2* 遺伝子を獲得した。カビ用高発現ベクターpNENU2512 に挿入後、プロトプラスト-PEG 法によって *Aspergillus oryzae* niaD300 株を形質転換した。培養条件を検討した結果、100 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 7）を含むデキストリンを炭素源とする DPK 培地を用いて 30℃で 4 日間振盪培養する条件に決定した。rPME2 は菌体外に分泌されるため、本組換え菌の培養上清を用いて各種カラムクロマトグラフィーにより精製を行った。酵素反応の基質には、HG 領域を主成分とするアップルペクチン（AP）と、RG 領域を主成分とする大豆ペクチン（SP）を用いた。酵素活性は反応産物であるメタノール量をガスクロマトグラフィーにより測定することで算出した。コントロールとして使用した産業用 PME 製剤（スミチーム PME：*Aspergillus niger* 由来）を用いて酵素反応を行った結果、AP に対しては高活性を示したが、SP に対する活性は認められなかった。一方、rPME2 は AP だけでなく SP に対してもメタノール遊離活性を示したことから、SP においては RG 主鎖中の GalA 残基は Me 化されており、本酵素はその Me 基にも作用している可能性が考えられる。本仮説を証明するため、現在 SP より RG 領域の単離を行っている。

pectin, pectin methylesterase, rhamnogalacturonan

発表番号：3D021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Zymomonas mobilis* 由来 levansucrase と invertase の反応特異性の解析

# Catalytic reaction of levansucrase and invertase from *Zymomonas mobilis*

○芹沢 領、田沼 正成、奥山 正幸、木村 淳夫（北大院農）
○Ryo SERIZAWA, Masanari TANUMA, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【目的】*Zymomonas mobilis* は 2 種の glycoside hydrolase family 68 酵素をゲノムにコードしている．それらは互いに高いアミノ酸配列類似性 (62%) を示すにもかかわらず，異なる反応を触媒するとされている．一方は sucrose の fructosyl 基をβ-2,6 結合で受容体に連続的に転移し levan を合成する levansucrase であり，他方は sucrose の加水分解を触媒する invertase であることが知られている．本研究の目的は両酵素の反応特異性の違いに関与する構造因子を明らかにすることである．

【方法】*Zymomonas mobilis* NBRC13576 の染色体 DNA から levansucrase および invertase をコードする遺伝子を PCR により取得し，大腸菌を用いてそれぞれの組換え酵素を生産した．組換え酵素を，Ni-アフィニティークロマトグラフィーにより精製し，sucrose を基質とした際の酵素反応を解析した．酵素反応により生成する glucose, fructose, 6-kestose ならびに 1-kestose を HPAEC-PAD により定量した．糖転移率をアグリコン遊離速度に相当する glucose 遊離速度と加水分解の際に生成する fructose 遊離速度から算出した．変異酵素作製のための変異導入を PCR により行った．

【結果】1 M sucrose を基質としたときの反応速度はそれぞれ，$2.03\times10^3$ μmol/min/mg (levansucrase), $3.8\times10^3$ μmol/min/mg (invertase)であった．また糖転移率は levansucrase が 51%, invertase が 34%であった．反応初期の糖転移反応の主生成物が両酵素で異なり，levansucrase では 6-kestose であり，invertase では 1-kestose であることがわかった．また levansucrase では反応 25 時間後に levan の生成が確認されたが, invertase ではその生成は見られなかった．

次に invertase のアミノ酸配列を levansucrase 様に改変することで，反応特異性の改変を試みた．両酵素のアミノ酸配列の比較から，invertase の活性中心近傍に位置する Ala343 に相当するアミノ酸残基が levansucrase では Ser345 に変化していることがわかり，この違いが反応特異性に関与していることが予想された．そこで invertase の Ala343 を Ser に置換した変異酵素 (A343S) を作製し，その反応特異性を解析した．1 M sucrose を基質としたときの A343S の反応速度は $2.6\times10^2$ μmol/min/mg であり，糖転移率は 29%であった．糖転移反応生成物に変化が見られ，6-kestose の生成量が野生型と比較して増加した．一方で長時間反応による levan の合成は見られなかった．

以上の結果は，Ala343 の位置にあるアミノ酸残基は糖転移反応生成物の位置特異性に関与するが，levan 合成にはさらに別の因子が必要であることを示す．

levansucrase, invertase, *Zymomonas mobilis*

発表責任者：奥山正幸（okuyama@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3D022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 希少糖生産酵素 *Arthrobacter* 属由来 D-プシコース 3- エピメラーゼの結晶化および X 線結晶解析
# Crystallization and crystal structure analysis of *Arthrobacter* D-allulose (D-psicose) 3-epimerase which is useful for rare sugar production

○吉田 裕美[1]、吉原 明秀[2]、大谷 耕平[3,4]、秋光 和也[3]、何森 健[3]、神鳥 成弘[1] ([1]香川大総合生命研究セ、[2]香川大希少糖研究セ、[3]香川大農、[4]松谷化学)
○Hiromi YOSHIDA[1], Akihide YOSHIHARA[2], Kouhei OHTANI[3,4], Kazuya AKIMITSU[3], Ken IZUMORI[3], Shigehiro KAMITORI[1] ([1]Kagawa Univ. Life Sci. Res. Center, [2]Kagawa Univ. Rare Sugar Res. Center, [3]Kagawa Univ. Fac. of Agri., [4]Matsutani Chemical Industry Co., Ltd)

【目的】天然には微量にしか存在しない希少糖の D-プシコース(別名 D-allulose)は、これまでに、血糖値上昇の抑制効果、動脈硬化の予防や肥満の抑制効果などが見いだされ、D-プシコースを含む甘味料や食品、飲料が機能性食品として市販されている。D-プシコースの生産には、基質特異性の広い *Pseudomonas cichorii* D-タガトース 3-エピメラーゼ(D-TE)を用いて、天然に大量に存在する D-フルクトースから生産が行われている。最近、D-プシコースを本来の基質とし、D-プシコースの生産への利用が期待される、*Arthrobacter* 属由来 D-プシコース 3-エピメラーゼ (D-PE) がクローニングされ、これまでに報告されている D-PE よりも、本来の基質を D-タガトースとする D-TE との相同性が高いことが明らかとなった。本研究では、*Arthrobacter* 属由来 D-PE の構造情報を得て D-TE と比較することを目的に、D-PE の結晶化および X 線結晶解析を行った。
【方法】プラスミド pQE60 を用いて、C 末端 His タグ付きと His タグを発現しない D-PE の発現ベクターを調製した。His タグを持つ D-PE の発現も確認はできたが、His タグのない D-PE の方が高発現であったことから、結晶化にはタグなしの D-PE を用いた。陰イオン交換、疎水クロマトグラフィーにより精製酵素を調製し、18.5 mg/ml まで濃縮した酵素溶液を用いて結晶化スクリーニングを行った。結晶化条件の最適化後、得られた結晶を用いて、高エネルギー加速器研究機構 PF-AR NW12A にてデータ収集を行った。
【結果】分解能 2.24Åで得られたデータを用いて L-ribulose 3-epimerase (PDBID: 3VYL)の構造をモデルとして分子置換法により *Arthrobacter* 属由来 D-PE の構造を決定した。D-PE の結晶中には非対称単位あたり 16 分子（ホモテトラマーが 4 分子）存在し、D-PE の各分子はβ/αバレル構造をとり、D-TE のサブユニット構造と非常によく似ていた。しかし、D-PE では、1 本の長いαヘリックスがダイマー間同士を強固に繋ぎ止め、安定なホモテトラマーを形成し、このホモテトラマーの全体構造は L-ribulose 3-epimerase と類似していた。D-TE はホモダイマーを形成するのに対し、D-PE はこれまでの D-PE の報告にあるようにホモテトラマーを形成していたが、その全体構造はこれまでに報告されている D-PE のホモテトラマーより強固なテトラマーを形成している可能性がある。

D-allulose (D-psicose) 3-epimerase, rare sugar, X-ray structure

発表責任者：吉田裕美（h.yoshi@med.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：3D023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 深海微生物 *Bacillus* sp. JAMB-FW51 株由来イソマルトデキストラナーゼの解析

# Isolation and Characterization of Isomaltodexitoranase from *Bacillus* sp. JAMB-FW51

○桐ケ谷 綾菜[1]、増田 美希[1]、増田 範生[2]、弓田 涼[1]、細谷 美菜子[1]、柳田 早智[1]、宮崎 征行[2]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市立大学、[2]海洋研究開発機構)
○Ayana KIRIGAYA[1], Miki MASUDA[1], Norio MASUDA[2], Ryo YUMITA[1], Minako HOSOYA[1], Sachi YANAGIDA[1], Masayuki MIYAZAKI[2], Yuji HATADA[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]JAMSTEC)

【目的】　デキストランは D-グルコースのα-1,6 結合から成る多糖類である。デキストラン分解酵素はグルカン-1,6-α-D-グルコシダーゼ、グルカン-α-1,6-イソマルトヒドラーゼ、デキストラン 1,6-α-イソマルトトリオシダーゼ、分岐デキストランエキソ-1,2-α-グルコシダーゼの 4 種類に分類される。イソマルトデキストラナーゼ(グルカン-α-1,6-イソマルトヒドラーゼ)はデキストランの非還元末端を切断しイソマルトースを生産する酵素であり、これまでは *Arthrobacter dextranolyticus* T6 株由来の酵素が唯一の発見例であった。この度、深海微生物群を探索源としてイソマルトデキストラナーゼ生産菌をスクリーニングした結果、*Bacillus* sp. JAMB-FW51 株の培養液よりイソマルトデキストラナーゼ活性を検出した。続いて、本酵素の諸性質並びに配列解析を行ったのでそれらの結果に関して報告する。

【方法と結果】　JAMB-FW51 株の培養上清より、疎水性樹脂、陰イオン交換樹脂、ヘパリン樹脂を用いた 3 ステップでの精製によりイソマルトデキストラナーゼ(Imd95)の単離精製に成功した。精製酵素は SDS-PAGE の結果から 95 kDa と判断された。Imd95 はおよそ pH 6.0 および 50℃にて最大活性を示した。酵素の比活性は 27 U/mg protein であった。本酵素は pH 5.5 から pH 9.5 の範囲で安定であった。本酵素はデキストランを基質として分解活性を示すが、可溶性デンプンやプルランなどには分解活性を示さないことが確かめられた。精製酵素の N 末端アミノ酸配列と一部の内部アミノ酸配列を決定し、これらの配列を基にプライマーDNA をデザインした。同プライマーDNA を用いて JAMB-FW51 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。得られた PCR 断片の DNA シークエンス解析を行い、続いて同配列情報を基にインバース PCR を行って、Imd95 をコードする遺伝子配列全長を増幅しその配列を解析した。その結果、本遺伝子は 28 アミノ酸から成る分泌シグナルペプチドを含む 881 アミノ酸をコードしていることが分かった。酵素の N 末端側領域(Arg29-Asp592)は *Arthrobacter dextranolyticus* T6 株由来のイソマルトデキストラナーゼ(65 kDa)と 48%一致(アミノ酸配列)という相同性を示した。内部領域(Thr474-Phe594、Leu603-Val747)にはそれぞれ糖質結合ドメイン CBM6_35_3 スーパーファミリー、CBM4_9_スーパーファミリーと低いレベルでの相同性が見られた。

isomaltodexitranase, dexitran, *Bacillus* sp

発表番号：3D024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# リガンドによるピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ 2 の動的構造変化

# Dynamical structural changes in pyruvate dehydrogenase kinase 2 by ligands

○海谷 京香、藤野 泰寛、土居 克実、西本 悦子、廣政 恭明（九大農）
○Kyoka KAIYA, Yasuhiro FUJINO, Katsumi DOI, Etsuko NISHIMOTO, Yasuaki HIROMASA (Kyushu Univ.)

ほ乳類ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)は、解糖系と TCA サイクルを連結する反応を触媒する。本複合体は、ミトコンドリア内に局在し、解糖系により生成されたピルビン酸をアセチル CoA と NADH に不可逆的に変換する。この反応は、ヒトを含め哺乳類ではグルコースからの解糖生成物を TCA サイクルに運ぶ唯一の経路であるため、その反応調節は代謝制御において重要である。

PDC は 3 種の構成酵素（E1, E2, E3)が会合した総分子量約 1 千万の巨大な酵素複合体であり、PDC の機能制御は、構成酵素 E1 のリン酸化と脱リン酸化反応により行われる。本発表では、リン酸化反応を触媒するピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ、特に最も生体内で発現しているキナーゼ 2 (PDK2)に関して、制御機構の分子レベルでの解明を目的としている。

PDK 2 は 2 量体で存在し、C 末端ドメインと N 末端ドメインの 2 つのドメインがある。N 末端ドメインには、ピルビン酸結合部位やリポイル基結合部位などの調節部位が存在する。一方、C 末端ドメインには活性部位が存在し、先端に存在するテール構造がもう一方のサブユニットに結合する（クロスアーム構造）。これまで、講演者らのグループを含めヌクレオチドやピルビン酸、PDC とのアロステリック相互作用により PDK2 の構造・機能変化が報告されている。さらに講演者らのグループは、PDK2 のクロスアーム構造の先端に位置する Trp383 の蛍光が、ピルビン酸や ADP の結合により蛍光は大きく消光すること、両者を加えると協同的に強く変化することを見いだした。結晶構造を比較すると、ADP とピルビン酸が同時に結合すると、C 末端のクロスアーム構造が消失し、リポイルドメインとの相互作用が失われた。そこで、本発表では、Trp383 に注目し、蛍光寿命変化並びに時間分割蛍光異方性について、リガンドによる構造変化、特に C 末端領域の運動変化を明らかにした。その結果、ヌクレオチドやピルビン酸を加えることにより、クロスアームを形成する Trp383 の運動性は大きくなった。さらに、PDK2 に存在する 3 つの Trp の Phe への変異実験より、C 末端領域で、リガンドによる運動性の増加が明らかになった。これらの結果より、リガンドの結合により、C 末端領域の Trp の運動が増加し、このことがクロスアーム構造の消失、さらにはリポイルドメインとの相互作用の消失につながることが示唆された。

Pyruvate dehydrogenase kinase, Allosteric effects, Dynamical structural changes

発表責任者：廣政恭明（hiromasasr@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3D025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 細菌グルコアミラーゼの N 末端配列の役割

# Role of N-terminal sequence in bacterial glucoamylase

○坂口 政吉[1]、松嶋 裕大[1]、永峯 雄介[1]、松橋 智希[1]、本田 翔太郎[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1]、川喜田 正夫[1,2] ([1]工学院大先進工、[2]東京都医学研)
○Masayoshi Sakaguchi[1], Yudai Matsushima[1], Yusuke Nagamine[1], Tomoki Matsuhashi[1], Shotaro Honda[1], Yasusato Sugahara[1], Fumitaka Oyama[1], Masao Kawakita[1,2] ([1]Kogakuin Univ., [2]Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

GH15 ファミリーに属するグルコアミラーゼは N ドメイン，リンカー領域，そして触媒機能を担う C ドメインとで構成されている。触媒ドメインの機能および N ドメインの機能を探求するために，N 末端から順次欠損したタンパク質の取得を試みた。

PCR 法を用いて，N 末端部分から部分的に欠損させた遺伝子を作製した。それぞれの遺伝子産物を，大腸菌を宿主として発現させ，電気泳動およびマルトトリオース分解活性測定で評価した。

グルコアミラーゼは、活性を有する可溶性タンパク質として取得可能であるが，C ドメイン単独では，不溶性タンパク質として検出された。また，C ドメインにリンカーを含めた産物と，N ドメインの N 末端領域 39 残基を欠損させた産物(Δ39)も同様の結果となった。そこで，この N 末端領域の役割について調べるために，欠損部分の長さが 5 残基ずつ異なる遺伝子産物の作製と，大腸菌での発現と取得を試みた。その結果，Δ29 および Δ34 は可溶性タンパク質として取得出来たものの，マルトトリオース分解活性が著しく減少した。一方，Δ24 では，野生型と同等の比活性を示すことがわかった。これらの結果は，細菌グルコアミラーゼの N 末端領域(30 番目から 39 番目のアミノ酸配列)がタンパク質全体のフォールディングに必要で，この配列の存在だけでは活性部位の形成に不十分であることを示し、また、N 末端領域(25 番目から 29 番目のアミノ酸配列)がその活性部位の形成に関与していることを示唆した。

次に、活性部位形成に関与する配列領域を限定するために、1 残基ずつ欠損した欠損体(Δ25、Δ26、Δ27、Δ28)を作製し、解析した。どの欠損体も可溶性タンパク質として取得できたが、Δ25 を除く欠損体の比活性は野生型よりも減少した。これらの結果から 26 番目の Asp 残基、27 番目の Thr 残基、28 番目の Trp 残基が活性部位形成に関与していることが示された。しかし、Δ24 Asp26Asn の比活性には大きな減少が観察されなかったため、Thr27・Trp28 が重要な役割を持っていると推定した。一方、Δ26 では両残基を保持しているにもかかわらず、比活性の減少が観察された。これは N 末端が Met-Thr-Trp では活性部位形成に不十分であることを示唆している。Met-X-Thr-Trp (X は他のアミノ酸)が必要なのか、Met 残基が活性部位形成阻害に影響を及ぼしているかを検証するために、現在、Δ25 欠損体の 26 番目に変異を導入した新規変異体を作製し、解析中である。

glucoamylase, expression, folding

発表責任者：坂口 政吉（bt11532@ns.kogakuin.ac.jp）

発表番号：3D026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Solubilizing ability of double-anchor type isomaltomegalosaccharide for drug delivery of ibuprofen

○ Sota UEKUSA, Weeranuch Lang, Yuya Kumagai, Masayuki Okuyama, Atsuo Kimura
(Laboratory of Molecular Enzymology, Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

**Introduction:** Megalosaccharide (DP=10-100; DP, degree of polymerization) has sugar-size between oligosaccharide (DP=2-9) and polysaccharide (DP>100). We have prepared isomaltomegalosaccharide (IMS), including α-1,6-glucosidic linkage, with α-1,4-glucose-linked chain at reducing end (single-anchor type IMS; S-IMS) (anchor, α-1,4-bond portion). S-IMS displayed valuable solubilizing ability of insoluble flavonoid and azo dye, to which anchor-length contributed, suggesting that IMS with further anchor exhibited more useful function. In this study, we synthesize double-anchor type IMS (D-IMS) with an anchor at non-reducing end of S-IMS, and analyze the solubilizing ability using ibuprofen (IBP) as the insoluble drug model, where IBP is a non-steroidal anti-inflammatory medical agent.

**Methods:** Two D-IMS were prepared from S-IMS by coupling reaction of cyclodextrin glucanotransferase. Structural analysis was done by $^{1}$H-NMR spectroscopy and iodine staining. Phase solubility of IBP with D-IMS was estimated, and orientation of IBP in water-soluble phase was identified by circular dichroism spectroscopy. Pancreatic digestion of IBP-D-IMS complex was performed with small intestine fluid at pH 6.9 and 37°C.

**Results:** Two D-IMS had the different chain-length of non-reducing anchor: short type (6, 13, and 3 for DP of non-reducing anchor, α-1,6-bond, and reducing anchor, respectively; D-IMS-6); long type (30, 13, and 3; D-IMS-30). Maximum water solubilities were 180 and 80 mg/mL for D-IMS-6 and D-IMS-30, respectively, indicating that the aggregate of non-reducing anchor (grafted-amylose) decreased the solubility by preventing flexibility of α-1,6-portion of D-IMS. D-IMS-6 could not form inclusion complex with iodine due to insufficient chain-length to form helices, while D-IMS-30 accepted iodine to show blue-purple color, meaning the existence of long helical segment. Consequently, D-IMS-30 enhanced water solubility of IBP, and exhibited a greater binding constant ($K_c$), which was evaluated by phase solubility diagram. The IBP content encapsulated in the soluble complex was 5.73 ± 0.78 mg/g. Circular dichroism spectrum with negative bands suggested an equatorial orientation of IBP located in the chain cavity of D-IMS-30. *In vitro* pancreatic digestion test of IBP-D-IMS-30 complex found that its degradation was smaller than that of free D-IMS-30. Accordingly, D-IMS-30 was a reasonable compromise between intrinsic solubility and inclusion function. D-IMS-6 showed weaker function, but it might be also a suitable non-specific or universal host for apolar ligand, due to non-negligible surface interaction of $K_c$.

isomaltomegalosaccharides, water-soluble complex, ibuprofen

発表番号：3D027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Polysaccharide lyase family 7 に分類される新規アルギン酸リアーゼの特性評価
# Characterization of the novel alginate lyase classified in polysaccharide lyase family 7

○八木 寿梓[1]、藤瀬 麻紗子[2]、板橋 成美[3]、鈴木 宏和[2]、大城 隆[2] ([1]鳥大・工・GSC、[2]鳥大院・工、[3]鳥大・工)
○Hisashi YAGI[1], Asako FUJISE[2], Narumi ITABASHI[3], Hirokazu SUZUKI[2], Takashi OHSHIRO[2] ([1]GSC, Tottori Univ., [2]Grad. Sch. of Eng., Tottori Univ., [3]Dept. of Eng., Tottori Univ.)

【目的】海藻由来のアルギン酸は、β-D-マンヌロン酸とα-L-グルロン酸の２種のウロン酸から構成される細胞間粘質多糖成分の一つで、Poly G、Poly M そして Poly MG の３つのブロックの組み合わせで形成している。アルギン酸ナトリウムはすでに多くの分野に利用されており、特に最近ではバイオマスとしての利用が期待されている。バイオマスとして利用するためには、単糖類まで速やかに糖化することが必要である。本研究では、鳥取県で採集した海藻や海水を分離源としてスクリーニングを行い、新規のアルギン酸分解酵素の取得を目的とし、その諸性質を検討した。
【方法】アルギン酸ナトリウムを単一炭素源とする培地を用いて、アルギン酸資化菌をスクリーニングし、16S rRNA 系統解析から種の同定、次世代シークエンス解析から全ゲノム配列を決定した。野生株からのアルギン酸分解酵素の精製は、アルギン酸含有培地で 20°C、約 30 時間培養し、種々のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて行った。アルギン酸分解酵素の酵素活性は、アルギン酸ナトリウムを基質とし、基質の分解によって生じる分解産物の二重結合の増加を、232 nm の吸光度の経時変化測定から求め、諸性質（至適温度、至適 pH、熱安定性、基質特異性等）を調べた。また、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)を用いて、分解産物を調べた。
【結果・考察】16S rRNA 系統解析から得られた菌株を *Shewanella* sp.と *Cobetia* sp.と同定し、*Shewanella* sp. YH1 と *Cobetia* sp. NAP1 と命名した。野生株からはそれぞれの１種類の精製酵素が得られ、N 末端アミノ酸配列解析と全ゲノム情報をもとに Blast 検索を行った結果、２種類とも polysaccharide lyase family 7 に分類されるアルギン酸リアーゼであった。２つの酵素のアミノ酸配列の相同性は 47%で、すでに報告されている基質認識に重要な配列も同じであった。興味深いことに、この２つの酵素の性質は大きく異なり、*Cobetia* sp. NAP1 由来のアルギン酸リアーゼは、報告されているアルギン酸リアーゼよりも熱安定性が高かった。また、酵素の比活性は高くはないが基質認識に差が見られず、結果として本酵素のみで単糖まで分解した。他方、*Shewanella* sp. YH1 由来のアルギン酸リアーゼは、酵素の比活性は *Cobetia* sp. NAP1 由来のアルギン酸リアーゼよりも高いが、熱安定性は低かった。基質認識においては Poly G に特異性が高く、二糖まで分解することがわかった。得られた結果から、同じ family の酵素でも大きく性質が異なり、これらの差を詳細に調べるとともに、タンパク質工学的に両酵素の性質を組み合わせることができれば、より安定で酵素活性が高いアルギン酸リアーゼの創製が期待できる。

Alginate, Lyase, Algae

発表番号：3D028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Kribbella flavida* 由来 isomaltosyltransferase の機能解析

# Functional analysis of isomaltosyltransferase from *Kribbella flavida*

○宮野 江梨[1]、田上 貴祥[2]、奥山 正幸[1]、木村 淳夫[1] ([1]北大院農、[2]酪農学園大)
○Eri MIYANO[1], Takayoshi TAGAMI[2], Masayuki OKUYAMA[1], Atsuo KIMURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Rakuno Gakuen Univ.)

【背景】Isomaltosyltransferase (IMT)は GH 31 の糖転移酵素であり, 2 分子の isomaltose 単位が互いにα-1,3 結合でつながった環状四糖 (cyclo-(1→6)-[α-nigerosyl-nigerosyl], CNN)を生成する. IMT は glucose 単位がα-1,3, α-1,6 結合で交互に結合した構造を持つ多糖 alternan の他, $6^2$-*O*-α-glucosylmaltose (panose) から CNN を生成する. 本研究では, 放線菌 *Kribbella flavida* ゲノム上に見出した IMT 様タンパク質 (KfIMT) を大腸菌で生産し, panose から CNN を生産することを確認した. さらに, panose, $6^3$-*O*-α-glucosylmaltotriose (B4), $6^4$-*O*-α-glucosylmaltotetraose (B5)および isomaltosyl-panose (IP)に KfIMT を作用させ, 基質特異性を評価した. また, 変異酵素を作製し, 糖転移特異性に寄与する構造因子について検討した.

【方法・結果】*K. flavida* NBRC 14399 由来 IMT の組換え酵素を大腸菌で生産した. 10 mM panose, B4, B5, および IP を基質として用い, HPAEC-PAD により反応初速度と糖転移率を求めた. B4, B5, IP 分解速度はそれぞれ, panose 分解速度 (14.3 μmol/min/mg)の 2.4 倍, 1.4 倍, 0.94 倍であった. B5 分解速度が B4 に劣ることから, KfIMT はサブサイト+3 を持たないか, 親和力が弱いと考えられた.

サブサイト+1 形成に関与するアミノ酸残基変異酵素 F547A および W546F を作製した. F547A で 10 mM panose に対する糖転移速度が 1.4 倍に上昇し, 一方で加水分解速度に変化はなかった. 逆に, W546F では panose に対する糖転移速度が 1/14 に減少し, F547A 同様, 加水分解速度は変化しなかった. これらの結果から, サブサイト+1 を形成する 2 つのアミノ酸残基 F547 と W546 が糖転移反応の進行に重要な役割を持っており, 加水分解反応には関与しないことがわかった.

panose に KfIMT を作用させた反応液中より, HPLC を用いて一次転移産物 IP を分取し, 基質として用いた. 生成物を反応経時的に TLC で分析すると, 初期に isomaltosyl-isomaltosyl-panose (IIP)が蓄積し, その後, IIP の減少と共に CNN が増加した. このことから, KfIMT による CNN 合成の直接の基質が七糖以上である可能性が示唆された.

glycoside hydrolase family 31, isomaltosyltransferase, cyclo-(nigerosyl-nigerosyl)

発表責任者：奥山　正幸（okuyama@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3D029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Efficient production and characterization of α-1,3-glucosidase from *Aspergillus niger*

○Min MA[1], Takayoshi TAGAMI[2], Masayuki OKUYAMA[1], Atsuo KIMURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Rakuno Gakuen Univ.)

[Objective] A preceding study on gene-expression microarray demonstrated that *Aspergillus niger* expresses three GH31 α-glucosidase genes, *agdA*, *agdB* and *agdE*, in response to maltose in the culture medium. AgdA corresponds to an α-glucosidase used for the production of isomaltooligosaccharides in the industrial field. AgdE displays significant sequence similarity to a catalytic subunit of glucosidase Ⅱ localized in endoplasmic reticulum, and is likely to be associated with the trimming of the *N*-linked sugar chain. Although AgdB seems to be involved in starch utilization by *A*. *niger*, the function of AgdB still remains obscure. The aim of this study is an investigation of catalytic properties of AgdB.

[Methods and Results] An *agdB* cDNA was cloned from *A*. *niger* mycelia grown in a medium, which contained maltose as a carbon source. The cDNA was subcloned into pGAPZB, and *Pichia pastoris* SMD1168H was transformed with the pGAPZB derivative. The recombinant AgdB (rAgdB) was purified by Ni-affinity chromatography. The purified rAgdB separated into several bands in SDS-PAGE and display two bands in native PAGE. Analysis of N-terminal amino acid sequence of each band suggested that the purified enzyme contained two isoforms, which had already undergone the specific proteolysis. Because the N-terminal sequences were identical between two isoforms, the difference seems to be due to the variety of post-translational modification, in particular *N*-glycosylation. AgdB possessed six potential *N*-glycosylation sites, and different efficiency for their glycosylation can produce the two isoforms. Six mutant rAgdBs, of which each inherent *N*-glycosylation Asn was replaced with Asp, were subjected to native PAGE analysis to confirm the homogeneity. Among them, N354D mutant enzyme gave one band on native PAGE gel, and it can be used as a parent enzyme for analyzing the enzymatic properties. The optimum pH for the hydrolysis of maltose by N354D was 4.0. The enzyme was stable within pH from 3.5 to 10.6 at 4°C for 24 h, and less than 51°C for 15 min at pH 4.0. The kinetic parameter for hydrolysis of disaccharides indicated that the enzyme preferred α-(1→3) and α-(1→4) glucosidic linkages. Among the series of maltooligosaccharides, maltotriose was the best substrate. The transglycosylation from 100 mM maltose was investigated through HPAEC-PAD analysis. The initial transglycosylation products were 3-*O*-α-glucosyl-maltose and maltotriose, and their ratio was 56 / 44 (3-*O*-α-glucosyl-maltose / maltotriose). The initial velocity of reaction products indicated that 83% of the reaction was transglycosylation, when using 100 mM maltose as substrate.

*Aspergillus niger*, α-1,3-glucosidase, post-translational modification

発表番号：3D030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Thalassomonas agarivorans* A33 株由来αアガラーゼの諸性質解析および枯草菌を宿主とした生産検討

Charactarization of α-agarase from *Thalassomonas agarivorans* A33.

○細谷 美菜子[1]、弓田 涼[1]、桐ヶ谷 綾菜[1]、高木 瑛実子[1]、大田 ゆかり[2]、能木 裕一[1,2]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市立大学、[2]海洋研究開発機構)

○Minako HOSOYA[1], Ryo YUMITA[1], Ayana KIRIGAYA[1], Emiko TAKAGI[1], Yukari OHTA[2], Yuichi NOGI[1,2], Yuuji HATADA[1,2] ([1]Yokohama City Univ., [2]Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology)

【目的】古くから食材として利用される寒天は紅藻類に属するテングサやオゴノリから抽出される。その主成分は多糖のアガロースであり、D -ガラクトースと 3,6 -アンヒドロ-L-ガラクトースがα-1,3、β-1,4 結合で交互に繋がった構造をしている。α-アガラーゼはα-1,3 結合を、β-アガラーゼはβ-1,4 結合を切断するアガロース分解酵素である。α-アガラーゼとβ-アガラーゼは配列的に全く相同性が無く、各々の触媒機構にはどのような差異があるか大変興味深い。α-アガラーゼは *Thalassomonas agarivorans* 由来と、*Alteromonas agarilytica* 由来の 2 例のみが世界で報告されている希少な酵素である。また、立体構造や触媒機構は未だ明らかにされていない。

今回、*T. agarivorans* 由来のα-アガラーゼの活性必須アミノ酸残基の特定解析および枯草菌を宿主とした大量生産検討を行ったのでこれらの研究結果に関して報告する。

【方法と結果】*T. agarivorans* 由来と *A. agarilytica* 由来α-アガラーゼのアミノ酸配列アライメントを実施し、両酵素に共通している酸性アミノ酸残基を調べた。*T. agarivorans* 由来α-アガラーゼに対して部位特異的変異法により、*A. agarilytica* 由来α-アガラーゼとの間で共通している酸性アミノ酸残基をアミド型(Asp→Asn、Glu→Gln)に置換した変異体を 37 種類構築した。これら変異体のアガラーゼ活性を評価した結果、活性が著しく低下した変異体を 2 種類検出した。

一方、枯草菌を宿主としたα-アガラーゼの高生産化にも取り組んだ。培養条件の検討を行った結果、12 units/ml の生産性を得ることができた。枯草菌の培養上清から組換えα-アガラーゼを精製した結果、枯草菌の分泌するプロテアーゼにより、酵素が低分子化されていることが判った。N 末端アミノ酸シークエンス解析の結果、開始メチオニンから数えて 690 番目のアミノ酸を N 末端とする低分子化酵素であることが判った。本酵素の諸性質を解析した結果、比活性は 140 units/mg protein、温度安定性に関しては 40℃まで安定であり、pH 5.6～8.4 の範囲で高い活性を示すことが判明した。

agarase, agarose, enzyme

発表番号：3D031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 緑藻 Volvox carteri 由来キチナーゼがもつ LysM ドメインのキチンオリゴ糖結合様式

# Binding mode of chitin oligosaccharides to LysM domains of a chitinase from green algae, Volvox carteri.

○北奥 喜仁、大沼 貴之、深溝 慶 (近畿大農)
○Yoshihito KITAOKU, Takayuki OHNUMA, Tamo FUKAMIZO (Kinki Univ.)

【目的】LysM(Lysin Motif)ドメインは、生物界において普遍的に見出される約 50 アミノ酸残基からなるタンパク質ドメインである.LysM ドメインの多くは細菌がもつタンパク質において見出されるが,植物のキチンエリシター受容体タンパク質や共生シグナル受容体タンパク質，および真菌が植物免疫システムによる認識を阻害するために産生するエフェクタータンパク質など，植物-微生物相互作用のインターフェースで機能していることが報告されている．これらのタンパク質は LysM ドメインの繰り返し構造をもち，結合する糖質の性状に応じた結合様式を示す．LysM ドメインの繰り返し構造におけるこれらの結合様式の違いは，個々の LysM ドメインのある特定の糖質に対する異なる結合力に反映されている．本研究では，緑藻(*Volvox carteri*)が産生するキチナーゼ(VcChi)がもつ LysM ドメイン(VcLysM1 および 2)の繰り返し構造について，各ドメインのキチン結合力の違いを調べることを目的とした.
【方法】VcChi がもつ LysM ドメインのタンデム構造（VcLysM tandem）および C 末端側 LysM ドメイン(VcLysM2)を TA クローニングによりクローニングした．部位特異的変異導入法を用いて，VcLysM2 をクローニングしたプラスミドに Trp96 残基の Ala への変異を導入し変異体タンパク質(VcLysM2 W96A)を作成した．上記のプラスミドを用いて，大腸菌発現系による LysM 単独の発現を行ない，カラムクロマトグラフィーにより精製した．各タンパク質とキチンオリゴ糖の相互作用を，ITC および NMR を用いた滴定実験により解析した．また、X 線結晶構造解析法により VcLysM2 の立体構造を決定した．滴定実験により得られた結果を VcLysM2 の結晶構造と比較することで，タンデムに繋がった 2 つの LysM ドメインのアミノ酸残基の違いがオリゴ糖との相互作用に与える影響について調べた.
【結果】ITC による VcLysM2 と W96A 変異体のキチンオリゴ糖結合実験の結果，両タンパク質が 3 糖以上と結合するということが分かった．Trp96 残基の変異により，4 糖以上のオリゴ糖に対する親和性が低下した．NMR 滴定実験においても Trp96 残基の側鎖 NH に由来する $^{1}H$-$^{15}N$ HSQC シグナルは，4 糖以上の糖鎖の滴定によって明らかに異なるシグナルの挙動を示した．これら結果から，Trp96 残基は 4 糖以上の鎖長をもつ糖鎖に対する結合力に寄与していることが分かった．一方，VcLysM2 と VcLysM tandem のキチンオリゴ糖滴定実験の結果を比べてみると，キチンオリゴ糖 3 糖での結合力に違いが見られた．Trp96 残基は VcLysM1 と 2 で保存されているので，Trp96 以外のアミノ酸残基も結合力の違いに寄与していると考えられた.

chitinase, LysM, chitin

発表番号：3D032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酵素反応・ボロン酸ゲルを用いた分離による D-プシコース、D-アロースの生産技術の開発

# Production of D-psicose and D-allose by enzymatic reaction and boric acid gel separation

野崎 智帆[2]、十川 直也[2]、後藤 成暁[2]、吉原 明秀[1]、高田 悟郎[1]、○森本 兼司[1] ([1]香大希研セ、[2]香大農)

Chiho Nozaki[2], Naoya Sogawa[2], Shigeaki Goto[2], Akihide Yoshihara[1], Goro Takata[1], ○Kenji Morimoto[1] ([1]Kagawa Uviv. RSRC, [2]Kagawa Uviv. Fac.Agr)

【目的】希少糖である D-プシコース（Psi）と D-アロース（All）はさまざまな生理活性作用をもつことから注目され、需要の高まりが予想されている。当研究室ではこれらの生産効率の向上を目指し、これら 2 つの希少糖を生産する酵素である D-プシコース 3－エピメラーゼ（DPE）、および L-ラムノースイソメラーゼ（LRhI）を併せもつ *Shinella* sp. NN-6 を単離し、その特性解析を行ってきた。今回はこれらの部分精製酵素を用いた両希少糖生産の生産方法について改良した結果とボロン酸ゲルによる分離回収技術について報告する。

【方法】NN-6 株を L-ラムノースを唯一培養炭素源とする酵母エキス培地にて培養し、DPE、LRhI の両酵素の酵素活性が培養時間によってどのように推移するかを調べた。粗酵素を菌体より抽出し、塩化マンガンを添加した後、熱処理により不要なタンパク質を除去した。その後、ポリエチレングリコール#6000（PEG）分画により両酵素を部分精製した。これらを陰イオン交換樹脂に固定化し、D-フルクトース(Fru)を基質として Psi、All の最適な生産方法を検討した。得られた酵素反応液から Psi、All をボロン酸ゲルを充填したカラムにより分離した。

【結果・考察】本菌由来の DPE と LRhI の Fru、Psi、All の生産性を考慮すると、培養は 21 時間が最適であると判断した。両酵素はともに PEG 20%画分に最も高い活性を示した。この画分を用いて固定化担体の再検討したところ、両酵素ともダイヤイオン HPA25L に固定化したときに最大活性を示した。両酵素が固定化された固定化酵素を用いて Fru から Psi と All を生産した結果、反応は平衡に達した。これとは別途、酵素反応し調製した Fru、Psi 混合液および Psi、All 混合液をボロン酸ゲルによる分離に成功した。現在、Fru、Psi、All の混合液からそれぞれを分画する条件について検討中である。

rare sugar, enzymatic reaction, boric acid separation

発表責任者：森本兼司（morimoto@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：3D033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酵素反応解析モデルを活用した糖脂質混合液の効率的調製法

# Preparation method of alkyl polyglycosides solution by alpha-amylase-catalyzed glycosylation reaction system: Effective utilization of a proposed models based on the subsite theory

○伊藤 博、星野 優人、鈴木 大樹、小林 厚志（日大工）
○Hiroshi Ito, Yuto Hoshino, Taiki Suzuki, Atsushi Kobayashi (Nihon Univ.)

**研究背景：**アルキルグリコシドは界面活性を有する配糖体であり、そのアグリコン、グリコン部位の組み合わせにより、機能が多岐にわたる。我々はこれまでに、アミロースを糖供与体、糖脂質（*n*-octyl β-D-glucopyranoside,C8G1）を糖受容体とした基質溶液に対し、α-アミラーゼ酵素製剤(*Aspergillus oryzae*)による酵素的配糖化反応を検討してきた [1)]。その結果、反応中間生成物として種々の重合度を有する C8G1 への配糖体（アルキルポリグリコシド : APG）混合物を確認した。本反応系は加水分解、糖転移、縮合反応が同時に進行する複雑な系であるため、実験的観測のみでは反応を制御することは困難である。そこで、我々は基質－酵素相互作用を表現したサブサイト理論に基づく既存の解析モデル [2)]を活用することにより、APG 溶液の組成を制御する手法の構築を目指した。

**解析モデル運用による APG 溶液調製法:**図 1 に今回検討した APG 溶液調製法の概略を示す。最初に、解析モデルを基に様々な反応初期条件（基質濃度、反応温度など）から反応の推移を予測し、C8G1 への配糖化が容易な反応条件、時間のパターンを提示する（①）。得られた推算パターンのうち、目的とする APG 溶液の調製に有利な条件を選択する（②）。選択した反応初期条件、反応処理手順を基に実験的に APG 溶液を得た後、これを HPLC や質量分析により評価する（③）。今回、α-アミラーゼ酵素製剤(*Bacillus subtilis*)を加えたマルトース溶液を反応原液とし、これに C8G1 を添加して APG 溶液の調製を検討した結果を、計算予測、実験的観測両面から議論する予定である。

【参考文献】1) A. Kobayashi, H. Itoh, S. Shoda, *Chem. Lett.*, **34**, 1384 (2005).
2) H. Fujimori *et al*., *J. Biochem*. **82**, 417-427 (1977)

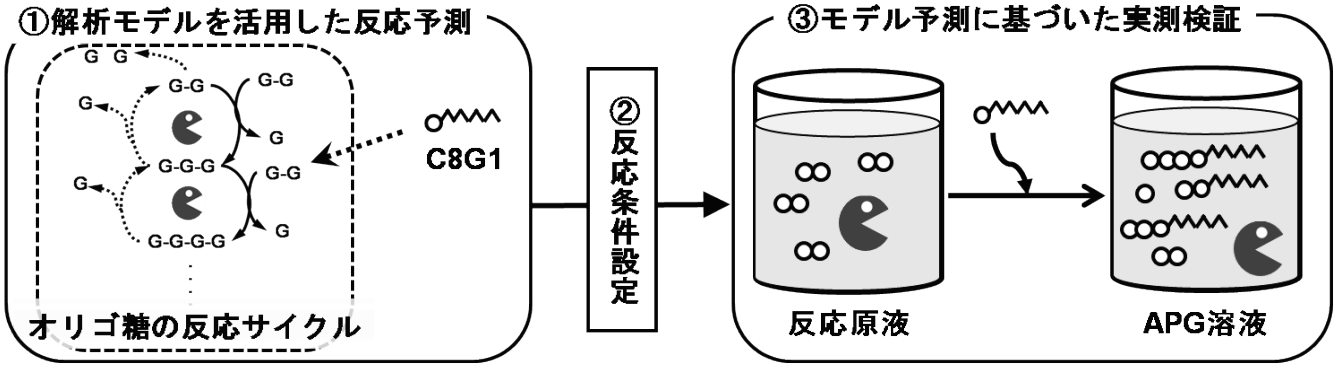



図 1　APG 溶液調製の工程

enzyme mechanism of alpha-amylase, computer simulation, glycolipid

発表番号：3D034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Intein を利用した超好熱菌由来プロテアーゼ（Tk-SP）の発現系構築

# Hyper-thermostable protease expression system using an archaeal intein

○足立 航平、上原 了、タンヌス エリアス、大政 健史、古賀 雄一 (阪大工)
○Kohei ADACHI, Ryo UEHARA, Elias Tannous, Takeshi OMASA, Yuichi KOGA (Osaka Univ.)

超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来の酵素である Tk-SP は極めて耐熱性の高い酵素で、反応至適温度は 100℃、100℃における半減期は 100 分である。また、Tk-SP は SDS、尿素、Triton-X100 などの変性剤や界面活性剤に対しても極めて高い耐性を示す。一般に酵素は高温で変性し失活してしまうことから、このような熱変性や化学変性に対して高い安定性を示す酵素は産業的に非常に有用であると考えられる。しかし、酵素活性が強いため、Tk-SP が発現宿主に対して毒性を示すことから、大腸菌等を用いた異種発現系の構築が困難であった。

本研究では、高温でセルフスプライシングすることができる *Thermococcus kodakarensis* Tk1620 由来 intein Tko CDC21-1 を、Tk-SP に挿入することで一時的に不活性化し、大腸菌体内で大量発現させた後、セルフスプライシングによって活性化することを試みた。Tk-SP の前駆体(Pro-Tk-SP)のアミノ酸配列、立体構造を確認し、立体構造形成コア領域、活性中心付近など 3 箇所に intein を挿入した融合タンパク質（T257intein, S261intein, S359intein）を作成した。いずれも WT に比べて毒性が低く形質転換体の取得は可能であったが、十分な発現が確認できたのは S359 intein のみであった。S359 intein は不溶性に 90%、可溶性に 10%発現していることが確認できた。不溶性画分を 8M Urea で可溶化したのち、90℃30 分の熱処理を行うと、セルフスプライシングによる intein の脱離と Tk-SP の成熟化が同時に進行し、Tk-SP が活性化することが確認できた。しかし、熱処理時に Tk-SP が自己消化してしまうために、成熟化 Tk-SP の収率は 10%以下にとどまっており、改善の余地がある。本発表では、intein 融合 Tk-SP と活性中心を改変した変異 Tk-SPintein 融合タンパク質を用いて、intein のセルフスプライシング条件と Tk-SP の成熟化条件それぞれについて最適化した結果について発表を行う。

Tk-SP, intein, selfsplicing

発表番号：3D035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# カルパイン 3 欠損型およびプロテアーゼ活性欠失変異型マウスの比較プロテオミクスによる肢帯型筋ジストロフィー2A 型発症機序の解析

# Differential proteomic analysis of pathogenic mechanisms of limb-girdle muscular dystrophy type 2A using calpain-3 genetically modified mice

○大内 史子[1]、進藤 真由美[2]、伊藤 義城[1]、小野 弥子[1]、秦 勝志[1]、今西 美知子[2]、反町 洋之[1] ([1]都医学研・カルパインＰＪ、[2]都医学研・基盤技術研究センター)
○Fumiko Shinkai-OUCHI[1], Mayumi Shindo[2], Yoshiki Itoh[1], Yasuko Ono[1], Shoji Hata[1], Michiko Imanishi[2], Hiroyuki Sorimachi[1] ([1]Calpain PJ, Igakuken, [2]Center for Basic Technology Research, Igakuken)

カルパイン−3（CAPN3, p94）は骨格筋に多く発現する細胞内 Ca 依存的 Cys プロテアーゼであり、肢帯型筋ジストロフィー2A 型（LGMD2A）の原因遺伝子産物である。我々は CAPN3 のプロテアーゼ活性欠失型を発現するモデルマウス（CAPN3-CSKI）を用いて CAPN3 のプロテアーゼ活性不全が病態の原因であることを示してきた。一方で CAPN3 を欠失した CAPN3-KO マウスと CAPN3-CSKI を比較すると、握力の低下は CAPN3-KO でのみ認められるなど、表現型の違いも認めた。このことから CAPN3 のプロテアーゼ活性以外の活性(非酵素的機能)も病態に関連すると考えられるが、その実体はこれまでのところ明らかになっていない。そこで、本研究では CAPN3 の非酵素的機能に着目して、CAPN3-KO、-CSKI と野性型（WT）マウスの骨格筋の比較プロテオーム解析を行うことで、LGMD2A 病態に関連する分子メカニズムの解明を目指した。

5～7 週齢における体重は CAPN3-KO では WT、CAPN3-CSKI と比較して有意に小さく、前脛骨筋では中心核を持つ筋線維の頻度が CAPN3-KO > CAPN3-CSKI > WT の順に多い傾向が認められたことから、この時期の骨格筋を採材して試料とした。可溶性タンパク質画分を調製して iTRAQ$^{TM}$ 標識し LC-MS（Sciex 5600+）を用いて比較定量プロテオーム解析したところ、約 1400 種類のタンパク質を同定し、このうち 837 種について定量比較できた。WT と比較して CAPN3-KO、-CSKI で顕著な変動が認められたタンパク質のうち両者で変動の傾向の異なるものが 10 種類あり、骨格筋の収縮・弛緩に関与するタンパク質も含まれていた。エンリッチメント解析の結果、CAPN3-KO では Ca イオン結合、アクチン結合の機能を持つタンパク質が野性型と比較して減少していたが、CAPN3-CSKI ではその傾向は認められなかった。

以上より、KO は KI よりもミオパチー症状が重篤であり、CAPN3 のプロテアーゼ活性のみならず非酵素的機能によって、カルシウム結合タンパク質やアクチン・ミオシンフィラメントを調節することで骨格筋の運動制御に関与し、その不全が病態に関連していると考えられた。

calpain, muscular dystrophy, proteomics

発表番号：3D036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 冷水病に罹患したアユから単離された *Flavobacterium psychrophilum* 由来コラゲナーゼの大腸菌での発現

# Expression of collagenase from *Flavobacterium psychrophilum* isolated from cold-water disease-affected ayu (Plecoglossus altivelis)

○森 真璃子[1]、中山 仁志[2]、田中 啓友[3]、服部 俊治[3]、滝田 禎亮[1,4]、保川 清[1,4]（[1]京大農、[2]和歌山県水産試験場、[3]株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所、[4]京大院農）
○Mariko Mori[1], Hitoshi Nakayama[2], Keisuke Tanaka[3], Shunji Hattori[3], Teisuke Takita[1,4], Kiyoshi Yasukawa[1,4] ([1]Faculty of Agric., Kyoto Univ., [2]Department of Freshwater Fisheries, Wakayama Prefectural Fisheries Experimental Station, [3]Nippi Research Institute of Biomatrix, [4]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】*Flavobacterium psychrophilum* はアユ冷水病の原因菌である。近年、本菌が産生するコラゲナーゼがアユ冷水病の原因毒素であることが示唆された。[1)] 本コラゲナーゼは宿主細胞への毒性が強いために形質転換菌での発現量が少ないなどの問題があった。本研究では、本酵素の大腸菌での発現系において培養条件等を検討し、発現条件の最適化を試みた。

【方法】 1. 発現菌の構築：pUC18 にプロモーター配列を含む *F. psychrophilum* コラゲナーゼ遺伝子を挿入した発現プラスミドを構築し、大腸菌 JM109 に導入した。2. 培養：形質転換菌を LB 培地（+Amp+5 mM CaCl）に植菌し、10、19、28、37℃の各温度で 14 日間培養して経時的に培養液を採取した。3. 活性測定：FITC 標識コラーゲン（Ⅰ型とⅡ型）および合成基質 MOCAc-KPLGL(Dpa)AR を基質として、培養上清の酵素活性を測定した。また、培養上清をゼラチンザイモグラフィーに供した。

【結果と考察】1. 培養条件の検討：培養液の $OD_{600}$ は、10、19、28℃では 4-8 日目に 5-6 に達した後、ほぼ一定であった。一方、37℃では 5 日目に 4 に達した後、減少した。培養上清のコラゲナーゼ活性は、19℃で最も高く、37℃でのみ 6 日目以降減少した。合成基質に対する分解活性は、37℃でのみ 6 日目以降上昇した。ゼラチンザイモグラフィーでは、成熟前、成熟後および部分消化を受けたと思われる低分子化したコラゲナーゼのバンドが、10℃と 19℃では全期間で、28℃と 37℃では 1-5 日目にみられた。37℃でのみ、6 日目以降、部分消化を受けたと思われるコラゲナーゼのバンドが非常に濃く観察された。培養上清および菌体を SDS-PAGE に供したところ、10、19、28℃では全期間を通して複数のバンドが見られたが、37℃では 6 日目以降に大腸菌由来の夾雑タンパク質のバンドが消失した。以上のことから、本酵素は、37℃で何らかの修飾を受けることによりコラゲナーゼ活性が低下する一方、ゼラチナーゼ活性および広い基質特異性を示すプロテアーゼ活性が上昇することが示唆された。この基質特異性の変化は、本酵素の宿主細胞に対する毒性に関連する可能性がある。また、コラゲナーゼ活性を維持した状態で本酵素を調製するためには、培養を 19℃で行うのが最適であると考えられた。2. コラゲナーゼの部分精製：形質転換菌を 19℃で 6 日間培養して得られた培養液上清の 50%飽和硫安沈殿画分は、コラーゲンを分解したが合成基質を分解しなかった。一方、60-75%画分は、コラゲナーゼ活性が低く、合成基質を効率的に分解した。以上のことから、本酵素は、これまで報告された他の微生物に由来するコラゲナーゼと異なり、上記の合成基質を分解しないことが示された。

【文献】1. Nakayama, H. *et al.* (2015) *Biosci. Bioechnol. Biochem.* in press

collagenase, cold water disease, metalloprotease

発表責任者：保川　清（yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3D037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# D-アミノ酸アミド加水分解酵素の活性部位ポケットを形成する残基と副反応“ペプチド結合形成能”との相関

# Relationship between side-reaction "peptide bond formation activity" of D-stereospecific amidohydrolase and its residues composing the active site pocket

○宮谷 一紗、有馬 二朗（鳥取大農）
○Kazusa MIYATANI, Jiro ARIMA (Tottori Univ.)

【背景・目的】*Streptomyces sp.* 82F2 由来 D 体特異的アミド加水分解酵素（DAH）は、Ser ペプチダーゼに属しており、弱アルカリ性の条件下ではアミノリシス反応を触媒してペプチドを生成する。この反応は水存在下でも加水分解反応と拮抗して進行するため、生理活性ペプチドの生産ツールとしての利用が期待されている。一方で、DAH は D 体アミノ酸誘導体をアシル供与体として、L 体アミノ酸誘導体をアシル受容体として選択的に利用して D-,L-配列を有するペプチドを選択的に合成する。即ち、基質として認識するアミノ酸誘導体の種類の幅が限られており、ペプチドの生産ツールとしての利用にはさらなる改善が求められる。DAH の立体構造解析から見出された活性部位付近に存在するポケットは、基質認識に関わると推定されており、ポケットのスペースを拡大と、アシル受容体に対する特異性に大きな変化がもたらされた。即ち、ポケットの構造置換を行うことでアミノリシス活性の変化が期待される。本研究ではこのポケットを構成する残基の中でも、類似酵素と異なる部位に着目し、様々な構造置換によるアミノリシス活性への影響について評価した。
【方法・結果】MEROPS の分類上、ファミリーS12 に属する酵素のうち、DAH と類似構造を持つ D-amino acid amidase (DAA), D-Ala-D-Ala carboxypeptidase 等と立体構造を比較し、類似酵素で基質認識に関わると推定される残基に対応する DAH の残基の変異酵素を作成した。これらの変異酵素で、D-Phe-OMe をアシル供与体、L-Phe-OMe をアシル受容体として酵素反応を行った結果、Thr145 の Asp, Glu 変異体では加水分解活性が向上する可能性が示唆された。立体構造上、DAH の Thr145 は DAA の Glu114 と対応し、Glu114 の側鎖は基質のアミノ基と水素結合を形成する。現在、Thr145 変異体を含めた変異体を対象として、ポケットの構造変化と加水分解活性・アミノリシス活性の相関について解析中である。

D-amino acid, peptide bond formation, serine peptidase

発表番号：3D038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 乳酸菌の分岐側鎖 D-2- ヒドロキシ酸脱水素酵素ホモログの機能と構造

# Functions and structures of branched D-2-hydroxyacid dehydrogenase homologs in lactic bacteria

○田口 速男[1]、森田 一弘[1]、古川 那由太[2]、三宅 真太郎[1]、内田 好美[1]、高橋 葉[1]、藤澤 伸介[1]、荒井 一人[1]、宮永 顕正[3]、中島 将博[1]([1]東京理大理工、[2]新潟薬大応生科、[3]東工大院理工)
○Hayao Taguchi[1], Kazuhiro Morita[1], Nayuta Furukawa[2], Shintaro Miyake[1], Konomi Uchida[1], Yoh Takahashi[1], Shinsuke Fujisawa[1], Kazuhito Arai[1], Akimasa Miyanaga[3], Masahiro Nakajima[1] ([1]Tokyo Univ. of Science, [2]NUPALS, [3]Tokyo Inst. of Tech.)

乳酸菌には、NAD を補酵素として 2-ケト酸と D-2-ヒドロキシ酸間の酸化還元反応を触媒する脱水素酵素群(D-HydDH)が広く分布している。D-乳酸脱水素酵素 (D-LDH) はその代表的な酵素であり、D-HydDH の多くは、D-LDH の構造類縁酵素である。私たちは *Enterococcus faecalis* (faecium)IAM10071(=JCM20313)株のもつ、ベンゾイルギ酸と D-マンデル酸間の反応を触媒する D-マンデル酸脱水素酵素-A (EfManDH-A) の機能と構造を解析し、この酵素が D-LDH の構造類縁酵素ではなく、2-ケトパント酸還元酵素(KPR)の構造類縁酵素であることを明らかにした。EfManDH-A は NAD を補酵素とし、大きな疎水性側鎖をもつ 2-ケト酸に幅広く作用する。すなわち、EfManDH-A は、NADP と親水性側鎖の基質を好む KPR とは、補酵素特異性と基質特異性のいずれにおいても大きく異なっていることから、この新規な D-HydDH ファミリーが、D-LDH のファミリーと同様に、多様な触媒特性の酵素群を包含するものであることが示唆される。本研究では、EfManDH-A のホモログが乳酸菌に広く分布することに注目し、*E. faecium* IAM10071 株のもう 1 つのホモログ (EfManDH-B)、*E. faecalis* V583 株の 2 つのホモログ (EfManDH-a、EfManDH-b)、および *Tetragenococcus halophilus* の 2 つのホモログ (ThManDH-A、ThManDH-B) の機能解析を行った。さらに、EfManDH-A、EfManDH-B、ThManDH-A については、X 線結晶解析より立体構造を決定した。

いずれの EfManDH ホモログも EfManDH-A と同様に NAD に厳密な補酵素特異性を示した。EfManDH-B、EfManDH-a、b、および ThManDH-B は、特に 2-ケトイソカプロン酸、2-ケトイソ吉草酸、ベンゾイルギ酸などに高活性を示し、EfManDH-A と類似した基質特異性を示したが、それぞれの基質に対する $K_m$ 値などの反応パラメータには互いに顕著な相違がみとめられた。一方、ThManDH-A はフェニルピルビン酸に対して高活性を示し、他のホモログと顕著に異なる基質特異性を示した。EfManDH-A においては、アポ型構造および NADH との 2 者複合体構造を既に決定、報告しているが(1)、今回、さらに NADH と基質類似体との 3 者複合体構造、および EfManDH-B のアポ型構造と 2 者複合体構造、ThManDH-A のアポ型構造を決定した。以上の構造解析から、これらの酵素の補酵素、基質認識に関わる構造的要因が示唆された。

(1) 宮永ら、*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439, 109-114 (2013)

Dehydrogenase, Mandelate, Lactic bacteria

発表責任者：田口　速男（htaguchi@rs.noda.tus.ac.jp）

発表番号：3D039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 好熱性アーキア由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素を用いた D-乳酸バイオセンサの開発

# Development of D-lactate biosensor using dye-linked D-lactate dehydrogenase from thermophilic archaea.

○里村 武範[1,2]、大柳 佑太[1]、布浦 拓郎[5]、高木 善弘[5]、高見 英人[5]、高井 研[5]、櫻庭 春彦[3]、大島 敏久[4]、末 信一朗[1,2] ([1]福井大院工、[2]福井大生命セ、[3]香川大農、[4]大阪工大工、[5]海洋研究開発機構)

○Takenori SATOMURA[1,2], Yuta OYANAGI[1], Takuro NUNOURA[5], Yoshihiro TAKAKI[5], Hideto TAKAMI[5], Ken TAKAI[5], Haruhiko SAKURABA[3], Toshihisa OHSHIMA[4], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Fac. Agric., Kagawa Univ., [4]Osaka. Inst. Technol, [5]JAMSTEC)

［背景・目的］

D-乳酸は、急性虫垂炎や糖尿病性ケトアシドーシス、腸管虚血など種々の疾病の診断用マーカーとして期待されている。また、食品中、特にワインやビールのような発酵食品中に多く含まれており、これら食品の品質管理用のマーカーとしても期待されている。これまで、D-乳酸の定量分析には主に高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いた定量法が行われており、高感度に D-乳酸を分析することが可能である。しかしながら、HPLC を利用した D-乳酸の定量方法は高コストかつ分析条件の設定など熟練の技術を要するなど簡便な D-乳酸分析が困難である。そこで、安価かつ簡便に測定することが可能な D-乳酸バイオセンサが注目されている。そこで D-乳酸バイオセンサ用素子として好熱菌由来色素依存性 D-乳酸脱水素酵素（Dye-DLDH）のスクリーニングを行った。その結果、未培養好熱性アーキア *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* ゲノム情報より Dye-DLDH（Cs-DLDH）をコードする遺伝子を見出した。本研究では、Cs-DLDH を大腸菌による組換えタンパク質用いて作製し、バイオセンサとしての機能評価を行った。

［方法・結果］

Cs-DLDH をコードする遺伝子を大腸菌によるタンパク質発現用ベクターpColdI に導入し、大腸菌内で組換えタンパクの発現を行った。大腸菌によって生産された組換えタンパク質をニッケルカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーによって電気泳動的に単一に精製した。精製した Cs-DLDH の酵素化学的性質の解析を行ったところ、70℃、10 分間の熱処理行を行っても失活せず高い安定性を示し、バイオセンサ用素子として有用性が高いことが明らかとなった。

そこで、本酵素をグラッシーカーボン電極上にカーボンナノチューブ(CNT)とナフィオンを混合した溶液で固定化した Dye-DLDH/CNT/ナフィオン電極の作成を行った。本電極を用いて D-乳酸センサの機能評価を行った。その結果、作製した固定化電極は 1 ヶ月以上、使用することが可能であり、高い安定性を示した。また、150 uM から 3 mM までの濃度範囲で D-乳酸を測定することに成功した。

D-lactate dehydrogenase, Thermophile, Biosensor

発表責任者：里村武範（satomura@u-fukui.ac.jp）

発表番号：3D040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Lactobacillus plantarum*(*pentosus*)由来 L 型乳酸脱水素酵素へのアロステリック特性の導入
Introduction of allosteric properties in L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus plantarum*(*pentosus*)

○久保 志歩[1]、荒井 一人[1]、古川 那由多[2]、斉藤 祐介[1]、中島 将博[1]、田口 速男[1] ([1]東理大院、[2]新潟薬科大)
○ Shiho KUBO[1], Kazuhito ARAI[1], Nayuta FURUKAWA[2], Yuusuke SAITOU[1], Masahiro NAKAJIMA[1], Hayao TAGUCHI[1] ([1]Tokyo University of Science, [2]NUPALS)

L 型乳酸脱水素酵素(L-LDH)は、補酵素 NAD(H)を用いてピルビン酸と L 型乳酸との間の酸化還元反応を触媒する。L-LDH は同一サブユニットで構成されるホモ四量体構造をとり、P,Q,R の 2 回回転対称軸をもつ。*Lactobacillus casei* 由来の L-LDH(LcLDH)はフルクトース 1,6-ビスリン酸(FBP)によって活性化されるアロステリック酵素であり、FBP 非存在下ではシグモイド型の基質飽和曲線を示すが、FBP 存在下では双曲線型の基質飽和曲線を示す。立体構造解析から、LcLDH のアロステリック転移は、基質親和性の高い R 状態と基質親和性の低い T 状態の２つをとる協奏 (MWC) モデルに従うことが明らかになっている。一方、同じ *Lactobacillus* 属乳酸菌である *L. pentosus* と、その近縁種でほとんど同一のアミノ酸配列の LDH をもつ *L. plantarum* 由来の LDH(LpLDH1)は、恒常的に高活性を示す非アロステリック型の LDH である。LpLDH では、Glu67 と Asp68 残基が Q 軸に隣接するサブユニットの Arg171,Lys178,Lys235 残基と塩橋ネットワークを形成し、これが R 状態の構造を安定化していると考えられる。LcLDH では LpLDH1 のような Q 軸間の塩橋ネットワークが存在しないために、柔軟な構造変化が可能と考えられる。実際に、アミノ酸置換によって LcLDH に LpLDH1 様の塩橋ネットワークを導入すると、酵素の FBP 非依存的な活性は大きく増大し、R 状態が大きく安定化される。本研究では、LpLDH1 の Asp68 と Lys178 に置換を導入して塩橋ネットワークの一部を破壊し、これによって、LpLDH1 にアロステリック特性が生じるかどうかを検討した。

Asp68 を置換した D68N および D68H 変異型酵素は、野生型酵素と異なり、シグモイド型の基質飽和曲線を示した。すなわち、Asp68 の置換によって LpLDH1 に基質によるホモトロピックな活性化効果が生じたと考えられる。一方、Lys178 を置換した K178Q 変異型酵素は、野生型酵素と同様に、双曲線型の基質飽和曲線を示し、基質 $K_m$ や $V_{max}$ の値にも大きな変化はみられなかった。Q 軸塩橋ネットワークでは、Asp68 が隣接サブユニットの Arg171 と Lys235 の２残基と強力な塩橋を形成しているのに対して、Lys178 は Glu67 の１残基のみとしか塩橋を形成していない。このため、Asp68 の置換と比較して、Lys178 の置換では、塩橋ネットワークの破壊が不十分で、R 状態を十分に不安定化するに至らなかったものと考えられる。

*L. pentosus* および *L. plantarum* は、LPLDH1 以外に、もう一つ L-LDH ホモログをもつ(LpLDH2)。LpLDH2 のアミノ酸配列では Lys178 が Gln に置換されている。この LpLDH2 の機能解析も現在行っており、その結果もあわせて報告する。

L-lactate dehydrogenase, allosteric, *Lactobacillus plantarum*

発表番号：3D041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が産生する第 2 のアルコール脱水素酵素の精製と性質解明
Purification and characterization of the second alcohol dehydrogenase from *Ogataea polymorpha* NBRC 0799

○七田 沙耶香[1,2]、上田 量子[1,2]、松井 大亮[1,2]、礒部 公安[1,2]、三木 慎介[3]、西井 哲郎[3]、石井 章央[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大生工科・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3]セントラル硝子)
○Sayaka SHICHIDA[1,2], Ryoko UEDA[1,2], Daisuke MATSUI[1,2], Kimiyasu ISOBE[1,2], Shinsuke MIKI[3], Tetsuro NISHII[3], Akihiro ISHII[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST, [3]Central Glass Co., Ltd.)

【目的】光学活性なトリフルオロメチルアルコール類は、医薬品や農薬などの合成原料として有用であり、その簡便な合成方法の開発が望まれている。当研究室では、*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が 1,1,1-トリフルオロアセトンを(*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールに還元することを見出しており、昨年度の本大会で、この反応を触媒する酵素の１つ（アルコール脱水素酵素、OpADH-1）を精製して、諸性質を報告した(1)。今回は、同一菌株から同じ反応を触媒する第 2 の酵素（OpADH-2）を精製し、性質を明らかにした。
【方法】*O. polymorpha* NBRC 0799 は YM 培地（1.0%グルコース、0.5%ペプトン、0.3%酵母エキス、0.3%、麦芽エキス、0.3%リン酸二水素カリウム、0.2%リン酸水素二カリウム）を用いて 30℃で 24 時間培養した。次に、得られた菌体 230 g をガラスビーズで破砕して粗酵素液を調製した。酵素は粗酵素液の 30%飽和硫安上清画分から、Phenyl-TOYOPEARL および Q Sepharose のカラムクロマトグラフィーを組み合わせて高度に精製した。酵素活性は 1,1,1-トリフルオロアセトンを基質として、30℃、pH 6.0 で反応して、NADH の減少速度を 340 nm で測定した。酵素 1 U は、1 分間に 1 μmol の NADH の減少を触媒する酵素量と定義した。
【結果】昨年度報告した酵素（OpADH-1）と新たに精製した酵素（OpADH-2）は、Phenyl-TOYOPEARL カラムクロマトグラフィーのグラジエント溶出で分離し、OpADH-2 をさらに Q Sepharose カラムクロマトグラフィーなどで精製した。精製 OpADH-2 の比活性は 0.81 U/mg、分子質量は SDS-PAGE で 38 kDa で、OpADH-1 の 44 kDa と比べ小さかった。本酵素は OpADH-1 と同様に、1,1,1-トリフルオロアセトンを(*S*)-1,1,1-トリフルオロ-2-プロパノールに還元し、R 体は生成しなかった。本酵素の内部アミノ酸配列を用いて遺伝子をクローニングし、アミノ酸配列の BLAST 検索を行った。OpADH-2 は *O. parapolymorpha* DL-1 由来のアルコール脱水素酵素と高い相同性を示し、スレオニン脱水素酵素/Zn 依存脱水素酵素様タンパク質と相同性の高かった OpADH-1 とは異なる酵素であった。2 つの配列を比較したところ、同一アミノ酸残基は 22%であった。また、その他の性質についても報告する。

1) 上田量子他：*Ogataea polymorpha* NBRC 0799 が産生するアルコール脱水素酵素の精製と性質解明. 日本農芸化学会 2015 年度大会

Alcohol dehydrogenase, Ogataea polymorpha, 1,1,1-Trifluoro acetone

発表番号：3D042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ギ酸オキシダーゼの亜硝酸を電子受容体とする酸化半反応

# Oxidative half-reaction of formate oxidase using nitrite as an electron acceptor

○田邊 直人[1]、道林 泰樹[1]、中垣 康平[1]、沖 昌也[1]、三上 文三[2]、内田 博之[1] ([1]福大院・工、[2]京大院・農)
○Naoto Tanabe[1], Daijyu Doubayashi[1], Kohei Nakagaki[1], Masaya Oki[1], Bunzo Mikami[2], Hiroyuki Uchida[1] ([1]Fukui Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】ギ酸オキシダーゼ (FOD) は、ギ酸を二酸化炭素に酸化し、酸素を電子受容体として過酸化水素を産生する酵素で、*Aspergillus* sp.や *Debaryomyces* sp.で確認されている。 FOD は GMC オキシドレダクターゼファミリーに属するが、8-formylFAD をコファクターとする。酸化型 FOD は、ジチオナイト処理すると、セミキノン型に変化し、このセミキノン型は酸素存在下でも安定に存在する。また、ジチオナイトにより生成するセミキノン型 FOD は、反応速度は遅いが亜硝酸により、酸化型酵素に変換される。本研究では、FOD の酸化半反応を解明する目的で、FOD の亜硝酸との反応について検討した。

【方法】大腸菌で生産した *Aspergillus oryzae* 由来 FOD を用いた。酸化型 FOD と亜硝酸を反応させ、可視吸収スペクトルを測定した。嫌気的条件下 FOD をギ酸と反応させて還元型 FOD を作成した後、亜硝酸を反応させ可視吸収スペクトル変化を観察した。酸化型 FOD を亜硝酸存在下で結晶化し、作成した単結晶を用いて X 線結晶解析を行った。

【結果と考察】酸化型 FOD を亜硝酸と反応させるとスペクトル変化が起こった。X 線結晶解析により、亜硝酸存在下で結晶化した FOD の立体構造を構築した。亜硝酸非存在下、存在下で結晶化した FOD の活性部位構造の比較により、非存在下で結晶化した FOD の 8-formylFAD の C4a、N5 近傍には一分子の水が存在するが、存在下で結晶化した FOD では同位置に水よりも大きい物質が存在していることが示唆された。これらの結果は、酸化型 FOD は、亜硝酸と複合体を形成し、その複合体中で亜硝酸は 8-formylFAD の C4a、N5 近傍に存在することを示唆している。

還元型 FOD を亜硝酸と反応させるとスペクトル変化が起こった。このスペクトル変化は、還元型 FOD は亜硝酸によりセミキノン型に変換され、その後ゆっくりと酸化型に変換されることを示した。

以上の結果より、亜硝酸を電子受容体とする FOD の酸化半反応では、FOD 還元型の 8-formylFAD の C4a、N5 近傍に亜硝酸が取り込まれ、一電子移動が起こり一酸化窒素とセミキノン型が生成し、次にセミキノン型の 8-formylFAD の C4a、N5 近傍に亜硝酸が取り込まれ、一電子移動が起こり一酸化窒素と酸化型が生成すると考えている。現在、FOD セミキノン型の立体構造の解明を進めている。

formate oxidase, nitrite, oxidative half-reaction

発表責任者：内田博之（uchida@u-fukui.ac.jp）

発表番号：3D043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 超好熱アーキア由来アルコール脱水素酵素の熱活性化による酵素活性及び構造の経時変化の解明

# Elucidation of the time-resolved structural and enzymatic activity changes in heat activation of alcohol dehydrogenase from a hyperthermophilic archaeon

○郷田 秀一郎、梶山 晃成、永野 結花、内田 拓郎、海野 英昭、畠山 智充（長崎大工）
○Shuichiro GODA, Kosei KAJIYAMA, Yuka NAGANO, Takuro UCHIDA, Hideaki UNNO, Tomomitsu HATAKEYAMA (Nagasaki Univ.)

超好熱アーキア *Sulfolobus tokodaii* 由来アルコール脱水素(StADH)は、大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL を宿主に用いて生産されると活性が低い状態で得られ、加熱によって活性が上昇する。このようにリコンビナントタンパク質として大腸菌を宿主に用いて生産されると活性が低い状態で得られる超好熱菌/好熱菌由来酵素としては、グルタミン酸脱水素酵素(GDH)が良く知られている。これまで不活性型として生産される GDH の研究から、活性化に伴って四次構造が変化するもの、四次構造は変わらないが、そのアレンジメントが変化することが報告されている。しかしながら、加熱後の酵素の立体構造は報告されているが、不活性型の構造は報告例がなく、不活性型として生産された構造は不明である。そこで本研究では StADH の加熱による酵素活性及び立体構造の変化の解明を目的とした。

StADH の酵素活性測定は、基質に ethanol、補酵素に NAD を用いて行ったところ、比活性は加熱することによって約 5 倍上昇した。また、ミカエリス定数（*Km*）を算出すると、基質に対する *K*m 値に大きな違いは見られなかったものの、補酵素に対する *K*m 値は加熱によって減少が見られ、補酵素と酵素の親和性が高くなると考えられた。

大腸菌で生産された低活性 StADH を 90℃で加熱し、構造及び酵素活性の経時変化を測定した。構造の変化は X 線小角散乱測定で行い、その結果、分子の回転半径であるギニエ半径は 15 秒加熱することによって活性型ほどのサイズに変化したが、酵素活性は 45 秒ほど加熱することによって最大値を示した。このことから StADH の熱活性化は、分子全体の構造が変化した後で、微細な構造変化が起こることによって完全な酵素活性を示すと考えられた。また、低活性型と活性型の構造の違いを調べるために 8-anilino-1-naphthalene sulfonate(ANS)存在下での蛍光スペクトルと円偏光二色性スペクトル測定を行った。分子表面に露出する疎水性残基の度合いで ANS 存在下での蛍光スペクトルは変化するが、活性型、低活性型では違いが見られず、疎水性残基の露出は見られなかった。円偏光二色性は遠紫外部でスペクトルの変化が見られ、活性化によって二次構造が変化することが示された。非加熱状態の StADH の原子レベルでの構造解析を目指して結晶化を行い、いくつかの条件で結晶化に成功した。

Alcohol dehydrogenase, Heat activation, Sulfolobus tokodaii

発表責任者：郷田秀一郎（sgoda@nagasaki-u.ac.jp）

発表番号：3D044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# マルチ銅オキシダーゼのタイプ I 銅酸化還元電位の精密制御による酵素活性制御

# The activity control of the multi-copper oxidase by the precise control of the redox potential of the type I copper site

○片岡 邦重、松田 奈々、櫻井 武（金沢大理工）
○Kunishige KATAOKA, Nana MATSUDA, Takaeshi SAKURAI (Kanazawa Univ.)

【序論】大腸菌のペリプラズムに存在する一価銅酸化酵素 CueO は，一価銅イオン($Cu^{+}$)を二価銅イオン($Cu^{2+}$)へ酸化・解毒するマルチ銅オキシダーゼ(MCO)の一種で，基質からの電子受容部位であるタイプ I 銅(T1Cu)と，その電子を用いて酸素を 4 電子還元する反応部位である三核銅中心を持つ。T1Cu 部位近傍には基質 $Cu^{+}$の結合部位(rCu)があり，rCu 部位に $Cu^{2+}$が結合すると基質から T1Cu への電子移動を仲介するため活性が増大する。これまでに我々は，T1Cu の酸化還元電位が MCO の酵素活性に及ぼす影響を検討し，MCO の酵素活性が主として基質から T1Cu への電子移動に支配され，T1Cu の酸化還元電位に依存することを明らかにしてきた。また，rCu 配位子の Asp439 を Ala に置換し，T1Cu 配位子 His443 との間の水素結合を切断した変異体(D439A)では，T1Cu 電位が 30 mV 正電位シフトするとともに酵素活性が大きく増大することを明らかにした。銅中心の電位は極性が低い環境にあるほど正側にシフトすると期待されることから，本研究では，Asp439 を Val，Phe，Trp に置換した変異体を作製し，水素結合の切断に加え，T1Cu 周辺の疎水的環境の増大が酵素活性に与える影響を検討した。
【結果と考察】3 種の変異体 D439V/F/W は，それぞれタンパク質当り約 4 個の銅を含み，UV-Vis 及び EPR スペクトルが野生型酵素と一致することから，変異導入による銅活性中心構造の大きな変化はないと考えられる。サイクリックボルタンメトリーにより変異体の T1Cu 電位を測定したところ，Val，Phe，Trp 変異体はそれぞれ野生型酵素より 40，50，70 mV 程度正電位シフトしており，Ala 変異体より大きな T1Cu 電位のシフトが観察された。したがって，T1Cu 配位残基への水素結合切断と疎水性アミノ酸残基導入による T1Cu 部位の極性制御により，T1Cu の酸化還元電位を精密に制御できることが明らかになった。さらに変異型酵素の有機基質に対する反応性は T1Cu の正電位シフトの傾向とほぼ一致した。すなわち，かさ高い疎水性側鎖のアミノ酸残基置換体ほど反応性が増大する傾向が見られ，Trp 変異体の ABTS 酸化活性では野生型酵素の 30 倍以上の活性を示した。一方，rCu 配位子を置換したにもかかわらず，各変異体の $Cu^{2+}$に対する親和性は野生型酵素と比べ大きく変化せず，$Cu^{2+}$の存在下では ABTS，2,6-DMP，*o*-PD，ADPA に対する酸化活性は増大しなかった。これらの結果は，439 位のアミノ酸残基が rCu 部位に結合した $Cu^{2+}$を介する電子移動に影響を及ぼすためと考えられる。

multicopper oxidase, laccase, CueO

発表責任者：片岡邦重（kataoka@se.kanazawa-u.ac.jp）

発表番号：3D045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 麹菌由来の D-乳酸脱水素酵素（D-LDH）のホモ 6 量体形成と乳酸生産最適条件の検討

# Homohexamer formation of and the optimal condition of D-lactate production by D-lactate dehydrogenase (D-LDH) from *Aspergillus oryzae*

○渡部 昭、佐藤 陽子、五味 勝也（東北大院・農・生物産業創成）
○Akira WATANABE, Yoko SATOU, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

【目的】 乳酸を原料とした生分解性プラスチックの一つであるポリ乳酸(PLA)は、成型性が高く、生分解性プラスチックの中で唯一透明であるという特性を持っているが、高価であることが普及の障害となっており、PLA の原料である乳酸を安価に生産する製造方法の確立が求められている。我々は、効率的な乳酸生産を目指し、麹菌ゲノム解析情報を利用して *Aspergillus oryzae* から乳酸脱水素酵素(LDH)遺伝子を探索し大腸菌で高発現させ、その基本的な酵素学的諸性質を報告した(1、2)。今回は、さらに詳細に本酵素の諸性質を調べたので報告する。

【結果と考察】 シアノバクテリア *Nostoc* D-LDH 配列とアミノ酸レベルで 51%の相同性のある遺伝子配列を麹菌ゲノム解析情報を利用して *A. oryzae* のゲノムから見出し、大腸菌 BL21(DE3)株で高発現させた。Co カラムに供して精製した発現タンパク質は、SDS-PAGE で 40 kDa 付近に単一バンドとして検出された。一方、Blue Native PAGE による解析では本酵素は約 242 kDa 付近に単一バンドとして検出され、本酵素はホモ 6 量体であると推定された。現在まで報告のある D-LDH のうち多量体を形成している酵素は全てホモ 2 量体か 4 量体であり、ホモ 6 量体である酵素の報告はこれまでないことから、さらにゲルろ過法を用いて解析した結果も合わせて報告する。また、本酵素のピルビン酸を還元し乳酸を生成する方向の反応の至適条件下(50℃、pH 7)での比活性は、ピルビン酸を還元し乳酸を生成する反応では 605.2(U/mg)で逆反応では 1.9(U/mg)であったことから、この条件下では本酵素の触媒反応はピルビン酸から乳酸を生成する方向に大きく傾いているものと考えられた。この結果は乳酸生成に適した特性と考えられるが、乳酸菌由来の多くの D-LDH がピルビン酸から乳酸を生成する方向とその逆方向の反応で至適温度、至適 pH が異なることが報告されていることから、乳酸生産に適した条件設定のためにも本酵素でもこの点を解析した結果を報告する。さらに、本酵素のピルビン酸や乳酸等に対する $K_m$、$k_{cat}$ 値等の反応速度パラメーターについても合わせて報告する。

(1) 渡部ほか、2007 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、p179
(2) 渡部ほか、2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集、p99

*Aspergillus oryzae*, D-lactate dehydrogenase, D-lactate

発表番号：3D046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 深海微生物 Novosphingobium sp. MBES04 株のリグニン代謝関連酵素の解析

# Characterisation of Lignin Metabolizing Enzymes from *Novosphingobium* sp. MBES04

○弓田 涼[1]、桐ケ谷 綾菜[1]、細谷 美菜子[1]、大田 ゆかり[2]、黒澤 佳奈子[2]、嶋根 康弘[2]、林 昌宏[3]、殿塚 隆史[3]、秦田 勇二[1,2] ([1]横浜市立大学、[2]日本海洋研究開発機構、[3]東京農工大学)
○Ryo YUMITA[1], Ayana KIRIGAYA[1], Minako HOSOYA[1], Yukari OHTA[2], Kanako KUROSAWA[2], Yasuhiro SHIMANE[2], Masahiro HAYASHI[3], Takashi TONODUKA[3], Yuzi HATADA[1,2] ([1]Yokohama City University, [2]JAMSTEC, [3]Tokyo University of Agriculture and Technology)

〈目的〉 持続可能な炭素循環型社会への変換が求められており、その中で注目されているのが未利用バイオマスである。具体例としては、農作物非食部位や林地残材などの食料と競合しない非可食バイオマスがあげられ、これらの主要成分の一つであるリグニンの有効利用は急務の課題と言える。我々はこれまでに、深海沈木から、リグニン 2 量体モデル分子の一種であるグアヤシルグリセロール β-グアヤシルエーテル（GGGE）中の β-O-4 結合を還元的に開裂する *Novosphingobium* 属細菌、MBES04 株を単離し、本菌株が、GGGE を出発原料としてグアヤシルヒドロキシプロパノン（GHP）を高効率で生産することを明らかにし、その反応に必要な遺伝子群を特定した。本菌株による β-*O*-4 結合の特異的開裂は、1. 酸化還元酵素(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) による Cα 位アルコールの酸化、2. glutathione-S-transferase (GST)群に属する β-etherase による β-*O*-4 結合開裂とグルタチオン(GS)付加体の生成、3. GST に属する β-glutathione thioetherase (glutathione lyase) による GS 付加体からの GS 脱離反応の 3 段階によって進行する。その中でこの度は、β-*O*-4 結合開裂とグルタチオン付加体の生成反応を触媒する酵素である GST4、およびグルタチオン付加体から GS 脱離反応を触媒する GST3 について進めた研究成果に関して発表する。
〈方法と結果〉 大腸菌を宿主として GST3 及び GST4 の組換え酵素を大量生産した。続いて金属イオンアフィニティークロマトグラフィーを用いて、これらの酵素を精製した。SDS-PAGE 解析の結果それぞれ約 27 kDa 及び 35 kDa の大きさである事を確認した。これらの酵素の触媒機構を明らかにすることを目的として酵素の構造解析を進めることとした。酵素の結晶化に取り組んだ結果、GST3 は 0.1 M Citric Acid、3% PEG6000、pH 5.0 の条件で酵素結晶を得る事ができた。本報告では、作成した結晶の X 線構造解析から得られたタンパク質立体構造について報告する。
一方、アミノ酸配列の相同性解析から GST3 は、GST サブファミリーの 1 つである Ure2P like GST に属すると推定される。Ure2P GST に分類される他のタンパク質とのアミノ酸配列アライメントを基に、触媒活性に重要な役割を持つと推測される 9 番目トレオニンを部位特異的変異によりアラニンあるいはセリンに、11 番目アスパラギンをアラニンあるいはアスパラギン酸に変異させた変異体 4 種を構築した。それらの酵素活性を測定したところ 11 番目アスパラギンをアラニン変異させた GST3 変異体（Asn11Ala）の活性が著しく低下している事が判明した。

Lignin, GST, Enzyme

発表番号：3D047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

好塩性古細菌およびシアノバクテリアに保存された新規ビオチン生合成酵素の機能解析
Functional analysis of novel biotin biosynthetic enzyme conserved in holophilic archaea and cyanobacteria

○大石 恵太[1]、清水 哲[1]、小林 一幾[2]、富田 武郎[1]、田中 寛[2]、葛山 智久[1]、西山 真[1]([1]東大生物工学セ、[2]東京工業大学　資源化学研究所)
○ Keita OISHI[1], Tetsu SHIMIZU[1], Ikki KOBAYASHI[2], Takeo TOMITA[1], Kan TANAKA[2], Tomohisa KUZUYAMA[1], Makoto NISHIYAMA[1] ([1]BRC, The Univ. of Tokyo, [2]Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology)

ビオチンは水溶性のビタミンであり、ビタミン $B_7$ とも呼ばれる。生体内においてカルボキシラーゼの補酵素として機能し、全ての生物の生育に必須である。ビオチンの生合成経路は、出発物質が異なる 3 種類が知られているが、経路の最終工程は共通の酵素群 (BioF、BioA、BioD、BioB) が反応を触媒し、ビオチンを生合成する。多くのバクテリアや古細菌では、この酵素群をコードしている遺伝子がクラスターを形成している。

しかし、好塩性古細菌のビオチン生合成遺伝子クラスターの中には、*bioF*、*bioD*、*bioB* は含まれるものの *bioA* が存在せず、代わりに機能未知タンパク質をコードする遺伝子が含まれている。Blast 検索の結果、この機能未知タンパク質のホモログ遺伝子は類似した好塩性古細菌ゲノムに加えて、一部のシアノバクテリアにも見出された。さらに、この機能未知遺伝子を含むシアノバクテリアにおいては、*bioA* が存在しなかった。BioA はビオチン生合成の後半における、7-keto-8-aminopelargomic acid (KAPA) から 7,8-diaminopelargonic acid (DAPA) への変換反応を触媒する酵素である。そのため、この機能未知タンパク質が BioA の代わりに機能し､KAPA から DAPA の反応を触媒していると推測した。このことを確かめるために、まず大腸菌の *bioA* 破壊株に対して、*in vivo* での相補実験を行った。相補実験の結果、*bioA* 破壊株は最少培地においてビオチン要求性を示すのに対して、好塩性古細菌またはシアノバクテリア由来の機能未知タンパク質を発現させた *bioA* 破壊株は、生育が野生型と同程度まで回復した。この結果は、機能未知タンパク質が大腸菌内で BioA の代わりとして機能し、ビオチンの生合成に関与していることを示唆している。現在、この機能未知タンパク質の *in vitro* での機能解析を行っている。

BioA は、PLP 依存的なアミノトランスフェラーゼであり、SAM またはリジンをアミノ基供与体として KAPA にアミノ基を転移し、DAPA の合成を行う。BioA と機能未知タンパク質の間にアミノ酸配列の相同は見られず、BioA には PLP 結合モチーフもなかった。これらの結果から、このタンパク質は BioA とは異なった様式で KAPA から DAPA への変換反応を触媒していると考えられる。また、この機能未知タンパク質と高い相同性を有する既知タンパク質は存在しないことから、ユニークな立体構造を有する可能性がある。我々はこの機能未知タンパク質の結晶構造の解明を目指し、結晶化スクリーニングを進めている。

biotin, halophilic archaea, cyanobacteria

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3D048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酵母由来デカプレニル二リン酸合成酵素の解析
# Characterization of decaprenyl diphosphate synthases from yeasts

○森山 大輔[1,2]、戒能 智宏[2]、矢島 麗嘉[1]、柳井 良太[2]、池中 康裕[1]、長谷川 淳三[1]、鷲田 元久[1]、難波 弘憲[1]、川向 誠[2]（[1]株式会社カネカ、[2]島根大・生物資源・生命工）
○Daisuke MORIYAMA[1,2], Tomohiro KAINO[2], Kazuyoshi YAJIMA[1], Ryota YANAI[2], Yasuhiro IKENAKA[1], Junzo HASEGAWA[1], Motohisa WASHIDA[1], Hirokazu NANBA[1], Makoto KAWAMUKAI[2] ([1]Kaneka Corp., [2]Fac Life Environ Sci, Shimane Univ.)

【目的】コエンザイム Q（CoQ）はユビキノンとも称される脂溶性化合物であり、生体内における電子伝達系の構成成分としてエネルギー産生に重要な役割を果たしていると共に、ヒトが生合成可能な脂溶性抗酸化物質として細胞の酸化ストレス低減にも寄与している。CoQ はイソプレノイド側鎖とキノン骨格から構成されており、イソプレノイド側鎖の長さは生物種によって異なり、出芽酵母では $CoQ_6$、大腸菌では $CoQ_8$、分裂酵母やヒトでは $CoQ_{10}$ を生合成している。この側鎖の長さは、生物が持つ長鎖ポリプレニル二リン酸合成酵素（PDS）に依存しており、ホモ型（大腸菌や出芽酵母など）とヘテロ型（ヒト、マウス、分裂酵母など）の酵素が存在することが知られている。本研究では、$CoQ_{10}$ を生合成する酵母からデカプレニル二リン酸合成酵素（Dps1）遺伝子を単離し、その解析を行った。

【方法・結果】$CoQ_{10}$ を生合成する酵母 *Saitoella complicata*、*Bulleromyces albus*、*Rhodotorula minuta* からゲノム DNA を抽出し、PDS によく保存された領域に対応した縮重プライマーを用いて PCR を行い DNA 断片を増幅後、プラークハイブリダイゼーション法、もしくは 5'RACE 法を用いてそれぞれの酵母から既知の PDS と相同性が高い遺伝子（*dps1*）を取得した。*S. complicata*、*B. albus*、*R. minuta* の Dps1 は、それぞれ 440、528、537 アミノ酸をコードしており、$CoQ_{10}$ を生合成する分裂酵母の Dps1 と比較して、それぞれ 61%、50%、46%の相同性があった。これらの遺伝子を、PDS 欠損株である大腸菌 KO229 株（*ΔispB*）及び分裂酵母 LA1 株（*Δdps1*,*Δdlp1*）に導入したところ、ほぼ全ての株で $CoQ_{10}$ の生成が認められ、同じ $CoQ_{10}$ を生合成するヒトや分裂酵母の Dps1 がヘテロ型であるのに対し、*S. complicata*、*B. albus*、*R. minuta* の Dps1 はいずれも単独で機能するホモ型であることが示唆された。また、分裂酵母の CoQ 生産性向上を期待して、野生株（PR110 株）でのこれらホモ型の *dps1* 遺伝子の増強も試みたので併せて報告する。

decaprenyl diphosphate synthase, isoprenoid, coenzyme Q10

発表番号：3D049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Purification and characterization of hydroxynitrile lyase from millipedes, *Parafontaria laminata*

○ Aem NUYLERT[1], Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yuko ISHIDA[1,2], Yasumasa KUWAHARA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Biotechnology Research Center, Toyama Prefectural University, [2]Asano Active Enzyme Molecule Project, ERATO, JST)

**[**Purpose**]** Hydroxynitrile lyase (HNL) is involved in the catabolic degradation of cyanohydrin in the millipedes that produce HCN to protect themselves against predators. As the reversible reaction of HNLs, the enzyme catalyzes the synthesis of optically pure cyanohydrins which are important synthetic intermediates for fine chemical and pharmaceutical industry. The HNL from millipedes, *Chamberlinius hualienensis* (Diplopoda: Paradoxosomatidae) or *Chua*HNL was reported to be a novel source of *R*-HNL by our laboratory and showed not only the highest specific activity but also high enantioselectivity in the synthesis of various cyanohydrins (Dadashipour et al. 2015). We are also interested in the HNL of *Parafontaria laminata* (Diplopoda: Xystodesmidea) origin in Toyama Prefecture which has a different defense compound compared with the previous report (Kuwahara et al. 2011)**.** We expect that these millipedes can be valuable resources for exploring new HNL.

**[**Materials and Methods**]** In this study, the living millipedes *P. laminata* were manually collected in the Takaoka Castle Park, Toyama, Japan in June-August, 2015. The enzyme was purified by various column chromatographies. The characteristic of enzyme, stability on pH and temperature and inhibitor were investigated. The specificity of the enzyme on synthesis and enantiomeric excess of the cyanohydrin products were determined in aqueous phase system. Moreover, the full-length cDNA encoding *Plam*HNL was discovered from paraterga of adult millipedes by rapid amplification of cDNA ends (RACE).

**[**Results**]** A hydroxynitrile lyase was isolated and purified to homogeneity with the final yield of 4.7% by column chromatographies on Butyl-Toyopearl, MonoQ and Resource PHE. The purified enzyme, which was a glycoprotein has a molecular mass of 21 kDa and displays a very high specificity in the synthesis of mandelonitrile. It catalyzes the synthesis of (*R*)-mandelonitrile from benzaldehyde with a 95% enantiomeric excess and has high stability of temperature up to 70 °C and a wide range of pH values. The sequence of *Plam*HNL exhibited 50% identity to *Chua*HNL.

Hydroxynitrile lyase, Millipedes, Cyanide

発表番号：3D050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ヤスデ由来ヒドロキシニトリルリアーゼの探索と大腸菌での発現系の確立

# Molecular cloning of hydroxynitrile lyase from millipedes and heterologous expression in Eshcerichia coli

○山口 拓也[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Takuya YAMAGUCHI[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

ヒドロキシニトリルリアーゼ（HNL）は、ケトンまたはアルデヒドとシアン化合物から光学活性シアノヒドリンの合成を触媒するため、工業プロセスで利用されている数少ない酵素であり、主にシアン化水素発生能を有する植物から見出されている。本プロジェクトで新たに見出されたヤンバルトサカヤスデ由来 HNL は、新規構造を有しているだけでなく、植物由来 HNL よりも優れた安定性、比活性を有していることが明らかになった（1)。日本国内に分布するヤスデの半数（約 170 種）も、ヤンバルトサカヤスデのようにシアン化水素を放出することが知られていることから、それらも高性能な HNL を有していると考えられた。そこで、本研究では様々なヤスデから HNL をコードする cDNA をクローニングし、大腸菌での異種発現系の構築を行った。

まず、富山県立大学内で採集したタンバアカヤスデから HNL を精製した。本酵素はシアン化カリウムとベンズアルデヒドから(*R*)-マンデロニトリルを合成し、その比活性は 4700 U/mg であり、現在産業利用されているアーモンド由来 HNL の比活性、1450 U/mg の約 3 倍であった。続いてヤンバルトサカヤスデとタンバアカヤスデ由来 HNL の保存領域から縮重プライマーを設計し、ヤケヤスデ、ウマガエシアカヤスデおよびミドリババヤスデから HNL をコードする cDNA のクローニングに成功した。これらの HNL は、ヤンバルトサカヤスデ由来 HNL と 50～70%の一次構造の相同性を有し、昆虫培養細胞において発現し、HNL 活性を示した。さらに、これら HNL の大腸菌での発現を試みた結果、ヤケヤスデ由来 HNL の発現に成功した。この HNL の酵素化学的諸性質を検討した結果、アーモンド由来 HNL と同等以上の比活性（1780 U/mg）を有し、80° C で 60 分間インキュベート後も 50%の残存活性を示した。以上のことから、ヤスデ由来 HNL は一般に優れた比活性と安定性を有し、特に、大腸菌で発現可能なヤケヤスデ由来 HNL は産業利用に資する酵素だと考えられた。

1. Dadashipour, M., Ishida, Y., Yamamoto, K. & Asano, Y. Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112,** 10605–10610 (2015).

Hydroxynitrile lyase, Millipede, Heterologous expression

発表番号：3D051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 放線菌フェルラ酸エステラーゼの活性と構造の関わり
# Relationship between enzyme activity and structure of *Streptomyces* feruloyl esterase

○裏地 美杉[1]、田村 はるか[1]、溝端 栄一[2]、万 クン[1]、小川 健一[1]、井上 豪[2]、畑中 唯史[1]([1]岡山生物研、[2]阪大院工・応化)
○Misugi URAJI[1], Haruka Tamura[1], Eiichi Mizohata[2], Kun Wan[1], Ken'ichi Ogawa[1], Tsuyoshi Inoue[2], Tadashi Hatanaka[1] ([1]RIBS, Okayama, [2]Osaka Univ.)

［目的］

フェルラ酸エステラーゼ（FAE）は、イネ科植物の細胞壁成分ヘミセルロースに豊富なフェルラ酸（FA）など桂皮酸エステル体に対して加水分解活性を示す酵素である。植物細胞壁の FA 抽出が可能であるとともに、FA などから構成されるリグニン除去にも効果を示すことから、バイオマスを資源としたバイオマテリアル生産において重要な酵素とされ、高機能 FAE の探索に注目されている。本研究では、我々が見出した、新規放線菌 FAE、R18（Uraji *et al.*, 2014 PLos One, 9(8):e104584）の活性および基質認識メカニズムを解明することを目的とし、R18 と R18 類似遺伝子 TH2-18 とのキメラ遺伝子を作成し、キメラ FAE の酵素活性を比較検討した結果について報告する。

［方法と結果］

放線菌 FAE の R18 は、*Streptomyces cinnamoneus* NBRC12852 株由来遺伝子であり、本遺伝子に相同性を示す遺伝子を放線菌ゲノム情報から探索した。R18 に最も相同性が高かったのは、近縁株 *S. cinnamoneus* TH-2 株由来の遺伝子 TH2-18 であり、アミノ酸配列で 74%の相同性を示した。TH2-18 を大腸菌でリコンビナントタンパク質として発現させ、FAE 活性を解析した結果、フェルラ酸エチルエステルに対する酵素活性は R18 の 1/10 以下と低かった。そこで、R18 の FAE 活性と１次構造との関わりを解析するために、R18 と TH2-18 のキメラ遺伝子を RIBS シャッフリング法（Mori *et al.*, 2005, Appl Environ Microbiol, 71(2):754-760）を用いて作成し、得られたキメラ遺伝子のキメラ FAE リコンビナントタンパク質を発現させ解析した。その結果、R18 の 140-154 番目アミノ酸からなる 15 残基の領域を保有するキメラ FAE で、TH2-18 より高い FAE 活性を保持していることが分かった。また同様に、TH2-18 の 15 残基に相当する領域を、R18 由来 15 残基に置き換えた改変 TH2-18 は、元の TH2-18 よりも FAE 活性が高く、$V_{max}$ 値の向上が見られた。R18 については、結晶構造解析を行い、活性中心セリンのほか、触媒三残基を構成するアスパラギン酸およびヒスチジンについても推定できた。また、140-154 番目アミノ酸領域は、ループ構造を含んでおり、基質の芳香族環と相互作用していた。このことにより、R18 ループ構造は、より最適な酵素-基質複合体を形成する一助となっていると考えられる。

Streptomyces, feruloyl esterase, ferulic acid

発表責任者：裏地美杉（uraji@bio-ribs.com）

発表番号：3D052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# タイプ 2・Extradiol 型二原子酸素添加酵素 PraA における環開裂位置選択性の解明

# Molecucular Mechanism of the Cleavage Specificity of a Protocatechuate 2,3-Dioxygenase, PraA, Derived from *Paenibacillus* sp. strain JJ-1b

○此下 亜椰[1]、TING Kah Wei[1]、杉本 敬祐[1]、千田 美紀[2]、上村 直史[3]、笠井 大輔[3]、福田 雅夫[3]、政井 英司[3]、千田 俊哉[2]([1]旭川高専、[2]KEK・構造、[3]長岡技科大・生物)
○ Aya KONOSHITA[1], Kah Wei TING[1], Keisuke SUGIMOTO[1], Miki SENDA[2], Naofumi KAMIMURA[3], Daisuke KASAI[3], Masao FUKUDA[3], Eiji MASAI[3], Toshiya SENDA[2] ([1]NIT Asahikawa College, [2]SBRC, INSS, KEK, [3]Nagaoka Univ.)

プロトカテク酸（PCA）は安息香酸の 3,4 位に水酸基が結合した芳香族化合物である。リグニン分解菌に代表される芳香族化合物分解菌の代謝経路において、PCA はタイプ 2・Extradiol 型二原子酸素添加酵素によって芳香環の C-C 結合が開裂される。本酵素は、活性中心のノンヘム 2 価鉄に PCA の 2 つの水酸基、次いで酸素分子を配位させることで PCA の環開裂反応を開始する。PCA を基質とするタイプ 2 に属する類縁酵素としては、LigAB（*Sphingobium* sp. strain SYK-6）と PraA（*Paenibacillus* sp. strain JJ-1b）が存在する。両酵素は、互いに一次構造の相同性を持っているが、約 140 残基からなるαサブユニットの有無およびオリゴマー状態が異なる。さらに両酵素は、PCA の環開裂位置がそれぞれ異なり、LigAB は PCA の 4,5-位の C-C 結合、PraA は 2,3-位の C-C 結合を開裂し、同じ基質から異なる生成物を生み出す。

我々はタイプ 2 全体における反応機構を立体構造の観点から明らかにするために、αとβから構成されている LigAB や DesB の X 線結晶解析を行ってきた。LigAB-PCA 複合体の X 線結晶解析から、基質 PCA は LigAB のαサブユニットとβサブユニットから構成される基質結合ポケットに結合し、αβの両サブユニットが酵素活性に必須であることを明らかにした。また LigAB が PCA の 4,5-位を特異的に開裂するメカニズムも明らかにした。一方、αサブユニットを持たないにもかかわらず PCA の 2,3-位を開裂する PraA の反応メカニズムは、PraA の立体構造解析が行われていなかったため、明らかにされていなかった。

そこで本発表では、PraA および基質（PCA）複合体の X 線結晶解析と変異体酵素の実験から、PraA における基質結合メカニズムと環開裂位置選択性のメカニズムについて報告する。

LigAB はαとβサブユニットが会合し基質結合部位を構築したヘテロテトラマー（$\alpha_2\beta_2$）であったが、PraA はホモテトラマー（$\beta_4$）のうち、2 つのβサブユニット同士が会合することで、お互いの基質結合ポケットを構成していた。この四次構造の違いにより、PraA はαサブユニット無しで基質分子と結合できることが示された。

触媒残基に対しての変異体酵素実験と LigAB と PraA の基質複合体構造を比較した結果、両酵素における触媒残基や PCA の水酸基などの位置は互いに類似していたが、基質結合ポケットに結合した PCA の配向だけが異なっていた。このことから、LigAB と PraA における環開裂位置選択性は、基質結合ポケットの構造に起因していることが明らかになった。

Extradiol Type Dioxygenase, Nonheme Iron Enzyme

発表責任者：杉本　敬祐（sugimoto@asahikawa-nct.ac.jp）

発表番号：3E001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酸化食用油によるヒト神経細胞 SH－SY5Y への影響

# Effect of oxidized edible oil on SH-SY5Y cells

○上野 有紀、中根 大和、夏目 梨冴、三浦 叶子、服部 恵美、公文 春枝、大澤 俊彦（愛知学院大心身科学)
○Yuki UENO, Yamato NAKANE, Risa NATSUME, Kyoko MIURA, Emi HATTORI, Harue KUMON, Toshihiko OSAWA (Aichi Gakuin Univ.)

【目的】

近年、認知症予防や炎症の抑制作用を有する食用油が注目されている。一方で食用油は、加熱調理および保存過程で自動酸化により、脂質ペルオキシド・カルボニル化合物等を生成する。脂質過酸化物は、神経変性疾患など種々の疾病の原因となることが知られている。そこで、本研究では酸化食用油による神経細胞への影響を検討するために、ヒト神経細胞 SH−SY5Y を用いて評価した。

【方法】

食用油 12 種類｛サラダ油・キャノーラ油・サフラワー油・コーン油・大豆油・こめ油・ごま油（焙煎）・ごま油（太白）・オリーブ油・シソの実油・アマニ油・グレープシード油｝をそれぞれ秤取し、60℃で 0～10 日間インキュベートした。脂質酸化度の測定は重量法とチオバルビツール酸（TBA）法を用いた。各種食用油含有培地で 24 時間培養した後の SH−SY5Y 細胞の生存率は、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を用いて測定した。

【結果・考察】

使用した食用油のうち、特にインキュベーション後のシソの実油とアマニ油は TBA 法での測定値が大きく増加した。またインキュベート 3 日の試料での TBA 値は、サラダ油、キャノーラ油、大豆油においても上昇したことから、脂質過酸化物の増加が確認できた。これらの結果より、各食用油の酸化度は、脂肪酸の組成および含有する抗酸化成分に依存すると考えられる。また、ごま油は TBA 値が低かったことから、含有するセサモール、セサミノールなどが強い抗酸化性に関与したと考えられた。SH−SY5Y 細胞を酸化食用油含有培地で培養後の細胞生存率は、シソの実油・アマニ油において低下することを明らかにした。これらの結果から、酸化しやすい食用油は、神経細胞死を誘導しやすい可能性が考えられた。

edible oil, oxidation, SH-SY5Y

発表責任者：上野有紀（ueno@dpc.aichi-gakuin.ac.jp）

発表番号：3E002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 糖の加熱における機能性ポリフェノールの生成―加熱条件と HHQ の生成―

# Production of functional polyphenols by thermal treatment of saccharides, relationships between heating conditions and HHQ production.

○野島 祥子[1]、増田 俊哉[1]、岡村 雄介[2] ([1]大阪市大院・生活、[2]花王・ヘルスケア食品研)
○Shouko Nojima[1], Toshiya Masuda[1], Yuusuke Okamura[2] ([1]Osaka City Univ., [2]Kao Corporation.)

【研究目的】

加熱は，食品の加工上欠かすことのできない操作である。なかでも焙煎などに代表される高温加工操作は，食材成分の化学的な変化を伴い，新たに，元の食材にはない様々な食品機能を発現させる。糖質の高温加熱による変化はカラメリゼーションとしてよく知られ，人の食欲を亢進する香気成分や呈色成分を生成する。一方，ヒドロキシヒドロキノン（HHQ）のようなポリフェノール性物質を生成することも明らかになっている。これらのポリフェノール性物質のラジカル種を経由した酸化還元反応性は，元の糖質が有する反応性よりはるかに高く，これに由来する様々な機能が最近着目されている。本研究では，ポリフェノールのうち HHQ の生成に着目し，各種の糖類からその生成について調べることを目的とした。

【方法と結果】

加熱加工として，今回は焙煎を念頭に各種の糖類の加熱反応を行った。まずスクロースを用いて，それを pH 5.4 と 6.5 のリン酸緩衝液に溶解，その後，水を除去したものを 190 ℃に加熱し，10 分後に HHQ を HPLC 法にて検出したところ，pH 5.4 条件の反応では HHQ の検出ができなかったが，ｐH 6.5 条件では，少量ながら生成されていることがわかった。次に加熱温度を検討した結果，HHQ 生成量は同温度に連動し，10 分間加熱条件では，160 ℃, 30 分間加熱条件では 150 ℃でもっとも多く HHQ が発生した。続いて，160 ℃加熱条件を用いて，他の糖類（グルコース，フルクトース，ガラクトース，マルトース，ラクトース，トレハロースなど）の反応を行い，生成した HHQ を定量比較した。なお，用いた HPLC 分析において HHQ 前後のピークが原料糖類によってそれぞれ異なり，HPLC を用いても，HHQ 定量の精度が原料によってはまだ十分ではない可能性はあるが，ラクトースからの生成が比較的多いことがわかった。一方，単糖については，反応時間が長くなると急激に HHQ 量が減少する結果が得られた。これらの結果を総合し，糖質の高温加熱と発生ポリフェノールの一つとして HHQ の生成について考察した結果を報告する。

Hydroxyhydroquinone, Polyphenols, Sugars

発表番号：3E003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 新規機能性材料としてのコンニャク由来グルコマンナンオリゴ糖の構造解析

# New evaluation study of oligosaccharides from konjac glucomannan.

○藤野 良[1]、竹本 克宏[1]、清水 功雄[2]、岡本 真由美[2]([1]株式会社スイスロワール、[2]早大理工)
○Ryo FUJINO[1], Katsuhiro TAKEMOTO[1], Isao SHIMIZU[2], Mayumi OKAMOTO[2] ([1]SWISS ROWAL INC., [2]Waseda Univ.)

【目的】コンニャクグルコマンナンとは、蒟蒻芋（*Amorphophallus Konjak*）の主成分として精製される水に可溶な非イオン性の高分子多糖類である。その構造は、マンノースとグルコースを 1.6：1.0 の比で有し、分子量は約 100 万から 200 万である。コンニャクグルコマンナンは体内の消化酵素で分解されず、整腸作用や血糖上昇抑制作用を持つことが報告されている。コンニャクグルコマンナンを部分加水分解し、保水性を有したまま水溶液を低粘性化する酵素を持つ菌体を単離・同定し、*Paenibacillus pabuli* SW10 と名付けた。部分加水分解によりオリゴ糖程度までの低分子量となることが示唆された。そして、生成したコンニャク由来グルコマンナンオリゴ糖は低分子コンニャクグルコマンナンとした。一方、セラミドは高い保湿性を有する化粧品素材として注目されてきた。セラミドは植物中ではグルコースと結合したグルコシルセラミドとして存在していることが確認されている。本研究では、この低分子コンニャクグルコマンナンから美容成分としてのグルコシルセラミドの単離精製および構造解析を行った。

【方法および結果】

低分子化グルコマンナンの平均分子量決定は、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分子量測定を行った。グルコマンナン分解物の糖末端を還元的アミノ化してピリジルアミノ基を付加することで UV モニターでの検出を可能にした。1 時間以上の培養をすることで分子量 3,000~5,000 の単一ピークとなった。続く、MALDI-TOF-MS による平均分子量測定を行った。結果、多糖類特有のユニットごとの周期的なピークを確認できた。

また、低分子コンニャクグルコマンナンから美容成分としてのグルコシルセラミドの単離精製にはエタノールを用いた。シリカゲルカラムで精製した抽出物を ESI-MS による質量分析を行った結果、既知のコンニャクセラミドの分子量 700~900 の範囲にピークがあることを確認できた。さらに、TOF-MS/MS による MS/MS 解析を行い、結果をもとに脂質の同定を目的とし Lipid View の検索を行った。すると、5 種類のグルコシルセラミドおよび 2 種類のセラミドを含有していることがわかった。

konjac glucomannan, oligosaccharides, ceramide

発表責任者：岡本真由美（okamoto@aoni.waseda.jp）

発表番号：3E004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵小麦デンプン(久寿澱粉)の糖鎖構造とゲル特性

# Molecular structure and gel properties of fermented wheat starch (Kuzu-starch)

○丸山 慶輔[1]、野口 治子[2]、内野 昌孝[2]、高野 克己[2] ([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Keisuke MARUYAMA[1], Haruko NOGUCHI[2], Masataka UCHINO[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】 江戸時代中期、関東では小麦粉からグルテンを分離した際に副生する小麦デンプンを長期間発酵させ、それを原料に久寿餅がつくられるようになった。久寿餅は歯触りが良く独特の弾力を呈し、小麦デンプンゲルにはないテクスチャーを示す。発酵を施した小麦デンプン(以下久寿澱粉)は、未発酵デンプンに比べ大粒子の一部が崩壊した様子が観察され、糊化特性値の最高粘度が低く、また老化し難い性質を示す。これらの性質は、発酵過程中の酵素作用などによって形成されると推論された。これまでに小麦デンプンの発酵工程における生デンプン分解菌の存在とデンプン構造の変化について報告した。本報告では発酵工程におけるデンプンの構造変化がゲル物性および色調にどのような変化を及ぼすか検証を行った。

【方法】 小麦デンプンと久寿澱粉(1.5 年発酵処理)をエタノールおよびアセトンにて洗浄と脱水し、風乾させたものを試料として各試験に用いた。アルカリ処理にて糊化させた試料をゲル濾過クロマトグラフィー（カラム:TOSOH 社製 TSKgel GMPWXL-TSKgel G5000PWXL 連結カラム、溶離液:0.02%アジ化 Na 含む 0.01N NaOH）に供し、発酵に伴う分子量の変化を検証した。また、各試料の糊化特性値を Rapid Visco Analyzer にて測定後、糊液を型に流し込みゲルを作製し、20 分間常温で粗熱を取り除いた後に 4℃で 1 時間、24 時間、48 時間および 72 時間保存した。ゲルの物性をテンシプレッサー(My Boy Ⅱ、タケトモ電機社製)にて、色調を分光測色計(KONICA MINOLTA 社製)にて測定した。

【結果および考察】 ゲル濾過クロマトグラフィーにて分子量分画を試みた結果、久寿澱粉ではアミロペクチンおよびアミロースの両ピークは低分子側にシフトした。糊化特性測定の結果、久寿澱粉はセットバック値が小麦デンプンより約 70%減少した。ゲル物性を測定したところ、小麦デンプンよりも久寿澱粉の方が柔らかなゲルを形成した。小麦デンプンゲルの硬さは 24 および 72 時間保存において、それぞれ約 20%および約 30%増加した。一方、久寿澱粉ゲルの硬さは 24 時間で約 10%、72 時間で約 20%増加が確認され、発酵処理により小麦デンプンの老化耐性が向上することが示唆された。白色度を示す L 値はサンプル間で大きな差はみられず、保存による変化も両者は同様の傾向を示した。これらの結果より、小麦デンプンは発酵工程中に酵素作用等により糖鎖構造が変化し、柔らかく老化し難いゲルを形成することが推察された。

Fermented wheat starch, Molecular structure, Gel properties

発表番号：3E005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# トコトリエノール類及び PQQ によるアマドリ化合物の分解作用

# Degradation of Amadori compound by tocotrienols and PQQ

○酒井 伸崇[1]、臼井 照幸[1,2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]女子栄養大栄養)
○Nobutaka SAKAI[1], Teruyuki USUI[1,2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】メイラード反応は、還元糖などのカルボニル化合物とアミノ酸などのアミノ化合物間における非酵素的褐変反応である。生体膜リン脂質の一つである phosphatidylethanolamine (PE) は分子内にアミノ基を有しており、近年、この PE にもメイラード反応が起きることが明らかになった。その結果、生成するアマドリ化合物は Amadori-PE と呼ばれ、糖尿病患者中で有意に蓄積の増加が認められている。Amadori-PE が生体内に蓄積すると、脂質過酸化、糖尿病性網膜症などの病態に関与することが示唆されている。したがって、Amadori-PE を分解する作用を有する化合物の発見が強く望まれていた。当研究室において、α-tocopherol (α-Toc) が Amadori-PE を分解することを見出した。本研究ではα-Toc の類縁体であるα, β, γ, δ-tocotrienol (T3) についても同様に実験を行いその作用を解析した。また、我々はこれまでの研究より、Amadori-PE の分解には *p*-キノン構造が重要であると考えてきたが、*o*-キノン構造を有する化合物である Pyrroloquinoline quinone (PQQ) についてもその作用を解析することとした。

【方法】(1) Amadori-PE にα, β, γ, δ-T3 を添加し、メタノール溶液中、37℃で 3 日間インキュベートした。反応溶液を LC-ESI-Q-TOF-MS 分析に供し、Amadori-PE およびその生成物を定量した。(2) 同様の方法により、PQQ の Amadori-PE に対する作用を解析した。

【結果】α, β, γ, δ-T3 の添加によって、濃度依存的に Amadori-PE は有意に減少した。また、それに伴って PE、およびグルコソンが生成した。また、その分解作用の大きさを比較したところ、α-T3 < β-T3 ≒ γ-T3 < δ-T3 の順に大きくなった。さらに、*o*-キノン構造を有する PQQ についても同様に実験を行ったところ、PQQ に関しても Amadori-PE の分解活性を有することが明らかになった。この結果より、*p*-キノンだけでなく *o*-キノン構造も Amadori-PE の分解に重要であることが示唆された。以上の結果は、α-Toc をはじめとする化合物がアマドリ化合物を分解することによってメイラード反応を抑制し、関連疾患の予防に寄与しうることを示唆するものである。

Maillard reaction, Amadori compound, tocotrienol

発表番号：3E006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米 SSP の精製およびα-アミラーゼのデンプン分解性に与える影響

# Effect of purified rice SSP on starch degradation with alpha-amylase

○塩野 弘二[1]、辻井 良政[2]、野口 智弘[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]東京農大応生・食加技セ)
○ Kouji SHIONO[1], Yoshimasa TUJII[2], Tomohiro NOGUCHI[3], Katsumi TAKANO[2]
([1]Grad.Sch.Agr.Agrochem, [2]Dept.Appl.BioSci.Biochem.Tokyo Univ.Agr, [3]Dept.Appl.Biosci.FPC)

【目的】

デンプン粒表層にはタンパク質(Starch Surface Protein:SSP)が局在する。しかし、その特性と機能性については十分な検討は行われていない。我々はこれまでにα-アミラーゼと SSP 間に相互作用性があること、またα-アミラーゼによるデンプンの分解に SSP が関することを報告してきた。しかし、米より抽出した SSP は複数のタンパク質が混在するため、先述の機能と各タンパク質との関係性は不明である。そこで本報告では、SSP の精製を行い、α-アミラーゼの生デンプン分解性に与える SSP の作用性の解析を試みた。

【方法】

SSP の調製は試料デンプンに 0.1% NaOH 溶液を加え、得られた抽出液に 10%飽和硫酸アンモニウムによる塩析を行い、 ButylTOYOpearl650-S カラム(Φ2.3cm×10cm)にて精製し H1 とした。更なる精製を行うため H1 を SUPER Q TOYOpearl650-S カラム(Φ2.0cm×17cm) に供した。溶出は 0.1、0.2、0.5M NaCl を含む 0.1% NaOH 溶液でステップワイズ溶出にて行い、それぞれ I1、I2、I3 とした。デンプン分解試験は、各画分(H1, I1～3)を 10mM MES-NaOH 緩衝液(pH6.0)に溶解し、α-アミラーゼ(*Bacillus.* sp 由来)5units とタンパク質量比で 1:1 になるように混合後、米デンプン 100mg に添加し酵素反応を行った(37℃、1 時間)。分解率は、反応液中に溶出してきた全糖量を Phenol-sulfate 法にて測定し算出した。

【結果】

α-アミラーゼによるデンプンの分解性試験を行ったところ、SSP を除去することで全糖量(mg/ml)が 17.5 から 16.2 と有意に減少し、分解性の低下が示唆された。そこで、精製した各 SSP 画分をα-アミラーゼと混合し、生デンプンの分解性試験を行ったところ、H1、I1、I2 画分ではデンプンの分解性は上昇しなかった。一方、I3 画分を添加することで全糖量(mg/ml)は 16.9 と増加し、分解性が回復した。また、各画分を SDS-PAGE に供したところ、I3 において 30 および 15kDa 付近をメインとするタンパク質バンドが検出された。次に上記タンパク質バンドを切り出し、LC/MS/MS によるタンパク質同定を行ったところ、30kDa 付近のタンパク質は glutelin(oryza sativa 由来)、15kDa 付近のタンパク質は prolamin(oryza sativa 由来)と同定された。

Starch Surface Protein(SSP), amylase, degradation of starch

発表番号：3E007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 沖縄県産海産物のプロテアーゼ加水分解により得られるアンジオテンシン I 変換酵素阻害ペプチドと SHR における血圧降下作用

# Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysates of Marine Products of Okinawa and Antihypertensive Effect of the Hydrolysate in SHRs.

○荻 貴之[1]、市村 年昭[2]、鎌田 靖弘[1]、照屋 盛実[1]、潮平 憲二[3]、瑞慶山 良寧[3]、稲福 桂一郎[3]、丸山 進[1]（[1]沖縄県工業技術センター、[2]産総研、[3]金秀バイオ（株））
○ Takayuki OGI[1], Toshiaki ICHIMURA[2], Yasuhiro KAMADA[1], Morimi TERUYA[1], Kenji SHIOHIRA[3], Yoshiyasu ZUKEYAMA[3], Keiichiro INAFUKU[3], Susumu MARUYAMA[1] ([1]Okinawa Industrial Technology Center, [2]AIST, [3]Kanehide Bio Co.,Ltd.)

【目的】

沖縄産の各種海藻、魚類、それらの加工残渣をプロテアーゼで加水分解して得られるペプチド混合物の利用を目的とした研究を行っている。演者らは、これまでに紅藻の光合成タンパク質フィコエリスリンのサーモライシン分解物から、フィコエリスロビリンと Ile-Asn-Lys-Cys が結合した赤色物質を見出し、この物質が *in vitro* の系において、タンパク質糖化反応を阻害することを報告している[1)]。そこで、赤色のフィコエリスロビリンペプチドを含有する機能性食品として開発することを目的に研究を行った。今回、ミリン科紅藻（*Agardhiella subulata*）からフィコエリスリンを含む可溶性タンパク質を抽出し、サーモライシンで分解したところ、この分解物がアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害活性を有することを確認し、さらに、高血圧自然発症ラット（SHR）への単回経口投与で血圧降下作用を示すことを確認した。また、他の海藻、魚類のサーモライシン分解物から既知の ACE 阻害ペプチドを種々見出した。

【方法・結果】

*A. subulata* からフィコエリスリンを含む可溶性のタンパク質を破砕処理により水抽出し、それをサーモライシンで加水分解、分画分子量 10,000 の限外濾過膜を通過した加水分解物を回収した。本加水分解物の ACE 阻害活性 $IC_{50}$ 値は 69 μg/mL であった。SHR への単回経口投与実験で、50 mg/kg の加水分解物投与群（n=8）は投与 6 時間後に、対照群（n=8）に対して有意な血圧降下作用が認められた。この加水分解物中の ACE 阻害物質をゲル濾過、C30 逆相カラムで精製したところ、フィコエリスロビリンと Ile-Asn-Lys-Cys が結合した物質に ACE 阻害活性があることが分かった。また、未精製の加水分解物をそのまま LC/MS で分析したところ、ACE 阻害活性のある AY、LY、VY が検出された。

また、アナアオサ、ヒトエグサ、キリンサイ、イバラノリ、クビレオゴノリ、モズク加工残渣、グルクン（タカサゴ科）、マグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物から IY、VY、FY、IF、FW、AW、MW、VW などのジペプチドを見出した。マグロ中骨部位のサーモライシン加水分解物は同時に加水分解物 1 mg あたり 0.04 mg のアンセリンを含んでいた。

1）平成 27 年度 日本栄養･食糧学会九州･沖縄支部 日本食品科学工学会西日本支部合同大会 講演番号 Bpm9

Antihypertensive Effect, Angiotensin, Algae

発表責任者：荻貴之（ogitkyuk@pref.okinawa.lg.jp）

発表番号：3E008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LC-MS/MS を用いたオウトウアレルゲンタンパク質 Pru av 2 の定量法の開発

# The development of quantification method for Pru av 2, an allergenic protein in sweet cherry, by using LC-MS/MS

○一法師 克成、笹沼 基恵、大池 秀明、小堀 真珠子、山本（前田） 万里 (農研機構・食総研)
○ Katsunari IPPOUSHI, Motoe SASANUMA, Hideaki OIKE, Masuko KOBORI, Mari MAEDA-YAMAMOTO (NARO・NFRI)

【緒論】口腔アレルギー症候群は、免疫グロブリン E （IgE）関与の即時型アレルギーで、口腔、咽頭、口唇粘膜の刺激感やかゆみが生じ、浮腫や水疱を併発することもある。まれに、蕁麻疹や下痢等の消化器症状、さらには、アナフィラキシーショックや重篤な全身症状を呈する。花粉と交差反応性のある食物の経口摂取によって発症する pollen-food syndrome は、口腔アレルギー症候群の一つである。オウトウ（サクランボ、*Prunus avium* L.）に含まれる thaumatin 様タンパク質 Pru av 2 （glucan endo-1,3-beta-glucosidase)は、オウトウが原因となる口腔アレルギー症候群に関与するアレルゲンタンパク質である。本研究では、液体クロマトグラフタンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いたターゲット・プロテオミクスによる Pru av 2 の定量法を開発した。

【材料および方法】UniProtKB に登録されている Pru av 2 のアミノ酸配列情報を用いて、トリプシン消化により Pru av 2 から生じるペプチド群の中から、PeptideCutter によるインシリコ消化の結果およびペプチドの鎖長や保存時の安定性などを考慮し、LC-MS/MS 測定用の安定同位体標識内部標準（SIIS）物質として、ペプチド TGC[CAM]STDASGK[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]（C[CAM]：カルバミドメチル化 C）および同配列の未標識ペプチドを合成した。これらペプチドのプロダクトイオンスペクトルなどを測定し、多重反応モニタリング(MRM)条件を決定した。また、オウトウ果実からトリクロロ酢酸/アセトンで抽出したタンパク質のトリプシン消化物を用いて、LC 条件を決定した。

【結果および考察】本定量法は、SIIS ペプチド TGC[CAM]STDASGK[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]の存在下、オウトウタンパク質抽出物をトリプシンで消化した後、LC-MS/MS で分析し、Pru av 2 由来のトリプシン消化ペプチド TGC[CAM]STDASGK のピークと TGC[CAM]STDASGK[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]のピークとを比較することで、Pru av 2 を定量する。プロダクトイオンスペクトルなどの測定の結果、TGC[CAM]STDASGK および TGC[CAM]STDASGK[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]の定量用 MRM トランジッションとして、492.2→413.2 および 496.2→417.2 を選択した。また、LC 条件に親水性相互作用クロマトグラフィー（HILIC）モード（ZIC-HILIC カラム）を採用した。これら検討の結果、MRM クロマトグラムの保持時間 5.5 分の位置に、TGC[CAM]STDASGK と TGC[CAM]STDASGK[$^{13}C_6$,$^{15}N_2$]のピークが観測され、所要時間 15 分で fmol/μL 濃度レベルでの定量分析が可能であった。オウトウ果実を分析した場合の日内および日間の変動係数は、15%以下であった。本定量法を用いて、ドライチェリー、ゼリー中のオウトウ果実やジャムの加工品を分析したところ、Pru av 2 の含量は、それぞれ、11、2.6、1.7 nmol/g であった。

Pru av 2, allergy, LC-MS/MS

発表番号：3E009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ナタマメから粗抽出したカナバリンは二価金属塩濃度に依存した可逆的溶解性を示す

# Canavalin extracted from sword bean shows a reversible solubility depending on the divalent chloride concentration

○西澤 果穂[1]、有井 康博[2]（[1]武庫女大院、[2]武庫女大）
○Kaho Nishizawa[1], Yasuhiro Arii[2]（[1]Mukogawa Women's Univ. Graduate School, [2]Mukogawa Women's Univ.）

【目的】カナバリンはナタマメの主要タンパク質の 1 つであり、ビシリン型（7S）グロブリンに分類される。我々はこれまでに白ナタマメからナタマメタンパク質を抽出する方法を確立し[1)]、ナタマメ粗抽出液中のカナバリンが $MgCl_2$ 濃度 15 mM、$CaCl_2$ 濃度 10 mM の時に不溶化、$MgCl_2$ 濃度 60 mM、$CaCl_2$ 濃度 200 mM の時に可溶化することを明らかにしている[2)]。以下、不溶化する塩濃度を低濃度、可溶化する塩濃度を高濃度と表現する。本研究では、ナタマメ粗抽出液に低濃度な塩を加えることで不溶化あるいは高濃度な塩を加えることで可溶化した、カナバリンの溶解性に対する塩濃度の影響について詳細に調べた。
【方法】我々が確立した方法[1)]に従って調製したナタマメ粗抽出液に、低濃度の $MgCl_2$ または $CaCl_2$ を添加し、25℃で 15 分間静置した。氷冷後に反応液を上清画分 1 と沈殿画分 1 に遠心分離した。沈殿画分 1 に高濃度の $MgCl_2$ または $CaCl_2$ を添加して懸濁し、再び上清画分 2 と沈殿画分 2 に同様に分けた。上清画分 2 を蒸留水で低濃度となるように希釈し、上清画分 3 と沈殿画分 3 に同様に分けた。各上清画分および 8 M 尿素で懸濁した沈殿画分を SDS-PAGE に供し、各条件におけるカナバリンの局在を調べた。また、ナタマメ粗抽出液に高濃度の $MgCl_2$ または $CaCl_2$ を添加することで生じた上清画分 4 を蒸留水で低濃度に希釈し、同様に上清画分 5 および沈殿画分 5 に分け、各条件におけるカナバリンの挙動を調べた。さらに、各塩で調製した沈殿画分 1 の沈殿を他方の塩で懸濁し、同様に上清画分 6 と沈殿画分 6 に分けた。上清画分 6 および沈殿画分 6 を SDS-PAGE で分析後、カナバリンのバンド強度を ImageJ で定量化し、各塩の組み合わせが回収率に及ぼす影響を調べた。
【結果と考察】カナバリンは低濃度の $MgCl_2$ および $CaCl_2$ によって不溶化し、不溶化したカナバリンは高塩濃度にすることで可溶化することが分かった。また、可溶化したカナバリンは低塩濃度で不溶化することも分かった。ナタマメ粗抽出液に低濃度の $MgCl_2$ を添加して生じた沈殿を高濃度の $CaCl_2$ で懸濁する方法におけるカナバリンの回収率が最高値を示した。以上の結果から、ナタマメから粗抽出されたカナバリンは $MgCl_2$ および $CaCl_2$ 濃度に依存した可逆的溶解性を示すことが分かった。
本研究は平成 26 年度飯島藤十郎食品科学振興財団の助成で行われた。
1）Nishizawa *et al.*, Precipitation of sword bean proteins by heating and addition of magnesium chloride in a crude extract, *submitted*.
2）西澤ら、日本食品科学工学会第 62 回大会要旨、3Fp6

canavalin, divalent chloride, sword bean

発表責任者：西澤果穂（mw259181@mukogawa-u.ac.jp）

発表番号：3E010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# メイラード反応を利用したβ-コングリシニンの機能改変

# Functional improvements in beta-conglycinin by the Maillard reaction

○高橋 良平、友野 美怜、好田 正、服部 誠（東農工大農）
○ Ryohei TAKAHASHI, Misato TOMONO, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI（Tokyo Univ.Agric. Tech.）

【目的】大豆タンパク質の主成分であるβ–コングリシニンは必須アミノ酸を豊富に含む良質のタンパク質であり、食品加工の際に有用な機能特性を発揮し、また、血中コレステロール低下作用、抗酸化作用などの生理機能を持つ有用な食品素材である。一方で、このタンパク質は酸性条件下で等電点により不溶化してタンパク質機能特性が低下するため、大豆タンパク質の食品工業への利用の障害となっている。また、大豆アレルギーの原因物質であることも問題となっている。そこで本研究では、β–コングリシニンの食品中における機能特性を向上させつつ低アレルゲン化の達成することを目的として、実際の食品に応用可能なメイラード反応により、β–コングリシニンと酸性多糖のカルボキシメチルデキストラン（CMD10）を複合体化させることで、β–コングリシニンの機能特性の向上と低アレルゲン化を達成することを目的としている。
【方法】β-コングリシニンは、等電点沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーにより、脱脂大豆粉末から抽出・精製した。CMD10 はデキストラン（10 kDa）を水酸化ナトリウム存在下でモノクロロ酢酸と反応させ、カルボキシメチル基を付加させて調製した。精製β-コングリシニンの Lys 残基と CMD10 のカルボキシメチル基のモル比が 1：10 となるように混合し、50℃または 60℃、RH79%、0～7 日間反応させて、最適時間条件を検討した。最適条件で調製したβ-コングリシニン-CMD10 複合体を SDS-PAGE に供し、分子量の変化を確認した。さらに、複合体中のβ-コングリシニンおよび CMD 含量を測定した後､機能特性の評価として様々な pH における溶解性および乳化性を測定した。加えて、複合体の免疫原性、抗原性をそれぞれ非競合法 ELISA、競合法 ELISA を用いて評価した。
【結果、考察】メイラード反応により、高分子のβ-コングリシニン-CMD10 複合体が得られた。いくつかの反応条件を検討した結果、メイラード反応の最適反応時間は 50℃では 7 日間、60℃では 5 日間であることが明らかとなった。溶解性測定により、β-コングリシニン-CMD10 複合体は 50℃、60℃で反応させた両者ともβ-コングリシニンと比較して pH 5.0 における溶解性が改善していることが確認された。また、乳化性においても pH 5.0 および 7.0 において著しい変化が認められた。抗原性および免疫原性は、50℃での複合体化による抗原性増加は認められず、免疫原性の著しい増加が認められた。しかし、60℃での複合体化によって、抗原性は著しく減少し、免疫原性の著しい減少も認められた。以上のように、CMD10 との複合体化はβ-コングリシニンの機能改変に有効であると考えられる。

beta-conglycinin, the Maillard reaction, Functional improvements

発表責任者：服部誠（makoto@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：3E011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 本みりんの熟成における D-アミノ酸の生成機構

# Formation mechanisms of D-amino acids during maturation in sweet rice wine (*Mirin*)

○井上 裕[1,2]、鈴木 理恵[2]、勝又 忠与次[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1] ([1]明治大農、[2]MC フードスペシャリティーズ（株））
○Yutaka INOUE[1,2], Rie SUZUKI[2], Tadayoshi KATSUMATA[2], Hirohito WATANABE[1], Fumitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]MC Food specialties Inc.)

【目的】
代表的な酒類調味料である本みりんには、製造後数年間保存熟成させることにより、特有の味と香りを付与した「長期熟成本みりん」がある。この本みりんは、高糖、高アルコール下で熟成されるため、メイラード反応が進行し、未熟成の本みりんとは異なる成分を有することが推測された。一方で、我々は熟成食品である醤油、味噌、チーズに複数の D-アミノ酸が含まれ、その含有量において特定の D-アミノ酸が味質に影響を及ぼしていることを明らかにしている[1)]。そこで、本研究は熟成期間の異なる本みりんの D-アミノ酸およびメイラード反応の中間生成物であるアマドリ化合物の含有量の測定を行うとともに、本みりんの熟成中におけるアミノ酸のラセミ化機構の解明について検討した。
【実験方法】
市販の未熟成の本みりん 3 種類と熟成年数の異なる長期熟成本みりん 8 種類について、RP-HPLC(OPA/IBLC 法)により 13 種類の L,D-アミノ酸(Ala、Arg、Asp、Glu、Ile、Leu、Lys、Phe、Ser、 Thr、Trp、Tyr、Val)、ESI-TOF-MS により 8 種のアマドリ化合物(Fru-Ala、Fru-Arg、Fru-Asp、Fru-Glu、Fru-Phe、Fru-Thr、Fru-Ser、Fru-Tyr、Fru-Val)の含有量を測定した。また熟成中におけるアマドリ化合物経由の D-アミノ酸の生成の有無を検証するため、合成したフルクトシルアスパラギン酸(Fru-L-Asp)とフルクトシルアラニン(Fru-L-Ala)を未熟成の本みりんに添加し、保存中の各 L,D-アミノ酸およびアマドリ化合物の消長を測定した。
【結果・考察】
未熟成の本みりん中にも原料の米由来と考えられる D-アミノ酸が含まれていたが、Ala、Arg、Asp、Glu、Phe、Ser のラセミ化率は、長期熟成した本みりんの平均値が未熟成の本みりんの平均値を上回った。アマドリ化合物量とラセミ化率の相関係数を算出した結果、Asp および Phe において高い相関が見られた。相関が高い代表として Fru-L-Asp を、相関が低い代表として Fru-L-Ala を添加して本みりんの保存試験を行った結果、Fru-L-Asp 添加区において D-Asp の生成が確認された。以上より、本みりんの熟成において、D-Asp はアマドリ化合物経由で生成している可能性が示唆された。

1) 井上裕、岡部唯、鈴木理恵、尾中孝、木田隆生　Trace Nutrients Research 31:59-65(2014)

sweet rice wine (*Mirin*), D-amino acid, Amadori rearrangement products

発表番号：3E012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 国内主要茶産地で生産された緑茶の成分および嗜好性に関する比較分析

# Comparative studies on the tea components and the preference of green tea produced in major tea area in Japan

○岡本 由希[1]、内山 裕美子[2]、高橋 貴洋[2]、山下 まゆ美[3]、築舘 香澄[4]、加藤 みゆき[5]、大森 正司[4,6] ([1]和洋女大、[2]味香研、[3]高崎商科短大、[4]大妻女大、[5]香川大、[6]お茶大学)
○Yuki OKAMOTO[1], Yumiko UCHIYAMA[2], Takahiro TAKAHASHI[2], Mayumi YAMASHITA[3], Kasumi TSUKIDATE[4], Miyuki KATOH[5], Masashi OMORI[4,6] ([1]Wayo Women's Univ., [2]T and A Inst., [3]Takasaki Univ. Commerce Junior College, [4]Otsuma Women's Univ., [5]Kagawa Univ., [6]Ocha college)

【目的】近年，日本国内における茶葉の生産量は減少傾向となっている．茶はかつて，10万tもの生産量があったが，年々漸減しており，現在は8万t程度となっている．一方，海外に目を向けると，特に緑茶の生産量は毎年10万t以上も増加しており，国際的には成長産業ともなっている．緑茶は，含有成分からも健康維持にかかせない飲み物であると国内外での客観的評価を受けている．しかし，このように海外との生産動向に大きな差が認められる事由には，日本における茶の長い歴史，文化，伝統が大きく関わっているとも考えられる．そこで，本研究では茶の需要拡大を検討する研究の一環として，国内の代表的な茶産地で生産された茶の化学成分の分析を行い，茶成分および嗜好性についての特徴を明らかにすることを目的とした．
【方法】試料には，埼玉県（狭山茶），静岡県（静岡茶），京都府（宇治茶），鹿児島県（鹿児島茶）において，2015年4～5月頃（一番茶）に生産された緑茶の仕上げ茶（100g，1,000円程度）を収集し，各地域それぞれ5種類を試料とした．まず，茶葉の外観を色差計により測定した．続いて，茶葉3gに熱湯200mlを加えて3分間浸出後のろ液および常法により完全抽出して得たろ液を各成分分析および味分析に用いた．茶の成分分析は，総ポリフェノール量，総アミノ酸量，カテキン，カフェインについて分析した．総ポリフェノール量は，酒石酸鉄法により540nmの吸光度を測定し，総アミノ酸量はニンヒドリン法により測定した．また，カテキンおよびカフェイン含量は，HPLC法により測定した．さらに，味覚センサーを用いてうま味，渋味，苦味およびミネラル感について測定し，味の数値化を行った．
【結果】1．色差計による茶の外観のL，a，b値の測定結果は，a値が最も大きく，緑の濃い茶葉は鹿児島茶であり，青味の強い茶葉は宇治茶，そして明るい（明度の大きい）茶葉は狭山茶であった． 2．総ポリフェノール量は，宇治茶に最も多く認められ，最も少ない茶葉は鹿児島茶であった．総アミノ酸含量は，宇治茶に最も多く，反対に最も少ない茶葉は狭山茶であった． 3．味覚センサーの測定結果は，うま味については，鹿児島茶，次いで宇治茶，静岡茶，狭山茶の順に強かった．また，渋味については最も強い茶葉が狭山茶，次いで静岡茶，宇治茶，鹿児島茶の順であった．
以上の結果から，日本国内における主要茶産地の茶成分および味の特徴をある程度明らかにすることができた．今後，これらの特徴についてさらに検討を加え，国内外での茶の需要拡大につなげていきたいと考えている．

green tea, tea components, preference

発表番号：3E013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 日本国内で生産される後発酵茶中の環状ジペプチドの定量
# Determination of cyclic dipeptides in Japanese post-fermented teas

○大塚 祐季[1]、林 未季[1]、山本 憲司[1,2]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[3]([1]高知大農、[2]サントリーグローバルイノベーションセンター（株)、[3]高知大地域協働)
○Yuuki Otsuka[1], Miki Hayashi[1], Kenji Yamamoto[1,2], Takehiro Kashiwagi[1], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[3] ([1]Fac. of Agri., Kochi Univ., [2]Suntory Global Innovation Center Limited, [3]Fac. of Regional Collaboration, Kochi Univ.)

【目的】環状ジペプチドは、直鎖ジペプチドの N 末端および C 末端が脱水縮合したジケトピペラジン構造を基本骨格とし、タンパク質を構成する 20 種のアミノ酸の組み合わせで D・L 体を区別しない場合、210 種類が存在する。一部の環状ジペプチドは生体内に存在する他、発酵食品や焙焼食品での検出例も報告されている。また、環状ジペプチドは直鎖ペプチドにはないユニークな生理活性を有し、近年注目されている化合物群である。我々は、LC-MS/MS を用いた環状ジペプチドの一斉分析法を開発すると共に、本法を用いることで後発酵茶の一種であるプーアル茶中の環状ジペプチド含量を明らかにすることに成功した[1)]。本研究では、日本国内で生産されている 4 種類の後発酵茶中の環状ジペプチドを LC-MS/MS 法を用いて定量し、製法と環状ジペプチド含量の関係について考察した。
【方法】分析試料として、バタバタ茶（好気的発酵茶)、阿波晩茶（嫌気的発酵茶)、および碁石茶と石鎚黒茶（二段階発酵茶）を用いた。また、碁石茶については、各製造工程（蒸し後、好気発酵 1-7 日後、嫌気発酵後、天日乾燥後）でサンプリングし、分析試料とした。乾燥茶葉粉末 2 g に対して 200 g の熱湯を加え、10 分間撹拌し、ろ過したものを茶抽出物とした。環状ジペプチドの分析は LC-MS/MS（Waters 社製）で行い、カラムとして Waters Atlantis T3（2.1 mm i.d.×150 mm)、溶離液としてアセトニトリルと 0.1% ギ酸を用いた。31 種類の環状ジペプチドを分析対象とし、各環状ジペプチドの$[M+1]^+$をプリカーサーイオンとし、検出感度の良好なフラグメントイオンをプロダクトイオンとして MRM で測定を行った。
【結果・考察】バタバタ茶、阿波晩茶、碁石茶、石鎚黒茶の抽出物中の環状ジペプチドの定量を行ったところ、二段階発酵茶の碁石茶が最も高い環状ジペプチド含量（1.2 ppm）を示し、次いで石鎚黒茶（0.33 ppm)であった。一方、嫌気的発酵茶の阿波晩茶（0.0069 ppm)、好気的発酵茶のバタバタ茶（0.0047 ppm）の含量は顕著に低かった。加えて、碁石茶で最も多くの種類の環状ジペプチド（21 種類）が認められた。さらに、碁石茶製造段階における環状ジペプチド含量の変化を調べたところ、好気発酵初期段階および嫌気発酵段階で環状ジペプチド含量が大きく増加した。このことから、好気と嫌気の 2 種類の発酵段階の組み合わせが、環状ジペプチドの生成に対して重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられた。

1) Yamamoto *et al.*, Development of LC-MS/MS analysis of cyclic dipeptides and its application to tea extract, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 172-177 (2016).

Cyclic dipeptide, Diketopiperazine, Post-fermented tea

発表番号：3E014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# パウチ封入がジャガイモ中のγ-アミノ酪酸に及ぼす影響

# Effects of pouch packaging on the γ-aminobutyric acid content of potato tuber

○喜田 駆[1]、田中 麻美子[1]、西田 毅[2]、松田 寛子[1]、白井 隆明[1] ([1]東京海洋大院・サラダサイエンス、[2]ケンコーマヨネーズ(株))
○Kakeru KIDA[1], Mamiko TANAKA[1], Takeshi NISHIDA[2], Hiroko MATSUDA[1], Takaaki SIRAI[1] ([1]Grad. Sch. of Mar. Sci. and Tech.,TUMSAT, [2]KENKO Mayonais Co.,Ltd.)

［目的］

γ-アミノ酸(GABA)タンパク質非構成のアミノ酸であり、血圧上昇抑制作用に加えて、脳機能改善作用、精神安定作用、抗利尿ホルモン分泌抑制作用を有することが知られている。GABA は、植物食材にも比較的高含量見られるが、指定野菜 14 品目の一つであるジャガイモ塊茎にも 30～50mg/100g 見られる。

本研究では、ジャガイモ塊茎の GABA について、塊茎内の分布、加熱が及ぼす影響やパウチ封入後の常温保存中の変化を検討した。

[方法]

試料には北海道産さやか *Solanum tuberosum L.*塊茎を用いた。塊茎を皮層、外髄、内髄に切り分けた。塊茎全体摩砕し、100℃20 分で加熱後、10 分間氷上冷却を行った。一方、摩砕した試料をパウチ封入後 24、48、72 時間常温保存した。1.5cm 角に細切した試料もパウチ封入後 12、24、48 時間保存した。

それぞれの試料からメタノールにより用いて抽出液を調製し、日本電子社アミノ酸自動分析計 JLC-500 により、ニンヒドリン法で遊離アミノ酸組成を測定した。

[結果および考察]

さやか塊茎内の GABA の分布には部位差がなかったが、内髄にはグルタミンが 1300mg/100g と多かった。加熱は GABA に影響しなかった。L-グルタミン酸を添加し常温でパウチ封入保存することで GABA は 60mg/100g から 110mg/100g へと倍増した。

pouch packaging, GABA, potato

発表責任者：白井　隆明（tshirai@kaiyodai.ac.jp）

発表番号：3E015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 沖縄産パインアップル(*Ananas comosus*) のフレーバーおよび品質特性

# Flavor characteristics and qualities of pineapples (*Ananas comosus*) in Okinawa

○宮城 春里[1]、ASIKIN Yonathan[2]、竹内 誠人[3]、諸見里 知絵[3]、玉城 聡[3]、平良 英三[1]、平良 東紀[1]、高良 健作[1]、和田 浩二[1] ([1]琉球大・農、[2]琉球大・熱生圏、[3]沖縄農研・名護)
○Shunri MIYAGI[1], Yonathan ASIKIN[2], Makoto TAKEUCHI[3], Chie MOROMIZATO[3], Satoshi TAMASHIRO[3], Eizo TAIRA[1], Toki TAIRA[1], Kensaku TAKARA[1], Koji WADA[1] ([1]Fac. Agr. Univ. Ryukyus, [2]TBRC, Univ. Ryukyus, [3]Nago, OPARC)

【目的】

パインアップルは沖縄本島北部の有機質に乏しい強酸性土壌において、露地栽培ができる数少ない果樹品目である。これまで沖縄県のパインアップル産業は、スムースカイエン‘N67-10’品種を原料とした缶詰加工業を中心に発展してきたが、缶詰輸入自由化による価格の下落、最近では観光産業との連携から、カットフルーツなどの商品にも対応できる食味の良い生食用のパインアップル品種が求められている。そこで本研究では、沖縄産 4 品種のパインアップルのフレーバー特性（色、味および香り）と収穫後の品質（果肉褐変）に影響を及ぼす酵素活性を分析し、生食用への適応性を検討した。

【方法】

試料として、平成 26 年 7 月、8 月に沖縄県農業研究センター名護支所で収穫した‘N67-10’（コントロール)、‘サマーゴールド’、‘ボゴール’および‘ゆがふ’の 4 品種のパインアップルを用いた。各試料は上部、中部、下部に三等分し、果肉の色(*L**、*a**、*b**)を測定した。また、各部位の果汁の糖度および酸度を測定した。各部位の香気プロファイルはヘッドスペースガスクロマトグラフィー（HS/GC/FID）ならびに GC/MS-e-Nose と多変量解析法を用いて分析した。さらに、パインアップルの収穫後に起こる果肉褐変の要因と考えられるポリフェノールオキシダーゼ(PPO)の活性を測定した。

【結果】

果肉の色調は *b**（黄味度）で品種間の違いが認められ、‘N67-10’に比べ、‘ボゴール’および‘サマーゴールド’で高く、‘ゆがふ’で低かった。果汁の糖度はすべての品種で上部に比べて中部と下部で高かったが、酸度については部位における違いはほとんどなかった。各品種とも香気成分として短鎖エステルを多く含んでいたが、香気成分含量は‘N67-10’に比べ、‘ボゴール’および‘ゆがふ’で高く、‘ボゴール’には Methyl butyrate、Methyl 2-methylbutyrate、‘ゆがふ’には Ethyl acetate、Ethyl hexanoate が特徴的に多く含まれていた。また、各品種の果汁のヘッドスペースガスを GC/MS-e-Nose と多変量解析法を用いて解析した結果、‘N67-10’と比較して、‘ボゴール’および‘ゆがふ’の香気プロファイルが大きく異なることが明らかとなった。PPO 活性は新鮮果肉重量当たりでは各品種ともほぼ同じ強さであった。一方、タンパク質量当たりでは品種間に差が認められたが、果肉褐変と活性の強さに関連は認められなかった。

*本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（26104C）により行った。

pineapple, flavor, polyphenol oxidase

発表責任者：和田　浩二（kojiwada@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：3E016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# スレオニン・グルコースならびにセリン・グルコース系メイラード反応で形成される新規ピロロオキサゾール色素について

# Novel Pyrrolooxazole Pigments Formed by the Maillard Reaction between Threonine-Glucose or Serine-Glucose

○野田 響子、村田 容常（お茶大院ライフ）
○Kyoko NODA, Masatsune MURATA (Department of Nutrition and Food Science, Ochanomizu Univ.)

【目的】本研究室において、システインのメイラード反応により生成した新規色素化合物として、6-ヒドロキシ-3[R],7a[S]-ジメチル-7-オキソ-2,3-ジヒドロピロロ[2,1-b]チアゾール-3-カルボン酸を同定した。本物質はピロロチアゾールのカルボン酸誘導体であることから、ピロロチアゾレート (pyrrolothiazolate) と命名し、システインを用いたモデル系によりその生成条件を明らかにしている (1)。さらに、先の関東支部大会において、ピロロチアゾレートの生成経路として 1-デオキシグルコソンの誘導体にシステインが脱水、縮合して生成することを示唆した。このことから、システインと似た構造を持つアミノ酸（スレオニン、セリン）においても、硫黄原子が酸素原子に置き換わったピロロチアゾレートの類縁体を生成する可能性が考えられる。そこで本研究では、スレオニン・グルコースおよびセリン・グルコースのモデル反応溶液を用い、ピロロチアゾレートの類縁体を探索した。その結果、ピロロオキサゾール誘導体である新規なメイラード反応生成物を見出したので、その精製、同定について報告する。
【方法】各反応溶液（スレオニン・グルコース、セリン・グルコース、システイン・グルコースを 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に溶解、110 ℃、3 時間加熱）を DAD-HPLC（カラム、ODS; 溶離液、MeOH・0.1 % AcOH 水溶液系; 検出、220-500 nm）で分析し、UV-Vis 吸収スペクトラムから、ピロロチアゾレート類縁体を探索した。精製においては、0.4 M スレオニン、0.1 M グルコースおよび 0.2 M セリン、0.2 M グルコースを 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解後、120 ℃、120 分および 90 分加熱した反応溶液 (それぞれ 1 L、10 L) を用いた。反応溶液を合成吸着樹脂（ダイヤイオン HP20）のカラムにかけ、非吸着画分を回収した。これを、pH 2 以下に調整し、再びダイヤイオン HP20 にかけ、吸着した目的物質を MeOH で溶出した。溶出液を濃縮後、濃縮液を pH 2 以下に調整し、酢酸エチルで抽出した。抽出液を濃縮後、褐色不定形粉末 (約 840 mg) および茶色ペーストを得た。セリン・グルコース系においては、茶色ペーストを HPLC (ODS) を用いて精製後、茶色不定形粉末 (約 250 mg) を得た。これらを NMR や MS などの機器分析に供し、構造解析を行った。
【結果】スレオニン・グルコース系、セリン・グルコース反応溶液を DAD-HPLC 分析した結果、300 nm と 360 nm に二つの極大吸収を示すピークを認めた。スレオニン・グルコース系から得られた物質の構造解析の結果、(2*R*,3*S*,7a*S*)-6-ヒドロキシ-2,5,7a-トリメチル-7-オキソ-2,3-ジヒドロピロロ[2,1-*b*]オキサゾール-3-カルボン酸を、セリン・グルコース系から得られた物質の構造解析の結果、(3*S*,7a*S*)-6-ヒドロキシ-5,7a-ジメチル-7-オキソ-2,3-ジヒドロピロロ[2,1-*b*]オキサゾール-3-カルボン酸を同定し、新規のピロロオキサゾール誘導体を見出した。
(1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 79, 1350-1355 (2015)

Maillard reaction, threonine, serine

発表番号：3E017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アスコルビン酸添加におけるアントシアニン分解物の探索

# Screening of the anthocyanin resolvent in the ascorbic acid addition

○江崎 正信[1]、野口 治子[2]、津久井 亜紀夫[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学)
○ Masanobu Ezaki[1], Haruko Noguchi[2], Akio Tsukui[2], Katsumi Takano[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric, [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric.)

【目的】アントシアニン（AN）は、高濃度のアスコルビン酸(AA)存在下では急激に退色する。このため AN と高濃度の AA を含む果実加工品においてはその赤色を長期間保つことができない。そこで本研究では食品中 AN の色調保持を目指し、AA による AN 退色機構の解明するための基礎的研究を行っている。本報では、AA 酸化過程で生じるラジカル化合物およびアニオン化合物による AN 分解作用を明らかにするためラジカル開始剤である 2,2'-Azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride1(AIPC)およびシアン化物イオン（アニオン）を生成するシアン化カリウムをモデル化合物として用い、AA による AN 分解機構の推定を行った。
【方法】Cyanidin 3-Glucoside Chloride(0.3mmol)を McIlvaine buffer(pH3)にて溶解した AN 溶液を試料として用いた。AN 溶液に対し AA(3mmol)、AIPC(0.25mmol)または KCN(1mmol)を添加し、保存温度 40℃、暗所にて保存した。各溶液中の AN 分解産物の経時的な変化について HPLC を用い、以下の分析条件にて測定した。検出器：SPD-M10Avp(島津製作所)、カラム：agilent eclipse plus c18 (3.5μm,2.1×150mm)、カラムオーブン温度:35℃、溶離液 A;0.1%TFA,B;ｱｾﾄﾆﾄﾘﾙ(0.1%TFA)、流速:0.15ml/min、グラジェント条件：B 液濃度 0～30 分 20%,30～40 分 40%。
【結果】AN 溶液に AA を添加したサンプルにおいて保存 48ｈ後に AA、AN 以外の 10（AA P1～AA P10）のピークが検出された。これらピークを AA による AN 分解産物とし、AIPC 添加サンプルおよび KCN 添加サンプルより得られたクロマトグラムとの比較を行った。AIPC 添加サンプルでは AN 以外の 6 ピーク（AIPC P1～AIPC P6）を検出し、そのうち AIPC P4,P5,P6 が AA 添加サンプルの AA P5、P6、P8 とリテンションタイムが一致した。KCN 添加サンプルにおいて AN 以外の 6 ピーク（KCN P1～P6）を検出し、そのうち KCN P3,P4,P5,P6 が AA 添加サンプルの AA P5,P7,P9,P10 とリテンションタイムが一致した。現在、AA による AN 分解機構は AA の酸化過程で生成されるモノデヒドロアスコルビン酸フリーラジカル(MDHA)が主な原因だと考えられ、今回の結果より AIPC を用いた試験からラジカルによる AN 分解作用が再度確認できた。しかし、シアン化カリウム添加において AIPC ラジカルと異なった AN 分解傾向がみられ、今後 AA が酸化過程で生成するアニオン化合物における AN への影響も再度検討する必要があると考えられた。

anthocyanin, ascorbic acid, anion

発表責任者：江崎　正信（masanobu@matsusaka.com）

発表番号：3E018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# チーズの貯蔵褐変とメイラード反応
# Browning of Cheese during Storage and the Maillard Reaction

○井越 明日香、佐藤 由依、亀山 久美、村田 容常（お茶大院ライフ）
○Asuka IGOSHI, Yui SATO, Kumi KAMEYAMA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】チーズは長期貯蔵により褐変する。チーズの原料である牛乳の褐変については多くの研究が行われおり、その主要因は Lac とタンパク質であるカゼインによるメイラード反応であると考えられている。チーズの褐変も牛乳の褐変と同様にメイラード反応によるものと考えられる。しかし、牛乳に比べてチーズ中の Lac ははるかに少なく、牛乳よりも多くのアミノ酸とペプチドが含まれている。牛乳と大きく成分組成の違うチーズの貯蔵褐変とメイラード反応の関係についての化学的検討はなされていない。また、チーズにより褐変しやすいものとしにくいものがあるが、その違いの理由も解明されていない。本研究では、チーズの褐変の要因物質を同定し、メイラード反応との関係を明らかにすることを目的とした。
【方法】チェダーチーズをヘキサン、酢酸エチル、エタノール、メタノールの順で抽出した。メタノール抽出物を濃縮乾固後、水に溶解し、ODS カラムに供した。その非吸着画分を Amberlite IR-120[$H^+$] に供して再び非吸着画分を得た。これを濃縮後、アセトンを加え上清を得た。これをシリカゲルクロマトグラフィーに供し、n-ブタノール/ 酢酸 / 水 (12:1:1) にて溶出させた。濃縮乾固後、褐変関係成分を NMR、MS、HILIC-HPLC、TLC により同定した。チェダーチーズを 70˚C で溶かし、Gal、Glc、Lac をそれぞれチーズに対して 0.1~1%になるように添加した。これをフィルムに包み 40℃で貯蔵し、L*、a*、b*値を測定し、ΔE を算出した。
【結果】各抽出液を 70˚C で貯蔵したところ、メタノール抽出液が最も強く褐変した。このメタノール抽出物からクロマトグラフィー等を用いて褐変要因物質を単離し､機器分析により Gal と同定した。異なるブランドのチェダーチーズについて同様の分析をしたところ、褐変しやすいチーズ（A）の褐変に寄与する物質を Gal と同定した。一方褐変しやすいチーズ（B）においては、Gal ではなく Lac が検出された。あまり褐変しないチーズ（C）からはどちらの糖も検出されなかった。このことから、Gal と Lac がチーズ褐変の要因物質であることが示唆されたため、チーズに Gal、Glc、Lac をそれぞれ添加し貯蔵試験を行った。その結果、Gal を添加したチーズが最も褐変しやすく、Gal 量がチーズの褐変に大きく関与することが明らかとなった。Gal は Glc に比べ鎖状構造の存在割合が大きいためチーズの褐変により寄与すると考えられた。現在、チェダーチーズ以外のチーズの褐変と糖含量の関係について検討している。

cheese, maillard reaction, browning

発表番号：3E019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品の複合臭とイミテーションフレーバーに対するマウス嗅球応答パターンとヒト官能評価との比較

# Analysis of responses to food odors and imitation flavors in the mouse olfactory bulb and comparison to human sensory evaluation

○藤田 怜[1,2,3]、堀尾 奈央[2]、東原 和成[2,3]([1]長谷川香料（株）、[2]東大院農生科・応生化、[3]JST ERATO 東原化学感覚シグナルプロジェクト)
○Rei FUJITA[1,2,3], Nao HORIO[2], Kazushige TOUHARA[2,3] ([1]T. Hasegawa Co., LTD., [2]The Univ. of Tokyo, [3]ERATO Touhara Chemosensory Signal Project, JST)

【目的】

近年、マウスを用いて、嗅覚一次中枢である嗅球上の糸球体において、匂いに対する応答を可視化できる技術が進展している。この技術を用いて単一化合物と結合する嗅覚受容体の探索[1)]やキラル化合物に対する糸球体の応答パターンの検証[2)]など単一化合物に対する研究例が多く報告されている。しかし、本来、匂いは様々な化合物が特定のバランスで混在する複合臭であり、この複合臭の情報が嗅覚系でどのように処理されているかを解明することも重要な課題であるが、嗅球における匂い応答イメージング法を用いてそれを詳細に研究した例は少ない。そこで、複合臭である食品の匂いに対するマウス嗅球での応答を測定し、複合臭に対する匂い情報処理について詳細に調べることにした。

【実験】

数種類の食品、その食品から検出される香料化合物を使って、ヒトの官能で匂いを模したフレーバー（以下、イミテーションフレーバー）、ヒトにとって重要か否かに関わらず食品の香気分析で検出される化合物で組んだ複合臭をマウスに嗅がせ、それぞれに対する匂い応答を嗅球で測定し、マウスが食品の匂いからどのような化合物の匂いを抽出して受容しているのか、詳細に検証した。またその結果に関して、ヒトの官能評価とどの程度類似性があるのかについても検証した。

【結果及び考察】

数種類の食品について実験を行ったところ、マウスがそれぞれの食品から認識している匂い化合物群を、嗅球の匂い応答を指標に同定することができた。食品ごとに、ヒトが重要だと考えているイミテーションフレーバー中の化合物に対して強く応答するものもあれば、ヒトが重要だと思っていない化合物に対して強く応答するものもあることがわかった。これらの結果は、化合物毎にヒトとマウスで閾値が異なるために、食品の匂いから認識している化合物の種類に差が生じていると考えられる。また、マウス嗅球で応答を示す匂いを混ぜたものと食品そのものの匂いがマウスにとって似た匂いなのかを行動実験レベルで検証した。さらに各サンプルのヒト官能評価とマウス匂い応答イメージング結果の比較も行った。

【参考文献】

1) Shirasu M *et al*., *Neuron* 81, 165-178 (2014)
2) Takai Y *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79, 1980-1986 (2015)

food odor, mouse olfactory bulb imaging, sensory evaluation

発表番号：3E020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# モモの香気特性における傷害および保存の影響について

# Influence of wounding and over-ripening for aroma profile of peach fruit

○飯島 陽子、角谷 南斗（神奈川工科大応用バイオ）
○Yoko IIJIMA, MINATO KADOTANI (Kanagawa IT)

【目的】国産モモは、ジューシーで上品な甘味や香りがあるため、最近では海外での人気も高く、輸出量も年々増加している。一方、国産モモは傷みやすいのが難点であり、傷害により褐変などが引き起こされ、見た目の品質は低下する。しかし、傷害によってモモの風味がどのように変化するかについては、詳細は分かっていない。そこで本研究では、モモの香気に着目し、モモにおける傷害が香気組成へおよぼす影響について調べることを目的とした。さらに、輸出を想定した過熟の香気組成への影響についても調べることとした。

【方法】山梨県産の白桃をサンプルに用いた。8 個体についてそれぞれ縫合線を中心として左側には手を加えず、右側については木槌で傷害を与え、12 時間室温で放置した。その後、左側と右側をそれぞれ分けて、液体窒素で凍結粉砕し、分析サンプルとした。また、過熟サンプルについては、摘果後 10 まで 15℃で保存し、経時的にサンプリングを行った。分析サンプルをバイヤル瓶に測りとり、超純水、飽和塩化カルシウム、内部標準（3-octanol）を加え、超音波処理を行い、ヘッドスペースガスについて SPME 法によって香気成分を捕集し、GC-MS 分析を行った。

【結果】各 GC-MS データについて、ピークアライメント、化合物の同定を行い、主成分分析、OPLS-DA 分析を行った。その結果、傷んだ部分と無傷の部分では個体差はあるものの、香気組成に違いがみられることが確認できた。S プロットにより、傷んだ部分と無傷の部分それぞれに量的に多い成分を精査した結果、傷んだ部分では、ethanol、ethyl acetate が増加することが分かった。また、それ以外のエステル類は、傷害によって増加するものと変化のないものが存在した。しかし、モモの主要成分であるラクトン類は、傷害によって増減はみられなかった。過熟による香気組成についても組成に変化が見られたので、その結果についても発表予定である。

Peach, Aroma profile, Wounding

発表責任者：飯島陽子（iijima@bio.kanagawa-it.ac.jp）

発表番号：3E021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コリアンダーの部位の違いによる香気成分の比較

# Comparison of flavor compounds between different parts of coriander

○伊藤 裕才、斉藤 みなみ、寺門 料子 (共立女子大家政)
○Yusai ITO, Minami SAITO, Ryoko TERAKADO (Kyoritsu Women's Univ.)

[目的] コリアンダー（*Coriandrum sativum* L.）はパクチーまたは香菜とも呼ばれる独特な香気をもつセリ科の植物であり、乾燥した葉や種子および生葉が東南アジア料理等でよく用いられる。葉の香気成分は *trans*-2-dodecenal を中心とした 2-アルケナール類と報告されているが、抽出や抽出後の処理によって香気成分の組成は変化することも報告されている[1]。また、部位における成分の違いや、香気成分の機能および生合成に関しては未知な部分が多い。そこで、本研究では市場で手に入るコリアンダーの乾燥葉および生葉を対象に、部位別の香気成分の分析を行ったので報告する。
[方法]コリアンダーの乾燥葉および生葉の全草を 50%メタノール溶液中でホモジナイズし、得られた抽出液中の香気成分をポラパック Q 樹脂に吸着させた。香気成分をエーテルによって樹脂から回収した後、常温で減圧濃縮して試料とした。これとは別にコリアンダーの生葉を根、茎、葉に分けて細切し、ヘキサン中に４℃で３日間浸漬して香気成分の抽出を行った。またコリアンダー全草を沸騰水に１分間漬けて酵素を失活させた後、同様にヘキサンで抽出した。この際、コリアンダー全草を真空パックし、熱水が草体に直接触れないようにした。香気成分の分析は GC-MS 分析[Shimadzu QP2010SE、column：DB-WAX (0.25mm i.d ×30m)]によって行われた。
[結果と考察]コリアンダー全草を 50%メタノール溶液でホモジナイズして得た抽出液からは、2-tetradecenal と 2-dodecenal を中心とした 2-アルケナール類および多数の微量副成分が観測された。さらに炭素鎖の長い 2-hexadecenal も多く含まれていたが、主成分と報告されることが多い 2-decenal はどの試料でも少量であった。乾燥葉からは 2-アルケナール類は検出されなかった。生葉を部位別に細切し、浸漬によって抽出した結果、葉と茎では 2-dodecenal と 2-tetradecenal 以外にこれらが還元した 2-dodecenol と 2-tetradecenol などのアルコール体が観測された。一方、根では 2-tetradecenal と 2-dodecenal が大半を占め、副成分はほとんど観測されなかった。コリアンダーにおいてはアルデヒド還元酵素によるアルケナールの還元が報告されている[1]。そこで抽出過程での酵素反応を抑止すべく、細切前の全草を沸騰水中で短時間処理（ブランチング）した。ブランチング後の草体を、葉および茎と根に分けて細切し分析した結果、アルコール体は大きく減少し、2-tetradecenal と 2-dodecenal を中心とした 2-アルケナール類のみが主成分として観測された。さらに茎および葉と根では 2-アルケナール類の組成に大きな差が見られた。
[1] To Quynh CT, Iijima Y, Kubota K. *J Agric Food Chem.* 2010 58(2):1093-9

coriander, alkenal, tetradecenal

発表責任者：伊藤裕才（yusito@kyoritsu-wu.ac.jp）

発表番号：3E022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 醸造醤油の香気に寄与するチオール化合物 2-methyl-3-furanthiol に関する研究
# Contribution of 2-methyl-3-furanthiol to the Aroma of Fermented Soy Sauce

○孟 き[1]、北川 莉帆[1]、今村 美穂[2]、片山 弘[2]、小幡 明雄[2]、菅原 悦子[1]（[1]岩大教、[2]キッコーマン（株））
○QI MENG[1], RIHO KITAKAWA[1], MIHO IMAMURA[2], HIROSHI KATAYAMA[2], AKIO OBATA[2], ETSUKO SUGAWARA[1] ([1]Iwate Education Univ., [2]Kikkoman Corporation)

目的：我々は醸造醤油の香気にチオール化合物が重要な役割を果していることを報告した[1)]。チオール化合物は含硫アミノ酸と糖類のアミノカルボニル反応によって生成するが、それぞれ特徴的で独特の香気特性を有している[2)]。本研究ではこれらの中から加熱肉様香気として知られている 2-methyl-3-furanthiol（2M3F）に着目し、醸造醤油からの同定・定量、香気に対する貢献度及び醸造醤油中での 2M3F 生成の影響要因について考察した。

方法：醸造醤油から溶媒直接抽出法により香気濃縮物を調製し、GC-MS により分析した。2M3F の標準物質と得られた香気濃縮物のマススペクトル、リテンションタイムの一致により 2M3F を同定した。GC-MS の SIM モードを用いる内部標準法による分析で、市販 5 種の醸造醤油と、3 種のアミノ酸液（酸加水分解植物性たん白）混合醤油の 2M3F を定量した。また、定量値を参考にして 2M3F を醸造醤油に添加し、官能評価により 2M3F の香気寄与度を明らかにした。さらに、2M3F の前駆物質と報告されているリボースとシステインを醸造醤油とアミノ酸液混合醤油に添加し、加熱による 2M3F の濃度変化を解明した。

結果:醸造醤油から加熱肉様香気である 2M3F を同定した。醸造醤油に含まれる 2M3F 濃度はアルコール水溶液中の閾値とされている 4ng/L[3)]を大きく上回るため、醸造醤油の香気に大きな影響を与えていると考えられた。一方、アミノ酸液混合醤油からは検出されなかった。また、官能試験により、醸造醤油中の 2M3F は一定濃度以上になると、加熱肉様の香りが有意に強くなると評価された。前駆物質とされるリボースとシステインを添加した醸造醤油を加熱すると 2M3F が大量に生成したが、同様の条件で加熱したアミノ酸液混合醤油では 2M3F は検出できなかったことから、醸造醤油では 2M3F の生成に寄与する成分の存在が示唆された。

1) Meng, Qi.; Kakuta, T. and Sugawara, E. *Food Sci. and Tech. Research*. **18**, 429-436 (2012)
2) Hofmann, T.; Schieberle, P. *J. Agric. Food Chem*. **46**, 235-241 (1998)
3) Tominaga,T. and Dubourdieu, D. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 29-33 (2006)

soy sauce, 2-methyl-3-furanthiol, aroma compound

発表番号：3E023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 様々な年代の日本食に含まれる成分の一斉分析

# Simultaneous analysis of the components contained in the various ages of Japanese diet

○坂本 有宇[1]、菅原 達也[2]、木村 和彦[3]、都築 毅[1]([1]東北大院・農、[2]京大院・農、[3]宮城大)
○Yu Sakamoto[1], Tatsuya Sugawara[2], Kazuhiko Kimura[3], Tsuyoshi Tsuduki[1] ([1]Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. of Agri. Sci., Kyoto Univ., [3]Miyagi Univ.)

【背景・目的】日本が長寿国になった要因の一つとして、日本食の影響が考えられている。これまでに、日本食に含まれる特徴的な成分については数多く研究されてきた。しかし、日本食まるごとが健康状態に及ぼす影響について、科学的に検討した研究はほとんどなかった。我々は以前の研究で、日本食は米国食に比べてストレス性が低く、旺盛な代謝が繰り返され、肥満になりにくいことを明らかとした [1]。しかし、日本食はここ 50 年で欧米の影響を受けて、その内容が大きく変化してきており、どの年代の日本食が健康維持に有益か分からなかった。そこで我々は、1960 年、1975 年、1990 年、2005 年の日本食（国民健康・栄養調査に基づいて調理作製）の健康有益性を比較するために、各年代の献立を実際に調理作成し、凍結乾燥、粉末化した食餌をマウスに与えた。その結果、1975 年の日本食が最も内臓脂肪蓄積を抑制し、この効果がタンパク質・脂質・炭水化物のエネルギーバランスのみに依存しないことを明らかとした [2]。しかし、日本食まるごとに含まれるどの成分が内臓脂肪蓄積抑制効果に寄与しているのかわからなかった。そこで、本研究では、各年代の日本食を様々な質量分析器を用いて一斉分析し、1975 年の日本食で見られた効果の要因となる成分の探索を行った。
【方法・結果】各年代の日本食のイオン性代謝物をキャピラリー電気泳動－飛行時間型質量分析計（CE-TOFMS）を用い、脂溶性代謝物を液体クロマトグラフィー飛行時間型質量分析計（LC-TOFMS）を用い、ミネラルを誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）を用いて分析した。その結果、CE-TOFMS では測定可能な約 900 個のイオン性代謝物のうち 261 個の成分が、LC-TOFMS では約 300 個の脂溶性代謝物のうち 66 個の成分が、ICP-MS では約 70 元素のうち 34 個の成分が検出できた。得られた 3 つの結果を統合し、主成分分析を行ったところ、各年代の日本食は成分的に大きな差異を有していた。第 1 主成分では年を追うごとに高値または低値を示している成分が抽出され、第 2 主成分では 1975 年の食事を中心に高値または低値を示す成分が抽出された。1975 年の食事を中心に健康有益性が高いことが示されているので、この第 2 主成分として抽出された成分に健康有益性を示す要因が含まれていることが示唆され、これらの成分は、魚類、大豆食品、野菜、鰹節、果物、緑茶等に多く含まれることが分かった。以上より、健康有益性の高い日本食の特徴として、魚、大豆食品、野菜、鰹節、果物、緑茶が多いことが示唆された。

[1] T. Tsuduki, et al., *J. Jpn Soc. Nutr. Food Sci.*, (2008).
[2] Y. Kitano, et al., *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, (2014).

Japanese diet, principal component analysis, mass spectrometry

発表番号：3E024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# NMR メタボリックプロファイリングによる和牛肉熟成過程の解析と熟成段階予測モデルの構築
# Comprehensive NMR and multivariate statistical analysis of compositional changes of Japanese Black cattle beef during aging

○小谷 良徳[1]、宮川 拓也[1]、小松 智彦[2]、田之倉 優[1]([1]東大院・農生科、[2]山形県農業総合研究センター畜産試験場)
○Yoshinori KODANI[1], Takuya MIYAKAWA[1], Tomohiko KOMATSU[2], Masaru TANOKURA[1] ([1]Grad. Sch. Agr. Life Sci., Univ. Tokyo, [2]Livestock Experiment Sta. of Yamagata Int. Agr. Res. Center)

【目的】近年、社会の嗜好や健康等に対する高まりを背景に牛肉の長期熟成が注目されている。核磁気共鳴（NMR）法は、食品中の成分の変質と損失を最小限に抑えて、化学的性質の異なる成分を定量的かつ網羅的に検出できる分析法であり、NMR と多変量解析を組み合わせた NMR メタボリックプロファイリングが、食品の機能評価やモニタリングなどに応用されている。本研究では $^1$H NMR によって観測される和牛肉の成分プロファイル変化から、熟成を特徴付ける成分を同定すること及び、熟成段階予測モデルを構築することを目的とした。
【方法】黒毛和牛 9 個体のロース肉を 5 分割し、真空包装中冷蔵下 2, 4, 6, 8, 10 週間熟成させた後、重水重クロロホルム混合溶媒中で多検体破砕機によって撹拌・抽出した。遠心分離後に重水層と重クロロホルム層をそれぞれ分取し、各々について $^1$H NMR スペクトルを測定した。測定は、緩和時間を考慮した定量測定、及び考慮しない迅速測定の 2 通り行った。シグナルの帰属は 2 次元 NMR スペクトル及び添加実験によって行った。各溶媒抽出サンプルについて、主成分分析（Principal Component Analysis; PCA）によってデータを概観し、OPLS 回帰（Orthogonal Partial Least Squares Regression）による熟成段階予測モデルを構築した。
【結果】$^1$H NMR スペクトル上でアミノ酸・糖・有機酸・脂質など 25 成分を検出した。重水抽出サンプルの定量 $^1$H NMR スペクトルを用いた PCA の結果、各熟成段階のサンプルは PC1 軸に沿って経時的に並び、PC2 軸は個体差を反映した。PC1 に関するローディングプロットにより、熟成過程で増加する成分として BCAA 等のアミノ酸と酢酸を、減少する成分として乳酸、クレアチン、カルニチン、IMP を同定した。また、同一の $^1$H NMR スペクトルから OPLS 回帰により熟成段階予測モデルを構築し、適合度を示す $R^2$ 値が 0.95、予測性能を示す $Q^2$ 値が 0.93 となる良好なモデルを得た。S plot によって検出された成分は、大部分が上記 PC1 軸と相関する成分と共通しており、熟成を特徴付ける成分であることが強く示唆された。熟成を特徴付ける成分のうち、PC2 との相関が小さく熟成に伴い増加したロイシンと減少したクレアチンの 2 成分比を用いて熟成週数との単回帰分析を行うことで、$R^2$ 値が 0.84 となる回帰式を得た。また、短時間の測定で得られた $^1$H NMR スペクトルを用いて構築した熟成段階予測モデルについても、予測精度は良好であった。

Beef, Aging, NMR

発表番号：3E025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# だしの評価への味覚センサーの応用

# Application of the taste sensor to an evaluation of the Dashi soup

○林 由佳子[1]、高橋 拓児[2]、松村 康生[1]、伏木 亨[3]([1]京大院農、[2]木乃婦、[3]龍谷大農)
○Yukako Hayashi[1], Takuji Takahashi[2], Yasuki Matsumura[1], Toru Fushiki[3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kinobu, [3]Ryukoku Univ.)

【背景と目的】日本食の味のベースになるものは「だし」である。だしは昆布と、魚類の節やしいたけ等の乾物を使った合わせだしとして一般的に用いられ、「うま味」を食品に与える。合わせだしは、昆布からのグルタミン酸と節や乾物からのイノシン酸やグアニル酸の核酸が共存することによって 100 倍閾値が下がるという、うま味の相乗効果を上手に利用している。だしをとるには時間がかかるため、今では液体や粉末状態や、インスタントにだしをとれるだしパックが市販されている。だしの「おいしさ」は、料理人の官能評価によるところが大きい。そこで、だしのおいしさを料理人に頼ることなく表現することを目的として、味覚センサーを用いて料理人が調製しただしと市販だしの評価を行った。
【方法】味覚センサーは、味認識装置 TS-5000Z（(株）インテリジェントセンサーテクノロジー、厚木市）を用いた。人工脂質膜プローブは食品用 5 本（AAE、CTO、CAO、COO、AE1）を用い、測定は 4 回反復して行った。だしは、料理人が昆布と鰹節から調製した。調製は、昆布 30ｇに対して水２Ｌを 62℃になるまで 10 分かけて加熱した。そのまま、2 時間同じ温度で保ち、昆布を取り出し 90℃まで加熱し鰹節 50ｇを入れ、15 秒後にペーパータオルで漉したろ液を「料理人だし」として使用した。また、「市販品だし」は、粉末、液体、だしパック形態のものを合計１２品購入し、各々吸い物用として調製した。擬似だしは、だしの組成を元にして、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、イノシン酸、塩化ナトリウムによって調製し味覚センサー測定の基準品として用いた。
【結果と考察】擬似だしは、無色・無臭であったが、料理人だしと市販だしは特有の黄金色と香りを示した。だしのうま味の主成分は、グルタミン酸、アスパラギン酸、ヒスチジン、イノシン酸である。それらで再構成した擬似だしは、味覚センサーによって料理人だし・市販だしと同程度のうま味を示した。しかし、奥行き感、複雑さ、味の広がり、コク、隠し味、うま味の余韻・後味に関する値に関しては、料理人だしは擬似だしや市販だしに比べて顕著に高値を示した。この差の要因となる物質は凍結乾燥では無くならず、不揮発性の物質もしくは非常に揮発しにくい成分と考えられる。
本研究によって料理人だしは、味覚センサーにおいても市販だしと異なることが明らかとなり、今後この要因となる成分に関して解析を進める予定である。
本研究は、生研センター「革新的技術創造促進事業（異分野融合共同研究)」(研究戦略名：医学・栄養学との連携による日本食の評価）の支援を受けて行った。

Taste Sensor, Taste, Dashi

発表責任者：林　由佳子（yhayashi@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3E026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ウメ'南高'果実貯蔵中のフェノール性化合物の成分変化

# Phenolics constituent change in stored Japanese apricot 'Nanko'

○堀西 朝子、安井 理世、中村 裕一、尾崎 嘉彦（近畿大生物理工）
○Asako HORINISHI, Riyo YASUI, Yuichi NAKAMURA, Yoshihiko OZAKI (Kindai Univ.)

【目的】 演者らはこれまでに、ウメ赤肉品種‘露茜’の未熟果を赤色色調の強化を目的に高濃度のエチレンガス存在下で追熟した場合、アントシアニンだけでなくネオクロロゲン酸も増加することを報告している[1)]。一方、演者らはウメの主要品種である‘南高‘果実のフェノール性化合物の解析を行い、カフェ酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸等のヒドロキシ桂皮酸類の誘導体が主であることを報告している[2)]。‘南高’では、梅酒や梅干への加工適期を設定する目的で貯蔵過程における有機酸や糖の変動の解析は行われているが、フェノール性化合物について詳細な分析は行われていない。そこで、‘南高’の貯蔵過程でのフェノール性化合物の変動についての検討を行ったので報告する。

【方法】 2015 年 6 月 8 日に和歌山県果樹試験場うめ研究所にて採取した‘南高’種のウメ果実を用いた。採取した果実はポリエチレン袋に入れ、20℃の恒温室に貯蔵した。採取当日及び 1、3、5、7、10 日間貯蔵した後、サンプリングを行い、種子を除き、果肉をペーストにして、直ちに-80℃で凍結した。各サンプルは凍結乾燥粉末とし、水抽出を行い、①Folin-Ciocalteu 法による総ポリフェノールの定量、 HPLC 法による②フェノール性化合物のプロファイルの比較、 ③クロロゲン酸類の定量、④アルカリ加水分解処理による構成ヒドロキシ桂皮酸の定量、⑤有機酸と糖の定量を行った。

【結果】 ‘南高’の貯蔵過程において、クロロゲン酸濃度は貯蔵開始直後から低下し始めたのに対し、ネオクロロゲン酸濃度は 5 日目以降に低下に転じた。これは、貯蔵開始直後からネオクロロゲン酸濃度の上昇が観察された‘露茜’の追熟過程での挙動とは異なっていた。構成ヒドロキシ桂皮酸について、*p*-クマル酸とフェルラ酸の濃度変化は少なかったが、カフェ酸濃度は 5 日目から低下した。収穫直後の濃度は、カフェ酸＞*p*-クマル酸＞フェルラ酸の順であったが、10 日目では *p*-クマル酸＞フェルラ酸＞カフェ酸となった。カフェ酸濃度の低下はクロロゲン酸類の変動を反映していると考えられる。本研究の結果から、ウメの品種や貯蔵方法によってフェノール性化合物の変動パターンが異なることが明らかになった。

【参考文献】

1）堀西ら 日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集 p. 2088
2）堀西ら 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集 p. 1935

Japanese apricot, phenolics, storage

発表番号：3E027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# レトルト食品に混入した虫の混入時期推定法の開発

# Development of the method to estimate the term of insect contamination in retort pouched foods

○坂井 浩晃[1]、垣谷 彩乃[1]、井上 智統[1]、表 雅之[2]、永富 康司[1]、宮本 靖久[1]、原山 耕一[1]([1]アサヒグループホールディングス（株)、[2]アサヒビール（株）)
○ Hiroaki SAKAI[1], Ayano KAKITANI[1], Tomonori INOUE[1], Masayuki OMOTE[2], Yasushi NAGATOMI[1], Yasuhisa MIYAMOTO[1], Koichi HARAYAMA[1] ([1]Asahi Group Holdings, LTD., [2]Asahi Breweries, LTD.)

食品への異物混入事例において虫の占める割合は高く、その混入時期を明らかにすることは混入原因を究明するうえで重要である。しかしながら食品の製造工程、虫の種類など変動要因は多種多様であり、混入時期推定は困難を極める。一般的な推定法としてはカタラーゼ試験が用いられているが、酵素の安定性や偽陽性といった問題が知られている。

そこで我々は、過去に飲料製品を対象として報告のあった CD スペクトル法および RT-PCR 法について、レトルト食品への適用を検討した。レトルト食品のモデル試験として、ゴキブリおよびハエを食品に添加し、レトルト加熱殺菌を行った。得られた虫体試料についてそれぞれ CD スペクトル測定および RT-PCR を実施した結果、タンパク質の著しい変性や RNA の消失が観測された。一方、電子レンジや湯せんといった消費者側での加熱調理を想定した条件においては、著しいタンパク質の変性や RNA の減少は認められず、非加熱と同様な結果となった。以上の結果より、これら２法は食品に混入した昆虫のレトルト加熱履歴を判定する有用な手法であると考えられる。

food safety, insect contamination, retort pouched foods

発表番号：3E028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米飯特性は炊飯中のプラチナ作用で変化する

# Cooked rice characteristics change in the platinum action during cooking

○辻井 良政[1]、木村 圭一[1]、吉田 貴美[2]、宮松 宏樹[2]、高野 克己[1]([1]東京農大・応生・ 化学、[2](株)エルブ)
○Yoshimasa TSUJII[1], Keiichi KIMURA[1], Takami YOSHIDA[2], Hiroki MIYAMATSU[2], Katsumi TAKANO[1] ([1]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [2]erubu co .,ltd.)

【目的】

コメの炊飯方法は、技術進歩により移り変わり、現在では電気炊飯ジャーが主流となっている。電気炊飯ジャーは 1950 年代に登場し、1960 年代には保温機能が開発され、炊飯から保温の一台二役となった。その後にタイマー機能 、温度管理のためのマイコン搭載など様々な改良が加えられ利便性が向上した。次に「いかにおいしいご飯が炊けるか」といった嗜好性を重視した改良がなされてきた。その一つの要因として炊飯方法の違いによる影響が大きく、浸漬時間、昇温速度の違い、熱効率向上のための IH（Induction Heating）および圧力処理などがある。また、近年では内釜の素材にプラチナ、ダイヤモンド、土鍋、炭釜など使用している。本研究では内釜の表層コーティングにプラチナを配合した場合の影響について検討行い、若干の知見が得られたので報告する。

【試料および方法】

富山産のコシヒカリを試料米として、プラチナをコーティングした内釜を使用し炊飯した米飯を用いて理化学的測定を行った。テクスチャーはテンシプレッサー(タケトモ電機)を用いて集団法にて測定を行った。次に米飯表層から純水にて可溶性化合物を抽出し、還元糖の測定を行った。さらに米飯を２％四酸化オスミウム溶液に浸け固定し、エタノールで脱水処理し、プロビレンオキシド、樹脂による置換を繰り返し、低温樹脂活断法（ 液体窒素中） にて活断面の作成を行った。その後、臨界点乾燥機（日立製 HCP-2）にて乾燥、イオンスパッター（Eiko 製） により白金パラジウムをコーティングし、走査型電子顕微鏡（日立製 S-4000）にて観察した。そして内釜を用いた改良型炊飯特性試験にて米飯評価を試みた。

【結果】

プラチナコーティングした内釜を用いて炊飯した米飯のテクスチャーは、コントロールよりも柔らかく、表面の粘りが強くなる傾向となった。米飯表層の還元糖量は増加する傾向がみられた。電子顕微鏡で観察した活断面は、デンプン糊と思われる面積の領域が多くみられた。改良型炊飯特性試験では、加熱吸水率および膨張容積が低くなる傾向がみられた。これらの結果から、プラチナコーティングした内釜は、炊飯中に米飯特性を変化する効果があることが示唆された。これらが米飯食味の向上に関与している可能性があると考えられた。

Platinum, Cooked rice characteristics, Cooking rice

発表責任者：辻井良政（96tsujii@nodai.ac.jp）

発表番号：3E029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小麦登熟過程中の PDI 活性の挙動解析

# A behavior analysis of PDI activity in wheat during grain filling

○加藤 亮[1]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]（[1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・食化技セ、[3]東京農大応生・化学）
○ Ryo Kato[1], Tomohiro Noguchi[2], Katsumi Takano[3] ([1]Agrichemi., Agr., Grad.Sch., Tokyo Univ.Agric., [2]Fac.Biosci., FPC, Tokyo Univ.Agric., [3]Dept.Appl.Biol.chem., Fac.Biosci., Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

小麦粉加工品の品質は生地中のグルテンの性状に依存し、この性状にはタンパク質間のジスルフィド結合(S-S 結合)が重要な働きをする。当研究室では同 S-S 結合の形成に対しコムギ内在 PDI の関与を検討し、小麦粉内在の PDI 活性量はコムギの品種間で差異がみられることを報告した。小麦粉やその加工品の品質は同一品種においてもコムギの生育環境や栽培方法により異なることから、これらの要因は PDI 活性量にも影響を与えることが考えられる。そこで、本研究では小麦の栽培条件の差異による影響の基礎的な研究としてコムギ登熟過程中における PDI 活性量の変化を解析した。

【方法】

試料のコムギは中力品種である「さとのそら」(2014 年および 2015 年, 埼玉県産）を用いた。同一圃場にて播種時期を変化させ(2013 年:11 月 9 日播種、2014 年:11 月 10 日、12 月 3 日及び 10 日播種)栽培した。コムギの出穂開花日を 0 日目とし、穂を 0～35 日間経時的に採取したものを試料とした。各生育段階においてコムギ種子 5 粒から PDI を抽出し、活性量をに還元活性測定法(基質：インスリン)にて測定した。また、成熟粒におけるタンパク質量は CN コーダーにて窒素量を測定し算出した。

【結果】

適正播種日であった 2013 年 11 月 9 日および 2014 年 11 月 10 日播種では、出穂開花日はそれぞれ 4 月 25 日および 4 月 23 日であった。12 月 3 日および 10 日播種では、約 1 か月遅延して播種を行ったが、いずれも 1 週間後の 4 月 29 日に開花した。また、2013 年 11 月 9 日、2014 年 11 月 10 日、12 月 3 日および 10 日播種の各成熟粒におけるタンパク質量はそれぞれ 7.4、10.8、9.4 および 10.2(%)であった。小麦粒中の PDI 活性量を測定したところ、いずれの播種日においても登熟が進むにつれ活性の増加が確認され、出穂開花後 10 日目以降に活性量が急激に上昇し、2014 年 11 月 10 日播種の増加量が最も高かった。また、2014 年 11 月 10 日の 20 日目で 1.01(Unit/コムギ 1 粒)で最も活性量が高くなり、他の試料では 25 日目が最も高く、いずれもその後減少する傾向であった。急激な活性増加がみられた開花後 11 日～15 日間の平均気温は、増加量の多かった 2014 年 11 月 10 日では 19.6℃であったが、増加量の少ない他の試料では 16.5～18.6℃と低い傾向を示した。

Protein Disulfide Isomerase, Wheat, Grain filling

発表番号：3E030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳化 *d*-リモネン噴霧乾燥粉末からの *d*-リモネン徐放挙動に及ぼす賦形剤の影響

# Effect of wall materials on *d*-limonene release behavior from emulsified *d*-limonene in spray-dried powders

○高重 至成[1]、四日 洋和[2]、安達 修二[3]、吉井 英文[1] ([1]香大院農、[2]京学大バイオ、[3]京大院農)
○Shisei TAKASHIGE[1], Hirokazu SHIGA[2], Shuji ADACHI[3], Hidefumi YOSHII[1] ([1]Kagawa Univ., [2]Kyoto Gakuen Univ., [3]Kyoto Univ.)

［目的］　食品フレーバーの徐放の制御は食品のおいしさを考える上で非常に重要である．噴霧乾燥による粉末香料の作製では，噴霧乾燥時のフレーバーおよび粉末の回収率に加え，貯蔵時の安定性の点々から，粉末からのフレーバーの徐放特性が重要となる．フレーバーの徐放挙動は，粉末を保存する環境の温度や湿度に大きく依存する．また，粉末化する際に用いる賦形剤の種類によっても異なると考えられる．賦形剤の分子物理化学的特性（分子構造やガラス転移温度 $T_g$ など）がフレーバーの徐放特性に影響を及ぼすと考えられるが，詳細な研究は行われていない．そこで本研究では，噴霧乾燥法により作製した *d*-リモネン粉末の徐放挙動に及ぼす賦形剤の影響を明らかにすることを目的として，賦形剤としてショ糖（Suc），α-ラクトース（Lac），マルトデキストリン（MD，Dextrose Equivalent（DE）= 25，19）を用いて *d*-リモネン粉末を作製し，*d*-リモネンの徐放挙動を恒温恒湿の条件下で検討した．

［実験方法］　賦形剤（Suc，Lac，MD（DE=25），MD（DE=19）），乳化剤（乳蛋白質加水分解物（エマルアップ，森永乳業）），抗酸化剤（アスコルビン酸ナトリウム）を蒸留水に溶解したのち，*d*-リモネンと中鎖脂肪酸トリアシルグリセロール（アクターM-2，理研ビタミン）を添加し，攪拌して乳化液を作製した．噴霧乾燥機（L-8型，大川原化工機製）を用いてその乳化液を乾燥し，*d*-リモネン粉末を調製した．作製した粉末は，目開き篩径106 μmと150μmで分級したのち徐放試験に供した．*d*-リモネン粉末（約0.1 g）をガラス製試料瓶に入れ，各種飽和塩を用いて関係湿度を44，60，68，75，80%に調整したデシケーター内（50℃）に静置した．所定時間毎に試料を採取し，粉末中に残存する *d*-リモネン量をガスクロマトグラフィー（GC-2014，島津製作所）で測定した．

［結果及び考察］　賦形剤に MD（DE=25，19）を用いた場合，湿度が高いほど徐放速度が大きくなり，湿度と徐放速度に相関が認められた．これは吸湿による賦形剤のガラス転移温度が低下し，アモルファスからラバー状態へと軟化して徐放速度が大きくなったと考えられる．賦形剤に Lac を用いた場合，44%RH と 83%RH では急激に徐放し，8 日後では 8 割が放出されたが，58，68，75%RH では約半分の徐放にとどまり，湿度と徐放速度は相関しなかった．同様に，賦形剤に Suc を用いた場合も，湿度と徐放速度が相関しなかった．これは，Lac，Suc の $T_g$ が低く，低い湿度でコラップス現象が生じ，粉末の表面に被膜が形成されて徐放速度が低下したためと推察される．Lac の場合は，粉末表面がアモルファス化していないため，44%RH で徐放速度が大きかったと考えられる．

flavor, spray-dried powder, emulsion

発表責任者：吉井英文（foodeng.yoshii@ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：3E031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 醸造用ブドウにおける果汁成分中からの新規成熟指標探索

# Studies on the new ripening index in juice of wine grapes

○石川 勇人[1]、潮上 史生[2]、斉藤 史恵[1]、久本 雅嗣[1]、三澤 彩奈[2]、三澤 茂計[2]、奥田 徹[1]([1]山梨大ワイン研、[2]中央葡萄酒（株））
○ Yuto ISHIKAWA[1], Fumio SHIOGAMI[2], Fumie SAITO[1], Masashi HISAMOTO[1], Ayana MISAWA[2], Shigekazu MISAWA[2], Tohru OKUDA[1] ([1]EnolVitic Univ.Yamanashi, [2]Chuo Budoshu Co.)

［背景・目的］

従来醸造用ブドウの収穫日の決定には，糖度および酸度を指標としてきた．しかし，これらの指標は果実成熟期での変化が緩慢であり，直接的な指標としての利用は困難である．実際にワイン醸造家は糖度，酸度以外に種子の渋みや香り等を総合的に判断し収穫日を決定しており，これには長年の経験と勘が必要となる．

そこで本研究では，収穫日前後に含有量が大きく変化する成分を探求し，新規の成熟指標として提案することを目的に，醸造用ブドウ品種（*Vitis vinifera* L.）であるシャルドネおよびメルローを対象として，成熟期における成分変化を分析した．本学会では，ブドウ果汁中の成分変化について報告する．

［方法・結果］

収穫期前後の各ブドウを決められた区画内からランダムに 100 粒採取し試料とした．試料ブドウを圧搾し得られた果汁を用いて，従来指標である糖度，滴定酸度を測定した．また，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて，有機酸，ポリフェノール，アミノ酸分析を行った．

糖度および滴定酸度は，収穫日前後での増減は緩慢となり，知見通りの結果となった．

有機酸分析より主要な有機酸は酒石酸，リンゴ酸の 2 種であった．酒石酸は成熟に伴いやや減少する傾向にあり，リンゴ酸は滴定酸度の変化と類似して収穫期前に大きく減少するが，収穫日前後での減少は緩慢という挙動を示した．

ポリフェノール分析より主要なポリフェノールはカフタリック酸であった．カフタリック酸は収穫期前に増減が見られたが，収穫日前後ではほぼ一定であった．

アミノ酸分析より収穫期での主要なアミノ酸（窒素性化合物）は，プロリン，アラニン，アルギニン，アンモニア，γ –アミノ酪酸，グルタミン酸であった．これらは，成熟に伴い増加するグループ（プロリン，γ–アミノ酪酸），減少するグループ（アンモニア），変化の少ないグループ（アラニン，アルギニン，グルタミン酸）に分類できた．中でもプロリンの成熟に伴う増加量は著しく，現段階において新規の成熟指標となる可能性が高いと考えている．

wine, grape, ripening

発表番号：3E032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 浸透圧脱水凍結が牡蠣の品質に及ぼす影響
# Influence of osmotic dehydration and freezing on oyster quality

○易 峰、川井 清司、羽倉 義雄（広島大院生物圏科学）
○Feng YI, Kiyoshi KAWAI, Yoshio HAGURA (Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【背景・目的】

牡蠣の生産現場においてバルクの牡蠣の冷凍処理を行う場合、設備や技術的な制約により、緩慢凍結になる場合が多い。一般に緩慢凍結では、食品内の水が粗大な氷結晶に成長するため、組織構造を破壊し、解凍後の品質が大幅に低下することが知られている。本研究では、氷結晶の粗大化を防ぐ目的で、牡蠣の水分の一部を脱水し凍結する方法を提案し、その評価方法を検討した。具体的には、新鮮な牡蠣を種々の塩分濃度の水溶液で浸透圧脱水し、凍結処理（緩慢凍結、急速凍結）し、解凍・復水後の牡蠣の品質を評価した。品質の評価には、電気物性の測定、力学物性の測定および顕微鏡観察を行った。

【方法・結果】

広島県呉市で水揚げされたマガキを直ちに剥き身（大粒牡蠣：約20g）にし、これを新鮮試料とした。この新鮮試料を1%、3%、5%、7.5%、10%の食塩水（5℃、2000ml）に12 時間浸漬し、脱水操作を行った（脱水試料）。次に、この脱水試料を500mlの脱水食塩水とともにフリーザーバックに充填し、凍結操作（緩慢凍結、急速凍結）を行い、引き続き、-20℃で所定の期間（0～6ヶ月）凍結保存を行った。凍結保存した試料を5℃の復水用の食塩水（0～3%）を用いて、解凍操作と復水操作を同時に行った（復水解凍試料）。但し、復水操作では、牡蠣の塩分濃度が新鮮牡蠣の塩分濃度と同じになるように復水時間を設定した。新鮮牡蠣および復水解凍試料の品質評価を行った。電気物性の測定では、牡蠣の外套膜上に電極を設置し、交流における電気抵抗（インピーダンス）を測定した。力学物性の測定では、材料試験機を用いて牡蠣のヤング率(弾性率）を測定した。顕微鏡観察では、試料をHE染色し、光学顕微鏡を用いて組織観察を行った。

復水解凍試料の周波数-インピーダンス曲線は、浸透圧脱水時の塩分濃度により大きく異なっていた。新鮮試料と比較すると、5%浸透圧脱水処理を行った復水解凍試料のインピーダンス曲線は新鮮試料とほぼ同じであったが、他の処理条件ではインピーダンスは全て低下していた。また、復水解凍試料のヤング率は、新鮮試料よりも低くなる傾向を示し、弾力性の低下が認められた。光学顕微鏡を用いた組織観察では、新鮮試料、脱水試料、凍結試料、復水解凍試料の比較を行い、脱水操作、凍結操作、復水解凍が牡蠣の組織構造に及ぼす影響を検討した。

osmotic dehydration, freezing, oyster

発表責任者：易峰（yifeng123a@hotmail.com）

発表番号：3E033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 蒸気吹き込み法によるエマルションの調製 ～攪拌速度及び攪拌槽の槽径が分散粒子に及ぼす影響～
# Preparation of O/W emulsion using vapor injection method - Influence of agitation speed and tank diameter on dispersed particle properties -

○村上 亮介[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏科学)
○Ryosuke MURAKAMI[1], Kiyoshi KAWAI[2], Yoshio HAGURA[2] ([1]App. Bio. Sci., Hiroshima Univ., [2]Biosphere Sci., Hiroshima Univ.)

【背景・目的】
蒸気吹き込み法とは、水と分散相となる精油の共沸混合蒸気を単孔ノズルより連続相中に吹き込むことでエマルションを調製する方法である。共沸混合蒸気を連続相中に吹き込むと、共沸混合蒸気の気柱が形成される。さらに，気柱と連続相との間のせん断力により分裂気泡が生成される。この気泡は冷却により凝縮し、水蒸気は水相である連続相中に溶解し、精油蒸気は凝縮液化後、エマルション化する。演者らは、①乳化剤未使用でエマルションの調製が可能であること、②従来の乳化法・乳化装置では調製することができなかった高粘度エマルションの調製が可能であること、③連続相の粘度が分散粒子性状に及ぼす影響などを明らかにしてきた。ところで蒸気吹き込み法では、連続相の流動状態（静止条件、攪拌条件）により、調製されるエマルションの粒子性状（粒子径分布、平均粒子径、SPAN 値など）大きく変化する。そこで本報告では、攪拌条件下での蒸気の吹き込み分散粒子性状に及ぼす影響については検討を行うことにした。具体的には、エマルションの調製時の、連続相の攪拌速度及び攪拌槽の槽径が分散粒子性状に及ぼす影響について検討した。
【方法・結果】
連続相にはジェランガムゾル、分散相には d-リモネンを用いた。連続相の攪拌条件（攪拌速度、邪魔板の有無）及び攪拌槽の槽径を変え、蒸気吹き込み法によりエマルションの調製を行った。調製したエマルションの分散粒子の粒子径分布を、レーザー回折式粒度分布測定装置（SALD-2000J, ㈱島津製作所）を用いて測定し、平均粒子径・SPAN 値などを算出した。邪魔板の設置により、攪拌の効率は向上した。しかし、攪拌速度の増加に伴い、エマルションの粒子径も増加した。また、攪拌槽の槽径の影響もあわせて検討した。その結果、攪拌効率の向上と分散粒子の衝突頻度との間に何らかの関連性があることが見出された。

O/W emulsion, vapor injection method, dispersed particle properties

発表番号：3E034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 炭酸飲料水の氷晶メカニズムに関する研究

# Research of the carbonated soft drink freezing mechanism below congealing point

○菅沼 剛[1]、鈴木 徹[2] ([1]アサヒ飲料株式会社、[2]東京海洋大学大学院)
○Takeshi Suganuma[1], Toru Suzuki[2] ([1]ASAHI SOFT DRINKS CO.,LTD, [2]Tokyo University of Marine Science and Technology)

【背景・目的】

氷点下をコンセプトとしたボトル詰め炭酸飲料は、中味液が凍結する寸前まで過冷却した状態で消費者に提供される。かかる氷点下にある製品は、ある一定条件下で消費者がボトルを開栓することで、飲料内部に微細な氷結晶が徐々に発生し、視覚的、味覚、のど越し等、これまでに無い形態の飲料の提供を可能とする。しかしながら、これら過冷却解消に伴う氷結現象（呼称 ＥＸ現象）は不安定で、従来の方法では安定に供給することは困難であった。本研究では、それらを安定に供給するために、ボトル詰め炭酸飲料開栓時に、過冷却が解消され氷結晶が発生する現象のメカニズムを科学的根拠に追究した。さらに、その結果を応用し、『-5℃を安定的に維持可能な専用冷蔵庫』と『-5℃で発色するラベル』とを組み合わることで、かかる製品の安定供給を可能とする技術開発を行った。本報告では、それらの経緯についての科学的発見、技術開発について述べる。

【方法・結果】

ＥＸ現象解明に向け、まず本現象を再現可能な評価装置を製作、各種条件変更を行い、ＥＸ現象のメカニズム解明を行った。炭酸飲料は中味液から遊離した炭酸ガスによりＰＥＴボトル空寸部が加圧状態となりつつ、凝固点以下の温度に冷却され、中味液が凍結せずに過冷却状態となっている。これが飲用時の開栓により空寸部の炭酸ガスが抜ける事でＰＥＴボトル空寸部の圧力が急激な低下を起こし、これに伴う気液界面の温度低下（断熱膨張）が起こる事で過冷却が解消される。この気液界面の温度低下に関しては、ＰＥＴボトル空寸部内で一律ではなく、界面近傍の変化がより顕著（⊿T≒-10℃）であった。また過冷却解消される事で気液界面に氷核が発生、これを起点にＰＥＴボトル底部に向かってＥＸ現象が進行していく事も判明した。

次にＥＸ現象発生に必要なＰＥＴボトル内圧力、温度、冷蔵保管庫から取り出した後の開栓までの時間、開栓速度など種々の条件の与える影響についても検証を行った。その結果、ＰＥＴボトル内圧力、温度については、ある一定値以上必要。冷蔵庫から取り出し後の開栓までの時間については、およそ 3 分以内。開栓速度については、一般的な開栓速度であれば影響なし。以上からＥＸ現象には、ＰＥＴボトル内圧力、温度、開栓までの時間のコントロールが重要であり、これら必要条件を全て満たす事でＥＸ現象が発生する事が確認された。

congealing point, carbonated soft drink, freezing

発表責任者：菅沼剛（takeshi.suganuma@asahiinryo.co.jp）

発表番号：3E035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 銀担持ゼオライトによるウイスキー硫黄化合物の選択的除去技術の開発

# Sulfur removal from new-make whisky with granular silver zeolite

○杉本 利和[1]、村田 充子[2]、各務 成存[3]、河島 義実[2]、朝日 輝[1]、細井 健二[1] ([1]ニッカ技開セ、[2]出光先進研、[3]出光生技セ)
○Toshikazu Sugimoto[1], Mitsuko Murata[2], Narinobu Kagami[3], Yoshimi Kawashima[2], Akira Asahi[1], Kenji Hosoi[1] ([1]Technical development center, The nikka whisky distilling co., ltd., [2]Advanced technology research laboratories, Idemitsu Kosan co., ltd., [3]Technology developement office, Idemitsu Kosan co., ltd.)

【目的】モルトウイスキーは麦芽を原料とした麦汁を酵母によりアルコール発酵させたモロミを蒸留することにより製造される。蒸留中に原料や酵母菌体の含硫アミノ酸に由来する硫黄化合物が生成されるため、蒸留直後のモルトウイスキー蒸留液（ニューポット）には「未熟臭」と呼ばれる好ましくない香気が存在する。主要成分である Dimethyl sulfide (DMS)はキャベツ様、Dimethyl disulfide (DMDS)はタマネギ様、Dimethyl trisulfide (DMTS)は漬物様のにおいを持つ。通常、ニューポットはオーク材の樽にて長期間貯蔵され、その間に上記硫黄化合物は酸化や揮散等により徐々に減少・消失し、好ましいウイスキー香味が形成される。一般的に、DMS は 1～2 年程度、DMDS で 8～10 年程度、DMTS は 10 年以上かけて消失することが知られている。本報告では、銀担持ゼオライト（AgY 型ゼオライト）をろ過剤とするニューポットの精製ろ過における DMS、DMDS、DMTS の除去性能を評価した。
【方法】市販の NaY 型ゼオライト成形体を砕いて平均粒子径 0.5～1 mm に揃えた顆粒状 NaY 型ゼオライトを調製し、硝酸ナトリウム水溶液によるアンモニウムイオン交換処理、引き続いて、硝酸銀とアンモニアを含む水溶液による銀イオン交換処理を行い、洗浄・乾燥後、400℃で焼成して顆粒状 AgY 型ゼオライトを得た。得られた AgY 型ゼオライトの銀担持量は 13.8 w/w%であった。顆粒状ゼオライトを直径 1 cm のカラムに高さ 6.25 cm まで充填し、封入量 5 $cm^3$ の精製ろ過用カラムを調製した。このカラムへ室温にて液空間速度 10 $h^{-1}$ の流通量でニューポットを通液し、精製ろ過液 100 ml を得た。
【結果】DMS 2.01 ppm、DMDS 0.36 ppm、DMTS 0.004 ppm を含むニューポットを供試液として、AgY 型ゼオライトによる精製ろ過を実施した結果、精製ろ過後の硫黄化合物の濃度は各々、不検出、0.001 ppm、不検出となり、顕著な吸着除去が確認された。一方、同様に NaY 型ゼオライトで精製ろ過した場合、硫黄化合物は除去されなかった。また、AgY 型ゼオライト精製ろ過前後で、ウイスキーの基本的な香味を構成する中長鎖脂肪酸エチルエステル類や酢酸エステル類、高級アルコール類等の含有量に変化は無かった。AgY 型ゼオライト精製ろ過品を官能評価した結果、未熟臭の無い好ましい香味を有していた。以上の結果、ウイスキーニューポットに含まれる未熟臭原因物質である硫黄化合物を選択的に吸着除去する方法が初めて見出された。今後、ウイスキー原酒製造における新規な精製ろ過技術としてのプロセス開発が期待される。

silver zeolite, sulfur compound, whisky

発表責任者：杉本利和（toshikazu.sugimoto@nikkawhisky.co.jp）

発表番号：3E036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *esp2* 変異体とコシヒカリの交配後代の農業形質および加工適性の評価

Evaluation for agronomic traits and processing suitability of rice inbred lines derived from a cross between esp2 mutant and Koshihikari

○飯島 健[1]、堀 清純[1]、中村 健治[2]、早川 克志[2]、奥西 智哉[3]、石井 卓朗[4]、山本 敏央[1]、川越 靖[1] ([1]農業生物資源研究所、[2]日清製粉（株）、[3]農研機構食総研、[4]農研機構作物研)

○ Ken IIJIMA[1], Kiyosumi HORI[1], Kenji NAKAMURA[2], Katsuyuki HAYAKAWA[2], Tomoya OKUNISHI[3], Takurou ISHII[4], Toshio YAMAMOTO[1], Yasushi KAWAGOE[1] ([1]NIAS, [2]Nissan Flour Milling Inc., [3]NARO NFRI, [4]NARO NICS)

【目的】1960 年代以降わが国の炊飯米の消費量は減少傾向にあり、炊飯米と差別化した様々な用途のイネ品種の開発により、炊飯米の米価の維持、休耕田の有効利用、食料自給率向上が求められている。本研究では、イネ種子貯蔵タンパク質変異体 *esp2* を用い、米粉用に特化した新たなイネの作出、各種評価を行った。*esp2* 変異体は Protein disulfide isomerase-like protein 1-1（PDIL1-1）の酵素活性が欠損した変異体であり、これまでの研究により、野生型と比較して種子貯蔵タンパク質の組成が異なることが明らかになっており、製パン時には腰折れしにくいなど、優れた米粉の加工特性が示されている。しかし、収量が著しく低く農業形質の改善が望まれていた。そこで、コシヒカリとの交配を行い、交配後代から収量性が向上した系統を選抜した。選抜系統について大規模栽培を行い、製粉特性および製パン、製麺、製菓時の二次加工特性を評価した。

【材料および方法】*esp2* 変異体とコシヒカリを交配し、交配後代について DNA マーカー選抜を行うとともに、圃場栽培による表現型選抜により収量性が向上した系統を選抜した。選抜系統を 2012 年に茨城県龍ヶ崎市で、2013 年に茨城県筑西市の圃場で栽培し、出穂期、収量性などの各種農業形質を測定した。収穫米について気流粉砕法（湿式、乾式）とロール粉砕法（乾式）、による製粉特性と、それぞれの米粉を用いた製パン、製麺、製菓時の二次加工特性を評価した。

【結果】選抜系統の農業形質は、*esp2* 変異体と比較して出穂期が早生になり、籾重および精玄米重が増加していた。選抜系統の製粉特性は、乾式気流粉砕法および乾式ロール粉砕法ではコシヒカリとの差は見られなかったが、湿式気流粉砕法では平均粒度が小さくなるとともに、損傷デンプンも少なくなった。選抜系統由来の米粉の二次加工特性は、製パン性については強力粉 80%米粉 20%条件下における焼成時のパン体積はコシヒカリと比較して同程度であったが、生地がまとまりやすいとの評価を得た。製麺性（うどん）では、米粉 20%では麺表面がなめらかであり、中力粉 100%と比較してやや軟らかいが、粘りは同程度であった。スポンジケーキ（米粉 50%）ではコシヒカリよりも体積が大きくなり、薄力粉 100%と同等となった。選抜系統は、コシヒカリに比べて製麺性および製菓性に優れることが明らかとなった。

本研究は農林水産省「農林水産業／食品産業科学技術研究推進事業（２５０３５Ｂ）」の支援を受けて実施した。

Rice flour, Strage protein, processing suitability

発表責任者：堀清純（horikiyo@affrc.go.jp）

発表番号：3E037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳含有飲食品に対するコンブ抽出物の光劣化抑制効果

# Effect of Kelp extract to suppress light deterioration in milk component-containing food and beverage.

○鈴木 健介、十川 詩帆、八木 芙雪、山口 麻美、神村 篤、瀬川 めぐみ（三菱商事フードテック株式会社）
○Kensuke SUZUKI, Shiho SOGAWA, Huyuki YAGI, Asami YAMAGUCHI, Atsushi KAMURA, Megumi SEGAWA (Mitsubishi Shoji Foodtech Co.,Ltd.)

【目的】

乳含有飲食品は、時間を経るとともに独特の不快臭が発生することがある。これは、乳製品中に含まれるメチオニンがビタミン B2 を触媒としてメチオナールへ、さらにメチオナールが不快臭の主体となるスルフィド類に変化することに起因する。特に光照射の条件下においてこの反応は促進される。本研究では、光による乳の劣化現象の抑制を目的とし、幅広い食品に利用されているコンブ抽出物を添加することによる影響を調べた。

【方法・結果】

乳含有飲食品として、試作した苺ラテ（乳含量 3.0%）、抹茶ラテ（乳含量 11.7%）、および市販の生クリーム（乳脂肪含有食品）、ホイップクリーム（植物油脂及び乳製品含有食品）を用い、コンブ抽出調味料（コンブエキス B5 三菱商事フードテック㈱社製）を添加して、5℃、8000 ルクスの条件下にて 24 時間光照射し、官能評価、理化学分析（UPLC、GC-MS、味覚センサー、においセンサー）を実施した。結果、コンブ抽出調味料添加区は乳含有飲食品の光劣化抑制効果が確認され、呈味・風味共に良好な飲食物を得ることが出来た。

次に、五訂日本食品標準成分表より牛乳に含まれると同量のメチオニン（83mg/100g）、ビタミン B2（0.15mg/100g）を配合した混合溶液を調製し、コンブ抽出調味料を添加して検討した結果、コンブ抽出調味料がメチオナールからスルフィド類への反応を抑制している可能性が示唆された。

さらに、本効果の作用機序を明らかにするため、コンブ抽出調味料に含まれる各種成分の添加効果を確認した結果、アラニン、NaCl、KCl、MgSO4、マンニトールに乳の光劣化抑制効果が確認されたが、各成分の単独の添加よりもコンブ抽出調味料としての添加が最も有効であった。

Kelp, Milk, Deterioration

発表責任者：鈴木健介（kensuke.suzuki@mcft.co.jp）

発表番号：3E038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大豆ホエー中の冷凍保護物質の探索

# Investigate of cryoprotectant in soybean whey

○金井 大樹[1]、風見 真千子[2]、野口 治子[2]、高野 克己[2]([1]東京農大院、[2]東京農大)
○Daiki KANAI[1], Machiko KAZAMI[2], Haruko NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

大豆ホエーは脱脂大豆から分離大豆タンパク質を製造する際の副産物で、大豆ホエー中には主にタンパク質、糖類およびミネラルが含まれているが、トリプシンインヒビターが存在することから食品への利用に関する報告は少なく、十分に活用されていない。当研究室では大豆ホエーの有効利用について検討を行い、大豆ホエーの添加によってボイルしたエビの歩留まりが向上することを報告している。さらに、大豆ホエー溶液に浸漬し冷凍保存したエビでは、ボイル後の歩留まりが同処理を施さない場合に比べ大きく増加したことから、大豆ホエー中に冷凍保護物質が存在することが推察された。そこで本研究では大豆ホエー中の冷凍保護物質について探索を行った。

【方法】

大豆ホエーは、脱脂大豆粉(ソーヤフラワーA、日清オイリオ社製）を用い調製した。凍結保護効果は、乳酸脱水素酵素（以下、LDH）を用いて確認した。LDH 溶液（1.5μl/ml、 Roche, from rabbit muscle）と試料タンパク質を混合し、－30℃で 24 時間凍結させた後、室温で 30 分間解凍させた。LDH 活性測定は、石英セル内で混合溶液 20μl と基質溶液[80mM Tris-HCl(pH7.5)、100mM KCl、2mM ピルビン酸、0.3mM NADH]を反応させ、吸光度（A340）にて LDH 活性による NADH 消費を測定し、活性の初速度を求めた。対象として BSA 及びリゾチームを用いて、同様の活性測定を行った。また、アフィニティークロマトグラフィー（TALON Resin）による精製を試み、部分精製物についても LDH を用いた凍結保護効果の確認を行った。

【結果】

LDH に対する凍害保護活性は大豆ホエーおよび BSA において確認されたが、リゾチームでは確認されなかった。大豆ホエー2mg/ml の LDH 残存活性は約 90%、BSA では 20mg/ml で 82%の残存活性を示し、大豆ホエーが高い凍害保護活性を示した。大豆ホエー中の凍害保護活性物質を単離するためアフィニティーカラムにて精製を行ったところ、吸着画分において 67%の LDH 残存活性を確認した。また、活性画分を SDS-PAGE に供したところ 30kDa 付近に複数のバンドが確認できた、これらのいずれかが凍害保護活性を有することが示唆された。現在、さらなる精製を行っている。

soybean whey, protein, cryoprotective

発表番号：3E039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 国産および中国産落花生からの豆腐様ゲルの形成

# Tofu-like gel formation from domestic and Chinese peanuts

○門間 美千子（農研機構　食総研）
○Michiko Momma (National Food Research Institute, NARO)

(目的)日本の食文化を支えてきた食材の一つに豆類がある。豆類は、その成分の構成割合によって、いんげん豆、あずき等の炭水化物主体のものと、落花生や大豆等の脂質含量の高いものに大別される。落花生で約 50%、大豆では国産、米国産、ブラジル産といった産地や品種で差はあるが、約 20%の脂質が含まれる。これらの豆類はタンパク質含量も高く、大豆では 30%以上のタンパク質が含まれる。大豆食品は主食の米と相性もよく、穀類で不足する必須アミノ酸を豊富に含むことから、東アジアの人々の食生活の中で貴重なタンパク質源として利用されてきた。豆腐は大豆の食品用途の代表的なものであり、豆腐に加工することにより不要成分が除去され消化性が改善されるとともに，調理が容易になり，油あげ等の二次加工用途も広がる。豆腐加工においては安定なゲルの形成性が重要な品質要因となっている。落花生には約 25%のタンパク質が含まれ、タンパク質食品素材としての多様な用途拡大が期待される。本研究では、国産落花生２品種と中国産落花生から豆腐様ゲルを作成し、その特性を調べた。

(方法) 試料として、市販の平成 26 年度産の中国産落花生と国産落花生 2 品種（ナカテユタカ、千葉半立）を使用した。落花生 70 g に 300ml の水を加え、一晩浸漬後、落花生の重量を測定し、乾燥重量の 6 倍となるように水を加えた。これをフードプロセッサーで 5 分間磨砕し、得られた豆乳を加熱後氷冷した。豆乳に市販のにがりを加え混合し、70℃で 60 分加熱後水冷した。生成した豆腐様ゲルの破断強度を卓上型物性測定器(山電 TPU-2S)で測定し、破断応力を求めた。豆乳、豆腐様ゲルおよび可溶性ホエー画分のタンパク質組成を SDS-PAGE で分析した。

(結果) 今回試料として使用した国産落花生 2 品種（ナカテユタカ、千葉半立）および中国産落花生のいずれにおいても、白色の豆腐様のゲルを形成した。落花生から生成した豆腐様ゲルの強度は、市販の絹ごし豆腐より低く、国産のナカテユタカで千葉半立や中国産落花生に比べて、やや高い破断強度を示した。これは落花生の脂質含量の高さが要因となっているものと推察された。豆乳および豆腐様ゲルは同様の SDS-PAGE パターンを示し、64、37 および 21kDa ポリペプチドを主成分としていた。可溶性ホエー画分では低分子量ポリペプチド含量が高く、ナカテユタカと中国産落花生および千葉半立で差異が認められた。

peanut, tofu, protein

発表番号：3E040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# リンゴ果実加工時の物性及び成分変化に対する中高圧処理の影響

# Effect of high-hydrostatic pressure processing on physical and chemical properties in apples

○樋口 拓[1]、藤田 智之[1]、山本 和貴[2]、深井 洋一[3]、山崎 慎也[4]、三輪 章志[5]、有手 友嗣[5]、吉野 勇[6]、新田 一朋[6]([1]信州大院農、[2]農研機構・食総研、[3]長野農工研、[4]長野工技セ、[5]石川農研、[6]スギヨ)
○Hiroshi HIGUCHI[1], Tomoyuki FUJITA[1], Kazutaka YAMAMOTO[2], Yohichi FUKAI[3], Shinya YAMAZAKI[4], Shoji MIWA[5], Tomotsugu ARITE[5], Isamu YOSHINO[6], Kazutomo NITTA[6] ([1]Shinshu Univ., [2]NAFR, NARO, [3]ATINFF, [4]NPGITC, FTD, [5]IAFRC, [6]SUGIYO CO., LTD.)

【目的】 バラ科果実であるリンゴにはポリフェノール類などの機能性成分が豊富に含まれており、生食だけでなく、古くからシロップ漬や果実酒などにも加工されてきた。山本らは果実シロップ漬において、中高圧処理が芽胞形成菌の自滅的発芽誘導及び殺菌に有効であることを報告している。[1)] 今回、中高圧処理を用いたリンゴ果実のシロップ漬加工時における物性及び含有成分量の変化を評価する目的で、各種加工条件（温度，圧力及びショ糖濃度）による浸透性及びポリフェノール成分等機能性成分量の変化を常圧及び加圧処理で比較したので報告する。

【方法】 材料としたリンゴは長野県産秋映 (2014 年産)、シナノゴールド (2014 年及び 2015 年産)、フジ（2015 年産）を用いた。リンゴは皮を剥き、芯を除去して 4 分割した後、褐変防止のために 1.0% アスコルビン酸水溶液に数秒間浸漬した。果実 3 個から調製した各切片に果肉重量の 2 倍量のショ糖水溶液（0%，10%，30%，50%）を添加し、25℃または 65℃、常圧（0.1MPa）または加圧（100MPa）下でそれぞれ 30 分間処理した。処理後、果肉重量及び糖度等を分析した。成分分析には、切片 10g を加工処理した後、70 %エタノール 30mL を加えて破砕し、抽出液を調製した。各試料の総ポリフェノール量及び主な成分量をそれぞれ Folin-Ciocalteu 法及び HPLC 分析法にて定量した。

【結果及び考察】 25℃処理では、ショ糖濃度が低いほどシロップ液の浸透により処理後の果肉重量が増加した。ただし、常圧と加圧処理ではほぼ同じ傾向を示した。一方、65℃処理では重量変化は小さく、50%ショ糖溶液処理した秋映では常圧処理により果肉重量が減少したのに対し、加圧処理では保持された。2014 年産のシナノゴールドにおいても、秋映と同様の傾向を示したが、2015 年産果実では加温による影響のみで、加圧による重量の変化は認められなかった。果肉糖度の変化より、加圧時にはショ糖溶液の浸透性が高まるものの、品種及び収穫年により差異が認められた。

処理後のリンゴ果肉中の総ポリフェノール量の比較では、65℃処理において品種間の差異はあるものの、加圧処理の成分量は常圧処理に比べて 1.6 倍程度となった。また、クロロゲン酸量の比較でも 1.2 倍以上の成分量であった。以上の結果から、加温・加圧処理ではシロップ液の果肉への浸透性が高まる反面、加圧下では成分の溶出が抑えられ、果肉中に留まることが示唆された。今後、品種フジを用いて同様の実験を行い、中高圧処理による品種間の違いをさらに明らかにしていく予定である。

1）山本和貴 他，日本食品科学工学会第 60 回大会講演要旨集，p.105（2013）.

high-hydrostatic pressure, apple, polyphenols

発表責任者：藤田智之（tfujita@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：3E041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# タンパク質が米粉バッター粘度に与える影響について

# Effect of protein during a rice flour batter stirring

○奥西 智哉、岸根 雅宏、宮下 香苗（農研機構・食総研）
○Tomoya OKUNISHI, Masahiro KISHINE, Kanae MIYASHITA (NARO-NFRI)

【目的】

近年、グルテンアレルギーを背景にグルテンフリー食品に注目が集まっている。パンもまたしかりで、基本的な食品でありながら、欧米を中心にアレルギーが原因で食生活の幅を狭められている事例がある。グルテンを用いない米粉パン製造は米粉バッタータイプが開発事例では多い。コメタンパク質はグルテンを形成することができず、それ故に米粉単独では十分な製パン性が得られない場合が多い。この不備を解消するために製パンに影響を与える要因として着目されるのは、米粉バッターの粘度あるいは糖・タンパク質の挙動が挙げられる。粘度を調整した米粉バッターからの製パン法が開発されていたり、タンパク質分解酵素による製パン性向上事例が報告されている。コメタンパク質の挙動と米粉バッター粘度との関係性を軸に、論ずる。

【実験方法】

原料米粉は市販の米粉パン用米粉を用いた。米粉 15ｇにミリ Q 水 15mL を加え攪拌した後、RVA4500 にて一定速度（800rpm）で攪拌し続けたときの粘度を測定した。米粉バッターに 20 倍量の 2%-SDS;5%-2ME を加えたものを SDS-PAGE で解析した。また、米粉バッターを乾燥した後、金スパッタリングしたものを低真空走査型電子顕微鏡（SEM）5600LV にて観察した。

米粉から水、1M 食塩水、1%酢酸水溶液および 70%エタノール水溶液でそれぞれ抽出したものをアルブミン、グロブリン、グルテリンおよびプロラミン画分とした。

【実験結果】

市販米粉にプロテアーゼを混合させ攪拌すると米粉バッター粘度が上昇した。アルブミンおよびグロブリン抽出残渣米粉を用いたときも同様に粘度上昇が見られた。一方、グルテリン抽出残渣米粉の場合は粘度上昇が観察されなかった。しかし、ここにグルテリン抽出画分を乾燥したものを再混合させた場合は粘度上昇が改めて観察された。この抽出画分の SDS 観察ではタンパク質の分解が観察された。プロラミン抽出残渣米粉にプロテアーゼを加えた場合は粘度上昇が見られず、しかも抽出物を再混合した場合でも粘度上昇回復はなかった。米粉バッター粘度が上昇する主要因は米粉タンパク質中のグルテリン画分が分解され、分解物がバッター系中において大きな役割を果たしていることがわかった。

rice flour, batter, viscosity

発表責任者：奥西智哉（tomoyaok@affrc.go.jp）

発表番号：3E042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ガゴメ昆布（*Kjellmaniella crassifolia Miyabe*)を用いたグルテンフリーパンの製造研究

# Development of Gluten-Free Bread Baked with Kelp (*Kjellmaniella crassifolia Miyabe*) Flour

○井関 杏子、田原 彩、瀬口 正晴（神戸女子大）
○Kyoko Iseki, Aya Tabara, Masaharu Seguchi (Kobe Women's Univ.)

【目的】小麦粉中のタンパク質であるグルテンは独特の粘弾性を有し、パンの膨化に重要な働きをしている。しかし、グルテンに起因する自己免疫疾患であるセリアック病が問題となっており、グルテンフリー食品が求められている。我々は、グルテンの代替素材としてガゴメ昆布の粘性に注目し、ガゴメ昆布を用いたグルテンフリーパンの製造研究を進めてきた[1)]。ガゴメ昆布中の粘性には、多糖類であるフコイダン、アルギン酸等が考えられるが、このうちどのような多糖類がガゴメ昆布によるグルテンフリーパンと関係しているのかを検討する。

【方法】ガゴメ昆布（*Kjellmaniella crassifolia Miyabe*）は市販のものを水洗、凍結乾燥後、粉砕して用いた。製パン試験は、ガゴメ昆布粉 300mg、小麦デンプン 30.5g、砂糖 8.86g、生イースト 10g、水 22mL を混合しパン生地を調製し、40℃の恒温器中で 20 分間発酵を行い、210℃のオーブン中で 10 分間ベーキングを行った[1)]。ガゴメ昆布からの各種多糖類の抽出試験として、ガゴメ昆布を 0.1M HCl で処理し、遠心分離後、その上清区分をフコイダン区分、沈殿区分をアルギン酸区分とし、それぞれ製パン試験を行った。さらに、アルギン酸の精製は、ガゴメ昆布を HCl 処理後、遠心分離して得られた沈殿を 3%$Na_2CO_3$ で可溶化し、中和したのち、2%$CaCl_2$ を加えゲル化した。ゲル化したものを NaOH に溶解し一晩透析後、NaCl を添加して凍結乾燥し、これをアルギン酸として製パン試験を行った。各種アルギン酸はキミカ（株）より提供された。

【結果】ガゴメ昆布粉 300mg、加水量は 22mL の条件で製パン試験を行うと高い製パン性（パン高 79.6mm、比容積 6.89$cm^3$/g）が得られた。ガゴメ昆布を 0.1M HCl で処理し遠心分離後、得られた上清区分（フコイダン）は 27.6%、沈殿区分（アルギン酸）は 75.1%であった。それぞれを用いた製パン試験の結果、フコイダン区分で焼成したパンは、パン高 28.0mm、比容積 1.73$cm^3$/g であり良好な製パン性は得られず、アルギン酸区分で焼成したパンは、パン高 62.1mm、比容積 4.53$cm^3$/g の良好な製パン性であった。このことから、ガゴメ昆布による製パン性はアルギン酸区分によるものであることが推察された。さらに、精製したアルギン酸による製パン性の検討、市販の各種アルギン酸を用いた製パン試験を検討した。

1）日本食品科学工学会第 62 回大会要旨集 p186

gluten-free bread, kelp flour, alginic acid

発表番号：3E043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小麦粉生地中における SS 結合形成に対する酸化剤と PDI 及び POD の影響について

# Effect of the oxidizing agent and PDI, and POD for SS bonds formation in dough

○樋口 貴俊[1]、岡 大貴[2]、野口 治子[3]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○Takatoshi HIGUCHI[1], Daiki OKA[2], Haruko NOGUCHI[3], Tomohiro NOGUCHI[2], Katsumi TAKANO[3] ([1]Agrichem., Agr., Grad. Sch., Tokyo Univ. Agric, [2]Fac. Biosci., FPC, Tokyo Univ. Agric, [3]Dept. Appl. Biol. chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】

小麦粉加工特性にグルテン中のジスルフィド(SS)結合形成が、大きな影響を与えることが知られている。製パンにおいて、グルテン中に SS 結合の形成促進の目的でアスコルビン酸（AA）やグルコースオキシダーゼ（GOD）など酸化的製パン改良剤が用いられている。これまでに我々は、小麦粉に内在するプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)や生地改良剤としても用いられるパーオキシダーゼ（POD）などによる酵素的 SS 結合形成について報告してきた。しかし、AA の酸化型であるデヒドロアスコルビン酸（DHA）や GOD の反応により生じる過酸化水素（$H_2O_2$）による SS 結合形成や、これら酸化剤と PDI、POD との関連性について検証が行われていない。そこで、これら酸化剤と内在酵素の SS 結合形成に対する影響を解明することを目的とした。

【方法】

PDI は、小麦遺伝情報を基に大腸菌を用いた大量発現系にて発現取得した。POD は西洋ワサビ起源（和光純薬）を用いた。SS 結合形成試験は、オボムコイド(SIGMA 社製)を還元変性させたものを基質に用いて行った。還元変性オボムコイド（red-OM）に DHA 単独、$H_2O_2$単独、PDI と DHA 併用、PDI と $H_2O_2$併用、POD と $H_2O_2$併用したものをそれぞれ作用させ、NBD-Cl 法を用いて遊離 SH 基量を測定し SH 基量の減少量から SS 結合形成量を算出した。なお、PDI および POD 添加量は、小麦粉中での活性比率と同比率にて試験した。

【結果】

DHA と PDI を用い red-OM（16nmol）に対する SS 結合形成試験を行った結果、製パン試験にて比容積の増大が確認された DHA 濃度（小麦粉 1g に対する相当量 57nmol）にて単独で試験したところ、SS 結合形成量は約 0.4nmol/OM 1nmol と小さかった。PDI を単独で添加（2.8U；小麦粉 1g 中の PDI 活性量）したところ、SS 結合形成はほとんど観察されなかった。一方、DHA と PDI 併用では、約 1.5nmol/OM 1nmol と DHA 単独に比べ約 4 倍に形成量が増大した。また、$H_2O_2$と PDI、POD を用い SS 結合形成能を検討したところ、$H_2O_2$単独（57nmol）では約 0.3nmol/OM 1nmol、POD 単独（2070U；小麦粉 1g 中の POD 活性量）では約 0.2nmol/OM 1nmol であった。$H_2O_2$と PDI の併用では約 0.5nmol/OM 1nmol であったが、$H_2O_2$と POD との併用では約 1.2nmol/OM 1nmol を示し、SS 結合形成能は大きく向上した。

PDI, oxidizing agent, disulfide bond

発表番号：3E044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# グリアジン添加の製パン性向上効果とω-グリアジンの関係

# The relationship between omega-gliadin and improvement effect of the baking quality

○岡 大貴[1]、野口 智弘[1]、高野 克己[2] ([1]東京農大応生・食加技セ、[2]東京農大応生・化学)
○Daiki OKA[1], Tomohiro NOGUCHI[1], Katsumi TAKANO[2] ([1]FPC, Fac. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Fac. Biosci. Tokyo Univ. Agric.)

【目的】 製パンにおいて小麦粉酸可溶性画分（ASP）が改良効果を示すことが知られている。しかし、その効果の要因は不明で、また原料小麦の品種によって効果が異なる。我々は ASP の製パン改良効果と原料小麦との関係を調べ、ASP の主要成分であるグリアジンが製パン性向上効果を示すこと、原料小麦粉による差異はグリアジン分子種の一つである ω-グリアジンの量比が関与し、ω-グリアジン量が多いほど製パン性向上効果が高いことを報告した[1)]。さらに、各種小麦粉から分画したグリアジンにおいても、パンに添加した際の製パン性向上効果と ω-グリアジン量に相関性があることが示唆された[2)]。これまでに、強力粉（カメリア）に対し、グリアジンを添加し製パン性向上効果を検討してきたが、本報告では、国内産小麦粉に対しグリアジンを添加し、その際の製パン性向上効果と ω-グリアジン量との関係について検討を行ったので、その結果を報告する。

【方法】 外国産小麦粉 3 品種（1CW、HRW、ASW)、国内産小麦粉には春よ恋およびゆめちからを用いた。製パンはストレート法にて行った。なお、ファリノグラフにて 500BU に達した際の加水量にて製パンした。パン比容積（$cm^3/g$）は 3D レーザー体積計測装置（ASTEX 社製)にて、クラムの硬さは 50% 圧縮時の荷重（N）として評価した。各小麦粉から 70%エタノールにてグリアジンを抽出し、噴霧乾燥にてグリアジン粉末を得た。ω-グリアジンの比率は RP-HPLC (Inertsil WP300 C8）にて求め、表面疎水性度（F.I. /mg protein）は ANS 法により測定した。また、国内産小麦粉に対し各グリアジンを 1.6% 添加し製パン試験を行った。

【結果】 各小麦粉の製パン試験を行ったところ、比容積は 1CW > HRW > ASW で ω-グリアジン量比（%）は 1CW が 13.1、 HRW 11.9 および ASW 9.0 であり、比容積と同様の傾向を示した。各グリアジンの表面疎水性度は、1CW が 193、 HRW 205 および ASW 218 を示し、ω-グリアジン量が多いほど表面疎水性度が低い値であった。また、ω-グリアジンが最も多い 1CW と少ない ASW のグリアジンを春よ恋に添加し製パン試験を行ったところ、比容積（$cm^3/g$)は、無添加 6.67、1CW 添加 6.84、ASW 添加 6.82 を示し、硬さ（N）はそれぞれ 1.04、 0.85 および 0.94 となり、ω-グリアジン量が多いグリアジンほど高い製パン性を示した。さらに、超強力粉であるゆめちからに対しグリアジンを添加したところ、比容積は、無添加 6.60、1CW 添加 6.60、ASW 添加 6.53 を示し、硬さ（N）はそれぞれ 0.97、 0.79、 087 となり、同様の傾向をしました。

1）日本農芸化学会 2015 年度大会, 3F26a03, 2）日本食品保蔵科学会第 64 回大会講演要旨集, p25
2）日本食品保蔵科学会第 62 回大会

omega-gliadin, baking quality, acid-soluble-protein

発表責任者：岡 大貴（d3oka@nodai.ac.jp）

発表番号：3E045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 分画グリアジンを用いたグリアジン分子種間相互作用の解析

# Analysis of molecular association of gliadin species isolated from wheat flour

○北尾 悠樹、東野 ゆうき、岩村 紗季、裏出 令子（京大院農・農学）
○Yuki KITAO, Yuki HIGASHINO, Saki IWAMURA, Reiko URADE (Kyoto Univ.)

【目的】小麦粉食品に多様性をもたらしている小麦粉生地の物性は、主にグルテンに起因すると考えられている。グルテンはコムギの主要な種子貯蔵タンパク質であるグリアジンとグルテニンが加工時に分子間相互作用することで生じる複合体であるが、その物性発現の分子機構はいまだ不明である。先行研究で、グルテンのうち約 50%を占めるグリアジンは水溶液中で一部が分子種間で特異性を持って分子会合していることを示唆する結果を得た*。そこで本研究では、グリアジンの分子間相互作用の分子機構の解明を目指して、グリアジンを分画しα、γ、ωグリアジン分子の会合特性を検討することにした。【方法・結果】α、γ、ωグリアジンサブユニットを特異的に同定、検出するために、α、γ、ωグリアジン mRNA 由来の cDNA を PCR 法によりクローニングした。α及びγグリアジンの cDNA を用いて、αとγグリアジン間で比較的相同性が低い C 末端ドメイン（α-C、γ-C）の大腸菌発現系を構築した。大量発現させ精製したリコンビナントα-C 及びγ-C を抗原として抗血清を作製した。作製した抗血清はリコンビナントαあるいはγグリアジンと特異的に交差することを確認した。グリアジンは食塩添加小麦粉生地から純水洗浄法*により抽出した。抽出したグリアジンはイオン交換クロマトグラフィーにより 6 画分に分画し（画分 1-6）、さらにゲル濾過クロマトグラフィにより精製した。各画分に含まれるグリアジン分子種は **O'Farrell** の二次元 PAGE により分離し、抗α及び抗γグリアジン血清を用いたウェスタンブロットにより分析した。その結果、画分 2 にはγグリアジンが 11 種類、画分 3、5、6 にはαグリアジンがそれぞれ 5 種類、11 種類、9 種類含まれていることが明らかとなった。画分 4 と 5 にはαとγグリアジンが混在していた。画分 1 のグリアジンは抗体との交差性の欠如と分子サイズからωグリアジンが 5 種類含まれていると推定された。画分 2(γ)と画分 3(α)のグリアジンを 3%水溶液とし、タンパク質架橋剤 DTSSP を加え、非共有結合で分子会合しているグリアジンを架橋した。架橋されたグリアジンは非還元 SDS-PAGE と、架橋剤の結合を切断する還元 SDS-PAGE を組み合わせた二次元 PAGE で分析した。αグリアジン、γグリアジンともに 3%溶液中では、大部分はモノマーとして検出されたが、架橋によって同じ分子量のもの同士が結合してできたダイマーも検出された。特にαグリアジンは同じ分子種同士で選択的に会合することが明らかとなった。他の画分のグリアジン及び異なるグリアジンの混合液についても同様の解析を進めている。*Sato *et al*., (2015) Molecular Assembly of Wheat Gliadins into Nanostructures: A Small-Angle X-ray Scattering Study of Gliadins in Distilled Water over a Wide Concentration Range. *J Agric Food Chem.* **63**:8715-8721.

gliadin, wheat, protein association

発表番号：3E046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# グリセリン脂肪酸エステルによるコエンザイム Q10/γ-シクロデキストリン包接複合体の可溶化
# Solubilization of coenzyme Q10/γ-cyclodextrin inclusion complex by glycerol fatty acid esters

○上梶 友記子[1]、大西 麻由[1]、中田 大介[1]、吉井 英文[2]、寺尾 啓二[1] ([1]シクロケムバイオ、[2]香大農)
○Yukiko UEKAJI[1], Mayu ONISHI[1], Daisuke NAKATA[1], Hidefumi YOSHII[2], Keiji TERAO[1] ([1]CycloChem Bio, [2]Kagawa Univ.)

【緒言】コエンザイム Q10 (CoQ10) は、高い抗酸化活性を持つ疎水性機能性物質である。CoQ10 は長い疎水性のイソプレノイド鎖を有するため水への溶解性が低く、経口吸収性も乏しいことが問題とされている。そのため、CoQ10 を環状多糖の γ-シクロデキストリン (γ-CD) を用いて包接複合体を形成することで、CoQ10 を安定化し、経口吸収性の改善が認められている。また、γ-CD と種々の界面活性剤との併用を検討し、グリチルリチン酸ジカリウムやタウロコール酸ナトリウムと組み合わせることによって、CoQ10 の水への溶解性が増大することを見出した。γ-CD に包接された CoQ10 は、γ-CD の空孔と親和性の高いグリチルリチン酸ジカリウムのような界面活性剤の水溶液に加えることによって、CoQ10 とグリチルリチン酸ジカリウムが置換し、空孔から出された CoQ10 とグリチルリチン酸ジカリウムがミセルを形成することで、CoQ10 の水への溶解度が見かけ上増加すると考えている。本研究では、食品に用いることのできる界面活性剤であるグリセリン脂肪酸エステルと CoQ10/γ-CD 包接複合体とを組み合わせて CoQ10 の可溶化技術を検討した結果を報告する。
【方法】γ-CD と併用する界面活性剤として、HLB 15 ~ 17 のグリセリン脂肪酸エステル (リョートー ポリグリエステル, 三菱化学フーズ株式会社) を用いた。CoQ10/γ-CD 包接複合体は、CoQ10 とγ-CD の包接複合体粉末 (CAVAMAX W8 CoQ10, Wacker Chemical Corporation) を用いた。グリセリン脂肪酸エステル併用時の CoQ10 溶解度は、2 wt% グリセリン脂肪酸エステル水溶液に 25 mg (CoQ10; 5 mg) の CoQ10/γ-CD 包接複合体を添加し、70ºC の湯浴で加熱攪拌した。本溶液を室温に戻した後、0.2 μm PTFE フィルターにて濾過した。濾液中の CoQ10 濃度を高速液体クロマトグラフ (LC-2010, 株式会社島津製作所) にて定量し、CoQ10 の見かけの溶解度を測定した。比較のため、γ-CD を含まない系として 2 wt% グリセリン脂肪酸エステル水溶液に 5 mg の CoQ10 を添加した場合についても検討した。
【結果・考察】CoQ10/γ-CD 包接複合体に HLB 17 のデカグリセリンラウリン酸エステルを添加することで、CoQ10 濃度として 0.5 mg/mL で水へ完全に溶解することができた。HLB 15, 16 のデカグリセリンミリスチン酸エステルを用いた場合は、水溶液に濁りが生じた。CoQ10 原末の場合、油滴が液表面に分離し、完全に溶解させることは困難であった。界面活性剤の疎水性と親水性のバランスを示す HLB 値が CoQ10/γ-CD 包接複合体の溶解性に影響を及ぼすことが示唆された。以上の結果から、γ-CD を介することによって CoQ10 と界面活性剤との親和性を高め、CoQ10 と界面活性剤のミセル形成によって CoQ10 の水への溶解性を向上させることが可能となった。

coenzyme Q10, cyclodextrin, glycerol fatty acid esters

発表責任者：上梶 友記子（yukiko.uekaji@cyclochem.com）

発表番号：3E047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 官能評価を反映した嚥下調整食の動的粘弾性による物性基準と予測モデルの構築

# Construction of new standard for dysphagia diet using dynamic viscoelasticity considered with sensory evaluation

○茅沼 友希[1]、上田 玲子[1]、南 道子[2]、舟木 淳子[3]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1]、朝倉 富子[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東京学芸生科、[3]福岡女子大院)
○Yuki KAYANUMA[1], Reiko UEDA[1], Michiko MINAMI[2], Junko FUNAKI[3], Yoshiro ISHIMARU[1], Keiko ABE[1], Tomiko ASAKURA[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Gakugei Univ., [3]Fukuoka Women's Univ.)

（背景・目的）近年、高齢者の誤嚥による肺炎が増加傾向にあり、高齢化が進んでいる日本において嚥下調整食開発への社会的ニーズが高まっている。現在嚥下調整食の物性基準による区分がいくつか設けられ提示されているが、その区分が摂食者の感覚的な「飲み込みやすさ」を反映しているかどうかは検証されていない現状にある。本研究では、ヒトによる官能評価と動的粘弾性による客観的評価の関連性を解析することにより、現有の物性基準が摂食者の「飲み込みやすさ」を反映しているかを検証するとともに、「飲み込みやすさ」のモデル構築を通して、新たな物性基準値を模索することを目的とした。
（方法）市販嚥下調整食品 54 種類とテクスチャー68 用語のアンケートデータに対応分析を適用し絞り込んだ試料 13 品とその代表的テクスチャー10 語の強度および「飲み込みやすさ」について、47 名をパネルとした 9 件法による採点法の官能評価を実施した。一方、同試料各 3 g の動的粘弾性を HAAKE MARS1 を用いて測定した。まず、PLS 回帰により用語及びパラメータの各変数選択を実施し絞り込んだ用語 5 項目と動的粘弾性測定のパラメータ 7 個のデータを用いて因子分析を適用し、官能値と物性値の関連性を解析した。13 品の「飲み込みやすさ」のクラスター分類と既存の嚥下調整食区分の比較からそれらの一致性を検証した。更に、「飲み込みやすさ」を目的変数、物性値を説明変数とした PLS 回帰分析を適用することにより、摂食者の感覚を反映する予測モデル構築を試みた。
（結果・考察）因子分析の結果、2 因子構造が得られ累積寄与率は 86.7%であった。第 1 因子は「飲み込みやすさ」と 7 個のパラメータで構成された「飲み込みやすさ」軸、第 2 因子は官能値のみで構成された「なめらかさ」軸で寄与率はそれぞれ 52.7% 、34.0%を示した。各試料の第 1 因子得点にクラスター分析を適用し、各クラスターに属する試料の現有区分を参照したところ合致していないことが確認された。更に、PLS 回帰分析の結果、3 個のパラメータの 1 潜在因子による「飲み込みやすさ」の予測モデル（決定係数 $R^2 = 0.79$、誤差の標準偏差 RMSE = 0.54）を構築することが出来た。このことより、動的粘弾性の測定値を用いて食品の飲み込みやすさを客観的に予測・評価できる可能性が示され、嚥下調整食における新たな物性基準値の設定や「飲み込みやすさ」のモデル構築が期待される。
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

Dysphagia, sensory evaluation, dynamic viscoelasticity

発表番号：3E048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高加熱処理乳のチーズカード形成不良に関する新たな知見

# Findings on cheese curd formation in high temperature milk

○小野 航[1]、岡 大貴[2]、野口 智弘[2]、高野 克己[3]([1]東京農大院農・農化、[2]東京農大応生・食加技セ、[3]東京農大応生・化学)
○ Wataru Ono[1], Daiki Oka[2], Tomohiro Noguchi[2], Katsumi Takano[3] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric, [2]Fac.Biosci.,FPC,Tokyo Univ.Agric, [3]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric)

【目的】

ヨーグルトにおいては、高度な加熱殺菌が施された乳ほど強固なカードが形成されるが、これは、加熱によってカゼインミセルに存在する κ-CN が β-Lg と SS 結合を形成しミセルから一部が脱離することで惹起されることを報告した(1)。一方、チーズにおいても同様に高度な加熱処理が施された乳ほどカード形成は起こらない。これは、β-Lg が加熱によりカゼインミセルの κ-CN と SS 結合を形成し、立体障害によりキモシンが作用出来なくなることに起因すると報告されてきた。我々は、乳の加熱によりミセルから κ-CN の脱離が生じるため、チーズカードが形成不良になるのではないかと推論した。そこで本報告では、カゼインミセルの κ-CN 脱離がチーズカード形成に及ぼす影響について検討を行った。

【方法】

生乳から脂肪分を除去した非加熱脱脂乳および 50-80℃、各 30 分間処理を行った加熱脱脂乳を試料とし、チーズカードはキモシン(クリスチャン・ハンセン社製、CHY-MAX)を用い調製した。チーズカードを超遠心分離（20℃, 33,000×g, 65 分）により分画した上澄液および沈殿、または試料を超遠心分離(20℃, 200,000×g, 60 分)により分画した上澄液および沈殿を SDS-PAGE（Me-および Me+）に供し、タンパク質組成を解した。

【結果】

非加熱脱脂乳および 50-70℃処理の加熱脱脂乳においてはチーズカードが形成されたが、80℃処理ではチーズカードが形成されなかった。チーズカードを SDS-PAGE に供したところ、非加熱および 80℃処理ではパラ-κ-CN のバンド強度に差異はなかったことから、キモシンの作用阻害は生じないことが明らかとなった。一方、80℃処理のチーズカードの沈殿画分のパラ-κ-CN のバンド強度は非加熱脱脂乳から調製したチーズカードの沈殿画分に比べ弱く、上澄液にパラ-κ-CN とホエータンパク質が検出された。80℃処理した加熱脱脂乳を超遠心分離（20℃, 200,000×g, 60 分）すると、沈殿画分には κ-CN が一部脱離したカゼインミセルが検出された。そこで、この沈殿を純水に分散させ、加熱により不溶化した分の $Ca^{2+}$を乳酸カルシウムとして添加後、キモシンを作用させたところ、非加熱脱脂乳と比較し軟弱なカードが形成された。

(1) 日本食品科学工学会第 62 回大会 3Ep10

κ-casein, β-lactoglobulin, chymosin

発表番号：3E049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 加熱調理過程における食材の粘弾性物性の非破壊・連続測定

# Non-destructive and continuous measurement of viscoelastic properties of food during cooking process

○梶原 翼[1]、川井 清司[2]、羽倉 義雄[2] ([1]広島大生物生産、[2]広島大院生物圏科学)
○TSUBASA KAJIHARA[1], KIYOSHI KAWAI[2], YOSHIO HAGURA[2] ([1]App. Bio. Sci., Hiroshima Univ., [2]Biosphere Sci.,Hiroshima Univ.)

【背景・目的】

高齢者人口の増加に伴い、嚥下・咀嚼機能の低下を補完する食品に対する需要が高まっている。例えば、テクスチャー（粘度に代表される「飲み込み易さ」や硬さに代表される「噛み砕き易さ」）を調整し、表示したユニバーサルデザインフードなどの介護食がその代表である。さらに、消費者（被介護者）のニーズが多様化しているため、様々な食材に対して、様々な方法で調理を行った食品の提供も求められている。これらの食品に対しては、テクスチャーの厳密な評価や表示が要求される。しかし、従来の食品のテクスチャー測定方法（例えば、プランジャー貫入試験など）では、測定時に試料の破壊が伴うため、全数検査は困難であった。そこで本研究では、加熱調理過程における食品のテクスチャー変化を非破壊かつ連続的に測定する方法を検討することにした。具体的には、非破壊測定手法である動的粘弾性測定を用いて、同一試料の加熱調理過程におけるテクスチャー変化の非破壊・連続計測を試みた。

【方法】

実験試料には市販の豚もも肉を使用した。これを直方体状に整形し（40㎜×40㎜×10㎜ と 40㎜×40㎜×25㎜)、実験試料（1 枚のみの試料、3 枚重ねの試料）とした。自作の動的粘弾性測定装置（縦振動印加方式）の試料台に加熱用ヒーターを取り付けたアルミニウム製容器を設置し、蒸留水を加熱媒体（100℃）として試料の茹で加熱を行いながら、動的粘弾性測定を行った。動的粘弾性測定では試料に対して圧縮の正弦波振動（周波数：0.6Hz、振幅：3㎜）を印加し、荷重（応力）と変位（歪み）の変化からリサージュ図形を作成し、動的粘弾性パラメーター（貯蔵弾性率、損失弾性率、損失正接）を算出した。さらに、同条件で加熱した試料の破断応力およびヤング率の経時変化を小型の材料試験機（島津製作所 EZ-SX500N）を用いて測定した。

【結果】

加熱時間の増加に伴い、豚もも肉のリサージュ図形は変化した。一定の加熱時間ごとにリサージュ図形を取り出し、動的粘弾性パラメーターを算出した。その結果、豚もも肉の加熱過程における貯蔵弾性率（動的粘弾性測定）の経時変化は、破壊測定により得られた破断応力およびヤング率の変化と類似した挙動を示した。これは、加熱調理過程における食品のテクスチャー変化を非破壊かつ連続的に測定する方法として動的粘弾性測定が有効であることを示唆している。

Non-destructive measurement, viscoelastic properties, cooking process

発表番号：3E050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# チルドうどんの食感の差を物性と構造の違いから解析

# Analysis of difference in the texture of chilled Udon noodles on structure and physical properties

○徐 シキ[2]、山下 紫緒里[1]、渡辺 哲也[1]、中村 卓[1]（[1]明治大農・農化、[2]明治大院農・農化）
○Shiki JO[2], Siori YAMASITA[1], TETUYA WATANABE[1], Takasi NAKAMURA[1]（[1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ.Grad.Sch）

【目的】チルドうどんにおいて、食感はおいしさを決める要因である。そのうどんの構造形成成分としてタンパク質や澱粉などの高分子化合物が挙げられる。それらの成分を圧延・茹でるといった加工・加熱することにより、食品構造を形成する。その食品構造が破壊される過程、つまり人間が口腔内で食品を咀嚼することで食感が発現される。また、冷蔵保存による品質劣化を改良する方法として、加工澱粉が用いられている。さらに、噛みごたえや弾力があるなどの望まれる食感を実現するためグルテンタンパク質の添加量を変えるだけでなく、小麦粉として強力粉も使用される。しかし、グルテンの違いによりチルドうどんの食感と物性が変化する機構は明らかではない。望まれるチルドうどんの食感を制御するために、うどん内部の構造変化を可視化する必要があると考えられる。そこで、本研究では、異なる小麦粉で作ったチルドうどんを用いて破断物性測定と微細構造を観察することにより食感と物性の差を微細構造の違いから解析することを目的とした。
【方法】強力粉(P)または中力粉(M)70%とエーテル化架橋タピオカ澱粉 30%を使用して2種類のチルドうどんを調製した。中力粉の場合にはバイタルグルテンを添加してタンパク質含量を揃えった。茹で後冷蔵保存されたうどんを用いて、クリープメータで破断強度試験を行った。また、茹でる前のうどん生地と茹でた後の麺線のローラ表面(圧延面)と切断表面(切り面)に対して共焦点レーザー走査顕微鏡(CLSM)及び走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて成分分布構造と微細構造を観察した。
【結果及び考察】破断強度試験で得られた荷重-歪曲線の結果より、P と M のうどんは冷蔵保存によって、低荷重・低歪率で破断される傾向があった。また、保存一日目では、低歪率領域の荷重に有意差がなかったが、高歪率領域の荷重、破断荷重と破断歪率において、P の方が有意に高い力学物性を示した。以上より、チルドうどん P と M は保存によって咀嚼前半の物性と食感に差がないと考えられる。しかし、P の方が高歪率領域で破断しにくいことから、咀嚼後半の噛みごたえと弾力があると考えられる。

さらに、P と M チルドうどん CLSM と SEM の観察結果より、M うどんはローラ表面と切断表面とも澱粉粒子の周りにストランドの蜂の巣状なタンパク質構造を観察された。しかし、P うどんでは繊維状で繋がっているグルテンネットワーク構造が観察された。また、茹でる前のうどん生地において、M うどんの澱粉粒子とタンパク質構造は単独に存在した。一方、P うどんは澱粉粒子上のタンパク質粒子と繊維状のタンパク質が繋がった構造が観察された。以上のように、グルテンが異なるチルドうどんの物性と食感の差を構造の違いとして明らにできた。

noodles, texture, structure

発表番号：3E051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 温州ミカン果皮及び摘果ポンカン配合ヨーグルト中のノビレチンの分析

# Analysis of nobiletin in the yogurt containing Citrus unshu peel and thinned Citrus reticulata

○福田 直大[1]、玉井 敬久[1]、永田 洋子[1]、菅 忠明[1]、門家 重治[1]、菅原 卓也[2]、菊池 泰三[3]、門田 歩[4]([1]愛媛県産業技術研究所、[2]愛媛大学農学部、[3]四国乳業（株）、[4]伊方サービス（株））
○Naohiro FUKUDA[1], Takahisa TAMAI[1], Yoko NAGATA[1], Tadaaki KAN[1], Shigeharu MONYA[1], Takuya SUGAHARA[2], Taizo KIKUCHI[3], Ayumu KADOTA[4] ([1]Ehime Institute of Industrial Technology, [2]Faculty of Agriculture, Ehime University, [3]Shikoku Milk Industry Co., Ltd., [4]Ikata Service Co., Ltd.)

【目的】

これまでに、温州ミカン果皮等に含まれるポリメトキシフラボノイドであるノビレチンの分析法については、産業技術連携推進会議四国地域部会食品分析フォーラム分科会（以下食品分析フォーラムと言う）の中で検討し、平成 26 年 7 月に食品分析フォーラムでマニュアル化され、活用が期待されている。温州ミカン果皮及び摘果ポンカン配合ヨーグルトについては機能性表示食品制度への届け出を検討しており、届け出の際には、最終製品の分析法を示す必要がある。そこで、本ヨーグルト中のノビレチンの分析法を確立することを目的とし、食品分析フォーラムの分析マニュアル（以下分析マニュアルと言う）の生鮮柑橘皮からの分析試料の調製等を準拠することで分析を検討した。また、最終製品中でのノビレチンの安定性についても検証した。

【方法】

試料を均一にホモジナイズし、試料約 1g を 15ml 遠沈管に量りとり、抽出溶媒（MeOH：DMSO＝1：1）10ml を添加し、5 分間超音波抽出し 1 時間以上放置後、遠心分離（10000rpm、10 分）を行う。上澄みを分取後、同様の操作を抽出溶媒 2ml でさらに 2 回行う。上澄み液に抽出溶媒の 9 倍量の超純水を加え混合し、アジレント社製ﾎﾞﾝﾄﾞｴﾙｰﾄ（C18,500mg/6ml）を用いてサンプルを通液し、10%MeOH で洗浄後、抽出溶媒（MeOH:DMSO＝1:1）5ml で溶出した。また、別の前処理方法として試料全量 150ml を凍結乾燥した後、均一に粉砕し分析用試料とし、試料約 1g について分析マニュアルを準拠して分析を行った。ノビレチンの分析条件は以下の通り。LC/MS システム：ACQUITY UPLC、Waters Q-TOF micro、カラム：BEHC18（1.7μm、2.1mm×100 mm）、カラム温度：40℃、移動相：10mM ギ酸アンモニウム含有水：アセトニトリル＝6：4、流速：0.25 mL/min。

【結果】

検討した方法は、分析試料を液体のまま、または粉末に前処理した試料であったが、いずれの方法も分析マニュアルを準拠することで、温州ミカン果皮及び摘果ポンカン添加量のノビレチンの 70%以上の回収率を得ることができた。また、添加回収試験においても良好な回収率が得られた。また、温州ミカン果皮及び摘果ポンカン配合ヨーグルト中のノビレチンの経時変化についても検証した結果、製造から 3 週間を経過しても、一定のノビレチン量を維持しており、ノビレチンがヨーグルト中で安定して存在していることが確認された。

nobiletin, Analysis, yogurt

発表責任者：福田直大（fukuda-naohiro@pref.ehime.jp）

発表番号：3E052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 相分離構造の異なる卵白・寒天共存ゲルにおける構造破壊によるアロマリリースの解析

# Analysis of aroma release of egg white protein/agar co-gels with different phase-separated structure during fracturing process

○上川 理絵、中村 卓 (明治大院農・農化)
○Rie KAMIKAWA, Takashi NAKAMURA (Meiji Univ.)

[目的]プリン等のゲル状食品の構造を形成する成分であるタンパク質と多糖類を共存させると,相分離構造を形成することが知られている。これまでの研究で,卵白タンパク質と寒天の混合ゲルにおいて,卵白と寒天の混合比を変化させると,卵白連続相・寒天分散相(a),両連続相(b),寒天連続相・卵白分散相(c)と,異なる相分離構造を形成することを明らかにした。また,これらの相分離構造の違いにより,ゲルの破壊様式が異なり,食感に影響することを明らかにした。そこで本研究では,おいしさのもう一つの要因である風味,中でも香りの放出(アロマリリース)への,卵白・寒天共存ゲルにおける相分離構造の影響を,構造破壊により解析することを目的とした。さらに,アロマリリースへの唾液の影響も検討した。
[方法]卵白溶液と寒天溶液を卵白連続相(a),両連続相(b),寒天連続相(c)となるように調製・混合し,疎水性の異なる 4 種類の香気化合物(Ethyl propanoate, *cis*-3-Hexenol, Methyl anthranilate, Damascenone)を含むグレープ合成香料を全量の 0.4%添加した。この溶液を 95℃で 10 分間加熱後,氷水中で 10 分間冷却,5℃で一晩冷蔵しゲルを作製した。作製したゲルについて,クリープメータによる破断強度試験を行った。また,共焦点レーザー走査顕微鏡,走査型電子顕微鏡による構造観察を行った。さらに,HS-SPME-GC 法により口腔内での咀嚼をイメージした圧縮破壊後のアロマリリース量を測定した。このとき,SPME にて香気成分を吸着する時間を破壊後 0,5,10,60 分とし,アロマリリースの継時的な変化を測定した。さらに,人工唾液を滴下してから破壊したゲルについても同様に測定した。
[結果]アロマリリース測定の結果,Damascenone 以外の 3 種類の香気化合物が検出され,ゲルの破壊後の時間経過に伴うアロマリリース量の変化に差が見られた。特に破壊 10 分後までのアロマリリースに違いが見られた。香気化合物間の比較では,疎水性の低い Ethyl propanoate は時間経過に伴いリリース量が減少, *cis*-3-Hexenol, Methyl anthranilate は増加した。サンプル間の比較では,疎水性の高い Methyl anthranilate のリリース量の変化に大きな違いが見られた。卵白連続相(a)では破壊 5 分後までにリリース量が増加し,その後ほぼ一定となった。両連続相(b)では破壊 10 分後まで直線的に増加した。寒天連続相(c)では破壊 5 分後までは変化が小さく,5 分後から 10 分後の間にリリース量が増加した。以上のように,異なる相分離構造は破壊後のアロマリリース速度に影響し,その差は特に疎水性の高い香気化合物において大きいことが明らかになった。さらに,アロマリリースへの唾液の影響,破壊構造との関係についても考察する。

aroma release, phase-separated structure, egg white protein/agar co-gel

発表番号：3E053
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ペプチドアレイによる新規コレステロール代謝改善ペプチドの探索評価と作用機構解析

# Screening of cholesterol-lowering peptides by peptide array and analysis of mechanism of their cholesterol-lowering action.

○秋江 祐希、久松 賢太郎、柳瀬 笑子、島田 昌也、長岡 利 (岐阜大学)
○yuki AKIE, kentaro HISAMATSU, emiko YANASE, masaya SHIMADA, satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

【目的】
血清コレステロール濃度を低下させる方策に、胆汁酸ミセルの崩壊によるコレステロールの吸収抑制と胆汁酸の腸肝循環の阻害があげられる。当研究室では、数百～数千種類のペプチドを同時に解析可能なペプチドアレイを導入し網羅的に解析することで、PWWWMY、VIWWFK、VVFLASVS などの新規コレステロール低減ペプチドを発見してきた。VVFLASVS は、コレステロールのミセル溶解性を医薬品であるコレスチラミンよりも強力に低下させることを明らかにした。また、これらのペプチドは胆汁酸と結合することにより、Apical Sodium-dependent Bile acid Transporter（ASBT）による胆汁酸再吸収を抑制し、胆汁酸の腸肝循環を阻害する可能性が推察される。そこで本研究では、ASBT のアミノ酸配列を元にペプチドアレイによる網羅解析を行い、ASBT の胆汁酸結合部位の探索、及び ASBT による胆汁酸再吸収を抑制することによりコレステロール代謝を改善する新規ペプチドの発見＜実験 1＞を、また、VVFLASVS のミセル溶解性低下機構の解明＜実験 2＞を目的とした。
【方法・結果】
＜実験 1＞ASBT のアミノ酸配列を元に 1 アミノ酸ずつずらしたヘキサペプチド（343 配列）とコントロール、ブランクを含んだ、計 348 配列を用いてペプチドアレイを作製し、in vitro で胆汁酸結合能試験を行ったところ、ASBT 配列のうち胆汁酸輸送に重要な役割を持つアミノ酸配列を含むペプチドはより強い胆汁酸結合能を示し、胆汁酸の腸肝循環を抑制しうるペプチドを発見した。また、ASBT の細胞外ループ 2・3、細胞内ループ 1 及び C 末端鎖に胆汁酸と強く相互作用を示すペプチド配列が集中していることを明らかにした。＜実験 2＞胆汁酸の臨界ミセル濃度(CMC)を測定したところ、2.5 mM であった。次に、混合ミセルの主要構成成分である胆汁酸をサンプル添加時と非添加時で定量し、VVFLASVS 添加後の胆汁酸濃度は CMC 以上であったのに対し、コレスチラミン添加では、CMC 以下であることを明らかにした。このことから、VVFLASVS 添加ではコレスチラミン添加とは異なる作用機構でコレステロールのミセル溶解性低下を引き起こす可能性が示唆された。また、胆汁酸以外の混合ミセル成分の定量をサンプル添加時と非添加時で GC-MS を用いて行い、VVFLASVS 添加によりコレステロール以外の脂質（オレイン酸・モノオレイン）のミセル溶解性も同様に顕著に低下することを明らかにした。以上から、VVFLASVS はミセルに内包されている脂質成分（コレステロール、オレイン酸、モノオレイン）と相互作用し、ミセルへの溶解性を低下させることを明らかにした。

bile acid, cholesterol, peptide

発表責任者：秋江　祐希（u8121001@edu.gifu-u.ac.jp）

発表番号：3E054
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アロエベラゲル抽出物による小腸上皮細胞の PPARα活性化が食後高脂血症に及ぼす影響

# Aloe Vera Gel Extract attenuates postprandial hyperlipidemia via activating PPARα in intestinal cells

○渡邊 奈津実[1]、高橋 信之[2]、田中 美順[3]、三澤 江里子[3]、後藤 剛[1]、河田 照雄[1]（[1]京大院農　食品生物、[2]東京農業大学　応用生物科学部、[3]森永乳業株式会社　素材応用研究所）
○Natsumi WATANABE[1], Nobuyuki TAKAHASHI[2], Miyuki TANAKA[3], Eriko MISAWA[3], Tsuyoshi Goto[1], Teruo KAWADA[1] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Faculty of Applied Bio-science, Tokyo Univ. of Agric., [3]Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】食後高脂血症は、冠動脈疾患をはじめとする動脈硬化疾患の危険因子となることが指摘されている。近年、小腸上皮細胞の PPARα を活性化することでエネルギー代謝を亢進し、食後高脂血症を改善することが報告されている。そこで本研究では、PPARα 活性を持つアロエベラ由来植物ステロール（アロエステロール）及びアロエステロールを豊富に含むアロエベラゲル超臨界抽出物（AVGE）が食後高脂血症に与える影響について検討した。
【方法】AVGE の PPARα 活性を検討するため、CV-1 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。また、小腸上皮細胞の遺伝子発現に与える影響を検討するため、Caco-2 細胞を 12 ウェルプレートに播種後、3 週間培養して腸管上皮モデルを作製した。そこへアロエステロール及び AVGE を添加し 16 時間後に細胞を回収、遺伝子定量を行った。動物実験では、6 週齢の雄性 C57/BL6J マウス及び PPARα 欠損マウスを 1 週間の予備飼育後 2 群に分け、高脂肪食（HFD、60 kcal% fat）を 2 週間摂食させることで食後高脂血症を誘導した。その後 AVGE を 10 mg/kg で 1 日 1 回経口投与を行い、食後高脂血症の判定として経口脂肪負荷試験（OFTT）を実施した。また、同様の投与条件で小腸上皮及び肝臓の遺伝子解析を行った。解剖前 3 日間の糞を回収し、糞中の中性脂肪を抽出・定量した。
【結果・考察】PPARα レポーターアッセイでは、AVGE 100 μg/mL でルシフェラーゼ活性が有意に上昇し、アロエステロール同様 AVGE にも PPARα 活性化作用があることが示唆された。また AVGE 投与 2 週目の OFTT では、AVGE 群で血中中性脂肪量の上昇が有意に抑制され、AVGE は食後高脂血症を改善することが示唆された。さらに、PPARα 欠損マウスで行った OFTT ではこの効果が消失したことから、AVGE の食後高脂血症改善効果は PPARα 活性化を介したものであることが示唆された。また AVGE 投与は糞中の中性脂肪量に変化を与えなかったため、AVGE 投与による食後高脂血症改善作用は中性脂肪の排泄促進によるものではないと考えられた。アロエステロール及び AVGE は Caco-2 細胞において、PPARα 標的遺伝子である脂肪酸酸化関連酵素（アシル CoA オキシダーゼ）の遺伝子発現を有意に上昇させた。
【結論】AVGE は小腸上皮細胞の PPARα を活性化することで食後高脂血症を改善することが示唆された。

small intestine, dyslipidemia, peroxisome proliferator-activated receptor alpha

発表責任者：渡邊奈津実（natsumiw@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3E055
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 炎症誘導が ApoE 欠損マウスの肝臓の病理学的特徴に及ぼす影響

# Effects of inflammation-inducing on the pathological features of the liver in apoE-deficient mice

○新保 美里、梅ケ谷 南、城内 文吾、佐藤 匡央 (九大農)
○MISATO NIIBO, MINAMI UMEGATANI, BUNGO SHIROUCHI, MASAO SATO (Kyushu Univ.)

【Introduction】

実験動物へのカゼイン投与は炎症を誘導する方法として炎症性疾患に関する研究に広く用いられている。肝臓での炎症性疾患の場合、アポリポタンパク質 E 欠損(ApoE$^{-/-}$)マウスへ 8 週間カゼイン投与すると、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を誘導したとの報告がある(Kun L.Ma *et al.Hepatology* 2008;48(3):770-781)。本研究では、8 週間カゼイン投与に加えて抗酸化剤無添加およびリノール酸含有高脂肪食によるさらなる炎症誘導が ApoE$^{-/-}$マウスの肝臓の病理学的特徴にどのような影響を与えるか検討した。

【Methods】

7-12 週齢の雄性 ApoE$^{-/-}$ マウスに、毎日 PBS 溶液を皮下投与した群(PBS 群)、1.7 mg/g 体重 カゼインを皮下投与した群(Casein 群)の 2 群に分け、AIN-76 組成に準じた高脂肪食を与え 8 週間飼育を行った。飼育期間終了後、6 時間絶食させた後に心臓採血にて屠殺を行った。血清脂質濃度、ALT 活性を測定した。また、肝臓トリアシルグリセロール(TAG)濃度、肝臓タンパク質量を測定した。全身および肝臓の炎症を評価するために血清および肝臓中の TNF-α 濃度の測定を行った。また、飼育 4，6，8 週目のマウスの肝臓のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、観察を行った。

【Results】

PBS 群と比較して Casein 群において血清脂質濃度、ALT 活性は有意に低下した。さらに Casein 群において肝臓 TAG 濃度およびタンパク質濃度の有意な低下が認められた。また、血清および肝臓の TNF-α 濃度が Casein 群で有意に上昇した。Casein 群において飼育 4 週目では肝臓に脂肪滴が観察されたが、6、8 週目では減少していた。

【Discussion】

ApoE$^{-/-}$マウスへの 8 週間カゼイン投与並びリノール酸含有高脂肪食は肝硬変を誘導した可能性が示された。飼育 4 週目において肝臓への脂肪蓄積が見られたことから、NAFLD から非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)、肝硬変の順に進行したものと考えられる。

ApoE-deficient mice, nonalcoholic steatohepatitis, inflammation

発表責任者：新保　美里（3310.booon.niii@gmail.com）

発表番号：3E056
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# レチノイン酸受容体活性化を介したβ-クリプトキサンチンの抗肥満作用の検討

# Anti-obesity effect of β-cryptoxanthin by activation of retinoic acid receptor

○原 英之[1]、高橋 信之[1,2]、高橋 春弥[1]、杉浦 実[3]、後藤 剛[1,2]、河田 照雄[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット、[3]農研機構　果樹研究所）
○Hideyuki HARA[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1,2], Haruya TAKAHASHI[1], Minoru SUGIURA[3], Tsuyoshi GOTO[1,2], Teruo KAWADA[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]NIFTS, National Aguriculture and Food Reserch Organization)

【目的】
温州ミカンなどに多く含まれるカロテノイドの一種であるβ–クリプトキサンチン（β-CRP）は疫学調査により、その血中濃度と糖尿病などの生活習慣病の発症リスクに負の相関があることが明らかにされているが、未だ詳しいメカニズムは分かっていない。今回、β-CRP が生活習慣病の発症リスクを低下させるメカニズムの一つとして、β-CRP がレチノイン酸受容体（RAR）の活性化を介して、脂肪組織の熱産生亢進に寄与するタンパク質である脱共役タンパク質１（UCP1）の発現を上昇させることに着目し、検討を行うこととした。
【方法・結果】
C57BL/6J マウス（♂）にβ-CRP を 0.05%含有する高脂肪食を摂食させ、高脂肪食群（control 群）と比較検討することにより、β-CRP の生理機能について検討を行った。β-CRP 摂食群では control 群と比較して体重に減少傾向が認められ、複数の脂肪組織において、重量の有意な低下が認められた。また、血糖値の有意な低下も認められ、β-CRP に抗肥満作用があることが確認された。次にβ-CRP の体脂肪蓄積抑制作用について検討するため、白色脂肪組織の遺伝子発現解析を行った。β-CRP 群では脂肪組織の熱産生亢進に寄与するタンパク質である UCP1 の発現上昇が認められた。これらの結果から、β-CRP 群では脂肪組織におけるエネルギー消費増加が示唆され、β-CRP 摂取による体脂肪蓄積抑制効果に寄与しているものと考えられた。続いて、培養脂肪細胞を用いることにより、脂肪組織に対するβ-CRP の熱産生亢進作用について検討した。培養脂肪細胞にβ-CRP を添加した結果、UCP1 mRNA 発現量の有意な増加が確認された。また、β-CRP による UCP1 発現亢進作用は RAR アンタゴニスト存在下で消失した。よって、β-CRP は RAR 活性化を介して UCP1 の発現を上昇させることが示唆された。
【結論】
β-CRP は脂肪組織のエネルギー消費増加に寄与し、生活習慣病を予防・改善することが示唆された。また、その作用は RAR 活性化を介した UCP1 発現の上昇に起因することが示唆された。

β-cryptoxanthin, uncoupling protein 1, retinoic acid receptor

発表番号：3E057
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クルクミンの機能性発現機構におけるタンパク質ストレス作用の関与

# Involvement of proteo-stress by curcumin in its physiological functions

○村上 明[1,2,3]、今林 健登[1]、村川 慧[1]、バレンティン シンディー[1]、中畑 恵利奈[1]、大西 康太[4]、入江 一浩[1]([1]京大院農・食品生物、[2]兵庫県大・環境人間、[3]兵庫県大・先端食科学研セ、[4]徳島大院・医歯薬学)

○Akira MURAKAMI[1,2,3], Kento IMAHAYASHI[1], SATOSHI MURAKAWA[1], Cindy VALENTINE[1], ERINA NAKAHATA[1], KOHTA OHNISHI[4], KAZUHIRO IRIE[1] ([1]Kyoto Univ, Food Sci. & Biotechnol, [2]Univ. Hyogo, Sch. of Human Sci. & Environ., [3]Univ. Hyogo, Res. Inst. Food & Nutr Sci, [4]Univ. Tokushima, Inst Biomed Sci)

【目的】私たちは最近、東南アジア産ハナショウガに含まれるゼルンボンが生体タンパク質と非特異的に相互作用することで生理機能性を発現する可能性を見出した[1)]。一方、香辛料ターメリックの主要な機能性成分であるクルクミンには結合タンパク質が数多く存在すると報告されている[2)]が、ゼルンボンと同様な特性を持つか否かは不明である。そこで本研究では、クルクミンのタンパク質ストレス誘導性を評価し、さらに、その脂肪分解活性との関連性を検討した。

【方法・結果・考察】クルクミンを雄性 ICR マウスに胃内強制投与（0, 2, 10 mg/kg）したところ、小腸上部粘膜中において数種の恒常性維持タンパク質（β-actin, GAPDH, α-tubulin）の不溶化を認めた。また、Hepa1c1c7 細胞（マウス肝臓がん）をクルクミンで処理すると、タンパク質ストレスの指標となる p62 結合タンパク質およびユビキチン化タンパク質が増加した。興味深いことに、ケミカルシャペロン活性を有するフェニル酪酸の前投与によってクルクミンのタンパク質ストレス作用を緩和すると、そのトリグリセリド分解誘導活性が有意に減弱した。以上から、クルクミンは細胞タンパク質の変性を通して脂質分解を促進している可能性が示唆された。一方で、脂質分解に関与する ATGL（adipose triglyceride lipase）の発現を低下させた細胞では、クルクミンの細胞毒性が顕著に増加した。本結果は、クルクミン投与により誘導される種々のストレスに適応するために、脂質分解から供給されるエネルギーが必要であることを示唆しており、クルクミンによる脂肪分解機構を部分的に説明できる可能性がある。一方、若年の線虫（4 日齢の *C. elegans*）における分子シャペロン *hsp16.1* の遺伝子発現誘導能は老年線虫（14 日齢）ではほぼ完全に消失していた。従って、タンパク質ストレスに対する適応応答能は加齢と共に減衰すると推察された。

【結語】一般的にクルクミンは、「体に良い」と捉えられているが、適度なストレスを与えることが生理機能性の発現につながる可能性を提示できたと考えている。

【参考文献】

(1) Ohnishi K, *et al*., Funct Food Health Disease, 2013;3:400-15 (review).
(2) Gupta SC, *et al*., Nat Prod Rep. 2011;28:1937-55.

curcumin, lipolysis, stress

発表番号：3E058
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ライチ由来低分子化ポリフェノールである Oligonol の脂質低下作用

# Lipid lowering effect of Oligonol, oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit polyphenol

○林 洪太[1]、河合 咲紀[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2] ([1]明治大農、[2]アミノアップ化学)
○Kouta HAYASHI[1], Saki KAWAI[1], Kyouiti OSADA[1], Jun TAKANARI[2], Kentarou KITADATE[2] ([1]Meiji Univ, [2]Amino Up Chemical)

＜目的＞

プロシアニジン化合物を低分子化してバイオアベイラビリティーを高めた Oligonol の脂質代謝制御作用について、コレステロールを給餌したラットに与えた場合の効果を検証した。

＜方法＞

7 週齢の Wistar 系雄性ラットを予備飼育した後、コレステロール 0.5%およびコーン油 5%を含む AIN76 純化飼料を 3 日間与えた。その後 3 日間は給餌 2 時間後に生理食塩水を経口投与（C 群）、あるいは Oligonol を 1000mg/kg B.W./day のレベルで経口投与（O 群）した。飼育後、麻酔を施して動脈より採血死させて肝臓と血漿の脂質代謝諸パラメータを測定した。

＜結果＞

体重 100g 当たりの盲腸重量は C 群よりも O 群が有意に高くなった。肝臓の総コレステロール濃度およびトリアシルグリセロール濃度は C 群と比べて O 群が有意に低くなった。肝臓の CYP7A1 の mRNA レベルは C 群よりも O 群が有意に高くなり、一方で SHP および FGFR4 の mRNA レベルは有意に低くなった。回腸の FXR および ASBT の mRNA レベルは C 群と比較して O 群が有意に高くなった。糞中に排泄された二次胆汁酸量は C 群と比べて O 群が減少したが、一次胆汁酸量は増加し、総胆汁酸量としては有意に増加した。また、糞中に排泄された総脂肪酸量は C 群よりも O 群が有意に増加した。盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度について、酢酸およびプロピオン酸濃度は C 群と比較して O 群が有意に高くなり、一方で酪酸濃度は有意に低くなり、総短鎖脂肪酸濃度としては有意に高くなった。

＜考察＞

本研究では、コレステロールを給餌したラットに対し Oligonol を経口投与した場合に、肝臓のトリアシルグリセロール濃度および総コレステロール濃度が低下することが明らかとなった。Oligonol の投与によって中性脂肪および胆汁酸の糞中への排泄が増加したこと、また、肝臓におけるコレステロール異化反応が亢進したことが影響していると考えられる。また、糞中に排泄された胆汁酸および盲腸内容物中の短鎖脂肪酸組成の変化から、Oligonol の腸内細菌叢の変動を介した代謝調節が示唆され、その詳細について現在検討中である。このように、ラットに Oligonol を経口投与すると 3 日間という短期間であっても体内の脂質レベルおよびその代謝が大きく変動することが明らかとなった。

polyphenol, procyanidin, obesity

発表責任者：林洪太（busterkun918@gmail.com）

発表番号：3E059
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸発酵豆乳中のイソフラボンとタンパク質は共存することで高コレステロール食投与ラットの脂質異常症を予防する

# Isoflavone and Protein Constituents of Lactic Acid-Fermented Soy Milk Combine to Prevent Dyslipidemia in Rats Fed a High Cholesterol Diet

○小林 麻貴[1]、江草 信太郎[2]、福田 滿[3]（[1]兵庫大　健康科学、[2]マルサンアイ株式会社、[3]武庫川女子大・栄養科学研）
○Maki KOBAYASHI[1], Shintaro EGUSA[2], Mitsuru FUKUDA[3]（[1]Hyogo Univ., [2]MARUSAN-AI Co., Ltd., [3]Mukogawa Women's Univ.）

【目的】

近年、脂質異常症が増加傾向にあり、その予防に有効な大豆食品に期待が寄せられている。大豆食品は、血中コレステロール濃度上昇抑制効果や、肝臓脂質蓄積抑制効果等の脂質代謝改善効果が報告されている。そのため我々は大豆食品の中でも摂取容易な豆乳に注目し、さらに植物性食品由来の乳酸菌で発酵させた乳酸発酵豆乳を作製した。既に、普通食、高脂肪食、高コレステロール食、高脂肪・高コレステロール食投与ラットにおいて乳酸発酵豆乳摂取により血中コレステロール濃度上昇抑制効果、肝臓脂質蓄積抑制効果を示すことを報告した。しかし、乳酸発酵豆乳の脂質代謝改善作用におけるイソフラボンアグリコン単独での効果や大豆タンパク質が共存時のイソフラボンアグリコンの効果は明らかではない。そのため、本研究では高コレステロール食投与ラットにおける乳酸発酵豆乳中のイソフラボンアグリコン単独での脂質代謝に及ぼす影響と、大豆タンパク質が共存時のイソフラボンアグリコンの脂質代謝に及ぼす影響について比較を行った。

【方法】

7 週齢 SD 系雄性ラットを AIN-93G 組成飼料で 1 週間予備飼育した後、AIN-93G 組成飼料を引き続き与えた C 群、C 群飼料の 1%をコレステロールで置換した H 群、H 群飼料の 4%を乳酸発酵豆乳 70%エタノール抽出物で置換した E 群、H 群飼料の 19.4%を 70%エタノール洗浄乳酸発酵豆乳で置換した W 群、H 群飼料の 23.2%を乳酸発酵豆乳で置換した F 群に分け 5 週間飼育した。毎週尾動脈採血を行い、血液成分の分析を行った。飼育終了後、肝臓脂質を Folch 法で抽出し、肝臓 Chol 濃度、肝臓 TG 濃度を測定した。さらに肝臓の脂質代謝関連遺伝子の発現量変化を Real time RT-PCR 法で調べた。

【結果】

血中 TC 濃度は H 群よりも E 群で有意に高値を示した。一方で、W 群と F 群では有意に低値を示し、さらに W 群よりも F 群で有意に低値を示した。また、血中 TG 濃度は、H 群と比較して E 群では変化がなかったが、W 群、F 群では有意に低値を示した。次に、肝臓 Chol 濃度、TG 濃度では H 群と比較して E 群、W 群では低値を示さなかったが、F 群のみ有意に低値を示した。以上の結果より、乳酸発酵豆乳摂取による脂質代謝改善効果はイソフラボンアグリコン単独ではなく、イソフラボンアグリコンと大豆タンパク質が共存することで効果を発揮することが示唆された。

isoflavone, soy protein, fermented soymilk

発表番号：3E060
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラットにおけるアルギン酸カルシウムの血中コレステロール低下作用
# Cholesterol-lowering Effect of Calcium Alginate in Rats

○荻原 琢男[1]、井戸田 陽子[1]、木暮 悠美[1]、加藤 多佳子[1]、小川 真奈[2]、小林 彰子[2]、柿沼 千早[1]、矢野 健太郎[1]、荒川 大[1]、宮島 千尋[3]、笠原 文善[3]（[1]高崎健大・薬、[2]東大院・農生科、[3]（株）キミカ）
○Takuo OGIHARA[1], Yoko IDOTA[1], Yumi KOGURE[1], Takako KATO[1], Mana OGAWA[2], Shoko KOBAYASHI[2], Chihaya KAKINUMA[1], Kentaro YANO[1], Hiroshi ARAKAWA[1], Chihiro MIYAJIMA[3], Fumiyoshi KASAHARA[3] ([1]Takasaki University of Health and Welfare, [2]Tokyo Univ., [3]KIMICA corporation)

【背景・目的】
アルギン酸ナトリウム（Na-Alg）は血中コレステロール（Cho）低下作用を有する特保として用いられているが、ナトリウム過剰摂取の懸念があり、また服用量の多い液体であるため利便性が低い。そこで我々は、アルギン酸カルシウム（Ca-Alg）の血中 Cho 値に与える影響を検討した。
【方法】
*in vitro*：種々の Na-Alg を用いてタウロコール酸の吸着能を検討した。すなわち、高分子あるいは低分子、種々M/G 比（構成糖のグルロン酸（G）とマンヌロン酸（M）の比）の Na-Alg 溶液にタウロコール酸を添加し、限外ろ過フィルターを用いて遠心分離し、Na-Alg に取り込まれずにろ過されたタウロコール酸を測定した。
*in vivo*：SD 系雄性ラットに、高 Cho 食あるいは高 Cho 食に種々比率で Ca-Alg を加えた餌を 2 週間与えた。この期間中、体重および食餌摂取量を測定し、2 週間後に血中 Cho 濃度、糞便中胆汁酸排泄量および門脈血中胆汁酸濃度を測定した。また脂質代謝以外の生理学的パラメータも測定した。さらに主要な臓器の病理解剖を行った。
【結果・考察】
*In vitro* における検討では、高分子量でグルロン酸比率が高い Na-Alg において吸着能が最も高かった。*In vivo* における検討では Ca-Alg 2%摂餌群において、血中 Cho 濃度および門脈血中胆汁酸濃度が有意に低下した。さらに糞便中の胆汁酸排泄量が Ca-Alg 摂餌量依存的に増加する傾向が見られた。生化学的パラメータおよび組織病理学的所見のいくつかの変化が観察されたが、生理的範囲内に留まった。
以上の結果より、Ca-Alg による血中 Cho 低下作用が示された。そのメカニズムの一つとして、腸において Ca-Alg が胆汁酸を吸着して排泄を促進することにより再吸収される胆汁酸が減少し、肝臓における Cho からの胆汁酸の合成が促進され、結果として血中 Cho の低下につながることが考えられた。Na-Alg とは異なり、Ca-Alg はナトリウム過剰摂取の危険性がなく、また固形のままの摂取で効果が認められたため、服用性や携帯性も良いと考えられる。さらに Ca-Alg は食品添加物としての安全性がすでに確認されており、長期服用可能な食品添加剤あるいは機能性食品として期待される。

alginate, cholesterol, bile acid

発表責任者：荻原　琢男（togihara@takasaki-u.ac.jp）

発表番号：3E061
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米タンパク質酵素分解物のマウス前駆脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用

# Inhibitory effects of rice protein hydrolysate on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes

○吉澤 瞳[1]、下田 博司[2]、柏木 豊[1]、前橋 健二[1] ([1]東京農大院・醸造、[2]オリザ油化株式会社)
○Hitomi Yoshizawa[1], Hiroshi Shimoda[2], Yutaka Kashiwagi[1], Kenji Maehashi[1] ([1]Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., Tokyo Univ. Agriculture, [2]Oryza Oil & Fat Chemical Co., Ltd.)

【背景・目的】

日本を含む多くの先進国で生活習慣病やメタボリックシンドロームの増加が深刻な問題となっている。これらの成因基盤であるインスリン抵抗性は、脂肪細胞が過剰な脂肪蓄積により肥大化したアディポサイトカイン分泌などの機能が低下することで引き起こされると考えられている。味噌をはじめとする発酵食品中には豊富なペプチドが含まれており、現在までに様々な機能性ペプチドが報告されている。大豆においては肥満抑制作用ペプチドの存在がすでに報告されている他、in vivo では米タンパク質、米麹においても抗肥満効果が報告されている。しかし、米ペプチドや in vitro における働きについては現在までに報告はみられない。そこで本研究では米発酵食品の肥満予防及び改善効果を明らかにすることを目的とし、モデルとして米タンパク質酵素分解物のマウス前駆脂肪細胞に対する抗肥満作用の評価を行った。

【方法】

米タンパク質としてオリザプロテイン-P70 を用い、各種市販酵素製剤で処理し米タンパク質酵素分解物を調製した。これを限外ろ過、イオン交換、逆相 HPLC にて順次分画した。細胞実験にはマウス前駆脂肪細胞(3T3-L1 細胞)を用い、培地に試料を添加して培養した際の細胞内トリグリセライド量または細胞内グリセロール量を測定して、試料が脂肪蓄積または脂肪分解に及ぼす影響を評価した。

【結果】

米タンパク質のプロテアーゼ M(ProM)分解物及びプロテアーゼ A 分解物にのみ脂肪蓄積抑制傾向が見られ、そのうち ProM には明瞭な作用が確認された。さらに ProM を分画して有効成分の検討を行ったところ、1kDa 以下の酸性・中性画分に含まれることが示唆された。

rice, protein hydrolysate, 3T3-L1 cell

発表責任者：前橋健二（maehashi@nodai.ac.jp）

発表番号：3E062
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高脂肪食を与えたマウスに対するキサントフモール精製物の抗肥満作用

# Anti-obesity effects of dietary purified xanthohumol in mice fed a high-fat diet.

○高橋 光輝、佐久間 祐子、長田 恭一 (明大農)
○Koki TAKAHASHI, Yuko SAKUMA, Kyoichi OSADA (Meiji Univ.)

【目的】ホップ搾りかすに存在するキサントフモールは、種々の生理作用を発揮することが報告されている。現在までに、キサントフモール高含有ホップ抽出物(XRHE、キサントフモール 18%含有)を用いて、抗肥満作用を明らかにしてきたが、XRHE には非キサントフモール成分も多く含まれている。よって、本研究では、XRHE から精製して得た高純度キサントフモール精製物(PX、キサントフモール 80%含有)を高脂肪食を与えたマウスに給餌することにより、キサントフモール自体の脂質代謝調節作用を検証した。

【方法】C57BL/6J マウス(3 週齢、雄性)を予備飼育した後、高脂肪(15%)食を与えた HF 群、その飼料に XRHE を 1%(XRHE 群)あるいは PX を 0.2%(PX 群)添加して 68 日間ペアフィーディング条件で飼育した。なお、陰性対照群(LF 群)には、5%脂肪添加食を与えた。飼育終了後、12 時間絶食させ、麻酔を施して眼底採血死させ、血漿、肝臓および糞を回収して、脂質代謝に関わる諸パラメータを解析した。

【結果】解剖時の体重、内臓白色脂肪組織重量、血漿トリグリセリド、遊離脂肪酸レベルおよび肝臓トリグリセリドレベルは HF 群と比べて XRHE と PX 両群は有意に低くなった。また、肝臓の脂肪酸合成を制御する転写因子の SREBP1c の mRNA 発現レベルは、HF 群と比べて XRHE と PX 両群は有意に低くなり、脂肪酸β酸化を制御する核内受容体の PPARαの発現レベルは、HF 群と比べて PX 群は高くなる傾向となった。さらに、糞中に排泄された脂肪酸と炭水化物の両レベルは、HF 群と比べて XRHE と PX 両群は有意に高くなった。

【考察】PX の摂取により、肝臓の脂肪酸合成が抑制される一方で脂肪酸β酸化が亢進され、また、食事由来の糖質と脂肪の吸収が阻害された。このような機序により、PX の摂取で脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。以上の結果より、以前報告した XRHE の抗肥満作用は、キサントフモール自体の効果であると考えられた。

Lipid Metabolism, Mouse, Xanthohumol

発表番号：3E063
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Chalcones suppress fatty acids-induced lipid accumulation through LKB1/AMPK pathway in hepatocytes

○Hitoshi ASHIDA[1], Tianshun ZHANG[1], Yoko YAMASHITA[1], Norio YAMAMOTO[2] ([1]Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, [2]House Wellness Foods Corporation)

Excessive lipid accumulation in the liver has been proposed to cause hyperlipidemia, diabetes and fatty liver disease. 4-Hydroxyderricin, xanthoangelol, cardamonin and flavokawain B are chalcones that have exhibited various biological effects against obesity, inflammation, and diabetes; however, little is known about the inhibitory effects of these chalcones on fatty liver disease. In the present study, we investigated the ability of 4-hydroxyderricin, xanthoangelol, cardamonin and flavokawain B to reduce lipid accumulation in hepatocytes. When HepG2 cells were treated with a mixture of fatty acids (FAs; palmitic acid : oleic acid = 1 : 2 ratio), significant lipid accumulation was observed. Under the same experimental conditions, addition of chalcones at 5 μM significantly suppressed the FA-induced lipid accumulation. We found that the expression of sterol regulatory element-binding protein-1 (SREBP-1), a key molecule involved in lipogenesis, was decreased in these chalcone-treated cells. We also found that these chalcones increased the expression of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα), which is involved in FA oxidation. Moreover, these chalcones increased phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and liver kinase B1 (LKB1), upstream regulators of SREBP-1 and PPARα. We confirmed that an AMPK inhibitor, compound C, reversed chalcone-induced changes in SREBP-1 and PPARα expression in the HepG2 cells. Collectively, we found that 4-hydroxyderricin, xanthoangelol, cardamonin and flavokawain B attenuated lipid accumulation through activation of the LKB1/AMPK signaling pathway in HepG2 cells.

chalcone, AMPK, lipid accumulation

発表責任者：芦田　均（ashida@kobe-u.ac.jp）

発表番号：3E064
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米糠抽出物の摂取が閉経後ベトナム人女性の動脈硬化リスク因子に与える影響

# Effect of rice bran extract on the risk of atherosclerosis in post-menopausal Vietnamese women

○中島 有里[1]、Vu Anh Linh[2]、伊藤 幸彦[1]、由井 慶[1]、Bui Thi Nhung[3]、山本 茂[2]([1]ファンケル総合研究所、[2]十文字学園女子大学大学院、[3]ベトナム国立栄養研究所)
○Yuri Nakashima[1], Linh Vu Anh[2], Yukihiko Ito[1], Kei Yui[1], Nhung Bui Thi[3], Shigeru Yamamoto[2]
([1]Fancl Research Institute, [2]Jumonji University, [3]Natitonal Institute of Nutirtion Vietnam)

【目的】我々はこれまでに、アシル化ステロール配糖体(PSG)画分を含む米糠抽出物が血中 LDL コレステロールの改善作用を有することを報告した。本試験では、血管機能の面から動脈硬化のリスク因子に対する影響について、高血中 LDL コレステロールを呈した閉経後のベトナム人女性を対象として評価した。

【方法】血中 LDL コレステロール値が 140mg/dL 以上の閉経後ベトナム人女性 60 例を対象に、プラセボ対照一重盲検並行群間試験を実施した。60 名の対象者を血中 LDL コレステロール値に偏りがないように、米糠抽出物(PSG；PSG 画分として 50mg/日)群、プラセボ群の 2 群に分けた。各群ともに 1 日 6 カプセル(毎食後 2 カプセル)を 6 ヶ月間毎日摂取させ、摂取期間中は生活習慣を変えないように指導した。摂取前および摂取 2、4、6 ヶ月後に身長、体重、体脂肪率、ウエスト周囲径、収縮期・拡張期血圧、血圧脈波検査(CAVI)、血流依存性血管拡張反応(FMD)の測定および採血を行い、血中総コレステロール値、HDL コレステロール値、LDL コレステロール値、中性脂肪値、血糖値、HbA1c、アディポネクチン、TNF - α の分析を行った。また、LH 比、BMI を既報の計算式により算出した。

【結果】摂取期間中に 5 名の被験者が試験から脱落し、解析対象者数は 55 名となった。摂取 2、4、6 ヶ月目において、プラセボ群の FMD 値は、PSG 群に比較して有意に低値を示した。また、摂取 4、6 ヶ月目において、PSG 群の血中 LDL コレステロール値、LH 比、および TNF - α は、プラセボ群に比較して有意に低値を示した。その他の項目には有意な変動はみられなかった。

【考察】高血中 LDL コレステロールを呈した閉経後女性において、PSG の摂取により、動脈硬化のリスク因子である高血中 LDL コレステロール、LH 比、および TNF-α が低下し、FMD 値が正常範囲内に維持された。これらの結果は、PSG の摂取が動脈硬化に対して予防的に作用する可能性を示している。

atherosclerosis, LDLcholesterol, clinical study

発表責任者：中島　有里（yuri_1204@fancl.co.jp）

発表番号：3E065
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Tomatidine による肝細胞の脂肪蓄積抑制作用の解明とその作用機構の解析

# Elucidation of the Inhibitory action of tomatidine on hepatic lipid accumulation

○楠 ひかり [1]、上久保 綾祐 [2]、赤川 貢 [2] ([1] 大阪府大・生命環境科学、[2] 大阪府大院・生命環境科学)
○Hikari KUSU[1], Ryosuke KAMIKUBO[2], Mitsugu AKAGAWA[2] ([1]Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】脂肪肝といえば、アルコールの過剰摂取に伴う疾病の代表であったが、近年では生活習慣病患者数の増加に伴い、アルコール常飲歴がない非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）患者が増加している．NAFLD は従来のアルコール性脂肪肝と同様、明確な治療法が確立しておらず、進行により肝炎を経て、肝癌、肝硬変を発症する危険性がある．そこで本研究では肝細胞において脂肪蓄積を抑制し、NAFLD の予防・改善に繋がるような食品由来成分を探索することを目的とした．
【方法・結果】ヒト肝由来細胞株 HepG2 細胞をパルミチン酸含有 DMEM 中で培養することで、肝細胞の脂肪蓄積状態を再現した．食品由来のポリフェノール、ビタミン様化合物、およびステロイド化合物等をそれぞれ添加した培地で HepG2 細胞を培養後、蓄積した脂肪を Oil Red O で染色し、その定量を行った．また、肝細胞内で脂質代謝を司るタンパク質である AMP 活性化プロテインキナーゼ（AMPK）のリン酸化レベル、及び AMPK の基質であり、リン酸化によって不活性化される脂肪酸合成の律速酵素である ACC のリン酸化レベルを、ウエスタンブロット法により評価した．食品由来成分のスクリーニングを行った結果、トマト由来のステロイドアルカロイドである tomatidine が、顕著に脂肪蓄積を抑制することが明らかになった．Tomatidine は、トマトの未熟果実や葉茎部に多く含まれる糖アルカロイドの一種である tomatine のアグリコンで、tomatine が腸で消化される過程で生じる化合物である．HepG2 細胞に tomatidine を添加して、AMPK 及び ACC のリン酸化レベルを評価したところ、tomatidine 濃度依存的なリン酸化レベルの上昇が確認された．一方で、AMPK 阻害剤である Compound C の共存によって、tomatidine の脂肪蓄積抑制作用が打ち消されたため、AMPK の活性化を介した分子機構が明らかになった．また、tomatidine が主要な AMPK キナーゼである LKB1 のリン酸化レベルを上昇させたことから、LKB1 による AMPK のリン酸化経路が推定された．さらに、AMPK の下流の転写因子であり、脂質合成を促進する SREBP-1c の細胞内局在を免疫蛍光染色法によって観察したところ、tomatidine 処理によって SREBP-1c の核内移行が顕著に阻害され、Compound C によってその作用が打ち消されることが判明した．以上の結果から、tomatidine は AMPK のリン酸化を誘導し、転写因子の調節を介して肝細胞の脂肪蓄積を抑制することが示唆された．

tomatidine, lipid metabolism, AMPK

発表責任者：赤川貢（akagawa@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3E066
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ビート種子由来フェノール性アミド化合物の 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪蓄積抑制作用

# Inhibitory effect of phenolic amides from beet seeds on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocyte

○金沢 匠[1]、福士 幸治[2]、菊地 裕人[3]、知地 英征[2,4]([1]千葉県立保健医療大栄養、[2]北大院農、[3]日本甜菜製糖、[4]藤女子大食物栄養)
○Takumi KANAZAWA[1], Yukiharu FUKUSHI[2], Hiroto KIKUCHI[3], Hideyuki CHIJI[2,4] ([1]Chiba Prefectural Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Nitten, [4]Fuji Women's Univ.)

【目的】我々はビート種子から強い抗酸化性を有した 2 種類のフェノール性アミド化合物（フェルロイルメチルドーパミン、フェルロイルチラミン）を単離し、有機合成により構造を決定した[1)]。その共通構造であるフェルラ酸については、抗酸化作用等の生理作用が報告されているが、アミド化合物の生理作用についての報告は少ない。本研究では、これらのアミド化合物の生理活性の探索を目的として、3T3-L1 脂肪前駆細胞での脂肪蓄積への効果について検討した。また、フェルロイルチラミンのより簡便な合成法についても検討したので報告する。
【方法】使用するアミド化合物は有機合成により作成した。3T3-L1 脂肪前駆細胞は脂肪細胞への分化を誘導するため、分化誘導培地（DMEM、10% 牛胎児血清、インスリン、デキサメサゾン、3-イソブチル-1-メチルキサンチン）で 3 日間培養した後、維持培地（DMEM、10% 牛胎児血清、インスリン）で 7 日間培養した。分化誘導期間を通じて 50 及び 100 μM のアミド化合物及びフェルラ酸を培地に添加し、分化誘導開始後 0、6、8、10 日目に細胞中トリグリセリド量を測定した。さらに、フェルロイルチラミンのより簡便な合成法を考案した。フェルラ酸とチラミン塩酸塩を DMF 中 4-ジメチルアミノピリジン存在下、1 当量のトリエチルアミンと 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩を加え縮合した。
【結果および考察】50、100 μM のアミド化合物及びフェルラ酸の添加により 8 日目までコントロールに比べて細胞内トリグリセリド量の有意な低下が見られた。フェルラ酸は添加 10 日目でトリグリセリド量の低下が見られなくなった。フェルロイルメチルドーパミンは添加量 50 μM では同様に 10 日目でトリグリセリド量の低下が見られなくなったが、100 μM に増やすことで 10 日目においてもトリグリセリド量の作用が確認できるようになった。フェルロイルチラミンについてはトリグリセリド量の低下が 10 日目まで確認でき、その低下作用は他の化合物と比べても強かった。本研究の結果から、ビート種子由来の 2 種類のフェノール性アミド化合物には 3T3-L1 脂肪前駆細胞の分化時に生じるトリグリセリド蓄積を抑制する効果があり、その効果はフェルラ酸と同等もしくはそれ以上であった（特開 2015-17044)。また、抑制効果が強かったフェルロイルチラミンについて、以前の方法（5 ステップ）に比べさらに簡便な方法（1 ステップ）による合成が可能となった。

[1)]Chiji, H. *et al.*(1984) Agric. Biol. Chem., 48(6), p1653-1654.

Beet seed, 3T3-L1 adipocyte, Phenolic amide

発表番号：3E067
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# キサントフモールによる転写因子 SREBP 活性抑制効果および分子機構の解明

# Analysis of inhibitory effect of xanthohumol on SREBP activity and its molecular mechanisms

○宮田 慎吾、井上 順、SHIMIZU Makoto、佐藤 隆一郎（東大院農生科・応生化）
○Shingo MIYATA, Jun INOUE, Makoto SHIMIZU, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【目的】SREBP は脂肪酸、コレステロール合成系遺伝子の発現を誘導することにより、脂質合成を促進する転写因子である。SREBP の過剰活性化は脂肪肝やインスリン抵抗性を惹起することが知られており、II 型糖尿病マウスの肝臓では SREBP の発現、活性化が亢進している。したがって、生活習慣病予防のためには SREBP 活性を適度に抑制することが望まれる。本研究では、SREBP の活性を低下させる食品成分を探索・同定し、その効果検証および作用機構の解明を試みた。
【方法】SREBP-1 の標的遺伝子 FAS のプロモーター領域 (-987~+121) を含むレポーター遺伝子を安定発現するヒト肝癌由来 Huh-7 細胞株を樹立した。156 種類の食品由来成分の中から、この細胞におけるプロモーター活性を低下させる化合物を選抜した。次に、見出した食品成分を Huh-7 細胞に処理し、活性型 SREBP タンパク質量、SREBP 標的遺伝子の mRNA 量、脂質合成量への影響を解析した。続いて、SREBP の活性化を負に制御する因子 Insig の欠損株における活性型 SREBP のタンパク質量、活性化過程で行われる SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送への影響を解析した。さらに、見出した化合物と SREBP の輸送に関与するタンパク質との結合、SREBP の輸送小胞への取り込みに及ぼす影響を解析した。また、食餌性肥満マウスにおいて摂食実験を行い、肝臓における SREBP の挙動を解析するとともに、抗生活習慣病効果を検証した。
【結果】FAS のプロモーター活性を抑制する化合物として、ホップに含まれるフラボノイドであるキサントフモールを見出した。その効果を検証したところ、キサントフモールは SREBP 標的遺伝子の mRNA 量、脂質合成量を低下させた。そして、Insig 非依存的に SREBP の小胞体・ゴルジ体間輸送を妨げることにより、SREBP の活性化を抑制することが示された。さらに、キサントフモールは SREBP を輸送する COP II 小胞の構成タンパク質である Sec23/24 に結合し、SREBP の COP II 小胞への取り込みを抑制することが示唆された。また、キサントフモールを摂食したマウスの肝臓では SREBP の活性化が抑制されており、肥満や脂肪肝が改善されることが明らかとなった。本研究の成果は、抗生活習慣病効果を有する新たな機能性食品開発への応用が期待される。

xanthohumol, SREBP

発表番号：3E068
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# フコキサンチンによる初代培養白色脂肪細胞での UCP1 発現調節作用

# Fucoxanthin upregulate uncoupling protein 1 expression in primary culture of white adipocytes

○小舘 めい、菅野 翔伍、前多 隼人（弘前大）
○Mei KODATE, Shogo KANNO, Hayato MAEDA (Hirosaki Univ.)

【目的】 Fucoxanthin は海藻類に含まれるカロテノイドの一種であり抗肥満、抗糖尿病作用があることから機能性食品素材としての利用されている。Fucoxanthin は白色脂肪細胞に Uncoupling protein 1(UCP1)タンパク質を発現させ、内臓脂肪の蓄積を抑制する機能が報告されている。UCP1 は本来は褐色脂肪細胞に存在し、熱産生に関与するタンパク質である。白色脂肪細胞での UCP1 の発現を促進する物質としては Troglitazone(Tro)や Rosiglitazone(Rosi)などの PPARγのリガンド物質などが知られている。本研究では Fucoxanthin による脂肪細胞での UCP1 発現促進をはじめとした機能の発現機構の解明を目的とし、マウス精巣上体周囲脂肪組織由来の初代脂肪細胞を用いた in vitro 試験による検討をおこなった。

【方法】 Fucoxanthin は体内へ吸収されると代謝物である Fucoxanthinol(FxOH)として存在することから、in vitiro 試験では FxOH を試料として実験をおこなった。マウス精巣上体周囲脂肪組織由来の初代脂肪細胞はコスモ・バイオ(株)から入手した。24 ウェルプレートに細胞を播種し、その後 1 日おきに分化培地に交換し、10 日間培養をおこなった。その後 FxOH を 5、10μM の濃度で培地へ添加した。比較対照の物質として UCP1 誘導の報告がされている Tro、Rosi を用い、それぞれを 5μM の濃度で添加した。添加 48 時間後にアドレナリン作動薬である Isoproterenol を 10μM 添加し、4 時間後に細胞から Total RNA とタンパク質を回収した。また培養上清も回収した。その後、UCP1 及びその発現に関係するとされる核内転写因子の mRNA 発現量の変化について RT-PCR 法にて測定した。また UCP1 タンパク質の発現量の変化を Western blot 法で評価した。

【結果】 Tro 及び Rosi 添加細胞では Control(未処理)の細胞と比較し UCP1 とその発現に関与するとされる PPARγ、PGC-1α、PRDM16(PRD1-BF1-RIZ1 homologous domain containing 16) の mRNA の発現が上昇した。FxOH 添加細胞でも同様の傾向が認められ、特に 10μM 添加細胞では Control の細胞と比較し UCP1 の発現が約 1.5 倍に上昇した。また UCP1 タンパク質の発現も上昇傾向を示した。一方、脂肪細胞での慢性炎症に関わる MCP-1 は Control の細胞と比較しサンプル添加細胞で有意な低下を示した。これらの結果から、FxOH は PPARγリガンドの薬剤よりは効果は弱いものの、in vitro 試験においても白色脂肪細胞での UCP1 発現に関与することが示された。

Obesity, fucoxanthin, uncoupling protein 1

発表責任者：前多隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

発表番号：3E069
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# パプリカ色素投与による食事性肥満マウスに対する効果、及び各種臓器へのカロテノイドの蓄積

Carotenoid accumulation and function of Paprika (*Capsicum annuum*) pigments on high fat diets induced obesity mice

○三上 翔平、中村 望、前多 隼人 (弘前大農)
○Shohei MIKAMI, Nozomi NAKAMURA, Hayato MAEDA (hirosaki Univ.)

【目的】 パプリカ色素は赤色の食用天然色素として食品添加物として利用されている。これまでの研究でパプリカに含まれるカプサンチン、カプソルビンが脂肪細胞での慢性炎症状態を軽減する作用があることを in vitro 試験で明らかにしている(1)。またその効果はカプソルビンの方が高い傾向を示す結果を得ている。本研究では高脂肪食によって誘導される肝臓での炎症や血漿脂質上昇に対するパプリカ色素の効果について動物実験にて評価するとともに、組織での各カロテノイドの蓄積量について分析をおこなった。

【方法】 パプリカ色素からカラムクロマトグラフィーによりカプサンチン、カプソルビンを多く含むサンプルを調製した。実験動物には 5 週齢のオスの C57BL/6J マウスを使用し、20%の脂質を含むコントロール群、パプリカ色素 0.1%群、パプリカ色素 0.5%群の 3 群で実験を行った。4 週間の実験飼育の後、解剖をおこない臓器重量の測定、及び血漿成分の分析をおこなった。また肝臓中での脂質代謝関連遺伝子の発現量の変化について RT-PCR 法で評価した。更に投与したカプサンチン、カプソルビンの各臓器での蓄積量を HPLC にて分析した。

【結果】 コントロール群と比較して、パプリカ色素群は血漿中のトリアシルグリセロール、肝機能障害の指標である GOT (glutamic oxaloacetic transaminase)、GPT (glutamic pyruvic transaminase)濃度に減少傾向が認められた。また、HDL-コレステロールは増加傾向が認められ、高分子アディポネクチンはパプリカ色素 0.5%群で有意に増加した。更に肝臓中のトリアシルグリセロール含量が 0.5%群で有意に低下し、肝臓での脂質代謝に関与する PPARα の mRNA の発現上昇傾向が認められた。また肝臓、腎臓、腸間膜白色脂肪組織、精巣周囲白色脂肪組織、腎周囲・後腹膜白色脂肪組織へのカプサンチン、カプソルビンの蓄積量を定量した結果、カプサンチンは肝臓、カプソルビンは白色脂肪組織への蓄積量が多いことが明らかになった。これらのことからパプリカ色素に含まれるカプサンチン、カプソルビンが食事性肥満による炎症や血漿脂質の改善作用を示すことが示された。また組織の種類によってカロテノイドの蓄積量が異なり、その性質の違いが肥満による慢性炎症などの機能性にも関与する可能性が示唆された。

(1) Maeda H, Saito S, Nakamura N, Maoka T. ISRN Inflammation, 2013: 763758 (2013)

obesity, paprika, carotenoid

発表責任者：前多　隼人（hayatosp@hirosaki-u.ac.jp）

発表番号：3E070
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

MIG12 による ACC 発現調節機構の解析
MIG12 modulates acetyl-CoA carboxylase gene expression.
○成田 淳子、和泉 彬子、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）
○ Junko NARITA, Akiko IZUMI, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (The University of Tokyo)

【背景と目的】LXR(Liver X Receptor)は脂質代謝関連遺伝子の転写制御に関わる核内受容体である。我々は、LXR の新規標的遺伝子として MIG12 を同定し、本遺伝子が脂肪酸・トリグリセリド合成に関与することを示してきた[1)]。MIG12 は脂肪酸合成の律速酵素である ACC(Acetyl-CoA Carboxylase)のポリマー化を亢進することにより ACC を活性化し、脂肪酸合成を上昇させる。しかし脂肪酸合成で見られた結果とは逆に、MIG12 過剰発現により ACC の mRNA 量が減少し、MIG12 ノックダウンで増加することが分かっており、その機構は明らかになっていない。そこで最近になって報告された脂肪酸合成と転写制御の関係に関する報告[2)]に着目した。酵母においては、ACC1 の発現を抑制するとヒストンのアセチル化が亢進し、転写制御が変動するというものである。これは、細胞内アセチル CoA が、脂肪酸合成の基質とヒストンアセチル化のアセチル基供与体の両方を担っていることに起因する。そこで我々は以下の仮説を立てた。①MIG12 過剰発現により ACC が活性化②アセチル CoA からマロニル CoA への変換が促進され細胞内アセチル CoA 量が低下③ヒストンのアセチル化が低下し ACC の転写が抑制する。この仮説の検証を本研究の目的とした。
【方法】アセチル化ヒストン H3 抗体を用いて、MIG12 過剰発現時のヒストン H3 のアセチル化変動を検討した。具体的にはラット初代培養肝細胞にアデノウイルスを用いて MIG12 を過剰発現させ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA を処理した後、細胞から抽出したタンパク質を Western Blotting に供し、アセチル化ヒストン H3 抗体を用いて検出を行った。
【結果と考察】コントロールである LacZ 群では TSA 処理によりアセチル化ヒストン H3 のシグナルが検出されたが、MIG12 を過剰発現するとそのシグナルが減少した。これにより、MIG12 過剰発現時に ACC の mRNA 発現量が低下するのは、脂肪酸合成合成亢進によりアセチル CoA 量が減少し、ヒストンアセチル化が抑制されたことによる可能性が示された。今回は whole cell を用いて検討を行っているので、今後は ChIP assay により ACC のプロモーター付近のヒストンアセチル化が実際に抑制されているのか検討を行う予定である。また、この ACC の発現変動はタンパク質レベルでは見られないため、ACC タンパク質の安定性などに MIG12 が関与する可能性など、今後検討が必要だと考えている。
1) J. Inoue *et al.* Mol. Endocrinol. **25**, 995–1005. (2011)
2)Galdieri, L. and Vancura, A. J Biol Chem. **287**, 23865–76. (2012)

ACC, acetyl-CoA, histone H3

発表番号：3E071
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 日本食の質の多様性が脂質蓄積に及ぼす影響

# The effect of the diversity of Japanese diet on lipid accumulation

○岩垣 ゆい、都築 毅（東北大院　農）
○Yui IWAGAKI, Tsuyoshi TSUDUKI (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ)

【背景・目的】日本人の平均寿命は、1980 年代に世界一位となって以来、現在まで健康長寿国として知られている。日本を世界一の長寿国に導いた要因の一つとして、日本食の影響が考えられる。日本食は欧米食に比べて、低脂肪、低カロリーであり、魚介類や植物性食品を多く含んでいる。日本食に含まれる特徴的な成分については、世界で広く研究されているが、日本食そのものが健康状態に及ぼす影響について、科学的に検討した研究はほとんどなかった。我々は先の研究において、日本食は米国食に比べてストレス性が低く、旺盛な代謝が繰り返され、肥満になりにくいことを明らかとした。また､様々な年代の日本食試料をマウスに与えたところ､1975 年日本食試料が最も肥満になりにくく、健康有益性が高いことを見出し、その効果はタンパク質、脂質、炭水化物のエネルギーバランスによるものではないことを明らかとした。この要因として、1975 年の日本食は、様々な食品群や栄養素が過不足なく含まれており、多様性に富む食事であったことが考えられた。そこで本研究では、日本食のタンパク質、脂質、炭水化物の質に焦点を当てて、1975 年日本食の健康有益性が、食材の多様性によるものであるか明らかにするために、タンパク質、脂質、炭水化物の素材の数を変化させることによって、健康へ与える影響を検討することとした。
【方法】ICR マウス（4 週齢、雄性）を用い、1 週間の予備飼育の後、AIN-93G 試料を与えたコントロール群、内臓脂肪蓄積を促進するため脂質を 27%添加した試料を与えた高脂肪食群、高脂肪食試料をもとに、タンパク質、脂質、炭水化物の素材の数を増やした試料を与えた多様性試験食群に分け、4 週間自由摂食させた。飼育終了後 9 週齢において 12 時間絶食後、血清や臓器を採取し、各種分析に供した。
【結果】多様性試験食群において、血清と肝臓のトリアシルグリセロール（TG）量や肝臓の総コレステロール（TC）量が有意に減少し、多様性試験食群は血清や肝臓の脂質量が低いことが示された。このメカニズムを検討したところ、多様性試験食群において、肝臓における脂肪酸合成にかかわる遺伝子の発現量が有意に減少し、脂肪酸β酸化かかわる遺伝子の発現量は有意に増加した。さらにコレステロール合成にかかわる遺伝子の発現量が有意に減少した。よって、多様性試験食群において、脂肪酸合成が抑制され、異化が促進されたことにより、TG 量が減少し、コレステロール合成が抑制されたことにより、TC 量が減少したと考えられた。以上より、1975 年日本食の健康有益性の要因の一つとして、食材の多様性が重要であることが示された。

Japanese diet, obesity, diversity

発表番号：3E072
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# べにふうき緑茶摂取のヒトにおける脂質代謝関連遺伝子発現調節作用

# Green tea "Benifuuki" intervention upregulates the expression of lipid metabolism related-genes

○平島 亜沙美[1]、山下 修矢[1]、花房 俊昭[2]、山本（前田） 万里[3]、立花 宏文[1] ([1]九大院農院・生機科、[2]大阪医科大学、[3]農研機構・食総研)
○ Asami HIRASHIMA[1], Shuya YAMASHITA[1], Toshiaki HANAFUSA[2], Mari YAMAMOTO (MAEDA)[3], Hirofumi TACHIBANA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Osaka Medical Univ., [3]NARO, NFRI)

【目的】
べにふうきは脂質代謝改善作用や抗アレルギー作用などさまざまな生理作用が報告されている機能性緑茶品種である。一方、Peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPARδ) はオレイン酸などの不飽和脂肪酸を生体内で感知し、脂質代謝関連遺伝子の発現を調節する不飽和脂肪酸センサーである。我々はこれまでに、マウスにおいてべにふうき緑茶とオリーブオイルの組合せ摂食が高カロリー食誘導性の肥満を抑制し、PPARδおよびその標的遺伝子の発現を増加させること見出している。そこで本研究では、ヒトの脂質代謝関連遺伝子に及ぼすべにふうき摂取の影響について、べにふうき緑茶介入試験における血液サンプルを解析することで検討した。

【方法】
大阪医科大学健康科学クリニック健康診断・人間ドック受検者のうち BMI ≧ 25 kg/m$^2$ かつ LDL-chol ≧ 120 mg/dl の脂質異常未病者 149 名をプラセボ (麦茶摂取) 群、やぶきた茶摂取群 (やぶきた群)、べにふうき茶摂取群 (べにふうき群) のいずれかに無作為に割り付け、12 週間の介入試験を行った。介入開始直前および介入終了時において、被験者の血液を採取した。血液から RNA を単離し、cDNA を合成した。PPARδ及びその標的遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により解析した。

【結果・考察】
プラセボ群、やぶきた群、べにふうき茶摂取群、全ての群において介入開始時と介入終了時の PPARδの mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。PPARδによって発現が調節されている多数の脂質代謝関連遺伝子の発現量はべにふうき摂取群において介入開始時と比較して介入終了時では有意に高値を示した。以上の結果から、べにふうき緑茶摂取は PPARδが標的とする脂質代謝関連遺伝子の発現を上昇させる可能性が示された。

Benifuuki, Green tea intervention, PPARδ activation

発表番号：3E073
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

フコキサンチンの PPARs を介した脂質代謝調節
Dual agonistic effect of fucoxanthin on peroxisome proliferator-activated receptor α/ß and modulation of lipid metabolism.
○金沢 功[1]、橋本 堂史[2]、水野 雅史[2] ([1]吉備国際大学、[2]神戸大学)
○KO KANAZAWA[1], TAKASHI HASHIMOTO[2], MASASHI MIZUNO[2] ([1]Kibi International Univ, [2]Kobe Univ)

【目的】褐藻類にはキサントフィル類のフコキサンチンが含まれる。フコキサンチンは腸上皮細胞で側鎖が脱アセチルされ、骨格構造を維持したフコキサンチノールとして少量であるが体内に吸収される。食事フコキサンチンが抗肥満効果をもつことは報告されているが、その作用機作は未だ明らかにされていない。筆者は、フコキサンチンを摂取したマウスの中性脂肪量が減少したという報告から、食事由来のフコキサンチンは脂質代謝系の上流に作用していると考えた。つまり、PPARs にフコキサンチノールがリガンドとして作用している可能性に注目した。フコキサンチンが脂質代謝や VLDL の分泌、白色脂肪細胞の分化調節に関与していることを明らかにすることで、褐藻類中心の食生活がメタボリックシンドロームの予防を示唆する。【方法】初めに、PPARs リガンド結合ドメイン(LBD)への結合活性の評価を行った。アゴニスト活性を評価するために、CHO-K1 細胞に PPARαまたはγ（α/β）LBD とレポーター遺伝子を導入し、5 μM のオレイン酸、ゼアキサンチン、カンタキサンチン、アスタキサンチン、リコペン、β-カロテン、β-クリプトキサンチン、フコキサンチンとフコキサンチノールをそれぞれ細胞に処理をし、Dual-Luciferase Assay を行った。リガンド親和性を評価するために、Biacore 3000 を用いて、hPPARα/γLBD へそれぞれ 25、50、100 μM のオレイン酸とフコキサンチノールを処理して結合解離速度を測定した。PPARαの活性化を評価するために、肝がん細胞 HuH-7 の培地にフコキサンチノールを添加して、24 時間後の培地中のトリグリセリド(TG)濃度を測定した。同様に、脂質代謝の調節に関与しているカルニチンパルミトイル転写酵素 1A(CPT1A)の遺伝子発現量についても測定した。また、PPARγの活性化を評価するために、線維芽細胞 3T3-L1 にフコキサンチノールを処理し、オイルレッド O 染色を用いて脂肪蓄積量を測定した。PPARα/γ活性評価いずれも、内因性リガンドのオレイン酸をポジティブコントロールとして用いた。【結果】ジーンレポーターアッセイでは、対照区を相対値 1 として、PPARα/γはそれぞれオレイン酸ではルシフェラーゼ活性が 3/1.7 を示し、フコキサンチノールでは 4.3/3.5 で有意にリガンド活性が高かった。また、オレイン酸とフコキサンチノールの EC50 はそれぞれ 5.2/39 μM と 3.9/7.4 μM であった。リガンド結合解離速度定数は、オレイン酸は $KD=1.8\times10^{-3}$ M/$8.8\times10^{-3}$ M、フコキサンチノールは $KD=3.5\times10^{-5}$ M/$1.7\times10^{-4}$ M であった。PPARαの活性化評価では、フコキサンチノールを処理すると TG 分泌量は濃度依存的に有意に減少した。CPT1AmRNA 量についても、有意に減少した。PPARγ活性化評価では、白色脂肪細胞への分化誘導をフコキサンチノールが有意に抑えた。

fucoxanthin, PPARα/ß, lipid metabolism

発表責任者：金沢　功（ko-kana@kiui.ac.jp）

発表番号：3E074
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大豆米糠発酵物（OE-1）の血糖上昇抑制における活性物質の解析

# Identification of anti-hyperglycemic substances from the fermented soybean and rice bran extracts (OE-1)

○加藤 亮[1]、熊倉 慧[1]、冨永 隆生[2]、清水 厚志[2]、松岡 寛樹[1]([1]高崎健大、[2](株)ラフィーネインターナショナル)
○ Ryo Kato[1], Kei Kumakura[1], Takanari Tominaga[2], Atsushi Shimizu[2], Hiroki Matsuoka[1] ([1]Takasaki Univ. of Health and Welfare, [2]Raffinee International Co. Ltd)

＜目的＞

糖尿病合併症である網膜症や腎症は血中グルコースによる血管障害により誘導され、食事による血糖値上昇が問題となっている。食後の急激な血糖値上昇は α-アミラーゼなどの消化酵素阻害によりグルコースへの分解を抑制することにより緩和される。今回、大豆米糠発酵物(OE-1)の α-アミラーゼ阻害による血糖上昇抑制作用について検討し、さらに OE-1 の精製物から α-アミラーゼ阻害物質の探索を行った。

＜方法＞

大豆タンパク質および米糠を納豆菌で発酵させ、中性プロテアーゼによる加水分解後、熱水抽出を行い、OE-1 を得た。OE-1 をマウスに単回投与し、デンプン負荷後、経時的に採血を行い血糖値の測定を行った。α-アミラーゼ阻害活性試験は、基質としてデンプンおよび CNP-G3 を用いて行った。OE-1 を合成吸着樹脂 (HP-20、三菱化学)，シリカゲルおよび ODS による分取クロマトグラフィーを行った。α-アミラーゼ阻害活性を示した画分については、LC/ESI-MS、NMR による構造解析を行った。

＜結果＞

OE-1 は α-アミラーゼ阻害活性を示し、マウスへのデンプン負荷試験による血中グルコースの上昇に対し、有意な抑制作用が認められた。そこで、α-アミラーゼ阻害活性因子を明らかにするために、各種クロマトグラフィーによる単離精製を行った。阻害活性の最も高かった HP-20 のメタノール溶出画分について、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、阻害活性を有する 4 つの画分 (F1～F4) のを得た。デンプンを基質としたとき、F1 および F2 が高い阻害活性を示し、G3-CNP を基質としたときの阻害活性は主要画分である F3 が高かった。主要画分である F3 については、さらに分取 ODS-HPLC を行い、2 種の活性物質を得た。LC-MS ならびに NMR による解析を行った結果、ダイゼインおよびゲニステインであることが明らかになった。

＜考察＞

動物実験において、OE-1 の α-アミラーゼ阻害により、食後の急激な血糖値上昇を抑制することが考えられた。その主要な阻害活性物質としてゲニステイン、ダイゼインなどのイソフラボン類によることが示唆された。

α-amylase inhibitors, anti-hyperglycemic effects, isoflavones

発表責任者：松岡寛樹（matsuoka@takasaki-u.ac.jp）

発表番号：3E075
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ウメポリフェノールの高脂肪食誘導性肥満マウスにおける糖尿病予防効果

# Diabetes preventive effect of polyphenols from plum vinegar in high fat diet-induced obese mice

○永井 宏平、劉 延平、吉田 昂司、伊谷 強、東山 瑞季（近大生物理工）
○Kouhei NAGAI, Nobuhei Ryu, Takashi Yoshida, Tsuyoshi Itani, Mizuki Higashiyama (Kindai Univ.)

〔目的〕近年、糖尿病などの生活習慣病の背後に、弱い炎症反応が長期間にわたって続く「慢性炎症」が潜み、病状を悪化させていることが明らかとなってきた。特に、脂肪を過剰に蓄積した脂肪組織においてマクロファージ細胞が起こす慢性炎症が生活習慣病の進展に及ぼす影響が注目されている。したがって、抗炎症作用を持つ物質の摂取によって生活習慣病の進展を抑制できる可能性がある。ごく最近、我々は、梅干しの製造過程に生成される梅酢から調整されたポリフェノール画分（UP）に、マクロファージ細胞の活性化を抑制する効果があることを *in vitro* の実験系によって示した。そこで、本研究では、UP に糖尿病予防効果があるかを調べるために、高脂肪食によって肥満誘導したマウスを用いて UP の長期摂取が空腹時血糖値や血中インスリン濃度に与える影響を解析した。

〔方法〕6 週齢の C57BL/6J Kwl 雄マウスに、高脂肪食（HFD-60, オリエンタル酵母）を 5 週間摂取させ、肥満を誘導した。UP 摂取群には 0.25%と 1%の UP を添加して摂取させた。各群の摂取カロリーはセルロースの添加によって一定になるように調整した。また、通常食で 5 週間飼育した対照群も設置した。試験中は経時的に餌の摂取量と体重を測定した。試験最終日に 16 時間の絶食を行い、空腹時血糖値と空腹時血中インスリン濃度を測定した。また、インスリン抵抗性の進行度合いを空腹時血糖値と空腹時インスリン濃度から算出された HOMA-R 値によって評価した。

〔結果と考察〕5 週目における体重の増加量は、通常食群 4.3±1.4 g, 抗肥満食群 6.7±1.7 g, 0.25% UP 群 9.4±1.0 g, 1.0% UP 群 7.3±1.1 g となり、UP 摂取による体重減少効果は確認されなかった。それにもかかわらず、5 週目における空腹時血糖、および、空腹時インスリン濃度は UP の摂取によって減少する傾向が見られた（$P<0.1$）。また、HOMA-R 値は通常食群 2.0±0.7, 抗肥満食群 3.2±1.2, 0.25%UP 群 3.0±0.7, 1.0% UP 群 2.0±0.8 となり、高脂肪食群に比べて、1.0% UP 群では HOMA-R 値が有意に減少し（$P<0.05$）、通常食群と同程度の値となった。以上の結果から、UP には肥満による慢性炎症抑制を介した糖尿病の進行予防効果が存在する可能性が示された。

Polyphenol, Plum vinegar, Diabetes

発表責任者：永井　宏平（knagai@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：3E076
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

膵β細胞において *S*-エクオールは細胞膜で cAMP を産生して protein kinase A シグナルを活性化する
*S*-Equol activates protein kinase A signaling via the production of cyclic AMP at the plasma membrane of pancreatic ß-cells
○堀内 寛子[1]、原田 直樹[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Hiroko HORIUCHI[1], Naoki HARADA[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Div. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Div. Clin. Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】膵β細胞の量やインスリン分泌能の低下は、インスリン分泌量を減少させるため 2 型糖尿病の発症や進行の原因となる。膵β細胞において、cyclic AMP/protein kinase A (cAMP/PKA) シグナルの活性化は、細胞増殖やグルコースに応答したインスリン分泌を亢進する。我々は、大豆イソフラボンであるダイゼインの腸内細菌代謝物 *S*-エクオールが、cAMP/PKA シグナルを活性化して細胞増殖とグルコース応答性インスリン分泌を促進することを見出している。また、*S*-エクオールによる cAMP/PKA シグナルの活性化はエナンチオ選択的であり、エストロゲン様作用とは関与がないことを明らかにした（*J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **60**, 291-296, 2014）。本研究では、*S*-エクオールによる cAMP/PKA シグナルの活性化機構について検討を行った。
【方法・結果】ラット膵β細胞由来 INS-1 細胞において、*S*-エクオールの増殖促進作用は、PKA 阻害剤である H89 により抑制された。cAMP 応答配列（CRE）を介した転写活性を測定した結果、*S*-エクオールは CRE を介した転写活性を上昇させたが、*R*-エクオールにその作用はなかった。*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性化は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼの阻害剤（2′,5′-dideoxy adenosine）によって抑制されたが、サイトゾル局在型のアデニル酸シクラーゼ阻害剤（KH7）は影響しなかった。次に、細胞膜での cAMP 産生・分解への *S*-エクオールの影響を検討した。INS-1 細胞の細胞膜画分において *S*-エクオール（10 μM）は cAMP の産生を促進したが、サイトゾル画分ではその作用はなかった。また、細胞膜画分において 10 μM の *S*-エクオールはホスホジエステラーゼの活性に影響を与えず、高濃度（100 μM）ではホスホジエステラーゼ活性を阻害したものの、その作用は *R*-エクオールと同程度であった。細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼは、三量体 G タンパク質の Gαs サブユニットによって活性化されるため、G タンパク質の関与を検討した。Gαs サブユニットを活性化させるコレラ毒素を用いて CRE レポーターアッセイを行った結果、コレラ毒素は、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンとは CRE を介した転写活性を相加的に上昇させたが、*S*-エクオールとは CRE を介した転写活性を相乗的に増加させた。さらに、リガンドが結合した G タンパク質共役受容体（GPCR）をリン酸化することで GPCR の作用を抑制する GPCR キナーセ 3 および 6 を siRNA によりノックダウンすることで、*S*-エクオールによる CRE を介した転写活性がさらに上昇した。以上の結果から、*S*-エクオールは細胞膜に局在する GPCR に作用して cAMP/PKA シグナルを活性化することで、膵β細胞の増殖やグルコース応答性インスリン分泌を促進すると考えられる。

equol, pancreatic ß-cell, cAMP/PKA signaling

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3E077
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米ぬか由来ステロール配糖体が ApoE 欠損マウスの動脈硬化に及ぼす影響

# The effect of rice bran steryl glucoside on arteriosclerosis in ApoE deficient mice.

○宇田川 賢太[1]、大村 妃代[1]、船戸 里香[2]、中島 有里[3]、奥原 康英[3]、太田 慶彦[3]、石川 純嗣[3]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大・生資科・生命化、[2]日本大院・生資科・応生科、[3]ファンケル総合研究所)

○Kenta Udagawa[1], Hisaki Omura[1], Rika Funado[2], Yuri Nakashima[3], Yasuhide Okuhara[3], Yoshihiko Ota[3], Junji Ishikawa[3], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ Grad.School., [3]FANCL Research Instutite.)

＜目的＞ 近年、食生活や運動不足を原因とする生活習慣病が社会問題となっている。肥満や耐糖能異常などの生活習慣病の危険要因は、動脈硬化を進展させ、虚血性心疾患や脳血管疾患などの重篤な血管合併症を惹起する。従って、その予防法の確立が急務となっている。これまでに演者らは、発芽玄米の抗肥満作用や抗糖尿病作用を明らかにし、発芽玄米由来の植物ステロール配糖体(Pre-germinated brown rice Steryl Glucoside; PSG)が、これらの機能性を担う成分である可能性や PSG が血中 LDL コレステロール濃度を低下させることを明らかにしてきた。しかしながら、動脈硬化巣の形成に及ぼす PSG の影響などについては明らかにされていない。本研究では、動脈硬化を自然発症する ApoE 欠損マウスを用いて、PSG の抗動脈硬化作用について検討を行った。

＜方法＞ 8 週齢の ApoE 欠損マウス(C57BL/6j KOR/StmSlc-Apoe$^{shl}$)を 2 週間の予備飼育後、群間で体重に有意差がないように1群 10 頭の 3 群に配置した。米ぬかより調製した PSG の食品原料である PSG03C と、さらにそれを精製した高純度 PSG を各々PSG 含有量が 0.45%となるように AIN-93G に添加した飼料を調製した(PSG03 群、高純度 PSG 群)。control 群には AIN-76 を自由に摂取させた。体重、摂餌量は 1 週間毎に測定し、12 週間の自由摂取終了後に採血および大動脈を採取し、血液生化学検査、組織学的観察を実施した。大動脈は、凍結切片を作成し、動脈硬化病変は、H.E.染色後グレイディングによる定性評価、Oil Red-O 染色像については pixel 処理による定量評価を行い、PSG の抗動脈硬化作用について検討した。

＜結果＞ 体重は、摂取開始 8 週目より control 群と比較して PSG03C 群、高純度 PSG 群で有意な減少または減少傾向が見られた。血液生化学検査では、control 群と比較して PSG03C 群と高純度 PSG 群で血中総コレステロール濃度、LDL コレステロール濃度の有意な減少が見られた。組織学的観察では、control 群と比較して PSG03C 群で弓部大動脈における動脈硬化病変の形成が有意に抑制された。

＜結語＞PSG は、ApoE 欠損マウスの LDL コレステロール濃度を低下させ、抗動脈硬化作用を示す可能性が示された。

rice bran, arteriosclerosis, apoe deficient mice

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3E078
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小腸におけるビタミン E 吸収活性の性差の解析

# Sex differences in intestinal vitamin E absorption

○佐藤 遼太[1]、熊谷 悠[1]、藤田 尚子[1]、井上 佳奈[2]、長谷川 由希子[2]、長田 恭一[2]、林 洪太[1]、竹中 麻子[2] ([1]明大院農、[2]明大農)
○Ryota Satoh[1], Yu Kumagai[1], Naoko Fujita[1], Kana Inoue[2], Yukiko Hasegawa[2], Kyoichi Osada[2], Kota Hayashi[1], Asako Takenaka[2] ([1]Meiji Univ. Grad. School, [2]Meiji Univ.)

【目的】体内の主要なビタミン E であるα-tocopherol(α-toc)の体内濃度はメスでオスより高いことが実験動物およびヒトで報告されているが、この性差が生じる機構は不明である。我々はこれまでにオスに比べてメスでα-toc 代謝産物であるα-carboxyethyl-hydroxychromans(α-CEHC)の尿中排泄量が多いこと、雄性ホルモンであるテストステロンがα-CEHC の尿中排泄を抑制することを報告した。本研究では、消化管からのα-toc 吸収活性の性差に着目し、糞中α-toc 排泄量および小腸α-toc トランスポーターの解析を行った。
【方法】8～9 週齢の Wistar ラットに AIN93G に準じた組成の実験食を与えて、以下の動物実験を行った。
実験 1:雌雄のラットから 24h 採糞を行い、糞中α-toc 濃度を測定した。
実験 2:雄ラットに精巣除去手術(Cas)あるいは偽手術(Sham)を施し、3 週間後に 24h 採糞を行って糞中α-toc 濃度を測定した。
実験 3:雌雄のラットに NPC1L1 阻害剤である Ezetimibe を 0.008%含む(Ezt)あるいは含まない(Con)実験食を給餌し、実験食給餌 3 日目に 24h 採糞を行って糞中α-toc 濃度を測定した。
実験 4:雌雄のラットの動脈血および肝臓中のα-toc 濃度、小腸粘膜のα-toc 吸収トランスポーター(NPC1L1、SR-BI)の mRNA 量およびタンパク質量を測定した。また、解剖前 24h 採糞を行い、糞中脂質およびα-toc 濃度を測定した。
【結果】肝臓α-toc 濃度がメスで有意に高いことを確認した。糞中α-toc 濃度、1 日あたりの糞中α-toc 排泄量はメスに比べてオスで有意に高く、摂食量当たりの排泄率においてもオスで有意に高かった。一方で糞中に排泄される中性ステロイド量には性差がみられず、糞中排泄の性差はα-toc に特異的であった。また、Cas 群の糞中に排泄されるα-toc 量は Sham 群に比べて有意に低く、雄性ホルモンであるテストステロンが糞中へのα-toc 排泄を促進している可能性が示された。Ezetimibe の混餌給餌は糞中排泄量の性差を解消せず、小腸 NPC1L1 の mRNA およびタンパク質量には性差がみられなかったことから、NPC1L1 を介した小腸でのα-toc 吸収活性に性差はないことが示された。一方で小腸の SR-BI mRNA 発現量はオスに比べてメスで高く、SR-BI を介した小腸でのα-toc 吸収活性に性差がある可能性が考えられた。以上の結果から、テストステロンによる小腸 SR-BI を介したα-toc 吸収抑制が、体内α-toc 濃度の性差を生じさせる一因である可能性が示された。

vitamin E, sex difference, intestine

発表番号：3E079
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 鉄欠乏がラット小腸各部位の Hcp1/Pcft, HO-1, Fpn1 mRNA 発現に及ぼす影響

# Effect of iron deficiency on mRNA expression of Hcp1/Pcft, HO-1, Fpn1 in rat small intestine

○東 雄貴、陳 風霞、篠田 粧子（首都大院・人間健康科学）
○Yuki AZUMA, Fengxia CHEN, Shoko SHINODA (Tokyo Metropolitan Univ.)

【目的】小腸におけるヘム鉄の吸収は、ヘム鉄の形態で小腸管腔から粘膜細胞内へ輸送され、heme oxygenase-1（HO-1）による分解を経て、遊離した鉄が非ヘム鉄と同様に ferroportin（FPN1）によって細胞外へ輸送されると考えられてきた。粘膜側に存在するヘム鉄輸送体として heme carrier protein 1（HCP1）が報告されているが、HCP1 の本来の機能が葉酸の輸送であることが新たに発見され（PCFT）、ヘム鉄輸送体としての機能について未解明な点が指摘されている。本研究では、鉄欠乏が HCP1/PCFT を中心としたヘム鉄吸収に関連するタンパク質の mRNA 発現へ及ぼす影響について検討した。小腸各部位の mRNA 発現と鉄欠乏への応答を調べることにより、ヘム鉄の吸収サイトが小腸のどの部位であるか明らかにすることを試みた。

【方法】4 週齢の Wistar 系雄ラット（n=7）に標準飼料（AIN-93G, 35ppm 鉄含有）を 3 週間与え、鉄充足群（FeS）とした。また、同様に鉄欠乏食を与えたラット（n=7）を鉄欠乏群（FeD）とした。ラットは麻酔下で下大動脈から採血し、血中 hemoglobin, 血清 TIBC, UIBC, Serum iron を測定して貧血状態を評価した。小腸は摘出後、上部、中部、下部に 3 等分し、上部はさらに 3 分割して上部①, ②, ③とした。小腸各部位は生理食塩水で内容物を洗浄後、粘膜上皮細胞をスライドグラスで採取し、－80℃で保存した。小腸各部位における Hcp1, HO-1, Fpn1 mRNA 発現は、各粘膜細胞をホモジナイズ後、total RNA を抽出し、RT-PCR 法により合成した cDNA を用いて、Real-time PCR（CFX96 Touch™ リアルタイム PCR 解析システム, BIO-RADLABORATORIES, INC.）で定量解析を行った。GAPDH を housekeeping gene として相対的発現比を求めた。HO-1 タンパク質の定量は、HO-1 (rat), EIA kit (Enzo Life Sciences) を用いて測定する。データは一元配置分散分析で統計処理を行い、$p<0.05$ で有意とした。

【結果】FeS の小腸各部位における Hcp1 mRNA 発現は、上部①, ②と下部の発現量に対して、上部③及び中部で約 2 倍高かった。上部①, ②, ③と下部の Hcp1 mRNA 発現は鉄欠乏により低下したが、中部では FeS と FeD がほぼ等しく、鉄欠乏による影響が認められなかった。上部①における Fpn1 mRNA 発現は、鉄欠乏の影響を殆ど受けないことを確認し、現在、その他の各部位について測定を進めている。HO-1 mRNA と HO-1 タンパク質についても測定し、鉄欠乏が小腸粘膜細胞のヘム鉄吸収に及ぼす影響について、mRNA レベルでの影響を明らかにする。

iron deficiency, Hcp1, HO-1

発表番号：3E080
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酸性乳飲料は牛乳よりも水分吸収が速く、糖質・電解質飲料よりも水分が体内に長く保持される

# Effect of acid milk beverage on fluid delivery and fluid retention

○伊藤 健太郎、津田 悠一、山口 真、山地 健人、谷口 茂（（株）明治　食機能科学研）
○Kentaro ITO, Yuichi TSUDA, Makoto YAMAGUCHI, Takeko YAMAJI, Shigeru TANIGUCHI (Food Science Research Lab., Meiji Co., Ltd.)

【背景・目的】牛乳は、乳タンパク質の働きにより、糖質・電解質飲料（CE）よりも、摂取後に水分が体内に長く保持される効果（水分保持効果）が高いことが報告されている。しかし、牛乳は胃内での乳タンパク質のカード化のために胃排出が遅く、速やかな吸収という面で課題がある。そこで我々は、酸性域での乳タンパク質の凝集を抑制し、安定化させる製法により酸性乳飲料（AM）を開発した。AM は、乳タンパク質の吸収が脱脂乳と比較して速いことが示されている。この特徴から、AM は、牛乳よりも体内への水分吸収が速く、CE よりも水分保持効果が高いことが期待できる。そこで、AM の水分補給における有用性を、水、CE、および牛乳と比較した。
【方法】試験 1 では、10 週齢の雄性 SD ラットを一晩絶食および 4 時間絶水させた。ラットに水、CE、牛乳、または AM を 20mL/kg 経口投与した。経口投与前および投与後 15、30、60、120、180 分後に頸静脈より少量ずつ経時採血した。ヘマトクリット値とヘモグロビン濃度から血漿量変化率を求めた。試験 2 では、試験 1 と同様に経口投与後、240 分後まで尿排泄量を測定した。また、投与前、投与後 30、60、90、120、180 および 240 分後に伏在静脈より経時採血した。血漿および尿中クレアチニン濃度から、腎における水再吸収率を求めた。また、試験 3 では、$^{13}C$ 酢酸を添加した牛乳または AM を経口投与後、120 分後まで経時的に呼気を採取し、胃排出速度を評価した。
【結果】試験 1 において、AM および CE は、牛乳と比較して 15 分後の血漿量変化率が有意な高値を示した（$p<0.05$）。試験 2 において、AM は、90 分後までの累積尿排泄量が CE と比較して有意な低値を示した（$p<0.05$）。また、60～240 分後までの累積尿排泄量が水と比較して有意な低値を示した（$p<0.05$）。AM の尿排泄量は、牛乳との間に有意差は認められなかった。AM および牛乳は、CE および水と比較して有意に高い水再吸収率を示した（$p<0.05$）。試験 3 において、AM は牛乳よりも胃排出が速いことが示された。
【結論】AM は、牛乳と比較して胃排出および体内への水分の吸収が速いこと、CE と比較して吸収された水分が体内に長く保持されることが示された。これらの結果から、AM は、牛乳と CE の長所を併せ持つ、効果的な水分補給飲料となり得ることが示唆された。

acid milk beverage, rehydration, fluid retention

発表番号：3E081
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 根菜類抽出成分による血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果

# Components extracted from root tuber crops improve nitric oxide production in vascular endothelial cells

○黒田 怜、南 雄二、加治屋 勝子（鹿大農）
○Rei KURODA, Yuji MINAMI, Katsuko KAJIYA (Kagoshima Univ.)

【目的】動脈硬化を始めとした血管関連疾患は、血管の最も内側に位置している血管内皮の機能が低下してしまうことで起こる。血管内皮細胞からは一酸化窒素(NO)が放出され、血管の収縮・弛緩の調節や、白血球などの血管内皮への付着による血栓形成の防御など、血管に直接働きかけることで血管を保護している。しかし、喫煙や飲酒、高血圧等により血管が酸化ストレスを受けると、血管内皮細胞が障害され、NO の産生が抑制されてしまい、血管関連疾患が引き起こされる。従って本研究では、約 200 種類の天然物の中から、血管内皮機能改善効果のある機能性成分を探索した。
【方法】鹿児島県産の天然素材を可食部と非可食部に分類し、ホモジナイズ後凍結乾燥粉末化した。次に、メタノール/水/酢酸溶液(90:9.5:0.5)とヘキサン/ジクロロメタン溶液(1:1)を用いて、それぞれ水溶性成分と脂溶性成分を抽出した。さらに、血管内皮細胞を用いた機能性評価に供する試料を絞り込むため、DPPH 法を用いて抗酸化活性試験を行った。DPPH 消去能は凍結乾燥粉末 1mg あたりのトロロックス相当量にて評価した。高い抗酸化活性が得られた抽出物については、コハク酸塩テトラゾリウム還元酵素を用いて血管内皮細胞に対する細胞毒性試験を行い、細胞に与えることができる抽出物の濃度範囲を定めた。最後に、蛍光法及び次世代食品機能性評価法により、根菜類抽出物を添加した際の、血管内皮細胞からの NO 産生量や NO 合成酵素の生成に関与する細胞質 $Ca^{2+}$ 濃度等を測定した。
【結果】抗酸化活性試験では、根菜類抽出物に高い活性が認められ、特にイモ類に高い活性が認められた。脂溶性抽出物にも抗酸化能を示すものはあったが、水溶性抽出物の方が総じて高い抗酸化能を示した。また、可食部だけでなく、非可食部にも抗酸化能を示すものがあった。細胞毒性試験では、評価した抽出物の濃度範囲では細胞毒性を示さなかった。NO 産生量の測定では、根菜類抽出物に血管内皮細胞からの NO 産生量の増加が確認できた。以上より、いくつかの根菜類に血管内皮機能を改善する効果が示唆されたため、作用メカニズムについての検討も行った。

vascular endothelial function, nitric oxide

発表番号：3E082
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小型魚類における摂餌量測定と摂餌誘引評価への応用

# Measurement of feeding amount in small fish and its application to evaluation of feed attractants

○笹渕 和樹、菅原 沙恵子、小川 智久、村本 光二（東北大・院生命科）
○Kazuki SASABUCHI, Saeko SUGAWARA, Tomohisa OGAWA, Koji MURAMOTO (Tohoku Univ.)

【背景・目的】コイ科ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は，モデル実験動物として遺伝，発生・分化，形態形成などの広範な研究分野で用いられ，循環器系や免疫系，レドックス・シグナル伝達系などが，ヒトと非常に似ていることが明らかにされてきた。しかし，消化管の機能や透過・輸送機構に関する報告はほとんどない。一方，糖鎖結合タンパク質であるレクチンは，動植物を問わず食品素材に普遍的に存在し，加熱調理や消化酵素への耐性を持つものもあり，腸管上皮細胞の生理機能に影響を与える可能性がある。

本研究では, 食品レクチンの腸管輸送･吸収機構に対する影響を評価するために, ゼブラフィッシュを用いることとし，先ず個体毎の摂餌量の測定法を検討するとともに，その測定法を用いて摂餌誘引物質の評価を行うことを目的とした。

【方法】カラムクロマト用担体 Wacosil octadecylsilane (ODS) (粒径 15~30 $\mu$ m)に蛍光マーカー 5-Dimethylaminonaphthalene-1-sulfonylamide (DNS-$NH_2$)を疎水結合させて摂餌量マーカーを作製した。ODS-DNS-$NH_2$ を添加した餌料をゼブラフィッシュに与えた後，2 時間後に腸管内容物から ODS-DNS-$NH_2$ を回収した。ODS から DNS-$NH_2$ を MeOH で溶出し，蛍光検出器(Ex: 340 nm,Em: 530 nm)を接続した逆相分配系 HPLC で定量分析して摂餌量を測定した。また，海藻から単離され魚類摂餌誘引物質として報告されている Dimethyl-$\beta$-propiothetin (DMPT)やアミノ酸(Val, Pro, Lys, Met, Ala, Asn, Thr)を小麦粉に添加して作製した試験餌料をゼブラフィッシュに与え、つつき回数や摂餌量から摂餌誘引性を評価した。

【結果】餌料に添加した ODS-DNS-$NH_2$ は，摂餌後 2 時間は消化器官に留まり，稚魚では蛍光顕微鏡下での直接観察が可能であり，また成魚では腸管から回収して摂餌量マーカーとしての使用が可能であった。この方法を用いて摂餌誘引物質の評価を行ったところ，DMPT とともに Val や Pro などのアミノ酸でも摂餌誘引性がみられ，0.5%の添加で摂餌量が増加した。しかし，Asn と Thr では摂餌量の増加はみられなかった。これらの結果から，本研究で設定した測定法により小型魚類個体毎の摂餌量の測定が可能であることが分かった。

zebrafish, feeding amount, feed attractants

発表番号：3E083
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 難消化性二糖 Melibiose 摂食によるケルセチン配糖体吸収促進作用について

# A Non-digestible Disaccharide, Melibiose Enhances Quercetin-3-Glucoside Absorption in Rats

○小泉 光可、原 博、田中 誠也（北大院農・応生科）
○Mika KOIZUMI, Hiroshi HARA, Seiya TANAKA (Hokkaido Univ.)

【目的】ケルセチンは植物中に豊富に存在するフラボノイドの一種であり、大部分が配糖体として存在する。ケルセチンには抗がん作用や抗動脈硬化作用などが報告されているが、消化管からの吸収率が低く、その吸収率の向上による血中濃度の上昇が、その生理作用の発揮には有効である。これまでの研究で、難消化性二糖である Melibiose(Mel)に、ケルセチン配糖体水解促進とラット小腸結紮ループによるその吸収増加が見いだされた。本研究ではより生理的条件として、Mel 摂食によるケルセチン配糖体の吸収促進を検討した。

【方法】4 週齢 Wistar/ST 系雄性ラットを AIN-93G 食で馴化後、AIN-93G の糖源をすべてスクロースに置換したメタボ誘導対照群、これに 0.5%の Quercetin-3-*O*-glucoside(Q3G)を与えた Q3G 群、0.5%Q3G に 2%Mel を添加した群(2%Mel 群)、0.5%Q3G に 4%Mel を添加した群(4%Mel 群)の計 4 群に分け、2 週間飼育した。試験食摂取 3 日目、7 日目、14 日目に尾静脈採血を行った。2 週目に麻酔下で腹部大動脈採血を行い、各種臓器を摘出した。また、血漿中のケルセチン関連化合物を LC-MS で定量した。

【結果】血清ケルセチンは大半が抱合体として存在し、試験食摂取 3 日目では対照群に対して Mel 用量依存的に、7 日目では 2%および 4%Mel 群ともに、より著明に血中総ケルセチン濃度が上昇した。しかし、14 日目ではその差は小さくなった。以上のことから、Mel は生理的条件下でケルセチン配糖体の吸収を促進することが示された。また、Mel 群で濃度依存的な大腸発酵促進が示唆されたため、これとの関連も考察する。

Melibiose, Quercetin-3-Glucoside, absorption

発表番号：3E084
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 機能性大麦 BARLEYmaxTM の整腸効果について

# Intestinal regulation effect of functional barley "BARLEYmaxTM"

○北薗 英一[1]、妹脊 和男[1]、楠 桃子[2]、松井 輝明[2] ([1]帝人株式会社 新事業推進本部、[2]帝京平成大学　健康メディカル学部　健康栄養学科)
○EIICHI KITAZONO[1], KAZUO IMOSE[1], MOMOKO KUSU[2], TERUAKI MATSUI[2] ([1]TEIJIN LIMITED New Business Development Department, [2]Teikyo Heisei University Faculty of Health and Medical Science Department of Health and Dietetics)

【背景と目的】腸内環境を整えることは疾病予防・健康維持において重要である。近年腸内細菌叢と各種疾病との関係及びそのメカニズムに関する研究がなされ徐々に解明されてきた。特に 便が形成される(下行結腸、S 字結腸及び直腸)”には腸内細菌の大多数が生息しており、特にこの部位の大腸の環境を整えることが健康維持との関係に重要であると考えられる。

食物繊維はプレバイオティクスとして善玉菌を増やし腸内細菌叢のバランスを整える機能性食品因子であり、整腸作用、食後血糖抑制、血中コレステロール抑制、肥満予防などもその生理機能として期待されている。今回我々は、通常の大麦と比較して 2 倍の食物繊維量と 4 倍のレジスタントスターチ量を含むスーパー大麦として CSIRO（オーストラリア連邦科学産業研究機構）により開発された BARLEYmax™ に着目し、大腸の環境を整える機能性食品素材としての可能性について、BARLEYmax™ が腸内環境に及ぼす影響と、BARLEYmax™ のドース量設定について検討し興味ある結果を得たので報告する。

【方法と結果】本評価は「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠し、被験者の人権保護に配慮し、試験審査委員会の承認を得て医師の管理の下にて実施した。
対象はランダム化二重盲検並行群間比較法に基づき 20 歳以上 60 歳未満の排便回数が週 3～5 回の健康な男女計 15 名を選抜し、日本人の不足している食物繊維量を 3 群に割り付け BARLEYmax™ を低用量 6g(※食物繊維換算量 2g)、BARLEYmax™ を中容量 12ｇ(※食物繊維換算量 4g )高用量 24g(※食物繊維換算量 8g)含むクッキーまたはショートバーを 1 日 3 回、毎食前に摂取し検討した。試験スケジュールは前観察期間 2 週間、被験食品摂取期間 4 週間、後観察期間 2 週間とした。評価項目は主要評価項目として、被験者日誌に基づき①排便回数、②排便量、③便形状、④便の色、⑤便の臭い、⑥排便後の感覚の評価を行った。その結果、主要評価項目である排便回数、排便量、便形状、便の色、便の臭い、排便後の感覚について優位に改善傾向がみられ、BARLEYmax™6g(※食物繊維換算量 2g)以上においては $p<0.05$%で排便回数、排便量で有意差が確認された。また、副次的評価項目として、便中の短鎖脂肪酸と毒素物質の測定も併せて実施した。

Functional Barley, Dietary Fibre, Microflora

発表責任者：北薗英一（e.kitazono@teijin.co.jp）

発表番号：3E085
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *Lactobacillus casei* 327 の経口摂取によるマウスの糞の軟化と腸管セロトニンレベルの上昇

Orally administrated *Lactobacillus casei* 327 softens stools and promotes an increase in duodenal serotonin levels in mice.

○三原 敏敬[1]、渡邉 由梨子[2]、熊谷 武久[1]、城 斗志夫[3]、原 崇[3] ([1]亀田製菓、[2]新潟大院自然科学、[3]新潟大農)

○ Toshihiro MIHARA[1], Yuriko WATANABE[2], Takehisa KUMAGAI[1], Toshio JOH[3], Takashi HARA[3] ([1]Kameda Seika Co., Ltd., [2]Grad. Sch. Sci. & Technol., Niigata Univ., [3]Fac. Agric., Niigata Univ.)

【背景及び目的】

玄米より分離された乳酸菌 *Lactobacillus casei* 327 (327 株) はヒト腸管到達性を有し、327 株を用いた発酵乳摂取により便秘傾向者の便通、便性が改善すること[1)]、ヒト腸内菌叢に含まれる *Bifidobacterium* 数が上昇すること[2)]を報告している。また、327 株の殺菌菌体摂取により便通改善効果が確認されているが[3)]、摂取された殺菌菌体の作用メカニズムについては検討されていない。腸の蠕動運動は、腸粘膜に存在する腸クロム親和性細胞で生産されるセロトニンがマイスナー神経叢に作用し、誘導されることが知られている。本研究では、327 株の便通改善効果のメカニズム解明へ向け、本株の殺菌菌体をマウスへ経口投与し、糞便の軟化と腸管セロトニンのレベルについて検討した。

【方法】

327 株は滅菌処理後、乾燥，粉末化 (生菌として $1\times10^{12}$ CFU/g) した製品粉末を滅菌蒸留水に懸濁後、実験に供した。BALB/c マウス (♂, 8 週齢) をコンベンショナル環境で飼育し、対照群には蒸留滅菌水を、327 株投与群には 327 株懸濁液 (10 mg/mouse/day) を経口投与し、便中水分量を経時的に測定した。投与 2 週間後、腸管組織を採取し、o-フタルアルデヒドを用いた蛍光 HPLC 法によりセロトニン量を測定した。また、セロトニン合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (Tph1) の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法により測定した。

【結果及び考察】

糞中水分量は、対照群と比較し、327 株投与群では投与 1 週目から増加傾向を示し、投与 2 週目には有意に増加することが確認された。この結果は、327 株の経口摂取が糞の軟化を促すことを示す。投与 2 週間後、327 株投与群の十二指腸では、対照群と比較してセロトニン量の有意な増加が認められた。また、327 株投与群では、十二指腸における Tph1 mRNA 発現量が対照群より高い傾向がみられた。以上の結果から、327 株は十二指腸におけるセロトニンレベル亢進を介し、蠕動運動を活性化することで便通を改善させると推察された。

1) 瀬野ら：日本食品科学工学会誌、47 (7)、555 (2000)
2) T. Kumagai *et al*.: Food Sci. Technol. Res., 10(2), 143 (2004)
3) 熊谷ら：食品工業、52 (6)、26 (2009)

Lactobacillus casei 327, serotonin, bowel movement

発表番号：3E086
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# L-トリプトファンおよび L-プロリンがマウス腸管上皮細胞のサイトカイン産生応答に与える効果
# Effect of L-tryptophan and L-proline on cytokine production by mouse intestinal epithelial cells

○羽多野 安曇、青木 綾子、戸塚 護（東大院農生科・応生化）
○Azumi HATANO, Ayako AOKI, Mamoru TOTSUKA (Dept. Appl. Biol. chem., The Univ. of Tokyo)

＜背景・目的＞

栄養素の消化、吸収を担う腸管上皮細胞は、Toll 様受容体(TLR)を介した菌体成分の認識およびサイトカイン等の細胞間シグナル伝達物質の産生により、腸管免疫系を制御する働きもしている。これまでに、L-ヒスチジンがマウス小腸上皮細胞株において Toll 様受容体(TLR)リガンド刺激で誘導されるインターロイキン 6(IL-6)の分泌を亢進することを明らかにしており、腸管粘膜免疫を増強する効果をもつことが示唆されている。本研究では、腸管上皮細胞の免疫関連機能に及ぼすアミノ酸の影響を明らかにすることを目的として、β-アラニンを含む 21 種のアミノ酸が TLR リガンド刺激により誘導されるマウス小腸上皮細胞株の IL-6 産生に対してどのような影響を及ぼすかを検討した。さらに、顕著な増強および抑制活性を示したアミノ酸に着目して、その作用機構の解析を行った。

＜方法＞

マウス小腸上皮細胞株である MoS13 細胞を用いて、TLR1/2 のリガンドである Pam3CSK4 による刺激とともに 21 種のアミノ酸を添加して 24 時間培養し、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法により測定した。また、MoS13 細胞に TLR リガンド刺激とともにアミノ酸を添加して 3 時間培養後に RNA を抽出し、サイトカインの mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

＜結果・考察＞

Pam3CSK4 による刺激とともに 21 種のアミノ酸を添加し IL-6 産生を測定した結果、L-ヒスチジンに加え、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-アルギニン、L-グルタミン、L-メチオニン、L-アスパラギンを添加した場合には IL-6 産生を増強する作用が認められ、中でも L-トリプトファンは顕著な IL-6 産生増強作用を示した。一方、L-プロリン、L-システイン、L-グルタミン酸の添加では IL-6 産生を抑制する効果が示された。また、TLR リガンドとして polyI:C（TLR3 リガンド）あるいはリポ多糖（LPS, TLR4 リガンド)を用いた場合にも L-トリプトファンおよび L-プロリンは上記と同様の増強/抑制効果を示した。これらの結果から、L-トリプトファンは腸管粘膜免疫を増強する効果を有すること、また L-プロリンは抗炎症効果を有する可能性が示唆された。

L-tryptophan, L-proline, interleukin-6

発表責任者：戸塚　護（atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E087
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide によるタンパク質分解系を介した 第一相薬物代謝酵素 CYP2E1 発現抑制機構の解明

# Suppression by diallyl trisulfide of drug-metabolizing enzyme CYP2E1 protein expression through the protein degradation systems.

○荒木 彩花、矢口 真実、奥江 紗知子、細野 崇、関 泰一郎（日本大院・生資科・応生化）
○Sayaka Araki, Manami Yaguchi, Sachiko Okue, Takashi Hosono, Taiichiro Seki (Nihon Univ. Grad. School)

【背景・目的】これまでに我々は、ニンニク由来香気成分の一つ Diallyl trisulfide（DATS）をラットに前投与することで、アセトアミノフェン（APAP）誘導性急性肝障害から肝臓を保護することを報告している。さらに、この保護メカニズムとして、DATS により肝臓中の第一相薬物代謝酵素である CYP2E1 の活性が抑制されることで、過剰なアセトアミノフェンの摂取によって生成される活性型中間体の産生が減少する可能性を明らかにした(2013 年, 農芸化学会)。しかし、DATS の投与による CYP2E1 の抑制メカニズムについては明らかとなっていない。

本研究では､DATS による CYP2E1 発現抑制機構について､タンパク質分解系に着目し *in vivo, in vitro* で検討を行った。

【方法】実験Ⅰ: Wistar ラット（オス、6 週齢）に DATS（500 μmol/kg b.w.）または DATS の溶媒として使用した Corn oil（2 ml/kg b.w.）を経口投与後､プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブ（0.5 mg/kg b.w.）または生理食塩水を腹腔内投与した。DATS 投与から 12 時間後に肝臓を回収し、CYP2E1 とユビキチン化タンパク質、 LC3 タンパク質発現量をウエスタンブロット法により測定した。また、CYP2E1 特異的基質である Chlorzoxazone（CLZ）を用いて、その代謝産物である 6-OH CLZ を HPLC により測定し CYP2E1 酵素活性を評価した。実験Ⅱ: CYP2E1 を過剰発現する HepG2 E47 細胞を 10%FBS, DMEM（High glucose）培地でコンフルエントになるまで培養した。低血清培地に交換後 DATS（200 μM）を添加培養し、経時的に細胞を回収した。実験Ⅰ同様にウエスタンブロッティングにより各種タンパク質発現量を、HPLC を用いて CYP2E1 酵素活性を測定した。

【結果と考察】ラットへの DATS の単回投与は、CYP2E1 タンパク質の発現量を減少させた。この減少メカニズムを明らかにする目的で、CYP2E1 タンパク質の主要な分解経路であるプロテアソーム系の関与を検証した。プロテアソーム阻害剤と DATS の共投与により、DATS による CYP2E1 タンパク質の減少が抑制される傾向を示した。また、DATS の単回投与により、オートファジー関連タンパク質である LC3-1,2 の発現が誘導された。さらに HepG2 E47 細胞に DATS を添加すると、添加 6 時間まで経時的に LC3-1,2 タンパク質発現量の増加と CYP2E1 活性の減少が観察された。さらに、PS-341 との共添加により高分子量のユビキチン化タンパク質及び CYP2E1 タンパク質が減少した。以上の結果から DATS はプロテアソーム系とオートファジーの両者を介して、CYP2E1 を減少させる可能性が示唆された。

Garlic, proteasome, CYP2E1

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3E088
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ガーリック由来香気成分 diallyl trisulfide の抗炎症作用メカニズムの解明

# Anti-inflammatory effect of garlic derived-compound, diallyl trisulfide

○奥江 紗知子[1]、今井 孝俊[1]、日吉 滉平[1]、荒木 彩花[1]、矢口 真実[1]、船戸 里香[1]、林 浩和[2]、小島 貴之[2]、横山 令奈[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院・生資科・応生科、[2]日本大・生資科・生命化)
○Sachiko OKUE[1], Takatoshi Imai[1], Kohei Hiyoshi[1], Sayaka Araki[1], Manami Yaguchi[1], Rika Funado[1], Hirokazu Hayashi[2], Takayuki Kojima[2], Reina Yokoyama[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon univ. Grad. School, [2]Nihon univ.)

【背景・目的】 ガーリックは抗がん、抗炎症、抗血栓作用をはじめとする薬理効果を有することが知られている。これまでに、演者らはガーリックの香気成分 diallyl trisulfide (DATS)がヒト大腸がん細胞の ß-tubulin のシステイン残基を *S*-allyl 修飾し、アポトーシスを誘導することなどを報告してきた(*J Biol Chem.*, 2005)。炎症は生体外異物や組織損傷に対する生理的な防御反応であるが、慢性炎症はがんや糖尿病をはじめとする生活習慣病に密接に関与しており、炎症反応の抑制は生活習慣病の予防や治療において重要である。DATS の抗炎症作用としてマクロファージにおける NF-κB シグナルや炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。本研究では、培養マクロファージ細胞株を用いて、DATS の抗炎症作用メカニズムを解明しようとした。

【方法】 マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264.7 に DATS を 30 分間前処理後、lipopolysaccharide (LPS)を添加培養して炎症様反応を惹起した。LPS 添加後、経時的に培養上清と細胞を回収し、nitric oxide (NO)産生量を Griess 法により、また、inducible nitric oxide synthase (iNOS)発現や NF-κB, MAPKs 関連タンパク質のリン酸化、NF-κB の核内移行について western blotting により解析した。Tumor necrosis factor-α (TNFα), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の遺伝子発現については、real-time PCR により解析した。さらに、NF-κB の DNA 結合活性を EMSA により、TLR4-MyD88 複合体形成に及ぼす影響について免疫沈降法及び western blotting により解析した。

【結果】 DATS は LPS により惹起される RAW264.9 細胞の NO 産生ならびに iNOS タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。また、TNF-α, MCP-1 の遺伝子発現も DATS の前処理により有意に減少した。NF-κB の核内移行および DNA 結合活性も DATS の前処理によって減少しており、NF-κB および IκBα, MAPKs (JNK, p38, ERK)のリン酸化も DATS により抑制された。さらに、DATS は TLR4 と MyD88 の複合体形成を阻害した。

【結語】 DATS はマクロファージにおける TLR4-MyD88 複合体形成を阻害し、NF-κB 及び MAPKs シグナルを抑制することでマクロファージによる炎症メディエーターの産生を減弱させる可能性が明らかになった。

garlic, anti-inflammation

発表責任者：関 泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3E089
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 光センシングによる簡便な生体内抗酸化能評価システムの開発
# Development of an easy-to-use optical sensing system for in vivo antioxidant capacity

○數村 公子[1]、原 顕子[1]、ウー ユーチュー[2]、土屋 広司[1]、美和 登志幸[1]、森下 直計[3]、大澤 俊彦[4] ([1]浜松ホトニクス・中研、[2]ヘルスケアシステムズ、[3]浜松ホトニクス・電子管、[4]愛知学院大・心身)
○Kimiko KAZUMURA[1], Akiko HARA[1], Yuqiu WU[2], Hiroshi TSUCHIYA[1], Toshiyuki MIWA[1], Naokazu MORISHITA[3], Toshihiko OSAWA[4] ([1]Hamamatsu Photonics CRL, [2]Healthcare Systems, [3]Hamamatsu Photonics Electron, [4]Aichi Gakuin Univ.)

生活習慣病発症や老化促進の原因と考えられている酸化ストレスに対し、食事由来の抗酸化成分摂取による改善が期待されている。「食」が持つ抗酸化能を評価する手法は、多数確立され盛んに研究が行われているが、「食」を摂取した後の生体内での真の効果が判別できる簡便法はほとんどない。我々はこれまでに、光センシング技術と好中球の自然免疫反応を利用した、食品機能性評価法を開発し、様々な食品や成分の評価結果を報告している。好中球様細胞の自然免疫反応を惹起した際に起こる、細胞内 $Ca^{2+}$濃度上昇を蛍光で、スーパーオキシド（$O_2^{\cdot-}$）産生を化学発光で、同時に継時的にモニタし、被検物質の存在によって変化する光の信号量で、抗酸化・抗炎症・自然免疫賦活の 3 つの機能性を判別する方法である。本技術を利用して、新たに生体内抗酸化能評価法の開発に取り組んだ。

好中球は、外敵の侵入に対し最初に働く免疫細胞で、活性酸素を出して攻撃する。好中球が直接産生する $O_2^{\cdot-}$や不均化等によって生じる過酸化水素（$H_2O_2$）は強力な活性酸素種ではないが、同時に好中球の顆粒から放出されるミエロペルオキシダーゼ（MPO）がハロゲンとの反応を触媒し、次亜塩素酸（HOCl）等の強力な活性種が産生される。これらは生体防御に大きく貢献すると同時に、正常な組織も傷つけて炎症が起こる。炎症は活性酸素を増加させ、酸化ストレスを引き起こす。我々は、この酸化ストレスの原因となる好中球の過剰活性化に着目し、好中球の活性化指標となる $O_2^{\cdot-}$産生と MPO 活性を、$O_2^{\cdot-}$検出用化学発光試薬 MCLA による化学発光と、$OCl^-$検出用蛍光試薬 APF による蛍光の、二つの光情報に変換して検出する技術を確立した。指先からランセットを用いて自己採取した極微量の血液中の好中球活性を、細胞分離することなく希釈のみで測定可能とするために、赤血球や血液中の夾雑物による影響を最小限にした光学系を開発し、新しいプレパラート型試作機を製作した。刺激剤の速やかな混合と血液凝集を防ぎ試料を均一に保つための空気流による撹拌機能や、37℃加温による試料液蒸発を防ぐ加湿機能を付加して、血液測定に最適化した。さらに、$O_2^{\cdot-}$消去剤の SOD、MPO 阻害剤の ABAH を添加したネガティブコントロールを同時に測定できる 2 連型としたことで、より正確な活性評価が可能となり、前処理無の簡便な評価手法が確立できた。将来的に、個人に最適なテーラーメイド食品の選択ツールにも利用できると考えている。現在、健常者ボランティア等のデータを蓄積中である。本手法の概要と、好中球数等との比較を含めた測定結果について報告する。

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、SIP（戦略的イノベーション創造プラグラム）「次世代農林水産業創造技術」委託研究で実施した。

in vivo, antioxidation, innate immune response

発表責任者：數村　公子（kimiko-k@crl.hpk.co.jp）

発表番号：3E090
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸間膜リンパ節樹状細胞の RALDH 活性および腸管指向性ホーミングレセプター誘導能の加齢による変化

# Effects of aging on RALDH activity and CCR9 induction of mesenteric lymph node dendritic cells

○高野 智弘[1,2]、上滝 隆太郎[1,2]、宮川 拓也[1]、朴 知賢[1]、塩河 亜弥[1,2]、好田 正[3]、足立(中嶋) はるよ[2]、田之倉 優[1]、八村 敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生化・食の安全研セ、[3]東農工大農・応生化）

○Tomohiro Takano[1,2], Ryutarou Kotaki[1,2], Takuya Miyakawa[1], Jihyun Park[1], Aya Shiokawa[1,2], Tadashi Yoshida[3], Haruyo Nakajima-Adachi[2], Masaru Tanokura[1], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food safety, Univ. Tokyo, [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】加齢に伴う免疫機能の低下が昨今注目されているが、腸管免疫系における加齢の影響については十分明らかとなっていない。レチノイン酸は、腸管指向性ホーミングレセプター（C-C chemokine receptor type 9; CCR9）の誘導や制御性 T 細胞の分化誘導などの作用を有していることから腸管免疫応答の制御に重要と考えられ、その産生に関わるレチノイン酸合成酵素（retinal dehydrogenase 2; RALDH2）は、特に腸間膜リンパ節（mesenteric lymph node; MLN）の樹状細胞（dendritic cell; DC）において発現量が高いことが知られている。

当研究グループでは、加齢により MLN DC において RALDH2 遺伝子発現が低下することを明らかにしており、加齢に伴う腸管免疫系の機能低下の要因となることが示唆されている。本研究では MLN DC の RALDH の活性に着目し、加齢による変化について検討した。また、MLN DC の $CD4^+$ T 細胞における腸管指向性ホーミングレセプターCCR9 の誘導能の加齢による変化について解析した。

【方法】BALB/c 若齢マウス（2~4 ヶ月齢）、加齢マウス（>12 ヶ月齢）の MLN DC について ALDEFLUOR assay kit を用いてフローサイトメトリーにより RALDH の活性を解析した。また、BALB/c 若齢マウス、加齢マウスの MLN から MACS 法により得られた $CD11c^+$ MLN DC と、卵白アルブミン抗原特異的な T 細胞抗原レセプターを発現する DO11.10 マウス（2~4 ヶ月齢）脾臓由来 $CD4^+$ T 細胞を卵白アルブミン由来抗原ペプチドの存在下で培養後、CCR9 の発現レベルをフローサイトメトリーにより解析した。

【結果】若齢マウスと比較して加齢マウスにおいて MLN DC の RALDH 活性が低下していた。また加齢マウス由来 MLN DC と培養した $CD4^+$ T 細胞の CCR9 発現レベルは、若齢マウス由来 MLN DC と培養した場合と比較して低下していた。本研究の結果から、加齢により MLN DC の CCR9 誘導能が低下し、その一因としては MLN DC における RALDH 活性の低下によるレチノイン酸産生の低下の可能性が示された。制御性 T 細胞誘導能は現在検討中である。

aging, dendritic cells, RALDH

発表責任者：八村 敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E091
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ケルセチンの摂取は食餌性肥満モデルにおける精巣上体脂肪組織の炎症を抑制する

# Dietary quercetin suppresses inflammation of epididymal adipose tissue in diet-induced obese mice

○小堀 真珠子、高橋 弓子、桜井 睦、秋元 由香里、大池 秀明、一法師 克成（農研機構　食総研）
○ Masuko Kobori, Yumiko Tahakashi, Mutsumi Sakurai, Yukari Akimoto, Hideaki Oike, Katsunari Ippoushi (National Food Research Institute, NARO)

【緒論】ケルセチンはタマネギ、緑茶、その他の野菜類から日常的に摂取しているフラボノイドであり、生活習慣病予防効果が期待されている。私達はこれまでに糖尿病モデルマウスや肥満モデルマウスを用いて、ケルセチンの有効性、作用機構等の解明を進めてきた。本研究では、ケルセチンが食餌性肥満モデルマウスの内臓脂肪組織に及ぼす影響を検討した。
【材料および方法】C57BL/6J マウス（雄性、5 週齢）を 1 週間の馴化飼育後、AIN-93G（コントロール食）、高脂肪・高ショ糖・高コレステロール（西洋型）食または 0.05%ケルセチン添加西洋型食（ケルセチン添加栄養型食）を 18 週間摂取させ、精巣上体脂肪組織の遺伝子発現や血中成分等を測定した。また、C57BL/6J マウスにコントロール食、西洋型食、ケルセチン添加西洋型食、西洋型食の脂肪の 5%をドコサヘキサエン酸（DHA）27%含有精製魚油（日油（株））に置換した DHA 添加西洋型食または 0.05%ケルセチン及び DHA 添加西洋型食（ケルセチン＋DHA 添加西洋型食）を 18 週間摂取させて、ケルセチンの効果に及ぼす DHA の影響を検討した。
【結果および考察】コントロール食、西洋型食、0.05%ケルセチン添加西洋型食を摂取したマウスの精巣周囲脂肪組織の遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて網羅解析し、パスウェイ解析（(Ingenuity パスウェイ解析 (IPA)) を行った結果、ケルセチンは西洋型食で誘導されるマクロファージ、T 細胞、B 細胞、樹状細胞、NK 細胞、マスト細胞等の免疫細胞の増加や活性化に関わる遺伝子発現を抑制した。また、活性酸素種の産生に関わる遺伝子発現の誘導を抑制することが明らかになった。また IPA の結果から、ケルセチンは西洋型食を摂取した脂肪組織で誘導されるミトコンドリアの機能障害を改善することが明らかになった。ケルセチンはインスリン耐性に関わる炎症性サイトカインの TNFα や IFNγの血中濃度を低下させた他、血中及び精巣上体脂肪組織の酸化ストレスマーカー、Lox-1 及びマロンジアルデヒド（MDA）を低下させた。ケルセチンは肝臓において脂肪酸代謝を促進し、血中脂質を低下させる PPARα の発現低下を抑制することが明らかになっており、酸化ストレスを軽減し、内臓脂肪の蓄積や炎症を抑制すること等からインスリン耐性やメタボリックシンドロームを改善すると考えられる。一方、ケルセチン＋DHA 添加西洋型食を摂取したマウスの肝臓の MDA 量はケルセチン添加西洋型食を摂取した場合に比べて低かったが、精巣上体脂肪組織の MDA のレベルはケルセチン添加西洋型食摂取に比べて高く、現在、DHA の添加がケルセチンの作用に及ぼす影響を検討している。

Quercetin, inflammation, adipose tissue

発表責任者：小堀真珠子（kobori@affrc.go.jp）

発表番号：3E092
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# スギ花粉症モデルマウスに対するフロロタンニンの抑制効果

# The suppressive effect of phlorotannins on pollenosis model mice

○杉浦 義正、太田 怜吾、谷口 凌佑、古家 圭祐、臼井 将勝、宮田 昌明（水大校 食品科学）
○Yoshimasa Sugiura, Ryougo Ota, Ryousuke Taniguchi, Keisuke Furuya, Masakatsu Usui, Masaaki Miyata (Natl Fish Univ)

【目的】褐藻サガラメは「刻みアラメ」等の原料として三重県伊勢・志摩地区で古来より食品利用されている。これまでに、in vitro 試験でサガラメ由来の海藻ポリフェノール（フロロタンニン）が抗アレルギー成分であることを明らかにした [1, 2]。しかし、花粉症などの具体的な病態に対する効果は確認できていない。そこで本研究では、花粉症に対するフロロタンニンの有効性を確認するため、スギ花粉アレルゲン Cry j 1 感作により作製した花粉症モデルマウスに対する抑制効果について調べた。

【方法】雌性 BALB/c マウス（6 週齢）を陰性対照区、陽性対照区および試験群に区分けした（各群 n = 6）。試験区には、サガラメからクロロフォルム／メタノール抽出して調製したフロロタンニン濃縮物を 32 日間連続で経口投与（4.5 mg/day/body）した。その間、経口投与開始 4 日目、11 日目、18 日目の 3 回にわたり Cry j 1 を腹腔内投与（1 μg/body）し、25 日目から 7 日間、Cry j 1 を点鼻投与（1 μg/body）した。点鼻投与 7 日目（経口投与開始 32 日目）に、ビデオカメラを用いてくしゃみと鼻掻き回数を撮影（点鼻後 5 分間）し、映像を確認してそれぞれの回数をカウントした。なお、陰性対照区と陽性対照区には試料溶媒である 1.5%ショ糖溶液を経口投与し、陽性対照区は Cry j 1 で腹腔内および点鼻投与により免疫負荷した。

【結果】点鼻投与後 5 分間の鼻掻き回数の平均値は、それぞれ、陰性対照区で 18.8 回、陽性対照区で 48.8 回、試験区（4.5 mg 投与）で 36.0 回となり、試験区の鼻掻き回数では抑制傾向が見られた。また、くしゃみの回数は、それぞれ、陰性対照区で 1～2 回、陽性対照区で 24.8 回、試験区で 10.3 回となり、陽性対照区に対して試験区では有意にくしゃみが抑制（$P < 0.01$）されていた。以上の結果から、フロロタンニンはスギ花粉症を抑制する可能性が見出された。

現在、血清中の IgE 抗体量とサイトカイン量（IL-5, IL-13）、ならびに脾臓中のサイトカイン量（IL-4, IL-5, IL-13）を測定し、抑制機序についても検討中である。

1) Sugiura Y, et al., *Food Sci. Technol. Res.*, **13**, 54-60 (2007). 2) Sugiura Y, et al., *J. Funct. Foods*, **1**, 387-393 (2009).

phlorotannin, anti-allergy, pollenosis

発表番号：3E093
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# イチジク茶抗アレルギー作用の生体効果と有効成分の探索
# Anti-allergic effect of fig tea in mice and isolation of active compounds

○阿部 竜也、西村 耕作、高橋 徹、沖浦 文（公益財団法人　東洋食品研究所）
○Tatsuya ABE, Kousaku NISHIMURA, Toru TAKAHASHI, Aya OKIURA (Toyo Institute of Food Technology)

【背景・目的】

当研究所の所在地である、兵庫県川西市は、イチジク（*Ficus carica L.*）の産地として知られている。我々は、イチジク葉を加工した茶にアレルギー抑制効果があることをラット好塩基球性白血病細胞 RBL-2H3 株を用いて明らかにした。また、その作用機構は、感作状態にある細胞に作用し、受容体に結合した IgE 抗体を解離させることと推測された。このような機構は報告が無く、新規作用機構を持つ抗アレルギー素材としての利用が期待された。そこで、イチジク茶抗アレルギー作用の生体効果の確認と有効成分の同定を試みた。

【方法・結果】

7週齢の雌性BALB/cマウスの耳介部において、人為的にⅠ型アレルギーを発症させた際に、イチジク茶投与の有無により症状が異なるか調査した。結果、イチジク茶を経口および経皮投与することで、アレルギーによる耳介部厚の増加が軽減される傾向を見出した。また、経口投与群の耳介部の病理組織観察から、イチジク茶処理群での組織内の血管拡張・浮腫・細胞浸潤の程度が緩和傾向にあることが確認された。以上から、イチジク茶は生体において、アレルギー症状を緩和し、炎症症状を抑制することが明らかとなった。

アレルギー抑制効果の強度が、茶液の保存温度によって変動することから、有効成分は保存温度によって変動することが示唆されていた。そこで、極端な温度条件下で保存し、成分変動量を明瞭化することで、有効成分の検出・同定を試みた。温度条件は、-20、4、30、50ºCに設定し、保存期間を1、2、4、8週間とし、各試料の抑制効果を調査した。結果、30ºC以上で1週間保存した試料では、抑制強度が大きく減少し、50ºC/2週間の試料では、完全に抑制効果が消失した。抑制強度が大きく異なる試料をLC-QTOF/MSで分析したところ、試料間で含有量の異なる幾つかの分子イオンピークを見出した。データベース検索及び標準試料の分析から、当該ピークがジフルクトース無水物やイソマルトースといった二糖類であることを同定した。また、標準試料を用いた評価により、これら二糖類が抑制効果を示すことを確認した。現在、至適濃度とIgE抗体解離作用について確認している。

fig leaf, anti-allergy, disaccharide

発表責任者：阿部竜也（tatsuya_abe@shokuken.or.jp）

発表番号：3E094
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

*Lactococcus lactis* T21 株の花粉症に対する効果
The effects of *Lactococcus lactis* strain T21 on allergic rhinitis
○砂田 洋介[1]、上原 和也[1]、大木 篤史[1]、中山 俊憲[2]、青木 玲二[3]、鈴木 チセ[3]、田中 充[1]、松尾 伸二[1]、田辺 創一[1]([1]日清食品 HD・グローバルイノベーション研究センター、[2]千葉大院・医学研究院、[3]農研機構・畜草研)
○Yosuke SUNADA[1], Kazuya UEHARA[1], Atsushi OKI[1], Toshinori NAKAYAMA[2], Reiji AOKI[3], Chise SUZUKI[3], Mitsuru TANAKA[1], Shinji MATSUO[1], Soichi TANABE[1] ([1]NISSIN FOODS HOLDINGS CO.,LTD. NISSIN Global Innovation Center, [2]Chiba Univ. Graduate School of Medicine, [3]National Agriculture and Food Research Organization)

【目的】ある種の乳酸菌には、免疫調節作用をはじめ様々な生理機能が報告されている。本研究では、マウスパイエル板細胞およびアレルギー性気管支喘息モデルを用いて、免疫調節作用の高い菌株を選抜し、マウス花粉症モデルに対する効果を評価した。
【方法】① BALB/c マウスのパイエル板細胞に乳酸菌乾燥菌体（1 μg/mL）を添加し 24 時間共培養後、培養上清中のインターロイキン（IL）-12 産生量を測定し、IL-12 産生促進能の高い株を選抜した。② BALB/c マウスに卵白アルブミン（OVA）および水酸化アルミニウムゲル（ALAM）を腹腔内投与後、気道経由で OVA 吸入を実施し、アレルギー性気管支喘息を誘発させた。IL-12 産生促進株の乾燥菌体を 0.3 mg/匹/日の用量で感作初日より 17 日目まで 14 回経口投与した後、肺胞洗浄液（BALF）中の総細胞数を測定し、免疫調節作用の高い *Lactococcus lactis* T21 株（東京農業大学から分譲）を選抜した。③ マウス花粉症モデルは、BALB/c マウスに OVA、ALAM および百日咳毒素を初回感作として腹腔内投与、その 5 日後に追加感作として OVA を背部皮下投与し、初回感作 18 日後から 7 日間 OVA を点鼻することにより作製した。本マウスに、乳酸菌（T21 株あるいは *Lactobacillus rhamnosus* GG 株）の乾燥菌体を 1 mg/匹/日の用量で点鼻 7 日後より 4 週間連続経口投与した。経口投与前および投与期間中、OVA 点鼻により誘発されるくしゃみ反応および鼻掻き行動回数を 1 週毎に 30 分間測定した。さらに、投与 4 週後、血清中 OVA 特異的 IgE 量を測定した。
【結果】① パイエル板細胞からの IL-12 産生量を比較したところ、菌株間で差が認められ、79 株から IL-12 産生促進能の高い上位 7 株を選抜した。② OVA 吸入により、対照群では BALF 中総細胞数が 8 倍以上に有意に増加した。一方、乳酸菌投与群では、7 株中 2 株で BALF 中総細胞数が有意に減少した。最も効果の高かったのは、クランベリー由来の T21 株であった。③ 対照群では、OVA 点鼻によってくしゃみ反応および鼻掻き行動回数が著明に増加したが、T21 株投与群では、投与 1 週目以降鼻掻き行動が有意に減少し、またくしゃみ反応は 3 週目以降有意に減少した。一方、LGG 株投与群では、T21 株よりも遅れて 4 週目に症状抑制効果があらわれた。さらに、血清中 OVA 特異的 IgE 量は、T21 株投与 4 週目に有意に低下したが、LGG 株には効果が認められなかった。
【結論】マウスパイエル板細胞およびアレルギー性気管支喘息モデルを用いて選抜した T21 株には、マウス花粉症モデルにおいて、著明な症状の緩和効果が認められた。

lactic acid bacteria, allergic rhinitis, *Lactococcus lactic* strain T21

発表責任者：田辺　創一（soichi.tanabe@nissin.com）

発表番号：3E095
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# LPS で刺激した RAW264.7 細胞に対する 12 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体の作用

# Effects of various 5,7-dihydroxyflavone analogs on LPS-stimulated RAW264.7 cells

○仁科 淳良[1]、鈴木 啓太[1]、浮谷 基彦[1]、深津 誠[1]、二ノ宮 真之[2]、纐纈 守[2] ([1]日大理工、[2]岐阜大工)
○Atsuyoshi NISHINA[1], Keita SUZUKI[1], Motohiko UKIYA[1], Makoto FUKATSU[1], Masayuki NINOMIYA[2], Mamoru KOUKETSU[2] ([1]Nihon Univ., [2]Gifu Univ.)

長い間、フラボノイド類の生理活性のうち、抗炎症作用は、漢方薬で未精製の植物抽出物を使用することによって、知らず知らずのうちに利用されている。また、単離または合成されたフラボノイドの抗炎症作用に関しては、多くの報告が存在するが、フラボノイドの抗炎症作用は概して穏やかであるため、報告が多いにもかかわらず、作用メカニズムや構造活性相関は完全に解明されているとはいえない。本研究では、リポポリサッカライド（LPS）で刺激したRAW264.7細胞に対する12種の5,7-dihydroxyflavone類縁体の作用を評価し、構造と作用の関係を明らかにすることを目的とした。
RAW264.7細胞に対する5,7-dihydroxyflavone類縁体の毒性と一酸化窒素（NO）産生抑制作用を測定した結果、2種の5,7-dihydroxyflavone類縁体は細胞毒性が低く、NO産生抑制作用が優れていた。当該2種の5,7-dihydroxyflavone類縁体は、LPS刺激で誘導されるプロスタグランジン$E_2$（$PGE_2$）の産生を陽性対照のインドメタシン、sc-293と同様に抑制した。以上の結果から当該2種の5,7-dihydroxyflavone類縁体は顕著な抗炎症作用を示すと判断した。
当該 2 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体は、炎症に誘導する iNOS、COX1、COX2 のうち iNOS と COX2 の、また、炎症関連サイトカインの IL-1β、IL-6、TNF-α のうち IL-1β、IL-6 の遺伝子およびタンパク発現を抑制した。iNOS、COX1、COX2 等の炎症関連酵素の発現を促す IKK、IκBα、NFκB のタンパク発現とリン酸化を測定した結果、IκBα のリン酸化を有意に抑制することが分かった。さらに、LPS で刺激することにより誘導される Akt のリン酸化が当該 2 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体により抑制された。以上の結果から、当該 2 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体は IκBα、Akt のリン酸化を抑制することにより NFκB の転写を調節し、iNOS、COX2、IL-1β、IL-6 等の炎症関連タンパクの発現を抑制することにより抗炎症作用を示すと推定した。今後、阻害剤、レポーターアッセイ等で当該 2 種の 5,7-dihydroxyflavone 類縁体の抗炎症メカニズムを明らかにしたい。

inflammation, flavonoid, RAW264.7 cells

発表責任者：仁科淳良（nishina.atsuyoshi@nihon-u.ac.jp）

発表番号：3E096
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# なたまめ茶摂取によるアレルギー症状の QOL 改善効果

# Improvement effect of a seasonal allergy by the 'Natamame-tea' intake

○藤田 美華[1]、関口 博太[1]、竹田 竜嗣[2]、森 充子[3]、宇住 晃治[1]、須藤 慶太[1]([1]株式会社ライフ・サイエンス研究所、[2]株式会社ＴＥＳホールディングス、[3]一般社団法人オリエンタル労働衛生協会)
○Mica FUJITA[1], Hirotaka SEKIGUCHI[1], Ryuji TAKEDA[2], Atsuko MORI[3], Koji USUMI[1], Keita SUTOH[1] ([1]Life Science Institute Co., Ltd., [2]TES Holdings Co., Ltd., [3]General Inco. Association Oriental Occupational Health Association)

なたまめは、豆亜科の一年草であり、古くから蓄膿症などの鼻炎に関する症状の緩和、口臭予防など様々な効能が知られている。その種子に含有される成分は、カナバニン、コンカナバリンＡなどが知られており、抗炎症作用や免疫賦活、尿素の解毒といった作用があると考えられる。本試験では、株式会社やまちやより入手したなたまめ由来成分含有飲料（なたまめ茶）の摂取による、季節性アレルギー性鼻炎症状に対する効果を検証した。

毎年 2 月～4 月頃に季節性アレルギー性鼻炎（花粉症）などの諸症状に悩む 30 歳以上 60 歳未満の男女を対象に、なたまめ茶または対照飲料としての麦茶をそれぞれ８週間摂取させ、各群 15 名でダブルブラインド法 プラセボ対照並行群間比較試験にて有効性を検証した。なお、通院、服薬治療が必要な重度の花粉症症状を有する者は除外とした。

有効性評価項目は、耳鼻咽喉科医師による鼻腔内評価/アレルギー性鼻炎症状の重症度分類、日本アレルギー性鼻炎標準 QOL 調査票（JRQLQ No.1)、血液特殊検査（好酸球、IgE)、被験者日記によるアレルギー関連設問とした。

その結果、耳鼻咽喉科医師による鼻炎症状の「水性分泌量」、「鼻汁性状」のスコアが対照飲料と比較して有意に低く、被験者による JRQLQ NO.1 においても、日常生活の不便度と鼻づまりの症状が対照飲料と比較して有意に低いスコアを示した。また、IgE 抗体産生量が、対照飲料と比較して有意に低かった。このことから花粉の増加による過剰な免疫反応の抑制によるところが大きいと考えられ、季節性アレルギー性鼻炎に関する QOL を改善する効果が示された。

Sword bean, Seasonal allergic rhinitis, Clinical Study

発表責任者：須藤 慶太（sutoh@life-science.co.jp）

発表番号：3E097
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米タンパク質酵素分解物の RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制作用

# Inhibitory effects of rice protein hydrolysates on degranulation in RBL-2H3 cells

○都能 諒太[1]、曽根田 祐太[1]、下田 博司[2]、柏木 豊[1]、前橋 健二[1]([1]東京農大院・醸造、[2]オリザ油化株式会社)
○Ryota Tsuno[1], Yuta Soneda[1], Hiroshi Shimoda[2], Yutaka Kashiwagi[1], Kenji Maehashi[1] ([1]Grad. Sch. Fermentation Sci. Technol., Tokyo Univ. Agriculyure, [2]Oryza Oil & Fat Chemical Co.,Ltd.)

【目的】

日本におけるアレルギー罹患率は深刻であり，現在では全人口の約 2 人に一人が何らかのアレルギー症状を罹患しているとされている。花粉症や食物アレルギーに代表されるⅠ型アレルギー反応においては，マスト細胞や好塩基球上の高親和性 IgE 受容体を介して引き起こされるヒスタミン等のケミカルメディエーターの細胞外放出に起因しており，これらの一連の反応は脱顆粒と呼ばれている。近年，醤油多糖類やホエータンパク質由来成分等にヒスタミン遊離抑制能が報告されるなど，日頃摂取している発酵食品中にアレルギー低減に効果的な成分が含まれていることが示されている。一方，米は味噌や清酒をはじめとする日本の醸造物に広く利用されている原料である。米に含まれるトコトリエノールやγ-オリザノールには脱顆粒抑制作用があることが報告されており，米タンパク質由来ペプチドには抗酸化，血圧降下等の様々な機能性が見出されている。本研究では醸造工程で生じることが予想される米タンパク質分解物について脱顆粒抑制作用の検討を行った。また，有効成分の推定のため，主要な米タンパク質であるグルテリン，グロブリン及びプロラミンの酵素分解物についても脱顆粒抑制作用を検討した。

【方法】

米タンパク質としてはオリザプロテイン-P70(オリザ油化)を用いた。米タンパク質は溶媒分別抽出によって粗主要タンパク質画分に分離した。麹菌由来の酵素製剤であるスミチーム FP を用いて米タンパク質の分解を行い，分解物は Amberlite IR120B，IRA410，Sephadex G-25，及び逆相 HPLC により分離した。脱顆粒抑制作用の評価は RBL-2H3(ラット好塩基球性白血病)細胞を用いた実験により行った。すなわち，抗 DNP-IgE 抗体により感作させた RBL-2H3 細胞における β-hexosaminidase 放出を指標として脱顆粒抑制作用を評価した。

【結果】

米タンパク質スミチーム FP 分解物に含まれる脱顆粒抑制物質の精製を行った結果，有効成分は低分子かつ親水性であり中世画分に含まれることが推定された。また，米タンパク質に含まれるプロラミンが米タンパク質分解物の脱顆粒抑制作用に関与していることが示唆された。

rice, protein hydrolysate, degranulation

発表責任者：前橋健二（maehashi@nodai.ac.jp）

発表番号：3E098
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 紫外線 B 波照射により誘導されるヘアレスマウスの皮膚障害に対する芳香族ピルビン酸の防御効果
# Protective effect of aromatic pyruvate on ultraviolet B-induced damage in hairless mouse skin

○青木 玲二[1]、青木 綾子[2]、鈴木 チセ[1]、高山 喜晴[1] ([1]農研機構・畜草研、[2]東大院農生科)
○Reiji AOKI[1], Ayako AOKI[2], Chise SUZUKI[1], Yoshiharu TAKAYAMA[1] ([1]NARO, [2]UTokyo)

【背景】280～320 nm の波長の紫外線 B 波（UVB）は、角化細胞に対し細胞死を誘導するとともに炎症を引き起こし、皮膚のバリア機能を破壊する。我々はこれまでに芳香族ピルビン酸（インドールピルビン酸、ヒドロキシフェニルピルビン酸、フェニルピルビン酸）が UVB 照射によるヒト角化細胞の細胞死や炎症性サイトカインの産生を抑制することを明らかにしてきた。本研究では、ヘアレスマウスを用いて芳香族ピルビン酸の UVB 照射に対する防御効果を検討した。
【方法】芳香族ピルビン酸（終濃度 100 mM）を 20%エタノール/30%プロピレングリコール/50 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）に溶解し、芳香族ピルビン酸溶液を用意した。8 週齢のオスヘアレスマウス（HR-1 マウス）の背部に、芳香族ピルビン酸溶液または溶媒のみを 100 μl ずつ塗布し、ハンディ型紫外線ランプを組み込んだ照明装置を用いて UVB を照射した。1 回当たりの紫外線照射量を 1 J/cm2 とし、1 日目と 3 日目の 2 回、塗布と照射を行った。5 日目にテヴァメーターを用いてマウス背部の経皮水分蒸散量を測定した。マウスは屠殺後、背部の皮膚を採取し、切片を作製後、ヘマトキシンリン・エオシンで染色して皮膚の肥厚を評価した。また、皮膚より RNA を抽出し、cDNA 化後、real-time PCR により IL-1β、IL-6、Cox-2 の mRNA 発現を測定した。
【結果】溶媒のみを塗布したマウスでは、2 回の UVB 照射により、皮膚に発赤が誘導され、表皮の壊死や表皮と真皮の肥厚、経皮水分蒸散量の上昇が認められた。また、炎症性のサイトカインである IL-1β、IL-6 の mRNA 発現や Cox-2 の mRNA 発現が上昇した。これに対し、インドールピルビン酸の塗布は、皮膚の発赤を抑制し、真皮の肥厚を抑制するとともに、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量の上昇を抑制した。また、インドールピルビン酸の塗布により IL-1β、IL-6 の mRNA 発現の上昇も抑制された。一方、ヒドロキシフェニルピルビン酸の塗布は、皮膚バリア機能の指標である経皮水分蒸散量の上昇を抑制したが、皮膚の肥厚や炎症性サイトカインの mRNA 発現の上昇に対しては効果が認められなかった。フェニルピルビン酸の塗布はいずれの項目に対しても有意な効果を示さなかった。以上より、芳香族ピルビン酸の中でも特にインドールピルビン酸に、UVB 照射に対する強い防御効果があることが示された。本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

UVB, aromatic pyruvate, hairless mouse

発表番号：3E099
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *Kaempferia parviflora* に含まれるポリメトキシフラボンの抗アレルギー作用

Anti-allergenic Activity of Polymethoxyflavones from *Kaempferia parviflora*

○小林 彰子[1]、加藤 太朗[1]、東 鋭明[2]、阿部 啓子[1,3]、菊崎 泰枝[4]（[1]東大院農、[2]阪市大院・栄養、[3]KAST、[4]奈良女・栄養）
○Shoko KOBAYASHI[1], Taro Kato[1], Toshiaki Azuma[2], Keiko Abe[1,3], Hiroe Kikuzaki[4] ([1]UTokyo, [2]Osaka City Univ, [3]KAST, [4]NWU)

[目的]*Kaempferia parviflora* はショウガ科バンウコン属の植物で、根茎はタイで伝承薬として、アルコールと煎じて、アレルギー、喘息、下痢、および糖尿病の治療薬に用いられている。我々はこれまでに *K. parviflora* の根茎部の主要成分として 14 種のメトキシフラボンを単離構造決定し、報告した。本研究では、*K. parviflora* の抗アレルギー作用を明らかにするため、*K. parviflora* から単離したメトキシフラボンの脱顆粒抑制活性を評価し、その抑制メカニズムを明らかにすることを目的とした。
[方法]ラット好塩基球由来細胞株 RBL-2H3 細胞を用いて抗アレルギー活性を評価した。β-ヘキソサミニダーゼの遊離から IgE 依存性脱顆粒活性を測定した。抑制機構を明らかにするため、それぞれ、細胞外および細胞内カルシウムイオノフォアである A23187 および 2,5-*ditert*-butylhydroquinone（DTBHQ）による $Ca^{2+}$依存的脱顆粒阻害試験を行った。さらに脱顆粒に関わる抗原特異的な細胞内シグナル伝達経路に位置するタンパク質のリン酸化を、ウエスタンブロッティングにより評価した。また細胞内および細胞膜上の FCεRI の発現量についてもウエスタンブロッティングにより評価した。
[結果および考察]単離されたメトキシフラボンはすべて 7-methoxyflavone を基本骨格としたフラボンであったが、脱顆粒阻害試験の結果により IC50 で活性の高い順に分類したところ、5 位にヒドロキシル基が置換したグループが最も活性が高かった。中でも最も活性の高かった 3',5-dihydroxy-3,4',7-trimethoxyflavone(KP10) および活性が高くかつ収量の高かった 5-hydroxy-3,4',7-trimethoxyflavone(KP02)を用いて脱顆粒抑制メカニズムを解析した。カルシウムイオノフォアを用いた検討では、KP02 および 10 は共に細胞内カルシウムイオノフォア DTBHQ に依存的な脱顆粒経路を阻害し、特に KP10 が高い活性を示した。しかしながら抗原刺激による脱顆粒における活性と比較すると、$Ca^{2+}$依存的経路における阻害の寄与率は小さく、主にその他の経路を阻害している可能性が示唆された。ウエスタンブロッティングでは、KP02 および KP10 により PLCγ1 のリン酸化が、また KP10 により PLCγ1 の上流に位置する Syk のリン酸化の阻害が観察された。さらに、KP02 および KP10 は、RBL-2H3 細胞における総 FCεRI タンパク質量は変化させなかったが、細胞膜におけるタンパク質量は低下させたため、これらのフラボンは細胞膜上の FCεRI 量を低下させることにより脱顆粒を抑制する可能性が考えられた。

本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Antiallergic activity, Polymethoxyflavone, Zingiberaceae

発表責任者：小林彰子（ashoko@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E100
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# マイタケ由来エルゴステロール誘導体の RBL-2H3 マスト細胞に対する脱顆粒抑制作用

# Ergosterol derivatives from *Grifola frondosa* suppress degranulation in RBL-2H3 mast cells

○森 光一郎[1]、樋口 侑夏[2]、川井 絢矢[1]、大内 謙二[1]、廣田 満[2]([1]ホクト、[2]信州大農)
○Koichiro Mori[1], Yuka Higuchi[2], Junya Kawai[1], Kenji Ouchi[1], Mitsuru Hirota[2] ([1]Hokuto Corp., [2]Shinshu Univ.)

【目的】
我々はこれまでに、マイタケの脂溶性抽出物が RBL-2H3 マスト細胞の脱顆粒を抑制すること(1)、マイタケの経口投与により花粉症モデルマウスのアレルギー反応が抑制されること(2)を明らかにし、マイタケが I 型アレルギー改善に有効な食材である可能性を発表してきた。本研究では、マイタケに含まれる抗アレルギー成分の単離、同定を目的として、RBL-2H3 マスト細胞に対する脱顆粒抑制活性を指標とした成分探索を行った。

【方法】
マイタケのエタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配して得られた酢酸エチル抽出物を、シリカゲルまたはODSを用いたカラムクロマトグラフィーで繰り返し分画することにより活性成分を精製した。活性試験は、抗 DNP-HSA IgE 抗体により感作させた RBL-2H3 マスト細胞に、被験物を添加して 20 分培養後、抗原として DNP-HSA 100 ng/ml を加えて刺激し、40 分後の培養上清中のβ-hexosaminidase 活性を脱顆粒の指標として測定した。また単離した化合物については、培養上清中のヒスタミン遊離量をo-phtalaldehyde を用いて蛍光誘導体化し測定した。

【結果・考察】
3種のエルゴスタン骨格を有する化合物、ergosterol、6β-methoxyergosta-7,22-dien-3β,5α-diol、および 6-oxoergosta-7,22-dien-3β-ol をマイタケに含まれる脱顆粒抑制活性成分として同定した。これら3成分は抗原刺激を行ったRBL-2H3細胞培養上清中のβ-hexosaminidase活性およびヒスタミン濃度上昇を有意に抑制し、これらの抑制活性は陽性対照として用いたtranilastとほぼ同等であった。ergosterolについては、市販の標品とマイタケ由来のものが同等の活性を示すことを確認した。また動物及び植物由来ステロールとの比較の為、cholesterol、β-sitosterol、campesterol との活性比較を行った結果、ergosterol のみに有意な脱顆粒抑制活性が見られた。ergosterol 類が抗アレルギー成分として有用であるとともに、ステロール類の中でも特異的に脱顆粒抑制活性を有する可能性があり、今後はその作用メカニズムと *in vivo* での効果を検証していく必要があると考えている。

(1)日本薬学会第133年会 「RBL-2H3細胞におけるマイタケとアガリクスのヒスタミン遊離阻害作用」
(2)日本薬学会第 134 年会 「マウス眼におけるブタクサ花粉誘発アレルギー性反応に対するマイタケ摂取の効果」

allergy, degranulation, mushroom

発表責任者：森 光一郎（koichiro.mori@hokto-kinoko.co.jp）

発表番号：3E101
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# β-クリプトキサンチン高含有ミカンジュースが食餌誘導肥満マウスの炎症応答と盲腸内細菌叢に及ぼす影響の解析

# Effects of beta-cryptoxanthin rich satsuma mandarin juice on cecal bacterial flora and inflammatory response of diet-induced obesity mice.

○荻田 佑、若木 学、渡辺 純、後藤 真生、石川（高野） 祐子（農研機構　食総研）
○ Tasuku OGITA, Mnabu WAKAGI, Jun WATANABE, Masao GOTO, Yuko ISHIKAWA(TAKANO) (NARO NFRI)

【目的】メタボリックシンドローム発症の予防には、全身性の慢性炎症の起因となる脂肪組織の炎症を抑制することが重要である。本研究では、抗肥満効果や抗酸化活性の確認されているβ-クリプトキサンチンを高含有する、ミカンジュースを高脂肪食とともにマウスに与え、肥満により誘導される脂肪組織の炎症が軽減されるか検討した。さらに、ミカンジュース投与による盲腸内細菌叢の変化を解析した。
【方法】7 週齢の雄性 C57BL/6 マウスに高脂肪食を摂取させて、ミカンジュース投与/非投与下で 9 週間飼育した。9 週間飼育後、脂肪組織を採取し、炎症応答に関与する遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析するとともに、血漿中の酸化ストレスマーカーとして HODE（Hydroxyoctadecadienoic acid）を測定した。また、盲腸内細菌叢を PCR-DGGE 法により解析した。
【結果】高脂肪食摂取により増加した脂肪組織での TNF-α の遺伝子発現、血漿中の HODE 量は、ミカンジュースの投与によりそれぞれ減少した。DGGE バンドパターンのクラスター解析により、ミカンジュース投与群と非投与群で盲腸内細菌叢が異なることが確認された。
【考察】肥満マウスへのミカンジュースの投与は、肥満により誘導される脂肪組織での炎症応答を抑制するとともに、盲腸内細菌叢を変化させた。ミカンジュースの炎症抑制作用の一因として腸内細菌叢の変化が考えられた。現在、菌種レベルでのより詳細な変化を確認するため 16SrRNA 遺伝子配列解析を行うとともに、炎症抑制に寄与する菌種の推定を行っている。

β-cryptoxanthin rich mikan juice, diet-induced obesity mice, cecal bacterial flora

発表番号：3E102
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 水熱処理法で精製した黒酵母 β グルカンによるマクロファージ活性化の抑制

# Activation-inhibiting effect for macrophage by the black yeast β-glucan obtained through a hydrothermal treatment process

○正林 由美[1]、林 信行[1]、福留 健司[2]、近藤 修啓[3]([1]佐大・農、[2]佐大・全教、[3]伊藤忠製糖)
○Yumi SHOBAYASHI[1], Nobuyuki HAYASHI[1], Kenji FUKUDOME[2], Nobuhiro KONDO[3] ([1]Fac. Agric., Saga Univ., [2]Org. Gen. Edu., Saga Univ., [3]Itochu Sugar CO., Ltd.)

［背景および目的］

黒酵母と呼ばれる *Aureobasidium pullulans* が培地中に発酵生産する β-1,3-1,6 グルカンは、免疫調節能を有する機能性多糖として注目されてきたが、発酵培地が生卵の卵白様の高粘性を示すため効率的な精製が難しく、多くは液状製品として上市されているのが実態であった。そこで、演者らは精製プロセスへの水熱処理法の適用を試みたところ、培養液の粘性が著しく低下して精製が容易になり、その結果、易溶性の高純度粉末を安定的に製造できるようになった(特許第 5172930 号)。ザイモサンとして知られるパン酵母の β グルカンは、マクロファージの Toll-like 受容体と Dictin-1 に結合して、炎症性のサイトカインや NO の産生を誘導することが知られている。本研究では、水熱処理で得られた黒酵母 β グルカン粉末についてその抗炎症作用をマクロファージの炎症性メディエーター産生抑制を指標として検討した結果を報告する。

［方法および結果］

*A. pullulans* 培養液を水熱処理後、濾過精製して得た純度 90%以上の易溶性の精製粉末を用いた。マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 に対し、種々の濃度の黒酵母 β グルカンを培地に添加して、培養上清の解析を行ったが、TNF や NO の産生は検出されなかった。一方、LPS 1ng/mL を加えた炎症誘導条件下においては黒酵母 β グルカンの濃度依存的に NO 産生量が抑制された。このことから水熱処理で得られた黒酵母 β グルカンはマクロファージの活性化抑制作用を有することが示唆された。

*Aureobasidium pullulans*, Hydrothermal treatment, anti-inflammatory

発表責任者：林信行（yurika@cc.saga-u.ac.jp）

発表番号：3E103
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 樹状細胞において RALDH2 発現を亢進する食品成分の探索

# Screening of food constituent to increase RALDH2 expression in dendritic cells

○山口 昌樹、八代 拓也、笠倉 和巳、西山 千春（東京理科大・基礎工）
○MASAKI YAMAGUCHI, TAKUYA YASHIRO, KAZUMI KASAKURA, CHIHARU NISHIYAMA (Tokyo Univ. of Science)

腸管に局在する樹状細胞（DC; dendritic cells)は、レチノイン酸合成酵素の一種である RALDH2 (Retinaldehyde dehydrogenase 2)を発現しており、食餌由来のビタミン A をレチノイン酸に変換する機能を有する。レチノイン酸は、免疫抑制機能に特化した $Foxp3^+$ 制御性 T 細胞の分化を促すことから、この機構は食品に対する免疫寛容の誘導において重要な役割を果たしていると考えられている。RALDH2 の発現亢進や活性上昇を誘導することは、過剰な免疫反応に起因する食物アレルギーの予防や治療に繋がることが期待されることから、本研究では、DC において RALDH2 の発現を亢進する食品成分の探索を行った。

マウスの大腿骨及び脛骨から採取した骨髄細胞を、GM-CSF（Granulocyte macrophage colony-stimulating factor)存在下で培養することで BMDC (Bone marrow-derived DC)を作製した。ポリフェノールを中心とする約 60 種類の食品成分で BMDC を 48 時間処理した後、RALDH2 mRNA 量を qPCR にて解析することで、食品成分が RALDH2 発現に与える影響を評価した。その結果、ワインなどに含まれる Tannic acid で約 4 倍に、玉ねぎなどに含まれる Kaempferol で約 3 倍に RALDH2 mRNA 量が増加することが明らかになった。また、同様に処理した BMDC において RALDH の酵素活性を測定したところ、Tannic acid と Kaempferol の両方で活性上昇が確認された。興味深いことに、Kaempferol が属するフラボノール類やフラボン類に属する他のポリフェノールでも RALDH2 mRNA 量の増加効果が見出されており、これらに共通する構造を認識する受容体が RALDH2 遺伝子の転写制御機構に関与することが示唆された。

以上の結果から、Tannic acid と Kaempferol が BMDC における RALDH2 発現を亢進し、酵素活性を上昇させることが明らかとなった。現在、Tannic acid や Kaempferol をマウスに経口摂取させ、腸管に存在する DC での RALDH2 発現レベルや食物アレルギー病態への作用について検討を行っている。

RALDH2, Dendritic cells, Polyphenol

発表番号：3E105
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# シトラスペクチンによる食物アレルギー予防効果の検討

# Prophylactic effect of citrus pectin in a murine model of egg allergy

○岩城 佳那、矢部 富雄、北口 公司 (岐阜大院・応生科・応用生命)
○Kana IWAKI, Tomio YABE, Kohji KITAGUCHI (Gifu Univ.)

【目的】

近年，食物アレルギーの患者数は増加しており，その症状を緩和する食品成分が切望されている。水溶性食物繊維であるペクチンはポリガラクツロン酸を主鎖とする複合多糖類であり，多様な生体調節機能を示すことが報告されている。このうち，ペクチン摂取により 2 型ヘルパーT 細胞（Th2）の分化が抑制され IgE 抗体価が減少することや，ペクチンがアレルゲンと相互作用することで IgE との結合力を高めることなどが報告されており，ペクチンはアレルギー応答を調節する食品成分であることが示唆されている。しかしながら，食物アレルギーに対するペクチンの効果については，作用点やその機序など不明な点が多い。本研究では，柑橘由来のペクチンを食物アレルギーモデルマウスに摂取させ，アレルギー病態に及ぼす影響と作用機序を調査することを目的とした。

【方法】

7 週齢の雄性 Balb/c マウスに柑橘由来ペクチンを溶解した脱イオン水(10 mg/mL)を自由摂水させ，水酸化アルミニウムゲルアジュバントと卵白オボアルブミン(OVA)を腹腔投与し，血清を経時的に採取した。ペクチンの飲水投与終了後に OVA の追加免疫を行った後，ゾンデを用いて OVA を強制的に経口投与(50 mg/day)し，アレルギー性の下痢を誘導した。さらに，OVA 経口投与終了後に，OVA を腹腔投与し，アナフィラキシーを誘導した。さらに，アナフィラキシー誘導後の腸間膜リンパ節と脾臓を採取して 1 型ヘルパーT 細胞（Th1），Th2 ならびに制御性 T 細胞（Treg）関連遺伝子発現量を qPCR 法で測定した。

【結果】

アナフィラキシーショックによる体温低下はペクチン摂取で軽減されず，血中の IgE 濃度もペクチン摂取群と対照群で同程度だった。一方で，OVA の経口投与により誘導された下痢症状の発症はペクチン摂取群で遅れる傾向にあった。また，ペクチン摂取群では追加免疫後の血中 $IgG_1$ 濃度と OVA 特異的抗体価の上昇が抑制された。Th1，Th2，Treg 関連遺伝子発現量は，ペクチン摂取群と対照群で有意な差はなかった。以上の結果より，ペクチンは T 細胞分化には影響を及ぼさずに $IgG_1$ 産生を調節することでアレルギー性の炎症を抑制している可能性が示唆された。

pectin, food allergy, $IgG_1$

発表責任者：北口公司（kkohji@gifu-u.ac.jp）

発表番号：3E106
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 塩酸処理小麦タンパク質含有石鹸使用による経皮感作成立の要因解明

# Factors for the establishment of percutaneous sensitization by soap containing HCl-treated wheat protein

○松風 成美、藤井 礼佳、土井 栞、阿部 竜典、赤尾 真、熊谷 日登美（日大）
○Narumi MATSUKAZE, Reika FUJII, Shiori DOI, Ryousuke ABE, Makoto AKAO, Hitomi KUMAGAI (Nihon Univ.)

【目的】近年、塩酸により加水分解した小麦タンパク質（Hydrolyzed Wheat Protein: HWP）を含む石鹸の使用が原因となり、その後、使用者が小麦含有の食品を食した際に全身性のアレルギーを発症するという症例が多数報告された。これは使用者が皮膚・粘膜を介して HWP に感作された後、小麦を使用した製品を経口摂取することで食物依存性運動誘発アナフィラキシーなどが引き起こされたためと考えられる。しかし、この塩酸処理小麦タンパク質によるアレルギー感作メカニズムの詳細は明らかにされていない。塩酸による処理過程では、タンパク質の加水分解のみではなく脱アミド化が同時に起こる。上記アレルギーでは、加水分解・脱アミド化された HWP が、石鹸の界面活性剤と共に経皮的に吸収・感作されたことがアレルギー発症の主因であると推察されるが、このアレルギー患者は、従来の経腸管感作による小麦アレルギーは発症しておらず、パンやケーキといった小麦製品を日常的に摂取していた。このことから、小麦に対する経口免疫寛容が誘導されていたにも関わらず、HWP への感作が成立したと考えられる。そこで本研究では、小麦に対して経口免疫寛容を獲得しているモデル動物を用いて、HWP 含有石鹸による経皮感作誘導のメカニズムと小麦製品摂取による食物アレルギー発症の要因について検討した。
【方法】小麦グリアジンは、グルテンから 60%エタノール可溶性画分として抽出した。未処理グリアジン（UG）の他、陽イオン交換樹脂処理により脱アミド化のみ起こしたグリアジン（DG）、ペプシン処理により加水分解のみ起こしたグリアジン（HG）、塩酸により加水分解と脱アミド化の両方を起こしたグリアジン（HDG）を作製した。BALB/c マウスに２週間 UG を経口投与し、経口免疫寛容を誘導後、各処理グリアジンを界面活性剤と共に皮膚に塗布し、経皮免疫を４週間行った。その後、UG の経口負荷試験を実施し、血清中抗グリアジン IgE 量、遊離ヒスタミン量等の測定を行い、食物アレルギー発症の有無を評価した。また、経口免疫寛容が誘導されているか否か確認するため、制御性 T 細胞核内因子である Foxp3 の発現を測定した。
【結果】UG の経口投与後、各処理グリアジンの経皮免疫を行い、UG の経口負荷試験を実施したところ、HDG 免疫群のみで血清中抗グリアジン IgE 量および遊離ヒスタミン量が有意に増加した。また、制御性 T 細胞核内因子である Foxp3 の発現は HDG 免疫群以外で有意に上昇した。よって、小麦タンパク質の加水分解と脱アミド化の両方の構造変化が経皮感作に関与しており、これが経口免疫寛容の破綻につながったと推察される。

wheat gliadin, HCl treatment, percutaneous sensitization

発表番号：3E107
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Jurkat 細胞の IL-2 産生能に対する PMA 処理の影響
# Influence of PMA treatment on IL-2 producing ability of Jurkat cells

○大沼 祐人、服部 誠、好田 正（東農工大農・応生化）
○Yuto ONUMA, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agric. Tech.)

**【背景と目的】**経口免疫寛容とは、経口的に摂取した抗原に対する免疫応答が特異的に低下する現象である。経口免疫寛容の破綻は、食品に対する T 細胞の活性化を誘導して過剰な免疫応答を引き起こし、食品アレルギーを発症させると考えられている。経口免疫寛容の成立には、T 細胞が抗原刺激に対して低応答を示す状態である T 細胞アナジーの誘導が重要な役割を担っていると考えられてはいるものの、その詳細は明らかとなっていない。今後、T 細胞のアナジー化メカニズムを明らかとすることができれば、実効性のある食品アレルギーの治療や予防法の確立への道が開かれると期待される。これまでの研究により、T cell receptor (TCR) を介した抗原シグナルと共刺激の CD28 シグナルが T 細胞のアナジー化や活性化の決定に関与することが明らかにされており、ionomycin および phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) がそれぞれ TCR および CD28 シグナルを代替する薬剤として使われている。現在、これらの薬剤を用いて T 細胞の活性化やアナジー化を決定するシグナルの同定を目指す研究が多く行われており、特に ionomycin の影響に着目した研究は盛んに行われている。一方で、PMA の影響に着目した研究はほとんど存在しない。そこで本研究では、種々の濃度の PMA 処理によって T 細胞に誘導されるアナジー化や活性化を解析することを目的とした。
**【方法】**様々な濃度の PMA が存在する条件下において Jurkat 細胞を 1 日間培養し、刺激を導入した。培養後は上清を回収し、細胞を洗浄した。得られた細胞の刺激応答性を測定するため、全群に対し同一濃度の Ionomycin および PMA を用いて二次刺激を行い、1 日後の培養上清を回収した。各上清に含まれる IL-2 の濃度を、ELISA 法により測定した。
**【結果と考察】**一次刺激時の IL-2 産生量は、すべての群できわめて少なかった。二次刺激応答時は、PMA の処理濃度が 12.5 ng/mL までの低い濃度で、細胞の IL-2 産生量が無処理群に比べて有意に増加したが、25 ng/mL 以上の高濃度処理群においては、産生量が無処理群と同程度のレベルまで低下した。これらのことから、低濃度の PMA による一次刺激は IL-2 の産生を促さないものの、二次刺激に対する細胞の応答性を変化させていることが明らかになった。本結果は、CD28 シグナルが単独で T 細胞を活性化させるはたらきをもつが、アナジー化を誘導することはできないこと、また弱い CD28 シグナルは T 細胞の活性化を誘導するが、シグナルが強いと活性化は誘導されないことを示唆している。T 細胞アナジーの誘導は、CD28 シグナルのみにより単純に決定づけられるのではなく、TCR 等のそれ以外のシグナルが複雑に関与して決まると考えられる。

T cell activation, Jurkat, PMA

発表責任者：好田正（tyoshi@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：3E108
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クリルオイルは軽度膝関節痛に対して改善効果がある

# Krill oil improves knee joint pain in patients with mild knee pain

○鈴木 良雄[1,2]、福嶋 稔[3,4]、櫻庭 景植[1,2,3]、澤木 啓祐[1,2]、関川 和晃[1] ([1]順大院スポーツ健康科学、[2]順大スポーツ健康科学、[3]順大医 整形外科、[4]福島整形外科病院)
○Yoshio SUZUKI[1,2], Minoru FUKUSHIMA[3,4], Keishoku SAKURABA[1,2,3], Keisuke SAWAKI[1,2], Kazuaki SEKIGAWA[1] ([1]Grad Sch Health and Sports Sci, Juntendo Univ., [2]Sch Health and Sports Sci, Juntendo Univ, [3]Dept Orthopaedic Surg, Sch Med, Juntendo Univ, [4]Fukushima Orthopedic Clinic)

【背景・目的】クリルオイルは南極海に生息する「ナンキョクオキアミ」から抽出された食用油脂であり、米国 FDA により GRAS 認証され、日本でも市販されている。DHA、EPA などのオメガ 3 系脂肪酸、抗酸化物質として知られるアスタキサンチンなどの有効成分を含んでいる。クリルオイルは、心疾患、関節リューマチ、変形性関節炎のいずれかの疾患を持つ患者に、300mg/日を 30 日間投与したときに CRP が減少するとの報告がある。しかし軽度の関節炎を有する患者に対する有効性は明らかでない。そこで、軽度の膝関節痛を有する被験者に対するクリルオイルの効果を確認することを目的とした。
【方法】被験者は、生物学的製剤治療を要するほど重症ではないが膝関節痛を有し通院している 20 歳以上の男女 50 名とし、クリルオイル（2g/日）もしくはプラセボを 4 週間投与した。摂取前後に日本人変形性膝関節症患者機能評価尺度（JKOM）、日本整形外科学会 OA 膝治療成績判定基準（JOA）による膝痛症状の検査と、血清学的検査、尿検査を行った。試験は二重盲検法により行い、UMIN-CTR への登録（ID UMIN000014413）を行ったうえで実施した。本研究は三生医薬からの委託研究である。投与期間中に 3 名が脱落し、試験を完遂した 47 名を解析対象者とした。
【結果】JKOM および JOA 質問票の各設問の摂取前のスコアには、対照群とクリルオイル群の間に差は観られなかった。摂取前後後のスコアの変化を年齢、体重、性別、飲酒、喫煙により調整して解析すると、JKOM 質問票では、ずっと立っているときの膝が痛み（P = 0.043）、JOA 質問票では左ひざの屈曲角度および強直・高度拘縮（P = 0.041）がクリルオイル群の方が対照群より有意に改善していることが示唆された。血液・尿検査では、摂取前では対照群とクリルオイル群に差はなかったが、摂取後はクリルオイル群の EPA（P = 0.048）、EPA/AA 比（P = 0.003）が上昇し、EPA（P = 0.007）、EPA/AA 比（P = 0.040）はクリルオイル群の方が対照群より有意に高くなった;
以上より、クリルオイルは血中の EPA/AA を高め、軽度膝関節痛を有する患者の症状を改善することが示唆された。

JOA, JKOM, arthritis

発表責任者：鈴木　良雄（yssuzuki@juntendo.ac.jp）

発表番号：3E109
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ハニーブッシュ抽出物の免疫調節機能の解析

# Immune-modulating effects of honeybush extracts

○村上 詩歩、服部 誠、好田 正（東農工大農・応生化）
○Shiho MURAKAMI, Makoto HATTORI, Tadashi YOSHIDA (Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agric. Tech.)

【目的】緑茶などの植物由来食品因子はポリフェノールのような多様な活性物質を含み、抗炎症作用や抗アレルギー作用、コレステロール低下作用といった多岐にわたる生体調節機能を持つことが知られ、それらの機能を疾患の予防や治療に役立てるための研究がこれまでに数多く報告されている。ハニーブッシュは南アフリカ原産のハーブであり、茎や葉の抽出物はお茶として飲用されている。近年の研究で、熱水およびエタノール抽出物中に、マンギフェリンやイソマンギフェリンなどのポリフェノールが豊富に含まれることが明らかとなったことから、ハニーブッシュ抽出物が何らかの生体調節機能を有すると期待されている。そこで、本研究では、食品因子が有する数々の生体調節機能の中でも免疫調節機能に着目して、ハニーブッシュ抽出物の効果を解析することを目的とした。
【方法】3 品種 (*Cyclopia genistoides*、*C. subternata*、*C. maculata*) のハニーブッシュを、93°C の熱水もしくは 70°C の 40% EtOH で、30 分間抽出、ろ過、凍結乾燥に供したものをハニーブッシュ抽出物とした。卵白アルブミン (OVA) 特異的 TCR トランスジェニックマウス (DO11.10) の脾臓細胞を、OVA の存在下で、ハニーブッシュ抽出物と共に 3 日間培養し、上清中の IFN-γおよび IL-4 産生量を ELISA 法により測定した。ハニーブッシュ抽出物の細胞毒性は、3 日間の培養の後に生細胞数の計測を行うことで評価した。
【結果】6 種類のハニーブッシュ抽出物をスクリーニングした結果、*C. subternata* (EtOH 抽出) および *C. genistoides* (EtOH 抽出) は、25 μg/ml の添加濃度で再現性良く IFN-γ産生と IL-4 産生を増強した。次に、*C. subternata* (EtOH 抽出) を 0.4~250 μg/ml の濃度で添加したところ、50 μg/ml 以下の添加濃度では、細胞毒性は認めらなかったが、250 μg/ml では、コントロール群の 80%程度まで細胞生存率が低下し、高濃度では細胞毒性を有する、もしくは T 細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。また、高濃度では、IFN-γの産生も抑制されていた。
【結論】*C. subternata* (EtOH 抽出) および *C. genistoides* (EtOH 抽出) は、低濃度で T 細胞の応答を増強する免疫調節活性を有することが示唆された。

honeybush, cytokine, T cell

発表責任者：好田正（tyoshi@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：3E110
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸内細菌叢の有無によるマウス由来血清エキソソーム構成の違い

# Differences of serum-derived exosome compositions between SPF mice and germ-free mice

○宇都 侑莉子[1]、青木 綾子[2]、青木 玲二[3]、園山 慶[4]、戸塚 護[2] ([1]東大・農、[2]東大院・農生科、[3]農研機構・畜草研、[4]北大院・農)
○Yuriko UTO[1], Ayako AOKI[2], Reiji AOKI[3], Kei SONOYAMA[4], Mamoru TOTSUKA[2] ([1]Facul. Agric., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]NARO, [4]Hokkaido Univ.)

［背景・目的］近年、腸内細菌による生体機能調節作用が明らかになり、腸内細菌叢の改善による疾病の予防や治療に対する関心が高まってきている。しかしながら、腸内細菌叢がどのようにして生体機能を調節しているかについては完全には解明されていない。そこで、我々は細胞間の情報伝達に関与する「エキソソーム」に着目し、腸内細菌による生体機能の調節におけるエキソソームの役割を解明することを目的に研究を進めている。エキソソームとは体液中を循環する膜小胞のことであり、mRNA や microRNA、タンパク質、脂質などが含まれる。情報伝達においてはその構成が重要となると考えられることから、本研究では、腸内細菌の存在がエキソソームの構成成分に与える影響を解析した。

［方法］specific pathogen-free (SPF) マウスと無菌マウスをイソフルランにより麻酔し、それぞれの腹大静脈から採血を行い、血清から Total Exosome Isolation Kit (invitrogen) を用いてエキソソームを精製した。血清当たりのエキソソーム量を、精製したエキソソームのタンパク質量を定量することで比較した。さらに、エキソソーム中に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で比較するとともに、エキソソームから microRNA を精製し、マイクロアレイ解析を実施した。

［結果・考察］タンパク質濃度を指標に測定した結果、SPF マウスの方が無菌マウスより有意に単位血清当たりのエキソソーム濃度が高いことが明らかになった。さらに、SDS-PAGE によるエキソソーム中タンパク質の解析では、SPF マウスと無菌マウスでの構成の差が確認された。また、microRNA をマイクロアレイにより解析した結果、無菌マウスに比べ SPF マウスのエキソソームで発現量が 0.5 倍以下のものが 70 種、逆に、2 倍以上のものが 23 種確認された。主成分分析によって SPF マウスと無菌マウスの血清エキソソームの microRNA 発現パターンを解析すると、第 2 主成分で明確に区別できたことから、腸内細菌の有無により microRNA の構成が大きく異なることも判明した。これらの結果より、腸内細菌がマウスの血清中エキソソームの量および構成成分に影響を与えることが明らかになった。

exosome, gut microbiota

発表責任者：青木綾子（aokiaya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E111
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 香辛料による免疫賦活効果の検討

# Studies on immunostimulatory effects of major spices

○西本 壮吾[1]、佐々木 藍美[1]、平野 里枝[1]、恩田 浩幸[2]、菅原 卓也[3]([1]石川県大、[2]エスビー食品(株)、[3]愛媛大・農)
○Sogo NISHIMOTO[1], Sasaki AIMI[1], Rie HIRANO[1], Hiroyuki ONDA[2], Takuya SUGAHARA[3] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]S&B FOODS INC., [3]Ehime Univ.)

【目的】香辛料は私たちの食生活において使用頻度の高い食品の一つである。本研究では、香辛料に含まれる機能性を評価することを目的とし、免疫賦活効果に焦点を当て免疫調節機能を明らかにすることとした。

【方法】代表的な香辛料（フェンネル、クミン、コリアンダー、カルダモン）の粉末を用い、エタノールによる抽出を行い濃縮乾固させた。ヒト抗体産生細胞株及びマウス脾臓リンパ球に対して、様々な濃度の香辛料抽出物を添加し、免疫細胞応答性を評価するため ELISA 法を用いて抗体産生量を定量し、各香辛料の抗体産生能を評価した。

【結果】ヒト抗体産生細胞において、フェンネル及びコリアンダーが抗体産生能を示した。また、マウス脾臓リンパ球において、クミンが IgM 抗体産生促進活性を示した。4 種類の香辛料はいずれも IgA 抗体産生に応答性を示したが、IgG 抗体産生においては変化が認められなかった。以上の結果から、香辛料に含まれる成分によってクラスの異なる抗体産生が促進され、生体内において免疫賦活効果を期待できる可能性があることが示唆された。

immunoglobulin production, spices, immune response

発表番号：3E112
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 が産生する菌体外多糖（EPS）の摂取は乾癬を予防・軽減する

# Intake of exopolysaccharide (EPS) from *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 prevents or relieves psoriasis.

○畑堀 翔[1]、久 景子[2]、米島 靖記[2]、鈴木 卓弥[1]（[1]広島大院生物圏科学、[2]日東薬品工業株式会社 研究開発本部）
○Sho Hatabori[1], Keiko Hisa[2], Yasunori Yonejima[2], Takuya Suzuki[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Nitto Pharm. Ind., Ltd.)

【目的】
エンドウマメ由来乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する菌体外多糖（EPS）は、腸管での IgA 産生促進や、Th1/Th2 バランス調節など多様な生理機能が報告されている。我々は前回大会において、この EPS が Th17 細胞分化抑制することを報告し、Th17 関連疾患の予防や軽減に役立つ可能性を提案した。そこで本研究では、Th17 関連皮膚疾患である乾癬のモデルマウスを用い、NTM048 株由来 EPS 摂取による予防軽減作用について検討した。
【方法】
マウス（BALB/c、雌性、6 週齢）に NTM048 株由来 EPS を各々0.67%、1.67%、3.33%含む、あるいは含まない飼料を 27 日間摂取させた。摂取開始 21 から 26 日目に、マウス背部にイミキモドクリームを連続塗布することにより、乾癬を誘導した。また、EPS を含まない飼料を摂取させてイミキモドクリームも塗布しない正常対照群も設けた。誘導後、乾癬症状スコア（PASI スコア：紅斑、皮膚肥厚度、症状範囲の観察により算出）、体重、摂食量を毎日測定した。試験開始後 27 日目に解剖を行い、背部皮膚組織と脾臓を採取し、皮膚肥厚度と脾臓重量を測定した。また、盲腸内容物も併せて採取した。
続いて、採取した脾臓から脾細胞を単離し、anti-CD3+anti-CD28 刺激により T 細胞を活性化させ、72 時間後の培養上清中の IL-17、IL-10 のサイトカイン産生量を ELISA 法で測定した。
【結果】
イミキモドの連続塗布により、PASI スコアの上昇、脾臓重量の増加、皮膚肥厚度の上昇、体重の減少が認められ、乾癬の発症が確認された。NTM048 株由来 EPS の摂取は、それらの数値を用量依存的に抑制あるいは抑制する傾向を示し、乾癬症状を軽減した。また、乾癬の発症はマウス脾細胞からの IL-17 産生量を増加したが、EPS の摂取はその増加を容量依存的に抑制し、1.67%および 3.33%の飼料を摂取した群の IL-17 産生量は顕著に低かった。一方で、EPS 摂取は乾癬による IL-10 産生量減少には影響しなかった。
以上の結果より、NTM048 株由来 EPS の摂取は、全身免疫系において IL-17 産生量を抑制し、Th17 関連皮膚疾患である乾癬の予防・軽減に効果的であることが提案された。今後、EPS の作用機序を検討するうえで、盲腸内容物中の有機酸、腸内細菌叢の解析を行う予定である。

exopolysaccharide, th17, psoriasis

発表番号：3E113
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

*Lactococcus lactis* C59 株由来莢膜多糖の免疫調節機能
Immunomodulatory effect of capsular polysaccharides derived from *Lactococcus lactis* C59
○山田 剛史[1]、青木 綾子[1]、青木 玲二[2]、野村 将[2]、鈴木 チセ[2]、戸塚 護[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・畜草研)
○Tsuyoshi YAMADA[1], Ayako AOKI[1], Reiji AOKI[2], Masaru NOMURA[2], Chise SUZUKI[2], Mamoru TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [2]NARO)

【目的】
乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスの免疫調節作用が様々な菌株について解析されている。菌株ごとにその作用機構は異なり、乳酸菌が産生する菌体外多糖による免疫調節機能についても注目が集まっている。*Lactococcus lactis* C59(C59)はガラクトースを含まないユニークな莢膜多糖(CPS)を有する乳酸球菌であり [1)]、これまでにマウスの血中 IgE 抗体量の増加を抑える作用を持つことを報告している [2)]。また、C59 をマウスに経口投与することで経口免疫寛容誘導が増強されることを報告しており [3)]、その機能の少なくとも一部が CPS によるものであることを明らかにしている。本研究では C59 由来 CPS の免疫調節機能の詳細を明らかにすることを目的として、ナイーブ $CD4^+$ T 細胞の増殖応答に与える効果に着目し解析を行った。
【方法】
GM17 液体培地を用いて、37℃で 18 時間静置培養した C59 を集菌した後、0.1 M 炭酸ナトリウム抽出により粗精製 CPS 画分を回収した。この画分には CPS 以外に核酸、タンパク質といった夾雑物が含まれるため、粗精製 CPS 画分を RNase A、DNase I、Proteinase K の各酵素で処理したもの、また、3 種全ての酵素で処理したものをそれぞれ調製した。BALB/c マウスの脾臓から磁気ビーズ法によりナイーブ $CD4^+$ T 細胞を調製し抗 CD3 抗体および抗 CD28 抗体による刺激を加え、調製した試料(50 μg/ml)を添加して培養した。培養 72 時間後に[$^3$H]-チミジンを添加し、添加後 24 時間における[$^3$H]-チミジンの取り込み量を測定した。
【結果】
粗精製 CPS 画分をマウス脾臓由来ナイーブ $CD4^+$ T 細胞培養系に添加したところ、培養 72 時間から 96 時間にかけての[$^3$H]-チミジンの取り込み量が有意に低下した。また、粗精製 CPS 画分を各種酵素で処理したものについても、培養 72 時間から 96 時間にかけての[$^3$H]-チミジンの取り込み量の有意な低下が確認された。いずれの酵素処理によっても活性が低下しなかったことから、C59 の CPS に T 細胞応答を抑制する作用があることが示唆された。
1) Suzuki C *et al. Biosci Biotechnol Biochem.* 77(10):2013-8. 2013
2) Yoshida A *et al. FEMS Immunol Med Microbiol.* 61(3):315-22, 2011
3)日本農芸化学会 2013 年度大会, 西田ら,

lactic acid bacteria, capsular polysaccharide, T cell response

発表責任者：戸塚 護（atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E114
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Investigation of immunologically functional Okinawan bioresource

○ Biligsaikhan BILIGT[1], Makoto MIYAGI[1], Ipputa TADA[1], Inoue YUICHI[2], Kawahara HIROHARU[2], Ikematsu SHINYA[1] ([1]National institute of technology, Okinawa college, [2]National institute of technology, Kitakyushu college)

**[Background&Purpose]**

Okinawa prefecture is a unique region abundant in natural resources. Unfortunately,most of them are underutilized. The purpose of this study is to find some biological resource has immunostimulatory activity from okinawan bioresources also increase the value of those.

The immune system is the body's main method for fighting infections. Any defect in the immune system decreases a person's ability to fight infections. A person whose immunty is decreased may get more frequent infections, heal more slowly, and have a higher incidence of some allergy. Therefore,making the development of effective natural functional food or drinks, medicine for increasing immunity is still needed.

**[Method]**

Immunostimulatory effects were tested production of IL-12 which is a trigger for the immune response, as an indicator. On the other hand, allergy inhibitory effect was measured IgE as an indicator. Specific experimental methods, the sample was freeze-dried and extracted with ethanol and hot water after the milling utilized beads shocker. Each 10μl of the sample was added to J774A.1 cell line derived from mouse blood cells. Then incubated 3-6 hours, the cell solution was collected and subjected to RNA extraction. Then, cDNA was prepared from RNA, was performed relative quantification of IL-12 by performing real-time PCR using TaqMan Gene Expression Master Mix.

Samples were added to the cells similarly, and cultured at 24h, the culture supernatant was collected. We measured the quantification of IL-12 in Invitrogen Ms ELISA kit.

**[Result&Conclusion]**

In this study, we used *Cerasus cerasoides*, *Mentha*, *Bidens pilosa* as a sample. IL-12, Tnf-α production increase was confirmed in the sample of *Cerasus cerasoides* and *Mentha.* Meanwhile, the results of IL-12 test at the protein level, the *Cerasus cerasoides* and *Mentha* production of IL-12 is showing equivalent to LPS which is the positive control. It has been suggested the *Cerasus cerasoides* and *Mentha* has immunostimulatory activity.

It was also examined antioxidant activity. The *Mentha* showed the highest value in 6 samples. The *Mentha* has shown efficacy in several functional tests, it is expected other effects other than immunostimulatory.

okinawan, bioresource, immunostimulatory

発表番号：3E115
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 短期間の高脂肪食摂取によってマウスの腹腔内脂肪におけるリポ多糖結合タンパクの発現が増加する

# Short-term high-fat diet induces lipopolysaccharide-binding protein expression in intraabdominal adipose tissues in mice

○関 真実[1]、三輪 秋穂[2]、鶴田 剛司[3]、園山 慶[4] ([1]北大農、[2]北大院生命、[3]岡山大農、[4]北大院農)
○Manami SEKI[1], Akiho MIWA[2], Takeshi TSURUTA[3], Kei SONOYAMA[4] ([1]Fac. Agri. Hokkaido Univ., [2]Grad. sch. Life Sci. Hokkaido Univ., [3]Res. Facul. Agri. Okayama Univ., [4]Res. Facul. Agri. Hokkaido Univ.)

【目的】リポ多糖結合タンパク（LBP, lipopolysaccharide-binding protein）は主として肝臓で発現する急性期タンパクの一種であり、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）と結合した後にマクロファージなどが発現する TLR4 に認識されることにより炎症を惹起する。近年、腸内細菌由来の LPS がメタボリックシンドロームにおける全身慢性炎症に寄与することが示されるとともに（Cani *et al.* 2007 *Diabetes*)、脂肪細胞が産生する LBP がメタボリックシンドロームにおける脂肪組織炎症に関与することが示唆された（Moreno-Navarrete *et al.* 2013 *Diabetologia*)。しかし、高脂肪食（HFD）摂取が LBP 発現動態に及ぼす影響については十分に調べられていない。我々は、7 日間および 28 日間の HFD 摂取によりマウスの肝臓および回腸における LBP 発現レベルは変化しないものの、腸間膜脂肪組織（mWAT）における LBP 発現は上昇することを観察した（関ら 2015 日本食品免疫学会)。そこで、本研究ではより短期の HFD 摂取によって mWAT における LBP の高発現が誘導されるか否か、また異なる脂肪組織でも mWAT 同様に HFD 摂取により LBP の高発現が誘導されるか否かを検証するために、1 日から 7 日間 HFD を摂取させたマウスの mWAT、精巣上体脂肪組織（eWAT）および鼠蹊部脂肪組織（iWAT）における LBP の発現動態を追跡した。
【方法】雄性 C57BL/6J マウスに通常脂肪飼料（NFD）または高脂肪飼料（HFD）を 1 日、3 日、5 日または 7 日与えた（各群 n=3)。飼育最終日にセボフルラン麻酔下で頸動脈より全採血を行い、安楽死させ、肝臓、mWAT、eWAT、iWAT および回腸粘膜を得た。各組織から total RNA を分離し、RT-qPCR により LBP の mRNA レベルを推定した。
【結果】体重は実験飼料の 1 日、3 日および 5 日の摂取では群間に差はみられなかったが、7 日において NFD 群と比べて HFD 群で有意に高かった。また、mWAT 重量は 3 日において、iWAT 重量は 3 日および 5 日において HFD 群で有意に高かったが、他の摂取期間では差は認められなかった。一方、eWAT および肝臓重量については全ての摂取期間で差は認められなかった。LBP mRNA レベルは 3 日間実験飼料を摂取させた群の mWAT および eWAT でのみ NFD 群と比べて HFD 群で有意に高く、肝臓、回腸粘膜および iWAT においては全ての摂取期間で差はみられなかった。以上のように、脂肪蓄積の増加を伴わない短期間の HFD 摂取によって、腹腔内脂肪組織（mWAT および eWAT）で LBP の発現誘導が生じるが、皮下脂肪組織（iWAT）では生じないことが示された。現在、HFD による脂肪組織における LBP 発現誘導に寄与する因子を明らかにするために、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いた実験を行っている。

Lipopolysaccharide-binding protein, High-fat diet, Adipose tissue

発表番号：3E116
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

制御性 B 細胞の IL-10 産生増強効果を示すフラボノイドの作用機構の解析
Mechanistic analysis of flavonoids enhancing IL-10 production from regulatory B cells
○堀内 準矢[1]、葉 鎮豪[1]、清水 誠[1,2]、戸塚 護[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東京農大・応生・栄養)
○JUNYA HORIUCHI[1], CHENHAO YEH[1], MAKOTO SHIMIZU[1,2], MAMORU TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】制御性 B 細胞(Breg)は抑制性サイトカインである IL-10 を産生する B 細胞として見出され、過剰な免疫反応を抑制することで生体の恒常性維持を担う B 細胞である。これまでに Toll 様受容体（TLR）リガンドによって刺激した B 細胞は IL-10 を高産生する Breg へと分化することが明らかにされているが、私たちはそこへさらにフラボノイドである Kaempferol あるいは Tamarixetin を添加すると、IL-10 産生量が増加することを報告してきた。そこで本研究では、このような活性をもつフラボノイドの作用機構の解明を目的として、Kaempferol および Tamarixetin を含む 15 種類のフラボノイドが Breg およびその他の IL-10 産生細胞に与える影響を比較解析し、各フラボノイドによる Breg の IL-10 産生増強機構を検討した。

【方法】8 週齢の C57BL6/J マウス脾臓から B 細胞を調製し、リポ多糖（LPS）の存在下でフラボノイド（1.25～20 μM）を添加し、48 時間培養した。同マウス脾臓からナイーブ $CD4^+$T 細胞を調製し、IL-10 産生 Tr1 細胞を誘導する培養条件下でフラボノイドを添加し、96 時間培養した。マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞についても同様に、LPS の存在下でフラボノイドを添加し、20 時間培養した。各培養上清中に含まれる IL-10 量を ELISA 法により測定した。さらに、B 細胞に関してフローサイトメトリーにより、Breg との関係が報告されている形質細胞に関する表面分子の発現および IL-10 産生細胞の割合の変化を解析した。

【結果】フラボノールに属する Kaempferol, Tamarixetin, Isorhamnetin, Myricetin の 4 種が Breg の IL-10 産生を強く増強する活性をもつことが明らかとなった。そのうち、Tamarixetin および Isorhamnetin は J774.1 細胞の IL-10 産生も増加させた。しかしながら、この 4 種はいずれも T 細胞の IL-10 産生には影響を与えなかった。さらに LPS 刺激時の B 細胞において、$CD138^+CD22^-$の表現型をもつ形質細胞が他の集団と比べて高い IL-10 産生能を示し、Myricetin はその集団の割合を増加させた。以上のことから、Myricetin は $CD138^+CD22^-$の表現型をもつ Breg への分化を促進することで IL-10 産生を増強すること、Tamarixetin および Isorhamnetin は B 細胞とマクロファージにおいて共通する機構で IL-10 産生を促進することが示唆された。

regulatory b cell, il-10, flavonoid

発表責任者：戸塚　護（atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E117
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 で発酵したヨーグルトのアジュバント効果とそのメカニズムの検証

Mechanism of adjuvant effect exerted by yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1.

○逸見 隼、千葉 芳香、中村 真梨枝、牧野 聖也、狩野 宏（株式会社 明治）
○Jun HEMMI, Yoshika CHIBA, Marie NAKAMURA, Seiya MAKINO, Hiroshi KANO (Meiji Co., Ltd.)

【目的】

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1(OLL1073R-1 株)で発酵したヨーグルトの摂取は、健常高齢者の NK 活性を増強し、風邪症候群への罹患リスクを低減することが明らかになっている。さらに、健常成人のインフルエンザワクチン接種による抗原特異的な抗体産生を増強することも示されている。しかし、抗体産生増強メカニズムの詳細は明らかになっていなかった。そこで、本研究ではまず、他の抗原でも同様の現象が見られるか、卵白アルブミン(OVA)を抗原に用いた動物モデルで検証した。さらに、本動物モデルで脾臓細胞のサイトカイン産生応答を評価した。

【方法】

OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトおよび蒸留水をマウスに 3 週間経口投与し、1 週間おきに 2 回 OVA を腹腔内投与した。その後、1 週間おきに血中の抗体価を ELISA 法にて測定した。また、同様に被験物質を 3 週間経口投与し、1 回目の OVA 投与の 5 日後に脾臓を摘出した。調製した脾臓細胞を OVA 存在下で培養し、回収した培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果と考察】

蒸留水投与群に比べて OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルト投与群では、有意に血液中の OVA 特異的な IgG1 抗体価が上昇した。一方、アレルギーとの関連が知られる IgE に関しては、OVA 特異的 IgE は検出されず、IgE の総量も群間に有意な差はなかった。このことから OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトの摂取は、インフルエンザワクチン以外の抗原に対する抗体産生も増強することが示唆された。また、脾臓細胞の IL-2 産生量が蒸留水投与群に比べてヨーグルト投与群で有意に増加した。IL-2 は T 細胞増殖因子であり、NK 活性増強活性が知られているほか、抗体産生増強活性の報告もあることから、OLL1073R-1 株で発酵したヨーグルトの摂取による抗体産生増強に、IL-2 産生増強の関与が考えられた。

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, immunoglobulin, adjuvant effect

発表責任者：逸見　隼（jun.henmi@meiji.com）

発表番号：3E118
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Effect of extracts from different parts of pomegranate on chemokine expression by mouse intestinal epithelial cells.

○PENG LI[1], AYAKO AOKI[1], HIDEYUKI ITO[2], MAMORU TOTSUKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [2]Dept. Nutr. Sci., Okayama Pref. Univ.)

Migration of lymphocytes depends on not only the combined actions of various adhesion molecules, but also interactions between chemokines and their receptors. Chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 interact with their receptor CXCR3, which play a crucial role on the migration of T cells and B cells. *Punica granatum* L. (pomegranate) is used in the traditional medicine of different Asian countries. Pomegranate has been shown to have anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory, and anti-cancer activities by a large number of studies. However, the effect of pomegranate extract on expression of chemokines including CXCL9, CXCL10, and CXLC11 by intestinal epithelial cells has not yet been uncovered. In the present study, we examined the effect of pomegranate extract from different parts on chemokine expression by mouse intestinal epithelial cells *in vitro* and *in vivo*.

After feeding BALB/c mice with drinking water containing 1% pomegranate aril extract (PAE), pomegranate peel extract (PPE), or pomegranate leaves extract (PLE) for 2 weeks, we analyzed gene expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in mouse intestinal mucosa by qRT-PCR. We observed the expression of these three chemokines was significantly up-regulated in 1% PPE intake group. In addition, we confirmed the enhancement effect of PPE on expression of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in a mouse small intestinal epithelial cell line MoS13. Subsequently, to examine the effect of PPE on activation of cell-signaling pathways, cell-signaling molecules in MoS13 cells were analyzed by Western blotting. Our results indicated that PPE increased the nuclear translocation of IRF3 and p-JNK.

The novel biological activity of pomegranate peel extract observed in this study provides new suggestion that pomegranate or its extract may have an immunopotentiating effect on intestinal mucosal immunity.

Pomegranate, Chemokine, Intestinal epithelial cell

発表責任者：戸塚　護（atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3E119
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ユズ果皮抽出物摂取による食物アレルギー緩和効果

# Anti-allergic effects of citrus junos peel extracts intake in a murine model of food allergy

○小林 みさき、手束 奈央、東 徳洋、山田 潔（宇都宮大農）
○Misaki KOBAYASHI, Nao TETSUKA, Norihiro AZUMA, Kiyoshi YAMADA (Utsunomiya Univ.)

【目的】食物アレルギーは近年、特に先進国で大きな問題となっているが、完全な治療法は未だ確立されていない。食物アレルギー患者は普段の食事においてアレルゲン除去をしているが、アレルゲンを摂取してしまったときにショック症状が起きてしまう場合も多い。アレルギー性皮膚炎や喘息の症状軽減とそれに関与する IL-5 などのサイトカイン産生の抑制といった効果が報告されているユズ果皮には、免疫機能の調節作用が期待できる機能性成分が含まれており、ユズ果皮の摂取が食物アレルギーの予防やアナフィラキシーの抑制に効果がある可能性も考えられる。そこで、本研究においては、マウスに卵の主要なアレルゲンである卵白アルブミン（OVA）を摂取させて誘導する食物アレルギーモデルを作成し、ユズ果皮抽出物を経口摂取させることによる食物アレルギーの症状改善効果を検討した。
【方法】BALB/cAJcl マウスに OVA-Alum 免疫を 2 回行い、その 1 週間後から 5 回 OVA 50 mg を経口摂取させた。最後の OVA 投与から 1 週間後に OVA 100 mg を経口摂取させることにより Challenge を行った。全期間中ユズ果皮抽出物 10 mg を経口摂取させた群をユズ群、ユズ果皮抽出物を与えなかった群をコントロール群とした。免疫前、免疫後 1 週、2 週目、Challenge 後に採血を行った。採取した血清を用いて血中総 IgE 量、Mast Cell Protease （MCP）-1 量を ELISA 法により測定した。Challenge 後の体温測定と下痢症状の有無の判定を行った。
【結果】Challenge 時に、コントロール群では全身性アレルギー応答の指標となる体温低下が認められたのに対して、ユズ群では体温低下は認められなかった。総 IgE 量もコントロール群と比較してユズ群で低下する傾向が認められた。一方で、腸管でのアレルギー応答である下痢症状はコントロール群、ユズ群でともに認められた。消化管でのアレルギー応答に伴い腸管マスト細胞の脱顆粒により分泌される MCP-1 の血中濃度もコントロール群とユズ群で有意な差は認められなかった。以上の結果から、ユズ果皮抽出物の経口摂取は体温低下などのアナフィラキシーショック症状を緩和する可能性があることが考えられた。

food allergy, citrus junos(Yuzu), anaphylaxis

発表責任者：小林みさき（ma158110@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

発表番号：3E120
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ボイセンベリーポリフェノールによる脂質代謝調節を介した抗炎症作用

# Anti-inflammatory effect via lipid metabolism regulation by boysenberry polyphenols

○古内 亮[1]、斎藤 雅史[2]、前島 大輔[1]、横山 忠幸[1]、西田 浩志[2]([1]ブルボン・健康科学研、[2]新潟薬大・応用生命)
○Ryo Furuuchi[1], Masashi Saito[2], Daisuke Maejima[1], Tadayuki Yokoyama[1], Hiroshi Nishida[2] ([1]Bourbon, [2]NUPALS)

【背景】
近年、食生活の欧米化に伴いω-6 脂肪酸は摂取過多となっている。過剰なω-6 脂肪酸の摂取はアラキドン酸カスケードを介しエイコサノイドへ代謝され炎症促進的に働くことで、アテローム性動脈硬化症、喘息、関節炎など炎症が関わる疾病の一因となっていると考えられている。我々は、プロアントシアニジン、アントシアニンなどのポリフェノール類を豊富に含んだベリー類果実であるボイセンベリーに着目し研究を進めてきた。ポリフェノール成分の一部は炎症反応を抑制することが報告されているが、ボイセンベリーポリフェノールの抗炎症作用に関しては明らかにされていない。本研究では、ボイセンベリーに含まれるポリフェノール成分の抗炎症作用および関連した脂質代謝への影響について研究を行った。
【方法】
ボイセンベリー種子を破砕し 70%エタノール抽出した。抽出液を Amberlite XAD7HP カラムを用い精製しボイセンベリー種子ポリフェノール(BS)を得た。
試験 1：正常マウスの血中および組織中脂肪酸組成に対する影響を評価した。C57BL/6J マウス(雄性、11 週齢）に水（CT 群）および BS（100mg/kg/day、BS100 群）を 1 週間経口投与した。投与終了後、血漿および各種組織を得て GC-MS により脂肪酸組成を分析した。
試験 2：急性炎症誘導マウスへの抗炎症作用を評価した。C57BL/6J マウス(雄性、11 週齢)に BS(100、300mg/kg/day）を 10 日間経口投与した。10 日目に lipopolysaccharide (2.5 mg/kg, LPS)を腹腔内投与し急性炎症を惹起させた。炎症惹起 6 時間後に解剖を行い、各種組織を得た。ウェスタンブロット法により COX-2、TNF-α発現を解析した。
【結果・考察】
試験 1 ：血漿中脂肪酸組成のω-3、ω-6 系脂肪酸に変化が認められた。血漿中アラキドン酸（AA）濃度は CT 群に比較し BS100 群にて有意に低下した。また、心血管リスク因子指標である EPA/AA 比は 0.06 から 0.13 へ有意に改善した。
試験 2：LPS 誘導炎症モデルマウスにおいて BS を投与した群にて肺、腎臓、脳組織の COX-2 および TNF-α発現量が低下する傾向が認められた。
これらの結果は、BS が生体の脂質代謝を調節し炎症反応の抑制した可能性を示している。

Boysenberry, Anti-inflammatory, Arachidonic acid cascade

発表責任者：古内　亮（furuuchi-ryo@bourbon.co.jp）

発表番号：3E121
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

SIRT1 を増強するアンチエイジング乳酸菌の同定とその機能性検証
Screening for anti-aging lactic acid bacteria and elucidation of their functionalities.

○山口 大貴[1]、味志 美穂[2]、高田 洋樹[4]、片倉 喜範[1,2,3] ([1]九大院・シス生、[2]九大院・生資環、[3]九大院・農院、[4]江崎グリコ)
○Taiki Yamaguchi[1], Miho Ajishi[2], Hiroki Takata[4], Yosinori Katakura[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ., [4]Ezaki Glico, Co., Ltd.)

【目的】
長寿・抗老化因子として機能するサーチュインファミリータンパク質の哺乳類ホモログの一つ SIRT1 は、カロリー制限シグナルの下流シグナル分子として知られており、これまでに様々なモデル生物の組織において抗老化、延命機能を発揮することが明らかとなっている。本研究では、食品と生体との直接的な接点となる腸管において SIRT1 発現を増強する食品の機能性及び機能性発現の分子基盤を明らかにすることを目的とした。
【方法】
ヒト結腸ガン由来の細胞株 Caco-2 細胞をモデル細胞株として用い、SIRT1 プロモーター制御下で EGFP を発現するベクターを安定導入した組換え Caco-2 細胞を樹立した。食品としては、乳酸菌の加熱死菌体を用いた。樹立細胞株に乳酸菌加熱死菌体を 30 μg/mL の濃度で添加させた後 2 日間培養し、IN Cell Analyzer 1000 を用いて EGFP の蛍光強度を追跡した。その結果から、SIRT1 プロモーターを増強しうる乳酸菌を選択し、さらに Caco-2 細胞内の内在性 SIRT1 遺伝子発現に対する効果を、定量 RT-PCR 法を用いて評価した。また、β-カテニン依存的な増殖を示すヒト結腸腺癌細胞株 DLD-1 細胞に対する乳酸菌の効果を Cell Counting Kit-8 を用いて検証した。
【結果】
IN Cell Analyzer 1000 を用いたスクリーニングの結果から、*Bifidobaterium bifidum 2*、*Lactobacillus acidophilus 14* 及び *Lactobacillus gasseri 1355* が、SIRT1 活性を強く増強した。これら 3 種の乳酸菌は、Caco-2 細胞及び DLD-1 細胞における内在性 SIRT1 遺伝子発現も増強することが明らかとなり、これら 3 種の乳酸菌を SIRT1 増強乳酸菌として同定することができた。Caco-2 細胞及び DLD-1 細胞の増殖及びコロニー形成能に対する効果を検証したところ、*Lactobacillus acidophilus 14* に強い抑制効果が観察された。以上の結果から、*Lactobacillus acidophilus 14* は腸管細胞の SIRT1 の活性化を通じてガン抑制を実現しうるアンチエイジング乳酸菌として、機能しうることが明らかとなった。

SIRT1, anti-aging, lactic acid bacteria

発表責任者：山口大貴（ruroken_18_78@yahoo.co.jp）

発表番号：3E122
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 昆布の新規生理機能の開拓

# Exploitation of the novel physiological function of *Laminaria japonica* (kombu)

○白杉 一郎[1]、松井 隆史[1]、伝宝 啓史[1,2]、榊原 陽一[3]、水光 正仁[3] ([1]株式会社くらこん、[2]株式会社くらこんホールディングス、[3]宮崎大・農・応生科)
○Ichiro Shirasugi[1], Takashi Matsui[1], Keiji Dempo[1,2], Yoichi Sakakibara[3], Masahito Suiko[3] ([1]Kurakon Co., [2]Kurakon Foods Co., [3]Miyazaki Univ.)

【目的】昆布は褐藻類コンブ目 *Laminariales* に属する海藻の総称で日本の伝統的な食品の一つである。昆布は低カロリーでヘルシーな食品として昔からよく食べられてきており、日本人の長寿にも貢献していると言われている。これまでに昆布に含まれている多糖類が様々な生理活性を有することが報告されており、中でもフコイダンのがん細胞へのアポトーシス誘導作用や免疫賦活作用などの研究は非常に注目されている。また、その他の成分としてカロテノイド類のフコキサンチンも抗肥満作用や抗糖尿病効果を有していると報告されている。
本研究では、昆布の酸化ストレスに対する防御機能性と抗がん作用について着目した。酸化ストレスはがんや糖尿病、アルツハイマーなどの疾病の原因になると言われ、現代社会の大きな問題となっている。また、平均寿命が延び続けている日本は高齢社会となり、がんの死亡者数も増加している。
私たちは昆布にはまだ多くの未知の生理機能があると期待し、昆布抽出物が Keap 1-Nrf 2 システムを介して抗酸化酵素に与える影響と薬物代謝酵素に与える影響をそれぞれ調べた。

【方法・結果】酸化ストレスに対する防御機能性に関してはアンチオキシダント・レスポンス・エレメント (ARE)の転写活性をレポーターアッセイシステムで評価した。さらに ARE 配列を有するヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、NAD(P)H-デヒドロゲナーゼキノン 1 (NQO1)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST）の発現量の変化をウエスタンブロッティング法や RT-PCR 法を用いて検証した。
産地に関わらず昆布のエタノール抽出物は ARE ルシフェラーゼ活性を上昇させ、HO-1、NQO1、GST の発現を誘導した。
抗がん作用に関しては、肝臓内でシトクロム P450 (CYP)によって代謝されることによって発がん性を発揮するベンゾピレン (B[a]P)を用いて検証した。B[a]P の代謝に大きく関与する CYP1A1 の発現量に関してウエスタンブロッティング法を用いて検証したところ、昆布エタノール抽出物は濃度依存的に CYP1A1 の発現量を減少させた。
活性成分に関しては昆布エタノール抽出物を分画し、現在同定を試みている。
これらの結果より昆布は抗酸化酵素誘導作用と抗がん作用を有することが示唆された。

kombu, antioxidant, carcinogenesis

発表責任者：白杉一郎（ichiro.shirasugi@kurakon.co.jp）

発表番号：3E123
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# フェルラ酸エステルの Hsp70 発現誘導を介する神経細胞保護効果

# Neuroprotective Effect of Esterified Ferulic Acid via HSP70 Inducing Effect

○丹治 典子、片山 茂、三谷 塁一、真壁 秀文、中村 宗一郎 (信大院農)
○ Noriko TANJI, Shigeru KATAYAMA, Takakazu MITANI, Hidefumi MAKABE, Soichiro NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【背景・目的】現在，日本は高齢化社会を迎え，加齢による疾病のリスクを軽減するための対策が求められている。神経変性疾患は，酸化ストレス等によって形成されたタンパク質凝集体が神経細胞に沈着することで生じることが知られており，特に認知症の半数以上を占めるアルツハイマー病は社会的な問題となっている。生体内に存在する Heat Shock Protein(HSP)は分子シャペロンの一種であり，凝集体といった変性タンパク質形成阻害や分解促進を行うことから，神経変性疾患の治療・予防の標的として注目されている。天然中に存在するフェルラ酸(FA)は様々な機能性が既に報告されており，本研究室でも FA のエステル化による炭素鎖の導入が，アルツハイマー病原因タンパク質であるアミロイドβ(Aβ)の凝集阻害活性を向上させることを明らかにしている [1)]。そこで，本研究では，HSP70 発現誘導に着目し，FA エステルの神経細胞保護効果を検討した。
【方法】エステル化は二段階の工程を経て行った。第一に酸触媒による脱水縮合を利用して FA メチルエステル(FA1)を調製した。第二に FA1 と炭素鎖長の異なるアルキルアルコールを基質として，固定化リパーゼを用いて 60℃，24 時間静置し，様々な鎖長の炭素鎖 を導入した。得られた FA エステルは HPLC (カラム:Inertsil ODS-3，溶媒:45-100 % メタノールグラジエント)を用いて分離・精製した。さらに，NMR 法を用いて FA エステルの構造決定を実施した。FA エステルの HSP70 発現誘導作用についてはヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH およびマウス初代培養ニューロンを用いて，リアルタイム PCR 法で測定した。Aβオリゴマーの細胞毒性に対する FA エステルの保護効果を MTT アッセイで測定した。
【結果】 FA とアルキルアルコールの酵素反応により，C1，3，4，6，8 の炭素鎖を有する FA エステルが得られた。NMR スペクトルにより，FA ブチルエステル(FA4)の合成を確認した。得られた FA エステルを SK-N-SH に与え，リアルタイム PCR 法で HSP70 発現誘導効果を検討した結果，HSP70 発現量は FA への C4，6 の導入によっては増加することが示された。マウス初代培養ニューロンに FA4 を添加した際においても，HSP70 発現量が増加することを確認した。次に、FA エステルの神経細胞保護効果を検討した。Aβを添加すると SK-N-SH の細胞生存率が減少したが，FA4 の添加によって改善された。以上の結果から，最適な炭素鎖長の導入は，FA が有している HSP70 発現誘導能を介する細胞保護効果を向上させることが明らかとなった。

【参考文献】1) Kondo et. al. Biotechnology and Applied Biochemistry, 61, 401-407, 2014.

neuroprotective effect, Hsp70, ferulic acid

発表番号：3E124
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 老化促進マウス SAMP8 における緑茶品種「サンルージュ」の認知機能保護効果

# Feeding of green tea 'Sunrouge' suppresses cognitive decline in SAMP8 mice.

○和才 昌史[1,2]、村田 希[2]、野中 遥奈[2]、河岡 明義[1]、立花 宏文[2]([1]日本製紙（株）、[2]九大院・農院・生機科)
○MASAFUMI WASAI[1,2], MOTOKI MURATA[2], HARUNA NONAKA[2], AKIYOSHI KAWAOKA[1], HIROFUMI TACHIBANA[2] ([1]Nippon Paper Industries Co.Ltd., [2]Kyushu Univ.)

【目的】

緑茶の認知機能保護効果については、ヒト観察試験で緑茶の摂取量と認知機能低下リスクの軽減が関連していることや、アルツハイマートランスジェニックマウス試験でエピガロカテキンガレートが脳へのβ-アミロイドの蓄積を抑制することが報告されている。一方、「サンルージュ」は、抗疲労・抗ストレス効果が期待される機能性茶として育種され、2009 年に品種登録された新しい緑茶品種である。これまでに、「サンルージュ」は、「やぶきた」に代表される既存の緑茶品種群と比較して、茶葉に含有される成分の組成が異なることが報告され、サンルージュに特徴的な機能や作用メカニズムを持つ可能性が示されている。今回、サンルージュの認知機能保護効果について検証した。

【方法】

サンルージュ茶葉と、やぶきた茶葉について、エピガロカテキンガレートを同等量含有する熱水抽出物の凍結乾燥粉末を作製し、通常食（AIN-93M）にそれぞれ 0.2 %（w/w）となるように混合して試験食を作製した。19 週齢の雄性老化促進マウスを用い、通常食を摂取させた通常マウス群（SAMR1）、通常食を摂取させた老化促進マウス群（SAMP8）、サンルージュ試験食を摂取させた老化促進マウス群（SAMP8SR）、やぶきた試験食を摂取させた老化促進マウス群（SAMP8YB）に分けた。21 週間の摂食期間が終了した後に、新奇物体認識試験とモリス水迷路試験を実施して、各群の認知機能を評価した。

【結果】

新奇物体認識試験では、トレーニングから 18 時間経過後の記憶保持状態を評価した。その結果、SAMR1 群と SAMP8SR 群では、18 時間経過後も有意に記憶を保持していた。一方、SAMP8 群と SAMP8YB 群では、記憶を保持していなかった。モリス水迷路試験では、4 日間のトレーニング期間を設定し、5 日目に学習・空間認知機能を評価した。その結果、SAMP8 群は、SAMR1 群と比較して認知機能が有意に低下した。これに対し、SAMP8SR 群は、SAMP8 群と比較して、認知機能の低下が有意に抑制された。一方、SAMP8YB 群は、SAMP8 群と比較して、認知機能の低下は抑制されなかった。以上の結果から、「サンルージュ」が「やぶきた」と比較して、効果的に認知機能の低下を抑制することが確認され、本作用にサンルージュ特有の成分組成が関与していることが示唆された。

Sunrouge, SAMP8, cognitive decline

発表責任者：和才　昌史（m.wasai@nipponpapergroup.com）

発表番号：3E125
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大豆ペプチドに含まれる神経保護効果を有する機能性ペプチドの同定

# Identification of functional peptides with neuroprotective effect in soy peptides

○清水 綾乃[1]、片山 茂[1]、前渕 元宏[2]、三谷 塁一[3]、中村 宗一郎[1] ([1]信大農、[2]不二製油株式会社、[3]信州大. 先鋭領域融合研究群)
○Ayano SHIMIZU[1], Shigeru KATAYAMA[1], Motohiro MAEBUCHI[2], Takakazu MITANI[3], Soichiro NAKAMURA[1] ([1]Shinshu Univ., [2]Fujioil Co.,Ltd., [3]IBS-ICCER. Shinshu Univ.)

【背景と目的】超高齢化社会を迎えた日本では，認知機能の低下予防や認知症の発症予防への関心が年々高まっており，脳神経系の機能維持・向上に関する研究が進展している。本研究室ではこれまでに大豆ペプチドを老化促進モデルマウス SAMP8 に長期期間摂取させると空間認知記憶学習能力が改善されることを明らかにした[1)]。このとき大豆ペプチド摂取群では，脳由来神経栄養因子（BDNF；brain-derived neurotrophic factor）やニューロトロフィン-3（NT-3；neurotrophin-3）の発現増加が認められたことから，これらの因子が脳機能改善に貢献していることが示唆された。そこで本研究では，大豆ペプチドに含まれる神経栄養因子発現促進効果を有する機能性ペプチドの同定を行うとともに，これらの神経保護効果作用について検討した。
【方法】マウス胎児脳由来初代培養アストロサイトに不二製油株式会社より提供された大豆ペプチド（終濃度 0.1，0.5，1 mg/mL）を添加した。活性ペプチドの同定を目的として，大豆タンパク質 7S グロブリン及び 11S グロブリンのアミノ酸配列と，BDNF の高親和性受容体である TrkB（tropomyosin-related kinase B）に対するリガンドの活性部位配列の情報に基づき候補ペプチドを選定し，これらの合成ペプチド（終濃度 1，10，50 μM）をマウス胎児脳由来初代培養アストロサイトに添加した。培養 6 時間後，アストロサイトにおける神経栄養因子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。
【結果】大豆ペプチドを添加した初代培養アストロサイトにおいて，BDNF 遺伝子発現量が顕著に増加することを見出した。このとき神経成長因子（NGF；neuro growth factor）や NT-3 においても顕著な遺伝子発現量の増加が示された。BDNF リガンドの活性部位配列として，IKRG や SKKR といった塩基性アミノ酸を多く含むテトラペプチドが報告されている[2)]。そこで 7S グロブリン及び 11S グロブリンのアミノ酸配列を基に塩基性アミノ酸を含む候補ペプチドを選定し，BDNF 発現促進効果を検討した。その結果，数種類の候補ペプチドにおいて，濃度依存的に BDNF 発現量が増加することが明らかとなった。以上より，これらの候補ペプチドは TrkB のリガンドとして結合することにより BDNF 遺伝子の発現を誘導させることが示された。

1) Katayama et al, *J Agric Food Chem.* 2014, 62 (16), 3563-3569
2) Cardenas-Aguayo MdC, et al, *PLoS One* 2013, 8: e53596

soy peptide, neurotrophic factor, astrocyte

発表番号：3E126
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# トコトリエノールによる細胞老化の抑制作用

# Tocotrienol attenuates cellular senescence

○永塚 貴弘[1]、舘脇 直人[1]、西田 浩志[1]、仲川 清隆[2]、宮澤 陽夫[3]([1]新潟薬大・応用生命、[2]東北大院農・機能分子解析、[3]東北大・未来科学技術共同研究センター)
○Takahiro EITSUKA[1], Naoto TATEWAKI[1], Hiroshi NISHIDA[1], Kiyotaka NAKAGAWA[2], Teruo MIYAZAWA[3] ([1]Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [3]NICHe, Tohoku University)

【目的】正常細胞は一定の分裂回数の後に増殖を停止して老化に至る。細胞老化の機構は長い間不明であったが、テロメア短縮がその一因であることが明らかになった。染色体の末端構造であるテロメアは、DNA 複製の度に短縮する特徴をもつため、ある一定の長さ以下になると細胞は分裂を停止する。近年、酸化ストレスがテロメアの短小化を促進することが明らかになった。この知見から、酸化ストレスの軽減により細胞の分裂寿命を延ばすことができると考えられる。不飽和ビタミン E であるトコトリエノール（T3）は抗酸化、抗血管新生[1]、癌細胞増殖抑制[2]などの多様な生理作用を有し、トコフェロール（Toc）よりも高い生理活性を示すことがわかっている。本研究では、ビタミン E によるテロメア短縮抑制を介した細胞分裂寿命の延長効果を検証した。
【方法・結果】培地にα-T3 またはα-Toc（それぞれ 1μM）を添加してヒト皮膚線維芽細胞 NB1RGB の継代を繰り返し、細胞分裂回数（population doubling level, PDL）を計測した。NB1RGB は PDL58 で細胞分裂を停止したが、α-T3 処理により分裂寿命が延び、PDL66 で細胞老化に陥った。一方、α-Toc 処理では PDL61 で老化に至った。継代の際に DNA を抽出して、サザンブロットとリアルタイム PCR によってテロメア長を測定した。PDL の増加に伴ったテロメア長の短縮が認められたが、α-T3 はテロメア DNA の短小化をα-Toc よりも効果的に軽減した。老化細胞に発現する SA-β-Gal（senescence associated β-galactosidase）を検出した結果、α-T3 とα-Toc を処理した NB1RGB 細胞ではコントロールよりも発現レベルが低かった。老化マーカーとして知られている p53 と p21 に対する影響を調べたところ、α-T3 はこれらの老化マーカーの発現をα-Toc よりも抑制した。細胞老化とミトコンドリアの膜電位低下の関わりが示されていることから、JC-10 をプローブとして膜電位レベルを評価した。α-T3 とα-Toc を処理した細胞ではミトコンドリアの膜電位が高く維持されていた。以上より、α-T3 はα-Toc よりも効果的にテロメアの短小化を防止することで各種老化マーカーの発現が抑制され、細胞の分裂寿命を延長させることがわかった。

[1] T. Miyazawa et al., J. Nutr. Biochem., 20, 79-86 (2009)
[2] T. Eitsuka et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 348, 170-175 (2006)

tocotrienol, telomere, senescence

発表責任者：永塚貴弘（eitsuka@nupals.ac.jp）

発表番号：3E127
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# レスベラトロール 3-*O*-α-グルコシドの諸性質

# Properties of resveratrol 3-*O*-α-glucoside

○杉本 和久、三瓶 春代、鷹羽 武史、栗木 隆 (江崎グリコ(株)健康研)
○Kazuhisa SUGIMOTO, Haruyo SAMBE, Takeshi TAKAHA, Takashi KURIKI (Institute of Health Sciences, EZAKI GLICO CO., LTD.)

【目的】resveratrol は赤ワインやブドウの果皮等に含まれるポリフェノールの一種であり、サーチュイン遺伝子の活性化による抗加齢作用をはじめ、抗酸化作用、抗炎症作用、神経保護作用、脂質や糖の代謝関連作用などの多様な生理活性を有する素材として注目を集めている。一方で、resveratrol はその水への溶解度の低さや、褐変などの水溶液中での安定性の低さにより、食品や化粧品等への配合面で困難さがあり、活用の妨げとなっている。ポリフェノール類の水溶性や安定性を改良する手段のひとつとして配糖体化が知られている。resveratrol の配糖体としてはブドウ果皮等に含まれる piceid (resveratrol 3-*O*-β-glucoside) が良く知られているが、近年ウコギの一種 *Acanthopanax brachypus* の樹皮より α-グルコシドである resveratrol 3-*O*-α-glucoside(R3AG)が見出されている[1)]。今回我々はこの R3AG に着目し、resveratrol や他の resveratrol 配糖体と諸性質を比較し、その有用性を検討した。

【方法】*Streptococcus mutans* 由来 sucrose phosphorylase を用いた酵素合成により得た R3AG、市販の piceid および resveratrol を試料とした。水やアルコール類への溶解度は 25℃における各種溶媒中での飽和濃度を HPLC で定量し求めた。安定性評価は 30%(v/v)エタノール水溶液にそれぞれ 2mM となるよう溶解した試料溶液を 40℃で保存後、溶液の着色を 430nm の吸光度測定で確認すると共に溶液中の各成分含量を HPLC で分析し、残存率を求めた。また、抗酸化活性として DPPH ラジカル消去活性、SOD 様活性について評価した。

【結果・考察】R3AG、resveratrol、piceid の水への溶解度はそれぞれ 2.9、0.03、0.4 (mg/ml) であり、R3AG はレスベラトロールのみならず piceid との比較においても水溶性が大きく向上していた。この傾向はアルコール類に対しても同様であった。水溶液中の安定性は R3AG、piceid 共に resveratrol に対して向上しており、保存中の着色は大幅に抑制された。抗酸化活性については、DPPH ラジカル消去活性、SOD 様活性ともに resveratrol には及ばないながらも piceid とほぼ同等の活性を保持していた。以上の結果より、R3AG は高い溶解性と安定性を兼ね備えた resveratrol 配糖体であり、水系溶媒中での抗酸化成分として、或いは resveratrol の安定型プロドラッグとして、resveratrol 活用の幅を広げる有用な素材であると期待される。

1) Hu H and Fan J, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **30**, 703-706 (2009)

resveratrol 3-*O*-α-glucoside, resveratrol, antioxidation

発表責任者：杉本　和久（sugimoto-kazuhisa@glico.co.jp）

発表番号：3E128
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 光照射を用いた食品のヒドロキシラジカル消去能

# Scavenging capacities of foods against hydroxyl radical generated from UV photolysis of $H_2O_2$

○阿部 準、高橋 有志、西川 佳子、中里 孝史（日本食品分析センター）
○Jun ABE, Yushi TAKAHASHI, Keiko NISHIKAWA, Takahito NAKASATO (Japan Food Research Laboratories)

［目的］
スーパーオキシドやヒドロキシラジカル、過酸化水素は体内で生じる活性酸素として知られている。なかでも、ヒドロキシラジカルは最も酸化力が強く、体内の様々な物質を酸化させて多くの疾病の一因となると考えられている。また、人の体内にはヒドロキシラジカルを消去する抗酸化酵素が存在しないため、食品からヒドロキシラジカルに対する抗酸化物質を摂取する必要がある。そのため、食品のヒドロキシラジカル消去能を測定することが重要となる。ヒドロキシラジカル消去能の測定は、フェントン反応により生じたヒドロキシラジカルを ESR で測定する方法が一般的である。しかし、フェントン反応はキレート作用を持つ物質があると阻害されてしまうため、近年では光照射を用いたヒドロキシラジカル消去能の評価が行われている [1)]。そこで、我々は光照射によるヒドロキシラジカル消去能の評価法を用いて、飲料および食品を測定できるか検討した。
［方法］
過酸化水素に光を照射することでヒドロキシラジカルを発生させた。発生したラジカルはスピントラップ剤である DMPO で補足し ESR で測定した。ESR は日本電子製 Multi-Analyzer(MA10)、ランプは浜松ホトニクス製を用いた。試料は市販されている飲料および食品を用いた。ヒドロキシラジカル消去能は、標準物質としてマンニトールを用いて評価した。
［結果］
光照射の評価法により、多くの飲料および食品でヒドロキシラジカルの消去能を測定できた。しかし、お茶やベリーなどポリフェノール類が多く含まれる食品では、光照射によりヒドロキシラジカルと思われるピークが発生することが示唆された。そのため、これらの食品のヒドロキシラジカル評価法については検討中である。
1)Kameya H, et al., Food Chem., 145, 2014, 866-873

hydroxyl radical, UV, ESR

発表番号：3E129
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

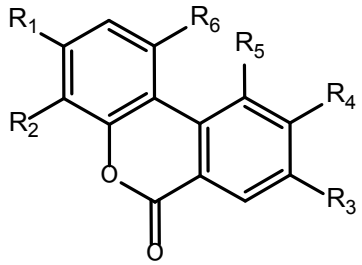
# ウロリチン誘導体の機能開拓に関する研究（第２報）－ヒト産生試験－

# Functionality of urolithin derivatives (Part 2) - the frequency of urolithin-producers -

○中島 賢則[1]、矢ヶ崎 秀雄[1]、山本 浩明[1]、伊東 秀之[2]([1]ダイセル・コーポレート研、[2]岡山県大・保健福祉)
○Takanori NAKAJIMA[1], Hideo YAGASAKI[1], Hiroaki YAMAMOTO[1], Hideyuki ITO[2] ([1]Daicel Co., [2]Okayama Pref. Univ.)

【背景・目的】

ザクロ、ベリー類にはエラジタンニンやその加水分解物であるエラグ酸が主要ポリフェノールとして含まれている。これらの生体利用性研究の一環として我々はエラジタンニンをラットに経口投与後、尿中から下図に示すポリフェノールである 7 種のウロリチン（URO）類（R1～R6 は-H, -OH, -OCH3 の数及び位置の組み合わせが異なる）を生体内代謝物として特定してきた。更に、代謝物の一つであるウロリチン A（URO-A）が元のエラジタンニンよりも強い抗酸化活性を有することも報告してきた。




このように URO 類がエラジタンニンの高活性代謝物であり、その有用性が示唆されてきたが、ヒトにおける URO 産生能に関する知見がなかった。本研究では、日常的な食生活においてエラグ酸から URO 類を産生できる URO 産生者の割合を調査すること及び主要な URO 代謝物を明らかにするために、健常人を対象とした摂取試験を行った。また、URO-A の更なる機能性の解明を目的として抗炎症作用に注目し、ヒアルロン酸分解抑制作用、ヒアルロン酸産生効果について検討した。

【方法・結果】

URO 産生者確認試験は、20 歳台から 70 歳台の健常人男性及び女性を被験者とした計 30 名を対象として、エラグ酸含有食品（エラグ酸として 160 mg/日）を 3 日間連続で摂取させ、摂取前及び摂取後 4 日目の尿中の URO 類濃度を分析することによって行った。その結果、URO-A が生体内において主要な代謝物であることが明らかとなり、全被験者中、約 55%が URO-A 産生者であり、約半数の被験者が URO-A を産生できる腸内細菌を保有していないことが示唆された。

URO-A の機能性としては、まずヒアルロニダーゼ阻害作用を評価した結果、濃度依存的な抑制活性が認められた。また、ヒアルロン酸産生効果を評価するために、ヒト正常皮膚線維芽細胞に URO-A を投与し、細胞より産生されるヒアルロン酸量を測定した結果、URO-A が強いヒアルロン酸産生促進作用を有することを明らかにした。同作用はエラグ酸よりも高い効果が認められた。これらのことから、URO-A が生体内において重要な代謝物であり、抗炎症作用を有する機能性ポリフェノールとして利用できる可能性が示された。

Urolithin, Polyphenol, Hyaluronic acid

発表責任者：中島賢則（tk_nakajima@jp.daicel.com）

発表番号：3E130
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

Effect of Oolong Tea Polyphenol on Low-Density Lipoprotein Oxidation *In Vitro*

○Enkhtsetseg Sukhbold, Shogo Sekimoto, Emiko Watanabe, Akane Yamazaki, Lifeng Yang, Hirofumi Arai (Kitami Institute of Technology)

**Introduction:** Oolong tea has been produced through semi-fermented process of *Camellia sinensis*. Many studies have suggested that intake of oolong tea confers beneficial effect to health, such as the prevention of cardiovascular diseases. Among them, the biological activities of oolong tea polyphenols have been attracted considerable attention in recent years. It has been suggested that low-density lipoprotein (LDL) oxidation by reactive oxygen species may play an important role in the onset of atherosclerosis. Oolong tea polyphenols such as oolonghomobisflavan A have the unique structures, which may contribute to reduce oxidative stress in human body. In present study, we evaluated antioxidant activity of oolonghomobisflavan A against LDL oxidation *in vitro*.

**Materials and Methods:** Radical scavenging activity of oolonghomobisflavan A in organic solvent was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method. LDL oxidation was induced by peroxyl radical-generating reagent (AAPH) or transition-metal ion ($Cu^{2+}$) in the presence of oolonghomobisflavan A. In the oxidation of LDL, polyunsaturated fatty acid residues of lipids and apolipoprotein B-100 (apoB-100) are major target molecules. As the indices of lipid peroxidation of oxidized LDL (oxLDL), cholesterol ester hydroperoxide (CE-OOH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured using HPLC. Protein carbonyl formation in oxLDL was analyzed by SDS-PAGE and western blotting.

**Results and Discussion:** DPPH radical scavenging activity of oolonghomobisflavan A was stronger than that of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. Oolonghomobisflavan A dose-dependently inhibited the formation of CE-OOH and TBARS in oxLDL mediated by AAPH and $Cu^{2+}$, respectively. In addition, oolonghomobisflavan A exhibited inhibitory effect on protein carbonyl formation in oxLDL. These results suggest that oolonghomobisflavan A can inhibit lipid peroxidation and oxidative modification of apoB-100 in oxLDL catalyzed by reactive oxygen species, which may reduce oxidative stress leading to atherosclerosis.

oolong tea, low-density lipoprotein, oxidation

発表責任者：Arai Hirofumi（araihrfm@mail.kitami-it.ac.jp）

発表番号：3E131
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# セサモールを用いたアフィニティークロマトグラフィーの作成
# Synthesis of sesamol immobilized affinity chromatography

○玉巻 沙季子、工藤 絵美、勝崎 裕隆（三重大院・生資）
○Sakiko TAMAMAKI, Emi KUDOU, Hirotaka KATSUZAKI (Mie Univ.)

【背景・目的】

ゴマ種子に含まれるリグナン類は、様々な生物機能を示すことで非常に注目されている。この生物機能に関連するタンパク質を網羅的に解析するためにリグナンをゲルやビーズに固定化し、それと相互作用するタンパク質を得ることを考えた。

相互作用分子の探索をアフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこととし、その構築を進めている。その際、オキシラン基で活性化させる方法を使用することとした。構築の前段階として、リグナンの部分構造であるセサモールで条件検討をすることにし、まずは反応性を確認することのみを目的とした。

【方法・結果】

原料のセサモール 100 mg（0.72 mmol）と 1,4-ビス-(-2,3-エポキシプロポキシ-)ブタン 200 μL（1.10 mmol）をアルカリ条件下で 16 時間、室温で反応させた。反応後、反応溶液を分取 HPLC にて精製した。分取後、NMR と質量分析により、目的とする生成物が含まれている画分（fr.3）を確認した。目的とする生成物の $^1$H-NMR においては、水酸基、エポキシ基が開環したときのメチレン基、および閉環したままのエポキシ基、この 3 つのシグナルの検出が特徴となる。fr.3 からは、これらの特徴が見られた。またその fr.3 を質量分析のポジティブモードで解析をおこなったところ、目的とする生成物の分子量（340）を示す 341 のイオンピークが検出された。また、この fr.3 の収量は 69.7 mg であり、その収率は 28.6% であった。しかし HPLC 分析結果から、目的の生成物である fr.3 が主生成物となっているため、反応性は高いと推測した。

次に、Sepharose 6B 1 g と 1,4-ビス-(-2,3-エポキシプロポキシ-)ブタン 1 mL（5.5 mmol）をアルカリ条件下で 8 時間、室温で反応させた。この反応で得られた Epoxy-activated Sepharose 6B とセサモール 100 mg（0.72 mmol）をアルカリ条件下で 16 時間、室温で反応させた。反応後、反応物を水と 0.1 M $NaHCO_3$ と 0.1 M $CH_3COOH$ で洗浄した。反応物を洗った水と反応液を HPLC で分析したところ、反応前と比べて原料であるセサモールが減っていたため、セサモールは Epoxy-activated Sepharose 6B に固定化されたと推測した。

sesamol, lignan, affinity chromatography

発表番号：3E132
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# マガキ由来抗酸化物質による抗酸化酵素群の遺伝子発現

# Gene expression of antioxidant enzymes by antioxidant from Pacific oyster

○布田 博敏[1]、上甲 紗愛[1]、渡邉 貢[2]、惠 淑萍[1]、武田 晴治[1]、渡邉 孝之[2]、千葉 仁志[1]([1]北海道大学大学院　保健科学研究院、[2]株式会社渡辺オイスター研究所)
○Hirotoshi FUDA[1], Sae Joko[1], Mitsugu Watanabe[2], Shu-Ping Hui[1], Seiji Takeda[1], Takayuki Watanabe[2], Hitoshi Chiba[1] ([1]Faculty of Health Sciences, Hokkaido University, [2]Watanabe Oyster Laboratory Co. Ltd.)

【背景と目的】抗酸化物質の抗酸化作用の検出及び作用機序の理解のためには、ORAC 法などのラジカル消去能試験に加えて、抗酸化系遺伝子群の誘導に関与する Keap1-Nrf2 経路活性化能試験を行う必要がある。本研究では、我々が見いだしたマガキ由来の抗酸化性ポリフェノール（3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl alcohol, DHMBA）の Keap1-Nrf2 経路活性化による抗酸化能について検討した。
【方法】DHMBA と既存の抗酸化物質（ガリック酸、クロロゲン酸、ローズマリー酸、スルフォラファン、イソリクイリチゲニン、クルクミン）を検討対象とした。Keap1-Nrf2 経路活性化能試験には、抗酸化剤応答配列（ARE）を有するプロモーターとレポーター遺伝子としてルシフェラーゼが配置されたベクターを用いる Reporter Gene Assay を行った。上記ベクターをトランスフェクトした培養ヒト肝細胞株（C3A）に、DHMBA あるいは既存の抗酸化物質を添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、ラジカル消去能試験として ORAC 法を実施した。
【結果】DHMBA、スルフォラファン、イソリクイリチゲニン、及びクルクミンは Keap1-Nrf2 経路を濃度依存的に活性化した。一方、クロロゲン酸、ガリック酸、ローズマリー酸は同経路を活性化しなかった。ラジカル消去能試験では、スルフォラファンの ORAC 値は測定限界以下であった。他の物質の ORAC 値では、特に、ローズマリー酸が高い活性を示した。DHMBA、イソリクイリチゲニン、及びクルクミンは Keap1-Nrf2 経路活性化能試験で活性を示し、ラジカル消去能も観察された。
【考察】抗酸化能試験として ORAC 法に代表されるラジカル消去能試験が広く用いられてきた。しかし、細胞を用いる抗酸化試験と ORAC 法の結果が乖離する例が多いことが知られるようになり、細胞内の抗酸化酵素を誘導する Keap1-Nrf2 経路に関心が集まっている。我々の別の研究において、ORAC 値では DHMBA よりも優れるクロロゲン酸と比較したところ、DHMBA は肝臓の株化細胞に対する抗酸化能で優れていた。この DHMBA の細胞レベルでの高い抗酸化能は、本研究で確認された Keap1-Nrf2 経路活性化能で説明できる。我々のこれまでの研究結果から、DHMBA はその両親媒性構造、ラジカル消去能、及び Keap1-Nrf2 経路により、肝細胞に対して強い抗酸化能を発揮すると考えられる。

antioxidant, Pacific oyster, Keap1-Nrf2

発表責任者：布田博敏（hfuda@hs.hokudai.ac.jp）

発表番号：3E133
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ゼブラフィッシュにおける酸化ストレス応答とヒスチジン含有ペプチドの抗酸化特性

# Oxidative Stress Response and Antioxidant Property of Histidine-containing Peptides in Zebrafish

○下岡 千尋[1]、大山 結香[1]、小川 智久[1]、村本 光二[1]、鈴木 徹[2]、数村 公子[3] ([1]東北大院生命、[2]東北大院農、[3]浜松ホトニクス中研)
○CHIHIRO SHIMOOKA[1], YUKA OYAMA[1], TOMOHISA OGAWA[1], KOJI MURAMOTO[1], TORU SUZUKI[2], KIMIKO KAZUMURA[3] ([1]Tohoku Univ. Life Sci., [2]Tohoku Univ. Agri., [3]Hamamatsu Photonics)

【背景・目的】ゼブラフィッシュ(*Danio rerio*)は，発生学や遺伝学など幅広い分野で用いられているモデル動物である。特長として，胚や稚魚が透明で観察が容易であること，ヒトの遺伝子と 70 %の相同性があり，循環器系やレドックス・シグナル伝達系などが類似していることが挙げられる。一方，活性酸素種(ROS)は，生体内において老化や動脈硬化，ガン発生の原因となることが知られている。当グループでの先行研究において，大豆タンパク質由来のヒスチジン含有ペプチドが抗酸化活性を持つことを明らかにした。本研究は，これまでに得られたヒスチジン含有ペプチドの知見を *in vivo* で検証することを目的とした。

【方法】ゼブラフィッシュの自然交配によりえた受精卵を回収し，胚培地 (NaCl, KCl, $Na_2HPO_4$, $KH_2PO_4$, $CaCl_2$, $MgSO_4$, $NaHCO_3$ を含む) に移した。受精後 3，5，7，9 時間後(hpf)の胚を 20 個で 1 グループとして，それぞれのグループを酸化ストレス発生剤 (2,2’-Azobis(2-methylpropinamidine)dichloride(AAPH) 25 mM, $CCl_4$ 飽和水溶液，パラコート 5 mM) を含む胚培地 1.5 mL 中で 5 時間，28°C で維持した。胚を 3 回洗浄して表面に付着した酸化ストレス発生剤を除いたのち，pH11 に調整した胚培地中でホモジナイズし，その上清を試料とした。蛍光・化学発光同時測定装置プレート型 CFL-P0000(浜松ホトニクス製)を用いて，luminol (4.8 mM)と Fluo-3 (2 μM)を含む溶液 (pH11) を試料液に滴下し，蛍光によりカルシウムイオンを，化学発光を用いて ROS を定量した。また，各酸化ストレス発生剤処理の 1 時間前に，ヒスチジン含有ペプチド(1, 5, 10 mM)を含む培地 1.5 mL でインキュベートした試料についてもカルシウムイオンと ROS 量を測定し，抗酸化特性を評価した。

【結果・考察】各酸化ストレス発生剤により，胚の ROS とカルシウムイオンが増加した。とくに 9 hpf 胚において，AAPH による酸化ストレス応答が顕著に増加した。また，ヒスチジン含有ペプチドと，比較対象に用いたグルタチオンの抗酸化活性を評価したところ，低濃度 (1 mM) ではカルシウムイオン量のみが減少し，5 mM 以上では ROS とカルシウムイオン共に減少がみられた。以上の結果から，酸化ストレス発生剤によりゼブラフィッシュ胚で ROS が生成するだけでなく，カルシウムイオンの流入がみられ，抗酸化ペプチドによってこれらの増加が抑えられることが示された。

Antioxidant, Peptide, Zebrafish

発表番号：3E134
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 鶴の子柿を原料とした柿酢の機能性

# Functionality of persimmon vinegar made from "TSURUNOKO-GAKI"

○上野 義栄[1]、植村 亮太[1]、高野 慶一[2]([1]京都府中小企業セ、[2]宇治田原むく福祉会)
○Yoshie Ueno[1], Ryota Uemura[1], Keiichi Takano[2] ([1]Kyoto Prefectural Technology Center for Small and Medium Enterprises, [2]Ujitawara Muku Welfare Association)

【目的】

京都府宇治田原町は古老柿として有名な干し柿の産地であり、毎年 11 月頃には古老柿の原料である「鶴の子柿」が実る。昨今、宇治田原町ではすべての鶴の子柿を古老柿に加工しきれずに一部は廃棄されていたが、地域資源を活かした新たな特産品の開発として宇治田原町が中心となり柿酢プロジェクトが発足し、2012 年から柿酢の製造販売を行っている。

柿には、抗酸化能を有する柿渋（タンニン）やβ-クリプトキサンチンが含まれている。渋柿である鶴の子柿は、特に柿渋が多いため、従来は天王柿と並んで柿渋原料に使用されていたこともあり、抗酸化能が高いと予想される。鶴の子柿を原料とした柿酢にも抗酸化能等の機能性成分が多く含まれていると予想されるため、これらの成分分析と抗酸化能等の測定を行い、柿酢の機能性について検討した。

【方法】

柿酢は、宇治田原町内で栽培された鶴の子柿を原料とし、宇治田原むく福祉会で製造された。柿酢のタンニンは、フォーリン・チオカルト法によりポリフェノール量として測定した。β-クリプトキサンチン及びアミノ酸は HPLC により測定した。抗酸化能は、トロロックスを標準試料とし、H-ORAC 法により測定した。

【結果】

１）柿酢のポリフェノール量は 90 mg/100ml であった。
２）柿酢にはβ-クリプトキサンチンは含まれていなかった。
３）柿酢に含まれるアミノ酸の中では血圧降下作用やストレス低減効果があると言われているγ-アミノ酪酸（GABA）の含有量が最も高く 19.4 mg/100ml であった。続いて甘味を呈するアラニンが 18.0 mg/100ml 含まれていた。
４）柿酢の H-ORAC 値は 860 μmol TE/100ml であった。




ORAC, persimmon vinegar, polyphenol

発表責任者：京都府中小企業技術センター　応用技術課　食品・バイオ担当（ouyou@pref.kyoto.lg.jp）

発表番号：3E135
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# β2 アドレナリン受容体の発現を制御し筋萎縮を予防する食品成分の探索

# Screening food components that regulate ß2 adrenergic receptor expression and prevent skeletal muscle atrophy.

○近澤 未歩、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大農）
○Miho CHIKAZAWA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

【背景・目的】

骨格筋機能の維持は日常生活を送る上で必要不可欠である。加齢に伴う筋量や筋力の低下を主な特徴とするサルコペニアは、高齢者の転倒や寝たきりの原因となること、QOL の低下につながることなどから、そのメカニズムの理解や対策の立案が急がれる。G タンパク質共役受容体（GPCR）は 7 回膜貫通構造を持ち、細胞内で G タンパク質と共役することを特徴とする受容体ファミリーである。骨格筋における GPCR シグナルの活性化は、筋増強や筋機能改善に有用であることがこれまでに多数報告されており、筋疾患の治療や予防における標的として着目される。

サルコペニア患者の増加を防ぐための方策として、低濃度・長期間摂取することにより効果を発揮する機能性食品の開発が有効であると考えられる。GPCR アゴニストによる筋機能改善効果については多く報告されているが、副作用も指摘されることから、骨格筋における GPCR の発現を亢進するような食品成分を明らかにし、作用機構解析を行うことでその有用性を明らかにすることを本研究の目的とした。今回、骨格筋における筋増強・筋機能改善効果が多数報告されている β2 アドレナリン受容体（β2AR）に着目し、検討を行った。

【方法・結果】

まず、β2AR 発現を亢進させる食品成分のスクリーニングを行った。β2AR 上流のプロモーター領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミドを、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞にトランスフェクションした。350 種類の食品成分を 100μM 投与し、24 時間後、レポーターアッセイにて食品成分による蛍光増大を評価した。その結果、複数の食品成分において、β2AR プロモーター活性が亢進することが明らかになった。次に、活性が見られた食品成分について、C2C12 細胞に食品成分を 100μM, 24 時間投与後、Real Time PCR により β2AR の mRNA レベルを評価したところ、食品成分投与群において β2AR の mRNA の増大が確認された。中でも、スチルベノイドポリフェノールの一種である Resveratrol 投与により、β2AR の mRNA が 3 倍程度に上昇することが明らかとなった。また、Resveratrol をより低濃度で投与した際の作用についても検証したところ、10μM, 24 時間投与によってもプロモーター活性の亢進、mRNA レベルの上昇が起こることを確認した。現在、発現制御機構の解析を進めている。

GPCR, ß2 adrenergic receptor, Resveratrol

発表責任者：近澤未歩（un_clou_violet@hotmail.co.jp）

発表番号：3E136
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵乳ケフィアの抗酸化活性と筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす効果

# Antioxidative activity of Kefir and effects on energy metabolism in skeletal muscle cells

○松元 拓也[1]、原田 大輔[2]、徳丸 浩一郎[3]、白畑 實隆[1,2,4]、照屋 輝一郎[1,2,4]（[1]九大院シス生、[2]九大院生資環、[3]日本ケフィア、[4]九大院農院）
○ Takuya MATSUMOTO[1], Daisuke Harada[2], Koichiro Tokumaru[3], Sanetaka Shirahata[1,2,4], Kiichiro Teruya[1,2,4] ([1]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ, [3]Nihon Kefir Co. Ltd, [4]Fac. Agr., Kyushu Univ)

【目的】
メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積などにより脂質代謝異常などの動脈硬化の危険因子が一個人に重積している状態である。当研究室では、発酵乳ケフィアのメタボリックシンドロームに対する有用性を研究してきた。本研究では、NKG ケフィアおよび他の抗酸化機能が期待される食品サンプルの抗酸化力および筋肉細胞のエネルギー代謝に及ぼす影響を検討し、NKG ケフィアのメタボリックシンドロームの予防・改善効果を検討することを目的とした。

【方法】
ケフィア標品は、日本ケフィア株式会社から提供された粉末ケフィア（NKG ケフィア）を使用した。DPPH ラジカル消去活性試験を行うことで NKG ケフィア等サンプルの抗酸化能を評価した。また、分化処理誘導を行ったマウス C2C12 筋管細胞に NKG ケフィア等サンプル処理を行った。48 時間処理後、WST-1/1-Methoxy PMS 溶液を添加した培地に交換し、WST-1 発色後、マイクロプレートリーダーにて波長 450 nm の吸光度を測定し細胞の呼吸活性を評価した。また細胞を 10%ホルマリンで固定後 Hoechst 33342 染色により細胞数を測定することで、細胞当たりの呼吸活性の評価を行った。

【結果・考察】
DPPH ラジカル消去活性試験の結果から、NKG ケフィアや他のサンプルが抗酸化活性を有することが確認された。また、WST-1 アッセイと Hoechst 33342 染色の結果から、筋肉細胞 1 個当たりのエネルギー代謝を亢進させる活性が確認され、特に高タンパク質ケフィア（NKG ケフィア HPT)において活性が高いことが確認された。以上のことから、NKG ケフィアが筋肉細胞のエネルギー代謝亢進を介したメタボリックシンドロームの予防・改善効果を有することが期待された。

Kefir, skeletal muscle, energy metabolism

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3E137
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# リポソームを用いた抗酸化能評価と抗酸化物の Median effect analysis による併用効果解析

# Estimation of the activity of some antioxidants with liposome and median effect analysis of their combination effects

○山内 良子、世古 なぎ、圓口 睦子、小林 弘司、石川 洋哉（福岡女子大　国際文理）
○Ryoko Yamauchi, Nagi Seko, Mutuko Enguchi, Hiroshi Kobayashi, Hiroya Ishikawa (Fukuoka Women's University)

【目的】本研究では、生体膜モデルとして利用されているリポソームに対する抗酸化能評価を目的として、リポソーム膜内外に局在する抗酸化物の活性評価を試みた。さらに、抗酸化物 2 成分がリポソーム膜外に局在した場合、およびリポソームの膜内外それぞれに局在した場合の併用効果（相乗・相加・相殺効果）を、薬剤の併用効果解析に汎用されている Median effect analysis を用いて詳細に解析した。
【方法】リポソームの作製には卵黄由来ホスファチジルコリン（PC）を用いた。PC を $CHCl_3$-MeOH に溶解後、窒素ガスで溶媒を留去し薄膜を形成させた後、0.01 M Tris-HCl buffer を添加し再溶解させた。続いて、ポリカーボネート膜（孔径 100 nm）を通過させることにより、均一なリポソームを調製した。なお、抗酸化物を膜内に局在化させる際は、薄膜形成前に抗酸化物を事前に添加した。抗酸化能測定は、リポソーム溶液に AAPH を添加し 3 時間反応させ、過酸化物量を TBA 法により測定した。測定結果から $IC_{50}$ 値、トロロックス等価活性（TEAC, μmol TE/ μmol）を算出した。さらに、抗酸化物単独・併用時の抗酸化能発現挙動をもとに、Median effect analysis による併用効果解析を行った。
【結果】ポリフェノール類を中心とした 21 種類の抗酸化物を用いて、リポソーム膜内外における抗酸化能をそれぞれ評価した。リポソーム膜内外の TEAC 値は、エピカテキン（3.51, 6.35）やカフェ酸（3.06, 4.09）など、分子内にカテコール構造を有する化合物でいずれの場合も高い活性を示した。フラボノール類では、リポソーム膜外での TEAC 値がケルセチン（7.79）>ミリセチン（2.69）>ケンフェロール（2.11）、リポソーム膜内では、ケルセチン（5.57）>ミリセチン（1.93）>ケンフェロール（1.41）の活性傾向が認められた。続いて、抗酸化物の併用効果解析を検討した。当研究室では、これまでにラジカル反応系、脂質過酸化反応系（リノール酸エマルジョン系）においてチオール類と各種抗酸化物の併用効果を検討してきた。本研究においても、まずグルタチオンと各種抗酸化物の併用効果解析を検討した。リポソーム膜外でのグルタチオン（GSH）とフラボノール類（ケンフェロール，ケルセチン，ミリセチン）の併用時には、いずれも相乗効果が認められたが、その効果はケンフェロール≈ミリセチン＞ケルセチンとなった。また、リポソーム膜内にフラボノールを、膜外に GSH を局在化させた場合、ケンフェロールとミリセチンでは相乗効果が認められたが、ケルセチンの場合には相加効果しか得られなかった。この結果、抗酸化能に大きく寄与するカテコール構造は、相乗効果発現の大きな要因とはならないこと、すなわち個々の抗酸化物の活性傾向と、チオール化合物との相乗効果発現傾向が一致しないことが示唆された。

Antioxidant, Lipid Peroxidation, Combination Effects

発表責任者：石川洋哉（ishikawa@fwu.ac.jp）

発表番号：3E138
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# カルノシンによるアンチエイジングシグナル活性化効果

# Carnosine activates the anti-aging signaling cascades.

○久保 智里[1]、藤井 薫[2]、松本 貴之[3]、片倉 喜範[4] ([1]九大院・生資環、[2]九大院・シス生、[3]日本ハム中央研究所、[4]九大院・農院)
○Chisato Kubo[1], Kaoru Fujii[2], Takashi Matsumoto[3], Yoshinori Katakura[4] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., [3]R&D Center, NH Foods, Ltd., [4]Fac. agric., Kyushu Univ.)

[目的] 我々はこれまでに、イミダゾールジペプチドの一種であるカルノシンが、腸管上皮細胞において転写共役因子 PGC-1α の活性化を通じてミトコンドリアの新生を亢進させることを明らかにしている。そこで本研究では、カルノシンが PGC-1α の活性化に至るまでの分子機構を明らかにするため、PGC-1α の直接的な制御因子である AMPK および SIRT1 に着目した。これらは近年アンチエイジング因子として注目されていることから、本研究はカルノシンがアンチエイジング活性を有する食品として機能する可能性に迫るものであるといえる。
[方法] 本研究においては、ヒト腸管上皮細胞のモデルとしてヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。カルノシンを添加した Caco-2 細胞内の $Ca^{2+}$動態については、Calcium Kit-Fluo4 および IN Cell Analyzer 1000 を用いて追跡を行った。$Ca^{2+}$カスケードにより活性化される AMPK のリン酸化レベルは、リン酸化型 AMPK 特異抗体を用いた免疫染色法により評価した。AMPK の制御下にある SIRT1 については qRT-PCR を用いて mRNA 発現量を追跡するとともに、その補因子 $NAD^+$量に関しては $NAD^+$/NADH Quantification Colorimetric Kit および蛍光プレートリーダーを用いて測定した。
[結果] 蛍光試薬 Fluo4-AM を用いて細胞内 $Ca^{2+}$をモニタリングした結果、カルノシンは Caco-2 細胞内の $Ca^{2+}$濃度を増加させることが明らかとなった。免疫染色法の結果から、カルノシンは AMPK のリン酸化を促進する傾向が認められた。一方 SIRT1 の mRNA 発現量に関しては、カルノシンの添加濃度によって異なる結果が得られたのに対し、SIRT1 の脱アセチル化活性を制御する $NAD^+$については濃度依存的に増加する傾向がみられた。以上のことから、カルノシンは腸管上皮細胞に作用して細胞内の $Ca^{2+}$量を増加させることで AMPK を活性化し、これにより細胞内 $NAD^+$レベルが上昇して SIRT1 の脱アセチル化酵素としての活性が促進されるものと考えられた。

Carnosine, AMPK, SIRT1

発表責任者：久保智里（chisato716@gmail.com）

発表番号：3E139
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# SIRT6 活性化食品の探索とその機能性解明

# Screening for SIRT6-activating foods and elucidation of their functionalities.

○松岡 沙季[1]、藤田 幸佑[1]、西田 典永[3]、長友 暁史[3]、田中 幸雅[3]、伊東 秀之[4]、片倉 喜範[1,2]（[1]九大院・生資環、[2]九大院・農院、[3]森下仁丹、[4]岡山県大保福）
○Saki MATSUOKA[1], Kousuke FUJITA[1], Norihisa NISHIDA[3], Akifumi NAGATOMO[3], Yukimasa TANAKA[3], Hideyuki ITO[4], Yoshinori KATAKURA[1,2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Agric., Kyushu Univ., [3]Morishita Jintan Co., Ltd., [4]Department of Nutritional Science Faculty of Health and Welfare Science Okayama Prefectural University)

【目的】

カロリー制限を行うと生体内ではサーチュイン遺伝子が活性化され、これが老化の抑制や寿命の延長に大きく関与しているとして注目を集めている。ヒトを含む哺乳類には SIRT1～SIRT7 のサーチュインファミリーが存在しており、その中でも SIRT6 においては唯一寿命延長効果が認められている。SIRT6 は DNA 損傷修復に寄与しているとの報告もあり、近年その機能への関心が高まっている。

そこで本研究では、SIRT6 を活性化する食品の探索とその機能性を評価することを目的とし、腸管上皮のモデルであるヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を用いて、SIRT6 活性化食品のスクリーニングシステムを開発するとともに、機能性食品成分の探索・同定を行い、それらの機能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

ヒト SIRT6 遺伝子のプロモーター領域を EGFP 発現ベクター中の CMV プロモーターと置換したレポーターベクター pSIRT6p-EGFP を作製し、これを Caco-2 細胞に導入することで、Caco-2(SIRT6p-EGFP)細胞を樹立した。この細胞に、18 種類のポリフェノールを添加して培養した後、イメージングサイトメーターにより EGFP 蛍光強度を定量化することで 1 次スクリーニングを行った。活性の高かった食品成分については、定量 real-time PCR 法によって内在性 SIRT6 の発現量に対する効果を検証した。さらに、同定した SIRT6 活性化食品の DNA 損傷修復促進効果を検証した。

【結果と考察】

1 次スクリーニングの結果、5 種類のポリフェノールを SIRT6 活性化食品として同定した。これらの食品成分について、定量 real-time PCR 法により内在性 SIRT6 発現に対する効果を検証したところ、ポリフェノール 2 種類（Fisetin, Oenothein B）で内在性 SIRT6 増強効果が認められた。そこで 2 種類のポリフェノールについて、Caco-2 細胞における DNA 損傷修復促進効果を、γH2AX を指標に検証した結果、いずれのポリフェノールも、二本鎖 DNA 切断の修復を促進する効果があることが明らかになった。

以上の結果から、この 2 種類のポリフェノールが SIRT6 の活性化を通じ DNA 損傷修復を促進することで、生体の老化抑制を実現するものと予想された。

SIRT6, pomegranate-derived polyphenol, DNA damage repair

発表責任者：松岡沙季（sack.y.ou.now@gmail.com）

発表番号：3E140
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# オートファジー誘導食品の探索とその機能性

# Screening for autophagy-inducing foods

○小野 友愛[1]、西田 典永[2]、長友 暁史[2]、田中 幸雅[2]、伊東 秀之[3]、片倉 喜範[4]（[1]九大院シス生、[2]森下仁丹株式会社、[3]岡山県大保福、[4]九大院農院）
○Tomomi ONO[1], Norihisa NISHIDA[2], Akifumi NAGATOMO[2], Yukimasa TANAKA[2], Hideyuki ITO[3], Yoshinori KATAKURA[4] ([1]Grad. Sch. Sys. Life. Sci., Kyushu Univ., [2]Morishita Jintan Co.,Ltd., [3]Grad. Sch. Health. Welfare Sci., Okayama Prefectural Univ., [4]Dept. Biosci. Biotech., Fac Agr., Kyushu Univ.)

【背景・目的】

オートファジーとは、細胞の自食作用によりタンパク質などの細胞内成分を非選択的に分解する機構である。このオートファジーは栄養飢餓応答だけでなく、細胞死やガン、老化など様々な病態に関係することが報告されている。最近になり、カロリー制限がマウスの寿命を延長するとともに、オートファジーを誘導し、その結果、腎臓老化を抑制することが報告されるなど、寿命延長とオートファジーの関係に注目が集まっている。しかしながら、カロリー制限を長期的に行うことは負担が大きいため、カロリー制限をせずに食品を摂取することでオートファジーを誘導し、アンチエイジングを実現することが重要であると考えられた。そこで、本研究では LC3 をマーカーとしてオートファジーを活性化する食品成分の探索とその機能性を評価することを目的とした。

【方法】

腸管上皮のモデルであるヒト結腸ガン由来 Caco-2 細胞に、マウス LC3 と緑色蛍光タンパク質(AcGFP1)との融合タンパク質発現ベクターを導入し、安定発現株（Caco-2(mLC3-AcGFP1)）を得た。この細胞を用いることで、mLC3-AcGFP1 がオートファゴソームへ点在して分布することをモニターし、オートファジー誘導活性を、オートファゴソームの数の増大として捉えることが可能となった。この Caco-2(mLC3-AcGFP1)細胞に、果実ポリフェノール 19 種類及び食肉成分 18 種類を添加して 48 時間培養した後、AcGFP の蛍光強度変化をフローサイトメトリーにより追跡し、オートファジー活性化食品成分のスクリーニングを行った。さらに、同定したオートファジー活性化食品成分の腸管に対する機能性を検証した。

【結果と考察】

各種食品成分のスクリーニングを行った結果、オートファジー活性化食品成分として、ポリフェノール 4 種（Resveratrol, Fisetin, Urolithin A, Oenothein B）を選定することができた。つまり、これらポリフェノールが腸管細胞においてオートファジーを誘導しうるものと考えることができた。次にこれらの成分について、内在性 LC3 を指標にオートファジー誘導活性を評価した。その結果、ザクロ由来ポリフェノールである Oenothein B に LC3-II 量の増強効果が認められた。以上の結果から、Oenothein B がオートファジー誘導食品成分として有望であると考えられた。現在、Oenothein B の機能性についての解析を進めている。

Autophagy, Oenothein B, pomegranate

発表責任者：小野友愛（tomomi.eg.0610@gmail.com）

発表番号：3E141
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米麹（糀）の抗酸化活性と関連する機能性化合物の探索

# Screening of functional compounds related to the antioxidant activity of koji

○中島 加奈子[1]、山﨑 京子[2]、木戸 みゆ紀[3]、林 真由美[3]、野村 一樹[3]、井口 晃徳[3]、重松 亨[3]（[1]新潟薬大・産官学、[2]山﨑糀屋、[3]新潟薬大・応生科）
○ Kanako NAKAJIMA[1], Kyoko YAMAZAKI[2], Miyuki KIDO[3], Mayumi HAYASHI[3], Kazuki NOMURA[3], Akinori IGUCHI[3], Toru SHIGEMATU[3] ([1]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci. LCRDP, [2]Yamazaki koujiya, [3]Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】　米麹（糀、*Aspergillus oryzae*）は炊飯米に麹菌を撒き発酵させた食品で、昔から味噌や醤油・酒などの発酵食品の製造に用いられている。糀を利用して製造された発酵食品の生理活性として血圧上昇抑制効果や中性脂肪低減効果などの報告があり、多くは糀由来の酵素や発酵によって生成された成分によるものである。しかし、糀そのものの生理活性についての報告例は少ない。我々は、糀の生理活性に関与する科学的検討の一つとして、糀に含まれる水溶性成分が抗酸化活性を示すことを報告した（1)。本研究では、抗酸化活性を担う機能性化合物の探索を目的とし、HPLC-UV/VIS ならびに質量分析器を用いて糀の水溶性成分に含まれる化合物を分離・同定した。
【方法・結果】　糀（山﨑糀屋「生黄糀」以下黄糀）を凍結乾燥・粉末化し、4℃、60 min の条件で水溶性成分を抽出し、HPLC-UV/VIS を用いて測定波長 280 nm にて分析を行った。まず、逆相カラムを用い、0.1％ギ酸水溶液と 100％アセトニトリルを移動相としてグラジエント溶離を行ったところ、白米粉末から抽出した水溶性成分ではピークは検出されなかった。しかし、黄糀の水溶性成分では、短い保持時間に重なったピークが約 7 本認められた。この結果から、逆相カラムでは分離が不十分であると考え、順相カラムを用いた分離・分析に切り替えた。順相カラムを用い、0.1％ギ酸水溶液と 100％アセトニトリルを移動相としてグラジエント溶離を行ったところ、黄糀の水溶性成分において、保持時間 3～25 min にかけて良好に分離されたピークが 11 本検出された。比較対照として、他社製米麹の水溶性画分を分析したところ、10 本のピークが検出され、全てのピークの保持時間が黄糀水溶性成分の保持時間と一致していた。これらのピークは、清酒の生酒試料を分析した場合にも検出された。つまり、この結果から米麹（糀）およびその発酵食品である清酒に共通した化合物の存在を示唆した。黄糀と他社製米麹で共通するピーク面積はそれぞれ異なることが示され、糀による化合物の構成比および相対的な含有量が異なることが示された。また、黄糀水溶性成分に認められた保持時間 7 min のピークは、黄糀に特異的な成分であると示唆された。また、検出されたピークをフラクションコレクターにて分取し、それぞれの画分に含まれる化合物の同定を質量分析器を用いて試みた。黄糀および他社製米麹に共通する保持時間 4 min のピークを含む画分から、141 m/z[M-H]の分子イオン、123、113、97 m/z[M-H]のフラグメントイオンが検出された。この結果から、このピークには kojic acid が含まれることが示唆された。現在、検出された他の共通ピークおよび黄糀に特異的なピークに存在する化合物の同定を進めている。(1) 2015 年度農芸化学会岡山大会

koji, antioxidant activity

発表番号：3E142
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 賀茂茄子のポリフェノール抽出量増加手法の検討

# A Study of Heating Method for Increasing the amount of Polyphenol Extracted from Kamo Eggplants

○内田 健太郎[1]、冨田 晴雄[1]、礒野 浩太[2]、城田 浩治[2]、三村 裕[2]、竹森 利和[1]([1]大阪ガス株式会社、[2]京都府農林水産技術センター)
○Kentaro UCHIDA[1], Haruo TOMITA[1], Kota ISONO[2], Koji SHIROTA[2], Yutaka MIMURA[2], Toshikazu TAKEMORI[1] ([1]Osaka Gas Co., Ltd., [2]Kyoto Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Technology Center)

【背景・目的】市販の千両茄子をガスグリルで加熱調理する際、茄子内部の総ポリフェノール量の変化がおきており、サンプルの中心温度 75 ℃までは調理過程の中でポリフェノール量の減少がおき、中心温度 95 ℃まで調理することで増加が起きることが確認されている[1]。本研究では、京都府の伝統野菜、賀茂茄子を使用し、調理中の減少について酸化酵素によるポリフェノールの酸化、増加について加熱による細胞壁の破壊を起因とする抽出量の増加という仮説[1]より、それらを阻害・増幅する要素を調理過程に含めることで、調理後の茄子よりポリフェノールの抽出量を増加させる手法を構築することを目的としている。
【実験手法】京都府農林水産技術センターより提供された 2015 年 9 月から 11 月までに収穫された賀茂茄子を使用し、茄子田楽を模擬したグリル加熱調理を行った。賀茂茄子の幅が直径 8 cm となる部分より高さ 2 cm を、皮を含め円柱型に切り取り調理サンプルとした。酸化酵素によるポリフェノールの減少を阻害するため、茄子切断面にみりんを塗布したサンプル（みりん塗布サンプル）と、塗布しないサンプル（塗布なしサンプル）についてガスグリルの弱加熱で加熱し、中心温度 65 ℃を終了条件として調理を行った。調理後のサンプルは、凍結乾燥により水分除去を行い、乾燥後にミルサーで 1 分間粉砕した。乾燥粉末 0.10 g を使用し 80 %エタノール溶液で抽出を行い、総ポリフェノール量(TPC)を測定した。また、加熱調理時間の影響を確認するためグリル加熱による調理時間 13 分、14 分のみりん塗布サンプルをそれぞれ用意し、同様の前処理の後に TPC を測定した。
【結果・考察】[1]において TPC の減少が見られた中心温度 65 ℃を終了条件とする塗布なしサンプルとみりん塗布サンプルを用意し、生サンプルと比較する TPC 維持率を求めた。塗布なしのサンプルでは維持率が 81.79 %、みりん塗布サンプルでは維持率が 91.37 %となった。一方で、弱加熱で 14 分加熱したものについては、塗布なしサンプルで、109.5 %、みりん塗布サンプルで 126.0 %となった。これらの結果により、茄子切断表面の pH もしくは、酸素と触れる表面積を少なくすることが調理中の TPC の減少を抑制する可能性が示唆された。加熱時間と抽出量の関係を確認するため、みりん塗布サンプルでは 13 分加熱したものも同様に比較した。13 分加熱したものでは、109.2 %のポリフェノール維持率が見られた。この結果を、14 分加熱したみりん塗布サンプルと比較することで加熱時間の増加により抽出量増加がみられることが示唆された。
【参考文献】[1]内田ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 大会講演要旨集, P585

antioxidant capacity, polyphenol, eggplant

発表責任者：内田　健太郎（ke-uchida@osakagas.co.jp）

発表番号：3E143
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# カシス水溶性抽出物の紫外線ダメージ抑制効果の検討

# Protective effects of blackcurrant extract against UV-induced damage in human keratinocytes cell.

寺下 美穂[1]、加藤 陽治[2]、○山本 歩[1] ([1]八戸工業高等専門学校、[2]弘前大教育)
Miho TERASHITA[1], Yoji KATO[2], ○Ayumi YAMAMOTO[1] ([1]NIT, Hachinohe College, [2]Hirosaki Univ.)

【目的】

著者らはこれまでに出芽酵母やヒトリンパ芽球由来培養細胞を用いて、カシス水溶性抽出物が過酸化水素処理（$H_2O_2$）による DNA 酸化損傷やメチルメタンスルホン酸処理（MMS）によるアルキル化損傷を軽減することを報告してきた。そこで、本研究では正常ヒト表皮角化細胞（NHEK 細胞）を用いたカシス水溶性抽出物の紫外線（UV）損傷抑制効果やチロシナーゼ活性阻害作用（*in vitro*）の解析を試み、薬用化粧品としての可能性を検討した。

【方法】

カシス水溶性抽出物（BCE）を NHEK 細胞に処理後（37℃、24 時間処理）、UV 照射し（0～150 J/m$^2$）、照射後 24 時間での生存率を確認した。また、紫外線誘発 DNA 損傷（シクロブタンピリミジンダイマー：CPD）を抗 CPD 抗体を用いた ELISA 法により測定した（UV 照射線量：35 J/m$^2$）。チロシナーゼ活性阻害作用はマッシュルーム由来チロシナーゼを用いた *in vitro* 試験で測定した。

【結果・考察】

BCE の UV 照射前処理により、UV 照射によって生じる生存率が優位に軽減された。また、UV 未照射細胞では BCE 処理により生存率の増加が確認された。CPD の検出では UV 照射によって生じる CPD が BCE の UV 照射前処理により大きく抑制（約 50%程度）されることが示された。また、*in vitro* チロシナーゼ活性阻害作用試験では BCE がチロシナーゼ活性阻害作用を有していることが確認された。

以上の結果より、BCE は UV 損傷に対する防護効果を有していること、チロシナーゼ活性阻害作用による美白効果を有している可能性があることが明らかとなった。これは BCE に含まれるアントシアニンなどのポリフェノールによる紫外線吸収作用などが関与している可能性が考えらえる。本研究結果より、BCE の薬用化粧品素材としての有用性が示唆された。

Blackcurrant, DNA damage, UV

発表責任者：山本歩（yamamoto-c@hachinohe-ct.ac.jp）

発表番号：3E144
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 低濃度白金ナノ粒子による細胞内抗酸化活性化機構の解明

# Analysis of intracellular antioxidant activity by low-concentration platinum nanoparticles

○石井 ふらの[1]、濱崎 武記[3]、樺山 繁[4]、照屋 輝一郎[1,2,3]、白畑 實隆[1,2,3]（[1]九大院生資環、[2]九大院シス生、[3]九大院農院、[4]日本トリム）
○Furano ISHII[1], Takeki HAMASAKI[3], Shigeru KABAYAMA[4], Kiichiro Teruya[1,2,3], Sanetaka SHIRAHATA[1,2,3]（[1]Grad. Sch. Biores. Bioenv. Sci., Kyushu Univ., [2]Grad. Sch. Sys. Life. Sci., Kyushu Univ, [3]Fac. Agr., Kyushu Univ., [4]Nihon Trim Co. Ltd.）

[背景・目的]

ガンや糖尿病、動脈硬化症等の疾患に共通する原因として、活性酸素種(ROS)による酸化ストレスが挙げられる。当研究室で検討を行っている電解還元水中には多量の分子状水素と微量の電極由来の白金ナノ粒子(PtNps)が含有し、細胞内 ROS 消去活性を持つことが確認されている。本研究ではこの PtNps に注目し、合成 PtNps の細胞内抗酸化活性について検討を行ってきた。これまでの検討から、PtNps には 1~10 ppm の濃度において ROS 消去活性が顕著に見られ、培養細胞試験ではその濃度の範囲内で顕著な細胞内 ROS 消去活性が確認されている。しかしながら、今回の検討では 1 ppm 以下の濃度においても有意な細胞内 ROS 消去活性を確認した。このような極低濃度において PtNps による直接的な細胞内 ROS 消去は考えにくいため、低濃度 PtNps における本結果は間接的な細胞内抗酸化活性化機構の関与が推測された。そこで、本研究では PtNps の低濃度における抗酸化活性を確認し、その消去機構を解析することを目的として検討を行った。

[方法]

PtNps の合成にはヘキサクロロ白金酸塩を用い、クエン酸ナトリウムにより還元することで作製した。培養細胞は、HT1080 細胞(ヒト繊維肉腫細胞株)を使用した。PtNps の細胞内抗酸化活性を確認するために、$H_2O_2$ 処理前後に PtNps で HT1080 細胞を 1 時間処理した際の細胞内 ROS 量を IN Cell Analyzer1000 により測定解析した次に、$H_2O_2$ 処理後、PtNps を 15 分、30 分と処理した際の細胞内 ROS 量を測定解析した。

[結果]

PtNps 処理のタイミングを変えてその細胞内 ROS 活性の違いを検討した結果、PtNps の後処理において細胞内 ROS 消去活性が確認された。また、15、30 分の短時間処理では細胞内の ROS 消去は見られなかった。

[考察]

いずれの条件においても PtNps は細胞に存在するにもかかわらず酸化処理前に PtNps を取り込ませた条件では ROS 消去活性が見られず、処理後に PtNps を処理した条件では活性が確認された。このことから、PtNps が取り込まれ始める、または細胞表面に吸着する時に刺激が起き、細胞内抗酸化活性の亢進が生じていることが示唆された。

platinum nanoparticles, antioxidation, electrolysis reduction water

発表責任者：照屋輝一郎（kteruya@grt.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3E145
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 老化皮膚モデル細胞を用いたコンドロイチン硫酸の有効性評価

# Assessment of the effectiveness on chondroitin sulfate in aging skin model cells

○田中 寛奈、渡邊 准子、中谷 祥恵、古旗 賢二、和田 政裕 (城西大学)
○ KANNA TANAKA, NORIKO WATANABE, SACHIE NAKATANI, KENJI KOBATA, MASAHIRO WADA (Josai Univ.)

【背景・目的】
近年、機能性化粧品および機能性食品の開発段階において、ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）が用いられており、その際に用いられる HDF は、増殖効率や細胞外マトリックス（ECM）産生量が十分に高い細胞であることが多い。しかし、機能性化粧品および機能性食品の主な利用対象者の皮膚は老化しており、増殖能力やコラーゲン産生量が低下しているため、増殖および基質産生効率が高い HDF での評価だけでは不十分である。そこで、本研究ではまず、HDF の老化皮膚モデルを確立することを目的とした。さらに ECM 構成成分の一種であるコンドロイチン硫酸(CS)が老化モデル細胞の増殖、基質産生、老化マーカーに与える影響を検討した。
【方法】
HDF の老化は、1）継代の増加に伴う細胞増殖量、2）senescence-associated β-galactosidase（SA-β-Gal）活性染色の陽性細胞数、3）グリコサミノグリカン（GAG）量、4）コラーゲン量の 4 つの指標を用いて評価した。GAG 量は Alcian Blue(pH2.5)染色法、コラーゲン量は AZAN 染色法を用いて測定した。CS の有効性評価は、老化皮膚モデル細胞にサメ軟骨由来の CS（MW：113kDa）を 1000 μg/mL 添加し、2 日後に Alcian Blue(pH2.5)染色と AZAN 染色を行なった。
【結果・考察】
1）HDF の継代数 15 で、1 日あたりの細胞増殖量が継代数 1 と比べて 50%以上減少した。2）SA-β-Gal 染色では、継代数 13 から陽性細胞数が増加しはじめた。3, 4) GAG 産生量およびコラーゲン産生量は、継代数 15 以上の細胞で継代数 1 と比べて有意に減少した。これらのことから継代数 15 以上の細胞を老化皮膚モデル細胞とした。Control 群では、継代を重ねるごとに GAG 量及びコラーゲン量といった細胞基質産生量の減少傾向が見られたが、CS を添加した群では、その減少が抑制された。特に、より継代数の多い老化皮膚モデル細胞において有意に細胞基質量の減少を抑制した。このことから、CS は細胞の基質産生能力の低下を防ぐことが示された。今後、この要因が細胞の老化速度の抑制によるものかを SA-β-Gal 染色を用いて検討していく。

Human dermal fibroblasts, Chondroitin sulfate, SA-ß-Gal

発表番号：3E146
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酒粕の抗酸化性に及ぼす精米歩合および貯蔵条件の影響

# Effects of rice polishing ratio and storage conditions on the antioxidant activity of sake lees

○谷本 昌太、岩佐 美月、近藤 留未、馬渕 良太（県立広島大人間文化）
○Shota TANIMOTO, Mitsuki Iwasa, Rumi Kondo, Ryota Mabuchi (Pref. Univ. of Hiroshima)

【目的】体内で活性酸素が大量に生成されると DNA の変異などを引き起こし生活習慣病の原因となると考えられている。そのため，活性酸素の発生とその働きの抑制や活性酸素の除去をする抗酸化物質を体内で合成する他に，それらを含む食品を積極的に摂取する必要がある。清酒製造時の副産物である酒粕は，米由来の成分と麹菌や酵母の菌体成分，またこれらの微生物が生産した葉酸などの代謝産物が含まれており，栄養学的にたいへん優れている食品である。また，酒粕の機能性として，コレステロール上昇抑制効果，血圧降下作用などが報告されている。一方，酒粕の抗酸化性については，清酒について広範に調べられているのに対してほとんど検討されていない。そこで，本研究では、酒粕の抗酸化性を測定し，精米歩合，製造方法および貯蔵の影響を検討した。
【実験方法】試料として，精米歩合の異なる清酒に由来する醸造後 1 か月以内の酒粕を用いた。貯蔵試験は，酒粕を 5℃また 20℃で，0，30，90，120 日間行った。抗酸化性の測定は，電子の供与によるラジカル消去活性である ET 機構に基づく方法として，DPPH ラジカル消去活性（DPPH）および水素ラジカル供与による HAT 機構に基づく方法として，酸素ラジカル吸収能 ORAC を行った， DPPH では抗酸化成分の抽出に 80%エタノールを用い，ORAC では，アセトン - ジクロロメタン（親油性 ORAC）およびメタノールー水ー酢酸（親水性 ORAC）を用いた。試料の抗酸化性は，既知の濃度の Trolox を用いて抗酸化性をそれぞれ測定し，これを基に算出した Trolox 当量として表した。
【実験結果】DPPH は，掛米の精米歩合が 61%以上の酒粕で，60％以下のものと比べて有意に高い値を示した。親油性 ORAC は，掛米の精米歩合が 61%以上の酒粕で，50％以下のものと比べて有意に高い値を示した。親水性 ORAC は，DPPH と同様に掛米の精米歩合が 61%以上の酒粕がその他のもの比べて有意に高い値を示した。貯蔵試験の結果，DPPH は，いずれの精米歩合の酒粕も 5℃および 20℃において貯蔵中に増加し，それらの値は 20℃貯蔵で 5℃貯蔵に比べて大きく増加した。また，精米歩合が大きい酒粕が低いものと比べて，貯蔵中においても高い DPPH 値を示した。親油性 ORAC は，一部の精米歩合の酒粕，一部の温度で貯蔵中に増加し，特に精米歩合 35%の大吟醸酒に由来する酒粕では，5℃貯蔵で有意な増加が認められるのに対して，20℃貯蔵では有意な増加を示さなかった。親水性 ORAC は，いずれの精米歩合の酒粕も両貯蔵温度において貯蔵中に増加したが，5℃と 20℃貯蔵の間でその増加に大きな差は認められなかった。以上の結果から，酒粕の抗酸化性は，精米歩合の高いもので高く，貯蔵により増加することが明らかになった。

antioxidant acitivity, sake lees, storage condition

発表責任者：谷本昌太（s-tanimoto@pu-hiroshima.ac.jp）

発表番号：3E147
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Antioxidant Effect of Yabumame Bean Extract on Low-Density Lipoprotein Oxidation *In Vitro* and Structural Characterization of Major Isoflavonoids in the Extract

○LIFENG YANG[1], TAKASHI YAMAGISHI[1], SHOGO SEKIMOTO[1], KENJI FUKUNAGA[2], ATSUYUKI HISHIDA[3], HIROFUMI ARAI[1] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]Kansai Univ., [3]National Institute of Biomedical Innovation)

**Introduction:** Yabumame (*Amphicarpaea bracteata* (L.) Fernald subsp. *edgeworthii* (Benth.) H.Ohashi) is a species of legume, distributed mainly in Hokkaido. Ainu people have consumed yabumame bean as a medicinal traditional food, however, the bioactivities of yabumame are unknown. It has been suggested that oxidation of low-density lipoprotein (LDL) by reactive oxygen species may be responsible for the development of atherosclerosis. In the present study, we evaluated the antioxidant activity of yabumame bean extract (YE) against LDL oxidation *in vitro*, and characterized the structures of major isoflavonoids in YE.

**Materials and Methods:** YE was prepared with 80% methanol. Total polyphenol content of YE was determined by the Folin-Denis method. Radical scavenging activity of YE in organic solvent was measured using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). LDL oxidation was induced by peroxyl radical-generating reagent (AAPH) or $Cu^{2+}$ in the presence of YE. As the indices of lipid peroxidation of oxidized LDL (oxLDL) by AAPH and $Cu^{2+}$, cholesteryl ester hydroperoxides and thiobarbituric acid reactive substances were determined by HPLC, respectively. Apolipoprotein B-100 (apo B-100) and protein carbonyls in oxLDL were analyzed using SDS-PAGE and western blotting. The major isoflavonoids were isolated from YE by chromatographic methods and their structures were determined by LC-MS, GC-MS, and NMR analysis.

**Results and Discussion:** Total polyphenol content in YE was 1.9%. YE showed DPPH radical scavenging activity in solution. YE suppressed lipid peroxidation of LDL induced by AAPH or $Cu^{2+}$ in a dose-dependent manner. YE also inhibited the oxidative modification of apo B-100 and the formation of protein carbonyls in oxLDL mediated by AAPH or $Cu^{2+}$. The results suggest that YE can suppress LDL oxidation through radical scavenging. Seven major phenolic compounds were obtained from YE, and 2 new isoflavonoids were found. It can be considered that the antioxidant effect of YE may be due to the polyphenols including isoflavonoids, which might prevent LDL oxidation leading atherosclerosis.

yabumame, low-density lipoprotein, oxidation

発表責任者：ARAI HIROFUMI（araihrfm@mail.kitami-it.ac.jp）

発表番号：3E148
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 小腸各部位の *Dmt1* スプライシング異性体 mRNA 発現に及ぼす鉄欠乏の影響

# Effect of iron deficiency on intestinal *Dmt1* splice variant mRNA expression of rats.

○有田 安那[1,2]、篠田 粧子[1] ([1]首都大院・人間健康科学、[2]十文字女子大・健康栄養)
○Anna ARITA[1,2], Shoko SHINODA[1] ([1]Tokyo Metropolitan Univ., [2]Jumonji Univ.)

**【背景・目的】**

mucosal block（MB）は、鉄欠乏時に過剰鉄の経口投与により誘導され、鉄投与後 3～72 時間にかけて鉄吸収が抑制される現象である。MB 誘導時には、十二指腸粘膜上皮細胞に存在する鉄輸送体（divalent metal transporter 1: DMT1、ferroportin: FPN）の mRNA およびタンパク質の発現量は減少する(Frazer *et al.*, 2003)。一方、私どもは鉄欠乏ラットの結紮腸管へ過剰の鉄（1,000μg）を投与し、速やかな一過性の吸収抑制が生じることを明らかにしたが、本現象は鉄欠乏時にのみ誘発され、鉄吸収関連分子の mRNA 発現の変動を伴わなかった（以下、short-acting mucosal block：SAMB)。SAMB 誘導時には、吸収上皮細胞内への鉄の取り込みが抑制されるため、十二指腸刷子縁膜上に局在する DMT1 の関与が予想される。*Dmt1* mRNA には、5'-末端と 3'-末端の配列の異なるスプライシング異性体が存在し、5'-末端側の 1 A 型、1B 型は、DMT1 タンパク質の細胞内局在の決定に寄与すると考えられている。一方、3'-末端側には、鉄依存的な翻訳制御に関わる iron responsive element（IRE）を持つもの（IRE 型）と持たないもの（non-IRE 型）が存在する。SAMB に関する *Dmt1* スプライシング異性体は不明である。そこで、本研究では DMT1 の鉄欠乏への応答を解析し、鉄欠乏時に過発現する *Dmt1* スプライシング異性体を調べ、SAMB に関与する *Dmt1* スプライシング異性体を特定することを試みた。

**【方法】**

4 週齢の Wistar 系雄性ラットに鉄無添加食（鉄欠乏群：FeD 群）または AIN-93G（コントロール群：FeS 群）を与えて 3 週間飼育した。各群のラットの小腸を摘出後、3 等分にし、上部、中部、下部とした。さらに、上部については胃直下から Treitz 靭帯までの約 8 ㎝を十二指腸とした。各部位から採取した粘膜は、-80℃で保存した。*Dmt1* スプライシング異性体 mRNA 発現を real-time PCR により解析した。

**【結果】**

*Dmt1-1A*、*Dmt1-IRE*、*Dmt1-nonIRE* mRNA 発現量は十二指腸で最も高く、ついで小腸上部で高い発現を示したが、中部、下部での発現量は極めて低かった。さらに、十二指腸と小腸上部の *Dmt1-1A*、*Dmt1-IRE*、*Dmt1-non-IRE* mRNA 発現量は、鉄欠乏に応答して発現が亢進し、特に十二指腸 *Dmt1-1A*（12.1 倍）、*Dmt1-IRE*（10.8 倍）で顕著であった。

iron deficiency, short-acting mucosal block, Dmt1

発表番号：3E149
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ピロロキノリンキノン （PQQ） による乳酸デヒドロゲナーゼの新規反応制御機構

# A novel mechanism for pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent reaction of lactate dehydrogenase

○三宅 佑季[1]、峰松 謙治[2]、柴田 貴広[3]、近藤 竜彦[3]、石井 剛志[4]、内田 浩二[3]、赤川 貢[2]([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大院・生命環境、[3]名古屋大院・生命農、[4]神戸学院大・栄養)
○Yuki Miyake[1], Kenji Minematsu[2], Takahiro Shibata[3], Tatsuhiko Kondo[3], Takeshi Ishii[4], Koji Uchida[3], Mitsugu Akagawa[2] ([1]Sch. of life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [3]Grad. Sch. of Bioagric., Nagoya Univ., [4]Fac. of Nutr., Kobe Gakuin Univ.)

【目的】 ピロロキノリンキノン（PQQ）は、1979 年に細菌のメタノール脱水素酵素の酸化還元補酵素として同定された *o*-キノン化合物である。PQQ は野菜や肉類などの食品中に広く含有されおり、PQQ の生合成能を持たないヒトの組織においても検出されることから、我々は食事から PQQ を摂取していると考えられている。1989 年に、PQQ 欠乏餌で飼育されたマウスが発育不良、皮膚の脆弱化、および繁殖能力の低下等の異常を呈することが明らかになり、哺乳類における PQQ の栄養学的重要性が初めて示された。これらの症状は、微量の PQQ を給餌することによって改善されたことから、PQQ は哺乳動物においても補酵素として機能するビタミンの一種ではないかと推測された。しかしながら、哺乳類において PQQ を補酵素として要求する酵素は未同定であり、PQQ はビタミンとしては認定されていない。我々は、PQQ をカップリングさせたアフィニティービーズを作製し、マウス線維芽細胞株 NIH/3T3 細胞から lactate dehydrogenase（LDH）を PQQ 結合タンパク質として同定している。本研究では、PQQ の LDH への結合が酵素反応に与える影響を詳細に解析した。
【方法・結果】 ピルビン酸と乳酸を基質とした酵素反応溶液に、PQQ または還元型 PQQ である $PQQH_2$ を添加してインキュベートし、ピルビン酸、乳酸、NADH、$NAD^+$、および PQQ の濃度変化を HPLC によって測定した。その結果、PQQ と $PQQH_2$ は LDH の補酵素として機能しないことが判明したが、PQQ の添加によって乳酸生成の抑制とピルビン酸生成の促進効果が確認された。また、PQQ の存在化では、ピルビン酸を基質とした反応系において NADH 消費と $NAD^+$生成が促進され、乳酸を基質とした反応系では NADH 生成の抑制が観察された。これらの結果から、PQQ のレドックスサイクリングを介して NADH が $NAD^+$へと酸化され、酵素反応が調節される機構が推定された。この現象が PQQ-LDH 複合体によっても起こるかどうかを調べるために、PQQ と LDH をインキュベートした後、透析によって遊離の PQQ を除去することで PQQ-LDH 複合体を調製し、乳酸を基質とし NADH を補酵素とする酵素反応を行った。その結果、経時的なピルビン酸の生成、NADH の減少、対応した $NAD^+$の生成が認められた。以上の結果から、LDH と結合した PQQ がレドックスサイクリングを介して NADH を $NAD^+$へと酸化することによって、ピルビン酸の生成が促進され、乳酸の生成が抑制される新規の反応制御機構が明らかとなった。

Pyrroloquinoline quinone, Lactate dehydrogenase, PQQ

発表責任者：赤川　貢（akagawa@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3E150
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 鉄欠乏状態が細胞老化と細胞内浄化機構オートファジーに及ぼす影響

# Relationship of cell senescence and autophagy in iron deficiency

○井上 博文[1]、小林 謙一[2]、鈴木 司[2]、山本 祐司[2]、勝間田 真一[3]、勝間田(坪井) 理恵[1]、高橋 信之[1]、上原 万里子[1] ([1]東京農大・応生・健康、[2]東京農大・応生・化学、[3]東京農大・応生・栄養)
○Hirofumi INOUE[1], Ken-Ichi KOBAYASHI[2], Tsuaksa SUZUKI[2], Yuji YAMAMOTO[2], Shi-Ichi KATSUMATA[3], Rie KATSUMATA-TSUBOI[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Mariko UEHARA[1] ([1]Tokyo Univ. Agri, Food safe. and Nutri. Scie., [2]Tokyo Univ. Agri, Applied Bioscience, [3]Tokyo Univ. Agri, Nutri. Scie.)

【目的】鉄は必須微量元素であり、生体内鉄濃度は輸送担体により厳密に制御されている。一方で、一方で、老化による輸送担体の機能低下は過剰な鉄の蓄積を招き、DNA や脂質の酸化を亢進し、加齢疾患リスクを増大させる。更に近年では、若年時の過度なダイエットによる鉄摂取不足も問題視されている。これまでに我々は、幼若期の鉄欠乏状態は銅の蓄積を介した肝中脂質過酸化量や心臓中酸化タンパク質の増大させることから、鉄欠乏状態による酸化ストレスの増大が細胞老化を誘発する要因であることを示唆している。そこで本研究では、『鉄欠乏状態による酸化ストレスの増大が老化を促進するのか？』に着目し、鉄欠乏による活性酸素種(ROS)の産生メカニズムと細胞老化との関連を解明することを目的とした。
【方法・結果】まず、マウス繊維芽細胞である NIH3T3 細胞に鉄キレート剤である deferoxamine(DFO)処理を行った結果、DCFDA および MitoSox 染色法により ROS が顕著に増加し、また作用機序として、ROS 産生酵素 *p47*$^{phox}$ および *p67*$^{phox}$ の遺伝子発現の増大と抗酸化酵素 *catalase* の遺伝子発現の低下によることを明らかにした。さらに鉄欠乏による ROS 産生が p47$^{phox}$ 依存的かどうかを明らかにするために p47$^{phox}$ のノックダウン(KD)を行った。その結果、DFO 単独処理に比し、p47$^{phox}$ KD 群で ROS 産生量および酸化タンパク質量が有意に低下した。加えて、DFO 処理により増加した酸化タンパク質がどのような作用機序で制御されているのかを明らかにするために、24h の DFO 処理後(0h)、通常の培地に戻し、6h, 9h, 24h と時間依存的な酸化タンパク質の変動を解析した。その結果、24h の DFO 処理後(0h)に比し、DFO 除去時間依存的に酸化タンパク質量が減少することを見出した。そこで、タンパク質分解機構であるオートファジーの活性化が示唆されたことから、オートファジーマーカー分子 LC3-II のタンパク質発現レベルおよびオートファジー関連分子群 *Beclin-1, Atg14L, UVRAG, Vps34, p62* の遺伝子発現についての解析を行った。その結果、DFO 処理により LC3-II の発現および全てのオートファジー関連分子の遺伝子発現が上昇した。一方、DFO 処理下において、タンパク質凝集体と不溶性タンパク質量は CTL 群と比較して増加することを確認した。以上から、鉄欠乏状態による異常タンパク質の増大が細胞老化を誘導するのではないかと推察し、老化マーカーである β-galactosidase(β-Gal)活性を測定した。その結果、CTL に比し、DFO 処理により β-Gal 活性は有意に増加した。
【結論】鉄欠乏時では、生体防御応答としてオートファジーを活性化させるが、慢性的な ROS 蓄積に伴うタンパク質の凝集により細胞老化が亢進することが示唆された。

iron deficiency, cell senescence, autophagy

発表番号：3E151
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腎臓中ビタミン D 活性化酵素(CYP27b1)に及ぼす鉄欠乏の影響

Effects of iron deficiency on vitamin D hydroxylase in kidney.

○塙 信彰、井上 博文、高橋 信之、上原 万里子（東農大院）
○Nobuaki HANAWA, Hirofumi INOUE, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】脂溶性ビタミン A,D,E は骨恒常性に関与していることが知られており、特にビタミン D は骨代謝に重要なビタミンである。これまでに我々の研究グループでは、鉄欠乏条件下で骨量減少および血中活性型ビタミン D が減少することを明らかにしているが、これら鉄欠乏下の骨代謝を制御するビタミンの分子栄養学的な知見については十分検討していない。そこで本研究では、鉄依存性水酸化酵素である Cytochrome-p450(CYP)のうち、ミクロソームに局在し脂溶性ビタミン代謝に必須である CYP27a1,b1(ビタミン D 代謝関連酵素)、CYP26a1(ビタミン A 代謝関連酵素)および CYP3a(ビタミン E 代謝関連酵素)に着目し、鉄欠乏状態がこれら CYP family の発現に与える影響について明らかにすることを目的とした。
【方法】被験動物として 4 週齢雄 Wistar 系ラットを用い、正常食(CTL)と鉄欠乏群(ID)の計 2 群に分け、pair-feeding による 4 週間の飼育観察を行った。飼育期間終了後、血中ヘモグロビン(Hb)濃度、大腿骨骨塩量及び骨密度を測定した。また、原子吸光にて肝臓及び腎臓中鉄濃度を測定した。続いて、肝臓および腎臓をホモジナイズ後、超遠心分離機を用い、細胞質画分(S100)と膜画分(P100)に分け、それぞれの CYP family の局在変化について western blotting 法による解析を行った。
【結果】先行研究と同様に、血中 Hb 濃度と骨塩量及び骨密度は CTL 群に対して ID 群で有意に減少した。また肝臓及び腎臓中鉄濃度は、ともに CTL 群に対して ID 群で有意に減少した。続いて、肝臓及び腎臓中 CYP 発現について検討を行った結果、肝臓中 CYP27a1,CYP26a1,CYP3a に関してはいずれも鉄欠乏による局在変化が見られなかったが、腎臓の P100 画分において CTL 群に対し ID 群で CYP27b1 が抑制されることを確認した。
【考察】本研究では、鉄欠乏状態がどのような作用機序で血中活性型ビタミン D 濃度の減少及び骨脆弱化に影響を及ぼすのかについて明らかにすることを目的とした。その結果、腎臓中の鉄濃度の低下と共に CYP27b1 のミクロソームへの局在移行が減少する事でビタミン D の水酸化が行えず、腎臓からのカルシウムの再吸収の障害により骨量減少が引き起こされている可能性が示唆された。一方で、鉄欠乏時においても肝臓中の CYP 群が変動しなかったことについては、鉄貯蔵タンパク質である Ferritin が多く存在しているため、腎臓よりも鉄欠乏の影響を受けにくかったのではないかと推察した。今後、腎臓および肝臓の培養細胞株を用い、より詳しいメカニズムを検討する予定である。

Iron deficiency, Vitamin d, Cytochrome p450

発表番号：3E152
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

ビタミンE同族体が培養膵β細胞のインスリン分泌能に与える影響
The effect of vitamin E homologues on insulin secretion from pancreatic beta cell.
○佐藤 春香[1]、近松 出穂[1]、市 育代[1]、曽根 保子[2]、藤原 葉子[1]([1]お茶の水女子大学、[2]高崎健康福祉大学)
○Haruka SATO[1], Izuho CHIKAMATSU[1], Ikuyo ICHI[1], Yasuko SONE[2], Yoko FUJIWARA[1]
([1]Ochanomizu University, [2]Takasaki University of health and welfare)

【目的】高脂肪食摂取により引き起こされる耐糖能異常はⅡ型糖尿病の発症に関わるため、これを早期に予防することは重要である。我々はこれまでに、ビタミン E 同族体の 1 つであるγ-Tocotrienol(γ-T3)が高脂肪食を摂取した C57BL6J マウスの耐糖能を、糖負荷後のインスリン分泌を増加させることによって改善することを報告してきた。この効果はα-Tocopherol(α-Toc)には認められないγ-T3 独自の作用である。そこで本研究では、培養細胞系を用いてγ-T3 による糖負荷後のインスリン分泌増強作用について検討することとした。

【方法】ラット膵β細胞由来 RIN5F 及びヒト膵β細胞由来 1.1B4 は 10%FBS を添加した RPMI1640 培地にて培養した。α-Toc 及びγ-T3 を終濃度 50μM になるように培地に添加し、24 時間後の培地を回収、培地中のインスリン濃度を ELISA 法にて測定した。細胞増殖・生存マーカーとして MTT アッセイを行った。細胞から mRNA を抽出し、炎症関連遺伝子 COX-2 及びインクレチンレセプターである GLP-1R 発現量を定量 RT-PCR 法にて測定した。また、高脂肪食誘導時の膵臓モデルとして、100μM のパルミチン酸(PA)を添加して同様の実験を行った。長期的な高血糖状態において、膵臓内の PKCα上昇を介して GLP-1R が減少しインスリン分泌低下を促すことから、PKC 活性剤である PMA を 1μM 添加した細胞を高血糖状態のモデルとして用いて検討した。細胞内のビタミン E 濃度は HPLC にて測定した。

【結果】本研究では培養細胞系を用いて、γ-T3 による膵β細胞のインスリン分泌増強作用の検討を行った。MTT アッセイの結果、α-Toc では有意な細胞生存率の変化は見られず、γ-T3 では 100μM で細胞毒性により細胞生存率が低下した。また、RIN5F を高グルコース培地で培養したときには、α-Toc、γ-T3 添加によるインスリン分泌量に有意な差は見られなかった。しかし、PA 添加による高脂肪食誘導時のモデルでは、PA 添加によって低下したインスリン分泌量が、α-Toc およびγ-T3 を添加することにより無添加と同じレベルまで回復した。この作用において、今回の 50μM レベルではα-Toc およびγ-T3 間の差は認められなかった。また、COX-2 や GLP-1R の発現量もビタミン間で有意な差はみられなかった。細胞内ビタミン E 量を測定したところ、γ-T3 はα-Toc に比べ、約 10 倍 膵β細胞に取り込まれやすいことが分かった。 RIN5F はインスリノーマの細胞であるため、現在ヒト由来で正常細胞に近い 1.1B4 細胞を用いて実験を行っている。

Vitamin E, Insulin, beta cell

発表責任者：藤原葉子（fujiwara.yoko@ocha.ac.jp）

発表番号：3E153
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の骨形成および生殖機能に対する生理作用の検討

# Biological action of 25-hydroxyvitamin D3 on osteogenesis and reproduction in CYP27B1 knockout mice

○高松 将士[1]、西川 美宇[1]、安田 佳織[1]、青木 健悟[1]、生城 真一[1]、中川 公恵[2]、津川 尚子[3]、岡野 登志夫[2]、榊 利之[1] ([1]富山県大、[2]神戸薬大、[3]大阪樟蔭女子大)
○masashi takamatsu[1], MIyu Nishikawa[1], Kaori Yasuda[1], Kengo Aoki[1], Shinichi Ikushiro[1], Kimie Nakagawa[2], Naoko Tsugawa[3], Toshio Okano[2], Toshiyuki Sakaki[1] ([1]Toyama Pref.Univ., [2]Kobe Pharma. Univ., [3]Osaka Shoin Women's Univ.)

従来、1α, 25-ジヒドロキシビタミン $D_3$ (1,25D3)が活性型ビタミン $D_3$ であり、25-ヒドロキシビタミン $D_3$ (25D3) はプロホルモンであると考えられてきたが、近年、25D3 自身がホルモン作用を示す可能性が示されている。我々はこれまでに、ヒト前立腺由来培養細胞 PZ-HPV-7 の細胞増殖抑制に 25D3 がビタミン D 受容体(VDR) のリガンドとして直接作用することを示し[1]、1,25D3 は強いホルモン、25D3 は弱いホルモンであり、ビタミン D の生理作用は両者の総和という考えを示唆してきた。本研究では CYP27B1 ノックアウトマウス(KO マウス)を用いて 25D3 の直接作用を検証した。

KO マウスの血中には 1,25D3 が検出されず、骨形成不全、子宮形成不全などが見られることから、これらの表現型には 1,25D3 が重要な役割を果たすことが推察された。離乳直後の KO マウスに 250μg/kg/day の 25D3 を連日投与し、表現型や生化学的所見に及ぼす影響を検証した。KO マウスにおける離乳後の発育不全は 25D3 投与により顕著に回復した。生後 10～12 週齢における骨密度を測定したところ、25D3 投与により KO マウスの骨密度は著しく上昇したが、血中カルシウムおよびリン濃度の有意な上昇は認められなかった。さらに、25D3 を連続投与した KO マウス同士を交配したところ、通常は不可能である次世代マウスの作出に成功した。腎臓におけるビタミン D 応答遺伝子の発現変化を mRNA レベルで解析したところ、25D3 投与により CYP24A1 の発現が著しく亢進し、25D3 が VDR リガンドとして作用している可能性が示された。これらの結果より、25D3 投与により高カルシウム血症などの副作用を示さずに骨密度を上昇させ、また生殖能力を回復させる可能性が示された。生殖機能においては特にメスの生殖周期正常化が見られたため、血中の性ホルモン分析を試みると共に、エストロゲン合成に関わる酵素である CYP19(アロマターゼ)の発現解析を行っている。

1] Munetsuna et al., Mol. Cell. Endocrinol. 381, 960-970 (2014)

vitamin D, CYP27B1

発表番号：3E154
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# L-シトルリンの疲労軽減による運動パフォーマンス向上効果

# The exercise performance enhancement effect of L-citrulline by declining of fatigue accumulation

○松川 隼也[1]、佐藤 薫[1]、本嶋 秀子[2]、礒田 博子[2,3]（[1]筑波大院生命環境、[2]筑波大北アフリカ研究センター、[3]筑波大生命環境系）
○Toshiya MATSUKAWA[1], Yuki SATO[1], Hideko MOTOJIMA[2], Hiroko ISODA[2,3]（[1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]ARENA, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba）

【目的】
運動による疲労や筋損傷を軽減、早期回復することは運動パフォーマンスを最大限に発揮するために重要となる。近年、運動前にサプリメントやスポーツドリンクを摂取する(プレワークアウト)による運動パフォーマンスの向上が注目されている。遊離アミノ酸の一種である L-シトルリンには、血管内皮における NO(一酸化窒素)産生を促進することで血管拡張作用､血流促進作用を示すことが知られており、このことから、運動前の L-シトルリンの摂取は運動パフォーマンスの向上に有効であると考えられている。そこで本研究では、運動前の L-シトルリン摂取が継続的な運動による疲労及び、運動パフォーマンスに与える影響についてマウスを用いて評価を行った。

【方法】
実験に使用した L-シトルリンは協和発酵バイオ株式会社よりご提供を頂いた。5 週齢の ICR マウスを 1 週間の予備飼育後、水(コントロール)及び L-シトルリンの経口投与を 15 日間行った。その間、1 日おきに強制水泳試験(体重の 5%の重りを負荷)を行うことでマウスに継続的に運動を負荷した。試験開始 15 日目に最大遊泳時間(疲労困憊になるまでの時間)と運動前後の乳酸値・血糖値の測定を行った。さらにマウスの血液を採取し、血清生化学検査により尿素窒素、総ケトン体、クレアチニン及び、筋損傷のマーカーであるクレアチンキナーゼについて定量を行った。

【結果・考察】
運動前の L-シトルリン摂取は運動による乳酸値上昇を抑制した。さらに、マウスの最大遊泳時間、骨格筋重量(大腿二頭筋・腓腹筋)を増加させた。また、L-シトルリン摂取はエネルギー代謝による老廃物である尿素窒素・総ケトン体量を減少させた。加えて、筋損傷のマーカーとなるクレアチンキナーゼ量も減少させた。
以上のことから、運動前の L-シトルリンの摂取は、継続的な運動による疲労蓄積、筋損傷が軽減することで、筋量の増加及び、運動パフォーマンスを向上することが示された。

L-citrulline, exercise, skeletal muscle

発表責任者：礒田 博子（isoda.hiroko.ga@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：3E155
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 緑茶摂取はヒトにおいて血液凝固阻害因子 TFPI の産生を促進する

# Green tea intervention promotes production of tissue factor pathway inhibitor.

○高倉 卓也[1]、上崎 浩克[1]、山下 修矢[1]、山本（前田） 万里[2]、栗山 進一[3]、立花 宏文[1] ([1]九大院農院・生機科、[2]農研機構・食総研、[3]東北大・IRIDeS)
○Takuya Takakura[1], Hirokatu Kanzaki[1], Shuya Yamashita[1], Mari Yamamoto(Maeda)[2], Shinichi Kuriyama[3], Hirofumi Tachibana[1] ([1]Kyushu Univ., [2]NARO, NFRI, [3]Tohoku Univ. IRIDeS)

【背景および目的】
世界全体の死因の第一位は虚血性心疾患、第二位は脳卒中と心血管疾患が長年占めているが、これら心血管疾患は血栓の形成により血管が閉塞する病態、すなわち血栓症に起因する。一方、疫学研究により緑茶の摂取頻度が高い人は、低い人に比べて心血管疾患による死亡リスクが 53％低いこと (*JAMA*. **296**. 1255-1265 (2006)) が報告されている。しかしながら、その詳細な作用機序は未だ不明である。我々はこれまでに、緑茶カテキンの主要成分で強い生理活性を有するエピガロカテキンガレート（EGCG）が EGCG センサーである 67kDa laminin receptor を介して血液凝固阻害因子である組織因子経路インヒビター (TFPI) の産生を誘導すること、また、マウスに投与することで血液凝固活性が低下するとともに、TFPI の血中濃度が増加することを見出してきた。そこで本研究では、TFPI の産生に及ぼす緑茶摂取の影響についてヒトレベルで検証することを目的とした。

【方法】
静岡県掛川市在住の 30～70 歳の男女 107 名で心血管疾患の既往歴のない人を被験者とした。被験者をプラセボ群（デンプン粉末摂取）と緑茶群（緑茶粉末摂取（総カテキン 630 mg/day)）の 2 群に割り付け、12 週間毎日経口摂取してもらった。介入開始前および介入終了時に採血を行い、血漿を分離後、TFPI 濃度を ELISA 法により測定した。また、末梢血単核球から RNA を抽出して cDNA を合成後、TFPI mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により定量した。

【結果】
プラセボ群では介入前後で血中 TFPI 濃度に変化は認められなかったが、緑茶群では介入終了時の血中 TFPI 濃度は介入開始前と比較して有意に高値を示した。また、緑茶群において末梢血単核球における TFPI の mRNA 発現量は介入後に有意に増加していた。

【結論】
緑茶摂取は末梢血単核球における TFPI mRNA 発現量を増加させるとともに血中 TFPI 濃度を上昇させることが示された。

Green tea intervention, TFPI, CVD

発表番号：3E156
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 水溶性食物繊維は高脂肪食摂取ラットの大腸 Alkaline phosphatase 活性を増加させる

# Soluble dietary fibers increase colonic alkaline phosphatase activity in rats fed a high-fat diet.

○岡崎 由佳子[1]、関田 彩夏[1]、田中 文[1]、清水 寿夫[2]、知地 英征[1]、加藤 範久[3] ([1]藤女子大、[2]清水化学（株）、[3]広島大・生物圏科学)
○Yukako OKAZAKI[1], Ayaka SEKITA[1], Aya TANAKA[1], Toshio SHIMIZU[2], Hideyuki CHIJI[1], Norihisa KATO[3] ([1]Fuji Women's Univ., [2]Shimizu Chemical Co., [3]Hiroshima Univ.)

【目的】我々は，水溶性食物繊維であるグルコマンナンを多く含む食品（ユリネ）の摂取が，高脂肪食摂取ラットの腸内環境を改善し，炎症性大腸炎モデルラットの炎症症状を抑制することを明らかにした。またこれらの過程で, 大腸の Alkaline phosphatase (ALP) 活性が上昇することを見出した。近年，小腸由来の ALP は炎症作用に対して防御的に働くことが指摘されており，栄養条件による変動についても検討されている。一方で大腸の ALP 活性についてはほとんど検討されていない。本研究では，数種の水溶性食物繊維が高脂肪食摂取ラットの大腸 ALP 活性に及ぼす影響について検討を加えた。
【方法】実験動物として，4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。高脂肪（30% Lard）の 5%セルロース食を基本食として，実験 1 では粘度の異なる 4 種類のグルコマンナンをセルロースに置き換えて 5%添加した飼料を与え，実験 2 では高粘度グルコマンナン，低粘度グルコマンナン，ペクチン，イヌリン，キトサンをセルロースに置き換えて 4%添加した飼料を与えた。実験食は 14 日間自由摂取させた。飼育終了後，糞，盲腸内容物，大腸，十二指腸，空腸，回腸の ALP 活性，各腸管組織の ALP 遺伝子の発現解析（RT-PCR 法），および糞中の細菌叢（qPCR 法）と mucin（蛍光光度法）を測定した。
【結果】実験 1 の結果より, ラットの最終体重と食餌摂取量は本実験条件による影響は認められなかった。糞および大腸組織の ALP 活性は，粘度の違いに関わらず，グルコマンナン 4 群で有意に増加することが示された。実験 2 の結果より, ラットの最終体重は, 本実験条件による影響は認められなかった。食餌摂取量は，高粘度グルコマンナンとペクチン添加食により若干減少した。糞と大腸組織の ALP 活性は，Control 群と比較して，水溶性食物繊維添加食 4 群で有意に増加した。一方，不溶性食物繊維であるキトサン添加食群では，ALP 活性への影響は認められなかった。盲腸内容物の ALP 活性は，低粘度グルコマンナンとイヌリン添加食群で有意に増加した。空腸 ALP 活性は，低濃度グルコマンナン食群でのみ有意に増加することが認められた。一方, 大腸と空腸の ALP 遺伝子（Akp3, Alpl）発現は本実験条件による影響は認められなかった。腸管バリア機能の指標である糞中 mucin 含量は水溶性食物繊維添加食 4 群で有意に増加したが，キトサン添加食群では，同様の影響は認められなかった。また，mucin 含量と糞および大腸 ALP 活性の間には，有意な正の相関関係が認められた。糞中の *Bifidobacterium spp.*の割合は，低粘度グルコマンナンとイヌリン添加食群で有意に増加し，*Clostridium coccoides* の割合は，水溶性グルコマンナン 4 群で有意に低下した。以上の結果より，水溶性食物繊維は共通して大腸 ALP 活性を増加させ，mucin 含量と相関関係があることが認められた。

Soluble dietary fibers, Colonic alkaline phosphatase, rats

発表番号：3E157
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アンカー型イソマルトメガロ糖を用いたフラボノイドの可溶化とバイオアベイラビリティの向上
# Addition of isomaltooligosaccharides increases the bioavailability of flavonoids.

○今井 裕介[1]、鈴木 志保[1]、木村 淳夫[2]、飯塚 貴久[3]、藤本 佳則[3]、原 博[2]、北村 進一[1]([1]大阪府大院 応用生命、[2]北大農、[3]日本食品化工)
○Yusuke IMAI[1], Shiho SUZUKI[1], Atsuo KIMURA[2], Takahisa IIZUKA[3], Yoshinori FUJIMOTO[3], Hiroshi HARA[2], Shinichi KITAMURA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Nihon Shokuhin Kako)

アンカー型直鎖状イソマルトメガロ糖（IMS）は、還元末端側にα-(1→4)グリコシド結合からなる2～6程度のマルトオリゴ糖部分（アンカー構造）を持つイソマルトメガロ糖である。フラボノイドなど機能性を有する食品成分は、アメリカ食品医薬品局による BCS（Biopharmaceutics Classification System）の分類においてクラス 2（低い溶解性・高い膜透過性）に属するものが多く、低い溶解性が原因で、生体内消化管においてわずかしか吸収されない。本研究では、フラボノイドの溶解性改善による生体でのバイオアベイラビリティの向上を目的とし、IMS を用いた hesperetin の可溶化と、そのバイオアベイラビリティへの影響を調べた。

IMS の一次構造と重合度は、$^1$H-NMR、 HPAEC-PAD、TOF-MS により解析した。hesperetin（2 mM）と IMS（10 mM）を含む水懸濁液を調製し、遠心上清中の hesperetin 量を HPLC-UV 法により定量し、溶解度を算出した。経口投与試験では、hesperetin 懸濁液を、Wistar ラット（雄, 12 週齢）に経口投与（10 mg/kg）して経時的に採血を行い、血漿中の hesperetin 量を HPLC-UV 法により定量した。hesperetin の消化管での膜透過性は、小腸上皮モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いた系で評価した。hesperetin の DMSO 溶液と、水懸濁液をそれぞれ apical 側（頂端膜側）に添加し、経時的に basolateral 側（基底膜側）から溶液を回収した。hesperetin の透過量を HPLC-UV 法により定量し、それぞれの膜透過係数 $P_{app}$ を算出した。

$^1$H-NMR の結果より、IMS の数平均重合度は 12.8 であった。また、α-1,4 結合：α-1,6 結合の存在比は 2：3 と算出された。hesperetin の溶解度は、IMS を添加した場合、無添加の場合と比べて約 2 倍増加した。経口投与試験では、IMS を添加した場合、無添加の場合と比べて血中濃度－時間曲線下面積（AUC）が約 1.5 倍増加した。Caco-2 細胞を用いた hesperetin の膜透過性試験では、DMSO 系での $P_{app}$ が $4.5\times10^{-6}$ cm/s、水系での $P_{app}$ が $0.2\times10^{-6}$ cm/s と算出された（高い膜透過性で知られる propranolol の $P_{app}$ が $3.2\times10^{-6}$ cm/s）。これらより、溶解しているとき hesperetin の膜透過性は非常に高く、hesperetin の膜透過は溶解に律速であると考えられる。今後は、IMS を添加した hesperetin の膜透過性を評価する。

isomaltooligosaccharide, flavonoid, bioavailability

発表責任者：北村 進一（skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3E158
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# マラリア原虫 *Plasmodium berghei* 感染 ICR マウスにおける硫酸化多糖の抗マラリア効果

Anti-malarial activity of sulfated polysaccharides in *Plasmodium berghei*-infected ICR mice.

○嘉正 雄太、橋本 堂史、藍原 祥子、水野 雅史（神戸大院・農）
○Yuta KASHO, Takashi HASHIMOTO, Yoshiko AIHARA, Masashi MIZUNO (Kobe Univ.)

【目的】マラリアはマラリア原虫がハマダラカを媒体として宿主の赤血球に寄生することで発症する熱帯感染症の一種である。現在、マラリアに対するワクチンが未開発であることや薬剤耐性原虫が増加していること、さらに流行地の経済状況による治療の遅れなどが問題視されていることから、食品によるマラリアの症状緩和が期待される。近年、ヘパリンなどの硫酸化多糖が *in vitro* においてマラリア原虫表面特異的なタンパク質や感染赤血球表面特異的なタンパク質と結合することで原虫の生育を阻害することが報告された。一方で、食品中に含まれる硫酸化多糖の *in vivo* における抗マラリア効果に関する報告は未だない。本研究ではマウスマラリアモデルを用いて硫酸化多糖であるフコイダンおよびコンドロイチン硫酸の抗マラリア効果について調べた。
【方法】雌性 ICR マウス(7 週齢)にマコンブ由来フコイダン(50 mg/kg body weight/day)を経口投与、腹腔内投与またはコンドロイチン硫酸 A(0.1 mg/kg body weight/day)を経口投与した。コントロール群として経口投与の場合は蒸留水、腹腔内投与の場合は PBS を投与した。投与後 5 日目に *Plasmodium berghei* 感染赤血球($1\times10^6$ 個)を腹腔内に注射しマラリアに感染させ、感染後も試料の投与は継続して行った。感染後 24 時間ごとに尾静脈から採血を行い、ギムザ染色法によってスメア標本を作製した。光学顕微鏡下で赤血球 1,000 個中の感染赤血球の数を計測することでマラリア感染率(%)を算出した。
【結果・考察】コントロール群では感染後 5 日目に感染率が 17.5%まで上昇したが、フコイダン腹腔内投与群では感染率が有意に抑制され 6.4%であった。一方で、フコイダン経口投与群では感染率の抑制は見られなかった。コンドロイチン硫酸 A 投与群では感染後 5 日目の感染率が 8.6%であり、コントロール群(21.8%)に対して有意に感染率を抑制した。マコンブ由来フコイダンは腸管での吸収を受けず排泄されることが報告されている。一方で、経口摂取されたコンドロイチン硫酸 A は腸内細菌由来の酵素によって二糖単位まで分解されて吸収されることが報告されている。フコイダンとコンドロイチン硫酸 A を経口投与した際のマラリア感染率の変化に違いが見られることから、現在腸管で吸収されたコンドロイチン硫酸 A 由来二糖が血中における抗マラリア効果に寄与しているかを検討中である。

Plasmodium berghei, sulfated polysaccharides, ICR mice

発表責任者：嘉正雄太（chachachachachat@gmail.com）

発表番号：3E159
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

テオフィリンによる脂肪細胞由来の炎症性アディポカインの発現抑制機構の解析
Effect of theophylline on the expression of inflammatory adipokine in adipocytes
○三谷 塁一[1,2]、片山 茂[3]、中村 宗一郎[3]、芦田 均[2]([1]信州大・先鋭領域融合研究群、[2]神大院・農、[3]信州大院・農)
○ Takakazu MITANI[1,2], Shigeru KATAYAMA[3], Soichiro NAKAMURA[3], Hitoshi ASHIDA[2] ([1]IBS-ICCER. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Kobe Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Shinshu Univ.)

【目的】欧米諸国や日本を中心とした先進国だけでなく、発展途上国の多くで過食と運動不足による肥満が増しており、それによって誘発される生活習慣病患者の増加が社会問題となっている。肥満状態の脂肪組織は慢性炎症状態であり、慢性炎症状態の脂肪細胞から分泌される炎症性アディポカインの IL-6 は、血管を介して他の組織へと運ばれ、膜受容体と結合することでインスリン抵抗性や動脈硬化症を惹起することが知られている。本研究では、茶葉に含まれる微量成分であるテオフィリン（1,3-dimethylxanthine）による脂肪細胞由来の炎症性アディポカインの発現抑制効果を検証し、その分子機構を解明することを目的とした。
【方法・結果】インスリン、デキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチンを含む分化誘導培地を用いてマウス線維芽細胞（3T3-L1）を脂肪細胞へと分化させた結果、時間依存的に IL-6 の発現量と分泌量が増加した。テオフィリンの存在下で 3T3-L1 細胞を分化誘導させたところ、テオフィリンの濃度依存的に IL-6 の発現量は減少し、その減少効果は転写レベルで示された。しかしながら、テオフィリンは脂肪細胞の分化には影響を示さなかった。IL-6 の発現を調節する因子の解析を行った。転写因子である C/EBPδ をノックダウンすることで、IL-6 の発現量が減少することが示された。そこで、テオフィリン存在下で 3T3-L1 細胞を培養すると、テオフィリンは C/EBPδ の発現量を転写レベルで減少した。分化誘導培地中の各成分が C/EBPδ と IL-6 の発現に及ぼす影響を検討した。核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) のアゴニストとして機能するデキサメタゾンが、C/EBPδ、IL-6 の発現量を増加し、一方、C/EBPδ、IL-6 の発現量は GR のアンタゴニストによって減少した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにより GR の転写活性を測定したところ、テオフィリンは GR の転写活性を抑制した。さらに、C/EBPδ 遺伝子のプロモーター領域と結合する GR をクロマチン免疫沈降法で解析した結果、テオフィリンによって C/EBPδ 遺伝子のプロモーター領域に結合する GR 量は減少した。
【結論】テオフィリンは、炎症性アディポカインの IL-6 の発現を抑制する抗炎症性効果をもつことが示された。その抑制機構として、テオフィリンは、GR 活性を抑制することで C/EBPδ の発現量を減少し、その結果、IL-6 の発現を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、テオフィリンは肥満由来のインスリン抵抗性や動脈硬化症の発症を抑制する食品成分になることが示唆された。

adipocyte, adipokine, theophylline

発表責任者：三谷塁一（mitani@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：3E160
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラクトフェリン＋ラクトパーオキシダーゼ配合食品の摂取による感冒症状に及ぼす影響

# Influence of ingestion of lactoferrin + lactoperoxidase containing tablets on the symptoms of common cold

○新 光一郎[1]、若林 裕之[1]、杉田 千泰[2]、吉田 裕樹[2]、佐藤 圭創[2]、園田 徹[3]、山内 恒治[1]、阿部 文明[1]、黒川 昌彦[2]([1]森永乳業素材応用研、[2]九州保福大薬、[3]九州保福大保健管理センター)
○Kouichirou SHIN[1], Hiroyuki WAKABAYASHI[1], Chihiro SUGITA[2], Hiroki YOSHIDA[2], Keizo SATO[2], Tohru SONODA[3], Koji YAMAUCHI[1], Fumiaki ABE[1], Masahiko KUROKAWA[2] ([1]Morinaga Milk Industry, [2]Kyushu Univ. of Health and Welfare, [3]Kyushu Univ. of Health and Welfare, Health Center)

【目的】ラクトフェリン（LF）とラクトパーオキシダーゼ（LPO）は、乳や唾液に含有される抗菌成分であり、LF と LPO を配合した食品の調査では、歯周病菌の低下や口臭抑制などの口腔衛生改善効果が報告されている。一方、LPO の酵素作用によって唾液中では抗菌活性をもつ次亜チオシアン酸が生成されることや、次亜チオシアン酸が種々のインフルエンザウイルスの感染能を短時間で低下させることが報告されている。そこで、本研究では LF+LPO 配合錠菓を舐めることによる摂取が感冒症状やインフルエンザ感染を予防するかどうかを探索的試験で検討した。【方法】本試験は九州保健福祉大学倫理委員会の承認を得て実施した。九州保健福祉大学の学生及び教職員を対象に、事前に目的と内容を説明し、試験参加への同意を得た。また、背景調査を行った。被験者は無作為に二群に割り付け、冬期の 8 週間、摂取群には LF+LPO 配合錠菓（森永オーラバリア）1 日 3 粒を、通学、移動、外出時などに、噛まずに唾液に溶かして摂取してもらい、非摂取群ではその摂取はしなかった。感冒症状は、発熱、のどの痛み、せき、鼻汁、鼻づまり、痰、頭痛、関節痛・筋肉痛の症状別に、日誌に有無を記録してもらった。各症状数を日毎に合計し、感冒症状総数とした。胃腸症状は、下痢、吐き気・嘔吐の症状別に記録してもらった。症状の発現の有無は Fisher 正確検定で、発現日数は Wilcoxon 順位和検定で統計解析した。また、マスク習慣、手洗い習慣、うがい習慣の背景因子で部分集団を構成し、部分集団解析を行った。【結果】登録症例 407 例のうち、試験終了症例 265 例（摂取群 129 例、非摂取群 136 例）を解析対象とした。その結果、感冒症状、インフルエンザ感染（各群 1 例)、胃腸症状の有無及び発現日数の主解析には、有意な群間差はなかった。背景因子のうち、うがい習慣有りの症例の比率について群間に不均衡が認められた（P＜0.1)。うがい習慣有りの部分集団 158 例では、感冒症状の有無（摂取群 23:46（33.3%)、非摂取群 24:65（27.0%））及び日数（摂取群 1.9±4.8 日、非摂取群 1.8±4.0 日）には、群間差はなかった。一方、うがい習慣無しの部分集団 107 例では、感冒症状の有無（摂取群 21:39（35.0%)、非摂取群 25:22（53.2%））及び日数（摂取群 2.4±5.0 日、非摂取群 3.3±4.7 日）には、摂取群おいて低下傾向がみられた。また、このうがい習慣無しの部分集団では、各感冒症状のうち、感冒症状総数と鼻づまり日数には、摂取群において低下傾向がみられた。さらに、マスク習慣無しの部分集団では、摂取群において 38℃以上発熱の日数が有意に低かった（摂取群 0.0±0.0 日、非摂取群 0.1±0.4 日、P＜0.05)。これらの結果から、LF と LPO を含む食品の摂取は、うがいやマスクが利用できない状況では、それらの予防手段の補完となる可能性が示唆された。

lactoferrin, lactoperoxidase, common cold

発表番号：3E161
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クロレラのロタウイルス増殖阻害効果

# Growth inhibition of the rotavirus by chlorella

○中島 綾香[1]、曽我部 りほ[2]、金城 次雄[3]、石垣 勝己[3]、鈴木 健吾[1]、伊勢川 裕二[2]([1]株式会社ユーグレナ、[2]武庫川女子大学生活環境学部、[3]八重山殖産株式会社)
○ Ayaka NAKASHIMA[1], Riho SOGABE[2], Tsugio KINJYO[3], Katsumi ISHIGAKI[3], Kengo SUZUKI[1], Yuji ISEGAWA[2] ([1]euglena Co.,Ltd, [2]Mukogawa Women's University, [3]Yaeyama Shokusan Co., Ltd)

【目的】

クロレラは、淡水に自生する直径 3～8 μm の球体をした緑藻の一種であり、その細胞の中には、ビタミン、ミネラル、アミノ酸などのさまざまな栄養素を含んでいる。ロタウイルスは、消化管疾患である感染性胃腸炎を引き起こすウイルスであり、一般に乳児下痢症や嘔吐下痢症の原因として知られている。ロタウイルスは感染力が非常に強く、衛生環境の整った先進国であっても、概ね５歳までにほぼ１００％のヒトがロタウイルスに一度は感染すると考えられており、全世界で毎年約７０万人程度が亡くなっている。先進国の疫学調査によると、衛生状態の改善はロタウイルスの有病率を減少させることはできないとされている。ロタウイルスのワクチンはすでに開発されているものの、ワクチンの無効な型やワクチンとの組み替え体が存在するため、それらへの対策等が求められている。

【方法】

本研究では、クロレラ粉末、クロレラ粉末を微細化した微細クロレラ粉末のロタウイルス増殖阻害活性について *in vitro* で検討を行った。100mg/mL エタノールとなるようにクロレラ粉末、微細クロレラ粉末について調整し、0.45 μm のフィルターにかけ、調整済みサンプルとした。MA104 細胞にロタウイルス Wa 株を感染後、調整済みサンプルを培地に対して 0.1%、1%、2%含む濃度、すなわちクロレラ粉末、微細クロレラ粉末として 0.1 mg/mL、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL 含む濃度を通常培地に添加し、ともに培養した。48 時間培養後、上清を回収し、フォーカス法によって上清のウイルス力価の算出を行った。

【結果】

0.1 mg/mL クロレラ粉末を添加したものでは 35.4%、1.0 mg/mL クロレラ粉末を添加したものでは、65.1%、2.0 mg/mL クロレラ粉末を添加したものでは、68.4%ロタウイルスの増殖を阻害した。これらは、すべての濃度でコントロールのエタノール溶液と比較して有意にロタウイルスの増殖を阻害した。また、0.1 mg/mL 微細クロレラ粉末を添加したものでは 31.3%、1.0 mg/mL 微細クロレラ粉末を添加したものでは、95.3%、2.0 mg/mL 微細クロレラ粉末を添加したものでは、85.1%ロタウイルスの増殖を阻害した。これらは、1.0 mg/mL、2.0 mg/mL でコントロールのエタノール溶液と比較して有意にロタウイルスの増殖を阻害した。以上のことからクロレラにはロタウイルス増殖阻害活性が示唆された。

chlorella, rotavirus, growth inhibitory effect

発表番号：3E162
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 微細藻類，Nostoc 属の抗発ガン性について

# Anticarcinogenic activity of Nostoc genus

○小原 章裕[1]、和仁 麻依佳[1]、川村 磨史[1]、山口 裕司[2]、竹中 裕行[2]、湊 健一郎[1] ([1]名城大農、[2]MAC 総合研究所)
○ Akihiro OHARA[1], Maika WANI[1], Mafumi KAWAMURA[1], Yuji YAMAGUCHI[2], Hiroyuki TAKENAKA[2], Ken-ichiro MINATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]MAC Gifu Res. Inst.)

**【目的】** 微細藻類は，35 億年前に地球上に発生した最古の植物プランクトンで，多くのストレスを受けながら現在まで生きつづけ大きな生理活性を有する可能性を秘めている。中でも髪菜に代表される *Nostoc* 属は，古代中国において不老長寿の食べ物として利用され，現在までに HIV ウイルスやインフルエンザウイルス等に対する抗ウイルス活性，食中毒菌などに対する抗菌作用，免疫増強作用などを示すと報告されている。我々研究グループは，*Nostoc* 属が発がん物質と関連の深い種々のタイプの変異原物質に対して抗変異原性を示し，更にガンの浸潤に関係する酵素の阻害や血管新生を阻害する事を見出している。今回は更に抗変異原性に対する活性発現のメカニズムについて検討した結果を含め，本試料の抗発ガンの可能性について検討した。

**【材料及び方法】** 試料は，MAC 総合研究所で人工培養した髪菜(*N.flagelliforme*)，イシクラゲ(*N.commune*)，葛仙米(*N.sphaericum*)の粉末乾燥物を使用した。直接変異原物質，1-ニトロピレンに対する抗変異原性は，Ames test の変法であるプレインキュベーション法で行った。また，これら抗変異原性を発現した試料を添加した，混液中の組成の変化を TLC 法で評価した。浸潤に対する抑制活性は，ガン細胞が浸潤をする際に誘導するウロキナーゼに対する試料の阻害活性と，細胞（HUVEC 細胞）を用いが血管新生抑制活性試験測定キット（倉敷紡績製）によりにより評価した。

**【結果及び考察】** 既に報告したように，髪菜，イシクラゲ，葛仙米のヘキサン，酢酸エチル，メタノールの抽出画分において，強弱の差はあるが髪菜の酢酸エチル抽出物以外の画分に１-ニトロピレンに対する抗変異原性が認められた。また，これら活性を示した画分を消化酵素ペプシンやパンクレアチンに作用させ，１-ニトロピレンに対する抗変異原性を測定した所，活性に若干の変化は認められたが有意な差ではなく，試料に含まれる抗変異原成分は消化酵素の作用で変化しないことが分かった。さらに，活性を強く示した葛仙米の酢酸エチル抽出物及びメタノール抽出物と１-ニトロピレンを試験管内で作用させ，その反応液を TLC 分析に供したところ１-ニトロピレンのスポットが消失した。このことより，本試料の抽出物は変異原物質に何らかの作用をし，変異原物質の構造を変化させて活性を示したものと判断した。また，髪菜のヘキサン抽出物以外は，強弱の差はあるが，ガン細胞が異常増殖をする際に誘導する酵素ウロキナーゼに対して阻害活性を示した。中でもイシクラゲの酢酸エチル画分は，細胞実験の結果から血管新生を抑制する成分を含んでいる可能性が極めて高いことが示唆された。 Ohara et al., ACN2015 Abstract Book, p.261 (2015)

Nostoc genus, anticarcinogenic activity, 1-nitropyrene

発表番号：3E163
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大豆イソフラボンの PAPD5 依存的な microRNA 発現調節作用

# Soy isoflavone controls microRNA expression in the PAPD5-dependent manner

○山下 修矢、林 イチェン、小松 智美、立花 宏文（九大院・農院・生機科）
○Shuya YAMASHITA, I-Chian LIN, Satomi KOMATSU, Hirofumi TACHIBANA (Kyushu Univ.)

【目的】

大豆イソフラボンは骨粗鬆症予防作用や抗がん作用などさまざまな保健作用を有することが報告され、そのメカニズムに一部エストロゲン受容体（Estrogen receptor: ER）が関与することが示唆されている。我々はこれまでに大豆イソフラボンの ER に依存しないがん細胞増殖抑制作用に関わる分子として non-canonical poly(A) polymerase の一種である Pap associated domain containing 5（PAPD5）を同定している。一方近年、生体恒常性維持や疾患発症に関わる新たな分子として microRNA（miRNA）が注目されているが、大豆イソフラボンと miRNA の関係はほとんどわかっていない。本研究では、主要な大豆イソフラボンであるダイゼインおよびその腸内代謝産物であるエクオールの miRNA 発現に及ぼす影響およびその機構について検討した。

【方法】

RNA 干渉法により PAPD5 を定常的にノックダウンしたヒト子宮頸がん細胞株 HeLa をダイゼインあるいはエクオールで処理した後、マイクロアレイ解析により miRNA の発現量を測定した。合成 miRNA を HeLa 細胞に導入した後に細胞数を測定し、細胞増殖に及ぼす miRNA の影響について検討した。HeLa 細胞をダイゼインならびにエクオールで処理した後、β-catenin 発現量をウエスタンブロット法により測定した。

【結果・考察】

マイクロアレイ解析の結果、ダイゼインおよびエクオールにより 6 種類の miRNA の発現量が 25%以上増加した。この miRNA の発現増加は PAPD5 ノックダウン細胞では認められなかったことから、イソフラボンによる miRNA の発現増加に PAPD5 が関与することが示された。ダイゼイン及びエクオールにより発現量が最も増加した miRNA に着目し、その合成 miRNA を HeLa 細胞に導入したところ細胞増殖が抑制されたことから、本 miRNA はがん細胞の増殖に関与することが示唆された。合成 miRNA の導入ならびにダイゼインおよびエクオールによる処理は、本 miRNA の標的候補であるβ-catenin のタンパク質発現量を低下させた。以上結果より、ダイゼインおよびエクオールは miRNA の発現量を調節し、その発現調節に PAPD5 が関与することが示された。

Isoflavone, microRNA, PAPD5

発表責任者：山下修矢（yamashitashu@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3E164
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アロエステロール含有ヨーグルト摂取による皮膚に及ぼす影響

# Effects of intake of aloesterol yogurt intake on the skin conditions

○田中 美順、三澤 江里子、齊藤 万里江、鍋島 かずみ、山内 恒治、阿部 文明（森永乳業　素材応用研）
○Miyuki TANAKA, Eriko MISAWA, Marie SAITOU, Kazumi NABESHIMA, Kouji YAMAUCHI, Fumiaki ABE (Morinagamilk Food ingredients & Technology Institute)

アロエベラの葉肉部分は、食品素材としても幅広く使用されている。これまでに我々は、アロエベラ葉肉の経口摂取における抗糖尿病や抗肥満効果を確認し、有効成分アロエステロールを同定した。一方でアロエには、古くから塗布による創傷治癒効果があることが知られていたが、経口投与による皮膚への効果についてはほとんど報告がなかった。2013 年の本学会大会において、アロエステロールが、ヒト皮膚線維芽細胞からのコラーゲン及びヒアルロン酸の産生を促進することを発表した。また、昨年の本学会大会にでは、皮膚光老化モデルでの検討において、紫外線による皮膚弾力性の低下が、アロエステロールの経口摂取によって予防されることを報告している。さらに我々は、乾燥肌の日本人女性を対象とした臨床試験を二重盲検下で実施し、アロエステロール摂取群で、シワ平均深さの有意な低下を確認した（40 歳以上部分解析　Clin Cosmet Investig Dermatol. 2015 Feb 20;8:95-104.）。しかし、その他の皮膚測定項目に関しては、化粧品の使用を継続した頬での測定では、アロエステロール摂取による皮膚への影響を正確に判断することができなかった。そこで今回、社外ボランティアにおいて、アロエステロール含有ヨーグルトの摂取及び非摂取期間での、腕の皮膚状態に関する予備的検討を行った。その結果、アロエステロール含有ヨーグルト摂取 4 週及び 8 週目での皮膚弾力性パラメーター値は摂取前に比べて有意にし、8 週目での経皮水分蒸散量は有意に減少した。アロエステロール含有ヨーグルト摂取中止し、1 か月のウオッシュアウト後で、摂取 8 週目に比べ有意な皮膚粘弾性の低下が認められた。さらに、その後の 8 週間の非摂取期間中では、皮膚測定値の変化は認められなかった。現在、アロエステロール含有ヨーグルト摂取による皮膚に対する効果を調べるため、ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較優越性試験にて検討中である。

Aloesterol, Aloe vera, skin condition

発表責任者：田中美順（m_tanaka@morinagamilk.co.jp）

発表番号：3E165
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米糠ペプチドの睡眠ホルモン合成酵素および細胞内グルタチオンに対する影響

# Effect of rice bran peptide on activity of serotonin N-acetyltransferase and cellular glutathione level

○畑中 唯史[1]、藤田 明子[2]、川上 晃司[2]、川上 賀代子[3]、守谷 智恵[3]、坪井 誠二[3] ([1]岡山生物研、[2]株式会社　サタケ、[3]就実大学)
○Tadashi Hatanaka[1], Akiko Fujita[2], Kouji Kawakami[2], Kayoko Kawakami[3], Chie Moritani[3], Seiji Tsuboi[3] ([1]RIBS, Okayama, [2]SATAKE Corp., [3]Shujitsu Univ.)

【背景】以前我々は、市販食品加工用酵素であるアスペルギルス・オリゼ由来ウマミザイム G で消化した米糠由来ペプチドが、インスリン分泌を促すペプチドホルモンであるインクレチンを血中で分解する酵素ジペプチジルペプチダーゼ－IV を、阻害することを明らかにしている*。

また我々は、松果体中のメラトニン合成の律速酵素である Serotonin N-acetyltransferase (NAT)の生化学的解析により、NAT がグルタチオンを介したレドックス制御を受けることについても、既に明らかにしている**。

【目的】今回は、ウマミザイム G 消化米糠由来ペプチドを用いて、NAT を強制発現させた COS 細胞（COS/NAT 細胞）およびヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞を用いて、NAT 活性および細胞内グルタチオン濃度に対する影響を検討した。

【方法】米糠タンパクは、脱脂糠を材料に、アルカリ抽出および酸沈殿にて調整した。得られタンパクを、ウマミザイム G によって消化し、凍結乾燥することによって、米糠ペプチドを得た。比較対象として、市販大豆タンパクを、同様にウマミザイム G により消化して得た大豆ペプチドを作成した。COS/NAT 細胞を $1.5\times10^5$ / 2ml / 35mm dish で 48 時間培養した後、ペプチドを培地に加え、24 時間後に細胞を回収し、細胞内 NAT 活性を測定した。また、HepG2 細胞を $1.5\times10^5$ / 2ml / 35mm dish で 48 時間培養した後、ペプチドを培地に加え、24 時間後に細胞を回収し、細胞内グルタチオン濃度に対する影響を検討した。

【結果】米糠ペプチドは、ペプチド無添加、大豆ペプチドと比較して、NAT 活性および細胞内グルタチオン濃度を、有意に上昇させることを明らかにした。

【参考文献】*T. Hatanaka, Y. Inoue, J. Arima, Y. Kumagai, H. Usuki, K. Kawakami, M. Kimura, T. Mukaihara Food Chem. 134: 797-802 (2012)
**S. Tsuboi, Y. Kotani, K. Ogawa, T. Hatanaka, S. Yatsushiro, M. Otsuka, Y. Moriyama J. Biol. Chem. 277 (46): 44229-44235 (2002)

rice bran, serotonin N-acetyltransferase, glutathione

発表番号：3F001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 運動性を示す *Lactobacillus agilis* のマウス腸管への定着と局在
# Colonization and localization of motile *Lactobacillus agilis* in mouse intestine

○鎌田 美帆[1]、田中 尚人[2]、岡田 早苗[1]、梶川 揚申[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]東農大・菌株)
○Miho KAMATA[1], Naoto TANAKA[2], Sanae OKADA[1], Akinobu KAJIKAWA[1] ([1]. Dept. of .Appl. BiolChem., Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

動物腸管内に生息している *Lactobacillus* 属細菌は宿主に有益な作用をもたらす有用微生物として知られている。一般的に *Lactobacillus* 属細菌は運動性を示さないが、一部の *Lactobacillus* 属細菌はべん毛を持ち運動性を示す。有べん毛 *Lactobacillus* 属細菌は環境中で運動性を活かすことで非運動性の同属細菌とは異なる生態や挙動を示す可能性が考えられるが、その知見は少なく明らかになっていない。そこで本研究ではニワトリの消化管由来である *Lactobacillus agilis* JCM 1048 から派生した旺盛な運動性を示す *L. agilis* BKN 88 を用いてマウスにおける定着モデルを構築し、腸管内での挙動や分布域の解析を試みることとした。

まず、*L. agilis* を用いたマウス定着モデルの検討を行った。供試菌のみの検出を可能にするため、*L. agilis* BKN 88 に Streptomycin および Rifampicin への自然耐性を付与し *L. agilis* BKN 156 とした。BALB/c マウスに Streptomycin, Rifampicin 0.5mg/ml 含有飲料水を与え始めてから 3 日後に *L. agilis* BKN 156 を $10^9$～$10^{10}$ CFU 胃内投与し、糞便中の供試菌数を経日的に測定した。その結果、抗生物質含有飲料水を与えている間は約 $10^{10}$CFU/g(feces)の供試菌が安定的に検出された。次に運動性が定着性に及ぼす影響を評価するため、*L. agilis* BKN 88 の運動性欠失変異体の作出を試みた。温度感受性プラスミドを用いた相同組換えにより *L. agilis* BKN 88 のべん毛モーターMotB の 1 アミノ酸置換を行い、運動性を示さない変異株を取得した。その後 Streptomycin および Rifampicin への自然耐性を付与したものを *L. agilis* BKN 154 とした。*L. agilis* BKN 156 と *L. agilis* BKN 154 をマウスへ経口投与し、経日的な糞便中の供試菌数を計測した。その結果、どちらの投与群においても $10^{10}$CFU/g(feces)程度の供試菌が継続的に検出され、両投与群の間に明確な差は見られなかった。現在、腸内における局在について調査を進めている。また、マウス腸管に定着させた *L. agilis* が宿主の獲得免疫に及ぼす影響についても評価を行った。BKN 154 と BKN 156 をマウスへ経口投与してから一ヶ月後に腸内容物を採取し、ELISA により腸内容物上清中の *L. agilis* 特異的 IgA を測定した。その結果、どちらの投与群においても *L. agilis* 特異的抗体の産生が認められたことから、宿主免疫系への影響が示唆された。

Lactobacilli, colonization, motility

発表番号：3F002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

家畜の生産性を向上させる新規プロバイオティクス細菌、*Bacillus hisashii* N-11$^{T}$
A novel probiotic bacterium, *Bacillus hisashii* N-11$^{T}$, that improves the productivity of livestock

○渡邉 凌[1]、西田 彩夏[1]、宮本 浩邦[1,2,3,4]、堀内 三吉[5]、森田 英利[6]、福田 真嗣[7,8]、大野 博司[8,9,10]、市野瀬 志津子[11]、宮本 久[3]、児玉 浩明[1]([1]千葉大院融合、[2]（株）日環科学、[3]（株）三六九、[4]慶大医、[5]医科歯科大医歯学総合、[6]岡大院環境生命、[7]慶大先端生命研、[8]理化学研究所、[9]横市大院ナノバイオ、[10]千葉大院医、[11]医科歯科大医歯学総合研)
○Ryo WATANABE[1], AYAKA NISHIDA[1], Hirokuni MIYAMOTO[1,2,3,4], Sankichi HORIUCHI[5], Hidetoshi MORITA[6], Shinji FUKUDA[7,8], Hiroshi OHNO[8,9,10], Shizuko ICHINOSE[11], Hisashi MIYAMOTO[3], Hiroaki KODAMA[1] ([1]Grad. Sch. Adv. Integr. Sci., Chiba Univ., [2]Japan Eco-science Ltd., [3]Miroku Ltd., [4]Dept. Biochem. & Integr. Med. Biol., Keio Sch. Med., [5]Dept. Mol. Virol., Tokyo Med. & Dent. Univ., [6]Grad. Sch. Environ. & Life Sci., Okayama Univ., [7]Inst. Adv. Biosci., Keio Univ., [8]Lab. Inst. Ecosystem, RIKEN, [9]Grad. Sch. NanobioSci., Yokohama City Univ., [10]Grad. Sch. Med., Chiba Univ., [11]Res. Ctr. Med. & Dent. Sci.,Tokyo Med. & Dent. Univ.)

［背景と目的］
本研究グループでは、家畜の生長促進や肉質向上などの効果をもたらす好熱菌発酵産物の生理作用について研究している。当該発酵産物は、未利用海産資源を原料として、微生物の自己発酵熱により、好気的・高温化でコンポスト化した資材である。発酵産物中に含まれる有用なプロバイオティクスを同定するために、発酵産物抽出液を無菌マウスへ投与し、その後、該当マウスの盲腸便から好熱性のバクテリアを複数種単離した。16S rRNA の遺伝子解析の結果、*Bacillus thermoamylovorans* に近縁な好熱性のバクテリアが 15 株単離された。単離株の一株である BP-863 株を動物に投与することにより、家畜の増大効果や腸管免疫の賦活化が確認され、好熱菌発酵産物が示す家畜への生理作用の一部に BP-863 株が関与していることが示唆された。本研究では、*Bacillus* 属の細菌の同定法に準拠して、BP-863 株を含む単離菌 15 株の形質を *B. thermoamylovorans* LMG18084$^{T}$ と比較することで、新種であるか検証した。
［方法および結果］
好熱菌発酵産物より単離された菌株のうち、16S rRNA 遺伝子配列が *B. thermoamylovorans* と近縁とされた 15 株は、rep-PCR を用いた fingerprint 法による菌種間比較から、2 群（BP-863 株型 2 株と N-21 株型 13 株）に分類された。次に、DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析により、BP-863 株と N-21 株は *B. thermoamylovorans* とは別種であること、BP-863 株と N-21 株は同一亜種の関係であることが示唆された。さらに、単一炭素源培地による糖の資化性や培養性状などを中心に、生化学的特徴差を明らかにした。この結果、いくつかの糖資化性や生育特性等で BP-863 株を含む 15 株は *B. thermoamylovorans* と異なる性質を示す一方で、単離菌株間においては生化学的な形質に一部相関性が確認された。以上の結果から、BP-863 株が新規の細菌であり、BP-863 株は *Bacillus hisashii* N-11$^{T}$(=NRBC110226$^{T}$ =LMG28201$^{T}$)として登録された。

compost, thermophils, *Bacillus*

発表責任者：児玉浩明（kodama@faculty.chiba-u.jp）

発表番号：3F003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# インドネシア原産微細藻類による抗酸化活性物質の生産

# Antioxidant activities of microalgae isolated from Indonesian samples

○岡田 和也[1]、Susilaningsih Dwi[2]、関口 弘志[1]、川崎 浩子[1]、鈴木 健一朗[1] ([1]（独）製品評価技術基盤機構（NBRC)、[2]インドネシア科学院 (LIPI))
○Kazuya OKADA[1], Dwi Susilaningsih[2], Hiroshi SEKIGUCHI[1], Hiroko KAWASAKI[1], Kenichirou SUZUKI[1] ([1]Biological Resource Center, NITE (NBRC), [2]Indonesian Institute of Sciences (LIPI))

【目的】微細藻類における有用機能の一例として、産生する色素に由来する抗酸化機能が知られており、既にカロテノイドやポリフェノールなどがサプリメント用途などに利用され注目されている。本研究では、インドネシアの各地域より分離した微細藻類株を対象に、抗酸化活性を測定し評価を行った。

【方法】インドネシアの各諸島の 27 地域から分離された 90 株を対象に抗酸化活性を測定し、SSU rRNA 遺伝子解析及び形態観察から同定を行った。抗酸化活性測定に供した微細藻類株は、培養温度 29℃、光量は 35 μmol/m²/s、連続明期の条件で、定常期に達するまで培養を行った。その後、培養サンプルをエタノールと水（1:1, v/v）の混合液による抽出物に対し、ABTS (2,2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)) を用いた比色法で抗酸化活性を測定した。抗酸化活性値はアスコルビン酸濃度（mg/L）に換算し、上位の株を選抜した。Guedes ら (2013) [1)]により高い抗酸化活性が報告されている *Scenedesmus obliquus* M2-1 と比較するため、選抜株についてクロロフィル量あたりの抗酸化活性値（mg/L/μg）を求め評価した。

【結果】同定の結果、本研究に供した微細藻類株は、原核藻類が 16 株、真核藻類が 74 株であり、このうち 70 株が緑色藻類であった。供試株の抗酸化活性値は 0.1～13.6 mg/L の範囲であった。抗酸化活性値が上位の選抜株について検証したところ、これらの株の採集地点はインドネシアの各島に分布し、同時に分類学的にも特段傾向は認められなかった。選抜株の中で、クロロフィル量あたりの抗酸化活性値が特に高い株は *Ettlia* sp. JSAT12-2-AL043 の 60.9 mg/L/μg であったが、*Scenedesmus obliquus* M2-1 の 149.0 mg/L/μg に及ばなかった。また、*Monoraphidium* sp. JSAT11-2-AL035 における細胞あたりの抗酸化活性値を定常期と対数期で比較したところ、それぞれ $2.01\times10^{-7}$ mg/L/cells 及び $0.61\times10^{-7}$ mg/L/cells と大きく異なる値であった。このことは、培養条件の違いが微細藻類株の過小評価につながる可能性があること示唆している。さらに抗酸化活性は強光などの環境ストレスにより増大することが知られており、正確に微細藻類の抗酸化活性能力を評価するためには、各種環境ストレスを考慮した培養条件を設定することが必要であると判断された。

1) A. Catarina Guedes, *et al.*, *Mar. Drugs*, **11**, 1256-1270, **2013**.

本研究は、JST 及び JICA による地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム（SATREPS）事業において実施された成果である。

microalgae, Indonesia, antioxidant activity

発表責任者：岡田　和也（okada-kazuya@nite.go.jp）

発表番号：3F004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Characterization of a novel bacterium species isolated from thermophilic compost prepared from marine animal resources material

○Clament CHIN[1], Pramod POUDEL[1], Hirokuni MIYAMOTO[2], Yuki OKUGAWA[1], Yukihiro TASHIRO[1], Kenji SAKAI[1] ([1]Fac. Agric., Kyushu Univ., [2]Japan Eco-science Co. Ltd.,)

Thermophilic composting of marine animal resources (MAR) material is a useful method with functional roles in both the degradation and recycling of waste organic materials. As reported previously, we have isolated a novel bacterium strain (CORY-14) from MAR material. In this study, we aim at elucidating the characterizations of CORY-14 by analysis of phylogeny, morphology, and physiology. Phylogenetic tree was constructed from sequences of 16S rRNA gene using neighbour-joining method with representative type strains from eight genera of the family Paenibacillaceae. It revealed that CORY-14 was grouped into different cluster from the type strains and shared only 89.97% similarity with *Paenibacillus elgii* NBRC 100335$^T$. These results suggested CORY-14 would be proposed as a novel strain of a new genus in the family Paenibacillaceae. As the results of the morphological analysis, CORY-14 formed small pale yellowish colonies with entire, circular, raised, mucoid and opaque on agar plate. Motility test with semi-solid agar indicated CORY-14 was non-motile. Microscopic observation revealed rod-shaped cells that were stained negative with Gram's solution. Also, terminal non-bulging endospores were seen within 24 h after stained with malachite green solution. In addition, CORY-14 was considered to be catalase and oxidase, and facultative anaerobic bacterium. In liquid shaking culture conditions, CORY-14 grew at temperature between 18.3–46.2°C, at 0.5–7.0% NaCl and at pH 5.0–9.5, with $\mu_{max}$ of 0.4055 $h^{-1}$ under the optimized condition. From the results of fermentation test with different carbon sources using API 20E, 20NE and 50CH Strips, CORY-14 grew from *N*-acetyl-glucosamine, gluconate, malate and citrate, but not glucose, arabinose, mannose, maltose, mannitol, caprate, adipate and phenyl acetate. Surprisingly, CORY-14 did not produce acids from all the sugars tested, and only *N*-acetyl-glucosamine and glycerol were utilized to produce acids. In addition, acetoin was produced but indole, hydrogen sulfide, nitrate reductase, and tryptophan deaminase were not detected. Furthermore, by hydrolysis tests on agar plate, CORY-14 hydrolyzed casein, gelatin, starch, tween-20 and tween-80, but not chitin, carboxymethyl cellulose and tyrosine. As the results of further casein hydrolysis test on the agar plate, CORY-14 exhibited clear hydrolytic zone after 6 h of inoculation, much earlier than ca. 19–24 h using *Paenibacillus* strains, which suggested high protease activity of CORY-14. In the further study, quantitative analysis of protease activity will be compared between CORY-14 and *Paenibacillus* strains.

CORY-14, novel genus, protease

発表責任者：酒井　謙二（kensak@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3F005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ミャンマー産発酵食品からの共培養による乳酸菌の分離とその発酵特性

# Isolation of Lactic acid bacteria from fermented food in Myanmar by co-culture method and fermentation characteristics

○乙黒 美彩[1]、前田 康太郎[1]、標 智仁[2]、岸本 宗和[1]、安藤 勝彦[3]、Nyunt Phay[4]、早川 正幸[5]、柳田 藤寿[1]([1]山梨大院・ワイン研、[2]山梨大・COC、[3]NBRC、[4]パテイン大学、[5]山梨大院・生命)
○ Misa OTOGURO[1], Kotaro MAEDA[1], Tomohito SHIMEGI[2], Munekazu KISHIMOTO[1], Katsuhiko ANDO[3], Phay Nyunt[4], Masayuki HAYAKAWA[5], Fujitoshi YANAGIDA[1] ([1]Enol. Vitic. Univ. of Yamanashi, [2]COC Univ. of Yamanashi, [3]NBRC, [4]Pathein Univ., [5]Univ. of Yamanashi)

【目的】東南アジア、東アジア諸国には特徴的な発酵食品が多数存在している。ミャンマー連邦においてもエビや魚、野菜類を用いた多様な発酵食品が食されている。本研究では NITE･NBRC の海外微生物探索事業に参画し、ミャンマー連邦の伝統的な発酵食品から乳酸菌を分離すること及び分離株の糖類発酵性を調査し発酵特性を明らかにすることを目的とした。

【方法】2014 年 11 月 20～21 日にエーヤワディー州パンタノーとミャウンミャの市場で発酵食品 29 点を採取した。サンプルを滅菌生理食塩水で 10 倍に希釈し、希釈平板法および酵母共培養法[1)]により乳酸菌を分離した。分離培地にはシクロヘキシミド 50 mg/l を含んだ MRS 培地を用いた。

糖類発酵性試験は希釈平板法および共培養法で分離した乳酸菌 150 株と NITE から分譲を受けたミャンマー産乳酸菌 108 株を加えた 258 株を供試菌株とした。GYP 培地(pH6.5)を基本培地とし、グルコースをはじめとする 17 種類の糖類について pH（酸度）の低下を指標に発酵性を調査した。

【結果と考察】ミャンマー連邦国内の市場より、漬物 12 点、なれ鮨 8 点、豆醤 1 点、発酵米麺 4 点、魚のペースト 4 点を購入し、これらの試料から希釈平板法、*Saccharomyces cerevisiae* との共培養法、*Kluyveromyces marxianus* との共培養法、*Pichia fermentans* との共培養法により乳酸菌を分離した。コロニーの形態や色などを基に希釈平板法からは 30 株、共培養法からはそれぞれ 40 株の合計 150 株の乳酸菌を選抜した。現在までに 16S rDNA の塩基配列解析が終了した 74 株の属レベルでの内訳は *Enterococcus* 属 1 株、*Lactobacillus* 属 48 株、*Leuconostoc* 属 2 株、*Lactococcus* 属 2 株、*Pediococcus* 属 4 株、*Vagococcus* 属 1 株、*Weisella* 属 15 株であった。また、*Staphylococcus* 属 1 株も分離された。残りの菌株については引き続き、16S rRNA 塩基配列解析を進めている。

我々が直接分離したこれら 150 株と購入したミャンマー産乳酸菌 108 株のうち 6 株の復元が確認できず、最終的に 252 株を糖類発酵性試験に使用した。全体の 54%にあたる 137 株が 17 種類の糖すべてを資化し生育を確認した。15 種類以上の糖を資化した株は 210 株、全体の 75%に達した。培養後の pH を測定したところ、グルコン酸ナトリウムでは pH4 以下を示す菌株は認められず、スターチでは pH4 以下になったのは 18 株のみであった。一方、その他の糖では 160 株以上が pH4 以下を示し、多くの菌株で酸度の上昇が認められた。このことからミャンマー産乳酸菌は多様な糖類を利用できることが明らかとなった。

【文献】1)日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集、講演番号 2A41a03

Lactic acid bacteria, Myanmar, co-culture

発表責任者：乙黒美彩（motoguro@yamanashi.ac.jp）

発表番号：3F006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Screening of lanthanum-dependent methylotrophs

○HAOXIN LYU, AKIO TANI (IPSR Okayama Univ.)

**Objective**

Methylotrophs can utilize reduced $C_1$-compounds, including methane, methanol and methylamine, as their sole carbon and energy source. They are widespread in nature, especially on the surface of plants due to large amount of C1 compounds produced by plants. The interaction between plants and methylotrophs is vital to plant health, agriculture, and the global cycle of C1 compounds. Recently methanol dehydrogenase (MDH) encoded by *xoxF* was found to be lanthanoid-dependent (1), while classic MDH encoded by *mxaF* is calcium-dependent. So far there is only one report on lanthanoid-dependent methanotroph: *Methylacidiphilum fumarioricum* is a thermoacidophilic, phylogenetically novel methanotroph belonging to Phylum Verrucomicrobia. These findings prompted us to seek new methyl/methanotrophs whose methylotrophic metabolism is dependent on lanthanum.

**Methods and Results**

Paddy mud soil, root soil of rice plants and other plants from experimental field in IPSR Okayama University, Japan, were used as samples. Enrichment culture with methane as a sole carbon source was done and bacteria were isolated by plating. We could isolate methanotroph closest to *Methylomonas koyamae*(T) as a methanotroph but its growth on methane was not lanthanoid-depedent. We could not isolate other or unknown methanotrophs that show lanthanoid-dependency. However, we obtained two new methanol-utilizing isolates, La 2-4 and La 3113, whose 16S rRNA genes show only 93.43% and 98.32% identity to *Methylophilus luteus* (T) and *Methylotenera mobilis* (T), respectively. Judging from their low identity they seemed to belong to a new genus and species, respectively. They could not grow on methanol in the absence of lanthanum. Now we are trying to sequence *nifH* and *cpn* of the isolates for further characterization.

**References**

(1) Nakagawa T. et al. A catalytic role of XoxF1 as $La3^+$-dependent methanol dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* strain AM1. PLoS One. 2012, 7(11):e50480.

lanthanoid, methylotroph

発表番号：3F007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 3,4-OH-DAP および OH-Glu を有する放線菌 *Rhizocola hellebori* K12-0602$^T$ 株の細胞壁ペプチドグリカン構造解析

# Cell-wall peptidoglycan analysis of actinomycete *Rhizocola hellebori* K12-0602$^T$ containing 3,4-OH-DAP and OH-Glu

○武 晃[1]、中島 琢自[2]、稲橋 佑起[2]、廣瀬 友靖[1,2]、塩見 和朗[1,2]、大村 智[2]、高橋 洋子[2]、松本 厚子[1,2]（[1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研）
○ Akira TAKE[1], Takuji NAKASHIMA[2], Yuki INAHASHI[2], Tomoyasu HIROSE[1,2], Kazuro SHIOMI[1,2], Satoshi OMURA[2], Yoko TAKAHASHI[2], Atsuko MATSUMOTO[1,2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci.)

【目的】グラム陽性細菌である放線菌の細胞壁は厚いペプチドグリカン (PG) 構造を有しており、そのアミノ酸組成が分類の重要な指標として用いられている。しかし、多くの場合 1972 年の Schleifer & Kandler による PG 構造の分類[1)] に基づきアミノ酸組成からその構造を推定し、分類に応用している。我々は前大会において、細胞壁分解酵素 lysozyme に耐性な *Micromonosporaceae* 科の基準属、*Micromonospora* 属を用いてその一次構造解析法を報告した[2)]。同科に属する *Rhizocola hellebori* K12-0602$^T$ は細胞壁ジアミノ酸として他に報告例のない 3,4-ジヒドロキシジアミノピメリン酸 (3,4-OH-DAP) を有するのが特徴である[3)]。さらに、ヒドロキシグルタミン酸 (OH-Glu) が細胞壁に含まれるため、標準物質がなく、細胞壁アミノ酸組成比の算出ができず、PG 推定構造も明らかとなっていない。そこで、3,4-OH-DAP および OH-Glu を細胞壁より精製し、組成比から構造を推定すると同時に PG 構造を明らかにすることを目的とした。

【方法】対象菌株を培養、集菌した菌体より常法に基づき細胞壁 PG を精製した。3,4-OH-DAP および OH-Glu の取得には、PG を 6 M HCl で完全に加水分解した後、benzoyl chloride で誘導体化し、HPLC により *N,N*-dibenzoyl-3,4-OH-DAP および *N*-benzoyl-OH-Glu を単離した。それぞれ HCl による加水分解で benzoyl 基を脱離し、標品を取得した。各アミノ酸と PG 完全加水分解物を FDLA で誘導体化後 LC/MS で比較し、組成比を算出した。PG 一次構造の決定は、PG を 4 M HCl, 60℃, 16 hr 処理で得た部分加水分解物を FDLA または PMP で誘導体化後、LC/MS で解析した[2)]。

【結果および考察】*R. hellebori* K12-0602$^T$ の細胞壁 PG 25 mg から benzoyl 化した 3,4-OH-DAP および OH-Glu をそれぞれ 1.2 mg, 2.5 mg 取得した。各種機器分析の結果、OH-Glu の OH 基は 3 位にあると判明した。アミノ酸組成比では D-Ala が Gly より少ないという結果となった。また、PG 部分加水分解物の FDLA 誘導体化試料から Gly–OH-Glu, OH-Glu–3,4-OH-DAP, 3,4-OH-DAP–Ala が、PMP 誘導体化試料からはムラミン酸に Gly が結合した構造が確認された。以上のことからムラミン酸に Gly–OH-Glu–3,4-OH-DAP–Ala が結合した A1γ[1)] タイプの構造であることが分かった。

【文献】

1) Schleifer KH. & Kandler O., *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407–477 (1972).
2)武　晃 他、2015 年度日本農芸化学会大会要旨、2A41p09.
3) Matsumoto A. *et al.*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **64**, 2706–2711 (2014).

peptidoglycan, *Rhizocola*, actinomycetes

発表責任者：松本 厚子（amatsu@lisci.kitasato-u.ac.jp）

発表番号：3F008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 地熱環境から単離した好熱性繊維状ファージの特性解析

# Isolation and characterization of thermophilic filamentous phages

○永吉 佑子[1]、熊谷 健太[1]、相川 浩輝[1]、藤野 泰寛[2]、土居 克実[3]([1]九大院・生資環、[2]九大・基幹、[3]九大院・農)
○Yuko NAGAYOSHI[1], Kenta KUMAGAE[1], Hiroki AIKAWA[1], Yasuhiro FUJINO[2], Katsumi DOI[3] ([1]Dept. Biosci Biotech., Kyushu Univ., [2]Fac. Arts and Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agr., Kyushu Univ.)

【背景と目的】
細菌に感染するウイルスであるバクテリオファージ（ファージ）は、豊富な未知遺伝子資源として研究が行われている。その中でも、好熱菌に感染する好熱性ファージは、高温環境下での感染機構の解明やそれらが生産する耐熱性酵素の産業応用等が期待できる興味深い研究対象である。しかし、好熱性ファージの分離例は些少で、常温菌に感染するファージと比べ情報量が少ない。特に、好熱性繊維状ファージは分離例が僅か一例で、ゲノム情報の報告例もなかった。そこで本研究では、*Thermus* 属細菌を宿主とする繊維状ファージを分離し、それらの表現型およびゲノム構造の解析を行った。

【方法】
高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 を指示菌とし、長崎県小浜温泉排水溝沈殿物サンプルよりファージ φOH3 及び φOH16 の単離を行った。単離したファージは、透過型電子顕微鏡を用いたネガティブ染色法による形態観察を行った。次いで 7 種の異なる菌株 (*T. thermophilus* HB8, HB27, TMY, AT-62, *T. aquaticus* YT-1, *Meiothermus ruber*, *Geobacillus kaustophilus*) を用いて宿主域の決定を行った。さらに各温度 (50, 60, 70, 80, 90ºC) 及び各 pH (pH 3, 5, 7, 9, 11) で 1 時間の処理を行い、二重寒天法によりプラークを形成させて測定し、熱・pH 対する影響を検討した。またファージを感染させた *T. thermophilus* HB8 を振とう培養して 120 分まで 10 分ごとに回収した感染液を用いて、PFU (Plaque Forming Unit) を測定し、一段増殖曲線の作成を行った。さらに、両ファージの Replicative Form (RF) DNA を基に塩基配列を決定し、既知のファージゲノムの塩基配列と比較した。

【結果と考察】
単離したファージ φOH3 及び φOH16 は濁ったプラークである Turbid plaque を形成した。ネガティブ染色法による形態観察から、φOH3 は長さ約 830 nm で幅約 7 nm、また、φOH16 は長さ約 850 nm、幅約 8 nm であり、ともに *Inoviridae* 科に分類された。宿主域を検討したところ、両ファージとも、*T. thermophilus* HB8 にのみ感染性を示した。熱安定性及び pH 安定性を検討したところ、両ファージとも 50～70℃及び pH5～9 で 80%以上の感染性を示したため、これらは既存の常温性ファージよりも高い安定性を保持していると考えられた。また、一段増殖曲線より、φOH3 は潜伏期間が 60 分で放出期間が 40 分、一方、φOH16 は潜伏期間が 50 分、放出期間が 30 分であることが明らかとなった。ファージ感染宿主細胞から核酸を経時的に抽出したところ、ファージ DNA と考えられる一本鎖 DNA 及び RF DNA と考えられる二本鎖 DNA が検出された。さらに、塩基配列解析の結果、φOH3 のゲノムサイズは 5,688 bp で 9 個の ORF が推定され、φOH16 はゲノムサイズ 6,533 bp であり、10 個の ORF が推定された。これらの ORF は既知ファージと塩基配列レベルでは有意な相同性が認められなかったが、*T. aquaticus* Y51MC23 株ゲノム上の推定 ORF とアミノ酸レベルで高い相同性を示したため、既存の繊維状ファージゲノム構成と比較し、各 ORF 産物の機能を推定した。

filamentous phage, *Thermus thermophilus*, *Inoviridae*

発表責任者：土居　克実（doi@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3F009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# RFLP を用いた簡易的 *Lactobacillus* 属菌種同定法の確立とその応用

# Restriction fragment length polymorphism ID system for the *Lactobacillus* species

○吉川 悠子[1,2]、田中 実穂[1]、大橋 典男[1] ([1]静県大食品栄養、[2]日獣大獣医)
○Yuko YOSHIKAWA[1,2], Miho TANAKA[1], Norio OHASHI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Nippon Vet. and Life Sci. Univ.)

【目的】代表的なプロバイオティクスである *Lactobacillus* 属菌は、一般細菌の菌種同定に汎用される 16S rDNA 配列の相同性が菌種間で極めて高いため、代わりに Phenylalanyl-tRNA synthase alpha subunit (*pheS*)遺伝子配列を用いた方法が有効であることが報告されている。本研究では、*pheS* の制限酵素断片長多型(RFLP)を用いた簡易的 *Lactobacillus* 属菌種同定法を確立し、その検証を試みた。
【方法】標的とする *pheS* 遺伝子の部分配列(428-431 bp)がデータベース上に登録されている 112 菌種/亜種の *Lactobacillus* 属菌について、4 種類の制限酵素(*Hha*I、*Rsa*I、*Sau*3AI および *Sau*96I)による理論上の RFLP パターンを制限酵素ごとに 2 桁の番号にコード化した。さらに、*Hha*I、*Rsa*I、*Sau*3AI、*Sau*96I の順でコード番号を繋げ、8 桁の RFLP ID を決定した。続いて、これを検証するため、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)により腸炎を起こしたマウス腸管内における *Lactobacillus* 属菌の変動を RFLP ID にて解析した。6 週齢の雌性 Balb/c マウスを 5 群に分け(n = 4)、うち 3 群には 1 x $10^9$ colony forming unit (CFU)のプロバイオティクス株(*L. plantarum* No-B6: plantarum 群、*L. paracasei* Tm21-1: paracasei 群および *Bifidobacterium bifidum* B12: bifidum 群)を、残り 2 群(saline 群および control 群)には生理食塩水をそれぞれ 1 週間投与した。その後(Day 0)、control 群以外は 4% DSS を含む水道水を自由飲水で与え、6 日後(Day 6)に DSS 投与を中止した。腸炎の重篤度は体重減少、糞便の硬さ、出血の有無で評価した。糞便の採取は DSS 投与 2 日前(Day -2)から DSS 投与終了 2 日後(Day 8)まで行い、変法 LBS 培地にて糞便より *Lactobacillus* 属菌を分離し、純培養後、RFLP ID 解析を行った。
【結果および考察】RFLP ID は理論上 *Lactobacillus* 属 112 菌種/亜種を 99 種類に分類することができ、一部の菌種においては亜種まで区別可能であることが判った。7 種の *Lactobacillus* 属基準株の RFLP ID が理論上の RFLP ID と完全に一致したことから、wDSS 誘導性腸炎マウスを用いて RFLP ID システムの実用性を調べた。DSS 投与前の正常時のマウス腸管内における *Lactobacillus* 属菌の優占種は *L. reuteri* および *L. kalixenisis* であり、また、検出される菌種に多様性が見られた。一方、DSS 投与後は菌種の多様性は消失し、*L. animalis* の検出率が有意に増加することが判った。重度の下痢状態にあるマウス腸管内で *L. animalis* が優占種となった具体的なメカニズムは不明であるが、*L. animalis* は腸管粘膜に強固に付着しているものと考えられる。以上、メタゲノム解析とは異なり、今回確立した RFLP ID を用いた同定法は、ある環境中で生存している *Lactobacillus* 属菌の動態を簡便に推定できることから、特にプロバイオティクス研究において極めて有効な手法であると考える。

*Lactobacillus* species, restriction fragment length polymorphism, *pheS*

発表番号：3F010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# MALDI-TOF MS による嫌気性微生物の識別

# Identification and discrimination of anaerobic microbes by MALDI-TOF MS

○細田 晃文、加藤 ひとみ、鈴木 真弓、田村 廣人（名城大農）
○Akifumi HOSODA, Hitomi KATO, Mayumi SUZUKI, Hiroto TAMURA (Meijo Univ.)

近年, 種々のバイオマーカーを指標として MALDI-TOF MS を用いた微生物同定法が報告されている。なかでも，MALDI-TOF MS の測定データを基にしたマスフィンガープリント法は臨床分野の細菌識別等に適用されている。しかし，現在のマスフィンガープリント法では，種レベルの識別は可能であるが，株レベルでの識別は困難である。そこで講演者らは，MALDI-TOF MS によるリボソームタンパク質（以下，R-protein）の測定データ（プロテオーム）とそれをコードする *S10-spc-alpha* オペロンの遺伝情報（バイオインフォマティクス）を融合したプロテオタイピングといえる株レベルでの細菌識別法（*S10*-GERMS 法）を確立した。これまでに，*Pseudomonas* 属，*Sphingomonas* 属，*Bacillus* 属および *Lactobacillus* 属などの細菌に対して 16S rRNA 遺伝子配列では 99%以上の相同性で同種とされた株について *S10*-GERMS 法を適用した結果, 株レベルの識別が可能であることを明らかにしてきた。*S10*-GERMS 法に基づく識別は，これまで好気性細菌に適用してきたが，本法の有用性を拡大することを目的に，本講演ではゲノム情報が公開されているメタン生成アーキアへの *S10*-GERMS 法の適用について検討した。供試菌株は，*Methanococcus maripaludis* S2 株および C6 株，*Methanosarcina barkeri* DSM800，1538，および 8687 株，*Methanosarcina mazei* DSM3671 株および 7222 株を用いた。 *S10*-GERMS 法では，ゲノム公開株の R-protein の分子量（理論質量）を KEGG データベースにより確認し，その情報に基づいて *S10-spc-alpha* オペロンの遺伝子の塩基配列を決定し，データベース情報と一致するか確認した。R-protein の測定に供した各供試菌株を液体培養し，細胞を集菌した。集菌した細胞は，MALDI-TOF MS 用のプレートに塗布して速やかにマトリックス剤（シナピン酸 50%－アセトニトリル 1%－TFA 溶液；シナピン酸終濃度 10 mg/mL）で重層および風乾した。R-protein の測定はリニアーポジティブイオンモード（2,000～20,000 *m/z*）で行った。塩基配列の解析より得られた R-protein の理論質量と各菌株を MALDI-TOF MS で測定した分子量（実測値）の比較により，測定された R-protein の中から各菌株のバイオマーカーとなる R-protein を選抜した後，各菌株間の識別を行った。その結果，*M. maripaludis* の 2 菌株では，バイオマーカーとして 7 つの R-protein を選抜し, その 4 つの分子量が両菌株間で異なったことから, 16S rRNA 遺伝子（相同性 99%）で同種と見なされた S2 株と C6 株は，バイオマーカーの相同性が 57%（4/7）の異なる菌株であることが明らかとなった。現在，*M. barkeri* と *M. mazei* の識別を行っており，本講演で報告する予定である。

Ribosomal protein, MALDI-TOF MS, Methanogen

発表責任者：細田　晃文（hosoda@meijo-u.ac.jp）

発表番号：3F011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 南極淡水氷河湖におけるバクテリア・アーキア・真核微生物群集構造の解析

# Community structures of prokaryotes and eukaryotic microbes in Antarctic freshwater glacial lake

○茶屋 葵[1]、川又 明徳[2]、伊村 智[3]、黒沢 則夫[1]（[1]創価大学大学院、[2]愛媛県総合科学博物館、[3]国立極地研究所）
○Aoi CHAYA[1], Akinori KAWAMATA[2], Satoshi IMURA[3], Norio KUROSAWA[1] ([1]Soka Univ., [2]Ehime Prefectural Science Museum, [3]National Institute of Polar Research)

【背景と目的】南極大陸の約 98%は常に氷に覆われているが、一部の沿岸域には恒久的または夏期に岩が露出する露岩域と呼ばれる場所が存在する。露岩域の湖沼は微生物の多様性が比較的高いことが報告されているが、それらの研究の多くは海跡湖を対象としており、淡水氷河湖における微生物群集構造を調査した研究は非常に限られている。また、原核生物を対象とした研究が多く、真核微生物の多様性については知見が乏しい。南極大陸には限られた海鳥または海獣を除いて高次栄養段階生物が存在せず、微生物が主体の生態系を形成することが知られており、この南極陸上生態系を理解するためには、真核微生物を含めた微生物全体の群集構造や多様性を明らかにする必要がある。本研究では、ひとつの南極淡水氷河湖におけるバクテリア・アーキア・真核微生物の群集構造を明らかにし、その種組成や多様性を南極の海跡湖や南極以外の淡水湖などと比較した。

【材料と方法】東南極リュッツォ・ホルム湾沿岸のラングホブデ露岩域に位置する淡水氷河湖「雪鳥池」から、2012 年 12 月 26 日に採取された堆積物を含む湖水を実験に用いた。この試料から抽出したメタゲノム DNA を用いて、バクテリア・アーキア・真核微生物それぞれの群集構造を、SSU rRNA 遺伝子クローン解析法により明らかにした。

【結果と考察】バクテリアの 16S rDNA 212 クローンは、12 門 148 系統群に分類された。Proteobacteria 門（51%）が最も優占しており、続いて Cyanobacteria 門（15%）、Bacteroidetes 門（10%）が多く検出された。Proteobacteria 門内の種組成は他の南極海跡湖とは大きく異なり、$\beta$-Proteobacteria 綱が圧倒的に優先していた。多様性は非常に高く Shannon index は 4.6 であった。この値は温帯域の一般的な湖沼と比較しても高い部類に属する。一方アーキアの 16S rDNA 72 クローンは、*Methanosarcina* 属（97%）と *Methanosaeta* 属（3%）のみが検出され、バクテリアとは対照的にその多様性は非常に低かった（Shannon index：0.011）。真核微生物の 18S rDNA 91 クローンは、5 門 19 系統群に分類された。Tardigrada 門（55%）が最も優占しおり、続いて Ciliophora 門（17%）Chlorophyta 門（8%）が多く検出された。真核微生物の Shannon index は 2.1 となり、バクテリアと同様に高い多様性を示した。全体として、南極淡水氷河湖の微生物群集構造は温帯域の淡水湖のそれとよく似ており、多様性も高いことが明らかとなった。雪鳥池が位置する雪鳥沢では、夏期にユキドリやナンキョクオオトウゾクカモメが営巣・繁殖しており、それらによる栄養塩の供給がシアノバクテリアや藻類による一次生産を維持し、次いで従属栄養微生物の多様性を高めていると推定された。

Antarctica, Microbial community, SSU rRNA gene

発表責任者：茶屋　葵（aoichaya94@gmail.com）

発表番号：3F012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 金属鉄を電子源として利用する有用物質生産菌の探索

# Exploration of bacteria which produce useful materials using iron as an electron source

○井上 達也[1]、平野 伸一[2]、松本 伯夫[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大農、[2]電中研)
○Tatsuya INOUE[1], Shin-ichi HIRANO[2], Norio MATSUMOTO[2], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]University of Tokyo, [2]CRIEPI)

【背景及び目的】微生物によって金属腐食が促進される微生物腐食が報告されている。嫌気条件下、金属鉄の腐食は鉄表面で形成されたアノード側での鉄酸化溶解反応とカソード側でのプロトンの還元反応に担われている。微生物腐食では鉄由来の電子、もしくはカソード反応で生じた水素を電子供与体として利用する微生物の存在によりカソード反応が促進されると考えられている。近年、このような腐食を促進する微生物としてメタン菌・酢酸菌のような水素資化性独立栄養細菌が報告された。これら水素資化性独立栄養性細菌は腐食を引き起こす反面、金属鉄の持つエネルギーを利用して $CO_2$ をメタンや酢酸のような有用物質へと変換する能力を持つと言うことができ、これらを利用した新しい $CO_2$ からの有用物質生産プロセスを構築できる可能性がある。しかし、腐食性独立栄養細菌は報告事例が少なく、知見の拡充が必須である。そこで、本研究では炭素源として $CO_2$、電子供与体として金属鉄を用い、自然環境中から腐食性微生物の探索を行うと共に、既存の水素資化性独立栄養細菌を対象として、鉄腐食・有用物質生産能を指標としたスクリーニングを行うことを目的とした。
【方法及び結果】嫌気条件下（$N_2$:$CO_2$=80:20）、鉄顆粒を添加した無機塩培地に湖沼底泥を微生物源として摂取し、30℃で 1 カ月培養を行った。金属鉄からの鉄溶出量および有機酸量を定量し、活性の高い試料について複数回の継代培養と平板培養を行った結果、金属鉄を腐食し、酢酸を生産しながら増殖する EE-1 株を単離した。EE-1 株は既知の *Desulfovibrio* 属に分類された。また、既存の水素資化性独立栄養細菌 5 種(*Moorella thermoacetica, Acetobacterium woodii, Clostridium autoethanogenum, Clostridium carboxidivorans, Sporomusa ovata*)について、上記と同様の培養試験を行い、鉄腐食能、有用物質生産能の評価を行った。その結果、*M. thermoacetica* については酢酸生産が確認されず、*A. woodii* では酢酸生産が見られたものの、その生産速度は金属鉄の自然酸化によって発生した水素を利用した酢酸生産速度 (7 mM / 2weeks) と一致し、積極的に金属鉄を利用する能力はないことが示唆された。それに対して、*C. autoethanogenum, C. carboxidivorans, S. ovata* の 3 種については顕著な酢酸生産が検出され（40mM, 48 mM, 31 mM / 2weeks）、金属鉄から電子を獲得し、酢酸を生産する能力を有することが明らかとなった。さらに、*C. carboxidivorans* に関しては酢酸生成と同時にエタノール生成 (3.2 mM / 2weeks) も確認された。以上の結果から、鉄腐食・有用物質生産能は特殊な微生物に限定されるものではなく、既知の微生物種にも広く存在している可能性が考えられる。今後、より効率的な $CO_2$ からの有用物質生産プロセスの構築に向けて、微生物種の選定および培養法について検討を進める。

Microbially influenced corrosion, carbon dioxide, Acetogen

発表番号：3F013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゲノム情報を用いたアプローチによる酢酸菌 *Komagataeibacter* 属の分類学的位置付けの検証

# Validation of the taxonomic position of the genus *Komagataeibacter* using genome-based approaches

○新村 梨恵[1]、松谷 峰之介[2]、石川 森夫[1]、矢吹 岳[1]、海野 祥子[1]、志波 優[3]、鈴木 治夫[4]、平川 英樹[5]、吉川 博文[3,6]、松下 一信[2]、小泉 幸道[1]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大・応生科醸造、[2]山口大・農、[3]東京農大・ゲノムセンター、[4]山口大・院・理工、[5]かずさ DNA 研、[6]東京農大・応生科バイオ)
○Rie NIIMURA[1], Minenosuke Matsutani[2], Morio Ishikawa[1], Gaku Yabuki[1], Shouko Umino[1], Yu Shiwa[3], Haruo Suzuki[4], Hideki Hirakawa[5], Hirofumi Yoshikawa[3,6], Kazunobu Matsushita[2], Yukimichi Koizumi[1], Akiko Kainuma-Okamoto[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Grad. Sch. Sci. Eng., Yamaguchi Univ., [5]Kazusa DNA Res. Inst., [6]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌群は、食酢醸造用の菌株を含有することで知られているが、分類上は 18 属 84 種に及ぶ分類群から構成されている。しかし一属一種が多いこと、及び 16S rRNA 遺伝子による系統と表現性状に相関が弱い等のことから、現在の分類体系には混乱や曖昧さがあることが指摘されている。このような問題点の解決の手段として、演者らはゲノム情報を用いた系統解析を行ない、これまでに(1) ゲノム準拠の系統は 16S rRNA 遺伝子準拠の系統と大きく異なること、(2) 得られた系統は酢酸菌の表現性状の相違を反映していることを確認して、本法による酢酸菌群の再整理を試みている [1, 2]。今回は、近年、*Gluconacetobacter* 属から更に分離・独立して成立した *Komagataeibacter* 属の正当性について検証を行ったので報告する。

【方法】Illumina Genome analyzer IIx により既に解析済みの現 *Gluconacetobacter* 属 4 種、*Komagataeibacter* 属 10 種のドラフトゲノム配列に公開済みの 2 種のコンプリートゲノム配列を加えた 16 種の配列を対象に系統解析を行った。ゲノム準拠の系統は全解析対象株で共通に保存されているオルソログ遺伝子を抽出し、これらのアミノ酸配列のコンカテマーをアライメント後、塩基配列にバックトランスレーションして ML 法にて解析した。また、得られたゲノム情報を用いて比較ゲノム解析を行い、各属が特徴的に保有する遺伝子の抽出を行った。さらに両属の表現性状について 35 項目の試験を行い、系統関係との相関について検討を行った。

【結果】ゲノム準拠の系統解析の結果、対象の 16 種は、それぞれ 5 種と 11 種から成る二グループに分かれ、各グループの構成メンバーは、16S rRNA 準拠の系統解析の結果（それぞれ現 *Gluconacetobater* 属と *Komagataeibacter* 属）と完全に一致した。また、この二グループは 35 項目の表現性状試験においても明確に二分された。比較ゲノム解析の結果も系統及び表現性状の違いを反映しており、保有遺伝子の特徴は二グループの間で大別された。以上のことから、両属は現時点では別属とすることが妥当と考えられ、*Komagataeibacter* 属の独立性が支持された。但し、16S rRNA・ゲノム準拠のいずれの系統においても、属内株間及び *Gluconacetobacter* 属株との株間の進化距離が、既存の他属と比較して短い傾向にあり、今後も検証が必要と考えられた。

1）貝沼（岡本）ら：日本農芸化学会 2012 年度大会講演要旨集，2C20a06（2012）
2）貝沼（岡本）ら：日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集，2A08p09（2014）

Acetic Acid Bacteria, *Komagataeibacter*, genome

発表番号：3F014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 芳香族化合物分解コンソーシアムに存在する非分解菌の分解菌に対する効果

# Microbial aromatic compound-degrading consortium: effect of non-degrading strain on degrading strain.

○小川 なつみ、加藤 広海、大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝 (東北大院生命科学)
○Natsumi OGAWA, Hiromi KATO, Yoshiyuki OHTSUBO, Yuji NAGATA, Masataka TSUDA (Tohoku Univ.)

環境汚染に対するバイオレメディエーションの可能性を追求するために、様々な分解細菌株が環境から単離され、各分解メカニズムが解明されてきた。一方これら菌株の単離過程において、複数の細菌種が共存する複合微生物系（コンソーシアム）が得られることがしばしばある。このようなコンソーシアムにおける細菌間の共在機構の解明するために、我々は芳香族化合物で汚染した土壌から取得したフェナントレン分解能を有するコンソーシアム（MixEPa4）について解析を行ってきた。MixEPa4 から単離したフェナントレン分解細菌株の *Mycobacteirum* sp. EPa45 株は単独ではフェナントレン含有最小培地で生育阻害を受けるが、コンソーシアム共在菌の非分解細菌株 *Burkholderia* sp. Bcrs1W 株と混合培養することで生育阻害が緩和される効果（SGI 効果: Suppression of Growth Inhibition）を見出した。本研究では、様々な培養条件を用いて本 SGI 効果が検出される条件を提示することを目的とした。

上記 2 株以外の細菌株を用いてフェナントレン培地での SGI 効果を検討した結果、分離源の異なる他の *Burkholderia* 属細菌株との共培養下、また他の多環芳香族化合物分解細菌の *M. vanbaalenii* PYR-1 株に対しても SGI 効果が検出された。従って、本効果は本コンソーシアムの 2 株間のみに限らず、両細菌属間において広範に認められる現象であると示唆された。また、他の多環芳香族化合物で、EPa45 株の分解試験と生育試験を行った結果、分解活性のあるナフタレン、ビフェニルに対して生育阻害を受ける一方で、分解活性を示さないカルバゾールでは生育阻害を受けなかった。このことから、EPa45 株は多環芳香族化合物を分解することで生育阻害を受ける可能性が示唆された。さらに、*Burkholderia* 属細菌株はナフタレン、ビフェニルによる EPa45 株の生育阻害を緩和したため、本効果は EPa45 株が分解能を有する多環芳香族化合物に認められる現象である可能性が示唆された。またこれら EPa45 株の生育阻害は、培地中のマグネシウム濃度の増加に伴って緩和されることから、*Burkholderia* 属細菌株による SGI 効果に関してもマグネシウムが関与している可能性が示唆された。現在、全ゲノム配列決定済の *B. multiovorans* ATCC 17616 株の遺伝子破壊株を用いて、SGI 効果の分子メカニズムの解明を試みている。

Microbial consortium, Biodegradation, Phenanthrene

発表番号：3F015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# フェナントレン分解コンソーシアム MixEPa4 における構成細菌間の相互作用

# Interaction among bacterial strains from a phenanthrene-degrading consortium MixEPa4.

○守屋 梓[1,2]、小川 なつみ[1]、加藤 広海[1]、大坪 嘉行[1]、永田 裕二[1]、津田 雅孝[1] ([1]東北大院生命科学、[2]日本農芸化学会)
○Azusa MORIYA[1,2], Natsumi OGAWA[1], Hiromi KATO[1], Yoshiyuki OHTSUBO[1], Yuji NAGATA[1], Masataka TSUDA[1] ([1]Tohoku Univ., [2]JSBBA)

【背景・目的】
難分解性の環境汚染物質である多環芳香族化合物の微生物分解は、これまで純粋分離株を用いて数多くの研究が行われてきた。しかし、自然環境中での微生物による汚染物質分解は、周囲の様々な微生物の関わり合いのもとで進行すると予想されるため、汚染に対する微生物の集団的挙動を理解する必要がある。そこで当研究室では、モデル多環芳香族汚染化合物であるフェナントレンを含む 4 種芳香族化合物で人工的に汚染した土壌から、複数細菌種から成るフェナントレン分解コンソーシアム MixEPa4 を取得した。MixEPa4 では、フェナントレン完全分解活性を有する *Mycobacterium* 属株は菌叢内で優占しておらず、分解活性が確認できない *Proteobacteria* 門の細菌株が優占している。またフェナントレン分解時にもこの菌叢構造が極めて安定的に維持されることから、本構造は何らかの利点を有するものと予想される。本研究では、これら構成細菌株を単離し、再度混合した MixEPa4 再構成系を構築・解析することで、各細菌株の相互関係を明らかにすることを目的とした。
【方法・結果および考察】
MixEPa4 より、これまでに分離されていた分解菌 *Mycobacterium* sp. EPa45 株と非分解菌の *Dyella* sp. EPa41 株，*Bordetella* sp. EPa43 株，*Burkholderia* sp. Bcrs1W 株に加え、新たに *Pseudolabrys* sp. Me6 株を分離した。これら 5 株は、上記菌叢を構成する 6 つの構成属細菌のうちで菌叢の 95%以上を占める 5 属細菌と 16S rRNA 遺伝子配列が一致した。この 5 株を混合した再構成系 ReMixEPa4、および各菌株を 1 種類ずつ除いた「シングルノックアウト」系(ΔEPa41，ΔEPa43，ΔEpa45，ΔBcrs1W，ΔMe6)を調製し、フェナントレン分解速度や菌叢構造を比較した。分解菌が存在する各「シングルノックアウト」系では ReMixEPa4 と分解速度に大きな差はなく、ΔMe6 で全体の生育量が増加したものの、各系の菌叢における菌株比率は同程度であった。またΔEpa45 ではフェナントレン分解が起きないが、それぞれの非分解菌は安定的に存在した。これら結果は、構成菌株が生育に関して互いに強固に依存する関係ではない可能性を示している。一方で、複数の非分解菌株において、分解菌 EPa45 がフェナントレン代謝時に示す生育阻害を緩和する効果ならびに分解促進効果が認められた。本研究によって、コンソーシアム内の生育における構成細菌株間の複雑な影響関係の一端が判明した。

Microbial consortium, Biodegradation, Phenanthrene

発表番号：3F016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 有機質肥料活用型養液栽培に適した微量要素供給剤の開発　2

# Development of supplement of minor metal nutrients suitable for organic hydroponics (2)

○篠原 信[1]、太田 香菜子[5]、藤原 和樹[1]、安藤 晃規[2]、宮本 憲二[3]、加藤 康夫[4]、浅川 晋[6]、小川 順[2]、高野 雅夫[5]([1]農研機構、[2]京大院農・応用生命、[3]慶大・理工、[4]富山県立大工、[5]名大院・環境、[6]名大院・生命農)

○Makoto SHINOHARA[1], Kanako Ota[5], Kazuki Fujiwara[1], Akinori Ando[2], Kenji Miyamoto[3], Yasuo Kato[4], Susumu Asakawa[6], Jun Ogawa[2], Masao Takano[5] ([1]NARO, [2]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [3]Dept. Biosci. Inform., Keio Univ., [4]Biotech. Res. Cent., Toyama Pref. Univ., [5]Grad. Sch. Environ. Stu., Nagoya Univ., [6]Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

[背景・目的]養液栽培では不可能とされていた、有機質肥料の利用を実現した新技術が有機質肥料活用型養液栽培である。肥料成分のうち、NPK の主要三元素は鰹煮汁などの有機質の肥料や草木灰などで供給できるが、それらだけでは Ca, Mg, Fe といった金属元素が不足するため、別の天然資材で金属元素を供給する必要がある。しかし天然の Ca 塩、 Mg 塩は炭酸化合物や酸化物として存在するものが多く、水溶液の pH を上昇させる原因となる。pH の上昇（pH6 以上）は Fe の不溶化を招くため、作物に鉄欠乏が発生する恐れが高くなる。したがって、十分な量の Ca, Mg を供給しながら pH の上昇を抑え、作物の Fe 吸収を妨げない技術の開発が必要である。昨年の発表では、Ca, Mg, Fe をバランスよく含む牡蠣殻粉末を発酵学的手法で溶解し、有機質肥料活用型養液栽培に微量金属元素を供給する資材について紹介した。しかしこの方法では、廃糖蜜由来の黒褐色物質がホウレンソウの根に付着し、根の生育を悪化させる恐れがあることが分かった。そこで本研究では、黒褐色物質を含まない形態での牡蠣殻石灰溶解法を検討した。

[方法・結果] 牡蠣殻石灰粉末をクエン酸で溶解させたところ、効率よく溶解することができたが、数時間後には沈殿が形成され始め、一晩経つとほとんどのクエン酸カルシウムが沈殿した。これはクエン酸カルシウムが水にほとんど溶けない（0.085 g/100mL、18℃）とされる過去の知見とよく一致した。ただし、牡蠣殻石灰にヤシ殻灰を加えてクエン酸で溶解したところ、クエン酸カルシウムの沈殿形成を抑えることができた。これは、クエン酸のカルボキシ基とカルシウムイオンが鎖状に連鎖して擬似高分子化するのを、ヤシ殻灰に含まれるカリウムが阻害する結果、溶解度の高い状態を維持できるものと考えられる。牡蠣殻石灰とヤシ殻灰をクエン酸で溶解した資材をトマトに施用したところ、大量のクエン酸で溶解したものはトマトの生育を悪化させたが、クエン酸の量を抑えて溶解した資材はトマトが良好に生育した。

Organic hydroponic, oyster shell lime, minor nutrients

発表責任者：篠原信（shsh@affrc.go.jp）

発表番号：3F017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Investigation of organic compounds-mineralizing conditions by designed microbial consortia

○Sakuntala SAIJAI[1], Akinori Ando[1,2], Yuki Shimura[1], Makoto Shinohara[3], Jun Ogawa[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ., [3]NARO)

[Background] Organic hydroponic is one of a soilless crop cultivation technique and expected to be used instead of traditional agricultural practices. Organic hydroponics consists of the nitrification process which is enrichment process of microbial community for mineralizing organic compounds and the crop cultivation process with maintaining the enriched nitrifying microbial community. Up to now, the nitrification model for organic hydroponics was constructed by combining only 3 strains. This model showed the ability to perform nitrification from organic compounds (peptone and yeast extract). In this study, we investigated the effect of various kinds of organic compounds-mineralizing conditions by the combination of nitrifying strains on nitrification process.

[Method and result] Combination cultures of a heterotrophic nitrifying bacterium (*Bacillus badius* NBRC15713) and autotrophic nitrifying bacteria (*Nitrosomonas europaea* NBRC 14298 and *Nitrobacter winogradskyi* NBRC 14297) were cultured in the organic mediums containing polypeptone NF, bonito solution, skim milk, corn steep liquor (CLS) or urea as nitrogen source (120 ppm). The C/N ratio of the medium was adjusted to 10 and 50. Nitrification activity was observed by measuring the concentrations of $NH_4^+$, $NO_2^-$, and $NO_3^-$. Nitrification by the combination of heterotrophic and autotrophic nitrifying bacteria was observed in the all culture medium conditions, except for the culture medium containing CSL as organic source. The medium containing polypeptone NF showed that nitrification of the medium with C/N 10 was finished faster than that of the medium with C/N 50. The similar result was also observed with bonito solution. In contrast, nitrification of the medium with both C/N ratios was finished at the same time in the medium containing urea. Nitrification seemed to be stopped when using skim milk. $NO_2^-$ accumulation (400 mg/L) was remained at high concentration in the culture medium without further oxidation to nitrate. In addition, we investigate various conditions; pH, organic compounds concentration, temperature, inoculums volume, for nitrification process by this consortia.

nitrification, nitrifying bacteria, organic hydroponics

発表番号：3F018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酸性鉱山廃水処理システムにおける微生物群集構造の高解像度解析

# High-resolution analysis of microbial community structure from a treatment process for acidic mine drainage

○青柳 智、堀 知行、稲葉 知大、Navarro Ronald、愛澤 秀信、尾形 敦（産総研・環境管理）
○Tomo AOYAGI, Tomoyuki HORI, Tomohiro INABA, Ronald NAVARRO, Hidenobu AIZAWA, Atsushi OGATA (AIST. EMRI)

【目的】休廃止鉱山のいくつかでは雨水や地下水が坑道へと浸透して重金属などを含んだ坑廃水が発生する。河川や湖沼への流出による重金属汚染を防止するために、閉山後もこれらの坑廃水を処理し続けなければならない。特に硫化鉄鉱を採掘していた鉱山からの坑廃水は強酸性を示し二価鉄を高濃度に含む。その処理には、強酸性環境で生育可能な鉄酸化微生物により二価鉄を三価鉄へと変換した後、炭酸カルシウム等の添加により鉄を沈殿除去する方法が採用されている。黄鉄鉱を採掘していた岩手県・旧松尾鉱山では本手法により年間を通して良好な処理水質が維持されている。これまでに分離培養法に基づいた微生物解析により、処理汚泥中では *Acidithiobacillus ferrooxidans* が主に鉄酸化を担うとされていたが、実際の汚泥中にどのような微生物が存在するのかは明らかになっていない。本研究では次世代シークエンス解析により、酸性鉱山廃水処理システムにおける汚泥中の微生物を数万種レベルで明らかにし、さらにこの汚泥を接種源に鉄酸化微生物の集積系の構築を試みた。
【方法・結果】旧松尾鉱山の酸性坑廃水処理システムにおける鉄酸化槽から汚泥を採取し、そこから DNA を抽出し 16S rRNA 遺伝子の V4 領域を標的に PCR 増幅を行った。得られた遺伝子増幅産物断片を次世代シークエンサー（MiSeq、illumina）による大規模塩基配列解読に供し、合計で約 15 万の遺伝子断片を系統学的に特徴付けた。その結果、独立栄養性の鉄酸化細菌として知られる *Ferrovum* 属細菌が最優占種として同定され、続いてアルカリ化を行う *Metallibacterium* 属細菌、金属を細胞内に蓄積する好酸性の *Acidiphilium* 属細菌、従属栄養性鉄酸化能を有する *Acidithiobacillus* 属細菌や系統学的に新規な Chloroflexi 門細菌が主要構成種であった。坑廃水中には有機炭素源が限られることから、鉄酸化で得られるエネルギーにより炭酸固定を行う独立栄養性細菌が最優占化したと考えられた。次に、この汚泥を接種源、二価鉄および重炭酸塩を基質として用い、pH1.8～2.0 の好気条件下において集積培養を行った。三ヶ月間にわたる長期培養により得られた微生物集積系から DNA を抽出し、上記と同様に次世代シークエンス解析に供した。その結果、系統学的に新規な Thermoplasmata 綱の古細菌および Firmicutes 門に属する *Tumebacillus* 属細菌および *Alicyclobacillus* 属細菌が高度に集積されていることが明らかとなった。集積された微生物はいずれも酸性の鉄酸化環境において高頻度に検出される未培養微生物群と近縁であった。以上から、坑廃水処理汚泥中では既知の鉄酸化細菌に加え、これまでに明らかとなっていない複数の微生物群が鉄酸化に関与していると推察される。現在、限界希釈培養法により、これらの純粋菌株の取得を試みている。

iron(II) oxidation, microbial community structure, high-throughput sequencing

発表責任者：堀知行（hori-tomo@aist.go.jp）

発表番号：3F019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 超高感度 rRNA-Stable Isotope Probing による未知環境微生物群の機能解析

# Ultra-high-sensitivity stable-isotope probing to study the ecophysiology of uncultured microorganisms in natural and engineered environments

○堀 知行[1]、青柳 智[1]、田中 亮一[2]、尾形 敦[1] ([1]産総研・環境管理、[2]熊本県・産技セ)
○Tomoyuki HORI[1], Tomo AOYAGI[1], Ryoichi TANAKA[2], Atsushi OGATA[1] ([1]AIST, [2]KIRI)

【目的】Stable Isotope Probing（SIP）は、自然環境における微生物群集の構造と機能を結びつける手法である。これまでに様々な安定同位体（$^{13}C$、$^{15}N$、$^{18}O$ 等）からなる化合物が微生物培養の基質として用いられ、微生物生体分子（リン脂質脂肪酸、核酸、タンパク質）の同位体標識が追跡されてきた。中でも rRNA-SIP は、同位体基質を資化した未培養微生物群を系統的に同定することが可能である。同位体標識された微生物 rRNA は、密度勾配遠心で分離された後、Denaturing gradient gel electrophoresis（DGGE）等により検出されてきた。近年、我々は高速かつ大規模な塩基配列解読を可能にする次世代シークエンサーの適用により、僅かな量の同位体標識 rRNA を超高感度に検出する新手法「超高感度 rRNA-SIP」を確立した。ここでは本手法の有効性を環境微生物群の機能解明により実証した。
【方法・結果】本研究では、自然環境における環境微生物の主要な栄養代謝（①好気呼吸と②食物連鎖）を対象とした。実験①で、活性汚泥微生物群集を $^{13}C$-パルミチン酸（1,2,3,4 位標識）を基質として培養したところ、開始直後から $^{13}C$ 基質の分解に伴う $^{13}CO_2$ の生成が観察され、リン脂質脂肪酸の分子量+4 の画分が急激に上昇した。培養 48 時間目の試料を超高感度 rRNA-SIP へと供したところ、系統学的に極めて新規な複数の環境微生物の $^{13}C$ 標識が観察された。これは活性汚泥中でこれまでに全く未知の環境微生物群が高級脂肪酸の取り込みに関与するという興味深い事象を示している。実験②で、$^{13}C$-重炭酸と硝酸を海底由来堆積物へと加えて培養したところ、開始後 4 日目には硝酸の減少と硫酸の生成（硝酸還元と硫黄酸化の酸化還元共役）が観察され、この時期に独立栄養性硫黄酸化細菌群の $^{13}C$ 標識が観察された。さらに培養を継続した結果、系統学的に新規な硫酸還元細菌群が $^{13}C$ 標識化された。これは硫黄酸化細菌により固定化された $^{13}C$ 炭素が従属栄養性の硫酸還元菌群へ直接的に伝達されたことを示している。本成果は、海底堆積物中の硫黄サイクルに関与する微生物群の密接な代謝連携（種間炭素伝達）を示した初めての例である。以上から、我々の確立した超高感度 rRNA-SIP が未知環境微生物群の機能解明に有効であることが示された。本手法は、増殖速度は遅いが代謝活性を有する微生物、微量有害汚染物質の分解微生物、重要な生物地球化学的反応を担う稀少微生物などを含めた微生物生態系機能の全貌解明に向けた一歩を示すものである。

Stable Isotope Probing, 16S rRNA, High-throughput sequencing

発表責任者：堀知行（hori-tomo@aist.go.jp）

発表番号：3F020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Leucobacter* 属 ASN212 株に対する増殖活性因子としての porphyrin 類金属錯体の構造活性相関研究

Structure activity relationship of porphyrin metal complex for *Leucobacter* sp. ASN212

○高井 亮吾、モハンマドナズルールイスラム ブイヤン、重冨 顕吾、鎌形 洋一、生方 信（北大院農）
○RYOGO TAKAI, Bhuiyan Mohammad Nazrul Islam, Kengo Shigetomi, Yoichi KAmagata, Makoto Ubukata (Hokkaido Univ.)

環境中に多種存在する微生物種のうち、実験室条件によって培養できる種は全体のわずか 10%以下であるとされ[1)]、残りの 90%以上の難培養微生物が生産する化合物や遺伝子には、未だ多くの新規生理活性物質または未知の有用遺伝子群が存在していると考えられる。

これらの資源化のためには難培養微生物の培養技術の確立が重要な課題であると考え、我々は難培養微生物とされる種のうち、自身の生育に異種が生産する増殖因子を必要とする種に注目した。

異種間でやり取りされている増殖因子を探索するために、活性汚泥より分離された *Sphingopyxis* 属 GF9 株及および 3 種の異種微生物（*Leucobacter* 属 ASN212 株、ASTN45 株及び AST4 株）に注目して研究を行った。ASN212 株、ASTN45 株及び AST4 株は、GF9 株が供給する異なる増殖因子を受け取ることで増殖可能となる。増殖因子探索の結果、GF9 株が生産する 6 種の porphyrin 類縁体が、ASN212 株に対する増殖因子として単離、構造決定された[2)]。過去に porphyrin 類縁体が微生物の増殖因子として報告された例はなく、また見出された増殖因子のうち、zincphyrin の ASN212 株に対する MEC は 14 pM であり、既知の微生物増殖因子と比較して極めて低濃度で活性を示すことがわかった。

このように、見出された porphyrin 類縁体は既知の微生物増殖因子とは異なる特徴を持ち、新たなクラスの微生物増殖因子となり得る可能性がある。そのため、増殖因子としての porphyrin 類縁体に関する研究を行うことは難培養微生物の培養方法確立に新たな知見を与えるものと考えられる。

我々は GF9 株より見出された ASN212 株に対する増殖因子である porphyrin 類縁体のうち、coporphyrin Ⅲ及びその亜鉛錯体である zincphyrin に注目した。この２種は同じ porphyrin 構造を持ちながら、MEC の値は 100 倍以上異なり、porphyrin 類の金属原子との錯体形成が ASN212 株の増殖促進に大きく寄与していると予想された。本研究では、porphyrin 類の亜鉛を含む 7 種の金属錯体と ASN212 株に対する増殖活性との構造活性相関を行うことを目的とした。

先行実験として copopirohyrin Ⅰを用いて 7 種の金属（Zn, Mg, $Fe^{2+}$, $Fe^{3+}$, Co, Ni）錯体を調製して ASN212 株に与え、ATP 生産量を計測することで増殖促進活性との構造活性相関を行う。次いで coproporphyrin Ⅲを用いて同様に構造活性相関を行う予定である。

また各種金属錯体の計算による分子の立体に基づいた構造活性相関も現在検討中である。

（参考文献） １）Amann. R. I. *et al.*, *Microbiol Rev.*, **59**, 143-146 (1995)
２）M.N.I.Bhuiyan. *et al., J Antibiot.*, 1-7 (2015)

uncultured bacteria, porphyrin

発表番号：3F021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高脂肪食における難消化性オリゴ糖 DFAIII と FOS の投与による腸内細菌叢の比較評価

# Evaluation of intestinal microflora by administration of DFAIII or FOS under high-fat diet

○鳶 諒介、石上 純佳、北川 航、曾根 輝雄、鎌形 洋一、石塚 敏、原 博、浅野 行蔵 (北大農)
○Ryosuke GAN, Sumika ISHIGAMI, Wataru KITAGAWA, Teruo SONE, Yoichi KAMAGATA, Satoshi ISHIZUKA, Hiroshi HARA, Kozo ASANO (Hokkaido Univ.)

【背景及び目的】　難消化性オリゴ糖 Difructose anhydride III (DFAIII)は腸内において Bifidobacterium 属菌には資化されないが，腸内発酵が促進される．この際に生成された有機酸は腸内 pH を低下させ，宿主の細菌叢を改善させるため，DFAIII にはプレバイオティクスとしての効果を有することが知られている．本研究では DFAIII 単投与，及びヒトから単離した DFAIII 資化性菌である *Blautia producta* AHU1760 との共投与を行い，宿主へもたらされる有益な影響の比較評価，及び腸内細菌叢の変化を解明し，腸内細菌と健康の関係における科学的な根拠に基づく証明を試みた．さらに，既知のシンバイオティクス素材であるフラクトオリゴ糖(FOS) +*Bifidobacterium breve* JCM1192$^{T}$との比較により，高脂肪条件下における本プレバイオティクスの効果の評価を試みた．

【方法】　5 週齢の SD 系雄性ラットを，対照群(Control 群)，DFAIII 投与群(DFAIII 群)，FOS 投与群(FOS 群)，DFAIII+ *B. producta* AHU1760 投与群(syn-DFAIII 群)，FOS+*B. breve* JCM1192$^{T}$投与群(syn-FOS 群)の標準脂肪食を与えた 5 群と，さらにそれぞれに対し 5 倍のコーン油を含む高脂肪食を与えた高脂肪食投与群(HF/Control 群，HF/DFAIII 群，HF/FOS 群，HF/syn-DFAIII 群，HF/syn-FOS 群)の計 10 群に 7 匹ずつ分け，30 日間の試験飼育を行った．解剖後，得られた盲腸内容物や糞便，血清を用いて腸内 pH，有機酸，胆汁酸，コレステロール等の解析を行った．さらに 16S rRNA 遺伝子の V3 領域に基づく DGGE 法と V3-V5 領域に基づく次世代シーケンス法により腸内細菌叢の解析を行った．

【結果及び考察】　標準脂肪食下での DFAIII の投与は，宿主の腸内において総有機酸量の増加とそれに伴う pH の低下を招き，盛んな腸内発酵が示された．高脂肪食を与えた場合においても，DFAIII の投与は依然として盲腸内容物量と有機酸量が多く，腸内 pH の有意な低下が確認された．一方で FOS の投与は腸内発酵の減少が観察された．さらに DFAIII の投与によって，血清中コレステロールでは高脂肪食条件下における HDL-コレステロール値の減少が緩和され，腸内細菌叢解析では他群とは異なる細菌叢を形成し，高脂肪食条件下での菌叢の維持が確認された．本結果を受けて，DFAIII の投与は高脂肪食ストレスにも強い耐性を持つ強固な細菌叢を形成させ，これらの細菌の高い発酵能により腸内環境の改善が期待されると考えられた．

DFAIII, Blautia producta, High-fat

発表責任者：鳶 諒介（ganryo-@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3F022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 由来細胞外多糖の構成糖解析

# Sugar composition analysis of EPS from hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1

○小原 薬子、阿形 朋子、三輪 京子、森川 正章（北大院・環境）
○Kusuko OBARA, Tomoko AGATA, Kyoko MIWA, Masaaki MORIKAWA (Hokkaido Univ.)

環境中において、多くの微生物はコロニーやバイオフィルムなどの固着性高次構造体を形成し、細胞同士が化学シグナルのやり取りを介して、協調的にふるまうことが知られている。大腸菌や枯草菌などの常温微生物では高次構造体形成に関わる研究は多くされているが、極限環境微生物、特に超好熱菌では研究がほとんど進んでいない。

超好熱菌とは至適生育温度 80℃以上の原核生物の総称である。その多くがアーキアに分類され、分子系統解析より原始生命体に近いと考えられている。また、転写因子などの分子生物学・生化学的解析から、アーキアは細菌よりも真核生物に近縁であることがわかっている。これらのことから、超好熱性アーキアは真核生物の起源に最も近い原核生物である。そこで、私たちは生命の進化に関する興味から超好熱性アーキア *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 のバイオフィルム等の高次構造形成機構の解明を目指している。

KOD1 は他の *Thermococcales* 科アーキアと比較すると非常に高いバイオフィルム活性をもつ。KOD1 の固着性細胞と浮遊細胞の比較により、これまでに固着性細胞では細胞壁成分である S-layer protein（Slp）の発現量が顕著に上昇していることがわかっている。大腸菌で KOD1 由来 Slp を大量発現させたところ、Slp 発現株では細胞凝集が見られた。また、免疫染色により Slp は大腸菌細胞で、内膜を貫通し外膜表面に露出しており、細胞凝集やバイオフィルム形成に直接関わっていることが示唆された。二次構造予測では、KOD1 の Slp は近縁種とは異なり、2 回膜貫通タンパク質と推測されている。

一般に微生物高次構造体は細胞外多糖（EPS）に覆われていることが多い。今回、KOD1 の細胞外多糖（EPS）の構成単糖の解析を行ったところ、KOD1 の EPS はマンノースを主成分とすることがわかった。そのほかには、Glc、Gal、Rib、GlcNAc、ManNAc、GalNAc を含んでいた。近縁種である *T. litoralis* はマンノースのみから構成される EPS をもつが、KOD1 はそれとは異なる組成の EPS をもつことが明らかになった。以上のことから、特有の Slp の構造と EPS の組成が KOD1 の高いバイオフィルム活性に関与しているのではないかと推測される。

hyperthermophile, biofilm, EPS

発表番号：3F023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母 *ura4* 遺伝子破壊株が受ける培地成分の影響の解析

# Analysis of the influence of media components that fission yeast *ura4* gene disruption strain receive

○西野 耕平、櫛間 満咲、松尾 安浩、川向 誠（島根大・生物資源・生命工）
○Kouhei Nishino, Misaki Kushima, Yasuhiro Matsuo, Makoto Kawamukai (Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

ポリペプトンはカゼインタンパク質を酵素消化したもので、単一のアミノ酸や低分子量のペプチドを含むことから窒素源、アミノ酸源として使用される培地基材である。ポリペプトンを含む YPD 培地は出芽酵母の生育によく用いられているが、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe*（以下 *S. pombe*）の生育を阻害することが知られておりその使用は敬遠されている。

分裂酵母の *ura4* 遺伝子は機能欠損することでウラシル要求性を示すことを利用して古くからマーカー遺伝子として使用されている。我々の研究室において *S. pombe* の *ura4* 遺伝子破壊株（以下 *Δura4* 株）は YPD 培地で生育させると劇的な細胞溶解を示すことを見出している。本研究においては、*Δura4* 株の細胞溶解がどのようにして起こるのかを明らかにすることを目的としており、本発表では培地成分に焦点を当てて発表する。まず我々は、ポリペプトンの影響を調べるために培地中にポリペプトンのみを添加した培地を作製すると野生株のみならず *Δura4* 株も生育可能であった。このことから、ポリペプトン中の成分には窒素源、アミノ酸源となる成分だけでなく各種ビタミン、ミネラル、無機イオン成分さらには少なくともウラシル要求性を相補する成分が含まれていることを見出した。しかし、興味深いことに酵母が生育可能な最少培地にポリペプトンを添加するとウラシル要求性株の生育は著しく悪くなることを見出し、さらにその原因は最少培地中の塩化アンモニウムである可能性が高かった。これらの結果より、培地中の窒素源が過剰にある場合ウラシルの取り込みが阻害されるのではないかと考えた。

また、これまでに我々はユビキチンリガーゼ Pub1 の欠損株により *Δura4* 株の細胞溶解は顕著に抑圧されること、またその原因はウラシルトランスポーターである Fur4 を介したウラシルの取り込みが亢進することであることを明らかにしている（1）。そこで、培地中の成分と Fur4 の関係性を調べると Fur4 は窒素源の枯渇によって膜への局在が誘導されることを明らかにした。また、単一アミノ酸を唯一の窒素源とした場合いくつかのアミノ酸では Fur4 の膜への局在が負に制御されることから Fur4 は明らかに培地中の窒素源に応答し局在が変化している結果を得た。これらのことから、YPD 培地においては過剰な窒素源により細胞内へのウラシルの取り込みが負に制御されており、そのことが細胞溶解の一因となっているのではないかと考えている。現在は Yeast Extract など他の培地成分の関連性も調べている。

（1）K Nishino et. al. PLoS ONE 10(11):e0141796

Medium, S. pombe, Cell lysis

発表責任者：西野　耕平（nishinokouhei890531@gmail.com）

発表番号：3F024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Pseudomonas* 属細菌の細胞離散に関与する因子の同定
Identification of a factor involved in cell dispersion in *Pseudomonas* species.
○土田 大暁、鈴木 誉士、上田 賢志、高野 英晃（日大生資科）
○Hiroaki Tsuchida, Takashi Suzuki, Kenji Ueda, Hideaki Takano (Nihon Univ.)

【目的】*Pseudomonas putida* KT2440 は難分解性芳香族化合物群の高い資化能を有するグラム陰性の環境浄化細菌である。我々は光合成能を有さない細菌の光応答現象に関わる新規なタイプの光受容体 LitR を見出し、*P. putida* の光応答機構に関する研究を進めてきた。その過程において、*P. putida* の細胞同士が相互作用する培養期依存的な凝集現象を独自に見出した。そこで、本研究では、*Pseudomonas* 属細菌の凝集メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果・考察】*P. putida* の凝集現象を詳細に調べたところ、凝集は対数増殖の初期である培養開始後 2～3 時間目に観察され、4 時間目以降には消失し、細胞は離散していた。また、本凝集現象は暗条件下においてのみ認められ、青色光照射下では観察されなかった。本現象は *P. fluva* と *P. mendocina* においても認められたことから、*Pseudomonas* 属細菌において広く起こる現象であり、それは光に大きな影響を受けることが明らかになった。*P. putida* の凝集・離散メカニズムを明らかにすることを目的として、凝集あるいは離散を引き起こす活性因子の検出を試みたところ、培養上清中に離散活性が検出された。その一方で凝集を誘発する因子は検出されなかった。離散因子は熱処理によって失活したことから、蛋白質であると予想された。そこで、LB 液体培地を用いて 18 時間培養した *P. putida* の培養上清から離散因子の精製を行った。培養上清を飽和濃度 10％で硫安分画、弱陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製を進めた。最終精製ステップの活性分画には、約 68 kDa の蛋白質が SDS-PAGE 解析によって確認され、それは鞭毛のプロペラの役目を担うフラジェリンを構成する FliC であった。離散活性は *fliC* 破壊株では検出されなかったことから、凝集した細胞の離散現象は FliC によって引き起こされることが強く示唆された。また、FliC を含む離散活性因子の発現は光照射による影響を受けなかったことから、離散現象は光に独立的な現象であることが示唆され、その一方で凝集現象は光に依存することが予想された。

Pseudomonas, dispersion, Flic

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

発表番号：3F025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母の窒素源カタボライト抑制を解除する分泌性活性物質の同定

# Identification of secretory factors that abrogate nitrogen catabolite repression in fission yeast

○孫 暁穎[1,2]、八代田 陽子[1,3]、平井 剛[4,5]、植木 雅志[6]、廣田 洋[3]、王 倩倩[5]、本郷 やよい[7]、中村 健道[7]、人羅 勇気[1]、高橋 秀和[8]、袖岡 幹子[4,5]、長田 裕之[9]、浜本 牧子[2]、吉田 稔[1,3] ([1]理研・化学遺伝学、[2]明治大院・農、[3]理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、[4]理研・有機合成、[5]理研 CSRS・触媒・融合、[6]理研・ナノ医工学、[7]理研 CSRS・分子構造解析、[8]山口大院・医、[9]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

○Xiaoying Sun[1,2], Yoko Yashiroda[1,3], Go Hirai[4,5], Masashi Ueki[6], Hiroshi Hirota[3], Qianqian Wang[5], Yayoi Hongo[7], Takemichi Nakamura[7], Yuki Hitora[1], Hidekazu Takahashi[8], Mikiko Sodeoka[4,5], Hiroyuki Osada[9], Makiko Hamamoto[2], Minoru Yoshida[1,3] ([1]Chem. Genet. Lab., RIKEN, [2]Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., [3]Chem. Genomics Res. Group, RIKEN CSRS, [4]Syn. Org. Chem. Lab., RIKEN, [5]Catal. and Integr. Res. Group, RIKEN CSRS, [6]Nano Med. Eng. Lab., RIKEN, [7]Mol. Struc. Characterization Unit, RIKEN CSRS, [8]Grad. Sch. of Med., Yamaguchi Univ., [9]Chem. Bio. Res. Group, RIKEN CSRS)

環境変化への適応能はすべての生物にとって必須である。酵母には、培地中に良質な利用しやすい窒素源（アンモニア、グルタミン酸等）が存在すると、利用しにくい窒素源（プロリン、分岐鎖アミノ酸等）の利用・取り込みに必要な酵素やトランスポーターの発現が抑制されるという「窒素源カタボライト抑制機構」が存在する。Eca39 は分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素であり、分岐鎖アミノ酸（ロイシン、イソロイシン、バリン）を合成する唯一の経路の最終段階の反応を触媒する。分裂酵母の *eca39*$^+$遺伝子の破壊株（*eca39Δ* 株）は、利用しやすい窒素源であるグルタミン酸を含む最小培地 EMM 上においては、分岐鎖アミノ酸が含まれていてもそれらを取り込めず生育不可能となるが、野生株の近傍にて培養することにより生育が可能となる適応現象を我々は見出した[1)]。この現象は、野生株から細胞外へ分泌された何らかの物質により、*eca39Δ* 株において窒素源による抑制機構が解除され、アミノ酸の取り込み能が回復することで引き起こされたと考え、我々はこの分泌されている物質の単離・同定を試みた。野生株の培養液上清を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび HPLC で分画・精製後、各種 NMR、LC/MS、GC/MS 等で解析した結果、活性物質として 10(*R*)-hydroxy-8(*Z*)-octadecenoic acid（$C_{18}H_{34}O_3$）および 10(*R*)-acetoxy-8(*Z*)-octadecenoic acid（$C_{20}H_{36}O_4$）を同定した。各化合物を全合成して活性を確認したところ、最小有効濃度はそれぞれ 12 ng/mL、6.1 ng/mL であった。一方、他の構造類縁体には活性は認められなかった。また、この適応生育現象は *eca39Δ* 株だけではなく、ロイシン要求性株 *leu1* においても見られた。*leu1* 株は高濃度アンモニアを含む EMM 培地においてはロイシンが含まれていても生育が抑制されるが、活性物質を添加すると生育が促進された。さらに、その生育の促進はアミノ酸トランスポーターをコードする *agp3*$^+$依存的であることがわかった。よって我々はこれらの化合物が新規の分裂酵母フェロモンであると提唱し、Nitrogen Signaling Factors (NSFs)と命名した。

1) Takahashi, *et al.*, 2012, *J. Biol. Chem.,* 287: 38158

adaptive growth, nitrogen catabolite repression, fission yeast

発表番号：3F026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌の中央代謝系と脂質代謝系を共役させる新規制御機構の解析

# Elucidation of the regulatory network between lipid synthesis and central metabolic pathway in *Bacillus subtilis*.

○多喜乃 雄太[1]、高田 啓[2]、兼崎 友[3]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1,3]（[1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]立教大・理・生命理、[3]東京農大・ゲノム解析セ）
○ Yuta TAKINO[1], Hiraku TAKADA[2], Yu KANESAKI[3], Satoru WATANABE[1], Taku CHIBAZAKURA[1], Hirohumi YOSHIKAWA[1,3] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Rikkyo Univ., [3]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center)

【目的】栄養状態に応じた増殖制御機構は枯草菌などをはじめとするバクテリアにおいて必須な現象である。中央代謝系（解糖系、クエン酸回路）および脂質代謝系（リン脂質・脂肪酸合成系）に関し、個々の制御機構は現在まで多くの研究がなされてきた一方で、栄養状態に応じてこの両代謝系を共役させる機構に関しては不明な点が多い。当研究室において、生育に必須なリン脂質合成酵素 PlsX の機能解析の一環として取得された *plsX22* 変異株は、野生株と比較して LB 培地における顕著な生育遅延を示した[1]。*plsX22* 変異株における生育遅延の原因を探索するため、生育が回復する抑圧変異株を取得し、次世代シーケンサーを用いた Mapping 解析を行った。その結果、抑圧変異を脂肪酸合成酵素遺伝子 *fabHA, fabF* や PTS 糖輸送酵素(EI) をコードする遺伝子 *ptsI* の ORF 内に同定した。そこで本研究では、PlsX とこれらの因子の遺伝学的関係性を明らかにすることを目的とした。
【方法と結果】脂肪酸合成酵素 FabHA・FabF はそれぞれ脂肪酸合成の開始と進行を担っている。このうち、FabF は特に PlsX と同様に Acyl-ACP を基質とするため、両者は競合関係にある。FabF 阻害剤 Cerulenin を低濃度添加することで plsX22 変異株の生育遅延を抑圧したことから、生育遅延抑圧には脂肪酸合成系の抑制が重要であると推定した。一方で plsX22 変異株に ptsI 破壊カセットを導入すると同様の抑圧効果が観察できたことから、EI (PtsI)の脂肪酸合成系制御への関与が示唆された。EI (PtsI)はホスホエノールピルビン酸から HPr (PtsH)の 15 番目の His 残基にリン酸基を転移する(P-His-HPr)。このリン酸基は PtsG などの糖特異的な輸送酵素に転移し、糖の取り込みを促進する一方で、P-His-HPr 自身も様々な因子と相互作用し、機能調節を行っている。このリン酸化の影響を検証するため、HPr の His15 を Ala に置換した PtsH (H15A)を plsX22 変異株に導入したところ、生育遅延を抑圧した。また *ptsI* の破壊と PtsH(H15A)の導入のどちらにおいても FabF の転写活性と発現量が低下していた。*fabF* は *fabHA* とオペロンを形成しプロモーターを共有することから、P-His-HPr が脂肪酸合成の開始と進行を転写レベルで制御している可能性が示唆された。また、P-His-HPr のリン酸基は他のタンパク質や転写因子をリン酸化し、機能調節をすることが知られている。これらのことから *ptsI* による HPr のリン酸化が脂質代謝の調節にも関与している可能性が示唆された。本発表では外界の栄養に応じて中央代謝系と脂質代謝系を共役させる機構について議論したい。

1. Takada, H et al., (2014) . *Mol Microbiol*.91, 242-255

Fatty acid synthesis, Central metabolic pathway, PTS

発表責任者：吉川博文（hiyoshik@nodai.ac.jp）

発表番号：3F027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細菌細胞はプラスミド保持に伴う負荷にどう適応するのか？
# Adaptation of bacterial strains to increased fitness cost by plasmid carriage

○河野 響、久保 彩、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Hibiki KAWANO, Aya KUBO, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【目的】プラスミドは可動性遺伝因子の一つであり、宿主に薬剤耐性や難分解性物質分解能などの新規形質を与える。一方、獲得した新規形質が有効に発揮されない条件下においてはプラスミドの保持が宿主の生育に負荷となる例も報告されている。非選択条件下においてプラスミド保持株は淘汰されると考えられるが、実際には多くのプラスミド保持株が環境中で生残している。このような宿主は、プラスミド保持に伴う負荷を軽減する何らかのメカニズムを持つことが予想される。そこで、本研究では環境中から単離された際にプラスミドを保持していた宿主 (“original host”) と、人工的にプラスミドを保持させた宿主におけるプラスミド保持に伴う負荷を比較することで、original host が保持していると予想される負荷軽減化機構の探索を目的とした。

【方法・結果】先行研究では、*Pseudomonas resinovorans* CA10 株から単離されたカルバゾール分解プラスミド pCAR1（IncP-7 群に属する）を *Pseudomonas putida* KT2440 株に保持させ、pCAR1 を保持しない *P. putida* KT2440 株と競合培養を行うと、pCAR1 保持株が速やかに淘汰されることが報告されていた (Takahashi *et al.*, 2015, *Environ. Microbiol.* 17: 134-55)。そこで本研究ではまず、pCAR1 の original host である *P. resinovorans* CA10 株と *P. putida* KT2440 株について、pCAR1 保持株・非保持株の競合培養実験における pCAR1 保持株の生残率を調べた。各株について、pCAR1 改変プラスミド pCAR1PK 保持株と非保持株を等量混合し、24 時間ごとに植え継ぎながら 144 時間競合培養したところ、*P. putida* KT2440 株では過去の結果と同様に pCAR1PK 保持株が速やかに淘汰されたのに対し、*P. resinovorans* CA10 株の pCAR1PK 保持株の比率に大きな変化は見られなかった (図)。また単独培養した際には、両株ともにプラスミド保持による生育の差は見られなかった。*P. putida* KT2440 株を original host とするトルエン分解プラスミド pWW0（IncP-9 群に属する）について、同様の実験を行った結果も併せて発表する。

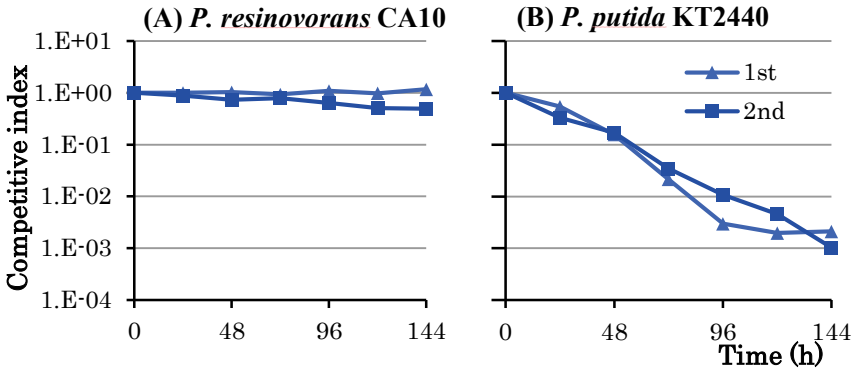



**図. CA10 (A) 及び KT2440 (B) における競合培養結果**
縦軸は各時間におけるプラスミド保持株の比率を 0 h のプラスミド保持株の比率で除した値を、横軸は培養開始後の時間を示す。
それぞれ 2 回の独立した実験の結果を示している。

plasmid, fitness cost, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

枯草菌における栄養状態に応じた新規 GTP 制御機構の解析
Studies on novel regulatory mechanism of GTP synthesis depending on nutritional status in *Bacillus subtilis*

○大坂 夏木[1]、高田 啓[3]、多喜乃 雄太[1]、兼崎 友[2]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、吉川 博文[1]([1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]立教大・理・生命理)
○ NATSUKI OSAKA[1], HIRAKU TAKADA[3], YUTA TAKINO[1], YU KANESAKI[2], SATORU WATANABE[1], TAKU CHIBAZAKURA[1], HIROHUMI YOSHIKAWA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center, [3]Rikkyo Univ.)

【背景･目的】細胞内 GTP 濃度は栄養状態に応じて厳密に制御されており、特に栄養飢餓時には、GTP 濃度を低下させることが生存するための代謝の切り替えに重要な役割を担っている。その切り替えに関与する主要な機構として、微生物一般に保存されている緊縮応答がある。緊縮応答はアミノ酸欠乏などのストレスによって誘導され、その結果、警告物質(p)ppGpp が GTP から合成･蓄積される。枯草菌においては、(p)ppGpp は直接的に GTP 生合成関連酵素の活性を阻害することで、GTP 濃度を低下させる。その結果、メチオニンなどのアミノ酸合成関連遺伝子の発現が誘導される。 (p)ppGpp 合成酵素遺伝子を全て欠失させた株(ppGpp$^0$ 株)は GTP による代謝の切り替えが出来ず、最少培地(MM 培地)において生育が阻害される。また、ppGpp$^0$ 株は急激なアミノ酸飢餓に対する適応性が野生株と比較して顕著に低下しており、富栄養培地(LB 培地)においてアミノ酸飢餓を誘導する RHX($^{Arg}$tRNA のアナログ)添加後、生菌率の劇的な低下が生じる。最少培地における ppGpp$^0$ 株の生育阻害を抑圧する変異は、これまでに *de novo* GTP 生合成に関与する遺伝子 *guaAB, gmk, codY* 内に同定されている(1) 。しかし、これらの抑圧変異株はメチオニン要求性を示す変異(*metB10*)を持つ ppGpp$^0$ 株から取得されており、単離にはメチオニンを加えた最少培地(MM+Met 培地)が用いられていた。そこで本研究では、メチオニン要求性を持たない ppGpp$^0$ 株を用いて新規の抑圧変異を探索し、GTP 制御を包括的に理解することを目指した。
【方法･結果】まず ppGpp$^0$ 株から最少培地でコロニー形成できる抑圧変異株を複数取得し、既存の抑圧変異がない株に関して次世代シーケンサーを用いた mapping 解析を行った。その結果、新規抑圧変異をプリンヌクレオチド生合成経路の初発酵素遺伝子 *prs* の ORF 内に同定した。プリンヌクレオチド生合成経路は栄養飢餓時に(p)ppGpp によって制御される GTP 生合成経路の上流に位置しており、*prs* 変異は細胞内 GTP 量に影響することが考えられた。また、*prs* の抑圧変異を導入した株は ppGpp$^0$ 株において生じる RHX 添加後の生菌率低下が回復していた。さらにこれらの株は MM+Met 培地において顕著な生育阻害を示すことが分かった。このことから *prs* の変異による抑圧効果にメチオニンの存在が影響する可能性が考えられた。本研究では抑圧変異 *prs* の影響から考えられる、栄養状態に応じた新規の GTP 制御モデルについて議論したい。

(1) Kriel,A.et.al.Molecular Cell 48(2):231-241[2012]

*Bacillus subtilis*, GTP synthesis, stringent control

発表責任者：吉川博文（hiyoshik@nodai.ac.jp）

発表番号：3F029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 絶対嫌気性菌 *Clostridium* 属細菌の $O_2$ 存在下における生育停止機構に関する研究
# Mechanisms of growth cessation of the genus *Clostridium* in the presence of $O_2$

○岡田 拓也、赤間 拓海、浦本 勲、長田 裕暉、関根 悠太、新村 洋一、川崎 信治（東農大　バイオ）
○Takuya OKADA, Takumi AKAMA, Tsutomu URAMOTO, Yuki OSADA, Yuta SEKINE, Yoichi NIIMURA, Shinji KAWASAKI (TUA bio)

【 目的 】

絶対嫌気性菌は各種醗酵産業やプロバイオティクス等の健康分野で注目され研究が行われているが、酸素（$O_2$）存在下で生育が阻害されることから大気下では取扱いが難しい細菌群として認識されている。絶対嫌気性菌は活性酸素消去酵素のカタラーゼや SOD を欠如する $O_2$ に弱い生物と考えられていたが、当研究グループにおいて代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属細菌を用いて $O_2$ による生育阻害原因の解明を目的として研究を行った結果、自身が消費可能な $O_2$ 量であれば $O_2$ を消費し、消費後は嫌気条件下とほぼ同等の生育を示すことが明らかになった。またアセトン・ブタノール醗酵菌の *Clostridium acetobutylicum* は $O_2$ や活性酸素種を高速に水へと還元的に無毒化する複合酵素系を有することが明らかになった[1)]。以上の結果から、$O_2$ や活性酸素種による毒性とは異なる要因によって $O_2$ 存在下で生育を停止する可能性が示唆された。本学会では、$O_2$ や活性酸素種による生育停止機構の解明を目的として、生育停止時の生理状態について解析した結果について報告する。

【 方法・結果 】

*Clostridium acetobutylicum* を絶対嫌気条件下と低 $O_2$ 濃度下で液体振盪培養を行ったところ、$O_2$ 濃度に応じた異なる生育挙動が観察された。また、絶対嫌気条件下の菌体に $O_2$ から生じる活性酸素種である過酸化水素（$H_2O_2$）を添加し同様に培養を行ったところ、低濃度 $O_2$ 存在下で観察された生育挙動に類似する挙動が観察された。そこで、Live / Dead 染色法や Flow Cytometry を用いた菌の生理状態に関する解析と共に、トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析を行った。その結果、$O_2$ 処理区と $H_2O_2$ 処理区において相関性が観察されたことから、$H_2O_2$ が生育停止のメディエーターとして機能する可能性が示唆された。

1) Kawasaki et al. AEM 75:1021-1029 (2009)

*Clostridium*, oxidative stress, anaerobe

発表番号：3F030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Cladosporium cladosporioides* の加熱損傷胞子の発育特性

Growth from heat-injured conidia of *Cladosporium cladosporioides*

○原田 真美[1]、堀切 茂俊[2]、坂元 仁[3]、土戸 哲明[3]、古田 雅一[1,3] ([1]大阪府大院工、[2]パナソニックエコシステムズ(株)・Ｒ＆Ｄ、[3]大阪府大・放研セ)
○Mami Harada[1], Shigetoshi Horikiri[2], Jin Sakamoto[3], Tetsuaki Tsuchido[3], Masakazu Furuta[1,3] ([1]Grad.Sch.Eng.,Osaka Pref Univ., [2]Panasonic Ecology Systems CO.,LTD, [3]Rad.CRes.Osaka Pref Univ.)

［目的］

*Cladosporium* 属カビの胞子は食品とその製造現場や住環境などでよくみられる汚染カビであり、その有効な対策が要望されている。演者らは、加熱による制御法に着目し、発芽後の伸長菌糸に対する熱作用の抑制効果を明らかにすることを目的として検討している。未発芽胞子を用いた前報[1)]では、マイクロプレートリーダー内培養での加熱処理後の発育過程を解析し、発育遅延解析法による生存率測定がカビ胞子に対しても適用できることを示した。さらに、平板法の結果との比較によって加熱初期に損傷胞子の発生を示唆する結果を得た。また、加熱後の発育速度がその損傷の程度によって低下することから、本菌の加熱損傷の修復には発育再開までのものと発育に伴うもの、2 つのタイプが関与することが示唆された。そこで本研究では、これら 2 種類の修復機構の特性を検討した。また、未発芽胞子の熱損傷・死滅反応の活性化エネルギーを求めることで胞子の損傷過程を考察した。

［方法］

*C. cladosporioides* NBRC6348 をポテトデキストロース平板上で 25℃、7 日間培養し胞子を形成させた。これに浸潤液を添加して胞子を回収し、撹拌後ろ過して懸濁液とした。加熱はプログラムインキュベーター内で浸潤液中 45℃で行い、前報[1)]と同様に処理後のサンプルを 96 穴マイクロプレートリーダー中で培養した。また恒温器で加熱処理した胞子を静置培養し、倒立顕微鏡で形態を経時的に観察した。画像処理によって胞子の平均径を求め、発芽したものについては菌糸長さを求めた。

［結果］

未処理の未発芽胞子の発育における $G_{10}$（培地接種量を 1/10 にしたときの発育遅延時間、h）は、約 11h であったが、45℃の加熱時間に伴い次第に上昇した。加熱による $G_{10}$ の上昇は、$G_{10}=2.303/\mu$(比発育速度)の関係から加熱後の発育速度がその損傷の程度によって低下することを示しており、この結果から発育に伴う損傷修復の存在が示唆された。また、未発芽胞子を加熱することで膨潤への移行が遅延したことから、発育再開までの損傷修復の存在も示唆された。未発芽胞子の熱損傷・死滅反応の温度依存性から求めた活性化エネルギーが細菌芽胞の湿熱死滅と同レベルを示したことから、カビ胞子でも自由水の減少が起こっていると推察され、加熱損傷の主因として胞子のタンパク質損傷が示唆された。

［文献］1）原田ら 日本食品微生物学会要旨集, p.61 (2015)

Cladosporium, growth, conidia

発表責任者：原田真美（maminuuun@gmail.com）

発表番号：3F031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Amphibacillus xylanus* の好気代謝における遊離フラビンと SH 化合物に関する研究
Investigation of free flavins and thiols in aerobic metabolism of *Amphibacillus xylanus*

○木俣 真弥[1]、名須川 哲哉[1]、及川 雅人[1]、新地 大輔[1]、富塚 駿[1]、吉村 悦郎[2]、有賀 智子[2]、阿部 晃[3]、武田 晃治[4]、佐藤 純一[1]、川崎 信治[1]、新村 洋一[1] ([1]東農大応生科・バイオ、[2]東大院・農生科・応生科、[3]札幌医大医・眼科、[4]東農大・教職)
○Shinya KIMATA[1], Tetsuya NASUKAWA[1], Masato OIKAWA[1], Daisuke SHINCHI[1], Syun TOMIZUKA[1], Etsuro YOSHIMURA[2], Tomoko ARIGA[2], Akira ABE[3], Kouji TAKEDA[4], Junichi SATO[1], Shinji KAWASAKI[1], Youichi NIIMURA[1] ([1]Dept. of Bioscience. Tokyo Univ. Agric., [2]Dept. of App. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo, [3]Dept. of Ophthal., Sapporo Med. Univ., [4]Edu. course, Tokyo Univ. of Agric.)

〈背景・目的〉

*Amphibacillus xylanus* は呼吸鎖とヘム鉄合成能を欠如するが、大腸菌に匹敵する未知の酸素吸収力を有し、好気的生育時に鉄要求性を示す。フラビン (FAD, FMN) は一般的に酵素タンパクに結合し機能するが、私達は *A. xylanus* の酸素代謝酵素としてタンパク質非結合 FAD (遊離フラビン) で活性化される NADH oxidase-Prx 系[1]と NAD(P)H oxidoreductase[2]を見いだしている[3]。この 2 酵素系はともに遊離 FAD 存在下で鉄還元反応も触媒するため、鉄代謝への関与が推定され、遊離フラビンとその利用酵素系は *A. xylanus* 以外の微生物種にも存在した[3]。

生体内 SH 化合物には遊離フラビン同様の酸化還元電位を有するものがあり、還元型グルタチオン (GSH) は鉄キレート効果を示すことが Robert らにより報告されている[Robert C. Hinder and Xiao L. Kong, 2011, *Biometals* **24**, 1179-1187.]。そこで、本大会では *A. xylanus* の細胞内 SH 化合物の探索を試みた。

<方法・結果>

① 細胞内 SH 化合物の探索と同定：細胞内 SH 化合物を蛍光プローブ monobromobimane 標識して HPLC で探索し、観察された主要ピークを LC-MS によりグルタチオンと同定した。

② 細胞内グルタチオンの定量 : 遊離フラビンは酸素で発現誘導されるため[3]、酸素の有無におけるグルタチオンの生成を検討した。DTNB 法により、*A. xylanus* 好気と嫌気培養菌体内の GSH はそれぞれ 767 ± 132 nmol/g dry cell, 993 ± 158 nmol/g dry cell と定量された。

③ GSH と GSSG の鉄キレート効果: GSH と GSSG の二価鉄および三価鉄に対するキレート作用を検討した。その結果、GSH だけでなく GSSG も嫌気条件下で二価鉄のキレートが観察され、キレート化が推定される鉄量はむしろ GSSG の方が高い傾向であった。

④ 細胞内 GSH / GSSG 比率：*E. coli* 細胞内グルタチオンの 95%以上は GSH として存在したが、*A. xylanus* 細胞内では総グルタチオンの 80%が GSH, 20%が GSSG であった。

現在、*A. xylanus* におけるグルタチオンの還元機構と、その酸素吸収への関与を検討している。

<参考文献>

[1] Nishiyama, Y. *et al*., 2001, *J. Bacteriol.* **183**, 2431-2438.
[2] Mochizuki, D. *et al.*, 2014, *Microbiology* **160**, 340-352.
[3] 名須川ら 2015 年 農芸化学会

free flavin, glutathione, iron

発表番号：3F032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Bacillus subtilis* 芽胞の発育に及ぼす香辛料精油成分の影響
Effect of essential oils on the development of *Bacillus subtilis* spores
○阪井 俊夫[1]、古田 雅一[1,2]、土戸 哲明[2] ([1]大阪府大院・工、[2]大阪府大・地域連携研)
○ Toshio SAKAI[1], Masakazu FURUTA[1,2], Tetsuaki TSUCHIDO[2] ([1]Osaka Prefecture Univ. Graduate School of Engineering, [2]Osaka Prefecture Univ. Regional-Cultural Studies Center)

【目的・背景】香辛料には微生物の増殖を抑制する効果があることが知られている。しかし、香辛料自身も雑菌（主に芽胞形成菌）の汚染を受けているため、食品添加物として香辛料を用いる場合には、芽胞数を 1000 個/g 以下に抑えなければならない。現在、我が国においては過熱水蒸気による殺菌が一般的であり、海外では放射線照射による殺菌も行われている。そしてこれらの処理を組み合わせる事で、より効率的に殺菌できる事が既に報告されている。しかし、殺菌処理後に損傷を受けながらも生残する芽胞が食品中でどのように発育（発芽・回復・栄養増殖）するかについての知見は十分に得られていない。上記の観点から、先行研究として、演者ら[1)]は加熱処理またはガンマ線照射を施した *Bacillus subtilis* 芽胞と香辛料粉末を共存させて寒天培地上で培養し、熱測定法を用いて発育挙動の解析を試みた。その結果、*B. subtilis* 芽胞への加熱処理との併用の併用により増殖抑制効果が相乗的に高まることが期待できる香辛料や、一方で加熱処理，ガンマ線照射のいずれとも相乗的な増殖抑制効果が期待できない香辛料があることがわかり、これらの現象は各香辛料の精油成分と *B. subtilis* 芽胞の発育システムが関与していることによる結果であると考察した。そこで、本研究では、単体の香辛料精油成分を添加した液体培養系で濁度変化を測定することにより、香辛料精油成分が *B. subtilis* 芽胞の発育に及ぼす影響について調査することを目的とする。
【方法】DMSOに溶解させたCapsaicin, Carvacrol, ThymolとTrypticase Soy Brothを試験管中に混合して、株式会社コーガアイソトープの手法[2)]に従って形成させた*B. subtilis* ATCC6633芽胞を測定開始直前に添加し、全量を5 mlとした（各精油成分の終濃度：100, 150, 200, 250 mg/ml、*B. subtilis*芽胞添加後の濁度:$OD_{600}$=0.5)。試験管を120 rpm,37℃で振盪培養し、$OD_{600}$で継時的に濁度測定を行った。
【結果】濁度測定の結果、いずれの精油成分でも*B. subtilis*芽胞の発育が抑制される現象が見られた。しかし、Capsaicinを用いた時は発育初期の濁度低下がほぼ一定であったことに対し、Carvacrolを用いた時は濃度が上がるにつれて濁度の低下速度が緩やかになる傾向が見られ、Thymolを用いた時は200 mg/ml以上で濁度低下が起こらなくなる現象が見られた。以上の結果より、精油成分によって*B. subtilis*芽胞の発育に及ぼす影響が異なることが改めて示唆された。*B. subtilis*芽胞に対して加熱またはガンマ線照射を行い、精油成分と共存させて同様に培養した場合については現在調査中である。
【文献】 1）阪井ら日本防菌防黴学会要旨集，講演番号 1Ap-05 (2015)
2）社団法人　日本アイソトープ協会　甲賀研究所「好気性芽胞形成菌の図鑑」(2004)

*Bacillus subtilis* spore, essential oil

発表責任者：阪井俊夫（sr304010@edu.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：3F033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# CO2 耐性を持つ微細藻類の探索

# Searching for microalgae having a torelance for carbon dioxide

○渡邉 一樹、藤井 克彦（山口大学）
○kazuki watanabe, katuhiko fuji (Yamaguchi University)

[目的]

現在の大気における CO2 濃度は約 300 ppmv であるが、43 億年前の原子地球の大気では CO2 は約 30%を占めていたと考えられている。従って、高濃度の CO2 で生育できる微細藻類種は、彼らが地球に出現した頃の形質を一部受け継いでいるのかもしれない。他方、工業由来の排気ガスには CO2 が高濃度で含まれており、火力発電所や鉄工所等の排気ガスには 20-40%程度の CO2 が含まれている。従って、CO2 削減および有効利用の観点からも、高濃度の CO2 で生育できる微細藻類種は大変興味深い。そこで本研究では、高濃度 CO2 下で増殖でき、かつ産業利用価値のある微細藻類の探索を行った。

[実験方法]

山口県沿岸から海水を採集し、フィルター濃縮を行った。人工海水に窒素、リン、微量金属、土壌エキスおよびビタミンを添加した培地に濃縮試料を接種し、100% CO2 を封入したプラスチック容器で振とう培養を行った。微細藻類の生育が見られた培養サンプルからは藻類株の単藻化を行い、得られた株の 18S-rRNA 遺伝子配列を決定した。また、0.03、2、20、40、70、100% CO2 を封入したガラス容器で藻類株を振とう培養し、CO2 濃度と生育の関係性を検討した。さらに、藻類株をビーズビータ処理により破砕し、ビタミン含量およびアミノ酸組成を検討した。

[結果]

100% CO2 を封入して約 1 ヶ月間集積培養した結果、6 種類のサンプルのうち、2 種類で藻類の生育が見られた。18S-rRNA 遺伝子全長配列の解析結果から、両株とも *Picochlorum* 属であることが明らかとなった。両株とも CO2 濃度 40%にて最も良好な増殖を示し、CO2 濃度 70%以上では増殖しなかった。同属既知種で 40%の CO2 下で生育する株は知られておらず、本研究が最初の報告例となった。また、集積培養で用いたプラスチックボトルには CO2 透過性があることがわかり、2 週間の振とうでボトル内の CO2 濃度は 20%、4 週間で 10%程度にまで減っていることがわかった。従って、実際には 20%から 10%程度の CO2 下で集積されたと推定される。他方、藻体の水溶性ビタミンを分析したところ、動物の必須ビタミンおよび必須アミノ酸の多くが含まれており、産業利用の点からも興味深い性質を有していると示唆された。

microalgae, tolerance for carbon dioxide

発表責任者：渡邉一樹（v029gm@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：3F034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 赤色光照射による *Nostoc commune* の培養速度改善

# Modification of growth rate of *Nostoc commune* by irradiation of red right

○荒西 佳織、河原 秀久（関西大化生工）
○Kaori ARANISHI, Hidehisa KAWAHARA (Kansai Univ.)

【目的】

石クラゲ(*Nostoc commune*)はネンジュモ属に属する陸生ラン藻類の一種である。日本各地に生息しており、土壌やコンクリートの上などで観察されている。石クラゲは極限的な乾燥状態でも生き延びることができ、この特性は細胞外に生産されている吸水性の高い高分子多糖によって起きていると考えられている。この多糖は約 30 倍量の水を吸収・保持することができ、石クラゲが長期間乾燥状態後でも、ただちに水分を吸収し、活動を再開することができる要因である。この特性から、石クラゲは砂漠の緑化に利用できると考えられ、これまで多くの研究者が培養および多糖生産の研究を行ってきた。しかしながら、その生育速度が遅く、細胞が凝集体として生育する欠点があり、多糖生産の方法も確立していない。そこで本研究では、石クラゲ(*Nostoc commune*)の培養方法の検討を行った。

【方法】

今回使用した菌株は *Nostoc commune* NIES-24 である。MDM 寒天培地を用い、20℃、一週間行った。この培養の際、常時 660 nm の赤色光の照射の影響についても検討した。菌体の増加量は培養後の菌体の湿重量を測定した。その他の評価方法として、全多糖量はフェノール硫酸法、ウロン酸量はカルバゾール硫酸法、クロロフィル色素はメタノールで抽出し、波長スキャン分析を行った。

【結果】

通常の固体培養において、菌体はフロック状態の塊で増殖した。赤色光の影響について検討したところ、培養 1 週間において、その菌体量は白色光で培養した場合より約 3 倍程度増加することが分かった。しかし、湿重量 1 g あたりの全多糖量やウロン酸量の増加は両者においてあまり差がなかった。この結果から、赤色照射は細胞増殖のみに影響し、吸水性の高い多糖の生産に影響しないことが判明した。赤色光照射した菌体は塊として生育せず、顕微鏡観察によって数珠状の細胞として観察された。細胞が塊状態であると基質の供給がうまくいかないが、赤色光を照射して培養した菌体は基質の供給しやすくなるため、菌体量が増加したのではないかと推測できた。また、菌体の色は赤色光で培養したものは黄緑、白色光のものは深緑となった。この結果は、クロロフィル a の極大吸収ピークと赤色光の極大吸収ピークが重なっているため、細胞の色素の含有量が変化したものと考えられた。今回の赤色光照射固体培養を行うことによって、培養速度を改善できた。現在は、液体培養における細胞増殖やその多糖の生産性の向上に関する条件検討を進めている。

*Nostoc commune*, Cyanobacteria, chlorophyll

発表責任者：河原秀久（kawahara@kansai-u.ac.jp）

発表番号：3F035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* における核の自食機構ヌクレオファジーの解析

Analysis of nucleophagy in *Aspergillus oryzae*

○三谷 隆宏、菊間 隆志、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Takahiro MITANI, Takashi KIKUMA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】　オートファジーは細胞質成分を液胞/リソソームに運び込んで分解する、真核生物によく保存された機構である。オートファジーには細胞質成分を無差別に取り込むバルクオートファジーと、ミトコンドリアやペルオキシソームといった特定の基質を選択的に取り込む選択的オートファジーが知られている。このうち選択的オートファジーの一種として核を分解するヌクレオファジーが酵母、哺乳類、糸状菌、繊毛虫で見つかっている。酵母においては液胞膜が陥入して核の一部を直接液胞に取り込むミクロオートファジーによるヌクレオファジーが、また哺乳類細胞では核から分離した一部がオートファゴソームと呼ばれる二重膜小胞によって囲まれ液胞に取り込まれるマクロオートファジーによるヌクレオファジーが報告されている。一方、当研究室では、麹菌 *Aspergillus oryzae* が核全体をオートファゴソーム膜で取り囲み、液胞に取り込み分解するマクロオートファジーによるヌクレオファジーを行うことを見出し、その解析を行ってきた。このオートファゴソーム膜が囲い込む形での核全体の分解は、現在までのところ *A. oryzae* で報告されているのみであり、その生理学的意義や機構などには未解明な部分が多い。本研究は、*A. oryzae* のヌクレオファジーの分子機構の解明を目的として、ヌクレオファジーの解析を行った。

【方法と結果】　オートファジーによる目的タンパク質の取り込みを評価する手法である Cleavage assay を、核質に局在するヒストン H2B-EGFP を用いて行った。その結果、核質がオートファジー依存的に液胞に取り込まれることを検出することに成功した[1)]。この方法を用いてペキソファジーやマイトファジーに関与する *Aoatg11* [2)]、およびペキソファジーやマイトファジーに加えて非選択的オートファジーに関与する *Aoatg26* [3)]の破壊株におけるヌクレオファジーの活性を測定した。その結果、*Aoatg11* 破壊株ではヌクレオファジーの活性は低下しないが、*Aoatg26* 破壊株ではヌクレオファジーが起こらなくなくなることを見出した。ヌクレオファジーは一般的に選択的オートファジーに分類されるが、*A. oryzae* における核の分解が選択的かどうかははっきりしていない。そこで、酵母と哺乳類細胞での知見から、非選択的オートファジーには影響を与えず、一部の選択的オートファジーに障害が起きることが予想される AoAtg8 の N 末端 8 残基を切断した AoAtg8ΔN8 発現株を構築した。現在、この株で Cleavage assay を行い、*A. oryzae* のヌクレオファジーの選択性について検討している。

[1)] 三谷ら、日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集, p.48 [2)] Tadokoro *et al*., Fungal Biol., 119, 560-567 (2015) [3)] 菊間ら，日本農芸化学会 2014 年度大会要旨集, p.50

Autophagy, *Aspergillus oryzae*, Nucleophagy

発表番号：3F036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 対数期における *Lactobacillus gasseri* JCM 1131$^T$ のリポテイコ酸の局在

# Localization of lipoteichoic acid in *Lactobacillus gasseri* JCM 1131$^T$ cells during logarithmic growth phase

○白石 宗[1]、横田 伸一[1]、佐藤 耶舞羽[2]、伊藤 利章[2]、吹谷 智[2]、山本 聡[1]、小笠原 徳子[1]、佐藤 豊孝[1]、横田 篤[2]（[1]札医大医、[2]北大院農）

○Tsukasa SHIRAISHI[1], Shin-ichi YOKOTA[1], Yamaha SATO[2], Toshiaki ITO[2], Satoru FUKIYA[2], Soh YAMAMOTO[1], Noriko OGASAWARA[1], Toyotaka SATO[1], Atsushi YOKOTA[2] ([1]Sapporo Med. Univ., [2]Hokkaido Univ.)

**【背景と目的】**リポテイコ酸（LTA）は，グラム陽性細菌の細胞表層の構成分子の一つであり，一般的にグリセロールリン酸を繰り返し単位とするポリマーが糖脂質に結合して，その糖脂質を介して細胞膜にアンカーされている．LTA は，細菌と宿主との相互作用（定着や免疫誘導など）において重要な分子とされており，特に宿主の免疫細胞に認識されて免疫応答を惹起させる分子であると考えられている．したがって，LTA の局在は細菌と宿主の相互作用メカニズムを考える上で重要である．我々は，腸内乳酸菌 *Lactobacillus gasseri* JCM 1131$^T$ において，対数期では LTA が細胞壁に埋没し，細胞外には露出していないことを報告している．しかし，LTA が細胞外に露出していない場合，宿主細胞との直接的な接触は考えにくく，両者の相互作用がどのように行われているのか疑問が生じた．一方，グラム陰性細菌では細胞外への外膜小胞の産生・放出が知られているが，近年，この膜小胞（ベシクル）の産生がグラム陽性細菌でも報告されている．今回，我々は *L. gasseri* JCM 1131$^T$ におけるベシクルの産生の有無，およびベシクル表層における LTA の局在（露出）を免疫電子顕微鏡法によって評価した．

**【方法】**免疫電子顕微鏡法に用いる抗 LTA モノクローナル抗体 Clone 55（Hycult Biotech）の結合特異性を，酢酸により部分加水分解した LTA 分子への結合および LTA 以外の細胞表層分子への交差反応によって評価した．ベシクルは，対数期まで培養した上清をフィルターに通した後，超遠心分離によって取得し，透過電子顕微鏡で観察した．その後，菌体，その超薄切片，溶菌酵素ムタノリシン処理菌体，およびベシクルについて，LTA の局在を Clone 55 と金コロイド標識二次抗体を用いて透過電子顕微鏡で観察した．

**【結果と考察】**本研究に用いた抗 LTA 抗体 Clone 55 は，LTA のグリセロールリン酸ポリマーを特異的に認識していると考えられ，LTA を評価する有用なツールとなることが示唆された．また，本抗体を用いた免疫電子顕微鏡法によって，対数期の *L. gasseri* JCM 1131$^T$ の菌体表層では LTA は細胞外に露出しておらず，細胞壁内に埋没していることが示唆された（既報）．一方で，*L. gasseri* JCM 1131$^T$ はこのときベシクルを自然産生しており，細胞外に放出されたベシクル表面には LTA が露出していることが示された．以上の結果から，対数期における LTA を介した宿主との相互作用は菌体ではなく，ベシクルを介して行われる可能性が示唆された．これは，細菌と宿主との相互作用メカニズム解明において重要な知見である．

Lipoteichoic acid, *Lactobacillus gasseri*, Membrane vesicle

発表責任者：白石宗（shiraishi1020@sapmed.ac.jp）

発表番号：3F037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母の胞子の細胞膜は Rab と SPB の相互作用によって形成される
# Interactions between the SPB and Rabs induce the forespore membrane biogenesis in fission yeast

○今田 一姫、中村 太郎（阪市大院理）
○Kazuki IMADA, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

分裂酵母は、減数分裂の進行に伴って細胞内に 4 つの胞子を形成する。胞子形成と呼ばれるこの過程の中で、分裂酵母は母細胞内で胞子の細胞膜を新しく形成する。本研究は、その分子メカニズム解明を目的とする。これまでに、我々はゴルジ体から細胞膜への分泌小胞の輸送を調節する Rab GTPase である Ypt3 が、胞子の細胞膜形成の開始に必要であることを明らかにしている。出芽酵母との相同性から、Ypt3 はその下流の Rab である Ypt2 と Rab カスケードを形成していると考えられている。そこで、Ypt3 と Ypt2 に着目して解析を行った。

まず、*ypt2* 変異株の表現型を調べた。その結果、Ypt2 は Ypt3 と同様に胞子の細胞膜形成の開始のステップに関わることが分かった。胞子の細胞膜は、スピンドル極体（SPB：哺乳類の中心体にあたる構造）を足場に形成される。蛍光顕微鏡法により、はじめに Ypt2 が SPB に局在し、続いて散在していた Ypt3 および分泌小胞が SPB に集積し、その後細胞膜の形成が起こることを明らかにした。これらの SPB 局在化は、胞子形成特異的な SPB 局在タンパク質である Spo13 に依存的であり、Spo13 はこれらのどの因子よりも早い時期に SPB に局在した。さらに、プルダウンアッセイにより、Ypt3 は Spo13 と結合することが分かった。一方、Ypt2 は Spo13 と結合し、Spo13 により活性化されることが知られている。この Spo13 を欠失させると、胞子の細胞膜は全く形成されない。以上のことから、SPB タンパク質である Spo13 が Ypt2 を SPB に局在させ、続いて Ypt3 の乗った分泌小胞が集まり、そこで膜小胞が融合することにより胞子の細胞膜が新たにつくられるというモデルを提唱した。

fission yeast, Rab GTPase, membrane traffic

発表責任者：今田一姫（imada@sci.osaka-cu.ac.jp）

発表番号：3F038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 正確な染色体分配を保証する微小管アンカーリングの分子機構
# Molecular mechanisms of microtubule anchoring to the spindle pole

○湯川 格史[1,2] ([1]広島大、[2]英国癌研究所)
○Masashi YUKAWA[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Cancer Research UK)

真核生物において、複製された姉妹染色体を正確に均等分配するためには、双極性紡錘体の形成が必須である。紡錘体の主要構成因子は微小管であるが、その伸長はγ-チューブリン環状複合体（γ-TuRC）が重合核となり、α-および β-チューブリンから成るヘテロ二量体が順次、方向性を持って繊維状に重合することにより起こる。チューブリンヘテロ二量体が付加しやすい微小管側はプラス端、安定な側はマイナス端と呼ばれる。分裂期細胞ではマイナス端は中心体が存在する二つの紡錘体極に集合し、一方、プラス端は細胞中央部で染色体と直接結合するか、あるいはプラス端同士が重なりあった逆平行構造を取る。プラス端における紡錘体微小管と動原体の結合に関しては精力的に研究されており、数多くの知見が得られているが、マイナス端における紡錘体微小管と中心体の結合（微小管アンカーリング）については不明な点が多い。また、ヒトガン細胞、繊毛症患者では中心体異常が広範に見られ、医学工学的観点からも中心体制御の理解は重要である。そこで、本研究では微小管アンカーリングの分子機構について明らかにすることを目的としている。

当研究グループは、これまでに分裂酵母の微小管アンカーリングに必須な分子としてコイルドコイル蛋白質 Msd1 を同定している(**1**)。この分子が欠損した株は、微小管マイナス端が紡錘極体(SPB)の外側に異常に突出したアンカーリング異常を引き起こし、プラス端が染色体と正しく結合できず染色体不分離を起こす。今回の解析により、Msd1 が新規 WD40 関連蛋白質 Wdr8、およびマイナス端方向性キネシン-14 ファミリー蛋白質 Pkl1 と MWP （Msd1-Wdr8-Pkl1）複合体を形成して微小管アンカーリングに働くこと、MWP は Pkl1 モーター活性により微小管上を SPB 方向に移動し、次に Msd1-Wdr8 を介して SPB に結合することを見出した(**2**)。また、大変興味深いことに *msd1* 欠損株が示す アンカーリング異常がプラス端方向性キネシンである Cut7/kinesin-5 の機能欠損によって抑圧されることを見出した。以上のことから、*mwp* 欠損株で観察される異様なスピンドル伸長の原因は、Cut7/kinesin-5 が *mwp* 欠損下で過剰に活性化されているためであり、Pkl1 と Cut7 は微小管アンカーリングにおいて拮抗的に機能することが判明した(**2**)。MWP 複合体の各構成因子はヒトまで高度に保存されていることから、現在、この複合体の進化的保存性について検証している。

**1. Toya et al., Nat. Cell Biol., 9: 646-653. (2007)**
**2. Yukawa et al., J. Cell Biol., 209:549-562. (2015)**

spindle microtubule, spindle anchoring, kinesin

発表責任者：湯川格史（myukawa@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：3F039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 真核微生物における AipA 様 AAA ATPase の機能解析

# Functional analysis of AipA-like AAA ATPases in eukaryotic microorganisms

○樋口 裕次郎、柿本 健一、宋 原準、竹川 薫 (九大農)
○Yujiro HIGUCHI, Ken-ichi KAKIMOTO, Wonjoon SON, Kaoru TAKEGAWA (Kyushu Univ.)

細胞内の様々な部位に局在する AAA (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase は、主にタンパク質複合体の解離やタンパク質分解において機能する。我々は、多細胞真核微生物である黄麹菌 *Aspergillus oryzae* において、yeast two-hybrid (YTH) スクリーニングにより、エンドサイトーシス関連タンパク質である AoAbp1 (actin binding protein) と相互作用する因子として AAA ATPase 様タンパク質である AipA (AoAbp1 interacting protein) を同定している。AipA は、エンドサイトーシスにおいて負の制御に関わると示唆されたが、その詳細な分子メカニズムについては未解明である。単細胞真核微生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* においては、AipA のオルソログとして Sap1p と Yta6p が存在し、共にエンドサイトーシスに関連する Las17p とエイソソーム構成タンパク質の Pil1p と相互作用すると報告されている。そこで YTH 法により、AoLas17、AoPil1 と AipA の相互作用を解析した結果、AoPil1 と AipA の相互作用を確認した。また、蛍光顕微鏡解析により、両タンパク質が黄麹菌生細胞内において共局在することを確認した。さらに、黄麹菌と近縁の糸状菌 *Aspergillus nidulans* における *pil1* オルソログ *pilA* の破壊株が、エルゴステロール合成阻害剤に耐性になると報告されている。そこで、*aipA* 破壊株において同様の解析を行ったところ、同阻害剤に対して逆に感受性を示した。このことから、AipA はエイソソームと関連して、薬剤排出に関わる ABC トランスポーター等のエンドサイトーシス機構に関与する可能性が考えられた。

さらに我々は、単細胞真核微生物である分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* にも 2 つの AipA オルソログ (SPAC328.04、SPBC947.01/*knk1*/*afl1* (以下 *knk1*)) が存在することを見出した。ごく最近になり、*knk1* 破壊株は細胞の一端がねじれる (kink) という表現型から、新規の形態形成因子として同定されたものの、具体的な分子機能に関しては未だ明らかになっていない。そこで、分裂酵母における 2 種の AAA ATPase の機能を解析するため、2 つの遺伝子単独破壊株及び二重破壊株を作製した。0.6 M カルシウム存在下でのプレート生育比較において、それぞれの単独破壊株はコントロール株と差は見られなかったものの、二重破壊株では生育の低下が見られた。このことから、SPAC328.04 タンパク質と Knk1 は一部で機能を重複している可能性が考えられた。さらに、分裂酵母データベースによると、SPAC328.04 タンパク質はエイソソームタンパク質である Pil2 と相互作用することが報告されている。以上から、単細胞及び多細胞の真核微生物における解析を通じて、AipA 様 AAA ATPase がエイソソームと関連し、エンドサイトーシスの制御機構に関わっていることが示唆された。

AAA ATPase, *Aspergillus oryzae*, *Schizosaccharomyces pombe*

発表番号：3F040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ウェルシュ菌はメンブランベシクルを介して宿主免疫応答を誘導する
Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* induce host immune responce

○永山 恭子[1]、尾花 望[1]、中尾 龍馬[2]、泉福 英信[2]、中村 幸治[1]、野村 暢彦[1]（[1]筑波大・院・生命環境、[2]国立感染研・細菌第一）
○ Kyoko NAGAYAMA[1], Nozomu OBANA[1], Ryoma NAKAO[2], Hidenobu SENPUKU[2], Koji NAKAMURA[1], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Dept. Bacteriol., Natl. Inst. Infect. Dis.)

近年、多くの微生物が 20～500 nm のメンブランベシクル（MV）を生産し、細胞外に放出することが明らかになってきた。MV は DNA やシグナル物質、毒素などを含有するという報告がなされていることから、MV がそれらの輸送体として機能していることが示唆されている。MV はグラム陰性細菌でその生産が多く報告されている一方、外膜を持たないグラム陽性細菌における報告は少なく、その詳細な機能や形成メカニズムはほとんど明らかにされていない。

我々は、グラム陽性細菌であるウェルシュ菌（*Clostridium perfringens*）が核酸やタンパク質、ペプチドグリカンを含む MV を生産し、細胞外に放出することを見出した。ウェルシュ菌はヒトを含む動物の腸管内に常在する偏性嫌気性の常在細菌である一方で、多くの毒素や細胞外酵素を生産することから食中毒やガス壊疽をもたらす病原性細菌としても知られている。

ウェルシュ菌 MV が宿主に与える影響を解析するため、ウェルシュ菌 MV をマウスマクロファージ様細胞 J774.1 に添加したところ、IL-6 や TNF-α といった各種炎症性サイトカインの放出を誘導することが明らかとなった。MV 添加により、ペプチドグリカンを受容して各種炎症性サイトカインの放出を誘導する受容体として知られる Toll-like receptor 2（TLR2）の発現が上昇し、TLR2 阻害剤によって MV 添加時における IL-6 放出量が減少することが明らかとなった。このことから、ウェルシュ菌 MV は TLR2 を介して宿主細胞からの各種炎症性サイトカイン放出を誘導していることが示唆された。また、ウェルシュ菌膜画分を J774.1 に添加したところ、MV 添加時と比較して TNF-α 放出は同程度に誘導した一方で、IL-6 放出量や TLR2 発現量が減少したことから、ウェルシュ菌 MV は膜画分とは異なる炎症性サイトカイン誘導性を示すことが明らかとなった。ウェルシュ菌 MV は膜画分よりも多くのペプチドグリカンを含有することから、MV 中に濃縮されたペプチドグリカンが TLR2 シグナリング経路を介した炎症性サイトカイン放出を誘導していることが考えられる。さらに、ウェルシュ菌 MV をマウスの鼻腔に接種したところ、血中にはウェルシュ菌特異的 IgG 抗体が、全身の粘膜面（鼻腔、口腔、腸管）には分泌型 IgA 抗体が生産誘導されることが明らかとなった。以上のことから、ウェルシュ菌 MV は宿主の自然免疫および獲得免疫を誘導することが示唆された。本研究により、ウェルシュ菌 MV は宿主免疫に大きな影響を与えており、ウェルシュ菌の病原性や定着性に寄与している可能性が考えられた。

membrane vesicle, host immune responce, *Clostridium perfringens*

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：3F041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヒスチジンキナーゼ HysA による糸状菌ミトコンドリアの機能制御

# Mitochondrial function controlled by histidine kinase HysA in *Aspergillus nidulans*

○平川 卓実、金丸 京子、稲葉 真友子、林 早紀、小島 憲介、木村 真、小林 哲夫 (名大院生命農)
○ Takumi HIRAKAWA, Kyoko KANAMARU, Mayuko INABA, Saki HAYASHI, Kensuke KOJIMA, Makoto KIMURA, Tetsuo KOBAYASHI (Nagoya Univ.)

ミトコンドリアは ATP 合成を担う重要な器官である。ミトコンドリアの機能欠損は単に ATP 合成量の低下に留まらず、マクロな面ではミトコンドリア自身の断片化、ミクロな面では活性酸素種（ROS）の発生によるタンパク質や DNA の酸化を引き起こし、最終的には細胞死を引き起こす。すなわち、HysA の欠損はミトコンドリアの過分極や脱分極を引き起こし、分生子形成の基盤となる梗子細胞間でのミトコンドリア膜電位の不均等分布が起こる。さらに、菌糸の肥大化や分岐化、分生子形成部位（分生子頭）の形態異常なども観察される。HysA は、環境変化を認知して自己リン酸化し、下流の因子にリン酸基を転移することで情報を伝達するセンサータンパク質である。従って、本センサーキナーゼは環境の変化に対応したミトコンドリア活性の制御を行い、糸状菌の正常な生育を促す重要な因子であると考える。

本研究では、HysA によるミトコンドリア機能調節の重要性を理解するために、共焦点レーザー顕微鏡の画像解析ソフトを用いたミトコンドリアの定量解析を行った。まず、野生株と HysA 欠損株に、電子伝達系複合体 IV を構成する CoxA と GFP の融合タンパク質を発現させ、両株から回収した分生子の GFP 蛍光シグナルを測定した。その結果、分生子あたりの蛍光レベルは同程度であり、欠損株の分生子においてもミトコンドリアは正常に合成されることが示唆された。一方、Mito Tracker Red で染色すると、欠損株は野生株と同レベルの膜電位を維持する分生子の割合が低下し、低い活性を示す割合が増加することが観察された（およそ 26%）。ミトコンドリア膜電位の変化が ATP 合成量に影響するかについても検討した。特に、HysA が環境ストレスに応答してミトコンドリア機能に影響するかについては、酸化ストレスに対する ATP 合成量の変化で評価をした。HysA の自己リン酸化ができない HQ 変異株とリン酸基を受け取ることができない DN 変異株の同様の解析結果から、His-Asp 間のリン酸基リレーがミトコンドリア機能調節にどのように関わるかを判断する。

histidine kinase, mitochondria, *Aspergillus nidulans*

発表責任者：金丸京子（kanamaru@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3F042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Lactobacillus* 属における細胞壁テイコ酸の金属保持とその役割

# The role of wall teichoic acid in metal binding in the genus *Lactobacillus*

○森脇 涼平[1]、田中 尚人[2]、梶川 揚申[3]、岡田 早苗[3]([1]東農大院農、[2]東農大菌株、[3]東農大応生科)
○Ryohei MORIWAKI[1], Naoto TANAKA[2], Akinobu KAJIKAWA[3], SANAE OKADA[3] ([1]Tokyo Univ. Agr., [2]NRIC, Tokyo Univ. Agr., [3]Dept. Appl. Biol. Tokyo Univ. Agr.)

【目的】グラム陽性細菌には細胞壁の構成成分として、細胞壁テイコ酸(WTA)という酸性多糖が存在する。WTA はペプチドグリカンに共有結合して存在しており、糖アルコールとリン酸が交互に結合したポリマーに D-アラニンやグルコースが修飾した構造を持つ。WTA は、細胞壁に高い割合で存在しているにも関わらず、生体における役割は明らかとされていない。その機能として、環境中の金属を結合・保持するという報告がある。また、WTA は、培養環境により修飾する D-アラニンの量の変化などの構造への影響を受けることが報告されている。本研究では、WTA の金属保持と環境による構造の変化に着目した。WTA は、環境中の金属量により、その機能を変化させ、菌体の生育に影響を与えている可能性が考えられる。そこで、本研究は、WTA の生体における役割を明らかにする為の知見として、乳酸菌の金属過剰や、金属飢餓の環境への適応における WTA の関与を明らかにすることを目的とした。
【実験・結果】WTA を持つ *Lactobacillus* 属細菌を用いて、田村・角田合成培地($Mg^{2+}$:0.4mM、$Mn^{2+}$:0.02mM、$Fe^{2+}$:0.02mM)を通常条件として、培地成分である $Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$, $Fe^{2+}$を 1/20 量にした飢餓条件と、10 倍量添加した過剰条件にて生育の変化を測定した。その結果、何れの株においても、両条件で生育の低下が見られた。続いて、WTA の構造について報告のある *L. plantarum* NRIC 1067$^{T}$ を用い、WTA に保持されている金属の定量を行った。その結果、通常条件では、$Mn^{2+}$の割合が大きくなっており、金属過剰条件では、$Fe^{2+}$の結合量が増加したが、濃度変化に応じた大きな変化は見られなかった。金属飢餓条件においては、$Mn^{2+}$の保持量が大幅に減少し、$Mg^{2+}$の結合量の増加が見られた。

この結果から、WTA の金属保持の変化と菌体の金属の獲得との関連性の検討の為、各条件で菌体中に含まれる金属の定量を行った。その結果、飢餓条件において、環境中の濃度に応じて、$Mn^{2+}$、$Fe^{2+}$の濃度は減少したが、$Mg^{2+}$は、環境中の濃度が減ったにも関わらず、菌体内に高い割合で存在しており、通常条件と同程度の量が保持されていることが確認された。

これらのことから、WTA の金属保持機能は、環境に応じて濃度非依存的に変化しており、選択性があることが示唆された。また、金属飢餓における変化から、生育に必須である $Mg^{2+}$を獲得し、菌体内に維持するように WTA が機能していることが考えられ、WTA を持つ乳酸菌において、金属を得られない環境で生育する為の戦略の一つとなっていることが考えられる。

Wall teichoic acid, *Lactobacillus*, Metal binding

発表番号：3F043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

新規単離極限環境紅藻の Mn 耐性関連遺伝子の探索
New isolation of red alga living in harsh environment and searching for gene related to manganese tolerance.
○小田 しおり[1]、重信 直人[1]、兼崎 友[2,5]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、笠原 浩司[3]、三角 修己[4,5]、吉川 博文[1,5] ([1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]東京農大・アイソトープ、[4]山口大・院・医、[5]CREST)
○SHIORI ODA[1], NAOTO SHIGENOBU[1], YUU KANESAKI[2,5], SATORU WATANABE[1], TAKU CHIBAZAKURA[1], KOUJI KASAHARA[3], OSAMI MISUMI[4,5], HIROHUMI YOSHIKAWA[1,5] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center, [3]Tokyo Univ. of Agriculture, Isotope Center, [4]Yamaguchi Univ, [5]CREST)

【目的】
紅藻イデユココゴメ綱はシゾン、シアニジウム、ガルデリアの 3 属からなる。これら 3 属はいずれも単細胞性で高温、強酸性下に棲息し、極限環境微生物として知られている。その中でもシアニジウムは $Al^{3+}$などの重金属に対して高い耐性能を持つが、その耐性機構については不明な点が多く、また純化されている株も極めて少ない。そこで我々は、高温酸性環境中からシアニジウム、ガルデリアの新規株を単離、純化し各種金属イオン耐性について試験をおこなうことで、高い環境ストレス耐性能(強酸性、重金属)など有用形質を持つ極限環境紅藻の新規単離とその新規単離紅藻の重金属イオン耐性に関わる遺伝子の探索および機能解析を目的とした。

【方法と結果】
新規単離に成功した紅藻を各種重金属イオン培地で生育の確認をすると *Cyanidium* sp. N3110 株は特に $Mn^{2+}$イオンについてシゾンやガルデリアより高い耐性を示した。シアニジウムの重金属耐性機構に迫る第一歩として 100mM $Mn^{2+}$添加/非添加の比較トランスクリプトーム解析を実施して高 $Mn^{2+}$ストレス耐性に関わる候補遺伝子を探索した。その結果、種々の金属イオンの輸送に関わる遺伝子群の転写産物量の変動が観測された。その中で最も発現量が強く抑制された zinc transporter の遺伝子は $Zn^{2+}$・$Mn^{2+}$イオンを含む重金属の取り込みに関与しているのではないかと予想し、酵母での機能相補試験により遺伝子の機能評価をおこなった結果、このトランスポーターは酵母においては、実際に亜鉛やマンガンの取り込み活性に関わることが示唆された。現在このトランスポーターの $Mn^{2+}$イオンを含めた金属特異性など詳細な解析を進め、*Cyanidium* sp. N3110 株における高 $Mn^{2+}$ストレス耐性の要因を調査している。また、トランスクリプトーム解析の結果、最も発現量が上昇していた metal ion transporter の遺伝子についても機能解析をおこなっているので議論したい。

この研究は CREST により支援されている。

Cyanidium, manganese stress, transporter

発表責任者：吉川 博文（hiyoshik@nodai.ac.jp）

発表番号：3F044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

出芽酵母のアセトアルデヒド耐性機構における NAD(H)キナーゼの機能と役割の解明
Analysis of function and physiological role of NAD(H) kinase on acetaldehyde tolerance in the budding yeast

○高木 哲史[1]、河井 重幸[2]、村田 幸作[3]、奥 公秀[2]、由里本 博也[2]、阪井 康能[2]、早川 享志[1]、中川 智行[1] ([1]岐阜大応生、[2]京都大院農、[3]摂南大理工)
○ Tetsushi TAKAGI[1], Shigeyuki KAWAI[2], Kosaku MURATA[3], Masahide OKU[2], Hiroya YURIMOTO[2], Yasuyoshi SAKAI[2], Takashi HAYAKAWA[1], Tomoyuki NAKAGAWA[1] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Setsunan Univ.)

【目的】

アセトアルデヒド（AA）は出芽酵母のアルコール発酵における代謝中間体であり、様々な生体物質と付加体を形成して、その機能を阻害する毒性化学物質として知られている．この代謝抑制因子である AA への耐性を強化することが、出芽酵母の分子育種の課題と考えることができる．我々は、グルタチオン還元系、脂肪酸合成系、含硫アミノ酸合成系といった NADPH を要求する代謝系と、それに NADPH を供給する $NADP^+$還元系［ペントースリン酸経路と AA 脱水素酵素（Ald6p)］が出芽酵母の AA 耐性において重要な役割を持つことを報告してきた[1)]．一方、出芽酵母は AA ストレス下では細胞内の NADPH のみならず $NADP^+$量も増加させ、細胞内 $NADP^+$・NADPH の絶対量を増強することが明らかになっている[2)]. このことは AA 耐性機構では NAD(H)をリン酸化する NAD(H)キナーゼが重要な働きを持つことを示している．そこで本研究では NAD(H)リン酸化系に焦点を絞り、NAD(H)キナーゼの AA 耐性機構における機能と役割を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

出芽酵母は、*POS5*、*YEF1* および *UTR1* の 3 つの NAD(H)キナーゼ遺伝子を持つことから、これら 3 つの遺伝子の AA ストレスに対する発現応答をレポーターアッセイにて観察した．その結果、*POS5* と *UTR1* は構成的な発現を示した一方、*YEF1* は AA により発現量が著しく増加した. そこで、これら NAD(H)キナーゼ遺伝子の過剰発現株の AA ストレスに対する表現型を観察したところ、すべての過剰発現株において AA 耐性の向上は見られなかった．一方、これら NAD(H)キナーゼの遺伝子欠損株の AA 感受性を観察したところ、*pos5*Δ 株は AA 存在下で強い生育阻害を示し、*YEF1* と *UTR1* 株は単独の欠損では AA 感受性を示さなかったものの、二重欠損で弱いながらも AA 感受性を示した. 3 つの NAD(H)キナーゼの細胞内局在は、Yef1p および Utr1p は細胞質、Pos5p はミトコンドリアであることから、AA ストレス下における NADPH の増強は細胞質およびミトコンドリアにて必要であることが考えられる．特に、細胞質では Yef1p と Utr1p が互いにその機能を相補し合うことができるものの、ミトコンドリアにおいては Pos5p が Oar1p（脂肪酸合成系）などの NADPH 要求型代謝系の機能発現において、より重要な役割を担っていることが推測される.

1) Matsufuji, Y. *et al.* (2008) *Yeast.* 25: 825-833.
2) 高木哲史ら. (2015) 2015 年度 日本農芸化学会大会要旨集.

*Saccharomyces cerevisiae*, NAD(H) kinase, acetaldehyde

発表責任者：中川智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

発表番号：3F045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Thiamine is an important factor for acetaldehyde tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○Annisyia Zarina Putri, Nodoka Kubota, Takashi Hayakawa, Tomoyuki Nakagawa (Gifu Univ.)

【Introduction】

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is one of the most popular microorganisms, which is widely used in several industries, such as alcohol fermentations and making breads. During these fermentations of the budding yeast, the cells synthesize a large amount of acetaldehyde as an important intermediate in the cell. Since acetaldehyde is highly toxic compounds for all living things, the budding yeast needs to take care for its toxicity during fermentation step.

In previous work, Aranda and del Olmo were reported that some genes, which participate the vitamin $B_1$ (thiamine) biosynthesis, were up-regulated under acetaldehyde stress[1)]. Therefore, we think that thiamine may be one of the most important factors for the acetaldehyde tolerance system in the budding yeast.

From these backgrounds, in this study, we showed that thiamine had some physiological roles for acetaldehyde tolerance in the budding yeast, *S. cerevisiae.*

【Results & discussion】

At first, we tried to show whether supplementation of thiamine to the medium were able to recover the acetaldehyde sensitivity of the budding yeast, or not. According to increasing of thiamine concentration in the medium, acetaldehyde sensitivity of the budding yeast was recovered up to 12 μM thiamine supplementation. On the other hand, it is known that the yeast cell uptake thiamine from outside of the cell, using thiamine transporter Thi7 and Thi72[2,3)]. Thus we observed effects of deletion of thiamine transporter Thi7 and Thi72 for acetaldehyde tolerance. As a result, strain *thi7*Δ showed acetaldehyde sensitivity compared with the wild type strain, although strain *thi72*Δ showed same phenotype with the wild type strain.

From these facts, we conclude that the budding yeast *S. cerevisiae* requires thiamine under acetaldehyde stress, and thiamine has some physiological roles for acetaldehyde tolerance system in the budding yeast.

1) Aranda, A. & del Olmo, M.L. (2004) *Appl. Environ. Microbiol*. **70:** 1913-1922.
2) Singleton, C.K. (1997) *Gene*. 1997 **199:**111-121.
3) Mojzita, D. & Hohmann, S. (2006) *Mol. Genet. Genomics*. **276:**147-161.

*Saccharomyces cerevisiae*, acetaldehyde stress, thiamine

発表責任者：中川智行（t_nakaga@gifu-u.ac.jp）

発表番号：3F046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# オカラ抽出物に含まれる *Bacillus* 芽胞形成誘導物質の探索、単離精製、構造決定

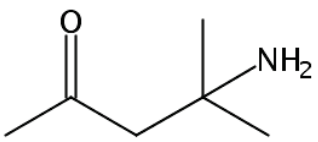
# Searching, isolation, and structure elucidation of *Bacillus* sporulation-inducing principle in soybean pulp extract

○池田 陽、KIM Dongyeop、橋床 泰之（北大農）
○Aki IKEDA, Dongyeop KIM, Yasuyuki HASHIDOKO (Hokkaido Univ.)

［背景・目的］ 微生物の形態や二次代謝産物生産制御に関わる天然資材の探索は、食品や医薬、発酵技術の面で重要な研究分野である。 *Bacillus* sp. は栄養増殖細胞から芽胞へと形態変化する際に抗生物質や昆虫特異的毒素を菌体外に放出、あるいは菌体内に大量蓄積することが知られている。一方、 *Bacillus amyloliquefaciens* がオカラ培地で抗生物質 iturin の産生量を大きく増大させることを見出している。本研究では *B. amyloliquefaciens* が産生する抗生物質の生産性向上を初期目的として、オカラ抽出物水溶性画分中の *B. amyloliquefaciens* 芽胞形成誘導物質の探索を行った。

［方法・結果］ オカラ(湿重量 10 kg) MeOH 抽出物を減圧濃縮後、$H_2O$ に再溶解し hexane 、EtOAc 、*n*-BuOH の順に液液分配し、水層画分を含め、それぞれの画分における芽胞形成誘導活性を調べた。培地 1 mL あたりオカラ 1 g 相当量を加えた芽胞誘導アッセイでは水層にのみ活性が認められた。水層画分は、Sephadex G-10 、 Sephadex LH-20 、CM-cellose 、 DEAE-cellose 、 Sephadex G-25 、順相シリカゲルの各種カラムクロマトグラフィーに供し、活性成分を追跡、精製した。最終精製物は TLC 上でシングルスポットを与え、anisaldehyde 硫酸試薬で桃色に呈色した。最終精製物の各種 MS 分析およびアセチル化誘導後の NMR 解析から活性本体を diacetonamine と同定した。市販の diacetonamine シュウ酸塩からシュウ酸を除き、そのアセチル化誘導物を調製し、MS および NMR スペクトルを比較したところ、オカラから得られた最終精製物誘導体と完全に一致した。

芽胞形成評価は以下の方法で行った。 NB 液体培地で 30 ℃、24 h 往復振盪培養（100 rpm）した *B. amyloliquefaciens* 菌体を遠心分離（10,000 rpm, 15 min, 4 ℃）で集菌し、その菌体ペレットを NB 培地と等量の MSG（Minimal Salts medium + Glutamate）液体培地に再懸濁し、活性物質を添加後、30 ℃で 48 h、回転振盪(60 rpm) した。処理後、菌体を LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit® による蛍光染色に供し、緑色蛍光で縁取られた特徴的染色パターンを示す芽胞をカウントすることで、おおよその芽胞分化誘導率を求めた。本芽胞誘導アッセイの結果、 diacetonamine シュウ酸塩および塩酸塩ともに、*B. amyloliquefaciens* に対し、10 μM で明瞭な芽胞形成誘導活性を示すことが明らかになった。現在、*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis* に対しても同様の活性を示すか否かを検定しているところである。



diacetonamine

*Bacillus* sporulation, soybean pulp, sporulation-inducing factor

発表責任者：橋床　泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3F047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分子シャペロン DnaK（Hsp70）は脂質・生体膜と相互作用し、UV-B ストレス下で重要な働きをする

# The molecular chaperone DnaK interacts with lipids to play a role under UV-B stress in cyanobacteria

○仲本 準[1]、Pilbat Ana Maria[2]、Huq Saaimatul[1]、末岡 啓吾[1]、Varvasovszki Viktoria[2]、粟井 光一郎[3]、Glatz Attila[2]、Torok Zsolt[2]、Vass Imre[2]、Horvath Ibolya[2]、Vigh Laszlo[2] ([1]埼玉大院理工、[2]Biol. Res. Centr、[3]静岡大理)
○ Hitoshi NAKAMOTO[1], Ana Maria Pilbat[2], Saaimatul Huq[1], Keigo Sueoka[1], Viktoria Varvasovszki[2], Koichiro Awai[3], Attila Glatz[2], Zsolt Torok[2], Imre Vass[2], Ibolya Horvath[2], Laszlo Vigh[2] ([1]Saitama Univ, [2]Biol. Res. Centr, [3]Shizuoka Univ)

DnaK は Hsp70 ファミリーの原核生物メンバーで、非天然タンパク質と一時的に相互作用し、補助因子である DnaJ や GrpE と共にタンパク質の折りたたみを助ける。シアノバクテリア（藍藻）には、複数種の DnaK や DnaJ が存在し、其々が異なる発現調節を受けることが知られている。本実験で用いた *Synechocystis* PCC 6803 株には 3 種類の DnaK が存在するが、DnaK2 のみが種々のストレス で誘導される。

DnaK2 の細胞機能を明らかにするために、我々はシアノバクテリア *Synechocystis* PCC6803 の *dnaK2* 変異株の解析を行ってきた。DnaK2 が必須であるために、この変異株が保持する複数のゲノムコピーのうちの一部のみにおいて *dnaK2* 遺伝子が破壊されていた。この株における DnaK2 タンパク質蓄積量は減少していたが、UV-B で処理された変異株における DnaK2 のサイトゾルとチラコイド膜における局在性をイムノブロット法で調べたところ、野生株に比較して、チラコイド膜における DnaK2 存在量が著しく減少していた。変異株と野生株を UV-B で処理し、これらの光合成光化学系 II（PSII）電子伝達速度を酸素電極を用いて測定したところ、野生株に比較して、変異株の PSII 活性は UV-B 処理によって著しく減少した。同様の UV-B 処理をタンパク質合成阻害剤であるリンコマイシン存在下で行ったところ、変異株と野生株の PSII 損傷に違いは見られなかった。従って、変異株の UV-B 感受性は、光阻害後の修復（過程）が阻害されていることに起因することが示唆された。単離チラコイド膜を用いて DPH 蛍光異方性を測定したところ、変異株から単離したチラコイド膜の流動性が変化していることが示唆された。精製した DnaK2 と種々の脂質単分子膜との相互作用を解析したところ、DnaK2 が特定の脂質と直接相互作用することが明らかになった。これらの脂質は、DnaK2 の ATPase 活性には、著しい影響を与えなかった。

Hsp70, thylakoid membrane, UV-B stress

発表責任者：仲本　準（nakamoto@mail.saitama-u.ac.jp）

発表番号：3F048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糖脂質の欠損による枯草菌 ECF シグマ因子 $\sigma^V$ の活性化メカニズムの解析

# Analysis of the activation mechanism of an extracytoplasmic function σ factor $\sigma^V$ by lack of glycolipids in *Bacillus subtilis*

○関 貴洋、松岡 聡、松本 幸次、原 弘志 (埼大理工学)
○Takahiro SEKI, Satoshi MATSUOKA, Kouji MATSUMOTO, HIROSHI HARA (Saitama Univ.)

枯草菌の細胞膜には大腸菌には無い 3 種類のグリセロ糖脂質が総脂質量に対して約 10%存在している。これらの糖脂質は UDP-グルコース転移酵素 UgtP によって合成され、UgtP はジアシルグリセロールに UDP-グルコースからグルコースを段階的に付加する。この UgtP を欠損した細胞では細胞形態の異常や細胞外ストレスに応答する 7 つの extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子のうち、$\sigma^M$、$\sigma^V$、$\sigma^X$ の 3 つが活性化している。これらの ECF シグマ因子は非ストレス条件下においてそれぞれに特異的な膜貫通タンパク質であるアンチシグマ因子によって捕捉され活性が抑制されている。$\sigma^V$ の活性化機構についてはいくらかの知見が得られており、$\sigma^V$ はリゾチームによって活性化し、その活性化は regulated intramembrane proteolysis (RIP) と呼ばれる一連のプロテアーゼカスケードによって $\sigma^V$ のアンチシグマ因子 RsiV が分解されることによると考えられている。本研究では糖脂質欠損による $\sigma^V$ の活性化がこの RIP を介した RsiV の分解によって起きているのか明らかにすることを目的とした。RsiV の膜貫通領域 site2 は亜鉛要求性のメタロプロテアーゼ RasP によって分解される。UgtP 欠損株における $\sigma^V$ の活性化が RasP による RsiV の分解によるのかを調べるために、UgtP と RasP の二重欠損株の $\sigma^V$ 活性を測定した。その結果、UgtP の単独欠損株と UgtP と RasP の二重欠損株における $\sigma^V$ の活性に変化はなく、UgtP 欠損株における $\sigma^V$ の活性化は RIP による RsiV の分解とは異なるメカニズムであることが示唆された。つぎに、UgtP 欠損株において RsiV が分解されているのかどうかを調べるために、RsiV の N 末端に FLAG タグを付けウェスタン解析を行ったところを、UgtP 欠損株において FLAG-RsiV の分解は起きていなかった。したがって、UgtP 欠損株における $\sigma^V$ の活性化は RIP による RsiV の分解とは異なるメカニズムであることが示された。つづいて、UgtP 欠損株における $\sigma^V$ の活性化が糖脂質の欠損によるものなのか UgtP タンパク質の欠損によるものかを調べるために、糖脂質合成活性を失った変異 $UgtP_{H18A}$ を UgtP 欠損株において発現させ $\sigma^V$ の活性を測定した。その結果、$UgtP_{H18A}$ を発現させても $\sigma^V$ の活性の低下は見られず、糖脂質の欠損が $\sigma^V$ の活性化を引き起こしていることが示された。つづいて、RsiV が糖脂質の欠損の影響を受けているのかを調べるために、UgtP と RsiV の二重欠損株において $\sigma^V$ の活性を測定したところ、RsiV 単独欠損株と UgtP と RsiV の二重欠損株の $\sigma^V$ 活性に変化は見られなかった。この結果は、RsiV が糖脂質欠損の影響を受けることで $\sigma^V$ が活性化していることを示している。以上のことから考察すると、UgtP 欠損株において糖脂質の欠損により RsiV のコンホメーションが変化し $\sigma^V$ が活性化していると考えられる。

*Bacillus subtilis*, ECF sigma factor, glycolipids

発表番号：3F049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ストレス応答時に枯草菌が蓄積するグアニンリボヌクレオチドの再検証

# Further validation of guanine riconucleotides accumulated during stress response in Bacillus subtilis

野村 勇太[1]、近藤 久海香[2]、○戸澤 譲[1] ([1]埼大院理工、[2]埼大理)
Yuhta NOMURA[1], Kumika KONDO[2], ○Yuzuru TOZAWA[1] ([1]Saitama Univ. Grd School Sci Eng, [2]Saitama Univ. Fac. Sci.)

バクテリアは、限られたほんの一部の種を除き、シグナル物質として(p)ppGpp を利用する制御系を進化させてきた。これまでに、大腸菌や枯草菌などのモデル生物に加え、多くの感染性バクテリアについても(p)ppGpp 合成制御系の研究とその生理学的意義の検証が進められてきた。その結果、(p)ppGpp は DNA 複製、転写、翻訳、核酸合成などを包括的に調節する global regulator として機能することが明らかにされてきた。最近では、pppGpp と ppGpp とでは大腸菌細胞内の機能に差があることが分子遺伝学的な手法を用いて明らかにされるなど、新たな展開を迎えている。

我々は、枯草菌（*Bacillus subtilis*）をモデル生物として(p)ppGpp 機能の解明に取組んできた。その過程でアルカリショックが(p)ppGpp 類似化合物である pGpp の蓄積を誘導するという興味深いデータを得ている。これまでに、一般的な栄養飢餓条件下においても、微量ながら pGpp が細胞内で(p)ppGpp と共蓄積するという報告もあったが、pGpp の生理的意義に関しての詳細は未解明のままであった。本研究においては、pGpp の枯草菌における機能的役割を明らかにするため、pGpp 合成および分解を担う責任酵素の同定と pGpp の標的分子の解析を進めた。

枯草菌は３種類の(p)ppGpp 合成酵素 Rel、YjbM、YwaC を有することを以前に明らかにしたが、今回の実験では、３酵素の完全欠損株は pGpp の蓄積能も完全に失うことを確認した。この結果は３種類の酵素のいずれかの触媒反応により、pGpp が合成されることを示す。そこで、生化学的な検証を進めるために、各酵素を組換えタンパク質として調製し、酵素反応基質の選択性ならびに反応生成物の検証を進めた。また、Rel は(p)ppGpp 分解も担う二機能性酵素であることから、Rel による pGpp 分解能についての検証も進めた。さらに、枯草菌の(p)ppGpp 主要標的が GTP 生合成関連酵素のグアニル酸キナーゼ（GK）であるとの最近の報告を踏まえ、同酵素に対する pGpp の作用をインビトロで解析した。

これまでに、YjbM タンパク質の pGpp 合成活性ならびに Rel タンパク質の pGpp 分解活性を生化学的に明らかにし、さらに酵素反応速度パラメーターに基づき、枯草菌の GK に対する pGpp の阻害作用が(p)ppGpp よりも 7 倍以上強いことを示す結果を得た。GK の基質が GMP(pG)であることを踏まえると、pGpp は構造的にも pppGpp や ppGpp に比べ GMP に類似性が高いといえる。我々は、pGpp は枯草菌細胞内でのグアニン核酸類の代謝の制御に関与する可能性が高いと予想している。本大会では、これらの結果に基づき、枯草菌の pGpp 合成系および pGpp による制御系について考察する。

Bacillus subtilis, ppGpp, stringent response

発表責任者：戸澤譲（tozawa@mail.saitama-u.ac.jp）

発表番号：3F050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における高圧ストレス応答に寄与するミトコンドリア機能の解析

# Mitochondrial function contribute to high pressure stress response in *Saccharomyces cerevisiae*

○野村 一樹[1,2]、井口 晃徳[1]、岩橋 均[2]、重松 亨[1]([1]新潟薬大応生科、[2]岐阜大応生)
○Kazuki NOMURA[1,2], Akinori IGUCHI[1], Hitoshi IWAHASHI[2], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]NUPALS, [2]Gifu Univ.)

【目的】 1,000 気圧(100 MPa)以上の非常に高い圧力(高圧)は、非熱的にタンパク質を変性させ、生物に物理的なストレスを引き起こすことが知られている。高圧を食品加工に応用することで、従来の加熱に依存した食品加工技術と比較して、食品の有用成分の劣化を抑制し、新鮮な風味や色を保持する高品質な食品の製造が期待できる。我々は、有益な発酵微生物のひとつである出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデルとして、圧力により発酵を制御する(Pressure Regulated Fermentation; PReF)技術の確立を目指している[1]。PReF 技術の確立には、可能な限り低い圧力で発酵を制御するため、圧力感受性酵母株の作出技術の開発および圧力感受性メカニズムの解明が必要である。本研究では、これまでに作出した圧力感受性変異株[2]を用いて、遺伝子発現プロファイルおよびミトコンドリア機能を評価し、高圧ストレス応答に寄与するミトコンドリア機能の影響を解析した。

【方法・結果】 本研究では、YPD 培地を用いて 30°C、48 h の条件で振盪培養した圧力感受性変異株 *S. cerevisiae* a924E1 株およびその親株 *S. cerevisiae* KA31a 株の定常期細胞を用いた。それぞれの細胞から total RNA を抽出し、Yeast オリゴマイクロアレイキット(Agilent)を用いて 1 色法により解析した。クオンタイル法により正規化し、MIPS(http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis)を用いて機能遺伝子群を分類解析した結果、エネルギー機能群の呼吸機能に分類される多くの遺伝子において発現量の有意な変動が認められた。遺伝子がコードするタンパク質の局在位置で分類解析した結果、ミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子において発現量の有意な変動が認められた。TTC 染色法によりミトコンドリア機能を解析した結果、a924E1 株の呼吸機能の低下が示された。PCR 法によりミトコンドリア DNA を解析した結果、a924E1 株において、電子伝達系の複合体 IV シトクロム *c* 酸化酵素のサブユニット 1 をコードする *COX1* 遺伝子の欠失が示された[3]。

高圧ストレス応答に寄与するミトコンドリア機能の影響を解析するために、ミトコンドリアの電子伝達系を標的とした呼吸阻害剤を用いて、225 MPa の圧力条件における不活性化挙動を解析した。その結果、アジ化ナトリウムによりシトクロム *c* 酸化酵素を阻害した場合において、KA31a 株の有意な生菌数の減少が認められ、a924E1 株と同等の圧力感受性能を示した。

以上の結果から、*COX1* 遺伝子の欠失により引き起こされたミトコンドリア機能不全と圧力感受性能が強く相関していることが明らかとなった。本研究の一部は、JST-CREATE により実施した。

[1] Nomura and Iwahashi, Rev. Agr. Sci., 2014. [2] Shigematsu *et al*., J. Food Sci., 2010. [3] Nomura *et al*., J. Food Sci., 2015.

*Saccharomyces cerevisiae*, high pressure stress response, mitochondria

発表責任者：野村 一樹（nomura@nupals.ac.jp）

発表番号：3F051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 65℃の熱処理で枯草菌胞子の不活性を可能にする圧力処理条件

# Pressure-induced reduction in thermal torelance of *Bacillus subtilis* enabling inacivation at 65℃

○平澤 貴昭[1]、中原 健太[1]、小林 裕紀[1]、中島 加奈子[2]、木戸 みゆ紀[1]、林 真由美[1]、野村 一樹[1]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟薬大・産官学連携セ)
○Takaaki HIRASAWA[1], Kenta NAKAHARA[1], Hiroki KOBAYASHI[1], KANAKO NAKAJIMA[2], Miyuki KIDO[1], Mayumi HAYASHI[1], Kazuki NOMURA[1], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATU[1] ([1]NUPALS, [2]LCRDP, NUPALS)

【背景】
食品中の胞子の殺菌工程で用いられるレトルト殺菌法(120℃, 4 min 以上)には，高温の影響による食品の風味の劣化や栄養価の低下等のデメリットが存在する。これまでに，我々は枯草菌の胞子をモデルとして，200 MPa～500 MPa，室温～65℃の条件により胞子の耐熱性が低下することを示した。本研究では，レトルト殺菌法よりも低い温度条件で胞子の生菌数を減少させることを目指した。

【実験方法】
*Bacillus subtilis* NBRC13719$^{T}$ (Marburg) 株を NBRC No. 802 培地にて 30℃, 1 week の条件で静置培養し胞子を形成させた。回収した胞子は 80℃, 20 min の条件で熱処理を行い，栄養細胞を不活化して胞子懸濁液を調製した。胞子懸濁液は，200 MPa および 500 MPa，室温～65℃，0，10，30，60，120 min の条件で圧力条件を行った。圧力処理を施した胞子は，65℃および 80℃，0，20 min の温度条件で熱処理し、生菌数を算出した。各操作における生菌数の減少から不活性化挙動を解析し、胞子の耐熱性の低下を評価した。

【結果・考察】
室温条件で 200 MPa，500 MPa の圧力処理後，80℃の温度条件で熱処理を行い，胞子の不活性化挙動を解析した。200 MPa の圧力処理を施した胞子は，圧力処理および熱処理により不活性化し，圧力処理による胞子の耐熱性の低下が示された。この結果は，圧力処理による胞子の発芽誘導により耐熱性が低下したことを示唆した。一方，500 MPa の圧力処理を施した胞子は圧力処理および熱処理による不活性化が認められず，胞子の耐熱性を維持したことが示唆された。次に，40℃，50℃の温度条件で 200 MPa または 500 MPa の圧力処理を施した胞子は,圧力レベルによらず，圧力処理および熱処理により不活性化し，圧力処理による胞子の耐熱性の低下が示された。しかし，65℃の温度条件で圧力処理を施した胞子は，圧力処理による不活性化は認められたが，熱処理ではそれ以上の不活性化は認められなかった。これらの結果は，圧力レベルに依存せず，65℃の条件で圧力処理を施した胞子は，圧力処理中に耐熱性が著しく減少して不活性化することを示唆した。そこで，40℃，50℃の条件で 200 MPa，500 MPa の圧力処理後，65℃の温度条件で熱処理を行い，80℃の場合と比較した結果，不活性化挙動が一致した。この結果は，圧力処理により耐熱性が減少した胞子が，65℃の温度条件の熱処理によって，80℃の温度条件での熱処理と同等に不活性化されることを示している。

*Bacillus subtilis* spores, pressure, thermal tolerance

発表責任者：重松　亨（shige@nupals.ac.jp）

発表番号：3F052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

牛乳β-ラクトグロブリン由来の新規グレリン分泌抑制ペプチド
A novel bovine β-lactoglobulin-derived peptide decreases ghrelin secretion.

○青木 隼人[1]、中戸 絢也[1]、水重 貴文[1,2]、岩倉 浩[3]、鈴木 秀幸[4]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大院農食品生物、[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット、[3]京大メディカルイノベーションセンター、[4]公益財団法人かずさ DNA 研究所)
○HAYATO AOKI[1], JUNYA NAKATO[1], TAKAFUMI MIZUSHIGE[1,2], HIROSHI IWAKURA[3], HIDEYUKI SUZUKI[4], RYUHEI KANAMOTO[1], KOUSAKU OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ Research Unit for Physiological Chemistry., [3]Medical Innovation Center, [4]Kazusa DNA Research Institutes)

【目的】グレリンは胃から分泌される摂食促進作用を示す内因性のペプチドホルモンであり、絶食により血中レベルが上昇する一方、食後に低下することが知られている。グレリン分泌抑制物質は摂食抑制作用および抗肥満作用が期待できるが、その分泌調節の詳細は不明な点が多い。本研究では株化されたグレリン分泌細胞 MGN3-1[1]を用いてグレリン分泌物質を探索したところ、牛乳タンパク質由来の外因性の 9 残基ペプチドがグレリン分泌を抑制することを見出した。グレリン分泌抑制作用を示す食品タンパク質由来ペプチドとしては初めての例である。
【方法】牛乳の主要な乳清タンパク質 β-ラクトグロブリンをサーモリシンで分解し、得た酵素消化物をグレリン分泌細胞 MGN3-1 の培養液に添加した。培養液を回収し、グレリン濃度を ELISA で定量した。またサーモリシン消化物中に含まれるペプチド混合物を nanoLC-Orbitrap-MS を用いて一斉分析し、含有するペプチドを網羅的に解析した。
【結果および考察】β-ラクトグロブリンのサーモリシン消化物を MGN3-1 に添加したところ、培養液中のグレリン濃度が減少し、グレリン分泌抑制作用を示すことが判明した。また、一斉分析によりサーモリシン消化物中に 130 種以上のペプチドを検出した。一方、既にジペプチドの中で Leu-Ile がグレリン分泌を抑制することを見出しており、この LI 配列に注目して探索したところ、Leu-Ile-Val-Thr-Gln-Thr-Met-Lys-Gly (LIVTQTMKG)がグレリン分泌抑制候補として考えられた。そこで本ペプチドを化学合成しグレリン分泌への影響を検討した。その結果 LIVTQTMKG は用量依存的にグレリン分泌抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに本ペプチドの細胞内 cAMP への影響を検討したところ、forskolin のアデニル酸シクラーゼ活性化作用を抑制することが明らかとなった。従って、LIVTQTMKG のグレリン分泌抑制作用には Gi が関与している可能性が考えられた。
【結論】グレリン分泌細胞を用いて牛乳 β-ラクトグロブリンのサーモリシン消化物および、消化物中に含まれるペプチド LIVTQTMKG がグレリン分泌抑制作用を示すことを新たに見出した。
本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。
[1] Iwakura H et al. Endocrinology. 2010;151(6):2940-5.

Global analysis, Ghrelin, β-Lactoglobulin

発表責任者：大日向耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3F053
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 活性汚泥処理水に存在するバイオフィルム形成細菌における Quorum Sensing 機構の解析

# Analysis of quorum-sensing system in biofilm-forming bacteria isolated from the treated wastewater

○我妻 隆樹[1]、石塚 美和[2]、池田 宰[1]、諸星 知広[1] ([1]宇都宮大院工、[2](株)東芝)
○Takaki AZUMA[1], Miwa ISHIZUKA[2], Tsukasa IKEDA[1], Tomohiro MOROHOSHI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]Toshiba Co., Ltd.)

【目的】水処理メンブレンバイオリアクターにおける膜ファウリングは、膜間差圧の上昇を引き起こすなど処理効率低下の原因となることから、大きな問題となっている。特に、微生物が原因となるバイオファウリングにおいては、膜表面に形成されるバイオフィルムが主な要因となっている。また、グラム陰性細菌においては、バイオフィルム形成が細胞密度依存的情報伝達機構 Quorum Sensing により制御される例が多数報告されている。本研究では、活性汚泥処理水中に存在する細菌群の中から、高いバイオフィルム形成能を示す細菌を単離するとともに、そのバイオフィルム形成機構と Quorum Sensing との関係を解析することを目的とした。

【実験方法及び結果】活性汚泥処理水を 24 穴マイクロプレートの各ウェルに加え、30℃で 10 日間インキュベートした。ウェルから処理水をアスピレーターで完全に除去し、付着した細菌を滅菌水で懸濁し、R2A 寒天培地上でコロニーを形成させること細菌株を得た。各菌株のバイオフィルム形成量をクリスタルバイオレット法で定量し、バイオフィルム形成量の高い菌株の菌種を同定したところ、その大部分が *Acinetobacter calcoaceticus* であることが明らかとなった。次に、*A. calcoaceticus* RR1 株を R2A 培地で培養し、その上清を濃縮して AHL レポーター株により AHL の検出を行ったところ、RR1 株培養上清中には AHL が存在することが明らかとなった。次に、RR1 株が生産する AHL の構造を決定したところ、RR1 株は *N*-(3-hydroxydecanoyl)-$_L$-homoserine lactone と *N*-(3-hydroxydodecanoyl)-$_L$-homoserine lactone の 2 種類の AHL を生産することが明らかとなった。これまでに、*A. calcoaceticus* PHEA-2 株のゲノム情報が公開されているが、PHEA-2 株ゲノム中に存在する AHL 合成遺伝子ホモログは RR1 株染色体上にも存在し、この AHL 合成遺伝子ホモログを大腸菌にクローニングして、培養上清中の AHL を解析したところ、RR1 株が生産する AHL と同じ構造の AHL が検出された。現在、RR1 株の AHL 合成遺伝子破壊株を作成し、バイオフィルム形成量の変化を解析している。

quorum sensing, acylhomoseine lactone, activated sludge

発表番号：3F054
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# VNC 状態のサルモネラにおける新規検出マーカーの探索
# Examination of a new marker to detect the Salmonella in the VNC state

○吹田 一将、磯貝 恵美子（東北大農）
○Kazumasa SUITA, Isogai Emiko (Tohoku Univ.)

〈目的〉

多くの細菌は化学的や物理的な様々な環境ストレスにより、生きているが培養できない状態である VNC (Viable but Non-Culturable)に移行することが知られている。通常の細菌検査では検出が困難なため、VNC 菌を検出できる方法を確立することが衛生管理上重要である。動物体内に侵入した VNC 菌は、体内環境において正常菌に回復し食中毒および感染症を引き起こす恐れがあり、サルモネラなどの病原性細菌の VNC 状態は非常に危険視されている。本研究では、サルモネラの VNC 状態菌を判別することのできるマーカーを検討した。

〈実験方法〉

実験に使用する菌株は *Salmonella* Enteritidis の zSE1 株を使用し、3mM の $H_2O_2$ を含む培地でサルモネラを培養することにより VNC 状態への移行を行った。移行後、透過型顕微鏡を用いて Membrane Vesicle (MV) 産生が促進されているか調べた。VNC 状態へ移行したサルモネラにおける外膜タンパク質 PagC の発現量を Western Blotting 法により測定した。

〈結果・考察〉

3mM の $H_2O_2$ を付加して培養したところ、約 2 時間で VNC 状態へ移行した。VNC への移行に伴い、MV の産生が促進していた。VNC 導入直後のサルモネラと正常なサルモネラとで PagC の発現量を比較してみたところ、大きな差は見られなかった。しかし、培養 7 日で PagC の発現量は 100．39ng であり正常なサルモネラと比較して発現量は約 4 倍に増加した。この結果から、VNC 状態へと移行するようなストレスを付加することにより PagC の発現が増加することが明らかとなった。よって本研究の結果から、PagC は VNC 菌を判別するマーカーのひとつとして有用であることが示唆された。

サルモネラの外膜タンパク質である PagC は $Mg^{2+}$飢餓や低 pH といった環境中のストレス因子に応答する PhoPQ 二成分制御系によって正に制御されている。PagC はエンベロープストレスを解消するための MV (Membrane Vesicle)の主要な構成成分であると報告されている。サルモネラが VNC 状態へ移行するとき、MV 産生が促進され、外膜タンパク質 PagC の発現量が増加すると考えられた。

*Salmonella*, Environmental stress, PagC

発表番号：3F055
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# QS によって制御される *Paracoccus denitrificans* の凝集体形成因子の探索

Analysis of aggregation factors regulated by quorum sensing in *Paracoccus denitrificans*

○森永 花菜、豊福 雅典、野村 暢彦（筑波大院生命環境）
○Kana MORINAGA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

多くの細菌は相互作用を行うことで、様々な挙動を制御している。シグナル物質を介した細胞間情報伝達機構である Quorum sensing (QS) もその一つである。QS は様々な細菌において多様な形質を制御することが報告されているが、その多くが病原性細菌に関する知見である。しかしながら、近年、QS は病原性細菌に限らず環境中の様々な細菌において行われていることが明らかとなっており、その制御下の形質、さらには環境中での役割に注目が集まっている。そこで、土壌や活性汚泥に広く存在する脱窒細菌である *Paracoccus denitrificans* に注目し、環境中での QS の役割を明らかにするため、QS 機構の解析を行うこととした。*P. denitrificans* が合成するシグナル物質である C16-HSL の合成遺伝子の欠損株（Δ*luxI*）を作製したところ、野生株では非凝集性であることに対し、Δ*luxI* は強凝集性を示した。*P. denitrificans* は QS を介して、凝集体形成を抑制するという興味深い知見を得ることができた。そこで、本研究では、*P. denitrificans* において QS に制御される凝集体形成因子の探索を行うことを目的とした。

凝集体の形成には、細胞外物質の生産量の変化が関与することが予想されたため、まず、電子顕微鏡（SEM）を用いた各株の詳細な観察を行った。その結果、凝集性を示すΔ*luxI* の細胞周囲には細胞外物質様のものが観察された。続いて、凝集体形成関連遺伝子を同定するため、Δ*luxI* においてトランスポゾンを用いた遺伝子のランダム破壊を行ったところ、非凝集性株の取得に成功した。取得した株の多くは細胞外物質の合成に関与すると推定される遺伝子にトランスポゾンが挿入されていた。Δ*luxI* は細胞外物質の生産量を増加させることによって凝集体の形成能を上昇させていることが考えられる。今後、QS によって制御される凝集体形成因子の解明を目指す。

quorum sensing, aggregation, cell-cell communication

発表番号：3F056
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細菌が放出するナノ膜小胞メンブランベシクルの形成機構解析

# Membrane vesicle formation mechanism produced in bacteria

○黒沢 正治、豊福 雅典、野村 暢彦（筑波大・生命環境）
○Masaharu KUROSAWA, Masanori TOYOFUKU, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

多くの細菌はメンブランベシクル(MV)と呼ばれる数十から数百 nm サイズの膜小胞を形成し、細胞外に放出している。MV にはタンパク質や核酸、細胞間シグナル物質などの様々な微生物由来の物質が内包されていることから、毒素やシグナル物質の輸送、遺伝子の水平伝播、抗菌物質に対するバリア、バイオフィルム形成など細菌の生態において重要な役割を果たしていると考えられている。また、近年では MV のワクチン利用も報告され、ナノテクノロジーの基盤としての応用も期待されている。現在までに MV の機能性に関する報告は数多くなされてきたが、MV の形成及び付着に関わる因子やその制御メカニズムに関する知見は未だ乏しく、現在その詳細な解析が求められている。

当研究室では MV 生産のモデル細菌である緑膿菌を用いて MV 形成機構の解析を進めてきた。先行研究において、緑膿菌は DNA 修復機構の一つである SOS レスポンスを介して MV を形成していることが明らかとなり、さらに pyocin 生産が MV 形成に関わることも示した。Pyocin は緑膿菌が生産するバクテリオシンで、同種の異なる株に対して抗菌活性を持つバクテリオファージ尾部様の構造体である。本研究でさらなる詳細を解析したところ、pyocin 自体の構成タンパク質ではなく、pyocin の放出(溶菌)に関わる推定 holin と推定 endolyisn の 2 つのタンパク質が MV 形成に関わることを新規に見出した。一般的に holin と endolysin は、バクテリオファージ(様構造体)の放出のための溶菌システムとして広く知られており、endolysin がペプチドグリカンを分解することで溶菌を起こす。Holin は細胞内膜に孔を形成し、endolysin のペリプラズムへのアクセスを可能とする。この pyocin 生産クラスター由来の推定 endolysin タンパクの推定活性部位に変異を与えたところ、MV 生産の増加が見られなくなったことから、推定 endolysin 活性が MV 形成に重要であることを前回大会までに報告した。その後の解析により、推定 holin は推定 endolysin の細胞質からペリプラズムへの局在化に必須であることが明らかとなり、“Holin-Endolysin”活性が MV 形成に重要であることを示した。興味深いことに、“Holin-Endolysin”システムを介して形成された MV には、当該システムを介さない MV と比べて、細胞質成分が顕著に多く含まれていた。また、“Holin-Endolysin”システムは多くの細菌に保存された機構であり、細菌共通の MV 形成機構である可能性が考えられ、現在異種細菌における普遍性の解析も進めている。

Membrane vesicle, Cell-cell communication, Holin-endolysin system

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：3F057
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 生息環境で異なる緑膿菌の微生物間コミュニケーション
# Various cell-cell communication of *pseudomonas aeruginosa* in different habitats

○遠矢 正城[1]、豊福 雅典[1]、木暮 一啓[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大院・生命環境、[2]東京大・大気海洋研)
○ Masashiro TOYA[1], Masanori TOYOFUKU[1], Kazuhiro KOGURE[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Tokyo Univ.)

微生物は地球上のいたる所に遍在し、様々な方法で環境適応している。緑膿菌はそのような微生物の中でも、ヒトの体内や土壌・河川など特に広い範囲に分布する細菌で、近年では塩濃度や栄養といった点で極限的な環境ともいえる海洋に存在することが報告されている。緑膿菌がこれらの広範囲な領域に分布している理由としては様々な環境適応機構を保持していることが考えられる。特に微生物間コミュニケーションの一つであるクオラムセンシング(Quorum sensing, QS)は様々な表現型を制御しており緑膿菌の環境適応に大きく寄与していることが予想される。QS とは菌特有のシグナル物質を介して一定以上の菌体密度に到達したことを感知し様々な遺伝子の転写を調節する機構である。いくつかの菌でこの機構は確認されているが、緑膿菌は種内シグナル・種間シグナルそれぞれで活性化する複数の QS システムを持っておりそれらが相互に発現を調節するという興味深い特徴をもつ。現在までに臨床現場から単離された緑膿菌株についてこの QS 機構の解明が多くなされてきたが、自然環境中に存在する緑膿菌株の QS についての知見は乏しく、QS が自然環境中における緑膿菌の環境適応にどのように寄与しているかどうかは明らかとなっていない。

そこで本研究においては水環境中から単離された緑膿菌株に着目し、臨床由来の標準株と比較し QS システムがどのように異なっているかを解析することで、QS の環境適応への寄与について新規知見を得ることとした。QS の制御下にあるピオシアニン色素の生産量・QS シグナルの生産量の定量を行い比較した結果、株ごとにそれらが異なり多様性に富んでいることがわかった。さらに興味深いことに、外洋領域から単離された緑膿菌においては多くの株でピオシアニン生産・QS シグナル生産の減少が見られた。また QS に関連した遺伝子についてシーケンス解析を行ったところ、アミノ酸配列を変化させる変異も見つかっている。このことから生息環境に応じて緑膿菌の QS システムが異なることが示唆された。今後これらの遺伝子の機能性の確認や QS シグナルの生産が減少していた株の外部シグナルへの応答性などを見ることで QS がどのように欠落しているのかを詳細に解析していく予定である。

cell-cell communication, Quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*

発表番号：3F058
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質生産における Quorum Sensing の多重制御機構の解析

# Production of antifungal substance controlled by multiple quorum-sensing systems in plant-associated *Pseudomonas chlororaphis*

○山口 貴人[1]、一村 奈々瀬[1]、染谷 信孝[2]、池田 宰[1]、諸星 知広[1] ([1]宇都宮大院工、[2]農研機構)
○ Takahito YAMAGUCHI[1], Nanase ICHIMURA[1], Nobutaka SOMEYA[2], Tsukasa IKEDA[1], Tomohiro MOROHOSHI[1] ([1]Utsunomiya Univ., [2]NARO)

【目的】ジャガイモ根から単離した *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 株は、植物病原性真菌の増殖を阻害する抗菌物質フェナジン-1-カルボン酸（PCA）を生産する。ある種の細菌では、抗菌物質生産がアシル化ホモセリンラクトン（AHL）を介した細胞密度依存的情報伝達機構 Quorum Sensing により制御される例が報告されている。StFRB508 株においても、染色体上に 2 種類の AHL 合成遺伝子および AHL レセプター遺伝子のセット（*phzI*/*phzR* および *aurI*/*aurR*）が存在し、AHL を介した Quorum Sensing により PCA 生産が制御されることを 2012 年度大会で発表している。本研究では、StFRB508 株の全ゲノム配列を決定し、すべての AHL 合成遺伝子の存在を明らかにするとともに、Quorum Sensing による PCA 生産制御機構の解析を行うことを目的とした。
【実験方法及び結果】StFRB508 株の全ゲノム配列を決定し、既知の AHL 合成遺伝子の相同配列を検索したところ、すでに明らかになっている *phzI*/*phzR* および *aurI*/*aurR* に加えて、新たに *csaI*/*csaR* と命名した配列が存在することが明らかとなった。次に、*phzI*、*aurI*、*csaI* を全ての組み合わせで破壊した多重破壊株を作成したところ、StFRB508 株の *phzI* のみを破壊すると PCA 生産が大幅に低下したことから、PhzI により生産される AHL が PCA 生産の活性化に主要な役割を果たしていることが明らかになった。次に、各遺伝子破壊株を LB 培地で 24 時間培養し、培養上清中の AHL を酢酸エチルで抽出し、AHL レポーター株を用いて培養上清サンプル中の AHL の存在を確認したところ、AHL 合成遺伝子の二重破壊株は全て AHL 生産を示したが、三重破壊株では AHL 生産が完全に消失したことから、StFRB508 株はこれらの AHL 合成遺伝子のみで AHL 生産を示すことが明らかとなった。

quorum sensing, acylhomoseine lactone, antifungal

発表番号：3F059
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 株の特異な運動能
# Unique motile behavior of *Paenibacillus* sp. NAIST15-1

○小林 和夫[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2] ([1]奈良先端大バイオ、[2]東京農大応生)
○KAZUO Kobayashi[1], Yu kanesaki[2], hirofumi yoshikawa[2] ([1]Nara Inst. Sci. & Tech., [2]Tokyo Univ. of Agri.)

植物根圏より単離した *Paenibacillus* sp. NAIST15-1 株は、高い運動能を示し、多くの細菌が移動できない 1.5%寒天培地の中央に接種した場合、一晩でプレートに全面に広がる。また、その際、*Paenibacillus* sp.は、均一に広がるのではなく、細菌を希釈して塗布したかのように、プレート全面に多数のコロニーを形成する。実体顕微鏡下で、そのコロニー形成過程を観察したところ、*Paenibacillus* sp.は、接種部位で多数の小コロニーを形成し、そのコロニーが成長しながら培地表面を動きまわり、その後各コロニーが自転を始め、丸いコロニーを形成することが分かった。我々は、この *Paenibacillus* sp.の特異な運動を colonial motility と名づけ、解析を行った。colonial motility は、1%以上の寒天濃度で見られる現象で、*Paenibacillus* sp.は、0.3%、0.5%寒天濃度では、移動コロニーを形成せず、他の微生物と同様 swimming motility、 swarming motility を示した。*Paenibacillus* sp.のドラフトゲノムを決定した結果、この菌の鞭毛遺伝子は、その配置、構成ともに、枯草菌と非常に類似していることが明らかになった。トランスポゾン mini-*Tn*10 を用いて、colonial motility に必要な遺伝子の探索を行った結果、多数の *Tn*10 の挿入が、鞭毛遺伝子内部に見つかった。しかし、鞭毛遺伝子の破壊は、colonial motility だけでなく、swimming motility、swarming motility も阻害した。また、鞭毛遺伝子の発現は、colonial motility が見られる 1.5%寒天培地上で強く誘導されたが、colonial motility の見られない 0.5%寒天培地でも同様に強く誘導された。これらのことから、colonial motility は、鞭毛に依存した運動能であるが、鞭毛の発現誘導だけでは、その運動能を説明できないことが明らかになった。我々は、Tn10 挿入株の解析から、CmoA と名付けた遺伝子を見出した。CmoA は、分泌シグナル配列を持つ 1061 アミノ酸残基からなる巨大タンパク質で、その欠損は、swimming motility, swarming motility には影響せず、colonial motility のみを阻害した。また、colonial motility 欠損の原因は、細胞集団を形成できないためであった。さらに、mCheryy 融合遺伝子を用いて CmoA の局在を観察したところ、CmoA は colonial motility で形成される細胞集団を包み込むように観察された。これらのことから、*Paenibacillus* sp. は、多数の鞭毛を持つ細胞が集団を形成することで、他の細菌が移動できない高寒天濃度の培地上を移動できると考えられ、CmoA は、その細胞集団形成に必須の因子であることが明らかになった。

Paenibacillus, motility, Draft genome

発表責任者：小林和夫（kazuo@bs.naist.jp）

発表番号：3F060
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 温度応答性高分子を用いた新規微生物制御法の開発

# A new method to control bacteria by using a temperature responsible polymer

○勝亦 雄太、豊福 雅典、小川 和義、野村 暢彦（筑波大院 生命環境）
○ Yuta KATSUMATA, Masanori TOYOFUKU, Kazuyoshi OGAWA, Nobuhiko NOMURA (Tsukuba Univ.)

近年，実環境中の微生物の多くはバイオフィルムのような集団を形成して存在することが知られるようになってきた．このような集団中において，微生物は互いにコミュニケーションを行うことが明らかとなっている．中でも Quorum Sensing (QS)と呼ばれるコミュニケーションは，病原性，抗生物質耐性，呼吸活性，運動性といった様々な挙動を制御することが報告されている．そのため QS の制御が可能となれば，新しい微生物制御法として幅広い産業分野への応用が期待できる．一般的に，QS は菌密度依存的なシステムである．よって，菌体密度を意図的に調節することができれば，QS 制御が可能になると考えられる．そこで我々は，温度応答性高分子の伸縮運動を利用し菌体密度を調節することにより，QS を制御できないか検証を行った．

温度応答性高分子として poly(*N*–isopropylacrylamide) (PNIPA)に着目した．PNIPA は 32℃を境に伸縮する性質を持つため, 微生物を包括固定した PNIPA 担体に温度変化を与えることで菌体密度の制御が可能になると考えた．そこでまず我々は，QS モデル細菌である緑膿菌; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (野生株)を包括した PNIPA 担体の伸縮挙動について観察を行った．結果，PAO1 包括 PNIPA 担体は温度に応じて体積を 70 %以上変化させたため，これに伴い菌体密度も変化することが示唆された．さらに興味深いことに，収縮した PNIPA 担体中では特異的に菌体数が増加することが示された．この挙動に QS が関与するか確かめるため, 続いて Δ*lasI*Δ*rhlI* (シグナル物質非生産株)を用い同様の実験を行った．結果，シグナル物質非生産株では野生株に見られた菌体数の増加は確認されなかった．加えて，収縮していない担体においてはこれまでような違いは観察されなかった．以上の結果から，収縮した PNIPA 担体が作り出す高い菌体密度条件が，*P. aeruginosa* の QS 発現を誘導する効果を持つことが示唆された．本研究により，菌体密度の調節によって QS が制御できる可能性が示された．

Quorum Sensing, Temperature Responsible Polymer, *Pseudomonas aeruginosa*

発表番号：3F061
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Rag/Gtr 複合体非依存的 TORC1 活性化機構の解析

Analysis of the Rag/Gtr independent activation mechanism of TORC1

○谷川 美頼、前田 達哉（東大分生研）
○Mirai TANIGAWA, Tatsuya MAEDA (Tokyo Univ.)

プロテインキナーゼ TOR を触媒サブユニットに持つ TOR 複合体 1（TORC1）は、細胞成長を制御する過程の中核を担っており、その構造、機能ともに真核生物に広く保存されている。TORC1 は、アミノ酸などの栄養や増殖因子によって活性化され、タンパク質合成などの同化作用を促進するとともにオートファジーなどの異化作用を抑制することで細胞成長を促す。この制御は厳密になされており、その破綻は糖尿病やがんなどの疾病の進行と深く関わることが明らかになっている。

アミノ酸による TORC1 活性化機構において、現在最も研究が進んでいるのが低分子量 G タンパク質である Rag（あるいは酵母オルソログ Gtr）のヘテロ 2 量体を介した機構である。このモデルでは、TORC1 は Rag/Gtr によりアミノ酸依存的にリソソーム（あるいは酵母相同オルガネラである液胞）にリクルートされることによって活性化されると考えられている。しかし、最近 Rag/Gtr とは独立した機構の存在が酵母でも哺乳類でも報告されている。これらの報告では、TORC1 がグルタミンによって Rag/Gtr 非依存的に活性化されることが示されているが、そのメカニズムの詳細は明らかでない。

我々は、酵母を用いて Gtr 複合体を介さない TORC1 活性化機構を明らかにしようと試みている。そのためにまず *in vitro* TORC1 活性評価系の構築を試みた。セミインタクト細胞を調製し、これを TORC1 のソースとしてキナーゼアッセイを行うことにより、アミノ酸依存的な TORC1 活性化を *in vitro* でモニターすることにはじめて成功した。この系ではグルタミンとシステインのみが TORC1 を活性化することができ、その活性化は Gtr 複合体に非依存的であった。この系を用いることにより、種々の分子がグルタミンによる TORC1 活性化に関わるか否かを、栄養の取り込みなどの影響を考慮に入れずに判定することが可能になった。また、精製した液胞膜を用いても、セミインタクト細胞と同様にグルタミンによる TORC1 の活性化をモニターすることができた。このことは、TORC1 のグルタミン応答に必要な分子は液胞膜上に存在することを示唆している。そこで、酵母の液胞に局在し、TORC1 構成因子との遺伝学的相互作用が報告されている遺伝子群について、破壊株を用いたキナーゼアッセイを行った。その結果、PI3 キナーゼをコードする *VPS34* の破壊株、および PI3P の結合モチーフである FYVE ドメインをもつタンパク質をコードする *PIB2* の破壊株ではグルタミンによる TORC1 活性化能が失われていた。このことは、Vps34 により産生された PI3P を介して液胞膜上にリクルートされた Pib2 が、グルタミンによる TORC1 活性化に重要な機能を持つことを示唆している。

TORC1, rapamycin, glutamine

発表番号：3F062
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母プロテインキナーゼ A は、塩化カルシウムストレスにおいて転写因子 Prz1 を制御している
# cAMP-dependent protein kinase, Pka1, is involved in the regulation of Prz1, on calcium tolerance of the fission yeast

○松尾 安浩、川向 誠（島根大・生物資源・生命工）
○Yasuhiro MATSUO, Makoto KAWAMUKAI (Shimane Univ.)

分裂酵母でプロテインキナーゼＡは、触媒サブユニット Pka1 と調節サブユニット Cgs1 からなるヘテロ 4 量体である。炭素源が豊富な条件下で、Pka1 と Cgs1 が解離し、下流因子をリン酸化して生体内の反応を調節している。これまでに分裂酵母では、糖新生、減数分裂過程移行への制御、ストレス応答、経時的寿命に関わっていることが報告されている。本研究では、プロテインキナーゼＡのストレス応答に関して解析を行うことを目的とした。

*pka1Δ*は、これまでに塩化カリウムに対して感受性を示し、塩化ナトリウムやソルビトールには、感受性を示さないことが明らかになっている。そこで、他のストレスを解析したところ、新たに塩化カルシウムに対して感受性を示した。この感受性は、プロテインキナーゼＡ活性に依存していた。次に塩化カルシウム存在下での Cgs1 及び Pka1 の発現と局在を解析したところ、発現は大きく変化していなかった。一方で、通常核と細胞質に局在している Cgs1 と Pka1 は、塩化カルシウム存在下で、核での局在が低下していた。

塩化カルシウムストレスにおける Pka1 のターゲットを明らかにするために、転写因子 Prz1 に注目した。Prz1 の高発現は、生育遅延を引き起こし、この表現型のマルチコピーサプレッサーとして、以前に Pka1 が単離されている。また、*in vitro* で、Pka1 が Prz1 をリン酸化していることも明らかにされている。そこで、*pka1Δ*における Prz1 の局在と発現を解析した。Prz1 の局在は野生株及び *pka1Δ* において、変化なく核に局在していた。一方で、Prz1 の発現は、野生株に比べ *pka1Δ*において増加していた。プロテアソーム阻害剤を用いた結果、これは、タンパク質分解の阻害ではなく、発現の制御であることが示唆された。さらに、野生株において、Prz1 を高発現させたところ、塩化カルシウムに対して感受性を示していた。次に、*pka1Δ prz1Δ*の二重破壊株を用いて塩化カルシウムに対する感受性を解析したところ、それぞれの単独破壊株に比べ、二重破壊株で感受性が増加していた。このことから、Pka1 のターゲットが Prz1 以外に存在していることが示唆された。Pka1 経路は、グルコース応答経路として知られているため、グルコース枯渇条件において、Prz1 を解析したところ、*prz1Δ*の塩化カルシウム感受性は、促進されていた。また、Prz1 の発現も増加することが明らかになった。

以上のことから Pka1 は、塩化カルシウムストレスに応答して、転写因子 Prz1 の発現制御に関与しており、カルシウムシグナリングとグルコース応答経路がクロストークすることが示唆された。

Protein kinase A, Prz1, calcium tolerance

発表責任者：松尾安浩（ymatsuo@life.shimane-u.ac.jp）

発表番号：3F063
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 熱耐性と胞子形成に関与する枯草菌 rpoC 遺伝子の新規機能解析

# Functional analysis of *rpoC* gene responsible for thermotolerance and sporulation of *Bacillus subtilis* cells.

○高松 美沙樹[1]、兼崎 友[2]、朝井 計[3]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]埼玉大・院・理工)
○Misaki TAKAMATSU[1], Yu KANESAKI[2], Kei ASAI[3], Hirofumi YOSHIKAWA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center, [3]Saitama Univ.)

【背景・目的】我々はこれまで枯草菌の主要シグマ因子 SigA 依存のプロモーターにおいて、転写開始点の塩基に依存した熱ショック応答機構について解析してきた。そして、SigA の機能をさらに顕在化させるため、朝井らによって開発された SigA のみを発現させるようにした株（SigA only 株）を解析している過程で、この株が 49℃ LB 培地において定常期に急速に溶菌することを見出した。これは SigA のみにしたことでストレス条件下において細胞機能の維持が出来なくなっていることが考えられた。そこで、49℃で一晩培養し残存した菌を調べたところ、溶菌が起こらなくなる抑圧変異株を取得することが出来た。この株は当研究室で近年追跡してきた、“増殖停止期の生存戦略”を考察する上で興味深い対象であると考え、さらに解析することを目的とした。

【方法・結果】変異株の全ゲノムシークエンスにより、共通して *rpoC* の C 末端側に変異が見られた。この変異が溶菌の抑圧に寄与しているかどうかを検証するため、これら *rpoC* 変異を再度 SigA only 株に導入したところ、確かに 49℃における溶菌を示さなくなった。さらにこの変異自体の影響を調べるため、168 野生株に導入した株を作製し、熱耐性や胞子形成に及ぼす影響を解析した。生育非許容温度である 55℃ 10 分処理後の生菌数を測定したところ、変異株では生存率が上昇していた。このことから、*rpoC* の変異により細胞の耐熱性が上がったと考えられる。一方、胞子形成率に関しては変異株では 37℃において減少傾向が見られ、さらに 49℃においては大きく減少した。以上のことから、*rpoC* の変異により転写活性が変化し、細胞を耐熱化させたり胞子形成能を低下させたりしていることが示唆された。転写活性に影響を及ぼす要因を探るために、*rpoC* 変異を持つ 168 株において、いくつかのプロモーターに対してリポーターアッセイを行った。SigA 依存の *groES/L-bgaB* アッセイでは、熱ショック応答のレベルが低くなっていた。また SigA, SigH に依存する *spo0A-lacZ* アッセイでは活性の上昇が野生株ほど見られず、SigH の活性化に影響を及ぼしていることが示された。これらの結果から、*rpoC* の変異により RNA ポリメラーゼの構造が変わり、プロモーター認識能が変化したか、あるいはシグマ因子への親和性が変化した可能性が考えられた。今後、RNA ポリメラーゼ自体の耐熱化、また特定の遺伝子群に対する転写量の変化などさまざまな影響について検証し、細胞の熱耐性と胞子形成率低下の要因について考察する。

RNA polymerase, Thermotolerance, Sporulation

発表責任者：吉川博文（hiyoshik@nodai.ac.jp）

発表番号：3F064
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な一酸化窒素合成および細胞死誘導の制御機構
# Regulatory mechanism of nitric oxide synthesis and cell death induced by the flavoprotein Tah18 in yeast

○那須野 亮、吉川 雄樹、佐藤 裕士、高木 博史（奈良先端大・バイオ）
○Ryo NASUNO, Yuki YOSHIKAWA, Yuji SATO, Hiroshi TAKAGI (Grad. Schl. Biol. Sci., Nara Inst. of Sci. and Tech.)

【目的】一酸化窒素（NO）は様々な生物において種々の生命現象に関わるシグナル分子である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のゲノムには、アルギニンから NO を合成する哺乳類の酵素（NO シンターゼ：NOS）のオルソログが存在しないため、NO の生成機構やその制御機構、生理機能は明らかになっていない。当研究室では最近、酵母の NOS 様活性に関与するタンパク質として Tah18 を同定し、Tah18 依存的に合成される NO が酵母の高温ストレス耐性に寄与することを報告した。Tah18 はシトクロム P450 レダクターゼや NOS のレダクターゼドメインに相同性を持つ、生育に必須のフラボタンパク質で、複合体を形成する Dre2 タンパク質に電子を伝達することで細胞質の鉄硫黄クラスタータンパク質の生合成に寄与する。一方、過酸化水素処理条件下において *TAH18* 遺伝子の過剰発現が細胞死を誘導することが報告されている。本研究では、Dre2 との相互作用を介した Tah18 依存的な NOS 様活性の制御機構を明らかにするとともに、Tah18 依存的に生成する NO と細胞死との関連性を検証した。
【方法と結果】NO 特異的蛍光プローブである Diaminofluorescein-FM diacetate（DAF-FM DA）を用いて細胞内の NO レベルを測定したところ、酵母の野生型株を過酸化水素処理した時に観察される NO 生成が、*TAH18* 遺伝子の発現抑制や哺乳類 NOS の阻害剤である L-$N^G$-Nitroarginine methyl ester（NAME）処理により抑制された。このことから、過酸化水素処理条件下で Tah18 依存的な NOS 様活性により NO が合成されることが示された。また *DRE2* 過剰発現株では、*TAH18* 発現抑制株と同程度まで NO 合成が低下したことから、Dre2 タンパク質が酵母の NOS 様活性を阻害することが示唆された。一方、共免疫沈降とウェスタンブロッティングによる解析から、過酸化水素処理条件下で Tah18-Dre2 複合体が経時的に解離することが示された。さらに、過酸化水素処理後の細胞生存率測定により細胞死の程度を評価したところ、*TAH18* 発現抑制や NAME 処理により細胞死は有意に阻害された。興味深いことに、*TAH18* 発現抑制株に NAME を処理しても阻害効果は軽微であったことから、Tah18 依存的な NOS 様活性により合成される NO が細胞死誘導に寄与するものと考えられた。これらの結果は、Tah18 依存的な NOS 活性・NO 合成が、ストレスの種類や条件に応答して「細胞死・細胞保護」と言う異なる機能を発現する可能性を提示している。我々は以上の知見から、Tah18-Dre2 複合体が過酸化水素処理により解離し、遊離した Tah18 に依存的な NOS 様活性により合成される NO が細胞死を誘導するというモデルを考えている。現在、このモデルの証明に向けて詳細な生化学的解析を行うとともに、Tah18/NO 依存的な細胞死誘導の下流経路についても解析を進めている。

nitric oxide, cell death, yeast

発表番号：3F065
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 過酷な生育環境から単離した真核微細藻類がもつ新奇な環境ストレス耐性機構の解析

# Analyses of novel systems to tolerate environmental stresses of the microalgae isolated from extreme severe environments

○長嶋 雄大[1]、小俣 翼[1]、田邉 義和[1]、石毛 太一郎[2]、久保田 恵理[2]、豊島 拓樹[1]、広瀬 優[1]、新村 陽一[1]、川崎 信治[1] ([1]東農大バイオ、[2]東農大・ゲノムセ)
○ Yuta NAGASHIMA[1], Tsubasa OMATA[1], Yoshikazu TANABE[1], Taichiro ISHIGE[2], Eri KUBOTA[2], Hiroki TOYOSHIMA[1], Suguru HIROSE[1], Youichi NIIMURA[1], Shinji KAWASAKI[1] ([1]Dept. of Biosci., Tokyo Univ. of Agric.,, [2]2NODAI Genome Center, Tokyo)

【目的】微細藻類は光合成により光独立栄養的に生育するが、強光が付随する高塩濃度や乾燥、高温や低温などの環境ストレスに曝されると光酸化ストレスが生じて生育が阻害される。ヘマトコッカス藻を始めとする幾つかの藻類においては、光酸化ストレス条件下においてアスタキサンチン等の油状カロテノイドを細胞内に蓄積し、細胞を保護することが報告されている。当研究グループでは過酷な環境に生息する微細藻類のスクリーニングを行い、その環境ストレス耐性能に関する諸性質の解析を行った結果、真核の微細藻類では初めての発見となる水溶性のカロテノイド結合タンパク質を同定した。本タンパク質はアスタキサンチンを主要なカロテノイドとして結合することから、AstaP と命名された。AstaP は強光が付随する乾燥や高塩濃度下において大量に発現誘導されることがプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析から判明しているが、その発現機構や発現誘導の詳細なメカニズムに関しては未解明である。本学会では、AstaP の発現誘導メカニズムの解明を目的として、様々な環境ストレスを付与した際の発現応答解析と AstaP 生産条件について検討した。

【方法・結果】Ki-4 株の培養時に強光が付随する様々な環境ストレスを付与し、AstaP をコードする遺伝子とタンパク質の発現応答を解析した。二次元電気泳動によるプロテオーム解析、cDNA ライブラリを用いたトランスクリプトーム解析の結果､様々なストレス環境下で AstaP の発現変動が観察され、その解析結果から AstaP の発現は光酸化ストレスに応答して高誘導されることが強く推定された。現在､AstaP 遺伝子の経時発現プログラムの解析や AstaP に発現が類似する他の遺伝子の解析を通じて、発現誘導因子の同定を試みている｡また AstaP タンパク質の高生産誘導条件についても検討を行った。

microalgae, photooxidative stress, carotenoid

発表番号：3F066
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ラパマイシンに応答した出芽酵母リボソーム分解機構の解析

# Mechanism of ribosome degradation induced by rapamycin in *Saccharomyces cerevisiae*

○赤川 博文、陣内 凱、島 日佳理、大石 早希子、大本 哲也、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大農）
○Hirofumi AKAGAWA, Gai JINNAI, Hikari SIMA, Sakiko OHISI, Tetsuya OHMOTO, Tetsuhiro OGAWA, Makoto HIDAKA, Haruhiko MASAKI (Univ. of Tokyo)

【目的】RNase T2 は、一本鎖 RNA を非特異的に分解するリボヌクレアーゼである。ゲノムが解読された全ての生物が持つことから生物学的に重要な役割を持つと考えられる。近年、シロイヌナズナやゼブラフィッシュ、テトラヒメナなどにおいて RNase T2 が rRNA を標的とすることが報告された。しかしながら、この rRNA 分解の生理的意義については明らかにされていなかった。我々は、飢餓ストレス応答を誘導する抗生物質であるラパマイシンを作用させた出芽酵母では、RNase T2（Rny1p）に依存して液胞内で rRNA が分解されること、これを通して飢餓状態に生育を適応化させることを報告した [1)]。リボソームは、rRNA と多数のリボソームタンパクから構成される巨大複合体であるが、上記の結果から、ラパマイシンに応答して成熟リボソームが分解されると考えられる。そこで、本研究では、これまでの rRNA 分解の解析に加え、更にリボソームタンパク分解を観察することで、飢餓条件におけるリボソーム分解機構の全容解明を目指した。

【方法・結果】窒素源飢餓によりリボソームは液胞に運ばれて分解されるが、これに関わる分解系として(1)選択的オートファジー（ribophagy）、(2)非選択的オートファジー[2)] が報告されている。このうち、(1)には Ubp3p, Ufd3p が、(2)には Atg2p がそれぞれリボソームの液胞への移行に関与する。そこで、本研究でこれまで観察してきたラパマイシンに応答したリボソームタンパク分解が、いずれの系に依存するかを調べるために、以下の実験を行った。GFP を融合させた特定のリボソームタンパクをゲノムから発現する株を作製した。更に、この株において、*UBP3*, *UFD3*, *ATG2* を個々に破壊した。得られた株に対してラパマイシンを作用させた後、24, 48 時間後に蛍光顕微鏡によりリボソームタンパクの局在を観察した。その結果、*ubp3*Δ, *ufd3* Δ株では、液胞内にリボソームタンパクが移行していた。一方で、*atg2* Δ株では、リボソームタンパクの液胞への移行は観察されなかった。このことから、ラパマイシンに応答したリボソーム分解には非選択的オートファジーが関与することが考えられた。

1) 陣内ら、日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集
2) Huang *et al*., ***EMBO J*** (2014)

stress response, ribosome, Saccharomyces cerevisiae

発表番号：3F067
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分泌経路遮断時の TOR を介したシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質の役割

# Role of sphingolipid in TOR-dependent response to the secretory defect.

○矢吹 友佳理、水田 啓子、船戸 耕一（広大院）
○Yukari YABUKI, Keiko MIZUTA, Kouichi FUNATO (Hiroshima Univ.)

【背景・目的】

細胞はリボソームの生合成に莫大なエネルギーを費やしているため、その生合成量は細胞内外の様々な環境変化に応答して厳密に調節され、最適化されていると考えられている。出芽酵母において、出芽時の膜合成に必須な分泌経路が遮断されると、リボソーム生合成が転写レベルで抑制される。このとき分泌経路の停止は、細胞表層ストレスセンサーである Wsc 蛋白質によって細胞膜ストレスとして感知され、そのシグナルがプロテインキナーゼ C (Pkc1)を介して核内へと伝達されると考えられているが、詳細な機構は明らかにされていない。

これまでに、分泌経路遮断時のシグナル伝達に Target of rapamycin complex (TORC) 1 およびその下流の分子 Sch9 が関与することを見出した。TOR 複合体には、構成因子と機能の異なる 2 つの複合体(TORC1 および TORC2)が存在する。近年、細胞膜ストレスによって TORC2 が活性化されることが報告された (Berchtold D *et al. Nat. Cell Biol* 2012)。分泌経路の遮断が細胞膜ストレスとして感知されることから、分泌経路遮断時に TORC2 が活性化されている可能性が考えられた。そこで、TORC2 が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与するかどうか検討を行った。

【方法・結果】

TORC2 の構成因子や下流で機能する因子の遺伝子変異株を用いて、分泌経路遮断時におけるリボソーム蛋白質遺伝子の転写への影響を調べた。その結果、TORC2 構成因子の変異株では野生株と同様に転写は抑制されていた。しかしながら興味深いことに、TORC2 によって制御されているスフィンゴ脂質生合成の初期ステップに関与する Lcb1 の遺伝子変異株において、転写抑制の度合いが弱まっていた。これらの結果から、分泌経路遮断時のシグナル伝達に TORC2 は関与しないが、スフィンゴ脂質生合成は関与することが示唆された。

現在、分泌経路遮断時のシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質と TORC1-Sch9 経路との関係について解析を進めている。

ribosome synthesis, TOR complex, sphingolipid

発表責任者：矢吹友佳理（d146752@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：3F068
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母の細胞壁合成に関わる新規膜タンパク質の機能解析

# Mutation analysis of the membrane proteins affecting cell wall formation in *Saccharomyces cerevisiae*

○上原 千央、星 直美、浜本 晋、魚住 信之（東北大・院工）
○Chihiro UEHARA, Naomi HOSHI, Shin HAMAMOTO, Nobuyuki UOZUMI (Tohoku Univ. Grad. Sch. Eng.)

【目的】$Ca^{2+}$のシグナル伝達によって細胞は様々な環境ストレスへの適応や生体内の恒常性の維持に不可欠な遺伝子調節やタンパク質活性の調整を行っている。細胞質内の $Ca^{2+}$は、極めて低濃度に維持されているが、細胞膜や細胞内小器官に局在する $Ca^{2+}$輸送体を介して細胞質に $Ca^{2+}$が流入する。近年、植物細胞の細胞膜に発現し、高浸透圧に応答して $Ca^{2+}$を透過する新規輸送体 OSCA1 が報告された。OSCA1 ホモログ遺伝子は多くの生物種に保存されており、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノムには 4 つのホモログ遺伝子が存在するが、これらの生理的役割や分子機能に関する知見は少ない。本研究では、単一遺伝子欠損株を用いて酵母 OSCA1 ホモログの機能解析と局在性の検討を行った。
【方法と結果】$Ca^{2+}$チャネル遺伝子に変異をもつ酵母では細胞壁合成阻害剤に高い感受性を示すことがこれまでに報告されている。各 OSCA1 ホモログ遺伝子の欠損株を、細胞壁合成阻害剤を添加した培地で培養した。その結果、キチンの合成を阻害する Calcofluor White と、多糖に結合し、キチン、1,3-β グルカン、1,6-β グルカンの合成を阻害する Congo Red をそれぞれ含む培地において、OSCA1 ホモログ遺伝子の *yll005c* と *ymr266w* の各欠損株の生育が阻害された。このことから YLL005c と YMR266w は細胞壁合成に関与する可能性が示された。Calcofluor White を含む培地では，野生株、各遺伝子欠損株ともに細胞が 3 つ以上つながっているものが観察され、特に *ymr266w* 欠損株においてその割合が多かった。これは *ymr266w* の欠損により細胞壁合成に異常をきたして出芽が完了しないために細胞が連結した形態が生じたと考えられた。また、各欠損株を異なる pH の培地で培養したところ、pH 7 以上で *yll005c* 欠損株の生育が抑制された。高次構造の異常なタンパク質が蓄積する小胞体ストレスへの応答には細胞質の $Ca^{2+}$濃度の上昇が必要である。各 *OSCA1* ホモログ遺伝子の欠損株を小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンを含む培地を用いて培養した。その結果、*yll005c* 欠損株の生育が阻害されて感受性を示した。このことから、YLL005c は小胞体ストレスに応答して細胞質内の $Ca^{2+}$濃度の上昇に関わっている可能性が示唆された。各 OSCA1 ホモログの細胞内の局在性を検討するために、各遺伝子に *GFP* 遺伝子を結合させた融合遺伝子を作成して酵母に導入したところ、YLL005c を発現した酵母において、顆粒状の GFP 蛍光が観察されたことから、Yll005c は ER もしくはゴルジ体への局在性が示唆された。また、YMR266w と YOL084w は細胞膜、YLR241w は液胞膜に主に存在することが観察された。以上の結果より、YLL005c は細胞内小器官に発現して細胞質への $Ca^{2+}$放出、細胞壁の合成と小胞体ストレス応答に関わっていることが示唆された。

cell wall, membrane protein, yeast

発表責任者：魚住信之（uozumi@biophy.che.tohoku.ac.jp）

発表番号：3F069
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 *Trichoderma reesei* におけるキチン合成酵素の機能解析

# Functional analysis of chitin synthases in *Trichoderma reesei*

○藤原 南帆[1]、田原 伸悟[1]、志田 洋介[1]、岡田 仁[2]、大隅 正子[2]、小笠原 渉[1]（[1]長岡技科大 生物、[2]綜合画像研究支援）
○Minaho FUJIWARA[1], Shingo TAHARA[1], Yosuke SHIDA[1], Hitoshi OKADA[2], Masako OSUMI[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Dept. of Bioeng., Nagaoka Univ. of Tech., [2]IIRS)

【目的】

セルラーゼ高生産菌として研究されている糸状菌 *Trichoderma reesei* は、その酵素学的性質や遺伝子発現メカニズムに関する研究が盛んに行われてきた。その一方で、菌糸や細胞内小器官の形態形成に関する研究は極めて少なく、その形成メカニズムは不明な点が多い。中でも菌糸の形態形成には細胞壁合成酵素が深く関わっており、その 1 つがキチン合成酵素である。キチン合成酵素はそのアミノ酸配列から少なくとも 7 つのクラスに分類されている。*Neurospore crassa* や *Aspergillus* 属では形態形成や細胞分裂に重要な関わりを持つことが明らかとされてきたが、*T. reesei* のキチン合成酵素に関する研究は皆無であり、その機能、あるいは形態形成に及ぼす影響は未だ不明である。そこで本研究は、*T. reesei* が持つキチン合成酵素の機能を明らかとすることを目的とし、ゲノムデータベースにおいてキチン合成酵素とアノテーションされている遺伝子について遺伝子破壊を行い、形態形成への影響を観察した。

【方法と結果】

*T. reesei* のゲノム上から見出された 6 種のキチン合成酵素について系統樹解析を行ったところ、*T. reesei* のキチン合成酵素はクラスⅠからⅥにそれぞれ 1 つずつ属していることが明らかとなった。世界標準株 QM9414 株を親株として各キチン合成酵素遺伝子の破壊株を構築し、クラスⅠ(*chs1*), Ⅱ(*chs2*), Ⅳ(*chs4*), Ⅴ(*chs5*)の破壊株を取得した。破壊株の胞子 $10^3$ 個相当をポテトデキストロース寒天培地上に植菌し、形態形成への影響を観察した結果、Δ*chs1* 株および Δ*chs5* 株の生育速度は QM9414 株とほぼ変化がないことが示されたが、Δ*chs2* 株および Δ*chs4* 株は生育速度が速いことが示された。また、すべての破壊株において形成される分生子の数が減少し、Δ*chs5* 株においては分生子を全く形成しなかった。さらに、同培地上にて細胞壁合成阻害成分であるコンゴーレッドに対する感受性を観察したところ、Δ*chs1* 株および Δ*chs4* 株は生育が著しく悪化することから、他の糸状菌と同様これらのキチン合成酵素は細胞壁合成に関与することが示唆された。また、グルコースを炭素源として培養した菌糸を蛍光顕微鏡で観察したところ、Δ*chs5* 株は菌糸中にバルーン状の構造を形成することが明らかとなり、菌体形成に重要な役割を持つことが示唆された。現在、Δ*chs3* および Δ*chs6* 株の取得を進めており、すでに取得した菌株と合わせて形態形成に与える影響について解析を行う。

*Trichoderma reesei*, chitin synthase

発表番号：3F070
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Possible roles and cellular localization of wild type and dominant negative sirtuin in *Lactobacillus paracasei* BL23

○ Glaezel Angelique Torres[1], Hotaka Atarashi[1], Shinji Kawasaki[2], Aiko Hirata[3], Akinobu Kajikawa[4], Akihito Endo[1], Junichi Nakagawa[1] ([1]Graduate School of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, [2]Department of Bioscience, Tokyo University of Agriculture, [3]Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, [4]Department of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture)

**Purpose:** Sirtuin, a $NAD^+$-dependent protein deacetylase, has been associated in prolonging lifespan of different model organisms. A sirtuin homolog protein deacetylase, cobB, found in *Escherichia coli* can deacetylate acetyl-CoA synthetase (Acs) at an active site lysine to stimulate its enzymatic activity. However, there have been no published studies regarding its role in lactic acid bacteria (LAB). This study aimed to elucidate the role of sirtuin in *Lactobacillus paracasei* BL23 in terms of roles and cellular localization.

**Methods:** To identify possible roles, target protein was determined and cellular localization was determined for both the wild type and dominant negative sirtuin in *L. paracasei* BL23. A dominant negative sirtuin was constructed by introducing point mutation in one of the active histidine sites. Target protein was identified through SDS-PAGE and Western Blot analysis, whereas cellular localization was determined through fluorescence microscopy and electron microscopy using immunogold labelling technique.

**Results:** *In vivo* treatment of *L. paracasei* BL23 with sirtuin inhibitor - nicotinamide (NAM), showed increasing acetylated levels of 28 kDa protein as the NAM concentration was increased; whereas *in vitro* treatment of the extract showed that this protein was deacetylated by LpSirA (supplemented recombinant sirtuin protein) together with $NAD^+$. This 28 kDa protein was then purified and identified to be 30S ribosomal protein S4. On the other hand, cellular localization of wild type sirtuin revealed its presence along division plates and on spiral-like structure inside *L. paracasei* BL23.

**Conclusion:** Initial results showed possible roles of wild type sirtuin in controlling protein synthesis, regulating cell division and some other functions yet to be identified. Results of this study may provide novel criteria using sirtuin activity for the selection of LAB as probiotics.

Lactobacillus paracasei, sirtuin, acetylated protein

発表責任者：Junichi Nakagawa（j3nakaga@bioindustry.nodai.ac.jp）

発表番号：3F071
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter themophilus*TK-6 の酸化ストレス防御系に関する研究

Study on the oxidative-stress defense system of *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

○加藤 真美[1]、佐藤 由也[2]、新井 博之[1]、石井 正治[1] ([1]東大院・農生科、[2]産総研・環境管理)
○Mami KATO[1], Yuya SATO[2], Hiroyuki ARAI[1], Masaharu ISHII[1] ([1]Univ.Tokyo, [2]AIST.EMTech)

【背景・目的】　好熱好気性水素細菌 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 は還元的 TCA 回路で二酸化炭素を固定している。この回路にはエネルギー的に不利な反応が存在するため、駆動するためには細胞内を高度に還元的に保つ必要があると考えられる。また鍵酵素が酸素・酸化ストレスに弱いことが知られており、還元的 TCA 回路を持つ生物のほとんどが嫌気性あるいは微好気性である。一方、本菌は例外的に 30%もの高い酸素濃度条件下でも生育することが可能であり、我々は本菌の酸化ストレス防御機構に着目して研究を進めている。これまでに好気生育に必須である新規酵素 Fpx (Ferriperoxin)をはじめ、複数の酸化ストレス防御酵素遺伝子(*sodA*、*sodC*、*ccpR*、*prx*、*bcp*、*ahpC*、*tpx*、*fpx*)をゲノムから見出してきた。しかし、これら遺伝子群の優先順位や使い分けについては明らかにできていない。そこで本研究では本菌の酸化ストレス防御機構の全体像を明らかにするため、細胞内の酸化還元バランスの解析と、各種遺伝子破壊株の性状解析を行った。

【方法・結果】　はじめに、細胞内の酸化還元状態を調べるべく、生体内の酸化還元指標の一つである $NAD^+$/NADH 比、$NADP^+$/NADPH 比の測定を行った。好気条件、および嫌気条件で培養した野生株（WT）細胞を比較したところ、いずれも好気条件の値が高く、細胞内が酸化的になっていることが示唆された。

次に、*sodA*、*sodC*、*ccpR*、*bcp*、*prx* の遺伝子破壊株を作成し、異なる酸素濃度条件下での生育観察を行った。Δ*sodA*、Δ*sodC*、Δ*prx* に関しては WT との間に顕著な差は観察されなかったが、Δ*ccpR* においては酸素濃度の上昇に伴い生育が遅れ、Δ*bcp* は高濃度（30%）の酸素濃度条件下で生育がやや遅れることが観察された。また、WT と Δ*fpx* に関しては、細胞内の Reactive oxygen species (ROS) 量を定量した。測定は Intracellular ROS assay kit (Cell Biolabs Inc)を用いて、DCFH-DA (2', 7'-Dichlorodihydrofluorescin diacetate)を細胞と反応させ、蛍光 (480 nm/530 nm)を検出することで行った。その結果、Δ*fpx* では WT と比較し多量の ROS が蓄積していることが示唆され、好気生育での必須性が裏付けられた。以上より、破壊株構築に成功した 6 種の遺伝子の内 *fpx* のみが必須であり、*ccpR* と *bcp* は必須ではないが好気生育時の酸化ストレス防御に寄与することが示された。このように、本菌は複数の ROS 解毒酵素を使い分けながら、好気条件下でも還元的な代謝を利用して生育していることが推察される。今後、未だ取得できていない *ahpC* と *tpx* に関して破壊株を作成し、生育を観察することで本菌の酸化ストレス解毒系の全貌を明らかにする予定である。

*Hydrogenobacter*, oxidative stress, peroxidase

発表番号：3F072
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*dltD* 欠損による *Lactobacillus casei* IGM393 の免疫応答への影響
Effect of *dltD* gene knockout on immune response of *Lactobacillus casei* IGM393

○桝田 和彌[1]、竹内 まみ[2]、金子 真梨恵[2]、冨田 理[3]、朝倉 宏[1]、梶川 揚申[2]、岡田 早苗[2]、五十君 靜信[1]([1]国立医薬品食品衛生研究所、[2]東農大応生科・化学、[3]農研機構食品総合研究所)
○ Kazuya MASUDA[1], Mami TAKEUCHI[2], Marie KANEKO[2], Satoru TOMITA[3], Hiroshi ASAKURA[1], Akinobu KAJIKAWA[2], Sanae OKADA[2], Shizunobu IGIMI[1] ([1]National Insutitute of Health Sciences, [2]Tokyo University of Agriculture, [3]National Agriculture and Food Research Organization)

【目的】

乳酸菌は様々な免疫調節作用が持つことが知られており、プロバイオティクスをはじめ、ワクチンの運搬体としての利用など食品にとどまらず医療面への応用も期待される。一方、これらの生体への有用な作用をもたらす分子やその詳細なメカニズムに関して明らかになっているものは一部である。また乳酸菌の免疫調節作用は菌株により異なることから、菌株ごとに分子やメカニズムの検討が必要である。本研究では *Lactobacillus casei* IGM393 株のリポタイコ酸（LTA）の D-alanylation を制御する *dlt* 遺伝子群の免疫調節作用への影響を検討した。

【方法・結果】

*L. casei* IGM393 株の *dlt* オペロン（*dltA-dltD*）のうち D-alanine の LTA への付与に関与する *dltD* 欠損株を相同組換えにより作出した。この *dltD* 欠損株から LTA を精製し、HPLC により解析した結果、*dltD* 欠損株の LTA からは D-alanine が検出されなかった。野生株及び *dltD* 欠損株の精製 LTA の免疫調節作用の比較は、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞からの TNF-α の産生量を指標として評価した。野性株の LTA に比べ *dltD* 欠損株の LTA では顕著な TNF-α 産生量の低下が確認された。

一方、野生株と *dltD* 欠損株の菌体（生菌、死菌）を RAW 細胞と共培養した場合、生菌、死菌いずれの場合でも *dltD* 欠損株の共培養群において野生株に比べ TNF-α の産生量が増加した。精製 LTA と菌株で TNF-α 誘導能が異なる結果となったことから、*L. casei* IGM393 株の LTA の細胞表面への露出を抗 LTA 抗体を用いた FACS により観察した。野生株、*dltD* 欠損株いずれも LTA 特異的なピークが確認されなかったことから、本菌株の LTA は菌体表面に露出していないことが示唆された。以上のことから本菌株では D-aranylation が LTA の免疫調節作用に影響を与えることは確認されたが、菌体自体の免疫応答へは直接的に関与していないことが示唆された。

*dltD* 欠損株の死菌体であっても TNF-α 産生量の増加が確認されたことから、菌体構造の影響を考慮し顕微鏡観察を行った。*dltD* 欠損株は野生株に比べ菌体が伸長していることが確認され、*dltD* 欠損株の TNF-α 産生量増加に対しこのような菌体の伸長が影響を与えていることが示唆された。

*Lactobacillus*, lipoteichoic acid, immune response

発表番号：3F073
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# L1 リボソームタンパク質欠損による胞子形成・タンパク質分泌異常

# The absence of ribosomal protein L1 causes defects in initiation of sporulation as well as in protein secretion

○赤沼 元気[1]、飯塚 祐加[2]、矢野 晃一[1]、河村 富士夫[1] ([1]立教大理、[2]中央大理工)
○Genki AKANUMA[1], Yuka IIZUKA[2], Koichi YANO[1], Fujio KAWAMURA[1] ([1]Rikkyo Univ., [2]Chuo Univ.)

生命活動維持に不可欠な翻訳機能を担うリボソームを構成するリボソームタンパク質は基本的に必須であると考えられてきた。しかし枯草菌 168 株にコードされている 57 種のリボソームタンパク質遺伝子のうち、22 種は非必須だった。50S サブユニットを構成する L1 リボソームタンパク質をコードする遺伝子（*rplA*）も非必須遺伝子の一つであり、この遺伝子の破壊株では 70S リボソーム複合体形成異常とそれに伴う生育遅延が観察される。このような表現型に加え、Δ*rplA* 株では胞子形成能が著しく低下した。Δ*rplA* 株と同様に顕著な生育遅延を示すΔ*rpmH* 株では正常な胞子形成が観察されたことから、細胞内翻訳活性の低下のみが原因ではないと予想した。Δ*rplA* 株では Spo0A の細胞内濃度上昇が観察されず、非対称隔膜が形成されないことから、L1 欠損による胞子形成能低下は胞子形成初期の異常に起因すると言える。さらに、Δ*rplA* 株では *spo0E* の転写量が野生株と比較して顕著に増加していたこと、*spo0E* 遺伝子欠損を導入することで胞子形成率が回復したことから、Spo0E の発現量増加による Spo0A の脱リン酸化が L1 欠損による胞子形成異常の一因であると考えられる。一方、Δ*rplA* 株ではタンパク質の分泌異常も観察された。野生株では $T_1$ から培養上清にタンパク質が検出されたが、Δ*rplA* 株ではタンパク質の分泌はほとんど認められなかった。さらに、タンパク質分泌効率を菌体外プロテアーゼ・アミラーゼ活性でモニターした場合においても、Δ*rpmH* 株ではそれぞれの酵素活性が検出されたが、Δ*rplA* 株ではこれらの酵素活性はほとんど観察できなかった。L1 欠損によるタンパク質分泌異常は分泌プロテアーゼとアミラーゼをそれぞれコードする *aprE*, *nprE*, *amyE* の転写を、恒常的かつ強力な rRNA オペロンのプロモーターで誘導した際にも観察されたことから、分泌タンパク質遺伝子の転写量低下以外にも原因があると予想される。また、タンパク質分泌装置を構成する SecA タンパク質量の顕著な低下もΔ*rplA* 株で観察されなかったことから、タンパク質分泌装置の発現量低下が直接の原因ではないと考えられる。

ribosome, translation, protein secretion

発表番号：3F074
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性と輸送機構の解明

# Elucidation of ion selectivity and ion transport mechanism in Mrp antiporter

○松井 光恵、伊藤 政博（東洋大院・生命科学）
○Mitsue MATSUI, Masahiro Ito (Graduate school of Life Sciences, Toyo Univ.)

チャネルやトランスポーターは、様々なイオンを輸送する。電位駆動型チャネルではイオンの選択透過を規定するフィルター領域の研究が分子レベルで詳細に明らかになっているものが多いが、トランスポーターにおけるイオン選択透過の研究は、結晶構造が解かれた一部のタンパク質を除き不明な点が多い。本研究で対象とする Mrp（Multiple Resistance and pH adaptation）アンチポーターは細胞内 pH ホメオスタシスや $Na^+$や $K^+$といったカチオン耐性に関与することが知られている。Mrp アンチポーターは 7 つのオープンリーディングフレームからなる 1 つのオペロンで構成され、アンチポーター活性には全ての遺伝子産物（MrpABCDEFG）が必要であることが報告されている。この Mrp アンチポーターの分布は、真正細菌や古細菌と多岐にわたり、緑膿菌では Mrp アンチポーターを欠損させると病原性の低下が観察され、また黄色ブドウ球菌では Mrp 遺伝子が必須遺伝子であることが報告されている。このようなことから Mrp アンチポーターは薬剤ターゲットタンパク質としても注目されている。

これまで、Mrp アンチポーターとして、① 好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株（以下 BP 株）から **$Na^+$を輸送するもの**、② 好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus* AV1934 株（以下 BA 株）からは **$K^+$を輸送するもの**、③ *Thermomicrobium roseum* DMS5159 株（以下、TR 株）からは **$Ca^{2+}$を輸送するもの**が発見されている。しかし、Mrp アンチポーターにおけるイオン選択性やイオン輸送の機構は解明されていない。また、呼吸鎖複合体 I における主要なプロトン輸送経路である NuoL、NuoM サブユニットと MrpA、MrpD サブユニットは相同性があることから、MrpA と MrpD サブユニットがイオン選択性やイオン輸送に関与することが推察された。

本研究では、Mrp アンチポーターのカチオン選択性やイオン輸送機構を解明することを目的とした。まず、主要な $Na^+/H^+$アンチポーター活性を欠損させた大腸菌 KNabc 株に BP 株由来の *mrpABCDEFG* 遺伝子から *mrpA* のみを欠損させた Δ*mrpA* と、BA 株又は TR 株由来の *mrpA* を発現させた。形質転換株を培養後、反転膜を調製して各種アンチポーター活性を測定した。その結果、BP 株由来の MrpA サブユニットを TR 株由来の MrpA サブユニットに置換した時に $Ca^{2+}/H^+$アンチポート活性が観察された。これより、カチオン選択性に MrpA サブユニットが関与していることが推定された。現在、詳細なデータを取得中であり、詳細はポスター発表で紹介する。

Cation/$H^+$ antiporter, *Bacillus pseudofirmus* OF4, pH homeostasis

発表番号：3F075
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Achromobacter denitrificans* YD35 株のメチオニン生合成を介した一酸化窒素耐性機構

Methionine biosynthesis tolerates *Achromobacter denitrificans* YD35 against nitric oxide

○長岡 亜依[1]、平林 美保[1]、土肥 裕希[2]、高谷 直樹[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]岡山理大工)
○ Ai NAGAOKA[1], Miho HIRABAYASHI[1], Yuki DOI[2], Naoki TAKAYA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Okayama Univ. of Science)

活性窒素種（RNS）のひとつである一酸化窒素（NO）は、強い酸化力と変異原性を有し、生体に対して強い細胞毒性を示す。細菌が高等生物への感染を成立させるためには、宿主免疫系が生産する NO による攻撃の防御と回避が必須であり、細菌の NO に対する耐性機構の解明は新たな創薬ターゲットの開発に役立つと期待される。我々は、自然界から単離された極めて強い NO 耐性の生育を示すグラム陰性細菌 *Achromobacter denitrificans* YD35 株（YD35 株）を研究対象として、NO 耐性に関わる遺伝子（NO 耐性遺伝子）の探索とその機能解析を行ってきた。これまでに見出された NO 耐性遺伝子の中には、RNS の解毒系タンパク質をコードする遺伝子はみられず、アミノ酸生合成に関わる遺伝子や、細胞壁やリポ多糖などの細胞表層構造に関わる遺伝子が多く見出された。

YD35 株では、NO 添加によって多くの細胞内のアミノ酸が増加していた。特に、メチオニンの増加量が最も多かったことから、本研究では、特に、メチオニン合成の NO 耐性における役割を解明することを目指した。YD35 株はメチオニン合成酵素をコードする遺伝子として *metH*、*metE1*、*metE2* の 3 つを有していた。YD35 株では、NO の添加の有無に関わらず *metH* と *metE2* のみが発現していることが明らかになり、NO の添加によって *metH* と *metE2* の転写は活性化された。また、*metH* 変異株の生育は NO に対して感受性を示し、この感受性は培地へのメチオニン添加により回復した。さらに、この感受性はシステインや葉酸とコバラミンの添加によっても回復した。しかしながら、メチオニン合成の基質であるホモシステインを添加した場合は感受性が回復されなかった。一方、*metE2* 破壊株の生育は NO に対して感受性を示さなかった。さらに、NO の添加によって *metH* 変異株の細胞内のメチオニン量が著しく低下したことから、YD35 株が NO 存在下で生育するためには *metH* を介したメチオニンの生合成が重要であることが示された。以上の結果から、YD35 株の NO 耐性にメチオニンの生合成が大きく寄与することが示された。また、*metH* と *metE2* がコードする 2 つのメチオニン合成酵素アイソザイムが、本菌の生育の NO 耐性において異なる機能を有することが明らかとなった。

nitric oxide, methionie, stress

発表番号：3F076
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細胞壁合成阻害剤を用いた NAB6 遺伝子の機能解析

# Functional analysis of NAB6 gene with cell wall synthesis inhibitors

○松山 崇[1]、北川 孝雄[3]、入江 賢児[2] ([1]（株）豊田中研、[2]筑波大人間総合科学、[3]山口大医)
○Takashi MATSUYAMA[1], Takao KITAGAWA[3], Kenji IRIE[2] ([1]TOYOTA Central R&D Labs., Inc., [2]The Univ. of Tsukuba, [3]Yamaguchi Univ.)

出芽酵母の *NAB6* 遺伝子（Nucleic Acids Binding protein 6）は、4 か所の核酸結合部位と推定される領域を（アミノ酸配列番号：59-114, 119-560, 652-725, 741-860）有している[1]。また mRNA に結合するタンパク質の網羅的な解析の結果、Nab6 タンパク質は、少なくとも 18 種類の mRNA と結合することが報告されている一方、結合する RNA 配列は不明であった[2]。この 18 種類のうちの 6 種類の mRNA（結合が強い順に *ASP3-1*, *PIR1*, *SCW4*, *TIR2*, *HSP150*, *YGP1*）の遺伝子は、細胞壁に関わる何らかの機能を有することが示されている。

以上の知見より Nab6 タンパク質は特定の細胞壁形成に関わる遺伝子群の mRNA 3′-UTR に存在する *cis* 配列と結合して上流にコードされたタンパク質の翻訳促進や、抑制を行う制御ネットワークのハブとして働く可能性が考えられた。すなわち、様々な制御シグナルが Nab6 タンパク質に入力されて、特定の mRNA やタンパク質と複合体を形成して、様々な転写後の制御を行う。Nab6 タンパク質結合 *cis* 配列の周囲の配列や生育環境などに依存して Nab6 複合体の種類が変化し、mRNA の種類に応じて異なった制御がなされている可能性も想定される（作業仮説）。

本発表において、*nab6Δ*単独破壊株、及び 3 種類の細胞壁の主成分β-1,3-glucan 合成に関わる遺伝子（*FKS1*, *FKS2*, *KNR4*）との二重破壊株を作製し、これらの株に対して 2 種類の細胞壁合成阻害剤（β-1,3-glucan の合成阻害剤 caspofungin、キチンと結合して生育阻害を惹起する薬剤 congo red）への耐性試験を行い、上記の作業仮説の検証を進めた。

細胞壁の機能異常の指標となる浸透圧ストレス耐性について、*nab6Δ*単独破壊株と野生株の間で差は認められなかったものの、*nab6Δ*単独破壊株は caspofungin に対しては耐性を示し、congo red に対しては感受性を示した。この結果は、*nab6Δ*単独破壊株において、細胞壁成分が補償的に変化して生育に必要な機能を補っていると考えられた。さらに、一連の二重破壊株を用いて解析を進めたところ、Nab6 タンパク質が *FKS1* 遺伝子の発現を抑制する働きを持つ可能性が示唆された。

今後は、分子生物学的・生化学的な解析を進めて、*NAB6* 遺伝子の作用点を明らかにしていきたい。

1. Samanta, M.P. & Liang, S. (2003) Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. Proc Natl Acad Sci USA, 100, 12579-12583.
2. Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO. (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. Plos Biol, 6, e255.

RNA binding protein, post-transcriptional regulation, cell wall

発表責任者：松山崇（e1215@mosk.tytlabs.co.jp）

発表番号：3F077
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 新規 RNAi ベクターを導入したシイタケ形質転換体のラッカーゼの発現

# Laccase genes expressions of *Lentinula edodes* tranasformants integrated with a novel RNAi vector

○吉田 一生、但野 健太、佐藤 利次（北見工大）
○Kazuki Yoshida, Kenta Tadano, Toshitugu Sato (Kitami Inst. Technol.)

(研究背景)遺伝子機能を解析する手法の 1 つに RNA 干渉(RNAi)がある。シイタケの RNAi に関しては、これまでシイタケ解糖系酵素遺伝子のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータを利用した外来遺伝子発現ベクターpChG に、シイタケラッカーゼ遺伝子 *lcc1* の inverted repeat 配列を挿入した RNAi ベクター pChG'-ivrL1 による *lcc1* 遺伝子の発現抑制が報告されている。しかし、inverted repeat 配列を挿入する RNAi ベクターの構築は困難であることが示唆された。そこで、*lcc1* 遺伝子を 2 種類のプロモータで挟んだ RNAi ベクターpChG$^{a}$S-cL1 を新規に構築し、REMI 法を用いてシイタケ形質転換体を造成した。本研究では、pChG$^{a}$S-cL1 を導入したシイタケ形質転換体における *lcc1* 遺伝子の発現抑制と他の *lcc* 遺伝子の発現に関して解析を行った。
(方法・結果)はじめに、REMI 法によりシイタケ *lcc1* 遺伝子発現抑制 RNAi ベクターpChG$^{a}$S-cL1 を導入して得られた 16 株の組換え体に関して、寒天培養物のラッカーゼ活性を解析した。ラッカーゼの基質としてカテコールを含む寒天培地に組換え体を接種して基質の着色を比較した結果、宿主株では培養 24 時間以降に褐変化が観察されたのに対して、16 株の組換え体では接種後 1 時間以内に強い褐変化が観察された。次に、それぞれの組換え体を培養した MYPG 寒天培養物からタンパク質を抽出し、Lcc1 と Lcc5 に対するペプチド抗体でウエスタン解析を行った。その結果、宿主株では Lcc1 のみ検出されたのに対して、組換え体 16 株中 6 株では Lcc1 はほとんど検出されず(#1、#2、#3、#4、#5、#14)、そのうちの 2 株(#1、#3)では Lcc5 が検出された。これらの結果より、RNAi ベクターpChG$^{a}$S-cL1 を導入することによって *lcc1* 遺伝子の発現が抑制されることが明らかになった。また、lcc1 遺伝子の発現が抑制された株の中には、宿主株では発現していない Lcc5 が新規に発現していることが明らかになった。次に、Lcc1 の発現が強く抑制された組換え体#1、#4、及び#5 に関して、MYPG 液体培養を行ってラッカーゼ活性変動を解析した。その結果、MYPG 寒天培地で観察された褐変化の傾向と同様に、それぞれの組換え体では宿主株よりも早期にラッカーゼ活性が上昇することが明らかになった。また、ラッカーゼ活性がピークになった時期の培養上清を濃縮し、ウエスタン解析を行った結果、組換え体#1 では寒天培養時と同様に Lcc1 はほとんど検出されず、宿主株では検出されなかった Lcc5 が検出された。一方、組換え体#4 及び#5 では寒天培養時に検出されなかった Lcc1 が検出され、寒天培養時では検出されなかった Lcc5 が新規に検出された。これらの結果より、pChG$^{a}$S-cL1 導入株では培養条件によって *lcc1* 遺伝子の発現抑制が変化し、他の *lcc* 遺伝子が発現する可能性が示唆された。

RNAi, *Lentinula edodes*, Laccase

発表番号：3F078
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌のハイドロフォービン HypD は分生子表面に局在する

Characterization of a hydrophobin HypD from *Aspergillus oryzae*

○石倉 幹大、藤井 祐希、土屋 文美、関 公一朗、中島 春紫（明治大・農・農化）
○Kandai ISHIKURA, Yuki FUJII, Ayami TSUCHIYA, Koichiro SEKI, Harushi NAKAJIMA (Meiji Univ.)

【背景・目的】

ハイドロフォービンは、糸状菌や担子菌の細胞表層に局在する低分子量タンパク質で、特徴的な配置の 8 つの Cys 残基を有する。これまでに麹菌 *Aspergillus oryzae* から 4 つのハイドロフォービン (HypA-D) を見い出している。HypD は全長 207 アミノ酸であり、ハイドロフォービンとしては例外的に C 末端に 63 個の荷電アミノ酸を含む 93 アミノ酸の非常に親水的な領域を有している。この C 末端領域はデータベース上に相同タンパク質の報告がなく、既存のハイドロフォービンと異なる機能を持つことが予想される。そこで本研究では、HypD タンパク質の機能について解析を行った。

【結果・考察】

*hypD* 遺伝子が発現する環境条件を特定するために、β-グルクロニダーゼをレポーターとして発現解析を行った。その結果、*hypD* 遺伝子は小麦ふすまや蒸し米を用いた固体培養時に高発現し、特に培地の水分含量が少ない条件において発現量が増大することが観察された。さらに、寒天平板培地においても、塩や糖などの溶質を添加して浸透圧を上昇させることにより、固体培養時と同等の発現量となることが見い出された。

次に、*hypD* 遺伝子欠失株を作製し、表現形質を観察した。通常の寒天平板培地における生育速度および分生子形成数は、野生株との差が見られなかった。一方、高浸透圧の寒天平板培地では分生子形成数は野生株の 50%ほどに減少していたが、その分生子の発芽率は野生株と有意な差が見られなかった。蛍光タンパク質を融合した HypD タンパク質が分生子表面に局在することから、分生子をストレスから保護する機能が考えられる。

*Aspergillus oryzae*, hydrophobin, conidiation

発表番号：3F079
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母の環状染色体の形成および維持に関係する遺伝子の探索

# Screening of novel factors involved in formation and maintenance of circular chromosome in S. pombe

○上野 勝、田中 大樹、南 結香子、シャミム ホシャイン（広大・院先端・分子生命）
○Masaru UENO, Daiki Tanaka, Yukako Minami, Hossain Shamim (Hiroshima Univ.)

ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高い頻度(異型脂肪腫様腫瘍で８５%)で環状染色体が見つかる(Trombetta ら、Genes. Chromosomes. Cancer. 2009. p993)。また先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者は、精神遅延や発達異常がみられるだけでなく、環状染色体は不安定で環状染色体を失うとがんのリスクが上がることも報告されている（Zirn ら、Clin. Genet. 2012. p82)。しかし、環状染色体が線状染色体とどのような点で違うのかや、環状染色体がどのように維持されているのかなどは、十分にはわかっていない。

分裂酵母のテロメア結合蛋白質 Pot1 は、テロメラーゼのリクルートとテロメアの保護の両方に必要である。*pot1*$^{+}$を破壊するとテロメラーゼによるテロメア伸長ができなくなると同時に、テロメア末端が分解される。その後、染色体内で末端融合が起こった環状染色体を持った株が生き残る。しかしこの過程にどのような因子が関係するのかは、十分には解明されていない。

今回は、DNA ダメージチェックポイントの活性化に必要な 9-1-1 複合体の一つである *rad9*$^{+}$の破壊が *pot1*$^{+}$の破壊と合成致死になることを発見した。一方、DNA ダメージチェックポイントの上流で中心的な機能を持つ *rad3* と *pot1* との二重破壊株が合成致死にならないことから(Wang ら、 Mol. Cell. 2008.p463)、*rad9 pot1* 二重破壊株が合成致死になる原因は、DNA ダメージチェックポイント機能の欠損によるものではなく、Rad9 の DNA ダメージチェックポイント以外の機能の欠損によることが予想される。

*rad9 pot1* 二重破壊株の合成致死の機構を解明するために、合成致死を抑圧する変異株の探索を行った結果、致死を抑圧する変異株を二種類取得した。一方の株の染色体は環状化しており、もう一方の株の染色体は線状であった。現在はこれらの変異株の変異箇所の同定を行っており、本発表ではこれらの結果について紹介したい。

Telomere, cancer, DNA repair

発表責任者：上野　勝（scmueno@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：3F080
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Molecular mechanism underlies transcriptional regulation of cellulolytic enzymes in Streptomyces sp. SirexAA-E

Wakana SATO[1], ○Yuto MAEDA[1], James ELLINGER[2], Taichi TAKASUKA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]The Univ. of Tokyo)

*Streptomyces* sp. SirexAA-E (SirexAA-E) is an aerobic and highly cellulolytic bacterium isolated from the wood-boring wasp, *Sirex noctilio*. Recent biochemical and structural studies of secreted enzymes from SirexAA-E suggested that the cellulolytic capability of this species is likely driven by a repertoire of secreted cellulolytic enzymes [1-5]. Interestingly, these enzymes are regulated at the transcriptional level by the LacI repressor-like protein, CebR, in response to available carbon source in the environment. CebR, which possesses DNA binding domain, recognizes and binds to the CebR binding motif found around upstream regions of targeted genes, and outcompetes transcription factors [1]. When cellobiose is present in the extracellular environment, it seems that CebR is down-regulated, thus transcription factors can fully transcribe the genes downstream from the CebR binding motifs [1, 6]. For the genes encoding the aforementioned cellulolytic enzymes, recognizable CebR binding motifs are present. Therefore, abundant secretion of these enzymes is regulated by CebR in the presence of cellobiose, which is one of the major products when the SirexAA-E deconstructs cellulosic materials. Currently, 20 CebR motifs are identified in the SirexAA-E genome by sequence homology, however the CebR cannot be a sole transcription repressor that governs regulation of all the cellulolytic enzymes.

In this study, we first aimed to assess the biochemical function of CebR to the sheared (~500 bp) SirexAA-E genomic DNA, in order to determine previously undescribed CebR DNA binding motifs. Moreover, by genome analyses of the SirexAA-E genome, we have found 5 additional LacI-like repressors. We also revisited a previous RNA-seq dataset [6], and confirmed that all 5 LacI-like repressors were down regulated when the medium contained various oligosaccharides including cellobiose. Thus, five LacI-like repressors might cooperatively regulate gene transcription in response to different carbon sources together with CebR. To gain more insight, 5 LacI-like repressors were also prepared, and purified for further biochemical characterization. Our results suggest that CebR is not the sole regulator of SirexAA-E cellulolytic capability, but also there are at least 5 other repressors that play a role in this process.

REFERENCES

1. Takasuka, T.E., et al. (2013), *Sci. Rep.*, 3, 1030
2. Bianchetti, et al. (2013), *J. Biol. Chem.*, 288, 18574
3. Takasuka, T.E., et al. (2014), *PLoS One* 9, e94166
4. Takasuka, T.E., et al. (2014), *Proteins: Str. Func. And Bioinfo.*, 82, 1245
5. Bianchetti, C.M., Takasuka, T.E., et al. (2015), *J. Biol Chem.,* 290, 11819
6. Book, A.J., et al. (2014), *Appl. Environ. Microbiol*., 80, 4692-4701

Cellulolytic Streptomyces, Gene regulation, DNA motif

発表責任者：TAKASUKA Taichi（takasuka@cen.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3F081
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# pLC-hph 導入シイタケ組換え株のラッカーゼ発現の解析
# Laccase genes expressions in a Lentinula edodes transformant integrated with pLC-hph

○伊藤 優希[1,2]、山形 明史[1]、佐藤 利次[1,2] ([1]北見工大、[2]日本農芸化学会)
○Yuki ITO[1,2], Akifumi YAMAGATA[1], Toshitsugu SATO[1,2] ([1]KIT, [2]JSBBA)

【緒言】食用担子菌シイタケ(*Lentinula edodes*)は、難分解性のリグニンを分解する酵素としてラッカーゼ(Lcc)を生産し、液体培養時に Lcc1 を、おが粉培地での培養時には Lcc6 を分泌することが明らかとなっているが、その発現制御メカニズムは不明である。これまでに、シイタケ用の薬剤耐性遺伝子発現ベクターpLC-hph を導入した組換え株の中から、宿主株とは Lcc の発現パターンが異なる#590 株が得られた。宿主株を液体培養した場合、Lcc 活性のピークが培養 20 日前後に 1 回であるのに対し、#590 株を液体培養した場合は、最初の活性のピークが宿主株よりも早期に出現し、その後 2 回目のピークが出現することが明らかとなった。また、ウエスタン解析の結果より、宿主株では Lcc1 のみ検出されるのに対し、#590 株では Lcc1 に加え、Lcc5 も検出されることが明らかとなった。本研究では、Lcc の発現メカニズムの解明を目的に、各株で発現している *lcc* 遺伝子の発現に関して解析を行った。

【方法】宿主株(SR-1)、#590 株を MYPG 寒天培地またはおが粉培地で前培養を行い、培養物を MYPG 液体培地に接種し、振とう培養を行った。培養液の Lcc 活性を経時的に測定し、ピーク時の菌体を回収した。これらの菌体から、RNA を抽出し、DNase I 処理及び cDNA 合成を行った。これらの cDNA を鋳型として、シイタケゲノムに存在する 13 個の *lcc* 遺伝子に関して、25 サイクルの PCR を行い、EtBr 含有アガロースゲルで電気泳動後、増幅遺伝子の検出を行った。

【結果】RT-PCR の結果、宿主株の場合には、寒天前培養物接種の条件では 4 種類(*lcc1*, *lcc7*, *lcc10*,及び *g7213)*、おが粉前培養物接種の条件では 7 種類(*lcc1*, *lcc7*, *lcc*9 *lcc10*, *lcc11*, g2753 及び *g7213*)の遺伝子が検出された。これに対して、#590 株の場合には、寒天前培養物接種の条件では、新規に *lcc5* が検出される以外に 1 次ピークでは 1 種類(*lcc1*)のみ、2 次ピークでは 2 種類の *lcc* 遺伝子(*lcc1* 及び *lcc10*)が検出され、宿主株に比べて検出される遺伝子数が減少した。また、#590 株のおが粉前培養物接種の条件では、*lcc1* は検出されず、新規に *lcc5* が検出される以外に、1 次ピークでは 3 種類(*lcc7*, *lcc10*,及び *lcc11*)、2 次ピークでは *lcc5* のみが検出された。したがって、この条件でも、#590 株の場合には、検出される *lcc* 遺伝子数が宿主株よりも減少した。以上の結果より、#590 株では pLC-hph がゲノムに挿入されたことにより、本来発現している *lcc* 遺伝子の数が減少し、新たに *lcc5* 遺伝子が発現していることが明らかになった。

Lentinula edodes, laccase gene, RT-PCR

発表番号：3F082
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物殺虫剤 *Bacillus thuringiensis* の巨大プラスミドの構造多型領域の解析

# Analysis of the structurally polymorphic region of large plasmid of microbial pesticide *Bacillus thuringiensis*

○野澤 貴洋、岩崎 誠、菱山 浩平、千 菊夫 (信州大・農・応生科)
○Takahiro NOZAWA, Makoto IWASAKI, Kohei HISIYAMA, Kikuo SEN (Dept.Biosc.Biotech., Shinshu Univ.)

【背景・目的】

*Bacillus thuringiensis*（*Bt*）は，殺虫性タンパク質顆粒を生産することで知られ，微生物殺虫剤や遺伝子組換え作物の遺伝資源として利用されている．この殺虫性タンパク質をコードする遺伝子は，ほとんど全て *Bt* の巨大プラスミド上に位置している．また近年では，*Bt* が生産するタンパク質の中に癌細胞に特異的に毒性を示すものも発見され，その有用性は高まりつつある．しかし，*Bt* は食中毒の病原菌である *Bacillus cereus* の近縁種であることから，*Bt* の利用にあたっては注意を要する．そのため，*Bt* のさらなる利用・普及に向けて *Bt* の本質の理解を深める必要がある．

本研究は，*Bt* の殺虫力を担うプラスミドの構造多型に着目し，プラスミド構造多型に関する新たな知見を得ることを目的としている．

【方法】

*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*（*Bti*）の野生株 HD522 の殺虫力を担うプラスミド pBTI-6 には，構造多型領域（*Bam*H I 6.5 kb 制限断片領域）が存在する．構造多型領域で PCR による DNA の増幅を行うと，6.5 kb の期待断片に加え，もう 1 本 DNA 断片が増幅されることが知られている（以後，このバンドをエクストラバンド，増幅されるプラスミドと領域を pBTI-6Ex，Ex 領域とする）．また，構造多型領域には，転移因子 IS*240A* が一つ存在していることがわかっている．本研究は，構造多型領域に存在する IS*240A* に注目し，様々なプライマーセットを用いた PCR 解析や塩基配列の決定を行い，Ex 領域の構造の解析を行った．

【結果】

PCR 解析の結果，Ex 領域には IS*240A* が二つ位置していることが明らかになった．また，二つの IS *240A* 間の塩基配列を決定したところ，この配列は *Bti* 4Q5 株が保有するプラスミド pBtoxis の特異的領域（pBTI-6 には存在しない領域）の一部と相同な配列であった．この結果は，*Bti* 野生株の同一菌株内で複数の異なる殺虫性プラスミドが存在することを示唆している．また，pBtoxis 特異的領域には，IS*240A* が豊富に存在していることがわかっている．これらの事実は，pBTI-6, pBTI-6Ex, pBtoxis の三つのプラスミド間の構造変化の一つとして，IS*240A* による相同組換えが大きく関わっていることを強く示唆している．

*Bacillus thuringiensis*, stractural polymorphism, plasmid

発表責任者：千　菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：3F083
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌プラスミド pSN22 由来 tra 遺伝子群挿入による染色体移行の解析

# Analysis of chromosomal mobilization by pSN22 *tra* genes insertion

○村端 広介、金 眞熙、宮武 徹、横井 崇紘、片岡 正和（信州大学大学院）
○Kosuke Murabata, Jinhee Kim, Tetsu Miyatake, Takahiro Yokoi, Masakazu Kataoka (Shinshu Univ.)

遺伝子水平移動は、同世代の生物間で DNA を移動させる機構であり、有性生殖を持たない原核生物は、この機構を利用することによって遺伝子多様性を獲得してきたと考えられている。　二次代謝産物生産菌として工業的に利用されている放線菌も、遺伝子水平移動機構の 1 つである接合伝達を利用することによって種間で遺伝情報を輸送している。我々は、*Streptomyces nigrifacians* 由来自己伝達性プラスミド pSN22 における接合伝達遺伝子の解析を勧めている。pSN22 の接合伝達は、4 つの遺伝子座(*traR, traA, traB, spdB*)に依存しており、TraB タンパク質が接合伝達の中心である DNA 輸送チャネルであることが明らかになっている。さらに、*traB* の下流域に位置するシス因子 *cis*-acting *locus* of *transfer* (*clt*)が高効率な接合伝達に必須であることや、プラスミド伝達に伴った宿主染色体の可動化を確認してきた。

本研究で私は、プラスミド伝達に伴う染色体移行能に着目した。過去の研究で、*S. lividans* 由来接合伝達プラスミド pIJ101 の接合伝達遺伝子 *tra* と *tra* の制御因子である *korA* を *S.lividans* の染色体内へ導入による染色体移行効率の向上が確認されている。そこで、我々は pSN22 由来接合遺伝子である *traR, traA, traB* および *clt* を *S. lividans* の染色体内へ導入し、染色体移行効率の変化を確認した。

染色体への遺伝子導入には、acthinophage phiC31 由来の部位特異的組換えを利用した。染色体移行の評価は、ホスト染色体とゲスト染色体の組換え効率の定量化により行った。現在までに、pSN22 由来の *tra* 遺伝子群の導入により、先行研究よりもはるかに高い染色体組み換え効率を確認した。さらに、*clt* 配列を欠損させることで染色体移行効率の大幅な欠損が見られ、*clt* がこの系においても必須であることを確認した。

Streptomyces, conjugal transfer, pSN

発表番号：3F084
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 様々な環境からの新規自己伝達性プラスミドの取得

# Capturing new self-transmissible from various environmental samples

○仲田 裕貴[1]、福田 洸平[2]、金原 和秀[3]、新谷 政己[3] ([1]静大工、[2]静大創造院、[3]静大工、静大創造院)
○Hiroki NAKATA[1], Kouhei HUKUDA[2], Kazuhide KINBARA[3], Masaki SHINTANI[3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ., [3]Shizuoka Univ., Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

【目的】プラスミドは染色体外の自己複製遺伝子で，その伝達現象は微生物の急速な進化・適応能に寄与する．またプラスミドは，微生物の遺伝子組換えの必須ツールであり，対照微生物を詳細に研究し利活用するには，その微生物に適したプラスミドベクターの開発が非常に重要である．一方，これまでに塩基配列の全長が解読されたプラスミドは 5000 以上あるが，ベクターとして利用可能なプラスミドの種類は，環境中に生息する種々の微生物を網羅するほど十分とはいえない．そこで本研究では，新規ベクターの開発を目指し，まずは環境中から新たなプラスミドを取得することを目的とした．
【方法】プラスミドの取得は，自己伝達性プラスミドと可動性プラスミドとを利用した三親接合を利用して行った．本手法では，自己伝達性プラスミドが，可動性プラスミドを伝達させる能力を指標にして，環境試料中の微生物集団から自己伝達性プラスミドの取得を試みた．可動性プラスミドには既知の pBBR1MCS-2 を用い，受容菌には，染色体上に GFP 遺伝子を挿入した受容菌を用いた．環境試料由来のプラスミドと，pBBR1MCS-2 を受け取った接合完了体は，可動性プラスミドが宿主に付与する抗生物質耐性能と，受容菌の GFP 遺伝子の発現を指標に選抜した．また，環境試料としては，静岡大学浜松キャンパス内の土壌と，既に稼働している高速液体メタン発酵槽内のグラニュールを用い，各サンプル 1 g を 5 mL の PBS に懸濁して濾過したサンプルを，環境微生物集団として使用した．可動性プラスミドを持つ菌株には大腸菌を，受容菌は *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 GFP を使用した．環境微生物集団と，上記 2 種類の菌株を混合し，吸引濾過で 0.22 μm フィルターにトラップ後，シクロヘキシミドを含む R2A 固体培地上で 30℃, 48 時間静置後，選択培地上で緑色蛍光を示したコロニーを選抜した．選抜後のコロニーを単離後，培養して，プラスミド抽出・全 DNA 抽出を行い，プラスミドの有無を調べた．
【結果と考察】これまでに GFP の蛍光を示し，プラスミドを持つと予測される菌株を約 131 株取得することに成功した．また，それらの一部より，プラスミド抽出後に電気泳動を行ったところ，それぞれサイズの異なるプラスミドを持つことが示唆された．また，pBBR1MCS-2 を伝達しうる，不和合性 IncP 群プラスミド DNA に特異的なプライマーを用いた PCR を行ったところ，49 株で陽性シグナルが検出された．現在，他の候補プラスミドについても同様に調べ，得られたプラスミドの分類を行っている．

plasmids, conjugative transfer, capturing

発表番号：3F085
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌プラスミド pSN22 における接合伝達関連タンパク質 TraB の機能解析

# Functional analysis of an essential protein for conjugal transfer of pSN22, TraB

○矢野 嵩紘、宮武 徹、片岡 正和（信州大学大学院）
○Takahiro Yano, Tetsu Miyatake, Masakazu Kataoka (Graduate School of Shinshu Univ.)

我々の研究室では、放線菌*Streptomyces nigrifaciens*由来の接合伝達性プラスミドpSN22の解析を進めてきた。pSN22は、接合伝達に必須の遺伝子座として*traR, traA, traB, spdB*を有する。中でも*traB*にコード*される*TraBは、菌糸間でのDNA輸送に関与するDNAチャネルであり、主要伝達タンパク質とも呼ばれる。我々はTraBが有する機能を分子レベルで解明することを目的とし、*in vitro, in vivo*の両面から解析を試みてきた。これまでに遺伝解析や一次構造解析、欠失解析によって、TraBの一次構造が大きく3つのドメインに大別され、アミノ末端側から順に細胞膜への係留、モーター活性、DNAへの結合の各機能を果たすことを明らかにしてきた。

今回我々は、モータードメインの機能に着目して解析した。このドメイン内にはWalker type-A, type-Bと呼ばれる2種類のNTP結合モチーフが存在し、Walker typeドメインは*Streptomyces*属を宿主とする他のプラスミド由来の主要伝達タンパク質と高い相同性を示す。先行研究により、これらのモチーフに変異を導入するとpSN22の接合伝達が不活化されることが示されてきた。我々はTraBがATPase活性を有し、その機能を担うためにはWalker typeドメインが重要なのではないかと考えた。この仮説を確かめるため、Walker typeドメイン内に点突然変異を導入した変異体TraB、及びWalker typeドメインをそれぞれ異なるパターンで欠落させた部分欠失変異体を作製し、これらのATPase活性を野生型TraBと比較した。その結果、変異型TraBの活性値は野生型に比べて50%以下に低下し、ドメイン内の保存性が高くない領域の変異でも同様の傾向を示した。また、Walker typeドメインを欠落させた部分欠失変異体の活性値も野生型と比較して著しい減少を示した。さらに先行研究との照らし合わせにより、ATPase活性を低下させるような変異を導入した場合において接合伝達の不活化が顕著に見られることを明らかとした。これらの結果はTraBがATPase活性を有し、Walker typeモチーフ内の変異によりその活性が損なわれること、及びTraBのATPase活性減少が接合伝達機構の喪失に直接関与することを示している。

さらに現在我々はアミノ末端側ドメインの機能に着目し、TraBが細胞膜と相互作用するメカニズムの解明に取り組んでいる。その結果も併せて報告する予定である。

Conjugal Transfer, Streptomyces, TraB

発表番号：3F086
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 線状プラスミドにおける接合伝達機構の解析

# Analysis of conjugal transfer mechanism of the linear plasmid

○丸山 直也[1]、池田 治生[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大学大学院、[2]北里大学北里生命科学研究所)
○Naoya MARUYAMA[1], Haruo IKEDA[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Graduate school of Shinshu Univ., [2]Kitasato Institute for Life Sciences)

当研究室では、*Streptomyces nigrifaciens* に由来する接合伝達性の環状プラスミド pSN22 が有する接合伝達関連遺伝子について、分子生物学的手法によってその機能を解析してきた。今回我々は、pSN22 内に存在する接合伝達関連遺伝子に相同な領域を有していることが判明している、*S. avermitilis* 由来の自己伝達性線状プラスミド SAP1 に着目した。線状プラスミドはその構造的特徴より、長大な DNA を安定して維持することができ、長大な DNA を取り扱う遺伝子操作系への応用が期待できるが、その伝達機構には不明な点が多く存在する。

線状プラスミドの伝達機構に対しては、'end first model' が提唱されている[1]。このモデルでは TtrA がヘリカーゼ活性を用いてプラスミドを一本鎖に分離するとともに TraB がプラスミドのテロメア様配列に結合している末端タンパク質を認識し、受容菌内へ輸送するといった機構が予測されている。このことから、TtrA が線状プラスミドの伝達に重要な役割を担っていると予想されるが、実験的に証明されてはいない。そこで我々は、SAP1 における接合伝達関連遺伝子と予測される領域の機能解析、及び線状プラスミドの接合伝達機構の解析を目的として研究を行っている。

SAP1 における接合伝達関連遺伝子と予測される領域を環状及び線状の他のベクターに移植し、接合伝達効率の測定を行った。加えて *ttrA* を付加したベクターを作成し、環状・線状のプラスミドの接合伝達に対する TtrA の影響を検討した。更にローリングサークル型の複製様式（RCR）をとるベクターに接合伝達関連遺伝子を移植し、接合伝達能の比較を行った。その結果、線状プラスミド由来の接合関連遺伝子が θ 型複製を行う環状プラスミドを可動化することを確認した。更に TtrA ヘリカーゼが線状プラスミドの接合伝達機構と密接に関係している可能性が示唆され、'end first model'を強く支持する結果となった。しかしながら *ttrA* を持たない線状プラスミドについても低頻度での伝達を確認した。RCR をとるプラスミドに SAP1 由来の *tra* 領域を保持させると高い伝達能を示すことを確認した。これらのことから、'internal initiation model'に沿った線状プラスミドの伝達と、その他のモデルが存在する可能性が示唆された。

(1) *Microbiology* 157,2556–2568 (2011)

Streptomyces, conjugaltransfer, SAP1

発表番号：3F087
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Gluconobacter frateurii* CHM43 の耐熱化に関する多剤耐性輸送体の機能解析

# Functional analysis of multidrug transporter related to thermal adaptation in *Gluconobacter frateurii* CHM43

○松本 奈実[1]、服部 浩美[1]、松谷 峰之介[1]、外山 博英[2]、片岡 尚也[1,3]、薬師 寿治[1,3]、松下 一信[1,3] ([1]山口大農、[2]琉球大農、[3]山口大　中高温微生物研究センター)
○Nami MATSUMOTO[1], Hiromi HATTORI[1], Minenosuke MATSUTANI[1], Hirohide TOYAMA[2], Naoya KATAOKA[1,3], Toshiharu YAKUSHI[1,3], Kazunobu MATSUSHITA[1,3] ([1]Yamaguchi Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]Yamaguchi Univ. RCTMR)

酢酸菌は糖やアルコールを酸化する能力を持ち、培地中に生産物を蓄積するため食酢の醸造やソルボース発酵、ケトグルコン酸発酵に用いられている。これらの発酵は通常 32℃以下で行われているが、発酵によって生じる温度上昇を抑える為に冷却システムが必要となる。耐熱化酢酸菌は、冷却コストの削減に貢献できることから開発が望まれている。

本研究では、より高温での L-ソルボース発酵可能な株の獲得と、耐熱化機構についての知見を得ることを目的とした。

ソルボース発酵株である *Gluconobacter frateurii* CHM43 を生育限界温度の高温で繰り返し培養をする高温適応育種によって親株に対して、より高温(38.5~40℃)で生育しソルボース生産可能な菌株が得られた[1]。

耐熱化株の変異箇所を同定する為に、親株との比較ゲノム解析を行ったところ、耐熱化株では 12 回膜貫通型の multidrug transporter にフレームシフト変異が入り、6 回膜貫通した辺りで終止コドンが現れることが分かった。

この変異が生じたトランスポーターの機能を調査する為に、様々な培地で親株と耐熱化株を培養した結果、培地炭素源の種類とその濃度によって耐熱性に違いがでることが示された。親株が生育可能な低ソルボース濃度の培養で、耐熱化株は生育が著しく悪いことから、このトランスポーターが低濃度ソルボースの取り込みに関与している可能性が示唆された。そこで、細胞内に蓄積する糖を分析したところ、ソルボースの蓄積は親株と耐熱化株間で差が見られなかったが、耐熱化株のみがトレハロースを蓄積していることが示された。また、トランスポーター破壊株においても細胞内トレハロースの蓄積が確認されたことから、本トランスポーターはトレハロースの排出にも関与していることが示唆された。現在、本トランスポーターの機能と耐熱性との関係についてさらなる解析を進めている。

本研究は、JST-ALCA 事業の一環である。

[1] Hattori H, et al: High-temperature sorbose fermentation with thermotolerant *Gluconobacter frateurii* CHM43 and its mutant strain adapted to higher temperature. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **95**: 1531 (2012)

*Gluconobacter*, thermotolerant, multidrug transporter

発表番号：3F088
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# リアルタイム細胞内 pH センサーによる大腸菌長期定常期の解明

# Intracellular realtime pH monitoring of Escherichia coli using GFP derivatives.

○小林 美貴[1]、淡路 健雄[2]、片岡 正和[1] ([1]信州大学大学院、[2]埼玉医科大学)
○Miki KOBAYASHI[1], Takeo AWAJI[2], Masakazu KATAOKA[1] ([1]Graduate school of Shinshu Univ., [2]Saitama Medical Univ.)

生物の細胞内環境は、温度や浸透圧の影響、細胞・組織による栄養分の消費や老廃物の排出などによって少しずつ変動している。そしてこの変化を感知して内部環境を一定に保つ働きは、ホメオスタシス（恒常性）と呼ばれている。ホメオスタシスは体内の細胞・組織・器官が安定して機能するために必要不可欠である。生物は pH（水素イオン指数）ホメオスタシスを持ち、細胞内 pH を一定に保つことは、細胞内での諸反応の進行に強い影響を与えている。

本研究では、研究対象として大腸菌を用いて、生きている細菌の細胞内 pH を非侵襲で測定するセンサーの作成を目的とし、細胞内 pH の描写を試みた。菌内の pH を求めるための手法として、以前に報告されている pH 感受性 GFP（Green Fluorescent Protein）と pH 非感受性 GFP の同時発現を利用したセンサーでは、不確定な発現レベルやそれぞれのプローブ不均等な分布という問題があった。また、塩化物感受性の蛍光タンパク質は蛍光が安定しないため不適である。菌内の pH をリアルタイムイメージとして正確に得るためには、まず以上の事を考慮して新しい pH センサーを作成する必要がある。今回用いた分子プローブは、水素イオン非感受性の GFPuv と、YFP（Yellow Fluorescent Protein）を改変した水素イオン、塩化物イオン感受性の蛍光タンパク質に、水素イオンにのみ感受性を持つようにアミノ酸を変異させた変異型 Venus（mVenus）を利用した。この 2 つの蛍光タンパク質遺伝子を連結して、大腸菌で発現させた。GFPuv と mVenus 由来の蛍光強度比を蛍光分光光度計で測定することによって pH の測定を試みた。また、細胞膜をジギトニンを用いて透過処理することで、菌内に任意の pH 緩衝液を流入させ、pH 標準曲線を作成した。さらに蛍光顕微鏡の画像から、J イメージにより輝度比を求め、pH の消長を捉えた。

現在、大腸菌の定常期から長期定常期において観察を進めており、細胞内 pH が非緩衝の培地とは逆方向の、中性からやや酸性に収束していくという結果が得られた。今後は、対数増殖期での測定の可能性や、他の菌への適応などを試み、さらに正確で実用的な pH センサーとすることを目指している。

living cell, pH monitoring, GFP derivatives

発表番号：3F089
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌におけるアクティベーションタギング法の検討

# Optimization of the activation tagging method for *Aspergillus oryzae*

○松岡 太郎[1]、井上 樹[2]、徳岡 昌文[2]、進藤 斉[2]、穂坂 賢[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・応生)
○ Taro MATSUOKA[1], Itsuki INOUE[2], Masafumi TOKUOKA[2], Hitoshi SHINDO[2], Masaru HOSAKA[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* には機能未知遺伝子が未だ数多く存在する。主に植物に用いられるアクティベーションタギング法は、エンハンサー配列を含む DNA タグ配列のランダム挿入により、挿入箇所近傍の遺伝子を過剰発現させることで、表現型から遺伝子の解析が可能である。本研究では、麹菌への応用を目指し、効果的なエンハンサー及び高効率な遺伝子導入法について検討を行った。
【方法・結果】挿入する DNA タグ配列として、麹菌アミラーゼ系遺伝子由来のエンハンサー配列について検討を行った。固体培養下で特異的に発現する *pepA* のプロモーター内に導入した結果、遺伝子発現促進が顕著に認められ、本エンハンサー配列をアクティベーションタギング法の DNA タグ配列として利用できることが分かった。

また、糸状菌において、高効率な遺伝子導入法として実績がある *Agrobacterium tumefaciens* を用いた ATMT 法について検討を行った。まず、エンハンサー配列と選択マーカー遺伝子を挿入 DNA タグとして、*A. tumefaciens* のバイナリベクター内 T-DNA 領域に導入した。次に、*A. tumefaciens* LBA4404 株及び C58 株を用い、*A. oryzae* NS4 株及びアフラトキシンクラスターを保持しない RIB143 株に対して ATMT 法による形質転換を実施した。その結果、LBA4404 株×NS4 株×*sC* マーカーの組み合わせにおいて遺伝子導入株の作出に成功し、C58 株×RIB143 株×*ptrA* マーカーの組み合わせにおいてピリチアミン耐性株を取得した。

現在、ATMT 法の最適化を行うとともに、取得した株における DNA タグの導入について確認を行っている。

*Aspergillus oryzae*, activation tagging, *Agrobacterium*

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

発表番号：3F090
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 食用担子菌ヒラタケのセルロース分解助長因子エクスパンシン様遺伝子 Poexp5 の単離

# Isolation of an expansin-like protein gene Poexp5 from edible basidiomycete Pleurotus ostreatus

○本間 靖隆[1,2]、佐々木 優太[1]、菅原 大希[1]、猪股 希[1]、佐藤 利次[1,2]（[1]北見工大、[2]日本農芸化学会）
○ Yasutaka Honma[1,2], Yuta Sasaki[1], Daiki Sugawara[1], Nozomi Inomata[1], Tositugu Sato[1,2] ([1]Kitami Institute of Technology, [2]JSBBA)

【緒言】有限な化石エネルギーを代替する再生可能なエネルギー源として、植物バイオマスの主成分であるセルロースが注目され、バイオエタノール等への変換が検討されている。セルラーゼ等によって温和な条件でセルロースを分解するには、植物バイオマス中に存在するセルロースの結晶構造を緩める必要がある。その活性を有する鍵となるタンパク質として、エクスパンシンあるいはスオレニンが注目されている。木材腐朽菌に属する食用キノコであるシイタケ(*Lentinula edodes*)及びヒラタケ(*Pleurotus ostreatus*)は木材を分解する微生物であることから、エクスパンシン様タンパク質遺伝子を有している可能性が考えられる。そこで、これらのキノコから当遺伝子の単離を試みた。
【方法と結果】シイタケに関しては独立行政法人森林総合研究所が公開しているシイタケゲノムデータベース Forest GEN、ヒラタケに関しては DOE joint Genome Institute で公開しているヒラタケゲノムデータベースの *Pleurotus ostreatus* PC15 v2.0 を利用して検索した結果、シイタケで 2 つ、ヒラタケで 9 つのエクスパンシン様タンパク質遺伝子の存在が確認できた。これらの遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、炭素源としてグルコースのみを含有する培地とセルロースのみを含有する培地で培養した菌糸から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、グルコース含有培地で培養した場合には、どちらのキノコでもバンドは検出されなかった。一方、セルロース含有培地で培養した場合には、シイタケではバンドは検出されなかったのに対して、ヒラタケでは 1 つの遺伝子 estExt_fgenesh1_pg.C_030456(以下 Poexp5)の増幅が確認された。この結果より、ヒラタケでは Poexp5 がセルロース存在下で発現が誘導されることが示唆された。次に、RACE 法により Poexp5 遺伝子 cDNA の全配列決定を試みた。その結果、全長 cDNA 配列は 1,394bp で、ORF が 903bp、推定アミノ酸配列は 301 残基であると明らかになった。また SignalP での検索により、シグナルペプチドの存在が示唆された。この DNA 配列をもとに、Poexp5 遺伝子の全長 cDNA を単離するためのプライマーを設計し、セルロース含有培地で培養したヒラタケ菌糸由来の cDNA を鋳型にして PCR を行い、約 1000bp の増幅 DNA 断片を得た。この DNA 断片を T-Vector へサブクローニングした。コロニーダイレクト PCR により、DNA 断片の挿入が確認できた 6 クローンのうち、全配列が決定できた 4 クローンの DNA 配列をゲノムデータベース上の配列と比較したところ、それぞれ 5～8 塩基のミスマッチが存在し、一致した配列は得られなかった。現在、さらに塩基配列の解析を行っており、最終的に配列が確定した遺伝子をシイタケ発現ベクター系で発現して、Poexp5 の解析を行う予定である。

expansin, Lentinula edodes, Pleurotus ostreatus

発表番号：3F091
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 変異型 T7 RNA polymerase プラスミドによって転位誘発される好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の転位因子

# Transposable elements induced by a mutant plasmid encoding T7 RNA polymerase in the thermophile *Geobacillus kaustophilus* HTA426

○鈴木 宏和[1]、小林 淳平[1]、田靡 実咲[1]、八木 寿梓[2]、大城 隆[1]([1]鳥取大院・工・化生応工、[2]鳥取大・工・GSC)
○Hirokazu SUZUKI[1], Jyumpei Kobayashi[1], Misaki Tanabiki[1], Hisashi Yagi[2], Takashi Ohshiro[1]([1]Dept. Chem. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Tottori Univ., [2]GSC, Faculty of Eng., Tottori Univ.)

【目的】我々は，*Geobacillus kaustophilus* HTA426 の高変異性株を作製し，その細胞内自発的変異を利用した耐熱化指向性の酵素遺伝子変異法を研究している。本研究では，当該手法を用いた T7 RNA polymerase の耐熱化を試みた。

【実験と結果】*G. kaustophilus* 高変異性株および安定株の染色体に，T7 プロモーター制御下の *pyrF* 遺伝子をインテグレートすることで，派生株 MK534 と MK536 を各々得た。また T7 RNA polymerase 遺伝子を *E. coli-Geobacillus* シャトルプラスミドにクローニングし，MK536 株に導入した。得られた形質転換株は, 本来の *pyrF* 遺伝子を欠失していることから, プラスミドから発現した T7 RNA polymerase が高温で機能した場合にのみ *pyrF* 遺伝子を発現し，ウラシル原栄養性を示す。当該変異株を高温条件下かつウラシルを含まない最少培地中で継代培養したところ，70℃でも生育する派生株を得た。偽陽性を除くため，生育した菌体群からプラスミドを抽出し，再び MK534 株に導入した。形質転換体をウラシル非含有最少培地で培養したところ, 65℃でもウラシル原栄養性を示す 9 個の派生株を得た。最も生育が良かった株からプラスミドを抽出し，全塩基配列を決定したところ，T7 RNA polymerase 遺伝子の開始コドン直後に 1 塩基欠失が見出された。さらにプラスミド中の pUC レプリコン近傍に，HTA426 株ゲノムにコードされる転位因子が挿入されていた。当初，本変異型プラスミドは耐熱化 T7 RNA polymerase を産生することでウラシル原栄養性を引き起こしたと考えられたが，ウラシル原栄養性の 9 株からプラスミドをキュアリングしても，相変わらずウラシル原栄養性を示した。そこで，これら 9 株が染色体にもつ T7 プロモーター周辺領域を調べたところ, 全ての株で T7 プロモーター配列中もしくはその上流に，様々な挿入配列が見出された。

【考察】得られたウラシル原栄養性株は，全てにおいて T7 プロモーター周辺に転位因子を有し，プラスミドキュアリングはウラシル原栄養性に影響しなかった。また, 変異導入前の T7 RNA polymerase プラスミドを導入しても，ウラシル原栄養性のクローンは発生しなかった。以上の結果は，変異型 T7 RNA polymerase プラスミドは，HTA426 株中に潜在する様々な挿入配列の転位を誘発すること，そして，その結果として転位因子が T7 プロモーター周辺に転位したことがウラシル原栄養性の原因であることを示唆している。現在，これら機能的転位因子と変異型 T7 RNA polymerase プラスミドの作用を解析している。本研究は，生研センターイノベーション創出事業および農食研究推進事業の支援を受けて行った。

*Geobacillus kaustophilus*, Transposable elements, T7 RNA polymerase

発表責任者：鈴木宏和（hirokazusuzuki@bio.tottori-u.ac.jp）

発表番号：3F092
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イネいもち病菌のキチンデアセチラーゼ相同タンパク質 Cbp1 の機能解析

# Molecular analysis of Cbp1, the gene encoding a putative chitin deacetylase protein of *Pyricularia oryzae*

○志賀 友理子、岡内 香奈、黒木 美沙、成川 恵、鎌倉 高志（東理大）
○Yuriko SHIGA, Kana OKAUCHI, Misa KUROKI, Megumi NARUKAWA, Takashi KAMAKURA (Tokyo Univ. of Sci.)

イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae, Magnaporthe oryzae*）は、イネに感染しイネいもち病菌を引き起こす植物病原糸状菌である。イネの病害において最も被害が甚大なのがこのイネいもち病であり、日本をはじめとした各国で流行し、その病害によって毎年イネの生産量の 10～30%が失われるといわれている。そのため、イネいもち病の感染機構を解明し、病害防除に役立てることは非常に有意義であるといえる。

イネいもち病菌は分生子の先端から発芽管を伸長させ、感染特異的な器官である付着器を形成することで宿主体内に侵入・感染する。本菌の宿主への感染にはこの付着器の形成が必須であり、付着器形成は植物表皮の認識によってシグナル伝達が起こることで誘導されると考えられているが、分化の条件や誘導に関する遺伝子については未解明の部分が多い。

イネいもち病菌の付着器形成は分生子の 1 回の細胞分裂に伴う細胞分化によるものであり、付着器形成までの一連の過程は、宿主植物を用いることなく人工基質上で簡易的に分化を誘導・観察することができる。そのため、付着器形成のメカニズムを解明することは植物病原菌の病害防除への貢献という観点だけでなく、真核生物の細胞分化に関する基礎的研究としての意味を持つ。

本研究では、発芽管伸長時に特異的に発現し、その欠損により付着器形成に遅延を生じる遺伝子 *CBP1* に着目した。*Δcbp1* 株は植物由来成分である HDD や cAMP 分解酵素阻害剤である IBMX の添加によって付着器形成能が回復することが知られる。Cbp1 はキチンゼアセチラーゼ（CDA）相同領域を持つことから、CDA として働く可能性が示唆された。これを検証するために、他種の CDA において活性中心の保存配列だと予測されているアミノ酸に部位特異的変異を加えた株を作製したところ、*Δcbp1* 株と同様の付着器形成遅延形質を示した。そのため、Cbp1 が CDA 活性によって付着器形成に関与する可能性があると考えられた。CDA として機能すると仮定した場合、CDA の構造や推定代謝産物の物性、あるいはそれに伴う pH の変化等が付着器形成に重要である可能性がある。そこで、*Δcbp1* 株に対して緩衝液や推定代謝産物を用いて、それらが及ぼす影響について検討を行った。

*Pyricularia*, chitin deacetylase, appressorium formation

発表番号：3F093
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の構造と機能の解析

# Research on structure and function of AVR-Pia isolated from Magnaporthe oryzae

○藤原 志帆[1]、樋口 裕也[1]、佐藤 佑樹[1]、尾瀬 農之[2]、神谷 昌克[3]、浅野 行蔵[1]、曾根 輝雄[1]（[1]北大院農、[2]北大院薬、[3]北大院先端生命）

○Shiho FUJIWARA[1], Yuya HIGUCHI[1], Yuki SATOH[1], Toyoyuki OSE[2], Masakatsu KAMIYA[3], Kozo ASANO[1], Teruo SONE[1] ([1]Grad. Sch. Agriculture., Hokkaido Univ., [2]Fac. Pharmaceutical Sci., Hokkaido Univ., [3]Fac. Adv. Life Sci., Hokkaido Univ)

イネいもち病はイネの最重要病害であり，その防除に抵抗性品種が使用されている．抵抗性反応は，病原菌の AVR 遺伝子産物を宿主の R 遺伝子産物が認識することによって起こるとされているが，その詳細は未だわかっていない．イネいもち病菌の AVR 遺伝子の 1 つである *AVR-Pia* はイネの R 遺伝子 *Pia* に対応しており，その遺伝子産物は，*Pia* 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と相互作用することが知られている．

Yeast two hybrid 解析により AVR-Pia は多量体化すると推測された．さらに，2 アミノ酸置換体（AVR-Pia$^{F38AV40A}$） が AVR-Pia 同士の相互作用を弱くすることが判明した．また，AVR-Pia$^{F38AV40A}$ は宿主の *Pia* 遺伝子産物の 1 つの RGA5-A の C 末端部分と野生型と同等の相互作用を示したが，接種試験において AVR-Pia$^{F38AV40A}$ を発現するいもち病菌は，*Pia* イネへの感染能を示した．

大腸菌にて封入体として発現させ，変性，リフォールディング後，ゲル濾過により精製した AVR-Pia の NMR 法による構造解析を行った．AVR-Pia は，6 つの逆並行 $\beta$ ストランドからなる $\beta$ サンドイッチ構造をとっており，既に構造解析がなされているイネいもち病菌の AVR タンパク質 AVR-Pizt や *Pyrenophora tricici-repentis* の宿主特異的毒素 ToxB と構造類似性を示した．

Plant pathogen, Avirulence protein, rice blast

発表番号：3F094
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Lactobacillus plantarum* 環境単離株集団中におけるムコイド型コロニーの出現機構の解析

# The appearance of mucoid variant colony in *Lactobacillus plantarum* environmental isolates

○江橋 由夏[1]、河嶋 伊都子[1]、尾花 望[1]、久保田 浩美[2]、清川 達則[1]、八城 勢造[2]、柿原 健佑[1]、小山 二花[1]、蓮見 基充[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]花王・安全性科学)
○ Yuka EHASHI[1], Itsuko KAWASHIMA[1], Nozomu OBANA[1], Hiromi KUBOTA[2], Tatsunori KIYOKAWA[1], Seizou YASHIRO[2], Kensuke KAKIHARA[1], Nika KOYAMA[1], Motomitsu HASUMI[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kao Co.)

乳酸菌は発酵食品やプロバイオティクスとして利用される有用菌として知られる一方で、食品に混入し食品変敗や包装の膨張の原因となる危害菌として問題視されている。また乳酸菌を含む多くの微生物は、実環境中においてバイオフィルム（BF）と呼ばれる微生物の高次構造体を形成し集団で生息している。乳酸菌 BF は多様な環境ストレスに対する耐性を有しており、BF 制御を含めた危害菌としての乳酸菌の制御法が求められている。本研究では危害菌として報告事例のある *Lactobacillus plantarum* を用いて乳酸菌の BF 解析を行った。

先行研究において、実環境中より単離された *L. plantarum* の集団中から、実験室株では見られない粘着性を有したムコイド型コロニー（mucoid variant：MV）が出現することが明らかとなった。野生型コロニー（WT）が形成する BF は、菌体同士が密着し、薄い構造をとる一方で、MV が形成する BF は細胞外マトリクスを多く含んだ厚みのある構造をとっており、両者の BF 構造は大きく異なっていた。つまり MV の出現が *L. plantarum* 環境単離株の集団における BF の構造や性質に影響を与えていると考えられた。よって本研究では *L. plantarum* 環境単離株の集団中における MV 出現機構の解明を目的とした。

MV 出現の原因因子を探索するため、マイクロアレイ解析にて WT と MV の全遺伝子の発現量を網羅的に解析した。その結果 WT に比べ MV では、莢膜合成に関与する *cps2* 遺伝子群の発現が有意に上昇していた。墨汁を用いた莢膜のネガティブ染色の結果、MV の菌体の周囲には WT と比べ厚い莢膜が観察され、MV では莢膜合成量が増加していることが明らかとなった。さらに WT と MV で *cps2* 遺伝子群の ORF とその上流の配列を解析した結果、*cps2* 上流の一部配列に逆位が見られたことから、転写調節領域の配列の逆位が *cps2* 遺伝子群の発現量の変化及び MV 出現の原因であることが示唆された。WT と MV は双方向に出現することから、*cps2* の上流配列の逆位によって相変異が起こり、集団内で不均一性を保持していると考えられる。また WT ではエタノールに対して高い耐性を示す一方で、MV は酢酸に対して高い耐性を示しており、それぞれ高い耐性を示すストレスが異なっていた。以上のことから、乳酸菌は実環境中で集団中に異なる性質の菌体を保持することで、多様なストレスに応答して BF の構造・性質を変化させ生存率を高めていると推測される。つまり MV 出現とその保持は *L. plantarum* 環境単離株の生存戦略であり、今後 MV の出現メカニズムをより詳細に解析することで、実環境中に生息する *L. plantarum* の集団に対する制御につながると考えられる。

biofilm, lactic acid bacterium, mucoid variant

発表番号：3F095
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# LysR 型転写制御因子 MexT のプラスミド保持依存的な機能変化の評価
# Plasmid-driven transcriptional regulatory activity of the LysR-family regulator MexT

○久保 彩、能登 優、水口 千穂、岡田 憲典、野尻 秀昭（東大・生物工学セ）
○Aya KUBO, Suguru NOTO, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】プラスミドは宿主に多剤耐性や難分解性物質分解能などの新規形質を付与する一方で、宿主染色体の転写様式や細胞内環境の変化を引き起こし宿主への負荷となり得ることが知られている。当研究室では *Pseudomonas putida* KT2440 株とカルバゾール分解プラスミド pCAR1 をモデルとし、プラスミド保持に伴う負荷を評価してきた。過去の研究から pCAR1 保持株と非保持株とを競合培養すると pCAR1 保持株が淘汰されることが示されていたが [1]、長期間の競合培養後に集団中で優占化した自然変異株のゲノム解析を行ったところ、LysR 型転写制御因子をコードする *mexT* に 2 種類の SNPs (*mexT*214A>G および *mexT*539A>G) が見出された。また Δ*mexT* 株を用いたトランスクリプトーム解析からは、多剤排出ポンプをコードする *mexEF-oprN* および機能未知の遺伝子 PP_4858 を含む 13 遺伝子が MexT レギュロンであると示唆された。これらの多くは pCAR1 保持特異的に転写される遺伝子 [1] であったため、pCAR1 保持に伴い染色体上の *mexT* の発現量が変化するか、MexT に何らかの機能変化が生じて上述の 13 遺伝子の転写を促進すると考えられた。そこで本研究では *mexT* の転写量と MexT の DNA 結合能を評価することで、pCAR1 保持に伴い宿主に負荷が生じる機構の解明を試みた。
【方法・結果】まず pCAR1 保持株、非保持株、自然変異株について、qRT-PCR により *mexT* の転写量を調べたところ、いずれの株でも転写量は同程度であった。一方、自然変異株では MexT の DNA 結合領域近傍 (*mexT*214A>G, MexT_I72V) または基質結合領域内 (*mexT*539A>G, MexT_D180G) にアミノ酸置換が生じていたため、MexT の DNA 結合能が低下していると予想し、ゲルシフトアッセイを行った。*P. aeruginosa* PAO1 株では MexT が DNA と結合するために必要なコンセンサス配列が報告されており [2]、PP_4858 の上流 86-110 bp にはこの配列と類似する配列が存在したため、PP_4858 上流 160 bp をプローブとした。また、C 末端側に His タグを付与した MexT (MexT_H6C) と DNA 結合領域近傍にアミノ酸置換を導入した MexT (MexT_I72V_H6C) を大腸菌中で発現させ、アフィニティー精製して使用した。その結果、両タンパク質の DNA への結合親和性に顕著な差は見られなかった。そこで *in vivo* でも MexT の DNA 結合能を評価するため、ChAP assay (Chromatin Affinity Purification assay) により pCAR1 の有無や MexT 中のアミノ酸置換が MexT の DNA 結合能に及ぼす影響を解析している。現在までに、染色体上の *mexT* に His タグを付与した (MexT_H6C) KT2440 株を相同組換えにより作製したため、この株を用いた ChAP assay の結果も併せて報告する。

[1] Takahashi *et al*., 2015, *Environ. Microbiol*., **17**: 134, [2] Tian *et al*., 2009, *Appl. Environ. Microbiol*, **72**: 3206

plasmid, MexT, Pseudomonas

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F096
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見

# Novel poly (ADP-ribose) glycohydrolase in *Aspergillus nidulans*.

○宮地 雄大[1]、平野 澪[1]、山本 竜也[1]、西尾 理志[1]、渡邊 美紀[1]、高谷 直樹[2]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]筑波大生命環境)
○Yuta MIYACHI[1], Mio HIRANO[1], Tatsuya YAMAMOTO[1], Satoshi NISHIO[1], Miki WATANABE[1], Naoki TAKAYA[2], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Tsukuba Univ.)

【目的】

ポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は真核生物に特異的なタンパク質の可逆的翻訳後修飾である。この反応には、PAR を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) が関与することが知られている。[1)] PARP は、酵母を除く全ての真核生物に保存され、DNA 修復、転写調節、細胞死、中心体の分裂制御に関与していると考えられている。*Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *parp* の ortholog が 1 つ存在するが、酵母および *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノムの中には、既知の *parg* の ortholog は見出されていない。[2)] 本研究では、糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し、その生理学的役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

*A. nidulans* のゲノム中からヌクレオチドを基質にすると考えられた *parg* 候補遺伝子を 7 種選抜し、大腸菌を宿主としてリコンビナントタンパク質を異種発現させた。精製後、これらの PAR 分解活性を測定したところ、1 種の遺伝子産物 (Hypothetical Protein) のみに $Mg^{2+}$ 依存的な PAR の分解が確認された。さらに、この遺伝子に関して、*A. nidulanas* を宿主として C 末端に TAP (Tandem Affinity Purification) tag を付加したリコンビナントタンパク質を発現後、アフィニティークロマトグラフィーにて精製を行なった。精製タンパク質と PAR との反応産物を LC-MS/MS にて解析したところ、ADP-リボースが検出された。以上の結果は、本精製タンパク質が PARG 活性を有していることを示しており、このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と命名した。

次に、*Δfparg* 株を作製し、3 種の DNA 損傷剤に対する影響を検討した。その結果、野性株に比べて、*Δfparg* 株は DNA 損傷剤に対して感受性を示した。そこで、fPARG の細胞内局在をウェスタンブロット法により解析したところ、主として核に局在していた。さらに、PAR の分解を経時的に追跡したところ、*Δfparg* 株では PAR の分解活性が顕著に低下していることが示された。

以上のことから、糸状菌では fPARG が PARG として機能しており、DNA 修復機構に何らかの関与をしていることが明らかとなった。

1）D'Amours D, *et al*. *J.Biochem* 1999; 342 (2): 249-268.
2）Kothe GO, *et al*. *Fungal Genet Biol*. 2010; 47(4): 297-309.

*Aspergillus nidulans*, poly (ADP-ribose) glycohydrolase, poly(ADP-ribose)

発表番号：3F097
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

メチオニン添加による *Shewanella oneidensis* MR-1 株の電流生成量の上昇
Effect of methionine on current generation by *Shewanella oneidensis* MR-1
○茂木 久恵、吉野 恵里加、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Hisae MOGI, Erika YOSHINO, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景・目的】
微生物燃料電池 (microbial fuel cells; MFC) は微生物によって有機物を電気エネルギーに変換することができる装置である。発電菌である *Shewanella oneidensis* MR-1 株は細胞外電子伝達系を持ち、MFC のモデル微生物として世界的に広く研究が進められている。以前の研究で我々は MR−1 株へのランダムトランスポゾン挿入を行い、野生株よりも高い電流を生産する変異株（EC-2 株）を取得した。トランスクリプトーム解析の結果、EC-2 株では活性メチルサイクル（AMC）に関連する遺伝子群 (*metR, metE, luxS*) が過剰に発現しており、AMC が MR-1 株の電流に関与する可能性が示唆された。そこで本研究では AMC の電流生産への関与とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、*metR* や *metE* の発現量に影響を与えるメチオニンの添加が電流生産に与える影響について調べた。

【方法・結果】
電気化学セル (培地: 10 mM 乳酸を含む無機培地、作用極: グラファイトフェルト、対極: 白金線、作用極電位: +0.2 V vs. Ag/AgCl) に MR-1 株を植菌し、生成される電流をポテンショスタットによって測定した。このとき半数のセルにメチオニン (0.13 mM) を添加し、電流生成に与える影響を調べた。その結果、メチオニンを添加したセルは、添加していないセルと比較して約 1.5 倍の電流を生成することが明らかとなった。そこで、メチオニン添加と電流増加との関連について調べるため、メチオニンが MR-1 株の遺伝子発現へ与える影響を DNA マイクロアレイを用いて解析した。メチオニンを添加した乳酸無機培地で MR-1 株を好気培養した結果、非添加時と比べてメチオニン合成に関与する遺伝子(*metR*、*metE*、*metH*)の発現が減少し、その一方で細胞外電子伝達系に関与する遺伝子(*omcA*、*mtrC*)を含む嫌気呼吸系遺伝子の多くが過剰発現していたことがわかった。このことから、MR-1 株のメチオニン添加による電流生成量の上昇は、細胞外電子伝達系遺伝子の発現上昇によるものと考えられた。また AMC 関連遺伝子の転写因子をコードする *metR* の恒常的発現株 (metR-CE 株) を作製した結果、metR-CE 株はフマル酸等を電子受容体とした嫌気呼吸条件下で生育できないことが明らかとなり、MetR が嫌気呼吸系の制御に関与している可能性が示唆された。現在その分子メカニズムを明らかにするため、metR-CE 株を用いたトランスクリプトーム解析やプロモーター解析等を進めている。

*Shewanella oneidensis*, microbial fuel cell, anaerobic respiration

発表番号：3F098
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌カーボンカタボライト抑制制御因子 CreA の炭素源依存的なリン酸化と細胞内局在変化

# Carbon source-dependent phosphorylation and altered subcellular localization of a carbon catabolite repression regulator, CreA, in *Aspergillus oryzae*.

○田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Mizuki TANAKA, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

麹菌はマルトース存在下で大量のアミラーゼを生産するが、グルコースが存在するとカーボンカタボライト抑制（CCR）によりアミラーゼ遺伝子の転写が抑制されることが知られている。糸状菌の CCR は、$C_2H_2$ 型転写因子である CreA によって制御されるが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。一方、出芽酵母では CCR 制御転写因子 Mig1 が、グルコース非存在条件では Snf1 キナーゼによりリン酸化され、核内から細胞質に移行することが明らかになっている。本研究では麹菌において CreA の N 末端に 3FLAG と GFP を融合させて発現させ、炭素源が CreA の局在と翻訳後修飾に与える影響について解析した。

グルコースおよびマルトース添加後の 3FLAG タグ融合 CreA の安定性を調べた結果、グルコース添加後は安定であるのに対し、マルトース添加後は急速に分解された。また、 GFP 融合 CreA の局在を観察した結果、グルコース培地に移した場合は核内に局在したのに対し、マルトース培地に移した場合は核内ではなく細胞質に主に局在が観察された。Snf1 キナーゼオーソログ（SnfA）の破壊株を作製してマルトース培地に移した際の CreA の安定性と局在を調べた結果、野生株と比較して安定性は高くなったものの、細胞質から核内へ局在が変化することはなかった。一方、CreA 内の nuclear export signal（NES）と予測されたロイシンをアラニンに置換したところ、マルトース培地に移した場合も核内に局在した。また、野生型 CreA と比較してマルトース存在下での安定性がやや高くなったことから、CreA はマルトース存在条件下で核内から細胞質に移行し、細胞質で分解されることが示唆された。次に、推定 NES 以降の C 末端領域(80 アミノ酸)を欠失させた CreA の N 末端に 3FLAG を融合してウェスタン解析で検出した結果、2 本のシグナルとして検出された。興味深いことに、グルコース培地に移した場合には低分子側のシグナルのみが検出されたのに対し、マルトース培地に移した場合には高分子側のシグナルのみが検出された。アルカリフォスファターゼ処理により高分子側のシグナルが低分子側にシフトしたことから、C 末端欠損 CreA は炭素源依存的にリン酸化及び脱リン酸化を受けることが明らかになった。一方、*snfA* 破壊株で C 末端欠損 CreA を発現させた場合もリン酸化型のシグナルが検出されたことから、SnfA 以外のキナーゼによって C 末端欠損 CreA はリン酸化されることが示唆された。

本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

*Aspergillus oryzae*, Transcription factor, Carbon catabolite repression

発表責任者：田中瑞己（mizuki.tanaka.a4@tohoku.ac.jp）

発表番号：3F099
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ストレス応答遺伝子 HO-1 発現への INO80 クロマチンリモデリング複合体の関与と bicyclic peptide による人為的制御の試み
Involvement of the INO80 chromatin remodeling complex in the regulation of stress-inducible *HO-1* gene

○秋山 祐亮[1]、高橋 裕一朗[2]、村上 寛和[2]、Christian Heinis[3]、加藤 恭丈[4]、五十嵐 和彦[4]、原田 昌彦[1,2] ([1]東北大・農・分子生物、[2]東北大・院農・分子生物、[3]EPFL・LPPT,Lausanne、[4]東北大・院医・生物化学)
○Yusuke Akiyama[1], Yuichrou Takahashi[2], Hirokazu Murakami[2], Heinis Christian[3], Yasutake Katoh[4], Kazuhiko Igarashi[4], Masahiko Harata[1,2] ([1]Lab.of Mol.Biol.,Facil.Agri.Tohoku univ, [2]Lab.of Mol.Biol.,Grad.Sch.Agri.Tohoku univ, [3]EPFL・LPPT,Lausanne, [4]Lab.of Biochemistry.,Grad.Sch.Med.Tohoku univ)

真核細胞において、ゲノム DNA はヒストンと結合してクロマチンを形成しており、このクロマチン構造が転写や DNA 損傷修復におけるエピジェネティック制御の分子基盤となっている。ATP 加水分解のエネルギーを用いてクロマチンの構造を変換する「クロマチンリモデリング複合体」は、クロマチン構造変化に中心的な役割を果たしている。細胞が様々なストレスに応答するために一群の遺伝子が誘導されるが、その制御にもクロマチン構造が関与することが知られている。一例として、活性酸素は酸化ストレスとして細胞内器官や DNA に深刻なダメージを与え、がんなどの様々な疾患の原因となるが、細胞は酸化ストレス応答遺伝子を発現して対応する。Heme oxygenase-1 (HO-1)は代表的な酸化ストレス誘導遺伝子である。我々は *HO-1* 遺伝子の発現誘導における、INO80 クロマチンリモデリング複合体の役割を解析している。INO80 複合体をはじめとする多くのクロマチンリモデリング複合体に、アクチンと進化的・構造的に関連性を有するアクチン関連タンパク質(actin-related protein; Arp)が含まれていることが知られている。このうち Arp5, Arp8 が INO80 複合体に特異的な構成因子であることから、ヒト Nalm-6 培養細胞株を用いて Arp5、Arp8 の遺伝子欠損細胞株を作製し、酸化ストレス条件下での遺伝子発現への影響を解析した。その結果、これらの Arp 遺伝子欠損細胞株では、酸化ストレスによる HO-1 の発現誘導の著しい低下が観察された。INO80 複合体における Arp5 および Arp8 の役割をより詳細に解析するために、それぞれの Arp に結合する低分子ペプチド bicyclic peptide のスクリーニングを行った。 bicyclic peptide は 2 つの環状構造をもつ十数個のアミノ酸からなるペプチドで、この環構造により標的タンパク質に高い親和性で結合する。スクリーニングによって得られた bicyclic peptide の Arp5 および Arp8 への結合を in vitro で確認した。さらにこれらの bicyclic peptide を細胞内に導入・解析することで、これらが INO80 複合体機能に与える影響を解析している。これらの bicyclic peptide を用いたクロマチンリモデリング複合体の機能の改変は、クロマチン構造変化の人為的制御の可能性を開き、また創薬への応用につながると期待している。

INO80 chromatin remodeling complex, HO-1, bicyclic peptides

発表責任者：秋山 祐亮（korokoro4716@gmail.com）

発表番号：3F100
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌ミニ染色体複製サイクルと転写・翻訳反応の再構成の試み

# How can we reconstitute "Central dogma"?

○高田 啓、辻本 寛子、末次 正幸（立教・生命理）
○Hiraku TAKADA, Hiroko Tujimoto, Masayuki Su'etsugu (Rikkyo Univ.)

細胞が自己複製を繰り返すための基本的な原理として、DNA 複製・転写・翻訳の一連の反応（セントラルドグマ）が存在する。近年の構成生物学的アプローチの発展に伴い、個々の生化学反応を組み合わせた、大腸菌の転写翻訳再構成系や染色体複製再構成系など、より高次な反応系が再構成されてきている。染色体複製は、複製の開始、伸長、終結そして姉妹染色体の分離のプロセスからなっている。複製起点 *oriC* 上での複製開始と、そこから両方向へ DNA 合成の伸長は、すでに 30 年ほど前に、Kornberg らのグループによって、試験管内で再構成されている。この系は、ミニ染色体と呼ばれる *oriC* 領域をもつ数 kbp ほどの環状 DNA と十数類の精製タンパク質を用いたものである。当研究室において、この再構成系を基盤に、複製終結や姉妹ミニ染色体分離のプロセスなどを検討し、複製終結後、 分離したミニ染色体を、さらに次のラウンドの複製サイクルへと繰り返し導く「複製サイクル再構成系（Replication cycle reaction : RCR）」が構築されてきている。我々は、RCR が遺伝情報を有するミニ染色体を増幅できる点に着目し、転写翻訳再構成系と融合することで、DNA 自身の情報を元に機能分子が発現し、自身の DNA 複製を駆動するような“自己複製系”の構築が可能ではないかと考えた。現在、RCR の構成因子の一つをミニ染色体の遺伝子に置き換え、この DNA からの転写・翻訳反応依存的に DNA 複製サイクルが駆動するかどうか検証している。本発表では、その現状と課題に関して議論したい。

E.coli, DNA replication, synthetic biology

発表責任者：高田啓（takadahiraku@yahoo.co.jp）

発表番号：3F101
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イネいもち病菌の *EHS1* ノックアウト株・ノックダウン株の表現型比較と *EHS1* ノックアウト株における機能相補因子の探索

# Phenotype comparison of disruptant with knockdown mutant of *EHS1* and a search of functional complementary gene in disruptant of *EHS1* in *Pyricularia oryzae*

○村野 慶奈[1]、林 平[1]、新井 和良[2]、荒添 貴之[3]、成川 恵[1]、大鐘 潤[2]、桑田 茂[2]、鎌倉 高志[1]([1]東理大院理工、[2]明治大院農、[3]神戸大院工)
○Keina Murano[1], Taira Hayashi[1], Kazuyoshi Arai[2], Takayuki Arazoe[3], Megumi Narukawa[1], Jun Ohgane[2], Shigeru Kuwata[2], Takashi Kamakura[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Meiji Univ., [3]Kobe Univ.)

イネいもち病菌はイネや小麦に感染していもち病を引き起こす植物病原糸状菌である。本菌は宿主植物上に接着すると発芽し、付着器と呼ばれる器官を形成する。付着器の形成はイネいもち病菌の通常の感染に必須な過程であり、本菌の病原性に深く関わる。

また本菌の発芽管伸長時や、付着器形成時の付着器内部で $Ca^{2+}$ 濃度が上昇することが知られており、前任者の研究から $Ca^{2+}$ チャネル阻害剤の添加によって付着器形成率が濃度依存的に低下することが分かっている。本研究では本菌の病原性のメカニズムを解明するために、分裂酵母で同定された機械刺激作動型の伸展活性化 $Ca^{2+}$ チャネルをコードする遺伝子 *MID1* のホモログである *EHS1* に注目した。

*EHS1* の機能解析のため、前任者によって 2 回相同組み換えを利用した *EHS1* ノックアウト株(国産野生株 P2 由来、以下 KO 株）が取得された。性状解析の結果、KO 株は野生株と比較して付着器形成率や栄養菌糸成長に有意な差はみられなかった。また $Ca^{2+}$ チャネル阻害剤を添加した状態では野生株よりも高い付着器形成能を示し、阻害剤による付着器形成阻害効果の緩和がみられた。

一方で、RNA interference 法を利用したイネいもち病菌 Br48 株由来の *EHS1* ノックダウン株（以下 KD 株）では野生株と比較して付着器形成率、胞子形成能が減少しているという報告がなされた（Nguyen, 2008）。両株に表現型の相違が見られる原因として、KD 株でオフターゲット効果が起こった可能性、KO 株で $Ca^{2+}$ チャネル阻害剤によって阻害されない他の因子が *EHS1* の機能を相補し、形質に変化が現れなかった可能性、それぞれの研究で用いた親株の違いによって表現型が異なった可能性の 3 つが考えられた。1 つめの可能性は、論文中（Nguyen, 2008）の記述及び当研究室の廣澤の確認によって低いと考えられた。よって本研究は 2 と 3 の仮説の検証を行うことで *EHS1* の機能をより正しく反映している方法を明らかにすることにし、その方法によって *EHS1* の機能解析を進めることにした。

現在著者が有力視している 2 の可能性において考えられる KO 株の機能相補因子の探索のため、親株 P2 、KO 株、エクトピック株の栄養菌糸由来の RNA を用いて次世代シーケンサーによる RNA-Seq を行った。2 回の試行の結果、親株 P2・KO 株間で発現変動遺伝子が複数検出された。しかし *EHS1* 機能相補因子候補の選抜には至らず、*EHS1* と似た機能を持つ遺伝子の発現上昇もみられなかった。また、親株・エクトピック株間で発現量が有意に変動した遺伝子が、親株・ KO 株間よりも多く検出された。

さらに 3 の可能性を検証するため、P2 由来の KD 株の取得を試みた。

*Pyricularia oryzae*, Phenotypic differences, RNA-Seq

発表番号：3F102
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

超好熱性アーキア Thermococcus kodakarensis の低温発現誘導機構
Regulatory mechanism for cold-induced gene expression in a hyperthermophilic archaeon, Thermococcus kodakarensis
○秀瀬 涼太、山岡 裕梨、藤原 伸介（関学大理工）
○Ryota HIDESE, Yuuri YAMAOKA, Shinsuke FUJIWARA (Kwansei-Gakuin Univ.)

【研究目的】超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* は他の超好熱菌と異なり 60℃から 93℃までの幅広い温度で生育し、低温ストレス（60℃）に応答して遺伝子発現を行う(1)。これら低温誘導型遺伝子は低温ストレス下での適応に重要な役割を果たすと考えられている。*T. kodakarensis* の低温誘導型 RNA ヘリカーゼ（*Tk*-DeaD）では SD 配列から開始コドンまでに存在するアデニンに富む領域が低温誘導発現の制御領域であるが、この領域が他の低温誘導型遺伝子の誘導に関与しているかは不明である(2)。本研究では、*T. kodakarensis* の低温誘導型遺伝子を対象にして、*Tk*-DeaD でみられた低温誘導機構が、他の低温誘導性遺伝子において認められるか一般性を調べた。
【結果と考察】DNA マイクロアレイ解析で、60℃で特異的に発現誘導される低温誘導型の候補遺伝子 54 種類のうち、低温誘導性が高い上位 23 個の遺伝子の低温誘導性を qRT-PCR で検証した。このうち 19 遺伝子で低温誘導が認められた。これら遺伝子群の発現制御領域を解析したところ、*Tk*-DeaD と同様に、SD 配列から開始コドンまでの間にアデニンまたはチミンが連続した配列が 19 遺伝子全てに存在した。低温誘導性のシャペロニン遺伝子 *cpkA* にも SD 配列から開始コドンまでにアデニンとチミンの連続配列(AAT)が存在する。*cpkA* の発現制御領域に着目し、耐熱性カタラーゼをレポーターとする実験系を用いて詳細に解析した。*cpkA* の開始コドンまでに存在する AAT をグアニンの連続配列(GGG)に置換したところ、低温誘導性が消失した。このことから、*cpkA* の低温誘導には SD 配列から開始コドンまでの間に存在する AAT 配列が重要であることが明らかとなった（3)。つまり、アデニンとチミンによる不安定な水素結合の連続が、高温で早期転写終結を引き起こし、高温では発現が抑制される。その結果、低温での特異的発現が導かれていると考えられる。qRT-PCR で低温誘導性を確認した 19 遺伝子のうち、TK2182、TK1226 及び TK0757 の発現制御領域の SD 配列から開始コドンまでにアデニンとチミンの連続配列の低温誘導性への関与を検証した結果も合わせて報告する。

(1) Fujiwara *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 74, 7306 (2008)
(2) Nagaoka *et al*., J. Bacteriol., 195, 3442 (2013)
(3) 西川ら，日本農芸化学会 2015 年度大会[講演番号: 2B41p08]

Cold-inducible gene, Gene expression, Hyperthermophile

発表責任者：秀瀬 涼太（rhidese@kwansei.ac.jp）

発表番号：3F103
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌におけるエネルギー代謝と分化・抗生物質生産の連携に関する研究

# Relationship between energy metabolism, differentiation and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2)

○千々和 雅人、高野 英晃、上田 賢志（日大生資科）
○Masato CHIJIWA, Hideaki TAKANO, Kenji UEDA (Nihon Univ.)

［目的］
*Streptomyces* 属放線菌はカビに似た複雑な細胞分化を行うとともに、多様な二次代謝産物を生産することで知られるグラム陽性細菌である。我々は末端呼吸鎖の遺伝学的解析を通じて、*Streptomyces coelicolor* A3(2)の分化と二次代謝は細胞内の高い ATP 量によって抑制される一方、ATP レベルの低下は分化と二次代謝を引き起こすことをこれまでに報告してきた。また、*Streptomyces* 属の ATP 合成酵素遺伝子クラスターのプロモーター領域の配列は種間で高く保存されていることから、その発現が特異的な制御を受ける可能性が考えられていた。本研究では細胞内においてエネルギー源として働く ATP の合成酵素遺伝子クラスターの発現制御に関わる蛋白質の同定を目的とした。
［結果・考察］
ATP 合成酵素遺伝子クラスターの発現制御に関わる蛋白質を同定するために、上述の保存配列を含む *atpI*(*SCO5366*)のプロモーター領域をプローブとした DNA アフィニティークロマトグラフィーを行った。その結果、本プロモーターに特異的に結合する蛋白質の検出に成功した。同定した蛋白質の一つは細胞内のレドックスバランスに関わる転写調節蛋白質 Rex であることが判明した。そこで、大腸菌を用いて調製した組換え Rex 蛋白質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、同プロモーター領域への特異的な結合が確認された。リプレッサーである Rex の DNA 結合活性は NADH によって阻害されることが知られている。実際に Rex の同プロモーターに対する結合は NADH によって強く阻害された。また、NADH と相互作用できない RexG102A 変異蛋白質の機能を評価したところ、Rex G102 A の標的 DNA に対する結合は NADH 存在下においても阻害されなかった。さらに、同プロモーター中に存在する Rex 結合配列(TGTG-6n-TTCAC)に変異を導入したプローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、Rex の結合は確認されなかった。これらの結果から、Rex は *atpI* プロモーター領域の結合配列を特異的に認識し、細胞内 NADH 量に基づいて ATP 合成酵素遺伝子群の転写量を調節する役割を担っていると考えられた。また、ゲノム情報が明らかな *Streptomyces* 属細菌において、*atpI* オルソログ遺伝子の上流領域に Rex の結合コンセンサス配列が存在すること、ならびに *rex* オルソログ遺伝子が高く保存されていたことから、Rex による制御は *Streptomyces* 属において普遍的に作動すると予測された。本メカニズムは、エネルギー代謝の恒常性維持機構の一つであると同時に、エネルギー代謝と分化開始の連携にも関与することが示唆された。

*Streptomyces*, ATP, energy metabolism

発表番号：3F104
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

プラスミド・宿主染色体由来 MvaT ホモログの DNA 結合能の評価
DNA-binding affinities of plasmid- and chromosomally encoded MvaT homologs
○角埜 裕基[1]、水口 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]富山県大生工科・生工セ)
○Yuki KADONO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ.)

【背景・目的】核様体タンパク質（NAPs）は、DNA の構造を変化させることにより数百もの遺伝子の転写制御を行う global regulator として働く。細菌間を水平伝播するプラスミドにも NAPs をコードするものが存在し、このようなプラスミドを宿主が保持すると、既に宿主内で形成されていた NAPs の転写制御ネットワークに新たな NAPs が加わることになり、転写制御ネットワークの再構築が起こる。当研究室では、プラスミド pCAR1 とその宿主 *Pseudomonas putida* KT2440 株をモデルにこの現象を追究してきた。pCAR1 にコードされる Pmr と、KT2440 株染色体にコードされる TurA, TurB の 3 つの MvaT ホモログ（NAPs の一種で、腸内細菌に存在する H-NS の機能的ホモログ）は、C 末端側の DNA 結合ドメインで標的塩基配列を認識して DNA に結合し、N 末端側の二量体／多量体化ドメインでホモ・ヘテロ多量体を形成して遺伝子の転写制御を行う。過去の研究では、各遺伝子破壊株で転写変動する遺伝子に違いが見られたものの、改変 ChIP-chip 解析で検出された Pmr, TurA, TurB の DNA 上の結合領域はほぼ一致していた（Yun *et al.*, *AEM*, in press)。しかし改変 ChIP-chip 解析で検出された各タンパク質の結合領域における塩基配列と *p*-value（結合の確からしさ）の関係を調べたところ、Pmr は A と T が、TurB は G と C が交互に繰り返される配列に結合する確率が高いことが示唆された（前年度本大会で発表)。そこで本研究では、Pmr, TurA, TurB の DNA 結合ドメインの配列特異性を生化学的に評価することを目的とした。
【方法・結果】Pmr の DNA 結合ドメイン（Pmr_ct）は過去に同定されていたため（Suzuki *et al.*, 2011, *BBB*, 75:711-7)、アミノ酸配列の保存性を基に、TurA の C 末端側 48 残基（TurA_ct)、TurB の C 末端側 45 残基（TurB_ct）を DNA 結合ドメインと予測した。N 末端側にヒスチジンタグを融合したタンパク質を大腸菌で発現させ、アフィニティー精製後、タンパク質間クロスリンク法により TurA_ct、TurB_ct ともに単量体で存在することを確認した。そこで Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct をアナライトとして、A と T が交互に繰り返される配列、A または T のみが連続した配列、G と C が交互に繰り返される配列を持つ二本鎖 DNA をリガンドとして、表面プラズモン共鳴法による解析を行った。その結果、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct のいずれも全ての二本鎖 DNA に結合したものの、どの組み合わせでも箱形のセンサーグラムが得られたこと、$K_D$ 値が $10^{-4}$ M 程度と見積もられたことから、Pmr_ct, TurA_ct, TurB_ct と DNA との結合親和性は弱く、迅速に結合・解離を行うことが明らかとなった。現在、塩基配列と結合親和性との関係を調べるために実験系の改善を行っている。

nucleoid-associated proteins, H-NS family proteins, Pseudomonas

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F105
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

PCB 分解菌 *Alcarigenes denitrificans* A41 株がもつ *bph* 遺伝子群の転写制御の分子機構の解明
Unraveling of molecular mechanism for regulating the transcription of the *bph* gene cluster in a PCB-degrading bacterium *Alcaligenes denitrificans* strain A41

○谷川 洋祐、前田 理久 (明治大農)
○Yosuke Tanikawa, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

*Alcarigenes denitrificans* A41 株は、PCB/ビフェニル分解遺伝子群（*bph* 遺伝子群）を染色体中のゲノミックアイランド上に保持する。*bph* 遺伝子群は最上流に存在するプロモーターから一つの転写単位で転写され、その発現は、ゲノム上離れた場所にある二成分制御系によって活性化され、*bph* 遺伝子群のプロモーター上流にコードされている BphS によって抑制されている。二成分制御系を構成するレスポンスレギュレーター(RR)およびヒスチジンキナーゼ(HK)のうち、どちらか一方の遺伝子でも破壊されると *bph* 遺伝子群は発現しない。意外なことに、HK 破壊株に RR を相補した場合でもビフェニル資化能が復帰した。また、これまでの研究で *bphS* 遺伝子を破壊すると *bph* 遺伝子群の発現は構成的になるが、転写活性が野生株よりも低下するということが示唆されている。今回、*bph* 遺伝子群の発現制御における RR のリン酸化を含めた制御様式および BphS 制御様式を解析したので報告する。

二成分制御系の RR に点変異を加えてリン酸化部位であるアミノ酸残基を変更した RR を含むプラスミドを構築した。このプラスミドを RR 破壊株に導入したところ、ビフェニル資化能は復帰しなかった。また、ウェスタンブロット法により *bph* 遺伝子群にコードされているタンパク質(Bph タンパク質)の発現を解析した結果、点変異を加えた RR を相補した株において RR は十分に発現しているにも関わらず Bph タンパク質は発現していなかった。

野生株と *bphS* 破壊株, 二成分制御系破壊株を、ビフェニル添加および無添加の基本培地(1/3LB 培地)で培養後、ウェスタンブロット法によって Bph タンパク質の発現量を解析した。野生株での発現量は、ビフェニルの添加により有意に増大した。二成分制御系破壊株での発現は、ビフェニルの有無にかかわらず全く見られなかった。*bphS* 破壊株での発現量は、ビフェニル無添加では野生株より高くなったが、ビフェニル添加時では野生株よりも低下した。

以上の結果から、*bph* 遺伝子群の発現には RR のリン酸化が必要不可欠であるが、このリン酸化は必ずしもパートナーの HK によるものとは限らないことが示唆された。また、BphS はこれまでにリプレッサーとしてはたらくことは実証されているが、さらにビフェニル存在下では活性化にも関与することが示唆された。

transcriptional regulator, two-component system, biphenyl

発表番号：3F106
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# シアノバクテリア由来 RNA polymerase の枯草菌での発現とその解析
# Reconstruction and analysis of cyanobacterial RNA polymerase in *Bacillus subtilis*.

○高橋 宏輝[1]、白川 文教[1]、渡辺 智[2]、朝山 宗彦[4]、今村 壮輔[5]、兼崎 友[3]、吉川 博文[2,3]、朝井 計[1]([1]埼玉大理工、[2]東京農大応生科バイオ、[3]東京農大ゲノム解析セ、[4]茨城大農、[5]東工大資源化学研)
○Hiroki TAKAHASHI[1], Fuminori SHIRAKAWA[1], Satoru WATANABE[2], Munehiko ASAYAMA[4], Sousuke IMAMURA[5], Yu KANESAKI[3], Hirofumi YOSHIKAWA[2,3], Kei ASAI[1] ([1]Saitama Univ., [2]Tokyo Univ. of Agriculture, [3]Tokyo Univ. of Agriculture Genome Research Center, [4]Ibaraki Univ., [5]Tokyo Inst. of Technology)

ある生物のゲノム DNA に異なる種の DNA が侵入して新たに組み込まれたり、一部が置換されたりすることがある。これは DNA の水平伝播と呼ばれ、今日存在している生物のゲノムは、様々な生物種の DNA・遺伝子が取り込まれ、モザイク状になっており、生物進化の原動力の一つと考えられている。現在、我々が頻繁に行っている遺伝子を欠損させたり、導入したりする遺伝子操作も人為的な水平伝播と考えられる。一方、少数の遺伝子を導入するだけでなく、一つの生物の全ゲノム DNA をも染色体上に導入するいわば、メガクローニング法が、枯草菌を宿主として慶応大学の板谷教授らによって開発され、グラム陽性の原核非光合成微生物である枯草菌 168 株に、進化的にかけ離れた、グラム陰性の原核光合成微生物であるシアノバクテリア PCC6803 の全ゲノムが組み込まれたシアノバチルスが構築された(Itaya et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102:15971-15976) 。本研究はシアノバチルスを用いて、DNA の水平伝播によるゲノム進化の過程を解析し、合成生物学的手法による効率的な有用遺伝子の蓄積と異種発現を目的としている。

遺伝子の転写を担っている酵素が RNA polymerase(RNAP)である。バクテリアが持つ RNAP コア酵素はα, β, β’(*rpoA*, *rpoB*, *rpoC* にコードされる)の 3 つのサブユニットから構成され、コア酵素にσ因子(*rpoD* にコードされる) が結合することで転写を開始する。シアノバチルスは生育可能であるが、シアノバクテリアゲノム由来の遺伝子がほとんど転写されておらず、シアノバクテリア由来の RNAP が機能していないことが示唆された。 そこでまず枯草菌内でシアノバクテリアのσ因子または、RNAP 全体を発現させることを目指した。

まず、枯草菌ゲノムにシアノバクテリア由来の RNAP 遺伝子群を周辺のリボソームタンパク質遺伝子とのオペロン構造を維持しつつ導入した。次に RNAP 遺伝子群の SD 配列を最適化し、導入した。また、宿主である枯草菌のσ因子がシアノバクテリア由来の RNAP 発現の妨げとなっている可能性を考え、枯草菌のシグマ因子の数を最少化した。これらのコンストラクトを組み合わせて導入し、シアノバクテリア RNAP 各サブユニットに対する抗体を用いたウェスタンブロットや、RT-qPCR などにより、発現解析を行った。種々の株ではシアノバクテリア RNAP の発現が見られ、増殖阻害も観察された。現在シアノバクテリア RNAP がどのような複合体を形成しているか、RNAP を精製し解析している。

RNA polymerase, Expression of heterologous proteins, *Cyanobacillus*

発表責任者：高橋宏輝（s15mb113@mail.saitama-u.ac.jp）

発表番号：3F107
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# PCB 分解菌 Alcaligenes denitrificans A41 株における bph 遺伝子群のリボヌクレアーゼ E による転写後制御

# Posttranscriptional control of bph genes by ribonuclease E in a PCB-degrading bacterium, Alcaligenes denitrificans A41

○久保 理那子、前田 理久 (明治大学)
○RINAKO KUBO, MICHIHISA MAEDA (Meiji Univ.)

リボヌクレアーゼ E (RNase E)は大腸菌の必須遺伝子である rne 遺伝子にコードされ、グラム陰性細菌において mRNA の分解の引き金として mRNA を切断するエンド型リボヌクレアーゼである。また、C 末端側は RNA 分解に適したタンパク質複合体の形成に必要な足場領域となっており、全体でデグラドソームと呼ばれる。 われわれは、PCB/ビフェニル分解・資化能をもつ Alcaligenes denitrificans A41 株の PCB/ビフェニル分解遺伝子群(bph 遺伝子群)の転写後調節について研究してきた。bph 遺伝子群は 10 個の構造遺伝子と２つの機能未知な ORF で構成され、最上流に存在する単一プロモーターによって転写されるオペロン構造をとる。これまでに、この転写物が転写後に少なくとも 2 カ所以上で切断を受けて複数のセグメントに分断されるが、各セグメントの安定性が異なるため、タンパク質発現量が変化していることが明らかにされた。これらの結果は全てインビボでの遺伝学的な解析によって得られたものであるため、RNase E の A41 株内での存在形態、切断の構造特異性などは不明のままである。そこで、RNase E による RNA 分子加工による転写後調節の分子機構を生化学的に実証するためにインビトロでのプロセシング実験を行った。

A41 株由来の RNase E を大量に得るために、ヒスチジンタグを付加した RNase E を大腸菌を用いて発現させ精製した。RNase E は双方の菌である程度の機能的相補性があるために大量というわけにはいかなかった。精製はデグラドソームの形で行い、得られたデグラドソームのインビトロでの活性を確認するために、5S rRNA の成熟化の確認を行った。5S rRNA 領域が十分含まれる DNA 断片を T7 プロモーター下に組み込み、インビトロ転写を行って得られた転写物との反応産物を解析したところ、RNase E 活性を有することが確認された。そこで、まず第 1 切断点(ORF の一つの中にある)を含む周辺領域を基質としてインビトロプロセシング実験を行ったところ、特異的切断が確認出来たが切断点の 5’側領域に相当するバンドが検出できなかった。これは、切断後 5’側領域がデグラドソームにより特異的かつ速やかに分解されたと考えられ、第 1 切断による上流領域の不安定化が 5’側領域の特異的分解によって引き起こされていることが示唆された。また、デグラドソームの構成成分の解析も進めている。

RNase E, degradosome, posttranscriptional control

発表番号：3F108
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Specificity of antibodies for three MvaT homologs encoded on plasmid pCAR1 and chromosome of *Pseudomonas putida* KT2440

○Zongping SUN[1,2], Delyana VASILEVA[1], Kohei KAWAZUMA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Feng LUO[2], Yasuo IGARASHI[2], Hideaki NOJIRI[1,2] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Southwest Univ.)

**[Background]** H-NS family proteins, which constitute one group of nucleoid-associated proteins, act as global regulators of transcription and play a key role in DNA compaction. MvaT homologs are one of the H-NS family proteins and every *Pseudomonas* has at least one MvaT homolog. In our former study, we studied on the function of MvaT homologs encoded on carbazole-degradative plasmid pCAR1 (Pmr) and chromosome of *Pseudomonas putida* KT2440 (TurA and TurB); these proteins can interact with each other and function cooperatively in pCAR1-harboring *P. putida* KT2440 cells. Considering that the amount of nucleoid-associated proteins can change depending on the growth phase, it is possible that the composition of Pmr, TurA, and TurB are different between log and stationary phase. Thus, to understand the function of each protein in living cells, it is necessary to quantify these proteins in pCAR1-free and -harboring *P. putida* KT2440 cells. In this study, we designed specific antibodies for the three proteins, and evaluated their specificity using Western blotting. **[Results and Discussion]** Although the amino acid sequences of Pmr, TurA, and TurB have 50~60% identity in full length, the linker region which connect dimerization/oligomerization and DNA-binding domains showed less homology (less than 10% identity). We synthesized peptides according to the linker region using residues 61-78 for Pmr, 61-77 for TurA, and 61-75 for TurB. The primary antibodies were produced using these peptides with rabbit. Specificity of these antibodies was evaluated by Western blotting using purified Pmr, TurA, and TurB, which were heterologously expressed in *E. coli* cells. When either of 10, 100, or 1,000 ng of Pmr, TurA, and TurB were used for Western blotting, only 1,000 ng own protein could be detected; No cross-reactivity was observed, and the optimum dilution of the antibodies were 500, 5,000, and 100-times dilution for anti-Pmr, anti-TurA, and anti-TurB antibodies, respectively. Now we are trying to measure the concentration of Pmr, TurA, and TurB in pCAR1-free and -harboring *P. putida* KT2440 in log and stationary phase.

*Pseudomonas*, H-NS family proteins, nucleoid-associated proteins

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F109
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

H-NS ファミリータンパク質における二量体／多量体形成機構の多様性
Dimerization and oligomerization mechanisms of H-NS family proteins

○水口 千穂[1]、川妻 孝平[1]、松澤 淳[1]、ヴァシレヴァ デリアナ[1]、藤本 瑞[2]、寺田 透[3,4]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1,4] ([1]東大・生物工学セ、[2]農生資研、[3]東大院農生科・応生工、[4]東大院農生科・アグリバイオ)
○Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kohei KAWAZUMA[1], Jun MATSUZAWA[1], Delyana VASILEVA[1], Zui FUJIMOTO[2], Tohru TERADA[3,4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1,4] ([1]BRC, The Univ. of Tokyo, [2]NIAS, [3]Dept. Biotechnol., Grad. of Agric. and Life Sciences, The Univ. of Tokyo, [4]Agricultural Bioinformatics Research Unit, Grad. of Agric. and Life Sciences, The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】細菌の核様体タンパク質は、DNA の構造を変化させることにより数百もの遺伝子の転写制御を行う。その一種である H-NS ファミリータンパク質は、N 末端側に二量体／多量体化ドメインを、C 末端側に DNA 結合ドメインを有し、AT 含量の高い DNA（主に外来遺伝子領域）上で多量体化することで当該領域の転写を抑制する機能を持つ。*Pseudomonas* 属細菌に広く保存される MvaT ホモログは、大腸菌の *hns* 破壊株の表現型を相補できることから H-NS ファミリータンパク質に含まれる。しかし、腸内細菌の H-NS と MvaT ホモログのアミノ酸配列の保存性は極めて低く、両者間で機能発現のメカニズムが共通しているかは不明であった。本研究では、土壌細菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株の MvaT ホモログ TurB の結晶構造解析を行い、MvaT ホモログと腸内細菌の H-NS の二量体／多量体形成機構を比較することを目的とした。
【方法】過去の研究では、*Pseudomonas* 属細菌を宿主とするプラスミド pCAR1 にコードされる MvaT ホモログについて、22 種類のアラニン置換体を作製しホモ多量体形成能を評価した (Suzuki *et al.*, 2014, *PLOS ONE*, 9: e105656)。その際ホモ多量体形成能が低下した 7 種類のアラニン置換を TurB の二量体／多量体化ドメインである TurB_nt$_{61}$ に導入したところ、3 つの置換体で多量体形成能が低下した。このうち TurB_nt$_{61}$-R8A は二量体で安定に存在したため、当該タンパク質を用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。BIS-TRIS propane (pH7.0-7.1) をバッファーとして、酢酸アンモニウムを沈殿剤として用いた際に良質な結晶が得られたため、セレノメチオニン置換体結晶を用いた単波長異常分散法で決定した位相により、分解能 2.3 Å で TurB_nt$_{61}$-R8A の結晶構造を決定した。
【結果・考察】TurB_nt$_{61}$-R8A は C 末端側（32-58 番目の残基）で二量体を形成しており、この領域 (central dimerization site) の構造は H-NS の当該領域 (Arold *et al.*, 2010, *PNAS*, 107: 15728-32) とよく似ていた。Central dimerization site を削った TurB 派生体も二量体を安定に形成したため、TurB_nt$_{61}$ は H-NS と同様に N 末端側にも二量体化部位 (terminal dimerization site) を持つことが示唆された。TurB の terminal dimerization site は一本のヘリックスから成り、coiled coil 構造をとると予想されたが、H-NS の当該領域は計三本のヘリックスから成り、central dimerization site と同様に疎水性相互作用で安定化していた。以上より、TurB の central dimerization site は H-NS と同様の機構で二量体化しているものの、terminal dimerization site の二量体形成様式は H-NS とは異なっており、H-NS と MvaT ホモログでは二量体が二量体化する（すなわち多量体化する）メカニズムが異なることが明らかとなった。

nucleoid-associated proteins, H-NS family proteins, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻 秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F110
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Rhodococcus jostii* RHA1 における安息香酸分解遺伝子群の転写制御

# Transcriptional regulation of benzoate degradation genes in *Rhodococcus jostii* RHA1

○宮内 啓介[1]、伊藤 拓[3]、斎藤 聖太[1]、鈴木 吉寛[1]、石川 諒[1]、東海林 和馬[1]、荒木 直人[2]、福田 雅夫[2]、遠藤 銀朗[1]([1]東北学院大工、[2]長岡技大工、[3]東北学院大工総研)
○Keisuke MIYAUCHI[1], Taku ITO[3], Shota SAITO[1], Yoshihiro SUZUKI[1], Ryo ISHIKAWA[1], Kazuma SHOJI[1], Naoto ARAKI[2], Masao FUKUDA[2], Ginro ENDO[1] ([1]Tohoku Gakuin Univ., [2]Nagaoka Univ. Tech., [3]Tohoku Gakuin Univ. Res. Inst. Eng.)

＜研究背景＞ポリ塩化ビフェニル（PCB）分解菌である *Rhodococcus jostii* RHA1（以下 RHA1 株）は PCB の基本骨格であるビフェニルを単一炭素源として生育することができる。ビフェニルは BphA、BphB、BphC、BphD の４種類の酵素で安息香酸（benzoate）にまで分解され、その後 benzoate dioxygenase 遺伝子（*benABC*）を始めとする安息香酸分解遺伝子群（*benABCDK*）にコードされる酵素群によってカテコールに変換される。カテコールは catechol 1,2-dioxygenase によってオルソ開裂を受け、最終的には TCA 回路に合流する。*bphA* から *bphD* までの遺伝子群の転写は二成分制御系である BphS（センサーキナーゼ）および BphT（レスポンスレギュレーター）によって制御されており、その誘導物質はビフェニルを始めとする複数の芳香族化合物であることが明らかとなっているが、下流の分解遺伝子群である *ben* 遺伝子群に関してはその転写制御の詳細は不明である。そこで、*ben* 遺伝子群の転写制御に関与する転写制御因子の同定をおこなうことを今回の研究の目的とした。
＜方法＞レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子（*luxAB*）を用い、その上流に *benA* の上流領域を挿入したレポータープラスミドを構築した。これを RHA1 株に導入し、安息香酸存在下での *benA* の転写量を観察した。RHA1 株の各種遺伝子破壊株の作製は、相同組換えを用いた方法（R. van der Geize ら、Appl Environ Microbiol. 66, 2029-2036）で行った。
＜結果と考察＞*benA* 上流領域を組み込んだレポーター遺伝子を導入した RHA1 株は、安息香酸存在下で高い転写誘導性を示した。また、安息香酸分解遺伝子 *benA* を破壊し安息香酸で生育不能な *benA* 破壊株に同じプラスミドを導入しても転写誘導能は失われなかったことから、*ben* 遺伝子群の転写は安息香酸によって誘導されることが強く示唆された。*benABCDK* 遺伝子群の上流には *ben* 遺伝子群と同じ向きに cytochrome P450 および reductase 遺伝子が存在しており、そのさらに上流に AraC / XylS ファミリーに属する転写制御因子をコードする遺伝子（*benR* と命名されている）が *ben* 遺伝子群と逆向きに存在する。*benR* の破壊株を作製し、*benA* レポータープラスミドを導入したところ、安息香酸による転写誘導は失われなかった。このことから *ben* 遺伝子群の転写制御は(i) *benR* 遺伝子以外の遺伝子産物が行っている、あるいは(ii) *benR* および *benR* と同じ機能をもつ別の遺伝子産物が同時に行っている可能性が強く示唆された。

Rhodococcus, PCB, transcriptional regulation

発表責任者：宮内啓介（kmiya@mail.tohoku-gakuin.ac.jp）

発表番号：3F111
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

小分子 RNA・ChiX による *chiR* 発現抑制とその解除
Derepression of the small RNA ChiX mediated *chiR* repression

○鈴木 一史[1,2]、南 晴香[1]、山岸 拓矢[2]、小川 知佐奈[1]、佐々木 直美[1]、杉本 華幸[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新潟大院・自然科学、[2]新潟大・農・応生化）
○Kazushi SUZUKI[1,2], Haruka MINAMI[1], Takuya YAMAGISHI[2], Chisana OGAWA[1], Naomi SASAKI[1], Hayuki SUGIMOTO[1,2], Takeshi WATANABE[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., Facul. Agric., Niigata Univ.)

不溶性多糖キチンの分解能に優れた細菌として知られている *Serratia marcescens* は、プロセッシブ型キチナーゼ（ChiA 及び ChiB）、エンド型キチナーゼ（ChiC）、キチン鎖を切断して酸化末端を生じるキチン結合タンパク質 CBP21 を生産し、これらキチン分解酵素の相乗効果によって効率的にキチンを分解し利用している。*S. marcescens* 2170 におけるキチン分解酵素群（３種のキチナーゼ及び CBP21）の発現には、転写調節因子 ChiR が必須であり、さらに、キチナーゼによるキチン分解産物である$(GlcNAc)_2$の取り込みに関する PTS が必須である。$(GlcNAc)_2$はキトポリン（ChiP）を経由してペリプラズムに取り込まれ、一部は $(GlcNAc)_2$の PTS を経由して細胞内に、その他は $(GlcNAc)_2$分解酵素（キトビアーゼ）によって GlcNAc にまで分解されて細胞内に取り込まれる。これら ChiP とキトビアーゼをコードする *chiPQ-ctb* オペロンは $(GlcNAc)_2$存在下で大量に発現し、また、この条件下でキチン分解酵素群が発現する。我々は、キチン分解産物の取り込みに関する遺伝子とキチン分解酵素群の発現を同調させる重要な役割を担っているのが小分子 RNA・ChiX であることを見出した。

ChiX は２つのステムループ構造とターミネーターを含む 88 塩基からなる小分子 RNA であり、その一本鎖領域は *chiP* 及び *chiR* mRNA の SD 配列を含む領域と塩基対形成すると考えられた。また、*chiP* の塩基対形成領域は *chiR* よりも長く、ChiX のターミネーター領域まで及んでいると考えられた。そこで、ChiX が塩基対形成によって *chiP* 及び *chiR* の発現を抑制していることを確認するため、ChiX に塩基置換や削除を行った変異 ChiX を発現させてその影響を調べた。その結果、SD 配列との相補配列中の１塩基置換によって ChiX は機能を失ったことから、ChiX は塩基対形成により *chiP* 及び *chiR* の発現を抑制していることがわかった。 *chiR* はキチン分解酵素非誘導の条件下でも転写されているが、ChiX によって翻訳が抑制される。この抑制は、$(GlcNAc)_2$の存在下で生じる *chiP* の発現によって解除される。*chiP* 5′UTR をプラスミド上で発現させた場合、キチン分解酵素非誘導の条件下でもキチン分解酵素群が発現したことから、発現した *chiP* 5′UTR と ChiX が塩基対形成することで *chiR* 発現抑制が解除されると考えられた。現在、*chiP* 5′UTR 及び *chiR* 5′UTR と ChiX の関係性について解析を進めている。また、キトビアーゼ遺伝子（*ctb*）は *chiPQ-ctb* オペロンの最下流に位置しているが、ChiX によって抑制される。ChiX 発現下でも *chiP* 5′UTR は存在しているのに対し、*ctb* 付近の mRNA 量は低下していた。よって、*ctb* の発現は *chiP* 5′UTR に ChiX が結合することによる mRNA の不安定化、もしくは転写終結が関与していると考えられた。

small RNA, *Serratia marcescens*, chitinase

発表責任者：鈴木一史（ksuzuki@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：3F112
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* における胞子嚢形成の制御遺伝子 AMIS_76070 の機能解析
# Functional Analysis of AMIS_76070 that regulates sporangium formation in *Actinoplanes missouriensis*

○安久都 卓哉[1]、平田 愛子[2]、手塚 武揚[1]、大西 康夫[1]([1]東大院農生科・応生工、[2]東大院新領域・先端生命)
○Takuya AKUTSU[1], Aiko HIRATA[2], Takeaki TEZUKA[1], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Graduate School of Agricultural and Life Sciences, Univ. Tokyo, [2]Graduate School of Frontier Sciences, Univ. Tokyo)

【背景・目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸生長による栄養増殖を行うが、栄養飢餓状態におかれると、基底菌糸から胞子嚢柄を伸ばし、その先に多数の遊走子を内部に含む胞子嚢を形成する。いくつかの細菌では環境シグナルのセンサータンパク質である histidine kinase（HK）から、遺伝子発現の制御因子である response regulator（RR）へのリン酸基の転移によって栄養細胞から休眠形態への移行が開始されることが知られている。*A. missouriensis* の RR をコードする遺伝子の 1 つに AMIS_76070 がある。以前に我々の研究グループで行った RNA-Seq 解析において、AMIS_76070 は培養 1 日目の菌糸生育期と比べ培養 3 日目の胞子嚢形成期に、転写量が約 100 倍と飛躍的に増加することが明らかになっており、胞子嚢形成に関与する可能性が示唆されていた。AMIS_76070 のコードする RR は他の多くのものと異なり、effector domain と呼ばれる DNA 結合ドメインがない。このような RR の例として、枯草菌の胞子形成の制御因子である SpoOF、大腸菌などの走化性制御因子である CheY が挙げられる。前者はリン酸基をさらに別のタンパク質に転移させる機能を、後者はリン酸化により活性化してべん毛モーターの構成タンパク質に結合する機能をもつ。一方で、放線菌では effector domain を欠く RR による形態分化の制御系の報告がない。この AMIS_76070 のコードする RR が、胞子嚢形成に果たす機能を解明することが、本研究の目的である。
【結果】AMIS_76070 遺伝子破壊株を in-frame deletion によって作製した。この遺伝子破壊株を栄養増殖培地および胞子嚢形成培地に植えて菌糸の生育と胞子嚢の形成を観察したが、野生株との違いは見られなかった。しかし胞子嚢を開裂条件におき、放出された遊走子の数を計数したところ、野生株に比べ、AMIS_76070 遺伝子破壊株では約 1/1000 まで放出される遊走子の数が減少していた。走査型電子顕微鏡で胞子嚢の形態を詳しく観察したところ、野生株に比べて胞子嚢柄の伸長、複数の胞子嚢が連なったような構造など、さまざまな形態の異常が起こっていた。一方、透過型電子顕微鏡で胞子嚢の内部構造を観察したところ、内部の遊走子の形成は野生株との間に大きな違いは見られなかった。また、遺伝子破壊株に野生型 AMIS_76070 をベクターで導入すると、野生株とほぼ同数まで放出される遊走子数が相補されたが、アミノ酸配列における 72 番目の Asp を Asn に変異させた変異型遺伝子を導入した株では表現型が相補されず、この Asp 残基のリン酸化がタンパク質の機能に重要であることが示唆された。今回の結果より、*A. missouriensis* の胞子嚢形成が、未知の HK から AMIS_76070 のコードする RR へのリン酸基の転移で制御されていることが示唆された。

*Actinoplanes missouriensis*, response regulator, sporulation

発表責任者：安久都 卓哉（akutsu.takuya@gmail.com）

発表番号：3F113
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌 *Streptomyces griseus* の液体培養での対数増殖に重要なシグマ因子 SGR6823

# Analysis of an RNA polymerase sigma factor (SGR6823) required for normal exponential growth in liquid culture in *Streptomyces griseus*

○石川 佳世子、手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Kayoko ISHIKAWA, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】*Streptomyces* 属放線菌のゲノム上には非常に多くのシグマ因子をコードする遺伝子が存在しており、これまでに全ゲノム配列が決定された細菌の中では最も多くのシグマ因子遺伝子を有する菌群である。これは、放線菌が周囲の環境の変化に応答して、さまざまな遺伝子の転写を厳密に制御していることの表れであると考えられる。*S. griseus* のゲノム上には、52 のシグマ因子をコードする遺伝子が存在する。過去に行った RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析の結果から、栄養豊富な固体培地と液体培地でともに高発現している *S. griseus* のシグマ因子遺伝子として 10 の遺伝子を見出した。このうち主要シグマ因子をコードする *hrdB*、気中菌糸形成に必須の *adsA*、酸化ストレス応答に関与する *sigR* を除く 7 つの遺伝子はこれまでに解析がなされていなかったため、これらのシグマ因子の役割を明らかにすることを目的として、遺伝子破壊株の作製と表現型の観察を行った。
【結果】7 つのシグマ因子遺伝子をそれぞれ in-frame deletion で破壊し、破壊株の表現型を観察したところ、3 つの遺伝子破壊株が野生株と異なる表現型を示した。野生株と比較して、SGR2378 と SGR6823 の遺伝子破壊株は液体培養時に定常期の菌体量が減少していた。また、野生株を最少培地で固体培養すると気中菌糸を形成するものの、培養を継続するとこの気中菌糸の伸長が抑制され、一部は消失するが、*SGR4466* 破壊株では培養を継続しても気中菌糸が維持されていた。野生株との表現型の違いが特に顕著であった *SGR6823* 破壊株についてさらに詳しく観察を行った。*SGR6823* 破壊株は、対数増殖期の初期までは野生株と同様の増殖を示したが、すぐに菌体量の増加が停止し、その後菌体量がほぼ一定の定常期が続くという表現型を示した。定常期の *SGR6823* 破壊株の細胞を培地に懸濁して静置すると野生株と比較して非常に早く沈降することから、菌糸塊の細胞密度が増大していることが示唆された。液体培地で培養した菌糸を光学顕微鏡で観察したところ、野生株では菌糸塊から外側に向かって放射状に菌糸が伸びている様子が観察されたが、*SGR6823* 破壊株では菌糸塊の周囲に伸びる菌糸が非常に短く、菌糸の伸長が阻害されている様子が観察された。そこで、液体培養した菌糸の LIVE/DEAD 染色を行ったところ、*SGR6823* 破壊株の培養液中には、ほぼ死菌で構成される菌糸塊が観察されたが、野生株ではそのような菌糸塊は観察されなかった。これらの結果から、*SGR6823* 破壊株は液体培養において、野生株と比較して菌糸密度が高い、凝集した菌糸の塊を形成しており、そのために菌糸生長が阻害されて増殖が停止していることが示唆された。

*Streptomyces griseus*, sigma factor, exponential growth

発表番号：3F114
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

麹菌染色体の任意領域の大規模多コピー重複株の作製と表現型の解析
Construction and phenotypic analysis of targeted multiple chromosomal duplication strain in *Aspergillus oryzae*

○高橋 理 (野田産業科学研究所)
○Tadashi TAKAHASHI (Noda Institute for Scientific Research)

麹菌の全ゲノム配列が明らかとなり、遺伝子工学的な技術の進展により、ゲノム育種が可能な時代となった。これまでに、麹菌において個々の遺伝子の強制発現や破壊による解析が主に行われてきたが、依然として機能未知遺伝子が多数存在する。そこで本研究では麹菌を用いて染色体上の任意の領域の重複株を作製し、表現型に与える影響を解析するとともに、大規模な染色体の重複による麹菌の育種あるいは機能未知遺伝子の機能解明を試みている。これまでの研究により、麹菌において染色体上の任意の領域をタンデムに重複させる技術を確立した (1)。タンデム重複は比較的簡単に取得できるが、これ以上にコピー数を増やすことは技術的に困難であり、また、染色体末端においては適用が困難であった。そこで染色体末端を含む任意の領域を他の染色体へ転座させて重複させること（重複転座）を試み、成功した（2)。具体的には、プロトプラスト化した菌体に対し、制限酵素を外部から取り込ませることにより、染色体上の狙った領域において大規模な重複を引き起こすことにより、2 番染色体上の約 1.4Mb の領域が 4 番染色体の末端領域に重複転座した株を得ている。本研究ではさらに 2 番染色体の領域を 4 番染色体以外の染色体末端に重複させた株の作製を行うとともに、重複領域をさらに別の染色体へと転座させて重複領域を 3 コピー化した株を作製した。これらの株の表現型を比較したところ、2 コピーの重複株ではいずれの株においても固体培養におけるプロテアーゼ活性、アミラーゼ活性の上昇が見られ、各株の間で大きな表現型の違いはなかったが、3 コピーの重複株では、生育は遅くなるものの、固体培養におけるプロテアーゼ活性あるいはアミラーゼ活性は 2 コピーの重複株に比較して、さらに上昇していた。また、これらの株において *prtT* を強制発現したところ、さらなるプロテアーゼ活性の上昇が観察された。またマイクロアレイを用いた発現解析により、染色体の重複領域に位置する多数の遺伝子群の発現上昇が観察された。さらにコピー数を増加させることにより、発現上昇が大きく増加した遺伝子の比率が上昇することも確認された。

1) Takahashi *et al.* (2014) *Appl. Environ. Microbiol.* 80:4547-58.
2) 「麹菌 *Aspergillus oryzae* における染色体の任意領域の重複転座およびタンデム重複の作製と分子育種」第 36 回日本分子生物学会年会（2013 年 12 月）

chromosome, duplication, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：高橋　理（ttakahashi@mail.kikkoman.co.jp）

発表番号：3F115
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# RNA-Seq を用いた冬虫夏草（Cordyceps militaris）の感染過程における網羅的解析

# Comprehensive analysis on the infection process of the fungus *Cordyceps militaris* using RNA-Seq.

○鈴木 智大[1]、道羅 英夫[2]、崔 宰熏[3]、加藤 竜也[2,3]、朴 龍洙[2,3,4]、三家本 利之[5]、佐伯 潤[5]、平井 浩文[2,3]、河岸 洋和[2,3,4]（[1]宇都宮大・バイオ、[2]静大・グリーン研、[3]静大農・応生化、[4]静大院・創造、[5]にちはら総研）

○Tomohiro SUZUKI[1], Hideo DOHRA[2], Jae-Hoon CHOI[3], Tatsuya KATO[2,3], Enoch Y. PARK[2,3,4], Toshiyuki MIKAMOTO[5], Jun-David SAEKI[5], Hirofumi HIRAI[2,3], Hirokazu KAWAGISHI[2,3,4] ([1]Utsunomiya Univ. C-Bio, [2]Green Science and Technology, Shizuoka Univ., [3]Faculty of Agriculture, Shizuoka Univ., [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka Univ., [5]Nichihara R&D Lab Inc.)

【目的】

冬虫夏草は昆虫などから生じるキノコの総称で、節足動物の病原体として世界的に約 400 種以上が確認されている。冬虫夏草 *Cordyceps militaris*（サナギタケ）は鱗翅目昆虫の蛹の病原体で、北半球の大部分で発生する[1)]。しかし、感染から寄生そして子実体形成における詳細なメカニズムは未だ不明であり、これらを解明することはこの種の菌の生産及び栽培にも有用な情報となることが期待される。

そこで本研究ではサナギタケの感染から子実体形成に至る分子機構の解明を目的として、サナギタケ菌体をカイコ（*Bombyx mori*）の蛹に接種した後の遺伝子発現を次世代シーケンサーを用いて解析した。

【方法及び結果】

1)ポテトデキストロース液体培地で培養した菌糸体、2)カイコ蛹をホモジナイズして作成した培地に分生子を接種した検体および 3)生きたカイコ蛹に分生子を接種した検体（10 日間培養 : 感染初期過程）から RNA を抽出し、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いたシーケンスを行った。シーケンスで得られた read は Trinity を用いてアセンブルした。次いでアセンブルによって得られた Contig を用い、各検体から得られた read を Bowtie によりマッピングし、RSEM を用いた FPKM 値の算出および edgeR を用いた発現差解析を行った。また、Swiss-Prot、Pfam をデータベースとした相同性検索も行い、アノテーションを行った。得られた発現差解析の結果から、サナギタケの光受容タンパク質の発現が大きく変動していることが明らかになったため、この光受容タンパク質の遺伝子クローニングおよびリアルタイム PCR を用いた発現定量を行った。現在白色・青色・赤色光照射下での菌糸体の変化・子実体形成能の評価などを行っている。

1) Sung, GH., et al., Studies in Mycology, 57, 5 (2007).

mushroom, *Cordyceps militaris*, RNA-Seq

発表番号：3F116
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の休眠を制御する転写制御因子 TcrA のレギュロンの網羅的同定

# Identification of direct targets of the global regulator TcrA involved in the spore dormancy in sporangium in *Actinoplanes missouriensis*

○毛利 佳弘、手塚 武揚、大西 康夫（東大院・農生科）
○Yoshihiro MOURI, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Tokyo Univ.)

【目的】希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は栄養豊富な環境下では菌糸生長し、栄養飢餓条件で基底菌糸上に胞子嚢を形成して休眠する。胞子嚢の内部には多数の遊走子が内包されており、胞子嚢が水と何らかの土壌成分を感知すると開裂し、遊走子を放出する。遊走子はべん毛運動により移動し、栄養を感知すると停止し、発芽して、再び菌糸生長を始める。これまでに我々は、べん毛遺伝子クラスターの近傍にコードされた転写制御因子 TcrA がべん毛遺伝子の転写を制御するだけでなく、ゲノム全体にわたって様々な遺伝子を制御して線毛合成や胞子嚢・胞子の休眠維持の制御にも関与することを明らかにしてきた。しかしながら、それらの転写制御が直接的なものであるか間接的なものであるかや、どのような遺伝子が胞子嚢・胞子の休眠維持に関与しているのなどについてはわかっていなかった。これらの疑問を明らかにするべく、TcrA が直接制御する遺伝子の同定を試みた。
【方法・結果】過去に行った RNA-seq 解析で、野生株と *tcrA* 破壊株を比較した結果、155 転写単位（計 267 遺伝子）の転写が *tcrA* 破壊株で有意に減少していた。これら 155 転写単位のプロモーター領域の DNA 配列を MEME アルゴリズムで解析し、共通する配列を探したところ、CTCAG-$N_{15\text{-}16}$-GCCGA からなる配列を 121 個、GCAACCG-$N_4$-GCAACCG からなる 2 回繰り返し配列を 42 個発見した。前者はべん毛遺伝子の転写単位のプロモーターの-35 領域、-10 領域に保存されている配列と一致していたことから、これらの配列を上流に持つ遺伝子の転写は、べん毛遺伝子の転写を制御する未知のシグマ因子により開始される可能性が示唆された。後者の 42 個の配列から導きだされたモチーフを FIMO アルゴリズムで解析し、このモチーフを *A. missouriensis* のゲノム全ての遺伝子間領域から探索した結果、

新たに 54 個の配列が見つかった（p-value≦$10^{-6}$）。これら 54 個の配列の下流に存在する遺伝子のうち、

過去に行った RNA-seq 解析のデータにおいて、転写量が野生株と比較して *tcrA* 破壊株で有意に減少していた遺伝子は 5 個であった。MEME と FIMO の解析により見つかった合計 47 個の配列のうち 9 個の配列については TcrA が *in vitro* で結合することが既知であったことから、残りの 38 個の配列にも TcrA が結合する可能性が示唆された。そこで競合ゲルシフトアッセイを行った結果、これら 38 個のうち 34 個の配列に TcrA が *in vitro* で結合することが確認された。このことから、GCAACCG-$N_4$-GCAACCG が TcrA の結合配列であることが支持された。これらの結果より、競合ゲルシフトアッセイで遺伝子上流領域に TcrA が結合し、かつ RNA-seq 解析で野生株と比較して *tcrA* 破壊株で転写量が有意に減少していた遺伝子を TcrA レギュロンとすると、計 43 転写単位（52 遺伝子）が該当した。

regulator, rare actinomycetes, transcriptome

発表責任者：毛利 佳弘（7662930423@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F117
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# プラスミド pCAR1 を保持した 3 宿主における転写開始点の網羅的決定と宿主間比較

# Comparative analysis of transcriptional start sites of three different *Pseudomonas* strains harboring the plasmid pCAR1

○舘 はる香[1]、水口 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、大坪 嘉行[3]、津田 雅孝[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]富県大生工科・生工セ、[3]東北大院生命科学)
○Haruka TACHI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Yoshiyuki OHTSUBO[3], Masataka TSUDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ., [3]Tohoku Univ.)

【背景と目的】プラスミドは宿主間を水平伝播し、宿主に様々な形質を付与する可動性遺伝因子である。プラスミド上の遺伝子はどの宿主でも同様に発現すると長年考えられてきたが、実際には同一プラスミド上の遺伝子であっても宿主ごとに異なる転写制御を受けることが明らかになりつつある。当研究室ではカルバゾール分解プラスミド pCAR1 をモデルとして、プラスミド保持菌の表現型やトランスクリプトームについて宿主間比較を行ってきた。過去に行われた 3 種の *Pseudomonas* 属細菌 (*P. putida* KT2440 株、*P. aeruginosa* PAO1 株、*P. fluorescens* Pf0-1 株) を宿主とするトランスクリプトーム解析では、pCAR1 上に存在する転写単位全 74 個中、17 個の転写単位が宿主ごとに異なる転写プロファイルを示した (Takahashi *et al.*, 2015, *Environ. Microbiol.*, 17: 134-155)。この原因としては、pCAR1 上の遺伝子のプロモーター領域に宿主ごとに異なる染色体由来の転写制御因子が結合している可能性や、ある遺伝子に対して複数のプロモーターが存在する場合、主に機能するプロモーターが宿主ごとに異なる可能性が考えられる。本研究では後者の可能性に焦点を当て、上記 3 株を宿主とした際の転写開始点の網羅的決定と、その宿主間比較を行った。
【方法】pCAR1 を保持した上記 3 株を対数期及び定常期に集菌し、RNA を抽出した。5′末端に 3 リン酸をもたない RNA を選択的に分解する酵素で処理することで転写開始点をもつ mRNA のみを濃縮した後、両端にアダプター配列を付加し、次世代シーケンサーにより配列を解析した（TSS-seq 法）。
【結果】上記 17 の転写単位のうち、特に宿主ごとの違いが顕著であった pCAR1 上の ORF37a（ファージのリプレッサーに相同な配列が見出されている）を含むものでは、宿主が KT2440 株の場合、翻訳開始点上流 136 bp に転写開始点が見出されたが、他 2 株においては同領域にほとんどリードがマップされなかった。これは、ORF37a で KT2440 株特異的な転写が見られたという定量 RT-PCR の結果（前年度本大会で発表）と一致していた。また、pCAR1 上の *tnpAc/C*（トランスポゼースとそのリプレッサーをコードする）を含む転写単位では、3 株共通で翻訳開始点上流 20 bp および 445 bp の 2 箇所に転写開始点の存在が確認されたが、KT2440 株では対数期において翻訳開始点上流 20 bp からの転写量が多いのに対し、PAO1 株、Pf0-1 株では翻訳開始点上流 445 bp からの転写量の方が多かった。以上の結果から、pCAR1 上の同一の遺伝子であっても、宿主ごとに主に機能するプロモーター領域が異なる場合があり、これが宿主ごとに異なる転写プロファイルを生じる原因となる可能性が示唆された。現在、3 宿主における染色体上遺伝子の転写開始点の解析も進めており、特に 3 宿主間で保存されている遺伝子についてプロモーターの使い分けの有無を調べている。

RNA-seq, plasmid, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F118
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# dRNA シーケンスによる希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* 胞子嚢の開裂過程に働く遺伝子のプロモーター領域の解析

# Identification of active promoters in the process of sporangium dehiscence in *Actinoplanes missouriensis* by dRNA-Seq analysis

○安田 理沙、手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Risa YASUDA, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (The Univ. of Tokyo)

【背景・目的】放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は菌糸生長により栄養増殖を行うが、栄養飢餓状態に置かれると内部に数百の胞子を内包した胞子嚢を形成し休眠状態に入る。外界からの特定のシグナルを感知すると休眠状態から覚醒し、胞子嚢外壁が破れて内部の胞子が放出される。本研究では細菌における休眠と覚醒についてこれまでに知られていない新規な分子メカニズムを明らかにすることを目指し、*A. missouriensis* の胞子嚢開裂機構の解明に取り組んだ。なお、これまでの解析で、胞子嚢の開裂時に転写阻害剤や翻訳阻害剤を添加すると開裂が阻害されることが分かっており、開裂時には特定の遺伝子の発現が必須であることが示唆されていた（2014 年度本大会発表）。
【方法】*A. missouriensis* 菌糸を胞子嚢形成培地に植菌し十分に生育させたのち、開裂を誘導するヒスチジン溶液で 15 分間処理した。この開裂初期段階にある胞子嚢より RNA を抽出し、これを用いて転写開始点を決定する differential RNA シーケンス（dRNA シーケンス）を行った。
【結果】dRNA シーケンスによって 4119 個の転写開始点（そのうち開始コドンの上流 300 bp 以内に存在するものは 1819 個）を決定した。プロモーター解析により-10 領域に保存されたモチーフがないか探索したところ、74 個の転写開始点（そのうち開始コドンの上流 300 bp 以内に存在するものは 48 個）についてその上流の-10 領域近傍に GCCGAW（W=T or A）という共通モチーフを持つことを見出した。このモチーフは *A. missouriensis* においてべん毛関連遺伝子を制御するシグマ因子 FliA の認識配列であった。開始コドン上流 300 bp 以内に転写開始点が存在する 48 個の遺伝子について、過去の開裂胞子嚢の RNA シーケンス解析の結果にもとづき（2015 年度本大会発表）、その転写産物の発現パターンを調べた。その結果、このうち 35 個の遺伝子の転写産物量が開裂初期段階に増加していることが分かった。このことは、これら 35 個の遺伝子の産物が開裂の初期段階に必要となる可能性を示唆している。これらの遺伝子には、他の細菌で FliA が制御することが知られているべん毛や走化性、線毛、c-di-GMP 合成・分解系に関わる遺伝子の他に、開裂時の胞子嚢外壁の分解に関わると予想される遺伝子が 2 つ、細胞壁合成に関わると予想される遺伝子が 1 つ存在した。*A. missouriensis* において、これまで FliA はべん毛クラスターに属する遺伝子のみを制御すると考えられていたが、この結果より *A. missouriensis* において FliA が幅広い機能を有する遺伝子の転写を制御していることが強く示唆された。また、本実験結果は FliA が細胞の分化に関わる遺伝子を制御している可能性を示した初めての例である。

dRNA-Seq, promoter, actinomycete

発表番号：3F119
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ClrB-ManS regulatory mechanism for mannanase gene expression in *Aspergillus nidulans*

○Nuo Li, Emi Kunitake, Kyoko Kanamaru, Makoto Kimura, Tetsuo Kobayashi (Nagoya Univ.)

*Aspergillus* species are able to degrade β–mannan by secreting endo-β-mannanase and β-mannosidase, and the enzymes have been widely used in food, feedstock, and sanitary industries. Transcriptional regulation of mannanase genes in *A. oryzae* is solely controlled by a transcription factor ManR. However, due to the presence of two ManR orthologs (ClrB and ManS), regulation of mannanase genes in *A. nidulans* is more complex. While ClrB is essential to cellulase production, ClrB and ManS both regulate mannanase production with ManS as a main transcriptional activator. Double deletion of *clrB* and *manS* abolishes mannanase production, confirming the involvement of both factors in regulation of mannanse genes. In this study, we analyzed dependency on ClrB and ManS of several mannanase genes by RT-qPCR and *in vitro* DNA binding characteristics, which revealed a complex regulatory mechanism by competition and cooperation of ClrB and ManS.

To clarify involvement of ClrB and ManS in mannanase gene regulation, effect of deletion of the *clrB* and *manS* genes on expression of several endo-β-mannanase genes, such as *manB, manC, manE, manF, man134A,* and a β-mannosidase gene *mndB* was analyzed by RT-qPCR. Expression of the genes was induced by cellobiose or mannobiose for 1.5h. The dependency on ClrB and ManS of their expression could be categorized into several types. In regulation of *manF*, ManS responded to mannobiose to activate gene expression by directly binding to the sequence $CGGN_9CCG$. While ClrB served as a repressor and competed to bind to the same region. In the case of *manE* regulation, ManS was identified as the main activator with mannobiose as an inducer, while dependency on ClrB was not detectable. Expression of *manB* was induced by both cellobiose and mannobiose. In this case, ClrB functioned as an activator in response to cellobiose and ManS worked as an activator in resoponse to mannobiose. In this type of regulation, heterodimer formation with ClrB and ManS was detected. The final type of regulation was observed for *mndB*, that is, ClrB and ManS served as an activator with cellobiose and mannobiose as an inducer, respectively. They recognized different binding sites (although all of the binding sites had $CGGN_8CCG$) in the promoter to control the gene expression. Future study will focus on the identification of the binding site for the heterodimer formed by ClrB and ManS.

This work was supported by the Science and technology research promotion program for agriculture, forestry, fisheries and food industry.

*Aspergillus nidulans*, hemicellulase, transcription

発表責任者：小林　哲夫（koba@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3F120
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Streptococcus mutans* のスクロースに応答した eDNA 放出機構の解析
Analysis of eDNA release mechanism by sucrose of *Streptococcus mutans*

○井上 紗智[1]、稲葉 知大[2]、尾花 望[1]、八幡 穣[3]、泉福 英信[4]、野村 暢彦[1]（[1]筑波大生命環境、[2]産総研環境管理、[3]Department of Civil, Environmental and Geomatic Engineering, Institute for Environmental Engineering, ETH Zurich、[4]感染研細菌第一部）
○sachi inoue[1], tomohiro inaba[2], nozomu obana[1], yutaka yawata[3], hidenobu senpuku[4], nobuhiko nomura[1] ([1]University of Tsukuba, [2]AIST, [3]ETH Zurich, [4]NIID)

85%以上の日本人がう蝕（虫歯）に罹患している。う蝕は *Streptococcus mutans* による歯表面へのバイオフィルム形成が大きな原因とされる、最も身近なバイオフィルム感染症の一つである。*S. mutans* は、砂糖の主成分であるスクロースを基質として、細胞外グルカンを合成する。このグルカンはバイオフィルムの主要構成成分であるため、スクロースはう蝕発症の重要な因子となる。また細胞外タンパク質や細胞外 DNA (eDNA) もまたバイオフィルムの重要な構成成分であり、バイオフィルムの構造や細菌の付着性に寄与するがスクロースとの関連は未解明であった。先行研究より、スクロースが *S. mutans* において eDNA の放出を誘導するとともに、eDNA の存在によりバイオフィルムの物理的強度が増強することが明らかとなった。つまりスクロースによる eDNA の放出誘導は *S. mutans* のバイオフィルム形成およびう蝕形成に重要と考えられる。しかしながら、スクロースによる eDNA 放出の誘導メカニズムの詳細はいまだ解明されていない。

*S. mutans* は糖類を基質とし乳酸発酵を行うことによって pH 低下を引き起こすことが知られる。スクロース存在下における酸耐性試験を行ったところ、非存在下と比較して酸処理後の生残率の低下がみられたことから、スクロースによる酸耐性の低下が示唆された。また培地に緩衝作用を持たせたところスクロースによる eDNA 量の増加がみられなかったことから、eDNA の放出は酸耐性の低下により引き起こされると考えられた。さらにスクロースによる酸耐性の低下及び eDNA 放出に関与する遺伝子を網羅的に解析するために RNA-seq を行った。その結果、スクロース存在下において転写量が 2 倍以上増加した遺伝子を 382 個、1/2 以下に減少した遺伝子を 85 個同定した。スクロース存在下で転写量が顕著に増加した遺伝子の中において、酸耐性に関与することが示唆されている二成分制御系遺伝子群の *ciaXHR* に着目した。*ciaXHR* 破壊株を作製し、バイオフィルム形成量および、バイオフィルム中に含まれる eDNA 量を測定した。*ciaXHR* 破壊株は WT と同様にスクロース存在下において eDNA 量が増加したにもかかわらず、バイオフィルム形成量が低下した。このことより、*ciaXHR* はスクロースによるバイオフィルム形成の増強に関与することが明らかとなった一方で、スクロースによる eDNA 放出には *ciaXHR* を介さずに制御される可能性が考えられた。つまりスクロースによる酸耐性の低下は、*ciaXHR* とは異なる機構で制御されている可能性が考えられる。以上より、スクロースは *S. mutans* の酸耐性を低下させ、細胞死を引き起こすことによって eDNA の放出が誘導されると示唆され、複数の遺伝子群が関与することが予想された。

*Streptococcus mutans*, sucrose, eDNA

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：3F121
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* におけるファージΦOH16 感染時の CRISPR/Cas の応答
# CRISPR/Cas immune response to ΦOH16 in extreme thermophile *Thermus thermophilus*

○白丸 優貴[1]、永吉 佑子[1]、田代 康介[3]、藤野 泰寛[2]、土居 克実[1] ([1]九大院・生資環、[2]九大・基幹教育、[3]九大院・シス生科)
○Yuki SHIROMARU[1], Yuko NAGAYOSHI[1], Kousuke TASHIRO[3], Yasuhiro FUJINO[2], Katsumi DOI[1] ([1]Grad. Sch. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., [2]Fac. Arts. Sci., Kyushu Univ., [3]Grad. Sch. Syst. Life Sci., Kyushu Univ.)

【背景と目的】CRISPR/Cas 系は細菌に見られる獲得免疫系として知られており、外来遺伝子の一部が切り取られ CRISPR 領域に挿入されて、CRISPR 領域が転写、プロセシングされると crRNA が生成され、crRNA と相補的な配列を持つ DNA に結合して分解される過程を経る。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 株の CRISPR/Cas 系は、好熱菌におけるモデル生物としての解析が盛んに行われており、タイプⅠ-E (Cascade 複合体) 、タイプⅢ-A (Csm 複合体) 、タイプⅢ-B (Cmr 複合体) から構成される。これまでに、*Myoviridae* 科の溶菌ファージ φYS40 を用いた転写特性解析から、CRISPR/Cas 系に関与する全遺伝子において転写量が増加し、本現象には転写活性化因子である cAMP 受容タンパク質 (CRP) が関与している[1]。本研究では、繊維状の形態を有し、ファージ粒子放出の際に溶菌を伴わない分泌型ファージ φOH16 を用いた転写特性解析を行った。これにより、ファージの生活環および DNA 複製系の違いが CRISPR/Cas 系の応答の違いを明らかにすることを目的とした。
【方法】*T. thermophilus* HB8 株に φOH16 を MOI=1 で感染させ、感染後 15 分、60 分後の菌体から全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に用いた。非感染時と比べて大きく転写量が変化した遺伝子については、qRT-PCR を用いて転写レベルの定量を行った。
【結果と考察】φOH16 感染後、転写量増加が見られた遺伝子は CRISPR/Cas 系に関与する 75 遺伝子のうち Cascade 複合体に関与する 8 遺伝子であった。また、外来遺伝子の分解に関与する Csm 複合体および Cmr 複合体に関与する遺伝子の転写量増加は見られなかった。さらに、CRP により転写調節を受ける遺伝子の大部分に転写量増加が見られたが、φOH16 感染後においてはその中でも約 35%の遺伝子の転写量増加しか検出できなかった。以上より、*T. thermophilus* HB8 における CRISPR/Cas 系には、CRP 以外の制御因子が存在する可能性が示唆された。また、溶菌性ファージと分泌性ファージに対する宿主応答には大きな差異があることが示唆された。

1: Agari, Y., *et al*. (2010), *J. Mol. Biol*. 395 : 270–281

CRISPR/Cas, filamentous phage, *Thermus thermophilus*

発表責任者：土居　克実（doi@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3F122
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イネ細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質 *p*-coumaryl alcohol の *Agrobacterium* による分解

# Degradation of *p*-coumaryl alcohol, a *vir*-gene-inducing compound secreted from rice cells, by *Agrobacterium* strains.

庄田 佐知子[1]、福満 啓博[1]、藤井 研人[1]、坂井 綾子[1]、高木 隆吉[2]、安倍 学[2]、○山本 真司[1]、鈴木 克周[1] ([1]広大院理・生物、[2]広大院理・化学)
Sachiko SHOTA[1], Akihiro FUKUMITSU[1], Kento FUJII[1], Ayako SAKAI[1], Ryukichi TAKAGI[2], Manabu ABE[2], ○Shinji YAMAMOTO[1], Katsunori SUZUKI[1] ([1]Dept. Biological Science, Grad. Sch. Science, Hiroshima Univ., [2]Dept. Chemistry, Grad. Sch. Science, Hiroshima Univ.)

多くの双子葉植物と裸子植物類は Ti プラスミドをもつ *Agrobacterium*（syn. *Rhizobium*）属細菌が感染すると根頭癌腫病を発病する。この現象はこれらの植物が産生するフェノール性の誘導物質を *Agrobacterium* が感知し、感染遺伝子（*vir*）を発現させ、T-DNA が植物細胞に輸送されることで引き起こされる。一方、単子葉植物では人為的に接種しても発病する植物は極めて限られ、シダ植物では感染例は無い。イネの胚性カルスではアセトシリンゴン（*vir* 遺伝子誘導物質）を人為的に添加すれば *Agrobacterium* によって遺伝子導入出来ることが知られているので、イネは多くの双子葉植物と同様に *Agrobacterium* から遺伝子を受けとるために必要な因子を持っているが、*vir* 遺伝子誘導物質は分泌しないと考えられている。

我々は、*A. rhizogenes* P-Ag-5 株をイネ胚性カルスと共存させると *vir* 遺伝子誘導物質を添加しなくても *vir* 遺伝子誘導が起こりイネ細胞を形質転換できることを明らかにした。従って、イネ細胞も *Agrobacterium* に *vir* 遺伝子発現を誘導する物質を合成分泌していると考えられる。我々はイネの培養細胞が分泌する *vir* 遺伝子誘導物質を精製して構造決定を行い、更に化学合成した同物質の活性測定を行うことによって、イネ細胞が合成分泌する *vir* 遺伝子誘導物質は *p*-Coumaryl alcohol (PCAL)であることを明らかにした。本研究では、P-Ag-5 株と、イネを含む多くの植物への遺伝子導入に広く利用されている *A. tumefaciens* C58 株の間でみられるイネとの応答性の差を理解するために、PCAL を分解する能力を比較分析したので報告する。PCAL を添加した培養液で P-Ag-5 株を培養すると PCAL は緩やかに減少し、分解中間体と考えられる *p*-Coumaryl aldehyde (PCAD) と *p*-Coumaric acid (PCAC)が検出された。同様に C58 を培養すると、PCAL は速やかに減少消失し PCAC が一過的に痕跡量検出された。PCAD と PCAC は *vir* 遺伝子を誘導しなかった。以上の結果から、C58 は PCAL を誘導能のない PCAC に酸化し、更に別の物質に分解する能力が高く、一方、P-Ag-5 株は PCAL を分解する能力が低い事が判った。従って、C58 株はイネが微量分泌する PCAL を速やかに分解するのに対して、P-Ag-5 株は分解能が低いので分解を免れた PCAL により *vir* 遺伝子が誘導されると推定される。現在、細胞抽出液の PCAL 脱水素酵素活性の測定、ならびに候補遺伝子を破壊した変異体菌株の性質を分析しているので合わせて報告する。

*Agrobacterium*, Rice, *p*-coumaryl alcohol

発表番号：3F123
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Shewanella oneidensis* MR-1 株における異化代謝系遺伝子の cAMP 依存的転写応答

Intracellular cAMP-dependent transcriptional regulation of carbon catabolic genes in *Shewanella oneidensis* MR-1.

○笠井 拓哉、高妻 篤史、渡邉 一哉（東薬大生命）
○Takuya KASAI, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景】Cyclic AMP (cAMP) receptor protein (CRP) は多くの細菌において保存されているグローバル転写因子であり、cAMP と複合体を形成することにより標的遺伝子の転写を活性化する。CRP の生理機能は腸内細菌において詳しく解析されており、大腸菌では糖代謝のカタボライト抑制に関与することが知られている。また、CRP の転写誘導活性は cAMP 濃度に依存し、大腸菌の細胞内 cAMP 濃度はグルコース存在下に低下することが知られている。このように、腸内細菌の CRP の生理機能やシグナル伝達経路が明らかにされてきたが、一方で異化的に糖を代謝しない環境細菌の多くも CRP を保有しており、これらの細菌における CRP の役割には不明な点が多い。そこで我々は、異化的に糖を代謝しない環境細菌 *Shewanella oneidensis* MR-1 株における CRP の生理機能とシグナル伝達経路の解明を目指して研究を行ってきた。*S. oneidensis* は多様な呼吸能を持つ通性嫌気性菌であり、今までに、CRP が嫌気呼吸系の制御に関与することが知られている。本発表では、新たに見出された細胞内 cAMP 濃度因子と、それに依存した CRP の生理機能について報告する。
【結果】MR-1 株において細胞内 cAMP 濃度調節に関与する遺伝子として、cAMP 加水分解酵素をコードすると推測された *cpdA* 遺伝子に着目した。*cpdA* の遺伝子破壊株（Δ*cpdA*）を作製し、細胞内 cAMP 濃度を測定した結果、Δ*cpdA* では野生株の約 3 倍量の cAMP が検出され、本遺伝子が MR-1 株の cAMP 分解において重要な働きをしていることが示された。また乳酸最少培地を用いた好気培養において、Δ*cpdA* は野生株と比較して著しく増殖が低下することが見出された。乳酸の消費量と代謝産物の生成量を測定した結果、Δ*cpdA* は乳酸を完全に消費せず、代謝産物として酢酸を顕著に蓄積することが明らかとなった。MR-1 株は嫌気呼吸条件下では乳酸を完全酸化せず、酢酸を主要代謝産物として蓄積することが知られている。しかしΔ*cpdA* では好気条件下においても嫌気条件下と類似した代謝パターンを示したことから、MR-1 株では cAMP/CRP 制御系が嫌気呼吸系に加えて有機酸代謝系の発現制御にも関与し、両者が協調して制御される可能性が考えられた。DNA マイクロアレイを用いてΔ*cpdA* のトランスクリプトームを解析した結果、本株では TCA サイクルに関連する遺伝子の多くが転写抑制されていることが明らかとなり、過剰な cAMP の蓄積が TCA サイクルの活性低下を引き起こすことが示唆された。今後は細胞内 cAMP 濃度と炭素異化代謝系の関係について、Δ*cpdA* を用いたメタボローム解析等により詳細な解析を行っていく予定である。

*Shewanella oneidensis* MR-1, cyclic AMP, transcriptome

発表責任者：笠井拓哉（s096051@toyaku.ac.jp）

発表番号：3F124
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌の L-アラニン排出輸送体 AlaE はロイシン応答性調節タンパク質（Lrp）により制御される
# Clarification of the transcriptional mechanisms of the *alaE* gene encoding L-alanine exporteer in *Escherichia coli*

○伊原 航平、勝部 哲、佐藤 一樹、堀 初弘、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕（東北大院農）
○Kohei IHARA, Satoshi KATSUBE, Kazuki SATO, Hatsuhiro HORI, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】当研究室では大腸菌において L-アラニン（L-Ala）に特異性を有する排出輸送体 AlaE を同定することに初めて成功した。これまでの研究で AlaE は、基質である L-Ala の排出にプロトン駆動力を利用することが明らかとなっている。L-Ala は細菌の生育にとって重要な栄養素であり、また、プロトン駆動力は様々な物質の輸送や ATP の合成に必要であることから、プロトン駆動力を消費して重要な栄養素である L-Ala を排出することは、エネルギー収支の観点から大きな損失であると考えられる。また、*alaE* 遺伝子上流域にはグローバルレギュレータであるロイシン応答性調節タンパク質（Lrp）の標的部位の存在が示唆されている。そこで本研究では、AlaE がなぜ L-Ala を細胞外に排出するのか、また、エネルギーの浪費を回避するための *alaE* 遺伝子の発現制御メカニズムを明らかにすることを目的に実験を行った。
【方法】AlaE の生理的役割を評価するため、*alaE* 遺伝子欠損株を用いて L-Ala と L-アラニル L-アラニン(Ala-Ala)に対する感受性試験を行った。また、Lrp が *alaE* 遺伝子の発現にどのような影響を与えるかを検証するため、*alaE* 遺伝子上流域とβ-ガラクトシダーゼ（β-Gal）遺伝子を融合したレポータープラスミドを構築し、野生株および *lrp* 欠損株を用いたβ-Gal レポーターアッセイを行った。さらに、Lrp と *alaE* 遺伝子上流域の相互作用を調べるためにゲルシフトアッセイを行った。また、ゲルシフトアッセイでは、Lrp のエフェクターとして知られる L-Ala と L-Leu を添加したときの影響についても調べた。
【結果】*alaE* 欠損株の生育は L-Ala と Ala-Ala の存在下で阻害されたことから、AlaE は細胞内への過剰な L-Ala の蓄積を防ぐための「安全バルブ」としての機能をもつことが示唆された。野生株において L-Ala、L-Leu あるいは Ala-Ala の添加によりβ-Gal 活性が上昇した。一方、*lrp* 欠損株ではこれらのアミノ酸およびペプチドが存在してもβ-Gal 活性の上昇は認められなかった。以上のことから、Lrp は *alaE* 遺伝子の発現を正の方向に制御することが明らかとなった。次に *alaE* 遺伝子上流域と Lrp の相互作用をゲルシフトアッセイにて評価した結果、Lrp が *alaE* 遺伝子の上流域に結合することが明らかとなった。さらに、この Lrp と *alaE* 遺伝子上流域の結合は L-Ala および L-Leu 共存下で添加したアミノ酸の濃度に依存して親和性が上昇することが明らかとなった。以上の結果より、Lrp は細胞内の L-Ala 濃度の上昇を感知し、*alaE* 遺伝子の上流域に強い親和性で結合することによって *alaE* 遺伝子の発現を制御すると考えられる。

amino acids exporter, leucine　responsive regulatory protein (Lrp), AlaE

発表番号：3F125
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌における選択的転写開始機構を有する解糖系酵素遺伝子プロモーターのシスエレメント解析

# Analyses of cis elements within promoters of glycolytic genes alternatively transcribed in *Aspergillus oryzae*

○井上 大志、田路 洋紀、高間 充、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Taishi Inoue, Hiroki Toji, Mitsuru Takama, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ.)

［**背景**］麹菌 *Aspergillus oryzae* のゲノムデータと EST データの比較から解糖系を構成する酵素の一つであるエノラーゼ遺伝子 *enoA* には 2 つの転写開始点が存在し、培養条件によってそれらを使い分けている可能性が見出された。その後の解析により、*enoA* は酢酸やエタノールなどの糖新生で代謝される炭素源ではプロモーター上流から転写開始され、グルコースやフルクトースなどの解糖系で代謝される炭素源では、上流から転写された際に 5′UTR 内のイントロンとなる配列内から転写開始されることが明らかとなった。さらに最近、他の解糖系酵素遺伝子における 5′ RACE 解析により、アルドラーゼ遺伝子 *fbaA* においても、*enoA* のように 2 つの転写開始点が炭素源の違いにより使い分けられることを明らかにした。このような、炭素源の違いに応じた解糖系酵素遺伝子の選択的転写開始機構の存在は、糸状菌において新たな知見であり、その生理的意義や詳細な分子機構に興味が持たれる。本研究ではこれらの解明に向け、*enoA* と *fbaA* の選択的転写開始機構に関与するシスエレメントの同定を目的とした。［**方法・結果**］既に *enoA* における上流からの転写には、*Aspergillus. nidulans* において糖新生の制御に重要とされる Zn(Ⅱ)Cys6 型転写因子 AcuK,AcuM のオーソログが関与することを報告している(2015 年度日本農芸化学会)。一方、*fbaA* のプロモーター上にも AcuK,AcuM の結合モチーフが存在したことから、その結合モチーフに変異を導入した *fbaA* プロモーターのレポーターアッセイを行った。その結果、酢酸培養条件において活性が有意に低下し、AcuK,AcuM が *fbaA* の上流からの転写の誘導にも関与することが示唆された。また、下流からの転写開始に関する知見としては、グルコース培養条件における *enoA* プロモーターの deletion assay により、ATG 上流-121～-224 bp 内に重要なシスエレメントが存在し、さらに全細胞抽出液を用いたゲルシフトアッセイにより-181～-195 bp の約 15 bp(region A)の重要性が示唆されている(Toda *et al.*, 2001)。一方、*A. nidulans* と *A. oryzae* それぞれのエノラーゼ遺伝子上流 1000 bp をペアワイズアライメントしたところ、region A とは異なる-137～-179 bp の約 42 bp (region B) が高度に保存されていた。グルコース培養条件において、これらの領域を欠失させたプロモーターのレポーターアッセイを行った結果、region A よりも region B を欠失したプロモーターにおいて活性が顕著に低下したことから、*enoA* の下流からの転写においては高度に保存されたこの region B がより重要であることが示唆された。今後は region B の部分塩基置換などによるさらなる詳細な解析を行う予定である。

glycolysis, gluconeogenesis, alternative transcription

発表責任者：井上大志（taishi.inoue.t3@dc.tohoku.ac.jp）

発表番号：3F126
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株の RpoE レギュロンの解析
Analysis on RpoE regulon in *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 using RNA-seq method

○佐藤 契太[1]、石川 森夫[1]、原田 佳子[1]、勝間田 憲子[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2,3]、小泉 幸道[1]、貝沼(岡本) 章子[1] ([1]東京農大・応生科醸造、[2]東京農大・ゲノムセンター、[3]東京農大・応生科・バイオ)
○Keita SATO[1], Morio Ishikawa[1], Keiko Harada[1], Noriko Katsumata[1], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Yukimichi Koizumi[1], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌は酢酸発酵により菌体外のエタノールを酢酸に酸化し、これにより ATP を生成して増殖するが、生成した酢酸を自己消費（過酸化）して再度増殖し、これにより特徴的な二段階の増殖挙動を示す。いずれの生育時期においても、菌体はそれぞれ固有の環境ストレス下で生育していると考えられ、それらに対応した適応機構を有していることが推測される。演者らは、これらの適応メカニズムについて解析を行なっているが、その一環として、細胞表層ストレス応答に関与すると言われるシグマ因子 RpoE について検討を行ない、本因子が①本菌の熱・酢酸・定常期ストレス応答に関与すること、②本菌に存在しない定常期シグマ因子 RpoS の代替をしていること、③ヒートショックシグマ因子 RpoH の発現を制御していること、④RpoE により自己制御されることの四点を既に明らかにしている[1, 2] これにより、本因子が多くの遺伝子の発現を制御している可能性が示唆されたため、今回、RNA-seq 法を用いて、本因子の制御下にある遺伝子を網羅的に解析し、本因子の酢酸発酵生理との関連について更に検証を行うことを試みた。
【方法】*A. pasteurianus* NBRC 3283 株及び同 *rpoE* 破壊株を供試し、YPE 培地（1%yeastextract, 1% hipolypepton, 1% ethanol）を用いて培養を行った。酢酸発酵期・移行期・過酸化期・定常期の各菌体について total RNA を抽出し、Illumina の HiSeq2000 を用いて RNA-seq 解析を行なった。得られた結果は M-A プロットにより解析し、親株と破壊株間で発現量に二倍以上の差異が認められた遺伝子群を抽出した。
【結果及び考察】M-A プロットによる解析の結果、移行期・過酸化期・定常期において、破壊株中の発現量が親株の 1/2 以下に減少した遺伝子が多数抽出され、本因子は多くの遺伝子をポジティブ制御していることが推測された。抽出された遺伝子の多くは上記三フェーズで共通しており、または親株において高発現を示すものが多かった。更に、これら遺伝子の上流には高い割合で RpoE 結合性の推定プロモーター配列が検出され、本因子が多くの遺伝子を直接制御して酢酸発酵生理を調節していることが確認された。これら遺伝子群には、各種ストレス応答因子や転写調節因子が含まれており、本因子が酢酸発酵時に生じる細胞内外の環境変化に応答して広く遺伝子の発現を調節し、酢酸発酵生理を成立させるための重要な役割を果たすことが示唆された。

1）原田ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集, 2A21p09 (2015).
2）原田ら：第 67 回 日本生物工学会講演要旨集, p. 122 (2015)

acetic acid fermentation, RpoE, *Acetobacter pasteurianus*

発表番号：3F127
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 *Trichoderma reesei* における窒素源応答転写調節因子の解析

Analysis of nitrogen-responsive transcription factor in filamentous fungi *Trichoderma reesei*

○平沢 大樹、志田 洋介、小笠原 渉（長岡技科大・生物）
○Hiroki HIRASAWA, Yosuke SHIDA, Wataru OGASAWARA (NagaokaUniv. of Tech.)

<緒言>

糸状菌 *Trichoderma reesei* は、木質バイオマス(リグノセルロース)を効率的に単糖へと分解するために必要なセルラーゼ、ヘミセルラーゼを多量に生産することが知られている。*T. reesei* のセルラーゼ生産は、セルロースを唯一の炭素源とした時に複数の転写調節因子により転写レベルで複雑に調節されることが明らかとなっている。しかしながら、糸状菌は様々な外的環境に応答する遺伝子発現機構を保持しているため、炭素源による応答だけではセルラーゼ生産機構の全容を説明することはできない。特に、窒素源応答はタンパク質生産に関与することが推測されるが、*T. reesei* において窒素源応答機構の解析は進められてこなかった。*Aspergillus* 属や *Fusarium* 属では、窒素源応答機構に関与する多くの転写調節因子の存在が明らかとなっており、それらが窒素源代謝に重要な影響を与えることが報告されている。*T. reesei* は、セルラーゼ生産に特化した特徴を有しており、窒素源応答によりセルラーゼ生産能が変化することが推測される。しかしながら、これら窒素源応答転写調節因子のホモログが存在しているが、その機能やセルラーゼ生産への影響は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、窒素源応答機構がセルラーゼ生産に与える影響を解析するため、窒素源応答転写調節因子ホモログ破壊株を構築し、種々の窒素源に対するセルラーゼ生産性の評価を行った。

<結果と考察>

2 種の推定窒素源応答転写調節因子をターゲットとし、それぞれの転写調節因子ホモログのコード領域を *pyr4* マーカーに置換した破壊用フラグメントを構築し、*T. reesei* QM9414Δ*pyr4* 株をプロトプラスト-PEG 法を用いて形質転換した(QMΔ*tf1* 、QMΔ*tf2* )。窒素源として硫酸アンモニウム(0.01M、0.05M)、硝酸 Na(0.02M)、グルタミン酸(0.02M)を添加した 1% 炭素源培地にて培養し、生育能およびセルラーゼ生産能の評価を行った。また、窒素源を添加しなかった条件をコントロールとして用いた。形質転換体の生育能を評価した結果、QM9414 株および QMΔ*tf1* 株は窒素源の種類に関わらず乾燥菌体重量に変化は見られなかったのに対し、QMΔ*tf2* 株はグルタミン酸を除く窒素源において乾燥菌体重量が WT と比べ約 50%減少していた。セルラーゼ生産能を評価した結果、QMΔ*tf1* 株のセルラーゼ生産能は全窒素源条件において親株よりもわずかに増加していた。しかし、QMΔ*tf2* 株では、0.01M 硫酸アンモニウムでのセルラーゼ生産能が劇的に減少していたが、高濃度硫酸アンモニウムやグルタミン酸培養ではセルラーゼ生産が観察された。これらのことから、窒素源応答機構がセルラーゼ生産に重要な影響を与えることが明らかとなった。

*Trichoderma reesei*, transcription factor, cellulase

発表番号：3F128
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌のグルコース抑制関連因子遺伝子破壊株における二次代謝産物生産性

# Production of secondary metabolites in deletion strains of genes involved in carbon catabolite repression in *Aspergillus oryzae*

○一瀬 桜子、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大院農）
○Sakurako ICHINOSE, Mizuki TANAKA, Takahiro SHINTANI, Katsuya GOMI (Tohoku Univ.)

麹菌は多様な多糖類分解酵素群を生産するものの、その発現はグルコースによるカタボライト抑制を受ける。糸状菌におけるグルコース抑制制御因子として、広域制御型転写因子 CreA 及び脱ユビキチン化酵素 CreB が同定されている。我々はこれまでに、麹菌において *creA* と *creB* 遺伝子の単独及び二重破壊株を作製し、各破壊株における多様な酵素タンパク質の生産性を解析した結果、α-アミラーゼのみならずセルロース系バイオマス分解酵素であるキシラナーゼやβ-グルコシダーゼの生産性も生産性が向上することを明らかにした(1)。一方、糸状菌は放線菌と並んで二次代謝産物生産菌として重要な位置を占めている。糸状菌の二次代謝産物の生産はグルコース抑制を受けることが知られているものの、このグルコース抑制に CreA と CreB が関与しているかについてはほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、CreA と CreB が二次代謝産物の生産制御に関与しているのかを明らかにするために、*creA* 及び *creB* 遺伝子の単独及び二重破壊株において、麹菌が生産する二次代謝産物であるペニシリンとコウジ酸の生産性の解析を行った。

各破壊株を試験菌 *Bacillus stearothermophilus* を含むペニシリン生産試験用寒天培地を用いて培養し、試験菌の生育阻止円の形成を観察した。その結果、野生株では生育阻止円の形成が観察されたものの、予想に反してすべての破壊株において阻止円が観察できなかった。一方、各破壊株をコウジ酸生産培地において 7 日間培養し、経時的にコウジ酸の生産量を測定した結果、*creA* 破壊株では野生株と同等の生産量を示した。しかし、*creB* 破壊株では野生株と比較して生産量が低下し、さらに *creA/creB* 二重破壊株ではコウジ酸を全く生産しなかった。以上の結果から、CreA 及び CreB は麹菌における二次代謝産物の生産制御に関与しており、さらに二次代謝産物の生産においては正の制御因子として機能することが示唆された。現在は、各破壊株においてペニシリン及びコウジ酸の生合成遺伝子の発現量を解析しており、その結果についても報告する。

（本研究は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。）

(1)一瀬ら、日本農芸化学会 2015 年度大会 3B41p10

*Aspergillus oryzae*, carbon catablite repression, secondary metabolite

発表責任者：五味勝也（gomi@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：3F129
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Rhodobacter sphaeroides* におけるピリドキサルリン酸依存型転写調節因子による 5-アミノレブリン酸生合成遺伝子の発現制御

# Regulation of the 5-aminolevulinate synthase gene by the pyridoxal phosphate dependent regulator in *Rhodobacter sphaeroides*

○天野 修、石井 正治、新井 博之（東大大学院農生科）
○Osamu Amano, Masaharu Ishii, Hiroyuki Arai (The university of Tokyo)

【背景と目的】5-アミノレブリン酸（ALA）はテトラピロール環の前駆体であり、ヘム、バクテリオクロロフィルといった代謝に必須な物質の生合成に不可欠である。また、ALA は植物成長促進剤、がん治療など医療分野でも応用されており注目すべき物質である。*Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 はα-プロテオバクテリアに属する紅色非硫黄細菌で、好気呼吸、嫌気呼吸、酸素非発生型の光合成など様々なエネルギー代謝機構を有する。本菌は *hemA* と *hemT* の２つの ALA 生合成酵素遺伝子を有しており、グリシンとスクシニル CoA から ALA を生合成している。通常は *hemA* が発現・機能しており、その発現制御に関する研究は進んでいる一方で、*hemT* の機能や発現制御については未だに不明な部分が多い。我々は昨年度本大会で、*hemT* 上流にコードされる RSP3026 がリプレッサーとして機能している可能性を報告した。RSP3026 は GntR type regulator のサブファミリーである MocR type regulator に分類される。このタイプの regulator は helix-turn-helix 型の DNA 結合ドメインとピリドキサルリン酸（PLP）結合部位を含むアミノトランスフェラーゼ様ドメインを有する。そのため、MocR type regulator は PLP 依存的な制御機構を有すると考えられ、興味がもたれた。そこで本研究では RSP3026 の制御機構に焦点を当てて解析を行った。

【結果】HemT 特異的抗体を用い、野生株と RSP3026 欠損株（⊿3026）の無細胞抽出液に対してウエスタンブロッティングを行った結果、⊿3026 特異的に *hemT* 由来の ALA 生合成酵素の発現が認められ、RSP3026 がリプレッサーとして機能することが確認された。大腸菌で発現・精製した RSP3026 に対して PLP を添加したところ、PLP が結合したホロ型タンパクの形成が確認された。*hemT* のプロモーター領域を含む DNA 断片に対してゲルシフトアッセイを行った結果、ホロ型タンパクについては結合が観察されたが、PLP が結合していないアポ型タンパクについては結合が観察されなかった。これらの結果から、RSP3026 は PLP 依存的に *hemT* の転写を制御していることが示唆された。

*Rhodobacter sphaeroides*, MocR, 5-aminolevulinic acid

発表番号：3F130
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Ralstonia* sp. NT-80 株におけるリパーゼ 転写調節因子 LipR80-4 の機能解析

Functional analysis of lipase transcription factor LipR80-4 in *Ralstonia* sp. NT-80

○多勢 真大、関谷 麻美、赤沼 元気、石塚 盛雄（中央大学）
○Masahiro TASE, Mami SEKIYA, Genki AKANUMA, Morio ISHIDUKA (Chuo Univ.)

*Ralstonia* sp. NT80 のリパーゼ（LipA）はステアリルアルコール等の高級アルコールによって顕著に発現誘導される。その誘導効率は一般的にリパーゼの誘導剤として用いられるダイズ油と比較するとおよそ 17 倍にも及ぶ。しかしながら、この特殊な誘導機構に関する詳細な分子メカニズムは解明されていない。一方、*Pseudomonas alcaligenes* においては、リパーゼの発現が LipQR 二成分制御系によって制御されていることが見出されている。二成分制御系では、外界からのシグナルをリン酸化酵素 LipQ が感知し、転写調節因子 LipR をリン酸化することで活性化する。活性化された LipR は、*lipA* の転写調節領域に直接結合し、転写を促進する。

私たちは NT-80 においても *P. alcaligenes* と同様の転写因子が存在し、リパーゼ遺伝子の転写を制御しているのではないかと考え、*lipQR* ホモログ遺伝子を探索し、NT-80 ゲノム上に LipR ホモログがいくつか存在することを確認した。そこで本研究では *P. alcaligenes* の LipR と最も相同性の高い LipR80-4 が *lipA* の転写を誘導するのかを検証するとともに、その作用機構について解明することを目的とした。

*lipR80-4* 遺伝子破壊株を作製し、ステアリルアルコール添加時において、培養上清リパーゼ活性、及び *lipA* 転写量を解析した結果、野生株と比較して活性、転写量ともに低下することが確認された。*lipR80-4* 破壊株では、*lipA* 転写量が野生株と比較して、約 90%低下した。このことから、LipR80-4 が *lipA* の転写促進因子として機能していることが示唆された。

このような結果をうけ、*lipA* 上流のプロモーター領域(200 bp)と転写因子 LipR80-4 との相互作用を検証するため、精製 LipR80-4 を用いた EMSA を行った。その結果、精製 LipR80-4 を添加したときのみ、シフトバンドが観察された。また、DNase I footprinting により LipR80-4 が *lipA* 上流-73bp~-47bp 付近に結合する可能性が示唆された。現在、変異プローブを用いて EMSA を行い、結合配列特定を試みている。また、アミノ酸変異導入を行い *lipA* 転写量を測定することで LipR80-4 のリン酸化部位特定も試みている。今回はその結果についても報告したい。

LipA, *Ralstonia*, transcription factor

発表番号：3F131
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Yersinia* 由来 Invasin を細胞表層に提示する組換え *Lactobacillus casei* の Caco-2 細胞を用いた評価及びその解析
Evaluation and analysis of genetically modified *Lactobacillus casei* expressing *Yersinia* Invasin using Caco-2 cells

○田中 健一[1]、桝田 和彌[2]、梶川 揚申[1]、岡田 早苗[1]、五十君 靜信[2]([1]東農大院・農化、[2]国立医薬品食品衛生研究所)
○Kenichi Tanaka[1], Kazuya Masuda[2], Akinobu Kajikawa[1], Sanae Okada[1], Shizunobu Igimi[2] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]National Institute of Health Science)

【目的】現在、乳酸菌を抗原運搬体とした経口粘膜ワクチンの開発が試みられているが、粘膜局所に十分な免疫を誘導するには多量の投与が必要となっている。そこで、免疫誘導効率の改善が求められており、小腸のパイエル板上に存在する M 細胞を標的とした研究がなされている。M 細胞を標的とする数少ない分子の一つとして報告されているのが、*Yersinia* の侵入因子である Invasin と呼ばれるタンパク質である。Invasin は M 細胞からの取り込みを促進させることから免疫誘導効率の改善を目的として、乳酸菌経口ワクチンへの応用が期待される。基本的に、乳酸菌での Invasin の発現はグラム陰性細菌の膜貫通ドメインを除いた細胞外領域である Inv497 を用いる必要があるが、未だその研究例は少なく、乳酸菌での Invasin 発現による取り込み数の増加の報告はされていない。そこで本研究では、Inv497 発現乳酸菌の腸管上皮様細胞での評価及び、その機能確認を目的とした。

【方法】長期培養することで小腸上皮細胞様の性質を示すことが知られている Caco-2 細胞のサブクローンである C2BBe1 細胞を用いて、Invasin 発現 *Lactobacillus casei* IGM393 の評価を行った。2 週間培養した C2BBe1 細胞に対して Invasin 発現乳酸菌を添加し、接着及び取り込みの評価を行った。また、Invasin 依存的な取り込みであることを確認するため、Inv 抗体を用いた取り込みの評価を行った。さらに、取り込みがどのエンドサイトーシス経路によるものなのかを明らかにするため、各エンドサイトーシス経路に対する阻害剤を用いた検討を行った。

【結果】C2BBe1 を用いた評価では Invasin 発現による接着数の変化は確認されなかった。取り込み数においては Invasin 発現により増加が確認されたものの、Invasin 非発現株においても一定数確認された。Invasin 発現乳酸菌の取り込み数は Invasin 抗体によって抑制されたことから、Invasin 依存的な現象であると示唆された。さらに各種エンドサイトーシス阻害剤を用いた取り込み経路の解析では Invasin 発現乳酸菌と非発現乳酸菌とで異なる経路で取り込まれている可能性が示唆された。以上の結果より、Inv497 を *L. casei* IGM393 に発現させることで、腸管上皮様細胞による取り込みを促進させることが示唆された。一方、Inv497 の侵入因子としての活性については、β1 インテグリンを介した C2BBe1 細胞内のシグナル伝達経路を標的としたより詳細な解析を行っていく必要性が考えられる。

Lactobacillus, Caco 2, vaccine

発表番号：3F132
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゲノム解析による maridomycin/platenomycin 生合成遺伝子クラスターの特定と生産菌の分類
# Identification of the gene cluster for maridomycin/platenomycin and a taxonomic study of the producers by genome analysis

○小牧 久幸、市川 夏子、小口 晃央、田村 朋彦、浜田 盛之、藤田 信之、鈴木 健一朗（NBRC）
○Hisayuki Komaki, Natsuko Ichikawa, Akio Oguchi, Tomohiko Tamura, Moriyuki Hamada, Nobuyuki Fujita, Ken-ichiro Suzuki (NBRC)

【目的】*Streptomyces hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* NBRC 14016 と"*S. platensis* subsp. *malvinus*" NBRC 13827$^T$ と"*S. albus* subsp. *coleimyceticus*" NBRC 13840$^T$ は学名が異なるが、16S rDNA 配列は完全に一致している。NBRC 14016 株と NBRC 13827$^T$ 株はそれぞれ 16 員環マクロライド系抗生物質である maridomycin と platenomycin の生産菌であり [1, 2]、NBRC 13840$^T$ 株からはその生産が報告されていない。Maridomycin と platenomycin は構造が良く似た類縁体だが、その生合成遺伝子クラスター（BGC）は未だ明らかになっていない。そこで、これら 3 株の分類学的な関係と maridomycin/platenomycin の BGC を明らかにすることを目的とし、ゲノム解析を行った。
【方法】イルミナのペアエンド法により whole genome sequencing を行った。イルミナのリードを Newbler でアセンブルし、GenoFinisher でゲノム配列のフィニッシングを行った。得られたドラフトゲノム配列をもとに株間の average nucleotide identity（ANI）を JSpecies で計算し、95–96%より高ければ同種、低ければ別種と判断した。 I 型ポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子クラスターと非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）遺伝子クラスターはドメイン構成をもとに既報 [3] の方法で解析した。
【結果】NBRC 14016, NBRC 13827$^T$, NBRC 13840$^T$ の 16S rDNA 配列は *S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* の基準株に対して 97%の相同性しか示さず、*S. albospinus* が最も近縁な既知種（基準株と 99.4%の相同性）であった。これら 3 株は株間の ANIb 値が 99.66–99.95%で、*S. albospinus* NBRC 13846$^T$ に対する ANI 値は 83.63–83.88%だったので、一新種とみなされる。NBRC 14016, NBRC 13827$^T$, NBRC 13840$^T$ には 7 種類の PKS と NRPS の遺伝子クラスターが存在し、その殆どが株間で共通していたが、*S. albospinus* NBRC 13846$^T$ のものとは異なっていた。Maridomycin 生産菌 NBRC 14016 と platenomycin 生産菌 NBRC 13827$^T$ には約 80kb の PKS 遺伝子クラスターが存在し、maridomycin/platenomycin の BGC であると推定された。一方、マクロライドの生産が知られていない NBRC 13840$^T$ ではその BGC に欠失と転移が認められた。
【考察】*Streptomyces* 属ではこれまで分類学上の種と二次代謝産物の種類には相関がないと信じられてきたが、同種であれば株間で少しの違いもあるものの保有する PKS と NRPS 遺伝子クラスターはよく似ており、近縁種であっても別種ならば異なることが明らかとなった。従って、菌株の正しい同定と適切な学名付与は二次代謝産物の研究においても重要な意味持つと考えられる。
【文献】[1] *J Antibiot* **26**, 191-198, 1973; [2] *J Antibiot* **27**, 95-101, 1974; [3] *BMC Res Notes* **8**, 548, 2015

*Streptomyces*, genome, polyketide

発表責任者：小牧久幸（komaki-hisayuki@nite.go.jp）

発表番号：3F133
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 日本の高山帯から単離された根粒菌のゲノム解析

# Genome analysis of rhizobia isolated from Japanese alpine area

○高梨 功次郎[1]、池田 啓[2]、瀬尾 直登[3]、佐藤 修正[4]、矢崎 一史[3]([1]信大・山岳研、[2]岡山大・植物研、[3]京大・生存研、[4]東北大・院生命科学)
○Kojiro Takanashi[1], Hajime Ikeda[2], Naoto Seo[3], Shusei Sato[4], Kazufumi Yazaki[3] ([1]Shinshu Univ., [2]Okayama Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Tohoku Univ.)

マメ科植物はその根において窒素固定細菌（根粒菌）と共生系を確立し、高効率の窒素固定器官である根粒を形成する。そのためマメ科植物は乾燥重量当たり 40% ものタンパク質を蓄積し、人類を支える窒素源として大きな役割を有すると共に、高山帯崩壊地など貧栄養土壌におけるパイオニア植物として土壌の栄養化を担うなど生態系においても重要な役割を有している。実際の圃場においてもその特性を利用して、窒素固定能の高い根粒菌を石灰コートでコーティングした種子を用いて収量の増加を図るなどの利用が世界中で進められている。根粒菌資源の拡充を目的として、本研究では日本の高山帯において根粒菌の探索を行い、オヤマノエンドウ（*Oxytropis japonica*）および、イワオウギ（*Hedysarum vicioides*）と共生する根粒菌を単離した。それらのゲノム配列を次世代シークエンサーを用いて調べたところ、大部分のゲノム領域は山域ごとに高い類似性を有していた。その一方で、マメ科植物との共生に必須な遺伝子群は宿主ごとに高い類似性を有していた。本大会では、このゲノム解析の結果を基に、高山に生育する根粒菌の特徴について報告する。

rhizobia, symbiotic nitrogen fixation, next generation sequencer

発表責任者：高梨功次郎（takanashi@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：3F134
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゲノム配列解析に基づく嫌気性細菌の分類における新たなアプローチ

# The new approach for classification of anaerobes by housekeeping genes from genome screening.

○林 将大[1]、一宮 尚志[2]、武藤 吉徳[3]、田中 香お里[1] ([1]岐阜大・生命セ・嫌気性菌、[2]岐阜大・医・医療情報、[3]岐阜大・医・生命機能)
○MASAHIRO HAYASHI[1], TAKASHI ICHINOMIYA[2], YOSHINORI MUTO[3], KAORI TANAKA[1] ([1]Div. Anaerobe Res., Life Sci. Res. Ctr., Gifu Univ., [2]Dept. Biomedical Info. Sch. Med., Gifu Univ., [3]Dept. Functional Biosci., Sch. Med., Gifu Univ.)

現在, ゲノム配列情報の集積量は著しく増加しており, GOLD (Genome Online Database) によると 6000 を超える細菌のゲノム配列が決定されている．株レベルでのゲノム情報が蓄積されることによって, 菌種内あるいは類縁菌種間での遺伝子情報の比較が容易となった. 本研究では, これらの情報を基に, 細菌の分類に有効な遺伝子の検索を試みた. 検証のモデルとして，嫌気性グラム陰性桿菌，特に *Bacteroides* 属およびその類縁菌群を対象とした.

PATRIC（PathoSystems Resource Integration Center）データベースに登録されている *Bacteroides* 属の全ゲノム情報から，すべての株に共通して保有する 328 種類の遺伝子を比較対象遺伝子として選択した. これらの遺伝子にはリボソームタンパク, DNA/RNA の複製・修飾, 膜へのタンパクの輸送に関与するシャペロン分子, 細胞壁の合成に関与する遺伝子群, t-RNA 合成遺伝子群が集約されていた.

アミノ酸配列に基づく類似度測定の結果から，分類性能が高いと予想される 5 遺伝子を分類マーカー候補遺伝子として選出した. 選出した遺伝子および汎用されている *gyrB, dnaJ, hsp60, recA* および *rpoB* の平均類似度を比較した結果，本研究において発見された候補遺伝子は，比較したハウスキーピング遺伝子に比べ類似度が低く，*Bacteroides* 属の菌種分類に適していることが示唆された.

本発表では，全ゲノム情報を利用した分類に有効な遺伝子の検索方法について報告する.

anaerobe, Bacteroides, genome

発表番号：3F135
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物統合データベースを高度化する微生物環境オントロジーと解析アプリケーションの開発
# Metagenome/Microbe Environment Ontology and Web application development for MicrobeDB.jp

○鈴木 真也[1]、山本 希[2]、森 宙史[1]、黒川 顕[1,2] ([1]東工大生命、[2]東工大地球生命研)
○ Shinya SUZUKI[1], Nozomi YAMAMOTO[2], Hiroshi MORI[1], Ken KUROKAWA[1,2] ([1]Tokyo Institute of Technology, [2]Earth-Lifescience Institute)

## 【背景・目的】

微生物は地球上のあらゆる環境に群集を形成して存在し、多彩な機能を担うことで生態系の根幹をなしている。微生物群集の機能を解明するためにメタゲノム解析が行われ、爆発的にデータが産出されているが、環境と微生物の関係については未だに理解が十分ではない。我々はこれまでに、微生物の生息環境についての情報を語彙集(オントロジー)として整理・統一した上で、微生物のゲノム・メタゲノム・菌株等の基盤となる情報を統合して微生物統合データベース MicrobeDB.jp を開発してきた。今回我々は MicrobeDB.jp をより高度化し利便性を向上させることを目的として、微生物の生息環境を幅広く表現可能なオントロジーの開発と、環境情報と組み合わせた比較メタゲノム解析等の高度な解析を簡易に可能とするアプリケーションの開発を行った。

## 【結果-オントロジー開発】

メタゲノムデータに付随した、サンプル採取環境の特徴を記述するために用いられている語彙を公共データベースから新たに収集し、これらを階層的に整理した。構築された MEO Ver. 0.8 (Metagenome / Microbes Environmental Ontology)と MSV Ver. 0.2 (Metagenome Sample Vocabulary)を用いることで、より広く精密な環境情報の統合が可能になった。

## 【結果-アプリケーション開発】

MicrobeDB.jp に存在する、オントロジーと対応したゲノム・メタゲノム・遺伝子といった微生物に関する幅広い種類のデータを活用するためにアプリケーション開発を行った。アプリケーションは Web ブラウザ上から利用されることを想定しており、バイオインフォマティクスを専門としない研究者にも簡便に解析を行うことを可能とする。これらを用いることで、利用者は環境間で生息する細菌群集をヒートマップや階層的クラスタリングといった広く用いられている統計手法で比較解析することができる他、逆に各系統が見つかった環境を一見して知ることもでき、環境と微生物の関係性について幅広い知見を得ることが可能になる。

Metagenomics, Database, Ontology

発表番号：3F136
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母における胞子特異的なタンパク質の網羅的解析
# Comprehensive analysis of fission yeast spore proteins

○松崎 彩子、東谷 未来、中村 太郎（阪市大院理）
○Ayako MATSUZAKI, Miku HIGASHITANI, Taro NAKAMURA (Osaka City Univ.)

＜目的＞

分裂酵母は通常一倍体での栄養増殖を行っているが、栄養飢餓状態下で接合し、減数分裂を伴った胞子形成過程を進行し、子嚢胞子を形成する。形成された胞子は様々な環境ストレスに対し耐性を持つ休眠細胞である。我々の研究により、胞子と栄養細胞は、その構造や含まれるタンパク質の面で大きく異なっていることが明らかになっている。本研究は胞子に含まれるタンパク質の網羅的に同定することを目的とする。

＜方法・結果＞

単離した胞子の破砕液を TCA 沈殿、還元アルキル化、およびトリプシン処理を行ったのち、LC MS/MS 解析により含有タンパク質の網羅的な解析を行った。その結果、833 のタンパク質が同定され、得られた結果を栄養細胞におけるプロテオーム解析の結果（Carpy *et al.* 2014）と比較することにより、34 の胞子特異的なタンパク質が明らかになった。

fission yeast, proteome, spore

発表番号：3F137
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌 Streptomyces coelicolor A(3)2 M145 における内在性 NO による代謝制御の解明

# Endogenous NO dependent Metabolic regulation in Streptomyces coelicolor A(3)2 M145

○行岡 揺弥、小口 悠、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東京農業大学）
○Yuriya Yukioka, Haruka Oguchi, Shinsaku Ito, Shunsuke Yajima, Hirofumi Shoun, Yasuyuki Sasaki (Tokyo University of Agriculture)

放線菌はグラム陽性の土壌細菌であり胞子の発芽、基底菌糸の成長、基底菌糸を分解し気中菌糸、胞子形成を行う複雑な形態分化や、二次代謝により、特に人類にとって非常に有益である多くの生理活性物質の生産を行っている。我々の研究チームでは放線菌 *Streptomyces coelicolor* A(3)2 M145 株に新規の窒素代謝系を見出した。本代謝系により生成される NO がシグナルとして働き、抗生物質生産や形態分化に影響を与えていることが示唆された。

一方、放線菌門に広く保存されている wbl (whiB like ) proteins は、放線菌の２大特徴である胞子形成、抗生物質生産に決定的に関与しており、*Mycobacterium tuberculosis* の WhiB1 が宿主のマクロファージが生産する NO を受容し、代謝を制御することが示唆された。WhiB1 は非ストレス時に保有する鉄硫黄クラスターがホロ体で存在しプロモータ領域に結合出来ないが、外来性 NO ストレス時においては鉄硫黄クラスターがニトロシル化され、この NO 複合体が DNA に結合することで転写を制御している。こうした Wbl protein と NO の関連性が示唆された一方、その他の放線菌では Wbl の制御機構について未だ不明な点が多い。今回我々の発見した新規窒素代謝系により生産される NO と Wbl ホモログの関連性を検証した結果、代謝制御に内在性 NO が Wbl protein を介して関わっていることが示唆された。

Nitric oxide, Streptomyces coelicolor, metabolic regulation

発表番号：3F138
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Corynebacterium glutamicum* のグルタミン酸生産におけるメチオニン合成酵素 MetE の生理的役割の解明

# Analysis of the physiological roles of methionine synthase MetE in L-Glutamate production in *Corynebacterium glutamicum*

○高橋 慧、高田 明香、山下 周子、岩井 伯隆、和地 正明（東工大院・生命理工・生物プロセス）
○Satoshi Takahashi, Haruka Takada, Noriko Yamashita, Noritaka Iwai, Masaaki Wachi (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Biosci. Biotechnol., Tokyo Tech)

［背景と目的］

*Corynebacterium glutamicum* は 1956 年にグルタミン酸生産菌として発見され、以来、生産量の増大や生産機構の解明を目指して精力的に研究されてきた。本菌にビオチン制限やペニシリン処理といった表層構造を変化させる処理を施すと、生育が止まり、著量のグルタミン酸が生産される。本研究では *C. glutamicum* がなぜ特定の条件でグルタミン酸を生産するのか、その生理的意義の解明を目指している。

近年、グルタミン酸排出チャネルタンパク質 NCgl1221 が見出された。NCgl1221 欠損株は、グルタミン酸生産誘導処理を施してもグルタミン酸をほとんど排出せず、細胞内にグルタミン酸を蓄積する。この時の発現タンパク質を解析すると、分子量 80 kDa のメチオニン合成酵素 MetE が過剰発現していることが見いだされた。本研究では、MetE の過剰発現が起こるメカニズムと、その役割の解明を目的とした。

［方法と結果］

*metE* 欠損株を構築しグルタミン酸生産実験を行ったところ、生産量が大幅に低下した。このことから、グルタミン酸生産には継続的なメチオニンの供給が必要であると考えられた。

*metE* プロモーターに *lacZ* 遺伝子を融合したプラスミドを NCgl1221 欠損株に導入して発現を調べたところ、生産誘導処理により LacZ の発現が増大した。このことから、MetE の過剰発現は転写レベルで引き起こされていると考えられた。

チオール含有抗酸化剤である *N*-アセチルシステインや 2-メルカプトエタノールの添加により MetE の過剰発現が抑制されたことから、NCgl1221 欠損株の細胞内では酸化ストレスが生じていることが示唆された。MetE は酸化ストレスに非常に弱いタンパク質であり、酸化ストレス条件下において、低分子チオール含有化合物マイコチオールによって修飾を受けるという報告がある。今後 MS 解析によって MetE の酸化修飾を調べる予定である。

*Corynebacterium glutamicum*, mechanosensitive channel, methionine synthase

発表責任者：和地　正明（mwachi@bio.titech.ac.jp）

発表番号：3F139
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Aspergillus terreus* における pH 依存的イタコン酸生産制御機構の解明（第二報）

# Regulation of pH responsive itaconic acid production in *Aspergillus terreus* (The second report)

○尾花 克哉[1]、安藤 祥生[1]、田中 遼[2]、金政 真[2]([1]中部大院・応生、[2]中部大・環境生科)
○Katsuya OBANA[1], Yoshiki ANDO[1], Ryo TANAKA[2], Shin KANAMASA[2] ([1]Grad. Sch. Biosci. Biotech. Chubu Univ., [2]Dept. Envi. Biol. Chubu Univ.)

【背景と目的】

イタコン酸は不飽和基を有する二価の水溶性有機酸であり、その構造から共重合によって線状高分子を形成できる特性がある。その特性と高い安全性から、合成樹脂や合成繊維、接着剤や印刷インキ等、工業製品の原料や添加剤のほか、食品添加物などに幅広く利用されている。イタコン酸は、*Aspergillus terreus*、*Aspergillus itaconicus* といった糸状菌や、*Candida tsukubaensis* のような酵母において生合成できることが知られており、工業生産においては生産速度の観点からもっぱら *A. terreus* が使用されてきた。*A. terreus* において、イタコン酸生産性向上のための研究は数多く行われてきたが、イタコン酸の生合成経路は近年まで未解明であった。これまでに、我々は本菌由来のシス・アコニット酸デカルボキシラーゼ（CAD）をコードする *CAD1* 遺伝子を単離・同定し、CAD がクエン酸回路（TCA 回路）代謝物であるシス・アコニット酸を基質として、イタコン酸を直接生成するイタコン酸生産の鍵酵素であることを明らかとした。これまでの研究により、本菌は pH2～3 のみで旺盛にイタコン酸を生産し、pH4 を超えるとイタコン酸生産性は大幅に減少することが知られている。しかし、この現象の原因は未解明である。そこで本研究では、本菌のイタコン酸生産性が pH 依存的に変化する仕組みを分子レベルで理解することを目指して行った。

【方法と結果】

前培養した本菌を、イタコン酸生産に適した pH2～3 と、ほとんどイタコン酸を生産しない pH5 の条件にシフトして培養し、*CAD1* 遺伝子転写量と CAD 活性を測定した。mRNA の定量は qRT-PCR を用い、CAD 活性は細胞破砕液を粗酵素、シス・アコニット酸を基質とした反応により生成するイタコン酸を HPLC にて定量した。その結果、pH2 における培養では pH5 と比較して *CAD1* 遺伝子転写量と CAD 活性が共に高かった。pH3 では、pH5 と比較して *CAD1* 遺伝子転写量に大きな差異は見られなかったが、CAD 活性は高い結果が得られた。以上のことから、本菌のイタコン酸生産の pH 依存的な変化は、pH に応じて mRNA 転写の段階、あるいは CAD 活性の両方の段階で調節されていると考えられた。また *CAD1* 遺伝子破壊株を各 pH 条件で培養したところ、イタコン酸の前駆体であるシス・アコニット酸の生産も pH 依存的に変化することがわかった。この結果は野生株におけるイタコン酸生産の pH 依存性と同傾向であったことから、野生株においても pH 依存的にシス・アコニット酸が生産され、その結果としてイタコン酸生産性の変化に影響を与えている可能性が考えられた。これらの成果から、本菌の pH 依存的なイタコン酸生産性の変化は、CAD 活性の変化に加え、シス・アコニット酸を含む TCA 回路の調節も影響していることが示唆された。

*Aspergillus terreus*, *cis*-aconitic acid decarboxylase, itaconic acid

発表責任者：金政 真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

発表番号：3F140
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Changing autotrophy to heterotrophy -Isolation of serine auxotroph in *Hydrogenobacter thermophilus*-

○KeugTae KIM[1], Yoko Chiba[2], Hiroyuki Arai[1], Masaharu Ishii[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Univ. of Tsukuba)

*Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 is an obligately chemolithoautotrophic, extremely thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, which was isolated from a hot spring located in Izu, Japan. Novel serine-synthesizing enzymes, iPSPs (iPSP1 and iPSP2) termed metal-independent phosphoserine phosphatases were detected from *Hydrogenobacter thermophilus*. iPSP1 and iPSP2 are homodimer of PspA subunit and heterodimer of PspA and PspB subunits linked by intermolecular disulfide bond, respectively. In addition, PSP activity was detected only in PspA subunit. To find the unknown role of PspA or PspB subunit, gene manipulation for *pspA* gene deletion was performed. As a results, we found that *pspA* gene was essential and *pspA* gene deletion mutant showed veiled characteristics, which means that obligate autotroph was changed into “heterotroph”. In the presentation, we will also show the results of transcriptome analysis

Phosphoserine Phosphatase, auxotroph, transporter

発表番号：3F141
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*A. ferrooxidans* のチオ硫酸代謝酵素系の解析
Analysis of a thiosulfate oxidizing enzyme system in *A. ferrooxidans*
○上村 一雄、高田 弓梨乃、金尾 忠芳（岡山大院環境生命）
○Kazuo Kamimura, Yurino Takada, Tadayoshi Kanao (Okayama Univ.)

*Acidithiobacillus ferrooxidans* は、２価鉄と還元型無機硫黄化合物を酸化してエネルギーを獲得する化学合成独立栄養細菌である。鉄や硫黄代謝には、その酸化還元に特異的な補因子が重要な働きをする。シトクローム *c* は、その中でも重要な因子の一つである。本菌のゲノム中には 11 個の酸化還元に関与すると考えられるチトクローム *c* をコードする遺伝子が存在する。鉄酸化に関与する酵素は *rus* オペロンにコードされており、この中には *cyc1*, *cyc2* の 2 個のシトクロームが含まれている。本菌は rus オペロンを２コピー持っている。また、炭酸固定に必要な NADH の生成に使用されると考えられている 2 個の *pet* オペロン（*petI* と *petII*）を持っており、これらのオペロンには、それぞれ *cycA1*, *cycA2* と 2 個の $cytc_1$ が含まれている。*cycA1* は鉄生育細胞内で、*cycA2* は硫黄生育細胞内で、それぞれ NADH の生成に使用されていると考えられている。これら 8 個のシトクローム以外の 3 個のシトクロームの機能は不明である。我々は、チオ硫酸をテトラチオン酸に変換するチオ硫酸デヒドロゲナーゼ（Tsd）を精製し、その遺伝子を決定した。酵素は、フェリシアンを電子受容体に用いて精製されたが、ユビキノン（$Q_2$）や馬シトクローム *c* を電子受容体に用いることができなかったため、本酵素の生体内電子受容体は不明である。細胞レベルの解析で、本菌はチオ硫酸の代謝にシトクローム *c* を電子受容体に使用すると推測された。そこで、本研究では、硫黄生育細胞でその転写が活性化される *Lferr_1630* にコードされている分子量約 15 kDa のシトクローム *c* の機能解析を試みた。

*Lferr_1630* のシグナル配列をコードする部分を削除した遺伝子領域を PCR 増幅し、PelB リーダー配列によってペリプラズムに目的遺伝子産物を発現させる pET22b(+)に導入して、pET-Lferr1630 を構築した。このプラスミドを、ヘム合成に必要な遺伝子（pEC86 プラスミド）を保持した *E. coli* BL21 (DE3)に導入して、*Lferr_1630* の遺伝子発現に用いた。IPTG 誘導によって、約 16 kDa のタンパク質が新たに検出され、凍結融解によって容易にこの発現タンパク質をピンク色の溶液中に回収できた。タンパク質を CM セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex-G100 によるゲルろ過クロマトグラフィーによって部分精製したものを解析に用いた。Lferr_1630 タンパク質のスペクトル解析は、シトクローム *c* に特徴的な 551 nm にα－ピークの吸収極大を示した。異種発現させた Tsd がこのシトクロームを電子受容体に用いるかどうかを検討した結果、Tsd とチオ硫酸存在下で酸化型 Lferr タンパク質が還元されたため、Tsd の電子受容体として Lferr_1630 タンパク質が機能していることが示唆された。

Acidithiobacillus, thiosulfate oxidation, cytocrome

発表責任者：Kazuo Kamimura（kamimura@okayama-u.ac.jp）

発表番号：3F142
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 翻訳因子 eIF5A によるエネルギー代謝制御

# The role of eIF5A in the regulation of energy metabolism

○近藤 直子[1,2]、白井 温子[1,6]、松山 晃久[1,3]、夏目 徹[4]、堂前 直[3]、浜本 牧子[5]、吉田 稔[1,2,3] ([1]理研 化学遺伝、[2]東京大院農、[3]理研 CSRS、[4]産総研 創薬分子、[5]明治大院農、[6]理研 細胞記憶)
○Naoko KONDO[1,2], Atsuko SHIRAI[1,6], Akihisa MATSUYAMA[1,3], Tohru NATSUME[4], Naoshi DOHMAE[3], Makiko HAMAMOTO[5], Minoru YOSHIDA[1,2,3] ([1]RIKEN Chemical Genetics Lab., [2]UTokyo, [3]RIKEN CSRS, [4]AIST molprof, [5]Meiji Univ., [6]RIKEN Cellular Memory Lab.)

タンパク質翻訳後修飾の１つであるハイプシン化は eIF5A（eukaryotic translation initiation factor 5A）と呼ばれる翻訳因子にのみ見出される非常にユニークな翻訳後修飾であり、翻訳における eIF5A の活性に必須である。eIF5A は高度に保存された生育に必須のタンパク質であるが、翻訳そのものには必須ではないことから、その分子機能の解明に興味が持たれる。

ハイプシン化は 2 つの酵素による二段階反応によって触媒され、一段階目の反応で骨格となるデオキシハイプシンが、二段階目の反応で水酸基がそれぞれ付加される。酵母では二段階目の反応は生育に必須ではないものの、分裂酵母において二段階目の反応を触媒する Mmd1 をコードする遺伝子を破壊すると、顕著なミトコンドリアの局在異常が観察される。このことから、eIF5A がミトコンドリア関連タンパク質の翻訳に関わっているのではないかと予想される。そこで、eIF5A の役割を明らかにするために、分裂酵母の全遺伝子発現ライブラリーを利用し、Mmd1 依存的にタンパク質レベルが変化する遺伝子をスクリーニングした結果、ミトコンドリアの電子伝達系に関与するタンパク質のいくつかが特異的に減少することを見出した。このことから、eIF5A がこれらのタンパク質の翻訳を介してミトコンドリアの呼吸制御に関わっていることが予想された。

そこで、*mmd1* 遺伝子破壊株の酸素消費量を測定したところ、予想通り、野生株と比較して酸素消費量が低下していた。さらに培地中のエタノール濃度を測定した結果、エタノール濃度が増加していたことから、*mmd1* 遺伝子破壊株では解糖系が活性化していると考えられた。興味深いことに、Mmd1 は酸素を基質として水酸基を付加するヒドロキシラーゼである。従って、周囲の酸素濃度が低下すると eIF5A のハイプシン化レベルは減少すると予想される。スクリーニングの結果を考え併せると、嫌気条件では酸素が使えないため、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化から解糖系へとエネルギー代謝がシフトするが、eIF5A はハイプシン化を介して酸素濃度を感知し、好気的リン酸化に関与するタンパク質の翻訳を通じて呼吸代謝を制御していると考えられる。

fission yeast, hypusine, eIF5A

発表番号：3F143
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高温条件での酸化ストレスの低減が *Kluyveromyces marxianus* のエタノール消費と酢酸生産を抑え、それに伴う酵母の死滅を防ぐ

# Impact of oxidative stress on ethanol consumption, acetic acid accumulation and cell viability at high temperature in *Kluyveromyces marxianus*

○西田 成輝[1]、高坂 智之[2,3]、山田 守[1,3]（[1]山大医、[2]山大農、[3]山大中高温微生物セ）
○Seiki NISHIDA[1], Tomoyuki KOSAKA[2,3], Mamoru YAMADA[1,3] ([1]Graduate school of medicine, Yamaguchi Univ., [2]Faculty of agriculture, Yamaguchi Univ., [3]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

【目的】耐熱性酵母 *Kluyveromyces marxianus* は多様な炭素源を利用でき、45 ˚C という高温においてもエタノール生産をできることから、現在エタノール生産に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* に代わる酵母として注目されている。しかし、どのような機構により *K. marxianus* の耐熱性が達成されているかは未だ明らかとなっていない。当研究室で行った *K. marxianus* のトランスクリプトーム解析の結果、30 ˚C と比較して 45 ˚C では、ペントースリン酸経路が活性化していることが示唆された。また、TCA 回路や呼吸鎖の一部の遺伝子の発現が低下し、ミトコンドリアではグルタチオン関連遺伝子の発現が上昇していた。そこで本研究では、高温条件下における *K. marxianus* の代謝物変動を分析するとともに、還元型グルタチオン（GSH）が代謝物量や細胞の生存に与える影響を解析した。
【結果】30 ˚C と比較して 45 ˚C では、*K. marxianus* の生育およびエタノール生産速度は低下し、培養開始後 12 時間以降において、培養液中のエタノールの減少と酢酸の蓄積が確認された。さらに、酢酸の蓄積に伴って生菌数が低下していた。まず、酢酸の高温条件下における影響を調べたところ、45 ˚C において酢酸存在下では、細胞内の ROS 量が増加し生育できないことが明らかとなった。加えて、45 ˚C では細胞内 ROS 量の増加と GSH の減少が確認された。一方、45 ˚C における酢酸蓄積時の細胞内 NADPH 量を測定したところ、対数増殖期と比較して減少していた。そこで、GSH 添加の影響を解析したところ、5 mM GSH の添加により 45 ˚C でのエタノールの減少と酢酸の蓄積、そしてそれに伴う生菌数の低下が抑制された。これらの結果より、45 ˚C におけるエタノールを利用した酢酸生産は、NADPH を生成し細胞内酸化ストレスを減少させることに寄与しており、抗酸化物質の添加により細胞内酸化ストレスを減少させることで、培養液中のエタノール消費と酢酸生産を抑制できることが明らかとなった。

high-temperature, antioxidant, Kluyveromyces marxianus

発表番号：3F144
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 呼吸鎖改変大腸菌ΔNDH-IΔCyt *bo* の酸素制限による糖代謝の変化

# Alternations of glucose metabolism in *Escherichia coli* mutants defective in respiratory chain enzymes NDH-I and Cyt *bo* under different oxygen supply conditions

○杉本 諒[1]、加藤 竜一[1]、荒井 博紀[1]、紀平 知枝[1]、吹谷 智[1]、和田 大[1]、片岡 尚也[2]、横田 篤[1]
([1]北大院農、[2]山口大農)
○Makoto SUGIMOTO[1], Ryuichi KATO[1], Hironori ARAI[1], Chie KIHIRA[1], Satoru FUKIYA[1], Masaru WADA[1], Naoya KATAOKA[2], Atsushi YOKOTA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Yamaguchi Univ.)

【背景と目的】大腸菌の呼吸鎖は酸化的リン酸化による ATP の獲得や NADH の再酸化を通じて細胞内のエネルギーレベルや酸化還元バランスに影響を与えている. 中でも糖代謝と呼吸鎖の相互関係については不明な部分が多く, 発酵生産菌育種のための基盤的知見として更なる理解が求められている. 大腸菌の呼吸鎖は NADH デヒドロゲナーゼ(NDH)と末端酸化酵素(Cyt)から構成され, NDH にはプロトン駆動力(pmf)形成能を有するⅠ型と, 持たないⅡ型, Cyt には pmf 形成能の高い Cyt *bo* と, 低い Cyt *bd* が存在する. 当研究室では過去に NDH と Cyt を単独または組み合わせて欠損させた株を用いて, 呼吸鎖と糖代謝の相互関係の解明が行われた. その中で, NDH-Ⅰ及び Cyt *bo* を欠損させた株(以下 ΔΔ 株)において, 細胞当りの糖消費速度の増加と, 細胞内の還元力の指標となる $NAD^+$/NADH 比の低下が見られた. この性質は前駆体物質の供給と細胞内還元力を増強し, 物質生産の効率化へ応用できる可能性がある. そこで, ΔΔ 株において酸素供給を制限して呼吸鎖の働きを抑え, 更なる $NAD^+$/NADH 比の低下を試みた. また, その際の ΔΔ 株の中枢代謝および呼吸鎖の変化を調べた.
【方法】撹拌数を調整して溶存酸素を一定に保つ条件(DO-stat)及び, 撹拌数を 500, 600, 700rpm に固定し, 酸素供給を制限した条件で, ΔΔ 株をジャーファーメンターで培養した. 培養は無機塩発酵培地を用いて 37℃, pH 6.0 にて行った. 各酸素供給条件において, 生育, 糖消費, 有機酸濃度を測定した. また細胞内の生理状態を調べるため, 中枢代謝関連の酵素活性および細胞内 $NAD^+$/NADH を測定した.
【結果と考察】酸素の制限に応じて, 最大生育量は低下したが, 定常期における細胞当りの糖消費速度は増加した. 有機酸については, 解糖系の最終産物であるピルビン酸とアセチル CoA から合成される酢酸の細胞当りの生成量は増加し, TCA 回路の中間体である 2-オキソグルタル酸の生成量は減少した. 酵素活性では PDHc の活性が上昇し, 細胞内 $NAD^+$/NADH 比は低下した. これらの結果から, 酸素制限によって炭素の流れは解糖系から酢酸へより多く流れたと考えられる. 代謝産物が 2-オキソグルタル酸から酢酸へと変化したため NADH 生成は減少したが, 酸素制限による NADH の再酸化抑制の影響がより強いため, 細胞内は還元的になったと考えられる. したがって, ΔΔ 株では酸素制限条件下で, 更なる前駆体物質の供給強化と細胞内還元力の増強が予想され, 酸素制限条件でより還元的物質を効率的に生産できると考えられる.

redox balance, respiratory chain, *Escherichia coli*

発表責任者：横田篤（yokota@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：3F145
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# メタボロームデータを利用した酵母の発酵呼吸状態推定の試み

# The estimation of yeast's fermentation and respiration state using metabolome data

○藤丸 裕貴、門脇 真史、Ferdouse Jannatul、木村 佑太、寺沢 洋平、北垣 浩志（佐賀大農）
○Yuki Fujimaru, Masafumi Kadowaki, Jannatul Ferdouse, Yuta Kimura, youhei Terasawa, Hiroshi Kitagaki (Saga Univ.)

【背景・目的】

酸素濃度は微生物の生理状態に多大な影響を及ぼすことから、発酵産業における微生物による物質の発酵生産には酸素濃度が極めて重要な意義を持つ。しかしながら酸素濃度の測定には煩雑な操作が必要であると同時に測定物の量が必要なことから、特に微小環境や局所的な酸素濃度を測定することは現在の科学技術ではほぼできないと言ってよい。実際の発酵物は不均一であり、局所的な酸素濃度が重要である場合が多いにもかかわらず，そうした情報にアクセスできていない状態であると言える。

一方、近年、生物のもつ代謝産物を網羅的に測定するメタボローム解析が普及してきている。この方法は微量のサンプルをもとに解析が可能であるため、発酵物中に含まれる微生物の局所的な酸化還元状態を測定もしくは推定するために活用できると考えられる。そこでさまざまな酸化還元状態の酵母を用意してメタボローム解析を行った。

【方法】

清酒酵母 RAK1536*his3* 株、ビール酵母 RIB2010 を用い、YPD10%glucose で流動パラフィンを添加して静置培養、YPG3%glycerol で振盪培養を行い、完全発酵型、完全呼吸型の酵母を用意し、それらを嫌気的条件で 6, 12, 24 時間培養して次第に発酵的に移行させる系を構築した。これらの細胞から親水性代謝物を抽出して誘導体化後 GC-MS で分析した。得られた代謝物の含量データをもとに PCA と PLS-DA を行った。

【結果・考察】

酵母の代謝物から GCMS の使用により代謝物 52 種類のピークを検出することができた(そのうち 33 種類を同定した)。そのデータを利用して PCA を行ったところ、培養前、培養 6 時間後の呼吸型と発酵型の酵母が、寄与率 9.7%の第 3 主成分に沿って分離され、PLS-DA によってそれぞれが 100%の確率で判別できた. 12 時間以降は発酵型と呼吸型で判別できないようになった。このことから、メタボローム解析による酵母の発酵呼吸状態の識別のための手がかりを得ることができた。

metabolome, redox state, PLS-DA

発表責任者：北垣浩志（ktgkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

発表番号：3F146
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高品質清酒醸造のための醸造用米・越淡麗の酒造適性に関する研究

# Studies on brewing properties of the sake rice Koshitanrei for high-quality sake brewing

○市川 絵梨[1]、安澤 義彦[1]、鍋倉 義仁[2]、佐藤 謙仁[1]、佐藤 優子[1]、中村 諒[1]、田村 博康[1]、金桶 光起[2]、渡邊 健一[2]、岩下 和裕[3]、平田 大[1,4]([1]朝日酒造、[2]新潟醸試、[3]酒総研、[4]広大・先端研)
○Eri ICHIKAWA[1], Yoshihiko ANZAWA[1], Yoshihito NABEKURA[2], Kenji SATOH[1], Yuko SATOH[1], Ryo NAKAMURA[1], Hiroyasu TAMURA[1], Mitsuoki KANEOKE[2], Ken-ichi WATANABE[2], Kazuhiro IWASHITA[3], Dai HIRATA[1,4] ([1]Asahi Sake Brewing Co., Ltd, [2]Niigata Prefectural Sake Research Institute, [3]National Research Institute of Brewing, [4]Hiroshima Univ. AdSM)

【背景及び目的】

清酒醸造において原料米の品質は清酒の品質を決定する重要な因子の一つである。特に、大吟醸酒醸造においては、優れた原料米品種の選択が必要となる。新潟県では、五百万石の精米特性を改善する目的で、五百万石と山田錦とを交配して越淡麗を開発した。これまでに、越淡麗に関する調査研究は限定的であったため（精米歩合 70%の精白米を使用した醸造特性調査、総米 120kg の試験醸造)、越淡麗の酒造適性について、更なる解析が求められていた。そこで、本発表では、まず、越淡麗の精米歩合 30%までの高度精白米を用いた精米特性と醸造特性について、これまでの解析結果を提示する[1)]。次に、清酒醸造において重要な工程の一つである製麹に着目し、越淡麗に適した麹菌の探索を目的として、市販の種もやしを用いた小スケールでの製麹試験の結果を報告する。

【方法・結果】

（１）越淡麗の精米特性および醸造特性[1)]

越淡麗の精米特性および醸造特性を把握するため、他の酒米 2 品種（五百万石・山田錦）と比較した。越淡麗の心白形状は山田錦と同様の線状心白で、実験室用精米機による白米を用いた剛度測定の結果、その米粒剛度は山田錦と同程度であった。次に、五百万石のみを比較対照とする実機精米機を用いた高度精米試験の結果、越淡麗の無効精米歩合は、五百万石よりも低かった。以上より、越淡麗の優れた精米特性は、線状心白に起因することが示唆され、高度精米に耐えうる性質をもつことが確認できた。また、越淡麗の吸水性および消化性は、五百万石より、ともに高い値を示し、さらに、小スケールの発酵試験で得られた製成酒は、官能試験においても高い評価を得た。

（２）越淡麗に適した麹菌株の探索

新潟県で一般的に使用されている五百万石を比較対照として、市販の種もやしを用いて、シャーレ法[2)]による製麹試験を行った。得られた麹の各種酵素活性（糖化酵素、タンパク分解酵素）を測定することにより、越淡麗に適した麹菌について解析中である。

１）Anzawa et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 77(10), 2160-2165 (2013)
２）岡崎直人ら：醸協,73(5),402-404(1978)

sake rice, koji-mold, sake brewing

発表番号：3F147
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# メタボローム解析による清酒中の麹由来成分の探索

# Metabolome analysis of compounds derived from rice-koji in Japanese sake

○矢澤 彌、後藤 美保、橋本 知子、日下 一尊、水野 昭博（酒総研）
○Hisashi YAZAWA, Miho GOTO, Tomoko HASHIMOTO, Kazutaka KUSAKA, Akihiro MIZUNO (National Research Institute of Brewing)

【目的】清酒製造において原料及び製造方法は、清酒の品質を決定づける様々な成分の構成に多大な影響を及ぼす。清酒の原料である米麹（以下、麹という）は、もろみ中の酵母の増殖に必要な成分及びアルコール発酵に必要なデンプンの糖化等に関わる酵素を供給するだけでなく、その含有成分により清酒の品質を特徴づけていると考えられる。麹が清酒成分にどのように寄与しているかについては興味深いが不明な点が多い。そこで清酒中の麹に由来する成分をメタボローム解析により探索し、製造工程中の動向を調べた。
【方法と結果】様々な麹の使用量で清酒小仕込を行い、製成酒を LC-QTOFMS 及び CE-TOFMS により一斉分析して、麹の使用量と相関のある成分を抽出した。同定後、LC-TQMS により定量した結果、麹の使用量と相関の高い 23 成分を見出した。これらには、アミノ酸（8 種）、糖アルコール（7 種）等、麹中の既知成分の他、これまで報告されていない成分（Putrescine、Stachydrine、Vanillic acid 等）も含まれていた。なお、これらの成分の多くは蒸米では検出されない又は微量しか検出されなかった。各成分のもろみ発酵期間、アルコール添加前後及び製成酒の貯蔵期間（生酒・火入酒）の動向について解析した結果、もろみ発酵中及び生酒での貯蔵期間中で変動が見られる成分（アミノ酸等）が多くある一方、変動がほとんど見られない成分（Stachydrine、Vanillic acid 等）もあった。また、小規模製麹を行い麹の破精廻りの違い、及び原料米の精米歩合による影響を解析した結果、アミノ酸等多くの成分が影響を受けた。一方、これらの影響をほとんど受けない成分（*N*-Acetylglucosamine、Vanillic acid 等）も見られた。

Japanese sake, Rice-koji, Metabolomics

発表責任者：矢澤彌（h.yazawa@nrib.go.jp）

発表番号：3F148
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 漬物から分離した乳酸菌による LPS 失活メカニズムに関する研究

# Mechanisms of Eliminating LPS(lipopolysaccharide) by Lactic Acid Bacteria YK23 islatied from pickles

○浅見 恭子、金内 誠（宮城大学）
○Kyoko ASAMI, Makoto KANAUCHI (Miyagi Univ.)

【目的】発酵食品は古くから健康維持に役立つことが知られており、これは主に乳酸菌の腸内環境改善や抗炎症作用等の健康機能効果である。腸内フローラには、グラム陰性菌のヒト腸内常在菌悪玉菌も存在し、増加により免疫疾患や各種感染症を誘発するといわれている。この悪玉菌由来の免疫刺激物質である細胞壁外膜成分 LPS(lipopolysaccharide、リポ多糖)は、炎症誘発物質として知られ、この無毒化には 250℃で 30 分以上の乾熱滅菌が必要である。LPS を失活する物質として乳タンパク質である LF(ラクトフェリン)が知られているが、熱に弱く市販の牛乳にはほとんど存在しない。さらに日本を含むアジア地域では乳糖不耐症の割合が高いため、乳由来の食品における大量摂取は難しく、発酵食品由来の乳酸菌による効果が期待される。ところで、LPS は O 抗原とコア多糖から成る糖鎖部分と、lipidA から成る脂質部分で構成されており、毒性中心は lipidA であると報告されている。これによる炎症は、菌の死滅により LPS が外膜より遊離し各種免疫細胞を活性化し、炎症性サイトカインが生理活性作用を引き起こすことで誘発される。これまでの研究で乳酸菌は LPS による毒性を減少することが報告されているが、その機作は未だ解明されていない。よって本研究では、乳酸菌による LPS 失活に関するメカニズム解明を目的とし、失活に関与する物質の成分変化を検討することとした。

【方法】乳酸菌は、当研究室保有菌株中で LPS 消去能が最も高い結果が得られた *Pediococcus pentosaceus* YK23 株を使用し、LPS は大腸菌 O26 由来を使用した。YK23 株を GYP 培地で 30℃、24 時間培養し、その培養液を LPS 溶液と 15℃で 24 時間反応させたものを sample とした。また、LPS 溶液添加直後のものを control とした。LPS の毒活性中心である lipidA の変化を分析するため、脂肪酸分析を行った。反応液を塩酸で加水分解し、Bligh-Dyer 法にて脂肪酸を抽出した。その後 GC-MS により脂肪酸の定性定量分析を行った。

【結果】GC-MS による脂肪酸分析の結果、大腸菌 O26 由来 LPS の脂肪酸の組成は、約 40%がミリスチン酸、25%がオレイン酸、7%がパルミチン酸及びステアリン酸であった。control の各脂肪酸量を 100%としたときの sample の相対脂肪酸残存率は、ミリスチン酸が 85%、オレイン酸及びパルミチン酸が 38%、ステアリン酸が 33%であり、いずれも減少した。この結果から、LPS の lipidA 構成脂肪酸が乳酸菌により分解、あるいは取り込まれた可能性が推察され、乳酸菌が LPS の毒性消去の機作に関与していることが示唆された。

Lactic Acid Bacteria, Lipopolysaccharide, Anti inflammatory Effect

発表責任者：浅見　恭子（asmkk.02@gmail.com）

発表番号：3F149
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 白神山地から分離した酵母の分子系統解析と清酒酵母としての可能性の検討

# Molecular phylogenetic analysis of the yeast Saccharomyces cerevisiae strains isolated from the Shirakami Mountains and investigation of their possibility for use as SAKE yeast.

○森山 裕理子[1]、小倉 亮[2]、齋藤 知明[2]、殿内 暁夫[1]([1]弘大農、[2]青森県産業技術センター弘前地域研究所)
○Yuriko MORIYAMA[1], Akira OGURA[2], Tomoaki SAITO[2], Akio TONOUCHI[1] ([1]Hirosaki Univ., [2]Technical Research Institute of Hirosaki Area)

【目的】酵母 *Saccharomyces cerevisiae* はその自然界における生態や分布がほとんど明らかになっていない。世界自然遺産・白神山地には原生的なブナ林が分布し、人為的な影響の少ない生態環境が存在する。白神山地において *S. cerevisiae* がどのような環境に生息し、どのように分化してきたかを明らかにすることと、白神山地からの分離酵母を清酒酵母として利用するための研究を行ったので報告する。
【方法】白神山地の様々な場所からリター・樹皮などを採取して分離源とし、集積培養と平板培地への画線により *S. cerevisiae* の分離を試みた。分子系統解析は複数の SNP 領域を用いて行った。分離株の中から数株を用いて清酒の小仕込み試験醸造を行い、改善すべき問題点を明らかにした上で、分離株を清酒醸造用酵母として活用するためのスクリーニング法の開発・育種改良試験を行った。
【結果・考察】採取した 892 試料から 57 株の *S. cerevisiae* を分離した（2015 年 11 月 24 日現在)。*S. cerevisiae* 分離株の分子系統解析から白神山地の *S. cerevisiae* は複数の固有クラスターを形成し、独自に分化してきた可能性が示唆された。

白神山地から分離した酵母（以下白神酵母と略称）を清酒酵母として利用するための研究を行った。白神酵母は醸造用協会酵母よりも発酵速度が遅いこと、アルコール生産量が低いこと、吟醸香の生産量が低いことが分かった。このことから分離する際のスクリーニング法を工夫してより清酒醸造に適した株を取得することや、分離株を清酒醸造用酵母として育種することの必要性が考えられた。

白神酵母と協会酵母との間で低 pH の麹汁培地での増殖に明確な差異が生じた。すなわち、協会酵母は健全に増殖したが、白神酵母は 75 株中 42 株が増殖しなかったことに加え、増殖した株でも協会酵母に比較して増殖が著しく不良でかつ株間の差も大きかった。低 pH の麹汁培地での酵母の増殖能の有無が清酒醸造適性株のスクリーニングに利用できるかどうかを、現在、小仕込み試験により検討中である。

清酒醸造用の酵母育種として白神酵母の芳香成分生成能の向上を目的とし育種を行った。育種用の株としてブナのリターから分離された白神酵母 No.9 株を選択し変異原処理によらない育種改良を試み、カプロン酸エチル高生産候補株（セルレニン耐性株)、酢酸イソアミル高生産候補株（TFL 耐性株)、β-フェネチルアルコール高生産候補株（4-FFA 耐性株）をそれぞれ得た。これらの株については小仕込み試験により香気成分生産性の解析を行う予定である。

*Saccharomyces cerevisiae*, Shirakami mountains, breeding

発表番号：3F150
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 富山県産大麦麦芽由来「とやま産まれの酵母」の清酒醸造特性

# Characterization of a wild Sake-brewing yeast isolated from malted barley in Toyama.

○尾仲 宏康[1,2]、丸山 潤一[1]、黒岩 真弓[1]、北本 勝ひこ[1] ([1]東大院農生科、[2]富山県大地域セ)
○Hiroyasu ONAKA[1,2], Jun-ichi MARUYAMA[1], Mayumi KUROIWA[1], Katsuhiko KITAMOTO[1]
([1]Univ. Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】清酒醸造には長らく日本醸造協会が頒布する酵母、いわゆる協会酵母が使用されてきているが、近年は地酒の地域性を鑑み、清酒原料の地場産にこだわると共に酵母についても分離源を地元に求めたものが使用される傾向がある。「とやま産まれの酵母」は、富山県産地ビールの醸造用として富山県高岡市産二条大麦麦芽より分離された出芽酵母であり、この酵母で醸造された地ビールの他に清酒、赤ワインなどの商品化が既に行われている。一般に自然環境より分離された酵母、特に麦より分離された酵母は麦酵母と呼ばれ清酒醸造には不適と考えられてきたが、本酵母を用いた清酒はアルコール度数が 20 度近くまで達し、清酒酵母としても十分実用に耐えうるものであった。そこで、天然酵母ながら既に地ビール、清酒、ワインの 3 種類の醸造酵母として使用されている「とやま産まれの酵母」の分離手法及び分子系統解析及び醸造特性の解析について報告する。
【方法と結果】酵母の分離は富山県産の果実（リンゴ、イチジク、柿、ブドウ等）および大麦麦芽を分離源として行った。まず、分離源サンプルを液体の酵母分離培地に添加し、7 日間室温にて静置培養を行った。培養液より泡の発生が認められた時点で、光学顕微鏡での確認により酵母の存在が確認できたため、培養液を希釈し、寒天プレート上で酵母を約 100 株分離した。系統分類を行うために、それぞれの分離酵母ゲノム内の ITS 領域をコロニーPCR によって増幅し塩基配列決定を行い、基準株との比較分類を行った。しかしながらほとんどの酵母は *Candida* 属や *Pichia* 属酵母であり、醸造には適さないことが明らかとなった。そこで、光学顕微鏡による形態観察を指標に上記二種の酵母以外の酵母を選抜し ITS 領域の塩基配列を決定することにより *Saccharomyces cerevisiae* に分類される酵母 1 株を分離した。本酵母を「とやま産まれの酵母」と命名した。清酒の小仕込み試験を協会 701 号をコントロールにして行った結果、酵母の増殖は 701 号より遅いが、高泡形成能は認められず 701 号と同程度であり、産膜形成も認められなかった。発表では発酵特性の詳細を示すと共に、*msn4* 遺伝子、*rim15* 遺伝子等の清酒酵母で特徴的な遺伝子の変異についても報告する予定である。

Sake yeast, brewing yeast, Saccharomyces cerevisiae

発表責任者：尾仲宏康（aonaka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F151
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ヨーグルト発酵における *Streptococcus thermophilus* NADH oxidase の重要性の比較検討

# Comparisons of the contribution of NADH oxidase of *Streptococcus thermophilus* on yogurt fermentation

○田中 雅人[1]、小柳 沙織[1]、村松 明日香[1]、堀内 啓史[2]、佐々木 泰子[1] ([1]明治大農、[2]（株）明治・食品開発研)
○Masato TANAKA[1], Saori KOYANAGI[1], Asuka MURAMATSU[1], Hiroshi HORIUCHI[2], Yasuko SASAKI[1] ([1]Meiji Univ., [2]Reserch & Development Laboratories Meiji Co.Ltd)

【 背景・目的 】

*Streptococcus thermophilus* ( 以下 *S. thermophilus* ) は *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ( 以下 *L. bulgaricus* ) と共にヨーグルト製造に広く利用されている乳酸菌である。これら両菌は単菌でもミルク中で生育可能であるが、共生することによって著しく生育が促進される。両菌間には *L. bulgaricus* から *S. thermophilus* へペプチドやアミノ酸を、*S. thermophilus* から *L. bulgaricus* へギ酸や $CO_2$ などをそれぞれ供与する共生関係が存在する。しかし、菌株の組み合わせによっても共生関係は多様であり、その詳細なメカニズムは分かっていない。2009 年に堀内、佐々木らは、ヨーグルト発酵はミルク中の溶存酸素によって阻害されること、2014 年に溶存酸素の減少を担う主要なメカニズムが *S. thermophilus* の $H_2O$ 生成型 NADH oxidase ( Nox )であることを報告した。さらに両菌の複数の組合せの共生関係を調べた結果、*S. thermophilus* の溶存酸素消費能が共生関係の重要因子であることを見出した。そこで、溶存酸素消費能や Nox 活性が異なる 3 株の *S. thermophilus* の *nox* 欠損株を作製し、生育にどのような影響を与えるか検討を行った。

【 方法・結果・考察・展望 】

当研究室で保持している *S. thermophilus* 菌株の内、① 酸素消費能および Nox 活性が高い株、② 酸素消費能および Nox 活性が中程度の株、③ 酸素消費能および Nox 活性が低い株をノックアウト対象株とした。ノックアウト株の作製には、温度感受性組込みベクターである $pG^+host6$ を用いた。上記 3 菌株の作製したノックアウト株では Nox の活性がないこと、および相補株においては Nox 活性が回復することを確認した。ミルク培地においてはノックアウト株 3 株全てにおいて顕著な生育の遅延が確認された。この時、①および②の株では溶存酸素を 0 mg/kg まで減少させることができなかったが、③の株では、0 mg/kg まで減少させることができた。この結果より、Nox 活性の低い株は活性の高い株よりも Nox への依存度は低いことが示唆され、NADH oxidase 以外の溶存酸素減少メカニズムがより多く働いている可能性が示唆された。現在、上記 3 菌株において *gusA* を用いたプロモーター活性の比較検討を行っており、ヨーグルト発酵における菌株の組合せの多様性に寄与する NADH oxidase 活性について比較考察を行う。

proto-corpolation, *Streptococcus thermophilus*, NADH oxidase

発表番号：3F152
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Streptococcus thermophilus* 及び *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* のヨーグルト発酵におけるウレアーゼの役割について

# The role of urease of *Streptococcus thermophilus* for yogurt fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

○山内 理夏子[1]、堀内 啓史[2]、佐々木 泰子[1] ([1]明治大農、[2](株) 明治・食品開発研)
○RIKAKO YAMAUCHI[1], HIROSHI HORIUCHI[2], YASUKO SASAKI[1] ([1]Meiji Univ., [2]Research & Development Laboratories Meiji Co.Ltd)

【目的】*Streptococcus thermophilus*（ *S. thermophilus* ）と *Lacotobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*（ *L. bulgaricus* ）によるヨーグルト発酵はミルク中の溶存酸素により阻害されるため、ミルク培地への窒素曝気によって発酵時間が短縮される。 *S. thermophilus* 単菌培養への窒素曝気は、株によって程度は異なるが、共生培養と同様に発酵の促進効果がみられた。しかし、*L. bulgaricus* 単菌培養では 8 株中 5 株で発酵遅延が見られた。この遅延は、窒素曝気によるミルク中の二酸化炭素減少によると考えられ、共生培養において発酵遅延が起きないのは、*S. thermophilus* のウレアーゼによる二酸化炭素供給があるためと推定された。上記 2 菌種間の共生関係は多様なため、本研究では 3 株の *S. thermophilus* のウレアーゼノックアウト株（ *ΔureC* ）と 8 株の *L. bulgaricus* という複数の組合せの共生関係におけるウレアーゼの役割、すなわち、二酸化炭素とアンモニアの供給について検討することを目的とした。
【方法】*S. thermophilus* のウレアーゼクラスター内の *ureC* 遺伝子の一部（ 693 bp ）を欠失させるため、温度感受性ベクター（ pG$^+$urC69 ）を導入後、二重相同組換えによって 3 株のウレアーゼノックアウト株（ *Δ ureC* ）を取得した。共生培養は、10%スキムミルク、43℃で行い、経時的に酸度を測定した。*L. bulgaricus* 単菌培養では、ギ酸ナトリウム を添加した。窒素曝気処理として培地に窒素を 15 分間曝気後、二酸化炭素添加として 30 mM $NaHCO_3$ を、アンモニア添加として 10 mM ( $NH_4$ )$_2SO_4$ をそれぞれ加えた。
【結果と方法】*L. bulgaricus* 8 株の単菌培養において、ミルク培地に窒素曝気処理を行うと 5 株で発酵遅延が見られたが、そのうち 3 株で窒素曝気処理後の 30 mM $NaHCO_3$ 添加によって発酵の回復がみられた。このことより *L. bulgaricus* は生育に二酸化炭素を必要とし、その要求性は株によって異なることが示唆された。3 株の *S. thermophilus Δ ureC* を取得し、ウレアーゼの失活を確認した。3 株の野生株または *Δ ureC* と二酸化炭素要求性が異なる複数の *L. bulgaricus* との共生培養へ窒素曝気処理を行ったところ、どの株の組合せでも *Δ ureC* との共生培養では発酵遅延がみられ、ヨーグルト発酵におけるウレアーゼの重要性が確認された。また *Δ ureC* との共生においては、*L. bulgaricus* 単菌では認められなかった（ $(NH_4)_2SO_4$ 添加効果が認められたことから、*S. thermophilus* 自身へのアンモニア供給源としてのウレアーゼの重要性が示唆された。さらに株に依存する多様な共生関係においてのウレアーゼの寄与について詳細な検討結果を報告する。

proto-corporation, *Streptococcus thermophilus*, urease

発表責任者：山内理夏子（ef21143@meiji.ac.jp）

発表番号：3F153
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Acetobacter* 属酢酸菌における酢酸発酵能と中間代謝物アセトアルデヒド生成との相関
Relationship between acetic acid fermentation efficiency and acetaldehyde production in *Acetobacter pasteurianus*

○楢崎 暢[1]、石川 森夫[1]、阿部 達明[1]、岸 幹也[2]、小泉 幸道[1]、貝沼（岡本） 章子[1]([1]東京農大・応生科醸造、[2]Mitzkan Holdings 中研)
○Toru NARASAKI[1], Morio Ishikawa[1], Tatsuaki Abe[1], Mikiya Kishi[2], Yukimichi Koizumi[1], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Central Research Institute, Mizkan Holdings Co., Ltd)

【目的】酢酸菌は細胞膜上に局在するアルコールデヒドロゲナーゼ（ADH）とアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)によりエタノールからアセトアルデヒドを介して酢酸を生成しエネルギーを獲得する酢酸発酵を行う。これらは食酢醸造の発酵菌として知られ、一般に伝統的な醸造法である静置発酵法には *Acetobacter* 属酢酸菌が用いられている。しかし、同属同種であっても、その発酵能は株によって異なり、食酢醸造現場では酢酸発酵能に優れた株が用いられているが、何故菌株によって酢酸発酵能が異なるかについての検証例は少なく、未解明な点が多く残されている。そこで、本研究では *Acetobacter pasteurianus* を用いてその理由について検証を行うことを目的とした。
【方法】菌株は *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株及び N-23 株を供試し、YP 基本培地（1% yeast extract, 1% hipolypepton）に炭素源としてエタノールを添加して培養した。染色体上の *aldh* 遺伝子の破壊は、相同組換えによる遺伝子置換により行った。培地中のエタノール・アセトアルデヒド・酢酸の定量は GC および HPLC を用いて行なった。発現ベクターは、プラスミド pMV24 に発現量の高いリボソームサブユニット（S13 サブユニット）遺伝子のプロモーターを組み込んで作製した。遺伝子の発現量は qRT-PCR 法で測定した。
【結果および考察】NBRC 3283 株および N-23 株のエタノール 5%存在下における生育挙動を比較したところ、NBRC 3283 株は培地中のエタノールを全て酸化し約 5%の酢酸を生成した一方、N-23 株においては約 3%の酢酸生成に留まり、同時に著しい生菌数の減少が確認された。この生菌数の減少は、培地中のアセトアルデヒドの蓄積量との間に相関が観察されたため、株間の酢酸発酵能の違いはアルデヒド蓄積量に依存することが推測された。そこで、細胞膜結合性 ALDH の遺伝子を破壊した N-23 株を作製し、同条件で生育させたところ、アルデヒドの蓄積量の増加と生菌数の著しい減少、及びそれに伴うエタノールの残存と酢酸生成量の低下が観察された。本破壊株中、ベクターにより *aldh* 遺伝子を高発現させて、ADH に対する ALDH の発現比率を親株より高め、同条件で酢酸発酵能を検討した結果、親株が 3%程度の酢酸生成能しか示さなかった一方、親株の約 10 倍の *aldh* 発現量を示した高発現株はアルデヒドの蓄積および生菌数の減少を示さず、最終的に NBRC 3283 と同様の約 5%の酢酸生成能を示した。これらのことから、従来、酢酸菌のエタノール耐性や酢酸耐性に因ると考えられてきた酢酸発酵能は、菌体のアルデヒド処理能力に大きく依存していることが明らかとなった。

acetaldehyde, acetic acid fermentation, *Acetobacter pasteurianus*

発表番号：3F154
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 清酒酵母の醸造特性に及ぼすアルギナーゼ活性の影響

# The Effect of Arginase Activity on the Brewing Characteristics of Sake Yeast

○五島 徹也[1]、濱田 つかさ[1,2]、周 延[1]、福田 央[1]、赤尾 健[1,2]（[1]酒総研、[2]広島大院・先端研・分子生命）
○Tetsuya GOSHIMA[1], Tsukasa HAMADA[1,2], Yan ZHOU[1], Hisashi FUKUDA[1], Takeshi AKAO[1,2]
([1]NRIB, [2]Hiroshima Univ)

【背景・目的】

濃醇甘口から淡麗辛口まで様々な種類の清酒があるが、日本酒の香味は甘味・酸味・辛味・苦味・渋味成分が複雑にからみ合い、うま味や香りも一体となって構成される。アミノ酸は清酒の呈味に影響するもので、特に、アルギニンはロイシン、バリン、チロシンと共に苦味を示すアミノ酸として知られている。

尿素サイクルの中間代謝物でもあるアルギニンは、酵母細胞内において、アルギナーゼ（Car1p）によってオルニチンと尿素に分解される。酒類中の尿素はエタノールと反応し、カルバミン酸エチルが生成する。従って、清酒中の尿素濃度を低く抑えることが、カルバミン酸エチルの低減化には効果的であり、酵母による尿素生成の低減方法として、アルギナーゼに異常がある変異株のみが生育する選択分離用培地を用いた尿素非生産性酵母を選抜する方法が開発され、実用清酒酵母から尿素非生産性菌株の育種が行われている。しかし、醸造特性との関係性については詳細に調べられていない。そこで、我々は清酒酵母菌株から新たに尿素非生産性株を選抜し、尿素非生産性と醸造特性の関係について調査することにした。

【方法・結果】

上記の方法を用いて自然突然変異により様々な清酒酵母菌株から尿素非生産性株を選抜した(1)。その結果、取得した尿素非生産変異体の大半は、アルギナーゼ活性を失っていたが、予想とは異なり、アルギナーゼ活性が向上している変異体も存在していた。つまり、酵母の尿素非生産性による醸造特性への影響はアルギナーゼ活性の有無による 2 通りに分類されると考えられた。また、アルギニン代謝活性の変動に応じて尿素非生産性を獲得する未知の制御機構の存在も示唆された。

今回、カナバニン耐性を指標に取得した尿素非生産性株を用いた実験結果から、アルギナーゼ活性が醸造特性に及ぼす影響について得られた知見について発表する。

1. 五島ら：日本農芸化学会大会 2015 年度大会要旨集, 3A21p17

urea, ethyl carbamate, arginase

発表責任者：五島徹也（t.goshima@nrib.go.jp）

発表番号：3F155
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ユビキチン-プロテアソームシステムの遺伝子発現を司る転写因子 Rpn4 を介したパン酵母の冷凍ストレス耐性
Rpn4, a key transcriptional activator of the ubiquitin-proteasome system, is essential for freezing stress tolerance of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○渡辺 大輔[1]、関口 拓史[2]、杉本 幸子[1]、長澤 淳[2]、喜田 直孝[2]、高木 博史[1] ([1]奈良先端大・バイオ、[2]テーブルマーク・食品開発セ)
○Daisuke WATANABE[1], Hiroshi SEKIGUCHI[2], Yukiko SUGIMOTO[1], Atsushi NAGASAWA[2], Naotaka KIDA[2], Hiroshi TAKAGI[1] ([1]NAIST, [2]TableMark)

酵母を、目的の活性を保持したまま冷凍状態で流通することができれば、種々の発酵産業において有益な技術となることが期待される。そこで本研究では、冷凍ストレスがパン酵母の発酵力と遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。パン酵母 45 株および冷凍生地用に用いられる YF 株を用いてバルクイーストを調製し、2 週間冷蔵または冷凍保存した後に高糖生地を模倣した液体培地に植菌し、発酵速度を測定したところ、いずれの株においても、冷蔵保存の場合と比較して冷凍保存により発酵初速度の低下が認められた。そこで、この発酵過程の細胞から全 RNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析に供したところ、両株の冷凍保存後のサンプルに共通して、有機酸代謝に関連する遺伝子の発現が有意に上昇していた。このことから、冷凍ストレスにより炭素代謝のフラックスが解糖から呼吸に傾き、発酵力が低下したと推測された。我々は以前に、グルコース脱抑制経路が発酵を抑制することを報告しており (Watanabe *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**: 2255-2262 (2013))、今回の結果もそのような知見に合致すると考えられる。また、YF 株は冷凍パン生地中では高い耐性を示す株であるとされているが、今回のようにバルクイーストを直接冷凍保存した場合には、45 株よりもさらに顕著な発酵力の低下を示した。この YF 株に特異的な遺伝子発現の特徴を探索した結果、ユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解に関連する遺伝子の発現が YF 株においてのみ有意に低下していることを見出した。この系はストレスにより傷害を受けたタンパク質を効率良く除去するために必要なメカニズムであることから、冷凍保存により傷害を受けたタンパク質の蓄積が、YF 株における冷凍ストレス後の発酵力の低下に関連している可能性が示唆された。このことを示すために、ユビキチン-プロテアソーム関連遺伝子の発現誘導において中心的な役割を果たすことが報告されている転写因子 Rpn4 に着目し、実験室酵母を用いて発酵力に及ぼす影響を調べたところ、*RPN4* 遺伝子の欠損により、YF 株と同様にバルクイースト調製後の冷凍保存による発酵力の低下がより顕著となった。さらに、YF 株は 45 株には存在しない *RPN4* 遺伝子上のナンセンス変異（C221A；TCG [Ser74]→TAG [Stop]）を有しており、かつ、YF 株を親株として育種された改良株では復帰変異（A221G；TAG [Stop]→TTG [Leu74]）が生じていたことから、Rpn4 の機能欠損が YF 株における冷凍ストレス後の発酵力の低下の原因であることが証明された。以上の結果から、冷凍ストレス応答における Rpn4 およびユビキチン-プロテアソーム系の機能の重要性を明らかにし、Rpn4 の機能強化によって冷凍ストレス耐性酵母を育種できる可能性を提唱することができた。

freezing stress, ubiquitin-proteasome system, baker's yeast

発表責任者：高木 博史（hiro@bs.naist.jp）

発表番号：3F156
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# コリネ型細菌によるグルタミン酸発酵における遺伝子発現・代謝プロファイルの解析

# Analysis of gene expression and metabolite profile during glutamic acid fermentation by *Corynebacterium glutamicum*

○平沢 敬[1]、齊藤 正輝[2]、吉川 勝徳[2]、古澤 力[3]、清水 浩[2]([1]東工大院生命理工・生物プロセス、[2]阪大院情報・バイオ情報、[3]理研・QBiC)
○ Takashi Hirasawa[1], Masaki Saito[2], Katsunori Yoshikawa[2], Chikara Furusawa[3], Hiroshi Shimizu[2] ([1]Dept. of Bioeng., Tokyo Tech., [2]Grad. Sch. of IST., Osaka Univ., [3]QBiC, RIKEN)

コリネ型細菌 *Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸を著量生産する細菌として知られ、現在ではさまざまなアミノ酸や有機酸などの生産に利用されている。*C. glutamicum* によるグルタミン酸は、ペプチドグリカン合成を阻害するペニシリンを添加することにより誘導される。グルタミン酸生産については、TCA サイクルとグルタミン酸生合成経路の分岐点に位置する 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体 (ODHC)の活性低下 (Kawahara et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997)、ODHC 活性の低下への OdhI タンパク質の関与 (Kim et al. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010･2011)、グルタミン酸の排出へのメカノセンシティブチャネルの関与 (Nakamura et al. Appl. Environ. Microbiol. 2012; Yamashita et al. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2013)などが報告されている。しかしながら、グルタミン酸生産のメカニズムは未だ不明な点が多い。本研究では、グルタミン酸生産のメカニズムを明らかにすることを目指し、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析およびキャピラリー電気泳動-質量分析計を用いた代謝プロファイル解析を行った。

ジャーファーメンターを用いて *C. glutamicum* ATCC 13032 株を培養し、対数増殖初期にペニシリンを添加してグルタミン酸生産を誘導した。そして、ペニシリン添加前および添加後の細胞を経時的に回収し、トータル RNA を抽出して遺伝子発現解析に、また細胞内代謝物質を抽出して代謝プロファイル解析に供した。ペニシリンによりグルタミン酸生産を誘導すると、解糖系から TCA サイクルをへてグルタミン酸合成に至るまでの酵素をコードする遺伝子の多くはあまり発現が変化せず維持されていた。また、ODHC の活性低下にかかわるタンパク質をコードする *odhI* 遺伝子や、グルタミン酸の排出にかかわるメカノセンシティブチャネルをコードする NCgl1221 遺伝子の発現は上昇した。一方、ペニシリンの添加により解糖系や TCA サイクルの代謝物質の含量は大きく低下し、ほとんど蓄積が見られなかった。ペニシリン添加によりグルタミン酸生産を誘導すると、解糖系や TCA サイクルの酵素をコードする遺伝子の発現レベルを保ちつつ *odhI* 遺伝子を発現上昇させるという遺伝子発現レベルでの制御により、細胞内代謝をグルタミン酸の生産へと切り替えることで細胞内に取り込んだ炭素源をグルタミン酸にまで効率よく変換するとともに、NCgl1221 遺伝子の発現上昇により細胞外排出を促進させていることが推測された。

*Corynebacterium glutamicum*, Glutamic acid fermentation, Omics analysis

発表責任者：平沢　敬（thirasawa@bio.titech.ac.jp）

発表番号：3F157
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# RNA-seq 法による酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株のグリセリン利用時における転写挙動の網羅的解析

# RNA-seq analysis on transcriptional behavior of *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 grown with glycerol as a carbon source

○阿部 達明[1]、石川 森夫[1]、松原 拓哉[1]、兼崎 友[2]、吉川 博文[2,3]、小泉 幸道[1]、貝沼（岡本） 章子[1]（[1]東京農大・応生科醸造、[2]東京農大・ゲノムセンター、[3]東京農大・応生科バイオ）
○Tatsuaki ABE[1], Morio Ishikawa[1], Takuya Matsubara[1], Yu Kanesaki[2], Hirofumi Yoshikawa[2,3], Yukimichi Koizumi[1], Akiko Okamoto-Kainuma[1] ([1]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [2]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [3]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric.)

【目的】酢酸菌は細胞膜上での酸化発酵により ATP を獲得するが、細胞内の基幹代謝経路を介した通常の ATP 生成経路も有する。これまでに演者らは、異なる基質の利用時における両 ATP 獲得系の関係について RNA-seq 法で比較解析を行い、（１）エタノールを利用する酸化発酵（酢酸発酵）時には基幹代謝系が殆ど駆動せず、エネルギー代謝と物質代謝が独立して活動すること（２）酢酸を自己消費する酢酸過酸化時には通常の細菌と同様、細胞内の基幹代謝経路と物質代謝系が連動し駆動すること（３）グルコースを利用する酸化発酵（グルコン酸発酵）時には、酸化発酵と並行して細胞内の基幹代謝経路が活発に駆動することの 3 点の知見を得ている[1, 2)]。このように酢酸菌は炭素源の違いによって細胞内の代謝経路の動態が大きく変化することが明らかになりつつあるが、今回、グリセリンを炭素源とした場合の知見を得たので報告する。
【方法】酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC 3283 株を供試し、YPG 培地（1%yeast extract, 1%hipolypepton, 170 mM glycerol）を用いて培養を行った。対数期初期・後期、定常期の各菌体について RNA を抽出し、Illumina Hiseq2000 を用いた RNA-seq 解析を行った。得られた結果について恒常的に発現する遺伝子、各生育時期で特徴的に発現する遺伝子群を抽出し、代謝経路へのマッピングおよび発現上位因子の抽出を行った。
【結果及び考察】本菌のグリセリン培養時における生育挙動は、エタノール・グルコース利用時とは異なり、長い増殖期（エタノール・グルコース利用時の約 4 倍）および高い増殖率（同約 6 倍）を示すという特徴を有していた。RNA-seq 解析の結果、生育時期を通しての基幹代謝経路因子・ATP 合成系因子・酸化ストレス応答因子・リボゾームタンパク質・分子シャペロン等の高発現が観察され、常時活発な通常の好気代謝が起こっていることが示唆された。これは本菌が細胞膜上にグリセロール脱水素酵素を有していないため酸化発酵を起こさず、グリセロールを全て細胞内に取り込んだ後、基幹代謝経路を介して通常のエネルギー代謝と物質代謝を常時連動させながら生育しているためと考えられた。以上のことより、酢酸菌は、細胞膜上の脱水素酵素の種類および有無により、炭素源の種類に応じた多様な代謝挙動を示すことが明らかになった。

1）松原ら：日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集，2A21p07（2015）
2）阿部ら：第 67 回 日本生物工学会大会講演要旨集，p. 122（2015）

*Acetobacter pasteurianus*, RNA-seq, metabolic pathway

発表番号：3F158
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂高蓄積変異株の油脂合成・分解遺伝子の発現解析
Expression profile of genes responsible for lipid production and degradation in oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* mutants accumulating a high level of lipid

○海老名 沙也佳[1]、阿部 史歩[1]、志田 洋介[2]、小笠原 渉[2]、山崎 晴丈[1]、高久 洋暁[1]([1]新潟薬大・応生命、[2]長岡技科大)
○Sayaka EBINA[1], Shiho ABE[1], Yosuke SHIDA[2], Wataru OGASAWARA[2], Harutake YAMAZAKI[1], Hiroaki TAKAKU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci.,Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci., [2]Nagaoka Univ. Technol)

日本の食用油脂は輸入に大きく依存しており、自給率の向上は急務である。日本の農業人口の減少、国土面積を考慮すると、油糧植物からの油脂獲得は困難である。そこで本研究では糖を資化して細胞内に油脂を蓄積する油脂酵母に注目した。その中でも本研究で取り扱う *Lipomyces starkeyi* は、食品・醸造残さなどのバイオマス由来の様々な糖から油脂生産が可能である。また、*L. starkeyi* が生産する油脂は植物油と似た性状を持ち、食用油として有望である。しかし *L. starkeyi* の産業利用のためには油脂生産性の向上が不可欠であるが、油脂合成・分解関連遺伝子の知見は少なく、その機構は未だ詳細に解明されていない。そこで本研究では油脂高蓄積変異株を取得し、さらに野生株とこの油脂高蓄積株の油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析の比較から油脂蓄積に重要な遺伝子の特定を目的とした。

EMS で変異を導入した細胞群から､Percoll 密度勾配遠心法で油脂高蓄積変異株群の濃縮を試みた。Percoll に菌体を混合し遠心すると、水と油脂の密度の違いから油脂を高蓄積した細胞を上層に分画することができる。この原理を利用して変異株群を遠心分離後、上層を分取、培養し、さらに遠心分離する操作を繰り返すことで油脂高蓄積変異株の濃縮を行った。Flow cytometry 解析及び顕微鏡観察で油脂高蓄積変異株の濃縮を確認後、コロニーを単離し、Flow cytometry によるスクリーニングの結果、油脂高蓄積変異株を 3 株取得した。これらの高蓄積変異株は、油脂の蓄積速度や糖消費速度が野生株と異なり、それぞれユニークな油脂高蓄積性を示した。次に定量 PCR を用いて、これらの株の油脂合成・分解関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、全ての高蓄積変異株でアシル CoA 合成に関与する遺伝子 *ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* の発現量が培養期間を通して野生株を上回っていた。また、これら遺伝子が高発現している変異株ほど、より多くの油脂を蓄積していた。一方、ジアシルグリセロールとアシル CoA のトリアシルグリセロール(TAG)合成に関与する遺伝子 *DGA1*、TAG 分解に関与する遺伝子 *TGL3*、*TGL4* の発現量は、野生株と変異株では同程度の発現量を示した。以上のことから、*ACL1*、*ACC1*、*FAS1*、*FAS2* の発現量上昇によるアシル CoA 量の上昇が油脂高蓄積を引き起こし、油脂蓄積の律速段階はアシル CoA の供給であると考えられた。現在はこれら変異株について、さらに詳細な遺伝子発現解析を行っている。

なお、本研究は農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」の支援を受けて行われた。

*Lipomyces starkeyi*, oleaginous yeast, lipid

発表責任者：高久洋暁（htakaku@nupals.ac.jp）

発表番号：3F159
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

焼酎用 4 号酵母を用いた差し酛において麹に用いる原料の違いが酵母純度に与える影響
Influence of different raw materials of *koji* to yeast purity by *sashimoto* using the *shochu* yeast S-4

○武藤 貴史、稲橋 正明、岡崎 直人、石川 雄章（日本醸造協会）
○Takafumi MUTOU, Masaaki INAHASHI, Naoto OKAZAKI, Takeaki ISHIKAWA (Brewing Society of Japan)

【目的】
焼酎製造では、一次醪の一部を種酵母とする「差し酛」が行われている。これまで、差し酛を行うと添加酵母の純度が低下することが報告されており、演者らが報告した差し酛[1)]においても酵母純度の低下が認められた。そこで、醪中の添加酵母の純度を高く維持することを目的に、きょうかい酵母焼酎用 4 号（ S4 ）による差し酛の酵母純度の推移を調べた結果、使用した麹原料により異なることを見出し、その要因を明らかにしたので報告する。

【方法】
麦焼酎用醪から分離したセルレニン感受性酵母である WS1(*S. cereviciae*)とセルレニン耐性の S4 を初発の仕込み時に 1:1 の割合で添加し、総原料 150 g の小仕込み試験を行った。あらかじめ米麹及び麦麹を水で抽出(23 ℃, 3 hr)してホルモール態窒素を測定し、測定値から窒素量で換算した硫酸アンモニウム濃度(麦麹 ： 0.026 % , 米麹 ： 0.053 %)を算出し、それぞれの濃度で培地を調製して差し酛による酵母純度及び各酵母の増殖速度を測定した。差し酛は、48 時間後の醪または培養液を次の一次醪または培地に対して 0.6 %を添加した。酵母純度の測定は、48 時間後の醪または培養液を希釈して塗抹し、YNB 寒天培地に生育したコロニー数に対するセルレニン 2 mg/L 含有 YNB 寒天培地に生育したコロニー数を計数することで、S4 の酵母純度を算出した。

【結果】
麦麹を使用した一次醪では差し酛により酵母純度が低下したのに対し、米麹では純度が高くなり、S4 の特徴香であるカプロン酸エチル含量は純度の推移と連動した。ロットの異なる麹を用いても同様の結果を得たことから、麹原料の違いが純度に影響すると推測した。次に、硫酸アンモニウム 0.053% 含有培地で差し酛を行ったところ、0.026 %含有培地と比較して酵母純度がより高くなった。さらに、増殖速度は硫酸アンモニウム 0.026%では S4 と WS1 は拮抗するのに対し、硫酸アンモニウム 0.053%では S4 の増殖速度が WS1 よりも速かった。この結果より、米麹を用いた一次醪では溶出する窒素含量が多いために S4 の増殖速度がより速くなり、差し酛により酵母純度が高くなったものと推察した。

1）平成 25 年度日本醸造学会大会講演要旨集 8 頁

*Sashimoto*, Yeast purity, *Koji*

発表責任者：武藤貴史（mutoh@jozo.or.jp）

発表番号：3F160
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# PEPA 破壊株を用いた米麹・清酒の成分分析

# Metabolome Analysis of Kouji and Sake compornent on PEPA deletion strain

○濱田 雄太郎[1,2]、梅尾 美幸[2]、織田 健[2]、岩下 和裕[1,2]([1]広大院・先端研、[2]酒総研)
○Yutaro Hamada[1,2], Miyuki Umeo[2], Ken Oda[2], Kazuhiro Iwashita[1,2] ([1]Hiroshima Univ, [2]NRIB)

【目的】麹菌の酸性プロテアーゼ(APase)は、清酒の呈味に影響を与える重要な酵素であると考えられ、原料米の溶解や米タンパク質中の PB-Ⅱのグルテリンを主に分解することなどが知られている。また、麹菌の酸性プロテアーゼの一種として *pepA* 遺伝子がクローニングされ製麹中の発現が解析されている。これまで当研究室では、*pepA* 破壊株の米麹を用いて、米グルテリンを基質とした APase 活性測定を行ったところ、比活性が約 90%減少し、破壊株のもたらす米麹への影響は大きいと考えられた。そこで、破壊株の米麹の諸性質を解析し、PEPA の醸造的役割を解明することを目的とした。
【方法・結果】まず、*pepA* 破壊による米麹への影響を検討するため、米麹中のアミノ酸分析・メタボローム解析を行った。破壊株において多くのアミノ酸が 50%以下と顕著な減少が見られた。メタボローム分析データによる主成分分析を行ったところ、破壊株と対照株で明確な分散が見られた。Loading-Plot 解析では Arg、Phe、Gln の寄与が大きく、Trp、His、Tyr など比較的かさ高いアミノ酸の寄与も見られた。そこで、米麹のタンパク質・ペプチド・アミノ酸の組成比が破壊株では変化していると考え、窒素元素分析により窒素存在比を検討した。破壊株では可溶化する窒素源が減少し、高分子画分は変化せず、低分子画分が有意に減少した。よって破壊株の米麹では、仕込み初期の窒素源供給の低下が示唆される。

次に、*pepA* 破壊株の米麹による製成酒成分変化について検討するため、小仕込み試験を行い、一般成分、香気成分、有機酸組成、アミノ酸組成の分析、およびメタボローム解析を行った。まず、発酵経過に関しては、発酵初期に 1 日毎の炭酸ガス減量が顕著に減少し、破壊株の米麹のアミノ酸供給の低下が酵母の発酵速度に影響したと考えられる。また、破壊株の仕込みでは粕歩合が 2 倍に上昇し、米の溶解が著しく低下した。一般成分では全て有意な減少が見られた。香気成分では破壊株で酢酸イソアミルの上昇が見られ、アミノ酸の濃度低下により酵母の代謝に変化が起きたと示唆される。大部分のアミノ酸は、破壊株で 20～40%減少が見られた一方、変化が見られないものがあった。一方、メタボローム分析データによる主成分分析の結果､破壊株と対照株の製成酒はPC1として70%で分散し、Loading-Plot 解析の結果アミノ酸が多く検出され、Arg、Pro、Phe が分散に寄与した。以上より、*pepA* 破壊の及ぼす影響は米麹のみならず、製成酒にも至ることが明らかになった。PEPA は米麹の酵素バランスに影響を与えると共にアミノ酸供給のバランスを変化させ、米の溶解や酵母の生育に関わっている。

*Aspergillus oryzae*, acid protease, Sake

発表番号：3F161
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# TCA 回路酵素遺伝子過剰発現による *Mortierella alpina* の脂質生産性向上の検討

# The effect of TCA cycle enzyme over-expression for lipid-productivity in *Mortierella alpina*

○島田 良美[1]、安藤 晃規[2]、和泉 自泰[3]、馬場 健史[3]、岸野 重信[1]、櫻谷 英治[4]、島 純[5]、小川 順[1,2] ([1]京大院・農、[2]京大・生理化、[3]九大・生医研、[4]徳島大院・ソシオ、[5]龍谷大・農)
○Yoshimi Shimada[1], Akiori Ando[2], Yoshikazu Izumi[3], Takeshi Bamba[3], Shigenobu Kishino[1], Eiji Sakuradani[4], Jun Shima[5], Jun Ogawa[1,2] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Kyoto Univ. Research Unit for Physiological Chemistry, [3]Med. Inst. Bioreg., Kyusyu Univ, [4]Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., [5]Agric. Ryukoku Univ.)

【目的】

当研究室で分離した糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株は、細胞内に脂質を高蓄積する油糧微生物で、アラキドン酸生産菌として工業的に利用されている。我々はこれまでに、本菌株の代謝プロファイリングにより、脂質生産時において TCA 回路の亢進に起因してクエン酸やリンゴ酸の蓄積量が増加することを明らかにしている[1)]。本研究では、TCA 回路関連酵素の過剰発現により、TCA 回路の回転を促進することが、本菌の脂質生産性に与える影響を評価した。

【方法および結果】

*M. alpina* において、脂質生産時に TCA 回路中で亢進していると考えられた２つの酵素、アコニターゼ(ACO)およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(IDH)に着目した。それぞれの酵素をコードする遺伝子を検索したところ、候補遺伝子として４つの ACO 遺伝子と３つの IDH 遺伝子を見いだした。本菌の cDNA を鋳型として PCR にて増幅後、本菌由来の過剰発現プロモーターSSA2　にて制御した発現ベクターを構築し、アグロバクテリウム法により導入した。得られた形質転換株を GY 培地(glucose 2%, yeast extract 1%)にて培養し、菌体内脂質を抽出して GLC により分析した。形質転換株の生育と脂肪酸組成は親株と同等であった。現在、詳細な脂質生産量の解析を行っている。

【参考】

１）　和泉自泰ら,「油糧微生物 *Mortierella alpina* のメタボローム解析」,第９回メタボロームシンポジウム，0-41，2015 年 10 月静岡

*Mortierella alpina*, lipid production, TCA cycle

発表番号：3F162
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 並行複発酵による乳からのアルコール発酵の可能性

# Alcoholic Fermentation of Milk by Parallel Multiple Fermentation

○脇田 義久[1]、神田 一[2]、金子 剛[2]、加戸 久生[1]、金田 弘挙[1]、土屋 陽一[1]、中村 剛[2] ([1]サッポロホールディングス・グループ研究戦略推進部、[2]サッポロビール・価値創造フロンティア研究所)
○Yoshihisa Wakita[1], Hajime Kanda[2], Takeshi Kaneko[2], Kado Hisao[1], Hirotaka Kaneda[1], Youichi Tsuchiya[1], Takeshi Nakamura[2] ([1]SAPPORO HOLDINGS LTD., [2]SAPPORO BREWERIES LTD.)

代表的な酒類酵母である *Saccharomyces cerevisiae* はラクトースを分解する能力がないことから、乳のみを原料として酒類を製造することは不可能である。一方、ヨーグルトで使用されている乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* はβガラクトシダーゼによりラクトースをガラクトースとグルコースに分解可能である。本研究では乳酸菌と酵母の複合発酵による乳からのアルコール産生について検討を行った。はじめに、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 48P 株と *Saccharomyces cerevisiae* SBC3207 株を用いて 10%脱脂粉乳溶液を原料とし 25℃、3 日間発酵を行ったところ、アルコール度数は 0.5%以下であった。この原因として、乳酸菌によるラクトース分解の不十分さや、分解したラクトースに由来するグルコースを乳酸菌自身が利用することが考えられた。そこで、カタボライト抑制を解除することによる高βガラクトシダーゼ産生株の作製を目的とし、NTG による変異処理とその後のグルコースアナログおよびラクトースを糖源とする培地による選抜を実施した。その結果得られた 48A12 株はβガラクトシダーゼを高産生し、且つラクトースの分解により得られたグルコースを自身が消費しにくくなるという予想外の特徴を有していた。そこで、48A12 株と SBC3207 株を用いて 10%脱脂粉乳溶液を発酵したところ、アルコール度数が 1%以上に増加しており、乳を原料とした並行複発酵による新たな酒類製造の可能性が考えられた。また、リシーケンス法により 48A12 株の変異箇所を同定したところ、RNA ポリメラーゼのαサブユニットに点変異が入っており、本変異によりカタボライト抑制が解除されているものと推察された。

milk, parallel multiple fermentation, alcohol

発表責任者：脇田　義久（yoshihisa.wakita@sapporoholdings.co.jp）

発表番号：3F163
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Cryptococcus diffluens* が持つ未知のガラクチュロン酸代謝経路についての研究

# A study for the unknown galacturonate metabolic pathway with the *Cryptococcus diffluens*

○松原 健生[1]、松村 知拓[2]、若林 彩香[2]、濱田 翔平[1]、岸田 正夫[1]（[1]阪府大院生環科・応生科、[2]阪府大生環科・応生科）
○Takeo Matsubara[1], Tomohiro Matsumura[2], Ayaka Wakabayashi[2], shohei Hamada[1], Masao Kishida[1] ([1]Osaka Pref. Univ. Gard. Sch., [2]Osaka Pref. Univ.)

ペクチンは植物の細胞壁の構成成分や細胞間接着物質として甜菜や柑橘類などに多く含まれる複合多糖であり、D-ガラクチュロン酸はペクチンの主な構成糖である。ペクチンは主に家畜の飼料や増粘剤等の安価な商品に利用されているが、加工コスト等の問題を有しており本来ペクチンが持つ価値に比べ現在その利用範囲は限定的である。我々はペクチンの新たな利用を目的に、微生物の働きを利用したペクチンおよびその主要構成糖であるガラクチュロン酸の高付加価値化学物への再資源化を目指している。当研究室ではガラクチュロン酸資化酵母 *Cryptococcus diffluens* OPU-FC11 株(以下 FC11 株)を単離しており、本酵母のガラクチュロン酸代謝の第一反応が、D-ガラクチュロン酸を希少糖である L-ガラクトン酸に変換するガラクチュロン酸還元反応であることを明らかにしている。酵母でガラクチュロン酸を資化できる例はこれが初めてである。しかし、FC11 株のガラクチュロン酸代謝経路について明らかになっているのはここまでであり、これ以降、中間体を含む代謝経路はわかっていない。本研究ではこの代謝経路を解明し、この酵母がガラクチュロン酸をどのように代謝するかを明らかにするのが目的である。

ガラクチュロン酸含有培地で培養した FC11 株から cDNA を合成して、糸状菌で多く見られる、L-ガラクトン酸デヒドラターゼ変換経路の存在を確かめる為に鋳型とし、糸状菌由来の L-ガラクトン酸デヒドラターゼ遺伝子の共通配列から作成したプライマーを加えて pCR を行ったが、シグナルは得られなかった。このことから FC11 株の L-ガラクトン酸代謝酵素は糸状菌のものとは異なる可能性が示唆された。また、FC11 株の無細胞抽出液を L-ガラクトン酸と反応させ、HPAEC-PAD で分析することによって L-ガラクトン酸の変換反応産物と考えられる新たなピークを確認することができた。現在このピークを示す産物の精製と解析を行っている。また、ガラクチュロン酸代謝経路の探索の為、FC11 株にガラクチュロン酸資化変異株の取得を試みている。

*Cryptococcus diffluens*, D-Galacturonate, L-Galactonate

発表番号：3F164
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 自然界より分離した納豆菌の LDH 活性阻害様化合物の探索と分画

# Screening and separation of the lactate dehydrogenase inhibitor from *Bacillus natto*

○七尾 圭香、大箸 信一、袴田 佳宏（金沢工大）
○Keika NANAO, Shinichi OHASI, Yoshihiro HAKAMADA (Kanazawa I.T)

【目的】乳酸脱水素酵素(LDH)阻害剤として、Epigallocatechin、Galloflavin、FX11 等、種々の化合物が報告されている。これらは、抗がん様作用や抗マラリア作用を示す化合物でマメ科や綿等に含まれている。がんは、日本人の死亡原因第 1 位であり、また、将来、温暖化の影響によりマラリアが日本に上陸する危険性も指摘されている。LDH 阻害剤は 1 つの有効な対抗手段と考えられることから、本研究では、短時間で効率よく LDH 阻害様化合物を回収するために、食品微生物である納豆菌に着目し、納豆菌が LDH 阻害様化合物を有するか検討を行った。

【方法】納豆菌が LDH 阻害様化合物を有するか確認を行った。市販納豆から納豆菌を分離し、1%(w/v)マルトースを炭素源とした液体培地で培養後、培養液を酢酸エチルで処理を行い、酢酸エチル可溶画分をヘキサンおよび 90%(v/v)エタノール可溶画分に分画した。90%(v/v)エタノール可溶画分を HP-20 カラムに掛け、平衡化溶媒の混合比を変えることで、カラム吸着物質を溶出させ、各フラクションの LDH 活性阻害率を測定した。LDH 阻害様化合物の経時的な生成の変化を調べるため、培養 5 日目までの培養液を用いて、LDH 活性阻害率を測定した。納豆菌培養液に LDH 活性阻害が認められたので、納豆菌を得るために自然界から納豆菌の分離を行った。分離した納豆菌 15 株が有する LDH 活性阻害率を、培養 3 日目培養液の有機溶媒抽出画分について測定した。その中から 1 株を選抜し、培養液の有機溶媒画分を PLC シリカゲルプレートにて展開した。シリカゲルプレートを UV 照射して確認されたスポットの部分のシリカをかき取り、溶媒抽出後 LDH 活性阻害率を測定した。

【結果】市販納豆から分離した納豆菌の培養菌体に対して、酢酸エチルで抽出した画分の 90%(v/v)エタノール抽出画分の LDH 活性阻害率を測定した結果、阻害率 24.5%を示した。また、ヘキサン抽出画分に活性阻害は認められず、培地成分による LDH 活性阻害も認められなかった。HP-20 カラムによる溶出では、10%(v/v)エタノール溶出画分に 16.2%の LDH 活性阻害率が認められた。また、LDH 活性阻害様化合物は、納豆菌の培養 3 日目に最も多く生産していることが判った。そこで、自然界からの分離納豆菌 15 株を培養し、3 日目の LDH 活性阻害率を測定した結果、しょう油から分離した納豆菌が最も高い阻害活性を有していることが判った。この納豆菌を培養し、各種有機溶媒で抽出後、PLC シリカゲル $60F_{254}$(2mm)プレートを用いてサンプル 100 µL を展開後、UV 照射で見られたスポットの活性阻害率を測定した結果、LDH 活性阻害率 23.7%が認められた。

lactate dehydrogenase, *Bacillus natto*, inhibitor

発表番号：3F165
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 原料米の違いによるエチル α-グルコシド（α-EG）の発酵製造効率の検討

# Examination of the fermentation production efficiency of ethyl α-glucoside (α-EG) by the difference of rice.

○坊垣 隆之[1,2]、中川 賢哉[3]、澤飯 大夢[3]、尾関 健二[1,3]([1]金工大・院・工・バイオ化学、[2]大関（株）・総研、[3]金工大・バイオ化学・応用バイオ)
○takayuki BOGAKI[1,2], kenya NAKAGAWA[3], hiromu SAWAI[3], kenji OZEKI[1,3] ([1]KIT graduate, [2]Ozeki co.ltd., [3]Kanazawa IT)

【背景】日本酒の第 4 構成成分であるα-EG は甘味と遅効性の苦味を持つ呈味成分であり、通常の日本酒で 0.5～1%程度含有されている。塗布による荒れ肌改善効果が認められることから化粧品に配合されているが、飲用においても動物実験でα-EG 高含有の日本酒による荒れ肌改善効果およびヒトで肘の角質水分量に差が出る報告がある。我々は、学生パネラーによる保湿試験によって、0.01%(w/v)の低濃度のα-EG およびそれを含有する発酵物で、塗布後 15 分から 4 時間以上まで対照と比較して水分保持機能が高いことを報告した。また 0.00001%（0.48μM）α-EG と非常に低濃度で線維芽細胞の増殖を賦活化し、その結果細胞のコラーゲン量の増加に効果がある新規の保湿効果を報告した。塗布による効果に加え、飲用では小腸からグルコーストランスポーターを介して吸収されることから、毛細血管から真皮層へ到達することでこの効果が期待できる。
【目的】我々はこれまでα-EG を高含有する日本酒 1）および焼酎 2）の発酵法を開発した。しかし、これまでデンプン原料の違いによるα-EG の生産性についての報告はなく、今回米原料のデンプン質を構成するアミロース、アミロペクチンの比率の違いによる、α-EG の製造効率を比較し検討した。
【方法および結果】米原料としてα化米のうるち米（精米歩合 70%）もしくは市販もち米を用い、麹を通常の半量の 10%に減らし、α-アミラーゼ剤としてスミチーム L とα-グルコシダーゼ剤として TGB を使用し、15℃で 20 日間の小仕込みを行った。なお、麹は市販の乾燥米麹（精米歩合 70%）を用いた。その結果、アミロペクチン 100%のもち米を使用した場合のαEG 濃度が 3%(w/v)を超え（アルコール 15%(v/v)弱)、アミロース約 20%のうるち米を使用した場合のα-EG は 2.5%程度の日本酒（アルコール 17%）になることが分かった。仕込み温度 30℃、20 日間のミリンでのαEG の製造効率は、うるち米はもち米の半分以下の生産量となった。これらの結果からα-1,4 グルコシド結合よりもα-1,6 グルコシド結合からのα-グルコシダーゼによるα-EG 製造効率が高いことが示唆された。試薬のイソマルトースとマルトースからの酵素反応での製造効率についても報告する。

１）坊垣ら、食品・臨床栄養（2015）
２）Bogaki et al., J. Biol. Macromol.（2015）

Ethyl α-glucoside, α-Glucosidase, Transglucosidase

発表責任者：坊垣　隆之（takayuki.bougaki@ozeki.co.jp）

発表番号：3F166
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂肪細胞分化段階における脂肪生合成関連遺伝子発現に対する紅麹水抽出物の影響

# Effect of water extracts of red mold rice on gene expression of lipogenesis related genes during adipocyte differentiation stage

○橘 信二郎[1,2]、ワンニナイカ インディカ・プラディープ[1,2]、田中 啓士朗[1]、外山 博英[1,2] ([1]琉大・農、[2]鹿児島大・連大農)
○Shinjiro Tachibana[1,2], Indika Pradeep Wanninaika[1,2], Keishiro Tanaka[1], Hirohide Toyama[1,2] ([1]Univ. Ryukyus, [2]Kagoshima Univ.)

【目的・背景】

肥満や過体重は、現代社会において様々な重要疾患のリスク要因となっている。紅麹は多様な二次代謝産物を産生し、血清コレステロール低下作用を有することから漢方薬としても長く利用されてきた。紅麹菌が産生するモナコリンは生体内コレステロール生合成過程において HMG-CoA 還元酵素の強力な拮抗阻害剤として働き、脂質代謝異常症の治療薬として世界的に利用されている。当研究室では、肥満予防と過体重の改善を目標に、食品添加物として利用可能な紅麹由来の水溶性生理活性物質の探索を行ってきた。これまでに、*Monascus pilosus* NBRC4507 株で調製した麹の水抽出画分にマウス脂肪細胞 3T3-L1 細胞の細胞内脂肪滴蓄積阻害活性を見出している。本研究では、脂肪細胞の分化制御および脂肪生成に関わる遺伝子の紅麹抽出物による発現制御について調べた。

【方法】

供試菌株として *M. pilosus* NBRC4507 を用い、蒸煮米に植菌して 30℃で 14 日間培養したものを紅麹試料とした。紅麹から水抽出物を得て濃縮・凍結乾燥し、滅菌水に再溶解して 3T3-L1 細胞試験に用いた。3T3-L1 細胞は、10% FCS と抗生物質を含む DMEM 基本培地で培養し、コンフルエント後に 10% FBS、抗生物質、IBMX、DEX およびインスリンを含む DMEM 培地に交換してさらに 2 日間培養し分化誘導刺激を行った。その後、10% FBS、抗生物質およびインスリンを含む DMEM 培地で 8 日間培養した。細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR 法により各遺伝子の発現量比を調べた。

【結果・考察】

紅麹試料を添加した細胞内において、脂肪細胞分化に関与する転写因子の PPARγや C/EBPαの有意な発現抑制が確認された。また、これらの転写因子の下流にある脂肪生成関連遺伝子の発現も有意に減少した。これらの遺伝子の発現は、脂肪細胞分化初期から中期にかけて特に顕著に抑制されていることが観測された。すなわち、紅麹水抽出物は脂肪細胞分化に関わる転写因子の発現を抑制することで脂肪細胞への分化・肥大化を初期段階で阻害することで脂肪滴蓄積を阻害していると考えられた。

*Monascus*, Lipogenesis, transcription factor

発表責任者：橘信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：3F167
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 深海由来真菌の分子同定および抗生物質の探索

# Molecular identification of fungi from deep-sea environments and search for antibiotics

○高橋 こなみ[1,2]、長野 由梨子[2]、瀧下 清貴[2]、藤倉 克則[2]、横田 賢史[1] ([1]東京海洋大学、[2]海洋研究開発機構)
○Konami Takahashi[1,2], Yuriko Nagano[2], Kiyotaka Takishita[2], Katsunori Fujikura[2], Masashi Yokota[1] ([1]Kaiyo Univ., [2]JAMSTEC)

真菌は、カビやキノコ、酵母が属する生物群のことで、食品や医薬品に利用されるなど、我々の生活に欠かせない微生物である。医薬分野では、1929 年に Fleming によってアオカビから抗生物質 Penicillin が発見されたことを皮切りに、様々な真菌が産生する多種多様な抗生物質が研究され、創薬の分野において非常に重要な役割を果たしてきた。こうした真菌は深海にも生息しており、その高い多様性が報告されている。しかし、容易にアクセスできない等の理由により、陸上由来の真菌に比べれば、抗生物質探索研究も含め、深海由来真菌の研究は進んでいない状況にある。したがって、深海環境の真菌を調べることによって、新規性の高い真菌や新たな抗生物質などの有用な活性物質を発見できる可能性は高い。本研究では、深海由来真菌が産生する有用な抗生物質の探索を目的とし、深海における真菌の多様性とその抗生物質産生能に着目した。

2013 年にブラジル沖水深約 1200m-4200m の深海環境から採集した試料（堆積物、アスファルト湧出物、深海生物）より真菌 112 株を分離培養し、その分子同定、および *Aspergillus tubingensis*、*Candida dublinieusis* の真菌 2 種、*Peudomonas stutzeri*、*Bacillus subtilis* の細菌 2 種、*Saprolegnia paracitica*、*Pythium* sp.の卵菌類 2 種に対する抗菌活性のスクリーニングを行った。得られた真菌から DNA を抽出し、PCR によって増幅された ITS-rDNA 領域の塩基配列情報を基に BLAST 検索により分子同定を行ったところ、112 株中 110 株（糸状菌 94 株、酵母 18 株）はデータベース中の既知配列と 99%以上の相同性を示し、残り 2 株に関しては、それぞれデータベース中の既知配列と 90%の相同性しか示さなかった。この 2 株はほぼ同一の塩基配列であり、これらの塩基配列を用いて系統樹を作成し、形態を観察することで、真菌のどの分類群に属するのか検討した。その結果、Hypocreales 目に属する新規な株である可能性が示唆された。さらに、6 種類の液体培地で糸状菌を単独培養し、その培養上清を用いて抗菌活性スクリーニングを行ったところ、静菌程度の弱い活性も含め、約 65%のサンプルでいずれかの対象菌に対して抗菌活性が認められた。今後はスクリーニングによって得られた抗生物質の詳細な構造解析を行う予定である。

antibiotics, deep-sea, fungi

発表番号：3F168
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 抗糸状菌作用を示す微生物の単離とそのメカニズムの解析

# Anti-fungal-microbial isolation from the biomass-fertilizer in Yamagata, and the elucidation of the mechanism.

○杉村 祐哉[1]、高塚 由美子[1]、横田 健治[2]、西野 徳三[1]、原 富次郎[1]([1]山形大院理工、[2]東農大・応生科)
○ Yuya Sugimura[1], Yumiko Takatsuka[1], Kenji Yokota[2], Tokuzo Nishino[1], Tomijiro Hara[1] ([1]Yamagata Univ., [2]Tokyo University of Agriculture)

【背景と目的】

当研究室では、山形県のバイオマス資源由来の肥料（以下、バイオマス肥料）から取得した *Bacilli* に属する細菌のうち異なる 6 株を複合培養した全溶液を 500 倍希釈し、トマト幼苗へ散布することで、ペスタロチオプシスによるトマト菌核病を合成農薬並に防除できたことを報告した[1)]。本研究ではその現象を詳細に検討するため、バイオマス肥料より植物病原性糸状菌に対して防除効果を示す微生物をさらに単離し、調査を継続したので報告する。

【方法および結果】

バイオマス肥料を種々の培養液に約 0.5 g/20 ml となるよう添加し、30℃、37℃、48℃にて振盪培養した。24 時間及び 6 日間集積培養した後、培養液を寒天培地に塗布し、各温度で培養した。培養後、生育したコロニーを釣菌し寒天培地上で植物病原性糸状菌と共培養した。その結果、菌株の周囲に糸状菌の阻止円を確認した菌株計 20 株を取得した。それら菌株の同定を 16S rDNA 配列または MALDI-TOF-MS を用いて行った。次に、複数種の植物病原性糸状菌に対する抗糸状菌スペクトルを測定した。取得された 20 株の菌株のうち 10 株については、植物病原性糸状菌全てに対して抗糸状菌活性を示した。その他の菌株についても抗糸状菌スペクトルは多種多様であり、バイオマス肥料に含まれる微生物の多様性が示唆された。さらに取得した菌株から一株を選抜し、培養上清中に分泌した抗糸状菌物質について、ゲルろ過クロマトグラフィーによる精製および LC-MS による物質の推定を行った。その結果、本菌株は培養上清中に複数のリポペプチドを産生していることが明らかになった。

本研究結果から、*Bacilli* 属より種を限定する方向で植物病原性糸状菌に対する防除効果を有する細菌が取得され、抗糸状菌作用を示す細菌株の多様性が明らかとなった。このことより、多角的に糸状菌を抑制する戦略が浮き彫りとなるとともに、これを農業で応用実践することが可能ではないかと考えた。

1）原富次郎ら、第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p. 128（2015）

fungi, plant disease, antifungal agent

発表責任者：原富次郎（thara@yz.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：3F169
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌 *Streptomyces avermitilis* におけるセルラーゼ遺伝子発現と avermectin 生産

# Expression of cellulase-encoding genes and avermectin production in *Streptomyces avermitilis*

○春日 和[1]、佐羽内 彩香[1]、牟田口 祐太[1]、志村 洋一郎[1]、石川 淳[2]、池田 治生[3]、小嶋 郁夫[1] ([1]秋田県大生資、[2]国立感染研、[3]北里大・北里生命研)
○Kanou Kasuga[1], Ayaka Sabanai[1], Yuta Mutaguchi[1], Yoichiro Shimura[1], Jun Ishikawa[2], Haruo Ikeda[3], Ikuo Kojima[1] ([1]Dept. Biotechnol., Akita Pref. Univ., [2]National Institute of Infectious Diseases, [3]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ.)

【背景・目的】

*Streptomyces* 属放線菌は有用な抗生物質生産菌として高度に産業利用されている。また、自然界においてはセルロース系バイオマスの分解者であり、放線菌由来のセルラーゼやその遺伝子が報告されている。我々は、セルロース系バイオマスの資源利用をめざして、有用なセルラーゼ遺伝子群をもつセルロース分解性放線菌を探索した。セルロース資化性放線菌 *Streptomyces thermocarboxydus* C42 株は、9 種類の推定セルラーゼ遺伝子(*cel5A*, *cel5B*, *cel6A*, *cel6B*, *cel6C*, *cel9A*, *cel12A*, *cel12B*, *cel48A*)とキシログルカナーゼ遺伝子(*xeg74A*)を有する。このうち 5 種のセルラーゼ遺伝子の上流域にはオペレーター配列 CebR box があり、セロビオースによる発現制御を受けることがわかっている。これまでに上記 10 種のセルラーゼ遺伝子群を組み合わせ、異種放線菌においてセルロース分解能を構成的に導くセルロース分解遺伝子発現ベクターpBOM66 を構築した。pBOM66 を放線菌 *Streptomyces avermitilis* SUKA1 に導入したところ、セルラーゼ活性の発現を確認できた。

本研究では、セルロースを高含量で含むセルロース系バイオマスを発酵原料として有用な抗生物質を生産できる放線菌の分子育種を目指し、avermectin (AVM)を生産する *S. avermitilis* に C42 由来のセルラーゼ遺伝子を導入し、セルラーゼ遺伝子の発現や AVM の発酵生産について検討することにした。

【方法・結果】

pBOM66 はチオストレプトン耐性をマーカーとし、遺伝子導入株における抗生物質生産に影響を及ぼす可能性があるため、pBOM66 のセルラーゼ遺伝子群のカセットを、カナマイシン耐性をマーカーとする放線菌染色体組込み型ベクターpTYM18 に連結して pBOM67 を構築した。pBOM67 を *S. avermitilis* K139（AVM 生産株）に導入したところ、グルコースを主要炭素源とする AVM 生産培地では、K139/pBOM67 は K139/pTYM18 と同レベルの AVM を生産した。また、同培養上清に分泌されたセルラーゼ活性を測定したところ、K139/pBOM67 は K139/pTYM18 に比べて有意に高い CMC 分解酵素(CMCase)活性を示した。この結果より、pBOM67 導入株はグルコースに富む栄養培地において AVM 生産能とセルロース分解能を有することが示された。

現在、この遺伝子導入株の培養条件を検討し、セルロースやその関連化合物を原料として AVM を生産可能であるか検討している。

cellulase, *Streptomyces avermitilis*, heterologous expression

発表責任者：春日和（ccasga@akita-pu.ac.jp）

発表番号：3F170
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌汎用宿主における二次代謝産物生産に適した構成的発現プロモーターの探索

# Investigation of constitutively-expressed promoter for the transcription of genes concerning secondary metabolite production in engineered *Streptomyces avermitilis* .

○小松 護、池田 治生（北里大・北里生命研）
○Mamoru KOMATSU, Haruo IKEDA (Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ.)

【目的】我々はこれまで、エバーメクチンの工業生産菌である放線菌 *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体 (SUKA) を宿主とした異種微生物由来の 2 次代謝産物生産について報告してきた [1-3] 。*S. avermitilis* SUKA 株を宿主とした異種生産において、導入した 2 次代謝産物生合成遺伝子群の発現は、宿主内在性の転写制御因子に強く依存するため、導入した遺伝子の発現に適した転写制御因子を宿主が保持していない場合、物質生産が観察されないあるいは生産量が顕著に低下する。その場合、発現に適したプロモーターを生合成遺伝子の最上流あるいは経路特異的転写制御因子の上流に導入し、強制的に発現させることによって良好な 2 次代謝産物生産を促すことができる。我々はこれまで、*Saccharopolyspora erythraea* 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子(*ermE*)あるいは *S. avermitilis* 内在性のリボソームサブユニット S10 遺伝子(*rpsJ*)のプロモーター領域を用いた構成的強発現によって、種々の 2 次代謝物質の生産に成功している。我々はさらに、より物質生産に適したプロモーターを探索することを目的として研究を行った。

【方法と結果】*S. avermitilis* 野生株ならびに大規模欠失体 SUKA5 株をグルコース、マルトース、キチンなどを単一炭素源とする培地を用いて液体培養を行い、培養液中に分泌されるタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって網羅的に調べた。その結果、培地中の炭素源に特に依存しないが、培養後期に顕著に分泌された約 40 kDa のタンパク質を検出した。MALDI TOF-MS を用いたペプチドマスフィンガープリント法ならびにエドマン分解により、*sav2794* の遺伝子産物であることが明らかとなった。SAV_2794 は sec 型分泌タンパク質であり、C-末端側に特徴ある P-domain (PF01483) を有するメタロプロテアーゼである(subtilin-like protease inhibitor との相互作用に関与)。本メタロプロテアーゼは定常期にかけて分泌されることから、その発現パターンに興味が持たれた。発現を定量的に測定するため *sav2794*($P_{sav2794}$)のプロモーターをロイシンアミノペプチダーゼ遺伝子に連結し、菌体外に分泌される酵素活性を測定した。その結果、発現は培養 2 日以降が最大となった。$P_{sav2794}$ は培養後期からの発現が良好であることから、2 次代謝産物生合成遺伝子の発現に適していると思われるため、これまで異種発現が全く達成できなかった telomestatin 生合成遺伝子群を用い telomestatin の生産を達成した(昨年度本大会・天貝ら)。さらに今回、数種の生合成遺伝子群の異種発現に供したところ良好な生産を確認することができた。【文献】1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651 (2010). 2. *ACS Synth. Biol*. **2**:384-396 (2013). 3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **41**:233-250 (2014).

Streptomyces, secondary metabolite, gene expression

発表番号：3F171
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Fusarium graminearum* のトリコテセン生合成における *Tri6* のフィードバック制御とその生理的役割

# Role of feedback regulation of *Tri6* in trichothecene biosynthesis of *Fusarium graminearum*

○中嶋 佑一、前田 一行、金丸 京子、小林 哲夫、木村 真（名大院生命農）
○Yuichi NAKAJIMA, Kazuyuki MAEDA, Kyoko KANAMARU, Tetsuo KOBAYASHI, Makoto KIMURA (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya Univ.)

トリコテセン系毒素生産菌として知られる *Fusarium graminearum* はデオキシニバレノール、ニバレノール、およびそれらのアセチル化体を産生する。本菌のトリコテセン生合成クラスターでは中央部付近に C2H2 zinc finger 型転写因子をコードする *Tri6* が位置し、P450 モノオキシゲナーゼをコードする *Tri4* が逆向きに隣接する。すなわち *Tri6* と *Tri4* はプロモーター領域を共有した構造をとる。この *Tri6*-*Tri4* 間のおよそ 1.1 kb の領域には TRI6 結合サイトや AreA 結合サイトと考えられる GATA 配列が存在する。遺伝子破壊実験から、TRI6 はトリコテセンクラスターの中心的な転写因子であり、また AreA はトリコテセン生合成の誘導に重要な働きをすると認識されている。本研究では *Tri6* の 5’上流領域に存在するシス因子に着目し、それらの変異がトリコテセンクラスターの活性化に及ぼす影響を 15-アセチルデオキシニバレノール（15-ADON）生産菌を用いて調べた。

*Tri6*-*Tri4* 領域において、*Tri4* 開始コドンから 370 bp 上流に存在する TRI6 結合サイトは *Tri4* 転写活性に寄与するとされる。この TRI6 結合サイトに点変異を導入した変異株を作出したところ、トリコテセン生産条件においても *Tri4* の転写活性化が全く見られず、15-ADON の生産も見られなくなった。しかしこの変異株では *Tri6* の転写量が大幅に減少してはいるものの、転写産物を認めることができた。この結果はトリコテセン生産時に *Tri6* の発現が正のフィードバック制御を受けて増大することを示すものである。この変異導入株に対し、トリコテセンクラスター外部から *Tri4* を過剰発現させたところ、*Tri6* の転写量は低いままであったが、15-ADON の生産がやや回復した。このことはトリコテセンクラスターの十分な活性化には *Tri6* の正のフィードバック制御が必須であり、*Tri6*-*Tri4* 間に存在する TRI6 結合サイトは *Tri4* の活性化にとどまらず、クラスター活性化に極めて重要な配列であることが示された。また、*F. graminearum* における 15-ADON 生合成に *AreA* の重要性が指摘されていることから、*Tri6*-*Tri4* 間領域に存在す AREA 結合サイトの候補である GATA 配列すべてに点変異を導入した変異株も作出した。GATA 配列を削除した変異株では DON 生産量の減少傾向は見られたものの、野生株と比べて顕著な減少は見られず、少なくとも実験室系のトリコテセン産生条件においては *Tri6* の転写活性化に *AreA* は不可欠な存在ではないことが示された。

【謝辞】 本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業シーズ創出ステージ「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

*Fusarium graminearum*, trichothecene cluster, *Tri6*

発表番号：3F172
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるコウジ酸生産新規制御因子の機能解析

# Exploring transcriptional regulators of the kojic acid biosynthesis in *Aspergillus oryzae*

○荒川 弦矢[1]、児玉 はる花[2]、江口 優一[1]、小川 真弘[3]、小山 泰二[3]、徳岡 昌文[2]、進藤 斉[2]、穂坂 賢[2] ([1]東農大院・農、[2]東農大・応生、[3]野田産研)
○Genya Arakawa[1], Haruka Kodama[2], Yuichi Eguchi[1], Masahiro Ogawa[3], Yasuji Koyama[3], Masafumi Tokuoka[2], Hitoshi Shindo[2], Masaru Hosaka[2] ([1]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric., [2]Fac. Appl. Biosci., Tokyo Univ. Agric., [3]Noda Inst. Sci. Res.)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* の二次代謝産物は醸造食品の安全性や品質に関わることから、その生産制御機構の解明が望まれている。従来は、主にモデル糸状菌の既知転写制御因子のホモログを中心に研究が行われてきた。本研究では *A. oryzae* の転写制御因子遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、コウジ酸生産の新規転写制御因子の発見を目指した。
【方法・結果】上記ライブラリーより 378 株をコウジ酸検出培地において培養し、培地の赤色呈色を指標としてスクリーニングを行い、コウジ酸生産が顕著に増加した機能未知遺伝子破壊株として 1 株を選抜した。BLAST 解析より、本遺伝子は広く糸状菌に保存され、Zn2-Cys6 モチーフを持つ転写制御因子をコードすると推定された。この遺伝子破壊株をコウジ酸検出液体培地で 6 日間表面培養し、培養液の 495nm における吸光度を測定した結果、親株に対してコウジ酸生産量が約 15 倍に増加した。さらに、ノーザン解析の結果、コウジ酸生産に関与する *kojA* の発現が増加していたことから、転写レベルでの抑制に関わる転写制御因子をコードしていると予想された。また、マルツ寒天培地上での気中菌糸が親株より長く、分生子数が半分に減少した。したがって本遺伝子はコウジ酸生産のみでなく、形態形成にも関わることが示唆された。現在、二次代謝関連及び形態形成関連の因子との制御関係について解析を進めている。

transcriptional regulator, *Aspergillus oryzae*, kojic acid

発表責任者：徳岡昌文（m3tokuok@nodai.ac.jp）

発表番号：3F173
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌代謝産物由来の Sirtuin A 阻害剤の探索

# Screening of Sirtuin A inhibitors from fungal metabolites

○松本 貴良、茂本 亮輔、張本 修平、伊藤 英里子、高谷 直樹（筑波大院生命環境）
○Takara MATSUMOTO, Ryosuke SHIGEMOTO, Syuhei HARIMOTO, Eriko ITOH, Naoki TAKAYA (Tsukuba Univ.)

【目的】糸状菌の二次代謝産物には、有用な化合物が多く知られており、医薬品として実用化されているものも多い。一方で、糸状菌のゲノム解読が進み、数多くの二次代謝産物生合成遺伝子が通常の培養では発現していないことが示された。これらの遺伝子を人為的に発現させることができれば、多様な二次代謝産物の取得が可能となり、様々な分野で貢献する。我々は、*Aspergillus nidulans* の $NAD^+$依存型ヒストン脱アセチル化酵素である Sirtuin（SirA）が、二次代謝系遺伝子の発現を抑制していることを見出した。また、*sirA* 遺伝子を破壊することによってこれらの生合成遺伝子の発現が促進されることを明らかにした。このことは、SirA 活性の阻害化合物を取得し糸状菌の培養へ添加することによって、様々な糸状菌が有する二次代謝産物生合成遺伝子の発現を遺伝子組換えによらずに誘導できる可能性を示す。そこで、本研究では、*A. nidulans* の SirA 活性の阻害剤を探索し、様々な糸状菌に利用可能な二次代謝生産活性化物質を開発することを目指した。
【方法・結果】糸状菌 189 種を 10 mL の Potato Dextrose、Yeast-Malt-Sucrose、Czapek Yeast 培地で 7～14 日間培養した。酢酸エチルによって培養物から抽出して得られた 729 種の糸状菌抽出物をスクリーニング源とした。まず、蛍光法によるヒストンの脱アセチル化を指標として SirA の活性を測定し、SirA 阻害活性を有する 70 種（55 菌種由来）の糸状菌抽出物を得た。これらの菌をスケールアップして培養し同様の検討を行ったところ、30 種の糸状菌抽出物が比較的強い SirA 阻害活性を示した。これらを、K16 アセチル化ヒストン H4 ペプチドを基質とした酵素反応系に添加した。反応産物である nicotinamide を、HPLC を用いて測定したところ、これらを添加しないものと比較して nicotinamide の生成量が減少した糸状菌抽出物が 16 種得られた。これらのうち 15 種の糸状菌抽出物をそれぞれ添加した Yeast-Malt-Sucrose 培地を用いて、糸状菌 *Aspergillus terreus* JCM 10257、*Ustilago maydis* JCM 2005、*Fusarium oxysporum* JCM 11502 を培養し、培養液の酢酸エチル抽出物を HPLC 解析に供した。いずれの糸状菌の代謝産物の生産を増加させた抽出物は 4 種であり、これらを含む 7 種の糸状菌出物は *A. terreus* の代謝産物の生産を増加させた。これらの結果から、得られた糸状菌抽出物中の SirA 活性の阻害剤の単離と構造解析が可能となった。

Sirtuin, Epigenetics, secondary metabolism

発表番号：3F174
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

清酒酵母の *S*-アデノシルメチオニン高蓄積能に関与する分子機構の解析
Analysis of molecular mechanism involved in high *S*-adenosylmethionine accumulation in sake yeast

○金井 宗良[1]、喜多 靖子[1]、吉田 艶枝[1]、河田 知子[1,2]、藤井 力[1,2]、水野 昭博[1]、山田 修[1]([1]独立行政法人酒類総合研究所、[2]広大院・生物圏)
○Muneyoshi KANAI[1], Yasuko KITA[1], Yoshie YOSHIDA[1], Tomoko KAWATA[1,2], Tsutomu FUJII[1,2], Akihiro MIZUNO[1], Osamu YAMADA[1] ([1]NRIB, [2]Grad. Sch. Biosph. Sci. Hiroshima Univ.)

【目的】醸造副産物は様々な有用物質を含むことが知られているが、未だ十分な解析が進んでいない。清酒粕の付加価値向上を図る基礎的知見を得ることを目的として、清酒酵母の機能性成分（S-アデノシルメチオニン（SAM)）高蓄積能に関与する分子機構の解析を行った。
【方法】清酒酵母の SAM 高蓄積能に関与する遺伝子を探索するため、清酒酵母と実験室酵母の交配による QTL（量的形質遺伝子座）解析を行い、特に有意な QTL 近傍に存在する 165 の遺伝子から *YHR032W/ERC1* を候補遺伝子として絞り込んだ。候補遺伝子 *ERC1* が清酒酵母の SAM 高蓄積能に本当に寄与しているか確認するため、実験室酵母又は清酒酵母の *ERC1* 破壊株（*BY*Δ*erc1, K701*Δ*erc1*）を、清酒酵母型又は実験室酵母型 *ERC1* 発現プラスミドを用いて形質転換させ、振盪培養における経時的な SAM 蓄積量を分析した。次に、SAM 高蓄積能に寄与する *ERC1* 遺伝子の SNP を同定するため、各種実験室酵母及び醸造用酵母（清酒、焼酎、ワイン、ビール酵母）について *ERC1* 遺伝子のシークエンスを行った。さらに、清酒酵母型 *ERC1* 遺伝子を酵母菌体内で発現させることでなぜ SAM 量が蓄積するのか調べるため、DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果】清酒酵母型の *ERC1* を発現させることで SAM の蓄積が観察され、実験室酵母型 *ERC1* を発現させてもほぼ変化が見られなかったことから、清酒酵母が持つ SAM 高蓄積能に、清酒酵母型 *ERC1* が深く関与していることが示唆された。次に、各種実験室酵母及び醸造用酵母（清酒、焼酎、ワイン、ビール酵母）について *ERC1* 遺伝子のシークエンスを行った結果、SNPs のパターンにより、焼酎酵母型、ワイン・ビール酵母型、清酒酵母型 *ERC1* に分類されることが分かった。また、SAM 蓄積に寄与する *ERC1* の SNP を調べた結果、醸造用酵母と実験室酵母 *ERC1* の塩基長の差の原因である変異(N545I)が、清酒酵母の SAM 高蓄積に大きく寄与していることが示唆された。さらに、清酒酵母型 *ERC1* を発現させた際の DNA マイクロアレイ解析を行った結果、特に硫黄の代謝及び輸送に関与する遺伝子の発現が上昇していることが分かった。

Sake yeast, *S*-adenosylmethionine, QTL

発表責任者：金井　宗良（kanai@nrib.go.jp）

発表番号：3F175
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高効率オウトウショウジョウバエ捕虫器の開発

# Effective trapping of spotted wing drosophila using brown rice vinegar as an attractant

石井 友理[2]、東久保 遥[2]、○赤坂 直紀[1]、秀瀬 涼太[2]、佐古田 久雄[1]、藤原 伸介[2]([1]マルカン酢(株)、[2]関西学院大理工)
Yuri Ishii[2], Haruka Higashikubo[2], ○Naoki Akasaka[1], Ryota Hidese[2], Hisao Sakoda[1], Shinsuke Fujiwara[2] ([1]Marukan Vinegar Co. Ltd., [2]Kwansei Gakuin Univ.)

オウトウショウジョウバエ(*Drosophila suzukii*, Spotted Wing Drosophila, SWD)は、ブルーベリー等の果実に寄生する害虫である。2000 年代後半の移入以降、北米及び欧州のほぼ全域に蔓延し、両地域の果樹栽培において甚大な被害を引き起こしている[1)]。また、日本国内でも同様の被害が報告されている。近縁種キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)とは異なり、雌の SWD は鋸歯状の産卵管を備えており、成熟前の固い果実にも産卵が可能である。更に宿主域が極めて広いため、根絶や封じ込めが非常に困難であり、一年を通して農業被害を起こしうる[1)]。しかしながら、SWD の総合的病害虫管理体系(Integrated Pest Management, IPM)は依然確立されておらず、薬剤散布防除が主流である。既存薬剤の薬効も低く、連用による残留農薬問題・耐性個体の出現も危惧される。従って、IPM 確立には、集団母数が少ない段階で迅速に個体を検出する事が重要となる。米国農務省に依れば、SWD 検知にりんご酢(apple cider vinegar, ACV)を誘引剤とした捕虫器使用が推奨されている[1)]。近年の解析から、ACV 中の誘引成分が同定されたが[2)]、依然強力な誘引素材が求められている。

当研究グループにおける先行研究で、食酢製造酢酸菌の転写調節因子を機能欠損させる事で、誘引物質高生産株が構築された[3)]。同株培養液は *D. melanogaster* に対して強い誘引性を示した[3)]。更に、上記転写因子は酢酸菌においてポリアミン代謝遺伝子群の発現も制御しており、誘引物質高生産株は野生株と比較し、培養液中に著量のポリアミンを蓄積する事が示された[4)]。前記を踏まえ、家庭用捕虫器原料として広く用いられている玄米黒酢(brown rice vinegar, BRV)の、SWD に対する誘引性を評価した。倒立させた 1.5 ml マイクロチューブの先端を除去し、先端を切除した 200 µl チップ(内径 2mm)を挿入したものをトラップとした[5)]。チューブに誘引剤を添加し、ガラスバイアル中に設置した後、約 20 匹の SWD 成虫(7-10 日齢)を放ち、トラップに捕捉された個体数を計測した。その結果、BRV は ACV と比較し、より多くの個体を捕捉した。HPLC 解析の結果、BRV のみからポリアミン(スペルミジン)が検出された。スペルミジン溶液も SWD に対する誘引性を示した事から、BRV の高い誘引性は、既知誘引成分及びスペルミジンの相乗効果に起因すると示唆され、BRV を用いた高効率 SWD 捕虫器の開発が期待される。

1) Lee et al. 2011. Pest Manag. Sci. 67:1349. 2) Cha et al. 2014. Pest Manag. Sci. 70:324. 3) Ishii et al. 2015. Appl. Environ. Microbiol. 81:2265. 4) 石井ら. 2015. 第 67 回日本生物工学会大会 5) Kain et al. 2013. Nature 502:507.

Spotted Wing Drosophila (*Drosophila suzukii*), Brown rice vinegar, Polyamine

発表番号：3F176
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 富有柿幼果黒麹菌発酵物の機能性に対する加熱処理条件の検討

# Consideration of heat treatment conditions of functionality of fermentation of immature fruit *Dispyros kaki* 'Fuyu' using *Aspergillus awamori*

○折居 千賀（（公財）東洋食品研究所）
○Chika ORII (TOYO INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY)

【目的】機能性発酵物の利用には、殺菌と酵素の失活による発酵の停止と機能性維持の両立が求められる。これまで黒麹菌を利用した発酵にてβ-リパーゼ阻害活性やアンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性が増強した富有柿幼果発酵物[1)]について、オートクレーブ（121℃、20 分）処理により、殺菌だけではなくそれらの機能性が維持、増強されることを明らかにした。本発表ではオーブンを用いて温度および時間を組み合わせた条件下での加熱処理を行い、機能性の増減に関する温度や処理時間の範囲を調べた。
【方法】試料は富有柿幼果の黒麹菌発酵物、7 日目のものを用いた。試験管に約 2.0 g の発酵物を入れ、アルミホイルで蓋をしたのちオーブンを用いて熱処理を行った。温度条件は 80℃、100℃、120℃、140℃、160℃とし、それぞれの温度について 10 分、20 分、30 分、40 分、50 分の熱処理時間を設定し検討した。熱処理後に水抽出を行い、抽出液を減圧乾固したのち水に再溶して試料溶液とした。抽出液のβ-リパーゼ阻害活性および ACE 阻害活性を調べ、50%阻害濃度（$IC_{50}$）を比較した。
【結果】β-リパーゼ阻害活性では 80℃・50 分熱処理区、100℃・40 分～50 分熱処理区および 120℃、140℃、160℃熱処理区で顕著な活性の増加が見られた。未処理区（$IC_{50}$=146.8 μg/ml）と比較すると、120℃・10 分処理区で阻害活性が増加（$IC_{50}$=14.0 μg/ml）し、50 分処理区にて最も高い阻害活性（$IC_{50}$=2.5 μg/ml）を示した。140℃（$IC_{50}$=13.2 μg/ml）、160℃処理区（$IC_{50}$=19.0 μg/ml）では加熱時間 10 分で 120℃・10 分処理区とほぼ同等の阻害活性を示した。これらの処理区では時間の増加にともなう顕著な活性の増減は見られなかった。このことより、発酵物のβ-リパーゼ阻害活性は 100℃を境として活性の増減傾向が変化することがわかった。120℃・20 分処理区での活性の増加はオートクレーブ（121℃・20 分）処理時の増加とほぼ同程度であり、処理温度 120℃、時間 20 分～50 分で最も増加し、140℃、160℃処理でもほぼ同等の効果が得られることがわかった。ACE 阻害活性では活性の増減にばらつきがみられ、β-リパーゼ阻害のような明確な傾向は示さなかった。しかし阻害活性の著しい減少は見られなかったため、ACE 阻害活性は今回の熱処理条件下でも維持されることがわかった。これらはオーブン加熱での発酵物の機能性増加の条件および範囲を示すものであり、富有柿幼果発酵物において熱処理は、機能性増強を目的とした加工手段となり得ることが示唆された。

１）「黒麹菌および乳酸菌を用いた発酵による富有柿幼果の機能性向上」日本栄養・食糧学会誌，68，5， 225-232（2015）

heat treatment, fermentation, *Dispyros kaki*

発表番号：3F177
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L における多糖産生制御因子の探索
Regulation of extracellular polysaccharides production in *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L

○菊地 淳史[1]、菅原 誠[2]、梶川 揚申[1]、田中 尚人[3]、岡田 早苗[1] ([1]東農大応生科・化学、[2]マルサンアイ株式会社、[3]東農大・菌株)
○Atsushi KIKUCHI[1], Makoto SUGAWARA[2], Akinobu KAJIKAWA[1], Naoto TANAKA[3], Sanae OKADA[1] ([1]Dept. of Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. Agr., [2]MARUSAN-AI CO., LTD., [3]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】*Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L が産生する菌体外多糖は発酵物に独特な物性を付与することができるのみならず、抗炎症機能性を持ち食品の嗜好性、機能性の向上も期待されている。これまで、培地や培養条件を変えることで菌体外多糖の構成糖や産生量、中性多糖や酸性多糖の割合に違いが生じることが報告されてきた[1) 2)]が、その要因はわかっていない。そこで有用性が確認されている菌体外多糖の高産生化へのアプローチとして、本研究では *L.delbrueckii* TUA4408L の菌体外多糖産生機構、特に産生を制御する因子を検索することを目的とした。
【方法・結果】基本培地として 1μg/ml ビタミン $B_{12}$ を加えた MRS 培地を用い、フェノール硫酸法にて *L.delbrueckii* TUA4408L の培養液中の多糖産生量を測定した。まず始めに、菌体外多糖の産生時期を確認するため、培養液に対して経時的に多糖産生量を測定した。その結果、対数期後期から定常期にかけて産生することが確認された。そこで、同時期に何かしらの誘導因子がある可能性を考え、代謝産物による影響を検討するため同時期の培養上清をフィルター滅菌後培養初期に添加し産生量を確認した。すると添加しない時に比べて有意な増加が見られた。しかし、同じように上清をタンパク質分解酵素で処理した場合は産生量の増加は確認されなかった。したがって、産生誘導因子はタンパク性物質であることが示唆された。

次に産生多糖の構成糖の制御について調べるため、培養条件による産生多糖の構造の違いを詳細に検討することにした。培養条件は温度と pH について、培地条件は基本培地の炭素源であるグルコースを各種糖類に置き換えたものについて検討した。その結果、生育至適条件下であるほど産生多糖の構成糖のマンノースの割合が高くなり、グルコースの割合が低くなる傾向が認められた。過去の報告[2)]では酸性多糖にマンノースを多く含むことが報告されているため、*L.delbrueckii* TUA4408L は生育至適条件において酸性多糖を産生する傾向にあると考えられた。

[1)] 吉田ら、2012 年度日本農芸化学会年次大会 2B18a04
[2)] 伊藤ら、2014 年度日本農芸化学会年次大会 2A14p08

*Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L, EPS

発表番号：3F178
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Synechocysits* のゲラニルゲラニルピロリン酸合成酵素 Slr0739 の酵素学的解析とイソプレノイド生産への応用
Enzymatic analysis and application for isoprenoid production of Synechocystis GGPP synthase Slr0739

○清田 浩史[1,2]、奥田 裕紀子[1]、梅野 太輔[3]、平井 優美[2]、池内 昌彦[1,4]（[1]東大総合文化、[2]理研環境資源科学研究センター、[3]千葉大工、[4]CREST）
○Hiroshi KIYOTA[1,2], Yukiko Okuda[1], Daisuke Umeno[3], Masami Hirai[2], Masahiko Ikeuchi[1,4]
([1]Tokyo Univ., [2]RIKEN, [3]Chiba Univ., [4]CREST)

イソプレノイドは二次代謝産物の主要なグループの 1 つであり、$C_5$ のイソプレン単位が複数連なった構造を持つ。多様な物性、用途を持ち、香料・医薬品原料・色素・燃料・材料として工業的に幅広く使われている。私たちは生育の速いシアノバクテリアを用いて、光合成による二酸化炭素からの直接的イソプレノイド生産について研究している。外来のリモネン合成酵素を導入することで外来モノテルペンであるリモネンをシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に生産させることに成功した（Kiyota *et al.*, J Biotechnol, 2014)。しかし、現在のところ *Synechocystis* におけるリモネンの生産量はカロテノイドやクロロフィルといった内在イソプレノイドの生産量に比べて数%のオーダーに留まっており、この炭素フローを目的の外来イソプレノイドに向ける必要があった。*Synechocystis* では、非メバロン酸経路を通して $C_5$ のイソプレン単位を合成し、これを重合することで $C_{10}$ のゲラニルピロリン酸（GPP)、$C_{15}$ のファルネシルピロリン酸（FPP)、$C_{20}$ のゲラニルゲラニルピロリン酸（GGPP）を順次合成し、この GGPP からカロテノイド類やクロロフィルが合成される。$C_5$ を重合し $C_{20}$ を合成する反応は全て GGPP 合成酵素 Slr0739 という単一の酵素によって触媒されるので、$C_{10}$ のゲラニルピロリン酸を前駆体として用いるリモネン生産との競合が危惧され、この酵素の酵素学的解析が必要だと考えた。前回の日本農芸化学会 2015 年度大会では、Slr0739 のクローニング・発現・精製と、その酵素学的解析および酵素反応シミュレーションについて報告した。

その後の研究と解析結果から、Slr0739 は GPP および FPP に対して低い Km を持ち、生成した GPP や FPP を速やかに自身で消費することがわかった。また、実験とシミュレーションの比較から、Slr0739 は一種のチャネリング機構により反応を促進していることが示唆された。これらのことは、Slr0739 が生成した GPP や FPP を他の酵素が利用しにくい状態にあることと GPP や FPP の供給を行う専用の酵素の必要性を示している。そこで、アモルファジエン合成酵素の導入によってアモルファジエン生産能を持った株を親株とし、$C_{15}$ を最終産物とする FPP 合成酵素を導入した。アモルファジエン合成酵素/FPP 合成酵素導入株では、親株に比べてアモルファジエン生産速度が 2.3 倍に向上した。この株にさらにアモルファジエン合成酵素をもう 1 コピー導入したトリプル株においては、元々のアモルファジエン合成酵素を 1 コピーだけ持つ親株に対して生産速度が 3.8 倍に向上した。このトリプル株ではカロテノイド量が大きく低下しており、内在イソプレノイド生産に向かう炭素フローを奪うことに成功している。

metabolic engineering, cyanobacteria, isoprenoid

発表責任者：清田 浩史（kiyo_hiro@bio.c.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3F179
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 化合物アレイを用いたアフラトキシン生産阻害物質の探索(その 1) －LaeA 結合物質の探索－
# Screening of aflatoxin production inhibitors with chemical array technology (Part1) - Search for LaeA binding compounds -

○山本 利義[1]、影本 貴大[1]、飯村 九林[1]、高城 景子[1]、近藤 恭光[2]、本田 香織[2]、長田 裕之[2]、作田 庄平[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]理研 CSRS)
○ Toshiyoshi YAMAMOTO[1], Takahiro KAGEMOTO[1], Kurin IIMURA[1], Keiko TAKAGI[1], Yasumitsu KONDO[2], Kaori HONDA[2], Hiroyuki OSADA[2], Shohei SAKUDA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]RIKEN CSRS)

[目的]

アフラトキシン(AF)は *Aspergillus parasiticus* や *Aspergillus flavus* により生産される急性毒性だけでなく強い発癌性も有する二次代謝産物である。強い毒性と食品加工や調理過程での高い安定性のため、AF 汚染は農業において甚大な経済的損失を与えている。しかし、アフラトキシン汚染被害を防除するための決定的な対策法は未だ開発されていない。

抗カビ剤の施用は耐性菌の発生を促し、耐性菌に対する駆除薬を開発し続けなければならないというジレンマを抱えている。我々は、AF が AF 生産菌の成育に必須ではないことに着目し、菌の成育に影響せず AF 生産を抑制する薬剤が効果的な汚染防除剤になることを期待した。

本研究では真菌二次代謝産物の発現調節に関与することが知られている転写因子 LaeA に着目し、化合物アレイを用いたスクリーニングにより LaeA 結合化合物を見出し、AF 生産に対する評価と見出された薬剤の作用機序の解析を通じて、より有効な薬剤を開発することを目的としている。

[方法および結果]

*A. parasiticus* NRRL2999 株より LaeA の cDNA を取得し、His タグを付加したリコンビナント蛋白質(rLaeA)を大腸菌より得た。化合物アレイを用いたスクリーニングにより LaeA と結合が認められるヒット化合物が 6 種類得られ、その中の 1 化合物が *A. parasiticus* の AF 生産を阻害した。この化合物を合成し、化学的に固定したビーズを用いたプルダウンアッセイにより rLaeA が結合することを確認した。

化合物が LaeA と結合することにより LaeA に端を発する転写調節系が影響を受け、その結果、AF 生産の阻害に至ったという仮定に基づき、AF 生産に影響すると考えられる転写因子群、および、ゲノム上の AF 生産関連遺伝子クラスターに存在する AF 生産酵素の転写量を定量 PCR により解析を行い、LaeA の作用点の解明を進めている。

[謝辞]
本研究は農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業「ケミカルバイオロジーを基盤とした革新的な農薬等の探索研究」として行われているものである。

Aflatoxin, inhibitor

発表番号：3F180
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ナズナから分離した乳酸菌 *Enterococcus* sp. PUK13 が生産する多成分バクテリオシンの精製と同定
# Purification and idenitification of multiple bacteriocins produced by *Enterococcus* sp. PUK13 isolated from shepherd's-purse

○山下 奈菜[1]、善藤 威史[2]、松崎 弘美[1,3]（[1]熊本県大院・環境共生、[2]九大院・農、[3]熊本県大・環境共生）
○Nana YAMASHITA[1], Takeshi ZENDO[2], Hiromi MATSUSAKI[1,3] ([1]Grad. Sch. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto, [2]Grad. Sch. Agric., Kyushu Univ., [3]Fac. Environ. Sym. Sci., Pref. Univ. Kumamoto)

【目的】乳酸菌が生産するバクテリオシンは食品保存料としての利用が期待されている。本研究ではナズナから分離した乳酸菌 *Enterococcus* sp. PUK13 が生産するバクテリオシンを精製・同定することを目的とした。

【方法および結果】ナズナからバクテリオシン生産乳酸菌 *Enterococcus* sp. PUK13 を分離･同定した。PUK13 株を MRS 培地にて、30℃で 15 時間培養した培養液上清について 70%飽和硫安分画を行い、透析（MWCO 1,000）後､陽イオン交換クロマトグラフィーを行った｡陽イオン交換クロマトグラフィーでは、0.1-0.6 M NaCl の直線濃度勾配によりバクテリオシンを溶出し、複数の活性画分（Fraction I~IV）を得た｡各活性画分の Tricine-SDS-PAGE および *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157$^T$ を指標菌としたゲルバイオアッセイ（重層法）を行った結果、Fraction I および Fraction III について異なる位置に生育阻止円が確認できた。このことから PUK13 株は、少なくとも 2 種類のバクテリオシン（6.0 kDa および 5.2 kDa）を生産していることが明らかとなった｡6.0 kDa に抗菌活性を示した Fraction I について、逆相系前処理カラム Sep-Pak Plus $tC_{18}$ による精製と濃縮を行った。最も強い抗菌活性（3,200 AU/mL）を示した 50%アセトニトリル溶出画分は、Tricine-SDS-PAGE により単一のバンドとして精製できた。そのため、バンドを PVDF 膜に転写して、アミノ酸配列を分析した結果、決定した 20 アミノ酸残基において enterocin B と同一であった。また、enterocin B を生産する株は enterocin A も生産するとの報告があるため[1, 2]、enterocin A および enterocin B の構造遺伝子に特異的なプライマーを用いて PUK13 株ゲノム DNA の PCR を行ったところ、両遺伝子とも検出された。そのため、5.2 kDa に抗菌活性を示した Fraction III は enterocin A である可能性が高いと考えられる。現在、この両遺伝子のクローニングと塩基配列の決定を進めている。

1) De Vuyst *et al., Int. J. Food Microbiol*., 84, 299-318 (2003)
2) Ozdemir *et al., Indian J. Microbiol*., 51, 182-187 (2011)

bacteriocin, lactic acid bacteria, *Enterococcus*

発表責任者：松崎弘美（matusaki@pu-kumamoto.ac.jp）

発表番号：3F181
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 進化工学による *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素のグリコール酸酸化活性の向上
# Enhancement of activity for glycolic acid of alcohol oxidase from *Ochrobactrum* sp. AIU 033 by in vitro evolution

○高橋 迪子、山田 美和、礒部 公安 (岩手大農)
○Michiko TAKAHASHI, Miwa YAMADA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】医療、農業、食品工業など幅広い分野で利用可能な有用物質であるグリオキシル酸の酸化酵素による合成を目指し、我々は *Ochrobactrum* sp. AIU 033 由来アルコール酸化酵素を見出してきた［1]。本酵素は、グリコール酸を酸化するがグリオキシル酸を酸化しないため、グリコール酸を原料としたグリオキシル酸の合成に適した酵素である。しかし、本酵素はグリコール酸に対する親和性が低く、反応速度も遅いという欠点がある。そこで、本研究では、グリコール酸に対する厳密な基質特異性を維持しつつ、グリコール酸酸化活性が向上したアルコール酸化酵素の創製を目指して、本酵素に遺伝子レベルで変異を導入して変異体ライブラリーを構築し、高活性変異体の取得を試みた。
【方法・結果】アルコール酸化酵素遺伝子全域に、error-prone PCR によるランダム変異を導入し、アルコール酸化酵素変異体遺伝子ライブラリーを作製した。次に、ランダム変異を導入したアルコール酸化酵素遺伝子を pTA プラスミドに挿入、連結して、大腸菌 J M109 株に形質転換し、X-gal プレートを使用した青白コロニー判定によってライゲーションが成功した 470 クローンを得た。続いて形質転換体よりプラスミドを抽出し、酵素発現用大腸菌である BL21(DE3)株に形質転換して、1,575 クローンの形質転換体を得た。それらを全て 1 mM IPTG 含有 LB 平板培地に植え継ぎ、30℃ で一晩培養して、全てのコロニーを PVDF 膜に転写し、1st アッセイに供した。1st アッセイでは、膜に転写した菌体に基質であるグリコール酸と発色液を滴下して、赤呈度の高いコロニーを高活性変異体として目視で選抜できるアッセイ系を利用した。赤呈度で酸化酵素活性の高低が評価できる原理は、アルコール酸化酵素の反応によって生じる過酸化水素とペルオキシダーゼとの反応を介して、発色液中の色原体の酸化縮合が促される発色法である。その結果、野生型よりも赤呈色の高い、高活性変異体候補 382 クローンを選抜した。次に、選抜した変異体を 30℃ で 5 mL の LB 液体培地で培養し、6 時間後に 1 mM IPTG を添加し、その後 20 時間培養を行った。集菌した各変異体を破砕して調製した粗酵素液を用いて、グリコール酸との反応で生じる過酸化水素を比色法（555 nm）によって測定し、グリコール酸酸化活性を算出した。その結果、野生型よりも活性の高い変異体が 135 クローン選抜され、そのうち最も活性の高い変異体は、野生型と比較して約 1.2 倍のグリコール酸酸化活性を示した。
［1］M . Yamada et al., Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 105, 41-48 (2014)

*Ochrobactrum* sp., alcohol oxidase, error-prone PCR

発表番号：3F182
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母からの細胞破砕をせずにタンパク質を抽出する方法

# A protein extraction method without cell disruption from yeast

○西岡 佐都子[1]、中村 美紀子[2]、美澄 幸恵[2]、星田 尚司[2]、赤田 倫治[2]([1]山口大・工・応化、[2]山口大・医系・応用分子生命)
○ Satoko NISHIOKA[1], Mikiko NAKAMURA[2], Yukie MISUMI[2], Hisashi HOSHIDA[2], Rinji AKADA[2] ([1]Yamaguchi Univ., Faculty of Engineering, Department of Applied Chemistry, [2]Yamaguchi Univ., Graduate School of Medicine, Applied Molecular Bioscience)

多くのバイオ医薬品は遺伝子組換えタンパク質により作られている。宿主細胞としては、大腸菌、酵母、動物細胞などが用いられる。これらの宿主細胞で作った遺伝子組換えタンパク質からバイオ医薬品を生産するには抽出と精製で多くの段階を踏まなければならず、これが原因で大量生産や安価にバイオ医薬品を患者に提供することが困難となっている。細胞内のタンパク質を抽出するには、細胞壁あるいは脂質二重膜（細胞膜）を破壊する必要があると考えられている。この場合、細胞内の全てのタンパク質が抽出されてしまい精製に多くの工程が必要となってくる。また、プロテアーゼのようなタンパク質分解酵素も放出され、目的タンパク質を分解し、収量が減る可能性が高くなる。もし、目的タンパク質のみが細胞を破壊せずに抽出することができたら、抽出の工程だけでなく、精製の工程も抑制することができる。そこで、本研究では RFP（赤色蛍光タンパク質）をマーカー遺伝子として用い、新しいタンパク質の抽出方法を開発した。

RFP は酵母の細胞質で発現し、赤色を示すため、抽出や精製の工程を目で観察することができる。そこで、我々が様々な条件で処理を試みて開発した溶液で抽出すると短時間で細胞外に RFP を抽出することができた。また、処理において細胞を高温で処理すると速く抽出できるが、低温では全く抽出できないことが分かった。また、抽出後の酵母を蛍光顕微鏡で観察すると、RFP の非常に強い赤色蛍光が細胞の外側のみで観察され、細胞の内側は赤色蛍光が全く観察されなかった。これは、抽出後に細胞膜が破壊されておらず、RFP が拡散していないことを示唆する。さらに、殺した細胞でも RFP が抽出されるかを観察したところ、同じ様子が顕微鏡で観察された。これは、RFP が輸送体などを利用せず、物理的に抽出されたことを示している。

RFP を SDS-page により分析すると 27 kDa を示し、これは予想分子量と一致する。細胞破壊により抽出した抽出液には他のタンパク質があまり存在していなかったので、RFP が特異的に抽出されたと考えられ、精製の工程を大いに抑制できると考えた。これらの結果から、今までのソニケーションなどの細胞破壊法に比べ、時間も短縮され、スケールアップも容易な有用な方法になると考えている。

RFP, *Saccharomyces cerevisiae*, fluorescence protein

発表責任者：赤田　倫治（rinji@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：3F183
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 分裂酵母のエリスロアスコルビン合成における新奇な D-アラビノース脱水素酵素について

# A novel D-arabinose dehydrogenase for erythroascorbic acid synthesis in fission yeast

森村 健一[1]、島田 友未[2]、大八木 真希[2]、蔭山 梨南[2]、垣内 彩也香[2]、○尼子 克己[2] ([1]神院大栄養、[2]仁愛大人間生活)

Ken-ichi Morimura[1], Tomomi Shimada[2], Maki Ohyagi[2], Rina Kageyama[2], Sayaka Kakiuchi[2], ○Katsumi Amako[2] ([1]Kobe Gakuin Univ., [2]Jin-ai Univ.)

【目的】　アスコルビン酸(AsA)は広範な生物種においてコラーゲンの合成や活性酸素代謝に機能しており、ヒトは野菜・果物、食品添加物から必須の栄養成分として AsA を摂取している。酵母やキノコなどの真菌類には AsA は見出されず、その C5 アナログであるエリスロアスコルビン酸(eAsA)が見いだされる。我々はこれまで、出芽酵母における eAsA 合成系が、特にその終盤の段階において植物の AsA 合成系と分子的相同性の高い遺伝子群によって構成されていることを明らかにしてきた(Amako et al. BBB (2006), FEBS Lett. (2006))。ここでは、分裂酵母における eAsA 合成系は出芽酵母のそれとは明らかに異なる遺伝子によって構成されていることを示唆する結果を得たので報告する。
【方法】　出芽酵母 YPH250 (Sc)および分裂酵母 HM528(Sp)を D-アラビノースおよび L-ガラクトース等の eAsA および AsA の前駆体を含む YPD 培地で培養し、10%トリクロロ酢酸で内容物を抽出後、HPLC-電気化学的検出法により細胞内の eAsA および AsA を定量した。
【結果と考察】　Sc は D-アラビノースの添加により eAsA を、L-ガラクトースおよび L-ガラクトノラクトンの添加により AsA を、それぞれ細胞内に著明に蓄積した。Sc において AsA は D-アラビノース脱水素酵素遺伝子の破壊によって完全に喪失され、基質特異性の点からも Sc の eAsA 合成系と植物の AsA 合成系との相同性が示された。一方、Sp は D-アラビノースの添加により eAsA を蓄積したが、Sp ゲノム上には Sc の D-アラビノース脱水素酵素のホモログが見出されなかった。さらに Sp は L-ガラクトノラクトンの添加により AsA をそれぞれ蓄積したが、L-ガラクトースの添加では AsA を全く蓄積しなかった。また Sc で確認された、拮抗阻害によると思われる L-ガラクトース添加時の eAsA 含量の低下も Sp では全くみられなかった。また Sp 抽出液で確認される D-アラビノース脱水素酵素は、Sc のそれと異なり、$NADP^+$をよい基質とすることが明らかになった。現在 Sp のアラビノース脱水素酵素遺伝子を同定すべく、D-アラビノースを含む培地で培養しても eAsA を蓄積しない変異株を 96 穴ディープウェルプレートベースでスクリーニングする方法を検討している。

ascorbate, arabinose

発表責任者：尼子克己（amakok@jindai.ac.jp）

発表番号：3F184
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 種々の炭素源で生育させた白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* の細胞外プロテオーム解析

# Secretome analysis of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on various polysaccharides.

○糀谷 紗季、鈴木 梨央、山田 麻衣子、河合 竜治、酒井 杏匠、村田 俊輔、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)
○Saki KOJIYA, Rio SUZUKI, Maiko YAMADA, Tatsuya KAWAI, Kiyota SAKAI, Shunsuke MURATA, Motoyuki SHIMIZU, Masashi KATO (Meijo Univ.)

【目的】

環境中に存在する植物バイオマスに含まれる多糖およびリグリンの分解速度および効率が高まれば、バイオ燃料生産やバイオファイナリーなどの産業分野に大きく貢献することができる。特に、ヘミセルロースおよびリグリンの効率的な分解が可能になれば、次世代バイオマス利用に革新をもたらすことができると考えられる。

本研究では、強力なセルロース、ヘミセルロース分解能だけでなくリグリン分解能を有しゲノム情報が公開されている白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* を対象にヘミセルロース（グルコマンナン、キシラン）および脱脂木粉を培地に添加し生育させた際に生産される細胞外タンパク質をプロテオーム解析により網羅的に解析した。それらの中で、それぞれの樹木成分の分解過程において生産される機能未知タンパク質を見出し、それらの機能を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

白色腐朽菌 *P. chrysosporium* を 1%グルコース、1%グルコマンナン、1%キシランおよび 1%脱脂木粉のみを炭素源にした培地で所定時間培養後、菌体をろ別した。得られた培養ろ液から TCA/アセトン沈殿によりタンパク質を回収した後、二次元電気泳動によってタンパク質を分離した。染色後、検出されたタンパク質スポットを切り出しトリプシン処理後に MALDI-TOF/TOF-MS にてタンパク質を同定した。グルコースのみを炭素源にして生育させたものと比較して、それぞれの樹木成分を用いて培養した場合、多数の特異的なタンパク質が生産されていた。特に、脱脂木紛を炭素源にして培養すると多種類のタンパク質が検出された。それらは、Glycoside Hydrolase family 6 (GH6), GH7 に属するセルラーゼ、GH11 に属するキチナーゼ、GH12 に属するグルカナーゼの他に、リパーゼなどが同定された。また、既知の酵素とアミノ酸配列レベルで全く相同性を示さない機能未知のタンパク質も生産されていた。キシランのみを炭素源とした場合では GH11 に属するキチナーゼが、グルコマンナンのみを炭素源とした場合では GH5 に属するマンナナーゼが生産されていた。また、それぞれでいくつかの機能未知タンパク質も同定された。現在、いくつかの機能未知タンパク質について機能を解析している。

Secretome, Wood degradation, *Phanerochaete chrysosporium*

発表番号：3F185
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Aspergillus oryzae* の変異処理及び光応答能力を利用したプロテアーゼの増産

# Increasing production of protease of *Aspergillus oryzae* by using mutation and light response ability

○楠本 憲一[1]、ムルティ プシュパ[1,2]、鈴木 聡[1]（[1]農研機構食総研、[2]インド国中央食品技術研究所）
○Ken-Ichi Kusumoto[1], Pushpa S. Murthy[1,2], Satoshi Suzuki[1] ([1]National Food Research Institute, NARO, [2]CSIR-Central Food Technological Research Institute, India）

【背景・目的】

我が国の伝統的発酵食品醸造における麹菌、あるいは食品用酵素生産菌として使用される *Aspergillus oryzae* のプロテアーゼ生産力を向上する方策検討のため、変異処理によるプロテアーゼ高生産株の取得を行い、同株を用いて、ジャガイモデンプン製造工程で排出されるデンプン残渣（PPP）を固体培養基質としたプロテアーゼの生産最適化の検討及び、光応答能力を利用した酵素増産を検討した。

【方法・結果】

*A. oryzae* RIB40 株の胞子懸濁液を PDA（ポテトデキストロース寒天）プレート上に塗布後、紫外線照射（生存率 0.018%）を施した。その後 PDA プレート上に生育したコロニーを分離し、別途胞子形成させ、胞子懸濁液を調製した後、液体培養を行った。培養上清のプロテアーゼ活性をアゾカゼイン法により測定し、RIB40 株の同活性と比較した。その結果、麹菌の紫外線照射処理により親株の約 5 倍程度のプロテアーゼ生産力を示す変異株 F6 を取得した。乾燥デンプン粕を培養基質とした本株の固体培養を行い、プロテアーゼの生産最適条件を明らかにした。

次に、F6 株のプロテアーゼ生産に与える光照射の影響について検討を行った。まず、ツァペックドックス（CD）プレートにおける F6 株の生育を白色蛍光灯による光照射の有無により観察した結果、非照射区のほうが菌体量、分生子数、コロニー径の全てにおいて光照射区よりも上回った。次に、光照射の有無による同株の液体静地培養（CD）、固体培養（PPP）を行った。両試験区においてそれぞれ培養液容量、重量当たりのプロテアーゼ活性をアゾカゼイン法により測定した。その結果、光照射を行わない場合に両培養条件共にプロテアーゼ活性が光照射区よりも有意に高いことを見出した。

醤油などの発酵食品醸造においては、プロテアーゼなどの高い酵素活性が求められるため、変異処理と光制御による培養は新たな酵素生産技術として有望である。光照射は麹菌の生育にも影響を与えることが知られている。今後、さまざまな光照射条件におけるプロテアーゼなどの酵素生産量及び生育量を検討することにより、光照射による麹菌酵素増産法の開発が期待される。

（研究の一部は UNU-キリンフェローシッププログラムにより実施）

1) Murthy P. S. et al. (2015) Food Science and Technology Research, 21 (4), 631-635 (2015)
2) Murthy P. S. et al. (2015) Food and Bioproducts Processing, 96, 180–188 (2015)

*Aspergillus oryzae*, protease production, light responce

発表番号：3F186
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* GB-4(0)の MEL 生合成遺伝子の破壊と酵素生産への影響
Characterization of a gene disrupted mutant of Pseudozyma antarctica GB-4(0)
○森田 友岳[1]、雜賀 あずさ[1]、吉田 重信[2]、鎗水 透[2]、小池 英明[1]、渡部 貴志[2]、羽部 浩[1]、北本 宏子[2] ([1]産総研、[2]農環研)
○Tomotake Morita[1], Azusa Saika[1], Shigenobu Yoshida[2], Tohru Yarimizu[2], Hideaki Koike[1], Takashi Watanabe[2], Hiroshi Habe[1], Hiroko Kitamoto[2] ([1]AIST, [2]NIAES)

担子菌酵母 *Pseudozyma antarctica* は、産業用酵素として使われるリパーゼやスキンケア化粧品に応用されている糖脂質（マンノシルエリスリトールリピッド, MEL）を分泌し、産業利用に有用な性質を有している。最近、生分解性プラスチック（生プラ）分解酵素（PaE）を分泌することも見いだされ、使用済み農業用マルチ急速分解への応用を目指した PaE 量産化のため、PaE 生産株の選抜育種の研究が進められている。一方、MEL は生プラフィルム上に配向して PaE による分解反応を阻害することから、*P. antarctica* の MEL 生合成を欠失させることで、PaE の生産性向上や酵素活性の安定化が可能になると予想した。そこで、本研究では、イネから分離選抜した PaE 量産株である *P. antarctica* GB-4(0)の MEL 生合成遺伝子破壊株を作製し、MEL 生合成の PaE 生産に対する影響を調べた。

*P. antarctica* GB-4(0)を親株として、MEL 生合成に必須であるマンノース転移酵素遺伝子（*PaEMT1*）の遺伝子破壊株（*ΔPaEMT1* 株）を作製した。親株と *ΔPaEMT1* 株を培養して、菌体量、PaE 活性及び PaE 生産量（SDS-PAGE 及びウエスタン解析）を調べた。菌体増殖は両株で違いはなかったが、予想に反して、*ΔPaEMT1* 株の PaE 活性と生産量は大きく低下しており、MEL 生合成が PaE 生産に関与していることが示唆された。培養液中に MEL を添加することで、*ΔPaEMT1* 株の PaE 生産能が親株と同じ水準まで回復したことから、菌体外の MEL も PaE 生産に寄与する可能性が考えられた。さらに、PaE 遺伝子の発現量を PR-PCR で確認したところ、親株と *ΔPaEMT1* 株で同程度であった。したがって、*ΔPaEMT1* 株でも PaE 遺伝子は発現しており、PaE を検出できない理由は、細胞内分泌経路や分解反応など翻訳後プロセスの異常である可能性が考えられた。また、*PaEMT1* 発現ベクターを *ΔPaEMT1* 株に導入して遺伝子破壊の相補株（*ΔPaEMT1::PaEMT1* 株）を作製し、*ΔPaEMT1::PaEMT1* 株の PaE 生産性を調べた。その結果、培養液中の PaE 活性は親株と同程度まで回復しており、ウエスタン解析で PaE のシグナルも検出できた。MEL 生産性の回復は、培養液の酢酸エチル抽出液を薄層クロマトグラフィーに供し、アンスロン試薬で MEL を検出して確認した。以上の結果から、*P. antarctica* GB-4(0)において、MEL 生合成が酵素生産に必要であることを初めて見出した。

本研究は、農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業で実施した。

basidiomycetous yeast, Pseudozyma, phyenotype

発表番号：3F187
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 SteelyB の産物多様性の解析

# Biochemical analysis of product diversity of a hybrid polyketide synthase, SteelyB

○飯島 知之、齊藤 玉緒（上智大理工）
○Tomoyuki IIJIMA, Tamao SAITO (Sophia Univ.)

【目的】土壌微生物の細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は今までに見つかっていない特殊なポリケタイド合成酵素(PKS)を持つことが全ゲノム解析から分かっている。それらは Steely と呼ばれ、反復型のⅠ型 PKS とⅢ型 PKS がハイブリッドした PKS である。Steely は A と B の 2 種類あり、それぞれで産物は特定されている。SteelyB は発生の途中で分化誘導因子として知られる DIF-1（Differentiation Inducing Factor-1）の前駆体を合成する。しかしながら、Ⅲ型 PKS にはゆるやかな基質特異性があることと、SteelyB は子実体になってからも発現していることから、SteelyB は DIF-1 以外の産物を生成していることが示唆されている。そこで塩素の放射線同位体ラベルを用いて SteelyB の遺伝子破壊株の子実体の産物を解析したところ、野生株で生成される塩素化化合物 LCCs（Late Chlorinated Compounds）が生成されていないことが分かった。LCCs は栄養状態の回復を待つ子実体期に合成されているため、なんらかのケミカルコミュニケーションのツールであることが推定されている。本研究ではこの新規ハイブリッド型 PKS である SteelyB の産物多様性およびその産物の一つである LCCs の生合成機構の解明への第一歩である LCCs の構造決定が目的である。
【方法】*D. discoideum* の野生株である V12M2 を *Klebsiella aerogenes* と共に SM agar 上で二員培養し、子実体を形成させた後回収した。回収した子実体は 250 μm の目開きのふるい上で SM buffer を流し胞子やクレブシラを落とした後にエタノールによる抽出を行った。その後、酢酸エチルと水による二層分配を行い、酢酸エチル層を回収した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより単離した後、FAB-MS、HRFAB-MS、$^{1}$H-NMR、$^{13}$C-NMR、$^{1}$H-$^{1}$H COSY、HMBC、HMQC を測定した。
【結果】FAB-MS の結果から塩素を 3 つ含むことが分かり、HRFAB-MS の結果から分子式は $C_{19}H_{17}Cl_3O_6$ であることが分かった。$^{1}$H-$^{1}$H COSY、HMQC、HMBC から hexanoyl 基の存在が確認され、*D. purpreum* の子実体から単離された抗菌活性を持つ塩素化されたジベンゾフラン骨格を持つ AB0022A の NMR のピークとも比較し、LCC の構造は 1-(4,6,8-trichloro-1,3,9-trihydroxy-7-methoxy-2-dibenzofuranyl)-hexanone であると決定した。今後この化合物の持つ活性を確認していくとともに、生合成機構の解明も行っていきたい。

polyketide synthase, soil microorganism, biosynthesis

発表責任者：飯島知之（ijima-tomoyuki-chime@sophia.ac.jp）

発表番号：3F188
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 卵殻膜分解酵素の異種発現と同酵素を用いた卵殻膜からの生理活性ペプチドの取得

# Heterologously expression of eggshell membrane degrading enzyme and fractionation of bioactive peptides from the hydrolysate

○竹中 慎治、大坂 宇津実、山下 陽子、芦田 均 (神戸大農)
○ Shinji TAKENAKA, Utsumi OSAKA, Yoko YAMASHITA, Hitoshi ASHIDA (Kobe Univ. Agrobioscience)

【目的】 卵殻膜は、タンパク質を主成分とする生体膜であり、切り傷・やけどの治癒や保湿効果などの生理作用を示すと言われているが、その利活用は進んでいない。我々は、卵殻膜が水に不溶な難分解性のタンパク質膜であることがその要因の一つと考え、微生物酵素（金属プロテアーゼ）による卵殻膜の分解と可溶性ペプチドおよびタンパク質の調製法を検討してきた。[1-2] また、卵殻膜分解物の新たな機能性を検討し、高血糖予防に関わる筋肉細胞へのグルコースの取り込みとそれを担うグルコース輸送体の細胞膜移行作用についても研究を行ってきた。[3] 本報では、*Brevibacillus* での発現および卵殻膜分解物由来生理活性ペプチド画分について報告する。

【方法】 卵殻膜分解酵素遺伝子のクローニングと発現：分離菌 *P. aeruginosa* ME-4 由来同酵素遺伝子(プロ-成熟領域)[2]をクローニングし、*Brevibacillus choshinensis*-pBIC DNA expression system にて行った。発現用培地と培養：グルコース-Bacto Soytone-Bacto Yeast Extract-$CaCl_2$·$2H_2O$ 培地（2SY 培地）およびグルコース-ファイトペプトン-かつお肉エキス-酵母エキス-金属塩類培地（pH 7.0）（TM 培地）を用いた。卵殻膜の加水分解・可溶性ペプチド・タンパク質の分画：卵殻膜（粉体）および組み換え精製酵素を添加した 10 mM リン酸カリウムナトリウム緩衝液（pH 6.5）にて、50℃で 12 時間反応した。その後、反応液上清を遠心ろ過膜（3.0 kDa）にて、ろ液と残渣に分けた。ろ液中のペプチド類を、HPLC（Cosmosil 5C18 AR-II、5 mM trifluoroacetic acid in $H_2O$）にて分画した。

【結果】 分泌シグナル配列の異なる発現ベクターpBIC1～pBIC4 を検討した結果、同配列の相違と分泌量に顕著な差はなかったが、再現性の点から pBIC4 に ME-4 プロテアーゼ遺伝子を組み込んだ発現ベクター系にて組み換え酵素を調製することにした。*E. coli* BL21(DE3)pLysS-pET11a の発現系では、封入体となった組み換えタンパク質を可溶化させる必要があったが、[2] *Brevibacillus* の発現系では培養上清中から目的の組み換えタンパク質を回収することができた。

卵殻膜の加水分解を行い、卵殻膜（粉体 400 mg）から可溶性ペプチド（4.8 mg, GlyGlyGly 換算）および可溶性タンパク質（11.9 mg, BSA 換算）を得た。現在、ペプチド生理活性画分のアミノ酸類について解析中である。

本研究の一部は、財団法人旗影会平成 27 年度研究助成により行った。文献：１）Cheng et al., J. Biosci. Bioeng. 107:373-378 (2009)；２）Takenaka et al., Biotechnol. Lett. 34:949-955 (2012). ３）芦田ら 日本食品化学工学会第 62 回大会講演要旨集 p.96.

eggshell membrane, Pseudomonas metalloprotease, bioactive peptide

発表責任者：竹中慎治（stakenaka@people.kobe-u.ac.jp）

発表番号：3F189
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

タイ土壌から分離した耐熱性 *Streptomyces* 属放線菌の生産するリパーゼの特性解析
Characterization of lipase from thermotolerant-*Streptomyces* isolated from soil in Thailand

○大坂 宇津実[1]、タノングサック チャイヤソ[2]、田中 耕生[3]、吉田 健一[1]、竹中 慎治[1]([1]神戸大農、[2]チェンマイ大アグロインダストリー、[3]神戸大自)
○Utsumi OSAKA[1], Thanongsak CHAIYASO[2], Kosei TANAKA[3], Ken-Ichi YOSHIDA[1], Shinji TAKENAKA[1] ([1]Kobe Univ. Agrobioscience, [2]ChiangMai Univ. Agro-Industry, [3]Kobe Univ. Advanced Science and Technology)

【目的】 糖の脂肪酸エステルは、非イオン性の界面活性剤に分類され、加工食品中の乳化剤として広く利用されている。同界面活性剤は、石油を原料として合成される界面活性剤と比較し、生物的な分解が可能で、環境に対する毒性も低いと言われている。糖の脂肪酸エステルの酵素法による合成には、触媒としてリパーゼが用いられ、これまで微生物由来の同酵素の検索および特性解析そその利用が行われてきた。本研究では、耐熱性または高温性微生物由来リパーゼを検索し、その特性を明らかにすることを目的とし、タイ土壌より単離された放線菌とそのリパーゼの特性について報告する。
【方法】 分離・培養培地：1.0% 麦芽エキス-0.4% 酵母エキス-0.4% D-グルコース培地（pH 7.2）に終濃度 1.0%となるようにオリーブオイルおよびアラビアゴムを添加し、50℃で振とう培養した。リパーゼ活性測定:4-ニトロフェニルラウリン酸または 4-ニトロフェニルパルミチン酸を基質とし､40℃で反応を行い、遊離 4-ニトロフェノール量を 410 nm の吸光度の増加量から活性を算出した。固定化酵素による糖脂肪酸エステルの合成：培養上清中に含まれるリパーゼをセライトに固定し、固定化酵素､糖類およびビニルエステル類を添加したアセトン-*t*-ブタノール反応液にて 45℃で振とうしながら行った。
【結果】 タイ温泉地の土壌より放線菌を検索し、リパーゼ活性を指標に TCW 株を選抜した。本菌の 16S rRNA 遺伝子解析（1,553 bp）を行い、*Streptomyces thermoviolaceus* と相同性が高いことが分かった。TCW 株におけるリパーゼ生産性を調べたところ、100 ml/500 ml フラスコ培養にて往復振とう培養よりも旋回振とう培養が良く、酵素活性は培養 3 日目から顕著に増大した。培養上清中のリパーゼをイオンクロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー等で精製した。同酵素の N 末端アミノ酸配列（AGGYVALGDSYSSGV）であり、*S. albidoflavus* NA297 由来リパーゼ（4HYQ_A）と類似していた。精製酵素を用いて 4-ニトロフェニル酢酸（C2）から 4-ニトロフェニルパルミチン酸（C16）までの鎖長の異なるアルキルエステル基を有する基質を用いて加水分解活性を調べたところ、C2 から C6 までの基質に対してはほとんど活性（相対活性 2～5%）を示さず、4-ニトロフェニルラウリン酸（C12、100%）または 4-ニトロフェニルミリスチン酸（C14、94%）に対して高活性であった。また、固定化したリパーゼにより､ビニルアルキルエステル（C2～C16）と D-グルコースのエステル交換反応を行ったところ、それぞれグルコースモノエステル体が生成していた。現在、同酵素の精製を進め、特性解析を行っている。

Streptomyces, lipase, sugar ester

発表責任者：大坂宇津実（utsumi.o.0724@gmail.com）

発表番号：3F190
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# セルロース結合ドメインを付加した NADH:DCIP 酸化還元酵素とグルコースデヒドロゲナーゼの調製とグルコース定量への応用

# Construction of cellulose-binding domain fusion NADH:DCIP oxidoreductase and glucose dehydrogenase for their immobilization on cellulose and quantification of glucose

○堀 友佳理[1]、矢野 成和[1]、白石 晴樹[2]、立木 隆[2]([1]山形大院理工、[2]立命館大生命科学)
○Yukari HORI[1], Shigekazu YANO[1], Haruki SHIRAISHI[2], Takashi TACHIKI[2] ([1]Yamagata univ., [2]Ritsumeikan Univ.)

【目的】 多糖加水分解酵素の多くは、触媒ドメイン以外に多糖結合ドメインを持つ。*Bacillus circulans* KA-304 のα-1,3-グルカナーゼはマルチドメイン酵素で、触媒ドメインが C-末端に位置し、N-末端に３つのα-1,3-グルカン結合ドメインが連なった構造を持つ。前大会では、α-1,3-グルカン結合ドメインの機能を解析することを目的に、α-1,3-グルカン結合ドメインと、NADH：DCIP 酸化還元酵素(NDOR)を結合させた融合酵素（α-1,3-binding-NDOR)を作製した（１）。その結果、α-1,3-binding-NDOR のほとんどがα-1,3-グルカンに結合し、さらに、NDOR はホモ二量体構造であるにもかかわらず、α-1,3-グルカンに結合した状態でも NADH を酸化し DCIP を還元した。この結果から、サブユニット構造を有する酸化還元酵素でも多糖結合ドメインを融合するだけで、容易に固定化酵素が調製でき、バイオリアクターやバイオセンサーに応用できると考えた。

本報では、多糖結合ドメインと酸化還元酵素の融合酵素を利用したバイオセンサーモデルの構築を目指し、*Clostridium thermocellum* のセルロソーム骨格タンパク質に含まれる Cellulose-binding domain と NDOR（NDOR-CBD)、あるいは NAD 依存性のグルコースデヒドロゲナーゼ（CBD-GDH）を融合させた。融合酵素の酵素学的な性質を解析するとともに、セルロース固定化状態での共役反応によりグルコースが定量できるかを調べた。

【方法と結果】 NDOR-CBD と CBD-GDH を大腸菌 pET ベクター系で発現し、融合酵素を各種カラムクロマトグラフィーにて精製した。NDOR-CBD と CBD-GDH は、野生型酵素に比べて活性は低くかったものの、CBD を付加した状態でも定量分析を行うには十分な活性を有していた。両酵素の非晶性セルロース（0.5%）に対する結合率はともに 95%以上であったが、結晶セルロース（0.5%）に対する結合率は NDOR-CBD が約 20%で CBD-GDH が約 8%であった。また、両酵素の結晶セルロースに対する結合率は、基質濃度の増加にともなって上昇した。NDOR-CBD と CBD-GDH は結晶セルロースに結合した状態でも活性を示すことから、結晶性セルロースに結合させた状態の NDOR-CBD と CBD-GDH を順にカラムに充填した。カラムにグルコース、$NAD^+$と DCIP を注入すると、グルコース濃度依存的に DCIP が還元された。

（１）日本農芸化学会 2015 年度大会講演要旨集、3A34p07

cellulose-binding domain, NADH:DCIP oxidoredactase, glucose dehydrogenase

発表番号：3F191
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Discovery and characterization of ulvan-degrading enzymes from *Alteromonas* sp. strain KUL17

○CHUAN HE, Ryo Takahashi, Kouhei Ohnishi (Research Institute of Molecular Genetics, Kochi Univ.)

Ulvans are complex sulfated polysaccharides in the cell walls of green algae belonging to the genus *Ulva*. The production of mono- and oligosaccharides from this polysaccharide could motivate its use to an industrial scale. For enzymatic degradation of ulvan to rhamnose and uronic acid, there are at least three steps; cleaving the linkage between sulfated rhamnose and uronic acid to produce oligosaccharides with an unsaturated uronic acid at the non-reducing end, cleaving by glucuronidase into rhamnose and uronic acid, then releasing the sulfate groups.

The objective of this study is to discover ulvan-degrading enzymes for production and potential use of mono- and oligosaccharides of ulvan. In order to achieve the objective, we screened ulvan-degrading bacteria. Feces of the molluscs and shrimps living on the surface of *Ulva ohnoi* were chosen as sampling sources and ulvan-degrading bacteria were enriched in the artificial seawater medium containing ulvan as the sole carbon source. Five strains of ulvan-degraders, KUL1, KUL4, KUL10, KUL17 and KUL42, were finally isolated on ulvan plates by visualizing ulvan-degrading activity with cetylpyridinium chloride (CPC). We already analyzed ulvan-degrading enzymes from KUL1, KUL10 and KUL42 and presented the data at the previous meetings. We are focusing on KUL17 in this study. 16S rDNA sequence analysis demonstrated that KUL17 was identified as belonging to the genus *Alteromonas*.

Ulvan-degrading enzymes of KUL17 were constitutively expressed, which is different from ulvan-inducible enzymes of other ulvan-degrading bacteria. Crude enzymes were purified from the supernatant of bacterial culture in the marine broth by ammonium sulfate precipitation, followed by anion exchange and hydrophobic interaction chromatographies. The CPC method indicated that the two proteins with molecular masses of 45 and 55 kDa created halo. We learned from the previous works that sulfatases, which remove sulfate groups, form halo on CPC plates. Indeed, N-terminal amino acid sequences of the proteins indicated that the 45-kDa protein was identified as sulfatase. Now we are cloning genes encoding both the 45– and 55–kDa proteins for analyzing enzymatic properties.

Algal polysaccharides, Polysaccharide degrader, Ulvan-degrading enzyme

発表番号：3F192
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イノシトール遊離能を持つ新規フィターゼの探索

# Search for Novel Phytases with Inositol Liberating Activity

○佐々木 海[1]、シャーマン ケビン[1]、吉田 健一[2]、阿部 歩[1]、浅野 行蔵[1]、曾根 輝雄[1] ([1]北大院農、[2]神戸大院農)
○Kai SASAKI[1], Kevin SHERMAN[1], Ken-ichi YOSHIDA[2], Ayumi ABE[1], Kozo ASANO[1], Teruo SONE[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kobe Univ.)

【背景と目的】

家畜の効率的生産においてリンは重要な栄養素である．家畜飼料の主原料である麦やトウモロコシなどの穀物中では，含まれるリンの 50-80%がフィチン酸（myo-イノシトール 6 リン酸）として存在しているが，豚や鶏などの単胃動物はフィチン酸消化酵素を持たないため，摂取されたフィチン酸は栄養素として吸収されることなく体外へ排出され，地下水の富栄養化につながる．また一方でフィチン酸は強力な 2 価カチオンキレート能を持つため，ミネラルの吸収も抑えてしまう．フィターゼはフィチン酸から無機リン酸を遊離させる酵素で，飼料中のリン利用効率を高め，環境負荷を抑えるための添加剤として広く利用されている．しかしながら，現在までに報告されている大部分のフィターゼはフィチン酸のイノシトール環第 2 位に結合したリン酸基を加水分解することができないため，その添加物としての性能には未だ改良の余地がある．本研究室で発見した *Klebsiella pneumoniae* 由来のフィターゼ,Phy9-3B はイノシトール遊離能を持つことがわかっている．本研究では，*K. pneumoniae* 以外の微生物からのイノシトール遊離能を持つ新規フィターゼの探索を目的とした．

【実験内容】

インドネシアの発酵食品であるテンペ，タペを微生物源として，フィチン酸を唯一炭素源，リン源とした培地（MM9 培地）を用いて集積培養によるスクリーニングを行ったが，*K. pneumoniae* しか得られなかった．これはフィターゼのイノシトール遊離能よりも，微生物のイノシトール資化性がより強い選択性を示したものと考えられた．そこで，イノシトール資化能を持つ *Bacillus subtilis* AHU1972 株を異種タンパク発現ホストとしたスクリーニング系の構築を行うこととした．本実験系ではフィチン酸を過剰に処理した土壌サンプルから DNA 抽出を行い，大腸菌-枯燥菌シャトルベクターにクローニングすることでメタゲノムライブラリーを構築し，このライブラリーを用いて AHU1972 株の形質転換を行い，MM9 培地に生育可能なコロニーを得ることで，フィチン酸完全分解能を持つフィターゼが導入された細胞を特定するというものである．これまでの実験で，ホストである AHU1972 株はポジティブコントロールとして用いたフィチン酸完全分解能を持つフィターゼ Phy9-3B を活性のある状態で発現できることが確認されたが，MM9 培地上でのコロニー形成には至らなかった．現在，AHU1972 株によるセレクションを可能にするため，MM9 培地上での異種タンパク発現能を向上させるベクター・培地条件の検討を行っている．

Phytase, Inositol, Screening Metagenome

発表番号：3F193
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 工学的改変ピキア酵母：同一ベクターによる多重遺伝子導入系の開発

# An engineered Pichia pastoris capable of repeated incorporation of vectors with the same selection marker.

○渋井 達郎、原 宏佳、坂口 大介（日本獣医生命科学大学）
○TATSURO SHIBUI, HIROYOSHI HARA, DAISUKE SAKAGUCHI (Nippon Veterinary and Life Scinece Univ.)

原核生物、酵母、カビ、昆虫細胞、動物細胞、植物細胞、トランスジェニック植物・動物などが遺伝子工学による目的タンパク質生産宿主として使用されているが、これら宿主を利用した目的遺伝子産物（タンパク質）の量産系には、原則として以下のような発現のための共通の因子が必要となる。

１．転写活性が高く、制御の容易な転写プロモーター配列と転写の read-through を防ぐための転写終結（ターミネーター）配列　２．翻訳開始効率の良くするための配列（5’Cap 構造、IRES、SD 配列等）の目的遺伝子上流への配置　３．翻訳効率の良いコドンの利用とその効率の良い配置

これらの他、目的遺伝子のコピー数を増加させることにより、目的遺伝子産物の量を増加させることができることは、種々報告されている[1)、2)、3)]。

上記宿主の中で、ピキア酵母は増殖力およびタンパク質生産能力が優れているため、組換え宿主として様々なタンパク質の生産に用いられている。当研究室では、目的遺伝子のコピー数をベクター上で増やす方法を用い、ピキア酵母での目的タンパク質の生産効率向上の検討を行った。しかし、ベクター上で目的遺伝子数を増やした場合、導入遺伝子断片が巨大になるため、エレクトロポレーション法による細胞内へのインタクトな遺伝子の導入効率は 12ｋbp 以上のＤＮＡ断片では著しく低下することを見出している[4)]。

今回は、ピキア酵母を工学的に改変し、同じベクターを繰り返し導入できる系を開発したので報告する。当方法では、目的産物の遺伝子をベクター上で複数化することなく、目的遺伝子を（好きなだけ）複個導入したピキア酵母を確実に作製できるため、様々な有用タンパク質の量産系に活用できると期待される。

1) T. Shibui *et.al*. “A methods for overproduction of a protein of a target gene in Escherichia coli.” Agric. Biol. Chem., 52, 2235-2241 (1988)

2) T. Shibui *et.al*. “High-level expression of human proapolipoprotein A-1 in Escherichia coli using expression plasmids containing tandemly polymerized proapolipoprotein A-1 structural genes.” Applied Microbiology and Biotechnology, 31, 518-523 (1989)

3) M. Kito *et.al.* “Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins.” Applied Microbiology and Biotechnology, 60, 442-448 (2002)

4) T Shibui *et,al.* “Construction and effects of tandem-repeat expression genes for *Pichia pastoris,* and their incorporation efficiencies and stabilities by electroporation.” CIBTech Journal of Biotechnology, 3, .25-35 (2014)

Pichia pastoris, cre-loxP, recombinant protein

発表責任者：渋井達郎（tshibui@nvlu.ac.jp）

発表番号：3F194
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

担子菌 *Bjerkandera adusta* Dec 1 株が分泌する酵素 DyP の生理的機能
Pysiological function of DyP from a basidiomycete, *Bjerkandera adusta* Dec 1

○大出 恵津乃[1]、天野 芳美[2]、長谷川 美穂[1]、佐藤 麻衣[1]、菅原 佳奈子[1]、菅野 靖史[1] ([1]日本女子大・理・物生、[2]東工大院・総合理工)
○Etsuno OHDE[1], Yoshimi AMANO[2], Miho HASEGAWA[1], Mai SATO[1], Kanako SUGAWARA[1], Yasushi SUGANO[1] ([1]Dept. Chem. Biol. Sci., Fac. Sci., Japan Women's University, [2]Int. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech.)

【背景】 白色腐朽菌の 1 種である担子菌 *Bjerkanderea adusta* Dec 1 株(Dec 1)は、樹木に寄生するキノコの一種であり、様々な染料や色素を脱色することが明らかになっている。特にアントラキノン染料に対して高い脱色活性を示し、この脱色反応に関与しているペルオキシダーゼ型の酵素として **dye-decolorizing peroxidase (DyP)**が単離精製された。合成染料であるアントラキノン染料は自然界には存在しないため、DyP の生理的な基質であるとは考えられない。そこで着目したのがアントラキノン骨格を有する天然の化合物である。アントラキノン化合物の中には、植物によって産生され、抗菌作用を示すものも多く存在する。先行研究では、植物がもつアントラキノン色素で抗菌作用を示すアリザリンを加えた寒天培地上で Dec 1 を培養し、菌糸の伸長を経時的に観察することで菌体増殖を評価した。その結果、菌糸の伸長開始時間には影響が見られるが、菌糸が成長を開始してからの伸長速度には影響がないことが示唆された。この結果から、Dec 1 は菌体増殖に先立って、DyP を分泌してアリザリンを分解すると仮説を立てた。そこで、本研究では、菌体増殖の前に DyP がアリザリンを分解していることを確認し、植物由来のアントラキノン化合物が DyP の生理的基質であるとの仮説を検証した。
【方法】 ポテトデキストロース(PD)寒天培地に Dec 1 を植菌し、13 日間、29℃で前培養した。培養 13 日目のプレート上に密生した菌糸を L 字型の白金耳で集めて滅菌水に懸濁してろ過したものを分生子懸濁液とし、これをフィルター濾過したアリザリン溶液を加えた PD 培地とアリザリン溶液を含まない PD 培地(コントロール)のそれぞれに植菌して振盪培養した。培養開始から 12、24、36、48 時間後に菌体と培養上清を回収し、菌体乾燥重量、DyP 活性測定およびアリザリンの定量分析を行い、DyP 活性と菌体乾燥重量から菌体 1 mg 当たりの DyP 活性を算出した。
【結果】 アリザリンを加えた PD 培地ではアリザリンを加えていない PD 培地に比べ、菌体増殖は遅いが菌体 1 mg あたりの DyP 活性が高いことが示唆された。さらに、アリザリンの定量分析から、培養の早い段階からアリザリンの分解が行われていることが示唆された。これらの結果から、Dec 1 は菌体増殖の前にアリザリン分解を行っている可能性が高い。
今後、DyP 産生の報告例が最も多い白色腐朽菌が寄生している樹木を自然界で探し、その樹皮を採取して樹皮に抗菌作用を有するアントラキノン化合物が含まれているか、およびその樹木に寄生していた担子菌が DyP を産生しているかを確かめたいと考えている。

DyP, Peroxidase, Biological interaction

発表責任者：菅野　靖史（suganoy@fc.jwu.ac.jp）

発表番号：3F195
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* 酸性プロテアーゼ多重欠損株の菌体外プロテアーゼの解析

# Analysis on extracellular proteolytic enzymes of multiple acid proteolytic enzyme gene deleted *Aspergillus oryzae* strains

○上野 絢子、前田 浩、山形 洋平、竹内 道雄（東京農工大学院農）
○Ayako UENO, Hiroshi MAEDA, Youhei YAMAGATA, Michio TAKEUCHI (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】黄麹菌 *A. oryzae* RIB40 のゲノム解析の結果、酸性条件下で作用しペプスタチンに阻害されるエンド型プロテアーゼであるアスパルティックプロテアーゼ（ APase ）をコードすると推定される遺伝子が 11 種存在することが明らかとなった。この 11 種の APase は液胞局在、膜局在、菌体外分泌型の 3 種に分類されることが示唆されている。以前に、5 つある菌体外分泌型 APase のうち、菌体外においてタンパク質として検出されたのは PepO のみであることを報告した。その一方で、APase 遺伝子すべてで mRNA の存在が確認され、転写は行われていることを明らかにした。以上の結果をもとに、本研究では *pepO* 遺伝子欠損株（ Δ*pepO* ）を作製し、その欠損が他の酸性で作用する菌体外プロテアーゼに及ぼす影響について調べることを目的とした。
【方法・結果】大豆タンパク質を窒素源とした培地で *A. oryzae* Δ*pepO* 株を培養し、その培養上清について、酸性条件下で作用するエンド型プロテアーゼの活性測定を行った。pH 3.0 においてカゼインを基質とした活性測定を行うと、Δ*pepO* 株では野生株 RIB40 の約 30～40 % 程度の活性が認められた。この活性は EDTA、PMSF、ベンザミジン、ペプスタチンによる阻害を受けず、アンチパインにより阻害を受けることが明らかとなった。*A. oryzae* は、アンチパインに阻害され、酸性で作用するエンド型プロテアーゼとして aorsin A を生産することが知られている。Δ*pepO* 株の培養上清には、aorsin A の基質 Z-Arg-Arg-MCA から AMC を遊離する活性が認められた。以上のことからΔ*pepO* 株の培養上清のカゼイン分解活性には、aorsin A が寄与することが明らかになった。すなわち、酸性条件下で作用し、カゼインをエンド型に分解する菌体外プロテアーゼは主に PepO と aorsin A であることが示唆された。そこでΔ*pepO* 株の aorsin A をコードする遺伝子 *aorA* を欠損した株、Δ*pepO*Δ*aorA* 二重欠損株を作製した。培養上清中の pH 3.0 におけるカゼイン分解活性を測定した。その結果、Δ*pepO*Δ*aorA* 株でもその培養上清にはカゼイン分解活性が約 30～40 % 程度残存していることが明らかになった。さらに、RIB40 に比べ、Δ*pepO*Δ*aorA* 株ではカルボキシペプチダーゼ ( CPase ) 活性の上昇が見られた。定量 PCR による転写解析の結果、Δ*pepO* 株および Δ*pepO*Δ*aorA* 株において *pepO* パラログである *ap4* の転写量が、Δ*pepO* 株において *aorA* の転写量が上昇傾向を示した。活性が上昇していた CPase 遺伝子欠損株について報告する予定である。

なお、本研究の一部は、生研センター基盤研究推進事業の一環として行われたものである。

*Aspergillus oryzae*, acidic proteases, extracellular proteases

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：3F196
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

神経剤分解を目的とした organophosphprus hydrolase 産生系の構築
Construction of organophosphorus hydrolase producing system with the aim of degrading nerve agents
○中山 公介[1]、岩田 なつみ[1]、大森 毅[2]、瀬戸 康雄[2]、石川 暁志[1]、川原 一芳[1] ([1]関東学院大理工生命、[2]科警研)
○ Kousuke NAKAYAMA[1], Natsumi IWATA[1], Takeshi OHMORI[2], Yasuo SETO[2], Satoshi ISHIKAWA[1], Kazuyoshi KAWAHARA[1] ([1]Kanto Gakuin Univ., [2]National Research Institute of Police Science)

【目的】*Spningobium fuliginis*（以前は *Flavobacterium* sp.）ATCC 27551 株が産生する organophosphorus hydrolase（OPH）は有機リン系の農薬分解酵素として報告されたが、その後サリンなどの有機リン系神経剤を分解できることがわかり、化学テロ対策の一環として研究されてきた。我々はこれまでに、OPH を大腸菌にクローニングし、アミノ酸置換により安定な神経剤である VX や RVX を分解できるよう改良することに成功している。しかし、大腸菌により OPH を産生させた場合、高産生条件では不溶性になるという問題点があった。神経剤除染システムを確立するためには、大量の OPH を産生することが必要と思われたので、OPH 産生用のプラスミドを元の産生菌である *S. fuliginis* ATCC 27551 に導入し、改良型 OPH を大量に産生する系の構築を試みた。
【方法】*Sphingobium* 属に導入可能なプラスミドとしては *Sphingobium amiense* のプラスミドを利用して作製されたシャトルベクターが知られている [1)]。そこでこのプラスミドの複製開始領域（2.9 kb）を、改良型 OPH を産生できるプラスミドの *Hin*dIII 部位に組み込んだプラスミドを作製した。これを用いて *S. fuliginis* を形質転換し、形質転換体から酵素液を調製した。神経剤の分解活性は、一定時間反応の後、残存神経剤を抽出し、GC-MS で残存量を定量することにより測定した。固定化 OPH は、酵素液をアルギン酸ナトリウムと混合し、塩化カルシウムに滴下することにより調製した。
【結果】大腸菌により産生された OPH と比較して、*S. fuliginis* 形質転換体により産生された OPH は粗酵素の状態で約 40 倍の比活性を示した。*S. fuliginis* が本来産生する OPH と比較しても形質転換体の比活性は約 2 倍になっており、さらに Ni カラムによる精製により約 10 倍に上昇した。形質転換体により産生された OPH はウエスタンブロットにより、His-Tag を有していることが確認できた。*Sphingomonadaceae* の代表的菌種である *Sphingomonas paucimobilis* に上記の OPH 産生用プラスミドを導入したところ、やはり OPH を産生させることができたが、比活性は *S. fuliginis* よりも低いことが示された。*S. fuliginis* 形質転換体により産生された OPH の神経剤分解活性を測定したところ、全ての神経剤に対して分解活性を示し、安定性の高い VX および RVX についても 20 分間の反応時間でこれらの神経剤を半減させることがわかった。アルギン酸ゲルに固定化された OPH については、残存神経剤の抽出効率に問題点はあったが、酵素溶液と同様の神経剤分解活性を示すことがわかり、OPH を用いた多様な除染システムの可能性が示された。
1) Saito, M., et al., Microbes Environ., 21, 235-239, (2006).

organophosphorus hydrolase, nerve agent, *sphingobium fuliginis*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

発表番号：3F197
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

enantio-pure な(*R*)-β-Phe の生産に役立つ酵素の構造解析及び生化学解析
Structural and biochemical analyses of an enzyme useful for enantio-pure (*R*)-β-phenylalanine production

○加藤 雄己[1]、野上 真央[2]、川崎 寿[1,2]、夏目 亮[1,2] ([1]東電大・院・工、[2]東電大・工)
○Yuki Kato[1], Mao Nogami[2], Hisashi Kawasaki[1,2], Ryo Natsume[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ.)

【背景・目的】*R* 体の β-フェニルアラニン（(*R*)-β-Phe）は、医薬品合成原料として有用な物質である。(*R*)-β-Phe は化学合成で得られるが *S* 体と混在したラセミ体として生成するため、医薬品合成原料に利用するにはエナンチオマーを分離する必要がある。我々は、(*R*)-β-Phe の分離法として、β-Phe のアミノ基をアセチル化したラセミ体の *N*-アセチル-β-Phe のアミド結合を *R* 体特異的に加水分解する酵素法に着目している。本研究では、この反応を触媒する *Burkholderia* sp.由来の *R* 体特異的 β-Phe アミノアシラーゼ（(*R*)-β-PheAA）の構造機能相関解析に取り組んでいる。現状では(*R*)-β-PheAA や当酵素と相同なアミノ酸配列を有する酵素の立体構造解析例が存在しないため、セレノメチオニン置換(*R*)-β-PheAA を用いた構造解析を試みた。これまでは、N 末端に His-tag が融合した(*R*)-β-PheAA 及び Tagfree 型の(*R*)-β-PheAA を用いて生化学解析、結晶化、構造解析に取り組んできた。結晶化に成功し、回折像は得られていたものの位相の決定には至らなかった。そこで、C 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA の精製、結晶化にも取り組んだところ、最近になって構造解析に成功した。併せて、C 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA の生化学解析を行い His-tag 融合による酵素活性への影響についても評価した。

【方法・結果】精製した組換え酵素を用いてハンギングドロップ蒸気拡散法で結晶化条件をスクリーニングした。その結果、沈殿剤にギ酸アンモニウム、緩衝液に HEPES-OH を含む結晶化溶液条件で 0.2×0.05×0.05 mm$^3$ 以上のロッド状の結晶が成長する条件を見出した。得られた結晶を用いて KEK の PF BL5A 及び PF-AR NE3A で回折データを収集した結果、本結晶は正方晶系に属し、空間群が $P4_12_12$、Unit cell 長が *a*=*b*=約 112 Å、*c*=約 341 Åであることが判った。セレノメチオニン置換 C 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA を用いて、SAD 法による位相決定を試みたところ、初期位相決定に至った。モデリングの結果、*Burkholderia* sp.由来(*R*)-β-PheAA は 3 つのドメインから構成されていること、及び、おそらく 2 量体を形成していることが判った。分解能 2.85 Åの回折データを用いた現時点のモデルの *R*-work 及び *R*-free はそれぞれ 21.9 %、26.5 %である。現在、構造精密化を進めている。今後は、酵素と反応産物の共結晶構造を解析し、基質結合部位、基質認識機構を明らかにする計画である。生化学解析の結果、C 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA は、65°C、pH 8.0 付近で最大活性を示した。また、N 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA や Tagfree 型(*R*)-β-PheAA よりも、C 末端 His-tag 融合型(*R*)-β-PheAA の方が高い耐熱性を有していることが示唆された。現在、酵素学的パラメーターの精密化を進めている。

beta-phenylalanine aminoacylase, optical-resolution, crystallization

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

発表番号：3F198
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# リンカー領域にパリンドロームなアミノ酸配列を持った好熱性放線菌由来セルラーゼ遺伝子のクローニング

# Gene cloning of cellulase containing palindromic linker region from *Thermobifida* sp.

○大田 毅[1]、堀江 瞳美[1]、松浦 愛奈[1]、河合 富佐子[2] ([1]県立広島大生命環境、[2]京都工芸繊維大学)
○Takeshi OHTA[1], Hitomi HORIE[1], Aina MATSU-URA[1], Fusako KAWAI[2] ([1]Pref. Univ. of Hiroshima, [2]Kyoto Institute of Technology)

**【目的】**将来のバイオエタノール実用化の課題として、安価な原料の安定供給と経済性の高い生産技術が挙げられる。第二世代のバイオエタノールはセルロース系バイオマスを原料とする為、酵素糖化はデンプン系資源のそれとは異なり単糖への分解が容易ではなく、新規技術開発には大きな期待が寄せられている。酵素糖化における大きな問題点としては、1. セルロースが結晶構造を有している、2. 結晶セルロースをヘミセルロースやリグニンが取り囲んだ複雑な構造を形成している、3. グルコース以外にヘミセルロース由来の種々の糖（キシロース、マンノース、アラビノースなど）が生成する、等があげられる。本研究では物理・化学的に高い安定性がある好熱性放線菌 *Thermobifida alba* strain AHK119 より新規セルロース分解酵素遺伝子をクローニングし、経済性の高いセルロース分解法を開発することを目的とした。

**【方法】**新規セルラーゼ遺伝子の配列解析は、*Tb. alba* strain AHK119 ゲノムを鋳型に、合成プライマーを用いた PCR 法により行った。プライマーデザインは cellulose binding-domain family 2（CBM2）遺伝子配列と相同性を持つ約 50 bp の内部配列と glucanase 遺伝子における保存領域の配列を基に行った。PCR 産物は pGEM-T easy vector へ TA クローニングし塩基配列を解析した。解析した塩基配列をアミノ酸に変換し、ExPASy proteomics server の Prosite を用いてタンパク構造中に含まれる domain 及び motif の検索を行った。

**【結果・考察】**得られた複数の PCR 産物について塩基配列を解析した結果、*T. fusca* 由来 endoglucanase E2、E5 及び mannan endo-1,4-beta-mannosidase と高い相同性を持つ *AHK-E2*、*AHK-E5* および *AHK-bMs* 遺伝子を得た。推定アミノ酸配列の解析から、これら 2 種の endoglucanase と 1 種の mannan endo-1,4-beta-mannosidase はいずれも触媒領域と基質結合領域が約 30 アミノ酸残基からなるリンカー領域で繋がれていた。AHK-E2 リンカー領域は -PGPNPDPDPTPDPDPTPDPDPNPGP-（25 アミノ酸残基）のパリンドローム、AHK-E5 リンカー領域は-GSDPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGGPGTDPGAG-（24 アミノ酸残基）の規則正しいタンデムリピート（GTP と PGGP のユニットが交互に並んでいる）であり、AHK-bMs リンカー領域は-GGSPGPTPDPTPDPTPDPTPDPDPGTEPGD-（15 アミノ酸残基）のパリンドロームであるが、TPDP ユニットのタンデムリピート（-GGSPGPTPDPTPDPTPDPTPDPDPGTEPGD-）と捉えることもできる配列であった。触媒領域と基質結合領域に高い相同性を持つ endoglucanase リンカー領域と比較しても、アミノ酸配列の規則性は極めて高く、酵素機能や構造に大きく関与していることが示唆された。

palindromic sequence, tandem repeat, cellulase

発表責任者：大田　毅（t-ohta@pu-hiroshima.ac.jp）

発表番号：3F199
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 従属栄養硝化を駆動する酵素『Pyruvic oxime dioxygenase』の分子的性質

# Molecular properties of pyruvic oxime dioxygenase that drives heterotrophic nitrification

○辻野 修平[1]、上松 千紗都[1]、岡 俊彦[1]、吉松 勝彦[2]、藤原 健智[1] ([1]静大理、[2]静大グリーン研)
○ Shuhei TSUJINO[1], Chisato UEMATSU[1], Toshihiko OKA[1], Katsuhiko YOSHIMATSU[2], Taketomo FUJIWARA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Research Institute of Green Science and Technology)

**【目的】**硝化は、アンモニアを亜硝酸塩を経て硝酸塩へと異化的に酸化する微生物作用であり，窒素サイクルにおける重要な生物学的過程である。独立栄養性の硝化細菌は、その生態学的、生化学的研究が盛んに行われている。一方、従属栄養的な硝化については *Alcaligenes faecalis* を用いた過去の研究で、ヒドロキシルアミンとピルビン酸が非酵素的に反応することでピルビン酸オキシムが生じ、ピルビン酸オキシム酸素添加酵素（Pyruvic oxime dioxygenase：POD）の作用によってピルビン酸と亜硝酸塩に分解される、という機構が提唱されている。POD は電気泳動的均一にまで精製されているが、遺伝子構造は報告されていない。本研究では、*A. faecalis* から POD を精製し、その酵素的性質を分析した。また今回明らかとなった POD の遺伝子配列を元に過剰発現系を構築した。

**【方法と結果】***A. faecalis* NBRC13111 を，塩化アンモニウムとピルビン酸を添加した液体培地で好気的に培養した。得られた菌体から調製した可溶性画分から POD を精製した。*A. faecalis* の POD は分子量約 30,000 のサブユニットからなるホモ 4 量体の可溶性タンパク質として精製された。POD 活性は，ピルビン酸オキシムを基質として加え、生成した亜硝酸塩濃度を diazo-coupling 法によって測定することで求めた。POD 遺伝子の DNA 配列は，*A. faecalis* の全ゲノム配列のドラフトデータから、精製 POD の N 末端アミノ酸配列と一致する配列を検索することで得られた。興味深いことに、得られた POD 遺伝子産物の推定アミノ酸配列はクラスⅡアルドラーゼと高い相同性を示した。また PCR 増幅した POD 遺伝子を pET21 ベクターに挿入し大腸菌 BL21 株に形質転換することで、POD の過剰発現系を構築した。過剰発現させた POD 組み換え体が酵素活性を示すことから、POD がクラスⅡアルドラーゼの相同タンパク質であることが証明された。POD の金属要求性は、組み換え POD を EDTA 溶液で透析することで金属イオンを取り除いた後、様々な金属イオンを加え POD 活性を測定することで分析した。EDTA の透析によって POD 活性は消失したが、二価鉄イオンを反応液に加えることで酵素活性が回復した。以上の結果は、POD が、クラス II アルドラーゼの活性中心である亜鉛を二価鉄に置き換えることで、新たな触媒機能であるジオキシゲナーゼ活性を獲得した酵素であることを示唆する。POD の反応機構を分子レベルで明らかとすることを目的として、POD の結晶化と構造解析を現在試みている。

heterotrophic nitrification, pyruvic oxime dioxygenase

発表責任者：藤原健智（fujiwara.taketomo@shizuoka.ac.jp）

発表番号：3F200
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 選択的抗菌活性による皮膚菌叢の健全化と皮膚疾患予防を目指した植物油からのパルミトオレイン酸異性体への微生物変換

# Microbial conversion of vegetable oil to palmitoleic acid isomer for skin microbiome control and skin diseases prevention through selective antibacterial activity.

○永尾 寿浩[1]、田中 重光[1]、倉田 淳志[2]、岸本 憲明[2]（[1]阪市工研、[2]近畿大院・農）
○Toshihiro Nagao[1], Shigemitsu Tanaka[1], Atsushi Kurata[2], Noriaki Kishimoto[2] ([1]Osaka Muni. Tech. Rese. Inst., [2]Grad. Sch. of Agric., Univ. of Kinki)

【背景・目的】

先進国の子供に多いアトピー性皮膚炎（AD）は様々な要因で発症・増悪化するが、それらの原因の 1 つが、皮膚菌叢の多様性と、*Staphylococcus aureus* と *S. epidermidis* の関係である。健常者では皮膚菌叢の多様性が高く、*S. aureus* よりも *S. epidermidis* の方が優勢であるが、AD の炎症部では皮膚菌叢の多様性が低下して *S. aureus* が顕著に増加し（全菌数に対する比率, 平均 65%）、分泌する物質が AD の増悪化に関与している。これ以外にも、*S. aureus* は種々の皮膚疾患の原因となっている。そこで、*S. aureus* を抑制し *S. epidermidis* を抑制しない選択的抗菌活性により、皮膚菌叢を正常な状態に戻し、AD などの皮膚疾患の増悪化を予防する素材の開発が期待されている。

これまでの研究では、(1)パルミトオレイン酸（9-*cis*-C16:1, 9-POA）は弱酸性下で *S. aureus* に対して抗菌活性が強く、*S. epidermidis* に対して活性が弱く、選択的抗菌活性を示した、(2)オレイン酸（9-*cis*-C18:1, OA）は *S. aureus* に対する活性を妨害した、(3)北海道で栽培されている小果実シーベリー（Sea Buckthorn）由来の脂肪酸は OA 含量が少なく（9-POA, 40%; OA, 10%）、本研究の目的に適した。しかし、その果実の生産量が十分でないことから、本研究では、シーベリーを補完する新たな素材開発として、植物油から POA 異性体を製造することを試みた。

【方法・結果】

*Aeromonas hydrophila* subsp. *hydrophila* は、植物油を基質として、炭素数が 2 または 4 個減少した脂肪酸を含むワックス（脂肪酸と脂肪族アルコールのエステル体）を菌体内に蓄積する。そこで、OA を豊富に含むハイオレイック向日葵油を基質として本菌株を培養し、ワックスに含まれる脂肪酸含量を調べたところ、経時的に、抗菌活性を妨害する OA が減少してパルミトオレイン酸異性体（7-*cis*-C16:1, 7-POA）に変換され、さらにミリストオレイン酸異性体（5-*cis*-C14:1, MOA）に変換された。得られた脂肪酸混液の抗菌活性を調べたところ、*S. aureus* NBRC13276 に対する抗菌活性は経時的に強くなったが、*S. epidermidis* NBRC100911 に対する抗菌活性も強くなり、十分な選択的抗菌活性を示さなかった。原因を調べたところ、副生する MOA が両方の菌株に対して強い抗菌活性を示すためであることが分かった。そこで、工業スケールに適用可能な ODS オープンカラムを用いて、培養液から得られた脂肪酸混液を精製したところ、7-POA が 74%にまで精製され、目的とする選択的抗菌活性を示し、AD などの皮膚疾患の増悪化を予防する素材として有効であることが示唆された。

antibacterial activity, atopic dermatitis, *Staphylococcus aureus*

発表責任者：永尾寿浩（nagao@omtri.or.jp）

発表番号：3F201
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# キラル化合物生産に有用な微生物由来イミダーゼに関する研究
# Studies on microbial imidases useful for the production of chiral compounds

○志澤 宏明[1]、日比 慎[2]、高橋 里美[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物)
○Hiroaki SHIZAWA[1], Makoto HIBI[2], Satomi TAKAHASHI[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

これまで、微生物に由来する環状イミドの代謝酵素類を利用した様々な物質生産プロセスの開発が試みられてきた。このうち、イミダーゼは環状イミド化合物の開環加水分解反応を触媒する酵素であり、この反応によりジカルボン酸モノアミド（ハーフアミド）が生成する。この加水分解反応における酵素の立体選択性や部位選択性を利用することで、化学合成が困難なハーフアミドの生産が可能になる。

昨年度の大会において、我々は 2 株の細菌 *Burkholderia phytofirmans* DSM17436 株および *Alcaligenes faecalis* NBRC13111 株が、プロキラルな環状イミドである 3-(4-chlorophenyl)glutarimide (CGI) と 3-isobutylglutarimide を立体選択的に加水分解し、光学活性を持つハーフアミドにほぼ定量的に変換できることを報告した。両株の保持するイミダーゼを同定して詳細な解析を実施したところ、両酵素ともプリン塩基の代謝にかかわるアラントイナーゼであることが分かり、また両者はアミノ酸配列が 75%一致する相同酵素であることが確認された。*B. phytofirmans* DSM17436 株由来の組み換え酵素を用いた反応で、33.6 mM の CGI から光学純度 99.0%e.e.の (*R*)体ハーフアミドを収率 99%で得ることができた。

今回我々は根粒菌 *Mesorhizobium* sp. A9-2-3 株が、プロキラルな環状イミドである *cis*-5-norbornene-*exo*-2,3-dicarboximide (NDI) を立体選択的に加水分解し、光学活性なハーフアミドを生成することを新たに見出した。前述の *B. phytofirmans* および *A. faecalis* 由来のイミダーゼには NDI に対する活性はなく、また 2 株のイミダーゼが構成的に発現していたのに対し *Mesorhizobium* sp.由来のイミダーゼは培養時に基質を添加することで特異的に誘導発現されるものであった。現在 *Mesorhizobium* sp.のイミダーゼに関して酵素同定を進めている。

imidase, chiral compounds, stereoselective hydrolysis

発表責任者：小川順（ogawa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3F202
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 変異型豚腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼを用いたシアン付加反応

# Addition of cyanide catalyzed by engineered D-amino acid oxidase from porcine kidney

○川原 寛弘[1,2]、安川 和志[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Nobuhiro KAWAHARA[1,2], Kazuyuki YASUKAWA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

[目的]
アミノニトリルは、イミンにシアンを付加させることで合成される。当研究室ではイミンを経由する酵素反応に着目し、*Crotalus atrox* 由来 L-アミノ酸オキシダーゼおよびブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼ(pkDAO) がシアン存在下でアミノ酸からアミノ酸のシアン付加物を合成できることを見出した[1]。また立体選択的にアミン化合物に作用する変異型 pkDAO Y228L/R283G[2]が、シアン存在下で(*R*)-α-メチルベンジルアミン((*R*)-MBA)から 2-メチル-2-フェニルグリシノニトリル(2MePGN)を生成することも確認した。これはアミンからアミノニトリルを合成する新規酵素反応である。本研究では変異型 pkDAO を用いたシアン付加反応による芳香族アミンからの物質生産を検討した。
[方法]
まず変異型 pkDAO Y228L/R283G による(*R*)-MBA からの 2MePGN への変換反応を最適化するため、シアンや基質の濃度、反応温度を検討した。次に、この反応にニトリラーゼを追加して 2MePGN から 2-メチル-2-フェニルグリシン(2MePG)への変換を検討した。さらに基質特異性の異なる変異体 pkDAO I230A/R283G を用いて、ベンズヒドリルアミンなどへのシアン付加反応も検討した。反応生成物は単離精製した後、NMR で解析して同定した。
[結果]
変異型 pkDAO による(*R*)-MBA からの 2MePGN への変換は 150 mM KCN, 100 mM HCl, 5 mM アミン, pH 9.0, 30℃が最適であった。しかし、(*R*)-MBA から生成された 2MePGN は非常に不安定で、単離が困難であった。そこで、変異型 pkDAO Y228L/R283G とニトリラーゼを組み合わせた反応を行った。その結果、5 mM (*R*)-MBA から 2MePGN を経由して 4.8 mM の 2MePG を合成できた(収率 96%)。同様に、ベンジルアミンからフェニルグリシノニトリルを経由しフェニルグリシンの合成やベンズヒドリルアミンから食欲抑制剤の中間体であるベンズヒドリルアミノニトリルなども合成できた。

1. 安川 和志、浅野 泰久, 日本農芸化学会 2014 年度大会講演要旨集
2. Kazuyuki Yasukawa, Shogo Nakano and Yasuhisa Asano, *Angew Chem. int. Ed* ., **53**(17), 4428-4431 (2014).

nitrile, oxidase, cyanide

発表番号：3F203
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Bacillus licheniformis* が生産する包接作用を有する新規多糖質の研究

Study of novel polysaccharides with inclusion complex-forming ability, produced by *Bacillus licheniformis* strain.

○鳥居 楓子[1]、篠原 友里江[2]、Kuakarun Krusong[3]、Jarunee Kauliboon[4]、Piamsook Pongsawasdi[3]、村上 周一郎[2]（[1]明治大院農・農化、[2]明治大農・農化、[3]Faculty of Science, Chulalongkorn Univ.、[4]Faculty of Medicine, Thammasat Univ.）

○ Kaede Torii[1], Yurie Shinohara[2], Kuakarun Krusong[3], Jarunee Kauliboon[4], Piamsook Pongsawasdi[3], Shuichiro Murakami[2] ([1]Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture Meiji Univ., [2]Department of Agricultural, Faculty of Agriculture Meiji Univ., [3]Faculy of Science, Chulalongkorn Univ., [4]Faculty of Medicine, Thammasat Univ.)

【背景・目的】

オリゴ糖や食物繊維に代表される機能性糖質は、食品や医療分野において利用されており、その多くは微生物由来の糖転移酵素を用いて工業的に生産されている。

当研究室では、これまでに新規な機能性糖質を生産する微生物を得る目的でスクリーニングを進め、多様な菌体外糖転移酵素生産菌を得た。

本研究では、これらの分離株の糖転移活性に基づき、新規な糖質生産能を有する菌株を選抜した。さらに、 生成糖の構造解析を目指し、目的糖質を合成する酵素の特定および精製を試みた。

【方法・結果】

これまでに、糖転移酵素を生産する微生物として分離された 76 株（pH 7.0、45℃ ：17 株、pH 9.0、45℃ ： 59 株）に対して、炭素源をデンプンとした培地で培養し、得られた培養上清を用いてさまざまな基質と反応させた。基質としては、主に四糖で構成されるテトラップ H やデンプン、直鎖状のデンプンであるハイアミロースなどを用いた。反応生成物は、薄層クロマトグラフィー（TLC）、および高速陰イオン交換クロマトグラフィー（HPAEC）で分析した。その結果、デンプンやハイアミロースを基質とした酵素反応により、グルコアミラーゼに対して抵抗性を示す多糖質を生産する株を選抜した。

またこの生成糖を用いて、ブロモクレゾールグリーンを用いたプレートアッセイを行った結果、2 株について包接現象を確認することができた。これらの菌株を形態観察や生理学試験、16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析結果に基づいて、それぞれ *Bacillus licheniformis* と同定した。

次に、目的多糖の生成に関与する酵素を陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製を進めたところ、目的多糖の合成には、複数種の酵素が関与している可能性が示された。今後、これらの酵素を特定し精製した上で、生成多糖の構造解析を行う予定である。

inclusion, glycosyltransferase, *Bacillus licheniformis*

発表責任者：村上 周一郎（smura@meiji.ac.jp）

発表番号：3F204
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糖転移反応によるオリゴ糖アルドン酸の合成
# Synthesis of Oligo-Aldonic acid by Transglycosylation

○村上 洋[1]、宮本 康平[2]、水掫 貴史[2]、湯口 宜明[2]、桐生 高明[1]、木曽 太郎[1]、中野 博文[1]([1]大阪市工研、[2]阪電通大・工)
○Hiromi MURAKAMI[1], Kohei MIYAMOTO[2], Takafumi MONDORI[2], Nobuaki YUGUCHI[2], Takaaki KIRYU[1], Taro KISO[1], Hirofumi NAKANO[1] ([1]OMTRI, [2]OECU)

（目的）アルドースの還元末端アルデヒド基がカルボキシル基に酸化された酸性糖はアルドン酸と呼ばれ、D-グルコン酸などが知られている。また、アルドン酸にグリコシル基が結合した二糖類のアルドン酸には、ミネラル吸収促進活性や抗う蝕作用がある。この二糖類アルドン酸は、酸化活性を有する酢酸菌を用いた微生物変換法により供給されているが、この方法では、三糖類以上の高重合度のアルドン酸オリゴ糖の合成は困難である。そこで、本研究では、糖転移酵素を用いた酵素法により三糖類以上のオリゴ糖アルドン酸の合成を検討する。

（方法）受容体として、セロビオースの還元末端をカルボキシル基に酸化したアルドン酸であるセロビオン酸(CA)を用いて以下の実験を行った。酵素の起源、pH、受容体濃度が糖転移反応に及ぼす影響を調べるため、1%可溶性澱粉あるいは 1% α-シクロデキストリン(α-CD)に、20～100 mM のセロビオン酸カルシウム(CACa)と *Bacillus maserans* 由来の糖転移酵素シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ(CGTase)を加え、40℃、pH6.5 で反応させた。24 時間後の反応液組成を分析した。

次に、供与体濃度が糖転移反応に及ぼす影響を調べるため、糖供与体として 1～8%可溶性澱粉あるいは 1～3% α-CD に、20mM CACa と *B.maserans* 由来 CGTase を加え、40℃、pH6.5 で反応させ、24 時間後の反応液組成を分析した。

目的の反応生成物を調製した。CGTase 反応液を 100℃で 10 分間加温した後、グルコアミラーゼを加え、40℃で 8h 加温し、長鎖の糖転移生成物を分解した。その後、活性炭クロマトグラフィーに供し、生成物を精製した。得られた生成物を質量分析および NMR 分析に供し、分子質量と構造を推定した。

（結果）*B. maserans* 由来 CGTase は、酸性基を含むと思われる生成物を生成した。転移生成物濃度は、受容体濃度に依存して増加したが、受容体に対する転移生成物のモル収率は減少したため受容体濃度は 20mM を選択した。転移生成物濃度は、供与体濃度に依存して増加したため、供与体は 3% α-CD あるいは 8%可溶性澱粉とした。

グルコアミラーゼによる酵素分解およびクロマト分画により、糖転移生成物を得た。
$[M-H]^-$、m/z 519.1 の負イオンピークが認められたため、糖転移生成物の分子質量は 520 と推定した。H-および C-NMR の測定結果および酵素分解時の生成物より、転移生成物の構造は CA にグルコースがα-1,4-結合したグルコシルセロビオン酸と推定した。

aldonic acid, trnsglycosylation, enzyme

発表責任者：村上　洋（murakami@omtri.or.jp）

発表番号：3F205
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物由来の新規な nucleside hydrolase を用いた核酸医薬原料 2'-*O*-メチルリボヌクレオシドの酵素的合成

# Enzymatic synthesis of 2'-*O*-methylribonucleosides by the novel microbial nucleoside hydrolases

○光川 侑輝[1]、日比 慎[2]、松谷 成裕[1]、堀之内 伸行[1]、高橋 里美[2]、小川 順[1]（[1]京大院・農・応用生命、[2]京大院・農・産業微生物）
○Yuuki MITSUKAWA[1], Makoto Hibi[2], Narihiro Matsutani[1], Nobuyuki Horinouchi[1], Satomi Takahashi[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【背景と目的】

核酸医薬品はその高い標的特異性と低い抗原性から、低分子医薬品や抗体医薬品に続く新たな合成医薬品として注目されている。しかし、同時に宿主ヌクレアーゼなどによる分解を受けやすく、患者体内での安定性などに課題が残っている。こうした問題の解決策として考えられているのが、2'-*O*-methylribonucleoside（2'-OMe-NRs）をはじめとした非天然型ヌクレオシドアナログの RNA 鎖への導入によるヌクレアーゼ耐性の付与である。ただ、有機化学合成によるプリンアナログの生産は困難で実用化への大きな障害となっている。そこで我々は酵素反応による効率的かつ温和なプリンアナログ合成法の開発を目指し、微生物酵素による糖転移反応を利用した 2'-*O*-methyluridine（2'-OMe-UR）を基質とする 2'-*O*-methyladenosine（2'-OMe-AR）の合成に取り組んだ。これまでの調査から、2'-OMe-UR に活性を持つ微生物として研究室保存菌株の乳酸菌 *Lactobacillus buchneri* LBK78 と土壌放線菌 *Agromyces* sp. MM-1 の 2 株を得ており、それぞれより新規な nucleoside hydrolase として *Lb*NH と *Ag*NH を単離した。両酵素は 2'-OMe-NRs に対する加水分解活性に加え、2'-OMe-UR と Adenine を基質として 2'-OMe-AR を合成する糖転移活性を示した。

【結果】

*Lb*NH、*Ag*NH の酵素特性について比較を行ったところ、両酵素ともに 2'-OMe-NRs を含む広範なヌクレオシドアナログに加水分解活性を示した。pH 耐性の比較では、*Lb*NH が酸性環境に耐性を示した一方、*Ag*NH は pH 11.0 を超える強塩基性環境に耐性を示し、50 mM NaOH 中でも加水分解活性を維持した。2'-OMe-AR の酵素的合成では、高基質条件下で *Lb*NH を用いた際に最大 6.7 mM、収率にして 0.45%の 2'-OMe-AR を得ることができた。しかし、*Lb*NH は基質 2'-OMe-UR 消失後に 2'-OMe-AR に対する加水分解活性を示し、長時間反応における安定な 2'-OMe-AR 蓄積に課題が残った。一方、*Ag*NH を用いた反応では蓄積された 2'-OMe-AR に対する加水分解はほとんど観察されなかったものの、高濃度の基質 2'-OMe-UR による阻害が観察され、2'-OMe-AR 蓄積量は最大で 0.1 mM、収率は 0.02%にとどまった。そこで、pH、金属イオンや有機溶媒、親水性溶質の添加について条件検討を行ったところ、*Ag*NH による 2'-OMe-AR 合成において収率が 5 倍以上に改善された。現在、長時間反応におけるこれらの項目の影響、また 2'-OMe-AR 最大蓄積量の増加についてさらなる検討を行っている。

nucleoside hydrolase, nucleoside analogue, transribosylation

発表番号：3F206
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属する、Pseudomonas sp.YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL Y12DS175GS176D 変異体の作製とそのホスファターゼ活性測定

# Construction of the Y12D S175G S176D mutant of L-2-haloacid dehalogenase from Pseudomonas sp. YL in haloacid dehalogenase superfamily and the measurement of its phosphatase activity

○李 貢順、殷 梓蘭、中村 卓（長浜バイオ大　バイオサイエンス）
○Gongshun Li, zilan Yin, takashi Nakamura (Nagahama Inst)

目的：

ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリー(HADSF)は様々なタンパク質を含む大きなグループで、ハロ酸類に対して脱ハロゲン化活性を持っている HAD から名付けられたが、様々なリン酸化合物の脱リン酸化反応を触媒するホスファターゼが大部分を占めている。HADSF のホスファターゼは４つの特徴的なモチーフ(Ⅰ:DXD、Ⅱ:S/T、Ⅲ:K、Ⅳ:GDXXXD）が存在する。一方、当研究室で研究対象としている HADSF に属する HAD の代表酵素である *Pseudomonas* sp. YL 由来 L-DEX YL にはモチーフⅡとモチーフⅢが保存されているが、(モチーフⅠ:DXY)、(モチーフⅣ:SSXXXD)に対応する下線部の配列が保存されていない。そこで、HADSF に属する両酵素の機能と配列の関連性を実験で確認するために L-DEX YL にホスファターゼ特徴的なモチーフを導入してホスファターゼ活性が向上するか確認した。本研究では、L-DEX YL にホスファターゼのモチーフⅠとモチーフⅣを導入することで得られる Y12DS175GS176D (YS) 変異体酵素を作製し、そのホスファターゼ活性を測定した。

方法：

部位特異的変異導入実験を用いて作製した L-DEX YL の YS 変異遺伝子を含むタンパク発現用プラスミド（pQE30Xa）を大腸菌 JM109 に形質転換して、N 末端に His-tag が付加した目的の酵素の発見系を構築した。次に、前培養と本培養、アフィニティクロマトグラフィーにより、YS 変異体酵素を精製した。今回作製した YS 変異体酵素はインクルージョンボディに含まれていたため、尿素で変性させて可溶性画分にしたのち、アフィニティ精製した。また、精製後透析を経て尿素を徐々に除いて目的の YS 変異体酵素を獲得し、それを用いてピロリン酸（PPi）に対するホスファターゼ活性をリン酸検出試薬により確認した。

結果：

インクルージョンボディから得られた YS 変異酵素、PPi に対して野生型より 14 倍低いホスファターゼ活性を示した。YS 変異体酵素のリフォールディングがうまくできていないことが原因かもしれないと考え、CD 測定を行ったところ、野生型 L-DEX YL のスペクトルよりもヘリックス部分の特徴的なピークが不鮮明であった。現在、YS 変異体酵素をわずかに含み、可溶性画分からの精製と比活性測定実験を遂行中で、これらの結果についても発表を行う予定である。

site-directed mutagenesis, L-2-haloacid dehalogenase, phosphatase activity

発表番号：3F207
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリーに属するホスファターゼのハロ酸デハロゲナーゼへの機能転換

# Functional alteration of phosphatase to haloacid dehalogenase in haloacid dehalogenase superfamily

殷 梓蘭、伊奈 胤仁、○中村 卓（長浜バイオ大学　バイオサイエンス）
Zilan YIN, Tsuguhito INA, ○Takashi NAKAMURA (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

【目的】
ハロ酸デハロゲナーゼスーパーファミリー（HADSF）はとても膨大なタンパク質のグループであり、名前の由来がハロ酸デハロゲナーゼではあるものの、ファミリーの大部分のメンバーはホスファターゼである。HADSF に属するハロ酸デハロゲナーゼとホスファターゼの間には、共通の配列とそれぞれの酵素に特異的な配列モチーフが存在し、反応機構も類似している。我々は、それら二酵素間における、機能と配列間の関連性を解明し、HADS に属する機能未知の酵素の機能推定には役に立つ知見を提供したいと考えている。前回の大会では、HADSF に属する機能既知の *Pseudomonas* sp. YL 由来ハロ酸デハロゲナーゼ L-DEXYL をホスファターゼに変換した研究について報告した。今回は、同じ HADSF に属するホスファターゼにハロ酸デハロゲナーゼの特異的な配列を導入して、ホスファターゼからデハロゲナーゼへの活性変化が見られるかについて研究を行った。
【方法】
まず、立体構造アライメントにより、HADSF における L-DEX YL と立体構造の類似した機能既知のホスファターゼを調べた。ヒットした 19 種類の候補について立体構造を比較し、その中のホスホセリンホスファターゼ Mj.PSP（*Methanococcus jannaschii* 由来）をダーゲット酵素とした。部位特異的変異導入実験キットを用いて、ハロ酸デハロゲナーゼの特異的なアミノ酸配列を Mj.PSP に導入した。その結果、D13Y、D167S、I22R、A42R、G166SD167S、D13Y G166SD167S 、D13YI22R 変異遺伝子を作製し、それぞれの変異体をアフィニティクロマトグラフィーにより精製した。得られた各変異酵素を用いて、L-DEX YL の代表的な基質である L-2-クロロプロピオン酸（L-CPA）に対するデハロゲナーゼ活性や、Mj.PSP の本来の基質 *o*-ホスホセリン（OPS）に対するホスファターゼ活性を確認した。
【結果】
活性に関わるコアドメインにハロ酸デハロゲナーゼ特徴的な配列を導入した Mj.PSP_D13Y,D167S 変異体のデハロゲナーゼ活性は野生型より向上し、ホスファターゼ活性は大幅に減少した。また、デハロゲナーゼ活性において、ハロゲン原子の脱離促進の役割が期待される Arg を導入した Mj.PSPI22R,A42R 変異体では、ホスファターゼ活性、デハロゲナーゼ活性ともに観察されなかった。現在、両者を組み合わせた D13YD167S,D13YI22R 変異体の実験中で、その結果も本大会で発表する。

phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, haloacid dehalogenase superfamily, functional alteration

発表番号：3F208
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌のコドンに最適化された遺伝子を利用した、超好熱性古細菌由来システイン合成酵素の大腸菌内での発現量増加のための条件探索

# Investigation of the condition for increase in expression level of *O*-phosphoserine sulfhydrylase from hyperthermophilic archaeon in *Escherichia coli* by using the gene optimized by synonymous codon substitution for higher expression level in *E. coli*

○岡本 章豊[1]、桐生 智子[2]、武田 瑛美[1]、中村 卓[2]([1]長浜バイオ大院 バイオサイエンス研究科、[2]長浜バイオ大 バイオサイエンス)
○Akito OKAMOTO[1], Tomoko KIRYU[2], Emi TAKEDA[1], Takashi NAKAMURA[2] ([1]Graduate School of Biosciences Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

【研究背景・目的】

*O*-Phosphoserine sulfhydrylase (OPSS)は、好気性超好熱性古細菌 *Aeropyrum pernix* 由来の酵素で、酵素反応の至適温度が 85℃付近にあり、熱に安定な *O*-ホスホ-L-セリン(OPS)を基質とし、硫化物イオンを求核剤としてシステインを合成することができる。さらに、硫化物イオンの代わりにチオール化合物や *N*-ヘテロ環化合物を求核剤として使用すると、それら求核剤が付加したような非天然アミノ酸を合成できる。我々は、OPSS を使用して医薬品やその原料となり得る非天然アミノ酸を効率よく生産できる方法を研究してきた。これまでに X 線結晶構造解析により決定した構造を利用して、分子動力学計算や量子化学計算を行い、OPSS の基質認識機構の解明、非天然アミノ酸合成能力の向上した改変 OPSS の作製を目指している。現在、OPSS を組み換え体として大腸菌内で生産し精製しているが、その収量は結晶化実験を行う上で十分とは言えない。組み換え OPSS の収量増加のために、コドンを大腸菌のものに最適化すればよいのではないかと考え、OPSS の遺伝子について大腸菌のレアコドンが使用されている箇所を調べたところ 24 か所存在した。そこで本研究では、組み換え OPSS の収量増加のために、大腸菌のコドンに最適化した OPSS 遺伝子を用いて、組み換え OPSS の大腸菌内での発現量が増加する条件を探索した。

【方法】

大腸菌のコドンに最適化した OPSS 遺伝子を GenScript 社から購入し、タンパク質発現用のプラスミド（pET16b, pQE30Xa, pQE80L)に導入した。得られたプラスミドを大腸菌(JM109、BL21 (DE3)pLysS、Rosetta (DE3))に導入して得られた形質転換体の培養、OPSS の発現を行い、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。Bradford 法を用いて発現量を算出した。システイン合成活性は酸ニンヒドリン法を用いて測定し、それぞれの比活性を算出した。

【結果】

100 mL 培養当たりのそれぞれの精製量は pET16b と BL21 (DE3)pLysS で 0.8 mg、pQE30Xa と JM109 で 0.46 mg となった。 この結果は、従来の系（pET3d と Rosetta (DE3)、100 mL 培養当たり 4～5 mg）よりも低いものであった。また、システイン合成活性測定の結果、37℃で 55 U/mg、80℃で 61 U/mg となり、従来の OPSS の比活性（37℃と 80℃でそれぞれ、57 U/mg、300 U/mg）よりも 80℃の活性が特に減少した。

*O*-phosphoserine sulfhydrylase, Higher expression level, Synonymous codon substitution

発表番号：3F209
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Geobacillus kaustophilus* HTA426 の IolE ホモログの機能解析
Functional analysis of IolE homologue in *Geobacillus kaustophilus* HTA426
○岡田 大、白江 雄介、田中 耕生、竹中 慎治、吉田 健一（神戸大院農学研究科）
○Atsushi OKADA, Yusuke Shirae, Kosei Tanaka, Shinji Takenaka, Ken-ichi Yoshida (Kobe Univ.)

【目的】 好熱性グラム陽性細菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 は枯草菌で解明されたイノシトール代謝経路とその遺伝子群(*iol* 遺伝子群)のホモログを 5kb と 12kb の２つの遺伝子クラスターに分かれて有しており、3 種のイノシトール脱水素酵素(IDH)IolG, IolX, IolW のホモログが 3 連続で 5kb のクラスターにコードされている。この 3 つの IDH の機能によって *myo*-inositol(MI), *scyllo*-inositol(SI), D-*chiro*-inositol(DCI)を分解代謝できることが示されており、これら 3 種のイノシトール異性体は脱水素反応の産物である 2-keto-MI (2KMI) を介して相互変換され、またこの次の分解反応には 2KMI を脱水する酵素 IolE が関与する。しかし、HTA426 の IolE 以降の代謝経路について実験的には未検証である。また枯草菌の *iol* 遺伝子群の制御因子である IolR を HTA426 は有しておらず、制御機構についても不明である。一方で HTA426 において、MI 存在下で 5kb と 12kb の２つのクラスターの転写が誘導されることがすでに示されており、MI またはその代謝中間物質が誘導物質として機能していることが示唆された。つい最近、好熱菌 *Thermotoga maritima* において新規のイノシトール代謝経路が発見され、その中の 2KMI を脱水素反応により Diketo-inositol へと変換する IolM という酵素が見出されたが、HTA426 ゲノムにはそのホモログが見出されたことから、万一 IolE を介さない代謝系がある可能性も疑われた。そこで本研究では HTA426 の IolE ホモログ(GK1890)の機能について検証を試みた。
【方法】 GK1890 破壊株を作製し、MI を炭素源とした培地での増殖を測定し、MI 資化能力への影響を調べた。大腸菌で過剰発現し、His タグ精製した GK1890 酵素を用いて、IolE 活性測定を行った。GK1890 破壊株において MI による誘導または非誘導条件での RNA を抽出し、ノザン解析によって 5kb と 12kb の２つの *iol* 遺伝子クラスターの転写を調べた。GK1890 破壊株にプラスミドによって GK1890 を相補し、GK1890 の *in vivo* での機能を確かめた。
【結果】 GK1890 破壊株を MI を唯一の炭素源として生育試験をしたところ、MI の資化性の消失が観察された。また、IolE 活性測定の結果、GK1890 の精製酵素の IolE 活性が確認された。これらのことから、GK1890 がイノシトール分解に必須である IolE として機能していることが示された。また、MI 存在下または非存在下における GK1890 破壊株の *iol* 遺伝子群についてノザン解析を行った結果、GK1890 破壊株において MI 非存在下で *iol* 遺伝子群の転写誘導が示された。このことから、IolE が *iol* 遺伝子群の転写誘導に関与していることが示唆された。現在、相補株を作製し、MI の資化性および *iol* 遺伝子群の転写を調べている。

*Geobacillus kaustophilus*, inositol metabolism, Thermophilic bacteria

発表責任者：吉田健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

発表番号：3F210
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ラビリンチュラ類の新規高度不飽和脂肪酸合成システムを利用したエイコサペンタエン酸 (EPA) の生産
# Production of eicosapentaenoic acid (EPA) by a new PUFA synthesis system of thraustochytrids

○合田 初美[1]、持永 聖也[1]、濱口 理恵[1]、坂口 圭史[1]、石橋 洋平[1]、関口 峻允[2]、石渡 夕子[2]、沖田 裕司[2]、沖野 望[1]、本多 大輔[3]、林 雅弘[4]、伊東 信[1,5] ([1]九大院農、[2]日水中研、[3]甲南大理工、[4]宮大農、[5]九大院農 i-BAC)
○Hatsumi Goda[1], Seiya Mochinaga[1], Rie Hamaguchi[1], Keishi Sakaguchi[1], Yohei Ishibashi[1], Takayoshi Sekiguchi[2], Yuko Ishiwata[2], Yuji Okita[2], Nozomu Okino[1], Daiske Honda[3], Masahiro Hayashi[4], Makoto Ito[1,5] ([1]Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu univ., [2]Central Res. Lab., Nippon Suisan Kaisha, Ltd., [3]Fac. Sci. Eng., Konan Univ., [4]Fac. Agric., Univ. Miyazaki, [5]i-BAC, Grad. Sch. Biore. Bioenvtl. Sci., Kyushu univ.)

従属栄養性の海洋性真核単細胞生物であるラビリンチュラ類は、ドコサヘキサエン酸(DHA)などの n-3 系高度不飽和脂肪酸(n-3PUFA)の合成能が高く、合成した脂肪酸を主にトリアシルグリセロールとして細胞内小器官である油滴に蓄積する。そのため、近年急速に需要が高まっている n-3PUFA の新たな供給源として注目されており、米国では主としてベジタリアンの要求に応えるためにオーランチオキトリウム属を用いた DHA の商業生産が始まっている。

PUFA の合成経路には、PUFA シンターゼ(PUFAS)によりアセチル CoA とマロニル CoA から中間生成物を経ず DHA が合成される PUFAS 経路と、脂肪酸合成酵素 FAS により合成されたパルミチン酸が段階的な鎖長伸長および不飽和化を経て DHA に変換されるスタンダード経路がある。ラビリンチュラ類においては、PUFAS 経路のみで PUFA を合成するタイプ(I 型)と、PUFAS 経路とスタンダード経路の両方を持つタイプ(II 型)が知られている(Matsuda et al., J. Lipid Res., 2012)。因みに、上記オーランチオキトリウム属は I 型 PUFA 合成システムで DHA を合成する。我々は、パリエティキトリウム属がスタンダード経路のみで PUFA を合成する新規システム(III 型)を持つことを見いだした。この新規 PUFA 合成システムでは、I 型や II 型と異なり、特定のエロンガーゼやデサチュラーゼの遺伝子を破壊することで目的とする脂肪酸の生産/蓄積株の作製が可能と考えられる。

パリエティキトリウム属において、PUFA 合成に関連する遺伝子の網羅的な同定を試みた結果、3 つのエロンガーゼ遺伝子と 5 つのデサチュラーゼ遺伝子を同定した。これらの遺伝子はスタンダード経路を構成していると推定され、新たな脂肪酸生産/蓄積株を作製する際の標的遺伝子となる。実際に、アラキドン酸(ARA)およびエイコサペンタエン酸(EPA)の鎖長伸長を担う酵素である C20 エロンガーゼ遺伝子の破壊により、ARA および EPA が蓄積する変異株を取得できた。この C20 エロンガーゼ遺伝子破壊株に、ミズカビ由来のω3 デサチュラーゼを過剰発現させると、蓄積した ARA が EPA に変換され、EPA 含量が高い変異株を取得できた。この変異株では、EPA は主としてリン脂質や中性脂質に組み込まれていることが LC-MS 解析により明らかになった。また、n-3 ドコサペンタエン酸(n-3DPA)に作用するΔ4 デサチュラーゼ遺伝子の破壊により、n-3DPA の蓄積株を得ることができた。このようにパリエティキトリウム属の新規 PUFA 合成システムを活用することにより、野生株では通常蓄積しない有用脂肪酸を蓄積する変異株を取得することが可能になった。本研究の一部は農水省シーズ創出ステージ「ラビリンチュラ類を用いた機能性脂質の生産基盤の構築と活用」で実施された。

eicosapentaenoic acid (EPA), n-3PUFA, thraustochytrids

発表責任者：伊東　信（makotoi@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3F211
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

異種遺伝子発現による出芽酵母イソブタノール合成活性化
Heterologous gene expression for higher isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae*

○森田 啓介[1]、松田 史生[1]、石井 純[2]、近藤 昭彦[3]、清水 浩[1]（[1]阪大院・情報・バイオ情報、[2]神戸大・自科・研究環、[3]神戸大院・工・応化）
○Keisuke MORITA[1], Fumio MATSUDA[1], Jun ISHII[2], Akihiko KONDO[3], Hiroshi SHIMIZU[1]
([1]Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., [2]Org. Adv. Sci. Technol., Kobe Univ., [3]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に炭素数 4 の高級アルコールであるイソブタノール生産能を付与することを目指し、バリン生合成経路の改変が行われている。ミトコンドリア中に存在するバリン生合成経路を細胞質中で追加構築することが試みられたが、ケトール酸レダクトイソメラーゼ (KARI) とジヒドロキシ酸デヒドラターゼ (DHAD) 反応の活性化が課題となっている。そこで本研究では、これらをコードする他生物種由来の遺伝子を取得し *S. cerevisiae* に導入することでイソブタノール生産能への影響を比較した。
【方法】*S. cerevisiae* YPH499 株 (*MATa ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2*) に酢酸リチウム法を用いてベクターを導入し、形質転換体を構築した。発酵性試験では、要求性を満たすようにアミノ酸を添加した 20 g/L のグルコースを炭素源とする 5 mL の SD 培地を用い、初期 $OD_{660}$ を 1 として、30℃、150rpm で培養を行った。培養開始から 48 時間目の培養液を回収し、ガスクロマトグラフィーを用いて培溶液中に含まれるアルコール濃度を測定した。
【結果】*S. cerevisiae* YPH499 株に、*Lactococcus lactis* 由来の *kivd* と *Lactobacillus plantarum* 由来の *als* を酵母にコドン最適化した *ALSLpOp*、出芽酵母の *ADH6* を過剰発現した YKI007 株を構築した。この株を用いた発酵試験を行ったところ、発酵開始 48 時間後のイソブタノール濃度は 24.4±5.2 mg/L だった。この株に対し、細胞質内で機能する酵母のアセト乳酸シンターゼ (ALS) と KARI、DHAD をコードする遺伝子 (*ILV2c*、*ILV5c*、*ILV3c*) を過剰発現した YKI008 株では 36.9±4.7 mg/L のイソブタノール濃度を示した。また、YKI008 株に導入した酵母由来の ALS 遺伝子 (*ILV2c*) を *L.plantarum* の *alsLpOp* に置き換えて過剰発現した YKI009 株ではイソブタノール濃度が 42.8±6.9 mg/L とわずかに上昇した。続いて、YKI009 株に導入した DHAD 遺伝子 (*ILV3c*) を *Corynebacterium glutamicum* と *Zymomonas mobilis* の DHAD 遺伝子に置き換えた YKI014 株と YKI015 株では、イソブタノール濃度がそれぞれ 77.2±9.7 mg/L と 104.8±8.6 mg/L となり YKI009 株の 2 倍程度となった。また、YKI009 株で発現した KARI 遺伝子 (*ILV5c*) を *Sulfolobus tokodaii* の KARI 遺伝子に置き換えた YKI024 株でも、YKI009 株に比べて 90.3±3.0 mg/L と 2 倍程度のイソブタノール濃度を示した。
本研究の一部は NEDO 若手グラントの支援を受けた。

*Saccharomyces cerevisiae*, Isobutanol, Valine synthesis

発表責任者：森田啓介（k-morita@ist.osaka-u.ac.jp）

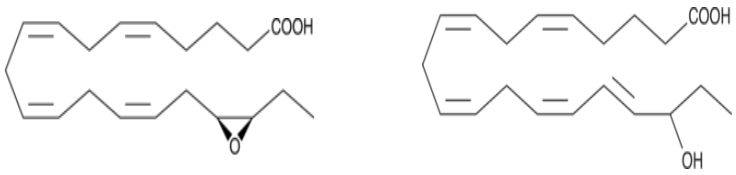
発表番号：3F212
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# エイコサペンタエン酸の酸化的変換能を有する微生物の探索

# Screening of microorganism for oxidative conversion of eicosapentaenoic acid

○齊藤 一輝[1]、石川 千弘[1]、永野 秀昭[2]、岸野 重信[1]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]京大院農・産業微生物）
○Kazuki SAITO[1], Chihiro ISHIKAWA[1], Hideaki NAGANO[2], Sigenobu KISHINO[1], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】エイコサペンタエン酸（*cis*-5, *cis*-8, *cis*-11, *cis*-14, *cis*-17-eicosapentaenoic acid; EPA）は、閉塞性動脈硬化症や高脂血症の治療薬として用いられている。また、近年 EPA にエポキシ基や水酸基が導入された酸化代謝産物（Fig.1）に、抗炎症作用や抗アレルギー作用など様々な生理活性が報告されている[1）2)]。本研究では、EPA を酸化的に変換する微生物の探索を行い、その生産条件の最適化を試みた。




17,18-EpETE　　18-HEPE

Fig.1　EPA 酸化代謝産物の例

【方法・結果】魚油を単一炭素源とした集積培養を行い約５００株を単離した。これらの株を 28℃、300 rpm の好気条件で 16 時間培養後、集菌・洗浄し、得られた洗浄菌体を用いて好気条件下で EPA（終濃度 1.7 mM）の変換反応を行った。反応液から基質および生成物をクロロホルム・メタノールで抽出し、遠心エバポレーターで濃縮した後、高速液体クロマトグラフ質量分析計（LCMS）分析に供した。その結果、土壌より単離した F13 株の反応液において EPA 変換産物の生成を確認し、NMR 分析により本生成物を酸化代謝産物である 17,18-EpETE と同定した（変換率 24.7 %mol/mol）。F13 株の 16S rRNA 上流 500 bp を用いて同定した結果、*Bacillus megaterium* と 99.6 %の相同性を示した。

【Reference】

１）Endo J et al. , J Exp Med. , 211: 1673 (2014)
２）Kunisawa J et al. , Sci Rep. , 5: 9750 (2015)

eicosapentaenoic acid, bacillus, 17,18-EpETE

発表責任者：岸野重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3F216
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 人工 DNA 切断酵素 TALEN を用いた *Rhizopus oryzae* における遺伝子破壊技術の確立

# Development of gene disruption technique in *Rhizopus oryzae* by programmable nucleases, TALEN

○壺井 雄一[1]、高橋 史員[1]、五十嵐 一暁[1]、萩原 浩[1]、佐久間 哲史[2]、山本 卓[2]（[1]花王・生科研、[2]広島大院・理）

○ Yuichi TSUBOI[1], Fumikazu TAKAHASHI[1], Kazuaki IGARASHI[1], Hiroshi HAGIHARA[1], Tetsushi SAKUMA[2], Takashi YAMAMOTO[2] ([1]Biol. Sci. Res., Kao Corp., [2]Grad. Sch.of Sci., Hiroshima Univ.)

糸状菌 *Rhizopus oryzae*（以下、*R. oryzae*）は、バイオケミカルスの中で市場規模、成長率ともにトップクラスの物質である乳酸を高生産し、バイオケミカルス生産菌として期待される菌株である。さらなる高生産化を目指した菌株育種には遺伝子組換えが有用であるが、*R. oryzae* に関しては遺伝子導入の報告例が少なく、また、遺伝子破壊の報告例はない。これは主に相同組換え能が極めて低いためと考えられている。そこで本検討では、近年着目を集める人工 DNA 切断酵素の 1 つである Transcriptional activator - like Effector Nuclease（以下、TALEN）を用いて、*R. oryzae* における遺伝子破壊技術の確立を目的とした。

初めに遺伝子導入系を確立するため、野生株に対して UV 変異を行うことでアデニン要求性株を取得し、*ade1* 遺伝子を導入マーカーとした宿主ベクター系を開発した。遺伝子破壊する標的遺伝子はトリプトファン合成遺伝子の 1 つである *trpC* 遺伝子とし、遺伝子破壊株のセレクションは、5-フルオロアントラニル酸を用いたポジティブセレクション培地（以下、5FAA 培地）にて行った。

TALEN の作製は、広島大学にて開発された高活性型の Platinum TALEN 用ライブラリを用い、Golden-gate 法にて *trpC* を標的とした TALEN を 2 ペア構築した。パーティクル・ガン法により TALEN を導入し 5FAA 培地にてセレクションを行ったところ、5FAA 培地で生育株が複数得られるものの、トリプトファン要求性株は得られなかった。これは、TALEN の発現により一時的にトリプトファン合成が抑制されるものの、修復エラーが起きるほどは発現しておらず、*trpC* 遺伝子の破壊には到っていないためと推察した。そこで続いては、TALEN による遺伝子破壊を促進するとの報告があるエキソヌクレアーゼを *R. oryzae* よりクローニングし、TALEN と同時発現させ検討を行った。その結果、依然として偽陽性の株が出現するものの、トリプトファン要求性株を 2 株取得した。この株のゲノムを抽出し、TALEN による切断サイト付近のシークエンスを確認したところ、1 つの株では 238 bp、もう 1 つの株では 708 bp の塩基欠失が認められた。塩基欠失が TALEN による切断サイトから起こっている点と、比較的大きな領域の塩基欠失が確認されたことから、今回の塩基欠失はランダムに起こったものではなく、TALEN 及びエキソヌクレアーゼが機能して、標的遺伝子を破壊できたことが強く示唆された。また修復部位に関して精査したところ、修復機構が糸状菌で一般的に優勢と言われる Non-Homologous End Joining によるものではなく、Microhomology-Mediated End Joining により修復されている可能性も合わせて示唆された。

*Rhizopus*, TALEN, genome editing

発表番号：3F217
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# $TiO_2$ 光触媒反応による細菌への影響の網羅的解析

# The comprehensive analyses of the effects of $TiO_2$ photocatalytic reaction to bacteria

○三ツ木 理騎[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大・応生、[2]東理大・総研)
○ Masaki MITSUGI[1], Akira FUJISHIMA[2], Tomonori SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Reseach Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【【目的】 大気汚染や水質汚染など様々な環境問題や、院内感染や空中浮遊菌による感染症などが問題になっており、その解決手段として注目されているのが光触媒である。しかし、光触媒による殺菌メカニズムの詳細はほとんどわかっていない。そこで本研究では、*Escherichia coli* に対して $TiO_2$ による光触媒反応を行い、反応後の *E. coli* のコロニー形成能、細胞膜損傷、呼吸活性、ATP 量、細胞構造の変化を比較することで、光触媒による殺菌メカニズムの解明を行うことを目的とした。

【方法】 *E. coli* IAM 12118$^T$ に対する光触媒反応は、次の装置を用いて行った。シャーレ内に濾紙を置き、滅菌超純水を 5 mL 滴下した。そこへプラスチックケースを置き、その上に日本曹達製 NDH-510C（$TiO_2$）でコーティングしたホウケイ酸ガラス（5.0×5.0 cm）を置いた。そのコーティングガラス上に PBS で約 $1.0\times10^9$ cells/mL に調製した *E. coli* 懸濁液を 100 μL 滴下し、フィルムをかぶせ、シャーレ全体をラップで覆った後に、0.25 mW/cm$^2$ の UVA 照射を 0-4 時間行った。その後、*E. coli* 懸濁液を回収し、コロニー計数、BacLight による細胞膜損傷判定, CTC による呼吸活性測定、ATP 量の測定、SEM による細胞構造観察を行い、比較解析した。

【結果】 コロニー計数の結果では、光触媒反応 40 分間で *E. coli* の生存率が 48%まで低下し、その後 4 時間まで徐々に生存率が下がる結果になった。このことから、光触媒反応が始まってすぐに *E. coli* に対する何らかの影響が及び、コロニー形成能が失われたことが示唆された。BacLight の結果では、40 分間で *E. coli* の細胞膜損傷率が 80%まで増加し、その後も徐々に上昇していった。このことから、*E. coli* の細胞死の主な原因は細胞膜損傷であることが考えられた。ATP 量の測定では、光触媒反応 40 分間で *E. coli* の ATP 量は 50%まで低下し、その後 4 時間まで徐々に減少する結果になった。ATP は細胞膜上で生成されるため、細胞膜損傷により ATP の生成量も減少した可能性が示唆された。CTC の結果では、光触媒反応によって呼吸活性が徐々に低下していき、4 時間で 46%となった。このことから、呼吸活性の低下より先に細胞膜損傷が起きたことが示唆された。SEM を使用した細胞構造の観察では、光触媒反応 1 時間後から細胞構造の変化が見られ、大きな変化は 3 時間後以降に見られた。コロニー計数や BacLight の結果では、1 時間以内で増殖能や細胞膜に大きな影響があったため、明らかな細胞構造の変化が起こるより前に、細胞内への影響により細胞死が導かれるのではないかと考えた。以上のことから、光触媒反応を開始すると細胞膜損傷が最初に起き、その後、コロニー形成能の損失、生成 ATP 量の減少が起きるが、細胞質での呼吸活性はしばらく残っており、細胞内での致死的な影響のしばらく後に、細胞表層構造が破壊されることが明らかになった。

photocatalysis, killing mechanism, bacteria

発表番号：3F218
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細菌細胞壁に対する $TiO_2$ 光触媒反応の影響

# The effects of the $TiO_2$ photocatalytic reaction to bacterial cell wall

○大嶋 佑治[1]、芦田 美稀[1]、藤嶋 昭[2]、鈴木 智順[1,2] ([1]東理大 応生、[2]東理大 総研)
○ YUJI OHSHIMA[1], MIKI ASHIDA[1], AKIRA FUJISHIMA[2], TOMONORI SUZUKI[1,2] ([1]Department of Applied Biological Science, Tokyo University of Science, [2]Research Institute for Science & Technology, Tokyo University of Science)

【目的】 新たな殺菌技術として光触媒効果が注目されている。光触媒による殺菌効果は、紫外光を照射することで生成する活性酸素種の強い酸化力によるものである。しかし、光触媒反応による殺菌のメカニズムについては明確な知見が得られていない。現在の知見では、光触媒による細胞膜損傷が殺菌に起因しているとされている。グラム陽性細菌はペプチドグリカン層が厚いためにグラム陰性細菌より殺菌効果が低いという報告もあるが、その一方で、活性酸素種はグラム陽性細菌のペプチドグリカン層をそのまま通過し、グラム陰性細菌では活性酸素種の侵入が外膜で阻まれるために、グラム陽性細菌の殺菌効果がグラム陰性菌よりも高いとする報告もある。この様に、細胞壁に対する光触媒反応には相反する報告が存在している。そこで本研究では、活性酸素種の寿命の短さ、反応性の高さで、果たして活性酸素種がペプチドグリカン層を通過できるのかを、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌の死滅速度の違いに着目し、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応の影響を探ることを目的としてプロトプラスト細胞に注目した。これまでの研究で、*Lactobacillus plantarum* JCM1149$^T$ のプロトプラストを高形成率で得る条件を探り、得られたプロトプラスト細胞に対して BacLight 蛍光試薬による評価を行ったところ、プロトプラスト化することで光触媒による生存率の低下が抑制された。この原因として、添加した細胞壁融解酵素タンパク質の存在が、光触媒反応による不活化を阻害している可能性と、ペプチドグリカン層の存在が細胞死を促進している可能性が示唆された。そこで、本研究では、これまでに得られた結果の更なる評価として、細胞壁融解活性をもたないタンパク質を添加して生存率測定を行うことで、添加した細胞壁融解酵素の影響を評価した。

【実験方法】 ペプチドグリカン層の有無による死滅速度の違いを見るために、芽胞を形成しないグラム陽性桿菌である *L. plantarum* JCM1149$^T$ のプロトプラストを作製した。作製したプロトプラスト細胞と、細胞壁融解酵素の代わりとして、同量の BSA を添加した通常細胞に対して、BacLight 蛍光試薬を添加し、$TiO_2$ コーティングガラス上で UVA を照射して光触媒反応を行った。照射後、共焦点顕微鏡で観察し、生存率評価を行った。

【結果・考察】 BSA を添加したほうが、タンパク質を何も添加していないときと比べて *L. plantarum* の生存率の低下が低く抑えられた。そのため、タンパク質の存在が光触媒反応による細菌の不活化を抑制している可能性が示唆された。しかし、プロトプラスト処理細胞と比べて生存率の低下は見られるため、ペプチドグリカン層の存在が細菌の不活化を促進している可能性が考えられる。この結果をうけて、細胞壁構造やその組成による影響の違いを評価するために、細胞壁構造を元から欠如している *Mesoplasma florum* NBRC100688$^T$ に注目した。この細菌は、細胞壁を欠いているだけでなく、病原性や運動性が無いといった特性をもつ。そこで、この *M. florum* に光触媒反応を行い、コロニー計数による生存率評価した結果も併せて報告する予定である。

photocatalysis, killing mechanism, bacterial cell wall

発表番号：3F219
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Enterobacter* 属細菌におけるリン酸欠乏誘導性のリン酸鉄溶解機構の解明

# Analysis of the mechanism underlying phosphate starvation-induced $FePO_4$ solubilization in *Enterobacter* sp.

○山栗 瑞希、矢野 敦士、岡野 憲司、本田 孝祐、大竹 久夫 (阪大院工)
○Mizuki Yamakuri, Atsushi Yano, Kenji Okano, Kohsuke Honda, Hisao Ohtake (Osaka Univ.)

リンは生命にとって必須の元素であり、主に肥料用途に用いられる。しかしリンの多くは土壌中で金属イオンと結合し固定化されるため、植物のリン利用効率は低い。難溶性リン酸塩溶解能を持つ微生物は多数報告されており、これらの微生物の難溶性リン酸塩の溶解を促進することで植物のリン利用効率を高められると考えられる。我々の研究グループは昨年度の大会で、リン酸カルシウムは pH に依存して溶解するが、リン酸鉄は有機酸やシデロフォアといったキレート剤の作用により溶解することを報告した。しかしこれらの溶解微生物においてキレート剤がどういった制御機構で生産されるかについてはほとんど報告がない。本研究ではキレート産生能を指標にリン酸鉄溶解能をもつ微生物を単離し、単離株が産生するキレート剤の特定、およびキレート剤生産経路・制御機構を解明することを目的とした。

まず土壌中から Chrome Azurol S 培地を用いたハローアッセイによりキレート剤産生能を指標とした微生物のスクリーニングを行った。単離株のリン酸鉄溶解能を測定したところ、リン酸鉄高溶解株である Soil 20 株を取得できた。本株が pH 低下能を有していたことから、HPLC 解析により本株が産生する有機酸の特定を行ったところ、鉄キレート作用のある 2-ケトグルコン酸（2KG）を産生することが示された。また興味深いことに 2KG は低リン酸濃度下において生産されることが明らかとなった。次世代シーケンサーにて本株のゲノム解析を行ったところ、直接酸化経路と解糖経路の 2 種類のグルコース代謝経路が推定され、2KG はグルコースの直接酸化により生産されることが示唆された。グルコース脱水素酵素（GDH）の活性が低リン酸濃度下でのみ確認されたことから、本株はリン酸濃度に応答してグルコース代謝を解糖経路から直接酸化経路へシフトさせることで 2KG を生産し、リン酸鉄を溶解していると考えられる。今後の研究では GDH 以外にリン酸欠乏下で活性や生産量が変化する酵素を探索し、これらの酵素遺伝子の発現制御機構の解明を行っていく。

$FePO_4$ solubilization, Glucose dehydrogenase, 2-Ketogluconic acid

発表番号：3F220
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 好熱性細菌によるシリカ沈殿機構の解明

# Elucidation of silica deposition mechanism of Thermophilic bacteria

○岡田 智紗[1]、藤野 泰寛[1]、花島 映里[2]、横山 拓史[1]、上田 晃[2]、土居 克実[1] ([1]九大、[2]富山大理工)
○Chisa OKADA[1], Yasuhiro Fujino[1], Eri Hanajima[2], Takushi Yokoyama[1], Akira Ueda[2], Katsumi Doi[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Toyama Univ.)

【緒言】地熱熱水には高濃度のシリカ($SiO_2$)が含まれており、地熱発電所で利用される熱水は、温度・圧力の低下に伴いシリカ濃度が過飽和に達する。過飽和シリカは発電設備に沈着し、発電効率の低下、メンテナンス費用の増大を生じさせている。この沈着物はシリカスケールと呼ばれ、本研究室ではシリカスケール中に微生物様構造を確認し、その生成には微生物が関与しているのではないかと推測している(1)。シリカスケール生成に微生物が関与しているならば、微生物を用いたシリカの除去法が開発できると考えられる。即ち、熱水に微生物を作用させることでシリカをあらかじめ沈殿させ、熱水中のシリカ濃度を低下させることで、シリカスケールの生成を防除する。今回は種類の異なる三種の好熱性細菌を用いて、シリカ沈殿が起きるかどうか検討した。
【実験】モデル微生物として、グラム陽性細菌の *Geobacillus kaustophilus* (NBRC 102445)、グラム陰性細菌の *Thermus thermophilus* HB8 (NBRC 101084)、超好熱アーキアの *Pyrobaculum calidifontis* (JCM 11548)の三種の菌株を用い、シリカ濃度 500 ppm の各種培地に植菌後、それぞれ 55℃、70℃、90℃で 24 時間振とう培養を行った。一定時間ごとに培地の一部を回収し、遠心 (2,000 x *g*, 3 min)により菌体を除去し、上清のシリカ濃度を ICP 発光分光分析法、またはモリブデンイエロー法により測定した。また、*T. thermophilus* HB8 の培養菌体をオートクレーブ処理したもの、抗生物質を添加したものに対しても同様の試験を行った。さらに澄川地熱発電所の地熱原水に対して *T. thermophilus* HB8 を添加し、溶存シリカ濃度の測定を行った。
【結果】使用した 3 種の菌体の中で、*T. thermophilus* HB が最も 24 時間後のシリカ濃度減少が大きかった。*G. kaustophilus* でも、培地中のケイ酸濃度は減少したものの、低い培養温度の影響が大きいものと推察された。*P. calidifontis* では培養温度が高いため培地の蒸発が起こり、シリカ濃度は時間とともに増大したが、シリカ沈殿に対する効果は少ないものと推察された。*T. thermophilus* 菌体を用いた実験では、抗生物質の有無に関わらずシリカ濃度は減少しており、菌体の代謝はシリカ沈殿に関与しないことが示された。オートクレーブ処理菌体では沈殿形成の割合が減少しており、菌体細胞表層の構成成分がシリカと相互作用しているものと考えられる。また澄川地熱発電所における現地試験では、原水に *T. thermophilus* 菌体を 10%添加した場合に、有意に溶存シリカ濃度が減少し、菌体によってシリカ沈殿形成が促進されることが明らかとなった。

(1) Inagaki F, et al. (1997). *FEMS Microbiol* Ecol., **24**:41-48.

silica scale, *T. thermophilus*, silica deposition

発表番号：3F221
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の菌膜形成多糖の構造解析

# structural characterization of pellicle polysaccharides of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108

○與那嶺 秋帆、外山 博英、高野 良（琉球大農・亜熱生資）
○Akiho Yonamine, Hirohide Toyama, Ryo Takano (ryukyu univ.)

【目的】

酢酸菌は伝統的な食酢製造の際には菌膜を形成して発酵槽中の培地表面に浮きながら生育する。菌膜(pellicle)は、菌体の表面に結合している多糖(CPS)と菌体から形成され、好気性を保ったり、環境ストレスに耐える役割を果たしている。また CPS の糖組成が、同じ種でも菌株ごとに異なることが報告されている[1]、ので菌株によりそれぞれ異なった化学構造を持つことが分かっている。しかし CPS の完全な化学構造やなぜそのような多様性があるのかは分かっていない。そのため本研究ではそれぞれの菌株の CPS をメチル化分析を行い多糖の完全な化学構造を決定することを目的とした。

【方法】

菌株として *A. pasteurianus* の 4 株(スリランカから単離された 3 株[1]とタイから分離された 1 株、SKU1108 株[2])を 37℃,200rpm で 2 日間本培養し、得られた菌体を破砕し、超遠心で細胞膜画分を得た。その後 Sonication し、それを超遠心により分離し CPS を含む上清を回収し、ゲル濾過で精製 CPS 画分を得た。この CPS を TFA で加水分解し、加水分解物を TMS 誘導体、アルジトールアセテート(AA)に誘導体化して GLC により組成分析を行った。さらに NaOH スラリー法によりメチル化し、得られたメチル化多糖を加水分解し、部分メチル化 AA として GLC で分析した。

【結果と考察】

SKU1108 の CPS は、組成分析の結果ラムノース(Rha):ガラクトース(Gal):グルコース(Glc)=1:1:2 であった。メチル化分析の結果、2,3,4,6-$Me_4$Glc :$Me_2$Rha:2,4,6-$Me_3$Gal:4,6-$Me_2$Glc=1:1:1:1 の比で含まれると推測された。この結果から非還元末端 Glc、1 位と 3 位で結合する Gal、1 位と 2 位と 3 位で結合する Glc を含む多糖と決定され、Rha の結合様式は、1 位と 4 位または 1 位と 3 位または 1 位と 2 位のいずれかであると推定された。GC-MS 法によりいずれの構造が正しいか決定を試みる。

文献 1) PABN perumpli, *J. Biosci, Biotech.* **118**, 134-138, 2014.
2) A. Saeki et al., *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 138-145, 1997.

polysaccharide, Acetobacter pasteurianus, methylation analysis

発表責任者：與那嶺秋帆（oryzae.a0705@gmail.com）

発表番号：3F222
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来テトラチオン酸ハイドロラーゼの結晶構造解析
# Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of tetrathionate hydrolase from iron- and sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*

○長谷 成記[1]、中山 久之[2]、小坂 恵[3]、玉田 太郎[4]、上村 一雄[2]、金尾 忠芳[2]（[1]岡山大農、[2]岡山大院・環境生命、[3]岡山大・自科支セ、[4]原子力研）
○ Naruki HASE[1], Hisayuki NAKAYAMA[2], Megumi KOSAKKA[3], Taro TAMADA[4], Kazuo KAMIMURA[2], Tadayoshi KANAO[2] ([1]Facul. Agr. Okayama Univ., [2]Grad. School of Emv. Life Sci. Okayama Univ., [3]Adv. Sci. Res. Center. Okayama Univ., [4]JAEA)

【背景と目的】鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* は、二酸化炭素を唯一の炭素源とし、生育のためのエネルギーを二価鉄または還元型無機硫黄化合物を酸化することにより獲得する、好酸性の化学合成独立栄養細菌である。本菌は、二価鉄または還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として生育した場合、その生育基質に対応して代謝を切り替える特性を持ち、異なるタンパク質を発現することが確認されている。我々は、本菌の異化的硫黄代謝における鍵酵素の一つ、テトラチオン酸ハイドロラーゼ（4THase）を分離精製し、これをコードする遺伝子（*Af-tth*）を同定した。
4THase は、本菌が無機硫黄化合物であるテトラチオン酸で生育した場合に、代謝の第一段階を担う重要な酵素である。本酵素は、テトラチオン酸（$S_4O_6^{2-}$）を加水分解し、元素硫黄（$S^0$）とチオ硫酸（$S_2O_3^{2-}$）、そして硫酸を生成する反応を触媒する酵素である。4THase は、*A. ferrooxidans* を含む *Acidithiobacillus* 属や *Acidianus brierleyi* など、一部の好酸性微生物から報告された極めてユニークな酵素であり、データベース上において高い相同性を示すものが存在しなかった。4THase の詳細な解析は、無機硫黄化合物に対する酵素反応機構の解明や、未解明である本菌の硫黄代謝機構の解明、あるいは 4THase の応用研究に必要不可欠である。本研究では、大腸菌を宿主とした組換え 4THase の大量発現・精製を行い、さらに結晶化することで X-線結晶構造解析による詳細な研究を行うことを目的とした。
【方法と結果】組換え大腸菌より *Af*-Tth を封入体として回収し、refolding による活性化および各種クロマトグラフィーにより高度に精製した。これをハンギングドロップ蒸気拡散法によって、結晶化に成功した。この結晶を大型放射光施設 SPring-8 にて X-線照射し、2.15Å の分解能で回折像データを得ることができた。さらに Se-Met 置換した *Af*-Tth の結晶を同様に作成し、MAD 法により解析し位相を決定した。これらより得られたデータを解析した結果、*Af*-Tth 結晶は空間群 $P3_2$ であり、本酵素は Class において All beta proteins、Fold において 8-bladed beta-propeller に構造分類されることが分かった。また *Af*-Tth の新規な反応機構を解明するために、得られた結晶を基質であるテトラチオン酸を含む溶液に浸すことにより酵素-基質複合体を形成させ、これに X-線照射を行って回折像データを得た。その結果、基質であるテトラチオン酸と推定される電子雲を確認することができた。その周囲には、他のほとんど全ての硫黄代謝関連酵素で認められている Cys 残基が存在せず、*Af*-Tth は Cys 残基が関与しない新規な反応機構を有していることが期待された。

Tetrathionate hydrolase, sulfur metabolism, *Acidithiobacillus ferrooxidans*

発表番号：3F223
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

プロトプラスト-PEG 法による黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* の形質転換系の構築
Construction of Protoplast-PEG transformation method for *Aspergillus luchuensis*

○渡嘉敷 直杏[1]、外山 博英[1]、渡邉 泰祐[2] ([1]琉球大農・亜熱生資、[2]日大生資科・生命化)
○Jikian TOKASHIKI[1], Hirohide TOYAMA[1], Taisuke WATANABE[2] ([1]Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus, [2]Dept. Chem. Life Sci., Coll. Biores. Sci., Nihon Univ.)

【目的】麹菌は糸状菌の一種で古来、我が国において清酒、醤油、味噌、泡盛など様々な発酵食品の製造に用いられており、医薬品や酵素等の有用物質生産にも利用されている。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、1990 年頃よりプロトプラスト-PEG 法を用いた形質転換法によって、分子生物学的研究が進められてきたが、黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* は、*A. oryzae* と同様の方法ではプロトプラストを得ることができないため、プロトプラスト-PEG 法での形質転換が困難であった。本研究では *A. luchuensis* を用いて効率的なプロトプラスト調製条件を決定し、形質転換系を構築することを目的とした。
【方法】供試菌株として標準株 *A. luchuensis* NBRC4314 株を用いて、プロトプラスト化に用いる菌体の最適な培養条件を検討した。異なる培地組成で培養し、得られた菌糸を細胞壁溶解酵素 Yatalase で処理しプロトプラスト化を行った。プロトプラスト化の進行は、反応液を分取し、位相差顕微鏡を用いたセルカウントをすることで確認した。次に溶解酵素を検討するため、培養条件を一定にして得られた菌糸を用いて、Yatalase と同時に異なる細胞壁溶解酵素を添加してプロトプラスト化を試みた。プロトプラスト化した細胞のコンピテンシーの評価と形質転換の為に、麹菌の染色体外で自立複製可能かつピリチアミン(PT)耐性遺伝子を持つ pPTR II プラスミドを用いて形質転換を行った。形質転換体は PT 耐性を持つコロニーとして得られた。得られた形質転換体は PT を含む寒天培地に数回植え継いだ後、トータル DNA を回収した。形質転換体におけるプラスミド導入の確認は、プラスミド上の約 1 kb の配列を PCR によって増幅させることにより行った。
【結果】*A. luchuensis* では *A. oryzae* のプロトプラスト化で使用されるようなリッチな培地で培養して得られた菌体を用いると、プロトプラスト化ができなかった。このことから *A. luchuensis* では細胞壁多糖が *A. oryzae* と異なり、より強固なものになっていると考えられた。また、α-1,3-glucanase を添加すると *A. luchuensis* のプロトプラスト化は促進された。この結果は、α-1,3-glucan の含量が *A. oryzae* や他の麹菌と大きく違う可能性を示唆するものであり、それが *A. luchuensis* のプロトプラスト化を困難にしていたと考えられた。*A. luchuensis* NBRC4314 株は PT(0.1 mg/L)によって生育が阻害されたのに対して、形質転換体は PT を含む寒天培地上でも生育した。この株からトータル DNA を回収し、PCR によって形質転換の確認を行うと、約 1 kb の DNA 断片が増幅されたことから、得られた形質転換体にはプラスミドが保持されていることが確認された。

*Aspergillus*, protoplast, α-1,3-glucanase

発表責任者：外山博英（toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：3F224
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 硫酸アルミニウムの抗菌剤としての利用にかかわる因子とその作用機序

# The factors and the action mechanism which concerns use as the antibacterial agent of aluminium sulfate

○大本 貴士、駒 大輔、山中 勇人、森芳 邦彦（阪市工研）
○Takashi OHMOTO, Daisuke KOMA, Hayato YAMANAKA, Kunihiko MORIYOSHI (OMTRI)

【目的】無機系抗菌剤は、銀、銅、亜鉛等の重金属を主成分とするものが主に利用されているが、我々は、アルミニウムに着目し、新規抗菌剤としての利用について検討している。これまでにアルミニウムを含むコラーゲン粉末が大腸菌に対して抗菌力を発揮することを示し[1)]、そのためには夾雑物としてリン酸関連化合物の存在しないことが条件となることを明らかにしている。現在、アルミニウムは抗菌剤としての認識は極めて低いが、論理的な知見を集め、作用機序等を明らかにすることによって、新しい抗菌剤或いは助剤としての利用も進むと考えられる。そこで、硫酸アルミニウムを抗菌剤として作用させた場合の、抗菌作用に伴う微生物の挙動を調べ、作用機序にかかわる因子を調べた。
【方法】2 mg/L～20 mg/L の硫酸アルミニウムを含む酢酸緩衝液（pH 6.1）に種々の細菌を接種し、27℃で一定時間放置した後、混釈平板培養法で生菌数を測定した。大腸菌懸濁液中の酸素濃度は、処理液を入れた閉鎖容器内にクラーク型酸素電極を取り付けることによって測定した。形態観察は、位相差顕微鏡、走査電子顕微鏡(SEM)を用いて行った。
【結果】アルミニウムイオンは、酸性かつリン酸非存在下で、数 mg/L 程度の濃度で *Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa* 等の種々の細菌に対して抗菌作用を示した。しかし、*Serratia marcescens* に対してはほとんど抗菌活性を示さなかった。大腸菌懸濁液にアルミニウムを添加し、添加時の酸素消費速度の変化を調べたところ、添加後すぐに酸素消費速度は低下した。アルミニウムイオンが菌体の好気的呼吸を阻害したものと考えられた。処理時の菌体濃度を高くし、アルミニウム添加時の視覚的な変化を観察した。目視、位相差顕微鏡による観察で、菌体の凝集が認められた。SEM により形態変化を調べたところ、凝集後の形態変化と考えられる部分が観察された。また、本処理後の菌体について、SEM-EDS 解析を行ったところ、菌体表面全体にアルミニウムの存在が確認された。さらに、アルミニウム処理した後の菌体は、ポリリジン処理ガラスに吸着しなかったため、菌体表面の電荷は正に帯電していると考えられた。一方、大腸菌をメンブランフィルター上に捕集してフィルター上で同様の処理を行ったところ、コロニー形成数が減少した。以上の結果より、アルミニウムイオンが菌体表面全体に吸着し、硫酸アルミニウムが凝集剤としての能力を発揮し凝集作用を示し、形態変化等が進行すると考えられた。また、凝集作用はコロニー形成数を減少させる原因の一つとなるが、同時に菌体表面の帯電の変化が抗菌作用に関係しているものと考えられた。

[1)] T. Ohmoto, *et al.* (2012) *Biocontrol Sci.* 17:37-44

antibacterial reagent, aluminium sulfate

発表番号：3F225
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌 $H^+$駆動型べん毛モーター固定子 MotAB のイオン選択性に重要なアミノ酸残基

# Identification of critical amino acid residues for ion selectivity of $H^+$-type flagellar stator MotAB in *Escherichia coli*

○石川 健太郎[1]、高橋 優嘉[2]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大学　生命科、[2]東洋大・バイオナノ)
○Kentaro ISHIKAWA[1], Yuka Takahashi[2], Masahiro Ito[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Bio-Nano., Toyo Univ.)

多くの細菌はべん毛と呼ばれる運動器官を回転させることにより自由な遊泳を行う。べん毛は大きく分けて、べん毛繊維であるフィラメント、モーター部分である基部体、べん毛繊維と基部体をつなぐフックの 3 つの箇所から構成されている。回転駆動力は、特異的なイオン(プロトン($H^+$)またはナトリウムイオン($Na^+$))が膜を通過する際に形成される電気化学ポテンシャル差を用いている。モーター部分である基部体は主に回転子と固定子から構成されており、特に固定子は回転駆動力変換ユニットとして機能する。大腸菌などの多くの細菌では $H^+$を共役イオンとする MotAB が固定子として報告されており、好アルカリ性 *Bacillus* 細菌や海洋性 *Vibrio* 属細菌では $Na^+$を共役イオンとする固定子 MotPS および PomAB が報告されている。

固定子は、4 回膜貫通型の MotA(MotP、PomA)サブユニットと 1 回膜貫通型の MotB(MotS、PomB)サブユニットが 4：2 の割合で複合体を形成し、イオンチャネルとして機能している。また、固定子のイオン流入チャネルは MotA サブユニットの 3 番目と 4 番目の膜貫通領域と MotB サブユニットの膜貫通領域から形成されている。また、固定子のイオン選択性は、特に MotB サブユニットが重要であることが報告されている。MotB サブユニットの膜貫通領域内にはイオン結合サイトであるアスパラギン酸残基(D)が存在し、イオン選択性に重要なアミノ酸残基として $H^+$駆動型ではバリン残基(V)が $Na^+$駆動型ではロイシン残基(L)が高度に保存されている。好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌においては、イオン選択性に重要なアミノ酸残基にアミノ酸置換変異を導入するとイオン選択性が変化することが報告されている。この結果をもとに大腸菌が持つ $H^+$駆動型固定子 MotB サブユニットの 42 番目のバリン残基(MotB-V42)を他のアミノ酸残基に置換した変異体を構築し、イオン選択性への影響を観察した。その結果、大腸菌において MotB-V42 に単独で置換変異を導入してもイオン選択性に対する影響は観察できなかった。この結果から、MotB-V42 以外にもイオン選択性に重要なアミノ酸残基があることが示唆された。

そこで本研究では、大腸菌の MotB-V42 を L に置換した変異と共に MotA サブユニットの膜貫通領域にも置換変異を導入することで $Na^+$で駆動する変異型固定子 MotAB を構築した。これらの変異株の運動性解析を行うことでイオン選択性に重要なアミノ酸残基の特定を試みた。詳細な結果はポスターで発表する。

Escherichia coli, flagellar motor, H+-type stator MotAB

発表番号：3F226
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌のべん毛モーターにおけるイオン選択機構の解明

# A functional analysis of the stator complex of the flagellar motor from alkaliphilic *Bacillus*

○長縄 俊[1]、今澤 陸[2]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大・生命科、[2]東洋大院・生命科学)
○Shun NAGANAWA[1], Riku IMAZAWA[2], Masahiro ITO[1,2] ([1]Faculty of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

細菌は、べん毛と呼ばれる運動器官を回転させることでより有利な生育環境に移動できる。べん毛のモーター部分に相当する基部体は、回転子と固定子から構成され、固定子は MotA 型と MotB 型の 2 つのサブユニットが４：２の割合で複合体を形成しイオンチャネルとして機能している。大腸菌などの多くの細菌のべん毛には $H^+$駆動型固定子 MotA/MotB が利用され、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や海洋性 *Vibrio* 属細菌のべん毛には MotA/MotB と相同性のある $Na^+$駆動型固定子 MotP/MotS、PomA/PomB がそれぞれ利用されている。好アルカリ性細菌 *Bacillus alcalophilus*(BAL)は、$Na^+$駆動型固定子 MotP/MotS を持つが共役イオンとして $Na^+$以外にも $K^+$や $Rb^+$を利用できる新奇な固定子であることが報告されている。BAL 以外にべん毛モーターの共役イオンとして $K^+$を利用する細菌はこれまで報告例がない。固定子の共役イオン選択には、一回膜貫通型膜タンパク質である MotB 型サブユニットが重要であると考えられている。MotB 型サブユニットの膜貫通領域内には共役イオン結合部位であるアスパラギン酸残基と共役イオン選択性に重要と推定されるアミノ酸残基が保存されている。イオン選択性に重要だと考えられるアミノ酸残基は、$H^+$駆動型の MotB ではバリン残基、$Na^+$駆動型の MotS や PomB ではロイシン残基が高度に保存されている。しかし、BAL の MotS ではそのアミノ酸残基の位置がロイシン残基ではなくメチオニン残基であった。このメチオニン残基をロイシン残基に置換した変異株は、べん毛の回転に $K^+$や $Rb^+$を利用できなくなり $Na^+$のみを利用できる。この結果から、共役イオンとして $K^+$を利用するためには MotS のメチオニン残基が重要であること示唆されていた。

今回の研究対象である *Bacillus trypoxylicola*(BT)は、カブトムシの幼虫の腸内から単離された好アルカリ性細菌である。BT の遊泳は $Na^+$だけでなく $K^+$濃度にも依存的な運動性が観察された。そこで、まず BT の固定子遺伝子のアミノ酸配列を同定した。その結果、BT のべん毛固定子は $Na^+$駆動型固定子 MotP/MotS に分類された。BT の MotS の共役イオン選択性に重要と考えられるアミノ酸残基は典型的なロイシン残基であった。よって、BT のべん毛モーターの $K^+$選択には MotS だけでなく、MotS とイオンチャネルを形成している MotP にも重要なアミノ酸残基及びモチーフが存在することが推定された。次に、BT の MotP/MotS のアミノ酸配列と他の *Bacillus* 属細菌がもつ固定子 MotP/MotS のアミノ酸配列を比較することで $K^+$選択性に特異的な配列の特定を試みた。そして、特定したアミノ酸を MotP/MotS に導入した変異株を構築し、運動解析を行うことでべん毛モーターの $K^+$選択機構を明らかにすることを試みた。結果の詳細は、ポスターで紹介する。

flagellar motor, alkaliphilic *Bacillus*, coupling ion

発表番号：3F227
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌における高圧損傷菌の特性解析

# Characterization of High pressure-injured *B. subtilis* cells

○稲岡 隆史[1]、木村 啓太郎[1]、森松 和也[2]、山本 和貴[1] ([1]農研機構・食総研、[2]愛媛大)
○Takashi INAOKA[1], Keitarou KIMURA[1], Kazuya MORIMATSU[2], Kazutaka YAMAMOTO[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Ehime Univ.)

損傷菌は、ストレス等により損傷を受け、一時的に増殖不能となった状態の細菌である。食品衛生分野では、損傷菌に対する関心は高く、食中毒菌等を中心に研究が行われているが、損傷菌に関する知見は極めて乏しい。また、損傷菌の問題は熱ストレスの観点で論じられることが多く、高圧ストレスによる損傷菌特性解明は遅れている。更に、枯草菌における高圧処理に関する研究は、耐圧性胞子の高圧発芽誘導等の報告があるものの、栄養細胞についての知見は皆無である。そこで本研究では、枯草菌栄養細胞における高圧処理の影響を、胞子形成能を欠失した菌株（$Spo^-$株）を用いて解析した。

胞子形成能を欠失した $Spo^-$株として *spoIIAC*::*kan* (sigF)株を高圧処理し、その損傷程度を異なる手法で解析した。平板表面塗抹法による生菌数測定においては、定常期の枯草菌栄養細胞における高圧殺菌の D 値（25 ℃で 10 分間の処理により 90 %死滅させる圧力）は約 250 MPa であった。また、DNA 蛍光染色試薬による生死判定法では、250 MPa で処理された細胞の殆どが生存菌であった。更に、増殖遅延時間に基づく判定では、250 MPa で処理した菌体の生残率は 0.1%程度であったことから、250 MPa での高圧処理により枯草菌栄養細胞の大部分が損傷菌となっていると推察された。高圧損傷した大腸菌の増殖阻害要因として酸化ストレスの関与が示唆されていることに鑑みて、枯草菌のスーパーオキシドジスムターゼ（Sod）欠損株及びカタラーゼ欠損株を用いて高圧感受性を調べたところ、Sod 欠損株において、高圧ストレス感受性が増大していた。よって、高圧処理による損傷により枯草菌栄養細胞内でスーパーオキシドが発生していることが示唆された。

High pressure, Injured cells, Bacillus subtilis

発表責任者：稲岡隆史（tina2672@affrc.go.jp）

発表番号：3F228
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 低温適応性乳酸菌を宿主とした新規ベクターの構築

# Construction of a new shuttle vector for a psychrotrophic lactic acid bacterium.

○二宮 健匡[1]、後藤 清太郎[2]、川本 純[1]、工藤 和幸[2]、栗原 達夫[1]（[1]京大化研、[2]日本ハム（株）商開研）
○ takemasa NINOMIYA[1], Seitaro GOTO[2], Jun KAWAMOTO[1], Kazuyuki KUDO[2], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]Insti. for Chem. Res., Kyoto Univ., [2]Product Development Laboratory, NH Foods Ltd.)

【目的】変敗食肉加工品より単離された乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* NH04 株は、近縁の標準株 (*L. mesenteroides* ATCC8292 株, NBRC3832 株) に比べて低温下 (10 ºC) における増殖能が高く、また、全ゲノム情報を利用した育種が可能であることから、熱安定性の低いタンパク質や常温では宿主に毒性を示すタンパク質などの異種タンパク質生産宿主として期待される。しかしながら、従来より用いられてきた *Escherichia. coli* − *L. mesenteroides* シャトルベクター pGK::nucMCS は、非選択圧下での本菌体内安定性や形質転換効率が非常に低く、高い生産効率が求められる異種タンパク質発現系で用いるベクターとしては不向きであることから、発現ベクターとしてより適した新規ベクターの開発が望まれる。本研究では、NH04 株においてより安定性が高く、形質転換効率の高いプラスミドを構築することを目的とした。
【方法】本菌固有のプラスミドの塩基配列を決定し、複製に関わる領域を推定した。この領域を、pUC19 の *ori* 配列を含む領域、および *E. coli* および *L. mesenteroides* の選択マーカーとしてのエリスロマイシン (EM) 耐性遺伝子発現カセットと融合することで、新規ベクターpUCNH04E を構築した。pUCNH04E を NH04 株および標準株 2 種 (*L. mesenteroides* ATCC8292 株, NBRC3832 株) にエレクトロポレーション法により導入し、形質転換効率を調べた。また、得られた形質転換体について、GAM + 1%グルコース液体培地にて非選択圧条件下 (EM 非存在下) で培養を行い、一定培養時間毎に採取した菌体試料を選択 (EM 含有) および非選択 (EM 非含有) GAM + 1%グルコース寒天培地に播種した。選択培地上で生育したコロニーの数に対する非選択培地上で生育したコロニーの数の割合 (プラスミド保持率) を算出することで、菌体内におけるプラスミドの安定性を評価した。
【結果】エレクトロポレーション法による各株への pUCNH04E の導入効率は、3 株いずれにおいても pGK::nucMCS よりも高く、NH04 株では約 10 倍高いことがわかった。また、pGK::nucMCS の保持率が培養 36 時間の時点で 3 株いずれにおいてもほぼ 0%であったのに対し、pUCNH04E は標準株 2 株においては約 40%、NH04 株においては 90%以上の高い保持率であった。培養 180 時間での pUCNH04E の保持率は、標準株 2 株においてはほぼ 0%にまで低下していたのに対し、NH04 株では 15%程度の保持率であった。これより、今回構築した新規シャトルベクターpUCNH04E について、NH04 株を宿主とした異種タンパク質発現系で用いるベクターとしての有用性が示唆された。

lactic acid bacteria, Leuconostoc mesenteroides, psychrotroph

発表責任者：二宮 健匡（timon009.sidechest@mbc.kuicr.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3G001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Sirt1 はオキシトシンを介してショ糖嗜好性を抑制する

# Sirt1 suppresses sucrose preference through oxytocin

○松居 翔、佐々木 努、橋本 博美、沼田 友理、小林 雅樹、北村 忠弘（群大生調）
○Syo MATSUI, Tsutomu SASAKI, Hiromi YOKOTA-HASHIMOTO, YURI NUMATA, Masaki KOBAYASHI, Tadahiro KITAMURA (Gunma Univ.)

【背景】肥満の原因となる過食の背景にある食嗜好性の機序解明の一端として、中枢神経系 Sirt1 による高ショ糖 食(HSD) 嗜好性調節の分子機序の解明を目的とし以下のことを検討した。
【方法】神経特異的 Sirt1 過剰発現（NS-KI）マウスで抑制された HSD 嗜好性の制御にオキシトシン（Oxt）シグナルが必要かを検討するために、NS-KI マウスに Oxt 受容体アンタゴニスト（Oxtr-A）を腹腔内（ip）投与し、HSD 嗜好性への影響を検討した。次に、Oxt ニューロンの Sirt1 は HSD 嗜好性を抑制するのに十分かを検討するために、Oxt ニューロン特異的 Sirt1 過剰発現（Oxt-KI）マウスを用いて、HSD 嗜好性試験、および Oxtr-A の ip 投与による HSD 嗜好性への影響を検討した。Sirt1 による Oxt 遺伝子の転写制御機序を解明するために、視床下部細胞株で Sirt1 の過剰発現を行い、Oxt プロモーター活性を測定した。
【結果】NS-KI マウスの Oxtr-A の ip 投与により、NS-KI マウスで認められる HSD 摂食抑制作用がキャンセルされた。さらに、Oxt-KI マウスではコントロールマウスに比して HSD 摂食量が減少し、その効果は Oxtr-A の ip 投与によりキャンセルされた。また、Sirt1 は、転写開始点上流から-5kb の Oxt プロモーター活性を上方制御した。さらに、-5kb よりも短い Oxt プロモーター解析の結果、-3.2kb～-2.1kb 領域の消失により Sirt1 の効果が消失した。
【結論】NS-KI および Oxt-KI マウスの Oxtr 阻害実験の結果から、Oxtr を介したシグナルが Sirt1 による HSD 嗜好性の抑制制御に必要であることが明らかとなった。加えて、Oxt-KI マウスの HSD 嗜好性試験の結果から、Oxt ニューロンにおける Sirt1 が、HSD 嗜好性を抑制するのに十分であることが証明された。現在、Oxt ニューロン特異的 Sirt1 ノックアウトマウスの HSD 嗜好性を解析中である。また、Oxt プロモーター解析の結果、Sirt1 による Oxt 遺伝子発現制御の責任領域が転写開始点上流の-3.2kb～-2.1kb に存在することが明らかとなった。同 Oxt プロモーター領域による活性制御の既報はなく、新規制御領域を同定したこととなる。現在、Sirt1 が Oxt の転写制御に必要とする候補転写因子を数種類まで絞り込み解析中である。以上より、Sirt1 は、Oxt の転写制御を介して HSD 嗜好性を抑制する。

Sirt1, Oxytocin, sucrose preference

発表責任者：佐々木努（tsutomus@gunma-u.ac.jp）

発表番号：3G002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 低タンパク質食を給餌した *Fgf21* ノックアウトマウス肝臓の cDNA マイクロアレイ解析

# DNA microarray analysis of the liver of *Fgf21*KO mice fed protein deficient diet

○尾崎 依[1]、中澤 京子[2]、斉藤 憲司[2]、小西 守周[3]、伊藤 信行[4]、高橋 伸一郎[5]、加藤 久典[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大・農・農化、[2]東大・総括寄付講座・食と生命、[3]神戸薬科大・薬、[4]京大院・薬、[5]東大・院・農生化)

○Yori OZAKI[1], Kyoko NAKAZAWA[2], Kenji SAITO[2], Morichika KONISHI[3], Nobuyuki ITOH[4], Shin-Ichiro TAKAHASHI[5], Hisanori KATO[2], ASAKO TAKENAKA[1] ([1]Meiji. Univ., [2]Univ. of Tokyo, Corporate Sponsored Research Program “Food for Life”, [3]Kobe Pharma Univ., [4]Kyoto Univ., [5]Univ. of Tokyo)

【背景】タンパク質低栄養は，低栄養にも関わらず肝臓へのトリグリセリド蓄積を誘導する。我々はこれまでに，ラットやマウス肝臓において低タンパク質食摂取 1 日で fibroblast growth factor 21（FGF21）の遺伝子発現が顕著に誘導されることを見出した。さらに，低タンパク質食を摂取した *Fgf21* ノックアウト（KO）マウスでは野生型（WT）マウスと比較して肝臓トリグリセリド蓄積量の増加が有意に大きく，また，WT マウスではみられない肝臓コレステロール蓄積の誘導が生じることを明らかにし，タンパク質低栄養が誘導する FGF21 は肝臓脂肪の蓄積を抑制することを示した。本研究ではこの分子機構の解析を目的として，低タンパク質食を摂取した *Fgf21*KO マウスの肝臓を対象に DNA マイクロアレイ解析を行い，対照食を摂取したマウス，および WT マウスと比較して発現量が変動する分子を探索した。【方法】4-5 週齢の C57BL/6J バックグラウンド WT および *Fgf21*-KO の雄性マウスに，20%のカゼインを含む対照食（20P），あるいは 20P と等エネルギーで 5%のカゼインを含む低タンパク質食（5P）を 10 日間給餌し，肝臓を採取した。得られた肝臓から total RNA を抽出し，Mouse Genome 430 2.0 Array（Affymetrix）を用いた DNA マイクロアレイ解析に供した。【結果】5P 食を摂取した *Fgf21*KO マウスで，対照食を摂取した *Fgf21*KO マウスおよび 5P 食を摂取した WT マウスと比較していずれも 2 倍以上発現量が増加する遺伝子を 124 個，0.5 倍以下に発現量が低下する遺伝子を 91 個同定した。パスウェイ解析の結果，コレステロール合成経路の遺伝子群の発現が，5P 食を摂取した *Fgf21*KO マウスにおいて，WT マウスおよび 20P 食を摂取したマウスと比較して顕著に抑制されることが明らかとなり，さらに上流の制御因子の予測結果から Sterol regulatory element-binding protein 2（SREBP-2）の活性が抑制されている可能性が示された。一方，対照食摂取時には *Fgf21*KO によるコレステロール合成経路の遺伝子群の発現低下は認められなかった。したがって，FGF21 はタンパク質低栄養時のコレステロール代謝の制御に重要な役割をもつと考えられた。また，*Fgf21*KO マウスにおいて 5P 食の摂取により肝臓のコレステロール蓄積量が増加しており，コレステロール合成経路の遺伝子発現の変化は，肝臓コレステロール濃度の増加に応答したフィードバック調節の結果であると考えられた。一方，脂肪酸の合成，脂肪酸の β 酸化，肝臓からの脂質輸送および脂質取り込みに関連する因子の発現量にはいずれも顕著な差は認めらなかった。以上の結果より，タンパク質低栄養時に誘導される FGF21 は，肝臓における上記因子の遺伝子発現制御以外の機構を介して，肝臓の脂肪蓄積を抑制することが示された。

FGF21, fibroblast growth factor 21, protein malnutrition

発表番号：3G003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 発達初期低タンパク質栄養による統合失調症関連行動異常発症の分子基盤としての脳内遺伝子発現変化

# Early life protein restriction elicits sexually dimorphic changes in brain gene expression profile

○今井 明香、中畑 亜加音、市瀬 嵩志、田代 康介、古屋 茂樹（九州大学大学院　生物資源環境科学府）
○Haruka IMAI, Akane NAKAHATA, Takashi ICHINOSE, Kosuke TASHIRO, Shigeki FURUYA (Kyushu Univ.)

発生・発達期の低栄養状態は、体内における様々な構造機能変化を引き起こし、成熟期や次世代での疾患の原因となることが知られている。精神疾患の疫学的研究からは、胎児期から幼年期に低栄養を経験することにより、成人期の統合失調症発症リスクが約2倍高まることが報告されている（Brown and Susser, Schizophr. Bull., 2008）。統合失調症は罹患率が全人口の約 1%と大きな割合を占めている上、患者の社会生活は大変困難となる場合が多い。また、その発症には複数の疾患脆弱性遺伝子に加えて環境要因も寄与するため、病因解明とその予防には環境要因の分子的基盤を把握する必要がある。環境要因として作用する低栄養による統合失調症発症リスク増大に関わる栄養素の実体については、ビタミン、葉酸、タンパク質/アミノ酸の欠乏を含む様々な候補が挙げられているが、詳細な解析は行われていない。我々はこれまでに妊娠期及び授乳期に低タンパク質栄養に曝された雌性マウスから出生した F1 世代において成熟期雌性特異的に統合失調症エンドフェノタイプであるプレパルス阻害（PPI）が低下することを見いだしている。PPI の異常はヒト統合失調症患者及び齧歯類モデルに共通して観察されるエンドフェノタイプである。本研究では、初期低タンパク質栄養による統合失調症関連エンドフェノタイプ発症の分子機序解明を目的として、大脳前頭前野における網羅的遺伝子発現解析を行った。

雌性 DBA/2 を雄性 C57BL/6 との交配開始日より AIN-93G 準拠通常タンパク食給餌群(カゼイン 20%:対照群)及び低タンパク食給餌群(カゼイン 10%:制限群)に分割して給餌し、D2B6F1 を得た。離乳まで合計約 7 週間雌性マウスに同給餌を続け、離乳後 F1 群を通常タンパク食給餌で飼育した。生後 11 週で前頭前野を取り出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、神経系の発達と機能に関わる約 150 遺伝子が有意に発現変化しており、その中にはヒト統合失調症患者脳内で発現異常が報告されている複数の最初期遺伝子群が含まれていた。QRT-PCR 解析においても最初期遺伝子群の発現低下を確認したが、その変化は雌性制限群特異的ではなく、雄性制限群前頭前野でも同様に観察された。その一方で、QRT-PCR 解析から雌性制限群特異的に発現変化を呈す複数の神経機能関連遺伝子の存在も確認できた。これらの遺伝子発現変化と統合失調症エンドフェノタイプ発症の連関が推測されたため、現在更なる解析を進めている。以上の結果より、初期低タンパク食摂取が、成獣期の神経活動を低下させ、さらに雌性特異的な遺伝子発現変化が生じることで行動異常を惹起する可能性が強く示唆された。

early life protein restriction, schizophrenia, sexually dimorphic changes

発表番号：3G004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 標準日本食飼料の作製とその検討

# Producing and confirming of the standard Japanese diet

○溝脇 由衣、都築 毅（東北大院・農）
○Yui MIZOWAKI, Tsuyoshi TSUDUKI (Grad.Sch.of Agri.Sci.,Tohoku Univ.)

【背景・目的】動物実験に用いられる標準飼料として、AIN-93 組成が世界各国で広く使われている。また、世界中で爆発的に増加している肥満を解決するために、アメリカ人の典型的な食事を模した飼料（ウェスタン飼料）が肥満誘導食として用いられている。ウェスタン飼料は飼料メーカーから販売もされており、誰でも手軽に使用できる。一方、日本食は健康有益性が高い食事として知られているが、標準化された日本食飼料はまだない。我々はこれまで国民健康・栄養調査の結果を基に日本食を再現し、「日本食まるごと」の健康有益性について研究を行ってきた。そしてこの経験から、日本食飼料を標準化し、誰でも簡単に日本食の試験が行えるようにしたいと考えた。日本食飼料をウェスタン飼料のように普及できれば、日本人の食生活をベースにした研究の更なる発展が期待できる。我々の以前の研究で、様々な年代の日本食のなかで 1975 年の食事が最も健康維持に有益であることが明らかとなった。よって、本研究では、簡単に手に入る素材を用いて 1975 年日本食の特徴を再現した精製飼料（mimic 日本食）を作製し、mimic 日本食が日本食の特徴を有しているか検討した。
【実験方法】mimic 日本食は AIN-93G 組成を改変して作製した。mimic 日本食のタンパク質・脂質・炭水化物（PFC）組成は 1975 年日本食の PFC バランス実測値を参考にし、素材の組成は 1975 年国民健康・栄養調査の栄養素等摂取量および食品群別摂取量のデータを基に決定した。AIN-93G 食および市販のウェスタン飼料（WD）を対照食とした。ICR マウス（5 週齢、雄性）を試験食で 4 週間飼育し、9 週齢にて屠殺し、血清や各種臓器を採取し、種々の分析に供した。
【結果】内臓脂肪量、肝臓トリアシルグリセロール量は、WD 群に対して mimic 日本食群で有意に低値であった。よって、mimic 日本食は脂肪が蓄積しにくいことが明らかになった。このメカニズムを検討するために脂肪酸代謝関連遺伝子の発現量を測定したところ、肝臓において脂肪酸合成に関わる *Lxrα*、*Me*、*G6pdx*、および、脂肪酸異化に関わる *Cpt-Ⅱ* の発現量が WD 群に対して mimic 日本食群で有意に高値であった。よって、mimic 日本食の脂肪蓄積抑制効果は、肝臓脂肪酸代謝系の活性化によると考えられた。我々の以前の研究で、日本食と米国食をラットに与えたところ、日本食は米国食と比較して代謝が活発化するために肥満になりにくいことが認められている。本研究において、mimic 日本食は肝臓における脂肪酸代謝系を活性化するために内臓および肝臓に脂肪が蓄積しにくいことが示唆された。以上より、本研究で用いた mimic 日本食は、日本食の健康有益性を一部有していることが示された。

Japanese diet, AIN-93, mice

発表番号：3G005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 高脂肪食給与マウスのインスリン抵抗性に対する短梗五加果実の作用

# The fruit of Acanthopanax Senticosus Harms improved insulin resistance in high-fat diet fed mice

○齋藤 哲男、西田 美也子、齋藤 雅史、永塚 貴弘、西田 浩志（新潟薬科大）
○TETSUO SAITO, MIYAKO NISHIDA, MASAFUMI SAITO, TAKAHIRO EITSUKA, HIROSHI NISHIDA (NUPALS)

【目的】肥満はインスリン抵抗性や脂肪肝を含む糖質および脂質代謝を悪化させる原因の一つである。さらに、肥満に伴うインスリン抵抗性はⅡ型糖尿病や脂質異常症を含む様々な代謝疾患を引き起こす要因になるため、その予防または改善は重要な課題である。五加は伝統中薬の素材として古くから使われており、その根皮には抗酸化作用、抗肥満作用および抗炎症作用があることが報告されている。しかし、五加果実（GF）はほとんど使われておらず、民間療法において利用されているにとどまっている。また、その科学的検証はほとんど行われていない。本研究では、高脂肪給与マウスのインスリン抵抗性に対する GF の作用を検討した。

【方法】C57BL/6J マウスは普通食群（CT）と高脂肪食群（HFD）に分け、8 週間飼育した。8 週間後、HFD 群をさらに蒸留水、GF 低用量（GFL：500mg/kg）、GF 高用量（GFH：1000mg/kg）、メトホルミン（MET：300mg/kg）を投与する 4 群に分け、それぞれ経口投与を行った。マウスは経口投与 8 週間後に経口糖負荷試験（OGTT）、10 週間後にインスリン負荷試験（ITT）を行った。経口投与 12 週間後にマウスを解剖し、血漿中トリアシルグリセロール（TG）、総コレステロール（TC）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、インスリンおよび血糖値を測定した。また、肝臓中の TG および TC 量を測定した。

【結果】OGTT において、GFL 群と GFH 群は HFD 群に比べ、血糖値と血中インスリン濃度の上昇が有意に抑られた。ITT では、GFH 群が HFD 群よりも血糖値が有意に低下した。飼育期間中の体重、解剖後の肝臓重量、内臓脂肪重量、血中 TG および血糖値は、HFD 群、GFL 群および GFH 群の 3 群間に差は見られなかった。しかし、GFL 群と GFH 群は HFD 群よりも血中インスリン量が有意に低かった。また、GFL 群および GFH 群は HFD 群と比べ、血中 TC、AST および ALT が GF の用量依存的な減少傾向を示した。肝臓への脂質蓄積量を測定した結果、GFH 群は HFD 群よりも TG と TC の蓄積量が有意に低かった。以上の結果から、GF は肝臓への脂質蓄積を抑制する作用があることが明らかとなった。GF はインスリン抵抗性を改善することが示唆された。

Acanthopanax Senticosus Harms, insulin resistance, glucose metabolism

発表責任者：齋藤哲男（ozawa26@gmail.com）

発表番号：3G006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 低炭水化物・高脂肪食摂餌マウスにおける血糖値調節機構の解明

# Regulatory mechanism in blood glucose of mice fed low carbohydrate/ high fat diet.

○船戸 里香[1]、宇田川 賢太[2]、小泉 洸太[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院・生資科・応生科、[2]日本大・生資科・生命化)
○Rika FUNADO[1], Kenta UDAGAWA[2], Kouta KOIZUMI[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【目的】近年、生活習慣の変化や食の多様化に伴い、肥満が増加している。肥満は、がんや脂肪肝炎などの発症リスクを高めることから、炭水化物の摂取を制限するダイエットが注目されている。一方、低炭水化物・高脂肪食は肥満患者の体重減少に有効であるが、インスリン抵抗性を引き起こすことも報告されている。また、低炭水化物・高脂肪食をマウスに給餌すると、血糖値は維持されたままケトン体濃度が増加する。本研究では、低炭水化物・高脂肪食(Ketogenic Diet)給餌マウスにおけるインスリン抵抗性や血糖値調節機構について基礎的な検討を行った。
【方法】C57BL/6J 雄性マウス 4 週齢を 2 週間予備飼育後、Control Diet, CD (D12359, リサーチダイエット社) 群と Ketogenic Diet, KD(D12369B, リサーチダイエット社)群に分け、これらを自由に摂食させて 16 週間飼育した。実験開始 1, 6, 12 週目に経口糖負荷試験を行い、16 週目には明期に 6 時間の絶食後、血漿グルコース濃度・インスリン濃度・脂質濃度・ケトン体濃度、肝臓および筋肉中グリコーゲン含量を測定した。また、肝臓の組織像、肝臓における糖新生関連因子 PEPCK, G6pase のタンパク質発現、グリコーゲン合成酵素 GSK3βリン酸化レベルを western blotting により測定した。さらに、肝臓における解糖系酵素ヘキソキナーゼ、グルコキナーゼの活性を測定した。
【結果】体重は CD 群と比較して KD 群で有意に増加したが摂取カロリーに差はなかった。明期 6 時間の絶食後では、血漿グルコース濃度は CD 群、KD 群で差はなかった。血漿インスリン、ケトン体、TG 濃度は CD 群と比較して KD 群で有意に増加した。また、血漿 NEFA, TC 濃度、肝臓および筋肉のグリコーゲン含有量に差はなかった。経口糖負荷試験では 1, 6, 12 週目いずれも CD 群と比較して KD 群で耐糖能異常が認められた。肝臓の組織学的解析では、CD 群と比較して KD 群で顕著な脂肪滴蓄積が観察された。肝臓における PEPCK, G6pase,リン酸化 GSK3βタンパク質発現は CD 群と比較して KD 群で有意に減少した。肝臓ヘキソキナーゼ、グルコキナーゼ活性に差はなかった。
【総括】低炭水化物・高脂肪食はインスリン抵抗性を惹起すること、糖新生を介さずに血糖値を調節していることが明らかとなった。

Low carbohydrate/ high fat diet, Blood glucose, Gluconeogenesis

発表責任者：関　泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3G007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# アミノ酸欠乏に応答して観察される肝臓トリグリセリド蓄積における脂肪酸β酸化の寄与
# Role of beta-oxidation in hepatic steatosis induced by amino acid deficiency

○関 亜理砂[1]、丸井 未槻[1]、川原 夕記[1]、尾崎 依[1]、長田 恭一[1]、高橋 伸一郎[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大・農・農化、[2]東大・院・農生化)
○Arisa SEKI[1], Mitsuki MARUI[1], Yuki KAWAHARA[1], Yori OZAKI[1], Kyoichi OSADA[1], Shin-ichiro TAKAHASHI[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【目的】成長期のタンパク質・アミノ酸欠乏により肝臓にトリグリセリド（TG）が蓄積することは、クワシオルコル患者の例でも古くから知られている。この TG 蓄積が生じる機構として、肝臓からの VLDL 分泌低下、脂肪酸β酸化の低下、脂肪酸合成の増加など複数の可能性が示されているが、分子機構については未だ不明な部分が多い。これまでに我々は、肝臓の VLDL の分泌低下および VLDL 取り込み増加がタンパク質欠乏時の TG 蓄積の原因ではないことを、ラット及びマウスを用いて示した。さらに、タンパク質欠乏動物における肝臓 TG 蓄積は絶食を経るとさらに増加する可能性を示している。こうした背景をふまえ、本研究ではタンパク質・アミノ酸欠乏が肝臓 TG 蓄積を引き起こす機構をラットと培養肝細胞を用いて検討した。

【方法】実験 1：5 週齢の Wistar 系雄ラットに対照食（20%カゼイン食、20C）あるいは低タンパク質食（5%カゼイン食、5C）を 1 日 8 時間給餌して 16 時間の絶食を経る制限給餌で与えて 7 日間飼育した（各群 n=10）。8 日目に、16 時間絶食後にそのまま解剖する群と、6 時間の再給餌を経て解剖する群に分けて解剖を行い、肝臓を採取して TG 量を測定すると共に、脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーで測定した（各群 n=5）。

実験 2：ラット肝臓由来 RL34 細胞を、アミノ酸含有培地（AA+）、アミノ酸欠乏培地（AA-）で 24 時間培養した。Oil Red O 染色により細胞内 TG 量を測定すると共に、β酸化関連酵素（ACO、CPT1α、MCAD）、脂肪酸合成関連酵素（FAS、ACC）等の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で測定した。

【結果】実験 1：肝臓 TG 量は再給餌下では実験食の影響を受けなかったが、絶食下では 5C 群で 20C 群と比較して有意に増加した。また、絶食後の肝臓脂肪酸組成は、5C 群でβ酸化の基質となりやすいオレイン酸（18:1）、リノール酸（18:2）の割合が 20C 群より大きくなったが、脂肪酸合成産物であるパルミチン酸（16:0）の割合は変化しなかった。再給餌下では上記の脂肪酸組成の変化は観察されなかった。

実験 2：細胞内 TG 量はアミノ酸欠乏により有意に増加した。脂肪酸合成酵素およびβ酸化酵素の遺伝子発現量はいずれもアミノ酸欠乏により有意に低下した。

【結論】以上の結果から、タンパク質低栄養状態における肝臓 TG 蓄積には、アミノ酸欠乏が直接のシグナルとなって肝細胞のβ酸化活性が低下するという機構が絶食時に稼働する可能性を示した。

protein malnutrition, triglyceride, amino acid

発表番号：3G008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

筋原線維タンパク質の維持における分岐鎖アミノ酸代謝制御の重要性
The importance of branched-chain amino acid metabolism in maintenance of myofibrillar protein
○北浦 靖之、石川 卓弥、森下 由佳子、太田 美樹、Xu Minjun、門田 吉弘、下村 吉治（名大院生命農）
○YASUYUKI KITAURA, Takuya Ishikawa, Yukako Morishita, Miki Ota, Minjun Xu, Yoshihiro Kadota, Yoshiharu Shimomura (Nagoya Univ.)

ロイシン、イソロイシン、バリンは分岐鎖アミノ酸：Branched-chain amino acid（BCAA）と称され、タンパク質を構成する必須アミノ酸であるが、特にロイシンはタンパク質の合成促進、分解抑制機能を持つ。また、BCAA はミトコンドリア内でアセチル CoA などに代謝され、運動時のエネルギー源となる。BCAA の代謝は最初の２ステップの反応が３つの BCAA に共通で、特に、第２反応を触媒する酵素である分岐鎖αケト酸脱水素酵素：Branched-chain alpha-ketoacid dehydrogenase（BCKDH）は不可逆的な反応を触媒し、BCAA 代謝の律速酵素であるとされている。BCKDH はリン酸化-脱リン酸化反応により調節され、BCKDH kinase（BDK）によるリン酸化により不活性化され、BCKDH phosphatase（BDP）による脱リン酸化により活性化される。本研究では、筋組織における BCAA 代謝制御機構の重要性を調べるため、筋組織特異的 BDK 遺伝子欠損マウス：muscle-specific BDK KO（BDK-mKO)マウスを作製し、低タンパク質食摂取による筋組織における変化について解析した。
【方法】 8 週齢の雄性 BDK-mKO マウスと Control マウスにそれぞれ 12 週間、20%タンパク質食(RPD: Regular protein diet)もしくは 8%タンパク質食(LPD ： Low protein diet)を自由摂取させ、各週における体重変化、摂食量を測定した。12 週間の飼育後に屠殺し、血漿および後肢筋（腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋）を採取し、後肢筋重量を測定し、可溶性および不溶性筋原線維タンパク質濃度を測定した。また、タンパク質合成において中心的な役割を担っている mTOR の活性について、Western blotting による S6K1, 4E-BP1 のリン酸化状態を調べた。
【結果】それぞれの群間で体重変化に有意な差は見られず、RPD 群より LPD 群で摂食量が有意に増加したが、Control マウスと BDK-mKO マウス間にその差は認められなかった。また、それぞれの群間で後肢筋とヒラメ筋重量に差は認められなかったが、LPD 摂取により、BDK-mKO マウスの後肢筋における不溶性筋原線維タンパク質濃度が他の群に比べて有意に低下した。さらに、mTOR 活性の指標である S6K1 及び 4E-BP1 のリン酸化率は LPD/BDK-mKO 群において有意に低下した。以上のことから、筋原線維タンパク質濃度の低下は BCAA 代謝亢進に伴う BCAA 濃度低下によるタンパク質合成低下に起因する可能性が示唆された。

branched-chain amino acid, myofibrillar protein, muscle

発表責任者：北浦靖之（ykitaura@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3G009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 食餌中のタンパク質の質の違いが創傷治癒に及ぼす影響

# Effects of types of dietary protein quality on wound healing

○上岡 美沙、山根 拓実、岩槻 健、大石 祐一（東農大応生科）
○Misa KAMIOKA, Takumi YAMANE, Takeru IWATUKI, Yuiti OISI (Tokyo Univ. Agriclture)

【目的】
創は炎症期・増殖期・再構築期を段階的に経て治癒することがわかっている。この治癒過程は栄養状態により、影響を受けることが報告されている。タンパク質栄養の悪化は創傷治癒の遅延を招くことが知られているが、摂取するタンパク質の質の違いが創傷治癒に及ぼす影響は未解明な点が多い。そこで､本研究では､ラット皮膚全層欠損創モデルを用いて､動物性由来の Casein と植物性由来の Gluten が創傷治癒に及ぼす影響を検討した。

【方法】
6 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いて 1 週間の馴致後、Casein 群（20%Casein）及び Gluten 群（20% Gluten）の 2 群に分け 1 週間試験飼育を行った。その後、ラットを除毛し、両側腹部に筋膜まで至る全層欠損創を 2 ヶ所ずつ作製し、創傷被覆材を貼付した。毎日、創洗浄並びに創部の観察を行い、新しい創傷被覆材と交換した。創治癒の評価パラメーターとして肉眼的観察を行った後、創面積を測定した。また、創作製 3 日後にそれぞれの群の創部から滲出液を回収し、群ごとにプールし、サイトカインアレイを用いて解析した。

【結果】
平均摂食量は両群間で有意な差は認められなかったが、体重は試験飼育 3 日目から Casein 群に比して Gluten 群で有意な低下を示した。肉眼的所見及び創面積の比較により、創作成後 5 日目で Casein 群に比して Gluten 群で創治癒に顕著な遅延が認められた。また、滲出液に含まれるサイトカインをサイトカインアレイを用いて解析したところ､炎症を促進させる Interleukin(IL)-1β及び IL-6 量は Casein 群に比して Gluten 群での低下が認められた。また、炎症を抑制する IL-10 量は Casein 群に比して Gluten 群での増加が認められた。

【考察】
以上のことから、Gluten 摂取では、創治癒に必須な炎症が惹起されず、治癒が遅延する可能性が示唆された。

Wound healing, Protein diet, Interleukin

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

発表番号：3G010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 胎児期から成長期おける高脂肪食ならびに食事時間制限がラットの発育に及ぼす影響

# Effect of high fat diet and food restriction during pregnancy and lactation on growth in weaning rat pups

○松本 義信、津崎 智之、小野 章史、松枝 秀二 (川崎医療福祉大臨床栄養)
○Yoshinobu Matsumoto, Tomoyuki Tsuzaki, Akifumi Ono, Syuji Matsueda (Kawasaki University of Medical Welfare)

【目的】近年の疫学研究により Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD, 成人病胎児期発症説)が注目されており、妊娠期間の母体栄養摂取状況が子の出生後の健康に影響を及ぼすことが明らかになってきた。妊娠期・授乳期に母親の食習慣は、生まれてくる子の胎児期・乳児期における栄養供給に影響することが考えられる。さらに離乳後の成長期における子の食習慣によっては、発育のみならず成人期以降の生活習慣病の発症リスクも高まることが考えられる。一方、現在の日本人の食生活における食事内容の変化に伴い総エネルギー摂取量に占める脂肪エネルギー比率が増加しているように、摂取栄養素の偏りが認められる。さらにはライフスタイルの多様化によるバランスよく 1 日 3 食摂取する食生活ではなく、朝食の欠食、就寝前の多量摂取といった食事摂取時間の偏りが認められる。そこで、本研究では妊娠期の母の食事に対して高脂肪食を食事時間制限して与え、そこから生まれてきた仔の食環境も母と同様とした場合に、発育等への影響についてラットを用いて検討した。
【方法】動物は妊娠 1 日目の 10～12 週齢の SD 系雌性ラットを用い、食餌は総エネルギー摂取量に対する脂肪エネルギー比率が 15%の普通食、あるいは 40%の高脂肪食を与えた。また、各食餌に対して、24 時間自由摂取させた群ならびに 4 時間/日に食事時間を制限した群をそれぞれ設けた。離乳後の仔の食餌条件は母と同じ食餌組成ならびに食事摂取時間とし、普通食 24 時間摂取群、高脂肪食 24 時間摂取群、普通食 4 時間摂取群、高脂肪食 4 時間摂取群とした。実験期間は母が仔の離乳完了時まで、仔が生後 7 週齢までとし、その後、採血を行い、臓器、体脂肪組織を摘出した。
【結果】母ラットの体重は妊娠期には食事摂取時間に関わらず普通食に比べて高脂肪食で低値傾向を示し、授乳期には食餌組成に関わらず 24 時間摂取に比べて 4 時間摂取で低値傾向を示した。仔ラットの体重は食餌組成に関わらず 24 時間摂取に比べて 4 時間摂取で有意に低値を認めた($p<0.001$)。体脂肪率(%)は食餌組成に関わらず 24 時間摂取に比べて 4 時間摂取で有意に低値を認めた($p<0.05$)。血清グルコース濃度は 4 群間に有意差を認めなかったが、血清トリグリセライド濃度は食餌組成に関わらず 24 時間摂取に比べて 4 時間摂取で有意に低値を認めた($p<0.01$)。肝臓トリアシルグセライド量は有意差を認めなかったものの、食餌組成に関わらず 24 時間摂取に比べて 4 時間摂取により低値傾向を示した。以上より、本研究では、仔ラットの発育には食餌組成の違いよりも食事摂取時間を制限することの方が大きい影響があると示唆された。

weaning pup, high fat diet, food restriction

発表番号：3G011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Human vaginal lactobacilli inhibit the inflammation by lipopolysaccharide stimulation through modulation of toll-like receptor expression

○Keiuske Tobita, Itsuki Watanabe (KITII Co., Ltd.)

**Purpose:** Lactobacilli are predominant in the normal human vaginal microbiota[1]. Vaginal lactobacilli (VLB) spread from the mother to the infant during vaginal delivery[2]. However, the effects of VLB on infant intestinal function remain unclear. This study investigated the probiotic function of VLB and the immune effects of VLB on human intestinal epithelia cells.

**Materials and methods:** The human VLB *Lactobacillus* (*Lb.*) *acidophilus, Lb. crispatus, Lb. gasseri, Lb. jensenii,* and *Lb. vaginalis* were obtained from the Japan Collection of Microorganisms (JCM). The INT-407 human embryonic intestinal epithelial cell line was used in this study. Cytokine levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expressions of toll-like receptors (TLRs) on cells were determined using flow cytometry.

**Results and discussion:** VLB survived the artificial gastric juice and adhered to INT-407 cells. Interleukin-8 produced by INT-407 cells on lipopolysaccharide (LPS) stimulation decreased with *Lb. gasseri* and *Lb. crispatus*. Moreover, TLR4 expression on INT-407 cells on LPS stimulation decreased with *Lb*. *gasseri* and *Lb. crispatus*. These results suggest that VLB suppresses inflammation on LPS stimulation through the down-regulation of TLR4 expression in human intestinal epithelia cells.

1) Petricevic *et al*., Sci. Rep., 4, 3746. doi: 10.1038/srep03746 (2014).
2) Matsumiya *et al*., J. Infect. Chemother., 8, 43-49 (2002).

vaginal lactobacilli, INT-407 cell, toll-like receptor

発表責任者：Tobita Keisuke（keisuke_tobita@kitii.co.jp）

発表番号：3G012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 老化モデルマウスを用いた加齢依存的な味覚嗜好性変化の解析

# Analysis of age-dependent change in taste preferences using senescence-accelerated mice

○幸田 理恵、成川 真隆、三坂 巧（東大院農生科・応生化）
○ Rie KOHTA, Masataka NARUKAWA, Takumi MISAKA (Dept.Appl.Biol.Chem., The Univ.Tokyo)

【背景と目的】高齢者の食生活を豊かにすることは、健康寿命を延ばすために重要である。食の好みは加齢とともに変化することが経験的に知られているが、どの味質がどの程度変化するかという定量性に関する統一的な見解は得られていない。また、どのように味嗜好性の変化が生じるかについてもその詳細は不明である。本研究では、老化促進モデルマウス SAMP1 を用い、加齢に伴う味嗜好性の変化を評価することを目的とした。マウスは系統により味感受性が著しく異なることが知られていることから、まず SAMP1 マウスの味覚表現型を C57BL/6J（B6）マウスと比較した。続いて、SAMP1 マウスの加齢依存的な味嗜好性の変化を観察した。
【方法】実験動物として、B6 と SAMP1 系統の雄性マウスを使用した。B6 マウスは味覚研究に頻用される系統である。SAMP1 マウスは一般的なマウスと比較し、寿命が約 2/3 と短命なフェノタイプを示す。味嗜好性評価は(1)5 秒間に味溶液を舐めた回数から嗜好率を算出するリッキング法と、(2)水と味溶液を 48 時間提示し、各々の飲水量の比率から嗜好性を算出する 48 時間二瓶選択法を行い、両者をもって比較した。味溶液として、デナトニウム（苦味）、クエン酸（酸味）、スクロースとサッカリン（甘味）、グルタミン酸 Na＋イノシン酸 Na（旨味）と NaCl（塩味）の五基本味を用いた。また、味蕾における味細胞マーカー分子の発現を免疫染色法により観察した。
【結果】8 週齢の B6 マウスと比較して、同週齢の SAMP1 の基本味に対する嗜好性は、苦味、酸味、塩味溶液に対して有意な変化を示したが、各味溶液に対して濃度依存的に嗜好性の変化が認められた。また、味覚マーカー分子の発現パターンに B6 と明確な差は認められなかった。したがって、SAMP1 マウスは全ての基本味に対する感受性を有すると考えられた。続いて、SAMP1 の経時的な味嗜好性変化を評価した。SAMP1 は高齢になるにつれて、苦味・酸味に対する忌避性が強まる一方で、旨味・甘味に対する嗜好性が上昇する傾向が観察された。現在、より高齢の SAMP1 を用いた味嗜好性を測定している。本大会ではその結果も合わせて報告する予定である。
本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

aging, taste preference, senescence-accelerated mice

発表番号：3G013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# NMDA 型グルタミン酸受容体に対する日本酒成分の効果

# Effects of components of sake on the NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptors

○矢吹 智[1]、則包 潔人[1]、上村 勇貴[1]、伊豆 英恵[2]、山田 康枝[1] ([1]近畿大工、[2]酒類総合研究所)
○Tomo YABUKI[1], Kiyoto NORIKANE[1], Yuki UEMURA[1], Hanae IZU[2], Yasue YAMADA[1] ([1]Kinki Univ., [2]Natl. Res. Inst. of Brewing.)

【緒言】NMDA 型グルタミン酸受容体（NMDA 受容体）は脳に多く存在し，高い Ca2+透過性を有するイオンチャンネルのひとつである．神経可塑性の中心的役割を担い，記憶形成，学習，運動等に深く関与しており，認知症や神経疾患などの病気の原因にかかわりのある受容体である．NMDA 受容体で作用する物質は神経疾患の治療と研究に利用可能である．日本酒は古来より飲用され 1000 種類以上の物質が含まれているが，その物質と生理活性は不明な点が多い．日本酒成分の生理活性を知るために、成分の分析を行い，日本酒成分である isoamylamine や 2-phenylethylamine といったアミンが NMDA 受容体に対し効果を示すことを報告してきた．今回，さらに NMDA 受容体の 4 つあるサブタイプのうち，脳の大脳皮質や海馬に多く存在する GluN1/GluN2A，GluN1/GluN2B 受容体に対する日本酒成分の効果とその精神作用についてもマウスを用いた行動実験で検討した．
【実験方法】マウス NMDA 受容体の GluN1，GluN2A 及び GluN2B サブユニットの mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞にインジェクションし，20℃で 24～48 時間インキュベートし発現させたものを受容体活性測定に使用した．膜電位を－70mV に固定し，二電極膜電位固定法によりグルタミン酸とグリシンをリガンドとして活性測定を行った．今回，純米酒を A 画分（酸等），R 画分（中・酸性アミノ酸，ペプチド等），C 画分（塩基性アミノ酸，ペプチド等），N 画分（糖等）にイオン交換樹脂を用いて分画し，各画分をメタボローム解析し，含有量が多かった成分のうち，C 画分 4 の成分（trimethylamine N-oxide，ornithine，betaine，chorine）と A 画分の 3 成分（5-oxoproline，cysteic acid，N-acetylglutamic acid（NAG））の単独活性とグルタミン酸 100 μM/グリシン 100 μM 存在下での NMDA 受容体活性への効果を検討した．また，マウスに NMDA 受容体に対して高い阻害効果を示した日本酒成分を腹腔内投与し，抗不安作用を検討するために高架式十字迷路試験を行った．
【結果と考察】７種の成分を比較検討した結果，どの成分もグルタミン酸 100 μM/グリシン 100 μM の活性(100%)に対し 13%以下であったが，単独活性がみられた．trimethylamine N-oxide は，GluN2A と GluN2B 受容体に対して活性化効果を示した．ornithine，choline，5-oxoproline，cysteic acid，NAG は，両受容体に対して阻害効果を示した．betaine は，2B 受容体に対し阻害効果を示したが，2A 受容体に対しては活性化効果を示した．高架式十字迷路試験では 2-phenylethylamine で有意に抗不安効果が見られた．以上の結果から，日本酒中には NMDA 受容体活性及び精神活動に影響を与える物資が多く存在することが示された．

N-methyl-D-aspartate receptors, sake, amine

発表番号：3G014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ミツバチ類の化学コミュニケーションと、ヒト社会の健康に関する科学コミュニケーション。
# Social behaviour of honeybee and human science communication.

○笹川 浩美[1,2,3] ([1]学校法人　跡見学園、[2]（公財）JSF・科学技術館、[3]（独）科学技術振興機構・さきがけ研究 21)
○Hiromi SASAGAWA[1,2,3] ([1]Atomi Gakuen, [2]JSF, [3]JST)

ニホンミツバチ働き蜂の成虫には、吸血性寄生ダニの 1 種であるミツバチヘギイタダニを、噛み取って捨てるという衛生グルーミング行動が認められる。ミツバチ類は、加齢に伴う分業を行い、高い学習記憶能力や高度なニケーション能力を持つ社会性昆虫の一種である。昼間も薄暗い巣の中で、異個体間に寄生しているダニをどのように見つけるのか？。

上記の疑問を化学生態学的に調べたところ、ダニの持つ化学物質が働き蜂の異個体間グルーミング行動の解発因子になっていることがわかってきた。ミツバチ類は、化学コミュニケーションを発達さたことで、個体の健康を維持できるばかりでなく、集団の存続維持につながり、さらには激しく変化する地球環境に適応してきたと考えられる。社会性動物の異個体間のコミュニケーションは、大変興味深い。

一方、ヒトの社会では、科学コミュニケーションが必要とされている。科学コミュニケーションとは、最先端の科学や科学技術などを、国民にわかりやすく正確に伝える多方向型のコミュニケーションを指す。演者らは、今までに震災復興支援や環境保護・科学技術などに関する科学コミュニケーションプログラム（SCP）を作成し、博物館や科学館・教育施設などで実施してきた。ミツバチの社会では、異個体簡コミュニケーションがコロニー間の健康維持に役立っていることから、ヒト社会の健康や健康の維持に関する科学コミュニケーションに注目し SCP を立ち上げた。今回は、外傷性亜急性尺骨神経絞扼性障害に焦点をあて、骨折など身近に潜む意外な問題を報告する。

science communication, social behaviour, human health

発表責任者：笹川浩美（sasagawahiromi@aol.com）

発表番号：3G015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マグネシウム摂取不足が骨代謝に及ぼす影響の包括的検討

# Comprehensive study of the effect of magnesium deficiency on bone metabolism

○矢後 拓己[1]、生貝 咲貴[1]、石島 智子[1]、阿部 啓子[1,2]、岡田 晋治[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○Takumi YAGO[1], Saki IKEGAI[1], Tomoko ISHIJIMA[1], Keiko ABE[1,2], Shinji OKADA[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]KAST)

【背景・目的】生体内マグネシウム（Mg）の 60%は骨に存在しており、その構成成分として、またミネラル代謝においても重要な役割を果たしている。Mg 欠乏食をラットに投与した実験では、骨形成の抑制と骨吸収の促進により骨密度・骨強度の低下が引き起こされると言われている。また、Mg は生体内で多くの生理的・生化学的作用に関与している事から、Mg 欠乏は上記以外にも何らかの影響を骨代謝に与えている事が推察されるが、その詳細については十分に明らかになっていない。そこで本研究では、Mg 欠乏食を投与したラットの大腿骨について DNA マイクロアレイ解析を行い、Mg の摂取不足が骨代謝に及ぼす影響を遺伝子レベルで包括的に理解する事を目的とした。
【方法】被験動物に 3 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。飼料は AIN-93G 飼料組成を基に作製し、Mg 欠乏食は Mg 給源の酸化 Mg を除いて作製した（Mg 濃度：0.004%）。18 匹のラットを正常食（Mg 濃度：0.05%）で 7 日間の予備飼育後に 3 群に分けた（n=6）。正常食（C）又は Mg 欠乏食（MD）を自由摂食させた群、MD 群が摂取した量と同量の正常食を投与したペアフィーディング（PF）群とし、それぞれの飼料を 28 日間投与した。解剖直前の 24 時間尿を採取し、解剖時には血液の採取と大腿骨の摘出を行った。血清中ミネラル濃度、血清中及び尿中の骨代謝マーカー量を測定した。摘出した大腿骨については骨密度・骨強度の測定、そして DNA マイクロアレイ解析を行った。
【結果】PF 群に対して、血清中 Mg 濃度は MD 群で有意に低下しており、Mg 欠乏食投与により Mg 欠乏状態が引き起こされている事を確認した。骨代謝マーカーについては、MD 群で骨形成マーカーは低下し、骨吸収マーカーは増加していた。大腿骨については、骨梁及び皮質骨の密度が MD 群で低下していた。また、骨強度の指標となる最大荷重及び破断エネルギーが MD 群で低下していた。これらの結果から Mg 欠乏状態では、骨形成の低下及び骨吸収の増加により骨密度・骨強度の低下が引き起こされる事が本実験でも確認できた。そこで MD 群と PF 群で DNA マイクロアレイ解析を行った。階層的クラスター解析の結果、MD 群と PF 群それぞれでクラスターを形成し、Mg 欠乏は大腿骨の遺伝子発現に大きく影響を与える事が示された。発現変動を示した遺伝子の詳細については現在解析中である。
【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号 14533567）「次世代農林水産業創造技術」（農研機構生研センター委託研究）によって実施されました。

bone metabolism, magnesium deficienc, dna microarray

発表番号：3G016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ビタミンE欠乏がストレプトゾトシン誘導性糖尿病ラットの不安行動に及ぼす影響

# Effect of vitamin E deficiency on anxiety-like behavior in streptozotocin-induced diabetic rats

○遠藤 駿、竹中 麻子（明大・農・農化）
○Shun ENDO, Asako TAKENAKA (Meiji Univ.)

【背景・目的】

我々はこれまでにビタミン E（VE）欠乏によりラットの不安行動が増加すること、不安行動増加が副腎除去で消失することからグルココルチコイド分泌亢進が不安増加に重要であることを報告してきた。さらに VE 欠乏によるグルココルチコイド分泌亢進は急性および慢性の身体的ストレスにより促進されることから、VE 欠乏による不安行動増加はストレス下において特に顕著に表れる可能性を示した。本研究では、糖尿病時の不安行動に VE 欠乏がおよぼす影響を、streptozotocin（STZ）誘発性Ⅰ型糖尿病モデルラットを用いて検討した。糖尿病はヒトにおいても精神疾患の発症リスクを増加させることが示されており、VE 欠乏は糖尿病時の不安行動をさらに増加させるのではないかと予想した。

【方法】

5 週齢 Wistar 系雄性ラットに 20 時間絶食下で STZ（60 mg/kg）あるいは Vehicle（Veh）としてクエン酸バッファー（50 mM、pH4.5）を腹腔内投与し、I 型糖尿病モデルラットを作製した。STZ 投与翌日から AIN93G に準じた対照食（CON）あるいは VE を含まない欠乏食（E-）を与えて 2 週間飼育した。実験食による飼育 14、15 日目に高架型十字迷路（EPM）試験による行動解析を行い、行動指標として総移動距離、open arm 活動量、head dipping, stretch out の行動量を測定した。

【結果・考察】

STZ 投与群で Veh 投与群と比較して飲水量、摂食量は増加したが、体重増加が有意に抑制された。これらの結果から、STZ 投与群における糖尿病の発症を確認した。一方で上記の結果に VE 欠乏の影響は認められず、2 週間の VE 欠乏は STZ による糖尿病の進行には影響を及ぼさなかった。EPM 試験において、STZ 投与群では Veh 投与群と比較して迷路上での総移動距離が有意に低下した。また、open arm への侵入回数の割合は変化しなかったが、open arm 滞在時間の割合が低下する傾向にあった。これらの測定項目において VE 欠乏の影響は認められず、本研究の結果では、2 週間の VE 欠乏食摂取は糖尿病時の不安増加を増長しなかった。ビタミン E 欠乏と糖尿病はいずれも不安行動を増加させる要因であるが、STZ 糖尿病モデルでは糖尿病による不安増加効果がビタミン E 欠乏よりも強くあらわれることが示された。

vitamin E, anxiety, diabetes

発表番号：3G017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

母マウスの choline 欠乏食が仔の肝臓中 choline 代謝、および遺伝子発現に与える影響
Maternal choline deficiency affects offspring health
○宮地 佑希野[1]、佃 慶子[1]、齊藤 亜佑美[2]、橋本 貴生[1]、加藤 範久[1]、矢中 規之[1]([1]広島大 生物圏科学、[2]広島大 生物生産)
○Yukino MIYACHI[1], Yoshiko TSUKUDA[1], Ayumi SAITO[2], Takao HASHIMOTO[1], Norihisa KATO[1], Noriyuki YANAKA[1] ([1]The Graduate School of Biosphere Sci.,Hiroshima Univ., [2]Faculty of Applied Biological Sci.,Hiroshima Univ.)

【研究背景】choline はリン脂質合成や神経伝達物質の合成だけでなく、メチル基の供給源として重要な栄養素である。特に、choline は胎児期から新生児期、成長期にかけて、母体から産仔への持続的、かつ活動的に輸送される重要な栄養素であると捉え、胎児期から、新生児期において母マウスに choline 欠乏食を負荷し、授乳された仔マウスの肝臓中 choline 代謝、遺伝子発現応答を解析した。さらに、産仔の choline 欠乏に対する組織応答について性差に関しても検討した。妊娠期、および授乳期における choline 供給の栄養学的重要性について情報を得ることを研究目的とした。【方法】10 週齢の雌性 ICR マウスを交配させ、妊娠日を day1 とし、day1 から choline 欠乏の AIN93G を摂取させた choline 欠乏食群(D1 群)、day11 から choline 欠乏の AIN93G を摂取させた choline 欠乏食群(D11 群)、AIN93G を摂取させた正常食群(C 群)として飼育を行った。生後 21 日で離乳後、引き続き choline 欠乏食、あるいは正常食で飼育を続け、生後 35 日で血漿中 AST、トリグリセリド、グルコースを分析した。また、肝臓より Bligh-Dyer 法で水溶性、および脂溶性画分を調製し、LC/MS 法によって choline 代謝物の測定を行った。肝臓より total RNA を調製し、DNA microarray 法により遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現の変動の認められた Elovl3 は、レトロウイルス法を用いて 3T3-L1 細胞に形質導入した。【結果、考察】各組織重量に有意な変動は認められなかったが、血漿トリグリセリドは C 群に比べ D1 群の雄仔で有意に増加していた。仔マウスの肝臓での choline、glycerophosphocholine(GPC)、phosphocholine、phosphatidylcholine(PtdC)は choline 欠乏による変化は認められなかったが、betaine は、C 群に比べ D1、および D11 群の雄仔で著しく減少しており、choline 欠乏群の雄仔において、betaine 変化の生理学的意義が示唆された。DNA microarray 解析の結果、choline 欠乏食群(D1)群で有意に発現が上昇した肝臓遺伝子の中から、リン脂質トランスポーターである PtdC transfer protein(PC-TP)、脂肪酸代謝関連遺伝子 Elovl3 に着目した。Real-time PCR 解析の結果、雌雄ともに PC-TP の choline 欠乏食群での発現上昇が認められたが、Elovl3 は雌仔においてのみ発現が上昇し、遺伝子応答に性差が認められた。PC-TP 遺伝子は、酵母において PtdC を分解する phospholipase を活性化し、細胞内の GPC 生成に関与することが示唆されており、リン脂質からの choline 供給への関与が示唆された。また、Elovl3 の発現上昇から choline 代謝と脂質代謝との関連性が示唆され、Elovl3 は小胞体様での局在が示されており、今後、Elovl3 の発現が肝細胞へ及ぼす影響についても解析する予定である。

choline, maternal, offspring

発表責任者：宮地　佑希野（m155037@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：3G018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# アデノシンの糖代謝への影響

# Effect of adenosine on glucose metabolism

○鳥羽 裕太郎、滝森 美穂、伊藤 由華、吉田 智美、清水 誠、服部 一夫、只石 幹（東農大・応生科・栄養）
○Yutaro TORIBA, Miho TAKIMORI, Yuka ITO, Satomi YOSHIDA, Makoto SHIMIZU, Kazuo HATTORI, Miki TADAISHI (Tokyo University of Agriculture)

【目的】アデノシンはプリンヌクレオシドの一種であり、細胞外ではアデノシン受容体に結合することによって組織の代謝機能を制御するシグナル伝達物質として働く。また、肝臓と骨格筋の初代培養細胞を用いた実験からアデノシン受容体を介したシグナルが糖代謝に関与することが報告されている。しかしながら、生体内のアデノシンが糖代謝へ及ぼす影響は明らかとなっていない。そこで、本研究ではアデノシンがマウスの糖代謝へ与える影響について検討した。
【方法】8 週齢雄性 C57BL/6J マウスに PBS またはアデノシン（10、25、50 mg/kg body weight）を皮下投与した。投与前と投与後 30、60、90 分において尾静脈から採血し血糖値を測定した。また、アデノシン 25 mg/kg body weight を投与した 30 分後に解剖を行い、肝臓と骨格筋を採取した。そして、採取した肝臓と骨格筋中のグリコーゲン量を測定した。また、リアルタイム PCR 法で肝臓における糖新生関連酵素とその転写調節因子の遺伝子発現を検討した。
【結果・考察】アデノシンの皮下投与は血糖値を濃度依存的に上昇させた。また、アデノシン皮下投与による血糖値上昇のピークタイムであった投与 30 分後において、肝臓中のグリコーゲン量は有意に減少した。一方で、骨格筋では変化はなかった。これらのことから、アデノシンは血糖値の上昇を誘導し、その作用機序の一つは肝臓のグリコーゲン分解であると推定された。肝臓において、糖新生関連酵素の転写調節因子である Foxo1 と PGC-1α の遺伝子発現はアデノシン投与により有意に増加し、それらの標的遺伝子である G6Pase と PEPCK の mRNA 発現も有意に増加した。加えて、アデノシン投与群では、オーファン核内受容体の NR4A ファミリーである Nur77、Nurr1、NOR1 の mRNA 発現が肝臓で有意に増加した。そして、Nur77 の標的遺伝子である FBPase の遺伝子発現も有意に増加した。NR4A ファミリーの発現上昇は肝臓の糖新生を誘導することが報告されている。また、FBPase は糖新生の律速酵素の一つである。これらのことより、アデノシン投与は肝臓の糖新生にも影響する可能性が示唆された。以上より、マウスへのアデノシン皮下投与は、肝臓においてグリコーゲン分解を介した血糖値の上昇と、糖新生関連遺伝子の発現増加を誘導することが示された。

Adenosine, Glucose metabolism, Glycogenolysis

発表番号：3G019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 体内時計を利用してマウスに肥満を誘導する飼育法

# Jet lag breeding induces obesity in C57BL/6J mice using a normal diet

○大池 秀明、桜井 睦、一法師 克成、小堀 真珠子（食総研/農研機構）
○Hideaki OIKE, Mutsumi SAKURAI, Katsunari IPPOUSHI, Masuko KOBORI (NFRI/NARO)

【背景】 地球上の多くの生物には内因性概日リズム（体内時計）が備わっており、エネルギー代謝やホルモン分泌を始めとする様々な生理機能が日内変動を示す。体内時計リズムを生み出す時計遺伝子は、脳の時計中枢（視交叉上核）のみならず、ほとんどの末梢組織においても発現しており、末梢体内時計を形成している。中枢時計は光環境による 24 時間サイクルに同調するが、末梢時計は食事時刻による 24 時間サイクルに同調し、エネルギー代謝の概日変動に大きく影響している。故に、全身における概日リズムの調和が乱れるとエネルギー代謝に異常が起きると考えられ、実際にヒトの疫学調査から、シフトワークや不規則な食生活（朝食抜きや夜食摂取など）は肥満のリスクを増大させることが報告されている。しかしながら、不規則な生活や食事が肥満を引き起こすメカニズムについては不明な部分が多く、その解明のために、モデル動物が利用できると有効である。ここでは、汎用性の高い C57BL/6J マウスと通常飼料を利用して、光環境や食事リズムの乱れによって肥満が誘導されるモデル実験系について検討した。

【方法・結果】 下記のいずれの実験においても、若齢の C57BL/6J マウス（オス）と、通常飼料（MF; オリエンタル酵母工業）を利用した。

実験１． これまでに、高脂肪食を休息期（明期）のみに与えた場合は、活動期（暗期）のみに与える場合よりも体重が増加することが知られている。ここでは、通常飼料と可動式餌箱を設置した飼育ケージを利用し、明期もしくは暗期の 12 時間のみ食餌にアクセス可能な 12 時間時刻制限給餌を行った。高脂肪食の知見と同様に、最初の 2 週間ほどで、明期のみの食餌群は、暗期のみの食餌群と比較して有意に体重が増加した。しかし、飼育を長期間続けると体重差は徐々に減少し、4 ヶ月後には、有意差が消失した。このことから、光サイクルと食餌サイクルのずれは、短期的には肥満を誘導するが、長期的には肥満が持続しないことが明らかとなった。

実験２． 通常 12:12 時間で特定の時刻（7:00-19:00 明期）に固定している明暗サイクルを、定期的に週 2 回 6 時間ずつ前進させる時差ボケ光環境で飼育した。その結果、時差ボケ光環境の開始から 2 週間以内に、通常の光環境下で飼育しているコントロール群と比較して有意に体重が増加し、3 ヶ月以上継続的に体重差が増加し続けることが明らかとなった。一方、同様に時差ボケ光環境下で飼育しているマウスの食餌時刻を、特定の 12 時間に固定した食餌時刻固定群は、自由摂食群と比較して摂食量は低下しないが、肥満の誘導が認められなかった。このことから、時差ボケ光環境は肥満を誘導し、それは食餌時刻の乱れに起因することが示唆された。

実験３． 実験２と類似して、時差ボケ光環境を週 2 回 6 時間ずつ後退させて飼育する実験を現在行っており、結果は本大会で報告する。

circadian clocks, obesity, mouse

発表責任者：大池秀明（oike@affrc.go.jp）

発表番号：3G020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Wnt シグナルを介する間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化制御

# Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts through Wnt signaling

○鬼丸 祐二[1]、谷口 実由紀[1]、田中 牧[1]、鋳方 綾香[1]、細田 明美[2]、金 東浩[1]、佐伯 茂[1]([1]大阪市大院・生活科学・生体情報、[2]東京医療保健大・医療栄養)
○Yuji ONIMARU[1], Miyuki TANIGUCHI[1], Maki TANAKA[1], Ayaka IKATA[1], Akemi HOSODA[2], Dong-Ho KIM[1], Shigeru SAEKI[1] ([1]Lob. of Mol. Biochem. Nutr.,Osaka City Univ., [2]Faculty of Healthcare,Tokyo Health Care Univ.)

【目的】骨髄に存在する間葉系幹細胞は，骨芽細胞や脂肪細胞など多様な細胞種に分化する能力を有する。しかし，糖尿病，肥満症，骨粗鬆症などの病態では分化のバランスが破綻し，骨芽細胞の分化が抑制され，脂肪細胞の分化が亢進する。分泌性糖タンパク質 Wnt は間葉系幹細胞の分化に大きく関与し，骨芽細胞への分化を誘導し，脂肪細胞への分化を抑制する。Wnt ファミリーには 19 種が知られ，線虫やショウジョウバエから哺乳類に至るまで生物種を超えて広く保存されている。Wnt によって活性化されるシグナル経路は， canonical 経路と non-canonical 経路に大別される。canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled と共受容体 LRP5/6 に結合すると， β-catenin が GSK3β によるユビキチン化を受けずに核内に移行して TCF を活性化する経路である。一方，non-canonical 経路は，Wnt が Wnt の受容体 Frizzled に結合するシグナル経路であり，この経路は β-catenin 非依存的な経路であると考えられている。本研究では，間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化機構に果たす canonical 経路と non-canonical 経路の役割について検討した。
【結果と考察】マウス骨髄由来間葉系細胞である ST2 細胞は，canonical 経路を活性化する Wnt3a で培養すると，TCF 活性が亢進し，骨芽細胞に分化した。一方，ST2 細胞は，non-canonical 経路を活性化する Wnt5a で培養しても骨芽細胞に分化しなかった。Wnt3a による骨芽細胞への分化は，細胞質での β-catenin のユビキチン化を誘導する GSK3β の阻害剤, 核内での β-catenin/TCF 結合の阻害剤，および β-catenin siRNA によって抑制された。これらの結果は，Wnt3a による骨分化は，canonical 経路を介する TCF の活性化によって誘導すると考えられた。しかし, Wnt3a 非存在下で，GSK3β によるユビキチン化を受けない活性型 β-catenin をトランスフェクションすると TCF 活性は亢進したが，ST2 細胞は骨芽細胞に分化しなかった。以上のことから，ST2 細胞から骨芽細胞への分化には，canonical 経路を介する TCF の活性化と共に、TCF 以外の因子が関与すると推定した。

Wnt, osteoblast

発表番号：3G021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 摂食時間制限がエネルギー代謝、肥満に及ぼす影響の解析

# The effect of time-restricted feeding on the energy metabolism and obesity in high fat diet fed mice.

○小島 貴之[1]、船戸 里香[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2]([1]日本大・生資科・生命化、[2]日本大院・生資科・応用科)
○Takayuki Kojima[1], Rika Funado[2], Takashi Hosono[1,2], Taiichiro Seki[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Grad. School)

＜目的＞近年、健康意識の向上により成人の 1 日の平均摂取カロリーは、戦時中と比較しても減少している。一方、肥満や糖尿病患者数は相反的に増加している。これらの原因として、1 日の活動時間が延長したこと、夜型のライフスタイルへの移行などがあげられている。すなわち、何をどれだけ食べるかに加えて、いつ食べるかが非常に重要な要因であると考えられる。そこで摂食タイミングと肥満の関係に着目し、本研究では摂食時間制限がエネルギー代謝、体重、白色脂肪組織重量におよぼす影響について基礎的な検討を行った。
＜方法＞4 週齢 C57BL/6J 雄性マウスを暗期 8:00～20:00 (ZT12～24)、明期 20:00～8:00 (ZT0～12)の飼育室で 2 週間予備飼育した。その後、60%脂質含有高脂肪食 High Fat Diet (HFD, D12492, Research Diets)を自由に摂食させる群と、暗期 8 時間のみに摂食を制限する群 (ZT12～ZT20)の 2 群に分けて試験を実施した。本試験期間中は、エネルギー代謝測定装置（コロンバス社:Oxymax 等流量システム）による呼気ガス分析と、自発運動量の測定（メルクエスト社:ケージ設置型運動量測定装置 LOCOMO)、経口ブドウ糖負荷試験 (OGTT; Oral Glucose Tolerance Test)を行った。本試験終了時 ZT20 に、血液、肝臓、白色脂肪組織を採取し、各種血液生化学的解析および組織学的解析を実施した。
＜結果＞摂食時間制限群は、自由摂食群と比較して体重と白色脂肪組織重量が有意に低値を示した。また、自由摂食群では耐糖能異常が認められた。血漿および肝臓における中性脂肪、総コレステロール量も自由摂食群と比較して摂食時間制限群で有意に低値を示した。正常マウスは明期に脂質、暗期に糖質を酸化するが、自由摂食マウスではこれらの酸化リズムの変調がみられ、摂食制限は肥満によって攪乱される代謝リズムを正常化し、酸素・二酸化炭素消費量および活動量を有意に増加させた。
＜結語＞摂食時間制限は脂質、糖質の代謝リズムを正常化し、主に白色脂肪組織重量の増加や肝臓および血中の脂質蓄積を抑制することによって、肥満や耐糖能異常を改善する可能性が明らかになった。

energy expenditure, high fat diet, respiratory exchange ratio

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3G022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# プラスミン阻害剤がラット部分肝切除モデルの肝再生に及ぼす影響

# The effect of plasmin(ogen) inhibitor on the liver regeneration in partial hepatectomy rat model.

○三浦 徳[1]、山口 朋美[2]、小泉 洸太[2]、細野 崇[1,2]、関 泰一郎[1,2] ([1]日本大院・生資科・応生科、[2]日本大・生資科・生命化)
○Atsushi MIURA[1], Tomomi YAMAGUCHI[2], Kouta KOIZUMI[2], Takashi HOSONO[1,2], Taiichiro SEKI[1,2] ([1]Nihon Univ. Grad. School, [2]Nihon Univ.)

【背景・目的】血液の流動性は凝固系と線溶系のバランスにより厳密に制御されている。線溶系は、血管内における血栓の分解・除去以外にも細胞外マトリクスの分解、増殖因子やシグナル伝達系の活性化を介して、腫瘍細胞の浸潤・転移や創傷治癒、炎症応答をはじめとする多様な生理現象にも深く関与している。血管外における線溶機能は、細胞線溶と呼称され、細胞周囲あるいは組織内に限局したプロテアーゼ活性により発揮される。肝臓は薬物やウイルスによる障害、物理的な損傷を受けても、分化機能を維持したまま著しい再生能力を発揮する。これまでに演者らは、線溶阻害酵素 Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor が肝再生に対して抑制的に働くことを 2/3 部分肝切除および四塩化炭素誘導急性肝障害モデルラットを用いて明らかにした（Okumura N et al., 2009, JBC)。本研究では、ラット部分肝切除モデルにおける線溶系の薬理学的阻害が肝再生に及ぼす影響について検討した。
【方法】Wistar ラット（オス、6-8 週齢）の背部皮下に線溶阻害剤 Tranexamic acid（TXA)を徐放する浸透圧ポンプ（3.6 mg/day/rat）を移植した。同時に TXA（20 mg/ml）を添加した飲料水を給与した。Vehicle 群には PBS を包含するポンプを移植し、滅菌水を給与した。TXA 投与開始 24 時間後に 70%部分肝切除術を施した。また、対照として偽手術群を設定した。肝切除後、168 時間まで経時的に肝臓および血液を採取し肝障害、肝機能マーカーとして血漿 ALT, AST 活性およびアルブミン濃度を測定した。肝再生は肝体重比および肝重量によって評価し、肝細胞増殖の指標として Proliferating cell nuclear antigen（PCNA）を western blotting により解析した。
【結果】部分肝切除後の肝臓重量もしくは肝体重比は、両群共に術後 168 時間にかけて増加し、術後 24, 48 時間においては Vehicle 群と比較して TXA 群で有意に低値を示した。これらの成績とよく一致して、肝臓における PCNA タンパク質の発現は、TXA の投与により肝切除後 24 時間において低値を示した。一方、血漿 ALT, AST 活性ならびにアルブミン濃度には TXA の投与は影響を及ぼさなかった。
【結論】TXA の投与による線溶系の阻害は、肝再生を遅延させることが明らかとなった。

Fibrinolysis, Liver regeneration, Tranexamic acid

発表責任者：関泰一郎（tseki@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：3G023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# PCTK3/CDK18 は FAK1 を抑制して細胞形態を制御する

# PCTK3/CDK18 regulates the cell morphology through surpression of FAK1

○松田 真弥、宮本 賢治、辻 明彦、湯浅 恵造 (徳島大院 STS)
○Shinya Matsuda, Kenji Miyamoto, Akihiko Tsuji, Keizo Yuasa (Tokushima Univ)

PCTAIRE kinae 3 (PCTK3)は CDK ファミリーに属する Ser/Thr kinase であり、他の CDK とは異なり、組織選択的な発現パターンを示すことから、細胞周期制御以外の生理機能を発揮することが推測されている。CDK ファミリーの中で PCTK3 と最も配列相同性の高い PCTK1 は、神経軸索の伸長や精子形成、インスリンの分泌などに関与することが報告されているが、PCTK3 の生体内における役割は謎に包まれたままである。最近、我々は PCTK3 の活性化因子として cyclin A 及び PKA を同定し、その活性調節機構を明らかにした。さらに、内在性 PCTK3 の発現が認められる HEK293T 細胞を用いてノックダウン解析を行ったところ、PCTK3 siRNA を導入した細胞では、細胞形態が変化すると共に、細胞膜辺縁に F-actin の凝集が観察された。また、PCTK3 ノックダウン細胞ではアクチン脱重合因子である cofilin のリン酸化が亢進していたことから、PCTK3 はアクチン動態を調節して細胞の形態形成に関与する可能性が示された。そこで、本研究は PCTK3 によるアクチン動態及び細胞形態制御機構を解明することを目的とし、PCTK3 ノックダウンによる細胞機能への影響及び、その下流シグナル伝達機構の解析を行った。まず初めに、PCTK3 ノックダウンによる細胞形態の変化を定量的に調べた。その結果、コントロール細胞と比較して、1 細胞あたりの細胞面積の増加が認められた。また、細胞遊走への影響を調べたところ、PCTK3 ノックダウン細胞において細胞遊走が促進されることが明らかとなった。加えて、ROCK 特異的阻害剤である Y27632 処理によって PCTK3 ノックダウンによる cofilin のリン酸化の増加が抑えられたことから、PCTK3 は RhoA/ROCK シグナル伝達経路の調節を介して細胞運動制御に関わる可能性が考えられた。そこで、RhoA 及び Rac1 の活性を調べた結果、PCTK3 ノックダウンによって RhoA 活性が増加するのに対して、Rac1 活性は減少し、PCTK3 は RhoA を特異的に負に制御していることが考えられた。さらに、PCTK3 ノックダウンが RhoA/ROCK の上流因子に及ぼす影響を調べた。その結果、PCTK3 をノックダウンすることによって、非受容体型チロシンキナーゼである focal adhesion kinase 1 (FAK1)の活性が上昇することを見出した。FAK1 は細胞接着分子であるインテグリンと結合することで下流にシグナルを伝達し、RhoA などの低分子量 GTP ase の活性調節を介して細胞形態や運動の制御を担っていることが知られている。以上のことから、PCTK3 は FAK1 活性を抑制することによってアクチン動態及び細胞形態を制御していることが推測され、現在、その抑制機構の解明を行っており、併せて報告したい。

PCTK3/CDK18, FAK1, cell morphology

発表責任者：湯浅恵造（kyuasa@tokushima-u.ac.jp）

発表番号：3G024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

TIPE2 は *Helicobacter pylori* CagA 誘導性 TAK1-NF-κB シグナルを抑制する
TIPE2 negatively regulates *Helicobacter pylori* CagA-induced TAK1-NF-κB signalings.
○中野 利沙[1]、櫻井 渉[1,2]、大穂 満隆[1,3]、舛廣 善和[1]、高橋 恭子[1]、花澤 重正[1] ([1]日本大学・生物資源・応用生物、[2]キッセイ薬品、[3]クインタイルズ)
○Risa Nakano[1], Wataru Sakurai[1,2], Michitaka Oho[1,3], Yoshikazu Masuhiro[1], Kyoko Takahashi[1], Shigemasa Hanazawa[1] ([1]Nihon Univ.,Seibutsushigen,ouyouseibutsu, [2]Kisseiyakuhin, [3]Quintiles)

【背景・目的】Tumor necrosis factor-α-induced protein-8 like 2 (TIPE2) は自然免疫と獲得免疫の負の制御因子として Chen 等の研究グループによって同定された。しかしながら、TIPE2 のその負のシグナル伝達制御機構については必ずしも明らではない。 最近、私共はこの制御機構を研究している過程において、TIPE2 が炎症応答における重要なシグナル伝達分子 TAK1 と相互作用し NF-κB を抑制するという知見を得ている。一方、NF-κB が炎症反応から癌への移行過程において極めて重要な役割を担っているという興味ある知見が示されている。

*Helicobacter pylori* が CagA 蛋白質の機能を介して慢性胃炎・胃潰瘍、胃癌を惹起することは広く知られている。これら病態の発症、成立に関する分子機構の研究は多くの研究者により精力的に展開されている。その分子機構の一つとして、第 IV 分泌機構を介して胃上皮細胞内に注入された CagA が TAK1 と相互作用し NF-κB シグナルを促進し炎症反応を誘導することが示されている。

本研究は、*H.pylori* CagA の炎症–発癌の成立機構をモデルとし、TIPE2 が NF-κB シグナルを介する炎症反応から癌の成立機構の制御因子として機能的役割を演じている可能性について追究する事を目的とした。

【結果・展望】まず初めに、*H.pylori* ATCC11639 を用いた感染実験を行ったところ, 以下の結果を得た。1) 胃癌上皮細胞 MKN-45 細胞に本菌を経時的に感染させたところ、感染後 1 時間で TAK1 の著明なリン酸化が認められた。2) この TAK1 のリン酸化は CagA 欠損菌では認められない事から CagA 依存的であることが示唆された。3) TIPE2 を強制発現した HEK293 細胞系を用いて、この *H.pylori* 感染による、TAK1 のリン酸化に関する TIPE2 の作用について検討した所、TIPE2 は TAK1 のリン酸化を顕著に抑制した。次に、CagA 発現ベクターを HEK293 細胞に強制発現させ、CagA 誘導性 TAK1 のリン酸化に及ぼす TIPE2 の負の制御作用について検討した。その結果、4) CagA は TAK1 と相互作用し、TAK1 のリン酸化を誘導した。このリン酸化は胃癌上皮細胞である AGS や MKN-45 細胞でも確認できた。5) TIPE2 はこの CagA-TAK1 相互作用を抑制しなかったが、6) CagA 誘導性 TAK1 のリン酸化を抑制した。さらに、7) TIPE2 は CagA 誘導性 NF-κB の転写活性を有意に抑制した。今後、CagA-TAK1-NF-κB シグナリングに関する TIPE2 の負の制御機構についてさらに詳細に解明したい。また、TIPE2 が CagA 誘導性発癌の負の制御にも関与しているかについて追究し、NF-κB を介する炎症反応から癌への移行過程における TIPE2 の機能的役割について究明したい。

*Helicobacter pylori*, CagA, NF-κB

発表責任者：中野利沙（nakano.saibou@gmai.com）

発表番号：3G025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Geranylgeranyl pyrophosphate が脂肪細胞の分化に与える影響
# Effect of geranylgeranyl pyrophosphate on adipocyte differentiation

○葉 語勝[1]、高橋 信之[1,2]、江川 香[1]、金 英一[1]、河田 照雄[1,2]、後藤 剛[1,2]（[1]京大院農・食品生物、[2]京大・生理化学研究ユニット）
○ YuSheng Yeh[1], Nobuyuki Takahashi[1,2], Kahori Egawa[1], Yong-Il Kim[1], Teruo Kawada[1,2], Tsuyoshi Goto[1,2] ([1]Div. Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Res. Unit Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【目的】コレステロール合成経路はコレステロール以外にも多様な代謝物の生産を担っており、生体の恒常性維持において極めて重要な役割を果たしている。特に、farnesyl pyrophosphate (FPP)、geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP)などのイソプレノイド化合物はプレニル化と呼ばれるタンパク質の翻訳後修飾の基質として、生体機能調節に重要な化合物であることが広く知られている。さらに近年では、これらの化合物がタンパク質プレニル化とは独立した生理活性を有することも報告されている。そこで本研究では、肥満に伴う生活習慣病の発症において重要な脂肪細胞機能における GGPP の役割を解明することを目的とした。
【方法・結果】GGPP が脂肪細胞の分化に与える影響を調べるため、3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化過程における GGPP の添加実験を行った。GGPP 添加は 3T3-L1 細胞の中性脂肪蓄積量、脂肪細胞分化マーカー遺伝子発現量、およびインスリン存在下での糖取り込みを減少させた。このことから、GGPP が脂肪細胞の分化を抑制することが示唆された。脂肪細胞分化過程における内因性 GGPP 量について定量したところ、GGPP 量は脂肪細胞の分化とともに増加することが明らかになった。また、GGPP の合成酵素である GGPP synthase (GGPS)を強制発現させた 3T3-L1 細胞では、脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現、インスリン存在下での糖取り込みが減少し、GGPS をノックダウンした 3T3-L1 細胞においては、脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現、インスリン存在下での糖取り込みが増加した。GGPP 添加による脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現抑制は、liver X receptors (LXR)アゴニスト存在下で消失した。さらに GGPS ノックダウン細胞においては LXR 標的遺伝子の発現亢進が認められ、GGPP による脂肪細胞分化抑制作用には LXR の活性抑制が関与しているものと考えられた。
【結論】GGPP は LXR の活性調節を介して脂肪細胞機能を調節する内因性物質であることが示唆された。

geranylgeranyl pyrophosphate, adipocyte differentiation, liver X receptors

発表番号：3G026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 炎症制御を目指したシアル酸認識レクチンの基礎研究
Analysis of Anti-inflammatory Effects of Sialic acid-binding Lectin Siglec.

○樋口 廣士、庄司 徹、村瀬 佑介、立山 博之、飯島 信司、西島 謙一（名大工）
○HIROSHI HIGUCHI, TORU SHOJI, YUSUKE MURASE, HIROYUKI TATEYAMA, SHINJI IIJIMA, KEN-ICHI NISHIJIMA (Nagoya Univ.)

## 背景

シアル酸は細胞膜上の糖鎖末端に付加され、様々な細胞機能を調節する。シアル酸を認識する分子として Siglec(sialic acid-binding Ig-like lectin)が存在し、シアル酸に依存して様々な免疫機能を制御することが知られている。多くの Siglec は免疫細胞表面に発現しており、細胞内の ITIM モチーフを介して免疫応答を抑制することが報告されているが、その機能については未解明の点が多い。

ヒト単球/マクロファージは複数の Siglec を発現していることが報告されているが、その中でも私たちは Siglec-9 に注目し、これまでにマクロファージ細胞株 RAW264 における機能解析を行ってきた。その結果得られた事実として、**1．Siglec-9 はマクロファージの炎症応答を強く抑制すること**、**2．Siglec-9 はマクロファージの IL-4 応答を促進すること**、などを報告してきた。

今回の発表では、生理的条件下での Siglec の役割を探るため、ヒト単球/マクロファージにおける Siglec の発現を様々な条件で比較し、ノックダウンによる Siglec-9 の機能解析を試みた。

## 実験手法・結果

まず、ヒト末梢血から単球(CD14 陽性細胞)を分離し、ヒト単球における Siglec の発現を qRT-PCR により比較した。その結果、CD33,Siglec-5,7,9,10 の発現が同程度である一方、これらに比べて Siglec-8,11,14,16 の発現はかなり低いことが確認された。

次に、単球を M-CSF または GM-CSF 存在下でマクロファージに分化させ、それぞれの Siglec の発現を比較したところ、マクロファージへの分化に伴い異なる変化を示したが、M-CSF と GM-CSF による違いは見られなかった。さらに、分化したマクロファージを LPS+IFN-γ、IL-4 により刺激し Siglec の発現を比較したところ、LPS+IFN-γにより Siglec-7 の発現が減少する一方、IL-4 により Siglec-10 の発現が増加することが観察された。これらの結果から、それぞれの Siglec は独自に発現を制御されていると考えられる。

マクロファージにおける Siglec-9 の発現は比較的安定していた。そこで、siRNA によるノックダウンを試みたところ、LPS/IFN-γ刺激により誘導される CCR7 の発現は増加したが、IL-4 刺激により誘導される CD200R の発現は減少した。この結果から、Siglec-9 はこれらの免疫制御分子の発現を調節することにより、間接的に免疫応答を制御することが示唆された。

今後、詳細な発現調節機構や生理的意義の解明が必要である。

inflammation, macrophage, Siglec

発表責任者：西島　謙一（nishijma@nubio.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3G027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 低酸素条件下におけるマウスメラノーマ細胞悪性化の機構解析

# Molecular Mechanisms for Hypoxia-Induced Acquisition of Malignancy in Mouse Melanoma Cells

○橋本 康太郎、佐藤 直也、三浦 豊（東京農工大・院・応用生命化学）
○Kotaro HASHIMOTO, Naoya SATO, Yutaka MIURA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】腫瘍組織では、しばしば低酸素環境が発生し、これががん細胞の悪性化に関与することが知られている。また、ガングリオシドの一種である GM3 は、細胞膜上の構造ユニットである細胞膜マイクロドメインに存在し、癌細胞の接着や遊走に関与していると考えられている。当研究室のこれまでの研究から、低酸素処理またはガングリオシド GM3 合成酵素のノックダウンによって、マウスメラノーマ細胞 B16F10 の細胞形態や運動能に変化が生じることが明らかとなった。しかし、低酸素環境によるがん細胞の悪性化に対して、細胞膜マイクロドメインの関与を検討した報告は少ない。そこで本研究では、B16F10 の形態変化・運動能変化のメカニズムを、細胞膜マイクロドメインの関与を中心に検討した。
【方法】マウスメラノーマ細胞 B16F10 を通常酸素条件下（20%$O_2$）で 24 時間培養後、低酸素条件下（1%$O_2$）で 72 時間培養したものを低酸素培養群とし、通常酸素条件下で 96 時間培養した通常酸素培養群との比較を行った。GM3 合成酵素のノックダウンには、siRNA を用いた。細胞形態の観察は、アクチン細胞骨格を蛍光染色した後、蛍光顕微鏡を用いて行った。細胞の運動能および浸潤能は、それぞれ wound healing assay と中皮細胞との共培養系を用いて測定した。また、細胞膜マイクロドメイン画分の調製はショ糖密度勾配超遠心法により行い、タンパク質の局在変化を western blotting により検討した。
【結果と考察】低酸素条件で培養した B16F10 には、細長い仮足が形成されたが、GM3 合成酵素のノックダウンがこれに影響を与えることはなかった。これは、GM3 存在量の変化は、低酸素処理による細胞形態変化に関与していないことを示唆している。また、細胞膜マイクロドメイン画分中には、アクチン骨格の動態に関与する Small G タンパク質である Rho、Rac1 が検出された。特に Rac1 は、低酸素処理によって細胞膜マイクロドメイン画分への局在が大きく減少することが確認された。これは、細胞膜マイクロドメインにおける Rac1 の存在状態の変化が、細胞内で形態・運動に関わるシグナルを変化させ、それが低酸素環境下でのがん細胞悪性化につながっている可能性を示唆している。現在、siRNA を用いた Rac1 のノックダウンを行い、それが低酸素処理による B16F10 の形態・運動能変化に及ぼす影響を検討している。また、プロテオミクスを用いたさらなる実験を行い、低酸素処理が、細胞膜マイクロドメインに局在するタンパク質構成にどのような変化をもたらしているのかについても検討中である。

hypoxia, membrane microdomains, Rac1

発表番号：3G028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Crisper/Cas9 法による Pin1-欠損ヒト細胞の作製と解析

# Production and Analysis of Pin1 KO human cell lines by CRISPR/Cas9 system

○秋吉 皓太、韋 達翀、カスジャン マシュー、内田 隆史（東北大農）
○Kota AKIYOSHI, Dachong WEI, Matthew KASJAN, Takafumi UCHIDA (Tohoku Univ.)

目的］
Pin1 はリン酸化された Ser/Thr とその次に位置する Pro を特異的に認識し、ペプチド結合の cis/trans の異性化を触媒する酵素(PPIase)である。我々は Pin1-KO マウスの解析から Pin1 と疾患との関係を明らかにし、また Pin1 のホモログ Par14 のクローニングも行った。しかし、Pin1 や Par14 の機能の詳細を解明するためには、Pin1-KO マウスや胎仔線維芽細胞だけでなく、Pin1 遺伝子破壊細胞株を使用することが望まれる。また Pin1 のヒトでの機能を解析するには Pin1-KO ヒト細胞株が必要である。Pin1 はがんなどの疾患の創薬ターゲットとして注目されており、我々はハイスループットスクリーニングにより発見した Pin1 阻害剤の 2 次 screening ではコントロールとしても有用である。
［結果］
CRISPR/Cas9 system は簡便に遺伝子の編集や破壊を行う技術である。我々は、Pin1 と Par14 の遺伝子破壊細胞株の作製に本技術を応用した。CRISPR/Cas9 system の問題である非特異な切断(オフターゲット効果)については、複数のツールを用い、リスクの低い配列を入念に選定した。ゲノム編集後、上位のオフターゲット候補について確認したが非特異な切断は確認されなかった。遺伝子編集する細胞としては NIH3T3-L1 とヒト癌細胞（HEK293, MCF-7）を選んだ。前者はがん遺伝子探索や脂肪細胞の分化において重要なツールであることから、後者は Pin1 の研究でよく用いられているヒト癌細胞であることが理由である。FACS を用いた細胞周期解析や脂肪細胞分化誘導実験などから、Pin1 ノックアウトにより S 期に細胞周期が停滞することや脂肪分化が抑制されることが分かった。また、われわれが発見した Pin1 阻害剤クロメポリフェノールの効果についても詳細を検討した。

Pin1, cancer

発表責任者：内田 隆史（uchidat@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：3G029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

*Xenopus laevis* 由来錐体 Phosphodiesterase 6 のシャペロン共発現下における機能的発現
Functional Expression of Cone Phosphodiesterase 6 from *Xenopus laevis* by Co-expression with Chaperones

○田端 勇人、大森 夢子、長岡 健斗、尾谷 優磨、嶺岸 卓徳、奥田 祐介、岡崎 修治、赤沼 元気、栗井 貴子、石塚 盛雄（中央大学）
○Hayato TABATA, Yumeko OMORI, Kento NAGAOKA, Yuma OTANI, Takunori MINEGISHI, Yusuke OKUDA, Shuji OKAZAKI, Genki AKANUMA, Takako AWAI, Morio ISHIZUKA (Chuo Univ.)

脊椎動物の網膜内視細胞では、Phosphodiesterase 6 (PDE6) が cGMP を特異的に加水分解し、イオンチャネルの閉鎖、続いて細胞膜の過分極を引き起こすことで視覚情報伝達が行われている。視細胞には桿体細胞と錐体細胞の 2 種類があり、桿体細胞に局在する PDE6 は触媒サブユニット α と β、2 個の阻害サブユニット γ が会合して四量体サブユニット構造を形成している。一方、錐体細胞に局在する PDE6 は触媒サブユニット α’、阻害サブユニット γ’がそれぞれ 2 個ずつ会合して四量体を形成している。PDE6 のアミノ酸変異やタンパク質の変性は先天性常夜盲や色盲といった網膜内疾患の原因の１つとされている。これまでに昆虫細胞や *Xenopus laevis* の視細胞において遺伝子組換え技術を用いた PDE6 の発現が試みられてきたが、PDE6 の詳細な機能及び構造は明らかにされていない。

分子シャペロンはそのクライアントとなるタンパク質の構造変化を制御するタンパク質であり、タンパク質のフォールディングにおいて主要な役割を担っている。近年、シャペロンタンパク質である Heat-shock protein 40 (Hsp40), 70, 90 そして Aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1 (AIPL1) が網膜内視細胞で桿体 PDE6 の立体構造の安定化と正しいフォールディング、そして PDE6 の多量体形成に寄与すると報告された。私たちはこれまでに、遺伝子組換え大腸菌を用いて発現・精製した *Xenopus laevis* 由来の各タンパク質を用いた *in vitro* での実験から各シャペロン (Hsp40, 70, 90 そして AIPL1) と錐体 PDE6α’との相互作用が PDE6α’の活性を増加させるという結果を得ている。これを踏まえ、高い cGMP 加水分解能を維持した可溶性 PDE6α’を得るために、同一の大腸菌内で、シャペロンである Hsp90, AIPL1 そして PDE6 阻害サブユニット γ’を、PDE6α’と共発現させる系を構築した。構築した共発現系により発現させた PDE6α’の cGMP 加水分解能を PDE-Glo™ Phosphodiesterase Assay Kit を用いて測定した結果、シャペロンと共発現させた PDE6α’の活性は上昇したことから、PDE6α’とシャペロンが大腸菌内で相互作用し、PDE6α’の構造安定化を促進していることが示された。また PDE6α’の可溶化促進において PDE6γ’が重要だと示唆された。

本研究ではさらにシャペロン Hsp40 を加えて、PDE6α’、γ’、そして Hsp40, Hsp90, AIPL1 を同一大腸菌内で共発現させることで、PDE6α’単体での発現時と比べ、高い cGMP 加水分解能を維持した PDE6α’の発現に成功した。現在、Hsp40 のクライアントタンパク質でもあるシャペロン Hsp70 を含めた計 6 種類の各シャペロン及び錐体 PDE6 サブユニット α’, γ’を共発現させ、より高い活性を維持した錐体 PDE6 の発現系構築を試みている。今回はそれらの結果も合わせて報告する。

PDE6, Chaperone, *Xenopus laevis*

発表番号：3G030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 紫外線 DNA 損傷の修復機構における SUMO 化 DDB2 の機能解析

# SUMOylation of damaged DNA-binding protein DDB2 regulates the efficiency of nucleotide excision repair

○金岡 英徳、奥嵜 雄也、萩原 遙太、飯島 信司（名大院工）
○Hidenori KANEOKA, Yuya OKUZAKI, Yota HAGIHARA, Shinji IIJIMA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

オゾンホールが拡大傾向にある現在、太陽光に含まれる紫外線(UV)は皮膚にとって最大の環境要因であり、UV による DNA 損傷の蓄積はシミ・シワなど皮膚老化や皮膚ガンの原因になると考えられている。生体には UV により生じた損傷を修復する機構（ヌクレオチド除去修復: NER）が備わっており、30種類以上のタンパク質が連動し働いている。これらの因子の中で XPE/DDB2 は損傷認識因子であり、損傷 DNA と結合し、修復反応を開始する。DDB2 は様々な翻訳後修飾を受け、その他の修復因子と機能連携することが明らかとなりつつある。本研究では翻訳後修飾の1つ SUMO 化を中心とした解析を行い、DDB2 の SUMO 化が NER に及ぼす影響について調べた。

【方法・結果】

SUMO 化は翻訳後修飾の一つであり、ユビキチン様の小型タンパク質 SUMO が基質タンパク質に結合することにより、その活性や局在、他のタンパク質との相互作用を制御する。我々の以前の研究から DDB2 が紫外線照射依存的に SUMO 化されることが明らかとなったが、その機能は不明であった。まず、DDB2 の SUMO E3 ligase である PIASy をノックダウンしたところ、NER による修復効率の低下が見られ、さらに DDB2 が正常に機能する上で重要な翻訳後修飾であるユビキチン化の低下が観察された。このことから、SUMO 化とユビキチン化の間に何らかのクロストークがあることが示唆された。次に、SUMO 化しない DDB2 の mutant を作製し、ユビキチン化の割合を測定したところ、ユビキチン化の低下が見られた。これらの結果より、DDB2 の SUMO 化はユビキチン化を促進ことにより、NER 修復反応を効率よく進行させている可能性が考えられる。

UV damage, nucleotide excision repair

発表責任者：金岡英徳（kaneoka@nubio.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3G031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウスの胃における酸性ほ乳類キチナーゼの発現と活性

# Expression and activity of acidic mammalian chitinase in mouse stomach.

○大野 美紗[1,2]、大貫 理穂[1]、根本 千雪[1]、大川 一明[1]、樫村 昭徳[1]、坂口 政吉[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1] ([1]工学院大先進工、[2]（独）日本学術振興会特別研究員 DC2)
○Misa OHNO[1,2], Riho ONUKI[1], Chiyuki NEMOTO[1], Kazuaki OKAWA[1], Akinori KASHIMURA[1], Masayoshi SAKAGUCHI[1], Yasusato SUGAHARA[1], Fumitaka OYAMA[1] ([1]Kogakuin Univ., [2]JSPS Research Fellow (DC2))

キチンは，*N*-アセチル-D-グルコサミンが β-1, 4 結合した直鎖の高分子化合物で，真菌，甲殻類, 昆虫を含む広範囲の生物の主要な構成成分として機能している。キチナーゼは, キチンの β-1, 4 グリコシド結合を加水分解する。マウスとヒトはキチンを合成しないが，活性のある二種類のキチナーゼ，chitotriosidase (Chit1) と acidic mammalian chitinase (AMCase)，を発現している。Chit1 は，ほ乳類で最初に発見されたキチナーゼで，ゴーシェ病，アルツハイマー病，慢性閉塞性肺疾患患者や喫煙者でレベルが増加する。他方，AMCase は酸性領域に至適 pH をもち，喘息，アレルギーモデルマウスで多量に発現される。我々は, これまでに二種類のキチナーゼと housekeeping 遺伝子などの対照遺伝子の発現を同じ尺度で定量する PCR システムを確立した。その結果，マウスでは AMCase が胃で, 消化酵素並みの非常に高いレベルで発現することを見出した。そこで，AMCase のマウス胃における機能の解明につなげるため，定量 PCR システムを発展させ，マウスの胃組織における四種類の胃粘膜タンパク質，Gastric intrinsic factor (Gif)，Mucin，Gastrin，$H^+/K^+$-ATPase，とキチナーゼの発現レベルの比較を行った。その結果，Gif，Mucin，$H^+/K^+$-ATPase は GAPDH よりも発現レベルが高かった。AMCase の発現レベルは，胃粘膜タンパク質遺伝子よりも著しく発現しており，pepsinogen C に匹敵するレベルであった。次に，4-nitrophenyl *N,N′*-diacetyl-β-D-chitobioside を基質とし，マウスの胃組織から調製した可溶性タンパク質を使って，マウスの胃における AMCase の酵素活性を調べた。その結果，AMCase は pH 2.0 で最大活性を示し，pH 3.0~7.0 でも低い活性を示した。また，pepsin の活性を調べた結果，pH 2.0~3.0 で最も高い活性を検出し，pH 5.0 以上で活性は検出されなかった。このことから，AMCase の活性は，pepsin と同様に強酸性で活性が高いことが分かった。以上の結果は，マウスの胃で AMCase が機能している可能性があることを示した。

Acidic mammalian chitinase, Pepsin, Quantitative real-time PCR

発表責任者：大野美紗（bd13001@ns.kogakuin.ac.jp）

発表番号：3G032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# キメラ体を利用したヒトとマウス AMCase の機能比較
# Functional comparison of human and mouse AMCase using chimeric proteins

○大川 一明[1]、樫村 昭徳[1]、大野 美紗[1,2]、坂口 政吉[1]、菅原 康里[1]、小山 文隆[1] ([1]工学院大先進工、[2]（独）日本学術振興会特別研究員 DC2)
○ Kazuaki Okawa[1], Akinori Kashimura[1], Misa Ohno[1,2], Masayoshi Sakaguchi[1], Yasusato Sugahara[1], Fumitaka Oyama[1] ([1]Kogakuin Univ., [2]JSPS Research Fellow (DC2))

キチンは, *N*-アセチル-D-グルコサミンが β-1, 4-グルコシド結合によって直鎖状に結合した多糖であり昆虫，甲殻類，真菌，線虫に存在している。キチナーゼはキチンを加水分解する酵素で，細菌，真菌，線虫および節足動物などの様々な生物においてキチン代謝を担っている。哺乳類はキチンを合成できないが，活性を持った形でキチナーゼを発現している。ヒトとマウスでは，chitotriosidase と acidic mammalian chitinase (AMCase) の二種類のキチナーゼが発現している。AMCase は喘息，アレルギー性の炎症，食物消化に関係している。ヒト AMCase は，マウス AMCase とアミノ酸配列の同一性が 81% ，相同性が 90% で，よく似ている。しかし，マウスの胃では消化酵素に匹敵するレベルで大量に合成されているが，ヒトでほとんど発現していないことが明らかになっている。さらに，ヒト AMCase は至適が pH 4 付近であるのに対して，マウス AMCase は至適が pH 2 と二つの酵素の性質がかなり異なる。そこで, 我々はヒトとマウスの AMCase の酵素機能の違いがどの領域が原因で起きているかを決定するためにキメラタンパク質を作製し, 融合タンパク質として発現させた。ヒト AMCase の C 末端領域をマウス AMCase に変換したキメラ体のキチナーゼ活性は低く，ヒト AMCase の N 末端領域をマウス AMCase に変換したキメラ体のキチナーゼ活性は高かった。この結果から，N 末端領域の影響でヒト AMCase の活性が著しく減少していることが明らかになった。

acidic mammalian chitinase, recombinant protein, chimera

発表責任者：大川 一明（bd14001@ns.kogakuin.ac.jp）

発表番号：3G033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

味覚受容体 T1R3 膜貫通領域における発現検討
Expression study of transmembrane domain of taste receptor T1R3
○中北 智哉[1]、三坂 巧[2]、小林 拓也[1] ([1]京大医、[2]東大院農生科・応生化)
○Tomoya NAKAGITA[1], Takumi MISAKA[2], Takuya KOBAYASHI[1] ([1]Dept. Cell. Biol., Kyoto Univ., [2]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo)

**[背景・目的]**味覚を構成する五基本味のうち、甘味、旨味については T1R ファミリーが担っており、甘味受容体は T1R2 / T1R3 が、旨味受容体は T1R1 / T1R3 がそれぞれヘテロダイマーを形成することにより機能することが明らかにされている。T1R ファミリーは G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、中でも膜外領域が大きいという特徴から class C GPCR に分類される。

近年、GPCR の精製・解析技術が向上し、結晶構造解析の成功例が増加しつつある。class C GPCR においても代謝型グルタミン酸受容体 mGluR1、及び mGluR5 の 2 受容体の膜貫通領域の構造が明らかにされた(Wu *et al.*, 2014; Dore *et al.*, 2014)。

一方で、T1R3 は甘味、旨味両受容体を形成しているサブユニットであるが、T1R3 膜貫通領域には甘味、旨味受容体の応答を増強あるいは抑制する物質が作用することが報告されている。しかしながらこれら応答調節物質がどのような作用機序により受容されるのかは明らかにはされておらず、構造解析により詳細な情報を得る必要がある。そこでまずは結晶化へ向けた安定なコンストラクトの作製を目指し、昆虫細胞 Sf9 発現系により T1R3 の膜貫通領域の発現検討を行った。

**[方法]** T1R3 膜貫通領域の C 末端側に EGFP を融合させたコンストラクトにおいて発現検討を行った。N 末端側、C 末端側の切断位置及び構造を安定化させるために必要な安定化タンパク質の挿入位置は mGluR1、及び mGluR5 のコンストラクトを参考にした。また、それぞれのコンストラクトを発現させ、膜取り、可溶化後に FSEC (Fluorescence detection size exclusion chromatography)を実施することで単分散性を評価し、構造が保持されていることの指標とした。

**[結果]** mGluR1 の結晶構造同様に N 末端に安定化タンパク質を挿入したコンストラクト、及び mGluR5 同様に intracellular loop 2 に安定化タンパク質を挿入したコンストラクトを試したところ、N 末端に安定化タンパク質 bRIL を挿入したコンストラクトについては良好な単分散性を保っていた。今後、このコンストラクトの精製を実施する。

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」よって実施された。

T1R3, transmembrane, expression

発表番号：3G034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# HDL 産生の鍵を握る ABCA1 の C 末端領域の機能解析

# The role of the C-terminal domain of ABCA1 during HDL generation.

○岡本 雄介[1]、永田 紅[2]、笠井 倫志[3]、楠見 明弘[2,3]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]([1]京大院農、[2]京大 iCeMS、[3]京大再生研)
○Yusuke OKAMOTO[1], Koh NAGATA[2], Rinshi KASAI[3], Akihiro KUSUMI[2,3], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto-Univ., [3]Inst. Frontier Med. Sci., Kyoto Univ)

【背景・目的】

ATP-binding cassette protein A1 (ABCA1)は，善玉コレステロール(HDL)の産生に必須の膜タンパク質である.ABCA1 は細胞に過剰に蓄積したコレステロールを,細胞膜中のホスファチジルコリン(PC)などのリン脂質とともに細胞外の脂質受容体であるアポリポプロテイン A-I(apoA-I)に受け渡すことで HDL の産生を仲介し，末梢組織から肝臓へのコレステロールの逆輸送系において重要な役割を果たしている．私たちは、これまでに ABCA1 が HDL を形成する際に一時的にダイマー化し，細胞膜上で静止することを明らかにしたが,そのメカニズムは未だ不明である.ABCA1 が属する ABCA サブファミリーは，他の ABC タンパク質のサブファミリーには見られない特徴的な約 100 アミノ酸残基の C 末端領域を持ち、その領域には ABCA1 の脂質排出活性や他のタンパク質との相互作用に関わる複数のモチーフが存在する．そこで本研究では，ABCA1 の C 末端領域を他の ABCA サブファミリーの C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質を作製し，その脂質排出活性や細胞膜上での挙動を解析することで，ABCA1 の C 末端領域の機能を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

ABCA1 の C 末端領域を，ABCA サブファミリーに属する他の 11 種類の ABC タンパク質の C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質を作製した．まず，これらのキメラタンパク質を HEK293 細胞に一過的に発現させ，野生型と同様に細胞膜に局在することをフローサイトメーターを用いて確かめた。次に、apoA-I 依存的なコレステロール排出活性と PC 排出活性を測定した．興味深いことに，ABCA1 と相同性の最も高い ABCA7 の C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質は脂質排出活性を失った。しかし、ABCA7 より相同性の低い ABCA4，ABCA12，ABCA13 などの C 末端領域は，ABCA1 の C 末端領域の機能を代替できることが明らかとなった．さらに，全反射照明蛍光(TIRF)顕微鏡を用いた一分子イメージングによって細胞膜上での挙動を解析した．その結果，脂質排出活性を保持した ABCA4 とのキメラタンパク質は，野生型の ABCA1 と同様に細胞膜上で静止する傾向にあった．一方で，脂質排出活性を失った ABCA7 とのキメラタンパク質は，細胞膜上でほとんど静止しなかった．以上の結果から，ABCA1 の C 末端領域は脂質排出活性と細胞膜上での静止の両方に重要であることが明らかとなった.

ABCA1, chimera protein, single-molecule imaging

発表責任者：植田和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3G035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ABCA1 細胞外ドメインの HDL 産生における役割の解析

# The role of extracellular domains of ABCA1 during HDL generation

○小笠原 史彦[1]、石神 正登[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2] ([1]京大・院農・応用生命科学、[2]京大・物質－細胞統合システム拠点)
○ Fumihiko OGASAWARA[1], Masato ISHIGAMI[1], Yasuhisa KIMURA[1], Noriyuki KIOKA[1], Kazumitsu UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

[背景・目的]

ATP Binding Cassette A1（ABCA1)は、善玉コレステロールと呼ばれる high-density lipoprotein（HDL）の産生に必須な脂質輸送体である。HDL を介したコレステロールの排出は、末梢で余剰になったコレステロールを除去する唯一の経路であるため、動脈硬化の予防に大きく貢献する。しかし、HDL 産生における ABCA1 の役割に関しては議論が分かれており、いまだ未解明である。私たちは、ABCA1 はコレステロールおよびリン脂質を血中の脂質アクセプターである apoA-I に直接受け渡し HDL を産生すると考えている。しかし、ABCA1 が輸送した脂質をどのように apoA-I に受け渡し、新生 HDL を形成するかは全く不明である。そこで、ABCA1 がもつ機能未知な細胞外ドメインに着目した。細胞外ドメインは apoA-I と直接相互作用することや、ATP 加水分解に伴って大きく構造変化することがわかっている。これらのことから、ABCA1 細胞外ドメインは脂質を蓄積することで大きく構造変化し、apoA-I が結合すると、蓄積した脂質を一度に受け渡すことによって HDL を産生するという仮説を立てた。本研究は、その仮説を検証することを目的とした。

[方法・結果]

まず、細胞をトリプシン処理することによって、ABCA1 あるいはその ATP 加水分解欠損変異体発現細胞の細胞表面タンパクを分解し、培地中に放出された脂質を定量した。その結果、野生型発現細胞からは時間依存的に脂質が放出されたが、変異体発現細胞では放出されなかった。また、細胞表面に残った ABCA1 を Western blotting 法により検出したところ、全長 ABCA1 量の時間依存的な減少は培地中に放出された脂質量の増加の時間依存性と類似した。これらのことから、細胞表面の ABCA1 細胞外ドメインを切断することにより脂質が放出されることが示唆された。次に、$^{3}$H-コレステロールあるいは $^{3}$H-コリンを ABCA1 発現細胞に取り込ませた後、トリプシン処理を行った。トリプシン処理後の培地を密度勾配遠心法により分画し、細胞外ドメインと脂質の検出を行った。その結果、放出された脂質と ABCA1 の細胞外ドメインペプチドが低密度な画分に検出された。それらの画分は必ずしも一致しなかったが、細胞外ドメインペプチドが検出された画分の密度が新生 HDL と同程度であったこと、さらに脂質もその画分から検出されたことから、ABCA1 の細胞外ドメインに脂質が蓄積していることが示唆された。

ABCA1, HDL, lipid transporter

発表責任者：植田和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3G036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト ABCA1 の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の作製とエピトープ探索

# Epitope mapping of a new monoclonal antibody against the extracellular domain of human ABCA1

○三好 里奈[1]、富岡 麻衣子[2]、小笠原 史彦[1]、木村 泰久[1]、木岡 紀幸[1]、植田 和光[1,2]([1]京大・農・応用生命、[2]京大 iCeMS)
○rina miyoshi[1], maiko tomioka[2], humihiko ogasawara[1], yasuhisa kimura[1], noriyuki kioka[1], kazumitsu ueda[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]iCeMS, Kyoto Univ.)

【背景・目的】

ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)は、細胞に過剰に蓄積したコレステロールをリン脂質とともにアポリポプロテインA-I(apoA-I)に受け渡すことで善玉コレステロール(HDL)を産生し、肝臓へのコレステロール逆輸送の鍵を握っている。ヒト ABCA1 は、2261 アミノ酸残基からなる膜蛋白質で、そのうち約 900 アミノ酸残基は細胞外に存在し、2 つの細胞外ドメイン(ECD1, 2)を形成していると予想される。これまでの研究から、HDL 形成時に、ATP 加水分解依存的に ECD の構造が変化すること、apoA-I が ECD に直接相互作用して脂質を受け取ることを、我々は提唱している。そこで、ABCA1 の ECD の機能をさらに詳細に解明するため、ヒト ABCA1 発現細胞をマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成した。本研究では、作成したモノクローナル抗体の評価とエピトープの探索を行った。

【方法・結果】

まず、ECD1 を形成すると予想される S45～R639 を Free style 293 細胞で大量発現させ、精製を行った。ヒト ABCA1 を発現させた BHK 細胞および HEK293 細胞を用いて評価を行った結果、数種のモノクローナル抗体が ELISA で高い反応性を示し、さらに、上記の精製タンパク質とも反応した。これらの抗体は、透過処理を行っていない ABCA1 発現細胞を効率よく免疫染色できることが分かった。また、FACS, Western blotting 法において反応性のよい抗体 1 種（モノクローナル抗体 I）を特定した。ATP 加水分解に必須である 2 つのリシン残基をメチオニン残基に置換した機能しない変異型 ABCA1 を発現させた細胞にも、モノクローナル抗体 I は高い反応性を示したため、ATP 加水分解に依存した構造変化は認識できないことが分かった。次に、抗原部位を探索するため、ECD1 を約半分に分けた C75～G314 と K360～R639 それぞれのポリペプチドを大腸菌 BL21 株で発現させたところ、モノクローナル抗体 I は C75～G314 ペプチドに対して高い反応性を示した。以上の結果から、ABCA1 発現細胞を免疫することによって得られたモノクローナル抗体 I は、ECD1 のうち C75～G314 の 240 アミノ酸残基からなるペプチド配列中にエピトープを持つことが明らかになった。現在、C75～G314 を数断片に分けて大腸菌に発現させ、抗原決定部位をさらに特定することを試みている。

ABCA1, transporter, membrane protein

発表責任者：植田　和光（uedak@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3G037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト-ウシ間のキメラを利用した抗ガン剤輸送タンパク質 MRP1(ABCC1)の基質認識部位の探索

# Analysis for domains for substrate recognition of anti-cancer drug transporter MRP1 (ABCC1) by utilizing chimera proteins between human and bovine orthologs

○田口 善智、戸木 星菜、徳原 舞、梶 友里恵、南 美幸、佐伯 和弘 (近畿大生物理工)
○Yoshitomo TAGUCHI, Seina TOGI, Mai TOKUHARA, Yurie KAJI, Miyuki MINAMI, Kazuhiro SAEKI (Kinki Univ.)

【目的】MRP1(ABCC1)は、よく保存された ATP 結合領域を共通して有する ABC トランスポーターの一つで、様々な抗ガン剤を細胞内から外へ輸送する膜タンパク質である。ウシより単離された MRP1 とヒトの MRP1 では、アミノ酸レベルでの同一性は９１%あるのにもかかわらず、両者の基質特異性は明確に異なる。このタンパク質の基質認識部位を同定する目的で、ヒト MRP1 の様々な部位をウシ MRP1 と置換した複数種のヒト-ウシ間のキメラ MRP1 を作製し、その基質特異性を野生型のヒトおよびウシの MRP1 と比較することによって、ヒトとウシの MRP1 における基質特異性の違いの原因になっている部位を明らかにしようと試みた。

【方法】膜タンパク質である MRP1 は 17 の膜貫通ヘリックスと 2 つの ATP 結合部位をもつ。N 末にある 5 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD0)、TMD0 に続く細胞内領域(L0)、L0 に続く 6 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD1)と N 末側にある ATP 結合領域(NBD1)を合わせた領域(TMD1+NBD1)、NBD1 に続く 6 つの膜貫通ヘリックスからなる領域(TMD2)、および TMD2 に続く C 末側にある結合領域(NBD-2)を、それぞれヒトからウシに置換したキメラ MRP1 の発現ベクターを構築した。ウシ-ヒト間のキメラ MRP1 の cDNA の作製には、In-fusion 反応を利用した。構築されたキメラ MRP1 の発現ベクターをヒト由来の培養細胞(HEK293)に導入し、それぞれの安定発現株を得た。キメラおよび野生型の MRP1 を安定発現する細胞の 5 種類の抗ガン剤に対する耐性度のパターンを調べた。

【結果・考察】TMD0 および TMD2 を置換すると、それぞれ一部の抗ガン剤(VP16, ドキソルビシン)に対する耐性度が変化し、基質特異性が変化していることがわかった。一方、それ以外の部位をヒトからウシに置換しても、抗ガン剤に対する耐性度のパターンは変化しなかった。以上の結果から、ウシとヒトの MRP1 の基質特異性の違いは、TMD0 および TMD2 の領域に原因があり、これらの領域が一部の抗ガン剤の基質輸送に関与していることが示唆された。

ABC protein, MRP1, In-Fusion cloning

発表責任者：田口 善智（taguchi@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：3G038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 転写因子 Bcl11b の脂肪細胞分化および脂肪蓄積における機能解析

# Functional analysis of Bcl11b in adipocyte differentiation and lipid accumulation

○安本 啓甫[1]、井原 悠介[1]、塚本 大介[1]、橋詰 力[2]、清水 誠[1]、井上 順[1]、佐藤 隆一郎[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]東大 IOG)
○Keisuke Yasumoto[1], Yusuke Ihara[1], Daisuke Tsukamoto[1], Tsutomu Hashidume[2], Makoto Shimizu[1], Jun Inoue[1], Ryuichiro Sato[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Tokyo Univ. IOG)

【目的】BCL11B は T 細胞の初期分化を制御する、C2H2 型 Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子である。Bcl11b KO マウスは生後 24 時間以内に死亡するが、出生直後において肩甲骨間の白色脂肪組織の顕著な萎縮が観察された。そこで本研究では、BCL11B がマウス生体において脂肪の蓄積に関与するかを検証するとともに、脂肪細胞分化を制御する可能性について検討した。
【方法】（１）マウスの脂肪組織における BCL11B の発現をリアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングによって確認した。（２）ウイルスベクターを用いて、3T3-L1 細胞や MEFs における BCL11B の発現をノックダウンし、脂肪細胞分化への影響を調べた。（３）野生型および Bcl11b ノックアウトマウスの MEFs を調製し、脂肪細胞分化を誘導して脂肪蓄積や脂肪細胞分化マーカーの発現を比較した。（４）マイクロアレイにより野生型および Bcl11b ノックアウトマウスの MEFs（脂肪細胞分化誘導後 12 時間）の遺伝子発現を網羅的に解析した。（５）野生型および Bcl11b ヘテロマウスに高脂肪食を長期摂食させ、体重増加や脂肪の蓄積を比較した。（６）代謝ケージを用いて野生型および Bcl11b ヘテロマウスの代謝パラメータを比較した。
【結果・考察】（１）BCL11B は脂肪組織に mRNA およびタンパク質レベルで発現しており、内臓脂肪よりも皮下脂肪組織に高い発現が観察された。（２）BCL11B は脂肪細胞分化過程で一過的に発現上昇した。また、ノックダウンにより分化が抑制された。（３）KO マウス由来 MEFs では脂肪細胞への分化能が低下していた。（４）Bcl11b ノックアウトマウス由来の細胞では Wnt/β カテニンシグナルの標的遺伝子が軒並み発現上昇していた。（５）高脂肪食負荷時において、摂食量が変わらないにも関わらず、ヘテロマウスは野生型と比較して低体重であり、脂肪肝の発症が抑制されていた。（６）BCL11B ヘテロマウスではエネルギー消費が亢進していた。
現在、BCL11B が脂肪細胞分化を促進するメカニズムについて、Wnt/β カテニンシグナルとの関連を調査するほか、Bcl11b ヘテロマウスのエネルギー消費が亢進している原因を検証している。

adipocyte, differentiation, Bcl11b

発表番号：3G039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ミミズに含まれる血栓分解並びに消化系酵素遺伝子発現条件の検討

# Gene expression analysis of fibrinolytic and digestive enzymes in earthworm

赤澤 真一[1]、○阿部 透[1]、田中 和歌子[1]、脇本 真之介[2]、志田 洋介[3]、小笠原 渉[3] ([1]長岡高専物質工、[2]ワキ製薬、[3]長岡技大工)
Shin-ichi AKAZAWA[1], ○Toru ABE[1], Wakako TANAKA[1], Shinnosuke WAKIMOTO[2], Yosuke SHIDA[3], Wataru OGASAWARA[3] ([1]Dept. Mat. Eng., Natl. Inst. Technol., Nagaoka Coll., [2]Waki Pharm., Co., Ltd., [3]Dept. Bioeng., Nagaoka Univ. Tech.)

【目的】今日の食生活の欧米化に伴い血栓症患者数の増加が問題となっている．そこで我々は，これまで強力な血栓分解酵素（ルンブルキナーゼ）を有するミミズを用いた健康食品を開発し[1)]，予防医療に用いる事を目指してきた．さらに，ミミズは強力な消化系酵素（アミラーゼ，エンドグルカナーゼ等）も有しており[2)]，酵素活性をコントロールできれば胃腸薬のような付加価値をもった健康食品も開発出来る．また，酵素活性の調節に食品廃棄物を餌として用いることで，廃棄物処理にも同時に貢献しうる．これらの実現には酵素活性の増大及び制御が必要不可欠であるが，これら機能性酵素群の発現条件は未だ明らかになっていない．そこで本研究では，各種酵素の最適誘導条件の確立に向けた研究の一環として，各種酵素の基質を添加した寒天培地と砂培地でミミズの酵素誘導培養を行い，リアルタイム PCR で各種酵素遺伝子の発現量の推移について検討する事を目的とした．
【方法】24 h 絶食したミミズ（*Eisenia fetida*）を各種基質を添加した基層培地に入れ遺伝子の発現誘導を行った．基層培地として 0.5 %寒天，砂の 2 種類の培地を用い，基質はゼラチン，カルボキシメチルセルロール（CMC），可溶性デンプンを用い，コントロールとして滅菌水を加えたものを用意した．誘導は 6 h，12 h，24 h，48 h 行った．各条件で遺伝子発現誘導を行ったミミズから RNA 抽出を行い，cDNA 合成を行った後リアルタイム PCR を用いて，ルンブルキナーゼ（*EfFIII1*），α-アミラーゼ（*EfAMY1*），エンドグルカナーゼ（*EfEG1*）について発現量の測定を行った．また，コントロール遺伝子としてアクチン（*EfACT*）を用いた．
【結果・考察】寒天と砂で遺伝子発現量の比較をすると，寒天の方が比較的発現量が高い傾向が見られた．*EfFIII1* はゼラチン含有培地で培養したミミズで多く発現しており，48 h 培養したものでは，培養前のミミズと比較し約 4.5 倍の発現量を示した． *EfAMY1* はデンプン含有培地で培養したミミズで多く発現しており，寒天培地での培養を行った方は培養時間の増加に伴い発現量が上昇した．*EfEG1* については発現が上昇する条件が見られなかった．以上の結果から，ゼラチンにより *EfFIII1* が，デンプンにより *EfAMY1* が誘導される可能性を見出した．今後，*EfEG1* については基質の再検討をアビセル等を用いて行い，実バイオマスを用いた検討も実施する予定である．
[1]赤澤真一，脇本真之介，渡邉俊則．特許番号 I 491397（台湾）．特許番号 9089581（米国）．特許第 5548931 号（日本），特許第 5505750 号（日本）．
[2]Akazawa, S., *et al*. Characterization of twoendoglucanases for the classification of the earthworm, *Eisenia fetida* Waki. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80(1):55-66 (2015).

earthworm, expression analysis, lumbrokinase

発表責任者：赤澤真一（s-akazaw@nagaoka-ct.ac.jp）

発表番号：3G040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 新規に作製したヒト細胞株とそのタンパク質生産能等について

# New human cell line and its protein productivity

○井上 祐一、山本 涼平、榮田 佳那子、川原 浩治（国立高専機構北九州高専）
○ Yuichi INOUE, Ryohei YAMAMOTO, Kanako SAKAEDA, Hiroharu KAWAHARA (NIT, Kitakyushu College)

【背景・目的】

幹細胞を用いた再生医療の研究進展やその実用化に伴って、今後ますますサイトカインが必要になると考えられる。しかし、現在使用されているサイトカインのほとんどは研究用のものであり、医療用のものは少ない。また、その生産宿主は主に動物細胞であり、シアル 酸組成がヒトとは異なるため医療用サイトカインとしては最適ではない。我々はこれまで国内外の製薬企業関係者の支援のもと、医薬品製造管理及び品質管理基準(GMP)に適合したハードウェア環境を整備し、管理運営体制に関するソフトウェア環境を構築してきた。そこで我々は、GMP に準拠したヒト細胞株を作製し、医療用タンパク質を効率的に生産することを目的とした。本発表では、その前段階である非 GMP 条件下において作製したヒト細胞株や、そのタンパク質生産能等について紹介する。

【方法】

ヒト末梢血から密度勾配遠心法によりリンパ球を分離し、発癌プロモーターPhorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)及び IL-6 を添加した 12.5%FBS-ERDF 培地で 1 週間培養を行った。その後、培地交換をしながら高密度のまま 3 ヶ月間培養を続けた。次にスケールアップを行い、継代培養が可能な細胞を限界希釈法でクローニングした。取得したクローンは、TERT 遺伝子や細胞表面抗原などの発現について解析した。また、IFN-beta をテストタンパク質として、タンパク質生産能を調べた。

【結果・考察】

我々は 3 つのヒト B リンパ球系クローンの取得に成功した。取得したクローンはすべて抗体を生産しており、分泌タンパク質の生産に有効であると考えられた。試験的に 1 つのクローンに IFN-beta 発現ベクターを導入し、IFN-beta タンパク質の安定発現について調べた結果、その生産能は同様に行ったチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株の約 200 分の 1 であることが分かった。現在、この原因が生産物に依存しているのかについては検討を行っている。また、今回の実験では CMV プロモーター制御系発現ベクターを使用したが、B リンパ球特異的プロモーター制御系発現ベクターによる発現実験も行っている。本研究の結果は、今後の GMP 環境下でのヒト細胞株の作製に役立つ。

biopharmaceutical, GMP, human cell line

発表責任者：井上 祐一（inoue@kct.ac.jp）

発表番号：3G041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 糖応答性遺伝子 ChREBPβは HNF4αにより転写制御される

# HNF4α regulates ChREBPβ gene expression.

○吉満 和、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院農）
○Nodoka YOSHIMITSU, Makoto SHIMIZU, jun INOUE, Ryuichiro SATO (Tokyo Univ.)

ChREBP（Carbohydrate Responsive Element-Binding Protein）は、糖の刺激に応答して糖・脂質代謝関連遺伝子の発現を制御する転写因子である。近年、新規アイソフォームである ChREBPβが白色脂肪組織において発見された。ChREBPβは、ChREBPαより短い N 末端を持ち、高い転写活性を有する。しかし、肝臓での ChREBPβの機能については報告がなされていなかった。そこで、我々は肝臓における ChREBPβの機能について研究を進めてきた。これまでに、マウス肝臓での ChREBPβ過剰発現により肝臓 TG が顕著に増加することや、フルクトースを長期摂取し脂肪肝を呈するマウス肝臓において ChREBPβの発現が亢進することを明らかにしてきた。

このように、ChREBPβは肝臓の糖・脂質代謝制御において重要な役割を果たすと考えられる。しかし、ChREBPβの発現制御機構は、ChREBP により転写が制御されること以外ほとんど不明である。我々は、ChREBPβの発現制御機構の解明を目指し、ルシフェラーゼアッセイを用いて ChREBPβプロモーター活性を変動させる転写因子の探索を行った。その結果、プロモーター活性を上昇させる転写因子として HNF4α（Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha)を同定した。マウス肝実質細胞で HNF4αをノックダウンしたところ、ChREBPβの発現が抑制された。また、プロモーター領域の解析により、ChREBPβプロモーター上に HNF4α応答配列である DR-1（Direct repeat-1）が見つかった。 さらに ChIP assay を行ったところ、DR1 付近に HNF4αが結合しており、HNF4αノックダウンによりその結合量が低下した。以上より、HNF4αはプロモーターに結合することで ChREBPβの発現を制御することが明らかになった。

以上のように、我々は HNF4αが ChREBPβの新規制御因子の一つであることを明らかにした。

NAFLD, ChREBP, HNF4α

発表番号：3G042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

インスリン受容体基質が cap 非依存的翻訳促進に果たす新規機能
Novel function of insulin receptor substrates (IRSs) in regulation of cap-independent translation

○中沖 優里[1]、尾添 淳文[1]、曽根 芽里[1]、山中 大介[1]、福嶋 俊明[1,3,4]、片岡 直行[2]、浅野 知一郎[3]、千田 和広[1]、伯野 史彦[1]、高橋 伸一郎[1] ([1]東大・院・農生科、[2]京大・院・医科、[3]広大・院・医歯薬保健学、[4]東工大・院・生命理工科)
○ Yuri NAKAOKI[1], Atsufumi OZOE[1], Meri SONE[1], Daisuke YAMANAKA[1], Toshiaki FUKUSHIMA[1,3,4], Naoyuki KATAOKA[2], Tomo-Ichiro ASANO[3], Kazuhiro CHIDA[1], Fumihiko HAKUNO[1], Shin-Ichiro TAKAHASHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]Kyoto Unv., [3]Hirosihima Univ., [4]Tokyo Inst. of Tech.)

インスリン受容体基質（IRS）は、インスリンおよびインスリン様成長因子（IGF）の受容体に内蔵されるチロシンキナーゼの基質のひとつで、インスリン様ペプチドの下流シグナル経路の活性化を仲介するアダプタータンパク質である。これまでに我々は、IRS が多くのタンパク質と相互作用して巨大な分子複合体を形成しており、この複合体には、RNA 結合タンパク質である Ras-GAP SH3-domain-binding-protein（G3BP1）など RNA 代謝に関与するタンパク質や RNA 自体も含まれていることを発見している。本研究では、IRS と G3BP1 の相互作用が翻訳制御に果たす役割を検討した。まず、乳がん細胞 MCF7 を用いて、IRS と G3BP1 との相互作用を抗 IRS1 抗体および抗 IRS2 抗体を用いた共免疫沈降によって解析したところ、G3BP1 は IRS1 のみと共免疫沈降されることが明らかとなった。また HEK293T 細胞に過剰発現した IRS1 と G3BP1 欠損変異体との共免疫沈降実験から、IRS1 は G3BP1 の acid rich region および arginine-glycine rich region と結合することがわかった。G3BP1 が cap 非依存的翻訳の開始に重要な RNA 配列である internal ribosome entry site (IRES) に結合することが報告されていることから、次に IRS1 複合体が IRES 配列を持つ mRNA と相互作用するかを調べた。抗 IRS1 抗体の免疫沈降物中に含まれる RNA を RT-PCR 法で解析したところ、IRES を有する Bcl-2、XIAP、IGF-I 受容体、c-myc、cyclin D1 などの mRNA の存在が確認された。更に、siRNA により IRS1 あるいは G3BP1 を発現抑制した MCF7 細胞を用いて、IRS1 複合体に存在が認められた mRNA の翻訳制御に IRS1 が関わっているかを解析した。その結果、IRS1 あるいは G3BP1 を発現抑制した場合、Bcl-2 の mRNA 量に変化は認められなかったが、Bcl-2 のタンパク量の減少が観察されたため、IRS1 と G3BP1 の複合体が cap 非依存的翻訳を正に制御することにより Bcl-2 タンパク質の発現が増加すると考えられた。最後に、IRS1 が Bcl-2 mRNA の cap 非依存的翻訳を制御するか調べるため、cap 依存的に翻訳される RFP と Bcl-2 mRNA の IRES 依存的に翻訳される GFP が、同一 mRNA 上に配置されるように設計した bicistronic reporter plasmid を作成した。これを IRS1 発現が抑制された MCF7 細胞に導入して、RFP および GFP 陽性細胞をフローサイトメーターによって計数した結果、IRS1 発現抑制細胞では対照細胞と比較して GFP/RFP 比が減少し、IRES 依存的翻訳が抑制されていることがわかった。以上の結果を併せ、IRS1 は、G3BP1 との相互作用を介して IRES を有する mRNA と複合体を形成し、cap 非依存的翻訳を促進する新規機能を有すると結論した。

insulin receptor substrate, G3BP1, translation

発表責任者：高橋伸一郎（atkshin@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3G043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# レスベラトロール投与によるオキシトシン受容体への影響

# Effect of Resveratrol on expression of Oxytocin Receptor

○菊池 昇平[1]、日出間 志寿[1]、堀江 謙吾[1]、平山 貴士[3]、鈴木 紳吾[1]、矢内 隆章[2]、高田 良二[2]、西森 克彦[1] ([1]東北大農、[2]キリン(株) R＆D、[3]順天堂大学医学部)
○ Shouhei KIKUCHI[1], SHIZU HIDEMA[1], Kengo HORIE[1], Takashi HIRAYAMA[3], Shingo SUZUKI[1], Takaaki YANAI[2], Ryouji TAKADA[2], Katsuhiko NISHIMORI[1] ([1]Tohoku Univ., [2]KIRIN Co., Ltd. R&D, [3]Jyuntendo Univ.)

〈背景・目的〉

トランスレスベラトロール(trans-resveratrol：RES)は、ぶどうの皮や赤ワイン、ピーナッツの赤皮に多く含まれるポリフェノールの一種であり、食品由来の生理活性物質として注目を集めている。実験動物への RES 投与実験によって抗酸化作用、抗がん作用、抗肥満作用、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、認知症予防効果など様々な作用が示されている。よってサプリメントや薬剤としての医学・健康促進の応用が期待されている。

共同研究先のメルシャンは赤ワインに含まれる RES の新規な作用を探索する目的で、RES を経口投与したマウスにおいて高架式十字迷路試験を行い、不安情動の緩和効果を明らかとした。また、マイクロアレイ解析により RES の投与が脳内のオキシトシン受容体(*Oxtr*)の発現上昇を引き起こす可能性を見出している（未発表データ）。オキシトシン(Oxt)は主に視床下部の室傍核(PVN)や視索上核(SON)で合成される全長 9 アミノ酸のペプチドホルモンで、下垂体後葉から血中に放出される。Oxt の受容体である Oxtr は 7 回膜貫通型 G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、Oxt シグナルによって子宮筋収縮、分娩誘導や射乳の促進、性行動、母性行動、社会記憶といった社会行動の制御に重要な役割を果たしている。そこで我々の開発した、Oxtr 発現細胞を蛍光タンパク質 Venus で標識できるマウス（*Oxtr-Venus* ノックインマウス）の脳組織の免疫染色により RES 投与による Oxtr 発現誘導の詳細な解析を行い、行動試験によりその効果を解析した。

〈方法〉

5~6 週齢の C57/BL6 オスマウスに対して RES 含有餌(RES0.05%)を 4 週間投与後に攻撃行動および Three Chamber Test を行った。次に RES の作用による Oxtr の発現変動を検証するため、成獣齢、オスの *Oxtr-Venus* ノックインヘテロマウスに対して RES を 30 mg/kg で腹腔内単回投与し、投与後 24 時間の脳組織に対して抗 GFP 抗体による免疫染色を行い Oxtr の発現変動を解析した。

〈結果〉

RES を 4 週間の食餌投与ののち行動試験を行った結果、攻撃行動(trans-RES: n=10, Control: n=7)、Three Chamber Test(RES: n=2, Control: n=4)ともに有意差は見られなかった。次に RES を腹腔内単回投与し Oxtr の脳内の発現変化を観察したところ、posterolateral cortical amygdaloid nucleus(PLCo)において Oxtr の発現細胞数が増加していた。PLCo は嗅覚器からの刺激が投射している領域であり, PLCo は社会行動にかかわる扁桃体や報酬、恐怖や快感にかかわる側坐核への投射が知られている。今後、RES が PLCo における Oxtr の発現を上昇させることによる社会行動の変化を解析する予定である。

Oxytocin, Resveratrol, Receptor

発表責任者：日出間　志寿（hidema@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：3G044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 脂肪組織慢性炎症における新規性ホルモン作用の機能解析

# A novel molecular mechanism of androgen action in adipocyte chronic inflammation

○諸岡 信克、植栗 慧、佐藤 隆史（群馬大学）
○Nobukatsu MOROOKA, Kei UEGURI, Takashi SATO (Gunma Univ.)

(目的)加齢に伴う性ホルモンの分泌低下は、性機能障害に加えて内臓脂肪性肥満を引き起こすことが知られている。そのため、代謝性疾患における性ホルモンによる病態制御の重要性が示唆されている。内臓脂肪性肥満はメタボリックシンドロームの基盤病態であり、マクロファージや T 細胞の浸潤によって、脂肪組織のリモデリングを伴った慢性炎症状態を呈する。現在まで、核内受容体を介した性ホルモン作用の分子機構はさまざまな方向から研究されてきたものの、炎症や代謝における性ホルモンの作用メカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで本研究は、脂肪組織慢性炎症の *in vitro* 解析モデルである成熟脂肪細胞とマクロファージの共培養を用いて、脂肪組織における標的遺伝子発現制御を介した性ホルモン作用のメカニズムの解明を目的とした。
(方法・結果)先ず、肥満組織の慢性炎症状態を *in vitro* で再現するため、脂肪細胞である成熟 3T3-L1 細胞と RAW 264.7 細胞由来の炎症性マクロファージを共培養した。その結果、炎症性サイトカインの発現は顕著に亢進し、抗炎症性サイトカインの発現は減少したことから、この共培養を *in vitro* 慢性炎症解析系とした。次に、この系に種々の性ホルモンを添加し、炎症および抗炎症性サイトカインの mRNA の発現レベルを定量 PCR で解析した。その結果、脂肪組織にマクロファージを浸潤させ、炎症の増悪に関与する炎症性サイトカインである MCP-1 (monocyte chemotactic and activating factor)の mRNA の発現レベルは、高活性型のアンドロゲンである DHT (dihydrotestosterone)添加によって顕著に抑制された。そこで、MCP-1 の遺伝子発現を制御するアンドロゲン-AR の分子メカニズム明らかにするために、アンドロゲン受容体(AR)を遺伝子導入した 293T 細胞を用いて、MCP-1 遺伝子のレポーターアッセイを行った。その結果、MCP-1 の転写活性は DHT 添加によって顕著に抑制された。興味深いことに、転写開始点上流 200 bp から 141 bp までの領域が、アンドロゲン-AR による転写抑制において重要な役割を有することが明らかとなった。現在は、MCP-1 プロモーターの点変異体や部分欠損体を用いて、アンドロゲン-AR が機能する配列の特定を目指している。

Androgen, MCP-1, chronic inflammation

発表番号：3G045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 時計遺伝子 BMAL1　による海馬 CA1 ニューロンの樹状突起スパイン形態の制御

# BMAL1 regulates spine morphology of CA1 neuron in the hippocampus

○宮原 瑞希[1]、長谷川 俊介[1]、喜田 聡[1,2]([1]東農大・応生科・バイオ、[2]科学技術振興機構・CREST)
○Mizuki MIYAHARA[1], Shunsuke HASEGAWA[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep.of Bioscience,Tokyo Univ.of Agriculture, [2]JST,CREST)

サーカディアンリズムの中枢は視床下部の視交叉上核（SCN）であり、転写調節因子 BMAL1 による転写制御を起点としてサーカディアン転写リズムが産生されている。この BMAL1 によるサーカディアン転写リズムは末梢組織においても観察されており、SCN は個体全体のリズムを統合していると考えられている。このサーカディアンリズムは学習記憶能力を中心とする認知機能を制御すると考えられているものの、認知機能との関連性の実体は未だ不明である。我々は、前脳サーカディアン転写リズムと学習・記憶能力との関係を明らかにするために、前脳特異的にドミナントネガティブ型 BMAL1（dnBMAL1）を発現する遺伝子改変マウス（dnBMAL1 マウス）を作製し、この変異型マウスの学習記憶能力の解析を進めてきた。現在までに、dnBMAL1 マウスでは前脳領域の時計機能が破壊されており、さらに、海馬依存性記憶の想起に障害が観察されることを明らかにし、前脳領域の時計機能が記憶想起をサーカディアン制御すると結論している。本研究では、前脳特異的な時計機能の破壊が導く記憶想起障害の機構を明らかにすることを目的として、学習記憶能力を制御すると考えられているシナプスの形態に着目し、dnBMAL1 マウスと神経細胞特異的プロモーターで GFP を発現する Thy1-GFP マウスを交配してダブルトランスジェニックマウスを作製し、海馬、前頭前野及び扁桃体領域のニューロンを可視化して樹状突起スパインの形態を解析した。dnBMAL1 マウスにおいて、海馬依存性記憶の想起に特に顕著な障害が観察される ZT10（明期開始 10 時間後）に解析した結果、dnBMAL1 マウスは海馬 CA1 領域においてスパイン密度の減少を示すこと、特に小型のスパイン（thin spine）の有意な減少を示すことが明らかとなった。これに対し、前頭前野、扁桃体、海馬歯状回領域ではスパイン密度の異常が認められなかった。以上の結果より、前脳領域 BMAL1 は海馬 CA1 領域における樹状突起スパインの形態制御に関与することが示唆され、この異常が記憶想起障害の一因である可能性が示された。

BMAL1, circadian, dendritic spine

発表番号：3G046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 転写因子 CREB 恒常的活性化による海馬ニューロンスパイン密度と樹状突起分枝数の増加

# Constitutive activation of CREB increases dendritic complexity and spine density in hippocampal neurons

○芹田 龍郎[1,2]、福島 穂高[1,2]、喜田 聡[1,2]（[1]東京農業大学院・農・バイオ、[2]JST・CREST）
○ Tatsurou SERITA[1,2], Hotaka FUKUSHIMA[1,2], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep.of Bioscience,Tokyo Univ.of Agriculture, [2]JST, CREST)

転写因子 CREB による転写活性化は長期記憶形成に必須である。我々は、CREB が記憶能力を正に制御するのではないかと考え、リン酸化非依存的に転写活性化を導く恒常活性化型 CREB 変異体（CREB DIEDML）を前脳領域で発現する変異型マウス(DIEDML マウス)を作製し、CREB の gain of function の効果を行動学的・生理学的に解析してきた。現在までに、DIEDML マウスでは、長期記憶のみならず、新規遺伝子発現を必要としない短期記憶までも顕著に向上していること、さらに、この変異型マウスは時間間隔を空けて条件刺激(CS; 音)と非条件刺激(US; 電気ショック)を提示して、両刺激の関連付けを学習させる痕跡恐怖条件付け課題(trace fear conditioning)においても、野生型マウスよりも音と電気ショックの関連を顕著に素早く学習することを示してきた。一方、ニューロンの樹状突起の形態や樹状突起スパインの形状及び数が学習及び記憶能力に強く影響を及ぼすことが示唆されている。そこで、本研究では、DIEDML マウスで観察された短期記憶並びに学習能力の向上は、CREB 恒常的活性化によるニューロンの形態の変化を原因とするのではないかと考え、この仮説を検討した。特に、時間間隔を空けた関連付け学習と、短期記憶の向上が観察されている単回学習の両者を統合して制御しているのが海馬 CA1 領域であるため、ニューロンで GFP を発現する Thy1-GFP マウスと交配した DIEDML マウスの脳を CLALITY 法により透明化し、CA1 ニューロンの樹状突起および樹状突起スパインについて３次元的に解析した。その結果、DIEDML マウスの CA1 ニューロンでは樹状突起分枝数および樹状突起スパイン密度の顕著な増加が観察された。従って、DIEDML マウスでは、このニューロン形態の複雑化により学習能力並びに短期記憶が向上していることが示唆された。

CREB, memory, learning

発表番号：3G047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 新規ヒストン H3 バリアント H3mm7 は骨格筋分化能を制御する
# Novel histone H3 variant, H3mm7, regulates skeletal muscle differentiation

○原田 哲仁[1]、前原 一満[1]、田口 裕之[2]、佐藤 優子[3]、謝 炎[2]、木村 宏[3]、胡桃坂 仁志[2]、大川 恭行[1]([1]九大医、[2]早稲田先進理工、[3]東工大生命理工)
○Akihito HARADA[1], Kazumitsu Maehara[1], Hiroyuki Taguchi[2], Yuko Sato[3], Yen Xia[2], Hiroshi Kimura[3], Hitoshi Kurumizaka[2], Yasuyuki Ohkawa[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Waseda Univ., [3]Tokyo Institute of Tech.)

骨格筋分化では、ヒストン H3 バリアントの一つであるヒストン H3.3 が、分化前から分化特異的遺伝子を“マーキング”することで分化後の選択的な遺伝子発現をもたらす。ゆえに、ヒストンの選択的な取り込み機構は、骨格筋分化において最も初期の遺伝子選択機構であると考えられる。我々は、最近、マウスゲノムにおいて、未知のヒストン H3 バリアント遺伝子を 14 種同定した。更に、これらの新規 H3 バリアント遺伝子のうち、H3mm7 を含む複数のヒストンバリアントが H3.3 と同様に分化遺伝子の選択的遺伝子発現に関与することを明らかにした。そこで本研究では、マウス組織間で特に骨格筋で発現が高かった H3mm7 の機能解析を行った。まず、CRISPR-Cas9 システムを用いて骨格筋芽細胞 C2C12 細胞で H3mm7 遺伝子座を完全にノックアウト(KO)した細胞株を作成した。mRNA-seq により骨格筋分化能を評価したところ、H3mm7 KO 細胞は野生型に比べ骨格筋分化が遅延していた。一方で、GFP を融合させた H3mm7 を強制発現させた H3mm7 KO 株は、骨格筋分化能が回復した。H3mm7 の特性を調べるために H3mm7 を含むヌクレオソームの結晶構造解析を行ったところ、H3.3 のアミノ酸配列と異なる 2 つの H3mm7 固有のアミノ酸のうち A57 がヌクレオソームにおける不安定性をもたらすことが示唆された。生化学的アプローチによる機能解析により検証した結果、H3mm7 を含むヌクレオソームは H3.3 ヌクレオソームに比べて不安定であることが示された。次に、H3mm7 遺伝子を持たない NIH3T3 線維芽細胞に MyoD を強制発現させ骨格筋形質転換を誘導する系を用いて、H3mm7 及び S57A 変異を持つ H3.3 を安定に発現させた NIH3T3 は、野生型に比べ骨格筋分化が促進されていた。これらのことから、H3mm7 は、分化過程で骨格筋遺伝子に優先的に取り込まれることでヌクレオソームを不安定化し、遺伝子発現を促進していることが示唆された。

skeletal muscle differentiation, histone variant, epigenetics

発表番号：3G048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 共培養系において初代培養細胞が iPS 細胞の分化成熟に与える影響

# Effect on differentiation and maturation of iPS cells by co-culturing with primary cultured neurons derived from mice

○八代 侑己[1,2]、川口 英夫[1] ([1] 東洋大学、[2] 日本農芸化学会)
○Yuki YASHIRO[1,2], Hideo KAWAGUCHI[1] ([1]Toyo Univ, [2]JSBBA)

【目的】iPS 細胞 （induced Pluripotent Stem cells）は様々な細胞に分化することができる細胞である。例えば、神経成長因子（NGF）などの添加によって神経細胞に分化誘導される。しかしながら、今後再生医療の臨床現場では、完全に分化した iPS 細胞を患者に移植するのではなく、分化しきっていない iPS 細胞を生体内に移植し、生体内で完全に分化させる治療も多用されると予想する。そのため、非完全分化の iPS 細胞の生体内移植を模した、iPS 細胞と生体細胞の共培養における iPS 細胞の分化成熟過程を明確にすることは必要不可欠であると考える。本研究で我々は、成熟神経細胞マーカである NeuN の遺伝子とタンパク質発現、および分化神経細胞における電気的活動の獲得について調査した。分化神経細胞の同定に用いられる神経細胞マーカの遺伝子やタンパク質の発現と、パッチクランプ測定法を用いた分化神経細胞の電気的活動を測定して分化神経細胞の成熟度を調査する。そして、生体細胞と共培養することによる NeuN の遺伝子とタンパク質の発現と分化神経細胞の電気的活動の変化を、分化神経細胞の物質的成熟と機能的成熟の相互関係について検討する。
【方法】シャーレ中のフィーダ細胞の上に iPS 細胞を播種し、2～3 日間培養した。そして、iPS 細胞を非接着性のシャーレに移し、6 日間浮遊培養し iPS 細胞コロニーを作成した。その後、P3 マウスから摘出した脊椎後根神経節（DRG）細胞をセルカルチャーインサート上に播種し、iPS 細胞コロニーを 24well 培養プレートに播種し 6～24 日間共培養を行った。NeuN を用いて免疫蛍光染色を行い、フルオロ・イメージアナライザーを用いて蛍光強度を測定し、分化神経細胞の分化成熟度を検討した。また、リアルタイム-PCR を用いて遺伝子の発現割合について検討する。
【結果】iPS 細胞をマウス DRG 細胞と共培養した結果、iPS 細胞単独で培養した場合と比較して、NeuN タンパクの発現が有意に低くなった。このことから、マウス DRG 細胞は iPS 細胞の神経細胞への分化成熟に対して抑制的に働いていることが分かった。また、iPS 細胞由来の分化神経細胞における NeuN の遺伝子発現量を計測したところ、培養 12 日目において最も多く発現した。また、その遺伝子発現は一過性のものであった。iPS 細胞由来の分化神経細胞における NeuN のタンパク質発現量は 3～21 日にかけて急激に増加し、その後は一定量の発現を示した。この結果より、iPS 細胞は培養 12 日目に NeuN の遺伝子発現が活発となり、培養 21 日目まで急激にタンパク質が増加した後およそ一定量維持されることが確認できた。先行研究で培養 27 日目の iPS 由来の分化神経細胞では自発発火が確認されており、神経機能の獲得には 1 か月程度の培養が必要であることが分かった。

iPS cells, co-culture, neuron

発表番号：3G049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マスト細胞における C/EBP α遺伝子の発現抑制の調節

# Regulatory mechanism for suppression of C/EBPα gene expression in mast cells

○笠倉 和巳[1]、八代 拓也[1]、原 むつ子[2]、奥村 康[2]、西山 千春[1] ([1]東京理大・基礎工、[2]順天堂大・医 アトピー疾患研究センター)
○KAZUMI Kasakura[1], Takuya Yashiro[1], Mutsuko Hara[2], Ko Okumura[2], Chiharu Nishiyama[1] ([1]Tokyo University of Science, [2]Juntendo University)

転写因子 C/EBPαは、共通ミエロイド系前駆細胞から顆粒球/単球・マクロファージ前駆細胞への分化に関与しており、好中球やマクロファージでの発現が高い。マスト細胞は、寄生虫感染防御やアレルギー反応誘導に関わる白血球であり、同じくミエロイド系細胞として共通前駆細胞から分化するが、分化・成熟に伴い C/EBPαの発現が低下し、このことがマスト細胞特異的機能獲得を制御する一因となっている。しかし、マスト細胞の分化に伴う C/EBPαの発現抑制の仕組みは不明であることから、今回、以下の解析を行った。まず、ヒトマスト細胞株 LAD2 と単球系細胞株である THP-1 および U937 における C/EBPαの mRNA 発現を測定したところ、LAD2では THP-1 や U937 に比べて C/EBPα発現が顕著に低かった。このことから、C/EBPα発現は転写レベルで制御を受け、これら細胞株はマスト細胞系列と単球系列の C/EBPα転写調節解析に有用であることが示された。次に C/EBPα遺伝子の□フラッキング領域を遺伝子クローニングし、その転写活性化能をルシフェラーゼアッセイで測定した。LAD2 では THP-1 と比較して C/EBPαプロモーター活性は低く、mRNA 量と相関していることが判明した。続いて、C/EBPα遺伝子のプロモーター領域に存在する CpG アイランドについてバイサルファイトシークエンス法と ChIP アッセイを用いて、それぞれ DNA メチル化状態とヒストン修飾状態を解析した。LAD2 では C/EBPα遺伝子のプロモーター領域において高度にメチル化されている領域が存在し、同領域のヒストン H3 および H4 のアセチル化は THP-1 に比べて低かった。そこで、DNA メチル化酵素阻害剤である 5-Azacytidine（5-Aza）やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A（TSA）存在下で LAD2 を培養し、C/EBPαの mRNA 発現量を測定した。その結果、5-Aza、TSA 処理により C/EBPαの mRNA 発現量は上昇し、5-Aza と TSA の両方の処理では相乗的効果がみられた。以上のことから、マスト細胞において C/EBPα発現は転写因子によるプロモーターの活性化調節に加えて、DNA メチル化やヒストンの脱アセチル化といったエピジェネティックな制御を受けていることが示された。

mast cells, C/EBPα, epigenetic

発表番号：3G050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ミズクラゲ幼生の内在性変態制御物質の探索

# Characterization of endogenous metamorphosis-regulating substances in the moon jellyfish larvae.

中谷 みなみ[1]、辻田 菜摘[1]、吉岡 沙弥香[1]、小山 寛喜[1]、荒川 賢治[2]、○国吉 久人[1]（[1]広島大院・生物圏、[2]広島大院・先端研）
Minami NAKATANI[1], Natsumi TSUJITA[1], Sayaka YOSHIOKA[1], Hiroki KOYAMA[1], Kenji ARAKAWA[2], ○Hisato KUNIYOSHI[1] ([1]Grad. Sch. Biosphere Sci. Hiroshima Univ., [2]Grad. Sch. AdSM Hiroshima Univ.)

【目的】刺胞動物ミズクラゲ(*Aurelia* sp.)のライフサイクルは、無性世代(ポリプ世代)と有性世代(クラゲ世代)を繰り返す。ポリプは出芽や分裂によって無性的に増殖し、冬期に海水温が低下すると、有性世代の前段階であるストロビラになる。ストロビラは胴体部に複数の節を持ち、１つ１つの節が盤へと形態変化する。さらに盤は一枚ずつ遊離して、それぞれがエフィラ幼生となり、成長して成体のクラゲとなる。ポリプ→ストロビラ→エフィラの変態過程はストロビレーションと呼ばれる。ストロビレーションは、胴体部の節が口丘側から足盤側に向けて1つずつ増えていく分節形成期と、完成したそれぞれの節がエフィラの形態へと変化していく形態形成期の２段階に分けられる。

演者らはこれまでに、非天然物のストロビレーション誘導物質としてindomethacin [*Biosci. Biotech. Biochem.*, **76**: 1397-1400 (2012)] や5-methoxy-2-methylindole (MMI)などを見出している(昨年度大会で報告)。一方、ミズクラゲと同じ刺胞動物門に属するウミヒドラなどでは、変態や形態形成に関与する内在性物質が同定されている。これらの知見から、ミズクラゲにおいてもストロビレーション過程の分節形成や形態形成を制御する内在性物質の存在が予想される。そこで本研究では、内在性のストロビレーション制御物質の同定を目指して、まず様々な生物検定法を用いて活性物質の存在を確認し、生物活性が検出できた物質についてはその精製を試みた。

【方法】ポリプまたは分節形成期ストロビラを冷methanol中でホモジナイズし、遠心分離後の上清をmethanol抽出画分とした。続いて、methanol抽出後の残渣を冷2% NaCl水溶液中でホモジナイズし、遠心分離によってNaCl水抽出画分を得た。各変態ステージ由来のそれぞれの抽出画分を、以下の4種類の生物検定法に供した。①ポリプに試料とストロビレーション誘導物質MMIを同時投与し、ストロビレーションが阻害されるか観察した。②ポリプの胴体部を切断して口丘側と足盤側に分離し、試料を投与して切断面から節が形成されるか観察した。③分節形成開始直後のストロビラに試料を投与し、分節形成・形態形成が阻害されるか観察した。④分節形成開始直後のストロビラの胴体部を切断して口丘側と足盤側に分離し、試料を投与して変態阻害や形態異常が認められるか観察した。

【結果】ポリプmethanol抽出画分では、①で阻害活性を示したのに対し、③④ではストロビレーションが正常に進行したことから、ストロビレーション開始阻害物質の存在が示唆された。また、ストロビラNaCl水抽出画分では、①④で分節形成の中断が認められたことから、分節形成阻害物質の存在が示唆された。現在、これら2物質の精製を進めており、その結果についても報告する予定である。

jellyfish, metamorphosis, bioactive substance

発表責任者：国吉久人（hkuni@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：3G051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

FRET を生じる蛍光発色団を導入した昆虫幼若ホルモン結合タンパク質の特性
Characterizations of insect juvenile hormone binding protein with fluorescent chromophres to cause FRET

○塩月 孝博[1]、山崎 俊正[1]、鈴木 倫太郎[1]、土屋 渉[1]、菊田 真吾[2] ([1]農生資研、[2]東京農工大農)
○Takahiro SHIOTSUKI[1], Toshimasa YAMAZAKI[1], Rintaro SUZUKI[1], Wataru TSUCHIYA[1], Shingo KIKUTA[2] ([1]NIAS, [2]Tokyo Univ. A&T)

【目的】
チョウ目昆虫に固有の血液性幼若ホルモン結合タンパク質（JHBP）の立体構造について、これまでにリガンド結合／未結合の各状態の解析から、JHBP分子の両端に存在する疎水性ポケットのうちの一方に、幼若ホルモン（JH）分子は奥深く入り込んで安定していることが分かった。そこで、さらにそのJHの結合様式の詳細を解析するとともに、分子内に2つの異なる蛍光発色団を導入することで、リガンド結合に伴う蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）現象発生の可能性を検討することを目的とした。
【方法】
カイコJHBPのリガンド結合／未結合の各状態についてX線結晶解析およびNMRによる構造解析を行った。その構造を元に、αヘリックス側にGFPから改変されたVenus、JHBP本体側にサンゴ由来のTFPの2つの異なる蛍光発色団を導入したJHBPの組換えタンパク質を調製し、リガンド存在／非存在下における蛍光特性を蛍光プレートリーダーで解析した。
【結果および考察】
まず、JH存在および非存在下の各立体構造を丁寧に比較したところ、JHが結合するとN末端寄りの短いαヘリックスが疎水性ポケットに蓋をする位置へ大きく構造変化することが明らかとなった。またJHの標的細胞では膜との相互作用により蓋が開き、JHが解離することが示唆された。このリガンド結合による大きな構造変化の情報をもとに、αヘリックス側にVenus、JHBP本体側にTFPの2つの異なる蛍光発色団を導入したJHBPを調製し、その相互作用による蛍光特性を解析したところ、JH存在下で濃度依存的に異なる波長での蛍光強度の変化、すなわちFRET現象が発生するものを発見した。JHI、II、III、およびJH活性物質と構造的にそれらに関連した化合物によるFRET現象の発生を解析したところ、JHの生物活性とFRET強度との間にある程度の相間が認められた。

Structural mechanism of JH delivery in hemolymph by JHBP of silkworm, Bombyx mori, R. Suzuki, A. Tase, Z. Fujimoto, T. Shiotsuki and T. Yamazaki, Scientific Reports, 1, 133 (2011).
Crystal structure of silkworm Bombyx mori JHBP in complex with 2-methyl-2,4-pentanediol: Plasticity of JH-binding pocket and ligand-induced conformational change of the second cavity in JHBP, Z. Fujimoto, R. Suzuki, T. Shiotsuki, W. Tsuchiya, A. Tase, M. Momma, and T. Yamazaki, PLoS ONE, 8, e56261 (2013).

juvenile hormone, FRET

発表責任者：塩月 孝博（shiotsuk@affrc.go.jp）

発表番号：3G052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 超深海性ヨコエビの地理的隔離

# Geographical isolation of the deep-sea amphipod

○小林 英城[1]、長濱 統彦[2]、荒井 渉[1]、高見 英人[1]、藤岡 勘太郎[3]、木戸 ゆかり[1] ([1]海洋機構、[2]ノートルダム大食品栄養、[3]神奈川大工)
○Hideki KOBAYASHI[1], Takahiko NAGAHAMA[2], Wataru ARAI[1], Hideto TAKAMI[1], Kantaro FUJIOKA[3], Yukari KIDO[1] ([1]JAMSTEC, [2]Notre Dame Univ., [3]Kanagawa Univ.)

【緒言】ヨコエビ類は海洋環境に広く分布し、深度 2,000 m を超える深海環境に生息する種が知られている。このような深海性ヨコエビ類の中でも、カイコウオオソコエビとして知られている *Hirondellea gigas* は、マリアナ海溝や小笠原海溝の深部、深度 8,000 m を超える超深海海域にのみ生息する(1)。また、他の *Hirondellea* 属ヨコエビ類はケルマディック海溝やチリ海溝など、やはり深度 8,000 m 付近の超深海に生息している。一方、*Hirondellea* 属ヨコエビ類は深度 6,000 m より浅い海域で採取された例はほとんど無く、深海底で採取した後に引き揚げた際、深度 6,000 m 付近で死滅する事が報告されている(2)。つまり、*Hirondellea* 属ヨコエビは大きな海溝の深部に生息し、海溝間を移動する事は出来ない事が予想される。そこで、マリアナ海溝に隣接する伊豆・小笠原海溝の最深部より超深海性ヨコエビを採取し、マリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部で採取された *H. gigas* と遺伝的・生化学的な差異について検討を行った。

【結果および考察】伊豆・小笠原海溝最深部において、ベイトトラップを仕掛けて深海生物の採取を行った所、超深海性ヨコエビが多数採取できた。マリアナ海溝チャレンジャー海淵のカイコウオオソコエビと遺伝的な差異を検討するため、ヨコエビ個体より遺伝子を抽出し、ミトコンドリア cytochrome oxidase I 遺伝子(COI)の塩基配列決定を行った。COI 塩基配列に基づいて系統解析を行った結果、カイコウオオソコエビと伊豆・小笠原海溝から採取されたヨコエビは、ほとんど同一である事がわかった。また、伊豆・小笠原海溝由来のヨコエビが、カイコウオオソコエビと同様の消化酵素を持っているか否かについて検討を行った。その結果、伊豆・小笠原海溝由来のヨコエビはカイコウオオソコエビと同様にセルラーゼ等の多糖分解酵素を持っていたが、反応至適 pH や反応至適温度などが異なっていた。また、カイコウオオソコエビには無いβグルコシダーゼを持っている事がわかった。以上の事より、カイコウオオソコエビと小笠原海溝由来ヨコエビは、遺伝学的にはほぼ同一であるものの、生化学的な特性は異なっている事が分かった。伊豆・小笠原海溝とマリアナ海溝は小笠原海台により分断され、境界の平均深度は 3,000 m である。また分断は 50Ma 前後に起きていると推定されている。これら生化学的な変化は分断後に起きた各環境への適応の一環であると予想される。

(1) Hessler RR, et al. Deep Sea Res 25: 1029-1047 (1978)
(2) 13. Yayanos AA Science 200: 1056-1058 (1978)
(3)Kobayashi H et al. PLoS ONE 7, e42727 (2012)

cellulase, amphipod, deep sea

発表責任者：小林英城（hidekik@jamstec.go.jp）

発表番号：3G053
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ダイズシストセンチュウの硝酸イオンへの誘引

# Chemotaxis of soybean cyst nematode to nitrate

○細井 昂人[1]、内山 博允[2]、近藤 竜彦[3]、佐々木 康幸[1]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東農大・バイオ、[2]東農大生物資源ゲノム解析センター、[3]名大院・生命農学)
○Akito Hosoi[1], Hironobu Uchiyama[2], Tatsuhiko Kondo[3], Yasuyuki Sasaki[1], Shunsuke Yajima[1], Shinsaku Ito[1] ([1]Tokyo University of Agriculture, [2]NODAI Genome Research Center, [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】

ダイズシストセンチュウ（SCN）は、ダイズ、アズキ、インゲンなどのマメ科植物根に寄生する植物寄生線虫である。SCN の特徴として、宿主の非存在下では、シストと呼ばれる殻に包まれ保護されているが、宿主の存在を認識するとシストから脱出し、宿主植物の根へと移動、侵入することが知られている。また SCN の行動を制御する物質としては、孵化促進物質であるグリシノエクレピン類が、宿主植物であるインゲンの根から単離されている。一方で、モデル線虫である *C.elegans* で報告されているような、誘引を引き起こす物質については、ほとんど知られていない。そこで我々は、SCN の誘引物質の特定を目的に、近縁種で誘引が報告されている各種イオンを用いてスクリーニングを行った。さらに、誘引関連遺伝子の同定のため、特定した誘引物質に対する SCN 応答遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】

誘引試験は、0.7%寒天を固めた直径 35 mm の丸シャーレ内で行った。サンプルを含ませた寒天玉をプレートの端から 5.5 mm 離れた位置に設置し、対称の地点にコントロール寒天玉を設置した。寒天玉を設置した地点の周囲 0.7 mm の個体を誘引された線虫とし、摂取個体数から誘引率を計測した。

サンプルに $NaNO_3$、$Na_2SO_4$、NaCl、$NaH_2PO_4$ を用いて試験を行ったところ、$NaNO_3$ にのみ誘引を引き起こすことが分かった。さらに、$KNO_3$、$MgNO_3$、$NH_4NO_3$、$Ca(NO_3)_2$ など $NO_3^-$ を含む化合物を用いて誘引試験を行ったところ、全ての化合物への線虫の誘引がみられた。

続いて、$NaNO_3$ を用いた誘引関連遺伝子の探索を行った。孵化した線虫を、濃度 10 mM の $NaNO_3$ に 10 分間、または 60 分間処理した後、RNA の抽出を行った。抽出した RNA からライブラリーを作製し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq 解析を行った。denovo assembly の後、応答遺伝子の抽出を行っている。

Nitrate, Soybean cyst nematode, RNA-seq

発表番号：3G054
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# *o*-phenanthroline によるダイズシストセンチュウの孵化促進

# Hatching acceleration by *o*-phenanthroline in soybean cyst nematode eggs

○野中 詩織[1]、細井 昂人[1]、内山 博允[2]、近藤 竜彦[3]、佐々木 康幸[1]、浅見 忠男[4]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東農大・農学研・バイオ、[2]東農大生物資源ゲノム解析センター、[3]名大院・生命農学、[4]東大院・農生科・応生化)

○ Shiori NONAKA[1], Akito HOSOI[1], HIronobu Uchiyama[2], Tatsuhiko KONDO[3], Yasuyuki SASAKI[1], Tadao ASAMI[4], Shunsuke YAJIMA[1], Shinsaku ITO[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]NODAI Genome Research Center, [3]Bioagricultural Sciences,Nagoya Univ., [4]Dept. Appl. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】

ダイズシストセンチュウ（以下 SCN）は、マメ科植物の根から栄養を奪うことで作物の生長を阻害し、収量を減少させる。根に寄生した SCN の雌は体内に多数の卵を保持したまま、表皮をシストに変える。その後、卵内の幼虫は付近のマメ科植物の根が分泌する孵化促進物質を認識することで孵化し、根に寄生する。

シストセンチュウは農薬や環境変化に耐性を持つため、現在では汚染土壌の改善に抵抗性品種の栽培や薬剤灌注処理が行われている。それらに続く新たな改善法として、宿主が栽培されていない環境の SCN を人為的に孵化させ、餓死させる方法も注目されている。しかし、それに用いる孵化促進物質として、これまでにインゲン（本金時と紅金時）の根から単離された Glycinoeclepin 類（以下 GEs）が報告されているが、GEs の全合成は複雑であり、農薬としての供給は困難である。そこで、孵化活性を示す化合物の探索を行い、新たな孵化促進物質の獲得を目指した。

【方法及び結果】

最終濃度を 3 mM に調製した化合物を SCN に添加し、SCN に対する孵化活性を計測した。それらの化合物と滅菌水のみを添加した SCN の孵化率との比較から、*o*-Phenanthroline（以下 Phen）に有意な孵化活性が示された。次に、Phen と GEs を SCN に添加し、孵化率の経時変化を計測した。その結果、Phen は GEs よりも早く孵化が見られた。このことから、SCN の孵化メカニズムにおいて Phen が GEs とは異なる作用をする可能性が考えられた。続いて、その活性が構造由来か確かめるために、Phen の類似化合物 2,2'-Bipyridyl、phenanthrene、biphenyl を SCN に添加し、それぞれの孵化率の比較を行った。その結果、Phen と 2,2'-Bipyridyl に GEs よりも早く孵化が見られた。これらはキレート剤としての知見があることから、Phen と金属イオンとの共処理による孵化活性への影響を観察したところ、Phen のキレート体では活性が失活していた。

soybean cyst nematode, *o*-phenanthroline, hatching stimulants

発表番号：3G055
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# アコヤガイ真珠の白化現象の原因となる微細構造と有機基質に関する研究

# Studies on organic matrices and microstructure of iridescence-lacking pearl formed in *Pinctada fucata*

○鈴木 道生[1]、三木 匠[1]、向井 広樹[2]、青木 秀夫[3]、吉村 悦郎[1]、作田 庄平[1]、長澤 寛道[1]、小暮 敏博[2] ([1]東大院農、[2]東大院理、[3]三重県水産研)
○Michio Suzuki[1], Takumi Miki[1], Hiroki Mukai[2], Hideo Aoki[3], Etsuro Yoshimura[1], Shohei Sakuda[1], Hiromichi Nagasawa[1], Toshihiro Kogure[2] ([1]Univ. Tokyo (Agriculture), [2]Univ. Tokyo (Science), [3]Mie Pref. Fish. Res. Inst.)

アコヤガイは日本では真珠養殖に利用される貝として知られており、その商業的な重要性から多くの研究が行われている。アコヤガイの貝殻は、内側は炭酸カルシウムのアラゴナイト結晶から成る真珠層、外側は炭酸カルシウムのカルサイト結晶から成る稜柱層と二層構造をしている。宝石である真珠は貝殻の真珠層の構造と同様の構造をしている。真珠層のアラゴナイト結晶は厚さが 300-400 nm 程度、直径が 2-4 μm 程度の扁平なタブレット状の形態をしており、これらのタブレットが有機膜層と交互に積み重なることで層状の真珠構造を形成する。真珠の層状構造の間隔が可視光の波長に近いことから、可視光の領域における光の干渉作用が生じ、独特の真珠模様を作り出す。また、真珠の光沢は表面の構造の滑らかさに依存しており、表面が滑らかなほど良い光沢となる。これらの干渉色と光沢は真珠の価値を決める重要な因子である。

アコヤガイ人工生産種苗の系統で、光沢はあるが干渉色を全く示さない真珠を作る個体が見出された。この真珠は肉眼で白色を呈していたため白化真珠と呼ぶこととした。また、貝殻真珠層の白化した個体もみられ、白化真珠の生産との関係が窺われた。本研究では、この白化の原因を明らかにするために、白化真珠および貝殻の真珠層の微細構造の観察および有機基質成分の解析を行った。

白化真珠および貝殻の切断切片を作成し光学顕微鏡による観察を行ったところ、白化真珠および貝殻には、成長に沿うように光の透過を阻害する暗いコントラストの線が非常に多く含まれていることが判明した。この暗いコントラストの線の部分を走査型電子顕微鏡によって観察したところ、多くの粒状の物質が真珠層のタブレット構造を挟む有機膜層に沿って形成されている様子が観察された。この粒状の物質は反射電子検出器による観察で暗いコントラストを示し、エネルギー分散型 X 線分析により酸素原子と比べて炭素原子を多く含むことが判明したことから有機物の粒子ではないかと考えられた。以上の結果から、白化真珠および貝殻の白化の原因は粒子状の有機物がタブレット構造を挟む有機膜層に凝集することで光の吸収、散乱を行い、干渉作用の減衰により干渉色が無くなり白化したものであると考えられた。さらに、これらの有機物粒子を含む白化真珠層を脱灰し、特異的に含まれる有機基質の解析を行ったところ N 末端配列が欠損した不完全な nacrein 分子が含まれることが判明した。現在、不完全な nacrein 分子が有機物粒子に含まれるのか、抗体を使った免疫染色を用いて確認を行っている。

biomineralization, pearl oyster, calcium carbonate

発表責任者：鈴木道生（amichiwo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3G056
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Genomic DNA cloning of sqst-3 gene, which encodes a predicted ZZ-type zinc finger protein in *C. elegans*

○Zhanar Nurtoleu, Noboru Sasagawa (Tokai University)

【Introduction】ANOX-R5 is an extract from red wine, which contains polyphenols. In previous work, we reported that a lifespan in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was extended by adding ANOX-R5 to the medium, and microarray experiment indicated that the addition of ANOX-5 to the medium affected gene expressions of *C. elegans*. One of upregulated gene was sqst-3 (T26H2.5), which contains ZZ-type zinc finger domain. Although the physiological function of sqst-3 is unknown, we hypothesize that zinc finger domain of sqst-3 enables the gene to play a role as transcription factor, and an upregulation of the sqst-3 gene affects expressions of its downstream genes. To make this point clear, we first tried to obtain sqst-3 genomic DNA, containing putative promoter region.

【Methods】We tried to clone sqst-3 genomic DNA from *C. elegans*. A length of transcribed sqst-3 pre-mRNA is assumed as 1256bp. We decided to obtain also over upstream 2309bp putative promoter region and downstream 1930bp of the gene. To make a cloning step more specific, we decided to clone sqst-3 genomic region (total 5495bp) in three parts (fragment 1, 2 and 3). For each fragment, forward and reverse primers were designed. Fragment 2 and 3 was successfully amplified by PCR, and cloned into pMD20 plasmid. Sequence analysis revealed that each fragment is identical to sqst-3 target sequence. By using restriction endonucleases and ligase, fragment 2 was subcloned into fragment 3 construct. Restriction analysis indicated that we successfully cloned fragment 2-3 fusion construct.

【Results and discussion】In this work, we successfully cloned fragment 2 and 3 into pMD20 plasmid. We also obtained sqst-3 fragment 2-3 fusion construct by subcloning step. The cloned sqst-3 fragment 2-3 fusion construct includes 732bp of putative promoter region, 1256bp of exon-intron component, and 1930bp of downstream of sqst-3. This construct enables us to establish sqst-3 transgenic worm, and also sqst-3 promoter-GFP expression experiment. A much upper region of sqst-3 (fragment 1) will contribute a promoter function of sqst-3 more specific.

Molecular cloning, Caenorhabditis elegans, Zinc finger protein

発表責任者：ヌルトレウ　ジャナル（zhanar.nurtoleu@gmail.com）

発表番号：3G057
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ブレビバチルス菌を用いたカイコガ前胸腺刺激ホルモンの大量調製法の確立

# Optimized preparation method for silkworm prothoracicotropic hormone using the *Brevibacillus* expression system.

○此上 祥史、山下 雄佑、楊 易文、片岡 宏誌、齋藤 一樹（東大院・新領域・先端生命）
○Tadafumi KONOGAMI, Yusuke YAMASHITA, Yiwen YANG, Hiroshi KATAOKA, Kazuki SAITO (Univ. Tokyo)

「前胸腺刺激ホルモン（PTTH）」は、前胸腺における脱皮ホルモンの生合成・分泌を促進することで昆虫の脱皮・変態を制御している神経ペプチドホルモンである。このホルモンの活性は、例えば、カイコガの PTTH は同じ鱗翅目のタバコスズメガにさえ活性をほとんど示さず、昆虫種間での交差性が非常に低いことが知られている。このような標的特異性の高さは、昆虫種によって異なる PTTH の構造の違いをレセプターが厳格に認識しているためだと考えられるが、レセプターによって認識されているアミノ酸残基などはいまだ明らかになっていない。そこで私たちは、PTTH に対するレセプターの分子認識機序を明らかにする目的で、カイコガ PTTH の大量調製系を確立することにした。

カイコガ PTTH を大腸菌で発現させると沈殿画分に回収されてしまうことから、これまでの報告では、沈殿した PTTH をリフォールディングさせることにより活性を有する PTTH を調製していた。しかし、この手法では収量が低く、また安定した活性型 PTTH へのリフォールディングが難しいため、本研究では、発現したタンパク質を培地に分泌するシステムを有するブレビバチルス菌を用いてカイコガ PTTH を発現し、培地から PTTH を可溶性の状態のまま回収して精製を行うことにした。

ブレビバチルス菌では、分泌されるタンパク質の量は、そのタンパク質を発現させる際に付加する分泌シグナル配列等によって大きく変動するため、まず、カイコガ PTTH により適した発現条件を検討した。C 端に $His_6$ タグ配列を付加したカイコガ PTTH を、4 種類のシグナル配列の直後につなげ、各シグナル配列によって培地へ分泌される PTTH の量を比較した。その結果、4 つのうちブレビバチルス菌自身が持つ細胞壁タンパク質のシグナル配列が PTTH の発現に最も適していることがわかった。次に、PTTH を非還元 SDS-PAGE で分離し、分泌された PTTH が天然と同じジスルフィド結合を介したホモ二量体を形成しているかどうかを確認した。その結果、培地から回収されたカイコガ PTTH は、二量体以外にも単量体や高分子量の会合体を含むことが明らかになった。その後の硫安沈殿の過程で高分子量の会合体はほぼ除くことができたので、$Ni^{+}$-NTA や逆相 HPLC などのカラム精製により単量体を除き、二量体構造のみを持つ PTTH を精製することに成功した。

現在、組織培養したカイコガ前胸腺からの脱皮ホルモン放出活性や培養細胞に発現させたレセプターに対する活性を測定することで、精製したカイコガ PTTH の生物活性を確認している。今後、同様の手法を用いて安定同位体標識したカイコガ PTTH を調製し、NMR 解析等に供することで、レセプターに認識されている PTTH の部位を明らかにしていこうと考えている。

Prothoracicotropic hormone, Insect neuropeptide hormone, *Brevibacillus* expression system

発表責任者：齋藤　一樹（saito@ib.k.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3G058
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

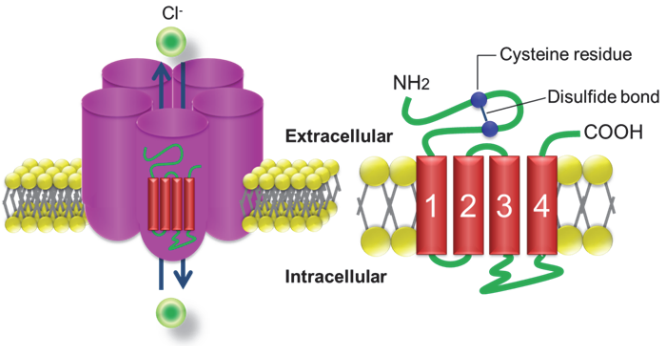
# カイコガ pH 感受性塩素チャネルの発現変動と遺伝子産物の多様化

# Variations in gene expression and protein structure of the pH-sensitive chloride channel of the *Bombyx mori* larvae

○奥原 大樹[1]、松田 一彦[1]、伊原 誠[1]、伊藤 克彦[2]（[1]近畿大農、[2]東農工大農）
○Daiki OKUHARA[1], Kazuhiko MATSUDA[1], Makoto IHARA[1], Katsuhiko ITO[2] ([1]Kinki Univ., [2]Tokyo Univ. of Agric. Tech.)

【目的】

昆虫の神経系には脊椎動物では見られない神経受容体が多数発現している。例えばシステインループをもつリガンド作動性塩素チャネルではヒスタミン作動性塩素チャネルや pH 感受性塩素チャネル（pHCl）がその例であり、安全性に優れた昆虫制御剤を開発する上で重要と考えられる。その中でも pHCl は、中枢で発現しているにもかかわらず、内在性のリガンドが同定されておらず、その生理学的機能は謎に包まれている。本研究では、カイコガ pHCl（下図）について、ステージ別での発現レベルの違いや唯一つの遺伝子から生じるバリアントがこれまでに報告したもの以上に存在することを見出したので報告する。




【方法と結果】

P-50 系統を用いて卵、幼虫、蛹および成虫から RNA を抽出するとともに、幼虫の脳、中枢、腸、マルピーギ管から RNA を抽出し、逆転写後、PCR によって pHCl の発現の有無を調べた。pHCl は幼虫と成虫ならびに孵化および羽化直前で強く発現していた。また幼虫体内の部位別では、中枢と前腸で強く発現し、精巣や卵巣でそれより低く発現していることを見出した。さらに、複数の primer セットを用いて、pHCl のバリアントがこれまで演者らが報告した以上に存在し、それらが変態ステージの進行とともに変化することをも明らかにした。こうしたバリアントが機能発現に必須な構造をもつのかどうか詳しくアミノ酸配列を解析した結果も併せて報告する。

pH-sensitive chloride channel, Bombyx mori, pHCl

発表番号：3G059
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ダイズシストセンチュウに対する誘引物質の探索

# Exploration of the attractants for soybean cyst nematode

○勝山 勉[1]、大木 拓海[1]、近藤 竜彦[2]、佐々木 康幸[1]、矢嶋 俊介[1]、伊藤 晋作[1] ([1]東農大・農学研・バイオ、[2]名大院・生命農学)
○Tsutomu Katsuyama[1], Takumi Ooki[1], Tatsuhiko Kondo[2], Yasuyuki Sasaki[1], Shunsuke Yajima[1], Shinsaku Ito[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Bioagricultural Sciences,Nagoya Univ.)

【背景・目的】

ダイズシストセンチュウは、ダイズやアズキなどのマメ科植物を宿主として寄生する根寄生性線虫である。本線虫は寄生後に植物の栄養を奪いながら成長するため、宿主植物は生育不良となり収量を著しく減少させる。そのため、本線虫の防除は農業において極めて重要であるが、現在行われている防除法では汚染土壌の改善に長い年月がかかるという問題がある。この問題を解決するためにも防除効果の向上が望まれる。

本線虫は土壌にシストという状態で存在し、付近の宿主植物の根から分泌される孵化促進物質を認識することにより孵化する。孵化後、根から分泌される誘引物質を認識して根に到達し、寄生すると考えられる。もし誘引物質を同定できれば、誘引物質と防除法を組み合わせることで防除効果の飛躍的な向上が期待できる。しかし、これまでにダイズシストセンチュウに対する誘引物質は単離、同定された報告はない。そのため我々は宿主植物から誘引物質が分泌されているかどうか確認する試験を行った。

【方法・結果】

宿主植物から誘引物質が分泌されているかどうか確認するため、種子を表面殺菌し寒天培地に播種した。その後、インキュベーターで発芽させ、成長した個体の根端を切り取り誘引試験に用いた結果、宿主植物では誘引が確認出来た。次に非宿主植物に誘引されるかどうか確認するために、種子を上記と同様に無菌状態で発芽、成長させ誘引試験を行った結果、誘引が確認出来なかった。

これらの結果から、本線虫に対する誘引物質は宿主植物のみが分泌している可能性があることが明らかとなった。

soybean cyst nematode, attractants, plant

発表番号：3H001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

ムラサキ培養細胞を用いたシコニン分泌機構に関わる脂質の探索
Analysis of lipid components relevant for shikonin secretion in *Lithospermum erythrorhizon*
○巽 奏[1]、岡咲 洋三[2]、斎藤 和季[2,3]、上撫 健太[1]、杉山 暁史[1]、矢崎 一史[1] ([1]京大生存圏、[2]理研 CSRS、[3]千葉大薬)
○ Kanade TATSUMI[1], Yozo OKAZAKI[2], Kazuki SAITOU[2,3], Kenta KAMINADE[1], Akifumi SUGIYAMA[1], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]kyoto Univ.RISH, [2]RIKEN CSRS, [3]Chiba Univ.)

ムラサキ（*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)は、日本、中国、韓国の山地に自生するムラサキ科の多年性草本である。根は赤紫色を呈しており、これを乾燥させたものは「紫根」と呼ばれ、抗菌作用や抗腫瘍作用を示すことから古来より薬用として、また紫色の染料として用いられてきた。紫根の主な薬効本体は、根皮特異的に蓄積する赤色色素であるナフトキノン系二次代謝産物のシコニン誘導体とされ、その生合成研究は主にムラサキ培養細胞系を用いて行われ、これまでに $Cu^{2+}$、酸性多糖等のシコニン生産促進因子や、$NH_4^+$等の抑制因子が明らかにされてきた。これらを組み合わせて色素生産に至適化したものが M9 培地である。シコニン誘導体は脂溶性が高くクロロホルム等の有機溶媒に易溶であるが、一般的な脂質と異なりシコニンは細胞外に蓄積する。シコニン誘導体の分泌に関しては、1980 年代半ばに田端らによりシコニン生合成時に小胞体に由来する膜小胞（vesicle）が生じることが報告されているが、この vesicle がシコニン分泌にどう関わるかなど分泌過程に関する分子機構は全くと言っていいほど理解されていない。本研究では、シコニンの細胞外分泌について分子レベルでの機構解明を目指している。

細胞外に分泌されたシコニン誘導体は、細胞壁表面に付着した多数の赤色顆粒状構造として観察される。しかし、シコニン誘導体自体は水に不溶であり水中では黒色の結晶として析出するため、細胞外のシコニン誘導体は顆粒内で何らかの脂質と共存しており、さらにその脂溶性から脂質一重膜に包まれていることが予想される。そこでシコニン誘導体が細胞外に分泌される際にどのような脂質と共に分泌されるかを明らかにするため、シコニン生産中の培養細胞を、赤色顆粒（無細胞）、細胞表面画分、細胞内画分に分け、シコニン誘導体を含む脂質成分を抽出し、順相 TLC を用いた解析を行った。その結果、細胞外顆粒にはプリムリンで染色される脂質がシコニン誘導体と共存していること、また同様に極性脂質もシコニン顆粒に存在することが示された。一方、トリアシルグリセロールやワックスエステルは一般的な植物組織と同様、細胞内画分で検出されたことから、これらの脂質成分は細胞外分泌には預かっていないことが示された。

より詳細な脂質分析を行うため、上記それぞれの画分から分析の妨げになるシコニン誘導体を prep. TLC により除き、非極性画分と膜脂質の含まれる極性画分に分けて LC-MS 解析を行った。大会ではその結果についても報告する。

secondary metabolism, shikonin, lipid secretion

発表番号：3H002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シソ目植物におけるフラボノイド生合成関連酵素群の相互作用ネットワーク形成
# Interaction networks of flavonoid biosynthetic enzymes in Lamiales plants

○天間 菜月[1]、藤野 尚人[1]、小松崎 友紀[1]、杉山 圭吾[1]、和氣 駿之[1]、本橋 令子[2]、田中 良和[3]、高橋 征司[1]、中山 亨[1]（[1]東北大院工、[2]静岡大農、[3]サントリーグローバルイノベーションセンター（株））
○Natuski TENMA[1], Naoto FUJINO[1], Yuki KOMATSUZAKI[1], Keigo SUGIYAMA[1], Toshiyuki WAKI[1], Reiko MOTOHASHI[2], Yoshikazu TANAKA[3], Seiji TAKAHASHI[1], Toru NAKAYAMA[1]
([1]Tohoku Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Suntory Global Innovation Center)

近年，さまざまな生物のさまざまな代謝経路において，代謝系を構成する酵素群によって細胞内で特異的に形成される複合体（メタボロン）の存在が示唆され，その重要性が議論されている．メタボロンを形成することにより，酵素から酵素への代謝中間体の直接的な受け渡し（チャネリング）や代謝分岐の制御（スイッチング）が可能となり，代謝の効率化や環境変化に応じた動的制御が達成されると考えられている．植物二次代謝では，小胞体膜局在のシトクロム P450（P450）を足場としてメタボロンが形成されることが多いと考えられ，青酸配糖体やリグニンの生合成経路においてその実例が示されている．メタボロン形成を介した代謝制御機構の解明は，効率のよい植物代謝工学技術を達成する上で重要である．フラボノイドは，花色発現，UV 防御，動物や昆虫，微生物との相互作用など多くの重要な生理学的役割を担う植物二次代謝物であり，それを摂取したヒトに対しても多彩な生理活性を示すことから，その効率的な生産は産業的にも注目を浴びている．フラボノイド生合成酵素群がメタボロンを形成している状況証拠は以前から得られており，P450 を足場としたメタボロンモデルも提示されていたが，フラボノイド生合成酵素群と P450 との直接的な相互作用が示された例はなかった．そこで本研究では，シソ目の植物（キンギョソウおよびトレニア）のフラボノイド代謝経路を取り上げ，これらの植物において共通に含まれる P450 [ II 型フラボン合成酵素（FNS）およびフラボノイド 3’-水酸化酵素（F3’H）]と相互作用しうるフラボノイド生合成酵素を網羅的に検索した．スプリットユビキチンシステムによる相互作用アッセイの結果，キンギョソウにおいては FNS に対してカルコン異性化酵素（CHI）とジヒドロフラボノール 4-還元酵素（DFR）が，また F3’H に対して CHI が相互作用することが示唆された．また二分子蛍光補完法を用いた *in planta* の相互作用解析を行った結果，上述の相互作用に加えて CHI と DFR の間にも相互作用が確認された．一方，トレニアでは，FNS とフラバノン 3-ヒドロキシラーゼ（F3H）の間の相互作用も確認された．FNS の酵素活性はアントシアニン生合成に直接必要ないにもかかわらず，いくつかのアントシアニン生合成関連酵素との相互作用が確認できた．このことは，FNS がこれらの植物においてアントシアニン生合成の足場タンパク質としての機能している可能性を強く示唆している．また，キンギョソウとトレニアで共通の相互作用ネットワークが見出されたことから，メタボロンがシソ目のなかである程度保存されている可能性も示唆される．本研究は日本学術振興会産学協力委員会地球環境・食糧・資源のための植物バイオ第 160 委員会による助成を受けた．

metabolon, flavonoid, cytochrome P450

発表番号：3H003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ CYP716A サブファミリー酵素遺伝子の機能解析

# Characterization of *CYP716A* subfamily genes in *Arabidopsis thaliana*

○安本 周平、福島 エリオデット、關 光、村中 俊哉（阪大院・工・生命先端）
○Shuhei YASUMOTO, Ery Odette FUKUSHIMA, Hikaru SEKI, Toshiya MURANAKA (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

[背景]
植物は特化代謝産物（二次代謝産物）と呼ばれる多様な化合物を生産する。それらの多くは生理活性を示すことから医薬品資源として注目されている。トリテルペノイドは 2,3-オキシドスクアレン（C30）がオキシドスクアレン環化酵素による環化、シトクロム P450（CYP）による酸化を経て合成される一群の化合物群であり、植物では約 14,000 種が確認されている。当研究グループはトリテルペノイドの生合成に関与する酵素遺伝子の同定を進めており、先行研究においてマメ科モデル植物であるタルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）由来の CYP716A12 がα-アミリン、β-アミリン、ルペオールの 28 位を酸化し、ウルソール酸、オレアノール酸、ベツリン酸を生産することを明らかとしたが、植物内での CYP716A サブファミリー酵素遺伝子、あるいはこれらの代謝産物の役割はほとんど明らかとなっていない。モデル植物であるシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）はゲノム上に *CYP716A1*、*CYP716A2* を保持しており、両遺伝子は第五染色体の近接した位置に存在しているがこれらの酵素のα-アミリン、β-アミリン、ルペオールへ対する酸化活性は明らかとなっていない。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いることで、植物内での CYP716A サブファミリー酵素遺伝子の役割の解明を目指した。
[方法・結果]
シロイヌナズナ cDNA ライブラリーより *CYP716A1*, *CYP716A2* 全長コーディング配列（CDS）をクローニング後、酵母発現ベクターを構築し、α-アミリン、β-アミリン、あるいはルペオールをそれぞれ生産するように改変した出芽酵母株へ導入した。培養後、反応産物を酢酸エチルにより抽出し、GC/MS 分析へ供したところ、CYP716A1、CYP716A2 共に全てのトリテルペン骨格に対する 28 位酸化活性が確認された。さらに CYP716A2 を発現するα-アミリン生産酵母においては、α-アミリンの 28 位以外の位置が水酸化されたと思われるピークも検出された。この化合物を精製し、NMR による構造決定を行ったところ、シロイヌナズナ植物体での報告はないが、生理活性を示すことが知られているトリテルペノイドであることが明らかとなった。また、CYP716A1、CYP716A2 は共にアミリンの 28 位酸化活性を示すことから、シロイヌナズナ植物体内において機能が重複していると予想される。そこで、シロイヌナズナにおける CYP716A サブファミリー酵素遺伝子の機能解析を行うために、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いた *cyp716a1 cyp716a2* 二重変異体の作出を進めている。

CYP716A, Arabidopsis thaliana, triterpene

発表責任者：村中 俊哉（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

発表番号：3H004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ナス科植物の有毒ステロイドグリコアルカロイド生合成に関わるアミノトランスフェラーゼの機能解析

# Characterization of an aminotransferase involved in steroidal glycoalkaloids biosynthesis in *Solanaceae*

○中安 大[1]、梅基 直行[2]、大山 清[2,3]、宮地 陽香[1]、渡辺 文太[4]、村中 俊哉[5]、斉藤 和季[2,6]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1]([1]神戸大院・農、[2]理研 CSRS、[3]東工大院・理工、[4]京大・化研、[5]大阪大院・工、[6]千葉大院・薬)

○Masaru NAKAYASU[1], Naoyuki UMEMOTO[2], Kiyoshi OHYAMA[2,3], Haruka MIYACHI[1], Bunta WATANABE[4], Toshiya MURANAKA[5], Kazuki SAITO[2,6], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Kobe Univ., Japan, [2]CSRS, RIKEN, Japan, [3]Grad. Sch. Chem. & Mater. Sci., Tokyo Tech. Univ., Japan, [4]ICR, Kyoto Univ., Japan, [5]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Japan, [6]Grad. Sch., Pharm. Sci., Chiba Univ., Japan)

ナス科植物であるジャガイモやトマトにはそれぞれα-ソラニン、α-トマチンといった分子内に窒素原子を持つステロイドグリコアルカロイド（SGA）が多く蓄積されている。SGA はコレステロールを前駆物質とし、C-16，22，26 位の酸化、C-26 位へのアミノ基転移、E，F 環形成、3 位水酸基への糖転移を経て生合成されると推定されているが、生合成遺伝子および生合成経路は一部の配糖化酵素遺伝子を除いて明らかとなっていなかった。これまでの研究により、ジャガイモ、トマト由来の 2 種のシトクロム P450（SGA1、SGA2）がコレステロール 26 位水酸化、22 位水酸化を、2-オキソグルタル酸依存性のジオキシゲナーゼ（16DOX）が 16 位水酸化をそれぞれ触媒することを明らかとした。本研究では、組織別発現解析により *SGA1*、*SGA2*、*16DOX* と共発現していたアミノトランスフェラーゼ遺伝子（*SGA4*）の機能解析の結果を報告する。*SGA4* を RNAi によりノックダウンさせた形質転換体を作製し、分析した結果、SGA 内生量が顕著に減少し、分子内に窒素原子を持たないステロイドサポニンが蓄積していた。続いて、大腸菌発現系を用いて SGA4 組換えタンパク質を作製し、in vitro で酵素機能を評価した結果、22-ヒドロキシ-26-オキソコレステロールを基質として 26 位へのアミノ基転移を触媒する活性を確認した。以上より、SGA4 は SGA 生合成に関わる C-26 アミノトランスフェラーゼであることを明らかとした。

aminotransferase, steroidal glycoalkaloid, *solanaceae*

発表番号：3H005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# カワラヨモギのフェニルプロパノイド特異的プレニル基転移酵素遺伝子の同定

# Identification of phenylpropanoid-specific prenyltransferase gene from *Artemisia capillaris*

○竹村 知陽[1]、棟方 涼介[1]、杉山 暁史[1]、鈴木 秀幸[2]、關 光[3]、村中 俊哉[3]、山浦 高夫[4]、矢崎 一史[1] ([1]京大・生存研、[2]かずさ DNA 研、[3]阪大院・工、[4]日本新薬)
○Tomoya TAKEMURA[1], Ryosuke MUNAKATA[1], Akifumi SUGIYAMA[1], Hideyuki SUZUKI[2], Hikaru SEKI[3], Toshiya MURANAKA[3], Takao YAMAURA[4], Kazufumi YAZAKI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kazusa DNA Res.Inst., [3]Osaka Univ., [4]Nippon Shinyaku Co., Ltd.)

植物の二次代謝において、芳香族化合物のプレニル化はフェノール類とテルペノイド類をカップリングする重要な反応ステップを司っており、化学構造の多様性に寄与するところが大きい。植物にとってプレニル化フェノール類は、外敵に対する防御物質などとして機能する一方、抗ガン活性などヒトに有用な生理活性をもつものも数多く報告されている。これらの生理活性は、プレニル側鎖の存在により飛躍的に上昇することも多く、フェノール性化合物の生理活性に対してプレニル化反応を担う膜結合型プレニル基転移酵素（PT）の果たす役割は大きい。

現在までに、フラボノイドやクマリンなど様々なグループのフェノール類に特異的な PT 遺伝子が同定されてきたが、単純なフェニルプロパノイドを基質とする PT 遺伝子は全くの未知であった。本研究では、薬効成分として抗菌・抗腫瘍活性を有する Artepillin C などプレニル化フェニルプロパノイド類を蓄積するキク科の薬用植物カワラヨモギ（*Artemisia capillaris*）を実験材料として、フェニルプロパノイド特異的 PT 遺伝子の同定を目指した。

かずさ DNA 研究所が有するカワラヨモギの RNA-seq データベースより、AtVTE2-1 をクエリーとした tblastn 検索を行った結果、PT 候補となる contig を 1 つ見出した。カワラヨモギ葉の totalRNA を用いて RT-PCR を行い、その全長 cDNA 配列を取得し *AcPT1* と命名した。*AcPT1* を *Nicotiana benthamiana* 葉で一過的に発現させ粗酵素液を調製し、フェニルプロパノイド類に対する PT 活性を調べた。その結果、*p*-Coumaric acid をプレニルアクセプター、DMAPP をプレニルドナーとして用いた際に、2 つの生成物が確認された。標品との直接比較により、これらはフェニルプロパノイドのモノプレニル化体である Drupanin とジプレニル化体である Artepillin C と同定された。この結果から、AcPT1 はフェニルプロパノイド基質 PT であること、さらにプレニルアクセプターに複数のプレニル側鎖を転移させることを示した。これらは、いずれも本酵素ファミリーとして初めての例である。

現在、AcPT1 の細胞内局在を含め、さらに詳細な酵素機能解析を行っている。大会ではこれらの結果についても報告する。

prenyltransferase, secondary metabolite, Artemisia capillaris

発表責任者：竹村知陽（takemura.tomoya.26m@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3H006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# トマトにおけるα-トマチン生合成に関わるステロイド 3 位酸化異性化酵素の解析

# Characterization of 3-hydroxysteroid dehydrogenase involved in α-tomatine biosynthesis from tomato

○李 ヒョン宰、小林 緑、中安 大、杉本 幸裕、水谷 正治（神戸大院・農・生命機能科学）
○ Hyoung Jae Lee, Midori Kobayashi, Masaru Nakayasu, Yukihiro Sugimoto, Masaharu Mizutani (Grad. School Agric. Sci., Kobe Univ.)

α-トマチンはトマト(*Solanum lycopersicum*)の未熟果実や葉、花に多く蓄積しており、トマチジンをアグリコンとする主要なステロイドグリコアルカロイド(SGA)です。そして、α-トマチンは苦味を呈し、動物や昆虫、微生物に対して毒性を示すことから生体防御物質として機能すると考えられる。また、トマトはデヒドロトマチジンをアグリコンとするデヒドロトマチンを α-トマチンの 10 分の 1 量の割合で蓄積している。α-トマチンはコレステロールを出発物質として、16, 22 及び 26 位の酸化、26 位のアミノ化、E, F 環の形成によりデヒドロトマチジンになり、さらに、3 位酸化異性化、5α 位還元、3 位水酸基への配糖化を経て生合成されると推定されているが未解明な点が多い。本研究では、α-トマチン生合成に関わるステロイド 3 位酸化異性化酵素(3β-hydroxysteroid dehydrogenase, 3βHSD)を解明することを目的とした。報告されているジギタリス(*Digitalis lanata*)における強心配糖体の生合成に関わる 3βHSD (*Dl3βHSD*)との相同性をもとに、トマトゲノムデータベース(Sol Genomics)から *LeHSD-1, -2, -3* の 3 つ遺伝子を選抜し、植物体で他の生合成遺伝子との発現相関が高い *LeHSD1* 遺伝子を解析することとした。*LeHSD-1* は short-chain dehydrogenases/reductases ファミリーに属する酵素であり、そのアミノ酸配列は *Dl3βHSD* と 62%の相同性を示した。*LeHSD1* についてトマトの組織別に発現分析の結果、 *LeHSD-1* は α-トマチンが多く蓄積している花や葉、未熟果実で強く発現していた。このことから、α-トマチン生合成に関わる可能性が高いと考えた。大腸菌発現系を用いて *LeHSD-1* 組換え酵素を作製し、*in vitro* で様々なステロールおよびステロイドに対象として酵素アッセイを行った結果、それらの化合物に対して 3 位酸化異性化反応を触媒することを確認した。また、デヒドロトマチジンを基質としても 3 位酸化異性化活性を確認した。RNA 干渉法を用いて *LeHSD1* の発現を抑制した組換えトマトを作製し、*LeHSD1* の発現量と蓄積代謝物を分析した結果、*LeHSD1* 発現抑制株はデヒドロトマチンを蓄積することを確認した。これらの結果から、*LeHSD1* は α-トマチン生合成経路の中間産物である デヒドロトマチジンの 3 位水酸基を酸化及び異性化、還元するステロイド 3 位酸化異性化酵素であることを明らかとした。

α-tomatine, 3-hydroxysteroid dehydrogenase, tomato

発表番号：3H007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 刈込みにより獲得されたスズメノカタビラの矮性形質に関する研究

# The dwarf phenotype of *Poa annua* L. acquired by repetitive trimming

○鈴木 宏佳[1]、岡崎 麻衣子[2]、小笠原 勝[2]、鈴木 義人[1] ([1]茨大・農、[2]宇大・雑草と里山センター)
○Hiroyoshi SUZUKI[1], Maiko OKAZAKI[2], Masaru OGASAWARA[2], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Utsunomiya Univ.)

【背景・目的】

スズメノカタビラ（*Poa annua* L.）はゴルフ場や公園などの芝地で問題となっている一年生のイネ科雑草であり、その形態は刈り取りストレスの強さ（頻度と刈り高）によって異なり、しかも次世代に引き継がれることが示されているが、その機構は不明である。

本研究では，刈込みにより生じたスズメノカタビラの矮性形質に，植物ホルモンの生合成，あるいはその情報伝達系が関与している可能性について追求した。

【結果】

ゴルフ場グリーン由来（以下矮性系統），また対照区として果樹園由来（以下非矮性系統）のスズメノカタビラの形態を播種時から経時的に観察したところ，矮性系統において発芽が早く，発芽後3～4週間後に非矮性系統が矮性系統の草丈を上回るという観察結果が得られた。次に各段階における植物ホルモン量の経時的変化を測定した。乾燥種子の水浸漬処理後のアブシジン酸（ABA）量の測定を行ったところ，浸漬2日目の種子中のABA濃度は矮性系統で非矮性系統より有意に低く，矮性系統の早い発芽時期との相関性が認められた。また，草丈の差異に関して，発芽後の矮性系統，非矮性系統について伸長成長に関わる植物ホルモン量を測定したところ，インドール-3-酢酸（IAA），アブシジン酸（ABA），サイトカイニン（tZ, tZR, iP, iPR）では有意な差が認められなかった。それに対し，発芽後2週間の段階で活性型ジベレリン（$GA_1$）の濃度が矮性系統で有意に高いという結果が得られた。このことから，矮性系統におけるGAの情報伝達系に異常が生じている可能性が考えられた。しかし，成長過程の全段階を通して同様の傾向が認められなかったことから，再現性を含めて慎重に検討を行う予定である。

*Poa annua* L., phytohormones

発表番号：3H008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

Screening of chemicals that affect protonemal differentiation of *Physcomitrella patens*

○Masatoshi NAKAJIMA[1], Che-Dong YANG[1], Sho MIYAZAKI[1], Seung-Hyun PARK[1], Masato OTANI[1], Hiroshi KAWAIDE[2], Ken-ichiro HAYASHI[3], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Appl. Biol. Sci., Tokyo Univ. Agric. Technol., [3]Dept. Biochem., Okayama Univ. Sci.)

Endogenous gibberellin (GA) has not been detected in a moss *Physcomitrella patens*, whereas the early steps of its biosynthesis are required for the moss differentiation. Namely, the protonemal differentiation of *Ppcps/ks* mutants which starved *ent*-kaurene, was significantly inhibited. However it was fully recovered by the application of either *ent*-kaurene or *ent*-kaurenoic acid (KA), not by that of GA. This suggests that any metabolite different from GA should be synthesized via KA, and the unidentified active substance regulates the process of the protonemal differentiation.

We feel a great interest in the regulation of its signal perception and transduction in the moss. The purification of the KA-metabolites is now proceeding. To support this, we are screening the chemicals which have a promotive effect to the moss differentiation, from the commercially-available chemical library. Those compounds are expected to share the signal perception system with the unidentified active KA-metabolite.

*Physcomitrella patens*, *ent*-kaurenoic acid, gibberellin

発表責任者：Masatoshi NAKAJIMA（anakajm@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3H009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# D14 と相互作用する転写因子・NF-YC の機能解析

# Studies on D14-interacting transcription factors, NF-YCs

○池上 佳菜子[1]、長江 未有[1]、増口 潔[2]、高橋 郁夫[1]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科、[2]東北大院・生命科学)
○Kanako IKEGAMI[1], Miyu NAGAE[1], Kiyoshi MASHIGUCHI[2], Ikuo TAKAHASHI[1], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch of Life Sci., Tohoku Univ.)

【背景と目的】

ストリゴラクトン（SL）は、根寄生植物の発芽誘導およびアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導を行う生物間シグナルとして働くだけでなく、植物ホルモンとしての機能を持つことが知られている。この植物ホルモンとしての機能に関しても、枝分かれ制御をはじめとして、老化、根の成長、茎の伸長、ストレス耐性など、多くの機能を持つことが明らかになりつつある。また、近年、SL のシグナル伝達機構、特に受容機構の解明が進められており、多くの知見が蓄積されているが、シグナル伝達の下流の様子については未解明な点も数多く残されている。私たちは SL 機能の多機能性の鍵を握ると考えられる、SL シグナル伝達機構の下流で働く因子を同定するため、SL シグナルにおいて中心的な働きをする F-box タンパク質 MAX2 と相互作用するタンパク質の酵母 two-hybrid system（Y2H）を用いたスクリーニングを行い、いくつかの MAX2 結合タンパク質を取得した。本研究ではこれらのタンパク質のうち、NF-YC ファミリーに属する 3 つの転写因子について機能解析を行っている。

【方法・結果】

シロイヌナズナ cDNA ライブラリーY2H 系を用いたスクリーニングにより、MAX2 と相互作用するタンパク質の候補として NF-YC ファミリーに属する 3 クローンを得た。これらのタンパク質と MAX2 との結合は SL 非依存的である一方、SL 受容体 D14 との結合は SL 依存的であった。

また、NF-YC が形態へ及ぼす作用を調べるため、3 つの候補タンパク質についてそれぞれ T-DNA 挿入変異株を入手し、さらに GFP 融合過剰発現株を作製した。これらの変異体の中に、枝分かれが異常になったものはなかったが、開花時期やバイオマスに変化が見られたものが存在した。特にそのうち一つ、*NF-YC3* 遺伝子の過剰発現体はロゼッタ葉の面積が大きくなっており、花茎長も長くなっていた。この結果は SL による生長制御機構を考察する上で非常に興味深い。現在、NF-YC ファミリータンパク質の SL シグナル伝達における位置づけ、および NF-YC ファミリータンパク質による生長制御機構について詳細な解析を行っている。

strigolactone, NF-YC, *Arabidopsis*

発表番号：3H010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ストリゴラクトン-ジベレリンシグナル伝達のクロストーク機構を応用した新たな SL 制御法の開発

# Development of novel methods to regulate strigolactone biosynthesis using crosstalk system between strigolactone-gibberellin signaling

○久保田 真康[1]、吉澤 真人[1]、小石原 暉[1]、山上 大智[1]、姜 凱[1]、伊藤 晋作[1,2]、中村 英光[1]、浅見 忠男[1] ([1]東大院・農生科・応生化、[2]東農大・応生科・バイオ)

○Masayasu KUBOTA[1], Masato YOSHIZAWA[1], Hikaru KOISHIHARA[1], Daichi YAMAGAMI[1], Kai JIANG[1], Shinsaku ITO[1,2], Hidemitsu NAKAMURA[1], Tadao ASAMI[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]Dept. Bioscience., Tokyo Univ. of Agr.)

【背景と目的】

ストリゴラクトン（SL）は、枝分かれの抑制などの働きをもつ植物ホルモンであり、また根寄生植物の種子発芽を促進する。根寄生植物による作物生産への被害はアフリカなどにおいて甚大であり、その防除法の確立が強く望まれている。一方、植物の枝分かれ抑制には、ジベレリン（GA）も SL と同様に関与することが報告されているが、両シグナルのクロストークに関しては未解明の部分が多い。私達は、SL の受容体 D14 と GA シグナル抑制因子である DELLA タンパク質とが SL 依存的に相互作用を引き起こすことを見出しているほか、GA が SL の生合成経路に作用してその生合成を負に制御していることを示唆する実験結果を得ている。そこで本研究では、SL-GA 間クロストーク機構の解明とともに、このクロストークを利用し、根寄生植物の防除法の確立を目的として新たな SL 生合成抑制法の開発を行っている。

【方法と結果】

イネに低濃度の GA を処理すると根からの SL 滲出量が低下すること、この SL 滲出量の低下は SL 生合成遺伝子の発現量低下による生合成量の低下によることが原因であることが判明した。そこで、本研究では GA シグナル亢進により SL 生合成量を抑制させる方法を検討した。本発表では、イネの唯一の DELLA タンパク質をコードする *SLR1* の発現を RNAi 法で抑制することにより GA シグナルを亢進させる方法を試みたので報告する。SL の根滲出量を下げることが目的であること、また、地上部での GA シグナル亢進は徒長を引き起こすことから、根特異的なプロモーターを用いて RNAi 法で根特異的に *SLR1* の発現量を低下させることにした。この方法により作出した形質転換イネの *SLR1* 発現量と SL の根滲出量の相関について報告し、この方法の有用性について議論したい。

strigolactone, gibberellin, striga

発表番号：3H011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

植物病害抵抗性の抑制化合物の構造展開
Structure development of the disease resistance inhibitor
○栗本 哲哉、姜 凱、徐 銀卿、中村 英光、宮崎 翔、中嶋 正敏、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○Tetsuya Kurimoto, Kai Jiang, Eun-kyung Seo, Hidemitsu Nakamura, Syo Miyazaki, Masatoshi Nakajima, Tadao Asami (Dept. of Appl. Biol. Chem., The University of Tokyo)

【背景】植物は病原菌に対する免疫機構の一つとして、サリチル酸（Salicylic acid/SA）を介して誘導される全身獲得抵抗性（Systemic Acquired Resistance/SAR）を備えており、二次感染を防御していることが知られている。しかしそのメカニズムの詳細については、不明な点も多い。これまで SAR 機構の解明研究には BIT （1,2 － benzisothiazol － 3 （2H） 1,1 － dioxide） や BTH （Benzo-(1,2,3)-thiadiazole- 7-carbothioic acid S-methyl ester）などの SAR 誘導剤が活用されてきた。一方で誘導剤と同様に SAR の機構解明に有効であると予想される SAR シグナルをターゲットにする阻害剤は知られていなかった。そこで我々は SAR 誘導阻害剤の探索研究に取り組み、まず SA 情報伝達に注目してこれまでに数種類の阻害剤候補物質を報告してきた。それら化合物中で最も活性が高かったのが PAMD である。PAMD は SA 情報伝達阻害剤として高い活性を有していたが、同時に強い生育阻害効果を示すという副作用があった。そこで将来的に SAR 制御剤としての応用につなげるため、植物の生育阻害活性と SA 情報伝達阻害活性との間の相関を調べる事を目的として、PAMD の構造展開を行うことにした。

【方法と結果】合成は、シクロヘキサンジオン化合物、オルトギ酸トリエチルとアニリンを原料として行った。また、種々の類似構造を持った化合物についても検討を行った。これらの PAMD 類縁体をシロイヌナズナに処理し、リアルタイム PCR を行う事で病害抵抗性のマーカー遺伝子である *PR* 遺伝子の SA 処理時の発現状況を調べた。その結果、*PR* 遺伝子発現抑制に影響を与える構造として、アニリノメチリデン構造を有していることが明らかになったため、他の部位についても検討を行っている。また、PAMD の示す生育阻害活性と構造との相関についても検討し、生育阻害活性の低い類縁体を得ることができた。さらにこれら PAMD 類縁体の SA の内生量や、ストレスにおいて影響される ABA など他の植物ホルモンに関しても内生量への影響について検討した。また、SA 情報伝達のどの段階に PAMD 類縁体が作用するかを調べる目的で、NPR1 タンパク質に対する影響に関しても検討を行っている。

Salicylic acid, SAR, PAMD

発表番号：3H012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Karrikins response in parasitic plants

○Wenqian HU, Yusaku IMAMURA, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

Karrikins, a group of newfound plant growth regulators discovered in the smoke of burning plant material, are well known for its stimulation ability of seed germination. In *Arabidopsis thaliana*, α/β hydrolase KAI2/HTL has been reported as the karrikins receptor receiving and inducing karrikins signaling in a MAX2-dependent pathway.

*Striga*, commonly known as witches weed, can be a parasitic plant of rice, millet, corn, sorghum, and other cereal crops in Africa, Asia, and Australia. As in Africa, *Striga hermonthica*, a common species of *Striga*, causes about $10 billion in crops losses a year, an effective method to deal with *Striga* plants is desperately needed. A new group of plant hormone strigolactones have been identified as main trigger compounds of *Striga* germination, exuded from host plants. Recent researches have found ShKAI2s as receptors of strigolactones in *S. hermonthica.* Since ShKAI2s are homologues of the karrikins receptor KAI2, not those of the strigoractone receptor D14 in *Arabidopsis*, ShKAI2s seemed to have evolved with a brand-new function to receive strigolactone in *Striga*. However, it is not fully understood whether the response ability of *Striga* to karrikins is still remained. Thus, we tried to determine whether *Striga* could respond to karrikins in seed germination.

To identify karrikins response in parasites, we designed several experiments to reveal the karrikins effect on strigolactone-dependent *S. hermonthica* gemination. By changing the duration time of seed conditioning and karrikins imbibition, some weak but unneglectable changes in germination were observed. On the contrary, karrikins showed antagonistic effects on strigolactone-induced seed germination, indicating that there exists complex crosstalk between karrikins and strigolactone signaling. We also found the changes of expression patterns of individual ShKAI2 species during seed conditioning period. These results may be helpful to illustrate the relationship between karrikins and strigolactone in parasitic plant germination, which could provide new clues for dealing with *Striga* and other parasites.

karrikins, striga germination, strigolactone

発表番号：3H013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Strigolactones and Brassinosteroids Crosstalk on Arabidopsis Hypocotyl Elongation under Weak Light Condition

○JUTIPORN THUSSAGUNPANIT[1], Yuko Nagai[1], Takeshi Nakano[2], Hidemitsu Nakamura[1], Tadao Asami[1] ([1]Dept Applied Bio Chem, Univ of Tokyo, [2]RIKEN, Wako)

**[Background]**

Multiple hormonal and light signals are coordinately related photomorphogenesis in plant. *Arabidopsis* grown under weak light condition elongates hypocotyl similarly to under darkness. Strigolactones (SLs) have been reported to induce light-adapted growth of *Arabidopsis* seedlings. SLs repress *Arabidopsis* hypocotyl elongation whereas brassinosteroids (BRs) stimulate *Arabidopsis* hypocotyl elongation under weak light condition. Moreover, SLs could up-regulate *STH7*, encoding a transcription factor belonging to the double B-box zinc finger subfamily. STH7 also regulates BR signaling in hypocotyl elongation. In this study, we attempt to analyze the crosstalk between SL and BR signaling by focusing on STH7 function.

**[Methods and Results]**

To investigate the crosstalk between SL and BR signaling, we observed the effect of SL and/or BR treatments on the hypocotyl growth of *Arabidopsis*. Wild type, *STH7*-overexpressing (*STH7ox*) and functionally defective *STH7* (*STH7-CR; STH7-Chimeric Repressor*) mutants were used in this study. The addition of GR24, a synthetic SL, reduced *Arabidopsis* hypocotyl length under weak light condition in contrast with brassinolide (BL). GR24 treatment decreased hypocotyl length of *STH7ox* mutant under weak light but, *STH7-CR* mutant did not. When GR24 was co-treated with BL, WT and *STH7ox* mutants showed the hypocotyl length between the lengths of GR24-treated and BL-treated plants. qRT-PCR analysis showed that *DWF4* expression was down-regulated but *SAUR22* expression was up-regulated in BL-treated WT plant. While in GR24-treated *STH7ox* mutant the level of *DWF4* expression increased and the level of *SAUR22* expression decreased more than those in WT. Therefore, it seems that SL regulates BR-responsive genes in STH7-dependent manner. Furthermore, we observed that the SL-upregulated transcription of *STH7* was enhanced by the treatment of Brz, a BR-biosynthesis inhibitor. Based on the above results, we concluded that SL and BR play antagonistic action in light-adapted growth of *Arabidopsis* depending on the function of STH7.

Strigolactone, Brassinosteroid, Crosstalk

発表番号：3H014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 酵母細胞壁が誘導する植物の病害応答機構の生物有機化学的研究

# Plant disease response induced by treatment of yeast cell wall

○矢口 賢臣[1]、木南 朋久[2]、岩渕 千賀子[2]、北川 隆徳[2]、安原 貴臣[2]、高橋 公咲[1]、松浦 英幸[1] ([1]北大院農、[2]アサヒグループホールディングス株式会社)
○ Takaomi YAGUCHI[1], Tomohisa KINAMI[2], Chikako IWABUCHI[2], Takanori KITAGAWA[2], Takaomi YASUHARA[2], Kosaku TAKAHASHI[1], Hideyuki MATSUURA[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Asahi Group Holdings)

［目的］

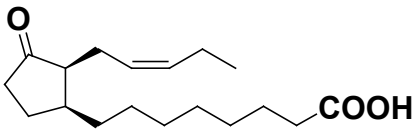
安心安全な農産物の供給は重要な課題であり、天然由来の素材を用いた農作物の健全育成技術が検討されている。この事例として、酵母から調製した細胞壁資材の葉面散布はイチゴうどんこ病を抑制すると報告されており、食品由来のバイプロダクトを用いる点や植物が本来持っている抵抗力を引き出す点で秀でた技術と考えられる。しかし、その作用機序の詳細は明らかでない。本研究では上記の生物活性を示した細胞壁資材を用い、病害抵抗性の誘導機構を明らかにすることを目的とした。

［方法］

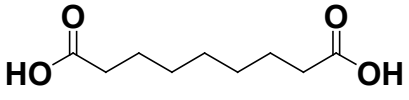
検定試料として酵母から細胞壁を抽出し、得られた細胞壁を可溶化した資材を 5 g/L 水溶液としたものを用いた。*Arabidopsis thaliana* の WT、もしくはアゼライン酸シグナルが不全な変異体(*azi1*)の葉面に検定試料を 1 日おきに 3 回処理した。惹起されうる病害応答経路を評価するため、植物内に蓄積するサリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)ならびに両化合物の合成経路の主要中間体、代謝産物の蓄積量を非処理のコントロール植物と比較した。目的化合物の分析は UPLC MS/MS を用い、重水素ラベル物質を用いた内部標準法によって定量した。

［結果］

WT では細胞壁水溶液(YCW)処理によって、フェニルアラニン(Phe)、12-オキソファイトジエン酸(OPDA)、アゼライン酸(AZA)が有意に増加した。*azi1* では Phe、AZA は有意な増加をしたものの、OPDA の増加は確認されなかった。AZA は全身獲得抵抗性(SAR)のプライミング物質であり、再度の病害刺激に対するサリチル酸応答を迅速にする生理活性物質であると考えられている。本実験から AZA はジャスモン酸中間体の OPDA と関連を持つことが推定され、ジャスモン酸経路との相互作用を持つ可能性が示された。




12-オキソファイトジエン酸(OPDA)




アゼライン酸

yeast cell wall, azelaic acid, OPDA

発表番号：3H015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ中アシルポリアミンの探索・機能解析

# Identification and characterization of the acylated polyamine in *Arabidopsis thaliana*

○和田 隆之介[1]、山野 博之[1]、岩川 純也[1]、山岸 卓矢[1]、彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、前田 哲[2]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]農業生物資源研究所)
○ Ryunosuke WADA[1], Hiroyuki Yamano[1], Junya Iwakawa[1], Takuya Yamagishi[1], Masashi Hikosaka[1], Hidemitsu Nakamura[1], Satoru Maeda[2], Masaki Mori[2], Tadao Asami[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo, [2]National Institute of Agrobiological Sciences)

## 背景・目的

*Spotted leaf 18* (*Spl18*)イネは、一定の生育ステージになると擬似病斑を生成するラインである。*Spl18* の原因遺伝子である *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、*Spl18* と同様に擬似病斑を形成し、また病害抵抗性を示す。*OsAT1* 遺伝子はアシルトランスフェラーゼをコードすることから、*OsAT1* 過剰発現体中に何らかのアシル化された化合物が蓄積されると考えられた。*OsAT1* 過剰発現体解析により、ポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の数種類の誘導体が蓄積されることを確認したので、LC-MS/MS を用いてその構造解析を行った。その結果、これら化合物は $N^4$-(10-hydroxylauroyl)-spermidine (4N10HydLau)と $N^4$-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N11HydLau)というアシル化スペルミジンであると決定した。

ポリアミン類が植物において老化やストレス応答に関わることは広く知られている。一方、ヘキサノイル化されたスペルミジンの誘導体が老化とともにエンドウ中に蓄積されることが報告されている。さらに、我々のグループがアシル化スペルミジンとして構造決定した 4N10HydLau と 4N11HydLau を投与したイネでは、病害抵抗性が誘導されることを見出している。これらのことから、植物体内においてアシル化ポリアミンが、老化やストレス応答などに関与していることが期待できる。そこでアシル化ポリアミンの植物体内における機能解析のために、シロイヌナズナを用いたアシル化ポリアミンの探索、作用の解明を試みた。

## 方法・結果

シロイヌナズナをメタノール/過塩素酸水溶液で抽出後、LC-MS/MS 分析に供し各種アシル化ポリアミンの探索を行った。その結果、すでに報告されているフェニルプロパノイド（クマル酸やフェルラ酸等）が結合したアシル化ポリアミンに加え、新たに数種類の脂肪酸が結合したアシル化ポリアミン類がシロイヌナズナに内生していることを確認した。現在、シロイヌナズナにおいて、各種条件下でアシル化ポリアミン内生量の分析やこれらの化合物の各種抵抗性の誘導について調べている。

polyamine, *Arabidopsis thaliana*, fatty acid

発表番号：3H016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ストリゴラクトン受容体 D14 によるストリゴラクトン類縁体の被加水分解性と生理活性の解明

# Relationship between hydrolysis by D14 and physiological activity of strigolactone mimics

○呂 瑩、戸塚 直哉、喜久里 貢、竹内 純、山野 博之、中村 英光、浅見 忠男（東大院・農生科・応生化）
○ Ying LYU, Naoya TOTSUKA, Ko KIKUZATO, Jun TAKEUCHI, Hiroyuki YAMANO, Hidemitsu NAKAMURA, Tadao ASAMI (Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

【背景と目的】
ストリゴラクトン（SL）は最初根寄生植物の種子発芽誘導活性を有する化合物として同定されたが、近年になりアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導活性と植物枝分かれを抑制する作用も持つことが明らかになった。SL の受容体と考えられている DWARF(D14) の加水分解活性により、GR24 は ABC 環と D 環へと加水分解されることが報告されたことで、この受容・加水分解機能と SL シグナルの関連に注目が集まっている。本研究では多様な SL アナログを合成することで、生理活性に必要な構造と D14 により加水分解を受けるために必要な構造を比較し、SL の生理活性における D14 の加水分解機構とその重要性を明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】
従来の活性型 SL や GR24 では、ABC 環と D 環はエノールエーテル結合を介して結合している。本研究では既に報告されている D 環の活性発現における重要性に基づき、D 環の水酸基と多様なカルボン酸誘導体をエステル結合させた化合物を合成した。また、D 環とフタルイミドの窒素原子は N-ヒドロキシフタルイミドの水酸基を反応させることでフタル酸型化合物もいくつか新規に合成し、これらの化合物の SL 活性を評価するため、いくつかの実験で検討した。
D14 と SLR1 や D53 タンパク質間の SL 依存的な結合について、酵母 two-hybrid 法を用いて検討した。植物における生物活性はイネの SL 生合成変異体である *d17* に化合物処理した際の第 2 分げつ伸長抑制活性によって評価した。また、ストライガ種子発芽誘導活性についても調べた。さらに、D14 による化合物の被加水分解活性を HPLC 用いて調べた。
その結果、エステル型とフタル酸型化合物の被加水分解性と生理活性が一致していること、D 環との連結様式により活性のばらつきがあることが分かってきた。これらの結果をもとに、SL 活性に必要な構造と被加水分解性との関係、その生理的な意義について議論したい。

strigolactone, phytohormone, mimic

発表番号：3H017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物新規アシルスペルミジン類の探索・機能解析
# Identification and characterization of novel acylated spermidines in plants

○山野 博之[1]、岩川 純也[1]、山岸 卓矢[1]、彦坂 政志[1]、中村 英光[1]、前田 哲[2]、森 昌樹[2]、浅見 忠男[1] ([1]東大院農生科、[2]農業生物資源研究所)
○Hiroyuki Yamano[1], Junya Iwakawa[1], Takuya Yamagishi[1], Masashi Hikosaka[1], hidemitsu nakamura[1], Satoru Maeda[2], Masaki Mori[2], Tadao Asami[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]National Institute of Agrobiological Sceinces)

背景・目的

イネアクチベーションタギングラインから見出された *Spotted leaf 18* (*Spl18*) は、一定の生育ステージになると自発的に疑似病斑を生成するラインであり、この *Spl18* の原因遺伝子であるアシルトランスフェラーゼをコードする *OsAT1* 遺伝子を過剰発現させたイネでは、*Spl18* と同じ疑似病斑を生成する。予備試験において *OsAT1* 過剰発現体中にポリアミンの一種であるスペルミジン(Spd)の数種類の誘導体が蓄積することを確認したので、LC-MS/MS にてその構造解析を行った。その結果、これらは $N^4$-(10-hydroxylauroyl)- spermidine (4N10HydLau)と $N^4$-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N11HydLau)という 2 種のアシル化スペルミジンであると推定された。

ポリアミン類が植物の生理やストレス応答に関与していることは広く知られている。アシル化スペルミジンの植物内での役割はわかっていないが、これらがポリアミン類の役割の一部を担っている可能性がある。また我々のグループではアシル化スペルミジンとして構造推定した 4N10HydLau と 4N11HydLau を処理したイネ中で病害抵抗性が誘導されることを見出している。

結果

前大会において、4N10HydLauと4N11HydLauを処理したイネではいもち病やごま葉枯病に対する病害抵抗性が誘導されることを示した。今回新たに紋枯病に対する病害抵抗性について報告する。また、イネには4N10HydLauや4N11HydLau以外にも脂肪酸とポリアミンがアミド結合したアシル化ポリアミンが内生していることがわかった。これらのアシル化ポリアミンの、イネ以外の植物における内生確認や生理作用などを明らかにするべく実験を行っている。

polyamine, disease resistance, fatty acid

発表番号：3H018
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 昆虫におけるインドール酢酸生合成過程に関する研究
# Studies on biosynthesis of Indole-3-acetic acid in insects

○横山 千晃[1]、永田 晋治[2]、鈴木 義人[1] ([1]茨大農・資源、[2]東大院・新領域・先端生命)
○Chiaki YOKOYAMA[1], Shinji NAGATA[2], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Ibaraki Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【背景】

ある種の昆虫は摂食や産卵などの刺激により，宿主植物上でゴールと呼ばれる異常な植物組織を形成する。この現象にはインドール酢酸（IAA）の関与が示唆されている。我々はゴール形成昆虫であるハバチと，ゴールを形成しないカイコが，トリプトファン（Trp）→インドールアセトアルドキシム（IAOx）→IAA という共通の生合成経路を有していることを確認した。カイコでは Trp→IAOx が IAA 生合成の律速段階であるのに対し，ハバチでは同変換が強化されていると考えられる結果が得られており，ゴール形成昆虫であるハバチが進化の過程で高い IAA 生合成能を獲得し，ゴール形成に活用していると推測される。一方で我々が取得した IAOx→IAA の阻害剤 IBI1 は，Trp あるいは IAOx からの IAA 合成を阻害するが，Trp を投与した際，阻害剤によって IAOx の蓄積が認められないことから，IAA 生成に至らない他の代謝経路が存在すると考えられた。Trp 代謝実験の結果，Trp→インドールピルビン酸→インドール乳酸の経路を明らかにしたが，変換活性は弱く，IAOx から IAA に至らない別の代謝経路の存在が示唆された。本研究ではカイコにおける IAOx の代謝に関する研究を行った。一方で，阻害剤 IBI1 は，カイコ個体レベルでの効果が確認できず，また，IBI1 がメタノールや水中で不安定であることが確認されている。カイコ個体で IBI1 の阻害活性が見られない原因を追及するとともに，IBI1 の分解物等の構造を確認し，阻害活性に必要な構造の特定を目指した。

【方法・結果】

カイコ絹糸腺由来の酵素液に IAOx を投与し，インキュベート後，酢酸エチルで抽出し，蛍光検出器（ex, 280 nm; em, 350 nm）を用いて HPLC 上で代謝物の確認を行ったが，IAOx 由来の代謝物は IAA 以外に確認できなかった。また，1-ブタノール抽出物を HPLC に供した場合も IAOx 由来の代謝物は確認できなかったため，LC/MS/MS 等の別の検出法を用いた解析を行う予定である。

一方，絹糸腺から調製した酵素液では，IBI1 の阻害効果が明瞭であるのに対して，体液を含むと阻害効果が低下するという傾向が見られた。体液中の代謝酵素が阻害剤耐性である，あるいは，体液中に阻害活性を低下させる物質が含まれている等の可能性を検討している。

Auxin, Gall, Insect

発表番号：3H019
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# オカボノクロアブラムシが形成するハルニレゴールの適応的意義に関する研究

# Study on adaptive significance of elm gall formation by an aphid

○武井 麻美[1]、伊藤 晋作[2]、石毛 太一郎[3]、田中 啓介[3]、鈴木 義人[1]([1]茨城大・農、[2]東農大・応生科・バイオ、[3]東農大・ゲノムセ)
○Mami TAKEI[1], Shinsaku ITO[2], Taichiro ISHIGE[3], Keisuke TANAKA[3], Yoshihito SUZUKI[1] ([1]Dept. Biores. Sci., Ibaraki Univ., [2]Dept. Bioscience., Tokyo Univ. of Agr., [3]NODAI Genome Research Center, Tokyo Univ. of Agr.)

【目的】ゴールとは昆虫の摂食などの刺激によって植物に形成される異常組織である。昆虫が形成するゴールの適応的意義は摂食対象，シェルターの二点がよく知られており，その他にも昆虫にとって都合の良い組織として利用されていると考えられる。その一つとして，ゴールは昆虫に対する抵抗性が低下していると考えられている。我々はオカボノクロアブラムシ（*Tetraneura nigriabdominalis*）がハルニレ（*Ulmus davidiana* var. *japonica*）に形成するゴールを対象としている。前年度大会でゴールは揮発性物質の生産やジャスモン酸（JA）応答性遺伝子の発現が抑制されており， JA 応答性が低くなっていることを報告した。今回，ゴールの新たな適応的意義を追究することを目的として，RNA-Seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【結果】1）ゴールと葉の全体的な比較，2）ゴールと葉における JA 応答性の比較の二点に関して解析を行った。RNA-Seq でアッセンブリングして得られた全コンティグ配列に対して Blast2GO で GO ターム，EC 番号を付加し，GO タームが付加された配列を用いて解析した。1）ゴールと葉における転写量を比較したところ，有意差のある遺伝子数は 1987 であった。これらは二組織間における性状の違いを示すと考えられることから，ゴールまたは葉で有意に発現量の高い遺伝子群（FDR<0.001）の特徴を比較するために GO 解析および Pathway 解析を行った。葉と比較してゴールで発現量が高い遺伝子群では，刺激に対する応答，成長過程の制御などに関わる遺伝子が多いという結果が得られ，ゴールの葉とは異なる応答性や急速な成長に関連していると考えられた。また，ゴールで発現量の高い遺伝子の中にはフェニルプロパノイド代謝に関わる遺伝子が含まれていた。これはゴールにおいてフェノール類が蓄積することを支持する結果である。2）組織間における JA 応答性を調べたところ，ゴールより葉で JA に応答する遺伝子が多く，ゴールは JA 応答性が低下しているという今までの結果と一致していた。また，GO 解析では JA 処理によって上方制御された遺伝子群の中でストレス応答に関わる遺伝子数が葉よりゴールで減少しており，ゴールでは JA シグナル伝達が抑制されている可能性が考えられる。

ゴールで顕著に発現量の高い遺伝子として，病害虫への抵抗性反応に関わる遺伝子等が含まれており，今後，ゴール組織におけるこれらの遺伝子の機能をもとに，ゴール組織に特徴的な性状を明らかにしたいと考えている。

insect gall, jasmonic acid, adaptive significance

発表番号：3H020
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 糖シグナリングによる側枝形成機構の解明

# Sugar signaling in the control of shoot branching

○大鳥 久美 [1,2]、岩城 孝平 [1]、田部 記章 [1,2]、田茂井 政宏 [1,2]、重岡 成 [1,2] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]JST,CREST)
○Kumi Otori[1,2], Kohei Iwaki[1], Noriaki Tanabe[1,2], Masahiro Tamoi[1,2], Shigeru Shigeoka[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ, [2]JST,CREST)

【目的】植物において側枝数は収量を左右する重要な要素であり、成長段階に応じて栄養状態を感知し、植物ホルモンを介して制御されていると考えられているが、その詳細は未だ不明なままである。我々がこれまでに作出したショ糖生合成系の律速因子である細胞質 FBPase を強化した形質転換植物は、高 $CO_2$ 環境下において側枝数が野生株より増加するという表現型を示した(*Photosynth Res.* 2011)この形質転換植物では、ソース・シンク器官におけるショ糖／ヘキソース量が変化するとともに、側枝形成に関与する植物ホルモンであるオーキシンやストリゴラクトン関連遺伝子の発現量が野生株と比べて変化していた。これらの結果は、糖バランスの変化が植物ホルモン代謝を介して形態形成を制御することを示唆していた。糖バランスによる側枝形成制御機構を明らかにするために、シロイヌナズナにおけるオーキシンおよびストリゴラクトン関連遺伝子発現に及ぼす糖処理の影響を検討するとともに、糖シグナリング関連遺伝子破壊株を用いて解析を行った。【方法と結果】通常 $CO_2$ 環境下で 4 週間水耕栽培したシロイヌナズナの野生株を、ショ糖、グルコースおよびフルクトースを各 50mM ずつ含む水耕液で 24 時間処理後の基部から単離した mRNA を用いて、オーキシン関連遺伝子である *YUCCA9*、ストリゴラクトン関連遺伝子である *MAX2* および側枝の形成を統合的に抑制している *BRC1* の遺伝子発現量を比較した。その結果、*YUCCA9*、*MAX2* および *BRC1* 遺伝子発現量は糖処理により減少した。このことは植物体内の糖量の変化が側枝形成に関与する遺伝子の発現量を変化させることを示唆していた。そこで次に、側枝の形成に関連する糖シグナリングにおいて、糖シグナルをこれらの植物ホルモン関連遺伝子に伝える因子を探索するために、これまでに糖シグナリング関連因子として報告のある遺伝子のノックアウト株(*stp1*、*hxk1*、*cw-inv6*)を単離し、野生株と同様に糖処理を行い、*BRC1* 遺伝子発現量について解析を行った。その結果、*hxk1* および *cw-inv6* 株では *BRC1* 遺伝子発現の糖応答性に変化は見られなかったが、*stp1* 株では *BRC1* 遺伝子発現の糖応答性が有意に低下していた。このことから STP1 は糖バランスによる側枝形成制御において、BRC1 の上流に位置する因子であると考えられる。現在、糖センサーを含めたこのシグナリングに関わる他の因子の探索および機能解析を試みている。

branching, plant hormone, sugar signaling

発表番号：3H021
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ HsfA1d/A1e を介したβ-シクロシトラールによる遺伝子発現制御機構の解明
# Gene regulation mechanism by ß-cyclocitral via Arabidopsis HsfA1d/A1e

○藪田 行哲[1]、佐々木 悠[1]、重岡 成[2]、渡邊 文雄[1]（[1]鳥取大院農、[2]近畿大農）
○Yukinori YABUTA[1], Yu SASAKI[1], Shigeru SHIGEOKA[2], Fumio WATANABE[1] ([1]Grad. Sch. Agr., Tottori Univ., [2]Fac. Agr. Kinki Univ.)

【目的】活性酸素種（ROS）は生体に酸化的傷害を引き起こす一方で、種々の遺伝子発現のシグナル分子としても機能する。近年、植物において $H_2O_2$ あるいは $^1O_2$ により誘導される遺伝子は異なる事が報告され、それぞれの ROS が異なるシグナル分子として機能していることが考えられた。植物細胞内の主要な ROS の生成源は葉緑体であり、光化学系 II では $^1O_2$ が、光化学系 I では $O_2^-$ を介して $H_2O_2$ が生成されている。最近、$^1O_2$ のスカベンジャーとして機能するカロテノイドの酸化物である β-シクロシトラール（β-CC）は $^1O_2$ 応答遺伝子の発現を特異的に誘導することから、$^1O_2$ を介したシグナル伝達に関与するメッセンジャーであることが報告された。しかしながら、それに関わる分子機構は不明である。ところで、β-CC 処理により熱ショックタンパク質（Hsp）の多くは誘導される。これまでの研究により Hsp 発現の誘導は熱ショック転写因子（Hsf）が関与し、特にクラス A1 Hsf（HsfA1）が重要である（Nishizawa-Yokoi et al., 2011）。そこで、Hsp の発現制御機構を詳細に解析することで、β-CC による分子機構が解明できると考え、シロイヌナズナ HsfA1d/A1e 二重変異株（KO-HsfA1d/A1e）を用いて $^1O_2$ 応答遺伝子の応答を解析した。

【方法】β-CC 処理時間および濃度について検討するため、MS 培地上で 2 週間栽培（100 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$）栽培したシロイヌナズナのシャーレに 20 μl の β-CC をしみこませたろ紙（φ8 mm）を 1～5 枚入れ、1～5 時間処理した。それぞれのサンプルより RNA を抽出し、リアルタイム PCR により Apx2、Dreb2A、Elip2、Gst6、HsfA2、Hsp18.1-CI、Hsp70.4、Zat12 の発現を解析した。また β-CC の取り込みを HPLC 分析により確認した。さらに β-CC による遺伝子発現の誘導に β-CC 付加タンパク質の蓄積が関与しているかを検討するため、1～10 mM GSH もしくはカルノシン（CAR）を予め処理し、β-CC による遺伝子発現の誘導への影響を解析した。

【結果】β-CC 処理条件を検討したところ、3 枚のろ紙をシャーレに入れ 3 時間処理することで全ての遺伝子の発現が誘導されること、この条件で β-CC は植物に取り込まれることを確認した。また、KO-HsfA1d/A1e において、β-CC 処理による Apx2 および Hsp18.1-CI の発現は抑制されていた。これまでに我々は HsfA1d/A1e を介する遺伝子発現には変性タンパク質の蓄積がトリガーとなる事を提唱している。また β-CC は α,β-不飽和アルデヒドであるため、β-CC 付加タンパク質が形成される事で遺伝子発現が誘導されるのでは無いかと考え、α,β-不飽和アルデヒドのスカベンジャーである GSH もしくは CAR による前処理を行ったが、β-CC により遺伝子発現の誘導を抑制することができなかった。

reactive oxygen species, Hsf, environmental stress response

発表責任者：藪田行哲（yabuta@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：3H022
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 被覆栽培したチャの RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析

# Comprehensive analysis of gene expression in shade-grown tea leaves by RNA-seq

○森田 重人[1,2]、北島 佐紀人[3]、栗栖 加奈[1]、竹本 哲行[4]、寺島 伸[5]、山本 直樹[1]、三村 裕[4]、矢野 健太郎[5]、佐野 智[1]、増村 威宏[1,2] ([1]京都府大生命環境、[2]京都農技セ生資セ、[3]京都工繊大応用生物、[4]京都農技セ農林セ、[5]明治大農)
○Shigeto MORITA[1,2], Sakihito KITAJIMA[3], Kana KURISU[1], Tetsuyuki TAKEMOTO[4], Shin TERASHIMA[5], Naoki YAMAMOTO[1], Yutaka MIMURA[4], Kentaro YANO[5], Satoshi SANO[1], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Biotech. Res. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center, [3]Kyoto Inst. Technol., [4]Agr. Forest. Technol. Dept., Kyoto Pref. Agr. Forest. Fish. Technol. Center, [5]Meiji Univ.)

【目的】玉露や抹茶などの高級茶は、新芽の生育中に茶樹を遮光する被覆栽培により生産される。被覆により弱光条件で栽培することで、茶葉の香味成分が増加し高品質な茶が得られる。一方、遮光下で栽培したチャは、収穫時に強光に曝されることでストレスを受け一過的に障害を受ける。このようなストレスは、複数年にわたる長期間の被覆栽培によって生じるチャの樹勢低下や収量減少の一因と考えられる。上記の状況を背景として、我々は被覆栽培によってチャが受けるストレスとその影響を明らかにするため、圃場において被覆栽培したチャのストレス応答を解析している。本研究では、チャの被覆解除に対する応答を詳細に調査するために、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析を行った。

【方法と結果】一番茶（4 月～5 月に栽培・収穫される茶）の時期に 30 日間、さらに二番茶（6 月～8 月に栽培・収穫される茶）の時期に 20 日間被覆栽培を行ったチャを材料として用いた。我々はすでに、二番茶の被覆解除後 1 日目の新芽と、対照として一番茶・二番茶とも被覆をかけずに栽培したチャの新芽をサンプルとし、RNA-seq 解析を行っている（本学会 2015 年度大会発表）。今回は、これに加えて被覆解除直後の新芽を採取し、Illumina Hiseq 2000 を用いて RNA-seq を行った。上記 3 つのサンプルから得られたリードを、既知のチャの cDNA、および NCBI に登録されている Roche 454 のチャ RNA-seq データと合わせて de novo アセンブルを行い、128,076 個のコンティグを得た。RPKM 値により発現量の比較を行った結果、対照に比べて被覆解除直後で有意に発現が低下していたコンティグは 20,963 個、被覆解除直後から 1 日後にかけて有意に発現上昇したコンティグは 22,105 個であった。被覆解除に応答して発現上昇したコンティグには、ELIP（Early Light-Induced Protein）遺伝子、光合成関連遺伝子、グルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子等が含まれていた。また被覆解除直後のサンプルでは、多数の熱ショックタンパク質遺伝子が高発現していたことから、夏期に被覆をかけることで温度上昇によりチャが高温ストレスを受けていることが示唆された。

Tea, shade culture, stress response

発表責任者：森田重人（s_morita@kpu.ac.jp）

発表番号：3H023
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネのジャスモン酸応答性転写因子 RERJ1 は虫害抵抗性においてリナロールの生産を制御する
# Rice JA inductive transcription factor RERJ1 regulates linalool emission in response to herbivory

○茂手木 敦史[1]、河村 奈央子[1]、宮本 皓司[1,2]、山根 久和[2]、小澤 理香[3]、高林 純示[3]、イバン ガリス[4]、新屋 友規[4]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1]([1]東大・生物工学セ、[2]帝京大・理工、[3]京大・生態学研究センター、[4]岡山大・資源植物科学研究所)
○Atsushi MOTEGI[1], Naoko KAWAMURA[1], Kouji MIYAMOTO[1,2], Hisakazu YAMANE[2], Rika OZAWA[3], Jyunji TAKABAYASHI[3], Ivan Galis[4], Tomonori SHINYA[4], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ., [3]Kyoto Univ., [4]Okayama Univ.)

【背景】ジャスモン酸は、植物が虫害・傷害などのストレスに応答して誘導的に生産される植物ホルモンであり、防御応答や成長制御など植物の様々な生理応答に関与している。我々は、イネにおいてジャスモン酸処理後 15 分で早期に発現誘導を受ける遺伝子として bHLH 型転写因子をコードする *RERJ1*（*Rice Early Responsive to Jasmonate 1*）を単離し、ジャスモン酸シグナル伝達における RERJ1 の生理的な役割の解明を進めている。これまでの研究により、*RERJ1* の発現誘導は傷害部位のごく近傍でのみ見られることが示されており、さらに *rerj1* 欠損株においてアワヨトウ幼虫を用いた摂食試験を行ったところ、*rerj1* 欠損株を与えた幼虫の体重は野生型株を与えた幼虫に比べ有意な増加が見られた。また、*rerj1* 欠損株を用いた傷害処理時のマイクロアレイ解析の結果からは、昆虫忌避作用を示す揮発性モノテルペン・リナロールの生合成遺伝子をはじめとした、複数の虫害抵抗関連遺伝子の発現が *RERJ1* の欠損により影響を受けることが明らかとなった。これらのことから、RERJ1 はイネの虫害抵抗性発現に寄与する転写因子であると予想された。
【方法と結果】これまでの解析はアワヨトウ幼虫を用いた摂食試験を除き、イネ葉身に対する傷害処理により進められてきた。本年度は、より虫害に近い条件下で実験を行うことで、昆虫の食害時における RERJ1 の機能を調べることにした。そこで本実験では、虫の吐き戻し液（Oral Secretion：OS）を調製し傷害処理部位に塗布することで、人工的に昆虫による食害を再現した際の揮発性成分の発生について検討した。

イネ野生型株および *rerj1* 欠損株の最大展開（n）葉と n-1 葉に対し、均一に傷がつくようルレットを用いて傷害処理を与えた。続く OS 処理には 4~5 齢のクサシロキヨトウ *Mythimna loreyi* の吐き戻し液を 3 倍に希釈し、傷害部位に塗布した。処理後の植物体をアクリル製の筒の中に置き、24 時間後の気相を回収し GC-MS を用いて揮発性成分の分析を行った。その結果、*rerj1* 欠損株では、ピネンやカリオフィレンなど他の主要な揮発性テルペノイドや緑のかおり（Green Leaf Volatiles）については変化が認められなかったのに対し、リナロールの生産量は野生型株に比べ大きく低下していた。この結果から、RERJ1 は虫害応答時の揮発性物質の生産制御に関与しており、特にリナロールの生産に強い影響を与えることが明らかとなった。現在、リナロール生合成遺伝子（*OsLIS*）プロモーターに対する RERJ1 の結合について解析を行っており、RERJ1 による OsLIS の発現誘導機構の解明を進めている。

Transcription factor, Jasmonic acid, Linalool

発表責任者：茂手木敦史（3282373264@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3H024
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物熱耐性向上物質サンギナリンの熱ショック応答誘導機構

# Induction mechanism of heat shock response by sanguinarine which is a heat tolerance enhancer of plants

○松岡 恵里奈[1]、村野 宏樹[1]、松原 匠[1]、原 正和[1,2]([1]静大農、[2]静大グリーン研)
○ Erina MATSUOKA[1], Hiroki MURANO[1], Takumi MATSUBARA[1], Masakazu HARA[1,2] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

【目的】
近年の地球温暖化による夏季の局地的熱波は、農作物の生産減少、生態系の崩壊につながるため、高温ストレスに強い植物を育成する必要がある。その手段の一つである熱耐性向上剤を用いる方法は、実用的であるが研究実績は乏しい。当研究室は、ベンジルイソキノリンアルカロイドの Sanguinarine（Sang)が植物の熱耐性を高めることを報告した。Sang は既知の熱耐性向上物質の Geldanamycin(GDA)と似た作用を持つ可能性が示されているが、その作用メカニズムはほとんど解明されていない。そこで、Sang、GDA、Sang 類縁アルカロイドの Chelerythrine（Chele)、Berberine（Berbe)、Papaverine（Papa）をシロイヌナズナに投与し、熱ショック応答誘導作用を比較調査した。
【材料と方法】
*試薬*：GDA とアルカロイド 4 種は市販品を購入した。*熱ショック応答*：GDA 応答性熱ショックタンパク質（HSP）プロモーターの下流にレポーター遺伝子（β-グルクロニダーゼ,GUS）を連結した遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを使用した。7 日齢の形質転換シロイヌナズナの実生を 6 段階に濃度を割り振った物質溶液に漬け込み、植物体内における熱ショック応答を蛍光強度で評価した。*GUS タンパク質発現*：形質転換シロイヌナズナを GDA または Sang 処理した時の GUS 発現の経時的変化をウェスタンブロッティングで調査した。*HSP 発現*：野生型シロイヌナズナを GDA または Sang 処理した時の HSP 発現の経時的変化をウェスタンブロッティングで調査した。*シャペロン阻害試験*：GDA、Sang とその類縁アルカロイドのシャペロン阻害活性を小麦胚芽抽出物による変性ルシフェラーゼ回復試験で調査した。
【結果と考察】
GDA は 50 μM、Sang は 5 μM で最も強くシロイヌナズナの熱ショック応答を誘導し、Chele はわずかに誘導し、Berbe と Papa は誘導しなかった。また、タンパク質発現の調査では、GDA と Sang による GUS 発現と HSP 発現の向上が確認された。シャペロン活性阻害試験では、GDA と Sang の阻害能が確認され、Chele の阻害能は低く、Berbe と Papa には阻害活性はなかった。GDA と Sang の共存試験では、添加した Sang の濃度が高くなると GDA 作用の限界を超える阻害が見られた。以上の結果より、Sang は GDA と同様、シャペロンを阻害して植物の熱ショック応答を向上させるが、その機構には異なる点があることが示唆された。

heat shock response, chaperone, sanguinarine

発表責任者：原正和（hara.masakazu@shizuoka.ac.jp）

発表番号：3H025
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ズッキーニにおけるダイオキシン類の体内輸送に関わる遺伝子の発現調節機構

# Expression mechanisms of genes related to translocation of dioxins and dioxin-like compounds in zucchini plants

○乾 秀之 [1,2]、吉原 亮平 [1]、廣田 又士 [2]、後藤 純弥 [2]、殷 熙洙 [3] ([1] 神戸大遺伝子、[2] 神戸大院農、[3] 農環研)
○Hideyuki INUI[1,2], Ryouhei Yoshihara[1], Matashi Hirota[2], Junya Goto[2], Heesoo Eun[3] ([1]Kobe Univ. Res. Ctr. Environ. Genomics, [2]Kobe Univ. Grad. Sch. Agric. Sci., [3]Nat. Inst. Agro-Environ. Sci.)

【目的】ダイオキシン類を含む高脂溶性汚染物質は、低濃度で広範囲の環境を汚染し、微生物による分解を受けにくいため、食物連鎖を通じてヒトを含む動物に高濃度に蓄積される。しかも、地球規模で汚染が拡大していることから、世界的な問題となっている。近年、植物を利用した環境浄化法であるファイトレメディエーションが、安価に、しかも広範囲の低濃度汚染を浄化できる方法として注目されている。しかし、一般に植物は土壌中の高脂溶性化合物を取り込みにくいため、これらの浄化には適していない。一方、ウリ科植物は高脂溶性汚染物質を他の植物種より効率よく取り込むことが可能であることから、ファイトレメディエーション用植物として有望である。しかし、どのようにしてウリ科植物が脂溶性汚染物質を取り込み、蓄積するのか、詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで、ウリ科植物の中で最も取り込み効率の高いズッキーニにおいて、ダイオキシン類の体内輸送に関わる遺伝子の発現調節機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】我々はこれまでに、ダイオキシン類高蓄積品種で発現するジンクフィンガーモチーフを持つ転写因子（*ZFP-BG*）遺伝子と、これと約80%のアミノ酸配列相同性を示す、低蓄積並びに高蓄積品種で同等に発現する*ZFP-PBG*遺伝子をクローニングしている。これら遺伝子を過剰発現した形質転換タバコ植物（ZFPタバコ）を作出し、感染時特異的タンパク質クラス10（*PR-10*）遺伝子の発現を調べた。一方、ズッキーニにおいて脂溶性汚染物質の体内輸送に関わっているメジャーラッテクスライクプロテイン（MLP）のプロモーター領域（MLP-P）をクローニングした。これをβ－グルクロニダーゼ（*GUS*）遺伝子の上流に結合し、アグロバクテリウムを用いてZFPタバコの葉に一過的に発現させた。
【結果】ZFP タバコにおいて、*PR-10* 遺伝子の発現が増加していることが判明した。PR-10 は MLP と三次元構造が類似しており、これまでに PR-10 は高脂溶性汚染物質の一種ポリ塩化ビフェニルと結合することを明らかにしている。ズッキーニにおいて ZFP が *MLP* 遺伝子の転写を制御しているか調べるために 4 種の MLP-P を低蓄積並びに高蓄積品種からクローニングした。これらを *GUS* 遺伝子の上流に結合し、ZFP タバコに一過的に発現したところ、ZFP-BG タバコにおいて GUS 活性が増加することが判明した。これら MLP-P には共通したシスエレメントが存在し、これを介して ZFP が *MLP* 遺伝子の転写を活性化していると考えられた。これらの結果から、高蓄積ズッキーニ品種において高発現する ZFP-BG が *MLP* 遺伝子の転写を活性化し、合成された MLP が高脂溶性汚染物質を根から地上部に輸送しているものと考えられる。

dioxins and dioxin-like compounds, zucchini, zinc finger protein

発表責任者：乾秀之（hinui@kobe-u.ac.jp）

発表番号：3H026
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物のアスコルビン酸蓄積量の制限に関わる因子の解析
# Identification of factors limiting the ascorbate levels in plants

伊藤 史帆[1]、大北 由佳[1]、重岡 成[2]、○吉村 和也[1]([1]中部大応生、[2]近畿大農)
Shiho Ito[1], Yuka Ohkita[1], Shigeru Shigeoka[2], ○Kazuya YOSHIMURA[1] ([1]Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ., [2]Fac. Agr., Kinki Univ.)

アスコルビン酸(AsA)は植物に最も豊富に存在する水溶性抗酸化物質であり、抗酸化剤としてだけでなく、細胞内レドックスバッファーとしてさまざまな生理作用に機能している。そのため、その細胞内蓄積量の制御は、光合成、ストレス応答および形態形成を含めた様々な細胞機能の発現に必須である。これまでに我々は、エストロゲン(ES)誘導による一過的発現系を用いて、8 段階の触媒過程を経る植物の AsA 生合成経路[D-マンノース/L-ガラクトース(D-Man/L-Gal)経路]の構成酵素群の中で、GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼをコードする *VTC2* の転写レベルでの制御が、シロイヌナズナの葉の明/暗条件に応答した細胞内 AsA 量の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた（Yoshimura et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2015)。しかし、ES 誘導性 VTC2 一過的発現系導入(IE-VTC2)株の葉における VTC2 活性は、ES 処理により最大約 11 倍に上昇しているにも関わらず、AsA 量の最大増加率は約 2.5 倍であった。この結果から、必要十分量以上の炭素源の AsA 生合成への利用を避けるために、VTC2 による生合成系の律速に続く、AsA 蓄積量の最大値を制限する因子の存在の可能性が示唆された。そこで、本研究では炭素供給源および輸送に注目し、AsA 蓄積量の制限に関わる因子の解析を試みた。

IE-VTC 株を 0, 2 および 5%スクロースを含む 1/2 MS 培地で弱光(80 µmol photons/$m^2$/s)下で 2 週間栽培し、ES 処理 3 日後の AsA 量を測定した結果、スクロース濃度依存的な増加が認められた。しかし、同条件と比較して、中程度の光条件(150 µmol photons/$m^2$/s)下では 0%スクロース培地で僅かに AsA 量が増加したのみであった。また、土栽培においても弱光条件下では ES 処理による AsA 量の増加が認められたが、中程度の光条件下では変化がなかった。一方、AsA 蓄積量が減少している KO-vtc2 株に IE-VTC2 遺伝子を導入した KO-vtc2/IE-VTC2 株では、弱光よりも中程度の光条件下で ES 処理により顕著に AsA 量が増加した。これらの結果から、光合成に起因する糖の供給量が VTC2 に続く AsA 蓄積量の制限要因であるが、AsA 生合成へのその供給量には上限があることが示唆された。

□播種後 3 週間栽培した IE-VTC2 株のロゼッタ葉の一部にのみ ES を塗布し、7 日後の各器官の AsA 量を測定した結果、未塗布のロゼッタ葉では変化なく、茎およびカーリン葉で増加していた。このことから、葉で過剰に蓄積した AsA は垂直方向に器官間を輸送されていることが示唆された。

Ascorbate, VTC2, Biosynthesis

発表責任者：吉村和也（k-yosi@isc.chubu.ac.jp）

発表番号：3H027
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# The arsenic accumulation and arsenate reductase gene of three Pteris ferns.

○ SHUJUN WEI[1], HAN WANG[2], KAZUKI SUGAWARA[1], MEIFANG CHIEN[1], CHIHIRO INOUE[1] ([1]Tohoku Univ., [2]TianJin Univ.)

Arsenic is one of the most dangerous carcinogens and is harmful to plants, animals and humans. However, some plants show arsenic bioaccumulation potential, thus these plants attract scientists interest in studying the mechanisms of their arsenic resistance and in applying these plants to remove arsenic from polluted soil or water. Previous studies show that some special ferns taxon, the genus *Pteris* (Pteridaceae) are arsenic hyperaccumulators, which can accumulate over 1000 mg $kg^{-1}$ arsenic in its fronds. *Pteris vittata* is the first identified and the most studied arsenic hyperaccumulator, which can accumulate arsenic in the fronds to concentration as high as 22,630mg/kg. The toxicity, bioavailability and mobility of arsenic vary depending on the state of oxidation, and the most prevalent types of dissolved arsenic are arsenite and arsenate. Our previous studies show that *P. vittata* mainly takes up arsenic as arsenate via phosphate transporter and that the major state of arsenic in the fronds is arsenite, which indicate that there should be an arsenate reducing system in *P. vittata*. Intriguingly, the sporophyte generation of ferns is much more active than their gametophyte generation, and the arsenate reductase gene, *PvACR2*, from *P. vittata* gametophyte has been isolated. However, there is no report about *PvACR2* in its sporophyte, and the details of arsenic accumulation in Pteridaceae are remain unclear. The present study investigated the arsenic accumulation potential and the arsenate reducing system in sporophyte of three ferns belong to *Pteris* genus, *P. vittata*, *Pteris multifida* and *Pteris x sefuricola* Kurata. *P. multifida* has also reported as an arsenic hyperaccumulator, and *P. x sefurecola* Kurata is a hybrid of two hyperaccumulators, *P. multifida* and *Pteris cretica*, while there is no report about its arsenic accumulation. The ferns were cultivated in pots with 300 ppm arsenite addition for 8 weeks. The arsenic accumulation and the state of arsenate in their fronds were examined by LC-ICP-MS. Besides, DNA from different parts (root, stem, leaflet) was extracted, and the arsenate reductase gene was investigated by a new designed primer set specific to *PvACR2*. The comprehensive evaluation among these ferns will be further discussed at presentation.

arsenic, arsenate reductase, Pteris ferns

発表責任者：MEIFANG CHIEN（meifang@mail.kankyo.tohoku.ac.jp）

発表番号：3H028
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネの転写因子 OsbZIP79 によるファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御機構

# Function of OsbZIP79 on the transcriptional regulation of phytoalexin biosynthetic genes in rice

○渋谷 大地[1]、宮本 皓司[2]、山根 久和[2]、野尻 秀昭[1]、岡田 憲典[1] ([1]東大・生セ、[2]帝京大・理工)
○Daichi Shibuya[1], Koji Miyamoto[2], Hisakazu Yamane[2], Hideaki Nojiri[1], Kazunori Okada[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Teikyo Univ.)

【目的】植物が病原菌に感染するとファイトアレキシン生産などの病害抵抗性反応を示す。イネでは主要なジテルペン型ファイトアレキシンとしてファイトカサン類とモミラクトン類が知られており、各々の生合成遺伝子はそれぞれ 2 番染色体と 4 番染色体上に遺伝子クラスターを形成している。先行研究において、bZIP 型転写因子 OsTGAP1 がこれら生合成遺伝子のエリシター応答性発現を正に制御することが示されたが、さらに yeast two-hybrid 法によって OsTGAP1 と相互作用する新たな bZIP 型転写因子 OsbZIP79 が同定された。これまでに *in vitro*、*in vivo* における両者の相互作用が確認されており、OsbZIP79 過剰発現培養細胞を用いた解析から、OsbZIP79 が OsTGAP1 とは対照的にファイトアレキシン生合成遺伝子群の発現を負に制御することが示されている。本研究では、植物体における OsbZIP79 の機能と分子レベルでのファイトアレキシン生合成遺伝子の転写制御メカニズムを解明することを目的として、植物体における 2 つの bZIP 型転写因子の発現変動と、それらの相互作用によって引き起こされる下流ターゲット遺伝子発現の変化に着目し解析を進めた。
【方法と結果】野生型イネ植物体を用いて *OsbZIP79* の転写レベルでの発現を RT-PCR により解析したところ、定常状態の根において非常に高い発現が見られた。このことから OsbZIP79 は根において重要な機能をもつと推察された。さらに、塩化銅やジャスモン酸を用いたエリシター処理による mRNA の発現変動を地上部と根に分けて経時的に調べた。その結果、*OsTGAP1* が発現誘導を示すことと対照的に、地上部、根ともに *OsbZIP79* の発現誘導はみられず、逆に根において 3 時間後から発現レベルの低下が顕著に認められた。次に、地上部でも明白な *OsbZIP79* の恒常的過剰発現を示す *OsbZIP79* 過剰発現イネ植物体の解析を進めた。まず、表現型の解析としてファイトアレキシン蓄積量を野生型株と比較したところ、過剰発現株のファイトアレキシン生産量は地上部において減少傾向が見られたが培養細胞ほどの顕著な差が得られず、根においては差が認められなかった。*OsbZIP79* は根で高い発現が見られるがエリシター処理により mRNA の減少が起こるため、エリシター処理時の過剰発現株の根における *OsbZIP79* の発現変動を現在確認中である。野生型株における *OsTGAP1* と *OsbZIP79* のエリシター処理時の対照的な発現挙動と相互作用の結果から、標的遺伝子の発現制御に両者の量的バランスが重要であると推察される。現在、OsTGAP1 の結合が示されている MEP 経路の初発遺伝子 *OsDXS3* のプロモーター領域をレポーターに用いて、OsbZIP79 と OsTGAP1 の共存効果を検討している。また、*osbzip79 Tos17* 挿入変異体の解析も進めている。

transcription factor, phytoalexin, diterpene

発表責任者：渋谷大地（3317100833@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：3H029
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 鉄欠乏応答に関与する葉緑体 $H_2O_2$ 応答性遺伝子の機能解析

# Functional analysis of chloroplastic $H_2O_2$-responsive genes involved in responses to iron deficiency stress

○野志 昌弘[1]、森 大輔[2]、田部 記章[1]、田茂井 政宏[1,2]、高木 優[3,4]、丸田 隆典[5]、重岡 成[1,2]（[1]近畿大・農・バイオ、[2]近畿大院・農・バイオ、[3]産総研・生物プロセス、[4]埼玉大・環境科学、[5]島根大・生資科・生命工）

○ Masahiro NOSHI[1], Daisuke MORI[2], Noriaki TANABE[1], Masahiro TAMOI[1,2], Masaru TAKAGI[3,4], Takanori MARUTA[5], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [3]AIST., [4]IEST, Saitama Univ., [5]Dept. Appl. Biosci. and Biotech., Fac. Life and Environ. Sci., Shimane Univ.)

活性酸素種（ROS）は、光合成や呼吸など様々な植物生理の副産物として生成される酸素毒である。一方で、ROS と抗酸化物質による細胞内レドックス状態の変化はシグナルとして、ストレス防御系の誘導のみならず、生長/発達やホルモンシグナルを含むあらゆる生理応答に関与する。近年では、ROS の種類や生成部位の違いに依存した複数のシグナル経路の存在が明らかとなってきたが、個々の機能の多くは不明である。我々は、葉緑体 $H_2O_2$ 応答性遺伝子の発現変異株からのストレス感受性異常株の選抜およびその機能解析により、レドックスシグナルを介したストレス応答の分子機構について明らかにしてきた。今回は、葉緑体 $H_2O_2$ 応答性転写因子の優性抑制株ラインより同定された、酸化的ストレス下において顕著なクロロシスを示す *mvs9* および *mvs11* の解析結果に焦点を絞り報告する。

*MVS9* は、塩基性ヘリックスループヘリックス（bHLH）転写因子である bHLH101 をコードしていた。bHLH101 は、植物特有の bHLH Ib clade に属しており、3 つのサブファミリーと協調的に鉄欠乏応答に寄与することが報告されていた。*bHLH Ibs* の発現は、いずれも強光により抑制されたが、*bHLH101* のみが葉緑体 $H_2O_2$ によっても抑制された。bHLH101 優性抑制株の光酸化的ストレス感受性に生育培地中の鉄濃度の変化はあまり影響せず、細胞死が増大するタイミングでの鉄含量に植物間での違いは見られなかった。また、bHLH101 の遺伝子破壊株も同様に光酸化的ストレス高感受性を示した。以上より、bHLH101 は鉄の恒常性とは別に、光酸化的ストレス耐性にも関与することが示された。一方、*mvs11* は強光のみならず通常条件での生育においても顕著なクロロシスを示す変異株として単離された。MVS11 は機能未知の転写因子であったが、*mvs11* のクロロシスは鉄過剰条件での生育により回復した。さらに、鉄欠乏下の *mvs11* では、鉄還元酵素活性および鉄輸送体の誘導が抑制されており、鉄含量も低下していた。また、これらと同様の結果が、MVS11 過剰発現株でも見られた。よって、MVS11 は転写抑制因子として鉄欠乏応答にネガティブに寄与する可能性が示された。現在、MVS11 の転写活性および細胞内局在を含めた分子特性について解析を進めている。

以上より、bHLH101 および MVS11 は、葉緑体 $H_2O_2$ に由来する酸化的シグナルを介して、鉄代謝と光酸化的ストレス応答の両制御あるいはクロストークに機能することが明らかとなった。また最近の結果より、MVS11 の優性抑制株では、鉄欠乏下での生育によるサリチル酸蓄積が増大されること、外部からのサリチル酸添加によりクロロシスが緩和されることが明らかとなった。現在、葉緑体 $H_2O_2$ と鉄代謝およびサリチル酸との関係について解析中である。

Reactive oxygen species, Oxidative signaling, Stress response

発表番号：3H030
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 根粒菌の生産するジベレリンが根粒数を制御する

# Rhizobial gibberellin regulates host nodule number.

○立上 陽平[1,2]、植田 充美[1] ([1]京大院農、[2]学振(DC1))
○Yohei TATSUKAMI[1,2], Mitsuyoshi UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS)

**【背景】**マメ科―根粒菌共生関係において、根粒菌はマメ科植物に感染し宿主の根に根粒を形成する。その中で、根粒菌は大気窒素をアンモニア態窒素に変換し植物に供給する一方、植物は光合成産物を根粒菌に供給する。生長時にこの炭素源供与と窒素源受容のバランスを最適な割合で保つことが宿主植物にとって重要であるため、一個体あたりの根粒の着生数は植物による厳密な制御を受けることが知られている。従来、両者の共生の場である根粒の形成は、宿主による自己制御機構や宿主の生産する植物ホルモンにより制御されることが示されてきた。一方、本研究では根粒菌側にも宿主の根粒数を制御する機構が存在することを発見した。
**【方法・結果】**まず、プロテオーム解析[1,2]により着目していた共生時特異的に発現する根粒菌のオペロンがジベレリンを生産することを発見した。さらに、ジベレリン合成遺伝子を破壊した根粒菌では根粒数が増加することを発見した。このことから根粒菌のジベレリン生合成は根粒数の制御を担っていると結論付けた。さらに、根粒菌のジベレリン合成遺伝子の分布は、植物の作る根粒の形態的特徴(有限・無限根粒)によりほぼ例外なく分類されることも判明し、根粒菌が共進化的にジベレリン合成オペロンを獲得したことの強い証拠を得た。最後に、根粒菌のジベレリンが根粒菌自身を進化的に安定させることを実験的に証明した[3]ので、これらの結果をまとめて報告する。

[1] Y Tatsukami *et al*., *BMC Microbiol.*, 13, 180-188 (2013) [2] M Nambu *et al*., *J Proteomics*, 125, 112-120 (2015) [3] Y Tatsukami *et al.,* submitted.

Plant-Microbe Interaction, Gibberellin, *Mesorhizobium loti*

発表責任者：立上陽平（tatsukami.youhei.88a@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3H031
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# マメ科モデル植物であるミヤコグサを用いた根粒菌との共生の初期過程の解析
# Analysis of the initial symbiotic processes with rhizobia using a model legume, *Lotus japonicus*

○菅沼 智淑[1]、鳥井 健次[1]、川口 正代司[5]、松岡 健[1,2,3,4] ([1]九大院生資環境、[2]九大院農、[3]九大生資セ、[4]九大オルガネラセ、[5]基生研)
○ Chiyo SUGANUMA[1], Kenji TORII[1], Masayoshi KAWAGUCHI[5], Ken MATSUOKA[1,2,3,4] ([1]Kyushu Univ. Grad. Sch. Biores. Bio-env. Sci., [2]Kyushu Univ. Fac. Agr, [3]Kyushu Univ. Biotron Appl. Ctr., [4]Kyushu Univ. Organelle. Ctr., [5]NIBB)

マメ科植物は、根粒と呼ばれる共生窒素固定菌である根粒菌を細胞内に持つ構造を形成し、根粒菌と栄養分を交換しあうことによって窒素欠乏下の土壌においても生育することができる。形態学的な解析から、根粒菌は感染糸と呼ばれる管状構造をマメ科植物の根毛中に形成しながら植物内へ進入することが知られている。しかし、マメ科植物と根粒菌の共生の成立初期過程において、感染糸が伸長する機構や、感染糸中での根粒菌の増殖、また、感染糸の伸長に伴う細胞膜や細胞内小器官の動態はほとんど解析されておらず、特にマメ科のモデル植物であるミヤコグサ（*Lotus japonicus*）については全く報告がされていない。

そこで我々は、①感染糸の伸長過程における根粒菌増殖の解析、②共生初期過程における根毛細胞の細胞膜と細胞内小器官の動態の解析の、二種の異なる視点からの解析を行うことにより、共生初期過程におけるマメ科植物と根粒菌の関係に関して解析を進めている。

まず、ミヤコグサ野生型系統 Gifu B-129 に、根粒菌 *Mesorhizobium loti TONO* に紫(外)光照射により不可逆的に緑色から赤色に蛍光特性が変化する色変換蛍光蛋白質 Kikme Green-Red と GFP を発現させたものを感染させ、形成される感染糸中での根粒菌の動態を、蛍光顕微鏡観察により進めた。その結果、感染糸の伸長の後期段階において、感染糸の先端側の部分で根粒菌が増殖していることが示唆された。

次に、根粒菌が感染する初期に発現が上昇する膜タンパク質を、かずさ DNA 研究所が報告したマイクロアレイデータから検索し、その中で細胞外とのコミュニケーションに関連する可能性のある Cobra-like GPI-anchored protein を解析対象に選び出した。このタンパク質と GFP の融合体の発現コンストラクトを作成し、ミヤコグサで発現させる前段階として 一般的な細胞内局在部位を確認するため、*Agrobacterium* 法を用いてタバコ BY-2 細胞中で発現させた。GFP 由来の蛍光を共焦点顕微鏡観察した結果、細胞膜やゴルジ体様の細胞内器官にこの融合体が存在することが示唆された。また、形質転換細胞から抽出した蛋白質を SDS-PAGE により分離し、蛍光を検出したところ、予想される融合タンパク質の大きさの蛍光性ポリペプチドが見出された。現在、この発現コンストラクトをミヤコグサに発現させることを進めており、その結果についても報告したい。

GPI-anchor, fluorescent conversion protein, plasma membrene

発表番号：3H032
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 日本のダイズリソースにおける Rj2 遺伝型の分布

# Distribution of Rj2 genotype in Japanese soybean resource

○菅原 雅之[1]、梅原 洋佐[2]、柿崎 芳里[1]、佐藤 修正[1]、加賀 秋人[2]、石本 政男[2]、南澤 究[1] ([1]東北大生命、[2]生物研)
○Masayuki SUGAWARA[1], Yosuke Umehara[2], Kaori Kakizaki[1], Shusei Sato[1], Akito Kaga[2], Masao Ishimoto[2], Kiwamu Minamisawa[1] ([1]Tohoku Univ., [2]NIAS)

マメ科植物ダイズは日本の食文化における主要作物であるが、その国内自給率の低さから安定多収の実現が求められている。安定多収の実現には、共生する*Bradyrhizobium*属根粒菌の窒素固定能力を最大限に活用することが１つの方法として期待されるが、そのためには双方間の相互作用機構や特異性および生態についての理解が重要である。栽培ダイズ*Glycine max* (L.) Merr.には、*Rj*と呼ばれる特定のダイズ根粒菌による根粒形成を制限する遺伝型が古くから知られている。その中で*Rj*2遺伝型を示すダイズ品種は、高い共生窒素固定効率を示す根粒菌*Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA122株による根粒形成を特異的に制限する。この*Rj*2共生不和合性の原因は、植物側のTIR-NBS-LRR型抵抗性Rタンパク質と、根粒菌側の３型分泌タンパク質との相互作用によることが明らかとされてきている。一方で、国内における*Rj*2表現型の分布といった面ではほとんど明らかとされておらず、また栽培ダイズの祖先でありダイズ育種の遺伝資源として貴重な野生ダイズ (*Glycine soja*) の*Rj*2遺伝型についてもこれまでに報告はない。そこで本研究では日本のダイズ遺伝資源を対象とし、*Rj*2遺伝型を決定するRタンパク質の多型解析と根粒菌接種試験から、*Rj*2遺伝型ダイズ品種の分布を調査した。

はじめに国内における*Rj*2遺伝型ダイズの分布を、農業生物資源ジーンバンクにより整備された日本ダイズミニコアコレクションを対象とし調査した。*Rj*2遺伝型ダイズは、原因遺伝子Glyma16g33780がコードするRタンパク質に共通して特異的なアミノ酸残基 (E452/I490) を有することから(Yang et al. 2010, PNAS, 107:18735-40)、本研究では当該遺伝子の塩基配列を決定し、推定されるアミノ酸配列の多型を比較した。その結果、全79品種中6品種 (地塚茨城1号、伊達茶豆、アオバコ、前津江在来90B、クラカケ、球磨地1号) のGlyma16g33780遺伝子がE452/I490を有するRタンパク質をコードすると推定され、USDA122株接種試験によりこれら品種を*Rj*2遺伝型ダイズと断定した。一方で、E452/R490アミノ酸残基を有するRタンパク質を生産するダイズ品種は、USDA122株と正常な根粒形成を示したため、*Rj*2遺伝子のR490Iのみがの共生表現型を左右するアミノ酸置換であることが示唆された。

次に、ジーンバンクが保存するダイズ1,586系統 (栽培ダイズ1,327系統、野生ダイズ259系統を含む) を対象に、*Rj*2遺伝子のI490をコードするSNPを調査した。その結果、5.4%の栽培ダイズからそのSNPが検出された。またこれらの品種に原産地や遺伝的な偏りは認められないことから、*Rj*2遺伝型は日本全国に広く分布していると考えられた。一方で、調査した7.7%の野生ダイズにおいても同様に*Rj*2遺伝型を示すSNPが検出されたが、*Rj*2型SNPを有する野生ダイズはUSDA122株による根粒形成を示し、栽培ダイズで観察される共生不和合性が認められなかった。

以上の結果から、*Rj*2遺伝型ダイズは日本国内に広く分布していること、および栽培ダイズの*Rj*2共生不和合性は野生ダイズからの栽培化の過程で獲得してきた形質であることが示唆された。

Soybean, Nodulation, R protein

発表責任者：菅原雅之（msugawara@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：3H033
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 植物生長促進細菌の単離と養液栽培における利用

# Isolation of plant growth-promoting bacteria and their application to hydroponic culture

○中岡 知規、宮澤 知愛、阿野 貴司、岡南 政宏（近畿大生物理工）
○Tomonori NAKAOKA, Chiaki MIYAZAWA, Takashi ANO, Masahiro OKANAMI (Kinki Univ)

【緒言】

植物生長促進細菌（plant growth-promoting bacteria: PGPB）と呼ばれる土壌細菌は、植物に対して直接的または間接的に植物の生長を促進する。PGPB は、植物ホルモン様物質の産生、リン、鉄、亜鉛の可溶化などを行っていると考えられる。また、一部の PGPB では植物生長促進（PGP）作用に加え、植物病原菌の増殖を抑制する作用も併せ持つことが知られている。このような PGPB を利用した微生物農薬は、化学農薬に代わって、植物の生長、植物病原菌への耐性や環境ストレスへの耐性のための安全な添加物として期待することができる。

【方法および結果】

PGPB を単離するため、ウキクサ（*Lemna aoukikusa*）と環境中から単離した細菌を 1/2×MS 液体培地上で共生させ、単離菌の PGP 作用を評価した。その結果、ウキクサの体積を増加、個体数を増加、あるいは、根の伸長を促進させることができる PGPB 候補株を多数得ることができた。また、環境中から鉄の可溶化能を指標としても PGPB 候補株を多数得ることができた。これらの PGPB 候補株についてグラム染色を行ったところ、グラム陽性および陰性を問わず、球菌や桿菌など様々な細菌が PGPB 候補株として単離されたことがわかった。単離された PGPB 候補株の中で、とくに強い PGP 作用を示した 3 つの株（CF1、CF2、CF3）は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定の結果、それぞれ *Burkholderia* sp.、*Achromobacter* sp.、*Psychrobacter* sp.であると推測された。一方、これらの 3 株に加え、いくつかの PGPB 候補株を用いて、レタス（ジェンティリナグリーン）の水耕栽培における PGP 効果を調べた。本大会では、それらの結果も報告する予定である。

plant growth-promoting bacteria, *Lemna aoukikusa*, hydroponic culuture

発表番号：3H034
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# *Pseudomonas fluorescens* によるシロイヌナズナの生長促進作用メカニズムの解析

Study on mechanisms for which *Arabidopsis thaliana* responds to a plant growth promotion signal of *Pseudomonas fluorescens*

○大浦 麻里[1]、中岡 知規[2]、田中 雄矢[2]、奥野 圭祐[2]、阿野 貴司[1,2]、岡南 政宏[1,2]([1]近畿大院生物理工、[2]近畿大生物理工)

○Mari OOURA[1], Tomonori NAKAOKA[2], Yuya TANAKA[2], Keisuke OKUNO[2], Takashi ANO[1,2], Masahiro OKANAMI[1,2] ([1]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kinki Univ., [2]Fac. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kinki Univ.)

【緒言】

植物生長促進細菌（PGPB）は、植物の生長を直接的または間接的に促進する環境細菌である。土壌中の鉄やリン、窒素の大部分は植物が利用できない形で存在している。PGPB は土壌中に存在する不溶性のリンや窒素を可溶化することで植物が利用できる形に変換することができる。また、植物ホルモン様物質を産生するものもいる。さらに、抗生物質を産生し、植物病原菌の増殖を抑制するものもいる。我々は、シデロフォア産生能、フィチン溶解能を指標にして土壌から *Pseudomonas fluorescens* A-2 株を単離してきた。*P. fluorescens* A-2 株は揮発性の物質を産生しており、その物質によりシロイヌナズナ芽生えの側根伸長や側根数、根毛、新鮮重量の増加を引き起こしていることが確認されている。また、*P. fluorescens* A-2 株は植物病原菌である *Fusarium oxysporum* と *Rhizoctonia solani* の増殖を抑制することも確認されている。

【方法および結果】

我々は、PGP 作用に関連する遺伝子の同定を目的として、エチルメタンスルホン酸(EMS)処理、または、T-DNA タギング法によってシロイヌナズナに変異を導入し、シロイヌナズナ芽生えの側根伸長を指標にしてスクリーニングを試みた。その結果、*P. fluorescens* A-2 株からの PGP シグナルを受けられなくなった変異体をいくつか単離することができた。現在、変異原因遺伝子の同定を試みているところである。一方、*P. fluorescens* A-2 株を亜硝酸処理し、変異体を作製した。スクリーニングの結果、PGP 作用を示さなくなった *P. fluorescens* A-2 変異体を単離することができた。得られた変異体に *P. fluorescens* A-2 株のゲノム DNA 断片をランダムに導入したところ、PGP 作用が復帰した形質転換体を単離することができた。現在、*P. fluorescens* A-2 株の PGP 作用に関わる遺伝子とその発現制御機構、また、その産物について解析しているところである。

plant growth promoting bacteria, *Pseudomonas fluorescens*, volatile compound

発表番号：3H035
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナにおける花粉色素体増殖の遺伝的制御解析
# Genetic control of plastid proliferation in *Arabidopsis* pollen

○佐々木 駿[1]、石川 浩樹[1]、鈴木 麻央[1]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[3]、藤原 誠[1,2] ([1]上智大理工、[2]理研、[3]琉球大理)
○ Shun SASAKI[1], Hiroki ISHIKAWA[1], Mao SUZUKI[1], Yusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOH[3], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN., [3]Univ. of the Ryukyus)

【目的】色素体はシアノバクテリアの祖先種が細胞内共生して発生したオルガネラで、植物組織や環境に応じて葉緑体、白色体など様々な形態に分化する。シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体（*accumulation and replication of chloroplasts*；*arc*）の解析などにより葉緑体はシアノバクテリア由来の FtsZ を中心とした分裂機構と後天的に獲得したダイナミン様タンパク質（ARC5）を中心とした分裂機構が協調することで均等 2 分裂することが明らかにされている。一方、葉緑体以外の色素体の増殖制御はあまり明らかされていない。昨年度、花粉栄養細胞中の色素体増殖の解析を行い、FtsZ2 が重要な因子であることを報告した。FtsZ2 は葉緑体分裂では ARC6、そのパラログ PARC6、ARC3 と相互作用している。さらに ARC3 は FtsZ1、PARC6 とも相互作用している。今回は葉緑体分裂における FtsZ2 制御遺伝子（*ARC6*、*PARC6*、*ARC3*）が花粉色素体増殖にも関与しているかを解析した。さらに後天的に獲得した分裂機構の遺伝子（*ARC5*）が花粉色素体増殖に関与しているかも解析した。
【方法】花粉栄養細胞で強い活性をもつ *ACTIN1* プロモーター下で花粉色素体を色素体移行配列融合型蛍光タンパク質 GFP で標識した。蛍光顕微鏡下で葉緑体分裂異常変異体の成熟花粉粒および花粉管における色素体表現型（数・大きさ）を観察し、野生型（WT）と比較した。
【結果】重度の葉緑体分裂阻害変異体である *arc6* では花粉色素体数が WT よりわずかに減少していたが葉緑体ほどの大きな表現型の変化はなかった。一方、葉緑体分裂位置異常変異体である *parc6* では花粉色素体の増殖が重度に阻害された表現型であった。このことから葉緑体では ARC6 が重要な分裂因子であるのに対し、花粉色素体では PARC6 の方が重要な増殖制御因子であることが示唆された。一方、*parc6* と同様に葉緑体分裂位置異常変異体である *arc3* では花粉色素体の表現型は WT と大きな違いがなかった。このことから ARC3 と PARC6 は花粉色素体では葉緑体と異なる機能を果たしていることが示唆された。さらに葉緑体分裂が終期で停止した変異体である *arc5* でも花粉色素体の表現型は WT と大きな表現型の違いがなかった。このことから花粉色素体では後天的に獲得した分裂制御機構の重要性は高くない可能性が示唆された。以上のことより花粉色素体の増殖制御機構は FtsZ2 が重要因子であるという共通点はあるが葉緑体の分裂制御機構とは大きく異なることが明らかになった。

*Arabidopsis thaliana*, plastid, pollen

発表責任者：藤原 誠（mtf1@mac.com）

発表番号：3H036
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ花粉体細胞分裂時における色素体の増殖

# Plastid multiplication during pollen mitosis of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

○石川 浩樹[1]、佐々木 駿[1]、平野 智也[2,3]、風間 裕介[2]、阿部 知子[2]、伊藤 竜一[4]、藤原 誠[1,2] ([1]上智大理工、[2]理研、[3]宮崎大農、[4]琉球大理)
○Hiroki ISHIKAWA[1], Shun SASAKI[1], Tomonari HIRANO[2,3], Yuusuke KAZAMA[2], Tomoko ABE[2], Ryuuichi ITOH[4], Makoto FUJIWARA[1,2] ([1]Sophia Univ., [2]RIKEN, [3]Univ. of Miyazaki, [4]Univ. of the Ryukyus)

【目的】植物の細胞内には植物固有のオルガネラである色素体が存在する。色素体の分裂増殖に関しては、葉緑体で研究が精力的に行われている一方、非光合成色素体については研究が進んでいない。本研究ではこれまで、非光合成色素体の一つとして花粉色素体に着目してきた。昨年度の大会では、花粉発生過程における色素体増殖に関して、以下の３点について報告した。(i)花粉発生初期では、花粉四分子にいたるまでに花粉色素体は分裂増殖をしている。(ii)減数分裂時の細胞質分裂においては、花粉色素体が４つの小胞子に均等に分配されているものが確認された一方、花粉四分子内の小胞子間において色素体数に大きな偏りがあるものも存在する。(iii)遊離した花粉小胞子から成熟花粉粒にいたる過程でも花粉色素体は分裂増殖を行う。
シロイヌナズナでは、花粉小胞子から成熟花粉粒にいたる過程において、花粉体細胞分裂と呼ばれる２回の分裂が、花粉管の発芽前に起こる。まず花粉体細胞分裂Ⅰで、花粉小胞子は栄養細胞と雄原細胞からなる二細胞性花粉粒になる。雄原細胞は更に花粉体細胞分裂Ⅱで２つの精細胞となり、花粉は三細胞性花粉粒となる。今回、より詳細な花粉色素体の分裂増殖過程を調べるため、花粉小胞子、二細胞性花粉粒、三細胞性花粉粒それぞれにおける花粉色素体数の測定を行った。
【方法】昨年度同様、花粉発生過程で強い活性を示す *ACTIN1* プロモーター制御下、色素体移行配列融合型 YFP を発現する形質転換シロイヌナズナ(Wassilewskija background)を使用した。蛍光顕微鏡下、青色光励起条件で花粉色素体を可視化し花粉色素体数を測定した。花粉小胞子、二細胞性花粉粒、三細胞性花粉粒の識別の際には、以下の２つの手法を用いた。(i) Smyth らによる花の発達段階 1)に基づく花粉発生過程の識別、(ii)核染色した細胞の直径と核数に基づく識別。なお核染色には、SYBR Green Ⅰ溶液を使用した。更に減数分裂時の細胞質分裂に伴う花粉色素体の分配に関して、サンプル数を増やしより詳細な解析を行った。
【結果】減数分裂時の花粉色素体の分配に関しては、色素体が均等に分配されているものと花粉四分子内の小胞子間に色素体数に偏りがあるものが見られ、昨年度の発表を支持する結果となった。花粉体細胞分裂期については、花粉小胞子から二細胞性花粉粒にかけての花粉体細胞分裂Ⅰ前後で色素体数の増加がより大きく見られ、二細胞性花粉粒から成熟花粉粒にかけての花粉体細胞分 II では色素体数に大きな変化は見られなかった。

1) D.R. Smyth et al., *The Plant Cell,* **2**, 755-767 (1990)

*Arabidopsis thaliana*, pollen, plastid

発表責任者：藤原誠（mtf1@mac.com）

発表番号：3H037
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アンチマイシン A 誘発シロイヌナズナ根色素体の形態変化

# Antimycin A induces morphological alterations of plastids in *Arabidopsis thaliana* roots

○三家本 梨央[1]、高橋 史[1]、笹川 展幸[1]、藤原 誠[1]、伊藤 竜一[2]([1]上智大理工、[2]琉球大理)
○Rio MIKAMOTO[1], Fumito TAKAHASHI[1], Nobuyuki SASAKAWA[1], Makoto FUJIWARA[1], Ryuuichi ITOH[2] ([1]Sophia Univ., [2]Univ. of the Ryukyus)

【背景】色素体は植物特異的な二層膜オルガネラで、その形やサイズは植物組織や環境に応じて大きく変化することが知られている。植物個体中の色素体は約 1 ㎛前後の原色素体を発生的起源としている。原色素体は葉肉組織では葉緑体、種子や根冠などではアミロプラスト、有色花弁や果実などでは有色体などへと分化する。色素体の分化や形態の分子レベルの制御は、シロイヌナズナを代表に解析が進められているが、未だ不明な部分が多い。近年私たちは、シロイヌナズナ実生の根皮層において、抗真菌性抗生物質アンチマイシン A が色素体の著しい伸長を誘導することを発見した(Itoh et al., 2010)。アンチマイシン A は一般にミトコンドリア電子伝達系に作用する呼吸阻害剤として知られ、植物では葉緑体の光化学系 I サイクリック電子伝達系に対する阻害活性も示す。
【方法】CaMV35S プロモーター制御下で色素体局在型 CFP とミトコンドリア局在型 YFP を同時に発現するシロイヌナズナ系統(Columbia background)を用いた。交配または形質転換により、両蛍光タンパク質を発現する 3 種の色素体分裂異常変異体 arc11、parc6、ΔftsZ も作出した。これらの種子を MS 寒天培地に播種し発芽誘導後、MS 液体培地で約 5 日間培養した。その後、実生全体を 50 μM のアンチマイシン A 溶液に 1 分間浸し、細胞レベルでの応答を蛍光顕微鏡で観察した。一方、動物細胞試料として生後 0 日の胎児マウスの表皮細胞を単離・培養し、培養約 1 週間後に MitoTracker Green 染色とアンチマイシン A 処理を行い蛍光顕微鏡で観察した。
【結果】主根の表皮の色素体は、皮層の色素体と同様の変化を示した。つまり、アンチマイシン A 処理前の色素体はどちらも球形のものが多かったが、処理後は細長く伸長した色素体の割合が増加した。さらに表皮では、新規の色素体異常表現型として数珠状に色素体ボディが連なったものが見出された。一方、ミトコンドリアは主根の表皮と皮層のいずれでも形態変化が見られなかった。さらに、胎児マウスの表皮細胞でも同様にアンチマイシン A 処理を行ったが、ここでもミトコンドリアの形態変化は検出されなかった。少なくとも今回の条件では、アンチマイシン A によるミトコンドリア形態への影響は、植物・動物どちらの表皮組織でも見出されなかった。
　現在は、解析対象をシロイヌナズナ色素体分裂異常変異体に拡張してアンチマイシン A の効果を検証中である。
文献)R.D. Itoh, H. Yamasaki, A. Septiana, S. Yoshida and M.T. Fujiwara: Physiol. Plant., 139, 144-158 (2010)

*Arabidopsis thaliana*, antimycin A, plastid

発表責任者：藤原 誠（mtf1@mac.com）

発表番号：3H038
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネジベレリン 2 酸化酵素は多量体構造形成によりジベレリン代謝を促進する
# Gibberellin metabolism is promoted by tetramerization of gibberellin 2-oxidase in rice.

○竹原 清日 [1]、三上 文三 [2]、樫尾 徹 [1]、松岡 信 [1]、上口（田中） 美弥子 [1] ([1]名大・生物機能セ、[2]京大院・農)
○ Sayaka TAKEHARA[1], Bunzo MIKAMI[2], Toru KASHIO[1], Makoto MATSUOKA[1], Miyako UEGUCHI(TANAKA)[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Kyoto Univ.)

【目的】植物ホルモンのひとつであるジベレリン (GA) は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox) および GA3-oxidase (GA3ox) が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox) が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。 我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA 不活化酵素である GA2ox3 の構造を明らかにした。 全体構造は、S−S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である $GA_4$ が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して 4 量体を形成していることが明らかとなった。 そこで本研究は、この多量体構造の形成と酵素活性との関係を明らかにすることを目的とした。 また、これら酵素の機能解析も行った。
【方法・結果】GA2ox3 の溶液中での分子状態を調べるため、多量体形成に必要と考えられる $GA_4$ 存在化でゲル濾過を行った。 その結果、溶液中でも 4 量体構造をとることが明らかとなり、4 量体および単量体の単離にも成功した。 そこで、得られた各分子の酵素活性を調べたところ、$GA_4$ を介した 4 量体は単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。 また、$GA_4$ の有無により可逆的に 4 量体を形成することも明らかになった。 さらに、植物細胞内における多量体形成能および細胞内での局在場所を調べるため、イネのプロトプラストを用いた BiFC 解析を行った。 その結果、*in vitro* と同様に *in planta* でも多量体構造をとっており、その多量体形成は細胞質で行われることも分かった。
以上の結果から、GA2ox3 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、$GA_4$ 濃度が上昇すると多量体構造を形成して活性を上げ、GA 代謝を促進するといった、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆された。
また、CRISPR システムによる GA2ox3 ノックアウト変異体の作出と表現型解析ならびにプロモーターGUS による発現解析により、GA2ox3 は節間伸長が起こる時期には分裂組織で分裂を制御し、その後は節で伸長を抑制している事が示唆されたので、合わせて報告する。

gibberellin biosynthesis, plant hormone, dioxygenase

発表番号：3H039
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネジベレリン 3 酸化酵素の機能解析および構造解析に関する研究

# Functional and structural analysis of gibberellin 3-oxidase in rice

○樫尾 徹、竹原 清日、松岡 信、上口（田中） 美弥子（名大・生物機能セ）
○Toru KASHIO, Sayaka TAKEHARA, Makoto MATSUOKA, Miyako UEGUCHI(TANAKA) (Nagoya Univ.)

【目的】ジベレリン（GA）は植物の伸長や発芽、生殖などを制御する、重要な植物ホルモンの一つである。 GA 生合成の最終段階の反応を行う GA3ox は、イネでは GA3ox1 と GA3ox2 の 2 種類が同定されている。 そこで、この両酵素の活性を調べたところ、どちらの場合も基質の $GA_9$ から本来の生成物である $GA_4$ が合成された他、$GA_7$ の合成も確認された。しかし、その合成量に違いが見られ、GA3ox1 では GA3ox2 に比べ $GA_7$ が合成される割合が極めて高かった。 $GA_7$ は $GA_4$ と同じ活性型ジベレリンの一種であるが、$GA_4$ とは異なり代謝酵素によって分解されないため、ジベレリンとしての活性が高いという特徴がある。 そこで本研究は、特殊な反応性を持つと考えられる GA3ox1 の植物における機能を調べることを目的とした。 また、反応性の違いを生じるアミノ酸を同定するため、構造的解析も行った。

【方法・結果】イネ植物体における OsGA3ox1 の発現を調べるため、プロモーターGUS による発現解析を行った。 その結果、GA3ox1 は出穂直後の葯でのみ発現していることが示唆された。 さらに、CRISPR システムによるノックアウト変異体の作出と表現型解析を行った。 作成した変異体に対し、花粉をヨウ素液で着色してデンプンの蓄積を観察したところ、ノックアウト変異体ではほとんどデンプンの蓄積した花粉は見られず、種子も得られなかった。 これらの結果から、OsGA3ox1 は成熟前の花粉で発現することでデンプンの蓄積を促進し、花粉の稔性に寄与している可能性が示唆された。

シダ類、イネを始めとする単子葉植物、双子葉植物など多くの植物種からの GA3ox のアライメントを行った結果、補酵素である 2-オキソグルタル酸との結合残基の一つは、チロシンでイネ GA3ox2 も含め非常に良く保存されていたが、イネの GA3ox1 においてのみフェニルアラニンに変わっていることが分かった。 そこでフェニルアラニンをチロシンに置換した GA3ox1 変異体 F230Y を作成し、酵素活性を測定したところ、$GA_7$ の合成量が大きく減少した。 この結果から、GA3ox に高度に保存されたチロシンが GA3ox1 ではフェニルアラニンとなっていることが、$GA_7$ を多量に生成するという GA3ox1 の反応特異性を生み出す一因ではないかと考えられた。

gibbrellin biosynthesis, plant hormone, dioxygenase

発表番号：3H040
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アセロラのアスコルビン酸生合成酵素 GDP-D-mannose pyrophosphorylase の転写調節因子の探索
# Exploring transcriptional regulators of the ascorbic acid biosynthesis enzyme, GDP-D-mannose pyrophosphorylase in acerola

○近藤 隆之、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Takayuki KONDO, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】

ビタミン C として知られるアスコルビン酸(AsA)は、強い還元力を有しており、細胞内で発生した活性酸素種を無毒化するなど、生物にとって必要不可欠な物質である。植物において AsA は D-fructose-6-P を初発物質とする Smirnoff-Wheeler 経路で主に生合成されると考えられている。熱帯植物アセロラは AsA を最も豊富に含む植物の一つとして知られているが、その AsA 高集積機構の詳細は未だ不明である。これまで当研究室では、アセロラの AsA 生合成において Smirnoff-Wheeler 経路に関わる GDP-D-mannose pyrophosphorylase (GMP)の発現調節機構について研究してきた。その結果、アセロラ GMP の開始コドンから上流域-1200~-600 bp に複数の転写活性化シス因子が存在し、さらに、上流域-1100~-1080 bp にも転写活性化シス因子が存在し、GMP 遺伝子の発現に必須であることが示唆された。本研究では、アセロラ GMP の転写調節機構の解明のため、アセロラ GMP プロモーターのトランス因子にも着目し、より詳細に解析した。

【方法・結果】

アセロラ GMP 遺伝子の上流域-1087~-1082 bp と-630~-624 bp にはそれぞれ Abscisic acid responsive element(ABRE)様配列と Dehydration responsive element(DRE)1 core 様配列が見られる。ABRE 配列と DRE1 core 配列にはそれぞれ ABRE binding factor(ABF)と Ethylene response factor(ERF)が結合することが知られている。そこで、アセロラ GMP の転写調節に ABF および ERF が転写因子として機能しているかどうかを明らかにするために、トランスアクチベーション解析を行った。トランスアクチベーション解析にはアセロラ GMP プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を結合したレポーターベクターと、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流にシロイヌナズナ ABF(AtABF)または ERF98(AtERF98)遺伝子を結合させた発現ベクター用いた。レポーターベクターと発現ベクターをシロイヌナズナのプロトプラストに同時に導入した後、ルシフェラーゼの発光強度を測定し、アセロラ GMP プロモーター活性を評価した。その結果、AtABF、AtERF98 ともに、単独で過剰発現させることによりアセロラ GMP プロモーターの活性が増加したことから、ABF および ERF はアセロラ GMP 遺伝子発現に転写レベルで関与している可能性が示された。現在、アセロラ自身の ABF および ERF を用いてトランスアクチベーション解析を行うために、アセロラ ABF および ERF の cDNA をクローニングすることを試みている。

ascorbic acid, Acerola, gene expression

発表番号：3H041
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# トマトのアルドケト還元酵素のアスコルビン酸生合成とストレス応答発現に関する機能解析

# Functional analysis of tomato Aldo-Keto Reductase on ascorbic acid biosynthesis and stress response

○末川 麻里奈、藤川 愉吉、江坂 宗春（広島大院生物圏）
○Marina SUEKAWA, Yukichi FUJIKAWA, Muneharu ESAKA (Hiroshima Univ.)

【目的】

アルドケト還元酵素(Aldo-Keto Reductase；AKR)は、動植物や微生物に幅広く存在し、ステロイドや糖など様々な物質の代謝に関わる酵素群である。植物では、AKR は種々のストレス耐性に寄与することが知られている。近年、イチゴ AKR の一つがガラクツロン酸還元酵素(Galacturonic Acid Reductase；GalUAR)として働き、ガラクツロン酸からアスコルビン酸を生合成することが明らかにされた。最近、トマト果実でも GalUAR 活性が認められ、ガラクツロン酸処理によるアスコルビン酸量の増加が報告された。そこで当研究室では、イチゴ GalUAR の一次構造と約 50%の相同性をもつトマト AKR1 に着目して研究している。これまでに、トマト AKR1 遺伝子はトマト果実で発現することや、種々のストレスによって発現が著しく増加することを確認している。さらに、トマト AKR1 の開始コドンから上流 1400 bp までのプロモーターに高い転写活性をもつシス因子が存在することも明らかにしている。本研究では、タバコ培養細胞と植物体を用いてトマト AKR1 の酵素活性を評価すると共に、AKR1 過剰発現によるアスコルビン酸量やストレスに対する影響について解析している。さらに、タバコ植物体を用いてトマト AKR1 プロモーターのストレス応答についても解析している。

【方法・結果】

トマト AKR1 の ORF 上流にカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターを結合した植物発現ベクターをタバコ培養細胞に導入した。得られた形質転換株から調製した抽出液を用いて、ガラクツロン酸、メチルグリオキサール、グリセルアルデヒドおよびグリオキサールを基質とした場合の AKR1 の酵素活性を測定した。その結果、コントロールの野生株から調製した抽出液と比較して、グリセルアルデヒドやグリオキサールに対して高い活性を示した。また、ガラクツロン酸やメチルグリオキサールに対しても活性が高い傾向を示した。次に、形質転換株のアスコルビン酸量を測定したところ、野生株と比較してアスコルビン酸量が高い傾向を示したものの、形質転換株間におけるアスコルビン酸量と AKR1 の発現量に有意な相関は認められなかった。現在、タバコ植物体を用いて、トマト AKR1 過剰発現によるアスコルビン酸量と種々のストレスに対する応答性について解析している。また、トマト AKR1 プロモーター-1400 bp の下流にレポーター遺伝子として β-グルクロニダーゼ遺伝子を結合させた植物発現ベクターを作製し、タバコ植物体に遺伝子導入した。現在、作出した遺伝子組換えタバコをストレス処理し、AKR1 プロモーターのストレス応答性を評価している。

aldo-keto reductase, tomato, ascorbic acid

発表番号：3H042
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イチジク由来 Rubber Elongation Factor のクローニングと大腸菌による発現

# Molecular Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Rubber Elongation Factor from *Ficus carica*

○横田 早希[1]、鈴木 友里奈[2]、北島 佐紀人[3]、大谷 典正[4]、後藤 猛[1]([1]秋田大院工資、[2]秋田大工資、[3]京都工繊大応用生物、[4]山形大理)
○Saki YOKOTA[1], Yurina SUZUKI[2], Sakihito KITAJIMA[3], Norimasa OHYA[4], Takeshi GOTOH[1]
([1]Grad. Sch. Akita Univ., [2]Akita Univ., [3]Kyoto Institute of Technology, [4]Yamagata Univ.)

【目的】

天然ゴムは主にパラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）の乳管細胞における乳液状の細胞質であるラテックスから生産され，合成ゴムでは達成できない優れた物性を持つ。我が国は天然ゴムの供給を 100%輸入に頼っており，その安定調達は大きな課題である。天然ゴムの生合成プロセスは明らかになっていないが，ラテックス中のゴム粒子には Rubber elongation factor（REF）と呼ばれるタンパク質が大量に存在し，その発現量はゴム収量と強く相関することからゴム生合成に重要な働きを持つと考えられている。さらに近年，組換え大腸菌によって得られたパラゴムノキ REF は *in vitro* においてアミロイド特性を示し，数マイクロメートルの凝集体を形成することが報告された。我々はこれまでに，パラゴムノキの代替資源候補として，日本で生育でき乳管細胞でゴムを生産するイチジクに着目して研究を行ってきた。本研究では，イチジク REF のクローニングと *in vitro* におけるその形態を明らかにすることを目的とする。

【方法と結果】

イチジクラテックスの RNA シーケンスデータよりパラゴムノキ *REF* と類似する配列を検索し，2 つの候補遺伝子配列（*REFL-1*,*2*）を得た。次に，新鮮なイチジクラテックスより全 RNA を抽出し，逆転写反応により合成した cDNA を鋳型に *REFL-1* および *REFL-2* のクローニングを行った。その結果，*REFL-1* の ORF は 762 bp，*REFL-2* の ORF は 732 bp であり，これらのコードするアミノ酸配列は互いに 52%の相同性を示した。 また，パラゴムノキ *REF* と *REFL-1* のアミノ酸配列は 48%，*REFL-2* は 43%の相同性を示した。

次に，得られた配列を PCR により増幅して pColdI（Takara）に挿入し，それぞれの候補タンパク質（REFL-1, 2）発現プラスミドを作製した。さらにこれを用いて大腸菌 BL21（DE3）を形質転換し，$OD_{600}$ が 0.7 になるまで培養した後, コールドショックおよび IPTG 添加による REFL-1 および REFL-2 の発現誘導をそれぞれ行った。その結果，それぞれの分子量に相当するタンパク質の大量発現が確認されたが, それらの多くは組換え大腸菌によるパラゴムノキ REF の発現と同様に不溶性画分に検出された。現在, この不溶性画分を尿素によって変性させ, N 末端に付加した His-tag による精製とリフォールディング，さらに形態観察を検討中である。

Rubber elongation factor, Natural rubber, *Ficus carica*

発表責任者：横田　早希（syokota@gipc.akita-u.ac.jp）

発表番号：3H043
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

スイレンのアルカン合成酵素 NyCER1 および NyCER3 の同定と炭素鎖長特異性の解析
Identification and characterization of alkane biosynthesis enzymes NyCER1 and NyCER3 in *Nymphaea sp.*

○小島 久恵[1]、山本 寛太[1]、鈴木 孝征[2,3]、早川 侑里[1]、徳弘 健郎[4]、片平 悟史[4]、東山 哲也[3,5,6]、榊原 均[1,7]、石黒 澄衛[1]([1]名大生命農、[2]中部大応用生物、[3]JST-ERATO、[4]豊田中研、[5]名大 ITbM、[6]名大理、[7]理研 CSRS)
○Hisae KOJIMA[1], Kanta YAMAMOTO[1], Takamasa SUZUKI[2,3], Yuri HAYAKAWA[1], Kenro TOKUHIRO[4], Satoshi KATAHIRA[4], Tetsuya HIGASHIYAMA[3,5,6], Hitoshi SAKAKIBARA[1,7], Sumie ISHIGURO[1] ([1]Bioagr. Nagoya Univ., [2]Chubu Univ., [3]JST-ERATO, [4]TOYOTA CRDL.,INC., [5]WPI-ITbM, [6]Science Nagoya Univ., [7]RIKEN CSRS)

石油の主成分であるアルカンはドロップイン燃料としても工業原料としても有用な化合物である。植物の茎や葉の表皮細胞や葯のタペート細胞は高いアルカン生合成能力をもち、体表面や花粉表面を保護するワックスとしてアルカンを分泌している。植物のアルカンは脂肪酸をアルデヒドに還元したのち脱カルボニル化するという二段階の反応で生合成され、シロイヌナズナでは CER3 および CER1 の二つの酵素がそれぞれの反応を触媒している。比較的少数の細胞で体表面の全てのワックスを生合成することから CER1 や CER3 は高い活性を持つ酵素であると推定され、有用な遺伝子資源であると期待される。ただし、シロイヌナズナが作るアルカンの炭素鎖長は 30（C30）前後であり、ドロップイン燃料としては長過ぎるうえ、多くの微生物は基質となる超長鎖の脂肪酸を作れないため、CER3 や CER1 を発酵生産に用いるのは無理がある。そこで、微生物が容易に合成でき、軽油と同程度の炭素鎖長である C20 前後の脂肪酸を基質にする CER1、CER3 ホモログを植物から探索することにした。

約 290 種の植物の花粉に含まれるアルカンを GC/MS で分析したところ、スイレンが比較的短いアルカンを合成していることが分かった。そこでスイレンの葯から抽出した mRNA を RNA シーケンス法で解析し、さらに RT-PCR によってスイレン *CER1*（*NyCER1*）およびスイレン *CER3*（*NyCER3*）の完全長 cDNA クローンを得た。これらの酵素のアルカン合成活性および合成されるアルカンの鎖長特異性を調べるため、シロイヌナズナの *cer1* 変異体および *cer1* ホモ *cer3* ヘテロ変異体にそれぞれ *NyCER1* と *NyCER3* のペアを遺伝子導入した形質転換体を作出し、茎表面のワックスに含まれるアルカンを GC/MS で分析した。その結果、炭素数 23～25 のアルカンが検出された。

シロイヌナズナでは脂肪酸伸長酵素が働いて C24～C36 の超長鎖脂肪酸が容易に合成されるため、アルカン合成酵素がそれより短い脂肪酸を利用しようとしても量が不足して利用できない可能性がある。そこで脂肪酸伸長酵素の変異体 *cer2* および *cer6* に *NyCER1* と *NyCER3* をペアで遺伝子導入した形質転換体を作出し、茎表面のワックス中により短いアルカンが含まれていないかどうかを調べた。その結果、*cer6* に導入した場合には C21～C25 のアルカンが、*cer2* に導入した場合には C23～C27 のアルカンが検出された。

本研究では非モデル植物から CER1、CER3 ホモログ遺伝子の完全長 cDNA クローンを取得する方法を確立し、さらに同定したスイレンの NyCER1、NyCER3 が軽油に相当する短い鎖長のアルカンを合成する活性を持つことを確認した。

biofuel, next generation sequencer, Arabidopsis thaliana

発表責任者：石黒澄衛（guronyan@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：3H044
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# エリシターペプチド PIP-1 のタバコ細胞による分解に関わる酵素の同定

# Identification of enzyme which degrades elicitor peptide PIP-1 in tobacco cells

○眞重 るり、宮下 正弘、宮川 恒（京大院農）
○RURI MASHIGE, MASAHIRO MIYASHITA, HIROSHI MIYAGAWA (Kyoto Univ.)

【背景と目的】植物は病原体の感染に対抗するための独自の防御システムを持っており、病原菌および植物由来の物質（エリシター）を認識して種々の防御応答を開始する。我々はこれまでに、エリシターペプチド PIP-1 (Tyr-Gly-Ile-His-Thr-His-$NH_2$) を合成ランダムライブラリより見いだしている。PIP-1 はタバコ細胞に対して様々な防御反応を誘導するが、分泌される酵素によって速やかに分解することがこれまでに分かっている。そこで本研究では、PIP-1 の分解に関わる酵素についての詳細を明らかにすることを目的として、各種クロマトグラフィーによる精製ならびに同定を行った。
【方法】タバコ細胞を液体窒素中で破砕し、25 mM Tris-HCl バッファーを加えて遠心した。得られた沈殿に 200 mM $CaCl_2$ を含む 25 mM Tris-HCl バッファーを加えて 45 分間攪拌した後、遠心して上清を得た。これを透析法により脱塩した後、陰イオン交換および疎水性相互作用カラムクロマトグラフィーによって分画した。それぞれの画分の活性は PIP-1 の分解を指標にして測定した。最終的に得られた活性画分を、ゼラチンを基質としたザイモグラフィーに供して分解酵素の分子サイズを推定した。さらにこの活性画分を二次元電気泳動に供し、現れたタンパク質スポットを切り出してトリプシン消化した後、その同定を質量分析計による MS/MS 測定ならびにデータベース検索によって行った。
【結果】まず、粗抽出液を用いて PIP-1 の分解に対する種々の阻害剤の効果を調べたところ、セリンプロテアーゼ阻害剤である AEBSF によってのみ阻害された。このことから、PIP-1 の分解酵素はセリンプロテアーゼであると推定された。続いて、活性画分を二次元電気泳動することによって得られたタンパク質スポットの同定を行った結果、この酵素は細胞外に存在するプロテアーゼの一種であるサブチラーゼ（SBT1.2B）であることが分かった。さらに、精製した酵素を用いて PIP-1 の分解活性を評価した結果、この酵素は 50℃まで活性を保持し、pH8~10 の領域で高い活性を示すことが分かった。また、種々のペプチドを用いてその基質特異性を調べたところ、極性アミノ酸が存在する領域で切断されやすい傾向が見られたものの、幅広い基質を認識することが示唆された。サブチラーゼの植物における役割は不明な点が多く、今後この酵素の機能を明らかにする上で PIP-1 は有用な基質となるものと考えられる。

protease, elicitor, tobacco

発表責任者：宮下正弘（miyamasa@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：3H045
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# クローバー複葉形成関連遺伝子の発現・機能解析

# Expression and function analysis of genes controlling compound leaf development in *Trifolium repens* L.

○大橋 ほなみ、瀬川 香、松田 修一、斎藤 靖史（岩大農・寒冷バイオ）
○Honami Ohashi, Kaori Segawa, Shuichi Matsuda, Yasushi Saitoh (Cryobiofrontier Research Center, Iwate Univ.)

［緒言］

４葉のクローバー（シロツメクサ）は、希少性のみならず、４枚の各小葉が愛情、健康、富、名声を意味することから、幸せの象徴とされている。このため、４葉煎餅、４葉ストラップ、４葉お守りとして商品化されているばかりでなく、レストランや結婚式場でも使用され、４葉を出荷する農家も存在する。よって、多くの４葉を産生するシロツメクサの開発は、これらの産業、ひいては、人類の幸福にとって有益である。クローバーの多葉発生は、環境要因や遺伝的要因による可能性が示唆されているだけで、具体的な遺伝子、機構は不明である。我々は、シロツメクサの複葉形成に関わると思われるいくつかのシロツメクサ複葉関連遺伝子のクローニングに成功している。そこで、これらの遺伝子のノックダウン形質転換体を作出し、これらの遺伝子がシロツメクサの複葉形成にどのような効果をもたらすかを明らかにすることにした。

［材料および方法］

シロツメクサ, *Trifolium repens* L. の種子を16℃で１晩吸水後、葉軸部から子葉を切り出し、標的mRNAに対する２本鎖RNAを発現させるプラスミドを含むアグロバクテリウムと3日間共存培養させた。子葉片を洗浄後、チジアズロンとハイグロマイシンを含む培地で６週間培養し、遺伝子が導入された多芽体を選抜した。インドール-3-酪酸を含む培地に移して発根処理後、土壌に移植して形質転換植物を得た。

［結果および考察］

マメ科のモデル植物であるタルウマゴヤシの*SLM1*（*Smooth Leaf Margin 1*）の変異株では、側生小葉数の増加、小葉の縁に存在する鋸歯の消失が報告されている。*SLM1*遺伝子と高い相同性を示すシロツメクサ*SLM1*に対するノックダウン解析を行ったところ、シロツメクサの小葉数に変化は見られなかったものの、本来卵型の小葉の形態が、笹の葉のような形状を示すようになった。また、小葉の縁に存在していた鋸歯が消失し、滑らかな縁を持つ小葉に変化した。　これらの結果から、シロツメクサの*SLM1*は小葉数に変化を与えないものの、小葉の形態形成に関わる機能を持っていることが明らかとなった。この実験系構築の過程で、遺伝子を導入せず、多芽体の培養期間を延長してから植物体を再生させたところ、葉の形状変異株２種類を取得することができた。これは、多芽体培養期になんらかの培養変異が起こったためであると考えられた。

Trifolium repens L., Smooth Leaf margin 1, compound leaf development

発表責任者：斎藤靖史（ysaitoh@iwate-u.ac.jp）

発表番号：3H046
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネ胚乳シンシチウム形成、細胞化の時期に発現する F-box 遺伝子の機能解析

# Expression and functional analyses of F-box proteins during transition between syncytial and cellularized endosperm in rice

○斎藤 靖史、杉山 輝樹、藤原 奈津美、松田 修一、水谷 征法、堤 賢一 (岩手大農寒冷バイオ)
○Yasushi SAITOH, Teruki Sugiyama, Natsumi Fujiwara, Shuichi Matsuda, Masanori Mizutani, Ken-ichi Tsutsumi (Iwate Univ.)

イネ胚乳形成初期において、胚乳核は細胞質分裂行わずに分裂を繰り返し、多核体（シンシチウム）を形成する。その後、開花後 3 日目に細胞化がおこり、細胞膜内側に並んだ細胞核間に一斉に細胞壁が形成され、単核の細胞になる。シンシチウム期から細胞化期への移行は、胚乳サイズの決定に重要であり、また、細胞周期、細胞質分裂制御の観点からも興味深いが、その分子機構は未だに不明の点が多い。我々は、この細胞化の時期に特異的に発現する F-box タンパク質である ESOFB2 を発見した。酵母ツーハイブリット法や BiFC 法を用いた相互作用解析の結果、ESOFB2 はイネ SKP 遺伝子群の OSK5、OSK9、OSK16 と核で相互作用することが明らかとなった。また、ドメイン解析の結果から、ESOFB2 の N 末端領域が OSK との相互作用に重要であることがわかった。これらのことから、ESOFB2 は SCF 複合体を形成してターゲット分子の分解を行い、細胞化期の制御を行っている可能性が考えられた。

SCF 複合体は、cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs)をユビキチン-26S プロテアソーム系を介して分解することで細胞周期を制御していることが広く知られている。そこで ESOFB2 もイネの CKI の分解に関与しているのではないかという仮説を立て、酵母ツーハイブリット法による相互作用解析を行った。その結果、*Orysa*;KRP1 から *Orysa*;KRP7 の 7 種類のイネ CKI の内、*Orysa*;KRP4 だけが ESOFB2 と相互作用することがわかった。次に、BiFC 法を用いて植物細胞内における相互作用を解析した結果、*Orysa*;KRP4 と ESOFB2 の結合が核内で行われていることがわかった。さらに、ドメイン解析の結果、ESOFB2 の C 末端領域に存在する DUF295 を含む領域が *Orysa*;KRP4 との結合に重要であることがわかった。以上の結果から、ESOFB2 は、細胞化の時期に *Orysa*;KRP4 の分解制御を行って細胞周期を制御することにより、イネ胚乳形成初期の細胞化制御に関わる機能を持つ可能性が考えられた。

cyncytium, CKI, cell cycle

発表責任者：斎藤靖史（ysaitoh@iwate-u.ac.jp）

発表番号：3H047
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

パスウェイエンジニアリングを用いたフリージア・エアリーパープル及びエアリーピーチの新規セスキテルペン合成酵素遺伝子の機能解析
Functional analysis of novel sesquiterpene synthase genes from *Freesia* × *hybrida* 'Ishikawa f1' and 'Ishikawa f6' through pathway engineering

○樋口 雄貴[1]、八反 順一郎[1]、大野 史菜[1]、伊藤 智子[2]、澁谷 ゆりか[2]、渡邉 ありさ[2]、石井 純[3]、近藤 昭彦[4]、三沢 典彦[1]（[1]石川県大・生資研、[2]日本女子大・家政、[3]神戸大・自科・研究環、[4]神戸大院・工・応化）
○YUKI HIGUCHI[1], JUN-ICHIRO HATTAN[1], FUMINA OHNO[1], TOMOKO ITO[2], YURIKA SHIBUYA[2], ARISA WATANABE[2], JUN ISHII[3], KONDO AKIHIKO[4], NORIHIKO MISAWA[1] ([1]Res. Inst. Bioresources Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ., [2]Dept. Food Nutritons, Japan Women's Univ., [3]Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ., [4]Dept. Chem. Sci. Eng., Kobe Univ.)

【目的】セスキテルペンは植物の芳香成分であるだけでなく、種々の健康に有用な生理機能を有している。本研究では、石川県が開発したフリージアの新品種であるエアリーパープル及びエアリーピーチから、そのようなセスキテルペンを合成する新規酵素遺伝子 *Tps* の取得を試みる。
【方法】大腸菌はメバロン酸経路を持たず、MEP 経路 (非メバロン酸経路) によってイソペンテニル 2 リン酸 (IPP) とジメチルアリル 2 リン酸 (DMAPP) を合成し、それに続く酵素によりセスキテルペン前駆体であるファルネシル 2 リン酸 (FPP) を合成できるが、生成量は僅かである。そこで、大腸菌に一連のメバロン酸経路遺伝子群、1 型 IPP イソメラーゼ遺伝子、及びアセト酢酸-CoA リガーゼ遺伝子を導入し、これに基質としてアセト酢酸リチウム (LAA) を加えて培養することで FPP の多量合成が可能である。フリージア （*Freesia* × *hybrida*）・ エアリーパープル ('Ishikawa f1') 及びエアリーピーチ ('Ishikawa f6') の花から既知テルペン合成酵素 (TPS; terpene synthase) とホモロジーのある *Tps* 様配列を単離し、上記組換え大腸菌に導入することでセスキテルペンの合成を試みる。次に、生成したセスキテルペンを GC-MS 分析して化合物予想 → 溶媒分画・各種クロマトグラフィーを用いて単離精製 → 各種 NMR スペクトル測定で解析することにより確実に産物同定、というプロセスを通して、TPS の機能解析を実施する。
【結果】全 RNA を抽出し、縮重 RT-PCR と RACE 法により、各々につき 1 つずつ *Tps* 全長配列を得た。次に全長配列増幅用プライマーを合成し、改めて PCR で全長を増幅し、アミノ酸配列がわずかに異なるクローンをエアリーパープルで 3 つ、エアリーピーチで 7 つ得た。各々につき代表的な遺伝子を選び、それぞれ、*Fh1Tps1*、*Fh6Tps1* と名付けた。これらの遺伝子を上記大腸菌に導入し、培養した。生成物の GC-MS 分析により、これらにセスキテルペンの生成が確認された。産物を溶媒分画及び逆相 HPLC 分取により精製し、GC-MS 及び NMR 分析により構造解析した結果、エアリーパープルでは α-selinene が、エアリーピーチでは α-copaene が主産物と同定された。したがって、*Fh1Tps1* と *Fh6Tps1* はそれぞれ、α-selinene synthase 及び α-copaene synthase 遺伝子であると同定された。また α-copaene の抗酸化活性（ラット脳脂質過酸化抑制作用）を測定したところ、$IC_{50}$ 36 μM と穏やかな抗酸化作用を有することを明らかとなった。

本研究は経産省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」の一部として実施された。

*Freesia*, fragrance, terpene synthase

発表責任者：三沢典彦（n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：3H048
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を用いた紅藻スサビノリ由来脂肪酸合成関連遺伝子の機能解析

# Identification of genes associated with fatty acid biosynthesis from red algae *Porphyra yezoensis* by expression in yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○渡部 智弘[1,2]、森田 嵩子[2]、長島 生[2]、菅野 陽平[3]、佐原 健彦[2]、扇谷 悟[2]、三上 浩司[4]、森田 直樹[1,2] ([1]北大院農・基礎環境微生物学、[2]産総研・生物プロセス、[3]道衛研、[4]北大院水産科学・育種生物学)

○Tomohiro WATANABE[1,2], Takako MORITA[2], Izuru NAGASHIMA[2], Yohei SUGANO[3], Takehiko SAHARA[2], Satoru OHGIYA[2], Koji MIKAMI[4], Naoki MORITA[1,2] ([1]Grad. Sch. Agr., Hokkaido Univ., [2]BPRI, AIST, [3]Hokkaido Inst. Pub. Health, [4]Fac. Fish. Sci., Hokkaido Univ.)

【緒言】ドコサヘキサエン酸（DHA）やエイコサペンタエン酸（EPA）は、様々な生理活性を示すことから機能性脂質と呼ばれている。現在これら脂肪酸の主な供給源は魚油である。一方、微生物による機能性脂質の生産は、資源量や品質の変動に影響されることなく安定な生産が期待できる。本研究では、微生物で機能性脂質生産を行うための基盤技術の開発と紅藻スサビノリ(*Porphyra yezoensis*)由来の脂肪酸合成関連遺伝子の解析を行うことを目的に、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を宿主として、紅藻スサビノリ由来の脂肪酸合成関連遺伝子を発現させ、脂肪酸組成の変動を調べることで各遺伝子の機能解析を行った。

【方法】紅藻スサビノリ由来Δ9、Δ6、Δ12、ω3 各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子ホモログ（*PyΔ9*、*PyΔ6*、*PyΔ12*、*Pyω3*）を、自己切断ペプチドをコードした TaV 配列を介して複数連結した多重遺伝子発現プラスミド（pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ12、pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12、pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12-TaV-Pyω3）を作成した。各発現プラスミドでΔ9 脂肪酸不飽和化酵素（OLE1）遺伝子欠失変異株 ole1Δ株を形質転換し、得られた形質転換体の脂肪酸組成を GC あるいは GC/MS で分析した。また、形質転換体から得られた脂肪酸をピロリジル誘導体化し、GC/MS 分析を行うことで各不飽和脂肪酸の二重結合の位置決定を行った。

【結果及び考察】pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ12 を導入した形質転換体では、全脂肪酸の 25%がジエン酸であった。一方，pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12 を導入した形質転換体からはジエン酸とトリエン酸が各々17%、3%検出され、トリエン酸まで得られたものの、トリエン酸の収率はジエン酸と比べると著しく低い結果となった。得られた脂肪酸をピロリジル誘導体化し，GC/MS 分析を行ったところ、pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ12 を導入した形質転換体から得られたジエン酸はリノール酸 18:2(9,12)であること、pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12 を導入した形質転換体から得られたトリエン酸はγ-リノレン酸 18:3(6,9,12)であることがそれぞれ明らかになった。よって、pLTex/PyΔ9-TaV-PyΔ6-TaV-PyΔ12 で用いた紅藻スサビノリ由来遺伝子ホモログ *PyΔ9*、*PyΔ6*、*PyΔ12* は、それぞれΔ9、Δ6、Δ12 各脂肪酸不飽和化酵素遺伝子であることが判明した。*Pyω3* の機能解析については現在精査中である。

fatty acid desaturase, red algae *Porphyra yezoensis*, *Saccharomyces cerevisiae*

発表番号：3H049
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ヒメツリガネゴケに存在する二つのアスコルビン酸生合成経路の機能検証

# Functional evaluation of two ascorbate biosynthesis pathways in the moss *Physcomitrella patens*

袖山 翼、丸田 隆典、澤 嘉弘、○石川 孝博（島根大生物資源）
Tsubasa Sodeyama, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, ○Takahiro Ishikawa (Shimane Univ.)

維管束植物のアスコルビン酸生合成は、D-マンノース(D-Man)と L-ガラクトース(L-Gal)を代謝中間体とする D-Man/L-Gal 経路が主要経路として機能している。一方、蘚類のヒメツリガネゴケのゲノム上には D-Man/L-Gal 経路構成酵素遺伝子以外に、微細藻類ユーグレナで同定されたガラクツロン酸経路構成酵素のアルドノラクトナーゼ(ALase)の相同遺伝子も存在することから、二つの生合成経路が機能している可能性が示唆されているが、両経路のアスコルビン酸合成との機能的な関連については証明されていない。そこで本研究では、各径路の鍵遺伝子となる *VTC2*, *VTC3* および *ALase* の各遺伝子の破壊株を作製し、機能評価を行うことにした。２つ存在する *ALase* 遺伝子(ALase-1, -2)の組換え体酵素を作製しラクトナーゼ活性を評価した結果、基質の L-ガラクトン酸に対して ALase-1 は ALase-2 よりも約 40 倍高い触媒効率を示した。相同組み換えにより *VTC2*, *VTC3* および *ALase* の各遺伝子の破壊株を取得した。３つ存在する VTC2 パラログのうち mRNA 発現レベルの高い *VTC2-1* と *VTC2-2* の破壊株では、野生株に比較して総アスコルビン酸量がそれぞれ 40%および 27%に減少していた。一方、ALase-1 破壊株のアスコルビン酸量は、野生株と有意な違いは観察されなかった。また最近シロイヌナズナで報告されたアスコルビン酸欠乏変異体の原因遺伝子 *VTC3* のオルソログ破壊株では、野生株に較べアスコルビン酸レベルが約 56%に低下した上、アスコルビン酸の光応答性も消失していた。以上の結果から、ヒメツリガネゴケのアスコルビン酸生合成経路は維管束植物同様、D-Man/L-Gal 経路が主要経路として機能しており、ALase を含めたガラクツロン酸経路の役割は副次的であることが強く示唆された。

Ascorbic acid, Biosyntheis, Physcomitrella patens

発表番号：3H050
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Metallothionein 遺伝子を導入した *Mentha aquatica* 形質転換体の作出と解析

# Construction and analysis of transgenic plant of *Mentha aquatica* introduced metallothionein gene

○田渕 晃、小野里 真志、栗田 将平、柴田 涼太 (信州大農)
○Akira Tabuchi, Shinji Onozato, Shouhei Kurita, Ryouta Shibata (Shinshu Univ.)

私達の研究室では，これまで，種々シソ科ハッカ属の植物を用いて，再生系ならびに形質転換系の確立を行ってきた．また，作出された形質転換植物体については，その精油成分の分析，金属耐性および金属蓄積性の解析を行ってきた．

本研究では，*Agrobacterium rhizogenes* を用いて，metallothionein（MT）遺伝子をウォーターミント *Mentha aquatica* に導入し，ファイトレメディエーションに有用な形質転換植物体の作出と解析を試みた。

【方法】

先ず，plasmid pBI121 の *GUS* 遺伝子を MT の 4 量体（*mt14s*）遺伝子に置換した plasmid をもつ *A. rhizogenes* を用いて，毛状根誘導を試みたのち，誘導された毛状根については，Gamborg B5 培地上，26℃で，除菌，カルス化および再生体の誘導を試みた．

一方，既に当研究室で作出されている MT 遺伝子導入形質転換植物体を用いて，銅の吸収および蓄積能の解析を行った．銅濃度を 0 ～ 50 mg/mL 含む Gamborg B5 固体培地に，植物体を移植後，26℃，16 時間明期で，4 週間培養を行った．さらに，MT 遺伝子導入毛状根を用いた実験においては，銅濃度 300 mg/mL を含む Gamborg B5 液体培地に毛状根を移植した後，26℃，9 時間の震盪培養を行った．次に，これら実験に供した植物体および毛状根の灰化処理を行った後，6 mol/L 塩酸を用いて銅を抽出した．得られた銅試料液については，原子吸光分析を行い，銅濃度等の測定を行った．

【結果】

先ず，*A. rhizogenes* を用いて，毛状根の誘導を試みた結果，*mt14s* 遺伝子が導入された毛状根を得ることができた．得られた形質転換体を用いて，PCR を行った結果，*mt1s4* に相当する増幅フラグメントが認められた．

また，MT 遺伝子を導入した形質転換植物体をもちいた銅耐性試験の結果，野生株よりは高い銅蓄積能が認められたものの，MT 遺伝子を導入した形質転換植物体とほぼ同様の結果を，*rol* 遺伝子導入形質転換体においても観察された．

毛状根については，MT 遺伝子導入形質転換体を用いて，銅吸収試験を行った結果，MT 遺伝子導入が導入された毛状根では，野生株と比較して，有意な差において銅蓄積能の向上が観察された。

Mentha aquatica, transgenic plant, phytoremediation

発表責任者：田渕　晃（tabuchi@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：3H051
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

植物のフルクタン合成酵素（６-SFT）遺伝子を利用した直鎖β(２,６)レバンの生産
Production of linear β(2,6) fructosyl-linked levan using plant sucrose:fructan 6-fructosyltransferase genes
○吉田 みどり、松平 洋明、田村 健一（農研機構・北海道農業研究センター）
○Midori YOSHIDA, Hiroaki MATSUHIRA, Ken-ichi TAMURA (NARO-HARC)

【目的】機能性糖であるフルクタンの一種のレバンはプレバイオティクス以外にも、その保水性や粘性の利用も注目されている。商品化されているレバンは主に微生物酵素による産物でありβ(2,6)結合フルクトース主鎖にβ(2,1)側鎖を持ち重合度(DP)が 100 から数千以上に達する長鎖を特徴とする。一方、植物に蓄積されるレバンは短くその機能も未知である。本研究はイネ科牧草チモシーの6−SFT 遺伝子を用いて植物型レバンを生産し、その特徴を解析する。【方法と結果】チモシーの6-SFT 遺伝子、*PpFT1*及び*PpFT2*をテンサイに導入し形質転換体を作出した。PpFT1 と PpFT２はテンサイ根部でフルクタンを高濃度で生産した。HPAEC-PAD 分析(Dionex)により PpFT1 と PpFT2の合成するフルクタンは直鎖β(2,6)レバンの傾向が強く、特に PpFT2はほぼ側鎖の無いβ(2,6)結合フルクトオリゴ糖からおよそ DP40までのレバンを生産することが明らかになった。一方 PpFT1 は重合度の高いレバンを合成する能力があり、テンサイ塊茎においてDP10 からDP40を超える直鎖β(2,6)レバンを生産した。

fructan, beet, timothy

発表責任者：吉田みどり（midori@affrc.go.jp）

発表番号：3H052
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# リゾビウム属細菌の Ti/Ri プラスミドの交換と形質転換特性に与える影響

# Construction of Ti/Ri plasmids-exchanged *Rhizobium* strains to detect synergy effects between the plasmids and chromosomal backgrounds

○坂井 綾子、山本 真司、鈴木 克周 (広島大理)
○Ayako SAKAI, Shinji YAMAMOTO, Katsunori SUZUKI (Hiroshima Univ.)

Ti/Ri プラスミドを持つ *Rhizobium* (syn. *Agrobacterium*)属の細菌は、植物に感染して自身が持つ T-DNA 領域を植物の染色体 DNA に導入するという能力を有する。T-DNA 上の遺伝子が発現することによって、根頭癌腫病あるいは毛状根病といった植物の病気が引き起こされる。病原菌株として単離されている菌株の大部分は、*A. tumefaciens* (*R. radiobacter*)、*A.*(*R.*) *rhizogenes*、*A.*(*R.*) *vitis* の計 3 種である。*Rhizobium* 属細菌は植物の病気を引き起こすという負の側面も持つ一方、大きな DNA 断片を効率よく安定して導入できることから、植物への遺伝子導入ツールとして広く応用されている。しかし同細菌を用いても形質転換困難な植物種・品種も数多く存在する。感染できる植物の種類や形質転換効率などの病原性は、菌株が持つ Ti/Ri プラスミドとゲノムバックグラウンド、そしてその組み合わせによって大きく異なることがわかっている。

本研究では、病原性に大きな影響を与える因子の特定と、それを利用した有用高形質転換菌株の作製を目的として、異なる *Rhizobium* 菌株間で Ti/Ri プラスミドを交換したハイブリッド菌株を作製し、それらの病原性を比較した。多数のハイブリッド菌株を作製するには、まず効率よく Ti/Ri プラスミドを移行させる必要がある。そこで RP4 の接合起点(*oriT*)および Ti/Ri プラスミドと相同な配列を持つ小型のプラスミド(小型可動化プラスミド)を作製し、相同組み換えによって Ti/Ri プラスミドと融合させた。こうして Ti/Ri プラスミドに *oriT* を持たせて可動化し、Ti/Ri プラスミドを除去した他の菌株に移行させた(方法の開発は平成 24 年度本会大会で報告済み)。この方法を使って、*A. tumefaciens*、*A. rhizogenes*、*A. vitis*、*R. etli* の 4 種 6 菌株に 9 種類の Ti/Ri プラスミドを導入し、49 株のハイブリッド菌株を作製した。ハイブリッド菌株作成の材料とした野生株と Ti/Ri プラスミド除去株も含めた合計 61 株について、アセトシリンゴンによる病原(*vir*)遺伝子誘導能を比較・評価した。その結果、野生株よりも明らかに高い *vir* 遺伝子誘導能を持つものが多数見出された。さらに特に高い値を示した菌株に関して、イネの培養細胞 Oc 細胞と共存培養させた。このときの *vir* 遺伝子の発現の強さを調べたところ、非常に高い *vir* 遺伝子発現が見られる菌株が存在した。この菌株はイネの形質転換への応用が期待できると考えられる。現在プラスミドの加工過程で変異が確認された一部のハイブリッド菌株を再作製し、その病原性について比較検討中である。

*Agrobacterium*, Ti plasmid, transformation

発表番号：3H053
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ラン藻 FBP/SBPase 導入によるサツマイモバイオマスへの影響

# The effect of introduction of cyanobacterial FBP/SBPase on biomass productivity in sweet potato.

○田部 記章[1,3]、大鳥 久美[1,3]、田茂井 政宏[1,3]、横田 明穂[2,3]、重岡 成[1,3] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]奈良先端大・先端科技推進セ、[3]JST, CREST)
○ Noriaki TANABE[1,3], Kumi OTORI[1,3], Masahiro TAMOI[1,3], Akiho YOKOTA[2,3], Shigeru SHIGEOKA[1,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Front. Sci. Tech. Promo. Ctr.,NAIST, [3]JST, CREST)

【目的】イモ類は、単位耕作面積当たりの収穫量およびハーベストインデックスが栽培植物の中でほぼ最大である。そのため、イモ類の収量増大は二酸化炭素資源化に大いに有効である。これまでに我々は、カルビンサイクルの律速酵素と考えられる fructose- 1,6-bisphosphatase (FBPase) と sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) の両反応を触媒するラン藻由来の FBP/SBPase をタバコやレタスの葉緑体で発現させることにより光合成機能（ソース機能）を増強し、収量を増大させることに成功している。本研究ではサツマイモ（*Ipomoea batatas* 高系 14 号）を対象に、FBP/SBPase の導入による光合成能およびバイオマス生産性への影響を検討した。

【方法・結果】FBP/SBPase をサツマイモ光合成器官特異的に発現させるために、これまでにサツマイモゲノムより 2 つの *RbcS* 遺伝子(*IbRbcS1* および *IbRbcS2*)を単離し、そのうち *IbRbcS1* 遺伝子が緑葉組織特異的に発現することを明らかにした。そこで、*IbRbcS1* 遺伝子の 5’UTR を含むプロモーター領域を同定し、シロイヌナズナを用いた GUS レポーター発現解析を行った。その結果、形質転換シロイヌナズナにおける GUS 染色は緑葉組織特異的に認められ、さらに *GUS* 遺伝子の発現は光依存的であった(Tanabe et al., *Gene* 2015)。

次に、*IbRbcS1* プロモーター下流に *IbRbcS1* 葉緑体トランジットペプチドと *FBP/SBPase* を融合した遺伝子をサツマイモ胚性カルスにアグロバクテリウム法により導入した。抗 FBP/SBPase 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、再生した形質転換サツマイモにおいて、FBP/SBPase は葉緑体トランジットペプチドを除く分子量のタンパク質として発現していることを確認した。そこで水耕栽培した形質転換サツマイモから 3 節を含む苗を作出し、土に定植させた。定植 1 ヶ月後形質転換サツマイモでは非組換え体と比較して FBPase 活性および光合成活性が有意に増加していた。さらに、定植 3 ヶ月後における形質転換サツマイモの地上部の乾燥重量は非組換え体と比較して有意に増加していた。また、形質転換サツマイモでは、節から形成される塊根の数および乾燥重量も増加しており、FBP/SBPase の導入はサツマイモバイオマスを増加させることを示した。現在、さらに塊根を成長させるための栽培条件を詳細に検討している。

sweet potato, plant productivity, photosynthesis

発表責任者：田部記章（nb_noritanabe@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：3H054
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# R4 Gateway リサイクリングクローニングシステムによる種々のプロモーターを用いた植物での複数遺伝子発現

# Multigene Expression in Plants under the Control of Different Promoter by R4 Gateway Recycling Clonig System

○税所 利基[1]、芝原 健太[1]、木村 哲哉[2]、中川 強[1]([1]島根大・総科センター・遺伝子、[2]三重大院・生物資源)
○ Toshiki Saisho[1], Kenta Shibahara[1], Tetsuya Kimura[2], Tsuyoshi Nakagawa[1] ([1]Int.Cen.Res.,Shimane Univ, [2]Grad.Schl.Biores.Mie Univ)

近年，タンパク質複合体の細胞内機能や局在の解析などを目的として複数遺伝子を簡便に植物に導入し，かつ安定に発現させることができる植物形質転換システムが必要となっている。そこで本研究室では、Gateway テクノロジーを用いた植物用複数遺伝子形質転換システムの開発を進めている。このシステムでは、Gateway テクノロジーによる部位特異的組み換え反応を繰り返すことで簡便に複数の遺伝子を持つ発現ベクターを作製することができる。これまでに， NOS プロモーターを用い，さらに核マトリックス付着領域 MD8 を全ての NOS プロモーターの上流に組み込むことで複数遺伝子の発現が安定化することが BY-2，トマト、シロイヌナズにおいて示されている。そして、同 Gateway リサイクリングクローニングシステムを用いて、NOS プロモーターにドライブされた遺伝子を 5 つ持つコンストラクトを作製し、BY-2 やトマト、シロイヌナズナにおいて全ての遺伝子を同時に発現させることに成功している。今回報告する R4 Gateway リサイクリングクローニングシステムでは、それぞれの遺伝子の発現に任意のプロモーターを用いて複数遺伝子コンストラクトを作製することができる。この R4 Gateway リサイクリングクローニングシステムを用いて、シロイヌナズナ由来の L15 プロモーター（RubisCo activate プロモーター）を用いた複数遺伝子コンストラクトや、3 つの特異的プロモーター（孔辺細胞の発達過程における発現時期が異なる 3 つのプロモーター）を組み合わせたコンストラクトを作製してシロイヌナズナに導入し、発現解析を行ったので、その結果を報告する。

plant, transformation, multigene cloning

発表責任者：中川強（tnakagaw@life.shimane-u.ac.jp）

発表番号：3I001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

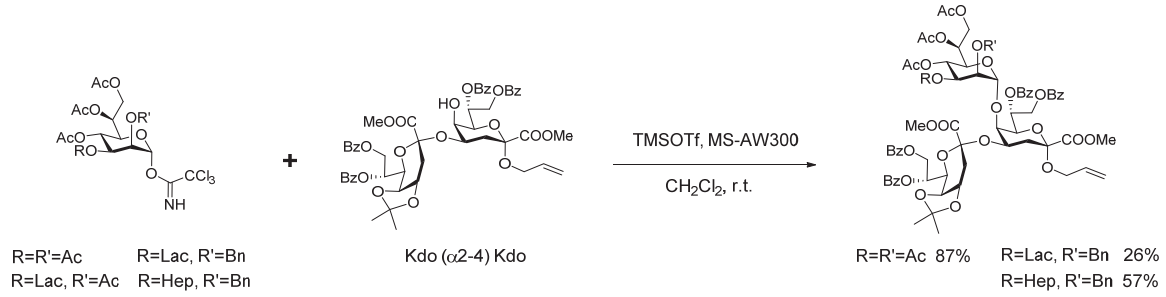
# リポオリゴ糖の酸性分岐内部コア 4 糖および 5 糖の合成

# Synthesis of branched inner-core oligosaccharides of lipooligosaccharide

○成本 裕文、蟻 瑞欽、野添 未来、一柳 剛 (鳥取大農)
○HIROFUMI NARIMOTO, RUIQIN YI, MIKU NOZOE, TSUYOSHI ICHIYANAGI (Tottori Univ.)

**【背景・目的】**リポオリゴ糖(LOS)は粘膜性グラム陰性細菌が細胞外膜に産生する複合糖脂質である。LOS のオリゴ糖鎖内には細菌の属によって構造が保存されたコア糖鎖領域が存在し、その内部コア糖鎖は高炭素糖である 3-デオキシ-D-マンノオクツロン酸(Kdo)、および L-グリセロ-D-マンノヘプトース(Hep)を中心に構成されている。その中でも 4,5 位で分岐した Kdo 残基は多くの LOS の内部コアで保存されている。我々は 4,5-分岐 Kdo を含む糖鎖合成を行っており、これまでに 2-4 結合を有する Kdo2 糖誘導体の 5 位水酸基へ単糖供与体を導入する経路での合成を達成してきた［1]。本研究ではこの経路での合成の限界を探るため糖供与体に 2 糖および 3 糖供与体のオリゴ糖供与体を用い、ブロック縮合による 4 糖および 5 糖の合成を試みた。

**【方法と結果】**還元末端にヘプトースを有する 3 種類のオリゴ糖供与体を用いて Kdo5 位水酸基へのグリコシル化反応を行った。その結果、還元末端ヘプトースの 2 位水酸基にエステル系保護基を有するオリゴ糖供与体では目的糖鎖を得ることが出来なかった。そこで水酸基保護基をベンジル系保護基へと変更したところ、この問題を解決することが出来た［2]。これによりブロック合成においても本経路での分岐コア糖鎖合成が可能であることが明らかにし、またナイセリア属 LOS の分岐構造を有する酸性内部コア 4 糖および 5 糖の合成を達成した。




［1］Yi, R.; Ogaki, A.; Fukunaga, M.; Nakajima, H.; Ichiyanagi, T., *Tetrahedron*, **2014**, 70,3675-3682
［2］ Yi, R.; Narimoto H.; Nozoe M.; Ichiyanagi, T., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **2015**, 79, 1931-1945

lipooligosaccharide, Kdo, Hep

発表責任者：一柳剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：3I002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# リポ多糖の酸性内部コア Kdo2 糖の合成研究ーKdo 供与体の配座と反応性の比較ー

# Synthetic study of inner-core disaccharide of LPS

○一柳 剛、田坂 瑞葵、村岡 南美、田中 琢也（鳥取大農）
○Tsuyoshi Ichiyanagi, Mizuki Tasaka, Nami Muraoka, Takuya Tanaka (Tottori Univ.)

【目的】

グラム陰性細菌は細胞外膜に複合糖脂質リポ多糖(LPS)を産生する. LPS は O 抗原多糖, オリゴ糖鎖(OS), Lipid A から成る. OS 内には構造変異が少ないコア糖鎖領域が存在し, 酸性糖 3-deoxy-D-*manno*-oct-2-ulosonic acid (Kdo)はこの構成糖として OS と Lipid A との架橋部に 1～3 分子の形で存在する. 我々は Kdo を含むコア糖鎖合成を研究しており, これまでに Kdo 鍵中間体の合成, 2-4 および 2-8 結合を有する Kdo2 糖および分岐糖鎖の合成を達成してきた[1]. しかし Kdo２糖合成におけるグリコシル化では, 立体選択性が中程度であること, グリカールの副生する問題であった. これは舟型糖供与体から発生するオキソカルベニウムイオン中間体の立体構造がグリカールに近いことが起因として考えられた. そこで本研究ではいす型配座を持つ糖供与体を設計し, Kdo2 糖合成を行い立体選択性の改善と副反応の抑制を試みた.

【方法と結果】

D-マンノースから Kdo 鍵中間体を合成した. この化合物のアノマー水酸基をパラジウム触媒と炭酸アリルエチルによりアリル化したのち 90%トリフルオロ酢酸水溶液で酸加水分解した 4, 5-ジオール体を糖受容体とした. 続いて t-ブチルシリルトリフラートにより 4,5 位を保護したのち水素付加したイリジウムでアノマー位のアリル基の異性化を行った.

そしてヨウ素を用いた加水分解を行い, 三フッ化ジメチルアミノ硫黄によりアノマー位の水酸基をフッ素に変換し糖供与体とした. 新たに合成した糖供与体の配座はアノマー位をアリル基で保護した化合物の 3, 4 位のプロトンのカップリングによりいす型配座であると判断した. 糖供与体と糖受容体の混合物のジクロロメタン溶液に低温条件下でトリエチルアミンと三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体を加え反応させたところ, α2-4 結合の Kdo2 糖を得た. 今回はそのグリコシル化反応の詳細および反応条件の検討, また脱保護体の合成の結果の報告を行う.

[1] Ichiyanagi, T. *et. al. Tetrahedron*, **2011**, *67*, 5964-5971, Yi, R. *et. al. Tetrahedron*, **2014**, *70*, 3675-3682, Yi, R. *et. al. Biosci. Biotechnol. Biochem.,* **2015**, *79*, 1931-1945.

lipopolisaccharide, Kdo, synthesis

発表責任者：一柳　剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

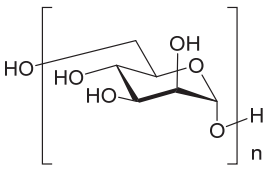
発表番号：3I003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 酵母細胞表層糖鎖の合成研究

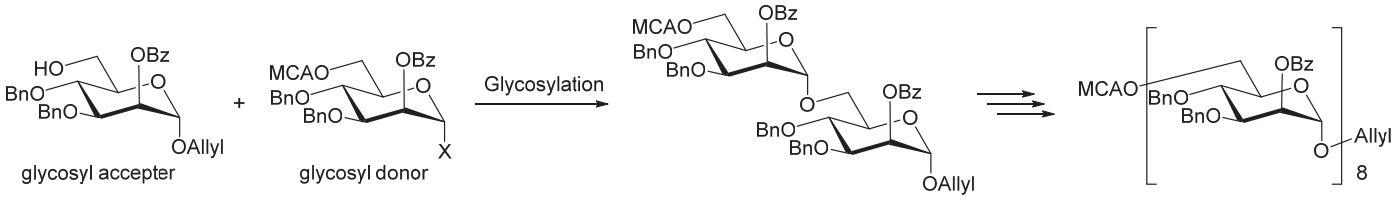
# Synthesis of yeast cell surface glycans

○吉田 英恵[1]、秋田 真[2]、勝田 亮[2]、矢島 新[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○Hanae YISHIDA[1], Makoto AKITA[2], Ryo KATSUTA[2], Arata YAJIMA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate School of Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture)

【背景・目的】酵母特有の細胞壁構成成分であり、細胞壁の最外層に位置しているマンナンは α(1→6)結合の主鎖から、α(1→2)結合、α(1→3)結合の側鎖が分岐し、タンパク質と結合した構造である[1)]。このような複雑に絡み合った構造であるがゆえに、その単離、精製は困難であり、構造および物理化学的性質は未だ解明されていない部分が多い。従って純粋かつ構造が明確な糖鎖の有機化学的合成により構造および物理化学的性質を解明する手法がとられている。本研究においてはマンナンの主鎖である α(1→6)結合マンノース多量体の合成法の確立および、多量体の配座解析を目的とした。




【方法・結果】マンノース供与体において 2 位および 6 位のアシル基は、α 結合の形成を促進することが報告されている[2)]。6 位にモノクロロアセチル(MCA)基を導入したイミデート糖供与体と触媒量の TMSOTf を用い、α(1→6)結合の形成を試みた結果、α 体と β 体およそ 1：1 の混合物を得るのみであった。6 位のみアシル基では α 結合の形成は困難であることが示唆された。また、2 位のヒドロキシ基にベンゾイル基を導入した糖受容体および糖供与体を合成した。これらを用いたグリコシル化反応では α 体を単一のジアステレオマーとして得た。得られた二量体から四量体へ糖鎖を伸長し八量体の合成を達成した。現在はさらなる多量体の合成、および 6 位にアシル基が導入された糖供与体における置換基効果について検討を行っている。




1) F. M. Klis, A. Boorsma, P. W. J. D. Groot, *Yeast*, **2006**, *23*, 185.
2) C. A. A. van Boeckel, T. Beetz, S. F. van Aelst, *Tetrahedron*, **1984**, *40*, 4097.

glycosylation, mannose, organic synthesis

発表番号：3I004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# DMT-MM を用いた GlcNAc ペプチドの合成と糖鎖の酵素的付加反応

# Preparation of GlcNAc-peptide by Using DMT-MM and the Enzymatic Addition of Sugar Chain

○苫米地 祐輔[1]、山本 憲二[1]、稲津 敏行[2]、国嶋 崇隆[3]（[1]石川県大・生資工研、[2]東海大・工、[3]金沢大院・薬）
○Yusuke TOMABECHI[1], Kenji YAMAMOTO[1], Toshiyuki INAZU[2], Munetaka KUNISHIMA[3]
([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Tokai Univ., [3]Kanazawa Univ.)

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来の endo-β-*N*-acetylglucosaminidase（Endo-M）は N-結合型糖鎖のジアセチルキトビオース残基のβ-1,4 結合部分に作用して糖鎖を遊離するだけでなく、適当な糖鎖受容体が存在すると遊離した糖鎖を転移付加させる糖鎖転移活性も有している。[1)]本酵素は化合物に多様なグライコフォームを効率的に付加できる手法として注目されている一方、糖受容体の簡便な合成法が必要とされている。我々は Endo-M が認識する糖鎖受容体の最小必須構造が、GlcNAc の 4 位と 6 位間の構造、すなわち 1 級水酸基と 2 級水酸基が隣接する 1,3-ジオール構造であることを明らかにし、糖鎖修飾ペプチドの合成へ応用することに成功している。[2)]

本研究では、より簡便な糖受容体の合成法の確立を目指して、糖受容体に保護基を導入せずにペプチド合成を行う方法を開発した。すなわち、水やプロトン性溶媒中でもアミド結合が構築可能な DMT-MM [(4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride][3)]を縮合剤として用いて、合成を試みた。合成するターゲットとしては薬理活性を有し、糖鎖転移反応がモニタリングしやすいように芳香族アミノ酸を含むペプチドとしてVIRIP(Virus-Inhibitory Peptide)[4)]を選んだ。VIRIPはアミノ酸20残基からなり、ヒト細胞へのHIV感染を阻害する活性があることが報告され、糖鎖を付加することによって薬効の向上が期待される。

まず VIRIP のアスパラギン残基に GlcNAc を付加したペプチドの合成を企てた。Fmoc-Phe-Wang 樹脂を出発原料とし縮合剤に DMT-MM を用いて固相合成を行った。目的の配列を有するペプチドを構築した後、脱保護及び樹脂からの切り出しを行い HPLC による精製を行った結果、収率 45%で GlcNAc-VIRIP を合成することができた。次に、糖鎖オキサゾリン体を糖供与体とし、改変酵素 Endo-M N175Q を用いた糖鎖転移反応を行ったところ、転移率 91%で糖鎖が付加した VIRIP を調製できた。本研究では、1,3-ジオール構造を持った VIRIP の合成と糖鎖の転移付加反応、及び、得られた糖鎖付加 VIRIP の抗 HIV 活性を測定した結果について報告する。

文献

1) K. Yamamoto, *et. al. Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1994**, *203*, 244.
2) Y. Tomabechi, T. Inazu, *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52*, 6504.
3) M. Kunishima, *et. al*. *Tetrahedron*, **2001**, 57, 1551.
4) J. Munch, *et. al. Nature Rev. Microbiol*. **2014**, *12*, 715.

Endo-β-N-acetylglucosaminidase, Endo-M, DMT-MM

発表責任者：苫米地　祐輔（yto017@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：3I005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 遠隔位からの分子内アグリコン転移反応によるシスグリコシル化の検討

# Study on long-range intramolecular aglycon delivery for *cis* glycosylation

○石渡 明弘[1]、伊藤 幸成[1,2] ([1]理研、[2]ERATO・JST)
○Akihiro ISHIWATA[1], Yukishige ITO[1,2] ([1]RIKEN, [2]ERATO・JST)

【目的】糖鎖の多岐にわたる機能を解明するには、それぞれ純粋な単一糖鎖構造を用いておこなう必要がある。単一糖鎖構造の調製方法として、化学合成は最重要であり、多様な糖鎖の合成における鍵反応であるグリコシル化を立体制御することで、単一な所望の糖鎖構造へ導くことができる。分子内アグリコン転移反応 (IAD) は、まず糖受容体と糖供与体を接続した後に、分子内でアグリコンを転移して、一般的に選択的合成が困難な 1,2-*cis* 結合を得る手法であり [1]、立体電子的に不利な β-マンノシドの合成に有効であることが見いだされている。最近当研究室では 2-Naphthylmethyl (NAP) エーテルを介した IAD を開発し、複合糖質糖鎖合成へ応用している [2]。今回 IAD の適用範囲を検証する目的で、遠隔位からの分子内シスグリコシル化 [3] について、検討することした。
【方法と結果】 2-デオキシ糖を供与体として用いるグリコシル化反応における立体制御は、２位水酸基を足がかりとする手法がとれず困難を極める。そこでまず、2-デオキシグルコースおよび 2-デオキシガラクトース供与体を用い検討をおこなったところ、デオキシガラクトース４位における混合アセタールからの分子内グリコシル化の場合のみグリコシドを与え、供与体の活性化において β-脱離によるグリカール体の生成が深刻な問題となることが明らかとなった。また、アラビノフラノシドの５位からの分子内シスグリコシル化の検討を種々おこなったところ、希釈条件下、高いシス選択性で β-アラビノフラノシドが得られた [4]。

参考文献
[1] Ishiwata, A. et al. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3596.
[2] Ishiwata, A. et al. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 4250.
[3] Bols, M. Hansen, H. C. *Chem. Lett.* **1994**, 1049.
[4] Ishiwata, A. Ito, Y. J. Am. Chem. Soc. **2011**, *133*, 19524.

Stereoselective glycosylation, Oligosaccharide, Intramolecular aglycon delivery

発表責任者：Akihiro Ishiwata（aishiwa@riken.jp）

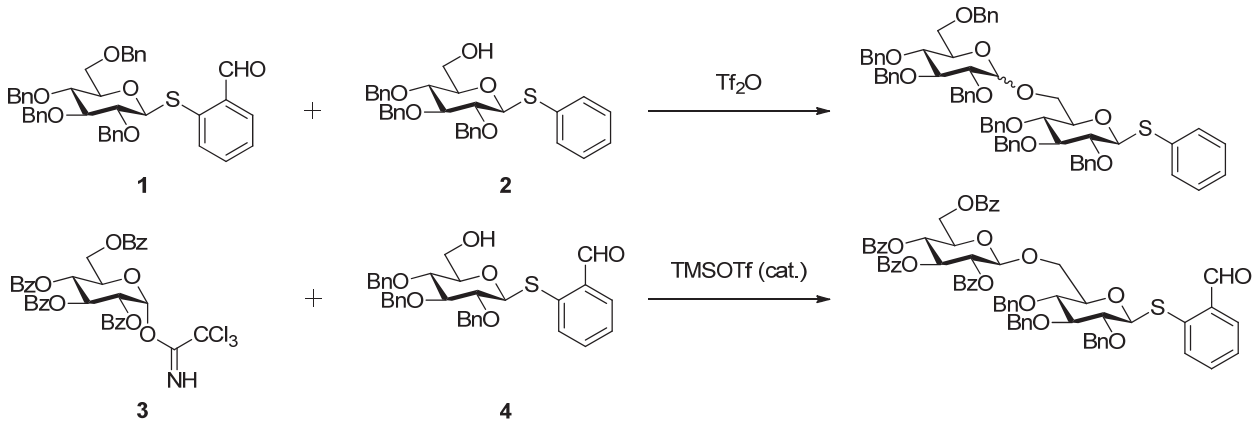
発表番号：3I006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# チオサリチルアルデヒド型糖供与体を用いた糖鎖合成法の開発

# Development of novel procedure for oligosaccharide synthesis using thiosalicylaldehyde donor

○駒井 亮太[1]、堺 英俊[1]、小室 晴香[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大院融合科学、[2]千葉大分子キラリティーセンター)
○Ryota KOMAI[1], Hidetoshi SAKAI[1], Haruka KOMURO[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Molecular Chirality Research Center)

【目的】連続的グリコシル化による糖鎖合成において、グリコシル化反応時に特定の脱離基を化学選択的に活性化することは重要である。チオグリコシドは高い化学的安定性と化学選択性を持つことから、ハロゲン糖やイミデート体などと組み合わせて連続的グリコシル化に幅広く用いられている。ゆえに、従来のチオグリコシドに影響を与えずに活性化可能なチオグリコシドは、連続的グリコシル化において化学的に安定な新しい糖供与体として期待できる。我々は脱離基中の *o* 位にアルデヒド基を持つチオサリチルアルデヒドドナー**1** が、通常のチオグリコシドは活性化されない TMSOTf によって活性化できることを前年度大会で報告したが、グリコシル化反応における収率に課題があった。今回の報告では、この収率を改善するために反応条件の検討を行った。
【方法・結果】チオサリチルアルデヒドドナー**1** に対して、様々なプロモーターを用いてグリコシル化における収率の向上を目指した。その結果、$Tf_2O$ をドナーに対して 1.2 等量用いることで反応収率を大幅に改善できることがわかった。また、イミデートドナー**3** とチオサリチルアルデヒドをアグリコンとして有するアクセプター**4** を共存させてプロモーターに TMSOTf を用いてグリコシル化を行ったところ、イミデートのみが特異的に活性化され対応する二糖のみを与えることを新たに見出した。現在チオサリチルアルデヒドドナー**1** を用いた連続的グリコシル化の条件検討を行っている。




glycosylation, oligosaccharide, aldehyde

発表責任者：駒井　亮太（r.komai@chiba-u.jp）

発表番号：3I007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 水酸基近傍にチオエーテルを有する糖受容体を用いた 1,2-*cis* 選択的グリコシル化

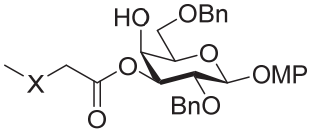
1,2-*cis*-Selective glycosylation using glycosyl acceptors carrying thioether groups adjacent to glycosylation site

○小林 真己[1]、江澤 あやめ[1]、山本 佳奈[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大融合科学、[2]千葉大学分子キラリティー研究センター)

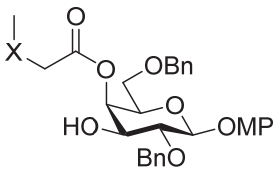
○Masaki KOBAYASHI[1], Ayame EZAWA[1], Kana YAMAMOTO[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Molecular Chirality Research Center Chiba Univ.)

【目的】近年のグリコシル化法の発展により種々の生理活性糖鎖の合成が可能となってきたが、1,2-*cis* 型グリコシドの構築は依然として困難を伴う。現在までに様々な糖供与体の保護基による 1,2-*cis* グリコシル化法が開発されてきたが、糖供与体の保護基による立体制御に関する報告例はほとんどない。昨年度大会において我々は新しい 1,2-*cis* グリコシド構築法の開発を目的として、反応点近傍にチオエーテルを有する糖受容体を設計し、3 位にメチルチオアセチル基、4 位に水酸基を有する糖受容体 **1a** によって 1,2-*cis* グリコシル化が促進することを報告した。今回は 1,2-*cis* 選択性向上のためのチオエーテル含有保護基の探索、および様々な糖供与体・活性化剤を用いたグリコシル化を行ったので報告する。

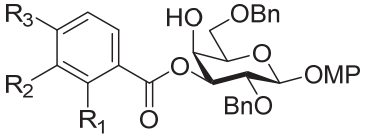
【方法・結果】水酸基の近傍に（メチルチオ）ベンゾイル基を持つ糖受容体 **3a**-**3c** と **4a**、およびそのアナログとしてベンゾイル基で保護した **3d** と **4b** をそれぞれ合成し、様々な糖供与体を用いてグリコシル化を行った。その結果、*o* 位にメチルチオ基を有する糖受容体 **3a** は、*m* 体 **3b** や *p* 体 **3c**、ベンゾイル体 **3d** に比べて高い 1,2-*cis* 選択性を示し、以前報告したメチルチオアセチル基を有する **1a** よりも高い結果となった。またフッ化グリコシドを用いたグリコシル化において、$AgClO_4/SnCl_2$ で活性化した時は **1a**・**1b** 間で立体選択性に変化が現れなかったのに対し、$AgOTf/HfCp_2Cl_2$ を活性化剤に用いると **1a** は高い 1,2-*cis* 選択性が発現した。このことから、系中で発生するグリコシルトリフレートにチオエーテルが関与することで 1,2-*cis* 選択性を向上させていることが示唆された。



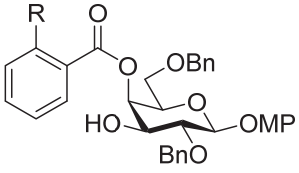

**1a** : X = S
**1b** : X = $CH_2$




**2a** : X = S
**2b** : X = $CH_2$




**3a** : $R_1$ = SMe, $R_2$ = H, $R_3$ = H
**3b** : $R_1$ = H, $R_2$ = SMe, $R_3$ = H
**3c** : $R_1$ = H, $R_2$ = H, $R_3$ = SMe
**3d** : $R_1$ = H, $R_2$ = H, $R_3$ = H




**4a** : R = SMe
**4b** : R = H

Glycosylation, Oligosaccharide, Stereoselectivity

発表責任者：小林真己（aada1317@chiba-u.jp）

発表番号：3I008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 脱離基中の官能基の違いによる新しい連続グリコシル化法の開発

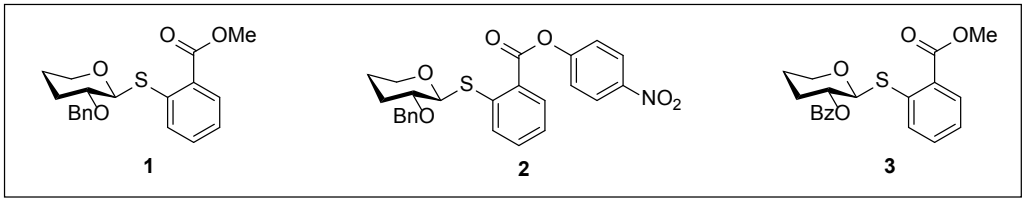
# Sequential glycosylation method using phenylthioglycoside with arming or disarming group in aril ring

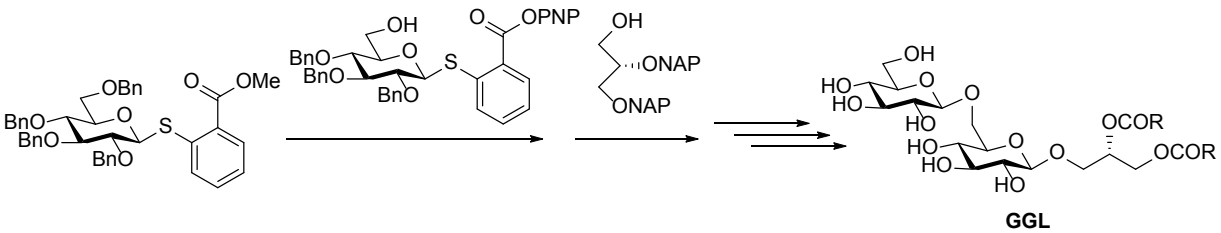
○江澤 あやめ[1]、木村 智文[1]、金澤 尊[1]、小林 真己[1]、駒井 亮太[1]、西田 芳弘[1,2]、土肥 博史[1,2] ([1]千葉大融合科学、[2]千葉大学分子キラリティー研究センター)

○Ayame EZAWA[1], Tomofumi KIMURA[1], Takeru KANAZAWA[1], Masaki KOBAYASHI[1], Ryota KOMAI[1], Yoshihiro NISHIDA[1,2], Hirofumi DOHI[1,2] ([1]Chiba Univ., [2]Molecular Chirality Research Center Chiba Univ.)

【目的】糖供与体の反応性の差を利用した連続グリコシル化法は、複雑な構造を持つ糖鎖の合成において極めて効果的な手法である。現在までに糖ユニットの保護基の電気的特性の差を利用した armed/disarmed 法や、脱離基中の官能基の電気的特性の差を利用した active-latent 法などが報告されているが、前者は二回目のグリコシル化で構築できる構造が制限されていること、後者は多段階に渡る官能基変換が必要になるなどの問題点を抱えている。本研究ではこれらの問題点を克服することを目的として、チオサリチル酸メチルグリコシドのエステル部位に異なる官能基を導入することで脱離基による armed および disarmed を制御可能な糖供与体を開発した。また、本糖供与体を用いて連続グリコシル化の検討を行い、生理活性糖鎖の合成を試みた。

【方法・結果】2-*O*-ベンジル型チオサリチル酸メチルグリコシド（**1**）を高活性型、そのメチル基を高い電子求引性を有する *p*-ニトロフェニル基に変換したものを中活性型（**2**）、2-*O*-ベンゾイル型チオサリチル酸メチルグリコシドを低活性型（**3**）としてそれぞれ設計・合成し、これらのグリコシル化における反応性等を評価した。その結果、高活性型糖供与体は中活性型糖受容体の存在下で NIS/TfOH によって選択的に活性化され、対応する二糖を高収率で与えた。また、中活性型糖供与体と低活性型糖受容体を用いたグリコシル化においても反応性の高い中活性型のみが活性化されることを見出し、反応性の高い脱離基から順に化学選択的にグリコシル化反応を起こすことに成功した。現在、**1-3** を用いた連続グリコシル化と、本法を用いた細菌由来グリセロ糖脂質 GGL の合成を検討している。




Glycosylation, Oligosaccharide, Stereoselectivity

発表番号：3I009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 糖鎖基質酵素反応におけるマイクロ波効果の研究

# Study of microwave effect for carbohydrates' enzymatic reactions

○長島 生[1]、作田 智美[1]、杉山 順一[2]、佐々木 正秀[1]、清水 弘樹[1] ([1]産総研生物プロセス、[2]産総研ナノ材料)
○Izuru NAGASHIMA[1], Tomomi SAKUTA[1], Jyun-ichi SUGIYAMA[2], Masahide SASAKI[1], Hiroki SHIMIZU[1] ([1]BPRI, AIST, [2]NMRI, AIST)

現在、化学反応用に市販されているマイクロ波反応装置は、IMS バンド（Industrial, Scientific and Medical radio bands）のひとつである周波数2.45GHz が用いられている。家庭用電子レンジにも 2.45GHz 帯が使われている様に、マイクロ波の効率加熱特性は一般に広く認知されているが、近年、マイクロ波による化学反応促進効果は単なる加熱特性に因るだけではないということが明らかにされつつある。しかし、マイクロ波が物質に及ぼす詳細な作用機構はまだ解明されていない。マイクロ波による物質加熱については、水分子の様な双極子分子の振動がマイクロ波の電磁界位相に対し遅れるため誘電損失として水が加熱されるという説明がなされるが、この考え方では水素結合ネットワークによる水分子クラスターの存在を無視している。つまり身近に実用化されているマイクロ波加熱の機構ですら、分子レベルで正確に把握できているとは言い難い。

この様に明確な作用機構は不明な点が多いが、我々は化学反応におけるマイクロ波効果を解明すべく研究を進めている。一昨年、昨年の本会では、エキソ型β-グルコース加水分解酵素であるβ-グルコシダーゼ HT1（株式会社耐熱性酵素研究所）を用いた 4-メトキシフェニルグルコシドの加水分解反応におけるマイクロ波利用のメリットや照射周波数依存性などを、反応系の複素比誘電率の測定から得られた誘電損失と導電損失の作用を切り分けて考察し、マイクロ波が分子選択的に効果を与えていることを報告した。本年は、糖ペプチドを基質とした酵素反応系におけるマイクロ波の作用機構について報告する。

エンド-β-アセチルグルコサミニダーゼは、*N*-結合型糖タンパクの糖鎖部基本骨格を構成する *N*, *N'*-ジアセチルキトビオース構造（GlcNAcβ1,4GlcNAc）を加水分解し、エンド型に糖鎖を遊離させる酵素である。同機能を有する酵素は様々な生物種から単離されており、*Arthrobacter protophormiae* 由来の Endo-A や *Mucor hiemalis* 由来の Endo-M などは、糖受容体存在下では糖転移活性も示し、生物製剤のひとつである糖タンパク製剤や抗体薬のバイオシミラー、バイオベターの開発と生産に利用価値の高い酵素として注目されている。また、Endo-M の活性中心付近を部位特異的に変異させた N175Q 変異体は、糖加水分解能が抑えられ効率的に糖鎖転移反応を進めることができる糖転移酵素として市販されている。我々は、鶏卵から単離精製される 11 糖シアリルグリコペプチド（SGP-11）を基質とし、Endo-M と N175Q 変異体それぞれの酵素反応をマイクロ波照射下、軽水溶媒中と重水溶媒中で行い、それらの結果について比較検討した。

microwave, enzymatic reaction, carbohydrate

発表責任者：清水弘樹（hiroki.shimizu@aist.go.jp）

発表番号：3I010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 担子菌の産生する糖鎖遊離酵素を利用した Native な糖タンパク質からのアスパラギン結合型糖鎖除去

# Removal of asparagine-linked oligosaccharides from native glycoproteins by endoglycosidases from basidiomycetes

高橋 剛生[1]、海住 宜広[1]、Nakapong Santhana[2]、Kuttiyawong Kamontip[3]、Krusong Kuakarun[4]、Kaulpiboon Jarunee[5]、Pongsawasdi Piamsook[4]、○伊藤 和央[1] ([1]阪市大院・理、[2]ラムカンヘン大・理、[3]カセサート大・教養、[4]チュラロンコン大・理、[5]タマサート大・医)
Go Takahashi[1], Takahiro Kaizumi[1], Santhana Nakapong[2], Kamontip Kuttiyawong[3], Kuakarun Krusong[4], Jarunee Kaulpiboon[5], Piamsook Pongsawasdi[4], ○Kazuo Ito[1] ([1]Grad. Sch.of Sci., [2]Fac. of Sci., Ramkhamhaeng Univ., [3]Fac. of Liberal Arts and Sci., [4]Fac. of Sci., Chulalongkorn Univ., [5]Fac. of Med., Thammasat Univ.)

【目的】エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (エンド)は、糖タンパク質のアスパラギン結合型糖鎖のジアセチルキトビオース間を加水分解する。本酵素は糖鎖の構造や機能解析あるいは糖鎖付加に有用である。我々は、担子菌が広く本酵素を発現していることを見出し、担子菌における本酵素の役割を明らかにするために各種担子菌由来酵素の構造と機能の解析を行ってきた。本研究では、担子菌由来酵素のアスパラギン結合型糖鎖工学への利用を目指して、*Flammulina velutipes* 由来のエンド FV と *Agaricus bisporus* 由来のエンド AB について、Native な状態の糖タンパク質からのアスパラギン結合型糖鎖の遊離作用を調べた。
【方法】エンド FV およびエンド AB は、構築した遺伝子発現系で発現した酵素を用いた。それぞれの遺伝子組換え発現酵素の精製は、各種カラムクロマトグラフィーによって行った。各種糖タンパク質を基質として Native な糖タンパク質からの糖鎖遊離作用を調べた。糖タンパク質から遊離した糖鎖の分析は TLC や質量分析計によって行った。
【結果】精製したエンド FV とエンド AB の組換え発現酵素は電気泳動的に単一であった。エンド FV は、ハイマンノース型糖鎖を結合している糖タンパク質に作用し、容易に糖鎖を遊離したが、コンプレックス型糖鎖を結合している糖タンパク質からの糖鎖遊離作用は認められなかった。一方、エンド AB は、ハイマンノース型糖鎖を結合している糖タンパク質に作用し、容易に糖鎖を遊離するとともに、コアフコースや非還元末端シアル酸の存在に関わらず、コンプレックス型糖鎖を結合している糖タンパク質にも作用し、糖鎖を遊離した。また、エンド AB は植物タイプのアスパラギン結合型糖鎖を結合している糖タンパク質にも作用し、糖鎖を遊離した。さらに、エンド AB をヒト由来の生体試料に添加することによって存在する複数の糖タンパク質からアスパラギン結合型糖鎖が除去され、遊離した糖鎖が検出された。一方、エンド FV を添加しても糖鎖を遊離する糖タンパク質はほとんど認められなかった。これらの結果から、エンド FV とエンド AB は、酵母や糸状菌などで発現した糖タンパク質から加熱などの変性を行うことなくハイマンース型のアスパラギン結合型糖鎖を除去するために利用できるものと考えられた。さらに、エンド AB は、ヒトなどの動物由来の各種生体試料中の Native な糖タンパク質からのコンプレックス型のアスパラギン結合型糖鎖の除去と、遊離した糖鎖の分析に利用できるものと考えられた。

asparagine-linked oligosaccharide, basidiomycetes, endo-β-*N*-acetylglucosaminidase

発表番号：3I011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 食物繊維による腸管上皮細胞応答とヘパラン硫酸糖鎖構造変化の相関

# Correlation between structural alteration of heparan sulfate and response of intestinal epithelial cells induced by dietary fiber

○桑江 俊成[1]、西田 光貴[1]、伊藤 千弘[1]、森 雄一郎[2]、山本 宏貴[2]、伊神 孝生[2]、北口 公司[1]、矢部 富雄[1] ([1]岐阜大院・応生科、[2]三基商事（株））

○ Toshinari KUWAE[1], Mitsutaka NISHIDA[1], Chihiro ITO[1], Yuichiro MORI[2], Hirotaka YAMAMOTO[2], Takao IKAMI[2], Koji KITAGUCHI[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., [2]MIKI Corp.)

【目的】

水溶性食物繊維の 1 種であるペクチンの長期摂取により，小腸絨毛の形態が変化することが報告されているが，その分子メカニズムは未だに不明である。また，小腸絨毛の恒常性には小腸上皮細胞のヘパラン硫酸（HS）糖鎖と Wnt/β カテニンシグナルが関与することが報告されている。そこで我々は，ペクチンの摂取による絨毛形態変化には，小腸上皮細胞表面 HS 糖鎖と Wnt/β カテニンシグナルが関与すると仮定し，*in vitro* 小腸モデル系におけるペクチンの摂取と小腸上皮細胞表面 HS 糖鎖および Wnt タンパク質との関連について検討した。

【方法および結果】

*in vitro* で小腸上皮を再現するため，ヒト腸管上皮様細胞株の Caco-2 細胞とラット腸管細胞株の IEC-6 細胞との共培養系からなる *in vitro* 小腸モデル系を構築した。

構築した *in vitro* 小腸モデル系において，分化 Caco-2 細胞にペクチンを添加し 24 時間後の IEC-6 細胞増殖活性を WST-8 法にて測定した結果，ペクチンの濃度依存的に細胞増殖が観察された。そこで，細胞表面に普遍的に存在する HS 糖鎖に注目し，HPLC による Caco-2 細胞表面の HS 糖鎖構造解析を行った結果，ペクチンの添加により HS の硫酸化パターンが変化していることを見出した。さらに，表面プラズモン共鳴法を用いた Biacore システムにより Caco-2 細胞表面 HS 糖鎖と Wnt3a タンパク質の分子間相互作用を解析した結果，ペクチンの添加により変化した HS と Wnt3a との結合力が顕著に減少していた。このペクチンを添加した際の Caco-2 細胞 Wnt3a 遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析すると，Wnt3a の mRNA およびタンパク質発現が亢進していた。このことから，Caco-2 細胞へのペクチン添加による IEC-6 細胞増殖は，Wnt3a タンパク質と関連することが示唆された。

また，抗 HS 抗体を用いたフローサイトメトリーにより，Caco-2 細胞にペクチンを添加した際の IEC-6 細胞表面 HS の解析を行った結果，HS 量に優位な差は見られなかった。一方で，リアルタイム RT-PCR 法にて IEC-6 細胞の HS 合成関連酵素発現を解析すると，6 位硫酸基転移酵素である 6-OST-1 遺伝子発現が変化していた。このことから，Caco-2 細胞へのペクチン添加により IEC-6 細胞表面 HS 糖鎖の硫酸化構造が変化することが示唆された。現在，Wnt3a の阻害による IEC-6 細胞増殖活性とペクチン添加による IEC-6 細胞表面 HS 糖鎖構造の硫酸化パターン変化を解析している。

Pectin, Heparan Sulfate, Wnt

発表番号：3I012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリアⅠ

# サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの細胞増殖促進効果における制御メカニズムの解明

# Mechanism analysis of effect of proteoglycan on cell viability in human dermal fibroblast

○佐野 栄宏、齋藤 知明（青森県産業技術センター）
○Masahiro Sano, Tomoaki Saito (Aomori Itc.)

[目的] プロテオグリカンは複合糖質の一つであり、細胞表面や細胞外マトリックスに存在し、様々な機能を担っている。最近の研究から、プロテオグリカンは細胞に働きかけ様々な細胞増殖因子や形態形成因子と相互作用し、細胞機能を調節するといった役割が明らかにされつつある。サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンには線維芽細胞に対して増殖を促進する効果のあることが報告されている。しかし、そのプロテオグリカンの細胞に対する効果の詳細な作用メカニズムは未だ不明である。そこでプロテオグリカンの細胞に対する作用メカニズムを解明し、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンの生体への有効性を証明することを目的とした。 [方法] **(1)** サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンのヒト皮膚繊維芽細胞の生存率に対する時間および濃度依存的な影響を、プロテオグリカン（１００、２００、４００、８００、１６００μg/ml）を添加し２４、４８および７２時間後に MTT assay により調べた。**(2)** サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンのヒト皮膚繊維芽細胞の生存率に対する効果がプロテオグリカンのコアタンパク質を介して作用しているかどうかを調べるために、プロテオグリカンを加熱処理してタンパク質の立体構造を壊し、前述の濃度および時間で細胞に添加して MTT assay により調べた。**(3)** ヒト皮膚繊維芽細胞の生存率がプロテオグリカンによって、どのような作用機序で増加しているかを調べるために、シグナル伝達因子の発現を解析した。 [結果] **(1)** ２４および４８時間においてはプロテオグリカンの濃度依存的にヒト皮膚繊維芽細胞の生存率は増加したが、７２時間においては高濃度のプロテオグリカンでその効果は減少した。**(2)** プロテオグリカンを加熱処理しても、ヒト皮膚繊維芽細胞に対する増殖促進効果は減少しなかった。**(3)** プロテオグリカンをヒト皮膚繊維芽細胞に作用させることによって、細胞増殖シグナル因子の変化していることがわかった。[まとめ]サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンは細胞に対して様々な作用を有しているが、プロテオグリカンのどのドメインを介して細胞のどの分子に作用しているのか、これまで全く不明であった。今回、プロテオグリカンの加熱処理実験から糖鎖部分の細胞生存率の増加に対する重要性を明らかにし、シグナル伝達物質の発現解析から細胞増殖シグナル伝達経路の関与を証明した。このことから、サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンはその糖鎖を介して細胞増殖シグナルを惹起し、細胞増殖を促進している可能性が示された。

Proteoglycan, Cell viability, Signal transduction

発表番号：3I013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# Cell surface N-linked glycan alteration in HepAD38 cell lines expressing hepatitis B virus

○Surya Agung Priyambada[1], Ryo Misaki[1], Toru Okamoto[2], Yuta Okamoto[1], Takao Ohashi[1], Yoshiharu Matsuura[2], Kazuhito Fujiyama[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Departement of Molecular Virology, Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University)

Chronic infection of hepatitis B virus (HBV) is the major cause of liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). Numerous reports has been linked the N-glycan alteration and progression of HCC. However, there have been no reports regarding N-glycan alteration correlated to chronic HBV infection. In this study, we analyzed the cell surface N-glycan of HepAD38 cell lines expressing HBV, which mimics the chronic HBV infection. Tetracycline-inducible promoter allowed the expression of HBV covalently closed circular DNA (cccDNA) and virions in HepAD38 cell lines. The glycopeptides were released directly from the cell surface by tryptic digestion of freshly harvested and vital cells. The surface N-glycans of HepAD38 incubated without tetracycline was highly fucosylated and sialylated with about 80%, respectively. On the other hand, suppressed HepAD38 under tetracycline showed fucosylated (about 70%) and dramatically lower amount of sialylated (about 30%) cell surface N-glycans. Meanwhile, we also analyzed the glycotransferases gene expression levels in both suppressed and induced HepAD38 cell lines. Surprisingly, gene expression levels of sialyl- and fucosyltransferase of induced and suppressed HepAD38 were not significantly different. None of the other genes expression level such as, α-mannosidase-II, *N*-Acetylglucosaminyltransferase-I and -II, and galactosyltransferase, appeared to be different as well. Our study demonstrated that the expression of HBV virions alter the N-glycosylation pathways of cell surface of HepAD38 cell lines. These findings lead to better understanding of N-glycan variances and glycosyltransferases expression level upon the infection of HBV.

hbv, n-glycan, HepAD38

発表責任者：Kazuhito Fujiyama（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

発表番号：3I014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# コウキクサ成長促進活性を有する酵母マンナンの構造限定

# Structural minimization of duckweed growth-promoting yeast mannan

○倉本 歩[1]、菅原 雅之[2]、三輪 京子[1,3]、仲山 賢一[4]、森川 正章[1,3]（[1]北大院・環境、[2]東北大院・生命、[3]JST-ALCA、[4]産総研・中国セ）
○ Ayumu KURAMOTO[1], Masayuki SUGAWARA[2], Kyoko MIWA[1,3], Kenichi NAKAYAMA[4], Masaaki MORIKAWA[1,3] ([1]Hokkaido Univ., [2]Tohoku Univ., [3]JST-ALCA, [4]AIST)

背景および目的

当研究室では、表層微生物作用によるコウキクサの成長促進技術の開発を行っている。これまでに、酵母エキス培地のエタノール沈殿物にコウキクサ成長促進活性があることを見いだしており、その活性因子の構造を解析した結果、酵母由来マンナンであることが判明している。そこで本研究においては酵母マンナンのコウキクサ成長促進に必要な構造単位の特定とその活性の持続性について検証することを目的とした。

方法

酵母のマンノース転移酵素欠損株からマンナン構造変異体を調製し、それぞれをウキクサに与えて成長促進活性を比較した。またコウキクサの酵母マンナン分解活性について、細胞破砕液を調製してデンプン分解活性と比較した。

結果

まず、植物用培地に野生型酵母マンナンを添加し、コウキクサを 10 日間生育させたところ、葉状体数、乾燥重量及びクロロフィル量の増加を確認した。さらに、酵母マンナンはコウキクサに取り込まれることなく成長促進することが示唆され、その効果の持続性も確認した。また、コウキクサには酵母マンナンの分解活性は検出されなかった。一方、主鎖 α 1,6 ポリマンノースを欠失した変異マンナン（OCH1）はウキクサ成長促進を示さなかった。一方、側鎖 α 1,2 オリゴマンノースを欠失し主鎖のみを有する変異マンナン（MNN2）では野生型酵母マンナンとほぼ同等の成長促進活性が認められた。以上のことから、ウキクサの成長促進に必要な構造は主鎖 α 1,6 ポリマンノースであることが示唆される。現在、他の変異マンナンについて検討を行っている。

Lemna minor, Saccharomyces cerevisiae, Duckweed growth-promotion

発表番号：3I015
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

EndoS2 変異体による抗体糖鎖のリモデリング
*N*-glycan remodeling on an antibody by EndoS2 mutants

○高島 晶[1]、黒河内 政樹[1]、森 昌子[1]、大隅 賢二[1]、戸治野 真美[1]、月村 亘[1]、菅原 州一[1]、弘瀬 友理子[1]、冨田 正浩[2]、高柳 淳[3]、水野 真盛[1]、松田 昭生[1]、天野 純子[1]、白井 孝[1]([1]（公財）野口研究所、[2]（株）免疫生物研究所、[3]慶應大学)
○Shou Takashima[1], Masaki Kurogochi[1], Masako Mori[1], Kenji Osumi[1], Mami Tojino[1], Wataru Tsukimura[1], Shu-ichi Sugawara[1], Yuriko Hirose[1], Masahiro Tomita[2], Atsushi Takayanagi[3], Mamoru Mizuno[1], Akio Matsuda[1], Junko Amano[1], Takashi Shirai[1] ([1]The Noguchi Institute, [2]Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd., [3]Keio University School of Medicine)

一般に糖タンパク質には複数の糖鎖構造が結合してヘテロな集団となっているが、品質管理や機能向上のために、均一構造の糖鎖をもった糖タンパク質を作製する技術が注目されるようになってきた。抗体の場合、その Fc 領域に存在する *N*-結合型糖鎖は、抗体の機能発現に影響を与えることがあるため、抗体医薬品の開発においては、糖鎖改変による機能向上の取り組みがなされてきている。我々は抗体糖鎖の改変法として、エンドグリコシダーゼおよびその変異体を利用し、化学合成等によって調製した均一構造をもつ糖鎖を抗体に転移させる方法に着目して研究を進めている。*Streptococcus pyogenes* 由来の EndoS および EndoS2 は、抗体糖鎖を特異的に切断する酵素として知られているが、両者の基質特異性には若干の違いがあって、EndoS2 は、基質特異性が狭い EndoS と異なりハイマンノース型糖鎖も切断できるほか、抗体糖鎖以外にもα1-acid glycoprotein の *N*-結合型糖鎖を切断することが報告されている（1)。また EndoS については糖転移活性をもつ D233A や D233Q が報告されていて（2)、抗体糖鎖のリモデリングに利用されている。本研究では、EndoS よりも広い基質特異性をもつ EndoS2 の変異体を作製し、その糖転移活性や糖鎖切断活性などの諸性質を調べ、グライコシンターゼとして抗体糖鎖のリモデリングに利用できるか検討することにした。

EndoS2 は EndoS と同様、GH18 ファミリーに属する酵素で、その活性部位には酸性アミノ酸残基によって構成された DxxDxDxE モチーフが存在する。EndoS はこのモチーフ内(D228～E235)にある D233 への変異導入で糖転移活性を有するグライコシンターゼに変換されている。そこで、EndoS2 についてもこのモチーフ(D179～E186)に存在する酸性アミノ酸に変異を導入し、各変異体の糖転移活性について IgG 抗体とオキサゾリン化糖鎖を基質として調べた。その結果、EndoS の D233 に相当する D184 への変異導入に加え、D182 への変異導入でも糖転移活性が確認された。この際、置換するアミノ酸や使用する基質の違いによって、変異体の糖転移活性や残存糖鎖切断活性に違いが見られたが、EndoS2 変異体の中には、EndoS の D233Q 変異体よりも高い糖転移活性を示すものもあった。また、EndoS2 はドメイン構造をもつ酵素であり、C 末端側にある抗体との相互作用にかかわると考えられる領域の一部を欠失させた変異体でも、抗体糖鎖に対する切断活性が保持されている場合があって、酵素を小型化して利用することも可能だと思われた。以上の結果から、EndoS2 変異体の中には、抗体糖鎖の改変に十分利用できるものがあると思われ、より至適化された変異体を作製できれば、抗体糖鎖改変のための強力なツールになると考えられた。

(1) Sjögren, J. et al., Glycobiology 25, 1053-1063 (2015)
(2) Huang, W. et al., JACS 134, 12308-12318 (2012)

endo-β-*N*-acetylglucosaminidase, antibody, *Streptcoccus pyogenes*

発表責任者：高島　晶（staka@noguchi.or.jp）

発表番号：3I016
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 蛍光標識糖脂質をプローブとした細胞内膜系の動態解析

# Analysis of organella membrane dynamics by using fluorescently tagged glycolipids

○新井 健太[1,2]、蟹江 善美[2,3]、蟹江 治[1,2,3]([1]東海大大学院工学研究科、[2]東海大工学部生命多様性研究会、[3]東海大学糖鎖科学研究所)
○Kenta Arai[1,2], Yoshimi Kanie[2,3], Osamu Kanie[1,2,3] ([1]Tokai University, Graduate School of Engineering, [2]Tokai University, Faculty of Engineering Research Alliance for Diversity of Life, [3]Tokai University, Institute of Glycoscience)

糖脂質は細胞間での様々な現象に関与しており、がんや糖尿病などの疾病マーカーとしても期待されている。細胞内における糖脂質代謝はベシクル依存的に行われることが知られているがその根底にある細胞内における糖脂質の代謝経路やそれらに関する制御メカニズム等は未解明である。そこで糖脂質の分子構造と局在変化の時間依存性についての解明が必要である。

近年、報告された蛍光標識糖脂質 LacCerBODIPY の導入による培養細胞内での糖鎖変換過程解析においては、時間分解能の問題から細胞内の局在変化や動態の解析が曖昧であった。そこで我々はパルスチェイスにより LacCerBODIPY の取り込みを制御することで時間分解能の向上をまた細胞膜との共染色により空間分解能の向上を目指した。その結果、蛍光糖脂質の細胞内での局在変化、および、挙動を詳細に解析する糸口を見出した。

始めに CHO-K1 細胞に 2.5 μM の LacCerBODIPY を 1 分間のパルスで取り込ませ、観察直前に PKH26 により細胞膜を染色したのちに LacCerBODIPY の挙動を追跡観察したところエンドサイトーシスにより取り込まれた後ゴルジ体へと移行していき、最終的に膜に再局在する時間依存的かつ循環的な動態を観察することができた。

次に PC12D 細胞に対して同様の蛍光糖脂質を取り込ませ、細胞内での局在の変化の速度について光退色後蛍光回復（FRAP）法を用いて観察した。上記と同様の実験より得られた蛍光糖脂質の細胞内局在の情報をもとに、細胞膜、ゴルジ体領域にて FRAP 解析を行った結果、NGF 添加の有無により細胞膜における動的成分の割合やゴルジ体領域での差異が見られた。これは、細胞の状態により細胞膜の流動性が異なるのみならず、細胞内小器官の運動性にも差異があることを示す結果である。また、分化過程における NGF 刺激時間による細胞膜の動態変化を同様にして調べたところ NGF 添加後速やかに細胞膜脂質の動的比率が変化することが判明した。

今後は、細胞内オルガネラマーカータンパク質と蛍光標識化糖脂質の共局在を解析することでゴルジ層板における局在時間やオルガネラ自体の動態について詳細に検討する。

organella membrane dynamics, FRAP, glycolipid

発表責任者：蟹江　治（kanie@tokai-u.jp）

発表番号：3I017
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# ループ構造の数が異なる植物由来ファミリーGH19 キチナーゼの機能に関する研究
# Structure and function of GH19 chitinases

○田中 盾[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、沼田 倫征[3]、深溝 慶[1] ([1]近畿大、[2]琉球大、[3]産総研)
○Jun TANAKA[1], Takayuki OHNUMA[1], Toki TAIRA[2], Tomoyuki NUMATA[3], Tamo FUKAMIZO[1]
([1]Kinki Univ, [2]Ryukyu Univ, [3]AIST)

【目的】キチナーゼ(EC 3.2.1.14)は *N*-アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合で連なった多糖であるキチンを加水分解する酵素であり、アミノ酸配列の相同性に基づく糖質加水分解酵素ファミリーの GH18 と GH19 に分類されている。GH18 キチナーゼは様々な生物種に見られるのに対し、GH19 キチナーゼはほぼ植物のみに分布しているが、一部の細菌も発現している。GH19 キチナーゼの構造には多様性があり，保存性の高いα-ヘリックスからなるコア構造に 6 つのループ構造（ループ I～VI）が付加した 6 ループ型やループ III のみを欠損した 5 ループ型 GH19 キチナーゼがクローニングされている。しかし、GH19 キチナーゼの各ループ構造が、酵素の機能に与える影響についてはよくわかっていない。当研究室ではこれまでに 1 ループ型のナガハハリガネゴケ由来キチナーゼ(BcChi-A)と 6 ループ型のライムギ種子由来キチナーゼ(RSC-c)の構造と機能に関する研究を行ってきた。今回新たにループ III のみが欠損した 5 ループ型イネ由来キチナーゼ(OsCHT46)の組換え型酵素の生産系を確立したことから、3 種のループ数が異なる GH19 キチナーゼを用いて、各ループ構造が GH19 キチナーゼの酵素活性および基質結合能に与える影響について調べた。

【方法】大腸菌発現系によって組換え型 BcChi-A、RSC-c、および OsCHT46 を発現させ、各種カラムクロマトグラフィーを用いて SDS-PAGE で均一なまでに精製した。キチンオリゴ糖の分解様式は、TSKgel-Amide80 カラム（東ソー）を連結した HPLC によって調べた。また、各酵素の不活性変異体型を作製し、CD スペクトルを用いて、各酵素の熱安定性およびキチンオリゴ糖結合による熱安定化効果を調べた。

【結果】HPLC の解析の結果、OsCHT46 は $(GlcNAc)_4$ を $(GlcNAc)_3$+GlcNAc に、$(GlcNAc)_3$ を $(GlcNAc)_2$+GlcNAc に分解することがわかった。このような分解様式は RSC-c や BcChi-A とは明らかに異なることから、ループ III の欠損が基質結合クレフトの構造に影響を与え、オリゴ糖基質の分解様式に違いをもたらしているものと考えられた。また、各酵素の 50%熱変性温度($T_m$)を測定したところ、ループ数の増加に伴い $T_m$ 値が低下することがわかった。本発表では各酵素と基質との結合性についても報告する。

oryza sativa, chitinase, GH19

発表番号：3J001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 好熱性アーキア *Sulfolobus acidocaldarius* を用いたアーキア由来タンパク質発現系の構築

# Construction of a recombinant archaeal protein expression system in *Sulfolobus acidocaldarius*

○小栗 隆寛[1]、前田 英利[1]、里村 武載[1,2]、鈴木 匠爾[3]、黒沢 則夫[3]、末 信一朗[1,2]（[1]福井大院工、[2]福井大・生命セ、[3]創価大）
○ Takahiro OGURI[1], Hidetoshi MAEDA[1], Takenori SATOMURA[1,2], Shoji SUZUKI[3], Norio KUROSAWA[3], Shin-ichiro SUYE[1,2] ([1]Grad. Sch. Eng., Univ. Fukui, [2]Res. Edu. Prog. Life Sci., Univ. Fukui, [3]Soka Univ.)

[緒言]

好熱性アーキアは温泉の源泉や海底火山の熱水噴出孔周辺などの高温環境に生息する微生物である。好熱性アーキアの生産する酵素は一般的に常温性菌由来のものより熱安定性が高く、幅広い pH 領域においても長期間安定的に機能し、有機溶媒や変性剤に対しても耐性を有することが知られている。そのため好熱性アーキア由来酵素は長期間安定的に作動することが求められるバイオセンサ、バイオリアクター、バイオ燃料電池用素子などへの応用利用が期待されている。しかし、多くの好熱性アーキア由来の酵素は大腸菌を用いた既存の遺伝子組み換え系によって発現させた場合、その多くはタンパク質として機能しないインクルージョンボディとして生産されてしまう。このことが好熱性アーキア由来酵素の応用利用の律速となっている。そこで、我々は好気条件下、簡便な培養条件で生育可能な *Sulfolobus* 属菌に着目し、*Sulfolobus* 属において好熱性アーキア由来組換えタンパク質を発現することを目的とした。

[方法・結果]

*S. solfataricus* 由来の 3 種類のプロモーター領域を *S. tokodaii* 由来 D-乳酸脱水素酵素をコードする遺伝子（STK06490）に連結した遺伝子カセットを *Sulfolobus-E.coli* シャトルベクターpSAV2 に導入した。作成したプラスミドをエレクトロポレーションによって *S. acidocaldarius* ウラシル要求性変異株 SK1 に導入した。得られた *S. acidocaldarius* 形質転換体について、D-乳酸脱水素酵素活性を測定することで組換えタンパク質の発現を評価した。その結果、本実験で用いた 3 種類のプロモーターの内、2 種類のプロモーターにおいて組換え D-乳酸脱水素酵素の発現が認められた。

thermophilic archeae, *Sulfolobus acidocaldarius*, recombinant protein expression

発表番号：3J002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 構造情報に基づく部位特異的変異及びランダム変異導入に依るヘモグロビン A1c ダイレクトオキシダーゼの造成

# Creation of hemoglobin A1c direct oxidase by structure-based site specific and random mutagenesis.

○小川 徳之[1]、木村 豪秀[1]、益成 利幸[1]、天野 芙美[1]、片山 有基[1]、永井 豪[1]、市村 通朗[1]、丸山 如江[2]、伊藤 貴文[3]、橋本 渉[3]、村田 幸作[2]、相阪 和夫[4]([1]協和メデックス(株) 研究開発本部、[2]摂南大・理工、[3]京大院・農、[4]無所属)
○ Noriyuki OGAWA[1], Takehide KIMURA[1], Toshiyuki MASUNARI[1], Fumi AMANO[1], Yuki KATAYAMA[1], Go NAGAI[1], Michio ICHIMURA[1], Yukie MARUYAMA[2], Takafumi ITO[3], Wataru HASHIMOTO[3], Kousaku MURATA[2], Kazuo AISAKA[4] ([1]R&D Div., Kyowa Medex Co.,Ltd., [2]Sch. Eng. Sci., Setsunan Univ., [3]Grad.Sch. Agric., Kyoto Univ., [4]Independent)

【目的】ヘモグロビン A1c(HbA1c)は、血中のグルコースがヘモグロビンβ鎖の N 末端のアミノ基に付加することで生成する糖化蛋白質であり、糖化の割合が 1-2 カ月の平均血糖値を反映することから糖尿病のモニタリングマーカとして有用である。現行の HbA1c 酵素測定法試薬は、変性させた HbA1c をプロテアーゼ処理し、HbA1c の部分構造である糖化ジペプチド F-VH を遊離させ、糖化ペプチドオキシダーゼ（FPOX）との反応で生成させた過酸化水素により色素を発色させる 2step 反応を原理としている。しかしながら試薬中のプロテアーゼが FPOX にも作用しうること等が懸念点となりうる。われわれは HbA1c に直接作用するオキシダーゼを用いて、プロテアーゼを必要としない次世代試薬を構築することができれば産業的価値が大きいと考え、新規 FPOX を取得し、構造情報に基づいて構造を改変することにより当該活性を有する新規酵素の造成を目指した。
【方法･結果】活性指標スクリーニングにより､F-VH に対して高い反応性を示した糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の FPOX をクローニングし、大腸菌発現系を構築した。野生型組換え酵素 FPOX-1 に対し、F-VH 反応性の上昇、非特異反応の原因となりうるε-糖化リジン(F-K)への反応性の低下、熱処理後の残存活性を指標として変異の蓄積、最適化を試みた結果、FPOX-1 に 11 カ所のアミノ酸置換を導入した改変酵素、FPOX-15 において、F-VH/F-K 反応性比を約 500 倍、50℃、15 分の条件での残存活性を約 75%まで上昇させることに成功した。
さらに次の段階として、FPOX-15 に HbA1c の糖化部位を反映する、より長いペプチド鎖を持ったモデル基質である糖化ヘキサペプチド(F6P)に対する反応性を付与すべく機能改変を試みた。FPOX-15 の X 線結晶構造を決定し、活性部位周辺の構造を精査したところ、61 位 Arg (R61)が活性部位入口を制限していると予想されたため、同部位を側鎖の小さいアミノ酸に置換したところ、明瞭な F6P 反応性を認めた。本結果を踏まえ、これまで F6P 反応性を持たないと考えていた FPOX-15 を再評価したところ、極めて微弱な F6P 反応性を示すことが分かったが、R61 置換効果により、同反応性が最大約 70 倍上昇することが明らかになった。さらに周辺構造への部位特異的変異、ランダム変異、飽和変異による最適化を駆使し、FPOX-15 に対して 12 カ所のアミノ酸置換を追加した結果、FPOX-15 の約 25,500 倍の F6P 反応性を示す、FPOX-42 の造成に成功した。FPOX-42 を用い、プロテアーゼを含まない HbA1c 測定試薬を試作したところ、生理的な濃度域の HbA1c を基質として濃度依存的なシグナルを検出することに成功した。

Diabetes, Hemoglobin A1c, Enzyme engineering

発表責任者：小川徳之（noriyuki.ogawa@kyowa-kirin.co.jp）

発表番号：3J003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 組換えカイコを用いて作製したシロアリセルラーゼ固定化シルクの特性

# Properties of termite cellulase-immobilized silk expressed in transgenic silkworms

炭谷 めぐみ、渡辺 裕文、中島 健一、飯塚 哲也、立松 謙一郎、瀬筒 秀樹、○石橋 純（国立研究開発法人農業生物資源研究所）
Megumi Sumitani, Hirofumi Watanabe, Ken-ichi Nakajima, Tetsuya Iizuka, Ken-ichiro Tatematsu, Hideki Sezutsu, ○Jun Ishibashi (National Institute of Agrobiological Sciences)

【背景・目的】遺伝子組換えカイコを用いて、機能性タンパク質を融合させたフィブロインを発現させることにより機能性シルクの作製が行われている。共有結合は強固な結合であり、融合フィブロインは安定した分子となる。しかし、融合したタンパク質の機能に基質、受容体等の他の分子との相互作用を必要とする場合、立体障害のために十分な機能を発揮できない可能性がある。また、絹糸腺での外来タンパク質の大量発現の報告はあるが、融合フィブロインの場合、発現量は一般的に比較的少量である。これらの問題を解決するために、非共有結合的にシルクに機能性タンパク質を固定化する技術を開発し、昨年度の本大会で報告した。今年度は作製したシロアリセルラーゼ固定化シルクの特性の解析を行った。

【方法】シルク結合ペプチド YN42、EGFP およびシロアリセルラーゼの融合タンパク質を組換えカイコの絹糸腺で発現させることにより得られたシロアリセルラーゼ固定化シルクについて、種々の条件で反応を行い、その特性について解析した。

【結果】シロアリセルラーゼ固定化シルクを可溶性セルラーゼ溶液に入れ、生成する還元糖の濃度を測定した。生成物濃度は一定時間後にプラトーに達した。しかし、シロアリセルラーゼ固定化シルクを取り出し、新たな基質溶液に入れたところ、初期と同等の活性を示し、数回にわたり再利用が可能であった。シロアリセルラーゼ固定化シルクをカラムに充填し、基質溶液をポンプで供給し、溶出液を回収したところ、長期間にわたり反応生成物を連続的に得ることが可能であった。

transgenic silkworm, immobilized enzyme, cellulase

発表責任者：石橋　純（bishiba@nias.affrc.go.jp）

発表番号：3J004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# DNA 結合タンパク質タグを利用した酵素の整列化技術とビーズディスプレイへ応用

# Development of enzyme arrangement on microbeads using DNA and DNA binding tags: application for bead display system

○林 健太、太田 英里、朱 博、兒島 孝明、中野 秀雄 (名大院・生命農・生命技術)
○Kenta Hayashi, Eri Ota, Bo Zhu, Takaaki Kojima, Hideo Nakano (Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ.)

【背景・目的】

我々は、エマルジョン PCR と W/O エマルジョン内での無細胞蛋白質合成系を組み合わせ、磁性マイクロビーズ上に変異蛋白質ライブラリーを作製し、Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)を用いて、機能性生体分子をハイスループットに解析、取得するビーズディスプレイ法を開発している。本研究ではその応用範囲を様々な酵素系に拡大することを目的に、複数の酵素分子を DNA 結合タンパク質とその認識 DNA 配列を利用し、マイクロビーズ上に固定化する系の開発を行った。モデルとして D-amino acid oxidase(DAO)と Horseradish peroxidase(HRP)との連続反応を取り上げ、ビーズ上への両酵素をナノレベルで間隔を制御して固定化し、その連続酵素反応の結果を FACS により解析することを試みた。

【方法・結果】

まず DNA 結合タンパク質タグとして、一本鎖 Cro タンパク質(scCro)とその変異体であり、異なる DNA 認識を示す変異体(scCroM)を、HRP および DAO の C 末端に融合させ、それぞれ活性体として発現できる大腸菌の宿主と培養条件などを検討した。それらの酵素を精製した後、９６穴プレート上に固定化した結合 DNA 配列と精製酵素との結合反応を行い、D-Ala を基質とした DAO/HRP 連続反応を確認した。

同様にマイクロビーズ上に結合 DNA を固定化し、DAO と HRP を結合 DNA を介してビーズ上に配置し、その連続反応を調べた。基質として D-Ala を加え、DAO の反応により過酸化水素が発生する。それが HRP に触媒されてビオチン化チラミドが活性化し、HRP 表面にビオチン化チラミドが共有結合する。それを蛍光標識したアビジンと相互作用させて FACS により検出を試みたところ、DAO を提示していないビーズに比べて DAO を提示したビーズにおいて有意な蛍光シグナルの差が得られた。同様な結果は、DAO を大腸菌無細胞タンパク質合成系により発現させた場合でも観察された。このことはマイクロビーズ上に DAO と HRP を配列できたことを示唆している。

現在本手法を用いて、DAO の変異体のスクリーニングに用いることを試みている。

in vitro molecular evolution engineering, DAO, FACS

発表責任者：林健太（hayashi.kenta@molbiotech-nagoya.org）

発表番号：3J005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 蛍光タンパク質を用いた BACE1 新規 FRET 基質

# Development of the novel FRET substrate for BACE1

○安達 稔[1]、山口 淳一[1,2]、飯田 泰広[1,3]（[1]神奈川工大工、[2]神奈川工大応用化学、[3]神奈川工大応用バイオ）
○ Minoru ADACHI[1], Jun-ichi YAMAGUCHI[1,2], Yasuhiro IIDA[1,3] ([1]Kanagawa Institute of Technology Engineering, [2]Kanagawa Institute of Technology department of Applied Chemistry, [3]Kanagawa Institute of Technology department of Applied Bioscience)

〔目的〕Alzheimer's disease (AD)は脳疾患であり有効な治療法は確立されておらず、原因も未解明であるが、amyloid-β(Aβ)が示す神経細胞毒性によって AD が引き起こされると論じるアミロイド仮説が有力である。その Aβの産生経路は、amyloid precursor protein(APP)が Beta-site APP cleaving enzyme 1{BACE1(β-secretase)}及びγ-secretase によって消化された、Aβペプチドの疎水凝集によって形成される。そこで、産生経路の初期に働く BACE1 の阻害による Aβ産生の抑制が、AD 治療に関する有用なターゲットになると考えられている。Aβ産生の抑制に繋がる BACE1 阻害剤のスクリーニングを行う際に、当該酵素活性を評価する必要があるが、活性の評価には BACE1 と基質特異性を持つ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)基質を用いる事が一般的である。この基質は BACE1 認識配列に FRET 効率の高い蛍光色素を化学修飾しており、蛍光波長の変化によって BACE1 の活性評価している。本研究では、Donor に青色蛍光タンパク質(ECFP)、Acceptor に黄色蛍光タンパク質(EYFP)、Linker に BACE1 認識配列を用いた FRET 基質を構築し、Linker の加水分解の有無による蛍光波長の変化によって、BACE1 の活性評価を目的とした。当該基質はタンパク質による活性評価であるので、*in vivo* で用いることが可能になると考えている。また、*E.coli* に当該基質を発現するプラスミドを形質転換、該当タンパクの産生を行う事で、安価で大量に基質を得る事が可能となり、BACE1 阻害剤のハイスループットスクリーニングに有用な基質になると考えている。
〔方法〕ECFP 及び EYFP を、BACE1 認識配列(βSRS)を付加したプライマーを用いて PCR を行った後、PCR 産物を In-Fusion®を用いて pCold1 にクローニングを行い pCold1-ECFP-βSRS-EYFP を作製した。DH5α に pCold1-ECFP-βSRS-EYFP を形質転換させた後、電気泳動による分子量の確認及び、DNA シークエンスを行い塩基配列の決定をした。得られた形質転換体の発現誘導行った後、超音波破砕によって菌体を溶菌させて His-Trap 精製を行い、SDS-PAGE によって分子量を確認した。精製タンパク質の蛍光スペクトラムを蛍光光度計によって測定した。
〔結果〕pCold1-ECFP-βSRS-EYFP の電気泳動及びシークエンス結果から、目的 DNA 分子量及び塩基配列との一致を共に確認した。また、精製タンパク質の SDS-PAGE 結果から、目的タンパク質分子量との一致が確認出来た事及び、蛍光スペクトルが FRET を示していた事から目的とする基質を得る事が出来たと考えられた。この新規 FRET 基質は BACE1 活性評価用基質として有用と考えられ、BACE1 阻害剤のスクリーニングに用いる事が出来ると考えられる。

Alzheimer's disease, BACE1, FRET

発表番号：3J006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# キトサンおよび臭化シアン活性化セファロースに固定化したパパインによるオリゴチロシンペプチドの合成

# Synthesis of oligo-tyrosine peptides by papain immobilized on chitosan and cyanogen bromide-activated sepharose; Difference between the two supports.

○三橋 純[1]、中山 勉[1,2]、奈良井 朝子[2] ([1]日獣大院 獣生科、[2]日獣大 応生)
○Jun MITSUHASHI[1], Tsutomu NAKAYAMA[1,2], Asako NARAI[2] ([1]Graduate School of Veterinary Medicine and Life Science, Nippon Veterinary and Life Science Univ., [2]Nippon Veterinary and Life Science Univ.)

【目的】
演者らは、パパインが触媒するアシル基転移反応を利用した L-チロシンエチルエステル(Tyr-OEt)の重合について検討してきた。本反応で合成されるペプチドのうち、水溶性の重合度 2～4 のオリゴ Tyr ペプチドには抗高血圧作用や Tyr 供給源としての利用が期待される。これまでに行った反応メカニズムの解析から、高収量のオリゴ Tyr ペプチドを生産するためには、Tyr-OEt の初濃度を低くする必要があることを明らかにした。しかし、パパインを単回使用するペプチド合成では利用効率の低下が考えられるため、固定化酵素の導入を試みた。臭化シアンで活性化したセファロース(CNBr セファロース)に固定化したパパインはペプチド合成反応に利用でき、反応前にジチオスレイトール(DTT)で処理すると活性化することを見出した(2015 年本大会)。そこで、今回はキトサンを固定化担体としてパパインを固定化し、ペプチド合成に利用できるか調べ、また反復利用に対する耐性を CNBr セファロースと比較することを目的とした。
【方法】
CNBr セファロースに固定化したパパイン、またはキトサンにグルタールアルデヒドで固定化したパパインを調製した。未吸着画分のタンパク定量を行い、酵素の吸着量を求めた。酵素活性は *N*α-ベンゾイル-L-アルギニン-4-ニトロアニリドを用いて測定を行い、活性の保持率を算出した。DTT による活性化処理を行った後、pH 6.5 の Tyr-OEt 溶液を添加してペプチド合成を開始した。反応後、遠心分離によって固定化酵素を回収し、上清を RP-HPLC に供して生成物組成を分析した。固定化酵素は洗浄して繰り返し利用した。
【結果と考察】
2 種類の固定化酵素はどちらも約 45%の活性保持率を示した。CNBr セファロースの場合は、白色のゲル状であり、本ペプチド合成反応における反復利用で一定のペプチド収量を維持した。一方、キトサンの場合は、褐色のフィルム状であり、基質が浸透・拡散しにくい性質が認められた。ペプチド合成反応ではフィルムを細かく破砕して利用したが、初回のペプチド合成反応から Tyr-OEt が残存し、反復利用における耐性が低くペプチド収量の低下が顕著であった。酵素の安定性はいずれも同等程度であったことから、Tyr-OEt や生成ペプチドがキトサンあるいは、キトサンに固定化したパパインに対して影響を及ぼしている可能性が示唆された。

immobilized enzyme, papain, peptide synthesis

発表番号：3J007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# *Stenotrophomonas maltophilia* 4A が産生するエステラーゼの特性とその遺伝子

# Characterization and molecular cloning of an esterase produced by *Stenotrophomonas maltophilia* 4A

○奥野 圭祐[1]、朝倉 紗也栞[1]、前田 真美[1]、大浦 麻里[2]、阿野 貴司[1,2]、岡南 政宏[1,2]([1]近畿大生物理工、[2]近畿大院生物理工)
○Keisuke OKUNO[1], sayaka ASAKURA[1], mami MAEDA[1], mari OOURA[2], takashi ANO[1,2], masahiro OKANAMI[1,2] ([1]Kinki Univ., [2]Grad. Sch. Biol. Ortd. Sci. Technol., Kinki Univ.)

【目的】

生分解性プラスチック製農業用品の効率的分解は、農業の環境負荷および従事者負担を軽減するための重要な課題の一つになっている。細菌が産生するエステラーゼは、一般的に動植物が産生する酵素より安定性が高く、生分解性プラスチックの分解への利用が期待できる。我々は、これまでに高いエステラーゼ活性を示す *Stenotrophomonas maltophilia* 4A 株を環境中より単離している。

【方法および結果】

4A 株が産生するエステラーゼについて、様々な誘導条件および様々な反応条件での活性を測定した。その結果、菌体から分泌されるエステラーゼは、25℃、Nutrient Broth で培養すると最も効率良く誘導されることがわかった。基質特異性については $C_{10}$ 基質(*p*NP-decanoate)を最も効率的に加水分解することがわかった。また、この酵素は、pH6 付近に活性のピークが見られ、25～37℃で同程度の活性を示した。この酵素は、60℃で 10 分間処理した後でも 90%の活性が残存し、熱安定性が比較的高いことがわかった。これらの結果は調べた他の菌の中で著しく高い値であった。これらの結果は、4A 株が産生するエステラーゼが農業での利用に適していることを示唆した。そこで、生分解性プラスチックを分解した 4A 培養液の植物の生長に対する影響を調べた。PBS 系生分解性プラスチックを分解した 4A 株の培養液をキュウリの苗に与えたところ、キュウリの生長は全く阻害されなかった。一方、4A 株がもつエステラーゼ遺伝子の単離を試みた。制限酵素によって断片化した 4A 株のゲノム DNA が挿入されたプラスミドを大腸菌に導入し、トリオレインを含む培地で培養した結果、コロニーの周辺にクリアゾーンを形成する形質転換体を得ることができた。本大会では、エステラーゼの特性に加えて、その推定されるアミノ酸配列や発現調節機構についても報告する予定である。

esterase, *Stenotrophomonas maltophilia*, biodegradable plastic

発表番号：3J008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 反応次数感度に基づく阻害および活性化の大きさの判定法

# Judgement of the magnitudes of inhibition and activation effects by means of kinetic-order sensitivities

○山田 正嗣[1]、岩永 征士[2]、シユタサ カンスポーン[3]、平井 優美[3]、白石 文秀[1] ([1]九大院農、[2]九大農、[3]理研環資研)
○Masatsugu YAMADA[1], Masashi IWANAGA[2], Kansuporn SRIYUDTHSAK[3], Masami HIRAI[3], Fumihide SHIRAISHI[1] ([1]Kyushu Univ. Grad., [2]Kyushu Univ., [3]RIKEN)

【目的】細胞内で実際に起こっている大規模代謝反応をミカエリス-メンテン型式を使ってモデリングすることは、多くのパラメーターや反応形式の決定を必要とするため、事実上困難である。本問題を解決するため、演者らはバイオケミカルシステム理論（BST）の利用を検討してきた。本法によれば、代謝マップのネットワーク情報に基づき微分方程式モデルの迅速な構築が可能である。代謝経路の中には、下流の複数の代謝物が上流の同一の酵素反応を阻害したり活性化したりするものがある。このとき、どの代謝物がより強く影響するかを同定することは代謝反応解析の重要な課題の一つである。この目的を達成する方法として、BST の反応次数感度の利用が考えられる。反応次数感度はべき乗則型流束式からなる微分方程式モデル中の反応次数が無限小増加したときの従属変数（代謝物濃度、流束など）の相対的な応答を表し、近年のメタボロームデータ解析において重要な指標となりつつある。しかし、反応次数感度の計算法や計算値の特性はこれまで十分に検討されたことがない。そこで本研究では、まず反応次数感度の計算法の問題点を指摘する。つぎに、正しい計算値が得られるようにその修正を行う。さらに、本法をアスパラギン酸代謝モデルへ適用し、その有用性を明らかにする。
【方法】反応次数感度の計算が正しく行われない原因を究明するため、簡単なべき乗則型式の計算値の特徴を検討した。また、本問題を克服するため簡単な数式モデルを導入し、代謝物濃度のオーダーを mM から$\mu$M へ変化させる方法などを検討した。さらに、確立した方法の有効性を検証するため、アスパラギン酸代謝モデルを導入した。ミカリエス-メンテン型式から構成された微分方程式を、定常状態値において GMA-システム型式へ変換した。得られた反応次数感度をその最大値で割ることにより正規化し、アスパラギン酸の代謝に関わる酵素反応の阻害の大きさを検討した。
【結果】代謝物濃度のオーダーを変更し、その定常状態値を 1 以上とすることにより、べき乗則型式中の反応次数感度計算を正しく行うことができた。また、阻害や活性化に関わる代謝物の正規化した反応次数感度を比較したところ、反応次数の絶対値の大きさだけではどの代謝物が最も強い影響を与えるかを特定できないこと、これは反応が起こる際の代謝物濃度の大きさにも影響されることがわかった。改良法によれば、どの代謝物がより強く阻害または活性化するかを正しく判定することができる。

biochemical systems theory, kinetic-order sensitivities, aspartate metabolic pathway

発表責任者：白石文秀（fumishira@brs.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3J009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 乳酸菌の菌体外多糖類生産における培養工学的検討

# Lactic acid fermentation for extracellular polysaccharide production

○齊田 実紗[1]、大政 健史[2,3] ([1]徳島大院・先端技術、[2]徳島大院・STS 研、[3]阪大院・工)
○Misa Saita[1], Takeshi Omasa[2,3] ([1]Grad. Sch. of Adv. Tech. & Sci., Tokushima Univ., [2]Inst. Tech. and Sci., Tokushima Univ., [3]Grad. Sch. of Eng., Osaka Univ.)

【目的】乳酸菌は、食用乳酸菌摂取時の生理活性として、免疫賦活機能が特に注目され、これには菌体外多糖（EPS：exopolysaccharide）が関係していることが近年明らかになってきている。EPS は乳酸菌によるヒトの免疫システムの活性化に関与しているが、乳酸菌における EPS 生産には未だ解明されていない点がある。そこで、本研究では、乳酸菌(*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*)を用いた多糖類生産に焦点を当て、菌体の詳細な培養経過と Lactose broth 液体培地・スキムミルク液体培地の異なる培地における多糖類生産の解析を行い、さらに、培地中の炭素源が及ぼす多糖類生産への影響を検討した。
【実験材料及び方法】　乳酸菌として、*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus* を用いた。培養は、Lactose broth 液体培地とスキムミルク液体培地中で 37℃にて行った。菌体濃度は、1 時間間隔でサンプルを取得後、寒天平板表面塗抹法を用いて評価した。さらに、Lactose broth 液体培地中で培養した乳酸菌において、乾燥菌体重量を測定し、濁度と乾燥菌体重量の関係を算出した。生産された多糖類の定量は、RI 検出器を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。培地中の炭素源が及ぼす影響については、スキムミルク液体培地中に 20g/L の炭素源(グルコース、スクロース、マルトース、トレハロース、ラクチトール、ラクツロース、アラビノース)を添加し、37℃、18h 培養後、生産された多糖類を、RI 検出器を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより解析した。
【結果及び考察】回分培養を用いて培地による増殖の違いについて検討した結果、本菌株では、実験用に使用する Lactose broth 液体培地と産業生産に近いスキムミルク液体培地では、比増殖速度に大きな違いはなかった。次に、35～50℃の間で培養温度を変化させ回分培養を行い、10 分間隔で増殖曲線を濁度法により解析し、比増殖速度に及ぼす影響を解析した。その結果、35 から 47℃へ培養温度の上昇に伴って比増殖速度が大きくなり、47℃を超えると比増殖速度が低下した。さらに、37℃において Lactose broth 液体培地とスキムミルク液体培地中を用いて乳酸菌を培養し、培養中に生産された多糖類を測定した結果、Lactose broth 液体培地よりスキムミルク液体培地の方が、最終濃度で最大約 7 倍の多糖類を生産していることが分かった。また、培地中の炭素源の添加について解析した結果、今回添加した全ての添加物に対して、培養時間 18h においては、最終生産物濃度に有意差がみられず、糖添加は多糖類生産には影響しないと推定された。

Lactic acid bacteria, exopolysaccharide, cultivation

発表責任者：大政健史（omasa@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

発表番号：3J010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# ヒトヘアケラチンによる中間径フィラメント束の形成

# Intermediate filament bundling in vitro of human hair keratins

○小池 謙造[1]、高田 京[2]、中村 朱里[2]、本田 裕子[3]、佐藤 博[4]、松元 俊彦[2]、安藤 祥司[2] ([1]花王・HC 研、[2]崇城大・生物生命、[3]佐賀大・医、[4]熊本大・理)
○Kenzo KOIKE[1], Miyako Takada[2], Akari Nakamura[2], Yuko Honda[3], Hiroshi Sato[4], Toshihiko Matsumoto[2], Shoji Ando[2] ([1]Kao Corp., [2]Sojo Univ., [3]Saga Univ., [4]Kumamoto Univ.)

毛髪を形成するヘアケラチンは中間径フィラメント（IF）蛋白質ファミリーに属し，ヒトで 17 種類存在する．しかし毛髪形成における個々の蛋白質の具体的な機能は不明である。これまでに私たちはヒトヘアケラチンの type I（K35，K36，K38）および type II（K81，K85）の組換え蛋白質を調製し、その機能解析を行ってきた。今回、ヒトヘアケラチンの K31（type I）と K86（type II）の組換え蛋白質を調製し, 既に調製した上記の蛋白質を含めて試験管内で type I-II 間相互作用と IF 形成特性を解析したので報告する．組換え蛋白質の調製は大腸菌の発現系を用い、精製はイオン交換カラムクロマトを行った。type I-II の相互作用は、4～8 M 尿素存在下，二次元電気泳動を用いて解析した。その結果，毛根における発現時期が近い K31-K81、K35-K85、K36-K86 の組合せは他に比べて安定な複合体を形成することが示された。IF 形成能の解析は、type I と II を等モル混合後、透析により尿素を除き、塩濃度を調整後、電顕観察を行った。その結果、K35-K85 と K36-K86 の組合せは短い IF を形成後，IF が緊密に集合した束を形成した．一方、K81 を type II として用いた組合せは短い IF を形成した。以上から、type II の種類が IF の形態を左右する可能性が示唆された。現在、IF 束の形成に働く type II の構造要素を探るため、K85 と K81 の変異体を作製中である。

Intermediate filaments, human hair, keratin protein

発表責任者：小池　謙造（koike.kenzo@kao.co.jp）

発表番号：3J011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 二官能基性人工アミノ酸を利用したタンパク質コンジュゲートの合成

# Production of conjugated proteins using a doubly functionalized synthetic amino acid

○山口 純[1]、渡邉 貴嘉[2]、芳坂 貴弘[2]、坂本 健作[1]([1]理研 CLST、[2]北陸先端大マテリアルサイエンス)
○ Atsushi YAMAGUCHI[1], Takayoshi WATANABE[2], Takahiro HOHSAKA[2], Kensaku SAKAMOTO[1] ([1]RIKEN, CLST, [2]JAIST, School of Materials Science)

タンパク質を別の分子と結合させる技術は、抗体-薬物結合体などのタンパク質製剤の合成やタンパク質相互作用の解析など、広い範囲で応用されている。近年の非天然アミノ酸導入技術の発展により、結合に有用な化学的特性をタンパク質に容易に付与することが可能となった。クリックケミストリーによる部位特異的な化学修飾や光架橋反応によるタンパク質複合体の安定化がその例であり、これらはそれぞれの用途に適した特殊な官能基をもつ非天然アミノ酸によって達成される。一方で、単一の官能基のみならず複数の官能基を持つ非天然アミノ酸は、多重修飾など複合的な反応を用いるアプリケーションに有用であるが、このような多官能基性の非天然アミノ酸についての報告はまだ少ない。我々は今回、タンパク質コンジュゲートの合成に有用な二官能基性アミノ酸の開発を試みた。メタン生成古細菌などが持つピロリジル tRNA 合成酵素(PylRS)と $tRNA^{pyl}$ は、通常は終止コドンである UAG(アンバーコドン)に対してピロリジンを導入するための天然のアンバーサプレッションシステムであり、アンバーコドンに対して非天然アミノ酸を導入するために有用なツールであることが示されている。この PylRS の変異体で導入する非天然アミノ酸である Z-リジンをベースにして、アジド基とアミノ基をベンゼン環上に持つ二官能基性アミノ酸を設計した。ラクダ科重鎖抗体由来の低分子抗体フラグメント(VHH)でヒト上皮成長因子受容体(EGFR)を抗原とする VHH 7D12 の適切な部位にこの二官能基性アミノ酸を導入し、アジド-アルキン環化反応および芳香族アミン特異的な還元アルキル化を行うことで、One-pot で二種類の化合物を部位特異的に結合させることに成功した。分子量 5 kDa のポリエチレングリコールと蛍光色素 TAMRA を基質として用いた場合の修飾効率は 79%であった。また、アリールアジドの光反応によりリガンドである EGFR の細胞外ドメインに対して光架橋が可能であることを示した。さらに、アミノ基を修飾用残基、アジド基を光反応基として、蛍光修飾した VHH とリガンドとの光架橋が可能であることを示した。これらの結果は、Z-リジンが多官能基性非天然アミノ酸を設計する際の良い分子スキャフォールドになることと、今回開発した二官能基性アミノ酸を利用することで様々なタンパク質コンジュゲートの合成が可能となることを示している。

Synthetic amino acid, Conjugated protein, Protein engineering

発表番号：3J012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# UAG コドンの再定義化株 B95.ΔAΔ*fabR* 株を用いたスルホチロシン含有ヒルジン(sulfo-HV1)の発現

# Synthesis of *O*-sulfo-L-tyrosine incorporated hirudin variant 1 (HV1) in engineered *Escherichia coli* cells with no specific assignment to the UAG codon

○高橋 美穂子、向井 崇人、坂本 健作 (理研・ライフサイエンス技術基盤研究センター(CLST))
○Mihoko Takahashi, Takahito Mukai, Kensaku Sakamoto (RIKEN Center for Life Science Technologies (CLST))

大腸菌は組換えタンパク質生産において広く使われている宿主ホストである。この微生物の系を利用して本来なら細胞には存在しない人工のアミノ酸（非天然のアミノ酸）を導入することによりタンパク質に新規の構造をもたらしたり、機能の向上させたり、タンパク質分子上に目印をつけることが可能になる。本来終止コドンである UAG コドンへの非天然アミノ酸導入は UAG コドンを特異的に認識する tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素を使うことにより可能である。以前、我々の研究室では UAG コドンをストップコドンとして認識する因子である RF-1 を欠損させ、UAG コドンに非天然アミノ酸を効率よく導入することが出来る大腸菌株（RFzero 株）を開発し、ヨードチロシンなどの非天然型アミノ酸やアセチルリジン、Boc モノメチルリジンなどの修飾アミノ酸をタンパク質内の複数カ所に導入してきた。

今回我々はSawitzkeらによるミスマッチ修復機構を利用した方法により大腸菌のBL21(DE3)株内のゲノムの 273 個ある UAG で終結している遺伝子のうち 95 個を他のストップコドンに書き換え、その後、株内の RF-1 を安全に取り除くことにより B95.ΔA 株を作成した。B95.ΔA 株は、25-42℃下、富栄養培地で BL21(DE3)株と同程度の速度で生育することが出来た。B95.ΔAΔ*fabR* 株は B95.Δから派生した低温下と最小培地下で B95.ΔA 株より生育の良い株である。

ヒルジン バリアント 1(HV-1)はヒルが血を吸うときに分泌し、血液凝固に関わる酵素であるトロンビンを阻害することで血液が凝固することを防ぐ抗血液凝固剤ポリペプチドである。この HV-1 の 63 番目のチロシンがスルホチロシンに修飾された sulfo-HV1 はトロンビンへのアフィニティが 10 倍になることが知られている。

B95.ΔAΔ*fabR* 株を用いて、sulfo-HV1 を作成した。BL21(DE3)との株による発現産物の性状比較について報告する。

参考文献

Mukai T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2011, **411**, 757-761
Yanagisawa T., Takahashi M. *et al. ChemBioChem,* 2014, **15**, 1830-1838,
Switzke JA. *et al., J Mol Biol.* 2011, **407**, 45-59

codon reassignment, release factor, *Escherichia coli*

発表番号：3J013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 枯草菌由来リパーゼ LipA の界面活性化に関する機能解析

# Functional analysis of interfacial activation of Lipase LipA from Bacillus subtilis

○高木 良樹、伊藤 貴文、西田 智里、仲上 真由、日ビ 隆雄（福井県大・生物資源）
○YOSHIKI TAKAGI, TAKAFUMI ITOH, CHISATO NISHIDA, MAYU NAKAUE, TAKAO HIBI (Fukui Prefectural Univ.)

【目的】

立体選択的な触媒として有機合成で用いられるリパーゼは、油液界面で活性化される性質を持つことで知られているが、枯草菌由来リパーゼ LipA は表面ループが欠失しており、脂質の加水分解活性は有するものの、界面活性剤による活性化は起こさないとされてきた。しかし、我々は最近、この LipA が界面活性剤 Tween80 で活性化されることを見出し、界面活性化にかかわる部位が本酵素の分子表面にあるものと推測した。そこで、リパーゼ活性化の基盤技術の開発を目指して、タンパク質分子表面に存在するループ中のアミノ酸残基を置換し、リパーゼの界面活性化やその立体選択性との関係について解析することにした。

【方法・結果】

*Bacillus subtilis* 由来リパーゼの結晶構造に基づいて、表面に存在するループ構造の根元ヒンジ部分に位置するアミノ酸残基 5 ヶ所を抽出した。調製した発現プラスミドを鋳型として、抽出したアミノ酸残基に対して部位特異的な飽和変異 (変異部位に対して NNN となるようなプライマーを作製) を行い、大腸菌 BL21Gold(DE3)を形質転換することで、変異体ライブラリーを作製した。変異体ライブラリーからコロニーを選抜し、ディープウエルプレートを用いて培養した。培養菌体から、タンパク質を抽出後、4-nitrophenyl butyrate を基質として活性の高い変異体を選抜した。スクリーニングの結果、野生型よりも比活性が有意に 20%増加した変異体として R147Y が取得された。0.5 μg/ml 酵素溶液に 0.1%(w/v) となる様に Tween80 を添加した場合、界面活性剤非添加時に比べて野生型 LipA の比活性が 150%増加したのに対して、R147Y では 20%の増加となり、本変異体酵素は、野生型酵素と比べて、界面活性剤による影響を受けにくいことが示唆された。また、高活性化した本変異体の熱安定性を Thermal shift assay によって評価したところ、構造表面のアミノ酸残基の変異は熱安定性に大きな影響を与えなかった。現在、本変異が立体選択性に与える影響について解析を行っており、その結果についても報告する予定である。

Lipse, surfactant, enatioselectivity

発表責任者：日ビ隆雄（hibi@fpu.ac.jp）

発表番号：3J014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 可溶化 *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素の大腸菌スクリーニング系の構築

# Development of *E. coli* screening system for the solubilizable *cis*-aconitate decarboxylase

○村上 諒、永田 圭介、小原 仁実、麻生 祐司（京都工繊大院）
○Ryo MURAKAMI, Keisuke NAGATA, Hitomi OHARA, Yuji ASO (KIT)

【目的】ビニルモノマーであるイタコン酸は *Aspergillus terreus* により発酵生産される。*A. terreus* においては TCA 回路中間体である *cis*-アコニット酸が *cis*-アコニット酸脱炭酸酵素 Cad により脱炭酸しイタコン酸が生成する。これまでに発表者らは、*Escherichia coli* において Cad を高発現させイタコン酸の生産を行ってきた(1)。しかし、*E. coli* において Cad は高発現させることで容易に封入体を形成するため、イタコン酸生産性は約 4 g/L と低いことが課題となっている。そこで本研究では、Cad にランダム変異を導入し、*E. coli* で高発現 Cad を可溶化させることを試みた。実験に先立ち、LacZα をレポータータンパク質として用い、Blue/White selection に基づき Cad の可溶化度を *E. coli* でスクリーニングする手法の確立を行った。

【方法】*A. terreus* 由来 Cad と *E. coli* 由来 LacZα を融合タンパク質として発現するように、発現ベクターpET-19b の T7 promoter 下流に *cad-lacZα* を in-frame でクローニングし、pET-19b-cad-lacZα を作製した。これを用いて *E. coli* KRX を形質転換し *E. coli* KRX（pET-19b-cad-lacZα）を得た。KRX は *lacZω* を有し、また、T7 RNA polymerase をラムノース添加で発現誘導できることから、ラムノース添加の有無により Blue/White selection に基づき Cad の可溶化度をアッセイすることができる。得られた *E. coli* KRX（pET-19b-cad-lacZα）を 0.125% X-gal、0.1% IPTG、0～0.1% ラムノース添加 LB 寒天培地に塗布後、37℃、18～36 h 培養しコロニーの色を確認した。また、0.1% IPTG、0～0.1% ラムノース添加 LB 液体培地に接種後、37℃、18 h 培養し菌体を SDS-PAGE に供することで Cad の発現量を確認した。

【結果と考察】制限酵素処理およびコロニーPCR より、pET-19b-cad-lacZα の作製を確認した。*E. coli* KRX（pET-19b-cad-lacZα）を 0.125% X-gal、0.1% IPTG、0.1% ラムノース添加 LB 寒天培地で培養した結果、コロニーは 18 h 培養後に白色、36 h 培養後に青色を示した。一方、ラムノース非添加の培地で培養した結果、18 h 培養後に青色を示した。また、SDS-PAGE で Cad の発現量を確認したところ、ラムノース添加により Cad が高発現することが確認された。よって、Blue/White selection に基づき Cad の可溶化度を *E. coli* でスクリーニングできることが示された。今後は、Cad にランダム変異を導入後、本手法を用いて高発現 Cad でも可溶化する変異 Cad を選抜し、これを *E. coli* で高発現させることでイタコン酸の高生産株の作製を試みる。

(1) S. Okamoto et al., J. Gen. Appl. Microbiol., 60 (5):191 (2014)

itaconic acid, *cis*-aconitate decarboxylase, screening

発表責任者：麻生祐司（aso@kit.ac.jp）

発表番号：3K001
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# ハートカット GC と酸化物半導体センサを組み合わせたオミッションテストによる香気分析

# Identification of key odorants from complex odor sources by the omission test using a heart-cutting gas chromatograph and an electronic nose

○三津谷 尭史[1]、喜多 純一[2]、山下 哲郎[1]、宮崎 雅雄[1] ([1]岩手大学院農学研究科、[2]島津製作所)
○Akihito MITSUYA[1], Jun-ichi KITA[2], Teturou YAMASHITA[1], Masao MIYAZAKI[1] ([1]Iwate Univ., [2]Shimadzu corporation)

我々が感じるにおいは、様々な揮発性物質が複雑な組成で混ざり合った複合臭である。よって、例えばにおい嗅ぎガスクロマトグラフ（GC）で個々の物質が単体でどのようなにおいを持つか明らかにできても、複合臭になった時にどの物質がにおい質の形成に寄与しているか分からない。つまり単体ではにおいを感じることが出来る物質でも、複合臭の一構成成分となった場合、その物質が抜けても全体のにおい質が変化しない場合もある。そこである物質が複合臭のにおい質の形成に寄与するか調べる方法としてオミッションテストがある。これは、試料ヘッドスペースガス等の GC 分析結果に基づいて標品を混合して複合臭を再現し、その複合臭とある物質のみ抜いた標品混合物で作った複合臭を嗅ぎ比べてにおい質の変化の有無を調べる手法である。ある物質を抜いた際のにおい質がすべての物質を含む複合臭から変化した場合、抜いた物質が複合臭のにおい質形成に寄与していることが分かる。よって複合臭を構成する全ての物質でオミッションテストを実施することができれば、複合臭のにおい質形成に寄与する物質を同定することが可能になると考える。このようなオミッションテストを実施するためには、対象となる複合臭の構成成分を同定し、再構築するための標品を準備する必要がある。しかし GC 分析で複合臭の構成成分をすべて同定するのは非常に難しく、また同定できたとしても市販されていない物質もあるので、標品を使ったにおいの再構築も容易ではない。更に複合臭の構成成分は一般に複雑なので、評価する物質が多くなった場合、どの物質から抜いて評価していくか、その順位付けも難しく、現状で候補物質を別な手法で絞り込むことなくオミッションテストを実施することは様々な問題点を解決する必要がある。そこで本研究ではハートカット GC でオミッションテストの試料を調整し、酸化物半導体センサで各試験試料のにおい質を数値化して、どの物質を抜いた時に元の複合臭からにおい質が大きく変化するか、客観的に順位付けすることが可能か検証したので報告する。ハートカット GC は流路を 2 つの経路に切り替えることができるので、GC で分離された物質を MS 側とガス回収部側に適宜切り替えることにより化合物の化学構造が同定できるか否か関係なく、オミッションテスト用の試料が作成できるようになった。ハートカット GC で調整した試料を 10 個の酸化物半導体センサを有したにおい識別装置で分析することで、各試料のにおい質を 10 次元上にベクトル表示することができた。すべての物質を含む複合臭の分析結果から得られたベクトルと、各物質を抜いて得られた測定結果で得られたベクトル間の角度を比較することで、抜いた際に大きくにおい質が変化する可能性のある物質を推定することが可能となった。よってハートカット GC と酸化物半導体センサを組み合わせたオミッションテストは、複合臭の形成に寄与する化合物の客観的な探索法として有効である可能性が示唆された。

Omission test, Heart-cutting GC, Electronic nose

発表番号：3K002
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 電界効果トランジスタ（FET）センサを用いたソバ 16kD アレルゲンタンパク質 の非標識高感度検出

# Label-free and highly sensitive detection of buckwheat 16kD allergenic protein with field effect transistor (FET) sensor

○原田 義孝[1]、綱 美香[1]、藤田 圭祐[3]、秀島 翔[2]、黒岩 繁樹[2]、中西 卓也[2]、逢坂 哲彌[2,3] ([1]日本製粉(株)中央研究所、[2]早稲田大学ナノ理工学研究機構、[3]早稲田大学先進理工学部)
○ Yoshitaka HARADA[1], Mika TSUNA[1], Keisuke FUJITA[3], Sho HIDESHIMA[2], Shigeki KUROIWA[2], Takuya NAKANISHI[2], Tetsuya OSAKA[2,3] ([1]Central Laboratory, Nippon Flour Mills Co., Ltd., [2]Research Organization for Nano & Life Innovation, Waseda Univ., [3]Graduate School of Advanced Science and Engineering, Waseda Univ.)

電界効果トランジスタ(Field Effect Transistor; FET)センサは、ゲート表面に固定化された捕捉物質に、電荷を有する物質が結合する際の電荷の変化を、閾値電圧の変化から計測する。これまで、インフルエンザウイルス等を、非標識で高感度に検出できることが報告され、様々な分野での計測への応用が期待されている。今回、この技術を使った食物アレルゲンの計測を、ソバ(*Fagopyrum esculentum*)の主要アレルゲンの一つである、16kD タンパク質(BWp16)モデルに検討した。

FET のゲート表面に、3-アミノプロピルトリエトキシシランの単層膜を形成し、そこにグルタルアルデヒドを介して抗 BWp16 抗体の抗原結合性フラグメント(Fab)を固定した。これをセンサに用いて、BWp16(組換え品)の検出を試みた。その結果、BWp16 の同抗体への結合に基づく閾値電圧の変化を検出することができた。しかしその感度は既存の ELISA 等に比べて低く、また FET センサを使った、他の物質のこれまでの計測結果と比較しても、不十分なものであった。これは、測定環境(pH 7.4)において、BWp16(等電点 5.2、分子量 15,106)が十分な電荷を持ち得ないためと考えられた。

そこで、BWp16 の電荷を増加させるため、同タンパク質をイオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)処理して負電荷を付与し、検出用試料とした。その結果、BWp16 の検出感度の大幅な向上が図られ、1 ng/ml の BWp16 の計測が可能となった。また、BWp16 の濃度と FET センサの閾値電圧変化量の大きさには、相関が見られた。さらに、ソバ種子の抽出液からの BWp16 の検出も確認され、SDS 処理が同タンパク質の検出に有効であることが示された。

SDS 処理という簡便な方法で、計測対象タンパク質に電荷を付与することで、FET センサを使った計測の感度の向上を図れることから、同計測技術の食品分野を含めた、さらなる応用展開が期待される。

field effect transistor biosensor, food allergen, label-free

発表番号：3K003
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# ほだ木中のシイタケ成育過程の MRI による追跡

# Tracing growth of Siitake mycelium and formation of fruit body in natural logs

田中 秀弥[1]、八島 武志[2]、○石田 信昭[1] ([1]石川県大食品、[2]石川農林総研)
Hideya Tanaka[1], Takeshi Yashima[2], ○ Nobuaki Ishida[1] ([1]Ishikawa Prefectural Univ., [2]Ishikawa-ken Forest Exp. Sta.)

シイタケはシイタケ菌の菌糸体から作られる子実体（キノコ）を食用として利用しているものである。もとは倒木に生える菌であり、コナラなどの木を伐採してそこに菌を植え付けたほだ木による栽培がはじめられたが、現在はやおが粉や栄養物などから作られた培地(菌床)で栽培されることが多い。シイタケの生育は樹皮の下やおが粉の中で進むため観察が難しく、菌糸体から原基を経て子実体が形成される過程は不明な点が多い。ここでは MRI を用いて外からでは観察することのできない、ほだ木中のシイタケの生育を追跡することを試みた。

【試料】冬に伐採し乾燥させて枯死させた径７～８ｃｍのコナラの木を長さ１ｍにカットし、4 月に向かい合う 2 か所に８ｃｍ間隔で交互に穴をあけ、シイタケ菌(菌興 115 号形成菌)を植え付けたものを試料とした。MRI の測定は、磁場強度 0.2 テスラの永久磁石に径 10.5cm の検出器を備えた、小型 MRI 装置(MR テクノロジー製)を用い、３D スピンエコー法(TE=7ms)を用い、データマトリックス 256x128(画像マトリックス 256x256)、32 スライスで断面画像の測定を行った。

【結果】水を含ませてシイタケ菌の生育に適した水分 30%以上の木の MRI では、内部の木目構造を見ることができたが、表面の樹皮ははっきり見ることはできなかった。木に穴をあけて打ち込んだシイタケ形成菌はほとんどイメージを与えなかった。１～2 カ月後に木の内部で菌糸が維管束に沿って生育し、切り口から菌糸が少し見えるようになったが、MRI では生育していくほだ木内部の菌糸の状態は捉えることはできなかった。さらに生育が進むと、うち込んだ形成菌の周辺に小さな明るい固まりができてくるのが MRI で捉えられた。形成菌の発砲スチロールをとってみると、白い菌糸の集合と原基と思われる小さな固まりを観察することができた。MRI では菌糸の集合はほとんど観察されず、原基が形成されると小さな固まりとして検出されると思われた。また、子実体となって発砲スチロール内部で成長を始めているところを捉える事ができた。通常、植菌後１年目のほだ木では植菌した箇所から子実体が発生するが、MRI による観察結果でもこのことが確認できた。

MRI を用いることにより、ほだ木内部におけるシイタケ菌の原基形成と、子実体の成長を捉える事が可能であった。

Shiitake, natural logs, MRI

発表責任者：石田信昭（n-ishida@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：3K004
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# メタボロミクス技術による成分基本台帳整備と食品研究への応用

# Construction of references for identification of small molecules by metabolomics and their applications to food sciences

○櫻井 望、秋元 奈弓、須田 邦裕、池田 千晶、小澤 馨史、花野 滋、宗藤 玲子、山田 学、柴田 大輔（かずさ DNA 研）
○Nozomu Sakurai, Nayumi Akimoto, Kunihiro Suda, Chiaki Ikeda, Keishi Ozawa, Shigeru Hanano, Reiko Muneto, Manabu Yamada, Daisuke Shibata (Kazusa DNA Res. Inst.)

低分子化合物を網羅的に検出するメタボローム解析は、基礎生物学のみならず、医薬学分野、食品学分野などでも応用が期待されている。質量分析装置により、数千種類の化合物がピークとして高感度に検出できる一方で、化合物の同定は、依然難しい課題として残されている。我々は同定率の向上を目指して、1）リファレンスとしての植物成分基本台帳整備と、2）経験知とバイオインフォマティクスを融合させたフラボノイド同定システムの開発を進めてきた。これらの技術を食品解析に応用した例として、3）醤油成分の解析を行ったので報告する。

1）植物の基本台帳整備：　多様な二次代謝産物を生産する植物を用いて、可能な限り詳細な同定・推定情報（アノテーション）を付与することで、植物サンプルを化合物同定のリファレンスにできる。安定同位体を使って水耕栽培した植物を用い、質量分析で窒素・硫黄の数を正確に評価することで、組成式の推定を大幅に向上させた。分析条件の組み合わせを工夫し、構造決定の鍵となる MS2、MS3 スペクトルの網羅性を高めた。さらに、高品質なアノテーションを付与するため、目視によるデータ確認・修正を迅速に行えるツール群を整備した。

2）フラボノーム解析：　抗酸化作用や抗がん作用などの機能を持つものが多いフラボノイド類は、天然界に約 7000 種類が知られているが、質量分析によるフラボノイドの同定では、専門知識を持った研究者がマススペクトルの解読を行なう必要があり、自動化が困難であった。我々は、予め専門知識を用いて、出現するマススペクトルを予測し、それをデータベース化することで、約 4500 のフラボノイドを判別できるデータ解析システムを開発した。このシステムを用いてフラボノイドの網羅的な解析（フラボノーム解析と呼ぶ）を行ったところ、ありふれた野菜の中にも未知の構造を持つフラボノイドが多数含まれることなどを見いだした。

3）醤油成分の解析：上記技術を用いて市販の醤油を分析したところ、各メーカーによって成分に特色があることが分かった。大規模製法と伝統的な製法との違いに着目して、成分の特徴解析を進めている。

metabolomics, flavonoids, soy sauce

発表責任者：櫻井望（sakurai@kazusa.or.jp）

発表番号：3K005
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 質量分析イメージング法を用いたトマト果実の生理応答に対する代謝動態解析

# *In situ* metabolomic imaging for physiological responses in the tomato fruit using MALDI-MS

○中村 純也[1]、一瀬 智美[2]、早川 英介[2]、藤村 由紀[2]、割石 博之[1,2,3]、三浦 大典[2] ([1]九大院生資環、[2]九大レドックスナビ、[3]九大基教)

○Junya NAKAMURA[1], Tomomi ICHINOSE[2], Eisuke HAYAKAWA[2], Yosinori FUJIMURA[2], Hiroyuki WARIISHI[1,2,3], Daisuke MIURA[2] ([1]Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci, Univ., [2]ICMRN, Kyushu Univ., [3]Fac. Arts. Sci., Kyushu Univ.)

**【緒言・目的】**近年、植物体内の代謝物の挙動を包括的に捉え、ゲノム情報だけでは解明できない生命現象を理解することを目指した植物メタボロミクス研究が盛んに行われている。特に果実は果皮や種子等の複雑な構造を有しており、部位特異的な代謝変動が生じていると考えられる。果実内の局所的な生理現象を詳細に理解するためには空間的かつ定量的な情報が必要となる。そこで我々は生体分子の *in situ* マッピング法であるマトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）法による質量分析イメージング（MSI）技術に着目した。本研究では世界で最も食される農作物の 1 つであり、かつ果皮、種子、ゼリー質等の複数の部位を持つトマト果実をサンプルとし、果実の成熟過程や傷害応答による空間的な代謝変動を理解すべく、MALDI-MSI 分析による代謝物空間分布の可視化を試みた。

**【材料および方法】**本研究ではトマト果実薄切片（切片厚 10 μm）に対し、エアーブラシを用いたスプレーコーティング法でイオン化助剤であるマトリックス（9-aminoacridine あるいは 2,5-dihydroxibenzoic acid）を塗布し、AXIMA-Confidence（島津製作所）にて MALDI-MSI 分析に供した。代謝物同定は AXIMA-QIT（島津製作所）にて果実と標品由来のフラグメントスペクトルおよびデータベース（Massbank、METLIN 等）との比較により行った。

**【結果および考察】**成熟トマト果実薄切片に対する MSI 分析の結果、1 度の分析で一次代謝や二次代謝に関与する複数の代謝物分布同時可視化に成功した。また、MSI 分析の結果は LC-MS や GC-MS 等の既存の分析技術を用いて得られた結果と同様の傾向を示すことが明らかになった。このことから、MSI 分析はトマト果実内の代謝物の空間情報を取得可能な技術であると考えられた。

次に成熟果実で使用した技術を用いて未熟果実と成熟果実の二者間における代謝物分布の比較を行った。その結果、成熟過程で増減する有機酸（リンゴ酸）や旨味成分（グルタミン酸、AMP）の分布可視化に成功した。さらに傷害ストレスによって傷害部周辺にトマチンが特異的に蓄積することが明らかとなった。この現象は傷害部周辺でトマチン分解が抑制された結果、抗菌物質であるトマチンが蓄積することで生体防御に寄与することと推察された。

以上の結果から MSI 分析は果実の局所的な代謝変動を可視化するために有用な技術であることが示された。今後、未解明な植物の生理・形態学的基盤情報の提供を通して、生理現象の理解に貢献できると考えられる。

metabolomic imaging, physiological responses, tomato fruit

発表責任者：三浦大典（daipon@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：3K006
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# デュアルフィルトレーションを用いた細菌検査試料前処理法の開発(第 2 報)

# Development of dualfiltration system for pretreatment at bacteriological operation - the second report

○種田 明子、金政 真（中部大応生）
○Akiko Taneda, Shin Kanamasa (Chubu Univ.)

【目的】

食品流通の現場では、安全性の確保の要求を背景に、微生物をより迅速かつ精度よく検出する手法が求められている。さまざまな検出法が研究開発されて、実用化が進められているが、試料中の微生物をより効率的に検出するためには、試料を濃縮して微生物の濃度を高める前処理法の開発が急務となっている。我々は、細菌検査試料液の濃縮法として、2 つのフィルタを用いたろ過式濃縮システムを考案し、操作が簡便で高精度なろ過式濃縮装置試作機の開発を、（公財）科学技術交流財団が愛知県からの委託により実施中の産学行政連携の共同開発プロジェクト『「知の拠点あいち」重点プロジェクト　食の安心・安全技術開発プロジェクト（P2)』にて、（公財）科学技術交流財団、（株）槌屋、中部大学の共同で進めた。昨年の本会大会では、2 つのディスク型フィルタを用いた水試料の細菌濃縮法について報告を行った。今回は、主に各種固形食品の検査試料の濃縮条件検討を行い、残渣の多い食品であっても残渣除去にディスク型、細菌捕捉に中空糸型の 2 つのフィルタを連係して用いることにより、効率よく細菌を濃縮することができたことを報告する。

【方法・結果】

ミネラルウォータ並びにキャベツ及びワカメの細菌検査用懸濁液に大腸菌を添加して試料液とし、ろ過式濃縮装置試作機を用いて分離濃縮処理を行い、大腸菌濃縮液を得た。濃縮液中の生菌の回収率により濃縮効率を評価した。ミネラルウォータでは、残渣を除去する 1 次フィルタとしてディスク型ナイロンネットフィルタ(網目 10 μm)を、細菌を捕捉する 2 次フィルタとしてディスク型親水性 PTFE フィルタ(孔径 0.45 μm)を用いて条件検討を行い、得られた 10 倍濃縮液の生菌回収率は 90%以上と良好であった。キャベツ及びワカメ懸濁液では、1 次フィルタとしてディスク型デプスフィルタ(ろ過精度 20-30 μm)、メンブレンフィルタ(孔径 8-10 μm)等を、2 次フィルタとして中空糸型フィルタモジュールを用いて条件検討を行い、得られた 10 倍濃縮液の生菌回収率は 90%以上と良好であった。

本ろ過式濃縮装置試作機を用いることで、流路の充填、試料液の送液、試料液の 2 次フィルタへの洗い込み、逆流洗浄による細菌濃縮液の回収を、簡便に精度よく行うことが可能となり、各種食品試料の濃縮処理で良好な生菌回収率が得られた。

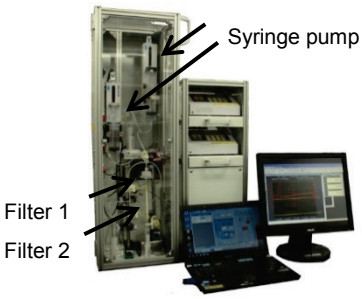


Fig. Construction of Prototype Dualfiltrate Concentrator

bacteriological operation, dualfiltration system, concentration

発表責任者：金政　真（kanamasa@isc.chubu.ac.jp）

発表番号：3K007
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 新規微生物微小コロニー染色法の開発

# Development of novel bacterial micro-colony staining method

○海谷 慎一[1]、中内 茂樹[2] ([1]豊橋技科大 環境生命工、[2]豊橋技科大 情報知能工)
○Shinichi KAIYA[1], Shigeki NAKAUCHI[2] ([1]Dept. of Environ. and Life Sci., Toyohashi Univ. of Tech., [2]Dept. of Computer Sci. and Engineering, Toyohashi Univ. of Tech.)

【目的】現在食品中の微生物数を調べる手段として、寒天平板培地上へ検査試料を塗布し、コロニー形成能を持つ微生物数をカウントする平板培養法が広く用いられている。しかしながら、平板培養法は微生物コロニーが肉眼で識別できるまでに長時間の培養期間を要することが問題点として挙げられている。これまでに我々は「知の拠点あいち」重点研究プロジェクトにおいて、微生物微小コロニーを高感度かつ非殺菌的に観察するための検査装置を設計・製作した。今回この装置を利用して、寒天平板培地上に直接生育した微生物微小コロニーを、非殺菌的かつ染色液による微生物コロニーの溶解による汚染を起こさずに染色する被覆染色法を提案し、その有用性を検証した。
【方法】モデル微生物として大腸菌および乳酸菌を用いて実験を行った。測定対象である微生物微小コロニーは、大腸菌については標準寒天培地上で 4 時間程度培養を行い、乳酸菌については MRS 培地上で 24 時間程度の培養を行うことで調製した。メンブレンフィルタ培養を行う際は 0.45 μm 孔径セルロース混合エステル系メンブレンを用いた。プレート上で菌を直接培養する際は、希釈した菌液を用いたミスラ法を使用した。染色剤には生菌検査用の微生物蛍光染色剤および蛍光色素で標識した抗微生物抗体を使用した。微生物微小コロニーの蛍光染色は、コロニーの上面部より染色液で湿潤したメンブレンを被覆する被覆染色法により行った。
【結果・考察】被覆染色用メンブレンとして 0.2 μm 孔径親水性 PTFE 製メンブレンを、染色剤として高波長の蛍光をもつテトラゾリウム塩系の微生物蛍光染色剤を用いることで、寒天平板培地上に生育した直径 100 μm 以下の乳酸菌の微小コロニーを観察可能であり、さらに観察後に被覆したメンブレンを取り除いて釣菌できることを確かめた。抗体による微生物微小コロニーの染色は、一般大腸菌と病原大腸菌 O157 を混合してメンブレンフィルタ培養を行った微生物微小コロニー群に対して行い、異なる蛍光波長を持つ微生物蛍光染色剤と蛍光標識 O157 抗体の同時染色により、それぞれの微生物微小コロニーを判別可能であることを確かめた。また、微生物蛍光染色剤と抗体が同一の蛍光波長を持つ場合も、抗体、染色剤の順で二度染色を行うことでコロニーの判別が可能だった。これらの結果は、被覆染色法が、微生物コロニーの溶解を起こさずに微生物コロニーと染色液を反応させることが可能であり、尚且つ蛍光の波長や染色のタイミングを変えることで同じ検体に対して複数の染色剤を使用することができる、微生物微小コロニーの迅速検査や抗体検出をする際に有用な手法であることを示している。

bacteria, microcolony, colony staining method

発表番号：3K008
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 近赤外蛍光を利用した食中毒菌の検出方法の確立と装置開発

# Development of method and equipment for detecting food-borne microorganisms by using Near Infrared Fluorescence

○田中 和裕[1]、加藤 晃代[2]、海谷 慎一[3]、三宅 司郎[4]、渕 真悟[5]、中野 秀雄[6]、田村 廣人[1]([1]名城大農、[2]（公財）科技財団、[3]豊橋技科大 環境生命工、[4]（公財）京都高度技術研究所、[5]青山学院大学 理工学部、[6]名大院生命農)
○Kazuhiro TANAKA[1], Teruyo KATO[2], Shinichi KAIYA[3], Shiro MIYAKE[4], Shingo FUCHI[5], Hideo NAKANO[6], Hiroto TAMURA[1] ([1]Meijyo Univ., [2]Aichi Science & Technology Foundation, [3]Toyohashi Univ. of Technology, [4]Advanced Science,Technology & Management Reserch Institute of KYOTO, [5]Aoyama Gakuin Univ., [6]Nagoya Univ.)

【背景・目的】
食品の安心・安全の要請が強まる中で、迅速かつ高精度に食中毒菌を検出可能な方法が望まれている。知の拠点あいち重点研究プロジェクトでは、食中毒菌を非培養にて検出する新規な技術および装置開発を目指している。今回はその過程で得られた成果を報告する。

【方法】
特定菌に対する親和性を有する生体プローブ（抗体）と、近赤外領域における蛍光を発するガラス粒子を化学修飾により連結させ生体標識剤とした。まず、抗体が標識された基板上に試料を作用させ、特定菌を捕捉する。これに前記生体標識剤を作用させ、洗浄する。そこに励起光を照射して近赤外領域の蛍光を誘起する。そして、その蛍光に基づいて特定菌を検出する。
まず、上記原理による検出を可能とする２つの装置を試作した。１点目は、強力な励起エネルギーを生じるレーザーを励起光源として、測定試料をＸＹ両方向に数μｍピッチにてスキャンできる機構とした装置である（スキャンタイプ)。２点目は、安価なＬＥＤ励起光源を用い、近赤外光に対して高い受光効率を有するカメラによる一括撮影方式が可能な装置である（エリア検出タイプ)。これらを用いて特定菌の検出を検討した。

【結果】
市販顕微鏡により、作製した生体標識剤が特定菌体に結合することを確認した。開発した２つの装置を用いて評価したところ、スキャンタイプにおいては、分光器にて得られた近赤外領域の蛍光のみをソフト的に抽出する事で、数μｍ程度の蛍光粒子１個（食中毒菌）の検出が可能となり高精度な蛍光検出が確認できた。また、エリア検出タイプでは、高解像カメラにて得られた画像を、新たに開発したソフトで処理し蛍光カウントする事で、簡便で迅速な蛍光検出が定量的にできる事を確認した。

【結論】
抗体と近赤外蛍光ガラス粒子を用いた食中毒菌検査技術を開発し、それを可能とする新規な検査装置を開発する事に成功した。

＜装置開発例＞ 

＊謝辞：装置開発には（株）槌屋様の協力を得ました

food-borne microorganisms, Near Infrared Fluorescence, detecting

発表責任者：田中 和裕（JP20000031@chinokyoten.pref.aichi.jp）

発表番号：3K009
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 希少糖を用いた酸化グラフェンの還元および機能性の付与

# Reduction and functionalization of graphene oxide using rare sugars

小堺 悠可[1]、平田 圭亮[1]、内田 貴司[1,2]、中島 義賢[1,2]、○水木 徹[1,2] ([1]東洋大、[2]東洋大バイオナノセンター)

Haruka KOZAKAI[1], Keisuke HIRATA[1], Takashi UCHIDA[1,2], Yoshikata NAKAJIMA[1,2], ○Toru MIZUKI[1,2] ([1]Toyo Univ., [2]BNERC)

近年、医療分野やバイオ・ナノ融合分野において、機能性微小マテリアルを利用したバイオセンサやドラッグデリバリ-システム、検査用微小デバイスの開発、ハイパーサーミアを用いたがん治療などの研究が盛んに行われている。本研究では高い生体適合性を有する新規機能性ナノ材料として希少糖を付与した酸化グラフェンを作製し、その物性、表面特性、生体への影響を解析することを目的とした。希少糖とは自然界での存在量が微量な単糖であり、糖ごとに多種多様な機能を保持している。

本研究では希少糖としてキシリトール、D-リボース、D-アロースの三種類を用い、比較対象として D-グルコースを用いた。希少糖溶液を GO 懸濁液と混ぜ、アルカリ環境下で一時間加熱することで還元を行うと同時に希少糖修飾された GO（以降希少糖-RGO）を得た。純水で洗浄・再懸濁後、物性、表面特性、生体への影響の解析を行った。

希少糖-RGO の表面解析を行うために X 線光電子分光法（XPS）、ラマン分光法、紫外・可視光分光法（UV-vis）を用いて測定した。XPS 解析を行った結果、希少糖-RGO では GO と比較して C=O 結合が減少する一方で、C−O 結合の比率が増加傾向にあることが確認できた。これは GO 還元と同時に GO 表面の側鎖に水酸基を多く保有する糖が修飾した可能性を示している。ラマン分光法の結果、D-アロース-RGO において G/D 比が GO と比較して大幅に上昇していた。また UV-vis の結果を見ると作製した希少糖-RGO の最大吸収波長は GO の吸収波長よりも長い波長へシフトしていた。これらの結果は GO が還元されたことを示している。

一方、生体適合性を確認するために希少糖-RGO がバクテリアの増殖へ及ぼす影響を解析した。大腸菌 *Escherichia coli* および枯草菌 *Bacillus subtilis* の培養液に希少糖、GO、希少糖-RGO を加えて振とう培養し、OD monitor を用いて生育曲線を作製した。D-アロースおよび D-アロース-RGO は大腸菌の増殖を抑制していることが確認された。

また、希少糖-RGO の赤血球に対する溶血活性を解析した。GO 単体は高い溶血性を示したが、希少糖および希少糖-RGO は溶血性が極端に低くなっていた。希少糖が GO の溶血活性を阻害した可能性が示された。

Rare sugar, Graphene oxide

発表責任者：水木　徹（mizuki@toyo.jp）

発表番号：3K010
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 多世代進化工学による転写スイッチの高性能化

# Multi-round laboratory evolution of transcription factors for high ON/ OFF ratio

○木村 友紀、大野 琢也、河合（野間） 繁子、斎藤 恭一、梅野 太輔（千葉大院・工・共生応化）
○Yuki KIMURA, Takuya OHNO, Shigeko KAWAI (NOMA), Kyoichi SAITO, Daisuke UMENO (Dept. Appl. Chem. Biotech., Chiba Univ.)

【目的】 リガンド応答型の転写因子タンパク質は，タンパク質や代謝経路など，さまざまな遺伝子機能の発現誘導ツールとして使うことができる。一般に，リガンドとの結合によって転写因子タンパク質と標的配列(オペレータ配列)との結合定数が変化することにより，転写スイッチの ON/ OFF 状態が変化する。誘導状態(ON 状態)における出力の高さと非誘導状態(OFF 状態)における緊縮性を両立するためには，この結合定数差を極めて高くする必要があるが，それを合理的な設計によって実現した例はない。そこで本研究では，多世代にわたる進化工学サイクルによって，幾つかの転写スイッチの ON/ OFF 比を向上させる試みを行った。

【方法・結果】 アクチベータ型転写因子 LuxR および AraC，リプレッサ型転写因子 BetI をターゲットとし，それらの遺伝子全域へランダム変異を導入してライブラリを作製した。われわれが開発した遺伝子スイッチの高速進化工学法(Tominaga, et al., PLoS One, 10 (3), e0120243 (2015))を用い，さまざまな選択条件で多世代進化工学を行った。いずれにおいても，野生型の転写因子よりも高い ON/ OFF 比を示す変異体を獲得することができた。興味深いことに，得られた変異体の多くは，その安定性が低下しており，細胞内における実効濃度はリガンド依存的に向上することが分かった。細胞内におけるスイッチ性能は，リガンドのもたらす構造変化の再デザインというよりも，リガンドの「化学シャペロン化」によって加速的に性能向上することが明らかとなった。実際，リガンド存在下のアクチベータおよびリプレッサ機能への選択を繰り返しながら高速にアミノ酸変異を蓄積させていくと，世代とともに ON/ OFF 比の高い転写スイッチが多数現れた。

genetic switch, directed evolution, chemical chaperone

発表番号：3K011
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 培地中の非天然アミノ酸で厳密に遺伝子の発現を制御する方法

# A novel gene regulation system responding to an unnatural amino acid in the medium

○加藤 祐輔（農業生物資源研）
○Yusuke KATO (Natn. Inst. Agrobiol. Sci.)

大腸菌において、特定の標的遺伝子の発現を、培地に添加した遊離の「自然の環境中には存在しないアミノ酸（非天然アミノ酸）」によって、厳密に制御する新しい方法を開発した。

部位特異的非天然アミノ酸導入法は、細胞がもつ翻訳系を利用して、本来どのアミノ酸も指定しないアンバー終止コドンに対応して、非天然アミノ酸をタンパク質に導入する技術である。この系は、アンバー終止コドンを認識する tRNA（$tRNA_{CUA}$）、およびその tRNA に特定の非天然アミノ酸を特異的に結合させる酵素（非天然アミノ酸を基質とするアミノアシル tRNA シンテターゼ、UaaRS）より構成される。もともと、この技術は、タンパク質の構造解析や機能改変のために、非天然アミノ酸を簡便にタンパク質に導入する技術として開発されたが、私達はこの系を非天然アミノ酸の有無で mRNA の翻訳を制御する技術として応用している[1,2]。すなわち、特定の標的遺伝子の翻訳開始コドンの直下にアンバー終止コドンを挿入すれば、その mRNA は非天然アミノ酸存在下では翻訳は進行するが、非存在下ではそのアンバー終止コドンより先には進まない。この「翻訳スイッチ」による制御は通常厳密ではなく、非天然アミノ酸がない時にも数～数十％の漏洩翻訳があるが、UaaRS や $tRNA_{CUA}$ の発現を同時に抑制すれば、相乗効果によって漏洩翻訳を減らすことができる[1]。

この研究では、翻訳スイッチによる制御をより厳密に改良するために、UaaRS 遺伝子にアンバー終止コドンを挿入して、翻訳スイッチの制御下においた系を構築した（正のフィードバック回路）。この系では、非天然アミノ酸が無いとき UaaRS の発現は抑制されるので、上記のような相乗効果によって漏洩翻訳が減じると予想され、厳密性の改善が期待される。非天然アミノ酸 3-ヨウ化-L-チロシンの導入系[3]を用いて、実証実験をおこなった。その結果、著しい漏洩翻訳の抑制（=厳密性の改善）を確認した。したがって、この正のフィードバック回路の付加は、翻訳スイッチの厳密性を改善する新しい方法として、極めて有効であることが示唆された。

[1] Minaba, M. & Kato, Y. (2014) High-yield, zero-leakage expression system with a translational switch using site-specific unnatural amino acid incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**:1718

[2] Kato, Y. (2015) Tunable translational control using site-specific unnatural amino acid incorporation in *Escherichia coli*. *PeerJ* **3**:e904

[3] Sakamoto et al., (2009) Genetic encoding of 3-iodo-L-tyrosine in *Escherichia coli* for single-wavelength anomalous dispersion phasing in protein crystallography. *Structure* **17**:335

gene expression, translation, unnatural amino acid

発表責任者：加藤祐輔（kato@affrc.go.jp）

発表番号：3K012
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# In vivo イメージングを志向した近赤外発光ルシフェリンの改良
# Challenge to innovate the high performance NIR luciferin for in vivo imaging

○北田 昇雄[1]、岩野 智[2]、木山 正啓[1]、齊藤 亮平[1]、丹羽 治樹[1]、平野 誉[1]、牧 昌次郎[1] ([1]電通大、[2]理研)
○Nobuo KITADA[1], Satoshi IWANO[2], Masahiro KIYAMA[1], Ryohei SAITO[1], Haruki NIWA[1], Takashi HIRANO[1], Shojiro MAKI[1] ([1]UEC, [2]RIKEN)

ホタル生物発光は、発光基質ホタルルシフェリンが発光酵素ホタルルシフェラーゼにより AMP 化され、続いて酸素化されることで、黄緑色（$\lambda_{max}$ = 560 nm）の発光を示す。ホタル発光系の非常に高効率（$\phi_{BL}$ = 0.41）な発光を活かして、ライフサイエンスの分野において応用が期待されている。

当研究室では、ルシフェリンの構造を改変することで可視光をほぼ網羅するような発光色を実現した（430～700 nm)。ホタルの黄緑色の発光は生体組織に吸収されやすいが、「生体の窓」とも呼ばれる近赤外領域（650～900 nm）ならば生体透過性が高く、生体イメージング材料への応用に望ましい。これにより、当研究室からは世界初の近赤外自発光材料として『アカルミネ®』（$\lambda_{max}$ = 675 nm)が製品化されている。

マウスでは良好な実験結果が得られているアカルミネではあるが、今後、最先端医療の研究を進めるにあたって、マウスやラットではなく、マーモセットやミニブタ等のさらに大型の動物での実験が必要不可欠となってくる。そこで今回は、以下の 3 つの観点からアカルミネに改良を加えたルシフェリンアナログの開発を目指し、本研究に着手した。

**・長波長化**

アカルミネの持つ 675 nm という波長は「生体の窓」領域の入り口に過ぎない。構造改変によりさらなる長波長化を目指した。

**・高輝度化**

アカルミネは天然型のホタルルシフェリンに比べると 1/10~1/100 の輝度しか有していない。2 段階で発光するホタル発光反応の反応中間体を用いることで発光輝度が 1000 倍程度向上する知見が得られている（特許第 5194258 号)。この中間体の安定化により高輝度化を目指した。

**・高水溶性化**

アカルミネは天然型のホタルルシフェリンよりも水溶性が大幅に低下している。アカルミネの構造改変、有機塩化により水溶性向上を目指した。

本会にて、各種ルシフェリンアナログの合成法、発光活性、詳細を発表する。

Luciferin, in vivo imaging, Firefly

発表責任者：牧　昌次郎（s-maki@uec.ac.jp）

発表番号：3K013
発表日時：3 月 29 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 簡易電気泳動装置の開発と高等学校生物における授業実践

# The development of simplified electrophoresis apparatus and the teaching practice in high school biological class

○倉林 正[1,3]、武村 政春[1,2] ([1]東京理科大・院・科学教育、[2]東京理科大・理、[3]沼田女子高校)
○Masashi KURABAYASHI[1,3], Masaharu TAKEMURA[1,2] ([1]Grad. Sch.Math. Sci. Edu., Tokyo Univ. Sci., [2]Fac. Sci., Tokyo Univ. Sci., [3]Numata Girls' H.S.)

**【背景・目的】**

近年，生命科学分野の著しい発展にともない，私たちの身近な生活の中でも，生命科学分野の研究手法を用いた検査や調査等が行われている。そして，今後さらに，私たちの生活と生命科学は，密接に結びついていくことが予想される。したがって，現在の教育現場において，生命科学教育を行うことは極めて重要であると考えられる。現行の高等学校学習指導要領（2009）では，「生物（４単位)」において，生命科学に関わる内容の取扱いがあり，そこでは「制限酵素，ベクター及び遺伝子の増幅技術に触れること」と記載されている。その中でも，特に，制限酵素を扱った実験や遺伝子の増幅に関わる実験では，結果の確認を行うために，電気泳動法が一般的に用いられている。そのため，現在，「生物」の教科書を出版している４社のうち３社で，電気泳動法についての内容や実験が掲載されていることから，電気泳動法に関する学習の重要性が高まっていると考えられる。ところが，多くの高等学校で，授業中に電気泳動実験は行われていない。その大きな理由として，電気泳動実験にかかるコストが高価であることが考えられる。特に，電気泳動装置については一台数万円するため，学校に装置がなかったり，数が十分に足りていなかったりする。そこで，本研究では，安価で誰にでも簡単に作成できる簡易電気泳動装置を開発するとともに，電気泳動実験全体のコストを下げ，授業で実施しやすくすることを目的とした。

**【方法・結果・考察】**

簡易電気泳動装置（電源付）は，シリコン容器，鉛筆の芯（シャーペンの芯)，９V 乾電池，リード線を使用することで，１台当たり 800 円程度で作製することができた。また，使用するゲルを市販の粉末寒天で作製し，実験結果の確認を青色 LED とオレンジフィルターを用いることで，電気泳動実験全体にかかるコストも下げることができた。そして，これらの機器等を使用して，電気泳動実験を高等学校生物の授業で実施した。制限酵素や PCR を扱った実験の場合，費用面から多くの学校で実施することが難しいと考え，今回は，簡易 DNA 抽出実験で得られた抽出物中の DNA を確認するための方法として実施した。その結果，生徒たちは，スムーズに実験の操作を行うことができ，抽出物からバンドを検出することもできた。さらに，高等学校生物教員を対象とした質問紙調査から，簡易電気泳動装置を利用した電気泳動実験を授業で実施できるという回答も多数得ることができた。以上より，本研究は，授業における電気泳動実験を実施しやすくするために有効であることが明らかとなった。

electrophoresis, life sciences, education

発表責任者：倉林正（kurabayashi-masashi@staff.gsn.ed.jp）

発表番号：3K014
発表日時：3 月 29 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 化学プロファイリングによる植物―土壌生態系の共代謝システム評価

# Co-metabolic evaluation of plant-soil ecosystems by chemical profiling

○伊達 康博[1,2]、篠 阿弥宇[1]、菊地 淳[1,2,3] ([1]理研 CSRS、[2]横市院生命医、[3]名大院生命農)
○Yasuhiro DATE[1,2], Amiu Shino[1], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]RIKEN CSRS, [2]Yokohama City Univ., [3]Nagoya Univ.)

【研究背景】植物とその根圏に存在する土壌生態系の関係は、ヒトや哺乳類に対する腸内フローラ生態系と多くの側面（例えば微生物叢の集積や栄養吸収に関する共代謝等）において共通点がある。この観点において、植物に対するプロバイオティクスやプレバイオティクス候補の探索およびその作用メカニズムを理解することは農業的にも基礎科学的にも重要な課題であるが、植物―土壌生態系の共代謝システムを理解しようとする試みはほとんど行われていないのが現状である。そこで我々は、植物と土壌生態系の間に存在する共代謝システムを理解し産業的に応用可能な技術開発を目指して研究を行っており、その一端として本研究では、土壌の種類や施肥方法の違いに基づく作物収量や病害虫抵抗性等との関係性を有機物・無機物プロファイリングにより比較解析し、土壌と栽培作物の関係性や共代謝システムに関する基礎的知見の収集を目的とした。
【実験方法】日本各地の施肥方法等が異なる農地から土壌およびその場所に栽培されている植物をサンプリングし、凍結乾燥および粉末化処理を行った。得られた粉末は、水およびメタノール溶媒を用いて有機物を抽出し、NMR 装置を用いて計測した。同時に、硝酸溶液を用いて無機元素の抽出を行い、ICP 装置で計測・定量した。NMR シグナルのアノテーションには 2D-*J*res NMR 等の 2 次元計測を行い、当研究室において開発された SpinAssign[1] や SpinCouple[2] 等のウェブプログラムを活用して物質を特定した。得られたデータは数値化・マトリクス化し、多変量解析等を用いて有機物・無機物のプロファイリングを行った。
【結果】土壌は生体サンプル等と比べ有機物濃度が比較的低いため、土壌プロファイリング用に最適化された抽出方法および NMR 計測パラメータを用いて各サンプルを抽出・計測し、有機物および無機物プロファイルを比較した。結果として、土壌中低分子有機化合物としては酢酸の存在量がどのサンプルにおいても比較的多い傾向にあり、その存在量は季節の影響を受けて増減している傾向が得られた。また、施肥方法の違いや作物収量、病害虫に対する抵抗性等と関係する土壌中有機物・無機物群を見出すことにも成功した。さらに、植物体中に蓄積している有機物・無機物群に関しても同様に作物収量や病害虫抵抗性との関連物質を見出すことができ、土壌と栽培作物の関係性を化学プロファイリングから評価することが可能であった。あわせて、日本各地からサンプリングした農地土壌を同様に比較・解析することにより得られた最新の知見についても本会で議論したい。
【参考文献】(1) Chikayama, et al., Anal. Chem., 82, 1653-8 (2010), (2) Kikuchi, et al., Anal. Chem., in press.

NMR, data mining, agricultural soil

発表番号：4A001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

*Methylobacterium* sp. FD1 株のホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子の単離と大腸菌での発現
Cloning of a formaldehyde dismutase gene from *Methylobacterium* sp. FD1 and its expression in *Escherichia coli*

○米光 裕[1]、菊地 悠太[1]、瀬田 寛行[2]、藏富 大智[1]、岸本 昇[1]、奥野 祥治[1] ([1]和歌山高専物質、[2]和歌山高専専攻科)
○Hiroshi Yonemitsu[1], Yuta Kikuchi[1], Hiroyuki Seta[2], Daichi Kuratomi[1], Noboru Kishimoto[1], Yoshiharu Okuno[1] ([1]NIT Wakayama, [2]NIT Wakayama Adv.)

【背景と目的】ホルムアルデヒドは、樹脂原料、界面活性剤、農薬、防腐剤等として広範囲で使用されている。しかし、強い毒性を有するため、排液や排気中のホルムアルデヒドは分解・除去する必要がある。我々は、微生物によるホルムアルデヒド分解に着目し、既にホルムアルデヒド分解菌 *Methylobacterium* sp. FD1 株を分離し、それが高濃度のホルムアルデヒドを分解することを明らかにした[1)]。しかし、FD1 株は増殖が遅いため、ホルムアルデヒド分解に使用する菌体や酵素を生産するには効率が悪い。そこで、ホルムアルデヒド分解酵素遺伝子を増殖の速い大腸菌等で発現させれば、ホルムアルデヒド分解に使用する菌体や酵素が効率的に生産できると考えられる。本研究では、FD1 株のホルムアルデヒドジスムターゼ遺伝子を単離し、その遺伝子で形質転換した大腸菌による高濃度ホルムアルデヒド分解について検討した。
【方法と結果】Soybroth 培地で培養した *Methylobacterium* sp. FD1 株菌体より酵素粗抽出液を調製した。この酵素粗抽出液の 50～70%硫酸アンモニウム沈殿画分を疎水性クロマトグラフィーにかけ、ホルムアルデヒド分解活性画分を得た。なお、ホルムアルデヒド分解活性は、ホルムアルデヒド分解で生じたギ酸によるメチルオレンジの変色より検出した。疎水性クロマトの活性画分を SDS-PAGE にかけ、得られた約 43 kDa のバンドを切り出し、nanoLS-MS/MS および Mascot search によりアミノ酸配列分析を行った結果、アルデヒドジスムターゼの思われるペプチド断片が検出された。これらペプチド断片のアミノ酸配列より設計した DNA プライマーを用いて FD1 株ゲノム DNA を鋳型に PCR したところ、目的の DNA 断片が増幅された。次いでこの DNA 断片の上流域と下流域を TAIL-PCR によりそれぞれ増幅した。これら DNA 断片は、塩基配列分析より、アルデヒドジスムターゼ遺伝子断片と示唆された。この遺伝子の ORF を PCR 増幅し、pUC19 の *lac* プロモーターの下流に連結して大腸菌 DH5α株に導入した。得られた形質転換体は、FD1 株に比べて増殖が速く、またホルムアルデヒドを効率的に分解し、ギ酸とメタノールを生成した。

１）塩﨑恵未，米光裕　2013 年 日本農芸化学会大会 3C11a03.

【謝辞】本研究は JSPS 科研費 26340065 の助成を受けたものです。心より感謝申し上げます。

formaldehyde dismutase, Methylobacterium, gene cloning

発表責任者：米光裕（yonemitsu@wakayama-nct.ac.jp）

発表番号：4A003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 緩速・生物ろ過による硬度低減法の実用化研究

# The research of practical application of reducing water hardness with slow sand and biological filtration.

○宮平 理恵、栗本 真衣、小宮 理絵、鈴木 智子、中田 未来、小関 正道（東京家政大学）
○Rie MIYAHIRA, Mai KURIMOTO, Rie KOMIYA, Satoko SUZUKI, Miku NAKATA, Masamichi KOSEKI (Tokyo Kasei Univ.)

【目的】水の硬度は飲料水の味に大きく関与し、食品製造や生活にも影響を与える。そのため高硬度の水を原水とする地域で硬度低減化をする場合には、専用の施設を建設し、薬品による硬度除去を行う必要があるのでコストが高くなっている。しかし、我々は安価で簡単な緩速ろ過法を用いる硬度除去法を報告した。本研究では緩速ろ過法による硬度低減効果を実用化するために効率の良いろ過条件を検討し、実際の浄水施設を想定したろ過装置モデルを作成し、硬度低減効果を検討した。
【方法】3 本の 2L ペットボトルに軽石・小石・砂をそれぞれろ過材として詰め、ろ過層内に水を循環させることで生物膜を形成させた。この装置を使い、まずろ過材の違いによる硬度低減効果を調べた。次に小石をろ過材とした装置を使用して、ろ過速度を 1~2m/日、5~6m/日、9~10m/日の 3 種類に設定し、ろ過速度別の硬度を測定した。ろ過材別と速度別の実験で得られた効率の良いろ過条件を元に構造の異なる平型のろ過装置を 8 種類作成し、それぞれのろ過水の硬度を測定した。平型の装置は 366mm×280mm×136mm のポリプロピレン製のコンテナを利用し、ろ過材の無いもの、小石を敷き詰めただけのもの、水の流れが左右を蛇行する形状のもの、水の流れが上下を通る形状のもの、網に小石を詰めたものを並べたもの、ろ過材の代わりに網を入れたもの、流路を作る仕切りに空間を設けたもの、コンテナの下部に空間を作りその上にろ過材を詰めたものの 8 種類を作成した。実験の試料水は硬度が 300mg/L 程度のミネラルウォーターを用い、0,1,3,5,7,9 日目で採水を行い、EDTA を用いた滴定法及びイオンクロマト法で硬度を測定し、その結果から硬度の減少率を求めた。
【結果】ろ過材の違いによる硬度低減効果の比較では軽石を用いたろ過装置では約 77%、小石を用いたろ過装置では約 88%、砂を用いたろ過層では約 75%の硬度が除去されていた。ろ過速度の比較ではろ過速度が 1~2m/日では約 71%、5~6m/日では約 72%、9~10m/日では約 72%硬度が除去されていた。このことより、ろ過材は小石が最も効率が良く、ろ過速度の違いで硬度低減効果に変化はないことがわかった。実用化を想定した平型の装置では最も硬度が下がったのは小石を敷き詰めた装置で、硬度はろ過前と比較して約 58%除去されていた。しかし、他の形状の装置と大きな差はなかったため、形状の違いによる硬度低減効果に差はなかった。これらの結果より、緩速ろ過法を用いた硬度低減化方法を実用化するにあたり、特殊なろ過条件や装置の加工は不要であることが言え、緩速ろ過法を用いた硬度低減化はより安価に実用化できる可能性があることが示唆された。

slow sand filtrarion, biological filtration, water hardness

発表責任者：小関正道（koseki.kansokuroka@gmail.com）

発表番号：4A004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# セシウム蓄積細菌の探索およびセシウム蓄積能の評価

# The search of cesium accumulation bacteria and evaluation of the cesium accumulation

○渡辺 剛[1]、松本 貴良[1]、齋野 一葵[2]、林 秀謙[1,2]（[1]前工大工、[2]前工大院工）
○Go WATANABE[1], Takara MATSUMOTO[1], Kazuki SAINO[2], Hidenori HAYASHI[1,2] ([1]Maebashi Inst. Technol., [2]Maebashi Inst. of Technol.)

【背景と目的】2011年3月に福島第一原発事故が起き、福島県を中心とする広い範囲に大量の放射性核種が放出された。特に$^{137}$Csは半減期が30年と長いことから、環境からの放射性セシウム除去は急務である。一方、一部の微生物は菌体内にセシウムを蓄積することがわかっている。セシウムは物理化学的性質がカリウムと似ているため、カリウム輸送系を介してセシウムを非特異的に取り込み、菌体内に蓄積されることの報告もある。取り込まれたセシウムは負電荷を持つポリリン酸と結合され、セシウムの毒性が弱まることでセシウムを菌体内に保持することができると考えられている。また、微生物の中でも放線菌は高いセシウム蓄積能を有することが報告されている。本研究は、高いセシウム蓄積能を持ち、環境からの放射性セシウムの除去に使用できる菌株を探索することを目的とする。
【方法】土壌または湖水を1 mM CsClを含む培地で集積培養し、その後コロニーを単一化した。16S rRNA遺伝子解析により菌種の同定を行った。単離した菌株を1 mM CsClを含む液体培地で定常期まで培養し、菌体内にセシウムを蓄積させた。菌体を回収しPBSで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥重量を測定した。乾燥した菌体は濃硝酸を用いて加熱溶菌、乾固させた。次いで、0.1N硝酸で懸濁させた。懸濁液を原子吸光測定により、セシウム量を測定し、乾燥重量当たりの蓄積量を算出した。またNBRCより提供を受けた放線菌のスクリーニング株(RD株)を上記と同様にセシウム蓄積能を測定した。比較的高いセシウム蓄積能を示した菌株については、16S rRNA遺伝子解析により菌種の同定を行った。さらに菌株のそれぞれの生育段階におけるセシウム蓄積量を測定した。
【結果と考察】122菌株を測定し、セシウム蓄積量が100 µmol / g (dry weight)以上の菌株は5つ得られた。この5菌株はRD株の放線菌*Dietzia*属2菌株と*Rhodococcus*属3菌株であった。16S rRNA遺伝子解析により2菌株の*Dietzia*属は*D. timorensis*と同定された。それぞれの菌株を対数期後期、定常期序盤・中盤・終盤と区別してセシウム蓄積能を測定し、最大蓄積量は定常期中盤でみられた。最も高い蓄積量を示した*D. timorensis* RD012637株は、295±49. 9 µmol / g (dry weight)だった。現在報告されているセシウム高蓄積菌*Rhodococcus erythropolis* CS98株は533 µmol / g (dry weight)であり(1)、これを上回る株をみつからなかった。菌体内のポリリン酸の増加はセシウム蓄積量増加と相関があると考えられており、ポリリン酸高蓄積変異株を作製し、セシウム蓄積能の変化についても合わせて報告する予定である。

(1) N. Tomioka et al. 1994. Appl. Environ. Microbio. 60:2227-2231.

cesium, polyphosphate, bacteria

発表責任者：渡辺剛（m1281044@maebashi-it.ac.jp）

発表番号：4A005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 嫌気性微生物叢の解析方法の検討

# Evaluation of the　analysis method for anaerobic microbial flora

○松本 邦成、堀西 直人、渡邊 克二（福工大・工）
○KUNIMASA MATSUMOTO, NAOTO HORINISHI, KATSUJI WATANABE (Fukuoka Institute of Technology)

前書き

嫌気性微生物は、有機物をメタンガスや炭酸ガスに分解する嫌気性生物処理法として、下水処理などに用いられており、近年では生物的分解が困難なダイオキシン類を分解できるものも発見された。一方で、環境次第ではガスによる環境問題や、金属の腐食による問題が起こる可能性が存在する。加えて、好気性微生物と比較すると菌叢解析に多大な労力が必要となるため、菌叢の簡単な解析方法が必要とされている。本研究室では、好気性微生物叢の簡便な同定・定量方法の開発を行っている。今回はその解析方法が、嫌気性細菌叢の解析に適用することが出来るか検討を行った。今回解析を行う嫌気性微生物として、硫酸還元菌を選択した。

実験方法

株式会社バイコムより提供された活性汚泥をサンプルとして、硫酸還元菌の選択培地を用いて嫌気培養を行った。同定・定量の方法としては、PCR 陽性数を基とした最確数法と、制限酵素断片長多型解析法を利用した。液体培地は加熱と窒素ガス注入によって嫌気状態とし、活性汚泥を $10^{-2}$ から $10^{-5}$ まで希釈後、各三連で接種して、アナエロボックス内で培養を行った。抽出はリゾチーム/SDS による DNA 抽出と、物理的破砕法による DNA 抽出の二つを検討し、41f/1066r プライマーを用いた PCR 後に最確数法による計数、制限酵素 4 種を用いた DNA の切断と、その断片長解析を行った。

結果と考察

リゾチーム/SDS による方法では、$10^{-4}$ に希釈したサンプルの２つのみが陽性を示し、最確数法による計数では、$6.2\times10^{4}$(MPN/ml)という値となった。そして解析の結果、*Desulfovibrio vulgaris, Desulfovibrio bastinii* が含まれていることが分かった。物理的破砕法では、$10^{-4}$ に希釈したサンプルの３つが陽性を示し、計数すると $9.4\times10^{4}$(MPN/ml)という値となった。解析の結果、*Desulfomonile limimaris, Desulfomonile tiedjei* が含まれていると分かった。

以上より、嫌気性微生物は検討中の解析方法で解析を行うこと自体は可能であると判断した。しかし、これまでに行ってきた好気性微生物と比較すると PCR 増幅効率が悪く、低次希釈のサンプルで増幅されないといった問題点が確認できた。これらの問題を解決するために、培養方法と抽出方法の検討、そして DNA 精製方法の検討などが必要だと考える。
以上の問題点を踏まえた改善結果については現在検討中である。

anaerobic microbial, MPN method, MERFLP

発表責任者：松本　邦成（mbm15004@bene.fit.ac.jp）

発表番号：4A006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# *Stenotrophomonas maltophilia* は一種類の走化性センサーによりフェノールを感知する

# *Stenotrophomonas maltophilia* senses phenol by just one chemosensory transducer

○渡邉 祐子[1]、荷方 稔之[1]、内田 智美[2]、柿井 一男[1] ([1]宇都宮大院工、[2]宇都宮大工)
○Yuko WATANABE[1], Toshiyuki NIKATA[1], Tomomi UCHIDA[2], Kazuo KAKII[1] ([1]Grad. Sch. Eng. Utsunomiya Univ., [2]Fac. Eng. Utsunomiya Univ.)

【目的】*Stenotrophomonas maltophilia* は *p*-クロロフェノールや内分泌攪乱物質の疑いのあるビスフェノール A をはじめとする幅広いフェノール類に正の走性を示す．本細菌は 12 の走化性センサー遺伝子（*mcp1*～*mcp12* と命名した）を有することが推定され，フェノール類のセンシングに関与する走化性センサー遺伝子を同定・解析することでフェノール類の新規検出システムや効率的なバイオレメディエーションへの応用が期待できる．昨年度の大会では走化性センサーMCP5 が本細菌においてフェノールをセンシングする唯一のセンサータンパク質である可能性について発表した．本発表では，フェノール走性の濃度依存性とその相補試験について検討した．

【方法】走化性は以下の方法で測定した．ガラスキャピラリーにフェノール類を含む 0.5%アガロース溶液を充填・固化した．このキャピラリーを 40 mM MOPS(pH 7.0)，5 mM $MgCl_2$ 溶液で遠心分離洗浄した菌体懸濁液に挿入し，細菌の運動の様子を倒立位相差顕微鏡で観察・録画した．そこから静止画をコンピュータに取り込み二値化した後，キャピラリー開口部付近の菌体を計数して菌体濁度当たりの集積初速度である比集積初速度(cells/sec･$OD_{660}$)で評価した．

【結果】*S. maltophilia* JCM1975 はフェノールに対し集積応答を示し（2.0 mM フェノールに対し比集積初速度 1.7 cells/sec･$OD_{660}$），その応答は 0.2 mM（0.94 cells/sec･$OD_{660}$）～20 mM（4.5 cells/sec･$OD_{660}$）の範囲内で濃度に依存していた．また，*mcp5* を破壊したΔmcp5 は 2 mM および 10 mM フェノールに走性を示さず，Δmcp5 に *mcp5* を再導入したΔmcp5(*mcp5*)は走性が回復していた(2.0 mM フェノールに対し 7.1 cells/sec･$OD_{660}$）ことから，フェノール走性に関与する唯一の走性センサー遺伝子であることが明らかとなった．Δmcp5(*mcp5*)の過剰応答は *mcp5* をプラスミドで再導入したためにコピー数が増加し，過剰発現したことによると考えられた．現在 *S. maltophilia* のフェノール資化性試験と *mcp5* の発現解析を行っている．

*Stenotrophomonas maltophilia*, chemotaxis, phenol

発表責任者：荷方稔之（nikata@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

発表番号：4A007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 抗がん剤 5-フルオロウラシルとその類似体を用いた微生物変換産物の挙動解析

# Behavior research of bacteria metabolites of an anticancer drug 5-Fluorouracil and the analogs

○岡山 真哉、前田 憲成（九州工大生命工）
○SHINYA OKAYAMA, KENSEI MAEDA (Kyushu Institute of Technology Univ.)

抗がん剤に由来する化学物質は、DNA 複製阻害作用という高い反応性を有しており、微量の濃度でも環境中の正常な生態系に影響を与える可能性が危惧される。実際に、抗がん剤が環境中から検出されている報告もあり、これにより生じる環境汚染の問題を解決することは急務である。つまり、抗がん剤は、がん患者の延命治療として活躍する反面、環境汚染を引き起こす化学兵器になり得ることが考えられる。このような問題を解決する手法として、汚染物質を分解する微生物の働きを利用したバイオレメディエーションが挙げられる。

そこで本研究では、バイオレメディエーションの確立を最終目的とし、抗がん剤の中でも使用頻度が高く、実際に水環境中での報告がある Figure.1 に示す 5-Fluorouracil を標的化合物とし、豊富な微生物源である「下水汚泥」を用いての微生物分解の検討を行い、その変換産物の挙動を追跡した。また、ピリミジン環 5 位に電子供与性のある置換基（アミノ基、メチル基）や電子求引性のある置換基（フッ素、アセチル基、トリフルオロメチル基、ニトロ基）をもった、すなわち、電子状態の異なるウラシル誘導体を用いて、これらの置換基効果が微生物分解にどのような影響を及ぼすのかを検証した（Figure.2）。

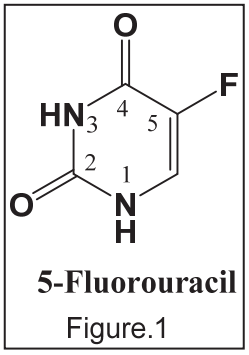


Figure.1

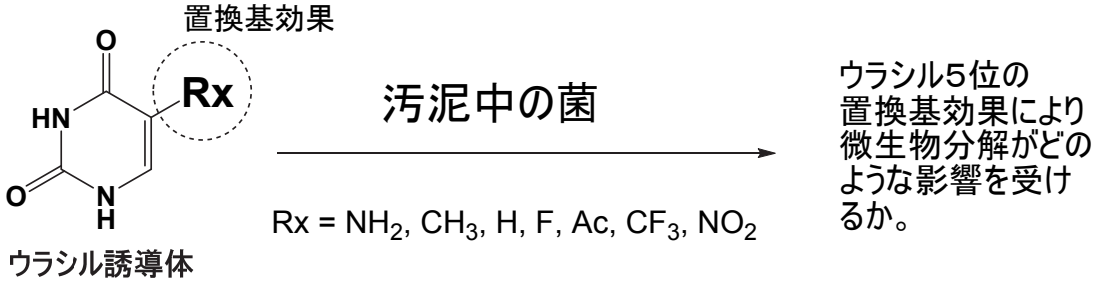


Figure.2

また、様々な置換基が導入されたウラシル誘導体に対して、サイクリックボルタンメトリーを行い酸化電位、還元電位を測定し、ウラシル誘導体自身の反応性を評価、そして、発光 umu 試験を行い、変異原性を評価して、これらを含めて微生物分解と相関性があるのかを検証し、置換基効果の寄与、微生物分解メカニズムの解明を行った。

anticancer drug, Fluorouracil, bioremediation

発表責任者：前田憲成（toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp）

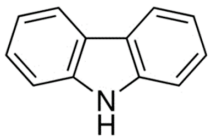
発表番号：4A008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# カルバゾール分解菌における分解遺伝子群の多様性の解析

# Diversity of degradative genes in carbazole-degrading bacteria

○徳田 裕太[1,2]、ベハラノ フェリペ[1]、水口 千穂[1]、兼崎 友[3]、岩田 健一[2]、吉川 博文[3,4]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]芝工大シ生、[3]東京農大・NGRC、[4]東京農大・応生科・バイオ)

○ Yuta TOKUTA[1,2], Felipe VEJARANO[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yu KANESAKI[3], Kenichi IWATA[2], Hirofumi YOSHIKAWA[3,4], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Shibaura Institute of Technology, [3]NGRC, Tokyo Univ. Agric, [4]Dept. Biosci., Tokyo Univ. Agric)



【背景・目的】カルバゾール（CAR）は染料、薬品、洗浄剤中の発色抑制剤などの原料として使用される一方で、その構造（右図）の類似性から、ダイオキシンのモデル化合物として微生物による分解経路の研究が進められてきた。既知の CAR 分解菌は *car* 遺伝子クラスター（*carAaAcAdBaBbCDEF*）を持ち、carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO; *carAa*, *carAc*, *carAd* がそれぞれコードする酸化酵素、フェレドキシン、レダクターゼによって構成される）により最初の水酸化が行われた後、アントラニル酸、カテコール等を介して TCA 回路を使用することで CAR を完全分解する。これまでに単離された多くの CAR 分解菌は土壌・活性汚泥由来であるが、一方で海水由来の CAR 分解菌はそれらとは異なる *car* 遺伝子クラスターを持つことが報告されていた [Maeda *et al.*, 2009, *Curr. Microbiol.*, 59:154-159]。そこで本研究では土壌・海水・活性汚泥など様々な環境から単離された CAR 分解菌の全ゲノム解析を行い、CAR 分解経路の多様性を解明することを目的とした。

【方法・結果】昨年度までに当研究室で単離された 5 株の CAR 分解菌（土壌由来 1 株、海水由来 2 株、活性汚泥由来 2 株）の全ゲノム解析を行ったため、今年度は新たに 27 株（土壌由来 6 株、海水由来 14 株、淡水由来 1 株、活性汚泥由来 6 株）の CAR 分解菌の全ゲノム解析を行った。このうち海水由来の 10 株では、昨年度報告した *Hyphomonas* sp. KY3 株や *Erythrobacter* sp. KY5 と同様に、*car* 遺伝子クラスター内に既知の *carAc*, *carAd* と高い相同性を示す遺伝子は見出されなかった。またこれらの株ではアントラニル酸をカテコールに変換する AntABC をコードする遺伝子も見出されず、代わりに anthranilate CoA ligase をコードする遺伝子が存在したことから、KY3 株、KY5 株を含むこれらの株では既知の CAR 分解菌とは異なるアントラニル酸代謝経路を持つ可能性が示唆された。さらに、今まで CAR 分解菌として報告のなかった *Thalassococcus* 属細菌（海水より単離）のゲノムには既知の *carBaBb* と高い相同性を示す遺伝子が見出されず、新規なメタ開裂酵素を持つ可能性が示唆された。現在、CAR 分解に関わる新規遺伝子の探索を進めるため、KY5 株において既知の *carAc*, *carAd* と低いながらも相同性を示す遺伝子や、anthranilate CoA ligase をコードする遺伝子を大腸菌で発現させ、休止菌体反応により基質の変換を行う系の構築を進めている。

本研究は東京農業大学生物資源ゲノム解析センター生物資源ゲノム解析拠点事業における共同研究として行われた。

Biodegradation, carbazole, gene diversity

発表責任者：徳田裕太（bn12037@shibaura-it.ac.jp）

発表番号：4A009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Aerobic and anaerobic benzene degradation pathway of *Azoarcus* sp. strain DN11

○Allan DEVANADERA[1], Felipe VEJARANO[1], Yu ZHAI[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yuki KASAI[2], Yoh TAKAHATA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Chuo Univ., [3]Taisei Corp.)

**[Introduction]** Benzene is a common soil and groundwater pollutant, which causes a major global health concern because of its carcinogenicity. Microbial metabolic pathways for the aerobic degradation of benzene have been studied extensively to determine the design of bioremediation processes. In contrast, rapid depletion of dissolved oxygen at hydrocarbon-contaminated subsurface environments results to anoxic conditions which render benzene recalcitrant. Previous studies have shown the ability of *Azoarcus* DN11, a denitrifying bacterium, to degrade benzene under both aerobic and anaerobic conditions (Kasai *et al.*, 2006, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72: 3586-92). However, the metabolic pathways for aerobic and anaerobic benzene degradation of DN11 have not yet been clarified. Three initiating pathways have been proposed for anaerobic benzene ring activation: methylation to toluene, hydroxylation to phenol and carboxylation to benzoate. Toluene, phenol and benzoate would then be converted to benzoyl-CoA which is a common aromatic intermediate. This study was carried out to identify putative genes responsible for aerobic and anaerobic benzene degradation of *Azoarcus* sp. DN11.

**[Methods & Results]** To search for putative benzene degradative genes, the whole genome sequences of *Azoarcus* sp. DN11 was determined using MiSeq sequencer (Illumina). Read assembly produced 66 contigs using *de novo* assembler in CLC Genomics Workbench (CLC bio). These contigs were reorganized to 39 contigs after mapping against the partial genome of DN11 as previously sequenced. Finally, 5 gaps were closed resulting to 34 contigs. Automatic annotation was performed using MiGAP for the automated prediction of genes. The genes encoding enzymes involved in three proposed pathways for anaerobic benzene degradation were locally blasted against the obtained genome sequence of DN11 to find homologous genes. Putative genes for anaerobic degradation of toluene and benzoate were found in the DN11 genome, whereas genes for anaerobic degradation of phenol were not found. These results were consistent with the previous result that showed DN11 could grow on toluene or benzoate, but not on phenol in anaerobic condition (Kasai *et al.*, 2007, *Environ. Sci. Technol.*, 41: 6222-7). Putative genes that encode for benzene hydroxylating monooxygenases and dioxygenases associated with aerobic benzene degradation were also found in the genome of DN11. Currently, RT-PCR experiments are being performed in order to confirm the expression level of the putative genes involved in aerobic and anaerobic degradation of benzene.

bioremediation, benzene, *Azoarcus*

発表責任者：Hideaki Nojiri（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4A010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 環境汚染物質 PCB/ビフェニル分解菌を利用したバイオプラスチック(PHA)生産の効率化

# Improvement of bioplastic (PHA) production efficiency from environmental pollutants by a PCB/biphenyl-degrading bacterium

○矢島 泰斗、前田 理久 (明治大学)
○Taito Yajima, Michihisa Maeda (Meiji Univ.)

ポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、様々な種類の微生物によって生産される脂肪族ポリエステルであり、生分解性をもつプラスチックとしても知られている。*Alcaligenes denitrificans* A41 株は PCB/ビフェニル分解能を有し、ビフェニルを炭素源として窒素制限下で PHA を生産することが既に確認されている。これまで、A41 株の PHA 生産特性について詳細に特徴付けるために、培養条件・培養方法の検討を行ってきたが、今回は、PHA 生産により適した条件を見出だすためのアプローチとして、菌体量に対する炭素源濃度の効果について解析したので報告する。

本実験では炭素源としてコハク酸とビフェニルを用い、すべて単一炭素の条件で培養を行った。このとき、炭素源濃度を 0.5% (w/v)で固定し、菌体量を調節することで、生産効率に及ぼす炭素源濃度および菌体量の影響を調べた。また、サンプリング(6, 12, 24, 48, 72 時間の 6 点)して得られた乾燥菌体重量から PHA 重量を引いた、菌体正味の重さ(Residual Cell Weight, 以下 RCW)の平均値を菌体量の指標として用いた。

コハク酸を単一炭素源にした場合では、RCW≒0.5 g/L で最大の蓄積率(49.3%, 24 h)を示した。また、RCW が 0.5 g/L を超えると、生産特性(経時変化)は変わらないが、蓄積率が低下した。これらの結果から、一定以上の菌体量では至適炭素源濃度が存在することが示唆された。ビフェニルを単一炭素源にした場合では、RCW≒0.2 g/L で最も高い蓄積率(32.8%, 12 h)を示し、RCW が大きくなるにしたがって蓄積率が低下した。これは予想以上に菌体量に対して炭素源濃度が高い条件が良好な PHA 生産効率を示す結果となった。これまでに、ビフェニル 0.3%、RCW≒1.4 g/L の培養条件下で、高い蓄積率(47.6%, 72 h)を示す結果を得ており、今回最大蓄積率を示した時間が 12 時間と短いこともこの条件での生産特性解析が不完全であることを示唆している。このように、至適濃度の決定には至らなかったため引き続き実験を行っている。また、並行して生産効率を向上の糸口を探すためにビフェニルから PHA への炭素の流れを詳細に解析している。現在は、ビフェニルおよび中間代謝物である安息香酸の量的変化を高速液体クロマトグラフィーを用いて詳細に定量している。

Polyhydroxyalkanoate, PHA, PCB/biphenyl

発表責任者：矢島泰斗（cf50127@meiji.ac.jp）

発表番号：4A011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 油糧系バイオ燃料植物ジャトロファの重金属応答の解析
# Responses of biodiesel plant Jatropha to heavy metals

○山田 みな美[1]、山田 智[1,2]、辻本 壽[2,3]、マランバニ ホイツィオネ[2]、明石 欣也[1,2] ([1]鳥取大農、[2]鳥取大院連合農学、[3]鳥取大乾燥地研)
○Minami YAMADA[1], Satoshi YAMADA[1,2], Hisashi TSUJIMOTO[2,3], Goitseone Malambane[2], Kinya AKASHI[1,2] ([1]Tottori Univ., [2]United Grad. Sch. Agr. Sci. Tottori Univ., [3]Arid Land Research Center, Tottori Univ.)

ジャトロファはトウダイグサ科の落葉低木で、乾燥地でも生育可能な油糧系バイオ燃料植物として注目されている。また、重金属汚染土壌での生育が可能であることが報告されており、ファイトレメディエーションによる土壌修復と、循環的エネルギー生産の両立が期待される。しかし、ジャトロファの重金属応答及び環境修復能の特徴については詳細が明らかとなっていない。そこで本研究では、水耕栽培実験系を用い、各種の重金属に対するジャトロファの生理応答の解析を行った。

水耕溶液として 1/2 Hoagland 溶液を用い、第一葉完全展開時に各種濃度の銅(Ⅱ)、亜鉛(Ⅱ)、ニッケル(Ⅱ)、カドミウム(Ⅱ)またはクロム(Ⅲ)の硫酸塩水溶液を付与した。重金属付与後 12 日目に、地上部及び地下部の形態、乾物生産量及び重金属蓄積量を解析した。カドミウム処理区については、組織内のチオール化合物の定量および光合成活性の解析を行った。その結果、重金属付与後 12 日目において、10 μM 以上の各種の重金属で処理したジャトロファでは、特に銅とニッケル処理区において生育の遅延が見られた。一方、亜鉛とクロム処理区では生育阻害の程度は低かった。重金属処理に伴う乾物生産量の低下は、すべての重金属処理区において地上部と地下部でほぼ同程度であった。重金属付与前に既に完全展開していた第一葉では葉の黄化は見られなかったが、新しく出現した第二葉においては、銅、亜鉛、カドミウム処理区で葉の黄化が観察された。100 μM のニッケルまたはカドミウムを処方した植物体では、根に黒色の着色が見られたが、1 分間の 1 M HCl 洗浄により着色は除去され、洗浄液中には付与した重金属が高濃度に含まれていた。一方、100 μM のクロムを処方した植物体の根においては緑色の着色が見られ、この着色は 1 M HCl 処理で除去されなかった。植物体内の重金属量を測定した結果、各処理区において付与した重金属が高濃度に蓄積していた。また一個体あたりの重金属蓄積量はクロムが最も高く、次いで亜鉛及びカドミウムで高い傾向が見られた。カドミウムの蓄積レベルは 7.6 μmol/g DW に達し、ヤナギやカエデなど一般樹木の報告値に比べ高い値を示した。また、カドミウム処理区の第二葉における $CO_2$ 固定量と電子伝達速度を測定した結果、コントロール区と比較して有意に低下しており、光合成活性が阻害されていることが確認された。エルマン法を用いて根におけるチオール化合物を定量した結果、コントロール区と比較してカドミウム処理区ではチオール化合物が 4.3 倍多く蓄積しており、重金属に対する防御物質として誘導されたことが示唆された。以上の結果から、ジャトロファは有害金属であるカドミウムに対する耐性が比較的高いことが示され、ジャトロファ植林による重金属汚染地の緑化と循環的エネルギー生産の両立が期待される。

Jatropha, Heavy metal, Phytoremediation

発表責任者：明石欣也（akashi.kinya@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：4A012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 生物膜と包括担体を併用した SNAP 法による窒素除去の試み

# Attempt of nitrogen removal by SNAP method in combination with biofilm and immobilization carrier

○海老根 会、高品 知典、角野 立夫（東洋大生命）
○KAI EBINE, TOMONORI TAKASINA, TATUO SUMINO (Toyo Univ.)

【目的】アナモックス法は、アンモニアと亜硝酸を嫌気性アンモニア酸化細菌によって、窒素ガスに変換させる反応であり、環境負荷を低減する高効率・省エネルギー型の窒素除去技術として期待を集めている。処理システムは、廃水中のアンモニアの約半量を亜硝酸にする部分亜硝酸化槽と、アンモニアと亜硝酸を窒素ガスに変換するアナモックス槽の 2 槽型で構成されている。近年、更なる省スペース化や設備更新の観点から、一槽型の SNAP 法が注目されている。SNAP 法とは、部分亜硝酸化反応とアナモックス反応を同一槽内で行う、一槽型の窒素除去技術である。筆者らは海水程度の NaCl を含んだ窒素含有廃水に対し SNAP 法の適応を検討している。本研究では、まず淡水系でのアナモックス菌群（RUN1、生物膜）と硝化細菌群（RUN2、包括固定）の集積培養をそれぞれ行い、この 2 つの系を組み合わせた SNAP 法（RUN3）を試み、処理特性を検討した。
【方法】アナモックス菌群の集積培養（RUN1、生物膜）には不織布を充填した固定床型リアクター(300mL)を用いた。硝化細菌群の集積培養（RUN2、包括固定）には包括担体を 10%充填した流動床型硝化リアクター(1.1L)を用いた。RUN1 には館林市Ａ下水処理場の返送汚泥から集積したアナモックス菌群を種汚泥として投入し培養した。包括担体は群馬県板倉町浄化センターの返送汚泥をポリエチレングリコール系プレポリマーで包括固定（3㎜ 角型担体）したものである。亜硝酸型硝化を維持するため担体加熱法で担体を処理した。RUN1 と RUN2 での馴養が完了した後に、RUN2 の装置に RUN1 の生物膜担体を投入し SNAP 装置（RUN3）とした。SNAP 装置は風量を制御することにより DO=0.5mg/L とし、pH=7.8、35℃、HRT=15.3～17.5h で運転した。廃水はすべて合成廃水を使用した。原水、処理水の $NH_4$-N、$NO_2$-N、$NO_3$-N を分析し処理特性を評価した。
【結果】アナモックス菌群の集積培養（RUN1、生物膜）では、容積負荷 0.24kg-N/$m^3$/d で運転を開始した。その後、1.33kg-N/$m^3$/d まで馴養を行い、T-N 除去速度 1.19kg-N/$m^3$/d を得た。硝化細菌群の集積培養（RUN2、包括固定）では、容積負荷 0.12kg-N/$m^3$/d で運転を開始し容積負荷 0.31kg-N/$m^3$/d まで馴養を行い、硝化速度 0.29kg-N/$m^3$/d を得た。馴養終了後、RUN2 に RUN1 の生物膜担体を投入し SNAP 槽（RUN3）とし、$NH_4$-N150～170mg/L 含有合成廃水の SNAP 処理運転を行った。処理水 $NH_4$-N7～22mg/L、T-N34～55mg/L を得、亜硝酸型硝化とアナモックス反応が同時に進行していると判断した。運転稼働 8 日目で窒素除去率 73%に達した。さらに負荷を上昇させ処理特性を解析した。

single-stage nitrogen removal using anammox and partial nitritation, partial nitritation, wastewater treatment

発表責任者：海老根　会（s39101500032@toyo.jp）

発表番号：4A013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# アセトニトリル分解能を有する微生物の探索と機能解析に向けて

# Screening and primary characteristics of an acetonitrile-degrading microorganism

○齋藤 麻理、岡部 海里、森澤 理紗、菅原 佳奈子、菅野 靖史（日本女子大・理・物生）
○Mari SAITO, Kairi OKABE, Risa MORISAWA, Kanako SUGAWARA, Yasushi SUGANO (Dept. Chem. Biol. Sci., Fac. Sci., Japan Women's University)

【背景と目的】

アクリル繊維や合成樹脂の原料として工業利用されているアクリロニトリルを生成する際の副産物として、アセトニトリルが生成する。アセトニトリルは、液体クロマトグラフィーの移動相などに利用されており、水と混合して用いられることが多い。水により嵩の増した廃液は、高温燃焼による処理が施され、多大なエネルギーが浪費されている。他方では、アセトニトリルを加水分解する微生物の報告もある。これらの微生物は分解産物としてアンモニアを放出するが、アンモニアには強い毒性があるので、これを如何に処理するかが課題となっている。本研究では、アセトニトリルを完全に無害な形まで分解できる菌を得ることを目的として探索を行い、発見された菌のアセトニトリル及びアンモニア消費の有無を検証した。

【方法と結果】

天然の干潟から、アセトニトリルを唯一の窒素源として含む培地中で生育が可能な菌を発見し、これを RM1 と命名した。アセトニトリルを唯一の窒素源とする培地と窒素源を含まない培地の両方で RM1 を培養し、菌体の増殖を濁度により測定した。測定の結果、RM1 が前者の培地で増殖することに加え、栄養豊富な環境から移された直後は窒素欠乏の培地中でも増殖することを確認した。つまり、RM1 はアセトニトリルを利用して増殖しており、加えて栄養を貯蔵する能力も持つことが示された。そこで、RM1 のアセトニトリル消費の有無の直接的な定量を目的とし、RM1 培養液中に含まれるアセトニトリル量の推移を GC-MS で定量することを試みた。また、培養液中にアセトニトリルの分解産物の一つであるアンモニアが存在するか否かを調べることで RM1 によるアセトニトリル消費を間接的に評価することとし、イオンクロマトグラフィー(IC)を用いて $NH_4^+$の定量を行った。測定は、アセトニトリルを唯一の窒素源とする培地に RM1 を加えたフラスコと、RM1 を加えない Control のフラスコの 2 通りを用意し、IC による $NH_4^+$の測定に加え、菌体の増殖を濁度により測定した。測定の結果、菌体増殖が定常状態に達した頃から $NH_4^+$が検出され始め、徐々に量を増やして行くことが判明した。菌体増殖期には $NH_4^+$の検出は見られなかったことから、RM1 は、アセトニトリルを分解して得たアンモニアを、全て自身の増殖に利用していることが示唆される。一方、検出された $NH_4^+$は、定常期から死滅期に入る細胞由来のものだと推測している。以上の結果から、RM1 がアセトニトリル及びアンモニアの分解能を持つことが明らかになった。

Acetonitrile, Degradation, Waste treatment

発表責任者：菅野　靖史（suganoy@fc.jwu.ac.jp）

発表番号：4A014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

バクテリアの還元型リン化合物輸送機構の解析
Characterization of a bacterial transport system for reduced phosphorus compounds
○廣田 隆一、森部 重彬、作田 敦士、野口 麗次、池田 丈、黒田 章夫（広島大院先端物質・分子生命）
○Ryuichi HIROTA, Shigeaki MORIBE, Atushi SAKUDA, Reiji NOGUCHI, Takeshi IKEDA, Akio KURODA (Hiroshima Univ)

リンは生物の必須元素であり、一般的に生物がリン源として使用するのはリンの酸化数が+５価のリン酸（$PO_4^{3-}$）であると認識されている。しかしながら、バクテリアには亜リン酸（$HPO_3^{2-}$, 酸化数+3）や次亜リン酸（$H_2PO_2^-$, 酸化数+1）などの還元型リン化合物をリン源として利用するバクテリアが存在する。我々はこれまでにバクテリアの亜リン酸酸化酵素（PtxD）を利用することで、抗生物質を使用しない安価な微生物培養や亜リン酸を用いた植物の効率的なリン施肥が可能になることを示してきた。亜リン酸を含む還元型リン化合物の輸送機構の解明は、PtxD を異種発現させた細胞の増殖において重要であるだけでなく、リンアナログとしての細胞内動態を考えるうえでも重要である。そこで本研究では大腸菌および亜リン酸酸化細菌由来の還元型リン化合物の輸送体の解析を行った。

PtxD を有する *Pseudomonas stutzeri* WM88, *Ralstonia* sp. 4506 株などの亜リン酸酸化細菌は亜リン酸輸送体として ATP-binding cassette（ABC）型のトランスポーターである PtxABC を有する。大腸菌の無機リン酸輸送体には低親和性（PitA, PitB）および高親和性（PstSCAB, PhnCDE）の 4 種類が存在することが知られている。PhnCDE は亜リン酸輸送能を持つことが報告されているが、Phn を欠損した大腸菌に *ptxD* を導入した株も亜リン酸利用能を示すことから、他の無機リン酸のトランスポーターが亜リン酸の輸送能を有すると予測された。そこで、4 種類の無機リン酸輸送体全てを破壊した大腸菌株 MT2012 を作製し、大腸菌のリン酸輸送体および *Ralstonia* sp. 4506 株由来 PtxABC をそれぞれ単一で発現する株を作製した。この株を用いて亜リン酸培地における増殖を調べ各輸送体の亜リン酸輸送能の比較を行った。その結果、還元型リン化合物輸送体である PtxABC、低親和性リン酸輸送体 PitA 発現株が亜リン酸培地における良好な生育を示し、これらの輸送体は高い亜リン酸輸送能力を持つことが示唆された。

phosphite, reduced phosphorus compound, transporter

発表責任者：廣田隆一（hirota@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4A015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

*Pseudomona stutzeri* NT-I 株の Dimethyl diselenide 合成速度促進因子の探索
Dimethyl diselenide synthesis rate promoting factor of *Pseudomona stutzeri* NT-I
○大塚 治[1]、黒田 真史[2]、池 道彦[2]、山下 光雄[1] ([1]芝浦工大 SIT 総研 レアメタルバイオリサーチセンター、[2]大阪大院・工・環エネ)
○Osamu Otsuka[1], Masashi Kuroda[2], Michihiko Ike[2], Mitsuo Yamashita[1] ([1]RMBC, Res. Org. Adv. Eng. SIT, Shibaura Inst. Tec., [2]Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

[目的] 廃水からのセレン浄化・回収技術の確立を目指して、我々は高濃度のセレン酸を好気的に還元するセレン酸還元細菌 *Pseudomonas stutzeri* NT-I 株を単離した。NT-I 株は水溶液中のセレン酸を固体の元素態セレン(バイオセレン)まで還元し、さらにバイオセレンを還元して揮発性の Dimethyl diselenide(DMDSe) を合成する。DMDSe は硝酸溶液中では Methylseleninic acid となり可溶化するため、NT-I 株が合成し揮発した DMDSe は硝酸による回収が可能である。我々は NT-I 株の DMDSe 合成能を利用して模擬廃水からのセレン回収を試み、培養開始から 120 時間目には初期セレン濃度の 71.2%を回収できた。しかし本技術の実用化に向けて、セレン回収処理が長時間となることが課題として挙げられる。そこでセレン回収時間の短縮を目指し、本研究では DMDSe 合成速度促進因子を探索した。

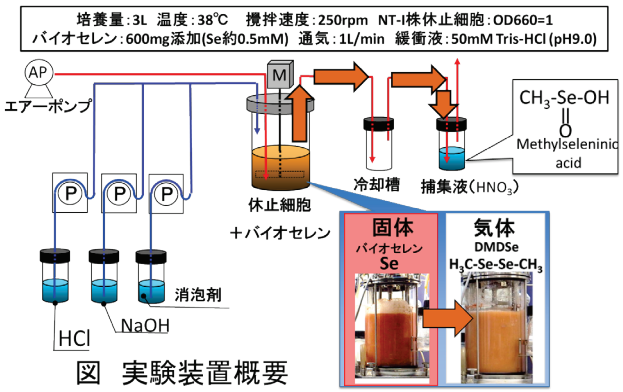


図 実験装置概要

[実験方法] NT-I 株を TSB 培地で 38 ℃, pH 9.0, 撹拌速度 250 rpm, 通気量 1 L/min の条件で 24 時間培養した。培養液から遠心分離(5,000 rpm, 20 分間, 4 ℃) で菌体を得た。菌体を 50 mM Tris-HCl 緩衝液(pH 9.0)で 2 回洗浄し、OD660=1 になるように同緩衝液に再懸濁し、この懸濁液を休止細胞とした。休止細胞 3L をバイオリアクターに移し、基質にバイオセレンを 600 mg 添加して DMDSe 合成反応を開始した。DMDSe の捕集液には硝酸を用いた。捕集液に含まれるセレン量を NT-I 株が合成した DMDSe 量とし、単位時間当りの DMDSe 合成量を菌体量(OD660 値)で除したものを DMDSe 合成速度とした。DMDSe 合成速度促進因子を探索するために、バイオセレンと共にアミノ酸添加や、温度など物理的因子を変化させて DMDSe 合成速度を求めた。

[結果] NT-I 株の菌体量を一定にするために、実験方法に従って休止細胞を用いた。NT-I 株の休止細胞にバイオセレンのみを添加すると DMDSe 合成速度は 0.13 μM / h・OD であった。アミノ酸の中ではメチオニンを添加すると DMDSe 合成速度は 1.28 μM / h・OD となり、バイオセレンのみと比べて約 10 倍に増大した。また通気量を 1 L/min から 0 L/min に変更すると、DMDSe は合成されなかった。この結果からメチオニンと通気が DMDSe 合成速度促進因子であると示唆された。

*Pseudomona stutzeri* NT-I, selenium, dimethyl diselenide

発表番号：4A016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 環境水中における相互変動因子評価技術の構築

# Evaluation method of interactive factors for algae variations in water environment

○大島 嵩裕[1]、三澤 拓真[1,2]、坪井 裕理[2]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3]（[1]横市院・生命医、[2]理研・CSRS、[3]名大院・生命農）
○Takahiro OSHIMA[1], Takuma Misawa[1,2], Yuuri Tsuboi[2], Yasuhiro Date[1,2], Jun Kikuchi[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Med. Life Sci., Yokohama City. Univ. Japan, [2]RIKEN CSRS, Japan, [3]Grad. Sch. Bioagri. Sci., Nagoya Univ. Japan.)

＜序論＞近年、経済活動の進展に伴い、日本各地でゲリラ的な集中豪雨や、関東甲信越を中心とした記録的な大雪、更には国内最高気温記録が更新されるなど様々な環境変動が発生している。特に水環境では、平成26年4月に水循環基本法が制定されるなど、環境変動から水循環の保全、維持、回復を目指し、国の水環境に対する意識が高まってきている。そのため、日本各地の河口や内湾、湖沼等の環境水中で相互的に関係し合い環境変動を引き起こす環境変動因子の特定と、その関係性を評価する環境評価技術の確立が急務の課題である。既に我々は、環境試料中に存在する有機物、無機物等の化学的情報、微細藻類や微生物群集等の生物学的情報の統合解析に成功しており、今回は更に気温、水温、降水量等の気象学的情報をも活用し、多変量時系列解析の一種であるVARモデルを主軸としたデータマイニング技術を駆使することにより、環境変動因子評価技術の構築を目指した。

＜方法＞　日本各地における河口や内湾、湖沼等の環境水サンプルをNMR、ICP-OES、次世代シーケンサー等で計測した。また、各サンプリング地点の気象および海洋データは気象庁と東京都港湾局から入手した。得られたデータは、フリーソフトウェアRを用いて主成分分析(PCA)などの多変量解析に供試し、各サンプリング地点における特性評価を行った。さらに、先に述べた全データを変数として用い、多変量時系列分析（VARモデル）による解析を行い、環境変動に重大な影響を与える環境変動因子の特定を行った。

＜結果・考察＞各種分光計測データおよび気象・海洋データを多変量解析により評価した結果、地域間の特性や淡水・河口・海水等における水域の特徴を鳥瞰することが可能であった。そこで東京湾の試料に対して、平成 22 年度のプランクトン増殖の変動に影響を与える環境変動因子の探索を行った。その結果、VAR 法に改良を加えることにより変動因子評価法を構築し、赤潮優占種となった *Heterocapsa* spp.の増減に影響を与える変動因子として鉄などのミネラルをスクリーニングすることに成功した。以上のことから、本研究において構築した環境変動因子評価法は、赤潮優占種の増殖を引き起こす重要な物質群の特定に有用であり、環境水中に存在する有機物、無機物、微生物群同士の相互作用や気象情報による影響評価などに応用可能であることが示唆された。

environmental Analysis, environmental water profiling, data mining

発表番号：4A017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ユーグレナによる低酸素下ワックスエステル合成における呼吸鎖電子伝達系の役割解明

# Study on the role of respiratory chain in wax ester fermentation in *Euglena gracilis*

○中澤 昌美[1,2]、太田 剛志[1]、井上 凌太[1]、石川 孝博[2,3]、上田 光宏[1]、阪本 龍司[1]、乾 博[4]、中野 長久[1]、宮武 和孝[5]（[1]阪府大生命、[2]科学技術振興機構 CREST、[3]島根大生資、[4]阪府大総リハ、[5]帝塚山学院大人科）

○Masami Nakazawa[1,2], Tsuyoshi Ohta[1], Ryota Inoue[1], Takahiro Ishikawa[2,3], Mitsuhiro Ueda[1], Tatsuji Sakamoto[1], Hiroshi Inui[4], Yoshihisa Nakano[1], Kazutaka Miyatake[5] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]CREST, JST, [3]Shimane Univ., [4]Dep. of Reh, Osaka Pref. Univ., [5]Tezukayama Gakuin Univ.)

微細藻類ユーグレナは、光合成による二酸化炭素低減と、光合成産物を生体内原料とした油脂生産が可能であるため、二酸化炭素をバイオ燃料に変換することのできる生物として注目されている。ユーグレナの油脂生成メカニズムは、他の光合成油脂生産生物とは全く異なっている。現在の予想メカニズムでは、まず細胞が低酸素・嫌気状態に曝露されると貯蔵多糖パラミロンを分解し、解糖系による ATP 獲得を行う。そして、解糖により生じた余剰の還元力および炭素を細胞内で処理するために、ミトコンドリアにおいて脂肪酸 β 酸化系の逆行により、アシル-CoA を合成し、小胞体に輸送後ワックスエステル（WE）へと変換・蓄積すると考えられている。しかし、本予想経路では、系全体の酸化還元バランスが不完全であり、未同定経路の関与が示唆されてきた。一方、ユーグレナの生産する WE には奇数鎖アシル基を有する分子も多く含まれており、この合成には逆向き TCA 回路によるフマル酸からコハク酸への変換が寄与していると予想されてきた。このことは、電子伝達系における最終電子受容体としてフマル酸を用いる無酸素下 ATP 獲得機構である「フマル酸呼吸」が低酸素・嫌気下でのユーグレナ WE 合成に寄与している可能性を示している。そこで、本研究ではユーグレナの低酸素下 WE 合成における呼吸鎖電子伝達系の寄与とその役割を解明するために、阻害剤を用いた検討を行った。

実験には、光合成電子伝達の影響を除くために、葉緑体欠損株を従属栄養培養したユーグレナを用いた。対数増殖後期まで振とう培養したユーグレナを、アルゴン通気により低酸素処理した後、電子伝達阻害剤を添加し、24 時間後の各種パラメーターを測定した。複合体 I の阻害剤であるロテノンを添加すると、濃度依存的に WE 量が低下した。生成した WE の鎖長分布はコントロールと比較して長鎖側にシフトしていた。複合体 II の阻害剤であるパモ酸ピルビニウム（PP）を添加した場合にも、濃度依存的に WE 量が低下した。PP 添加時の WE の鎖長分布は、長鎖側へのシフトが起こると同時に、奇数アシル鎖を有する WE 比率が低下する傾向が見られた。これらの阻害剤添加時の貯蔵多糖パラミロン消費量は、コントロール細胞と比較して上昇しており、パラミロンから WE への炭素変換効率は電子伝達系阻害剤の添加により低下していた。

これらの結果より、ユーグレナの低酸素下での WE 合成には、呼吸鎖電子伝達系が寄与していることを実験的に初めて証明した。複合体 I および II による還元力の消費が、WE 代謝メカニズムにおいて重要であることが示唆されたため、現在各阻害剤添加時の細胞内酸化還元バランスの測定を進めている。

*Euglena gracilis*, Wax ester fermentation, Respiratory chain

発表責任者：中澤 昌美（mami@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4A018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 代謝工学を用いた大腸菌によるアンモニア生産

# Ammonia production with metabolic-engineered *Escherichia coli*

○三上 洋祐[1]、米田 久成[1]、立上 陽平[1,2]、青木 航[1,3]、植田 充美[1,3] ([1]京大・農・応用生命、[2]日本学術振興会特別研究員(DC1)、[3]バイオ計測センター)
○Yosuke MIKAMI[1], Hisanari YONEDA[1], Yohei TATSUKAMI[1,2], Wataru AOKI[1,3], Mitsuyoshi UEDA[1,3] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]KIST-BIC)

【背景・目的】アンモニアは地球上の資源や人の生活において重要な物質であり、さらに未来型エネルギーである水素の液体キャリアとしても注目を集めている。アンモニアの生産法としては、100 年の歴史を持つハーバーボッシュ法が知られているが、この方法は高温高圧反応により膨大なエネルギーを消費することが大きな課題である。我々は代謝工学を用いた大腸菌 *Escherichia coli* によるアンモニア生合成系の確立を目指しており、原料として注目しているのは農林水産廃棄物（バイオマス）である。本発表では、それらの廃棄物からアンモニアを取り出すモデル系を構築することを試みた。

【方法・結果】まずモデル窒素原料としてスレオニンを培地に用い、スレオニン代謝関連遺伝子を検討した。これらの遺伝子を過剰発現した大腸菌を用いて、スレオニンを唯一の窒素源とする培地で培養し、アンモニアが生成されることを確認した。次に、Yeast Extract を唯一の炭素源および窒素源とする培地でアンモニア生産を行ったところ、アンモニア生産量はコントロールに比べ倍増した。さらに、遺伝子欠損株などを用いた生産量向上の検討も行ったので、これらの結果も合わせて発表する[1]。

[1] Y. Mikami *et al.,* submitted.

metabolic engineering, ammonia, *Escherichia coli*

発表番号：4A019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Establishment of volumetric oxygen transfer coefficients in batch fermentation for optimal algal biofuel production by *Aurantiochytrium* sp. NBRC102614 strain

○BONIFACIUS PEDRO SATRIA, FUMIYA MATSUSHITA, HIROSHI MATSUURA (National Institute of Technology, Asahikawa College)

**[Background]**

For the past few years, microalgae have been attracting a lot of attention as biomass energy due to the fact that they produce a large amount of oil and valuable chemicals despite using less resource compared to other bioresources. The produced oil usually contains saturated fatty acids, which can be used as an alternative to fossil fuels. In order to practically utilize these chemicals, batch fermentation of microalgae is indispensable. Among oil-producing microalgae, *Aurantiochytrium* sp. is a heterotrophic Labyrinthulomycetes with a high growth rate and an exceptional lipid accumulation ability. Therefore, it is probable that *Aurantiochytrium* sp. will provide algal biofuel when mass cultivation is established. Optimal culture conditions of one species in batch fermentation differ from those in flask cultivation due to several factors such as the amount of microorganism, and feedback inhibition. Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa), which determine the amount of dissolved oxygen in the medium, also play an important role in batch cultivations and need to be established for efficient batch cultivation of microalgae.

In this study, we assessed the relation between the kLa in a jar fermentor and the production of fatty acids by *Aurantiochytrium* sp. NBRC102614 in order to establish the optimal culture conditions for algal biofuels production.

**[Methods and Results]**

*Aurantiochytrium* sp. NBRC102614 strain was used in this study. Volumetric oxygen transfer coefficients equation of the jar fermentor utilized in this study was determined before fermentation. Batch fermentation experiments were conducted in an 8 L jar fermentor with 5 L of GTY culture medium. With a constant agitation speed of 150 rpm and temperature of 25 °C, batch fermentations were carried out under kLa of 11, 15, and 19 for 72 hours. 200 mL of the culture medium is then centrifuged (3000 rpm, 15 min.) and freeze-dried as a sample. Lipids were extracted using the Folch method, dried by evaporation, and weighed afterwards. The results of the experiments suggested that under agitation speed of 150 rpm and the temperature of 25°C, increasing value of kLa decreases the amount of fatty acid contents produced by *Aurantiochytrium* sp. NBRC102614 strain. Composition of fatty acid contents from each sample are analyzed, and will be discussed at the poster session.

Biofuel, Aurantiochytrium, Jar fermentor

発表責任者：松浦裕志（matsuura@asahikawa-nct.ac.jp）

発表番号：4A020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 植物バイオマス糖化液を用いた新奇ラビリンチュラ類によるバイオ燃料生産

# Microbial Production of Biodiesel Fuel from saccharified plant biomass by novel thraustochytrids

○林 雅弘[1]、松田 綾子[1]、松田 高宜[2]、泉 可也[2]([1]宮崎大農、[2]（株）bits)
○Masahiro HAYASHI[1], Ayako MATSUDA[1], Takanori MATSUDA[2], Yoshiya IZUMI[2] ([1]Univ. Miyazaki, [2]bits, co. ltd)

海洋性の微生物・微細藻類の中には、高度に脂質を蓄積するものがいくつも知られており、食品素材やバイオ燃料など様々な方面から産業利用が検討されている。ラビリンチュラ類は従属栄養性の真核微生物で、これまで応用面での検討例が多いオーランチオキトリウム（*Aurantiochytrium*）など 2 科 11 属が含まれることが最近の分子系統解析)によって示されており、いずれの属のラビリンチュラも多価不飽和脂肪酸（PUFA）を細胞内に蓄積し、その高い増殖性や脂質蓄積性から機能性脂質生産を中心に産業利用が検討されている。最近ではその高い脂質蓄積性を生かしてラビリンチュラによるバイオ燃料生産の検討が進められている。ラビリンチュラを利用したバイオ燃料生産における課題として、ラビリンチュラは従属栄養性であるため、その培養に炭素源として多量の糖質が必要なことがあげられる。そのため、食糧と競合しないリグノセルロースバイオマス（コーンファイバー、稲わらなど）由来の糖質、特にキシロース、アラビノースなどのペントースを糖源として有効に利用することが必要である。

本研究では、キシロースまたはアラビノースを唯一の炭素源とする完全合成培地を選択培地として、日本の沿岸域の海水サンプルからペントース資化性ラビリンチュラを分離した。分離株のうち、特にペントース資化能と脂肪酸含量が高い mh1882 株、mh1912 株、mh1913 株について、植物バイオマス（広葉樹クラフトパルプ）糖化液を用いた培養を 2L-ジャーファーメンターを用いて実施した。mh1882、mh1912、mh1913 のいずれの株においても、バイオマス糖化液中に含まれるペントースを最終的に 100%資化することが確認され、バイオマス糖液に含まれるペントースを完全に資化できるラビリンチュラ株を取得することができた。しかしながら、いずれの株においてもカタボライトリプレッションが確認された。また、キシロースはあまり効率的に資化されず、キシロースを完全に資化するにはグルコースの 4 倍近い日数を必要とした。

さらに分離株の高密度培養を目指して流加培養を行い、mh1912 株による 6 日間の流加培養で乾燥菌体収量 81g/L、対糖収率 54.2%、菌体の脂質含量 45.8%という培養結果を得た。さらに流加培養条件を最適化することにより、本株の培養効率はさらに向上するものと考えられる。今後はカタボライトリプレッションの回避と、より効率的にバイオマス糖液を利用できる株の創成を目指して分離株の分子育種も行っていく。

biodiesel Fuel, thraustochytrids, plant biomass

発表責任者：林　雅弘（hayash-m@cc.miyazaki-u.ac.jp）

発表番号：4A021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# コリネ型細菌による UV 吸収性アミノ酸の生産

# Production of a UV-absorbing amino acid by recombinant Corynebacterium glutamicum

○柘植 陽太[1]、山本 省吾[2]、曽田 匡洋[2]、荻野 千秋[3]、近藤 昭彦[3,4]（[1]神戸大・研究環、[2]長瀬産業株式会社、[3]神戸大院・工、[4]理研・CSRS）
○Yota TSUGE[1], Shogo YAMAMOTO[2], Masahiro SOTA[2], Chiaki OGINO[3], Akihiko KONDO[3,4]
([1]Kobe Univ. Adv. Sci. Tech., [2]NAGASE & CO., LTD, [3]Kobe Univ. Grad. Sch. Eng., [4]RIKEN CSRS)

【背景と目的】紫外線は生体に大きな悪影響を及ぼす。UV-B（波長 280-315 nm）は生体高分子を破壊し、メラニン色素を生成することで日焼けの原因となる。また、紫外線の 95%を占める UV-A（波長 315-400 nm）は、一年中肌に暴露し、しわやたるみといった肌の光老化の原因として近年問題視されている。シアノバクテリアや海洋藻類は 310 nm から 365 nm の主に UV-A 領域に極大吸収波長を有するアミノ酸 mycosporine やその類似アミノ酸（mycosporine-like amino acid）を生体内で合成することにより紫外線の有害性を防いでいる。従ってこれら UV 吸収性アミノ酸の高生産が可能となれば、日焼け止めや化粧品原料としての利用が期待できる。近年、本アミノ酸や類似アミノ酸の生合成に必要な遺伝子クラスターがシアノバクテリアやアクチノバクテリアから明らかにされた[1,2]。本研究ではグルタミン酸などのアミノ酸生産菌として知られるコリネ型細菌を宿主として、mycosporine の類似アミノ酸である shinorine（mycosporine-glycine-serine）の生産の可能性について検討した。
【方法と結果】*C. glutamicum* ATCC13032 株の lactate dehydrogenase 遺伝子（*ldhA*）欠損株に *Actinosynnema mirumshinorine* 由来の shinorine 生合成遺伝子群を導入し、栄養培地条件下でグルコン酸を炭素源としてフラスコ条件下で培養したところ、shinorine の菌体外への生産を確認した。次にトランスアルドラーゼ遺伝子（*tal*）を破壊したところ、shinorine の生産量は約 5 倍向上した。さらにペントースリン酸経路遺伝子群の高発現を行った結果、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子（*gnd*）とリボース-5-リン酸イソメラーゼ遺伝子（*rpi*）の高発現で shinorine 生産の向上が見られた。本研究は、文部科学省先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム・バイオプロダクション次世代農工連携拠点の形成の支援を受けて実施した。

[1]Balskus and Walsh (2010) Science, 329:1653–1656
[2]Miyamoto et al (2014) Appl Environ Microbiol, 80:5028–5036

Corynebacterium glutamicum, metabolic engineering, amino acid

発表番号：4A022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# マンナンバイオマスからのエタノール生産：β-マンナナーゼとβ-マンノシダーゼを細胞表層に提示した出芽酵母の開発

# From mannan to bioethanol: cell surface co-display of β-mannanase and β-mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*

○石井 純[1]、岡崎 文美[1]、Djohan Apridah Cameliawati[2]、原 清敬[1]、浅井 菜々実[1]、Andriani Ade[2]、寺村 浩[3]、Kahar Prihardi[3]、Yopi[2]、Prasetya Bambang[2]、荻野 千秋[3]、近藤 昭彦[3]（[1]神戸大・自科・研究環、[2]インドネシア科学院（LIPI）、[3]神戸大院・工・応化）

○Jun ISHII[1], Fumiyoshi Okazaki[1], Apridah Cameliawati Djohan[2], Kiyotaka Hara[1], Nanami Asai[1], Ade Andriani[2], Hiroshi Teramura[3], Prihardi Kahar[3], Yopi[2], Bambang Prasetya[2], Chiaki Ogino[3], Kondo Akihiko[3] ([1]Org. Adv. Sci. Technol. Kobe Univ., [2]Res. Cen. Biotech., Indonesian Institute of Sciences (LIPI), [3]Dept. Chem. Sci. Eng., Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

【目的】リグノセルロース系バイオマスには，グルカン，リグニン，キシランに次いでマンナンが豊富に含まれている。マンナンは植物のヘミセルロース成分やデンプン以外の貯蔵炭水化物の構成成物として知られ，針葉樹や蒟蒻芋・ナッツなどの主要な成分となっている。これまで，グルカンやキシランなどの多糖はバイオ燃料やバイオ化学品生産の原料として広く研究されてきたが，マンナンを原料としたこれらの発酵生産に関する研究はほとんど行われていない。そこで本研究では，マンナンを直接分解してエタノール生産を行うマンナン分解酵素を表層提示する酵母を開発することを目的とした。

【実験】マンナン分解酵素として，*Aspergillus aculeatus* 由来のβ-マンナナーゼとβマンノシダーゼを用いた。これらをコードする遺伝子をそれぞれ酵母細胞壁に結合する Flo1 由来のアンカータンパク質（Flo428）をコードする遺伝子と融合することで，これらの酵素を細胞表面に提示するためのプラスミドを構築し，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に導入することでマンナンからの直接エタノール発酵を試みた。

【結果】出芽酵母 *S. cerevisiae* はグルコースとほぼ同程度の速度で単糖であるマンノースを消費して生育でき，エタノールも生産できることが明らかとなった。構築したプラスミドを導入した酵母の酵素活性を測定したところ，β-マンナナーゼおよびβマンノシダーゼともに菌体触媒としての活性を有することが確認された。作出した表層提示酵母を用いて 1,4-β-D-マンナンからの発酵を行ったところ，マンナンを直接分解してマンノースにまで分解し，エタノールを生産できることが確かめられた。さらに，3 回の繰返し発酵においも発酵能を維持できることも確かめられた。最終的に，実バイオマスのモデルとしてアイボリーナッツ由来マンナンを用いた発酵試験を行ったところ，作出下表層提示酵母でエタノールを直接生産することにも成功し，さらにアイボリーナッツ由来マンナンをアルカリ加水分解処理することでエタノール発酵生産の効率を向上することにも成功した。

Mannan, Bioethanol, Cell surface display

発表責任者：石井純（junjun@port.kobe-u.ac.jp）

発表番号：4A023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# Integrated engineering of *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolymers from structurally unrelated sugars and glycerol

○MENGXIAO ZHANG, Yui Kawashima, Shunsuke Kurita, Izumi Orita, Satoshi Nakamura, Toshiaki Fukui (Grad. Sch. Biosic. & Biotechnol, Tokyo Tech.)

**Objective:** Among bacterial polyhydroxyalkanoates (PHAs), poly((*R*)-3-polyhydroxybutyrate-*co*-(*R*)-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-*co*-3HHx)] exhibits suitable physical properties for practical applications as ecofriendly bio-based biodegradable aliphatic polyesters. Although previously known P(3HB-*co*-3HHx) producers synthesized this copolyester from vegetable oils and fatty acids through β-oxidation, our group has reported the artificial pathway for biosynthesis of P(3HB-*co*-3HHx) from structurally unrelated fructose in *Ralstonia eutropha*. This study aimed to expand the carbon source range for efficient production of P(3HB-*co*-3HHx) by integrated engineering of *R. eutropha*.

**Methods and Results:** *R. eutropha* wild strain H16 has been known to well grow on gluconate and fructose, but can not assimilate glucose and shows very slow growth on glycerol. A recombinant strain NSDG-GG was constructed by integration of three chromosomal modifications in H16, which are introduction of $phaC_{NSDG}$ (encoding a mutant of PHA synthase with broad substrate specificity from *Aeromonas caviae*), deletion of *phaB1* (encoding acetoacetyl-CoA reductase), and mutations in *nag* operon and introduction of $glpFK_{Ec}$ for uptake and kination of glucose and glycerol, respectively. Further introduction of plasmid-borne $phaJ_{Ac}$((*R*)-enoyl-CoA hydratase), $ccr_{Me}$ (crotonyl-CoA carboxylase/reductase) and $emd_{Mm}$ (ehylmalonyl-CoA decarboxylase] into the strain NSDG-GG resulted in accumulation of 69 wt% of P(3HB-*co*-4.4 mol% 3HHx) from glucose and 60 wt% of P(3HB-*co*-2.1 mol% 3HHx) from glycerol. Further deletion of *phaB1*(encoding acetoacetyl-CoA reductase) from the chromosome led to increase of 3HHx fraction to 8.2 mol%, but decreased PHA content to 64 wt% on glucose, probably due to less provision of (*R*)-3HB-CoA by the lack of PhaB1. We thus examined to use $phaB_{NVYF}$ encoding a mutant of acetoacetyl-CoA reductase with weakened activity into the *R. eutropha* strain. The resulting strain produced P(3HB-*co*-3HHx) composed of 11 mol% 3HHx with high cellular content (75 wt%) from glucose.

(1) Insomphun C, Xie H, Mifune J, et al. Improved artificial pathway for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with high C 6-monomer composition from fructose in Ralstonia eutropha[J]. Metabolic engineering, 2015, 27: 38-45.

Polyhydroxyalkanoates, Poly(3-polyhydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate), *Ralstonia eutropha*

発表番号：4A025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 海洋性細菌 *Microbulbifer* sp. KIT-19 株のアルギナーゼの性質とミックスプライマーを用いたアルギナーゼ遺伝子の取得

# Purification, characterization and gene cloning of an alginase from marine bacterium *Microbulbifer* sp. KIT-19

○袴田 佳宏、庄山 創太、大箸 信一（金沢工大）
○Yoshihiro Hakamada, Souta Shouyama, Shinichi Ohashi (Kanazawa I.T)

【目的】トウモロコシやサトウキビ、木質系バイオマスを使ったバイオエタノール生産の研究は、これまでに数多く行われている。当研究室では海藻の中でも年間生産量が約 600 万トンと世界的に最も多いコンブに着目し、海藻分解能を有する組換え酵素を組合せ（酵素カクテル）て、酵素によるコンブの分解、および分解生成物を利用した海洋性酵母によるアルコール生産を目指している。コンブには特有のヌメリ（アルギン酸）があり、コンブ本体に酵素を作用させるためには、先ずこのヌメリ成分を除去する必要があると考えられる。そこで、本研究では、アルギナーゼを生産する海洋性細菌をスクリーニングして酵素の解析およびアルギナーゼ遺伝子を取得することを目的とした。
【方法】コンブを唯一の炭素源とした集積培養で得られた株の中から、1 株を選抜後、16S rDNA (約 1.5 kb)の塩基配列を決定して分離菌の帰属を推定した。培養液中のアルギナーゼを DEAE-Toyopaerl 650M により精製し、アルギン酸の分解パターンを含め酵素学的諸性質を検討した。アルギナーゼ遺伝子の取得に関しては、既知のアルギナーゼ遺伝子のコンセンサス配列からミックスプライマーを設計し、分離菌のゲノムに対して PCR を行った。得られた約 600 bp のアルギナーゼ遺伝子の増幅 DNA 断片を元に、プライマーウォーキングによりアルギナーゼ遺伝子全長の塩基配列を決定した。ゲノムより PCR で取得したアルギナーゼ遺伝子を T-Vector pMD19 にサブクローニング後、目的遺伝子を pColdⅡベクターに連結し、得られたキメラプラスミドをシャペロン大腸菌 pTf16/BL21 に導入した。本形質転換大腸菌を 15℃の低温化で培養して、アルギナーゼ遺伝子を高発現させ、培養液から組換えアルギナーゼを回収した。組換え酵素の精製は、ヒスタグを利用した HisTALON$^{TM}$ Gravity column を用いて行い、その精製酵素の酵素学的な諸性質を検討した。
【結果】分離菌は 16S rDNA (約 1.5 kb)の塩基配列の解析結果から、*Microbulbifer* sp. KIT-19 と命名した。本菌の精製アルギナーゼはリアーゼ活性を有せず、その最適反応 pH は 8 付近、最適反応温度は 40℃、アルギン酸に対して分解作用を示し、100 mM NaCl の共存下で活性は 2.3 倍となった。分子量は約 28 kDa、アルギン酸の分解によりオリゴ糖の生成が認められた。一方、取得した遺伝子は、*Microbulbifer* sp. 6532A と 97.0%の最も高いホモロジーを示した。最適反応 pH は 8 付近、最適反応温度は 40℃で菌体由来のアルギナーゼと類似していたが、推定分子量は約 37 kDa であることから、PCR で取得した遺伝子は、菌体から精製した酵素の遺伝子ではなかった。

alginase, characterization, Microbulbifer

発表番号：4A026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 粗粉砕草本系バイオマス含有リグニン分解酵素について

# Some properties of lignin degrading enzyme on milled rice straw without alkaline pretreatment

○伊藤 龍、伊藤 雅紀、湯下 佳和、倉根 隆一郎（中部大院）
○Ryu ITO, Masaki ITO, Yosikazu YUSITA, ryuitirou KURANE (Tyubu Univ.)

〈目的 〉二酸化炭素排出量削減のためのバイオエタノールが注目されている。第一世代バイオエタノールはトウモロコシなどの食糧デンプンを原料として生産されているため、食糧との競合が起こり、食糧問題や作物の価格上昇等深刻な問題も引き起こされている。そこで、非食部位である稲わらなどの草本系、木質系バイオマスのセルロースバイオマス資源等からの第二世代バイオエタノールの開発が期待されている。しかしながら、そのためには脱リグニンの工程が必要不可欠であり、現行の脱リグニン前処理工程ではアルカリ等処理が必要とされているが、これらの前処理工程よりそ生じるリグニン含有排水処理問題が実用化への最大の壁となっている。そこで本研究では現行のアルカリ等前処理によらない生物的脱リグニン法をめざして、リグニン分解酵素であるマンガンペルオキシダーゼ等を強力に産生する新規微生物の探索を行った。
今大会では SDS ページを用いて活性のあるバンドの特定、及び、取得菌株の産生酵素を用い糖化の検討も行った。
〈方法〉
SDS ページを用いて、染色にはザイモグラム染色を用いて活性のあるバンドの確認を行った。
また、当核菌株の産生粗酵素及び、SA 株の粗酵素を用いて、前処理を施した稲わらを基質として糖化を行い、DNS 試験を行い還元糖量の測定を行った。

〈結果〉
ザイモグラム染色により、既存のリグニン分解酵素、ラッカーゼ、MaP、LaP とは、異なった 140kDa あたりに活性のあるバンドを得ることが出来た。
また、酵素を用いた結果についても報告を行う。

Lignin-degrading enzyme, Saccharification

発表番号：4A028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ゲノム工学を用いた物質生産微生物工場開発の新戦略

# The creation of high efficiency bioplastic producing host strain by genome engineering

○門屋 亨介[1,2]、松本 謙一郎[1]、大井 俊彦[1,2]、田口 精一[1,2]（[1]北大院工、[2]JST-CREST）
○ Ryosuke KADOYA[1,2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Toshihiko OOI[1,2], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

（研究背景）再生可能なバイオマスを原料として微生物合成される多元ポリ乳酸は、生分解性を有することから炭素循環システムに組み込まれる環境調和型プラスチック素材である。これまで、ポリマー生産性の増大や質的向上を目指し、(1)遺伝子発現システムの強化、(2)酵素進化工学、(3)代謝工学、(4)培養工学などが、主要戦略として取り組まれてきた。さらに、これら戦略を組み合わせ、ポリマーの生産性向上が図られてきた。このような背景の下、本研究では多元ポリ乳酸合成に優良な形質の探索を目指して、大腸菌を対象にトランスポゾン変異をゲノムワイドに導入したところ、複数の高生産変異株が取得できた。本成果の示すところは、ポリマー合成に正の影響をもたらす変異が複数存在することを示唆し、これらを顕在化して利活用することはポリマー微生物合成の新しい戦略になると考えられる。

（方法・結果）乳酸ポリマー生合成系遺伝子群を導入した組換え大腸菌にトランスポゾン（mini-Tn5）を導入し、変異体ライブラリーを作成した。ポリマー生産量が向上したと考えられるコロニーを選抜するために、変異株ライブラリーをポリマーを特異的に染色可能なナイルレッドを含む寒天培地で培養し、呈色反応を用いた一次スクリーニングを行なった。約 1 万個のコロニーから野生株と比較して強い呈色反応を示したコロニーを選抜した。続いて強い呈色反応を示した菌株を液体培地で培養後、HPLC を用いた二次スクリーニングを行ない、最終的に最も高いポリマー生産性を示した変異株を 1 株選抜した。この株のポリマー生産量は野生株と比較して約 40%増大しており、また、野生株と比較してグルコースが効率的にポリマー合成に転換することがわかった。変異解析の結果、ペプチドグリカン合成に関与する遺伝子をコードする *mtgA* に Tn-5 が挿入されていた。本変異株は、一定以上のポリマー合成・蓄積に連動する様式で大腸菌細胞が肥大化し、結果的にポリマー収量およびグルコース消費が増大することが明らかになった。

Escherichia coli, genome engineering, polymer

発表責任者：田口　精一（staguchi@eng.hokudai.ac.jp）

発表番号：4A029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 汚泥分解微生物の生化学的解析

# Biochemical analysis of sludge-degrading microbes

○佐藤 颯音、藤井 克彦（山口大院農）
○HAYATO SATO, KATSUHIKO FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】

活性汚泥法では処理にともない余剰汚泥が発生する。余剰汚泥の減容ならびにバイオガスを生産する手段として嫌気消化槽を導入する下水処理場が増えている。しかし嫌気消化後の減容率は 30%程度に留まり、生分解性の低い消化汚泥が発生する。最近になって演者らは消化汚泥分解能を持つ 6 株の糸状菌株（以下、分解菌）を分離した。分解菌はキシラナーゼ、キチナーゼ、ケラチナーゼ活性を有しており、これらの酵素で消化汚泥を分解していると考えられた。そこで本研究では、①分解酵素の最適温度条件を検討するとともに、②酵素の発現パターンを SDS-PAGE で分析した。さらに、③分解酵素の発現が恒常的なものか、あるいは基質に誘導されるのかを考察した。

【方法】

消化汚泥を水に懸濁させたものを培地として分解菌を培養し、培養上清液を分解酵素溶液として用いた。酵素活性はキシラン、アゾキチン、アゾケラチンを基質として反応させ、遊離される還元糖あるいはアゾ色素の吸光度を測定することで算出した。SDS-PAGE に際しては、硫安分画法で培養上清を濃縮し、SDS-PAGE にかけた。ペプチドシーケンスならびにザイモグラフィーは既報文献等を基に行った。

【結果】

① 菌株ごとに差は見られるが、最適温度はキシラナーゼでは 37℃、キチナーゼ、ケラチナーゼでは 57℃で高い活性を持つ株が多かった。また、いくつかの株では最適温度が異なる複数の酵素を分泌生産している可能性が示唆された。

② SDS-PAGE の結果、分解菌は多様な分子量のタンパク質を分泌生産していた。この点からも、①で複数の最適反応温度を持つ酵素が見られた株は、分解酵素を複数生産している可能性が示唆された。ペプチドシーケンスの結果、既知の加水分解酵素と相同性の高いタンパク質が見つかった。一方、他の属種の加水分解酵素と似たタンパク質を生産しているものもあり、その分解菌の属種では最初の報告例と言える。ケラチンザイモグラフィーでは数株でゲル上においてもプロテアーゼ活性が観察された。

③ キシラナーゼとケラチナーゼは、分解基質により発言が誘導されることが分かった。

sewage sludge, degrading microorganisms, Hydrolase

発表番号：4A030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 大腸菌における 1,4-ブタンジオール人工生合成経路の構築

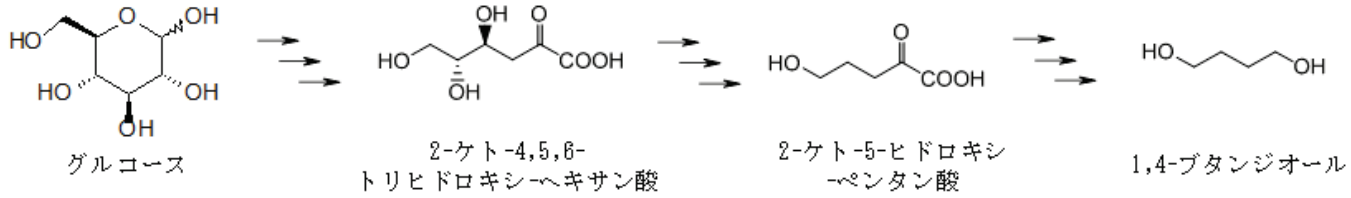
# Construction of 1,4-Butanediol artificial metabolic pathway in *Escherichia coli*

○江口 晃一[1]、工藤 基徳[2]、荒木 通啓[2]、石井 純[2]、山本 浩明[1]、近藤 昭彦[2] ([1]株式会社ダイセル、[2]神戸大学)
○Koichi EGUCHI[1], Motonori KUDOU[2], Michihiro ARAKI[2], Jun ISHII[2], Hiroaki YAMAMOTO[1], Akihiko KONDO[2] ([1]DAICEL CORPORATION, [2]Kobe Univ.)

【背景・目的】

近年、化石資源の枯渇や地球温暖化の観点から、再生可能資源であるバイオマス由来原料からの化学品生産に対して、社会的な要請が高まっている。我々は、エンプラ、フィルムなどに利用価値の高いポリブチレンテレフタレート(PBT)やポリウレタンの原料モノマーとして、また C4 環状化合物(テトラヒドロフランやγ-ブチロラクトン)の合成原料として広く利用されている 1,4-ブタンジオール(14BDO)に着目し、そのバイオマス由来原料からの製法開発を進めている。

本研究では、微生物を用いた効率的な 14BDO 発酵生産法の開発を目的に、*in silico* 代謝設計ツール M-path を利用し、出発原料のグルコースから中間体としてα-ケト酸を経由することを特徴とした経路を探索した。探索結果から 6 種類の人工生合成経路を考案し、遺伝子組換え大腸菌を用いた 14BDO の新規合成法を開発した。




【方法・結果】

6 種類の生合成経路の内から 1 つの経路を選択し、生合成経路を構築するために 9 種類の酵素遺伝子をクローニングした。それぞれの遺伝子に関して発現プラスミドを構築後、大腸菌に導入し、タンパク質発現及び期待する反応を触媒する酵素活性を有することを確認した。

次に大腸菌でグルコースから 14BDO を一貫生産するために、9 種類の酵素遺伝子を含む発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入した。この遺伝子組み換え大腸菌を用い、グルコースを含む培地で培養したところ、培養液中に 0.16 g/L の 14BDO の生成が確認できた。本研究により、ケト酸を中間体とした 14BDO を生産する人工生合成経路を新たに構築し、*in vivo* で 14BDO を発酵生産することを実証した。

【謝辞】
本研究は科振費「先端融合領域イノベーション創出拠点の形成 -バイオプロダクション次世代農工連携拠点(iBiok)」の一環で実施した。

1,4-Butanediol, artificial metabolic pathway, *Escherichia coli*

発表番号：4A031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 加水分解性を有するグリコール酸ベースポリマーの微生物合成
# Microbial synthesis of glycolic acid polyester with hydrolyzability

○工藤 悠希[1]、平出 幸和[1]、大井 俊彦[1,2]、田口 精一[1,2]、松本 謙一郎[1,3]([1]北大院工、[2]JST CREST、[3]JST PRESTO)
○Yuki Kudo[1], Yukikazu Hiraide[1], Toshihiko Ooi[1,2], Seiichi Taguchi[1,2], Ken'ichiro Matsumoto[1,3]([1]Hokkaido Univ., [2]JST CREST, [3]JST PRESTO)

**【研究背景】**

グリコール酸ポリマーは生体適合性・加水分解性に優れた脂肪族プラスチックである．本ポリマーの合成は，重金属触媒を用いたグリコリドの開環重合により行われるのが一般的であるが，この方法では，ポリマー中に残留する触媒を注意深く除去することが必要となる．当研究室では，基質特異性を拡張した微生物のポリエステル重合酵素を発現する組換え大腸菌を，グリコール酸培地で培養することによって，グリコール酸ポリマーP[glycolate(GL)-*co*-3 ヒドロキシ酪酸(3HB)]の細胞内合成に初めて成功した．ポリマー中のグリコール酸分率は，添加するグリコール酸濃度を変化させることによって 0～15mol%の範囲で変化させることができる．また，得られた共重合体ポリマーは P(3HB)ホモポリマーと比較して非常に高い加水分解性を有することが分かった．本研究では，P(GL-*co*-3HB)の加水分解産物の構造を明らかにするとともに，P(GL-*co*-3HB)中のグリコール酸分率の制御により，分解産物の分子量を改変することを試みた．

**【方法・結果及び考察】**

3HB モノマー(3HB-CoA)供給系酵素群(PhaA, PhaB)，グリコール酸モノマー(GL-CoA)を供給する CoA 転移酵素(PCT)および重合酵素遺伝子(PhaC1(ST/QK))を導入した組換え大腸菌を作製し，炭素源としてキシロース，モノマー前駆体としてグリコール酸を添加した培地で培養することで P(GL-*co*-3HB)を合成した．糖濃度，グリコール酸濃度を変えることにより，グリコール酸分率の異なるポリマーを調整した．得られたポリマーを用いてエマルジョンを作製し，それを水中で加熱することで，加水分解物を得た．分解後のエマルジョンを可溶性画分と不溶性画分に分け，可溶性画分を ESI-MS 分析に供した結果，重合度が 3 から 20 程度の 3HB のオリゴマーが検出された．一部のオリゴマー分子にはグリコール酸ユニットも含まれていた．一方，不溶性画分を NMR 分析した結果，3HB のみが検出され，不溶性画分はほぼ P(3HB)であることが分かった．これらの結果から，本手法で 3HB オリゴマーが調整できること，ポリマー中に含まれるグリコール酸ユニットは，3HB ユニットよりも加水分解を受けやすいことが分かった．さらに，グリコール酸ポリマーを加水分解することにより，ポリマー中に含まれていたグリコール酸ユニットの分布を知ることができることが分かった．

biodegradable plastic, bioabsorbable, biocompatible

発表番号：4A032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 白色腐朽菌の混合培養によるセルロース系原料からのエタノール生産

# Ethanol production from cellulosic materials by a mixed culture of white rot fungi

○井上 瑛絵、安藤 広将、内土井 さくら、堀沢 栄（高知工科大）
○Akie Inoue, Hiromasa Ando, Sakura Uchidoi, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Tech.)

再生可能エネルギーの一つであるバイオエタノールは植物資源を原料にして微生物の発酵によって得られ、ガソリンに代わる燃料として注目されているが、現在使用されている植物は食料や飼料として利用されているものであるため、食料と競合しないセルロース系原料を用いた第二世代バイオエタノールが必要とされている。しかし、セルロース系原料を用いた第二世代エタノールは、脱リグニンや糖化の工程が増えるため、製造コストが高い。酸熱処理による前処理は、糖化過程としては処理速度が大きいが発酵阻害物質が生じる問題がある。そこで、脱リグニンや糖化を酵素や微生物によって行う方法も研究されている。

我々はこれまでに、エタノール発酵能を持つ木材腐朽菌を用いてセルロース系バイオマスをエタノールに変換する方法を検討してきた。白色腐朽菌は植物細胞壁の主成分であるリグニン、セルロース、ヘミセルロースを分解する酵素を生産する。従って１つの反応槽中で脱リグニン、セルロースの糖化、発酵を同時に行う一貫バイオプロセス（consolidated bioprocessing, CBP）が可能となる。エタノール生産力に注目して白色腐朽菌をスクリーニングしたところ、スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）の１株が高い生産性を有することを見いだした。さらに同株は、グルコース、マンノース、ガラクトースの他にキシロースを原料としてエタノールを生産することが明らかとなり、多糖を分解しながらのエタノール生産も可能であることがわかった。そこで本研究では、スエヒロタケを用いて、スギ材を原料としたエタノール生産を試みた。また、リグニン分解力を増強するために、優れたマンガンペルオキシダーゼ生産力を持つヤケイロタケ（*Bjerkandera adusuta*）とともに複合培養を行いエタノール生産に対する効果を検討した。

consolidated bioprocessing, white rot fungi, cellulosic material

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

発表番号：4A033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 嫌気性細菌の共存培養によるセルロースからの水素ガス生産

# Hydrogen gas production from cellulose by co-cultivation of anaerobic bacteria

関 兵馬、吉田 稜、粟冠 真紀子、○木村 哲哉、粟冠 和郎（三重大院生資）
Hyoma Seki, Ryo Yoshida, Makiko Sakka, ○Tetsuya Kimura, Kazuo Sakka (Mie Univ.)

目的：水素ガスは次世代クリーンエネルギーとして注目されているが、工業的には主に化石燃料を原料として生産されている。我々は、水素ガスをバイオマスから微生物によって直接生産することを究極の目的として、キャンパス土壌から単離した中温菌 *Clostridium paraputrificum* M21 を中心としたシステムの構築をめざしている。*C. paraputrificum* M21 は様々な単糖類やデンプン、キチンなどを分解して水素ガスを効率的に生産するが、豊富な植物細胞壁を分解することが出来ない。一方、おなじ嫌気性細菌には植物細胞壁を効率的に分解する株が多く存在する。これらの中から植物細胞壁分解酵素の高分子複合体を形成し、効率的に植物バイオマスを分解する中温菌 *Ruminiclostridium josui* と *C. paraputrificum* M21 を共存培養することで、植物バイオマスから直接水素ガスを効率的に生産するための検討を行った。
方法：*C. paraputrificum* M21 と *R. josui* をそれぞれハンゲートチューブ（10mL）を用いて前培養し、対数増殖期の培養液を本培養量の 10 分の 1 とって、ボールミル処理したセルロースを炭素源とする GS 改変培地 90 mL に添加し、45℃で培養を行った。ガスの生産を測定するため、嫌気培養瓶にチューブをさして水上置換法でメスシリンダーに生産されたガスを回収した。ガス組成の測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。また、培養液を回収して生産された有機酸を HPLC 法で定量した。さらに、培養液から菌体を回収して全ゲノム DNA を回収し、それぞれの株に特異的な遺伝子領域に対するプライマーで PCR を行い菌体の増殖を検出した。
結果：*C. paraputrificum* M21 株はセロビオースを炭素源として培養した場合には水素ガスを生産したが、ボールミルセルロースを炭素源として生育することは出来なかった。一方、*R. josui* は 10 日の培養でほぼ 1 g のボールミルセルロースを完全に分解し 14 mL の水素ガスを生産した。そこで、*C. paraputrificum* M21 と *R. josui* を 1g のボールミルセルロースを炭素源として共存培養したところ、10 日の培養でほぼセルロースを分解して 81 mL の水素ガスを生産できた。HPLC による有機酸分析の結果、*R. josui* 単独では乳酸の生産が多かったのに対して、共存培養の場合は酪酸が増えていたことから *C. josui* とともに *C. paraputrificum* M21 も増殖して水素ガスを生産していることが予測された。培養液中から得られた全 DNA を PCR 法で解析したところ、共存培養には両株が増殖していることが示された。また、培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、共存培養でも *R. josui* 単独で培養したときに近いバンドが観察され、同じ酵素が分泌されていることが示唆された。

Clostridium paraputrificum, Ruminiclostridium josui, hydrogen gas

発表責任者：木村哲哉（t-kimura@bio.mie-u.ac.jp）

発表番号：4A034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ウキクサ亜科植物葉状体からの植物生育促進細菌の探索

# Isolation of plant growth-promoting bacteria from cormosphere of *Lemnoideae*

○岩下 智貴[1]、田中 靖浩[1]、玉木 秀幸[2]、米田 恭子[2]、牧野 彩花[2]、遠山 忠[3]、鎌形 洋一[2]、森川 正章[4]、森 一博[3] ([1]山梨大生命環境、[2]産総研生物プロセス、[3]山梨大工、[4]北大院環境)
○TOMOKI IWASHITA[1], YASUHIRO TANAKA[1], HIDEYUKI TAMAKI[2], KYOKO YONEDA[2], AYAKA MAKINO[2], TADASHI TOYAMA[3], YOITI KAMAGATA[2], MASAAKI MORIKAWA[4], KAZUHIRO MORI[3] ([1]Fac. Life Environ. Sci., Univ. Yamanashi, [2]BRI. AIST, [3]Fac. Engineer., Univ. Yamanashi, [4]Grad. Sch. Environ. Sci., Hokkaido Univ)

【背景と目的】

ウキクサ亜科植物の多くは葉と茎が融合した葉状体と根で構成される浮遊性の水生植物でデンプンやタンパク質を多く含有することから、バイオエタノール等のエネルギー生産資源や家畜の飼料としての利用が検討されている。このような背景から、我々は当該植物の根部分（根圏）から多数の植物生育促進効果を示す微生物（Plant Growth Promoting Bacteria；PGPB）を分離培養し、これらを根圏に再導入すること（根圏機能の強化）でウキクサ亜科植物のバイオマス生産性向上を目指してきた。その一方で、これまでウキクサ亜科植物の葉状体に生息する微生物に関する情報はほとんど無い状況であったことから、我々はこれまでに、葉状体にも根圏と同程度の微生物が生息し、その微生物相は根圏とは大きく異なることを明らかにしてきた。このことから、ウキクサ亜科植物のバイオマス生産能の向上には、根圏機能の強化に加えて葉状体機能の強化（葉状体へのPGPB 導入）も有効であると考えられる。

そこで本研究では、ウキクサ亜科植物の葉状体由来の微生物コレクションを構築し、その中でも系統的に新規な微生物を標的とした PGPB 検索を行うこととした。

【方法と結果】

ウキクサ、アオウキクサ、コウキクサの 3 種のウキクサ亜科植物の葉状体から計 261 株の微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析に供した。その結果、全分離株の約 27%に相当する 70 株が系統的に新規な微生物であることが明らかとなった。これらを対象にコウキクサに対する PGPB 検索を行ったところ約 2.5～4 倍の生育促進効果を示す菌株を 5 株（SP-2-A8 株、LA-C6 株、SP-2-C10 株、SP-H3 株、LM-L-3 株）見出した（この 5 株の中には難培養性細菌群の一つで、これまでに 4 株しか分離培養例のない *Armatimonadetes* 門に属する新規性の高い菌株も含まれていた)。取得したこれら 5 株の PGPB に関して陸生植物の生育促進因子として知られているシデロフォア生産能、不溶性リン酸の可溶化、IAA 生産能の有無を調べたところ、すべての菌株がシデロフォア生産能を有していた。

現在、最も生育促進活性が高かった SP-2-A8 株について、他の微生物の共存下におけるコウキクサの生育促進効果について検討中である。

Duckweed, PGPB, Novel microbe

発表責任者：岩下智貴（l12ev007@yamanashi.ac.jp）

発表番号：4A035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ユーグレナのバイオ燃料生産性に及ぼすラン藻 FBP/SBPase 導入による光合成機能強化の影響

# Effects of overexpression of cyanobacterial FBP/SBPase on biofuel productivity in Euglena

○小川 貴央[1,3]、作山 治美[1,3]、田茂井 政宏[1,3]、石川 孝博[2,3]、重岡 成[1,3] ([1]近畿大・農・バイオ、[2]島根大・生資科・生命工、[3]JST, CREST)
○Takahisa OGAWA[1,3], Harumi SAKUYAMA[1,3], Masahiro TAMOI[1,3], Takahiro ISHIKAWA[2,3], Shigeru SHIGEOKA[1,3] ([1]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Life Sci. Biotechnol., Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ., [3]JST, CREST)

【目的】次世代エネルギー資源として藻類バイオ燃料が注目されている。真核藻類ユーグレナは、好気条件下では光合成産物として貯蔵多糖パラミロンを蓄積し、嫌気条件下に移行するとパラミロンを分解し、ワックスエステル発酵によりミリスチン酸(C14)とミリスチルアルコール(C14)からなるミリスチルミリステート(C28)を主成分とするワックスエステルを生産する特徴を有する。C14 程度の軽質な脂肪酸は、バイオディーゼルはもちろん代替ジェット燃料としての利用も期待されている。他の微細藻類の多くは鎖長 C16 以上の脂肪酸が主要な生成物であることからも、ユーグレナの C14 合成能は際立った特徴である。そこで本研究ではユーグレナのワックスエステル生産性向上を目的として、ラン藻由来 FBP/SBPase 遺伝子導入により光合成を強化し、バイオマスおよびワックスエステル生産性に及ぼす影響について解析した。

【結果】CaMV35S プロモーター下流にラン藻 FBP/SBPase 遺伝子を連結した導入遺伝子をユーグレナ野生株へパーティクルガン法により導入し、複数の EpFS 株を得た。最も高い FBP/SBPase タンパク質の発現が認められた EpFS4 株の FBPase 活性は、野生株の約 1.4 倍に上昇していた。強光・高 $CO_2$ 条件（350 $\mu$mol photons/$m^2$/s, 0.3% $CO_2$）で生育比較を行った結果、EpFS4 株の光合成活性は野生株の約 1.5 倍に上昇し、バイオマス量（乾燥重量）は野生株の約 2 倍に増加していた。パラミロン蓄積量は細胞あたりで野生株の約 1.2 倍に増加していた。さらに、細胞を 24 時間嫌気処理し、ワックスエステル（C28）および脂肪酸を GC-MS により定量した結果、EpFS4 株のワックスエステル（C28）量は野生株の約 100 倍に増加しており、C14 は野生株の約 5.6 倍に増加していた。したがって、FBP/SBPase 遺伝子導入による光合成能の強化は、ユーグレナのバイオマスおよびワックスエステル生産性を向上させることが示された。しかしながら、光独立栄養条件下で培養した細胞を嫌気処理した際のパラミロンの減少量に対するワックスエステルの生成量が非常に低く、パラミロン分解によって生じた炭素がワックスエステル発酵以外にも利用されている可能性が考えられた。そこで様々な嫌気処理条件におけるパラミロン分解/ワックスエステル合成能を検討した。光独立栄養条件下で対数増殖期および定常期まで培養したユーグレナ野生株を 24 時間嫌気処理した時、対数増殖期の細胞の嫌気処理前後のパラミロン減少量が約 30%であったのに対し、定常期の細胞では約 50% のパラミロンの減少が認められた。またこのときの定常期の細胞のワックスエステル生成量は、対数増殖期の細胞の約 10 倍高い値を示した。現在、様々な条件下での EpFS4 株のワックスエステル生成量の検討を行っている。

Euglena, paramylon, wax esters

発表番号：4A036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# 遺伝子組換え分裂酵母を用いた D - 乳酸の無中和発酵プロセス

# The production processes of D-lactic acid by fermentation without pH neutralization using genetically modified fission yeast.

○木村 修一郎、田中 博己、原 太志、田中 崇之（旭硝子株式会社）
○Shuichiro Kimura, Hiroki Tanaka, Futoshi Hara, Takayuki Tanaka (ASAHI GLASS CO., LTD.)

D - 乳酸は 3 個の炭素からなるヒドロキシカルボン酸であり、医農薬中間体やステレオコンプレックスポリ乳酸原料などへの利用が期待されている。これらの用途に D - 乳酸を用いるには、高い光学純度（99.5%e.e）が求められる。高光学純度の D - 乳酸を生産するには、乳酸を光学分割する高コストな手法と、発酵などのバイオプロセスで D - 乳酸のみを生産する手法が知られている。

しかしながら、報告されている微生物を用いた回分発酵での D - 乳酸の生産速度は 1～4 g/（L・h）程度であり、L - 乳酸の発酵生産速度 13 g/（L・h）の 4 分の 1 以下である。そこで本研究では、生産コスト低減のために D - 乳酸をより高い生産速度かつ、中和廃棄物の生じない pH 無中和条件下で発酵生産する事を目的とした。

D - 乳酸を高速度で発酵生産する菌株を得るには、①天然からのスクリーニング、②乳酸生産株から L - 乳酸の生産能力を欠落させる、③乳酸非生産株に D - 乳酸の生産能力を付与する、などが考えられる。本研究では、高い耐酸性を示す分裂酵母を宿主として用い、手法③を選択した。

本酵母は本来エタノール発酵を行うため、エタノール生産に関る遺伝子を削除し、D - 乳酸生産に関る遺伝子を染色体上に導入した組換え酵母を作製した。D - 乳酸の発酵生産は、11 %グルコース溶液に本組換え菌体を 36 g-dcw/L となるよう添加し、pH 無中和条件下で実施した。結果、本組換え酵母の D - 乳酸の生産速度は 10 g/（L・h）を示し、従来の生産速度の 4 倍以上に相当した。また、発酵後の D - 乳酸濃度は 84 g/L であり、光学純度は 99.5 %e.e.以上に達した。更に D - 乳酸生産性を高めるため、pH 無中和発酵プロセスの改良検討も行ったので、併せて報告する。

fission yeast, lactic acid fermentation, non-neutralizing

発表責任者：木村　修一郎（syuichiro-kimura@agc.com）

発表番号：4A037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア A

# ジャーファメンターを用いた組換え *E. coli* による乳酸ベースバイオポリマー生産法の確立

# Lactate-based biopolymer production by recombinant *E. coli* in jar fermenter

○滝沢 憲治[1,2]、大井 俊彦[1,2]、松本 謙一郎[1]、田口 精一[1,2]([1]北大院工、[2]JST-CREST)
○ Kenji TAKISAWA[1,2], Toshihiko OOI[1,2], Ken'ichiro MATSUMOTO[1], Seiichi TAGUCHI[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST-CREST)

【目的】

ある種の微生物は植物由来の糖などのバイオマスを原料として、細胞内にポリヒドロキシアルカン酸（PHA）と呼ばれるポリエステルを合成することができる。当研究室では重合酵素の分子進化により乳酸重合酵素（LPE）の創出に成功し、これにより，組換え *Escherichia coli* をプラットフォームとして、グルコースまたはキシロースを炭素源として、同一ポリマー鎖内に乳酸（LA）ユニットと 3-ヒドロキシブタン酸（3HB）ユニットが共重合された P(LA-*co*-3HB)の生合成が可能となった。本研究では、糖質バイオマスに多く見られる混合糖液を利用して P(LA-*co*-3HB)を高生産する方法の確立を目的とし、モデル基質としてキシロース：ガラクトースの混合糖液を用い、2 L ジャーファーメンターによる回分培養試験を行い、本ポリマー生産のための培養条件の検討を行った。

【方法および結果】

LPE およびモノマー供給系酵素遺伝子群を導入した組換え *E. coli* を、LB 培地にキシロース：ガラクトース 4：1 に調製された糖液（20、30、40 g/L）を加えた培地で 30℃、48 時間培養した。通気量（0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 vvm）を制御して培養した結果、通気量の増加に伴いポリマー生産量が増加した。ポリマー中の LA 分率は 1.5 vvm で最も高い LA 分率 21 mol%が得られ、2.0 vvm においては 2 mol%に減少した。以上の結果から酸素供給がポリマー生産に与える影響が確認される一方、過剰な酸素供給は LA 分率を低下させることが分かった。また撹拌速度（300、500、700 rpm）がポリマー生産に与える影響を検討した結果、初発糖濃度が 20 g/L のとき 300 rpm が最適であったが、初発糖濃度 40 g/L においては 500 rpm の撹拌がポリマー生産に最適であり、このときポリマー生産量は 10.2 g/L で LA 分率 6 mol%のポリマーが生産された。これは初発糖濃度の増加により、菌体濃度が上昇し、菌の酸素要求量が増大するためであると考えられる。

P(LA-*co*-3HB)の幅広い応用のためには、より高い LA 分率を持つポリマーの生産も求められる。そこで NAD 非依存性 D-乳酸デヒドロゲナーゼ（dld）およびピルビン酸ギ酸リアーゼ（pflA）遺伝子を欠損させた宿主を用い、LPE に更なる改変を加えた進化型乳酸重合酵素（eLPE）の組み合わせることによるポリマーの LA 分率向上を試みた。その結果、LA 分率 6～67 mol%のポリマーを約 10 g/L 培養することに成功した。

Biopolymer, P(LA-*co*-3HB), fermentation

発表責任者：田口精一（staguchi@eng.hokudai.ac.jp）

発表番号：4B001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アロニアに含まれる水溶性成分が及ぼすブドウ球菌属への抗菌効果

# Antibacterial activity of water soluble components in Aronia juice against *Staphylococcus* strains.

○阪上 綾[1]、鈴木 友里[1]、森本 亮祐[1]、隅谷 栄伸[2]、伊勢川 裕二[1]([1]武庫川女子大院食栄、[2]東洋食品研究所)
○AYA SAKAGAMI[1], YURI SUZUKI[1], RYOSUKE MORIMOTO[1], HIDENOBU SUMITANI[2], YUJI ISEGAWA[1] ([1]Mukogawa Univ., [2]TiFT)

【目的】アロニア(Aronia melanocarpa)は北米原産のバラ科の小果樹であり、アントシアニンを非常に多く含んでいる。これまでに抗酸化、抗菌、抗ウイルス、抗糖尿病等、様々な生理活性が報告されている。その果実を使用したアロニア果汁ジュースが黄色ブドウ球菌とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、表皮ブドウ球菌に抗菌効果を示した。そこで本研究では、アロニアの抗菌成分を明らかにするとともに、食品保存や薬剤耐性菌の治療・予防への応用の可能性として、アロニアに含まれる水溶性成分が及ぼすブドウ球菌属への抗菌効果について検討し、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

【方法】ブドウ球菌属として、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌を用いた。アロニア果汁ジュースを用いて、3 種類の抽出法を使用し、超純水溶解物、エタノール溶解物、クロロホルム・メタノール抽出物を得た。抗菌活性試験は寒天平板希釈法を使用し、IC50,MIC,MBC を測定し、抗菌効果の検討を行った。最も高い抗菌効果を示したアロニアの超純水溶解物を逆相クロマトグラフィーに供した。成分分析は LC/MS,LC/MS/MS を使用し、分子量と分子式の一致により成分同定した。

【結果・考察】超純水溶解物で高い抗菌効果を示した。この超純水溶解物を分画し、成分分析を行った結果、アセトニトリル濃度 0～20%画分で数十種類の成分を同定した。その中でクロロゲン酸、プロトカテク酸、キナ酸、ゲンチシン酸が黄色ブドウ球菌、MRSA に対して抗菌活性を示した。アロニアの主要な成分はアントシアニンであるが、同定した成分で抗菌効果を示した成分の多くがフェノール酸の化合物であった。現在、表皮ブドウ球菌に対する阻害剤の作用機序の検討を行っている。

Aronia, *Staphylococcus*, Phenolic acid

発表責任者：伊勢川裕二（isegawa@mukogawa-u.ac.jp）

発表番号：4B002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養により生産される新規イソキノリンアルカロイド

# Novel isoquinoline alkaloid produced by co-cultivation of *Aspergillus ustus* with *Penicillium aurantiogriseum*

○小川 凌太[1]、齊藤 太樹[2]、仁戸田 照彦[2]、神崎 浩[2] ([1]岡山大・農、[2]岡山大院・環境生命)
○Ryota OGAWA[1], Taiki SAITO[2], Teruhiko NITODA[2], Hiroshi KANZAKI[2] ([1]Fac. Agr., Okayama Univ., [2]Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】2 種類の微生物を組み合わせる培養法により，単独微生物では生産されない新規生理活性物質が生産されることが知られている。我々は *Aspergillus ustus* NSC-F038 株と *Penicillium aurantiogriseum* IAM 13793 株の組み合わせ培養を行ったところ，各々の単独培養では見出されない化合物 (TS-1)の生産を確認した。HPLC-DAD 分析により TS-1 は我々が報告した *A. ustus* NSC-F038 株の単独培養において生産される TS-2[1)]と類似した UV 吸収スペクトルを示すことから，TS-1 は TS-2 と同様にイソキノリンアルカロイドの類縁体であると示唆された。【方法･結果】*A. ustus* NSC-F038 株と *P. aurantiogriseum* IAM 13793 株をそれぞれ 5 日間単独培養後，培養物を合一して 4 日間回転振とう培養した。得られた培養液上清 325 mL (100 mL 容三角フラスコ 10 本分) の酢酸エチル抽出物から分取-ODS-HPLC により，TS-1 を 2.06 mg 単離した。TS-1 の質量分析の結果，positive ion mode で *m/z* 258，negative ion mode で *m/z* 256 に分子量関連イオンピークが検出され，TS-1 の分子量は TS-2 と同じ 257 と決定した。次に，TS-1 と TS-2 の $^1$H-NMR スペクトルを比較したところ酷似していた。両者の相違点として，TS-2 で観測された 10 位のメチルプロトン由来のシグナルが TS-1 では観察されず，δH 4.97 にメチレンプロトン，δH 3.23 にヒドロキシプロトンと推察されるシグナルがシングレットで観測された。さらに，このメチレンプロトンは TS-2 の 10 位のメチルプロトンと同様に $^1$H-$^1$H COSY 分析において 6 位のプロトンと遠隔カップリングによる相関を示した。また，このメチレンプロトンは HSQC スペクトルにおいて，芳香環に結合したヒドロキシメチル基のメチレン炭素と考えられるものと相関が見られた。また，11 位のヒドロキシ基由来のシングレットのシグナルが消失し，12 位と 13 位のメチルプロトンが高磁場シフトしており，イソプロピル基のメチンプロトン由来と考えられるダブルセプテットライクのシグナルが観測された。その上,分子量が同じであることから TS-1 は TS-2 の 11 位のヒドロキシ基が水素に, 10 位のメチル基がヒドロキシメチル基に置換された 7-hydroxymethyl-2-(1-methylethyl)-*furo*[3,2-*h*]isoquinolin-3(2*H*)-one と決定した。本化合物はこれまでに報告のない新規イソキノリンアルカロイドであった。

[1)]齊藤, 仁戸田, 神崎, 日本農芸化学会 2015 年度岡山大会講演要旨集, 講演番号 4E23a13

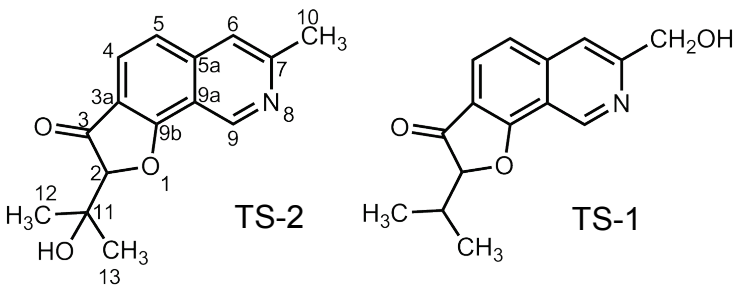



図 TS-2, TS-1 の構造

co-culture, dual cultivation, isoquinoline

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

発表番号：4B003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 *Streptomyces griseus* OS-3601 が生産する新規物質 iminimycin A 及び iminimycin B について

# Iminimycin A and iminimycin B, new compounds produced by an actinomycete strain *Streptomyces griseus* OS-3601

○宮野 怜[1]、松尾 洋孝[2]、木村 徹[1]、浅見 行弘[2]、岩月 正人[1,2]、佐藤 倫子[3]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、中島 琢自[2] ([1]北里大院・感染制御、[2]北里大・生命研、[3]北里大・薬学部)
○Rei MIYANO[1], Hirotaka MATSUO[2], Toru KIMURA[1], Yukihiro ASAMI[2], Masato IWATSUKI[1,2], Noriko SATO[3], Kazuro SHIOMI[1,2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Takuji NAKASHIMA[2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Kitasato Univ., [2]Kitasato Inst. Life Sci., [3]Department of Pharm. Kitasato Univ.)

【背景と目的】放線菌の代謝産物から、生物活性を指標に多くの化合物が発見されてきた。しかし、特定の生物活性評価系を用いて二次代謝産物から有用物質を探索することは、かなりの偶然性を期待しており、既知物質に遭遇することも多い。また、目的の生物活性と一致しなかった物質は、新規化合物であったとしても見逃されている可能性が高いと考えられる。

近年の画期的な分析機器の発展は、多くの化合物の検出を可能にし、微生物の化合物生産能を最大限に引き出すことができるようになった。そこで、当研究室では放線菌代謝産物の物理化学的性質に着目した physicochemical screening（PC Screening）を積極的に進めてきた。すなわち、培養液中に含まれる生産物質の HPLC 保持時間 (RT) 、UV 極大吸収 、分子量などの物理化学的性状をデータベースと比較し、新規性を予測して単離精製を進める方法である。これまで、当研究室では PC screening により trehangeline 類[1], mangromicin 類[2] 等の新規物質を取得してきた。

そこで本研究では、北里生命科学研究所が保有する物質生産菌ライブラリーを有効活用するため、PC screening により更なる新規物質取得を目的とした。

【方法と結果】物質生産菌約 200 株を 4 種類の生産培地で培養した培養液抽出物 (約 800 サンプル) の LC/MS データから新規物質を推定し、精製候補化合物を選択した。つまり、他のサンプルには含まれていない物質を選び、その化合物の極性, 組成式, UV 極大吸収などの物理化学的性状をデータベース (Dictionary of Natural Products) で検索し、新規物質と推定された物質を選択した。

その結果、dihydrostreptomycin 生産菌である *Streptomyces griseus* OS-3601 株が生産する物質 (OS-3601A と仮称) を選択した。本物質は生産培地 4 種のうち、1 種の培地 (脱脂小麦胚芽含有培地) でのみ生産が確認され、RT 27.5 min, *m/z* = 242.1926 ($C_{17}H_{24}N^+$), 272, 284 nm に UV 極大吸収を有する化合物であった。データベース検索の結果、該当するものはなく新規物質と推定された。

OS-3601 株を生産培地 10 L で培養後、培養液を各種クロマトグラフィーに供し、OS-3601A 物質を約 1.5 mg 取得した。構造解析を行った結果、分子内にイミニウムイオンを有する新規物質であった。この化合物を iminimycin A と命名した。イミニウムイオンを含む化合物は放線菌由来では初めての例である。さらに、OS-3601 株の培養液には iminimycin A と類似した化合物 (OS-3601B と仮称) が含まれており、RT 26.9 min, *m/z* = 399.1758 ($C_{22}H_{27}N_2O_3S^+$), 278 nm に UV 極大吸収を有し、新規物質と推定された。培養液を各種クロマトグラフィーに供し、OS-3601B 物質を約 20 mg 取得した。構造解析の結果、この化合物は iminimycin A の類縁物質で分子内にピリジニウムイオンを有する新規物質であった。この化合物を iminimycin B と命名した。

【考察】Dihydrostreptomycin 生産菌である *S. griseus* OS-3601 株の培養液抽出物から分子内にイミニウムイオンを有する iminimycin A 、及び分子内にピリジニウムイオンを有する iminimycin B を得た。この結果は、既知物質生産菌や古くから研究されている著名な菌株でも新規物質の発見が可能であり、 PC Screening はその可能性を広げる優れた新規物質探索方法であることを示すものである。

【文献】1) Nakashima T. *et al*., J. *Antibiot*., **66**, 311-317 (2013)
2) Nakashima T. *et al*., *J. Antibiot.,* **67**, 253-260 (2014)

physicochemical screening, actinomycete, iminimycin

発表責任者：中島琢自（takuji@lisci.kitasato-u.ac.jp）

発表番号：4B004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 放線菌 Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216 株が生産する新規化合物に関する研究

# Study of new compounds produced by actinomycete strain Lechevalieria aerocolonigenes K10-0216

○木村 徹[1]、稲橋 佑起[2]、岩月 正人[1,2]、高田 拓和[1]、谷口 寿章[3]、塩見 和朗[1,2]、高橋 洋子[2]、大村 智[2]、中島 琢自[2] ([1]北里大院感染制御、[2]北里大生命研、[3]徳島大疾患酵素学研究センター)
○ Toru KIMURA[1], Yuki INAHASHI[2], Masato IWATSUKI[1,2], Hirokazu TAKADA[1], Hisaaki TANIGUCHI[3], Kazurou SHIOMI[1,2], Yoko TAKAHASHI[2], Satoshi OMURA[2], Takuji NAKASHIMA[2] ([1]Grad. Sch. Infection Control Sci., Infect. Cont. Sci., [2]Kitasato Inst. Life Sci., Kitasato Univ., [3]Inst. Enz. Res., Tokushima Univ.)

【目的】放線菌は有用な産業微生物であり、その代謝産物から多くの生物活性物質が発見されてきた。その多くは生物活性を指標に見いだされ、医薬品や農薬に活用されている。しかし、その培養液の中には多くの化合物が含まれており、生物活性スクリーニングでは見逃されてきた有用物質が未発見のまま取り残されてきていると考えられる。ここ数年画期的に発展してきた分析機器は、多くの化合物を検出でき、微生物の持つ化合物生産能力を最大限に引き出すことを可能とする。当研究室は、これまで分析機器を用いて放線菌培養液抽出物に含まれる化合物の分子量、分子組成、紫外線吸収や極性などを指標とした ”Physicochemical (PC) screening” により新規物質を探索してきた。PC screening により取得された mangromicin は tetrahydrofuran 環及び 5, 6-dihydro-4-hydroxy-2-pyrone 環を含む cyclopentadecan 骨格を有するユニークな構造である。Mangromicin の大量取得を目指し、生産培地の検討を実施した。その結果、従来用いていた培地組成のうち、スターチ及びドライイーストが mangromicin の生産性に大きく影響し、さらに mangromicin 新規類縁体及び mangromicin 以外の新規物質を得た。今回、これら新規物質の構造及び生物活性について報告する。

【方法】Mangromicin 生産菌である *Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株を改良した小麦脱脂胚芽–スターチ培地に 1%植菌し、8 日間培養、各種クロマトグラフィーに供し、精製を行った。精製途中のフラクションを LC/MS で解析し、MS 値と UV 極大吸収をもとにデータベースで検索を行い、新規物質を見いだした。その物性を指標に各種クロマトグラフィーにより新規類縁体を 6.5 mg, 新規物質を 16.8 mg を得る事ができた。

【結果および考察】*Lechevalieria aerocolonigenes* K10-0216 株の培養液より、mangromicin の新規類縁体を取得した。この新規類縁体は今まで取得された mangromicin の構造と異なり、2 つの tetrahydrofuran 環を有するユニークな構造をしていた。また、PC screening により新規物質と推定された化合物の単離・精製を行い、各種 NMR による構造解析を行ったところ、pyridine 環と thiazole 環をもつ新規物質を取得した。取得後、生物活性評価を行い、抗菌活性及び細胞毒性が見られ、本物質を pyrizomicin と命名した。

Physicochemical screening, Mangromicin, Lechevalieria aerocolonigenes

発表番号：4B005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 海洋由来の放線菌を用いた physicochemical screening による新規化合物の探索

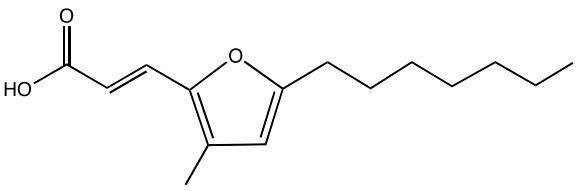
# Search for new compounds by physicochemical screening using marine actinomycetes

○田島 文乃[1]、木村 徹[2]、岩月 正人[1,2]、森山 俊介[1]、高橋 洋子[3]、大村 智[3]、中島 琢自[3] ([1]北里大海洋生命、[2]北里大感染制御、[3]北里大生命研)
○Ayano Tajima[1], Toru Kimura[2], Masato Iwatsuki[1,2], Shunsuke Moriyama[1], Yoko Takahashi[3], Satoshi Omura[3], Takuji Nakashima[3] ([1]Marine Biosciences, Kitasato Univ., [2]Infect. Cont. Kitasato Univ., [3]Life Sci. Inst. Kitasato Univ.)

【目的】放線菌の生産する二次代謝産物は、人知の及ばない複雑な構造や強力な活性を示すものが多く、放線菌は有用な産業微生物として注目されてきた。そして、これまで多くの研究機関が放線菌を分離し、有用な生物活性物質を発見してきた。放線菌の分離源には主に土壌が用いられており、土壌から分離される放線菌の 9 割以上は *Streptomyces* 属である。我々の研究グループは土壌に代わる分離源として植物の根に注目した。植物の根からは多くの希少放線菌が得られ、新規物質も得られている。分離源を変えることで分離される放線菌も異なり、新規物質を得られる可能性も高くなると考えられる。そこで、本研究では北里バイオテクノロジー釜石研究所が保有する海洋由来の放線菌を探索源として physicochemical screening を実施し、新規物質を探索した。

【方法】海洋由来の希少放線菌 26 株をそれぞれ 5 種類の培地で培養し、培養液から解析用サンプルを作製して LC/UV 解析を行った。解析結果より、一菌株のみで生産されている物質、かつ、一種類の菌株のみで生産されている物質を指標にサンプルを選択した。次に、選択したサンプルを LC/MS 解析し、得られた培養液に含まれる化合物の分子量、分子式、UV 吸収などをデータベース検索して化合物の新規性を予測した。検索の結果、データベースに該当するものが無い化合物を新規と推定し、精製および構造解析を行った。

【結果および考察】LC/UV 解析より、26 株中、*Mumia* sp. YSP-2-79 株のきなこ培地のみで生産する物質を選択した。この物質の分子量、分子式、UV 吸収が一致する化合物がデータベース上に無いことから、新規物質と推定した。構造解析の結果、この物質はフラン環に脂肪酸を有するフラン脂肪酸類の新規化合物だった。抗菌活性を評価したところ、*Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *E. coli* に活性を示したことから mumiamicin と命名した。現在さらなる生物活性を評価している。




Mumiamicin

Physicochemical screening, marine actinomycetes, Mumiamicin

発表番号：4B006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Isolation of haplacutine F as a potent antibiotic from Burkholderia cepacia MBAF1239

○Dandan Li[1], Atsumi Hasada[1], Naoya Oku[1], Masafumi Shimizu[2], Igarashi Yasuhiro[1] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Gifu University)

[Introduction]

Bacteria belonging to genus *Burkholderia*, within the phylum *Betaproteobacteria*, include human, animal or plant pathogens, as well as rhizosphere symbionts which promote plant growth. More than 70 compounds have been isolated from this genus, among of which romidepsin, which originally isolated from a related taxon (*Chromobacterium violaceum*), is used for the treatment of T-cell lymphomas. To further, exploit the biomedical potential of this taxon preparation of the fermentation library and exploration of antimicrobial metabolites were attempted. So it is necessary to explore new antibiotics from the genus *Burkholderia.*

[Methods & Results]

Antimicrobial screening of 144 extracts prepared by fermentation of 36 strains with 4 different media with 9 human/fish/plant pathogens highlighted *Burkholderia cepacia*, strain MBAF1239 was selected as candidate producer. The strain was first seed-cultured in V-22 and then transferred into IMM-HS medium for production. After 4 days, the cultures production were extracted by n-BuOH and the extract was fractionated by ODS flash chromatography. The fractions inhibitory to *Trichophyton rubrum, Rhizopus oryzae* and *Tenacibaculum maritimum* were further purified by reversed phase HPLC to afford 10 fractions. The ninth fraction was found pure and confirmed as 2-nonenylquinolin-4(1H)-one by the interpretation of ESI-TOFMS, $^{13}$C NMR, $^{1}$H NMR, COSY, HSQC, and HMBC experiments. This compound shows antibiotic activities against *Trichophyton rubrum, Rhizopus oryzae* and *Tenacibaculum maritimum*. Although this compound has already been detected as haplacutine F in the extract of *Haplophyllum acutifolium* and synthesized. Isolation and detailed characterization of physico-chemical and bioactive properties have not been done.

quinolone, Burkholderia, antimicrobial

発表番号：4B007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# AM 菌胞子から分離した AHL 生産菌に由来する菌糸分岐誘導活性物質

# Isolation of hyphal branching inducers from AHL-producing bacteria, living on spores of AM fungi

○三宅 智、甲斐 建次、秋山 康紀（阪府大院・生命環境）
○Tomo MIYAKE, Kenji KAI, Kohki AKIYAMA (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi，AM 菌）はリンを宿主植物に供給する有用微生物であり，80%以上もの陸上植物と共生している。AM 菌の菌体には特定のバクテリアが付着しており，菌根形成に重要な役割を果たしていることから菌根ヘルパーバクテリア(mycorrhiza helper bacteria，MHB)と呼ばれている。MHB は AM 菌の胞子発芽や菌糸生育，植物の菌根感受性を高めることにより菌根共生を促進していると考えられているが，これらの作用を示す MHB の生産する菌根共生促進物質は明らかになっていない。近年グラム陰性菌の生産するアシルホモセリンラクトン(*N*-acyl homoserine lactone, AHL)が AM 菌の胞子発芽や菌根形成を促進することが報告された(Dahmen, *et al*.2013)。しかし，MHB による菌根形成促進における AHL の寄与については不明であり，AHL の AM 菌の菌糸生育に対する効果についても調べられていない。そこで本研究では，MHB の菌根共生促進機構の解明を目的として，AM 菌の胞子から AHL 生産菌を分離し，それら菌株の生産する AHL の菌糸分岐誘導活性を評価すると共に，培養液中に含まれる菌糸分岐誘導物質の探索を行った。
【方法及び結果】AM 菌 *Gigaspora margarita* の胞子を滅菌水に懸濁し，超音波処理して得た懸濁液を栄養寒天培地に塗布し，30℃で培養した。AHL レポーターアッセイにより AHL 生産菌として TM-29 及び TM-M3 を単離した。これらについて 16S rDNA 塩基配列解析を行い，それぞれ *Sphingomonas* sp. 及び *Agrobacterium tumefaciens* と同定した。これら菌株の培養抽出物から AHL を単離し，$^{1}$H-NMR 及び MS 解析と合成標品との比較を行い，TM-29 の生産する AHL を (3*R*)- 及び (3*S*)-3-hydroxyoctanoyl-L-HSL(3-HO-C8- L-HSL)と同定した。TM-M3 はこれら二つの AHL に加えて，3-HO-C12-及び 3-HO-C14-HSL を生産していた。二つの 3-HO-C8- L-HSL について菌糸分岐誘導活性を調べたところ，活性を示さなかった。次に，TM-29 と TM-M3 の培養抽出物について菌糸分岐アッセイを行ったところ，両菌株ともに活性が見られた。そこで TM-29 の活性画分について精製を行い，LC-MS 解析からシデロフォアである yersiniabactin と推定される化合物を単離した。そこで TM-M3 からシデロフォアである agrobactin を単離し，菌糸分岐アッセイに供したところ強い活性を示した。Fe(Ⅲ)-EDTA によって，菌糸分岐は誘導されなかったことより，シデロフォアの菌糸分岐活性は鉄によるものではないことが示唆された。現在，代表的な MHB である *Pseudmonas fluorescens* の生産するシデロフォアである pyoverdine 及び植物由来のシデロフォアであるムギネ酸について菌糸分岐活性を調べている。

arbuscular mycorrhizal fungi, acyl homoserine lactone, siderophore

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4B008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 海藻抽出物の β-グルクロニダーゼ阻害成分

# Beta-glucuronidase inhibitors derived from extracts of marine algae

○張 鐸、今井 雅志、栗原 秀幸（北大院水）
○Duo ZHANG, Masashi IMAI, Hideyuki KURIHARA (Hokkaido Univ.)

【目的】　β-グルクロニダーゼはグルクロン酸抱合体を加水分解する酵素で、腸内細菌が産生する。解毒代謝産物として胆汁内に排泄されたグルクロン酸抱合体は、腸内で本酵素の加水分解を受けて体内に再吸収される。本作用は毒性物質の体外排泄を遅延させるため、本酵素阻害により毒性物質の体外排泄促進作用を期待できる。海藻は陸上植物とは異なる独特な二次代謝産物を有することが知られており、さまざまな機能も報告されている。本研究では、海藻抽出物に含まれる β-グルクロニダーゼ阻害成分を探索することを目的とした。

【方法】　β-グルクロニダーゼ活性測定には、酵素には大腸菌 β-グルクロニダーゼ、基質には *p*-ニトロフェニル β-D-グルクロニドを用いた。海藻は北海道函館市、小樽市、根室市で採集した。これらのメタノール抽出物を調製して阻害性スクリーニングを行ったところ、紅藻類のクシベニヒバ、フジマツモ、褐藻類のヒバマタ、アナメ、ウミトラノオ、フシスジモク抽出物が比較的高い阻害活性を示した。これらのうち、函館市で採集したクシベニヒバ（78.5 g　風乾重）のメタノール抽出物（3.69 g）から有機溶媒分画により酢酸エチル可溶画分（369 mg、阻害率 96.9%）を調製した。シリカゲル、逆相カラムクロマトグラフィー及び HPLC により化合物 **1**（1.38 mg）及び **2**（12.8 mg）を単離した。

【結果】　化合物 **1** 及び **2** の構造は MS や NMR など機器分析により、ブロモフェノール二量体と予想された。詳細な構造は現在検討中である。これらの化合物 **1**（$IC_{50}$ = 3.03 μM）及び **2**（$IC_{50}$ = 19.0 μM）の阻害活性は、既知阻害物質である D-グルカロ-1,4-ラクトン（$IC_{50}$ = 77.9 μM）比較して、高い阻害活性を示した。他の海藻由来の β-グルクロニダーゼ阻害成分の精製は現在進行中である。

glucuronidase, alga, bromophenol

発表責任者：栗原　秀幸（kuri@fish.hokudai.ac.jp）

発表番号：4B009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ポルチーニ茸からの膵リパーゼ阻害物質の探索

# Search for the pancreatic lipase inhibitor from *Boletus edulis*

○竹本 彩乃[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2] ([1]北大院農、[2]北大農)
○Ayano TAKEMOTO[1], Eisuke KATO[2], Jun KAWABATA[2] ([1]Graduate school of agriculture, Hokkaido University, [2]Hokkaido University)

[目的]

食事中に含まれる脂質の主成分はトリグリセリドであり、膵臓より分泌される膵リパーゼによってモノグリセリドと脂肪酸に分解され、小腸絨毛より吸収される。したがって、膵リパーゼを阻害することで脂質の吸収量が減少し、肥満の予防、改善につながる。このような作用を持つ脂肪吸収阻害剤に orlistat や cetilistat があり、抗肥満薬として利用されている。一方で、肝機能障害や脂溶性ビタミンの吸収阻害といった副作用もあるため、服用には医師による適切な指示が必要とされる。本研究では、抗肥満作用を持つ機能性食品の開発を目標とし、食用素材 57 種をブタ膵リパーゼを用いた *in vitro* の試験法により評価した。その結果、高い活性を示したポルチーニ茸（*Boletus edulis*）に含まれる活性物質の探索を行った。

[方法]

膵リパーゼ阻害活性試験には、基質としてトリオレインミセル溶液、酵素としてブタ膵臓リパーゼを用いた。サンプル溶液を酵素反応溶液に添加し、酵素反応により遊離した脂肪酸量をコントロールと比較することで阻害率を算出した。

[結果]

ポルチーニ茸 600 g の 50%メタノール水溶液抽出物を、ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールを用いて溶媒分配した。得られた水可溶画分を吸着カラムクロマトグラフィー、逆相カラムクロマトグラフィーに供し三つの活性画分を得た。そのうち一つの画分は、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーと NMR の結果より高分子化合物であることが予想されたため、6 M 塩酸条件下、130 °C で 3 時間の分解反応を行ったところ、分解物として数種のアミノ酸が得られた。これより、活性画分はタンパク質であることが予想された。現在、さらなる検討を行っている。その他の活性画分についても、現在活性物質の単離精製を行っている。

*Boletus edulis*, lipase inhibitor

発表番号：4B010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ツルナ（*Tetragonia tetragonoid*）由来のフラボノイド配糖体の分離、同定および定量

# Purification, identification and quantification of flavonoid glycosides in New Zealand spinach (*Tetragonia tetragonoid*)

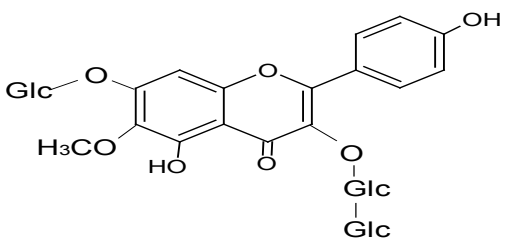
○島袋 瑞己、町田 宗貴、高野 良、玉城 一（琉大農）
○Mizuki SHIMABUKURO, Munetaka MACHIDA, Ryo TAKANO, Hajime TAMAKI (Ryukyu Univ.)

【目的】ツルナ（*Tetragonia tetragonioides*）は、ツルナ科ツルナ属に分類される植物で、日本では北海道南部以南の海岸沿いの砂地に自生している。沖縄県では「ハマホウレンソウ」という名で親しまれ、和え物、味噌汁、炒めものに使われる。また、胃炎や胃潰瘍などに効くとされ、民間薬にも用いられる。ツルナには抗酸化物質であるアスコルビン酸やβカロテンが豊富に含まれているが、その他にも抗酸化物質を含んでいる可能性がある。そこで、本研究では沖縄本島中部の中城海岸に生息しているツルナに含まれている未知の抗酸化物質の存在を明らかにし、その化合物を分離、同定及び定量することを目的とした。

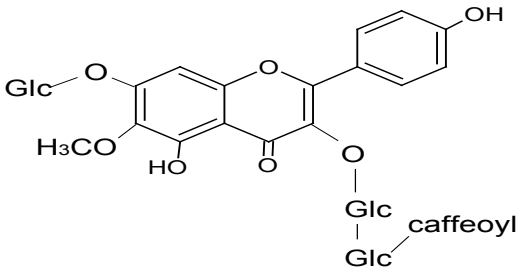
【方法】凍結乾燥処理したツルナの粉末 50g を 6L の 80%メタノールで抽出した後、0.1%アスコルビン酸水溶液と石油エーテルを加えて水溶性物質と脂溶性物質に分液した。今回は水溶性物質についての分析を行った。水溶性物質を固相抽出でメタノール 10%、30%、50%、70%に分画し、抗酸化活性が見られた 30%と 50%画分から ODS カラムを用いたセミ分取 HPLC を用いて、30%画分から化合物 1、50%画分から化合物 2 を単離した。これらの同定には分光光度計、LC-MS 、GC、NMR（1H、13C、1H-1H COSY、HSQC、HMBC、ROSY）を用いた。この化合物 1 と 2 について DPPH ラジカル消去活性を測定し抗酸化力とした。

【結果】機器分析の結果より化合物 1 と 2 はケンペロール配糖体の 1 種で、それぞれ 3-O-sophorosyl-7-O-glucosyl-6-methoxy-kaempferol
及び 3-O-(2-O-caffeoyl)-sophorosyl-7-O-glucosyl-6-methoxy-kaempferol と同定された。DPPH ラジカル消去活性試験における抗酸化力は、化合物 1 はアスコルビン酸の約 0.5 倍、Trolox の 0.15 倍であったが、化合物 2 はアスコルビン酸の 3.5 倍、Trolox の約 1.1 倍強い抗酸化力を示した。化合物 2 の抗酸化の強さはこの化合物の構造中の caffeoyl 基由来であると考えられる。現在、化合物 1 と化合物 2 のツルナ中の含量を調べているところである。

化合物 1




化合物 2




*Tetragonia tetragonoid*, flavonoid glycosides, antioxidant

発表番号：4B011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

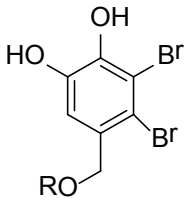
# Antioxidant activity and tyrosinase inhibition of marine-derived bromophenols

○Md. Reazul ISLAM, Momoka ONO, Hideyuki KURIHARA (Hokkaido Univ.)

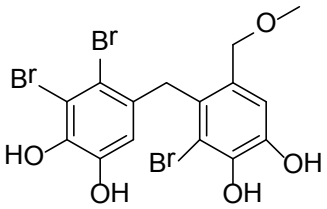
[Objective] Marine algae have been known as rich sources of various phenolic compounds. Bromophenols are commonly found in the red algae of the family Rhodomelaceae. Bromophenols exhibit various functions such as enzyme inhibition. This research aims to determine antioxidant activities and tyrosinase inhibition of the bromophenols obtained from the red alga *Neorhodomela aculeata*.

[Methods] The air dried red alga (3.0 kg) was extracted with acetone at room temperature. The acetone extract (88.3 g) was successively partitioned with organic solvent and water. The EtOAc-soluble fraction was chromatographed over normal and RP silica gel. Compound **1** (12 mg), **2** (10 mg) and **3** (10.5 mg) were purified by preparative TLC and ODS HPLC. DPPH radical-scavenging activity was determined with the method of Guo *et al*. Mushroom tyrosinase activity was measured absorbance at 490 nm using tyrosine as a substrate.

[Results] Compounds **1-3** were characterized to bromophenols with consideration of MS and NMR data. Compounds **1** and **2** were identified as lanosol (3,4-dihydroxybenzyl alcohol) and its methyl ether respectively, well-known monomeric bromophenols. Compounds **3** was also identified as a known asymmetric dimeric bromophenol. These bromophenols showed almost same scavenging activities against DPPH radical to BHA. Compound **2** showed the highest inhibitory activity against tyrosinase among the bromophenols examined. Investigation of other antioxidant activities is now in progress.




**1** R=H
**2** R=$CH_3$




**3**

bromophenol, radical scavenging activity, tyrosinase

発表責任者：栗原　秀幸（kuri@fish.hokudai.ac.jp）

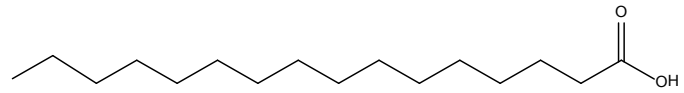
発表番号：4B012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# レモンバーベナの脱タンニン画分からのα-アミラーゼ阻害物質の探索

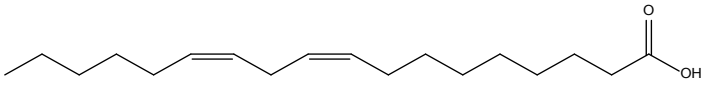
# Search for α-amylase inhibitors from tannin removed fraction of *Lippia citriodora*

○櫛引 夏花[1]、加藤 英介[2]、川端 潤[2]([1]北大農、[2]北大院農)
○Natsuka Kushibiki[1], Eisuke Kato[2], jun Kawabata[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ.)

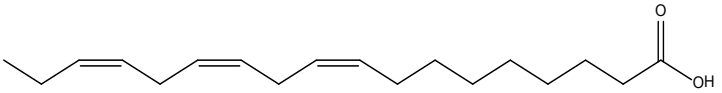
研究背景）糖尿病は慢性的な高血糖状態を示す疾患であり、その患者数は世界中で増加し続けている。その治療薬の一つに膵α-アミラーゼ阻害剤が利用されており、各種植物からの探索が数多く行われている。しかし、植物には各種の酵素を阻害する特異性の低いポリフェノールやタンニン類が含まれており、選択性の高い阻害物質の探索には工夫が必要である。そこで、Wall ら（2006）により報告されている溶媒分配法を用いて、植物抽出物から水溶性タンニンを除去して、低極性画分に焦点をあてたα-アミラーゼ阻害物質の探索を行うこととした。
方法・結果）α-アミラーゼ阻害活性の評価には、化学修飾デンプンである starch azure を用い、酵素反応後に上清中に可溶化した青色色素量を測定し、コントロールと被験物質添加群の差から阻害率を算出した。各種植物のメタノール抽出物をクロロホルム：メタノール：水＝4:1:5 で溶媒分配し、クロロホルム層を 1%食塩水で洗浄して、タンニンを除去した低極性画分を得た。この画分のスクリーニングの結果、スターアニス（*Illicium verum*）、シモン芋葉（*Ipomoea batatas*）、レモンバーベナ（*Lippia citriodora*）、すいかずら（*Lonicera japonica*）、桜葉（*Prumus lannesiana var speciosa*）、クローブ（*Syzygium aromaticum*）に 50%以上の活性を見出した。このうち、アミラーゼ阻害に関する報告がなく、かつ良好な再現性を確認できたレモンバーベナの低極性画分からα-アミラーゼ阻害物質の探索を行った。レモンバーベナの葉をメタノールで抽出してタンニンを除去した後、各種カラムクロマトグラフィーに順次供し、分取 TLC により精製を行った。得られた活性画分を解析した結果、活性画分は脂肪酸の混合物であることがわかり、palmitic acid (1)、linoleic acid (2)、linolenic acid (3) の 3 つの脂肪酸が同定された。これらの脂肪酸の標品を用いて $IC_{50}$ を算出したところ、それぞれ 2.5 mM、1.5 mM、5.1 mM であった。




(1)




(2)




(3)

α-amylase inhibitor, fatty acid, *Lippia citriodora*

発表責任者：加藤英介（eikato@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4B013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ネコにマタタビ反応を誘発する新規活性物質の探索

# Purification of new active compound that induces matatabi response to cat

○室岡 孝信[1]、宮澤 悠[2]、安立 昌篤[2]、山下 哲郎[1]、西川 俊夫[2]、宮崎 雅雄[1] ([1]岩手大学農学部、[2]名大院生命農)
○ Takanobu Murooka[1], Yu Miyazawa[2], Masaatsu Adachi[2], Tetsuro Yamashita[1], Toshio Nishikawa[2], Masao Miyazaki[1] ([1]Faculty of Agriculture, Iwate University, [2]Nagoya University Graduate School of Bioagricultural Sciences)

ネコ科動物はマタタビを見つけると匂いを嗅いだ後に、顔を擦り付けたり、体をくねらせて転がるといった特異的な反応を提示する。この反応はマタタビ反応と呼ばれ、日本では「ネコにマタタビ」ということわざがあるほど、よく知られている現象である。マタタビ反応を誘発する活性化合物は 1950 年代にマタタビの葉や実から単離された Actinidine と Iridomyrmecin (通称マタタビラクトン)であると特定された。しかし、その後ネコのマタタビ反応についての研究は進展しておらず、マタタビ活性化合物の嗅覚受容機構やマタタビ反応がネコ科動物特異的に生じるメカニズムなどについては明らかにされていない。そこで我々はこれらの問題を解明することを目的に研究を開始し、その過程で Actinidine と Iridomyrmecin 以外にマタタビ活性化合物が存在する可能性を見出した。本発表では、マタタビからネコにマタタビ反応を誘発する新規活性化合物を探索したので報告する。まず Actinidine と Iridomyrmecin がマタタビにどの程度含まれるか、季節によってこれらの含有量が変動するか調べた。6 月から 9 月までの岩手県九戸村で自生しているマタタビを定期的に採取して、Folch 法で総脂質を抽出した後、GC-MS を用いて抽出物中の Actinidine と Iridomyrmecin の含有量を測定した。その結果 Actinidine は 6 月のマタタビに葉 1g あたり約 400 $\mu$g 含有しており、時間が経つに連れて含有量は減少し､9 月のマタタビ葉の Actinidine 含有量は 6 月の含有量の約 10 分の 1 になっていたことが分かった。一方 Iridomyrmecin はいずれの時期においても検出できなかった。そこで次に Actinidine と Iridomyrmecin の合成標品をネコに嗅がせて異なる 2 種の化合物がそれぞれどのような活性を有するか行動解析で調べた。するとネコは Iridomyrmecin に対してマタタビ反応を提示したが、Actinidine に対して匂いを嗅ぐだけであった。以上の結果、Actinidine はマタタビに含有するがマタタビ反応を誘発せず、Iridomyrmecin はマタタビ反応を誘発するがマタタビに含まれないことが明らかになり、マタタビに含まれる別の化合物がマタタビ反応を誘発している可能性が極めて高いと考えられた。そこでマタタビ活性を示す脂質抽出液からマタタビ活性化合物の精製に取り組んだ。マタタビ葉抽出物を液体クロマトグラフィーで分画してマタタビ活性を指標に精製を進め、得られたマタタビ活性画分を GC-MS で分析した。その結果、Actinidine と Iridomyrmecin とは異なる化合物が検出された。現在この化合物の構造解析と化学合成による同定を検討している。

domestic cat, olfaction, natural product

発表番号：4B014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# オオムギ属植物における防御関連二次代謝産物

# Defensive secondary metabolites in *Hordeum* species.

○宇部 尚樹[1]、西坂 美穂[2]、上野 琴巳[2]、武田 真[3]、石原 亨[2]([1]鳥大院・農、[2]鳥大・農、[3]岡山大・植物研)
○Naoki UBE[1], Miho NISHIZAKA[2], Kotomi UENO[2], Shin TAKETA[3], Atsushi ISHIHARA[2] ([1]Grad. Sch. Agric. Tottori Univ., [2]Fac. Agric. Tottori Univ., [3]Institute of Plant Science and Resources. Okayama Univ.)

【背景・目的】

植物は病原菌や害虫に対して，二次代謝産物を介した防御機構を有する。オオムギ属植物には防御関連二次代謝産物として，トリプトファン経路に由来するベンゾキサジノン類（Bx 類）やグラミンが存在する。加えて，ヒドロキシ桂皮酸アミドの *p*-クマロイルアグマチン（*p*-CA）およびその二量体のホルダチン A（HA）なども蓄積することが知られている。オオムギ属は 31 種からなり，ゲノム構成から 4 つのクレード（H，$X_a$，$X_u$，および I）に大別されるが，これらと防御関連二次代謝産物の分布との関係についてはあまり研究されていない。本研究では，オオムギ属の代表的な種においてこれら化合物の分布を調査し，防御関連二次代謝がどのように進化したのかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

オオムギ属植物 10 種の幼苗をメタノールで抽出した。抽出液を逆相 HPLC により分析し，Bx 類，グラミン，*p*-CA，および HA の蓄積量を測定した。I および $X_a$ クレードに含まれる全ての種は，Bx 類を蓄積していたが，グラミンや *p*-CA，HA の顕著な蓄積は見られなかった。H クレードの *Hordeum vulgare* と *H. spontaneum* は Bx 類を蓄積しない代わりに，高濃度の *p*-CA と HA を蓄積していた。$X_u$ クレードの *H. murinum* はいずれの化合物も蓄積しなかったが，複数の未同定の化合物が検出された。そこで *H. murinum* の幼苗に蓄積している主要な 3 つの未同定の化合物を精製し，構造を解析した。その結果これらの化合物は，ヒドロキシ桂皮酸アミド類であるフェルロイルアグマチン（FA）の二量体 2 種と，FA 二分子とチラミンが結合した構造を有する化合物であった。いずれの化合物もこれまでに記載がない新規化合物であった。また FA 二量体は，オオムギ斑点病菌に対し FA よりも強い抗菌活性を有していた。Bx 類がイネ科植物に広く分布することから，H および $X_u$ クレードに含まれる種は，進化の過程において Bx 類の生合成を喪失した一方で，新たに HA や FA 二量体などのヒドロキシ桂皮酸アミド二量体による防御機構を獲得したと推察された。

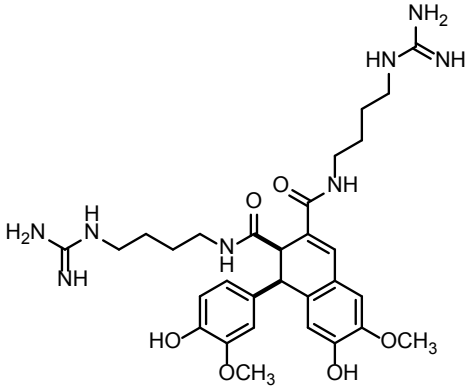



図　フェルロイルアグマチン二量体

*Hordeum*, secondary metabolite, hydroxycinnamic acid amide

発表責任者：石原亨（aishihara@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：4B015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ミヤコグサが生産する新規ストリゴラクトンの探索

# Identification and structure determination of strigolactones from *Lotus japonicus* root exudate

○謝 肖男[1]、松下 明真[1]、米山 香織[1]、内田 健一[2]、横田 孝雄[2]、野村 崇人[1]、秋山 康紀[3]、米山 弘一[1] ([1]宇都宮大・バイオ、[2]帝京大・理工・バイオ、[3]大阪府立大・生命環境・応用生命科学)
○ Xiaonan XIE[1], Asuma Matsushita[1], Kaori Yoneyama[1], Kenichi Uchida[2], Takao Yokota[2], Takahito Nomura[1], kohki Akiyama[3], koichi Yoneyama[1] ([1]C-Bio., Utsunomiya Univ., [2]Dept. Bio. Sci., Teikyou Univ., [3]Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】

植物の根から分泌されるストリゴラクトン（SL）とその関連化合物は、根寄生雑草による寄生およびアーバスキュラー菌根菌(ＡM菌)による共生のシグナルであり、植物の形態形成などに関わる植物ホルモンでもある。2005 年にはミヤコグサの根浸出液からアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐を誘導する物質として、SL の一つである 5-deoxystrigol が同定されたが、他の SL の存在も示唆されている。そこで、本研究はミヤコグサが生産する新規 SL の構造解析を試みた。

【材料および方法】

ミヤコグサの種子（Miyakojima MG-20, 400 粒）を表面殺菌し、温室で 21 日育成した後、水道水を用いて水耕栽培した。水耕液に含まれる根の分泌物を活性炭に吸着させた後、アセトンで溶出し、アセトンを減圧濃縮後、残渣を酢酸エチルで抽出して酢酸エチル可溶区を得た。抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、ヤセウツボ（*Orobanche minor*）種子に対して発芽刺激活性を示すフラクションをさらに HPLC で精製した。精製したサンプルは種々の機器分析によって構造解析を行った。

【結果および考察】

LC-MS/MS で分析した結果、ミヤコグサの根浸出液には 5-deoxystrigol の他に、カーラクトン酸を含まれていることがわかった。さらに、分子量 372 である新規 SL の存在が示唆され、現在、この SL の構造解析を行っている。

Strigolactone, Lotus japonicus, Plant hormone

発表番号：4B016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# イネ葉身のケイ酸体形成に関与する有機基質の探索と同定

# Exploratory research of an organic matrix associated with biomineralization in silica bodies from rice leaves

○石田 拓也、宍戸 勇太、岡野 桂樹、吉澤 結子、尾崎 紀昭（秋田県大生資料）
○Takuya Ishida, Hayato Shishido, Keiju Okano, Yuko Yoshizawa, Noriaki Ozaki (Akita Pref. Univ.)

【背景と目的】
珪藻や海綿はバイオミネラリゼーションにより、常温・常圧下でシリカを形成するが、シリカ内に含まれる長鎖ポリアミン（LCPA）などの有機物がケイ酸重合に関与すると考えられている。イネはケイ酸輸送体を用いて根からケイ酸を吸収し、籾殻や葉身にケイ酸体（シリカが主成分）を沈着する。我々は、2013 年度日本農芸化学会東北支部大会において、イネ葉身からケイ酸体を単離する方法（時計皿法）を確立し、単離ケイ酸体に LCPA 様の有機物が含まれることを報告した。しかし、ケイ酸体はシリカの周囲が細胞壁に覆われているため、この LCPA 様の有機物が細胞壁由来である可能性も否定はできなかった。本研究の目的は、シリカを覆っている細胞壁成分を分解する手法を検討し、有機物の存在部位を明らかにすることである。
【方法】
（1）ケイ酸体の単離と細胞壁成分の除去
時計皿法で単離したケイ酸体に対し、濃硫酸処理（80%硫酸、50℃、1 時間）、希硫酸処理（80%硫酸、50℃、1 時間）による 2 段階の加水分解を行った後、10%セルラーゼ（オノズカ RS）溶液を添加することでケイ酸体の周囲を覆う細胞壁成分の分解を試みた。
（2）シリカ表面の洗浄、シリカの溶解と有機基質の分析
細胞壁成分を除去した試料に対して SDS-EDTA、SDS-PAGE 用試料緩衝液で処理することでシリカ表面を洗浄した。精製シリカに対し、8 M フッ化水素(HF)溶液を添加し、シリカを溶解させた。この溶解液を透析・濃縮したものを HF 可溶性画分とし、洗浄画分とともに SDS-PAGE に供し、泳動パターンを比較した。
【結果および考察】
分解処理を行った試料と未処理の試料をそれぞれ HF により溶解すると、未処理の試料にのみ不溶性の構造体が確認された。したがって、本分解処理により細胞壁が分解されたと考えられる。
CBB 染色を行った結果、HF 可溶性画分、洗浄画分のいずれにも LCPA 様の有機物が検出された。この結果より、同分子がシリカと細胞壁の両方に存在する可能性が示唆された。さらに今回、LCPA 様の有機物とは異なる新たなバンド（11kDa）が検出された。このバンドは洗浄画分では検出されないため、シリカ内部に存在していると考えられる。現在、その構造と機能について解析中である。

biomineralization, rice, silica

発表責任者：尾崎紀昭（ozanor@akita-pu.ac.jp）

発表番号：4B017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)によるカテキン類の分離分析
Separation and analysis of catechins using supercritical fluid chromatography (SFC)
○宮田 健吾、中塚 宏志、松本 恵実、中塚 進一 (長良サイエンス株式会社)
○Kengo MIYATA, Hiroshi NAKATSUKA, Emi MATSUMOTO, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

【目的】
超臨界流体クロマトグラフィー(SFC)は、HPLC と同様カラムクロマトグラフィーの一種であり、その特徴は分離に用いる移動相が、HPLC は液体であるが SFC は超臨界流体ということである。超臨界流体とは臨界点以上の温度・圧力下に置いた物質の状態のことで、気体と液体の区別がつかない状態と言われ、気体の拡散性と液体の溶解性を持つ。この性質は食品の製造等、様々な場面で利用されている。超臨界流体の特徴により、SFC は HPLC と比較し分離能力が高いと言われ、SFC は医薬品、農薬等様々な分析で利用されている。
我々は和漢薬や植物、食品等に含まれる薬理活性物質の精製において、SFC が HPLC で困難であった分離精製に利用できないか検討し、その過程で興味深い結果が得られたので報告する。
【方法・結果】
緑茶から得た主要カテキン 4 種(-)-EC, (-)-EGC, (-)-EGCg, (-)-ECg 及びメチル化カテキン (-)-EGCg-3”-OMe を SFC で分析した。分析条件としてカラムはシリカゲルカラム、溶媒は二酸化炭素と 2%TFA/エタノールの混合溶媒を用いた。その結果、図 1 に示すクロマトグラムが得られ、主要カテキン 4 種が完全に分離した。一方、(-)-EGCg-3”-OMe は(-)-EGCg にメチル基が結合した構造であるが（図 2)、これを同条件で分析したところ(-)-EGCg と同じ時間に溶出し、興味深い結果となった。SFC が ODS-HPLC とは異なる分析結果となったことから、これらを組み合わせることにより、これまで困難であった分離精製がかなり容易になることが分かった。

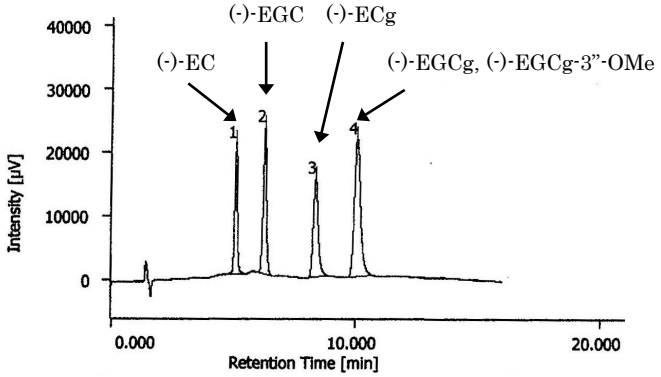


図 1　主要カテキン類の SFC クロマトグラム

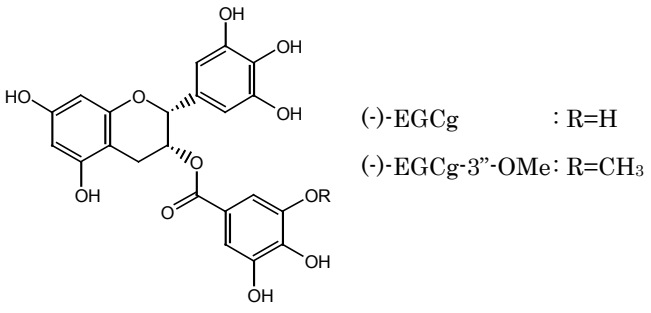


図 2　(-)-EGCg 及び(-)-EGCg-3”-OMe の構造

SFC, catechins, analysis

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

発表番号：4B018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 紫外線エンド吸収と分取セルを利用したグルコシルセラミドの改良定量法

# Improved quantitative HPLC analysis of glucosylceramide using uv end-absorption

○松本 恵実、石野 暢好、藤野 和孝、牧岡 富広、中塚 進一（長良サイエンス（株））
○Emi MATSUMOTO, Nobuyoshi ISHINO, Kazutaka FUJINO, Tomihiro MAKIOKA, Shin-ichi NAKATSUKA (Nagara Science Co., Ltd.)

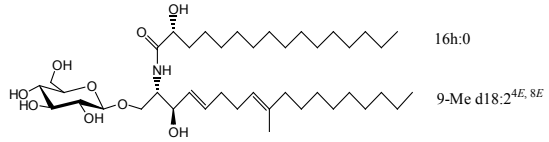
【目的】我々はこれまでグルコシルセラミドなど特徴的な UV 吸収を持たない化合物の定量分析法として、UV エンド吸収($UV_{200nm}$)と分取セルを用いることにより、UV 検出器で定量する方法を報告してきた [1)]。しかしグルコシルセラミドは炭素鎖長や二重結合数、ヒドロキシル基の数、幾何異性等の異なる混合物として存在するため、ODS カラムを使用する本法で分析すると構成成分が分離し、構成成分ごとの定量には優れているが、総量としての定量は困難であった。そこで我々は順相シリカゲルカラムを用いることによりグルコシルセラミド定量法の改良を検討したので報告する。

【方法】タモギタケ由来グルコシルセラミド混合物標準品を用いて HPLC-順相シリカゲルカラム分析法を検討した。溶媒はクロロホルム、ジクロロメタン、メタノールの混合溶媒を用い、検出は UV 検出器で行なった。2013 年に報告した ODS カラムを用いた分析法では、UV 検出器でエンド吸収($UV_{200nm}$)と、分析用セル(セル長 10mm)よりも短い分取用セル(セル長 1mm)を用いたが、この方法ではクロロホルムやジクロロメタン自身の光の吸収によりセルを光が透過せず、分析が不可能であった。そこでセル長をさらに短い 0.05mm にして分析法を検討した。

【結果】タモギタケ由来グルコシルセラミド混合物標準品を、カラムは順相シリカゲルカラム、溶媒条件はメタノール・ジクロロメタン混合溶媒、検出器はエンド吸収($UV_{210nm}$)と分取用セル(セル長 0.05mm)を用いて HPLC 分析したところ、ひとつのまとまったピークとして検出され、検量線を作成できた。

次にタモギタケ抽出物中のグルコシルセラミドの定量分析を試みた。タモギタケ抽出物を HPLC-順相シリカゲルカラム分析したところ、グルコシルセラミド混合物標準品の溶出時間にピークが検出された。このピークを分取し、主要な構成成分 4 種類の構成比を保持していること、グルコシルセラミド以外の成分を含まないことを確認した。検量線と比較し、タモギタケ由来抽出物中のグルコシルセラミドを定量できた。

以上の結果、紫外線エンド吸収と分取セルを利用したグルコシルセラミドの定量法を改良できた。




タモギタケ由来グルコシルセラミド主成分

1) 松本恵実, 中塚進一, FOOD Style 21, **17**(3), 87-89 (2013). 2) 松本恵実, 中塚進一ら, 日本農芸化学会 2013 年度大会.

HPLC, quantitative analysis, glucosylceramide

発表責任者：中塚進一（nagara@nsgifu.jp）

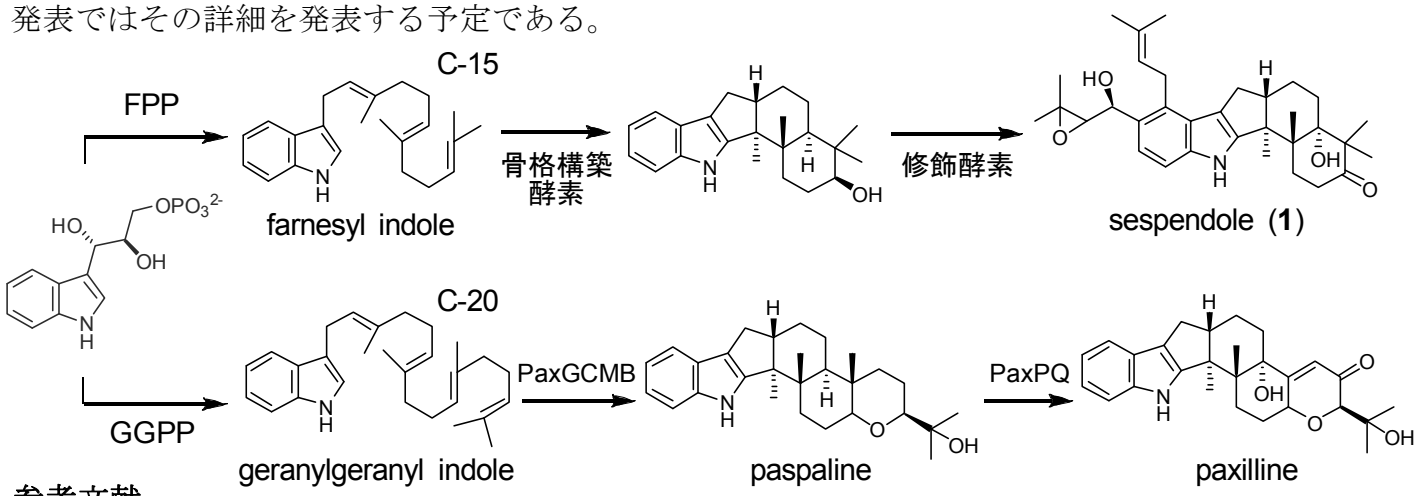
発表番号：4B019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

麹菌異種発現系を用いたインドールセスキテルペン、セスペンドールの生合成研究
Reconstitution of biosynthetic machinery for indole sesquiterpene sespendole in *Aspergillus oryzae*

○松本 知之[1]、南 篤志[2]、劉 成偉[2]、五味 勝也[3]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]東北大農)
○Tomoyuki MATSUMOTO[1], Atsushi MINAMI[2], Chengwei LIU[2], Katsuya GOMI[3], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ, [3]Tohoku Univ.)

**【研究背景】**インドール環の 3 位にゲラニルゲラニル鎖（炭素数 20）が置換したインドールジテルペン（IDT）は、糸状菌が生産する代表的なマイコトキシンである。我々は本化合物群に特徴的な骨格構築機構に興味を持ち、paxilline[1] や penitrem[2] の生合成経路の解明と麹菌異種発現系を利用した酵素的全合成を達成してきた。一方、ファルネシル鎖（炭素数 15）がインドール環に置換したインドールセスキテルペン（IST）も類似の生合成機構で生成されると考えられるが、各反応を触媒する酵素の機能の詳細については未だ不明である。そこで本研究では、糸状菌からは初めて単離されたインドールセスキテルペンである sespendole (**1**) に注目し、麹菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株を用いた異種発現系を利用した、生合成遺伝子の機能解析と **1** の酵素的全合成を目指した。

**【方法・結果】**sespendole 生産菌である *Pseudobotrytis terrestris* のドラフトゲノムデータから、paspaline の骨格構築酵素遺伝子を指標として高い相同性を持つ遺伝子を探索したところ、6 個の酵素遺伝子からなる生合成遺伝子クラスター（*spd* ）を発見した。これらの遺伝子を麹菌に複数の組み合わせで導入した形質転換体を作製した。得られた形質転換体に対して予想生合成中間体を基質として微生物変換を行った結果、骨格構築酵素とプレニル基転移酵素の同定に成功した。現在は、IDT および IST の基質と生合成酵素を利用し、相互の基質受容能について検討している。ポスター発表ではその詳細を発表する予定である。




**参考文献**

1：Tagami, K. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260.　2：Liu, C. *et. al. Angew. Chem.* **2015**, *54*, 5748.

indole-sesquiterpene, sespendole, biosynthesis

発表番号：4B020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

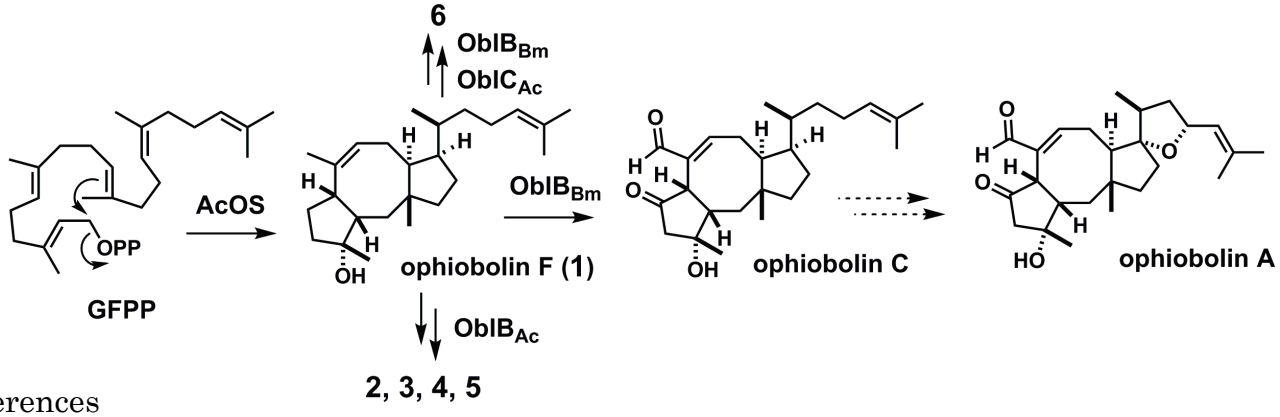
# 麹菌発現系を利用した生物活性セスタテルペノイドのゲノムマイニング

# Genome mining of bioactive sesterterpenoids with the Aspergillus oryzae expression system

○成田 興司[1]、千葉 諒太[1]、南 篤志[2]、児玉 基一郎[3]、五味 勝也[4]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]鳥取大農、[4]東北大院農)
○Koji NARITA[1], Ryota CHIBA[1], Astushi MINAMI[2], Motoichiro KODAMA[3], Katsuya GOMI[4], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Facul. Agric., Tottori Univ., [4]Grad. Sch. Agric. Sci,, Tohoku Univ.)

【目的】近年、ゲノム情報解析技術の発展に伴い、糸状菌ゲノムから機能未知の二次代謝産物生合成遺伝子の探索を行うことが容易になってきている。我々は麹菌異種発現システムを利用して新規テルペノイドのゲノムマイニングを行っており、以前の研究で糸状菌ゲノム公開株 *Aspergillus clavatus* から世界初のセスタテルペン環化酵素である ophiobolin F(**1**)合成酵素(AcOS)を見出した [1]。**1** は ophiobolin 類縁化合物の前駆体であり、抗腫瘍活性を示す ophiobolin A は **1** から 6 段階の酸化によって生合成されると予想される [2]。AcOS の周辺には酸化酵素遺伝子が複数存在しており、さらに ophiobolin A 生産菌である *Bipolaris maydis* からも類似の遺伝子群が見つかったことから、これらが ophiobolin 類の生合成に関与していると考えられた。そこで、これらの機能解析により ophiobolin 類の多段階酸化修飾機構について調べることにした。また、糸状菌ゲノム公開株から AcOS と相同性を示すセスタテルペン環化酵素のゲノムマイニングを行った。

【方法・結果】*A. clavatus* 由来の P450 (*oblB*$_{Ac}$)を麹菌内で *AcOS* と共発現させた結果、4 種の新規酸化生成物 **2**-**5** が得られたのに対し、*B. maydis* 由来の P450 (*oblB*$_{Ev}$)の共発現株からは天然物である ophiobolin C の生産が確認された。さらに、FMO (*oblB*$_{Ac}$)を *AcOS*, *oblB*$_{Bm}$ と共発現させたところ、新規化合物 **6** が得られた。以上の結果から、ophiobolin 類の多段階修飾機構について新たな知見が得られた。また、新規セスタテルペン環化酵素のゲノムマイニングを行った結果、複数の新規生成物の生産が確認された。これらの結果について、ポスターにて詳細を報告する。




References
1) Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594.
2) Nozoe, S.; Morisaki, M.; Tsuda, K.; Okuda, S. *Tetrahedoron Lett*, **1967**, *35*, 3365.

biosynthesis, genome mining, terpenoid

発表責任者：及川英秋（hoik@sci.hokudai.ac.jp）

発表番号：4B021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 植物疫病菌交配ホルモンα1 の生合成酵素の探索

# Search for Biosynthetic Enzymes of *Phytophthora* Mating Hormone, α1

○戸村 友彦、小鹿 一（名大院生命農）
○Tomohiko TOMURA, Makoto OJIKA (Nagoya Univ.)

【背景・目的】

植物疫病菌（*Phytophthora* 属糸状菌）は、ジャガイモなどの重要農作物に感染し甚大な被害を与え、その被害は世界３大植物病害の１つとして知られている。疫病菌が地球規模の蔓延や急速な薬剤耐性化を起こしやすい要因の１つは、有性生殖と考えられている。したがって有性生殖メカニズムの分子レベルでの解明は、疫病菌防除に繋がる重要な課題であると言える。疫病菌の有性生殖には２つの交配ホルモンα1（A1 交配型が分泌）とα2（A2 交配型が分泌）が関与している。この２つの交配ホルモンの構造と生合成経路が当研究室で解明され、疫病菌の有性生殖の化学的基盤が整ったが、疫病菌有性生殖の全容解明には「交配ホルモンがどこから来て、どのように作用するのか」というケミカルバイオロジー的課題の解決が必須である。そこで本研究では、α1 生合成酵素アッセイ系を確立し、α1 生合成酵素を探索することを目的とした。

【方法・結果】

α1 産生能が高い（生合成酵素の発現量が高いと思われる） ３株（*P. cryptogea*、*P. capsici* および *P. cinnamomi*）を、生合成前駆体である phytol を添加した V8 野菜ジュース液体培地で培養し（27℃、80 rpm）、1 週間のα1 産生量の経時変化を１日毎に確認した。その結果、20% V8 野菜ジュースで培養した *P. cryptogea* がα1 産生量が最も多く、また５から６日目にかけて産生量が急激に増加していることが明らかとなった。したがってα1 生合成酵素アッセイには、20% V8 野菜ジュース液体培地で５日間培養した *P. cryptogea* を用いることにした。交配ホルモンは phytol からα2（11,16-ジヒドロキシル化）、α2 からα1（4 位のヒドロキシル化と二重結合の移動、ケト化）へと生合成される（図 1）ので、交配ホルモンの生合成には水酸化酵素（P450）が重要であると考えられる。そこで液体培養後の *P. cryptogea* 菌体からタンパク質を抽出し、NADPH、glucose-6-phosphate (G-6-P) および G-6-P dehydrogenase 存在下、α2 を加えてα1 生合成酵素アッセイを行った。反応物中のα1 を LC-MS で測定したところ、α2 からα1 への変換が確認された。現在、アッセイの最適条件を検討中である。

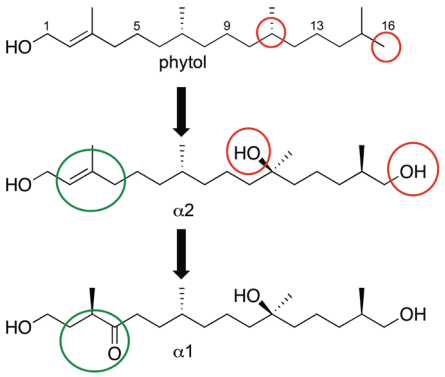


図１　交配ホルモンの生合成経路

*Phytophthora*, mating hormone, biosynthesis

発表番号：4B022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

Reconstitution of biosynthetic machinery for ustiloxin B

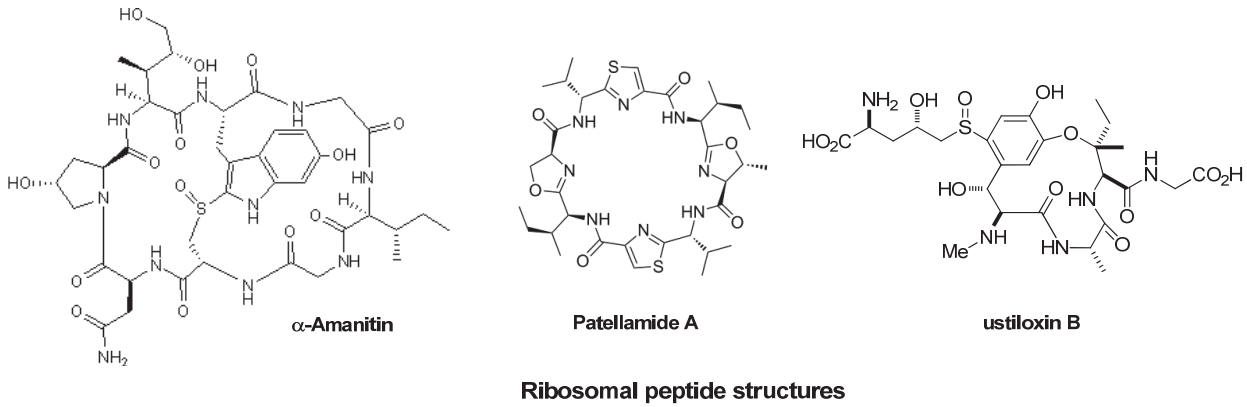
○Ying Ye[1], Atsushi Minami[2], Myco Umemura[4], Yuya Igarashi[2], Kazuo Shinya[5], Miho Izumikawa[6], Masayuki Machida[4], Katsuya Gomi[3], Hideaki Oikawa[2] ([1]Grad.Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [4]Bioproduction Research Institute, AIST, [5]Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, AIST, [6]Japan Biological Informatics Consortium)

**[Background]** Ustiloxins, a family of antimitotic peptides, were known to be produced by *Ustilaginoidea virens*. They cause mycotoxicosis and inhibit the polymerization of tubulin, but have no growth inhibitory effect on bacteria or fungi[1]. Their structures contained a 13-membered peptide macrocycle having a rare chiral tertiary alkyl-aryl ether linkage. Recently, the biosynthetic gene cluster for ustiloxin B in *Aspergillus flavus* has been reported[2]. It strongly suggested ustiloxin B is biosynthesized through ribosomal peptide synthesis (RiPS) pathway. Although its biosynthetic mechanism is proposed according to sequence analysis of the whole cluster, the specific pathway is not yet elucidated.

**[Results and discussion]** In this study, we used both *A. oryzae* heterologous expression system and *in vitro* enzymatic assays to elucidate ustiloxin B biosynthetic machinery. Accumulated examples of heterologous production of fungal metabolites suggested that the *A. oryzae* expression system allows us to analyze the biosynthetic machinery of complex natural products[3]. Transformation of plasmids harboring genes on ustiloxin B biosynthetic cluster into *A. oryzae* in a stepwise manner enabled us to isolate important intermediates in the ustiloxin B biosynthetic pathway from the corresponding transformants. Also, using in vitro enzymatic assays we characterized novel enzymes catalyzing unusual oxidative reaction and carbon-carbon bond formation.

**[References]**

[1] Li, P. *et al*. *J. Am. Chem. Soc.,* **2008**, *130*, 2351-2364; [2] Umemura, M. *et al*. *Fungal Genet. Biol*., **2014**, *68*, 23-30; [3] Tagami, K. *et al*. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 1260–1263.




**Ribosomal peptide structures**

heterologous expression, ribosomal peptide synthesis, Aspergillus oryzae

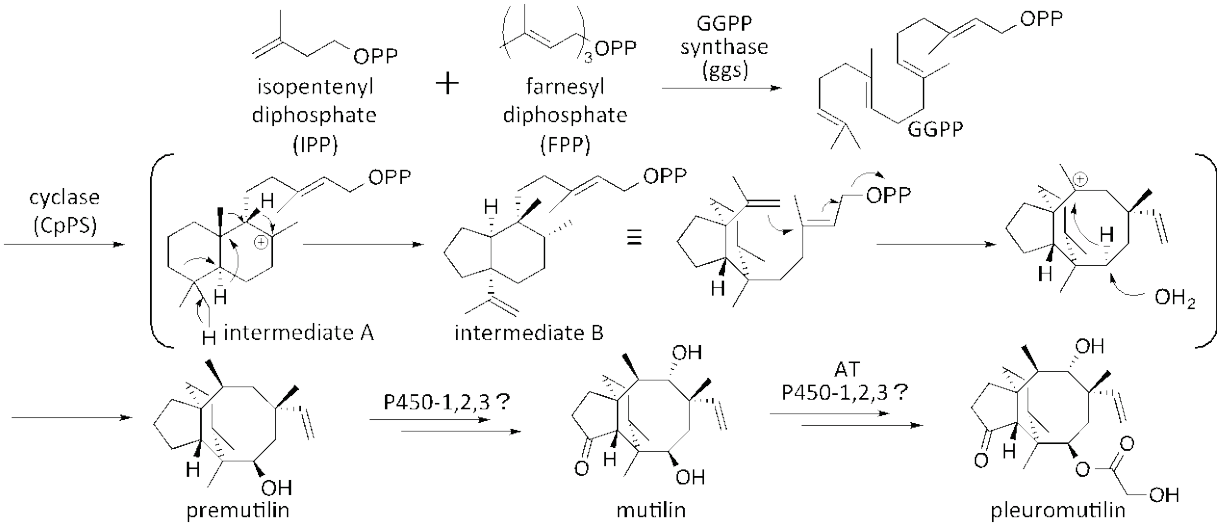
発表番号：4B023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 抗生物質 pleuromutilin 生合成における環化酵素の機能解析
# Functional Analysis of Terpene Cyclase in Antibiotic Agent Pleuromutilin biosynthesis

○山根 桃華[1]、塚越 多映[2]、南 篤志[2]、常盤野 哲生[3]、五味 勝也[4]、及川 英秋[2] ([1]北大院総化、[2]北大院理、[3]秋田県立大院、[4]東北大院農)
○Momoka YAMANE[1], Tae TSUKAGOSHI[2], Atsushi MINAMI[2], Tetsuo TOKIWANO[3], Katsuya GOMI[4], Hideaki OIKAWA[2] ([1]Grad. Sch. Chem. Sci. and Eng., Hokkaido Univ., [2]Grad. Sch. Sci., Hokkaido Univ., [3]Grad. Sch., Akita Prefectural Univ., [4]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】*Clitopilus* 属から単離されたプロイロムチリンはタンパク質合成の阻害物質として知られるジテルペンである。プロペラ様のユニークな 3 環性骨格を有していることから，その骨格構築を担う環化酵素の触媒機構に興味が持たれている。既に，Hasler の $^{14}C$ 標識化合物の取り込み実験より，二段階の環化機構が提唱されている。すなわち，コパリル二リン酸類似のカチオン中間体(intermediate A)を経由した，6 員環から 5 員環への環縮小により intermediate B が生成した後，ピロリン酸の脱離に伴う 8 員環形成により premutilin が形成される機構である。本研究では環化酵素の同定とその精密機能解析及び，信頼性の高い麹菌異種発現系を用いたプロイロムチリンの生合成系の再構築を目的としている。

【方法・結果】プロイロムチリン生産菌 *Clitopilus pseudo-pinsitus* から，プロイロムチリン生合成遺伝子クラスターを同定した。反応に関わる 6 個の遺伝子をクローニングし，麹菌の形質転換及び *in vitro* 解析を行った。GGPP 合成酵素(ggs)とテルペン環化酵素(CpPS)を導入した二重形質転換体を構築し，その代謝産物を解析したところ，premutilin を得ることに成功した。また，組換え酵素 CpPS を用いて，GGPP から premutilin への変換も確認した。本ポスターでは，環化酵素の機能解析と生合成系の再構築に関して，その詳細を発表する予定である。




参考論文：Thesis, P. D. *Diss ETH 6359*, Zurich, 1979.

pleuromutilin, biosynthesis, diterpene

発表番号：4B024
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# イネいもち病菌のピリクロール類生合成遺伝子クラスターの同定
# Identification of biosynthesis cluster of pyriculol

○古山 祐貴[1]、本山 高幸[2]、鎌倉 高志[1]、長田 裕之[2] ([1]東理大、[2]理研)
○Yuki FURUYAMA[1], Takayuki MOTOYAMA[2], Takashi Kamakura[1], Hiroyuki OSADA[2] ([1]Tokyo Univ. of science, [2]Riken)

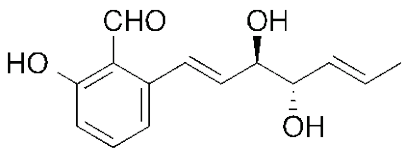
【目的】

植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*)のゲノム中には、約 30 個の二次代謝遺伝子クラスターがあるが、生産物が報告されているのはメラニンとテヌアゾン酸の遺伝子クラスターのみである。メラニン及びテヌアゾン酸の生合成の鍵遺伝子はそれぞれ *ALB1* (*MGG_07219*) 及び *TAS1* (*MGG_07803*) であることが明らかになっている。ピリクロール類 (pyriculol 及び dihydropyriculol 等の類縁体) はイネいもち病菌が生産する主要な二次代謝産物であるが (Iwasaki *et al.* 1969、Kono *et al.* 1991)、生合成遺伝子は不明だった。ピリクロールに関しては、イネに壊死斑を形成させる活性が報告され、病原性との関連が示唆されていた。今回、ピリクロール類の生合成遺伝子クラスター同定及び生合成遺伝子破壊株の解析結果について報告する。

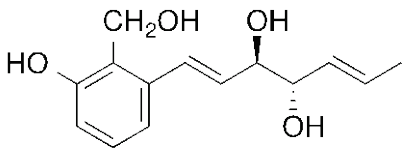
【方法と結果】

ピリクロール類はポリケタイド化合物であることが明らかになっていた。まず、ピリクロール類の生産が PDB 培地で液体培養することにより生産誘導されることを見出した。そこで、DNA マイクロアレイ解析により PDB で発現誘導されるポリケタイド合成酵素 (PKS) 遺伝子を探索した。その結果、*MGG_10912* が候補遺伝子として見出された。*MGG_10912* の遺伝子破壊によりピリクロール類の生産が消失したことから、本遺伝子がピリクロール類の生合成遺伝子であることが明らかとなった。*MGG_10912* の周辺には同様の発現パターンを示す遺伝子群が存在し、ピリクロール類の生合成に関与する遺伝子クラスターが存在することが示唆された。これらの遺伝子群の中から、ピリクロール類の生産に関与するものを見出した。*MGG_10912* の遺伝子破壊株は野生株と同様の病原性を示した。

本研究の一部は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。



pyriculol



dihydropyriculol

pyriculol, magnaporthe oryzae, biosynthesis

発表番号：4B025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Design and Labelling of Proposed Cyclic Intermediates in the Biosynthesis of Coelenterazine-type Luciferins

○Richard Metzner[1,2], Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST)

## [Purpose]

The biosynthesis of coelenterazine-type luciferins (Figure 1) remains a great challenge for both microbiologists and synthetic chemists. To elucidate multi-step pathways in biological systems, the total synthesis of the final product is sometimes inconvenient, while tracing small monomers in vivo and in vitro can become quite tedious due to the low enzyme specificity at these stages. As a compromise, labelled medium-sized intermediates can provide the necessary specificity, low activity with unrelated proteins and easier recognition in an extract of several secondary metabolites.

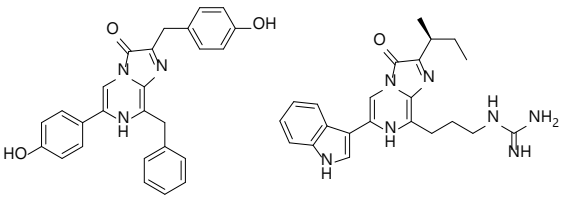


Figure 1. Coelenterazine-type luciferins

## [Results and discussion]

We designed biomimetic chemical syntheses to obtain labelled, bioactive intermediates which are useful in the identification of isolated metabolites and target-related active proteins. The key steps in these syntheses are cyclization reactions (Figure 2, A-C) based on previously identified amino acid monomers and proposed peptides. Retrosynthetic analysis of the heteroaromatic core structure of **1** and **2** gave us three distinct approaches for peptide cyclization, starting from commercially available monomers to ensure a broad applicability and compatibility with general detection methods (MS, NMR). We applied these procedures in the synthesis of novel $^{19}$F-labelled, possible biosynthetic intermediates, which are currently investigated for in vitro conversion in bioluminescent organisms, e.g. the sea firefly *Cypridina hilgendorfii*.

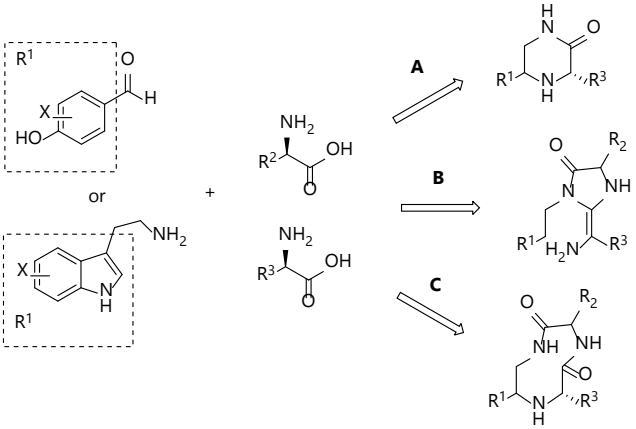


Figure 2. Synthetic cyclic peptide derivatives

Peptide cyclizations, Biosynthesis, Bioluminescence

発表責任者：Yasuhisa Asano（asano@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：4B026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

放線菌由来ジテルペン環化酵素 CotB2 が触媒する精巧な環化反応機構の解明
In-depth mechanistic study on *Streptomyces* diterpene cyclase CotB2

○寺本 和矢[1]、目黒 亜由子[1]、本吉 祐大[1]、佐藤 玄[2,3]、増本 優衣[2,3]、手塚 則亨[2,3]、坂井 健太[4]、上田 翔太[4]、遠塚 悠輔[4]、安藤 祐美[4]、富田 武郎[1]、金 承榮[1]、木村 智之[5]、五十嵐 雅之[5]、澤 竜一[5]、品田 哲郎[4]、王 超[2,3]、内山 真伸[2,3]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]東大院・薬、[3]理研、[4]大阪市大院・理、[5]微化研)

○ Kazuya TERAMOTO[1], Ayuko MEGURO[1], Yudai MOTOYOSHI[1], Hajime SATO[2,3], Yui MASUMOTO[2,3], Yoshinori TEZUKA[2,3], Kenta SAKAI[4], Shota UEDA[4], Yusuke TOTSUKA[4], Yumi ANDO[4], Takeo TOMITA[1], Seung-Young KIM[1], Tomoyuki KIMURA[5], Masayuki IGARASHI[5], Ryuichi SAWA[5], Tetsuro SHINADA[4], Chao WANG[2,3], Masanobu UCHIYAMA[2,3], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]BRC, UTokyo, [2]Pharm. Sci., UTokyo, [3]RIKEN, [4]Osaka City Univ., [5]BIKAKEN)

【目的】放線菌 *Streptomyces melanosporofacience* MI614-43F2 の生産する cyclooctatin は，lysophospholipid を加水分解する lysophospholipase の阻害活性を有するジテルペンである[1]。その生合成には CotB1 から CotB4 の 4 つの遺伝子産物が関わっており，なかでも， CotB2 はバクテリアから単離された初めての I 型ジテルペン合成酵素である[2]。CotB2 は不斉点を持たない非環状化合物 geranylgeranyl diphosphate (GGDP) を基質として，6 つの不斉点を持ち三環が縮合した cyclooctat-9-en-7-ol を唯一の反応産物として与えることから，テルペン環化酵素のなかでも特に厳密な反応制御を行っていることが推測された。そこで，テルペン環化酵素の精巧な反応制御機構を理解するために，CotB2 の詳細な環化反応機構の解明を試みた。

【方法・結果】cyclooctatin 生合成遺伝子クラスターを導入した *S. albus* 異種発現株に[U-$^{13}C_6$]glucose を取り込ませ，精製した cycloocatin の標識パターンを $^{13}C$ NMR により解析することで炭素–炭素結合の変化を調べた。また，基質である GGDP の 2, 6, 8, 9, 10 位の各水素原子を重水素原子に置換したラベル化基質をそれぞれ合成して CotB2 との *in vitro* 反応を行い， $^{1}H$ NMR と $^{2}H$ NMR により反応過程での重水素原子の転位を解析した。以上の *in vivo* と *in vitro* の結果を組み合わせ，図に示す 2 回の遠隔ヒドリドシフトおよびシクロプロパン環形成を介した炭素–炭素結合の組換えを含む CotB2 の反応機構を明らかにした[3,4]。また，密度汎関数 (DFT) 法による各中間体および遷移状態の構造最適化とポテンシャルエネルギー計算からも上記の環化反応機構を支持する結果が得られ，CotB2 の持つ高い位置選択性と立体選択性はこの反応機構によってもたらされることが示された[4]。

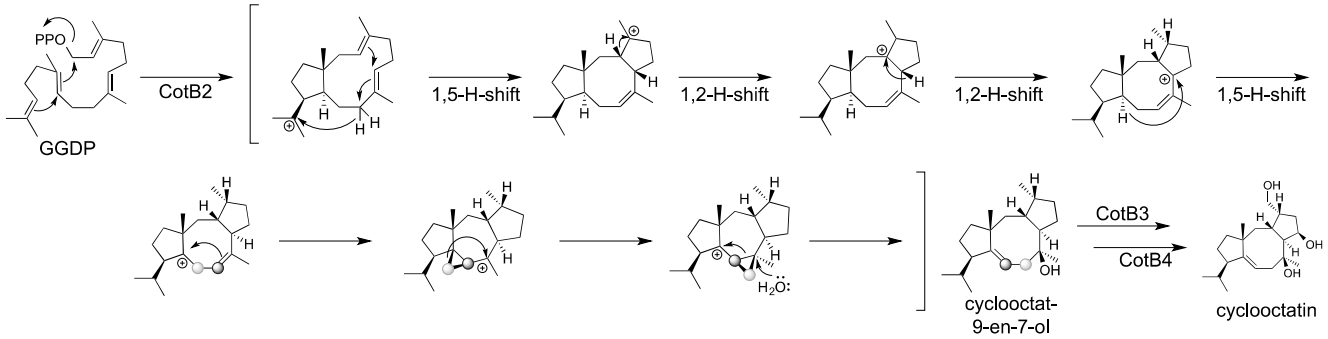



図 I 型ジテルペン環化酵素 CotB2 の環化反応機構

【文献】1, T. Aoyagi, *et al.*, *J. Antibiot*, **45**, 1587 (1992); 2, S.Y. Kim, *et al.*, *Chem Biol.*, **16**, 736 (2009); 3, A. Meguro, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 4353 (2015); 4, H. Sato, *et al.*, *Sci. Rep.*, DOI: 10.1038/srep18471

terpenoid, cyclase, biosynthesis

発表責任者：寺本和矢（5013044358@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4B027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

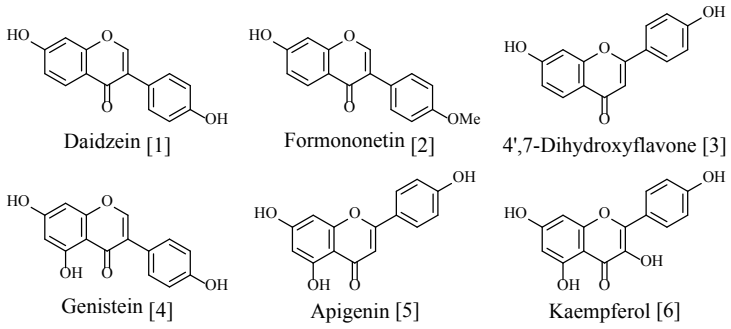
# 安定同位体を用いたハスモンヨトウ幼虫に対するダイズ葉の化学的応答の動態解析

# Biodynamic analysis with stable isotopes of chemical responses in soybean leaves against *Spodoptera litura*

○木村 有希[1]、中田 隆[1]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、寺石 政義[1]、Eric SCHMELZ[2]、奥本 裕[1]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]カリフォルニア大学サンディエゴ校)
○Yuki KIMURA[1], Ryu NAKATA[1], Naoko YOSHINAGA[1], Hajime ONO[1], Masayoshi TERAISHI[1], Eric SCHMELZ[2], Yutaka OKUMOTO[1], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]UCSD)

植物は植食者や病原菌に対し様々な化学的応答を示す．これに関与する化学物質の多くは植物が生産する誘導性の二次代謝物である．我々は，ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫に食害されたダイズ (*Glycine max*) の葉の化学的応答に注目した．昨年までの大会で，ハスモンヨトウ幼虫の食害およびエリシター処理によりダイズ葉で phenylalanine から flavonoids への生合成が活性化され，daidzein [1] や formononetin [2] とその配糖体類が誘導されることを報告した．なお，植物体内ではその多くが配糖体やマロニル配糖体の形態であることが知られている．そこで本研究では, phenylalanine 安定同位体を取り込ませ，エリシター処理に応答して変化する flavonoids 生合成の全体的な動態を調べた．

コントロール区として 50 mM リン酸バッファー (pH 8.0) ，エリシター処理区として幼虫腸管内容物抽出液をそれぞれダイズ葉に供試した．処理液には $^{13}C_9$,$^{15}$N-L-α-phenylalanine を混合した．まず，ダイズ葉 (品種: エンレイ) の 80% MeOH 抽出物を加水分解し，$^{13}C_9$ ラベル化された flavonoid アグリコン総量を比較した．加水分解サンプルを LCMS で分析し，$^{13}C_9$ ラベル化された [1], [2], 4',7-dihydroxyflavone [3], genistein [4], apigenin [5], kaempferol [6 ]を検出した．両処理区を比較したところ，エリシター処理区で，$^{13}C_9$ ラベル化された [1], [2], [3], [4] の誘導量が有意に増加した．これらの flavonoids の *in vivo* 生合成がエリシター処理で活性化されることを意味している．さらに，各サンプルの粗抽出物および脱マロニル化物を同様に分析した．その定量結果から，[1], [2], [3], [4] の各アグリコン・配糖体・マロニル配糖体の誘導量を比較し，各形態の誘導動態を調べた．[1], [2] は，いずれの形態も増加し，存在比は変化しなかった．一方で，[3], [4] は，特に配糖体が大きく増加した．




biological interaction, biosynthesis, chemical responses

発表番号：4B028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Caloglyphus rodriguezi* における炭化水素の生合成経路の探索

A search for biosynthetic pathway of hydrocarbon in *Caloglyphus rodriguezi*

○小木曽 浩也[1]、中田 隆[1]、吉永 直子[1]、小野 肇[1]、桑原 保正[2]、清水 伸泰[2]、森 直樹[1] ([1]京大院農、[2]京都学園大)

○Hiroya OGISO[1], Ryu NAKATA[1], Naoko YOSINAGA[1], Hazime ONO[1], Yasumasa KUWAHARA[2], Nobuyasu SIMIZU[2], Naoki MORI[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Kyoto gakuen Univ.)

[背景と目的]コナダニの一種である *Caloglyphus rodrigueizi* は体表に undecane 及び tridecane の二種の奇数鎖炭化水素を分泌する。それぞれ dodecanoic acid 及び myristic acid から生合成されると考えられている。ほかのコナダニ類にも炭化水素を持つ種はあるが、炭素数が 15 や 17 と比較的長い炭化水素であり *C. rodriguezi* のような短い炭素数の炭化水素を持つものは少ない。本研究ではこの炭化水素の生合成経路の探索を行った。

[方法と結果] Myristic acid *d*-27 を混ぜた乾燥酵母を摂食させた *C. rodriguezi* と摂食させていない *C. rodriguezi* の体表のヘキサン抽出物を GC-MS で分析し、比較した。その結果 *d*-ラベル体が全て保持された炭化水素の $C_{14}HD_{27}$ が検出された (図 1 )。すなわち、本種のダニにおける tridecane の生合成経路には $\beta$-酸化による脱炭酸反応は関与していない (図 2 )。*Drosophila melanogaster* では炭素数 21-37 の奇数鎖炭化水素の生合成がみられ、脂肪酸が一度アルデヒドに還元されたのち脱炭酸される。*C. rodriguezi* においても同様の生合成経路が予想された。また、ラベル体を摂食させてから継時的に GC-MS でヘキサン抽出物を分析し、ラベル体の tridecane と非ラベル体の tridecane のピーク強度を比較し炭化水素の生合成速度を求めた。その結果体表の炭化水素は 1 日で 3 割程度が置き換わることが分かった。次に *C. rodriguezi* を Bligh dyer 法で抽出し、その抽出物から遊離脂肪酸、単純脂質、リン脂質を分画し、それぞれ加水分解とメチルエステル化を行い GC-MS で分析した。その結果 myristic acid が遊離脂肪酸中から多く検出された。

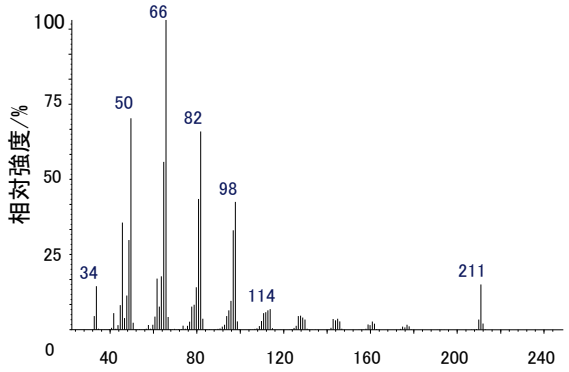



図 1 $CD_3(CD_2)_{12}H$ の MS スペクトル

$$CD_3(CD_2)_{12}COOH \rightarrow CD_3(CD_2)_{12}H$$

図 2 ラベル体 myristic acid からラベル体 tridecane への変換

tridecane, myristic acid, caloglyphus

発表番号：4B029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# クサギカメムシ由来アルデヒド酸化酵素の体内分布と基質特異性
# Aldehyde oxidation activities in the brown marmorated stink bug

○野下 浩二、田母神 繁（秋県大・生資科）
○Koji NOGE, Shigeru TAMOGAMI (Akita Pref Univ)

【背景と目的】カメムシ類は，(*E*)-2-hexenal に代表されるアルデヒド類を防御物質として分泌腺に蓄積し，外敵に襲われた際にその臭気を発することで身を守る [1]．また，カメムシ類の 1 種であるクサギカメムシ *Halyomorpha halys* は，餌となる植物を探索する手掛かりとして，植物由来の hexanal に選好性を示す．我々は，クサギカメムシ触角内において hexanal を hexanoic acid に酸化するアルデヒド酸化酵素の存在を見出している．このようなアルデヒド酸化酵素は外来のアルデヒド類の代謝分解に何らかの役割を担うと推定される．そこで，カメムシ体内における本酵素の生物学的な役割を明らかにすることを最終目的に，同様のアルデヒド酸化酵素が触角以外の部位にも存在するか，どのようなアルデヒドを代謝するか検討するとともに，クサギカメムシからアルデヒド酸化酵素の単離・精製を試みた．

【方法と結果・考察】まず，カメムシを解剖し，触角，頭部，分泌腺，腸管に分けた．各部位を破砕し，得られた粗酵素液を native PAGE で分離後，hexanal を基質とした活性染色により，アルデヒド酸化活性の検出を行った．いずれの部位からもアルデヒド酸化活性が検出されたが，native PAGE での移動度の違いから，分泌腺には他の 3 つの部位に存在する酵素とは異なる特異的なアルデヒド酸化酵素が存在することが示唆された．次に，アルデヒド酸化活性の高いクサギカメムシ頭部を材料に，その粗酵素液を hexanal，decanal，(*E*)-2-hexenal，(*E*)-2-decenal，benzaldehyde，phenylacetaldehyde と反応させ，その生成物を GC–MS でモニターし，アルデヒド酸化酵素の基質特異性を調べた．その結果，脂肪族ならびに芳香族いずれの基質も酸化され，このアルデヒド酸化酵素は幅広いアルデヒド類を代謝できることが示された．この結果は，本酵素がアルデヒド類の代謝分解に関わるとの推定を支持するものであった．さらに，粗酵素液を硫安分画，ゲル濾過，イオン交換クロマトグラフィー，アフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した．精製した酵素の諸性質についても合わせて報告する．

[1] Noge et al., *J. Chem. Ecol.*, **38**, 1050–1056 (2012)

aldehyde, oxidation, *Halyomorpha halys*

発表責任者：野下浩二（noge@akita-pu.ac.jp）

発表番号：4B030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# コナダニ類が生産する不飽和炭化水素の生合成

# Biosynthesis of unsaturated hydrocarbon in astigmatid mites

○森山 太介[1]、森 直樹[2]、桑原 保正[3,4]、清水 伸泰[1]（[1]京都学園大院バイオ環境、[2]京大院農・応用生命、[3]富山県大工・生工研セ、[4]JST, ERATO）
○Daisuke MORIYAMA[1], Naoki MORI[2], Tasumasa KUWAHARA[3,4], Nobuhiro SHIMIZU[1] ([1]Kyoto Gakuen Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Toyama pref. Univ., [4]JST, ERATO)

【背景と目的】
貯穀害虫として知られるコナダニ類のサトウダニ *Carpoglyphus lactis* は一般的な動物には生合成できないとされるリノール酸の生合成能を有する。同位体標識化合物を用いた取り込み実験において、ダニの分泌成分の一つである不飽和炭化水素 (*Z,Z*)-6,9-heptadecadiene (6,9-C17) はリノール酸から誘導されることが証明された[1)]。コナダニでは 6,9-C17 を分泌する種が多く、フェロモンを含む他の分泌成分を効率的に体外に放出するための溶媒としての役割に加え、放出後はフェロモンなどの揮散を調節する働きをもつと考えられる。昆虫においてクチクラ炭化水素の生合成研究は古くから盛んに行われてきたが近年、キイロショウジョウバエで昆虫特異的な生合成酵素が同定された[2)]。生合成前駆体は脂肪族アルデヒドであり、シトクロム P450、酸素分子、NADPH の作用で炭化水素に変換されると報告されている。本研究ではこの知見をもとに 6,9-C17 の前駆体をリノレイルアルデヒドに設定し、粗酵素による 6,9-C17 への変換条件を検討した。
【方法と結果】
合成したリノレイルアルデヒドを基質として、サトウダニに Tris-HCl buffer（スクロースを含む）を加えホモジネートした後、遠心分離で核画分、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、細胞質画分にそれぞれ分画した。それぞれの画分に基質を加え変換の有無を GC-MS で確認した。確認方法はコントロールとのマススペクトルにおける分子イオンピークの増加量で判断した。結果としてミクロソーム画分に含まれる酵素が炭化水素の生合成に関与していることが判明した。次にミクロソーム画分に含まれる酵素の可溶化を検討した。ミクロソーム画分に各種安定剤および界面活性剤を加え撹拌した。撹拌後、遠心分離したところ上清画分にだけ活性が認められたので、酵素の可溶化は成功したと判断した。本発表ではそれらの知見を総合して、リノレイルアルデヒドから 6,9-C17 が生成する変換条件を考察する。

1）*Insect Biochem. Mol. Biol*., 45, 51-57, 2014.　2）*PNAS*,109,14858-14863, 2012.

biosynthesis, hydrocarbon, astigmatid mite

発表番号：4B031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 非リボソームペプチド JBIR-126 が有するピロリジン環の形成機構に関する研究
# Studies on pyrrolidine ring formation in the biosynthesis of JBIR-126

○角田 毅[1]、勝山 陽平[1]、泉川 美穂[2]、橋本 絢子[2]、藤江 学[3]、佐藤 矩行[3]、新家 一男[4]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]JBIC、[3]OIST、[4]AIST)
○ Takeshi TSUNODA[1], Yohei KATSUYAMA[1], Miho IZUMIKAWA[2], Junko HASHIMOTO[2], Manabu FUJIE[3], Noriyuki SATOH[3], Kazuo SHIN-YA[4], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Grad. Sch. Agri. and Life Sci. Univ. of Tokyo, [2]Japan Biological Informatics Consortium, [3]Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University, [4]National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)

【背景、目的】JBIR-126, -148, -149 は放線菌 *Streptomyces sp*. NBRC 111228 から単離された非リボソームペプチド (NRP) であり、インドールカルボン酸、α-メチルオキサゾリン、ピロリジルグリシン (Py-Gly)、α-メチル-L-セリンから構成される (JBIR-148, 149 では C 末端の 1 つのアミノ酸が欠けている)。α-メチルオキサゾリン環とピロリジン環は NRP においてほとんど見られない構造である。JBIR-126 と類似の構造を持つ JBIR-34, 35 に関するこれまでの研究により、 α-メチルオキサゾリン環の生合成機構は明らとなっているが (A. Muliandi *et al., Chem. Biol.,* **2014**)、ピロリジン環の生合成は未だに不明である。そこでこのピロリジン環の生合成機構を解明することを目的として研究に着手した。
【結果、考察】まず、生産菌のドラフトゲノム配列を決定し、JBIR-126 の生合成遺伝子クラスターの探索を行った。JBIR-126 は JBIR-34, -35 と同様にα-メチルオキサゾリン環を持つため、その基質であるα-メチル-L-セリン合成酵素とα-メチル-L-セリンを認識する NRP 合成酵素 (NRPS) を生合成遺伝子探索の際の指標とした。その結果、これらの酵素遺伝子を含む、JBIR-34, 35 生合成遺伝子クラスターと相同性が高い遺伝子群を発見した。JBIR-126 と JBIR-34, 35 の生合成遺伝子クラスターを比較した結果、JBIR-126 の生合成遺伝子クラスターにのみ存在する脱水素酵素と stand-alone な condensation (C) domain 様タンパク質をコードすると予想される遺伝子が存在した。これより、Lys が脱水素され生じた二重結合に対し C domain 様タンパクが触媒する Michael 付加型の環化反応が起こり Py-Gly が合成されると予想した。この環化は (i) Lys が NRPS にロードされ NRPS 上の Lys が環化を受ける、(ii) NRPS にロードされる前に遊離の Lys が環化を受けるという 2 つの様式が考えられる。一般に、NRPS の基質認識は Adenylation (A) domain による基質の活性化の段階で行われるため、A ドメインの基質特異性を調べることでいずれの経路が用いられているかを明らかにすることとした。JBIR-126 を生合成する 4 つの NRPS の A ドメインの系統樹解析、JBIR-34, 35 の NRPS とのモジュールの構成比較から PgpA4 と名付けた NRPS が Lys もしくは Py-Gly の活性化と縮合反応に関与していることが示唆された。PgpA4 を組換え酵素として取得し、いくつかのアミノ酸に対する A domain の基質特異性を調べた結果、Lys が良く認識された。現在、Py-Gly の立体選択的な合成を行っており、PgpA4 が Lys と Py-Gly のいずれをよい基質とするかを調べる予定である。また、環化を担うと推測される脱水素酵素、stand-alone な C domain 様タンパクの組換えタンパクの取得とそれらを用いた *in vitro* でのピロリジン環の生合成経路の再構築も試みている。

Streptomyces, Biosynthesis, NRPS

発表番号：4B032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 紅藻マギレソゾ Laurencia saitoi 由来ブロモペルオキシダーゼの臭素化反応
# Enzymatic bromination by bromoperoxidase from the red algae Laurencia saitoi

○正木 志良[1]、金子 賢介[3]、小林 大毅[1]、石川 高史[1]、西川 慶祐[4]、森本 善樹[4]、鷲尾 健司[1,2]、森川 正章[1,2]、沖野 龍文[1,2] ([1]北大院環境、[2]北大院地球環境、[3]八戸高専、[4]阪市大院理)
○Shiro MASAKI[1], Kensuke KANEKO[3], Daiki KOBAYASHI[1], Takafumi ISHIKAWA[1], Keisuke NISHIKAWA[4], Yoshiki MORIMOTO[4], Kenji WASHIO[1,2], Masaaki MORIKAWA[1,2], Tatsufumi OKINO[1,2] ([1]Env.Sci.Hokkaido Univ., [2]Earth.Sci.Hokkaido Univ., [3]NITHC, [4]Osaka city Univ.)

【目的】

我々は、紅藻ソゾ由来含臭素化合物の生合成における臭素の導入過程に注目している。これまでに $C_{15}$ アセトジェニンを産生するウラソゾ（*Laurencia nipponica*）からバナジウム依存性ブロモペルオキシダーゼ(VBPO)を同定し、推定生合成前駆体に対して臭素を導入することを示してきた。一方、マギレソゾ(*Laurencia saitoi*)は、含臭素トリテルペノイド類を数多く産生する。例えば、thyrsiferyl 23-acetate は白血病細胞のアポトーシスを誘導し、タンパク質脱リン酸化酵素 2A に対する阻害活性が知られている。そこで、本研究では、マギレソゾ由来トリテルペノイドの臭素付加機構の解明のため、マギレソゾ由来 VBPO(*Ls*VBPO)の組換えタンパク質を精製し、Monochlorodimedone(MCD)およびソゾが産生する臭素化合物の推定生合成前駆体を用いた *in vitro* 臭素付加反応を行った。

【実験方法】

大腸菌発現系にて調製した *Ls*VBPO 組み換えタンパク質を、硫安塩析および陰イオン交換クロマトグラフィーで精製した。また、得られた *Ls*VBPO タンパク質の臭素付加活性を MCD アッセイで評価した。ソゾ属由来含臭素トリテルペノイドの推定生合成前駆体を用いた *in vitro* 臭素付加反応を行い、LC-MS で解析を行った。

【結果】

*Ls*VBPO 組み換えタンパク質は失活しやすく、完全に精製することはできなかった。そこで、MCD アッセイで活性を示した陰イオン交換画分を粗精製画分としてそのまま実験に用いることとした。粗精製画分の MCD に対する臭素付加活性は 78 U/mg protein(25 ℃、pH 6.0)であり、ソゾを含む他の海藻由来 VBPO(400 U/mg protein 程度)と比較し著しく低かった。他の海藻由来 VBPO は pH 6.0-7.0 で最大活性を示すが、*Ls*VBPO は、pH 8.0 で最大活性を示した。Squalene tetraepoxide を用いた *in vitro* 臭素付加反応を行ったところ、LC-MS で臭素付加産物が検出された。また、Squalene tetraepoxide に対して、3 種ソゾ由来(ミツデソゾ、ウラソゾ、マギレソゾ) VBPO 組み換えタンパク質間で反応性の違いが示唆されたことから、種間や立体における反応性の違いを精査する必要があると考えられた。現在、他の化合物を用いた反応も検討中である。

Bromoperoxidase, Biosynthesis, Laurencia

発表番号：4B033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# *Methylopila* sp. Yamaguchi のピロロキノリンキノン生合成遺伝子 *pqqE*、*pqqF*、*pqqG* 及び *pqqFG* 欠損株の作製と性質

# Construction and characterization of mutants of *Methylopila* sp. Yamaguchi disrupted in *pqqE, pqqF, pqqG* and *pqqFG*, involved in biosynthesis of pyrroloquinoline quinone

○石川 枝里奈、外山 博英（琉球大農・亜熱生資）
○ERINA ISHIKAWA, HIROHIDE TOYAMA (Dept. of Biosci. Biotech. Fac. of Agr., Univ. of Ryukyus)

【目的】ピロロキノリンキノン(PQQ)は、キノプロテインと呼ばれる細菌由来の脱水素酵素の補欠分子族であり、微生物や植物に様々な生理作用を示すことが報告されている。メタノールを唯一の炭素源として生育する細菌(メチロトロフ)は、メタノール脱水素酵素の補欠分子族である PQQ を大量に生産し培地中に蓄積する。これまでに、*Methylobacterium extoquens* AM1 などの微生物において、PQQ 生合成に関与する遺伝子(*pqqABCDEFG*)が報告されている。PqqA はグルタミン酸残基とチロシン残基を持つペプチドであり、PQQ の前駆物質であると予想されている。PqqE は鉄硫黄クラスターを持つ Radical SAM ファミリーに属し、PQQ 炭素鎖骨格の形成に関与すると予想されている。PqqF 及び PqqG は金属プロテアーゼに相同性のあるタンパク質で、PqqA ペプチドまたはその誘導体が基質となると予想されている。しかし、PQQ 生合成過程の生化学的詳細はまだ明らかになっていない。そこで、本研究では、PQQ 生合成過程の生合成中間物質を取得し同定することを目的として、PQQ 高生産菌である *Methylopila* sp. Yamaguchi(Y 株)の *pqqE*、*pqqF*、*pqqG* 及び *pqqFG* 遺伝子の欠損株を作製し、各欠損株の生育及び PQQ 生産性について確認した。

【方法】Y 株のゲノム配列から相同性解析により *pqqABCDE* と *pqqFG* を決定した。各遺伝子断片を PCR 法により増幅して T ベクターにクローニングした。*pqqE*、*pqqF*、*pqqG* 及び *pqqF* と *pqqG* の両方の遺伝子を破壊するようにカナマイシン耐性遺伝子を挿入した遺伝子断片を作製し、それぞれを suicide vector にクローニングした。三親接合法により Y 株の形質転換を行い、各遺伝子を破壊した変異株(ΔE 株、ΔF 株、ΔG 株及びΔFG 株)を作製した。欠損株の確認は PCR 法により行った。各欠損株は、無機培地である Hypho 培地に 1%(v/v)メタノール及びカナマイシンを添加した培地及びこれにさらに PQQ を終濃度 3 μM となるように添加した培地の両方を用意して、30℃、200 rpm で 120 時間浸透培養した。生育測定はマクファーランド比濁法により 24 時間毎に行った。また、アポ型グルコース脱水素酵素を用いた酵素法により培養 120 時間目の培地上清の PQQ 定量を行った。

【結果と考察】ΔE、ΔG、ΔFG 株は野生株と比較してメタノールでの生育が顕著に低下し、PQQ 生産も見られなかった。ΔF 株は PQQ 生産量が野生株の 10 分の 1 以下になったが、メタノールでの生育は野生株とほとんど違いがなかった。Y 株のゲノム配列を再解析したところ、*pqqF* と相同性の高い遺伝子(*pqqF2*)がゲノム上の離れた位置に存在しており、この遺伝子も PQQ 生合成に関与している可能性が考えられた。現在、各欠損株のメタボローム解析及び *pqqF2* 遺伝子の欠損株の作製を行っている。

pyrroloquinoline quinone, PQQ, Methylotroph

発表責任者：外山博英（toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：4B034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Biosynthetic study of akaeolide and lorneic acid A, two structurally unique polyketides from marine Streptomyces

○Tao Zhou[1], Hisayuki Komaki[2], Natsuko Ichikawa[2], Akira Hosoyama[2], Seizo Sato[3], Yasuhiro Igarashi[1] ([1]Toyama Prefectural University, [2]Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation, [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd.)

[Introduction] In our previous studies of secondary metabolites from *Streptomyces* sp. NPS554, two structurally unique polyketides, akaeolide and lorneic acid A, were isolated. Akaeolide possesses a 15-membered carbocyclic framework and a β-keto-δ-lactone unit, while lorneic acid A belongs to a minor group of fatty acid-like polyketides bearing a benzene ring in the center of the molecules. Since the biosynthesis of these structurally unique compounds has not been reported previously, we attempted to elucidate the biosynthetic pathway of akaeolide and lorneic acid A.

[Methods & Results] The incorporation pattern of biosynthetic precursors into akaeolide and lorneic acid A was studied by $^{13}C$-labeled precursor feeding experiments. The biosynthetic gene clusters for these polyketides were assigned from the draft genome sequence of the producer strain. Putative biosynthetic pathways were proposed according to the combination of $^{13}C$-labeling results, gene annotations and function predictions: in akaeolide, an unusual carbon-carbon bond formation throughout an aldol reaction catalyzed by a SnoaL-like protein is proposed; in lorneic acid A, the benzene ring is formed from a polyolefin precursor by an unknown mechanism possibly catalyzed by P450.

biosynthesis, polyketide, Streptomyces

発表番号：4B035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# カプラザマイシン生合成におけるジアゼパノン環形成機構の解明

# Mechanism of diazepanone-ring formation in caprazamycin biosynthesis

○白石 太郎[1]、五十嵐 雅之[2]、西山 真[1]、葛山 智久[1] ([1]東大・生物工学セ、[2]微化研)
○Taro SHIRAISHI[1], Masayuki IGARASHI[2], Makoto NISHIYAMA[1], Tomohisa KUZUYAMA[1] ([1]Biotechnol. Res. Ctr., UTokyo, [2]BIKAKEN)

【目的】カプラザマイシン類は 2003 年に放線菌 *Streptomyces* sp. MK730-62F2 より単離されたヌクレオシド系抗生物質である[1)]。近年、その誘導体である CPZEN-45 は優れた選択的抗結核菌活性を有すること、さらにその作用機序に関しても報告され[2,3)]、新たな抗結核菌薬として期待されている。一方でその生合成遺伝子クラスターは同定されてはいるものの[4)]、生合成経路に関する知見は少なく、特にカプラザマイシンの特徴的なジアゼパノン環の形成機構については未解明のままである。そこで、本研究ではカプラザマイシンの生合成経路を明らかにすることで、新規酵素の発見やカプラザマイシンの効率的な生産につながる知見を得ることを目的とした。

【方法】カプラザマイシンの生合成遺伝子クラスター中の各遺伝子の破壊株を作製し、その培養抽出液を解析することで生合成中間体と推測される化合物の単離・構造決定を試みた。次に同定した生合成中間体候補化合物と、破壊した遺伝子産物の組換え酵素を用いて *in vitro* 活性試験を行うことで各種酵素の同定と生合成経路の同定を試みた。

【結果および考察】二回交叉法により *cpz10, cpz11, cpz13, cpz26* の各破壊株を作製し、その培養抽出液を LC-MS 解析に供した。その結果、それぞれ野生株では検出されない新たな化合物の蓄積を検出した。各化合物の推定構造と各遺伝子の推定機能から、カプラザマイシンの生合成経路を推測した。この推定生合成経路を検証するために *cpz13* および *cpz11* 破壊株が蓄積する中間体候補化合物 **2** および **4** の単離・構造決定を行った。次に、こうして得られた化合物を、調製した各組換え酵素との *in vitro* 反応に供した。その結果、化合物 **2** は Cpz13 と Cpz10 によって化合物 **4** へと変換されることが明らかになった。さらなる解析の結果、Cpz13 は 3-amino-3-carboxypropyl 基を転移する新規な PLP 依存型の酵素であることが明らかになった。また、化合物 **4** は Cpz11 によりジアゼパノン環を形成したと推測される *m/z* を示す化合物 **5** へと変換された。このことから Cpz11 はペプチド結合形成を触媒する新規酵素であることが示唆された。これらの実験結果に基づいて、カプラザマイシンの生合成機構を提唱する。

【文献】1) Igarashi, M. et al., *J. Antibiot.* 2003, **56**, 580.
2) Takahashi, Y. et al., *J. Antibiot.* 2013, **66**, 171.
3) Ishizaki, Y. et al., *J. Biol. Chem.* 2013, **288**, 30309.
4) Kaysser, L. et al., *J. Biol. Chem.* 2009, **284**, 14987.

biosynthesis, nucleoside antibiotics, streptomyces

発表番号：4B036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 抗真菌性ポリケタイド butyrolactol の生合成に関する研究

# Biosynthetic study of butyrolactol, an antifungal polyketide from *Streptomyces*

○春成 円十朗[1]、小牧 久幸[2]、市川 夏子[2]、細山 哲[2]、五十嵐 康弘[1] ([1]富県大・生工セ、[2]NITE・NBRC)
○ Enjuro HARUNARI[1], Hisayuki KOMAKI[2], Natsuko ICHIKAWA[2], Akira HOSOYAMA[2], Yasuhiro IGARASHI[1] ([1]Toyama. Pref. Univ., [2]NBRC, NITE)

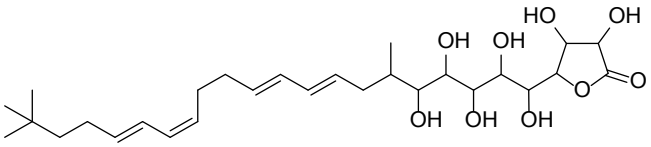
【背景・目的】

Butyrolactol は *Streptomyces* 属放線菌が生産する抗真菌活性を有するポリケタイドであり、ヒドロキシ-γ-ラクトンにポリオールおよびジエンを含む炭素鎖が結合した構造を有する。ラクトンからポリオールにかけて水酸基が 7 個連続することや、炭素鎖の末端に *tert*-ブチル基を有するなど特異な構造的特徴を有し、類似構造の化合物が存在しないことから生合成に興味が持たれた。本研究ではゲノム情報から生合成経路を推定し、標識化合物の添加培養による生合成前駆体の解明を試みた。

【方法・結果】

Butyrolactol 生産菌である *Streptomyces* sp. TP-A0882 株のドラフトゲノムシークエンス解析により、butyrolactol の二次代謝生合成遺伝子はスターター基質としてトリメチルマロニル-CoA×1、伸長鎖基質として 6 分子のマロニル-CoA、1 分子のメチルマロニル-CoA および 2 分子のヒドロキシマロニル-ACP（または-CoA）により生合成されることが示唆されたが、ポリオールとラクトン部分の 2 個の基質は不明であった。そのため標識化合物にはバリン-$d_8$、[メチル-$^{13}$C]メチオニン、[1,2-$^{13}C_2$]酢酸および[1-$^{13}$C]プロピオン酸の添加培養による標識実験を行った。また、不明である 2 個の基質は butyrolactol の化学構造からヒドロキシマロニル-ACP であると推定されたが、前駆体となる 1,3-ビスホスホグリセリン酸の標識化合物は入手困難であり、グリセリン類は代謝により最終的にアセチル-CoA を生じることから酢酸の取り込みと区別できない。そのため、前駆体原料となる[U-$^{13}C_6$]グルコースと原料とならない[1,2-$^{13}C_2$]酢酸の取り込みの差を調べることにより証明することとした。

標識された butyrolactol の $^1$H NMR、$^{13}$C NMR および MS スペクトル解析から、1 分子のバリン、1 分子のメチオニン、6 分子の酢酸および 1 分子のプロピオン酸の取り込みが確認された。また、ポリオールからラクトンにかけては 8 個のグルコース由来炭素のみが取り込まれたことから、解糖系を経て供給される 1,3-ビスホスホグリセリン酸を前駆体とする 4 分子のヒドロキシマロニル-ACP が基質であることが示された。これらの結果から butyrolactol の生合成経路を提唱する。




butyrolactol

butyrolactol, hydroxymalonil-ACP, *Streptomyces*

発表番号：4B037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Verticilactam 生合成遺伝子クラスター異種発現による新規類縁体の同定

# Heterologous expression of verticilactam biosynthetic gene cluster and identification of novel derivatives

○高橋 俊二[1]、寺井 淳高[2]、野川 俊彦[1]、天貝 啓太[1,3]、二村 友史[1]、橋本 絢子[4]、新家 一男[5]、池田 治生[6]、川崎 寿[2]、長田 裕之[1]（[1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]東電大院・物質、[3]次世代天然物化学技術研究組合、[4]バイオ産業情報化コンソーシアム、[5]産業技術総合研究所、[6]北里大・生命研）

○Shunji Takahashi[1], Atsutaka Terai[2], Toshihiko Nogawa[1], Keita Amagai[1,3], Yushi Futamura[1], Junko Hashimoto[4], Kazuo Shin-ya[5], Haruo Ikeda[6], Hisashi Kawasaki[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Tokyo Denki Univ., [3]Technology Research Association for Next generation natural products chemistry, [4]JBIC, [5]AIST, [6]Kitasato Univ.)

【目的】我々は、独自に構築した Natural Products Plot (NPPlot) データベースを活用することによって、様々な微生物から効率的に新規二次代謝産物の同定を行っている。放線菌 *Streptomyces spiroverticillatus* JC-8444 からは、β-ケトアミド構造、16 員環マクロラクタム骨格を有する verticilactam (VTL) の同定に成功している[1,2]。一方、本菌による VTL 生産量は非常に低く、生物活性評価を行うために十分な量を取得することが出来ない。そこで、放線菌異種発現及びプロモーター交換により VTL 生産性を改善し生物活性評価を行う事を目的とした。

【方法・結果および考察】*S. spiroverticillatus* JC-8444 より VTL 生合成遺伝子全長を有する BAC ベクターを構築し、SUKA17 株[3]への導入を行った。形質転換株を培養、酢酸エチル抽出後に LC/MS 解析を行ったところ、生産菌以上の VTL の生産性を確認した。しかしながら、生物活性評価を広範囲に行うためには十分な生産量ではなかった。そこで、VTL 生合成遺伝子クラスター中の転写制御因子(SSP_1550)に着目し、放線菌で利用可能な複数のプロモーターを *SSP_1550* 遺伝子に導入した。プロモーター交換株を培養し、代謝産物を LC/MS 解析したところ、VTL 生産性の大幅な改善を確認できた。また、類似の吸収スペクトルと *m/z* を示す新たなフラクションを見出した。そこで、生産最適化株を培養し、単離・構造決定を行ったところ新規 VTL 類縁体であることが判明した。今回、生産改善に成功した VTL について生物活性評価を行った結果を報告する。

【文献】

1) Nogawa T. *et al*, *Org. Lett.* 12, 4564-4567 (2010)
2) Osada H, Nogawa T. *Pure Appl Chem.*, 84,1407-1420 (2012)
3) Komatsu M. *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 2646–2651 (2009)

Streptomyces, verticilactam, polyketide

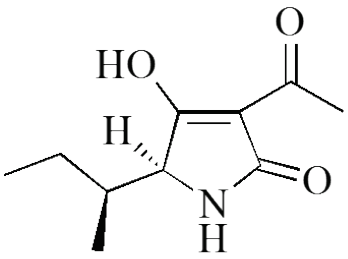
発表責任者：長田裕之（hisyo@riken.jp）

発表番号：4B038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# カビ由来新規 NRPS-PKS 融合酵素によるカビ毒テヌアゾン酸の生合成

# Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a novel NRPS-PKS hybrid enzyme in fungi

○尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之（理研 CSRS・ケミカルバイオロジー）
○ChoongSoo YUN, Takayuki MOTOYAMA, Hiroyuki OSADA (Chem. Biol., RIKEN CSRS)



Tenuazonic acid

【背景及び目的】かび毒の一種であるテヌアゾン酸は 1957 年に植物病原性糸状菌である *Alternaria tenius* の培養液から初めて報告されて以来、タンパク質合成阻害活性、抗腫瘍活性などの生理作用も報告されている。イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* など他の植物病原性糸状菌からもその生産が報告され、植物病原性糸状菌に汚染された穀物、果物、野菜からの検出も報告されてきたが、その生合成遺伝子は現在まで不明であった為、テヌアゾン酸生合成遺伝子を明らかにすることを目的とした。今回、*M. oryzae* より初めてテヌアゾン酸生合成遺伝子の特定に成功し、テヌアゾン酸の生合成機構を明らかにしたので報告する。

【方法と結果】*M. oryzae* 北 1 株を用いて情報伝達系を攪乱することにより、二次代謝遺伝子を活性化して、休眠状態の二次代謝遺伝子を活かすための二次代謝活性化実験を行い、二成分情報伝達系の下流で働く p38 MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊によりテヌアゾン酸の生産が誘導されることを報告している。また、化合物による二次代謝活性化スクリーニング過程で培地中に 1 %の DMSO を添加する事もテヌアゾン酸の生産を誘導することを見出した。この二つのテヌアゾン酸生産誘導条件を用いたマイクロアレイ解析から，共通して発現誘導される二次代謝遺伝子 *MGG_07803* を見出した。*MGG_07803* の破壊株がテヌアゾン酸を生産しないことと強制発現株がテヌアゾン酸を大量生産することから、*MGG_07803* がテヌアゾン酸生合成遺伝子(*TAS1*; Tenuazonic acid synthetase 1)であることが明らかとなった。*TAS1* は糸状菌では初めて報告される NRPS-PKS hybrid タイプの酵素をコードし、C-A-PCP ドメインで構成される NRPS 部分と KS ドメインのみで構成される PKS 部分を保持している。*S. cerevisiae* を用いて調製した 173 kDa の精製 TAS1 蛋白質を用いて、TAS1 が isoleucine と acetoacetyl-CoA からテヌアゾン酸を生合成することを証明した。別々に調製した NRPS 部分と PKS 部分の蛋白質を用いて TAS1 の酵素活性には KS ドメインが必須であることを明らかにした。この KS ドメインは系統学的解析から type I PKS の KS に近い新しいグループに分類され、今までの KS ドメインでは報告のない環化反応のみを触媒していることを明らかにした。

本研究の一部は，農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業による支援を受けた。

Tenuazonic acid, NRPS-PKS, KS domain

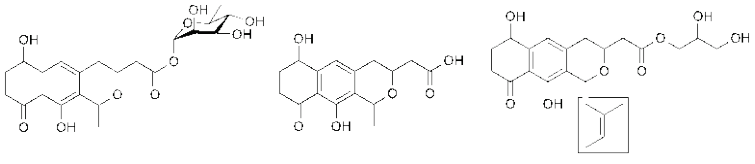
発表番号：4B039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 希少放線菌の β-アルキル化酵素遺伝子群を含む II 型ポリケタイド合成酵素遺伝子クラスターに関する解析

# Analysis of a type II polyketide synthase gene cluster containing ß-alkylation enzyme genes in a rare actinomycete

○佐藤 啓、横田 康介、勝山 陽平、大西 康夫（東大院・農生科・応生工）
○Kei Sato, Kosuke Yokota, Yohei Kastuyama, Yasuo Ohnishi (Grad. Sch. Agri. and Life Sci. Univ. of Tokyo)

【背景・目的】　ポリケタイドは植物、真菌、細菌のポリケタイド合成酵素 (PKS) によって生産される、酢酸を構造の基本単位とする化合物群である。希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* のゲノムから見つかった II 型 PKS 遺伝子クラスターは HCS cassette と呼ばれる酵素群をコードする遺伝子を持つ。HCS cassette はポリケタイド鎖のβ位のアルキル化を担う酵素群であり、これまで I 型 PKS でしか知られていなかった。そのため、この遺伝子クラスターは新規化合物の生産を担っていることが示唆されていた。また、このクラスターには II 型 PKS では通常一組しかないケトシンテース (KS) /チェインレングスファクター (CLF) が二組 (のちに *fogA10*/*fogA9* と *fogN*/*fogO* と命名) コードされていた。我々は、これまでに *A. missourienis* の培養液からこのクラスターの生産物と予想される芳香族ポリケタイド、fogacin (M. Radzom et al, 2006) の配糖体 (**1**) を単離、同定していた。しかし、この構造は生合成にβ位のアルキル化を必要としないと予想された。このことから、HCS cassette が生合成に関与する芳香族ポリケタイドが他に存在すると予想し、さらに化合物の探索を行った。
【方法・結果】　*A. missourienis* の培養液から新たに芳香族ポリケタイド化合物 **2**、**3** を単離、同定した。化合物 **3** は HCS cassette によって合成されると予想される構造を有していた (図中枠内)。次に、二組の KS-CLF 遺伝子を二重破壊した株を作製し野生株と比較した。その結果、これらの化合物の生産が全て消失することを確認した。次に、HCS cassette と KS/CLF (*fogA10*/*fogA9*) をコードするオペロンを *Streptomyces albus* で異種発現したところ、β-アルキル化された開始基質から合成されたオクタケタイドが生産された。そこで、このオペロン中の KS/CLF 遺伝子をもう一組の KS/CLF 遺伝子 (*fogN*/*fogO*) と置換し、*S. albus* で異種発現したところ、このオクタケタイドは極微量しか検出されず、アセチル基を開始基質としたオクタケタイドが主生成物となった。以上から、*A. missourienis* は HCS cassette により生産されたβ-アルキル化された開始基質を優先的に利用する KS-CLF (*fogA10*/*fogA9*) と酢酸を開始基質として利用する KS-CLF (*fogN*/*fogO*) を使い分け、多様な構造の芳香族ポリケタイドを生産していることが強く示唆された。



**1**　　**2**　　**3**

biosynthesis, polyketide, Actinoplanes missouriensis

発表責任者：大西康夫（ayasuo@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

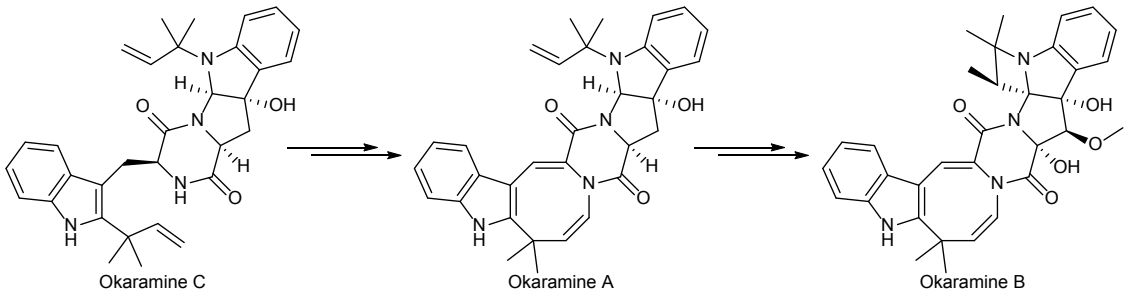
発表番号：4B040
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# プレニル化インドールアルカロイド okaramine の遺伝学的手法による生合成経路解析
# Genetic analysis of the biosynthetic pathway for prenylated indole alkaloid okaramine

○加藤 直樹[1]、古谷 章悟[2]、大高 潤之介[1]、衣笠 清美[1]、高橋 俊二[1]、松田 一彦[2]、長田 裕之[1] ([1]理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、[2]近畿大農)
○Naoki Kato[1], Shogo Furutani[2], Junnosuke Otaka[1], Kiyomi Kinugasa[1], Shunji Takahashi[1], Kazuhiko Matsuda[2], Hiroyuki Osada[1] ([1]Chem. Biol., RIKEN CSRS, [2]Dept. of Agri., Kinki Univ.)

【目的】Okaramine は *Penicillium simplicissimum* AK-40 株より単離されたプレニル化インドールアルカロイド化合物である．これまでに，本化合物の選択的な殺虫活性に関わる分子標的が，無脊椎動物にのみ存在する抑制性グルタミン酸受容体であることを明らかにしている．さらなる生物活性評価のためには生産性向上が必須であるため，生合成研究に着手している．生産菌より取得された類縁化合物を用いた構造活性相関研究から，本化合物群の特徴的な構造である azocine 環，および azetidine 環がその殺虫活性に大きく寄与していることが判明している．今回は，それらの環構造形成に関わる酵素遺伝子の特定を目的に行った okaramine 生合成遺伝子クラスターの遺伝学的解析について報告する．
【方法と結果】はじめに，okaramine 遺伝子クラスター同定のため，生産菌 *P. simplicissimum* AK-40 株のドラフトゲノム解読を行った．Okaramine の化学構造（下図）から，非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）およびプレニル基転移酵素（DMATS）に加え，メチル基転移酵素，複数のオキシゲナーゼの関与が予想された．NRPS と DMATS 遺伝子が近傍に存在する領域はゲノム中に 2 カ所見出されたが，周辺の遺伝子構成から，生合成を担う遺伝子クラスターを一方に絞り込むことができた．本遺伝子クラスターには環化反応を担う候補遺伝子となるオキシゲナーゼ遺伝子が 4 つ含まれていた．

次いで，それらのオキシゲナーゼ遺伝子を対象としたノックアウト実験を行い，各遺伝子の生合成への関与について検討した．標的遺伝子の全長を薬剤耐性遺伝子と置換することで欠失株を作製し，その代謝物生産を LC/MS により解析した．その結果，4 種類の遺伝子欠失株のそれぞれにおいて，その生合成における役割に見合う代謝物生産パターンの変化が認められ，候補クラスターが okaramine 生合成を担っていることが明らかとなった．一部の酵素遺伝子について，複数の生合成ステップへの関与が予想されたため，現在，欠失株において検出された代謝物の詳細な解析を進めている．




okaramine, indole alkaloid, Penicillium

発表責任者：長田　裕之（hisyo@riken.jp）

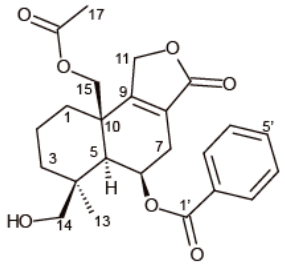
発表番号：4B041
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 麹菌 astellolide 生合成遺伝子クラスターの解析

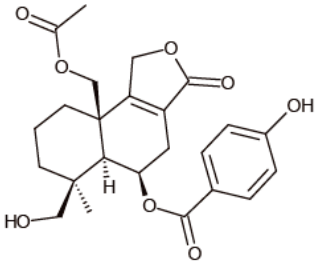
# Analysis of the astellolide biosynthetic gene cluster in *Aspergillus oryzae*

○篠原 靖智[1]、高橋 俊二[2]、長田 裕之[2]、小山 泰二[1] ([1]野田産研、[2]理研・CSRS)
○Yasutomo SHINOHARA[1], Shunji TAKAHASHI[2], Hiroyuki OSADA[2], Yasuji KOYAMA[1] ([1]Noda Ins. Sci. Res., [2]RIKEN CSRS)

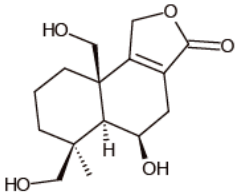
我々は、これまでに麹菌 *A. oryzae* RIB40 の転写制御関連遺伝子破壊株ライブラリーを用いた代謝物プロファイルの解析から、ヒストン 3 リジン 4 のメチル化に寄与する遺伝子 *cclA* の麹菌ホモログを破壊した株（Δ*cclA*）において、14-deacetyl astellolide A (14-DAA)および B (14-DAB)の産生が増加することを見出している [1)] 。astellolides は、過去に *A. oryzae* から単離の報告はあるものの生合成遺伝子に関する知見は全くないことから、本研究では *A.oryzae* における astellolide 生合成遺伝子クラスターの同定およびその生合成遺伝子の機能解析を試みた。マイクロアレイ解析を用い、Δ*cclA* 株で発現量が増加している二次代謝関連遺伝子の探索を行ったところ、NRPS をコードすると予測されている遺伝子 *astA* の発現がΔ*cclA* 株で顕著に増加していた。そこで、この遺伝子をΔ*cclA* バックグラウンドで破壊し、得られた破壊株(Δ*cclA* Δ*astA*)の代謝物の LC-MS 解析を行った。その結果、Δ*cclA* Δ*astA* 株では、14-DAA および 14-DAB が消失していたことから、*astA* が astellolides の生合成に関与していることが明らかとなった。また、*astA* の破壊に伴って蓄積が見られた代謝物を単離・精製し構造解析を行ったところ trihydroxy confertifolin (TC)であった。続いて、*astA* 近傍の 11 遺伝子を破壊し、得られた破壊株の代謝物解析を行った。その結果、*astA* を含め 7 遺伝子の破壊株で 14-DAA および 14-DAB の消失が確認された。この 7 遺伝子の内、AstA およびテルペンの環化活性を有する可能性が考えられた AstC について、大腸菌を用いた組換え酵素を調整し、*in vitro* で活性の確認を行った。その結果、NRPS と予測される AstA が安息香酸のエステル縮合反応を触媒する活性を有していること、また、AstC は classII の環化様式により astellolides の基本骨格であるドリマン型セスキテルペンの環化反応を触媒する新規セスキテルペン環化酵素であることを明らかとした。



14-deacetyl astellolide A
**(14-DAA)**



14-deacetyl astellolide B
**(14-DAB)**



trihydroxy confertifolin
**(TC)**

1) Y. Shinohara et al., *J. Antibiot*. in press

biosynthesis, sesquiterpene cyclase, NRPS

発表番号：4B042
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ポリエンを生合成する II 型ポリケタイド合成酵素の機能解析
# Functional analysis of a type II polyketide synthase responsible for polyene biosynthesis

○杜 丹ヤオ[1]、勝山 陽平[1]、新家 一男[2]、大西 康夫[1] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]産業技術総合研究所)
○Danyao DU[1], Yohei KATSUYAMA[1], Kazuo SHIN-YA[2], Yasuo OHNISHI[1] ([1]Tokyo Univ., [2]AIST)

【背景と目的】放線菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08（以下 JE-08 株と略す）は okicenone と streptazone E (Ohno *et al.*, **2015,** *Chembiochem*, *16*, 2385) の生産菌である。JE-08 株のドラフトゲノム解析からは、25 個程度の「休眠遺伝子クラスター」と思われる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが見出された。これらの休眠遺伝子クラスターを活性化することにより、JE-08 株から新規化合物を単離し、その生合成経路を解明することを目的として、SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) と相同性を示す転写活性化因子の過剰発現を試みた。その結果、ORF07803 の過剰発現株では、新規化合物である 3-((2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)13-hydroxytetradenca-2,4,6,8-tetraenamido) propanoic acid (化合物 **1**) が生産されることが明らかになった (2105 年度日本農芸化学会大会発表)。今回、この化合物 **1** の生合成酵素の機能解析を行った。
【方法と結果】化合物 **1** 中のポリエン構造を含む脂肪酸部位はポリケタイド合成酵素 (PKS)により生合成されると考えられる。遺伝子破壊実験により、化合物 **1** は過剰発現した転写活性化因子遺伝子の下流に存在する II 型 PKS 様遺伝子を含む二次代謝生合成遺伝子クラスターにより合成されることが明らかになった。この生合成遺伝子クラスター中には 2 つのケトシンテース (KS) がコードされており、そのうちの片方だけに活性残基である cysteine が保存されていた。この特徴は II 型 PKS における KS と鎖伸長因子 (CLF)の関係と類似している。しかし、系統樹解析を行った結果、これらの酵素は一般的な KS と CLF とは異なるクレードを形成していることが明らかになった。これらの新しいクレードに属する KS と CLF は高度に還元されたポリケタイドを合成する新規な II 型 PKS のファミリーであると考えられる。この II 型 PKS をより詳しく解析するために、大腸菌を用いて、ポリエン部分を生合成すると考えられる KS、CLF、アシルキャリアープロテイン、ケトレダクターゼ、デヒドラターゼ、オキシドレダクターゼの組換えタンパク質を調製した。なお、KS、CLF をそれぞれ単独で発現させた場合では、組換えタンパク質を取得することができなかったが、両者を共発現させることによって、組換えタンパク質の取得に成功した。また、pull down assay により、この 2 つのタンパク質が相互作用していることが明らかになった。現在これらの酵素を用いてポリエン構造を含むポリケタイドの生合成経路を *in vitro* において再構築するための条件検討を進めている。また、これらの遺伝子の異種発現や遺伝子破壊により、ポリエン構造の合成機構に関する知見が得られると考え、異種発現系の構築に取り組んでいる。

streptomyces, secondary metabolite, polyketide

発表番号：4B043
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 微生物における *cis*-jasmone の生合成経路の解明

# Biosynthesis pathway of *cis*-jasmone in a microorganism

○松井 稜[1,2]、天野 就基[1]、高橋 公咲[1,2]、松浦 英幸[1,2] ([1]北大院農、[2]日本農芸化学会)
○ Ryo MATSUI[1,2], Naruki AMANO[1], Kosaku TAKAHASHI[1,2], Hideyuki MATSUURA[1,2] ([1]Hokkaido Univ., [2]JSBBA)

【研究背景および目的】

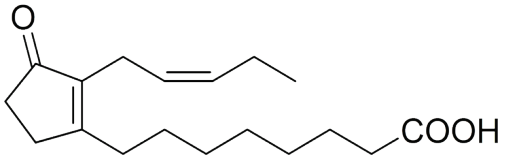
植物が生産する *cis*-jasmone（CJ）は、jasmonic acid（JA）の排出形態としてだけでなく、アブラムシに対する成長阻害や寄生蜂の誘引などの独自の生物活性を有する防御応答分子として知られている。また、工業的には香料の構成成分として利用される。微生物が CJ を生産する例はこれまで報告されていなかったが、当研究室は植物病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* が、CJ を産生することを明らかとしている。植物における CJ の生合成経路は、α-リノレン酸を出発物質として、*cis*-JA を経由する経路（経路１）と *iso*-OPDA を経由する経路（経路２）が報告されている。そこで本研究では、糸状菌 *L. theobromae* における CJ の生合成経路を明らかとすることを目的として、経路１、経路２の可能性について検討する。

【方法】

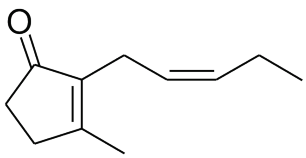
α-リノレン酸の重水素ラベル体、経路 1・2 共通の生合成中間体である OPDA の重水素ラベル体、および経路１の生合成中間体である OPC 類の重水素ラベル体を *L. theobromae* 培養液中に終濃度 1 mM として投与した。その後、2 週間培養した培養液を塩酸酸性としたのち、酢酸エチルで抽出した。抽出物を GC-MS に供し、JA と CJ の分離・検出を試みた。

【結果および考察】

α - リノレン酸の重水素ラベル体と OPDA の重水素ラベル体を投与した培養抽出液から、JA の重水素ラベル体と CJ の重水素ラベル体が検出された。OPC 類の重水素ラベル体を投与した培養抽出液からは、JA の重水素ラベル体が検出されたが CJ の重水素ラベル体は検出されなかった。この結果から、微生物において JA を経由する経路１は存在せず、α-リノレン酸を出発物質として OPDA を経由する生合成経路２が存在する可能性が示唆された。現在、経路２の検討を行うために *iso*-OPDA の重水素ラベル体の合成を試みている。




*iso*-OPDA




*cis*-jasmone

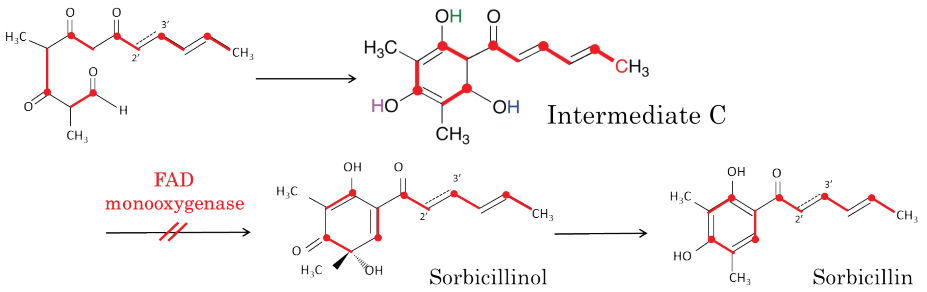
*cis*-jasmone, biosynthesis, plant pathogen

発表責任者：松井稜（ryo-matsui@eis.hokudai.ac.jp）

発表番号：4B044
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

*Trichoderma* sp. USF-2690 産生 sorbicillinol の生合成研究
Biosynthetic study on sorbicillinol isolated from *Trichoderma* sp. USF-2690.
○河上 悠香、並木 大輔、盛岡 陽、清水 寛之、加藤 達也、煙山 紀子、菅谷 紘一、小野瀬 淳一、阿部 尚樹（東京農大院・食品）
○Yuuka KAWAKAMI, Daisuke NAMIKI, You MORIOKA, Hiroyuki SHIMIZU, Tatuya KATOU, Noriko KEMURIYAMA, Kouichi SUGAYA, Jyunichi ONOSE, Naoki ABE (Tokyo Univ of agriculture)

【目的】 我々は、これまでにツチアオカビ *Trichoderma* sp.USF-2690 が、複数の強い DPPH ラジカル捕捉物質を生産していることを見いだし、その培養液から 8 種類の新規化合物を含む計 13 種類の sorbicillinoid 類及び bisorbicillinoid 類を単離した。これらの化合物、特に二量体である bisorbicillinoid 類は多彩な炭素骨格を有し、また、興味深い生理活性を持っている。bisorbicillinol は抗酸化活性や炎症性サイトカイン TNF-α 放出抑制活性を持ち、またその他の bisorbicillinoid 類においても様々な生理活性が報告されている。これらの多様な生理活性は多彩な炭素骨格がもたらすものであり、それらの物質を効率的に産生するために、その生合成経路には非常に興味がもたれている。しかし、bisorbicillinoid 類の前駆体と考えられる sorbicillinol の生合成経路については、まだ詳しく解明されていない。そのため、我々はこの生合成経路の鍵化合物である sorbicillinol に着目し研究を行ってきた。
【方法・結果】 これまでの研究において、*Trichoderma* sp.USF-2690 より、sorbicillinol を含む sorbicillinoid 類及び bisorbicillinoid 類生合成の関与が示唆された遺伝子クラスターを得ている。そこで、sorbicillinol 生合成酵素と考えられる FAD monooxygenase を遺伝子破壊実験のターゲットにし、遺伝子破壊実験を行った。相同的組み換えにより遺伝子破壊株を作製するために、FAD monooxygenase 及び、遺伝子破壊株の選択に用いるマーカーに Hygromycin B 耐性遺伝子を組み込んだプラスミドを構築し、形質転換しコロニーインサートチェックにより、目的の破壊遺伝子が組み込まれたことを確認した。*Trichoderma* sp.USF-2690 への形質転換方法は、プロトプラスト－PEG 法を用いた。形質転換後に培養液の解析を行った。転換体の生産物の解析により、野生型の生産物とは異なる物質を生産していることがわかった。現在、異なる物質の構造解析・転換体の遺伝子配列を検討中である。




Trichoderma sp. USF-2690, sorbicillinol, transformation

発表番号：4B045
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# イネ様々な品種におけるファイトアレキシン、サクラネチンとナリンゲニンの蓄積
# Accumulation of the phytoalexins, sakuranetin and naringenin in various rice cultivars

○北野 生薫[1]、西口 沙也加[1]、上野 琴巳[2]、藪田 行哲[2]、寺石 政義[3]、奥本 裕[3]、森 直樹[3]、石原 亨[2]([1]鳥取大院・農、[2]鳥取大・農、[3]京大院・農)
○takashige KITANO[1], sayaka NISHIGUCHI[1], kotomi UENO[2], yukinori YABUTA[2], masayoshi TERAISHI[3], yutaka OKUMOTO[3], naoki MORI[3], atsushi ISHIHARA[2] ([1]Graduate School of Agriculture, Tottori Univ., [2]Faculty of Agriculture, Tottori Univ., [3]Graduate School of Agriculture, Kyoto Univ.)

【目的】植物は病害から身を守るための様々な防御機構を有しており、その一つにファイトアレキシンの蓄積が挙げられる。イネ（*Oryza sativa*）のファイトアレキシンには、モミラクトンなどのジテルペン系化合物に加えフラボノイド系のサクラネチンが知られている。イネはジャポニカとインディカの二つの亜種に分類される。我々はこれまでに、ジャスモン酸（JA）で誘導されるサクラネチンの蓄積量がジャポニカに属する日本晴では多く、インディカに属するカサラースでは少ないことを見出した。さらにその原因は、前駆体のナリンゲニンからサクラネチンへの変換に関わる naringenin-7-*O*-methyltransferase（NOMT）遺伝子の転写にあることを突き止めた。本研究では、イネの様々な品種において、サクラネチンやナリンゲニンの蓄積に違いが見られるのかを検証した。また、イネの病原菌に対するサクラネチンとナリンゲニンの抗菌活性を比較した。

【方法・結果】世界で栽培されているイネ 95 品種について、播種後 14 日目の第 3 葉を 1 mM の JA 溶液で処理し、誘導されるナリンゲニンおよびサクラネチンを LC-MS/MS で定量した。その結果、ナリンゲニンを多く蓄積する品種やサクラネチンを多く蓄積する品種が存在した一方で、両化合物ともあまり蓄積しない品種もあった。この違いは亜種とは関係していなかった。イネの野生種 *O. rufipogon* にも同じような多様性が存在していたが、南アジアを中心とした熱帯地域で栽培される品種がナリンゲニンを多く蓄積する傾向にあった。続いてイネの病原菌に対する抗菌活性を調べた。糸状菌 4 種、*Magnaporthe grisea*（イネいもち病菌）、*Rhizoctonia solani*（イネ紋枯病菌）、*Gibberella fujikuroi*（イネ馬鹿苗病菌）*Bipolaris oryzae*（イネごま葉枯病菌）については胞子発芽阻害を、細菌 2 種、*Xanthomonas oryzae*（イネ白葉枯病菌）、*Burkholderia grumae*（イネ籾枯細菌病菌）ついては増殖にともなう濁度の増加抑制を指標に活性を評価した。サクラネチンは、ナリンゲニンに比べてより低濃度で糸状菌の胞子発芽を抑制した。これに対しナリンゲニンは、細菌の増殖阻害をより低濃度で阻害した。この結果から、サクラネチンだけでなくその前駆体のナリンゲニンもファイトアレキシンとして機能している可能性が示唆された。イネ白葉枯病は熱帯地域で多く発生する病害である。ナリンゲニンは細菌に対して高活性を示すため、南アジアにはナリンゲニンを高濃度に蓄積する品種が存在するのかもしれない。

rice, phytoalexin, sakuranetin

発表責任者：石原　亨（aishihara@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：4B046
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# リンゴ実生における Phlorizin 類の生成に関する研究

# Study on the biotransformation of phlorizin in apple seedlings

○小山 愛美[1]、常盤野 哲夫[2]、水野 幸一[2]、小森 貞男[3]、吉澤 結子[2] ([1]秋田県立大生資科院、[2]秋田県立大生資科、[3]岩手大農)
○Manami OYAMA[1], Tetsuo TOKIWANO[2], Koichi MIZUNO[2], Sadao KOMORI[3], Yuko Yoshizawa[2] ([1]Akita Pref. Univ. Grad. Sc., [2]Akita Pref. Univ., [3]Iwate Univ.)

【緒言】

Phlorizin は、リンゴの葉や果実に存在が認められるポリフェノール類で、抗酸化、抗炎症作用などが報告されている。当研究室で行っている、リンゴが産生するポリフェノール類の代謝研究の中で、リンゴ実生を用いた実験系においてエリシター処理をしたところ、phloretin が新生していることを見出したため、その生成について詳細に検討した。

【実験方法】

実験材料をリンゴの実生とし、無菌状態において固体培地上で約 1 ヵ月間生育させた培養植物体（品種：Starking delicious）を用いた。これを液体培地に移し、エリシター処理を施した。エリシターとして、2,6 -ジクロロイソニコチン酸を使用し、一定期間培養後、植物体と培地をそれぞれ有機溶媒で抽出し、未処理のコントロールと比較して、エリシター処理をした植物体あるいは培地中に含まれる成分について分析した。重水素 3 個で標識された[$^2H_3$] phloretin は、ナリンゲニンを重水中で開環反応することにより調製した。

【結果】

Phloretin の生成時期を確認するため、エリシター処理したリンゴ実生について 1 ～7 日間培養し、それぞれの抽出物の確認を行った。植物体はメタノールで抽出し、培地はクロロホルムとの間で液ー液分配を行った。植物体のメタノール抽出物について HPLC にて分析し、phloretin はエリシター処理後 2 日目から生成し始めていることがわかった。未処理のコントロールには phloretin 配糖体である phlorizin が生成していることから、これと相互変換する可能性を考慮し、まず phloretin の重水素標識体 [$^2H_3$] phloretin を調製して、エリシター処理と共に添加した。これを 7 日間培養した植物体の抽出物を LC-MS で分析した結果、[$^2H_3$] phlorizin を検出したことから、phloretin が配糖体化されて phlorizin に変換されていることが示唆された。現在、phloretin と phlorizin の相互変換について検討している。

*Malus domestica*, Phloretin, Phlorizin

発表責任者：小山　愛美（D15G001@akita-pu.ac.jp）

発表番号：4B047
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 小胞体グルコシダーゼ II 阻害剤の開発と抗ウイルス剤への応用

# Development of ER glucosidase II inhibitor for antiviral drugs

○荒井 詩織[1]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2]（[1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化）
○ SHIORI ARAI[1], WATARU HAKAMATA[1,2], TAKAKO HIRANO[2], TOSHIYUKI NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresourse Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. of Bioresourse Sciences, Nihon Univ.)

【目的】近年、新興・再興ウイルス感染症が世界的な問題となっており、新規抗ウイルス剤が強く求められている。そこで我々は、原因ウイルスの感染・増殖に必須なウイルスエンベロープの *N*-結合型糖鎖に着目した。そのなかでも *N*-結合型糖鎖プロセシングに関わる小胞体グルコシダーゼ II（以下 GII）阻害剤は、ウイルス表面糖鎖を未成熟とし、ウイルスの感染力を大幅に低下させることが広く知られている。また、GII はヘテロダイマー構造を有し、α サブユニットは触媒ユニット、β サブユニットは糖鎖認識ユニットとなっている。しかし、現在報告されている GII 阻害剤は触媒ユニットの活性部位に結合する拮抗型阻害剤のみである。そこで、これまでとは異なる新しい作用部位・機序に基づく GII 阻害剤を開発し、抗ウイルス剤に展開することを本研究の目的とした。
【方法および結果】これまでに当研究室で開発したセルベースでの GII 阻害剤スクリーニング系を用いて阻害剤をスクリーニングした結果、抗ウイルス剤として必要な細胞毒性が低く GII 阻害活性が高い化合物として仮想スクリーニング由来の AR-200 シリーズ、理化学研究所天然化合物バンク（NPDepo）ライブラリ由来の AR-400 シリーズ、計 2 母核を選抜した（図）[1)]。そこで、これら GII 阻害剤の作用部位・機序を明らかにすることにした。

GII の α サブユニットの活性部位に結合することが報告されている既知グルコシダーゼ阻害剤（カスタノスペルミンとブロモコンジュリトール）と得られた阻害剤を同時に投与し、阻害活性が上昇した場合は活性部位とは異なる部位に作用し、阻害活性が同程度であった場合は同じ活性部位に作用していることが考えられる。本実験の結果から、AR-200 シリーズでは阻害活性が上昇したため、活性部位以外の部位に結合して阻害する阻害剤であることが示唆された。一方で、AR-400 シリーズでは阻害活性が同程度であったため、活性部位に結合して阻害する阻害剤であると推定した。さらに、これらの化合物と GII の糖鎖認識ユニットのドッキングシュミレーションを行なった結果、AR-200 シリーズは糖鎖認識部位に結合できることを確認した。現在は、得られた阻害剤について抗コロナウイルス活性評価及びより詳細な阻害部位を明らかにするために阻害剤存在下での *N*-結合型糖鎖解析を行なっている。

1) 荒井詩織ら、日本応用糖質科学会平成 27 年度大会（p.58、Dp-13）

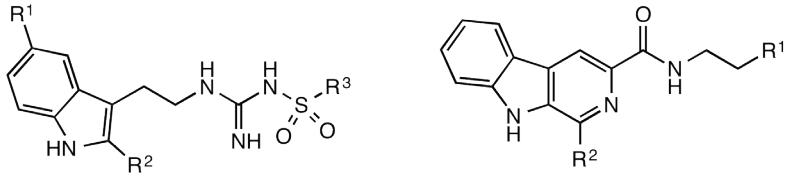



図. AR-200 シリーズ（左）と AR-400 シリーズ（右）の母核

antivirus, glucosidase II, inhibitor

発表番号：4B048
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# トウモロコシ芽生えの重力屈性に関わる生理活性物質の機能解明

# Mechanism of Bioactive Substances Involved in Gravitropism of Maize Coleoptiles

○繁森 英幸[1]、須藤 恵美[2]、牧野 譲[2]、長谷川 剛[2]、山田 小須弥[1]、長谷川 宏司[1]([1]筑波大生命環境、[2]筑波大院生命環境)
○Hideyuki SHIGEMORI[1], Megumi SUTO[2], Yuzuru MAKINO[2], Tsuyoshi HASEGAWA[2], Kosumi YAMADA[1], Koji HASEGAWA[1] ([1]Facul. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Univ. Tsukuba)

【目的】重力屈性とは、重力を感受して器官が成長運動を変化させながら姿勢制御を行う反応である。重力屈性のメカニズムは、光屈性と同様にこれまで Cholodny-Went 説で説明されてきた。これは重力屈性刺激を受けた際に上側組織から下側組織へとオーキシンが移動した結果、屈曲が生じるというものである。しかしながら、光屈性の場合は、光側組織から影側組織へのオーキシン移動は起こっておらず、光側組織で生成する成長抑制物質が光屈性に関与しているとする Bruinsma-Hasegawa 説が新たに提唱されてきた。当研究グループでは、すでにトウモロコシの光屈性においてベンゾキサジノイド化合物である DIMBOA や MBOA を光屈性成長抑制物質として見出してきた。そこで本研究では、トウモロコシ芽生えを用い、重力屈性における偏差成長の観測と、成長抑制物質である DIMBOA および MBOA の内生量の変化ならびに成長抑制活性に着目した重力屈性メカニズムの解明を目的として研究を行った。

【方法および結果】暗所において 4 日齢のトウモロコシ黄化芽生えを水平方向に傾け（重力屈性刺激）、赤外線ビデオカメラを用いて、屈曲角度ならびに上側および下側組織の成長率の測定を行った。その結果、重力刺激開始 20 分以内より上側組織での成長抑制が確認され、一方、下側組織では重力刺激開始 30 分後から成長促進が確認された。したがって重力屈性刺激後 30 分間は上側組織の成長抑制のみによって屈曲が誘導されたと考えられる。次に、重力屈性刺激にともなうベンゾキサジノイド化合物の内生量変化を HPLC により調べたところ、重力刺激開始 30 分後に DIMBOA および MBOA のピークの増加が観察されたことから、重力刺激後 0～30 分の間でトウモロコシ芽生えにおいて成長抑制物質が生成されていることが分かった。そこで、DIMBOA および MBOA を暗所でトウモロコシ芽生えの片側に投与し、投与量と投与側への屈曲反応について検討した結果、顕著な屈性が観察された。また、Tissue printing 法を用いて重力屈性刺激にともなう $H_2O_2$ の分布を調べたところ上側組織で $H_2O_2$ の産生が観察された。それにともなうリグニンの蓄積を蛍光顕微鏡によって観察した結果、上側組織で顕著な蓄積が確認された。

以上の結果よりトウモロコシ芽生えにおいて、重力刺激後に生成される成長抑制物質による成長抑制が重力屈性の引き金となると考えられ、これは Bruinsma-Hasegawa 説を支持する結果であり、学術的にも大きな意義がある。

gravitropism, maize, Bruinsma-Hasegawa Theory

発表責任者：繁森英幸（shigemori.hideyuk.fn@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：4B049
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# フラバン-3-オール誘導体の糖化反応検討

# Studies of glycosylation reaction of flavan-3-ol derivatives

○野呂 健太[1]、柴崎 亨[1]、法島 太一[1]、橋場 祥智[2]、八上 修一[2]、川崎 崇[3]、齊藤 安貴子[1,2] ([1]大阪電気通信大学工学研究科先端理工学専攻、[2]大阪電気通信大学工学部環境科学科、[3]立命館大学薬学部薬学科)

○ Kenta NORO[1], Tohru SHIBASAKI[1], Taichi HOJIMA[1], Yoshitomo HASHIBA[2], Syuichi YAKAMI[2], Takashi KAWASAKI[3], Akiko SAITO[1,2] ([1]Graduate School of Engineering, Osaka Electro-communication University, [2]Faculty of Engineering, Osaka Electro-communication University, [3]Department of Pharmaceutical Sciences, Ritsumeikan University)

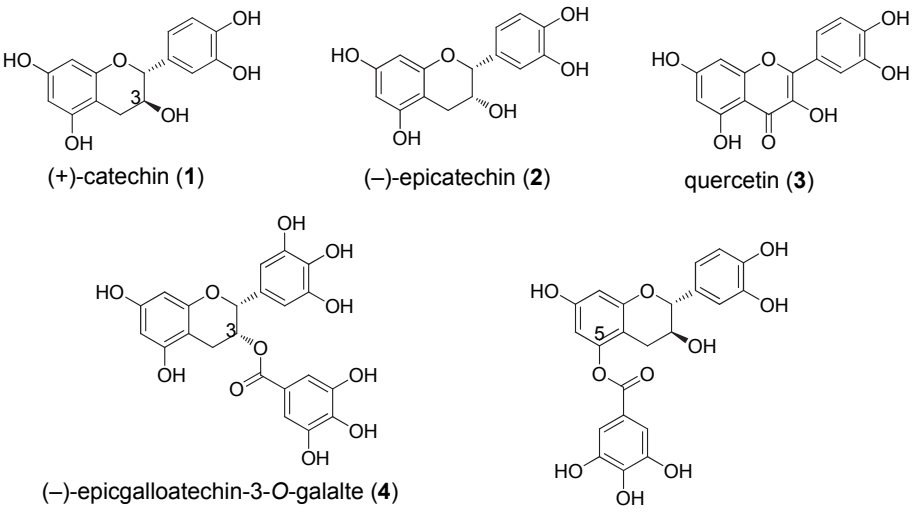
【目的】

フラバン-3-オール類は様々な植物体に含まれ、日々大量に摂取している化合物群である。高い機能性を示し、かつ、食経験が豊富であることから、様々な食品の機能性成分として注目されている。一方で、比較的単純な構造を持つ化合物であるにも関わらず、植物内で多種多様な修飾がなされ、純粋にそれぞれの化合物を単離・構造決定することが極めて困難な化合物としても知られる。我々は、その立体や修飾によってどのように生物活性が変化するのか構造−活性相関に興味を持ち、より活性の高い構造を明らかにするため、有機合成を主軸としフラバン−3-オール類の機能性解明や位置選択的な修飾方法の開発を進めてきた。本発表では、市販の化合物、及び、合成した化合物について、生体触媒を用いた糖化反応の検討を行ったので報告する。

【方法・結果】

糖化反応にはシロイヌナズナからクローニングした糖転移酵素 UGT78D2[1]、ブドウ細胞 *Vitis vinifena L.*(VW)、及び、市販の糖転移酵素を用いた。糖化反応の基質として市販品、及び、合成したフラバン-3-オール類合計 12 種類を用いた検討を行なった。

その結果、ブドウ細胞を用いた場合は、化合物 **1~4** において糖化反応が進行した。標準化合物との比較の結果、quercetin (**3**)では、3 位にグルコースが導入されていることが確認された。一方で、糖転移酵素 UGT78D2 では、化合物 **5** のみにおいて糖化生成物が得られた。




現在、これらの糖化位置を確認するため、有機合成による標準化合物の確保を試みている。

1)B. G. Kim *et al*., *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **93**, 2447 (2012).

Flavan-3-ol, biocatalytic glycosylation, proanthocyanidin

発表番号：4B050
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# ベツリン酸とオレアノール酸は細胞接着因子 ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用する

# Betulinic acid and oleanolic acid interfere with N-linked glycan medication of a cell adhesion molecule ICAM-1

○平松 令子、福原 早友里、三津田 智嗣、横道 公伸、片岡 孝夫（京都工繊大院・応生）
○Reiko HIRAMATSU, Sayuri FUKUHARA, Satoshi MITSUDA, Tomonobu YOKOMICHI, Takao KATAOKA (Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech.)

【目的】多くの植物に含まれている五環性トリテルペノイドは、近年、抗腫瘍活性などの様々な生物活性を持つことが報告されている化合物である。我々は、五環性トリテルペノイドであるウルソール酸 (ursolic acid)が、細胞接着因子intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞内輸送を阻害することにより、細胞表面の発現を抑制することを発見した[1)]。さらに、ウルソール酸の構造異性体であるベツリン酸 (betulinic acid)、及びオレアノール酸 (oleanolic acid)の糖タンパク質の細胞内輸送に対する影響を検討し、本学会で報告した[2)]。本研究では、これらの五環性トリテルペノイドの糖タンパク質の糖鎖修飾に対する作用機序を明らかにすることを目的とした。
【方法】ヒト肺がん腫A549細胞を五環性トリテルペノイドで1時間処理した後、炎症性サイトカインであるinterleukin-1α (IL-1α)でICAM-1を誘導した。細胞生存率に対する影響をMTT法、細胞表面のICAM-1発現をCell ELISA法、並びに細胞内のICAM-1の発現量や分子量の変化をウェスタンブロッティングで調べた。細胞ライゼートをpeptide-*N*-glycosidase F（PNGase F）とendoglycosidase H（Endo H）で処理し、ICAM-1の糖鎖修飾に対する影響を調べた。α−グルコシダーゼ（酵母由来）とα−マンノシダーゼ（タチナタマメ由来）に対する五環性トリテルペノイドの直接的な影響を検討した。
【結果】Cell-ELISA 法により、ウルソール酸が細胞表面の ICAM-1 発現を阻害するが、ベツリン酸とオレアノール酸にはほとんど阻害がないことを見出した。ベツリン酸とオレアノール酸はウルソール酸とは異なる ICAM-1 の低分子量化を誘導し、これらは Endo H 耐性を示した。糖鎖修飾阻害剤と比較したところ、ベツリン酸とオレアノール酸は、α-グルコシダーゼを阻害するカスタノスペルミンと同様の作用を示した。さらに、ベツリン酸、オレアノール酸、ウルソール酸はいずれもα-グルコシダーゼに対する阻害活性を示したが、これらの五環性トリテルペノイドはいずれもα-マンノシダーゼの酵素活性をほとんど阻害しなかった。以上の結果から、ベツリン酸とオレアノール酸はα-グルコシダーゼ活性を阻害することにより、細胞レベルでの ICAM-1 の N 結合型糖鎖修飾に作用するが、細胞表面への細胞内輸送を阻害しないことを明らかにした[3)]。
【参考文献】
1) Mitsuda, S. *et al.*, FEBS Open Bio, 4, 229–239 (2014)
2) 三津田智嗣ら、日本農芸化学会 2014 年度大会、2A05p14 (2014)
3) Hiramatsu, R. *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 767, 126–134 (2015)

betulinic acid, oleanolic acid, ursolic acid

発表番号：4B051
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 低酸素誘導因子の情報伝達経路に対する 4-O-methylascochlorin の作用機序の解析

# Mechanism of action of 4-O-methylascochlorin on hypoxia-inducible factor signaling pathway

○武田 賢治[1]、馬替 純二[2]、伊藤 昭博[3,4]、吉田 稔[3,4]、片岡 孝夫[1] ([1]京都工芸繊維大学応生、[2]馬替生科研、[3]理研化学遺伝、[4]理研環境資源ケミカルゲノミク)
○Kenji TAKEDA[1], Junji MAGAE[2], Akihiro ITO[3,4], Minoru YOSHIDA[3,4], Takao KATAOKA[1] ([1]Dept. Appl. Biol., Kyoto Inst. Tech., [2]Magae Biosci. Inst., [3]Chem. Genet., RIKEN, [4]Chem. Genomics, RIKEN CSRS)

【目的】低酸素誘導因子 hypoxia-inducible factor（HIF）は、低酸素状態において誘導される重要な転写因子であり、低酸素応答に関与する遺伝子群を活性化する。通常酸素圧では、HIF-1αはプロリルヒドロキシラーゼにより水酸化される。プロリン水酸化を受けた HIF-1αタンパク質は von Hippel-Lindau (VHL)タンパク質を含むユビキチンリガーゼによりユビキチン化され、プロテアソームにより分解される。したがって、通常酸素状態では、HIF-1αの発現量は低く維持されているが、低酸素状態では、プロリルヒドロキシラーゼが不活性化するため、HIF-1αは分解されず安定化する。安定化した HIF-1αは核へ移行し、HIF-1βとヘテロ二量化し、標的遺伝子の hypoxia-response element (HRE)に結合することで、アポトーシス、血管新生、細胞増殖等に関与する遺伝子を活性化させる。アスコクロリン（ascochlorin）は、不完全糸状菌 *Ascochyta viciae* から単離された抗生物質である。これまでに、アスコクロリン関連化合物は抗腫瘍活性や免疫調節活性などの生物活性を有することが報告されている。本研究では、アスコクロリン誘導体の一つである 4-*O*-メチルアスコクロリン (4-*O*-methylascochlorin; MAC)が HIF-1αタンパク質の発現を亢進することを見出し、その作用機序の解析を行った。
【方法】ヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞とヒト肺がん腫 A549 細胞をアスコクロリン関連化合物で処理し、HIF-1αタンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより調べた。さらに、HT-1080 細胞を MAC で処理し、HIF-1αの水酸化に対する影響を抗ヒドロキシ HIF-1α抗体を用いたウェスタンブロッティング、HIF-1α mRNA に対する影響をリアルタイム PCR 法により検討した。
【結果と考察】HT-1080 細胞及び A549 細胞を MAC で処理したところ、HIF-1αタンパク質の発現量が濃度依存的及び時間依存的に増加した。HT-1080 細胞は、MAC に対する感受性が A549 細胞よりも高く、5 μM 以上の濃度で HIF-1αの発現量が有意に増加した。さらに、HT-1080 細胞をアスコクロリン関連化合物で処理したところ、MAC と異なり、アスコクロリンはむしろ HIF-1αの発現量を減少させることが観察された。MAC は、HIF-1αの mRNA 発現量には影響しなかったことから、その作用は転写以降にプロセスに作用していることが考えられた。MAC は、HIF-1αタンパク質の水酸化を阻害していることを見出した。さらに、MAC による HIF-1αタンパク質の発現量の増加は、アスコルビン酸の添加により定常状態に回復した。以上の結果から、MAC はプロリルヒドロキシラーゼによる HIF-1αタンパク質の水酸化を阻害していることが示唆された。

hypoxia-inducible factor, 4-O-methylascochlorin, ascochlorin

発表番号：4B052
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 酵母凝集反応を利用した新規なエピ変異原可視化検出系の開発
# Development of a novel epimutagen detection system using flocculation of yeast

○杉山 圭一[1]、古沢 博子[1]、清水 雅富[2]、本間 正充[1] ([1]国立衛研・変異、[2]東京医療保健大学)
○Kei-ichi SUGIYAMA[1], Hiroko FURUSAWA[1], Masatomi SHIMIZU[2], Masamitsu HONMA[1] ([1]Div. Genetics and Mutagenesis, Nat. Inst. Health Sci., [2]Tokyo Healthcare University)

【背景】近年、ヒト健康影響また抗がん剤等の創薬の観点からエピジェネティック変異原（エピ変異原）検出系の構築が切望されているが、現時点で微生物を用いたエピ変異原短期スクリーニング系はない。一方、真核微生物の出芽酵母は、DNA metyltransferase（*DNMT*）遺伝子が同定されておらず、DNA のメチル化レベルも低いとされる。我々は既に、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母を作出し同酵母が特異的に示す表現型として可視化可能な凝集性を同定している。さらに本酵母内で転写レベルが亢進している凝集関連遺伝子の 1 つ *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルが、DNMT 阻害剤により抑制されることを明らかにしている。

【目的】本研究では、DNA メチル化と共に主要なエピジェネティックな制御機構の 1 つとされるヒストン修飾に作用する化学物質が、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母の凝集性に与える影響を解析し、育種したヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母の誘導型凝集性がヒストン修飾制御剤スクリーニングのバイオマーカーとしても応用可能か検討した。

【方法】ヒストン修飾制御剤として Histone deacetylase（HDAC）阻害剤である Trichostatin A（TSA）を用いて、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母の凝集レベルにおよぼす作用を半定量化、また *FLO1* 遺伝子の転写レベルへの影響を RT-PCR により解析した。HDAC 阻害剤である Dimethyl sulfoxide（DMSO）および Suberoylanilide Hydroxamic Acid（SAHA）についても、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母の凝集におよぼす影響を検証した。なお、ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母としては、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3A* もしくは *3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母に co-transformation したヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母 2 株を使用した。

【結果・考察】ヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母が示す凝集は TSA 濃度依存的に促進され、*FLO1* 転写レベルの亢進が増強されることも確認された。濃度依存的な凝集の促進作用は、DMSO よっても認められたが、SAHA は濃度依存的な抑制作用を示した。HDAC 阻害剤による凝集性に対する作用の相違は、本酵母内 HDAC に対する各剤の阻害プロファイルを反映していると推測される。以上の結果から、本酵母ゲノム上の *FLO1* 遺伝子プロモーター領域は、DNA メチル化制御に加えヒストン修飾による制御も受けること、またこのヒストン修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は可塑性も有すると考えられる。よって本研究より、エピ変異原である HDAC/DNMT 両阻害剤の世界初可視化スクリーニング系のプラットフォームとして、本酵母は応用可能であることが示唆された。

epigenetic mutagen, flocculation, yeast

発表責任者：杉山圭一（sugiyama@nihs.go.jp）

発表番号：4B053
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# マウス 3T3-L1 細胞を用いたイソキノリンアルカロイドの生理活性評価

Evaluation of physiological activity of isoquinoline alkaloids with 3T3-L1 cells.

○十亀 真実、岩田 優子、チョウ イライ、佐藤 文彦（京大生命）
○Mami SOGAME, Yuko IWATA, Yit-lai CHOW, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

当研究室ではこれまで、主要な代謝産物としてberberineを産生する、キンポウゲ科のオウレン（Coptis japonica）のイソキノリンアルカロイド生合成系を対象とした研究が進められてきた。代謝工学的な手法により、多様なイソキノリンアルカロイド生合成系の改変を行い、代謝産物の多様性を拡大することが可能になってきており、その多様な代謝産物を薬剤に応用する可能性もまた広がりつつある。

berberineは古くから止瀉剤等の胃腸薬として利用されてきたが、近年では糖尿病、メタボリックシンドローム治療薬としての可能性が示唆されている。先行研究において、研究対象としている生合成経路に含まれる中間体及び各種イソキノリンアルカロイドを産生する植物培養細胞の抽出物について、線虫を用いて脂肪蓄積を制御する物質のスクリーニングが行われ、新規の有望なアルカロイドとして、sanguinarineが見出されてきた（Chow, Y. L. and Sato, F. BBB, 2013）。

本研究では、線虫よりも哺乳類に近い実験系であるマウス3T3-L1脂肪細胞を用いて脂肪蓄積抑制効果を有する各種イソキノリンアルカロイドのスクリーニングを行い、新規の高活性のイソキノリンアルカロイドとして13-methylberberineを見出した。3T3-L1細胞において13-methylberberineはberberineの3分の1の濃度でほぼ同等の脂肪蓄積抑制効果を示した。また、13-methylberberineはberberineと同様に、比較的弱い細胞毒性を示したが、3T3－L1細胞においては多少berberineよりも高い細胞毒性が見られ、HepG2細胞においてはほぼ同程度の毒性であった。一方で、13-methylberberineはberberineよりも安定に細胞内外に存在し、持続的な効果を有する可能性が示された。

berberineに関しては3T3-L1細胞において、PPAR- γ発現の抑制を介した脂肪細胞分化抑制効果及び、AMPKのリン酸化によるエネルギー消費の活性化による脂肪蓄積抑制効果が示唆されている。そこで、効果を13-methylberberineと比較したところ、遺伝子、タンパク質レベルで13-methylberberineがberberineと同様の標的に対し、より強力な効果を示すことが示唆された。

以上の結果から、13-methylberberineのberberineよりも効率の高い糖尿病、メタボリックシンドローム治療薬としての可能性が示された。

isoquinoline alkaloid, berberine, adipogenesis

発表番号：4B054
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 抗ガン活性を持つゴルジ体マンノシダーゼ I 阻害剤の開発 ： 天然化合物ライブラリからの新規非糖ミミック阻害剤の探索

# Development of golgi mannosidase I inhibitor with anticancer activity.

○小山 亮祐[1]、江田 大曜[2]、袴田 航[1,2]、平野 貴子[2]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資科・生物資源利用、[2]日大生資科・生命化)

○Ryosuke KOYAMA[1], Hiroaki EDA[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Takako HIRANO[2], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresourse Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. of Bioresourse Sciences, Nihon Univ.)

【目的】*N*-結合型糖鎖合成に関与するゴルジ体マンノシダーゼ I (GMI) の阻害剤は、細胞表面糖鎖の構造を変化させることにより、抗ガン作用を示す事が報告されている。しかし、このような作用機序を持つ既知阻害剤であるデオキシマンノジリマイシン等は、糖ミミックな構造を有し、高い親水性による膜透過性の低さや構造展開の難しさによって、抗ガン剤への応用が困難となっている。そこで、この問題を解決するために適度な疎水性を有し構造展開の容易な非糖ミミックな阻害剤を化合物ライブラリから探索することとした。そこで、効率的に目的の阻害剤を得るため、酵素レベルの探索を経ずにセルベースでの阻害剤探索系の構築を試み、セルベースで機能する GMI 特異的蛍光基質を開発し、それを用いたセルベースでの阻害剤探索系を開発した（小山亮祐ら、日本応用糖質科学会平成 27 年度大会、P.58、Dp-14)。本研究では、開発した探索系を用いて理化学研究所天然化合物ライブラリ (NPDepo) から新規非糖ミミックな GMI 阻害剤を見出し、抗ガン剤としての活性を評価することを目的とした。

【方法および結果】当研究室で開発した阻害剤探索系を用いて、NPDepo から GMI 阻害剤の探索を行った。全 376 母核から探索を行った結果、高い GMI 阻害活性を示す 3 種の異なる母核を見出した。その中の 1 つを母核とした AR500 シリーズ（下図）の 13 化合物について、GMI 阻害活性と細胞毒性（抗ガン活性）を検討した。その結果、いくつかの化合物が GMI 阻害活性と抗ガン活性を有していた。そこで、抗ガン活性の作用機序を明らかにするため、細胞表面糖鎖の変化による細胞の形態変化および細胞のハイマンノース糖鎖の局在について観察を行なった。その結果、GMI 阻害による細胞表面糖鎖の成熟不全に基づく細胞の接着不全とそれに伴う細胞の形態変化が観察された。また、GMI 阻害剤処理細胞のハイマンノース糖鎖の局在をレクチン蛍光染色で確認した結果、ゴルジ体以外のオルガネラでハイマンノース糖鎖が観察された。これらの結果は AR500 シリーズの化合物が細胞内の GMI を阻害し、*N*-結合型糖鎖合成不全による抗ガン作用を有することを示唆している。

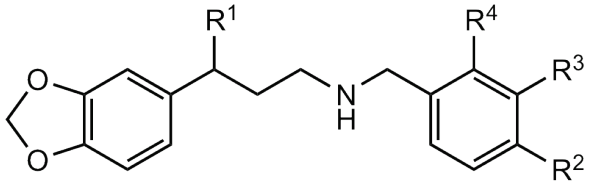



図. AR500 シリーズ母核

anticancer, mannosidase, inhibitor

発表番号：4B055
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

ポリオキソメタレートの抗菌活性評価
Evaluation of antibacterial activity by polyoxometalate
○今野 博行、小林 大樹、矢野 成和、二階堂 由莉、東海林 由憲、似内 郁美、川井 貴裕、野々村 美宗、鵜浦 啓、並河 英紀（山形大院理工）
○ Hiroyuki KONNO, Daiki KOBAYASHI, Shigekazu YANO, Yuri NIKAIDO, YOshinori TOKAIRIN, Ikumi NITANAI, Takahiro KAWAI, Yoshimune NONOMURA, Kei UNOURA, Hidenori NABIKA (Yamagata Univ.)

[目的]
ポリオキソメタレートは $MO_6$ を基本骨格とする酸化物クラスターアニオンでありこれまでに様々な構造体が報告されている．これらは構成元素や対カチオンを変化させることで酸化力や酸性能を精密に制御できることが特徴であり，それによって得られる誘導体には様々な機能性を付与できる可能性がある．我々のグループはこれらポリオキソメタレート誘導体の抗菌活性に興味を持ち，その構造と抗菌スペクトル、さらに動物細胞に対する毒性について調査した．
[方法]
抗菌剤として用いるポリオキソメタレートは Keggin ならびに Dawson type とし，リンタングステン酸 $(P_xW_xO_z)^{n-}$ ならびにリンモリブデン酸 $(P_xMo_yO_z)^{m-}$ とした．またグラム陽性細菌として代表的な 6 種，グラム陰性細菌 2 種を選択し，さらに真菌 3 種について最小発育阻止濃度 (MIC) を調査した．一方でヒト細胞については細胞増殖能測定 (MTT アッセイ) を行った．
[結果]
評価するポリオキソメタレートのうち $H_3[PMo_{12}O_{40}]\cdot 17H_2O$ は日本無機化学工業株式会社から購入し，$K_6[P_2W_{18}O_{62}]\cdot 10H_2O$ は以下の方法に従って合成した．初めに、$Na_2WO_4$ と $H_3PO_4$ 混合溶液を 10 時間還流した．その後，KCl 添加により析出した結晶を 60°C の超純水にて再結晶を行った．採取した結晶を超純水に再溶解したあと加熱し，$HNO_3$ を添加した．放冷後，$KHCO_3$ 溶液と HCl を加え，1 時間沸騰させた．自然濾過後，濾液への KCl 添加によって $K_6[P_2W_{18}O_{62}]\cdot 10H_2O$ を得た．他のポリオキソメタレートも同様に調製した．
今回評価に用いた Keggin type のポリオキソメタレートについてはいずれの場合においても顕著な抗菌活性や細胞毒性は示さなかった．一方で Dawson type である $K_6[P_2W_{18}O_{62}]\cdot 10H_2O$ は，グラム陰性細菌に対して全く抗菌活性を示さないものの (MIC = >800 μg/mL)，ブドウ球菌 (*Staphylococcus)*，納豆菌 (*Bacillus subtilis 168)*，ミクロコッカス(*Micrococcus luteus*)，エンテロコッカス (*Enterococcus raffinosus)* 等，グラム陽性細菌に対して顕著な抗菌活性を示すことを見出した (MIC = 25~100 μg/mL)．また，Hela 細胞には $CC_{50}$ = 2.5 mM という高濃度条件下で毒性を示した．この結果はポリオキソメタレートが選択毒性を示すことを表しており，新規性の高い抗菌剤の候補として大きな可能性を秘めていると考えられる．協奏的抗菌効果の検討もあわせて報告する．

polyoxometalate, anti-bacteria, self-assembly

発表責任者：今野博行（konno@yz.yamagata-u.ac.jp）

発表番号：4B057
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# シスチン－グルタミン酸アンチポーター（system $x_c^-$）を標的とした阻害剤の分子設計及び合成
# Synthesis of inhibitors of cystine-glutamate antiporter system $x_c^-$, a potential target for cancer chemotherapy

○尹 紫薇[1]、李 春傑[1]、佐藤 茉美[2]、渡辺 文太[1]、佐藤 英世[2]、平竹 潤[1]（[1]京大化研、[2]新大医）
○Ziwei YIN[1], Chunjie LI[1], Mami SATO[2], Bunta WATANABE[1], Hideyo SATO[2], Jun HIRATAKE[1]
([1]Kyoto Univ., [2]Niigata Univ.)

【背景・目的】

グルタチオン（GSH）は、抗酸化作用を示すほか、求電子的な化合物や重金属といった生体異物の解毒の最前線に立つ極めて重要な生体内還元物質である。細胞内の GSH レベルは、原料となるシステインおよびシスチンの供給量に大きな影響を受けている。System $x_c^-$は、グルタミン酸 1 分子と交換に、血中のシスチン 1 分子を細胞内へと取り込むトランスポーターで、ある種の癌細胞で高発現し、薬物・放射線に対する耐性の獲得や増殖および転移といった、癌細胞の悪性化に深く関係している。その阻害剤として、グルタミン酸アナログやスルファサラジン、エラスチン等が報告されているが、毒性や非選択性等の問題点があり、抗癌剤としての実用化には至っていない。そこで本研究では、癌細胞へのシスチン供給を遮断することで GSH による細胞の自己防衛システムを破綻させ、内在性の活性酸素種によって癌細胞を自滅に導くことのできる抗癌剤の創製を目指し、system $x_c^-$を特異的に阻害する新しい不可逆的阻害剤を開発するため、Figure 1 に示した化合物 **1** をリードとして化合物 **2-14** を設計し、その合成を行った。

【方法・結果】

先行研究で合成されたカーバメート型 γ-glutamyl transpeptidase 阻害剤について、system $x_c^-$に対して阻害活性を示す化合物をスクリーニングした結果、**1** は 1 mM でシスチン（0.05 mM）の取り込みを 94%阻害した。そこで、カーバメート型阻害剤 **1** とスルファサラジンの構造をもとに、アミド型化合物 **2**、**6**、**7** をデザインして合成を行った。System $x_c^-$に対する阻害活性を測定した結果、左側のベンゼン環メタ位に α -アミノ酸構造を導入した **2** は **1** と同等の阻害活性を示した一方で、ヒダントイン構造を持つ **6** 及び **1** のアミド結合のカルボニル基とアミノ基を逆にした **7** の阻害活性は弱いものであった。この結果に基づき、構造活性相関を更に明らかにすることを目的として、アミド型化合物 **3-5**、アルケン型化合物 **8** 及びナフタレン型化合物 **9-14** を合成した。

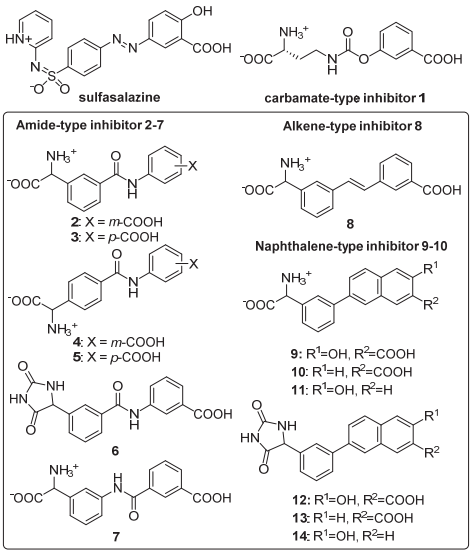


***Figure 1.*** Structure of sulfasalazine, carbamate-type inhibitor **1** and novel system $x_c^-$ inhibitor **2-14**.

system $x_c^-$, cystine-glutamate antiporter, drug design

発表番号：4B058
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# プロリン異性化酵素 Pin1 阻害ポリフェノールの発見

# Discovery of polyphenols inhibiting peptidyl prolyl isomerase Pin1

○對馬 早織[1]、日高 將文[1]、高橋 典子[2]、津吹 政可[2]、内田 隆史[1] ([1]東北大学農学部 分子酵素学、[2]星薬科大学)
○ Saori TSUSHIMA[1], Masafumi HIDAKA[1], Noriko TAKAHASHI[2], Masayoshi TSUBUKI[2], Takafumi UCHIDA[1] ([1]Tohoku University, Molecular Enzymology, [2]Hoshi University)

［目的］

Pin1 は、タンパク質中のリン酸化 Ser/Thr-Pro 部位を特異的に認識し、ペプチド結合の *cis*/*trans* 異性化を触媒するプロリン異性化酵素である。Pin1 は細胞周期や細胞内シグナル伝達を調節することで細胞の増殖や分化を制御する。我々は Pin1-KO マウスの表現型解析により、Pin1 が生活習慣病、アルツハイマー病、癌、感染症など多くの疾患、特に加齢関連疾患に関係していることを明らかにしてきた。最近、Pin1 は、健常時では生体の恒常性を個体レベルで維持する役割を果たしていることが分かってきた。我々は、Pin1 の活性を制御する化合物を合成化合物または天然物ライブラリーから探索し、これらの疾患の治療や生体の恒常性を維持し疾患を予防する薬剤を見出すことを目指して研究を行ってきた。Pin1 活性を調節する薬剤のハイスループットスクリーニング（HTS）系を構築し、これまでに数種類の Pin1 阻害剤を発見した。それら阻害剤は Pin1 の機能の研究で重要な武器になっている。しかし、細胞の機能を制御できる濃度では細胞毒性などの副作用がでるので、Pin1 に対する特異性を示すより安全性の高い薬剤の発見が望まれる。

［方法・結果］

ヒト Pin1 は、これまでと同様に大腸菌で作製した。しかし、本研究ではこれまで使用していた GST 融合 Pin1 ではなく、eXact-tag システム（BioRad）を用いて発現・精製したタグが付加されていない Pin1 を使用したので、より Pin1 特異性が高い化合物のスクリーニングを可能とした。酵素活性測定は、HTS の場合には FDSS（浜松ホトニクス）を用いて室温で行うが、本研究ではポリフェノールやレチノイドの誘導体に絞って化合物を探索したので、キュベットを用いて低温で測定する手法をとった。ペプチド基質・AEPF（Ala-Glu-Pro-Phe）-pNA を用いてα−キモトリプシンとのカップルアッセイ法で酵素活性を測定した。他のプロリン異性化酵素（サイクロフィリン）についても、基質として AAPF-pNA を用いた酵素活性測定で化合物を評価し、化合物の Pin1 に対する特異性を調べた。また、Pin1 の変異体を用いて化合物がどのように Pin1 に作用しているのかをタンパク質化学的に検討した。Pin1 活性を阻害すると確認された化合物については、その生物機能についても研究を進めており、合わせて発表する。

polyphenol, peptidyl prolyl isomerase, inhibitor

発表番号：4B059
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

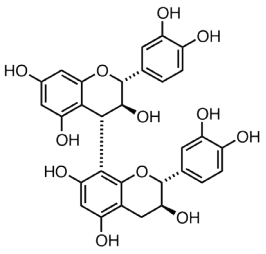
# 新規プロアントシアニジン誘導体の開発 －動脈硬化治療薬を目指して－

# Synthesis of proanthocyanidin analogue to reduce the risk of atherosclerosis

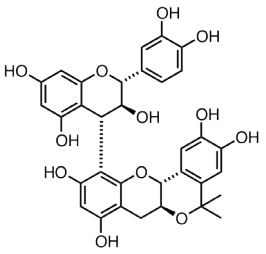
○水野 美麗[1]、川村 綾乃[1]、大石 菜摘[1]、根本 徳子[1]、小森 公陽[1]、中西 郁夫[2]、松本 謙一郎[2]、福原 潔[1] ([1]昭和大薬、[2]放医研)
○ Mirei MIZUNO[1], Ayano KAWAMURA[1], Natsumi OISHI[1], Noriko NEMOTO[1], Masaaki KOMORI[1], Ikuo NAKANISHI[2], Ken-ichiro MATSUMOTO[2], Kiyoshi FUKHARA[1] ([1]Showa Univ., [2]NIRS)

【目的】近年、我が国では動脈硬化の罹患者数が増加している。発症要因の 1 つに、酸化 LDL と酸化 LDL 受容体(LOX-1)の結合による血管内皮細胞の機能的変化が挙げられる。LOX-1 阻害作用を有する抗酸化物質として、カテキンの重合体であるプロアントシアニジンが報告されている。

当研究室ではカテキンの立体構造を平面に固定化した平面型カテキンを開発した。カテキンに比べてラジカル消去反応速度が約 5 倍増加し、α-グルコシダーゼ阻害作用や抗ウイルス作用など新規生理活性を有することも報告した。酸化 LDL は LOX-1 のレクチン様ドメインに結合することが知られている。これより糖と類似した構造を持つ平面型カテキンは、LOX-1 のレクチン様ドメインに対する強い結合親和性が期待される。そこで我々は、強い抗酸化作用と LOX-1 結合阻害作用を期待し、カテキンの一方の立体構造を平面に固定化したプロアントシアニジン誘導体(Cat-PCat, **1**)を設計した。さらに、合成した誘導体(**1**)とプロシアニジン B3(Cat-Cat)のラジカル消去活性について検討した。



procyanidin B3



(**1**)

【方法・結果・考察】カテキンの水酸基を保護し脱離基を導入した誘導体と、立体構造を平面に固定化した誘導体をルイス酸で縮合させ目的化合物(**1**)を合成した。ラジカル消去活性の測定は、活性酸素種のモデルであるガルビノキシルラジカル(GO·)と Cat-Cat 及び Cat-Pcat との反応をストップトフロー分光測定装置で追跡した。得られた結果を速度論的解析した結果、単量体のカテキンに比べて、Cat-Cat のラジカル消去速度は大幅に高くなった。Cat-PCat(**1**)においては、平面型カテキン及び Cat-Cat よりもさらに優れたラジカル消去能を有することがわかった。今後は LOX-1 への酸化 LDL の結合阻害作用を解析することで、カテキン−平面型カテキン誘導体の動脈硬化予防作用を明らかにする。

proanthocyanidin, catechin, atherosclerosis

発表責任者：水野美麗（mizuno@pharm.showa-u.ac.jp）

発表番号：4B060
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 癌遺伝子産物 PPM1D を阻害する低分子化合物

# Screening and characterization of small molecule inhibitors of PPM1D

岩崎 祐太[1]、青山 友果[1]、鵜飼 武寛[1]、鵜飼 容子[1]、饒村 修[2]、○大西 素子[1] ([1]中部大応生、[2]中部大工)

Yuta IWASAKI[1], Yuka AOYAMA[1], Takehiro UKAI[1], Yoko UKAI[1], Osamu NIYOMURA[2], ○Motoko OHNISHI[1] ([1]College of Bioscience and Biotechnology, Chubu Univ., [2]College of Engineering, Chubu Univ.)

【目的】PPM ファミリーのプロテイン Ser/Thr ホスファターゼは大腸菌からヒトに至るまで広く保存され、生命活動に必要不可欠な分子であると考えられており、ほ乳類には 17 種類の異なった遺伝子にコードされるアイソフォームが存在している。PPM1D は DNA 損傷時に癌抑制遺伝子産物である p53 依存的に誘導されるプロテインホスファターゼとして同定され、p53 を初め p38、Chk1 および Chk2 など不活性化し、細胞死を抑制しがん化を促進することが知られている。乳がんや脳腫瘍など様々ながん組織では PPM1D 遺伝子の増幅や発現上昇が認められるのに加え、PPM1D 遺伝子には C 末端欠失をもたらし、ホスファターゼドメインを安定化する機能獲得型のナンセンス変異が頻繁に起きていることも報告されている。さらに最近、Wip1 欠損マウスでは腫瘍形成が抑制されるだけでなく、脂肪滴の蓄積が抑制され、アテローム性動脈硬化症を改善することが報告された。そこで本研究ではこれらの疾病の治療を目指し、Wip1 阻害物質の探索を行った。

【方法】 マウス Wip1 は、N 末端に His-Tag を融合し、C 末端 179 アミノ酸残基を欠損した組換えタンパク質として大腸菌 BL21 codonplus DE3RIL 株で発現し、Ni Sepharose 6 を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。PP2C α、β および ε は GST 融合タンパク質として同様に大腸菌で発現し、精製を行った。プロテインホスファターゼ活性は、α-casein またはリン酸化ペプチドを基質としてマラカイトグリーン法により測定した。

【結果】様々な有機セレン化合物の Wip1 への影響を検討したところ、diphenyl diselenide および phenyl [3-(2-pyridyl)imidazo[1,5-a]pyridin-1-yl] diselenide に特に高い阻害効果が認められた。そこで PPM ファミリーに属する PP2C α、PP2C β および PP2C ε の活性に対する、これらの化合物の影響を検討したところ、PP2C α と PP2C β には弱い阻害活性を示すものの、PP2C ε の活性にはほとんど影響を与えないことがわかった。Lineweaver-Burk プロットによる解析を行ったところ、これらの化合物はいずれも Wip1 に対し非拮抗阻害剤として作用することがわかった。さらに diphenyl diselenide の類似構造を持つ有機硫黄化合物の Wip1 に対する影響を調べたところ、bis(3-nitrophenyl) disulfide に diphenyl diselenide よりも高い Wip1 阻害活性がみとめられた。

以上より、2 種類の有機セレン化合物および bis(3-nitrophenyl) disulfide は Wip1 の特異的非拮抗阻害剤として作用することが明らかとなった。

protein phosphatase, oncogene, inhibitor

発表責任者：大西素子（mohnishi@isc.chubu.ac.jp）

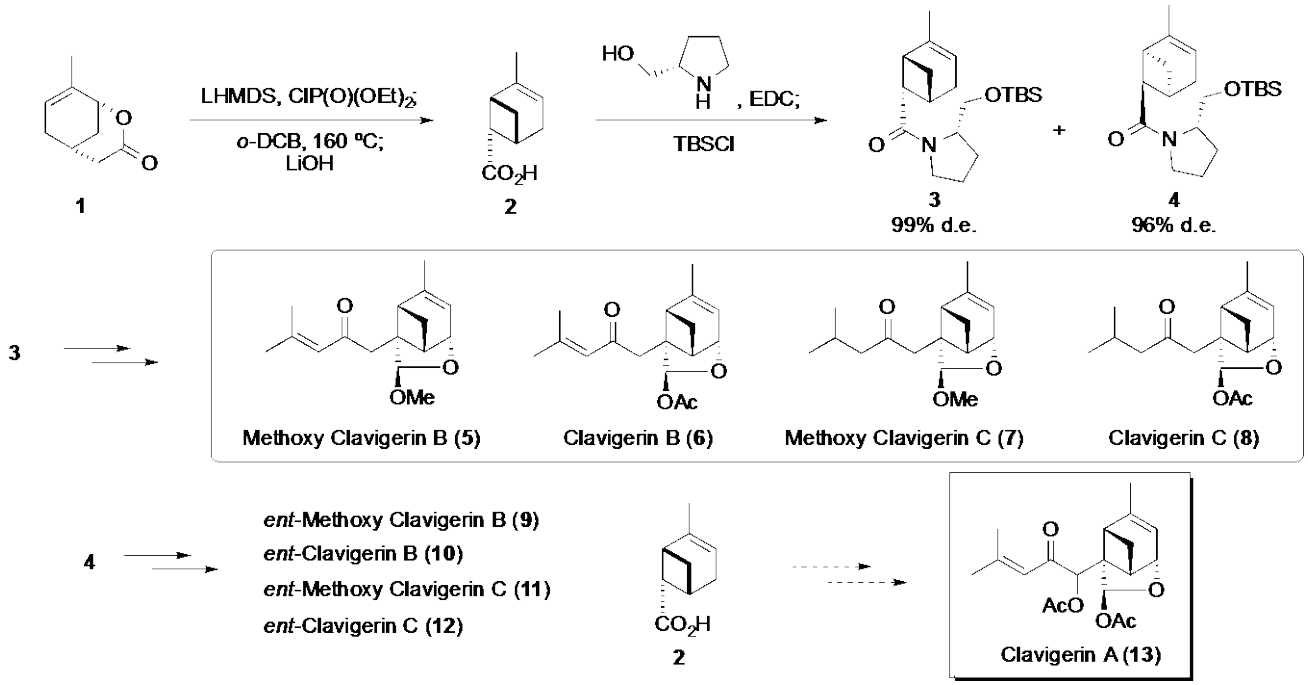
発表番号：4B061
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# クラビゲリン類の両鏡像体の合成
# Synthesis of Both Enantiomers of Clavigerins

○柿本 望、石神 健、渡邉 秀典（東大院農生科・応生化）
○Nozomu KAKIMOTO, Ken ISHIGAMI, Hidenori WATANABE (Tokyo Univ.)

Clavigerin 類はニュージーランド産の苔類 *Lepidolaena clavigera* より単離、構造決定されたベルガモタンセスキテルペンである [1, 2)]。生理活性として衣類害虫であるコイガやカツオブシムシの幼虫に対する摂食阻害活性を有する。昨年度大会では Clavigerin B, C のラセミ合成を報告した。今回本化合物群の両鏡像体の不斉合成を達成するとともに、未決定であった絶対立体配置の決定に成功したので報告する。

ラセミ体ラクトン **1** に対して Ireland Claisen 転位反応を行いビシクロ[3.1.1]ヘプテン骨格を有するカルボン酸 **2** を合成した後、L-プロリノールを用いたジアステレオマー法による光学分割を行い、**3** および **4** を得た。得られた両ジアステレオマーを用い、artifact を含む一連の Clavigerin 類の両鏡像体を合成し、天然物の絶対立体配置が 5～8 に図示した通りであると決定した。現在 Clavigerin A (**13**)の合成に向けた検討を行っている。




(1) N. B. Perry. *et al.,* *Tetrahedron Lett.,* **2003**, *44*, 1651 (2) Y. Asakawa. *et al.,* *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 258

total synthesis, optical resolution, antifeedant

発表番号：4B062
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

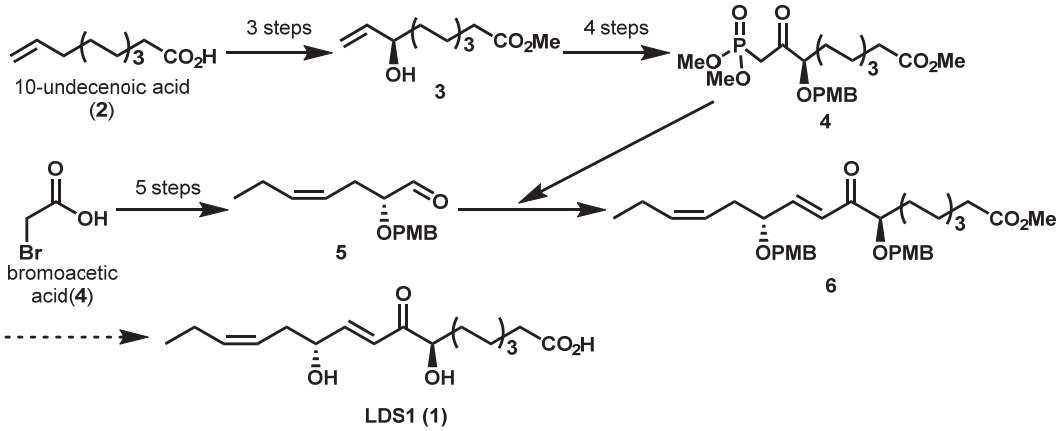
# 花芽形成誘導物質 LDS1 の合成研究

# Synthetic Studies on the Flower-Inducing Compound LDS1

○高安 悠希、十和田 諒、桑原 重文（東北大院農）
○Yuki TAKAYASU, Ryo TOWADA, Shigefumi KUWAHARA (Tohoku Univ.)

【目的】花芽形成を誘導する技術の発展は、果実や花卉を始めとする農作物の供給量の増大に大いに役立つものと考えられる。LDS1 (**1**)は、アオウキクサ(*Lemna paucicostata*)から単離されたオキシリピンであり、双子葉植物と単子葉植物の両方に対して低濃度で花芽形成を誘導する活性を示す [1)]。LDS1 は植物の葉や生長点など特定の部位に限らず散布や塗布、滴下などのあらゆる方法を使用できる優れた特徴を有することから、実用的な植物生長調節剤としての応用が期待されている [2)]。そのため、まずは LDS1 の全合成を達成して合成方法を確立し、実用化に向けたサンプル供給を行って、最終的に農作物の生産性向上へと応用することを目的に本化合物の全合成研究に着手した。

【方法・結果】LDS1 はホスホン酸エステル部位(**4**)とアルデヒド部位(**5**)から合成できると考えた。ホスホン酸エステル部位は 10-ウンデセン酸(**2**)を出発原料とし、エステル化とアリル位酸化、Sharpless 速度論的光学分割を含む 7 工程で調製した。アルデヒド部位は、ブロモ酢酸(**4**)を出発原料に Evans 不斉アルキル化を含む 5 工程で合成した。現在は、Horner-Wadsworth-Emmons 反応による両部位の *E* 選択的な連結反応まで完了している。今後 2 種類の保護基を除去して LDS1 の全合成を達成する予定であり、本発表ではその後の検討を含めた詳細を報告する。




1) Ariaki Murata *et al.*, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4969–4976.
2) 渡辺修治ら, 特開 2012-46458.

LDS1, Flower Induction, oxylipin

発表責任者：高安悠希（yuki.takayasu.s5@dc.tohoku.ac.jp）

発表番号：4B063
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

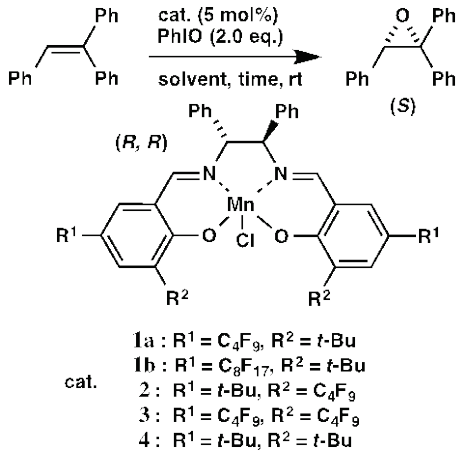
# フルオラスマンガンサレン錯体を用いる不斉エポキシ化反応と共溶媒効果

# Asymmetric Epoxidation Using Fluorous Manganese Salen Complexes and Cosolvent Effect

○宮崎 裕紀、小林 佑基、杉山 祐也、濱本 博三、塩入 孝之、松儀 真人（名城大農）
○Hiroki MIYAZAKI, Yuki KOBAYASHI, Yuya SUGIYAMA, Hiromi HAMAMOTO, Takayuki SHIOIRI, Masato MATSUGI (Meijo Univ.)

マンガンサレン錯体を用いる不斉エポキシ化反応では、サレン骨格上の置換基がエナンチオ面選択性と酸化活性に影響を及ぼすことが知られている[1]。当研究室では無保護のサリチルアルデヒドの芳香環上に直接パーフルオロアルキル化できる手法を見出しており[2]、容易に様々なフルオラスサレンリガンドの合成が可能であることから、今回我々は、サレン骨格の 3, 3’ 位および 5, 5’ 位にパーフルオロアルキル基（フルオラスタグ）を導入した新規フルオラスマンガンサレン錯体 **1**～**3** を合成し、酸化活性とエナンチオ面選択性を調べた。

5, 5’ 位または 3, 3’ 位に $C_4F_9$ タグを導入したフルオラスマンガンサレン錯体 **1a** および **2** では、ノンフルオラスマンガンサレン錯体 **4** に比べてエナンチオ面選択性は低下したが、酸化活性は向上した（entry 2, 6, 9)。興味深いことに、**1a** では共溶媒である BTF（benzotrifluoride）の添加によりエナンチオ面選択性の向上が観測された(entry 2)[3]。一方、5, 5’ 位に $C_8F_{17}$ タグを導入したサレン錯体 **1b** では、BTF による共溶媒効果は観測されなかったが、**4** に比べて、エナンチオ面選択性並びに酸化活性が向上することがわかった（entry 3, 4)。 3, 3’ 位および 5, 5’ 位に $C_4F_9$ タグを導入したサレン錯体 **3** では酸化活性は向上したが、エナンチオ面選択性が低下し共溶媒効果も観測されなかった(entry 7, 8)。




| entry | cat. | solvent | time (min) | conv. (%)[a] | *ee* (%)[b] |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1a | MeCN | 20 | 100 | 49 |
| 2 | 1a | MeCN/BTF[c] | 10 | 100 | 65 |
| 3 | 1b | MeCN | 10 | 100 | 80 |
| 4 | 1b | MeCN/BTF[c] | 10 | 100 | 80 |
| 5 | 2 | MeCN | 10 | 83 | 49 |
| 6 | 2 | MeCN/BTF[c] | 10 | 100 | 46 |
| 7 | 3 | MeCN | 10 | 100 | –1 |
| 8 | 3 | MeCN/BTF[c] | 10 | 100 | –2 |
| 9 | 4 | MeCN | 20 | 100 | 73 |

[a] Determined by $^1$H NMR.
[b] Determined by HPLC (DAICEL CHIRALCEL OD–3, hexane/$^i$PrOH = 9/1, flow rate 0.4 ml/min ).
[c] MeCN : BTF = 1 : 1

References

[1] Jacobsen, E. N. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 948-954.
[2] Matsugi, M. et al. *Tetrahedreon Letters* **2008**, *49*, 4189-4191.
[3] Matsugi, M. et al. *Tetrahedreon: Asymmetry* **2014**, *25*, 1209-1214.

fluorous manganese salen complex, asymmetric epoxidation, cosolvent effect

発表責任者：宮崎裕紀（153561020@ccalumni.meijo-u.ac.jp）

発表番号：4B064
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 長鎖ペプチドの合成に有用な新規 Cys 残基側鎖保護基の開発

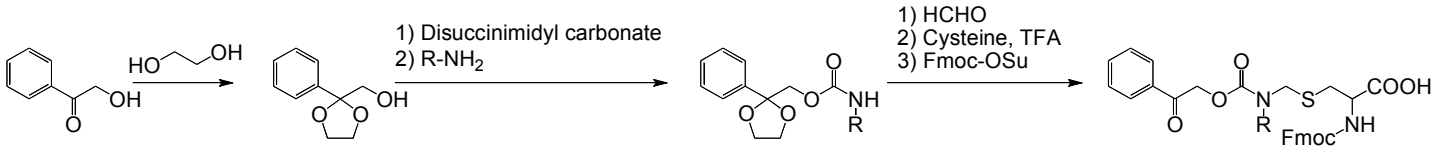
# Development of a novel Cys protecting group useful for the chemical synthesis of long peptide chains

○片山 秀和、後藤 拓眞（東海大工・生命化学）
○Hidekazu KATAYAMA, Takuma GOTO (Dept. Applied Biochemistry, School of Engineering, Tokai Univ.)

【背景・目的】ペプチドの化学合成には固相合成法が広く用いられているが、40～50 アミノ酸残基の鎖長が限界といわれている。そのため、長鎖のペプチドの化学合成には、固相合成によって調製したペプチドを縮合するセグメント縮合法が広く用いられている。セグメント縮合法の一つであるチオエステル法は、C 末端にチオエステル構造を有するペプチドをもう一方のペプチドセグメントの N 末端アミノ基と反応させることによってペプチド結合を形成させる方法である。この方法では、位置選択的な縮合反応を行うために反応性の高い Lys および Cys 残基側鎖に保護基を必要とする。我々は以前、Cys 残基側鎖保護基として、縮合反応後に亜鉛／酢酸によって脱保護可能な保護基として *N*-methyl-phenacyloxycarbamidomethyl (Pocam)基を開発した[1]。しかし Pocam 基の酸に対する安定性が不十分であったことから、汎用性に欠けるという問題点があった。そこで本研究では、Pocam 基の N 原子上のメチル基を置換することによって安定性を向上させ、その新たにデザインした保護基の有用性を検証することを目的とした。

【方法・結果】メチル基を種々の置換基に変換した Pocam 基を有する Cys 誘導体を合成し、それを Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖に導入した。それを同じ条件下で TFA 処理を行いその安定性について検証したところ、メチル基を電子求引性官能基に置換したときに酸に対する安定性が向上し、中でも 2,2,2-trifluoroethyl (Tfe)基に置換した誘導体が最も高い安定性を示した。現在、Tfe-Pocam 基を導入したペプチドを用いて、チオエステル法におけるセグメント縮合反応への有用性、およびその脱保護条件の検討を行っている。本発表では、その詳細について報告する。

[1] Katayama, H., et al. (2011) *Org. Biomol. Chem.* **9**, 4653-4661.




R = Me, *iso*-Bu, 2-methoxyethyl, 2,2,2-trifluoroethyl

[1] Katayama, H., et al. (2011) *Org. Biomol. Chem.* **9**, 4653-4661.

Cys protecting group, solid-phase peptide synthesis, thioester method

発表責任者：片山　秀和（katay@tokai-u.jp）

発表番号：4B065
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

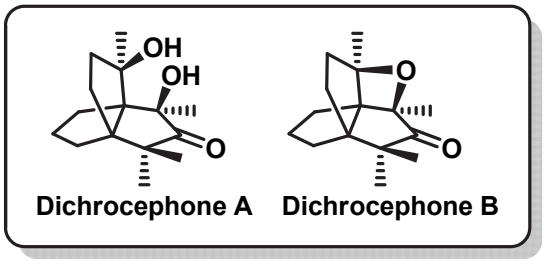
# Dichrocephone 類の合成研究

# Synthetic study of dichrocephones

○小林 宗隆[1,2]、小西 俊介[2]、渡邉 秀典[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]長谷川香料)
○Munetaka KOBAYASHI[1,2], Shunsuke KONISHI[2], Hidenori WATANABE[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]T. Hasegawa)

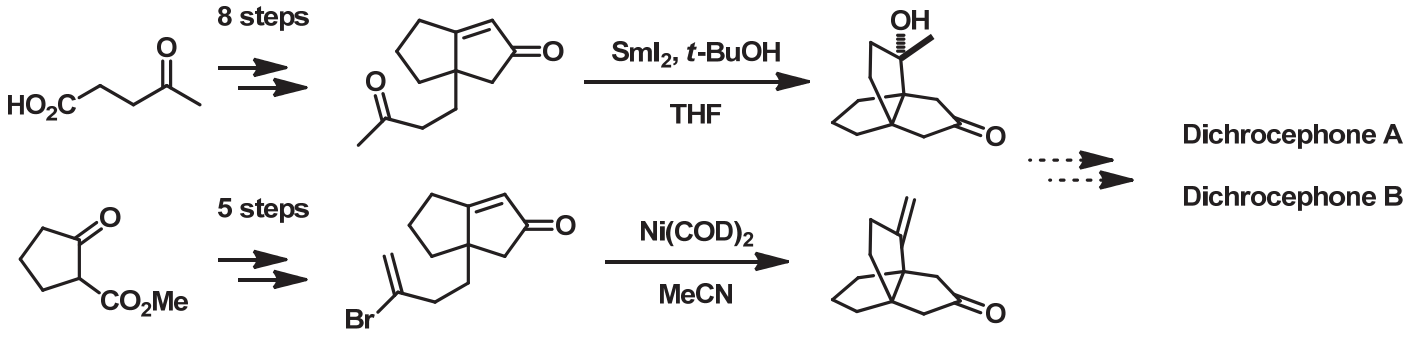
【目的】

Dichrocephone A 及び B は、キク科の一年草 *Dichrocephala benthamii* より単離された、がん細胞に対する細胞毒性を有するセスキテルペンである。[3.3.3]propellane 骨格を有するトリキナンであり、5 つの連続する四級炭素を有する混み合った構造を持つ。未だ全合成の報告はなく、我々はその特徴的構造を有する生理活性に興味を持ち、合成研究に着手した。




【方法と結果】

レブリン酸を出発原料とし 8 工程の変換を経て得た二環性のジケトンに対し、ヨウ化サマリウムを用いたラジカル環化反応を行い[3.3.3]propellane 骨格を構築したが、その立体化学は目的とは異なるものであった。立体選択性の向上を企図し異なる基質に対して同様のラジカル環化反応を試みたが、いずれも目的の環化体を得ることは困難であった。そこで立体化学の構築を環化後に行うこととし、新たな方法による骨格構築を試みた。シクロペンタノン-2-カルボン酸メチルより 5 工程で得たブロモアルケンに対し、ニッケルを用いた不飽和ケトンへの共役付加を行い目的の環化体を得た。現在それぞれの基質に対する官能基化により、Dichrocephone A 及び B への誘導を検討中である。




total synthesis, triquinane sesquiterpene, natural product

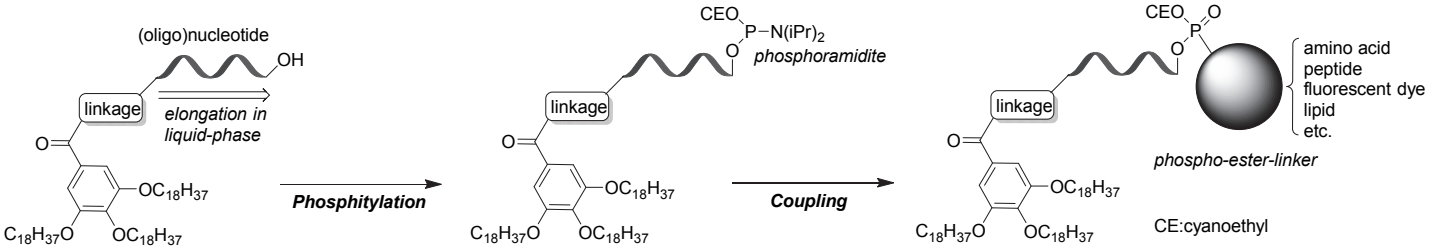
発表番号：4B066
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 可溶性担体を用いた修飾核酸の液相合成法の開発

# Liquid-Phase Synthesis of Modified Nucleic Acids by Using Alkyl-Chain-Soluble support(ACSS)

○福冨 弘貴、小路 貴生、千葉 一裕（東農工大農）
○Hiroki FUKUTOMI, Takao SHOJI, Kazuhiro CHIBA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】人工核酸は医薬品や診断薬をはじめ、様々な分野への応用が期待され、新たな機能性核酸の創出や活性向上のため積極的に研究が進められている。とりわけ医薬品分野へは核酸医薬の有効性が実証されてきており、低コストかつ量産化可能な人工核酸製造技術が求められている。現在は不溶性樹脂上にホスホロアミダイト化された核酸モノマーを逐次伸長していくことでオリゴヌクレオチドを合成する固相法が主流であり、自動合成機も開発されている。しかし、各反応工程で大量の洗浄溶媒を要し、高価なホスホロアミダイト試薬を過剰量用いるため高コスト化、大量廃棄物発生の問題がある。またホスホロアミダイトはリン酸エステルを形成する前駆体構造として修飾核酸の合成に有用である一方、水分や熱に不安定な構造で、その合成や後処理、保存操作が煩雑になるため修飾核酸の製造を困難にする要因になっている。我々の研究室では以前、固相法の課題を解決するため、可溶性担体を開発し、反応性向上と迅速簡便な分離操作を持ち合わせた効率的なオリゴヌクレオチド合成システムを構築した。可溶性担体は低極性溶媒中では均一に分散し、高極性溶媒中では凝集、沈殿する特性を持っているため、高い反応性を保持し、溶媒置換とろ過による迅速簡便な分離を可能とする。本研究ではホスホロアミダイト試薬の課題を解決するため可溶性担体の特性に着目し、担体上におけるホスホロアミダイト化とろ過による迅速に分離と回収を行い、取扱操作を改善した。また形成されたホスホロアミダイトに対しアミノ酸やペプチド、脂質などの各種分子を導入することで、天然物と同様のリン酸エステルをリンカーに持つ様々な修飾核酸（核酸コンジュゲート）の合成を目指した。
【方法】可溶性担体上で伸長したオリゴヌクレオチドの 5'-OH をホスホロアミダイト化し、生成物をろ過によって迅速簡便に分離、回収した。また、ペプチドや脂質などの分子とカップリングを行い、生体内で存在するリン酸エステル型リンカーを持つ核酸コンジュゲートを合成した。
【結果】多様な機能性分子をホスホロアミダイト法でオリゴヌクレオチドに導入した。各カップリング反応生成物は迅速に分離することが可能であり、核酸コンジュゲートライブラリーが構築できた。



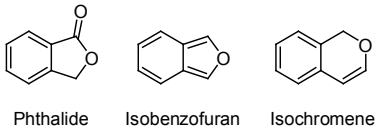

liquid-phase synthesis, modified nucleotide, phosphoramidite

発表番号：4B067
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 選択的分子内環化反応を利用した環状エーテル類の分岐合成
# Divergent synthesis of cyclic ethers via selective intramolecular cyclizations

○平田 瞭、倉持 幸司、椿 一典（京都府大・生命環境）
○Ryo HIRATA, Kouji KURAMOCHI, Kazunori TSUBAKI (Kyoto Pref. Univ.)

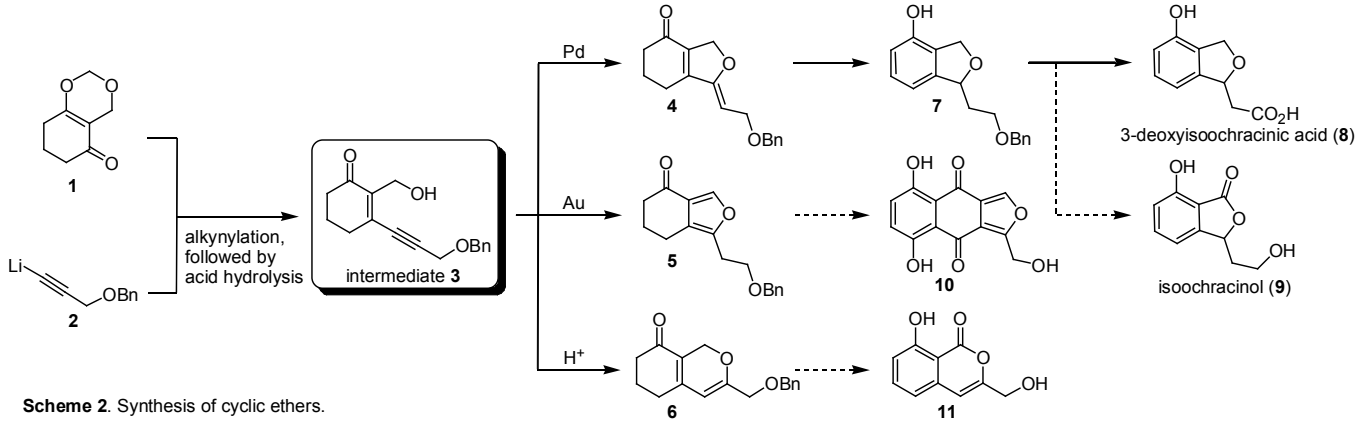
【目的】 環状エーテル結合をもつ phthalide, isobenzofuran 及び isochromene 骨格 (**Scheme 1**) は、天然物に多くみられる。これら天然物の中には、興味深い生物活性を示すものも知られており、新規医薬品候補化合物として期待されている。しかし、複雑な構造をもつ化合物の合成は多工程を有すことから、経済的かつ環境的にデメリットがある。それゆえ、これらコア骨格を簡便に合成する方法の確立が求められている。そこで、我々はひとつの共通中間体からの分岐合成により phthalide, isobenzofuran 及び isochromene 骨格を短工程で構築することにした。加えて、それら関連天然物の全合成に取り組んだ。



**Scheme 1**. Cyclic ethers.

【方法と結果】 ビニルケトン **1** に対するアセチリド **2** のアルキニル化と酸処理により、共通中間体 **3** を得た (**Scheme 2**)。次に、鍵反応である分子内環化反応を行った。まず、**3** に $Pd(PPh_3)_4$ を用いて環化反応を行ったところ、フタリド前駆体 **4** を高選択的に得ることができた。一方、**3** に AuCl を作用させるとイソベンゾフラン前駆体 **5** を選択的に得ることができた。さらに、**3** に対してブレンステッド酸を作用させると、イソクロメン前駆体 **6** を唯一の生成物として得ることができた。

目標である 3 つの骨格の構築に成功したので、続いて関連天然物の合成研究に取り組んだ。最初に、**4** の芳香化と還元を行い **7** を合成した。その後、**7** のベンジル基を脱保護し、第一級アルコールをカルボン酸へ酸化することで、3-deoxyisoochracinic acid (**8**) の全合成を達成した。現在、isoochracinol (**9**) 及び、天然物 **10** や **11** の合成に取り組んでいる。



**Scheme 2**. Synthesis of cyclic ethers.

divergent synthesis, cyclic ethers, intramolecular cyclizations

発表責任者：平田　瞭（s812310028@kpu.ac.jp）

発表番号：4B068
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# シクロペンタン導入型 KODA 類縁体の合成研究

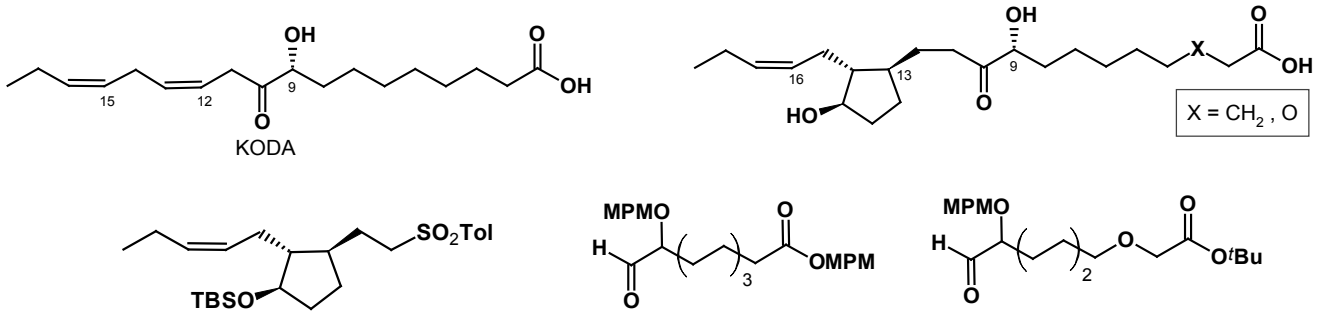
# Synthetic study on KODA analogs containing cyclopentane ring

○渡辺 美聡[1]、横山 峰幸[2]、長谷川 守文[1]、戸嶋 浩明[1] ([1]茨城大農、[2]横浜市大)
○Misato WATANABE[1], Mineyuki YOKOYAMA[2], Morihumi HASEGAWA[1], Hiroaki TOSHIMA[1]
([1]Ibaraki Univ., [2]Yokohama City Univ.)

【目的】アオウキクサより単離された 9,10-α-ketol-octadecadienoic acid (KODA) は，花芽形成、休眠打破、発根促進などの活性を示す．現在，それらの活性発現機構の解明にむけた研究が進められている. 我々はすでに 12,13－位にシクロプロパン環を導入した誘導体を合成し[1)], 生理活性試験を行っている．本研究では，活性発現機構の解明にむけた今後のプローブ化を視野に入れ，新たな KODA 類縁体としてシクロペンタン環導入型 KODA 類縁体の合成を目的とした.

【方法と結果】ジャスモン酸メチルからセグメントを誘導することで，炭素骨格は $C_{19}$ となるが，より簡便にセグメントを合成することとした．スルホン体セグメントは，市販のジャスモン酸メチルを原料とし，ケトンの $NaBH_4$ 還元，水酸基のシリル化，エステルの LAH 還元，水酸基のハロゲン化を経て合成した．アルデヒド体セグメントは，当研究室にて設計された経路に基づき，9-decene-1-ol を原料とし，合成を行った．また，セグメントをエステル型に改良したことで，カップリング後の反応数の削減に成功した．スルホン体セグメントを *n*-BuLi 処理し，発生したアニオンとアルデヒド体セグメントのカップリング後, 水酸基の酸化, Al-Hg による脱硫, 酸性条件下での脱保護を行い, KODA 類縁体の合成を達成した.

また，KODA は植物により β－酸化されるため，3－位を酸素原子で置換した抗 β－酸化型 KODA 類縁体の合成も合わせて検討する．アルデヒド体セグメントは，1,6-hexanediol を原料とし，合成を行った.




スルホン体セグメント　　アルデヒド体セグメント

1） *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1354-1357, 2013.

9,10-α-ketol-octadecadienoic acid, synthesis, methyl jasmonate

発表番号：4B069
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

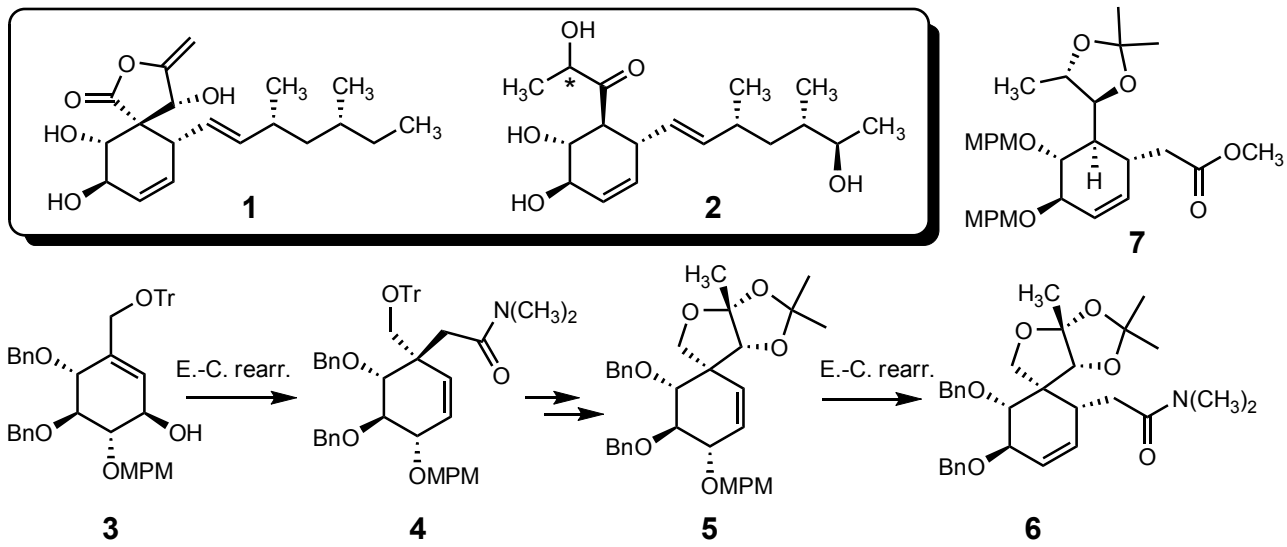
# Spiroleptosphol 類の合成研究

# Synthetic study on spiroleptosphols

○竹田 珠実、高橋 萌子、橋本 勝 (弘大農生)
○Tamami TAKEDA, Moyoko TAKAHASHI, Masaru HASHIMOTO (Hirosaki Univ.)

当研究室で単離した spiroleptosphol 類は、P388 マウス白血病細胞に対し強い細胞毒性を示す。また、スピロ構造を中心に不斉炭素が集中するなど合成化学的にも興味深い化合物群である。我々は、構造が複雑な spiroleptosphol (**1**)及び、立体化学未決定が残る norleptosphol C (**2**, ＊部分）の合成研究を行っている。

グルコースから 17 工程で導いた **3** に Eshenmoser-Claisen 転位を行い **4** とした後、スピロ環構築、カルボニル α 位の水酸基化、及びメチル基の導入を行い、**5** を導いた。MPM 基を除去後、再び Eshenmoser-Claisen 転位により側鎖の手掛かりを導入し **6** を合成した。現在、**6** より、側鎖の導入、スピロ環部の更なる官能基化を検討している。同様な戦略を用いた合成ルートにより **7** の合成にも成功している。ポスターでは **7** の **2** への変換についてもあわせて報告する。




1 ) T. Murakami, M. Hashimoto *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 492-495 (2009).
2 ) T. Murakami, M. Hashimoto *et al*., *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **19**, 1122-1125 (2009)

total synthesis, Claisen rearrangement reaction, glucose

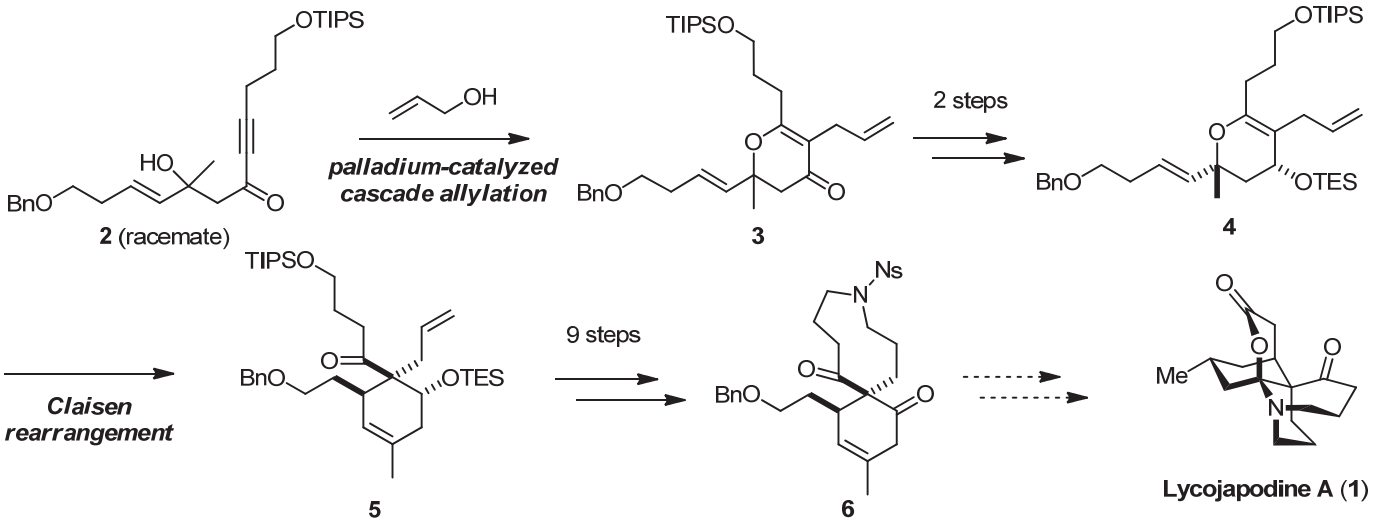
発表番号：4B070
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# Synthetic Study on Lycojapodine A through palladium-catalyzed cascade allylation and Claisen rearrangement

○Wenyu Huang, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki (Nagoya Univ.)

Lycojapodine A (**1**), a novel *Lycopodium* alkaloid, was isolated from the club moss *Lycopodium japonicum* by Zhao and co-workers in 2009.[1] Lycojapodine A (**1**) exhibited anti-HIV-1 activity and inhibitory activity against acetylcholinestrease. Due to the unique structure as well as its biological importance, we embarked on the synthesis of **1**.

In the previous presentation,[2] we reported synthesis of ynone **2** from commercially available 3-butyn-1-ol in 9 steps (Scheme 1). In this time, we succeeded in the synthesis of azaspirocyclic diketone **6** though two key reactions; palladium-catalyzed cascade allylation and Claisen rearrangement. Final transformations are currently underway.




**Scheme 1.** Synthetic route towards lycojapodine A (**1**).

## References

1. Zhao, Q.-S. *et al. Org. Lett.* **2009**, *11*, 1397.
2. Huang, W.-Y.; Nakazaki, A.; Nishikawa, T. Annual Meeting of JSBBA (2014), 2A07p17.

Natural Product Synthesis, Cascade allylation, Claisen Rearrangement

発表責任者：黄　文宇（huang.wenyu@e.mbox.nagoya-u.ac.jp）

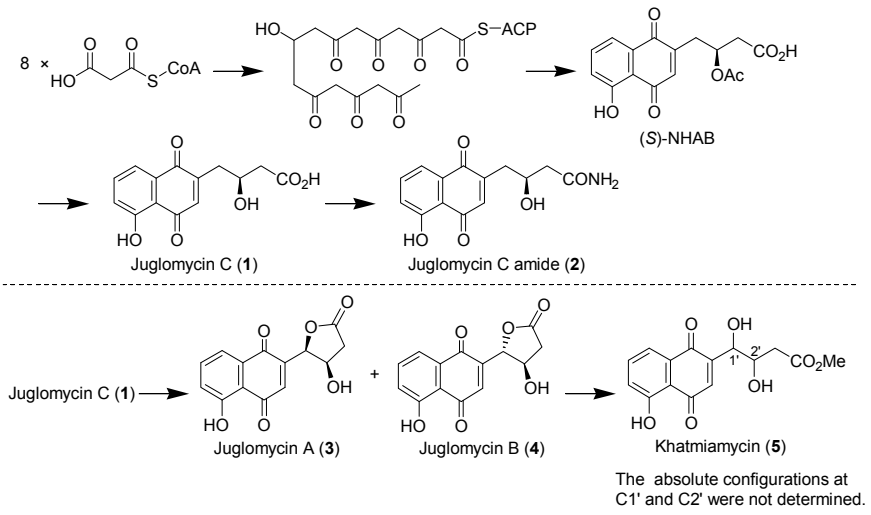
発表番号：4B071
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 1,4-ナフトキノン天然物群の系統的合成法の開発

# A systematic synthesis of natural 1,4-naphthoquinones.

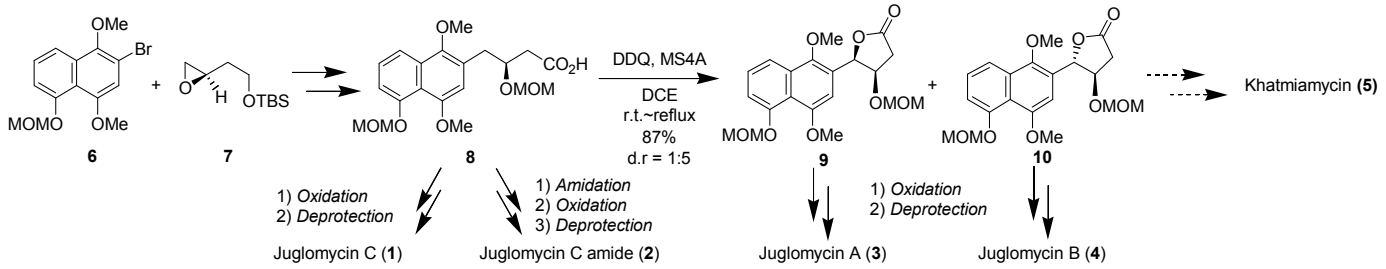
○吉岡 快、加茂 翔伍、倉持 幸司、椿 一典（京都府大院生命環境）
○kai YOSHIOKA, syougo KAMO, kouji KURAMOCHI, kazunori TSUBAKI (Kyoto Prefectural Univ.)

【目的】1,4-ナフトキノン天然物である Juglomycin 類 (**1** ~ **4**) は放線菌 *Streptomyces* sp. より単離され、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) や大腸菌 (*Escherichia coli* ) などに対する抗菌活性を有する事が知られている (Scheme 1)。しかし、生体内における抗腫瘍活性等の詳細な生物活性については未だ報告されていない。そのためこれら天然物群の系統的かつ網羅的な合成法を確立する事は、詳細な生物活性評価のためのサンプル供給を可能にし、医農薬分野に大きく貢献できると考えられる。これらの天然物は生産菌内で共通中間体である Juglomycin C (**1**) を経由し、順次生産されると考えられている (Scheme 1)。今回我々は Juglomycin 類 (**1**～**4**) の生合成を参考にし、共通の中間体を経由した 1,4-ナフトキノン天然物群の系統的な合成法を開発することを目的として研究を行なった。




**Scheme** 1. Proposed biosynthetic pathway of natural 1,4-naphthoquinones

【方法・結果】臭化ナフタレン **6** とエポキシド **7** から合成した共通中間体 **8** を合成し、天然物 (**1**～**5**) の合成を行なった (Scheme 2)。まず共通中間体 **8** より、官能基変換および酸化と脱保護を施し Juglomycin C (**1**) と Juglomycin C amide (**2**) を合成した。また、**8** に対し分子内酸化的ラクトン形成反応の検討を行なった。酸化剤として DDQ を用いる事により、ラクトン **9** と **10** がジアステレオマー比 1:5 の選択性で得られることを見出した。次いでラクトン **9** と **10** の酸化と脱保護を行ない、Juglomycin A (**3**) と Juglomycin B (**4**) の合成を達成した。現在我々は、**9** もしくは **10** から Khatmiamycin (**5**) への変換と天然物の絶対立体配置の決定について検討を行なっている。




**Scheme** 2. Synthesis of natural 1,4-naphthoquinones

Lactonization, 1,4-naphthoquinones, Total synthesis

発表責任者：吉岡　快（s812310037@kpu.ac.jp）

発表番号：4B072
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

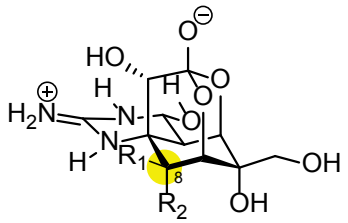
# 8-*epi*テトロドトキシンの合成研究

# Synthetic studies on 8-*epi*tetrodotoxin

○岩瀬 翔太郎、堀田 貴大、安立 昌篤、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Shoutaro IWASE, Takahiro HOTTA, Masaatsu ADACHI, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

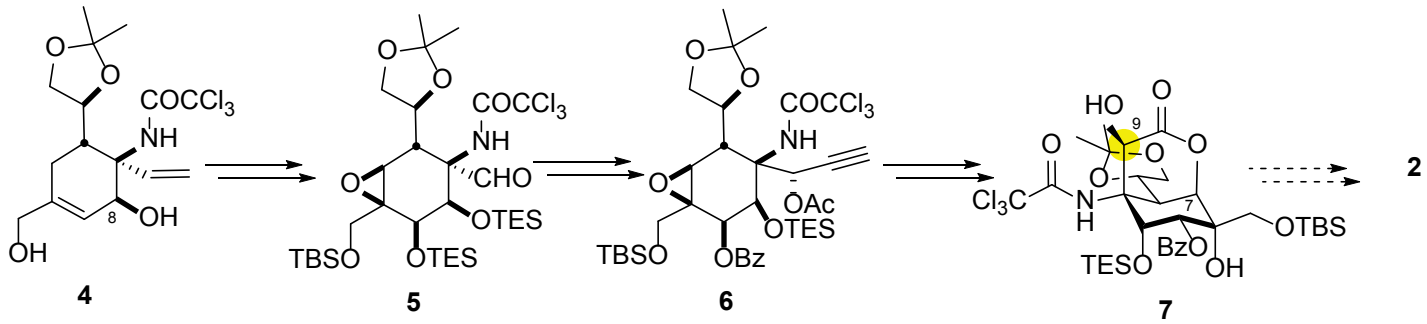
## [目的]

フグ毒テトロドトキシン (TTX, **1**)は、電位依存性 $Na^+$イオンチャネルを強力に阻害することで、その毒性を発現する。近年、天然には存在しない 8-deoxyTTX (**2**)を化学合成したところ、ナトリウムイオンチャネル阻害活性に大幅な低下が見られ、8 位水酸基が阻害能に重要だと明らかになった [1]。そこで、8 位水酸基の立体化学が阻害活性に及ぼす影響を評価するために、まだ天然から単離報告のない 8-*epi*TTX (**3**)の合成を計画した。




## [方法・結果]

当研究室において TTX 類縁体の合成に用いられてきた共通の中間体 **4** [2]は、8 位に望む立体配置の水酸基を初めから備えているため、**4** を出発原料とした。シクロヘキサン上への立体選択的な水酸基とエポキシドの導入及び、ビニル基のオゾン分解を経て、エポキシアルデヒド **5** を得た。このアルデヒドに対し、カルボン酸等価体としてアセチリドの付加を行った。その後、アセチレン部位の酸化的切断によるカルボン酸への変換と続く分子内でのエポキシドの開環によって、ラクトン **6** を合成した。現在は、7 位と 9 位の水酸基の立体反転を検討中である。




4 5 6 7

## [参考文献]

1. Satake, Y.; Adachi, M.; Tokoro, S.; Isobe, M.; Nishikawa, T. *Chem. Asian J.* **2014**, *9*, 1922.
2. Satake, Y.; Nishikawa, T.; Hiramatsu, T.; Araki, H.; Isobe, M. *Synthesis* **2010**, 1992.

natural product synthesis, tetrodotoxin, $Na^+$ ion channels

発表番号：4B073
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 紅茶テアルビジン類の構造解明に向けた茶カテキン類の酸化反応に関する研究

# Oxidation study of tea catechins

○内田 和宏、小川 和樹、柳瀬 笑子 (岐阜大応生)
○Kazuhiro UCHIDA, Kazuki OGAWA, Emiko YANASE (Gifu Univ.)

【目的】紅茶特有の赤色色素であるテアフラビン類は、紅茶を製造する際に茶の生葉中に含まれるカテキン類が酵素の働きにより、酸化的に縮重合することによって生成する。その構造はカテキン類の 2 量体であり、カテキン類の B 環部が酸化的に縮合したベンゾトロポロン骨格を持っている。紅茶中の色素成分としては他に、酸化重合が進んだ高分子であるテアルビジンが存在する。しかし、テアルビジンの構造は現在でも明らかとなっていない。我々はテアフラビンの合成収率の改善のため、反応条件の検討を行ってきた。その過程で EGC に対する EC (**1**)の当量を増加させたところ、HPLC チャート上にいくつかの未知のピークが確認できた。このピークの構造解明がテアルビジンの部分構造を解明する一つのアプローチであると考え、本研究ではテアフラビン合成時に HPLC 上で確認できた未知のピークの構造決定及び **1** の酸化反応物の構造決定を行ったので報告する。

【方法・結果】テアフラビン合成時に得られた HPLC 上のピークが **1** 由来の反応物であるか確かめるため、**1** のみを塩化銅で酸化したところ、同様のピーク **5, 6** が得られた。これらのピークを単離し構造決定を行ったところ、**1** の A 環部と B 環部が結合した 2 量体及び 3 量体であることが明らかとなった。さらに、塩化銅の当量を増加させ反応を行ったところ、先ほどとは異なるピーク **2, 3** が得られた。このピーク **2, 3** を単離し構造決定を行ったところ、先ほどとは異なる **1** の 3 量体であった。得られた化合物の UV スペクトルを測定したところ、**3** 及び **6** には **1** には見られない 300～500nm での吸収を確認できた。これらの色の変化から **3** 及び **6** の構造は紅茶テアルビジンの形成に関わっている可能性が示唆された。

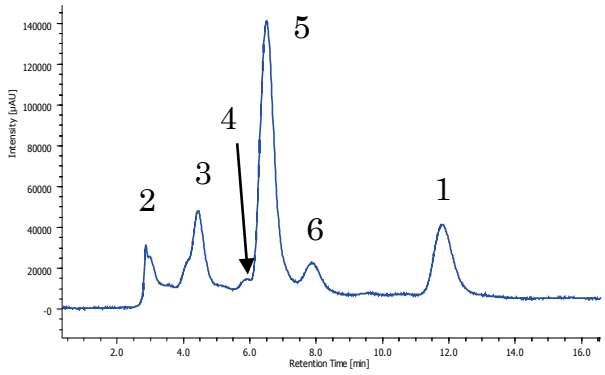


図 1　EC 酸化物の HPLC チャート

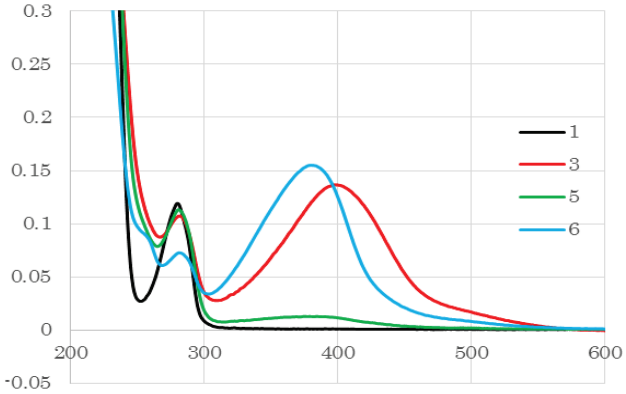


図 2　各サンプルの UV スペクトル

Epicatechin, Theaflavin, Thearubigin

発表番号：4B074
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# (+)-Epogymnolactam の類縁体合成ならびにオートファジー誘導活性評価

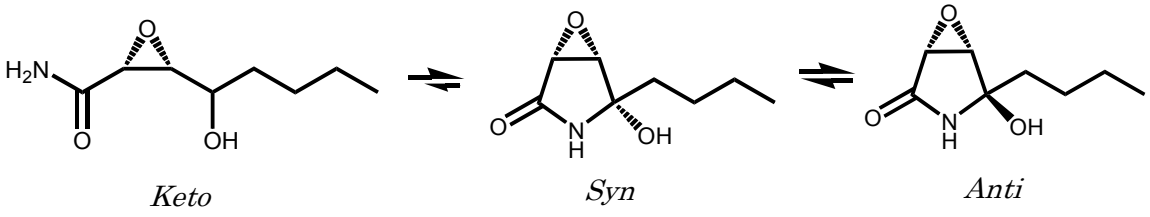
# Synthesis of analogs of (+)-epogymnolactam and evaluation of their autophagy-inducing activities

○上田 一貴[1]、岡戸 祐治[2]、重冨 顕吾[2]、生方 信[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Kazuki UEDA[1], Yuji OKADO[2], Kengo SHIGETOMI[2], Makoto UBUKATA[2] ([1]Hokkaido Univ. school of agriculture, [2]Hokkaido Univ. graduate school of agriculture)

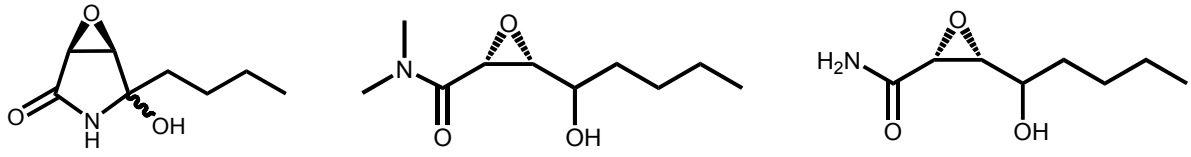
オートファジーとは細胞内成分の自己分解機構のひとつであり、飢餓対応や細胞内環境維持のほか、ガンや神経疾患に関係している。しかし、その詳細な生理機構に関しては未だ明らかとなっていない。そのため、オートファジー誘導もしくは阻害活性を持つ物質は、オートファジーの関与する様々な生理機構の解明に有用であるばかりでなく、将来的に医療の現場での応用の可能性が期待されている。

当研究室において、北海道に自生するモリノカレバタケ属の一種（*Gymnopus* sp.）からオートファジー誘導活性を持つ化合物(+)-epogymnolactam が単離・構造決定された。その構造は直鎖型、*Syn* 型、*Anti* 型の三つで平衡構造となっている。そして、(+)-Epogymnolactam の全合成も当研究室において達成されている。しかし、依然としてオートファジーの詳細な作用機構については明らかになっていない。

本研究では、(+)-epogymnolactam のオートファジー誘導機構解明のための構造活性相関を行うことを目的として、(+)-epogymnolactam の各種類縁体を調製した。現在までに、(+)-epogymnolactam のエナンチオマーである(-)-epogymnolactam を含めた、いくつかの類縁体を調製した。本発表では、各種類縁体におけるオートファジー誘導活性評価について報告する。




(+)-Epogymnolactam と平衡構造



(+)-Epogymnolactam の各種類縁体

autophagy, structure activity relationship, *Gymnopus* sp.

発表番号：4B075
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アミスギタケ子実体形成因子 basidifferquinone 類の光学活性体の合成研究

# Synthetic studies of optically active basidifferquinones inducers of fluting-body formation of *Favolus arcularius*.

○橋村 奏[1]、浦尾 翔太[1]、矢島 新[2]、勝田 亮[2]、額田 恭郎[2] ([1]東農大院農、[2]東農大応生)
○ So HASHIMURA[1], Shota URAO[1], Arata YAJIMA[2], Ryo KATSUTA[2], Tomoo NUKADA[2] ([1]Graduate school of Agriculture, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Faculty of Applied Biosciences, Tokyo Univ. of Agriculture)

*Streptomyces* sp. B-412 より単離された basidifferquinone 類は、*Favolus arcularius*(和名：アミスギタケ)の子実体の不完全形成に関わる化合物群である(Fig.1)[1)]。2009 年、滝川らにより basidifferquinone C のラセミ体全合成が報告されたが、光学活性体の合成はいまだ報告されていない [2)]。Basidifferquinone 類の 1 位の立体化学と生物活性との相関に興味が持たれることから、光学活性体の合成研究を行うこととした。

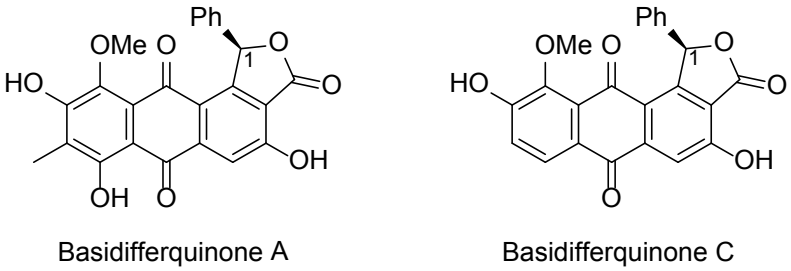
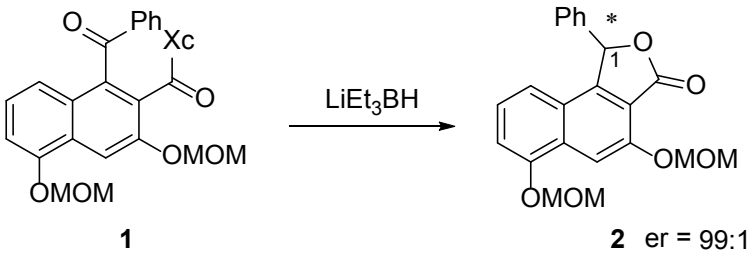



**Figure 1.** Basidifferquinone 類の構造

まず光学活性体の合成経路の確立を目的とし、滝川らの合成中間体であるラクトン **2** の光学活性体の合成を試みた(Scheme 1)。不斉補助基を導入したアシル化体 **1** に対し、$LiEt_3BH$ を用いたジオアステレオ選択的還元により鏡像異性体比 99:1、中程度の収率で 1 位に不斉を有した **2** を合成することができた。




**Scheme 1.** 光学活性ラクトン **2** の合成

現在はこれを用いた basidifferquinone 類の光学活性体の全合成を検討中である。

1) Beppu, T. *et al. Agric. Biol. Chem.* **54**, 1447-1452 (1990).

2) Takikawa, H. *et al. Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 2299-2302 (2009).

synthesis, Basidifferquinones, optically active

発表番号：4B076
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 活性エステル担体を用いたペプチド合成法の構築

# Development of Peptide Coupling with an Active Ester Support

○早川 聡美、岡田 郁、千葉 一裕、北野 克和（東農工大農）
○Satomi HAYAKAWA, Iku OKADA, Kazuhiro CHIBA, Yoshikazu KITANO (Tokyo Univ. of Agric. and Tecnol.)

【目的】

ペプチド化合物はホルモン作用、神経伝達作用、抗菌作用など様々な生理活性作用を持っており、生体内で大きな役割を担っている。また、医薬品や合成甘味料としても用いられ、その有用性から簡便・効率的なペプチド合成法の研究が継続的に行われている。現在、一般的なペプチド合成法として分離精製の面で優れる固相合成法、および反応効率が高い液相合成法が広く用いられているが、これらのペプチド合成法では主に保護アミノ酸が利用されている。しかしながら、保護アミノ酸の利用は保護・脱保護の操作を行う必要があり、また脱保護による廃棄物の産生や保護にかかるコストの面から改善点が存在する。そこで本研究では、*N*-ヒドロキシイミド構造を有する活性エステル担体を足場とした、無保護アミノ酸を用いるペプチド合成法の構築を目指した。具体的には、疎水性部分として長鎖アルキルオキシ基を有するベンゼン環を導入することによって活性エステル担体の溶解度を調整し、①．良溶媒中におけるペプチド結合形成反応、②．分離段階では貧溶媒に置換し活性エステル担体を晶析、という手順を連続的に行うことで無保護アミノ酸を用いたペプチド合成法の検討を行った。

【方法と結果】

疎水性部分として長鎖アルキルオキシ基を複数持つベンゼン環、カルボキシ基活性化構造として *N*-ヒドロキシフタルイミドまたは *N*-ヒドロキシスクシンイミド構造が導入された活性エステル担体を合成した。次に合成した活性エステル担体と Boc アミノ酸の縮合反応の検討を行った。その結果、一般的な縮合剤を用いることによって、Boc アミノ酸が担持された活性エステル担体が得られた。しかしながら、*N*-ヒドロキシスクシンイミドを有する活性エステル担体においては、Boc アミノ酸が担持された化合物は、室温において分解性が高いことが示唆された。従って、ペプチド合成の検討は、*N*-ヒドロキシフタルイミドを有する活性エステル担体を用いて行った。活性エステル担体に Boc アミノ酸が担持された化合物に、塩基性条件下において無保護アミノ酸を反応させた。その結果、求核置換反応によりペプチド結合が形成されジペプチド化合物を得ることが出来た。さらには、得られたジペプチド化合物を用いて同様の反応を行ったところ、トリペプチド化合物の生成が確認された。なお、回収した活性エステル担体はペプチド結合を形成すると同時に元の構造に戻っており、再利用が可能であると示唆された。

peptide coupling, amino acid

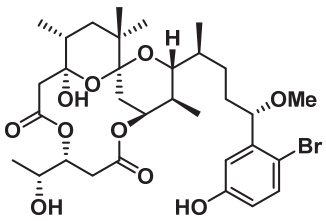
発表責任者：北野克和（kitayo@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：4B077
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# アプリシアトキシンの合成研究

# Synthetic studies on Aplysiatoxin

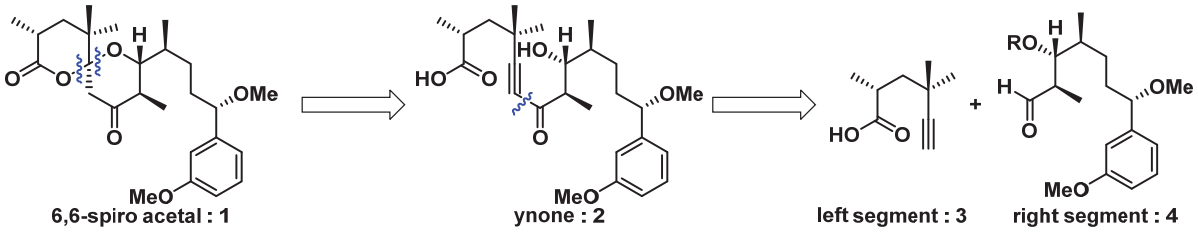
○野倉 吉彦、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yoshihiko NOKURA, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)



Aplysiatoxin (ATX)

【目的】アプリシアトキシン（ATX）は、シアノバクテリアが生産する天然化合物であり、プロテインキナーゼ C（PKC）を活性化し、発がん促進活性を有することが知られている。近年入江らは、ATX の構造を単純化した誘導体の中に、発がん促進活性はなく、がん細胞増殖抑制効果を有する化合物を見出し、注目されている[1]。しかし、ATX は天然から極僅かしか入手できず、また、その複雑で不安定な構造のため、全合成の報告は岸らの一例だけである[2]。そこで本研究では、ATX とその類縁体のより効率的な化学合成法の開発を目指した。

【方法および結果】我々は ATX のコア部分である 6,6-スピロアセタール構造を、イノン **2** の連続する分子内環化反応により構築する計画を立てた。現在、イノン **2** の左側セグメント **3** および右側セグメント **4** の合成を進めており、今後はイノン **2** を合成し、続く環化反応により 6,6-スピロアセタール **1** を合成する予定である。



6,6-spiro acetal : 1　ynone : 2

1) Kikumoto, M.; Yanagita, R. C.; Tokuda, H.; Suzuki, N.; Nagai, H.; Suenaga, K.; Irie, K. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614.
2) Park, P.; Broka, C. A.; Johnson, B. F.; Kishi, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 6205.

aplysiatoxin, natural product synthesis, spiroacetal

発表番号：4B078
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

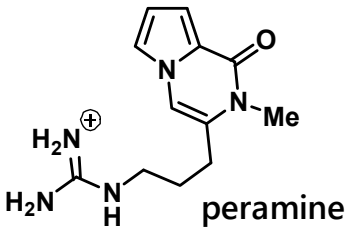
# エンドファイトが産生するアルカロイド、ペラミンの化学合成研究

# Synthetic study on peramine produced by an endophyte

○山本 雄太、西川 俊夫 (名大院生命農)
○Yuta YAMAMOTO, Toshio NISHIKAWA (Nagoya Univ.)

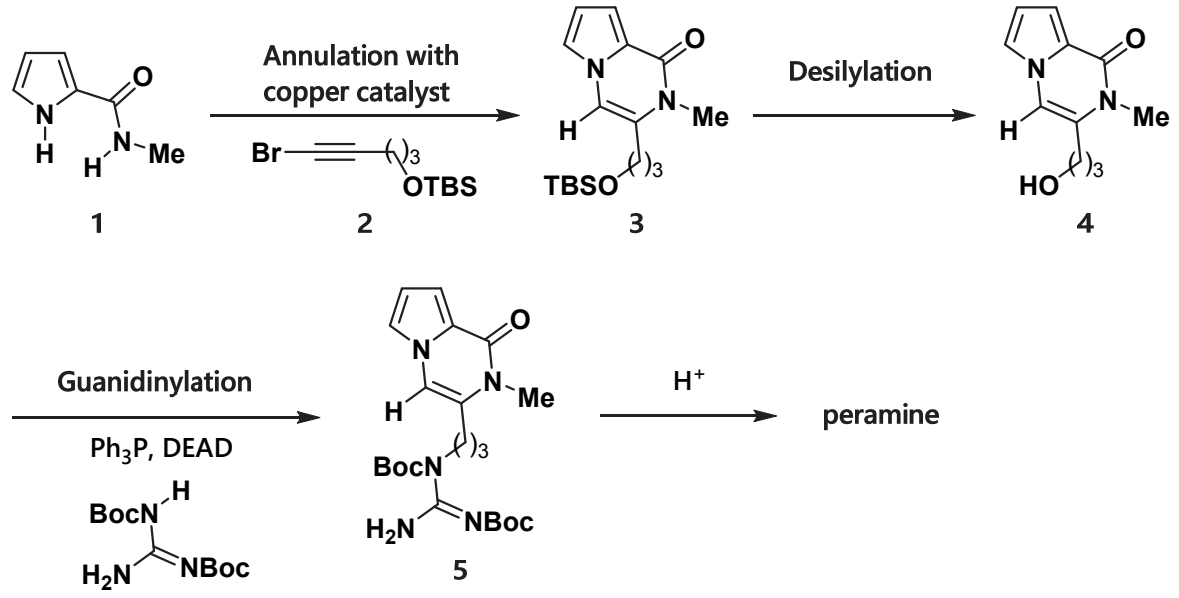
【目的】

エンドファイトは植物に共生し、植物に耐虫性や耐塩性等を付与する微生物である。牧草の一種であるホソムギに共生する *Neotyphodium* 属糸状菌などが知られている。この糸状菌が産生するアルカロイド、peramine は牧草の害虫の摂食阻害及び産卵抑制を引き起こすとされる [1)]。しかし、その詳細は全く研究されていない。我々は peramine の生物活性の詳細とその作用機構を解明すべく、peramine の合成研究を開始した。




【方法・結果】

Peramine の特徴的なピロロピラジン環を、ピロールアミド **1** 及びブロモアセチレン **2** を用いた直接環化により、合成する計画を立てた。条件検討の結果、触媒として銅塩を使うと、ピロロピラジン環をもつ化合物 **3** を一挙に得ることに成功した。化合物 **3** の脱保護、脱保護体 **5** に対し光延反応の条件での diBoc グアニジンの導入により化合物 **6** を得、これを脱保護し peramine の化学合成を達成した。




1）D. D. Rowan *et al*. *J.Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1986**, 935-936.

peramine, endophyte, natural product synthesis

発表番号：4B079
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 炭素環構造を持つユニークな糖 Bradyrhizose の合成研究

# Synthetic Studies of Bradyrhizose, a Unique Carbocyclic Monosaccharide

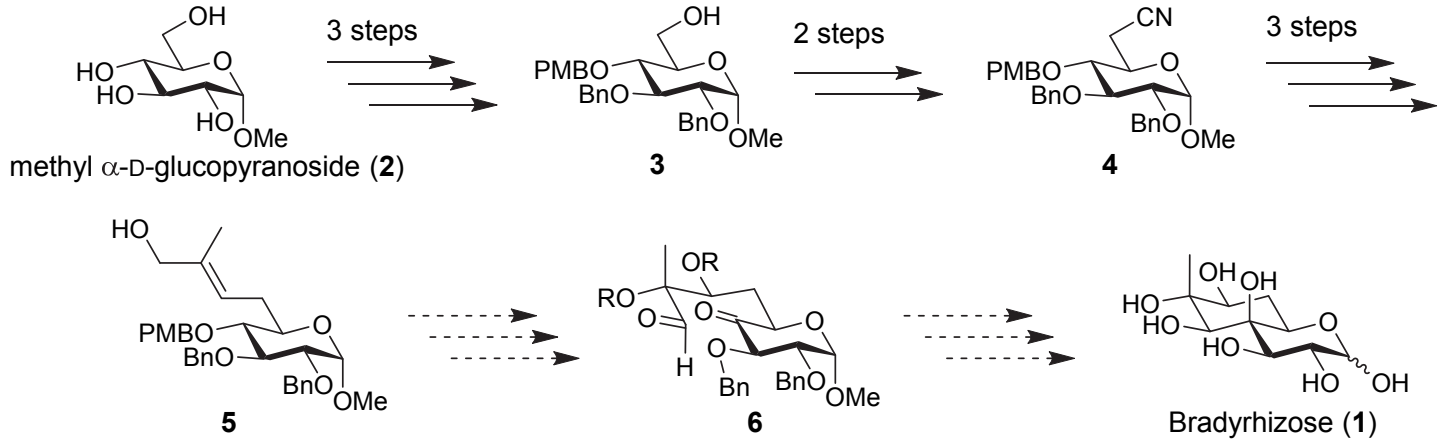
○今野 寛之、松島 芳隆（東京農業大学・生物応用化学科）
○Hiroyuki Konno, Yoshitaka Matsushima (Tokyo Univ of Agriculture, Dept of Applied Biology and Chemistry)

【背景・目的】

Bradyrhizose (**1**)は、2007 年に発見されたマメ科植物 *Aeschynomene indica*（クサネム）に共生する植物根粒菌 *Bradyrhizobium sp.*（BTAi1 株）の細胞壁多糖から単離された新規の糖である [1)]。この糖の機能はほとんど不明であり、また全合成に関しても昨年の 3 月に発表された 1 例のみである [2)]。しかし、その合成は反応ステップ数が多く、非効率的でもある。本研究では分子内 pinacol coupling を鍵反応とした Bradyrhizose の効率的な合成ルートの確立を行うことを目的とする。

【方法・結果】

安価に入手可能な methyl α-D-glucopyranoside (**2**)を出発物質とし、三工程で 2~4 位のヒドロキシ基を選択的に保護することでアルコール **3** を得た。その後、6 位にシアノ基を導入してニトリル **4** とした後、Wittig 反応を含む三工程でアリルアルコール **5** へと変換した。今後は、アリルアルコール **5** から得られるケトアルデヒド **6** の分子内 pinacol coupling の検討を行う予定である。




1) A. Silipo *et al*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12610-12612.
2) W. Li *et al*. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 6964-6967.

carbocyclic monosaccharide, Bradyrhizose, synthesis

発表責任者：松島　芳隆（ym205308@nodai.ac.jp）

発表番号：4B080
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# タグ法による環状ペプチドの効率的な合成方法の開発
# Development of Tag method for cyclic peptide synthesis.

○山上 紗弓理[1]、大神 啓介[2]、藤田 裕子[2]、千葉 一裕[1] ([1]東京農工大学、[2]東京農工大学大学院)
○Sayuri YAMAGAMI[1], Keisuke OGAMI[2], Yuko FUJITA[2], Kazuhiro CHIBA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Graduate school of Tokyo Univ. of Agric. and Technol.)

## 1. 目的

環状ペプチドはその酵素耐性や生物活性の高さから、医薬品や化粧品として幅広く利用されている。環状ペプチドを得る方法としては主に微生物からの単離と化学合成があり、特に化学合成法では大スケールでの合成、アミノ酸配列のデザイン、その他化学修飾が可能な一方で反応時間の長さ、副反応による副生成物の生成などが課題となっている。

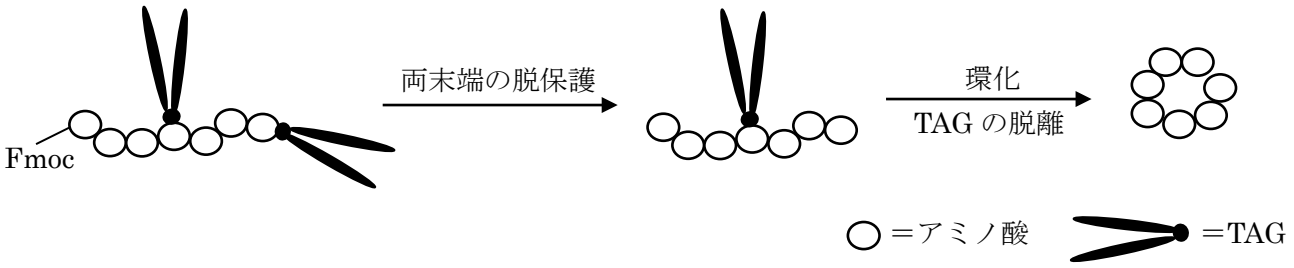
我々はこれまでにベンジルアルコール誘導体を可溶性担体(TAG)として用いた液相ペプチド合成法(TAG 法)を開発し、Head-to-Tail 型環状ペプチドの合成に成功した。しかしこの研究では塩基処理によるエピマー化、反応点近傍の嵩高い TAG による環化反応時の立体障害などの可能性が存在する。そこで本研究では TAG の導入位置、保護基の選択によってこれらの課題を解決し、効率的な環状ペプチド合成法の開発を目的として研究を行った。

## 2. 方法

本法では反応点から離れたペプチド鎖中央に TAG を導入する為にまず N 上に TAG を導入したグリシン（N-TAG-Gly）の合成を行った。次に、C 末端から TAG 法により直鎖ペプチドを合成し、その中央に前述の N-TAG-Gly を導入した。続いて C 末端 TAG と N 末端の脱保護を行い、環化反応に供した。また、反応場の変化が環化反応の効率にどのような影響を及ぼすのかについても検討を行った。

## 3. 結果

直鎖ペプチド合成時に立体障害により進行しにくいと考えられていた C 末端 TAG ペプチドと N-TAG-Gly との縮合反応が効率よく進行することが確認された。また、ペプチド鎖中央に TAG を導入した状態において効率的に環化反応が進行することが確認された。




cyclic peptide, liquid phase synthesis, soluble carrier

発表番号：4B081
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# セルラーゼ反応遷移状態構造解明を目的とする糖アナログの合成研究

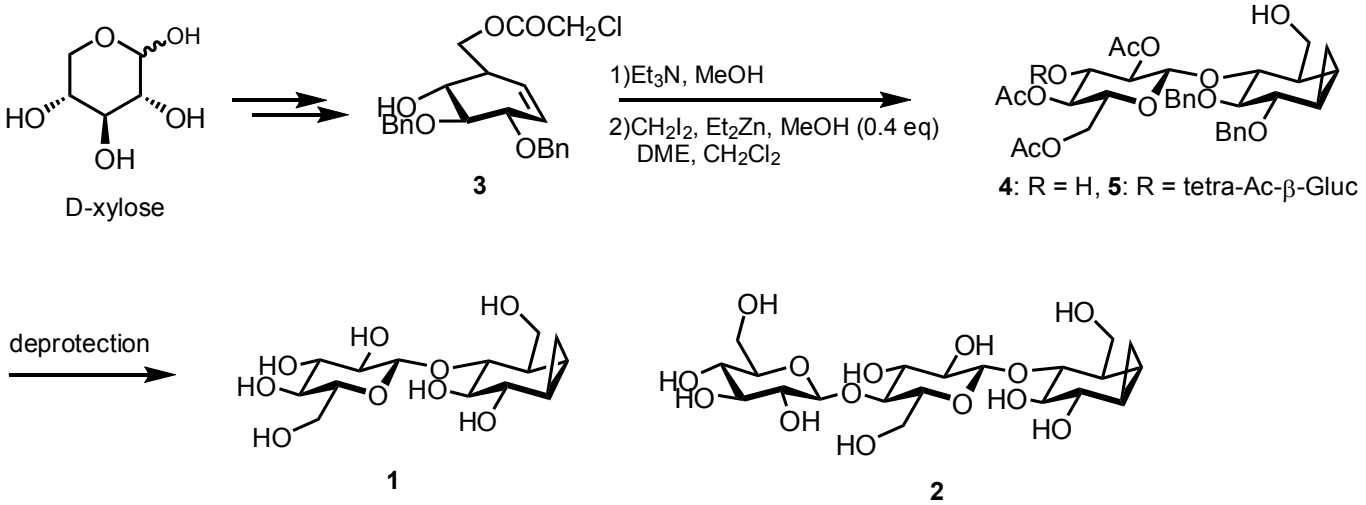
# Synthetic Study on cellulase hydrolysis transition state analogues

○熊谷 郁也、橋本 勝 (弘前大農生)
○Fumiya Kumagai, Masaru Hasimoto (Hirosaki Univ.)

バイオエタノールの製造において、糖質源に可食部を用いることによる食品の物価高騰、農地化による自然破壊などが問題となっている。木材・農業廃棄物中のセルロースを糖質源に用いることでこれら問題の解決が期待できる。本目的には、新たに超天然高活性なセルラーゼミュータントの開発が必須であり、その原子レベルでの機構解明が重要となる。当研究室ではビシクロ[4.1.0]ヘプタン構造とすることでセルラーゼ反応遷移状態を安定配座でミミックすると期待し、セロオリゴ糖アナログの合成を行っている。

キシロースから 4 位遊離のシクロヘキセン誘導体 **3** を合成した。セルロース、及びセロビオースユニットを Schmidt 法により、$\beta$ 選択的に導入後、還元末端相当部 6 位保護基を除去し、当研究室で開発した立体選択的シクロプロパン化反応条件に付したところ、望むシクロプロパン誘導体が満足できる選択性で進行した (**4**: $\alpha$ : $\beta$ = 12:88, **5**: $\alpha$ : $\beta$ = 20:80)。さらに、保護基を除去して、セロビオース誘導体 **1**、セロトリオース誘導体 **2** を得た。

ポスターでは、より収束的な合成ルート開発についても言及する。



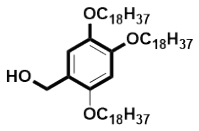

M. Hashimoto, *et al. Biosci. Biotech. Biochem.,* 2011, 75, 1380.
A. Kornienko, *et al. J. Org. Chem.*, 2005, 70, 742.

cellulase substrate analogue, cello-oligomer, stereoselective Simmons-Smith reaction

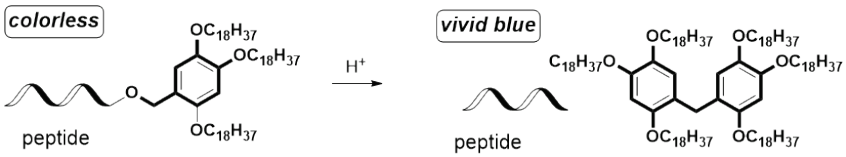
発表番号：4B082
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

液相ペプチド合成を指向した発色機能をもつ疎水性ベンジルアルコール担体の開発
Development of Colorimetric Hydrophobic Benzyl Alcohol Tags for liquid phase peptide synthesis
○若松 弘起[1]、岡田 洋平[2]、菅井 正枝[1]、Esko I. Kauppinen[3]、千葉 一裕[1] ([1]東農工大院農、[2]東農工大院 BASE、[3]Aalto Univ., Finland)
○Hiroki Wakamatsu[1], Yohei Okada[2], Masae Sugai[1], Esko I. Kauppinen[3], Kazuhiro Chiba[1] ([1]Dept. Appl. Bio. Sci., Tokyo Univ. of Agric. and Tech, [2]Tokyo Univ. of Agric. and Tech, [3]Aalto Univ., Finland)

【緒言】可溶性ポリマーを用いた化学合成は，均一状態での迅速な反応と目的物の簡便な分離を可能にしてきた．一般的に，可溶性ポリマーを反応物質や触媒へと導入し，均一状態で反応を行う．反応終了後，ポリマーの沈殿を誘導する相に変換することで，濾過や遠心分離により簡便に目的物を分離することができる．これら可溶性ポリマーを用いた反応を行うためには，ポリマーの溶解性の精密な制御が重要である．特にペプチド合成のような多段階反応では僅かな収率の低下が，全体収率を著しく下げてしまうため，より厳密な制御が求められる．我々の研究室では，疎水性ベンジルアルコールを可溶性担体として用いたペプチドの液相合成法の開発に取り組んできた．本研究では，溶解性や沈殿特性を保持させながら，可溶性担体に新たにマーカー機能を付加することを目的とし，優れた発色特性をもつアルコキシ基の置換配置の探索とその疎水性担体への応用を試みた．
【方法および結果】置換様式の異なるメトキシベンジルアルコールを，疎水性ベンジルアルコール担体のモデルとして探索に用い，担体の解離する酸性条件下において，2,4,5-trimethoxybenzyl alcohol が鮮やかな青色に発色することを確認した．続いて，2,4,5-位に長鎖アルコキシ基をもつ疎水性ベンジルアルコール担体を調整し，酸性条件下において同様の発色特性をもつことを確認した．発表では，新規疎水性ベンジルアルコール担体の発色特性の詳細やそのペプチド合成や定量検定への応用について報告する．



Colorimetric Hydrophobic Benzyl Alcohol tag




【参考文献】
Y. Okada, H. Wakamatsu, M. Sugai, E. I. Kauppinen, K. Chiba, *Org. Lett.*, **2015**, *17*(17), 4264-4267..

Colorimetric tag, Liquid phase peptide synthesis, Quantitative assay

発表番号：4B083
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

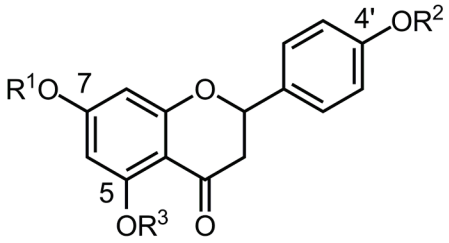
# リパーゼを触媒とする、フラボノイドアセタートの位置選択的脱アセチル化の活用

# Utilization of lipase-catalyzed deacetylation on flavonoid acetates

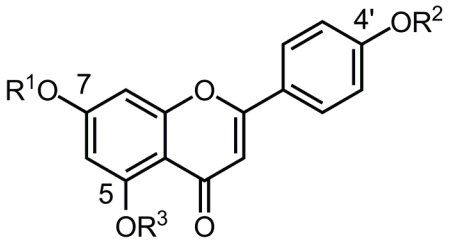
○須貝 威、山下 泰信、花村 駿、マンダル スサンタ、花屋 賢悟、庄司 満（慶應大薬）
○Takeshi SUGAI, Yasunobu Yamashita, Shun Hanamura, Susanta Mandal, Kengo Hanaya, Mitsuru Shoji (Keio Univ.)

我々はナリンギンの全アセチル体をリパーゼでエステル交換すると、フェノール性アセタートのうち立体障害が最少の 4’-位のみで脱アセチル化が進行することを見出している [1]。同じ反応を対応するアグリコンのトリアセタート **1a** に付すと 7-位でも反応が進み、**1b** が主生成物になる。今回、メラニン生合成促進作用を持つアカセチン **2a**、抗カビ作用を示すセリノン **1c** を標的化合物として、リパーゼ触媒の基質および反応条件、さらにアルキル化について検討した。

ロイフォリンの全アセチル体 **2b** にリパーゼを作用させると、4’-位でのみ脱アセチル化が進行し **2c** が生じた。遊離 4’-位をメチル化、残りのアセタートを脱保護した後、酸性条件下、糖部分を加水分解除去して **2a** の合成に成功した。セリノンでは 4’-位に置換したプレニル基が、糖を除去する最終段階の酸性条件で一緒に脱落してしまうので、アグリコン **1a** から出発する必要がある。リパーゼ触媒反応の条件検討により、**1d** を 82%で得ることができるようになった。遊離 4’-位を光延反応でプレニル化、**1c** へ誘導した。アピゲニントリアセタート **2d** では 4’-位の求電子性が上がり、リパーゼを作用させても 7-位は全く反応しない。しかし生成した **2e** の遊離 4’-位メチル化を試みたところ、予期しない転位が併発した。アセチル基を脱保護し、生薬の一種芫花（ゲンカ）に含まれるゲンカニン **2f** が生じていることがわかった。このように、アルキル化の位置選択性の担保にも、配糖体糖鎖は重要な役割を果たしている。




**1a**: $R^1 = R^2 = R^3 = Ac$
**b**: $R^1 = R^2 = H$, $R^3 = Ac$
**c**: $R^1 = R^3 = H$, $R^2$ = prenyl (selinone)
**d**: $R^1 = R^3 = Ac$, $R^2 = H$




**2a**: $R^1 = R^3 = H$, $R^2 = CH_3$ (acacetin)
**b**: $R^1 = (1\beta)GlcAc_3(2,1\alpha)RhaAc_3$, $R^2 = R^3 = H$ (rhoifolin)
**c**: $R^1 = (1\beta)GlcAc_3(2,1\alpha)RhaAc_3$, $R^2 = H$, $R^3 = Ac$
**d**: $R^1 = R^2 = R^2 = Ac$
**e**: $R^1 = R^3 = Ac$, $R^2 = H$
**f**: $R^1 = CH_3$, $R^2 = R^3 = H$ (genkwanin)

1) Sugai, *et al*., *J. Mol. Catal. B: Enz* **2013**, *92*, 14.

lipase, regioselective transesterification, flavonoid

発表責任者：須貝 威（sugai-tk@pha.keio.ac.jp）

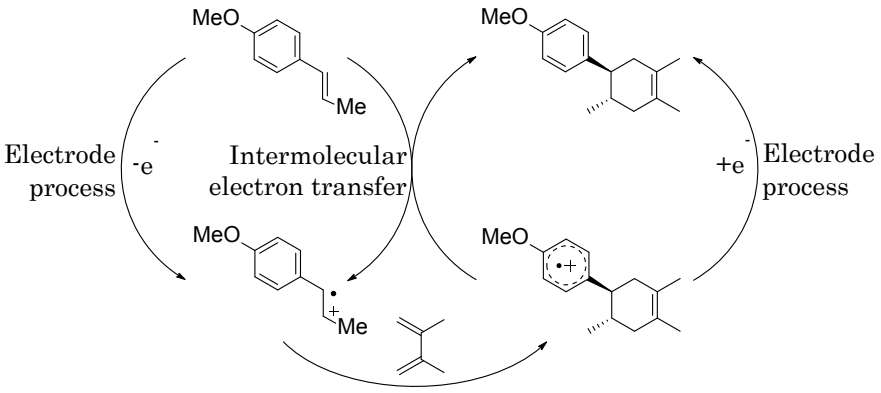
発表番号：4B084
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 電子移動型 Diels-Alder 反応の反応メカニズムに関する研究

# Mechanistic Investigation of Electron Transfer-Induced Diels-Alder Reaction

○尾崎 惇史、山口 勇将、岡田 洋平、北野 克和、千葉 一裕（東農工大院）
○Atsushi OZAKI, Yusuke YAMAGUCHI, Yohei OKADA, Yoshikazu KITANO, Kazuhiro CHIBA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

Diels-Alder 反応では簡便にかつ立体・位置選択的に反応が進行し，六員環の環状化合物を合成することができる．電子密度の高いジエンと電子密度の低いジエノフィルを基質として用いる場合、触媒や加熱により反応が速やかに進行する。また電子密度が高い基質同士を用いる場合，一方の基質を一電子酸化し，対応するラジカルカチオンにすることで，反応を迅速に進める(電子移動型 Diels-Alder 反応)ことも可能である.[1,2] 我々は電極の一電子酸化により誘起される，電子移動型 Diels-Alder 反応の開発を行ってきた. そして電子移動型 Diels-Alder 反応について, 次のような反応メカニズムを我々は提唱している（Scheme 1）. まずトランスアネトール（$E_p^{ox}$ = 1.07 V vs. Ag/AgCl）の一電子酸化により対応するラジカルカチオンが発生する．これは系中の 2,3-ジメチルブタジエン（$E_p^{ox}$ = 1.69 V vs. Ag/AgCl）に捕捉され, 続くトランスアネトールとの分子間電子移動または電極により還元され Diels-Alder 生成物を与える. 本反応は酸化電位の低いジエンも適応可能であり，トランスアネトールに対して, 9-メチルアントラセン（$E_p^{ox}$ = 1.10 V vs. Ag/AgCl）を用いた場合も高収率で生成物を得ることができる．この時，1.0 V (vs. Ag/AgCl)の定電位条件下では両基質とも酸化される可能性があり，複数の反応メカニズムが考えられる.



Scheme 1. Proposed mechanism of electron transfer-induced Diels-Alder reaction

本研究では，電解質溶液中に溶解しないシリカゲルとジエンまたはジエノフィルを共有結合させた基質をそれぞれ用意し，電解反応を行った．これにより電極と固体基質間では電子の授受が行われないため，選択的に一方の基質を酸化させることができる.

発表においては, 電子移動型 Diels-Alder 反応の反応機構を提示し, 結果の詳細について報告する.

1. S. Lin, M. A. Ischay, C. G. Fry, T. P. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 19350.
2. N. L. Bauld, J. T. Aplin, W. Yueh, H. Sarker, D. J. Bellville, *Macromolecules* **1996**, *29*, 3661.

electron transfer-induced Diels-Alder reaction, reaction mechanism, radical cation

発表番号：4B085
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

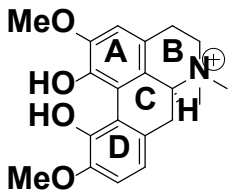
# (+)-マグノフロリンの不斉全合成研究

# Synthetic study toward the asymmetric total synthesis of (+)-Magnoflorine

○石井 亮、一柳 剛 (鳥大農)
○Akira Ishii, Tsuyoshi Ichiyanagi (Tottori Univ.)

【背景・目的】

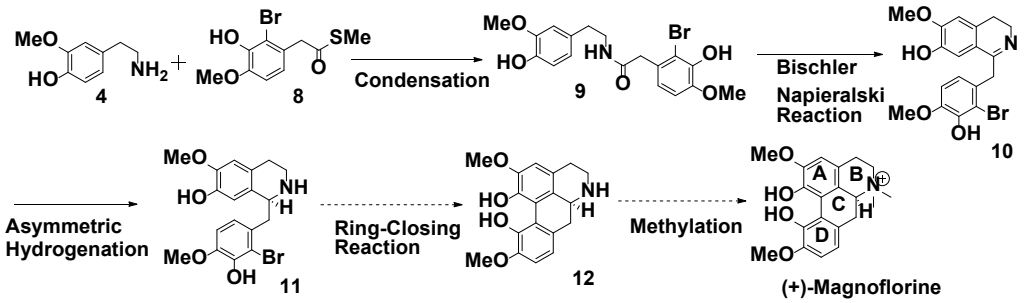
アポルフィンアルカロイドは、ジヒドロイソキノリンを含む連続した 4 環構造を持つ一群の総称である。漢方薬の辛夷の成分の一つとして単離されたマグノフロリン（右図）は中枢神経弛緩作用やヒステリー抑制作用などを示すことが知られ、最近では共同研究者により抗テロメレース活性が見いだされ、医薬品のリード化合物として期待されている。我々はマグノフロリンの作用機構の解明と構造-活性相関を解明することを目指している。本研究では合成化学的手法を用いてマグノフロリンの全合成を試みたので報告する。




**(+)-Magnoflorine**

【方法】

本研究ではバニリンよりフェネチルアミン誘導体 4 を、イソバニリンよりチオエステル体 8 を合成し、それらを縮合した後、Bischler-Napieralski 反応により B 環を構築 10, 不斉水素化反応に引き続き、Ar-Ar カップリング反応によりアポルフィン骨格を構築する経路での合成を試みた。




【結果】フェネチルアミン誘導体 4、チオエステル体 8 を良好な収率で合成した。縮合反応では塩基性条件下、チオフェノールを活性化剤として用いて化合物 9 を得、続く Bischler-Napieralski 反応により収率 37%でパパベリン誘導体 10 を得た。水素化ホウ素ナトリウムでイミンを還元した。現在不斉水素化還元を行っており、パラジウム触媒を利用したカップリング反応によるアポルフィン骨格合成と併せて報告する。

aporphine, asymmetric synthesis, magnoflorine

発表責任者：一柳剛（yanagi@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：4B086
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 臭化オキサノルボルナジエンを利用した多置換安息香酸誘導体の合成

# Convenient Synthesis of Differentially-functionalized Benzoic Acid Derivatives by Using 1-Bromo-7-oxanorborna-2,5-dienes

○池田 安裕[1]、園田 素啓[1]、篠原 広幸[2]、早金 直哉[2]、小川 昭弥[2]、谷森 紳治[1] ([1]阪府大院生命環境、[2]阪府大院工)

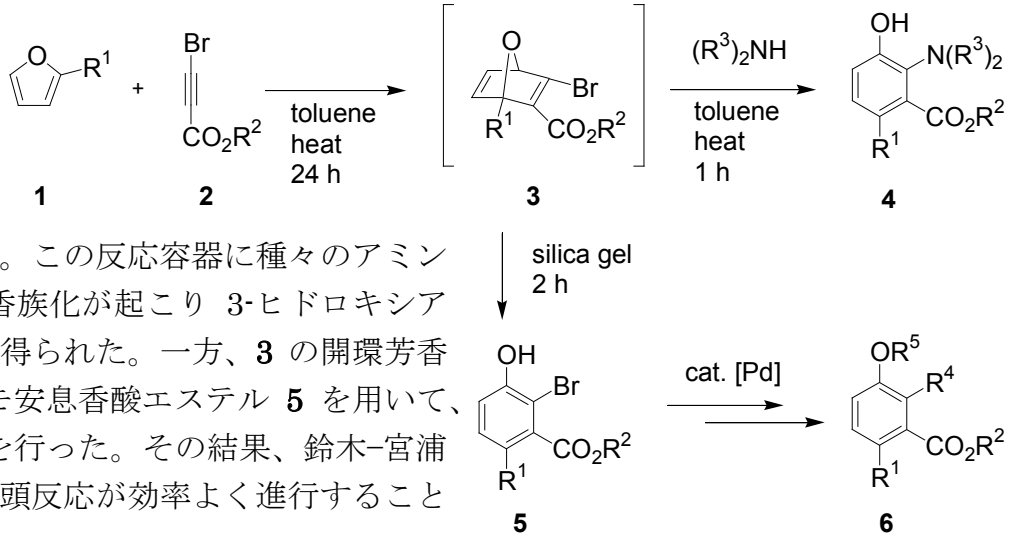
○Ayu IKEDA[1], Motohiro SONODA[1], Hiroyuki SHINOHARA[2], Naoya HAYAGANE[2], Akiya OGAWA[2], Shinji TANIMORI[1] ([1]Grad. Sch. of Life and Env. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Grad. Sch. of Engineering, Osaka Pref. Univ.)

【諸言】

ベンゼン環上に異なる官能基を有する多置換芳香族化合物は、医薬品・有機機能材料・高分子材料など様々な有用物質を構成する重要なビルディングブロックの一つである。多官能性ベンゼンの合成は従来、ベンゼンまたはハロゲン化ベンゼンを出発物質として、Friedel–Crafts 反応や触媒的クロスカップリング反応などを段階的に行って置換基を導入する方法が一般的である。しかし、多段階過程による収率の低下・廃棄物の増加などの問題が生じるほか、先に導入した置換基の電子的ならびに立体的要因により置換基の導入反応の反応性や位置選択性も影響を受ける。一方当研究室では、非平面のオキサノルボルナジエン誘導体を利用して、その開環芳香族化による多置換ベンゼンの簡便な合成法の開発を行っている。本研究では、五員環ヘテロ芳香族化合物と臭化アルキンとの Diels–Alder 反応により生成する臭化オキサノルボルナジエンを利用して、アミンとの反応によるヒドロキシアントラニル酸誘導体の合成について検討を行った。また、臭化オキサノルボルナジエンの開環芳香族化によって得られる臭化ベンゼンを原料として、パラジウム触媒クロスカップリング反応による更なる官能基化についても検討を行った。

【実験方法と結果】

まず、2-アルキルフラン **1** とブロモプロピオル酸エステル **2** をトルエン溶媒中、加熱して臭化オキサノルボルナジエン **3** を得た。この反応容器に種々のアミンを添加したところ、開環芳香族化が起こり 3-ヒドロキシアントラニル酸エステル **4** が得られた。一方、**3** の開環芳香族化によって得られるブロモ安息香酸エステル **5** を用いて、触媒的クロスカップリングを行った。その結果、鈴木–宮浦反応やヘック反応、および薗頭反応が効率よく進行することが明らかとなった。




1) Sonoda, M. Tanimori, S. *et al. Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5302–5305; *ibid.* **2015**, *56*, 2500–2503.

7-oxanorborna-2,5-diene, Diels-Alder, Cross-coupling

発表責任者：園田素啓（sonoda@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4B087
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア B

# 花芽誘導物質 LDS1 構造要求性の解明

# Synthesis of LDS1 and Its Structurally Related Compounds with Flower-Inducing Activity towad Lemna Plant

○山田 優作[1]、土屋 諒[2]、廣住 操俊[1]、佐藤 浩平[1]、鳴海 哲夫[1]、戸田 三津夫[1]、大西 利幸[2,3]、間瀬 暢之[1,3]、渡辺 修治[1,4] ([1]静大工、[2]静大農、[3]静大グリーン研、[4]静大創造科学技術大学院)

○Yusaku YAMADA[1], Ryo TSUCHIYA[2], Ayatoshi HIROZUMI[1], Kohei SATO[1], Tetsuo NARUMI[1], Mitsuo TODA[1], Toshiyuki OHNISHI[2,3], Nobuyuki MASE[1,3], Naoharu WATANABE[1,4] ([1]Faculty of Engineering, Shizuoka University, [2]Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [3]Research Institute of Green Science and Technology, [4]Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University)

【目的】

低分子花芽誘導物質の合成は植物生理学的研究だけでなく、農産物の開花調節への応用面でも期待されている。本研究室では、アオウキクサ（*Lemna paucicostata*）の乾燥処理によって生成する花芽誘導分子(11*E*,15*Z*)-9,13-dihydroxy-10-oxooctadeca- 11,15-dienoic acid（**1**, LDS1）を発見した。LDS1 は 10 nM という低濃度でアオウキクサに対して花芽誘導を示す。LDS1 の構造要求性に関する知見を得るために、LDS1 構造改変体合成に着手した(Fig. 1 )

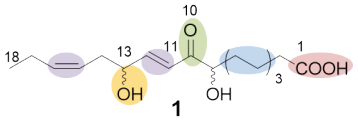



**Figure 1.　新規花芽誘導分子 LDS1**

【方法】

LDS1 は 5 種類の官能基、炭素直鎖の長さ及び脂溶性が花芽誘導活性に関与していると考え、LDS1 における構造要求性を解明するために、13 位水酸基、11 位二重結合、11 位、15 位の二重結合の欠損体、10 位カルボニル還元体、炭素鎖短縮体、および、1 位カルボン酸メチルエステル等の構造改変体の合成に着手した。

【結果】

合成が完了している 13 位水酸基欠損体の、1 位側の炭素鎖を短縮することで脂溶性を LDS1 に近似させた化合物(**5a-5c**)を合成し、その花芽誘導活性を精査した。近似した脂溶性を有する化合物(**5a-5c**)で花芽誘導試験をしたところ、いずれも花芽誘導活性を示さなかった。また、13 位水酸基欠損体の 10 位カルボニル基を還元したジオール体(**6**)においても花芽誘導活性を示さないことが明らかとなった(Fig. 2)。したがって、水酸基の位置、数が花芽誘導活性に重要であると考えられる。さらなる知見を得るため LDS1 の水酸基位置異性体を合成中である。その花芽誘導活性検討結果についても報告する。

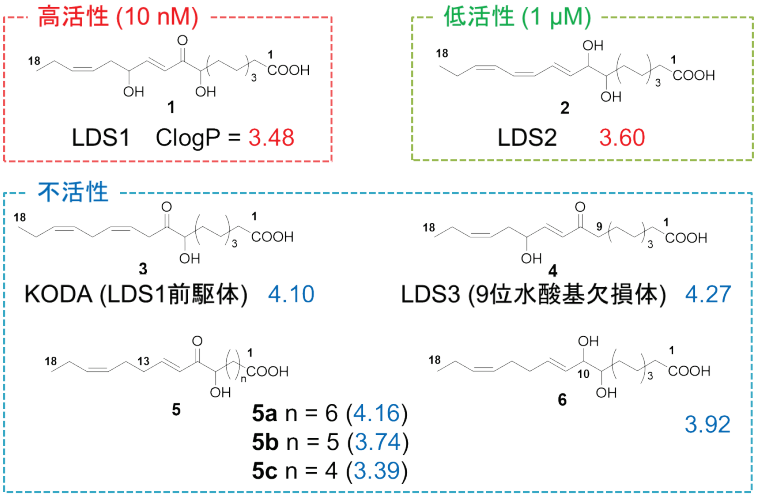



**Figure 2.　構造改変体一覧**

Relationship, Synthesis, FlowerInducing Activity

発表番号：4C001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# ジャガイモ由来抗菌ペプチド snakin-1 の安定的な発現・精製系の構築と NMR による構造解析

# Overexpression and NMR structual analysis of an antimicrobial peptide snakin-1 derived from potato

○山野 めぐみ、神谷 昌克、熊木 康裕、菊川 峰志、出村 誠、相沢 智康 (北大理)
○Megumi YAMANO, Masakatsu KAMIYA, Yasuhiro KUMAKI, Takashi KIKUKAWA, Makoto DEMURA, Tomoyasu AIZAWA (Hokkaido Univ.)

【背景】抗菌ペプチド snakin-1（SN1）はジャガイモの塊茎に存在し、63 個のアミノ酸残基から構成され、12 個のシステインがジスルフィド結合を形成し、植物に対して病原性を有する糸状菌等に対して強い活性を持つことが知られている。相同性の高いペプチドが植物に広く存在することが報告されているが、立体構造や作用機序には未知の点が多い。抗菌ペプチドの遺伝子組換え調製においては、目的ペプチドを封入体として発現することにより、プロテアーゼの分解、宿主細胞への毒性を防ぐ手法が広く用いられているが、SN1 においては通常の大腸菌発現系では封入体の形成が不安定であり、試料調製が困難であることが明らかになっている。そこで、封入体形成能の高いパートナータンパク質の共発現により封入体化を促進する手法[1, 2]を用いることで、SN1 の発現・精製量の向上を目的とした検討を進めた。さらに得られた組換えペプチドを用いて、NMR 法による構造解析を目指した。
【方法・結果】封入体形成能の高いパートナータンパク質として、ヒト *α*ラクトアルブミンを選択し、T7 プロモーターを用いて、大腸菌株 BL21(DE3)を宿主として、SN1 との共発現を行うことで、単独での発現と比較して封入体形成量の向上が確認された。得られた封入体を回収し、尿素により変性可溶化、陽イオン交換クロマトグラフィーより精製し、透析により巻き戻しした後、逆相 HPLC で精製し最終的な収量を比較すると、共発現の効果により数倍の収量の向上が確認された。得られた組換え SN1 は天然由来のものと同等の抗菌活性を保持しており、CD スペクトル、NMR スペクトルの比較からも正しくフォールディングしていることが確認された。また、構築した発現系を利用することで、安定同位体標識試料の調製を行い、三重共鳴実験により効率的に SN1 の信号帰属を進めることが出来た。現在、帰属結果を元に立体構造の決定を進めている。

[1] S. Tomisawa *et al.*, *AMB Express.*, **3**, 45 (2013)
[2] S. Tomisawa et al., *Protein Expr. Purif.*, **112**, 21 (2015)

snakin-1, antimicrobial peptide, coexpression

発表責任者：相沢　智康（aizawa@mail.sci.hokudai.ac.jp）

発表番号：4C002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# R13A5.9 のシナプス小胞と初期エンドソームへの局在
# Localization of R13A5.9 in synaptic vesicles and early endosomes

○對馬 駿弥、辻 俊祐、小栗栖 太郎、坂田 和実 (岩手大学)
○Toshiya TSUSHIMA, Syunsuke TSUJI, Taro OGURUSU, Kazumi SAKATA (Iwate Univ.)

線虫 *C.elegans* 遺伝子 *R13A5.9* は膜タンパク質と推定されるアミノ酸配列をコードしている。配列の類似度の高いホモログが哺乳類にも存在する。突然変異体は運動速度が低下し、産卵数が減少する。線虫のシナプスにおける神経伝達物質の放出や(Ogurusu *et al*. (2015) BBRC 463:994-998)腸からの卵黄タンパク質の分泌に必要と推定している。R13A5.9 の分泌への寄与を検討するため、蛍光タンパク質（GFP および RFP）との融合タンパク質の発現部位を解析した。変異体に R13A5.9::GFP を発現させたところ、運動速度や産卵数が回復した。超音波により破砕後、低速遠心で沈降する分画より GFP 抗体と反応するタンパク質がウエスタンブロット法により検出された。これらの結果は、融合タンパク質は機能を保持しており、配列から予想されるように膜タンパク質であることを示唆する。蛍光顕微鏡による観察では、シナプス小胞マーカである SNB-1::RFP と重複する場所に検出され、シナプスにおける発現が示された。腸においては、卵黄タンパク質 YP170::RFP を取り囲む網目状の分布が基底膜直下で観察された。同時に多波長の蛍光の観察が可能なレーザー共焦点顕微鏡により分泌に関与する膜系への存在を検討した。初期エンドソームマーカーRAB-5::RFP と R13A5.9::GFP の蛍光強度の散布図は腸および神経で 0.4～0.5 の相関係数を示し、弱い相関が示された。ゴルジマーカー F58H1.3::RFP と R13A5.9::GFP の蛍光強度の散布図は神経では-0.3～-0.4 の相関係数を示し、腸では-0.16～0 の相関係数を示し、正の相関が認められなかった。リサイクルエンドソームマーカー RAB-11::RFP と R13A5.9::GFP の蛍光強度の散布図は腸で-0.1～0 の相関係数を示し、正の相関が認められなかった。シナプス小胞マーカーの SNB-1::GFP と R13A5.9::RFP の蛍光強度の分布は神経で 0.5～0.7 の相関係数を示し、中程度の正の相関が検出された。卵黄タンパク質 YP170::GFP と R13A5.9::GFP の蛍光強度の散布図は腸で 0.1～0.4 の相関係数を示しほとんど相関がなかった。これまでのところ、腸内で強い相関（局在）を示す膜系を検出できていない。最近の研究で、腸内のクラスリン非依存性初期エンドソーム由来のリサイクルエンドソームは網目状に分布することが報告された。R13A5.9 も腸内で網目状に分布するので、このタイプのリサイクルエンドソームに局在している可能性が考えられる。

R13A5.9, exocytosis, localization

発表責任者：小栗栖　太郎（ogurusu@iwate-u.ac.jp）

発表番号：4C003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# ソテツ由来抗菌ペプチド Cy-AMP1 の X 線結晶構造解析

# X-ray crystal structure analysis of Cy-AMP1, an antimicrobial peptide from the cycad Cycas revoluta

○永田 宏次[1]、神谷 知貴[1]、横山 勢也[2]、南 雄二[2]、田之倉 優[1]([1]東大院農生科、[2]鹿児島大農)
○Koji NAGATA[1], Tomoki KAMIYA[1], Seiya YOKOYAMA[2], Yuji MINAMI[2], Masaru TANOKURA[1]
([1]UTokyo, [2]Kagoshima U.)

【背景と目的】抗菌ペプチドは様々な病原菌の感染に対する自己防御のために機能する重要な物質である。動物、植物、微生物に広く分布し、獲得免疫系を持たない生物においても生体防御系として働くことが知られている。多くの抗菌ペプチドが単離、配列解析されているが、その抗菌作用の分子機構は未だに解明されていないものが多い。Cy-AMP1 はソテツ（*Cycas revoluta*）の種子由来の抗菌ペプチドであり、44 アミノ酸残基からなり、4 対のジスルフィド（SS）結合を有する。真菌、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌のいずれに対しても抗菌活性を示す[1]。キチン結合性を失った Cy-AMP1 の点変異体のいずれも真菌に対する抗菌活性のみ低下し、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌に対する抗菌活性は変わらないことが示されている[2]。本研究では X 線結晶構造解析により Cy-AMP1 の立体構造を決定し、Cy-AMP1 の立体構造と抗菌活性に重要な部位とを結びつけ、抗真菌活性、抗グラム陽性細菌活性、抗グラム陰性細菌活性、それぞれの分子機構を明らかにすることを目的とした。
【方法】結晶化に用いる Cy-AMP1 は大腸菌を宿主として発現した組換え体を用いた。多段階の精製により得られた Cy-AMP1 を用いて抗菌活性試験と結晶化を行った。X 線回折実験は SPring-8 にて、結晶構造解析は Phenix および CCP4 に含まれるソフトウェアを用いて行った。
【結果と考察】Cy-AMP1 の柱状結晶から分解能 1.3 Å の X 線回折データを取得し、空間群 *C*2、格子定数 $a = 34.2$, $b = 32.8$, $c = 41.1$ Å, $\beta = 90.7°$と決定した。Cy-AMP1 とアミノ酸配列相同性 39%の小麦胚芽アグルチニンのキチン結合ドメインの結晶構造（PDB: 1WGC の残基番号 79－118）をモデルとし、分子置換法により構造解析を行い、$R = 16.0\%$, $R_{free} = 21.1\%$まで構造精密化した。この Cy-AMP1 の結晶構造から SS 結合は Cys5-Cys10, Cys11-Cys30, Cys21-Cys36, Cys29-Cys43 であると決定した。Cy-AMP1 分子は N 末端側のアミノ酸配列もフォールドも独特なドメインと C 末端側のキチン結合ドメインとから構成されていた。非対称単位中に Cy-AMP1 が 1 分子とそれに結合した 5 糖または 6 糖からなるオリゴ糖の電子密度が観測された。このオリゴ糖は Cy-AMP1 のキチン結合ドメインの疎水性表面に結合しているが、ファンデルワールス相互作用だけではなく、Cy-AMP1 の Ser31 や Tyr42 の側鎖水酸基とオリゴ糖中の *N*-アセチルグルコサミン（キチンの構成成分でもある）の水酸基との間に水素結合も形成されており、Cy-AMP1 によるキチン認識機構を反映していると推測される。

[1] Yokoyama, S. *et al.* (2008) *Peptides* **29**, 2110-2117.
[2] Yokoyama, S. *et al.* (2009) *J. Peptide Sci.* **15**, 492-497.

antimicrobial peptide, Cycas revoluta, X-ray crystallography

発表責任者：田之倉　優（amtanok@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4C004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 麹菌由来の両親媒性タンパク質 ハイドロフォービンの物性解析

# Physicality analysis of hydrophobin: amphipathic protein derived from *Aspergillus oryzae*

○安藤 祐人、中野 宏軌、陶山 友彰、廣木 寛之、石倉 幹大、中島 春紫（明治大農）
○Yuto ANDO, Hiroki NAKANO, Tomoaki SUYAMA, Tomoyuki Hiroki, Kandai ISHIKURA, Harushi NAKAJIMA (Meiji Unv.)

ハイドロフォービンは、糸状菌・担子菌が生産する両親媒性の分泌タンパク質であり、気液界面において自己集合し、強固な重合体を形成する。特徴的なパターンで保存された 8 つの Cys 残基を有するが、アミノ酸配列の相同性は低く、多様な機能が見い出されている。一方、ビールの泡の吹き出し現象（beer gushing）を引き起こす原因物質としても知られ、バイオサーファクタント・乳化剤としての利用など、さまざまな応用利用が期待されている。

これまでに筆者らは、黄麹菌 *Aspergillus oryzae* のハイドロフォービン *AoHypA～D* について解析を行っており、気中菌糸または分生子に部位特異的に発現することを明らかにしている。本研究では、麹菌 *A. oryzae* ゲノムよりさらにハイドロフォービン遺伝子を単離するとともに、近縁の *A. kawachii, A. wentii, A. sydowii* よりハイドロフォービン遺伝子を単離した。一般にハイドロフォービンは強い吸着性のため大量生産・精製が困難である。筆者らは独自に高生産の麹菌宿主を構築し、各種のハイドロフォービン遺伝子を発現させることにより生産・精製したハイドロフォービンについて物理化学的な性質の比較・検討を行ったので報告する。

hydrophobin, biosurfactant, *Aspergillus oryzae*

発表番号：4C005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# Cleaved 型病原性ニューロセルピン変異体 S49P の X 線結晶構造解析
# The crystal structure of the cleaved form of pathogenic neuroserpin variant S49P

○久留宮 綾人[1]、津田 美代子[1]、山崎 正幸[2]、恩田 真紀[1] ([1]大阪府立大学理学系研究科、[2]龍谷大学農学部)
○Ayato Kurumiya[1], Miyoko Tsuda[1], Masayuki Yamasaki[2], Maki Onda[1] ([1]Osaka Pref. Univ., [2]Ryukoku Univ.)

【目的】ニューロセルピンは主に大脳から分泌されるセルピン(serine protease inhibitor スーパーファミリーに属する蛋白質群)で、生理機能はtPA(tissue-type plasminogen activator)の阻害である。ニューロセルピンのS49P変異体はポリマー化しやすく、これが脳内に蓄積すると認知症を発症する。S49P変異はポリマーのリンケージ部分にあり、この変異近傍の構造を決定する事はポリマーの伸長機構を明らかにする上で重要である。しかし、セルピンのポリマーは非常に不安定であり、結晶化は極めて困難である。そこで、ポリマーのリンケージ部分と酷似した構造を持ち、かつポリマーよりも安定で結晶化の実績が多いCleaved型（セルピンが標的プロテアーゼを阻害する際に生じる熱安定な分子種）に着目し、これのX線結晶構造解析を行うことで、変異が分子構造に与える影響を明らかにすることを試みた。
【方法・結果】mis-foldingしやすいS49Pは、いかなるホストを用いた発現系でも可溶性画分から得ることは非常に困難であった。そこでS49Pを大腸菌で発現させて封入体画分から取得し、我々が開発したLong-time refolding法(日本農芸化学会2015年度大会で報告済)を用いることで、Native型S49Pの大量調製に成功した。得られたNative型S49Pを、標的プロテアーゼであるtPAで限定加水分解し、Cleaved型S49Pを調製した。得られた結晶をSpring-8にてX線回折測定をしたところ、分解能1.9Åのデータを得ることに成功し、Cleaved型S49Pの構造を決定した。
【考察】Cleaved 型 S49P の構造と、野生型ニューロセルピンの Cleaved 型の構造（PDB code：3F02）を重ね比較した。その結果、分子全体に大きな違いは見られなかったが、変異近傍では野生型の Ser49 は His338、Leu389 と水素結合を形成しているのに対し、変異体の Pro49 はどちらとも水素結合を形成していなかった。Ser49、His338 はセルピンにおいて非常に保存性が高く、セルピン分子の安定性やポリマー化に関与する The shutter region H-bond network を形成する残基である。S49P では、このネットワークが壊れていることが今回得た構造から明らかとなった。また、野生型の His338 の方が、分子内部のコアとより強く相互作用していることもわかった。これらの事から、S49P の β-シート A は野生型のそれに比べて剥がれ易いと考えられる。この結果は、S49P のポリマーが野生型のそれに比べ不安定であることや、S49P の Latent 型(自己ループ挿入による安定型)がポリマー化するという既存の研究と合致する。

serpin, neurodegradation, crystal structure

発表番号：4C006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア C

# 生物進化過程におけるタンパク質の安定性の役割

# The role of protein stability in evolutional process

○倉橋 亮、佐野 智、高野 和文（京府大生命環境）
○Ryo KURAHASHI, Satoshi SANO, Kazufumi TAKANO (Kyoto Pref. Univ.)

【背景・目的】好熱菌は進化系統樹において生命の起源の近傍に位置し、Archaea と Bacteria の両ドメインに広く存在している。好熱菌のタンパク質は熱に対して安定であるが、その熱安定化機構は Archaea と Bacteria によって 2 つに分類される。Archaea のタンパク質は、分子内部を安定化させる機構であるのに対し、Bacteria のタンパク質は、分子表面を安定化させる機構に基づいている。さらに、こうした安定化機構の違いにより、Archaea タンパク質は Bacteria タンパク質に比べて、変異を受容して活性を向上させる力(Evolvability)を有していることが明らかとなってきた。このように、タンパク質の安定性は進化における重要な因子として考えられているが、進化過程におけるその役割はまだよく理解されていない。

そこで本研究では、好熱性 Archaea タンパク質である Sulfolobus tokodaii 由来エステラーゼ（Sto-Est）を用いた進化実験を行う。タンパク質の安定性に着目し、安定性を保持した変異体と損失した変異体を進化させながら、活性変動を観測することにより、進化過程における安定性と活性の関係を調べ、タンパク質の進化における新たな知見の獲得を目的とした。

【結果・考察】

第一世代において、WT と比較して、活性が上昇した変異体と低下した変異体が得られた。活性が低下した変異体のうち、安定性を保持した変異体を第三世代まで進化させると、WT と同等の活性まで回復した変異体を得た。一方、安定性を大きく損失した変異体を進化させたところ、活性が上昇した変異体は得られず、全ての変異体でさらに安定性は低下した。この結果から活性が低下した変異体が再び復活するには、安定性の寄与が必要不可欠であるということが示唆された。次に、第一世代で活性が上昇した変異体において、安定性を保持した変異体と少し低下した変異体を並行して進化させると、ともに活性が上昇した変異体を得たが、全体的に安定性を損失した変異体は、保持した変異体と比べて活性は低かった。この結果から、安定性を保持した変異体の方が、更なる進化を遂げる可能性が高いと考えられる。安定性を損失した変異体において、WT の半分以上の安定性を保持していないと、活性が上昇した変異体を得ることは難しいということが分かった。本実験によって、安定性は進化過程において必須因子であることが示唆された。タンパク質が有害な変異に耐えて、より良い機能を得るためには、一定の安定性を保持している必要があると考えられる。生物においても、進化過程における長時間の変異の蓄積に耐えるためには、タンパク質の安定性が必要不可欠であったと考えられる。

evolution, protein stability, esterase

発表責任者：倉橋亮（rkcancion@gmail.com）

発表番号：4D001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 D-スレオニンアルドラーゼの酵素学的諸性質と結晶化

# Characterization and Crystallization of D-Threonine Aldolase from the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*

○平戸 祐喜[1]、後藤 勝[2]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,3] ([1]日大理工、[2]東邦大理、[3]日大短大)
○Yuki Hirato[1], Masaru Goto[2], Mayumi Oda[1], Minoru Tanigawa[1], Katsushi Nishimura[1,3] ([1]Nihon Univ., [2]Toho Univ., [3]Nihon Univ. Junior college)

【目的】

細菌以外の生物においては D-アミノ酸に積極的な存在意義はないものと考えられてきた。しかし，遊離型の D-セリンが脳内 NMDA レセプターのコアゴニストとして働くことが発見される等，真核生物における D-アミノ酸の役割が注目されている。

われわれは，緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) が D-アラニン耐性を有することとアラニンラセマーゼ活性を示すことを見出した。そこで，*C. reinhardtii* の推定アラニンラセマーゼ遺伝子を大腸菌内で発現させたところ, その遺伝子産物はアラニンラセマーゼではなく D-スレオニンアルドラーゼ (DTA) 活性を示した。DTA は主に D-スレオニンのグリシンとアセトアルデヒドへの分解を触媒する酵素であり，真核生物における DTA の報告例はない。

本報告では，緑藻 *C. reinhardtii* における D-アミノ酸代謝の意義や DTA の構造と性質を検討することを目的として，*C. reinhardtii* の DTA の酵素学的諸性質および結晶化について述べる。

【方法及び結果】

*C. reinhardtii* の DTA 遺伝子情報をもちいて, 大腸菌のコドンに最適化した遺伝子 (*dta'*) を合成し，pET41b に挿入後，*E. coli* BL21 (DE3) に導入した。得られた形質転換体の無細胞抽出液から，硫酸アンモニウム分画および DEAE-Sepharose と MONO Q カラムクロマトグラフィーによって DTA を精製した。500 µL の酵素反応溶液 (100 mM HEPES buffer, pH 8.1, 5 mM D-スレオニン, 50 µM PLP, 100 µM $MnCl_2$, 200 µM NADH, 13.3 U Alcohol dehydrogenase, 3.8 µL 酵素試料) を 50℃で 3 分間インキュベートし，340 nm における吸光度の減少より，DTA 活性を算出した。

D-スレオニンを基質としたときの DTA の比活性は 7.0 U/mg，$K_m$ および $K_{cat}$ はそれぞれ 0.43 mM, $2.1 \times 10^4$ $s^{-1}$ であった。D-*allo*-スレオニンに対しては，D-スレオニンの約 4 倍の比活性を示した。L- および L-*allo*-スレオニンを基質としたときには, 活性は検出されなかった。耐熱性を調べたところ, 50℃で 3 時間のインキュベート後の残存活性は 90%であり，最適温度は 60℃であった。$Mn^{2+}$, $Co^{2+}$, $Ni^{2+}$, $Mg^{2+}$の添加によって酵素活性は増加し，金属キレート試薬によって活性は著しく阻害された。

結晶構造解析を目指し精製 DTA の結晶化を検討した。沈殿剤にポリエチレングリコールや 2-メチルペンタン-2，4-ジオール等を用いてハンギングドロップ法で結晶化を行ったところ，板状結晶が確認された。現在，結晶化条件の最適化を試みている。

D-Threonine aldolase, D-Amino acid, Chlamydomonas reinhardtii

発表責任者：平戸祐喜（whiteautumnsiki@gmail.com）

発表番号：4D002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 由来 Serine Racemase の遺伝子クローニング

# Cloning of Serine Racemase from the Green Algae *Chlamydomonas reinhardtii*

○小池 美弥[1]、平戸 祐喜[1]、小田 真弓[1]、谷川 実[1]、西村 克史[1,2] ([1]日大理工、[2]日大短大)
○ MIYA KOIKE[1], YUKI HIRATO[1], MAYUMI ODA[1], MINORU TANIGAWA[1], KATSUSHI NISHIMURA[1,2] ([1]Nihon Univ., [2]Nihon Univ. Junior college)

【目的】

D-アミノ酸は細菌の細胞壁以外に存在しないものと考えられていたが, 近年の分析技術の進歩により, 微生物, 植物, 下等動物, 哺乳類など様々な生物体内に多様な遊離 D-アミノ酸が存在することが明らかにされ, それら D-アミノ酸の生理的役割について研究が進められている。

緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) は, 葉緑体の遺伝子発現や機能, 鞭毛の構築と運動性, 概日時計等の基礎的な生物学的プロセス解析のモデル生物である。当研究室において, *C. reinhardtii* が D-Ser 等の D-アミノ酸に対して耐性を示すことを明らかにしてきた[1)]。また *C. reinhardtii* のゲノム中に動物のセリンラセマーゼと相同性が高い遺伝子が存在することが明らかになった。

本研究では, 緑藻 *C. reinhardtii*における D-アミノ酸代謝の意義や, 酵素タンパク質の立体構造と生理的役割の解明を目的として, *C. reinhardtii*のセリンラセマーゼの遺伝子クローニングを行った。

【方法及び結果】

*C. reinhardtii* より抽出した mRNA を用いて First strand cDNA を合成し, それを鋳型としてセリンラセマーゼ遺伝子 (*ser*) を増幅した。増幅産物をベクター pChlamy_1/D-TOPO® へ挿入し, 得られたプラスミド pChlamy_1/D-TOPO®/*ser*を用いて *Escherichia coli* DH10Bを形質転換した。この大腸菌よりプラスミドを抽出し, 挿入した *ser*のシーケンスを解析しその配列を決定した。エレクトロポレーションを用いてプラスミド pChlamy_1/D-TOPO®/*ser*を *C. reinhardtii* に導入し, ハイグロマイシン耐性により染色体に *ser* が組み込まれた株を選抜した。

*C. reinhardtii*の *ser* の配列をもとに大腸菌のコドンに最適化した遺伝子 (*ser'*) を合成し, pET41bに挿入した。得られたプラスミド pET41b/*ser'*を*E. coli* BL21 (DE3) に導入した。

現在, *C. reinhardtii*の組換え体(+*ser*)及び大腸菌の組換え体 (pET41b/*ser'*) を培養し, セリンラセマーゼ及び D-セリンデヒドラターゼの活性を調べている。

1) 2015年度日本農芸化学会大会二重作 和宏等

Serine Racemase, D-Amino Acid, Chlamydomonas reinhardtii

発表番号：4D003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Isoleucine 2-epimerase ホモログ遺伝子をもつ乳酸菌の D-アミノ酸生産

# D-Amino acids productions of lactic acid bacteria containing a homologous gene of isoleucine 2-epimerase

○牟田口 祐太、春日 和、小嶋 郁夫（秋田県大生資）
○Yuta MUTAGUCHI, Kano KASUGA, Ikuo KOJIMA (Akita Pre. Univ.)

【背景・目的】

イソロイシン 2-エピメラーゼ（Ile 2-E）は、L-イソロイシンと D-アロイソロイシン間の異性化反応及び非極性アミノ酸のラセミ化反応を触媒する新規酵素である。これまでに、Ile 2-E は乳酸菌 *Lactobacillus otakiensis*、*Lactobacillus buchneri* に見出されており、これらの乳酸菌の D 型分岐鎖アミノ酸の生産に関与していると考えられている。Ile 2-E ホモログ遺伝子は γ-アミノ酪酸アミノ基転移酵素やアセチルオルニチンアミノ基転移酵素推定遺伝子として乳酸菌に広く分布しており、多くの乳酸菌が D 型分岐鎖アミノ酸を生産している可能性がある。しかし、乳酸菌における D 型分岐鎖アミノ酸の生理機能や生産分布についての知見は殆どない。本研究では、Ile 2-E ホモログ遺伝子に着目し、乳酸菌における D 型アミノ酸の生産性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

Ile 2-E ホモログ遺伝子をゲノム DNA 中にコードする乳酸菌について、MRS 培地にて定常期まで培養を行い、培養液上清中の D-アミノ酸を分析した。D-アミノ酸の分析は、*N*-isobutyryl-L-cysteine と *o*-phthaldialdehyde によって DL-アミノ酸をジアステレオマー蛍光誘導化した後、ODS カラムを用いた逆相クロマトグラフィーによって行った。

【結果】

Ile 2-E ホモログ遺伝子はゲノム中でクラスターを形成する遺伝子によって二種類に大別される。一方はコハク酸セミアルデヒド脱水素酵素推定遺伝子や *N*-アセチルグルタミン酸キナーゼ推定遺伝子とクラスターを形成し、もう一方はアミノ酸膜輸送タンパク質推定遺伝子とクラスターを形成する。この知見を踏まえて、本研究結果を見ると、前者の Ile 2-E ホモログ遺伝子をもつ乳酸菌では D 型分岐鎖アミノ酸の生産は確認されなかった。一方、後者の Ile 2-E ホモログ遺伝子をもつ乳酸菌のほとんどが、D 型分岐鎖アミノ酸を生産していた。例外として、*Lactobacillus plantarum subsp. plantarum* JCM 1149 は後者の Ile 2-E ホモログ遺伝子をもつにもかかわらず、D 型分岐鎖アミノ酸の生産は確認されなかった。現在、*L. plantarum subsp. plantarum* JCM 1149 の Ile 2-E ホモログ遺伝子の機能を解明するために、該当遺伝子をクローニングし、発現タンパク質の酵素学的機能解析を行っている。

D-Amino acid, Lactic acid bacteria, Epimerase

発表番号：4D004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# PGC1α を過剰発現させた骨格筋における代謝変動の網羅的解析

Omics analysis of metabolic change in skeletal muscle overexpressing PGC1α

○畑澤 幸乃[1,2]、妹尾 奈波[3]、三浦 進司[3]、亀井 康富[1] ([1]京都府立大学、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]静岡県立大学)

○Yukino HATAZAWA[1,2], Nanami Senoo[3], Shinji Miura[3], Yasutomi Kamei[1] ([1]Kyoto Prefectural University, [2]Research Fellow of the Japan Society for the Promotion of Science for Young Scientists, [3]University of Shizuoka)

骨格筋は、運動や栄養素代謝のみならずヒトの健康に重要な組織である。転写共役因子である PGC1α は、運動トレーニングによって骨格筋での発現量が増加する。演者らは、これまでに PGC1α を骨格筋特異的に過剰発現させた PGC1α-Tg マウスにおいて、骨格筋の遅筋化と持久力の向上を確認している。本研究では、PGC1α-Tg マウスの骨格筋の代謝変化を、遺伝子発現および代謝産物の網羅的変化の観察により明らかにすることを試みた。

マイクロアレイ法により、PGC1α-Tg マウスの骨格筋において分岐鎖アミノ酸（BCAA）代謝が亢進していることが示唆された。さらに、PGC1α-Tg マウスの骨格筋において BCAA 代謝酵素の遺伝子発現及びタンパク質発現が増加したことを確認した（Hatazawa et al. PLOS ONE 2014)。

さらにメタボローム解析により、PGC1α-Tg マウスの骨格筋中の低分子代謝物、特に水溶性代謝物の変動を検討した。その結果、TCA 回路の代謝産物のレベルが増加していた。そして、TCA 回路の基質となりうる BCAA やβ-アラニンを含むアミノ酸のレベルが顕著に減少していた。さらに運動時に活性化することが知られているプリンヌクレオチド回路とアスパラギン酸ーリンゴ酸シャトルの代謝産物のレベルが増加した。これらの結果から、PGC1α がアミノ酸を含む様々な基質を利用して TCA 回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された(Hatazawa et al. PLOS ONE 2015)。

一方、このメタボローム解析において PGC1α-Tg マウスの骨格筋ではβアミノイソ酪酸（BAIBA)、γアミノ酪酸（GABA)、セロトニンの量が顕著に増加していた。最近、運動時の骨格筋において BAIBA が分泌され、白色脂肪組織を褐色化してエネルギー消費を増加させるという報告がなされている（Cell Metab 2014)。BAIBA、GABA、セロトニンなどは、PGC1α-Tg マウスの骨格筋から分泌され、他臓器に影響を及ぼす新たなマイオカインである可能性が示唆される。すなわち、運動による生活習慣病改善等の臓器間相互作用の効果を説明する新たな機序であるかもしれない。

metabolome analysis, skeletal muscle, amino acid

発表番号：4D005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

植物における環状アミノ酸ピペコリン酸生合成酵素の解明
Characterization of Pipecolic acid biosynthesis in plants
○松田 達也[1]、三宅 良磨[2]、川端 潤[2]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大院農、[2]三菱化学科学技術研究センター)
○ Tatsuya MATSUDA[1], Ryoma MIYAKE[2], Hiroshi KAWABATA[2], Yukihiro SUGIMOTO[1], Masaharu MIZUTANI[1] ([1]Kobe Univ., [2]Mitsubishi Chemical Group Science and Technology Research Center)

環状アミノ酸であるピペコリン酸 (PipA)やその水酸化体は医薬品合成中間体となる有用化合物である。医薬品の開発および製造において PipA を完全な光学活性体として供給することは極めて重要であり、古くから環状アミノ酸合成の研究が行われてきた。我々はクワやハマエンドウなどいくつかの植物種にリジン由来の環状アミノ酸 PipA および PipA の 5 位が水酸化された 5-ヒドロキシピペコリン酸 (5-OH-PipA)が豊富に蓄積していることに着目した。しかし、これらの植物における PipA および 5-OH-PipA の生合成に関わる酵素はほとんど明らかになっていなかった。そのため、L-Lys から 5-OH-PipA までの生合成経路の解明を目的とした。シロイヌナズナの *agd2-like defense response protein1* (*ald1*) 変異株では内生 PipA の欠損により病原菌抵抗性が低下し、アミノ基転移酵素をコードする *ALD1* は PipA 生合成に関わることが示唆されたが、その酵素活性は明らかとなっていない[1)]。植物における 5-OH-PipA 生合成経路では、L-Lys が脱アミノ化および閉環して中間体である Δ[1]-piperideine-2-carboxylate (PipC2) となり、続いてイミン還元酵素によって PipA へ変換され、さらに 5 位が水酸化されて 5-OH-PipA へ変換されると推定されている。そこで PipA 水酸化酵素を探索するにあたって、まず PipA 生合成の解析を行なった。本研究では、シロイヌナズナから ALD1 をクローニングし、組換え酵素の機能解析を行い、また、クワおよびハマエンドウにおいても ALD1 ホモログの機能解析を行った。
シロイヌナズナ ALD1（AtALD1）の配列情報を利用して AtALD1 cDNA を単離した。大腸菌発現用ベクターpCold に AtALD1 を挿入し、大腸菌 BLR 株を用いて組換え酵素の発現を行った。得られた組換え酵素を用いて L-Lys を基質に *in vitro* アッセイを行った。PipC2 の検出が困難なため、さらに、大腸菌発現系で発現させた *Pseudomonus putida* 由来の PipC2 還元酵素 (dpkA)[2)]を ALD1 酵素反応溶液に加えた ALD1-dpkA カップリングアッセイの結果、PipA を検出した。これにより AtALD1 が L-Lys を PipC2 に変換する活性を確認した。またクワ ALD1 ホモログ (MaALD1)でも同様の活性を確認した。現在は PipA 生合成の次の反応である PipC2 の還元に関わるイミン還元酵素の探索を行なっている。

1) Navarova et al., Plant Cell 24: 5123 (2012)
2) Muramatsu et al., JBC 280: 5329 (2005)

pipecolic acid, aminotransferase, lysine

発表責任者：水谷正治（mizutani@gold.kobe-u.ac.jp）

発表番号：4D006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Pseudomonas putida* 由来 L-メチオニン γ-リアーゼ変異酵素を用いた L-ホモシステイン定量法の開発

# Determination of L-homocysteine using L-methionine γ-lyase mutant from *Pseudomonas putida*

○安田 江里[1]、福本 充樹[1]、湯之戸 俊介[2]、根本 理子[1]、田村 隆[1]、佐藤 暖[2]、原田 繁春[2]、稲垣 賢二[1]([1]岡山大院・環境生命、[2]京工繊大院・応生)
○Eri YASUDA[1], Mitsuki FUKUMOTO[1], Syunsuke YUNOTO[2], Michiko NEMOTO[1], Takashi TAMURA[1], Dan SATO[2], Shigeharu HARADA[2], Kenji INAGAKI[1] ([1]Okayama Univ., [2]Kyoto Institute of Technology)

【目的】*Pseudomonas putida* 由来 L-メチオニン γ-リアーゼ(MGL)は補酵素としてピリドキサール 5'リン酸(PLP)を持ち, 主に L-Met とその誘導体のα, γ-脱離反応, L-Cys とその誘導体のα, β-脱離反応を触媒する[1, 2]。中でも特に L-Met と共に L-ホモシステイン(L-Hcy)を良い基質とする。この L-Hcy のヒト血中濃度は, 心筋梗塞や脳梗塞, 認知症, 骨粗鬆症などに関わっているという報告があり注目されている。その為, 生体試料中の L-Hcy 濃度を定量することは医療的観点から重要である。しかし, 簡便で高精度の血中 L-Hcy 濃度定量法の確立は未だ不十分であるのが現状である。そこで, 変異酵素を用いた簡便で正確な L-Hcy 酵素定量法の確立を目的として実験を行った。
【方法】活性測定は, MBTH 法により生成するα-ケト酸の量を測定することで行った。変異酵素の作製は部位特異的変異導入法によって行った。【結果】MGL と基質(L-Met, L-Hcy)の複合体の X 線結晶構造解析から, Gln349 残基が基質のα-カルボキシル基と相互作用していることが分かった。この情報を基に MGL_Q349A 変異酵素を作製したところ, 野生型 MGL と比較して L-Met に対する活性が大きく減少したが L-Hcy に対する活性は保持した為, この残基に変異を導入することで基質認識機構に影響を与えることができる可能性が示唆された。そこで, より L-Hcy に対する特異性が高い MGL 変異酵素を得ることを目的として, 新たに 10 種類の MGL 変異酵素を作製した。その結果, 野生型 MGL と比較して L-Hcy に対する活性が増加し L-Met に対する活性は減少した MGL_Q349S 変異酵素を得ることができた。そこで, この MGL_Q349S 変異酵素によって触媒される L-Hcy 分解産物の定量を行うことで, L-Hcy 濃度の定量を試みた。サンプル中の L-Met の影響を除くことを目的として, L-Hcy を基質とした時の分解産物である硫化水素を定量するメチレンブルー吸光度法を用いた。その結果, 15 μM L-Hcy サンプル中に終濃度 50 μM となるよう L-Met を添加した時, L-Hcy の回収率は約 100%となり, L-Met による影響を除くことができた。また, L-Hcy の検量線を 0-200 μM の間で直線的に得ることができた。

1) Kudou, D., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 72, 1722-1730 (2008)
2) Fukumoto, M., *et al*., *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 76, 1275-1284 (2012)

L-methionine γ-lyase, L-homocysteine, amino acid determination

発表責任者：稲垣賢二（kinagaki@okayama-u.ac.jp）

発表番号：4D007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 非海洋性細菌由来ネオアガロビオース加水分解酵素の諸性質検討と遺伝子解析

# Enzymatic Characterization and Gene Identification of a Neoagarobiose Hydrolase Derived from a Non-Marine Bacterium

○樫村 佳奈、渡辺 輝彦、小林 慶一、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Kana KASHIMURA, Teruhiko WATANABE, Keiichi KOBAYASHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】ネオアガロビオースは保湿性や美白作用を有する機能性二糖であり [1]、ネオアガロビオース生成型のβ-アガラーゼによる効率的生産が可能である [2]。しかし、ネオアガロビオース加水分解酵素 (EC 3.2.1.159; NAH) やその遺伝子についての研究例は極めて少ない。演者らは、アガロースを唯一の炭素源として生育可能な非海洋性の好アルカリ性細菌 *Cellvibrio* sp. WU-0601 由来の NAH [3]に関して、遺伝子クローニングと組換え酵素の諸性質検討を行い、NAH をコードする遺伝子の周辺領域を解析した。

【方法および結果】寒天を炭素源として培養した WU-0601 株の無細胞抽出液から 4 段階の工程を経て、NAH 比活性が無細胞抽出液の 24.3 倍となるまで精製した [3]。精製 NAH は SDS-PAGE 分析で分子量 42 kDa の単一バンドを示した。また、ゲル濾過クロマトグラフィーでは 83 kDa を示したことから、NAH はホモ二量体酵素と考えられる。反応最適 pH は 6.0、最適温度は 25°C であった。また、精製 NAH の N 末端アミノ酸配列に基づいて遺伝子クローニングを行った。当該酵素遺伝子は 1092 bp の遺伝子領域から成り、364 個のアミノ酸残基 (推定上 40.8 kDa) をコードしていた。さらに、NAH 遺伝子の上流 9 kb と下流 8 kb の周辺領域解析を行ったが、α-およびβ-アガラーゼ遺伝子は存在せず、寒天分解に関わる酵素群がクラスターとして存在するわけではないことが示唆された。一方、大腸菌 *Escherichia coli* BL21 を宿主として当該酵素遺伝子を異種発現させ、組換え NAH を調製した。組換え NAH の反応最適 pH は 6.0、最適温度は 25°C であり、WU-0601 株由来 NAH のそれと一致することを確認した。

1) R. Kobayashi, et al., Biosci. Biotech. Biochem., **61**, 162-163 (1997).
2) K. Kirimura, et al., J. Biosci. Bioeng., **87**, 436-441 (1999).
3) 渡辺 輝彦, 他, 2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p. 105 (2015).

agarase, *Cellvibrio* sp. WU-0601, neoagarobiose hydrolase

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

発表番号：4D008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 乳中ラクトースのエピラクトースへの直接変換を指向した各種セロビオース 2-エピメラーゼの機能評価

# Functional assesment of cellobiose 2-epimerases for the direct conversion of lactose to epilactose in milk.

○武藤 洋彦、佐分利 亘、森 春英（北海道大院農）
○Hirohiko Muto, Wataru Saburi, Haruhide Mori (Hokkaido Univ.)

[目的]セロビオース 2-エピメラーゼ（CE）は β-(1→4)結合した二糖の還元末端グルコース残基とマンノース残基を可逆的に異性化する酵素である。CE は多様な細菌が保持し、生体内で β-マンナナーゼにより生じた β-(1→4)-マンノビオースを 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースに異性化することで、β-マンナンの代謝に関わると推定される。CE がラクトースに作用するとエピラクトース（4-*O*-β-D-ガラクトシル-D-マンノース）が最大変換率 30%で生成され、これにはプレバイオティクス効果やミネラル吸収促進効果が認められる。牛乳には約 5%（w/v）のラクトースが含まれるため、CE を直接作用させることで最大で約 1.5%（w/v）のエピラクトースを含む牛乳に加工できる。牛乳は殺菌処理以外の製造過程では 10°C 以下で保存されるため、本加工には低温で高活性を持つ CE の使用が望まれる。本研究では牛乳中ラクトースのエピラクトースへの直接変換を指向し、各種 CE の機能評価を行った。
[方法と結果]既知 CE10 種および CE 様タンパク質 6 種について大腸菌組換えタンパク質を調製し、4―37°C で β-(1→4)-マンノビオースに対する活性を測定した。CE 様タンパク質 6 種のうち 4 種が異性化活性を示した。4°C で 2 U/mg 以上の活性を示した酵素 12 種について、4°C において 5%（w/v）ラクトースに対する活性を測定した。高活性を示した酵素 6 種から、*Flavobacterium johnsoniae* 由来 CE（FjCE）、*Clostridium lentocellum* 由来 CE（ClCE）、*Ruminococcus albus* 由来 CE（RaCE）、および *Rhodothermus marinus* 由来 CE（RmCE）を選択した。これらを 4°C において 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 6.7）中に 24 時間保持すると、FjCE の酵素活性は 40%に低下したが、他は 80%以上の活性が保持された。牛乳に各酵素を添加後 4°C に保持した結果、酵素添加量を 4°C における 5%ラクトースへの活性値で 0.250 U/ml（FjCE 20.6 μg/ml、ClCE 29.8 μg/ml、RaCE 31.6 μg/ml、RmCE 48.8 μg/ml）とすると、12 時間で生成エピラクトースが平衡量に達した。酵素添加量を 0.125 U/ml、0.0625 U/ml とすると、それぞれ 24 時間、48 時間の保持により平衡に達した。耐熱性酵素の RmCE の場合は、牛乳の低温殺菌処理過程と組み合わせ、熱処理中に CE 反応を行うことも可能と考えられた。RmCE を牛乳に添加後 60°C、30 分間あるいは 72°C、15 秒間の熱処理を行い、続けて 4°C に 12 時間保持した場合、酵素添加量をそれぞれ 0.0625 U/ml、および 0.125 U/ml に減じてもエピラクトースの生成は平衡に達した。すなわち熱処理過程での酵素添加によって、酵素使用量の削減が可能であった。

cellobiose 2-epimerase, epilactose, functional assesment

発表番号：4D009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Ruminococcus albus* 由来 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼのサブサイト+1 に保存される Arg92 の基質結合への関与
Involvement of invariant Arg92 of RaMP1 in substrate binding

○塩田 咲耶子[1]、尾高 伶[1]、佐分利 亘[1]、イエ ウキン[2]、薦田 圭介[2]、加藤 公児[2]、西本 完[3]、北岡 本光[3]、姚 閔[2]、森 春英[1]（[1]北大院農、[2]北大院生命、[3]食総研）
○Sayako SHIOTA[1], Rei ODAKA[1], Wataru SABURI[1], Yuxin YE[2], Keisuke KOMODA[2], Koji KATOH[2], Mamoru NISHIMOTO[3], Motomitsu KITAOKA[3], Min YAO[2], Haruhide MORI[1]
([1]Research Faculty of Agriculture in Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Life science in Hokkaido Univ., [3]National Food Research Institute)

[研究背景]Glycoside hydrolase family 130 (GH130) はβ-マンノシドを加リン酸分解するホスホリラーゼを中心とした酵素群である. GH130 はアミノ酸配列の類似性に基づき, さらに 3 つのサブファミリー (GH130_1, 2, NC) に分類される．GH130_1 には 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコース (Manβ1-4Glc) に特異的なホスホリラーゼ, GH130_2 には 4-*O*-β-D-マンノシル-*N*-アセチル-D-グルコサミンやβ-(1→4)-マンノオリゴ糖に作用するホスホリラーゼ，GH130_NC にはβ-(1→2)-マンノシド結合に特異性が高いホスホリラーゼや加水分解酵素が分類される．*Ruminococcus albus* には Manβ1-4Glc を基質とする 4-*O*-β-D-マンノシル-D-グルコースホスホリラーゼ (RaMP1) と, β-(1→4)-マンノオリゴ糖を基質とする RaMP2 が存在する．RaMP1 は合成反応で D-グルコースの 2 位誘導体を糖受容体としないが，RaMP2 はそれらを糖受容体とすることができる．このことから D-グルコース基の O2 周辺に注目し，RaMP1 の基質結合に関与するアミノ酸残基の特定を行った.
[方法・結果および考察]RaMP1 のサブサイト+1 に存在する Arg92 は結晶構造から D-グルコース基の O1 および O2 との水素結合形成に関わる残基として推定される．Arg92 の該当アミノ酸残基を GH130_1 および GH130_2 の酵素間で比較すると，GH130_1 では Arg が完全に保存されているのに対し，GH130_2 では Asp や Asn など多様である．従って Arg は GH130_1 酵素の Manβ1-4Glc に対する特異性に重要なアミノ酸であると予想された．次に Arg92 を Leu に置換した R92L を作製し，酵素化学的諸性質を解析した．R92L の Manβ1-4Glc 加リン酸分解および合成活性は 0.10 U/mg および 0.051 U/mg であり，それぞれ野生型酵素の 0.019%および 0.081%にまで低下した．10 mM α-Man1*P* 存在下での D-グルコースに対する $k_{cat\ app}$ は野生型酵素の 2.4% (3.5 $s^{-1}$) に低下し，$K_{m\ app}$ は 49 倍 (1040 mM) に上昇した．40 mM α-Man1*P* を糖供与体，40 mM D-グルコース，1,5-アンヒドロ-D-グルシトール, 2-デオキシ-D-グルコース, D-マンノース, D-グルシトール, D-グルコサミン, *N*-アセチル-D-グルコサミン，メチル α-D-グルコシドおよびメチル β-D-グルコシドをそれぞれ糖受容体として野生型酵素および R92L を 37 ˚C にて 48 時間作用させ，TLC により生成物を解析した．両酵素は共に D-グルコース以外に 1,5-アンヒドロ-D-グルシトールおよびメチル β-D-グルコシドを合成反応の基質とした．R92L は野生型酵素と異なり，*N*-アセチル-D-グルコサミンを糖受容体とした生成物も生成した．R92L を 40 mM α-Man1*P*, 40 mM *N*-アセチル-D-グルコサミンに作用させて得られた生成物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーにより精製し，現在，構造を解析している.

Glycoside hydrolase family 130, phosphorylase, acceptor specificity

発表番号：4D010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 小麦 0.19 アミラーゼインヒビターの大腸菌発現および N 末端領域の改変

# Expression in E.coli and mutational analysis of the N-terminal region of wheat 0.19 α-amylase inhibitor

○小根田 洋史（長田産業）
○Hiroshi Oneda (Nagata Sangyo Co., Ltd.)

【背景・目的】糖尿病患者あるいは肥満予備軍の増加に伴い、食後血糖値上昇の制御にかかわる物質が注目されている。小麦中には多種のタンパク質性アミラーゼインヒビター（AI）が存在し、二量体型の 0.19・0.36・0.53 AI, 単量体型の 0.28 AI, WRP 25 (WMAI)・26・27 等が知られている。その主成分である 0.19 AI はヒトのα-アミラーゼを強く阻害することをこれまでに報告したが、その反応部位など阻害機構については未だ不明な点が多い。本研究ではアミラーゼ活性の阻害に関する知見を得るべく、0.19 AI の大腸菌発現系を構築、種々の変異体を作成し、ヒト唾液α-アミラーゼ（HSA）活性の阻害効果を検討した。

【方法・結果】HSA 活性はブルースターチまたは *p*-nitrophenyl-α-D-maltoside（*p*NP-G2）を用いて pH 7.0, 37℃で測定した。0.19 AI の遺伝子は小麦のゲノム DNA からクローニングして pET3a に挿入し、大腸菌 Rosetta-gami B (DE3) pLysS で発現させた。発現したタンパク質は不活性封入体（IB）を形成したので、1 mM DTT を含む 6 M 塩酸グアニジンで可溶化した後、100 倍希釈による再生条件を検討した。pH 10.0、25℃以下、16 時間以上の処理で最大の AI 活性の回復が得られ、陽イオン交換カラムを用いて精製を行ったところ 25.9 mg のタンパク質を含む IB から 4.7 mg の均一な 0.19 AI 標品が得られた。この精製標品は MALDI 質量分析、CD および HSA 阻害活性において小麦から精製したものと同等であり、阻害物質定数（$K_i$）は 2.15 nM と求められた。また小麦中、0.19 AI に次いで多く存在する WMAI についても同様に発現・精製し、その $K_i$ は 845 nM と求められた。小麦 AI 分子種に高度に保存されている配列のうち N 末端配列に着目し、0.19 AI の SGPWMC を WMAI の SGPWSWC に改変した変異体 1、WRP26 の SGPWMWC に改変した変異体 2、P3A、W4A および M5A の 5 種類の変異体を作成した。変異体 1 および 2 の $K_i$ はそれぞれ 257 および 857 nM と求められ、WMAI と同様、1 残基の挿入により阻害活性が大きく減少することが示唆された。また、P3A および M5A の $K_i$ はそれぞれ 1,640 および 72.6 nM と求められ、W4A については阻害活性が認められなかった。これらの残基はα-アミラーゼとの結合に大きく寄与している可能性が高い。

amylase, inhibitor, wheat

発表責任者：小根田洋史（oneda@nagatasangyo.co.jp）

発表番号：4D011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 環状四糖[cyclo-(1→6)-(α-nigerosyl-nigerosyl)]の分解を担う 2 種の糖質加水分解酵素の発見

# Two novel glycoside hydrolases degrading a cycloglucotetraose, cyclo-(1 → 6)-(α-nigerosyl-nigerosyl)

○田上 貴祥[1]、貞廣 樹里[2]、奥山 正幸[2]、木村 淳夫[2]、岩崎 智仁[1] ([1]酪農大、[2]北大院農)
○Takayoshi Tagami[1], Juri Sadahiro[2], Masayuki Okuyama[2], Atsuo Kimura[2], Tomohito Iwasaki[1] ([1]Rakuno Gakuen Univ., [2]Hokkaido Univ.)

【背景】放線菌の一種である *Kribbella flavida* は可溶性デンプンを炭素源とした培養液中に，4 分子の glucose がα-1,6 結合とα-1,3 結合で交互に連結した環状四糖(CNN)を蓄積する．細菌類の CNN の合成酵素遺伝子はすでに明らかとなっているが，分解酵素遺伝子については未知であった．本研究では *K. flavida* において CNN の分解を担う 2 種の糖質加水分解酵素を発見したので報告する．

【方法と結果】CNN 合成酵素と類似のタンパク質遺伝子を *K. flavida* ゲノム上で探索し，45.4%のアミノ酸配列類似性を示す GH31 酵素様遺伝子(*Kfla_1895*)を見出した．*Kfla_1895* の上流には GH15 酵素様遺伝子(*Kfla_1896*)および ABC 輸送体遺伝子(*Kfla_1897-1899*)が存在した．大腸菌を用いて Kfla_1895 および Kfla_1896 の組換え酵素を生産し，これらの機能解析を行った．

Kfla_1895 を CNN に作用させて反応生成物を経時的に TLC で分析した結果，時間経過にともなって直鎖四糖および isomaltose の生成が確認された．isomaltose 単位を有する各種基質(10 mM)に対する加水分解速度を測定した結果, CNN 分解速度(85.1 μmol/min/mg)は panose (α-isomaltosyl-(1→4)-glucose)および isomaltotriose (α-isomaltosyl-(1→6)-glucose)の分解速度の 479 倍および $10^5$ 倍であった．以上の結果から，Kfla_1895 は CNN のα-1,3 結合を特異的に加水分解して isomaltose を遊離する酵素であり，既報の *Bacillus* sp. 由来 CNN 分解酵素(cycloalternan isomaltosylhydrolase)と同様の特異性を有する酵素であった．CNN の加水分解反応における $K_m$ は 7.63±1.38 mM, $k_{cat}$ は 223±17 $sec^{-1}$, $k_{cat}/K_m$ は 29.7±3.4 $sec^{-1}mM^{-1}$ であった．

Kfla_1896 を CNN 部分分解物に作用させて反応生成物を TLC で分析した結果，isomaltose の消失および glucose と微量な三糖の生成が確認された．様々な結合様式の glucobiose (10 mM)に対する加水分解速度を測定した結果，isomaltose 分解速度(11.7 μmol/min/mg)は trehalose, kojibiose, nigerose, および maltose の分解速度の 874~1.8 x$10^4$ 倍であった．また，isomaltotriose (10 mM)および dextran10 (2%)の分解速度(μmol/min/mg)はそれぞれ 0.921 および 0.182 であった．以上の結果から，Kfla_1896 はα-1,6 結合を特異的に加水分解して glucose を遊離する酵素であり, 二糖に高い特異性を示す点で既報の GH15 酵素である glucodextranase とは性質を異にする新奇酵素であった. isomaltose に対する $K_m$ は 2.38±0.07 mM, $k_{cat}$ は 11.4±0.3 $sec^{-1}$, $k_{cat}/K_m$ は 4.81±0.18 $sec^{-1}mM^{-1}$ であった．

これらの結果から, *K. flavida* は菌体内に取込んだ CNN を Kfla_1895 によって isomaltose にまで分解した後に Kfla_1896 によって glucose にまで分解していると考えられる．

glycoside hydrolase family 31, glycoside hydrolase family 15, actinomycete

発表責任者：田上　貴祥（t-tagami@rakuno.ac.jp）

発表番号：4D012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* における *N*-アセチルグルコサミンおよび *N*-アセチルガラクトサミン資化経路の生化学的解析

# A *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylgalactosamine metabolism in *Bifidobacterium bifidum*

○谷内 寛之[1]、櫻間 晴子[2]、西本 完[3]、後藤 愛那[4]、杉山 友太[1]、和田 潤[5]、栗原 新[1]、北岡 本光[3]、片山 高嶺[4] ([1]石川県大院生物資源環境、[2]山形大院理工、[3]農研機構食総研、[4]京大院生命、[5]京都市産技研)

○ Hiroyuki YACHI[1], Haruko SAKURAMA[2], Mamoru NISHIMOTO[3], Aina GOTOH[4], Yuta SUGIYAMA[1], Jun WADA[5], Shin KURIHARA[1], Motomitsu KITAOKA[3], Takane KATAYAMA[4] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Yamagata Univ., [3]NARO, [4]Kyoto Univ., [5]Kyoto Municipal Institute of Industrial Technology and Culture)

ビフィズス菌は特に乳児期に腸内優先種(90%以上)となり、乳児の健康や免疫獲得に寄与すると考えられているが、その腸管定着機構には不明な点が多い。ビフィズス菌は人乳に含まれるオリゴ糖(母乳オリゴ糖)や粘膜上皮のムチン糖タンパク質の糖鎖を分解資化することができ、当研究室では、これらヒト由来糖質に作用するビフィズス菌の酵素を解析することにより、両者の共生の基盤を明らかにすることを試みている。

これまでの研究により、ビフィズス菌 *Bifidobacterium bifidum* は母乳オリゴ糖やムチン型糖鎖を分解して細胞内でそれぞれ *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)および *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を生じることが明らかとなっている。GlcNAc については他の生物種と同様の経路でフルクトース-6-リン酸(Fru-6-P)に変換されることが予想されたが、GalNAc がどのように利用されるかについては他の生物種においても明らかにされた例がないために不明であった。本研究では、*B. bifidum* の GlcNAc 代謝経路上の GlcNAc-6-リン酸デアセチラーゼ(NagA)の組換え酵素の性状解析を行うと共に、当研究室においてこれまで単離した酵素群を用いて GlcNAc および GalNAc の代謝経路を解明することを試みた。

精製した組換え NagA は活性発現に $Zn^{2+}$を要求した。GlcNAc-6-リン酸に対する $K_m$ および $k_{cat}$ は 0.44 mM および 24 $s^{-1}$ であった。NagA を GlcNAc キナーゼ(NagK)、*N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ(NahK)およびグルコサミン-6-リン酸デアミナーゼ(NagB)と共に GlcNAc、ATP、ADP、$MgCl_2$ および $ZnCl_2$ を混合したところ、GlcNAc は Fru-6-P へ 44%変換されたが GlcNAc-1-P への変換は検出されなかった。また、上記反応液に更に UDP-グルコース-ヘキソース-1-リン酸ウリジリルトランスフェラーゼ(GalT)、UDP-グルコース 4-エピメラーゼ(GalE)および UDP-GlcNAc を添加し、GlcNAc に替えて GalNAc を加えたところ、GalNAc は Fru-6-P へ 48%変換されたが GlcNAc-1-P への変換は検出されなかった。以上のことから、これら酵素群が母乳オリゴ糖やムチン型糖鎖に由来する GlcNAc および GalNAc の資化に関わることが明らかとなった。GalNAc の資化経路を明らかとしたのは全ての生物種において本報告が初めてである。

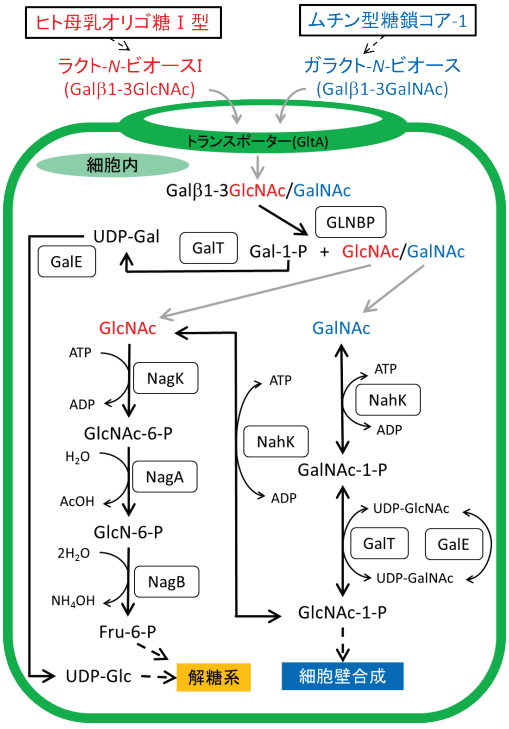



図 1. *B. bifidum* の母乳オリゴ糖/ムチン型糖鎖資化経路

human milk oligosaccharides, mucin, bifidobacteria

発表責任者：片山高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4D013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Gluconobacter oxydans*由来の菌体外酵素 dextran dextrinase は自らの生成物デキストランによって細胞表層から遊離する.

# Dextran dextrinase extracellularly secreted by *Gluconobacter oxydans* is released from the cell surface using its own product dextran.

○貞廣 樹里、森 春英、佐分利 亘、奥山 正幸、木村 淳夫（北大院農）
○Juri SADAHIRO, Haruhide MORI, Wataru SABURI, Masayuki OKUYAMA, Atsuo KIMURA (Hokkaido Univ.)

【背景】Dextran dextrinase (DDase) はマルトオリゴ糖の非還元末端α-(1→4) グルコシド結合に作用し，受容体への連続的なα-(1→6) 転移により粘性多糖デキストランを合成する．本酵素は酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* の限定された菌株により生産され，糸引きビールの原因として知られている．このうち ATCC 11894 株は菌体外に DDase を分泌し，培養条件の違いでその局在性を変化させる [1]. マルトオリゴ糖添加培養では主に上清に遊離し (遊離型 DDase), グルコース添加培養では主に細胞表層に結合する (菌体結合型 DDase) ことを明らかにした [1]．本発表では，DDase の局在性変化に関与する因子 (遊離因子) ならびに酵素タンパク質中の菌体結合領域について決定したので報告する．
【方法・結果】まず菌体結合型 DDase の遊離因子を探索した．グルコース添加培養後の菌体 5 OD ユニットを 0–0.5%の各種糖質 [グルコース，マルトース，マルトテトラオース (G4)，アミロース (平均重合度 18)，ソルビトールおよびマンニトール] 含有溶液に懸濁し室温に 40 分間静置した．菌体懸濁液を上清画分 (遊離型 DDase) および菌体の *n*-ブタノール抽出画分 (菌体結合型 DDase) に分画し，SDS–PAGE 解析によるタンパク質バンド強度に基づき，それぞれの半定量を行った．G4 およびアミロースに強い遊離効果が認められた. これらは DDase の基質であることから, 遊離因子としてα-(1→4) グルカンあるいは静置 40 分間で生成されたα-(1→6) グルカンが予想された．続いて，組換え DDase を菌体に再結合させた菌体を用い，遊離因子探索を行った．再結合実験では，グルコース添加培養後の菌体に 0.5% G4 溶液を加え DDase を細胞表層から遊離させた菌体を用いた. 0–30 OD ユニット分の各菌体懸濁液に DDase 10 μg を加えて結合させた．DDase の結合量は，菌体量依存的に増加し 15 OD ユニットで最大となり，約 80% (約 8 μg) の結合が認められた．この組換え DDase 飽和結合菌体を使用し，さらに遊離因子の推定を行った．DDase の阻害剤アカボース (10 μM) 存在下で，各種重合度のα-(1→4) グルカン，α-(1→6) グルカン，またはラミナリオリゴ糖，セルロース，キシランを菌体懸濁液に加えた．平均重合度 10 以上のα-(1→6) グルカンのみに遊離効果が認められた．すなわち，DDase の菌体表層からの遊離因子はα-(1→4) グルカンではなく酵素生成されたデキストランであると判明された．次に，変異酵素を用いた菌体再結合実験により，DDase の菌体結合領域を探索した．C 末端から 40 残基を削除した変異体は菌体に再結合しなかったことから，C 末端の 40 残基が菌体への結合に関与すると考えられた.

1) Sadahiro J. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 456, 500–505, 2015.

*Gluconobacter oxydans*, dextran dextrinase, cell surface

発表番号：4D014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Aspergillus aculeatus* 由来β-glucosidase 1 のセロオリゴ糖に対する反応性が高い変異酵素の取得

# Improvement of hydrolytic activity for cellooligosaccharide of ß-glucosidase 1 from *Aspergillus aculeatus*

○田中 清貴、馬場 祐太朗、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司（阪府大生命）
○kiyotaka tanaka, yutaro baba, Shuji Tani, Jun-ichi Sumitani, Takashi Kawaguchi (Osaka Pref. Univ.)

【目的】セルロース系バイオマスの実用的な糖化酵素として，世界中で *Trichoderma reesei* 由来のセルラーゼが利用されている。本研究室で単離された *Aspergillus aculeatus* No. F-50 が生産するβ-glucosidase 1（BGL1）は単糖生成力が強く，*T. reesei* 由来のセルラーゼに対して高い添加効果を示すことが明らかとなっている。しかし，BGL1 は他の BGL と同様に酵素反応が進むにつれ蓄積するグルコースによって阻害を受け反応効率が低下することが問題となっている。そこで，より強力なセルラーゼ剤の開発を目的とし，更なる糖化効率の向上のためにグルコースによる阻害が緩和された BGL1 変異酵素の取得を試みた。その結果，活性中心付近に存在し，BGL1 の表面に露出している 15 か所のアミノ酸それぞれをターゲットとした Site-Saturation Mutagenesis によるライブラリから，グルコース存在下におけるセロビオース分解活性が WT よりも上昇した変異酵素 S436P を単離している。また，S436P はグルコース非存在下においても WT よりセロビオース分解活性が高いことがわかった。そこで本研究では，S436P のセロビオース分解活性が上昇した原因を明らかにすることを目的とした。
【方法及び結果】サブサイト-1 および+1 が関与するセロビオースの加水分解に対して，S436 はサブサイト+2 付近に位置していることから，間接的な効果で活性を上昇させていることが予想された。その要因として，①S436P となることで，サブサイト+1 および+2 でのセロビオースの非生産的な結合が抑えられている可能性，および②S436P がサブサイト+1 を構成するアミノ酸と相互作用することでセロビオースに対する反応性が向上している可能性が示唆された。そこで，まずサブサイト+2 における基質との親和性の低下について，セロトリオースに対する反応性を調べることで検証した。その結果，驚くべきことに S436P のセロトリオースに対する比活性は WT と比較して 1.9 倍に，触媒効率（$k_{cat}/K_m$）は 2.4 倍に上昇し，①の可能性は否定された。現在，②について検証しているところである。また，S436P は少なくともセロトリオースに対する活性が上昇した変異酵素であることが明らかとなった。現在，S436P の他のセロオリゴ糖やβ-オリゴ糖に対する反応性について調べる事によって，基質特異性の変化について詳細に検討中であり，あわせて報告する予定である。

*Aspergillus aculeatus*, ß-glucosidase, screening

発表責任者：炭谷順一（monger@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4D015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# キチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* に由来する酸化型キチン分解酵素の解析

# Analysis of an enzyme catalyzing oxidative degradation of chitin from the chitinolytic bacterium, *Chitiniphilus shinanonensis*

○松山 友香、矢野 健太、田口 悟朗、野川 優洋、下坂 誠（信州大・繊維・応生系）
○ Yuka MATSUYAMA, Kenta YANO, Goro TAGUCHI, Masahiro NOGAWA, Makoto SHIMOSAKA (Div. Appl. Biol., Textile Sci. and Technol., Shinshu Univ.)

本研究室では、新属新種の強力なキチン分解細菌 *Chitiniphilus shinanonensis* SAY3 株を分離同定した。全ゲノムドラフトシークエンスによって得られた塩基配列から、キチン分解関連酵素遺伝子を探索したところ、CBM33 と相同性を示す遺伝子 *chi33* を検出した。CBM33 は lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) の auxiliary activities (AA10) に分類されている。結晶性キチンを酸化型分解する酵素で、他のキチン加水分解酵素との相乗効果によって効率的なキチン分解への関与が指摘されている。*chi33* は N 末端側の CBM33 触媒ドメインと C 末端側の 2 つのキチン結合ドメインで構成されていた。今回は、組換え酵素 Chi33 のキチン分解活性と他のキチン加水分解酵素との相乗効果について報告する。

全長 *chi33* とキチン結合ドメインを除いた CBM33 触媒ドメインのみを有する *chi33Δcbd* の 2 種類を、大腸菌宿主（発現ベクター pColdI）を用いて発現させ、組換え酵素 Chi33 および Chi33Δcbd を精製した。粉末キチンに対する結合性分析では両タンパク質とも結合能を示し、CBM33 触媒ドメイン単独でもキチンへの結合能があることを確認した。また、SDS-PAGE 後のゲルを活性染色することによりわずかなキチン分解活性がみられたが、Schales 法による還元糖量の測定ではキチン加水分解活性を検出できなかった。さらに、*C. shinanonenshis* 由来のプロセッシブ型キチナーゼである Chi1 とエンド型キチナーゼである Chi17（ともに発現用ベクター pColdI を用い大腸菌宿主で発現させた組換え酵素）を用いて、各キチナーゼと Chi33 の間でキチン分解に対する相乗効果を生成還元糖量の測定および生成した$(GlcNAc)_2$ の HPLC 定量により評価した。その結果、キチナーゼ単独よりも Chi33 添加時の方が高い生成還元糖量を示し、Chi33 がキチナーゼの加水分解を促進することが示された。

chitin, chitinase, lytic polysaccharide　monooxygenase

発表番号：4D016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Euglena gracilis* Z 由来ラミナリビオースホスホリラーゼのクローニングと大腸菌での異種発現
Gene cloning and heterologous expression of laminaribiose phosphorylase from *Euglena gracilis* Z

○土橋 柚美[1]、津野 裕美[1]、中澤 昌美[1,2]、阪本 龍司[1]、石川 孝博[2,3]、谷 修治[1]、炭谷 順一[1]、川口 剛司[1] ([1]阪府大院・生環科、[2]JST CREST、[3]島根大院・生資科)
○ YUZUMI TSUCHIHASHI[1], HIROMI TSUNO[1], MASAMI NAKAZAWA[1,2], TATSUJI SAKAMOTO[1], TAKAHIRO ISHIKAWA[2,3], SHUJI TANI[1], JUN-ICHI SUMITANI[1], TAKASHI KAWAGUCHI[1] ([1]Grad. Sch. Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]CREST, JST, [3]Grad. Sch. Bioresour. Sci., Shimane Univ.)

**【目的・背景】**グルコース(Glc) が β-1,3 結合したオリゴ糖 (LO) は抗ガン作用などが期待されているが, 希少である。そこで LO を合成する方法としてホスホリラーゼに注目した。ホスホリラーゼは, オリゴ糖または多糖を加リン酸分解して糖リン酸エステルを生成する反応と，その逆反応として糖リン酸エステルを用いた脱リン酸合成を触媒する酵素である。(1) 初発物質の濃度を変えることで生成するオリゴ糖の重合度の制御がある程度可能な点，(2) 反応位置選択性が厳密である点などから，オリゴ糖合成のツールとして注目されている。LO に作用するホスホリラーゼとして，ラミナリビオースホスホリラーゼ (LBP) および β-1,3-オリゴグルカンホスホリラーゼ (LOP) が知られている。一般的に LBP はラミナリビオース (Lam2)，LOP は三糖以上の LO の加リン酸分解とその逆反応を触媒する。*Euglena gracilis* Z（ミドリムシ）は貯蔵多糖パラミロンの分解酵素として LBP と LOP の両方を持つことが知られている。*E. gracilis* Z 由来 LBP は弱いながら LO に対しても加リン酸分解および脱リン酸合成を行い，LOP は Glc に対しても脱リン酸合成活性を示すことから，Glc からの LO 合成に有利な酵素系と考えられる。既に LOP については部分アミノ酸配列をもとに *Euglena* EST データベースから遺伝子の同定に成功している。そこで，本研究では LBP 遺伝子の同定を試みた。
**【方法および結果】**LOP のアミノ酸配列をもとに *Euglena* EST データベースで BLAST 検索を行った結果，5'側の一部が分かっている遺伝子がコードする配列との相同性があることが分かった。この遺伝子が LBP をコードする可能性が考えられたため，cDNA を鋳型に 3'-RACE 法を用い，この遺伝子の全長の取得を試みたところ，4 kb 弱の遺伝子が得られた。発現産物の N 末端に His-tag が付加されるように発現プラスミドを構築し, 大腸菌を用いて異種発現させたところ，SDS-PAGE で約 120 kDa のバンドが確認され，以前報告されていた LBP の分子量と一致した。また，粗酵素を用いて脱リン酸合成活性を確認したところ，Glc や Lam2 をアクセプターとした脱リン酸合成反応を検出した。粗酵素が示すアクセプター特異性は，以前報告された LBP のものとほぼ一致し，取得した遺伝子は LBP をコードすることが強く示唆された。現在発現産物の精製を行い，諸性質の検討を行っている。

laminaribiose phosphorylase, *Euglena gracilis*

発表番号：4D017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

Serratia marcescens 2170 の多糖モノオキシゲナーゼ CBP21 の生理機能の解明
Studies on the physiological role of polysaccharide monooxygenases CBP21 from Serratia marcescens 2170

○桜井 大地[1]、杉本 華幸[1,2]、鈴木 一史[1,2]、渡邉 剛志[1,2]（[1]新大院　自然研、[2]新大農　応生化）
○Daichi Sakurai[1], Hayuki Sugimoto[1,2], Kazushi Suzuki[1,2], Takeshi Watanabe[1,2] ([1]Grad. Sch. Sci. & Tech., Niigata. Univ., [2]Dept. Appl. biol. Chem. Agri., Niigata. Univ.)

**【目的】**我々は、自然界におけるキチン循環のキーステップを理解すべく、高キチナーゼ生産菌 *S. macsescens* 2170 株をモデル細菌としてキチン分解利用機構の全体像の解明を目指している。本菌が分泌する酵素の一つ、キチン結合タンパク質 CBP21 は Auxiliary Activity Family 10（AA10）に属する多糖モノオキシゲナーゼで、キチナーゼによるキチン分解を促進する。近年、バイオマス多糖糖化のツールとして研究が盛んに行われているが、*in vivo* でどのように機能しているかほとんどわかっていない。そこで我々は、Allelic exchange によって *S. marcescens* 2170 株における CBP21 遺伝子の欠損株Δ*cbp* を取得し、キチン分解細菌おける CBP21 の生理機能解明を目的とし研究を行った。
**【方法・結果】**Δ*cbp* は、接合伝達性プラスミド pKNG101 と大腸菌 SM 10（λpir）を用いて欠損遺伝子を *S. marcescens* 2170 に導入し、Alellic exchange によって染色体上の *cbp* 遺伝子を破壊して取得した。そのΔ*cbp* を高結晶性β-キチン微小繊維を分散させた寒天平板培地で培養したところ、Δ*cbp* の形成するクリアゾーンは野生株に比べ、顕著に小さく、不明瞭だった。フレーク状キチンを唯一の炭素源としΔ*cbp* と野生株を培養したところ、Δ*cbp* はタンパク質濃度、キチナーゼ活性共に、野生株に比べ顕著に低下していた。キチン以外の炭素源ではΔ*cbp* と野生株の生育に有意な差は見られなかった。また、*cbp* 相補株を作製したところ、キチナーゼ活性が回復したことから、これらの結果が CBP21 欠損による影響であることが確認された。次に、Δ*cbp* と野生株を$(GlcNAc)_2$を炭素源として定常期まで培養し、その培養上清タンパク質画分のコロイダルキチンに対する分解活性を継時的に測定した。すると、野生株の培養上清タンパク質画分は、24 時間反応時点で、還元剤の添加なしにΔ*cbp* の 2.3 倍高い活性を示した。*in vitro* において、CBP21 によるキチナーゼのキチン分解促進効果は、電子供与体存在下のみで認められることから、$(GlcNAc)_2$ を炭素源とした培地で培養した野生株培養上清中に、CBP21 の活性を促進する物質が含まれている可能性が強く示唆された。
**【考察】**CBP21 は細菌そのもののキチン分解利用において、非常に重要な役割を担っていることが初めて明らかになった。また、*in vivo* で CBP21 の活性を確認できた事実は、*S. marcescens* 自身が何らかの生理的電子供与体を分泌している可能性を示唆している。ある種のセルロース分解菌では、細胞外にセルロース結合性電子伝達活性を持つタンパク質を分泌することが報告されており、本菌のキチン分解系でもそのようなタンパク質が存在するのか、現在探索中である。*cbp* 遺伝子欠損株は、*S. marcescens* 2170 のキチン分解利用機構の新たな理解に大きく貢献することが期待される。

CBP21, Serratia marcescens 2170, polysaccharide monooxygenases

発表責任者：渡邉剛志（wata@agr.niigata-u.ac.jp）

発表番号：4D018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# アレルゲン活性をもつスギ花粉キチナーゼ CJP-4 の構造と機能

# Structure and Function of class IV chitinase with allergenic activity from cedar pollen, *cryptomeria japonica*

○高島 智也[1]、梅本 尚之[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、沼田 倫征[3]、深溝 慶[1] ([1]近大院農、[2]琉球大農、[3]産総研)
○Tomoya TAKASHIMA[1], Naoyuki UMEMOTO[1], Takayuki OHNUMA[1], Toki TAIRA[2], Tomoyuki NUMATA[3], Tamo FUKAMIZO[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ryukyu Univ., [3]AIST)

【目的】

キチナーゼ（EC 3.2.1.14）は，*N*- アセチルグルコサミンがβ-1,4 結合で連なった多糖であるキチンを加水分解する酵素である．本酵素はアミノ酸配列の相同性に基づく糖質加水分解酵素ファミリーの分類（CAZy: Carbohydrate-Active Enzymes）において，GH18 と GH19 に分類されている．植物キチナーゼは同じファミリー内でも構造に多様性があるために,独自にクラス I から V に分類されている.この内,クラス IV キチナーゼは，N 末端側の Hevein-like fold の糖質結合モジュール CBM(Carbohydrate Binding Module)と，C 末端側の Lysozyme-like fold の触媒ドメイン CatD(Catalytic domain)がリンカーを介して繋がった構造をとり,GH19 に分類される酵素である．CJP-4(Cryptomeria japonica pollen class IV chitinase)はクラス IV キチナーゼであり，スギ花粉症患者の IgE と高い反応性を示す 4 番目のアレルゲンとして同定された．本研究では CJP-4 の酵素学的性質と立体構造,および基質との結合性について調べた.

【結果】

組換え型 CJP-4 全長および CJP-4CatD タンパク質を大腸菌を用いて発現させ，SDS-PAGE で均一なまでに精製した．精製した両タンパク質の結晶化を行い,CJP-4CatD の結晶を得た.フォトンファクトリーのビームライン BL-17A を用いて回折データを得,オウシュウトウヒクラス IV キチナーゼ(PDB 3HBD)をサーチモデルとした分子置換法により CJP-4CatD の立体構造を決定した.

CJP-4 全長および CJP-4CatD のキチンオリゴ糖の分解様式および分解速度を HPLC で解析したところ, 結果に大きな違いは見られなかったことから,CJP-4 の CBM はオリゴ糖基質の分解には関与しないことが示唆された．一方，不溶性基質であるキチンビーズを基質とした場合，CJP-4 全長が CJP-4CatD より高い分解活性を示した. また,*Trichoderma viride* に対する抗真菌活性を調べた結果, CJP-4 全長に抗真菌活性が認められたが,CJP-4CatD にはほとんど認められなかった．以上のことから, CJP-4 の CBM は不溶性基質に結合しそれらの分解に寄与するものの,可溶性基質の分解には関与しないことが示唆された.

現在,各酵素の活性中心に変異を加えた不活性変異体を作製し,等温滴定型熱量計(ITC)と,核磁気共鳴法(NMR)を用いたキチンオリゴ糖滴定実験を行っている.

chitinase, allergen, cedar pollen

発表番号：4D019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# L-アスコルビン酸への糖転移反応における基質特異性および位置特異性の異なるβ-グルコシダーゼの速度論的研究

# A kinetic study of ß-glucosidases with different substrate- and regio-specificities in transglycosylation of L-ascorbic acid

○菅沼 笙子、寺坂 美紀、仁戸田 照彦、神崎 浩（岡山大院環境生命）
○Shoko SUGANUMA, Miki TERASAKA, Teruhiko NITODA, Hiroshi KANZAKI (Grad. Sch., Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【目的】我々はアスコルビン酸（AA)配糖体を合成する酵素の探索を行う中で，糖質加水分解酵素ファミリー3 (GH3)に属する *Aspergillus niger* 由来β-グルコシダーゼが AA の 6 位水酸基への位置特異的な糖転移反応を触媒し，アスコルビン酸 6βグルコシド（AA6βGlc)を合成することを見出した。一方で, *Trichoderma* 属由来β-グルコシダーゼは AA への糖転移反応によりアスコルビン酸 2βグルコシド（AA2βGlc)と AA6βGlc を同時に生成することが分かっている。このことを受け，我々は起源の異なるβ-グルコシダーゼを精製し，糖供与体としてセロオリゴ糖，結合位置の異なるβ-グルコ二糖および芳香族アグリコンをもつ配糖体を用いて AA への糖転移活性の特徴を比較した。その結果，GH3 に属する菌由来酵素の中でも糖転移活性の大きさ，配糖化位置選択性，基質特異性により細分類できることが分かった。その過程で *Penicillium multicolor* から見出したβ-グルコシダーゼは AA6βGlc を優先的に生成する点では *A. niger* 由来酵素と共通していた。しかし，*A. niger* 由来酵素が試験に用いた化合物ほぼ全てを糖供与体として利用できたのに対して, *P. multicolor* 由来酵素は *p*-nitrophenyl β-D-glucopyranoside（*p*NPG)やインディカンといった芳香族アグリコンをもつ配糖体を非常によい糖供与体とする一方でセロオリゴ糖やβ-グルコ二糖類を糖供与体として利用できないというユニークな基質特異性を示すことを明らかにした [1)]。以上のようにこれら 3 種の酵素は糖転移反応においてお互いに異なる性質を示したことから, 今回酵素反応について *p*NPG を基質とした際の速度論的解析を中心に詳細検討を加えた。　【方法・結果】*A. niger* 由来酵素は固体培養抽出液から，*Trichoderma viride* 由来酵素はヤクルト薬品工業株式会社製オノズカ R-10 から，*P. multicolor* 由来酵素は天野エンザイム社製アロマーゼから各種クロマトグラフィーにより精製し，*p*NPG 加水分解反応での遊離 *p*NP を定量することによって速度論的解析を行った。*A. niger* 由来酵素は $K_m$ = 0.633 (mM)と算出され，既に報告されているように基質濃度 2.5 mM 以上で加水分解活性が阻害された。*T. viride* 由来酵素と *P. multicolor* 由来酵素は $K_m$ = 0.140 (mM)と算出され，少なくとも基質濃度 5 mM 以下では阻害を受けなかった。*P. multicolor* 由来酵素の $K_m$ が小さく，*p*NPG による阻害を受けないことは，糖転移反応と加水分解反応において芳香族アグリコンをもつ配糖体を用いた時のみ高い活性を示すことを支持するものであった。現在，他の基質の加水分解反応や糖転移反応の速度論的解析を行うことにより，酵素のサブサイトにおける基質認識機構に関して新しい知見を得ようとしている。

1) 菅沼・寺坂・仁戸田・神崎，日本農芸化学会中四国支部第 43 回講演会要旨集，p65 (2015)

*Penicillium multicolor*, *Aspergillus niger*, *p*NPG hydrolytic activity

発表責任者：神崎浩（hkanzaki@okayama-u.ac.jp）

発表番号：4D020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 高等植物由来推定 GPI アンカー型ポリガラクツロナーゼの細胞内局在解析

# Subcellular localization analysis of a putative GPI-anchored polygalacturonase from higher plant

○大橋 貴生、鈴木 真未、三崎 亮、藤山 和仁（大阪大学生物工学国際交流センター）
○Takao OHASHI, Mami SUZUKI, Ryo MISAKI, Kazuhito FUJIYAMA (ICBiotech, Osaka Univ.)

ポリガラクツロナーゼはペクチンの主骨格であるポリガラクツロン酸を加水分解する酵素であり、植物から微生物に至るまで広く存在し、巨大なタンパク質ファミリーを形成している。モデル植物であるシロイヌナズナでは、69 種類のポリガラクツロナーゼ遺伝子が見出されているが、そのほとんどが酵素活性の有無や細胞内局在を含めて未解明である。シロイヌナズナの 69 種類の遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列を元に、網羅的に推定ドメイン構造を調べてみたところ、N 末端および C 末端の両方に推定疎水性領域を有する GPI アンカー型のポリガラクツロナーゼを見出し、PGD2 と名付けた。既知のポリガラクツロナーゼは全て可溶性タンパク質であり、膜結合型である GPI アンカー型タンパク質として存在する可能性があることは非常に興味深い。そこで本研究では PGD2 が GPI アンカー型ポリガラクツロナーゼとして、膜画分に局在しているかどうかを調べるため、細胞内局在解析を行った。

シロイヌナズナから cDNA を調製し、PCR 法により *PGD2* 遺伝子を単離し、植物発現ベクターを構築した。この発現ベクターを用いて、PGD2 を GFP 融合タンパク質としてタバコ BY-2 細胞に発現させた。共焦点顕微鏡を用いて GFP-PGD2 融合タンパク質の蛍光観察を行ったところ、小胞体および細胞膜マーカーと共局在していた。また、GFP-PGD2 融合タンパク質発現タバコ BY-2 株よりタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット解析を行ったところ、GFP-PGD2 融合タンパク質のサイズに相当する特異的なシグナルを検出できた。この結果より、共焦点顕微鏡で観察された蛍光シグナルは分解物では無く、インタクトな GFP-PGD2 融合タンパク質に由来する蛍光シグナルであることが示され、他の GPI アンカー型タンパク質と同様に小胞体および細胞膜に局在することが明らかとなった。今後、シロイヌナズナ *pgd2* 遺伝子欠損変異体を取得し、*PGD2* タンパク質が細胞壁ペクチン成分に与える影響を解析することにより、*PGD2* タンパク質の植物体における機能解明が可能となる。

GPI-anchored protein, pectin, polygalacturonase

発表番号：4D021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ループ構造を欠失している植物由来 GH19 キチナーゼの構造と機能
# Structure and function of a plant Family GH19 chitinase lacking loop structures.

○河本 大毅[1]、隠岐 円[1]、大沼 貴之[1]、平良 東紀[2]、深溝 慶[1] ([1]近大院農、[2]琉球大農)
○Daiki KAWAMOTO[1], Madoka Oki[1], Takayuki Ohnuma[1], Toki Taira[2], Tamo Fukamizo[1] ([1]Kinki Univ., [2]Ryukyu Univ.)

キチナーゼ(EC3.2.1.14)は N-アセチルグルコサミンが連なった多糖であるキチンのβ-1,4 グリコシド結合を加水分解する酵素であり、アミノ酸配列の相同性に基づく糖質分解酵素ファミリーの分類(CAZy : Carbohydrate-Active Enzymes)において、ファミリーGH18 および GH19 に分類されている。GH19 キチナーゼは多数のα-ヘリックスからなるコア構造と、コア構造から突出した複数のループ構造から形成されている。コア構造は GH19 キチナーゼに保存されており、高い相同性を示すが、ループ構造においては多型が存在する。これまでに 6 つのループ(Loop I, II, III, IV, V, C-terminal )をもつ 6-ループ型、一部のループ構造を欠損した 5-ループ型や 1-ループ型が存在することが報告されている。しかしながら、これらループ構造の有無が GH19 キチナーゼの機能、特に基質認識にどのような影響するのかよくわかっていない。

ナガハハリガネゴケ(*Bryum coronatum*)が生産する GH19 キチナーゼ(BcChi-A)は 5 つのループ構造を欠損した 1-ループ型であり、これまでの研究から基質であるキチンオリゴ糖 4 糖との複合体構造も決定されている。我々は GH19 キチナーゼがもつループ構造の機能について調べるために、野生型 BcChi-A が唯一もつループ構造(Loop III)を欠失させ、ループ構造を全くもたない変異体 BcChi-AΔIII を作製した。本研究では野生型および変異型 BcChi-A の基質結合様式について調べた。

各酵素のキチンオリゴ糖分解産物を HPLC により解析した結果、分解様式に違いが見られた。すなわち野生型 BcChi-A はキチンオリゴ糖 6 糖を基質とした場合、非還元末端から 2、3、4 番目のグリコシド結合を同程度の頻度で加水分解した。一方 BcChi-AΔIII においては、主な切断個所は非還元末端から 3、4 番目であった。酵素-基質複合体の立体構造において Loop III はマイナス側の基質結合サイトを形成していることから、Loop III の欠損によりキチンオリゴ糖 6 糖の結合様式に影響を与えたものと考えられた。現在より詳細に BcChi-A の基質結合における Loop III の機能を調べるために、NMR による基質結合実験を行っている。

chitinase, Gh19, Loop

発表番号：4D022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# マツタケ(*Tricholoma matsutake*)培養菌糸由来糖質分解酵素遺伝子群の発現解析

Expression analysis of polysaccharide hydrolyzing enzyme genes from *Tricholoma matsutake*

○大沼 広宜、福田 泰久、亀井 健吾、白坂 憲章 (近大農)
○Hiroki ONUMA, Yasuhisa FUKUTA, Kengo KAMEI, Norifumi SHIRASAKA (Kindai Univ.)

【背景と目的】マツタケ(*Tricholoma matsutake*)等の樹木に共生して生育するタイプのきのこは菌根菌と呼ばれ，生育のための糖質等を，菌根を介して得ているとされている．そのため，菌根形成菌の人工培地上での生育は非常に遅いだけでなく，デンプンやセルロースといった天然の多糖を分解する能力が低い．当研究室において，マツタケはα-アミラーゼや極めて強いβ-グルコシダーゼ活性を示すことを明らかにしてきたが，グルコアミラーゼやエンド型セルラーゼ等の活性については殆ど検出されていない．また，マツタケの利用できる糖質が多糖類ではデンプン，二糖類ではマルトース，トレハロース，単糖類ではグルコース，フルクトース，マンノースなどと限られたものとされている．そのため，他の腐生性のきのこと同様の栽培法では人工栽培が困難であるとされている．マツタケの人工栽培化においては，マツタケがどのような糖質分解系を発現しているかを解析し，生育に有効な糖質を探索することは重要である。そこで本研究では，糖質分解酵素遺伝子誘導性を明らかにすることを目的とし，定量 PCR による発現解析を行った．

【方法・結果】本研究室保存の *T. matsutake* NBRC30605 株を各種糖質 1 %, Yeast Extract 0.5 % の液体培地に接種後 30 日間静置培養した各培養菌糸体より mRNA を抽出し，逆転写により合成した cDNA を鋳型として，定量 PCR により発現量を定量し，それに伴う菌体外グルコアミラーゼ活性またはセルラーゼ活性を測定した．アラビノガラクタン，グルコマンナンなどのヘミセルロースを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ，グルコアミラーゼ活性および遺伝子発現量がグルコース培養と比較して増加した．また，カードランやラミナランなどのβ-1,3/1,6 グルカンや前述のヘミセルロースを添加することでエンドグルカナーゼ活性および遺伝子発現量が増加した。マツタケの菌糸体培養において，各種糖質のうち，一部を除いた単糖類や二糖類は上記酵素群の誘導は見られなかったが，ヘミセルロースやβ-1,3/1,6 グルカンなどの多糖類によって，エンドグルカナーゼまたはグルコアミラーゼ酵素遺伝子が誘導・発現していることが示唆された．しかしながら，生育基質としてβ-1,3/1,6 グルカンはある程度利用し生育することは可能であるが，ヘミセルロース類は菌糸体生育量が著しく低下してしまうことから，現在，継代による順化を行い菌糸体生育への影響および遺伝子発現の変動などの検討を行っている．

*Tricholoma matsutake*, polysaccharide hydrolyzing enzyme genes, Hemicellulose

発表番号：4D023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 糖オキサゾリンの効率的精製法の確立と植物由来 GH18 キチナーゼを用いたキチンオリゴ糖の合成
# Effective purification of sugar oxazolines and synthesis of chitin oligosaccharide by plant GH18 chitinase.

○梅本 尚之[1]、野口 正人[1]、齋藤 夏貴[1]、大沼 貴之[2]、深溝 慶[2]、正田 晋一郎[1] ([1]東北大院工、[2]近畿大院農)
○Naoyuki UMEMOTO[1], Masato NOGUCHI[1], Natuki SAITOU[1], Takayuki OHNUMA[2], Tamo FUKAMIZO[2], Shin-ichiro Shoda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Kinki Univ.)

**【目的】**キチンは食品廃棄物として処理されているエビ殻やカニ殻の主成分であり、セルロースに次いで地球上に多く存在するバイオマスである。このキチンから得られる長鎖キチンオリゴ糖は抗ガン作用や抗真菌活性を有することが報告されており注目を集めている。現在この長鎖キチンオリゴ糖は、キチンを酸または酵素によって分解することにより生産されているが、これら方法では長鎖キチンオリゴ糖の収率は低い。この難点を克服するために、多量に得られるキチンの 2 糖や 3 糖から酵素の糖転移反応を用いて長鎖キチンオリゴ糖を合成することが試みられている。GH18 に分類されるキチナーゼを用いた長鎖キチンオリゴ糖合成において糖オキサゾリンは非常に有効なドナー基質である。本研究では、キチンオリゴ糖のオキサゾリン誘導体(GlcNAc)n-oxa の効率的な精製法を確立し、(GlcNAc)n-oxa と植物由来 GH18 キチナーゼを利用した長鎖キチンオリゴ糖合成を試みた。また、等温滴定カロリメトリー(ITC)により、(GlcNAc)n-oxa との結合性を調べた。
**【方法】**キチンオリゴ糖の混合物と 2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride (DMC)を反応させ、水系・無保護で各キチンオリゴ糖のオキサゾリン化を行った。その後、HPLC により各(GlcNAc)n-oxa の精製を行った。得られた(GlcNAc)n-oxa と植物由来 GH18 キチナーゼを用いて長鎖キチンオリゴ糖の合成を行った。また、不活性化した植物由来 GH18 キチナーゼを用いて(GlcNAc)n-oxa に対する結合性を、20 mM リン酸カリウムバッファー pH 8.5 の条件下で、MicroCal 社製 iTC200 により測定した。
**【結果】**ODS カラムを用い、水：アセトニトリル＝98：2 の条件で各(GlcNAc)n-oxa を効率よく分取することができ、減圧蒸留による溶媒の留去および凍結乾燥により各(GlcNAc)n-oxa を精製することに成功した。水溶液中において(GlcNAc)n-oxa は自己水解によりキチンオリゴ糖へと戻るため、この方法はキチンオリゴ糖の精製にも用いることが可能であると考えられる。また、得られた(GlcNAc)n-oxa とシロイヌナズナ由来 GH18 キチナーゼの変異体(AtChiCG75W/W324F)を用いて合成反応を行ったところ、(GlcNAc)7 の生成を確認することができた。すでに報告されている微生物由来 GH18 キチナーゼを用いた方法との比較を行った結果、糖合成反応に適した(GlcNAc)n-oxa の鎖長は、植物酵素と微生物酵素では異なることが分かった。この両酵素における違いは、キチナーゼのドナー結合クレフトの長さに起因していると考えられる。現在、植物由来 GH18 キチナーゼの(GlcNAc)n-oxa に対する結合力を ITC により測定している段階である。

sugar oxazoline, plant GH18 chitinase, chitin oligosaccharide

発表番号：4D024
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Melioribacter roseus* 由来ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析

Characterization of laminaridextrin phosphorylase from *Melioribacter roseus*

森 晴彦、○磯野 直人（三重大院生資）
Haruhiko MORI, ○Naoto ISONO (Mie Univ.)

【目的】ラミナリデキストリンホスホリラーゼ（LDP, EC 2.4.1.30）は、ラミナリオリゴ糖の加リン酸分解とその逆反応（合成反応）を触媒する酵素である。LDP はミドリムシから発見された酵素であるが、ミドリムシ LDP の構造は明らかにされていない。また、β-1,3-グルカンホスホリラーゼ（EC 2.4.1.97）やラミナリビオースホスホリラーゼ（EC 2.4.1.31）とは基質特異性（鎖長特異性）が異なる。最近、我々は細菌由来の LDP（好冷性細菌 *Psychromonas ingrahamii* 由来, PiLDP）をはじめて見出し、その一次構造と酵素特性を明らかにした。また、グルコースと α-グルコース 1-リン酸（α-G1P）を基質として PiLDP の反応を行うと、ラミナリオリゴ糖や短鎖の β-1,3-グルカンを試験管内合成することが可能であることを見出した。一方、PiLDP は不安定な酵素であり、5°C でも失活が進行した。そこで、本研究では熱安定性に優れた LDP を見出し、その特性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】好熱菌 *Melioribacter roseus* のゲノム中に PiLDP と約 60%のアミノ酸配列類似性を示す 134 kDa のタンパク質 MrLDP がコードされていることを見出した。ヒスチジンタグが付加された MrLDP を大腸菌で生産し、ニッケルカラムで精製した。MrLDP は LDP 活性を有し、三糖以上のラミナリオリゴ糖に対する分解活性が高く、ラミナリビオースに対する分解活性は低かった。α-G1P を基質とした合成反応ではグルコース、ラミナリオリゴ糖、ラミナリンのほか, セロビオース, ソホロース、ゲンチオビオース、2-デオキシグルコース、グルコサミンなどをアクセプターとした反応も触媒した. これらの基質特異性は PiLDP と類似していた。MrLDP の至適温度は 55°C、至適 pH は 7.4 であった（PiLDP の至適温度は 25°C）。また、MrLDP を 55°C 以下で 60 min 加熱処理した後も加熱前と同等の活性を維持しており（PiLDP では 10°C 以下）、45°C で 48 h 保持しても活性に変化は見られなかった。α-G1P（100 mM）とグルコース（0.4–100 mM）を基質として、MrLDP の反応を 45°C で一晩行ったところ、ラミナリオリゴ糖や短鎖の β-1,3-グルカン（重合度 20 程度）が合成された。α-G1P/グルコースの値が大きくなるにつれて、反応産物の平均鎖長が長くなることが観察された。

laminaridextrin phosphorylase, laminarioligosaccharide, β-1,3-glucan

発表責任者：磯野直人（isono@bio.mie-u.ac.jp）

発表番号：4D025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 高効率 1,2-α-L-fucosynthase を用いた *O*-型および *N*-型糖鎖のフコシル化

# Fucosylation of *O*- and *N*-glycans using a highly efficient 1,2-α-L-fucosynthase

○杉山 友太[1]、加藤 紀彦[1,2]、後藤 愛那[1]、本多 裕司[1]、吉田 永史奈[1]、栗原 新[1]、山本 憲二[1]、北岡 本光[3]、片山 高嶺[1,2] ([1]石川県大、[2]京大院生命、[3]農研機構・食総研)
○Yuta SUGIYAMA[1], Toshihiko KATOH[1,2], Aina GOTOH[1], Yuji HONDA[1], Erina YOSHIDA[1], Shin KURIHARA[1], Kenji YAMAMOTO[1], Motomitsu KITAOKA[3], Takane KATAYAMA[1,2] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ., [3]NARO)

【背景】 分泌型個体では、ある種の上皮細胞や分泌タンパク質の糖鎖の非還元末端側に H 抗原 (Fucα1-2Gal) が見られ、これは FUT2 (α-1,2-fucosyltransferase 2) の機能による。1996 年に、Lynn らはマウス腸管の *fut2* 遺伝子発現が腸内細菌の存在により上昇することを見出した[1)]。その後、これは 3 型自然リンパ球が生産するインターロイキン-22 を介して起こることが報告され、また、腸管内における H 抗原の存在が、病原菌の感染を抑制していることが明らかにされた[2,3)]。最近では、*fut2* 遺伝子とクローン病との関連性も指摘されており、フコシル化糖鎖は良い共生を保つ上で重要な役割を果たすと考えられる[4)]。

我々は、2004 年に、H 抗原に特異的に作用する 1,2-α-L-fucosidase (*Bb*AfcA)を *Bifidobacterium bifidum* から単離した。本酵素は新規なアミノ酸配列を有していたため、新しい糖質加水分解酵素ファミリー95 として分類された。その後、*Bb*AfcA のグリコシンターゼ化に取り組み、その結果、N423H 変異体が Lactose とβ-Fucosyl fluoride (β-FucF)から 86%という高収率で 2'-Fucosyllactose を合成可能であることを見出した。本変異体は位置選択性が極めて高く、2'-Fucosyllactose 以外の副産物は検出されなかった。そこで本研究では、N423H がオリゴ糖だけでなく糖タンパク質糖鎖に H 抗原を導入可能であるかを調べた。

【方法】 ブタ胃ムチン、フェツインおよびアシアロフェツインをアクセプターとして用いた。なお、これら糖タンパク質はあらかじめ野生型 *Bb*AfcA で処理して非還元末端 Fucose を取り除いてから使用した。これら基質を N423H 変異体の存在下でβ-FucF と反応させた後、レクチンブロットを行うとともに、糖鎖を遊離させて完全メチル化処理をし、質量分析に供し構造を解析した。

【結果・考察】 *O* -型および *N*-型糖鎖ともに、その非還元末端に H 抗原の導入が認められた。また、質量分析の結果から、N423H 変異体はシアル酸含有糖鎖に対しても作用可能であることが示された。これらの結果より、N423H 変異体は糖タンパク質糖鎖に H 抗原を導入する上で有効なツールとなることが明らかとなった。

1) Lynn *et al., Science*, 1996
2) Goto *et al.*, *Science*, 2014
3) Pickard *et al.*, *Nature*, 2014
4) Philipp *et al., Proc.Natl.Acad.Sci,* 2011

fucosynthase, glycan, H antigen

発表責任者：片山 高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4D026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* のヘミセルロース分解酵素遺伝子クラスターの解析

# Characterization of a gene cluster from *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* involved in hemicellulose degradation

○芦田 久、米野 雅大、速水 穂乃香（近大生物理工）
○Hisashi Ashida, Masahiro Komeno, Honoka Hayamizu (Kinki Univ.)

【目的】ビフィズス菌が生息する大腸は容易に利用できる単糖や二糖類が限られた環境であるため、ビフィズス菌は宿主由来の複合糖質や食物由来の難消化性多糖を効率的に利用するための糖質分解経路を有している。特に、乳幼児から成人まで幅広い世代に見られる菌種 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* のゲノムは非常に多くの糖質分解酵素を含むが、植物性多糖に作用するものについては十分に明らかにされていない。そこでヘミセルロースに作用する酵素が含まれる Glycoside Hydrolase Family 43（GH43）に着目し解析することとした。

【方法】*B. longum* subsp. *longum* JCM 1217 のゲノム中には GH43 ドメインが 11 個、9 遺伝子が見出された。その中でも BLLJ_1854, BLLJ_1853, BLLJ_1852, BLLJ_1851, BLLJ_1850 は連続した遺伝子クラスターを形成しており、BLLJ_1851, BLLJ_1850 はそれぞれ２つの GH43 ドメインを有していた。いずれも、細胞外に GH43 ドメインを配向させた膜貫通タンパク質と予想された。BLLJ_1850、BLLJ_1852 および BLLJ_1853 について、N 末端分泌シグナル配列と C 末端膜貫通領域を除く部分をコードする遺伝子を pET23b ベクターにクローニングし、大腸菌 *E. coli* BL21(λDE3)Δ*lacZ* を用いて発現させたのち、His-tag アフィニティ精製したものを試験に供した。

【結果】いずれの酵素も *p*NP-α-arabinofuranoside に特異的に作用した。反応最適 pH はいずれも 5.5～6.0 であり、最適温度は BLLJ_1850 と BLLJ_1852 では 40℃、BLLJ_1853 では 30℃であった。また、いずれの酵素もマンガンイオンの添加により著しい活性化がみられた。天然基質に対する特異性については、BLLJ_1850 はアラビノキシランの側鎖のアラビノースに作用し、BLLJ_1853 と BLLJ_1852 はアラビナンに作用してアラビノースを遊離することがわかった。これらの酵素は、梅干製造の副産物である梅酢より調製された新規食品素材「ウメポリフェノール」中の多糖にも作用し、アラビノースを遊離した。

【結果】本研究は地域イノベーション戦略支援プログラム事業の支援を受けた。

bifidobacteria, arabinofuranosidase, hemicellulose

発表責任者：芦田久（ashida@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：4D027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *N*結合型糖鎖修飾経路に関わるカイコ *N*-アセチルグルコサミン転移酵素 II の解析

# The Characterization of *N*-Acetylglucosaminyltransferase-II, Involved in *N*-Glycan Processing Pathway in Silkworm

○西村 茉莉、三崎 亮、大橋 貴生、藤山 和仁（阪大）
○Mari NISHIMURA, Ryo MISAKI, Takao OHASHI, Kazuhito FUJIYAMA (Osaka Univ.)

［背景及び目的］

近年バイオ医薬品の需要が高まってきている。現在その多くはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で生産されているが、タンパク質生産性が低く、さらにヒトに感染するウイルスによる汚染の危険性がある。一方、昆虫細胞は CHO 細胞に比べ生産性が高く、さらに上記ウイルスによる汚染の危険性がないことから、今後昆虫細胞において、より安価で安全なバイオ医薬品が生産されることが期待される。しかし、ヒトと昆虫では生産した糖タンパク質の糖鎖構造が異なることが懸念される。糖鎖構造はタンパク質の安定性、生物学的活性、細胞間認識等に関与するため、より高品質なバイオ医薬品を生産するためには、糖鎖構造を昆虫型からヒト型に改変する必要がある。

昆虫型糖鎖では、その非還元末端にヒト型に見られるガラクトース（Gal）やシアル酸（Sia）残基の付加が見られない。*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）残基が露出した糖鎖の分布もわずかであり、また、ガラクトース転移酵素（GalT）を昆虫で発現させたとしても、基質である GlcNAc 化糖鎖が少ないため Gal 残基が付加する割合は低いという基礎的なデータを得ていることから、ヒト型への糖鎖の改変にはまず糖鎖非還元末端への GlcNAc 残基の付加が重要であると考えられる。特に、GlcNAc 転移酵素 II（GnT-II）は $GlcNAcMan_3GlcNAc_2$（$GNM_3$）型の糖鎖に GlcNAc を付加する鍵となる酵素である。しかしながら、昆虫では GnT-II 遺伝子が未だ同定されていない。そこで、本研究ではカイコ由来 GnT-II 遺伝子を単離・同定し、その酵素活性を測定した。

［方法及び結果］

カイコ幼虫より mRNA を抽出し、逆転写反応を行い cDNA を調製した。次に、cDNA を鋳型として GnT-II 遺伝子を PCR 法にて増幅したところ複数の PCR 産物を得た。これらをサブクローニングし塩基配列を決定したところ、2 か所のエキソンの有無によるスプライシングバリアントが見られた。そのうち、エキソン構造がヒトのものに最も近い GnT-IIB について pCold TF ベクターに挿入し、大腸菌で発現させ組み換え GnT-IIB の精製を行った。精製酵素を用い、ピリジルアミノ化標識した $GNM_3$ 型糖鎖を基質として酵素反応を行った。アミノカラムを利用した高速液体クロマトグラフィーを用いて酵素反応物を解析したところ、カイコ由来 GnT-IIB が活性を有することを確認した。

*N*-acetylglucosaminyltransferaseII, Silkworm, *N*-glycan

発表番号：4D028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# マルトースを出発物質とするトレハロース 6-リン酸の酵素合成法の確立

# Enzymatic synthesis of trehalose 6-phosphate from maltose

○田口 陽大[1]、佐分利 亘[2]、今井 亮三[2,3]、森 春英[2] ([1]北大農、[2]北大院農、[3]農研機構・北農研)
○Yodai TAGUCHI[1], Wataru SABURI[2], Ryozo IMAI[2,3], Haruhide MORI[2] ([1]School of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [3]Hokkaido Agricultural Reserch Center)

**目的）**トレハロース 6-リン酸 (Tre6*P*) はトレハロース生合成前駆体の一つであり、植物において胚の発生や花成、糖代謝を制御するシグナルとして働く。Tre6*P* の合成法として酵母による発酵法や有機合成法などが知られているが、収率が低く、また環境への負荷が懸念される。そこでトレハロース 6-リン酸ホスホリラーゼ (Tre6PP) を利用した酵素合成に着目した。本酵素は細菌のホスホトランスフェラーゼシステム (PTS) によるトレハロースの資化に関わり、Tre6*P* をグルコース 6-リン酸 (Glc6*P*) と β-グルコース 1-リン酸 (β-Glc1*P*) に加リン酸分解する。本研究では *Lactococcus lactis* sp. *lactis* JCM5805 株由来 Tre6PP 組換え酵素を、大腸菌を宿主として生産し、その酵素化学的諸性質を明らかにすると共に Tre6*P* の合成への応用を行った。β-Glc1*P* と Glc6*P* からの合成に加え、マルトースホスホリラーゼ (MP) とのカップリング反応を行った。すなわちマルトースを基質として加リン酸分解により β-Glc1*P* を生産し、さらに β-ホスホグルコムターゼ (β-PGM) による β-Glc1*P* の Glc6*P* への変換を組み合わせたワンポット反応により高効率での Tre6*P* 合成反応系を検討した。

**方法、結果、考察）**組換え Tre6PP を、大腸菌 BL21(DE3)を用いて生産し，ニッケルキレーティングカラムクロマトグラフィーにより精製した。1 L の培養液より精製酵素 18.5 mg を得た。pH 6.5、30℃における 10 mM Glc6*P* と 10 mM β-Glc1*P* に対する比活性は 231 U/mg であった。本酵素の安定性は 30℃以下 (pH 5.5、15 分間) 、pH 5.0-8.0 の範囲 (30℃、15 分間) であり、合成反応の至適 pH は 5.5 であった。各濃度の Glc6*P*、β-Glc1*P* に対する反応速度は三者複合体機構の速度式に良く従った。速度パラメーターは $k_{cat}$ 759 $s^{-1}$、$K_{m\ Glc6P}$ 1.85 mM、$K_{m\ \beta\text{-}Glc1P}$ 0.413 mM、$K_{i\ \beta\text{-}Glc1P}$ 0.519 mM であった。100 mM Glc6*P*、β-Glc1*P* を基質として 30℃、pH 7.4 にて 30 時間 Tre6PP を反応させた結果、82 mM Tre6*P* が得られた (収率 82%) 。次に組換え MP とのカップリング反応を行った。MP には *Bacillus* sp. AHU2001 株由来の組換え酵素を用いた。基質を 100 mM マルトース、20 mM 無機リン酸 (pH 6.8) 、および 100 mM Glc6*P* とし、Tre6PP と MP の存在下 30℃に 72 時間保持した。その結果 31 mM Tre6*P* が得られた (収率 31%) 。更に β-PGM の添加によりマルトースと無機リン酸のみを基質とした Tre6*P* 合成を行った。反応条件の最適化を行った結果、無機リン酸濃度はマルトース濃度の 50%に、マルトース濃度については 300 mM に、そして pH は 6.5-7.0 において Tre6*P* の生成量が最大となった。すなわち 300 mM マルトースおよび 150 mM 無機リン酸 (pH 7.0) から、54 時間の反応により 98 mM Tre6*P* が得られた (収率 65%)。

Trehalose 6-phosphate, Enzymatic synthesis, Trehalose-6-phosphate phosphorylase

発表責任者：田口陽大（dyddydy621@eis.hokudai.ac.jp）

発表番号：4D029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

非凍結結晶を用いたβ - アミラーゼ／マルトース複合体の pH による構造変化の解析
Crystallographic analysis of structural change of ß-amylase/maltose complex caused by pH
○三上 文三[1]、河村 和広[1]、安達 基泰[2]、姜 有那[1]、水谷 公彦[1]、高橋 延行[1] ([1]京大農、[2]日本原子力機構)
○Bunzou Mikami[1], Kazuhiro Kawamura[1], Motoyasu Adachi[2], Youna Kang[1], Kimihiko Mizutani[1], Nobuyuki Takahashi[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Japan atomic energy agency)

【目的】βーアミラーゼの活性中心付近には触媒残基である二つのGlu残基の他に、最大11Å移動する9残基のフレキシブルループと主鎖の構造がアポ型からプロダクト型に切り換わる5残基のインナーループの二つの可動ループが存在する。本酵素の生成物であるマルトースは本酵素の-2, -1と+1, +2のサブサイトに連続して2分子が結合するが、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪むことが知られている。一方、インナーループ上の変異体T342Sではインナーループの構造がアポ型に固定され、活性が低下することが明らかにされている。結晶内でのβ-アミラーゼの構造変化の詳細を明らかにするために、キャピラリーを用いた非凍結状態でのX線結晶構造解析を行い、野生型酵素とT342変異体についてマルトースの結合とインナーループの構造変化のｐH依存性について検討した。
【方法】野生型β - アミラーゼとT342変異体の三方晶の結晶はｐH5.4、42%飽和硫安溶液中でハンギングドロップ蒸気拡散法によって作製した。得られた結晶はｐH 3.3～8.8に調整した200mM マルトースを含む母液に５分間ソーキングした後にガラスキャピラリーに封じ、SPring-8のBL26B1とBL38B1で非凍結状態で回折データの収集を行った。一部のデータは30%グリセロールを含む母液を用いて凍結し、凍結状態でより高分解能のデータを同様に収集した。構造の精密化には主にSHELXLを用いた。また、各ｐHで異なるマルトース濃度で回折データを収集してマルトース結合の濃度依存性を調べた。
【結果】非凍結状態での回析データの収集は分解能1.5～1.9Åで行った。本酵素の至適ｐHである5.4ではマルトースは本酵素の-2, -1と+1, +2のサブサイトに連続して2分子が結合し、-1 サイトのグルコースの環はαアノマーのボート型に歪む。ｐHを変化させると、ｐＨ４以下では-1 サイトのグルコースの環はイス型になり、α、βの両アノマーが結合する。野生型ではすべてのｐHでインナーループはプロダクト型であった。-1サイトにイス型のαアノマーが結合すると、+1サイトのＯ４と衝突するため、+1, +2のサブサイトに結合しているマルトースは+2, +3サイトに移動して結合することが明らかになった。一方、T342S変異体では、すべてのｐHでインナーループはアポ型であり、-1サイトにはイス型のα、βの両アノマーをとるグルコース残基が結合していた。以上の結果から-1 サイトのグルコースの環がボート型に歪むためにはT342によって変化できるプロダクト型のインナーループが重要であることが示された。

β-amylase, crystal structure, enzyme mechanism

発表責任者：三上　文三（mikami@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4D030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Bacillus* sp. NTP-1 株由来マンガンカタラーゼ様タンパク質の機能解析
# Characterization of manganese catalase-like protein from *Bacillus* sp. NTP-1

○梅村 晃弘[1]、戸部 隆太[1]、田島 寛隆[1,2]、三原 久明[1] ([1]立命大生命、[2]立命大 R-GIRO)
○Akihiro UMEMURA[1], Ryuta TOBE[1], Hirotaka TAJIMA[1,2], Hisaaki MIHARA[1] ([1]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ., [2]R-GIRO, Ritsumeikan Univ.)

〔緒言〕

カタラーゼは、過酸化水素を水と酸素に分解する反応を触媒する酵素であり、生体内の酸化還元バランスの維持に重要な役割を果たしている。カタラーゼは一般に補因子としてヘムを用いるが、*Thermus thermophilus* や *Lactbacillus plantaum* など一部の細菌においてはヘムの代わりにマンガンを補因子として用いるマンガン型カタラーゼが存在する。インドパンジャーブ地方から単離された *Bacillus* sp. NTP-1 は、酸化ストレス誘導剤として知られる亜セレン酸に対して高い耐性能を有する。ゲノム解析の結果、本菌はヘム型カタラーゼ遺伝子を 2 種、マンガン型カタラーゼ遺伝子を 2 種、計 4 種のカタラーゼ遺伝子を持つものと推定された。これまでに本菌のマンガンカタラーゼの一つをコードする *katM* 遺伝子を欠損した変異株において、亜セレン酸耐性が著しく低下することを見出した。そこで本研究では、*Bacillus* sp. NTP-1 の抗酸化システムにおける KatM の機能を解明することを目的とした。

〔方法・結果〕

TSB 富栄養培地における *Bacillus* sp. NTP-1（WT）と *katM* 欠損株（TN1）の生育を $OD_{600}$ の測定により経時的に調べた。その結果、定常期における最高到達濁度は同じであったが、WT は 8 時間で定常期に達するのに対し、TN1 では 12 時間を要した。一方で、両菌株を過酸化水素含有 TSB 培地で培養し、生育への過酸化水素の影響を調べた結果、WT は 5 mM 過酸化水素を含む培地中でも生育できたのに対し、TN1 は 2 mM 以上の過酸化水素を含む培地中では生育できなかった。次に、WT と TN1 の持つカタラーゼ活性をアミノアンチピリン法により調べた。両菌株を TSB 培地で定常期まで培養し、超音波破砕後の細胞抽出液と沈殿画分を用いて、消費された過酸化水素量を測定した。その結果、WT と TN1 間で細胞抽出液におけるカタラーゼ活性に差はみられなかったが、沈殿画分では WT に比べて TN1 におけるカタラーゼ活性の低下が認められた。また、両菌株における総カタラーゼ活性の経時変化を同様の方法により測定した結果、菌体の生育に伴ってカタラーゼ活性が上昇し、KatM は対数増殖期に最も発現していた。これらのことより、KatM は細胞膜画分に局在し、亜セレン酸耐性に対してのみならず、過酸化水素などの酸化ストレスへの耐性にも大きく寄与していることが示唆された。

catalase, selenite, antioxidant

発表責任者：三原　久明（mihara@fc.ritsumei.ac.jp）

発表番号：4D031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

Exploring Microbial Genomes in Search of Novel Rieske Oxygenase
○Joydeep CHAKRABORTY, Chiho SUZUKI-MINAKUCHI, Kazunori OKADA, Hideaki NOJIRI
(The Univ. of Tokyo)

**Background:** Bacterial aromatic ring-hydroxylating oxygenases, bearing Rieske [2Fe-2S] centre, constitute a large family of enzymes, which have potential utility in bioremediation of diverse aromatic compounds in the environment. In our previous studies we have already revealed the pathways leading to the evolution of ROs with such a wide spectrum of substrate specificities, based on phylogenetic studies and mathematical models **[1]**. However, all the functionally characterized ROs known till now have been identified in mesophiles. We are currently trying to identify novel ROs present among thermophiles. Apart from enriching our understanding on the distribution and mechanism of ROs in nature, this study is believed to aid in designing new bioremediation strategies along with application in industrial biosynthetic processes.
**Methods and Results:** Screening of the bacterial genome database revealed the existence of 800 thermophilic genome sequences (out of 3152 completed genomes) distributed among 10 different phyla. Blastp search, using representative sequences from each class of ROs, initially lead to the identification of 93 putative homologues belonging to 18 thermophilic genera. Among them, 42 non-redundant sequences were subjected to phylogenetic studies to assess their relatedness with known ROs based on which, they were clustered among 4 major RO types **[1]**. The analyses were further focused on the most diverse classes, narrowing down to 29 ROs. The conserved motif signatures corresponding to the N-terminal Rieske [2Fe-2S] center and the C-terminal 2-His-1-carboxylate motif were found to be intact in all the sequences with minor variation in their respective positions. The RO homologues were further screened on the basis of their occurrence exclusively among taxonomically close thermophilic genera. Finally, genomes of all these thermophiles were browsed for presence of putative genes encoding the associated electron transport enzymes (oxidoreductases) using suitable query probes followed by manual inspection. All these analyses led to the selection of four different strains, viz., *Thermus oshimai* JL-2, *Geobacillus thermoglucosidasius* NBRC 107763, *Thermomicrobium roseum* DSM 5159 and *Thermoanaerobacterium xylanolyticum* LX-11, for further experimental validation of their substrate specificity and mode of catalysis. Attempts are currently being made to clone and express the RO genes (along with possible combinations of electron transport genes) from strains JL-2 and NBRC 107763 to test their substrate specificity and mode of catalysis.
**[1]** Chakraborty et al. (2012). *J Biomol Struct Dyn* 30:419-436.

Rieske [2Fe-2S] oxygenase, enzyme evolution, thermophile

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4D032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 糸状菌 Z26-4-8 株が産生するタンパク質酸化能を持つアミノ酸オキシダーゼの諸性質

# Characterization of an amino acid oxidase with protein-oxidixing activity from fungal strain Z-26-4-8

○土屋 高伸、平良 竜大、山田 美和、礒部 公安 (岩手大農)
○Takanobu TSUCHIYA, Ryouta TAIRA, Miwa YAMADA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】生体内においてタンパク質中のリジン残基がオキシダーゼによって酸化され、非酵素的反応によって重合する反応が報告されていることから、タンパク質中のリジン残基を酸化する酵素は食品等の物性改良への応用が期待できる。当研究室ではこれまでに、タンパク質を酸化する酵素を産生する微生物を探索し、新規な *Penicillium steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼを見出してきた[1]。本研究では、他の菌株（糸状菌 Z26-4-8 株）からタンパク質酸化能を有するオキシダーゼを精製し、諸性質を明らかとすることを目的とした。

【方法】酵素活性は、基質の酸化で生成される過酸化水素を比色法(555 nm)で測定し、算出した。酵素は、L-リジン培地で培養した菌体から粗酵素液を調製し、DEAE-Toyopearl、Phenyl-Toyopearl、Hydroxyapatite、Toyopearl HW-55 の各カラムクロマトグラフィーで精製した。

【結果・考察】40 L 分の培養菌体を用いて、酵素を上記４段階のクロマトグラフィーで精製した結果、酵素は 924 倍の精製度で電気泳動上単一となり、活性回収率は 33.8%であった。本酵素は、吸収スペクトル分析から、フラビンを補欠分子族として有している可能性が示唆された。本酵素の分子質量は約 290 kDa(サブユニット 79.6 kDa)と推定された。N 末端アミノ酸配列（25 残基）は、*P. steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼと高い相同性を示した（同一残基 96%)。本酵素は、β-ラクトグロブリン（$K_m$ 値 0.18 mM)、サケ由来ゼラチン（$K_m$ 値 0.42 mM)、アルブミン、ミルクカゼイン、ミオグロビン、リジン含有ペプチド、一部の D-アミノ酸、および *n*-ブチルアミンに対して活性を示し、幅広い基質特異性を有していた。β-ラクトグロブリンを基質とした場合、pH 5.0～10.0 の広い範囲で作用し、最適反応 pH は 6.5 であった。また、最適反応温度は 55℃であり、pH5.0～6.0 で 40℃、30 分間加温しても 90%以上の活性を維持していた。以上のように、本酵素は、分子質量、補欠分子族および酵素反応に対する pH、温度の影響において *P. steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼと類似していたが、*P. steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼとは異なり、D-アミノ酸およびアミンにも作用した。これまでに、銅含有の牛血清アミンオキシダーゼやリジルオキシターゼがタンパク質とアミン類を酸化することが報告されているが、本酵素はタンパク質とアミンだけでなく、D-アミノ酸および L-アミノ酸にも活性を示すフラビン酵素であった。以上のことより、本酵素は *P. steckii* AIU 027 由来 L-アミノ酸オキシダーゼに近い新規酵素であると推定された。

[1] K. Isobe et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 117, 690-695 (2014)

Amino acid oxidase, Protein oxidase

発表番号：4D033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *Sporidiobolus salmonicolor* TPU 2001 由来新規エノン還元酵素

# Novel enone reductase from *Sporidiobolus salmonicolor* TPU 2001

○山本 和範[1,2]、伊奈 隆年[1,2]、奥 裕子[1,2]、銅谷 正晴[3]、江端 秀司[3]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO、[3](株)東邦アーステック)
○Kazunori YAMAMOTO[1,2], Takatoshi INA[1,2], Yuko OKU[1,2], Masaharu DOYA[3], Shuji EBATA[3], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST, [3]TOHO EARTHTECH,INC.)

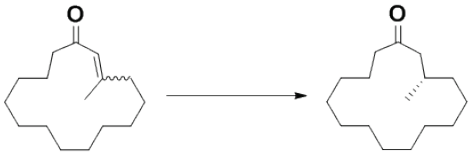
【目的】

ムスコンは麝香鹿の香嚢から得られる大員環ケトンであり、香料や漢方薬として利用される。これまでに多くの光学活性ムスコンの合成法が報告されているが、高価な金属試薬や多段階の反応を必要とするため、工業スケールでの製造には至っていない。そこで本研究では、酵素を用いてムスコンの合成中間体として知られる (*E/Z*)-3-メチルシクロペンタデセノンを立体選択的に還元し、光学活性なムスコンを生産することを目的とした。

【方法および結果】

(*E/Z*)-3-メチルシクロペンタデセノンを還元できる微生物のスクリーニングは、YPD 培地 (1% yeast extract, 2% polypepton, 2% glucose) で生育した微生物を用いて、次の方法で行った。200 mM グルコース含有 20 mM リン酸バッファー (pH 7.0) に菌体と 1 mM (*E/Z*)-3-メチルシクロペンタデセノンを加えて、30ºC で 24 時間反応し、反応液から酢酸エチルで生成物を抽出し、GC-MS で分析してムスコンの生産を調べた。最も収率良く基質を還元する微生物として *Sporidiobolus salmonicolor* TPU 2001 を選抜した。無細胞抽出液を用いて反応して生成物を同定した結果、生成物は(*S*)-ムスコンあった。そこで、*S* 選択的酵素の精製を実施した。本酵素を疎水性クロマトグラフィーやイオン交換クロマトグラフィーなどを組合せて SDS-PAGE で単一バンドになるまで精製した。

精製酵素の内部配列解析の結果を用いて、本酵素の遺伝子をクローニングし、発現用ベクター pET28a に組み込んで、大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) を形質転換した。組換え酵素の (*E/Z*)-3-メチルシクロペンタデセノンに対する比活性は、*S. salmonicolor* TPU 2001 から精製した酵素と同程度であり、シクロドデセノンやシクロペンタデセノンなどの大員環エノンと反応したが、シクロヘキセノンなどの小員環エノンとは反応しなかった。また、本酵素の補酵素は NADPH であり、最適温度は 30ºC、最適 pH は 7.0-9.0 で、40ºC 以下および pH 4.5-11.0 で安定であった。本発表では、本酵素を用いた立体選択的な(*S*)-ムスコンの生産についても報告する。




(*E/Z*)-3-メチルシクロペンタデセノン　(*S*)-ムスコン

enone reductase, *Sporidiobolus salmonicolor* TPU 2001, Muscone

発表番号：4D034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

*Streptomyces avermitilis* 由来 DyP 型ペルオキシダーゼの異種発現と特性解析
Heteologous expression and characterization of DyP-type peroxidase from *Streptomyces avermitilis*

○菅原 佳奈子[1]、成岡 知美[1]、加藤 史帆[1]、森田 美文[2]、菅野 靖史[1] ([1]日本女子大・理・物生、[2]東工大院・総合理工)
○ KANAKO SUGAWARA[1], TOMOMI NARIOKA[1], SHIHO KATO[1], MIFUMI MORITA[2], YASUSHI SUGANO[1] ([1]Dept. Chem. Biol. Sci., Fac. Sci., Japan Women's Univ., [2]Int. Grad. Sch. Sci. Eng., Tokyo Tech.)

【背景】1999 年にある種の白色腐朽菌からアントラキノン染料を脱色する酵素が単離精製され、Dye decolorizing peroxidase( **DyP)**と名付けられた。その後、様々な生物種でこの酵素に類似のアミノ酸配列を持つ酵素が発見され、これら一群の酵素は、**DyP 型ペルオキシダーゼファミリー**として分類されている。このファミリーに含まれる酵素は一次配列の相同性によりサブクラスに分けられていたが、最近になって立体構造の相同性により **P、I、V の 3 つのクラス**に再分類された。クラス P および I は主に細菌の産生する酵素で構成されており、ペルオキシダーゼ活性は低く、染料の脱色能をほとんど有しない。一方、クラス V は主に真菌とシアノバクテリアの産生する酵素から構成され、高いペルオキシダーゼ活性を示し、アントラキノン骨格を持つ染料を脱色する。**放線菌 *Streptomyces avermitilis*** のもつ 2 つの DyP 型ペルオキシダーゼは一次配列からクラス V に属すると予測されるが、その場合は高いペルオキシダーゼ活性を有するはずである。また、放線菌由来の DyP 型ペルオキシダーゼがクラス V に属する例は初めてとなる。このことは、生物種の進化とは独立して、クラスごとに酵素自体の進化が起きている可能性を示唆している。従って、クラスごとの酵素の特徴を明らかにすることにより、DyP 型ペルオキシダーゼファミリー全体に対する理解が進むことが期待される。
【方法】*S. avermitilis* 由来の DyP 遺伝子である *SavDyPrx03-2* に His タグ配列を付加し、同属関係にある *Streptomyces lividans* を用いた発現系により過剰発現を行った。得られた形質転換体を振とう培養の後、菌体を回収し、超音波破砕して可溶性画分を回収した。その後、Ni-NTA およびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製した。得られた酵素（**SaDyP2**）を用いて一般的なペルオキシダーゼ基質である ABTS および DMP に対する至適 pH と酵素の耐熱性を調べ、酵素学的パラメータ（$K_m$、$V_{max}$）を算出した。また、アントラキノン染料およびアゾ染料に対する分解活性を調べた。
【結果】SaDyP2 の ABTS に対する酵素反応の至適 pH は 4.5、DMP に対しては 4.0 であった。熱安定性は 30 ℃、30 分の加温では 80 %、40 ℃では 60 %の残存活性がみられた。一方、50 ℃では 30 分、60 ℃では 5 分で活性が失われた。染料に対しては、アントラキノン染料である Acid Blue 324 を分解したが、アゾ染料に対して分解活性はみられなかった。これらの結果から、SaDyP2 は真正細菌由来でありながら低い至適 pH、高いペルオキシダーゼ活性、アントラキノン染料に対する分解活性を持ち、クラス V に属する酵素であることが裏付けられた。今後は X 線結晶構造解析を行い、構造上の特徴を明らかにしていきたいと考えている。

DyP, Peroxidase, biological evolution

発表責任者：菅原　佳奈子（sugawarak@fc.jwu.ac.jp）

発表番号：4D035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# *In vitro* maturation of soluble manganese peroxidase expressed in chaperones over-expressing *E. coli*

○Almasul Alfi, Bo Zhu, Jasmina Damnjanovic, Takaaki Kojima, Yugo Iwasaki, Hideo Nakano (Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ.)

Manganese peroxidase (MnP) oxidizes $Mn^{2+}$ to $Mn^{3+}$, which chelated with organic acid, can function as a strong non-specific oxidant to degrade inaccessible and bulky substrates. Therefore, MnP is widely used in paper industries, biodegradation of synthetic polymers, and bioremediation of environmental pollutants. However, MnP is mostly expressed as insoluble form in *E. coli*. The objective of this study was to improve and maturate the soluble fraction of MnP from *Phanerochaete chrysosporium* expressed in *E. coli*. Our previous study showed that disulfide bond isomerase DsbC improved the solubility of *in vitro* synthesized MnP (1). Hence, *E. coli* strain SHuffle T7 Express was chosen as the host for *in vivo* expression, because it overexpresses the DsbC in the cytoplasm. The MnP was also co-expressed with various other chaperone combinations, where DsbC-dnaK-dnaJ-grpE proved as the best combination to increase MnP solubility. After the purification of MnP, the chaperones were found to be co-purified. To disassociate the MnP-chaperone complex, the cell lysate or the semi-purified MnP-chaperone complex was incubated with additional hemin, ATP and ATP-regeneration system. Optimization of this *in vitro*-maturation step led to the production of holo-MnP with specific activity comparable to that of commercial glycosylated MnP form *P. chrysosporium*.

(1) Ninomiya, R., Zhu, B., Kojima, T., Iwasaki, Y., and Nakano, H. (2014) Role of disulfide bond isomerase DsbC, calcium ions, and hemin in cell-free protein synthesis of active manganese peroxidase isolated from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biosci. Bioeng., 117, 652-657.

Manganese peroxidase, Chaperone co-expression, ATP-dependent chaperone release

発表責任者：Hideo Nakano（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4D036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# アナモックス菌のヘムタンパク質発現系構築

# Expression system for heme protein of anammox

○平 大輔[1]、古川 憲治[2]、藤井 隆夫[1] ([1]崇城大応生命、[2]熊大院自然)
○Daisuke HIRA[1], Kenji FURUKAWA[2], Takao FUJII[1] ([1]Sojo Univ., [2]Kumamoto Univ.)

【目的】ある種の細菌が行う、嫌気的にアンモニアを酸化する（anaerobic ammonium oxidation：anammox）反応が知られている。anammox 反応では、亜硝酸が酸化剤となり、アンモニアと亜硝酸の窒素原子由来の窒素ガスが嫌気的に生じる。この反応過程においてヒドラジンが中間体となることが明らかとなっているが、反応機構の全容解明には至っていない。我々は独自に集積した anammox 菌 KSU-1 株について、ヒドロキシルアミン酸化還元酵素（HAO）、ヒドラジン酸化酵素（HZS）、ヒドラジン合成酵素（HZS）の精製、性質の解明を進めてきた。これら酵素は分子内に共有結合したヘム（*c* 型ヘム）を複数有しているマルチ *c* 型ヘムタンパク質である。一般的に、大腸菌や酵母を用いた異種発現系では、マルチ *c* 型ヘムタンパク質の大量発現は困難であり、HAO や HZO などの異種発現についても成功例がない。本研究では、これら anammox 菌の各種酵素の発現への適用を目指して、新たな *c* 型ヘムタンパク質の異種発現系の構築を目的とした。
【方法】*c* 型ヘムタンパク質の異種発現系構築にあたり、ゲノム解読されていること、HAO 遺伝子を有すること、従属栄養細菌であること等の条件から、*Ruegeria pomeroyi* DSS-3 を宿主に選んだ。広宿主域プラスミド pBBR122 を用いて本菌の形質転換条件を検討した。本菌で発現していることが知られている低分子量シトクロム *c* のプロモーター領域とペリプラズムへの輸送シグナル配列を pBBR122 に組込み、*c* 型ヘムタンパク質発現用プラスミドを作成した。発現用プラスミドに anammox 菌の *c* 型ヘムタンパク遺伝子（低分子量シトクロム *c*（遺伝子番号 *b_428*）、HAO、HZS など）を組み込み、*Ruegeria pomeroyi* DSS-3 を形質転換、大量培養することで *c* 型ヘムタンパクの発現を試みた。
【結果】*Ruegeria pomeroyi* DSS-3 を宿主とし、pBBR122 上に配置したプロモーター及びシグナル配列を利用した *c* 型ヘムタンパクの発現系を構築することが出来た。anammox 菌の低分子量シトクロム *c*（b_428）の発現株を用いて発現条件を検討したところ、15℃での低温培養で収量が上昇し、最大で培地 1 L 当たり 0.5 mg の精製タンパク質が得られた。本発現系は熱に不安定な *c* 型ヘムタンパク質の発現に使用できることが示された。現在、HAO および HZS の発現を検討している。

anammox, heme protein, protein expression

発表責任者：平　大輔（hira@life.sojo-u.ac.jp）

発表番号：4D037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酢酸菌のイソマルトビオン酸生産酵素の同定

# Identification of isomaltobionic acid producing enzyme from acetic acid bacterium

○桐生 高明、駒 大輔、田中 重光、木曽 太郎、中野 博文、村上 洋（大阪市工研）
○Takaaki Kiryu, Daisuke Koma, Shigemitsu Tanaka, Taro Kiso, Hirofumi Nakano, Hiromi Murakami (Osaka Municipal Technical Research Institute)

（目的）ラクトースを酸化すると還元末端にカルボキシル基が導入されたラクトビオン酸が生成する。我々は企業との共同研究により酢酸菌の菌体を利用したラクトビオン酸生産法の実用化に成功した。現在、ラクトビオン酸は機能性食品素材としてヨーグルトをはじめとする食品に配合され販売されている。一方、酢酸菌は、ラクトースと同じ二糖類であるイソマルトースをラクトースの 20-60 倍効率的に酸化できることから、イソマルトビオン酸はラクトビオン酸より効率的に生成できると期待されている。我々はすでに酢酸菌のラクトース酸化酵素が PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼであることを報告している。しかし、本酵素は D-グルコースを効率的に酸化するが、ラクトースをはじめとする二糖類への酸化活性は極めて低いことから、二糖類であるイソマルトースを効率的に酸化できる糖酸化酵素の正体は不明であった。我々は本酵素の同定を目的に研究を行った。
（方法）様々な酢酸菌を培養し休止菌体を調製した。休止菌体のイソマルトース酸化活性を測定し、活性の高い株の取得を目指すとともに、様々な酢酸菌のイソマルトース酸化活性とラクトース酸化活性を比較した。さらに、*Gluconobacter frateurii* NBRC3285 休止菌体のイソマルトース酸化活性に及ぼす D-グルコース添加の影響を調べた。全ゲノム配列解析株である *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*)NBRC3288 株の PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼ過剰発現株および本酵素の欠失株を調製し、それぞれの株のイソマルトース酸化活性を調べた。
（結果）様々な酢酸菌のラクトース酸化活性の強さと、イソマルトース酸化活性を比較したところ、両者の強さには正の相関が見られた。最もイソマルトース酸化活性が高かった *G. frateurii* NBRC3285 の休止菌体のイソマルトース酸化活性は、PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼの良好な基質である D-グルコースにより強く阻害を受けることを明らかにした。これらの結果より、目的の酵素は PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼと考え、酢酸菌と大腸菌の発現用シャトルベクターに目的酵素を組込み、*K. medellinensis* NBRC3288 で大量発現させた。PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼを大量発現させることで D-グルコース酸化活性だけでなく、イソマルトースの酸化活性も高くなった。さらに、*K. medellinensis* NBRC3288 株のゲノム上の目的酵素を破壊し、欠失株を調製した。欠失株は D-グルコース酸化活性、ラクトース酸化活性及びイソマルトースの酸化活性のいずれも示さなかった。上記の結果は、酢酸菌のイソマルトース酸化酵素は PQQ 依存性膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼであることを示唆している。

glucosedehydrogenase, acetic acid bacterium, isomaltose

発表責任者：桐生高明（kiryu@omtri.or.jp）

発表番号：4D038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# ヤンバルトサカヤスデ由来マンデロニトリル酸化酵素の性質の解明と分子系統樹解析

# Characterization and phylogenetic analysis of mandelonitrile oxidase from the invasive millipede, *Chamberlinius hualinensis*

○石田 裕幸[1,2]、桑原 保正[1,2]、森田 將史[1,2]、市来 弥生[1,2]、浅野 泰久[1,2]（[1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO）
○Yuko ISHIDA[1,2], Yasumasa Kuwahara[1,2], Masashi Morita[1,2], Yayoi Ichiki[1,2], Yasuhisa Asano[1,2]
([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST)

【目的】私たちは、新規酵素探索の目的でヤンバルトサカヤスデ(*Chamberlinius hualienensis*)から産業上有用な酵素を探索し、ヒドロキシニトリルリアーゼ(ChuaHNL)を単離し、性質を解明してきた(Dadashipour et al., 2015)。また昨年度は mandelonitrile を benzoyl cyanide に酸化する反応を触媒する新規酵素、mandelonitirle oxidase (ChuaMOX)、を単離し、ヤスデにおける防御機構への関与を明らかにした。本研究では、さらに、ChuaMOX の補因子、基質である mandelonitrile、酸素消費と生成物である benzoyl cyanide、$H_2O_2$ の化学量論的関係、基質特異性、阻害剤について検討した。また、フロリダカーペンターアント(*Camponotus floridanus*)由来グルコースデヒドロゲナーゼと 51%の相同性があることから分子系統樹解析も行った。

【方法】ChuaMOX 活性は、mandelonitrile を基質とし、生成する $H_2O_2$ を比色法で測定した。酵素活性は、1 分間当たり 1μmol の $H_2O_2$ の生成を 1 U と定義した。また、基質である mandelonitrile と生成物である benzoyl cyanide は HPLC-キラルカラム用いて定量した。本酵素は、-80℃で凍結保存された 1,000 頭のヤンバルトサカヤスデからイオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過で精製した。補因子は薄層クロマトグラフィーで同定した。酸素消費量は、S1 クラーク型酸素電極で測定した。分子系統樹は MEGA6 で作製した。

【結果】ChuaMOX の補因子はフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)であった。同酵素は、(*S*)-mandelonitrile とは反応せず、(*R*)-mandelonitrile から benzoyl cyanide を生成した。酸素消費量と生成物である benzoyl cyanide 量を測定した結果、化学量論的に酸素を消費し、(*R*)-mandelonitrile から benzoyl cyanide と $H_2O_2$ を生成したことから、FAD を補因子とする EC 1.1.3-に属する酸化還元酵素に分類された。ChuaMOX は、mandelonitrile、(*E*)-2-hydroxy-4-phenylbut-3-enenitrile、2-(3-bromophenyl)-2-hydroxyacetonitrile を基質とし、D-glucose とは反応しなかった。また、1 mM の potassium cyanide、sodium azide、8-hydroxyquinoline で酵素活性が阻害され、1 mM の塩化鉄(III)で活性化された。分子系統樹解析より、ChuaMOX はグルコースデヒドロゲナーゼやアルコールデヒドロゲナーゼのクレードには含まれないことが明らかとなった。

Dadashipour et al. (2015) PNAS, 112, 10605-10610.

mandelonitrile oxidase, Characterization, *Chamberlinius hualienensis*

発表番号：4D039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# Cumene dioxygenase における oxygenase-ferredoxin 間相互作用部位の解明

# Interaction between terminal oxygenase and ferredoxin components of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01

○小竹 立朗[1,2]、松澤 淳[1]、伏信 進矢[3]、岩田 健一[2]、水口 千穂[1]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]（[1]東大生物工学セ、[2]芝工大院シ、[3]東大院農生科・応生工）

○Tatsuro KOTAKE[1,2], Jun MATSUZAWA[1], Shinya FUSHINOBU[3], Kenichi IWATA[2], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]Biotechnology Research Center, The Univ. of Tokyo, [2]Shibaura Institute of Technology, [3]Dept. Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】難分解性芳香族化合物の芳香環に水酸基を導入する初発酸化酵素は Rieske [2Fe-2S]クラスターと非ヘム鉄を有することから Rieske nonheme iron oxygenase (RO)と呼ばれ、基質と直接反応する酵素 terminal dioxygenae (Oxy)、Oxy に NADH から電子を受け渡す電子伝達酵素 [reductase (Red)と ferredoxin (Fd)、クラスによっては Red のみ]を含む複数のコンポーネントから構成されている。Oxy には$\alpha_3$ 型と$\alpha_3\beta_3$ 型の二種類が存在することが知られており、当研究室ではこれまでに $\alpha_3$ 型である carbazole 1,9a-dioxygenase (CARDO)を用いた Oxy-Fd 複合体の結晶構造解析を行い、その結合様式や結合に重要なアミノ酸残基などを明らかにしてきた (Ashikawa *et al*., 2006, *Structure*, 14:1779-89)。その一方で、$\alpha_3\beta_3$ 型の Oxy-Fd 間相互作用の解析はほとんど成されていない。本研究では、CARDO と同様に Fd から電子を受け取る $\alpha_3\beta_3$ 型 Oxy を有する RO であり、結晶構造解析により Oxy の構造が明らかとなっている *Pseudomonas fluorescens* IP01 株由来の cumene dioxygenase (CDO)を材料に $\alpha_3\beta_3$ 型 Oxy の Fd 結合部位を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】$\alpha_3$ 型である CARDO の Fd 結合表面は疎水性残基が窪みを形成し、その周りに荷電性残基が突出しているという特徴を持つ。$\alpha_3\beta_3$ 型である CDO の表面電荷を調べた結果、Fd 結合部位は $\alpha_3$ 型である CARDO と同様な部位とそれとは異なる部位の 2 か所が予想された（図）。これらの推定結合部位を構成する残基のうち、側鎖がタンパク質表面に出ている残基 16 種類についてアラニン置換体を作製した。大腸菌で発現後、α サブユニットの C 末端側に付加したヒスチジンタグを用いたアフィニティークロマトグラフィー、及びゲル濾過クロマトグラフィーで目的タンパク質を精製し、CD スペクトルにより二次構造解析を行った結果、結晶構造解析で構造が明らかになっているネイティブなタンパク質と同等の数値（α-helix: 35.1%, β-sheet: 31.6%, random coil: 33.3%）を示したことから、アラニン置換による大きな構造変化は無かったと考えられた。また、NADH（電子供与体）、精製した各種 Oxy、Fd、Red を用いて、Oxy が酸化還元状態で吸収スペクトルが変化することを利用し 457 nm の吸収を経時的に測ることで Oxy への電子伝達活性を測定する系を構築した。各アラニン置換体で活性測定を行った結果も併せて報告する。

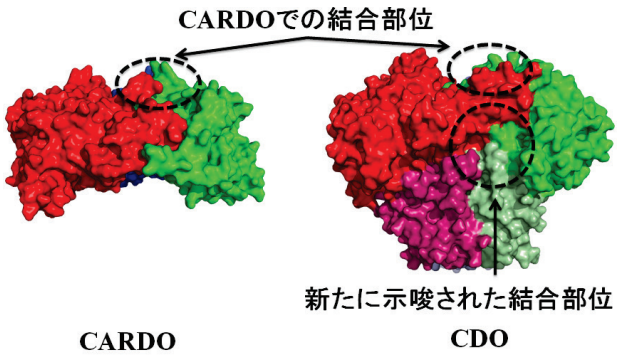


図 Fd推定結合部位

rieske nonheme iron oxygenase, electron transfer, protein-protein interaction

発表番号：4D040
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# 酸性多糖の代謝に関わる還元酵素の補酵素要求性に関わる構造要因

# Structural determinants for coenzyme requirement in reductases responsible for metabolism of acidic polysaccharides

高瀬 隆一[1]、丸山 如江[2]、老木 紗予子[1]、三上 文三[1]、村田 幸作[2]、○橋本 渉[1] ([1]京大院・農、[2]摂南大・理工)
Ryuichi TAKASE[1], Yukie MARUYAMA[2], Sayoko OIKI[1], Bunzo MIKAMI[1], Kousaku MURATA[2], ○Wataru HASHIMOTO[1] ([1]Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Fac. Sci. Eng., Setsunan Univ.)

【背景と目的】補酵素 NADPH と NADH との構造類似性（アデニル酸リボース 2'位：リン酸基の有無）にもかかわらず、酸化還元酵素の補酵素要求性は厳密に制御されている。しかし、その構造要因に関する知見は少ない。本研究では、生物に普遍的に存在する SDR（short-chain dehydrogenase/reductase）ファミリーに焦点を当て、酸性多糖（アルギン酸、ペクチン、グリコサミノグリカン）から生じる不飽和ウロン酸（α-ケト酸）に作用する細菌由来還元酵素を対象に、異なる補酵素要求性を示す酵素群の分子特性と構造機能相関、ならびに補酵素要求性を決定する構造要因を明らかにすることを目的とする。これまでに、それぞれ NADPH と NADH 要求性を示すアルギン酸代謝関連 α-ケト酸還元酵素 A1-R と A1-R′の構造解析により、補酵素のアデニル酸リボース 2'位の結合に関わる二本のループを特定し、両酵素のループを互いに交換することで補酵素要求性を変換した。今回は、グリコサミノグリカンの代謝に関わる連鎖球菌 α-ケト酸還元酵素 DhuD の立体構造を決定し、各種酸性多糖の代謝に関わる α-ケト酸還元酵素の比較構造解析により、補酵素要求性に関わる構造要因を解明した。
【方法と結果】連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* より DhuD 遺伝子をクローニングし、大腸菌発現系を構築後、DhuD を精製した。本酵素は、NADH 特異的に 2,5-diketo-3-deoxy-D-gluconate（DK-II）を還元し、2-keto-3-deoxy-D-gluconate（KDG）を生成した。ペクチン代謝関連酵素 KduD も DhuD と同一の反応を触媒するが、NADH と NADPH の両方を用いることができる。X 線結晶構造解析により決定した DhuD の立体構造は、他の SDR ファミリーと同様、三層からなる α/β/α を基本骨格として補酵素結合モチーフ Rossmann fold と二本のループをもつ。当研究室で決定した A1-R、A1-R′および KduD の立体構造を用いて、補酵素結合部位におけるアデニル酸リボース 2'位結合部位を比較すると、DhuD は四つの酵素の内、最も小さい空間容積を示すのに対し、KduD は A1-R と A1-R′における該当空間の中間程度の容積を有していた。また、pH 7.0 における分子表面電荷を比較した結果、DhuD の該当部位は弱い負電荷を帯びていたが、KduD ではほとんど帯電していなかった。
【考察】酸性多糖の代謝に関わる α-ケト酸還元酵素において、補酵素のアデニル酸リボース 2'位結合部位の空間と電荷を形成する二本のループが補酵素要求性を決定する構造要因であることが分かった。共通の基本骨格をもつ SDR ファミリーは、リン酸基の空間容積と負電荷を許容あるいは反発する二本のループ構造を組み合わせて、補酵素要求性を制御していることが示唆された。

本研究の一部は、公益財団法人野田産業科学研究所の研究助成により行われた。

Coenzyme, Acidic polysaccharide, Reductase

発表責任者：橋本　渉（whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4D041
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア D

# α-プロテオバクテリアの細菌が持つコハク酸脱水素酵素の鉄硫黄クラスター近傍アミノ酸変異による活性制御の解析

# Effect of amino acid mutation introduced close to iron-sulfur cluster in succinate dehydrogenase from α-proteobacteria

○前多 晴香[1]、福士 実咲[1]、Daldal Fevzi[2]、坂元 君年[1]（[1]弘前大農、[2]ペンシルバニア大）
○Haruka MAETA[1], Misaki FUKUSHI[1], Fevzi DALDAL[2], Kimitoshi SAKAMOTO[1]（[1]Hirosaki Univ., [2]Univ. Pennsylvania）

コハク酸脱水素酵素（succinate dehydrogenase: SDH）はミトコンドリア内膜に存在し、succinate: quinone oxidoreductase（SQR）反応もしくは quinol: fumarate oxidoreductase（QFR）反応を触媒する酵素として知られている。SQR は好気的ミトコンドリアにある SDH に見られる活性で、コハク酸＋キノンからフマル酸＋キノールを生成する。ほとんどの哺乳類の SDH は SQR 反応を行う。QFR はフマル酸＋キノールからコハク酸＋キノンを生成する反応であり、SQR と逆反応の関係にある。QFR 型の SDH は一部の細菌の他、寄生虫のミトコンドリアにおいて嫌気的呼吸鎖の末端酸化酵素として利用されている例が明らかになっている。QFR 型の SDH は QFR 反応、SQR 反応の双方向きの反応を効率よく触媒することとは対照的に、好気的ミトコンドリアで利用される SQR 型の SDH は QFR 反応がほとんど検出できない。すなわち SQR 反応に特化した酵素と言える。この反応の方向性を制御している機構を解析するために部位特異的変異体の作成を計画した。

大腸菌は SQR 型と QFR 型の２種の SDH を保有しているため、これら２つの酵素それぞれへの部位特異的変異体の作成による機能比較が複数報告されている。しかし、これら酵素は SDH の中では進化的距離が遠く、比較に適した組み合わせとは言いがたい。そこで今回は、α-プロテオバクテリアの紅色光合成細菌である *Rhodospirillum rubrum* と *Rhodobacter capsulatus* が持つ SDH に注目した。これらの酵素は SDH の中では進化的距離が近く、*R. capsulatus* 由来の酵素は SQR 反応特化型であるのに対し、*R. rubrum* 由来の酵素は十分な QFR 活性を持つことを我々の研究で明らかにしている。

これら２つの細菌や他の SDH 遺伝子の配列を比較したところ、*R. rubrum* に特異的なアミノ酸置換を発見した。SDH は４つのサブユニット（SdhA, B, C, D）から構成されており、酸化還元中心である FAD、３つの鉄硫黄クラスター[2Fe-2S]、[4Fe-4S]、[3Fe-4S]、ヘム *b* を内包している。今回注目したアミノ酸残基は SdhB に存在する３つの鉄硫黄クラスターのうち、[4Fe-4S]の近傍に存在する。この残基はほとんどの好気的ミトコンドリアや *R. capsulatus* ではアラニンが保存されているが、*R. rubrum* ではフェニルアラニンである。この残基を *R. capsulatus* 由来の酵素では *R. rubrum* 型に、*R. rubrum* 由来の酵素では *R. capsulatus* 型に置換させ、作成した SDH 遺伝子を *R. rubrum* と *R. capsulatus* で発現させた。それぞれの SDH 活性がどう変化するかを活性測定により調べた。

succinate dehydrogenase, fumarate dehydrogenase, complex II

発表番号：4E001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# フコイダン含有食品に対する ELISA 測定系の応用

# Application of the fucoidan ELISA system for the fucoidan component foods.

○伊波 匡彦[1]、嘉手納 築[1]、松田 優子[1]、長嶺 竹明[1]、中嶋 克行[2]([1]サウスプロダクト、[2]群馬大院・医)
○Masahiko Iha[1], Kizuku Kadena[1], Yuko Matsuda[1], Takeaki Nagamine[1], Katsuyuki Nakajima[2]
([1]South Product Co.,LTD, [2]Gunma Univ.Graduate school of medicine)

【目的】オキナワモズク（*Cladosiphon okamuranus* Tokida）から分離精製される多糖体フコイダンは抗潰瘍作用、抗腫瘍作用、免疫活性化など様々な機能性が明らかになっている。フコイダンはこれらの機能を活用した健康食品に多く利用されている。しかし、フコイダンの定量分析において、広く使われているアンスロン硫酸法などの比色法は食品中に含まれる他の糖質の影響を受ける。また、加水分解を行い、生成するフコースを定量する方法は、加水分解条件の影響を受ける。以上のことから飲料やサプリメントなどの商品中のフコイダンの定量分析は極めて困難である。我々は、オキナワモズクフコイダンの抗体を作成し、これを用いて ELISA 法による定量分析法を確立した[1)]。本方法は選択性と感度が極めて高いことから様々な成分を含む食品への応用を検討した。
【方法】定量分析を行うためにゲル濾過法およびイオン交換法を用いて高純度なフコイダンを作成した。これを標準成分として市販されているフコイダンを含む食品（飲料・サプリメント）を購入し、比色法（アンスロン硫酸法)、加水分解物のフコースの測定（HPLC 法)、ELISA 法を用いてフコイダンを測定し、比較検討した。
【結果・考察】標準フコイダンに対して各測定法は良好な検量線を示し、高い定量性を示した。市販のフコイダン商品には甘味料や安定化剤として様々な糖類が配合されている。アンスロン硫酸法はこれら糖と交差反応があり、大きく値が変化した。また、加水分解物のフコースの定量法は加水分解条件の最適化が必要であった。これらに対して ELISA 法は最も高感度で他の糖の影響をほとんど受けなかった。このことから、ELISA 法によるフコイダンの定量法は最も簡便で確実な方法であり、様々な成分を含む食品への応用が可能であった。現在、標準フコイダンの市販と ELISA 測定系のキット化を準備している。

1) Y.Tokita, K.Nakajima, H.Mochida, M.Iha and T.Nagamine. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 74,350 (2010)

Fucoidan, Mozuku, ELISA

発表番号：4E002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食用海藻の低分子量糖の分析

Analysis for low molecular weight saccharides in edible seaweeds.

○垣田 浩孝、小比賀 秀樹（産総研健康工学）
○Hirotaka Kakita, Hideki Obika (AIST)

【緒言】食品成分の誇大広告等が社会的問題となっていること及び国民の健康志向の高まりの両面から、加工食品の成分情報提供を求める声が消費者及び量販店から多く寄せられている。食品データベースによると食用海藻の糖質含有量は 38%～64%であり、糖質は食用海藻の主成分の一つである。海藻の中でも緑藻、紅藻、及び褐藻により遊離糖の種類が異なっていることが知られている。高等植物と同様に多くの緑藻はデンプン、グルコース、フルクトース、シュークロースを含む。紅藻に含まれているデンプン、グルコース、フルクトース、シュークロース量は緑藻に含まれるそれらの量と比べると非常に低い特徴がある。一方多くの褐藻は緑藻や紅藻にみられる遊離糖や貯蔵糖をほとんどあるいはまったく含まないが、マンニトールやラミナリンを含有する。したがって、海藻由来食品中の低分子量糖は原料の海藻により変動する。海藻由来食品中の糖含有量情報獲得や海藻由来食品の開発において海藻中の糖質分析方法の確立が重要である。糖質分析方法として最も知られている分析方法の一つは高速液体クロマトグラフィー（HPLC）である。そこで本研究では HPLC を用いて海藻由来食品中の低分子量糖の分析法を開発し、各種海藻由来食品中の低分子量糖を比較することを目的とした。
【方法】HPLC カラムは TSKgel Amide-80 を用いた。カラムサイズは 4.6 mm I.D. × 25 cm を使用した。粒径は 5 μm を用いた。非還元糖分析には送液ポンプ 2 台、示差屈折計、オートサンプラー、カラムオーブンを組み合わせた HPLC 装置で分析を行った。アセトニトリルと水の混合液を移動相として用い、流速 1 ml/min、試料注入量 10 μl で行った。カラム温度は 80 °C に設定した。還元糖分析には送液ポンプ 2 台、発色試薬送液ポンプ 2 台、蛍光検出器、オートサンプラー、カラムオーブンを組み合わせた HPLC 装置で分析を行った。還元糖は分析カラムで分離後、蛍光誘導体化して蛍光検出器で検出した。食用海藻は凍結乾燥後に粉砕して得た海藻粉末に抽出液を加えて成分を抽出した。
【結果】３種類の緑藻由来食品中の低分子量糖組成が異なっていること、産地による違いが検出された。
【考察】今回検討した HPLC を用いた糖分析法は、海藻由来食品中の低分子量糖の定量分析法としておおむね満足のいく方法であると考えられた。

food, seaweed, saccharide

発表番号：4E003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ペクチンによる細胞表面糖鎖構造変化の誘導機構の解析

# A potential mechanism for the alteration of sugar chain structure on cell surface induced by dietary fiber

○下吉 美澄、西田 光貴、村田 一馬、北口 公司、矢部 富雄 (岐阜大学)
○Misumi SHIMOYOSHI, Mitsutaka NISHIDA, Kazuma MURATA, Koji KITAGUCHI, Tomio YABE (Gifu Univ.)

【背景】

私たちはこれまでに，小腸上皮様モデル細胞の Caco-2 細胞を用いて，プルーンペクチンを DEAE-セルロースカラムで精製した画分(F3 画分)が細胞に作用し，ヘパラン硫酸 (HS) 脱硫酸化酵素である HSulf-1 の発現量が抑制される一方，HSulf-2 の発現量が促進され，HS 糖鎖の硫酸化構造が変化することを発見している。また，フィブロネクチン (FN) が F3 画分に特異的に結合するタンパク質であることを同定した。さらに，ペクチンと FN の結合力は，ペクチンの由来する植物種によって異なっていることを見出した。そこで，ペクチンと FN との結合力の相違が HS 硫酸化構造の変化と関連するのかを検討するため，FN との結合力が F3 画分と同程度に強い大豆ペクチン(SP)および FN との結合力が低いレモンペクチン(LP)を用いて，Caco-2 細胞に添加した場合の HSulf 遺伝子発現に対する細胞応答について検討した。その結果，FN との結合力が同程度である SP と F3 画分とでは，異なる細胞応答を示したことから，FN 以外にもペクチンと相互作用するタンパク質が存在する可能性が考えられた。そこで本研究では，FN 以外にペクチンと相互作用するタンパク質を同定することを目的とした。

【方法】

7 週令のマウス小腸を磨砕し，膜タンパク質と細胞質タンパク質をそれぞれ抽出した。F3 画分を固定したアフィニティーカラムを作成し，抽出したタンパク質をそれぞれアプライして吸着させた後，0.5 M および 1 M NaCl でタンパク質を溶出した。F3 画分と相互作用するタンパク質画分は，凍結乾燥によって濃縮した後，SDS-PAGE によりタンパク質を分離した。

【結果】

0.5 M および 1 M NaCl 溶出画分のタンパク質濃度を測定した結果，膜タンパク質と細胞質タンパク質のいずれのサンプルをアプライした画分においても，タンパク質の存在が確認された。そこで，SDS-PAGE を行った結果，膜タンパク質の 0.5 M NaCl 溶出画分において，40 kDa 付近にシングルバンドが確認された。現在，MALDI-TOF-MS によって単離されたタンパク質の同定を試みている。

pectin, intestine, heparan sulfate

発表番号：4E004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# レジスタントスターチの新規機能性の解明と調理過程における生成量の変動に関する研究

# The study of new functions of resistant starch (RS) and changes in RS content during cooking

○田中 麻美子[1]、熊崎 広大[1]、男澤 嶺[1]、西田 毅[2]、松田 寛子[1]、白井 隆明[1] ([1]東京海洋大院 サラダサイエンス、[2]ケンコーマヨネーズ（株）)
○Mamiko TANAKA[1], Kodai KUMAZAKI[1], Ryo OTOKOZAWA[1], Takeshi NISHIDA[2], Hiroko MATSUDA[1], TAKAAKI SHIRAI[1] ([1]Grad. Sch. of Mar. Sci. and Tech., TUMSAT, [2]KENKO Mayonais Co., Ltd.)

【目的】レジスタントスターチ (RS) は小腸内で吸収されない澱粉であり、血糖値上昇の抑制や腸内環境の改善効果がある。しかし、脂質吸収への影響については明らかとされていない。また、澱粉質食物に含まれる RS 生成には温度が大きく関与しているが、調味料添加などの調理過程における RS 量変化に関する知見は乏しい。

そこで本研究では、食事を想定した単回摂取が RS の脂質吸収へ与える影響、および多くの調理方法が知られている澱粉質食物のうちジャガイモ (イモ) に着目し、イモ中の RS 生成に与える温度処理と食酢の原料となり得る酢酸添加の影響を検討した。

【方法】＜脂質吸収抑制能の検討＞RS は市販の加工 RS 粉を用いた。トリグリセリド (TG) は胆汁酸によって乳化され、リパーゼによる分解を受けた後再合成され体内に吸収される。そこで、TG の乳化に関わる一次胆汁酸に着目し、まず、*in vitro* での RS の胆汁酸吸着能を測定した。1mM 一次胆汁酸リン酸緩衝液と 5、15、30mg/ mL RS を吸着させ、吸着前後の胆汁酸濃度を比較することで胆汁酸吸着能を評価した。次に *in vivo* の検討として、4 週齢 SD 系雄ラットで経口脂質負荷試験を行った。ラットは 1 週間予備飼育した後、コーン油のみ (cont.) 、コーン油＋RS 100mg/ mL (L-RS) 、コーン油＋RS 200mg/ mL (M-RS) 、コーン油＋RS 500mg/ mL (H-RS) 群の 4 群に分け、各々の条件で RS を共投与した。投与後 1 時間ごとに計 10 時間尾静脈採血を行い血清を得た後、血清中の TG 値を測定した。

＜調理条件の検討＞基礎知見を得るため、イモ由来の精製澱粉を用いた。精製澱粉に水分含量 80%となるように水を加え、①無処理、②100℃ 20 分加熱、③100℃ 20 分加熱後 6℃ 24 時間、④120℃ 20 分加熱、⑤120℃ 20 分加熱後 6℃ 24 時間の条件で温度処理後、凍結乾燥したものを試料とした。これらを酵素処理法と示差走査熱量計により RS 量を測定した。また、上記の条件にて水を 1M 酢酸に置き換え同様に RS 量を測定した。

【結果】脂質吸収抑制能の検討では、*in vitro* において RS は一次胆汁酸に対し吸着能を示した。特にケノデオキシコール酸に対し RS 5mg/ mL の 1/ 3 が吸着され、この傾向は濃度依存的であった。*in vivo* では、H-RS 群で血清中の TG 値上昇が抑制された。よって、RS は胆汁酸吸着能を介した脂質吸収抑制能を有することが示唆された。また、調理条件の検討においては現在検討中である。

resistant starch, cooking effect, lipid consumption

発表責任者：松田寛子（hmatsu1@kaiyodai.ac.jp）

発表番号：4E005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 鉄触媒によるリノール酸メチルヒドロペルオキシドの分解に対するγ-トコフェロールの作用

# Effect of γ-tocopherol on the iron-catalyzed decomposition of methyl linoleate hydroperoxide in solution and micelles.

○木下 知美、岩本 悟志、山内 亮 (岐阜大院)
○Tomomi KINOSHITA, Satoshi IWAMOTO, Ryo YAMAUCHI (Gifu Univ.)

【目的】トコフェロール (TH) はフリーラジカル捕捉剤として脂質過酸化反応を抑制する。そのうち、γ-TH は食事からの摂取が多いにもかかわらず、α-TH に比べて生理活性が低いため、フリーラジカル捕捉機構についての詳細は未だ不明である。そこで本研究では、リノール酸メチルヒドロペルオキシド (MLOOH) の鉄触媒分解で生成するフリーラジカル種とγ-TH との反応生成物から、γ-TH のフリーラジカル捕捉機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】リノール酸メチルを自動酸化させて MLOOH を調製した。MLOOH (0.5 mM) とγ-TH (0.1 mM) はトルエンに溶かし、Fe-アセチルアセトネート (7.5 mM) を加えて 37℃で反応させた。反応生成物は、逆相 HPLC で分取して構造解析した。また、MLOOH (0.5ｍM) とγ-TH (0.1 又は 0.2 mM) を 0.5% Brij-35 含む 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) でミセル溶液とし、ヘミン (10 μM) を添加して 37℃で反応させた。反応溶液中の MLOOH とγ-TH との反応生成物は、ヘキサン/2-プロパノールで抽出して逆相 HPLC で分析した。MLOOH の分解で生ずるアルデヒドは、ジニトロフェニルヒドラジン誘導体として HPLC 分析した。

【結果】トルエン溶液中で MLOOH とγ-TH とを鉄触媒を加えて反応させ、生成物を逆相 HPLC で分析すると、γ-TH の二量体とともに新規ピーク 1～3 が認められた。これらのピークは分取して構造解析したところ、1 は MLOOH のレドックス分解で生じたアルコキシルラジカル由来のエポキシペルオキシルラジカルにγ-TH が付加した TOO-epoxyML、2 と 3 は同様のレドックス分解で生じた ML ペルオキシルラジカルにγ-TH が付加した TOO-ML の立体異性体であった。本反応を経時的に調べると、γ-TH 二量体とこれらの付加体は反応の進行とともに蓄積し、二量体は 24 時間で付加体は 48 時間で最大となった。一方、MLOOH ミセル溶液にヘミンを添加すると酸化二次生成物であるアルデヒド (hexanal と methyl 9-oxononanate) の急激な生成が確認され、γ-TH の添加はこれらのアルデヒドの生成を抑制した。またこの時のγ-TH 反応生成物としてキノン、トコレッドおよび付加体である TOO-epoxyML が認められた。以上の結果より、γ-TH は鉄触媒反応で生じた脂質フリーラジカルを捕捉して付加体を形成して、α-TH の場合と同様に脂質過酸化二次反応を抑制できることが明らかとなった。

γ-tocopherol, lipid peroxidation, antioxidant

発表責任者：山内亮（yamautir@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4E006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コンドロイチン硫酸がマウス前駆軟骨細胞 ATDC5 に与える影響

# Effect of chondroitin sulfate in chondrogenic cell line ATDC5

○工藤 俊也、中谷 祥恵、古旗 賢二、和田 政裕（城西大学）
○Toshiya KUDOU, Sachie NAKATANI, Kenji KOBATA, Masahiro WADA (Josai Univ.)

【目的】コンドロイチン硫酸（CS）はヒアルロン酸（HA）と同様に軟骨細胞より産生されるグリコサミノグリカン（GAG）の一種である。CS は高い保水性を有しており、関節に圧縮抵抗性をもたらしている。しかし、加齢や物理的刺激により関節軟骨における CS 量が減少することが報告されている。また、HA は *in vitro* 試験において軟骨細胞の分化を促進することが報告されている。しかし、関節軟骨に HA よりも多く存在する CS については未だ不明な点が多い。我々は先行実験において、CS をマウス前駆軟骨細胞 ATDC5 に添加して培養を行ったところ、軟骨細胞の分化の指標となる Alkaline phosphatase（ALP）活性を有意に減少する事を見出した。本研究では、CS が ATDC5 の分化に与える継時的な影響明らかにすることを目的とし、ATDC5 の増殖、膠原繊維量、GAG 産生量、石灰化に与える影響の評価も同時に行った。
【方法】CS は鮫由来の分子量 113 kDa、HA は鶏由来の分子量 110 kDa を用いた。ATDC5 を CS（1 mg/mL）および HA（1 mg/mL）存在下で 0, 4, 7, 14 日間培養後、ALP 染色することにより ATDC5 の分化に及ぼす影響をみた。ATDC5 を CS（1 mg/ml）および HA（1 mg/ml）存在下で 1, 21, 40 日間培養後、細胞増殖を WST-1 試験、GAG 産生量を Alcian blue（AB）染色、膠原繊維量を AZAN 染色、石灰化を Alizarin red（AR）染色により評価した。また、CS および HA が ALP 酵素を物理的に阻害する可能性について、牛由来 ALP に与える影響を *in vitro* の系により検討した。
【結果】CS および HA の添加は細胞増殖および膠原繊維量に影響を与えなかった。一方で、CS および HA の添加は培養 4, 7 日目において ALP 活性を有意に減少させた。また、通常培養および HA を添加して培養した細胞と比較して、CS を添加して培養した細胞でのみ GAG 産生量が有意に増加し、石灰化は有意に抑制した。*in vitro* における反応の結果では、CS および HA は ALP 酵素活性に影響を与えなかった。
【考察】軟骨細胞は増殖期、成熟期、肥大化期を経て石灰化軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は増殖期から成熟期への分化の際に ALP を産生するようになる。今回の結果から、CS および HA は増殖期から成熟期への分化段階における ALP 活性を減少させた。この減少は、CS, HA による ALP 酵素への直接阻害ではなかった。これらのことから、CS および HA は ALP の発現を抑制することで軟骨細胞の分化を遅らせる可能性が考えられた。また、HA は GAG 産生量および石灰化に影響を与えなかったが、CS は GAG 産生量を有意に増加、石灰化を有意に減少した。このことから、CS は HA とは異なるメカニズムで ATDC5 の分化を抑制し、GAG 産生の促進および石灰化を減少している可能性が考えられた。

chondroitin sulfate, ATDC5, differentiation

発表番号：4E007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

超小角 X 線散乱法による小麦タンパク質グリアジン水和凝集体の構造解析
Structural analysis on the hydrated aggregates of wheat protein gliadin by ultra-small-angle X-ray scattering

○佐藤 信浩[1]、東野 ゆうき[2]、北尾 悠樹[2]、岩村 紗季[2]、岡田 ひかり[2]、奥田 綾[2]、松崎 元紀[2]、大場 洋次郎[1]、井上 倫太郎[1]、杉山 正明[1]、裏出 令子[2] ([1]京大原子炉、[2]京大院農・農学)
○Nobuhiro SATO[1], Yuki HIGASHINO[2], Yuki KITAO[2], Saki IWAMURA[2], Hikari OKADA[2], Aya OKUDA[2], Motonori MATSUSAKI[2], Yojiro OBA[1], Rintaro INOUE[1], Masaaki SUGIYAMA[1], Reiko URADE[2] ([1]Kyoto Univ., Research Reactor Institute, [2]Kyoto Univ., Division of Agronomy and Horticultural Science)

【目的】小麦タンパク質グリアジンの構造や物性はこれまで 60-70%のエタノール水溶液中などで調べられてきたが、近年、蒸留水中への抽出法が見いだされ [1]、実際の食品で用いられる小麦粉生地と類似した環境におけるグリアジンの構造や物性の解析の進展が期待されている。我々はこれまでに、大型放射光施設を用いた X 線小角散乱（SAXS）測定により、広範囲の濃度におけるグリアジン水溶液および水和凝集体の 2-100 nm 程度のスケールのナノ構造を調べ、希薄水溶液中での孤立タンパク質分子の形態や、濃度上昇に伴う会合挙動、高濃度域における凝集と凝集体内部の密度ゆらぎの変化等について明らかにしてきた [2]。一方、これまでの SAXS 測定の傾向から、濃度の増加や食塩の添加等により、より大きな構造が成長していくことが示唆されたが、装置の測定限界によりそれを直接確認することはできなかった。そこで本研究では、グリアジン水和凝集体に対して、これまで行ってきた SAXS 測定に合わせて新たに超小角 X 線散乱（USAXS）測定を行い、30-1000 nm スケールでのグリアジン凝集体の微細構造に対するグリアジン濃度や食塩添加量が及ぼす影響を調べた。
【方法】グリアジンは既報 [1] に従って調製した。グリアジンの濃度範囲は 15‐70%とし、添加する食塩濃度は 0-3 M とした。SAXS 測定は高エネルギー加速器研究機構フォトンファクトリーのビームライン BL-10C（測定 $q$ 範囲 0.06-2.5 $nm^{-1}$）、USAXS 測定は SPring-8 のビームライン BL19B2（測定 $q$ 範囲 0.005-0.2 $nm^{-1}$）をそれぞれ用い、いずれも室温で測定した。
【結果】グリアジン濃度が 20-30%の範囲では、会合したグリアジンの形成するドメイン間干渉による相関ピークが $q$ = 0.1 $nm^{-1}$ 近傍に観測されるが、濃度の増加とともにピーク幅が増大し一見消失するかのように見える。このとき、USAXS の観測領域では急峻な立ち上がりが成長しており、グリアジンドメインが融合して大きな凝集構造を作ることが確認された。このとき同時に $q$ = 0.3 - 1 $nm^{-1}$ の中広角領域では、グリアジン凝集体内部の密度ゆらぎに基づくブロードなピークが観測されており、2-1000 nm に対応する広い空間スケールにわたって、階層的な構造の変化が濃度増加によって誘起されていることがわかった。40-70 wt%のグリアジン凝集体に食塩を添加した場合も、同様に、数 100 nm 程度を超える大きな凝集構造とその内部の密度揺らぎの存在が確認されたが、グリアジン濃度の増加とともに食塩添加量の影響は小さくなることが明らかとなった。

1) T. Ukai *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **56** 1122 (2008).
2) N. Sato *et al.*, *J. Agric. Food. Chem.*, **63**, 8715 (2015).

gliadin, SAXS, USAXS

発表責任者：佐藤信浩（sato-n@rri.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4E008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ローヤルゼリー由来ペプチドによる IEC-6 細胞に対するアポトーシス誘導

# Induction of apoptosis for IEC-6 cells by the peptides from royal jelly

○竹内 まい子[1]、大島 和也[1]、松岡 拓磨[2]、川島 拓司[2]、中村 正[2]、北口 公司[1]、矢部 富雄[1]([1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]（株）秋田屋本店)
○ Maiko TAKEUCHI[1], Kazuya OSHIMA[1], Takuma MATSUOKA[2], Takuji KAWASHIMA[2], Tadashi NAKAMURA[2], Kohji KITAGUCHI[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Akitaya Honten Co.Ltd.)

【目的】

ミツバチ(*Apis mellifera*)の働き蜂によってつくられるローヤルゼリー（RJ）は，幼虫を女王蜂に分化させる成分を含むなど，様々な生理機能をもつ物質である。私たちは，RJ 主要タンパク質の幼虫由来消化酵素処理画分から機能性ペプチド YPDWSFA を同定し，配列内のトリプトファン残基が酸化されていることを発見した。酸化型トリプトファン残基と RJ の生理機能との相関関係を検討するため，これまでに，鉄イオンと過酸化水素によるフェントン反応を用いて人工的に酸化型トリプトファン残基を含むペプチドを作成した。このペプチドをラット小腸上皮細胞（IEC-6）に添加するとアポトーシスが誘導された。また，フェントン反応に用いた鉄イオンがペプチドによる IEC-6 細胞のアポトーシス誘導にどのように影響するかを検討するため，銅イオンを用いて作成したペプチドと比較すると，鉄イオンを用いて作成したときと異なる結果が得られた。本研究ではフェントン反応によってトリプトファン残基を酸化して得られたペプチドと，酸化型トリプトファンを前もって組み込んだペプチドが IEC-6 細胞に与える影響を検討した。

【方法・結果】

過酸化水素と鉄イオンまたは銅イオンによりペプチド配列内のトリプトファン残基を酸化し，酸化型ペプチドを作成した。反応後にペプチドと共存する金属イオンは，陽イオン交換樹脂を用いて取り除いた。ペプチド配列内のトリプトファン残基の酸化は，MALDI-TOF-MS 分析により確認した。作成した酸化型ペプチドを IEC-6 細胞に添加し，24 時間培養後に WST-8 試薬を用いた吸光度測定により細胞生存率を算出した。その結果，鉄イオンにより作成した酸化型ペプチドの添加とは異なり，銅イオンにより作成した酸化型ペプチドの添加ではアポトーシスはほとんど誘導されず，銅イオン除去によりアポトーシスが促進された。細胞に与える挙動が異なることから，鉄イオンと銅イオンによる酸化では生成物が異なることが示唆された。また，フェントン反応によって得られた酸化型トリプトファン分子では IEC-6 細胞に影響を与えなかった。このことから，酸化型トリプトファン分子ではなくペプチド配列がアポトーシス誘導には重要であることが示唆された。そこで，酸化型トリプトファンの一つである *N*–ホルミルキヌレニンを含むペプチドを合成し細胞に添加し，細胞生存率を調査した結果，有意な影響を示さなかった。現在，他の酸化型トリプトファンである 5-ヒドロキシトリプトファンを含むペプチドのアポトーシス誘導への影響について検討している。

Royal jelly, apoptosis

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4E009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# バイオハイブリッド創出によるβ-ラクトグロブリンの機能改変

# Functional Improvements in beta-Lactoglobulin by Preparing Edible Bioconjugate

○堀内 建吾、池田 理沙、好田 正、服部 誠 (農工大農)
○Kengo HORIUCHI, Risa IKEDA, Tadashi YOSHIDA, Makoto HATTORI (Tokyo Noko Univ.)

【目的】β-ラクトグロブリン(BLG)は乳清タンパク質の約半量を占めるタンパク質である。BLG は栄養学的に優れ、乳化性、ゲル化性、気泡性などの機能特性をもち、食品素材として有用なタンパク質である。しかし、BLG は牛乳アレルギーの主な原因物質であることや、酸性条件下および塩存在下では乳化性が著しく低下してしまうなどの欠点もある。本研究ではトランスグルタミナーゼ反応により BLG にε-ポリリシン(PL)を結合させ、さらにメイラード反応によりデキストラン(Dex)を結合させることにより、BLG の機能改変を達成することを目的としている。

【方法】BLG と PL のモル比が 1:3 となるように混合し、タンパク質溶液とした。1 g の BLG に対してアクティバ TG-K(Ajinomoto Co.)の酵素力価が 2,000 unit となるように、タンパク質溶液と酵素溶液を混合した。pH 7.0、37 ℃で 48 時間反応させ、BLG-PL 複合体を得た。さらに、BLG-PL 複合体と Dex（分子量 9,000-11,000）を相対湿度 79%、50℃で 24 時間メイラード反応を行い、BLG-PL-Dex 複合体を得た。複合体を SDS-PAGE に供し、CBB 染色および PAS 染色することにより複合体化の確認をした。複合体化による構造変化を調べるために、4 種類のモノクローナル抗体を用いて高次構造の局所解析を行った。さらに、283 nm で励起した時の自然蛍光を測定し、複合体の Trp 残基周辺の構造変化を調べた。機能性の評価として、pH 3.0、5.0、7.0 における乳化性、および 0.2 M の NaCl 存在下での乳化性の測定を行った。免疫原性の評価として、複合体を C57BL/6 マウスに腹腔内投与することにより免疫し、得られた血清を用いて非競合法 ELISA を行うことによって特異的抗体量を測定した。

【結果】酵素反応により BLG:PL=1:1 および 1:2 の BLG-PL 複合体が得られた。また、メイラード反応により分子量が不均一な BLG-PL-Dex 複合体が得られた。モノクローナル抗体を用いた高次構造の解析により、BLG-PL 複合体および BLG-PL-Dex 複合体の 125Thr-135Lys(ランダムコイル、αーヘリックス)近傍の構造が変化したこと、さらに BLG-PL-Dex 複合体のみ 15Val-29Ile(β-シート)、8Lys-19Trp(ランダムコイル、ショートヘリックス)近傍の構造が変化したことが明らかとなった。自然蛍光の測定により、BLG-PL 複合体は Trp 残基周辺の構造変化を起こさなかったのに対し、BLG-PL-Dex 複合体は Tpr 残基が遮蔽されるような構造変化を起こしたことが明らかとなった。乳化性の測定により、試験した全 pH で乳化性が有意に向上し、塩存在下においても有意に向上したことが認められた。免疫原性を評価した結果、複合体化により BLG の免疫原性は低下し、新たな免疫原性も生じていないことが明らかとなった。以上より、本研究の手法は BLG の機能特性の改善に有効であると考えられた。

beta-Lactoglobulin, Protein Conjugate, Functional Improvements

発表番号：4E010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 抗酸化性ポリフェノールによる自然抗体リガンドの生成

# Production of ligands for natural antibodies by anti-oxidative polyphenols

○古橋 麻衣[1]、畑佐 行紀[1]、柴田 貴広[1]、赤川 貢[2]、内田 浩二[1]([1]名大院生命農、[2]阪府大院生命環境)
○MAI FURUHASHI[1], YUKINORI HATASA[1], TAKAHIRO SHIBATA[1], MITSUGU AKAGAWA[2], KOJI UCHIDA[1] ([1]Nagoya Univ., [2]Osaka Prefecture Univ.)

【背景】

自然抗体は自然免疫系を担う分子のひとつであり、外因性抗原である病原体関連分子パターン（PAMPs）に加え修飾タンパク質やアポトーシス細胞など内因性抗原であるダメージ関連分子パターン（DAMPs）を認識することにより生体の恒常性を維持している。自然抗体による DAMPs の認識機構の詳細はいまだ未解明だが、修飾タンパク質やアポトーシス細胞において相対的に増加している陰性電荷がその認識に関与している可能性が示された。またビタミン C 酸化体であるデヒドロアスコルビン酸（DHA）によって修飾されたタンパク質が自然抗体に認識されることが示された。（Chikazawa et.al. JBC 2013）ビタミン C は酸化反応により DHA に変換されることで自然抗体リガンド生成能を得ると考えられる。そこで同様に酸化反応によってキノン体への変換が予想され様々な食品中に含まれるポリフェノールに着目し、ポリフェノールの自然抗体リガンド生成能について検討するとともに、自然抗体による修飾タンパク質認識メカニズムの解明を目指して研究を進めることとした。

【結果】

ウシ血清アルブミン（BSA）を種々のポリフェノールと 37℃、24 時間反応させポリフェノール処理 BSA を作製した後 ELISA 法を用いて自然抗体との交差性を測定した。その結果、resveratrol の酸化誘導体である piceatannol やベリー類に含まれる cyanidin、ellagic acid などのポリフェノール処理によって交差性が上昇した。また、ポリフェノール処理に伴う電荷の変化についてゼータ電位測定を行い測定したところ、抗体との交差性と陰性電荷の増加に相関があることが確認された。特に複数の抗体に対して強い交差性を示した piceatannnol/BSA に着目し検討を進めた結果、piceatannol 濃度依存的かつ継時的な交差性の上昇を確認した。さらに piceatannol 処理によりリジンやアルギニンの脱アミノ化反応が進行していることが見出され、このような正電荷アミノ酸の消失による陰性電荷の増加を抗体が認識している可能性が示された。また、BSA との反応に伴い Piceatannol は減少する一方で Piceatannol 由来の新規産物の生成が確認されたことから、現在この新規産物の同定を行うとともに、自然抗体が認識するタンパク質の構造変化についてより詳細な検討を行っている。

polyphenol, natural antibody, serum albumin

発表責任者：古橋麻衣（furuhashi.mai@d.mbox.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4E011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酵素的化学修飾によるエビアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化

# Enzymatic modification of prawn allergenic protein for improvement the allergenicity

○菰田 俊一、佐々木 直美（宮城大）
○Toshikazu Komoda, Naomi Sasaki (MIYAGI Univ.)

[目的]

エビ・カニ等の甲殻類に含まれる主要なアレルゲンタンパク質は、トロポミオシン(TM)と呼ばれる耐熱性のタンパク質であり、Ⅰ型アレルギーの原因成分となっている。当研究室では、以前からこのタンパク質を化学的に修飾することにより、そのアレルゲン性の低減化を試みている。近年、他のアレルゲンタンパク質にて、酵素(トランスグルタミナーゼ)を利用した化学修飾によるタンパク質の機能改変を行った例がいくつか報告され、これをエビ由来のタンパク質にも応用できる可能性があると考えた。そこで、我々は、新たなタンパク質修飾法として、この方法をエビに応用し、エビアレルゲンタンパク質の低アレルゲン化を図ることとした。

[結果および考察]

はじめに、ブラックタイガー種のエビを PBS 中で煮沸し、耐熱性のタンパク質を抽出した。これを、サイズ排除クロマトにより粗精製し、得られたタンパク質(37KDa)をトロポミオシンタンパク質(TM)とした。次に TM と基質となるポリリジン(PL)を供に、酵素(トランスグルタミナーゼ、TGase、味の素)にて 42℃で反応させ、TM-PL 複合体を作成した。反応の様子は SDS-PAGE により確認した。作成した TM-PL 複合体のアレルゲン性に関わる評価は、はじめに in vitro 試験として、ウェスタンブロッティング法による抗体反応性試験を行った。この結果、TM は PL と複合体を形成すると、TM 認識抗体との反応性が低減化することが示された。このことは、複合体形成により、TM のアレルゲン性が低減化した可能性を示すものであった。現在、動物を用いた in vivo 試験として、エビアレルギー化マウスを作成し、新たに作成した TM-PL 複合体または未修飾の TM を投与したときに、アレルギー発症の様子にどのような違いが生じるか評価を行っている。

本学会では、エビ TM の持つアレルゲン性を、タンパク質修飾酵素による新たな手法により、どの程度低減化できるか、動物モデルを用いた試験結果も含めて報告する。

Transglutaminase, Tropomyosin, Allergen

発表責任者：菰田俊一（komoda@myu.ac.jp）

発表番号：4E012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# エゴマによるコラーゲン産生促進メカニズムの解析

# Analysis of the mechanism for collagen production induced by the extracts from Perilla frutescens

○永井 美帆[1]、加島 隆洋[2]、鈴木 寿[2]、北口 公司[1]、矢部 富雄[1] ([1]岐阜大院・応生科・応用生命、[2]岐阜県産業技術センター)
○Miho NAGAI[1], Takahiro KASHIMA[2], Hisashi SUZUKI[2], Kohji KITSGUCHI[1], Tomio YABE[1] ([1]Gifu Univ., [2]Industrial Technology Center, Gifu prefectural Goverment)

【目的】

脊椎動物を構成する細胞が最も大量に産生するタンパク質であるコラーゲンは，歯や骨および皮膚などの結合組織において外からの応力に抵抗する素材の主成分である。コラーゲンは高齢化に伴ってその産生量が減少することから，健康長寿を目指す上でコラーゲンの産生量の維持は非常に大きな課題となる。我々はこれまでに，マウス線維芽細胞（L-M 細胞）に各種野菜由来の熱水抽出画分を添加すると，濃度依存的にコラーゲンの産生量が増加することを見出している。そこで本研究では，エゴマ（学名：*Perilla frutescens var. frutescens*）種子の搾油後粉末から抽出される成分に，コラーゲン産生促進作用が存在するかを調べた後，そのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】

エゴマ種子の搾油後粉末を用いて，冷水抽出（4℃，1 時間）と遠心分離（11590×g，10 分，4℃）を 2 回行い，上清を凍結乾燥したものを冷水抽出画分とした。さらに得られた沈殿に対して，熱水抽出（121℃，1 時間）と遠心分離（11590×g，10 分，4℃）を 2 回行い，上清を凍結乾燥したものを熱水抽出画分とした。調製した冷水または熱水抽出画分を細胞培養培地に添加し，L-M 細胞を 37℃，5%$CO_2$ 下で培養した後，WST 法により細胞生存率を求め，抽出か区分の細胞毒性を検討した。また，各被験薬を添加して L-M 細胞を培養した上清を回収し，SCA 法によりコラーゲン量を測定した。

【結果】

細胞毒性試験の結果，エゴマ熱水抽出画分は，0.25 mg/mL 以上の濃度で L-M 細胞に対し細胞毒性を示した。一方，エゴマ冷水抽出画分は，少なくとも 1 mg/mL の濃度以下において，L-M 細胞に対する細胞毒性は示さなかった。また，0.1 mg/mL の濃度で有意な細胞増殖効果がみられたことから，冷水抽出画分には L-M 細胞の増殖を促進する物質が含まれていることが示唆された。続いてコラーゲン産生促進作用を調べた結果，冷水および熱水抽出画分に，コラーゲン産生を促進する成分が含まれていることが示された。特に，冷水抽出画分には濃度依存的なコラーゲン産生促進作用がみられた。さらには，熱水抽出画分の場合は，添加後に時間依存的なコラーゲン増加が観察されたのに対し，冷水抽出画分の場合は，添加 3 時間後以降 48 時間まで同程度のコラーゲン量を産生した。このことから，冷水と熱水抽出画分に含まれるコラーゲン産生促進物質は，それぞれ異なるメカニズムで作用していることが示唆された。

perilla frutescens, collagen, fibroblast

発表責任者：矢部富雄（yabet@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4E013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品由来 ACE 阻害ペプチドの生体組織 ACE 阻害メカニズム

# Tissue ACE inhibitory mechanism of a food-derived ACE inhibitory peptide

○小山 正浩、興津 翔、野尻 恵資、岩本 しほり、中村 浩蔵（信大農）
○Masahiro KOYAMA, Shou OKITSU, Keisuke NOJIRI, Shihori IWAMOTO, Kozo NAKAMURA (Shinshu Univ.)

【目的】7 種のアンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害ペプチドがソバスプラウト乳酸発酵物から単離され，これらは *in vitro* よりも *in vivo* で効果的に ACE を阻害するという特徴を示した。*in vivo* ACE 阻害メカニズムを考察するため，高血圧自然発症ラット（SHR）血管組織を用いて生体内環境を再現した *ex vivo* 試験系を開発した。この試験系により，単離ペプチド中最も高い *in vivo* 活性を示した Trp-Thr-Phe-Arg（WTFR）は，生成した ACE 阻害フラグメント（FR，TF，WT，TFR，WTF）とともに血管組織へ蓄積し，血管 ACE を有効に阻害していることが明らかとなった。本研究では，血管組織中の WTFR およびフラグメント定量結果をもとに再構成液を調製し *ex vivo* 試験によりフラグメントの寄与度を評価するとともに，*in vitro* 試験により ACE 阻害ペプチド混在下での相乗効果を検討した。

【方法】*ex vivo* 試験：雄性 13 週齢 SHR 由来胸部大動脈から作製した血管リング標本をマグヌス実験装置にセットし，WTFR，WTFR-フラグメント再構成液，カプトプリル(対照)をリング標本へ添加後，一定時間インキュベートした。その後，Angiotensin(Ang)I を添加し，生成 Ang II による血管収縮を記録後，リング標本を LC-MS 定量に用いた。血管 ACE 阻害活性は，血管収縮抑制率により評価した。*in vitro* 試験：WTFR およびフラグメントを 25%阻害濃度で 2 種混合し，その ACE 阻害活性を Cushman らの方法により測定した。相乗効果は期待値(50%阻害)より有意に高い ACE 阻害活性から判断した。

【結果】WTFR は，ACE 阻害フラグメントと共に血管組織へ蓄積し，インキュベーション 60 分後に蓄積量および血管 ACE 阻害活性ともに最大を示した。一方で，短時間のインキュベーションで高い血管 ACE 阻害活性を示したカプトプリルは血管組織中から検出されなかった。ACE との相互作用は強いが組織親和性は低いカプトプリルと対照的に，組織親和性が高いペプチドは ACE との相互作用は弱くとも血管組織へ蓄積して効果的に血管 ACE を阻害できることを確認できた。また，インキュベーション 60 分後のペプチド定量結果をもとに調製した WTFR-フラグメント再構成液は，WTFR 単独より短時間のインキュベーションで同レベルの血管 ACE 阻害作用を引き起こした。つまり，ACE 阻害フラグメントの生成が WTFR の血管 ACE 阻害作用に寄与していることが明らかとなった。さらに，複数 ACE 阻害ペプチドの存在が ACE 阻害活性に与える影響を *in vitro* 試験により評価したところ，期待阻害率 50%に対して 1.2-1.6 倍の相乗効果を持つフラグメントの組み合わせが確認された。これらの結果から，血管組織への蓄積，ACE 阻害フラグメントの生成，複数阻害剤による相乗効果がペプチドの効果的な生体組織 ACE 阻害作用を担うファクターであると考えられた。

accumulation into tissue, generation of fragment peptides, synergy by ACE inhibitory peptides

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4E014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# グリセルアルデヒド由来メイラード反応後期段階生成物「GLAP」による RAGE を介した細胞毒性発現機構の解明

# Elucidation of RAGE mediated cytotoxic expression mechanism by advanced glycation end products derived glyceraldehyde,GLAP

○藤野 峻行[1]、長谷川 俊樹[1]、村上 庸人[1]、三浦 彩[1]、臼井 照幸[2]、渡辺 寛人[1]、早瀬 文孝[1]([1]明治大農、[2]女子栄養大)
○Takayuki FUJINO[1], Toshiki HASEGAWA[1], Youto MURAKAMI[1], Aya MIURA[1], Teruyuki USUI[2], Hirohito WATANABE[1], Humitaka HAYASE[1] ([1]Meiji Univ., [2]Kagawa Nutrition Univ.)

【目的】

メイラード反応とは、タンパク質などのアミノ化合物と、還元糖などのカルボニル化合物との間で起こる非酵素的褐変反応であり、Advance glycation end products（AGEs）を生成する。メイラード反応によるタンパク質中のリジン残基、アルギニン残基の修飾は、タンパク質の機能低下や細胞毒性を引き起こす。グリセルアルデヒド（GLA）は代謝異常や糖の分解などで生成し、カルボニル化合物としてアミノ酸を修飾する。GLA 由来の主要な AGEs として GLAP や MGH1 が報告されている[ 1 ][ 2 ]。中でも GLAP は Receptor for AGEs（RAGE）に認識されることにより細胞毒性を示すことが明らかになっている[ 3 ]。本研究では、GLAP に類似したアナログ化合物を合成することで、RAGE に認識される構造を解明することを目的とした。

【実験方法】

0.1 M の 3-hydroxypyridinium または 3-hydroxymethylpyridinium と 0.1 M の 6-bromohexanoic acid を 10 ml の DMSO に溶解後、2 時間 80℃で反応させた。その後、DMSO を減圧下で除去し、HPLC により GLAP のアナログ化合物の単離・精製を行った。単離した化合物は LC-ESI-Q-TOF-MS、NMR にて構造を確認した。その後、PC12 細胞に 1 μM、10 μM、100 μM の合成した化合物を添加し、細胞毒性試験を行った。

【結果・考察】

DMSO 中での合成により GLAP に構造が類似した pyridinium 構造を持つアナログ化合物が合成できた。アナログ化合物の中でも 3-hydroxypyridinium 構造を有する化合物の添加により濃度依存的に細胞生存率が減少したが、3-hydoroxymethyl 基のみを有する化合物の添加では細胞生存率が減少しなかった。以上より、GLAP が示す細胞毒性には 3-hydroxypyridinium 構造が重要であり、RAGE がこの構造を認識していることが示唆された。

[ 1 ] Usui, T., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (4), 930-932, 2003
[ 2 ] Usui, T., M., Watanabe, H., and Hayase, F.,：*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (6), 1496-1498, 2006
[ 3 ] 長谷川俊樹、藤野峻行、臼井照幸、渡辺寛人、早瀬文孝　日本農芸化学会　3F26a11

Glycation, RAGE, hydroxypyridinium

発表番号：4E015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 卵白塩基性様タンパク質（OVAX）の鶏卵の胚発達中における生化学的な変化

# Biochemical changes of the egg white basic protein(OVAX) during the embryo development in hen egg

○赤澤 隆志、小川 雅廣、早川 茂（香川大農）
○Takashi AKAZAWA, Masahiro OGAWA, Shigeru HAYAKAWA (Kagawa Univ.)

【目的】鶏卵白の塩基性タンパク質 ovalbumin-related protein X（OVAX）はオボアルブミンと共通の祖先遺伝子から発生したパラログであると考えられている。OVAX とオボアルブミンの全長アミノ酸配列は 61.6%と高い相同性を有しているが、オボアルブミンは酸性タンパク質であり両タンパク質の表面電荷には違いが見られる。またオボアルブミンはグリコサミノグリカンであるヘパリンに結合しないのに対し、OVAX は強い親和力を持っている。ヘパリンと親和性のあるタンパク質は生理的機能をもったものが多く存在している。そのため OVAX にも生理的機能があることが予測されるが、明らかとなっていない。2015 年度岡山大会で無精卵の貯蔵中に OVAX はヘパリンに対する親和力が低下することを報告した。卵の本来の機能である胚の発生は無精卵では起きない。そこで有精卵を用いた実験を行い、胚の発達中に起きる OVAX の変化を分析し、無精卵の貯蔵と有精卵の貯蔵中に起きる OVAX の挙動を比較検討した。
【方法および結果】（1）無精卵の貯蔵実験：無精卵を 37℃（相対湿度 65%）で 20 日間貯蔵し、各貯蔵時間の卵から卵白を分離した。卵白タンパク質をヘパリン結合樹脂（Heparin sepharose）に吸着させ 0.2，0.4，0.6 M NaCl 溶液でステップワイズ溶出させることで、ヘパリンに対する親和力の異なる 3 種の OVAX を分離した。当研究室で作製した OVAX のポリクローナル抗体を用いた間接 ELISA で、各 OVAX の定量を行った。貯蔵 0 日目では 0.2，0.4，0.6 M NaCl 溶液で溶出する OVAX がそれぞれ、2.2, 3.3, 2.0 mg 存在した。しかし、貯蔵 20 日目では 0.6 M NaCl 溶液で溶出する OVAX は存在せず、低濃度の NaCl 溶液（0.2，0.4 M）で溶出する OVAX が増加した。
（2）有精卵の貯蔵実験：有精の鶏卵を 37℃（相対湿度 65%）で 15 日間貯蔵し、胚を発達させた。各貯蔵時間の卵白を分取し、無精卵と同条件で解析を行った。有精卵においても無精卵と同様にヘパリンに対する親和力の強い OVAX が減少し、弱い OVAX が増加した。
有精卵の胚発達中においても OVAX のヘパリンに対する親和力が低下したことから、OVAX の静電的相互作用の変化が生体内の何らかの機能に関係することが推測された。

egg white protein, ovalbumin, heparin

発表責任者：赤澤隆志（s14g631@stmail.ag.kagawa-u.ac.jp）

発表番号：4E016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食素材蛋白質の網羅的ペプチドアレイを用いた苦味マスキング剤の新規探索法 ～茶殻 RubisCo 由来 EGCG 結合ペプチドの解析例～

# Peptide array-based screening of EGCG-binding peptides from green tea leaves as bitterness-masking agents

○小池 麻友[1]、黒田 侑希[1]、伊藤 圭祐[1]、石井 剛志[2]、中村 順行[1]、渡辺 達夫[1]、河原崎 泰昌[1] ([1]静県大・食栄、[2]神戸学院大・栄)
○Mayu KOIKE[1], Yuki KURODA[1], Keisuke ITO[1], Takeshi ISHII[2], Yoriyuki NAKAMURA[1], Tatsuo WATANABE[1], Yasuaki KAWARASAKI[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Kobe Gakuin Univ.)

【背景・目的】「良薬口に苦し」と言われるように、食品機能成分の多くはヒトにとって好ましくない苦味を呈する。そのため苦味マスキング剤は食品機能成分の摂取を容易にすることで健康効果の発揮につながると期待されるが、多様な苦味物質に対するマスキング剤を効率的に探索する方法論は確立されていない。そこで本研究では、食品科学分野でも利用が広がりつつあるペプチドアレイについて、苦味マスキング剤探索への応用を検討した。

【方法・結果】本研究では緑茶の苦味成分である Epigallocatechin gallate (EGCG) をモデルとして、茶産業廃棄物である出がらし（茶殻）から苦味マスキング剤を探索した。茶殻を加水分解して作製した“緑茶ペプチド”は、味覚認識装置を用いた解析において市販緑茶飲料の苦渋味シグナルを減少させたことから、緑茶ペプチド中に苦渋味をマスキングする EGCG 結合ペプチドの存在が示唆された。そこで、茶殻の主要蛋白質である RubisCo のアミノ酸配列を全網羅するように鎖長１５アミノ酸のペプチドをアレイ上に 598 種類合成し、レドックスサイクル染色法で EGCG との結合を解析した。その結果、顕著に結合能が高い 7 つのペプチドを見出した。これらのペプチドについて N または C 末端からアミノ酸残基を一残基ずつ欠失させていった 196 種類のペプチドを解析し、EGCG 結合に寄与する配列を決定した。さらに Alanine-scanning 解析により、これらのペプチドに含まれる Lys、Arg 残基が EGCG との結合に特に重要であることも明らかとした。本研究から見出された代表的な EGCG 結合ペプチドである GTP1 (Phe-Thr-Gly-Leu-Lys-Ser-Thr-Ser-Ala-Phe-Pro-Val-Thr-Arg-Lys) および GTP2 (Met-His-Phe-Arg-Val-Leu-Ala-Lys-Arg-Leu-Arg) は、EGCG による苦味受容体 (hTAS2R39) の応答を強く抑制した。これらの結果から、苦味物質結合ペプチドには苦味マスキング効果が期待でき、候補となる食素材蛋白質の網羅的ペプチドアレイを用いることで、苦味マスキング剤の効率的探索およびその分子メカニズムの解析が可能であることが示唆された。

※本研究の一部は SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

peptide array, bitterness-masking agent, green tea catechin

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：4E017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 香気成分シトロネラールを含むアガロースゲルの破壊によるフレーバーリリース

# flavor release from destroyed agarose gel containing citronellal

○山田 恭正、石井 麻菜、甲斐 理紗子（同志社女子大食栄）
○Yasumasa YAMADA, Mana ISHII, Risako KAI (Doshisha Women's Coll. Lib. Arts)

【研究目的】 現在，高齢者向けを中心にゲル状食品が普及している。咀嚼・嚥下の障害にならないようなゲルのテクスチャーに関する研究は進んでいるが，味や香りなど「おいしさ」に関わる研究は物性と比べて相対的に遅れていると言える。演者らは，寒天などのゲル状食品に含まれる香気成分が，ゲルを破壊した時にリリースされる現象をモデルとして，フレーバーリリースに影響を与える要因を解明することを目的として研究を行っている。

【研究方法】 食品用ゲルに添加された揮発性成分（香料など）は，その化学構造によってゲルと相互作用して，ゲルが破壊された時にリリースされる度合い（リリース率）に影響を与える。本研究では，柑橘類に特徴的な香気成分の一種であるシトロネラールを添加したアガロースゲルを調製して，ゲルを破壊した時にリリースされるシトロネラールのリリース率をGCMSにより求めた。また，シトロネラールを添加したアガロースゲルについてテクスチャーアナライザーを用いた一軸圧縮により破壊強度（g）を調べた。リリース率と破壊強度の測定では，共にゲル中におけるショ糖濃度は 20%とし，またゲルの pH は 3.0，3.5，7.0 に調整した。

【研究結果】 破壊されたゲルからリリースされた揮発成分を GCMS で分析した結果，ゲル調整時の pH が 3.0 の場合，シトロネラールのみならず，シトロネラールがゲル調整時に構造変化（環化）して生じたと推定されるイソプレゴールを同定した。イソプレゴールは，柑橘系香料のシトロネラールとは異なる特徴の香りであることから一種のオフフレーバー（off odor）と言えよう。これまでに，オレンジレモネードの保存中に光照射[1)] やオレンジオイルに紫外線照射[2)] をするとシトロネラールからイソプレゴールが生成することが報告されている。ゲル状食品の製造において，寒天などを約 95℃で溶解後，シトロネラールを含む香料や果汁をゾル状態で添加する時の温度や pH そして固化させるまでの時間を制御することによって，オフフレーバーと言えるイソプレゴールの生成を抑制する方法の検討が必要である。本実験では，pH7.0，65℃でシトロネラールを添加したアガロースゲルからは，イソプレゴールの生成が抑制された。また，pH7.0 で調整したゲルは，pH3.5 で調整したゲルよりも一軸圧縮による破壊強度（g）が大きかった。

【参考文献】

[1)] Pfannhauser W., *Boll. Chim. Farm.*, 126 (2), 84-87 (1987).
[2)] Ziegler M., Brandauer H., Ziegler E., Ziegler G., *J. Essent. Oil Res.*, 3 (4), 209-220 (1991).

citronellal, flavor release, agarose gel

発表責任者：山田恭正（yyamada@dwc.doshisha.ac.jp）

発表番号：4E018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 国産小麦の麺生地形成時における揮発性成分の変化

# Analysis of Changes in the Volatile Compounds on Producing Japanese Noodle Doughs from Domestic Wheat Flour

○成澤 朋之[1]、仲島 日出男[1]、小島 登貴子[1]、杉山 健二郎[2]、山田 昌治[2]([1]埼玉産技セ北部、[2]工学院大先進工)
○Tomoyuki Narisawa[1], Hideo Nakajima[1], Tokiko Kojima[1], Kwnjirou Sugiyama[2], Masaharu Yamada[2] ([1]SAITEC NL, [2]Kogakuin Univ.)

【目的】

国産小麦は外国産小麦に比べ、味や風味において特徴があるという評価が製粉業者や製麺業者を中心に多くみられているが、依然として科学的な裏付けが行われていない状況にある。これを受け、我々はこれまでにガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)を用いて、埼玉県産およびオーストラリア産小麦の小麦粉や麺生地、ゆで麺などの揮発性成分分析を行い、品種間の香気成分の違いや製麺時の香気成分の変化を解析するとともに、ゆで麺の風味の指標となりうる小麦粉中の香気成分について検討してきた。その結果、麺生地調製時の小麦粉への加水により生成するアルデヒド類がゆで麺の香気特性に影響を与えており、小麦品種の香気成分特性の評価には、小麦粉ではなく加水生地の評価が必要であることを明らかにした[1)]。本研究では、小麦品種の香気成分特性評価方法の確立を目的として、小麦粉への加水後により生じる揮発性成分の経時的な変化を確認した。

【方法】

農林 61 号の商用 2 等粉を測定に供した。測定生地試料は、ビーカー中で小麦粉、50mM MES バッファー(pH 6.0)及び塩化ナトリウムを 10 g:5 ml:0.2 g の割合で混練して調製した。生地試料 3g を 20ml バイアル瓶にとり、生地形成直後、および 25℃で 1.5 時間、3 時間、4.5 時間、6 時間、24 時間保管後に揮発性成分の測定を行った。保管後の試料を 60℃で熱平衡化後、ヘッドスペースガスを TENAX チューブに捕集し、GC/MS 分析を行った。

【結果】

麺生地の揮発性成分は、加水直後から 1.5 時間後まで、低沸点側の成分で変化が大きかったが、その後の変化は緩やかであった。生地の香気成分への寄与が大きなアルデヒド類については、24 時間後までに増加しているものが多かったが、(E)-2-heptenal、(E)-2-octenal では検出量が低下していた。小麦品種の香気成分特性の評価にあたっては、揮発性成分の変動が大きい生地形成直後は避け、加水から 1.5 時間以上経過後に測定を行う必要があることが分かった。

1) 第６２回食品科学工学会大会要旨集, 3Ga3, p120 (2015)

Wheat flour, GC/MS, Volatile compound

発表番号：4E019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC100933 株におけるフェノール酸脱炭酸酵素遺伝子(*padC*)の構造と発現

# Structure and expression of phenolic acid decarboxylase (*padC*) in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC100933

○仲宗根 薫（近畿大工学部）
○Kaoru NAKASONE (Kinki University)

ヒドロキシケイ皮酸の誘導体であるフェルラ酸（FA）は、様々な植物等の細胞壁に見いだされる。この FA は、食品中のフレーバー・医薬・化粧品等に用いられる、バニリンの前駆体であり、また抗酸化・抗炎症作用も有し、多機能性化合物と言える。さらに揮発性フェノール類の一種である、4-ビニルグアヤコール（4-VG）、4-ビニルフェノール（4-VP）、エチルフェノール等は、ビール・ワイン・ウイスキー・泡盛等の発酵中に検出される。これらフェノール化合物は、通常、原材料中のフェノール酸（ヒドロキシケイ皮酸）の微生物による脱炭酸反応に由来する。従って、これら化合物は、様々なフレーバーの（微）生物変換にとり重要な前駆体である。フェノール酸は、様々な微生物の増殖を抑制することから、微生物由来のフェノール酸脱炭酸酵素（Phenolic acid decarboxylase, PAD）による FA から 4-VG への変換などは、フェノール酸の無毒化機構の一つであると考えられる一方、その増殖抑制の影響を受けない微生物も見いだされる。本研究では研究例の少ない乳酸菌の PAD に着目し、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC100933 株におけるフェノール酸脱炭酸酵素遺伝子(padC)の構造と発現について解析を行った。

乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NBRC100933 株（Type strain）は NITE（製品評価技術基盤機構）より入手した。MRS 培地を用い微好気条件による静置培養の後、回収菌体から染色体 DNA を精製した。既に全ゲノム解析の終了した *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 株、その他 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* のドラフトゲノム情報に基づき、フェノール酸脱炭酸酵素遺伝子(*padC*)のプライマー設計を行い、PCR により部分配列を増幅し塩基配列を確認した。その後、本遺伝子の前後配列を inverse PCR により増幅取得し *padC* 周辺の構造解析を行った。その結果、*padC* 遺伝子の下流に、その発現制御に関与する *padR* 遺伝子が見いだされた。本講演では、これら構造解析の結果に加え、*padC*/ *padR* の発現解析結果、PADC 酵素活性測定等について報告する。

Lactococcus lactis subs. lactis, phenolic acid decarboxylase, awamori mash

発表番号：4E020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# バレイショ品種・系統のアントシアニン評価

# Anthocyanin analyses of potato (Solanum tuberosum) varieties and breeding lines

○石黒 浩二、田宮 誠司、瀧川 重信、遠藤 千絵、野田 高弘（北農研）
○ Koji ISHIGURO, Seiji TAMIYA, Shigenobu TAKIGAWA, Chie ENDO, Takahiro NODA (NARO/HARC)

【目的】

アントシアニンを含有するバレイショは、様々な料理や加工品に利用されており、抗酸化性や肝障害軽減などの機能性作用を示すことが報告されている。アントシアニンをさらに高含有する品種が育成されれば、食用色素や機能性食品など新たな需要の創出が期待される。そこで本研究では、高色素含有育成系統について、アントシアニン含量、組成、色調および抗酸化性を評価することを目的とした。

【方法】

紫または赤色の肉色を呈する既存の３品種および品種育成中のバレイショ13系統（紫色系５系統、赤色形８系統）について、アントシアニンの組成および含量をHPLCによって評価した。また、色調を測色色差計によって分析し、抗酸化性をORAC法によって評価した。バレイショアントシアニンの各成分を各種クロマトグラフィーにより単離し、各成分の抗酸化性を評価した。

【結果】

紫色系品種に含まれるアントシアニンはペタニン（petunidin 3-p-coumaroylrutinoside,5-glucoside）、赤色系品種ではペラニン（pelargonidin 3-p-coumaroylrutinoside, 5-glucoside）が主成分であり、品種・系統間で色素組成の大きな差異は認めらなかった。紫色系の代表品種「シャドークイーン」と赤色系の代表品種「ノーザンルビー」のアントシアニン含量は、それぞれ 101.5 mg/100g FW、46.3 mg/100g FWであった。育成系統はこれらの既存品種より高含量であり、最も高い含量を示した系統は紫色系で445.6 mg/100g FW、赤色系で169.3mg/100g FWであり、それぞれ既存品種の4.4倍および3.7倍であった。紫色系の色調は、含量が高いほどa*値が高くb*値が低く、紫キャベツ色素と似た色調であった。赤色系の色調は含量が高いほどa*値、b*値が高く、赤ダイコンと似た色調であった。

バレイショ品種・系統のH-ORAC値はアントシアニン含量と相関性があり、育成系統は既存品種より高い抗酸化性（3,004μmol-TE/100g FW）を示した。精製したバレイショアントシアニン５成分の抗酸化性は、ペラニンが最も高い値を示した（H-ORAC：10.3μmol-TE/mol）。

今後これらの育成系統の中から、アントシアニン高含有品種が開発され、加工品や食用色素、機能性食品などとして利用されることを期待したい。

potato, anthocyanin, ORAC

発表番号：4E021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 青葉アルデヒドの生成に関わる酵素遺伝子の同定とトマトの香気成分の改変

# Identification of hexenal isomerase converting to leaf aldehyde and manipulation of volatile component in tomato

○國嶋 幹子、山内 靖雄、水谷 正治、杉本 幸裕（神大農）
○Mikiko KUNISHIMA, Yasuo YAMAUCHI, Masaharu MIZUTANI, Yukihiro SUGIMOTO (Kobe Univ.)

【目的】植物普遍的に存在する揮発性成分として、テルペン類や６つの炭素鎖からなる緑葉揮発性成分(green leaf volatiles, GLVs)がある。食用作物におけるこれらの香りは、商品価値を左右する要素の一つである。GLVs の１つである(3*Z*) -ヘキセナールは青臭い香りを有するのに対して、青葉アルデヒドと名付けられている(2*E*)-ヘキセナールは果実様の香りとして知られている。これらの揮発性成分は、リノレン酸から酵素的に変換されることによって生じる。(2*E*)-ヘキセナールは(3*Z*) -ヘキセナールの異性化によって生合成されることが示唆されてきた。したがって、この変換は食用作物の商品価値に影響を与えていると予想されるが、その詳細は未解明であった。本研究では(2*E*)-ヘキセナール生合成に関わるヘキセナールイソメラーゼを同定し、遺伝子組換えによりトマトの香気成分の改変を試みた。

【方法・結果】2-ヘキセナールは果実の成熟に伴って増加することが報告されていたので、様々な果実のヘキセナールイソメラーゼ(HI)活性を調べた。その結果、最も高い活性を有したパプリカ果実より酵素精製を行い、分子量 35 kDa の単一のバンドを得た。キネティクス解析の結果、3-ヘキセナールに対する $K_m$ 値は 0.73 mM で $k_{cat}$ 値は 760 であった。NMR 解析を行い、酵素変換された 2-ヘキセナールは trans 体であることを確認した。部分アミノ酸配列を得て、それに基づいて酵素遺伝子を同定した。系統樹を作製し、相同性を示した遺伝子について組換え酵素を作製し活性を測定した結果、ナス科とマメ科、ウリ科、イネ科由来の遺伝子が活性を有する酵素をコードしていることが明らかとなった。トマトとパプリカを用いて組織別発現量を測定した。パプリカでは果実の成熟に伴って、HI 遺伝子の発現量が増加したが、トマトでは同様の増加は見られなかった。そこで、アグロバクテリウム法により 35S プロモータを用いてパプリカ由来 HI 過剰発現形質転換トマトを作製し、香気成分の改変を試みた。GC-MS 分析により香気成分を解析した結果、野生株の葉では 98.8%、果実では 85%を(3*Z*)-ヘキセナールが占めたのに対し、形質転換株では(2*E*)-ヘキセナールが 87.1%、100%を占めていた。これにより単離した遺伝子を活用することによってトマトの香気成分の改変が可能になったと考えられる。

hexenal, volatile

発表番号：4E022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ウメ果実由来のフェノール化合物中の *cis*-*p*-クマル酸の生成と役割

# Occurrence and role of *cis*-*p*-coumaric acid in the phenolics from a processing byproduct of Japanese apricot, mume (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

○味村 妃紗[1]、林 行則[2]、岡崎 一誠[2]、小山 一[3]、三谷 隆彦[1]([1]和歌山大産研セ、[2]JA 紀南、[3]和歌山県立医大)
○Hisa MIMURA[1], Yukinori HAYASHI[2], Kazunobu OKAZAKI[2], Hajime KOYAMA[3], Takahiko MITANI[1] ([1]Wakayama Univ. R&D Center, [2]JA kinan, [3]Wakayama Med.Univ.)

【目的】

我々はこれまで梅干し製造中の副産物である梅酢からフェノール性化合物（UP）を調製し、その分析と機能性に関する研究を行ってきた。UP のアグリコンは主に *p*-クマル酸（PC）、カフェ酸、フェルラ酸などのヒドロキシ桂皮酸誘導体で構成されている。今回は工業的に調製した UP の 3 ロットの分析と、その中に存在する *p*-クマル酸異性体の由来と役割について調べた。

【方法】

フェノール性化合物定量法はフォーリンチオカルト法で、全糖量はフェノール硫酸法で分析した。ヒドロキシ桂皮酸の分析はアルカリ加水分解後、HPLC および TLC で分析した。HPLC は YMC Hydrosphere C18 で、0.1%TFA 水溶液とメタノールのグラジエントで行った。TLC はセルロース担体で、展開溶媒は 1%酢酸水溶液を用いた。

【結果及び考察】

１．UP のポリフェノール量は没食子換算で平均 12.4%（PC 換算で 18.5%）、糖含量は平均 58%であったが、ロット間の差異は見られた。アグリコンの内 PC には *trans* 体と *cis* 体が存在したが、*cis* 体の含量がロットにより大きく異なっており、PC 総量の 40%近くに達するロットも見られた。

２．UP の原料である梅酢にも *cis* 体がある程度存在しており、ウメ果実中にも *cis* 体の存在が認められ、ウメ果実の熟度に伴い増加する傾向が見られた。また果実の表層と内部の *cis* 体含量を調べたところ、表層部分に多いことが判明した。標品の *trans*-PC は紫外線照射で容易に *cis*-PC を生成することから、UP 中の PC の *cis* 体は果実が太陽光を受けることで生成し、紫外線防御の一機構ではないかと推察された。

３．一方、UP の原料となる梅酢は太陽光下で放置すると、*cis*-PC 含量を増加させることが確かめられたことから、梅酢の保管上の問題が指摘される。

４．UP をラット腸管アセトン粉末で処理すると、主に PC の *trans* 体が遊離し、*cis* 体は遊離がほとんど見られないことが判明した。さらに UP をブタ肝臓エステラーゼで処理した場合も同じ結果を得た。これらのことを踏まえて、*cis*-PC の動物生体内での利用についても考察をする。

*Prunus mume*, phenolics, *p*-coumaric acid

発表責任者：三谷　隆彦（tmitani@center.wakayama-u.ac.jp）

発表番号：4E023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 炭素・水素安定同位体比分析による梅酒中酸味料の原材料判別

# Authentication of Japanese apricot liqueur applied by carbon and hydrogen stable isotope analyses of acidic ingredients

○赤松 史一[1]、橋口 知一[2]、久常 有里[1]、大江 孝明[2]、川尾 尚史[2]、藤井 力[1] ([1]酒総研、[2]和歌山県)
○ Fumikazu AKAMATSU[1], Tomokazu HASHIGUCHI[2], Yuri HISATSUNE[1], Takaaki OE[2], Takafumi KAWAO[2], Tsutomu FUJII[1] ([1]Natl. Res. Inst. Brew., [2]Wakayama Pref.)

【背景】

2015 年 1 月に梅、糖類及び酒類のみを原料として製造された梅酒を本格梅酒とする日本洋酒酒造組合の自主基準が制定された。本格梅酒の偽装表示防止は、消費者の保護だけでなく、原料を供給する梅栽培農家にとっても利点があり、本格梅酒の表示を担保するための科学的判別手法が必要とされている。本研究は、梅酒における酸味料の主原料であるクエン酸添加の有無を炭素・水素安定同位体比（$\delta^{13}C$・$\delta^{2}H$）から判別する技術を開発した。

【方法】

酸味料を加えず作成した梅酒（酸味料無添加梅酒）および酸味料表記のある市販梅酒からイオン交換固相抽出カラム用いて有機酸を抽出し、抽出した有機酸から ODS カラムを用いた高速液体クロマトグラフでクエン酸を単離した。単離したクエン酸は、凍結乾燥後、炭素安定同位体比分析に供した。水素安定同位体比分析用の試料は、クエン酸カルシウムに変換してから測定を行った。

【結果と考察】

酸味料無添加梅酒に含まれているクエン酸の平均 $\delta^{2}H$ 値は-8.0‰、平均 $\delta^{13}C$ 値は-23.6‰を示した。一方、酸味料が添加されている市販梅酒の平均 $\delta^{2}H$ 値は-49.6‰、平均 $\delta^{13}C$ 値は-13.2‰と対照的な値を示した。$C_4$ 植物原料のクエン酸の $\delta^{13}C$ 値は-11.2‰、$C_3$ 植物原料のクエン酸の $\delta^{13}C$ 値は-25.2‰を示したが、これらの $\delta^{2}H$ 値は、両方とも-50‰程度の低い値を示した。梅は $C_3$ 植物であり、本研究で示した梅由来クエン酸の $\delta^{13}C$ 値も典型的な $C_3$ 植物の値である。酸味料添加市販梅酒のクエン酸の $\delta^{13}C$ 値と $\delta^{2}H$ 値は、$C_4$ 植物原料のクエン酸が添加されていることを示しているが、梅酒に $C_3$ 植物を原料としたクエン酸を酸味料として添加した場合、炭素安定同位体比で酸味料添加の有無を判別するのは困難である。しかし、水素安定同位体比分析を使えば、クエン酸の原材料にかかわらず、酸味料添加の判別が可能となることを示唆している。

Japanese apricot liqueur, stable isotope analysis, citric acid

発表番号：4E025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

LC-MS/MS を用いたかつお節抽出液のアミノ酸定量の検討
Development of quantitative analysis for amino acids in dried bonito extract by LC-MS/MS
○上原 大輝[1]、与那嶺 務[2]、玉城 一[1]([1]琉大農、[2]与那嶺鰹節店)
○Daiki UEHARA[1], Tsutomu YONAMINE[2], Hajime TAMAKI[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Yonamine katsuobushi-ten)

[目的] 沖縄県はかつお節の消費量が全国 1 位の県であり、かつお節を用いた伝統料理が数多く存在する。その中でもかつお節本来の風味を生かしたものに「かちゅー湯」がある。これはかつお節と味噌に湯を加えただけのもので、沖縄では昔から風邪や疲労、二日酔いのときに飲まれてきた。近年イミダペプチドを 200～400mg/日を 1～2 週間継続摂取することで抗疲労効果を示すとの報告がある。かつお節にはこれらのペプチドに加えヒスチジン、タウリンが豊富に含まれていることが知られておりかちゅー湯にも抗疲労効果が期待できる。我々はかつお節を用い、科学的根拠に基づいた新規機能性食品の開発を目指している。そこで本研究ではかつお節抽出液中のイミダペプチド及びアミノ酸の簡便かつ迅速な定量を試みた。

[方法] 試料には市販の枕崎産血合かつお節の削り節を用いた。このフードプロセッサー粉砕物、凍結粉砕物を調製しそれぞれ熱水で抽出した。コントロールには粉砕していない削り節を用いた。ヒスチジン以外のアミノ酸の分析には、抽出液を 0.2N HCl と 1:1 の割合で混合、ろ過したものを用いた。ヒスチジンの分析には抽出液を 0.1N HCl で 100 倍希釈したものを用いた。Wako アミノ酸混合標準液 H 型および Ans, Asn, Car, Gln, Gly, Hyp, Ser, Tau, Trp を 0.1N HCl で希釈したものをアミノ酸分析の標準液とし、調製した各試料および標準液は LC-MS/MS を用いて分析した。LC で用いたカラムは Imtakt 社製 Intrada Amino Acid 50×3mm, 溶離液は A 液 : アセトニトリル/テトラヒドロフラン/25mM ギ酸アンモニウム/ギ酸=9/75/16/0.3, B 液 : アセトニトリル/100mM ギ酸アンモニウム=20/80 でグラジエント分析を行った。

[結果] かつお節の迅速な分析方法を検討した結果、抽出は 2 分×2 回で十分であった。血合かつお節のコントロール、フードプロセッサー粉砕物、凍結粉砕物においてアミノ酸含量の有意な差は認められなかった。凍結粉砕物 100g 中に多く含まれるアミノ酸の含量はそれぞれ His 1604.14mg、Tau 412.96mg、Ala 149.02mg、Ans 133.05mg、Car 93.09mg であった。この結果からかつお節中には Ans,Car 合わせて約 230mg/100g 含まれていることが確認できた。また、その他のアミノ酸の含量も定量可能な範囲内にあった。このことから、かつお節およびかつお節を用いた食品において本実験法でアミノ酸の測定が可能であることが示唆された。

Dried bonito, Amino acids, LC-MS/MS

発表番号：4E026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 古代米味噌の抗酸化性

# Aantioxidant activity of miso made from ancient rices

○近藤（比江森） 美樹[1]、山下 夏海[1]、山田 光春[2]、大熊 紘治[3]（[1]徳島文理大人間生活、[2]佐那河内村良土れん、[3]（株）みむら）
○Miki Hiemori-Kondo[1], Natsumi Yamashita[1], Mitsuharu Yamada[2], Kouji Okuma[3] ([1]Tokushima Bunri Univ., [2]Sanagochivillage Yoidoren, [3]Ltd. Mimura)

【目的】 古代米の紫黒米や赤米はアントシアニンならびにプロシアニジンを含む有色米であり、これら色素成分は抗酸化作用を示すことから、古代米を利用した加工食品には機能性が期待される。徳島県佐那河内村では、地域おこしの一環として古代米の生産から加工食品の製造・販売に至る 6 次産業化に取り組んでいる。本研究では、紫黒米および赤米の加工食品である古代米味噌における品質特性、抗酸化性ならびにポリフェノール量について、市販の米味噌ならびに豆味噌との比較を行った。
【方法】 試料は、佐那河内村において製造した紫黒米味噌（醸造期間 0.5 年）、赤米味噌（0.5 年および 2.5 年）白米味噌（1.5 年および 2.5 年）の 5 種類、および市販の味噌 4 種類（豆味噌、赤色辛口米味噌、淡色辛口米味噌、甘味噌）を用いた。色度は、粒が残存する古代米味噌（0.5 年）は乳鉢で磨砕して均質化後、測色計を用いて *L**値 (明度)、*a**値 (赤-緑度)、*b**値(黄-青度) を測定した。次いで､80%エタノール抽出液を調製し､抗酸化性は DPPH ラジカル捕捉活性をトロロックス当量として、さらに、ポリフェノール量はフォーリンチオカルト法にて没食子酸当量として評価した。また、色素成分の分析試料として紫黒米味噌の酸性エタノール抽出物を調製し、シアニジン 3-グルコシド、シアニジンならびにシアニジン 3-グルコシドの熱分解物であるプロトカテキュ酸を HPLC－PDA を用いて分離・定量し、標準品の保持時間および吸収スペクトルとの比較から各成分を定量した。
【結果および考察】 *L**値(明度)は、白米味噌 0.5 年や甘味噌で高く、白米味噌 2.5 年や豆味噌で低値を示し、熟成期間が長くなるに従って低下が認められた。抗酸化性は、豆味噌＞紫黒米味噌 0.5 年、赤米味噌 0.5・2.5 年、白米味噌 2.5≧赤色辛口米味噌、白米味噌 1.5 年≧淡色辛口米味噌≧甘味噌の順に高値を示した。フェノール量は、豆味噌＞白米味噌 2.5＞赤色辛口米味噌≧赤米味噌 2.5≧白米味噌 1.5 年＞紫黒米味噌 0.5 年､赤米味噌 0.5＞淡色辛口米味噌＞甘味噌の順であった｡項目間の関連性は、*L**値と抗酸化性の間および *L**値とフェノール量の間で負の相関を示し､抗酸化性とフェノール量の間では正の相関を示した。さらに、紫黒米味噌においてシアニジン 3-グルコシドの分解物として抗酸化作用を有するプロトカテキュ酸が検出された。
以上の結果から、紫黒米および赤米を用いた古代米味噌は、長期熟成の白米味噌と同等の抗酸化活性を有し、市販の米味噌よりも高い抗酸化性を示すことが明らかとなった。

miso, ancient rice, antioxidant activity

発表責任者：近藤(比江森）美樹（m-kondo@tks.bunri-u.ac.jp）

発表番号：4E027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高知県四万十町産ショウガの機能性成分および呈味成分に関する研究

# Study on the functional and taste compounds of ginger harvested in Shimanto Town in Kochi Prefecture

○野村 凜[1]、市田 彩香[1]、岡村 健志[2]、武井 秀樹[3]、柏木 丈拡[1]、島村 智子[1]、受田 浩之[2,4]（[1]高知大・農、[2]高知大・地域連携セ、[3]四万十町、[4]高知大・地域協同）
○ RIN NOMURA[1], SAIKA ICHIDA[1], KENJI OKAMURA[2], HIDEKI TAKEI[3], TAKEHIRO KASHIWAGI[1], TOMOKO SHIMAMURA[1], HIROYUKI UKEDA[2,4] ([1]Fac. of Agri., Kochi Univ., [2]CRC, Kochi Univ., [3]Shimanto Town, [4]Fac. of Regional Collaboration, Kochi Univ.)

【目的】高知県は国内産ショウガの約 40%の収穫量を占める一大生産地であり、その中でも高知県西部に位置する高岡郡四万十町は高知県で最もショウガ収穫量が多い地域である。一般的に、ショウガは秋から初冬にかけて収穫し、その後 2 ヶ月ほど貯蔵した後、約 1 年にわたり出荷される。この貯蔵後に出荷するショウガを「ひねショウガ」、または「囲いショウガ」と呼ぶ。四万十町では、「ひねショウガ」に加え、収穫直後のショウガ「堀りだちショウガ」を販売している。ショウガは古くから漢方薬素材として用いられていることから、健康増進効果に関する数多くの報告がなされている。しかし、ショウガの貯蔵中の機能性成分、および呈味成分の変化についての知見は乏しい状況にある。本研究では、四万十町産ショウガを分析対象とし、収穫直後から 1 年間にわたり機能性成分、および呈味成分の経時的変化について調べた。また、ハウス栽培された新ショウガ、露地栽培されたショウガの収穫直後、ならびに 1 年間貯蔵後の味パターンの比較も行った。
【方法】2014 年 11 月に四万十町で収穫されたショウガ（品種 トサイチ）を試料とし、収穫直後から 1 年間、経時的に総ポリフェノール量、ジンゲロール類・ショウガオール量、抗酸化活性、遊離アミノ酸量を測定した。サンプリングしたショウガは直ちに凍結乾燥し、エタノール、または水で抽出したものを各測定に供した。総ポリフェノール量はフォーリン・チオカルト法にて測定した。6-、8-、10-ジンゲロールと 6-ショウガオールの定量は HPLC にて行った。カラムとして Wakosil-Ⅱ $5C_{18}$-AR（φ 4.6 mm×150 mm）、溶離液として 0.05% TFA 溶液および 0.05% TFA を含むアセトニトリルを用い、流速 1.0 mL/min、検出波長 228 nm の条件で分析を行った。抗酸化活性の測定には DPPH ラジカル消去活性測定法を用いた。遊離アミノ酸は AQC 法で誘導体化後、UPLC で分析した。また、味パターンの比較には味覚認識装置を用い、味覚センサーにて甘味、塩味、酸味、苦味、旨味、渋味の分析を行った。
【結果】収穫直後のショウガ中の 6-、8-、10-ジンゲロールと 6-ショウガオール量は、各々、838、169、143、3.78 μg/g f.w.であった。また、総ポリフェノール量は 599 μg GA/g f.w.、DPPH ラジカル消去活性は 440 μg TE/g f.w.、総遊離アミノ酸量は 4424 nmol/g f.w.であった。貯蔵期間中の変化について調べたところ、これらの指標は全てほぼ一定した値を示すことが判明した。味パターンの比較の結果、ハウス栽培された新ショウガは他の 2 種類と比較して塩味と渋味において高い値を示した。また、露地栽培のショウガを 1 年間貯蔵したものは収穫直後のものと比較して、塩味と旨味において高い値を示した。一方、渋味と苦味においては低い値を示すことが判明した。

Ginger, antioxidant activity, free anino acid

発表番号：4E028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# セルロースカラムを用いた *cis-p*-coumaric acid の調製と単離

# Preparation and purification of *cis-p*-coumaric acid using cellulose column chromatography

○三谷 隆彦[1]、味村 妃紗[1]、小山 一[2]、坂本 英文[3] ([1]和歌山大産研セ、[2]和歌山県立医大、[3]和歌山大システム工)
○Takahiko MITANI[1], Hisa MIMURA[1], Hajime KOYAMA[2], Hidefumi SAKAMOTO[3] ([1]Wakayama Univ. R&D Center, [2]Wakayama Med.Univ., [3]Wakayama Univ. Sys.Eng.)

【目的】

ウメ果実由来のフェノール化合物は主に *p*-クマル酸（PC)、カフェ酸、フェルラ酸などのヒドロキシ桂皮酸誘導体で構成されている。前報でウメ果実中の PC には *trans* 体と *cis* 体の異性体が存在し、*cis* 体は *trans* 体が太陽光にさらされることにより生成することを明らかにし、紫外線照射の産物と考えられた。

PC は植物のフェノール化合物の生合成の制御やアレロパシーに関与したり、紅色光合成細菌の Photoactive Yellow Protein（Hh-PYP）の発色団としての役割も報告されている。今後の PC の研究には、これまで入手が困難であった PC の *cis* 体の供給が必要と思われる。我々はセルロースカラムを用いた PC の *cis* 体の調製・単離法を見出したので報告する。

【方法】

標品の *trans*-PC 及び *cis*-PC はそれぞれ SIGMA-ALDRICH 及び TRC より得た。カラムクロマトグラフィー用セルロースは Merck 社製の微結晶セルロースを用いた。HPLC は YMC Hydrosphere C18 で、0.1%TFA 水溶液とメタノールのグラジエントで行った。TLC はセルロース担体を用いた。

【結果及び考察】

*trans*-PC 標品はメタノールに溶解し、太陽光もしくは紫外線ランプを用いて紫外線照射処理をした後、HPLC および TLC で *cis* 体の生成を確認した。

この *trans* 体と *cis* 体の混合溶液（TCM）中の *trans* 体と *cis* 体の分離を TLC で検討したところ、1%酢酸水溶液：メタノール（＝90：10）の混液が最適であることが判った。

この TCM を直径 50 ㎜×長さ 300 ㎜のセルロースカラムで溶出したところ、*trans* 体と *cis* 体の分離が可能となった。溶出画分をそれぞれ酢酸エチルで分液し、酢酸エチル層を分取乾固して目的物を得た。それぞれの分析データを示す。

cellulose column chromatography, isomerization, *cis-p*-coumaric acid

発表責任者：三谷　隆彦（tmitani@center.wakayama-u.ac.jp）

発表番号：4E029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 泡盛油が泡盛酒質に及ぼす影響

# Influence of fusel oil on quality of awamori.

○新垣 壱馬[1]、宮澤 舞[2]、玉城 康智[1] ([1]沖縄高専、[2]三洋化成工業株式会社)
○Kazuma ARAKAKI[1], Mai MIYAZAWA[2], Yasutomo TAMAKI[1] ([1]NIT,Okinawa college, [2](Sanyo Chemical Industries, Ltd.)

【背景・目的】

泡盛は沖縄の伝統的な蒸留酒であり，その熟成過程で泡盛表面に油性成分が析出してくる．これは一般的にはフーゼル油と言われているが，他の蒸留酒のそれと区別するためここでは泡盛油と呼ぶ．泡盛油は，古酒独特の味や香りに関与することが経験的に知られているが，油臭の原因にもなるため通常は取り除かれている．しかし，この泡盛油が泡盛の味や香りにどのような影響を及ぼすのか，その詳細は明らかにされていない．そこで本研究は，モデル泡盛（43%エタノール溶液）を用いた泡盛油の添加試験を行い，保存期間の異なる泡盛油の添加量の違いがモデル泡盛の酒質に及ぼす影響について検討した．

【実験方法】

モデル泡盛に，保存期間の異なる 3 種類（泡盛油採取後 1 年，5 年，9 年）の泡盛油を 4 段階の量（1μl，10μl，100μl，1000μl）に分けて添加し，暗所で 3 年間熟成させた．モデル泡盛の酒質を比較するため，TBA 価，総酸度，pH，低沸点香気成分の 4 項目について測定し，泡盛油がモデル泡盛の酒質に与える影響を検討した．また，泡盛油の組成を明らかにするため，泡盛油をメチルエステル化処理後，ガスクロマトグラフ質量分析装置(GC/MS)により脂肪酸の定性分析を行った．

【結果】

モデル泡盛は，泡盛油の添加量が多いほど総酸度は高くなり，pH は低くなる傾向が見られた．また，泡盛油の添加量の増加に伴い低沸点香気成分は増加し，特に酢酸エチルの増加が顕著であった．酢酸エチルはフルーティーで華やかな香りを呈する古酒香の一つとして知られており，これが泡盛中に増加することで，より香りに富んだ泡盛となることが期待される．以上のことから，泡盛油は泡盛の香気成分の生成に深く関与しており，さらに，添加する泡盛油を熟成させることで，モデル泡盛に与える影響を促進させることが示唆された．

awamori, fusel oil, addition

発表番号：4E030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乾熱処理による米粉タンパク質の SH 基の露出と米粉パンの製パン性劣化について

# Naked SH groups from protein in dry-heated rice flour and deteriorated breadmaking properties baked with these treated rice flour/fresh gluten flour

○田原 彩[1]、中川 真理子[1]、牛島 雄毅[2]、松永 幸太郎[2]、中村 智英子[3]、竹内 美貴[3]、瀬口 正晴[1]([1]神戸女子大家政、[2]熊本製粉（株）、[3]神戸女子短大)
○Aya TABARA[1], Mariko NAKAGAWA[1], Yuki USHIJIMA[2], Kotaro MATSUNAGA[2], Chieko NAKAMURA[3], Miki TAKEUCHI[3], Masaharu SEGUCHI[1] ([1]Kobe Women's Univ., [2]Kumamoto Flour Milling Co., Ltd., [3]Kobe Women's Junior College)

【目的】長期間室温貯蔵，あるいは乾熱処理（120℃，2 時間）した米粉と新鮮な小麦グルテンを用いて製パン試験を行うと，製パン性 (パン高， 比容積)の劣化することが知られている[1)]。これらの処理で米粉中のタンパク質の疎水化が強まり，そのことが小麦グルテンの粘弾性に大きな影響を与えることが確認された[2)]。我々はタンパク質の疎水性のうち特に SH 基に注目し，米粉中の SH 基がこれらの処理により表面に露出し製パン性劣化に繋がったのではないかと推察した。本研究では，SH 基の存在状態を確認するため，DDD（6,6’-dihydroxy-2,2’-dinapthl disulfide）試薬を用いた染色法に注目し検討を進めた。【方法】米粉を 120℃のオーブン中で 10～120 分間乾熱処理し，乾熱処理米粉とした。疎水性は米粉(2g)，水(20mL)，オイル(4mL)を試験管中で激しく撹拌した後，オイル吸着能を測定して判定した。製パン試験は米粉(184.9g)と小麦グルテン(32.6g)をブレンドし，中川らの方法[1)]により行った。粘弾性の変化は米粉(8.5g)とグルテン，グリアジン，グルテニン各サンプル(1.5g)をブレンドし，ミキソグラフ試験により検討した。SH 基の染色法は DDD 法[3)]を用いた。染色した米粉は，測色色差計により *Lab* 値を測定した。【結果】オイル吸着試験及び製パン試験の結果，米粉の乾熱処理時間が長くなるに伴って，オイル吸着能の増加及び製パン性の低下が認められ，米粉の疎水化と製パン性は相関性の高いことがわかった。また，0.2%NaOH 溶液で脱タンパク質処理した場合，米粉はオイル吸着能を失い，製パン性の回復することが確認された。ミキソグラフ試験の結果，グルテニンの場合，未処理米粉とでは強い粘弾性をもつドウを形成したが，乾熱処理米粉とでは粘弾性の低いドウとなった。DDD 染色試験の結果，米粉の乾熱処理時間が長くなるに伴い，*a* 値の増加及び *L*，*b* 値の低下する傾向がみられ，乾熱処理による表面の-SH 基の増加が推察された。なお，これらの結果はオイル吸着能増加と相関のあることが確認され，米粉の疎水化と米粉タンパク質の SH 基増加は関係のあることが推察された。乾熱処理により露出した-SH 基が小麦グルテニンを還元して低分子化し，グルテンの粘弾性を低下させ製パン性低下に繋がったものと推察された。

1)日本農芸化学会 2015 年度大会 2F28p16， 2)日本食品科学工学会第 62 回大会要旨集 p.119,
3) Plant Physiol. 44:168-172, 1969.

rice flour/gluten flour bread, SH groups, reduction in glutenin

発表番号：4E031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Improving the emulsifying properties of egg white protein by partially hydrolysis

○ Hajime HATTA[1], Mayuko YAMASHITA[1], Yu WANG[1], Francoise NAU[2] ([1]Kyoto Women's University, [2]Agrocampus-Ouest, Rennes, France)

Hen egg white (EW) is one major protein sources of diet, with remarkable nutritional and functional properties. It is thus a desirable ingredient for many foods. While egg yolk is widely used for its exceptional emulsifying properties, egg white (EW) is mainly used for gelling and foaming properties. However, yolk is sometimes rejected because of its high lipid content. Then, a relevant issue is to modify EW in such a way to obtain an emulsifying agent as efficient as egg yolk.

In the present study, partially hydrolysis followed by heat treatment has been investigated in order to modify EW protein structure and to improve emulsifying properties. EW was hydrolyzed by a thermostable protease (enzyme) at 65° C and at various enzyme concentrations (0.1%, 0.2%, 0.4%, 0.8%), followed by no supplementary heat treatment or heat treatment at 80° C or 90° C for 8 min.

Results showed that optimal emulsifying properties were obtained when enzyme concentration was 0.4% followed by heat treatment at 90° C and enzyme concentration was 0.2% followed by heating at 80° C. Moreover, compared with native EW and a highly hydrolyzed peptides, significant improvement of emulsifying properties of hydrolyzed EW indicates that limited hydrolysis (DH<26%) combines with heat treatment favors emulsifying properties of EW, highly hydrolyzed peptides possessed relative weak emulsifying activities (EA) and emulsifying stabilities (ES). On the other hand, by using ANS fluorescent probe method, surface hydrophobicity (H0) of the above hydrolysates have also been observed, it is noticeable that in a certain range of H0 (100-160), a high correlation could be determined for H0 vs EA ($R^2$=0.81) and H0 vs ES ($R^2$=0.86), higher H0 contributes to a higher EA and ES. When H0 exceed 160, no correlation can be observed between H0 and EA as well as H0 and ES any more.

In the present study, we found partially hydrolysis of EW by protease followed by moderate heat denaturation of the hydrolysate is important to improve emulsifying properties of egg white proteins.

egg white, hydrolysis, emulsifying property

発表責任者：八田　一（hatta@kyoto-wu.ac.jp）

発表番号：4E032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# パンへのグルテンまたはデンプン添加がパン粥のテクスチャーへ及ぼす影響

# Effect of bread partially-replaced by gluten or starch on texture of bread gruel

西原 百合枝[2]、○沖邉 敦代[1]、久保 奈美[2]、松尾 実優[2]、芹田 千穂[1]、江頭 和佳子[2]、朝倉 富子[3]、舟木 淳子[1,2] ([1]福岡女子大院、[2]福岡女子大・国際文理、[3]東大院)
Yurie NISHIHARA[2], ○Atsuyo OKIBE[1], Nami KUBO[2], Miyuu MATSUO[2], Chiho SERITA[1], Wakako ETO[2], Tomiko ASAKURA[3], Junko FUNAKI[1,2] ([1]Fukuoka Women's University, [2]International College of Arts and Sciences, Fukuoka Women's University, [3]The University of Tokyo)

【目的】日本では現在、総人口に占める 75 歳以上の割合が年々増加しており、高齢者の摂食嚥下障害が問題となっている。需要が高まっている嚥下困難者用食品として、われわれはパン粥に着目し、パンの材料や配合がパン粥のテクスチャーへ及ぼす影響を検討している。本研究では、パン作製時の強力粉の一部をグルテンやデンプンに置換することがパン粥のテクスチャーへ及ぼす影響を検討した。
【方法】パンはホームベーカリー（SD-BMT2000、パナソニック株式会社）で作製した。グルテンは強力粉重量の 10%を置き換え、デンプンはタピオカデンプンを使用し、強力粉重量の 20%を置き換えた。これらのパン（強力粉 100%、グルテン 10%、デンプン 20%）について比容積の測定を行った。その後、パンのクラムを２cm 角に切り、パンの重量の３倍の水とともに攪拌した。試料温度を 70℃に保ちつつ、10 秒間に１回攪拌しながら、３分 30 秒間加熱しパン粥を作製した。45℃で保温したパン粥について、それぞれクリープメータ（RHEONERⅡ、株式会社山電）を用いてテクスチャー解析を行った。
【結果】パンの比容積は強力粉 100%が 4.29±0.12 ml/g、グルテン 10%が 5.39±0.05 ml/g、デンプン 20%が 3.60±0.06 ml/g であった。グルテン 10%の比容積は強力粉 100%よりも有意に大きく（$p<0.01$）、デンプン 20%の比容積は強力粉 100%よりも有意に小さかった（$p<0.01$）。パン粥のテクスチャー解析結果は以下の通りであった。硬さは、強力粉 100%が 1.19±0.28 kPa、グルテン 10%が 1.31±0.16 kPa、デンプン 20%が 2.21±0.64 kPa であった。グルテン 10%、デンプン 20%の硬さはそれぞれ強力粉 100%と有意差はみられなかったが、デンプン 20%については強力粉 100%よりも大きい傾向があった。パン粥の付着性は、強力粉 100%が 0.43±0.11 kJ/m$^3$、グルテン 10%が 0.53±0.06 kJ/m$^3$、デンプン 20%が 0.80±0.20 kJ/m$^3$であった。デンプン 20%の付着性は、強力粉 100%よりも有意に大きかった（$p<0.01$）。つまりパン粥のテクスチャーは、デンプン 20%が強力粉 100%より硬く、付着性が高い傾向がみられた。グルテン 10%は、強力粉 100%と大きな違いはみられなかった。パン作製時の強力粉の一部をグルテンやデンプンに置換することによって、様々なテクスチャーのパン粥を作製できる可能性があると考えられた。
本研究の一部は、総合科学技術・イノベーション会議のＳＩＰ（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

bread, gruel, texture

発表番号：4E033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ウメ新品種「橙高」の乳化特性に関する研究（第 1 報）

Studies on the Emulsifying Properties of Japanese apricot "Toko".1.

○赤木 知裕[1]、根来 圭一[1]、行森 啓[2]、土田 靖久[2]（[1]和歌山工技セ、[2]和歌山果樹試うめ研）
○Tomohiro Akagi[1], Keiichi Negoro[1], Akira Yukimori[2], Yasuhisa Tsuchida[2] ([1]Ind. Tech. Ctr. of Wakayama Pref., [2]Japanese Apricot Lab. , Wakayama Fruit Tree Experiment Sta.)

【目的】本県の梅関連産業は約 800 億円の市場規模で、重要な基幹産業となっている。また、ウメ生産量のうち約 7 割が梅干し加工原料で、栽培面積のうち約 8 割が「南高」である。しかし近年、供給過剰気味で価格が低下傾向となっており、新たな食品形態の需要開拓や品種構成の見直しが必要となっている。ウメ「橙高」は 2009 年に和歌山県果樹試験場うめ研究所で育成された新品種である。この品種は成熟や追熟に伴い果皮および果肉が橙色を呈するのが特徴で、主要品種である「南高」やβ-カロテン高含有の「地蔵梅」に比べてβ-カロテン含量が極めて高い。β-カロテンなどのカロテノイドは脂溶性であることから、「橙高」の特性を活かすため、我々は油脂を用いた食品開発について検討している。本報告では、試作品開発における基礎データ獲得のため、ウメ「橙高」果実の収穫時期と追熟処理が乳化特性に及ぼす影響について調査を行ったので、その結果を報告する。
【方法】2014 年に和歌山県果樹試験場うめ研究所ほ場内植栽の 13 年生「南高」樹に高接ぎした「橙高」7～8 年生枝から、6 月 10 日（青果収穫始期）、15 日（青果収穫後期）および 20 日（完熟期）に果実を採取した。採取果実は、種を除いた後に回転式ナイフミルで粉砕し、ピューレとして試験に供した。また、採取果実の一部を 30℃で 5 日間追熟させた後、同様にピューレを調製した。乳化特性については、「橙高」ピューレとサラダ油（日清オイリオグループ(株)、日清キャノーラ油）を、20:80、40:60、60:40 および 80:20（ピューレ：サラダ油、重量比%）で混合し、ポリトロンホモジナイザーを用いて 23,000 回転で 1 分間乳化処理した。その後、乳化安定性を調査するため、スイング式遠心機にて 1,000 回転で 5 分遠心処理し、水層、乳化層、および油層の長さを実測した。比較対照として同様の試験を「南高」についても行った。
【結果】油の混合比が 20～40%の試験区では水層の分離が、60～80%の試験区では油層の分離が主に認められた。また、追熟果実を用いることにより未追熟果実のものに比べて分離量が少なくなり、特に油の混合比が 20～40%の試験区では水層の分離が減少した。したがって、「橙高」ピューレは重量で 1.5 倍以上の油を安定的に乳化できないが、果実を追熟することで乳化安定性が高まると思われた。なお、「南高」でも同様の結果が得られた。「橙高」果実は、完熟期に収穫し追熟することでカロテノイド含量が極めて高まることから、追熟果実を原料に用いることにより、機能性の高い乳化食品を製造できることが示唆された。
※本研究は、和歌山県農林水産部「農林水産業競争力アップ技術開発事業」において実施した。

Japanese apricot, Emulsifying properties, Maturity condition

発表責任者：赤木知裕（akagi@wakayama-kg.jp）

発表番号：4E034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 東北の地域資源”ツノナシオキアミ”を用いた魚味噌

# Production of a Novel Fermented Fish Paste from *Euphausia pacifica*

○福田 翼[1]、及川 克敏[2]、大関 美咲[1]、藤澤 和貴[1]、辰野 竜平[1]、古下 学[1]、原田 和樹[1]([1]水大校食品科学、[2]（株）小野万)
○Tsubasa FUKUDA[1], Katsutoshi OIKAWA[2], Misaki OZEKI[1], Kazuki FUJISAWA[1], Ryohei TATSUNO[1], Manabu FURUSHITA[1], Kazuki HARADA[1] ([1]National Fisheries Univ., [2]Onoman Co., Ltd.)

【目的】ツノナシオキアミ（*Euphausia pacifica*）は、宮城県などの東北地方で漁獲される地域資源である。しかしながら、自身の持つプロテアーゼ活性が高く、身崩れなどの品質劣化を引き起こしやすいため、低価格である上、利用法は限られている。一方、大豆味噌は、麹の持つ高いプロテアーゼ活性、さらに酵母や乳酸菌などの働きを利用した伝統食品である。本研究では、ツノナシオキアミの高付加価値化を目的とし、大豆味噌製造法を応用したオキアミ魚味噌製造を試みた。塩分濃度および麹添加割合が及ぼす影響を調査し、最適な製造条件について明らかとした。
【方法】ツノナシオキアミは，2014 年 2 月から 5 月に気仙沼漁港（宮城県）に水揚げされ，冷凍保存されたものを利用した。オキアミ味噌は，塩蔵（最終塩分濃度：5-20%）したツノナシオキアミペーストと市販米麹（総量に対する麹添加割合：0-50%）を混合し，酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）および乳酸菌（*Tetragenococcus halophilus*）を添加し製造した。発酵温度は 30 ºC とした。
【結果】オキアミ味噌の一般生菌数は、麹添加割合が高いほど抑制された。麹添加割合 25%条件下において、塩分濃度 5%では $6.0\times10^1$ CFU/g、塩分濃度 15%では $5.8\times10^3$ CFU/g であった（発酵 3 ヵ月後）。この時、pH も塩分濃度が高いほど上昇し、pH は塩分濃度 5%では 5.5、塩分濃度 15%では 5.8 であった。乳酸菌数は塩分濃度 5%では発酵 0.5 ヶ月後では $1.7\times10^5$ CFU/g であったが、発酵 3 月後では $6.0\times10^1$ CFU/g に減少していた。一方、塩分濃度 15%では発酵 0.5 ヶ月後では $7.2\times10^5$ CFU/g であったが、発酵 3 ヶ月後では $1.9\times10^3$ CFU/g と塩分濃度 5%に比べ緩やかに減少していた。塩分濃度 10%条件下における遊離アミノ酸総量は、麹添加割合 10%では 6,886 mg/100 g、麹添加割合 25%では 4,707 mg/100 g、および麹添加割合 50%では 3,321 mg/100 g であった。すなわち、麹添加割合が低いほど遊離アミノ酸量は大きい傾向にあった。（発酵 3 ヶ月後）。
官能検査は、異なる麹添割合におけるツノナシオキアミ魚味噌（添加塩分濃度 10%）について行った。各評価は、麹添加割合 0%のツノナシオキアミ魚味噌を基準とした。嗜好性評価（色・香り・味・組成（舌触り）・総合）を行った結果、麹添加割合が高くなる程、各評価は高くなった。また、麹添加割合 25%と 50%では、評価に差は見られなかった。さらに客観性評価（色・香り・味・組成（舌触り））を行った結果、麹添加割合が高くなる程、ツノナシオキアミ風味が低下し、大豆味噌風味が強くなる事が明らかとなった。嗜好性評価および客観性評価の結果より、麹添加割合 25%時においてオキアミ風味の残る嗜好性の高いツノナシオキアミ魚味噌の製造が可能である事が示唆された。

fish paste, fishery fermented food, *Euphausia pacifica*

発表責任者：福田　翼（tsubasa@fish-u.ac.jp）

発表番号：4E035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵バターの製造法の違いによる脂肪酸量の比較

# Comparison of the fatty acid content due to the difference of the production process in cultured butter.

○栃原 孝志、高橋 翼、斎藤 優里、竹田 保之（酪農大食と健康）
○Takashi TOCHIHARA, Tsubasa TAKAHASHI, Yuri SAITO, Yasuyuki TAKEDA (Rakuno Gakuen Univ.)

【目的】発酵バターはクリームをチャーニングする前に，乳酸菌スターターによって発酵するものであり，一般に流通する甘性（非発酵）バターとは，酸味・匂いなど芳醇な風味が付与される点で大きく異なるものである。今回，発酵バター製造過程における試行を取り入れ，いわゆる甘性バターとの違いについて，脂肪酸組成の観点から検討した。なお，脂肪酸については，特にがん抑制効果や体脂肪軽減効果があると示唆されている共役リノール酸と，動脈硬化や心筋梗塞の発症リスクを高めるとされて諸外国で摂取量の制限等が実施されているトランス脂肪酸について重点的に解析をした。
【方法】発酵バター製造に用いる微生物は基本スターターとして 3 種乳酸菌混合スターターD-1(Chr.Hansen's)単独，リノール酸から共役リノール酸を生成するとの報告がある *Bifidobacterium breve* JCM1273，同種の標準株 *B. breve* JCM1192$^{T}$ の各培養液を各々基本スターターに混合して用いた。市販 47%クリームに基本スターターをクリーム容量の 10%相当量，またはそれに加えて JCM1273 培養液あるいは JCM1192$^{T}$ 培養液を同じく 1%相当量添加し，25℃および 40℃で 3 日間発酵させた。その後，4℃に冷却し，直ちにチャーニングを行うか 3 日間低温に保持（エージング）した後，チャーニングを行ったうえで，得られたバターから加熱けん化法で脂肪酸を抽出した。蛍光試薬 ADAM と脂肪酸を反応させ，逆相 HPLC により試料中の各脂肪酸（共役リノール酸，トランス脂肪酸としてバクセン酸）の含量を求めた。なお，脂肪酸量測定の際の内部標準として，ヘプタデカン酸を用いた。
【結果】混合スターターD-1 によって調製された発酵バター試料については，培養温度，チャーニングまでの静置の有無を問わず，水分含量がいずれも 15±2%の範囲に入ることから，製造過程の試行の違いによる水分量の顕著な差は見られなかった。またこれらの試料の脂肪酸組成を解析したが，顕著な変化などは見られなかった。一方，スターターとして D-1 と JCM1273 培養液を併用した場合，25℃で培養した試料中の脂肪酸は，培養前のクリームに比べ共役リノール酸が約 13 倍に増加したものの，バクセン酸も約 7 倍に増加した。しかしながら，その試料を 3 日間エージングしたそれでは，共役リノール酸は約 11 倍に低下していたものの，バクセン酸が約 3 倍に低下していた。JCM1273 と同種の 1192$^{T}$ を D-1 と併用して調製したバターについては，25℃培養の試料についてはほぼ変化は無く，40℃培養の試料については，エージングをすることで共役リノール酸が培養前のクリームと比較すると，約 13 倍に増加していた。これらの結果からある種のビフィズス菌は，発酵バター製造においてその製造方法により，共役リノール酸等の組成を変化させ得ることが示唆された。

Fatty acid, Cultured butter, Trans- fatty acid

発表責任者：栃原孝志（tochi@rakuno.ac.jp）

発表番号：4E036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高温低酸素気流によるソバ粉の加熱殺菌処理

# Heat sterilization of soba flour with low oxygen concentration gas at high temperature

○森川 卓哉[1]、伊藤 綾香[2]、三浦 靖[1,2]、廣瀬 宏一[3]、船崎 健一[3]、齋藤 和良[4]、川端 實[5] ([1]岩手大三陸水産研究センター、[2]岩手大農、[3]岩手大工、[4](株)平岩鉄工所、[5](株)川喜)
○Takuya MORIKAWA[1], Ayaka ITO[2], Makoto MIURA[1,2], Koichi HIROSE[3], Ken-ichi FUNAZAKI[3], Kazuyoshi SAITO[4], Minoru KAWABATA[5] ([1]SFRC, Iwate Univ., [2]Fac. of Agri., Iwate Univ., [3]Fac. of Eng., Iwate Univ., [4]HIRAIWA IRON WORKS Co., Ltd, [5]KAWAKI Co., LTD)

【背景・目的】ソバ粉や小麦粉などから製造される生麺は，原料粉体中に存在する微生物によってその保存期間が制限されるため，エタノール製剤を添加して販売されるのが一般的である。しかし，アルコール臭により本来の風味が損なわれているため，原料粉体の風味や特性を損なうことなく殺菌できる装置の開発が望まれている。前報[1)]では，高温気流を利用して対象の理化学的品質を保持しつつ高効率で殺菌する粉体用開回路型高温気流連続式殺菌装置プロトタイプ機を開発し，最適な殺菌条件の検討結果を報告した。本報では，プロトタイプ機の装置回路を閉回路型窒素気流式，試料冷却方式を気流式冷却に改造した実用機レベルの殺菌性能を報告する。
【方法】粉体用閉回路型低酸素気流連続式殺菌装置実用機レベル（HTD-202Labo 改良型，平岩鉄工所㈱）に，試料となるソバ粉を供給して加熱殺菌処理した。装置の運転条件を，庫内循環流速を 5.2 $m^3$/min，気流温度（加熱殺菌管出口の温度）を 180℃ に設定し，5kg/h で加熱殺菌処理した。試料中の一般生菌，大腸菌群，*E. coli*，黄色ブドウ球菌の生菌数を測定するとともに，水分含量，水分活性，匂い特性（におい識別装置 FF-2020，㈱島津製作所），色特性およびデンプン糊化特性を測定し，実用機レベル（試料１）やプロトタイプ機（試料 2）による加熱殺菌処理試料ならびに無処理試料の理化学的品質を比較した。また，加熱殺菌処理試料から調製した日本そばの理化学的品質についても評価した。
【結果・考察】試料 1（実用機レベルにて処理）は，加熱殺菌処理によって一般生菌・大腸菌群ともに生菌数が無処理ソバ粉から 1 log CFU/g 程度減少した。これはプロトタイプ機による加熱殺菌処理と同程度の殺菌効果であった。また，*E. coli* 数は処理の前後で 2.6 log/CFU･g（無処理）から非検出（試料 1）にまで減少した。また，黄色ブドウ球菌は加熱殺菌処理前後でいずれも非検出であった。このことから実用機レベルは，プロトタイプ機と同程度の加熱殺菌処理能力があった。試料 1 は，試料 2 に比較して，水分含量および水分活性が高く，試料乾燥が軽減したほか，無処理試料からの色特性，匂い特性の変化が軽減された。なお，無処理試料と比較してデンプン糊化挙動に若干の相違がみられており，これは，加熱殺菌処理によってソバ粉中のデンプンが一部糊化したことによるものと考えられる。試料 1 から調製した日本そばの理化学的品質についても報告する。
1）森川ら，日本農芸化学会 2014 年度大会 要旨集（2014），講演番号 3B02a03
*本研究は，JST 平成 24 年度復興促進プログラム（マッチング促進）により実施された。

heat sterilization, soba flour, Japanese noodle

発表責任者：森川　卓哉（morikawa@iwate-u.ac.jp）

発表番号：4E037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 異なる製造施設で作られた北海道産ゴーダタイプチーズにおける特性の違い

# Characteristic difference of Gouda-type cheese made by several manufacturing facilities in Hokkaido prefecture

○竹田 保之、上田 高之、堀内 祥太、千葉 知孝、山本 佳人、栃原 孝志 (酪農大)
○Yasuyuki Takeda, Takayuki Ueda, Shouta Hriuchi, Tomotaka Chiba, Yoshito Yamamoto, Takashi Tochihara (Rakuno Gakuen Univ.)

【目的】海外のナチュラルチーズでは同一の名称のものであっても、製造施設の違いによりその特性が異なることが広く知られているが、国産ナチュラルチーズにおいてはそのような差がどの程度あるのかほとんど知られていない。ゴーダチーズは中温性混合乳酸菌スターターを用いるオランダ原産の半硬質系チーズで、我が国において広く作られているチーズの一つである。そこで今回、いくつかの北海道産ゴーダチーズを用い、一般成分ならびに乳酸菌叢を指標としてゴーダチーズの特性の違いについて検討した。

【方法】試料チーズとして市販の北海道産ゴーダチーズ 6 種（チーズ A~F）を使用した。水分は常圧乾燥法、塩分はホルハルト法で求めた。全窒素量および非タンパク態窒素量はケルダール法を用いて測定した。また、全窒素量に対する非タンパク態窒素量の割合を熟成率とした。試料を 2%クエン酸三ナトリウムと共にストマッカー処理して得られた懸濁液を希釈した後、MRS、M17 および Rogosa の各寒天培地に 0.1ml 塗沫し、アネロパック存在下で 30℃および 37℃で 48 時間、嫌気的に静置培養した後コロニー数を測定した。チーズ懸濁液ならびに各寒天培地上から回収したコロニー懸濁液を試料として DNA を抽出した後、U968-GC/L1401 のプライマーペアを用いて得られた PCR 産物を DGGE 法により解析した。

【結果】今回、試料とした 6 種のゴーダチーズの一般成分において、水分率は 29.7%～46.8%、塩分率は 1.5%～2.7%、全タンパク量および熟成率はそれぞれ 22.3%～29.5%と 8.5%～28.1%とチーズ試料間で大きな差が認められた。中温性スターター乳酸菌数の測定に適当と思われる MRS 寒天培地（30℃培養）における菌数では $3.6\times10^{4}$ cfu/g～$1.4\times10^{9}$ cfu/g までチーズ試料間で大きな差が見られた。また、非スターター性の乳酸菌を検出しやすいと思われる Rogosa 寒天培地（37℃培養）においても検出限界以下から $7.75\times10^{6}$ cfu/g まで菌数に大きな差が見られた。 チーズ懸濁液を試料とした PCR-DGGE 法による優勢乳酸菌種の解析では通常ゴーダチーズで主要スターターとして使用される *Lc. lactis* のみ見られたチーズが 1 種、*Lc. lactis* ならびにそれ以外の乳酸菌が存在したチーズが 5 種認められた。これらの中で Rogosa 寒天培地（37℃培養）において存在が認められた乳酸菌は *Lb. casei/paracasei* であると考えられた。このように、国産ゴーダチーズにおいても製造施設の違いにより、その成分的および微生物学的特性に大きな差があることが確認された。

Gouda-type cheese, characteristic difference, manufacturing facility

発表責任者：竹田保之（takeda@rakuno.ac.jp）

発表番号：4E038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 瞬間的高圧処理による北限ユズ果汁の高付加価値化

# High added-value of Northern Limit Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) juice with underwater shock-wave process

○藏屋 英介[1]、仲田 志奈[1]、當山 瑛子[1]、比嘉 修[1]、安田 淳[2]、伊東 繁[1] ([1]沖縄高専、[2]大阪サニタリー株式会社)
○Eisuke KURAYA[1], Shina Nakada[1], Akiko Touyama[1], Osamu Higa[1], Atsushi Yasuda[2], Shigeru Itoh[1] ([1]National Institute of Technology, Okinawa College, [2]Osaka sanitary Co., Ltd.)

【緒言】

2011 年 3 月 11 日に発生した東北地方太平洋沖地震により、岩手県を含む東北地方太平洋沿岸一帯は甚大な被害を受けた。農業被害額総計は 687 億円を超え、四年以上が経過した現在も復興作業が続けられている。津波の被害が著しかった陸前高田市には「北限のユズ」として産するユズ（*Citrus junos* Tanaka）があり、生産量は少ないながらも香りがよいことが知られている。本研究では、岩手県農業の復興戦略の一つとして北限ユズのブランド化による、新たな商品開発への展開基盤の確立を目指し、北限ユズ果汁の瞬間的高圧処理による高付加価値化を検討した。

【実験方法】

本研究では水中での電極間における放電(2.5～3.5 kV, 2.5～4.9 kJ)により生じる瞬間的高圧を利用し処理を行った。試料として、岩手県陸前高田市産の北限ユズ果実ならびに比較として高知県香美市産ユズ果実を用いた。瞬間的高圧処理後に搾汁し、果汁の搾汁率、香気成分、有機酸、ミネラルの含有量等の基本特性のほか、機能性の評価としてフラバノン配糖体、リモノイド類、総ポリフェノール量ならびに ORAC による抗酸化活性の評価を行った。

【結果及び考察】

瞬間的高圧処理後に搾汁した北限ユズ果汁に含まれる香気成分の量は、瞬間的高圧処理のエネルギーの増加に応じて大幅に増加し、3.5 kV の 1 回の負荷で香気成分の含有量が 10.6 倍に増加した。ミネラル成分も瞬間的高圧処理のエネルギーの増加に応じて増大する一方、クエン酸、リンゴ酸は減少する傾向にあり、酸度の低下が見られた。機能性の評価では、瞬間的高圧処理のエネルギーの増加に応じ、フラバノン配糖体、リモノイド類の機能性成分の含有量が増大し、総ポリフェノール量も未処理の果汁では 0.60 mgGAE/mL であったのに対し、3.5 kV の瞬間的高圧処理により 0.83 mgGAE/100mL と 1.4 倍に増加することが明らかとなった。また、ORAC 値も未処理の果汁では 7.56 μmol TE/mL であったのに対し、瞬間的高圧処理により 13.1 μmol TE/mL と 1.7 倍にまで増加した。これらの現象は、瞬間的高圧の負荷によるスポーリング破壊現象により果皮や内果皮内に抽出通路が形成され、香気成分やフラバノン配糖体、リモノイド類といった機能性成分が効率よく抽出されたものと推察される。

本研究は、農林水産省「食料生産地域再生のための先端技術展開事業」採択課題「北限ユズ果汁の瞬間的高圧搾汁による高付加価値化実証研究」に基づいて実施された。

*Citrus junos*, underwater shock-wave, antioxidant activity

発表責任者：藏屋英介（kuraya@okinawa-ct.ac.jp）

発表番号：4E039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 中高圧処理を活用した長期冷蔵保存可能な果実シロップ漬の新規製造法

# Method utilizing medium high hydrostatic pressure for novel fruit compotes with a long-term refrigerated shelf-life

○山本 和貴[1]、三輪 章志[2]、有手 友嗣[2]、深井 洋一[3]、山崎 慎也[4]、水野 文敬[5]、新川 猛[6]、藤田 智之[7]、吉野 勇[8]、新田 一朋[8]、森松 和也[9]、中浦 嘉子[1]([1]農研機構食総研、[2]石川農研セ、[3]長野農工研、[4]長野工技セ、[5]岐阜中山間農研、[6]岐阜農技セ、[7]信州大農、[8]スギヨ、[9]愛媛大農)
○Kazutaka YAMAMOTO[1], Shoji MIWA[2], Tomotsugu ARITE[2], Yoichi FUKAI[3], Shinya YAMAZAKI[4], Hisataka MIZUNO[5], Takeshi NIIKAWA[6], Tomoyuki FUJITA[7], Isamu YOSHINO[8], Kazutomo NITTA[8], Kazuya MORIMATSU[9], Yoshiko NAKAURA[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Ishikawa Pref. Agric. Center, [3]Nagano Agric. Eng. Res. Institute, [4]Nagano Pref. Res. Inst. for Industry and Technol., [5]Gifu Pref. Res. Inst. for Agric Technol in Hilly and Mountainous Area, [6]Gifu. Pref. Res. Inst. for Agric. Technol., [7]Shinshu Univ., [8]Sugiyo Co., Ltd., [9]Ehime Univ.)

【緒言】世界で市場を伸ばしている高圧加工食品の多くは、600 MPa（約 6,000 気圧）での微生物制御を目的としたものである。一方日本では、装置コストが低減される 100 MPa 近傍での中高圧処理での制菌、液体含浸による食品加工が注目されており、各種エキス製品等が市場を伸ばしている。本研究では、中高圧処理の用途拡大に向けて、果実シロップ漬の製造技術開発を試みた。従来のシロップ漬は、熱処理により作られていたが、加熱による液体含浸工程において、色、香り、栄養成分が損耗するのみならず、その食感が著しく損なわれて軟化する問題があった。この欠点を補うべく、脱気処理で果実中の気泡を除去してから中高圧処理する効率的な液体含浸を試みた。同時に、これを 60℃前後の中温領域で実施することによって芽胞発芽を誘導しつつ殺菌する「自滅的発芽誘導殺菌」の効果を検証した。
【方法】リンゴ、アンズ、ウメ、カキ等の果実素材を用いた。各果実は必要に応じて、剥皮、芯・種抜き、表面穿孔等の前処理を施した。前処理試料をパウチに入れ、それぞれに適したシロップを加え、脱気密封して試料とした。各試料は、液体含浸、自滅的発芽誘導殺菌のため、30 分間以上を基本とする中温中高圧処理を施した。中高圧処理試料は、冷蔵（5±1 ℃）または常温（25 ℃）で保存し、一般生菌数、大腸菌群、耐熱性芽胞、酵母、カビ＋酵母について、菌数を経時的に調べた。
【結果】いずれの果実も、色調、新鮮な風味を保持しつつ、軟化を抑制したシロップ漬に仕上げることができた。いずれの試料も,処理直後からほぼ無菌状態であり、冷蔵保存では少なくとも半年～1 年以上、常温保存でも 1 ヶ月以上は無菌状態を保持できることが明らかとなった。常温保存では、変色による品質低下が見られたが、冷蔵では少なくとも半年～1 年以上は処理後の品質を保持していることがわかった。例えば、リンゴシロップ漬は、開封後も褐変しづらいことも明らかとなった。また、試食による消費者嗜好性調査を実施したところ、大多数から高い評価を得ることができた。更に、これら果実シロップ漬を、和菓子、洋菓子の素材として活用した事例を幾つか示した。
【展望】本研究で開発した新加工法では、上記以外の果実でも、新鮮さを保持した各種シロップ漬の製造が可能である。これにより、収穫期外にも各種果実シロップ漬が通年で冷蔵供給できる。常温でも少なくとも 1 ヶ月程度は衛生確保が可能なことから、お土産として常温で持ち帰ってから冷蔵で保存してそのまま喫食したり、必要に応じて冷蔵庫から取り出して菓子素材・トッピング素材として利用したり、今後様々な用途が期待される。

medium high hydrostatic pressure, fruit, compote

発表責任者：山本和貴（kazutaka@affrc.go.jp）

発表番号：4E040
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 冷凍処理と組み合わせた中高圧処理による微生物不活性化

# Microbial inactivation by medium high hydrostatic pressure in combination with freezing processes

○中浦 嘉子[1]、森松 和也[2]、小田 真知子[1]、山本 和貴[1] ([1]農研機構・食総研、[2]愛媛大農)
○Yoshiko NAKAURA[1], Kazuya MORIMATSU[2], Machiko ODA[1], Kazutaka YAMAMOTO[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Ehime Univ.)

【緒言】食品高圧加工では、600 MPa（約 6,000 気圧）での高圧処理が、ジュース、肉製品等の賞味期限延長に利用されている。一方、100～300 MPa での中高圧処理による牡蠣等の二枚貝の開脱殻は、日本でも実用化が進みつつあるが、中高圧処理では微生物不活性化効果は弱いことも知られている。しかしながら、冷凍温度帯で中高圧処理すると微生物不活性化効果が向上するという報告もある。そこで本研究では、中高圧処理における微生物不活性化効果を向上させる目的で、中高圧処理と冷凍処理とを同時又は逐次で組み合せた処理が、微生物不活性化効果に及ぼす影響を検討した。
【方法】牡蠣の衛生管理上重要な大腸菌及び腸炎ビブリオ（大腸菌より低耐圧性）を対象とし、それぞれ *Escherichia coli* ATCC25922、*Vibrio parahaemolyticus* ATCC43996 を実験に供した。前培養により得た菌体を洗浄し、リン酸緩衝生理食塩水または人工海水に懸濁し、パウチに密閉して実験試料とし、冷凍温度帯での中高圧処理（25、5、0、-5、-10、-20 ℃で 200 MPa で 30 分間処理）、冷凍後の中高圧処理（-20 ℃で凍結後に直接又は解凍してから 200 MPa、10 ℃で 10 分間処理）等により、処理の組合せ効果を調べた。菌数は、平板塗布法によって評価した。必要に応じて選択培地（大腸菌用デソキシコレート培地またはビブリオ用 Vibrio agar）及び非選択培地（標準寒天培地）に塗布し、損傷菌数を評価した。
【結果】冷凍温度帯での中高圧処理においては、各温度で処理（200 MPa、30 分間）した大腸菌は、5 ℃での不活性効果が一番低く、それよりも低温で処理する程、不活性化効果が高まること、25 ℃では、5 ℃よりも 2 log CFU/ml 程不活性化することが示された。また、選択培地・非選択培地での比較により評価した損傷菌は、最大で健常菌より約-4 log CFU/ml 低い数になることが示された。-10 ℃または-20 ℃では、ほぼ 5 log CFU/ml の生存菌数減少が見られ、損傷菌数はその更に約 2 log CFU/ml 少なかった。一方、大腸菌よりも高圧処理に弱いとされる腸炎ビブリオは、100 MPa または 200 MPa の中高圧処理を 4 ℃で 5 分間施しても、殆ど菌数が減少しなかった。一方、-20 ℃で冷凍するだけでも 2～3 log CFU/ml の減少が見られる場合があること、冷凍してから 4 ℃で中高圧処理すると、最大で 6 log CFU/ml の減少があること等が分かった。
【展望】冷凍処理と中高圧処理とを同時または逐次で組み合わせることにより、大腸菌または腸炎ビブリオの不活性効果が向上する可能性が示された。今後、それぞれの微生物について、不活性化機構解明も視野に加えて、より効率的な処理条件を更に検証する。

high hydrostataic pressure, freezing, microbial inactivation

発表責任者：山本和貴（kazutaka@affrc.go.jp）

発表番号：4E041
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 緑豆もやしの冷蔵中の褐変とポリフェノールオキシダーゼ

# Browning and polyphenol oxidase of mung bean sprout during cold storage

○向後 佑佳子、鮫島 那奈、村田 容常（お茶大院ライフ）
○Yukako KOGO, Nana SAMESHIMA, Masatsune MURATA (Ochanomizu Univ.)

【目的】緑豆もやしは冷蔵中に徐々に褐変する。この現象は酵素的褐変の一種であり、ポリフェノールオキシダーゼ（PPO）が重要な役割を果たす。緑豆もやし PPO はカフェオイルタルトロン酸などのポリフェノールを基質とし褐変を引き起こすと考えられている（1）。また、緑豆もやし PPO の発現については調べられていない。リンゴ等では PPO とポリフェノールが別の細胞内小器官に存在し、切断等の組織損傷により基質と酵素が接触し褐変する。しかし緑豆もやしにおいては、貯蔵に伴い切断等の組織損傷がなくとも徐々に褐変する。そこで本研究では、緑豆もやし PPO の mRNA をクローニングすること、PPO の細胞内分布と経時変化について調べること、ポリフェノール量の経時変化について調べることを目的とした。
【方法】6 種の植物 PPO の塩基配列を参考に 7 組のプライマーを設計し、緑豆もやし cDNA に対し 29 種の PCR を試みた。その結果 1 組のプライマーによる PCR 増幅から PPO と思われる部分配列を得た。これを元に RACE 法により緑豆もやし PPO の mRNA のクローニングを行った。また、緑豆もやしを 4℃で 6 日間貯蔵してホモジナイズし、これを可溶性画分と不溶性画分に分け、PPO の活性を測定した。活性測定は酵素液にクロロゲン酸を添加しその消費量を吸光度法で測定した。ポリフェノールの定量は、ホモジナイズした組織からメタノール、酢酸エチルで抽出後、HPLC で測定した。
【結果】RACE 法により得られた緑豆もやし PPO の mRNA は塩基数 1,957 bp であった。この塩基配列と他植物 PPO の塩基配列を比較したところ、インゲンマメ（*Phaseolus vulgaris*）、ダイズ（*Glycine max*）、タルウマゴヤシ（*Medicago truncatula*）との相同性はそれぞれ 88%、87%、76%であった。推定されるアミノ酸数は 592、理論上の分子量は 66,718 Da であり、インゲンマメ、ダイズ、タルウマゴヤシのアミノ酸配列との相同性はそれぞれ 84%、84%、70%であった。また、PPO の活性中心（CuA、CuB）と思われる部分も確認された。PPO の総活性に貯蔵中の変化はなく、可溶性画分にほぼ全ての活性が認められた。緑豆もやしのポリフェノールのうち、カフェオイルタルトロン酸は貯蔵 6 日間で 2 倍程度に増加した。新たに生合成されたポリフェノール類が細胞質に存在している PPO に酸化され、褐変を引き起こすと考えられた。

（1）Sameshima,N. *Food Sci.Technol.Res.*（投稿中）

enzymatic browning, mung bean sprout, polyphenol oxidase

発表番号：4E042
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食肉中における各種食中毒菌の付着・侵入および増殖に対する液体塩こうじの抑制効果

# Inhibitory effects of salted-koji on adhesion, invasion and growth of various food poisoning bacteria in meat

○島村 裕子[1]、江川 瑞規[1]、平田 伸行[2]、松原 英祐[2]、増田 修一[1]（[1]静岡県大・食品栄養科学、[2]ハナマルキ（株））
○Yuko SHIMAMURA[1], Mizuki EGAWA[1], Nobuyuki HIRATA[2], Eisuke MATSUBARA[2], Shuichi MASUDA[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Hanamaruki Foods Inc)

【目的】食肉に塩こうじを添加、また浸漬することで、麹菌が産生する酵素が作用し、うま味や肉質の軟化に影響を与えることが報告されている。しかし、塩こうじを食肉に利用することによる食中毒菌の付着・侵入および増殖に及ぼす影響ついてはほとんど報告されていない。そこで、本研究では、種類や部位の異なる食肉を用いて、液体塩こうじの食中毒菌の付着・侵入および増殖に及ぼす影響を調べ、食肉の微生物学的な安全性を維持する塩こうじの作用メカニズムについて検討した。
【方法】鶏むね肉を縦 3 cm、横 3 cm、高さ 6 cm の立方体にカットし、液体塩こうじ（5%NaCl 濃度に調製)、5%NaCl 溶液および滅菌水（コントロール）に 4°C で 24 時間浸漬した。浸漬後、線維の方向が垂直または平行の上部表面に *Salmonella* Enteritidis NBRC3313 を浸み込ませたペーパーディスク（$10^3$～$10^4$ CFU/100 μL）を置き、4°C で 24 時間保存した後、上部から 1 cm ごとに切断して菌数を測定し、菌の分布を調べた。また、浸漬後の食肉のアミノ酸含有量の変化についても検討した。さらに、食肉の結合組織の構成成分である各種細胞外マトリックス（ECM）タンパク質で被膜した丸底 96 well plate に液体塩こうじ、5%NaCl 溶液を加え、ECM タンパク質への食中毒菌の付着に対する抑制効果について、クリスタルバイオレット染色法を用いて調べた。
【結果および考察】液体塩こうじ、5%NaCl 溶液および滅菌水に 4°C、24 時間浸漬した鶏むね肉の線維の方向が垂直の上部表面に菌を付着させ、24 時間後の菌の侵入の程度を調べた結果、液体塩こうじおよび 5%NaCl 溶液に浸漬した食肉では、菌は表面～1 cm までの侵入に留まり、一方、滅菌水に浸漬した食肉では、表面～4 cm まで内部に侵入した。これらの結果より、食肉を液体塩こうじに浸漬することで、食肉への食中毒菌の付着・侵入を阻害できる可能性が示唆された。次に、液体塩こうじによる食中毒菌の食肉への付着に対する抑制機構を解明するために、食肉の結合組織の構成成分である ECM タンパク質に着目し、食中毒菌の ECM タンパク質への付着に対する液体塩こうじの影響について検討した。その結果、液体塩こうじ処理は、食中毒菌の各種 ECM タンパク質への付着を有意に抑制した。これらの結果より、液体塩こうじによる食中毒菌の食肉への付着阻害メカニズムとして、食肉中に含まれる ECM タンパク質への付着に対する抑制作用が考えられた。また、アミノ酸分析の結果、4°C、24 時間の浸漬では、液体塩こうじと 5%NaCl 溶液との間にアミノ酸含有量の差は認められなかった。現在、液体塩こうじ溶液で処理した食肉中における食中毒菌病原性因子の発現に対する抑制効果について検討中である。

salted-koji, food poisoning bacteria, meat

発表責任者：島村裕子（shimamura@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：4E043
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 黒糖におけるアクリルアミド生成の低減化

# The reducing methods of acrylamide formation in brown sugar.

○島田 健作[1]、高良 健作[1]、広瀬 直人[2]、和田 浩二[1] ([1]琉大農、[2]沖農セ)
○Kensaku SHIMADA[1], Kensaku TAKARA[1], Naoto HIROSE[2], Koji WADA[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Okinawa Pref. Agr. Exp. Sta.)

【目的】ヒトに発がん性の可能性があるアクリルアミド(AA)は炭水化物を多く含む食品を高温で加工調理した場合に多く生成されることが知られ、還元糖とアスパラギン(Asn)含量と加熱温度を主要な因子とするメイラード反応生成物とされている。沖縄県産品の黒糖も AA を含む食品の一つで、その低減化法が期待されている。本研究では実験室レベルでのモデル黒糖製造法を用いて AA 生成要因である加熱温度、還元糖量、Asn 含量について調べ、さらに AA 生成を低減する物質の探索を行った。

【方法】①**AA 生成モデル黒糖製造**　均一なサトウキビ搾汁液を確保することが困難なことから、本研究では黒糖にグラニュー糖を添加し、これを水で再溶解させた糖液を実験に供し、この糖液に還元糖や Asn を添加後、加熱濃縮してモデル黒糖を調製した。市販の黒糖を粉砕後、均一化し、粉末黒糖 50g にグラニュー糖 5g を加え水 50ml で溶解した。この糖液に Glc、Fru、Asn をそれぞれ添加し、この糖液をアルミブロック恒温槽、可動二枚羽攪拌機から成るモデル黒糖試作機で、温度 165℃、撹拌 25rpm に設定し加熱濃縮を開始した。糖液の温度が 140℃に到達後 10 分で濃縮を終了し、これをモデル黒糖とした。その後、直ちに水 100ml を加え、10 分間冷却撹拌 (200rpm) を行い、その後直ちに冷凍 (-25℃以下) し、試料調製まで冷凍保存した。**②AA 抽出、分析**　試料液 10g は水で 100ml に定容し、これに内標準の AA-$d_3$ メタノール溶液を 10μg 添加し、遠心分離した。上清 80ml は、上部に Oasis MCX、下部に Sep-Pak AC-2 (いずれも Waters)を直列に接続した前処理カートリッジに通液し、これを水 5ml で洗った。その後両カートリッジを切り離し、AC-2 に保持した AA をメタノール 5ml で溶出後、メタノールを留去後に再度メタノール 200μl で溶解し、これを適度に希釈して LC-MS/MS 試料液とした。

【結果･考察】加熱温度を 130℃から 140℃に上げると AA 量が 40%増加したが 150℃では頭打ちになった。糖液に Asn を添加すると AA 量がそれに相関して増加したが、還元糖添加では増加は見られなかった。モデル黒糖では AA の生成は還元糖よりも Asn 濃度に大きく依存していることが分かった。また、グリシン、ロイシン、GABA、システインそれぞれの添加では、濃度依存的に AA 量が減少し、特にグリシンは AA を 55%低減出来た。現在、サトウキビ搾汁液中に含まれるフェノール化合物やポリフェノール抽出物添加による AA 形成低減効果について検討している。

aqcrylamide, brown sugar, LC-MS/MS

発表番号：4E044
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 米飯におけるエンテロトキシン A 産生とその制御
# Production and Regulation of Staphylococcal Enterotoxin A in Cooked Rice

○筒浦 さとみ、村田 容常（お茶大院　人間文化創成科学）
○Satomi Tsutsuura, Masatsune Murata (Ochanomizu Univ.)

【目的】　近年の日本における黄色ブドウ球菌食中毒の原因食品には米飯製品が多い。米飯における黄色ブドウ球菌の生育とエンテロトキシン A（SEA）産生に影響を与える要因として、温度、pH、水分活性、酸素の有無、食品添加物の有無等が考えられる。本研究では米飯における SEA の産生制御を目的として、初発菌数、保存温度、菌株、食品添加物や塩分濃度が黄色ブドウ球菌の生育や SEA 産生に与える影響について調べた。
【方法】 炊飯米に複数の黄色ブドウ球菌 SEA 産生株を初発菌数 $10^2$-$10^6$ CFU/g になるように添加し、15-37℃で保存した。グリシンと塩分の影響を調べる際にはグリシンを飯重量の 0-5%、NaCl を 0-2%加えて、炊飯した米飯を用いた。2 mL の BSA（1 mg/mL）溶液を加え、撹拌後、遠心分離して SEA を抽出した。その上清を SDS-PAGE に供した後、Western blot し、抗 SEA 抗体を用い、化学発光法により SEA を定量した。Western blot の検出限界は 0.4 ng/g 程度であった。菌数はマンニット食塩寒天培地を用い、平板培養法で測定した。
【結果】　米飯における SEA 産生に対する初発菌数の影響を調べたところ、初発菌数 $10^2$ CFU/g では 8~16 時間目から、$10^6$ CFU/g では 4 時間目から SEA を検出し始めた。初発菌数 $10^6$ CFU/g では 4 時間目には 0.6-4.0 ng/g の SEA を産生したことから、米飯への菌の付着量が多い場合、4 時間の保存でも喫食量によっては食中毒を発症する可能性があることが示唆された。次に、複数の菌株間における最大 SEA 量を比較した。37℃で保存した米飯における最大 SEA 量は初発菌数 $10^2$ CFU/g では 1.2-10.8 ng/g 程度、初発菌数 $10^6$ CFU/g では 0.8-58 ng/g 程度であった。一定の条件下において菌株間で最大 SEA 量は異なり、これは液体培養における複数の菌株間における SEA 産生の結果と同様であった [1]。初発菌数が少ないものでは、多いものに比べ、SEA 産生に要する時間が延長された。このように、米飯において SEA 産生は菌の付着量の影響を受け、その程度は菌株によって異なった。
また、SEA 産生に対するグリシンの影響を調べたところ、初発菌数 $10^6$ CFU/g、37℃で米飯を保存した際に、2%及び 5%のグリシン添加飯ではほとんどの菌株の SEA 産生が抑えられた。一方、0.5%及び 1%程度のグリシン添加では、コントロールと比べて、SEA 産生に差が認められなかった。0.5%及び 1%のグリシンに 0-2%の NaCl を加えて添加した米飯においても、コントロールと比べて、効果的に SEA 産生を抑制する組み合わせは認められなかった。

1) Biosci. Biotechnol. Biochem., 77 (1), 30-37 (2013)

*Staphylococcus aureus*, staphylococcal enterotoxin A (SEA), cooked rice

発表責任者：筒浦　さとみ（tsutsuura.satomi@ocha.ac.jp）

発表番号：4E045
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 東南アジアの農業用水に含まれるグラム陰性衛生指標細菌

# Contamination of Gram-negative bacterialia in water used for crop production

○稲津 康弘[1]、宮崎 圭子[1]、Rithy Chrun[2]、Ek Sopheap[2]、Thongsavath Chanthasombath[3]、Dam Sao Mai[4]、細谷 幸恵[1]([1]農研機構　食総研、[2]カンボジア王立農業大、[3]ラオス清浄農研センター、[4]ベトナム　ドンナイ大学)

○ Yasuhiro Inatsu[1], Keiko Miyazaki[1], Chrun Rithy[2], Sopheap Ek[2], Chanthasombath Thongsavath[3], Mai Dam Sao[4], yukie Hosotani[1] ([1]NFRI, NARO, [2]Royal Univ. Agric. Cambodia, [3]Laos CADC, [4]Dong Nai Univ. Vietnam)

諸外国において、生野菜を原因とする腸管出血性大腸菌やサルモネラ食中毒が問題となっている。これらの細菌の野菜への混入は、主として圃場において生じるものと考えられており、衛生的な用水の選択の重要性が、一般論として GAP（適正農業規範）ガイドライン等では指摘されている。しかし、具体的に「いかなる種類の用水の使用が望ましいのか」という問いに答えることができる実証的な研究は少ないことから、我々は東南アジア３カ国の農業現場で実際に使用されている農業用水を対象として、その細菌汚染実態を調査している。今回はそのうち、2013～2014 年の調査結果を報告する。

プノンペン、ホーチミンシティ、ルアンナムタの近郊で２回ずつおよびビエンチャン近郊で１回ずつ農業用水を収集し、ラオス 166、カンボジア 100 およびベトナム 100 の計 366 検体を得た。これらより「食品衛生検査指針」に準拠して大腸菌およびサルモネラの検出を行うとともに、ビオメトリュー社の「Api20E/NE」を使用して、乳糖マッコンキー寒天培地上で生育しうる中温菌の同定を行った。

収集した検体の 51%から大腸菌群が、39%から大腸菌が、それぞれ分離された。これらの大腸菌は 44.5℃で旺盛に生育し、ソルビトール発酵性かつβグルクロニダーゼ陽性の性状を示したことから、0157:H7 株である可能性は低いものと考えられた。収集した検体の 15%が二次増菌後、MLCB 寒天培地上で黒いコロニーを形成したが、2 検体由来の *Salmonella* spp. を除き、いずれもサルモネラ O1 または O1 多価血清と反応せず、そのほとんどが *Citrobacter* spp. と同定された。大腸菌群は *Cronobacter sakazakii* が 6 検体から分離された他、*Klebsiella* spp. （38 検体）、*Enterobacter* spp. および *Serratia* spp.（各 14 検体）、その他 6 種類の細菌が分離された。乳糖非発酵性グラム陰性菌として *Pseudomonas* spp. が 34 検体から分離された他、2 種類の細菌が同定された。

カンボジアおよびラオスで収集した 139 検体を対象として、用水の種類と大腸菌群検出率の関係を検討したところ、「井戸、タンク、塩素処理水」等の衛生的な用水と、「河川（引き込み）水」等の非衛生的な用水では、前者よりも後者の方が高い大腸菌群検出率を示し（14%および 52%）、そのオッズ比は 4.9（95%信頼区間 2.2-10.6）であった。

以上の結果より、少なくとも東南アジア地域の農業現場においては、河川水等、地表面を流れる水を使用するよりも、井戸または天水を貯めたタンクの水を使用する方が、ヒトまたは動物糞便に由来する食中毒原因細菌の、生産物への付着リスクを下げる上で望ましいと考えられ、この結果は、一般的な GAP ガイドラインに述べられていることと一致した。

irrigation water, fecal coliform, Escherichia coli

発表番号：4E046
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# サトウキビ内実部を原料とした含蜜糖の嗜好性と抗酸化性の分析

# Food Composition, Taste Characteristic, Aroma Profile, and Antioxidant Activity of Solidified Non-Centrifugal Brown Sugars Prepared by Two Sugarcane (Saccharum officinarum L.) Juices Using Different Cane Parts

○高橋 誠[1]、ムタンダ イシュマエル[2]、ヨナタン アシキン[3]、広瀬 直人[4]、水 雅美[5]、和田 浩二[1]([1]琉球大・農、[2]鹿児島大連大、[3]琉球大・熱生圏、[4]沖縄県農研セ、[5]三井製糖（株））
○Makoto Takahashi[1], Ishmael Mutanda[2], Asikin Yonathan[3], Naoto Hirose[4], Masami Mizu[5], Koji Wada[1] ([1]Univ. of the Ryukyus, [2]Kagoshima Univ., [3]Univ. of the Ryukyus, COMB, [4]OPARC, [5]Mitsui Sugar Co.,Ltd.)

## 【目的】

沖縄の特産品である黒糖は独特の風味を有するとともに，栄養性や機能性の点からも優れた食品素材として注目されている。しかしながら，黒糖製造においてサトウキビの全茎搾汁工程で生じる多量のバガスは，ポリフェノールやポリコサノールなど有用な食品成分を含んでいるものの腐敗しやすいことから，多くは燃料や肥料としての利用に限られている。従って，あらかじめ外皮と内実部を分割し，部位ごとの活用が望まれているが，内実部搾汁液のみで調製された含蜜糖の物理化学的な性質や機能性の報告はない。そこで本研究では，サトウキビ内実部の搾汁液を用いて新たな含蜜糖を調製し，従来の黒糖との嗜好性および食品機能性の比較を行った。

## 【方法】

サトウキビは沖縄県農業研究センターで採取した農林 15 号を用いた。原料蔗汁には従来のサトウキビ全茎の搾汁液およびケーンセパレーターを用いて外皮を分離した内実部の搾汁液を用いた。得られた各蔗汁をライミング処理した後，加熱濃縮して得られた 50°Brix のシラップを用い，卓上型黒糖試験製造装置を用いて固形含蜜糖（全茎，W-NCS; 内実部，P-NCS）を調製し，試料とした。嗜好性の検証は各試料の糖含量とミネラル含量の測定，味覚センサーによる味特徴の測定ならびにヘッドスペースガスクロマトグラフィー（HS-GC）および質量分析（MS）を用いた香気成分の分析により行った。また食品機能性については，総ポリフェノール含量（TPC），DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値の測定を行い，評価した。

## 【結果】

W-NCS および P-NCS の糖分析では，糖組成およびその含量には顕著な違いが認められなかった。同様にミネラル含量についても，特に味覚に影響を与える K，Mg，Na 含量は違いが認められなかった。また，W-NCS および P-NCS で検出された味特徴は「うま味」、「塩味」、「渋み」、「甘味」および「ミネラル系苦味」の 5 種類で共通していたが，両含蜜糖のそれぞれの味強度には顕著な差がないことが示された。一方，両含蜜糖の香気分析では 17 種類の共通する成分が検出され，P-NCS の香気成分含量は W-NCS と比較して有意に低い値を示した。また，P-NCS の TPC，DPPH ラジカル消去活性および ORAC 値は，W-NCS の値の 60%以上を保持していた。従って，内実部搾汁液から調製した含蜜糖は黒糖と比べて同様の味特徴および機能性を保持する食品素材になり得る可能性が示された。

Sugarcane pith, Solidified non-centrifugal brown sugar, Food composition

発表責任者：高橋　誠（h119314@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：4E047
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 構造を改変した米澱粉の物性と味物質の溶出挙動に関する研究

# Physicochemical Properties and Teste Compound Release Behavior of Modified Rice Starches

○阿久澤 さゆり[1]、矢田 千晶[1]、藤田 直子[2]、木下 健[3]、松川 真吾[4]([1]東京農大・健康、[2]秋田県大・生物資源、[3]（株）島津製作所、[4]東京海洋大学・大学院)
○Sayuri Akuzawa[1], Chiaki Yada[1], Naoko Fujita[2], Ken Kinoshita[3], shingo Matsukawa[4] ([1]Tokyo Univ. of Agric., [2]Akita Prefectural Univ., [3]SHIMADZU, [4]Tokyo Univ. of Marine Sci. Tech.)

【目的】 澱粉性食品素材は、植物由来の構造の違いによる糊化・老化特性や糊液のレオロジー特性が利用されているが、天然澱粉に物理的または化学的修飾を施して、得られた特性を検証・評価しているのが現状である。その要因として、澱粉を生合成する植物ごとに、多様なレオロジー特性を示し、さらに、アミロースおよびアミロペクチンが超高分子であることが物質的解析を困難にしている。演者らは、澱粉性食品のテクスチャーを含むレオロジー特性の発現要因の解明と物性の制御を目的として、湿熱処理（物理的方法）および遺伝学的手法（変異体米の作出）により澱粉の構造改変を試み、これらの手法により得られた米胚乳澱粉について、澱粉の結晶性と水溶媒での分子量（粒径半径）と糊液の動的粘弾性特性について報告した。そこで本研究では、澱粉糊液の凝集性に影響する要因とネットワーク中に共存する低分子多糖の溶出挙動を検討した結果を報告する。
【方法】日本晴（野生型）および日本晴が原品種のイネスターチシンターゼ SSIIIa 欠損変異体から分離精製した澱粉、日本晴分離澱粉に湿熱処理（125℃、20 分）を施した 3 種の澱粉を試料として用いた。測定項目は、澱粉の水分吸着挙動、アミロペクチンの鎖長分布測定および水溶媒における絶対分子量と粒径半径の測定、および、DMSO を分散媒とし、澱粉の凝集性を抑制した系の分布状態を観察した。また、糊化後の水分散系の評価として、NMR による緩和時間の測定、および澱粉ゲルから共存する低分子多糖の溶出糖量を測定した。
【結果】澱粉粒の水分吸着能を観察したところ、変異体米澱粉は日本晴米澱粉と総吸着量および水分吸着等温線ともに極めて近似していたが、湿熱処理による総吸着量は減少した。アミロペクチンの鎖長分布は、変異体米澱粉は短鎖が顕著に増加したが、湿熱処理の差はわずかであった。水溶媒における慣性半径は、日本晴米澱粉＞変異体米澱粉＞湿熱処理米澱粉であり、レオロジー特性を反映していると考えられたが、DMSO を分散媒とした溶質の分布状態では、日本晴米澱粉と変異体米澱粉はシングルピークであったが、湿熱処理米澱粉は複数のピークが出現し、NMR による糊化後の冷却過程の緩和時間の変化においても、湿熱処理澱粉糊液は凝集形態が異なることが示されたことから、澱粉糊液のレオロジー特性は、構造解析とともに分散性を要因として解析する必要性が示唆された。

modified rice starch, structure, rheology

発表番号：4E048
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 玄米米糠麹（FBRA）の多変量解析による品質管理に関する基礎的検討

# Quality control of fermented brown rice and rice bran with *Aspergillus oryzae* using multivariate analysis

○根本 英幸[1]、堀江 裕紀子[1]、新実 香保里[1]、池川 繁男[2]（[1]（株）コーケン、[2]（株）玄米酵素）
○Hideyuki NEMOTO[1], Yukiko HORIE[1], Kaori NIIMI[1], Shigeo IKEGAWA[2]（[1]Koken Co., Ltd., [2]Genmai Koso Co., Ltd.）

【背景】玄米および米糠にはビタミンやミネラル、食物繊維の他、γ-オリザノールやフェルラ酸、フィチン酸などの低分子生理活性物質が含まれており、近年、栄養素の摂取にとどまらず健康を維持する機能性の上からも多くの注目が寄せられている。しかしながら、難消化性なばかりか食味の評価が低く、米糠が除去された白米として食されているため、その機能性成分は十分に生かされていない。玄米米糠麹（FBRA）は玄米と米糠の混合物を黄麹菌で発酵させ、そこに含まれる豊富な栄養素を摂取しやすくした健康補助食品である。これまで FBRA の品質管理は、黄麹菌が分泌する消化酵素の活性が指標として用いられてきた。しかしながら、黄麹菌が分泌する酵素の活性は味噌や日本酒など醸造用米麹の品質指標にはなるが、食品としての品質評価に適したものとは言い難い。
【目的】原料（米糠・玄米）および発酵産物である FBRA に含まれる遊離アミノ酸に着目し、従来用いられてきた米麹の品質指標を遊離アミノ酸とともに FBRA の品質指標に利用が可能か検討した。
【方法・結果】複数ロットの原料、発酵中間物ならびに最終発酵物である FBRA を試料とした。遊離アミノ酸はオルトフタルアルデヒドを用いるポストカラム検出 HPLC により定量した。酵素活性としてα-アミラーゼと酸性プロテアーゼを公定法に基づき、一方、グルコアミラーゼとα-グルコシダーゼを市販キットを用いて測定した。黄麹菌の菌体量はヤタラーゼ処理によって遊離する N-acetyl gulcosamine 量として測定した。アミノ酸量による主成分分析の結果、発酵産物である FBRA では経時的に変化しながら最終的に 1 つのクラスターに収束することが分かった。本会ではアミノ酸含量とその他の測定項目との相関をもとに、FBRA に含まれるアミノ酸の多変量解析が品質管理の一助となりうるかを報告する。

brown rice, *Aspergillus oryzae*, multivariate analysis

発表番号：4E049
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 酢〆調理加工工程における最適浸漬状態を評価可能にする計測システム開発

Novel measurement system to evaluating most suitable state in sujime cooking process

○石川 匡子、佐藤 柊也、秋山 美展（秋田県立大生物資源）
○Kyoko ISHIKAWA, Shuya SATO, Yoshinobu AKIYAMA (Akita Pref. Univ.)

【目的】調理加工では、食品素材に下味を付ける、身を引き締めることでうま味を封じ込めるために塩や食酢が用いられる。振り塩や酢〆に代表されるこの調理技法は、食品表面上での塩の溶解ならびに塩や食酢の浸透による食品内部での成分相互作用を利用したものであるが、食材毎での最適な調理条件は、経験に頼らざるを得ないのが現状である。また、生活習慣病予防の観点から減塩が推奨されていること、食酢への漬けすぎは食味に影響することから、最適な漬かり具合を見極める必要がある。我々はこれまで、電気インピーダンスを用いた塩分浸透挙動非破壊計測法について検討してきた。本研究では、電気インピーダンス法を改良し、食品内部への塩や有機酸の浸透挙動、濃度変化を非破壊かつリアルタイムでモニタリング可能か否かを検討した。
【方法】対象とする食品には、寒天ゲルならびに卵白ゲルを用いた。25 mm×25 mm×12 mm の PP 容器の両端にステンレス電極を取り付けた後、ゲルを流し固め、テストピースを作製した。インピーダンス測定には LCR メータを用いた（3532-50 日置電気（株））。各ゲル表面に有機酸（酢酸、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、乳酸）溶液を添加し、インピーダンス値を測定した。さらにガラス容器（5 mm×25 mm×50 mm）を用いて表面部のみ塩分を含んだ寒天ゲルを作製した。一部分のみがゲルと直接接触できるよう加工したステンレス製の棒電極を用いて同様にインピーダンス値を測定した。
【結果】寒天および卵白ゲル表面に有機酸溶液を添加した後、インピーダンス値を測定した結果、有機酸の濃度増加に伴い、インピーダンス値は低下した。さらに各ゲル中の有機酸濃度測定により、有機酸量にインピーダンス値は反比例することが確認出来た。このことから、本システムは有機酸の食品内部への浸透挙動計測に有効であることが示唆された。酢〆の調理法は、食品表面上に振り塩をした後、酢に漬けるため、この実際の調理手法に近い環境で調べるため、摸擬的に振り塩を行った状態に近い表面部のみに塩を含有させた寒天ゲルを作製し、各種有機酸を添加してインピーダンス値を測定した。その結果、食塩無添加ゲルの結果と同様に、ゲル上部から下部へ有機酸が浸透するに伴いインピーダンス値が一定になる時間を要することが確認された。さらにブロモクレゾールグリーンを混合した寒天ゲルを用いて、可視化により有機酸添加後の浸透挙動を観察したところ、インピーダンス値の変化と同様の挙動を示し、有機酸濃度はインピーダンス値の変化と相関性が高いことが分かった。以上の結果から、電気インピーダンス法によって食品中の有機酸浸透挙動ならびに塩蔵食品による有機酸浸透挙動が計測可能であることが示唆された。

penetration, sujime, non-destructive measurement

発表番号：4E050
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 麺内部のグルテンタンパク質の三次元ネットワーク構造の新規計測　～麺をまるごと透明に～
# Measurement of 3D gluten-network inside optically cleared noodle

○小川 剛伸、松村 康生（京大院農）
○Takenobu OGAWA, Yasuki MATSUMURA (Kyoto Univ.)

【概要】これまでは、乾麺などの食品内部のグルテンタンパク質のネットワーク構造を数 μm 程度の深度までしか三次元的に観察できなかったが、デンプン含有食品を透明化できるナトリウム塩を主成分とする新たな溶液を見出し、この溶液を用いて試料を透明化することで（図 1）、グルテンタンパク質のネットワーク構造を少なくとも約 500 μm 程度の深度までサブミクロンレベルの空間分解能で三次元的に測定することに初めて成功した。

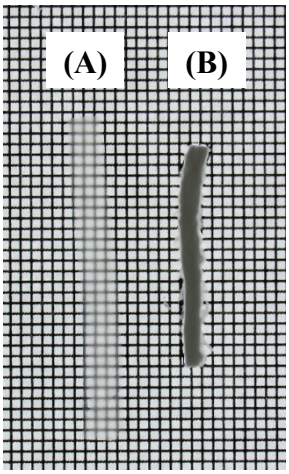



**図 1.** 透明化処理した麺（A）と未処理の麺（B）。

【背景】例えば小麦粉と水の混練物であるドウは、麺やパンなどの材料であり、ドウの内部ではグルテンタンパク質が約 30 μm のデンプン粒を取り囲むように三次元的なネットワーク構造を形成している。このネットワーク構造は、製造時の製パン性や喫食時の食感などの品質を決定する非常に重要な因子である。そのため、これまではドウの二次元断面の画像を基に、三次元的なネットワーク構造の特徴を推測し、品質との関係を論ずることが多かった。しかし、未だ食感などの予測において鍵となる特徴を十分に把握するには至っていない。

【課題】近年、脳内神経のネットワーク構造などを解析するために、生体組織をまるごと透明化し、2 光子励起顕微鏡などと組み合わせることにより、非破壊的に生体組織内部のタンパク質の構造を一細胞レベルの空間分解能で三次元的に計測する手法が開発されている。この手法では試料の「透明化」が不可欠であり、生体組織を透明化する尿素などの物質や電流を流す方法が相次いで報告されている（*Nature Neuroscience* 2011, 2013, *Nature Protocols* 2012, *Nature* 2013, *Cell* 2014）。しかし、これら生体組織を透明化する既存の物質や方法では、デンプンを主成分とするドウなどの食品をほとんど透明化できないか、あるいはある程度透明化できても、グルテンタンパク質のネットワーク構造を破壊してしまうという課題があった。

【解決方法および結果】演者らは、乾麺などを透明化できるナトリウム塩を主成分とする新たな溶液を見出した。まず、この溶液に乾麺を浸漬させて、白色不透明な乾麺をまるごと透明なゼリー状にした（図 1）。その後、この透明にした乾麺内部のグルテンタンパク質のネットワーク構造を 2 光子励起顕微鏡で非破壊的に三次元測定した。その結果、本透明化処理を施した乾麺では表面から少なくとも約 500 μm 程度の深度まで三次元的なネットワーク構造を初めて測定することができた。この手法を深化・発展させることにより、製パン性や食感を予測し、所望する品質となる食品の効率的かつ合理的な設計につながることが期待できる。

3D fluorescence imaging, gluten network, transparent noodle

発表責任者：小川剛伸（ogawat@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4E051
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 機能性乳酸菌（*Lactobacillus paracasei* MCC1849 株）飲料の冷蔵保存における官能特性と香味成分の変化

# Changes in sensory characteristics and flavor compounds of functional lactic acid bacteria (*Lactobacillus paracasei* strain MCC1849) beverage during refrigerated storage

○鈴木 泰輔[1]、秋山 正行[1]、佐藤 由康[2]、岳上 美紗子[3]、村上 祐介[4]、大西 正展[4]、溝田 泰達[1]、越智 浩[2]、小泉 玲子[3]、池田 三知男[1]、岩渕 久克[4]（[1]森永乳業(株)食品総合研究所、[2]森永乳業(株)素材応用研究所、[3]森永乳業(株)応用技術センター、[4]三栄源エフ・エフ・アイ(株)）
○Taisuke SUZUKI[1], Masayuki AKIYAMA[1], Yoshiyasu SATOU[2], Misako OKAUE[3], Yusuke MURAKAMI[4], Masanobu ONISHI[4], Yasumichi MIZOTA[1], Hiroshi OCHI[2], Reiko KOIZUMI[3], Michio IKEDA[1], Hisakatsu IWABUCHI[4] ([1]Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Food Research & Development Institute, [2]Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Food Ingredients & Technology Institute, [3]Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Product Evaluation Center, [4]San-Ei Gen F.F.I.,Inc.)

【目的】免疫賦活活性を有する機能性乳酸菌を配合した乳酸菌飲料を開発するために、冷蔵・2 週間保存における、製品品質（官能特性、香味成分、乳酸菌の生残性、pH 等の特性値）の経時変化を調べることを目的とした。具体的には、官能特性、香気成分・親水性低分子量成分、および匂い成分を、各々、官能評価、GC-MS、GC-O（GC-Olfactometry）により評価・分析を行った。
【方法】乳酸菌(*Lactobacillus paracasei* MCC1849 株)を 1 億／ml 配合した、無脂乳固形分 0.8%・乳脂肪分 0.1%の、香料を含まない乳酸菌飲料を作製し、10℃で保存した。作製直後（0W)、保存 1 週間後（1W)、および保存 2 週間後（2W）のサンプルを、以下の評価・分析に供した。1）専門パネル 13 名（20～30 代、男性 7 名・女性 6 名）により評価用語（8 語）を選定した。官能特性と強度の摺合せ訓練を実施後、全経時サンプル（0W, 1W, 2W）について 2 回繰り返して評価を行った。2）溶剤抽出-GC-MS および 3）ヘッドスペース SPME 抽出-GC-MS により、香気成分を分析した。4）溶剤抽出-GC-O により検出された香気成分の香りへの寄与度を評価した。また、5）溶剤抽出(-誘導体化)-GC-MS により親水性低分子量成分（有機酸、アミノ酸、糖等）を分析した。統計解析ソフト XLSTAT 2014 または JMP8 を用いて、各々の評価・分析データの分散分析、多重比較検定、および主成分分析を行った。
【結果】1）官能評価：「香りの強さ」、「発酵臭」、「酸味の強さ」、「発酵臭の残り」の官能特性強度は保存中に有意に（$p<0.05$）増加し、「乳由来の雑味臭」の強度は有意に減少した。2）GC-MS（香気成分）：検出・同定した 23 成分の内、14 成分の香気量が保存中に有意に（$p<0.05$）増加したが、フルフラールのみが有意に減少した。3）GC-MS（ヘッドスペース）：検出・同定した 14 成分の内、9 成分が保存中に有意に増加し、3 成分が有意に減少した。4) GC-O：検出した 34 成分(内 30 成分同定)の内、17 成分の匂い強度が保存中に増加し、6 成分の匂い強度が減少する傾向がみられた。5）GC-MS（親水性低分子量成分）：検出した 28 成分（内 20 成分同定）の内、3 成分の成分量が保存中に有意に増加し、3 成分が有意に減少した。

各々の評価・分析データの主成分分析結果から、10℃保存における官能特性および香味成分の変化により、経時サンプル（0W, 1W, 2W）毎に識別されることが明らかとなった。

lactic acid bacteria beverage, sensory characteristic, flavor compound

発表番号：4E052
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ヨーグルトの食感の見える化～破壊過程に着目した物性・構造の解析～

# Visualization of texture of yogurt - Analisys of pysical properties and structure focused on fracture process -

○日下 舞[1]、市村 武文[3]、風間 紫穏[1]、上川 理絵[2]、中村 卓[1]([1]明治大農・農化、[2]明治大院・農化、[3]株式会社 明治)
○ Mai KUSAKA[1], Takefumi ICHIMURA[3], Shion KAZAMA[1], Rie KAMIKAWA[2], Takashi NAKAMURA[1] ([1]Meiji Univ., [2]Meiji Grad. Shc., [3]Meiji Co.)

【目的】ヨーグルトのおいしさにとって食感は重要な要因である。その食感は咀嚼により食品構造を破壊することによって発現する。構造破壊の過程を明らかにすることは、望まれる食感を実現するための指標となる。ヨーグルトの構造は原料の混合・均質化・殺菌・発酵・冷却の過程の中で形成される。この形成過程において原料の殺菌温度を変化させるとヨーグルトのカード強度が変化し、食感に影響することが知られている。しかし、その食感の違いがどの様な構造的要因によるかは明らかではない。そこで本研究では原料殺菌温度の異なるヨーグルトについて、破壊過程に着目した物性測定・構造観察を行ない、食感の違いを構造的要因から見える化することを目的とした。

【方法】殺菌温度の異なるヨーグルトミックス 3 種(70℃殺菌・110℃殺菌・130℃殺菌)を発酵・冷却し、異なる特徴のヨーグルトを作成した。物性測定では、第一咀嚼を想定してクリープメーターを用いた破断強度試験を行った。咀嚼後期過程を想定してレオメーターを用いた動的粘弾性試験を行った。また、構造観察では、未破壊および破壊後のヨーグルトを走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。得られた結果については SPSS を用いて統計処理を行った。

【結果および考察】破断強度試験の結果、110℃殺菌のヨーグルトは 70℃・130℃殺菌のヨーグルトに比べて破断応力が有意に高く、さらにもろさ応力が生じた。また、動的粘弾性試験の結果においても 110℃殺菌のヨーグルトは貯蔵弾性率(G')の値が有意に高くなった。これは 110℃殺菌のヨーグルトの硬い食感を生じることと一致した。構造観察では、未破壊の構造において、130℃殺菌のヨーグルトではカゼインミセルがひも状につながった細いストランド（太さ 300 nm）のネットワーク構造が観察された。110℃殺菌のヨーグルトではカゼインミセルが太く集まってつながったストランド(太さ 1000 nm)のネットワーク構造が観察された。一方、70℃殺菌のヨーグルトではカゼインミセルがランダムに凝集し、ストランド状のネットワーク構造は観察されなかった。圧縮破壊構造では、目視レベルにおいて破片サイズは殺菌温度が高いほど小さく細かい構造だった。これが 130℃殺菌ヨーグルトのなめらかな食感の要因であると考えられた。顕微鏡レベルでは、70℃殺菌のヨーグルトは凝集体がさらに集まった大きな塊が観察された。110℃殺菌のヨーグルトでは太いストランドのネットワーク構造が引きちぎられている様子が観察された。130℃殺菌のヨーグルトではひも状につながったストランド構造が伸びている様子が観察された。以上のように破壊前後の構造を比較することにより、殺菌温度の異なるヨーグルトの亀裂発生と凝集塊形成のメカニズムが異なることが明らかとなった。

yogurt, structure, pysical properties

発表番号：4E053
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品中イソフラボンの簡易エストロゲン様活性分析法に関する研究
# The Assaying Methods of Estrogenic Activity for Isoflavones in Food

○永野 理佳[1]、金内 誠[1]、下山田 真[2]、石田 光晴[1] ([1]宮城大学、[2]静岡県立大学)
○ RIKA NAGANO[1], Makoto KANAUCHI[1], Makoto SHIMOYAMADA[2], Mituharu ISHIDA[1] ([1]Miyagi University, [2]University of Shizuoka)

【目的】 イソフラボンはエストロゲンと分子構造が類似しているため、エストロゲン受容体(ER)を介する生理活性を有している。イソフラボンには、活性型である daizein, genistein, glycitein の 3 種類のアグリコン、及びそれらの配糖体（グリコシド）など合計 12 種類の異性体が存在する。食品中では主に配糖体として存在し、微生物による変換を受け、活性型のアグリコンとなる。これら 12 種類のイソフラボンはそれぞれ、ER への親和性が異なる事が報告されている。ER には ERα、ERβの 2 つのアイソフォームがあり、生体内での分布組織、存在比が異なり、イソフラボンの健康への有効性と有害性の観点から重要な性質である。これまで、食品中のイソフラボン類の分析には HPLC が用いられてきた。しかし、HPLC による分析は高価で煩雑な操作を要する。そのため、簡易かつ迅速な分析法として、Yeast Two-hybrid 法(Y2H 法) の原理を用いた、ERαリガンド結合ドメイン及びコアクチベーター、レポーター遺伝子導入酵母による分析法が確立されている。しかし、食品試料中のイソフラボンによるエストロゲン様活性を ERα、ERβ両方の存在下で測定した報告はない。そこで本研究では、ERα、ERβの両存在下におけるイソフラボンのエストロゲン様活性解析方法の確立を目的とする。ER がリガンドと結合すると 2 量体を形成する性質を利用し、イソフラボンによる ER 活性化能の評価系を開発し､簡便な食品試料中の ER 活性測定及びイソフラボンの定量化を検討することとした。

【方法】 Matchmaker Two-Hybrid System-3(Clontech)を用い､Y2H 用のヒトエストロゲン受容体(hER)発現酵母を作成した。すなわち、RIKEN BRC より分譲された hERβの全長 cDNA を PCR にて増幅した。これらを pGBKT7 ベクターおよび pGADT7 ベクター(Clontech)へライゲーションし、pGBKT7-hERβ、pGADT7-hERβを構築した。これらベクターを大腸菌 DH5α へ導入し形質転換した。
【結果及び考察】 hERβの全長の cDNA はプライマーhER F 及びプライマーhER R を用い、PCR にて増幅可能であった。さらに各ベクター及び PCR にて増幅した cDNA は、*Nde* Ⅰ－*BamH* Ⅰ の組み合わせにて制限酵素処理した後にライゲーションすることができ、pGBKT7-hERβ、 pGADT7-hERβが得られた。これは、これまで明確な用量依存性曲線が得られると報告された、エストロゲン応答配列の下流に緑色蛍光タンパク質を導入したレポータープラスミド及び全長 hER 発現プラスミドを導入した報告と一致した。しかし、-濃度範囲が狭く、濃度が広範囲の食品測定には適さない。そこで、広い濃度範囲にも対応できるようなβ-ガラクトシダーゼによる測定について検討した。

estrogen receptor, isoflavone, yeast two-hybrid

発表番号：4E054
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 和食に共通して含まれる麹グリコシルセラミドが腸内細菌叢に及ぼす影響の解析

# Influence of koji glycosylceramide, common in Japanese dishes, on the intestinal microbial flora

佐藤 友哉[1]、譚 政[1]、中山 二郎[2]、浜島 浩史[1]、光武 進[1]、永尾 晃治[1]、○北垣 浩志[1]([1]佐賀大学農学部、[2]九州大学大学院農学部)
Tomoya Sato[1], Sei Tan[1], Jiro Nakayama[2], Hiroshi Hamajima[1], Susumu Mitsutake[1], Koji Nagao[1], ○Hiroshi Kitagaki[1] ([1]Saga University, [2]Kyushu University)

［緒論］

和食は日本人の健康長寿の鍵でありさまざまな機能性があると考えられているがその詳細は不明である。

和食の一つの特徴は発酵食品を多く含むことであり、日本の発酵食品のほとんどには麹が含まれている。従って麹の機能性がわかれば和食の機能性全般に波及できると考えられる。我々はこれまで、麹にはグリコシルセラミドが 1-3 mg/g （乾燥重量）と多量に含まれていることや、この麹グリコシルセラミドは他の微生物に多様な生理作用を賦与することを明らかにしている[1)]。

そこで麹グリコシルセラミドが腸内細菌へと影響を及ぼし、日本人の健康長寿を支えているのではないかとの仮説を立てた。

［方法・結果］

上記の仮説を検証するため、麹グリコシルセラミドを粗精製し、食餌中に 1%w/w で混ぜ、マウスに給餌してその糞を採取した。糞からゲノムを抽出し、次世代シークエンサーMiSeq 及びそれに付属した MiSeqReporter を用いてその細菌叢を調べた。その結果、*Sphingobacterium* や *Blautia coccoides* など細菌が麹グリコシルセラミド添加区で有意に上昇していた。

そこで *Blautia coccoides* を精製グリコシルセラミドを添加して YPD で 37℃で 24 時間培養したところ確かにグリコシルセラミドやその分解物を添加することで増殖が亢進した。一方、一般の腸内細菌、大腸菌や乳酸菌にグリコシルセラミドを添加しても増殖は刺激されなかったことからグリコシルセラミドの効果はこれらの細菌に特異的であると考えられた。

*Blautia coccoides* の腸内での増加は大腸で制御性 T 細胞集積を誘導し免疫機能を抑制する効果や不安行動の抑制効果が報告されていることから、和食に含まれる麹グリコシルセラミドが腸内で *Blautia coccoides* を増加させ、機能性を発揮している可能性が考えられた。

1) *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(11):3688-98 (2015)

Japanese dishes, koji glucosylceramide, microbial flora

発表責任者：北垣浩志（ktgkkhrs@cc.saga-u.ac.jp）

発表番号：4E055
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が産生する菌体外多糖による代謝改善作用

# Metabolic beneficial effects by *Leuconostoc mesenteroides* strain NTM048-derived exopolysaccharides

○柴田 光治[1]、宮本 潤基[2]、清水 秀憲[1]、山本 憲二[3]、木村 郁夫[2]、久 景子[1] ([1]日東薬品工業株式会社、[2]東京農工大学 大学院農学研究科、[3]石川県立大学 生物資源工学研究所)
○ Koji SHIBATA[1], Junki MIYAMOTO[2], Hidenori SHIMIZU[1], Kenji YAMAMOTO[3], Ikuo KIMURA[2], Keiko HISA[1] ([1]Nitto Pharm. Ind., LTD., [2]Tokyo Univ. of Agriculture and Technology, [3]Ishikawa Pref. Univ.)

**【背景・目的】**

菌体外多糖 (EPS; exopolysaccharide)とは乳酸菌が菌体外に産生する多糖の総称である。難消化性の食物繊維に代表される食事由来多糖は、従来よりその生理機能は多様かつ重要であると考えられていたにも関わらず、分子作用メカニズムについては不明な部分が多かった。近年、腸内細菌叢の変化が宿主のエネルギー調節や栄養摂取、免疫機能等に関与し、肥満や糖尿病等の病態に対して、直接影響することが明らかとなった。そして、その宿主側に最も影響を及ぼす分子実体が、腸内細菌による多糖の分解産物、短鎖脂肪酸であると考えられ始めた結果、食事由来多糖自体の重要性も再認識されるに至った。この中で我々は独自に分離したエンドウマメ由来の乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* NTM048 株が腸管粘膜免疫系および全身免疫系への賦活効果を有する EPS を産生することを明らかにしてきた [1)]。本研究では、新たな展開として NTM048 株由来 EPS の代謝機能へ及ぼす影響について活性評価および短鎖脂肪酸との関連について検討した。

**【方法】**

高脂肪食や低繊維食等、各種栄養組成食に対し、NTM048 株由来 EPS を配合する餌を作製した。C57BL/6J マウスへ短期あるいは長期投与後、糞便および血中の短鎖脂肪酸産生量の比較、体重・組織重量、血液生化学データ等、各種代謝パラメーターの測定および菌叢解析を行った。

**【結果・考察】**

NTM048 株由来 EPS 投与群における各種代謝改善効果が確認できた。さらに、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の短鎖脂肪酸量に関しても、それぞれ有意な上昇が確認できたことから、代謝改善効果の要因の一つとして NTM048 株由来 EPS の分解に伴う腸内細菌叢変化の関与も期待される。今後、より詳細な腸内細菌叢の解析や免疫・代謝機能への分子作用メカニズムの解明を行うことにより、EPS とその産生菌株を利用した、さらに効率的な短鎖脂肪酸産生制御、全く新しい観点からのプレ・プロバイオティクスによる腸内環境改善、肥満・生活習慣病予防をも視野に入れた機能性食品創出への可能性を提供する。

1) Matsuzaki *et al.*, 2015. *J Agric Food Chem.* **63**(31): 7009-7015.

*Leuconostoc mesenteroides*, Exopolysaccharide, Short-chain fatty acid

発表番号：4E056
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ライチ由来低分子化ポリフェノール Oligonol と共役リノール酸の併用投与による脂質代謝調節作用
# Regulation of lipid metabolism by co-administration of conjugated linoleic acid and Oligonol, oligomerized polyphenol formulated from lychee fruit polyphenol

○河合 咲紀[1]、林 洪太[1]、依田 浩樹[1]、長田 恭一[1]、高成 準[2]、北舘 健太郎[2] ([1]明治大農、[2]アミノアップ化学)
○Saki KAWAI[1], Kota HAYASHI[1], Hiroki YODA[1], Kyoichi OSADA[1], Jun TAKANARI[2], Kentaro KITADATE[2] ([1]Meiji Univ., [2]Amino Up Chemical)

**【目的】**

ライチ由来低分子化ポリフェノールの Oligonol と共役リノール酸(CLA)をラットに併用投与させた場合の脂質代謝調節作用を検討した。

**【方法】**

5 週齢の Wistar 系雄性ラットを予備飼育した後、2 週間 AIN76 純化飼料を与えた群を N 群、1.5 % CLA を含む飼料を与えた群を C 群とした。また、N 群の中で給餌 2 時間後に Oligonol を 500 mg/kg B.W.のレベルで経口投与した群を O 群、C 群に Oligonol を投与した群を I 群とした。なお、N と C 群は生理食塩水を経口投与した。飼育後、麻酔を施して動脈より採血死させ、種々の脂質パラメータを測定した。

**【結果】**

体重増加に変化はなかったが、肝臓重量は対照群と比較して CLA 摂取で有意に高くなったものの、Oligonol 投与では低くなった。内臓白色脂肪組織重量は対照群と比較して CLA 摂取で有意に低くなった。肝臓コレステロールレベルは対照群と比較して Oligonol 投与及び CLA 摂取で有意に低くなり、肝臓の SREBP2 及び CYP7A1 の mRNA レベルは対照群と比較して Oligonol 投与で有意に高くなった。回腸の FXR および ASBT の mRNA レベルは対照群と比較して Oligonol 投与で有意に高く、N、C 及び I 群と比較して O 群が有意に高くなり、Oligonol と CLA の相殺作用があった。糞重量及び糞中に排泄された中性ステロイド量は対照群と比較して Oligonol 投与で有意に高くなった。盲腸重量は対照群と比較して Oligonol 投与で有意に高くなり、盲腸内短鎖脂肪酸組成も変化した。

**【考察】**

Oligonol 投与によるコレステロールレベルの低下は、コレステロール異化反応の亢進と糞中へのコレステロール排泄の増大が主な要因と考えられる。Oligonol 投与による肝臓のコレステロール合成系酵素の遺伝子発現が変化したのは、コレステロール恒常性の維持機能が働いたためではないかと考えられる。また、糞中ステロイド組成及び盲腸内短鎖脂肪酸組成が Oligonol の投与で大きく変化したことから、腸内の細菌叢が変化したと推測される。腸内細菌叢が宿主のエネルギー代謝の制御に関与するので、Oligonol による脂質代謝調節作用は上記の作用に加えて腸内細菌叢の変化も寄与していると思われる。CLA の摂取により褐色脂肪重量が増加した一方で内臓白色脂肪組織重量が低くなった。現在、脂肪組織の遺伝子発現や各組織の脂肪酸組成を検討している。

本研究結果から、CLA と Oligonol の同時摂取による相乗的な作用は認められなかったが、阻害的な作用はほとんどなく、併用摂取は可能であると考えられる。

Oligonol, conjugated linoleic acid, lipid metabolism

発表責任者：河合咲紀（skkw.ai32@gmail.com）

発表番号：4E057
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 更年期脂質代謝変動に対する大豆イソフラボンと共役リノール酸の併用摂取効果

# Effects of the combined intake of soy isoflavone and conjugated linoleic acid against change of lipid metabolism with menopause

○谷澤 郁[1]、小栗 幹也[1]、長田 恭一[1]、戸田 登志也[2] ([1]明治大農、[2]フジッコ研究所)
○Kaoru TANIZAWA[1], Mikihisa OGURI[1], Kyoichi OSADA[1], Toshiya TODA[2] ([1]Meiji Univ., [2]Fujicco Co., Ltd.)

【目的】更年期の女性は、卵巣機能低下による女性ホルモンの欠乏に伴い、脂質代謝異常をはじめとした種々の症状を発症する。本研究では、脂質代謝異常を予防または改善する機能性成分として期待されている共役リノール酸（CLA）と大豆イソフラボンを、卵巣を摘出した更年期モデルラットに単独あるいは同時に摂取させた場合の脂質代謝変動に対する効果を検討した。

【方法】5 週齢の Wistar 系雌性ラットの卵巣を摘出し、対照群は偽手術を施した。予備飼育後、卵巣を摘出したラットを食餌により 4 群に分けた。偽手術ラットには AIN93 純化飼料(SHAM 群)を、卵巣摘出ラットには純化飼料(OVX 群)、純化飼料に 1%CLA を添加した飼料(CLA 群)、0.2%大豆イソフラボンを添加した飼料(IF 群)、1%CLA と 0.2%大豆イソフラボンを添加した飼料(INT 群)をそれぞれペアフィーディング条件で給餌した。38 日間飼育し、12 時間の絶食後、腹部動脈より採血死させ、種々の組織を採取し、脂質代謝に関わる諸パラメータを測定した。

【結果】IF 群と INT 群は SHMA 群、OVX 群および CLA 群と比べて体重増加は有意に低くなった。CLA 群、IF 群および INT 群の総白色脂肪重量は、OVX 群と比べて有意に低くなった。血漿 TC 濃度は OVX 群と比べて IF 群と INT 群は有意に低くなったが、HDL-C 濃度は OVX 群と比べて INT 群で有意に低くなった。また、肝臓 TG 濃度は、OVX 群と比べて CLA 群、IF 群および INT 群で有意に低くなり、TC 濃度は OVX 群と比べて CLA 群は有意に低くなった。肝臓の脂肪酸合成酵素である FAS の活性は、OVX 群と比べて CLA 群、IF 群および INT 群で有意に低くなった。Insulin 濃度は、OVX 群および CLA 群と比べて IF 群と INT 群は有意に低くなり、Leptin 濃度は、OVX 群と比べて CLA 群、IF 群および INT 群は有意に低くなった。さらに、HOME-IR は OVX 群と比べて IF 群と INT 群は有意に低くなった。

【考察】卵巣の摘出により、体重増加量や脂質パラメータに変動が生じたが、CLA と IF の摂取により肝臓 TG 濃度上昇が抑えられた。これは主に CLA と IF 摂取による脂肪酸合成の抑制によるものと考えられた。血中レプチン濃度の調節には CLA と IF の相加的作用が認められた。さらに、IF の摂取で血糖値の上昇が抑制され、血中 Insulin 濃度も改善された。よって、IF の摂取により肥満に伴って生じるインスリン抵抗性は改善されるかもしれない。以上のように、CLA と IF を摂取することで、卵巣機能低下による肥満発症が予防され、同時摂取した場合にはより強い予防作用が得られるのではないかと考えられる。

isoflavone, conjugated linoleic acid, menopause

発表責任者：谷澤　郁（kaorutanizawa@gmail.com）

発表番号：4E058
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高β-コングリシニン大豆がラットの脂質代謝に及ぼす影響

# Effect of high-β-conglycinin soybean on lipid metabolism in rats

○高橋 陽子[1]、石黒 貴寛[2]、高橋 浩司[3]、羽鹿 牧太[3] ([1]農研機構食総研、[2]旭松食品、[3]農研機構作物研)
○Yoko TAKAHASHI[1], Takahiro ISHIGURO[2], Koji TAKAHASHI[3], Makita HAJIKA[3] ([1]NFRI, [2]Asahimatsu Foods Co., Ltd., [3]NICS)

【目的】大豆タンパク質の主要成分であるβ-コングリシニンは、血中中性脂肪濃度を低下させることが知られている。大豆から精製されたβ-コングリシニンは特定保健用食品の関与成分として利用されているが、品種改良によりβ-コングリシニン含有量を高めた大豆でも同様の作用が得られないかと考えた。本研究では、実験動物において高 β-コングリシニン大豆の脂質代謝改善作用の有効性を検討するため、分離大豆タンパク質、精製 β-コングリシニンおよび低 β-コングリシニン大豆の作用と比較した。
【方法】食餌タンパク質源をカゼイン、分離大豆タンパク質、β-コングリシニン、高β-コングリシニン大豆、または低 β-コングリシニン大豆とした 5 種類の飼料を調製し、雄 SD ラットに 21 日間自由摂食させた。各食餌の脂質および食物繊維量は 90 および 75 g/kg となるよう、大豆油およびセルロース添加により調整した。飼育期間終了後、血清および糞中の脂質濃度と、肝臓の脂質代謝関連酵素の活性および mRNA 発現量を測定した。
【結果】血清中性脂肪濃度は各群間の有意差がなかったが、カゼイン群よりも β-コングリシニン群で低下傾向が見られ、大豆群間の比較ではβ-コングリシニン含有量が高い方がわずかに低い値を示した。肝臓の中性脂肪濃度は、β-コングリシニン群とカゼイン群との差はなかったが、2 つの大豆食はβ-コングリシニンよりも有意に値を低下させた。糞便の水分含量および総脂質濃度は大豆食群で他群よりも有意に高かった。肝臓の脂肪酸合成系酵素の活性はカゼイン群と比べて他の 4 群で有意に低下したが、これらの低下作用には差がなかった。肝臓リンゴ酸酵素の活性および mRNA 発現量は、β-コングリシニン群ではカゼイン群と差がなかったのに対し、大豆群では有意に低下した。肝臓の VLDL レセプターmRNA 発現量は、β-コングリシニン群で他の群よりも大きく上昇していた。以上の結果からは、β-コングリシニン含有量が異なる大豆の脂質代謝改善作用は、違いがほとんど見られなかった。しかし、精製されたβ-コングリシニンと高 β-コングリシニン大豆の脂質代謝への影響の違いは、β-コングリシニンは肝臓での VLDL の取り込み量を増加させる一方、大豆は腸管での食餌脂肪吸収を阻害することであり、両者とも肝臓での脂肪酸合成が抑制されることが確認された。

β-conglycinin, soybean, lipid metabolism

発表番号：4E059
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 卵巣摘出ラットにおける共役リノール酸とヘスペリジンの脂質代謝異常予防効果

# Preventive effect of conjugated linoleic acid and hesperidin on ovariectomy-induced dyslipidemia in female rats

○小栗 幹也、谷澤 郁、吉富 廉、長田 恭一 (明治大農)
○Mikiya OGURI, KAORU TANIZAWA, REN YOSITOMI, KYOICHI OSADA (Meiji Univ.)

【目的】

更年期女性の卵巣機能低下に伴う女性ホルモン欠乏は、脂質代謝異常をはじめ様々な症状を引き起こす。卵巣を摘出した閉経後肥満発症モデルラットに、共役リノール酸（CLA）とヘスペリジン（HES）を単独あるいは同時に投与した場合の肥満予防効果を検証した。

【方法】

6 週齢の Wistar 系雌性ラットに卵巣摘出手術を（対照は偽手術）施した。1 週間の予備飼育の後、卵巣を摘出したラットを食餌により 4 群に分けた。偽手術ラットには CLA と HES を添加しない AIN76 基準飼料（SHM 群)、卵巣摘出ラットには基準飼料（OVX 群)、あるいは基準飼料に 1%CLA を添加した飼料（CLA 群)、0.5%を添加した飼料（HES 群)、1%CLA と 0.5%HES を添加した飼料（INT 群）を 75 日間給餌した。麻酔下で腹部動脈より採血死させ、肝臓、腎臓、盲腸、子宮、褐色脂肪組織、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織（子宮周囲、腎臓周囲、腸間膜）を採取し、脂質代謝に関わる種々のパラメーターを測定した。

【結果】

SHM 群に比べ、卵巣を摘出した 4 群で食餌摂取量が有意に増大し、体重増加量が有意に高くなった。OVX 群は、SHM 群と比べて内臓脂肪である子宮周囲白色脂肪組織と腎周囲白色脂肪組織の重量が増大したが、CLA の摂取により内臓脂肪重量は有意に低くなった。血漿トリアシルグリセロールレベルは OVX 群に比べて CLA の摂取により有意に低くなった。血漿総コレステロールレベルは SHM 群に比べて OVX 群は有意に高くなったが、OVX 群と比べると CLA の摂取によりそのレベルは有意に低くなった。肝臓トリアシルグリセロールレベルは、SHM 群に比べて OVX 群は有意に高くなったが、OVX 群と比べて CLA の摂取により有意に低くなり、HES の摂取によっても有意に低くなった。肝臓総コレステロールレベルは、OVX 群と比べて CLA 摂取および HES 摂取で有意に低くなった。以上の結果より、卵巣を摘出したラットにおいて、CLA の摂取により内臓脂肪の蓄積が抑制され、かつ、血漿と肝臓の脂質パラメーターが改善されること、また、HES の摂取により肝臓の脂質パラメーターが改善されることを確認した。現時点で、併用摂取による相乗効果あるいは、相殺効果は確認されなかったが、相加的な効果が一部確認された。

menopause, conjugated linoleic acid, hesperidin

発表責任者：小栗幹也（yosamickey@gmail.com）

発表番号：4E060
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# キノコ由来新規化合物が NPC1L1 依存性コレステロール取込みに及ぼす影響

# Effects of a novel compound from the mushroom on NPC1L1-dependent cholesterol uptake

○千場 智尋[1,3]、櫻田 剛史[1]、渡邊 理恵[1]、山口 宏二[1]、木村 泰久[2]、木岡 紀幸[2]、河岸 洋和[4,5,6]、松尾 道憲[7]、植田 和光[2,3]（[1]ファンケル総研、[2]京大院農、[3]京大 iCeMS、[4]静大院・創造、[5]静大・グリーン研、[6]静大院農、[7]京女大・家政）
○Tomohiro CHIBA[1,3], Tsuyoshi SAKURADA[1], Rie WATANABE[1], Kohji YAMAGUCHI[1], Yasuhisa KIMURA[2], Noriyuki KIOKA[2], Hirokazu KAWAGISHI[4,5,6], Michinori MATSUO[7], Kazumitsu UEDA[2,3] ([1]FANCL Research Institute, [2]Grad. Sch. of Agric, Kyoto Univ., [3]iCeMS, Kyoto Univ., [4]Grad. Sch. of Sci. and Tech., Shizuoka Univ., [5]RIGST, Shizuoka Univ., [6]Fac. of Agric., Shizuoka Univ., [7]Fac. of Home Econ., Kyoto Women's Univ.)

【背景・目的】高コレステロール血症は、日本人の死因の上位を占める心筋梗塞や脳梗塞を誘発する動脈硬化症の危険因子であり、血中コレステロール濃度の適切な調節がこれら疾患の予防として重要である。食事および胆汁由来コレステロールの小腸からの吸収を担う Neimann-Pick C1-Like 1（NPC1L1）は、高コレステロール血症改善剤である ezetimibe の標的タンパク質であり、薬理学的に重要である。一方、NPC1L1 遺伝子には多型が存在し、ezetimibe の効果は個人差の大きいことも報告されている。我々は、これまでにキノコの一種であるクロサルノコシカケ（*Fomitopsis nigra*）より単離した新規化合物 fomiroid A が、NPC1L1 との直接結合を介してコレステロール取込みを阻害することを明らかにした。しかし、クロサルノコシカケには fomiroid A と構造が類似する化合物がまだ多数存在すると予想され、更に強力な活性化合物を見出せる可能性があった。そこで、本研究ではクロサルノコシカケより NPC1L1 機能阻害活性を有する新たな活性化合物を明らかにすると共に、NPC1L1 に対する結合様式や構造類似化合物を用いた活性評価を検討した。
【方法・結果】Ezetimibe の代謝物を標識した[$^3$H]ezetimibe-glucuronide（[$^3$H]EZG）と NPC1L1 発現細胞の膜画分を用いて、クロサルノコシカケ分画物の[$^3$H]EZG 結合阻害活性を評価した。その結果、新たな活性化合物の単離に成功し、ステロール骨格を有する新規化合物 fomiroid B の構造を決定した。Fomiroid B は fomiroid A のケトン側鎖がアセチル化された構造類似体であった。続いて fomiroid B の結合様式を検討するため、fomiroid B 存在下 NPC1L1 に対する[$^3$H]EZG の飽和曲線を作製し、スキャッチャードプロット解析を行った。その結果、最大結合量（Bmax）が減少する非競合阻害が示され、NPC1L1 の fomiroid B 結合部位は ezetimibe とは異なることが示唆された。更に fomiroid B と平面構造が類似する数種類の天然物由来化合物を用いて[$^3$H]EZG 結合阻害活性を調べた結果、いずれも阻害活性を示さず fomiroid B の構造特異性が示された。最後に、NPC1L1 発現細胞および[$^3$H]cholesterol を用いて fomiroid B の影響を調べた結果、fomiroid B は ezetimibe と同様、NPC1L1 依存的なコレステロール脂肪酸エステル形成を阻害した。また、その阻害活性は fomiroid A より強力であることが示唆された。

上記結果より、新規化合物 fomiroid B は、ezetimibe とは異なる結合部位を介して NPC1L1 依存的なコレステロール取込みを阻害することが示唆された。

Cholesterol, Lipids, NPC1L1

発表責任者：千場　智尋（tochiba@fancl.co.jp）

発表番号：4E061
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 1 型糖尿病モデルラットを用いた脂肪酸合成関連遺伝子の発現制御機構の解析

# Regulation for the transcription of genes involved in fatty acid synthesis in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats.

○森田 貴大、白川 仁、我妻 紀代恵、駒井 三千夫（東北大院農）
○Takahiro Morita, Hitoshi Shirakawa, Kiyoe Wagatsuma, Michio Komai (Tohoku Univ.)

【目的】 脂肪酸合成酵素(FASN)は、NADPH 依存的に脂肪酸を合成する酵素である。 FASN 遺伝子の発現には、摂食後血中で増大したグルコースとインスリンが関わっていることが多くの研究で示されてきたが、脂肪酸合成に関与するとされる転写因子との詳細な関連は未解明な点も多く存在する。そこで、ストレプトゾトシン(STZ)を投与し、インスリン分泌能を消失させたラットにおいて、摂食後の FASN をはじめとする脂肪酸合成関連遺伝子の発現を解析し、STZ 非投与ラットと比較することで、摂食後の脂肪酸合成におけるグルコースやインスリンの役割をより明確にすることを本研究の目的とした。
【方法】 SD 系雄性ラット(6 週齢)に STZ を腹腔内投与しインスリン分泌能を消失させた。24 時間絶食後に、高スクロース無脂肪食(HS/NF)を再摂食させ、経時的に解剖した。解剖により得た血清中の液性因子の変化と、肝臓での FASN をはじめとする脂肪酸合成関連遺伝子の発現量を定量 RT-PCR とウエスタンブロット法により測定した。また、STZ 非投与ラットにおいても同様の実験を行い、STZ 投与ラットの結果と比較した。さらに、グルコースを経口投与した後解剖し、同様の解析を行った。
【結果】STZ 非投与ラットにおいて、FASN の mRNA 量は再摂食前と比べ摂食後 6 時間で約 110 倍に増大した。FASN の転写に関わる転写因子の中でも、インスリンにより制御される SREBP-1c の mRNA 量は摂食後 6 時間で約 30 倍に増大した。一方、STZ 投与ラットでは、FASN、SREBP-1c 共に、摂食後の mRNA 量の大幅な増大が見られなかった。また、他の脂肪酸合成関連遺伝子においても、摂食後の増大が抑制される傾向にあった。さらに、グルコース経口投与によって、STZ 非投与ラットの FASN や SREBP-1c の mRNA 量は増大したものの、STZ 投与ラットでは変化しなかった。これらのことから、摂食後の FASN やその関連遺伝子の転写制御において、グルコースよりもインスリンがより大きな役割を果たしていることが示唆された。

fatty acid synthesis, gene expression, insulin

発表番号：4E062
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アミノ酸バランスの異なる食事が脂質蓄積に及ぼす影響

# The influence the meal from which an amino acid balance is different exerts on lipid accumulation

○南野 勝彦[1]、堀尾 拓之[2] ([1]羽衣国際大学、[2]名古屋経済大学)
○Katsuhiko MINAMINO[1], Hiroyuki Horio[2] ([1]Hagoromo University of International Studies, [2]Nagoya University of Economics)

【目的】 非アルコール性脂肪性疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) のうち非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis; NASH)は日本人の約 1%が罹患しており、なかには肝硬変に進展するものもみられているが、その詳細は明らかではなく、これらの病態の解明および治療方法の確立は喫緊の課題となっている。近年、NASH の発症機序は、肝細胞への中性脂肪の沈着がおこり(first hit)、さらに肝細胞障害(second hit)が加わって発症する、two hit theory が提唱されており、我々は、first hit である”肝細胞への中性脂肪の沈着を防ぐこと”は、NASH を予防するうえで重要なステージであると考えている。しかしながら、ヒトの脂肪肝形成の詳細な機序についても未だ充分には明らかにはされていない。そこで、本研究ではタンパク質性低栄養が引き起こす脂肪肝形成の作用機序解明を目的とし、アミノ酸バランスの異なる食事によるラットの成長および代謝へ及ぼす影響について比較検討をおこなった。

【方法】4 週齢 Wistar ラットに、AIN93G 組成飼料、高脂肪食、低タンパク質(9% カゼイン)飼料および低タンパク質(9% アルブミン)飼料を 13 週間摂取させ、原因の異なる食事性肥満モデルラットを作成した。生化学的変化については、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、アラニンアミノトランスフェラーゼ、アルブミン/グロブリン比、トリグリセライド、コレステロールおよび遊離脂肪酸の測定をおこなった。また、成長については飼料、尿および糞をもちいて窒素測定をおこなった。さらに、鉄およびカルシウムを中心としたミネラルの挙動については、摘出した臓器への蓄積、尿およびフンへの排泄を原子吸光分析法で測定をおこなった。

【結果】コントロール群である 20%カゼイン飼料を与えたラットと比較して、低タンパク質(9% カゼイン)飼料を与えたラットおよび低タンパク質(9% アルブミン)飼料を与えたラットでは予想どおり低成長が見られた。しかしながら、同じ低タンパク質食である低タンパク質(9% カゼイン)飼料群と低タンパク質(9% アルブミン)飼料群とでは血清アルブミン / グロブリン(A/G) 比や血清中性脂肪量に相違が見られた。これらのことから、同じ低タンパク質食であっても、アミノ酸バランスが異なることによって脂肪肝形成の作用機序が異なる可能性が示唆された。尚、ミネラルの挙動の詳細については現在検討中である。

amino acid balance, low protein, lipid accumulation

発表番号：4E063
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アカガシに含まれるα-グルコシダーゼ阻害活性成分の単離と同定

# Isolation and Identification of α-Glucosidase Inhibitors from Japanese evergreen oak (*Quercus acuta*)

○柏木 丈拡[1]、森本 ゆかり[1]、陳 新陽[1]、金 哲史[1]、渡邊 浩幸[3]、鈴木 大進[2]、川北 浩久[2]、篠原 速都[2]、渡邊 高志[4]、島村 智子[1]、受田 浩之[5] ([1]高知大農、[2]高知工技セ、[3]高知県立大健康栄養、[4]高知工科大学地域連携機構、[5]高知大地域)

○ Takehiro KASHIWAGI[1], Yukari Morimoto[1], Xin-Yang Chen[1], Chul-Sa Kim[1], Hiroyuki Watanabe[3], Masanobu Suzuki[2], Hiroyuki Kawakita[2], Hayato Shinohara[2], Takashi Watanabe[4], Tomoko Shimamura[1], Hiroyuki Ukeda[5] ([1]Kochi Univ., [2]Kochi Pref. Indus. Techno. Center, [3]Univ. of Kochi, [4]Kochi Univ. of Technol., [5]Kochi Univ. Region. Collab.)

【目的】アカガシ (*Quercus acuta*) はブナ科コナラ属の常緑広葉樹であり、日本では宮城県以西に広く分布する。その材は非常に堅く、木刀や農具、船の舵や櫂などに使用されている。ドングリ状の実は水晒しによるアク抜きを行い、古くは縄文時代から食されてきた。本種の実は、糖尿病の改善効果が認められており、短期間の摂取による体重減少と血糖値の改善効果が報告されている。またコナラ属の実にはα-グルコシダーゼの阻害効果が報告されているものの、その活性の関与成分についての報告はほとんどない。そこで、本研究では、本種のみの MeOH 抽出物が示す強いα-グルコシダーゼ阻害活性に着目し、その関与成分の単離と同定を試みた。

【方法】高知県中部で採取したアカガシの実の子葉部を 80% MeOH で抽出し、濃縮乾固後 100 mg 当量/mL に定容したものをアカガシ MeOH 抽出液とした。この抽出液を、液液分配、シリカゲル中圧カラムクロマトグラフィー、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、逆相系の HPLC により順次分画した。α-グルコシダーゼ阻害活性の評価は、ラット小腸管由来のα-グルコシダーゼを用いたマルトースの分解反応を指標に、サンプル 100 mg 当量/mL における阻害率として表した。単離・精製した活性成分の構造解析は、LC-MS および NMR 分析にて行った。

【結果および考察】アカガシ MeOH 抽出液のα-グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、非常に強いα-グルコシダーゼ阻害活性 (93.4%) が認められた。この抽出液を水に懸濁しヘキサン及び酢酸エチルで順次液液分配を行い、各層の活性を評価した結果、酢酸エチル層がもっとも強い活性を示し (91.3%)、次いで水層が活性を示した (51.4%)。この酢酸エチル層をシリカゲル中圧カラムクロマトグラフィーに供し、酢酸エチル/ヘキサン系の溶出液で順次溶出した所、酢酸エチル溶出部に活性が集中した (79.8%)。続いてこの画分を ODS 中圧カラムクロマトグラフィーにより分画した結果、この活性は 40% MeOH 溶出部に局在した (66.8%)。活性の認められた ODS 40% MeOH 溶出部を HPLC に供し、保持時間に従って 5 つの画分に分画し、活性を評価したところ、Fr. 2 (45.1%) 及び Fr. 4 (16.5%) のみに強いα-グルコシダーゼ阻害活性が認められた。そこで、単一のピークで活性を示す Fr. 2 と Fr. 4 から、それぞれ化合物 A、B を単離し機器分析に供した。構造解析の結果、化合物 A は 1,2,3,6-tetra-gallyl-β-D-glucopyranose、化合物 B は 1,2,3,4,6-pentagallyl-β-D-glucopyranose と同定した。定量の結果、各化合物はアカガシ実の子葉 1g 中にそれぞれ 14.6 mg、2.4 mg 含まれていることが明らかとなった。

glucosidase inhibitor, Quercus acuta, gallylglucose

発表責任者：柏木丈拡（tkashi@kochi-u.ac.jp）

発表番号：4E064
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ナツメの抗メタボリックシンドローム作用における分子機序の解明と有効性の検証

# Anti-metabolic syndrome action of *Ziziphus jujuba* in type 2 diabetic KK-Ay mice and its underlying molecular mechanisms

○川畑 球一[1]、成瀬 翔真[1]、松浦 倫大[1]、海道 洋子[2]、川上 文清[3]([1]福井県大・生物資源、[2]（株）シーロード、[3]北陸産業活性化センター)

○Kyuichi KAWABATA[1], Shoma NARUSE[1], Tomohiro MATSUURA[1], Yoko KAIDO[2], Bunsei KAWAKAMI[3] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Searoad Co., Ltd.,, [3]The Hokuriku Industrial Advanced Center)

【目的】ナツメは中国や韓国で古くから利用される薬食用植物であり、最近では福井県の特産品として需要の拡大が期待されている。我々はこれまでに、ナツメに含まれる筋肉糖取り込み誘導活性成分として 4 種のトリテルペノイド（oleanonic acid、betulonic acid、betulinic acid および ursonic acid）を見出し、筋肉細胞に対して GLUT4 依存的な糖取り込みを誘導することを報告している（2014 年度本大会）。本研究では、ナツメトリテルペノイドによる GLUT4 細胞膜移行の分子機序を解明するとともに、ナツメ抽出物を用いて糖尿病モデルマウスにおける抗メタボリックシンドローム作用の検証を行った。

【方法】ラット骨格筋由来 L6 筋芽細胞は、筋管細胞へと分化させたのち、ナツメトリテルペノイドを 1～4 時間処理した。GLUT4 活性化に関与するシグナル伝達分子（PI3K、PDK1、Atk, PKCζ、AMPK および mTOR）の各種阻害剤は、トリテルペノイド添加の 30 分前に細胞へ処理した。糖取り込み活性は、2-deoxyglucose 取り込み量を蛍光法により測定した [1]。シグナル伝達分子のリン酸化は Western blot 法により解析した。ナツメ抽出物は、ナツメ乾燥果実のメタノール抽出物を水－酢酸エチル分配し、得られた有機層を乾固することで調製した。5 週齢の KK-Ay マウスは 1 週間の馴化後、1 群 8 匹として通常食もしくはナツメ抽出物混合食（0.1%および 0.01%）で飼育した。

【結果】ナツメトリテルペノイドの筋肉糖取り込み誘導活性は PI3K 阻害剤によってほとんど低下せず、PDK1、PKCζおよび mTOR 阻害剤によって有意に低下したことから、PI3K を起点とするインスリン経路とは異なることが明らかとなった。一方、AMPK 阻害剤はナツメトリテルペノイドの活性を強く増強し、AMPK が抑制的に作用していることも示唆された。ナツメトリテルペノイドは、Akt のリン酸化には影響を与えず、PKCζ、PRAS40 および AMPK のリン酸化を誘導しており、阻害剤実験を支持する結果となった。これらの結果から、ナツメトリテルペノイドは、PDK1 を介して PKCζおよび mTOR 経路を活性化し、GLUT4 の細胞膜移行を誘導していることが強く示唆された。またこの時、AMPK 経路は GLUT4 活性化に干渉している可能性も考えられた。KK-Ay マウスの体重増加量は、飼育 5 週目で通常食群が 10.5 ± 1.2 g であったのに対し、ナツメ抽出物混合食群は 0.1%で 9.4 ± 1.5 g、0.01%で 9.1 ± 0.7 g（$p < 0.05$）と抑制傾向を示した。今後、飼育終了時の脂肪重量や血糖値、アディポサイトカイン量などを測定し、抗メタボリックシンドローム作用の詳細な解析を予定している。

[1] Yamamoto N. *et al.*, *Curr. Protoc. Pharmacol.*, Chapter 12, Unit 12.14, 2011

*Ziziphus jujuba*, Triterpenoids, Metabolic syndrome

発表責任者：川畑球一（kawaba-k@fpu.ac.jp）

発表番号：4E065
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# スダチ果皮成分の糖代謝への影響

# Effect of sudachi peel extracts on the metabolism

○酒井 徹、中本 真理子、首藤 恵泉（徳島大大学院医歯薬学研究部実践栄養学）
○Tohru SAKAI, Mariko NAKAMOTO, Emi SHUTO (Tokushima Univ.)

【目的】

これまで我々は、スダチ果皮に含まれるポリフェノールが抗肥満・抗糖尿病作用を有していることを明らかにしてきた。一方で、人への応用を考えると、果皮全体の抽出物や果皮そのものを応用した方が簡便でかつ安価である。そこで本研究では、スダチ果皮エタノール抽出物をウエスタン食で飼育したマウスに与え、その作用を観察した。また、スダチ果皮の糖代謝への影響を健常人で検証を行った。

【方法】

（動物試験）8 週齢雌の C57BL/6 マウスに脂肪エネルギー比率 45%のウエスタン食を与え飼育を行った。スダチ果皮抽出物は混餌しマウスに与えた。糖代謝は、グルコースを経口的あるいはインスリンを経腹腔に投与を行い、経時的に血中グルコース濃度を測定することにより評価を行った。体重、内臓脂肪量、皮下脂肪量、体脂肪率の測定を行った。内臓脂肪から mRNA を抽出し qPCR により脂質代謝に関わる酵素、炎症マーカーおよび炎症性サイトカインの評価を行った。

（人試験）男女 30 人にスダチ果皮 6 g を含んだ糖液（75 g グラニュー糖）を飲んでもらい経時的に血糖の測定を行った。なお、試験はクロスオーバーで行った。

【結果・考察】

スダチ果皮抽出物を与えたマウスは、コントロールマウスに比べ有意に体重の減少が認められた。血清脂質（トリグリセリド、コレステロール、遊離脂肪酸）に関しては両群で差を認めなかった。インスリン負荷試験において、スダチ果皮抽出物を与えた群は、コントロール群と比べ有意な血糖値の低下が認められた。また、内臓脂肪における炎症性サイトカインである TNF-αは、スダチ果皮抽出物投与により発現低下が認められた。

すべての人をトータルで解析するとスダチ果皮は血糖上昇抑制作用を見いだすことができなかった。一方で、層別し 35 歳男性に限定して解析を行うと、スダチ果皮はコントロール群に比べ血糖上昇を抑制していた。

以上のことより、スダチ果皮成分およびスダチ果皮は糖代謝や体重増加抑制作用等の生活習慣病発祥予防に関わる食品成分である可能性が示唆された。

Sudachi, obesity, human study

発表責任者：酒井徹（sakai@tokushima-u.ac.jp）

発表番号：4E066
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラットにおける肥満誘導食への DFA III、ラフィノース添加の影響

# Impact of DFA III, raffinose supplemetation in high-fat/high-sucrose diet in rats

○古賀 俊希[1]、比良 徹[1]、高橋 敬典[2]、名倉 泰三[2]、内野 浩克[2]、原 博[1]（[1]北大院農・応生科、[2]日本甜菜製糖株式会社）
○Toshiki KOGA[1], Tohru HIRA[1], Keisuke TAKAHASHI[2], Taizo NAGURA[2], Hirokatsu UCHINO[2], Hiroshi HARA[1]（[1]Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., [2]Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd.）

【背景と目的】種々の難消化性糖質、オリゴ糖摂取により腸内環境への影響を伴った抗肥満、糖・脂質代謝改善作用などが報告されている。フラクトース 2 分子が環状に結合した Difructose anhydride Ⅲ（DFA Ⅲ）、またショ糖にガラクトースが結合したラフィノースに関して、ミネラル吸収、腸内細菌への影響が知られているが、肥満や糖・脂質代謝などへの影響は知られていない。本研究では DFA Ⅲ、ラフィノース（Raf）を添加した高脂肪高ショ糖食をラットに 8 週間摂取させ、血糖、脂肪蓄積への影響を検討した。
【方法】SD 系ラット（5 週齢、雄）を AIN-93G 標準食にて 1 週間馴化させた後、標準食を与えるコントロール群、高脂肪高ショ糖食（脂肪 30%、ショ糖 40%）を与える HFS 群、高脂肪高ショ糖食に 3%の DFA Ⅲまたはラフィノースを添加した飼料を与える HFS+DFA Ⅲ群、HFS+Raf 群に分けた。コントロール群は自由摂食とし、HFS 摂取の 3 群は摂取カロリーの最も低い群に合わせてペアフィーディングとした。試験 2、4、6 週に、一夜絶食後、経口糖負荷試験（OGTT）を実施した。8 週後に絶食下で解剖を行い、門脈血、腹部大動脈血、腸管組織、内臓脂肪組織（腸間膜脂肪、副睾丸脂肪、後腹膜脂肪）、肝臓、膵臓を採取した。
【結果と考察】HFS 食を与えた 3 群の中では、DFA Ⅲ添加群の摂食量が試験期間を通じて低く、この群の摂取量に合わせたペアフィーディングとなった。その結果、HFS 摂取 3 群の体重は、コントロール群に比べて有意な増加とはならなかった。解剖時の副睾丸脂肪重量は HFS 群でコントロール群に比べて増加したが、HFS+Raf 群では増加は見られなかった。耐糖能試験では、4 週目においてラフィノース群で、糖負荷後の血糖上昇の抑制が見られた。以上のことからラットにおいて、ラフィノースは高脂肪高ショ糖食摂取による内臓脂肪蓄積を抑制すること、DFA Ⅲは高エネルギー食の過食を抑制することで肥満を抑制することが示唆された。

DFA III, raffinose, obesity

発表番号：4E067
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# サケ白子由来血糖値上昇抑制ペプチドのヒト臨床試験での検証

# Clinical trial of salmon milt peptide on postprandial blood glucose levels

○鎌田 彰[1]、広瀬 あかり[1]、高橋 義宣[1]、山本 久[1]、西村 三恵[2]、西平 順[2] ([1]マルハニチロ、[2]北海道情報大学)
○ Akira KAMATA[1], Akari HIROSE[1], Yoshinori TAKAHASHI[1], Hisashi YAMAMOTO[1], Mie NISHIMURA[2], Jun NISHIHIRA[2] ([1]Maruha Nichiro Corporation, [2]Hokkaido Info. Univ.)

【目的】現代社会において生活習慣病、特に糖尿病は問題であり、健康な生活を送るためにも血糖値の管理は重要である。薬物療法に先立って、毎日の食事の中で生活習慣病の一次予防を行うことが自然、かつ有効な手段であると考えている。そこで、我々はインクレチン分解酵素 Dipeptidyl Peptidase-IV (DPP-IV) を阻害することで、インスリン分泌が維持され、血糖値上昇抑制効果を示すことに着目し、食経験を有する天然物、特に水産資源からの DPP-IV 阻害活性素材の探索を行った。その結果、サケ白子のプロテアーゼ加水分解物（サケ白子ペプチド）で高い DPP-IV 阻害活性を示すことを見出し、活性成分として 12 種のペプチドを同定した（2013 年農芸化学会発表)。今回、探索的にヒト臨床試験によるサケ白子ペプチドの食後血糖値上昇抑制効果を検証した。
【方法および結果】試験デザインは二重盲検クロスオーバーで実施した。空腹時血糖値が正常からやや高め（≦125 mg/dL）の男女 14 名（56.5±6.2 歳）にサケ白子ペプチド 1 日 500 mg を 1 週間摂取させた。最終日に糖負荷試験を行い、摂取前、糖負荷 30 分後、60 分後、90 分後及び 120 分後に採血を実施した。その結果、全体解析では被験食摂取時とプラセボ食摂取時の食後血糖値に有意差は認められなかった。2 型糖尿病の発症の一つにはインスリン分泌不全が関係することが知られているが、日本人を含むアジア人の 2 型糖尿病患者ではインスリン抵抗性（HOMA-IR）は正常範囲内の者が多い。そこで、HOMA-IR 値が 1.6 未満（正常範囲）の被験者において層別解析した結果、プラセボ食摂取時に比べて被験食摂取時で血糖値低下傾向を示した。
以上より、水産資源のサケ白子から得られる DPP-IV 阻害活性を示すペプチドは、インスリン抵抗性が正常範囲の方に対して、食後血糖値の上昇抑制効果があると考えられた。本サケ白子ペプチドは食品素材由来であり、また、少量でも効果を示したことから、幅広い食品への応用が可能であり、無理なく毎日の食事の中での予防が期待された。

DPP-IV inhibition, salmon milt peptide, HOMA-IR

発表番号：4E068
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# サケ鼻軟骨由来プロテオグリカンが血糖値および空腸グルコース吸収に及ぼす効果の検討

# Effects of salmon nasal cartilage proteoglycan on plasma glucose concentration and active glucose transport in the small intestine

○土谷 庸[1]、川俣 幸一[2]、富田 雅弘[1]、坪井 誠[3]、高橋 達治[3]、米塚 正人[4]（[1]東北女子大健康栄養、[2]東北生活文化大家政、[3]一丸ファルコス（株）、[4]（株）角弘プロテオグリカン研究所）
○Yo Tsuchiya[1], Koichi Kawamata[2], Masahiro Tomita[1], Makoto Tsuboi[3], Tatsuji Takahashi[3], Masato Tonezuka[4] ([1]Tohoku Women's College, [2]Tohoku Seikatsu Bunka Univ., [3]Ichimaru Pharcos, [4]Proteoglycan Lab. Kakuhiro)

【目的】

近年、サケ鼻軟骨より精製されたプロテオグリカンに様々な有用な生理的効果が明らかにされ、例えば、ヒト経口摂取における皮膚及び関節機能の改善が報告されている。一方で、生体グルコース代謝における効果は不明であった。本研究では、ラット血糖値上昇に対するサケ鼻軟骨由来プロテオグリカン（サケ PG）経口投与の効果を検討した。

【実験方法】

経時的な門脈血採血を行うため、麻酔下にて 9 週齢・雄ラット門脈内にカテーテル挿入した。その後、経口グルコース負荷試験を行うため、ラットにグルコース溶液（2g/kg）を胃ゾンデにて経口投与した。1%サケ PG 同時投与および非投与ラット群ともに、グルコース負荷後 30 分おきに門脈血および尾静脈血を採血し、血中グルコース濃度変化を 2 時間測定した。また単離したラット反転腸管標本にて、1%サケ PG 存在下および非存在下における空腸グルコース吸収量を測定した。さらにサケ PG のグルコース輸送機構がフロリジン感受性ナトリウム―グルコース共輸送体を介した機構であるかを、カロメル電極を用いて空腸反転腸管膜電位変化を測定した。

【結果および考察】

経口グルコース負荷試験において、1%サケ PG の同時投与は門脈血中および末梢血中のグルコース濃度上昇を有意に抑制させた。次に、このサケ PG による血糖値上昇抑制効果が小腸グルコース吸収の抑制によるものかを検討した。ラット反転空腸を用いた実験では、1%サケ PG はグルコース能動輸送量を有意に低下させた。また腸管膜間電位差測定実験においては、1%サケ PG 投与によりグルコース依存性及びフロリジン感受性電位変化上昇は有意に抑制された。以上の結果により、サケ PG は空腸フロリジン感受性ナトリウムーグルコース共輸送体 1（SGLT1）を介したグルコース能動輸送を抑制し、その作用は門脈および末梢血中グルコース濃度上昇の抑制効果に反映されている事が示唆された。

proteoglycan, plasma glucose level, SGLT1

発表責任者：土谷庸（ytsuchiya@tojo.ac.jp）

発表番号：4E069
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 多糖修飾ソバアルブミンの食後血糖値上昇抑制効果

# Suppressive effect of buckwheat albumin modified with polysaccharide on postprandial hyperglycemia

○中条 早紀、茂木 崇、稲 成信、赤尾 真、熊谷 日登美（日大・生資科・生化）
○Saki NAKAJO, Takashi MOGI, Shigenobu INA, Makoto AKAO, Hitomi KUMAGAI (Dept. Chem. Life Sci., Nihon Univ.)

【目的】ソバは他の穀類に比べ、タンパク質含量が高く、アミノ酸バランスも優れた食品素材の一つである。我々はこれまでに、ソバ種子中のアルブミン（BWA）が、昆虫および哺乳類のα-アミラーゼの活性を阻害すること、また、BWA がデンプン摂取時の食後血糖値の上昇を抑制することを明らかにしている。一方、多糖の中には、消化管内で分解されず、高分子のままの状態で、様々な物質を吸着し、その吸収を阻害する作用を持ったものがある。従って、そのような多糖と BWA を結合させ、α-アミラーゼ阻害作用と糖吸着作用の両方を併せ持った化合物を作製することができれば、より有効に食後血糖値の上昇を抑制できる可能性がある。そこで本研究では、メイラード反応により、BWA に多糖を修飾し、得られた多糖修飾 BWA の食後血糖値上昇抑制作用について検討した。
【方法】ソバ粉より pH 6.9 の緩衝液を用いてアルブミン画分を抽出後、硫酸アンモニウムによりタンパク質を沈殿させ、透析、凍結乾燥により BWA を得た。修飾の程度を検討するための多糖としては、分子量の異なるデキストラン、ローカストビーンガム、グアーガム、キサンタンガムを用いた。BWA と種々の多糖を重量比で１：３となるように混合し、水で溶解後、凍結乾燥した。凍結乾燥物を飽和ヨウ化カリウム存在下（水分活性 0.65～0.75）の密閉容器内で 24 から 72 時間、60℃で保存した。多糖の修飾の程度は、SDS-PAGE およびトリニトロフェニル（TNP）法による残存アミノ基の量から評価した。陰イオン交換樹脂を用いて未反応の多糖を除去し、多糖修飾 BWA を得た。ブタ膵臓由来α-アミラーゼを用い、多糖修飾 BWA のα-アミラーゼ阻害活性を評価した。次に、ラットに、BWA、ローカストビーンガム、ローカストビーンガム修飾 BWA をデンプンとともに経口投与し、その後、経時的に尾静脈から採血を行い、血糖値を測定した。
【結果】BWA はローカストビーンガムとは速やかに反応し、BWA 中のアミノ基の約 50 %が修飾された。SDS-PAGE においても分子量の増加が見られた。一方、その他の多糖は、72 時間経過後も BWA とほとんど結合しなかった。ローカストビーンガムで修飾することにより、BWA のα-アミラーゼ阻害活性は 48 時間までの反応時間では約 80%程度、72 時間の反応時間では約 70%に低下したが、依然高いα-アミラーゼ阻害活性を保持していた。デンプン負荷試験の結果、BWA、ローカストビーンガム、ローカストビーンガム修飾 BWA 投与のいずれも、食後 15 分における血糖値上昇を抑制した。ローカストビーンガム投与では、血糖値上昇のピークが投与後 15 分から 30 分に移行した。血中グルコース濃度曲線下面積は、ローカストビーンガム修飾 BWA 投与群が、他の群よりも有意に低くなった。

buckwheat albumin, polysaccharide modification, postprandial hyperglycemia

発表責任者：熊谷日登美（kumagai@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：4E070
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クルクミンによる GLP-1 分泌促進作用と血糖値制御

# Glycemic control by curcumin via stimulation of GLP-1 secretion.

○加藤 正樹[1]、池畑 秋穂[1]、谷 翼[1]、高橋 司[2]、今泉 厚[2]、津田 孝範[1] ([1]中部大・応生、[2](株)セラバリューズ)
○MASAKI KATO[1], AKIHO IKEHATA[1], TSUBASA TANI[1], TSUKASA TAKAHASHI[2], ATSUSHI IMAIZUMI[2], TAKANORI TSUDA[1] ([1]Chubu Univ., [2]Theravalues Corporation)

【目的】

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は腸管内分泌細胞（L 細胞）から分泌され、血中グルコース濃度に依存してインスリン分泌を促す消化管ホルモンである。演者らはこれまでに細胞レベルでのクルクミンの GLP-1 分泌促進作用を明らかにしている[1)]。本研究では、クルクミンの GLP-1 分泌促進作用機序と動物個体での立証を目的とした。

【方法】

マウス大腸由来の GLP-1 産生細胞株を定法に従い培養した後、クルクミンまたは種々のアンタゴニストを投与し、培地中へ分泌される Total GLP-1 濃度を ELISA により測定した。雄性 Sprague-Dawley ラット（7 週齢）に 0.9%NaCl またはクルクミン、高吸収性・高分散性のクルクミン製剤（セラクルミン；株式会社セラバリューズ）を経口前投与し、腹腔内グルコース負荷試験（IPGTT）及び門脈血を採取した。

【結果】

細胞レベルでの実験において、各種アンタゴニスト処理の結果から、クルクミンによる GLP-1 分泌促進作用にはある種の G タンパク質共役受容体が関与することを明らかにした。動物個体での検討では、クルクミンの経口投与は IPGTT 後の血糖値上昇を有意に抑制しなかった。一方吸収性・分散性に優れた「セラクルミン」の経口投与は IPGTT 後の血糖値上昇を有意に抑制し、門脈血中の活性型 GLP-1 濃度を有意に上昇させた。従ってセラクルミンは動物個体において GLP-1 の分泌を促し血糖値上昇を抑制することが明らかになった。現在、細胞、動物の評価系を用いてさらに詳細な解析を進めている。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435: 165-70 (2013)

Glucagon-like peptide-1, diabetes, curcumin

発表番号：4E071
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 高エネルギー食摂取が世代を越えて孫世代の糖尿病リスクに与える影響

# The effect of high energy diet intake on the risk of diabetes in the grandchild generation

○畠山 雄有、都築 毅（東北大院・農）
○Yu Hatakeyama, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【背景・目的】

肥満およびメタボリックシンドロームの予防は世界的な課題であり、その発症メカニズムに関する研究の重要性が高まっている。肥満発症の要因としてエネルギーの過剰摂取や運動不足が挙げられるが、近年、親世代の栄養状態も子の肥満発症リスクに大きな影響を与えることが明らかとなっている。以前我々が行った研究から、マウスに 3 世代にわたって高エネルギー食（HD）を与えた場合、後の世代ほど肥満進行が促進されることが明らかとなり、HD の影響が孫世代まで及ぶことが示唆された［1]。この結果を受け、HD 摂取による子孫への影響は「親から子へ」ばかりでなく、「親から孫へ」世代を飛び越えて影響する可能性が考えられた。そこで本研究では親世代（P 群）の HD 摂取が孫世代（F2 群）の肥満およびメタボリックシンドローム発症リスクに及ぼす影響についてマウスを用いて検討することとした。

【実験方法】

3 週齢の ICR マウスを HD で飼育し、8 週齢で一部を交配し、残りは 15 週齢で解剖した（P 群)。P 群の仔を離乳後コントロール食（CD）で飼育し、8 週齢で一部を交配し、残りは 15 週齢で解剖した（F1 群)。F1 群の仔を離乳後 HD で飼育し、15 週齢で解剖した（F2 群)。飼育期間中、体重と摂食量を測定した。また、血清と肝臓の各種パラメーターの測定、肝臓と脂肪組織の組織学的観察、肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量の測定を行い、P 群と F2 群を比較することで、HD が孫世代の肥満およびメタボリックシンドローム発症リスクに及ぼす影響を検討した。

【結果】

F2 群では HD を摂取したにも関わらず P 群よりも内臓脂肪の蓄積が弱く、体重の増加も見られなかった。さらに興味深いことに、血清糖代謝パラメーターにおいて、F2 群のオスで P 群よりも血糖値、血中インスリン濃度が増加し、インスリン抵抗性の指標である HOMA-IR が有意に高値であり、インスリン抵抗性が進行していることが明らかとなった。肝臓における糖・脂質代謝関連遺伝子の発現量を測定したところ、F2 群のオスでは、インスリン濃度が高いにも関わらず *Irs2* や *G6pdx* の発現が低値を示し、G6PDH の酵素活性も低値を示し、肝臓における糖・脂質代謝能が低下していることが明らかになった。以上より、HD 摂取は世代を飛び越えて孫世代の糖尿病発症リスクを高めることが示唆された。

[1]Tsuduki, T. et al., JNB, 2012.

Diabetes, DOHaD, mice

発表番号：4E072
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# フェネチルイソチオシアネートの糖新生抑制作用における ErbB3 の役割について
# The role of ErbB3 signal in anti-gluconeogenic activity by phenethyl isothiocyanate.

○鈴木 安沙美、伊藤 芳明、長澤 孝志 (岩手大農)
○Asami Suzuki, Yoshiaki Ito, Takashi Nagasawa (Iwate Univ.)

**【目的】**クレソンなどに含まれるイソチオシアネート化合物の一つであるフェネチルイソチオシアネート （PEITC）は抗ガン活性、抗酸化活性を有する物質として知られる。我々は、糖尿病モデルマウス KKA$^{y}$ において血糖値上昇抑制効果、ラット肝臓由来細胞 H4IIE において糖新生律速酵素 G6Pase の遺伝子発現抑制効果を明らかにした。また、その作用は細胞内シグナル分子である Akt, ERK を介している可能性を見出した。本研究では、新たに PEITC の刺激でリン酸化が誘導される 180kDa 付近に存在する分子（タンパク質 X）について検討を行い、PEITC の作用における関与を検討した。

**【方法･結果及び考察】**我々はタンパク質 X が EGF 受容体 family（約 180kDa）ではないかと推定し、H4IIE を PEITC 30μM で処理し、60 分後にそれら受容体のリン酸化応答を観察したところ、EGF 受容体 family のうち、ErbB3 のリン酸化が上昇することを認めた。また、H4IIE 及び動物の肝臓サンプルを用い、EGF 受容体 family の発現を測定した結果、H4IIE では ErbB3 が、動物の肝臓組織では EGFR, ErbB3 が発現していることを確認した。さらに、ErbB 阻害剤である CI-1033（CI）2.5μM で 30 分間前処理した後に PEITC 30μM を添加したところ、180kDa 付近のタンパク質のリン酸化が打ち消された。以上から、タンパク質 X は ErbB3 である可能性が高いと推定した。これまでに ErbB3 は Akt, ERK 活性を制御していることが報告されている。そこで CI で前処理後に PEITC による Akt と ERK のリン酸化応答を観察した結果、Akt のリン酸化のみが打ち消され、ERK のリン酸化は認められなかった。このことから、PEITC が活性化する ErbB3 は Akt を制御しているが、ERK に関しては制御が弱く、PEITC による ERK の活性化は、ErbB3 とは独立している可能性が高いと考えられた。さらに、ErbB3 と糖新生抑制効果との関係を明らかにすべく、CI と PEITC を同時に添加し糖新生に及ぼす影響を検討した。その結果、CI 処理で PEITC の糖新生抑制効果はほとんど阻害されなかった。このことから、PEITC の糖新生抑制効果の作用機序には、ErbB3 や下流の Akt のリン酸化よりも ERK のリン酸化が最も重要である可能性が考えられた。さらに、ErbB3 のリガンドである heregulin-β1 が糖新生抑制効果を持つか検討を行ったところ、PEITC と比べると効果は弱いが G6Pase の発現が抑制されることが明らかになった。このことから、ErbB3 の活性化も少なからず PEITC による糖新生抑制効果に関与している可能性が示唆された。

ErbB, isothiocyanate, gluconeogenesis

発表番号：4E073
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# スフィンゴミエリンによる培養筋管細胞における糖取り込み促進作用とその機構解析

# Mechanisms for the increased glucose uptake of L6 myotube cells by sphingomyelin

○吉田 佳穂里、譚 哲立、三浦 豊（東農工大）
○ Kahori YOSHIDA, Zheli TAN, Yutaka MIURA (Tokyo University of Agriculture and Technology)

【目的】 スフィンゴ脂質は細胞膜の構成成分として生物界に普遍的に存在しており、我々は日常的にスフィンゴ脂質を摂取している。スフィンゴ脂質の栄養機能に関する知見は限られているが、近年スフェンゴ脂質の機能性に関する報告が増えつつある。我々はスフィンゴ脂質の一つである食品由来スフィンゴミエリン (SPM) がラット筋管細胞においてグルコース取り込みに与える影響を検討した。また、コリン含有化合物である塩化コリン、ホスホコリン、グリセロホスホコリン、ホスファチジルコリンやセラミド含有化合物であるグリコシルセラミド、ラクトシルセラミドの作用を SPM と比較することにより、SPM の作用機構の一端を明らかにすることを試みた。
【方法】 ラット骨格筋由来 L6 筋芽細胞を 10 日間培養し、筋管細胞へと分化させた後、各サンプルを 0.25% FBS/D-MEM 培地に溶解し、あらかじめ 2 日間インキュベートした。グルコースを含まない KHH buffer で 2 時間インキュベート後、11mM グルコースを含む KHH buffer で 4 時間インキュベートした。インキュベート前後の培地中グルコース量の差を測ることによりグルコース取り込み量を測定した。細胞中の Glucose Transporter 4 (GLUT4) の量は、抗 GLUT4 モノクローナル抗体を用いたウエスタンブロッティングにより測定した。
【結果と考察】 SPM はラット骨格筋細胞においてグルコース取り込みを促進させた。また、セラミド含有化合物はグルコース取り込みを促進させる傾向がみられた一方で、コリン含有化合物では影響は見られなかった。これらのことから、グルコース取り込みの促進作用には SPM のコリン部分が関与している可能性は少なく、セラミド部分が関与している可能性が示唆された。加えて、SPM は GLUT4 の量を増加させた。このことから、SPM は GLUT4 の量を増加させることで、グルコース取り込みを促進させている可能性が示唆された。現在、SPM が GLUT4 の細胞膜上での局在に与える影響についても検討し、さらなる機構解析を試みている。

sphingomyelin, Glucose transporter 4

発表番号：4E075
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アミノ酸がパネト細胞αディフェンシンに与える影響

# Induction of Paneth cell α-defensin secretion by amino acid

○高桑 暁子[1,2]、中村 公則[2]、櫻木 直也[2]、綾部 時芳[2] ([1]天使大、[2]北大生命)
○ Akiko TAKAKUWA[1,2], Kiminori NAKAMURA[2], Naoya SAKURAGI[2], Tokiyoshi AYABE[2] ([1]Tenshi college, [2]Hokkaido Univ)

【背景･目的】パネト細胞は小腸陰窩の基底部に位置し，細菌刺激やカルバミルコリン刺激に反応して自然免疫の作用因子である抗菌ペプチドαディフェンシンを分泌する（Ayabe T et al.,*Nat Immunol* 2000). パネト細胞αディフェンシンはマウスでは cryptdin (Crp)1～Crp6，ヒトでは HD5 と HD6 がある. Crp は，病原菌を強く殺菌する一方で，常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず，腸内細菌に対して選択的な殺菌活性を持つ（Masuda K et al., *J Innate Immun* 2011). すなわち，パネト細胞αディフェンシンは腸内細菌を制御し，腸管の恒常性維持に貢献していることが明らかになった. 腸内細菌の制御に関しては，これまでに食物繊維やオリゴ糖などのプレバイオティクスが腸内細菌の構成および数を変化させることや，プロバイオティクスの作用などが知られている. われわれは，宿主が経口摂取した種々の栄養素をパネト細胞が識別してαディフェンシンの産生・分泌を変化させるという新たな可能性を考えた. 本研究は，栄養素が小腸のパネト細胞が分泌する Crp を介して自然免疫機能に与える影響を明らかにすることを目的とし，生体にとって基本的な栄養素でありながら食事から摂取しなければならない必須アミノ酸が Crp 分泌に与える作用について検討を行った.
【方法】CD1 マウスから EDTA 分離法により小腸陰窩を単離した. 小腸陰窩 $10^4$ 個をリン酸緩衝生理食塩水（PBS)，カルバミルコリンまたは 9 種類の必須アミノ酸（各 1μM)に 37℃，30 分間暴露し，各々の上清を採取した.上清に最終濃度が 30%になるよう酢酸を加え，分画分子量 1,000 Da 膜を用いて透析した後，凍結乾燥を行った. 得られた試料について，我々が樹立した抗 Crp1 sandwich ELISA (Nakamura K et al., *Anal Biochem* 2013)で Crp1 を定量した.
【結果】各必須アミノ酸の Crp1 分泌誘導能について, PBS をコントロールとして，分泌された Crp1 濃度の相対比で検討したところ，ロイシン，トリプトファンで顕著に Crp1 分泌の誘導が認められた. スレオニンは Crp1 分泌を誘導しなかった. その他のアミノ酸では，顕著な分泌誘導は認められなかった. 本研究により，食事に由来する必須アミノ酸の一部にパネト細胞からの Crp1 分泌誘導能を認めた. Crp1 分泌誘導の機序は未だ不明であるが，例えばロイシンはパネト細胞の mTOR シグナル伝達経路の活性化に関与するなどアミノ酸は腸管で多様な働きをする可能性が知られており，自然免疫はもちろん再生や代謝との関与が示唆された.

Paneth cell, amino acid, α-defensin

発表番号：4E076
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# テレメトリー法を用いた高血圧自然発症ラットにおけるアセチルコリン反復経口投与の抗高血圧作用評価

# Evaluation of anti-hypertensive effect of repeated orally administrated acetylcholine in spontaneously hypertensive rats by using telemetry

○中村 浩蔵[1]、渡辺 旭[1]、早崎 大輔[1]、小山 正浩[1]、猪狩 直樹[2]([1]信大農、[2]大和薬品（株））
○Kozo NAKAMURA[1], Akira WATANABE[1], Daisuke HAYASAKI[1], Masahiro KOYAMA[1], Naoki IGARI[2] ([1]Shinshu Univ., [2]Daiwa Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】 近年、我々は、ソバスプラウト乳酸発酵物の抗高血圧成分としてコリンエステル類（アセチルコリン（AcCh)、プロピオニルコリン、ラクトイルコリン）を同定した。本研究では、テレメトリー法を用いて血圧（動脈圧）および腎交感神経活動を測定し、最も代表的なコリンエステルである AcCh の高血圧自然発症ラット（SHR）への反復経口投与による血圧上昇抑制作用を評価した。テレメトリー法は、実験動物に埋め込んだセンサによる測定生体データを無線送信して記録する手法であり、無拘束・覚醒下の生体データを連続取得することができる。

【方法】 Millar 社製のセンサおよびテレメトリーシステムを用い、データの収録・解析を PowerLab で行った。信州大学動物実験委員会で承認された試験計画に基づき、まず、テレメトリーセンサ装着 SHR を作成した。麻酔下で SHR（雄性 10 週齢、日本チャールスリバー）の腹部大動脈に血圧センサを挿入し、腎交感神経に神経電位センサを取り付け、腹腔内にテレメトリーセンサを留置した。一週間の回復期間後、試験群には $10^{-8}$mol/kg の AcCh を、コントロール群には純水を毎日定時に経口投与し、テレメトリーセンサで測定された動脈圧および腎交感神経電位を 5 ms 毎に連続記録した。取得した動脈圧波形の上端と下端を、それぞれ収縮期および拡張期血圧とし、一定の閾値を超えた腎交感神経活動電位（スパイク）の回数をカウントし、一定期間の平均値を経時的にプロットした。また、動脈圧間隔から心拍変動解析を行い LF/HF(交感神経活動指標)、HF(副交感神経活動指標)を算出した。

【結果】 AcCh 投与群では、収縮期血圧、拡張期血圧および試験開始後の血圧変動値が、コントロール群と比べて低値を示し、低用量の AcCh 経口投与による血圧上昇抑制作用が確認された。また、AcCh 投与群の腎交感神経スパイク数が減少し、腎交感神経活動の低下が見られた。心拍変動解析では、LF/HF と HF に相補的な関係が見られたものの、血圧との明確な関連は見られなかった。腎交感神経活動によって放出されたノルアドレナリンは、副腎でアドレナリンに変換されて血中に放出され一過性の血圧上昇を引き起こす。そして、β刺激によってレニン分泌を促進し、レニン-アンジオテンシン系を活性化するため持続的な高血圧の一因と考えられている。本研究の結果は、AcCh 投与群の血圧上昇抑制と腎交感神経活動低下が連動していることを示しており、AcCh 経口投与が神経活動を介して血圧上昇を抑制している可能性が示唆された。

acetylcholine, telemetry, anti-hypertensive effect

発表責任者：中村浩蔵（knakamu@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4E077
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 発酵豆乳の単回飲用試験 －発酵による大豆イソフラボン吸収性の亢進－

# Intake of a fermented soymilk beverage containing moderate levels of isoflavone aglycones enhances bioavailability of isoflavones in healthy premenopausal Japanese women: a double-blind, placebo-controlled, single-dose, crossover trial

○梛野 崇之[1]、狩野 光芳[1]、増岡 範江[1]、加賀 千晶[1]、安部 慶憲[2]、志田 寛[1]、宮崎 幸司[1]、蒲池 桂子[3]、田中 明[3]（[1]ヤクルト本社中央研究所、[2]ヤクルト本社開発部、[3]女子栄養大学栄養クリニック）
○Takayuki NAGINO[1], Mitsuyoshi KANO[1], Norie MASUOKA[1], Chiaki KAGA[1], Michitoshi ANBE[2], Kan SHIDA[1], Kouji MIYAZAKI[1], Keiko KAMACHI[3], Akira TANAKA[3] ([1]Yakult Central Institute, [2]Yakult Honsha Co., Ltd., [3]Nutrition Clinic of Kagawa Nutrition Univ.)

**【背景】**大豆中イソフラボン（IF）の大部分を占める配糖体型 IF（IF 配糖体）は、摂取後、一部が腸内細菌等の β-グルコシダーゼによってアグリコン体型 IF（IF アグリコン体）に変換され、体内へ吸収される。一方、β-グルコシダーゼ活性を有する微生物で大豆を発酵させると IF 配糖体の一部は IF アグリコン体に変換される。よって、IF アグリコン体を多く含む発酵大豆製品は未発酵大豆製品よりも IF の吸収効率が高い可能性が考えられる。そこで、豆乳を *Lactobacillus casei* strain Shirota （LcS）で発酵させた発酵豆乳（FSM）について、IF の吸収性向上を検証するヒト単回飲用試験を実施した。

**【方法】**プラセボ対照二重盲検クロスオーバー法で実施した。すなわち、閉経前の健常女性 10 名（平均年齢 35.3 ± 11.0 歳）をランダムに 2 グループに分け、FSM またはプラセボ豆乳（SM）を各 1 本（100 ml）単回飲用させ、6 日間のウオッシュアウト後、クロスオーバーさせて飲用させた。FSM および SM の IF 含量を HPLC 法で測定し、飲用前、飲用 1, 2, 3, 4, 5 時間後の daidzein, genistein などの血中 IF 濃度を LC-MS/MS 法で測定した。解析は脱落した 3 名を除き、7 名で実施した。

**【結果および考察】**[1] アグリコン化率が 32.5%であった FSM では、同率が 0%の SM に比べて、血中の総 IF と daidzein の濃度が飲用 1、2、5 時間後に、血中 genistein 濃度が飲用 1、2 時間後に有意に高値であった。また、総 IF と genistein の AUC（血中濃度－時間曲線下面積）も、SM に比べて FSM でいずれも約 1.4 倍と有意に高かった。

[2] 各被験者を解析した結果、全被験者において総 IF 濃度に 2 峰性がみられ、飲用 1 時間後にみられた前半のピークについては、全被験者で SM 飲用時と比べて FSM 飲用時が高値を示した。一方、飲用 2 時間後以降にみられた総 IF 濃度の後半のピークについては、7 名中 5 名が FSM 飲用時で高値を示し、残り 2 名は SM 飲用時で高値を示した。さらに、後者 2 名は前者 5 名と比較して SM 飲用時の総 IF の AUC が高かった。

以上より、アグリコン化率が 32.5%の FSM は、SM と比べて飲用後の IF 吸収性が向上したものと考えられた。また、発酵による IF 吸収性の向上は、血中 IF 濃度の推移における 2 峰性の前半のピークで明確に認められ、とくに、SM 飲用時の IF 吸収能が低い被験者で顕著である可能性が示された。

**【結論】**LcS で発酵させた FSM は、SM と比べて飲用後の IF 吸収性が高いことが明らかになり、IF の各種効果が期待されやすいものと推察された。

**【文献】**Nagino T., et al. Biosci Microb Food Health, doi.org/10.12938/bmfh.2015-011.

isoflavone aglycone, fermented soymilk, bioavailability

発表責任者：梛野崇之（takayuki-nagino@yakult.co.jp）

発表番号：4E078
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# クロレラの健康機能に資する活性成分の探索

# Investigation of chlorella bioactive compounds

○井関 達也[1]、伊藤 隼哉[1]、樋口 央紀[2]、佐々木 将人[2]、堀籠 悟[3]、渡辺 章夫[3]、竹腰 英夫[4]、藤島 雅基[4]、大西 真人[4]、仲川 清隆[1]、宮澤 陽夫[5,6]（[1]東北大院農・機能分子解析、[2]（株）機能性植物研究所、[3]（一財）日本食品分析センター、[4]（株）サン・クロレラ、[5]東北大・未来科学技術共同研究センター、[6]東北大院農・食の健康科学ユニット）
○Tatsuya ISEKI[1], Junnya ITOU[1], Ouki HIGUCHI[2], Masato SASAKI[2], Satoru HORIGOME[3], Akio WATANABE[3], Hideo TAKEKOSHI[4], Masaki FUJISHIMA[4], Masato ONISHI[4], Kiyotaka NAKAGAWA[1], Teruo MIYAZAWA[5,6] ([1]Food Biodynamic Chemistry Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, [2]Biodynamic Plant Institute Co., Ltd., [3]Japan Food Research Laboratories, [4]Sun Chlorella Corporation, [5]New Industry Creation Hatchery Center (NICHe), Tohoku University, [6]Food and Health Science Research Unit, Tohoku University)

【背景】クロレラは単細胞性緑藻類の一種で、大量培養が可能となって以来、サプリメントなどとしての活用が広がっている。タンパク質や脂質、ビタミンが豊富に含まれることから、免疫賦活や抗炎症、脂質代謝改善などの作用が示唆されているが、活性成分や作用機構については不明な点が多い。そこで本研究では、①クロレラを種々の方法で抽出・分画し、②マウスマクロファージ様細胞株 RAW264（免疫賦活・抗炎症モデル）および、③マウス脂肪前駆細胞 3T3-L1（脂質代謝モデル）に供して、クロレラの免疫賦活・抗炎症・脂質代謝改善に資する活性成分の探索と同定を目指した。

【方法と結果】①クロレラ原末に水あるいは熱水を加え、水抽出物と熱水抽出物を得た。熱水抽出物は限外濾過に供し、4 つの画分（分子量 100,000～300,000、10,000～100,000、3,000～10,000、3,000 以下）に分画した。②これらの抽出物と分画物（0.1～30 μg/mL）を培地に加えて RAW264 を 24 時間培養し、産生される一酸化窒素（NO）の量を評価することで、NO 産生誘導作用（免疫賦活）を調べた。その結果、分子量 3,000 以下画分の活性は低く、他の抽出物と分画物には活性が認められ、特に分子量 100,000～300,000 と 3,000～10,000 画分にはフコイダンに匹敵する強い作用があることがわかった。一方、RAW264 への LPS 刺激により NO 産生を亢進させ、この NO 産生の抑制能（抗炎症）を評価したが、いずれの抽出物と分画物にも活性は認められなかった。③抽出物と分画物（1～100 μg/mL）を培地に加えて 3T3-L1 を 7 日間培養し、脂肪細胞へ分化誘導後にトリグリセリド量を測定して、脂肪蓄積抑制作用を調べた。その結果、分子量 3,000 以下と 100,000～300,000 画分の活性は低く、熱水抽出物と分子量 3,000～10,000 画分には強い活性が認められた。以上のように、分子量 3,000～10,000 画分は、強い NO 産生誘導と脂肪蓄積抑制作用をともに示すことが示唆された。そこで、再現性確認およびクロレラ原末のロットの違いの影響を知る目的で、あらためて分子量 3,000～10,000 画分を調製し、現在、その活性評価と成分分析を進めている。加えて、DNA チップやリアルタイム PCR による遺伝子発現解析で作用機構を調べる予定である。

chlorella, immunostimulation, lipid metabolism

発表番号：4E079
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 福井県伝統野菜類のラジカル産生抑制活性ならびに肝脂肪蓄積抑制効果の検討

# Inhibitory effects of traditional edible plants in Fukui on phagocyte radical production and lipid accumulation in hepatocytes

○古矢 康久[1]、松原 竜之典[1]、小林 恭一[2]、村上 茂[1]、高橋 正和[1]([1]福井県大生物資源、[2]福井県食品加工研)
○ Yasuhisa Furuya[1], Ryunosuke Matsubara[1], Kyoichi Kobayashi[2], Shigeru Murakami[1], Masakazu Takahashi[1] ([1]Fukui Pref. Univ., [2]Fukui Pref. Food Process. Res. Inst.)

【目的】食細胞は活性酸素種(ROS)やフリーラジカルを産生し，生体防御に利用しているが，慢性炎症状態では過剰な ROS やラジカル類が産生され，各種炎症性疾患の原因となる．福井県では古くから栽培されている伝統野菜が 20 種以上報告されているが，健康機能解析は十分とは言えない．そこで本研究では福井県伝統野菜抽出物について，ラジカル産生抑制活性の検討を行うとともに，さらに昨今報告数が増加している非アルコール性脂肪肝障害(NAFLD)に対する改善効果を検討することを目的とした．

【方法】福井県伝統野菜など 23 作物のアセトン抽出物を調製し，エバポレーター濃縮後に水ー酢酸エチル分配後，食細胞に対するラジカル産生抑制活性を検討した．大腸菌由来 LPS 刺激によって誘導される RAW264 細胞の一酸化窒素(NO)ラジカル過剰産生は, Griess 試薬で比色定量した. スーパーオキシドアニオン($O_2^-$)については，TPA 刺激によって誘導される DMSO 分化 HL-60 細胞の $O_2^-$ 産生系を利用し，WST-1 を用いて産生量を比色定量した．また NAFLD 細胞モデルには HepG2 肝細胞株を用い，脂肪酸添加によって誘導される細胞内脂肪蓄積をオイルレッド O で染色した．2-プロパノールにより抽出されたオイルレッド O を比色定量して脂肪蓄積抑制活性を評価した．さらに、ICR マウス（5 週令）に基本飼料に牛脂 20%とコール酸ナトリウム 0.4%を添加した高脂肪食を 2 週間自由摂食させて脂肪肝を誘発し，この間に供試サンプルを投与して肝脂肪蓄積抑制効果を検討した．

【結果】各種伝統野菜アセトン抽出物の NO 産生抑制活性を解析した結果，酢酸エチル画分は顕著な活性を示し，特に板垣大根などアブラナ科野菜には強い NO 産生抑制活性が認められた．50%阻害濃度($IC_{50}$)を示す抽出物量を 1 unit として，作物 100 g の活性量(U/100 g-作物)を比較した結果，板垣大根や穴馬カブラは一般作物(他県産)の 2～5 倍強い活性を示すと判明した. さらに白茎ゴボウや黒河マナなどにも強い活性が認められた．$O_2^-$についても穴馬カブラと板垣大根に顕著な産生抑制活性が認められた．

さらに板垣大根抽出物は脂肪酸誘導性の HepG2 細胞脂肪蓄積を抑制することが示された．またアブラナ科植物の機能成分として代表的な各種イソチオシアネートについても同様の活性が認められた．さらに ICR マウスにベンジルイソチオシアネート（BITC）の i.p.投与によって高脂肪食による肝臓への脂肪蓄積に対して抑制傾向が認められた．

nitric oxide, NAFLD, traditional edible plant

発表責任者：高橋正和（mastak@fpu.ac.jp）

発表番号：4E080
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

湿式微粒子化装置を用いたフコイダンの低分子化

Preparation of a series of different molecular weight fucoidan samples using a wet pulverizing system

○武部 静香[1]、鈴木 志保[1]、クリステンセン ビヨン[2]、湯口 宜明[3]、北村 進一[1] ([1]大阪府大院 応用生命、[2]ノルウェー科学技術大学、[3]大阪電気通信大学)

○Shizuka TAKEBE[1], Shiho SUZUKI[1], Bjorn.E Christensen[2], Yoshiaki YUGUCHI[3], Shinichi KITAMURA[1] ([1]Osaka Prefecture Univ., [2]NTNU, [3]Osaka Electro-Communication Univ.)

フコイダンは、褐藻などに含まれる硫酸化したL-フコースを主な構成糖とする多糖である。フコイダンの一次構造には多様性があり、褐藻の種類によって構成糖、結合様式、硫酸基置換度、分子量が異なる。一方、フコイダンには抗ガン作用や抗凝固作用など生理活性があることが報告されているが、構造－活性相関の詳細な解明には至っていない。これまでに *Cladosiphon novae-caledoniae* 由来フコイダンの腸管免疫賦活活性を見出している。本研究では、腸管免疫賦活活性に及ぼす分子量の影響を調べるために、分子量の異なる試料の調製を行い、同時に一次構造解析を行った。

一次構造解析では、構成糖分析、$^1$H-NMR 測定を行った。重量平均分子量（$M_w$）は、SEC-MALLS 測定により算出した。低分子化処理では、0.5%フコイダン水溶液（20 ml） を湿式微粒子化装置（Star Burst mini HJP-25001H、スギノマシン）を用いて処理し[1)]、処理圧力（100 MPa、245 MPa）と処理回数（1、5、10、20、30 pass）による、$M_w$への影響を調べた。この結果に基づき、0.5%フコイダン水溶液 100 ～ 300 ml を処理して低分子化試料を調製した。さらに GPC カラム(Sepheacryl S-500 HR, 20cm I.D.×77cm)を用いて、$M_w$ ＝ 880,000 と 313,000 の試料を分画した。C3H/HeJ マウスを用いた腸管免疫賦活活性測定は既報[1,2)]に従った。

一次構造解析の結果、構成糖のモル比は Fuc: Gal: Glc: Man: GlcA= 46: 19: 18: 13: 2 であり、主に→3)-α-L-Fuc*p*-4-*O*-$SO_3^-$-(1→から成り、 α-D-GlcA*p*-(1→、アセチル基を含むことが分かった。低分子化処理前の $M_w$は 880,000 であったが、処理圧力の増加に伴って $M_w$が低下し、分子量分布は狭くなった($M_w/M_n$=1.1 以下)。処理回数が 5 pass までに $M_w$は大きく低下したが、それ以上の処理回数では $M_w$はある一定の値に収束した(245 MPa-30 pass では $M_w$ = 50,000 程度)。100 MPa-1 pass の処理により $M_w$ = 313,000、$M_w/M_n$ = 1.07、245 MPa-20 pass の処理により $M_w$ = 61,000、$M_w/M_n$ =1.04 の試料を調製した。GPC カラムで分画し、$M_w$ ＝ 880,000 の試料から、$M_w$ ＝ 1,164,000～260,000、$M_w$ ＝ 313,000 の試料から、$M_w$ ＝ 913,000～67,000 の分子量分布の狭い試料（$M_w/M_n$ =1.07 以下）を調製した。

(1) Suzuki, S.; Ono, M.; Toda, T.; Kitamura, S. *J. Appl. Glycosci. in press*.
(2) Suzuki, S.; Christensen, B.E.; Kitamura, S. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 629.

fucoidan, a wet pulverizing system, molecular weight

発表責任者：北村進一（skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4E081
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アルコール性胃炎はエビアレルギーリスクを増大させる可能性がある

# Alcoholic gastritis may enhanced the shrimp allergy risk

臼井 将勝、○新井 健太、田邉 真悠、森田 夏妃、杉浦 義正、宮崎 泰幸（水大校・食品科学）
Masakatsu USUI, ○Kenta ARAI, Mayu TANABE, Natsuki MORITA, Yoshimasa SUGIURA, Taiko MIYASAKI (Fisheries Univ.)

【目的】エビの主要アレルゲンであるトロポミオシンは胃粘膜上皮細胞を介して体内に吸収されることが報告されている。ゆえに，胃粘液や胃粘膜によって形成される胃内壁バリア機構の破綻はエビアレルギーに影響をおよぼすことが予想される。他方で，空腹時の高濃度アルコール摂取は胃粘膜を傷害することが知られている。そこで本研究では，BALB/c マウスを用いてエビアレルギーモデルを作製し，エビアレルギーの重篤化に対するアルコール性胃炎の影響について検討した。

【方法】エビアレルギーモデルマウス（BALB/c，メス，7 週齢）は，クルマエビトロポミオシン（Pen j 1）とコレラトキシンの反復経口投与により作製した。各マウスの感作レベルは，血清中の Pen j 1 特異的 IgE 量を Sandwich ELISA によって測定し確認した。アルコール性胃炎はエビアレルギーモデルマウスを 6 時間絶食させたのちに 25% EtOH 150 μL を経口投与して誘導し，1 時間経過後に実験に供した。エビアレルギー重篤化に対するアルコール性胃炎の影響は，エビアレルギーモデルマウスを EtOH + Pen j 1 投与群，Pen j 1 投与群，Control 群に分けて検討した（n=3）。Pen j 1 600 μg または HBSS のみを 300 μL 経口投与し，その後 90 分間アレルギー症状を観察した。さらに 5 日後に尾部静脈より血清を得て Pen j 1 特異的 IgE 量を Sandwich ELISA によって測定した。

【結果】4 回の Pen j 1 とコレラトキシンの共投与ののちに，すべてのエビアレルギーモデルマウスにおいて Pen j 1 特異的 IgE 量の増加が確認された。エビアレルギー重篤化に対するアルコール性胃炎の影響について検討した結果，EtOH + Pen j 1 投与群と Pen j 1 投与群においてチャレンジ 20 分後から 90 分後の間に鼻や頭，頸部のスクラッチ行動が観察され，EtOH + Pen j 1 投与群に一部では活動低下も確認された。さらにチャレンジ 5 日後の血清中 Pen j 1 特異的 IgE 量も EtOH + Pen j 1 投与群と Pen j 1 投与群で増加が確認され，増加レベルは EtOH + Pen j 1 投与群でより顕著であった。

shrimp allergy, alcoholic gastritis, tropomyosin

発表責任者：臼井将勝（usuim@fish-u.ac.jp）

発表番号：4E082
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ヒト腸上皮細胞株 Caco-2 における牛乳カゼインの取り込みと細胞内分解およびペプチド断片の放出
# Uptake, intracellular degradation and peptide-fragment release of milk casein by monolayers of intestinal epithelial Caco-2 cells

○櫻井 那央、秋山 友香、西尾 俊亮、大島 健司、灘野 大太、松田 幹（名大院・生命農学）
○Nao Sakurai, Yuka Akiyama, Syunsuke Nishio, Kenzi Oshima, Daita Nadano, Tsukasa Matsuda (Grad. Sch. of Bioagr., Nagoya Univ.)

【背景と目的】食物アレルギーの原因となるのは主にタンパク質抗原であり、未分解のタンパク質や抗原性を有したペプチドが腸管から吸収され、アレルギー症状を引き起こす。牛乳の主要タンパク質であるカゼイン(CN)は、消化性に優れた食品タンパク質であるが、牛乳アレルギーにおける主要アレルゲンとしても知られている。牛乳中では主に三種類のタンパク質(αs1-CN,β-CN,κ-CN)から成るミセルとして存在するが、このようなナノ粒子状の抗原が腸管から吸収される機構は明らかにされていない。本研究では、CN の腸管における吸収機構を明らかにすることを目的として、CN の腸上皮様細胞株(Caco-2)による取り込みおよび細胞内消化と、その後の消化産物の放出について解析した。
【方法】Caco-2 細胞を多孔性膜上で培養した *in vitro* 腸上皮様モデルを用い、タンパク質抗原として CN と比較対照のオボアルブミン(OVA)を同時に頂端側溶液に添加し培養した。その後細胞層を免疫染色して、細胞内の抗原を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、同様に CN のみを頂端側に添加し培養した後、CN を含まない培地に交換し再び培養した。その後頂端側および基底側の培養液を回収し、限外濾過膜(MWCO:10 kDa)により分画した。10 kDa 以上の画分をトリプシン消化し、10 kDa 以下の画分は直接 nano-LC- MALDI-TOF/TOF-MS により質量分析を行った。
【結果】Caco-2 細胞により取り込まれた CN と OVA の細胞内分布において、両タンパク質とも細胞質に蛍光シグナルが検出されたが、OVA では頂端近傍のみであるのに対し、CN は基底側近傍でも観察された。また、頂端側に CN を添加した後に細胞から基底側および頂端側に放出されたタンパク質とペプチドを質量分析法により解析した結果、10 kDa 以上の画分においては頂端側培養液からβ-CN の断片(Val185-Arg198)とαs2-CN の断片(Tyr115-Pro129)が検出され、基底側培養液からαs1-CN の断片(His23-Arg37)が検出された。また、10 kDa 以下の画分からは、基底側にβ-CN の Gln209-Val224 の間のいずれかで切断された断片が複数検出された。以上の結果より、Caco-2 細胞により取り込まれた CN は細胞内消化を受け、10 kDa 以下だけでなく 10 kDa 以上の大きな断片(あるいは未分解 CN)が細胞の基底側へ放出されること、また 10 kDa 以上の大きな断片は頂端側へも放出されることが明らかになった。基底側に放出される 10 kDa 以下のペプチド断片により、あるいは本来は頂端側に再放出される 10 kDa 以上の断片(あるいは未分解 CN)が細胞極性の変調等で基底側に放出されることにより、アレルギー症状が誘発される可能性が示唆された。

milk allergy, intracellular degradation, intestinal epithelial cell

発表責任者：松田　幹（tmatsuda@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4E083
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸管免疫系細胞におけるインターロイキン-5 産生に与える腸内共生菌の影響

# Influence on interleukin-5 production in gut immune cells by stimulation of intestinal commensal bacteria.

○畑井 俊哉[1]、上滝 隆太郎[2]、於 鉄峥[1]、高橋 恭子[1]、八村 敏志[2]、細野 朗[1]([1]日大生資科・食品生命、[2]東大院農生科・食の安全研究セ)
○ Syunya HATAI[1], Ryutaro KOTAKI[2], Tie Zheng YU[1], Kyoko TAKAHASHI[1], Satoshi HACHIMURA[2], Akira HOSONO[1] ([1]Nihon Univ., [2]Univ of Tokyo.)

【目的】哺乳類の腸管には腸内細菌が共生しており、宿主の免疫系の発達や炎症制御反応に関与している。また、腸内細菌のバランスと特定の疾患との関連性が見出され、近年注目を集めている。腸管免疫応答において、この腸内細菌と免疫グロブリン A (IgA)抗体産生が相互に制御し合うことが明らかにされている。さらに、近年は IgA 産生誘導作用を有するインターロイキン－5 (IL-5)を多量に産生する細胞である 2 型自然リンパ球 (ILC2) が見つかり注目されている。そこで本研究では、腸内共生菌の加熱死菌体や菌体細胞壁構成成分が腸管免疫系細胞の IL-5 産生に与える影響を調べ、腸管内における共生菌の役割を解明することを目的とした。

【方法】BALB/c マウスの小腸パイエル板を摘出し、$Pam_3CSK_4$, LPS, およびマウス腸内細菌分離株の *Bacteroides* 加熱死菌体, *Lactobacillus* 加熱死菌体と 6 時間または 3 日間共培養した。そして培養後の細胞についてフローサイトメトリーによる細胞フェノタイプおよび細胞内 IL-5 産生細胞割合の解析、さらに ELISA 法による培養上清中の IL-5 量の定量を行った。

【結果】パイエル板細胞中の ILC は腸内細菌の加熱死菌体の刺激によって IL-5 産生細胞割合が上昇する一方で菌体細胞壁構成成分である $Pam_3CSK_4$ や LPS による刺激に対しては変化が認められなかった。しかし、パイエル板細胞全体の IL-5 産生量は腸内細菌の死菌体, $Pam_3CSK_4$ および LPS 何れの刺激によっても増加した。

【考察】以上の結果から、パイエル板 ILC2 の IL-5 産生は、腸内共生菌の菌体刺激により増強されるものの、菌体細胞壁構成成分の単独の刺激では、その作用が十分でないと考えられた。
ILC2 が腸内細菌に応答して IL-5 を介して IgA の誘導に関わる可能性が考えられる。

Gut assosiated lymphoid tissue, Intestinal commensal bacteria, Gut immunology

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E084
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アトピー性皮膚炎モデル NC/Nga マウスにおける アルキルリン脂質摂取による症状改善効果
# Effect of the alkyl phospholipid intake in NC/Nga mouse

○西向 めぐみ[1]、鈴木 卓弥[2]、山崎 裕也[3]、小池 誠治[3]([1]岩大農、[2]広大院生物圏、[3]（株）ADEKA)
○Megumi NISHIMUKAI[1], Takuya SUZUKI[2], Yuya YAMAZAKI[3], Seizi KOIKE[3] ([1]Iwate Univ., [2]Hiroshima Univ., [3]ADEKA Co.)

【目的】リン脂質サブクラスの一種であるプラスマローゲン（Pls）は、そのラジカル消去能による抗酸化作用とともに、近年では、様々な臓器において、その減少が疾病に関与していることが明らかになってきている。我々はこれまで、体内 Pls 増加物質の検討を行ない、ラットにおいて、アルキル型リン脂質（AlkPL）の摂取が血中の Pls を増加させることを明らかにしてきた。また、ヒト正常皮膚細胞 NHEK への Pls の添加により、皮膚バリア機能の指標の一つである経上皮抵抗値の上昇、および、タイトジャンクション（TJ）タンパク質の増加が見られたことを発表してきた（2014 年第１回アジアオレオサイエンス会議)。そこで今回は、皮膚バリア機能の低下が要因の一つとされているアトピー性皮膚炎のモデルマウスを用い、AlkPL を摂取させることにより体内 Pls 濃度を増加させ、その時の皮膚 TJ バリア機能および病態への影響を検討した。
【方法】NC/Nga マウス(アトピー性皮膚炎モデルマウス、雄性、８週齢)を用い、頸背部にビオスタ AD（ダニ抗原）を塗布することで皮膚炎を誘導した。抗原塗布開始と同時に、AlkPL 含有食または比較対照として基本食（AIN93-G に準拠）を３週間摂取させた。抗原塗布をしない無発症群も設けた。１週間ごとに症状スコアをチェックし、３週間目に解剖を行い、腹部大動脈血と皮膚を採取した。分析は、血中・皮膚中の Pls および AlkPL 濃度、皮膚中の TJ タンパク質の測定を行なった。
【結果と考察】症状スコアには食餌による有意な差はみられなかった。血中 Pls 濃度は皮膚炎発症により有意に低下した。AlkPL の摂取で n-6 系脂肪酸のアラキドン酸（AA）が結合した Pls の分子種は有意に減少したが、n-3 系脂肪酸のドコサヘキサエン酸（DHA）またはエイコサペンタエン酸（EPA）が結合した分子種は有意に増加した。一方、皮膚中の Pls 濃度は皮膚炎発症により増加し、その増加は AA が結合した分子種によるものであった。しかし、血中と同様、AlkPL の摂取により、皮膚中の n-6/n-3 比は減少した。皮膚中の TJ タンパク質は、皮膚炎発症により、Occludin が有意に減少し、AlkPL の摂取によって、Claudin-1 が増加傾向にあった。
以上、皮膚炎の発症で AA 結合型の Pls が増加したが、AlkPL 摂取により AA と n-3 系脂肪酸との入れ替えが見られたこと、また、皮膚炎発症群において AlkPL 摂取による皮膚 TJ タンパク質の増加傾向が見られたことにより、アトピー性皮膚炎発症時には AlkPL の摂取が炎症緩和、TJ 機能強化につながることが示唆された。

alkyl phospholipids, atopic dermatitis

発表番号：4E085
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Notch シグナル阻害による食物アレルギーの症状の軽減

# Alleviation of symptoms associated with experimental food allergy by inhibition of Notch signaling

○中野 信浩[1]、本庄 明日香[1]、西山 千春[1,2]、大塚 宜一[1]、清水 俊明[1]、奥村 康[1]、小川 秀興[1]（[1]順天堂大院・医、[2]東京理科大・基礎工）
○ Nobuhiro NAKANO[1], Asuka HONJO[1], Chiharu NISHIYAMA[1,2], Yoshikazu OHTSUKA[1], Toshiaki SHIMIZU[1], Ko OKUMURA[1], Hideoki OGAWA[1] ([1]Juntendo Univ., [2]Tokyo Univ. of Sci.)

【背景】IgE 依存性食物アレルギーでは、食物抗原の摂取により消化器症状やアナフィラキシーを含む多彩な症状が惹起される。これらの症状の発症には腸管粘膜に存在する粘膜型マスト細胞が中心的な役割を果たしている。IgE 依存性食物アレルギーでは腸管粘膜においてマスト細胞数の顕著な増加が見られ、また粘膜型マスト細胞数と消化器症状やアナフィラキシーの重要度が相関していることから、腸管粘膜のマスト細胞は食物アレルギー治療の有力なターゲットである。しかしながら、粘膜型マスト細胞の分化や腸管粘膜に集積するメカニズムはよくわかっていない。
【目的】我々は *in vitro* の実験系において、マスト細胞表面に発現する受容体 Notch を介したシグナルが粘膜型マスト細胞の分化・成熟を促進することを明らかにしている。本研究では、実験的食物アレルギーマウスモデルを用いて、Notch シグナル阻害剤の投与が粘膜型マスト細胞の発生を阻害し、食物アレルギーの症状を軽減できるかどうか検討した。
【方法】まず、マウス骨髄由来マスト細胞を Notch リガンド存在下で培養し、Notch シグナル阻害剤であるγ-セクレターゼ阻害剤 DAPT 処理が粘膜型マスト細胞への分化を阻害するかどうかを確認した。次に、IgE 依存性食物アレルギーマウスモデルを作製し、エフェクターフェーズにおける DAPT 投与が腸管粘膜のマスト細胞数及び食物アレルギーによって誘発される症状に与える影響を検討した。
【結果】マウス骨髄由来マスト細胞を Notch リガンド存在下で培養すると粘膜型マスト細胞マーカー分子及び腸管粘膜に存在する免疫細胞に特徴的な接着分子の発現が誘導されたが、DAPT 処理はこれらの発現を阻害した。食物アレルギーマウスモデルに対する DAPT 投与は、食物抗原の経口摂取によって誘発されるアレルギー性下痢の発生割合を低下させ、直腸温の低下も有意に軽減させた。さらに、DAPT 投与は小腸及び上行結腸粘膜に集積するマスト細胞数も有意に低下させた。
【結論】食物アレルギーマウスモデルに対する Notch シグナル阻害剤の投与は腸管粘膜に集積するマスト細胞を減少させ、食物アレルギーの症状を軽減させた。Notch シグナル阻害は粘膜型マスト細胞の分化及び分化に伴って誘導される接着分子の発現を抑制し、結果として腸管粘膜に定着するマスト細胞が減少したと考えられる。

Notch signaling, Mast cell, Food allergy

発表責任者：中野信浩（nbnakano@juntendo.ac.jp）

発表番号：4E086
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 経口免疫寛容において誘導される CD62L$^{high/int}$CD44$^{int}$ および CD62L$^{low}$CD44$^{high}$ T 細胞の遺伝子発現・機能解析

# Functional and gene expression analysis of CD62L$^{high/int}$CD44$^{int}$ and CD62L$^{low}$CD44$^{high}$ T cells induced in oral tolerance

○芝原 恭子[1,2]、門岡 桂史[3]、片倉 喜範[3]、田邊 康祐[1]、塩河 亜弥[1,2]、村上 仁[4]、細野 朗[4]、上野川 修一[4]、足立(中嶋) はるよ[2]、八村 敏志[1,2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]九大院農院、[4]日大生資科・食品生命)
○Kyoko SHIBAHARA[1,2], Keishi KADOOKA[3], Yoshinori KATAKURA[3], Kousuke TANABE[1], Aya SHIOKAWA[1,2], Hitoshi MURAKAMI[4], Akira HOSONO[4], Shuichi KAMINOGAWA[4], Haruyo NAKAJIMA-ADACHI[2], Satoshi HACHIMURA[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Fac. Agri., Kyushu Univ., [4]Dept. Food Bioscience Biotechnol., Nihon Univ.)

【背景および目的】　経口的に摂取した抗原に対する免疫応答は、経口免疫寛容という現象によって抑制される。この現象は食物アレルギーの発症を抑制していると考えられることから、食物アレルギーの治療法・予防法を開発するうえで、経口免疫寛容の誘導メカニズムを理解することは非常に重要である。経口免疫寛容の成立は抗原特異的 T 細胞に依存しており、当研究室ではこれまでその T 細胞サブセットの解析を進めてきた。経口免疫寛容誘導時の抗原特異的 T 細胞が、CD62L と CD44 の発現によって CD62L$^{high/int}$CD44$^{int}$ T 細胞(62Lint 細胞)と CD62L$^{low}$CD44$^{high}$ T 細胞(62Llow 細胞)に分画されることをすでに報告した。どちらのサブセットも抑制活性を有するが、62Llow 細胞で特に抑制活性が高い。また、脾臓や腸間膜リンパ節では 62Lint 細胞が多く存在する一方で、小腸粘膜固有層では 62Llow 細胞が多く存在する。本研究では、これらのサブセットが経口免疫寛容の成立に寄与するメカニズムの解明を目的として、遺伝子発現および機能の解析を行った。
【方法および結果】　抗原特異的 T 細胞を詳細に解析するために、Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスを用いた。このマウスでは卵白アルブミン(OVA)特異的 T 細胞抗原レセプター遺伝子が導入されており、すべての T 細胞が OVA 特異的となる。Rag2$^{-/-}$DO11.10 マウスに OVA 含有水を 7 日間自由摂取させ、経口免疫寛容を誘導した。滅菌水で維持したマウスをコントロール群として用いた。セルソーターを用いて、コントロール群の脾臓もしくは腸間膜リンパ節より CD62L$^{high}$CD44$^{low}$ T 細胞(62Lhigh 細胞)を分離し、OVA 投与群より同様に 62Lint および 62Llow 細胞を分離した。
DNA マイクロアレイによって、62Lhigh、62Lint および 62Llow 細胞の遺伝子発現を解析したところ、細胞の遊走に関与するケモカイン経路において有意に遺伝子発現の変動が見られた。そこで、リンパ球のホーミングレセプターの発現をリアルタイム PCR を用いて解析した。その結果、ケモカインレセプターの遺伝子である *Ccr6* について、62Lhigh および 62Lint 細胞に対して、62Llow 細胞で有意に発現が上昇していることが示された。そこでトランズウェルプレートを用いて CCR6 のリガンドであり、腸管で発現が報告されている CCL20 に対する遊走活性の評価を行った。その結果、62Llow 細胞で、62Lhigh および 62Lint 細胞に対して遊走活性が高い傾向が認められた。以上のことから、抑制活性の高い 62Llow 細胞が CCR6 を介して小腸に遊走し、腸管における免疫応答を抑制している可能性が示唆された。

oral tolerance, intestinal immunity, chemokine receptor

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E087
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ロコモティブシンドロームに対するフラバンジェノールの多面的効果（関節炎および変形性関節症に対する作用メカニズムの違い）

# Pleiotropic action of flavangenol against locomotive syndrome (flavangenol has different mechanisms against on collagen induced arthritis and osteoarthritis)

○佐藤 敬、鍔田 仁人、友澤 寛、森川 琢海、上野 栞、池口 主弥（株式会社東洋新薬）
○Kei Sato, Masahito Tsubata, Hiroshi Tomozawa, Takumi Morikawa, Shiori Ueno, Motoya Ikeguchi (TOYOSHINYAKU co.,ltd.)

【背景・目的】リウマチや変形性関節症を基礎疾患の一つとする運動器障害（ロコモティブシンドローム）は単に行動を制限されるだけでなく、歩行困難、寝たきりなど患者の QOL を著しく低下させ、結果として健康寿命低下の要因となっている。また、傷害された軟骨組織の病変はほとんどが不可逆的であることから、疾患の予防、生活の質向上を目的とする健康日本 21 を達成するにあたり、ロコモティブシンドロームを予防することは必須であると考えられる。
当社が開発しているフラバンジェノール® (FG)はフランス海岸松の樹皮から抽出される機能性食品素材である。FG はカテキンが 2-4 個重合したオリゴメリック・プロアントシアニジンなど抗酸化作用を有する成分を多く含み、現在までに抗肥満作用、脂質異常症改善作用、抗炎症作用など、多くの機能性を持つことが報告されている。そこで当社は、ロコモティブシンドロームに対する FG の有効性を評価するため、変形性関節症モデルおよびコラーゲン誘発関節炎モデルラットを作製し、FG の有効性およびそれぞれの関節炎モデルラットに対する作用との比較・検討を行なった。
【方法】モノヨードアセテート（MIA）誘発変形性関節症モデル：8 週齢雄性 SD ラットの関節腔内へ MIA を投与し、その日から 1 日 1 回 250mg/kg FG の経口投与を行なった。FG 投与 7 または 14 日目に下肢疼痛評価および関節組織の病理学的評価を行なった。コラーゲン誘発関節炎モデル：8 週齢雌性 DA ラットに II 型コラーゲン溶液と Freund's 不完全アジュバンドを混合したエマルジョンを皮下投与し、関節炎を発症させた。このコラーゲン誘発関節炎モデルラットに 0.3 または 1%FG 含有飼料を 28 日間自由摂取させた。28 日目に生化学検査および膝関節の病理学的評価を行なった。軟骨細胞を用いた FG の有効性評価：ヒト軟骨細胞株をアスコルビン酸による分化誘導後、IL-1alpha により刺激し、FG を添加後の MMP1, 3 の発現測定を行った。
【結果】FG 投与は変形性関節症ラットにおいて MIA 投与 7 日後の下肢疼痛、関節病変を有意に改善させた。また、コラーゲン誘発関節炎ラットでも関節病変の改善が確認され、血中 NO 濃度の低下が認められた。また、FG は IL-1alpha で刺激された軟骨細胞に対し、MMP1, 3 の発現を抑制した。
【考察】以上の結果から、フラバンジェノールは両動物モデルにおいて関節病変の初期段階に作用しているものの、コラーゲン誘発関節炎には抗炎症作用、変形性関節症には軟骨細胞の機能改善作用とそれぞれ異なるメカニズムで作用していることが明らかとなった。

Pine Bark Extract, proanthocyanidine, locomotive syndrome

発表責任者：鍔田　仁人（tsubatam@toyoshinyaku.co.jp）

発表番号：4E088
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 抗原の経口感作により誘導される気管支関連リンパ組織の T 細胞応答の解析

# Analysis of T Cell responses induced by dietary antigen in bronchus-associated lymphoid tissues

○高橋 輝、鞍田 汐莉、生井 千裕、半澤 直行、津田 真人、細野 朗（日大生資科・食品生命）
○Akira TAKAHASHI, Shiori KURATA, Chihiro NAMAI, Naoyuki HANZAWA, Masato TSUDA, Akira HOSONO (Nihon Univ.)

**【目的】** 食品アレルギーの発症は将来的な喘息のリスクを増加させることが知られている。しかしながら、抗原の経口感作により誘導される気管支関連リンパ組織の免疫応答は十分に明らかにされていない。本研究では、食品アレルギーモデルマウスである卵白オボアルブミン（OVA）特異的 T 細胞受容体トランジェニックマウス（OVA23-3 マウス）を用いて、OVA の経口摂取により誘導される気管支関連リンパ組織の抗原特異的 T 細胞応答を、腸管および全身免疫系と比較し解析を行った。

**【方法】** 食品アレルギー応答を誘導するために、雄の OVA23-3 マウスに 20%卵白含有飼料、対照として 20%カゼイン含有飼料をそれぞれ 1 週間自由摂取させた。両群のマウスから全身免疫系の脾臓、腸管免疫系のパイエル板、気管支関連リンパ組織の肺を採取し、細胞調製した。各組織由来の細胞を OVA 刺激下で 48 時間培養し、細胞培養上清中のサイトカイン（IL-2、IL-4、IL-5、IL-13、IFN-γ）産生量を ELISA 法により定量した。また、フローサイトメーターを用いて、各組織の T 細胞のフェノタイプを解析した。

**【結果】** 卵白含有飼料の摂取によって、脾臓やパイエル板の細胞は、Th2 型のサイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）産生が増加し、Th1 型のサイトカイン（IL-2、IFN-γ）産生が減少する Th2 型サイトカイン応答へのシフトが確認された。肺細胞も同様に、卵白含有飼料の摂取により、Th2 型サイトカイン産生の増加と Th1 型サイトカイン産生の低下のパターンを示した。脾臓やパイエル板に比べて肺細胞では、特に、IL-4、IL-5 の高産生を示した。フローサイトメトリーによる解析から、肺細胞は脾臓、パイエル板細胞と同様に、卵白含有飼料の摂取により、$CD4^+$細胞中の $CD62L^{high}CD44^{low}$ 集団が減少し、$CD44^{high}CD62L^{low}$ 集団が増加した。すなわち、ナイーブ T 細胞から感作型 T 細胞への分化が観察された。さらに、制御性 T 細胞のマスター転写因子である Foxp3 やその抑制性分子である CTLA4 の発現の増加も観察された。以上から、食品アレルギー誘導時においては、腸管免疫系のみならず、気管支関連リンパ組織である肺の T 細胞においても経口抗原に対する感作が惹起され、Th2 型の免疫応答を誘導していることが示唆された。

food allergy, bronchus-associated lymphoid tissue, T cell respose

発表番号：4E089
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* MCC1849 による濾胞性ヘルパーT 細胞誘導機構の *in vitro* 解析

# *In vitro* analysis of T follicular helper cells induced by *Lactobacillus paracasei* MCC1849

○糸賀 翔大[1,2]、上滝 隆太郎[1,2]、佐藤 風太[1,2]、芝原 恭子[1,2]、新井 聡[3]、岩淵 紀介[3]、清水（肖）金忠[4]、阿部 文明[3]、八村 敏志[1,2]（[1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]森永乳業・素材研、[4]森永乳業・基礎研）

○Shota Itoga[1,2], Ryutaro Kotaki[1,2], Futa Satou[1,2], Kyoko Shibahara[1,2], Satoshi Arai[3], Noriyuki Iwabuchi[3], Jin-zhong Xiao[4], Fumiaki Abe[3], Satoshi Hachimura[1,2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Food Ingredients Technology Inst., Morinaga Milk Industry Co., Ltd., [4]Next Generation Sci. Inst., Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【目的】腸管における感染防御や腸内細菌の制御には IgA 抗体が重要な役割を果たしている．その産生には濾胞性ヘルパーT 細胞（Tfh）が関わっており，腸内細菌によっても誘導されることが知られている．当研究グループでは *Lactobacillus paracasei* MCC1849 をマウスに経口投与することにより抗原特異的 IgA 抗体産生が誘導され，その際小腸パイエル板（PP）において Tfh が増加することを見出した．さらに，*in vitro* における樹状細胞，T 細胞，B 細胞の共培養系において，CpG 存在時に MCC1849 を添加することで CpG による Tfh 様細胞（$CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^{high}$）誘導能が増強されることも明らかにしている．今回は共培養系における mRNA 発現，およびサイトカイン産生量を解析し，MCC1849 による Tfh 誘導機構について調べた．

【方法】BALB/c マウス PP より樹状細胞として $CD11c^+$ 細胞，脾臓（SPL）より B 細胞として $IgM^+$ 細胞，また DO11.10TCR トランスジェニックマウス SPL より T 細胞として $CD4^+$ 細胞を，それぞれ MACS 法により精製した．その樹状細胞，B 細胞，T 細胞を OVA 抗原ペプチド，CpG（TLR9 リガンド），および MCC1849 菌体の存在下で共培養した．培養 2 日後の mRNA 発現を RT-PCR 法により，培養 3 日後の細胞をフローサイトメトリーにより，培養上清を ELISA 法により解析した．

【結果】PP 樹状細胞，SPL T 細胞，SPL B 細胞の CpG 存在下での共培養に MCC1849 を添加することにより Tfh 様細胞（$CD4^+CXCR5^+PD\text{-}1^{high}$）が誘導され，このとき，Tfh の機能をつかさどる転写因子である B-cell lymphoma 6 protein（Bcl-6）の mRNA 量 が上昇していた．また，Tfh 誘導に関わるサイトカインである IL-6，IL-12p40 産生量が上昇した．これらのことから，MCC1849 が腸内細菌による刺激と協調して Tfh 細胞を誘導し，その誘導には IL-6，IL-12 が関与する可能性が示唆された．

intestinal immunity, Tfh, *Lactobacillus*

発表責任者：八村敏志（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E090
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 野沢菜抽出物を摂取したマウスにおける免疫賦活効果の解析

# Oral administration of *Brassica rapa* L. extract enhances NK activity and IFN-gamma production in mice

○田中 沙智、山本 佳奈、古屋 花暖、山田 和輝、大角 友紀、高橋 楓香、浜島 知里（信大農）
○Sachi TANAKA, Kana YAMAMOTO, Kanon FURUYA, Kazuki YAMADA, Yuki OHGAKU, Fuka TAKAHASHI, Chisato HAMAJIMA (ShinshuUniv)

【目的】感染症はウイルスや細菌などの病原体が体内に侵入して増殖することが原因で引き起こされる疾病であり、発熱や下痢などの諸症状を伴う。特に免疫機能が低下している乳児や高齢者では、感染症で致死的な状況になることもあり、免疫機能を適切に維持して、感染症を予防することが重要である。また、ストレスや睡眠不足、食生活の乱れなどにより免疫機能が低下するため、日頃の食生活において感染症予防に寄与する食材を摂取することが簡便かつ効果的であると考えられる。平均寿命が男女ともに全国でトップとなった長野県で生産される野菜をスクリーニングした結果、野沢菜（*Brassica rapa* L.）において著しい免疫賦活効果を *in vitro* の実験で確認した。そこで本研究では、信州の伝統野菜の 1 つであり、アブラナ科の植物である野沢菜に着目して、マウス生体内における免疫賦活効果を明らかにすることを目的とした。

【方法】野沢菜をオートクレーブ処理と遠心分離することにより、熱水抽出物を調製した。調製した野沢菜抽出物を C57BL/6 マウスに 7 日間経口投与した。コントロールには、200 μL の水を経口投与した。投与後、野沢菜摂取による免疫機能の変化を調べるために、マウスの脾臓細胞を単離し、以下の実験に用いた。NK 活性を測定するために、ターゲット細胞として CFSE でラベルした YAC-1 細胞を使用し、脾臓細胞と YAC-1 細胞の共培養を行った。その後、PI による染色を行い、YAC-1 細胞の死細胞の割合をフローサイトメーターにより解析した。また、野沢菜抽出物を経口投与したマウスの脾臓細胞にリポポリサッカライド（LPS）、あるいはコンカナバリン A（Con A）をそれぞれ添加して培養を行い、培養後の上清中に含まれる IFN-γ産生レベルを ELISA にて測定した。

【結果と考察】マウスに野沢菜抽出物を 7 日間経口投与し、マウスの脾臓細胞を YAC-1 細胞と共培養して NK 活性を解析したところ、野沢菜抽出物を経口投与したマウスはコントロールのマウスに比べて NK 活性が有意に増加した。また、樹状細胞を活性化させ、NK 細胞からの IFN-γ産生を促す LPS で脾臓細胞を刺激したところ、野沢菜抽出物を摂取させたマウスはコントロールのマウスに比べて IFN-γ産生が著しく増加した。一方、T 細胞の活性化を促す Con A で脾臓細胞を刺激したところ、IFN-γ産生レベルはコントロール群と野沢菜摂取群で有意な違いは見られなかった。以上の結果より、野沢菜抽出物は生体内においても NK 活性の増強と IFN-γ産生増加を特徴とする免疫賦活効果があることが示された。我々はこれまでに、野沢菜抽出物により樹状細胞が活性化し、NK 細胞からの IFN-γ産生が増強することを *in vitro* の実験で証明している。そのため、野沢菜抽出物を摂取することで、生体内においても IFN-γを介して樹状細胞と NK 細胞が活性化されることが示唆された。

NK activity, IFN-gamma, *Brassica rapa* L.

発表番号：4E091
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大腸リンパ組織における制御性 T 細胞フェノタイプ特性の解析

# Analysis of property of regulatory T cells in large intestinal lymphoid tissue

○村木 悠平[1]、小熊 俊生[1]、津田 真人[1]、於 鉄峥[1]、沓掛 優香[1]、八村 敏志[2]、高橋 宣聖[3]、高橋 恭子[1]、上野川 修一[1]、細野 朗[1]([1]日大生資科・食品生命、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]感染研・免疫)

○Yuhei MURAKI[1], Toshiki OGUMA[1], Masato TSUDA[1], Tetsuzen OH[1], Yuka KUTSUKAKE[1], Satoshi HACHIMURA[2], Yoshimasa TAKAHASHI[3], Kyoko TAKAHASHI[1], Shuichi KAMINOGAWA[1], Akira HOSONO[1] ([1]Nihon Univ., [2]The University of Tokyo, [3]Department of Immunology, NIID)

【目的】

腸管内には膨大な数と種類の細菌が共生しており、腸管免疫系の発達や恒常性の維持に大きく寄与している。腸管の中でも大腸内にはより多くの腸内細菌が存在していることから、大腸部位の免疫系は小腸部位の免疫系に比べて、腸内細菌からより強い影響を受けていること考えられる。特に、大腸では膨大な腸内細菌に対して過剰な炎症反応を抑える免疫制御システムが備わっているのではないかと考えられる。本研究では大腸部位に存在するリンパ組織の免疫応答の特徴を明らかにすることを目的として、T細胞フェノタイプの解析を行った。

【方法】

通常環境下で飼育した雌性10～12週齢のBALB/cマウスから腸管免疫系リンパ組織として、小腸パイエル（Peyer's patches: PP）、盲腸リンパ節（Cecal patches: CeP）、結腸リンパ節（Colonic patches: CoP）、腸間膜リンパ節（Mesenteric Lymph Node: MLN）、脾臓(SPL)のそれぞれの細胞を調製し、フローサイトメトリーによりCD4$^+$ T細胞に発現する細胞表面及び細胞内分子の解析を行った。

【結果】

PP 細胞に比べて CoP 細胞では、CD4$^+$細胞中の CD62L$^{high}$CD44$^{low}$ ナイーブ T 細胞集団の割合が高く、CD44$^{high}$CD62L$^{low}$ 感作型 T 細胞集団の割合が低かった。さらに、活性化 T 細胞を表す CD4$^+$細胞中の CD69$^+$細胞の割合も低かった。また、PP 細胞に比べて CoP 細胞では、CD4$^+$細胞中の制御性 T 細胞マーカーでもある Foxp3$^+$と CTLA-4$^+$細胞の割合が低かった。特に、CTLA-4 発現に着目すると、CoP 細胞には PP 細胞に比べて、CTLA-4$^+$CD25$^-$細胞画分や CTLA-4$^+$Foxp3$^-$細胞画分の割合が低かったことから、Foxp3$^+$CD25$^+$制御性 T 細胞以外の CTLA-4 を発現する CD4$^+$ T 細胞の割合が低いことが示唆された。しがたがって、結腸部位に存在する CoP では小腸部位の PP よりも、ナイーブなタイプの CD4$^+$ T 細胞が多い特徴を示し、制御性 T 細胞の特性も PP とは異なる可能性が考えられた。

colonic patches, peyer's patches, regulatory T cells

発表番号：4E092
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

パイエル板樹状細胞は T 細胞の IL-21 遺伝子発現を誘導する.
Peyer's Patch Dendritic Cells Induce IL-21 Gene Expression of T Cells.
○上滝 隆太郎[1,2]、糸賀 翔大[1,2]、石井 俊祐[3]、輪島 隼一[1,2]、芝原 恭子[1,2]、高橋 恭子[3]、上野川 修一[3]、細野 朗[3]、八村 敏志[2] ([1]東大院農生科・応生化、[2]東大院農生科・食の安全研セ、[3]日大生資科・食品生命)
○ Ryutaro KOTAKI[1,2], Shota ITOGA[1,2], Shunsuke ISHII[3], Shun-ichi WAJIMA[1,2], Kyoko SHIBAHARA[1,2], Kyoko TAKAHASHI[3], SHUICHI KAMINOGAWA[3], Akira HOSONO[3], Satoshi HACHIMURA[2] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. Tokyo, [2]Res. Cent. Food Safety, Univ. Tokyo, [3]Dept. Food Bioscience Biotechnology, Nihon Univ.)

**【背景・目的】** 腸管には多数の共生細菌が存在しており、この腸内細菌叢の構成の乱れは炎症性疾患や肥満など様々な病態に関わることが明らかとなってきている。さらに、腸管は経口的に侵入してくる病原菌に頻繁に曝される。このような腸内の細菌叢を適切に制御するメカニズムの一つとして、腸管免疫系は抗原特異的な IgA 抗体を管腔へと分泌している。

抗原特異的な抗体産生には、リンパ組織の B 細胞領域で起こる胚中心応答が重要な役割を果たす。小腸に点在するリンパ組織であるパイエル板では、腸管外のリンパ組織と異なり、定常状態で胚中心構造が観察される。このパイエル板胚中心応答は腸内細菌に対する IgA 産生の誘導に大きく関わっていると考えられる。

胚中心応答では濾胞ヘルパーT (T follicular helper; $T_{FH}$) 細胞と呼ばれる T 細胞サブセットがはたらくことが知られている。一般に T 細胞は樹状細胞による抗原提示を受けて活性化される。そこで本研究では、パイエル板樹状細胞が $T_{FH}$ 細胞の誘導に関わるか、T 細胞との共培養系における $T_{FH}$ 細胞関連遺伝子の発現誘導能を、全身免疫系に属する脾臓の樹状細胞と比較しながら検討した。

**【方法・結果】** まずパイエル板 $T_{FH}$ 細胞の誘導に樹状細胞が関わるか検討するため、樹状細胞マーカーとして CD11c を用い、BALB/c マウスのパイエル板もしくは脾臓の $CD11c^+$ 細胞と DO11.10 マウス脾臓の $CD4^+$ 細胞 (卵白アルブミン特異的 T 細胞) を MACS 法により精製、抗原ペプチド存在下で培養し、qPCR により遺伝子発現誘導を比較した。結果、パイエル板 $CD11c^+$ 細胞は脾臓 $CD11c^+$ 細胞と比べて、$T_{FH}$ 細胞に特徴的なサイトカイン IL-21 の遺伝子の発現を高く誘導した。一方、$T_{FH}$ 細胞誘導にはたらく転写因子 Bcl-6, c-Maf の遺伝子発現に差は見られなかった。

パイエル板 $CD11c^+$ 細胞は $CD19^-$ 樹状細胞と $CD19^+$ B 細胞を含む。そこで IL-21 誘導について、これらの細胞を蛍光セルソーターにより分離して同様な実験を行ったところ、$CD19^-$ 樹状細胞のみが高い IL-21 遺伝子発現誘導能を示した。

**【考察】** 以上の結果より、樹状細胞がパイエル板における $T_{FH}$ 細胞誘導において、IL-21 の産生に関わることが示唆された。誘導された $T_{FH}$ 細胞は、胚中心応答にはたらき、IgA 抗体を通して腸内細菌叢を適切に制御すると考えられる。樹状細胞は腸内の抗原を積極的に取り込み T 細胞活性化にはたらくため、この樹状細胞を標的とした食品やプロバイオティクスなどにより $T_{FH}$ 細胞、IgA 応答、ひいては腸内細菌叢を制御できる可能性が示唆された。

T follicular helper cell, Peyer's patch, dendritic cell

発表責任者：HACHIMURA Satoshi（ahachi@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E093
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 抗原刺激下におけるエリオジクチオールの制御性 T 細胞分化およびサイトカイン応答への影響

# Effect of eriodictyol on regulatory T-cell differentiation and cytokine response of antigen-stimulated T cells

○松田 幸、青木 綾子、戸塚 護（東大院農生科・応生化）
○Miyuki MATSUDA, Ayako AOKI, Mamoru TOTSUKA (Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. of Tokyo)

【目的】制御性 T 細胞（Treg）は T 細胞応答を抑制し、過剰な免疫応答を制御することで免疫寛容および免疫恒常性を維持する役割を担っている。これまでに私たちは植物由来食品因子の Treg 分化誘導作用に着目し、柑橘類に含まれるフラバノンであるナリンゲニンおよびエリオジクチオールが、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体による刺激下でマウス脾臓 $CD4^+$T 細胞の Treg への分化を誘導することを明らかにした。一方で、ナリンゲニンは $CD4^+$T 細胞と樹状細胞の共培養条件下では樹状細胞にも作用することで Th17 細胞への分化を誘導することも報告している。そこで本研究では、T 細胞に対するより自然な刺激である抗原提示細胞による抗原刺激下において、エリオジクチオールがマウス脾臓 $CD4^+$T 細胞の Treg 分化およびサイトカイン産生に与える影響を解析した。

【方法】卵白アルブミン（OVA）特異的 T 細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスである DO11.10 マウスの脾臓由来 $CD4^+$ $CD62L^+$未分化 T 細胞を、エリオジクチオールの存在下で、BALB/c マウス脾臓由来の抗原提示細胞（$Thy1^-$細胞）および OVA323-339 ペプチドと共に培養した。培養後の T 細胞における Treg 特異的転写因子 Foxp3 および各種サイトカインの発現をフローサイトメトリーにより解析した。また、培養後の T 細胞を回収して再刺激した後、培養上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法により測定した。

【結果】エリオジクチオールは、$CD4^+$ $CD62L^+$未分化 T 細胞を刺激した場合と同様に、抗原提示細胞を用いて抗原刺激した場合も、$Foxp3^+CD4^+$T 細胞（Treg）を増加させる効果を示した。ナリンゲニン添加時には Th17 細胞への分化が促進されたのに対し、エリオジクチオールは IL-17 産生量及び IL-17 産生 T 細胞（Th17）の割合には影響を及ぼさなかった。また、Th2 応答の指標である IL-4 の産生量および IL-4 産生 T 細胞（Th2）の割合を濃度依存的に減少させた。これらの結果より、エリオジクチオールは抗原提示細胞による抗原刺激条件下において Treg を誘導し、同時にアレルギーの発症・増悪方向に働く Th2 応答を抑制することが示唆された。

regulatory T cell, eriodictyol, cytokine response

発表責任者：戸塚護（atotuka@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E094
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸内細菌により誘導される miR-21-5p は腸管上皮機能を調節する

# miR-21-5p is induced by commensal bacteria and regulates the function of intestinal epithelial cells

○中田 一彰、高橋 恭子、杉 由高、小早川 哲朗、楢林 ひかり、花澤 重正、津田 真人、細野 朗、上野川 修一（日本大学生物資源科学部）
○ Kazuaki NAKATA, Kyoko TAKAHASHI, Yutaka SUGI, Tetsuro KOBAYAKAWA, Hikari NARABAYASHI, Shigemasa HANAZAWA, Masato TSUDA, Akira HOSONO, Shuichi KAMINOGAWA (Nihon Univ. College of Bioresource Sciences)

［目的］

近年、腸内細菌叢とアレルギーや炎症性腸疾患等の様々な疾患との関係が明らかにされてきている。これらの疾患においては、腸内細菌叢のバランスの破綻、免疫システムの変調、腸粘膜バリア機能の低下や上皮透過性の亢進とそれによる炎症の誘導・憎悪が観察される。このような観点から、腸内細菌による宿主細胞の機能制御の分子機構を明らかにすることは、これらの疾患の予防や治療のための標的分子の同定につながると考えられる。本研究では特に、腸内細菌が腸管上皮細胞(IEC)における miRNA の発現にどのように影響を及ぼし、上皮機能を調節するかを明らかにすることを目的とした。これまでに、通常マウスと無菌マウスの比較から、腸内細菌が IEC における miRNA の発現に影響を及ぼすことを報告し、腸内細菌により発現が誘導される miRNA として miR-21-5p を同定している。そこで、腸内細菌による miR-21-5p の発現調節機構及び IEC における miR-21-5p の役割について解析を行った。

［方法］

ヒト IEC 株 SW480 を LPS、Pam3CSK4、マウス由来腸内細菌分離株の *Bacteroides acidifaciens* type A43 および *Lactobacillus johnsonii* 129 加熱死菌体で刺激し、miR-21-5p の発現量を定量 RT-PCR により解析した。さらに、MyD88 ドミナントネガティブ変異体を過剰発現させて同様の解析を行った。また、ヒト IEC 株 Caco-2 に miR-21-5p インヒビターを導入して Transwell インサート膜上にて培養し、上皮透過性を経皮電気抵抗（TER）試験により継時的に測定した。

［結果］

SW480 細胞における miR-21-5p の発現は、使用した菌体成分リガンドおよび加熱死菌体のいずれによっても上昇した。さらに、MyD88 ドミナントネガティブ変異体を過剰発現させることにより、無処理の細胞およびコントロールベクターを導入した細胞と比較して菌体刺激による miR-21-5p の発現誘導が抑制される傾向が観察された。したがって、IEC における miR-21-5p の発現は菌体成分により誘導されることが示された。また、その経路の少なくても一部は MyD88 依存的であることが示唆された。一方、Caco-2 細胞に miR-21-5p インヒビターを導入することによりコントロールインヒビターを導入した場合と比べて TER が有意に増加した。以上の結果から、腸内細菌の菌体成分が IEC における miR-21-5p の発現誘導を介して腸管上皮の透過性の制御に関わると考えられた。

microRNA, intestinal epithelial cell, commensal bacteria

発表責任者：高橋恭子（ktaka@brs.nihon-u.ac.jp）

発表番号：4E095
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

河内晩柑果皮水溶性抽出物の抗炎症作用に関する研究
Anti-inflammatory effect of water-soluble extract from the peel of Kawachi bankan (*Citrus maxima*)

○竹國 千尋[1]、西 甲介[1]、福田 直大[2]、玉井 敬久[2]、菅原 卓也[1,3] ([1]愛媛大・農、[2]愛媛県・産技研、[3]愛媛大・農・食品健康科学研究センター)
○ Chihiro TAKEKUNI[1], Kosuke NISHI[1], Naohiro FUKUDA[2], Takahisa TAMAI[2], Takuya SUGAHARA[1,3] ([1]Faculty of Agriculture, Ehime Univ., [2]Ehime Institute of Industrial Technology, [3]Food and Health Sciences Research Center, Ehime Univ.)

【目的】河内晩柑（*Citrus maxima*）は、愛媛県で生産される主要な柑橘類の一つであり、果皮部分にクマリン類の一種であるオーラプテンを豊富に含むことを特徴とする。オーラプテンには、脂質代謝改善効果や肝臓内中性脂肪抑制効果など、メタボリックシンドロームに対する効果があることが知られている。また、これまでの我々の研究で、リンパ球の抗体やサイトカイン産生を促進する一方[1)]、マクロファージに対しては、抗炎症効果を示すことが明らかになっている。しかし、果皮の水溶性成分の機能性についてはあまり報告がない。そこで、河内晩柑果皮水溶性成分のマクロファージに対する作用を明らかにすることを本研究の目的とした。
【方法】河内晩柑果皮を凍結乾燥後、微粉末化したものを 0.1 g/mL となるように 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、10℃で 20 時間抽出した。遠心により不溶物を除去した後、pH 7.4 に調整し、フィルター滅菌したものを、河内晩柑果皮水溶性抽出物(KPE)として実験に使用した。マウス由来マクロファージ様細胞株である RAW264.7 細胞を、グラム陰性菌細胞膜成分であるリポ多糖（LPS）で刺激することで炎症性応答を誘導し、KPE の抗炎症効果を検討した。炎症性サイトカインの定量には酵素抗体法、一酸化窒素（NO)の定量には Griees 法、細胞毒性の評価には WST-8 法、遺伝子発現への影響にはリアルタイム RT-PCR 法、シグナル伝達因子への影響にはウエスタンブロット法を用いて検討した。また、生体内における効果については、BALB/c マウスに対し KPE を 7 日間経口投与した後、腹腔内に LPS を投与することで全身性炎症反応症候群（SIRS）を誘導した。その後、採血し、血中サイトカイン量を酵素抗体法により定量した。
【結果】KPE は細胞毒性を示すことなく、RAW264.7 細胞の IL-6、および TNF-α産生量を有意に抑制し、NO 産生も有意に抑制した。また、炎症性サイトカイン、および NO の産生抑制効果は遺伝子発現の抑制によるものであることが明らかになった。そこで、シグナル伝達因子に与える影響について検討したところ、NF-κB の核内移行の抑制、および p38 のリン酸化を抑制することが示唆された。培養細胞により、KPE は抗炎症作用を有することが示唆されたため、生体内での KPE の抗炎症作用について SIRS モデルマウスを用いて検討したところ、100 mg/kg/day の投与により、血中 IL-6 はコントロールレベルの約 5 分の 1、TNF-αは 4 分の 1 程度へ、有意に抑制された。これらの結果から、KPE は生体内においても抗炎症作用を示すことが明らかになった。

1) Nishimoto, S. et al. J. Funct. Foods 4, 883-890 (2012)

anti-inflammatory effect, Kawachi bankan peel, macrophage

発表責任者：菅原卓也（mars95@ehime-u.ac.jp）

発表番号：4E096
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ロタウイルス増殖抑制活性に関与する牛乳ラクトフォリンの分子構造の特定

# The identification of molecular structures of bovine milk latophorin involvement in anti-rotavial activity

○稲垣 瑞穂[1]、大野 翔平[1]、小林 純子[2]、山田 佳太[3]、金丸 義敬[1]、中込 とよ子[4]、中込 治[4]、鈴木 徹[1] ([1]岐阜大応生、[2]北大院医、[3]大阪大谷大薬、[4]長崎大院医歯薬)

○ Mizuho INAGAKI[1], Shouhei Ohno[1], Junko KOBAYASHI[2], Keita YAMADA[3], Yoshihiro KANAMARU[1], Toyoko NAKAGOMI[4], Osamu NAKAGOMI[4], Tohru SUZUKI[1] ([1]Gifu Univ., [2]Hokkaido Univ., [3]Osaka Otani Univ., [4]Nagasaki Univ.)

【目的】我々はこれまで牛乳乳清糖タンパク質 18 kDa ラクトフォリン（LP）が、乳幼児下痢症のもっとも重要な病因であるロタウイルスに対して、他の乳清由来タンパク質と比較して、非常に強力な増殖抑制活性を示すことを明らかにしてきた。しかし、その活性の分子構造基盤が何であるかは不明である。81 個のアミノ酸から構成される LP は、C 末端側にαヘリックス構造をもち、2 カ所の *O* 結合型糖鎖と 1 カ所の *N* 結合型糖鎖修飾をうける。本研究では、これらの糖鎖およびタンパク質の高次構造と LP のロタウイルス増殖抑制活性の関連を調べ、抑制活性がどこに存在するかを明らかにすることを目的とした。

【方法】LP のタンパク質高次構造が活性に与える影響を調べるため、proteinase K によりタンパク質構造を破壊して proK を調製し、抗ウイルス活性を評価した。LP 上の *N* 型糖鎖構造が活性に与える影響を調べるため、*N*-glycosidase F を用いて LP に修飾された *N* 型糖鎖を酵素的に切断した（Ngly）。この Ngly をゲルろ過クロマトグラフィー（Sephadex G-25）に供することで、遊離した *N* 型糖鎖（*N*-glycan）と O 型糖鎖をもつ LP（*O*-LP）のフラクションを分取した。糖の定量にはオルシノール硫酸法、タンパク質の定量にはブラッドフォード法もしくは BCA 法を用いた。抗ロタウイルス活性は、サル腎臓細胞 MA104 に LP 派生サンプル（proK、Ngly、*N*-glycan、*O*-LP）とヒトロタウイルス MO 株（G3P[8], m.o.i=0.01）を同時に接種し、培地に被験物質を添加しない場合を対照として対数近似曲線から感染阻害率を算出することにより評価した。

【結果】proK について抗ウイルス活性を評価したところ、100 μg/ml 添加では LP と同等の活性が保持されていたのに対して、10 μg/ml 添加では LP と比較して約 35%の活性低下が見られた。また 1 μg/ml 添加においては、LP では対照と比較して約 25%の活性が残っていたが、proK では全く活性を示さなかった。Ngly(*O*-LP と *N*-glycan の混合物)および *O*-LP の活性について LP と比較したところ、100 μg/ml 添加では Ngly において約 15%の活性低下がみられるのに対し *O*-LP では 20%程度の活性増加が認められた。*N*-glycan では感染阻害が見られなかった。

【考察】タンパク質高次構造および *N* 結合型糖鎖は LP の抗ウイルス活性への関与は低く、*O* 結合型糖鎖が鍵となる分子構造であることが示唆された。これまでの結果から、LP の抑制活性はウイルスへの中和作用に起因する可能性が低いことがわかっており、LP 上の *O* 結合型糖鎖が宿主細胞に何らかの影響を与えることでウイルス増殖抑制活性をもたらすと推測される。

lactophorin, rotavirus, infection

発表番号：4E097
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 黒大豆種皮抽出物の抗酸化能を介した肝損傷抑制効果について

# Preventive effects of black soybean seed coat extract on fibrosis in hepatocytes through anti-oxidative ability.

○山下 陽子[1]、李 岫[1]、戸田 登志也[2]、難波 文男[2]、芦田 均[1] ([1]神大院農、[2]フジッコ株式会社)
○Yoko YAMASHITA[1], Xiu Li[1], Toshiya TODA[2], Fumio NANBA[2], Hitoshi Ashida[1] ([1]Kobe Univ., [2]Fujicco Co., Ltd.)

【目的】ポリフェノールを高含有する黒大豆種皮抽出物(BE)は、様々な生理機能を示すが、肝損傷抑制効果については明らかではない。本研究では、BE と BE からシアニジン-3-グルコシドを除去した画分(PC-rich BE)を用いて、それらの抗酸化能と四塩化炭素($CCl_4$)が誘導する肝線維化に対する抑制作用機構を調べることを目的とした。【方法】抗酸化能は、BE、PC-rich BE の 2,2’-アゾビス（2-メチルプロピオンアミジン）(AAPH)ラジカル吸収能から評価した。また、HepG2 細胞に、これらの抽出物を作用させ、活性酸素(ROS)産生の抑制効果を 2’,7’-ジクロロフルオレセインジアセタート(DCFH)法を用いて定量するとともに、DCF に由来する蛍光を顕微鏡観察することからも ROS 産生の抑制効果を確認した。次に、BE と PC-rich BE の肝損傷抑制効果を検討するため、ICR マウス(6 週齢雄)を 5 匹ずつ 9 群に分け、このうち、陰性対照群、$CCl_4$ 群と陽性対照群(silymarin 200mg/kg BW/day)には、AIN-93M 粉末飼料を与えた。残り 6 群は、BE あるいは PC-rich BE を同じ飼料に混合し、BE 0.5%群、BE 1.0%群、BE 2.0%群、BE 4.0%群、PC-rich BE 2.0%群、ならびに PC-rich BE 4.0%群を設けた。陰性対照群はコーン油を、他の群には $CCl_4$(5%コーン油溶液)を 4ml/kg BW で週 2 回 8 週間経口投与した後にマウスを実験に供した。【結果】BE ならびに PC-rich BE の AAPH ラジカル吸収能は、コントロールと比較して高値を示した。また、DCFH 法を用いた場合、BE と PC-rich BE は濃度依存的に ROS 産生を抑制した。動物実験において、$CCl_4$ により血漿の AST と ALT 活性が上昇したが、BE と PC-rich BE は濃度依存的にこの上昇を抑制した。また、$CCl_4$ により、肝線維化に関わる α-SMA のタンパク質発現量、および MMP13 と TIMP1 の遺伝子発現量が増加したが、BE と PC-rich BE は、発現上昇を抑制した。TGF-β1、Collagen-I ならびに CYP2E1 のタンパク質発現量も同様の傾向が認められた。さらに、$CCl_4$ により増加した炎症マーカーTNF-α と IL-6 の遺伝子発現量も有意に抑制した。$CCl_4$ により、脂質過酸化マーカーである MDA の産生量が肝臓で上昇したが、BE と PC-rich BE は、これを有意に抑制した。この抑制には、$CCl_4$ による抗酸化酵素である CAT、SOD、GR および GST の活性低下、HO-1 と GST の発現減少、ならびにこれらの上流にある Nrf2 の発現減少を BE と PC-rich BE が抑制したことによると考えた。また、$CCl_4$ の代謝に必要となる CYP2E1 のタンパク質発現も $CCl_4$ により減少したが、BE と PC-rich BE は、この減少を抑制した。【結論】BE と PC-rich BE は、$CCl_4$ が誘導する肝線維化と炎症を抑制することで肝損傷を軽減させることが判った。

Black soybean seed coat extract, fibrosis in hepatocyte, anti-oxidative ability

発表責任者：山下　陽子（yoko.y@crystal.kobe-u.ac.jp）

発表番号：4E098
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# アスタキサンチンの経口摂取による光老化抑制作用とそのメカニズムの解明

# Preventive effect and its mechanism of dietary astaxanthin on skin photoaging

○小松 俊之[1]、佐々木 克[1]、真鍋 祐樹[1]、斎藤 仁美[2]、菅原 達也[1]([1]京大院農、[2]富士フイルム（株))
○Toshiyuki Komatsu[1], Suguru Sasaki[1], Yuki Manabe[1], Hitomi Saito[2], Tatsuya Sugawara[1]
([1]Kyoto Univ., [2]FUJIFILM Corp.)

**[目的]** 紫外線は、活性酸素種（ROS）の発生を介して皮膚の光老化を引き起こし、深いシワやシミを生じる。中でも UVA は、地上に届く紫外線中の約 95%を占め、雲やガラスを透過して無意識に浴びてしまうことからその対策が難しい。アスタキサンチンは、主に水圏生物に広く分布する赤色のカロテノイドであり、極めて強力な抗酸化作用を有することから、継続的に摂取することで皮膚の抗酸化能を高め、光老化を抑制することが期待される。そこで本研究では、UVA 照射ヘアレスマウスを光老化モデルとして用いて、アスタキサンチンの経口投与による光老化抑制作用を評価し、そのメカニズムの解明を試みた。

**[方法]** ヘマトコッカス油から精製したモノエステル型アスタキサンチンあるいはヘマトコッカス油乳化組成物の乾燥粉末(ナノ化アスタキサンチン)を試験試料として用いた。AIN93G 配合を基本食とし、アスタキサンチン当量として 0.01%または 0.1%となるように上記試料をそれぞれ配合したものを試験食とした。ヘアレスマウス(Hos:HR-1)を 1 週間予備飼育後、 6 群に分け、ノーマル群とコントロール群には AIN93G 食を、試験群にはアスタキサンチンを含む試験食をそれぞれ自由摂食させ、10 週間飼育した。試験期間中、試験群に対して、1 週間に 5 回、背部に UVA 照射を行った。経時的に経皮水分蒸散量（TEWL）の測定と背部皮膚レプリカの三次元画像解析を行い、アスタキサンチン摂取による影響を調べた。試験終了後、背部皮膚を採取し、ディスパーゼ処理によって表皮と真皮を分離し、それぞれのアスタキサンチン蓄積量の定量と遺伝子発現解析を行った。

**[結果と考察]** アスタキサンチンを摂取させた全ての群で、UVA 照射による TEWL とシワの増加が有意に抑制された。また、摂取した濃度に依存してアスタキサンチンの血漿濃度と皮膚への蓄積量が増加した。以上のことから、経口摂取されたアスタキサンチンは皮膚に到達し、光老化を抑制することが示された。さらに、表皮においてアスタキサンチンを摂取させた全ての群で UVA 照射による *Spink5* と *Sts* の遺伝子発現の増加が有意に抑制された。また、真皮においてシワ形成に関与するいくつかの遺伝子の発現変化が抑制された。以上のことから、アスタキサンチンは表皮と真皮の両方において遺伝子発現を正常化し、光老化現象を抑制することが示唆された。

Astaxanthin, skin, photoaging

発表責任者：菅原　達也（sugawara@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4E099
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 細胞培養系を用いた尿酸産生抑制検定系の構築と天然物・食品由来成分の作用解析

# Assay System for Screening Anti-hyperuricemic Natural Products and Food Factors with Cultured Hepatocytes

○安達 真一[1]、高見 有希[2]、小池 慎一郎[3]、豊崎 美紅[1]、吉澤 史昭[2,3]、矢ヶ崎 一三[1]([1]宇都宮大・バイオセ、[2]宇都宮大・農、[3]農工大院・連農)
○ SHINICHI ADACHI[1], YUKI TAKAMI[2], SHINICHIROU KOIKE[3], MIKU TOYOZAKI[1], FUMIAKI YOSHIZAWA[2,3], KAZUMI YAGASAKI[1] ([1]Utsunomiya Univ. C-Bio, [2]Utsunomiya Univ., [3]Tokyo Univ. of Agri. and Tech.)

【背景と目的】生活習慣病として分類される高尿酸血症は、血中の尿酸濃度が高い状態を意味し、痛風、尿路結石症や腎障害などの基礎病態である。近年、日本において高尿酸血症患者や痛風患者が増加していることから、尿酸値の上昇を抑制するポリフェノールをはじめとする天然物・食品由来の有用成分が期待されている。

高尿酸血症の原因のひとつとして、プリン体を多く含む食品の過剰摂取が挙げられる。プリン体は、肝臓においてキサンチンオキシダーゼなどの数種類の酵素により尿酸に代謝され、尿酸は血中に放出される。そこで、本研究では培養肝細胞を用いて尿酸産生抑制検定系を構築し、その検定系を用いて尿酸値の上昇を抑制しうる天然物・食品由来成分の探索とモデル動物での作用解析を目的とする。

【方法と結果】モデル肝細胞としてマウス由来 AML12 細胞を用いた。まず、尿酸前駆体であるプリンヌクレオチド（AMP、IMP および GMP)およびプリンヌクレオシド（アデノシン、イノシン、グアノシン)を AML12 細胞に作用させた際の尿酸産生量を測定し、どの前駆体が、本検定系における尿酸の前駆体に適しているか検討を行った。検討の結果、本検定系では尿酸前駆体としてグアノシンおよびイノシンの両者を同時に用いることとした。次に、AML12 細胞にグアノシンおよびイノシンと、尿酸産生抑制剤であるアロプリノールを陽性対照とし、ポリフェノールであるケルセチンまたはエラグ酸を同時に作用させ、AML12 細胞の尿酸産生量を測定した。その結果、アロプリノール、ケルセチンおよびエラグ酸の添加により、いずれも AML12 細胞の尿酸産生量が低下した。

また高尿酸血症モデルマウスを用いて、アロプリノール、ケルセチンおよびエラグ酸の経口投与が血中尿酸濃度を低下させるか確認を行ったところ、アロプリノール、ケルセチンおよびエラグ酸の投与により血中尿酸濃度が低下した。

【結論】アロプリノール、ケルセチンおよびエラグ酸の添加により AML12 細胞による尿酸産生が抑制された。また高尿酸血症モデルマウスの血中尿酸濃度もアロプリノール、ケルセチンおよびエラグ酸の投与により低下することを確認した。以上より、尿酸前駆体の存在下で培養した肝細胞を用いて構築した検定系を用いて、尿酸値の上昇を抑制する天然物・食品成分候補を探索し、動物モデルでの作用確認へ適用できる可能性が示された。

hepatocytes, hyperuricemia, polyphenol

発表番号：4E100
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 老化に伴う脂質吸収能低下は高脂肪食摂取によって抑制される

# High-fat diet inhibits the decrease in lipid absorption ability with aging

○山本 和史、都築 毅（東北大院・農）
○Kazushi Yamamoto, Tsuyoshi Tsuduki (Grad. Sch. of Agri. Sci., Tohoku Univ.)

【目的】近年、日本における高齢者の約 5 人に 1 人が低栄養状態であることが知られている。高齢者の低栄養状態は、日常生活に支障をきたすフレイルやロコモティブシンドロームを誘導するため、低栄養状態の早期解決が望まれている。我々は最近、この問題の要因の一つとして、高齢者の消化管吸収能の低下に着目してマウスを用いて実験したところ、老化により脂質吸収能が低下することを示した［1]。加えて、マウスは老化が進行して寿命が近づくと、体重と内臓脂肪量が大きく減少する様子を観察した。そこで本研究では、老化によるこれらの現象を防ぐ方法として高脂肪食に着目し、老齢時からの高脂肪食摂取が、老化による脂質吸収能にどのような影響を与えるのか検討することとした。
【方法】実験動物として老化促進マウスである SAMP8 マウス（11 週齢、雄性）を用いた。SAMP8 マウスの老化が始まる 6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育する 6C 群、12 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育する 12N 群、6 ヶ月齢まで通常飼育食で飼育し 6 ヶ月齢以降 12 ヶ月齢まで高脂肪食で飼育する 12F 群の計 3 群を作成した。各群既定の月齢に達した後屠殺を行い、各種分析に供した。
【結果】経口脂質負荷試験を行ったところ、継時時間における血清トリアシルグリセロール濃度の変化に群間で違いは見られなかったが、脂質吸収曲線下面積が 12N 群に対し 12F 群で有意に増加した。以上より、老化による脂質吸収能低下は高脂肪食摂取により抑制されることが認められた。これを受け、肝臓や膵臓、小腸におけるトリアシルグリセロール吸収関連分子の mRNA 発現量を測定したところ、群間で大きな差は認められなかった。そこで、脂質吸収能低下抑制効果のメカニズムに関してより詳細に調べるため、栄養素吸収にとって最も重要な組織である小腸に対してヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的観察を行ったところ、小腸絨毛が 6C 群に対して 12N 群で退化し、12F 群でこれが抑えられている様子が観察された。これを受け、小腸上皮細胞の機能変化を調べるために、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、細胞機能低下に関与する炎症・ストレス・老化に深く関係する遺伝子の発現量が 12N 群で高くなり、12F 群ではその発現が抑制されたことを認めた。以上の結果から、老齢時からの高脂肪食摂取は、老化による小腸の細胞機能低下や絨毛退化を抑え、老化による脂質吸収能低下を抑制していることが示された［2]。

[1] K. Yamamoto et al. *Biogerontology*. 2014.
[2] K. Yamamoto et al. *J Clin Biochem Nutr*. 2015.

aging, lipid absorption ability, SAMP8

発表番号：4E101
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 生理的濃度における非標識、迅速な表皮のターンオーバー評価のための *in vivo*-like セルベースアッセイの開発－約 1 時間で判定－

# Evaluation by laser with ca 1 hour! Development of *in vivo*-like label-free and rapid cell-based assay for both efficacy and toxicity evaluation of epidermis turn-over compounds at physiological concentration

○小名 俊博[1,2]、柴田 純子[1,2] ([1]九大院農、[2]小名細胞アッセイ技術研究所)
○Toshihiro ONA[1,2], Junko SHIBATA[1,2] ([1]Kyushu Univ., [2]O'Atari Inc.)

【目的】表皮のターンオーバー活性化成分のスクリーニングには、基底膜である角化細胞との二次元共培養が一般に用いられるが、間質などが取り除かれた特殊環境のため、非生理的濃度での検討が多い。一方、間質との三次元培養により、角質層も用いる皮膚再構築試験法が報告されている。しかし、エンドポイント法であるため、長い判定期間（～1 カ月）が必要であり、効果と副作用（毒性）の同時判定も難しい。長期間培養による細胞活性の低下から、再現性が低い問題がある。これに対し、高精度な表面プラズモン共鳴法（HP-SPR-3D）を用い、刺激に対する初期の細胞内ミトコンドリア応答をモニターする装置、並びに方法を開発し、エンドポイントでの効果、副作用（毒性）を予測し、上述の問題の克服を検討した。

【方法】細胞としてヒト角化細胞株 PSVK1 を、資材として *trans*-resveratrol（RESV）、AHCC（Active Hexose Correlated Compound）および均質化処理（剝皮後圧搾、加熱滅菌処理、酵素処理などの均質化とアレルゲンの分解）したキウイフルーツ（佐賀県産ゴールドキウイフルーツ *Actinidia chinensis*）を用いた。HP-SPR センサーチップ上に二次元培養した生細胞を自己接着させ、コラーゲンを重層した後、資材を投与、投与後約 1 時間の細胞応答の経時変化をモニターした。

【結果】全ての資材において、濃度依存的に表皮のターンオーバーを活性化する効果が見られた。RESV および AHCC では、一定濃度に達するとアポトーシスによる毒性が認められた。両方の成分において、効果が得られた濃度は血中濃度と同等であった。キウイ資材では、一定濃度以上の濃度増加に対しては効果がなくなり、非常に低い毒性が認められた。この場合、通常認められるアポトーシス毒性は非常に低く、大半はミトコンドリアの機能不全として観察された。投与後約 1 時間で、迅速、簡便、非標識、かつ高感度で、生理的濃度での表皮のターンオーバー、並びに毒性の迅速定量評価に成功した。

Ona, T. and Shibata, J.
Rapid *in vivo*-like efficacy and toxicity evaluation of target compound using mitochondria activity change within epidermis keratinocyte cell.
FRAGRANCE Journal, Vol. 42 (9): 50-55 (2014).

*in vivo*-like cell-based assay, epidermis turn-over, physiological concentration

発表責任者：小名俊博（ona@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：4E102
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 改良親油性 ORAC 法の室間共同試験による妥当性確認

# Method validation of improved lipophilic-ORAC method by inter-laboratory tests

○渡辺 純[1]、沖 智之[2]、竹林 純[3]、箭田 浩士[1]、若木 学[1]、石川 祐子[1]、安井 明美[1]([1]農研機構食総研、[2]農研機構九沖研、[3]国立健栄研)
○Jun WATANABE[1], Tomoyuki OKI[2], Jun TAKEBAYASHI[3], Hiroshi YADA[1], Manage WAKAGI[1], Yuko ISHIKAWA(TAKANO)[1], Akemi YASUI[1] ([1]Natl. Food Res. Inst., [2]Kyushu Okinawa Agric. Res. Cen., [3]Natl. Inst. Health Nutrition)

【目的】Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 法では、ペルオキシルラジカルがフルオレセインを分解し蛍光強度が減弱する過程を測定し、蛍光強度の曲線下面積をもとに Trolox 当量として抗酸化能を表す。我々は、親油性物質の ORAC (L-ORAC) 測定における分析精度低下の要因として、①試料溶液からのアセトンの揮発、②試料の希釈・分注に用いるプラスチック容器からの可塑剤の試料溶液への混入、③試料の希釈倍率の測定値への影響を明らかにし、それぞれについて対策を行い室内再現精度が改善された改良法を開発した[1)]。本研究は、改良 L-ORAC 法の室間共同試験を行い、その妥当性を確認することを目的とした。
【方法】室間共同試験には、2 種類の親油性抗酸化物質（α-トコフェロール、γ-オリザノール）の DMSO 溶液（1 g/L）および 3 種類の食品抽出液（シナモン、ジンジャー、玄米の乾燥粉末のヘキサン-ジクロロメタン（1:1）抽出液を DMSO に転溶した溶液）を用いた。試料の均質性を確認し、参加 15 試験室に非明示で２反復の試料を配付した。各試験室の L-ORAC 測定値は、Cochran および Grubbs 検定による外れ値検定を行った後、中間相対標準偏差($RSD_{int}$)、室間再現相対標準偏差($RSD_R$)、および HorRat 値を算出した。
【結果および考察】１回目の室間共同試験の結果、いくつかの試験室でフルオレセイン蛍光強度の減弱が緩慢である、あるいは Trolox 検量線内となるように試料の希釈倍率を設定することが非常に困難である等の問題が指摘された。フルオレセイン、ラジカル発生剤、Trolox 標準液の濃度を最適化するとともに、3.2 mmol/L Trolox の DMSO 溶液、DMSO を陽性および陰性対照として試料とともに測定することで、測定に問題がなかったか確認する手順に改め、２回目の室間共同試験を実施した。その結果、$RSD_{int}$ は 7.0～16.7 %の範囲、$RSD_R$ は 14.8～19.4 %の範囲となった。5 種類の試料の HorRat 値は 1.35～1.78 であり、すべての試料の HorRat 値が 0.5<HorRat≦2 の範囲内に収まったことから、改良法の妥当性が確認された。現在、食品乾燥試料を各試験室に配付し、試料の抽出・抽出液の親水性 ORAC(H-ORAC)および L-ORAC 測定までを一括して行う室間共同試験を実施している。

1) Watanabe et al. (2013) *Biosci Biotechnol Biochem*, **77**, 857-859.

antioxidant capacity, oxygen radical absorbance capacity, method validation

発表責任者：渡辺純（nabej@affrc.go.jp）

発表番号：4E103
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 亜鉛は消化管内分泌細胞からの CCK 分泌を誘導する
# Zinc induces CCK secretion from enteroendocrine cells

○中島 進吾[1]、比良 徹[2]、岩谷 一史[3]、原 博[2] ([1]北大保健、[2]北大農、[3]ラホヤ研究所)
○Shingo NAKAJIMA[1], Tohru HIRA[2], Hitoshi IWAYA[3], Hiroshi HARA[2] ([1]Hokkaido Univ. Health science, [2]Hokkaido Univ. Agriculture, [3]La Jolla Institute)

＜背景＞

食事成分によって消化管内分泌細胞から分泌される Cholecystokinin (CCK)は、胃排出遅延や食欲抑制、炎症反応抑制などを通じて、生体防御の一端を担っている。亜鉛は免疫機能や酵素活性を調節する必須微量栄養素の一つとして知られているが、インスリン分泌などホルモン分泌への関与も報告されている。Transient receptor potential ankylin-1 (TRPA1) は不飽和アルデヒドやアリルイソチオシアネートによる CCK 分泌に関与するが、亜鉛のセンサーとしても機能することが明らかにされており、CCK 分泌においても亜鉛が作用する可能性が考えられた。そこで本研究では、CCK 分泌細胞株として広く用いられる STC-1 細胞およびラットを用いて、CCK 産生細胞における亜鉛の CCK 分泌能を検証した。

＜方法＞

48-well plate 上に培養した STC-1 細胞を塩化亜鉛（$ZnCl_2$、30-1000 μM）に暴露し、上清中に放出された CCK を ELISA 法により測定した。蛍光 $Ca^{2+}$指示薬(Fura-2-AM)および $Zn^{2+}$指示薬(Fluozin-3-AM)を用いた蛍光イメージング法により、$ZnCl_2$ 添加後の細胞内 $Ca^{2+}$および $Zn^{2+}$濃度を測定した。7-8 週齢の雄性 SD ラットに $ZnCl_2$（0.5 mg/kg body weight）と共に、吸収性（アセトアミノフェン）または非吸収性（フェノールレッド）胃排出マーカーを経口投与し、尾静脈中または胃内の胃排出マーカーをそれぞれ測定した。さらに、CCK 受容体アンタゴニストである Devazepide（0.5 mg/kg body weight）を腹腔投与し、$ZnCl_2$ 投与による胃排出遅延作用に CCK が関与するかどうかを検証した。

＜結果と考察＞

$ZnCl_2$ 曝露により CCK 分泌が誘導され、細胞内 $Ca^{2+}$および $Zn^{2+}$の顕著な増加が認められた。細胞外カルシウム除去や亜鉛キレート剤の前処理によって、$ZnCl_2$ による CCK 分泌が消失したことから、細胞内 $Ca^{2+}$および $Zn^{2+}$濃度上昇が CCK 分泌に寄与することが明らかとなった。TRPA1 アンタゴニストの処理下では、$ZnCl_2$ による細胞内 $Ca^{2+}$シグナルや CCK 分泌が減弱したことから、$ZnCl_2$ は TRPA1 活性化により細胞外カルシウム流入を誘導し、CCK 分泌を促進している可能性が考えられた。$ZnCl_2$ の経口投与によって、血中アセトアミノフェン濃度上昇が緩和され、フェノールレッドの胃内残存量が有意に増加した。さらに、$ZnCl_2$ 投与によって血中 CCK 濃度が上昇し、CCK 受容体アンタゴニスト投与により $ZnCl_2$ の胃排出遅延作用が消失したことから、亜鉛は消化管内分泌細胞からの CCK 分泌を介して胃排出遅延作用を発揮することが明らかとなった。

Cholecystokinin, Zinc, Transient receptor potential ankylin 1

発表責任者：中島進吾（nakaji@hs.hokudai.ac.jp）

発表番号：4E104
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 3,4,5-トリカフェオイルキナ酸の有する神経新生促進作用の解析

# Neurogenesis promoting effects of 3,4,5-tricaffeoylquinic acid

○荒尾 紗代[1]、VILLAREAL Myra[2,3]、本嶋 秀子[3]、礒田 博子[2,3] ([1]筑波大院生命環境、[2]筑波大生命環境系、[3]筑波大北アフリカ研究センター)
○Sayo Arao[1], Myra VILLAREAL[2,3], Hideko Motojima[3], Hiroko Isoda[2,3] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba, [3]ARENA)

【目的】
アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症（ALS）に代表される神経変性疾患は、様々な外因的及び内因的要因により中枢神経系における神経細胞死が誘発されることで進行する疾病であり、生体内に存在する神経幹細胞の生存・成熟を促進することが効果的な新規治療法の一つとされている。本研究で用いた 3,4,5-tricaffeoylquinic acid（t-CQA）は、先行研究において高い神経保護作用を示した他、神経可塑性を促す可能性が報告されている。本研究では、t-CQA の神経新生に及ぼす影響及びその作用機序について、ヒト由来神経幹細胞（hNSC）を用いて検討した。
【方法】
ヒト由来神経幹細胞（hNSC）を増殖因子（EGF, FGFb）の除去により分化を誘導すると同時に、t-CQA を添加し 24～96 時間培養した際のニューロン、オリゴデンドロサイト、アストロサイトの各分化マーカーであるβ3-tubulin, Myelin basic protein（MBP）, Glial fibrillary acidic protein（GFAP）のタンパク質発現量を Western blotting により定量し、神経新生促進作用を評価した。また、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析及び細胞周期アッセイを行い、その作用機序を解析した。
【結果】
t-CQA 処理により、β3-tubulin, MBP, GFAP のタンパク質発現量がそれぞれ 2.3 倍、1.5 倍、1.2 倍増加したことから、t-CQA の有する神経新生促進作用が示された。また、t-CQA 処理による $G_0/G_1$ 期における細胞周期停止の増加、及びこれを制御するリン酸化 p53 の増加が認められた。
以上のことから、t-CQA は神経幹細胞の分化誘導に伴い、細胞周期を $G_0/G_1$ 期において停止させることが示唆された。現在、t-CQA の有する神経新生作用の詳細な作用機序解明のため、DNA マイクロアレイ法によるシグナル解析を行っている。

Caffeoylquinic acid, Neurogenesis, Neural stem cell

発表番号：4E105
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食用菊フラボノイド組成の種による特徴と神経栄養因子様作用

# Comparison of polyphenol components and neurotrophic effects between extracts from two type of chrysanthemum petals

○馬 東建、若生 豊（八戸工大）
○Dongjian MA, Yutaka WAKOU (HIT)

【目的】菊は中国や日本など多くの国々で、薬あるいは食用に用いられている。その有効成分は基本的にフラボノイドやテルペン、クロロゲン酸類により構成されるが、具体的な構成化合物は種によりそれぞれ異なっている。消炎作用や抗アレルギー作用などの生理作用が知られているが、作用の程度や特徴は菊の種類により構成成分が違っていることから異なることが考えられる。食用の菊は約 60 種あるとされるが、青森県の「阿房宮」と山形県の「延命楽」は代表的なものであり、本研究ではこの２種について組成や作用の特徴の比較を行った。認知症や抑うつ症疾患は増加傾向にある。近年、正常な神経機能の維持には、継続的な神経細胞の分化と新生が重要と考えられ、神経系の回復に有効とされる神経栄養因子様物質が研究されておりフラボノイドもその一つとされている。本研究では、「阿房宮」と「延命楽」種のフラボノイドの構成と神経栄養因子様等の作用を比較する。

【方法】阿房宮および延命楽品種の菊花よりメタノール抽出物を調製し、ポリフェノールの総量と特徴となる各フラボノイド量をフォリンデニス比色分析と HPLC により測定した。また、ダイオードアレイ検出器を備えた HPLC で観察し、紫外スペクトル等よりフラボノイド組成の特徴を比較した。両品種のメタノール抽出物より、溶媒分画、逆相クロマトグラフィー等により分離した画分について、抗酸化活性、ならびに PC12 細胞に対する神経栄養因子様作用を検討しその活性を比較した。神経栄養因子様作用は PC12 細胞の神経突起伸長作用の位相差顕微鏡による観察と、MAPK ERK1/2 のリン酸化活性化をウエスタンブロッティングにより評価し比較した。

【結果】両菊花弁のポリフェノール量について、それぞれの主要フラボノドを標準試料に用いて推定した結果、乾燥重量 100 g 当たり、阿房宮は 170 $\mu$ mol 程度、延命楽は 41 $\mu$ mol 程度であった。両菊花弁のポリフェノールの構成は､阿房宮では　isochlorogenic acid､apigenin glycoside､apigenin (aglycone) が､延命楽では luteolin (aglycone) がそれぞれ主要な成分であった。HPLC 分析の結果、阿房宮には乾燥重量 100 g 当たり約 10 $\mu$ mol 程度の apigenin が含まれ、延命楽には、約 7 $\mu$ mol 程度の luteolin が含まれていることが示された。両菊花弁の抽出物の抗酸化能を SOD 消去活性により検討した。阿房宮種の抽出物の方が高い消去活性を示したが、ポリフェノール量を揃えて比較したものでは両者に差は無かった。PC12 細胞を両抽出物により刺激した結果、神経突起伸長作用が認められ有意な神経栄養因子様作用が示唆された。MAPK の ERK1/2 のリン酸化が活性化しており、U0126 の添加により突起伸長とリン酸化が抑制されることより ERK 経路によるシグナル伝達が示唆された。両抽出物の神経栄養因子様作用の比較は現在検討中で、結果を大会で発表の予定である。

chrysanthemum, flavonoid, neurotrophic effect

発表番号：4E106
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ロスマリン酸による脳機能改善機作の解明

# Elucidation of mechanism for brain function improvement by rosmarinic acid

○宍戸 駿[1]、山下 玲[2]、豊田 集[1]、濱口 毅[3]、篠原 もえ子[3]、小野 賢二郎[4]、山田 正仁[3]、阿部 啓子[1,5]、小林 彰子[1] ([1]東大院農、[2]東大農、[3]金沢大医、[4]昭和大医、[5]神奈川科学技術アカデミー)
○Shun SHISHIDO[1], Rei YAMASHITA[2], Tsudoi TOYODA[1], Tsuyoshi HAMAGUCHI[3], Moeko SHINOHARA[3], Kenjiro ONO[4], Masahito YAMADA[3], Keiko ABE[1,5], Shoko KOBAYASHI[1] ([1]UTokyo., [2]UTokyo, [3]Kanazawa Univ., [4]Showa Univ., [5]KAST)

【目的】ポリフェノールにはアルツハイマー病(AD)などの認知症を予防する疫学的知見が報告されている。これまでに我々は、Aβ を用いた *in vitro* のスクリーニングにより Aβ 凝集を抑制するポリフェノールとしてロスマリン酸 (RA)を見出した（*J Neurosci Res*. 2004）。さらに RA は AD モデルマウスの 1 種である Tg2576 を用いた検討においても、コントロール食群と比較し脳内 Aβ 沈着を低下させた（*Am J Pathol*. 2009）。一般的にポリフェノール類は脳内へ移行しにくいことから、我々は RA の Aβ 凝集抑制に関する新規の機能を探索するため、上記 Tg マウス脳の DNA マイクロアレイ解析を実施した。その結果、細胞死関連遺伝子の低下などと共に Aβ 凝集抑制作用が報告されているモノアミン類の分解抑制が示唆された。そこで本研究では、血液脳関門 (BBB) モデル細胞および野生型マウスを用いて、RA 摂食時の RA の体内動態を明らかにすること、および脳の DNA マイクロアレイ解析および脳内モノアミン濃度測定により RA 摂食が脳に与える影響について明らかにすることを目的とした。
【方法】Tg2576 の背景系統である C57BL/6 マウス 7 週齢を用いた。AIN-93G を基本飼料としたコントロール群（C 群、n=10）、および 0.5% RA 含有 AIN-93G を摂食させた RA 群(n=10)の 2 群に分け飼育した。7 週間後、それぞれの群の半数を DNA マイクロアレイ解析とモノアミン測定に分けて用いた。大脳皮質から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供した。全脳をホモジナイズし、RA およびモノアミンを測定した。マイクロダイアリシス法ではカニューレをマウス線条体に挿入し RA 経口投与後 4 時間の透析液を 30 分おきに回収し、モノアミンを測定した。RA およびその体内代謝物の BBB の透過性は BBBKit$^{TM}$(RBT-24H)により検討した。被験物質を血管腔側に添加し、20 分おきに 60 分間、脳実質側の透過液を回収した後に濃度を測定し、透過速度を算出した。モノアミン、RA、およびその体内代謝物はクーロメトリック式 HPLC-ECD を用いて測定した。
【結果・考察】7 週間の RA 摂食マウスでは、RA は血中に検出されたが脳では検出限界以下であった。RA 群において DNA マイクロアレイで上昇が示唆されたモノアミン濃度は C 群に比べて有意に高値を示した。マイクロダイアリシス法でも RA 投与後群で同様のモノアミンの上昇傾向が見られた。BBB モデル細胞による検討においても RA およびその体内代謝物は透過速度が非常に低く RA を経口摂取した際、脳内へは到達しにくいことが示唆された。現在 DNA マイクロアレイの解析を進めている。
本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」の助成によって実施された。

Rosmarinic acid, DNA microarray, microdialysis

発表番号：4E107
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ケトジェニック環境下における短鎖脂肪酸受容体 FFAR2 を介した生理機能

Physiological function of FFAR2 under ketogenic condition

○粕渕 真由、長谷川 沙恵、木村 郁夫（東農工大農）
○Mayu KASUBUCHI, Sae HASEGAWA, Ikuo KIMURA (Tokyo Agriculture and Technology Univ.)

【背景・目的】食事由来の食物繊維から腸内細菌による発酵で産生される短鎖脂肪酸は、宿主の組織でエネルギー源として利用されることが知られてきた。しかしながら近年この短鎖脂肪酸が、エネルギー源としてだけでなく G タンパク共役型受容体 FFAR2, FFAR3 を介し、宿主の身体においてエネルギー恒常性維持のためのシグナル伝達因子としてはたらくことが報告された。すなわち、短鎖脂肪酸受容体は、酢酸や酪酸、プロピオン酸に代表される短鎖脂肪酸をエネルギー過剰のシグナルとして検知し、エネルギー代謝制御に関与することが明らかとなってきた（Kimura et al. PNAS. 2011, Kimura et al. Nature Commun. 2013）。この中で我々は FFAR3 に対する新しいリガンドとして、ケトン体であるβ-ヒドロキシ酪酸を新たに見出した。ケトン体は飢餓時や糖尿病時に産生が上昇するため、そのようなケトジェニック環境下において FFAR3 が生体生理機能の制御にはたらくことが示唆された（Kimura et al. PNAS. 2011）。そこで我々は今回、FFAR3 と同じく短鎖脂肪酸受容体である FFAR2 とケトン体との関係に着目し、ケトジェニック環境下における FFAR2 の生理機能について探るために in vitro および FFAR2 遺伝子欠損マウスを用いた in vivo 機能解析を行った。ケトジェニック環境での受容体による生体生理機能制御を明らかにすることは、同様の環境である糖尿病等の病態生理機構の理解を深めることによる創薬応用につながることが期待され、さらには近年注目されている糖質制限や中鎖脂肪酸摂取が生体に及ぼす影響に対しても新たな知見を提供し得るものと思われる。

【方法】受容体に対するリガンド活性を評価するために、FFAR2 強制発現細胞株を作製してモノカルボン酸リガンドスクリーニングを行い、さらに FFAR2 の下流シグナルの確認を行った。また、FFAR2 遺伝子欠損マウスを作製し、生後 7 週で 48 時間絶食をかけたときの変化を野生型マウスと比較した。

【結果・考察】モノカルボン酸リガンドスクリーニングおよび GPCR シグナルの確認により、アセト酢酸が FFAR2 の内因性リガンドであることが示された。またこのとき、同じケトン体であるβ-ヒドロキシ酪酸によって FFAR2 は刺激されなかった。さらに in vivo の実験において、FFAR2 遺伝子欠損マウスは絶食時に野生型マウスよりも体重が落ちにくく、脂肪組織の減少が緩やかであった。このときの血糖値や遊離脂肪酸の値には変化がなく、しかしながら血中トリグリセリド濃度は遺伝子欠損マウスで有意に高かった。これらの結果より、絶食時に上昇するケトン体のうちアセト酢酸が FFAR2 を刺激し、シグナルを増強することで何らかのメカニズムにより生体生理機能、特に脂質代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

short chain fatty acid, ketone body, GPCR

発表責任者：粕渕 真由（50012152019@st.tuat.ac.jp）

発表番号：4E108
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# RNA-Seq 法を用いた小腸刷子細胞発現遺伝子の網羅的探索

# Comprehensive gene expression analysis in the intestinal brush cells using RNA-Seq

○谷下 道大[1]、吉岡 美紗子[1]、朝倉 富子[1]、阿部 啓子[1,2]、石丸 喜朗[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]KAST)
○Michihiro TANISHITA[1], Misako YOSHIOKA[1], Tomiko ASAKURA[1], Keiko ABE[1,2], Yoshiro ISHIMARU[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]KAST)

【背景】我々はこれまでに、味細胞に発現する転写調節因子 *Skn-1* を欠損させたマウスを作出し、そのマウスでは味蕾の甘・苦・うま味細胞と消化管の刷子細胞が消失し、消費エネルギー増大のために体重と体脂肪率が低下することを見出した。以上より、味細胞や刷子細胞を起点としたエネルギー代謝制御機構の存在が示唆されたが、刷子細胞の機能は未解明である。そこで我々は、刷子細胞の機能を規定する遺伝子の同定を目的とし、RNA-Seq 法を用いて野生型と *Skn-1* 欠損マウス小腸における遺伝子発現プロファイルを比較解析した。

【方法と結果】野生型と *Skn-1* 欠損マウスの小腸から RNA を抽出し、RNA-Seq 法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行った。「刷子細胞に発現する遺伝子は *Skn-1* 欠損マウスにおける発現量が野生型より低い」という仮説を立て、発現量を示す RPKM 値が野生型マウスで 0.5 以上かつ *Skn-1* 欠損マウスと比べて 3 倍以上の遺伝子を抽出した。得られた 238 個の遺伝子には刷子細胞での発現が報告されている *Trpm5* と *Dclk1* も含まれており、本方法が有効であることが確かめられた。現在、刷子細胞に発現する新たな遺伝子を同定するために、免疫染色法などを用いた組織学的な発現解析を行っている。

【謝辞】本研究は、総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

RNA-Seq, intestine, brush cell

発表責任者：谷下　道大（5255965256@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E109
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コール酸の経口投与が C57BL/6J マウスの社会性行動および不安行動に与える影響

# Effects of oral administration of cholic acid on social and anxiety-like behavior of C57BL/6J mice

○伊藤 誠晃[1]、青木 綾子[1]、山岸 直子[2]、青木 玲二[2]、鈴木 チセ[2]、高山 善晴[2]、戸塚 護[1]([1]東大院農生科・応生化、[2]農研機構・畜草研)
○ Masaaki Ito[1], Ayako Aoki[1], Naoko Yamagishi[2], Reiji Aoki[2], Chise Suzuki[2], Yoshiharu Takayama[2], Mamoru Totsuka[1] ([1]Dept. Appl. Biol. Chem., The Univ. Tokyo, [2]NARO)

【背景・目的】脳と腸は神経系や液性因子を介して機能的に相互に影響を及ぼすことが知られており、中枢神経系に与えられたストレスは様々な形で腸に影響を与える。逆に腸が受けたストレスは中枢神経系にフィードバックされる。この相互作用は脳腸相関と呼ばれる。我々はこれまでに社会性の低下を示す社会的敗北ストレスモデルマウスにおいて、社会的敗北ストレスの負荷により盲腸内の胆汁酸濃度が上昇することを報告している。本研究では、腸内での胆汁酸の増加がうつ様行動の誘導に寄与しているという仮説をたて、胆汁酸の主要成分であるコール酸の投与がマウスの行動に与える影響と、記憶と情動に関係する海馬および自律神経機能を調節している視床下部の遺伝子発現に与える影響を調べた。
【方法】C57BL/6J マウス（雄性 7 週齢）に 0.1%のコール酸を含む AIN93G 飼料を 10 日間自由摂取させた。その後、オープンフィールドテストおよび高架式十字迷路により不安行動を評価し、social interaction test により社会性を評価した。行動観察後、マウスの脳から海馬および視床下部を摘出し、RNA を抽出後、cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、セロトニン（5HT）受容体、神経栄養因子（BDNF および GDNF)、胆汁酸受容体(TGR5 および FXR)の発現量をリアルタイム PCR で解析した。
【結果】予想に反し、コール酸の投与によりマウスの社会性が有意に向上したが、不安行動への有意な影響は認められなかった。脳内の遺伝子発現解析の結果、海馬において TGR5 の発現量の上昇と 5HT2BR 発現量の低下を確認した。また、視床下部において GDNF および TGR5 の発現量の上昇と 5HT3AR の発現量の低下を確認した。なお、FXR の発現は海馬、視床下部ともにほとんど検出できなかった。
【考察】コール酸投与試験の結果から、胆汁酸は脳腸相関を形成する一つの有力な因子である可能性が示唆された。GDNF は神経保護作用を有する他、うつ病との関係が報告されているため、コール酸は GDNF の発現上昇を介して行動に影響を与えている可能性がある。胆汁酸受容体の発現解析の結果から、脳内では TGR5 が胆汁酸の受容体として働いていることが示唆された。今後は社会的敗北ストレスマウスにおける胆汁酸の体内動態を明らかにするとともに、脳内胆汁酸受容体の役割とうつ様症状との関係を明らかにしていく予定である。本研究の一部は、内閣府総合科学技術・イノベーション会議の SIP（戦略的イノベーション創造プログラム）「次世代農林水産業創造技術」によって実施されました。

cholic acid, bile acid, behavior

発表責任者：青木綾子（aokiaya@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4E111
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 経口投与で抗うつ薬様作用を示す大豆由来ペプチドの腸－脳相関

# An orally active soy-derived antidepressant-like peptide via the gut-brain axis

○森 薫葉[1]、山本 あかね[1]、小田桐 紗織[2]、山田 大輔[2]、関口 正幸[2]、和田 圭司[2]、鈴木 秀幸[3]、柴田 大輔[3]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1]（[1]京大院農食品生物、[2]国立精神・神経医療研究センター、[3]公益財団法人かずさ DNA 研究所）

○ YUKIHA MORI[1], AKANE YAMAMOTO[1], SAORI ODAGIRI[2], DAISUKE YAMADA[2], MASAYUKI SEKIGUCHI[2], KEIJI WADA[2], HIDEYUKI SUZUKI[3], DAISUKE SHIBATA[3], RYUHEI KANAMOTO[1], KOUSAKU OHINATA[1] ([1]Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, [2]National Center of Neurology and Psychiatry, [3]Kazusa DNA Research Institutes)

【目的】高齢者における神経機能の低下に着目し、意欲向上作用を示す食品素材の開発を目指している。昨年、我々は、主要な大豆貯蔵タンパク質β-コングリシニンのサーモリシン消化により生成する 10 残基ペプチド Leu-Ser-Ser-Thr-Gln-Ala-Gln-Gln-Ser-Tyr（LSSTQAQQSY）が、抗うつ薬様作用を示すことを見出した。本ペプチドは経口投与により医薬品に匹敵する低用量で抗うつ薬様活性を示す一方、腹腔内投与では活性が認められないことから、まず、消化管に作用し、腸－脳軸を介して中枢にシグナルが伝達されている可能性が考えられた。そこで本研究では、腸から中枢にシグナルを伝達する迷走神経が、本ペプチドの抗うつ薬様作用に関与しているかを検討した。

【方法】実験動物は ddY 雄性マウスを用いた。抗うつ薬様活性は尾懸垂試験により評価し、無動時間が減少した場合に抗うつ薬様活性がありと判定した。LSSTQAQQSY による抗うつ薬様作用が迷走神経を介しているかを検討するため、迷走神経切除マウスを使用した。麻酔下で迷走神経を切除し、術後の回復期間を経て、ペプチドを経口投与し、尾懸垂試験により抗うつ薬様活性を評価した。また、求心性迷走神経からのシグナルが入力する脳部位である孤束核における c-Fos（神経活動マーカー）の発現変化を免疫組織染色により検討した。

【結果および考察】LSSTQAQQSY を経口投与したところ、偽手術群では尾懸垂試験における無動時間が減少し、抗うつ薬様作用が認められたが、迷走神経切除群では無動時間の減少が認められなくなり、抗うつ薬様作用が消失した。したがって、本ペプチドの抗うつ薬様作用は、迷走神経を介していることが明らかとなった。また、末梢から中枢にシグナルを伝達する求心性迷走神経が投射する孤束核における神経活動マーカーc-Fos の発現が、LSSTQAQQSY の経口投与により上昇することが判明した。本結果は、抗うつ薬様作用が迷走神経を介するという迷走神経切除マウスを使用した実験結果と一致している。なお、LSSTQAQQSY の類縁体を化学合成し構造―活性相関を検討したところ、C 末の Tyr が活性に重要であり、他の芳香族アミノ酸への置換が許容されることも明らかにした。

【結論】大豆β-コングリシニン由来の LSSTQAQQSY は迷走神経を介して中枢にシグナルが伝達され、抗うつ薬様作用を示す可能性が示唆された。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。

Gut-brain axis, Vagus nerve, Antidepressant-like activity

発表責任者：大日向　耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4E112
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 短鎖脂肪酸がマウス結腸オルガノイドの腸内分泌細胞分化に及ぼす影響

# The impact of short-chain fatty acids on differentiation of enteroendocrine cells in mouse colonic organoid

○尾崎 洋輔[1]、斉藤 伸一[2]、濱田 晃弘[1]、鶴田 剛司[3]、園山 慶[2]（[1]北大院・生命、[2]北大院・農、[3]岡山大・農）
○Yosuke OSAKI[1], Shinichi SAITO[2], Akihiro HAMADA[1], Takeshi TSURUTA[3], Kei SONOYAMA[2]（[1]Grad. sch. Life Sci. Hokkaido Univ., [2]Res. Facul. Agr. Hokkaido Univ., [3]Res. Facul. Agr. Okayama Univ.）

【背景・目的】腸粘膜上皮のみで成り立つ組織構造体である腸管オルガノイドは、*in vivo* を反映した腸管疑似モデルとしての利用が考えられる。我々は、腸内分泌細胞のマーカー遺伝子である chromogranin A (CgA)の腸管オルガノイドにおける発現を *in vivo* と比較したところ、*in vivo* では小腸に比べ結腸で顕著に高かったにもかかわらず、オルガノイドでは差がみられなかった。*In vivo* において腸内細菌叢が存在することを考慮すると、腸内細菌叢に由来するシグナルが CgA の発現および腸内分泌細胞の分化に関与する可能性が考えられる。そこで本研究では、腸内細菌の発酵産物である短鎖細胞酸（short-chain fatty acid, SCFA）が結腸オルガノイドにおける腸内分泌細胞分化に与える影響を調べた。
【方法･結果】オルガノイドの誘導に必須な分泌性シグナルタンパクである R-spondin 3 および Noggin の遺伝子を含むプラスミドベクターを作成し、腸上皮幹細胞の自己複製因子とされる wnt3a タンパク発現性の L-wnt3a 細胞にトランスフェクションして形質転換体（L-WRN）を得るとともに、親株である L-細胞についても同様にトランスフェクションを行い、L-RN を作成した。それらの馴化培地を用い、C57BL/6N マウスの結腸粘膜から分離した陰窩の 3 次元培養を行った。L-WRN の馴化培地を用いることで未分化細胞主体と考えられるスフェロイドを誘導した後、L-RN の馴化培地に交換したところ、出芽構造を有するオルガノイドが形成された。このものを、0.1、1 および 10 mM の酢酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウムおよび酪酸ナトリウムを添加した培地で 24 時間培養し、遺伝子発現動態を RT-qPCR により分析した。また、同様の SCFA を含む培地で 5 日間の培養を行い、免疫組織染色により CgA タンパク陽性細胞を観察した。その結果、10 mM の各 SCFA の刺激により CgA の mRNA レベルが増加した。さらに 0.1 mM の各 SCFA により CgA タンパク陽性細胞の数が増加する傾向を確認した。これらの結果は、SCFA が結腸オルガノイドにおける腸内分泌細胞を増加させることを示しており、すなわち腸内細菌叢が結腸における腸内分泌細胞分化に関与することを示唆している。
本研究は、内閣府の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：生研センター)により実施されたものです。

intestine, organoid, intestinal flora

発表責任者：尾崎洋輔（osa-osa1130@eis.hokudai.ac.jp）

発表番号：4E113
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食品タンパク質由来のグレリン分泌促進ペプチドの発見

# A novel ghrelin-releasing peptide derived from food protein.

○中戸 絢也[1]、青木 隼人[1]、水重 貴文[1,2]、岩倉 浩[3]、金本 龍平[1]、大日向 耕作[1] ([1]京大院農食品生物、[2]京大学際融合教育研究推進センター・生理化学研究ユニット、[3]京大メディカルイノベーションセンター)
○Junya NAKATO[1], Hayato AOKI[1], Takafumi MIZUSHIGE[1,2], Hiroshi IWAKURA[3], Ryuhei KANAMOTO[1], Kousaku OHINATA[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Research Unit for Physiological Chemistry, C-PIER, Kyoto Univ., [3]Medical Innovation Center, Kyoto Univ.)

【目的】グレリンは、食欲促進作用と成長ホルモン分泌促進作用を有する消化管ホルモンである。超高齢社会を迎えるわが国では、加齢に伴う食欲不振や成長ホルモン分泌減少の改善に寄与するグレリン分泌促進物質の開発が望まれる。本研究では、株化されたマウス胃由来グレリン分泌細胞を用いて、食品タンパク質の酵素分解物のグレリン分泌活性を検討した結果、大豆由来のグレリン分泌促進ペプチドを見出した。グレリンの分泌を促進する外因性ペプチドとしては初めての例である。
【方法】主要な大豆貯蔵タンパク質 β-コングリシニン (β-CG)をトリプシンで消化し、得られた酵素消化物をグレリン分泌細胞株 MGN3-1[1]に添加した。培養液を回収し、活性型グレリンを ELISA により定量した。トリプシン消化物を逆相 HPLC で分画し、各ピークのグレリン分泌活性を検討した。最も活性が強いピークに含まれるペプチドを質量分析計およびプロテインシーケンサーで同定するとともに、そのペプチドおよび類縁体を化学合成し、グレリン分泌活性を測定した。
【結果および考察】大豆 β-CG のトリプシン消化物を MGN3-1 に添加した結果、培養液中のグレリン濃度が増加し、グレリン分泌を促進することが判明した。さらに、酵素消化物を HPLC で分画し、最も強力にグレリン分泌を促進したピークを分析した。その結果、β-CG の α サブユニット (192-213) に相当する 22 残基ペプチドを同定し、本ペプチドはグレリン分泌促進活性を示すことを確認した。さらに、ペプチドのトリプシン切断部位に着目し、構造―活性相関を検討した。C 末端側の 11 残基ペプチドにはグレリン分泌活性が認められなかったが、N 末端側の 11 残基ペプチド Asn-Lys-Asn-Pro-Phe-Leu-Phe-Gly-Ser-Asn-Arg (NKNPFLFGSNR)は、全長の 22 残基ペプチドよりも強いグレリン分泌活性を示したことから、22 残基ペプチドの N 末端側が重要であることが判明した。さらに、N 末端の NK 配列を欠失させるとグレリン分泌活性が消失したことから、N 末端側が活性に特に重要であると考えられた。また、NKNPFLFGSNR が β-CG のトリプシン消化により実際に生成することを確認した。なお、NKNPFLFGSNR は細胞内 $Ca^{2+}$および cAMP を増加させなかったことから、従来のグレリン分泌促進経路とは異なる作用経路を介すると考えられる。
【結論】主要な大豆タンパク質 β-CG のトリプシン消化物から、新しいグレリン分泌ペプチド NKNPFLFGSNR を見出した。
本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業を活用して実施した。
[1] Iwakura H et al. Endocrinology. 2010;151(6):2940-5.

Ghrelin, Structure-activity relationship, Food protein

発表責任者：大日向　耕作（ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4E114
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# Menaqauinone-4 and geranylgeraniol regulate testosterone production and insulin secretion.

○Hsin-Jung Ho, Hitoshi Shirakawa, Risa Yoshida, Misato Maeda, Tomoko Goto, Michio Komai (Tohoku Univ.)

[Objectives] Menaquinone-4 (MK-4) and its structurally related compounds—geranylgeraniol (GGOH), already have been reported that both play important roles in several biological processes. We previously showed that MK-4 and GGOH enhance testosterone production[1,2]. According to these results, we hypothesized MK-4 and GGOH may act similar effect on different roles via the regulation of cAMP-dependent pathway. In the present study, we further clarified the effects of MK-4 and GGOH on testosterone production and insulin secretion.

[Materials & Methods] First, testosterone productions after MK-4 and GGOH treatments in mouse testis-derived tumor cells (I-10 cells) were measured by EIA. cAMP levels of these cells were measured by EIA after treated with MK-4 or GGOH. We also analyzed the effect of the inhibitors for enzymes that are related to cAMP levels in I-10 cells. And mRNA and protein levels of steroidogenesis-related genes in I-10 cells were measured by using qRT-PCR and western blots. Second, glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) after MK-4 and GGOH treatments in rat insulinoma cells (INS-1 cells) were measured, then the effects of MK-4 and GGOH on cAMP-dependent pathway also been measured here.

[Results] MK-4 and GGOH enhanced testosterone and its precursor—progesterone production as well as enhanced cAMP levels in I-10 cells. These effects of MK-4 and GGOH were abolished by the co-treatment of the inhibitor of protein kinase A or adenylate cyclase, not phosphodiesterase in I-10 cells. MK-4, not GGOH regulated mRNA levels of adenylate cyclase, but GGOH regulated both mRNA and protein levels of StAR. On the other hand, MK-4 enhanced GSIS and cAMP levels in INS-1 cells, but GGOH did not show any effects on GSIS. These results showed that MK-4 and GGOH modulate intracellular cAMP levels via enhancement of AC but not PDE activity in I-10 cells. MK-4 but not GGOH enhanced GSIS in a cAMP-dependent manner in INS-1 cells.

1) Ito et al., Lipids Health Dis., 2011, **10**, 158.
2) Ho et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., in press.

menaqauinone-4, geranylgeraniol, cAMP-dependent pathway

発表番号：4E115
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラットを用いたエイコサペンタエン酸の不安抑制効果の検討
# Anxiolytic effect of eicosapentaenoic acid in rats

○大島 靖世[1]、遠藤 駿[1]、渡辺 剛[2]、竹中 麻子[1]([1]明治大・農・農化、[2]タマ生化学（株））
○Yasuyo OHSHIMA[1], Shun ENDO[1], Tsuyoshi WATANABE[2], Asako TAKENAKA[1] ([1]Meiji Univ., [2]TAMA Biochem. Co., LTD.)

【目的】

n-3 系多価不飽和脂肪酸が不安抑制効果を有することが、ラットやマウスへの魚油給餌の効果として数多く報告されている。これまでに我々は、ラットにエイコサペンタエン酸（EPA）高含有魚油を給餌することにより、EPA による強い不安行動低下低下作用を確認している。本研究では、社会的隔離ストレスを負荷したラットにおける EPA の不安抑制効果を検討し、EPA の効果にストレスがおよぼす影響を検討した。

【方法】

3 週齢の Wistar 系オスラットに、AIN-93G に準じた対照食あるいは EPA を 42%含む精製魚油(EPA-40)を 3%含む EPA 添加食を与えて、個別又は集団（３匹／ケージ）で飼育した。対照食には油脂としてコーン油を添加し、コーン油と EPA-40 の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。実験食給餌 2 週間後に高架式十字迷路（EPM）試験・オープンフィールド（OF）試験による不安行動の解析を行い、EPM 試験では open arm 活動量、head dipping（迷路から下を覗く探索行動）、stretch out（体を伸ばして探索を躊躇する行動）を、OF 試験では center area 活動量、rearing（立ち上がり）、grooming（毛づくろい）を行動指標として測定した。

【結果】

飼育期間中の摂食量・体重には群間で差は認められなかった。飼料中の油脂の脂肪酸組成の測定結果より、EPA 添加食は脂肪酸含有率で EPA を 28.0%、ドコサヘキサエン酸を 8.8%含むと算出した。行動解析試験では、いずれの試験でも総活動量には群間で差がなく、OF 試験の行動指標にも差がなかった。EPM 試験では、個別飼育によって open arm 滞在時間、head dipping の時間、stretch out の時間と回数において不安行動が有意に増加し、EPA 摂取はこの増加を抑制した。集団飼育時には EPA の不安抑制効果はみられなかった。以上の結果から、EPA は社会的隔離ストレスで生じる不安行動増加に対する強い抑制効果をもつことが示された。

eicosapentaenoic acid, anxiety, n-3 PUFA

発表番号：4E116
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# りんご果汁摂取によるアスコルビン酸の組織特異的蓄積

# Tissue-specific accumulation of ascorbic acid in rats fed apple juice

○井澤 弘美、三浦 みこと、神 友美 (青森県立保健大学)
○Hiromi IZAWA, Mikoto MIURA, Tomomi JIN (Aomori Univ. of Health and Welfare)

**【緒言】** 一般に果物にはビタミン C（アスコルビン酸、以下 AsA とする）が多く含まれているが、リンゴの AsA は他の果物と比べて少ない（日本食品標準成分表では 4mg/100g 可食部）。一方、リンゴを摂取することで通常以上の AsA が体内に保持されることを示した報告があり、当研究室でもリンゴ果汁摂取ラットの血中 AsA 濃度が高くなることを発表した（2015 農芸化学会大会）。そこで今回は、リンゴ果汁摂取ラットにおける各種臓器の AsA 量や、AsA を細胞内へ取り込む輸送体である SVCT1 と SVCT2 の腎臓と小腸での発現について検討した。

**【研究方法】** ODS 雄性ラットを用い、対照群（Control 群）と 2%リンゴ果汁溶液摂取群（2%AJ 群）に分け、飲料水として Control 群には 2g/L AsA 溶液を与え、2%AJ 群には 2g/L AsA を含む 2%リンゴ果汁溶液を与えた。飼料及び飲料水は実験終了時まで自由摂取させた。10 週間の飼育後解剖し、血漿及び臓器を実験に供した。なお、飼育中の AsA 摂取量に群間の差は見られなかった。

**【結果および考察】** 各種臓器の AsA 濃度は、全ての臓器で 2%AJ 群の濃度が高値となり、小脳、精巣、精巣、副腎、胸腺、脾臓、甲状腺、骨格筋及び眼球においては有意に高値を示した。さらに、腎臓の髄質と皮質の AsA を比較したところ、2%AJ 群の髄質において高値を示した。このことから、リンゴ果汁摂取により臓器特異的に AsA が蓄積することが示された。血漿と尿 AsA 濃度は群間に有意差は見られなかった。このことから、2%AJ 群の各種臓器 AsA 濃度が高値を示した原因は、腎臓での AsA の再吸収によるものではないことが示唆された。

腎臓での AsA の再吸収を詳細に検討するために、皮質と髄質の SVCT1 と SVCT2 たんぱく質をウエスタンブロット解析した。皮質 SVCT1 は群間に有意差は見られなかったものの、2%AJ 群で低値傾向であった（$p=0.06$）。髄質 SVCT1 は群間にほぼ差はなかった。このことは、2%AJ 群の各臓器内ですでに高濃度の AsA が存在していたため皮質での AsA 再吸収の必要がなく、その結果 SVCT1 発現が Control 群よりも低値であったと考えられた。よって臓器中の AsA 増加は腎臓での原尿からの AsA の再吸収が原因ではないことが強く示唆された。皮質 SVCT1 発現と髄質 SVCT1 発現を比較したところ、両群とも髄質 SVCT1 の発現が有意に高値を示した。SVCT2 については皮質と髄質の間に有意差は見られなかった。

小腸での AsA の吸収機能を検討するため、小腸の SVCT1 と SVCT2 たんぱく質をウエスタンブロット解析した。その結果両方とも群間に有意差は見られなかった。

apple, ascorbic acid

発表責任者：井澤弘美（h_izawa@auhw.ac.jp）

発表番号：4E117
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ジンゲロールによる肥満改善効果

# Gingerol provides anti-obesity effects

○岡本 真由美[1]、酒井 美帆[1]、侭田 貴史[2]、清水 功雄[1]（[1]早大理工、[2]永谷園）
○ Mayumi OKAMOTO[1], Miho Sakai[1], Takashi Mamada[2], Isao Shimizu[1] ([1]Waseda Univ., [2]Nagatanien Co.,Ltd.)

【目的】ショウガ（学名：*Zingiber officinale*）は古くから生薬や食材として親しまれてきた植物であり、身体を温める、風邪を予防するなどの効果が経験的に言われ、最近ではショウガに含まれる[6]-Gingerol の抗肥満効果、抗高血糖効果、抗酸化効果などが研究されてきた。そこで、食品としての応用可能なショウガパウダー（NG4P;永谷園作製）を動物へ長期投与することで、ショウガの生体内機能及び作用機序の解明を目的とした。

【方法および結果】

高脂肪食に対し、合成した[6]-Gingerol を 0.01% w/w、0.1% w/w、および NG4P を 0.025% w/w、0.25% w/w、2.5% w/w の濃度で混ぜ、野生型マウスに長期投与した。経時的に体重測定や Oral Glucose Tolerance Test（OGTT）による耐糖能試験を行うとともに、解剖時は皮下脂肪、内臓脂肪などを採取し、重量測定などを行った。また、摂餌量も継時的に測定した。

長期投与の結果、[6]-Gingerol 投与群、NG4P 投与群はいずれも混餌投与直後は摂餌量が低下したが、その後は安定し 2.5% w/w NG4P 投与群を除き、統計的に有意な差は認められなかった。投与後 90 日での体重は 0.01% w/w [6]-Gingerol 投与群および 0.025% w/w NG4P 投与群ではコントロールの高脂肪食群と有意な差は認められなかったが、その他の群は有意に体重増加抑制傾向が見られた。絶食時の血糖には有意な差は認められなかった。

内臓脂肪および皮下脂肪ともに体重と同様の傾向を示し、0.01% w/w [6]-Gingerol 投与群および 0.025% w/w NG4P 投与群では高脂肪食群と有意な差は認められなかったが、その他の群は有意に効果が見られた。しかし、褐色脂肪量に差は認められなかった。

gingerol, anti-obesity, ginger

発表責任者：岡本真由美（okamoto@aoni.waseda.jp）

発表番号：4E118
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 巨大胚芽米における発芽条件の GABA 生成量に及ぼす影響

# Effect of germination condition on GABA generation in huge germs rice

○船田 京子 (美作大学)
○Miyako FUNADA (Mimasaka Univ.)

## 序論

津山産巨大胚芽は胚芽の大きさが通常米より約３倍あり、通常の玄米に比べて発芽時にγ-アミノ酪酸 (GABA) の発現量も高く、ヒトの健康面への有益性、高機能性を期待されている。本研究では GABA やフェルラ酸を始めとする抗酸化物質など、機能性成分生成量の多い巨大胚芽米のさらなる機能性成分生成量増加を図ることを主たる目的とし、巨大胚芽米を対象として発芽時に様々な発芽ストレスをかけた際の GABA 他機能性成分生成量の動向を探った。

## 方法

試料は平成 25 年産の津山産巨大胚芽米「COCORO」を使用した。COCORO は岡山県勝田郡奈義町の㈱ライスクロップ長尾から入手した。巨大胚芽米は 28℃8 時間の環境下で、４種類の発芽ストレス、すなわち 1.3%塩化ナトリウム、１%エタノール、１%酢酸、１%重炭酸ナトリウム中にて発芽させ、炊飯による加熱により発芽を停止させた。GABA の分析は食品分析センターに委託した。抗酸化能に関してはカテキンを標準物質とし、DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)で生成させたラジカル消去能をもって測定した。

## 結果

巨大胚芽米 100ｇあたりの GABA 含量は、酢酸水溶液の浸漬条件では 17.5mg で最も低く、エタノール水溶液と蒸留水の浸漬では 20mg、食塩水と重曹水溶液の浸漬では 22.5mg であった。以上の結果から浸漬時に酢酸を加えると GABA 生成を阻害し、食塩と重曹の添加は GABA の生成を増加させることがわかった。ラジカル消去能では有意差を認めなかった。

Huge germs rice, Gaba, Functional food

発表番号：4E119
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ヒシポリフェノールの化粧品素材としての有用性の評価

# Evaluation of the usefulness as cosmetics material of polyphenols in water chestnut

○安田 みどり[1]、斎木 まど香[1]、浜島 弘史[1]、柳田 晃良[1]、池岡 正樹[2]、深田 拓也[2]、森 隆志[2]（[1]西九州大健栄、[2]日本リファイン）
○Midori YASUDA[1], Madoka SAIKI[1], Hiroshi HAMAJIMA[1], Teruyoshi YANAGITA[1], Masaki IKEOKA[2], Takuya FUKADA[2], Takashi MORI[2] ([1]Nishikyushu Univ., [2]Nippon Refine Co.,Ltd.)

【目的】“菱（ヒシ）”とは、池や沼に自生する一年生の水草のことで、秋に熟したとげのある実をつける。ヒシの実の外皮には、緑茶に匹敵するほどのポリフェノールが含まれていることがわかっている。我々は、ヒシ外皮に含まれる主なポリフェノールについて分取、精製を行い、構造決定を行った。これまでの研究において、これらのヒシポリフェノールは高い抗酸化活性を示し、マウスに対する血糖値上昇抑制効果を示すことを明らかにしている[1)]。本研究では、これらのポリフェノールについて、抗糖化活性、メラノーマ細胞によるメラニン産生抑制効果などを調べ、化粧品素材としての機能性について検討した。

【方法】試料には、佐賀県産のワビシ（*Trapa japonica*）の外皮から分取・精製した３つのヒシポリフェノール、オイゲニイン、1,2,3,6-tetra-O-galloyl-β-D-glucopiranose（TGG）、トラパインを用いた。抗糖化活性は、コラーゲン抗糖化アッセイキット ver.2（コスモ・バイオ株式会社）を用い、糖化したコラーゲンから生じる蛍光（Ex/Em : 370/440nm）を測定した。また、ヒアルロン酸を分解するヒアルロニダーゼの阻害活性についても調べた。さらに、チロシナーゼ阻害活性は、ポリフェノールとチロシナーゼ（マッシュルーム由来）とともにインキュベーション（37℃、15 分間）後の吸光度（475nm）の測定により評価を行った。メラニン産生抑制作用は、B16F0 メラノーマ細胞株を用いて、培養 3 日後に生成したメラニンの吸光度（475nm）を測定することにより評価した。

【結果・考察】抗糖化試験については、いずれの試料においても、濃度依存的に糖化反応の阻害作用が見られ、トラパインに特に強い抗糖化作用が認められた。また、ヒアロニダーゼ阻害活性もすべてのヒシポリフェノールに認められた。さらに、チロシナーゼ阻害活性については、トラパイン、オイゲニイン、TGG の順に強い阻害作用が示唆された。メラノーマ細胞を用いた試験については、細胞毒性が認められない最大のポリフェノール濃度（10 μ M）にて行ったところ、メラニン産生抑制効果が認められた。つまり、ヒシポリフェノールが抗糖化作用やヒアルロニダーゼ阻害活性を示したことから抗シワ・たるみ作用を持つこと、また、チロシナーゼ阻害活性やメラノーマ細胞によるメラニン産生抑制作用により美白作用を持つ可能性が明らかになった。このように、ヒシポリフェノールは、化粧品素材として有用であることが示唆された。

1) M. Yasuda, et al., Inhibitory effects of polyphenols from water chestnut (*Trapa japonica*) husk on glycolytic enzymes and postprandial blood glucose elevation in mice, *Food Chemistry*, **165**, 42-49 (2014)

polyphenol, water chestnut, melanogenesis-suppressing action

発表責任者：安田みどり（midori@nisikyu-u.ac.jp）

発表番号：4E120
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# イソチオシアネート類が破骨細胞分化シグナルに及ぼす影響 ～初代培養および破骨細胞前駆細胞様株を用いて～

# Effects of isothiocyanates on osteoclastogenesis related signal transduction in primary cell and osteoclast precursor cell

○高木 智弘、井上 博文、高橋 信之、上原 万里子（東農大院）
○Tomohiro TAKAGI, Hirofumi INOUE, Nobuyuki TAKAHASHI, Mariko UEHARA (Tokyo Univ. of Agric.)

【目的】超高齢社会を迎えた我が国では骨粗鬆症罹患率の増加が問題となっており、その予防が重要課題となっている。これまでの研究から抗炎症作用を示す食品成分は骨代謝改善効果を示すことが報告されているが、抗炎症作用を有する食品成分の中で、含硫化合物である isothiocyanate(ITC)類による骨代謝制御に関する詳細な作用機序は未だ明らかになっていない。前大会にて、我々は初代培養系を用いた実験で ITC の一種である sulforaphane(SFA)、sulforaphene(SFE)および erucin(ERN)は細胞毒性と骨芽細胞分化に影響のない濃度で、従来の破骨細胞分化因子(*NFATc1*, *TRAP*, *Cathepsin K*)の遺伝子発現抑制に加え、新たに成熟化促進因子である *DC-STAMP* の遺伝子発現抑制を介し、破骨細胞分化を抑制することを報告した。そこで本研究では、SFA、SFE および ERN による破骨細胞分化抑制機構の作用機序について、骨髄細胞および破骨細胞前駆細胞様株の RAW264.7 細胞を用いて更なる検討を行った。
【方法】マウス大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞を用い、活性型ビタミン $D_3$ ($10^{-8}$M) による破骨細胞分化誘導と同時に SFA、SFE および ERN(各 0-1μM)で処理した。その後、破骨細胞分化刺激分子である JNK, ERK1/2, p38MAPK のリン酸化活性を western blot 法を用いて解析した。次に、骨芽細胞が共存しない系において、ITC 類の破骨細胞に対するより直接的な影響を明らかにするため、RAW264.7 細胞を用いて解析を行った。先ず RAW264.7 細胞に SFA、SFE および ERN(0～5μM)を添加し、WST-8 法による細胞生存率の測定を行った。続いて、sRANKL(50ng/ml)による多核破骨細胞分化誘導を行い、SFA、SFE および ERN の破骨細胞に対する作用を破骨細胞分化マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色法により評価した。
【結果】骨髄細胞を用いた western blot 解析の結果、JNK, ERK1/2, p38MAPK のリン酸化活性に影響はみられなかった。RAW264.7 細胞を用いた解析の結果、全 ITC 類で細胞生存率は低濃度(～1μM)では影響を示さず、高濃度でのみ有意に減少した。また TRAP 染色の結果、破骨細胞形成率は低濃度(0.01μM～)から減少を示した。
【結論】SFA、SFE および ERN による破骨細胞分化抑制機構については、破骨細胞分化刺激分子の活性制御を伴わない経路を介した機構が示唆された。また、RAW264.7 細胞において SFA、SFE および ERN は骨髄細胞を用いた解析と同様に細胞毒性を示さない濃度で破骨細胞分化を抑制することが明らかとなった。現在、RAW264.7 細胞を用いた破骨細胞関連遺伝子発現の解析中である。

Sulforaphane, Osteoclastogenesis, MAPK

発表番号：4E121
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# カルノシン酸の新規作用機構と脳機能保護効果

# The effect of carnosic acid on cerebral function and its mechanism

○柴田 紗知[1]、石飛 博之[2]、味八木 茂[2]、萱島 知子[3]、川岡 知博[4]、松原 主典[1]([1]広島大院教育、[2]広島大病院、[3]佐賀大文化教育、[4]川岡クリニック)
○Sachi SHIBATA[1], Hiroyuki ISHITOBI[2], Shigeru MIYAKI[2], Tomoko KAYASHIMA[3], Tomohiro KAWAOKA[4], Kiminori MATSUBARA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Hiroshima Univ. Hosp, [3]Saga Univ., [4]Kawaoka Clinic)

【目的】シソ科のハーブであるローズマリーの主な機能成分として知られているカルノシン酸(Carnosic acid)は，抗酸化作用や Keap1-Nrf2 系を介する酸化ストレス生体防御機能活性化作用が報告されている。我々は，カルノシン酸の新規機能として，血管新生抑制作用や脳神経細胞保護作用を見出している。また脳神経細胞保護作用機構として，情報伝達系タンパク質のリン酸化促進作用とオートファジー誘導の関与を 2013 年度本大会において報告した。さらに新たな作用機構について細胞を用いて検討するとともに，加齢に伴う脳機能低下に対する予防効果を検証するために，老化促進マウスへのカルノシン酸の長期経口投与を行った。
【方法】作用機構の検討には，脳神経細胞モデル細胞の SH-SY5Y 細胞を用いた。細胞をカルノシン酸で一定時間処理した後，タンパク質を抽出し，各種抗体を用いたウエスタンブロット法で検討した。
マウスへの投与実験では，老化促進マウス(senescence-accelerated mice; SAM)のうち，早期学習記憶障害モデル動物として確立された SAM P8 系を用いて検討した。まず，予備投与実験として，12 ヶ月に亘ってカルノシン酸(6 μM 及び 60 μM)投与を行った。対照群には蒸留水を自由摂取させた。飼育期間中に新奇物体認識試験等の行動科学試験を行い，脳機能への影響を評価した。その後，個体数を増やし，カルノシン酸(50 μM)投与を 10 ヶ月間行った。飼育期間中，行動科学試験に加え握力測定等の運動機能試験を行った。
【結果】SH-SY5Y 細胞を用いた実験では，ウエスタンブロット解析で，カルノシン酸処理により転写因子 Fox03a の脱リン酸化が促進されていることが分かった。Fox03a は抗酸化酵素の発現や長寿との関連が知られており，リン酸化を受けることにより核外へ移行し転写因子としての機能を失う。そこで，蛍光免疫染色法で検討したところ，未処理の細胞では核内外にリン酸化 Fox03a が確認されたのに対して，カルノシン酸処理した細胞では核内のリン酸化 Fox03a が消失し，転写因子として働いていることが示唆された。この結果は，カルノシン酸の細胞保護作用として Fox03a も関与していることを示している。また，SAM P8 への経口投与実験では，新奇物体認識試験において，対照群では既知物体と新奇物体へのアプローチに差がなかったものの，カルノシン酸投与群では既知物体に比べ新奇物体に対するアプローチが有意に増加し，加齢に伴う脳機能低下に対するカルノシン酸の保護効果が確認された。これらの結果から，カルノシン酸は加齢に伴う脳機能低下を抑制し，その作用機構として転写因子 Fox03a の活性化が新たに示唆された。

Carnosic acid, SH-SY5Y cells, FoxO3a

発表責任者：松原主典（kmatsuba@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4E122
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 乳酸菌と酵母を用いて発酵させた発酵乳の香りがラットの脳波に及ぼす影響

# Effect of odor of milk fermented with lactic acid bacteria and yeast on brain wave in rat

○久住 朝子、小谷 恵、川口 恭輔、大木 浩司（カルピス(株) 発酵応用研究所）
○Asako KUSUMI, Megumi KOTANI, Kyosuke KAWAGUCHI, Kohji OHKI (CALPIS Co.,Ltd. Microbiology & Fermentation Laboratory)

【目的】

近年、香り刺激が自律神経系に影響を与え、その自律神経活動変化が引き起こす生理機能変化に関する研究成果が多数報告されている。われわれはこれまでにラットを用いた研究において、乳酸菌と酵母で発酵した発酵乳（以下本発酵乳と表記）は嗜好性が高く、その要因として香りが重要であることを明らかにし、さらに、本発酵乳の香りの暴露による、明期活動率の有意な低下を確認してきた[1]。本研究では、本発酵乳の香りが睡眠の質に与える影響の解明を目的とし、脳波に与える影響を評価した。

【方法】

雄性 Wistar ラットに脳波・筋電位測定用の電極を装着し、1 週間馴化期間を設けた。12 時間毎の明暗周期の元、明期中間に被験物質（本発酵乳）またはプラセボ（水）をバブリングした空気を暴露することにより吸入投与した。投与は 30 分/日を 7 日間繰り返し実施した。投与 1 日目および 7 日目に脳波および筋電図を測定した。睡眠-覚醒周期の解析は SleepSign（キッセイコムテック社製）を用い、脳波および筋電位を指標に覚醒期、ノンレム睡眠期、レム睡眠期に分類した。統計解析はウィルコクソンの順位和検定を用いて行われた。

【結果】

投与 1 日目の明期（休息期）0-3h において、被験物質群はプラセボ群に比べて覚醒期占有率の減少傾向（$P<0.1$）を示した。さらに、投与 7 日目の明期（休息期）0-3h において、被験物質群はプラセボ群に比べてノンレム睡眠期占有率の有意な増加（$P<0.05$）を示した。以上の結果より、本発酵乳の香りは覚醒量を減少させ、ノンレム睡眠量を増加させるなど、睡眠改善効果を有する可能性が示された。

【参考文献】

[1] Aroma research：journal of aroma science and technology, 2014, 60 (15), 340-345.

odor, sleep, brain wave

発表責任者：久住朝子（asako.kusumi@calpis.co.jp）

発表番号：4E123
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 2 つのプロバイオティクス摂取によるスギ花粉症患者の腸内フローラに与える影響

# Effect of two probiotics supplementation to Japanese ceder pollinosis on fecal microbiota

○原田 岳[1,2]、Kumar Himanshu[2]、久保田 晃[1]、宮澤 賢司[1]、依田 一豊[1]、川瀬 学[1]、何 方[1]、Salminen Seppo[2] ([1]タカナシ乳業（株）、[2]Turku 大学)
○ Gaku Harata[1,2], Himanshu Kumar[2], Akira Kubota[1], Kenji Miyazawa[1], Kazutoyo Yoda[1], Manabu Kawase[1], He Fang[1], Seppo Salminen[2] ([1]Takanashi milk products co., Ltd, [2]Turku University)

【目的】スギ花粉症シーズン（2006 年）のヒト臨床試験において、2 つのプロバイオティクス乳酸菌（*Lactobacillus* GG 株と *L.gasseri* TMC0356 株）で調製した発酵乳の摂取により、投与 9 週目以降で鼻閉症状が改善された。そこでスギ花粉症シーズンにおける腸内細菌の変動及び、発酵乳投与による鼻閉症状改善効果の関与機序を探索するため被験者の腸内細菌の変動を分析した。

【方法】スギ花粉症患者を 2 群（発酵乳群 14 名、プラセボ群 11 名）に分け、二重盲検で *Lactobacillus* GG 株と TMC0356 株で調製した発酵乳とプラセボ食を 1 日 1 回、10 週間摂取させた。被験者 25 名の試験開始時と終了時に採取した糞便から DNA を抽出後、V4-V5 領域を増幅するプライマーを用いて、次世代シークエンサーによる腸内細菌の占有率を解析した。また数種類の細菌種は定量 PCR 法により定量した。

【結果・考察】花粉シーズン前後の比較において、門レベルの解析では、ファーミキューテス門とバクテロイデス門の割合がシーズン前後で異なり、シーズン後でバクテロイデス門の割合が減少した。発酵乳摂取における影響を属レベルで解析すると、プラセボ群ではシーズン前後で優位に増減した菌属は見られなかったのに対し、発酵乳群では、*Lactobacillus* 属、*Blautia* 属が優位に増加し、*Oscillospira* 属が優位に減少した。さらに菌の多様性は発酵乳群でのみ有意に増加した。
また血液パラメータと細菌の関連性を見た結果、シーズン中に中性脂肪の数値は上昇する傾向にある中、*Akkermansia.muchiniphila* を有する被験者は、有しない被験者と比較して有意に中性脂肪の増加を抑制することが明らかとなり、発酵乳群で *A.muchiniphila* を保有する被験者が多い傾向を示した。以上のことから、花粉シーズンによって腸内細菌は変動する可能性があり、発酵乳投与によって細菌を多様化することで花粉症患者に一定の効果を与えることが示唆された。

microflora, probiotics, *Lactobacillus*

発表責任者：原田岳（g-harata@takanashi-milk.co.jp）

発表番号：4E124
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 大豆イソフラボン代謝産物 equol 鏡像異性体が破骨細胞分化に及ぼす影響の差異

# Differences in effects of soy isoflavone metabolite equol enantiomers on osteoclast differentiation

○藤井 駿吾[1]、井上 博文[1]、高橋 信之[1]、上野 友美[2]、内山 成人[2]、上原 万里子[1]([1]東農大院・農・食品栄養、[2]大塚製薬(株)・佐賀栄養製品研)
○ Shungo FUJII[1], Hirofumi INOUE[1], Nobuyuki TAKAHASHI[1], Tomomi UENO[2], Shigeto UCHIYAMA[2], Mariko UEHARA[1] ([1]Dept. of Food Nutr. Sci., Graduate School, Tokyo Univ. of Agric., [2]Saga Nutraceuticals Res. Institute, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

【目的】超高齢社会を迎えたわが国では、様々な加齢性疾患が社会問題となっている。それらの疾患の中でもエストロゲン欠乏に起因する閉経後骨粗鬆症に対しては、ホルモン補充療法などが用いられる。しかし、副作用として子宮がんなどのリスクを増大させる可能性が報告されていることから、副作用がより緩やかな食品による予防や改善が期待されている。大豆イソフラボンの一種である daidzein の代謝産物 equol はエストロゲンと構造が類似しており、骨代謝改善効果が報告されている。一方で equol には二種類の鏡像異性体(*S*)体と(*R*)体が存在するが、その構造の違いと骨代謝に関する報告は少ない。これまでに我々は、生体での骨量減少抑制効果は(*S*)体の方が強いことを見出しているが、破骨細胞や骨芽細胞に対する直接的な影響についての詳細な検討は行っていない。そこで本研究において、破骨細胞に対する equol 異性体の効果の差異を直接的に検討することを目的とし、数種類の細胞を用いた *in vitro* 試験にて解析を行った。
【方法】マウス大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を用い、まず初めに両異性体 equol(0.1～50 μM)で処理し、WST-8 法による細胞生存率を測定した。続いて、活性型ビタミン $D_3$ による破骨細胞分化誘導を行い、各 equol の破骨細胞分化に対する影響について破骨細胞分化マーカーである tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP)を染色することにより破骨細胞形成率を、また、破骨細胞分化関連遺伝子の発現を real time PCR 法にて解析した。次に破骨細胞単独での各 equol の影響について検討するために、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞を RANKL 処理によって破骨細胞に分化誘導し、同時に各 equol 処理を行い、TRAP 染色により破骨細胞形成率を解析した。
【結果】マウス骨髄細胞において、(*S*)体、(*R*)体ともに細胞生存率に影響を与えない濃度で破骨細胞分化を抑制したが、(*S*)体に対して(*R*)体の方が低濃度で有意に抑制した。破骨細胞分化関連遺伝子についても(*R*)体のほうがより強く RANKL 遺伝子の発現を抑制した。しかし、RAW264.7 細胞における破骨細胞形成率では(*S*)体、(*R*)体間での抑制効果に差はみられなかった。
【結論】マウス骨髄細胞では(*S*)体よりも(*R*)体でより強く破骨細胞の形成を抑制したが、RAW264.7 細胞における破骨細胞単独培養での破骨細胞形成抑制効果は(*S*)体、(*R*)体間で差がなかった。また、骨髄細胞での RANKL 遺伝子の発現も(*R*)体で強く抑制されたことから、(*S*)体、(*R*)体における破骨細胞の分化調節は、骨芽細胞に対する RANKL 遺伝子の発現制御が関与している可能性が示唆された。現在、骨芽細胞に対する両鏡像異性体 equol の影響について解析中である。

equol, enantiomers, osteoclast

発表番号：4E125
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 食生活状況及び身体の健康が若年層における皮膚機能に及ぼす影響

# Effects of diet and physical health on skin function in Japanese young adults

○山根 拓実[1]、吉崎 貴大[2]、君羅 好史[3]、岩槻 健[1]、大石 祐一[1]([1]東農大応生科、[2]東洋大学食環境、[3]城西大薬)
○Takumi Yamane[1], Takahiro Yoshizaki[2], Yoshifumi Kimira[3], Ken Iwatsuki[1], Yuichi Oishi[1] ([1]Tokyo Univ. Agriculture, [2]Toyo Univ., [3]Josai Univ.)

【目的】皮膚の状態には普段の生活習慣・栄養状態が反映される。著者らは動物実験により、食事内容の違いが皮膚構成分子の代謝に関与することを明らかにした[1, 2]。しかしながら、皮膚に関する分子生物学的な知見をもとに疫学研究へ発展させた報告は少ない。そこで、本研究ではヒトを対象とし、皮膚機能と食生活状況および心身の健康との関わりを探索した。
【方法】調査は 2015 年 7 月下旬に実施し、皮膚機能の評価、さらには自記式質問票を用いて食生活状況および心身の健康状態を評価した。食生活状況の把握には食事歴法質問票(DHQL)を用いた。皮膚機能のパラメーター測定は、7 月中の連続した 1 週間に室温 23－26℃、湿度 58 - 68%に保持した著者らが所属する大学研究室内で実施した。主要アウトカムである経皮水分蒸散量(TEWL)の測定には Tewameter®TM300 を用いた。睡眠効率および睡眠の質の評価には Pittsburgh Sleep Quality Index（以下、PSQI）の日本語版を用いた。構成される 9 つの質問項目を 7 つの要素（睡眠の質、睡眠時間、入眠時間、睡眠効率、睡眠困難、睡眠導入剤使用、日中の眠気による日常生活への支障）へと分類し，PSQI の総合得点（0－21 点）を算出した。なお、本研究では PSQI の総合得点に加え、実睡眠時間と床上時間から算出される睡眠効率も指標として用いた。結果は平均値±標準偏差で示した。解析には Windows 版 SPSS（ver22.0）を用い、検定は全て両側検定とし、統計的有意水準は 5% とした。統計手法は各変数の正規性を Shapiro-Wilk 検定を用いて評価した上で決定した。
【結果及び考察】本研究の解析対象 42 名の特性は、年齢 21.9±2.8 歳、BMI20.4±2.4kg/m$^2$、TEWL 17.6±5.1g/m$^2$/hr であった。TEWL は 4 分位に分けたところ、Q1 群では 7.1-12.8.g/m$^2$/hr、Q2 群では 13.6-17.3g/m$^2$/hr、Q3 群では 20.0±21.2g/m$^2$/hr、そして Q4 群では 21.5±28.7g/m$^2$/hr であった。さらに、関連する要因を探索した結果、TEWL が高値を示す Q4 群では、睡眠効率が低い傾向を示した（p=0.023）。また、TEWL と居住形態、飲酒習慣、喫煙習慣およびアルバイトの有無との間に有意な関連はみられなかった。他の心身症状に関わる尺度についても、TEWL との間に有意な関連がみられなかった。TEWL を従属変数とした階層的重回帰分析を行ったところ、TEWL には睡眠効率が有意に関与していた（標準化回帰係数(以下, β)= -0.417）。以上のことから、適切な睡眠効率を保つことが、皮膚の角層バリア機能の維持につながる可能性が示唆された。

1）Yamane T. et al., Mol. Nutr. Food Res. 54. S53-S61 (2010)
2）Yamane T. et al., Mol. Nutr. Food Res. (2011)

skin, TEWL, diet

発表責任者：山根拓実（ty204887@nodai.ac.jp）

発表番号：4E126
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 腸管オルガノイドを用いた幹細胞機能に及ぼす食品成分の研究

# Study on food components that affects the function of stem cells using intestinal organoids

○齋藤 由季、齋野 瑞姫、渡部 由佳梨、岩槻 健、清水 誠、只石 幹、服部 一夫（東農大応生科）
○Yuki SAITO, Mizuki SAINO, Yukari WATANABE, Ken IWATSUKI, Makoto SHIMIZU, Miki TADAISHI, Kazuo HATTORI (Tokyo University of Agriculture)

【背景・目的】最近、消化管オルガノイド培養系が開発され、幹細胞や幹細胞から分化した吸収上皮細胞、内分泌細胞、ゴブレット細胞、パネート細胞の培養が可能になった。この *in vitro* 培養系を用いて、生体に近い環境で消化管研究が進められることが期待されており、消化管オルガノイド培養系を用いた研究は増加傾向にある。しかし、同培養系を用いた食品成分の影響について調べた研究はほとんどない。そこで本研究では、消化管オルガノイドへの食品成分の影響を明らかにすることを目的とし、短鎖脂肪酸などの有機酸がオルガノイドの増殖と幹細胞の増殖や分化に及ぼす影響を検討した。
【方法】先行研究に従い、C57BL/6J マウス空腸よりクリプトを単離後、マトリゲル存在下にてオルガノイド培養を開始した。次に、管腔側から食品成分が作用することを考慮し、オルガノイドの継代時（Day 0）に、試料としてヘキサン酸、乳酸、コハク酸をそれぞれ添加（1, 10, 25 μM）し 2 日間培養した。その後は試料非存在下で Day 7 まで培養し、オルガノイドの形態変化を観察するとともに、増殖の目安となる面積比を Image J で測定した。また、Day 7 に RNA の抽出を行い、リアルタイム PCR 法により、幹細胞や分化に関連するマーカー遺伝子［Lgr5（幹細胞), ChgA（内分泌細胞), Gip (GIP 産生細胞), ITF（ゴブレット細胞), I-FABP (吸収上皮細胞), Lyz1（パネート細胞), Tph（セロトニン産生細胞)］の発現量を測定した。
【結果・考察】ヘキサン酸、乳酸、コハク酸添加群は、コントロール群と比べ、全体では形態変化に大きな違いは認められなかった。個々に観察したオルガノイドの面積比に関しては、ヘキサン酸、乳酸、コハク酸添加群で有意な変化は示さなかったが、1 μM のヘキサン酸、コハク酸ではクリプト数が増加する傾向が認められた。幹細胞や分化に関連するマーカー遺伝子の発現量においては、ヘキサン酸、乳酸添加群でコントロール群に比して有意な差は示されなかったが、1 μM 乳酸添加群の Lgr5, ChgA, ITF, Tph 発現量は増加する傾向を示した。コハク酸添加群では、Lgr5, Gip, ITF, I-FABP, Lyz1, Tph の発現量に変化は認められなかった。ChgA 発現量に対しては、10 μM および 25 μM で変化は示さなかったものの、1 μM において増加する傾向が示された。これらの結果から、ヘキサン酸、乳酸、コハク酸は、消化管オルガノイドの増殖に明確な影響を及ぼさないが、低濃度の乳酸、コハク酸は内分泌細胞への分化を誘導する可能性があることが示された。

organoids, stem cells, organic acids

発表番号：4E127
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# オルガノイド培養系を用いた消化管インクレチン分泌細胞の同定
# Identification of incretin secreting intestinal cells using organoid culture system

○大木 淳子[1]、熊木 竣佑[1]、小村 汐里[1]、山根 拓実[1]、大石 祐一[1]、松本 征仁[2]、粟飯原 永太郎[3]、岩槻 健[1] ([1]東農大応生化、[2]埼玉医大医、[3]シンシナティ大学)
○Junko OHKI[1], Shunsuke Kumaki[1], Shiori Komura[1], Takumi Yamane[1], Yuichi Oishi[1], Masahito Matsumoto[2], Eitaro Aihara[3], Ken Iwatsuki[1] ([1]Tokyo Univ. Agriculture, [2]Saitama Medi. Univ., [3]Univ. Cincinnati)

【目的】

消化管は食品の吸収だけでなく、免疫、輸送、ホルモン分泌など様々な機能を有している。我々は、未だ不明な点が多いインスリン分泌を促進するホルモンとしてインクレチンである GLP-1 や GIP 産生細胞に着目し、in vitro 消化管モデルであるオルガノイド培養系を用いてこれらの細胞を解析する事を目的とした。

【方法】

先行研究を参考に、マウス消化管のオルガノイド培養を試みた。C57BL/6J マウスより小腸および大腸を摘出し、管腔内を DPBS（-）にて洗浄後ハサミで組織を細かくし 2.5-3.0mM EDTA にて 30 分インキュベートし絨毛とクリプトを分離した。その後、セルストレーナーにてクリプトのみ回収し、マトリゲルに包埋後 DMEM/F12 培地に B27、N2、Murine EGF、Noggin、R-Spondin、Wnt3a（Wnt3a は大腸オルガノイド作製時のみ添加）を加えたものにて培養した。

免疫染色は、マウス消化管組織においては 4% PFA にて固定後凍結切片を作製、オルガノイドは数日間培養後 4% PFA にて固定した。内分泌細胞のマーカーにて検出を試み、消化管組織とオルガノイドにおける内分泌細胞の数と割合を比較した。

【結果・考察】

今回、十二指腸、空腸、回腸、大腸からのオルガノイド培養を試みたが、いずれからもオルガノイドの作製に成功した。大腸オルガノイド作製時に Wnt を添加しないと培養が維持できない事が分かった。これは小腸とは異なり、大腸には Wnt を産生するパネート細胞が存在しないからと考えられる。マウス消化管組織切片の免疫染色では、十二指腸から GIP、GLP-1 が検出された。現在、その他の消化管においてもこれらインクレチンの発現を解析中である。オルガノイドでは、十二指腸由来のものから GIP、GLP-1 が検出された。回腸、大腸オルガノイドからは GLP-1 が検出された。GIP は上部消化管に、GLP-1 は下部消化管に局在していることが報告されているが、オルガノイドにおいても生体における内分泌細胞の分布が反映される事が分かった。今後、上部、下部消化管によるインクレチン分泌細胞の分布の差異による機能の違いがオルガノイドにおいても反映されるか検討する予定である。

organoid, incretin, enteroendocrine

発表番号：4E128
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# コラーゲン、ヒアルロン酸、グルコシルセラミド配合大麦若葉末（むぎおう）粉末飲料の皮膚症状に及ぼす影響

# Effect of young barley grass (MUGIOH) powdered drinks blended with collagen, hyaluronic acid, and glucosylceramide on skin condition

○神谷 智康、鍔田 仁人、青木 幸久、永瀧 達大（大地の力研究所）
○Tomoyasu KAMIYA, Masahito TSUBATA, Yukihisa AOKI, Tatsuhiro NAGATAKI (Energy of Ground (Daichi-no-chikara) Laboratory Co., Ltd.)

イネ科オオムギ属のオオムギ（*Hordeum vulgare* L.）から製造される大麦若葉末は主に青汁に配合されている。我々は青汁により適した品種を選定し、その大麦若葉を「むぎおう」と名付け、その成分と機能性についての研究を行っている。本研究では、コラーゲン、ヒアルロン酸、米由来グルコシルセラミドを配合した「むぎおう」の青汁を評価するため、以下の 4 試験を行った。

【試験 1】雄性 Wistar ラットに「むぎおう」または他の品種の大麦若葉末を摂取させ、その後の血中のヒドロキシプロリンの推移を評価するため、コラーゲンを経口投与した。その結果、「むぎおう」を摂取した方が、高い血中ヒドロキシプロリンの推移を示した。

【試験 2】雄性 ICR マウスに「むぎおう」または他の品種の大麦若葉末を摂取させ、腸内細菌叢を調べたところ、「むぎおう」を摂取したマウスでは腸内のビフィズス菌比が他の品種に比べて高かった。これらのことから、腸内環境を変化させることがコラーゲンの吸収性に影響を与える可能性が考えられた。

【試験 3】ヒト正常繊維芽細胞を用いてヒアルロン酸、米由来グルコシルセラミドがヒアルロン酸合成酵素の遺伝子発現量に及ぼす影響を評価した。その結果、ヒアルロン酸、米由来グルコシルセラミド単独時よりも併用時の方が高い遺伝子発現を示した。

【試験 4】コラーゲン、ヒアルロン酸、米由来グルコシルセラミドを配合した「むぎおう」の青汁の摂取がヒト皮膚バリア機能に及ぼす影響をランダム並行試験にて評価した。その結果、被験食品摂取群では、コントロールと比較して経表皮水分蒸散量が低下した。

以上の結果より、コラーゲン、ヒアルロン酸、米由来グルコシルセラミドを配合した「むぎおう」の青汁は美容に対して有用な効果を示すことが確認された。

young barley grass, collagen, glucosylceramide

発表責任者：鍔田仁人（tsubatam@toyoshinyaku.co.jp）

発表番号：4E129
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# 蛍光標識レスベラトロールを用いた細胞内動的イメージング

# Dynamic imaging of fluorescently labeled resveratrol in Caco-2 Cells

○小林 謙一、島野 愛美、柳 佑芽、茂木 裕暉、高橋 明日香、鈴木 司、山本 祐司（東京農大・応生・化学）
○Ken-Ichi Kobayashi, Manami Shimano, Yume Yanagi, Yuki Mogi, Asuka Takahashi, Tsukasa Suzuki, Yuji Yamamoto (Dept. Appl. Biol. Chem., Tokyo Univ. of Agri.)

【目的】近年、イメージング技術の進歩によって、機能性食品成分の体内動態を正確に把握できるようになりつつある。しかし、「生きた」細胞の動的モニタリングは、未だ難しいのが現状である。そこで、機能性食品成分を蛍光標識化した上で、細胞内動態追跡システムを構築しようと考えた。本報告では、蛍光標識する機能性食品成分として、赤ワインに含有するポリフェノールの一種であるレスベラトロールに着目した。レスベラトロールは、長寿遺伝子産物である Sirtuin の活性化物質として注目を集めている。レスベラトロールは、動脈硬化や癌のリスクの低減に効果があるとされているが、その効果を疑問視する報告もある。このように、レスベラトロールは有望な機能性食品分子ではあるものの、検討すべき課題の多い分子でもあることから、蛍光標識化による新たな実験系で検討を行えば、新たな展開が開けるものと考えた。そこで、レスベラトロールの機能解明の一つとして、レスベラトロールの蛍光標識化に着手し、培養細胞レベルでの細胞内動態解析を実施した。

【方法】レスベラトロールの 3 位の水酸基と 4'位の水酸基について、それぞれリンカーとしてエチレンを用いて、フルオロセインイソシアネート（以下 FITC）で標識した 2 つの化合物を合成した。その後、HPLC と LC/MS を用いて、FITC 標識レスベラトロールの合成を確認した。そして、大腸癌モデル培養細胞である Caco-2 を FITC 標識レスベラトロールで処理後、リソソームマーカー（LysoTracker Red）もしくはミトコンドリアマーカー（MitoTracker Red）と反応させた。その後、核マーカー（Hoechst 33342）で 30 分間反応後、生細胞イメージング装置（KEYENCE BZ-X700）を用いて、イメージングムービーを取得した。

【結果・考察】まず、2 種類の FITC 標識レスベラトロールの合成に成功した。生細胞イメージングの結果、FITC 標識レスベラトロールが、細胞内に取り込まれること、一部はリソソームに局在することを見出した。しかし、ミトコンドリア、核には局在しないことが示された。一方、FITC およびフルオロセインのみではほとんど細胞内に取り込まれなかったことから、本結果で得られた蛍光画像、レスベラトロールに依存した画像であることが示された。本報告によって、レスベラトロールの細胞内での「真」の動きを捉えつつ、その機能性を発揮する「さま」の一端を明らかにできたと考える。

【謝辞】本研究は、第 41 回公益財団法人農芸化学研究奨励会研究奨励金をもとに実施したものである。ここに深謝いたします。

polyphenol, resveratorol, live cell imaging

発表番号：4E130
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# カドミウム蓄積に伴う脂肪組織の機能変化

# Cadmium accumulation change the function of adipose tissue

○吉城 由美子、福井 里菜、嵯峨 彩花、田中 陽介、和田 恭平（石川県大）
○Yumiko Yoshiki, Rina Fukui, Ayaka Saga, Yousuke Tanaka, Kyouhei Wada (Ishiukawa Univ)

[目的]

重金属の一種であるカドミウム（Cd）は土壌中に広く分布しており、食品にも微量ながら含まれている。日本人の場合、食品による Cd 摂取量は食品安全委員会が定めた暫定耐用摂取量（7 μg/kg/week）の約 40%におよぶ。摂取された Cd は肝臓、腎臓などに蓄積されやすく、Cd と糖尿病、腎炎および高血圧などの関連性が報告されている。これまで我々は、肥満時における Cd の体内分布を調べ、運動負荷による毒性緩和機構などを明らかにしてきた。本研究では Cd 蓄積に伴う脂肪組織の機能変化を糖尿病との関係から検討した。

[方法]

C57BL/6J 系統マウス（雌、４週齢）を１週間の予備飼育後、標準食群（Ｎ群）と高脂肪食群（Ｈ群）に分けた。それぞれの半数に摂取量が 0.6 mg/kg/day となるように $CdCl_2$ を調製し、飲み水として Cd を投与した。（ＮＣ群、ＨＣ群）。体重測定とフンの採取を１回/week で行い、91 日間飼育した。解剖後、腎臓、肝臓、膵臓、卵巣周囲脂肪、大腿四頭筋を採取し、Cd 測定は偏光ゼーマン原子吸光光度計（Hitachi）を用いて行った。血清 Glc（グルコース CII テストワコー）、T-Cho、HDL-Cho、AST、ALT（長浜サイエンス）を分析した。腎臓、肝臓の MT1,MT2 および卵巣周囲脂肪 GLUT4、IR、IRS の mRNA 発現量を RT-PCR で測定した。

[結果]

体重はＮ群とＨ群で有意差が、また、臓器重量では卵巣周囲脂肪で有意差（$p<0.01$）が見られた。血清 Glc はＮ群では 73.2±7.4 mg/dL であったのに対し、Ｈ群が 178.5±28.8 mg/dL であり、Cd 摂取が糖尿病の一つの要因となる可能性が示唆された。卵巣周囲脂肪の GLUT4mRNA 発現量はＮ群、Ｈ群共に Cd 摂取による影響はなかった。しかし、Ｎ群の IR および IRS1mRNA の発現量は Cd を摂取したＮＣ群で up-regulation されたのに対し、Ｈ群では Cd を摂取しても IR および IRSmRNA 共に変化はなく、Cd 摂取は肥満時の糖代謝をより悪化すると考えられる。また、Ｈ群では膵臓の肥大化が見られたが、Cd 蓄積量はＮ群―Ｈ群間でほとんど差がなかった。その他、Ｈ群では Cd 摂取による腎臓メタロチオネイン１および２の発現率が変化し、発現量も減少した。

cadmium, obesity, glucose metabolism

発表番号：4E131
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ラットにおけるケルセチン配糖体の腸管吸収代謝経路の比較

# Intestinal absorption pathway and metabolism of quercetin glycosides in rats

○室田 佳恵子[1]、金城 ちなつ[1]、中村 俊之[2]、中村 宜督[2]、加藤 陽二[3]、生城 真一[4]([1]近大・理工、[2]岡山大院・環境生命、[3]兵庫県大・環境人間、[4]富山県大・工)
○Kaeko MUROTA[1], Chinatsu KINJO[1], Toshiyuki NAKAMURA[2], Yoshimasa NAKAMURA[2], Yoji KATO[3], Shin-ichi IKUSHIRO[4] ([1]Kinki Univ., [2]Okayama Univ., [3]Univ. Hyogo, [4]Toyama Pref. Univ.)

【目的】フラボノイドは植物性食品に豊富に含まれる機能性成分であり、その構造は、アグリコン骨格の違いのみならず、結合した糖の種類や数により非常に多彩である。構造の異なるフラボノイドは吸収性や代謝性が異なり、フラボノイド配糖体の大部分は、腸内細菌による糖の脱離反応を経てから大腸で吸収されるが、アグリコンや一部のグルコース配糖体は小腸から吸収されることが報告されている。本研究では、アグリコン構造は同じだが結合する糖が異なる配糖体の吸収代謝性を比較することを目的とし、代表的なフラボノイドであるケルセチンを用い、アグリコン(Q)、モノグルコース配糖体（Q3G)、ルチノース配糖体（ルチン）の 3 種についての吸収代謝経路を、リンパカニュレーションラットを用いて比較した。
【方法】Wistar/ST ラット（雄性、9-10 wk）の胸管リンパにカニュレーションを留置し、サンプル投与用チューブは十二指腸に設置した。術後一晩回復させた後、プロピレングリコールに溶解した Q, Q3G, ルチンをケルセチンアグリコン当量として 10 mg/kg 体重となるように投与した。リンパ液は投与前 1 h から投与後 6 h（Q)、8 h（Q3G)、12 h（ルチン）の間、0.5～1 h ごとに回収した。末梢血漿はリンパ液回収と同じタイミングで尾部採血により採取した。得られた血漿およびリンパ液は、脱抱合処理後に酢酸エチルにより抽出を行い、HPLC-UV（365 nm)を用いて総ケルセチン濃度を求めた。
【結果および考察】Q および Q3G 投与時にはいずれも、リンパ、血漿ともに投与後 0.5 h には速やかにケルセチン抱合体が出現し最大濃度に達した。同時に検出されたメチル化代謝物（イソラムネチン抱合体）の場合、最大濃度はケルセチン抱合体よりもやや遅くに観察される傾向がみられた。ケルセチン抱合体濃度はイソラムネチン抱合体濃度よりも高かったが、投与後 4 h 頃からは同程度の値となった。総ケルセチン濃度の経時変化は Q と Q3G 投与時で同様のパターンを示し、小腸で吸収される分子種の場合は、吸収経路や代謝パターンも類似していることが示唆された。一方、ルチンを投与したところ、血漿では投与後 4-5 h 頃からケルセチン抱合体が検出され、大腸から吸収されたことが示された。このとき、リンパ液では血漿よりも遅れてケルセチン代謝物が検出された。また、血漿やリンパ液中濃度は Q や Q3G 投与時よりも全体的に低い傾向がみられた。これらの結果は、ケルセチンがアグリコン、配糖体のいずれであっても小腸から迅速に吸収される場合、代謝物となって門脈および腸管リンパ管の両経路へ輸送されるが、大腸から吸収される配糖体の場合には、主として血流を介して吸収された代謝物の一部が、末梢血流からリンパへも流入していくことが考えられた。

quercetin glycoside, Intestinal absorption, lymphatic transport

発表番号：4E132
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア E

# ケルセチンとその配糖体投与後のラット血漿およびリンパ液中代謝物の比較

# Comparison of quercetin metabolites in plasma and lymph of rats after administration of quercetin and its glucoside.

○中村 俊之[1]、中村 宜督[1]、加藤 陽二[2]、生城 真一[3]、室田 佳恵子[4]([1]岡山大院・環境生命、[2]兵庫県大・環境人間、[3]富山県大・工、[4]近畿大・理工)
○Toshiyuki NAKAMURA[1], Yoshimasa NAKAMURA[1], Yoji KATO[2], Shinichi IKUSHIRO[3], Kaeko MUROTA[4] ([1]Okayama Univ., [2]Univ. of Hyogo, [3]Toyama Pref. Univ., [4]Kinki Univ.)

【目的】
ケルセチンはタマネギやリンゴに含まれており、抗炎症や抗肥満が期待される植物由来成分である。植物中においてケルセチンの多くは配糖体として存在しており、摂取した配糖体は小腸または大腸で糖が脱離され体内へ吸収される。多くの臨床試験によりケルセチンの生体利用率が示されているものの、アグリコンと配糖体による代謝パターンの違いについての研究は少ない。抱合代謝物にはそれぞれ特徴的な有効性が報告されており、代謝物量や代謝パターンの理解は有用であると考えられる。そこで本研究では、ケルセチンアグリコン（Q）とモノグルコース配糖体（Q3G）を用い、小腸での吸収経路と代謝パターンの違いを、ラット血漿およびリンパ液を分析することで調べた。
【方法】
プロピレングリコールに溶解した Q（10 mg/kg 体重）または Q3G（10 mg/kg 体重当量）を Wistar/ST ラット（雄性、9-10 wk）に投与後、胸管リンパ液および末梢血漿を 6 時間まで採取した。回収した血漿およびリンパ液は、メタノールおよびアセトニトリルを用いて抽出後、Liquid chromatography-tandem mass spectrometry（LC-MS/MS）により抱合代謝物を検出し、代謝パターンの比較を行った。
【結果および考察】
Q 投与または Q3G 投与後の血漿およびリンパ液を LC-MS/MS 分析したところ、投与 30 分後には小腸で第二相解毒酵素により速やかに抱合され、どちらからも幾つかの代謝物が検出できた。主な代謝物は、グルクロン酸または硫酸抱合体であり、一部はメチル化抱合されていた。血漿・尿中での主要な代謝物の一つであることが報告されているケルセチン-3-グルクロン酸において、血漿だけでなくリンパ液からも同程度の量が検出されたことから、小腸を介した主要代謝物であることが強く示唆された。また、多くの代謝物は投与後速やかに最大濃度に達し時間とともに減少する一方で、6 時間後においても血中に多く存在する代謝物が確認できた。すなわち、一部の代謝物は、小腸で抱合・吸収された後に、肝臓または腸肝循環によりさらなる抱合を受け、血液・リンパ中に存在していることが示唆された。

quercetin metabolite, intestinal absorption, LC-MS/MS analysis

発表番号：4F001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高知県沖海綿に生息する放線菌の分離と多様性解析

# Isolation and characterization of marine sponge-derived actinomycetes from Tosa Bay, Japan

○富岡 寿也[1]、木谷 茂[1]、野田 大貴[1]、ウラノヴァ ダナ[2]、津田 正史[3]、仁平 卓也[1] ([1]阪大・生物工学国際交流セ、[2]高知大・総合研究セ、[3]高知大・海洋コア)
○Toshiya TOMIOKA[1], Shigeru KITANI[1], Hiroki NODA[1], Dana ULANOVA[2], Masashi TSUDA[3], Takuya NIHIRA[1] ([1]International Center for Biotechnology, Osaka University, [2]Science Research Center, Kochi University, [3]Center for Advance Marine Core Research, Kochi University)

【背景】

底生海洋生物の 1 つである海綿は強力な生理活性を示す低分子化合物を生産することが知られている。しかし、これらの生理活性物質は海綿に共生する微生物に由来する報告が相次いでおり、海綿共生微生物は生理活性物質の次世代探索源として急速に注目されている。この海綿には、一般的な土壌微生物であり、かつ生理活性物質の主要探索微生物でもある放線菌が生息することが分かってきた。海綿に由来する放線菌からも多種多様な生理活性物質が近年、報告されるようになり、新たな生理活性物質探索源である海綿由来放線菌に関する研究が盛んになってきた。

本研究では、高知県沖で採集した海綿から放線菌を分離し、その分類学的多様性と生理活性物質生産能力を調査することを目的とした。

【方法・結果】

海綿に生息する放線菌を分離するため、海綿動物 10 種を高知県土佐湾にて採集し、人工海水成分と抗生物質を含む培地に直接、接触させた。また、海綿破砕液も調製し、希釈サンプルを同様の培地に塗布した。各培地を 28ºC で 1 ヶ月間以上培養し、菌体性状に基づき、放線菌様微生物を分離した。放線菌様微生物を純化培養した結果、143 菌株の分離に成功した。

次に、これらの分離株の多様性を検証するため、16S rDNA 塩基配列の系統解析に基づき、分離株の属を暫定的に同定した。現在までに 94 菌株にて、その 16S rDNA 塩基配列を決定し、相同性解析を行った結果、*Micromonospora* 属がその多くを占めたが、*Streptomyces* 属に加え、希少放線菌である *Blastococcus* 属や *Actinomycetospora* 属などが分離株に含まれていた。分離株の生理活性物質生産能を検討するため、グラム陽性細菌とグラム陰性細菌に対する抗菌活性、抗真菌活性、*Streptomyces lividans* TK21 に対する二次代謝誘導活性を培養寒天片を用いて測定した。その結果、分離した海綿由来放線菌群は各活性を示したことから、これらの放線菌は生理活性物資の有望な探索源になりうることが示唆された。

actinomycetes, marine sponge, bioactive compounds

発表責任者：木谷茂（kitani@icb.osaka-u.ac.jp）

発表番号：4F002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 南極淡水湖からの低温活性プロテアーゼ産生菌の分離と同定

# Isolation of bacteria producing cold-active protease from Antarctic freshwater lakes

○松井 美保子[1]、川又 明徳[2]、小杉 真貴子[3]、伊村 智[4]、黒沢 則夫[1]([1]創価大院工、[2]愛媛県総合科学博物館、[3]中央大、[4]国立極地研究所)
○ Mihoko MATSUI[1], Akinori KAWAMATA[2], Makiko KOSUGI[3], Satoshi IMURA[4], Norio KUROSAWA[1] ([1]Soka Univ., [2]Ehime Prefectural Science Museum, [3]Chuo Univ., [4]National Institute of Polar Research)

【背景と目的】プロテアーゼはタンパク質のペプチド結合の加水分解を触媒する酵素群の総称であり、世界における主な工業用酵素の需要の約 6 割を占めている。低温で高い活性を示すプロテアーゼは、低温下での食品加工や寒冷地での廃水処理などへの利用が期待されているが、そのようなプロテアーゼを分泌する好冷性あるいは耐冷性微生物の分離例は少なく、低温活性プロテアーゼの構造や性質に関する研究例も限られている。本研究では、低温下でより高い活性または分泌量を示すプロテアーゼ産生菌の分離を試みた。

【材料と方法】2012 年 12 月～2013 年 1 月に、東南極リュッツォ・ホルム湾沿岸の露岩域に位置する淡水湖スカーレン大池・雪鳥池・仏池（水温 5.4～6.1°C、pH 7～8）から堆積物を含む湖水を採取した。これらを分離源として、3%スキムミルクを含む LB 寒天培地または MBS 寒天培地を用いて 4°C で分離培養を行う事により、低温活性プロテアーゼ分泌菌のスクリーニングを行った。スキムミルク分解によるクリアゾーンの形成が認められたコロニーをランダムに選択し、シングルコロニーアイソレーション法により純粋培養を行った。単離された株は、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づき同定するとともに、3%スキムミルクを含む MBS 寒天培地を用いて、4°C および 25°C における増殖能とプロテアーゼ活性を半定量的に評価した。

【結果と考察】 4°C で活性を示すプロテアーゼを分泌する菌を計 63 株分離した。16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づきこれらは 7 属 15 種に分類された。全分離株中、スキムミルクを含む MBS 寒天培地上で最も高い活性を示した ANS4-1 株は、*Pseudomonas prosekii* と同定された。分離株中 24 株は、4°C では生育するものの 25°C では生育しなかったことから、好冷菌であると推定された。この 24 株中、最も高いプロテアーゼ活性を示したのは *Cryobacterium psychrophilum* と同定された ANH4-27 株であった。また、*Flavobacterium psychrolimnae* であると同定された ANY4-14 株は、増殖速度は 4°C よりも 25°C の方が大きいが、プロテアーゼ活性は 4°C の方が高いという興味深い性質を示した。今回分離されたこれらプロテアーゼ分泌菌を用いて、生育温度とプロテアーゼ分泌量の関係や、分泌されたプロテアーゼの構造や性質の解析を行ってゆく事により、酵素の低温適応機構や低温活性プロテアーゼの工業利用のための知見が深まることが期待される。

psychrophilic bacteria, cold-active protease, Antarctic freshwater lakes

発表責任者：松井美保子（e15m5720@soka-u.jp）

発表番号：4F003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 国際宇宙ステーション「きぼう」における真菌動態調査：中間報告

# Fungal dynamics in Japanese Experiment Module "KIBO", International Space Station

○佐藤 一朗[1]、山崎 丘[1,2]、梅田 宜子[1]、槇村 浩一[1] ([1]帝京大医療共通教育研、[2]宇宙航空研究開発機構)
○Kazuo SATOH[1], Takashi YAMAZAKI[1,2], Yoshiko UMEDA[1], Koichi MAKIMURA[1] ([1]G-MEC, Teikyo Univ., [2]JAXA)

国際宇宙ステーション（ISS）に存在あるいは増殖した真菌が、機器の正常な稼働や宇宙飛行士の健康に影響を及ぼすことが懸念されている。そこで ISS 日本実験モジュール（JEM）「きぼう」内における真菌を含めた環境微生物動態について、運用開始後約 500 日（Microbe-I）、約 1000 日（Microbe-II）、約 1500 日時点（Microbe-III）それぞれにおいて軌道上のサンプルを採取し、解析した。Microbe-I において真菌は分離されず、クローンライブラリー法による解析ではヒトの常在真菌である *Malassezia* 属を優占とした真菌 DNA が検出された[1)]。Microbe-II および III では、複数の真菌が分離培養された。引き続き、Microbe-II および III で船内壁面を拭き取ったスワブから抽出した DNA を用いて、クローンライブラリー法による解析を実施した結果、*Malassezia* 属のみならずヒトが持ち込んだ各種の環境真菌による真菌叢が形成されていたので、その結果を報告する。

本研究は、宇宙航空研究開発機構（JAXA）が公募した JEM 第二期利用テーマとして 2009 年に採択された「国際宇宙ステーション内における微生物動態に関する研究（Microbial dynamics in International Space Station; Microbe-I, II&III）」として実施された軌道上微生物叢解析実験の真菌関連研究成果の中間報告である。

1）Satoh et al. (2011) Microbiol. Immunol., 55, 823-829.

Fungal dynamics, International Space Station, *Malassezia*

発表番号：4F004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 伝導率の違いを利用した微生物のスクリーニング法の検討および構築

# Analysis of the microbe phase in the difference between the pretreatment conditions of sediments collected from the Mariana Trench.

○中野 栞[1]、渡邉 彬宏[1]、小林 徹[2]、三浦 健[1] ([1]東洋大生命科、[2]海洋研究開発機構)
○ Shiori NAKANO[1], Akihiro Watanabe[1], Tohru Kobayashi[2], Takeshi Miura[1] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

これまでに深海底泥サンプルを前処理条件の違いで、明らかに異なる微生物が観察された。その原因として、微生物と土壌粒子間に異なる電荷が生じ、両者が強弱な力で結合していたことが示唆された。そのため、イオン強度の違いによって両者を分離できるのではないかと推測した。そこで、イオン強度勾配を利用する新規スクリーニング法を構築し、前処理液の pH と塩濃度を変化させることで微生物の取得を試みた。

まず、土壌粒子をイオン交換樹脂として仮定して、カラムに、イオン交換樹脂を充填した。その上に、*Escherichia coli* NBRC3972 または *Bacillus subtilis* NBRC3134 を 100 mM Tris-HCl buffer（pH7）1 ml に懸濁し重層した。その後、100 mM Tris-HCl buffer（pH7）で洗浄し、NaCl 濃度を 0～6 M まで段階的に上昇させ分取した。この各分取液を LB または NB 寒天培地に塗布した。2 日間培養後、コロニー数の観察を行った。また、その分取液の伝導率も測定した。その結果、*E. coli* NBRC3972 は、陽イオン交換樹脂には結合せずに洗浄液において、コロニーの出現がみられた。また、陰イオン交換樹脂は洗浄液と同等な伝導率においてコロニー数が出現した。よって、*E. coli* は帯電していないか、若干負に帯電している可能性が示唆された。一方、*B. subtilis* NBRC3134 では、陰イオン交換樹脂においては伝導率が 2.0 S/m 以下ではコロニーの出現が観察できなかった。これらの結果より、微生物と土壌粒子が異なる電荷が生じ結合していることが示唆された。

そこで、粒度の異なる粉末濾紙を用いて層を作製した後、その上に 4 種類のマリアナ海溝底泥コアサンプル（YK09-08）を重層した。前処理液として、酸・中・アルカリ性緩衝液、塩濃度 6 M まで徐々に上げて分取した。その分取液を Marine Broth 2216 寒天培地に塗布し、25℃で 14 日間培養した。培養後、出現したコロニーの大きさ、色、形状を観察し、異なるコロニーを 733 株単離・保存した。異なるサンプルにおいて、異なる pH と塩濃度で単離した株において、特定の電離度で黄色の極小コロニーや白色の花形コロニーが出現するなど、形態が同じコロニーが、唯一同程度の電離度（伝導率）でそれぞれ観察できた。さらに、異なる pH と塩濃度において、同程度の電離度で分離したコロニーの形態が似ていた株の中には、同様の菌体外酵素を産生している株も観察できた。このことから、これらの株は同一のものである可能性が高いと考えられた。本年度の研究より、使用する緩衝液の種類や塩濃度の組み合わせの違い（電離度）によって取得できる微生物に違いが見られたことから、分離できる微生物が異なることが示唆された。

Mariana Trench, electrical conductivity, enzyme

発表番号：4F005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 担子菌 *Ganoderma lucidum* NBRC 8346 における継代培養が引き起こす遺伝子領域の塩基配列の変化

# Changes in the coding region sequences of subculturing *Ganoderma lucidum* NBRC 8346

○桜井 健太、田村 朋彦、稲葉 重樹、細山 哲、黄地 祥子、山副 敦司、川崎 浩子、佐藤 真則（製品評価技術基盤機構）
○Kenta SAKURAI, Tomohiko TAMURA, Shigeki INABA, Akira HOSOYAMA, Syoko OHJI, Atsushi YAMAZOE, Hiroko KAWASAKI, Masanori SATO (National Institute of Technology and Evaluation)

【背景・目的】

生物遺伝資源センター(BRC)が提供する微生物ゲノム情報は、研究開発のスタンダードやリファレンスとして広く利用されている。NBRC では、安定的な長期保存を目的に、液体窒素や超低温フリーザーによる凍結保存や L-乾燥真空アンプルによる保存を行っている。その理由の一つに、継代培養による突然変異の可能性が危惧されていることから、なるべく継代回数を減らした状態でゲノム上も安定的に保存することが重要と考えているからである。特に、凍結保存が難しい菌群を有する担子菌類において、長期保存における遺伝子の安定性は重要な課題である。これまで、継代培養における遺伝子の変異が危惧されていたにもかかわらず、詳細な科学的分析がなされていなかったことから、本研究では、担子菌類において、凍結保存株と継代培養を繰り返した株のゲノム配列の比較を行い、継代によって遺伝子の塩基配列に生じる変異の割合を解析した。

【結果・考察】

異核共存体の *Ganoderma lucidum* NBRC 8346（マンネンタケ）を用い、液体窒素による凍結保存を行ってきた株と、それを元に 1.5 ヶ月ごとに 30 回の継代培養を繰り返し実施した株について、全ゲノム配列を解読し、メバロン酸経路、グルカン生合成系、リグニン分解系、TCA 回路に関わる 65 遺伝子に注目し各遺伝子の塩基配列の変異の割合を算出した。その結果、解析した 65 遺伝子のうち、62 遺伝子に、1,000 塩基あたり 0.53～34.60 塩基の変異が検出された。イントロンはエキソンに比べ同程度もしくはそれ以上の塩基配列の変異が検出された。また、エキソンの塩基配列の変異の中にはアミノ酸置換を伴うものがあり、解析した 4 つの代謝系における塩基配列の変異の割合は同じであった。

異核共存体では、アミノ酸置換を伴う塩基配列の変異が、必ずしも表現性状に影響を与えるとは限らないが、上記の結果から、代謝系の種類に関わらず、ほとんどのエキソン領域において、アミノ酸置換を伴う遺伝子配列の変異が生じていることが明らかとなったことを考えると、継代培養ではない、遺伝子変異を起こす頻度を押さえた長期保存法の開発が求められるところである。

本研究は平成 27 年度特許庁委託研究「ゲノム解析による微生物の保存及び品質管理に関する技術開発」の一環で実施されたものである。

basidiomycetes, subculturing, genetic changes

発表番号：4F006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# MALDI-TOF MS を用いた糸状菌の同定のためのプロテオミクス
# MALDI-TOF MS proteomic based identification of filamentous fungi

○岩本 孝樹、濱田 亮介、堀沢 栄 (高知工科大学)
○Kouki Iwamoto, Ryosuke Hamada, Sakae Horisawa (Kochi Univ. Tech.)

糸状菌の正確な同定は、微生物利用、医療関係、衛星管理、農業分野などの様々な分野で必要とされている。しかし、糸状菌類の同定は、現状では形態的特徴に頼るところが大きく、この方法では時間がかかる、誤同定が起こりやすいなどの問題がある。そこで、DNA やタンパク質などの生体分子を用いた同定方法が発達してきた。DNA を用いる方法は、検出感度も信頼性も高いが、クローニングなどには手間がかかり、また大量に分析するにはコストがやや高い。一方、生体分子であるタンパク質を用いる方法では、質量分析装置を用いた技術が注目されている。これは、MALDI-TOF MS を用いて、細胞内の 2000～20000 Da 程度の比較的小さなペプチド全てを合わせたスペクトルを取得し、既知の菌種のスペクトルと比較することで種の同定またはタイピングを行う。既にバクテリア、酵母類ではスペクトルのデータベースが作成されており、実用段階の研究が進められている。しかし糸状菌類ではまた報告が少ない。そこで本研究では、担子菌類の種の同定およびタイピングについて検討することとした。

木材腐朽菌を中心とした担子菌類を用い、PDA プレート上のコロニーよりタンパク質を抽出した。Autoflex Speed (Burker)を用いて MS スペクトルを取得し、MALDI Biotyper (Burker) を用いてデータベースを作成した。種間および種内のスペクトルパターンを比較した。スペクトルパターンの比較を数値化し、評価したところ、カワラタケ *Trametes versicolor* とその近縁種 *T. hisuta* のスペクトルはそれぞれの種内では類似性が認められたが、種間では明らかに類似性が異なった。一方で、*Pleurotus ostreatus* では種内でも大きな変異が見られた。これらのことから、種・属レベルから種内レベルでの多様性を検出できることが示唆された。

maldi-tof ms, species identification, fungi

発表責任者：堀沢　栄（horisawa.sakae@kochi-tech.ac.jp）

発表番号：4F007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物細胞の付着現象に基づく分離技術の開発

# Development of isolation method based on attachment phenomena of bacterial cells

○松尾 朋昇、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治 (東農大)
○ Tomonori MASTUO, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUZIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ.Agric.)

【背景と目的】環境試料中には培困難な微生物細胞が多数存在するため、微生物生態系の解析には分子生物学的技術が用いられている。近年発展してきた次世代シーケンサーを用いることで、微生物生態系における存在比率が全体の1万分の一を下回る少数派の微生物の理解が可能になりつつある。土壌1g中には$10^9$程度の微生物細胞が存在することから、このような自然界の微生物生態系における少数派の理解が期待される。しかしながら、分子生物学的技術では生きた細胞の獲得は不可能であり、微生物生態系における少数派の微生物を生きたまま分離および培養する何らかの手段が必要である。本研究では、微生物の細胞表層が持つ物理化学的特徴に基づいて微生物細胞を分画し、少数派の微生物を獲得するための技術開発を試みる。今回は、ガラス表面に対する微生物の付着現象に基づいた分離手法について検討した結果を報告する。

【実験材料と方法】土壌から菌体剥離懸濁液を作成して供試試料とした。ソーダガラス製のガラス板を滅菌後、供試試料に3分間浸漬した。浸漬後のガラス板を50mlのリン酸緩衝液で順次洗浄することで細胞を剥離させた。その後、pH6～2.5の間で5段階に調整したクエン酸溶液50mlで順次洗浄した。これらの洗浄液は全量を肉エキス培地に個別に添加し、37℃で4日間培養した。なお、クエン酸溶液を用いた洗浄液の培養では培地に緩衝液を添加してpHを中性に調整した。また、洗浄後のガラス板と、緩衝液で段階的に希釈した供試試料も同様に培養した。培地の濁度上昇から微生物の増殖を判定し、増殖した微生物細胞を回収してPCR-DGGE法で菌相を解析した。

【結果および考察】ガラス板を洗浄した緩衝液では、洗浄 7 回目の緩衝液まで細胞の増殖が確認できたが洗浄 8 回目以降は細胞の増殖が確認できなかった。また、pH4 のクエン酸溶液、洗浄後のガラス板では細胞の増殖が確認できた。これらのことから、緩衝液による洗浄工程ではガラス板に一部の微生物が付着したまま残存し、pH を変えて洗浄を行うことで付着した細胞の一部が滑落したことが考えられた。また、ガラス板を洗浄した緩衝液で増殖した菌相には供試試料中の優占種が多く含まれていたのに対し、pH4 で滑落した菌相にはこれとは異なる菌種(*Kocuria marina*)が含まれた。そこで次に、*K. marina* に特異的なプライマー（KMARI）を作成し、供試試料の希釈培養物から抽出した核酸を PCR に供した。KMARI では供試試料を $10^{-3}$ 希釈した培養物でのみ DNA 増幅が確認できた。$10^{-6}$ 希釈した培養物で微生物の増加が確認されていることから *K. marina* は供試試料中では優占種の千分の一以下の少数派であることが示唆された。今後は次世代シーケンサーを用いて *K. marina* の供試試料中に占める個体数の推定を行う。

microbial attachment, microflora, isolation method

発表番号：4F008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植種の希釈が集積培養後の微生物相に与える影響について
# Effect of dilution of inoculum to enrichment culture

○羽鳥 伸太郎、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Shintaro HATORI, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric.)

【背景と目的】近年発展してきた次世代シーケンサーを用いることで、微生物生態系において存在比が 1 万分の一を下回る少数派の微生物を検出することが可能となりつつある。環境試料中の少数派の微生物の存在と、その役割の理解に期待が持たれる。しかしながら、少数派の微生物を生きたまま分離する手法については、未だ開発が進んでいないのが現状である。少数派を簡便に分離する効果的な手法の開発が望まれる。生きた微生物の分離技術として主に用いられている希釈培養法では、試料を分散媒で段階的に希釈して平板培地に塗抹して培養する。コロニー形成に基づいた生菌数の計数と、生態系を構成する優占菌種（多数派）の単離が主な目的である。これに比べて集積培養法は、選択培地や抗生物質のような強力な制限因子により、特定の微生物のみを選択的に優占化させる手法である。しかしながら、生態系における少数派の微生物のうち制限因子の影響を受ける微生物はこれらの手法では分離することが不可能である。本研究では、制限因子に依存しない集積培養法において、培地の基質濃度と植種する複合微生物の段階的な希釈が、培養後の微生物相に与える影響を検討する。

【実験材料と方法】供試培地には MRS 培地の基質濃度を 1/10 濃度（培地 A)もしくは 1/100 濃度（培地 B)に調整して用いた。植種源には複合微生物の生態系として二相式メタン発酵槽内のグラニュール汚泥を用いた。グラニュール汚泥約 3.0ml を破砕後、生理食塩水 27ml で懸濁した。得られた上澄み液を回収後、遠心分離により集菌して供試培地で再懸濁したものを供試植種とした。集積培養には 25ml 容試験管に供試培地を 9ml 加えてオートクレーブ滅菌して用いた。供試試料を供試培地で段階的に希釈して 37℃で培養した。培養物の微生物相は PCR-DGGE 法により解析した。

【結果及び考察】微生物の増殖が確認できた培養物のうち、植種希釈率が最も高い培養物は、培地 A では $10^{-6}$ 希釈、培地 B では $10^{-7}$ 希釈であった。この培養物は植種源に含まれる優占菌種と考えられ、PCR-DGGE バンドプロファイルに基づくと、培地 A と B 間ではその菌相に違いがあることが示唆された。また、低い植種希釈率において、これらの微生物が検出されない場合があることが示された。さらに、低い植種希釈率でのみ特異的に検出される微生物種の存在も明らかになった。このように、培地濃度と植種希釈率が、集積培養後の微生物相に影響を及ぼすことが示された。強い制限因子に依存しない集積培養では、植種された微生物間の相互作用が、集積される微生物相に大きな影響を及ぼすものと考えられた。

microflora, enrichment culture, isolation technique

発表番号：4F009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 共培養法を適用したセルロース分解菌の探索

# Search of the cellulose degrading microflora by co-culture method.

○北村 俊貴、大西 章博、藤本 尚志、鈴木 昌治（東農大）
○Toshiki KITAMURA, Akihiro OHNISHI, Naoshi FUJIMOTO, Masaharu SUZUKI (Tokyo Univ. Agric)

【背景と目的】近年、分子生物学的技術の発達により培養操作を経ずに微生物が検出できるようになり、環境中の微生物生態系には培養困難もしくは培養が不可能な微生物が多数含まれることがわかってきた。本研究グループでは Co-culture 法と名付けた共培養による新たな未培養微生物の獲得技術を提案した[1)]。Co-culture 法では集積培養過程に特定の微生物（Bait と呼称する）を共存させることで、優占化する微生物相に変化を与える。その後、希釈培養法による分離段階において Bait だけが排除される条件を与えることで、集積された微生物相だけを効率的に分離することができる。本研究では、Co-culture 法を適応したセルロース分解微生物の探索を試みる。今回は 6 種類の環境試料を植種源として用いた結果を報告する。まず、各試料から微生物細胞を浸出し、Co-culture 法と通常の集積培養法にてセルロース分解菌の集積を試みた。

【実験材料と方法】*Aeromonas salmonicida* を Bait として用いた。植種源には、生ごみのメタン発酵システムにおける好気性溶解処理液（G 液）と酸生成処理液（A 液）、馬糞堆肥、腐朽した木の木片、コンポストⅠおよびⅡの計 6 種類の環境試料を用いた。各環境試料 3g を 0.85%生理食塩水 27ml で懸濁し、5 分間撹拌して菌体剥離懸濁液を得た。125ml 容バイアルに D58 改変培地を 50ml 充填し、濾紙（10×50 ㎜）を加え、気相部を窒素置換して密栓後滅菌した。Bait を菌体濃度 $OD_{660}$≒1.0 となるように添加した系（以下、Co-culture）と添加していない系（以下、Control）を用意し、各菌体剥離懸濁液を 1.0ml 接種し、37℃で静置培養した。濾紙分解の有無からセルロース分解菌の集積を判定し、セルロース分解が確認された培養物は新たな培地に再度接種して培養を繰り返した。微生物相の解析は PCR-DGGE 法により行った。

【結果及び考察】Control では、G 液、A 液、コンポストⅠを植種源とした培養物でセルロースの分解が確認された。また、A 液については、培養物を新たな培地に接種した回分実験においてもセルロース分解能は維持された。Co-culture では、6 種類の全ての植種源でセルロースの分解が確認された。また、馬糞堆肥、木片、コンポストⅠおよびⅡの 4 種類の植種原については、培養物を新たな培地に接種した回分実験においてもセルロース分解能が維持された。また、菌相解析の結果、木片から集積されたセルロース分解微生物群では *Clostridium herbivorans*、コンポストⅡでは *Clostridium termitidis* がセルロース分解の主役を担うものと考えられた。このように、Co-culture 法では通常の集積培養法と比べて高い確率でセルロース分解菌を集積できることが示された。

1）井上　拓　日本生物工学会 2012 年度大会講演要旨集

Co-culture, cellulose, Aeromonas salmonicida

発表番号：4F010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 共培養時に観察される *Methylobacterium* sp. ME121 株の運動性向上因子の同定

# Identification of compounds involved in improving the mobility of *Methylobacterium* sp. ME121 in co-cultivation.

○若林 佑[1]、清水 哲[2]、中村 顕[2]、伊藤 政博[1]([1]東洋大学大学院・生命科学研究科、[2]筑波大学・生命環境科系)
○Yuu Wakabayasi[1], Tetsu Shimizu[2], Akira Nakamura[2], Masahiro Ito[1] ([1]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ., [2]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

【背景・目的】

土壌を始めとする自然環境中では、多様な生物が様々な形で共存することでお互いに作用し合っている。これまでの細菌を扱う研究では、環境中の細菌を単離培養後に実験に使用する研究が主流であった。しかし、自然環境中に存在する細菌の内、単離培養可能な細菌は全体の 1%未満であると言われている。近年、異種の細菌同士を共培養することで以下のような単独培養時には観察されないような細菌の性質が報告されつつある。

●難培養性の細菌を異種の細菌と共培養することで難培養性の細菌が生育する
●単独培養時に生産しない物質を共培養下でのみ生産する。

これらの報告から、自然界における細菌も、お互いに影響しあっていると考えられている。そのため既存の細菌でも、単独で培養した際には観察されないような細菌の性質や代謝産物などが、共培養下で新たに観察されることが期待されつつある。そのため、共培養を行う実験は主に、細菌の生育や代謝産物に着目がされてきた。

本研究で使用する *Methylobacterium* sp. ME121 株(以後 ME121 株と表記、運動性あり)と *Kaistia* sp. 32K 株(以後 32K 株と表記、運動性なし)は、同一の土壌サンプルから単一のコロニーとして分離された細菌である。この二種類の細菌を共培養した際に、ME121 株の活発な運動性が顕微鏡下で観察された。しかし、ME121 株を単独で培養した際には同様の遊泳は観察されなかった。このような共培養による運動性の変化はこれまで報告例はない。そのため、細菌の運動性についても細菌間で相互に影響しあっていることが示唆された。そこで本研究では、共培養下で観察された ME121 株の運動性向上の機構を明らかにするために 32K 株が生産する ME121 株運動性向上因子(K 因子)の同定を目的とした。

【実験操作】

32K 株の培養上清中に含まれる ME121 株運動性向上因子の影響を明確にするために、32K 株の培養上清を使った ME121 株の運動性試験を行った。また、培養上清に加熱やプロテアーゼ処理などの様々な処理を行うことで培養上清中に含まれる K 因子の絞り込みを行った。

【結果】

32K 株の培養上清を使った ME121 株の運動性試験の結果から、この上清中に含まれる生産物の影響で ME121 株の運動性が向上することが明らかとなった。また、K 因子は加熱やプロテアーゼ処理の影響を受けないことが分かった。現在、K 因子の同定を試みており、その詳細についても報告する。

Co-culture, Motility, *Methylobacterium*

発表責任者：若林 佑（s39101400198@toyo.jp）

発表番号：4F011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 固化剤濃度および呼吸機能関連遺伝子が大腸菌のコロニー形成に及ぼす影響

# Influence of gelling agent concentration and a respiratory gene on colony forming ability of Escherichia coli

○伊藤 俊輔[1]、佐藤 寛美[1]、古寺 和人[1]、中島 加奈子[2]、林 真由美[1]、野村 一樹[1]、山口 利男[3]、井口 晃徳[1]、重松 亨[1] ([1]新潟薬大・応生科、[2]新潟薬大・産学連携セ、[3]新潟薬大・薬)
○Syunsuke ITO[1], Hiromi SATO[1], Kazuto KODERA[1], Kanako NAKAJIMA[2], Mayumi HAYASHI[1], Kazuki NOMURA[1], Toshio YAMAGUCHI[3], Akinori IGUCHI[1], Toru SHIGEMATSU[1] ([1]Fac. Appl. Life Sci., NUPALS, [2]LCRDP, NUPALS, [3]Fac. Pharm., NUPALS)

【目的】 Koch の固形培地により純粋培養法が確立されたが、近年、従来の培養法では増殖・コロニー形成が困難な種類あるいは状態の微生物(Viable but nonculturable; VNC)の存在が報告されている。その要因として、寒天に含まれる Furan-2-carboxylic acids、リン酸がグルコースと共にオートクレーブすることで生じる $H_2O_2$、大腸菌については脂肪酸供給不全等が報告されている。本研究では、実験室でよく用いられる *Escherichia coli* をモデルとし、固化剤の濃度の違いおよび呼吸機能関連遺伝子がコロニー形成能に及ぼす影響を解析した。

【方法】 本研究では、親株 *E. coli* BW25113 および cytochrome *bd*-I terminal oxidase subunit II をコードする *cydB* が欠損した変異株 JW0723 を LB 液体培地にて振盪培養した対数増殖期細胞を用いた。生菌数は固化剤 Agar Noble (Difco) (以下 AN)を 0.5%、1.5%の濃度で添加した LB 平板培地によるコロニーカウント法($N_C$)、および 96 well microplate を用いた液体培地希釈法($N_L$)により生菌数を算出した。$N_C$ を $N_L$ で除した値をコロニー形成率とした。LB 培地および YPD 培地に 0～2 mM のリン酸緩衝液を添加し、リン酸のオートクレーブのコロニー形成への影響を解析した。

【結果・考察】 親株の対数増殖期細胞の生菌数を、0.5%、1.5%の AN の濃度の LB 平板培地を用いた $N_C$ により求めた所、0.5%の方が 1.5%より 2 倍高い値を示した。この結果、AN の濃度が低い平板培地の方がコロニー形成しやすいことを示した。リン酸緩衝液 2 mM を加えオートクレーブした YPD 寒天平板培地、LB 寒天平板培地をそれぞれ調製して生菌数を $N_C$ により求め、リン酸緩衝液 0 mM の条件での生菌数と比較した。その結果リン酸緩衝液の有無で生菌数に差は認められず、リン酸による $H_2O_2$ の影響は本株には当てはまらないことが示唆された。親株と変異株の対数増殖期細胞のコロニー形成率を 0.5%、1.5%の AN 濃度の LB 平板培地を用いた $N_C$ および $N_L$ により求め比較した。両株共に、AN の濃度の 0.5%のコロニー形成率が、1.5%に比べて親株で 2 倍～3 倍、変異株で 1.5 倍～5 倍高く、また、AN の濃度に関わらず、親株の方が変異株よりも高いコロニー形成率を示した。以上の結果から、大腸菌の対数増殖期の細胞では、固化剤の濃度が低い条件において高いコロニー形成率を示し、また呼吸機能関連遺伝子の欠損によりコロニー形成が阻害されていることが示唆された。

gelling agent concentration, respiratory gene, colony forming ability

発表責任者：重松 亨（shige@nupals.ac.jp）

発表番号：4F012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

低温飢餓条件でのコロニー形成能の低下を抑える大腸菌遺伝子の解析
Analysis of genes retaining colony-forming activity of cold- and starvation-stressed *Escherichia coli* cells

○福嶋 凡子、西尾 優宏、高丸 玲子、小川 哲弘、日高 真誠、正木 春彦（東大農）
○Hiroko FUKUSHIMA, Masahiro NISHIO, Reiko TAKAMARU, Tetsuhiro OGAWA, Makoto HIDAKA, Haruhiko MASAKI (Univ. of Tokyo)

固体培地上にサンプルを塗布し単一細胞由来のコロニーを形成させる純粋培養法は細菌の分離法の基本であるが，実際に自然に生息する細菌は，極めて一部のものしかコロニー形成に到らない。明らかにコロニー形成は，細菌が単に生きているという以上の特殊な現象であり，我々はそういうコロニー形成に関与する遺伝子の発現と作用機構を知りたいと考えた。大腸菌は通常は培養が容易であるが, 低温・飢餓条件に曝すと生菌数に対してコロニー形成頻度が低下していく, いわゆる VBNC（viable but non-culturable）状態に陥ることが知られている。VBNC 状態は, 自然の大多数の細菌のコロニー形成率が低い現象のモデルとも見られている。我々は，VBNC 化はコロニー形成に必要な遺伝子の発現が減衰していく過程だと想定し，その遺伝子を求めるため ASKA ライブラリー（大腸菌の全 ORF をプラスミドに個別にクローニングしたライブラリー）の中から, 遺伝子を余分に発現すると, VBNC 化処理に抗してコロニー形成能を高く保つような遺伝子を，多数スクリーニングした。この中には，VBNC との関係がすでに報告されている *rpoS* 遺伝子も含まれていた。

今回, VBNC 化条件でコロニー形成能を保つ効果がとくに高いと思われた 7 つの遺伝子クローン化プラスミドをそれぞれ MG1655 株に入れ，対照のベクター株を加えた 8 種類の菌株を等量混合してプラスミドを発現させた上で，菌株混合物を VBNC 化条件に曝し，経時的にコロニー形成させて出現コロニー中での 8 株の占有率を追跡した（競争実験）。低温飢餓条件に置くと対照株は出現コロニーから速やかに消失し，*rpoS* をもつ株は中程度の占有率を示したが，最終的に出現コロニー中の占有率が最も高くなったのは，cyclic-AMP のシグナルを抑える遺伝子を持つ株であった。このことから，cAMP が関わる遺伝代謝系と VBNC 化の関係に興味が持たれた。しかし，cAMP は *rpoS* の転写を抑制することが知られているので，この遺伝子は *rpoS* の発現を上昇させることで間接的に効果を示した可能性もある。この点を含めて現在 VBNC との関係を検討している。

VBNC, colony formation

発表責任者：正木春彦（amasaki@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

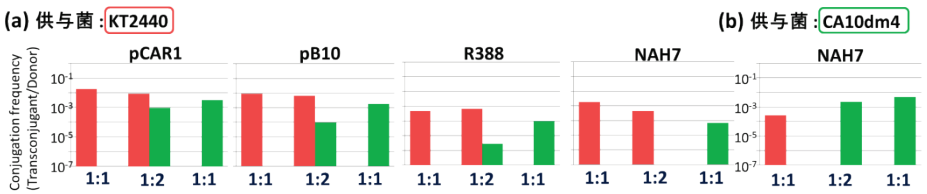
# 複数の受容菌存在下で接合伝達の成立に影響を及ぼす因子の探索

# Novel elements regulating conjugation selectivity of plasmid in multiple recipient candidates

○作田 郁子[1]、水口 千穂[1]、橋本 詢子[2]、小曾根 郁子[2]、小松 護[3]、新家 一男[2]、池田 治生[3]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1]（[1]東大生物工学セ、[2]産総研、[3]北里大・北里生命研）
○Ayako SAKUDA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Junko HASHIMOTO[2], Ikuko KOZONE[2], Mamoru KOMATSU[3], Kazuo SHINYA[2], Haruo IKEDA[3], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1]
([1]The Univ. of Tokyo, [2]AIST, [3]Kitasato Univ.)

【背景・目的】プラスミドの接合伝達は細菌の進化や環境適応の原動力となることから、実環境中でのプラスミドの挙動を知ることは重要である。しかし従来の接合実験の多くは 1 種の供与菌と 1 種の受容菌間で行われ、多種多様な供与菌・受容菌が存在する実環境での接合を反映しているとは言えなかった。本研究では供与菌 1 種に対し受容菌が 1 種の接合（1:1 接合）および同時に 2 種存在する接合（1:2 接合）を行い、受容菌種の増加がプラスミドの接合伝達に及ぼす影響の評価および複数の受容菌存在下でプラスミドの挙動を決定する因子の探索を目的とした。

【方法・結果】異なる不和合性（incompatibility; Inc）群に属する 4 種のプラスミド pCAR1 (IncP-7)、pB10 (IncP-1)、 R388 (IncW) 、NAH7 (IncP-9)について、*Pseudomonas putida* KT2440 株および *Pseudomonas resinovorans* CA10dm4 株を用いて 3 時間の 1:1 接合および 1:2 接合実験を行い、各プラスミドの接合伝達頻度（接合伝達体数／供与菌数）を算出した。1:2 接合では受容菌 CA10dm4 株染色体上に挿入した GFP 蛍光を用いて 2 種の受容菌を区別し、コロニーハイブリダイゼーションにより遺伝子レベルでも確認した。KT2440 株を供与菌とした場合、1:1 接合時はいずれのプラスミドでも両受容菌に対して接合伝達が起こったのに対し、1:2 接合においては、pCAR1 は両受容菌間で接合伝達頻度に差が見られなかったものの、pB10、R388、NAH7 は KT2440 株に接合伝達しやすいことが明らかとなった（図 a)。pCAR1 と NAH7 については接合時間を 16 時間に延ばしても同様の結果が得られた。また NAH7 について供与菌を CA10dm4 株に変えたところ、1:2 接合において CA10dm4 株に接合伝達しやすいことが明らかとなった（図 b)。この「受容菌が 2 種存在する場合には、NAH7 は供与菌と同じ菌株に接合伝達しやすい」現象の原因因子は、供与菌、受容菌、プラスミドのいずれにも存在し得る。現在は受容菌染色体上の因子を探索するため、受容菌 KT2440 株ゲノムから作製した Bacterial Artificial Chromosome（BAC) ライブラリーを受容菌 CA10dm4 株染色体上に挿入し、KT2440 株との 1:2 接合時に NAH7 の接合伝達が可能な CA10dm4 株の取得を目指している。




図．4種のプラスミドの1:1および1:2接合伝達頻度　供与菌として(a)KT2440株、(b) CA10dm4株を用い、受容菌KT2440株、CA10dm4株への接合伝達頻度をそれぞれ赤色、緑色で示した。供与菌の保持プラスミドをグラフ上部に示した。

horizontal gene transfer, plasmid, conjugation

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Methylobacterium* 属細菌の Ca を葉上シグナルとする PQQ 分泌機構の解析
Analyses of Ca-dependent PQQ synthesis and secretion in plant symbiotic methylotrophic bacterium *Methylobacterium extorquens* AM1

○三井 亮司、矢野 裕之、一小路 貴士、田中 美知留、田中 三男（岡山理大理）
○Ryoji Mitsui, Hiroyuki Yano, Takashi Ichikouji, Michiru Tanaka, Mitsuo Tanaka (Okayama Univ. of Sci.)

【目的】植物の生長に伴い放出されるメタノールは植物周辺の菌叢形成に大きな影響を与えている。葉上に優先的に生育する *Methylobacterium* 属細菌は植物よりメタノールを得るとともに植物ホルモンや PQQ を放出して生育を促し、共生関係を形成している。私たちはモデル菌株である *M. extorquens* AM1 を用いて植物と微生物の共生機構を分子レベルで明らかにすることを試みている。*Methylobacterium*のメタノール代謝では植物葉上より放出されるメタノールはPQQを補酵素とするメタノールデヒドロゲナーゼ(MDH)により酸化される。この MDH はアイソザイムを有しており、メタノール酸化に Ca を利用する MxaFI タイプと La, Ce などのレアアースを利用する XoxF タイプがある。また、ゲノムが検索できるすべての *Methylobacterium* でこのアイソザイムが確認できる。私たちは *M. extorquens* AM を用いた解析で、アイソザイムの使い分けが金属元素に依存して厳密に制御されていることを明らかにしている。これは金属元素が植物の生育に伴い土壌から葉上へ移行する環境のシグナルとして利用されていると考えている。本研究では MDH アイソザイムの補酵素であり、メタノール生育時に菌体外に多量に分泌される PQQ に着目した。植物の生育促進作用などが報告される PQQ は、植物との共生関係を担う微生物側からのアプローチ物質であると考えられる。そこで主に土壌シグナルとなる La、葉上シグナルとなる Ca の培養液への添加により、PQQ 生合成、および分泌に及ぼす影響を検討し、植物共生との関係を明らかにすることを試みた。
【方法と結果】植物葉上より新たに *Methylobacterium* を複数分離し、これにモデル菌株の *M. extorquens* AM1 を加えて検討を行った。これらの菌株をもちいてメタノールを炭素源とし、Ca または La の添加により PQQ 分泌に及ぼす影響を確認した。この結果、菌体外に放出された PQQ は菌株間で差はあるものの、すべての菌株で Ca 添加時に PQQ 分泌量が多いことが明らかになった。*M. extorquens* AM1 を用いてさらに詳細に検討した結果、メタノールを炭素源とする生育において Ca でも La でも生育にほとんど差は無かったが、PQQ の分泌量は 4 倍程度多かった。このことから添加する金属が PQQ 生合成系に影響を及ぼすことを推測した。そこで PQQ 生合成系遺伝子の鍵酵素である PQQ シンターゼをコードする *pqqC/D* と PQQ トランスポーターをコードする *pqqB* の発現量の変化を定量PCR法により確認したところ、明らかに Ca を用いて培養したときに発現量が増加しており、分泌量を反映した結果となった。PQQ 分泌や MDH 使い分けなど金属に対する応答は環境を反映する因子となっており、植物との共生に重要な役割を持っていることが推測された。

Methylotroph, PQQ, Plant symbiotic bacteria

発表責任者：三井亮司（rmitsui@dbc.ous.ac.jp）

発表番号：4F015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 花に生息する嫌気性細菌に関する研究

# Charactarization of anaerobes living in flowers

○平井 昂二郎[1]、板橋 貴智[1]、石毛 太一郎[2]、岩田 絢子[1]、田川 可琳[1]、千葉 誠[1]、新村 洋一[1]、川崎 信治[1] ([1]東農大バイオ、[2]ゲノム解析センター)
○Kojiro HIRAI[1], Takanori ITABASHI[1], Taichiro ISHIGE[2], Ayako IWATA[1], Karin TAGAWA[1], Makoto CHIBA[1], Youichi NIIMURA[1], Shinji KAWASAKI[1] ([1]TUA Bio, [2]Genome center)

【目的】嫌気性細菌であるビフィズス菌の多くは動物腸管内に生息するが、例外としてミツバチの腸管から$0_2$耐性能の高いビフィズス菌が単離された報告がある。そこで我々はミツバチの腸内細菌が花由来であると推定した。糖源として蜜が豊富な花には特有の微生物叢の存在が推定されることから、2006年から花に生息する嫌気性細菌の探索を行っている。その結果、花から乳酸など酸を生成する嫌気性細菌のコロニーが多く検出され、花に特有の嫌気微生物叢の存在が強く推定された。またその過程で動物からは単離報告例のない新種の嫌気性乳酸菌が単離され、*Lactobacillus floricola*と*Lactobacillus ozensis*と命名した[1)]。本研究では花に生息する嫌気性細菌の生態分布の解明と新たな微生物資源の探索を目的とする。

【方法】花試料は 2006 年から 2015 年にかけて長野県や北海道などの国立公園で許可を得て、ミズバショウ自生地を中心に日本全国で採取した。採取した花はそのまま、あるいは部位ごとに培養法に供し、得られたコロニーをランダムに選択し、16S rRNA 遺伝子解析を行った。また次世代シーケンサーによる微生物叢解析を行い、培養法との相関性を解析した。

【結果】尾瀬国立公園等の人の生活圏外で採取した花からは *Lactobacillus* 属、*Lactococcus* 属、*Leuconostoc* 属などの乳酸菌が主に単離され、多いもので花 1 輪あたり $10^4$～$10^8$ ものコロニーが得られた。また、ミズバショウからは地域性を問わず *Carnobacterium* 属細菌に分類される乳酸菌が多く単離され、両者が共生関係にある可能性が示唆された。ミズバショウにおいては開花後に細菌叢の形成が定着することが推定された。網羅的な 16S rDNA 解析の結果、花の微生物叢としてグラム陰性細菌や、乳酸菌以外のグラム陽性細菌、好気生細菌なども検出されたが、培養法にて単離された嫌気性乳酸菌の検出頻度は他の菌属種に比べて高く、培養法との相関性が得られた。花と接触性があるアブやハチ類の菌叢解析を行った結果、花の菌叢と類似する結果が得られた。嫌気性菌が花に生息する意義の解明を目的として、花から単離された菌株の生理学的な特性の解析を進めている。

1）Kawasaki *et al.* IJSEM 61:1356-1359 (2011), IJSEM 61:2435-2438 (2011)

anaerobe, lactic acid bacteria, flower

発表番号：4F016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 重油分解微生物コミュニティの *de novo* メタトランスクリプトーム解析

# *De novo* metatranscriptome analysis on heavy-oil degrading microbial communities

○佐藤 由也[1]、堀 知行[1]、小池 英明[2]、松尾 和幸[1]、柳澤 真紀[1]、ナバロ ロナルド[1]、羽部 浩[1,3]、尾形 敦[1] ([1]産総研・環境管理、[2]産総研・生物プロセス、[3]産総研・機能化学)
○Yuya SATO[1], Tomoyuki HORI[1], Hideaki KOIKE[2], Kazuyuki MATSUO[1], Maki YANAGISAWA[1], Ronald NAVARRO[1], Hiroshi HABE[1,3], Atsushi OGATA[1] ([1]AIST EMRI, [2]AIST BPRI, [3]AIST RISC)

【背景・目的】　活性汚泥による廃水処理技術は世界中で利用されている。活性汚泥は細菌、古細菌、原生動物などの多種多様な微生物からなる複雑なコミュニティであり、その中には多くの難培養微生物が含まれている。そのため、微生物個々の働きや詳細な代謝反応の多くが謎であり、活性汚泥法の開発から 100 年以上が経つ現在でもブラックボックスが解消されないままである。一方、分解機構は不明ながら多くの難分解性化合物の処理が確認されており、効率的な処理法の確立のためにもそれらの分解経路や鍵となる微生物種の解明が求められている。そこで本研究では、難分解性物質の一つである重油を含有する廃水を活性汚泥により処理し、当該バイオリアクターを対象に、次世代シークエンサー解析（16S rRNA 遺伝子解析、*de novo* メタトランスクリプトーム解析）および各種化学分析を行い、活性汚泥中の複雑な微生物代謝系の解明を試みた。
【方法・結果】　初めに、230 L 容のバイオリアクター2 基に重油を添加し、その濃度を 50~200 ppm で段階的に上昇させ処理実験を行った。活性汚泥中に残存する重油成分を GC-MS 解析したところ、一方のリアクターでは処理能が低かったが、もう一方のリアクターでは重油が高度に処理されていることが確認された。次世代シークエンサーを用いた微生物群集構造解析（16S rRNA 遺伝子解析）を行ったところ、重油添加後に両リアクターの微生物組成が大きく変遷することが観察された。両リアクターで石油分解能を有する *Zooglea* 属細菌の近縁種が高い存在量を示していたが、低処理能リアクターでは運転後期にその存在量が低下することが観察された。微生物多様性指数（Chao1、Shannon、Simpson reciprocal）を算出したところ、高処理能リアクターでは多様性が徐々に低下し、特定の微生物が集積されている傾向が観察された。一方、低処理能リアクターでは重油添加後に多様性が増加し、添加前とは異なる微生物コミュニティが形成されていたことが示唆された。さらに詳細な分解機構を解明すべく、トランスクリプトーム解析を行った。本解析法は、微生物の遺伝子発現を解明する強力なツールであるが、活性汚泥のようにゲノム情報が存在しない複雑な微生物コミュニティに対しては適用困難である。そこで我々は、対象生物のゲノム情報に依存しない「*de novo* メタトランスクリプトーム解析」を活性汚泥微生物コミュニティの機能解析のために構築・適用した。その結果、高処理能リアクターでは脂肪酸のベータ酸化酵素遺伝子が高発現していることが確認され、重油が酸化的に分解されていることが示唆された。それに加え、転写・翻訳に関わる遺伝子、及び核酸・アミノ酸代謝系遺伝子が高発現しており、重油存在下でも微生物の増殖が活発であったことが示唆された。本研究によって、活性汚泥のような複雑な微生物コミュニティに対しても *de novo* メタトランスクリプトーム解析が有効であることが示された。本手法は様々な環境サンプルに応用が可能であり、今後広く展開されていくことが期待される。

metatranscriptome analysis, microbial community, activated sludge

発表番号：4F017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* を *Pseudomonas* 属非窒素固定細菌と共培養した際の窒素固定活性の強化、持続化に関する研究

# Enhancement and persistence of nitrogen-fixing activity of *Klebsiella oxytoca* by cocultivation with a non-nitrogen fixer *Pseudomonas* sp.

○中村 弘輝、正木 春彦、日高 真誠（東大院農生科・応生工）
○Koki Nakamura, Haruhiko Masaki, Makoto Hidaka (UTokyo)

## 背景・目的

現在栽培されている多収穀類の収量確保には窒素肥料の大量投与が不可欠である。ところが、窒素肥料の製造過程や施肥過程で、化石燃料の大量使用と二酸化炭素の排出、窒素の溶脱などによる環境負荷を招いている。そこで我々は、窒素固定細菌を生物窒素肥料として活用することによる化学窒素肥料の使用量削減を目指している。過去の本大会で発表したように、イネ根圏から単離された窒素固定細菌 *Klebsiella oxytoca* NG13 を水田土壌から単離した非窒素固定細菌 *Pseudomonas* sp. RKF06 と共にイネ根圏に接種することで、イネ一株当たりの籾数を増加させることに成功している。本発表では、*Pseudomonas* sp. RKF06 による *K. oxytoca* NG13 の窒素固定活性の増強メカニズムの解明を試みた結果を報告する。

## 方法・結果

NG13 を改変レニー培地で好気的に液体培養してアセチレン還元活性(ARA)の経時変化を観察した。NG13 を $10^4$、$10^5$、$10^6$ cell/mL で植菌したが、いずれの場合も 1 日で $10^8$ cell/mL まで増殖し、その後菌数に変化はなく ARA は 1 週間持続した。そこで、NG13 と等量、10 倍量、100 倍量の RKF06 を植菌する共培養系で ARA を観察したところ、NG13 と RKF06 の量比の増加にともなう ARA の強化と持続化が認められた。最も大きな変化が認められたのが NG13:RKF06($10^6$:$10^8$)の系であり、ARA の強化と 3 週間の持続により最終的なエチレン生成量は NG13 単独培養時の 4 倍に達した。この系における特徴として、RKF06 細胞の極端な微小化が観察された。

次に、半透膜を用いて NG13 と RKF06 の増殖区画を分離して両者の接触を阻害する系における ARA の強化を観察した。NG13:RKF06($10^6$:$10^6$)の系では分離培養と接触培養とで同様の ARA 強化を示したが、NG13:RKF06($10^6$:$10^8$)の系では分離培養の ARA 強化は接触培養のものよりも劣っていた。分離培養の両区画における NG13 と RKF06 の菌数を計測すると、どちらも単独培養時の半数ほどの菌数であり、半透膜を通過する何らかのシグナル交換により相互に生育抑制をかけていることが示唆された。また、RKF06 細胞の微小化も観察された。

以上より、RKF06 の微小化にともなって生産される物質が NG13 の細胞当たりの ARA を強化し、それは両菌の接触でより増強されるものと考えられる。

biological fertilizer, coculture, nitrogen fixation

発表番号：4F018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 反射顕微鏡法による微生物腐食の新規観察手法

# Visualization of microbiologically influenced corrosion by using continuous optimizing confocal reflection microscopy

○渡辺 宏紀[1]、稲葉 知大[2,3]、豊福 雅典[2]、宮野 泰征[4]、野村 暢彦[2] ([1]筑波大・生命環境、[2]筑波大院・生命環境、[3]産総研・環境管理、[4]秋田大・工学研究科)
○ HIROKI WATANABE[1], TOMOHIRO INABA[2,3], MASANORI TOYOFUKU[2], YASUYUKI MIYANO[4], NOBUHIKO NOMURA[2] ([1]Life and Environ. Sci. University of Tsukuba, [2]Grad. Sch. Life and Environ. Sci. University of Tsukuba, [3]Environ. Manage. Research. Inst. AIST, [4]Grad. Sch. Eng. Akita University)

金属腐食において，微生物に由来する腐食を特にMIC(Microbiologically influenced corrosion)と呼ぶ．MICは常温・中性環境下においても金属材料が大きな腐食損傷を受ける場合があることからその理解と，防止が求められている．MICの発生した金属表面には微生物細胞が集団で付着していることが観察されており，この微生物集団はバイオフィルムと呼ばれている．物質表面上にバイオフィルムを形成した微生物は，自由遊泳時とは異なる性質を示すことが知られており，MICにおいてもバイオフィルム形成が影響を与えていることが予想される．しかし，技術的な問題からバイオフィルム形成とMICが同時に観察された例はなく，両者の関係性についての知見は乏しい．そこで我々は，当研究室の反射顕微鏡法をベースとした新しい観察手法であるCOCRM(Continuous-optimizing Confocal Reflection Microscopy)法[1, 2)]を用いることとした．本手法では反射光をシグナルとして用いることで，金属表面および表面上のバイオフィルムを非破壊的にリアルタイムに観察することを可能した.

ステンレス鋼(SUS303)を千葉県富津にて採取した海水に浸漬し，金属表面に形成されたバイオフィルムから細菌を単離した．単離した細菌を滅菌した海水に播種し，そこにステンレス鋼を浸漬させることで金属表面上にバイオフィルムを形成させた．共焦点顕微鏡を用いてCOCRM法にて観察を行った.

実際にCOCRM法を用いた観察により，金属表面へのバイオフィルム形成とMICの進行を同時かつ継時的に可視化することに成功した．この観察報告は本実験が初めてである．金属表面には立体的なバイオフィルムが形成される様子が確認され，バイオフィルムの内部には微生物の代謝産物であると考えられる細胞外多糖が存在することが示された．さらに，バイオフィルム下の金属表面には腐食孔と推測される孔が観察された.

本発表では，COCRM法を用いたMICの新規観察手法に加え，それを用いることで得られたバイオフィルムとMICに関する知見を報告する。

(1)Yawata *et al.* J.Biosci.Bioeng. 2010 (2) Inaba *et al.* Microbiol. Immunol. 2013

Microbially Influenced Corroson, Biofilm, Microscopy

発表責任者：渡辺宏紀（s1210734@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：4F019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ゲノム配列に基づく Rhodococcus 属細菌の超低栄養性の比較

# Comparison of oligotrophy among genus Rhodococcus strains based on genome data

○小林 亮太[1]、矢野 嵩典[1]、鈴木 智大[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1]、吉田 信行[1] ([1]静岡院、[2]静大、グリーン研)
○Ryouta Kobayashi[1], Takanori Yano[1], Tomohiro Suzuki[2], Hideo Dora[2], Kazuhide Kinbara[1], Masaki Shintani[1], Nobuyuki Yoshida[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ. RIGST)

[背景と目的] 我々は低炭素社会の実現に向けた取り組みとして，炭酸固定能を持つ微生物を利用した物質生産に注目している．*Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は，大気中の二酸化炭素のみを炭素源として生育可能な超低栄養性細菌であり，新規な炭酸固定能を持つと推定されているが，その経路の全容は未解明であった(1). そこで本研究では，N9T-4 株の炭酸固定能の理解を目指し，まず本菌株と，*Rhodococcus* 属の類縁菌株（*R. erythropolis* A および *R. erythropolis* C）の全ゲノム配列を解読するとともに，同属の他の菌株について低栄養性の有無や，遺伝子レベルの比較を行った．

[実験方法] 本菌株を含む，*Rhodococcus* 属細菌 9 株（*R. erythropolis* N9T-4, *R. erythropolis* A, *R. erythropolis* C, *R. erythropolis* PR4, *R. erythropolis* NBRC 15567, *R. jostii* RHA1, *R. opacus* NBRC 108011, *R. ruber* NBRC 15591, *R. wratislaviensis* DSM 44193）を用いて，$OD_{660}$ 値をそろえた菌体懸濁液を，炭素源を含まない無機塩最少培地（BM）上に塗布して 30℃で静置し，その生育の可否を比較することで低栄養性を評価した．また，9 株のうち本研究で全ゲノム配列を解読した 3 株と，既に解読済みの 4 株の計 7 株（N9T-4 株, A 株, C 株, PR4 株, RHA1 株, NBRC 108011 株, DSM 44193 株）について，N9T-4 株の低栄養性に必須な遺伝子の 1 つである，*aldA*(1)の有無を調べた．

[結果と考察] *Rhodococcus* 属 9 株のうち, N9T-4 株を含む 6 株は BM 培地上で一定の生育が認められたが，コロニーの出現速度や数に違いが見られ，N9T-4 株が最も良い生育を示した．一方，残りの 3 株のうち A 株と DSM 44193 株は，コロニーの出現が遅く，NBRC 15567 株は生育が認められなかった．また，ゲノム情報を利用可能な N9T-4 株を含む 7 株全てが，N9T-4 株の *aldA* と identity を示す遺伝子を有していたが, A 株のみ 39%と低く, 他の 6 株は 90%以上の identity を示した. 以前の研究で, N9T-4 株の低栄養性は, *aldA* を破壊することで失われ, 相補すると回復する(1)こと, *aldA* 遺伝子の発現量は，低栄養性条件下で数百倍にまで上昇することが判明している(2)．従って，それぞれの菌株における低栄養生育能の違いは，低栄養性に関与する *aldA* の発現量の差によるものと考えられた．現在，*aldA* の発現ベクターを構築し，これらの菌株内で発現させることで，BM 培地上での生育に変化が見られるか調べている．

(1) Ohhata *et al*., 2007, J. Bacteriol, 189: 6824-6831
(2) Yoshida *et al*., 2011, Biosci. Biotechnol. Biochem., 75: 123-127

oligotroph, Rhodococcus, genome

発表責任者：新谷政己（tmshint@ipc.shizuoka.ac.jp）

発表番号：4F020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アラスカ永久凍土氷楔由来放線菌の休眠に関わる遺伝子特定の試み

# Identification of genes specific to dormancy of actinomycetes from permafrost ice wedge in Alaska

○池 晃祐[1]、寺島 美亜[2]、北川 航[1,3]、加藤 創一郎[1,3]、鎌形 洋一[1,3]、浅野 行蔵[1]([1]北大院農、[2]北大低温研、[3]産総研生物プロセス)
○ Kosuke IKE[1], Mia TERASHIMA[2], Wataru KITAGAWA[1,3], Soichiro KATO[1,3], Yoichi KAMAGATA[1,3], Kozo ASANO[1] ([1]Hokkaido Univ., Grad. Sch. Agr., [2]Hokkaido Univ., Inst. Low. Temp., [3]AIST., Bioprod. Res. Inst.)

無芽胞形成のバクテリアには環境ストレスに対応して「生存してはいるが増殖しない」状態に陥るものがいる。このような状態は休眠(dormancy)と呼ばれている。我々のグループはアラスカの楔状に発達した永久凍土層から新属新種の無芽胞形成放線菌 *Tomitella biformata* AHU 1821$^{T}$ を単離し、本菌を人工的に休眠状態へ誘導可能であることを見出した。このような休眠状態が氷中などでの長期生残に関与していると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。本研究では休眠中の生理や生残性に関与する遺伝子の特定を目的とし、本菌株の休眠および増殖細胞を用いたプロテオーム解析を行い、得られた候補遺伝子の破壊株の構築・解析を進めた。休眠細胞の調製は次のように行った。液体栄養培地で前培養した *Tomitella* 菌体を生理食塩水で 2 度洗浄した後、フルクト―スを加えた液体最小培地に $OD_{600}$ が 0.01 となるよう接種した。本培養は 30 mL 容バイアルチューブに 20 mL の培地を添加し、チューブの口をブチルゴム栓で覆う酸素制限状態で行った。溶存酸素濃度がほぼ 0 になるまで振盪培養した後、静置に切替えて培養を継続した。本手法で約 2 年静置して得た休眠細胞と通常の好気的な対数増殖期細胞からビーズ式細胞破砕によって全タンパク質を抽出し SDS-PAGE に供したところ、休眠細胞においてもタンパク質がほとんど分解されずに細胞内で保存されていることが観察された。これらサンプルを質量分析によるプロテオーム解析に供した結果、休眠細胞からは 15,471 スペクトル、1,002 タンパク質を、対数増殖期細胞からは 15,872 スペクトル、1,454 タンパク質を検出・同定した。これらの中から休眠生理に関与しているタンパク質を特定するため、対数増殖期と比べて休眠細胞で 3 倍以上の発現かつ 50 以上の全スペクトラルカウントのタンパク質のみを選抜した結果、12 種類のタンパク質が選抜された。その中でも我々は一酸化炭素脱水素酵素(Carbon monoxide dehydrogenase、以下 CODH)に注目した。プロテオーム解析により CODH の 3 つのサブユニットすべてが休眠細胞から特異的かつきわめて高頻度（大サブユニットが 22 ユニークペプチド、アミノ酸配列被覆度 40.9%；中サブユニットが同 12、13.39%；小サブユニットが同 5、49.38%）に検出されたためである。CODH には一酸化炭素と水から二酸化炭素とプロトンを生成するエネルギー獲得反応を触媒する機能が知られおり、低酸素・貧栄養の本休眠系で *Tomitella* 細胞が CODH を利用したエネルギー代謝によって生残性を高めていると予想される。現在、相同組換えを利用した *Tomitella* の CODH 破壊株を構築し、その休眠誘導への寄与または休眠中の役割を検討中である。

Dormancy, Proteome, Carbon monoxide dehydrogenase

発表責任者：池　晃祐（k-ike@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4F021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 水素酸化細菌の培養特性と独立栄養代謝活性の解析

# Analysis of growth characteristics and autotrophic activities of hydrogen-oxidizing bacteria

○近藤 晃一郎[1]、飯塚 久美子[1]、白神 清三郎[2]、石井 正治[3]、西原 宏史[1]([1]茨城大・農・資生科、[2]味の素・バイオ・ファイン研、[3]東大院・農生科・応生工)
○Koichiro Kondo[1], Kumiko Iitsuka[1], Seizaburo Shiraga[2], Masaharu Ishii[3], Hirofumi Nishihara[1]([1]Dept. Bioresour. Sci., Coll. Agric., Ibaraki Univ., [2]Res. Inst. for Bioscience Prod. & Fine Chemicals, Ajinomoto Co., Inc., [3]Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Agric. Life Sci., Univ. Tokyo)

(目的)水素酸化細菌の特徴である高活性の水素酸化系と炭酸固定系は、クリーンエネルギーである水素を利用した環境技術開発が考えられる重要な機能である。*Hydrogenophilus thermoluteolus* TH-1 株は生育至適温度が 50℃付近にある好熱性菌であり、独立栄養条件下での倍加時間は約 60 分と速い増殖速度を有する。また、*Hydrogenophaga* sp. AH-24 株は蓮田土壌から分離された生育至適温度 35℃付近にある中温性菌である。本研究では、これらの水素酸化細菌を有用物質生産等へ利用するための基盤情報として、独立栄養・従属栄養・混合栄養条件など、各種条件下での増殖と独立栄養代謝活性について解析することを試みた。

(方法と結果)独立栄養条件では完全無機培地(気相／$H_2$:$O_2$:$CO_2$ = 75:15:10)、従属栄養条件では数種類の複合培地と上記無機培地に有機物を添加した合成培地を使用した。密閉条件での培養ではバイアルびんを用い、気相を好気または嫌気的な条件にて振とうした。培地中の基質や生産物の消長はHPLCを用いて分析し、密閉した気相中のガス成分の変化はGCにより分析した。水素酸化系は細胞膜に存在してATP生成に関与する膜結合型ヒドロゲナーゼと可溶性のNAD還元型ヒドロゲナーゼについて、それぞれ水素に依存したベンジルビオローゲンおよび NAD の還元を指標として活性を測定した。炭酸固定系活性は、カルビン回路初期反応酵素であるリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼの共役による炭酸ガスに依存したNADH酸化活性を測定した。

これまでの研究で、TH-1 株においてヒドロゲナーゼ活性が従属栄養条件でも高いレベルで発現しており、有機基質と無機基質が共存する混合栄養条件では炭酸固定系活性も高いレベルで発現していることが確認されていた。一方、今回 AH-24 株で調べたところ、従属栄養条件だけでなく、混合栄養条件でも水素酸化系と炭酸固定系は強く抑制されており、有意な活性は検出されなかった。同じ水素酸化細菌でも、両菌株の独立栄養代謝活性の有機物に対する挙動は大きく異なることがわかった。TH-1 株が水素の有無にかかわらず、従属栄養条件において高いヒドロゲナーゼ活性を発現することについて、ヒドロゲナーゼが菌体内の余剰還元力を処理するために水素を発生する方向に機能する可能性が考えられた。そこで、培地中に有機基質を含む好気条件にて密閉系で培養を行ったところ、酸素の消費による欠乏と共に水素の発生が確認された。

hydrogen-oxidizing bacterium, hydrogenase, CO2 fixation

発表番号：4F022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Physiological and molecular analyses of yeasts isolated from Toddy in Sri Lanka

○Maduka Subodinee Ahangangoda Arachchige, Hirohide TOYAMA (Dept. of Biosci. Biotech,, Fac. of Agri., Univ. of Ryukyus.)

[Objective] In Sri Lanka, the coconut phloem sap collected from tapped tender inflorescence is fermented by natural airborne yeasts and the resultant alcohol beverage called “Toddy”. About yeast from Coconut Toddy, the detail research was not performed yet. Therefore, the present research study was attempted to explore the coconut toddy yeasts’ physiological and biochemical characteristics.

[Methods] Isolation and characterization of yeast strains were carried out on YPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) agar medium. Isolated yeasts were identified through analysis of DNA sequences of PCR amplified 26S rDNA D1/D2 region. Tolerance to salinity was examined on 50 $gL^{-1}$ to 140 $gL^{-1}$ NaCl and to inhibitor on 3 mM to 24 mM vanillin in YPD. Growth of yeast incubated at 30 $^0$C, 37 $^0$C to 42 $^0$C were observed for thermotolarance. The fermentation ability of yeast was investigated on batch ferment media contained 100 $gL^{-1}$ glucose at 30 $^0$C, 37 $^0$C, 40 $^0$C or 41 $^0$C in a static incubation conditions. Samples were collected by 12 h intervals and alcohol quantification was carried by using Alcohol dehydrogenase (ADH) enzyme from Acetic acid bacteria.

[Results] Twenty seven yeast strains were isolated from coconut toddy. Eighteen strains showed 100% identify to those of *Saccharomyces cerevisiae* (SLY-1 to 18), eight strains showed 99% identify to those of *Pichia manshurica* and the sequences of the one strain showed 100% identify to that of *Saccharomycodes ludwigii.* All *Saccharomyces cerevisiae* strains were found to be tolerance to 12.5 % NaCl in YPD except SLY-10 which tolerated up to 13.5 %. It was found that most of *S. cerevisiae* strains showed a significant growth at 40 $^0$C and poor growth at 42 $^0$C. Among a few strains which could grow against in the presence of 18 mM vanillin concentration, only the yeast SLY-10 strain could grow in the presence of 21 mM while its lag period was extended to 60 h. Eight strains of *S. cerevisiae* showed higher alcohol production at 40 $^0$C and five strains produced alcohol than the other three strains at 41 $^0$C.

Toddy, Yeast, Thermotolerant

発表責任者：Hirohide TOYAMA（toyama@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：4F023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 溶存酸素がビール酵母生育に及ぼす影響に関する研究
# Effect of Dissolved Oxygen on the Brewer's Yeast Growth

○宮澤 拓巳[1]、金内 誠[1]、チャールズ.W. バンフォース[2] ([1]宮城大学食産業学部大学院、[2]カリフォルニア大学デービス校)
○ TAKUMI MIYAZAWA[1], MAKOTO KANAUCHI[1], Bamforth Charles[2] ([1]Miyagi Univ., [2]University of California, Davis)

【緒論】ビール醸造において、発酵工程は最も重要な工程である。酵母を冷却した苦麦汁に添加する際、溶存酸素を上昇させる目的でエアレーションを行うことが一般的である。溶存酸素は古くから酵母に及ぼす影響について研究され、酵母の良好な増殖や、過度なエステル生成の抑制などの効果が報告されてきた。しかし、酵母の酸素要求量は菌株によって異なり、その要因は明らかとなっていない。さらに、過度なエアレーションは麦汁を酸化し、タンパク質とポリフェノールの結合による濁り物質の生成や、濾過速度の低下などの問題を引き起こす。

そこで本研究では、溶存酸素のビール酵母間での生育に及ぼす影響を検討した。これにより、菌株間での適正な酸素要求量が明らかになることになることによって、より高品質なビールの醸造に寄与することを目的とした。

【方法】使用菌株は基準株である NRIC1560(*Saccharomyces cerevisiae*)と 2035 American Lager、Safale US-05 を用いた。酸素が生育へ及ぼす影響を検討するために、培地中の溶存酸素を嫌気条件(0.00ppm)としたものと好気条件(9.50ppm)としたものを用いた。また、培地条件は maltextract 培地及び maltose-salt 培地、培養温度は 15℃及び 30℃とした。さらに、脂肪酸(リノール酸)添加した培地での生育も検討した。培養期間は 96 時間とし、経時的に $OD_{600}$、溶存酸素、EtOH、Plato を測定した。

【結果及び考察】

各条件下で培養した結果、15℃において生育に違いが見られた。溶存酸素は培養開始時点から各酵母に取り込まれ maltextract 培地では 48h には 0.00ppm まで減少し、対数増殖期を迎えた。しかし、maltose-salt 培地では溶存酸素は 9.50ppm 中、約 5.00ppm 取り込まれた。$OD_{600}$、EtOH は、溶存酸素を好気条件(9.50ppm)としたものが、嫌気条件(0.00ppm)としたものよりも高い値を示した。Plato は溶存酸素を 9.50ppm とした方がより低い値を示し、増殖により発酵していた。また、リノール酸を添加した系では、添加しない系よりもいずれも良好な生育を示した。一方で、30℃で培養したものは、生育条件間で差異が見られなかった。これらの結果から、溶存酸素は低温条件での生育により大きな影響を与えていることが推察された。一般的に、低温ストレス条件下において酵母は、膜脂肪酸組成の不飽和脂肪酸含量が酸素を要求する不飽和脂肪酸合成酵素により増加し、良好に生育すると言われており、既知の報告と一致した。これらのことから、溶存酸素が酵母に与える影響を網羅的に分析し明らかとした。

yeast, dissolved oxygen, fermentation

発表責任者：宮澤拓巳（f1553008@myu.ac.jp）

発表番号：4F024
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 奈良八重桜の花から分離された Torulaspora delbrueckii 株のストレス耐性

# Stress tolerance in Torulaspora delbrueckii strains isolated from the Cherry blossom, Narano-yaezakura (Prunus verecunda 'Antiqua')

○岩口 伸一[1]、角井 理衣[1]、高橋 達治[2]、坪井 誠[2] ([1]奈良女大理生物科学、[2]一丸ファルコス株式会社)
○Shin-ichi IWAGUCHI[1], Rie KAKUI[1], Tatsuji TAKAHASHI[2], Makoto TSUBOI[2] ([1]Nara Women's Univ, [2]Ichimaru Pharcoc Co.,Ltd.)

ビールやワイン、パンなどの発酵食品の生産には目的に即した菌種、菌株の選定が必要で、主として*Saccharomyces cerevisiae*の菌株が利用されている。現在では、消費者志向に合わせた新たな菌株を選択することも試みられており、non-*Saccharomyces*属の酵母種の利用も行われている。

2008年に当大学において、ナラノヤエザクラ（奈良八重桜）の花から分離された数種類の酵母のうち、4株が*Torulaspora delbrueckii*（*T. delbrueckii*）と同定された。*T. delbrueckii*は高い冷凍ストレス耐性と浸透圧ストレス耐性を示すことが知られており、冷凍パン生地などに利用されている。しかしながら、遺伝的、生理学的そして分子生物学的背景は不明なことも多い。

本研究ではナラノヤエザクラの花から得られた*T. delbrueckii* 4菌株(B11株、B61株、C1株、E1株)が産業的に利用可能かどうかについて、冷凍ストレスと浸透圧ストレスを含む複数のストレスに対する耐性の程度を調べた。C1株は30℃以上で増殖が出来ず、B61株のみが37℃で増殖が可能であった。冷凍ストレスに対しては、冷凍後の生存率が菌株ごとに異なっていた。塩ストレスでは、*T. delbrueckii* の3株(B11株、B61株、E1株)が*S. cerevisiae*菌株よりも高い耐性を示した。酸化ストレス（過酸化水素）においては*T. delbrueckii*のうち3株(B61株、C1株、E1株)が*S. cerevisiae*菌株と比べ特に高い耐性を示した。紫外線感受性実験については*T. delbrueckii*の 3株(B11株、B61株、E1株)が*S. cerevisiae*菌株と比べ高い耐性を示したが、*T. delbrueckii* C1株は*S. cerevisiae*菌株よりも感受性が高かった。

生育可能な温度、塩ストレス、過酸化水素、紫外線、冷凍ストレスへの抵抗性に関しては、B61株が最も有用性の高い株と判断した。今後はB61株のストレス耐性の原因を遺伝子レベルから探っていくとともに、実用化に向けた検証を行う。

Torulaspora delbrueckii, Stress tolerance, yeast

発表責任者：岩口伸一（iwaguchi@cc.nara-wu.ac.jp）

発表番号：4F025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ラクチュロース-ラフィノース-ガラクトオリゴ糖の組み合わせが新生仔マウス消化管に与える影響の検討

# Physiological effect of Lactulose-Raffinose-Galactooligosaccharide combination on the intestine of neonatal mice

○江原 達弥、津田 宗哉、松原 毅、和泉 裕久、中里 友紀、岩本 洋、武田 安弘（森永乳業（株）栄養科学研究所）
○Tatsuya EHARA, Muneya TSUDA, Takeshi MATSUBARA, Hirohisa IZUMI, Yuki NAKAZATO, Hiroshi IWAMOTO, Yasuhiro TAKEDA (Nutritional Science Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)

【背景】健常なヒト乳児の腸内菌叢はビフィズス菌が圧倒的に優勢であり、乳児の感染症やアレルギー発症のリスク低減に貢献していると考えられている。人工栄養児は一般的に母乳栄養児と比較して腸内菌叢におけるビフィズス菌占有率が低いことが知られており、人工栄養児に母乳栄養児と同等のビフィズス菌優勢の腸内菌叢を形成させることは、乳児用調製粉乳の開発において重要な課題の一つである。この点に配慮し、乳児用調製粉乳には難消化性オリゴ糖などのプレバイオティクスが配合されているが、オリゴ糖はその種類によりビフィズス菌の代謝様式、資化性が異なることが知られている。我々はこれまでに、*in vitro* において 3 種オリゴ糖（ラクチュロース、ラフィノース、ガラクトオリゴ糖）の組み合わせが相乗的にビフィズス菌を増殖させることを報告してきた。【目的】3 種オリゴ糖の組み合わせの *in vivo* におけるビフィズス菌増殖作用及び遺伝子発現調節作用を評価し、人工栄養児の腸内菌叢改善における有用性を明らかにすることを目的とした。【方法】哺乳中の新生仔マウスに 1 ないし 3 種オリゴ糖とビフィズス菌 *Bifidobacterium breve* を 8 日間連続投与し、大腸内容物中の *B. breve* 数及び盲腸内容物中の有機酸濃度を定量した。また、大腸及び肝臓組織の遺伝子発現解析を行った。【結果と考察】3 種オリゴ糖投与群は、*in vitro* の結果と同様に *in vivo* においても 1 種あるいは 2 種オリゴ糖群と比較して高い *B. breve* 増殖促進作用を示した。また、3 種オリゴ糖は盲腸内容物中の酢酸濃度を増加させた。さらに大腸において、制御性 T 細胞のマーカー遺伝子 *Foxp3* 及び消化管ホルモン GLP-1/GLP-2 をコードする遺伝子 *Gcg* の発現が増加した。これらの結果から、3 種オリゴ糖の組み合わせは *in vivo* においても優れたビフィズス菌増殖促進効果を発揮し、人工栄養児の腸内菌叢改善に繋がることが示唆された。またビフィズス菌による代謝産物である酢酸を介した免疫調節等の生理作用が期待された。

prebiotics, bifidobacteria, infant formula

発表番号：4F026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

光変換型蛍光蛋白質で細胞極を標識した大腸菌の観察と光変換条件の最適化
Conditions for photoconversion and characterization of *Escherichia coli* strains labeled with potoconvertible fluorescent proteins.
○陶山 哲志、水野 敬文（産総研）
○Tetsushi SUYAMA, Takafumi MIZUNO (AIST)

【背景】細胞極の間に分裂面を形成して等分裂する桿菌（例えば大腸菌）では、二つの極の一方が必ず新しい極になり、もう一方が代々親から受け継がれた古い極になる。大腸菌では受け継いだ極の新旧によって娘細胞の生理的な特徴に差が生じることが報告されている[1]。光変換型の蛍光蛋白質 Kaede により大腸菌の極に局在するアスパラギン酸の走化性レセプターTar を標識し、ブラックライトによる光変換とその後の培養の過程で細胞極の新旧を可視化できることを前回の農芸化学会大会で報告した[2]。また同じ株に関して Percoll の密度勾配遠心[3]により細胞の比重に従って分画すると、光変換でラベルされた極を一方または両方に持つ細胞はそれぞれ特定の比重の画分に集積されることを見出した。しかし、ブラックライト（ピーク波長 369 nm）による光変換は細胞にダメージを与える可能性があり、本研究には改善の余地が残されていた。今回は Percoll 密度勾配遠心の結果について報告するとともに、405 nm の LED を光源とした光変換、培養液の組成、また 4 量体の Kaede に対して単量体で機能し 37℃培養においてより良好な光変換シグナルを示す mKikume 標識について検討したので、これらについて報告する。
【方法と結果】組換えや観察は前回に報告した方法に準じた。ブラックライト照射下で培養した Tar-Kaede 株を 100μg/mL のリファンピシンを含む生理食塩水に再懸濁し密度勾配遠心で分画したところ、両極が未変換の蛍光を示す細胞がピークとなり、比重が軽い側に両極が変換型の蛍光を示す細胞、さらに軽い画分に両極の一方が変換型、一方が未変換型の蛍光を示す細胞が集積された。ブラックライトおよび LED の照射下で大腸菌の増殖速度を観察したところ、LED を用いた系では暗条件での培養とほぼ同じ結果となり明らかに細胞へのダメージの軽減が見られた。また従来は完全に光変換することは困難であったが、LED を用いることで完全な光変換が観察された。一方、培地では M9 をベースにした培地中でより良好な光変換が観察された。mKikume 標識に関しては良好なシグナルが得られたものの、対数増殖期の細胞ではほとんど蛍光が観察できず現状では使用が難しい状況にある。現在は新たな知見を加えて、より精度の高い細胞の分画を試みている。本研究は JSPS 科研費 26660078 の助成を受けた研究の一環で実施したものです。
【参考文献】[1] Stewart EJ, et al. (2005) Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. PLoS Biol 3(2): e45. [2] 陶山ら, 日本農芸化学会 2015 年度大会 3C25p11. [3] 佐々木ら, 日本微生物生態学会第 30 回大会 (2015) PI-145.

fluorescent protein, cell division, live cell imaging

発表責任者：陶山哲志（t.suyama@aist.go.jp）

発表番号：4F027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

出芽酵母の細胞壁β-1,6-glucan の合成に関わる Kre6 の機能に必須なアミノ酸残基の同定
Identification of the essential amino acid residues of yeast Kre6 protein which is responsible for biosynthesis of β-1,6-glucan

○東 亮介[1,2]、足立 博之[1]、依田 幸司[1]、鎌倉 高志[2]、野田 陽一[1]（[1]東大院・農生科・応生工、[2]東理大・理工）
○RYOSUKE AZUMA[1,2], HITOYUKI ADACHI[1], KOJI YODA[1], TAKASHI KAMAKURA[2], YOICHI NODA[1] ([1]The University of Tokyo, [2]The Tokyo University of science)

［目的］出芽酵母細胞壁はマンナン蛋白質，キチン，β-1，3-glucan，β-1，6-glucan から構成される．前三者の合成機構に関しては比較的理解が進んでいるのに対して，それらの構成成分をお互いにつなぎ合わせる重要な役割を担うβ-1，6-glucan の合成機構に関しては不明な点が非常に多く残されている．その合成機構の解明は，基礎生物学的に興味深いのみならず，新規抗真菌剤の開発のためにも非常に有用であることが期待される．β-1，6-glucan の合成に関連する Kre（killer toxin resistance）蛋白質のうち，720 アミノ酸からなる II 型の膜貫通型蛋白質 Kre6 は，β-1，6-glucan の合成に中心的な役割を持つことが強く推測されている．その機能解析のため，本研究では Kre6 の機能や，動態への関与が予想されるアミノ酸を置換し，それらの影響を調べた結果について報告する．

［方法と結果］アミノ酸置換は，N 末（細胞質側）に存在する推定の ER 搬出シグナル三ヶ所，C 末（内腔側）の Glycoside Hydrolase （GH）に共通に存在する活性中心部位に類似の配列一ヶ所，N 糖鎖付加共通配列五ヶ所に対して行った．まずアミノ酸置換体の発現コンストラクトを Δ*kre6* 株の染色体に相同組み替えにより導入した．これらの株のライセートを調製して，抗 Kre6 抗体によるウエスタンブロッティングを行い，泳動のパターン，蛋白量を比較した．Kre6 はリン酸化により，電気泳動後複数のバンドとして検出されるが，アミノ酸置換によりそのパターンや量に変化が生じる場合があることを見出した．また Kre6 は，Skn1 という相同蛋白質を持ち，それぞれの遺伝子の単独破壊は生育に大きな影響を及ぼさないが，二重破壊は致死となる．このことを利用して，上記アミノ酸置換が Kre6 の機能へ及ぼす影響を調べた．その結果，推測の GH 活性中心アミノ酸の置換体と，N 末から二つ目の N 糖鎖付加共通配列のアミノ酸の置換体が機能を失っていることを見出した．

Yeast, Cell wall, Membrane traffic

発表責任者：野田陽一（anoday@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* 金属プロテーゼ AdmA, AdmB の局在解析および発現解析

# Analysis on localization and protein expression of metalloproteases, AdmA and AdmB in *Aspergillus oryzae*

○小林 拓嗣、大岩 達郎、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大院）
○ Takuji KOBAYASHI, Tatsurou OIWA, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】 AdmA, AdmB は、麹菌 *Aspergillus oryzae* の ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) である。ADAM は、金属プロテーゼドメインやディスインテグリンドメインといった特徴的なドメインと膜貫通領域を持つ膜タンパク質である。哺乳類 ADAM は、細胞膜上でのタンパク質分解によるユニークなメカニズムでシグナル伝達に関与することが知られている。我々は、昨年度までの本大会において、Δ*admB* と Δ*admA*Δ*admB* の細胞壁構造が変化していることを表現型観察や細胞壁構成多糖の定量により明らかにした (1, 2)。さらに、欠損株の RNA-Seq 解析の結果、一部のキナーゼ遺伝子や転写制御に関わる遺伝子の発現が変動しており、麹菌 ADAM がシグナル伝達に関与することが示唆された (2)。今回は、麹菌 ADAM の生体内での基質を同定することを目標に、候補となるタンパク質を絞るために、AdmA と AdmB の局在解析および発現解析を行った。
【方法・結果】 C 末端に EGFP を融合した AdmA-EGFP, AdmB-EGFP をマルトース誘導型高発現プロモーターである *glaA142* もしくは自身のプロモーター下で発現させるためのプラスミドを構築し、*A. oryzae* niaD300 を形質転換した。得られた株を 24 時間液体培養し、蛍光顕微鏡で観察した結果、*glaA142* プロモーター下で AdmB-EGFP は主に液胞で蛍光が観察され、菌糸先端部でこれより弱い蛍光が観察された。次に、培養した菌体からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE に供し、抗 GFP 抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。その結果、AdmB-EGFP を発現する株では、菌体内可溶性画分で GFP 単体の大きさ付近にバンドが検出され、菌体内不溶性画分に AdmB-EGFP 全長に相当する大きさのバンドが検出された。このことから高発現した AdmB-EGFP の多くは分解され、EGFP 部分が液胞に蓄積し、菌糸先端部に見られた弱い蛍光が AdmB-EGFP 全長のものであると推察した。また、*admA*, *admB* 自身のプロモーター下では液体培養 24 時間では蛍光強度が弱く、検出されるバンド強度も低かったため、120 時間まで 24 時間ごとに菌体を回収し、タンパク質発現解析を行った。解析の結果、菌体内可溶性画分の GFP 単体付近の大きさ付近のバンド強度が培養時間依存的に増加したが、菌体内不溶性画分に融合タンパク質全長に相当する大きさのバンドは検出されなかった。現在、AdmA, AdmB の発現量が増加する培養条件を検討している。

なお、本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

1 ) 小林ら、2014 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、3A13p13
2 ) 小林ら、2015 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、2B41p06

*Aspergillus oryzae*, protease, localization

発表責任者：山形洋平（y-yama@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：4F029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Aspergillus oryzae csrA* 遺伝子の natural antisense RNA は sense RNA と結合し、sense RNA 量と分生子の発芽を制御する

# The natural antisense RNA of *csrA* binds to the sense RNA and regulate the quantity of the sense RNA and germination in *Aspergillus oryzae*

○辻井 雅、竹内 道雄、山形 洋平（東京農工大学）
○masaru Tsujii, Michio Takeuchi, Youhei Yamagata (Tokyo Univ. of agriculture and technology)

【背景と目的】黄麹菌の分生子及び発芽分生子の EST 解析の結果、分生子中では conidia specific reductase（*csrA*）遺伝子領域と重なる領域から転写された antisense RNA（as-*csrA*）由来の EST が最も多く、解析された 528 の EST のうち 43 を占めていた。まず、*csrA* 遺伝子から転写された sense RNA（*csrA* mRNA）と as-*csrA* の配列を決定した。その結果、 *csrA* mRNA は Short-chain dehydrogenases/reductases の触媒ドメインを保持する 444 アミノ酸残基のタンパク質に翻訳され、as-*csrA* は 1.4 kb の転写産物であるが、60 アミノ酸以上のペプチドに翻訳されないことが明らかになった。この結果から、as-*csrA* を *csrA* 遺伝子の natural antisense RNA であるとした。次に、各生育条件における *csrA* mRNA と as-*csrA* の存在量の比較を定量 PCR で行った。その結果、*csrA* mRNA は分生子と分生子着生直前菌体に最も多量に存在し、膨潤した分生子にも僅かに見られた。一方、 as-*csrA* は分生子特異的な転写産物であることを明らかにした。さらに、*csrA* 遺伝子の ORF と as-*csrA* の 3’末端領域をコードする遺伝子領域を欠損した株（Δ*csrA* 株）において、分生子数の減少と分生子形成の異常が見られた [1)]。今回は、*csrA* mRNA と as-*csrA* の関係を明らかにするために、as-*csrA* のプロモーター領域欠損株（Δp-as-*csrA* 株）を作製して、*csrA* mRNA の存在量が変化するかどうかを調べ、その変化が分生子形成や発芽にどのような影響をあたえるかを調べた。
【方法と結果】まず、Δp-as-*csrA* 株 を作製し、定量 PCR によって分生子内の *csrA* mRNA 量をそのホスト株と比較した。その結果、ホスト株と比較して分生子内における *csrA* mRNA 量は Δp-as-*csrA* 株で上昇していることを明らかにした。次に、Δp-as-*csrA* 株とホスト株の分生子の発芽率の測定を行ったところ、Δp-as-*csrA* 株の分生子は有意に発芽率が低いことを明らかにした。一方、 *csrA* mRNA と as-*csrA* の 3’末端は相補的な配列を保持しており、共に分生子に多く存在していることから、*csrA* mRNA と as-*csrA* が分生子内で結合しているのではないかと推測した。 *csrA* mRNA と as-*csrA* が形成する二本鎖 RNA を検出するために、分生子から抽出した S1 nuclease で処理した total RNA を用いて、RT-PCR を行った。その結果、アクチン RNA からは増幅が見られなかったが、*csrA* mRNA からは増幅が見られた。以上の結果から、as-*csrA* は *csrA* mRNA と結合して、*csrA* mRNA 量を減少させることで、発芽を促進していることが推測された。糸状菌において、antisense RNA による遺伝子発現の制御が形態形成に影響していることを明らかにした研究はこれが初めてである。

1）M Tsujii *et al*, Biosci Biotech Biochem, *in press*: 10.1080/09168451.2015.11013333

*Aspergillus oryzae*, natural antisense transcript, conidiation

発表責任者：辻井雅（tsujii8812@gmail.com）

発表番号：4F030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 の局在解析

Localization analysis of autophagy-related protein AoAtg26 in *Aspergillus oryzae*

○菊間 隆志、有岡 学、北本 勝ひこ（東大院・農生科・応生工）
○Takashi KIKUMA, Manabu ARIOKA, Katsuhiko KITAMOTO (Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo)

【目的】麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるオートファジー関連タンパク質 AoAtg26 はステロールグルコシルトランスフェラーゼドメインを有し，その欠損株は選択的オートファジーであるマイトファジー, ペキソファジーのみならず非選択的オートファジーにも障害が生じる [1]。一方でメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* PpAtg26 はメタノール誘導性ペキソファジーに関与するが，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *atg26* 破壊株は表現型を示さない。また，ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* CoAtg26 は付着器におけるペキソファジーに関与し, その破壊株は顕著な病原性の低下を示す。このように，Atg26 は基本的にペキソファジーに機能するが，生物種間でその機能は多様であることが予想される。細胞内局在については，PpAtg26 がペキソファジー誘導時に preautophagosomal structure (PAS)にリクルートされ，さらに micropexophagy-specific membrane apparatus (MIPA)に局在すること, また CoAtg26 も PAS 様のドット状構造として観察されることが報告されている。AoAtg26 はペキソファジー以外にも機能するが，その詳細な分子機構は不明であり，局在解析も行われていない。そこで本研究は，糸状菌である *A. oryzae* における AoAtg26 機能のさらなる知見を得ることを目的とし，AoAtg26 の局在観察を中心に解析を行った。

【方法・結果】AoAtg26 全長（AoAtg26FL），および C 末端側の触媒ドメインを欠損した AoAtg26（AoAtg26ΔCAT）をそれぞれコードする cDNA に *egfp* 遺伝子を融合させ，*Aoatg26* 破壊株で EGFP-AoAtg26FL，EGFP-AoAtg26ΔCAT を発現する株を作製した。これらの株を用いて局在解析を行った結果，最少培地での 24 時間培養で EGFP-AoAtg26FL はドット状構造に局在した。一方，EGFP-AoAtg26ΔCAT は EGFP-AoAtg26FL のドット状構造よりも大きい凝集体として観察された。さらに 48 時間培養では EGFP-AoAtg26ΔCAT は *Aoatg26* 破壊株で観察されるオートファゴソーム形成途中の隔離膜の蓄積体 [1] と考えられる構造に観察された。これらの結果より，EGFP-AoAtg26 は PAS，隔離膜およびオートファゴソーム膜に局在することが明らかとなり，AoAtg26 の触媒ドメインは正常な局在に必須でないがオートファゴソーム形成に必要であることが示唆された。また EGFP-AoAtg26FL 発現株は分生子および気中菌糸形成が回復したが，AoAtg26ΔCAT 発現株では *Aoatg26* 破壊株の表現型の回復は認められなかった。このことからも AoAtg26 のグルコシルトランスフェラーゼ活性が機能に必要であることが強く示唆された。

1) 菊間ら，日本農芸化学会 2014 年度大会要旨集 p. 50

*Aspergillus oryzae*, Autophagy, Sterol-glucosyltransferase

発表番号：4F031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 乳酸菌由来 S-layer タンパク質が示す免疫学的特性

# Immunological properties of S-layer proteins isolated from lactic acid bacteria

○鈴木 駿也[1]、梶川 揚申[2]、田中 尚人[3]、岡田 早苗[2] ([1]東農大院・農化、[2]東農大・生応科・、[3]東農大・菌株)
○Shunnya SUZUKI[1], Akinobu KAJIKWA[2], Naoto TANAKA[3], Sanae OKADA[2] ([1]Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr., [2]Dept. Appl. Biol. Chem,Tokyo Univ. Agr., [3]NRIC, Tokyo Univ. Agr.)

【目的】S-layer タンパク質は一部の細菌や古細菌の細胞壁外層に多量に存在するタンパク質、又は糖タンパク質で、自己集合することで規則的な結晶構造(S-layer)を呈する。乳酸菌では *Lactobacillus* 属の少なくとも 13 菌種において S-layer タンパク質の存在が確認されているが、その機能については未解明な点が多い。これまでの知見から、一部の S-layer タンパク質が宿主との免疫応答において重要な役割を担っていることが報告されている。しかし、乳酸菌の S-layer タンパク質には多様性があり、それらの免疫学的機能に関する知見はほとんどない。そこで、本研究では異なる乳酸菌が持つ S-layer タンパク質を比較し、その免疫学的特性を評価することを目的とする。
【方法・結果】*Lactobacillus* 属細菌の S-layer タンパク質をアミノ酸配列のアライメント解析により比較した。その結果、全体の相同性は 10%～70%程度で、特に N 末端領域において多様性がみられた。次に、*Lactobacillus* 属 9 菌種から 5MLiCl を用いて S-layer タンパク質を精製した。*Lactobacillus acidophilus* NCFM の S-layer タンパク質（SlpA）については、組換え大腸菌を用いた His-tag 融合 SlpA（His-SlpA）も精製した。SDS-PAGE により分離したタンパク質について PAS 染色を行ったところ、S-layer タンパク質の染色は観察されなかった。各 S-layer タンパク質の免疫学的特性を比較するため、精製した S-layer タンパク質でヒト単球由来 THP-1 細胞を刺激し、24 時間後の培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインを ELISA により定量したところ、S-layer タンパク質種間で IL-12p40 産生誘導能に差異がみられた。*L. acidophilus* NCFM の SlpA と His-SlpA で C3H/HeJ マウスの脾臓細胞を刺激し、培養上清中のサイトカインを ELISA により定量した。その結果、IFN-γ 産生誘導能に差異は認められなかった。
【考察】乳酸菌が持つ S-layer タンパク質のサイトカイン誘導能は菌種間で大幅な差がみられたが、アミノ酸配列の相同性との相関は認められなかった。*L. acidophilus* NCFM の SlpA は C 型レクチンである DC-SIGN に認識されることが報告されているが、PAS 染色では S-layer タンパク質の糖鎖は確認できず、*L. acidophilus* NCFM の SlpA と組換え His-SlpA との比較からも翻訳後修飾による免疫活性誘導能への影響は確認できなかった。現在、S-layer タンパク質の免疫学的特性とアミノ酸配列を比較した結果より、組換え S-layer タンパク質を用いて S-layer タンパク質の免疫誘導に関わるドメインの探索を行っている。

S layer protein, immune response, lactic acid bacteria

発表番号：4F032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母 *Yarrowia lipolytica* の *n*-アルカン代謝におけるオキシステロール結合タンパク質ホモログ Osh6p の機能解析

# Functional analysis of oxysterol binding protein homologue Osh6p in the assimilation of *n*-alkanes in the yeast *Yarrowia lipolytica*

○岩間 亮、堀内 裕之、福田 良一（東大院・農生科・応生工）
○Ryo IWAMA, Hiroyuki HORIUCHI, Ryouichi FUKUDA (Dept. Biotech., Univ. Tokyo.)

*n*-アルカン資化性酵母 *Yarrowia lipolytica* は *n*-アルカンや脂肪酸などの疎水性化合物を単一の炭素源として生育できる。*Y. lipolytica* の *n*-アルカン代謝において、シトクロム P450 をコードする *ALK1* は *n*-アルカンの末端水酸化に主要な役割を果たす[1)2)]。*ALK1* は *n*-アルカンにより発現が大きく誘導される。この発現制御には、転写活性化因子をコードする *YAS1* および *YAS2* と転写抑制因子をコードする *YAS3* が関与する[3)4)5)]。これまでに、野生型株、*YAS2* 破壊株および *YAS3* 破壊株を用いた網羅的転写解析が行われ、*ALK1* と同様の発現パターンを示す遺伝子として酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のオキシステロール結合タンパク質ホモログ遺伝子 *OSH3* のオルソログが見出された。

そこで、*Y. lipolytica* のゲノム配列を検索したところ、オキシステロール結合タンパク質と相同性を示す遺伝子が４つ見出され、これらを *OSH1*、*OSH3*、*OSH4*、*OSH6* と命名した。これら *OSH* 遺伝子の破壊株を作製し生育を解析したところ、*OSH3* 破壊株と *OSH6* 破壊株では *n*-アルカン資化能が低下していた。今回は、*OSH6* について解析を行った結果を発表する。*OSH6* 破壊株では、*ALK1* のプロモーター活性や転写量は野生型株と比較して低下していなかったが、CO 還元差スペクトル解析において *n*-アルカンにより誘導される P450 由来のピークが低下し、また *n*-アルカンの代謝産物である脂肪酸の量も低下していた。これらの結果から、*OSH6* 破壊株では P450 の翻訳あるいはフォールディングに異常があることが示唆された。次に *OSH6* 破壊株の細胞内リン脂質組成を調べたところ、ホスファチジルセリン（PS）の割合が低下していることが示された。*S. cerevisiae* において、Osh6p は PS を小胞体から細胞膜に輸送する機能を持つことが示唆されている[6)]。そこで *S. cerevisiae* の Osh6p においてリン脂質との結合に関わることが示唆されているアミノ酸残基に相当する残基を改変した *Y. lipolytica* の Osh6p を作製し *OSH6* 破壊株で発現させたところ、*n*-アルカン資化能の低下を回復させることが出来なかった。これらの結果から、*OSH6* が膜脂質組成を調節することで、機能的 P450 の生産に影響を与えている可能性が考えられた。

1) Iida, T., et al. (2000) *Yeast*, **16**, 1077-1087. 2) Takai, H., et al. (2012) *Fungal Genet. Biol.*, **49**, 58-64. 3) Yamagami, S., et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22183-22189. 4) Endoh-Yamagami, S., et al. (2007) *Eukaryot. Cell.* **6**, 734-743. 5) Hirakawa, K., et al. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 7126-7137. 6) Filseck J. M. *et al.*, (2015) *Science*, **349**, 432-436.

*Yarrowia lipolytica*, *n*-alkane, oxysterol binding protein homologue

発表責任者：福田良一（afukuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質 CAP と相互作用する Csh3
# Csh3 protein which interacts with Cyclase Associated Protein (CAP)

○川向 誠[1]、山本 孝治[2]、大岡 妥世[1]、周 国雷[3] ([1]島大生資、[2]郵政省情報通信研、[3]アーカンサス大)
○Makoto Kawamukai[1], Takaharu Yamamoto[2], Yasuyo Ooka[1], Guo-Lei Zhou[3] ([1]Shimane Univ., [2]NICT, [3]Arkansas Univ.)

アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質として、出芽酵母で最初に発見された CAP(Cyclase Associated Protein)は、広くアクチンやコフィリンに結合するタンパク質として真核生物全般に認められる。CAP は酵母など真核微生物では、アデニル酸シクラーゼに結合するが、ヒトを含めて哺乳類ではアデニル酸シクラーゼとの結合は認められず、アクチン結合タンパク質として知られる。

これまでの研究から、分裂酵母の CAP を生化学的にアデニル酸シクラーゼ結合タンパク質として同定し、Cap1 と命名している (1)。ヒトには２種類の CAP ホモログがあるが、分裂酵母内で発現させたところ、機能的な相補性が認められた。分裂酵母の Cap1 の機能を調べる中で、Cap1 結合タンパク質をツーハイブリッド法で探索した。その結果、296 アミノ酸残基からなる Csh3 と命名した SH3 ドメインを有するタンパク質を見出した。この Csh3 タンパク質は出芽酵母では Lsb1(あるいは Lsb2)として知られ、Las17 結合タンパク質(ヒト WASP ホモログ)として、アクチン重合の阻害やエンドサイトーシスに関与すると報告されている。

ツーハイブリッド法および、免疫沈降実験により分裂酵母の Cap1 は自ら会合し、２量体を形成することを見いだした。N 末側はアデニル酸シクラーゼとの結合部位で、C 末側にはアクチン結合領域があり、中央にはプロリンリッチな領域を有している。免疫沈降実験によるドメイン解析の結果、この Cap1 の N 末側の領域に Csh3 が結合していることを決定した。Csh3 の局在は通常細胞質に全体に存在することが観察されるが、Cap1 に依存して局在を変化させていた。分裂酵母の Cap1 は細胞増殖の際には、先端部分に主に局在し、その局在性は Cap1 のプロリンリッチな領域に依存したが、Csh3 の有無による影響は少なかった。

Cap1 あるいは Csh3 の単独高発現では、それほど大きな影響はないが、両方を発現させると増殖に影響を及ぼした。Cap1 単独の破壊株よりは Cap1, Csh3 の２重破壊株の方が、カルシウム感受性が増大した。分裂酵母の Cap1 は、アクチン、コフィリン、Csh3 など複数のタンパク質と相互作用して機能する多機能タンパク質であることが判った (2)。

(1) 川向　誠、アデニル酸シクラーゼ結合タンパク質（CAP）とそのホモログ。生化学 68:31-35.(1996)
(2) Takaharu Yamamoto, Yasuyo Kobayashi, Guo-Lei Zhou, Makoto Kawamukai. Identification and characterization of Csh3 as a SH3 proten that interacts with fission yeast Cap1. FEMS Yeast Research, on line (2015)

fission yeast, CAP, adenylyl cyclase

発表責任者：川向　誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

発表番号：4F034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *In vitro* 再構成系を用いた出芽酵母胞子壁におけるジチロシン層形成機構の解析

Assessment of dityrosine layer assembly in the yeast spore wall using an *in vitro* reconstitution system

○中西 秀樹、ベムナ レオ、ムカマ オマール、高 暁冬（江南大・生物工程）
○Hideki NAKANISHI, Leo BEMENA, Omar MUKAMA, Xiao-Dong GAO (Jiangnan Univ.)

出芽酵母 *S. cerevisiae* の胞子壁は四層（内側からマンナン、グルカン、キトサン、ジチロシン層）から構成されている。この内、キトサン層およびジチロシン層は栄養増殖細胞の細胞壁には存在しない胞子壁特有の構造であり、胞子に外的ストレスに対する耐性を付与している。胞子壁は、内側の層から順に *de novo* で作られ、ジチロシン層形成にはキトサン層の存在が必須である。ジチロシン層の主な原料はビスホルミルジチロシンであり、これは胞子の細胞質でチロシンから合成された後細胞膜を通過して胞子壁へと運ばれることがわかっている。ビスホルミルジチロシンがキトサン層上で重合することでジチロシン層が形成されると考えられているが、その構造や形成機構は明らかでない。我々は、ジチロシン層の形成機構の解明を目的として、主に *in vitro* 再構成実験を用いた解析，検討を行っている。

*dit1Δ* 変異株はビスホルミルジチロシン合成に欠損を持つため、ジチロシン層を持たないキトサン層が露出した胞子を形成する。我々は、*dit1Δ* 胞子をビスホルミルジチロシン又はジチロシン層形成過程の中間物質（以下ジチロシン関連物質とする）とインキュベートすれば *dit1Δ* 胞子壁上でジチロシン層が再構成されるのではないかと考えた。そこで、ジチロシン関連物質を含むと考えられる野生型胞子の抽出液を用いてこの仮説を検証した。ジチロシン層の有無は、カルコフロー染色によって検証できる。これは、カルコフローによる胞子壁（キトサン層）の染色がジチロシン層によって阻害されるためである。実際、*dit1Δ* 胞子がカルコフロー染色陽性なのに対して、野生型胞子は陰性を示す。我々は、野生型胞子の抽出液でインキュベートした *dit1Δ* 胞子が、カルコフロー染色陰性になることを見いだした。*dit1Δ* 胞子の抽出液でインキュベートした *dit1Δ* 胞子はカルコフロー染色に陽性を示す。野生型胞子の抽出液で処理した *dit1Δ* 胞子にはジチロシン関連物質が強固に結合していることも確認している。また、*dit1Δ* 胞子にジチロシン関連物質が結合するためにはキトサン層が必要である。これらの結果は *dit1Δ* 胞子のキトサン層上でジチロシン層様の構造が形成されたことを示唆しており、現在更なる解析を行っている。

Yeast, Spore wall, Dityrosine

発表責任者：中西秀樹（hideki@jiangnan.edu.cn）

発表番号：4F035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Characterization of a new cold-adapted Shewanella sp. to develop a system for secretory production of proteins.

○Chen CHEN[1], Soichiro KAWAI[1], Jun KAWAMOTO[1], Tomoya IMAI[2], Tatsuo KURIHARA[1]
([1]Institute for Chemical Research, Kyoto University, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University)

**[Purpose]** Protein expression system working at low temperatures is useful for the production of thermolabile proteins. It is also useful for the production of enzymes that are toxic at moderate and high temperatures due to their activities, because enzyme activities can be decreased by lowering the temperature. In this study, we searched for cold-adapted microorganisms suitable as a host for production of foreign proteins at low temperatures, in particular paying attention to their ability to secrete proteins.

**[Method]** Cold-adapted microorganisms were isolated from the intestine of fishes. They were identified by their 16S rRNA sequences. Proteins secreted at 4 ˚C were analyzed by subjecting the culture supernatant to SDS-PAGE followed by N-terminal sequencing. Membrane vesicles (MVs) were recovered from the culture supernatant by ultracentrifugation and purified by sucrose density gradient ultracentrifugation. Purified MVs were analyzed by transmission electron microscopy. Size distribution of MVs was measured by dynamic light scattering analysis. Phospholipid composition and fatty acid composition of MVs were measured by ESI-MS and GC-MS, respectively.

**[Results and Discussion]** The majority of the cold-adapted strains isolated belonged to the genera *Pseudomonas*, *Shewanella*, and *Flavobacterium*. One of the isolated *Shewanella* strains secreted a protein of about 41 kDa (0.15 g/ml), which accounted for the majority of the secreted proteins. The N-terminal amino acid sequence of the protein showed 75% identity with the corresponding region of a hypothetical cytoplasmic membrane protein of *Methylocystis* sp. ATCC 49242. We found that the isolated *Shewanella* strain secreted MVs with a diameter of about 100 nm. The lipid composition of MVs was slightly different from that of the cells. For example, the amount of eicosapentaenoic acid was much lower in MVs than in the cells. When the culture supernatant containing MVs was subjected to sucrose density gradient ultracentrifugation, the 41-kDa secreted protein was co-sedimented with MVs, suggesting that the protein is associated with MVs and possibly integrated into the membrane. This system would be useful for secretory production of proteins at low temperatures.

membrane vesicle, psychrotroph, protein secretion

発表責任者：陳晨（chenchen88728@gmail.com）

発表番号：4F036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Sphingomonas* 菌株から産生された五糖型スフィンゴ糖脂質の糖鎖構造解析

Analysis of carbohydrate structure in pentasaccharide-type glycosphingolipid produced by *Sphingomonas* strains

○川原 一芳、串間 由里奈、有路 沙織、高橋 希恵、飯田 博一（関東学院大理工生命）
○Kazuyoshi KAWAHARA, Yurina KUSHIMA, Saori ARIJI, Kie TAKAHASHI, Hirokazu IIDA (Kanto Gakuin Univ.)

【目的】*Sphingomonadaceae* に属する菌種はグラム陰性であるがリポ多糖を持たず、その代わりにスフィンゴ糖脂質（GSL）を有することが明らかになっている[1)]。この科の大部分の菌種はグルクロン酸あるいはガラクツロン酸を持つ単糖型の GSL により外膜を構成していると考えられているが、*Sphingomonas* 属および近縁の菌種においてはオリゴ糖型 GSL を有することが知られている。さらにこれまでの研究で、一般的な四糖型 GSL である GSL-4A[1)]に加えて五糖型の GSL（GSL-5X）を有する菌株がいくつか見出されており、分類学の指標、および保湿剤への応用という観点から興味が持たれていた。しかし、この GSL は各種溶媒への溶解度が低く産生量も少ないことから精製が困難であり、以前の研究では糖鎖の詳細な構造を明らかにすることができなかった。そこで本研究では GSL-5X の糖鎖構造を質量分析と NMR 分析により再度解析した。

【方法】五糖型 GSL の調製には *Sphingomonas* sp. KGU0041 株を使用した。乾燥菌体からクロロホルム/メタノール（C/M）（2:1）でリン脂質を抽出した後、C/M/$H_2O$（3:1:0.3）で加熱抽出を行い、オリゴ糖型 GSL を抽出した。抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで部分精製した後、TLC により GSL-4A と GSL-5X を精製した。質量分析は MALDI-TOF MS（AXIMA-CRF plus, Shimadzu）により行い、マトリックスには 2,5-dihydroxybenzoic acid を使用した。$^1$H-NMR 分析は JNM-ECX 500II（JEOL RESONANCE）を用いて、45°C にて測定した。GSL 中のウロン酸のカルボキシル基は、メタノール存在下に TMS ジアゾメタンを加えることによりメチルエステル化した。

【結果】五糖型の GSL-5X を持つ菌株は全て四糖型の GSL-4A を有しているため、両者を精製し、糖鎖の比較分析を行った。GSL-5X、あるいは GSL-5X の 1 M 塩酸分解により得られた部分加水分解物について MALDI-TOF MS 分析したところ、検出されたフラグメントイオンから、糖鎖の配列は Man-Glc-GlcN-GlcN-GlcA であることが確定できた。2 つの GSL をカルボキシルメチル化した後にアミノ基をアセチル化し、$^1$H-NMR 分析に供したところ、GSL-4A の構成糖（Man-Gal-GlcN-GlcA）に由来するアノマープロトンは Man を除いて全て 3.5-4.0 Hz の結合定数を示し、これまでの知見通り全てαアノマーであることがわかった。これに対して GSL-5X の構成糖に由来するアノマープロトンのシグナルには約 8 Hz の結合定数を示すものが 2 本見られ、これらはβアノマーであると推定された。今後さらにβアノマー構造を持つ糖の同定を行う予定である。

1) Kawahara, K., et al., J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 23, 408-413, (1999).

glycosphingolipid, carbohydrate, *Sphingomonas*

発表責任者：川原一芳（kawahara@kanto-gakuin.ac.jp）

発表番号：4F037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 の菌体外膜小胞の解析

# Characterization of extracellular membrane vesicles of a psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ac10

○横山 文秋[1]、川本 純[1]、今井 友也[2]、小川 拓哉[1]、栗原 達夫[1] ([1]京都大学 化学研究所、[2]京都大学 生存圏研究所)
○ Fumiaki YOKOYAMA[1], Jun KAWAMOTO[1], Tomoya IMAI[2], Takuya OGAWA[1], Tatsuo KURIHARA[1] ([1]KyotoUniversity Institute for Chemical Research, [2]Research Institute for Sustainable Humanosphere)

## 【目的】

細菌は病原性因子や糖や酵素、核酸などを含む膜小胞を分泌生産することが知られている。これら菌体外膜小胞 (MV) は宿主への病原性因子の輸送やバイオフィルム形成の制御、遺伝子の水平伝播など多様な生理活性物質の輸送に寄与していると考えられている。しかし MV 生合成機構の詳細は未だ明らかにされていない。本研究では、南極海水より単離された低温適応性グラム陰性細菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 における MV の生産機構および生理的役割の解明を目的とし、動的光散乱 (DLS) による粒径分布解析、透過型電子顕微鏡 (TEM) をもちいた MV の微細構造の解析、MV を構成するタンパク質の解析を行った。

## 【方法・結果】

*S. livingstonensis* Ac10 を 4°C で定常期まで LB 培地で振盪培養し、培養上清を遠心することで MV を回収した。DLS 解析より、本菌は直径約 100 nm の MV を形成していることがわかった。5% 酢酸ウランをもちいてネガティブ染色した MV を TEM 観察した結果、主に一層の膜をもつ小胞であることが見いだされた。極低温 TEM をもちいて本菌由来の MV を観察した結果、一層もしくは二層の膜構造をもつ球状の小胞以外に、鎖状に小胞が連結したもの、複数の小胞を内包したもの、チューブ状に伸長した形状のものなど多様な形状の MV が形成されていることがわかった。MV をトリクロロ酢酸沈殿に供し、MV 由来のタンパク質を濃縮後、SDS-PAGE で解析した。MV に由来する主要なタンパク質のバンドをゲル内消化し、MALDI-TOF MS を用いた Peptide Mass Fingerprinting 法により解析した。その結果、外膜ポーリンタンパク質 Omp176、鞭毛関連タンパク質 FlgL、転写制御タンパク質 LysR と機能未知タンパク質の 4 種のタンパク質が同定された。それらのうち、Omp176 と FlgL は低温誘導的に生産量が増加するタンパク質として同定されており、本菌の低温での物質輸送や運動性に関与することが推定されている。Omp176 と FlgL は外膜に局在することが予想されるタンパク質であるが、LysR と機能未知タンパク質は内膜タンパク質と予想された。以上の結果から本菌は 、外膜成分に加えて、内膜に由来するタンパク質を MV を介して菌体外に輸送する仕組みを有していることが示された。

Membrane Vesicle, *Shewanella livingstonensis* Ac10, Cryo-TEM

発表番号：4F038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高圧によって引き起こされる細胞小器官損傷の GFP 酵母を用いた観察

# Damage of organelles caused by high-pressure using Yeast GFP Clone Collection

○三輪 晃久、岩橋 均 (岐阜大)
○Akihisa Miwa, Hitoshi Iwahashi (Gifu Univ.)

【背景・目的】

高圧は微生物に生理的な影響を与える。高圧下で微生物は適応し、適応できないと損傷を受ける。高圧から解放され損傷から修復できると生存でき、修復できないと死滅する。この修復をゲノミクス、メタボロミクスで解析したところ、タンパク質、特に膜タンパク質の分解が活発であることを示していた。そこで本研究では細胞オルガネラに局在する、GFP を融合させたタンパク質を指標として、高圧下における細胞オルガネラの損傷を視覚的に観察した。

【方法】

本研究は *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株、および各遺伝子に GFP 遺伝子を挿入した Yeast GFP Clone Collection (ThermoFisherScience) を利用した。各酵母は液体 YPD 培地で 8 時間本培養し、対数増殖期細胞 (OD660 ≒0.8) を用いた。GFP 遺伝子の被融合遺伝子としては、核では *ROX3* (YBL093C)、核膜では *NIC96* (YFR002W)、小胞体では *PH086* (YJL117W)、ゴルジ体では *SEC7* (YDR170C) を利用した。酵母の高圧下での各細胞小器官の損傷を調べるために、氷中で 50 MPa、100 MPa、150 MPa、200 MPa ・30 分の条件で酵母を処理し、常圧に戻した後に蛍光顕微鏡で観察を行った。同時に生菌数を測定し、高圧下での酵母の生菌数の変化も評価した。

【結果・考察】

50 MPa では細胞小器官の蛍光にほとんど変化がなかった。100 MPa では核において蛍光が減退しており、核膜においては蛍光の局在がほとんどなくなり、細胞内に散在した。150 MPa ではゴルジ体の局在が不鮮明になっていた。200 MPa では核、ゴルジ体では蛍光がほとんど確認できず、また小胞体の蛍光はやや不鮮明になっていた。この結果から、50 MPa では細胞内の細胞小器官の構造にまでは影響がないと思われる。100 MPa 以上では主に核、核膜に損傷が起こり、200 MPa ではほぼすべての細胞小器官の構造に影響が出ると考えられる。今後は高圧により損傷を受けた酵母の修復過程を経時変化を追って観察していきたい。

yeast, high-pressure, stress response

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4F039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細胞極性制御因子による微小管制御機構の解析

# Study on regulation of microtubule organization by cell polarity factors.

○金子 さゆり[1]、水沼 正樹[1]、平田 大[1,2]、久米 一規[1] ([1]広島大・院先端研、[2]朝日酒造)
○Sayuri KANEKO[1], Masaki MIZUNUMA[1], Dai HIRATA[1,2], Kazunori KUME[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Asahi-Shuzo Sake Brewing company.)

【目的】細胞極性は、細胞増殖と連動し適切に制御され、細胞固有の形を形成・維持するために必須である。しかし、細胞極性と細胞増殖との連携制御機構については不明な点が多い。我々は、細胞増殖と連動する細胞極性制御機構を明らかにするために、単細胞真核生物・分裂酵母を用いて研究を行っている。分裂酵母は、細胞周期を通し直径が一定で細胞端でのみ極性成長する円筒形の細胞形態を示す。円筒形の維持には、細胞骨格（アクチン・微小管）が重要である。我々はこれまでに細胞極性制御に重要な細胞内シグナル伝達経路を明らかにするために、高温で増殖停止し、かつアクチンが細胞全体に分散した球形の細胞形態異常変異体を取得・解析し、ＭＯＲ経路（Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｓｉｓ　Ｏｒｂ６　ｎｅｔｗｏｒｋ）を明らかにした。ＭＯＲ経路は進化上保存されたＰｍｏ２５、Ｍｏｒ２、２つのキナーゼ（Ｎａｋ１、Ｏｒｂ６）により構成され、アクチンの細胞端への局在を制御する。また、興味深いことに、*ｍｏｒ２*変異体が、微小管重合阻害剤（ＴＢＺ）に感受性を示すことから、ＭＯＲ経路と微小管制御系との機能的関連性が示唆された。そこで、ＭＯＲ経路と微小管制御系とをつなぐ因子を同定するために、当研究室ではこれまでに、*ｍｏｒ２*変異体のＴＢＺ感受性を抑圧する*ｓｕｐ*変異体を複数取得し、その解析を行ってきた。本研究では、*ｓｕｐ*変異体の微小管構造を観察し、その中から、特徴的な微小管構造を示す*ｓｕｐ５*変異体の解析を行った。
【結果】分裂酵母の微小管は、細胞周期間期において、細胞質で３～５本の微小管が観察される。しかしながら、*ｓｕｐ５*変異体では、細胞質微小管の数が減少し、間期にも関わらず、核内において微小管が観察された。そこで、*ｓｕｐ５*変異体の核内微小管の形成に、核–細胞質間輸送が必要であるかを調べるために、*ｓｕｐ５ｉｍｐ１Δ*（Ｉｍｐ１：インポーチンα）二重変異体を構築し、微小管構造を観察した。その結果、*ｓｕｐ５ｉｍｐ１Δ*では、核内微小管が観察されず、野生株と同様の微小管構造が観察された。つまり、*ｓｕｐ５*変異体の核内微小管の形成はＩｍｐ１に依存していることが示唆された。現在、*ｓｕｐ５*変異体の原因遺伝子の同定と細胞周期間期における核内微小構造形成による細胞極性および細胞周期への影響について解析を進めている。

Cell polarity, Microtubule, Fission yeast

発表番号：4F040
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Aspergillus nidulans* におけるリン酸基中間因子 YpdA の発現抑制に伴う HogA 経路の持続的な異常活性化と致死性について

# The relationships between the lethality and the constitutive activation of HogA pathway through the downregulation of the histidine-containing phosphotransfer protein YpdA in *Aspergillus nidulans*

○吉見 啓[1]、福間 泰之[2]、萩原 大祐[3]、古川 健太郎[4]、緑川 裕良[2]、中山 真由美[2]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大・未来研、[2]東北大院・農、[3]千葉大・真菌医、[4]新潟大・医歯学)
○Akira YOSHIMI[1], Yasuyuki FUKUMA[2], Daisuke HAGIWARA[3], Kentaro FURUKAWA[4], Yura MIDORIKAWA[2], Mayumi NAKAYAMA[2], Keietsu ABE[1,2] ([1]NICHe, Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [3]MMRC, Chiba Univ., [4]Niigata Univ. Grad. Sch. Med. and Dent. Sci)

【目的】 二成分性シグナル伝達経路は、His-Asp リン酸リレー情報伝達系としても知られ、バクテリアから高等植物に至るまで普遍的に保存された環境応答機構である。我々は、これまでに、モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の高浸透圧応答機構について解析し、浸透圧応答や酸化ストレス応答にヒスチジンキナーゼ NikA、リン酸転移中間因子 YpdA、レスポンスレギュレーター(RR)SskA および SrrA が関与していることを明らかにしてきた。一方、*ypdA* 遺伝子の欠損は致死とされているが、その原因の特定には至っていない。我々は、YpdA の機能と致死性の要因、下流のRRとの相互作用を明らかにするため、*ypdA* 遺伝子の発現を制御可能な Conditional-*ypdA* 株（ C*ypdA* 株）を取得し、*ypdA* 発現抑制時の表現型解析や下流経路の転写解析を進めてきた。本研究では、C*ypdA* 発現抑制時のYpdA タンパク発現量を解析し、*sskA*、*srrA* 遺伝子の単独破壊株および２重破壊株において、下流 HOG 経路の活性化状態、表現型との比較解析を行うことにより、YpdA と SskA、SrrA の相互作用を解明することを目的とする。
【方法】 本研究では、C*ypdA* 株に加えて、C*ypdA* 株を親株とした *sskA* および *srrA* 遺伝子破壊株（それぞれ、C*ypdA-sskA*Δ株、C*ypdA-srrA*Δ株）、２重破壊株（C*ypdA-sskA*Δ*srrA*Δ株）を準備した。それぞれの変異株について、YpdAを定常発現状態から発現抑制状態にスイッチし、YpdA 自身の発現量および SskA 下流の HOG 経路の活性化状態をウエスタンブロッティングにより解析した。また、それぞれの菌糸形態を観察し、YpdA 発現抑制に見られる生育異常と下流経路遮断との相関について考察した。
【結果と考察】YpdA のタンパク質発現は、定常発現から抑制状態にスイッチして12時間後には完全に抑制された。また、YpdA 抑制に伴うHOG 経路の異常活性化が、24時間以上持続することが明らかになった。これほど長時間持続するHOG 経路の異常活性化は報告されておらず、この現象が YpdA 欠損による致死性の要因に関連する可能性が考えられた。また、C*ypdA-srrA*Δ株では、YpdA 抑制に伴う HOG 経路の活性化が認められるが、C*ypdA-sskA*Δ株では、HOG 経路の活性化は認められなかった。したがって、HOG 経路の異常活性化は SskA 経路のみに依存すると考えられた。ところで、YpdA 抑制時に認められる生育悪化は、*sskA* および *srrA* 遺伝子の破壊で回復するが、隔壁形成や核分布など経路依存的に回復しない形質も認められる。現在、C*ypdA-sskA*Δ*srrA*Δ株を含めて経路依存性を詳細に解析中であり、YpdA と SskA、SrrA の相互作用についての全容解明を目指している。

Aspergillus, two-component signaling system, YpdA

発表責任者：吉見　啓（a-yoshimi@niche.tohoku.ac.jp）

発表番号：4F041
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌二成分制御系 WalKR の制御における糖脂質の影響

# Influence of glucolipids on regulation of WalKR two-component system in *Bacillus subtilis*

○松岡 聡、松本 幸次、朝井 計、原 弘志 (埼玉大院　理工研)
○Satoshi MATSUOKA, Kouji MATSUMOTO, Kei ASAI, Hiroshi HARA (Saitama Univ.)

枯草菌における糖脂質合成酵素 UgtP は、ジアシルグリセロールに UDP-グルコースを用いてグルコースを段階的に転移するグルコシルトランスフェラーゼである。UgtP によって合成される糖脂質は枯草菌膜脂質の約 10%を占め、リン脂質と共に枯草菌生体膜を構成する主要な脂質である。枯草菌 *ugtP* 破壊株は対数増殖期において太く歪曲した形態を示すことから、枯草菌細胞膜での糖脂質の重要性が示唆された。そこで、枯草菌の細胞分裂に必須の二成分制御系 WalKR の制御に関与する SigI に注目して解析した。SigI は膜タンパク質 RsgI に制御されており、*ugtP* 破壊株において SigI の転写活性が上昇したこと、大腸菌を用いた異種発現系において糖脂質合成酵素遺伝子 *ugtP* を発現させることで SigI の活性が抑えられることから、糖脂質が SigI の活性制御に関わることが示唆された。次に、*sigI* プロモーター領域に存在するシスエレメントの変異・欠失を導入した配列と *lacZ* の転写融合を作製し、枯草菌染色体に導入して糖脂質の有無による *sigI* 転写への影響を解析した。糖脂質の欠損により、SigI 認識配列による SigI 活性が上昇したことが示された。さらに、SigI とは別に、WalR の活性も糖脂質の影響を受けることが示唆された。そこで、*walR* の C 末端に His タグを導入して、WalR のリン酸化の度合いを解析したころ、*ugtP* 破壊株では野生株と比べて WalR のリン酸化が亢進した。
これらの結果から、枯草菌の細胞分裂に関わる二成分制御系 WalKR と SigI の制御に糖脂質が重要な役割を持つことが示唆された。

glucolipids, WalR, cell morphology

発表責任者：松岡　聡（matsuoka@molbiol.saitama-u.ac.jp）

発表番号：4F042
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母 *Pichia pastoris* のメタノール培養時に誘導される新規トランスポーターの解析
# A novel transporter induced by methanol in *Pichia pastoris*

○芝田 桃子[1]、大澤 晋[1]、由里本 博也[1]、寶関 淳[2]、阪井 康能[1,2] ([1]京大院農、[2]京大・生理化学)
○MOMOKO SHIBATA[1], SHIN OHSAWA[1], HIROYA YURIMOTO[1], JUN HOSEKI[2], YASUYOSHI SAKAI[1,2] ([1]Grad. Sch. Agri., Kyoto Univ., [2]Res. Unit for Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

*P. pastoris* は、メタノールを単一の炭素源として生育できる。そのための C1 代謝経路、メタノール誘導性遺伝子発現に関わる転写因子、ならびにペルオキシソーム形成については、これまで多くの研究が進められてきたが、メタノール代謝に関わる低分子代謝物の細胞内外への輸送やその機構については、ほとんど解明されていない。

本研究では、*P. pastoris* ゲノム配列に存在し、メタノールで誘導される Sodium:solute symporter (SSS)ファミリータンパク質をコードする遺伝子 *SSS 1* に着目した。*SSS 1* は、その発現が mRNA レベルでもタンパク質レベルでもメタノール依存的に増加し、Sss1-YFP は細胞膜に局在していた。メタノール培養時に、*SSS 1* 破壊株は、野生株と比較して、弱い生育阻害を示した。Sss1p が細胞外からメタノール資化に必要な基質を取り込む可能性を考え、別府フラスコを用いて、野生株と *SSS 1* 破壊株の２株を同時に生育させた。別府フラスコは、培地成分のみが透過できる膜を介して二種類の菌体の液体培養が可能な二槽式透析培養器で、野生株と *SSS1* 破壊株の間で生育に必要な基質を奪い合わせることが出来る。その結果、メタノール培養時に *SSS1* 破壊株の生育が強く阻害され、*SSS* がメタノールでの生育に必要な基質を細胞内へ取り込むトランスポーターであることが示唆された。基質の候補として、メタノール代謝における重要な中間体であるホルムアルデヒドに着目し、メタノール培地での培養時における培地中のホルムアルデヒド濃度を追跡した。培養初期でのホルムアルデヒド増加濃度に差は見られなかったが、メタノールを消費した培養後期において、*SSS 1* 破壊株は、野生株に比べて、ホルムアルデヒドの減少速度が低下した。ホルムアルデヒドを含む培地における培養時でも、*SSS 1* 破壊株は、培地中におけるホルムアルデヒドの減少速度が抑制された。以上の結果から、Sss1p は、メタノール培養時の細胞膜トランスポーターとして機能し、その基質の一つとしてホルムアルデヒドを細胞内に取り込むことが示唆された。

methanol, transporter, formaldehyde

発表番号：4F043
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* の遊走子べん毛回転停止に必須な遺伝子 *ftgA* の機能解析

# Analysis of the *ftgA* gene essential to stop flagellar rotation of *Actinoplanes missouriensis* zoospores

○木村 知宏、種村 裕幸、手塚 武揚、大西 康夫（東大院農生科・応生工）
○Tomohiro KIMURA, Hiroyuki TANEMURA, Takeaki TEZUKA, Yasuo OHNISHI (Univ. of Tokyo)

【背景・目的】多くの細菌はべん毛を用いて遊走し、走化性を指標に生存に適した環境に向かっていく。自身の生育にとって好ましい環境に到達すると、べん毛の回転を停止する。べん毛を止める機構は、可逆的に停止させるクラッチ型(*Bacillus subtilis*, EspE)や、不可逆的に停止させるブレーキ型(*Escherichia coli*, YcgR)が知られている。本研究の題材である希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、栄養飢餓条件下で胞子嚢内に直径 0.9 μm の球形の遊走子を形成する。湿潤環境下で胞子嚢から泳ぎだした遊走子は、15 本程度のべん毛を用いて最高 400 μm/sec で遊走し、走化性を示す。遊走子が好ましい環境に到達し、菌糸生長へと移行するにはべん毛の停止が不可欠だと考えられる。実験室条件下において、遊走子液に栄養生長用培地を添加すると、遊走子はべん毛の回転を停止し発芽する。しかし、べん毛の停止機構に関するモデル細菌以外での知見は少なく、*A. missouriensis* においても未知であった。本研究では、べん毛の停止機構の解明を目的として解析を行った。
【結果・考察】ゲノム中に 3 セット存在する走化性遺伝子クラスター（*Che* cluster 1, 2, 3）のうち、べん毛遺伝子クラスター近傍に存在する *Che* cluster 1 全体を欠失させた破壊株の遊走子懸濁液に栄養生長用培地を添加して同調的に発芽させたところ、この株の遊走子は発芽後もべん毛の回転を停止しないことを発見した。べん毛の停止に必須な原因遺伝子を特定するため、クラスターを分割し、それぞれの領域を破壊していったところ、*ftgA* と命名した先頭から 4 番目の遺伝子(*AMIS_76540*)のみを欠失させると、栄養培地を添加してもべん毛の回転が停止しないことが判明した。*ftgA* はゲノム情報既知の 8 種の *Actinoplanes* 属放線菌では高度に保存されているが、機能解析されたドメインとの相同性は見つからなかった。ゲノム組込み型ベクターを用いて破壊株へ *ftgA* 遺伝子を導入したところ、表現型は野生型に戻った。また、野生株に *ftgA* 遺伝子を導入すると、遊走子は運動性を失った。これより、FtgA は不可逆的に機能するブレーキであることが示唆された。さらに、昨年度の本大会で報告した走化性アッセイ系(木村ら、2A36p11)を用いて走化性を定量すると、*ftgA* 破壊株は誘引物質であるガラクツロン酸に対して走化性を示さなかった。走化性アッセイの結果と、*ftgA* が走化性遺伝子クラスター中に存在することから、*A. missouriensis* 遊走子における走化性は、発芽・生存に好ましい環境に向かっていくのではなく、そうした環境で遊走子を停止することにより制御されていると示唆された。

zoospore, flagella, chemotaxis

発表責任者：木村知宏（4470604077@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F044
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# HKR1 の部分発現による Saccharomyces cerevisiae の HM-1 耐性獲得機構

# Mechanism of HM-1 resistance acquired by partial expression of HKR1 in Saccharomyces cerevisiae.

○鈴木 宇香、笠原 紳（宮城大食産業）
○UKYO SUZUKI, SHIN KASAHARA (Miyagi Univ.)

*Hansenula mrakii*（*Williopsis saturnus* var. *mrakii*）が生産するキラートキシン HM-1 は，88 アミノ酸から成る分子量 10.7 kDa のタンパク質であり，*Saccharomyces cerevisiae* に対して極めて強い殺菌作用を示す。その作用点は，細胞壁 β−グルカン合成系であるとされるが，詳細については不明な点も多い。

*S. cerevisiae* の *HKR1* 遺伝子産物である Hkr1p は，細胞表層にあるムチン様 I 型膜タンパク質で，HOG（High-Osmolarity Glycerol）経路，CWI（Cell Wall Integrity）経路と関連して同菌の浸透圧応答や細胞壁構築等を制御するとされるが，その過剰発現により HM-1 耐性を獲得することも報告されている。Hkr1p の細胞外領域はセリンとスレオニンに富み，高度にマンノシル化されて細胞壁の一部を構成していると予想されるが，その細胞内領域にはロイシンジッパーやカルシウム結合部位である EF ハンドモチーフが認められ，同タンパク質が何らかの形でシグナル伝達系にも関与していることが考えられる。また，Hkr1p は同菌の Msb2p と酷似した構造を示すが，後者は HM-1 耐性との関係は認められず，機能的には一致しない点が多い。

本研究では，Hkr1p の膜貫通領域以後の 295 アミノ酸を *GAL1* プロモーター支配下に配置して誘導的に強制発現させ（実験 A），HM-1 耐性を評価した。また，C 末端 666 アミノ酸についても同様に強制発現させて（実験 B）HM-1 耐性の評価を行った。また，膜貫通領域以後を *GAL1* プロモーター下に逆方向に挿入した場合（実験 C），実験 B に用いた領域を逆方向に挿入した場合（実験 D）のそれぞれについても HM-1 耐性を評価した。その結果，実験 A および実験 C では HM-1 耐性を得ることができなかったが，実験 B および実験 D のいずれにおいても，非常に強い HM-1 耐性が認められた。$IC_{50}$ 相当の HM-1 存在下で培養した *S. cerevisiae* の生細胞上の出芽痕を Calcofluor white で染色して蛍光観察すると，細胞極性の乱れが認められた。*HKR1* の発現制御により HM-1 耐性を獲得した形質転換株（実験 B および実験 D）は，HM-1 非存在下では健全な細胞極性を示したが，HM-1 存在下ではランダムな出芽方向性を示していた。これらより，HM-1 が感受性酵母の細胞極性に影響を与えること，また，*HKR1* の発現制御による HM-1 耐性獲得は，細胞極性の正常化を伴わないものであることが示された。現在，上記の実験 B および実験 D における HM-1 耐性獲得に Hkr1p の C 末端側部分配列の発現が伴っているかを確認するために，*HKR1* の当該配列内に存在する ATG を除いて *GAL1* プロモーター下に配置し，HM-1 耐性獲得の有無を評価する実験を進めている。

saccharomyces cerevisiae, HM-1 killer toxin, cell polarity

発表責任者：鈴木　宇香（f1553004@myu.ac.jp）

発表番号：4F045
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 撹拌条件下における接合伝達性プラスミドの動態解析

# Monitoring of plasmid transfer in stirring conditions

○孕石 明[1]、中澤 駿介[2]、福田 洸平[3]、金原 和秀[1,2,3]、新谷 政己[1,2,3]（[1]静大工、[2]静大院、[3]静大創造院）
○Akira HARAMIISHI[1], Syunsuke Nakazawa[2], Kouhei Fukuda[3], kazuhide Kimbara[1,2,3], Masaki Shintani[1,2,3] ([1]Shizuoka Univ., [2]Grad. Sch. Shizuoka Univ., [3]Grad. Sch. Sci. Technol, Shizuoka Univ.)

【目的】プラスミドは，微生物どうしの接触を通して伝達可能で，細菌の進化・適応能を担う重要な遺伝因子である．また，固体上で接合伝達しやすいプラスミドと，液体中で接合伝達しやすいプラスミドとがあるとされ，河川や湖沼など，動的な動きのある水環境中でも微生物間を伝播する可動性遺伝因子として知られている．このことから液体の動きはプラスミドの伝達にとって重要な環境因子であることが考えられる．しかし，「動きのある」液体内においてプラスミド，供与菌，受容菌がどのようにふるまうのかについては不明瞭なままである．そこで本研究では，撹拌条件下でプラスミドの伝達頻度がどのように変化するのかを明らかにすることを目的に，撹拌速度を変化させた際の，プラスミドの伝達効率を詳細に比較し，プラスミドごとの伝播特性の解明を試みた．
【方法】モデルプラスミドとして，液体中よりも固体上でより伝達しやすいとされる pBP136 と，固体上・液体内でも伝達可能な pCAR1 を使用し，モデル供与菌として *Pseudomonas putida* SMDBS 株を，受容菌としては *P. putida* KT2440 株を用いた．また，撹拌槽には 125 mL 容のスピナーフラスコを用いた．1/3 に希釈した LB 液体培地 100 mL を入れたスピナーフラスコに，供与菌と受容菌を異なる密度で接種し，静置条件と，様々な撹拌速度にした場合における接合伝達頻度を比較した．実験開始から 0 分，45 分後に混合液を採取し，接合完了体のみが生育する 1/3LB 液体培地に添加して，生育した接合完了体数を最確数（MPN）法によって推算した．MPN 法は，96 穴プレートを用いて，2 倍（または 1/2 倍）ずつの段階希釈系列を作製し，統計学的に推計した．
【結果と考察】供与菌・受容菌の菌体密度を $1.0\times10^6$ CFU/mL とした際，静置条件下では，pBP136 の方が pCAR1 よりも高い伝達頻度を示したが，攪拌速度を 400 rpm とした際には，pCAR1 の方が pBP136 よりも高い伝達頻度を示した．これは，pBP136 が rigid タイプの性線毛をもつのに対し，pCAR1 が flexible タイプの性線毛をもつため，高い撹拌条件下でも接合伝達できるためと考えられた．また，供与菌と受容菌の菌体密度を変化させると，伝達頻度がもっとも高くなる撹拌速度に違いが認められた．このことから，供与菌と受容菌が接合する頻度や，接合伝達を開始し，完了するまでの確率が，菌体密度に応じて異なると推定された．現在は，供与菌・受容菌に大腸菌を用い，F プラスミドについても同様の実験を行っている．

conjugative plasmid, transfer frequency, stirring conditions

発表番号：4F046
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

非運動性グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* における付着因子とバイオフィルム形成の解析
An adhesin required for biofilm formation by the non-motile Gram-negative bacterium *Paracoccus denitriticans*

○吉田 圭太朗、豊福 雅典、尾花 望、野村 暢彦（筑波大院・生命環境）
○Keitaro YOSHIDA, Masanori Toyofuku, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura (Univ. Tsukuba)

【背景と目的】バイオフィルム(BF)は固体表面に付着した微生物の集合体であり、環境中の細菌の主要な存在形態である。固体表面への細菌の付着は、水中を放浪していた状態から固体表面で定住する状態へ移行するという細菌のライフスタイルの分岐点となるプロセスである。細菌の付着には菌体と固体表面の接触が鍵であり、運動性を有する細菌は頻繁に固体表面と接触して付着する。一方、非運動性細菌は自ら移動して固体表面と接触することはできないが、環境中の水の流れによって受動的に固体表面と接触して付着し、BF を形成すると考えられている。実際に、非運動性細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は水の流れがある振とう培養条件下において固体表面にバイオフィルムを形成できることが報告されている。しかし、非運動性細菌の付着機構の詳細は明らかになっていない。興味深いことに、非運動性グラム陰性細菌 *Paracoccus denitrificans* は、水の流れが無い静置培養条件下において固体表面にバイオフィルムを形成できる。本研究では非運動性細菌の BF 形成機構の解析を目的とし、トランスポゾンを用いて *P. denitrificans* の BF 形成に関わる因子を解析した。
【方法と結果】*P. denitrificans* は非運動性細菌に分類されるが鞭毛の遺伝子を部分的に有するため、motility assay を行ったが、運動性は観察されなかった。さらに、鞭毛の遺伝子を欠損させた株においても野生株と同様に BF を形成したことから、*P. denitrificans* は非運動性であるにも関わらず流れが無い条件下において気液界面で固体表面に付着して BF を形成することが確認された。*P. denitrificans* における BF 形成因子を解析するため、トランスポゾン(Tn)ミュータントライブラリーを構築し、Tn ミュータントの BF 形成能をスクリーニングした。その結果、4416 株の Tn ミュータント中、29 株で野生株と比べ BF 形成量が増加・減少する株が得られた。これらの Tn ミュータントの菌体表面の疎水性を測定した結果、野生株より BF 形成量が増加した株で疎水性が増加し、BF 形成量が減少した株で疎水性が低下していた。また、BF 形成に必要な細胞外マトリックス成分を解析するため、DNase I および Proteinase K を培養時に添加して BF を形成させた結果、Proteinase K 添加時に BF 量が減少した。これらの結果より、非運動性細菌 *P. denitirificans* は菌体表面に疎水性のタンパク質を付着因子として産生することにより、流れの無い環境下においても固体表面へ付着し、BF を形成できると考えられた。本発表では以上の結果とトランスポゾン挿入箇所の解析結果を合わせて発表を行う。

biofilm, motility, *Paracoccus denitrificans*

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：4F047
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Bacterial Two-Hybrid 法による二成分制御系のヒスチジンキナーゼ間の相互作用の探索

# Search of interactions between histidine kinases of two-component signal transduction systems by Bacterial Two-Hybrid system

○羽田 朋子[1]、江川 広紀[1]、江口 陽子[2]、内海 龍太郎[1] ([1]近大農、[2]近大生物理工)
○Tmoko HANEDA[1], Hironori Egawa[1], Youko Eguchi[2], Ryutaro Utumi[1] ([1]Kinki Univ. agr., [2]Kinki Univ. Biological Science and Engineering)

細菌は二成分制御系（TCS; two-component signal transduction system）という機構を構成して外界シグナルに対応している。センサーとして作用するヒスチジンキナーゼ（HK; histidine kinase）はシグナルを受容すると ATP 依存的に自己リン酸化し、対となるレスポンスレギュレーター（RR; response regulator）にリン酸基を転移する。リン酸化した RR は環境応答する特定の遺伝子のプロモーター領域に結合し、その発現を制御する。
大腸菌内で浸透圧ストレスを感知する EnvZ/OmpR 系の HK である EnvZ はホモダイマーを形成することが報告されている。また、高熱細菌の HK でもホモダイマーを形成することが報告され、一般には HK は膜上にホモダイマーを形成すると考えられている。近年、緑膿菌の HK である RstS と GacS がヘテロダイマーを形成することで GacS の自己リン酸化が抑制されることが示された。
本研究では、大腸菌でもヘテロオリゴマー形成による HK 活性の調節が起こっているのではないかと考え、Bacterial two-hybrid 法を用いて HK 間の相互作用を測定した。pT18-HK と pT25-HK-His6 は当研究室コレクションを利用した。まず、一種類の pT25-HK-His6 に対して全 29 種類の混合 pT18-HK を DHPI 株に形質転換後、MacConkey 寒天培地で培養し、赤色を呈するコロニーを選択した。選択した菌から pT18-HK、pT25-HK-His6 混合プラスミドを抽出し、再度 DHPI 株に形質転換後、MacConkey 寒天培地で赤色を呈し、X-gal を含む寒天培地で青色を呈するコロニーを HK 相互作用株と判定した。さらにヘテロな相互作用を確認するために、それらのプラスミドを含む大腸菌を培養して、
β-galactosidase assay と Western Blotting を行った。以上の測定の結果、ArcB と PhoR、ArcB と TorS、AtoS と BarA などで相互作用が示唆された。今後は、ヘテロダイマーを形成すると示唆される HK について、片方を欠失させるともう片方の活性がどのように変化するかをレポーターアッセイによって検討する。

histidine kinases, Bacterial Two-Hybrid, two-component signal transduction system

発表番号：4F048
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物病原菌 *Pantoea ananatis* の病原性遺伝子領域の発現制御における Quorum Sensing 機構の解析
# Regulation of virulence gene expression by quorum sensing in plant pathogen *Pantoea ananatis*

○佐藤 隆亮、池田 宰、諸星 知広（宇都宮大院工）
○Ryusuke SATO, Tsukasa IKEDA, Tomohiro MOROHOSHI (Utsunomiya Univ.)

【目的】多くのグラム陰性植物病原菌は、アシル化ホモセリンラクトン（AHL）をシグナル物質とした細胞間情報伝達機構 Quorum Sensing により、自身の病原性発現を制御している。植物病原菌 *Pantoea ananatis* は、イネやタマネギなどの農作物に対する感染菌であるが、詳細な病原性発現機構は明らかになっていない。我々の研究グループでは、*P. ananatis* SK-1 株から AHL 合成遺伝子（*eanI*）をクローニングするとともに、AHL を介した Quorum Sensing が、菌体外多糖生産、バイオフィルム形成、菌体凝集、タマネギ葉に対する病原性発現など、様々なフェノタイプを制御することを明らかにしてきた。本研究では、病原性 *P. ananatis* に特異的に存在することが報告されている病原性関連遺伝子領域 PASVIL に着目し、SK-1 株において PASVIL の発現が Quorum Sensing により制御されるか解析を行うとともに、タマネギ葉に対する病原性発現との関連性についても解析を行うことを目的とした。
【実験方法及び結果】*P. ananatis* SK-1 株を対数増殖後期まで培養し、細胞から Total RNA を抽出した。全ゲノム配列が公開されている *P. ananatis* LMG 20103 のデータベースを用いてカスタムマイクロアレイを設計し、Total RNA をラベリングして調製したサンプルを用いて各遺伝子発現量の違いを比較した。その結果、16 個の遺伝子から構成される PASVIL の中でも、7 個の遺伝子が *eanI* 遺伝子の破壊により発現量が大幅に低下したが、*eanI* 遺伝子破壊株に外部から AHL を添加することにより、野生株と同程度まで発現量が回復したことから、PASVIL 構成遺伝子の一部は AHL を介した Quorum Sensing により制御されることが明らかとなった。また、Quorum Sensing により制御される PASVIL 構成遺伝子について、個々の破壊株の作成を進めたところ、主要な病原性遺伝子と報告されている *leuA2* と *leuC* を破壊すると、SK-1 株においてもタマネギへの病原性発現が大幅に低下することが明らかとなった。現在、残りの遺伝子についても破壊株の作成及び病原性発現の検証を行っている。

quorum sensing, acylhomoseine lactone, plant pathogen

発表番号：4F049
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 蜂蜜酵母 *Zygosaccharomyces mellis* の高糖度耐性遺伝子の探索

# Genetic search involved in the high-glucose tolerance in *Zygosaccharomyces mellis*

○田村 倫子[1]、笠原 浩司[2]、桑村 麻由里[1]、阿久澤 さゆり[1]、村 清司[1] ([1]東農大応生科・健康、[2]東農大・アイソトープ)
○Tomoko TAMURA[1], Koji KASAHARA[2], Mayuri KUWAMURA[1], Sayuri AKUZAWA[1], Kiyoshi MURA[1] ([1]Tokyo Univ. Agric., [2]Tokyo Univ. Agric. Isotope)

【目的】浸透圧の高い食品に生育する酵母が知られている。カナダ産蜂蜜から単離した *Zygosaccharomyces mellis* は、蜂蜜やシラップに生育できる高い耐糖性を有しているが、塩に対する耐性は一般酵母と同様である。そこで今回は、*Z. mellis* の糖に特化した浸透圧耐性メカニズムを明らかにするため、高グルコース培地で *Z. mellis* を培養したときに大きく発現変動する浸透圧応答遺伝子を明らかにすることを目的とした。
【方法】①浸透圧耐性試験においては、10～80%グルコース含有 YM 寒天培地に *Z. mellis* をストリークし、25℃ 6 日間培養後の生育を観察した。対照実験として *Saccharomyces cerevisiae* を用いた。
②トランスクリプトーム解析は、まず 1%及び 50%グルコース YM 培地に *Z. mellis* を培養し、全 RNA を抽出した。次に次世代シークエンサーを用い RNA-Seq を行い *de novo* アセンブリによりコンティグを得た。コンティグをブラスト検索しアノテーションを得た後、total gene reads が 100 以上、かつ sequence reads が 400 bp 以上、かつ fold change が 2.5 以上となった遺伝子を抽出しその詳細を調べた。
③RT-PCR は、トランスクリプトーム解析で変化の見られた遺伝子を対象に行い、1%グルコース培地における遺伝子の発現量を 1 とした時の 50%グルコース培地における発現量を調べた。
【結果】①浸透圧耐性試験においては、*S. cerevisiae* が 50%グルコース培地に生育しなかったのに対し、*Z. mellis* は 60%グルコース培地でも生育した。
②9672 遺伝子がシークエンス解読された。このうち方法②の条件で選出すると、糖により up-regulate された遺伝子は 123 遺伝子であり、セラミド産生酵素、細胞周期調節因子、グルコーストランスポーター、ミオシンタンパク質などが含まれた。一方、down-regulate された遺伝子は 56 遺伝子であった。
③糖により up-regulate された遺伝子の RT-PCR を行うと、酸性スフィンゴミエリナーゼ(ASM)、細胞周期転写調節因子(activator of CUP1 expression2, ACE2)、ミオシン重鎖をコードする遺伝子の発現量が 1%グルコース培地における発現量より有意に高かった($p<0.05$, n=3)。ASM により生成されるセラミドは細胞膜に発現するトランスポーターやレセプターを膜に留めるアンカーとして機能する他、膜の修復にも関与することが他の生物種で知られているが、高糖ストレスにおける発現増加は知られていない。*Z. mellis* は、タンパク質細胞骨格や細胞膜の構造に関わる遺伝子の発現を増加させることで、高糖度ストレス耐性を示すことを示唆した。今後は、糖負荷により有意に発現増加した遺伝子を *S. cerevisiae* に形質転換し、*S. cerevisiae* が高糖度耐性能を獲得するかを検討する。

*Zygosaccharomyces mellis*, high-glucose tolerance, RNA-Seq

発表責任者：田村 倫子（t3tamura@nodai.ac.jp）

発表番号：4F050
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌の抗シグマ因子 YhdL と YhdK によるシグマ M の活性制御機構の解析

# Analysis of regulation mechanisms of SigM with its cognate anti-sigma factor, YhdL and YhdK, in Bacillus subtilis.

○朝井 計、佐俣 友理、吉本 祥子（埼玉大理工）
○Kei ASAI, YURI SAMATA, SHOUKO YOSHIMOTO (Saitama Univ.)

グラム陽性胞子形成土壌細菌である枯草菌は、様々な種類のストレス応答シグマ因子を有している。その中でも、ECF（細胞外機能の略）と呼ばれるサブファミリーに属するシグマ因子は細胞表層に対する様々なストレスに応答するシグマ因子として、多くの細菌に保持されている。ECF シグマ因子の特徴の一つとして、膜タンパク質である抗シグマ因子により活性が調節されていることが挙げられる。枯草菌にも 7 つの ECF シグマ因子があり、そのうちのシグマ M は、酸、熱、塩、スーパーオキシドや主に細胞壁ストレスに応答するシグマ因子である。シグマ M の活性は、抗シグマ因子である、YhdL と YhdK の２つの膜タンパク質によって負に調節されている。 YhdL の細胞質側の N 末端領域が、シグマ M と結合し、YhdK は YhdL と相互作用し、YhdL-シグマ M の結合を補助すると考えられている。しかし、YhdL と YhdK が、ストレスシグナルに応じてどのようにシグマ M 活性を制御しているのかといった、分子メカニズムは完全には解明されていない。本研究は、YhdL と YhdK によるシグマ M の制御機構の解明を目的としている。

YhdL の C 末端部分は細胞外にあり、シグナル受容体としてシグナル分子と相互作用していることが考えられる。YhdL のアミノ酸配列の保存性を検討したところ、異なる細菌種間で高度に保存された領域が見出された。そこで保存領域を含む様々な C 末端の欠失変異株を作製し、シグマ M 活性の制御能を検討したところ、C 末端の 18 アミノ酸を欠失しただけで、制御能が大きく失われた。シグマ結合ドメインである YhdL の N 末端ドメインに GFP を融合し、細胞内での挙動をウエスタンブロットや蛍光顕微鏡観察によりモニターした。この GFP 融合 YhdL はシグマ結合能が失われていると考えられるが、興味深いことに前述の C 末端欠失 YhdL との部分二倍体では、シグマ M の活性制御能が回復した。YhdL が二量体となり、それぞれの欠損を互いに相補したことが考えられる。シグマ M、YhdL、YhdK をコードする遺伝子はオペロンを形成し、さらにコード領域が重なっている。それぞれの遺伝子を分断して発現させると、シグマ M の活性制御能が減少した。シグマ M－YhdL－YhdK の相互作用には、いわゆる翻訳カップリングが関与していることが示唆された。

Bacillus subtilis, sigma factor, stress response

発表責任者：朝井計（asai@molbiol.saitama-u.ac.jp）

発表番号：4F051
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 全ゲノム解析による実験室進化 *Saccharomyces cerevisiae* の熱適応戦略の分子解析

# Molecular Analysis of Adaptational Strategies under Heat Stress by Whole-Genome Sequencing of Laboratory-Evolved *Saccharomyces cerevisiae*

○里村 淳[1,2]、三浦 夏子[1]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1,3]（[1]京大農、[2]日本学術振興会特別研究員、[3]京都バイオ計測センター）
○ATSUSHI SATOMURA[1,2], NATSUKO MIURA[1], KOUICHI KURODA[1], MITSUYOSHI UEDA[1,3]
([1]Kyoto Univ., [2]JSPS, [3]KIST-BIC)

[背景]

熱耐性酵母を用いたバイオエタノール生産は、冷却エネルギーの削減、発酵の迅速化等の利点があり、低コストなバイオエタノール生産には不可欠である[1]。しかし、任意の酵母に耐熱性を付与できる遺伝子変異の同定と再構築は進んでいない。本研究では、熱ストレス下で実験室進化を行った酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、全ゲノム解析を行うことで、熱耐性に関わる遺伝子変異の同定と再構築を試みた。

[方法・結果]

*S. cerevisiae* を 32ºC から 38 ºC まで 2 ºC ずつ段階的に適応育種を行うことで、各温度に適応した酵母株集団を獲得した[2]。各酵母株集団の全ゲノム解析を次世代シーケンサーにより行うことで、熱ストレス下における集団の推移を解析した。32ºC から 38ºC において、特定の遺伝子上に塩基置換を有する酵母株が集団の優勢を占めることがわかった。また、温度が上がるにつれて、その遺伝子における変異の座位も変化していた。同定された変異を育種親株に導入したところ、全ての株で熱耐性が再現できた。これらの変異株のシグナル情報伝達を解析したところ、包括的に転写を改変して、熱耐性をもたらしていることがわかった。また、これらの株は高温下において、育種親株よりも高いエタノール発酵能を示したことから、本変異の産業への応用も十分に期待できることが判明した[3]。

[1] A. Satomura et al. Biotechnology Progress (2013), 29, 1116-1123
[2] Satomura, A. et al. Current Environmental Engineering (2014), 1, 149-156
[3] A. Satomura et al. Submitted

Whole-genome sequence, *Saccharomyces cerevisiae*, Thermotolerance

発表責任者：里村　淳（satomura.atsushi.77w@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F052
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ホールトランスクリプトーム解析によるカロテノイド生産乳酸菌の酸化ストレス応答因子の探索

# Whole-Transcriptome analysis of the oxidative stress response genes in carotenoid-producing lactic acid bacteria

○萩 達朗、小林 美穂、野村 将（農研機構・畜草研）
○Tatsuro HAGI, Miho KOBAYASHI, Masaru NOMURA (NARO)

【目的】カロテノイドは植物や微生物が保有している色素であり、光合成や酸化ストレス応答に関与している。一部の乳酸菌もカロテノイドを有しているが、その機能についてはあまり明らかではない。本研究グループではこれまでに、乳酸菌のカロテノイドを中心としたストレス応答機構について研究を行い、乳酸菌由来カロテノイドは乳酸菌のストレス耐性を向上させることや、酸化ストレスでイソプレノイドーカロテノイド生合成経路の遺伝子発現が誘導されることを明らかにしてきた 1)。本大会では、カロテノイド生産系を含め、カロテノイド生産乳酸菌に特有なストレス応答因子の探索を目的とし、ホールトランスクリプトーム解析を用いて酸化ストレスによって誘導される遺伝子群を調べることとした。
【方法】生乳由来のカロテノイド生産乳酸菌 *Enterococcus gilvus* CR1 株を、200 mL の GM17 培地 (0.5%グルコース含有) を含む 500 mL 三角フラスコに 0.5% (v/v) 接種し、30℃・4 時間、静置培養した。その後、酸化ストレス処理区 (好気培養) では CR1 株を振とう培養し、30℃・30 分間培養した。一方で、CR1 株をそのまま 30 分間静置培養し、これを酸化ストレス未処理区とした。各培養条件で回収した菌体から RNA を抽出し、次世代シークエンサー（Illumina Hi-Seq）を用いてホールトランスクリプトーム解析を行った。
【結果】酸化ストレス処理区では未処理区と比較して、ピルビン酸をアセトインあるいはアセチル CoA に変換する酵素をコードする遺伝子群の発現量が増加していた。酸化ストレスで Acetyl-CoA から始まるイソプレノイドーカロテノイド生合成経路の遺伝子群の発現量も同時に増加することから、ピルビン酸からカロテノイドまでの代謝経路遺伝子群が好気培養によって全体的に増加し、カロテノイド生産の促進に繋がったと考えられる。また、好気培養によって機能未知遺伝子や UvrABC system protein をコードする DNA 修復系遺伝子、カロテノイド生産に関わると推測される転写制御因子 Spx をコードする遺伝子の発現量が変動した。

1) Hagi et al., 2015. FEMS Microbiology Letters, 362(12):fnv075.

lactic acid bacteria, carotenoid, transcriptome

発表番号：4F053
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* の光応答メカニズムの解明

# The elucidation of light responsive mechanism in oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides*

○宮田 淳史[1]、志田 洋介[1]、山崎 晴丈[2]、正木 和夫[3]、森 一樹[4]、久原 哲[4]、高久 洋暁[2]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大生物、[2]新潟薬科大応、[3]酒総研、[4]九大院農)
○Atsushi MIYATA[1], Yosuke SHIDA[1], Harutake YAMAZAKI[2], Kazuo MASAKI[3], Kazuki MORI[4], Satoru KUHARA[4], Hiroaki TAKAKU[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ., [2]Niigatayakka Univ., [3]Shuruisogo RL., [4]Kyushu Univ.)

【目的】

油脂生産酵母 *Rhodosporidium toruloides* は菌体外に存在する糖を代謝し、菌体当たり最大 70%の油脂を蓄積する特徴を有している。そのため、食用油の原料や新たなエネルギー資源として近年注目を浴びている。また、抗酸化作用を有するカロテノイドを生合成することから、カロテノイド生産菌としての利用も期待されている。しかし、*R. toruloides* のカロテノイド生産性は低く、産業利用に向けてカロテノイド生産性向上は必須である。現在までに、他のカロテノイド生産菌は光照射によりカロテノイド生産性が向上すると報告されているが、光照射によるカロテノイド生合成機構の詳細な報告はされていない。本菌においても光照射によって菌体が赤色化する表現型を示し、カロテノイド生産性の向上が示唆された。そこで本研究では、本菌の光照射によるカロテノイド生合成機構の解明を目的としている。カロテノイドは油脂生産に必須である Acetyl CoA からメバロン酸経路を介して生合成されることから、光照射による本菌の油脂生産とカロテノイド生産の関連についても解析を行った。

【方法と結果】

30 ℃、130 rpm で 7 日間光照射培養を行い、経時的に菌体を回収し、カロテノイド量、乾燥菌体重量、残糖量、油脂量を測定した。その結果、光照射により経時的にカロテノイド生産量が増加することが明らかになった。また、光照射により乾燥菌体の減少がみられたが、細胞当たりの油脂含有量に変化はなかった。このことから、光照射は本菌の生育に影響を及ぼすが、油脂生産性に影響がないことが明らかになった。そこで、qRT-PCR 解析を用いてカロテノイド生産経路関連遺伝子の転写量を測定した。その結果、メバロン酸経路関連遺伝子の発現量は変化しなかったが、カロテノイド生合成関連遺伝子の発現量が光照射後 1 時間と光照射後 3 日目以降で増加していた。これらの結果より、本菌が 2 段階の光応答機構を保持することが示唆された。また、光照射後 1 時間でカロテノイド生合成関連遺伝子の発現量が増加したため、光照射後早期に光応答遺伝子の発現量が増加することが示唆された。そのため、光照射後 1 時間の菌体を抽出した Total RNA を用いてマイクロアレイ解析による光応答関連遺伝子の同定を進めている。

*Rhodosporidium toruloides*, Carotenoid, Light response

発表番号：4F054
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 炭酸と不飽和脂肪酸による連鎖球菌の増殖と莢膜多糖生合成の制御

# Bicarbonate and unsaturated fatty acids enhance *cps* gene expression in *Streptococcus anginosus*

松本 裕子、中西 猛志、○三宅 克英（石川県大資源研）
Yuko MATSUMOTO, Takeshi NAKANISHI, ○Katsuhide MIYAKE (Res. Inst. Biores. Biotech., Ishikawa Pref. Univ.Res. Inst. Biores. Biotech., Ishikawa Pref. Univ.)

菌体外莢膜多糖はバイオフィルムの主成分として細菌を外部環境から保護する働きを有している。我々はこれまで溶血性連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae* や口腔連鎖球菌 *S. anginosus* の莢膜多糖に着目し、これらの菌株から莢膜多糖生合成（*cps*）遺伝子群をクローン化し、その解析を行ってきた。連鎖球菌の莢膜多糖生合成遺伝子群は多くの菌株で報告されてきており、その構造や特徴も明らかになっているが、遺伝子群を調節し、莢膜多糖の生産を制御するメカニズムには不明な点が多い。今回は二酸化炭素、あるいは変換された炭酸および不飽和脂肪酸が *cps* 遺伝子群の発現と増殖に与える影響について解析したので報告する。

炭酸と不飽和脂肪酸は莢膜多糖生産量を増強することを ELISA 法で明らかにした。また RT-qPCR 法とプロモーター解析の結果、炭酸と不飽和脂肪酸は *cps* 遺伝子群の発現を正に制御していることが判明した。プロモーター解析の結果は、*cps* 遺伝子群のプロモーターが単独では機能できず、遺伝子群先頭の *cpsA* が発現には必須であることも示唆していた。これらの現象は二酸化炭素を炭酸に変換する carbonic anhydrase の強制発現株でも確認された。*S. anginosus* はこの酵素を持っていないため、二酸化炭素が炭酸に変換されることが重要と考えられる。また炭酸と不飽和脂肪酸は細菌増殖に対しても同様に働くことも確認した。不飽和脂肪酸がなぜ炭酸の作用を代替できるのかという点を調べるために、脂肪酸生合成系遺伝子群（*fabK, fabM, fabZ*）の発現解析を、炭酸による制御という観点から行った。*fabK* は飽和脂肪酸、*fabM* は不飽和脂肪酸生合成経路に特異的な酵素をコードしている。

炭酸や不飽和脂肪酸を検知する調節遺伝子に関しては、*cps* 遺伝子群近傍下流に存在する二成分制御系因子（OrfO（脱リン酸化酵素）、OrfP（LPXTG 細胞壁表層蛋白質）、OrfQ（転写因子）、OrfR（ヒスチジンキナーゼ））をコードする遺伝子群を候補として考えている。OrfP が受容体であり、他の三つは情報伝達に関与するものと仮定している。不飽和脂肪酸が受容体に直接作用するのか、あるいは細胞膜の脂質組成の変化を介して作用するのか興味深い。これらの因子の欠損変異株と強制発現株を取得し、炭酸、不飽和脂肪酸の莢膜多糖生産、*cps* 遺伝子発現、増殖への影響を解析している。

unsaturated fatty acid, Streptococcus anginosus, capsular polysaccharide

発表責任者：三宅克英（miyake@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：4F055
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母に対する酸化イットリウムナノ粒子の影響評価

# The evaluation for effect of yttrium oxide nanoparticles on yeast

○森山 章弘[1]、高橋 淳子[2]、堀江 祐範[2]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大、[2]産総研)
○Akihiro MORIYAMA[1], Junko TAKAHASHI[2], Masanori HORIE[2], Hitoshi IWAHASHI[1] ([1]Gifu Univ., [2]AIST)

【はじめに】
今日、ナノ粒子は多くの製品に利用されており、例えば工業的には触媒として幅広く用いられている。産業でのナノ粒子の利用の増加につれ、環境中への流出時の環境影響が懸念される。当研究室では環境中に普遍的に存在する酵母を用いて種々のナノ粒子の影響を評価している。今回は *in vivo* イメージングの赤色光源としても利用される $Y_2O_3$ ナノ粒子についての影響を評価した。
【実験方法】
使用した酵母は *Saccharomyces cerevisiae* S288C 株で、YPD 培地を使用した。$Y_2O_3$ ナノ粒子は一次粒子径 33 nm、比表面積 35 $m^2/g$ を使用した。前培養した酵母を 1%接種し 6h の本培養後、粒子を添加しさらに 2h 培養したのち RNA を抽出し、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行った。
【結果・考察】
酵母を塗布した YPD 寒天培地に $Y_2O_3$ ナノ粒子を添加すると阻止円が形成され、可溶性成分が毒性の原因であると推定した。そこで可溶性イットリウム化合物の $YCl_3$(1 mg/ml:IC50 相当)と $Y_2O_3$ ナノ粒子(0.6 mg/ml:IC50 相当)それぞれの影響を、遺伝子発現解析を用いて比較を試みた。しかし IC50 に基づく $Y_2O_3$ ナノ粒子の処理条件では遺伝子の発現変動はほとんど観察されなかった。原因は粒子による酵母の吸着にあると推定され、CFU では IC50 を求めることができないことが分かった。そこで $YCl_3$ 処理で誘導された遺伝子のうち *MET17*、*MEP2*、*SAM2*、*OPI3* を指標として、新たな $Y_2O_3$ ナノ粒子処理条件(4 mg/ml)を確定した。この条件では、$Y_2O_3$ ナノ粒子処理酵母においても顕著な遺伝子発現変動が起こり、タンパク質合成系の停止、酸化ストレスなどの付加が明らかとなった。$YCl_3$ 処理(1 mg/ml)と比較すると、アミノ酸合成系など、誘導された遺伝子機能に類似性はあるものの、より強いストレス付加がされていると考えられた。このことはナノ粒子自体の影響が付加されている可能性を示唆しており、現在、粒子の影響も視野に入れたさらなる確認実験を行っている。

yeast, stress response, nanoparticles

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4F056
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

プラスミド保持に伴い宿主の生育負荷を引き起こす染色体上転写単位の解析
Transcription unit on *Pseudomonas putida* KT2440 causes the fitness cost by harboring RP4.
○杉山 大介[1]、水口 千穂[1]、高橋 裕里香[2]、岡田 憲典[1]、野尻 秀昭[1] ([1]東大生セ、[2]富県大生工科・生工セ)
○ Daisuke SUGIYAMA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Yurika TAKAHASHI[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Toyama Pref. Univ.)

【目的】プラスミドは宿主間を水平伝播し宿主に新規形質を与える一方で、宿主の生育にとって負荷となる場合もある。これは非選択条件下においてプラスミド保持株が他の細菌に淘汰されやすいことを示唆しているが、実際には淘汰されずに生き残る場合や他の細菌に対して優占化する現象も観察されている。昨年度までに当研究グループは、多剤耐性プラスミド RP4 (IncP-1、60 kb) を保持させた *Pseudomonas putida* KT2440 株 (以下 KTRP4) とプラスミドを保持していない KT2440 株 (以下 KT) との競合培養を行い、非選択条件下において優占化した KTRP4 (以下進化株) を単離した。進化株では宿主染色体上の PP_5401 及び PP_5402 の遺伝子間領域に変異が存在していたこと、KTRP4 では誘導されていた当該領域の転写量が進化株では抑制されていたことから当該領域の転写産物が RP4 保持による負荷を引き起こしていることが強く示唆された。そこで本年度は RP4 保持が宿主の生育負荷を引き起こすメカニズムの解明を目的として当該領域の詳細な解析を行った。
【方法・結果】当該領域が KT に与える影響及び機能に必要な領域を解析するために過剰発現株を作製した。昨年度までに 5'-RACE 法により転写開始点が決定されていたため、転写開始点以下の領域 100, 200, 300, 400 bp を過剰発現させるベクターを作製しそれぞれ KT に保持させた。これまで KTRP4 が寒天培地上に形成するコロニーは KT と比較して小さくなることが明らかとなっていたため、これらの過剰発現株についても寒天培地上に形成するコロニーサイズを定量し KT 及び KTRP4 と比較した。その結果、100 及び 200 bp を過剰発現させた株では KT と同程度のコロニーを形成していたのに対し、300 及び 400 bp を過剰発現させた株では KTRP4 と同程度の小さなコロニーを形成しており、KTRP4 と同様に宿主の生育負荷が起きていることが示唆された。この結果より当該領域の転写が RP4 を保持した際の宿主の生育負荷に関与すること、少なくとも転写開始点以下 300 bp が機能に必要な領域であることが確認された。当該領域には読み枠が存在しないことから non-coding RNA として機能していることが推測されたため、RNA の相互作用領域解析ツール IntaRNA (http://rna.informatik.uni-freiburg.de/IntaRNA/Input.jsp) を用いて当該領域の標的遺伝子の探索を行った。上述の結果を基に、200 bp をクエリとした際には検出されず、300 及び 400 bp をクエリとした際に検出された遺伝子を標的遺伝子候補としたところ、24 遺伝子が検出された。ポスター発表では、過剰発現株における生育負荷を評価するための競合培養実験の結果及び、IntaRNA によって検出された標的遺伝子候補の RT-PCR による発現解析結果も併せて発表する。

fitness cost, plasmid, *Pseudomonas*

発表責任者：野尻秀昭（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F057
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *Aspergillus oryzae* の金属プロテアーゼ insulysin の機能解析

Analysis on Physiological functions of insulysins in *Aspergillus oryzae*.

○鈴木 遥香、吉永 良平、前田 浩、竹内 道雄、山形 洋平（東農工大農）
○ Haruka SUZUKI, Ryohei YOSHINAGA, Hiroshi MAEDA, Michio TAKEUCHI, Youhei YAMAGATA (Tokyo Univ. of Agriculture and Technology)

【背景・目的】

*Aspergillus oryzae* は EST 解析及び全ゲノム解析によりヒト insulysin の ortholog を 3 つ有していることが推定された。真核生物の優れたモデル生物である酵母では, *Saccharomyces cerevisiae* の Ste23, *Schizosaccharomyces pombe* の Iph1 が insulysin のオルソログとされている。いずれのプロテアーゼも推定アミノ酸配列においてヒト insulysin と約 40%という高い相同性を持つ。また，ヒト insulysin と同様に insulin や amyloid-β の分解能を有することも報告されている。その他，出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における ortholog, Ste23 は α-prohormone の成熟化に関与している事が報告されている。一方，分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* における ortholog, Iph1 をコードする *iph1* 遺伝子の欠損は野生株より高い ER ストレス耐性を誘導する事，Iph1 が TORC1 の産生を制御する事が報告されている。 *A. oryzae* の 3 つの ortholog 酵素もヒトや酵母の insulysin と高い相同性を持つことは推定されたが，機能についてこれまで報告はない。しかし，ヒトや酵母には 1 つしかない insulysin をコードする遺伝子を *A. oryzae* は 3 つ有していることから，３つの遺伝子は *A. oryzae* 固有の役割を持つ，または機能を分担・相補している可能性が示唆された。本研究ではこれらの酵素をコードする遺伝子 *insA*, *insB*, *insC* の各遺伝子欠損株を作製し，欠損株の表現型を比較する事で各酵素の生体内での機能を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

*A. oryzae* RIB40 Δ*pyrG* Δ*ligD* 株をホストとし,*pyrG* 遺伝子を選択マーカーに用いて *insA*, *insB*, *insC* 各遺伝子欠損株を作製した。Δ*insA* 株は Δ*insB* 株や Δ*insC* 株と同様に行ったが，目的の株を取得することが出来なかった。そのため,*insA* 遺伝子は lethal である可能性が示唆された。

得られた Δ*insB* 株及び Δ*insC* 株について野生株との表現型の比較を行った。その結果, Czapek-Dox 寒天培地上では Δ*insC* 株の分生子量が野生株の約半分に減少した。更に，ER stressor としてツニカマイシンを添加した Czapek-Dox 寒天培地上では, 野生株のコロニー直径が顕著に減少したのに対し，Δ*insB* 株及び Δ*insC* 株ではそのコロニー直径の減少に回復が見られた。

以上の結果から，*A. oryzae* の InsB 及び InsC は *S. pombe* Iph1 と同様に ER ストレスに関与する可能性が示唆された。

なお，本研究の一部は生研センター基礎推進事業の一環として行われたものである。

*Aspergillus oryzae*, protease, ER stress

発表番号：4F058
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 接合菌 *Mucor circinelloides* の二形性メカニズムの解析

Analysis of dimorphical mechanism on zygomycota *Mucor circinelloides*

○岩倉 遼[1]、寺山 結香[1]、高野 真希[2]、星野 一宏[2]([1]富大工、[2]富大院理工)
○Ryo IWAKURA[1], Yuka TERAYAMA[1], Maki TAKANO[2], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Univ. Toyama, [2]Grad. Univ. Toyama)

【目的】二形性真菌とは、温度や pH、血清の有無などの様々な環境に応じて酵母体と糸状体の 2 つの異なる形態をとる真菌のことである。*Candida albicans* や *Coccidioides immitis* などの二形性真菌は酵母体から糸状体に形態を変化させ、糸状体で病原性を示す。一方、接合菌 *Mucor circinelloides* は好気条件で糸状体、完全嫌気条件で酵母体へと形態が変化する二形性真菌であり、好気および嫌気条件下でエタノール発酵が可能な非病原性の菌株である。しかし、糸状体から酵母体へと形態が変化する際の細胞内での代謝系や遺伝子発現系における二形性メカニズムは不明である。そこで本研究では、好気・嫌気条件下における二形性変化に関わる遺伝子発現を解析し、*M.circinelloides* の形態変化メカニズムを検討した。

【方法】本研究では二形性メカニズム解明のために *Mucor circinelloides* NBRC4572 J 株を使用した。Glucose 培地にて、好気条件および 70%$N_2$+30%$CO_2$ の完全嫌気条件下で振盪培養を行い、6, 12, 24 時間目に培養液から菌体を回収した。回収した菌体から RNA 抽出を行い、Real-time PCR を用いた遺伝子発現量の定量を行った。ターゲット遺伝子として細胞の $CO_2$ 取り込みから菌糸伸長に至るまでの遺伝子群（*Nce103, Ras1, cdc35, Efg1, PKAR2, PKAR3, PKAR4, PKA4, PKA5, PKA6 , PKA10, PDE*）を定量した。ハウスキーピング遺伝子として *Actin* を使用した。

【結果】培養は酵母体の *M.circinelloides* を植菌し開始した。培養 6 時間目では好気条件で菌糸が伸び始め、嫌気条件では酵母体を維持していた。$CO_2$ 取り込みに関与する *Nce103* (Carbonate anhydrase 遺伝子)は糸状体と比較すると酵母体では 1.8 倍発現していた。*Nce103* の発現量が増加することによって $CO_2$ から $HCO_3^-$への変換が促進され下流の遺伝子群(*Ras1*, *Cdc35*)へ影響すると考えられる。実際、*Ras1*, *Cdc35*, *PDE* は糸状体と比べ酵母体ではそれぞれ 1.12、2.71、0.49 倍発現していることが確認できた。これらの結果から *Cdc35* が増加し PDE が抑制されたことで細胞内 cAMP が増加すると考えられる。さらに *PKA*, *PKAR* は 1.35~1437 倍、および下流の *Efg1*(菌糸伸長因子遺伝子)が 101 倍発現していることがわかった。*Efg1* の発現により菌糸伸長が抑制され酵母体が維持できると推察できる。培養 12 時間目では好気条件で菌糸の伸長が確認でき、嫌気条件では酵母体の維持が確認できた。遺伝子発現量は 6 時間目と違いは認められなかった。培養 24 時間目では好気条件では完全に糸状体となり、嫌気条件では酵母体を維持していた。以上のことから、*M.circinelloides* の二形性メカニズムは、培養液中の $CO_2$ によって制御され、細胞内 cAMP の蓄積に伴い菌糸伸長が抑制されることが示唆された。

*Mucor* , dimorphism, $CO_2$

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

発表番号：4F059
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Methylobacterium* 属細菌におけるメタノール走化性センサーの同定

Identification of methanol-chemotaxis sensor in *Methylobacterium* species

○伊賀 俊貴[1]、加藤 純一[2]、谷 明生[1] ([1]岡山大植物研、[2]広島大院先端物質科学)
○Toshiki IGA[1], Junichi Kato[2], Akio Tani[1] ([1]IPSR Okayama Univ., [2]Hiroshima Univ.)

【目的】植物は年間約 1 億トンものメタノールを大気中に放出しており、そのメタノールを利用できる *Methylobacterium* 属細菌は植物表面上の細菌の 10-20%を占めている優占種である。本属細菌は、代謝産物を植物に与えたり、他の病原性菌と競合することで病原菌から植物体を守るといった働きがあり、植物の生育を促進する。本属細菌は植物と共生する前の段階で、何らかの物質を感知することで植物の存在を探し当てていると考えられる。私たちはエゾスナゴケから分離した *M. aquaticum* 22A 株をモデルとして植物との相互作用を解析する中で、本菌がメタノールに対して走化性を示すことを見いだした。本研究では本属細菌におけるメタノールへの走化性を司る遺伝子の同定を目的とした。
【方法】細菌の運動は鞭毛の回転に依存する。鞭毛の回転方向は methyl-accepting chemotaxis protein (MCP) というセンサータンパク質から発せられるシグナルと複数の chemotaxis protein (Che protein) によって制御されており、MCP の数だけ多様な化合物を認識すると考えられている。22A 株のゲノム中には MCP と考えられる遺伝子が 51 個確認されている。これらの中からメタノール走化性センサーを絞り込むために、メタノールに生育しゲノム情報の明らかな *M. extorquens*, *M. oryzae*, *M. nodulans*, *M. radiotolerans*, *M. chlolomethanicum*, *M. dichlolomethanicum*, *Bradyrhizobium japonicum* のメタノールへの走化性テストを行うことで候補遺伝子を絞った。また 22A 株の遺伝子は pK18mobsacB ベクターを用いた相同組み換えにより欠失させた。
【結果】22A 株はメタノールの他にリンゴ酸、グルタミン、グリセリン酸に走化性を示した。また糖には走化性を示さなかった。絞り込みにより 4 つの遺伝子がメタノールセンサーと考えられ、それらをそれぞれ欠失させた変異株を作成した。変異株のメタノールへの走化性アッセイによりそのうち一つが野生株に比べてメタノールに対する走化性が減少することを見いだした。しかし走化性は完全には失われず、他にもメタノールセンサーが存在することが示唆された。またこの変異株はアミノ酸等には野生株と同等の走化性を示した。現在他の MCP 遺伝子との多重欠失株を作成している。

chemotaxis, MCP, *Methylobacterium*

発表番号：4F060
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物-真菌融合ヒスチジンキナーゼを用いた糸状菌におけるエチレン応答性人工シグナル伝達系の創製とその応用

# Development of ethylene-responsive singling system using plant-fungal fusion histidine kinase in filamentous fungi and its application.

○中山 真由美[1,2]、古川 健太郎[3]、吉見 啓[1]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大・未来研、[2]東北大・院農、[3]新潟大・院医)
○Mayumi NAKAYAMA[1,2], Kentaro FURUKAWA[3], Akira YOSHIMI[1], Keietsu ABE[1,2] ([1]NICHe., Tohoku Univ., [2]Agric. Sci.,Tohoku Univ., [3]Med. Sci.,Niigata Univ.)

二成分情報伝達系はバクテリアから真核生物にまで広く保存される普遍的な環境応答機構であり，糸状菌，酵母および植物でも保存されている。このシステムは，ヒスチジンキナーゼ（HK），リン酸転移中間因子（HPt），レスポンスレギュレーター（RR）の３つから構成されており，HK については糸状菌や酵母において環境ストレスセンサーとして知られているほか，植物においてはエチレンやサイトカイニンといった植物ホルモンのセンサーとして機能していることが知られている。

植物のシロイヌナズナにおいてエチレンセンサーとして機能する AtETR1 は HK 活性を持ち，エチレンによって HK 活性が制御されている。これまでに，この植物由来のエチレン結合ドメイン（EBD）と，出芽酵母唯一の HK である ScSln1p，糸状菌 *Aspergillus nidulans* の浸透圧ストレスに応答する HK である AnTcsB および主要な HK である AnNikA のヒスチジンキナーゼドメイン（HKD）と融合した HK 分子を設計し，出芽酵母 Sln1p 温度感受性株において HK の機能相補性およびエチレン応答性を確認している。

本研究では，出芽酵母で HK 機能相補性およびエチレン応答性を確認できた EBD 融合 HK 分子について，糸状菌においても発現系を構築し，HK 機能相補性およびエチレン応答性の確認を行うことにより，エチレン応答性の新規シグナル伝達系を創出することを目的とした。

糸状菌 *A. nidulans nikA* 破壊株において EBD 融合 HK 分子のエチレン応答性を確認するため，糸状菌 HOG 経路の標的である *AngfdB* 遺伝子のプロモーターに核移行型の *EGFP-LacI-NLS* 遺伝子を連結した蛍光レポーター株を作製し，各種 EBD 融合 HK 分子を発現させた。これらの EBD 融合 HK 分子導入株では，エチレンに応答して核に EGFP が局在することが確認され，糸状菌での EBD 融合 HK 分子のエチレン応答性が確認できた。糸状菌においてエチレン応答性の新規シグナル伝達系を構築できたことから，実際にエチレン制御による転写因子発現システムを構築し，酵素生産等の応用を試みている。

Two-component regulatory system, Histidine kinase, Ethylene

発表番号：4F061
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌の特性と変異部位の決定

# Characterization of mutations in spontaneously isolated antibacterial-surfactant resistant strains

○御厨 真幸[1]、松村 吉信[2] ([1]関大院化生工、[2]関大化生工)
○Masayuki MIKURIYA[1], Yoshinobu MATUMURA[2] ([1]Grad. Kansai Univ., [2]Kansai Univ.)

〔目的〕公衆衛生や清潔志向への関心の高まりから、高い安全性と抗菌力をあわせもった抗菌剤の開発が望まれている。一方で、抗菌剤の需要の増加に伴い、抗菌剤に対する耐性菌の出現も懸念されている。このため、耐性菌の効果的な殺菌法の確立や耐性菌の出現を軽減する抗菌法の開発が望まれ、どのような過程で耐性菌が出現するのかを検証するとともに、抗菌剤に対する耐性菌の耐性機構を網羅的に解明する必要がある。これまで、抗菌性陽イオン性界面活性剤、臭化セチルトリメチルアンモニウム塩(CTAB)に耐性を示す自然突然変異株 *Escherichia coli* OW66 株を単離し、その親株である OW６株と比較したところ、スーパーオキシドストレス耐性に関わる遺伝子に変異が生じ、スーパーオキシドストレス耐性に変化していた。そこで新たに OW6 株を親株として耐性度の異なる複数の CTAB 耐性自然突然変異株を取得し、これら新規 CTAB 耐性株におけるストレス耐性能と CTAB 処理における活性酸素発生量の比較を行うとともに、次世代シーケンサーによる変異部位の同定を試みた。
〔方法〕CTAB 耐性自然突然変異株は L 培地または M9 培地に適当な濃度の CTAB を添加して培養した細胞より選択した。また、より高い耐性株の取得にはさらに高濃度の CTAB 培地で培養した細胞より選択した。最小発育阻止濃度(MIC)の測定は各薬剤を含む培地で 24 時間培養後、目視により増殖の有無で確認した。増殖が確認できない最小濃度を MIC とした。細胞内活性酸素の発生確認は活性酸素と特異的に反応する蛍光試薬を用い、蛍光顕微鏡観察法およびフローサイトメーター分析法で調査した。自然突然変異株の変異部位同定は、次世代シーケンサーMiSeq(illumine 社)を用いた。
〔結果〕今回好気条件下で取得された CTAB 耐性株は、終濃度 540 μM CTAB を含む LB 培地と終濃度 34 μM CTAB を含む M9 培地から単離された。また、低濃度 CTAB 含有培地で単離された低程度および中程度耐性株も複数取得された。各耐性株は、CTAB 耐性能の向上に伴い、アンピシリンなどのその他の薬剤に対する耐性能も獲得し、CTAB 処理による $O_2^-$ や $H_2O_2$ の発生量も減少していた。この結果から、CTAB 耐性化に活性酸素の消去能力向上や発生能の低下が重要であると示唆された。また、一部の CTAB 耐性株では、致死条件の CTAB 処理で細胞集団の一部が死滅しないことが確認された。この集団の耐性が、死滅したその他の集団よりも耐性化していることも確認されたため、persister cell（永生細胞）であると予想された。一方、嫌気条件下で取得された CTAB 耐性株の CTAB 耐性は、好気条件での顕著な耐性化は確認されず、多剤耐性化も示さなかった。現在、各耐性株で確認された変異部位の機能と薬剤耐性化への関与について検証している。

antibacterial agents, registant mutant, persister cell

発表責任者：松村吉信（ymatsu@kansai-u.ac.jp）

発表番号：4F062
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Paenibacillus alvei* No. 14 株の有する光反応機構の解明
Analysis of light-response mechanisms in *Paenibacillus alvei* No. 14
○末崎 和弥[1]、吉原 周佑[2]、村上 周一郎[2] ([1]明治大院農・農化、[2]明治大農・農化)
○Kazuya SUEZAKI[1], Shusuke YOSHIHARA[2], Shuichiro MURAKAMI[2] ([1]School of Agriculture, Meiji Univ., [2]Fac. of Agriculture, Meiji Univ.)

【背景・目的】当研究室において、遮光条件下でのスクリーニング過程において、土壌団粒内部から分離された *Paenibacillus alvei* No. 14 株では、光によって増殖が抑制されることが見出されている。しかし、*Paenibacillus* 属における光による増殖抑制や光感受機構に関する報告はこれまでになく、他の細菌においてはトランスクリプトーム解析を中心とした遺伝子発現に関する報告が多い。そこで本研究では、プロテオーム解析により光照射条件下および遮光条件下で発現するタンパク質を比較することで、No. 14 株の光に対する反応機構をタンパク質レベルで解明することを目的とした。
【方法】No. 14 株の光感受性をより詳細に調べるために、本菌を 1/10 肉汁培地で遮光条件下、30℃、130 rpm で 2 日間培養し、得られた菌体を光照射条件下および遮光条件下に分けて同様に培養し、生育を観察した。また、遮光条件下で培養した後、光照射条件下で培養した時の増殖を観察した。
次に、光照射条件下で 4 時間および 13 時間培養した No. 14 株から調製したタンパク質を、二次元電気泳動により分離し、遮光条件下と比較して発現量が異なるタンパク質を MALDI-TOF-MS により同定した。
【結果】培養開始時より光照射をした場合、遮光条件下では指数増殖期や定常期が見られるのに対し、光照射条件下では培養初期から生育が抑制された。また、指数増殖中期において、本菌を遮光条件から光照射条件へ移した場合、増殖が抑制されることが確認された。以上の結果より、本菌の増殖は生育時期に関わらず光照射の影響を受けることが明らかとなった。また、*P. alvei* NBRC 3343$^T$ を用いて同様の実験を行った結果、No. 14 と同様の挙動を示したことから、光による増殖の抑制は *Paenibacillus alvei* において一般に見られる現象であることが示唆された。
プロテオーム解析を行った結果、光照射を 4 時間した菌体内では、superoxide dismutase、thioredoxin peroxidase の発現量が増加していた。一方、遮光条件下で 13 時間培養した菌体では、糖や鉄の輸送に関わるトランスポーターの基質結合ドメイン、pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A の発現量が低下しているのに対し、光照射条件下ではこれらのタンパク質の発現量が維持されていた。これらの結果から、本菌は光照射 4 時間以降では、抗酸化系タンパク質を用いて、光エネルギーによって生じた活性酸素種を除去しつつ代謝系を維持している可能性が示唆された。また、本菌の顕微鏡観察によって、光照射条件下でバイオフィルム形成が抑制される現象が見出された。本菌のバイオフィルム形成における光照射の影響について、現在解析中である。

*Paenibacillus alvei*, light response, proteome analysis

発表責任者：村上周一郎（smura@isc.meiji.ac.jp）

発表番号：4F063
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Shewanella oneidensis* MR-1 株における異化的代謝系の電極電位応答機構
Molecular mechanisms for electrode potential-dependent regulation of catabolic pathways in *Shewanella oneidensis* MR-1
○廣瀬 篤弥、高妻 篤史、渡邉 一哉 (東薬大生命)
○Atsumi HIROSE, Atsushi KOUZUMA, Kazuya WATANABE (Tokyo Univ. Pharm. Life Sci.)

【背景と目的】*Shewanella oneidensis* MR-1 株は多様な呼吸能を有する細菌で、電極への電子伝達が可能なことから bioelectrochemical systems (BES) における微生物・電極間相互作用を解明するためのモデルとして広く研究されている。BES における電流値は作用極の電位に依存することが知られており、これは電位が微生物に様々な影響を及ぼすためと考えられている。一方、微生物がどのように電極電位を認識するか、また代謝がそれに応答するかについては不明であった。最近我々は、MR-1 株の変異株を使った解析を行い、内膜キノンの酸化還元状態を認識する Arc 二成分制御系（ArcSA）が電極電位の認識に関与する可能性を示した。さらに、異なる電極電位で培養した野生株及び ArcS 破壊株のトランスクリプトーム解析を行い、Arc 二成分制御系が転写に影響を及ぼす代謝系遺伝子をリストアップした。しかし、その中には過去の研究で Arc 二成分制御系の制御下にあると考えられてこなかった遺伝子が多数あり、それらへの影響が直接的なものか疑問が持たれた。そこで本研究では、電流生産やエネルギー代謝に関与すると考えられる遺伝子を中心に、Arc 二成分制御系による制御機構及び電流生産への関与を調査した。
【方法と結果】今までの研究において、Arc 依存的に電位応答する遺伝子の多くが異化代謝に関連する遺伝子であることが示され、これらうちの幾つかは電流生産に関与すると予想された。本研究では、Arc によって直接的に制御される遺伝子を同定することを目的に、Arc 系の response regulator である ArcA と *sucA-D* (2-oxoglutarate dehydrogenase)、*nuoA-N* (NADH-ubiquinone oxidoreductase)、*atpA-I* (F0F1-ATP synthase) 、*fdnG-I* (nitrate-inducible formate dehydrogenase) の上流プロモーターを使用してゲルシフトアッセイを行った結果、*nuo* と *fdn* の上流プロモーター配列へのリン酸化された ArcA の結合が確認された。これらの遺伝子がコードする酵素は内膜キノンを直接還元すると考えられるので、MR-1 株においては電流生産に関与すると予測された。そこで、Nuo と Fdn のサブユニットをコードする *nuoF*、*fdnG* の遺伝子破壊株を作製して電流量を測定した結果、BES における電流値は WT よりも低くなった。また、低電位においては MR-1 株が持つ 3 つの formate dehydrogenase のうちの 2 つ（Fdn と Fdh-2）の発現量が低下したことから、低電位においてはギ酸の代謝が低下することが予想された。培地中の乳酸とギ酸の濃度を調べた結果、高電位においてはギ酸の蓄積は見られず、一方低電位では蓄積が見られた。よってギ酸の代謝も電流生産に関与するものと予測される。以上の結果から、Arc 二成分制御系が内膜キノンの酸化還元状態に応じて *nuo* や *fdn* 等の異化的代謝系遺伝子の発現を制御し、電流量を調節するという電極電位応答機構が示唆された。

*Shewanella oneidensis* MR-1, bioelectrochemical system, two-component regulatory system

発表責任者：廣瀬篤弥（s116188@toyaku.ac.jp）

発表番号：4F064
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 のエタノール発酵における生理的役割

# The physiological role in the ethanol fermentation of ubiquitin ligase Rsp5

○北 侑子、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Yuko Kita, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi (Naist)

【背景・目的】酵母 HECT 型ユビキチンリガーゼである Rsp5 は、哺乳類 Nedd4 のオルソログとして知られており、様々な基質タンパク質のユビキチン化を介してタンパク質の分解や活性調節などを司っている。現在までに、我々は Rsp5 が細胞膜上の主要なアミノ酸パーミアーゼである Gap1 のエンドサイトーシスの制御や、ストレスにより傷害を受けたタンパク質の分解調節において中心的な役割を果たしていることを明らかにしてきたが、これらのメカニズムの意義について十分には理解されていない。そこで本研究では、*RSP5* 遺伝子の変異株を用いた発酵試験やメタボローム解析を通して、特に細胞内代謝における Rsp5 の生理的役割について、より直接的に解明することを目的とする。
【方法・結果】まず、Rsp5 の触媒活性に欠損を有する L733S 変異株（高温感受性）および基質認識に欠損を有する A401E 変異株を用いて、20%グルコース含有 YPD 培地における発酵試験を実施した。その結果、興味深いことに、両者共に Rsp5 の機能欠損株であるにも関わらず、野生型株よりも L733S 変異株は非制限温度下において高い発酵速度を、A401E 変異株は低い発酵速度をそれぞれ示した。このことから、エタノール発酵調節における Rsp5 機能の多面性が明らかになった。各変異株において Rsp5 の標的となる代謝経路の手がかりを得るために、発酵中のサンプルを用いて CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施した。その結果、L733S 変異株では、エタノール発酵の促進に直接関連する代謝産物への影響は見出されなかったが、抗酸化物質として知られるグルタチオン合成の顕著な促進が認められたことから、発酵環境中に生じる酸化ストレスがグルタチオン合成関連酵素のユビキチン化と分解を介してエタノール発酵を阻害するという新規なメカニズムの存在が示唆された。 一方、A401E 変異株では、アミノ酸パーミアーゼ Gap1 のエンドサイトーシスの欠損に対応して細胞内アミノ酸含量の上昇が認められたことに加え、解糖系の最終産物であるピルビン酸が蓄積されていたことから、ピルビン酸からエタノールへの変換に必要なアルデヒド／アルコールデヒドロゲナーゼの活性低下が推察された。したがって、401 番目のアラニン残基を介した何らかの基質との相互作用が効率的なエタノール発酵に必須なのではないかと考えられる。さらに、A401E 変異株はエタノール耐性も低下したことから、Rsp5 の改変によりエタノール生産速度とエタノール耐性の両方を向上できる可能性がある。現在、 401 番目のアラニン残基を他のアミノ酸に置換した Rsp5 変異体の発現プラスミドや、同残基を含む「WW ドメイン」にランダム変異を導入したプラスミドライブラリーを用いて、発酵生産性を向上させる高機能型 Rsp5 変異体の取得を試みている。

ubiquitin ligase Rsp5, ethanol fermentation, stress response

発表番号：4F065
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ロドコッカス属細菌の凝集形態は Nonribosomal peptide synthetase によって制御される
# A nonribosomal peptide synthetase regulates bacterial aggregation in *Rhodococcus* sp. SD-74

○茂木 亮介[1]、長田 啓司[1]、菊子 拓真[1]、稲葉 知大[2]、尾花 望[3]、豊福 雅典[3]、野村 暢彦[3]([1]筑波大院・生命環境、[2]産総研・環境管理、[3]筑波大・生命環境系)
○Ryosuke MOGI[1], Keiji NAGATA[1], Takuma KIKUKO[1], Tomohiro INABA[2], Nozomu OBANA[3], Masanori TOYOFUKU[3], Nobuhiko NOMURA[3] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, University pf Tsukuba, [2]Environmental Management Research Institute, Advanced Industrial Sciences and Technology, [3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba)

多くの微生物は集団を形成して存在することが知られており、凝集体はその形態の一つである。凝集体は微生物が自己凝集することで形成される構造体であり、液体中を浮遊した状態で存在する。有用物質生産や病原性などへの関与が知られる放線菌の多くは液体培地中で凝集体を形成することが知られており、凝集体が放線菌の普遍的な存在形態であることが示唆されている。しかし、その詳細な形成メカニズムや制御はほとんど解析されていない。

*Rhodococcus* sp. SD-74 は当研究室によって単離された、多機能な糖脂質を生産する放線菌群の細菌である。SD-74 株は液体培地中で粒径が数 mm にも及ぶ大きく強固な凝集体を形成する。この顕著な凝集性を有する SD-74 株をモデルとして、凝集体形成メカニズムの解析を行った。

共焦点顕微鏡を用いた凝集体形成過程の観察によって、微小な凝集体を形成した後に、それらが集合することで発達した凝集体を形成することが明らかになった。また、SD-74 株の発達した凝集体を更に培養すると、ほとんどの凝集体が崩壊し培養液の白濁が観察された。したがって、SD-74 株は細胞密度に依存して凝集しているわけではなく、能動的に凝集形態を制御し、秩序だった凝集体ライフサイクルを有していると考えられた。そこで、トランスポゾンを用いたランダムな遺伝子破壊により、SD-74 株の凝集体形成及び崩壊に関与する遺伝子を探索した。Nonribosomal peptide synthetase (NRPS) をコードする遺伝子がトランスポゾンにより破壊された株では、凝集体の成熟を経た後も崩壊が観察されなかった。加えて、この遺伝子のインフレーム破壊株においても凝集体の崩壊が観察されなかった。したがって、SD-74 株の凝集体の崩壊には本 NRPS 遺伝子が必須であることが示された。NRPS はペプチド (NRP) の合成に関与することが知られていることから、本 NRPS によって産生された NRP が細胞外に分泌され、凝集体の崩壊を誘導していると考えられた。凝集体崩壊後の培養上清は野生株の凝集度を低下させたが、NRPS 破壊株の培養上清は野生株の凝集度に影響を与えなかった。よって、本 NRPS が産生する NRP が凝集体崩壊因子であることが示唆された。本研究は、放線菌における普遍的な集団形態が、ロドコッカス属細菌においては二次代謝産物によって制御されるという興味深い知見を初めて報告するものである。

*Rhodococcus*, Nonribosomal peptide, Bacterial aggregation

発表番号：4F066
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質(AstaP) ホモログの機能解析
# Characterization of microalgal water-soluble astaxanthin binding protein (AstaP) homologs found in bacteria

○加藤 聖子、荒木 花梨、岡田 和隆、新村 洋一、川崎 信治（東農大 バイオ）
○ SHOKO KATO, KARIN ARAKI, KAZUTAKA OKADA, YOICHI NIIMURA, SHINJI KAWASAKI (TUA Bio)

【目的】光合成生物は、強光が付随する環境ストレス下では活性酸素の生成を伴う光酸化ストレスを発生し、枯死に至る。我々は一般の光合成生物の生育が困難と思われる真夏のアスファルトから、高い環境ストレス耐性能を有する真核微細藻類（Ki-4 株）を単離した。Ki-4 株は強光が付随する乾燥や高塩分などの環境ストレス付与時に、真核の植物界で新規の発見となる脂溶性カロテノイド（アスタキサンチン）を結合する水溶性タンパク質（AstaP）を大量に発現する。AstaP はアスタキサンチンを主要なカロテノイドとして結合し、水溶液中で高い一重項酸素消去活性を示す [1)]。タンパク質の一次構造を解析した結果、N 末端部分に細胞外輸送シグナルを有し、かつ脊椎動物で細胞間接着因子として同定されている Fasciclin ドメインを保持していた。AstaP の他生物における分布は不明である。そこで本学会では、AstaP の生物分布を調査した結果と、主に原核生物に分布する AstaP ホモログについて解析を行ったので報告する。

【方法・結果】AstaP と高い相同性を示すホモログはすべてファシクリンファミリータンパク質群に属しており、真核藻類のみならず、海洋生物やバクテリアを中心として幅広く分布していた。それら生物はすべて色を持つことが特徴として挙げられたことから、AstaP ホモログはカロテノイド代謝に関与することが推定されたが、それらは全て機能未知タンパク質であった。そこで AstaP ホモログの分布が確認されたバクテリアから数種を選択し、その機能解明を目的としてリコンビナントタンパク質の精製を行った。また原核生物のラン藻 *Synechocystis sp.* PCC6803 における AstaP ホモログは機能未知の光応答遺伝子としてすでに同定されていたことから、PCC6803 株と共に他のバクテリアがコードする AstaP ホモログ遺伝子の各種環境ストレス付与時の遺伝子発現解析を行った。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).

photooxidative stress, astaxanthin, microalgae

発表番号：4F067
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 真核微細藻類で同定された水溶性アスタキサンチン結合タンパク質(AstaP)ホモログの微細藻類における分布

# Distribution of water-soluble astaxanthin binding protein (AstaP) homologs in microalgae

○宮田 彩実、淺野 朋美、望月 晧平、宮崎 貴章、新村 洋一、川崎 信治（東農大バイオ）
○Ami MIYATA, Tomomi ASANO, Kohei MOCHIDUKI, Takaaki MIYAZAKI, Yoichi NIIMURA, Shinji KAWASAKI (TUA-Bio)

【目的】光合成生物は、強光、高温、高塩濃度などの様々な環境ストレスが存在する過酷な環境下では、光酸化ストレスが発生するため、生育が困難である。当研究グループでは、光合成生物の生存が困難な過酷な環境（直射日光下の真夏のアスファルト、砂浜、砂漠土壌など）から光独立栄養的に増殖する微細藻類を探索し、現在までに70株ほどの微細藻類を単離・保有している。これらの微細藻類は、単離源の特徴からも高い環境ストレス耐性能を有することが期待された。真夏のアスファルトから単離した真核の微細藻類であるKi-4株は、強光が付随する環境ストレス存在下において、高い抗酸化力を持つカロテノイド（アスタキサンチン）を可溶化する水溶性タンパク質（AstaP）を発現した。AstaPの機能はアスタキサンチンの優れた抗酸化能力を水溶液中で発揮するための機能性蛋白質であることが推定された[1)]。AstaPのアミノ酸一次構造をデータベース解析に供したところ、真核藻類のみならず海洋性バクテリアなどを中心としてAstaPホモログの分布が検出されたが、全て機能未知のFasciclinファミリータンパク質であった。本学会では、真核藻類におけるAstaPホモログの分布調査とその機能解析の結果について報告する。

【方法・結果】系統解析から、Ki-4 株は *Scenedesmus costatus*、*Scenedesmus vacuolatus* と近縁であることが判明した。これら近縁種や当研究グループにて過酷な生育環境から単離した真核の微細藻類を供試菌として用い、AstaP 類似タンパク質の探索と分布調査を行った。ストレス付与実験の結果、複数の株において可溶化されたカロテノイドが検出されたが、Ki-4 株のように大量に発現するものは観察されなかった。*Scenedesmus costatus* では AstaP に類似の N 末端アミノ酸配列を持つタンパク質の同定に成功し、cDNA の取得に成功した。得られた一次構造から AstaP のオルソログであることが判明した。現在はその精製を試みると同時に、他供試菌における分布も調査している。

1) Kawasaki et al. Plant Cell Physiology,54(7) 1027-1040(2013).

microalgae, astaxanthin, photooxidative stress

発表番号：4F068
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# D-malic acid Chemoreceptors in *Ralstonia solanacearum* and Their Ligands Specificity

○MATTANA TUNCHAI, Akiko HIDA, Shota OKU, Takahisa TAJIMA, Yutaka NAKASHIMADA, Junichi KATO (Hiroshima Univ., Grad. Sch. Adv. Sci. Matt.)

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solonacearum* is a disease widely distributed in many economically important crops such as tomato, potato, tobacco etc. Previous studies found that chemotaxis is an important trait for the early stage of host invasion, virulence and pathogenic fitness in this pathogen. Due to this fact, our laboratory attempt to functionally annotate and characterize chemoreceptors in this pathogen. Despite D-malic acid is unnatural occurred form and cannot support growth of the pathogen, highly positive chemotaxis toward D-malic acid was detected in *R. solanacearum*, while four well-known *Pseudomonas spp.* showed no response to it. Since chemotaxis toward D-malic acid is unique and never been descripted, in this study we attempted to identify and characterize D-malic acid chemoreceptors in bacterial wilt pathogen. Among 22 methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs) *R. solanacearum* possesses, Mcp3 and McpM were identified as chemotactic sensors for D-malic acid. Besides Mcp3 was the sole receptor distinguishing taxis toward L-tartaric acid, which has similar chemical structure and three-dimensional orientation with D-malic acid. This finding likely suggested that Mcp3 may be L-tartaric acid chemoreceptor which can sense D-malic acid. In addition, ligand specificities of both MCPs were investigated. McpM previously identified as L-malic acid chemoreceptor, was able to bind broader ligands than Mcp3.

chemotaxis, *Ralstonia solanacearum*, Bacterial wilt disease

発表責任者：Prof. Junichi KATO（jun@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4F070
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 長鎖 AHL に応答する *Chromobacterium violaceum* のクオラムセンシング機構の解析

# How does *Chromobacterium violaceum* respond to signaling compounds?

○島村 裕子[1]、豊福 雅典[1]、諸星 知広[2]、池田 宰[2]、野村 暢彦[1]（[1]筑波大・院生命環境、[2]宇都宮大・院工）
○Hiroko SHIMAMURA[1], Masanori TOYOFUKU[1], Tomohiro MOROHOSHI[2], Tsukasa IKEDA[2], Nobuhiko NOMURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]Utsunomiya Univ.)

多くの細菌は集団中においてシグナル物質を言葉として細胞外に生産し、周囲の細菌が特異的なレセプターを介してシグナル物質を受け取ることによりコミュニケーションをとる。細胞間コミュニケーションの一種であるクオラムセンシングは、細菌がシグナル物質を生産、感知、応答し遺伝子発現を一斉に変化させるシステムである。クオラムセンシングは様々な遺伝子を制御し、細菌の毒素生産や医療現場等で問題となるバイオフィルム形成にも関与する。クオラムセンシングを行う上で重要であるのが、シグナル物質を感知することである。グラム陰性細菌の最もよく知られているシグナル物質として、アシル化ホモセリンラクトン(AHL)がある。AHL はラクトン環と様々な炭素数の側鎖から構成される。短鎖 AHL は細胞内に自由に拡散し、レセプターと結合し受け取られることがわかっている。一方、長鎖 AHL は疎水性が高く細胞内に入りにくいと考えられ、どのように細菌が長鎖 AHL を感知しているのかほとんどわかっていない。グラム陰性細菌である *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 株は長鎖 AHL に応答するが、解明されているレセプターは細胞内のレセプターCviR のみである。そこで、本研究では ATCC 12472 株がどのような機構で長鎖 AHL に応答するのか解析を行うことを目的とした。その結果、新たに 2 つのセンサーキナーゼが AHL 応答に関与することを示し、前大会ではそれが CviR を介してクオラムセンシングを制御する可能性までを報告した。本研究では 2 つのセンサーキナーゼと二成分制御系の推定のペアであると考えられるレスポンスレギュレーターについて解析した。一方のレスポンスレギュレーターの破壊株では応答性がセンサーキナーゼと同様に低下し、もう一方のレスポンスレギュレーターの破壊株では応答性が増加し、低濃度の AHL 条件下においても AHL を感知した。これらの結果より、2 つの推定の二成分制御系が AHL 応答そしてクオラムセンシングの制御に関与していることが示唆された。*C. violaceum* はこれらの 2 つの二成分制御系を用いて環境中の何らかの因子を感知し、複雑にクオラムセンシングを制御することにより環境適応していると考えられる。

quorum sensing, acyl-homoserine lactone

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：4F071
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Clostridium perfringens* の毒素産生を制御するクオラムクエンチング機構の解明
Quorum quenching of toxin production in *Clostridium perfringens*

○安達 桂香[1]、大谷 郁[2]、河野 道生[1]、ラビンドラパル シン[1]、園元 謙二[1]、中山 二郎[1] ([1]九大院農、[2]ミヤリサン製薬)
○ Keika ADACHI[1], Kaori OHTANI[2], Michio KAWANO[1], Singh RAVINDRA PAL[1], Kenji SONOMOTO[1], Jiro NAKAYAMA[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Miyarisan pharmacy)

〔背景〕微生物は、同種間でクオラムセンシング（QS）と称される菌密度依存的コミュニケーションをして、生物発光、バイオフィルム形成、毒素生産など、特定の遺伝子の発現調節を行なっている。例えば、ウエルシュ菌 *Clostridium perfringens* の毒素生産も VirR/VirS 二成分制御系による QS により制御されており、自身が産生する自己誘導ペプチド（AIP）に反応して毒素遺伝子 *pfoA* を発現誘導する。しかし、*C. perfringens* は *pfoA* 発現を自ら下方制御する内在性クオラムクエンチング（QQ）機構も有しており、*pfoA* の発現を一過的なものにしている。本研究では、*C. perfringens* の QQ の分子機構解明を目指し、QQ 活性測定方法の構築、QQ 誘導期の調査、培養液からの QQ 誘導物質の精製および諸性質の解明を試みた。
〔方法・結果〕*C. perfringens* strain 13 の定常期培養液上清を、対数増殖期初期の菌体に添加し、37℃で 15 分間インキュベーションすることで、*pfoA* の mRNA が消滅することがノーザン解析より確認された。このことから、*C. perfringens* は培地中に QQ を誘導する物質を分泌することで QQ を自己誘導していることが判明した。また、15 分という培養時間より短い時間で *pfoA* の mRNA が消失したことから、*C. perfringens* の QQ 誘導物質には *pfoA* の mRNA 分解を促進する働きがある可能性が示唆された。この *pfoA* の下方制御は逆転写定量 PCR によっても確認された。
QQ 誘導物質の産生期を調べたところ、対数増殖期初期の QS 誘導期の後の対数増殖期中期以降から QQ 誘導物質の産生が行なわれていることが示された。次に、QQ 誘導物質の諸性質を調べた。QQ 誘導物質はタンパク質分解酵素トリプシンおよびα-キモトリプシンに対して耐性があり、限外ろ過実験の結果から分子質量は 10 kDa 以下であることが判明した。さらに 121℃で 15 分間加圧滅菌しても失活しなかった。最後に、QQ 誘導物質の精製を試みた。*C. perfringens* strain 13 の定常期培養液上清を活性炭カラムクロマトグラフィー、逆相 ODS カートリッジカラム、陰イオン逆相 ODS カートリッジカラムを用いて部分精製した。精製における溶出挙動より、QQ 誘導物質は疎水性が低い酸性の化合物である可能性が考えられた。現在、QQ 誘導物質の化学的実体解明のため、QQ 誘導物質のさらなる精製を進めている。

quorun sensing, quorun quenching, *clostridium perfringens*

発表責任者：中山二郎（nakayama@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：4F072
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Lactobacillus plantarum* 4 株のストレス耐性に及ぼす培地の影響

Influence of culture medium on stress tolerances of four strains of *Lactobacillus plantarum*.

○矢島 冬紗子[1]、杉本 咲[2]、水上 優里奈[2]、佐々木 泰子[2]([1]株式会社ピックルスコーポレーション、[2]明治大学)

○Fusako YAJIMA[1], Saki SUGIMOTO[2], Yurina MIZUKAMI[2], Yasuko SASAKI[2] ([1]PICKLES CORPORATION, [2]Meiji Univ.)

【背景と目的】プロバイオティクスの条件の一つとして胃液・胆汁酸などに耐性を持ち、腸内に達することが挙げられている。高い胃酸耐性能をもつとして漬物から単離された*Lactobacillus plantarum* PIC-NBN22 (Pne-12) は胃酸暴露実験において、白菜を主要成分とした白菜培地とMRS培地間で生残率に差が認められた。そこでストレス耐性への白菜培地の寄与とそのメカニズム解明を目的として、他の*Lb. plantarum*の株を含めて、様々なストレスについて検討を行った。

【実験方法】使用菌株：*Lb. plantarum* PIC-NBN22 (Pne-12) 、*Lb. plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1057, JCM 1149, JCM 1551;　使用培地：白菜培地（すりおろした白菜、1%酵母エキス、1%Glucose、0.2%大豆ペプチド）、MRS培地 (Difcco)

[A.酸耐性実験]（１）対数増殖期：OD=0.5の菌体培養液を人工胃液(pH 2.5)に1%添加、90分までの生残率測定。（２）定常期：o/n培養した菌体培養液を人工胃液(pH 2.0)に1%添加、90分までの生残率を測定。[B.胆汁酸耐性実験] OD=0.5の菌体培養液をコール酸(0～10 mM)含有MRS培地に1%添加、3時間後の生残率を測定。[C.膵液耐性実験]パンクレアチン (1 g/l) にOD=0.5の菌体培養液を15%添加、4時間後の生残率を測定。　[D.過酸化水素耐性]過酸化水素(0～5 ppm)を含む1/2 MRS培地にOD=0.5の培養液を1%添加、3時間後の生残率を測定。[E.酸素耐性] OD=0.5の菌体培養液を振とう培養3時間後に生残率測定

【結果】*Lb. plantarum* 4株の人工胃液中の生残率は、定常期では培地または菌株による大きな差は認められなかった。一方、対数増殖期ではPne-12を含めて3株の生残率がMRS培地に比べ白菜培地において10～100倍高かった。コール酸処理においても同様に白菜培地による耐性の増加が認められた。しかし膵液・過酸化水素・酸素耐性では、培地による生残率の差は見られなかった。上記の実験結果では、白菜培地からの菌の単離が困難なために同培地が1%混入することによる影響を除外できない。そこで現在、別府フラスコを用いて培地の混入による影響を除く検討を行っている。さらに、二つの人工胃液とコール酸に対する生残率増加が白菜培地の何に起因するかについて、低栄養条件の可能性も含めて検討中である。さらに上記菌株中の3株のゲノム解析を行っている。

今後、白菜成分を有する培地で生育させ、高い胃酸耐性、胆汁酸耐性を示す *Lb. plantarum* を用いた新規プロバイオティクス食品の開発を目指す。

*Lactobacillus plantarum*, acid stress, bile acid stress

発表責任者：矢島 冬紗子（kenkyu@pickles.co.jp）

発表番号：4F073
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 放線菌 *Streptomyces griseus* 自己調節因子受容体 ArpA と A-factor の共結晶化条件スクリーニング
# Screening of crystallization conditions for A-factor-ArpA complex from *Streptomyces griseus*

○和田 英嗣[1]、稲葉 龍生[2]、加藤 雄己[1]、夏目 亮[1,2] ([1]東電大・院・工、[2]東電大・工)
○Eiji Wada[1], Ryusei Inaba[2], Yuki Kato[1], Ryo Natsume[1,2] ([1]Grad. Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ., [2]Sch. of Eng., Tokyo Denki Univ.)

【背景及び目的】

放線菌 *Streptomyces griseus* は、自己調節因子 A-factor の生産を引き金に、二次代謝と形態分化を同時期に開始する特徴を有している。A-factor 制御系の鍵因子は、A-factor の特異的受容体で ArpA と呼ばれる DNA 結合タンパク質である。A-factor 非存在時の ArpA は、グローバルな転写活性化因子 AdpA の発現を抑制する転写因子として機能する。A-factor が生産され ArpA に結合すると、ArpA は DNA との結合能を失い DNA から解離する。その結果、*adp*A 遺伝子が発現し、二次代謝と形態分化が開始されることが明らかになっている。我々の目的は、放線菌における自己調節因子とその受容体を介した転写制御の分子メカニズム／構造機能相関を原子レベルで明らかにすることである。ArpA の相同タンパク質である *S. coelicolor* A3(2)の CprB についてこれまでに行われた研究から、自己調節因子受容体の全体構造や DNA との相互作用様式については明らかにされてきた。しかし、自己調節因子と結合した受容体の構造解析例が存在しておらず、受容体による自己調節因子の認識機構については不明である。本研究では、ArpA に A-factor が結合した複合体の構造を決定することで、自己調節因子とその受容体の間に高い特異性が生み出される仕組みを解明することを目指している。

【方法および結果】

N 末端 His-tag 融合型全長 ArpA(His-ArpA)と C 末端 His-tag 融合型全長 ArpA(ArpA-His)を大腸菌内で可溶性タンパク質として高発現させた。His-ArpA と ArpA-His のどちらについても、Ni-アフィニティークロマトグラフィー精製、イオン交換クロマトグラフィー精製、ゲルろ過クロマトグラフィー精製を進めて、一度の精製で 1 mg 以上の高純度な組換えタンパク質を得られるようになった。精製試料を用いて EMSA 法による生化学的機能解析を行った結果、His-ArpA は DNA と結合する“活性”を示さなかった一方で、ArpA-His は DNA や A-factor と結合する“活性”を示した。現在、ArpA-His と A-factor の共結晶化条件をスクリーニングしている。

現時点で最も懸念しているのは、全長 ArpA の C 末端領域は側鎖の小さいアミノ酸残基が多いためにこの領域の構造が分子ごとに異なるのではないかと考えられることである。ArpA の C 末端領域を欠失させることで良質の結晶が得られるようになる可能性を考慮し、C 末端のアミノ酸残基を欠失させた C 末欠損型 ArpA-His シリーズの発現、精製、結晶化にも取り組んでいる。

ArpA, A-factor, crystallization

発表責任者：夏目　亮（natsume@mail.dendai.ac.jp）

発表番号：4F074
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母のプロリン合成系酵素 Pro1 はリボソームの選択的なオートファジーに関与する
# The proline biosynthetic enzyme Pro1 of yeast is involved in selective ribosome autophagy

○立橋 祐樹、渡辺 大輔、高木 博史（奈良先端大）
○Yuki TATEHASHI, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi (Nara Inst. of Sci. and Tec.)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるプロリン合成は、グルタミン酸から 3 段階の酵素反応によって行われる。まず、Pro1 がグルタミン酸のγ-カルボキシル基をリン酸化し、γ-グルタミルリン酸（γ-GP）を生成する。次に、このγ-GP は Pro2 によりグルタミン酸-γ-セミアルデヒド（GSA）へと変換され、さらに GSA から非酵素的に生成する$\Delta^1$-ピロリン-5-カルボン酸が、Pro3 によりプロリンへと変換される。これらの中で、Pro1 はその活性が最終産物であるプロリンによるフィードバック阻害を受けることで細胞内のプロリン合成を調節する重要な酵素（γ-グルタミルキナーゼ）である。

当研究室では以前に、*PRO1* 遺伝子の破壊によって高温や酸化などの様々なストレスに対する感受性が上昇することを見出した。しかし、プロリン合成の同一経路上にある *PRO2* 遺伝子の破壊株は野生型株と同程度のストレス感受性を示すことから、Pro1 はプロリン合成以外の機能を介してストレス耐性に寄与する可能性が示唆された。そこで、Pro1 の新規な機能を推定する目的で、Pro1 との物理的な相互作用が知られている 17 種類のタンパク質をコードする遺伝子と *PRO1* 遺伝子の二重破壊株をそれぞれ作製したところ、*BRE5* および *UBP3* の 2 遺伝子の破壊が *PRO1* 遺伝子の破壊との組合せにより顕著な増殖遅延を示した。Bre5 と Ubp3 は複合体を形成することで脱ユビキチン化酵素として機能し、その活性に依存して窒素飢餓時におけるリボソームの選択的オートファジー（リボファジー）を促進させる。そこで、Pro1 がリボファジーに与える影響を Rpl25-GFP 融合タンパク質を用いて調べた結果、*PRO1* 破壊株では *UBP3* 破壊株よりもリボファジーが抑制されていた。一方、GFP-Atg8 を用いて非選択的なオートファジーを観察したところ、*PRO1* 破壊株においてもオートファジーが誘導されていることが示された。このことから、Pro1 はリボファジー特異的に関わっていることが判明した。また、リボファジーを欠損する *UBP3* 破壊株は窒素飢餓に高い感受性を示すことが報告されているが、*PRO1* 破壊株は *UBP3* 破壊株よりも窒素飢餓に対する感受性が上昇していた。この結果は、*PRO1* 破壊株は *UBP3* 破壊株よりもリボファジーが強く抑制されているためであると考えられ、窒素飢餓に適応するためにリボソームの分解が重要であることを示唆している。

以上のことから、Pro1 はプロリン合成における酵素活性とは独立して、新規なストレス耐性機構に関与すること、およびリボファジーに必要であることが明らかとなった。これらの結果から、窒素飢餓以外のストレスにおいても、Pro1 に依存したリボファジーによるリボソームの分解がストレス耐性獲得に重要な役割を果たしているのではないかと推察される。

proline biosyntesis enzyme, autophagy, ribosome

発表番号：4F075
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 細胞極性制御因子・Mor2 とスピンドルチェックポイントとの機能的関連性の解析

# Study on functional relationship between cell polarity factor・Mor2 and spindle assembly checkpoint

○西川 健二[1]、金子 さゆり[2]、水沼 正樹[2]、平田 大[2,3]、久米 一規[2] ([1]広島大・工、[2]広島大・院先端研、[3]朝日酒造)
○Kenji NISHIKAWA[1], Sayuri KANEKO[2], Masaki MIZUNUMA[2], Dai HIRATA[2,3], Kazunori KUME[2] ([1]Hiroshima Univ. Engineering, [2]Hiroshima Univ., [3]Asahi-Shuzo Sake Brewing Co.,Ltd.)

【目的】細胞極性は、細胞形態を確立・維持するために必須である。細胞極性の破綻は、細胞形態異常を示し、さらに細胞機能障害を伴う細胞増殖異常を示す。しかしながら、細胞極性と細胞増殖との関連性については不明な点が多い。我々は、細胞増殖と連動する細胞極性制御機構を明らかにするために、細胞増殖に伴い細胞極性が制御される単細胞真核生物・分裂酵母を用いて研究を行っている。これまでに、高温で増殖停止し、かつ細胞極性異常を示す変異体の解析から、細胞形態形成ネットワーク（ＭＯＲ経路：Ｍｏｒｐｈｏｇｅｎｅｓｉｓ　Ｏｒｂ６　ｎｅｔｗｏｒｋ）を同定した。ＭＯＲ経路は、進化上保存されたＰｍｏ２５、Ｍｏｒ２、２つのキナーゼ（Ｎａｋ１、Ｏｒｂ６）により構成され、極性成長に重要なアクチンの局在を制御する。また、興味深いことに、*ｍｏｒ２*変異体を微小管重合阻害剤（ＴＢＺ）で処理することにより、染色体分配異常を示す細胞が増加し、生存率が顕著に低下した。つまり、Ｍｏｒ２が染色体分配に必要である可能性が示唆された。そこで、本研究では、染色体分配における細胞極性制御因子・Ｍｏｒ２の新規機能を明らかにするために、以下の２つについて解析を行った。
（１）Ｍｏｒ２とスピンドルチェックポイント経路（ＳＡＣ）との機能的関連性
（２）*ｍｏｒ２*変異体のＴＢＺ感受性抑圧変異体（*ｓｕｐ*）とＳＡＣとの機能的関連性
【方法・結果】
（１）*ｍｏｒ２*変異体とＳＡＣの機能的関連性を検証するために、ＳＡＣ構成因子の遺伝子欠損株と*ｍｏｒ２*変異体の二重変異体を構築し、生育への影響を調べた。その結果、複数のＳＡＣ構成因子の欠損により、*ｍｏｒ２*変異体の生育が悪化した。つまり、*ｍｏｒ２*変異体の生育にはＳＡＣが必要であることが示唆された。現在、*ｍｏｒ２*変異により、ＳＡＣの活性化が誘導されるかについて調べている。
（２）これまでに当研究室で取得した、*ｓｕｐ*変異体（*ｍｏｒ２*変異体が示すＴＢＺ感受性を抑圧する変異体）が示すＴＢＺ耐性が、ＳＡＣに依存するかを調べるために、*ｓｕｐ*変異体とＳＡＣ構成因子の遺伝子欠損株との二重変異体を構築し、ＴＢＺ存在下での生育を調べた。その結果、ＳＡＣ構成因子の欠損により、*ｓｕｐ*変異体がＴＢＺに感受性を示した。現在、*ｓｕｐ*変異の原因遺伝子のクローニングを行っている。

Fission yeast, Cell polarity, Spindle assembly checkpoint

発表番号：4F076
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アミノ酸排出輸送体 YtfF の基質排出メカニズムに関する研究

# Studies on the transport mechanism of the amino acid exporter YtfF in *Escherichia coli*

○勝部 哲、金 世怜、齊藤 康平、安藤 太助、磯貝 恵美子、米山 裕 (東北大学)
○Satoshi KATSUBE, Seryoung KIM, Kohei SAITO, Tasuke ANDO, Emiko ISOGAI, Hiroshi YONEYAMA (Tohoku Univ.)

【目的】

我々はこれまで大腸菌の L-アラニン(L-Ala)排出輸送体をコードする 4 つの遺伝子(*yddG*, *yeaS*, *ytfF*, *ygaW*)を同定してきた。この内、*yddG*, *yeaS* はすでに輸送基質が同定されている既知輸送体であった。一方で、*ygaW* 及び *ytfF* は機能未知遺伝子であったが、その後当研究室の堀らによって YgaW は主要な L-Ala 排出輸送体(AlaE と命名)であることが明らかとなった。しかし、YtfF の主要な輸送基質が L-Ala であるのか、または別の代謝産物であるかは未だ不明であった。そこで、本研究において *in vivo* および *in vitro* 評価系を構築し YtfF の基質となりうる物質の探索を行ったところ、YtfF はβ-アラニン(β-Ala)を基質とすることが示唆された。本研究では YtfF のさらなる生理的な機能を明らかとするために、反転膜小胞を用いた *in vitro* 評価系による YtfF のβ-Ala 輸送活性の詳細を解析することにした。

【方法】

YtfF の排出活性を測定するために反転膜小胞を利用した *in vitro* 評価系を用い、小胞内への[$^3$H]β-Ala の蓄積実験を行った。down hill 条件下において、小胞外のβ-Ala 濃度を 0.5 ～ 4.0 mM に設定し[$^3$H]β-Ala の小胞内への蓄積量を測定した。次に、YtfF が基質の濃度勾配に逆らった輸送を行うことができる能動輸送体であることを検証するために、反転膜小胞内にβ-Ala(10 mM)をローディングした評価系を用い、β-Ala の輸送活性を測定した。また、YtfF のエネルギー依存性を調べるために、阻害剤として CCCP 及び DCCD を用いた輸送阻害実験を行った。

【結果】

小胞外のβ-Ala 濃度を 0.5 ～ 4.0 mM の濃度に設定した down hill 条件下において、2.5 mM NADH をエネルギー源として添加したときにβ-Ala 濃度に依存した反転膜小胞内への[$^3$H]β-Ala 蓄積が見られた。また、β-Ala をローディングした反転膜小胞を用いた場合においてもβ-Ala の濃度勾配に逆らったエネルギー依存的な[$^3$H]β-Ala の輸送が認められ、YtfF はβ-Ala を基質とする能動輸送体であることが明らかとなった。さらに、プロトノフォアである CCCP (5 μM)を添加した場合、YtfF によるβ-Ala の反転膜小胞内への取り込みが有意に阻害された。一方で、ATPase 阻害剤である DCCD (50 μM)を添加した場合にはβ-Ala 輸送の阻害は見られなかったことから、YtfF はプロトン駆動力を利用する能動輸送体であることが強く示唆された。

*E.coli*, ß-alanine, exporter

発表番号：4F077
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌 *A. oryzae* の新規宿主を用いたハイドロフォービン遺伝子群の機能解析

Functional analysis of hydrophobins utilizing novel host strains in *Aspergillus oryzae*.

○朽方 康裕、中野 宏軌、菊池 遥香、辻 華奈、利根川 唯、森谷 翔太、中島 春紫（明治大・農・農化）
○Yasuhiro KUCHIKATA, Hiroki NAKANO, Haruka KIKUCHI, Kana TSUJI, Yui TONEGAWA, Shota MORIYA, Harushi NAKAJIMA (Meiji univ.)

【背景と目的】

麹菌 *Aspergillus oryzae* は高いタンパク質生産能を有する日本の代表的な醸造微生物である。現在国内で遺伝子工学研究に幅広く用いられている宿主菌株の多くは、紫外線照射等の突然変異誘発処理を繰り返して育種されているため、分生子形成能の低下など非意図的な表現型の変化が認められている。筆者らはゲノム解析が行われた標準的な野生株 RIB40 株から、突然変異誘発処理を行わずに選択マーカーを導入し、宿主 HiMe10 株（*⊿ligD, ⊿pyrG*）を構築している。HiMe10 株は分生子形成能およびコロニー形態が野生型 RIB40 株とほぼ同一の表現型を示した。

ハイドロフォービンとはカビやキノコの細胞表層に局在する両親媒性の低分子量タンパク質である。単量体の形で分泌され、分生子や気中菌糸の表層で重合体を形成することで構造の維持に関与すると考えられている。従来型宿主を用いた以前の研究では、ハイドロフォービン遺伝子の破壊による分生子形成能等の表現型の変化を検出できなかった。本研究では、新たに構築した HiMe10 株を用い、改めてハイドロフォービン遺伝子の機能解析を行った。

【結果】

HiMe10 株に対し、相同組換えによってハイドロフォービン遺伝子群（*hypA~D*）のそれぞれについて破壊株を作製した。

従来型の宿主と比較して HiMe10 株の分生子形成能は約 3 倍であった。さらに、*hypA* 破壊株は宿主 HiMe10 株と比べて分生子の形成数が約 40%低下していることが観察され、*hypA* 遺伝子破壊の影響を検出することができた。

タンパク質生産用宿主として使用するため、*amyR*（アミラーゼ系転写因子），*tppA*（トリペプチジルペプチダーゼ），*pepE*（酸性プロテアーゼ）を破壊した HiMe20 株を作製した。さらに、セルラーゼ等の外来酵素タンパク質および修飾したハイドロフォービンの生産性について検討を行っている。

Hydrophobin, *Aspergillus oryzae*, host strains

発表番号：4F078
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アグロバクテリウムを用いた担子菌スエヒロタケの形質転換

# Transformation of basidiomycete *Schizophyllum commune* mediated by *Agrobacterium tumefacience*

○吉田 佳奈子[1]、鷲見 あずさ[1]、山口 美咲[1]、野澤 貴洋[1]、下坂 誠[2]、千 菊夫[1]([1]信州大・農・応生科、[2]信州大・繊維・応生科)
○Kanako YOSHIDA[1], Azusa SUMI[1], Misaki YAMAGUCHI[1], Takahiro NOZAWA[1], Makoto SHIMOSAKA[2], Kikuo SEN[1] ([1]Dept.Biosc.Biotech., Shinshu Univ., [2]Dept.Appl.Biol., Shinshu Univ.)

【目的】 従来，担子菌の形質転換法としてプロトプラスト - ポリエチレングリコール（PFG）法が用いられてきた．しかし，担子菌においてはプロトプラスト調製の操作が煩雑で容易でなく，細胞壁の再生率も低いため，形質転換効率が非常に低いのが実情である．そこで菌類では，プロトプラスト - PEG 法に代わる形質転換法として実験操作が簡便であるといわれる ATMT（*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation）法が導入されつつある．担子菌類においてもこの方法による形質転換がいくつかの菌種で報告されているが，種々の担子菌で有効かどうかは不明である．

本研究の目的は，モデル担子菌スエヒロタケ（*Schizophyllum commune*）における有効な外来遺伝子導入法として ATMT 法を検討し，その形質転換条件を決定することである．

【方法】 *Schizophyllum commune* 野生型株 T11，*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株/バイナリーベクターpFungiwayEH-2DsRed（真核生物でのマーカー：ハイグロマイシン B 耐性，DsRed 発光）を実験に供した．ATMT 法の実験操作手順は以下の通りである．
1)前培養：アグロバクテリウムを 40 μg/mL クロラムフェニコール含有 MM 液体培地で，スエヒロタケを CYMTU 平板培地で，それぞれ前培養した．2)誘導培養：前培養終了後のアグロバクテリウムとスエヒロタケを集菌し，濃度を調整してから，200 μM アセトシリンゴン含有 IM 液体培地で，それぞれ誘導培養した．3)共培養：200 μM アセトシリンゴン含有 IM 平板培地にセロハン膜を貼り付け，アグロバクテリウムとスエヒロタケの培養液を 200 μL ずつ塗布し，20℃，96 時間共培養した．4)選択培養：セロハン膜ごと 200 μg/mL セフォタキシム，25 μg/mL ハイグロマイシン B 含有 CYMTU 培地に移し，25℃，2～3 週間選択培養した．5)蛍光顕微鏡観察：抗生物質含有培地で選抜した形質転換体コロニーの菌糸細胞内における蛍光レポーター*DsRed*遺伝子の発現を蛍光顕微鏡で観察した．

【結果】 誘導培養時のスエヒロタケ菌糸濃度とアグロバクテリウム細胞濁度に着目し，条件検討をした．スエヒロタケ菌糸濃度を 2～8 mg/mL に，アグロバクテリウム細胞濁度を $OD_{600}$ 0.03～0.06 に調整して実験を進めたところ，ハイグロマイシン B 耐性形質転換体コロニーを得ることに成功した．形質転換体細胞内に DsRed の蛍光発色を確認できたため，目的の DNA 断片が導入され，蛍光レポーター遺伝子が発現していると判断した．

*Schizophyllum commune*, transformation, *Agrobacterium tumefacience*

発表責任者：千　菊夫（kik1000@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4F079
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 好熱性アーキア Sulfolobus acidocaldarius の制限酵素 SuaI 遺伝子欠損株の構築と直鎖状 DNA を用いた相同組換え効率の評価

# Construction of the restriction endonuclease SuaI deficient strain and homologous recombination efficiency using linear DNA of the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus acidocaldarius

○鈴木 匠爾、黒沢 則夫（創価大）
○shoji suzuki, norio kurosawa (souka Univ.)

【背景と目的】好熱性アーキア *S. acidocaldarius* は独自の *Sua*I 制限修飾系を持っていることが知られている。そのため、*S. acidocaldarius* における形質転換実験では、細胞内に導入する DNA の *Sua*I 部位をあらかじめメチル化する必要があった。このメチル化操作が、*S. acidocaldarius* を宿主とする遺伝子操作を行う上での障害となるため、改善すべき一つの課題であると考えられた。本研究では、*S. acidocaldarius* における遺伝子操作をより簡便に行うために、制限酵素遺伝子 *suaI* 破壊株を作製することを目的とした。さらにその破壊株を用いて、直鎖状 DNA により相同組換えが起こる際の、相同領域の長さと組換え効率との関係ついて評価を行った。

【材料と方法】*S. acidocaldarius* のピリミジン要求性変異株 MR31（⊿*pyrE*）を親株として、MID strategy（marker insertion and unmarked target gene deletion strategy）により *suaI* 破壊株 SK-1 を構築した。SK-1 株において *Sua*I の活性が失われていることを確認するために、無細胞抽出液による基質 DNA の分解実験と、*Sua*I 部位をメチル化していないプラスミドベクターpSAV2 による形質転換実験を行った。直鎖状 DNA による相同組換え効率の評価においては、まず PyrE および β-Galactosidase 遺伝子からなるマーカーカセット（*pyrE-lacS*）を作製し、SK-1 株へ導入した。マーカーカセットの上流と下流には、10～800 bp の様々な長さの相同領域を連結した。これらの直鎖状 DNA を SK-1 株にエレクトロポレーションで導入し、ピリミジンを含まないプレートに植菌後、75℃で 6-7 日間培養した。コロニーの形成が確認出来たプレートに X-gal（10 mg/mL）を噴霧した後、75℃で一晩培養した。青いコロニーの数から形質転換効率を算出した。

【結果と考察】*S. acidocaldarius* の *suaI* 破壊株 SK-1（⊿ *pyrE,* ⊿ *suaI*）を構築した。SK-1 株は、ピリミジンが無い培地中では全く生育せず、ピリミジンを添加した培地中では、野生株や親株の MR31 と同様に生育した。また、無細胞抽出液による基質 DNA の分解実験を行った結果、MR31 株では制限酵素 *Sua*I による基質の切断が確認されたが、*suaI* 破壊株 SK-1 ではその活性は確認されなかった。さらに、SK-1 株はメチル化されていないプラスミドベクターpSAV2 の導入により容易に形質転換したが、MR31 株では形質転換体は得られなかった。SK-1 株を利用することにより、導入前の外来 DNA のメチル化が不要になり、*S. acidocaldarius* の形質転換実験をより簡便に行う事が可能となった。直鎖状 DNA を用いた相同組換え実験の結果、少なくとも 50 bp の相同領域が必要である事がわかった。

Sulfolobus acidocaldarius, suaI deletion mutant, homologous recombination

発表責任者：鈴木　匠爾（s.suzukie@gmail.com）

発表番号：4F080
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ビフィズス菌プロモーターの機能解析
Analysis of the promoter of *Bifidobacterium*
○小酒井 智也、野村 泉、鈴木 徹 (岐阜大・応生)
○Tomoya KOZAKAI, Izumi NOMURA, Tohru Suzuki (Gifu Univ.)

【目的】近年，様々なビフィズス菌の全ゲノム配列がわかってきている。しかし，ゲノム上の配列がもつ機能についてはわからないことが多い。ゲノムの中でも，遺伝子の上流に存在するプロモーターは，mRNA への転写の中心的な役割を担っている。プロモーター配列の中でも特に重要な-10 領域と-35 領域については，ビフィズス菌においてはほとんど解明されていない。そこで，*Bifidobacterium longum* 内で種々の遺伝子をコードする領域の上流に存在するプロモーター領域を用い，ビフィズス菌におけるプロモーターの機能解析および機能の向上を行った。
【方法・結果】プロモーター活性を測定するためのプラスミドを構築した。活性の測定には，*Staphylococcus aureus* 由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)を用いた。この手法は，DTNB が TNB に変化した際の蛍光強度の変化から活性の強さを算出するものである。ベクターとしては pKO403 を用い，プロモーター，CAT 遺伝子，*hup* ターミネーターを Golden-Gate 法により組み込むことで，目的のプラスミドを得た。他の *Bifidobacterium* 属のプロモーターとの相同性から-10 領域と-35 領域を予測し，それを元にクローニング領域を変えた十数種のプロモーターを組み込んだプラスミドを構築した。クローニングの際は，予測された-35 領域から 10 塩基ずつ区切るようにしてクローニングを行った。構築したプラスミドは *Bifidobacterium longum* 105-A 株にエレクトロポレーション法により導入した。今後，これらの形質転換体を用いて CAT アッセイを行い，プロモーターの機能部位を特定していく予定である。
また，各種プロモーターから-10 領域および-35 領域のコンセンサス配列を推測し，プロモーターを改変することで機能を向上させることも検討している。

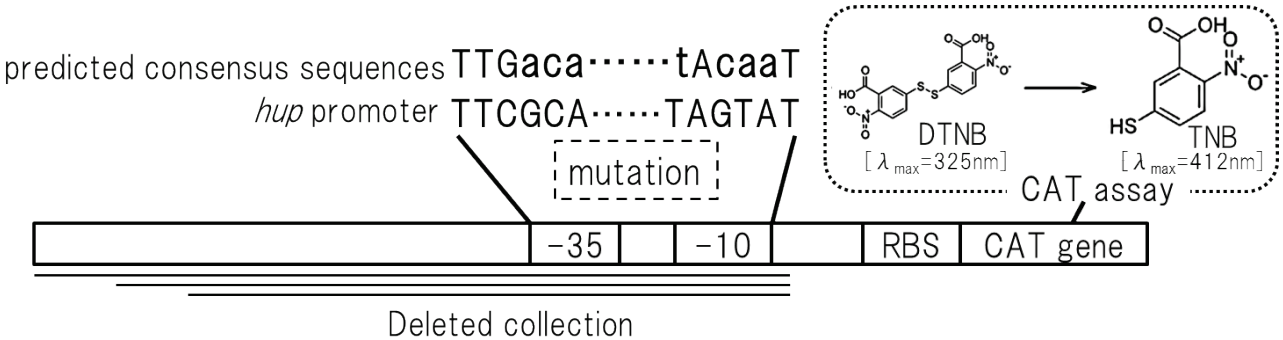


図 1 実験の概要

*Bifidobacterium*, promoter

発表番号：4F081
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Corynebacterium glutamicum* におけるメカノセンシティブチャネル欠損による抗生物質の感受性の変化

# The alternation of the sensitivity to antibiotics by mechanosensitive channels deletion in *Corynebacterium glutamicum*

○野畑 和宏、鬼熊 友美、鄭 芳珍、山崎 早苗、橋本 賢一、川崎 寿 (東京電機大学)
○Kazuhiro Nobata, Tomomi Onikuma, Fangzhen Zheng, Sanae Yamazaki, Kenichi Hashimoto, Hisashi Kawasaki (Tokyo Denki Univ.)

*Corynebacterium glutamcum* は工業的なグルタミン酸生産菌である。この微生物は十分な生育条件では細胞外にグルタミン酸を蓄積することは無いが、生育必須因子であるビオチンの制限、界面活性剤である Tween 40 の添加、抗生物質であるペニシリンの添加などにより生育が阻害され、細胞外に著量のグルタミン酸を蓄積する。細胞内で合成されたグルタミン酸は *NCgl1221* 遺伝子産物を介して細胞外へ排出されることが明らかとなった。*NCgl1221* 遺伝子産物はメカノセンシティブチャネルと相同性がある。メカノセンシティブチャネルは細胞が低浸透圧ストレスにさらされた際、膨圧の上昇に伴う細胞膜張力により開孔し、細胞内の低分子化合物を細胞外に排出することにより膨圧を制御する安全バルブとしての働きをするとされている。

この微生物におけるメカノセンシティブチャネルの欠損株は低浸透圧耐性に明確な差が確認できないこと(Nottebrock *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.*, 2003)などから、*C. glutamicum* におけるメカノセンシティブチャネルは低浸透圧ストレスに対する安全バルブとしての働き以外にも機能があるのではないかと考えた。

2014 年、*Escherichia coli* においてストレプトマイシンによる生育抑制はメカノセンシティブチャネルの一種である MscL の発現に依存することが報告された(Iscla *et al.*, *Nat Commun.*, 2014)。この報告はメカノセンシティブチャネルは物質排出担体としてだけではなく物質取り込み担体としても機能する可能性を示唆した。我々は *C. glutamicum* のメカノセンシティブチャネル欠損株において野生株と比較し、ストレプトマイシンの感受性が低下することを明らかにした。

また、*C. glutamicum* におけるメカノセンシティブチャネル欠損株は野生株と比較し、ストレプトマイシン以外にもカナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールでも感受性が低くなったが、ペニシリンに対する感受性は変化がなかった。

これは細胞内に作用点があるストレプトマイシン、カナマイシン、エリスロマイシン、クロラムフェニコールに対してメカノセンシティブチャネルは細胞内への侵入に関与するが、作用点が細胞表層にあるペニシリンは、メカノセンシティブチャネルの有無により生育抑制に影響を受けないことが予想された。

*Corynebacterium glutamicum*, mechanosensitive channel, antibiotics

発表番号：4F082
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 株内セルフクローニング法による *PDE2* 遺伝子を高発現する冷凍耐性パン酵母の構築

# Construction of freeze tolerant baker's yeast strains overexpressing *PDE2* by an intra-strain self-cloning procedure

○望月 千里、荻原 宏幸、中川 洋史、山村 英樹、早川 正幸（山梨大院・医工総・生命）
○ Chisato MOCHIZUKI, Hiroyuki OGIHARA, Youji NAKAGAWA, Hideki YAMAMURA, Masayuki HAYAKAWA (Dept. Biotechnol., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi)

【背景および目的】パン製造における冷凍生地製パン法は、消費者に焼き立てのパンを提供できる反面、パン生地の冷凍および解凍処理は発酵能力の低下や細胞死などのダメージを酵母に与えるため、冷凍耐性パン酵母のニーズが高まっている。また、消費者には食品微生物における遺伝子組換えに対する不信感や消極的姿勢が根強く存在することから、セルフクローニング法が注目されている。しかし、これまでに報告されているセルフクローニング法による実用酵母の育種においては、途中の段階でプラスミド DNA や変異処理を用いている。そこで、本研究ではプラスミド DNA や変異処理を一切使用しない新たなセルフクローニング法である“株内”セルフクローニング法を開発し、*PDE2* 遺伝子を高発現する冷凍耐性パン酵母を構築することを目的とした。

【実験方法および結果】まず、二倍体実用パン酵母株のセルフクローニング型 *URA3* 遺伝子破壊株を構築するために、外来のマーカー遺伝子を用いずに *URA3* を破壊することを試みた。*URA3* の上流域と下流域の DNA 断片を当該実用パン酵母株の染色体 DNA を鋳型とした PCR により増幅し、これらの断片を fusion PCR により連結することにより、*URA3* 破壊用 DNA 断片を作製した。本 DNA 断片を当該実用パン酵母株に導入し、5-FOA 含有平板培地にて生育したコロニーを取得することで、セルフクローニング型 *URA3* 破壊株の構築に成功した。続いて、本 *URA3* 破壊株を用いることで、多コピーで実験室酵母株に冷凍耐性を付与することが報告されている *PDE2* を高発現するセルフクローニング型実用パン酵母株を構築することを試みた。当該実用パン酵母株の染色体 DNA を鋳型とした PCR により *PDE2* の上流域、*URA3* 領域、構成的発現遺伝子である *TDH3* のプロモーター領域（*TDH3*p）、および *PDE2* の翻訳開始領域を増幅し、これらの断片を fusion PCR により連結することにより、*URA3*–*TDH3*p–*PDE2* 組み込み用 DNA 断片を作製した。本 DNA 断片を *URA3* 破壊株に導入し、ウラシル原栄養株を取得することで、*TDH3*p–*PDE2* が *PDE2* 遺伝子座にヘテロで組み込まれた *TDH3*p–*PDE2* ヘテロ株と、ホモで組み込まれた *TDH3*p–*PDE2* ホモ株の取得に成功した。これらの株は元の株と比べて *PDE2* mRNA の発現量が顕著に高く、冷凍ストレスに対して高い生存率を示し、さらに冷凍パン生地を用いた製パン試験において高い発酵力を示した。一方、*PDE2* の高発現が生育に与える影響を調べるために増殖曲線を作成した結果、*TDH3*p–*PDE2* ヘテロ株と *TDH3*p–*PDE2* ホモ株はともに、対数増殖期における比増殖速度は元の株よりもやや低いが、定常期における $OD_{600}$ 値は元の株と同程度であることが明らかになった。

baker's yeast, self-cloning procedure, freeze tolerance

発表責任者：中川洋史（youji@yamanashi.ac.jp）

発表番号：4F083
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イネいもち病菌突然変異体 Ina168m95-5 株における *AVR-Pik* の欠失機構

# Mechanism of *AVR-Pik* Deletion in *AVR-Pik* Spontaneous Mutant Ina168m95-5 of *Magnaporthe oryzae*

○富田 有貴[1]、船引 麻衣[1]、中馬 いづみ[2]、浅野 行蔵[1]、曾根 輝雄[1] ([1]北大農、[2]神戸大農)
○Yuki TOMITA[1], Mai FUNABIKI[1], Izumi CHUMA[2], Kozo ASANO[1], Teruo SONE[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Kobe Univ.)

**研究背景**）イネいもち病はイネの最重要病害であり，その原因菌は子のう菌の 1 種，イネいもち病菌（*Magnaporthe oryzae*）である．イネいもち病菌にAVR遺伝子が存在すると，それに対応するR遺伝子を持つイネには感染できない．現在，いもち病の防除は抵抗性品種が用いられているが，いもち病菌の AVR 遺伝子の変異によるイネの抵抗性の崩壊が問題となっている． AVR 遺伝子の突然変異機構を解明し，変異を抑制することで新しい防除法につながる可能性がある．本研究では，イネの R 遺伝子 *Pik* に対応するいもち病菌の AVR 遺伝子 *AVR-Pik* に着目しており，これまでに，圃場分離株である日本産イネいもち病菌 Ina168 株は1コピーの *AVR-Pik* を持つこと，また Ina168 株の *avr-pik* 自然突然変異株である Ina168m95-5 株は *AVR-Pik* を欠失していることを明らかにした．
**方法・結果**）当研究室が保有する Ina168 株のコスミドライブラリーから，*AVR-Pik* 周辺の 3 種類のコスミドクローンをスクリーニングし，PacBio を用いるなどしてそれらの配列解析を行い，約 45 kb の領域の塩基配列を決定した．それにより，*AVR-Pik* 近傍にはトランスポゾン *Pot2-like* やレトロトランスポゾン *MGR583*，*MINE*，*Pyret*，また各種レトロトランスポゾンの LTR 配列など，反復配列が多数存在することが明らかとなった．決定した Ina168 株の塩基配列情報を基に，PCR 解析やサザンハイブリダイゼーション，シーケンス解析を利用して Ina168m95-5 株の相同領域の構造を解析したところ，*AVR-Pik* を含む欠失領域と部分的に保存されている領域，両株に保存されている領域があり，*AVR-Pik* の欠失には *AVR-Pik* の 3´側に存在する同方向の2コピーの *Pot2-like* の一方に2重鎖切断が起こり，もう一方との間の相同組換え，次いで 2 つの *MGR583* 間での相同組換え，さらに別な遺伝子座に存在する *Pot2-like* との相同組換えと，複雑な再編成が関与していることが示唆された．

*Magnaporthe oryzae*, *AVR-Pik*, Deletion

発表番号：4F084
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Thermus thermophilus* HB27 株を用いた $t^6A$ 修飾関連遺伝子の機能解析

# Functional Analysis of $t^6A$ Modification with *Thermus thermophilus* HB27 strain

○川端 祐佳[1]、澤田 泰平[1]、北原 一正[1]、小野瀬 晃由[1]、星野 貴行[1]、吉澤 聡子[2]、朝原 治一[3]、中村 顕[1] ([1]筑波大院生命環境、[2]CNRS-I2BC、[3]NEB)
○Yuka KAWABATA[1], Taihei SAWADA[1], Kazumasa KITAHARA[1], Teruyoshi ONOSE[1], Takayuki HOSHINO[1], Satoko YOSHIZAWA[2], Haruichi ASAHARA[3], Akira NAKAMURA[1] ([1]Univ. of Tsukuba, [2]CNRS-I2BC, [3]NEB)

【目的】mRNA 上のコドンの読み取りを担う tRNA 中の塩基は、様々な修飾を受けている。$N^6$-threonylcarbamoyl adenosine（$t^6A$）という修飾塩基は、全てのドメインの生物が持つ、数少ない保存された修飾塩基の一つである。$t^6A$ 修飾は ANN コドンを解読する tRNA のアンチコドンに隣接する 37 位に存在し、アンチコドンループ構造の維持、コドン-アンチコドン相互作用の安定化、cognate コドン認識の増強を通じて、正確なコドン解読を補助し、翻訳の忠実度に寄与する。従って、$t^6A$ 修飾が無いと ANN コドンで frameshift 等の障害が生じ、翻訳過程に深刻な異常をきたすとされている。

近年の研究で $t^6A$ 修飾の合成酵素が同定され、大腸菌では TsaD（YgjD）、TsaB（YeaZ）、TsaE（YjeE）そして TsaC（YrdC）が関わることが示された。*tsaD* と *tsaC* は全ての生物で保存されており、かつ大腸菌、枯草菌、酵母といった代表的なモデル微生物で生育に必須であるとされてきた。また *tsaB* と *tsaE* は細菌でのみ保存されており、これらもまた代表的なモデル細菌で生育に必須であるとされてきた。ところが *Deinococcus radiodurans* R1 株の *tsaD* と *tsaB*、*Synechocystis* sp. PCC6803 株の *tsaD*、*Streptococcus mutans* の *tsaE* については、遺伝子破壊株の取得が報告されている。これらに加えて、本研究室で扱っている高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB27 株では、*tsaB*, *tsaC*, *tsaD*, *tsaE* の遺伝子破壊株の作製に成功した。これにより HB27 株では、*tsa* 遺伝子全てが生育に必須ではないことが明らかとなった。そこで本研究では、HB27 株の *tsa* 遺伝子破壊株を用いて、$t^6A$ 修飾とその関連遺伝子の機能についての知見を得ることを目的とする。

【方法と結果】各株の培養液より total tRNA を調製し、ヌクレオシド単位に酵素分解後、LC/MS 分析を行い、$t^6A$ 修飾の有無を検討したところ、全ての *tsa* 遺伝子破壊株が $t^6A$ 修飾合成能を失っていた。次に、HB27 株の至適生育条件下で各株の生育を比較したところ、全ての *tsa* 遺伝子破壊株は野生株と同様に良好な生育を示した。これらの結果から、HB27 株では $t^6A$ 修飾が生育に必須ではないということが明らかになった。また、野生株と *tsaD* 破壊株より調製した total tRNA を用いて、*T. thermophilus in vitro* タンパク質合成系で *gfp* mRNA の翻訳を行ったところ、どちらの tRNA を用いた場合も Gfp の翻訳効率は同程度であった。このことから、HB27 株では翻訳効率に $t^6A$ 修飾の有無はほとんど影響しないことが明らかになった。さらに *tsa* 遺伝子破壊株の各種ストレスへの感受性を野生株と比較したところ、一部の *tsa* 遺伝子破壊株は高温、高塩、高浸透圧、酸化ストレス、UV 照射に対して感受性を、また全ての *tsa* 遺伝子破壊株が mitomycin C 曝露に対して耐性を示した。この結果から、*tsa* 遺伝子(及び $t^6A$ 修飾)はストレス条件での生育に関与することが明らかになった。

tRNA modification, *Thermus thermophilus* HB27 strain, translation

発表番号：4F085
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Thermus thermophilus HB27 株における VapBC toxin-antitoxin システムの解析

# Analysis of a VapBC-type toxin-antitoxin module, TTC0125-TTC0126, in Thermus thermophilus HB27

○Fan Yuqi[1]、星野 貴行[2]、中村 顕[2] ([1]筑波大学生命環境科学研究科、[2]筑波大学生命環境系)
○Yuqi FAN[1], Takayuki HOSHINO[2], Akira NAKAMURA[2] ([1]Grad. Sch. Life. Environ. Sci. , Univ. of Tsukuba, [2]Fac. life. Environ. Sci ., Univ. of Tsukuba)

【目的】多くのバクテリアは多様な toxin-antitoxin (TA) system を保有している。その中でも特に VapC は、多くの生物でゲノム上に一番数が多く存在する toxin ファミリーとして近年注目されている。HB27 株ゲノム中には既知の VapC toxin と相同性を示す三つの遺伝子が見出されたが、これらの遺伝子の機能に関する報告はまだなされていない。そこで本研究では、これらの遺伝子の機能に関して解析を行った。

【方法及び結果】最初にこれらの遺伝子が toxin としての活性を有しているかどうかを検討するため、大腸菌に導入し発現誘導を行ったところ、TTC0125 遺伝子発現を誘導した場合にのみ大腸菌の生育抑制が認められ、またその抑制が antitoxin の TTC0126 を同時発現させることにより解除された。精製 TTC0125 及び TTC0126 を用いた RNase assay の結果から、TTC0125 は遊離の一本鎖 RNA に対する RNase 活性を有するが、tRNA およびリボソーム内の rRNA に作用しないことが明らかになった。また、PURExfrex を用いた大腸菌 *in vitro* translation に対する精製 TTC0125/TTC0126 の添加効果を検討したところ、TTC0125 は overall の翻訳を阻害し、同様の阻害が mRNA と pre-incubation した場合にも認められたが、リボソームと pre-incubation した場合には阻害が認められなかった。この翻訳阻害は TTC0125 と同時に TTC0126 を添加すると認められなかった。以上のことから TTC0125 は free-RNA に作用する RNase として機能し、*in vivo* では mRNA を分解することにより翻訳を阻害することが示唆された。また、TTC0125 の VapC 間で保存されているアミノ酸残基を Ala または Asp に置換したところ、一部の置換体で TTC0125 の活性が失われた。この結果より、これらのアミノ酸残基が活性に重要な機能をしていることが示された。

VapC toxin は、抗生物質やストレスの存在下で菌の増殖を阻害し、細胞を persistence の状態に導く役割をしていることが報告されている。そこで、様々なストレスや低濃度の抗生物質存在下での増殖や生存に TTC0125 破壊が与える影響を検討したところ、TTC0125 破壊株は Cm や高濃度の NaCl には感受性を示したが、逆に Km, Amp, menadione に対しては弱い耐性を示した。特に Km 処理後の生存率が大きく上昇していた。この結果は従来の説とは大きく異なるものであった。

通常 Toxin 遺伝子は、ペアとなる antitoxin 遺伝子とのみオペロンを形成しているが、TTC0125-TTC0126 はゲノム上 TTC0130-TTC0124 オペロンの中に含まれている点が特徴的である。周辺遺伝子は glyoxylate cycle 合成酵素と annotate されており、また glyoxylate cycle は様々な抗生物質に対する耐性に関与することが報告されている。そのため、これらの遺伝子と TTC0125-TTC0126 の機能の間に何らかの関連があることも考えられる。

toxin-antitoxin, VapBC, Thermus thermophilus

発表番号：4F087
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Characterization of lytic enzymes from thermophilic bacteriophage φOH2

○Mina Kim[1], Hindra MARTONO[1], Yuko NAGAYOSHI[1], Junpei MAEDA[1], Toshihisa OSHIMA[2], Yasuhiro FUJINO[1], Katsumi DOI[1] ([1]Kyushu Univ., [2]Osaka institute of technology Univ.)

Bacteriophages are regarded as the most diverse biological entity on the earth and still remained as untapped genetic resources. They have also been pursued as alternative antibacterial agents, as emergence of bacteria with multi-drug resistance become more prevalent.

Thermophilic phage, named φOH2, was isolated from Obama Hot Spring with *Thermus thermophilus* HB8 as indicator strain. From its genome analysis, we found that φOH2 consist of 38099 bp genome and 60 open reading frames (ORFs), including two particular genes coding endolysin and holin proteins that are involved in host cell lysis at terminal stage of phage lytic cycle. Accordingly, aim of this study is to clone the φOH2 endolysin (LysOH2) and holin (HolOH2) for further analysis of their functions and antibacterial activities.

First, LysOH2 gene was inserted into pET21a vector for recombinant protein expression using *E. coli* BL21. To characterize the activity of this enzyme, *Geobacillus kaustophilus* was used as a substrate, for measurement of turbidity ($OD_{450}$) after exogenous addition of LysOH2. The turbidity of substrate cell suspension began to decrease after addition of 100 ng/mL LysOH2. Lytic activity of purified LysOH2 was retained more than 90% of its activity 20 minutes after heat treatment in 85℃, and 40% residual activity was observed even after heat treatment in 100℃, showing the excellent thermostability of this enzyme. The enzyme showed highest activity in pH 7 and 70℃, and was stable in pH 5-10 buffers 3 hours after treatment. Antibacterial spectrum of LysOH2 was also evaluated and LysOH2 showed lytic activity both on gram-positive and gram-negative bacteria. These results suggested that φOH2 endolysin has potential as a stable therapeutic agent possessing broad-antibactieral spectrum.

Meanwhile, the recombinant plasmid, pET15b containing HolOH2 gene, was transformed into *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS and growth of transformants was monitored after induction with ITPG. It was showed that $OD_{600}$ value began to decrease 20 minutes after induction causing cell lysis. It is deduced that expression of HolOH2 leads to lesion formation, allowing release of T7 lysozyme which have been expressed from pLysS plasmid harboring host cell. Purification of HolOH2 for further investigation is currently in progress.

lytic enzymes, lysin, *Thermus thermophilus*

発表責任者：DOI Katsumi（doi@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：4F088
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 各種ガン細胞におけるファージ由来溶菌酵素 Holin の効果とアポトーシス誘導

# Apoptotic induction of cancer cells using holin, lytic enzyme from bacteriophage

○千羽 啓太、黒木 未知瑠、原田 額郎、片倉 喜範、土居 克実 (九大農)
○ KEITA CHIBA, MICHIRU KUROKI, GAKUROU HARADA, YOSHINORI KATAKURA, KATSUMI DOI (Kyushu Univ.)

【目的】近年、ガンの遺伝子治療に関する様々な研究が精力的に行われているが、未だ完全な治療法の確立には至っておらず、ガン細胞を安全かつ効果的に死滅される能力を有する新たな遺伝子または遺伝子産物が必要とされている。当研究室では、ガン遺伝子治療の新たなアプローチとして好熱性ファージΦOH2 由来の溶菌酵素 Holin(Hol)の応用を試みている。Hol は宿主細菌の細胞膜に重合後、穿孔することで溶菌をもたらすことが知られている。一方、動物細胞において Bax/Bak がミトコンドリア外膜を穿孔し、ミトコンドリア外膜透過性(MOMP)を亢進することでアポトーシスが誘導される。我々は一見異なる MOMP 亢進と溶菌の分子機構間に、細胞膜穿孔による細胞致死という類似性を見出した。そこで、ガン細胞内で Hol を発現させ、ミトコンドリアに局在させることで、MOMP 亢進によるアポトーシスが誘導されるか検討した。

【方法】はじめに、ΦOH2 ゲノムを鋳型に *hol* を PCR 増幅し、Doxycycine(Dox)による発現誘導可能な pRetroX-TetOne-Puro ベクターにクローニングした。さらに、Hol のミトコンドリア局在による細胞死の効果を検討するために、ミトコンドリア局在シグナル(MTS)を、また Hol 検出のために、FLAG tag を付加した *mts::hol* カセットも同様にクローニングした。次に、構築した 2 つのプラスミドを、レトロウイルスを用いてヒト肺胞基底上皮腺ガン細胞（A549）とヒト結腸ガン由来細胞（Caco-2）にインフェクションした。得られた形質導入細胞内での *hol* の転写は、qRT-PCR により確認した。次いで、Dox による Hol 発現誘導後の細胞生存率をセルカウントで求めた。また、Hol の発現と Caspase cascade の活性化は抗 FLAG, Caspase-3, 7, PARP 抗体を用いてウエスタンブロッティングにより検出した。さらに、蛍光顕微鏡を用いて、TUNEL 法によるクロマチン DNA の断片化と、免疫染色による MTS::Hol のミトコンドリア局在をそれぞれ確認した。

【結果・考察】形質導入 A549 では、Dox 濃度依存的に *hol* の転写量は増大し、また、Hol の発現も Dox 誘導 24 時間後以降に確認され、Hol、MTS::Hol 発現誘導 96 時間後の細胞生存率は共に 70%程度減少した。また、形質導入 Caco-2 では MTS::Hol 発現誘導 96 時間後の細胞生存率が 45%程度減少した。さらに、形質導入 A549 においては、MTS::Hol 発現細胞のみで、アポトーシスの特徴である Caspase-3, 7, PARP の活性化、クロマチン DNA の断片化が確認された。以上より、Hol は A549、Caco-2 の複数種のガン細胞に細胞致死をもたらし、また形質導入 A549 では、Hol をミトコンドリアに局在させることで、Bax/Bak と同様にアポトーシスが誘導されることが示唆された。

apoptosis, holin, cancer cell

発表番号：4F089
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 糸状菌 Trichoderma reesei におけるセロビオース応答性セルラーゼ転 写活性化因子の機能解析
# Analysis of cellobiose-responsive transcription activator for cellulase genes in filamentous fungus Trichoderma reesei

○高橋 圭太郎、会田 宏樹、平沢 大樹、塩屋 幸樹、志田 洋介、小笠原 渉（長岡技科大，生物）
○Keitaro TAKAHASHI, Hiroki AITA, Hiroki HIRASAWA, Kouki SHIOYA, Yousuke SHIDA, Wataru OGASAWARA (Nagaoka Univ. of Tech Dept. of Bioenging)

【目的】

セルロース分解性糸状菌は，セルロースに応答し，セルラーゼやヘミセルラーゼを誘導的に生産する．セルロースの分解産物であるセロビオースも多くの糸状菌ではセルラーゼ誘導能を持つが，*Trichoderma reesei*の世界的標準株 QM9414 株は, セロビオースのセルラーゼ誘導能は結晶セルロースに比べ極めて低い．そのため，セロビオースに応答したセルラーゼ誘導発現機構は *T. reesei* ではあまり明らかにされてこなかった．しかし，QM9414 株より作出されたセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 株ではセロビオースのセルラーゼ誘導能が向上していた. そのため, PC-3-7 株は *T. reesei* におけるセロビオース誘導性セルラーゼ発現機構を解明するために有用である．一方，*Aspergillus* 属では近年，セロビオースに応答してセルラーゼや他の加水分解酵素遺伝子発現を活性化する転写因子が報告されてきた． *T. reesei* もゲノム上にこのホモログを有していたため，本研究では *T. reesei* PC-3-7 株を親株としてそのホモログ遺伝子破壊株の解析を行うことで，*T. reesei* のセルロースやセロビオースに応答したセルラーゼ生産調節機構を解明することを目的とした.

【方法と結果】

ホモログ遺伝子破壊株は，ホモログのコード領域を選択マーカー*pyr4* で置換した破壊用 DNA 断片を *T. reesei* PC-3-7 *pyr4* -株にプロトプラスト-PEG 法を用いて導入することで作製した(PCΔ*tf1*)． PC-3-7 株と *tf1* 破壊株を種々の炭素源を含む培地で培養し，セルラーゼ生産性を測定した．その結果，*tf1* 破壊株はセルロース培養では PC-3-7 株と同等のセルラーゼ生産性であったが，セロビオース培養において菌体外セルラーゼ活性が PC-3-7 株に対して 35 %低下した. そこでセロビオース上における遺伝子発現挙動を調べたところ，PCΔ*tf1* 株では主要セルラーゼ遺伝子である *cbh1* の転写量が PC-3-7 株に対して 98 %減少しており，他の菌体外セルラーゼ遺伝子の転写量も著しく低下していた．他の二糖であるソホロース上でも同様の傾向がみられた．これらの結果より，TF1 は二糖に応答し, セルラーゼ遺伝子の発現を活性化することが示唆された. また, *tf1* 破壊株ではセルラーゼ発現の活性に関与する既知因子遺伝子 *xyr1* や *crt1* の転写量が PC-3-7 株に対して減少していたことから，TF1 はセルラーゼ遺伝子の誘導発現機構において Xyr1 や Crt1 より上流に位置していることが示唆された.

Trichoderma reesei, cellulase, filamentous fungus

発表責任者：高橋圭太郎（s143350@stn.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：4F090
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌のリンゴ酸酵素遺伝子 *ytsJ* および 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素遺伝子 *gndA* の調節因子の探索

# Regulatory factors for *ytsJ gndA* in *Bacillus subtilis*.

○夏目 文音、田中 耕生、竹中 慎治、吉田 健一 (神戸大院農学研究科)
○Ayane NATSUME, Kousei TANAKA, Shinji Takenaka, Ken-ichi Yoshida (Kobe Univ.)

【目的】 シロ-イノシトール (SI) は、アルツハイマー病の予防・治療薬として期待されている有用希少イノシトールである。我々は、イノシトール類の中で最も自然界に豊富に存在し比較的安価に供給されるミオ-イノシトール (MI)から二段階の反応を経て SI へ変換する細胞工場を開発した。この変換の効率化には、二段階目の反応に必要な NADPH の供給が鍵となることが示唆されている。枯草菌においてはトランスヒドロゲナーゼがないため、NADPH は $NADP^+$を直接還元して再生されると考えられ、そのために糖新生、ペントースリン酸経路、および TCA 回路等の中心代謝系に含まれる NADPH 再生反応の増強が必要であると推定される。特に、MI→SI への変換を活発に行っている条件では、リンゴ酸酵素遺伝子 *ytsJ*、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素遺伝子 *gndA* について、5 倍程度の転写誘導が観察された。従って、少なくともこれら 2 遺伝子が NADPH の還元再生に関与すると考えられたため、*ytsJ*、*gndA* 遺伝子の転写調節機構の解明を目的とした。
【方法】 *ytsJ* と *gndA* のプロモーター領域に結合する転写因子を、*in vitro* の DNA 結合によるプルダウンと質量分析を応用して探索した。同定した両プロモーター領域に結合する転写因子の遺伝子を大腸菌にクローン化精製して、実際に両遺伝子のプロモーター領域に結合することを EMSA で確認し、プロモーターの deletion 解析および DNase I footprint 法を用いて認識配列の同定を試みた。さらに、これらの転写因子をコードしている遺伝子を破壊し、*ytsJ* や *gndA* の転写レベルを調べるために、Northern 解析を行った。
【結果】 *ytsJ* と *gndA* のプロモーター領域に結合するタンパク質として、*comK* のリプレッサーとして知られる Rok が共通して見出された。まず、Rok の結合認識配列の同定を試みた。Rok の DNA 結合配列については推定コア配列が報告されているが、この配列は *ytsJ* や *gndA* のプロモーター領域に存在しない。そこで Rok が実際に両遺伝子のプロモーター領域に結合することを EMSA で確認した後、deletion 解析および DNase I footprint 法を用いて認識配列を同定することに成功した。しかし、*rok* の破壊が *ytsJ* および *gndA* の転写に与える影響を改めて詳細に調べたところ、両遺伝子は共に転写量を増加させる傾向を示すものの、その影響は極めて部分的であった。すなわち、*ytsJ* および *gndA* の転写制御においては、Rok 以外の別の転写調節因子が中心的な役割を果たす可能性が示唆された。現在、プルダウンと質量分析を再度行い、*ytsJ*、*gndA* のプロモーター領域に結合する Rok 以外の因子の候補、CodY、YcbG を同定し、これらをコードする遺伝子を破壊した時の転写効果を調べている。

Bacillus subtilis, inositol, NADPH

発表責任者：吉田健一（kenyoshi@kobe-u.ac.jp）

発表番号：4F091
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 標準 RNA を用いた抽出 RNA のクオリティーコントロール
# Quality control of extracted RNA using standard RNA

○長谷川 丈真[1]、高橋 淳子[2]、岩橋 均[1] ([1]岐阜大学、[2]産総研)
○Takema HASEGAWA[1], Junko TAKAHASI[2], Hitoshi IWAHASHI[1] ([1]Gifu Univ, [2]AIST)

【目的】細胞や菌などの生理学的挙動を観察するとき、DNA マイクロアレイや RNA seq など、RNA に着目した実験手法が広く用いられている。しかし、RNA は一般的に分解されやすいと言われていて、これらの実験手法による解析結果は様々なファクターによって左右される可能性が高い。そのため RNA を扱う実験を行うとき、RNA のクオリティーコントロールが必要となる。

RNA に着目した実験で結果に大きな影響を与えるファクターとして、RNA の抽出効率、RNA の分解、抽出 RNA 溶液によるポリメラーゼ等への酵素反応阻害の 3 つが考えられる。本研究は、この 3 つのファクターについて標準 RNA を用いて評価することにより、抽出された RNA のクオリティーコントロール法の確立を目的とする。本研究ではクオリティーコントロールの 3 つのファクターのうち、RNA の抽出効率と抽出 RNA 溶液によるポリメラーゼ等への酵素反応阻害の 2 つを、標準 RNA を用いて評価した。酵素反応阻害については、PCR 反応を指標とした。

【方法】標準 RNA は、産業総合研究所が核酸標準物質として開発した「定量解析用リボ核酸(RNA)水溶液」を用いた。この標準 RNA は 5 種類あり、濃度既知で、自然界に存在する生物のゲノムと相同性が低い配列に設計されている。酵母または大腸菌から、Hot Phenol 法で RNA を抽出した。抽出操作は、菌体破砕、クロロホルム精製、エタノール沈殿、の 3 つの工程がある。それぞれの工程で各種標準 RNA を添加し、リアルタイム PCR で残存量を測定することで、全体または各工程での RNA 回収率を求めた。また、この抽出 RNA 溶液に各工程で添加した量と同じ量の標準 RNA を添加して、リアルタイム PCR で RNA 量を測定した。抽出 RNA 溶液に標準 RNA を添加したものと添加してないものの RNA 量を比較することで、PCR 反応の阻害を評価した。

【結果・考察】酵母または大腸菌を Hot Phenol 法で RNA を抽出するとき、全体の RNA 抽出効率は約 50%であることが分かった。各工程での RNA 回収率を比較したとき、RNA はクロロホルム精製の工程で大きく失われていて、菌体破砕とエタノール沈殿の工程では RNA の損失は少なかった。また、大腸菌からの抽出 RNA 溶液では PCR 反応の阻害は少なかったが、酵母からの抽出 RNA 溶液では阻害が大きいことが分かった。本研究では抽出 RNA のクオリティーコントロールの 3 つのファクターのうち 2 つを、標準 RNA を用いて評価できることが分かった。現在、RNA の分解性についての評価法を検討している。

Quality control, standard RNA, RNA extraction

発表責任者：岩橋均（h1884@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4F092
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 恐怖記憶形成に対する断眠処置の影響

# Effect of sleep deprivation on fear memory

○堺 大樹[1]、喜田 聡[1,2] ([1]東農大・応生科・バイオ、[2]科学技術振興機構・CREST)
○Hiroki SAKAI[1], Satoshi KIDA[1,2] ([1]Dep. of Bioscience, Tokyo Univ. of Agriculture, [2]JST, CREST)

睡眠は記憶を強化することが知られているが、恐怖体験が強く記憶されると心的外傷後ストレス障害（PTSD）などの重篤な精神疾患を引き起こす。そのため、恐怖記憶制御における睡眠の役割の解明が期待されている。そこで、本発表では、マウスを用いた恐怖条件付け文脈学習課題により、恐怖条件付け（トレーニング）後の断眠処置が恐怖記憶に与える影響について解析した。トレーニングでは、マウスを電気ショックチャンバーに入れ、148 秒後に 0.4mA、2 秒間の電気ショックを与え、この 30 秒後に取り出した。断眠処置はトレーニングの直後から6時間行った。実験群としては、マウスを水面に設置した不安定な足場の上に乗せることにより、常に体のバランスを維持しなければならない状態にした群と、飼育ケージ内でマウスが3秒以上目を閉じた時にマウスの体に綿棒を接触させることで断眠させた群を用いた。またコントロール群は飼育ケージ内に入れたまま何の処置も施さなかった。そして、トレーニングから24時間後と30日後にマウスを再び電気ショックチャンバーに入れ、マウスが恐怖を感じた時に示す、すくみ反応（フリージング）を示した時間の割合を測定した（テスト）。その結果、不安定な足場を用いて断眠処置を行った群は、トレーニングから 24 時間後のテストにおいて、コントロール群よりもフリージングを示した時間の割合が低い傾向を示した。一方、綿棒による断眠処置を行った群は、トレーニングから 24 時間後のテストではコントロール群と同程度であった。しかし、興味深いことに、綿棒による断眠処置を行った群は、トレーニングから30日後の Test において、24 時間後のテストの時よりもフリージングを示した時間の割合が有意に高く、さらに、コントロール群よりも有意に高かった。以上の結果から、恐怖記憶形成直後の断眠により、恐怖記憶形成が阻害されること、および恐怖記憶の維持が強化される可能性が示された。

sleep deprivation, fear memory

発表番号：4F093
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

高速 DNA シークエンシングを用いた糸状菌転写制御ネットワークのゲノムワイド解析システム
Genome-wide analysis of fungal transcriptional regulation by using high-throughput DNA sequencing

○兒島 孝明[1]、國武 絵美[2]、井原 邦夫[3]、小林 哲夫[2]、中野 秀雄[1]([1]名大院・生命農・生命技術、[2]名大院・生命農・生物機構、[3]名大・遺伝子実験施設)
○Takaaki KOJIMA[1], Emi KUNITAKE[2], Kunio IHARA[3], Tetsuo KOBAYASHI[2], Hideo NAKANO[1] ([1]Dept. Bioeng., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [2]Dept. Biol. Mech. Funct., Grad. Sch. Bioagr. Sci., Nagoya Univ., [3]Centre for Gene Research, Nagoya Univ.)

【目的】転写因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合し、遺伝子の発現を制御するタンパク質群の総称である。本研究グループは、高速 DNA シークエンシング技術を駆使した 2 種類の転写因子制御部位の網羅的解析技術、Genomic SELEX-Seq(gSELEX-Seq)と RNA-Seq を融合させた転写制御ネットワークの新規網羅的開発システムを開発した。gSELEX-Seq はゲノムライブラリーから標的転写因子に対して結合性を有する領域を *in vitro* で濃縮選択した配列情報を、RNA-Seq は培養菌体より回収した mRNA ライブラリーから各遺伝子の発現量情報をそれぞれ出力する。本研究では、*Aspergillus nidulans* における糖代謝遺伝子群の転写活性化因子 AmyR の結合部位をゲノムワイドで解析し、AmyR による転写制御機構の解明を目的とした。
【方法・結果】平均長約 100 bp に剪断化された *A. nidulans* ゲノムライブラリーを調製し、このライブラリーに対して MalE－AmyR 融合タンパク質を加える。これにより、AmyR 結合部位を保持する DNA と MalE－AmyR との複合体が形成される。この複合体はアミロースレジンを用いて分離され、選択された DNA は PCR によって回収される。この操作を 3 ラウンド実施後、各選択ラウンド DNA プールをマイクロビーズ上に固定化し、MalE－AmyR 及び蛍光標識抗体を用いてフローサイトメトリーによる AmyR 結合能の評価を行ったところ、各選択ラウンドにおける結合シグナルの増加を確認した。そこで各選択プールの配列を高速 DNA シークエンサーによって解析し、得られた配列データを用いてバイオインフォマティクス解析を行ったところ、AmyR の既知の結合モチーフである $CGGN_8CGG$ が抽出された。また、AmyR 結合活性を示すプロモーター配列を保有する遺伝子が多数検出された。
次に、*A. nidulans* 野生株及び AmyR 欠損株をイソマルトース誘導／非誘導の条件下で培養を行い、RNA をそれぞれ抽出した後、Oligo-dT ビーズによって mRNA を回収し、mRNA ライブラリーを調製した。このライブラリーを高速 DNA シークエンサーによって解析し、得られた配列データをバイオインフォマティクス解析に供したところ、AmyR 依存的及びイソマルトース誘導依存的な発現変動遺伝子(DEGs)を検出した。これらの条件で重複して検出された 35 種類の DEGs を詳細に解析したところ、AmyR による発現制御を受けることが既知の 7 遺伝子を含む 20 種類の遺伝子は、gSELEX-Seq によって検出された AmyR 制御候補遺伝子群に含まれていた。このことから、gSELEX-Seq と RNA-Seq を組み合わせた本手法は、標的転写因子によって直接的に発現制御される遺伝子を高精度に検出できる強力な転写制御ネットワーク解析システムであることが示された。

Transcription factor, Aspergillus nidulans, High-throughput sequencing

発表責任者：兒島孝明（kojimat@nuagr1.agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4F094
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# プラスミドが宿主に与える影響の比較

# Comparisons of effects of harboring plasmids on the host strains.

○片岡 大亮[1]、鈴木 智大[2]、道羅 英夫[2]、金原 和秀[1]、新谷 政己[1] ([1]静大院、[2]静大，グリーン研)
○Taisuke KATAOKA[1], Tomohiro SUZUKI[2], Hideo DOURA[2], Kazuhide KIMBARA[1], Masaki SHINTANI[1] ([1]Glad. Sch. Shizuoka Univ., [2]Shizuoka Univ.RIGST)

【目的】プラスミドは種々の微生物間を接合伝達によって伝播可能な遺伝子の運び手であり，微生物の急速な進化・適応に寄与すると考えられている．プラスミドは，分子生物学の必須のツールとして用いられている一方，薬剤耐性遺伝子を伝播する媒体として問題視されている．宿主は，プラスミドを保持することで様々な影響を受けるが，それは必ずしも生存に有利な影響ばかりでなく，宿主にとって負荷となる影響を与えることもある．前年度本大会で，IncP-1 群に属するプラスミド pBP136 を，*Pseudomonas putida* mt-2 株の派生株，KT2440 株および PpY101 株に伝達して，それぞれの菌株が受ける影響を比較したところ，全く異なる現象を見出した[1)]．本研究では，プラスミドと宿主の関係を理解することを目的に，これら 2 株がプラスミドを持つ際に示す違いについて，より詳細に調べることとした．

【方法】KT2440 株と PpY101 株を宿主とした場合に，他のプラスミドを持つ場合の影響を調べるため，pBP136 の他に，IncP-7 群プラスミド pCAR1 および IncP-9 群プラスミド NAH7 の 3 種類を用いて実験を行った．プラスミドが宿主に与える影響を評価するために競合試験を行った．競合試験は，各々のプラスミド保持・非保持菌株を，それぞれ同量になるように混合・接種して，24 h ごとに新鮮な 3 mL の LB 液体培地に 3 回継代した．各継代の際に，選択マーカーを含まない 1/3 に希釈した LB 固体培地上で，プラスミド保持・非保持菌株のコロニー数を計測・比較した．また，これら 2 菌株のドラフトゲノム配列を，次世代シークエンサーにて解読し，ゲノム配列上で違いがあるかどうかを比較した．

【結果と考察】競合試験の結果，pBP136 と pCAR1 に関しては，PpY101 株を宿主とした場合に，プラスミド保持株が優占化したのに対し，KT2440 株を宿主とした場合には非保持株が優占化した．一方，NAH7 においては，KT2440 株・PpY101 株ともにプラスミド保持株・非保持株が拮抗する結果となった．本現象の理由を探るべく，2 つの菌株のゲノム配列を解読し，比較したところ，PpY101 株では，KT2440 株における外来遺伝子領域[2)]の一部が欠落しており，全体でゲノムサイズが約 340 kb 小さくなっていることが示唆された．

1) 片岡ら，日本農芸化学会 2015 年度大会
2) Wu *et al.,* 2011, FEMS Microbiol Rev 35: 299–323.

plasmid, host, fitness

発表責任者：新谷政己（shintani.masaki@shizuoka.ac.jp）

発表番号：4F095
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 新規共存プロテオーム解析法による病原性真菌 *Candida albicans* の免疫細胞マクロファージとの相互作用解析

# Description of the interaction between *Candida albicans* and macrophages by mixed and quantitative proteome analysis without isolation

北原 奈緒[1]、○青木 航[1,2]、森坂 裕信[1,2]、黒田 浩一[1]、植田 充美[1,2] ([1]京大農、[2]KISTIC)
Nao KITAHARA[1], ○Wataru AOKI[1,2], Hironobu MORISAKA[1,2], Kouichi KURODA[1], Mitsuyoshi UEDA[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]KISTIC)

【背景】

カンジダ症とは、常在性真菌 *Candida albicans* によって引き起こされる日和見感染症である。健常者においては、免疫細胞マクロファージが *C. albicans* の病原性を抑制しているが、高齢・AIDS などを契機として免疫力が低下すると、*C. albicans* は全身を侵襲する。カンジダ症に有効な診断薬や抗真菌薬は少なく、特に全身性カンジダ症の致死率は 50%以上にも達するため、病原性の解明および新規治療薬の開発が急務となっている。

本研究では、新規共存プロテオーム解析法を構築することにより、*C. albicans* のマクロファージ破壊機構の解明を試みた。既存プロテオーム解析では、共存する *C. albicans* とマクロファージの混合サンプルからそれぞれの細胞を単離する必要があった。これは、質量分析の前段階である試料分離における従来 LC カラムの分離能が低いためである。本研究は、我々の開発した高分離能ロングモノリスカラム（500 cm）を用い、共存する 2 つの細胞を分離せずに、プロテオームを一斉測定できる「共存プロテオーム解析」を行った。

【結果】

*C. albicans* のマクロファージ脱出時における、両細胞のタンパク質を網羅的に同定した。コントロールとしてそれぞれの単培養時のプロテオームと比較した。その結果、*C. albicans* とマクロファージそれぞれで発現しているタンパク質を網羅的に同時定量することに成功し、ここから *C. albicans* のマクロファージ破壊モデルを構築したのでまとめて報告する[1]。

[1] Kitahara *et al*., AMP Express, in press.

*Candida albicans*, Macrophage, Mixed proteome

発表責任者：植田充美（miueda@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F096
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

異化的ヒ酸還元細菌のヒ素ストレス応答の網羅的解析
Proteome analysis of global responses to arsenic stress by a dissimilatory arsenate-reducing bacterium

○土屋 達哉[1]、笠原 康裕[2]、天知 誠吾[1] ([1] 千葉大院園芸、[2] 北海道大低温科学研究所)
○Tatsuya Tsuchiya[1], Yasuhiro Kasahara[2], seigo Amachi[1] ([1]Grad. Sch. Horticul., Chiba Univ., [2]Inst. Low Temp. Sci., Hokkaido Univ.)

【背景と目的】
近年、微生物によるヒ酸[As(V)]から亜ヒ酸[As(III)]への還元反応が、帯水層などのヒ素汚染の原因であることが明らかになってきた。我々はヒ素汚染の原因菌の１つとして、国内水田土壌より異化的ヒ酸還元細菌 *Geobacter* sp. OR-1 の単離に成功している。このような細菌は、ヒ素ストレス下で特異な応答機構を発現すると予想されるが、網羅的な解析例はこれまでほとんどない。そこで本研究では、OR-1 株がヒ素存在下で発現するタンパク質を同定することを目的として、プロテオーム解析を行った。

【方法】
OR-1 株を酢酸を炭素源、ヒ酸またはフマル酸を最終電子受容体として嫌気的に生育させ、全タンパク質抽出を行った。タンパク質は 1D SDS-PAGE と LC-MS/MS を用いて同定した。ゲノムワイドで定量的な解析法を行うため、emPAI に基づいたラベルフリーな半定量的なプロテオーム解析アプローチを用いた。

【結果】
ヒ酸とフマル酸生育条件下において、それぞれ 985 個と 831 個のタンパク質が同定された。ヒ酸生育条件下では、フマル酸生育時と比較して、異化的ヒ酸還元酵素 ArrAB が高い発現量を示し、Arr の活性中心 molybdopterin の生合成系や亜ヒ酸排出に関わる ArsA の発現上昇も見られた。また、抗酸化酵素(peroxiredoxin, rubrerythrin, rubredoxin)、ストレス応答(UspA, Hsp90) 、folding 関連タンパク質(SurA)、分子シャペロン(ClpB, DnaJK, GrpE)、trigger factor などの発現上昇が確認された。さらに、mismatch repair 関連酵素、mRNA・tRNA 合成酵素、elongation factor の発現も上昇していた。ヒ酸生育時には、ヒ酸のアナログであるリン酸 transporter の発現上昇が見られ、硫黄代謝経路の活性化、特に thiol 基の再形成に関わる酵素が発現上昇していた。これは、亜ヒ酸と thiol 基の親和性が高いことに関連すると考えられた。エネルギー代謝に関して、NADH dehydrogenase や、$H^+$-ATPase の発現は低下した一方、酢酸の活性化経路、および還元的アセチル CoA 経路の活性化が見られた。以上の結果から、OR-1 株は高濃度のヒ素に曝露されることで、ヒ素代謝酵素群のみならず、抗酸化酵素、分子シャペロンなどを協調的に発現上昇させると共に、硫黄、エネルギー代謝系を活性化することで、ヒ素耐性を獲得することが示唆された。

arsenate redaction, proteome, *Geobacter*

発表番号：4F097
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Protein lysine acetylation profile of a plasmid-free and pCAR1-harbouring *Pseudomonas putida* KT2440

○Delyana VASILEVA[1], Chiho SUZUKI-MINAKUCHI[1], Saori KOSONO[1], Minoru YOSHIDA[2], Kazunori OKADA[1], Hideaki NOJIRI[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]RIKEN CSRS)

**[Background]** Understanding the modification landscape created by the functional interaction between a catabolic plasmid and a host system is a prerequisite for successful bioremediation. Previous studies in our lab demonstrated that the carbazole-degradative plasmid pCAR1 alters the primary metabolic capacity of three *Pseudomonas* hosts [1]. For instance, carriage of pCAR1 has led to reduced cell respiration, when intermediate compounds of the TCA cycle were used as sole carbon sources. Protein lysine acetylation is a post-translational modification dynamically regulated by the metabolic status of the cell and it affects diverse cellular functions. Identified acetylated proteins are associated with almost every aspect of cellular physiology. In particular most enzymes involved in the central metabolic pathways are acetylated. Therefore the aim of this work is to explore possible effects of pCAR1 carriage on the acetylome profile of the host.

**[Methods and Results]** Among the three hosts investigated, *P. putida* KT2440 was chosen as a model system for the acetylome studies, because carriage of pCAR1 in this strain resulted in the most pronounced physiological effect. To characterize the overall protein acetylation pattern and to detect any changes in the lysine acetylation abundance in KT2440 and pCAR1-harbouring KT2440 (KTPC) strains, a quantitative mass spectrometry (MS) approach based on stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) was employed. In order to facilitate SILAC labeling, lysine auxotrophic strains were constructed. To achieve that *lysA1* and *lysA2*, both coding for diaminopimelate decarboxylase, an enzyme which catalyzes the last step in the biosynthesis of L-lysine, were inactivated by homologous recombination. The inability of the resulting double mutant strains to grow in minimal medium without L-lysine was confirmed. Furthermore, 50 µg/ml L-lysine was able to restore the growth of the mutant strains to the wild-type levels. For SILAC labeling, KT2440*ΔlysA1ΔlysA2* and KTPC*ΔlysA1ΔlysA2* strains were grown in minimal medium supplemented with 0.1% succinate as sole carbon source and with 50 µg/ml of lysine (SILAC "light") or $^{13}C_6$-lysine (SILAC "heavy"), respectively. Samples for acetylome analysis were taken from exponential phase and stationary phase cells. The workflow for proteomics of lysine acetylation consists of the following steps: (i) equal amounts of protein from both strains are mixed and digested by trypsin; (ii) the tryptic peptides are subjected to anti-acetyllysine antibody enrichment and (iii) the isolated lysine-acetylated peptides are then analysed by MS.

**[1]** Takahashi *et al*., 2015, *Environ Microbiol*, 17: 134-55.

proteome, acetylome, plasmid

発表責任者：NOJIRI Hideaki（anojiri@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F098
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

PacBio RS II を用いた Lactobacillus curvatus FBA2 ゲノム完全長配列の構築
De novo assembly of Lactobacillus curvatus FBA2 genome using PacBio RS II platform

○鈴木 チセ[1]、中野 和真[2]、保 日奈子[2]、小川 智子[3]、木元 広実[1]、小林 美穂[1]、守谷 直子[1]、青木 玲二[1]、佐藤 万仁[2]、照屋 邦子[2]、平野 隆[2,4] ([1]農研機構・畜草研、[2]沖縄綜研、[3]生物研、[4]沖縄科技セ)
○Chise SUZUKI[1], Kazuma NAKANO[2], Hinako TAMOTSU[2], Tomoko Eguchi-Ogawa[3], Hiromi KIMOTO-NIRA[1], Miho KOBAYASHI[1], Naoko MORIYA[1], Reiji AOKI[1], Kazuhito SATOU[2], Kuniko TERUYA[2], Takashi HIRANO[2,4] ([1]NARO NILGS, [2]OIAS, [3]NIAS, [4]OSTC)

【背景・目的】*Lactobacillus curvatus* FBA2 (以下 FBA2)は沖縄の漬物由来乳酸菌であり、ヒト皮膚由来線維芽細胞を用いた *in vitro* スクリーニングにおいて加熱死菌体添加時に I 型コラーゲンおよびヒアルロン酸産生を促進する株として乳酸菌 200 株の中から選抜された。低タンパク食餌摂取ヘアレスマウスへの FBA2 加熱死菌体経口投与は、低タンパク食による皮膚機能低下を改善する効果が見られた (1)。また FBA2 加熱死菌体を投与したラットではコラーゲンペプチドを投与した時の血中ヒドロキシプロリン量が有意に増加した (2)(3)。*L. curvatus* のゲノム解析はいくつかの菌株で進行中であるが、scaffolds が最少でも 72 個であり未だ全貌解明には至っていない。本研究では、PCR 増幅を必要としないため GC バイアスに依存せず、また非常に長いリードが得られる PacBio RS II を用いて FBA2 ゲノムの完全長配列を構築することを目的とした。
【方法】FBA2 のゲノム DNA は高純度に精製後、Qubit により定量し、Pippin pulse 電気泳動にて純度の確認を行った。その後 PacBio 標準プロトコルにより 20kb ライブラリを作成し、P6-C4 ケミストリを用いて PacBio RS II によるシーケンス解析を行った。統合解析環境 SMRT Analysis 上の HGAP2 ワークフローによりアセンブリを行い、環状処理により FBA2 ゲノムの完全長配列を構築した。
【結果】842,920 リード（平均 4,419 bp）から最終的にゲノムサイズ 1,848,756 bp、GC% 42.09 の完全長配列が構築された。本菌種の完全長配列は初めての報告である。プラスミドはパラメータの精査を行っても検出されず、また Pippin pulse 電気泳動においても検出されなかった。完全長配列が明らかになっているゲノム配列との Blast 検索の結果、*Lactobacillus sakei* strain 23K とほぼ一致したゲノム構造を示し、相同な領域に関しては 94%の相同性を示した。

(1) 宮田ら、第 63 回日本栄養・食糧学会大会要旨集（2009）
(2) 宮田ら、第 64 回日本栄養・食糧学会大会要旨集（2010）
(3) 乳酸菌およびそれらを用いた飲食物又は化粧品（特許第 5791009 号）（アサヒグループホールディングス（株）、農研機構）
本課題は平成 27 年度沖縄県「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」の支援により行われた。

PacBio, *Lactobacillus curvatus*, complete genome sequence

発表責任者：鈴木チセ（csuzuki@affrc.go.jp）

発表番号：4F099
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ランダム変異による超好熱菌温度感受性株の単離と解析
Characterization of temprature-senstive mutants of hyperthermophilic archaeon isolated by random mutagenesis

○福居 俊昭[1]、二石 涼平[1]、金子 瑛[1]、折田 和泉[1]、今中 忠行[2]、中村 聡[1] ([1]東工大院・生命理工、[2]立命館・生命科学)
○Toshiaki Fukui[1], Ryohei Futatsuishi[1], Akira Kaneko[1], Izumi Orita[1], Tadayuki Imanaka[2], Satoshi Nakamura[1] ([1]Grad. Sch. Biosci. & Biotechnol., Tokyo Tech, [2]Coll. Life Sci., Ritsumeikan Univ.)

【目的】 超好熱菌の耐熱機構は多くの研究者の興味を引きつけてきた。超好熱菌由来タンパク質の高い耐熱性や核酸の安定化などに加えて、細胞構造の高温環境下での安定化や熱不安定な代謝中間体の円滑な代謝など、数多くの要因の相加的・相乗的な効果により高い耐熱性が達成されているものと推測される。また超好熱菌の至適生育温度より低い温度への適応は、進化の観点からも興味深い。ゲノム情報のみでは超好熱菌の生育温度特性の理解には十分ではない。

本研究では超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis*（生育温度 60～100℃、至適 85℃）の生育温度に関与する因子の同定とその機能解明を目指し、先行研究で確立された *T. kodakarensis* ランダム変異ライブラリーから至適生育温度より高温域および低温域での生育能が欠失・低下した温度感受性変異株の単離と解析を行った。

【方法】*T. kodakarensis* 推定制限系遺伝子破壊株 Δ2239 株 [Δ*pyrF* Δ*pdaD* Δ*tk2239*]を宿主株とし、*pdaD* マーカー（アグマチン要求性相補）を含むトランスポゾン転移ライブラリーDNA で形質転換することによりランダム変異ライブラリーを作製した。ピルビン酸含有人工海水栄養豊富液体培地 (MA-YT-Pyr) を分注した 96 穴プレートの各ウェルにランダム変異体モノコロニーを植菌し、85℃で培養した。その後、レプリケーターを用いて培養プレートを 3 枚に複製し、各プレートをそれぞれ 60℃、85℃、93℃で培養した。85℃と比較して 93℃または 60℃で生育が低下した高温感受性または低温感受性の変異株を単離し、プラスミドレスキューによる変異部位の同定を行った。

【結果と考察】約 2,000 クローンのランダム変異株について高温感受性スクリーニングを行い、1 次スクリーニングで得られた 46 株の候補株について液体培養による 2 次スクリーニングを行うことで最終的に 39 個の高温感受性株を得た。この約 2%という高い出現率は、超好熱菌の耐熱性が多数の遺伝子機能の集積によるものであることを強く示唆している。取得した 36 株について変異遺伝子を同定したところ、tRNA 修飾関連遺伝子が 9 株と多く同定され、超好熱菌の高温生育における tRNA 修飾の重要性が示された。また 4 個の物質輸送関連遺伝子が同定され、超好熱性の発現に重要な物質輸送の存在が推定された。現在、自律複製ベクターを用いた遺伝子相補実験を行っている。また、約 1,000 クローンの *T. kodakarensis* ランダム変異体について低温感受性スクリーニングを行ったところ、3 株のみを得た。この低い出現率から、超好熱菌の低温適応は少数の遺伝子機能に担われていることが推測された。

Hyperthermophile, Archaea, Random mutagenesis

発表責任者：福居俊昭（tfukui@bio.titech.ac.jp）

発表番号：4F100
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 海洋性好酸性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のゲノム解析

# Draft genome sequence of the marine acidophilic sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans* strain SH

○金尾 忠芳、スルタナ シャーミン、上村 一雄（岡山大院・環境生命）
○Tadayoshi Kanao, Sharmin Sultana, Kazuo Kamimura (Okayama Univ.)

【背景と目的】

当研究室において岡山県下津井の海水試料より単離された *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株は、その生育にナトリウムイオンを要求する好塩性好酸性の硫黄酸化細菌である。低品位鉱石から有用金属を溶出させるバイオリーチングは塩濃度の高い環境下で行われる場合もあり、その際には好塩性の硫黄酸化細菌の利用が必要となる。*A. thiooxidans* SH 株はこの様な条件下においての応用が期待でき、実用化にはその硫黄代謝を解明し硫黄化合物の酸化能力を理解することが必要となる。本研究では、*A. thiooxidans* SH 株の全ゲノム配列を解読し、ORF の決定とアノテーションによって硫黄代謝に関与する遺伝子群の種類と数を把握し、本菌株に存在する硫黄代謝の推定を行った。

【結果および考察】

*A. thiooxidans* SH 株のゲノム DNA を次世代シーケンサーにより解読し、ドラフトゲノム配列を作成した。本菌株のゲノムは 73 の contig から 2.91 Mbp と決定され、G+C 含量は 54.3%であった。また、1 つの 5S-16S-23S rDNA オペロンを持ち、45 の tRNA 遺伝子、2,986 の ORF が確認された。この中には代表的な硫黄代謝経路 SOX 経路に関連する遺伝子（*sox*）や S4I 経路に関係するテトラチオン酸ハイドロラーゼ遺伝子(*tth*)、サルファイドキノン酸化還元酵素(*sqr*)などが同定された。これらの遺伝子クラスターは、既に全ゲノム配列が解読されている SH 株と同属同種の *A. thiooxidans* の 3 つの菌株（ATCC19377, A01, Licanantay）においても、それらの配置は同一であった。

最近、我々の研究グループにて、本菌株より新たなチオ硫酸デヒドロゲナーゼを分離精製し、それをコードする遺伝子（SH-*tsd*）を同定した。本酵素遺伝子で BLAST 検索を行ったところ、近縁種の *Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus ferrivorans* において低いながらも相同性を示す遺伝子が検出されたが、*A. thiooxidans* の 3 菌株のゲノム中にその ortholog を検出することはできなかった。SH-*tsd* はトランスポダーゼ様遺伝子を含む 4.8 kbp のゲノムアイランドに存在し、この遺伝子は SH 株に他の好酸性微生物から水平伝播したものと推測され、本菌株に新たな硫黄代謝関連酵素遺伝子が付与されたと考えられた。

sulfur-oxidizing bacteria, sulfur metabolism, horizontal transfer

発表責任者：金尾忠芳（tkanao@cc.okayama-u.ac.jp）

発表番号：4F101
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ピロリ菌の適応形質を支配する DNA メチル化系ネットワークの発見
# Network of DNA methyltransferases behind the adaptive phenotype in Helicobacter pylori

○矢野 大和[1,2]、アラム ゾバイドル[1]、林原 絵美子[3]、古田 芳一[1,2]、鈴木 穣[1]、菅野 純夫[1,2]、柴山 恵吾[3]、小林 一三[1,2] ([1]東大新領域、[2]東大医科研、[3]国立感染研)
○Hirokazu Yano[1,2], Zobaidul M Alam[1], Emiko Rimbara[3], Yoshikazu Furuta[1,2], Yutaka Suzuki[1], Sumio Sugano[1,2], Keigo Shibayama[3], Ichizo Kobayashi[1,2] ([1]Univ. Tokyo, [2]IMSUT, [3]NIID)

ピロリ菌のゲノムおよびメチローム解析から、ゲノム変異でなくメチローム状態の変化がピロリ菌進化の原動力である可能性が示唆されてきた（Furuta et al., PLoS Genetics 2014)。特定のメチローム状態がピロリ菌の形質発現に果たす役割を調べるため、私たちは異なるタイプのメチル化系の欠損変異体を 3 種類作成し、それら変異体のトランスクリプトームと基本的な形質を解析した。変異体はそれぞれ特有のトランスクリプトーム変化を示し、増殖パターンもそれぞれ異なっていた。ある変異体は、野生株と比較して、活性酸素に対して高い感受性を示し、さらに酸に対しても高い感受性を示した。ある II 型メチル化系は他 7 種類のメチル化系の発現に影響を与えていた。このメチル化系ネットワークの存在が特定のメチル化系による複数の形質の支配につながっている可能性がある。これらの発見は総じて、メチル化酵素遺伝子の獲得、不活化、または組換えによるメチローム状態の変化が、ピロリ菌の適応進化において重要な役割を果たすことを示唆する。

methylome, restriction-modification system, transcriptome

発表責任者：矢野大和（hyano@ims.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F102
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母 *Kluyveromyces marxianus* の交配による耐熱性遺伝子の探索

# Cross-breeding of the yeast *Kluyveromyces marxianius* to identify the genes responsible for its thermotolerance

○廣田 潤哉[1]、矢野 晴也[2]、星田 尚司[2]、赤田 倫治[2]([1]山口大・工・応化、[2]山口大院・医系・応用分子生命)
○Junya HIROTA[1], Seiya YANO[2], Hisashi HOSHIDA[2], Rinji AKADA[2] ([1]Yamaguchi Univ., Fac. Eng., Dept. Appl. Chm., [2]Yamaguchi Univ., Grad. Sch. Med., Dept. Appl. Mol. Biosci.)

地球温暖化問題や化石燃料の枯渇を解決する手段の一つにバイオエタノールがある。現在、バイオエタノールは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によって発酵生産されているが効率的な発酵可能温度は 35℃以下である。従って、発酵熱、機械熱による温度上昇を抑えるために莫大な冷却コストを必要とする。これに対して酵母 *Kluyveromyces marxianus* は 45℃でもエタノール発酵ができる耐熱性があり、冷却コストを低減することが期待されている。しかし、酵母 *K. marxianus* の耐熱性に寄与する遺伝子、及び、耐熱性機構は明らかになっていない。これまでに酵母 *K. marxianus* 株の多くは 1 倍体として存在し、接合して 2 倍体になる事、さらに 2 倍体を胞子形成させて得た子孫の遺伝子型は 2:2 に分離することを明らかにしている。そこで本研究では酵母 *K. marxianus* の耐熱性遺伝子の同定を交配により進めることにした。

本研究では耐熱性株として DMKU3-1042 株を感受性株として NBRC1777 株を使用した。2 倍体からの 1 倍体子孫の取得を容易にするために、ウラシル要求性を利用した。両 *K. marxianus* 株から 5-フルオロチン酸(5-FOA)を含む培地上で選択し、*ura3*株, *ura5*株を得た。これらを 2%グルコース培地で接合させ最少培地にレプリカして 2 倍体を得た。2 倍体からの子孫の選択に 5-FOA 培地を用いることで、胞子形成後 5-FOA 培地で増殖してきたコロニーは *ura3*株, *ura5*株または *ura3 ura5*株であり、1 倍体を選択できる。DMKU3-1042 *ura3*株と NBRC1777 *ura5*株の 2 倍体から得た 1 世代目の子孫 96 株の耐熱性を 47.5℃で調べると、耐熱性を示した株が 35 株で感受性を示した株が 61 株であった。ここから耐熱性株及び感受性株をそれぞれ 1 株選び耐熱性の異なる親株と戻し交雑を繰り返した。耐熱性子孫と感受性株 NBRC1777 *ura5*株で交配を繰り返していくに従って耐熱性子孫は減少傾向にあった。8 世代目の子孫の 192 株には 47.5℃で増殖する株は存在しなかった。さらに残りの 7 世代目の耐熱性子孫株 12 株を感受性株 NBRC1777 *ura5*と交配させて得た子孫の各 96 株にも耐熱性子孫が存在しないことが分かった。耐熱性に寄与する遺伝子を明らかにするために、7 世代目の耐熱性子孫のドラフトゲノム配列を次世代シークエンスによって解析した。

*Kluyveromyces marxianius*, thermotolerance, cross-breeding

発表責任者：星田　尚司（hoshida@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：4F103
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 環境試料 RNA の大量シーケンシングと経時解析による有用遺伝子の大規模検索

# Discovery of valuable genes by massive sequencing and time-lapse analysis of environmental RNAs

○中村 祐哉、森 宙史、黒川 顕、中島 信孝（東工大）
○Yuya Nakamura, Hiroshi Mori, Ken Kurokawa, Nobutaka Nakashima (Tokyo Tech)

現代の医薬品製造や化成品生産において、酵素タンパク質の利用は欠かせない。新規に有用酵素遺伝子を探索する際、メタゲノムと呼ばれる手法がよく用いられる。これは、環境などから取得してきた微生物群集を培養せずに、そのDNA/RNAだけを抽出し、ライブラリ化して利用するものである。ライブラリ化後は、DNA/RNA配列の相同性を指標にハイブリダイゼーションや、組換えタンパク質を発現させ酵素活性を指標にスクリーニングすることが多い。しかし、それらの方法では多大な時間を要することから、より簡易なスクリーニング方法が求められていた。そこで本研究では、新たなスクリーニング方法として、大量RNA配列経時解析法（TILAMS）を提唱する。TILAMSではまず、環境から取得した微生物群集に、着目する基質を添加した物としない物を用意し、両試料から経時的にRNAを抽出する。そして、次世代シーケンサーを用いて得られたRNAを大量に配列解読し、基質添加によって量が変動したRNA配列を探し出す。そこに、バイオインフォマティクスによる各種解析を与えることによって、擬陽性のRNA配列を除去し、基質に作用する酵素遺伝子のRNA候補を探しだす。TILAMSによれば、微生物細胞を使用せずに大量にスクリーニングを行うことができるため、メタゲノムからの有用酵素遺伝子探索のボトルネックを解消することができる。本研究においては、化成品として利用価値の高いレブリン酸を基質として用い、その代謝を担うレブリン酸分解酵素遺伝子を取得することを目指し、講演では研究の過程と成果について発表する。

RNA-Seq, metagenome, levulinic acid

発表責任者：中村　祐哉（ynakamura@bio.titech.ac.jp）

発表番号：4F104
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# スウェーデン北部の U 字谷 Karkevagge の土壌微生物群集の解析と植生の関連性

# Relationship of vegetation to microbial community in U-shaped glacial valley Karkevagge, Sweden

○礒田 玲華[1]、Giesler Reiner[2]、橋床 泰之[1] ([1]北大院農、[2]Umea Univ.)
○Reika Isoda[1], Reiner Giesler[2], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Umea Univ.)

【背景・目的】スウェーデン北部 Abisko に位置する Kärkevagge は，氷河後退により形成された U 字谷である。この U 字谷内には，北スカンジナビア山脈に見られる高山植物帯を代表する植生が分布しており，2004 年に Darmody らは Kärkevagge の植生分布と連動した土壌特性について報告している。本研究では，U 字谷内に見られる主要 5 タイプの植生域それぞれの土壌微生物群集についてメタゲノム解析を行い，植生と微生物群集の関連を明らかにすることを目的とした。
【方法】Kärkevagge における主要な 5 タイプの植生である measic meadow (MM), measic heath (MH), *Dryas* heath (DH), boulder heath (BH), grass land (GL)すべてを調査した。それぞれの植生について，各 4 反復の有機物層土壌を採取し，土壌含水率，アンモニア態窒素，硝酸態窒素，土壌 pH を測定した。また，ISOIL を用いて採取後速やかに土壌 DNA を回収した。Winogradsky's 無機塩無窒素ソフトゲル培地の混合炭素源を 0.1%および 0.5% (w/v) とし，培地に各土壌 300 mg を接種し，これらの培養物についてアセチレン還元試験を行った。土壌培養物についても同様に DNA 抽出を行った。土壌および土壌培養物の回収 DNA をもとに 16S rRNA 遺伝子を標的として，変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法および次世代シークエンサーによる菌叢解析を行った。
【結果・考察】各植生における含水率は，MM, DH で比較的低く，MH, BH, GL において比較的高かった。土壌 pH は 4.7～7.0 に分布し，低 pH から順に BH, MH, GL, MM, DH であった。硝酸態窒素濃度は MM, DH, GL において比較的高く 0.62~3.58 mg/ L であったのに対し, MH および BH は 0.00~0.14 mg/ L であった。各土壌 DNA を用いた 16S rRNA を標的とした PCR-DGGE 解析では，植生毎に特徴的な土壌微生物群集構造プロファイルが示された。MM, DH, GL の土壌培養物は高いアセチレン還元を示した (最大 118 nmol/ h, 0.5%炭素源, MM)。一方，MH および BH の土壌培養物はほとんど活性を示さなかった。従って土壌含水率や pH には，窒素固定との強い関連性は見出されなかった。むしろ植生そのものの影響が大きいと推察された。土壌培養物における微生物群集は，各植生に共通して *Proteobacteria* 門が優占していた。高いアセチレン還元を示した MM, DH, GL 土壌培養物からは，*Firmicutes* 門および *Bacteroidetes* 門が，活性をほとんど示さなかった MH, BH 土壌培養物からは *Actinobacteria* 門および *Acidobacteria* 門が主要な群集として検出された。以上より，植生と微生物群集構造・窒素固定との高い関連性が強く示唆された。

sub-arctic ecosystem, microbial community, vegetation

発表責任者：橋床泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4F105
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

セルロースを混合した土壌における微生物生態系の変遷
Transition of microbial ecosystem in soil mixed with cellulose
○小林 慶紀、林田 英里香、横山 和平、藤井 克彦（山大農）
○ Yoshiki KOBAYASHI, Erika HAYASHIDA, Kazuhira YOKOYAMA, Katsuhiko FUJII (Yamaguchi Univ.)

【目的】
土壌 DNA の抽出では界面活性剤、アルカリ、ガラスビース等を用いて試料中の微生物細胞を破砕するという方法が一般的であり、抽出キットも多数市販されている。
しかし未知微生物の酵素遺伝子を探索する場合、酵素遺伝子が必ずしもマルチコピーではないこと、そして DGGE で解析対象となる 16S rRNA 遺伝子の部分配列よりも酵素遺伝子の配列の方が長いことから、より穏やかな条件で DNA を抽出する工夫が求められる。演者らは、①DNA のせん断が少なく、②抽出 DNA に腐植質が混入せず、③細菌のみならず糸状菌 DNA も抽出できる、といった条件を満たす抽出法を検討し、研究結果の一部を昨年の本学会で発表した。そこで今回は、抽出した DNA がセルラーゼ遺伝子の探索に利用可能かどうかを検証した。
【実験方法】
ブナ林から落葉・落枝を除去した A 層土壌（深さ 0-10 cm 程度）を採集し、1 mm ふるいに通して砂利等を除いた。この土壌に滅菌水を加え、Avicel、オガクズ、またはキチンを混ぜて 2 ヶ月間静置した。2 ヶ月後に土壌に滅菌水を加えてブレンダー撹拌し、ガーゼで濾過、9,000×$g$での遠心分離により微生物と土壌粒子を含む沈殿を得た。次に沈殿を Ficoll で懸濁し、密度勾配遠心分離により微生物と土壌を分画し、今度は Ficoll 濃度を半分にして遠心することで水溶性腐植質が除去された微生物画分を得た。微生物画分から CTAB 法で DNA の抽出を行い、得られたゲノムを鋳型として 16S および 18S rRNA 遺伝子部分配列を増幅、D-Code DGGE システムで微生物組成を解析した。また、その DGGE ゲルバンドを切りだし､そのゲルから溶出した DNA を鋳型とし Nested-PCR､シーケンス解析を行った。
【結果】
上記方法で約 20 kbp の DNA を回収できた。電気泳動上では腐植質による暗色バンドは見られず、分画の原理を踏まえても、腐植質の混入は極めて少ないと考えられた。基質を混ぜて 2 ヶ月間静置培養した土壌の微生物相を検討したところ、各基質に対して分解能が報告されている属種の rDNA バンドが複数確認された。基質を加えずに培養した土壌ではこれらのバンドは見られなかった。さらに、uncultured としてしか報告されていない微生物の rDNA バンドも多数見られた。以上の結果より、本方法で得られた土壌 DNA サンプルは、培養困難種も含めて新奇のセルラーゼ遺伝子の探索に有用な試料であると期待された。

Metagenome, DGGE, Sequence

発表番号：4F106
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 殺ボウフラ活性を示す *Bacillus thuringensis* TK-E6 株がもつ巨大プラスミドの殺虫タンパク質遺伝子群の構成

# Gene organization of *cry* genes on large plasmids of novel mosquitocidal *Bacillus thuringensis* TK-E6

○植田 翔、冨田 佳捺衣、稲盛 香織、野田 麻友、東 慶直、武部 聡 (近大生物理工)
○Sho UEDA, Kanae TOMITA, Kaori INAMORI, Mayu NODA, Yoshinao AZUMA, So TAKEBE (BOST,Kindai Univ.)

**[目的]***Bacillus thuringiensis*(Bt)は土壌中に生息するグラム陽性桿菌で、胞子形成期にタンパク質結晶顆粒を生産する。この結晶顆粒の中に含まれる Cry タンパク質には昆虫目特異的な殺虫活性を示すものがあり、標的以外の昆虫目や農作物、家畜などには影響が無く残留性が低いことから、生物農薬での利用が進められている。Bt. TK-E6 は本研究室で分離した新規 Bt 菌株で、この菌が生産するタンパク質結晶顆粒は双翅目昆虫に対して殺虫活性を示した。そこでこの菌の殺虫タンパク質遺伝子を degeneratePCR および PFGE による巨大 plasmid 分画とサザンハイブリダイゼーションにより調べたところ *cry*32 グループの遺伝子を少なくとも 10 個以上持ち、それらは 4 つの巨大 plasmid に重複なく分乗していた。Bt. TK-E6 は遺伝子の数、および、それらが乗った巨大 plasmid の構成において、通常の Bt 菌には見られない特徴を持つことが分かった。そこで Bt. TK-E6 が持つ plasmid の塩基配列の決定をすることにより、この菌がもつ *cry* 遺伝子の構成と配置を調べた。

**[方法及び結果]**Bt. TK-E6 の持つ巨大 plasmid 上での *cry* 遺伝子の配置を決めるために、次世代シーケンサー(illumina 社)を用いてゲノム解析をした結果、全塩基配列は 799 個の contig に分かれた。各 contig の末端の塩基配列を調べるとトランスポゾンや IS があり、これが原因で contig の数が増えたと思われる。*cry* 遺伝子はプラスミド上にあるので、全 contig をゲノム情報が登録されている Bt. MC28 と *B. toyonensis* を reference としてクロモソームと「それ以外」の contig に分けた。次に、「それ以外」の contig から 12 個の *cry* 遺伝子をコードしている contig を抽出し PFGE とサザンハイブリダイゼーションの結果を基に、4 つの巨大 plasmid のグループに分けた。これらの contig の両端にプライマーを設計し、Multiplex PCR 法を用いて 4 つの plasmid の塩基配列の決定と *cry* 遺伝子の配置の検討を進めている。Bt TK-E6 がもつ *cry* 遺伝子の plasmid 上の配置の解析は、*cry* 遺伝子が plasmid で増幅し、Bt が特定の昆虫目にだけ殺虫活性を示すようになった進化的過経緯の関する知見が得られると考えている。

*Bacillus thuringensis*, *cry* gene, plasmid

発表責任者：武部　聡（takebe@waka.kindai.ac.jp）

発表番号：4F107
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌で継代培養を繰り返した際にゲノム配列に生じる突然変異の網羅的解析

Effect of repeated subculturing on genome sequence of *Escherichia coli*.

○下平 潤、細山 哲、内野 佳仁、山副 敦司、藤田 信之（製品評価技術基盤機構）
○Jun SHIMODAIRA, Akira HOSOYAMA, Yoshihito UCHINO, Atsushi YMAZOE, Nobuyuki FUJITA (National Institute of Technology and Evaluation)

【緒言】微生物は継代培養を繰り返すことで変異するとされている。本研究では、どのような変異がどのくらいゲノム配列中に蓄積するのかを調べるために、大腸菌を栄養液体培地にて継代培養を繰り返し、次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンスを行った。そして、得られたリードを用いて欠失/挿入（InDel）解析及び 1 塩基多型（SNPs）解析を行うことで細胞集団中に蓄積する変異を網羅的に調査した。

【方法】*Escherichia coli* NBRC 3972 株を LB 培地にて 24 時間ごとに植え継ぎ、合計 50 回の継代培養を行った。実験は独立して 4 回行い、継代培養を 10 回経るごとに菌液の一部を回収して Hiseq 1000 (Illumina)によりゲノムシーケンスを実施した。得られたリードを CLC genomic workbench ver. 7.5.1 を用いて、継代培養前のゲノム配列にマッピングすることで InDel 解析と SNPs 解析を行った。

【結果】継代培養 50 回までで遺伝子領域に 2 個所、遺伝子間領域に 2 個所の変異が検出された。遺伝子領域の変異のうちアミノ酸置換を伴う変異は、浸透圧調整等に関与する Outer membrane protein F (OmpF)をコードする遺伝子上の 1 個所のみだった。冗長度の解析から、変異を持った細胞の割合は 40%~50%程度で安定しており、継代培養回数による増減は観察されなかった。また、独立して 4 回行った実験のうち少なくとも 2 回以上の実験で同一の変異が検出されていることから、変異の生じやすいホットスポットが存在する可能性が示唆された。以上の結果より、栄養液体培地にて植継ぐ場合、ゲノム配列への影響は小さいことが示唆された。

本研究は平成 27 年度特許庁委託研究「ゲノム解析による微生物の保存及び品質管理に関する技術開発」の一環で実施されたものである。

genome, subculture, SNPs

発表番号：4F108
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ベタニン摂取ワラジムシ(*Porcellio scaber*)に特徴的な腸内微生物叢の解析

# Investigation of microflora in gut of betanin-fed *Porcellio scaber*

○浅野 純一[1]、橋床 泰之[2] ([1]北大農、[2]北大院農)
○Junichi Asano[1], Yasuyuki Hashidoko[2] ([1]Hokkaido Univ., [2]Hokkaido Univ)

背景および方法)

ワラジムシ(*Porcellio scaber*)は雑食性で低栄養耐性が高く、0.2%スクロース入り 2%寒天平板のみをエサとしても比較的長期間飼育できる。一方でエタノールへの感受性が高く、食餌とする寒天平板に終濃度 5%となるようにエタノールを含ませて与えると、対照区と比べて死亡率が有意に高くなる。高い抗酸化作用があるとされるベタニンをエタノールとともに含ませた食餌寒天を与えた時、エタノールによるワラジムシ致死率に変化が認められるか否かを調べるため、1) 5.0% EtOH, 20 μM betanin , 2) 5.0% EtOH, 20 μM L-glutamine(窒素源) , 3) 5.0% EtOH (control) の 3 食餌区を各 3 群のワラジムシ(n=10×3, 3 区)に分け、それぞれ 2 週間の摂食試験を行い、各区における生存率を求めた。実験では、屋外で採集したワラジムシ野生群を飼育環境下に馴化させるためスクロース入り寒天で 40 日間飼育し、それらの中から披検個体をランダムに選び、本試験に用いた。さらに摂食期間終了後、各試験区で生き残ったワラジムシの中腸内微生物叢について、DGGE 法を用いて解析した。

結果)

生存率は、試験開始 8 日目以降ベタニン投与区で高くなる傾向が見られた。またワラジムシの腸内微生物叢のうち、特に真菌においては、試験区ごとに明らかな違いが生じることが示された。5%アルコール＋ベタニン投与区の個体に特異的な真菌として、出芽酵母 *Trichosporon* sp. が検出された。また、50%アルコール＋L-glutamine 投与区個体群に特徴的な酵母 *Malassezia* sp. はベタニン投与区では認められなかった。この *Trichosporon* の優占はベタニンによってエタノールストレスが解消されたため引き起こされたか、あるいはベタニンによって中腸内で優勢になった *Trichosporon* がワラジムシ腸内でエタノール解毒の役割を積極的に果たしていることが期待される。真菌細菌叢の比較に平行して、腸内微生物叢とストレス応答との関連性についても明らかにする必要があるため、各区個体群中腸に特異的な微生物を分離し、それらにベタニンを直接与え、そのアルコール酸化能の変化や窒素代謝応答などについての詳細な検討を試みる予定である。これらの研究は、ヒトやその他の生物に対するベタニンの生理機能発掘の足がかりになることが期待される。

*Porcellio scaber* , Investigation of enteric microflora, Betanin

発表責任者：橋床泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4F109
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# DNA 配列表示ツール SeqView

# SeqView; a DNA sequence viewer

○大坪 嘉行、永田 裕二、津田 雅孝（東北大院生命）
○Yoshiyuki Ohtsubo, Yuji Nagata, Masataka Tsuda (Tohoku Univ)

ゲノム配列や DNA 配列を効率良く解析するには、便利なソフトウエアが欠かせない。本発表では、DNA 配列/アミノ酸配列表示ツール SeqView について紹介する。DNA やアミノ酸配列を表示可能なソフトウエアは多数存在する。しかしそれらは、一つの画面に一つの配列しか表示できないか、1 つの画面に複数を表示できるのは固定されたアラインメントに限られているなど、複数の配列を自由に扱えるものがなく、DNA 配列を解析する上での障害となっている。
SeqView は、通常の描画ソフトのように、配列そのものを同一画面内に配置が可能な DNA 配列/アミノ酸配列の viewer である（配列が長い場合には、配列の代わりに長方形として表示も可能である）。SeqView では、DNA 配列あるいはアミノ酸配列を GUI 上で自由に動かすことができるだけでなく、BLAST プログラムによって検出された相同性を表示可能であり、この際、ミスマッチ部位を線で結んで表示するため、2 つの配列の差異をより明解に理解可能である。また配列は複数の配列を探索した結果によって着色可能であり、配列のどの部位に何があるのかを容易に知ることができる。これらの機能により 3 本以上の DNA 配列の相互関係を理解するのが容易となる。
本発表では、PacBio によって決定された低精度ドラフトゲノム配列と、Miseq リードを使用して決定した完全ゲノム配列の比較結果等、SeqView を利用した解析例について紹介する。

PacBio, genome sequence comparison

発表責任者：大坪嘉行（yohtsubo@ige.tohoku.ac.jp）

発表番号：4F110
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 の NO 恒常性制御機構の解析

Nitric oxide homeostasis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145

○小川 翔大、草間 慎一朗、杉浦 遼、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、祥雲 弘文、佐々木 康幸（東農大）
○Shota Ogawa, Shinichiro Kusama, Ryo Sugiura, Shinsaku Ito, Shunsuke Yajima, Hirofumi Shoun, Yasuyuki Sasaki (Tokyo Univ. of Agriculture)

放線菌 *Streptomyces* 属細菌はグラム陽性の土壌細菌である。本菌は胞子が発芽し生育と共に栄養菌糸（基底菌糸）が伸長・分岐し、再び胞子を成熟させるといった糸状菌のような複雑なライフサイクルを持つ。また、結核菌の治療薬として用いられるストレプトマイシンをはじめ、二次代謝産物として様々な天然生理活性物質を生産する特徴を有しており、基礎研究、応用研究の両面において、非常に興味深い菌である。

一酸化窒素（NO）は生物において、チオール化合物や金属タンパク質、活性酸素種など様々な生体分子と反応することから広範囲にはたらく重要なシグナル分子であるが、同時に毒物として細胞障害の介在物質である一面もある。最近の研究により、放線菌の代謝制御に NO が関与していると示唆され始めた。しかし、我々の研究グループは、モデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 に、有機体窒素から NO を合成する新規窒素代謝経路の存在を明らかとし、本代謝系により産生された内在性 NO は、抗生物質生産や二次代謝に関与することを明らかとした。また、生産された NO をシグナルとして受容する二成分制御系（TCS）を見出した。TCS は、細菌の主要な外的環境応答制御機構であることが知られており、様々な遺伝子の発現をコントロールしている。そこで 2D-PAGE により検証した結果、本 TCS は複数の遺伝子を制御していることが示唆された。その中で、本 TCS の直接制御下にある機能未知の遺伝子に対して、遺伝子発現解析や破壊株による表現型観察を行った結果、本遺伝子は内在性 NO の恒常性維持に重要な役割を果たしていると示唆されたため、今回はその詳細について報告する。

Nitric oxide homeostasis, Streptomyces coelicolor

発表番号：4F111
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Gluconobacter* 属酢酸菌における 5-ケトグルコン酸輸送体分子と資化能との関係

# Relationship between transporter for 5-keto-D-gluconate uptake and its assimilation in *Gluconobacter*

○西原 彬[1]、片岡 尚也[2]、藥師 寿治[2]、松下 一信[2]、阿野 嘉孝[1]([1]愛媛大農、[2]山口大農)
○Aki NISHIBARA[1], Naoya KATAOKA[2], Toshiharu YAKUSHI[2], Kazunobu MATSUSHITA[2], Yoshitaka ANO[1] ([1]Fac. of Agr., Ehime Univ., [2]Fac. of Agr., Yamaguchi Univ.)

【目的】5-ケトグルコン酸（5KGA）は、キシリトールや酒石酸、ビタミン C、生分解性プラスチック等の合成中間体となりうる汎用性の高い化学素材であり、*Gluconobacter* 属酢酸菌によって生産される。これまでの研究により、本菌は酸化発酵的に 5KGA を生産し安定に培地中に蓄積した後、条件によって、蓄積している 5KGA を細胞内で資化する能力があることが明らかとなっている。この 5KGA の細胞内への輸送・資化能は、工業的 5KGA 生産の確立においての重要な制御因子となるだけでなく、希少糖である 5KGA 代謝の観点からも興味深い。本研究では、5KGA の細胞内への輸送・資化の理解を深めるため、*Gluconobacter* の 5KGA 輸送体分子を探索し、5KGA 資化との関係を調査した。
【方法】*Gluconobacter* のゲノムデータベースから、5KGA の取り込みに関与する可能性のある輸送体分子を探索した。その候補分子の破壊株を作製し、5KGA 生産性への影響を調査した。また候補分子について *Gluconobacter* のゲノムを広く調査し、輸送体分子と 5KGA 資化能について比較調査した。
【結果と考察】まず 5KGA 輸送体候補分子として、5KGA の資化に関わる 5KGA レダクターゼ（5KGR）遺伝子に隣接して存在する推定グルコン酸パーミアーゼ（GntP）に着目し、*G. thailandicus* NBRC 3255 について破壊株（*Δ gntP*）を作製した。*Δ gntP* では、野生株でみられた 5KGA 資化能が失われ、5KGA を培地中に安定に蓄積していることが確認され、GntP が 5KGA の取り込みに関与していることが強く示唆された。次に、本分子について *Gluconobacter* のゲノムを広く調査した。その結果、推定 GntP 遺伝子は調査した *Gluconobacter* 全てのゲノム上に共通して存在していた。興味深いことに、GntP 遺伝子に隣接して、5KGR 遺伝子が存在するが、その位置関係と相同性から 2 つのタイプに大別できることが分かった。すなわち、5KGR 遺伝子の上流に GntP 遺伝子が位置するグルコン酸パーミアーゼ型と 5KGR 遺伝子の下流に GntP 遺伝子に 78%の相同性を示す D-セリンパーミアーゼ遺伝子が位置する D-セリンパーミアーゼ型であり、この輸送体のタイプが 5KGA 資化能の違いに影響している可能性が示唆された。

acetic acid bacteria, *Gluconobacter*, 5-keto-D-gluconate

発表責任者：阿野　嘉孝（anoy@agr.ehime-u.ac.jp）

発表番号：4F112
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Acetobacter pasteurianus* SKU1108 の高温適応耐熱化株 TH-3 の発現・機能解析から見える耐熱性機構
Transcriptome and physiological analysis in thermo-adapted TH-3 strain of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 for understanding the mechanism of thermotolerance

○松下 一信[1,4]、松谷 峰之介[1]、西倉 慎顕[1]、秦野 智之[1]、サイチャナ ナツラン[1]、マスード ウライワン[1]、服部 浩美[1]、貝沼（岡本） 章子[2]、兼崎 友[3]、石川 森男[2]、片岡 尚也[1,4]、藥師 寿治[1,4] ([1]山口大農・生物機能、[2]東京農大・応用科醸造、[3]東京農大・ゲノムセンター、[4]山口大・中高温微生物研究センター)
○Kazunobu Matsushita[1,4], Minenosuke Matsutani[1], Mitsuteru Nishikura[1], Tomoyuki Hatano[1], Natsaran Saichana[1], Uraiwan Masud-Tippayasak[1], Hiromi Hattori[1], Akiko Kainuma-Okamoto[2], Yu Kanezaki[3], Kazunobu Matsushita[2], Naoya Kataoka[1,4], Toshiharu Yakushi[1,4] ([1]Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ., [2]Dept. Ferment. Sci., Tokyo Univ. Agric., [3]Genome Research Center, Tokyo Univ. Agric., [4]Research Center for Thermotolerant Microbial Resources, Yamaguchi Univ.)

【目的】酢酸菌を用いた工業的な酢酸発酵は、通常 25~30 ˚C の定温に制御されて行われる。しかし、酢酸発酵過程では多量の発酵熱が生じるため多大な冷却コストを必要とする。この問題に対処するため、私達は耐熱性酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 株から更に生育温度の上昇した耐熱化株を、酢酸発酵条件下で、且つ生育限界温度下で継代培養を繰り返すことによって取得した。得られた高温適応耐熱化株 TH-3 は、ゲノム中に 11 カ所の変異（欠損を含む）をもち、40˚C 近い高温下でも良好に酢酸発酵する能力を有していた [1]。
【方法】今回、これらの適応変異が遺伝子発現に及ぼす影響を調べるために、親株と耐熱化株 TH-3 の適応変異（SKU1108 から TH-3：37˚C）及び高温培養（TH-3：37˚C から 40˚C）にともなう遺伝子発現の変化を Illunima シークエンサによるトランスクリプトーム解析を用いて網羅的に調べるとともに、それらの生理・生化学的解析を行った。
【結果と考察】適応変異にともなって発現変化した遺伝子群のうち、１）高温適応で変異した転写因子 *marR* によって制御される遺伝子群の大幅な発現上昇、２）脂肪酸酸化系遺伝子群の著しい発現低下、３）酸化ストレス（ROS）抑制系因子のいくつかの遺伝子の発現低下、４）エタノール酸化呼吸鎖（アルコール脱水素酵素・ADH 及び末端ユビキノール・オキシダーゼ）及びエネルギー生成系（ATP 合成酵素）遺伝子群のオペロン揃っての発現上昇、が特徴的であった。

一方、高温培養において発現変化した遺伝子群の中では、１）適応変異において発現が低下した ROS 抑制因子全ての高発現、２）呼吸鎖複合体 I の全遺伝子群の発現上昇、３）尿素・アミノ酸代謝及び輸送系遺伝子群の発現低下、が特徴的に見られた。

一方で、生理・生化学的解析からは、１）高温下での ROS 生成の上昇と高温適応株での ROS 生成の低下、２）高温適応株の酢酸発酵能の上昇とエタノール酸化呼吸鎖活性の上昇、が観察された。

これらの解析結果に、メタボローム解析データも含めて、本菌における耐熱化機構を推論する。

本研究は JST-ALCA プロジェクトの一環である。

[1] Matsutani M. et al., J. Biotechnol. **165** 109-119 (2013)

thermotolerance, acetic acid bacteria, transcriptome

発表責任者：松下一信（kazunobu@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：4F113
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

増殖期と増殖停止期におけるイソプロピルアルコール生産大腸菌の $^{13}$C 代謝フラッ クス解析
$^{13}$C-metabolic flux analysis of isopropyl alcohol-producing *Esherichia coli* at growth and non-growth phases
○岡橋 伸幸[1]、吉川 勝徳[1]、松田 史生[1]、松本 佳子[2]、白井 智量[3]、和田 光史[2]、清水 浩[1]([1]阪大情報、[2]三井化学、[3]理研)
○ Nobuyuki OKAHASHI[1], Katsunori YOSHIKAWA[1], Fumio MATSUDA[1], Yoshiko MATSUMOTO[2], Tomokazu SHIRAI[3], Mitsufumi WADA[2], Hiroshi SHIMIZU[1] ([1]Osaka Univ., [2]Mitsui Chemicals, [3]Riken)

[背景] 有用物質生産において、増殖停止期は細胞増殖に炭素や還元力を奪われない魅力的なプロセスである。しかし、増殖停止期のフラックス分布や酸化還元バランスに関する知見は乏しい。そこで本研究では、プラスチック前駆体のイソプロピルアルコール(IPA)を生産する大腸菌に $^{13}$C 代謝フラックス解析を適用し、増殖期と増殖停止期の代謝状態の比較を行った。
[方法] *Esherichia coli* B 株に IPA 生産経路を導入した親株を作成した。さらに、酸化還元バランスと前駆体供給の観点から *pgi*, *gnd*, *gntR* を破壊、*zwf* を過剰発現し、Entner Doudoroff (ED) 経路を使ってグルコースを資化する株(ED 株)を構築した。これらを $^{13}$C 標識グルコース含有 M9 培地で好気的にフラスコ回分培養した。増殖停止期の培養は窒素源不含の M9 培地に増殖後の菌体を植菌して行った。対数増殖期のフラックス解析にはタンパク由来アミノ酸の $^{13}$C 標識割合を、増殖停止期のフラックス解析には中枢代謝中間体の $^{13}$C 標識割合を質量分析器で計測し、フラックス解析ソフトウェア“OpenMebius”にて解析を行った。
[結果] 対数増殖中期の親株および ED 株の培地を HPLC で調べたところ、両株ともに副産物の酢酸の生産が大部分を占めた。親株では IPA 生産が見られなかったのに対し、ED 株では IPA 生産が確認された。この理由を明らかにするため $^{13}$C 代謝フラックス解析を行い、IPA 生産に必要となる NADPH 供給速度と消費速度のバランスを調べた。増殖期では供給された NADPH が増殖に必要な前駆体の合成に奪われたため、IPA が生産できなかったことが示唆された。一方、ED 株では NADPH の余剰が発生しており、これが IPA の生産につながったと考えられた。
続いて、増殖停止期の生産物を調べたところ、両株ともに IPA が生産され、酢酸の排出は見られなかった。それぞれの株の IPA 対糖収率を計算したところ、親株で 0.13(mol/mol glucose)、ED 株では 0.54(mol/mol glucose)と ED 株で収率が飛躍的に向上することがわかった。代謝フラックス解析を行ったところ、増殖期に比べて増殖停止期では両株ともにアセチル CoA を供給するフラックスが 1.3 倍に増加しており、増殖停止期に IPA 前駆体の供給が強化されていることが明らかとなった。また、親株では増殖期に比べてペントースリン酸経路で代謝されるグルコースの割合が 30%から 88%に増加していた。一方で ED 株では、ED 経路を使って取り込んだグルコースを代謝していることが確認された。この結果より、増殖停止期では、ED 経路を使って Gnd が触媒する脱炭酸反応を迂回することが、IPA 収率を向上させることが示唆された。

$^{13}$C-metabolic flux analysis, isopropyl alcohol, non-growth phase

発表責任者：清水浩（shimizu@ist.osaka-u.ac.jp）

発表番号：4F114
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Enterococcus mundtii* QU 25 における Phosphoketolase 活性の翻訳後調節機構の解析
Analysis for post-translational regulation of phosphoketolase activity in *Enterococcus mundtii* QU 25

○鍋田 啓介[1]、岩永 美優[1]、渡辺 智[1]、千葉櫻 拓[1]、門多 真理子[5,1]、園元 謙二[3,4]、吉川 博文[1,2] ([1]東京農大・院・バイオ専攻、[2]東京農大・ゲノム解析セ、[3]九大院・農、[4]九大バイオアーク、[5]武蔵野大・環境)
○Keisuke NABETA[1], Miyu IWANAGA[1], Satoru WATANABE[1], Taku CHIBAZAKURA[1], Mariko KADOTA[5,1], Kenji SONOMOTO[3,4], Hirohumi YOSHIKAWA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agriculture, [2]Tokyo Univ. of Agriculture, Genome Research Center, [3]Fac. Agric., Kyushu Univ., [4]Bio-Arch, Kyushu Univ., [5]Musashino Univ.Dpt. Environmental Sciences)

背景・目的

乳酸球菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 株（以下 QU 25 株）はグルコースやキシロースからバイオプラスチックであるポリ乳酸の原料となる L-乳酸を高純度で発酵できる菌株であり、培養条件によりホモ型乳酸発酵、ヘテロ型乳酸発酵を切り替えている。高濃度キシロースのみの糖源で培養すると、ホモ乳酸発酵を行い、低濃度キシロースのみで培養するとヘテロ乳酸発酵も行う。ヘテロ型乳酸発酵を担うホスホケトラーゼ経路の初期で働くホスホケトラーゼ Ptk は、低濃度キシロースで培養した菌体では酵素活性があったが、高濃度キシロースでは検出できなかった[1)]。転写レベルで解析を行ったところ、高濃度キシロース下でも *ptk* は転写されていた。このことから高濃度キシロース下でヘテロ乳酸発酵が行われなくなる現象は、*ptk* 遺伝子の転写調節によるものではないことが明らかとなった[2)]。本研究では Ptk の活性制御機構を明らかにすることを目的に実験を行った。

方法・結果

QU 25 株の組換え Ptk に対するポリクローナル抗体を作製し、ウエスタンブロッティングを行った結果、高濃度キシロース下においても Ptk タンパク質は検出できた。ホルムアルデヒドによるクロスリンクを行った結果、培養条件に関わらず複合体を形成していた。この結果は他菌種での結果と同様であった。これまでの結果から、高濃度キシロース下における Ptk 活性の消失は複合体の形成後の調節であることが考えられた。現在、二次元ゲル電気泳動による解析を試みている。

文献

1) M.A. Abdel-Rahman et al., Appl Microbiol Biotechnol. 2011,89(4):1039-49.
2) H.Yanase et al., RSC Adv.2015, 5,:93283-93292.

metabolic shift, phosphoketolase, lactic acid fermentation

発表責任者：吉川博文（hiyoshik@nodai.ac.jp）

発表番号：4F115
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトン代謝に関する研究 : ジヒドロキシアセトンリン酸化酵素
Dihydroxyacetone metabolism in *Gluconobacter thailandicus*: dihydroxyacetone kinase
平田 花織、松谷 峰之介、足立 収生、片岡 尚也、○薬師 寿治、松下 一信 (山口大農)
Kaori HIRATA, Minenosuke MATSUTANI, Osao ADACHI, Naoya KATAOKA, ○Toshiharu YAKUSHI, Kazunobu MATSUSHITA (Yamaguchi Univ.)

*Gluconobacter* 属酢酸菌はペリプラズムにあるキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素によってグリセロールを酸化し，ジヒドロキシアセトン（DHA）へと変換，蓄積することができる。生産された DHA は，*Gluconobacter oxydans* 621H ではほとんど消費されないが，*Gluconobacter thailandicus* NBRC 3255 ではほぼ完全に消費される。NBRC 3255 は 621H にはない独特な DHA 代謝能を持っていることが考えられる。微生物による DHA の工業的生産を考えると，DHA を消費しない方が好ましいと考えられるが，*Gluconobacter* 属酢酸菌における DHA 代謝やその制御に関する知見は乏しい。私たちは，NBRC 3255 株から NADH 依存性，ならびに NADPH 依存性の DHA 還元酵素を精製し，諸性質の解析を報告した（１）が，本酵素の生理学的役割については十分に明らかにはなっていない。本研究では，*G. thailandicus* NBRC 3255 株の DHA 代謝に関する解析を行った。

休止菌体を用いた，DHA による酸素消費活性は，NBRC 3255 で高く， 621H は非常に低かった。DHA の細胞内代謝に関連すると予想される酵素である，ATP 依存型 DHA リン酸化酵素（DHAK）と NADH 依存型，ならびに NADPH 依存型 DHA 還元酵素の活性を 621H と NBRC 3255 で比較すると，DHAK の活性が NBRC 3255 で特に高かった。なお，ホスホエノールピルビン酸依存型の DHA リン酸化酵素活性は検出できなかった。NBRC 3255 株のドラフトゲノム解析（２）からは，DHAK をコードすると考えられる遺伝子が 2 つ(*NBRC3255_2003* と *NBRC3255_3084*)存在する。この内，*NBRC3255_3084* は，*G. oxydans* 621H 株でアノテートされた DHAK 遺伝子のホモログであり，一方の *NBRC3255_2003* は，NBRC 3255 に特有の DHAK 遺伝子であると予想できる。そこで，ミュンヘン工科大学の Ehrenreich らが開発した遺伝子破壊用スーサイドベクター（３）を用いて，*NBRC3255_2003* 遺伝子と *NBRC3255_3084* 遺伝子を破壊した。しかしながら，*NBRC3255_2003* 遺伝子破壊株，*NBRC3255_3084* 遺伝子破壊株，ならびにそれらの二重破壊株とも，DHA の消費に関して野生株と同様の能力を持っており，DHAK 活性は野生株並みであった。以上のことから，予想された２つの遺伝子は DHAK をコードしていないことが示唆された。そこで，*NBRC3255_2003* 遺伝子と *NBRC3255_3084* 遺伝子の二重破壊株の可溶性画分から DHAK の精製を試みた。私たちの部分精製標品は，DHA だけでなくグリセロールのリン酸化も行うことが出来た。現在，遺伝子を特定するために，アミノ酸配列の同定を進めている。

（１）Adachi et al., (2008) Biosci Biotechnol Biochem. 72:2124. （２）Matsutani et al., (2013) Genome Announc. 1:e0011813. （３）Kostner et al., (2013) Appl Microbiol Biotechnol. 97:8341.

*Gluconobacter*, dihydroxyacetone, kinase

発表責任者：薬師寿治（juji@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：4F116
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Methylobacterium aquaticum 22A のメタノール脱水素酵素ホモログの機能解析

# Functional analysis of methanol dehydrogenase homologues in methylotrophic bacterium, Methylobacterium strain 22A.

○中辻 由加里、谷 明生（岡山大　植物研）
○Yukari NAKATSUJI, Akio Tani (IPSR Okayama Univ.)

【目的】植物は細胞壁構成成分の分解に由来するメタノールを放出する。一方 *Methylobacterium* 属細菌は生育にメタノールを利用することができるため、植物葉圏の優占微生物種となっている。*Methylobacterium* 属細菌はメタノールを methanol dehydrogenase (MDH)によってホルムアルデヒドに酸化し、生育に利用する。これまで MDH は二種類確認されている。一つはヘテロテトラマーを形成し、補因子として $Ca^{2+}$を要求する MxaF、もう一つはホモダイマーを形成し、$La^{2+}$を要求する XoxF 型である。本研究室でエゾスナゴケから単離され植物生育促進能を示す *Methylobacterium aquaticum* 22A 株についてゲノムシーケンスを行なった結果、これらの MDH に相同性を示す 6 つの遺伝子が見つかった。本研究ではこれら 6 つの酵素遺伝子の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】MDH に相同性を示す 6 つの遺伝子のさまざまな欠失株を作成し、メタノール、エタノール、コハク酸を基質とする培地で $Ca^{2+}$、$La^{2+}$、$Ca^{2+}La^{2+}$を加えた条件で生育試験を行なった。その結果 MxaF と XoxF 以外の 4 つの遺伝子は欠失しても問題なく生育したことから、これらを基質とする生育に関与していないと考えられた。XoxF 遺伝子のみを残した欠失株は La 存在下でのみ生育することから、La 依存型の XoxF1 遺伝子と考えられた。一方、MxaF 遺伝子のみを残した欠失株はメタノールに金属に関わらず生育せず、XoxF1 遺伝子の存在によりカルシウム存在下で生育を示した。従って MxaF 遺伝子の発現には XoxF 遺伝子の存在が必要であり、これは *M. extorquens* AM1 株で見られる現象と同様であった。しかし、MxaF のみを持つ欠失株及び XoxF1 欠失株から $Ca^{2+}$存在下でメタノールに生育する MxaF サプレッションミュータントが単離された。これらのゲノムシーケンスを行った結果、両者とも MDH の発現調節に関わる MxbD 遺伝子に異なる変異が起こっていることが分かった。現在は MxbD 遺伝子破壊株を作成するとともに、MDH 遺伝子欠失株に変異型 Mxbd 遺伝子を導入し、メタノールへの生育を確認している。また、MxaF, XoxF1 以外の遺伝子については、プロパノールやブタノールなど高級アルコールを基質とした培地で生育試験を行い、機能の特定を目指している。

Methylobacterium, Methanol dehydrogenase, lanthanoid

発表責任者：中辻　由加里（ag422066@s.okayama-u.ac.jp）

発表番号：4F117
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 解糖系フラックスセンサーを利用した高効率物質生産のための代謝制御手法の開発

# Development of metabolic control method using glycolytic flux sensor for efficient bioproduction

○戸谷 吉博、渡辺 祥、徳山 健斗、吉川 勝徳、松田 史生、清水 浩（阪大院・情報・バイオ情報）
○Yoshihiro TOYA, Sho WATANABE, Kento TOKUYAMA, Katsunori YOSHIKAWA, Fumio MATSUDA, Hiroshi SHIMIZU (Dept. of Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ.)

【目的】微生物を利用した有用物質生産において、目的物質の安定した高生産を実現するには、培養条件を適切に制御することが重要である。従来、培養液の pH、温度、濁度、溶存酸素などを指標として、培養プロセスを制御する取り組みが行われてきたが、生物の代謝が有する自由度に対して，オンライン計測可能な情報が少ないことが課題であった。また、$^{13}$C 代謝フラックス解析は、代謝経路の個々の反応速度を明らかにする強力な手法であるが、解析に時間がかかるため培養プロセスの制御に利用することが困難であった。近年、大腸菌の解糖系フラックスを可視化する方法（フラックスセンサー）として、転写因子 Cra が解糖系フラックスを制御することを利用した方法が開発された（Kochanowski et al., PNAS, 2013）。本研究では、解糖系フラックスセンサーを培養プロセス制御の指標として利用できるか検討した。

【方法】Cra の活性は、Cra が発現量を制御する *pykF* のプロモーター下流に GFP 遺伝子を導入したプラスミドを構築し、プロモーターの Cra 結合部位をランダムな配列に置き換えた場合との蛍光強度の比から測定した。また、解糖系フラックスを制御するため、ゲノム上の *pgi* を欠失し、*pgi* の発現量を IPTG でコントロールするためのシステムを導入した（Usui et al., Microb Cell Fact, 2012）。培養はグルコースを単一炭素源とする合成培地を用いて、好気条件下で回分培養を行なった。$^{13}$C 代謝フラックス解析は細胞を[1-$^{13}$C]グルコースで培養し、GC/MS で測定したタンパク質由来アミノ酸の $^{13}$C 濃縮度に基づいてフラックス分布を推定した。

【結果・考察】大腸菌の野生株と中枢代謝経路の遺伝子破壊株（Δ*pgi*, Δ*zwf*, Δ*ptsG*）にフラックスセンサーを導入し、Cra 活性を計測した。これらの菌株について $^{13}$C 代謝フラックス解析を実施し、Cra 活性とフルクトース 1,6 二リン酸アルドラーゼ（FBA）のフラックスに負の相関があることを確認した。次に、*pgi* の発現量を IPTG で制御可能な大腸菌株にフラックスセンサーを導入し、解糖系とペントースリン酸経路の分岐比を IPTG 濃度(0, 10, 100 μg/mL)によってコントロールした。その結果、本株においても Cra 活性と FBA フラックスに負の相関があり、その関係性は遺伝子破壊株の実験と同様であった。すなわち、FBA フラックスの違いを GFP の蛍光強度として検出できることを示した。

ペントースリン酸経路は還元力 NADPH の主な生産の場であるため、NADPH を生合成に利用する化合物の生産においては、解糖系とペントースリン酸経路の分岐比率を適切にコントロールすることが重要である。本株はこのような化合物の生産に有効な培養プロセスの開発に役立つであろう。

Flux sensor, Escherichia coli, Fluorescent protein

発表責任者：清水 浩（shimizu@ist.osaka-u.ac.jp）

発表番号：4F118
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# Analysis of glucose repression in thermotolerant yeast Kluyveromyces marxianus DMKU3-1042

○Mochamad NURCHOLIS[1], Suprayogi[1], Savitree LIMTONG[2], Tomoyuki KOSAKA[3,4], Mamoru YAMADA[1,3,4] ([1]Graduate School of Medicine, Yamaguchi Univ., [2]Faculty of Science, Kasetsart Univ., [3]Faculty of Agriculture, Yamaguchi Univ., [4]RCTMR, Yamaguchi Univ.)

*Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 is budding yeast which posseses attractive characters including utilization ability of various sugars, ethanol producer and thermotolerance. Considering utilization of biomass consisting various sugars, glucose repression is the major problem for utilizing mixed sugars in yeast cell. In order to analyse the glucose repression mechanism in *K. marxianus*, two genes related to glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, *MIG1* (Cys2His2 zinc finger protein) and *RAG5* (hexokinase) were disrupted by site-specific homologous recombination. In addition, 2-deoxy-D-glucose (2-DOG) resistant mutants were obtained by either spontaneously or by random insertion of a PCR-amplified *kan*MX4 DNA fragment into the genome. Six of 2-DOG-resistant mutants have been identified to have an intergenic insertion of *kan*MX4 by using TAIL-PCR method and nucleotide sequencing. Based on phenotype and metabolic characteristics, the intergenic mutants were categorized into three groups. Group 2 exhibited strong resistance to 2-DOG plates but were unable to grow on YNB plates containing glucose and antimycin A due to insufficient energy that was provided by fermentation pathways. This group showed slow utilization of glucose and xylose in liquid media due to reduction of hexokinase activity, but increase inulinase activity compared to that of parental strain. These characteristics were similar to those of a hexokinase-defective mutant, *RAG5*::*kanMX4*. These results suggest that the defect of hexokinase decreases the initial catabolism of sugar but increases in inulinase activity. On the other hand, in the *MIG1*::*kanMX4* mutant, neither reduction of hexokinase activity nor increase inulinase activity were observed.

Glucose repression, Kluyveromyces marxianus, Metabolic characteristics

発表責任者：Mamoru Yamada（m-yamada@yamaguchi-u.ac.jp）

発表番号：4F119
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Thermus thermophilus* においてアセチル化を受ける CoA トランスフェラーゼの機能と制御機構の解析

# Function and regulation mechanism of CoA transferase acetylated in *Thermus thermophilus*

○山本 寛之、吉田 彩子、富田 武郎、古園 さおり、葛山 智久、西山 真（東大生物工学セ）
○ Hiroyuki YAMAMOTO, Awake YOSHIDA, Take TOMITA, Saori KOSONO, Tomohisa KUZUYAMA, Makoto NISHIYAMA (BRC, The Univ. of Tokyo)

【目的】ヒストン翻訳後修飾として有名なタンパク質アセチル化は、近年のプロテオミクス解析によりヒストン以外のタンパク質においても非常に広範に存在することが明らかとなった。タンパク質アセチル化は KAT（lysine acetyltrasferase）と KDAC（lysine deacetylase）の二つの酵素によって可逆的に制御され、これらがそれぞれアセチル CoA や $NAD^+$を基質とする場合があることからもタンパク質アセチル化と代謝制御との関連が示唆されている。バクテリアにおいても様々なアセチル化タンパク質の存在が明らかとなっている一方で、実際にアセチル化による制御の存在が明らかになっている KAT 及びその標的タンパク質の例は極めて少ない。前回発表において、我々は 4-Hydroxybutyrate CoA transferase とアノテーションされる TTC1083 が KAT である TTC1711 と KDAC である TTC0104 によりアセチル化、脱アセチル化されることを報告した。TTC1083 は短鎖脂肪酸にアセチル CoA の CoA moiety を転移し、短鎖アシル CoA と酢酸を生成する反応を可逆的に触媒する活性を有している。今回は、アセチル化による TTC1083 の制御機構の解明を目指し、アセチル化体及び非アセチル化体の機能解析及び、TTC1083 の pull-down assay を行った。【結果】TTC1083 の活性や耐熱性をアセチル化の有無で比較したが顕著な違いは見られなかった。そこで、アセチル化がタンパク質間相互作用を介した活性調節に関与している可能性を考え、TTC1083 高発現株による pull-down assay を行った結果、TTC1082 が TTC1083 と相互作用することが明らかとなった。TTC1082 は Alanine dehydrogenase とアノテーションされるが、その活性を有していなかった。一方、NAD (H) 結合サイトが保存されていることから、TTC1082 が NAD (H) と結合し TTC1083 の活性に影響を与えると考えた。TTC1082 存在下において TTC1083 の活性を測定したところ、$NAD^+$の添加により活性の低下が認められたが、NADH 存在下において変化しなかったことから、TTC1082 は生体内の NAD/NADH 比を感知し、TTC1083 の活性を調節するタンパク質である可能性が考えられる。また、100 μM の $NAD^+$存在下のアセチル化体、非アセチル化体の TTC1083 の活性はそれぞれ約 30%、50%と異なっていた。この結果は、アセチル化が $NAD^+$を結合した TTC1082 により低下した TTC1083 の活性を打ち消す機能を有することを示している。TTC1083 はアセチル CoA を基質として利用することから、TTC1711 によるアセチル化や、TTC1082 と相互作用することで生体内の栄養状態に応じた CoA 体及び $NAD^+$の恒常性の維持に寄与していると考えられる。*in vivo* における NAD/NADH 比の定量や遺伝子破壊株を用いた解析により、CoA トランスフェラーゼの生理学的機能と制御について解析した結果をより詳細に報告する予定である。

protein acetylation, protein-protein interaction, CoA transferase

発表責任者：西山真（umanis@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

発表番号：4F120
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* におけるミトコンドリア膜局在型クエン酸輸送体遺伝子破壊株の作製

# Disruption of the Gene Encoding Mitochondrial Citrate Transport Protein in Citric Acid-Producing *Aspergillus niger*

○小林 慶一、上田 由佳、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Keiichi KOBAYASHI, Yuka UEDA, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl.Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】クエン酸生産糸状菌 *Aspergillus niger* では、ミトコンドリア内で生産されたクエン酸がサイトソルに輸送されるためにミトコンドリア膜局在型の輸送タンパク質が必要とされる。しかし、ミトコンドリアからのクエン酸輸送に関わるタンパク質やその遺伝子についての報告は少ない。クエン酸高生産菌 *A. niger* WU-2223L[1)]のゲノム上には、酵母由来ミトコンドリア局在型クエン酸/2-オキソグルタル酸輸送体ホモログ遺伝子 (*cocA*) が存在する。本研究では、*cocA* の機能解析を目的として、クローニングおよび破壊株の作製を行い、生育やクエン酸生産への影響について検討した。
【方法および結果】WU-2223L 株からクローニングした *cocA* は 316 個のアミノ酸残基から成る推定 33.7 kDa のポリペプチドをコードしており、そのアミノ酸配列中には mitochondria carrier family に特徴的なドメインが保存されていた。作製した *cocA* 破壊株 DCOCA-1 は、WU-2223L 株と比較してグルコースを炭素源とする最少寒天培地での培養において生育の遅延が観察された。また、この生育の遅延はクエン酸などの有機酸を炭素源とした寒天培地上においても確認された。さらに、クエン酸生産条件下での培養では、12 日間で WU-2223L 株のクエン酸生産量 が 63 g/L に達するのに対して、DCOCA-1 株のそれは 23 g/L であり、著しく減少していることを確認した。以上より、*cocA* の破壊が *A. niger* における生育とクエン酸の高生産に関与していることを明らかにした。*cocA* 破壊株の性質は、リンゴ酸-クエン酸輸送体遺伝子（*ctpA*）破壊株[2)]のそれと大きく異なる。本研究は、クエン酸生産糸状菌 *A. niger* のクエン酸の高生産に関与する有機酸輸送体遺伝子を明らかにした初の報告である。

1) K. Kobayashi *et al.*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **41**, 749-756 (2014).
2) 小林 慶一, 他, 2015 年度日本生物工学会大会講演要旨集, p. 291 (2015 年).

*Aspergillus niger*, citrate transport protein, citric acid production

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

発表番号：4F121
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Burkholderia* sp. 5-2 株が有する L-glycerate 代謝経路の L-glycerate dehydratase の解析

Analysis of L-glycerate dehydratase involved in L-glycerate catabolism of *Burkholderia* sp. 5-2.

○根岸 真衣子[1]、中村 顕[2] ([1]筑波大生命環境科学研究科、[2]筑波大生命環境系)
○Maiko Negishi[1], Akira Nakamura[2] ([1]Grad. Sch. Life. Environ. Sci. , Univ.of Tsukuba, [2]Fac. Life. Environ. Sci. , Univ.of Tsukuba)

【目的】糖には鏡像異性体である D 体と L 体が存在するが、地球上のほぼ全ての生物が代謝可能な糖は D 体に偏っている。このような糖代謝のホモキラリティーが生じた起源はいまだに不明である。この起源の解明を目指して、本研究室では L-glucose 資化菌の単離とその代謝経路の解明を行った。この代謝経路では、L-glucose は L 体のまま代謝されず、途中で D 体に変換されて、最終的に D-グリセルアルデヒド-3-リン酸(D-G3P)へと代謝される。D-G3P は D-glucose の代謝中間体であるのに対して、L-G3P は大腸菌に対する生育阻害が報告されていることから、生物は光学活性を示す最小単位である C3 化合物の代謝でもホモキラリティーを示すと考えられる。さらに化学進化説では、生命誕生以前に純粋な化学反応により C3 化合物が生じ、C3 化合物が縮合して六炭糖が生じたとされている。この過程で生じた化合物はラセミ体であったと考えられ、C3 化合物の方が六炭糖よりも進化的起源が古いと考えられる。以上のことから、糖代謝のホモキラリティーの起源を解明するには、C3 化合物について検討する必要があると考えた。そこで本研究では、L 体の C3 化合物である L-グリセリン酸(L-GA)資化菌の探索とその代謝経路の解明を目的とした。なお、D-GA の代謝経路は複数報告があるが、L-GA の代謝についての報告は現在までにないため、新奇な代謝経路の発見も期待される。
【結果と考察】初めに、L-GA を単一炭素源とする最少培地(MM)を用いて集積培養を行い、筑波大学構内の土壌から L-GA 資化菌候補株として 5-2 株を分離した。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、5-2 株は *Burkholderia* 属に属することが示された。次に L-GA 代謝経路の解明のため、初発反応酵素を精製した。精製酵素と L-GA の反応産物を HPLC で解析した結果、反応産物はピルビン酸であったため、本酵素は L-GA を脱水してピルビン酸へと変換する L-GA dehydratase (L-gaD)であることが明らかとなった。また、5-2 株を D-glucose MM, D-glucose MM +L-GA or D-GA で培養し、菌体破砕液中の L-gaD 活性を測定した結果、L-GA が培地中に存在する時のみ、L-gaD 生産が誘導されることが示された。続いて精製 L-gaD の部分アミノ酸配列を元に、PCR 法によりゲノム上の L-gaD 遺伝子を同定した。その結果、L-gaD 遺伝子は 5-2 株と同属の *B. terrae* のゲノム情報より見いださされ推定 galactarate dehydratase (galD：WQE_08037)遺伝子とほぼ一致したが、組換え L-gaD は galactarate とは反応せず、逆に酵素活性が報告されている大腸菌 galD (L-gaD との相同性は 31%)は galactarate とは反応するが L-GA とは反応しなかった。また、L-gaD は D-GA に対しても活性を示すが($k_{cat}/K_m$＝60 $sec^{-1}$ $M^{-1}$)、L-GA に対して特に高い反応効率と特異性を示す($k_{cat}/K_m$＝$2.7\times10^5$ $sec^{-1}$ $M^{-1}$)ことを明らかにした。さらに L-gaD は、L-GA と類似の構造を持つ C4 から C6 の化合物 7 種類とは反応しなかった。以上のことから L-gaD が L-GA に対して高い基質特異性を有していることが明らかになった。

L-glycerate metabolism, *Burkholderia*, L-glycerate dehydratase

発表責任者：根岸真衣子（mnegneg97@gmail.com）

発表番号：4F122
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 液体クロマトグラフ質量分析計を用いた培養上清成分一斉分析手法の開発とその応用

# Simultaneous analysis of cell culture supernatant using liquid chromatography-mass spectrometry and its application

○豊田 健一[1]、氏本 貴仁[2]、平丸 大介[1]、鈴木 崇[1]、中西 豪[1]、大津 厳生[2] ([1]島津製作所 分析計測事業部、[2]奈良先端大・バイオ)
○ Kenichi Toyoda[1], Takahito Ujimoto[2], Daisuke Hiramaru[1], Takashi Suzuki[1], Tsuyoshi Nakanishi[1], Iwao Ohtsu[2] ([1]Anal. Meas. Inst. Div. Shimadzu Corp., [2]Grad. Sch. Biol. Sci., NAIST)

発酵における有用物質や抗体医薬品の生産性向上を目的として，遺伝子組換えによる有用株の探索や培養プロセスの最適化が実施されている。培養経過に伴う培地成分や分泌代謝物の変化を連続的にモニタリングすることは，変異導入が代謝経路に与える影響の理解を補足するとともに，培養条件の最適化に有用な情報を与えることが期待される。そこで，液体クロマトグラフ質量分析計を用いた培地成分および分泌代謝物の一斉分析手法の開発を行った。開発した分析手法は，培地成分および主要分泌代謝物の計 95 成分を 17 分で一斉分析することが可能であるという特長を有する。
本発表では，大腸菌 BW25113 の野生株とラクトースオペロンの調節因子の一つである CRP（cAMP receptor protein）の欠損変異株をモデルとし，培養に伴う培養上清成分の変化を比較検討した。その結果，変異株では野生株と比較してグルコースやいくつかのアミノ酸の消費速度の低下が観察され，CRP 遺伝子の欠損により細胞増殖速度が低下するという表現型と良く一致していた。一方で，変異導入による培地成分の消費速度に顕著な変化が認められない化合物も複数認められた。また，野生株，変異株とも培養上清中にクエン酸回路の代謝成分を複数検出することができた。さらにこれらの成分がグルコース枯渇の前後において大きく変動したことが観察された。以上のように，変異導入によって培地成分の消費量や分泌代謝物の産生量に変化が生じることを確認した。よって，本手法と細胞内メタボローム解析を組み合わせることで，変異導入が代謝経路に与える影響についてより理解が進むと期待できる。

Simultaneous analysis, Bioprocess, Liquid chromatography-mass spectrometry

発表責任者：豊田 健一（tkenichi@shimadzu.co.jp）

発表番号：4F123
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 吟醸酒品質優劣と極性代謝物及びタンパク質プロファイルはどう関係するか?

# Different Polar Metabolites and Protein Profiles between High- and Low-quality Japanese Ginjo Sake

○高橋 圭、河野 弘美 (酒総研)
○Kei Takahashi, Hiromi Kohno (NRIB)

【背景と目的】

吟醸酒は､精米歩合 60%以下に高度に搗精した米を用い低温で発酵させた清酒(日本酒)であり、果物のリンゴのような香りと雑味の少ない洗練された味わいを特徴とする。その一方で、吟醸造りは絶妙な技術を必要とするため何らかの理由でオフフレーバーが発生した場合には、吟醸酒の品質に致命的な欠陥をもたらす。近年、海外における吟醸酒の需要が高まってきていること等の背景から、吟醸酒の品質の分析・管理はこれまで以上に注目されるようになってきているが、吟醸酒品質・オフフレーバーと極性成分プロファイルとの関連性については、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、吟醸酒品質・オフフレーバーと吟醸酒極性成分との関連性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

（方法１：CE-TOFMS による極性代謝物網羅的解析）吟醸酒は、平成 22 酒造年度新酒鑑評会出品酒(成績上位酒 7 点、オフフレーバー指摘酒 6 点：合計 13 点)を用いた。官能評価データには、鑑評会の 5 段階評価点数及び指摘数を用い、定量的記述分析(QDA)データ及び Check-All-That-Apply(CATA)データとした。CE-TOFMS でアニオンモードとカチオンモードで分析し、主な成分については定量分析を行なった。統計解析には、JMP10.0.2 を用いた。（方法２：タンパク質解析）吟醸酒に等量のアセトンを混合し、一晩-80℃に静置し、タンパク質を沈殿させ、その後 SDS-PAGE し、タンパク質を解析した。

【結果】

吟醸酒から 200 以上の極性代謝物が確認された。まず、ヒートマップから極性代謝物総量は、いくつかの低品質吟醸酒で多いことが分かった。解糖系・クエン酸回路の化合物、アミノ酸・グルタチオン・補酵素関連化合物の含有パターンに、吟醸酒の品質と高い相関が確認された。また、オフフレーバーのうち、脂肪酸臭と相関する化合物は、中鎖脂肪酸関連化合物・メチオニン再生経路関連化合物であり、不調和苦味と相関が高い化合物は、多くのアミン類であった。極性代謝物総量の上昇は醸造微生物からの漏出によるものと考え、タンパク質プロファイルを解析すると、低品質吟醸酒に特徴的に見られるタンパク質を見出し、清酒酵母由来の解糖系に関与するタンパク質と同定した。

metabolomics, rice wine, quality

発表責任者：高橋圭（k.takahashi@nrib.go.jp）

発表番号：4F124
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# NMR メタボリックプロファイリングを利用した野菜ジュース中における乳酸菌の発酵特性解析

# NMR-based metabolic profiling of vegetable juices fermented by lactic acid bacteria strains

○冨田 理、齋藤 勝一、中村 敏英、蔦 瑞樹、関山 恭代、亀山 眞由美（農研機構・食総研）
○ Satoru TOMITA, Katsuichi SAITO, Toshihide NAKAMURA, Mizuki TSUTA, Yasuyo SEKIYAMA, Mayumi KAMEYAMA (NARO, Nat. Food Res. Inst.)

【背景・目的】 NMR メタボリックプロファイリング法は，試料の NMR スペクトルを混合系のまま測定し，多変量解析によって網羅的に重要成分を探索する手法である．試料調製の簡便さやスペクトル再現性の高さといった NMR 法の利点を活かし，試料の特性に相関する成分を迅速に絞り込める．本研究では乳酸菌の発酵食品を想定したモデル試料に本手法を適用した．乳酸菌は漬け物や味噌・醤油など日本の発酵食品に幅広く含まれその品質を左右するだけでなく，食品に多岐にわたる保健機能性を与える有益かつ重要な微生物である．食品製造へ乳酸菌を活用するには目的に応じた特性を有する菌株を見出し、適切に利用することが求められる．しかし用いられる食品原料の成分組成は複雑であり，複数の炭素源や制菌物質等の存在，また塩や pH など，乳酸菌が活動する環境には多要素が存在する．このような混合系における発酵特性を包括的に捉えることは容易ではない．そこで市販の野菜ジュースをモデル試料として NMR メタボリックプロファイリングを適用し，発酵に伴う食品成分の動態や乳酸菌株の発酵特性の違い，またそれらの相関性についての情報が得られるか検討を行った．
【方法と結果】モデル試料として市販の野菜ジュース 5 種類(いずれも数十種類の野菜と果物を原料とする)を選択した．供試菌株には，*Lactobacillus plantarum* などホモ乳酸発酵菌の 3 種 4 菌株と，ヘテロ乳酸発酵菌のうち *L. brevis* を主とした 2 種 8 株を選択した．前培養したこれらの菌株をジュースに接種し，30℃で 3 日間，1 週間，3 週間静置で発酵させた．そしてこの発酵物の遠心上清を $^{1}$H-NMR スペクトル測定に供し，バケット積分によりデータセット(232 変数，195 試料)を作成して多変量解析を実施した．まず全試料を主成分分析(PCA)に供したところ，PC1 にホモ乳酸発酵菌とヘテロ乳酸発酵菌のクラス分離がみられ，発酵形式が最大の要素であることが確認された．ジュース間の特徴差は次いで PC2 に現れた．次にジュースごとに PCA を行ったところ，主に発酵の進行度を反映するクラス分離が観察され，発酵速度に菌株間の相違があることが示された．このとき *L. brevis* 菌株のうち，特定のジュース中で顕著に異なる発酵特性を示した菌株が認められた．この結果を基に NMR スペクトルを個別に比較したところ，それらの菌株は複数種類含まれる炭素源の消費傾向や，マンニトールの生産量が他菌株と異なっていた．全体としては，菌種・菌株間で有機酸類・アミノ酸類・その他微量成分の消長についても異なることが確認された．アノテーションされた 37 成分のほか未同定の 39 シグナルにも消長に差がみられ，混合系における各菌株の発酵特性の違いが現れた．以上の結果により本手法は食品材料中における乳酸菌株の発酵特性の解析に有効であると考えられた．

Metabolomics, Lactic acid bacteria, Fermentation

発表責任者：齋藤 勝一（k.saito@affrc.go.jp）

発表番号：4F125
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ジアセチル低生産性酵母の育種

# Breeding of sake yeast with low productivity of diacetyl

○山口 泰広、高橋 俊成、末野 和男（菊正宗酒造総研）
○Yasuhiro YAMAGUCHI, Toshinari TAKAHASHI, Kazuo SUENO (Kiku-masamune)

【背景・目的】

清酒において品質を損なうとされるオフフレーバーの一つに「ジアセチル臭」と呼ばれるものがある。これはヨーグルトやチーズのような乳製品様、もしくはムレたような臭いと形容される。昨今開発が盛んになっている低アルコール清酒であるが、その製造方法によってはジアセチル臭が発生する恐れがある。ジアセチルは酵母のαアセト乳酸合成酵素（ALS）によって 2 分子のピルビン酸から生合成される 1 分子のαアセト乳酸が非酵素的に分解されることで生じる。つまりジアセチルの前駆体である α アセト乳酸の生成を抑制することができればジアセチル臭の少ない清酒を醸造できると考えた。そこで、ALS をコードする遺伝子 *ILV2* の破壊株を作製し、この遺伝子破壊によって低アルコール清酒醸造におけるジアセチル臭発生の危険性を低下させることが明らかとなったので報告する。また破壊株の表現型をもとにジアセチル低生産酵母のスクリーニング方法を確立したのであわせて報告する。

【方法・結果】

ジアセチルの定量は、醪上清を 40℃で 24 時間静置することにより、αアセト乳酸をジアセチルに変換し、GC/MS を用いて総ジアセチル量（ジアセチル生成ポテンシャル）を測定した。このジアセチル生成ポテンシャルは上槽後に発生しうるジアセチルの最大量を示すことになる。

実験室酵母 *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 株を親株として、*ILV2* 領域に *HIS3* マーカーを挿入して破壊した株を用いて総米 200 g の小仕込みを行ったところ、破壊株では親株と比べてジアセチル生成ポテンシャルが 30%にまで低下していた。次に清酒酵母 UT-1 株（きょうかい酵母 K701 のウラシル・トリプトファン要求性変異株）を親株として、*ILV2* 領域に *URA3* または *TRP1* マーカーを挿入して破壊した株を作製し、総米 200 g の小仕込みを行ったところ、*ILV2* 破壊株では K701 と比べてジアセチル生成ポテンシャルが 25%にまで低下していた。*ILV2* 破壊株の生育特性を調べたところ、スルホニルウレア系の薬剤クロリムロンエチルに耐性を示すことおよびバリン・イソロイシン要求性を示すことが明らかとなった。そこで、これらの生育特性を示す変異株を育種することにし、菊正宗嘉宝蔵の醪より分離された清酒酵母 Km67 株よりジアセチル生成ポテンシャルが低下した株を取得することに成功した。現在、この変異株の醸造特性を解析中である。

*Saccharomyces cerevisiae*, diacetyl, acetolactate synthase

発表責任者：山口 泰広（y-yamaguchi@kikumasamune.co.jp）

発表番号：4F126
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂質蓄積性出芽酵母形質転換株における糖新生と脂質蓄積の制御

# Modulation of gluconeogenesis and lipid accumulation in oleaginously engineered *Saccharomyces cerevisiae*

○神坂 泰[1]、木村 和義[1]、植村 浩[1]、Ledesma-Amaro Rodrigo[1,2]（[1]産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門、[2]サラマンカ大学）
○Yasushi KAMISAKA[1], Kazuyoshi KIMURA[1], Hiroshi UEMURA[1], Rodrigo Ledesma-Amaro[1,2]
([1]Bioproduction Res Inst, AIST, [2]Universidad de Salamanca)

【目的】我々は、出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いて脂質蓄積機構の解明及び油脂生産系の構築をめざしている。これまでに、出芽酵母の貯蔵脂質合成酵素ジアシルグリセロールアシルトランスフェラーゼである Dga1p の N 末端領域が欠失すると活性型になり、この N 末端欠失 Dga1p（Dga1ΔNp）を *dga1* 破壊株に過剰発現させると、脂質含量 45%の脂質蓄積性株が得られることを見出した。さらに、この *dga1* 形質転換株では、*DGA1* に隣接する遺伝子であるヒストンアセチル基転移酵素をコードする *ESA1* の発現低下が脂質蓄積に重要であることを見出した。この形質転換株では、非発酵性の炭素源である 2%グリセロール/乳酸での増殖が低下しており、Esa1p が糖新生の律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ(PEPCK)（Pck1p）をアセチル化して、活性化するという報告と考え合わせると、Esa1p の機能低下により、Pck1p を介して糖新生が低下したために増殖が低下したと推測された。今回は、この *dga1* 破壊株由来の脂質蓄積性株での糖新生と脂質蓄積の制御の関係について、さらに検討を行った結果を報告する。

【方法及び結果】まず、*pck1* 破壊株に Dga1ΔNp を過剰発現させた形質転換株に、Pck1p あるいは Esa1p を発現した株を作製し、2%グリセロール/乳酸で培養したところ、Pck1p を発現した株でのみ増殖したことから、Esa1p が Pck1p を介して糖新生を亢進させていることが確認された。また、10%グルコースで培養した時の in vitro PEPCK 活性を測定したところ、Dga1ΔNp を発現させた *dga1* 破壊株では、野生株に比べて顕著に低下するのに対し、この株に Esa1p あるいは Pck1p を過剰発現させると PEPCK 活性が増加し、グルコース培養においても、同様の糖新生の低下が起こることが確認された。しかしながら、*pck1* 破壊株に Dga1ΔNp を過剰発現させた形質転換株を 10%グルコースで培養しても、脂質含量の増加は認められず、糖新生の低下だけでは脂質蓄積しないことも明らかになった。一方、*dga1* 破壊由来形質転換株に、Δ９不飽和化酵素 Ole1p を過剰発現させたところ、グリセロール/乳酸での増殖が顕著に改善された。*dga1* 破壊株では、パルミトオレイン酸/オレイン酸比が増加しており、Ole1p の過剰発現でオレイン酸が増加することが、増殖の改善に寄与していると考えられた。そこで、培地中にオレイン酸あるいはパルミトオレイン酸を添加して、グリセロール/乳酸での増殖を調べたところ、オレイン酸では増殖を改善したが、パルミトオレイン酸添加ではむしろ増殖のラグを遅らせることが見いだされ、細胞中の脂肪酸組成がグリセロール/乳酸での増殖に影響していることが示された。以上の結果から、*dga1* 破壊脂質蓄積性株では、Esa1p の発現低下によって、PEPCK 活性が低下するとともに、パルミトオレイン酸含量が増加することが、糖新生及び脂質蓄積の制御に関与していることが示唆された。

lipid production, Saccharomyces cerevisiae, gluconeogenesis

発表責任者：神坂　泰（kamisaka.y@aist.go.jp）

発表番号：4F127
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Thermococcus kodakarensis* での ATPase 高発現により水素生産の細胞増殖依存性は部分的に解除される

# Overexpression of an ATPase in *Thermococcus kodakarensis* results in partial uncoupling of $H_2$ production from cell growth

○金井 保[1,2]、Simons Jan-Robert[1,2]、別府 春樹[1]、今中 忠行[2,3]、跡見 晴幸[1,2]（[1]京大院工、[2]JST, CREST、[3]立命館大, 総合科研）
○Tamotsu KANAI[1,2], Jan-Robert Simons[1,2], Haruki Beppu[1], Tadayuki Imanaka[2,3], Haruyuki Atomi[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, [3]Ritsumeikan Univ.)

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* はピルビン酸やマルトデキストリンを栄養源に生育し、代謝産物として $H_2$ を排出する。本菌の $H_2$ 生産は、菌体増殖に依存した一次代謝であることが知られている。本研究では *T. kodakarensis* における細胞増殖非依存的な $H_2$ 生産系の構築を目指し、細胞質における ATPase 高発現株を構築した。ATPase の細胞質内での高発現により、菌体の ATP の利用効率が減少し、それを補うために代謝 flux（水素生産反応を含む）が向上することが予想される。実験には、ATPase ドメイン を含む ATP synthase の細胞質ドメインの遺伝子群を、*T. kodakarensis* KU216 株のキチナーゼ遺伝子(*chiA*)部位に導入した（KUA-PF 株）。KU216 株と比べて KUA-PF 株では、$H_2$ 生産量は僅かに減少したものの、細胞収量は大きく減少したことから、KUA-PF 株の細胞あたりの $H_2$ 生産量は増加した。また KUA-PF 株では、菌体あたりのピルビン酸やマルトデキストリンの消費量も向上した。この結果は、細胞質内での ATPase の高発現によって、$H_2$ 生産における細胞増殖依存性が、部分的とはいえ解除されたことを表す。

hydrogen production, hyperthermophile, ATPase

発表責任者：金井保（kanai@sbchem.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F128
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

協会系酵母と系統が異なる清酒酵母の醸造特性

The brewing characteristics of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae* Km67 which is different genetic lineages of sake yeast *S. cerevisiae* Kyokai no. 7 group.

○高尾 佳史[1]、高橋 俊成[1]、赤尾 健[2]、五島 徹也[2]、磯谷 敦子[2]、福田 央[2]、末野 和男[1]([1]菊正宗酒造総研、[2]酒総研)

○Yoshifumi TAKAO[1], Toshinari TAKAHASHI[1], Takeshi AKAO[2], Tetsuya GOSHIMA[2], Atsuko ISOGAI[2], Hisashi FUKUDA[2], Kazuo SUENO[1] ([1]Kiku-masamune, [2]NRIB)

【背景と目的】

現代の清酒醸造において使用される酵母の大半は日本醸造協会より頒布されている協会系酵母であるが、自社の蔵より分離した酵母を始め、様々な場所から分離された酵母を用いた醸造も全国で行われている。協会系酵母は優れた発酵性を有する反面、ストレス応答欠損により、実はストレス耐性が弱いことが報告されている。そこで、我々は菊正宗酒造(株)嘉宝蔵より分離され、今なお醸造に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* Km67 株の醸造特性およびストレス耐性を協会系酵母と比較することにした。

【方法と結果】

協会系酵母（K6、K7、K9、K10 及びこれらの派生株）には、特徴的な DNA 配列または構造を有する 3 つの遺伝子（*MSN4*、*RIM15*、*PPT1*）が存在することが知られており、協会系酵母の判別マーカーとして利用可能であると提唱されている。Km67 株についてこれらの遺伝子の DNA 配列を調べたところ、そのような変異は認められなかった。そこで、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行い、系統解析を行ったところ、Km67 株は協会系酵母とは別の系統群に分類されることが明らかとなった。

Km67 株は協会系酵母とは系統が異なるため、ストレス耐性に違いがあるか調べることにした。協会系酵母の泡なし株を対照として、Km67 株の熱ストレス耐性およびエタノールストレス耐性試験を行ったところ、いずれのストレスにおいても Km67 株は対照と比較して高耐性であることが認められた。

Km67 株および協会系酵母の泡なし株を用いて総米 1 kg の小仕込み試験を行ったところ、アルコール発酵性に大きな違いは認められなかった。生成酒について味認識装置での分析を行ったところ、Km67 株では「酸味」「苦味雑味」「塩味」が強かった。そこで、官能評価を行ったところ、Km67 株では酸味と濃淡が強い傾向が見られ、これは味認識装置の分析結果とも一致すると考えられた。さらにアミノ酸分析、有機酸分析、親水性低分子化合物を対象とした網羅的解析を行ったところ、Km67 株はアミノ酸ではアルギニンが多い、有機酸ではリンゴ酸や乳酸が多い、親水性低分子については 2-Methylglutarate が多いなどの特徴が見られ、協会系酵母とはクラスターが分かれた。

以上の結果より、Km67 株は協会系酵母とは遺伝的に異なる系統であり、ストレス耐性能や生成酒の酒質の面からも異なる特徴を有する酵母であることが明らかとなった。

*Saccharomyces cerevisiae*, sake yeast, stress tolerance

発表責任者：高尾佳史（y-takao@kikumasamune.co.jp）

発表番号：4F129
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 油脂酵母 *Lipomyces* のスクリーニング指標とした脂肪球と油脂生産との相関

# Relationship between oil globule of screening index in yeast *Lipomyces* and oil production

○柳場 まな、松本 美穂、長沼 孝文（山梨大・院）
○Mana YANAGIBA, Miho MATSUMOTO, Takafumi NAGANUMA (Yamanashi Univ.)

【背景と目的】　我々は、低価値再生可能資源からバイオディーゼル燃料の微生物生産を目指している。この研究では、低価値再生可能資源(炭素源)から油脂を高生産できる菌株のスクリーニングは極めて重要である。スクリーニングにおいては多数の再生可能資源と多数の菌株および幾つかの培養温度の組み合わせが必要である。このような多数系列での実験を迅速、簡便かつ低コストで行うにはどのような手法を用いれば良いのか考えた結果、対象酵母とした *Lipomyces* の最大の特長である菌体内脂肪球に着目することにした。この脂肪球は光学顕微鏡下で明瞭に観察できることから、体積を算出し油脂生産の指標としてスクリーニングを行った。脂肪球体積を定量的な油脂生産量や対糖油脂変換効率との比較に用いるのは困難であるため、脂肪球体積を菌体の油脂生産能力とみなせることを確認し、この値を用いて脂肪球体積が持つ油脂生産の意味を解析した。

【方法】　①脂肪球体積：顕微鏡写真を用い、直径を測定しこれをもとに体積($4\pi r^3/3$)を算出した。②油脂生産能力：一定数の菌数をガラスビーズで摩砕し油脂を抽出して臨床検査用 TG 定量キットを用いて油脂量を測定した。測定値から[Oil mg/$10^8$cells]を算出した。③油脂生産量：一定量の培養液中に存在する菌体から油脂を抽出し油脂量を測定した。測定値から[Oil g/ℓ(培養液)]を算出した。④対糖油脂変換効率：菌体が生産した油脂量と消費した糖量を求め[油脂生産量 (g/ℓ)／消費糖量 (g/ℓ)×100]を算出した。⑤油脂抽出の容易性：ガラスビーズを用いて、所定の時間および強度で摩砕して菌体から漏出してくる油脂量を測定した。この値が高い菌株を抽出容易性に優れているものとした。

【結果と考察】　脂肪球体積は菌体油脂生産能力[Oil mg/$10^8$cells]として表せられることがわかった。

油脂生産量[Oil g/ℓ]は[油脂生産能力(Oil mg/$10^8$cells)×培養液当たりの菌数(cells/mℓ)]で表されるが、油脂生産能力と油脂生産量との関係、菌数と油脂生産量との関係を比較したところ油脂生産能力の方が油脂生産量には強く影響することがわかった。油脂生産能力は対糖油脂変換効率[油脂生産量(g/ℓ)／消費糖量(g/ℓ)×100]とも関係があり、糖の利用にも生産能力は影響することが示唆された。

脂肪球が大きな菌は顕鏡などの際に菌体外に油脂が漏出しやすい兆候がみられた。そこで物理的な摩砕における強度と脂肪球体積すなわち油脂生産能力との関係を調べた。その結果、油脂生産能力の高い菌の方が油脂の菌体外への漏出は簡単に起こったことから油脂が多量に蓄積されることで脂肪球膜の強度が弱められてしまっている可能性が推定された。この現象を利用することで *Lipomyces* 油脂を BDF として利用する過程で、これまで難しかった油脂抽出が容易になる可能性が示された。

screening of *Lipomyces*, oil globule, oil production

発表番号：4F130
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アミノ酸高蓄積酵母 101H を用いた泡盛の酒質評価

# Flavor analysis of Awamori fermented with by 101H

○塚原 正俊[1]、伊波 朋哉[1]、塚原 恵子[1]、大城 彩音[1]、鼠尾 まい子[1]、新里 修一[2]、外山 博英[3]、渡辺 大輔[4]、高木 博史[4] ([1]バイオジェット、[2]新里酒造、[3]琉球大・亜熱生資、[4]奈良先端大・バイオ)

○Masatoshi TSUKAHARA[1], Tomoya IHA[1], Keiko TSUKAHARA[1], Ayane OSHIRO[1], Maiko NEZUO[1], Shuichi SHINZATO[2], Hirohide TOYAMA[3], Daisuke WATANABE[4], Hiroshi TAKAGI[4] ([1]BioJet, [2]Shinzato-Shuzo, [3]Univ. of the Ryukyus, [4]NAIST)

【目的】

我々は、沖縄県の伝統的蒸留酒「泡盛」について酒質のバラエティー化や付加価値向上を目指した様々な取り組みを進めている。泡盛は、黒麹菌を用いた全麹仕込みで醸造されることから、もろみのクエン酸濃度が高く低pHである。さらに、発酵中にもろみは高温、エタノール濃度の上昇、高浸透圧など複合的なストレス環境下にある。泡盛酵母は、このような環境のもろみ中で効率的にアルコール生成を行うと共に、泡盛が良好な香味バランスとなる特性が求められる。一方、泡盛を含む酒類の香気成分として知られる酢酸イソアミルとその前駆体であるイソアミルアルコールは、主にロイシンの生合成に依存して生成される。我々は、泡盛醸造に広く用いられている101号酵母を親株としてロイシンを高蓄積する株の育種を行い、本変異株を醸造に応用することで泡盛の多様化を目指した。

【方法・結果】

101号酵母を親株として、ロイシンを高蓄積する変異株18-T55を得た。得られた18-T55は、実験室規模で泡盛中のイソアミルアルコール量を親株と比較して30-50%程度増加させること、本育種株はロイシンによるフィードバック抑制に関与する*LEU4*遺伝子の変異を有することを確認した。さらに、101号酵母および18-T55を用いて5tスケールの実機醸造を行った。発酵条件は通常の101号酵母と同一条件とした。蒸留は、泡盛醸造で広く用いられている常圧蒸留または減圧蒸留としてそれぞれを比較した。得られた泡盛は、フラッシュGCノーズHERACLES IIを用いた香気成分の測定を行った。

18-T55を用いた発酵過程については、アルコール生成など醸造指標に大きな問題は無く、親株である101号酵母の良好な特性を引き継いでいることが確認された。また、蒸留液の香気成分についてはイソアミルアルコールおよび酢酸イソアミルが実機規模においても増加することが確認された。さらに、香気成分の網羅的な分析を行ったところ、常圧蒸留および減圧蒸留ともに101号酵母と比較して成分バランスが変化したことが確認された。一方、官能評価においても101号酵母と明確に差別化できることを確認した。このように、18-T55を用いた実機規模での泡盛醸造、醸造特性および酒質評価を行い、実際に泡盛醸造に利用可能であることが確認され、本育種株を「101H酵母」と命名した。本酵母を用いた泡盛が新里酒造より商品化された。

Awamori, yeast, flavor

発表責任者：塚原正俊（tsuka@biojet.jp）

発表番号：4F131
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 油糧微生物 *Mortierella alpina* の標的遺伝子破壊による希少脂肪酸生産

# Production of rare fatty acids in oil-producing fungus *Mortierella alpina* by using gene-targeted disruption

○菊川 寛史 [1]、櫻谷 英治 [1,2]、安藤 晃規 [1,3]、小川 順 [1,3] ([1] 京大院農・応生、[2] 徳島大院・ソシオ、[3] 京大・生理化学)
○Hiroshi Kikukawa[1], Eiji Sakuradani[1,2], Akinori Ando[1,3], Jun Ogawa[1,3] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Inst. Technol. Sci., Tokushima Univ., [3]Res. Uni. Physiol. Chem., Kyoto Univ.)

【背景】

近年、様々な生理機能を有する高度不飽和脂肪酸（PUFA）が注目され、医薬原料や機能性食品として利用されている。しかし、PUFA の供給源は天然資源に依存しており、微生物による安定生産法の開発が期待されている。我々は油糧微生物 *Mortierella alpina* において生合成酵素遺伝子の過剰発現や RNAi を用いた代謝改変によって PUFA の生産性向上を報告してきた。また、*M. alpina* の非相同組換え機構を欠損させることで、標的遺伝子の効率的な破壊系を構築した。

本研究では、標的遺伝子破壊系を利用してジホモ-γ-リノレン酸（DGLA）をアラキドン酸へと変換する Δ5 不飽和化酵素（Δ5DS）をコードする遺伝子を破壊することで、DGLA 生産株の構築を試みた。また、ω9 脂肪酸を ω6 脂肪酸へと変換する Δ12 不飽和化酵素（Δ12DS）をコードする遺伝子を破壊することにより、ω9 脂肪酸であるミード酸（20:3ω9）を生産する株の取得も試みた。

【方法・結果】

相同組換えを介した Δ5DS 遺伝子破壊用コンストラクトを作製し、ウラシル要求性を指標に形質転換を行った。得られた株を GY 液体培地（Glucose 2%, Yeast extract 1%）にて培養後、菌体内総脂肪酸をガスクロマトグラフィー（GC）にて分析した。結果、アラキドン酸生産を伴わずに DGLA 生産を示す株を 50%の効率で取得した。得られた破壊株の DGLA 生産性は 900 mg/L（総脂肪酸中の含有率 40%）に達し、化学変異剤にて取得した Δ5DS 遺伝子欠損株よりも高い DGLA 生産性を示した。

上記と同様に Δ12DS 遺伝子破壊用コンストラクトを作製し、ウラシル要求性を指標に形質転換を行った。得られた株を GY 液体培地にて培養後、菌体内総脂肪酸を GC 分析に供した。その結果、ω6 脂肪酸群の生産を伴わずにミード酸等の ω9 脂肪酸群を蓄積する株を 23%の効率で取得した。得られた破壊株のミード酸生産性は 134 mg/L（総脂肪酸中の含有率 8.4%）に達し、化学変異剤にて取得した Δ12DS 遺伝子欠損株よりも高いミード酸生産性を示した。

*Mortierella alpina*, metabolic engineering, fatty acid desaturase

発表番号：4F132
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 醤油用麹菌 *Aspergillus sojae* KBN1340 株由来酸性ホスファターゼ（AsAphA）の酵素学的性質

# Characterization of acid phosphatase (AsAphA) from *shoyu koji* mold, *Aspergillus sojae* KBN1340

○安田（吉野） 庄子、小野 奈津子、長谷川 摂、間野 博信（あいち産科技総セ・食工技セ）
○Shoko YOSHINO-YASUDA, Natsuko ONO, Osamu HASEGAWA, Hironobu MANO (Food Res. Center, Aichi-Inst)

【目的】醤油や料理酒などの液状醸造食品では、加工・流通・保存の過程でオリ（沈殿物や濁り）が発生し問題となることがある。オリ原因物質のひとつであるフィチンは、大豆や米などの植物原料に存在するリン貯蔵物質で、通常は醸造中に分解されるが、残存するとフィチンオリの発生原因となりうる。これまでの*Aspergillus oryzae*由来酸性ホスファターゼ（以下AoAphと呼ぶ）の研究から、フィチンオリの発生はフィターゼ活性を有するAoAphAが熱失活しやすいことに起因すると考えられた。一方、*Aspergillus sojae*のフィターゼは *A. oryzae*のフィターゼよりも熱安定性が高いと考えられているが、詳細は不明である。そこで本研究では、*A. sojae*の推定フィターゼAsAphAの高生産、精製および酵素学的性質の解析を行った。

【方法および結果】BLAST検索により、*A. sojae* NBRC4239株のゲノム情報から*AoaphA*遺伝子と非常に相同性の高い遺伝子を見出し、*AsaphA*遺伝子と命名した。*A. sojae* KBN1340株の染色体DNAを鋳型としてPCRにより*AsaphA*遺伝子断片を取得した。*A. sojae* KBN1340株の*AsaphA*遺伝子は68 bpの1個のイントロンを含む1,470 bpから成ると推定され、*A. sojae* NBRC4239 株の配列と100%一致した。*AsaphA*遺伝子産物の酵素学的性質を明らかにするために、*A. oryzae* によるAsAphAの分泌生産を試みた。*A. oryzae*由来*taaG2*遺伝子プロモーターの下流に*AsaphA*遺伝子を連結した高発現ベクター、pTAAsaphAを構築し、宿主*A. oryzae* PDE1（*pyrG*$^{-}$, *alp*$^{-}$）に導入した。得られた高生産株の培養液から、イオン交換クロマトグラフィーによりAsAphAを精製した。AsAphAの分子量は約58.0～65.0 kDaで、不均一な糖鎖の付加が示唆された。AsAphAの至適pHは4.5、至適温度は40°Cであった。pH安定性は酸性域で広く、温度安定性は35°C以下と、AoAphAと同程度の温度安定性を示した。AsAphAの基質特異性を調べたところ、グルコース6リン酸に対して最も高い脱リン酸活性を示し、二番目にフィチン酸およびα-グリセロリン酸に対して高い活性を示した。次に、醸造におけるAsAphAとAoAphAの機能の差異を調べるため、*A. oryzae* P4株（*pyrG*$^{-}$）を宿主としてAsAphA高生産株およびAoAphA高生産株を作出し、これらの株を用いてフラスコ醤油麹を作製した。両株のフィターゼ活性値は、いずれも対照株の700倍以上となった。現在、麹に食塩水を加えた諸味のフィターゼ活性の推移を解析している。

本研究は「公益財団法人内藤科学技術振興財団 平成 27 年度研究助成」の一環として実施した。

*Aspergillus sojae*, acid phosphatase, phytase

発表責任者：安田（吉野）庄子（shiyouko_yasuda@pref.aichi.lg.jp）

発表番号：4F133
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Lactobacillus.sakei* YK20 株中の脂肪酸ヒドロキシラーゼの役割に関する研究

Roles of the fatty acid hydroxylase in *Lactobacillus.sakei* YK20

○近藤 彩夏、長田 彩加、金内 誠、石田 光晴（宮城大食産）
○Ayaka KONDO, Ayaka NAGATA, Makoto KANAUCHI, Mitsuharu ISHIDA (Miyagi Univ.)

[目的]

醸造分野において、γ-ラクトンはモルトウイスキー中の甘い香気成分として知られている。ラクトンは発酵工程において、原料中のオレイン酸等の不飽和脂肪酸を乳酸菌がヒドロキシ脂肪酸へ変換し、続いて酵母がβ-酸化を行うことで生成される。一方、共役脂肪酸変換乳酸菌は、遊離脂肪酸を中間体としてヒドロキシ脂肪酸へ変換した後、最終的に共役化する。しかし、その他の乳酸菌におけるヒドロキシ脂肪酸の役割は明らかとなっていない。自然界から分離された *Lactobacillus sakei* YK20 株は、オレイン酸等のヒドロキシ脂肪酸への変換率が約 90%と高かった。また、乳酸菌中の酵素がヒドロキシ脂肪酸生成に関与していることを明らかにし、脂肪酸ヒドロキシ化酵素(FAHase)遺伝子の塩基配列を特定した。その結果、細胞膜中の表層タンパク質である NlpC/P60 superfamily の一部であることが明らかとなった。乳酸菌はストレス条件下において細胞膜中の脂肪酸組成を変化させることで生体機能を維持することが報告されているが、FAHase 及びヒドロキシ脂肪酸の関与は不明である。そこで本研究では、乳酸菌中の FAHase による機能性を遺伝子工学的に検討し、ヒドロキシ脂肪酸へ変換する微生物学的意義について分子生物学的手法を用いて明らかにすることとした。

[方法]

乳酸菌は、*L. sakei* YK20 株及び *L. sakei* 標準株を使用した。特定された FAHase 遺伝子中にネオマイシン耐性遺伝子を挿入し、FAHase 遺伝子欠失プラスミドベクターpNXaUC を得た。*Escherichia coli* DH5α に形質転換後、FAHase 遺伝子破壊領域を pHY300PLK シャトルベクターに組み込んだ pLKNHa20 を作製し、YK20 株へ相同組換えを行った。乳酸菌粗酵素液は、MRS 培地で 16 時間、30℃前培養後、YP 培地で 18 時間、30℃培養した菌体を回収し、PBS(-)buffer(pH7.0)に懸濁した。ガラスビーズとともに 1 時間破砕し、遠心分離で得られた上清を粗酵素液とした。

[結果]

*L. sakei* YK20 株は、オレイン酸を含む培地において細胞膜中にヒドロキシ脂肪酸が検出され、15%エタノールへの耐性を持った。また、pLKNHa20 より得られたΔFAHAK-20 株との比較より、FAHase 遺伝子の有無によるアルコールや金属等のストレスへの影響が見られた。また、脂肪酸添加条件下においては、脂肪酸取り込みによる脂肪酸組成変化が見られ、FAHase のストレス耐性への関与が明らかとなった。

Lactic acid bacteria, Enzyme, Hydroxylation

発表番号：4F134
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 新規 MOA レダクターゼ A (MorA) を高発現させた麹菌を用いて製造した清酒の成分分析。
# Component analysis of Japanese sake prepared by the MorA-overexpressing strain.

○栗本 真希[1]、山本 竜也[1]、岡部 夏海[1]、望月 麻衣[1]、船越 吾郎[2]、安田（吉野） 庄子[2]、三井 俊[2]、村野 宏達[1]、志水 元亨[1]、加藤 雅士[1] ([1]名城大農、[2]あいち産業技総セ・食工技セ)
○Maki KURIMOTO[1], Tatsuya YAMAMOTO[1], Natsumi OKABE[1], Mai MOCHIZUKI[1], Goro FUNAKOSHI[2], Shoko YASUDA-YOSHINO[2], Shun MITSUI[2], Hirotatsu MURANO[1], Motoyuki SHIMIZU[1], Masashi KATO[1] ([1]Meijo Univ., [2]Food Reserch Center, Aichi Center for Industory and Science Techonology.)

【目的】

清酒の代表的な香気成分としてカプロン酸エチルや酢酸イソアミルなどが知られている。これらは酵母単独で生合成できるため、それらの生産能を高めた酵母の育種は盛んに行われている。一方、清酒の香気増強に重要なロイシン酸エチルについては酵母単独で生合成できないことが明らかになっている。ロイシン酸エチルの生成機構として麹菌 *Aspergillus oryzae* により、ロイシンがロイシン酸へと変換され、さらに酵母の作用によってロイシン酸エチルが生成される事が報告されている。しかしながら、これまで *A. oryzae* においてロイシンからロイシン酸の生合成に関与する酵素についての知見はなかった。最近、本研究室において、ロイシン酸の前駆体と考えられた 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する *A. oryzae* 由来の新規酵素 MOA レダクターゼ A （MorA）を発見した（Shimizu M et al. (2015) *Appl. Microbiol. Biotechnol*. in press)。さらに、MorA を高発現させた麹菌（MorA OE 株）を作製した。本研究では、MorA OE 株を利用して、清酒の小仕込み試験を行い、製造した清酒のロイシン酸エチルおよび各成分について LC-MS/MS、GCMS を用いて分析した。

【方法・結果】

MorA を高発現させた醸造用麹菌 KBN8243 （MorA OE 株）を作製し、 Czapek-Dox 培地で培養後、それぞれの株のロイシン酸の生産量を LC-MS/MS にて定量したところ、麹菌 KBN8243 株（親株）と比較して、 MorA OE 株ではロイシン酸を 125 倍多く生産していた。そこで、 KBN8243 株および MorA OE 株を用いて日本酒の小規模醸造試験を行った。製造した清酒を濃縮後、 LC-MS/MS にてロイシン酸エチルの生産能量を定量した。その結果、KBN8243 株を用いて製造したものと比べて、MorA OE 株を用いて製造した清酒では、ロイシン酸エチル含有量が 6.3 倍多かった。これらのことから、 MorA OE 株を用いて清酒を製造するとロイシン酸エチル含量が多い清酒を製造できることが明らかとなった。しかしながら、 KBN8243 株 と MorA OE 株を用いて製造した清酒の香りが大きく異なっていたこと、 MorA がいくつかの 2−ケト酸を基質にできることから、 MorA OE 株 ではロイシン酸エチル以外の 2−ケト酸の生産にも違いがあることが考えられた。そこで現在 LC-MS/MS および GCMS を用いて製造した清酒の成分分析を進めている。

*Aspergillus oryzae*, MOA reductase, Ethyl leucate

発表番号：4F135
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

泡盛麹菌 *Aspergillus luchuensis* 由来フェノール酸脱炭酸酵素の諸性質と誘導条件
Induction and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Aspergillus luchuensis*
○眞榮田 麻友美[1]、渡嘉敷 正司[2]、渡嘉敷 みどり[2]、伊藤 進[1]、平良 東紀[1]([1]琉大農、[2]石川種麹店)
○Mayumi Maeda[1], Masashi Tokashiki[2], Midori Tokashiki[2], Susumu Ito[1], Toki Taira[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Ishikawatanekojiten)

【目的】泡盛は米を原料として黒麹菌 *Aspergillus luchuensis* を用いて製麹した麹を酵母によって発酵させ，得られたもろみを蒸留し製造される沖縄の伝統的な蒸留酒である。3 年以上貯蔵された泡盛は古酒と呼ばれる。泡盛の古酒の特徴香と知られているバニリンは，泡盛の原料である米から遊離されたフェルラ酸（FA）がもろみ発酵中に酵素的に 4-ビニルグアヤコール（4-VG）へ変換され，貯蔵中に非酵素的酸化によって生成されることが知られている。もろみ発酵中の FA から 4-VG への変換は，酵母または乳酸菌等のフェノール酸脱炭酸酵素（PAD）によるものだと考えられてきた。一方、*A. kawachii* のゲノムに，細菌および *Candida* 属由来の PAD と相同性を有する配列が存在する。本研究では，*A. kawachii* の近縁種である泡盛麹菌 *A . luchuensis* の FA から 4-VG への変換活性を調べ，*A . luchuensis* の PAD（AlPAD）候補遺伝子の cDNA クローニングを行い，リコンビナント AlPAD を精製し，その諸性質について調べた。
【方法】有限会社石川種麹店より分与いただいた *A. luchuensis* var. awamori ISH1 株（以下，*A. luchuensis* ISH1）を供試菌株として用いた。誘導実験は米ぬか 1%を含む合成培地で行った。対象としてグルコース含有合成培地を用いた。*A. luchuensis* ISH1 からの PAD 遺伝子の cDNA クローニングは，米ぬか培地で培養した菌体より抽出した total RNA と *A. kawachii* のゲノム情報を基に設計したプライマーを用いた RT-PCR 法によって行った。AlPAD の発現はベクターとして pET22b 職種として大腸菌 BL21(DE3)を用いた。FA および 4-VG の定量は RP-HPLC にて行った。
【結果】グルコース含有培地に対して米ぬか含有培地では約 5 倍の変換活性を示した。また，培養時間に伴い変換活性が高くなっていることが確認された。得られた AlPAD cDNA の配列解析結果，AlPAD は細菌類や *Candida guilliermondii* の PAD と比較して N 末端側に挿入配列があること，*A. kawachi* の PAD とは 1 アミノ酸のみ異なっていることがわかった。大腸菌により発現させた精製リコンビナント AlPAD の分子サイズは SDS-PAGE では 19.4 kDa, ゲル濾過では 35.6 kDa と算出されたことから AlPAD はホモダイマーであることが示唆された。熱安定性は 50℃, 1 時間処理後も 100%の活性を保持し，最適温度は 40℃だった。pH 安定性は pH 4.2～9.6 の範囲で 18 時間処理後もほぼ 80%以上の活性を保持し，最適 pH は 5.5 付近だった。また，本酵素は *p*-クマル酸，フェルラ酸，カフェイン酸の順に分解活性が高いことが分かった。これらの結果から，泡盛もろみ中の FA から 4-VG への変換の一部は泡盛麹菌によって行われている可能性が示唆された。

*Aspergillus luchuensis*, Phenolic acid decarboxylase, Awamori

発表番号：4F136
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酢酸菌ファージを利用した染色体組み込み型ベクターの開発

# Development of chromosomal integration vector in acetic acid bacteria by utilizing bacteriophage

○小俣 行輝[1]、日比 徳浩[2]、中野 繁[2]、天野 昭一[1]、上田 賢志[1]、高野 英晃[1]（[1]日大生資科、[2]株式会社 Mizkan Holdings 中央研究所）
○Koki OMATA[1], Naruhiro HIBI[2], Shigeru NAKANO[2], Shoichi AMANO[1], Kenji UEDA[1], Hideaki TAKANO[1] ([1]Nihon Univ., [2]Central Research Institute, Mizkan Holdings Corporation)

【経緯と目的】前大会において、我々は酢酸菌 *Acetobacter pasteurianus* NBRC109446 株に由来する溶原性ファージを発見したことを報告した。また、同株の染色体とファージゲノムの全塩基配列を解読し、プロファージ領域を特定するとともに、そのキュアリング株を取得することに成功した。本研究では、この溶原性ファージの特性を利用して染色体組み込み型ベクターを作製することを通じて、酢酸菌を宿主とする汎用性の高い遺伝学的ツールを構築することを目的とした。
【方法と結果】プロファージおよび宿主ゲノムの配列を解析したところ、プロファージ領域の両末端に 19 bp からなる同一配列が存在していた。また、プロファージが完全に除去されたキュアリング株においては、本配列は 1 コピーのみ存在していた。このことから、本配列はファージが宿主ゲノム上に組み込む際に認識する attachment (*att*) site であることが強く示唆された。ファージゲノム上には部位特異的組み換えを触媒するインテグラーゼの遺伝子がコードされていた。したがって、ファージゲノムの溶原化は、インテグラーゼが感染ファージの *attP* と宿主 *attB* 間の部位特異的組み換えを触媒することで起こることが予想された。そこで、本ファージを利用した染色体組み込み型ベクターの構築を試みた。まず、ファージゲノム上の *attP* および*インテグラーゼ遺伝子*を含む DNA 断片を、酢酸菌で自律複製しない pUC 系プラスミド（*アンピシリン耐性遺伝子*を含む）に挿入した。次に、本ベクターをエレクトロポレーション法で *A. pasteurianus* の親株およびキュアリング株の細胞に導入し、アンピシリンを用いて形質転換体を選抜した。その結果、キュアリング株では多数の形質転換体が出現した一方、親株では形質転換体は得られなかった。PCR 法を用いた試験により、本ベクターは予想通りキュアリング株の *att* site に組み込まれていることが確認された。以上の結果から、溶原性ファージとそのキュアリング株を利用することで染色体組み込み型の遺伝子クローニング系が構築できることが明らかになった。そこで次に、キュアリング株を効率的に取得する手法を検討した。ネガティブ選択マーカーとして知られる*レバンスクラーゼ遺伝子 sacB* を、*A. pasteurianus* 親株のプロファージ領域中に相同組み換えによって導入した。次に、本組み換え株のマイトマイシン C 処理培養液からスクロース耐性を示すコロニーを 146 株単離して調査したところ、2 株のキュアリング株が含まれていることが判明した。本法は、従来法に比べ 16 倍以上の高い効率でキュアリング株を取得可能とする有効な手法であると考えられた。以上を多様な酢酸菌ファージに適用し改良を重ねることを通じて、より汎用性の高いベクターが構築できるものと予想している。

*Acetobacter pasteurianus*, chromosomal integration vector, prophage

発表責任者：高野英晃（takano.hideaki@nihon-u.ac.jp）

発表番号：4F137
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Mortierella capitata* を用いた極長鎖モノ不飽和脂肪酸ネルボン酸の発酵生産

# Fermentative production of monounsaturated fatty acid nervonic acid by *Mortierella capitata*

○夏原 千怜[1]、川見 直也[2]、竹村 玲亮[2]、倉田 淳志[2]、濱口 翔平[3]、梅本 宏樹[3]、塚原 智[3]、石黒 隆[3]、岸本 憲明[2] ([1]近畿大院農、[2]近大農、[3]ミヨシ油脂株式会社)
○ Chisato Natsuhara[1], Naoya Kawami[2], Ryousuke Takemura[2], Atsushi Kurata[2], Shouhei Hamaguhi[3], Hiroki Umemoto[3], Satoshi Tsukahara[3], Takashi Ishiguro[3], Noriaki Kishimoto[2] ([1]Kinki Univ Graduate school, [2]Kinki Univ, [3]MIYOSHI OIL & FAT CO)

【目的】 ネルボン酸（*cis*-C24:1、ω-9）はヒトの脳の白質に多く含まれる極長鎖モノ不飽和脂肪酸で、脱髄疾患の治療薬に用いられている。また、メタボリックシンドロームの危険因子である超悪玉コレステロール（sdLDL-C）やトリグリセリドの濃度と血清中のネルボン酸濃度は逆相関関係にあることが、 反対に善玉コレステロール（HDL-C）濃度とは正の相関関係にあることが報告され、ネルボン酸はメタボリックシンドロームの予防に効果があると期待されている。

ネルボン酸は植物の種子から抽出されているが、生産量が少なく供給が安定していない。そこで、ネルボン酸を生産する微生物を探索して、ポテトデキストロース培地でネルボン酸を 125 mg/L 生産する *Mortierella capitata* RD000969（969 株）を取得した[1)]。本研究では、ネルボン酸を高生産する培養条件の検討と、ネルボン酸高生産変異株の取得を目的とした。また、得られた変異株と野生株で発現量が異なる遺伝子を探索した。

【方法・結果】 PG 培地に菌を接種し 28℃、140 rpm で 7 日間フラスコ培養し、凍結乾燥菌体から脂質蓄積量とネルボン酸を定量した。培養条件を検討した結果、ペプトンと酵母エキスの種類、撹拌速度、グルコースと酵母エキス濃度が 969 株の生育とネルボン酸生産量に影響を与えることを見出した。また、ジャー・ファーメンター培養では培養液の発泡が激しく、全菌体の 67%が培養液表層に凝集した。そこで油脂を添加すると、発泡とネルボン酸生産量の低い凝集菌体の発生をともに抑制することができた。

969 株に NTG 処理と UV 照射して変異株を 493 株得た。変異株 M209 と M324 株のネルボン酸生産量は、野生株より高かった。とくに M324 株はフラスコ培養で撹拌速度を 140 から 215 rpm に高めると、M209 株や野生株より良好に生育し、凍結乾燥菌体の 53%の脂質を蓄積した。また、M209 株は全脂肪酸に占めるネルボン酸の割合が最も高かった（10%）。そこで、野生株と M209 株で発現量が異なる遺伝子を探索したところ、M209 株では脂質合成関連遺伝子の発現量が増加していた。現在までに最適化した培養条件でフラスコ培養すると、M431 株が 883 mg/L のネルボン酸を生産した。

1) H. Umemoto *et al.*, J. Oleo Sci., 63(7), 671-679 (2014).

Nervonic acid, *Mortierella capitata*, Fermentative production

発表番号：4F138
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 清酒醸造におけるグアイアコール（4-VG 様フェノール臭原因物質）の生成

# Formation of guaiacol; a causative compound for the 4-vinylguaiacol-like phenolic odor, in the sake brewing

今野 真人[1]、伊藤 俊彦[1]、志村 洋一郎[1]、渡邉 誠衛[2]、高橋 仁[2]、○橋爪 克己[1]（[1]秋田県大、[2]秋田県総合食品研究センター）

Mahito Konno[1], Toshihiko Ito[1], Toichiro Shimura[1], Seiei Watanabe[2], Hitoshi Takahashi[2], ○Katsumi Hashizume[1] ([1]Akita Prefectural Univ., [2]Akita Res. Inst. for Food & Brewing)

【目的】発表者らは清酒のフェノール様異臭原因成分としてグアイアコールを見出し、清酒の官能的品質に影響を及ぼす可能性を明らかにした[(1)]。グアイアコールは果汁飲料の細菌汚染時に生成する異臭成分として知られているが、ワインやビール中にも存在し、その由来が研究されている。一方、清酒醸造過程におけるグアイアコールの生成については知見がないため検討を行った。

【実験材料および方法】①グアイアコールレベルが高い清酒の製造場を含む 4 製造場 8 点の米麹試料の揮発性フェノール化合物含有量を GC-MS により測定した。同時に米麹の抽出・濃縮成分を HPLC で分画し、TMS 化後 GC-MS 分析することにより揮発性フェノール化合物を生じると考えられるフェノール酸を同定し、続いてそれらの含有量を HPLC により測定した。②YSG 液体培地と同寒天プレート培地を用いて分離操作を行い、米麹試料中からグアイアコールを生成する微生物を分離し、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく同定を行った。③3 株の分離微生物について YSG 液体培地に各種フェノール化合物（10mg/L）を添加して 30℃、1 日間培養し、添加化合物の変化を調べた。④3 株の分離微生物について YSG 液体培養時のエチルアルコール濃度と pH の影響を調べた。

【結果】①全ての米麹試料から 4-ビニルグアイアコール（4-VG）、4-ビニルフェノール（4-VP）、4-エチルフェノール（4-EP）を検出した。うち 1 点の試料のみが高いグアイアコールおよび 4-VG レベルを示した。また、全ての試料中にフェルラ酸（FA）、*p*-クマル酸、バニリン酸（VA）、*p*-ヒドロキシ安息香酸および *p*-ヒドロキシフェニル酢酸を見出した。②4 点の麹試料から VA をグアイアコールに変換する微生物 9 株を分離した。9 株のうち 6 株は *Bacillus* 属、3 株は *Staphylococcus* 属細菌と同定した。③分離した *Bacillus* 属 2 株、*Staphylococcus* 属 1 株について、各種フェノール化合物の変換能を調べたところ、3 株ともに VA→グアイアコールおよび FA→4-VG への変換能を示した。一方、シリンガ酸の変換については差異が見られた。④3 株について清酒醸造過程に見られるエチルアルコール濃度および pH が増殖と VA からのグアイアコール生成に及ぼす影響を調べたところ、*Bacillus* 属 2 株は 5%エチルアルコールでも増殖し高いグアイアコール生成を示し、また、pH4 以下では 3 株ともに増殖とグアイアコール生成が抑制された。

参考文献(1)　平成 27 年度日本醸造学会大会講演要旨集

sake brewing, guaiacol, microbial contaminant

発表責任者：橋爪克己（hashizume@akita-pu.ac.jp）

発表番号：4F139
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 次世代 DNA シーケンサーを利用した清酒酵母のエタノール発酵力の QTL 解析

# QTL analysis of sake yeast using a next generation DNA sequencer

○渡部 保容[1]、山田 美和[1]、赤尾 健[2]、下飯 仁[1] ([1]岩手大・農、[2]酒総研)
○Yasutaka WATANABE[1], Miwa YAMADA[1], Takeshi AKAO[2], Hitoshi SHIMOI[1] ([1]Iwate Univ., [2]NRIB)

【目的】
清酒酵母は *Saccharomyces cerevisiae* に分類されるが、同種の他の菌株に比べて清酒もろみにおいて高濃度のエタノールを生産することが知られている。清酒酵母の高い発酵力の原因遺伝子を探索する目的で、我々は以前、清酒酵母と実験室酵母の交配株のセグレガント 100 株についてマイクロサテライトマーカーを用いた量的遺伝子座（QTL）の解析を行った[1)]。今回は、さらに高い解像力で QTL 解析を行う目的で、セグレガントの中で高い発酵力を示した 10 株のゲノム DNA をプールして次世代シーケンサーを用いた解析を行った。

【方法】
清酒酵母きょうかい 7 号の一倍体と実験室酵母一倍体の交配二倍体株の胞子形成によって得られた 100 株の一倍体から[1)]、清酒小仕込後のエタノール濃度が高い上位 10 株と低い下位 10 株を選択した。上位 10 株をそれぞれ培養し、等量の菌体を混合してゲノム DNA を抽出した（上位 10 株プール）。下位 10 株プール、親株 2 株についてもゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA のシーケンス解析には、イルミナ社の HiSeq 2500 を用いた。得られたリードを S288C ゲノムにマッピングし、ゲノム配列に対する清酒酵母型のアレル頻度をプロットした。

【結果】
上位 10 株プールで清酒酵母型のアレル頻度が高い領域には、清酒酵母の高発酵力に関与している QTL が存在すると考えられるが、そのような領域の一つに第 VI 染色体 70 kb 付近の領域があった。この領域には個別遺伝子の解析によって清酒酵母の発酵力に関与していることが知られている *RIM15* が存在した。清酒酵母の *RIM15* は変異により機能を欠損しているが、その結果、ストレス感受性ではあるが高い発酵力を示すことが知られている。また、第 XIII 染色体の 350 kb 付近では、上位 10 株プールの清酒酵母型アレル頻度が低く、下位 10 株プールのアレル頻度が高かった。このことは、清酒酵母のこの領域に発酵力にマイナスに作用する変異が存在していることを示しており、興味深い。

現在は、きょうかい 7 号の半数体 100 株から選抜した発酵力上位 8 株に関しても、次世代シーケンサーを用いた QTL 解析を行っている。

1) Katou et al. J. Biosci. Bioeng. **107** 383 (2009)

※本研究は、2014 年度「野田産研研究助成」により行った。

Sake Yeast, QTL, Next Generation Sequencer

発表責任者：下飯　仁（simoi@iwate-u.ac.jp）

発表番号：4F140
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 清酒酵母の接合型ホモ株の作成とそれを利用した交配育種

# Making homozygous mating type strain of sake yeast and its application in breeding

○長谷川 悠太[1]、山田 美和[1]、赤尾 健[2]、下飯 仁[1] ([1]岩手大・農、[2]酒総研)
○Yuta Hasegawa[1], Miwa Yamada[1], Takeshi Akao[2], Hitoshi Shimoi[1] ([1]Iwate Univ., [2]NRIB)

【目的】

現在使われている清酒酵母の多くは、きょうかい 6 号、7 号、9 号、10 号とそれらを親株として育種した菌株であり、系統的にきわめて近縁であることが知られている（１）。本研究では、清酒酵母の多様性を増す目的で、系統の異なる清酒酵母を二倍体のままで交配し、得られた雑種四倍体を胞子形成させることで多様な二倍体を育種することを試みた。従来の清酒酵母の交配育種では、まず親株を胞子形成させて一倍体を作成し、一倍体同士を交配していた。しかし、清酒酵母は一般に胞子形成能が低く、一倍体の取得は容易ではない。また、清酒酵母はヘテロザイガスな二倍体であるので、一倍体では形質分離による多様性が生じ、多数の一倍体から交配に使用する菌株を選抜する必要があった。本研究では、UV 処理により親株の接合型を変換して接合型がホモの二倍体株を作成し、接合型の異なる二倍体同士を接合させることとした。得られた四倍体を減数分裂させて得られる二倍体セグレガントでは、染色体の組換えと分配が生じるので、多様な遺伝子型と表現型を持つ二倍体が生じることが期待できる。

【方法と結果】

清酒酵母の接合型ホモ株（*MAT*a/*MAT*a または *MAT*α/*MAT*α）は、UV 処理で Loss of heterozygosity (LOH) を誘導することで作成した。接合型ホモ株の選抜には、a-factor または α-factor 感受性株を散布した培地を用い、阻止円を生じた株を分離した。以上の方法により、きょうかい 701 号（K701）及びきょうかい 5 号（K5）から *MAT*a/*MAT*a および *MAT*α/*MAT*α の菌株を取得した。接合型の確認は、標準株との接合実験と *MAT* 座の PCR によって行った。生存率の大きな減少を生じないような微弱な UV 処理でも、十分な頻度の接合型ホモ株が得られた。取得した接合型ホモ株同士を混合して培養することで、四倍体株を作成した。得られた株の倍数性はフローサイトメーターで DNA 量を測定することで確認した。K701 および K5 はどちらも胞子形成能が低いが、作成した K701×K5 四倍体は十分な胞子形成能を持ち、四分子解析により多数の二倍体セグレガントを得ることができた。現在は、得られたセグレガントの清酒醸造特性やその他の形質について検討中である。K701×K701 や K5×K5 でも接合が生じたので、本方法は様々な清酒酵母の交配育種にも応用できると考えられる。

（１）赤尾健：化学と生物 **52**, 223 (2014)

sake yeast, tetraploid, segregant

発表番号：4F141
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 生乳・漬物・赤ワイン滓由来の乳製品用乳酸菌の単離・同定・機能性評価

# Isolation, identification, and characterization of dairy lactic acid bacteria from raw milk, pickles, and dregs of wine

○根来 雄哉、高屋 朋彰（小山高専物質）
○Yuya NEGORO, Tomoaki KOUYA (NIT. Oyama Col.)

【背景・目的】栃木県は生乳生産量全国第 2 位の畜産県である．しかし，コスト高・採算性の問題や後継者不足，生産業者の減少などから，全国の酪農家戸数は 1 年間当たり約 1,000 戸ずつ減少している．さらに，輸入乳製品との価格競争や家畜飼料価格の高騰などの理由から国内の生乳生産量も減少し続けている. その一方で, 昨今では生乳消費拡大の観点からナチュラルチーズが注目を集めており, 生産量はここ 20 年で 1.6 万 t 増加している．本研究では，栃木県の地域特産品からチーズ製造に利用できる微生物を分離し，その安全性・機能性を評価した.

【方法】分離源として県北地域のウシ生乳，漬物，および赤ワイン滓を用いた．乳酸菌の分離用培地として MRS 培地および MRS 寒天培地を用いた. 寒天培地には, サンプル中のグラム陰性細菌やカビ, 酵母の増殖を抑制するためのアジ化ナトリウム，シクロヘキシミド，および酸の産生を検出する $CaCO_3$ を添加した．乳酸菌の選別・同定は，HPLC を用いた乳酸生産量の測定，X-gal を用いた乳糖分解酵素（β―galactosidase）生産能の判別，リトマスミルクを用いた乳タンパク質の酸凝固性評価，血液寒天培地を用いた安全性評価，および 16S rDNA 解析による微生物の同定を行った．また，選別した乳酸菌について，冷蔵（4℃）・冷凍（-18℃）条件下における保存性評価，および人工胃液・人工腸液への曝露試験による生残性評価を行った.

【結果・考察】本研究では，ウシ生乳，漬物，赤ワイン滓から 14 菌株の乳酸菌を単離することに成功した．これらの乳酸菌から，酸凝固性を示した植物性分離源由来の ONCT 6002 株と ONCT 6009 株を用いて，冷蔵・冷凍条件下における保存性評価を行った．その結果，ONCT6002 株は冷蔵条件において 8 週目の生残性が検出限界以下まで低下したのに対し，冷凍条件では 56%の乳酸菌が生存した．一方，ONCT 6009 株は冷蔵条件における 8 週目の生残性が 7.1%，冷凍条件では,生残性が 1.4%であった．この結果， ONCT 6002 株および ONCT 6009 株のいずれの菌株も保存期間における生残性の低下は確認されたが，8 週間の冷凍保管が可能であることが明らかとなった．人工胃液と人工腸液を用いた胃酸・胆汁酸耐性を評価した結果，ONCT 6009 株は人工胃液に曝露（3 h）した後の生残性が 24%となり, 胃酸耐性があることが示唆された. また, 人工胃液に曝露した ONCT 6002 株および ONCT6009 株をさらに人工腸液に曝露（7 h）した結果，生残性が 48～50%まで増加したことから，人工胃液中で減少した乳酸菌の生残性は人工腸液中で回復することが示唆された.

lactic acid bacteria, dairy products, dregs of wine

発表番号：4F142
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 上面発酵酵母の発酵特性解析

# Fermentation character analysis of top-fermenting yeast

○高橋 沙織、稲留 弘乃、太田 拓、吉崎 成洋、善本 裕之（キリン・酒類研）
○ Saori TAKAHASHI, Hironori INADOME, Taku OTA, Shigehiro YOSHIZAKI, Hiroyuki YOSHIMOTO (Res. Lab. for Alcoholic Beverage Tech., Kirin Co. Ltd.)

【背景】

上面発酵ビール酵母は、下面発酵ビール酵母に比べバラエティーに富んだ香味特徴を有している。キリン社では､上面発酵ビール酵母及び下面発酵ビール酵母を合わせたビール醸造用酵母を約 800 株、ビール以外の醸造酵母（清酒、ワイン、ウイスキー等）を約 300 株、合計約 1,100 株を保有しており、商品コンセプトに応じて酵母を使い分けている。バラエティーに富んだ上面発酵ビール酵母の発酵特性を把握し、特徴的な香味を醸成できる酵母株を選ぶこと、更には、その株の特徴を最大限引き出す最適発酵条件を見つけ出すによって、多様な香味特徴を持つビール類醸造への応用が期待できる。

【方法・結果】

我々は、上面発酵ビール酵母の発酵特性を評価するために、自社保有の 200 株以上の上面発酵ビール酵母について、ラボスケールで発酵試験を実施し、それぞれの株の発酵や香味の特性の評価を行った。発酵終了後にエステル、有機酸、4-ビニルグアイアコール(略して 4-VG 、燻製様やスパイス様の特徴的な香りの主因である)、糖の資化性や酵母の凝集性等を評価し、それらの分析値等の解析から上面発酵ビール酵母をいくつかのクラスターに分類した。これらの中で、4-VG の生成能に関して、遺伝子レベルの解析(SNP 解析)と発酵試験の両面から解析を実施した。その結果、SNP 解析により、4-VG の生成能の判別が可能だった。更に、4-VG 生成能がある株の中で、4-VG の生成に影響を及ぼす発酵条件として発酵温度、酵母添加量等を精査した結果、発酵温度が 4-VG の生成量に重要な影響を及ぼす要因の一つであることを明らかにした。これらの知見を活用し、酵母の違いとその最適な発酵条件との組合せによって、多様な香味特徴を持つビール類の開発へ繋げて行きたい。

brewer's yeast, top-fermenting yeast, fermentation character

発表番号：4F143
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# カプロン酸エチル高生産性かつ遺伝的安定性を持つ自然発生的セルレニン耐性酵母の分離

# Isolation of the spontaneous cerulenin-resistant sake yeast with both ethyl caproate-high productivity and normal genetic stability

○田村 博康[1]、岡田 啓希[3]、久米 一規[2]、五島 徹也[4]、中村 諒[1]、赤尾 健[4]、下飯 仁[5]、水沼 正樹[2]、大矢 禎一[3]、平田 大[1,2] ([1]朝日酒造・研究開発、[2]広島大・先端研、[3]東大・新領域・先端生命、[4]酒総研、[5]岩手大)

○ Hiroyasu TAMURA[1], Hiroki OKADA[3], Kazunori KUME[2], Tetsuya GOSHIMA[4], Ryo NAKAMURA[1], Ken AKAO[4], Hitoshi SHIMOI[5], Masaki MIZUNUMA[2], Yoshikazu OHYA[3], Dai HIRATA[1,2] ([1]Asahi Sake Brewing Co., Ltd., [2]AdSM, Hiroshima Univ., [3]Univ. Tokyo, [4]NRIB, [5]Iwate Univ.)

【目的】近年、大吟醸酒に代表される高品質清酒醸造では、多くの酒造場において、カプロン酸エチル高生産性を持つセルレニン耐性清酒酵母が使用されている。清酒酵母の遺伝的安定性は、酵母の醗酵特性（アルコール、香気成分、有機酸などの生成能）および製成酒の品質の安定維持に極めて重要であると考えられる。真核生物の遺伝的安定性は、チェックポイント機構により保障されるが、現在のところ、清酒酵母での本機構の完全性については未解析である。

今回、我々は、一般的に使用されている清酒酵母の遺伝的安定性を調査した。その結果、チェックポイント機構が部分的に不完全なものがあった。そこで、カプロン酸エチル高生産性かつ遺伝的安定性を持つ自然発生的セルレニン耐性酵母の単離を試み、これに成功した[1)]。

【方法・結果】（１）新潟県醸造試験場の保有清酒酵母（G9 株）から、以下の３段階のスクリーニングにより、カプロン酸エチル高生産性を持つ自然発生的セルレニン耐性酵母を単離した。一次スクリーニングでは、自然発生的（変異剤未処理）セルレニン耐性株を 3056 株、分離した。二次スクリーニングでは、分離株の培養液中での遊離脂肪酸濃度を測定し、14 株の遊離脂肪酸高生産性酵母を分離した（栗林ら：特開 2012−231751）。三次スクリーニングでは、分離株の *FAS2* 遺伝子（Fatty Acid Synthase α subunit）の DNA 塩基配列を調べ、カプロン酸エチル高生産性を持つ Fas2-G1250S 株を 1 株、分離した（以降 G9CR 株）。（２）分離した G9CR 株の遺伝的安定性を調べた結果、研究室酵母の野生株や親株と同様、チェックポイント機構の機能は正常であることが判明し、さらに、この結果は、CalMorph を用いた細胞形態のロバストネス解析によっても支持された。（３）G9CR 株の優れた醗酵特性および製成酒の品質を、工業規模（総米 600 ㎏）の醗酵試験により確認した。

1) Tamura H. *et al., Biosci. Biotechnol. Biochem*., 79, 1191-1199 (2015)

cerulenin-resistance, spontaneous mutant, genetic stability

発表番号：4F144
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# イオンビームによる耐熱性乳酸生産糸状菌の Xylose 発酵変異株の構築およびリグノセルロースからの同時糖化発酵への応用

# Construction of xylose-fermentable mutant by ion beam from thermotolerant lactic acid producing fungi and its application to simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose

○山下 聖樹[1]、高野 真希[2]、畑下 昌範[3]、星野 一宏[2] ([1]富大工、[2]富大院理工、[3]若狭湾エネ研)
○Satoki YAMASHITA[1], Maki TAKANO[2], Masanori HATASHITA[3], Kazuhiro HOSHINO[2] ([1]Univ. Toyama, [2]Grad. Univ. Toyama, [3]WERC)

【目的】石油化学製品の原料である化石燃料の枯渇問題から、バイオリファイナリー技術の開発が急務となっている。その一つとして未利用リグノセルロースからバイオプラスチックの原料となる乳酸生産法の開発が求められている。*Rhizopus oryzae* は Glucose などの糖類を基質とした乳酸生産が可能であり、特に *R.oryzae* NBRC 5384 株は乳酸生産能が高い菌株である。しかし、Xylose を基質にした場合、乳酸生産能が低い。一般にリグノセルロースからの乳酸生産を行う際、Cellulose および Hemicellulose を加水分解すると Glucose のみならず Xylose も生成される。リグノセルロースを効率よく乳酸へ変換するには、Xylose からの乳酸生産能の向上が必要である。そこで本研究では 5384 株に対し変異範囲が広く、変異頻度の高いイオンビームを照射し、Xylose 発酵能を向上させた耐熱性変異株の取得を試みた。さらに、この菌株を用いてリグノセルロースの同時糖化発酵(SSF)による乳酸生産について検討を行った。

【方法・結果】本研究では *R.oryzae* NBRC 5384 株を使用した。変異誘導はこの株の分生子にカーボンイオンビームを 2,500 Gy で照射することで行った(若狭湾エネルギー研究センター)。照射後の分生子は Xylose を基質とした液体培地に 40℃で静置培養し、増殖した 112 株を変異株として取得した。これら変異株に対して Xylose 50 g/L、pH 調整のため $CaCO_3$ 50 g/L を含む液体培地で振盪培養を行い、安定して乳酸生産能が高い 5384M 株を得た。親株を 40℃で Glucose 120 g/L あるいは Xylose 50 g/L を基質として振盪培養した結果、144 h で乳酸生産量はそれぞれ 58.6 g/L、0.02 g/L であった。一方、5384M 株はそれぞれ 27.9 g/L、14.7 g/L の乳酸を生産した。5384M 株は親株と比較して Glucose からの乳酸生産能が低下したものの、Xylose からの乳酸生産能が大幅に向上した。このイオンビーム照射変異法によって、Xylose からの乳酸発酵能が向上した耐熱性変異株を獲得できた。現在、変異株の Xylose 代謝酵素の活性について検討中である。さらに本変異株とセルラーゼ剤を用いて、Hemicellulose の含有量が高いリグノセルロースである竹粉(1 mm 以下)を基質とし 5384M 株で 40℃における SSF を実施した。この際、竹粉の加水分解に適したセルラーゼ剤(セルラーゼ T、オノズカ 3S、ペクチナーゼ、ノボザイムを 1:1.5:0.5:0.5、3.5 g-protein/L)を使用した。その培養の結果、100 g/L の竹(Cellulose 38.7 %、Hemicellulose 30.1 %)から 48 h で乳酸 17.6 g/L 生産することができた。

ion beam, *Rhizopus*, lactic acid

発表責任者：星野一宏（khoshino@eng.u-toyama.ac.jp）

発表番号：4F145
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 清酒に含まれるチオールの解析

# Analysis of thiols in Japanese sake

○飯塚（古川） 幸子、磯谷 敦子、藤井 力 (酒総研)
○Sachiko IIZUKA(FURUKAWA), Atsuko ISOGAI, Tutomu FUJII (NRIB)

【背景と目的】近年、全国新酒鑑評会出品酒に、マスカット様、ライチ様あるいは柑橘様の香りの指摘がみられるが、これにはワインやビールで報告されているアロマティックチオールの関与が考えられる。アロマティックチオールの一つである 4-mercapto-4-methylpentan-2-one（4MMP）はソーヴィニオンブランワインの特徴香成分として知られており、清涼でグリーン感のある香りを有する。当所では、黄桜株式会社との共同研究により、これまでに 4MMP の清酒醪中での挙動[1)]や、ワインで 4MMP 前駆体と報告されているシステイン抱合体とグルタチオン抱合体の清酒原料及び清酒醪中での挙動[2)]について明らかにした。今回は、全国新酒鑑評会に出品された清酒に含まれるチオールについて解析した結果を報告する。

【方法】平成 26 酒造年度新酒鑑評会出品酒より、予審審査におけるコメント欄の記載内容やチオールの関与が考えられる指摘項目「麹」、「酵母様粕臭」、「硫化物様」等の指摘数をもとに試料 25 点を選抜した。これら 25 点について、Tominaga らの方法[3)]を参考に 4MMP 含量の測定を行うとともに、官能評価や製造条件等との関連を検討した。また、一部の試料についてにおいかぎ GC 分析および GC-MS 分析を行い、4MMP 以外のチオールの関与についても検討した。

【結果と考察】官能評価で得られた評点やコメントと 4MMP 含量に相関性は認められなかったが、今回分析を行った出品酒の 4MMP 含量は 1.6～10ng/L 程度で、いずれも清酒における 4MMP の検知閾値 1.2 ng/L（当所職員 17 名をパネリストとして求めた値）[1)]よりも高かった。以前、純米酒のカテゴリの清酒中の 4MMP 含量が検知閾値よりも高いことを報告した[1)]が、大吟醸酒のカテゴリである出品酒も分析したものはいずれも 4MMP 含量が閾値より高かったことから、4MMP が清酒の基調香の一つである可能性が考えられた。また、4MMP の測定に用いたチオール抽出液のにおいかぎ GC 分析を行ったところ、4MMP 以外のチオールの存在が示唆された。今回の解析により、清酒の香味にもアロマティックチオールが多面的に関与する可能性が考えられたため、引き続き、4MMP をはじめとするアロマティックチオールの解析を行っている。

1)古川ら，日本農芸化学会大会講演要旨集 P689 (2012)
2)古川ら，日本生物工学会大会講演要旨集 P203 (2013)
3)Tominaga, T.; Dubourdieu, D. J.Agric. Food Chem. 2006, 54, 59-33.

thiol, the annual japan sake awards 2015, 4-mercapto-4-methylpentan-2-one

発表番号：4F146
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌による D-プシコースの高純度発酵生産法の開発

# Development of the fermentation process for high purity D-psicose using *Escherichia coli*

○島並 祐子、林 幹朗、田畑 和彦（協和発酵バイオ）
○Yuko Shimanami, Mikiro Hayashi, Kazuhiko Tabata (Kyowa Hakko Bio)

【目的】D-プシコースは D-フルクトースの 3 位のエピマーであり、天然にほとんど存在しない希少糖の一種である。D-プシコースは砂糖の 7 割ほどの甘味を持ちながらほぼゼロカロリーであり、また、インスリン分泌作用や動脈硬化を防止する作用なども報告されることから、新たな高機能性甘味料として注目を集めている。現在、D-プシコースはアルカリ条件でのケミカル的、および香川大・何森らが見出した酵素（D-タガトース 3-エピメラーゼ）を用いた中性での異性化反応により D-フルクトースから製造されているが、分子量の等しい異性体が半量以上の混合物として得られるため、D-プシコースの高純度品を安価に調整する事は難しい。そこで異性化＋α の酵素反応による D-プシコースの優先的変換系の構築を考えた。大腸菌は元々D-プシコースの異性体である D-アロースの資化経路を有しており、その過程でリン酸化した D-プシコースを経る事が知られている。そこでその資化経路の逆反応を想定して安価なグルコースから大腸菌セルフ組換え株による高純度 D-プシコース変換系構築の検討を行った。

【方法と結果】まず、大腸菌 D-アロース資化経路の D-プシコース-6-リン酸（P-6-P）の分解酵素を破壊した株で D-フルクトース-6-リン酸（F-6-P）と P-6-P の異性化反応を担う *alsE* 遺伝子の発現強化を実施したところ、わずかではあるがグルコースから D-プシコースの生産を確認することが出来た。そこで、次に、D-プシコースへの選択的変換を促す工夫として P-6-P を効率的に脱リン酸化する酵素の探索を行った。大腸菌内在性の脱リン酸化酵素（ホスファターゼ）ファミリーの個々について、共発現させ D-プシコースの生産性を評価したところ、*yniC* 遺伝子を発現強化した場合に大きく向上していることが確認できた。次に、P-6-P への異性化基質となる F-6-P の供給能を向上させるため、解糖系経路上の *pfkA* 遺伝子の破壊に加えてグルコースの取り込み及びリン酸化を行う *galP*, *glk* 遺伝子の強化を実施したところ、さらなる生産性の向上が確認できた。この菌株について Jar 培養を実施したところ、16.3g/L のプシコースが生産されたが、明らかに糖代謝は菌体増殖・エネルギー産生へ優先されており、原料糖からの変換率は低かった。そこで糖代謝を産物変換へ効率化するために培養途中で培地中の窒素源を制限し、培養中盤からの菌の生育を止めたところ、D-プシコース生産が終盤まで持続して 28.8g/L まで成績が向上した。この時の培地中のグルコース及びフルクトース量を測定したところ、どちらも培地中にはほとんど残存しておらず、純度の高い D-プシコースの発酵生産法を確立することが出来たと言える。

D-Psicose, fermentation, rare sugar

発表責任者：田畑和彦（kazuhiko.tabata@kyowa-kirin.co.jp）

発表番号：4F147
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ニトロチロシン合成酵素の同定に向けた非リボソームペプチド rufomycin の生合成遺伝子クラスターの解析

# Studies on biosynthesis of the non ribosomal peptide rufomycin for identification of a tyrosine nitration enzyme

○冨田 宏矢[1,2]、勝山 陽平[1,2]、大西 康夫[1,2] ([1]東大院・農生科・応生工、[2]JST, CREST)
○Hiroya TOMITA[1,2], Yohei KATSUYAMA[1,2], Yasuo OHNISHI[1,2] ([1]The University of Tokyo, [2]JST, CREST)

【背景・目的】近年、微生物を用いた有用物質生産に関する研究が盛んに行われているが、新規な酵素反応の発見によって、微生物による物質変換の可能性は大きく拡張される。本研究で着目した rufomycin は、放線菌 *Streptomyces atratus* DSM41673 株が生産する 7 個の L-アミノ酸からなる環状ペプチドである [1]。その構成アミノ酸はインドール環上にイソプレノイドが付与したジメチルアリルトリプトファン (DmaTrp)、*trans*-2-ブテンを側鎖に持つ *trans*-2-クロチルグリシン (CroGly)、水酸基の隣にニトロ基を持つ 3-ニトロチロシン (NitTyr) といった特異なものを含む。NitTyr があることから、rufomycin の生合成遺伝子クラスターには Tyr のニトロ化酵素がコードされていると予想される。このように芳香環にニトロ基を導入する酵素は、これまで Trp をニトロ化する放線菌由来 cytochrome P450 酵素の TxtE が知られるのみである [2]。TxtE はそのすぐ下流にコードされる NO synthase (NOS) が供給する一酸化窒素を基質に用いる。我々が着目した Tyr のニトロ化は新規な酵素反応であることから、本研究では rufomycin の生合成遺伝子クラスターの決定と Tyr ニトロ化酵素の取得を目指した。
【結果・考察】次世代ゲノムシークエンサーを用いてドラフトゲノム解析を行った結果、DmaTrp, CroGly を合成する遺伝子群と NOS-P450 オペロン、non ribosomal peptide synthetase (NRPS) 遺伝子を含むコンティグが見つかった。DmaTrp に関しては Trp のジメチルアリル化酵素のホモログ遺伝子が存在し、また NRPS の N 末端側の A ドメインの相同性を基にした基質予測は DmaTrp であった。CroGly に関しては、クラスターにコードされる polyketide synthase (PKS) のドメイン構成から 4-ヘキセン酸が合成されることが示唆され、周辺にコードされる P450 や aminotransferase によって CroGly が生成すると予想された。これらの *in silico* 解析から、このクラスターは rufomycin 生合成を担うと考えた。また NRPS 遺伝子はコンティグの末端で途切れていたが、PCR と primer walking 法によって下流のコンティグを発見し、クラスター全体の塩基配列の決定を進めている。加えて後述する P450 遺伝子の破壊株を作製し、このクラスターが rufomycin 合成を担うことを遺伝学的に明らかにする予定である。

NOS 遺伝子とオペロンを形成する P450 遺伝子は、コードするタンパク質の C 末端領域において TxtE と弱い相同性 (約 40%) を示した。この遺伝子の C 末端に Strep-tag を付与し、Strep-tactin を使ったアフィニティ精製によって組換えタンパク質を得た。これを使った基質差スペクトルにより、Tyr との相互作用を示唆する結果が得られ、現在 *in vitro* での活性検証を進めている。

[1] Shibata *et al.*, ***Agric. Biol. Chem.*** (1962), [2] Barry *et al.*, ***Nat. Chem. Biol.*** (2012)

non ribosomal peptide, P450, Streptomyces

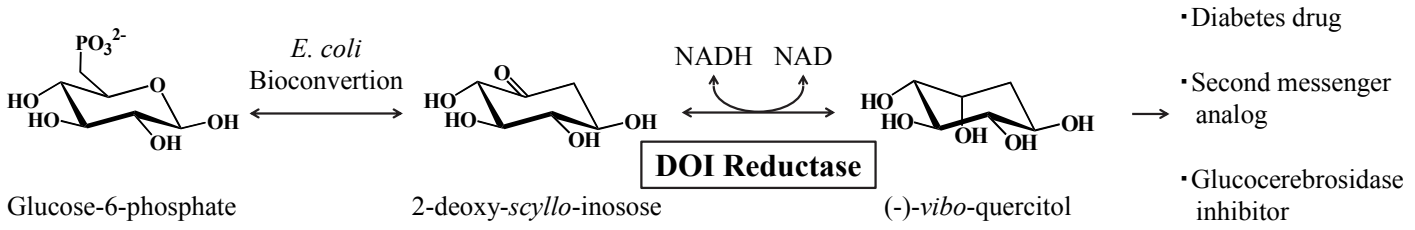
発表番号：4F148
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵母によるグルコースからの有用イノシトール類縁体への変換
# Bioconversion of glucose into inositol analog in yeast *Cryptococcus podzolicus*

○荒 学志、山崎 晴丈、高久 洋暁（新潟薬大・応生科）
○Satoshi ARA, Harutake YAMAZAKI, Hiroaki TAKAKU (Fac. Appl. Life Sci., Niigata Univ. Pharm. Appl. Life Sci.)

【目的】近年、希少なイノシトール類縁体において有用な生理活性が見出されており、その一部はアルツハイマー治療薬や糖尿病治療薬、多嚢胞卵巣症治療薬としての実用化が進められている。本研究室はイノシトール類縁体の合成前駆体として利用可能な 2-deoxy-*scyllo*-inosose (DOI)を、グルコースを原料として組換え大腸菌に大量に生産させる技術を有している。そこで本研究では DOI を資化し有用イノシトール類縁体へ生物変換する酵母の探索と得られた DOI 変換酵素の特性解析を目的とした。

【方法・結果】環境中より単離した DOI 資化酵母を DOI 含有培地で培養し、その培養上清を GC-MS を用いて解析したところ (-)-*vibo*-quercitol と *scyllo*-quercitol が蓄積していた。(-)-*vibo*-quercitol はマウス実験において血糖降下作用を示す報告があることから糖尿病治療薬としての利用や、抗炎症剤として使用が期待されるデオキシイノシトールリン酸エステルの合成前駆体としての利用が考えられる。この DOI 資化性酵母のリボソーム DNA 配列を解析し、*Cryptococcus podzolicus* と同定した。次に DOI 資化性酵母から DOI 変換を担う酵素を単離し、その特性解析を行うため、目的の蛋白質をコードする遺伝子のクローニングを試みた。DOI 資化性酵母由来の酵素が DOI の C1 のケトン基を還元して水酸基に変換することからイノシトール酸還元酵素様の触媒作用によるものと推察された。そこでイノシトール資化能を有する *Cryptococcus* 属、*Fusarium* 属、*Aspergillus* 属と *Bacillus subtilis* のイノシトール酸化還元酵素のアミノ酸配列の比較検討を行い、保存領域から縮重プライマーを設計した。設計したプライマーを用いて PCR を行い、DOI 変換酵素をコードする遺伝子の部分配列を増幅し、得られた部分配列をもとに完全長 cDNA 配列をクローニングした。次に取得した DOI 変換酵素をコードする遺伝子を大腸菌に導入し、組換え蛋白質として発現・精製した。精製した DOI 変換酵素を NADH 存在下で DOI と反応させたところ(-)-*vibo*-quercitol が合成された。このことから本研究において単離した酵素は DOI を基質として認識し(-)-*vibo*-quercitol に変換する NAD 依存型酸化還元酵素であることが明らかとなった。酵母において環状糖アルコールを基質とした酸化還元酵素の詳細な研究はこれまでに報告例がなく、その生理的な意義を解明する上でも本研究は非常に興味深いものである。




Inositol, 2-deoxy-*scyllo*-inosose, (-)-*vibo*-quercitol

発表責任者：荒学志（z1a9b3c7d@yahoo.co.jp）

発表番号：4F149
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 由来の推定ペプチド遺伝子の異種発現と抗菌活性の検討
Heterologous expression of a putative peptide gene from *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 and investigation of the antimicrobial activity.

○山口 大志[1]、吉良 将顕[2]、古中 康平[2]、倉田 淳志[2]、岸本 憲明[2] ([1]近畿大院農、[2]近畿大農)
○Taishi YAMAGUCHI[1], Masaaki KIRA[2], Kouhei HURUNAKA[2], Atsushi KURATA[2], Noriaki KISHIMOTO[2] ([1]Kinki Univ. Grad. Sch., [2]Kinki Univ.)

【目的】抗菌ペプチドは、抗菌作用を示す比較的分子量の小さなペプチドである。これらのペプチドは、幅広い抗菌スペクトルや、低濃度での抗菌作用を示し、強力な耐性菌を生じにくいと考えられるため、新たな抗菌ペプチドの開発が期待されている。本研究室では、親水性イオン液体 [BMIM][Cl] 耐性 *Bacillus amyloliquefaciens* CMW1 を京都味噌から見いだした。本株は、アルカリ耐性,有機溶媒耐性,耐塩性を示すプロテアーゼを生産した。*Bacillus amyloliquefaciens* の他の菌株では、抗菌活性を示すポリケチドやリポペプチド、ジペプチドを生産することが報告されている。そこで、CMW1 株のゲノム DNA を解読して、抗菌ペプチドを探索したところ、Bacteriocin class IId cyclical uberolysin-like protein (BacIId) に属するペプチドをコードする遺伝子を見いだした。そこで、本研究では CMW1 株由来の推定 BacIId の諸性質の解明を試みた。

【方法と結果】*B. amyloliquefaciens* CMW1 のゲノム DNA を解読したところ、染色体 DNA (3,847,203 bp 、scaffold 1～8) とプラスミド DNA (61,368 bp、scaffold 4) の塩基配列を決定できた。ゲノム DNA を探索したところ、scaffold No.2 より、推定 bacIId 遺伝子 (336 bp) を見いだした。本ペプチドの機能解析を目的として、①野生型 BacIId (推定分子量 11189.13)、②HisTag 付き野生型 BacIId (推定分子量 14729.03)、③HisTag 付き成熟 BacIId (推定分子量 10040.65) をそれぞれ発現する組み換え *Escherichia coli* を構築した。野生型 BacIId の発現は、2.0 mM IPTG 添加、20℃、18 時間培養で行った。この組み換え *E. coli* を用いて、培養液上清画分、菌体破砕液上清画分、菌体破砕液沈殿画分を調製した。被検菌に *Bacillus subtilis* JCM10629 を用いて、各種画分の抗菌活性を検討した。その結果、培養液上清画分と菌体破砕液上清画分には抗菌活性を検出できなかったが、菌体破砕液沈殿画分には *B. subtilis* JCM10629 に対する抗菌活性を見いだした。野生型 BacIId は、封入体の形で宿主菌体内に存在すると推定された。

antimicrobial peptide, *Bacillus amyloliquefaciens*, heterologous expression

発表番号：4F150
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# シアノバクテリアによるソルビトールの光合成生産

# Photosynthetic production of sorbitol by cyanobacteria

○陳 泰駿、池内 昌彦（東大）
○Taejun CHIN, Masahiko IKEUCHI (Tokyo Univ.)

【緒言】近年、地球温暖化や化石資源枯渇など環境・資源問題のクローズアップに伴い、光合成微生物シアノバクテリアを $CO_2$ からの物質生産に応用する研究が盛んに行われている。一方、バラ科果樹に多く含まれるソルビトールは、甘味料や保湿剤など多様な原料として利用されており、化学的触媒法や発酵法で生産されているが、環境負荷や培養手法など問題点がある。したがって、環境・資源問題と調和する、より優れたソルビトール生産法が望まれている。そこで本研究では、シアノバクテリウム *Synechocystis* sp. PCC 6803 にソルビトール生合成遺伝子を導入し、$CO_2$ からソルビトールを光合成生産することを目的とした。

【方法】ソルビトール生合成遺伝子として、グルコース-6-リン酸のソルビトール-6-リン酸への触媒反応を NADPH 依存的に行う、リンゴ *Malus domestica* 由来ソルビトール-6-リン酸脱水素酵素(*s6pdh*)遺伝子に着目した。*s6pdh* をテオフィリン誘導型 $P_{trc}$::riboswitch(TR)の下流につなげ、6803 株のゲノム DNA に組み込んだ形質転換体 6803(TR-s6pdh)を作製した。31℃, 30 μE, 1% $CO_2$ 通気下で、2 mM テオフィリンの添加時期を培養 0, 1, 2, 3 日目と変えながら 6803(TR-s6pdh)を培養し、テオフィリンによる S6PDH 発現誘導時期がソルビトール生産および菌体増殖に与える影響を検討した。また、0.1~2 mM の各濃度テオフィリン誘導下で 6803(TR-s6pdh)を培養し、ソルビトール生産性における最適なテオフィリン濃度を検討した。

【結果と考察】6803(TR-s6pdh)の培養 2, 3 日目で 2 mM テオフィリンを添加した場合に、約 68 mg/L のソルビトールが同等に生産された。また、テオフィリン誘導なしではソルビトールが生産されず、0.5 mM テオフィリン誘導下における 110 mg/L 以上のソルビトール生産性が最も高かった。したがって、テオフィリン依存的に S6PDH を発現誘導させた 6803 株によるソルビトール生産に成功し、培養 2 日目($OD_{730}$≒2.0)の適切な細胞濃度にて 0.5 mM テオフィリンを添加することが適していると考えられる。しかし、テオフィリン誘導下の全ての培養条件において、テオフィリン添加から 2 日後に 6803(TR-s6pdh)の増殖阻害が見られた。S6PDH 触媒反応により減少する還元力 NADPH または代謝中間体グルコース-6-リン酸の量を増加、または蓄積するソルビトールの菌体外排出を促すことで、増殖阻害を緩和して 6803(TR-s6pdh)のソルビトール生産性を向上できるかもしれない。

sorbitol, cyanobacteria, production

発表番号：4F151
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 植物または植物性発酵食品由来乳酸菌の抗菌性について

# Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from plants and plant fermented foods

○高倉 麻菜美[1]、内野 昌孝[2]、田中 尚人[3]、高野 克己[2]([1]東京農大院・農化、[2]東京農大応生・化学、[3]東京農大応生・菌株)
○ Manami TAKAKURA[1], Masataka UCHINO[2], Naoto TANAKA[3], Katsumi TAKANO[2] ([1]Agrichem.,Agr.,Grad.Sch.,Tokyo Univ.Agric., [2]Dept.Appl.Biol.chem.,Fac.Biosci.Tokyo Univ.Agric., [3]Fac.Biosci.,CCC,Tokyo Univ.Agric.)

【目的】

乳酸菌はヨーグルトや味噌、キムチなど様々な発酵食品の製造に利用されている。乳酸菌の生産する乳酸が食品中の pH を下げることにより雑菌の繁殖を抑え、腐敗を防止し長期間の保存を可能にしている。この保存期間の延長には pH だけでなく、ナイシンなど乳酸菌の生産する抗菌性ペプチドの効果も報告され、*Lactococcus* の生産するナイシンが食品添加物として認可されている。

東京農業大学菌株保存室では数千株の乳酸菌を保有し、現在、これらの菌の機能性を複数の研究者の分担で調査している。本研究では、本大学菌株保存室が保存する乳酸菌株の培養物がバクテリオシン指標菌の 1 つである *Micrococcus luteus* に対しての抗菌性と抗菌性の高い菌株についての性質を調べ、同定を行った。また、その抗菌活性と各株の乳酸産生量の関係性を調べた。

【方法】

供試菌株は、本学菌株保存室より分与された乳酸菌 42 株と本研究室で高知県大豊町の伝統的発酵茶である碁石茶から分離された 5 株、計 47 株を用いた。同菌の抗菌効果を調べるために *Micrococcus luteus* を指標菌とした。抗菌試験には spot on lawn 法を用いた。また、菌株の同定には 16S rDNA 塩基配列を利用し、性質は乳酸菌実験マニュアルに従い試験した。各株の乳酸産生量試験では、各株の生産する有機酸が全て乳酸であると仮定して、乳酸菌培養液の上澄液を用いて中和滴定によって求めた。

【結果】

*Micrococcus luteus* に対し、46 株で阻止円が確認された。その中で特に大きな阻止円(半径 8 mm 以上)を形成した 27 株について系統解析した結果、6 株が *Leuconostoc* 属、20 株が *Lactobacillus* 属、1 株が *Lactococcus lactis* であった。*Leuconostoc* 属、*Lactococcus lactis* はそれぞれロイコシンとナイシンの生産が既報告により明らかにされているため、それぞれのバクテリオシンの生産が示唆された。これら 27 株のうち 18 株は分離源が生酛やもろみ、ピクルスなど発酵食品由来であった。また、これら 27 株では特徴的な表現性状は見られなかった。

抗菌活性と乳酸産生量との関係を調べた結果、乳酸産生量が同程度のものであっても阻止円の大きさにはばらつきがあり、抗菌活性と乳酸産生量は必ずしも比例関係にはないことが示唆された。

Bacteriocin, Lactic acid bacteria, Antibacterial agent

発表番号：4F152
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 紅麹水抽出物による石灰化促進に及ぼす骨形成マーカー遺伝子の発現変動

# Changes in gene expression of bone formation marker proreins by treatment of water extracts of *Monascus*-fermented rice

○安里 雪乃、池尻 真美、橘 信二郎（琉大農）
○YUKINO ASATO, MAMI IKEJIRI, SHINJIRO TACHIBANA (Ryukyu Univ.)

【目的】骨粗鬆症は骨密度の低下を惹起し、男女問わず骨折リスクを増大させる疾患であり、患者の QOL 低下や社会保障費の増大などの課題が指摘されている。近年、紅麹サプリメントによる骨形成促進効果やモナコリン（スタチン製剤）による骨密度増大などの臨床成果が報告され、骨粗鬆症の代替治療モデルとして注目されている。しかし、スタチンはコレステロール生合成の強力な阻害剤であり、処方箋医薬品であるため骨粗鬆症の予防的適用は困難である。そこで、当研究室ではスタチンと異なるメカニズムで骨芽細胞の石灰化を促進する紅麹抽出物の生理活性をスクリーニングし、候補株を選抜してきた。本研究では、マウス骨芽前駆細胞 MC3T3-E1 株を用いて紅麹候補株で調製した麹水抽出物による石灰化促進に関わる骨形成マーカー遺伝子の発現変動について調べた。
【方法】紅麹菌（*Monascus* 属）を米または麦を用いて 31℃で製麹し、各水抽出物を凍結乾燥して滅菌水にて再溶解したものを紅麹抽出物試料とした。マウス骨芽前駆細胞は 10% FBS と抗生物質を含むα-MEM を基本培地として 37℃、5% $CO_2$ 条件下で培養した。コンフルエント後に、基本培地に L-アスコルビン酸とβ-グリセロリン酸を含む分化誘導培地に交換して刺激を与え、骨芽細胞への分化と石灰化を誘導した。紅麹試料の添加は、培地終濃度 0.1 mg/mL または 1.0 mg/mL で行い、対照群には 10% (v/v)滅菌水を用いて分化培養中に 3 日おきに培地を交換した。未分化骨芽細胞に対する紅麹試料の細胞毒性は WST-1 比色法で評価した。骨石灰化は、21 日間分化培養した細胞を Alizarin red S 染色及び von Kossa 染色することで評価した。骨形成マーカー遺伝子の発現変動は、各細胞から抽出した total RNA を用いて Real-time PCR 法で評価した。
【結果】本研究で使用した紅麹試料濃度では、未分化細胞に対する細胞毒性は認められなかった。石灰化染色で石灰化亢進を示した紅麹試料で処理した骨芽細胞では、細胞外骨基質タンパク質遺伝子の有意な発現量の増大が認められた。一方、骨代謝マーカーであるアルカリホスファターゼ（ALP）活性は、対照群との間でいずれの処理期間においても有意差は認められなかった。従って、紅麹水抽出物による骨石灰化促進作用は、ALP 活性増大によるリン酸カルシウムの形成促進ではなく、細胞外骨基質タンパク質の発現増強を介したカルシウム沈着が大きく寄与していると考えられた。本研究成果は、紅麹水抽出物に含まれる有効成分が骨粗鬆症予防に有効であることを示し、新規機能性成分の開発が期待できることを示唆している。

*Monascus*-fermented rice, MC3T3-E1, mineralization

発表責任者：橘信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：4F153
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 麹菌細胞壁成分のコウジ酸生産への影響

# Effect of cell wall components on kojic acid production in *Aspergillus oryzae*

○張 斯来、田中 瑞己、新谷 尚弘、五味 勝也（東北大学　農学研究科）
○Silai Zhang, Mizuki Tanaka, Takahiro Shintani, Katsuya Gomi (Tohoku Univ)

コウジ酸 (5-Hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4-pyrone) は麹菌の重要な二次代謝産物の一つであり、食品・医療薬剤・化粧品などに広く利用されている。麹菌はコウジ酸生合成に関わる遺伝子 ***koiA***、 そのトランスポーター遺伝子 ***kojT*** と、転写因子遺伝子 ***kojR*** を持っており、最適な窒素や炭素源濃度を維持し長時間培養することで生産される (1)。我々は alpha-1,3-グルカン (AG) 生合成遺伝子 ***agsB*** 欠損株におけるコウジ酸生産性を解析した結果、興味深いことに生産性は著しく低下し、コウジ酸生合成に関する遺伝子 ***kojA***、***kojT***、***kojR*** の発現量も低下したことを明らかにした(2)。このことから AG の欠損はコウジ酸生合成に関与する遺伝子の発現を抑制しているものと考えられる。そこで、AG とコウジ酸生産性の関係を更に解析するため､本研究では ***agsB*** 欠損株にアクチンプロモーターで ***agsB*** を高発現させた株 (***PactA::agsB***) を構築し、コウジ酸の生産性を調べた。

***PactA::agsB*** 株をコウジ酸生産培地で培養した結果、野生株（WT）と同様なコウジ酸の生産性を示した。このことから AG はコウジ酸の生産に関与していることが示唆された。AG のコウジ酸生産への影響を調べるため、***PactA::agsB*** 株の細胞壁を熱水可溶画分 (HW)、アルカリ可溶画分 (AS)、アルカリ不可溶画分 (AI) に分画した。AG が多く含まれている AS 画分をコウジ酸生産培地に添加した条件で WT を培養すると、無添加培地では 4 日目からコウジ酸の生産が始まるのに対して、AS 画分を添加した条件では 2 日目から生産が始まり、コウジ酸の生産性が著しく増加した。また、3 日間培養した時のコウジ酸の生産に関与する遺伝子の発現量は 10 倍以上に増加していた。興味深いことに、***agsB*** 破壊株に AS 画分を加えて培養すると WT と同様のコウジ酸生産性を回復した。一方、コウジ酸生産培地に beta-1,3,-グルカンとキチンが含まれていると考えられる AI を添加した条件でもコウジ酸の生産性が増加したが、キチンのみを添加した条件ではコウジ酸の生産量は増加しなかった。このことから、beta-1,3-グルカンもコウジ酸の生産に関与している可能性があることが示唆された。また、細胞壁の画分に糖以外の成分も含まれているため、コウジ酸の生産に細胞壁画分の糖以外の成分が関与している可能性もあると考えられる。beta-1,3-グルカン分解酵素である zymolyase-100T で処理した AI 画分と alpha-1,3-グルカン分解酵素で処理した AS 画分のコウジ酸生産性への影響を調べた結果についても報告する予定である。

(1) Terabayashi et al., *Fungal Genet. Biol.*, **47**, 953–951 (2010)
(2) 第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス　p.43

koji acid, alpha-1,3-glucan, *Aspergillus oryzae*

発表責任者：五味　勝也（gomi@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：4F154
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化の分子生物学的仕組みの解析

Molecular analysis of the mechanism by which lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp.

○下野 和真[1]、今井 優[1]、田中 幸徳[2]、佐藤 誠造[3]、越智 幸三[2]、保坂 毅[4] ([1]信州大院農、[2]広工大生命、[3]日本水産中央研、[4]信州大先鋭領域融合研究群)

○Kazuma SHIMONO[1], Yu IMAI[1], Yukinori TANAKA[2], Seizo SATO[3], Kozo OCHI[2], Takeshi HOSAKA[4] ([1]Grad. Sch. Agri. Shinshu Univ., [2]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol., [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., Tokyo Innovation Center, [4]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

**【目的】** リンコマイシンは細菌のリボソーム 50S サブユニットに作用し, タンパク質合成を阻害する抗生物質である。最近我々は, 最小生育阻止濃度 (MIC) の 1/200 ~ 1/3 の抗生物質リンコマイシン存在下で *Streptomyces* 属放線菌を培養すると, 同菌の二次代謝能が劇的に向上することを見出した[1)]。加えて, 放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) において, リンコマイシン存在下で $F_OF_1$ATP 合成酵素の発現やネイティブ状態が変化すること, 細胞内 ATP レベルが上昇することを突き止めた。しかし, これらの現象が放線菌の二次代謝能の向上にどのように関わっているかは全く判っていない。本研究ではその未解明部分を分子レベルで解明することを目的とした。

**【方法・結果・考察】** 青色抗生物質アクチノロージンの生産量が劇的に増加する条件[MIC の 1/10 濃度 (10 μg/ml) のリンコマイシンを含む MR5 液体培地]で *S. coelicolor* A3(2) を対数増殖期まで培養した。得られた菌体から全 RNA を調製し, 先ず RNA シーケンス解析により遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。その結果, リンコマイシン存在下で非存在下に比べて 2 倍以上の発現上昇あるいは低下が認められた遺伝子が 828 遺伝子（全 8152 遺伝子中）あることが明らかになった。この中には, *SCO6720* 遺伝子（リンコマイシンの排出・輸送に関わる ABC トランスポーター）のように, リンコマイシン存在下で約 100 倍のレベルで高発現する遺伝子も存在した。その他には, 23S rRNA メチル化酵素などの薬剤耐性に関わるタンパク質やリンコマイシンの作用標的であるリボソーム大サブユニットを構成する L33 タンパク質の発現量が大きく変化していることも判明した。以上のことから, *S. coelicolor* A3(2) においてリンコマイシンが細胞内に取り込まれると, 物質の輸送・排出およびタンパク質合成など, 細胞内で重要な役割を果たす因子の発現が大きく変化する事実を突き止めた。これら大きな発現変化が認められた遺伝子については, その発現動態をさらに詳細に解析した。その結果, 驚くべきことに, ABC トランスポーター*SCO6720* 遺伝子は, リンコマイシン添加後わずか 1 分で 10 倍発現上昇していることが明らかとなった。以上の結果を受けて, 機能発現に ATP を必要とする ABC トランスポーターSCO6720 がリンコマイシンに応答して高発現する仕組みを理解することが, 放線菌の二次代謝活性化機構の解明に繋がると考察した。

今後は, リンコマイシン存在下で ABC トランスポーターSCO6720 の高発現をもたらす鍵因子の特定と機能解析を行い, リンコマイシンによる二次代謝活性化機構の解明を目指す。

**【文献】** [1)] Imai, Y. et al., Appl Environ Microbiol, 81:3869-3879 (2015).

*Streptomyces*, secondary metabolite production, lincomycin

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4F155
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Streptomyces* 属放線菌のリファンピシン耐性変異株における二次代謝活性化機構の解析と抗生物質探索研究へのその応用

# Analysis of the molecular mechanisms by which a rifampicin-resistant mutation activates secondary metabolite production by streptomycetes and its applicability to antibiotic discovery.

○長 大哲[1]、越智 幸三[2]、保坂 毅[3] ([1]信州大院農、[2]広工大生命、[3]信州大先鋭領域融合研究群)
○Hiroaki CHO[1], Kozo OCHI[2], Takeshi HOSAKA[3] ([1]Grad. Sch. Agri. Shinshu Univ., [2]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

**【背景・目的】** リファンピシン（Rif）は，原核生物の RNA ポリメラーゼ（RNAP）に作用し，RNA 合成の開始反応を阻害する抗生物質である．細菌では，RNAP $\beta$ サブユニットの遺伝子（*rpoB* 遺伝子）内の突然変異により Rif 耐性の表現型が現れる．興味深いことに，特定の *rpoB* 変異は代表的な有用二次代謝産物生産菌である *Streptomyces* 属放線菌において，二次代謝活性化作用を示す．現在我々は，その仕組みを，①分子生物学的な面から詳しく解明すること，②抗生物質探索に応用すること，以上二つの課題に取り組んでいる．

**【方法・結果・今後の計画】**

**① *S. coelicolor* A3(2) 抗生物質高生産 Rif 耐性変異株の *rpoB* 変異型 RNAP の機能解析** 放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) から抗生物質生産能が劇的に向上した *rpoB*Q428P 変異株（野生株に比べて約 100 倍の赤色色素抗生物質生産量を示す）を新たに取得した．本ポスター発表では，この *rpoB* 変異株の RNAP の機能解析（シグマ因子プロファイルおよび転写活性を野生型 RNAP と比較）を行うことで，*rpoB* 変異と二次代謝活性化の関係を明らかにする取り組みについての成果を報告する．

**② Rif 耐性を指標とした土壌からの二次代謝活性化型放線菌の分離** Rif 耐性を付与する *rpoB* 変異が放線菌の二次代謝を向上させる事実を踏まえ，自然界に存在する Rif 耐性放線菌を分離することで，二次代謝活性化型放線菌を取得できるのではという着想を得た．本研究ではこのことを実験的に証明し，有用放線菌の新しい取得方法を確立することを目的に以下の検討を行った．定法[1)]に従い放線菌分離用培地（HV 寒天培地）を用いて，信州大学農学部キャンパス内の土壌から 97 菌株の放線菌を分離した．これらを大腸菌（*Escherichia coli* W3110）を検定菌とした抗菌試験に供したところ，1 菌株が抗菌活性を示した．興味深いことに，同じ土壌から Rif を含む HV 寒天培地を用いて Rif 耐性放線菌を分離したところ，抗菌活性を示す菌株が 55 菌株中 3 菌株存在することが明らかになった．このことから，Rif 耐性放線菌からは高効率で抗生物質生産を示す放線菌を分離できることが見えてきた．現在，抗菌物質生産を示した放線菌の同定および生産が認められた抗菌物質の単離・同定を進め，土壌から分離した Rif 耐性放線菌の特性を詳しく調べている．加えて，Rif 存在/非存在条件で放線菌の分離パターンにどのような違いが認められるか，様々な土壌で検証し，今回のアプローチが抗生物質探索における有用放線菌の分離に有効であるか否かを明らかにすることに取り組んでいる．

**【文献】**1）生物工学会誌，90(8):493-498 (2012).

actinomycetes, antibiotic production, rifampicin-resistant mutants

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4F156
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 抗生物質クロラムフェニコールのホルミシス効果による放線菌の潜在的二次代謝能の活性化

# Chloramphenicol at subinhibitory concentrations activates secondary metabolite production by actinomycetes.

○石塚 美咲[1]、濱渦 亮子[2]、今井 優[1]、長 大哲[1]、佐藤 誠造[3]、越智 幸三[4]、保坂 毅[2]（[1]信州大農、[2]信州大先鋭領域融合研究群、[3]日本水産中央研、[4]広工大生命）
○Misaki ISHIZUKA[1], Ryoko HAMAUZU[2], Yu IMAI[1], Hiroaki CHO[1], Seizo SATO[3], Kozo OCHI[4], Takeshi HOSAKA[2]（[1]Fac. Agri. Shinshu Univ., [2]IBS-ICCER, Shinshu Univ., [3]Nippon Suisan Kaisha, Ltd., Tkyo Innovation Center, [4]Fac. Life Sci. Hiroshima Inst. Technol.）

【背景・目的】 クロラムフェニコール（Cm）は, 細菌のリボソーム 50S サブユニットに作用し, タンパク質合成を阻害する抗生物質である. 最近我々は, *Streptomyces* 属放線菌を最小生育阻止濃度（MIC）より低い濃度の Cm 存在下で培養すると, 同菌が二次代謝産物を高生産する現象を見出した. 本研究では, Cm が示すそのような濃度依存的現象（ホルミシス）の特性を明らかにするとともに, その効果が様々な放線菌の二次代謝活性化に有効か否かを検証することを目的とした.

【方法】 本研究では, 放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) とその近縁種 *S. lividans* 66, 抗菌物質非生産性の土壌分離放線菌（11 菌株）, および海洋由来放線菌（4 菌株）を使用した. 各菌株を Cm を含む YEME 培地や MR5 培地などの放線菌用培地（液体・寒天培地）で培養し, 得られた培養物を HPLC 分析や抗菌試験等に供して二次代謝活性化の有無を評価した. 抗菌試験では, Cm 耐性を示す *Staphylococcus epidermidis* SUAH-1 を検定菌とした.

【結果・考察】 *S. coelicolor* A3(2) を YEME 液体培地で培養し, 36 時間後に Cm を終濃度 25 μg/ml となるように添加したところ, 赤色色素抗生物質ウンデシルプロジギオシンの生産量が Cm 非存在下の約 20 倍に増加した. 加えて, この条件下では *S. coelicolor* A3(2) の生育が向上することも判明した. これらの現象は, *S. lividans* 66 でも認められた. これまでに我々は, Cm をはじめ様々なリボソーム攻撃性抗生物質の二次代謝活性化効果を検証してきた. 今回の検討の中で, YEME 液体培地における *S. coelicolor* A3(2) や *S.lividans* 66 に対して Cm のみが強い二次代謝活性化効果を示すことが判明し, Cm には他のリボソーム攻撃性抗生物質とは異なる作用メカニズムがあることも推察された. 一方, 本検討に供した土壌分離放線菌のうち 1 菌株 (*Streptomyces* sp. THSU-12) の潜在的抗菌物質生産能を Cm の作用により活性化できた. 興味深いことに, リボゾーム工学アプローチによりこの菌株から取得した抗菌物質生産を示す RNA ポリメラーゼ変異株に Cm を作用させたところ, 抗菌物質生産量が劇的に増加することも確認できた. 海洋由来放線菌については, *Verrucosispora* sp. NPS653 を Cm を含む MR5 液体培地で培養すると, 代謝プロファイルが大きく変化すること, さらには Cm 存在下でのみ生産される成分が複数出現することを明らかにした.

以上の結果から, Cm は様々な放線菌に強い二次代謝活性化作用を示すことが判明した. 現在, その仕組みを生化学・分子生物学的な面から解析するとともに, Cm の活用が新しい二次代謝産物の探索に有効か否かを検証している.

chloramphenicol, actinomycetes, secondary metabolite production

発表責任者：保坂 毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4F157
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# $F_O$ $F_1$ATP 合成酵素の機能変化が *Streptomyces* 属放線菌の生育と二次代謝能に及ぼす影響の解析

# The effects of a functional alteration of the $F_O$ $F_1$ ATP synthase on the cell growth and secondary metabolism of *Streptomyces* strains.

○丸山 友子[1]、下野 和真[2]、保坂 毅[3] ([1]信州大農、[2]信州大院農、[3]信州大先鋭領域融合研究群)
○Tomoko MARUYAMA[1], Kazuma SHIMONO[2], Takeshi HOSAKA[3] ([1]Fac. Agri. Shinshu Univ., [2]Grad. Sch. Agri. Shinshu Univ., [3]IBS-ICCER, Shinshu Univ.)

【背景・目的】 $F_OF_1$ATP 合成酵素は, あらゆる生物のエネルギー供給源である ATP の合成を担う重要な酵素である. 最近我々は, 代表的な抗生物質生産菌である *Streptomyces* 属放線菌を, 生育と二次代謝能が向上する条件下で培養すると, $F_OF_1$ ATP 合成酵素の発現変化やネイティブ状態の安定化に起因して, 細胞内 ATP 量が上昇することを見出した.[1)] 本研究では, この現象を分子レベルで詳しく理解することを目的とし, 以下の検討を行った.

【方法】 本検討では, 放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) を供試菌株とし, 基本培地に GYM 培地（液体・寒天）を用いた. また, $F_OF_1$ATP 合成酵素阻害剤として *N,N'*-ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCCD）を用いた. GYM 培地（液体・寒天）での *S. coelicolor* A3(2) に対する DCCD の最小生育阻止濃度(MIC)を決定し, それを基に, 生理学的・遺伝学的に異なる 2 つのアプローチで $F_OF_1$ATP 合成酵素の機能を変化させ, 供試菌株の生育と二次代謝におけるその影響を解析した.

【結果・考察】

**1. 生理学的アプローチ.** GYM 液体培地での *S. coelicolor* A3(2) に対する DCCD の MIC は 75 μg/ml であった. この結果を受け, 0～75 μg/ml の DCCD を含む GYM 液体培地で *S. coelicolor* A3(2) を 10 日間培養し, 生育と代謝産物のプロファイルを調べた. その結果, 培養 24 時間後に 30～60 μg/ml の DCCD を添加した条件で, 供試菌株の生育が向上し, 菌体重量は最大で 1.5 倍まで増加することが判った. 興味深いことに, この条件下で劇的に生産量が増加する代謝産物が複数存在することも判明した.

**2. 遺伝学的アプローチ.** GYM 寒天培地での *S. coelicolor* A3(2) に対する DCCD の MIC は 60 μg/ml であった. この結果を基に, 60 μg/ml の DCCD を含む GYM 寒天培地（25 ml）10 枚に約 $2\times10^9$ CFU の *S. coelicolor* A3(2) の胞子を接種し 7 日間培養した. 出現したコロニーのうち 200 個を無作為に選び, 60 μg/ml の DCCD を含む GYM 培地上で明確な生育が認められたものを DCCD 耐性変異株とした. これらの生育や二次代謝における性質を野生株と比較したところ, 色素抗生物質の高生産株などの様々な表現型を示す DCCD 耐性変異株が取得できたことを確認した.

以上の結果から, $F_OF_1$ATP 合成酵素の変化が, *S. coelicolor* A3(2) の生育と二次代謝能に影響を与えることが明らかとなってきた. 現在, この現象の仕組みを分子生物学的な面から解明するとともに, *S. coelicolor* A3(2) 以外の菌株においても同様の現象が起こるか否かを検証している.

【文献】[1)] Imai et al., Appl Environ Microbiol, 81:3869-3879 (2015).

streptomycetes, $F_OF_1$ ATP synthase, secondary metabolism

発表責任者：保坂　毅（thosaka@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4F158
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 大腸菌を用いたモルヒネの発酵生産

# Total biosynthesis of morphine using engineered *Escherichia coli*

○中川 明[1]、松村 栄太郎[1]、片山 高嶺[2]、小柳 喬[1]、山本 憲二[1]、熊谷 英彦[1]、佐藤 文彦[2]、南 博道[1] ([1]石川県大資源研、[2]京大院生命)
○Akira NAKAGAWA[1], Eitaro Matsumura[1], Takane Katayama[2], Takashi Koyanagi[1], Kenji Yamamoto[1], Hidehiko Kumagai[1], Fumihiko Sato[2], Hiromichi Minami[1] ([1]Ishikawa Pref. Univ., [2]Kyoto Univ.)

モルヒネを始めとするモルヒナンアルカロイドは、強い鎮痛作用があり、ガンやリウマチ等に伴う強い痛みの処方に用いられている．本薬は根治治療ではなく、痛みの軽減を目的に処方されるため、継続的な投薬が必要となる．しかし、これらの医薬品は、植物からの抽出物を原料に製造されるため、薬価が比較的高く、患者の QOL 向上には安価な生産方法が望まれている．微生物による植物の生薬生産は、時間的、空間的なコストが植物からの抽出に比べ安く、昨今、合成生物学分野において注目を集めている．

現在までに微生物を用いたモルヒネの生産は 2 例報告があるが、どちらも高価な(*R*)-Reticuline、Thebaine といったアルカロイドを原料に作られており、実用生産には程遠い．グルコース、グリセロールといった単純で安価な炭素源からの物質生産は、コストの面から非常に重要な技術であり、実用生産を目指す場合、重要なコンセプトとなる．

ケシにおいてモルヒネは 2 分子のチロシンから生成される．2 分子のチロシンがアミンとアルデヒドに転換され、重合し、3 つのメチル化、1 つの水酸化反応を経て、(*S*)-reticuline に転換される．(*S*)-reticuline は R 体に転換された後、P450 酵素による C-C カップリング、水酸基のケト化、アセチル化を経て、thebaine に転換され、2 つの脱メチル化、ケト基の還元を経てモルヒネを生成する．

最終的に 6 つの生物種由来の 20 個の酵素遺伝子を複数菌体に導入し、それらの菌株を段階的に培養することにより、グリセロールからのモルヒネ生産系を構築した．本研究は世界で初めて単純な炭素源からのモルヒネ直接発酵生産に成功した例であり、合成生物学における礎になり得ると考えている．

microbial production, alkaloid, morphine

発表責任者：南博道（minami@ishikawa-pu.ac.jp）

発表番号：4F159
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

Debaryomyces 属酵母が産生するフェノール代謝関連酵素 catechol 1,2-dioxygenase（C12O）の特徴と属内における C12O 遺伝子の分布
Characterization of catechol 1,2-dioxygenase by the strain of the Debaryomyces and the distribution of C12O gene among the species in the genus

○栗原 甘奈[1]、前田 剛志[2]、加藤 未来[1]、能木 裕一[3]、浜本 牧子[1,2]（[1]明治大農、[2]明治大院農、[3]JAMSTEC）
○Kanna KURIHARA[1], Takayuki MAEDA[2], Miku KATO[1], Yuichi NOGI[3], Makiko HAMAMOTO[1,2]
([1]Meiji Univ., [2]Meiji Univ. Grad. Sch., [3]JAMSTEC)

【目的】環境浄化への応用を目的として高濃度フェノール分解性海洋酵母の探索を行った結果、ベンゼン環の ortho-開裂により高濃度フェノール資化性深海酵母 Debaryomyces hansenii （D. hansenii）を見出した。本研究ではフェノール分解経路の初期段階における代謝中間体、カテコールの分解反応に関わる catechol 1,2-dioxygenase（C12O）について解析を行うとともに、Debaryomyces 属内における C12O の普遍性について検討を行った。一方、大腸菌による C12O の異種発現についても検討を行った。

【方法と結果】供試 C12O について、フェノールを単一炭素源とする液体培地で酵母を培養し、菌体を機械的に破砕して得た無細胞抽出液を硫安沈殿後、Superdex 75 pg ゲルろ過カラムクロマトグラフィーおよび HiTrap Q HP イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製し、電気泳動的に単一バンドとなる標品を用いた。C12O の酵素化学的特徴について、C12O の作用によりカテコールから生成する cis, cis-muconic acid を吸光光度法で定量した結果、至適温度 15～25℃、15～35℃で 90%以上の活性を保持し、既存の酵母由来 C12O では報告のない温度特性を有していることが明らかになった。また、酵素の速度論的特徴として Km 値は 47.63（μM）、Vmax 値は 1.23×10-3（U/min）であると考えられた。Debaryomyces 属内における C12O の分布について、D. hansenii 基準株の C12O 遺伝子をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションより、深海酵母および既知の Debaryomyces 属酵母のゲノム DNA 上に類似配列が存在することが示唆された。これら類似配列の塩基配列相同性について、同一種間では 90 %以上と高く、一方、異種間では 50 %程度であった。現在、大腸菌過剰発現システムの一つである pET 発現システムを用いて D. hansenii 産生 C12O の高発現システムの構築を進めている。

bioremediation, catechol 1,2-dioxygenase, Debaryomyces

発表責任者：浜本牧子（hamamoto@meiji.ac.jp）

発表番号：4F160
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 変異型ブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼの機能解析および応用

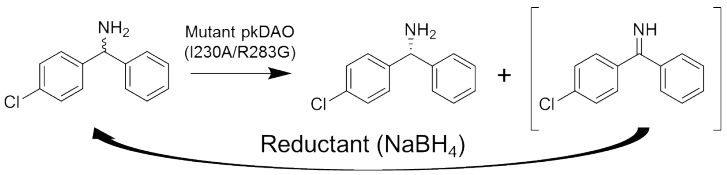
# Functional analysis of mutants of D-amino acid oxidase from pig kidney and their application

○大野 篤[1]、安川 和志[1,2]、浅野 泰久[1,2] ([1]富山県大工・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Atsushi ONO[1], Kazuyuki YASUKAWA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]ERATO, JST)

【目的】
光学活性なアミン類は医薬品の合成原料として有用である。また、デラセミ化法は反応系内でラセミ体の一方の立体のみを反転させ、他方の鏡像体を理論収率 100%で得ることが可能な効率良い合成法である。我々はブタ腎臓由来 D-アミノ酸オキシダーゼ (pkDAO)に変異を導入することにより、*R* 立体選択的に methylbenzylamine (MBA)に作用する変異型酵素 (Y228L/R283G)の作成に成功した[1)]。また、変異型酵素と $NaBH_4$ を共存させることでデラセミ法による(*RS*)-MBA から(*S*)-MBA の合成を報告した。今回は、医薬品中間原料の出発物質になり得る 4-chlorobenzhydrylamine (CBHA)に作用する変異型酵素を得るため、活性中心付近にさらなる変異を導入し、新たに 3 種類の変異型酵素を取得した。本研究では 3 種類の変異型酵素を用いた速度論的解析を行い、構造と活性の関連について考察すると共に、CBHA のデラセミ化についても合わせて報告する。

【方法と結果】
変異型酵素 (Y228L/R283G)の活性中心付近のアミノ酸残基を変異し、benzhydrylamine (BHA)を基質として認識できる 3 種類の変異型酵素 I230A/R283G, I230C/R283G, I230F/R283G を取得した。次に(*RS*)-CBHA を基質とした結果、全ての変異型酵素は *S* 立体選択的に CBHA に作用し、相対活性が最大の I230A/R283G は、CBHA に対する $K_m$ 値が 2.67 mM、$k_{cat}$ 値が $47.6 \times 10^2$ $s^{-1}$ で、触媒効率($k_{cat}/K_m$) は $16.1 \times 10^2$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ であり、 Y228L/R283G の 22.8 倍を示した。一方、本変異体の(*R*)- MBA に対する触媒効率は Y228L/R283G と比較し、1/20 に減少した。そこで、Y228L/R283G の結晶構造解析データを基に統合計算化学システム (MOE)を用いて、CBHA と pkDAO 変異体のドッキングシミュレーションを行った。その結果、I230A/R283G は CBHA に対し Y228L/R283G における(*R*)-MBA と同様の結合様式を取り、塩素置換されたフェニル基を受け入れるポケットを形成しており、I230 の変異導入により CBHA に対する触媒効率と *S* 立体選択性が向上したと推測した。また、本変異型酵素に(*RS*)-CBHA と $NaBH_4$ を共存させたデラセミ化法により、(*S*)-CBHA を光学純度 97.2%ee で得た。

【参考】
1)K. Yasukawa, S. Nakano and Y. Asano, *Angew. Chem. Int. Ed*. 2014, 53, 4428-4431




Amino acid oxidase, Amine, Mutagenesis

発表番号：4F161
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 合成生物学的手法によるエチレン生成シアノバクテリアの改良―Ethylenome 最適化によるエチレンの高生産

# Engineering a Chimeric Complex of Plant Enzymes to Improve Photosynthetic Production of Bio-ethylene by Cyanobacterium

○神藤 定生[1]、林 茉依[2]、細田 晃文[2]、田村 廣人[2]([1]名城大・理工、[2]名城大・農)
○Sadanari JINDOU[1], Mai HAYASHI[2], Akifumi HOSODA[2], Hiroto TAMURA[2] ([1]Meijo Univ. Fac. of Sic. and Tech., [2]Meijo Univ. Fac. of Agri.)

【目的】

脱石油依存社会を可能にする新規なエチレン製造法を確立するため、我々は二酸化炭素から光合成的にエチレンを生産するシアノバクテリアを構築した。すなわち、植物由来の 1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)合成酵素(ACS)および ACC 酸化酵素(ACO)を複合体化させ、Ethylenome とし、これをシアノバクテリアへ導入した結果、本細菌はバイオエチレンを 3.4 nl/ml/O.D.$_{730}$/h の効率で生産した（Jindou *et al., ACS Synth. Biol.*, 2014)。さらなるバイオエチレン生産効率の向上を目的として、①基質 S-アデノシルメチオニン(SAM)供給量を増やすため、SAM 合成酵素(SAMS)を、②メチルチオアデノシン(MTA)による ACS の活性阻害を回避させるため、MTA ヌクレオシダーゼ(MTAN)を、それぞれ Ethylenome へ導入したので、その成果を報告する。

【方法および結果】

① *Arabidopsis thaliana* 由来 cDNA クローンから MTAN 遺伝子を、*Clostridium josui* ゲノム DNA から Cel8A 由来ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット AtMTAN-Cjdoc を構築した。② *Streptomyces avermitilis* ゲノム DNA から SAMS 遺伝子を、*Clostridium thermocellum* ゲノム DNA から CipA 由来タイプ II ドックリン遺伝子を、それぞれ PCR 法で増幅させ、これらを融合させたキメラサブユニット SaSAMS-CtdocII を構築した。③ ①、②で得たキメラサブユニットを保持する 2 種のキメラ骨格タンパク質、Cip3C および Cip4、をそれぞれ構築した。①～③で構成される Ethylenome による、シアノバクテリアのバイオエチレン生産効率、およびこれら組換え体の $CO_2$ 固定化能をガスクロマトグラフィーで定量したので、その詳細を報告する。

synechococcus, ethylene, cellulosome

発表番号：4F162
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Trichoderma reesei* における BGLII の生理学的役割

# The physiological role of BGLII in *Trichoderma reesei*

○中村 彩奈[1]、高橋 真智子[1]、松沢 智彦[2]、志田 洋介[1]、矢追 克郎[2]、小笠原 渉[1] ([1]長岡技科大生物、[2]産総研)
○Ayana NAKAMURA[1], Machiko TAKAHASHI[1], Tomohiko MATSUZAWA[2], Yosuke SHIDA[1], Katsuro YAOI[2], Wataru OGASAWARA[1] ([1]Nagaoka Univ. Technol., [2]AIST)

セルラーゼを高生産糸状菌である *Trichoderma reesei* において、セルラーゼ遺伝子群の発現は誘導的であり、誘導物質の存在下で観察される。セロビオヒドロラーゼおよびエンドグルカナーゼの作用によりセルロースが分解されて生じるセロビオースと、β-グルコシダーゼ（BGL）の糖転移活性によりセロビオースから生じるソホロースが、セルラーゼの誘導物質になっていると考えられているが、その詳細は不明である。

*T. reesei* 標準株 QM9414 株を親株として造成されたセルラーゼ高生産変異株 PC-3-7 は、基質にセロビオースを用いた際のセルラーゼ誘導能が強化された菌株である。そのため、セロビオースおよびソホロースによる *T. reesei* のセルラーゼ誘導メカニズムを解析するうえで重要な株である。比較ゲノム解析の結果から、PC-3-7 株は細胞内 BGL である BGLII をコードする遺伝子に変異が生じていることが明らかとなった。この変異を回復させたところ、セロビオースによるセルラーゼ生産性が低下した。さらに、QM9414 株に PC-3-7 株の変異を組み込んだ株では、野生株よりも高いセルラーゼ生産能が獲得された。これらのことから、BGLII の変異が PC-3-7 株のセルラーゼ高生産能に関与していると考えられた。そこで本研究では、*T. reesei* のセルラーゼ発現誘導における BGLII の機能を明らかにするため、PC-3-7 株の BGLII の変異が糖転移活性にどのような影響を与えているのかを明らかにし、セルラーゼの誘導に関する新たな知見を得ることを目的としている。

*Escherichia coli* を宿主として用い、PC-3-7 株における BGLII の変異箇所を 20 種のアミノ酸にそれぞれ置換した BGLII を発現、精製し、HPLC および TLC を用いて糖転移産物の解析および酵素の諸性質についての解析を行った。その結果、野生型 BGLII の糖転移活性によって、ラミナリビオースやセロトリオースに加え、四糖および五糖が生成されていることを明らかにした。野生型 BGLII の他に、A, L, I, S, T, C のアミノ酸置換 BGLII の発現に成功しており、それら変異体についても同様の解析を進めている。また、生成された糖転移産物にセルラーゼの誘導能があるかを調査するため、糖転移産物を炭素源とした誘導についても検証した。さらに、発現が確認できなかった他の変異 BGLII の獲得を目指すため、発現させる手法について現在検討を行っている。

*Trichoderma reesei*, ß-glucosidase, Transglycosylation

発表責任者：中村　彩奈（s155032@stn.nagaokaut.ac.jp）

発表番号：4F163
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# シロアリ腸内に共生する好アルカリ性細菌由来糖化遺伝子のリソース
# BioResources of glycoside hydrolase genes from alkalophilic symbiotic bacillus of the termites

○岸川 昭太郎、村田 武英、小幡 裕一 (理研バイオリソースセンター)
○Shotaro KISHIKAWA, Takehide MURATA, Yuichi OBATA (RIKEN BioResource Center)

世界的な環境・エネルギーの問題を解決する目的で、バイオマスの利用が進められている。しかし、化石由来の燃料や化成品と価格競争が可能なバイオ燃料やバイオプラスチックを、食料と競合しない植物バイオマスから生産するには、まだ多くの課題が残っている。理研バイオリソースセンター(BRC)では、ライフサイエンス研究の発展と社会的課題解決に資する遺伝子材料の開発と整備を進めており、その一環として植物バイオマスの糖化に必要なセルラーゼ関連遺伝子を、産生菌として有名な糸状菌（*Trichoderma reesei*）などから収集し提供を行っている。

今回、我々は木材を効率よく分解するシロアリの一種のムシャシロアリ腸内から単離され、植物バイオマス糖化に有用なアルカリ域で活性をもつ糖化酵素を有する好アルカリ性細菌*Paenibacillus sp.* strain JCM 10914のゲノム情報を元に、セルラーゼを含む23の糖化酵素遺伝子を単離し、大腸菌酵素活性検討を行えるように菌体内発現用と菌体外分泌用大腸菌用発現ベクターにクローニングした。そのうちエンドグルカナーゼ 4種、キシラナーゼ8種について発現検討を行ったところ、エンドグルカナーゼ 1種とキシラナーゼ2種に酵素活性を認めた。活性を認めた3酵素について至適pHを調べたところ、エンドグルカナーゼの至適pHは*Paenibacillus sp.*の生育するアルカリ性域でではなく、酸性域に存在していた。また、キシラナーゼは、酸性域からアルカリ性域まで広く活性を維持していた。これらの酵素活性より、酵素がその酵素を持つ生物の生育環境に必ずしも最適化されているわけではないことが示された。今回報告する酵素遺伝子を含む各種遺伝子リソースは、理研BRC 遺伝子材料開発室より提供している。

理研BRC 遺伝子材料開発室: http://dna.brc.riken.jp/ja/

biomass, xylanases, cellulases

発表責任者：岸川昭太郎（kishikawa@brc.riken.jp）

発表番号：4F164
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

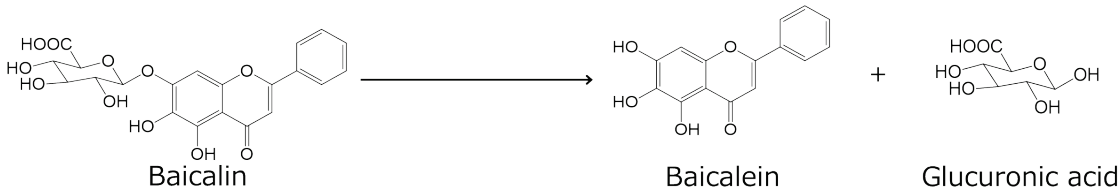
# 漢方薬配糖体成分の脱グリコシル化反応を担う乳酸菌由来新規β-グルクロニダーゼの機能解析

# Characterization of a novel ß-glucuronidase derived from lactic acid bacteria degrading glycoside in herbal medicine

岸野 重信[1]、内堀 良重[1,2]、櫻間 晴子[3]、○渡邊 寛子[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1]（[1]京大院農・応用生命、[2]日東薬品工業、[3]京大院農・産業微生物）

Shigenobu KISHINO[1], Yoshie UCHIBORI[1,2], Haruko SAKURAMA[3], ○Hiroko WATANABE[1], Yasunori YONEJIMA[2], Jun OGAWA[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch., Agric., Kyoto Univ., [2]Nitto Pharm., [3]Lab. Ind. Microbiol., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【目的】漢方薬の主成分の多くは配糖体であり、腸内細菌やヒトの代謝により脱グリコシル化されアグリコンになることで薬効や吸収性が向上することから、漢方薬の薬効に個人差が生じる要因の一つとして腸内細菌叢の関与が指摘されている。そこで、漢方薬の薬効の向上にプロバイオティクスの利用が期待されている。一方、近年注目が高まっている防風通聖散は、高血圧や肥満に伴う諸疾患、湿疹等の改善に効果がある。この主成分の一つは、グルクロン酸配糖体型の Baicalin（Baicalein 7-*O*-β-D-glucuronide）であるが、実際に吸収され薬効を示すのは脱グリコシル化した Baicalein である。当研究室では、Baicalin を Baicalein へと脱グリコシル化する *Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* (ラブレ菌)を見いだし、本反応を触媒する酵素が新規なβ-グルクロニダーゼ（*Lc*GUS30）であることを明らかにしている[1)]。そこで本研究では、*Lc*GUS30 の機能解析を行った。




【方法と結果】*Lc*GUS30 を誘導発現する形質転換大腸菌を作製し、得られた菌体より *Lc*GUS30 を精製した。精製した *Lc*GUS30 を用い、本酵素の基質特異性や至適 pH、至適温度を調べた結果、基質特異性に関して、糖については厳密にグルクロン酸特異的に作用する一方、アグリコンについては幅広い基質について脱グリコシル活性を示すことが明らかとなった。グルクロン酸を有する配糖体として、Baicalin と同様に漢方薬の薬効成分である Wogonoside に対しても脱グリコシル活性を示した。一方で、体内ステロイドホルモンであるヒト由来の基質などに対する親和性は低く、従来報告のある大腸菌由来のβ- グルクロニダーゼとは異なる基質特異性を有することが明らかになった。以上の結果より、*Lactobacillus brevis* subsp. *coagulans* (ラブレ菌)は、漢方薬の配糖体成分を選択的、効率的に変換する有用な菌であることが示唆された。

【参照文献】1) Haruko S., *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 98, 4021-4032 (2014).

herbal medicine, beta-glucuronidase, probiotics

発表責任者：岸野 重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F165
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 脂肪酸アシル CoA を脂肪族アルデヒドに変換する酵素に関する研究
# Studies on an enzyme converting fatty acyl CoA into fatty aldehyde

藤井 宏祐[1]、岸野 重信[1]、中谷 友樹[1]、○宇佐美 陸[1]、伊藤 正和[2]、村松 正善[2]、小川 順[1]([1]京大院農・応用生命、[2]トヨタ自動車)
Kosuke Fujii[1], Shigenobu Kishino[1], Yuki Nakatani[1], ○Riku Usami[1], Masakazu Ito[2], Masayoshi Muramatsu[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Toyota Motor Corp.)

【目的】近年、ガソリンや軽油の主成分である *n*-アルカンの微生物による発酵生産プロセスの開発に注目が集まっている。*n*-アルカンは、脂肪酸の還元によって生じる脂肪族アルデヒドが還元的脱カルボニル化を受けることで生合成されることが知られている。本研究では、脂肪酸を脂肪族アルデヒドに還元する微生物を探索し、脂肪族アルデヒドの生産に関与する酵素および遺伝子の単離を試みた。

【方法・結果】研究室保存菌と自然界からの単離菌を対象に、テトラデカン酸を還元する菌株のスクリーニングを行った。その結果、テトラデカナールを生産する菌株は取得できなかったが、1-テトラデカノールを生産する菌株を 121 株取得した。その中で 1-テトラデカノールの生産能が最も高かった *Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* NBRC3321 株を用いて、脂肪酸還元酵素の精製を試みた。本菌の無細胞抽出液を用いた反応において、テトラデカン酸の還元は認められなかった。しかし、テトラデカン酸誘導体であるテトラデカノイル CoA を基質とした場合には、1-テトラデカノールの生産が認められた。そこで、この無細胞抽出液をカラムクロマトグラフィーに供し、各フラクションのテトラデカノイル CoA 還元活性を評価したところ、1-テトラデカノールを生成せずにテトラデカナールのみを生成するフラクションを得た。このフラクションを用いてさらに精製を行った結果、SDS-PAGE 解析において単一のバンドを示すタンパク質が得られた。得られたタンパク質の N 末端のアミノ酸配列を決定し、この配列について相同性検索を行ったところ、*K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* MGH78578 株由来の酵素と高い相同性を示した。この酵素をコードする遺伝子配列をもとにプライマーを設計し、*K. pneumoniae* ssp. *pneumoniae* NBRC3321 株のゲノムを鋳型としてクローニングを行い、大腸菌の形質転換体を作製した。発現したタンパク質を精製し、反応に供したところ、テトラデカノイル CoA をテトラデカナールに変換することを確認した。

acyl-CoA dehydrogenase, aldehyde, alkane

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F166
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 高いプリン体代謝活性を有する乳酸菌の探索

# Screening of lactic acid bacteria with high purine metabolizing activity

岸田 奈弓[1]、岸野 重信[1]、○雑賀 あずさ[1]、米島 靖記[2]、小川 順[1] ([1]京大院農・応用生命、[2]日東薬品工業)
Nayumi Kishida[1], Shigenobu Kishino[1], ○Azusa Saika[1], Yasunori Yonejima[2], Jun Ogawa[1] ([1]Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., [2]Nitto Pharm.)

【背景・目的】

食事成分のプリン体源となる核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシドは、腸管内において主にプリンヌクレオシドの形態で吸収され、血中へ移行する。吸収されたプリンヌクレオシドはさらに代謝され、最終的に尿酸となる。血中の尿酸量が過剰になると、生活習慣病の一つである高尿酸血症となり、痛風等を引き起こす原因となる。これらの予防策としてプリン体摂取量の抑制が推奨されているが、食事療法では栄養の偏りや、食品のうま味の減少が懸念されるため、近年プロバイオティクスによる予防法が注目されている。腸管からの吸収がプリンヌクレオシドに比べてプリン塩基の方が遅いことから、プリンヌクレオシドのプリン塩基への分解を促進することで、プリン体の血中への吸収が抑制されると考えられる。そこで、本研究ではプリンヌクレオシドの分解活性を有する乳酸菌の探索を試みた。

【方法・結果】

漬物や野菜、果物などの食品から単離した乳酸菌を、MRS 培地にて培養し、洗浄菌体を調整した。得られた洗浄菌体を 4 mM イノシン、2 mM グアノシンを含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液（pH 7.0）1 ml に懸濁後、37 度、嫌気条件下で 1 時間反応を行った。反応後、反応液上清を分析することでプリンヌクレオシダーゼ活性を評価した。その結果、多くの乳酸菌でプリンヌクレオシダーゼ様活性が確認できた。最もプリンヌクレオシダーゼ様活性が高かった M003 株を選抜し、16S rDNA による同定を行ったところ、*Lactobacillus brevis* と同定できた。さらに本株を用いて、反応時間、pH、酸素の影響など反応条件の詳細な解析を行った。

*Lactobacillus brevis*, purine metabolism, nucleosidase

発表責任者：岸野　重信（kishino@kais.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F167
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 基質結合による構造の安定化を利用した乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* 由来 AspT の基質探索手法の検討

# Structural stabilization induced by the substrate binding were used for substrate screening of AspT from lactic acid bacterium *Tetragenococcus halophilus*.

○金 ななせ[1]、宮本 あかり[1]、鈴木 聡美[1]、七谷 圭[2]、阿部 敬悦[1,2,3] ([1]東北大・院・農・応用微生物、[2]東北大・院・農・微生物資源、[3]東北大・未来研)
○Nanase Kon[1], Akari Miyamoto[1], satomi Suzuki[1], Kei Nanatani[2], Keietsu Abe[1,2,3] ([1]Grad. Sch. Agri., Tohoku Univ., Microbial Biotechnology, [2]Grad. Sch. Agri., Tohoku Univ., Microbial Resources, [3]NICHe., Tohoku Univ.)

【背景・目的】微生物を利用したアミノ酸や抗生物質などの有用物質の生産には、細胞内代謝系を改変した株が広く利用されている。しかし、細胞内代謝系の改変のみでは基質の取り込みや生産物の排出が律速となり、より効率的な有用物質生産を行う上で障害となる。そこで、基質の取り込み、あるいは生産物の排出を行う輸送体の機能を改良することで物質輸送を制御し、より効率的な有用物質生産系の構築が進められている。標的化合物を輸送する輸送体の探索には、基質の同定が不可欠だが、膜輸送体は菌体（細胞）膜上での高発現が難しく、さらにその疎水的な性質のため精製の際に界面活性剤による可溶化が必要であり、活性の測定には人口膜小胞（リポソーム）への再構成が必要であるなどの理由から基質の探索がきわめて難しい。そこで本研究では、より簡便に膜輸送体の基質の同定を可能にするため、微量の膜輸送体タンパク質で解析が可能であり、かつリポソームへの再構成を必要としない膜輸送体の基質探索手法の確立を目的とした。
【方法・結果】膜輸送体は、疎水性領域を多く有しているため、熱を与えると安定構造が崩れ、疎水性領域同士が集合・凝集する性質がある。また、膜輸送体は基質と結合することによって構造の安定性が増し、熱変性が抑制されることが報告されている。そこで、本研究では精製した膜輸送体に様々な基質候補化合物存在下で熱を与え、ゲル濾過クロマトグラフィーに供することにより膜輸送体の分子量を観察した。本研究では、既にリポソーム再構成法により、基質特異性や温度安定性、解離定数 $K_D$ 値が決定されているアスパラギン酸：アラニン交換輸送体（AspT）を用いた(1)。始めに、ゲル濾過クロマトグラフィーを行う際の移動相の検討を行った。精製 AspT は、移動相が L-Asp 200mM、NaCl 350 mM を含む時に構造が安定化されきれいなピークを示した。また、加温処理の際にナトリウムイオンを添加することで熱安定性の向上が観察された。以上の条件下で、加温処理時に基質候補化合物を添加して、精製 AspT の熱安定性を観察した。Sasahara らによって、すでに AspT の親和性の高い基質であることが報告されている L-Asp、D-Asp 存在下で、精製 AspT の熱安定性の向上が観察された。このことから、本手法が基質探索の定性的な手法として有効であることを示すことができた。今後、他の基質候補化合物についても解析を進める。本手法により微量の精製膜輸送体を用いての基質探索が可能になれば、リポソームへの再構成法による基質選択性の検討が難しい輸送体についての基質探索が可能となる。

(1) Sasahara A., Abe K., et al., *J. Biol. Chem.*, 286：29044-29052 (2011)

production of substances, transporter, substrate screening

発表責任者：阿部　敬悦（kabe@niche.tohoku.ac.jp）

発表番号：4F168
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

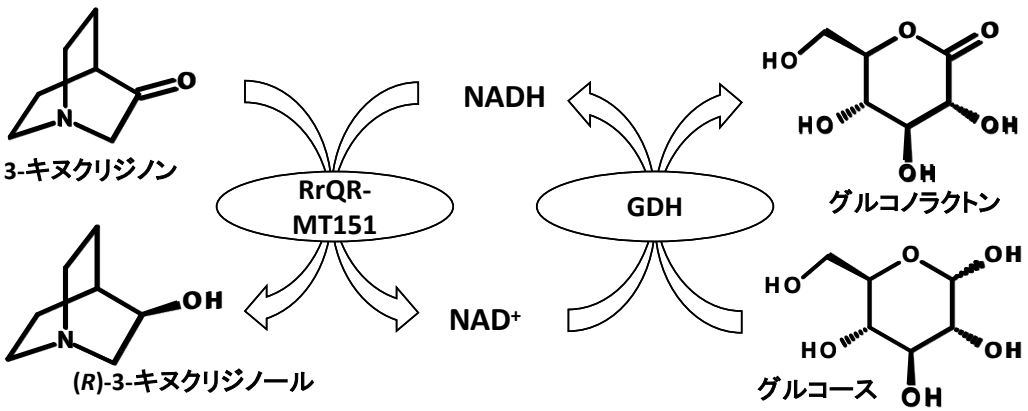
# 変異型キヌクリジノン還元酵素を用いた (*R*)-3-キヌクリジノール生産に関する研究

# Studies on the production of (*R*)-3-Quinuclidinol by mutant 3-quinuclidinone reductase

○李 暁トウ、品田 雅、浦野 信行、松原 充、藤本 良美、片岡 道彦 (阪府大院)
○ Xiaotong LI, Miyabi SHINADA, Nobuyuki URANO, Mitsuru MATSUBARA, Yoshimi FUJIMOTO, Michihiko KATAOKA (Osaka Pref. Univ.)

【目的】 (*R*)-3-キヌクリジノールは認知増強剤や気管支拡張剤などの医薬品の合成中間物質として利用される。前駆体である 3-キヌクリジノンを化学的に還元するだけでは(*R*)-3-キヌクリジノールと同時に(*S*)-3-キヌクリジノールも生成されるため、何らかの方法によって選択的に還元する必要がある。*Rhodotorula rubra* 由来のキヌクリジノン還元酵素 (RrQR) は NADPH を補酵素として 3-キヌクリジノンを不斉還元することで(*R*)-3-キヌクリジノールを生成する酵素である。先行研究において、補酵素の要求性を NADH 依存性に変換し、さらに活性を向上させた変異酵素として RrQR-MT151 を取得した。そこで本研究では、RrQR-MT151 による効率的な(*R*)-3-キヌクリジノール生産を目的とし、組換え *Escherichia coli* を用いた検討を行った。

【方法と結果】 RrQR-MT151 によって消費される NADH を再生供給するためにグルコース脱水素酵素 (GDH) と RrQR-MT151 の遺伝子共発現系の構築を検討し、*E. coli* に対して GDH と RrQR-MT151 の両酵素遺伝子を導入した。この共発現菌を用いた反応を行った結果、(*R*)-3-キヌクリジノールの生成が認められたが、同時に(*S*)-3-キヌクリジノールの生成も確認されたことから、(*S*)体の生成活性を持った *E. coli* 内在性酵素の存在が示唆された。そこで (*S*)体生成活性の低い宿主を用いることで (*R*)体過剰率を上昇させることを目指し、宿主 *E. coli* の検討を行った。*E. coli* JM109(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* Origami2 (DE3)を宿主とした GDH と RrQR-MT151 の共発現菌を作製した。その結果、*E. coli* BL21(DE3)を用いたときに、生成量及び(*R*)体過剰率が最も高くなった。現在、さらなる生成量及び(*R*)体過剰率の向上のための共発現系や反応条件の最適化を行っている。




3-quinuclidinol, chiral alcohol, *Escherichia coli*

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

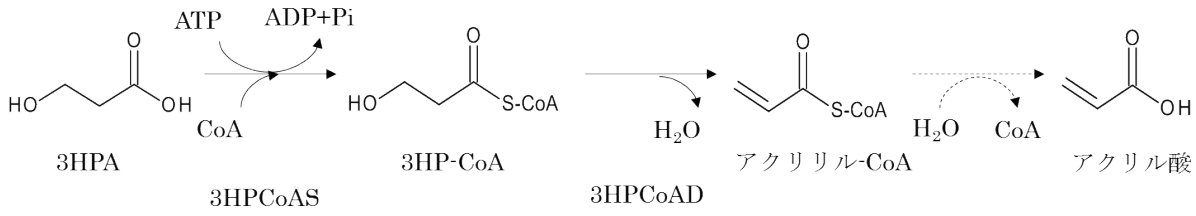
発表番号：4F169
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 微生物酵素を用いたアクリル酸生産に関する研究
# Production of acrylic acid using microbial enzymes

○西本 菜津紀、浦野 信行、西川 恵美、片岡 道彦（阪府大院・生環科・応生科）
○Natsuki NISHIMOTO, Nobuyuki URANO, Megumi NISHIKAWA, Michihiko KATAOKA (Div. Appl. Life Sci., Grad. Sch. Life and Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

[背景・目的]アクリル酸は高機能性ポリマーや合成樹脂、水性塗料の原料に用いられる有用な物質である。しかし現在アクリル酸の製造は石油化学に依存しており、石油資源の枯渇、$CO_2$ の排出などが問題視されている。そのため、再生可能で安価な炭素源を原料とした微生物による発酵生産が期待されており、本研究では *Sulfolobus tokodaii* 由来の 3-ヒドロキシプロピオニル（3HP）-CoA synthetase (3HPCoAS)と、3HP-CoA dehydratase (3HPCoAD)を用いて 3-ヒドロキシプロピオン酸（3HPA）を出発基質とするアクリル酸の生産を目指した。
[方法・結果]*S. tokodaii* のゲノム DNA から 3HPCoAS と 3HPCoAD の遺伝子クローニングを行い、得られた組換え大腸菌を用いて酵素発現、酵素精製を行った。精製酵素を用いて 3HPA と CoA を基質とした 3HPCoAS 反応を行い、その反応液上清を LC-MS 分析したところ 3HP-CoA に固有の分子スペクトルが確認された。また、3HPCoAS により合成した 3HP-CoA を基質とした 3HPCoAD 反応においてはアクリリル-CoA に固有の分子スペクトルが確認された。さらに発現大腸菌菌体を触媒として用いる酵素反応について検討したところ、組換え大腸菌の熱処理菌体において精製酵素よりも多量の反応生成物を得ることができた。最大生成量として 37.5 mM の 3HPA、7.5 mM の ATP および 7.5 mM の CoA から 3HPCoAS 反応のみにより 4.63 mM の 3HP-CoA を生成、3HPCoAS と 3HPCoAD 反応により 3.65 mM のアクリリル-CoA を生成した。

次に、3HP-CoAS と 3HP-CoAD の共発現菌を作成し、一菌体で 3HPA からアクリリル-CoA までの反応が行えるかを検討したところ、二菌体による反応と同様に 3HPA からアクリリル-CoA の生成が確認できた。現在より高濃度のアクリリル-CoA を生産するために共発現菌における酵素発現量、酵素活性の向上、また、アクリリル-CoA をアクリル酸に変換する酵素の探索を進めている。




acrylic acid, 3-hydroxypropionate, *Escherichia coli*

発表責任者：片岡道彦（kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4F170
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

ショウガ活性 6-ジンゲロールの微生物反応による配糖体に関する研究
Microbial glucosylation of 6-gingerol, a bioactive ingredient of ginger, by *Ensifer adhaerens*.
○松本 里佳[1]、佐藤 浩志[2]、上田 誠[1] ([1]小山高専物質工学科、[2]日生バイオ株式会社)
○ Rika MATSUMOTO[1], Hiroshi SATOH[2], Makoto UEDA[1] ([1]Oyama National College of Technology, [2]Nissei Bio Co)

【目的】ショウガ活性成分の 6-ジンゲロールには殺菌作用、脂肪蓄積防止作用などの生理的作用がある。しかし、6-ジンゲロールは水に不溶であり、また強い辛味と刺激臭を持つことから 6-ジンゲロールの応用分野並びに使用量は限定されているのが現状である。一般にポリフェノール類は配糖化することにより水溶性や刺激性の改善が可能であり、フェノール性水酸基を受容体とした酵素反応例は多い。一方、6-ジンゲロールのアルコール性水酸基への配糖化例はほとんどない [1)]。そこで本研究では微生物反応による 6-ジンゲロール配糖化の探索を行い、微生物反応により得られた配糖体の特性と本酵素活性の諸性質を解明することを目的とした。

【方法】バクテリア、カビなど種々の微生物をマルトースを主炭素源とする液体培地で培養を行い、有機溶媒に溶解させた 6-ジンゲロールを培養液に途中添加することにより酵素活性の探索を行った。生成物の分析は TLC と HPLC により行った。得られた活性株は 16S rDNA 塩基配列解析により同定した。活性株による反応検討は休止菌体を調整しドナーの検討等を行った。得られた 6-ジンゲロール配糖体の同定は $^1$H-NMR を用い、グルコシド結合の様式は市販のα－,β－グルコシダーゼを用い確認した。

【結果】活性株の探索の結果、マルトースの添加により 6-ジンゲロールの側鎖水酸基配糖体を生成する微生物を取得した。得られた活性株は 16S rDNA 塩基配列解析により *Ensifer adhaerens* M-26 株と同定した。生成した配糖体は 6-ジンゲロールと比べ水溶性が向上し、反応液から酢酸エチル等による溶媒抽出とヘキサン等による優先晶析により容易に粗精製が可能であった。精製した配糖体は $^1$H-NMR により 6-ジンゲロールの側鎖水酸基にグルコースが転移した構造であることが判明した。さらに、反応の諸性質について検討結果を報告する。

1) Teruyo Ojima, Kenta Aizawa, Wataru Saburi and Takeshi Yamamoto
Carbohydrate Research, **354,** 59-64(2012)

6-gingerol, Glcosylation, *Ensifer adhaerens*

発表責任者：上田誠（mueda@oyama-ct.ac.jp）

発表番号：4F171
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# シークワァーサー由来フラボノイドメチル化酵素を利用したメチル化フラボノイド生産

# Bioproduction of methylated flavonoids using flavonoid *O*-methyltransferase from *Citrus depressa*

○戸田 弘、早苗 千晶、伊藤 伸哉（富県大生工研セ）
○Hiroshi TADA, Chiaki SANAE, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

【研究目的】フラボノイドは植物が生産する二次代謝産物であり、その種類は 1 万種以上に上ると推測されている。これらのフラボノイドは植物体内において、メチル化や配糖化など様々な修飾を受けた形で存在しており、花弁の色調調整、病害虫防除、シグナルセンシング等多岐に渡る生理機能を有する。またこれらのフラボノイドは我々人間に対しても様々な生理活性を有することが明らかとなっており、古来より漢方や民間薬として利用されてきた。メチル化フラボノイドの機能としては抗アレルギー、抗腫瘍活性、肥満抑制、認知症予防などが知られておりその高度利用が期待される。しかし、これらの成分は植物体内に微量しか存在せず、その抽出精製品は高額なものが多い。そこで本研究では、メチル化フラボノイドの高度利用を目的として、植物より *S*-アデノシルメチオニン(SAM)依存フラボノイド *O*-メチル基転移酵素(FOMT)を単離・取得し、その物質生産への応用を試みている。
【実験方法・結果】沖縄県産柑橘類であるシークワァーサーより複数の FOMT 様遺伝子を単離し、大腸菌による異宿主発現を試みた。単離した 5 つの FOMT 遺伝子のうち、CdFOMT5 および CdFOMT6 の 2 遺伝子について、有意なフラボノイドメチル化活性が認められた。これら FOMT の酵素学的特性を解析した結果、CdFOMT5 はフラボノールの A および C 環の水酸基に対して広くメチル化活性を示し、CdFOMT6 は B 環の 3’位水酸基に対して特異的にメチル化活性を示すことが明らかとなった [1)]。これらの発現菌体を用いてメチル化フラボノイドの生産試験を行った結果、CdFOMT5 発現菌体を用いた時にはケルセチンを基質としたときテトラメトキシケルセチンを最終産物として蓄積することが明らかとなった。一方、CdFOMT6 発現大腸菌体を用いたとき、ケルセチンをはじめミリセチン、ルテオリン、フィセチン、エピカテキン、エピガロカテキン、エリオジクチオールなどに対しメチル化産物の蓄積が確認できた。また、ミリセチンを基質としたときにはメチル化産物と思われるピークが 2 つ検出され、これらは B 環の 2 ヵ所の水酸基(3’/5’-OH)がメチル化された 3’,5’-ジメトキシミリセチンであることが確認された。さらにこれらのメチル化フラボノイドの生産性を向上させるために、SAM 合成酵素(SAM シンターゼ)および *S*-アデノシルホモシステイン加水分解酵素(SAH)の共発現菌体を作成した。現在これらの株において、メチル化フラボノイド生産性に対する導入遺伝子の効果を検討中である。

1) 特願 2013-214464：シークヮーサー由来フラボノイド O-メチル転移酵素(FOMT)及びその利用

Flavonoid, Flavonoid *O*-methyltransferase, *Citrus depressa*

発表番号：4F172
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Sphingobium* sp. BD3100 株のベルベリン脱メチレン化酵素遺伝子の解析
Characterization of demethyleneation genes for berberine degradation in *Sphingobium* sp. strain BD3100

○武田 尚[1]、石川 和樹[1]、若菜 大悟[1]、福田 雅夫[3]、佐藤 文彦[2]、細江 智夫[1] ([1]星薬大、[2]京大院生命、[3]長岡技大・生物)
○Hisashi TAKEDA[1], Kazuki ISHIKAWA[1], Daigo WAKANA[1], Masao FUKUDA[3], Fumihiko SATO[2], Tomoo HOSOE[1] ([1]Hoshi Univ., [2]Kyoto Univ., [3]Nagaoka Univ. of Tech.)

ベルベリンは、キハダやオウレンなどの植物に含まれ、鮮やかな黄色を呈するベンジルイソキノリンアルカロイドの 1 種であり、抗菌作用を持つ止瀉薬として効果があるとされてきた。しかし、近年はベルベリンの抗酸化作用に由来するコレステロール低下作用・神経変性改善作用などが注目されている。当研究室では、ベルベリン分解能を持つバクテリアの未知の分解物や分解に関与する酵素遺伝子を明らかにすることで、ベルベリンを出発物質とした有用化合物の創出・生産を目的として研究を行っている。当研究室で単離されたグラム陰性菌 *Sphingobium* sp. BD3100 株とグラム陽性菌 *Rhodococcus* sp. BD7100 株は、ベルベリンを唯一の炭素源として生育可能な菌として、その代謝経路の解明を行っている。これまでに、BD3100 株と BD7100 株の共通な代謝物として demethyleneberberine が同定されている。最近、BD7100 株におけるトランスポゾンを用いた変異株の解析から、ベルベリンを demethyleneberberine に変換する酵素遺伝子 *brdA* が特定された。本研究では、BD7100 株の *brdA* と相同性を示す BD3100 株の遺伝子の機能について解析を行った。

BD3100 株のドラフトゲノム解析から、BD7100 株の BrdA のアミノ酸配列と 31%の同一性を示す CDS1201 および 30%の同一性を示す CDS1137 遺伝子の二つを見出し、それぞれ *brdA1* および *brdA2* と名付けた。BrdA1 と BrdA2 のアミノ酸配列は 61%の同一性を示し、BLAST 検索の結果、それぞれグリシン開裂系の GcvT やバニリン酸・シリンガ酸脱メチル酵素である LigM, DesA と相同性が見られた。BD3100 株の *brdA1* 遺伝子の破壊株の作製を行い、休止菌体によるベルベリンの分解を HPLC で調べた結果、ベルベリンの減少と demethyleneberberine の蓄積が見られ、*brdA2* が機能していることが示唆された。そこで、*brdA1, brdA2* の二重破壊株を作製し、同様に休止菌体によるベルベリンの分解を調べた結果、demethyleneberberine は検出されなかった。この結果から、BD3100 株において *brdA1* と *brdA2* の両方がベルベリンの脱メチレン化に関与していることが示唆された。*brdA2* 破壊株の休止菌体は *brdA1* 破壊株よりも速やかなベルベリンの減少がみられ、BD3100 株においてベルベリンの脱メチレン化に *brdA1* が主要な役割を担っていることが示唆された。さらに、BrdA1 の機能を明らかにするために、N 末端に His-Tag を付加した BrdA1 を大腸菌で発現させた。精製した BrdA1 はベルベリンの変換活性を示さなかったが、BrdA1 を含む大腸菌粗酵素抽出液ではベルベリンが減少し、demethyleneberberine の生成がみられた。

berberine, alkaloid, biotransformation

発表番号：4F173
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Phialemonium* sp. AIU 274 由来ω-アミノ基酸化酵素と *Pseudomonas* sp. AIU 362 由来アルデヒド酸化酵素によるジカルボン酸の合成

# Production of dicarboxylic acids by an enzyme oxidizing ω-amino group of aminocarboxyric acid, aminoalcohols and amines from *Phialemonium* sp. AIU 274 and aldehyde oxidase from *Pseudomonas* sp. AIU 362

○大江 光章、山田 美和、北條 渉、山下 哲郎、礒部 公安 (岩手大農)
○Mitsuaki OOE, Miwa YAMADA, Wataru HOJO, Tetsuro YAMASHITA, Kimiyasu ISOBE (Iwate Univ.)

【目的】我々は、*Phialemonium* sp. AIU 274 が中長鎖 ω-アミノ化合物を酸化する稀有な酸化酵素を産生することを見出しており[1]、応用のひとつとして、本酵素を中長鎖 ω-アミノカルボン酸を原料としたジカルボン酸合成に利用することを目指している。ジカルボン酸は、アミン類との縮合反応によるポリマーの合成に利用でき、特に炭素数が 6 のアジピン酸は、6,6-ナイロンの原料として有名であるが、炭素数が 6 以上の中長鎖ジカルボン酸においても、多様なポリマー原料としての活用が期待できる。我々は、これまでの研究で、本酵素と基質特異性の広い *Pseudomonas* sp. AIU 362 由来アルデヒド酸化酵素[2]を組み合わせ、6-アミノヘキサン酸からアジピン酸を合成可能なことを確認している。そこで、本研究では、アジピン酸合成量に対する酵素反応条件の影響、および同方法による炭素数が 7、8 のジカルボン酸（ピメリン酸、スベリン酸）合成の可能性について検討を行った。
【方法】ω-アミノ化合物酸化酵素は、6-アミノヘキサン酸を窒素源とする培地で 1 日間培養した菌体を破砕した後、硫安塩析と 3 種のカラムクロマトグラフィーによって精製した。アルデヒド酸化酵素は、2-メトキシエタノールを炭素源とする培地で 5 日間培養した菌体から、硫安塩析と 5 種のカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。続いて、6-アミノヘキサン酸、7-アミノヘプタン酸、もしくは 8-アミノオクタン酸に上記 2 種の酸化酵素を pH 7.0 で段階的に反応させた。各反応生成物は LC-MS 分析で同定し、生成量は HPLC 分析で定量した。
【結果】第一段階目の反応は、6-アミノヘキサン酸を出発物質として、ω-アミノ化合物酸化酵素添加量、反応温度、反応時間を検討した。その結果、0.3 U の ω-アミノ化合物酸化酵素を添加し、30℃で 24 時間反応した時、反応生成物である 6-オキソヘキサン酸生成量が最大に達した。また本反応系にカタラーゼを添加することで 6-オキソヘキサン酸の生成量を約 5 倍向上させることに成功した。続いて、アルデヒド酸化酵素を添加する第二段階目の反応について、反応温度を検討した結果、40℃の反応でアジピン酸合成量が最大となった。同様の反応条件で 7-アミノヘプタン酸および 8-アミノオクタン酸に２種の酵素を反応させた結果、ピメリン酸、スベリン酸の生成が確認された。よって、上記 2 種の酸化酵素を組み合わせる方法は、多様な中長鎖ジカルボン酸の合成に応用することが可能である。

[1] K. Isobe et al., Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 96, 89-95 (2013)
[2] Y. Sasaki et al., Journal of Bioscience and Bioengineering, 106, 297-302 (2008)

*Phialemonium* sp., ω-amino group oxidase, dicarboxylic acid

発表番号：4F174
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Hericium coralloides* 由来ラッカーゼ（Lcc2）の *A. oryzae* での効率的発現とポリフェノール変換反応

# Extracellular expression of Lcc2 (laccase) gene of *Hericium coralloides* using *A. oryzae* system and its application to polyphenol oxidation

○伊藤 伸哉、戸田 弘、高木 伸也、黒川 純司（富山県大工）
○Nobuya ITOH, Hiroshi TODA, Shinya TAKAGI, Junji KUROKAWA (Toyama Prefectural Univ.)

**【研究目的・経緯】**ラッカーゼは担子菌や細菌類など様々な生物種においてみられるフェノールオキシダーゼの一種であり、活性中心に銅イオンを含む。担子菌類が持つラッカーゼは木材のリグニン分解等に深く関与し、様々なフェノール化合物の酸化反応を行うことが知られている。近年このラッカーゼを食品添加剤や機能性食品成分合成へと利用する研究が進められている。我々はこれまでに、緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート(EGCg)と没食子酸をラッカーゼにより酸化重合させ、エピテアフラガリン 3-*O*-ガレート(ETFGg)へと変換するバイオプロセスについて研究を行ってきた(1,2)。ラッカーゼ活性を指標としたスクリーニングの結果、担子菌 *Hericium coralloides* が分泌生産するラッカーゼ Lcc2 が効率よく EGCg を ETFGg へ変換することが明らかとなった。この Lcc2 を *S. cerevisiae* や *P. pastoris* にて異宿主発現させ、各種ポリフェノール化合物に対する活性を検討した結果、レスベラトロールやイソオイゲノールを酸化しこれらの二量体(δ-ビニフェリン、リカリン A)を生成することが明らかとなった。しかしながら、酵母を用いた発現系では酵素の発現量が少なく、産業利用には難しいと考えられる。そこで本研究では、糸状菌 *A. oryzae* を宿主とした Lcc2 発現系の構築および各種ポリフェノール化合物生産への応用を検討した。

**【実験方法・結果】**Lcc2 遺伝子を SOD(スーパーオキサイドディスムターゼ)プロモーター下流に連結し、糸状菌発現ベクターpPTRI-1 に挿入した。得られたプラスミド pPTRI-PsodM-Lcc2 を *A. oryzae* NBRC30113 にプロトプラスト-PEG 法で導入し、ラッカーゼ活性を示す形質転換体を得た。単胞子分離による純化を経て形質安定株を得た後、各種培養条件によるラッカーゼ発現量の検討を行った。培地、炭素源濃度、培養日数、銅イオン濃度、界面活性剤添加など各種条件を検討した結果、デキストリン-ポリペプトン(DP)培地でラッカーゼが高発現することが明らかとなった。また N 源濃度よりも C 源濃度の方が活性発現への寄与が大きく、5%のデキストリンおよび 1 mM $CuSO_4$ を添加することで最大活性を得ることができた。最適条件下における酵素発現量は培地上清あたり 8 U/mL となり、*P. pastoris* を宿主としたときの約 20 倍まで発現量を向上させることができた。現在、本発現系によるラッカーゼの大量発現と発現酵素の性状比較を行い、各種フェノール化合物に対する酸化活性と化合物生産への応用を検討している。

1) 特開 2013-179849：ラッカーゼ及びそれを用いたエピテアフラガリンの製造方法
2) Itoh N., et al., Enz Microbial Tech., doi:10.1016/j.enzmictec.2015.09.004

laccase, *Hericium coralloides*, polyphenol oxidation

発表責任者：伊藤伸哉（nbito@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：4F175
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 枯草菌を宿主とした L-glucose 生産系構築に向けた試み
# Experiments toward the production of L-glucose in *Bacillus subtilis*

○久住 夏紀[1]、清水 哲[1]、吉田 健一[2]、中村 顕[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]神戸大・農)
○Natsuki Kusumi[1], Tetsu Shimizu[1], Kenichi Yoshida[2], Akira Nakamura[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Kobe Univ.)

【目的】日本などの先進国では、成人病対策やダイエット志向の高まりにより、アスパルテーム等の低カロリー合成甘味料が多く利用されている。ところがこれらは糖類ではないため、砂糖とは異なる独特な甘味を呈し、万人には受け入れられていないのが現状である。ヒトはブドウ糖である D-glucose を代謝することができるが、その立体異性体である L-glucose は代謝することができない。そのため、自然な甘味を呈する L-glucose の代替甘味料としての利用が期待されているが、L-glucose は天然には存在しておらず、現在までに報告されている化学合成方法では高価なため、実用化には至っていない。

我々が明らかにした *Paracoccus laeviglucosivorans* の L-glucose 代謝経路では、L-glucose は LgdA により L-gluconate へ、さらに LgnH により 5-keto-L-gluconate へと変換されて代謝される。また近年報告された超好熱菌 *Thermotoga maritima* (*Tma*)の新たな inositol 代謝経路では、*myo*-inositol は一般的な IolG により inosose へと変換された後、同経路に特異的な IolM (inosose dehydrogenase), IolN (diketo-inositol hydratase)による反応により 5-keto-L-gluconate へと変換され、さらに代謝されていく。そこで、枯草菌 inositol 代謝経路の IolG 及び上記の IolM, IolN、そして LgnH の逆反応を組み合わせることにより、自然界に豊富に存在し安価な inositol から 5-keto-L-gluconate を経由して L-gluconate を生産する系を、枯草菌を宿主として構築することを当面の目的とした。最終的には L-glucose を直接生産する系の構築を目指す。

【方法及び結果】*Tma*IolMN は超好熱菌由来の酵素であるため、枯草菌の生育温度である 37℃では活性が著しく低下する。そこで同様の代謝経路を持つと推定される 6 種の菌株由来の IolMN オルソログを大腸菌で発現させ、それぞれの活性を NADH の生成に伴う 340 nm の吸光度変化および GC/MS を用いた検出によって測定した。その結果、*Desulfotomaculum nigrificans* (*Dni*)および *Aneaerobaculum hydrogeniformans* (*Ahy*)由来の IolM が *Tma*IolM と同じ酵素活性を有しており、特に *Dni*IolM が 37℃で *Tma*IolM の約 7 倍と、最も高い活性を示すことが明らかとなった。また GC/MS 分析により *Tma*IolM と *Tma*IolN の coupling 反応の産物が標品 5-keto-D-gluconate と一致し、*Tma*IolN の代わりに *Ahy*IolN を用いた場合も同じ結果が得られたことから、*Ahy*IolN が *Tma*IolN と同じ酵素活性を有することが明らかとなった。更に *Dni*IolM と *Ahy*IolN の coupling 反応により inosose から 5-keto-L-gluconate への変換が可能であることを確認した。現在 *DniiolM* および *AhyiolN*、さらに *lgnH* を枯草菌高発現ベクター pHT255 にクローニングし、枯草菌での発現を試みている。

L-glucose, *Bacillus subtilis*, Bioconversion

発表責任者：久住夏紀（s1530215@u.tsukuba.ac.jp）

発表番号：4F176
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 土壌から分離した細菌の COS 分解活性及び COS hydrolase 遺伝子の分布

# COS degrading activity of bacteria isolated from soil and distribution of COS hydrolase speculated by its gene

○小川 貴弘[1]、加藤 広海[2]、片山 葉子[1]（[1]農工大・農、[2]東北大・院生命）
○Takahiro OGAWA[1], Hiromi KATO[2], Yoko KATAYAMA[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]Tohoku Univ.)

【背景・目的】硫化カルボニル (COS) は対流圏に最も多く存在する気体状硫黄化合物であり、その濃度は 500 pptv 前後である。対流圏において COS は安定であることからその一部は成層圏へ移行し、光分解により硫酸に分解される。この硫酸が凝結核となり、気候変動やオゾン層破壊に影響を及ぼす硫酸エアロゾルになることから、その起源物質として COS の動態を把握することは重要である。対流圏における主な消失源は植物や土壌が知られているが、我々は土壌微生物として重要な放線菌について COS 分解細菌を分離した。

一方、独立栄養性の硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thioparus* THI115 を、唯一のエネルギー源としてチオシアネート（$SCN^-$）で成長させた時に $SCN^-$が硫酸へ酸化される過程で COS が中間体である事及び培養条件によってはその一部は生成及び分解される事、さらにその反応に関わる酵素の精製を行い、SCN hydrolase (EC 3.5.5.8) や COS hydrolase の結晶構造や生化学的な性質を明らかにした。

本研究では土壌から分離した COS 分解細菌 9 菌株及び、菌株保存機関の放線菌の分譲菌 20 菌株間の COS 分解活性を比較し、さらに、COS 分解細菌に COS hydrolase 遺伝子が存在するか明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】COS 分解活性を比較するために、全有機炭素 (TOC) を測定し、TOC 当たりの COS 分解速度定数を求めた。*Dietzia* 属細菌や *Mycobacterium* 属細菌の COS 分解活性は 2～12 $h^{-1}$ $mg\text{-}C^{-1}$ の範囲で比較的高かったものの、系統的に近い菌株間でもそれらの活性は異なり、傾向は掴めなかった。このうち、大気レベルの低濃度の COS (～500 pptv) の分解能を有する微生物の種類は限られたが、COS 分解能は土壌微生物に広く保持されており、これらの土壌微生物が土壌環境における COS 分解を担っていると考えられる。

COS hydrolase 遺伝子の存在の確認は PCR 法によって行った。先ず、*T. thioparus* THI115 の COS hydrolase 及びそれと相同性の高いβ-carbonic anhydrase において保存性の高いアミノ酸配列から、COS hydrolase のアミノ酸配列に基づいて縮重プライマーを設計した。土壌から分離した COS 分解細菌から精製した DNA に対して PCR、更に PCR 増幅産物のシークエンス解析を行った。その結果、8 菌株中 4 菌株で COS hydrolase の部分領域に類似した塩基配列の存在が明らかになり、土壌微生物による COS 分解のメカニズムのひとつとして COS hydrolase の寄与が示唆された。

carbonyl sulfide, COS hydrolase, Actinomycetes

発表責任者：小川貴弘（togawa@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：4F177
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *Eggerthella sp. YY7918* の daidzein reductase の酵素学的性質

# Enzymatic characterization of daidzein reductase from *Eggerthella sp. YY7918*

○川田 結花[1]、五島 智子[2]、横山 慎一郎[3]、鈴木 徹[2] ([1]岐阜大学連合農学研究科、[2]岐阜大学応用生物科学部、[3]岐阜県産業技術センター)
○Yuika KAWADA[1], Tomoko GOSHIMA[2], Shin-ichiro YOKOYAMA[3], Tohru SUZUKI[2] ([1]Gifu United Grad.School agricultural Sci., [2]Gifu Univ., [3]Gifu Pref.)

【目的】

大豆イソフラボンである daidzein は特定の腸内細菌によって equol へと代謝される。equol はエストロゲンレセプターへの結合活性を示すため更年期障害の緩和、骨代謝改善効果などホルモン性疾病への関与が報告されている。daidzein を equol へ変換する酵素として daidzein reductase、dihydrodaidzein reductase、tetrahydrodaidzein reductase と 3 つの reductase が関与していることが *Lactococcus*、*Slackia*、において報告され、我々は過去に *Eggerthella* に関して報告した。BLAST によるアミノ酸相同性検索の結果、報告されているものの中で daidzein reductase は特に多様性があることが示唆された。これは daidzein reductase がイソフラボンを代謝する最初のステップで基質認識に関わっていることに関係していると考えられる。そこで当研究室にてヒト糞便より単離されたエクオール生産菌 *Eggerthella* sp.YY7918 株の daidzein reductase の諸性質を明らかにした。

【方法・結果】

pColdII に挿入した Daidzein reductase 遺伝子は IPTG を用いず cold shock promoter のみを用いて低温誘導を行い大腸菌で発現させた。N-末端に His-tag を付与しイオン交換クロマトグラフィーなどを組み合せて精製し約 69 kDa の目的のタンパク質を得た。酵素活性は逆相 HPLC クロマトグラフィーにて daidzein の変換量を測定することで求めた。本酵素は Old yellow enzyme と高い相同性を示し、FMN binding site を含んでおり flavin 由来と考えられる 370 nm 付近の UV 吸収を示した。また、本酵素は NADPH を補酵素として要求し、嫌気状態においてより高い活性を示した。pH 3.5~8.0、0$^{o}$C~30$^{o}$C と幅広い条件にて安定であった。その他の酵素化学的諸性質についても報告する。

isoflavone, Equol, gut microflora

発表責任者：鈴木徹（suzuki@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4F178
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ポリエチレンテレフタレート資化菌の分離・同定と分解機構の解明

# A bacterium that assimilates polyethylene terephthalate

○吉田 昭介[1,2,5]、平賀 和三[2]、竹花 稔彦[3]、谷口 育雄[2]、山地 広尚[2]、前田 康人[4]、豊原 清綱[4]、宮本 憲二[1]、木村 良晴[2]、小田 耕平[2] ([1]慶應大、[2]京都工繊大、[3]株式会社 ADEKA、[4]帝人株式会社、[5]京大院工)

○ Shosuke YOSHIDA[1,2,5], Kazumi HIRAGA[2], Toshihiko TAKEHANA[3], Ikuo TANIGUCHI[2], Hironao YAMAJI[2], Yasuhito MAEDA[4], Kiyotsuna TOYOHARA[4], Kenji MIYAMOTO[1], YOSHIHARU KIMURA[2], Kohei ODA[2] ([1]Keio Univ., [2]Kyoto Inst. Technol., [3]ADEKA Corporation, [4]Teijin Ltd., [5]Kyoto Univ.)

Polyethylene terephthalate (PET) は、テレフタル酸とエチレングリコールが縮重合した芳香族ポリエステルである。PET は強度や柔軟性が高く、ボトルや衣服などの素材として広く利用されている。一方で、PET は生分解されないため、微生物を用いた物質変換は不可能と見なされてきた。このような背景の下、各地で採取した環境サンプルを対象に PET 分解菌の探索を試みた。PET を主な炭素源としてサンプルを培養したところ、PET フィルムを分解する微生物群を見出した。さらにこの微生物群を限界希釈し、PET を炭素源とした集積培養により、単独で PET を分解・資化可能な細菌 *Ideonella sakaiensis* 201-F6 株の分離に成功した。次に 201-F6 株の PET 分解機構を明らかにするため、本菌のゲノム解析を実施した。PET 分解酵素遺伝子の探索を試みたところ、既知の PET 分解性酵素と相同性を持つ遺伝子が見出された。本組み換え型タンパク質は PET 加水分解活性を示した。本酵素は既知の PET 分解性酵素と比べて常温で高活性であり、PET に対する基質特異性が高かったため、PETase と命名した。興味深いことに、PETase は PET を分解して mono(2-hydroxyethyl) terephthalic acid (MHET)を主に生じるが、MHET に対して全く加水分解活性を示さなかった。これまでに数例の PET 分解性酵素について MHET 加水分解能が報告されていたが、これらの相同遺伝子は 201-F6 株ゲノム上に見当たらなかった。そこで 201-F6 株のトランスクリプトーム解析から、目的遺伝子の探索を試みた。種々の培地において、PETase 遺伝子と類似した mRNA 発現動態を示した遺伝子に着目し、組み換え型タンパク質の機能解析を進めた。その結果、本組み換え型タンパク質は MHET を特異的に加水分解することがわかった。以上、本菌が PET を効率的にモノマー化する機構が明らかとなった。

Polyethylene terephthalate, RNA-Seq, hydrolase

発表責任者：吉田昭介（yoshida.shosuke.5u@kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F179
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 土壌から分離された真菌の COS 分解活性及び *Trichoderma* sp. THIF20 株からの COS 分解酵素の精製

# Activity of COS degradation by fungi isolated from forest soil and purification of relevant enzyme from *Trichoderma* sp. strain THIF20

○正木 啓仁[1]、影山 渓[2]、小澤 理恵[3]、松下 保彦[1]、片山 葉子[1] ([1]農工大、[2]国際石油開発帝石、[3]栗田工業)
○Yoshihito MASAKI[1], Kei KAGEYAMA[2], Rie Ozawa[3], Yasuhiko Matsushita[1], Yoko Katayama[1] ([1]Tokyo Univ. of Agric. and Technol., [2]INPEX CORPORATION, [3]Kurita Water Industries Ltd.)

【背景と目的】

硫化カルボニル（以下 COS）は大気中におよそ 500 pptv の濃度で存在する大気微量硫黄ガスであり、温室効果及びオゾン層破壊に関連することが知られる物質である。COS は植物、藻類、地衣類、古細菌などによる分解が知られている。本研究室では *Thiobacillus thioparus* THI115 株より新規 COS 分解酵素を精製し、結晶構造解析を行った(Ogawa et al.,2013)。さらに、COS の主要な消失源でもある土壌から複数の COS 分解細菌を分離しているが、真菌についての COS 分解はほとんど報告がない。そこで本研究では COS 分解能を有する真菌の分離を試み、COS 分解活性の比較を行うとともに、高い活性を示した菌株を用いて分解酵素の精製を試みた。

【方法と結果】

東京農工大学農学部付属 FM 唐沢山及び複数の森林土壌より、PDA 培地を用いて真菌を純粋分離した。PDA 培地で生育させた菌体に 30 ppmv の COS を暴露し、その COS の減少を FPD−ガスクロマトグラフィーで測定することで、COS 分解能を比較した。その結果、分離した 43 株中 38 株に COS 分解活性が確認され、分離された真菌には高い頻度で COS 分解能が見出されることが明らかになった。さらに高い COS 分解能を示した 11 株について、ITS 領域の塩基配列をもとに系統解析を行ったところ、その中の 6 株が *Trichoderma harzianum* に近縁であることがわかり、この内 *Trichoderma* を含む 7 株すべてが 500 pptv から 12500 ppmv の極めて広い濃度範囲で COS 分解をすることが明らかになった。

さらにその中の THIF20 株について COS 分解酵素の精製を行った結果、COS 分解酵素は cell free の状態で安定であり、反応産物として硫化水素を生成することが示された。また、部分精製された画分を用いて native-PAGE 後、硫化水素生成を利用した活性染色法を行うことにより、COS 分解酵素は約 60kDa のサイズのタンパク質であることが判明した。今後、真菌の分解酵素の構造と機能について解析する。

carbonyl sulfide, fungi, *Trichoderma*

発表責任者：片山葉子（katayama@cc.tuat.ac.jp）

発表番号：4F180
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# *N*-アセチルスクロサミンを原料として用いた新規オリゴ糖の酵素合成

# Enzymatic synthesis of novel oligosaccharides using *N*-Acetylsucrosamine as a raw materials

○坂木 洋平[1]、加藤 萌[2]、平野 貴子[2]、袴田 航[1,2]、田代 充[3]、西尾 俊幸[1,2] ([1]日大院生資化・生物資源利用、[2]日大生資化・生命化、[3]明星大理工・総合理工)
○Yohei SAKAKI[1], Moe KATO[2], Takako HIRANO[2], Wataru HAKAMATA[1,2], Mituru TASHIRO[3], Toshiyuki NISHIO[1,2] ([1]Graduate School of Bioresourse Sciences, Nihon Univ., [2]Dept. Chem. and Life Sci. of Bioresourse Sciences, Nihon Univ., [3]Dept. Chem. Science and Technology, Meisei Univ.)

【目的】ラクト-*N*-ビオースや *N*-アセチルラクトサミンのような *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を構成糖として含むヘテロオリゴ糖には、病原菌に対する腸管接着阻害効果やビフィズス菌増殖促進効果などがあることが報告されている。このことから GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖には様々な有用な生理機能が期待できる。当研究室でも GlcNAc 含有ヘテロオリゴ糖の合成について研究しており、現在までの成果として、糖転移型 β-フルクトフラノシダーゼを含むコウジキンの乾燥菌糸を用いて、GlcNAc とフルクトースから成る 2 糖である *N*-アセチルスクロサミン(SucNAc)の合成に成功している[1)]。本研究では、さらに SucNAc にガラクトースを糖転移させ、新規な GlcNAc 含有オリゴ糖の酵素合成を行うことを目的とすると共に、生成糖の諸性質調査を行うことにした。
【方法】【結果】メリビオースと SucNAc の高濃度溶液に、黒カビの α-ガラクトシダーゼを作用させ、得られた生成物を HPLC により分析したところ、2 種類の生成物が確認できた。そこで、それぞれを分離し、NMR と MS により構造を確認したところ、ラフィノースとプランテオースそれぞれのグルコース残基が GlcNAc 残基に置き換わった *N*-アセチルラフィノサミン(RafNAc)と *N*-アセチルプランテオサミン(PlaNAc)であることが明らかとなった。続いて、合成した RafNAc の性質調査を構造類似体であるラフィノースと比較した。また、PlaNAc は構造異性体である RafNAc と比較した。各オリゴ糖の酸・熱安定性は、各オリゴ糖溶液を pH 3～9、25～100℃で 1 時間インキュベートした後、TLC と HPLC によりその分解の程度を調べた。その結果、弱アルカリ性から弱酸性では各オリゴ糖共に安定であったが、pH 3、100℃の条件下で、ラフィノースはほぼ分解した。一方、RafNAc と PlaNAc はこの条件下でもほとんど分解しなかった。各オリゴ糖の酵素による分解性は、Green coffee beans 由来の α-ガラクトシダーゼや微生物由来の β–フルクトフラノシダーゼなどの分解酵素を作用させることにより調べた。その結果、α-ガラクトシダーゼでは、RafNAc>ラフィノース>PlaNAc の順に分解されやすかった。一方、β–フルクトフラノシダーゼは、RafNAc を分解しなかった。このことから、RafNAc, PlaNAc が化学的にも生物的にも安定なオリゴ糖であることが分かった。以前の研究において、SucNAc とスクロースを比較した際にも、同様の結果が見られたことから、SucNAc, RafNAc, PlaNAc のように GlcNAc を構成糖とすることで、酸性溶液中で安定性が高くなり、また、酵母の β-フルクトフラノシダーゼの作用が受けにくくなることが示唆された。

1) Takako Hirano, Toru Wada, Sumire Iwai, Hitoshi Sato, Makoto Noda, Mai Juami, Masatoshi Nakamura, Yasuko Kumaki, Wataru Hakamata, and Toshiyuki Nishio, *Carbohydr. Res.*, **353**, 27-32 (2012)

oligosaccharide, transgalactosylation, α-galactosidase

発表責任者：坂木　洋平（bryo15010@g.nihon-u.ac.jp）

発表番号：4F181
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# シアノバクテリアによるケトンの不斉還元への赤色パルス光照射が与える影響

# The influence of red plus light on cyanobacterial asymmetric reduction of ketone

○伊藤 賢一[1]、村上 雅彦[1]、青山 忠[1]、中村 薫[2] ([1]日大理工、[2]神大発達科学)
○Kenichi ITOH[1], Masahiko MURAKAMI[1], Tadashi AOYAMA[1], Kaoru NAKAMURA[2] ([1]Nihon Univ., [2]Kobe Univ.)

## 【背景と研究目的】

古来より人類は微生物（生体触媒）を用いて有機化合物を物質変換（生体触媒反応）させ，人間の役に立つ物質群を生産し，それらを利用して繁栄を続けてきた．我々はこれまで，生体触媒として微細藻類，特にシアノバクテリアを用いたケトン類（アセトフェノン誘導体）の不斉還元を行うことにより，医薬化合物の中間体となり得る光学活性アルコールの合成を行ってきた．本反応では，シアノバクテリアが有する NADPH が関与した反応により不斉還元が進行することが判明しており，また NADPH は細胞内の電子伝達系で光エネルギーによって再生産され，反応に利用されていく．先に我々は，NADPH の再生産に利用される照射光に注目し，光の波長やその強度が不斉還元に与える影響を調べるため，生体触媒反応用小型特定波長光照射装置を自作し，これを用いた検討により赤色光の有効性や反応性が光強度に依存していることを報告した．そこで本研究では，反応装置の詳細な解説及びそれを用いて，赤色光を照射光とし，さらに連続光からパルス光へと変化させてシアノバクテリアに照射した場合，ケトンの不斉還元にどのような影響を与えるのかの検討を行ったので，その詳細について報告する．

## 【実験方法】

十分に育成したシアノバクテリア：*Synechocystis* sp. PCC 6803 懸濁液から，培地を用いて $OD_{750}$ ＝ 1.0 の反応懸濁液を調製し， かく拌用ガラス棒を入れたネジ口瓶に 6 mL 分け取った．これに DMSO（50 μL）に溶解させた 2’,3’,4’,5’,6’-Pentafluoroacetophenone（1.0 mg, $5.0 \times 10^{-3}$ mmol）を加えて，反応装置上に容器を載せて固定し，DT 比（明期時間／周期）：50 % の各種赤色パルス光（660 nm, 20 W $m^{-2}$：110 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$）照射下，25 °C, 120 r.p.m.で反応を行った．また，同時に比較対象として赤色連続光（660 nm, 10 W $m^{-2}$：55 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$）照射下で反応を行った．反応終了後，酢酸エチルにより溶媒抽出を行い，生成物の化学収率及び立体選択性はガスクロマトグラフィーによる分析で求め，連続光の実験で得られた化学収率を基準とし，各種パルス光の結果を相対化して比較検討を行った．

## 【実験結果】

パルス光周期を 0.1, 1.0, 10, 100, 500, 750, 1000, 2000, 4000, 5000, 10000, 20000, 100000 及び 1000000 ms で反応を行った結果，反応時間：24 時間において 0.1 から 500 ms までは連続光照射条件とほぼ同等の収率となったが，750 ms を境に 1000 ms より周期が長くなると収率が低下することが判明した．しかしながら，その収率は連続光の約 60 % 程度で一定となる（収束する）結果となった．

cyanobacteria, asymmetric reduction, red plus light

発表責任者：伊藤賢一（k-itoh@chem.ge.cst.nihon-u.ac.jp）

発表番号：4F182
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# アコニット酸イソメラーゼ遺伝子を異種発現させた組換え大腸菌の細胞反応によるクエン酸からの *trans*-アコニット酸生産

# Bioproduction of *trans*-Aconitic Acid from Citric Acid by Whole-cell Reactions of *Escherichia coli* Heterologously Expressing Aconitate Isomerase Gene

○丸海老 純也、油原 かほり、小林 慶一、桐村 光太郎（早大理工・応化）
○Junya MARUEBI, Kahori YUHARA, Keiichi KOBAYASHI, Kohtaro KIRIMURA (Dept. Appl. Chem., Fac. Sci. Eng., Waseda Univ.)

【目的】*trans*-アコニット酸は機能性高分子原料としての用途があり、バイオプロセスによる生産が期待されている有機酸である。アコニット酸イソメラーゼ（AI; EC 5.3.3.7）は、植物や *Pseudomonas* 属細菌等の微生物に存在し、*cis*-アコニット酸と *trans*-アコニット酸の異性化反応を触媒する酵素である。本研究では、*Pseudomonas* sp. WU-0701[1, 2] 由来の AI 遺伝子を高発現させた組換え大腸菌の細胞反応を利用した *trans*-アコニット酸生産を検討した。
【方法および結果】上述の AI 遺伝子を、大腸菌 *Escherichia coli* Rosetta 2(DE3)を宿主として異種発現させることで、組換え酵素を活性のある可溶性タンパク質として取得した。取得した組換え酵素は、*cis*-アコニット酸を基質とする *in vitro* 反応において、最適反応 pH が 6.0、最適反応温度が 37°C であり、*Pseudomonas* sp. WU-0701 由来の AI と同一であることを確認した。また、AI 遺伝子を異種発現させた大腸菌の細胞反応により、37 °C、120 分間の反応で 100 mM のクエン酸から 32.4 mM の *trans*-アコニット酸生産に成功した。さらに、クエン酸から *cis*-アコニット酸への反応を促進するためアコニターゼ (AH; EC 4.2.1.3) 遺伝子を *E. coli* W3110 よりクローニングし、*E. coli* Rosetta 2(DE3)を宿主として AI 遺伝子と共発現させた大腸菌を作製した。作製した組換え大腸菌の細胞反応により、37°C、30 分間の反応で 100 mM のクエン酸を原料として 34.8 mM の *trans*-アコニット酸の生産が可能になり、反応時間の短縮に成功した。

1) K. Yuhara, et al., FEBS J., **282**, 4257-4267 (2015). (Editor's choice)
2) 油原 かほり, 他, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 講演番号 4B23a14 (2013).

aconitate isomerase, biocatalyst, *trans*-aconitic acid

発表責任者：桐村光太郎（kkohtaro@waseda.jp）

発表番号：4F183
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 単細胞微生物用液-液界面バイオリアクターの開発

# Development of a novel liquid-liquid interface bioreactor with unicellular microorganisms

○小田 忍、馬場 俊樹、中西 真美、大箸 信一（金沢工大ゲノム研）
○ Shinobu ODA, Toshiki BABA, Mami NAKANISHI, Shinichi OHASHI (Kanazawa Inst. Technol.)

【目的】 中空微粒子(MS)を用いて液体培地／疎水性有機溶媒界面にカビマットを形成させ、これを生体触媒として有機層中の基質を微生物変換する液-液界面バイオリアクターは、脂溶性有用化合物の合成に威力を発揮する(1)。しかしながら、本リアクターは菌糸が発達して物理的に強固なマットを形成し得るカビにのみ適用可能であり、細菌や酵母のような単細胞微生物には適用不能であった。そこで本研究では、中空微粒子同士を粘着させ得るバインダー剤(BM)を用いて、バイオフィルム／中空微粒子層を安定化させ得る新規な単細胞微生物用液-液界面バイオリアクターの構築を図った。

【方法】 Agar や Na-alginate 等の天然高分子、carboxymethylcellulose (CMC)等の半合成高分子、polyvinyl alcohol (PVA)や polyvinyl butyral (PVB)等の合成高分子について、水と有機溶媒に対する溶解性試験並びに水-decane 界面下での MS-BM 層の耐久性試験を行った。選定された BM 材と MS (HB-2051、積水化学)、液体培地、1-d ブロスの配合よりなる新規な単細胞用液-液界面バイオリクターを構築し、*Rhodococcus equi* NBRC 3730 による 2-octanol の 2-octanone への酸化、2-methylcyclohexanol の 2-methylcyclohexanone への酸化、(*RS*)-citronellol の(*R*)-citronellal への酸化等に適用し、その有用性を検討した。

【結果】 水と有機溶媒の両者に溶解せず、長期に渡って表面が水和して粘着性を発揮する BM 材として、日本製紙(株)製の CMC 材である Sunrose SLD-F1 並びに SLD-FM を選定した。両者とも、MS (HB-2051) 300 mg 当り 10 mg、液面積 1 $cm^2$ 当り 1.4 mg の配合で十分に効果を発揮した。そこで次に、BM 材として SLD-FM、MS として HB-2051 を用いた本システムに、上記の微生物変換反応を適用した。*R. equi* NBRC 3730 による 5% 2-octanol の酸化では、エマルジョン系反応では強い基質毒性が発現して全く反応は進まず、水-decane 二相系反応では Baeyer-Villiger 酸化による生成物の分解が認められた。これらに対して、界面バイオリアクターではバイオフィルム／MS-BM 層の崩壊が生じずに反応は安定的に進行し、12 日間の静置培養で 33 g/L もの 2-octanone の蓄積が認められた。同株による 2-methylcyclohexanone 並びに(*RS*)-citronellol の酸化等についても、良好な成績が得られた。以上の結果より、微生物変換用システムの液−液界面バイオリアクター並びに発酵生産用システムの(抽出)液面固定化システムへ、細菌、酵母、放線菌、微細藻類を適用できることとなった。

(1) 小田 忍、バイオサイエンスとインダストリー, **70**, 124–127 (2012).

interface bioreactor, microbial transformation, bioreactor

発表責任者：小田 忍（odas@neptune.kanazawa-it.ac.jp）

発表番号：4F184
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 酵素を利用した *myo*-inositol 合成法の開発

# An *in vitro* enzyme system for the production of *myo*-inositol

○藤澤 智子[1]、跡見 晴幸[1,2] ([1]京大院・工、[2]JST, CREST)
○Tomoko FUJISAWA[1], Haruyuki ATOMI[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST)

【背景・目的】*Thermococcus kodakarensis* は超好熱性アーキアの 1 種で、デンプンを含む様々な有機物を分解・資化して生育する。*T. kodakarensis* はデンプンを利用する際、まず amylopullulanase の働きにより細胞外でデンプンをマルトオリゴ糖にまで分解し、細胞内に取り込む。取り込まれたマルトオリゴ糖は、加水分解および ADP-dependent glucokinase によるリン酸化反応を介した経路と、maltodextrin phosphorylase (MalP) による加リン酸分解および phosphoglucomutase (PGM) によるリン酸基転移反応を介した経路により glucose 6-phosphate (G6P) に変換されることが示唆されている。後者の代謝経路による G6P 生成は、ATP の消費を伴わないため、*in vitro* において必要酵素と加リン酸分解に必要なリン酸のみで反応がある程度進行すると考えられる。さらにこの経路と、G6P を *myo*-inositol 3-phosphate synthase (MIPS) により *myo*-inositol 3-phosphate (I3P) に変換し、*myo*-inositol monophosphatase (IMPase) による脱リン酸反応で *myo*-inositol を生成する経路とを組み合わせることで、リン酸を再生させながら *myo*-inositol を合成できると考えた。そこで本研究では上記の経路を利用した *in vitro* におけるアミロースからの *myo*-inositol 合成系の構築を目指した。

【方法・結果】本合成系に必要となる 4 種の酵素について、MalP および PGM は *T. kodakarensis*、MIPS は超好熱性アーキア *Archaeoglobus fulgidus*、IMPase は超好熱性バクテリア *Thermotoga maritima* のゲノムからそれぞれ遺伝子を増幅し、pET21a(+)に挿入して発現ベクターを作製した。これらの発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、IPTG による発現誘導を行った。超音波破砕を行い、得られた大腸菌粗抽出液に 90℃、10 分間の熱処理を施した。こうして得られた 4 種の酵素の粗精製溶液とアミロースを *in vitro* で反応させ、その反応後の溶液を HPLC によって解析した結果、*myo*-inositol の生成が確認された。現在は *myo*-inositol の生成効率の向上を目指して反応系のスケール、基質濃度、反応温度、酵素量等の検討を進めている。

*myo*-inositol, metabolic engineering, thermophile

発表番号：4F185
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 組換え枯草菌によるショ糖からの DFA IV 生産の向上にむけて

# Toward the improvement of DFAIV production from sucrose by recombinant *Bacillus subtitlis*

村尾 和樹、阿部 歩、浅野 行蔵、○曽根 輝雄（北大院農）
Kazuki Murao, Ayumi Abe, Kozo Asano, ○Teruo Sone (Hokkaido Univ.)

【背景と目的】DFA IV (di-D-fructofuranosyl-2,6’:2’,6-dianhydride) は新規のプレバイオティック効果をもつオリゴ糖として期待されている. DFA IV はレバンから levanfructotransferase(LFTase)により生産される．先行研究においてショ糖からレバンを生成する levansucrase をもつ Bacillus subtilis 168 に *Arthrobacter nicotinovorans* GS-9 由来の LFTase 遺伝子を発現させることで，単一培養系によるショ糖からの DFA IV 生産が可能となった．しかしながら，未だ高効率な生産には至っておらず，本研究では組み換え枯草菌を用いた単一培養系における生産効率の更なる向上を目指した．
【方法と結果】DFA IV 直接生産菌である *B. subtilis* 168/pLFT-SD36 を, スクロースを基質とした DFA IV 生産培地で坂口フラスコを用いて 37°C で振とう培養した．スクロースは培養 72 時間においてすべて消費され，培養終了後 DFAIV濃度は 35g/L に達しており，その収率は 17.6%であった．培養液中からエタノール沈殿によりレバンを回収し，定量したところ，13g/L のレバンが残存しており，レバンからの DFAIV生産が律速段階であることが示唆された．ベクターの脱落，プロテアーゼによる分解による LFTase の発現量の低下が考えられたが, ベクターは有意に脱落しておらず, プロテアーゼ阻害剤, プロテアーゼ欠損株を用いても生産量は改善されなかった．さらに，His-タグをつけた LFTase を pET ベクターへと組み込み，大腸菌で発現させた後，アフィニティクロマトグラフィーによって酵素を精製し，単一培養系における LFTase の濃度の影響を検討するため，培養中に大腸菌で発現させた精製 LFTase の添加を試みた. その結果, 精製 LFTase の添加によって DFAIV生産速度の上昇は見られたが, 最終的な生産量に変化は見られなかった．さらに，高濃度で精製 LFTase を添加したものは DFAIV の生産量が減少し，代わりにレバンビオースが生成していることが分かった．次に，DFAIV 生産の平衡を明らかにするため，精製した LFTase と *B.subtilis* の培養液中から抽出したレバンを用いて酵素反応を行った. その結果, 10g/L のレバン溶液に対する酵素反応は DFAIV が 65%, レバンビオースが 15%, フルクトースが 5%で生成した時に平衡に達することが分かった．さらに，LFTase の高濃度条件下では LFTase によって DFAIV が分解され，レバンビオースが生成することが明らかとなった．これらの結果から，レバンからの DFAIV 生成の向上には酵素量の増加ではなく，レバンの生成量の増加あるいは LFTase の改変による平衡状態の改善が必要であることが示唆された．今後はスクロースからのレバン変換効率の向上，およびレバナーゼ欠損によるレバンの分解を阻害することで生産効率の向上を目指したい.

DFAIV, *Bacillus subtilis*, Levan

発表責任者：曽根輝雄（sonet@chem.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4F186
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

フルオロ酢酸分解活性の向上したハロ酸デハロゲナーゼ L-DEX YL 変異体の量子化学計算によるデザインと実験による検証

Design of haloacid dehalogenase L-DEX YL mutants that improve the defluorination activity toward fluoroacetate by Quantum-Mechanical calculation and its verification by activity measurement

○福田 昌寛[1]、山村 眞輝[1]、中村 卓[1]、田中 成典[2]([1]長浜バイオ大 バイオサイエンス、[2]神戸大院システム情報)

○Masahiro Fukuda[1], Masaki Yamamura[1], Takasi Nakamura[1], Sigenori Tanaka[2] ([1]Nagahama Institute of bio-science and Technology, [2]Graduate School of System Informatics, Kobe Informatics)

**[背景]** フッ素化合物は医薬品のように有効利用されているものがある一方で、自然界では残留性が高く環境汚染物質として存在するものもある。我々は環境に有害な有機ハロゲン化合物の一種であるハロ酸の分解を触媒する代表的な酵素 *Pseudomonas* sp. YL 由来の L-2-ハロ酸デハロゲナーゼ（L-DEX YL）を研究している。これまでのところ、L-DEX YL は塩素や臭素のついたハロ酸は分解できるがフルオロ酢酸（MFA）などフッ素のついたハロ酸はほぼ分解できないとされている。

先行研究から、L-DEX YL は基質の L-2-ハロアルカン酸を二段階反応によって分解することが知られている。一段階目では、触媒残基である Asp10 のカルボキシル基の酸素原子が L-2-ハロ酸の C2 炭素に対して求核攻撃を行い、エステル中間体を形成する。二段階目ではエステル中間体の周辺に存在する水分子が Asp10 の $C_\gamma$ 原子を攻撃し、加水分解によって Asp10 の再生と立体反転した D-2-ヒドロキシ酸が生成する。また、L-DEX YL の Asp10, Thr14, Arg41, Ser118, Lys151, Tyr157, Ser175, Asn177, Asp180 が酵素活性において重要な役割を持つことが知られている。本研究では、L-DEX YL－MFA 複合体構造において、MFA と上記の残基を含む MFA の周辺残基については量子化学(QM)計算を行い、それ以外の部分は分子力学(MM)計算を行う QM/MM 法により MFA の脱フッ素化反応の活性化エネルギーを計算し、得られた結果から MFA を効率よく分解できる L-DEX YL 変異体をデザインして、その妥当性をデザインした変異体の MFA 分解活性により検証した。

**[方法]** 量子化学計算ソフト(Gaussian 09) と Gaussian 計算結果可視化ツール(Gauss View 5.0.9)を用いて L-DEX YL－MFA 複合体構造の入力ファイルを作製した。QM/MM 法を用いて L-DEX YL－MFA 複合体の脱フッ素化反応をコンピュータ上で再現し一段階目の反応の活性化エネルギーを算出した。また、反応前構造と遷移状態構造において、QM 法を適用した領域のアミノ酸一つずつに対してエネルギー一点計算を行いその差を算出することでそのアミノ酸ごとの活性化エネルギーへの寄与を測定した（Decomposition Analysis)。Decomposition Analysis で得られた結果を基に、Y12W, W179Y (シングルミュータント), Y12W_W179Y, Y12W_F60Y (ダブルミュータント) の変異体作製を行った。

**[結果と今後の予定]** 野生型の L-DEX YL が MFA を分解するための一段階目の反応の活性化エネルギーは 41.3kcal/mol と算出され、Y12W, W179Y, Y12W_W179Y, Y12W_F60Y ではそれぞれ 44.9 ,46.7 ,45.7 ,45.6 kcal/mol であった。すべての変異体において活性化エネルギーは上昇したが、Y12W においては活性を下げるような Decomposition Analysis の結果が得られた。実験により上記の変異体を作製して、それらの MFA 分解活性を測定する実験に現在取り組んでおり、その結果については本大会で発表する予定である。

Haloacid dehalogenase L-DEX YL, Quantum-Mechanical /Molecular-Mechanical (QM/MM) calculate, Decomposition Analysis

発表責任者：福田 昌寛（b112133@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

発表番号：4F187
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Bacillus* 属細菌の至適生育 pH の違いによる $Na^+$駆動型べん毛モーター固定子 MotPS の中性環境におけるイオン透過性の差異の解明
Elucidation of the reduced motility mechanism of *Bacillus* at low pH
○高橋 優嘉[1]、野口 有希奈[2]、伊藤 政博[1,2] ([1]東洋大・バイオナノ、[2]東洋大院・生命科学)
○Yuka TAKAHASHI[1], Yukina Noguchi[2], Masahiro Ito[1,2] ([1]Bio-Nano., Toyo Univ., [2]Graduate School of Life Sciences, Toyo Univ.)

多くの細菌は、べん毛と呼ばれる運動器官を回転させることでより適した環境へと移動している。べん毛の構造は、大きく分けて膜に埋まったモーター部分に相当する基部体、推進力を得るスクリュー部分に相当するべん毛繊維、基部体とべん毛繊維をつなぐフックの 3 か所から構成される。モーター部分である基部体は、主に回転子と固定子から構成されており、特に固定子はイオンチャネルであると同時に回転駆動力変換ユニットとして機能する。大腸菌やサルモネラ菌などの多くの細菌は $H^+$を共役イオンとする固定子 MotAB をもち、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌や海洋性 *Vibrio* 属細菌では $Na^+$を共役イオンとする固定子 MotPS および PomAB をもつ。

好アルカリ性細菌 *Bacillus pseudofirmus* OF4 株（OF4 株）は、pH 10 以上の高アルカリ環境で良好に生育し、pH 7.5~11.4 の pH 範囲で生育する通性好アルカリ性細菌である。一般に、高アルカリ性環境は $H^+$駆動力を利用しづらいため、好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌はべん毛の回転に $Na^+$駆動型固定子である MotPS を用いている。OF4 株の運動性は、pH が pH 8 以上の環境中で良好な遊泳を示すが、pH 7 付近の中性環境では 100 mM 以上の $Na^+$が存在しないと運動性を示さない。一方で、好中性細菌である枯草菌は OF4 株と同様に $Na^+$駆動型固定子 MotPS を持つが、中性環境でも $Na^+$濃度に依存した遊泳が報告されている。このように枯草菌と好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌が持つ MotPS では、その固定子の機能や制御が生育する環境 pH に応じて適応進化していることが推察されている。中性環境下における OF4 株の運動低下の原因を追究することで好アルカリ性細菌と好中性細菌間における $Na^+$に対する親和性の相違点を特定できるのではと考えた。

OF4 株のべん毛モーター$Na^+$駆動型固定子 MotPS の中性環境における運動性を観察するために、枯草菌の固定子欠損株に OF4 株由来の *motPS* 遺伝子を導入した株（OF4PS 株）を構築した。OF4PS 株を親株として、中性環境で自然突然変異により運動性向上株を取得し、*motPS* 遺伝子配列から変異箇所を同定した。同定された変異を新たに導入した株の生理学的解析の結果から、中性環境下の運動性には MotP-N186D が関与していることが示唆された。

本研究では、OF4 株由来の $Na^+$駆動型べん毛モーター固定子 MotPS から同定された変異 MotP-N186D の詳細な運動性解析と他の *Bacillus* 属細菌が持つ $Na^+$駆動型固定子 MotPS における運動性への影響を観察した。これらの結果から、MotP-N186D によって $Na^+$の選択的透過が向上したために中性環境中での運動性が向上した可能性が示唆された。

flagellar motor, motility mechanism, *Bacillus*

発表番号：4F188
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# バニリン添加時の選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* の菌体内タンパク質の発現解析

# Proteomic analysis of the selective white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* against exogenous addition of vanillin

○渡邊 崇人[1]、吉岡 康一[2]、西村 裕志[1]、渡辺 隆司[1] ([1]京大・生存研、[2]京府大院・生命環境)
○Takahito WATANABE[1], Koichi YOSHIOKA[2], Hiroshi NISHIMURA[1], Takashi WATANABE[1] ([1]RISH, Kyoto Univ., [2]Kyoto Pref. Univ.)

【目的】選択的白色腐朽菌 *Ceriporiopsis subvermispora* は，木材細胞壁多糖であるセルロース等を極力分解せずにリグニンを高選択的に分解するユニークな特徴を有する．また，グルコースを炭素源とする液体合成培地を用いて本菌を培養する際，リグニン分解フラグメントの一つであるバニリンを添加すると，「①グルコースの著しい消費；② β-1,3-グルカンを主成分とする菌体外多糖の産生；③長鎖の飽和・不飽和脂肪酸の産生量の増加；④新規代謝物 ceriporic acids の産生量の増加」[1)] 等の特徴も見られる．そこで，今回は，蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動をベースとしたプロテオミクスの手法 [2)] を用いてバニリン添加時の *C. subvermispora* の菌体内タンパク質の発現挙動を解析することを目的とした．

【方法・結果】グルコースを炭素源とする液体合成培地にバニリン添加及び非添加の条件で *C. subvermispora* をそれぞれ培養した．次に，それぞれの培養条件で調製した 2 種類の菌体内タンパク質を異なる 2 種類の蛍光色素で標識後，蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動を行った．発現差のある，または，発現量の多いタンパク質のスポットを優先的にゲルより切り出し，トリプシン消化後，MALDI-TOF-MS による測定を行った．得られた測定データと *C. subvermispora* のタンパク質のデータベース[3)] を用いて Peptide Mass Fingerprinting 法によるタンパク質の同定を行った．その結果，代謝に関与する，特に，バニリンを始めとする芳香族化合物の分解，TCA 回路，解糖系やペントースリン酸回路等に関与するタンパク質が同定された．また，細胞内プロセス・情報伝達に関与するタンパク質としては翻訳後修飾，シャペロン，抗酸化に関与する酵素やヒートショックタンパク質等も多く同定された．現在，バニリン添加によって見られる上記①から④の特徴と今回までに得られたプロテオミクスの結果との関連性について検討している．

1) 渡邊崇人ら，第 13 回糸状菌分子生物学コンファレンス講演要旨集 (2013), p. 36
2) 渡邊崇人ら，2015 年度（平成 27 年度）日本農芸化学会大会講演要旨集 3B21a07
3) Fernandez-Fueyo, E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 5458-5463 (2012)

white-rot fungus, proteomic analysis, vanillin

発表責任者：渡邊崇人（takahito@rish.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4F189
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# スエヒロタケ菌糸体によるエルゴチオネイン高生産培養法の確立

# Establishment of the ergothioneine high production culture by *S.commune* mycelia

○鮫島 由香、綿谷 真未、田畑 麻里子、松井 徳光（武庫女食栄）
○Yuka SAMESHIMA, Mami WATATANI, Mariko TABATA, Tokumitsu MATSUI (Mukogawa Univ.)

【目的】現在、多くの食品に酸化防止剤が使用されているが、安全性などの点において問題があり、新たな抗酸化剤が期待されている。一方、エルゴチオネインは人体にも含まれる抗酸化物質であり、水溶性かつ耐熱性、耐酸性に優れていることから、新たな食品の酸化防止剤としての応用が期待されている。しかし、エルゴチオネインはタモギタケやエノキタケのどの一部の担子菌の子実体からごくわずかに生産され、これまでに子実体よりも液体培養で得られる菌糸体の方が高い収量であることが報告されている。そこで本研究では、スエヒロタケを用いてエルゴチオネインを高生産する効果的な培養方法の確立を目的として実験を行った。

【方法】供試菌株はスエヒロタケ(*Schizophyllum commune* NBRC30749)を使用した。菌糸体の培養にはかつおだし培地(かつお節 100g、水道水 1L、30 分間沸騰、1%グルコース)を用い、界面活性剤（レシチンあるいは Tween20）を添加後、25℃で 2～8 週間回転振とう培養した。乾燥した菌糸体に蒸留水を加え超音波破砕後、遠心分離(12,000rpm、4℃、15 分)して得られた上清液を減圧乾固した。乾固した粉末を蒸留水に溶解し菌糸体試料液とした。菌糸体試料液および培養液に等量のアセトニトリルを添加・混合し、遠心分離後フィルターろ過を行い、HPLC に供しエルゴチオネイン量を測定した。また、得られたエルゴチオネインを含む菌糸体試料液またはエルゴチオネイン標品をりんごに添加し褐変の状況を観察すると共に、上清液について 465nm における吸光度の変化を測定した。

【結果および考察】乾燥菌糸体 1g あたり最も多くエルゴチオネインを生産した条件は Tween20 の 0.1%添加であり収量は 27.7mg/g であった。本収量はこれまでに報告されている 4.74mg/g(*Grifola gargal*)よりも高値を示した。また、本研究によりスエヒロタケの菌糸体中だけでなく培養液にもエルゴチオネインが含まれていることが示唆され、その含有量は 10.9μg/ml であった。Tween20 の 0.1%添加はエルゴチオネイン生産量を増加させたが、レシチンの 0.1%を添加した場合は抑制または減少が見られた。標準エルゴチオネインおよびエルゴチオネインを含む菌糸体試料液は持続的にりんごの褐変を抑制した。以上、安全性に優れたエルゴチオネインの効果的な生産法を確立した。今後、培養温度、培地量などの検討を行うことによってさらなるエルゴチオネイン生産量の向上が期待される。

*S.commune*, Ergothioneine, Mycelia

発表番号：4F190
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# ジャトロファ種子搾油残渣の糸状菌発酵による有効活用～紅麹菌による抗酸化能の向上～

Effective utilization of fungal fermentation on *jatropha* seed cake

○仲眞 弘樹[1]、名城 龍[1]、SUNTORNSUK WORAPOT[2]、橘 信二郎[1] ([1]琉大農、[2]King Mongkut's University of Technology Thonburi)
○ HIROKI NAKAMA[1], RYU NASHIRO[1], WORAPOT SUNTORNSUK[2], SHINJIRO TACHIBANA[1] ([1]Ryukyu Univ, [2]KMUTT)

【背景・目的】

ジャトロファ（*Jatropha curcas*）は中南米を原産とする熱帯性の落葉低木であり、仁に含まれる豊富な脂質は植物性燃料資源として利用されてきた。近年、ジャトロファ種子は採油効率の高さや非食用植物であることからバイオディーゼル燃料の原料として注目されている。種子搾油残渣はタンパク質含量が高く家畜飼料として期待されているが、ホルボールエステルなどの有毒成分も含まれるため付加価値の低い有機肥料としての利用、または利用されずに廃棄されている。紅麹菌（*Monascus* 属）は、多様な分泌型プロテアーゼを産生することが報告されている。そこで我々は、タンパク質含量の高いジャトロファ搾油残渣を培養基質として紅麹菌発酵することで、機能性ペプチドが産生されると考えた。本研究では、ジャトロファ搾油残渣を紅麹菌発酵させて抗酸化能が向上するかどうか調べた。

【方法】

乾燥させた搾油後のジャトロファ種子を粉砕し、ヘキサン脱脂処理した乾燥残渣を試料として用いた。乾燥残渣の水分含量を 70%に調整し、オートクレーブ滅菌して培養基質として用い、紅麹菌 31 株をそれぞれ植菌し 31℃で 14 日間静置培養した。培養物の 3 倍容の蒸留水で水溶性画分を抽出し、ORAC 法により抗酸化活性を調べた。抗酸化能は Trolox 当量（TEAC 値）で比較した。コントロールとして紅麹菌非接種培地の水抽出物を用いた。最も抗酸化能の高い抽出物を逆相カートリッジカラム Sep-Pak $C_{18}$ でアセトニトリル濃度勾配により分画した。コントロールに比べて抗酸化能が高い画分をさらに逆相カラム HPLC により分画した。

【結果・考察】

脱脂処理したジャトロファ種子搾油残渣を紅麹菌で発酵することにより、水抽出画分の抗酸化能がコントロールに比べて最大約 2.9 倍高くなった。紅麹菌が分泌するプロテアーゼの作用により抗酸化性ペプチドが生成されたと推定される。ジャトロファ種子抽出物には抗菌性や抗真菌性が報告されていることから、紅麹菌の生育と抗酸化能の向上を示した本研究成果は、ジャトロファ搾油残渣の有効利用に紅麹菌発酵が寄与できることを強く示唆していた。

Jatropha curcas, *Monascus*, antioxidant capacity

発表責任者：橘　信二郎（tachiban@agr.u-ryukyu.ac.jp）

発表番号：4F191
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 土壌肥沃度診断指標（SOFIX: Soil Fertile Index）を基盤とした水稲栽培の最適土壌条件の決定

Determination of optimum soil conditions for rice in Soil Fertile Index (SOFIX) based agriculture

○馬場 崇誠、向 真樹、アディカリ ディネッシュ、荒木 希和子、久保 幹（立命大生命）
○Takanobu BABA, Masaki MUKAI, Dinesh ADHIKARI, Kiwako S. ARAKI, Motoki Kubo (Ritsumeikan Univ.)

【背景・目的】

我々は、土壌肥沃度診断指標(SOFIX: Soil Fertile Index)を開発した。SOFIX とは、土壌の物質循環に望ましい土壌成分の量とバランスを数値化する診断指標であり、土壌の成分、微生物数、物質循環活性を測定することでその土壌がどれぐらい肥沃であるか評価することができる。そして、SOFIX 分析結果に基づき、有機肥料により微生物数、物質循環活性を増加させるように土壌成分を調節した土壌で作物を栽培するのが、SOFIX に基づく有機農法である。畑地の微生物数や物質循環活性を増加させる最適土壌条件はすでに明らかになっており、適切な処方を施した土壌では作物の収量増加や品質向上といった結果が得られ、畑地での SOFIX に基づく有機農法は確立されている。これに対し、水田においては最適土壌条件がまだ明らかになっていない。水田は畑地と異なり冠水されることによって比較的嫌気環境が広がっている。そこで、畑地とは別に、水田に特化した最適土壌条件を設定する必要があり、その条件が設定できれば、水田での SOFIX に基づく有機農法の確立につながると考えられる。本研究では、水稲栽培における最適土壌条件を明らかにし、成分を適切に調節した土壌での水稲栽培により、物質循環活性の向上と水稲成長の促進を検証することを目的とした。

【方法・結果】

はじめに、日本各地の水田で採取した 121 サンプルを SOFIX 分析した。分析結果を比較することで、水田の総炭素量（TC）が 20,000 mg/kg 以上および総窒素量（TN）が 800-1,200 mg/kg のとき、最も物質循環活性が高いことがわかった。次に、3 つの水田圃場（圃場 1, 2, 3）から土壌を採取し、それらの土壌に対し SOFIX に関する分析を行った。分析結果に基づき、TC、TN を上記の条件に近づけるように有機肥料を用いて採取した土壌の成分を調節した。調節した土壌を再度分析した後、ポットで水稲の栽培実験を行った。その結果、SOFIX を用いた土壌調節により微生物数が増加するとともに、物質循環活性も増加することが確認できた。また、2014 年の各圃場ごとの収量を比べると、圃場 1、圃場 2、圃場 3 の順序で収量が多かったのに対し、今回のポットでの収量は各圃場で有意差はなかった。したがって、水稲栽培における最適土壌条件は TC が 20,000 mg/kg 以上および TN が 800-1,200 mg/kg であり、その条件に水田の土壌成分を調節すると物質循環活性が増加し、水稲の収量も増加することが示唆された。

SOFIX, paddy fields, rice

発表責任者：馬場　崇誠（sb0031hp@ed.ritsumei.ac.jp）

発表番号：4F192
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア F

*Aspergillus* 属糸状菌におけるハイドロフォビン-クチナーゼ間のイオン的相互作用
Ionic interaction between *Aspergillus* hydrophobins and *Aspergillus* cutinases.
○田中 拓未[1]、高橋 徹[2]、中山 真由美[2]、山形 洋平[3]、阿部 敬悦[1,2] ([1]東北大院 農、[2]東北大 未来研、[3]農工大院 農)
○Takumi Tanaka[1], Toru Takahashi[2], Mayumi Nakayama[2], Youhei Yamagata[3], Keietsu Abe[1,2] ([1]Grad. Sch. Agric. Sci., Tohoku Univ., [2]NICHe., Tohoku Univ., [3]Grad. Sch. Agric., Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**【背景】** hydrophobin は糸状菌に広く保存された低分子量の両親媒性タンパク質であり，気中菌糸・分生子表面に局在する。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の hydrophobin RolA は生分解性ポリエステル PBSA 等の固体表面に吸着し，PBSA 分解能を持つ酵素 cutinase CutL1 と相互作用して CutL1 を固体表面に濃縮する[1)]。これまでの研究で，*A. oryzae* には RolA 以外にも CutL1 と相互作用する界面活性タンパク質 HsbA が存在すること[2)]，RolA-CutL1 間の相互作用は RolA の N 末端側正電荷残基と CutL1 分子表面の負電荷残基が協奏的に作用するイオン的相互作用であること，RolA は CutL1 ホモログ CutC とも相互作用することを明らかとした[3)]。このような hydrophobin-固体高分子分解酵素間の相互作用は糸状菌の生理学的に新規に発見された機能であり，本報告では，このような組み合わせが他の *Aspergillus* 属糸状菌にも存在するかどうかを検証する。
**【方法】** RolA オルソログ,CutL1 を含む Carbohydrate esterase family 5 (CE5) enzyme について，それぞれ系統解析・アラインメント解析を行った。次に，モデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* の RodA(RolA オルソログ)，Cut1，Cut2(CutL1 オルソログ)をそれぞれ *A. oryzae* において異種発現・精製した。そして，これらの精製タンパク質を用いて PBSA 分解試験，テフロン微粒子を用いたプルダウンアッセイによる吸着量定量，分子間相互作用解析装置 QCM を用いた親和性の定量解析を行った。
**【結果】** 系統解析とアラインメント解析から，担子菌類・子嚢菌類の糸状菌において，N 末端側に複数の正電荷残基を持つ hydrophobin や，CutL1 と分子表面負電荷残基の保存性が高い CE5 enzyme が存在することを見出した。また，精製タンパク質を用いた試験により，①RodA 存在下で Cut1 による PBSA 分解が促進されること，②RodA による Cut1 リクルート量は pH3-7 で最大となり，最大リクルート条件下では，RodA-Cut1 分子比と RolA-CutL1 分子比が一致すること，③RodA-Cut1，RodA-CutL1 間にイオン的相互作用が働き，その強さは RolA-CutL1 > RodA-CutL1 > RodA-Cut1 であることを見出した。以上の結果から，少なくとも *Aspergillus* 属糸状菌一般において，イオン的相互作用により相互作用する RolA オルソログ-CutL1 オルソログの組み合わせが存在する可能性が高いことが示唆された。

1) Takahashi, T., *et al. Mol. Microbiol.* 57:1780-1796 (2005)
2) Ohtaki, S., *et al. Appl Environ Microbiol* 72:2407-2413 (2006)
3) Takahashi, T., *et al. Mol. Microbiol.* 96:14-27 (2015)

*Aspergillus*, hydrophobin, cutinase

発表番号：4F193
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア F

# 水平伝播を利用した簡便で迅速な形質転換法の活用

# Gene delivery system from *Escherichia coli* by designed horizontal transfer

○金子 真也[1]、板谷 光泰[2] ([1]東工大・生命理工、[2]慶應大・先端生命研)
○Shinya KANAKO[1], Mitsuhiro ITAYA[2] ([1]Dept. of Life Science, Tokyo Tech., [2]Inst. Adv. Keio Univ.)

大腸菌で構築したプラスミド DNA を他の宿主に形質転換で導入するプロセスには、一般的に生化学的手法による DNA の抽出・精製が必要であると考えられてきた。ところが形質転換には「きれいな DNA」は必須ではない、生化学的な精製操作は不要であることを偶然発見した。我々はこれまでの研究で大腸菌ラムダ溶原株を溶菌させることで培養液中に放出されたプラスミド DNA が、ある条件下で分解されず構造的に安定であることを見出し、溶菌液中に自然形質転換能を持つ枯草菌を共存させることで、放出されたプラスミド DNA が枯草菌細胞中に取り込まれることを確認した(1-4)。溶菌法(Culture Mix Method; CMM)と名付けたこの操作法ではプラスミド DNA の抽出・精製操作を要しないため、迅速かつ簡便に、大腸菌で構築したプラスミド DNA を他の目的の宿主(例えば枯草菌)へ導入することが可能である。特に精製操作でダメージを受けやすい長鎖 DNA の取扱いに適していると期待される。溶菌法の汎用性を広げるため、様々な条件検討を行なった結果を紹介するとともに実践的な活用法について報告する。

(1) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *J. Biochem.* 147: 819-822.
(2) Itaya M. and Kaneko S. (2010) *Nucleic Acids Research* 38: 2551-2557.
(3) Kaneko S. and Itaya M. (2010) *Nucleic Acids and Molecular Biology* 25: 39-53 (Springer).
(4) Itaya M. et al. (2012) *J. Biochem.* 152: 591-504.

horizontal gene transfer, natural transformation, Culture mixed method

発表番号：4G001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ピロロキノリンキノンとイミダゾロピロロキノリンの SK-N-SH 細胞と HepG2 細胞に対する効果の比較検討

# Comparison of the effect of pyrroloquinoline quinone and imidazole pyrroloquinoline on SK-N-SH cells and HepG2 cells

○西居 和哉、中路 昌志、野村 宏基、久保 航大、延谷 直哉、中西 慧、山田 康枝（近畿大工）
○Kazuya Nishii, Masashi Nakamiti, Hiroki Nomura, Koudai Kubo, Naoya Nobutami, kei Nakanishi, Yasue Yamada (Kinki Univ.)

【目的】ピロロキノリンキノン（PQQ)は母乳，キウイ，ピーマンなどの果物，野菜類に含まれ，多くの生理活性があることが知られており，医薬品，化粧品，サプリメントの有効成分としての使用が期待されている．その効果としては，活性酸素及びラジカルの消去作用，細胞増殖促進作用，神経成長因子産生促進作用，また，ミトコンドリアの増殖にも関与して，離乳マウスに PQQ を添加した餌を 4 週間与えたところ，PQQ を欠餌した離乳マウスと比べ肝細胞のミトコンドリア量が増加することが報告されている．しかし作用機序は不明な点が多い．一方，PQQ は非常に高い反応性を示すため，製剤を調整する際にアミノ基含有物質と容易に反応し，イミダゾール骨格を形成して，イミダゾロピロロキノリン（IPQ)を形成することが報告されている. 今回は IPQ の作用を検討するために IPQ (還元型)及びその誘導体である $IPQNa_3$（酸化型)の細胞増殖促進効果，ミトコンドリア量の指標となる Human COX4/1（シトクロム c オキシダーゼ）の発現量，また，活性酸素の一種である $H_2O_2$ の毒性に対する細胞保護効果をヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH とヒト肝がん由来細胞株 HePG2 を用いて，$PQQNa_2$（酸化型)及び $PQQH_2$（還元型）と比較検討した.

【方法】SK-N-SH と HepG2 細胞を $2.0\times10^5$ cells/ml に調整し 96well マイクロプレートに播種し，24 時間 37℃5%$CO_2$ インキュベーター内で培養した．培養後保護作用を検討する物質を添加し 10 分間インキュベートし, 室温で $H_2O_2$ を加え, 10 分間培養し, MTTassay 法により細胞生存率を求めた．細胞増殖は播種後 1 時間静置し，検討物質を添加し，0，24，48，72 時間培養後，MTTassay 法により細胞生存率を求めた．Human COX4/1 の発現量を測定するために TaqMan プローブを用いて RT-PCR を行った.

【結果・考察】$PQQNa_2$ と IPQ は細胞増殖効果を示し，SK-N-SH 細胞では 1 nM の $PQQNa_2$，72 時間で最も高い効果を示した．HepG2 細胞では $PQQNa_2$ と IPQ は何れも，5 μM と 10 μM，48 時間で高い効果が見られた． SK-N-SH 細胞では 100 nM の，HepG2 細胞では 10 μM の $PQQNa_2$ 存在下で HumanCOX4/1 の発現量が増加したことから, ミトコンドリア量が増えていることが示唆された。また，$H_2O_2$ による細胞死を $PQQNa_2$ と IPQ は抑制し，特に SK-N-SH 細胞で $PQQNa_2$ は 10 nM と 100 nM，HepG2 では 50 μM と 100 μM で有意な保護効果を示した．一方，IPQ も SK-N-SH 細胞では 5 nM,HepG2 細胞では 50 μM と 100 μM で有意な保護効果を示した. 以上の結果から， SK-N-SH 細胞は，HepG2 細胞よりも $PQQNa_2$ と IPQ に対する感受性が高いことが示唆された.

pyrroloquinoline quinone, imidazole pyrroloquinoline, cell proliferation

発表番号：4G002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ウェルナー症候群モデルマウスにおけるテロメアの役割

# Biological significance of telomere in a mouse model for Werner syndrome

○澁谷 修一[1]、小山 浩史[1]、横手 幸太郎[2]、清水 孝彦[1] ([1]千葉大院医 先進加齢医学、[2]千葉大院医 細胞治療内科学)
○Shuichi Shibuya[1], Hirofumi Koyama[1], Koutaro Yokote[2], Takahiko Shimizu[1] ([1]Dept. of Adv. Aging Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med., [2]Dept. of Clinic. Biol. and Med., Chiba Univ. Grad. Sch. of Med.)

ウェルナー症候群(Werner syndrome, WS)は RecQ ヘリカーゼファミリー*WRN* を原因遺伝子とする常染色体劣性の遺伝性早老症であり、患者の多くが日本人である。20 歳代から毛髪変化や白内障を生じ、骨粗鬆症、筋萎縮、脂肪肝などを併発、悪性腫瘍や冠動脈疾患により 50 歳代で死に至ることが多い。幼少期から発症する他の早老症と異なり、WS は成人以降に発症し、最もヒトの個体老化に近い疾患である。WS の発症原因および治療法の研究は老化研究の基礎ともなり得る。ウェルナー症候群患者のテロメア長は同年代の正常人のテロメア長よりも短いことが報告されており、テロメア短縮と早老症の関連が示唆されている。また、テロメラーゼ RNA 構成要素 TERC 欠損マウスは交配世代を経るにつれてテロメア長が短縮し、低身長や骨量減少、寿命短縮などの老化症状を呈することが報告されている。さらに Wrn 遺伝子を欠損させるとわずかながら表現型を悪化することが報告されている。本研究では、テロメアの不安定性と WRN 機能の関連を再確認するために、WRN とテロメラーゼ逆転写酵素 TERT の二重欠損マウスを作製し、表現型を解析した。

まず、*Wrn* 欠損マウスと *Tert* 欠損マウスを交配して *Wrn/Tert* 2 重欠損マウスを作製した。さらに同世代間で交配して第 4 世代（$Tert^{G4/G4}$)まで作製し表現型を解析した。$Wrn^{-/-}$, $Tert^{G4/G4}$ マウスは正常に生まれ、体重の差もなく正常に発育した。さらに *Wrn* 遺伝子の有無に関わらず $Tert^{G4/G4}$ マウスはテロメア長も有意に短縮し、テロメラーゼ活性低下の確証を得た。皮膚の組織学的解析により $Wrn^{+/+}$, $Tert^{G4/G4}$ マウスと $Wrn^{-/-}$, $Tert^{G4/G4}$ マウスともに皮膚萎縮を示したため、*Wrn* 欠損の影響は全く認められなかった。さらに、ウェルナー症候群で顕著な病態が現れる臓器や、その臓器のミトコンドリア DNA コピー数に *Wrn* 欠損による有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、WS の早老病態とテロメア長の短縮の寄与が低い可能性が示唆された。WRN 機能の詳細な解析には WS 病態を模する新たなモデルマウスの作出が必要である。

Werner syndrome, progeroid, senescence

発表番号：4G003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 初乳摂取前後の新生子牛血清のメタボローム解析

matabolomics of calf serum before and after colostrum ingestion

○宮崎 珠子、岡田 啓司、佐藤 繁、山下 哲郎、宮崎 雅雄 (岩手大学)
○Tamako MIYAZAKI, Keiji OKADA, Shigeru SATO, Tetsuro YAMASHITA, Masao MIYAZAKI (Iwate Univ.)

新生子牛は、免疫防御機能を初乳からの IgG 吸収に依存しており、生後 24 時間以内は、初乳から IgG を分解せずに吸収できることが知られている。また IgG の吸収と相関して、他の乳汁由来ホエータンパク質の血中濃度も哺乳後有意に増加するので、新生子牛の小腸には、初乳中のタンパク質を非特異的に吸収する機構が備わっていると考えられている。タンパク質の吸収が非特異的であれば、初乳由来の低分子化合物も同じように非特異的に吸収され、その血中濃度が哺乳後に著しく増加する可能性も考えられる。しかし初乳摂取前後で新生子牛の血中低分子化合物がどのように変動するか網羅的に調べた報告はほとんどない。そこで本研究では、初乳摂取前後の新生子牛の血中低分子化合物をメタボローム解析し、血中低分子化合物の経時的変化を明らかにして新生子牛の小腸における初乳成分の吸収機構について考察した。5 頭のホルスタインフリージアン種の新生子牛に体重４％の初乳を生後 6 時間以内に哺乳し、哺乳前と哺乳後 12 時間まで経時的に採血した。まず血清タンパク質組成を非還元下の SDS-PAGE で解析し、すべての個体で初乳摂取後に血中 IgG 濃度が顕著に増加していることが確認できた。そこで血清をアセトン抽出し、抽出液を乾固した後、MSTFA にて誘導体化して、二次元ガスクロマトグラフィー質量分析計（GC×GC-TOF-MS、Pegasus 4D, LECO)を用いて低分子化合物の網羅的解析を行った。データ解析は、ChromaTOF software (LECO)を用いてデコンボリューションとピークアライメントを行い、多変量解析で初乳摂取前後に変化する低分子化合物の同定を行った。GC×GC-TOF-MS のトータルイオンクロマトグラムを精査したところ各検体間で若干の差はあるものの大きな差はなく、糖やアミノ酸、遊離脂肪酸、アルコールなどに分類される約 2500 におよぶ代謝物が検出できた。しかし IgG のように初乳後時間経過に伴って著しく増加する低分子化合物は検出できなかった。哺乳前後で変動のある化合物は検出することができたが、哺乳後のみに検出された乳汁由来と考えられる化合物についてはほとんど検出されなかった。以上の結果、新生子牛の血清低分子化合物は哺乳前後で血清タンパク質のように著しく変動しないことが明らかとなり、初乳からのタンパク質の吸収機構と低分子化合物の吸収機構は異なっていることが強く示唆された。

metabolomics, GCGC-TOF MS, neonatal calf

発表責任者：宮崎珠子（okatama@ksh.biglobe.ne.jp）

発表番号：4G004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 胎児期と性成熟期の男性ホルモンの作用は膵β細胞量を規定する

# Actions of fetal and pubertal androgens regulate pancreatic ß-cell mass

○原田 直樹[1]、與田 安紘[1]、甲木 孝弘[1]、乾 博[2]、山地 亮一[1] ([1]大阪府大・生命環境、[2]大阪府大・栄養)
○Naoki HARADA[1], Yasuhiro YODA[1], Takahiro KATSUKI[1], Hiroshi INUI[2], Ryoichi YAMAJI[1] ([1]Life Environ. Sci., Osaka Pref. Univ., [2]Nutr., Osaka Pref. Univ.)

【目的】2型糖尿病は、体内における相対的なインスリン不足に起因して発症する。膵臓β細胞の寡少は、インスリン分泌の低下に直結するため、2型糖尿病のリスクを上昇させる。男性ホルモン（アンドロゲン）であるテストステロンは、性成熟期に増加して第2次性徴に関与するが、雄では胎児期にも一過的に増加して性差形成に関与する。我々は、胎生19.5日目の雄性Wistarラットのβ細胞前駆細胞にアンドロゲン受容体が発現すること、この時期に抗アンドロゲン剤であるフルタミドを母ラットに投与すると、雄仔ラット特異的に出生時のβ細胞量が減少することを昨年度の大会で発表した。本年度は、(1) 胎児期にアンドロゲンシグナルが抑制された雄ラットでは、生育後もβ細胞量は少ないままなのか？ (2) 性成熟期のアンドロゲンシグナルはβ細胞量に影響するのか？について検討を行った。
【方法】＜実験1＞胎児期のアンドロゲンの影響を調べるため、母ラットにフルタミド（50 mg/kg）を妊娠16.5日目から出生まで毎日経口投与した。出生した雄仔ラットは全てコントロール群の母獣に生育させ、6週齢（性成熟前）または12週齢（性成熟後）まで飼育した。＜実験2＞性成熟期のアンドロゲンの影響を調べるために、雄ラットを6週齢時に去勢または擬似手術を行った。さらに、7週齢からテストステロン誘導体を10日間（短期試験）または9週間（長期試験）投与した。解剖後に膵臓の切片を作製して、β細胞マーカーであるインスリンの免疫染色を行ってβ細胞を解析した。
【結果・考察】実験1において、胎児期にフルタミドを投与された母獣から生まれた雄ラットでは、出生時のみならず、6週齢および12週齢時のβ細胞量がコントロール群に比べそれぞれ約7割および約5割まで減少した（出生時は約7割まで減少）。β細胞量の減少は、膵島の個数とβ細胞塊の大きさの両方が減少することに起因することが判明した。実験2の短期試験において、性成熟期に去勢したラットでは、細胞増殖マーカーであるKi67陽性のβ細胞が有意に減少し、テストステロン誘導体の投与によりコントロール群と同程度まで回復することが判明した。さらに長期試験では、去勢によりβ細胞量がコントロール群の約3割まで減少し、テストステロン誘導体の投与によりβ細胞量がコントロール群と同レベルまで回復した。膵臓当たりの膵島の数やβ細胞塊の大きさは、去勢により有意に減少し、テストステロン誘導体の投与によりコントロール群と同程度まで回復した。本研究より、胎児期のアンドロゲンシグナルが将来のβ細胞量を規定すること、性成熟期のアンドロゲンシグナルもβ細胞量を正に調節することが判明した。また、胎児期と性成熟期のアンドロゲン作用の低下は、β細胞量を減少させるため、2型糖尿病のリスクファクターとなることが示唆された。

pancreatic ß-cells, androgen, type 2 diabetes

発表責任者：原田直樹（harada@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4G005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# FGF21 はアミノ酸欠乏性脂肪肝を抑制する

# FGF21 inhibits fatty liver induced by amino acid deprivation

丸山 竜人[1]、○清水 誠[1]、井上 順[1]、伊藤 信行[2]、佐藤 隆一郎[1] ([1]東大農、[2]京大国際)
Ryuto Maruyama[1], ○Makoto Shimizu[1], Jun Inoue[1], Nobuyuki Itoh[2], Ryuichiro Sato[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Kyoto Univ.)

FGF21（fibroblast growth factor 21）は肝臓で高発現する繊維芽細胞増殖因子であり、白色脂肪組織での脂肪酸分解や全身のインスリン感受性の改善など様々な機能を有することが知られている。我々はこれまで FGF21 がアミノ酸欠乏や小胞体ストレスなどで活性化される転写因子 ATF4 の標的遺伝子であることを同定し、その転写制御機構を明らかにしてきた。アミノ酸やタンパク質摂取不足は脂肪肝を誘発することが知られている。また FGF21 の発現はアミノ酸枯渇で誘導されることから、FGF21 が脂肪肝の代謝に関与することが考えられた。これらの背景から、欠損マウスやアデノウイルスによる過剰発現を用いて FGF21 のアミノ酸欠乏性脂肪肝における機能解析を行った。

脂肪肝モデル食であるメチオニン・コリン欠乏食を FGF21 欠損マウスもしくは FGF21 過剰発現マウスに与えた。その結果、FGF21 欠損マウスの肝臓のトリグリセリド量は、野生型マウスと比較して有意な増加が見られた。また炎症性サイトカインや酸化ストレスマーカーの発現なども欠損マウスで増加していた。一方、FGF21 の過剰発現により肝トリグリセリド量が低下した。これらの結果から、FGF21 はメチオニン・コリン欠乏食による脂肪肝を抑制することが示された。

FGF21 による脂肪肝抑制効果のメカニズムを検証した。その結果、FGF21 欠損マウスの肝臓において転写因子 PPARgamma の発現が増加していることを見出した。また PPARgamma の標的遺伝子の発現増加も確認された。肝臓における PPARgamma の発現は高脂肪食などで増加し、肝臓の脂質蓄積に関与することが報告されている。以上のことから FGF21 は肝臓の PPARgamma を介してアミノ酸欠乏性脂肪肝を抑制することが示唆された。

FGF21, fatty liver, PPARgamma

発表番号：4G006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 運動の動機形成における脳内報酬系の役割

# Role of the reward system in the brain in the motive formation of the exercise

○高谷 亮典[1]、横山 小夜香[1]、伏木 亨[2]、井上 和生[1] ([1]京大農、[2]龍大農)
○Ryosuke TAKAYA[1], Sayaka YOKOYAMA[1], Tohru HUSHIKI[2], Kazuo INOUE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ryukoku Univ.)

【目的】　近年の研究により、持久運動時に側坐核（NAc）においてドーパミン（DA）レベルが上昇することが報告されており、持久運動によって報酬系が活性化することが示唆された（Wilson WM. Et al. 1995, 横山 日本栄養・食糧学会発表 2014)。報酬系における DA は報酬を得ようとする動機付けに深く関与していると考えられている。持久運動時の NAc DA レベル上昇について、その生理的意義は明らかになっていないが、走行する動機付けもしくはその維持に関与している可能性がある。また NAc は shell と core に大別され、それぞれの領域が動機付け行動に対して異なる役割を持つことが示されている。そこで本研究では持久運動時の NAc shell と core における神経活動を検討し、運動意欲がどのように形成されるのかを神経科学的に検討した。

【方法】　7 週齢の雄性 SD ラットの NAc shell あるいは NAc core にカニューレ設置手術を行った。15 m/min、傾斜 3°、60 分間のトレッドミル走行を課した時の NAc shell と core における神経活動の動態を In vivo microdialysis 法を用いて測定した。

ラットにトレーニングを課すことにより、末梢組織において持久運動をより効果的に行えるような適応をすることが明らかになっている。同様に中枢神経系や末梢神経系においても、運動刺激に適応している可能性がある。そこで 2 週間のトレーニングを課したラットの NAc shell における神経活動の動態を調べた。これにより、持久運動時の NAc shell における DA レベル上昇と運動トレーニングとの関与を検討した。

【結果と考察】　持久運動時、NAc shell における DA レベルは有意に上昇し、走行終了後も継続して高い値を示した。一方 NAc core における DA レベルも有意に上昇したが、徐々にベースラインまで減少した。これより、NAc core に投射している DA 作動生神経が活性化するのは、持久運動開始時であると考えられる。また NAc shell における DA レベルの上昇は、走行し続ける動機に関与している可能性がある。

ラットに運動トレーニングを課した場合の結果についても報告する。

endurance exercise, motivation, dopamine

発表責任者：高谷　亮典（takatanitakaya@gmail.com）

発表番号：4G007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 視床での油脂摂取に伴う感覚情報の伝達/中継に関する解析

# Electrophysiological analysis of thalamic nerve activity during fat ingestion

○森山 智代[1]、後藤 瑞貴[1]、伏木 亨[2]、井上 和生[1]([1]京大農、[2]龍大農)
○ Tomoyo MORIYAMA[1], Mizuki GOTO[1], Tohru FUSHIKI[2], Kazuo INOUE[1] ([1]Kyoto Univ., [2]Ryukoku Univ.)

【目的】油脂に対する嗜好性の発現には、脳内報酬系が関与していることが知られているが、油脂摂取時にこの神経回路がどのように応答しているのかは明らかとなっていない。これまでに我々は、脳内報酬系の主要な部位である腹側被蓋野（VTA）および側坐核（NAc）で、油脂摂取時の口腔内刺激によって特異的に応答するニューロンが存在することを報告している（後藤 第 12 回アジア栄養学会議発表 2015)。しかし、油脂を摂取した際、その情報は味覚と類似した経路を辿って伝えられるのか、あるいはテクスチャーとして認識されているのかなど、未だ不明な点が多い。そこで本研究では、味覚神経の中継地点として知られる視床味覚野（VPMpc）において、油脂摂取時にどのような神経活動を示すのか測定した。

【方法】雄性 Wistar ラットの VPMpc にマイクロドライブ設置手術を行い実験に供した。ラットが提示部に近づき鼻先がノーズポークセンサを横切った際に、10% Intralipos（乳化油脂)、20% sucrose、水、dry（飲み口のみの提示）をランダムに 5 秒間提示し、溶液摂取前後の神経活動を測定した。溶液の摂取は、ノズルの手前に設置した光センサを舌が横切った時をリックの発生タイミングとして記録した。1 回の提示における最初のリックを基準とし、その前後 3 秒間ずつの平均神経発火率を比較した。神経発火率が溶液摂取前より後で有意に上昇しているか、また dry 提示の際より有意に上昇しているか、解析を行うことで「溶液の口腔内刺激に応答したニューロン」であるか判定した。

【結果と考察】VPMpc において、sucrose 特異的に応答するニューロンの存在と共に、Intralipos 特異的に応答するニューロンの存在が示された。油脂が口腔内で認識された際、VPMpc を中継する神経により伝達されていることが示唆される。また、油脂に対する嗜好性の形成には脂肪酸やテクスチャーが関与していることが明らかとなっている。そのため、油脂に応答したニューロンが油脂中のどの要素に応答しているのか、Intralipos 特異的に応答するニューロンに対し 50% corn oil、1% linoleic acid、mineral oil の 3 つのサンプルを追加で加え、油脂の化学的な特性、あるいはテクスチャーの情報が伝達されているのかを検討した結果についても報告する。

fat, thalamus, electrophysiology

発表責任者：森山智代（motoshiapple@yahoo.co.jp）

発表番号：4G008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

不活動症候群モデルラットにおける脂質代謝異常の統合オミクス解析
Integrated multi-omics analysis of hepatic changes in lipid metabolisms in physically inactivated rats

○半澤 史聡[1]、松本 知大[2]、ローラン トマ[2]、梅木 美樹[3]、望月 聡[3]、池田 彩子[1]、小田 裕昭[2]([1]名古屋学芸大学・院・栄養科学、[2]名古屋大学・院・生命農学、[3]大分大学・教育福祉)
○Fumiaki HANZAWA[1], Tomohiro MATSUMOTO[2], Thomas Laurent[2], Miki Umeki[3], Satoshi Mochizuki[3], Saiko Ikeda[1], Hiroaki Oda[2] ([1]Nagoya University of Arts and Sciences, [2]Nagoya University, [3]Oita University)

【目的】演者らは、どのように食べるかという「食スタイル（食の 5W1H)」に関する研究を進めている。以前の寝たきりモデルラットを用いた研究では、寝たきりによってコレステロール代謝異常と肝障害が引き起こされることを見出した。今回は、震災等により、仮設住宅で生活している人々にとって問題になっている不活動症候群に注目した。これまでに私たちは、両肢の坐骨神経を切除した不活動症候群モデルラットに高コレステロール食を与えて飼育することで、不活動が血中コレステロール濃度および肝臓からの VLDL 放出速度を低下させ、解糖系と脂質合成系遺伝子の mRNA 量を低下させることを明らかにしてきた（1)。本研究では、不活動が肝臓における代謝変動に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、トランスクリプトームおよびメタボローム解析による統合オミクス解析を行った。
【方法】Wistar 系雄性ラットの両肢の坐骨神経を切除し、回復期間後、高コレステロール食を与えて飼育した。定期的に採血を行い、124 日後に屠殺し各臓器を採取した。肝臓および筋肉から RNA を抽出し、マイクレアレイ解析およびリアルタイム PCR による mRNA 量の定量を行った。また、肝臓サンプルを用いて、肝臓脂質濃度の測定および CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。
【結果】不活動症候群ラットにおいて、対照群に比べ活動量が 40%低下していた。また、肝臓、精巣上体脂肪重量が低下し、下腿の筋重量は大きく低下していた。肝臓脂質濃度に変化はみられなかったが、血中コレステロール濃度の低下がみられた。この不活動による脂質代謝の変動を明らかにするために、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用い、肝臓トランスクリプトームおよびメタボロームの統合オミクス解析を行った。ファンクション解析の結果、糖代謝および脂質代謝が変動していた。パスウェイ解析においても、糖新生、解糖系および中性脂肪合成の変動が明らかになった。また、エネルギー産生系が変動しており、不活動がエネルギー代謝に影響を及ぼしていた。一方、筋肉のマイクロアレイの結果を IPA によって解析したところ、筋肉においても脂質代謝が変動していた。さらに、変動遺伝子の中から肝臓での脂質代謝を抑制することが知られるマイオカインの候補遺伝子の探索を行っている。以上の結果から、不活動による筋肉での代謝異常が、肝臓へ情報を伝達し肝臓でのエネルギー代謝と糖代謝、脂質代謝を変動させることが示唆された。

(1) 小田ら：日本栄養・食糧学会大会 2013 年度大会講演要旨

physical inactivity, lipid metabolism, integrated multi-omics

発表責任者：小田 裕昭（hirooda@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4G009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 大腸癌細胞にアノイキスを誘導する酸化コレステロールの比較検討

# Comparative analysis of oxysterols induce anoikis in colon cancer cells

齋藤 瞭子[1]、守冨 早織[1]、上原 至雅[2]、○田中 亜路[1]([1]安田女子大家政栄養、[2]岩手医科大薬)
Ryoko SAITOU[1], Saori MORITOMI[1], Yoshimasa UEHARA[2], ○Arowu TANAKA[1] ([1]Yasuda Womans Univ., [2]Iwate Medical Univ.)

血球系以外の通常細胞の多くは、生存・増殖のために「足場」を必要とし、足場が失われた場合にはアポトーシスをおこす。このアポトーシスは特別にアノイキスと呼称されている。一方、ほとんどの癌細胞ではアノイキスは強く抑制されている。この「癌細胞の足場非依存的増殖」のメカニズムは現時点でも不明な点が多いが、その性質上、細胞接着や細胞骨格に着目した研究が行われている。癌の転移は、さまざまなプロセスをクリアした結果に生じてしまう多段階的な現象であるが、この「癌細胞の足場非依存的増殖」は、その最も根本的な条件であるといえる。

発表者は、大腸癌細胞株 DLD-1 の強制浮遊培養系を用いて、酸化コレステロールの一種である 25-hydroxycholesterol(25-HC)がアノイキスを誘導すること、しかし、接着状態の DLD-1 細胞にはアポトーシスを誘導しないことを見出した。興味深いことに、25-HC とよく似た酸化コレステロールとしてその差異もほとんど注目されていない 22-(R)-hydroxycholesterol(22-HC)は、アノイキス誘導活性を有しないことを示している(当然ながら、コレステロールにもこの活性はない)。

本発表では、25-HC に類似し、かつ生体内に存在する酸化コレステロールのアノイキス誘導活性を検討した結果を報告する。すなわち、25-HC において、3 位と 25 位の水酸基はアノイキス誘導に必要だが、3 位については 25 位のものほどシビアな条件とはならないこと、また、ステロール環に側鎖が導入されているいくつかの 25-HC 類似酸化コレステロールにおいても、同様のアノイキス活性を見出した。これらの結果は、25-HC 誘導アノイキスシグナルに関与するタンパク質を示唆する一方、生体内における酸化コレステロールの役割についての新たな議論の土台になるものと考えられる。

oxysterol, anoikis, 25-hydroxycholesterol

発表番号：4G010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# β-カロテンはレチノイン酸受容体γを介して骨格筋のタンパク質合成を促進する

# β-Carotene promotes protein synthesis via retinoic acid receptor γ in skeletal muscle

○北風 智也、原田 直樹、山地 亮一（大阪府大院生命環境）
○Tomoya KITAKAZE, Naoki HARADA, Ryoichi YAMAJI (Div. Appl. Life Sci., Osaka Pref. Univ.)

【背景・目的】骨格筋量は筋タンパク質の合成と分解のバランスにより制御されている。つまり骨格筋を構成する筋線維でのタンパク質の合成が分解を上回ると筋肥大が起こり、逆にタンパク質の分解が合成を上回ると筋萎縮を起こす。タンパク質合成の促進には mTOR シグナル経路の活性化が重要な役割を果たし、タンパク質分解は主にユビキチン–プロテアソーム系を介した分解により引き起こされる。ビタミン A は筋肥大を誘発するが、その作用機序は不明である。活性型ビタミン A であるレチノイン酸 (ATRA) は転写因子であるレチノイン酸受容体（RAR）を活性化する。プロビタミン A である β-カロテンは生体内で ATRA に代謝されるので、β-カロテンを経口投与したマウスの骨格筋量を検討したところ、後肢のヒラメ筋でタンパク質合成が促進し、筋肥大が起こることを見出した[1]。そこで本研究では、β-カロテン摂取による筋肥大の促進に RAR が関与するかを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞と骨格筋における RAR の発現を検討した結果、RAR の 3 つのアイソフォーム (RARα、RARβ、RARγ) が全て発現していた。β-カロテンと ATRA による RAR の転写活性を測定した結果、β-カロテンと ATRA による RAR の転写活性の増加は RARγ のノックダウンにより抑制された。β-カロテンと ATRA はタンパク質合成を促進したが、RARγ のノックダウンにより抑制されたことから、C2C12 細胞において β-カロテンが RARγ を介してタンパク質合成を促進していることが明らかとなった。さらに、8 週齢 ddY 雄性マウスをコントロール群と β-カロテン投与群の 2 群に分け、両群の一方の後肢のヒラメ筋に RARγ siRNA を、もう一方のヒラメ筋にコントロール siRNA を投与した。β-カロテンの投与 2 週間後に骨格筋重量を測定した結果、コントロール siRNA を投与したヒラメ筋では β-カロテンによって筋重量が増加したが、RARγ をノックダウンしたヒラメ筋では β-カロテンによる筋重量の増加は抑制された。また β-カロテンによるヒラメ筋のタンパク質合成促進、タンパク質合成促進因子であるインスリン様成長因子（IGF-1）の発現レベルの上昇、mTOR の基質である p70S6K のリン酸化の亢進は、RARγ をノックダウンしたヒラメ筋で抑制された。一方、β-カロテンによるユビキチン化タンパク質の減少は、RARγ siRNA の投与による影響を受けなかった。これらのことから、β-カロテン摂取によるヒラメ筋における筋重量増加とタンパク質合成促進に、RARγ が関与することが明らかとなった。

(1) Kitakaze T. *et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol.* in press

β-Carotene, Skeletal muscle, Retinoic acid receptor

発表番号：4G011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# マウスでの日本食モデル飼料の摂取による持久運動能力の増大

# Increase in endurance performance of mice by Japanese model diet

○山口 悟史、彭 蘭、マニオ マーク クリスチャン、松村 成暢、井上 和生 (京大農)
○Satoshi Yamaguchi, Lan Peng, Mark Christian Manio, Shigenobu Matsumura, Kazuo Inoue (Kyoto Univ.)

【背景】
近年、世界中で日本食への注目が高まっている。これは日本が健康長寿国として知られるようになり、健康である要因が医療だけでなく、日本食にもあると考えられるようになったためである。しかし、日本食といっても時代の流れで内容は変化している。1975 年の再現日本食が最も肥満発症リスクが低いとの報告があり (Tsuduki, et al.,2014)、この日本食では脂肪の代謝も向上していることが明らかにされた。この脂肪代謝の向上が運動能力の向上につながる可能性がある。本実験では、1975 年の再現日本食をマウスに与え、 持久運動能力の向上･抗疲労に影響があるのかを検討した。
【方法と結果】
6 週齢の雄性 Balb/c マウスを用いた。明暗 12 時間サイクル、自由摂食・摂水で飼育した。飼料は 1975 年の国民栄養調査を基に作成した精製日本食モデル飼料(日本食群) と、National Health and Nutrition Examination Survey 2009-2010 を基に作成した精製西洋食モデル飼料 (西洋食群) を用い、2 群で実験した。持久運動能力の測定には京大松元式改良型流水プールを用い、疲労困憊により遊泳不能になるまでの遊泳時間を測定した。マウスの遊泳には 9 L/min の流量から始め、10 分毎に 1 L/min ずつ流量を増加させるプロトコルを用いた。7 秒間自力で水面まで上がって来られない時点で遊泳不能と判断し、限界遊泳時間とした。群分け後 4 週間に渡って実験を行った。週に 2 回遊泳トレーニングを行い、週末に限界遊泳時間を測定した。遊泳トレーニングは 1、2 週目は 30 分間、3、4 週目は 40 分間前述のプロトコルで行った。結果として、3 週目以降、統計的に有意ではなかったが、日本食群において西洋食群よりも限界遊泳時間が長く、持久運動能力の増加傾向が見られた。我々は本実験で用いているプロトコルではマウスの限界遊泳時間は 3 週目以降下がる傾向にあると報告しているが、日本食群においてはこの減少傾向は見られなかった。
また、トレッドミル走行時の呼気ガス測定を行ったので、この結果についても報告する。
【考察】
1975 年の日本食を継続的に摂取することで持久運動能力の向上がみられた。これは遊泳トレーニングのみを課した際における疲労蓄積による遊泳時間の減少に対し、抗疲労効果が働いたためと考える。
本研究は農研機構生研センター異分野融合研究「世界の健康に貢献する日本食の科学的・多面的検証」の助成を得て行った。

Japanese diet, endurance performance, anti-fatigue

発表責任者：山口悟史（yamaguchi.satoshi.72n@st.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4G012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 暗期の光曝露ストレスが血栓関連因子に及ぼす影響

# Effects of light exposure stress during the dark period on anti-fibrinolytic factor, PAI-1

○保田 倫子[1]、渡辺 悠人[1]、鈴木 敬明[1,2]、榊原 啓之[3]、下位 香代子[1] ([1]静岡県大食、[2]静岡県工技研、[3]宮崎大農)
○Michiko YASUDA[1], Yuto WATANABE[1], Taka-aki SUZUKI[1,2], Hiroyuki SAKAKIBARA[3], Kayoko SHIMOI[1] ([1]University of Shizuoka, [2]Iri. of Pref. Shizuoka, [3]University of Miyazaki)

【目的】夜間の光曝露を余儀なくされる交代制勤務労働者（シフトワーカー）は、日中勤務労働者と比較して血栓症による死亡リスクが高いことが報告されている。この原因は夜間の光曝露による日内リズムの攪乱が原因ではないかと予想されているが、その作用機構等も含め不明な点が多い。以前、我々のグループは、暗期に雄性 C3H/He マウスに 1 時間光曝露ストレスをかけると、肝臓における血栓症との関連が深い線溶阻害因子 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の遺伝子発現が亢進することを報告した（Aoshima et al., *Exp. Anim.*, 63(3), 331-338, 2014)。本研究では、暗期に C3H/He マウスに対して 250 ルクスの光を 2 時間曝露した場合に生体に及ぼす影響を、PAI-1 への影響を中心に検討を行った。【方法】 雄性 C3H/He マウス 4 週齢を 12 時間ごとの明暗サイクル（ZT0-12：明期、ZT12-24：暗期）で動物個別飼育装置内において 4 週間馴化させた。馴化期間終了後、暗期開始 2 時間後から 2 時間（ZT14-16)、250 ルクスの光を曝露させた後、再び暗期に戻した。ZT12-24 の間に解剖を行い、肝臓、心臓、血液を採取し、時計遺伝子の発現量、線溶系・凝固系遺伝子発現量、血中の PAI-1 量、コルチコステロン量およびカテコールアミン量を調べた。（ZT：Zeitgeber Time、点灯開始時刻を ZT0 とする）【結果・考察】対照群の肝臓における時計遺伝子、Clock、Per2、Cry2、Reb-erba の発現を調べた結果、従来の報告と同様、遺伝子発現に日内変動があった。これに対し、光曝露 2 時間群は光曝露後の ZT17 以降に対照群とそれらの発現量が異なる場合があり、光曝露 2 時間により時計遺伝子群の発現に影響があることを確認した。次に、心臓および肝臓における Pai-1 遺伝子発現量に及ぼす影響について調べたところ、光曝露終了直後の ZT16 に対照群と比べてその発現量が上昇することがわかった。心臓においては tPA の発現が光曝露終了直後で減少することも明らかとなった。血中 PAI-1 量およびコルチコステロン量については、ZT21 において対照群と比較して光曝露群でわずかではあるが有意にその量が上昇した。さらに、光曝露終了直後の血中カテコールアミン量を調べた結果、血中ノルアドレナリン量に変化は見られなかったが、アドレナリン量は光曝露により有意に上昇した。これらのことから、光曝露ストレスにより Pai-1 の遺伝子発現が上昇すること、それにはアドレナリンが関与している可能性が示唆された。現在、アドレナリン受容体アゴニストおよびアンタゴニストを用いてその可能性について検証中である。さらに、このストレスによる影響を緩和できる可能性がある食品成分についても検討をしている。

light exposure stress, adrenaline, PAI-1

発表責任者：保田倫子（yasuda@u-shizuoka-ken.ac.jp）

発表番号：4G013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# シークヮーサー抽出液の血中尿酸値低下作用の検討

# Investigation of effect of shiikuwasha extract for reducing serum uric acid

○多田 一風太[1]、要 匡[2]、柳 久美子[2]、山本 憲国[3]、池松 真也[1] ([1]沖縄高専、[2]成育医療センター、[3]オキハム)
○Ipputa Tada[1], Tadashi Kaname[2], Kumiko Yanagi[2], Norikuni Yamamoto[3], Shinya Ikematsu[1] ([1]NIT, Okinawa college, [2]Natl. Center for Child Health and Development, [3]Okiham)

**【背景･目的】**

高尿酸血症は，血中尿酸値が 7 mg/dL 以上の状態を指し，放置すると痛風関節炎や尿路結石などの原因となる．成人男性の 4 人に 1 人は高尿酸血症といわれており，国民的な問題として注目されている．また，高尿酸血症は，①尿酸産生量増加タイプと②尿酸排出量低下タイプの 2 つに分けることができ，タイプに適した処置が必要である．

当グループの先行研究により，シークヮーサー抽出液が血中尿酸値を低下させる可能性が示唆された．本研究では，シークヮーサー抽出液が実際に血中尿酸値を低下させるか実験動物を用い検証し，またその作用機作を明らかにすることによって，どのようなタイプの高尿酸血症患者に適しているのかを明確にし，シークヮーサー抽出液の産業的利用価値向上を目的とした．

**【実験方法】**

①尿酸産生抑制試験として，キサンチンオキシダーゼがキサンチンを基質とし尿酸を産生することを利用し，キサンチンオキシダーゼ阻害試験を行った．

②尿酸排出促進試験として，高尿酸血症モデルマウスを用いた動物試験を行った．試験サンプルを一週間連続で高尿酸血症モデルマウスに一定時刻に腹腔内投与し,体重，食餌量，糞便量，尿量の測定を行った．一週間後，各マウスから採血及び腎臓を摘出し，採取した血中・尿中の尿酸値を測定することで，血中から尿中への尿酸の排出が促進しているか検討した．加えて，リアルタイム PCR を用いて，腎臓での尿酸関連トランスポーターの発現変動を解析した．

**【結果･考察】**

シークヮーサー抽出液のキサンチンオキシダーゼ阻害率は約 35%となり，一般的なキサンチンオキシダーゼ阻害薬であるアロプリノールと比較すると，阻害能は極めて低いと判断した．

高尿酸血症モデルマウスを用いた試験では，シークヮーサー抽出液投与群において，血中尿酸値は低下し尿中尿酸値が上昇する傾向を得た．加えて，尿中尿酸の再吸収に働く遺伝子の発現量が低下傾向を示した．これまでの検討により，シークヮーサー抽出液はキサンチンオキシダーゼ阻害率とは異なる経路で, 血中尿酸値低減を導いていることが確認できた. 本成果により, 産業的にシークヮーサーを有効活用するための，新たな付加価値の方向性を示唆することができた．

shiikuwasha, hyperuricemia, urate transporter 1

発表番号：4G014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 日本料理がヒトの気分状態に及ぼす影響

# Excitement and calm in Japanese cuisine：Effects of Japanese dishes on mood states and autonomic nerve activity

○山崎 英恵[1]、高橋 拓児[2]、伏木 亨[1]([1]龍谷大学農学部食品栄養学科、[2]龍谷大学農学部食の嗜好研究センター)
○Hanae YAMAZAKI[1], Takuji Takahashi[2], Tohru Fushiki[1] ([1]Ryukoku Univ. Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Human Nutrition, [2]Ryukoku Univ. Faculty of Agriculture)

【目的】懐石料理に代表される日本料理は、コースの流れの緩急を表現することに大きな特徴がある。西洋料理や中華料理に豊富に含まれる油脂は、それら料理のおいしさを決定づける大きな因子であるが、油の使用量が極めて少ない日本料理では、料理の提供順序により飽きないおいしさを長時間継続する工夫がなされている。本研究では、食事の際のヒトの興奮・沈静状態を主観的及び客観的な両側面から検討し、日本料理の構造特性を解析することを目的とした。
【方法】飲料や食品には、リラックス効果や高揚感などの心理学的効果があることが経験的に知られている。我々はこれまでに、飲料・食品摂取時の心理的および生理的状態について評価・検討し、様々な食品の摂取や、香りの吸引が気分状態や自律神経活動に影響を与える事を明らかにしてきた。本研究においても、同様の方法を用い、懐石料理に供出される煎茶や食前酒、造り・煮物椀・八寸について検討した。また、日本料理と西洋料理、中華料理の特性を検討する目的で、それぞれの代表的な料理として日本料理の造り、西洋料理としてステーキ、中華料理として麻婆豆腐を比較検討した。
被験者は、21-30歳の健康な成人女性(n=16)とした。気分を表す30ワードで構成された評価尺度「気分シート」を主観的指標として、各ワードに対する評価を気分の変化量としてスコア化した。自律神経活動変化は、心拍変動パワースペクトル解析法により評価した。心拍変動測定と気分シート記入を1セットとし、その後食品（料理）摂取を組み込み、4回測定を行った。各料理の摂取後には、料理に対する嗜好強度をVisual Analogue Scale (VAS) を用いて測定した。
【結果と考察】いずれの料理も気分をポジティブな状態へと誘導した。造り（日本料理・低油脂）はステーキ（西洋料理・高油脂）や麻婆豆腐（中華料理・香辛料多）に比べ、高い興奮状態を継続させること、総自律神経、交感・副交感神経活動を亢進させることが特徴として見いだされた。懐石料理には、心理的・生理的作用に強弱があり、食べ手の習熟度もその要因の一つとなることが推察された。

autonomic nerve activity, mood states, Japanese cuisine

発表番号：4G015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 運動性疲労が味覚嗜好性に及ぼす影響の検討

# The effect of physical fatigue on taste preference

○冷水 里穂子、林 由佳子（京大農）
○Rihoko SHIMIZU, Yukako HAYASHI (Kyoto Univ.)

【背景と目的】近年の健康志向の風潮のなか、生活に運動を取り入れる人がますます増えている。運動後の疲労回復には迅速かつ適切な栄養補給が重要であり、その時々の生体の生理・栄養状態を反映する感覚である味覚の変化を明らかにすることは、その実現への手がかりとなると期待される。本研究室においては過去に、ヒトにおいて運動後の疲労時に甘味や塩味の感受性や嗜好性が変化することを明らかにしてきた(日本味と匂い学会誌 15(3),309-312,2008)。しかし、運動後の疲労時における味覚変化については未解明な部分が多い。本研究では、運動後の疲労時における味嗜好性の変化を明らかにすべく、マウス(C57BL/6J 系統,♀)を用いて行動学的解析を行った。
【方法】マウスに暗期開始と同時に絶水をかけ、その 4 時間後よりトレッドミル装置を用いて 4 時間の強制走行を負荷し、疲労状態にさせた（疲労群)。運動負荷後、水と味溶液の 2 種類のボトルを呈示し、10 分間自由に飲水させた。マウスの位置による嗜好性の偏りの影響を排除するため、溶液呈示開始より 1、3、5 分時点で両ボトルの位置を交代した。10 分後に両溶液の摂取量を測定し、味溶液の嗜好率を、味溶液摂取量を総摂取量で除した値として算出した。比較対象群として 4 時間走行を負荷しない運動なし群の味溶液嗜好率を測定した。
【結果と考察】疲労群では 30 mM スクロース溶液（甘味）に対する嗜好率が運動なし群と比較して上昇しており、運動後の疲労時には甘味に対する嗜好性がより低濃度から上昇することが明らかとなった。疲労群では、様々な濃度の塩化ナトリウム溶液（塩味）のなかで 100 mM 塩化ナトリウム溶液に対してのみ嗜好率の上昇がみられた。運動による体液損失に伴い、体液浸透圧に近い濃度の塩化ナトリウム溶液に対する欲求が生じた可能性がある。そのほか、疲労群ではクエン酸溶液（酸味）やグルタミン酸ナトリウム溶液（うま味）に対する嗜好率の低下がみられた。本研究ではさらに、こうした種々の味質に対する嗜好性の変化が、運動後の血糖値の低下や血中乳酸値の上昇といった生理状態の変化に影響を受けているのかについて検討した。

taste, preference, physical fatigue

発表番号：4G016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 14-3-3 から解離した DAPK2 はチューブリンとの結合を介してアポトーシスを誘導する
# DAPK2 released from 14-3-3 induces apoptosis through interaction with tubulin

○湯浅 恵造[1]、一色 衣香[1]、太田 玲奈[1]、松田 真弥[1]、井上 雅広[2]、辻 明彦[1] ([1]徳島大院・STS、[2]久留米大・医)
○Keizo Yuasa[1], Kinuka Isshiki[1], Reina Ota[1], Shinya Matsuda[1], Masahiro Inoue[2], Akihiko Tsuji[1] ([1]Tokushima Univ., [2]Kurume Univ.)

Death-associated protein kinase 2（DAPK2）は $Ca^{2+}$/CaM 依存性 Ser/Thr キナーゼであり、アポトーシスの正の制御因子として機能している。しかしながら、DAPK2 がどのような分子機構でアポトーシスを誘導するのか明らかにされていない。そこで本研究では、DAPK2 シグナリングの制御因子を明らかにするために、DAPK2 と相互作用するタンパク質の探索を行った。Strep タグ DAPK2 をヒト乳癌細胞 MCF7 細胞およびヒト子宮頸癌 HeLa 細胞に遺伝子導入し、Strep プルダウンアッセイを行った結果、約 30、31、55 kDa の特異的なバンドが得られた。質量分析法により、30、31 kDa タンパク質として 14-3-3 タンパク質を、55 kDa タンパク質として β-チューブリンをそれぞれ同定した。14-3-3 タンパク質は mode1、mode2、mode3 モチーフと呼ばれるリン酸化モチーフを認識してタンパク質間相互作用を示す。DAPK2 の C 末端配列（$^{364}$RRRSSTS-COOH）が mode3 モチーフ（(pS/pT)$X_{1\text{-}2}$-COOH）と一致したことから、この配列が 14-3-3 との結合に関与するのか調べた。DAPK2 T369A 変異体において 14-3-3 タンパク質との相互作用が著しく低下したことから、$Thr^{369}$ を介して二者が結合することが示された。また、DAPK2 の C 末端配列は Akt のコンセンサスリン酸化モチーフ（RXRXXS/T）とも一致することから、Akt による DAPK2 のリン酸化について検討した。Akt は $Thr^{369}$ をリン酸化し、Akt 阻害剤である MK2206 処理によって DAPK2 と 14-3-3 タンパク質との相互作用が低下することが明らかとなった。さらに、14-3-3 タンパク質との結合が DAPK2 のキナーゼ活性にどのような影響を与えるのか検討した結果、14-3-3 タンパク質との相互作用によりキナーゼ活性が阻害され、さらに細胞内においてアポトーシス促進能が抑制されることが明らかになった。一方、チューブリンは重合と脱重合を繰り返すことにより微小管を形成する。有糸分裂において、微小管は紡錘体の形成に重要な役割を果たし、微小管脱重合阻害剤ノコダゾールなどの微小管に作用する薬剤はアポトーシスを引き起こすことが知られている。そこで、ノコダゾールによって誘導されたアポトーシスに DAPK2 が関与するのか検討した。内在性 DAPK2 が発現する HeLa 細胞をノコダゾールによって処理するとアポトーシスが誘導されたのに対して、DAPK2 ノックダウン細胞においてアポトーシスは有意に抑制された。また、ノコダゾール処理によって DAPK2 は 14-3-3 タンパク質から解離し、チューブリンと強い相互作用を示した。以上の結果より、通常 Akt によって DAPK2 がリン酸化され、そのリン酸化された $Thr^{369}$ を介して 14-3-3 タンパク質と結合しているが、アポトーシス刺激に応答して 14-3-3 タンパク質から解離し、チューブリンと相互作用をすることによりアポトーシスを誘導することが示された。

DAPK2, apoptosis, protein-protein interaction

発表責任者：湯浅恵造（kyuasa@tokushima-u.ac.jp）

発表番号：4G017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

PKGII は Raf1 の Ser43 のリン酸化を介して MAPK 経路を負に制御する
PKGII negatively regulates the MAPK pathway via phosphorylation of Raf1 at Ser43
○小松 弘明[1]、亀村 典生[2]、辻 明彦[1]、湯浅 恵造[1] ([1]徳島大・STS、[2]徳島大)
○ HIROAKI KOMATSU[1], NORIO KAMEMURA[2], AKIHIKO TSUJI[1], KEIZO YUASA[1] ([1]Tokushima Univ., STS, [2]Tokushima Univ.)

FGF/FGFR3/MAPK シグナリングは軟骨細胞の増殖および分化に重要な役割を果たしており、ヒトにおける FGFR3 の恒常的活性型変異によるそのシグナルの異常は軟骨無形成症や軟骨低形成症といった疾患の原因となることが知られている。一方、C 型ナトリウム利尿ペプチド（CNP）は、その受容体である NPR-B を介して細胞内セカンドメッセンジャーcGMP を産生し、続いて cGMP-dependent protein kinase II（PKG-II）を活性化することによって（CNP/NPR-B/PKG-II）、軟骨性骨化促進作用を発揮するとともに、FGF/FGFR3/MAPK 経路を阻害することが示されている。しかしながら、その阻害機構の詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、PKG-II によってリン酸化制御を受ける FGF/FGFR3/MAPK シグナル伝達因子あるいはその調節因子の探索を行い、PKG-II による FGF/FGFR3/MAPK 経路の阻害機構の解明を試みた。まず、ラット軟骨肉腫（rat chondrosarcoma（RCS））細胞に FGF2 を添加し、MAPK 経路の活性化を調べた。FGF2 刺激によって ERK1/2、さらに MEK1/2 のリン酸化の上昇が認められ、これらの活性化は膜透過性 cGMP 誘導体である 8-*p*CPT-cGMP 処理によってほぼ完全に阻害されることを確認した。次に、MEK/ERK の上流因子である Raf1 のリン酸化について調べた。FGF2 刺激によって Raf1 の活性化に必要な $Ser^{338}$ のリン酸化の上昇が認められ、このリン酸化は MEK/ERK と同様に 8-*p*CPT-cGMP 処理によって阻害された。これに対して、Raf1 の $Ser^{43}$ のリン酸化は 8-*p*CPT-cGMP 処理によって有意に上昇した。Raf1 の $Ser^{43}$ のリン酸化は Raf1 活性を負に制御することから、cGMP 依存的な $Ser^{43}$ のリン酸化によって Raf1 以降の MAPK 経路が抑制されることが考えられた。そこで、PKG-II が Raf1 の $Ser^{43}$ を直接リン酸化するのか検討した。PKG-II は cGMP 依存的に Raf1 の $Ser^{43}$ をリン酸化したのに対して、43 番目 Ser を Ala に置換した Raf1 S43A 変異体のリン酸化は認められなかった。また、cGMP との親和性が低下した PKG-II D412A/R415A 変異体を用いて、同実験を行ったが、Raf1 の $Ser^{43}$ のリン酸化は認められなかった。以上のことから、PKG-II は軟骨細胞において Raf1 の $Ser^{43}$ のリン酸化を介して FGF/FGFR3/MAPK 経路を負に制御することが示された。現在、Raf1 の $Ser^{43}$ のリン酸化がどのような分子機構によって MAPK 経路を阻害するのか解析しており、併せて報告したい。

PKG, FGF/FGFR3/MAPK, chondrocyte

発表責任者：湯浅恵造（kyuasa@tokushima-u.ac.jp）

発表番号：4G018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# HSP90 plays a critical role in lipid metabolism by stabilizing the SREBP-SCAP complex

○YEN-CHOU KUAN[1], Tsutomu HASHIDUME[1], Takahiro SHIBATA[2], Koji UCHIDA[2], Makoto SHIMIZU[1], Jun INOUE[1], Ryuichiro SATO[1] ([1]The University of Tokyo, [2]Nagoya University)

Sterol regulatory element binding protein (SREBP) is the master transcription factor controlling lipid metabolism. SREBP activation is regulated by SREBP cleavage activating protein (SCAP), which binds to and stabilizes SREBP. As an approach to study SCAP/SREBP binding, we searched for new SCAP-binding partners by affinity purification-mass spectrum analysis. HSP90 was identified as one of the SCAP-binding partner, and the formation of endogenous and ectopically expressed HSP90/SCAP/SREBP complex was confirmed by co-immunoprecipitation. HSP90 is a chaperone that binds to, stabilizes, and matures more than two hundred cellular proteins and participates in almost all aspects of cellular processes. We discovered that inhibition of HSP90 by 17-AAG or siRNA knockdown led to SCAP and SREBP degradation and the subsequent downregulation of SREBP-target genes in HepG2. Through a cycloheximide protein chase assay we revealed that 17-AAG caused the destabilization of SCAP and SREBP and accelerated protein degradation, which was via a proteasome-dependent pathway since treating HepG2 with MG132 relieved 17-AAG-induced SCAP and SREBP degradation. Taking advantage of CHO-7 and SRD-13A (SCAP-deficient) cell lines, we found that SCAP was essential for HSP90 to regulate SREBP. While, 17-AAG dose-dependently reduced SCAP and SREBP-1 proteins in CHO-7 but not SRD-13A, overexpressing SCAP in SRD-13A restored the effect of 17-AAG on SREBP-1, in which both the overexpressed SCAP and the SREBP-1 proteins were reduced. Finally, we examined the effect of HSP90 inhibition *in vivo*. C57BL/6N mice were treated with a 17-AAG derivative, 17-DMAG, (5 mg/kg body weight) by i.p. injection. In the 17-DMAG-treated liver, the levels of SCAP and SREBP protein as well as mRNA of SREBP-targets were significantly decreased. Primary mouse hepatocytes treated with 17-DMAG also showed dose-dependent reduction of SCAP and SREBP proteins and downregulation of SREBP-target genes. Altogether, we identified HSP90 as a new SCAP-binding partner and unveiled a novel mechanism of SCAP-SREBP regulation.

heat shock protein, lipid metabolism, hepatocyte

発表番号：4G019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 免疫老化における B 細胞機能変化および網羅的遺伝子解析に関する研究

# Study of comprehensive analysis of genes and function of phenotypic changes of B cells associated with aging in immune system.

○藤木 司[1]、片倉 喜範[2]、岸原 健二[1] ([1]長崎国際大院薬、[2]九大院農院)
○Tsukasa FUJIKI[1], Yoshinori KATAKURA[2], Kenji KISHIHARA[1] ([1]Nagasaki Int. Univ., [2]Kyushu Univ.)

【目的】

加齢に伴う免疫老化についてこれまでにストレス MAPK として知られる p38 の活性化が B 細胞における細胞の分裂老化において重要な役割を果たしていると考えられており、本研究では加齢に伴う免疫機能低下における炎症性シグナル、抗原提示機能への原因遺伝子について検証を行った。

【方法】

高齢者（65 歳）および若年者（22 歳）より採取した B 細胞を EB ウィルスによって不死化した細胞株（EBV-B old、EBV-B young）を実験に供し、PhosFlow assay による細胞内リン酸化タンパク質解析、フローサイトメーターによる細胞表面発現分子解析、DNA マイクロアレイおよびリアルタイム PCR による発現遺伝子に関する網羅的解析を行った。

【結果・考察】

これまでの研究から EBV-B young は EBV-B old より IgM 抗体を優位に産生する一方、IgG 抗体産生については EBV-B old より著しく低下することが明らかとなった。さらに EBV-B old においては、抗原に対する感作能低下が観察された。またストレス応答因子 MAPKp38 および炎症シグナル因子 NF-kB の細胞内リン酸化について検証したところ、EBV-B old において共に優位に活性化していることが明らかとなった。さらに免疫応答における T-B 細胞間シグナル相互作用分子の発現ついて解析したところ、EBV-B old において HLA-DR 発現が低下していた。この発現低下は MAPK p38 阻害剤 SB203580 処理により回復したことから、EBV-B old では p38 を介した HLA-DR の発現制御が存在する可能性が考えられた。また DNA マイクロアレイによる網羅的解析により EBV-B young と EBV-B old 間で発現に有意な差がみられた候補遺伝子群について検体数を増やしてリアルタイム PCR により発現確認を行ったところ、p16、TNF-α をはじめとする細胞老化表現型に関わる SASP 因子、NMDA 受容体分子、ミトコンドリアタンパク質、スカベンジャー受容体、DNA 結合タンパク質などにおいて有意な差が観察された。特に TNF-α は MAPKp38 および NF-kB の恒常的なストレスシグナル亢進に関与する可能性が考えられた。これらについては加齢に伴う B 細胞機能変化への関与について解析を進めていく予定である。

Immunosenescence, B cell, p38

発表番号：4G020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ミクログリアにおける GAPDH の非典型的放出機構と自然免疫応答調節

# Unconventional secretory pathways and innate immunomodulatory functions of GAPDH in microglial cells

○竹之内 敬人[1]、月本 光俊[2]、佐藤 充[1]、木谷 裕[1] ([1]農生資研・動物生体防御、[2]東理大・薬)
○Takato TAKENOUCHI[1], Mitsutoshi TSUKIMOTO[2], Mitsuru SATO[1], Hiroshi KITANI[1] ([1]Natl. Inst. Agrobiol. Sci, [2]Tokyo Univ. of Sci.)

【目的】グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）は解糖系の主要酵素として知られ、近年では、細胞内で様々な役割を持つ多機能性蛋白質としても注目されている。また、細胞外で神経突起伸長や細胞接着調節などに関与することも報告されているが、細胞外への分泌に必要なシグナル配列を持たない GAPDH がどのような機構で分泌されるかの詳細については未解明である。最近、自然免疫担当細胞として知られるマクロファージから、比較的多くの GAPDH が分泌されることが報告された。さらに、マウス腹腔内に前投与した GAPDH が抗炎症性に作用し、リポ多糖（LPS）で誘導した敗血症病態に対し改善効果を示すことも報告されている。本研究では、細胞外 GAPDH の自然免疫系における役割を検討するために、脳マクロファージであるミクログリアからの GAPDH の非典型的分泌機構とその自然免疫応答調節作用について調べた。
【方法】マウス初代培養ミクログリア及びその不死化細胞株 MG6 を実験に用いた。細胞をプレートに播種し、LPS で前処理した後 ATP で刺激し、培養上清中に分泌される GAPDH をウエスタンブロット法や ELISA 法で検出した。GAPDH の細胞内局在については、免疫染色法で検討した。また、ATP 刺激後の培養上清からマイクロベシクルやエキソソームを回収し、これら膜小胞への GAPDH の局在についても検討した。
【結果・考察】ミクログリアを高濃度 ATP で刺激すると、培養上清中に GAPDH が分泌されることがわかった。ミクログリアからの GAPDH 分泌は LPS 前処理によって顕著に促進された。また、ATP 受容体ファミリーの一つ P2X7 受容体活性化に伴うカスパーゼ 1 の活性化が GAPDH 分泌に関与することが示唆された。さらに、ATP 刺激で培養上清中に放出されるエキソソームやマイクロベシクルに GAPDH の局在が確認されたことから、GAPDH 分泌にこれら膜小胞が関与することも示唆された。また、細胞外に添加したヒト GAPDH 蛋白質には、LPS によるミクログリアの p38MAP キナーゼリン酸化を促進する効果があることが示された。これらの結果から、ミクログリア／マクロファージにおいて ATP-P2X7 受容体経路が関与する GAPDH の非典型的分泌機構の存在が示唆された。また、分泌された細胞外 GAPDH は自然免疫系の調節に関与する可能性が推測された。

glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, microglia, unconventional secretion

発表責任者：竹之内敬人（ttakenou@affrc.go.jp）

発表番号：4G021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# コラーゲン分解物の炎症誘導作用の解析

# Proinflammatory effects of collagen hydrolysate

○村上 庸人[1]、藤野 峻行[2]、倉知 遼太郎[1]、篠原 慶浩[1]、早瀬 文孝[2]、渡辺 寛人[1]([1]明治大農・生命科、[2]明治大農・農芸化)
○ Yoto MURAKAMI[1], Takayuki FUJINO[2], Ryotaro KURACHI[1], Yoshihiro SHINOHARA[1], Fumitaka HAYASE[2], Hirohito WATANABE[1] ([1]Faculty of Life Sciences, Meiji Univ., [2]Faculty of Agricultural Chemistry, Meiji Univ.)

【目的】

細胞外マトリクスの構成成分であるコラーゲンは、インテグリンをはじめとするいくつかの細胞膜受容体と相互作用することにより、免疫応答、血液凝固、創傷治癒といった多様な細胞プロセスに関与することが示されている。なかでもマクロファージの免疫機能活性化にはコラーゲンが深く関与していることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。そこで本研究においては、マクロファージの免疫応答、とくに炎症応答に対するコラーゲンの詳細な生理作用を明らかにすることを目的として解析を行った。

【方法】

ウシアキレス腱由来コラーゲンをプロナーゼによって消化し、分解物を粗精製した後、ゲル濾過クロマトグラフィー（Sephadex G-25）に供して分子量約 1500～6000 のペプチド画分を得た。これをマウス由来マクロファージ様細胞株である RAW264.7 に作用させ、RT-PCR により各種遺伝子の mRNA 発現変化を解析した。

【結果】

RAW264.7 細胞にペプチド画分を作用させたところ、iNOS、MCP-1、および COX-2 をはじめとする炎症応答関連因子の mRNA 発現が顕著に増大した。またこの増大作用はペプチドの濃度に依存的なものであった。これらのことから、コラーゲン由来のペプチドがマクロファージの炎症応答を強く誘導しうることが示唆された。

collagen, proinflammatory cytokine, macrophage

発表番号：4G023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 遺伝学的相補解析によるヒストンバリアント H2A.Z の機能ドメインと進化的保存性の解析

Genetic complementation assay of the histone variant H2A.Z in vertebrate and yeast cells

○高橋 大輔、日下部 将之、奥 裕之、原田 昌彦（東北大農）
○Daisuke TAKAHASHI, Masayuki KUSAKABE, Hiroyuki OKU, MASAHIKO HARATA (Tohoku Univ.)

DNAとヒストンによって構築されるクロマチン構造は、真核細胞におけるエピジェネティック制御の基盤である。転写、複製、修復といったゲノム機能は、クロマチン構造変換による制御を受けており、これが分化・発生・病態などの高次生命現象の発現にも寄与している。様々な核内因子がクロマチン構造変換に関与しているが、最近になり、コアヒストンに替わってヌクレオソーム中に導入されるヒストンバリアントがエピジェネティック制御に重要な役割を果たすことが見出されている。H2A.Zは、コアヒストンH2Aのバリアントである。H2A.Zは酵母からヒトまで進化的に高度に保存されており、がんや初期発生との関連も報告されている。H2A.Zの分子機能については、これまで出芽酵母のH2A.Z (Htz1)が主に解析の対象となってきたが、その機能には不明な点が多く、特に脊椎動物のH2A.Zの機能解析は遅れている。そこで本研究では、脊椎動物H2A.Zの機能ドメインの同定と、出芽酵母H2A.Zとの進化的保存性を解析することを目的とした。これまでに我々は、ニワトリDT40細胞を用いて、テトラサイクリン誘導型H2A.Z欠損細胞（H2A.Z-KO）を樹立している。このH2A.Z-KO細胞はテトラサイクリン存在下で致死性を示すが、この細胞中で外来性脊椎動物H2A.Zを発現させることによりH2A.Z-KO細胞の致死性は回復した。このことは、H2A.Z-KO細胞を用いて遺伝学的相補解析が可能であることを示している。出芽酵母H2A.Z (Htz1)をH2A.Z-KO細胞で発現した場合には、H2A.Z-KO細胞の致死性は回復しなかった。このことは、進化の過程でH2A.Zの機能に変化が起こったことを示している。そこで個々のドメインの解析を目的として、脊椎動物と出芽酵母のアミノ酸配列を置換した様々なキメラH2A.Zを作製し、H2A.Z-KO細胞でこれらのキメラH2A.Zを発現したところ、すべてのキメラH2A.Z発現細胞で、中程度の細胞増殖の回復が観察された。これらの結果は、

①H2A.Zの個々の機能ドメインは、不完全ながら進化的保存性を示すこと、②酵母と脊椎動物H2A.Z

の進化的機能変化は、個々のドメインにおける部分的変化の相乗的効果によるものであること、を示唆している。

chromatin, histone variant, H2A.Z

発表番号：4G024
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# がん細胞におけるクロモドメインタンパク質 CBX2 のアポトーシス制御機構の解析

# Functional analysis of chromodomain protein CBX2 in the regulation of apoptosis in cancer cells

○横山 翔[1,2]、伊藤 昭博[1]、波多野 稔子[1]、浜本 牧子[2]、吉田 稔[1] ([1]理研、[2]明治大院)
○ Sho Yokoyama[1,2], Akihiro Ito[1], Naruko Hatano[1], Makiko Hamamoto[2], Minoru Yoshida[1] ([1]RIKEN, [2]Grad. Sch. Meiji Univ.)

【背景と目的】ヒストン H3 の 27 番目のリジンのトリメチル化（H3K27me3）は転写抑制のためのエピジェネティックマークとして機能するが、同時に細胞のがん化に密接に関与していることが明らかになってきた。メチル化酵素である EZH2 によって触媒されるヒストン H3K27me3 による転写抑制は、H3K27me3 と直接結合するクロモドメインタンパク質 CBX2 により仲介されるが、がん細胞における高発現や、がん細胞の増殖を促進させるドライバー変異の発見といった EZH2 とがん細胞との関わりが明らかになっていく一方で、細胞のがん化における CBX2 の役割はほとんど不明である。そこで本研究では、CBX2 が制御する遺伝子を特定することで、細胞のがん化における CBX2 の重要性を明らかにすることを目指した。
【方法】ヒト正常線維芽 TIG3 細胞および、ヒト乳がん細胞である MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞について、細胞内 ATP 量を指標として CBX2 のノックダウンによる細胞増殖への影響を検討した。また、CBX2 ノックダウン条件下における遺伝子発現レベルの変化を、DNA マイクロアレイによって網羅的に調べた。さらに、ウエスタンブロット法による Cleaved PARP の検出と、Annexin V とヨウ化プロピジウム（PI）で染色した細胞のフローサイトメトリー解析を行い、CBX2 のノックダウンによるアポトーシスへの影響を検討した。
【結果と考察】CBX2 をノックダウンすることで、MDA-MB-231 細胞の増殖のみ顕著に抑制されることが明らかとなった。そこで MDA-MB-231 細胞において、DNA マイクロアレイによって CBX2 ノックダウンにより発現が変動する遺伝子を網羅的に探索したところ、アポトーシスの促進因子である BIK、PUMA の発現が上昇していることを見出した。定量的 PCR 解析の結果、MDA-MB-231 細胞でのみ、CBX2 のノックダウンで有意に両遺伝子の発現が上昇することが確認された。またこの細胞において、ウエスタンブロット法により CBX2 のノックダウン依存的にアポトーシスの指標となる Cleaved PARP が検出され、Annexin V 染色においても CBX2 のノックダウン依存的にアポトーシスが引き起こされていることを見出した。以上の結果から、CBX2 はヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞において、BIK、PUMA の遺伝子発現を下方制御することによりアポトーシスを回避し、がん形質の維持に寄与する可能性が示された。

epigenetic, CBX2, histone methylation

発表番号：4G025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# カイコガのフェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）とその受容体（PBANR）の結合解析および PBANR の結晶化用リガンド探索

# Quantitative binding analysis of the silkmoth pheromone biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) and its receptor (PBANR) and its application to the screening of ligand(s) for PBANR crystallization

○片山 幸江[1]、片山 秀和[2]、山口 和也[1]、河合 岳志[1]、夏目 亮[3]、千田 俊哉[4]、永峰 俊弘[5]、HULL J.Joe[6]、松本 正吾[5]、長澤 寛道[7]、永田 宏次[1]、田之倉 優[1]（[1]東大院農生科、[2]東海大工、[3]東京電機大工、[4]高エネ研、[5]理研、[6]米農務省農研局、[7]浙江大生科院）

○ Yukie KATAYAMA[1], Hidekazu KATAYAMA[2], Kazuya Yamaguchi[1], Takeshi KAWAI[1], Ryo NATSUME[3], Toshiya SENDA[4], Toshihiro NAGAMINE[5], J.Joe HULL[6], Shogo MATSUMOTO[5], Hiromichi NAGASAWA[7], Koji NAGATA[1], Masaru TANOKURA[1] ([1]Univ. of Tokyo, [2]Tokai Univ., [3]Tokyo Denki Univ., [4]KEK, [5]RIKEN, [6]USDA-ARS, [7]Zhejiang Univ.)

【背景と目的】蛾類昆虫のフェロモン生合成活性化神経ペプチド受容体（PBANR: Pheromone Biosynthesis-Activating Neuropeptide Receptor）はフェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）をリガンドとする膜タンパク質で、G タンパク質共役受容体（GPCR）クラス A に属する。33 残基のペプチド PBAN の結合による PBANR の活性化が蛾の性フェロモン生合成を統御しているため、PBANR による PBAN 認識機構は、蛾の繁殖抑制に役立つ基盤情報である。我々はこの分子認識機構を解明するために、PBAN-PBANR 複合体の X 線結晶構造解析を目的としている。これまでに、カイコガ PBANR 組換え体を高発現する昆虫細胞系を用いて、結晶化に適した PBANR コンストラクトの設計、細胞培養、発現、細胞膜からの可溶化、精製、結晶化において種々の検討を進めてきた。これまで PBANR 精製時にタンパク質の安定性向上と状態均一化のため、PBAN の活性部位（C 末端 5 残基および C 末端アミド基）を含む PBAN の C 末端 10 残基ペプチド（C10PBAN-$NH_2$）50 $\mu$M（終濃度）を添加してきたが、リガンド濃度がこれより低いと PBANR の収量が減少する。そこで、今回、PBANR に対する PBAN とその誘導体との親和性を解析し、さらに結晶化に用いるリガンドについて検討した結果を報告する。

【方法】PBANR に対する PBAN の結合の強さの指標として解離定数（$K_d$）を求めた。次により低濃度でも PBANR に結合して安定化するリガンドを得るために、全長 PBAN（33PBAN-$NH_2$）に対する C10PBAN-$NH_2$、およびいくつかの PBAN 誘導体について 33PBAN-$NH_2$ との競合実験を行い、阻害定数（$K_i$）を求めた。

【結果と考察】33PBAN-$NH_2$ と C10PBAN-$NH_2$ の、野生型 PBANR との $K_d$ は 110 nM と 240 nM、結晶化用に改変した変異体 PBANR との $K_d$ は 110 nM と 230 nM であり、野生型と結晶化用変異体 PBANR のリガンド結合能にはほぼ差が見られなかった。両分子とも雌のカイコガに注射する場合は、血リンパ中の濃度 1 nM 以下でもフェロモン生合成を活性化するが、PBAN と PBANR の解離定数の値はこの濃度よりも桁違いに高かった。一方、33PBAN-$NH_2$ との競合実験において、C10PBAN-$NH_2$ の $K_i$ が 42 nM であるのに比べ、C 末端がアミド化されていない C10PBAN-OH の $K_i$ は 11 $\mu$M で、PBAN の C 末端アミド化が PBANR への親和性に直接寄与することが示された。次に、雌の蛾を用いたフェロモン産生実験で PBANR アンタゴニストと報告されているいくつかのペプチド誘導体についても $K_i$ を求めたところ、$K_i$ が 0.60 nM で 33PBAN-$NH_2$ に比べて 2 桁強く PBANR に結合する化合物が見つかった。現在、この PBAN 誘導体をリガンドとして用いて PBANR の結晶化実験を進めている。

PBAN-PBANR complex, ligannd screening, quantitative binding analysis

発表番号：4G026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒスチジンリッチタンパク質／ペプチドの細胞膜透過機能に関する研究

Analysis of cellular uptake of histidine-rich protein/peptide

○井上 千穂、河野 強、岩崎 崇（鳥取大農）
○Chiho INOUE, Tsuyoshi KAWANO, Takashi IWASAKI (Tottori Univ.)

【背景・目的】これまでに我々は、ヒスチジンのみが連続したペプチドである『ポリヒスチジン』が、非常に高い細胞膜透過能を有することを明らかにした。また、ポリヒスチジンは一部の腫瘍細胞に対して、高い細胞選択性を示したことから、薬物輸送キャリアーの有力な候補として期待されている[1)]。しかし、その細胞選択性のメカニズムはいまだ未解明である。ポリヒスチジンを薬物輸送技術に応用するためには、細胞選択性メカニズムの解明が必要である。そこで本研究では、ポリヒスチジンの細胞選択性メカニズムの解明のため、ポリヒスチジンが細胞膜上で結合する因子の探索を試みた。

【方法・結果】ポリヒスチジンの結合因子の特定のため、既に結合因子が明らかになっているヒスチジンリッチタンパク質との機能の比較を行った。我々はヒト由来の Histidine Rich Glycoprotein (HRGP)の中に存在する Histidine Rich Region (HRR)に着目した。HRR は細胞膜表面のトロポミオシンと結合することが知られている。そこで我々は HRR の細胞膜透過について解析した。

まず、HRR に GFP を融合した HRR-GFP を大腸菌の発現系で調製した。次に、共焦点レーザー顕微鏡とフローサイトメトリー解析によって、HRR-GFP の細胞膜透過について調べた。顕微鏡観察の結果、ポリヒスチジンと同様に HRR-GFP は明確な細胞膜透過を示し、また、ポリヒスチジンと類似した細胞内局在を示した。フローサイトメトリー解析においても、HRR-GFP の細胞膜透過が確認された。さらに興味深いことに、亜鉛イオンの存在下において HRR-GFP の細胞膜透過量の増加が確認された。同様に、ポリヒスチジンに関しても、亜鉛イオンによって細胞膜透過量の増加が見られた。

【考察】HRR は細胞膜表面でトロポミオシンと結合することが知られているが、その結合は亜鉛イオンの存在下でさらに増強することが報告されている[2)]。一方で、本研究において、HRR-GFP は細胞膜透過を示し、さらにその細胞膜透過は亜鉛イオンの存在下で増加することが確認された。このことから、HRR-GFP の細胞膜透過にはトロポミオシンとの結合が関与している可能性が示唆された。同様に、ポリヒスチジンも亜鉛イオンの存在下において細胞膜透過が増加したことから、ポリヒスチジンの細胞膜透過においてもトロポミオシンとの結合が関与している可能性が示唆された。現在、ポリヒスチジンとトロポミオシンの直接的な結合を証明するために、詳細な分子間相互作用解析を行っている。

1) Iwasaki T et al. *J. Control. Release*, **210**, 115-124. (2015)
2) Jones AL et al. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 106-118. (2005)

histidine-rich protein, cell-penetrating peptide, cellular uptake

発表責任者：岩崎　崇（itaka@muses.tottori-u.ac.jp）

発表番号：4G027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 蛍光タンパク質を用いた抗体を得にくいタンパク質の機能解析法
# Functional analysis for ubiquitous protein using fluorescent protein

○高田 勇輝、松本 諒哉、高木 美香、高野 勇太、田中 眞人（東京電機大学）
○Yuki TAKADA, Ryoya MATUMOTO, Mika TAKAGI, Yuta TAKANO, Masato TANAKA (Tokyo Denki Univ.)

蛍光タンパク質は、至適な波長の励起光を吸収する事で、ある特定の波長の蛍光を発する性質を持ったタンパク質であり、現在、オワンクラゲや造礁サンゴから得られた蛍光タンパク質を改変した様々な組換え蛍光タンパク質が作製されている。これらの蛍光タンパク質の特性は分子内転移によって自ら形成する発色団および beta-バレルとの相互作用によるもので、外部からの基質や補因子を必要としない。そのため、蛍光タンパク質を標的とするタンパク質に融合標識して遺伝子導入する事で、標的タンパク質の細胞内分布や細胞内移動、親和性分子の探索等を行う事が可能となる。この手法は、標的タンパク質の機能を解析するため、生細胞系において、リアルタイムで標的タンパク質の動態が観察可能となるだけでなく、抗体を得にくいタンパク質の機能解析において非常に有効なものである。

今回、我々は赤色蛍光タンパク質 DsRed-monomer、および緑色蛍光タンパク質 AcGFP を用いて、標的とするタンパク質の機能解析を可能とする動物細胞での発現系を構築した。これは、標的タンパク質に蛍光タンパク質を付加して発現させるプラスミドと、標的タンパク質と共に蛍光タンパク質を同一プラスミド上に構築し、共発現させるプラスミドを基本とする。前者は、標的タンパク質の N 末端、あるいは C 末端側に 2 種類の蛍光タンパク質のいずれかを付加して発現させるプラスミドであり、これを用いる事で、1 つのタンパク質に対して、計 4 種の標識を行うことが可能となる。もう一方は、標的とするタンパク質と共に蛍光タンパク質を、それぞれ独立して発現させるプラスミドである。これによって、標的タンパク質と蛍光タンパク質とを融合させる事によって生じる不具合を排除し、遺伝子導入された細胞自体を蛍光タンパク質によって標識しつつ、標的タンパク質を発現させる事ができる。

これまでに、これら発現プラスミドを用いる事で、リボソームタンパク質やヒストン、転写因子等、様々なタンパク質を蛍光タンパク質によって標識し、それらの機能解析を行ってきた。中でも、プロフィリンの 4 種のアイソフォーム解析に関しては、本研究で構築した系を利用する事で、アクチン断片が引き起こす細胞死を特定のプロフィリンアイソフォームが抑制するという新たな知見が得られている。また、これらのプラスミドを利用して、緑膿菌由来のカルシウム結合ドメインを 2 種類の蛍光タンパク質間に組み込み、DsRed と AcGFP から成る一分子 FRET 系の構築を試みている。

Fluorescent protein, Fusion protein, Expression vector

発表番号：4G028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# C2C12 筋管細胞における収縮依存性カルシウムシグナリングによる CCL5 分泌制御

Role of calcium signaling in contraction-dependent CCL5 secretion in C2C12 myotubes.

○佐藤 整、石内 友里、石井 貴之、佐藤 和典、根建 拓（東洋大生命）
○HITOSHI SATO, YURI ISHIUCHI, TAKAYUKI ISHII, KAZUNORI SATO, TAKU NEDACHI (Toyo Univ.)

生体の骨格筋で収縮が生じると様々な細胞内シグナルが活性化される。特に筋収縮誘導に必須な骨格筋内のカルシウム振動は、同時にカルシウム依存性シグナルを活性化し、カルシニューリンなどにシグナルを伝達しながら様々な遺伝子発現を制御する。これまで、カルシウム依存性シグナルによって骨格筋の分化を調節する遺伝子群の発現が制御されることが知られているが、その他にも多くの遺伝子発現がその支配下にあることが予想されている。近年、骨格筋収縮に応答して分泌されるタンパク質（マイオカイン）が多数同定され、運動による代謝制御、免疫調節などに重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。そこで本研究では骨格筋研究の有用なモデルである C2C12 筋管細胞を用いて、新規マイオカインの同定およびマイオカイン分泌制御におけるカルシウム依存性シグナルの関与を明らかにすることを目的とした。

まず、C2C12 細胞に電気パルス刺激（EPS)を負荷し、電位依存性カルシウムチャネルの強制開口による人為的カルシウム振動を引き起こした後、培養上清液を回収、抗体アレイ（Proteome Profiler)を用いたマイオカイン分析を行った。その結果、EPS 処理依存的に分泌変動する新規マイオカインを複数同定することができた。その中でも特に運動によって分泌減少する CCL5 に着目し、カルシウム依存性シグナルとの関係を調べた。C2C12 細胞への EPS 負荷時に各種カルシウム依存性シグナルの阻害剤を添加し、培養上清に含まれる CCL5 量を解析したところ、特にカルシウムキレート剤 EGTA によって収縮依存的な CCL5 の遺伝子発現減少が抑制されることが観察された。他の結果もあわせると、カルシウム依存性シグナルが筋収縮依存的な CCL5 の発現抑制に関与していることが示された。

以上の研究から、運動依存的に骨格筋から CCL5 の分泌が減少すること、またこの遺伝子発現減少にはカルシウム依存性シグナルが関与していることが明らかとなった。今後、さらに CCL5 の分泌を制御しているシグナルの下流分子を明らかにすることで、運動依存的な免疫制御の一部が明らかになることが期待される。

contraction, C2C12, myokine

発表責任者：佐藤　整（s39101500133@toyo.jp）

発表番号：4G029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# Characterization of Environmental RNA Interference in the Cotton Bollworm

○Keita MIYATA, Yasuhiko ITO (Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences, Chubu University)

RNA interference (RNAi), a phenomenon in which silencing of gene expression is triggered by a double-stranded RNA (dsRNA) molecule, has been established as powerful and useful tool for reverse genetics-based studies in many organisms. RNAi triggered via microinjection of dsRNA is widely used in reverse genetics studies of many insects. RNAi has been demonstrated in some insects when fed with dsRNA. This discovery indicates the possibility of environmental RNAi (e-RNAi), which can potentially be used in RNAi-based pest management. We previously have been established an *in vivo* assay system to identify candidate genes involved in e-RNAi in the western corn rootworm[1)]. However, the mechanism underlying e-RNAi in insects is still unclear. Thus, elucidation of e-RNAi mechanism in insects is essential information to open the door of RNAi-based pest management. A recent study has reported that, in some insects, the efficiency of RNAi response depends on the concentration and size of dsRNA[2)]. In this study, we investigated whether the e-RNAi response in the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) is affected by the dsRNA concentration and size.

To evaluate the effect of e-RNAi by dsRNA in the cotton bollworm, we designed a dsRNA feeding system for cotton bollworm larvae. Ten microliters of dsRNA solution was added to 500 mg of artificial diet. One third-instar larvae and the treated diet were then placed in a dish (35 × 10 mm). Feeding of treated diet was kept for 4 days in incubator (25°C with 70% humidity). Subsequently, the larvae were dissected to exenterate gut, and RNA was extracted from exenterated gut. Silencing of target gene expression was investigated by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results of qRT-PCR analysis indicated a significant RNAi response in the gut of cotton bollworm larvae; this response depended on the concentration and size of dsRNA in the artificial diet. In conclusion, our results show that the concentration and size of dsRNA used can affect the efficiency of e-RNAi in the cotton bollworm.

(Reference)

1. Miyata et al. PLoS ONE, 9, e101661 (2014)
2. Miller et al. PLoS ONE, 7, e47431 (2012)

RNA interference, uptake, pest management

発表番号：4G030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒト因子由来完全再構成型無細胞翻訳系の樹立

# Establishment of cell-free translation systems reconstituted with human factors

○重田 友明、町田 幸大、今高 寛晃（兵庫県大院工）
○Tomoaki SHIGETA, Kodai MACHIDA, Hiroaki IMATAKA (Univ. of Hyogo)

再構成型タンパク質合成系は翻訳（開始・伸長・終結）に関わる個々の因子を試験管内で再構築した無細胞翻訳システムであり、大腸菌においては PURE システムが確立されている。一方、真核細胞由来のシステムとしては翻訳開始に依存しないシステムが樹立されている（Machida *et al*. J Biol Chem. 2014; 289:31960）。しかしながら、真核細胞におけるタンパク質合成制御はその大部分が翻訳開始においてなされているため、このシステムの利用性は限定的なものである。そこで、我々は翻訳開始因子を含む完全再構成型タンパク質合成系の開発に着手した。

細胞の mRNA の翻訳は 5’末端の Cap 構造に依存している。そこで、まず Cap 依存的翻訳の構築を行った。翻訳開始に関わる因子（eIF1, eIF1A, eIF2s, eIF2Bs, eIF3s, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G, eIF5, eIF5B, PABP, DHX29）を精製し、翻訳伸長・終結に関わる因子（ribosome, eEF1s, eEF2, eRF1, eRF3, tRNA, ARSs）と混合した。そこに Cap 構造とポリ A 鎖を持った *Renilla* luciferase の mRNA を投入し、32℃でインキュベートした。その結果、Cap 構造依存的に luciferase の合成量が増大することが分かった。現在、再構成系におけるポリ A 依存性翻訳の解析を行っている。

次に、RNA ウイルスの 1 種である脳心筋炎ウイルス（EMCV）の IRES に依存した再構成型翻訳系を確立した。上のシステムから eIF4E, PABP, DHX29 を除き、PTB を加えた。そこに T7 RNA polymerase と T7 promoter の制御下にある全長 EMCV の cDNA を添加し、インキュベーションを行った。その結果、殻タンパク質である L-2A（約 120 kDa）に加え、制御タンパク質である 2B-3D（約 140 kDa）が合成された。更に、processing 産物の 1 種である 3CD（約 75 kDa）も検出できた。今後は、この系を利用して、EMCV の複製機構を試験管内で明らかにしていく予定である。

以上、本研究で確立されたシステムは真核細胞の翻訳機構や RNA ウイルスの複製機構を研究する上での強力なツールとなる。

Reconstitution, Human, Translation

発表責任者：今高寛晃（imataka@eng.u-hyogo.ac.jp）

発表番号：4G031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 放線菌由来マシキノシン遺伝子の大腸菌での発現

# Expression of Masikinosin gene from *Streptomyces griseoloalbus* strain SN-22 in *E.coli*.

○藤末 優香[1]、浴野 圭輔[2]、尾山 廣[1]([1]摂南大、[2]熊本工大)
○Yuka FUJISUE[1], Keisuke EKINO[2], Hiroshi OYAMA[1] ([1]Setsunan Univ., [2]Kumamoto technical Univ.)

【目的】*Streptomyces griseoloalbus* SN-22 株(SN-22)が菌体外に産生するマシキノシンは、既知の微生物セリンプロテアーゼ阻害剤(SSI や MAPI)に阻害を受けず、タンパク質の Ala や Val のカルボキシル末端を水解するユニークなセリンプロテアーゼ（マシキノシン）である。浴野らは、2015 度の本大会において、ゲノム DNA からインバース PCR によりマシキノシン遺伝子をクローニングし、プレプロ領域と成熟酵素領域からなる前駆体タンパク質であること、成熟酵素領域の N 末端側に 50 残基（プレプロ領域）を含む前駆体遺伝子を大腸菌で発現させたが、活性型酵素が得られなかったことを報告した。本研究では、マシキノシン遺伝子のホモロジー検索を新たに行って得られたデータを基に、N 末端側の上流に 60 残基を追加した 110 残基をプレプロ領域と予想し、マシキノシン前駆体遺伝子の大腸菌での発現について検討した。
【方法】SN-22 の菌体破砕液から PCR によりプレプロ領域（110 残基）を含む成熟酵素領域の遺伝子を増幅した。この遺伝子をコールドショックベクターの pColdⅡに挿入し、*E. coli* BL21 株を形質転換した。形質転換体はプラスグロウ培地、15℃の低温条件下で発現を誘導した。マシキノシン前駆体の発現の有無は、抗 His-tag 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した。酵素活性は、Suc-Ala-Ala-Ala-pNA を基質に、37℃、pH9.0 で行い、反応産物の吸光度の上昇から算出した
【結果・考察】経時的にマシキノシン前駆体の発現を確認したところ、低温誘導（IPTG 添加）から４時間後の菌体破砕上清にわずかな発現を確認した。その後１９時間まで培養を続けたが、菌体量は増加せず、発現量もほとんど変化しなかった。そこで、非誘導下の 37℃で $OD_{600}$＝2.0 になるまで培養し、菌体量を増やした後、菌体を新しい培地に移して 15℃で 4 時間の発現誘導を行った。この菌体破砕上清の酵素活性を測定したところ、コントロール（ベクターのみ）に対して優位な差がみられ、この上清を 37℃、pH9.0 で加温したところ、37kDa 付近の His-tag 融合マシキノシン前駆体のバンドが消失し、酵素活性の上昇が確認された。以上より、マシキノシン前駆体は、大腸菌で発現し、その一部が大腸菌内で成熟体へと移行するため、発現誘導中の菌体増殖に影響を及ぼしているものと推測した。今後は、発現量を増やすための条件検討と変異体による機能解析を進める予定である。

protease, expression, maturation

発表番号：4G032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 摘出骨格筋をもちいた張力および糖取り込み測定系の構築

# Construction of a system for the quantitative determination of muscle tension and glucose uptake

○真鍋 康子、稲垣 晶子、田村 晃太郎、古市 泰郎、藤井 宣晴（首都大 人間健康）
○Yasuko MANABE, Akiko INAGAKI, Koutaro TAMURA, Yasuro FURUICHI, Nobuharu FUJII (Tokyo Metropolitan Univ.)

マウスおよびラットから摘出した骨格筋を試験管内で電気刺激によって収縮させる *in vitro* 筋収縮システムは、筋収縮時の発揮張力や収縮刺激に応じた糖取り込みを測定できる重要な実験系である。しかし、現在、使用されている *in vitro* 筋収縮システムは、各研究室が独自に開発したものを用いており、汎用性がない上に、骨格筋の摘出および培養用装置への装着に熟練した技術が必要となる。また、現存のシステムでは、糖取り込みの測定は放射性同位体（radioisotope;RI）を用いる必要があるため、実験者の被爆の危険性の点から、筋収縮中の糖取り込み測定は行われておらず、収縮後の糖取り込みしか測定できていないという問題点も有している。

本研究では、従来のシステムの問題点を改善し、①汎用性が高く、②RI による汚染のリスクが低く、収縮中の糖取り込みが可能な *in vitro* 筋収縮システムを確立することを目的とした。

**（方法）**摘出した骨格筋を装着し収縮させる装置は、骨格筋を水平方向に装着できるキュベットに電極と張力測定装置を備えたコンパクトなサイズに設計した。詳細な設計は内田電子株式会社（八王子）と相談し、装置の作成を依頼した。完成したシステム（新システム）とこれまでのシステム（旧システム）との比較のため、1）2 週間の後肢懸垂法により廃用性萎縮を引き起こしたマウスの筋の発揮張力、2）健常マウスの筋収縮後の糖取り込み量、を新旧両方のシステムで検証した。また、新システムでは構造を変えたことから、筋収縮中の糖取り込みが可能となったため、3）新システムを用いた筋収縮中の糖取り込み量を測定した。

**（結果・考察）**廃用性萎縮モデルの骨格筋では新旧の両システムで有意な発揮張力の低下が認められた。一方、収縮後の糖取り込み量は新システムにおいては、旧システムよりも収縮誘導性の糖取り込み量の増加率が大きくなった。新システムでは測定中に筋に触れることなくバッファー交換ができるため、旧システムで操作上避けることのできなかった物理的ストレスによる非特異的な糖の取り込みが抑えられ、収縮による糖取り込みの増加率が上昇したと考えられる。また、新システムを用いた筋収縮中の糖取り込み量は、筋収縮時間に伴って増加する傾向にあり、収縮開始 20 分以内に糖取り込みがピークになることが明らかになった。

以上の結果から、操作性や汎用性を改善した新システムによって、筋発揮張力ならびに収縮後、または収縮中の糖取り込み量をより簡便に測定する事ができるようになった。

skeletal muscle, muscle contraction, glucose transport

発表責任者：眞鍋康子（ymanabe@tmu.ac.jp）

発表番号：4G033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# フザレノン X の摂食抑制メカニズムに関する研究

# Anorexic mechanism of Fusarenon X

○富永 美沙、只石 幹、市川 沙織、坂下 文子、百中 佑果、横瀬 ちひろ、服部 一夫 (東京農大応生科・栄養)
○Misa Tominaga, Miki Tadaishi, Saori Ichikawa, Fumiko Sakashita, Yuka Momonaka, Chihiro Yokose, Kazuo Hattori (Tokyo University of Agriculture)

［背景・目的］ フザレノン-X (FX) は、トリコテセン系マイコトキシンの一つであり、主に麦類に発生する赤かび病の原因となるフザリウム属菌によって産生される。FX の中毒症状としては、吐き気、嘔吐、下痢、摂食抑制、皮膚の炎症などが報告されているが、その中でも摂食抑制の機序は明らかではない。そこで本研究では FX をマウスに経口投与し、摂食制御に関わる視床下部や腸管における摂食関連ホルモンやその制御に関わる因子について検討した。

［方法］ 6 週齢雌性 B6C3F1 マウスを 8 時間絶食させた後、PBS または FX (0.5、1、2.5 mg/kg bw) を経口投与し、3、6、12、18、24 時間後の摂食量を測定した。また、FX (2.5 mg/kg bw) 投与後、3 時間で解剖を行い、視床下部、胃、小腸を採取した。採取したサンプルから、摂食関連ペプチドやその制御に関わる因子の mRNA 量やタンパク質量をリアルタイム PCR またはウエスタンブロッティング法にて測定した。

［結果・考察］ 摂食量は、投与後 0-3 時間で減少傾向、投与後 3-6 時間で FX2.5 mg/kg bw 投与群において有意な減少を示した。また、FX 投与後 3 時間で、摂食抑制ホルモンの Pomc、Cart mRNA 量が増加した。一方、摂食促進ペプチドである Npy、Agrp mRNA 量に有意な差は認められなかった。さらに Pomc の下流に存在する Mc4r、Bdnf、TrkB のmRNA 量は有意に増加し、Crh mRNA 量は増加傾向を示した。また、Pomc の発現を制御する NF-κB、NF-κB の活性化を誘導する炎症性サイトカインの影響を調べた。その結果、視床下部における IL-1β、TNF-α mRNA 量、IκB のリン酸化レベルは、CO 群に比して、FX 投与群で有意な増加を示した。以上より、FX は視床下部における炎症性サイトカインの増加、NF-κB の活性化を誘導し、Pomc を増加させ、その下流に存在する Mc4r、Bdnf、TrkB、Crh の増加を介して、摂食量を減少させたと考えられた。また、FX による摂食量の減少には、Cart の増加も関与している可能性がある。さらに、胃や腸管の摂食関連ホルモンに関しては、摂食抑制を示す Pyy、摂食促進を示す Ghrl が FX によって変動しなかったのに対し、摂食抑制ホルモンである Cck においては、FX の投与によって有意に増加した。また、Cck 分泌を制御することが報告されている受容体 Trpa1 の mRNA 量は FX 投与群で有意な増加を示した。以上より、FX は Trpa1 の増加を介して、Cck を増加し、摂食量を減少させる可能性が示唆された。

Fusarenon X, Cholecystokinin, Pomc

発表番号：4G034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* におけるアラトスタチン B およびその受容体の同定

# Identification of allatostatin Bs and their receptor in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○塚本 悠介、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Yusuke TSUKAMOTO, Shinji NAGATA (Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo)

【目的】昆虫において、脳神経系で産生される神経ペプチドは、様々な生理現象を制御している。脳神経ペプチドのひとつであるアラタ体抑制ホルモン(allatostatin; AST)は、アラタ体での幼若ホルモンの生合成を阻害する生理活性ペプチドとして発見された。AST のうちタイプ B (ASTB)は、9 残基から 13 残基のアミノ酸からなり $WX_6W$ のアミノ酸配列とアミド化された C 末端を共通構造に持つ、多くの昆虫種で保存されているペプチドである。前年度の本大会において、私たちは、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の脳と食道下神経節における次世代シーケンサーから作成したデータベースより、他の昆虫種の ASTB と ASTB 受容体(ASTBR)と相同なタンパク質をコードする Contig が見いだされたことを報告した。ASTB は、*in vitro* でのアラタ体における幼若ホルモン生合成抑制活性以外にも、様々な生理現象の調節に関わることが報告されている。しかし、実際に生体内での ASTB の機能に関しては未知な部分が多い。そこで本研究では、フタホシコオロギの 11 種類の ASTB の組織別発現の検討と、ASTB と ASTBR の結合実験から、ASTB の生体内での調節機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】フタホシコオロギの 11 種類の ASTB のペプチドとしての存在を確認するため、フタホシコオロギの成虫の各組織から 0.1%トリフルオロ酢酸を含む 60%アセトニトリルで抽出液を調製し、逆相カートリッジで粗精製した後に MALDI-TOF MS によりペプチド画分を分析した。その結果、脳、食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節の脳神経系由来の粗精製画分において、11 種類のうち、6 種類の ASTB のサブタイプに相当するイオンピークが確認できた。また、腸管由来の粗精製画分には 2 種類の ASTB のサブタイプに相当するイオンピークが確認できた。次に、フタホシコオロギの ASTB の ASTBR に対する応答性をカルシウムイメージングにて調べた。実際には、ASTBR と Gα15 とを HEK293 細胞にて共発現させ、化学合成した ASTBs を暴露しそれらの応答性を確認した。Fluo-4 をカルシウムの蛍光指示薬として HEK293 細胞に導入し、リガンド暴露に依存した細胞内カルシウム濃度の変化を共焦点レーザー顕微鏡により測定した。11 種類の ASTB のサブタイプをそれぞれ ASTBR に対する応答を検討したところ、いずれも $10^{-10}$–$10^{-5}$ M の範囲で ASTBR に応答したが、応答性にわずかな違いが認められた。各ペプチドの化学構造と受容体に対する応答性には関係性が見出せなかったものの、ASTBR の応答性は、ASTB 分子内の $WX_6W$ 配列や C 末端のアミド基以外の構造も受容体の認識に寄与していることが示唆された。

allatostatin-B, $Ca^{2+}$ imaging, *Gryllus bimaculatus*

発表番号：4G035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における神経ペプチド CCHamide およびその受容体の同定
# Identification of neuropeptide CCHamide and its receptor in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*

○土本 真帆、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命科学）
○Maho TSUCHIMOTO, Shinji NAGATA (Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo)

【目的】生物の摂食行動のモチベーションは、脳神経ペプチドホルモンで制御されている。昆虫においても同様で、脳神経ペプチドホルモンは、摂食行動の重要な制御因子である。この制御メカニズムは、複数のペプチドホルモンがネットワークを構築し作用する複雑系のシステムであると考えられている。しかし、脳神経ペプチドホルモンの存在は、オミクス情報より演繹、同定されているにもかかわらず、各々の機能の詳細は明らかになっていない。そこで、摂食行動を支配しているホルモンネットワークの全容を解明する一環として、本研究では脳神経ホルモン類の中でも脂肪組織でも発現が認められているCCHamideに着目することとした。実験材料には、近年我々が確立した摂食行動の解析プラットフォームで用いているフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いた。本発表では、先ず*G. bimaculatus*におけるCCHamideおよび CCHamideのレセプターを同定し、それらの摂食行動における発現動態およびホルモンとしての機能を明らかにするための研究調製段階を報告する。

【方法・結果】先ず、CCHamide を同定するため、次世代シークエンサーを用いて構築したフタホシコオロギの転写物のデータベース（昨年度本大会にて発表）から、CCHamide をコードする cDNA の塩基配列を検索した。その結果、他の昆虫種と同様に、CCHamide-1、-2 をそれぞれコードする 2 種の Contig が得られた。得られた CCHamide-1、および-2 の演繹アミノ酸配列は、それぞれシステインを 2 残基有する 13 残基からなるペプチドを含む前駆体タンパク質であることが分かった。同様に、CCHamide に対するレセプターをコードする塩基配列を検索した。その結果、キイロショウジョウバエの CCHamide-1 受容体と相同性の高い塩基配列をコードする Contig が得られた。得られた塩基配列を基に、RT-PCR により CCHamide-1 レセプターの発現部位を確認した。その結果、脳神経系および腸管での発現が確認され、それらが CCHamide の標的組織であることが分かった。次に、CCHamide の機能を解析するために必要な CCHamide-1、-2 を、Fmoc 法にて化学合成した。CCHamide は、分子内のジスルフィド結合を介した環状ペプチド構造が活性型であると予想されているため、逆相 HPLC にて精製した合成 CCHamide を凍結乾燥後、10mM $CH_3COONH_4$ 水溶液中にて空気酸化した。酸化反応後の水溶液を、再び逆相 HPLC に供し分離後、反応産物を MALDI-TOF MS で確認した結果、反応前よりも 2 マス小さいイオンピークが観察された。このことは、合成 CCHamide がジスルフィド結合を介した環状ペプチドである活性型に調製されたことを示す。

CCHamide, *Gryllus bimaculatus*, Feeding behavior

発表番号：4G036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* における AKH シグナリングによる摂食行動と脂肪酸組成の調節機構

# Mechanisms regulating fatty acid composition and feeding behavior mediated by adipokinetic hormone signaling in two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*.

○福村 圭介[1]、小沼 貴裕[2]、永田 晋治[1]([1]東大院・新領域・先端生命科学、[2]東大院・農生科・応生化)
○Keisuke FUKUMURA[1], Takahiro KONUMA[2], Shinji NAGATA[1] ([1]Grad. Sch. of Fro. Sci., the Univ. of Tokyo, [2]Grad. Sch. Agric. Life Sci., the Univ. of Tokyo)

【目的】昆虫の脂質代謝を制御する神経ペプチド Adipokinetic hormone (AKH)は、体内の不足分のエネルギーを補償する際に、側心体から分泌され脂肪体に作用し、貯蔵されている脂質を体液中に動員する。私たちは、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、AKH が制御する脂質代謝が与える摂食行動への影響の分子メカニズムについて研究してきた。これまでの研究により、RNA 干渉法(RNAi)で AKH 受容体をノックダウンしたコオロギでは、摂食頻度や摂食量が増加し、運動量が低下するような摂食行動に関わる一連の変化が観察された。そこで、本研究では、コオロギにおける AKH を介した脂質の質的および量的な変動、および脂質の生合成および代謝を担う酵素群の転写量の変動を解析し、それらの統合的な関連性を見出すことを目的とした。

【方法・結果】先ず、フタホシコオロギの AKH による脂質の量的および質的な変動を検討するため、AKH の投与前後の脂肪酸組成を解析した。実際には、5 齢オス幼虫に AKH を注射後 90 分の体液および脂肪体より脂質画分を得た。脂質画分をけん化し得られた脂肪酸は、9-Anthryldiazomethane で蛍光標識後、HPLC に供し脂肪酸組成比を分析した。その結果、AKH 投与後の個体の体液には、飽和脂肪酸であるパルミチン酸(C16:0)、ステアリン酸(C18:0)の割合が減少したのに対し、不飽和脂肪酸であるオレイン酸(C18:1)、リノール酸(C18:2)が顕著に増加した。同様に、AKH 受容体を RNA 干渉法にて転写抑制した個体(AKHR/i)の脂肪酸組成比も分析したところ、AKHR/i により、体液中の C18:0 の割合が増加し、C18:1、C18:2 の割合が減少した。次に、これら脂肪酸の生合成および代謝酵素をコードする遺伝子群 *Fatty acid synthase* (*FAS*)、*Elongation of very long chain fatty acids protein 6*、*Stearoyl-CoA 9-desaturase*、*Δ12-desaturase*、*Hormone-sensitive lipase* (*hsl*)、*Brummer lipase* (*bmm*)を同定し、AKHR/i によるこれらの転写量変動を定量 PCR にて分析した。その結果、AKHR/i により *FAS* など脂質生合成酵素は転写量が増加したが、脂肪酸を遊離させる酵素 *Hsl*、*bmm* の転写量は減少した。これらの結果から、AKH による体内の脂質の質的かつ量的な変動は、脂質代謝関連酵素の転写レベルで調整されていることが示唆された。さらに、栄養分に対する選好性の変化をビデオモニタリングで観察した結果、AKHR/i により、不飽和脂肪酸への選好性が顕著に惹起された。つまり、体液中の不足不飽和脂肪酸の補償行動が認められた。以上の結果から、昆虫において AKH シグナリングは、体液中の脂肪酸の組成変動を介して行動を修飾していることが明らかとなった。

*Gryllus bimaculatus*, Adipokinetic hormone, Fatty acid composition

発表番号：4G037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* とカイコ *Bombyx mori* における DHCR24 様タンパク質の生化学的解析

# Biochemical characterization of DHCR24 homologous proteins in *Bombyx mori* and *Gryllus bimaculatus*

○藤盛 春奈、永田 晋治（東大院・新領域・先端生命）
○HARUNA FUJIMORI, SHINJI NAGATA (Grad.Sch.of Front. Sci., Univ. of Tokyo)

【背景・目的】コレステロールは生命の維持に重要であるにも関わらず、昆虫をはじめとする節足動物はコレステロールを *de novo* で生合成できない。そのため、多くの昆虫種では、食餌からステロール化合物を取り入れる必要がある。カイコ *Bombyx mori* のような植食性昆虫では、植物ステロールが、腸管内で 4 段階の酵素反応を経てコレステロールに変換される。この 4 段階目のデスモステロールからコレステロールへの還元反応を担う酵素 DHCR24 は、脊椎動物におけるコレステロール生合成の最終ステップの酵素であるため、多くの生物種で保存されている。ところが、昆虫種では食性の違いで DHCR24 を持つ種と持たない種がある。植食性昆虫であるカイコの場合、DHCR24 のホモログとして、DHCR24 と同様の触媒能を有する酵素(BmDHCR24)と、それに類似した酵素(BmDHCR24like)の 2 つがある。これらは植食性を特徴づける酵素と考えられるが、食性の異なる昆虫種での DHCR24 様タンパク質の解析はこれまで行われていない。そこで、雑食性の昆虫種におけるコレステロール変換過程を検討するため、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の DHCR24 様分子を同定し、カイコおよびコオロギの DHCR24 様分子の発現部位解析など比較生物学的なアプローチによる機能解析を目的とした。
【方法・結果】データベースの探索により、カイコの BmDHCR24 と BmDHCR24like のそれぞれにはスプライシングバリアントが見出された。いずれも組織ごとに異なる発現様式が確認されたため、カイコ DHCR24 様タンパク質は、転写レベルで組織特異的な発現調節が行われていることが分かった。続いて、次世代シーケンサーにより構築したフタホシコオロギのデータベースから、BmDHCR24 と BmDHCR24like に相同性を有するアミノ酸配列を BLAST 検索した。その結果、2 種類の contig 配列を見出した(GbDHCR24-1、GbDHCR24-2)。昆虫種の DHCR24 様分子の系統樹を作成したところ、フタホシコオロギの GbDHCR24-1、GbDHCR24-2 は BmDHCR24 と同じクレードに属していることが分かった。すなわち、フタホシコオロギの 2 つの DHCR24 は酵素活性を有するタイプであることが示唆された。つまり、フタホシコオロギの 2 つの DHCR24 様分子は植物ステロールからコレステロールに変換能を有することが予想された。次に、DHCR24 および DHCR24like の酵素活性発現で重要となる細胞内局在を調べるため、それぞれを HEK293 細胞に一過的に発現をさせ、その分布を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、細胞質内でパッチ状に観察された。このことは、脊椎動物の DHCR24 が小胞体膜上に局在していることと同様、昆虫種の DHCR24 および DHCR24like がオルガネラで局在し機能していることが示唆された。

DHCR24, *Bombyx mori*, *Gryllus bimaculatus*

発表番号：4G038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# ヒストン H1 はアレルギー増悪の新たな danger signal 分子として働く
# Histone H1 acts as a novel danger signal molecule of allergic deterioration

○堀 采音[1]、藤村 孝志[2]、手島 愛子[1]、亀井 力哉[2]、中野 敏明[3,4]、後藤 茂[4]、後藤 武[5]、小埜 和久[2,6]、河本 正次[2] ([1]広大工、[2]広大先端、[3]台湾長庚大医、[4]台湾高雄長庚記念病院、[5]城西国際大看護、[6]広工大生命)
○Ayane HORI[1], Takashi FUJIMURA[2], Aiko TESHIMA[1], Rikiya KAMEI[2], Toshiaki NAKANO[3,4], Shigeru GOTO[4], Takeshi GOTO[5], Kazuhisa ONO[2,6], Seiji KAWAMOTO[2] ([1]Hiroshima Univ. Eng., [2]Hiroshima Univ. ADSM, [3]Chang Gung University College of Medicine, [4]Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, [5]Josai International Univ., [6]Hiroshima Institute of Technology)

【目的】我々はラット肝移植寛容モデルにおいて、抗ヒストン H1 抗体が遊離ヒストン H1 を中和することにより拒絶反応を抑制していることを明らかにした。そこで本研究では、ヒストン H1 が炎症の増悪に関与していると考え、アレルギー炎症におけるヒストン H1 の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】最初にアレルギー疾患におけるヒストン H1 の関与を明らかにするため、ovalbumin (OVA) を Alum と共に BALB/c マウスに腹腔内投与し、血清中のヒストン H1 量を ELISA により測定した。その結果、OVA で感作したマウスでのみヒストン H1 レベルの上昇が見られた。次にヒストン H1 のアレルギー疾患増悪への影響を調べるため、OVA/Alum 感作マウスに OVA もしくはヒストン H1 を点鼻投与した結果、OVA 点鼻マウスに比べてヒストン H1 点鼻マウスではくしゃみ回数が有意に増加した。一方、ヒストン H1 によるくしゃみ回数の増加は PBS/Alum 免疫マウスでは認められず、本分子によるアレルギー炎症誘発には IgE 感作が必要であることが示唆された。さらに肥満細胞依存的アレルギー炎症モデルである受動皮膚アナフィラキシー(PCA) 反応においても、ヒストン H1 が IgE 感作条件下で抗原刺激なしにアレルギー炎症を増悪させることが判明した。また本系の IgE 感作条件下でヒストン H1 と抗原を共投与した場合には、ヒストン H1 による PCA 反応のさらなる増悪効果は確認できなかった。以上の *in vivo* での検討結果より、ヒストン H1 がアレルギー疾患において抗原非特異的に IgE 感作された肥満細胞の脱顆粒を誘導していることが推測された。そこで、*in vitro* においてもヒストン H1 が IgE 感作肥満細胞から直接脱顆粒を誘導しうるか否かを解析した。その結果、IgE の感作により抗原刺激なしでもヒストン H1 が濃度依存的に肥満細胞からの脱顆粒を誘導することが明らかとなった。また、IgE 感作条件下で肥満細胞をヒストン H1 と抗原で共刺激しても、抗原単独刺激と比較して有意な脱顆粒の促進は見られなかった。

【結論】以上の結果から、ヒストン H1 が IgE 感作肥満細胞に作用し、抗原非特異的に脱顆粒を誘導することによりアレルギー炎症を増悪させうることが示唆された。

Allergic inflammation, Histone H1, Mast cell

発表責任者：堀　采音（b122660@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4G039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア G

# 抗ヒストン H1 抗体によるアレルギー炎症抑制効果の解析

# Analysis of inhibitory activities for allergic inflammation by anti-histone H1 monoclonal antibody

○手島 愛子[1]、藤村 孝志[2]、堀 采音[1]、亀井 力哉[2]、中野 敏明[3,4]、後藤 茂[4]、後藤 武[5]、小埜 和久[6]、河本 正次[2] ([1]広大工、[2]広大先端、[3]台湾長庚大医、[4]台湾高雄長庚記念病院、[5]城西国際大看護、[6]広工大生命)

○Aiko TESHIMA[1], Takashi FUJIMURA[2], Ayane HORI[1], Rikiya KAMEI[2], Toshiaki NAKANO[3,4], Shigeru GOTO[4], Takeshi GOTO[5], Kazuhisa ONO[6], Seiji KAWAMOTO[2] ([1]Hiroshima Univ. Eng., [2]Hiroshima Univ. ADSM, [3]Chang Gung University College of Medicine, [4]Kaohsiung Chang Gung Memorial Hospital, [5]Josai International Univ., [6]Hiroshima Institute of Technology)

【背景】

炎症や細胞死により細胞外に放出されたヒストンなどの自己成分は、DAMPs（Damage-Associated Molecular Patterns）として、免疫細胞の遊走・活性化に働くことが報告されている。我々はこれまでに、ヒストン H1 が IgE 抗体で感作された肥満細胞から抗原非特異的な脱顆粒反応を誘導することによりアレルギー炎症増悪の danger signal 分子として働くこと、また抗ヒストン H1 抗体が肝移植後の拒絶反応ならびに T 細胞の活性化を抑制することを明らかにしている。

【目的】

本研究では抗ヒストン H1 抗体がアレルギー炎症を抑制できるか否かを検証することを目的とした。

【方法】

Ovalbumin（OVA）をモデル抗原としたアレルギー鼻炎モデルマウスに抗ヒストン H1 抗体を腹腔内投与し、OVA 点鼻後のくしゃみ回数、ならびに、鼻粘膜に浸潤した肥満細胞数及び好酸球数を測定した。また、抗ヒストン H1 抗体投与群及び対照群における OVA 特異的抗体価及び OVA 刺激により脾細胞から分泌されるサイトカイン産生量を ELISA により測定した。さらに、抗ヒストン H1 抗体の肥満細胞への抑制効果を調べるために、抗 DNP-IgE 抗体で感作したマウスに DNP-HSA 抗原投与により I 型アレルギー炎症を誘導する受動皮膚アナフィラキシー（PCA）モデルに抗ヒストン H1 抗体を尾静脈投与することにより、本抗体が *in vivo* で肥満細胞からの脱顆粒反応を抑制できるかを検討した。また抗ヒストン H1 抗体が *in vitro* で肥満細胞の脱顆粒を直接抑制しうるか否かも検証した。

【結果】

抗ヒストン H1 抗体の腹腔内投与により OVA 点鼻後のくしゃみ回数が有意に抑制された。さらに、鼻局所への肥満細胞浸潤及び好酸球浸潤も有意に抑制された。一方で血清抗体価及び脾細胞からのサイトカイン産生には変化がなかったことから、抗ヒストン H1 抗体が全身性免疫の変調を介さず直接炎症細胞の遊走や活性化を抑制していることが推測された。そこで PCA 反応に対する抗ヒストン H1 抗体の炎症抑制効果を調べた結果、本抗体の投与により PCA 反応の有意な抑制が認められた。さらに *in vitro* 試験においても、抗ヒストン H1 抗体が実際に肥満細胞からの脱顆粒を直接抑制しうることが判明した。以上の結果から、抗ヒストン H1 抗体がアレルギー炎症の治療活性を有することが示唆された。

Allergic inflammation, Anti-histone H1 antibody, Mast cell

発表責任者：手島愛子（b110707@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4H001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ドラフトゲノムを用いたハナビシソウアルカロイド生合成に関わる 新規 P450 の探索

# Exploring draft genome sequence of California poppy to identify novel P450s involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis

○堀 健太郎、山田 泰之、佐藤 文彦（京大院・生命）
○Kentaro HORI, Yasuyuki YAMADA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

高等植物が産生するアルカロイドは強力な生理活性を示すことから、医薬品の原料として古くから利用されてきた。また近年では、植物体が持つアルカロイド生合成経路を遺伝子レベルで解明することが可能となってきている。特に、berberine、morphine、noscapine、sanguinarine といったイソキノリンアルカロイド（IQAs）については、キンポウゲ科あるいはケシ科の植物を用いた研究により、これまでにほぼ全ての生合成酵素遺伝子が単離・同定されている。一方で、chelirubine や macarpine などのベンゾフェナンスリジンアルカロイド、あるいは argemonine、eschscholtzine などのパビンアルカロイドの生合成に関与する OMT、P450 については、酵素遺伝子の同定をはじめ分子レベルでの詳細な解析はなされていない。本発表では、新学術領域研究「ゲノム支援」により得たハナビシソウのドラフトゲノム情報に基づく、アルカロイド生合成に関わる新規 P450 遺伝子の探索について報告する。まず、ドラフトゲノム配列からハナビシソウにおける P450 遺伝子数を推定し、シロイヌナズナと比較したところ、IQAs 生合成に関与する CYP80、CYP82、CYP719 ファミリーが多数存在すること、また CYP82 ファミリーに関しては、およそ半数の配列が、特定の scaffold 内にクラスターを形成していることを見出した。さらに CYP82 ファミリーに着目し、mRNA レベルでの発現解析を行った結果、macarpine の蓄積と相関を示すクローンや、ハナビシソウ地上部組織で高い発現を示すクローンが存在することを見出した。これらの CYP82 酵素遺伝子をハナビシソウ cDNA から単離し、酵母において異種発現させ、酵素反応を行ったところ、dihydrosanguinarine あるいは reticuline を基質としたアルカロイド変換活性を有するものをそれぞれ見出すことが出来た。現在、反応産物の同定など詳細な活性解析を進めるとともに、他の CYP82 ファミリー遺伝子の単離ならびにアルカロイド変換活性を検討中である。また、P450 のアミノ酸一次構造と酵素活性の相関についても議論する。

Isoquinoline alkaloid, Cytochrome P450, Plant draft genome sequence

発表番号：4H002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Isolation and functional characterization of carotenoid cyclase genes from sweetpotato plants

○Khan MUHMMAD ZUBAIR, Miho TAKEMURA, Jun-ichiro HATTAN, Motoyasu OTANI, Norihiko MISAWA
(Ishikawa Pref. Univ.)

**Objective**

Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) occupies the seventh rank among the most important food crops in the world. Carotenoids belong to the $C_{40}$-subgroup of isoprenoids and have multipurpose commercial uses. β-Carotene is the major carotenoid in the tuberous roots of sweetpotato orange cultivars. Biosynthesis of carotenoids in this crop still needs to be revealed on molecular grounds. The cyclization reactions of lycopene to β-carotene and α-carotene are catalyzed by two lycopene cyclases, which ultimately result into two branches leading to carotenes with β- and ε-rings. In order to obtain a molecular view, we isolated two cyclase genes from sweetpotato leaves, along with their functional characterization.

**Materials and Methods**

Two white and orange cultivars of sweetpotato, 'White Star' and W71, respectively, were selected to elucidate the cyclase genes. RNA was extracted from the leaves and first strand cDNA was synthesized. To isolate the genes encoding sweetpotato lycopene β-cyclase (*IbLCYb*) and lycopene ε-cyclase (*IbLCYe*), 3'-and 5'-RACE PCR was performed. Full length cDNA of *IbLCYb* and *IbLCYe* were amplified by respective gene-specific primers, and cloned into pETDuet vector for expression in a lycopene-producing *Escherichia coli.* Each tranformant that harbored pETD-IbLCYb or pETD-IbLCYe was cultured, followed by carotenoid extraction and HPLC analyses.

**Results**

We isolated two *IbLCYb* genes from 'White Star', called *IbLCYb*-A and *IbLCYb*-B. On the other hand, three *IbLCYb* genes were isolated from W71, whereas, two of them were the same on their amino acid sequences. Therefore, we designated them *IbLCYb*-C1, *IbLCYb*-C2 and *IbLCYb*-D. In the case of *IbLCYe*, we were able to isolate only one gene from W71, called *IbLCYe*-A. When plasmids, pETD-IbLCYb-A, pETD-IbLCYb-B and pETD-IbLCYb-C2, were separately introduced into the lycopene-producing *E. coli* cells, β-carotene was detected in all the extracts. In contrast, when pETD-IbLCYb-D was introduced there, lycopene was not converted. These results indicated that IbLCYb-A, B, C possess lycopene β-cyclase activity, but IbLCYb-D does not. On the other hand, PETD-IbLCYe-A introduction led to the production of δ-carotene, indicating that IbLCYE-A catalyzed the formation of δ-carotene with a monocyclic ε-ring from lycopene. These findings are in line with the earlier reports for lycopene cyclase genes that function in some other higher plants.

Sweet Potato, Lycopene β-cyclase, Lycopene ε-cyclase

発表番号：4H003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

シロイヌナズナのフラビン代謝制御に関与する新規因子の同定と機能解析
Isolation and characterization of novel factors involved in the flavin metabolism in Arabidopsis
○戸田 結奈[1]、西元 里美[2]、小川 貴央[2]、田茂井 政宏[1,2]、吉村 和也[3]、重岡 成[1,2]([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]中部大・応生・食栄)
○ Yuina TODA[1], Satomi NISHIMOTO[2], Takahisa OGAWA[2], Masahiro TAMOI[1,2], Kazuya YOSHIMURA[3], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ., [3]Dept. Food Nutr. Sci., Coll. Biosci. Biotech., Chubu Univ.)

【目的】リボフラビン(RF)を前駆体とするFMNやFADは、すべての生物において重要な電子伝達や酸化還元プロセスに関わる多数の酵素(デヒドロゲナーゼ、オキシダーゼ、レダクターゼ等)に必須な補因子である。高等植物において、FMNとFADは光合成/呼吸電子伝達系・脂肪酸酸化・光受容・DNA修復・他の補因子の代謝や多くの二次代謝産物の生合成系に関与する。このように、フラビン化合物は植物の生理応答の根幹に関わるため、細胞内におけるそれらのレベルは厳密に制御されなければならない。植物においてRFは葉緑体のみで合成されるが、FADやFMNの代謝に関与する酵素群は葉緑体に限らず、細胞質やミトコンドリアにも存在することが明らかになっている。これまでに我々は、シロイヌナズナNudix hydrolaseファミリーの中で、FADからFMNへの加水分解活性を有する葉緑体局在型AtNUDX23の機能解析を通して、植物細胞内のフラビン化合物レベルがその生合成/分解系のバランスにより恒常的に維持されていることを明らかにした。しかしながら、それら代謝系の制御機能や、オルガネラ間の輸送の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、植物におけるフラビン化合物の恒常性維持に関わる因子を同定することを目的として、植物細胞内のフラビン化合物レベルの変化により発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。
【結果】シロイヌナズナ葉へのフラビン化合物の外部添加実験から、細胞内の過剰なFADやFMNは速やかにRFへ分解されると考えられた。そこで、FAD添加1時間後のトランスクリプトーム変化を解析した結果、発現量が2倍以上および0.5倍以下に増減した遺伝子を、それぞれ262個および198個同定した。それらには、トランスポーター関連遺伝子が17個、転写因子関連遺伝子が47個含まれていた。また興味深いことに、それら転写因子の多くが概日リズムに関与する転写因子であった。そこで、FAD外部添加による概日リズム関連遺伝子の発現変化を解析した結果、それら遺伝子群の発現の概日リズムの振動が早まることが明らかになった。このことから、概日リズムの正確な振動には、細胞内フラビンレベルの制御が重要であることが示唆された。次に、トランスクリプトーム解析により同定した転写因子およびトランスポーター関連遺伝子群のT-DNA挿入遺伝子破壊株の単離を行った。単離した遺伝子破壊株を通常条件下で生育した結果、顕著な表現型は認められなかった。しかし、これら遺伝子破壊株の細胞内フラビン化合物レベルの解析を行った結果、29種類の変異体のうち1株において、野生株と比較してFADが0.6倍に減少、FMNおよびRFが約1.4倍に増加していた。

flavin, transcription factor, transporter

発表番号：4H004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イソキノリンアルカロイド生合成系の発現制御に関わる CjWRKY1 の翻訳後制御機構の解析

# Post-translational modification of CjWRKY1 involved in the regulation of isoquinoline alkaloid biosynthesis

○山田 泰之、佐藤 文彦（京大院生命科学）
○Yasuyuki YAMADA, Fumihiko SATO (Kyoto Univ.)

【背景と目的】キンポウゲ科のオウレン（Coptis japonica)が産生するイソキノリンアルカロイド、ベルベリンは局方医薬品として広く利用される。その生合成系の発現制御には植物特異的な WRKY 型転写因子、CjWRKY1 が機能していることが明らかとなっている（1)。当研究室で選抜されたベルベリン高産生性オウレン培養細胞 156-S 株と無選抜のベルベリン低産生性オウレン培養細胞 CjY 株では、mRNA レベルでの CjWRKY1 発現量とタンパク質レベルでの CjWRKY1 蓄積量に差が見られ、CjWRKY1 自身が何らかの翻訳後修飾機構により制御されている可能性が示唆された。そこで、本研究では CjWRKY1 の修飾状態の解析を行うことで、ベルベリン生合成系の発現制御に関わる CjWRKY1 の転写・翻訳後制御機構を解明することを目的とした。
【方法と結果】CjWRKY1-GFP 融合タンパク質を 156-S 株プロトプラストに一過的に発現させ、抗 GFP アフィニティーカラムを用いて共免疫沈降を行い、得られた免疫沈降サンプルを LC-MS/MS 解析に供した。その結果、CjWRKY1 の 115 番目のチロシン残基がリン酸化されている可能性が示唆された。抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロット解析でも同様に、CjWRKY1 の 115 番目のチロシン残基のリン酸化が確認された。このチロシン残基は WRKY ドメインを構成するチロシンであり、リン酸化模倣型変異によって DNA への結合性の著しい低下や局在性の変化が引き起こされ、結果的に CjWRKY1 の転写活性が低下することが明らかとなった。また、チロシンリン酸化阻害剤の添加により部分的に CjWRKY1 の転写活性が上昇することから、チロシンリン酸化がフィードバック阻害的に CjWRKY1 の機能を調節している可能性が示唆された。また、156-S 株プロトプラストにおいて発現させた CjWRKY1 タンパク質は速やかに分解され、26S プロテアソームの阻害剤である MG132 処理により分解が抑制されることが明らかとなった。この時、リン酸化 CjWRKY1 の蓄積は見られなかったが、脱リン酸化阻害剤やプロテアーゼ阻害剤を組み合わせることで検出が可能となったことから、CjWRKY1 タンパク質が複数の経路によって分解制御を受けている可能性が示唆された。

1) Kato et al., Plant and Cell Physiology, (2007)

isoquinoline alkaloid, WRKY transcription factor, post-translational regulation

発表番号：4H005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 果肉褐変の抑えられたモモ新品種の解析

# Analysis of the peach new cultivar characterized by suppression of flesh browning

横谷 尚起[1]、裏地 美杉[1]、日原 誠介[2]、畑中 唯史[1]、○小田 賢司[1]（[1]岡山農総セ生科研、[2]岡山農総セ農研）
Naoki Yokotani[1], Misugi Uraji[1], Seisuke Hihara[2], Tadashi Hatanaka[1], ○Kenji Oda[1] ([1]RIBS, Okayama, [2]Res Inst for Agric, Okayama)

［目的］
モモ果実は、皮を剥くと数時間も経たないうちに果肉表面が茶褐色に変色してしまう。昨年、岡山県が品種登録した晩生品種 PEH7 号（品種名未定）は、果肉の褐変化が起こりにくい特徴を有している。そこで、PEH7 号および収穫期の近い PEH8 号の褐変現象を比較解析することで、PEH7 号の特性を明らかにすることを試みた。
［結果および考察］
モモ果肉片を緩衝液中で破砕すると、破砕液は 1～2 時間のうちに濃茶褐色に変色する。遠心後の上清および沈殿はいずれも褐変化が認められることから、本実験では上清の変化を指標に解析した。PEH7 号および 8 号の果肉破砕液はいずれも色の変化が認められたが、PEH8 号の方が濃く変色し、果皮を剥いたときに見られる果肉の現象と一致した。果肉の褐変現象はポリフェノールの酸化によることが知られている。PEH8 号の果肉破砕液に抗酸化剤を添加すると変色はほとんど見られず、変色は主にポリフェノールの酸化により引き起こされることが確認された。そこで、破砕液上清の総ポリフェノール量を Folin-Ciocalteu 法により測定すると、PEH7 号は 8 号に比べて約半分であることが分かった。一方、ポリフェノールオキシダーゼ（PPO）活性を測定すると、いずれも十分高い活性を有しており、むしろ PEH7 号の方が高い傾向が認められた。これらのことから、PEH7 号の褐変化が弱いのは、基質であるポリフェノールの含量が少ないためと推察された。このことを確かめるため、PEH7 号および 8 号の上清より調整したポリフェノール基質液を、PEH7 号または 8 号の PPO 酵素液と反応させた。その結果、基質液が PEH8 号由来のときはいずれの酵素液でも褐変化が著しく、基質液が PEH7 号由来のときはいずれの酵素液でもあまり着色しなかった。この結果は、PEH7 号と 8 号の褐変度の違いは基質の違いに起因することを示している。PEH7 号および 8 号の上清に含まれる可溶性ポリフェノールを LC-MS により分析したところ、PEH8 号に比べて約 1/10 に低下しているピークが PEH7 号に 3 本検出された。MS 解析により算出されたこれらの分子量はいずれも同じで、モモ果肉に含まれることが知られているクロロゲン酸類（クロロゲン酸、ネオクロロゲン酸、クリプトクロロゲン酸）と一致した。これら標品のリテンションタイムは 3 つのピークと一致した。また、PEH7 号の破砕液にクロロゲン酸を添加したところ、PEH8 号と同程度に着色した。以上のことより、PEH7 号はクロロゲン酸類の含量が少なく、そのことが褐変抑制を引き起こしていると考えられる。

peach, flesh browning, chlorogenic acid

発表責任者：小田賢司（oda@bio-ribs.com）

発表番号：4H006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# トチュウ(*Eucommia ulmoides*)果実に蓄積する長鎖 *trans*-ポリイソプレンの局在解析

# Histochemical analysis of *trans*-polyisoprene localization in *Eucommia ulmoides* samara

○梶浦 裕之、鈴木 伸昭、中澤 慶久（日立造船株式会社）
○Hiroyuki KAJIURA, Nobuaki SUZUKI, Yoshihisa NAKAZAWA (Hitachi Zosen Corporation)

【 目的 】トチュウ(*Eucommia ulmoides*)は中国原産の温帯圏で生育する雌雄異株の落葉性の高木で，バイオポリマーである長鎖の *trans*-ポリイソプレン(TPI，Mw >$10^6$)を合成する．TPI を生産する植物種が少ないためその生合成・蓄積に関する知見は乏しいが，トチュウは TPI を葉，樹皮，根などほぼすべての器官で生合成・蓄積し，中でも雌の樹になる果実には多量の TPI が蓄積していることが知られている．つまり植物における TPI 生合成機構，及び蓄積機構を解明する上でトチュウ，特に果実はモデル植物のモデル器官となり得る．そこで本研究ではトチュウ果実における TPI の局在解析を共焦点レーザー顕微鏡，走査型電子顕微鏡を用い行なった．

【 方法 】果実内に蓄積する TPI を特異的に染色・可視化するため，果実の凍結切片を 2 方向で作製後，切片を Nile Red 染色した．Nile Red 染色では細胞内局在の脂質成分も染色するため， TPI，脂質成分等の蛍光スペクトルを取得した．共焦点レーザー顕微鏡で取得した Nile Red 染色画像の蛍光分離を行ない，さらに蛍光分離した画像は細胞壁染色結果と統合した．詳細な蓄積形態を確認するため，果実の切断面の走査型電子顕微鏡(SEM)画像を取得した．

【 結果 】Nile Red 染色により蛍光が確認できるトチュウ果実に存在する成分は大きく分けて TPI，種子に蓄積する脂質，及び種子周辺に存在する脂質由来成分の 3 種類あり，それぞれの最大蛍光波長は 550 nm，580 nm，630 nm であった．この波長域は各成分の蛍光分離が可能であり TPI，脂質成分由来のシグナルを特異的に検出した．この手法によりトチュウ果実中の TPI の局在を確認すると，TPI は種子の周りを何層にも覆うように局在し，TPI を蓄積する細胞も種子周辺のみで，その他の細胞では TPI の蓄積は検出できなかった．また種子は TPI を含む 4 種類の層に覆われており，TPI を含む細胞はその中でもっとも外側に局在・蓄積していた．興味深いことに，4 層の中には 1 層のみからなるものがあり，その細胞では二次電子を放出しやすい成分を蓄積している事が SEM 観察で確認できた．以上より，トチュウ果実中で種子は TPI を含む複数の成分の多重構造により温度変化・乾燥・光障害など様々な環境変化からのストレス耐性を獲得しているものと推測された．

Eocommia ulmoides, *trans*-Polyisoprene, Microscopic analysis

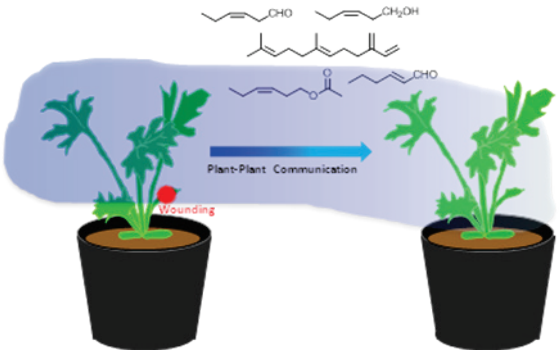
発表責任者：梶浦　裕之（kajiura@hitzbio.com）

発表番号：4H007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 除虫菊のピレスリン生合成に対する傷害誘導性揮発性化合物の作用：分化状態と脱分 化状態の比較

Effects of wound-induced volatiles on pyrethrin biosynthesis in Tanacetum cinerariifolium: The effects on differentiated and dedifferentiated tissues.

○阪森 宏治、松田 一彦（近畿大院・農・応生化）
○Koji SAKAMORI, Kazuhiko MATSUDA (Kinki Univ.)




【目的】天然殺虫剤ピレスリンは除虫菊により生合成されるエステル化合物であり、昆虫神経組織において膜電位感受性ナトリウムチャネルに作用することで、殺虫効果を発揮する。これまでに我々は、除虫菊幼苗から傷害ストレスに応じて生じるみどりの香り（GLV）と呼ばれる不飽和アルコール・アルデヒド類とセスキテルペン化合物(*E*)-β-ファルネセンの揮発性有機化合物（VOC）のブレンドが、無傷の除虫菊幼苗のピレスリン生合成を活性化することを見出している。今回、その概念が他のピレスリン生合成関連遺伝子の発現にも及ぶのかどうか検討した。また、幼苗が脱分化した場合に VOC による生合成の調節が見られるのか調査したので報告する。

【方法と結果】除虫菊各部位で発現する遺伝子を RNA-seq で獲得し、コンティグを得た。本データベースをシロイヌナズナで同定済みの遺伝子等を用いて Blast 検索し、chrysanthemic acid synthase (CAS)、13-lipoxygenase (13-LOX)、allene oxide synthase (AOS)、allene oxide cyclase (AOC)、OPDA reductase3 (OPR3)、acyl-coenzyme A oxidase 1 (ACX1)の mRNA 配列を得た。これらと他の研究者が既知の chrysanthemyl diphosphate synthase (CDS)および我々が独自に単離したエステル結合形成に関わる GDSL リパーゼ遺伝子の配列をもとに realtme PCR 用の primer を設計した。

(*Z*)-3-hexenal 90.0 nM (8.83 ppm)、(*E*)-2-hexenal 0.5 nM (49.1 ppb)、(*Z*)-3-hexen-1-ol 5.0 nM (500 ppb)、(*Z*)-3-hexenyl acetate 6.0 nM (853 ppb) および(*E*)-β-farnesene 13.0 nM (2.66 ppm)からなるブレンドを気体として除虫菊幼苗に一定時間処理し、生合成関連遺伝子の発現を調べたところ、これまで発表した生合成遺伝子以外の遺伝子についても有意に発現量が上昇することが明らかとなった。

除虫菊幼苗の葉の切片から 2,4-D と bennzylaminopurine (BAP)を含む MS 培地で培養してカルスを得た。これに対して傷害誘導性 VOC を処理したところ、調べた全ての遺伝子は VOC に対して応答しなかった。このことから、傷害誘導性 VOC によるピレスリン生合成遺伝子の発現制御には、分化した組織が必須であることが初めて明らかとなった。

Primary metabolism, Secondary metabolism

発表番号：4H008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ソルガムにおける Sorgomol synthase 遺伝子の同定および機能解析
# Identification and characterization of sorgomol synthase in sorghum

○石輪 俊典 [1]、上野 琴巳 [1,2]、鈴木 秀幸 [3]、水谷 正治 [1]、杉本 幸裕 [1] ([1]神戸大院農、[2]鳥取大農、[3]かずさ DNA 研究所)
○ Shunsuke Ishiwa[1], Kotomi Ueno[1,2], Hideyuki Suzuki[3], Masaharu Mizutani[1], Yukihiro Sugimoto[1] ([1]Grad. School of Agric. Sci., Kobe Univ., [2]Fac. of Agriculture, Tottori Univ., [3]Kazusa DNA Res. Inst.)

ストリゴラクトン（Strigolactone, SL）は、根寄生植物の発芽刺激物質として様々な植物から単離同定されている。SL は根圏において寄生だけでなく、菌根菌共生の情報伝達物質として働くと同時に、植物体内では地上部の枝分かれを制御するホルモンとして機能する。多様な SL は、C 環の立体によって、orobanchol 型と strigol 型に分けられる。SL 生合成において、β-carotene から D27、CCD7、CCD8 酵素により共通の生合成中間体である carlactone（CL）が生成されることが明らかにされている（Alder et al., 2012)。Orobanchol 型の SL を生合成するイネにおいて、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ（CYP）である MAX1（CYP711A）の Os900 によって、CL から 4-deoxyorobanchol（4-DO）が生成されることが、さらに別の MAX1 ホモログである Os1400 によって 4-DO の 4 位が水酸化され、orobanchol が生成されることが明らかになっている（Zhang et al., 2014)。一方、strigol 型の SL については CL 以降の詳細な生合成経路は明らかになっていない。Strigol 型の SL を生合成するソルガム（*Sorghum bicolor*）からは、5-deoxystrigol（5-DS)、sorgomol、sorgolactone が見出されている。我々は重水素標識した 5-DS が sorgomol へと水酸化されること、この変換が uniconazole-P によって阻害されることを示し、水酸化反応には CYP が関与することを報告した（Motonami et al., 2013)。本研究では、5-DS を sorgomol へ変換する sorgomol synthase 遺伝子の同定を目的とした。

候補遺伝子を選抜するため、SL 高生産ソルガム品種を Long Ashton 水耕液で 14 日間栽培した後、引き続き Long Ashton 水耕液を用いる通常条件、水道水に置換したリン欠乏条件で栽培した。24 時間後、それぞれの培地の SL 含量を分析した結果、通常条件に比べ、リン欠乏条件では SL が顕著に増加した。それぞれの根から RNA を抽出し、次世代 RNA-seq 解析を行った。リン欠乏条件において、既知の SL 生合成遺伝子 *D27*、*CCD7*、*CCD8*、*CYP711A* の発現量は増加した。既知 SL 生合成遺伝子と協調して発現量が変化する機能未知の CYP-SM 遺伝子を選抜した。大腸菌で発現させた組換え CYP-SM の CO 差スペクトルが 450 nm 付近に吸収が見られたことから、活性型酵素として発現していることが確認できた。この CYP-SM を用いて 5-DS を基質として酵素反応を行い LC-MS/MS 分析に供した結果、sorgomol 標品と一致する生成物ピークが得られ、sorgomol synthase の同定に成功した。

strigolactone, P450, biosynthesis

発表責任者：杉本幸裕（yukihiro@kobe-u.ac.jp）

発表番号：4H009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# エチレン様活性化合物の作用機構の解析
# Characterization of ethylene mimic compounds

○北畑 信隆[1]、渡辺 健志郎[1]、鈴木 優志[2]、浅見 忠男[2]、朽津 和幸[1] ([1]東京理科大、[2]東大院)
○Nobutaka KITAHATA[1], Kenshiro WATANABE[1], Masashi SUZUKI[2], Tadao ASAMI[2], Kazuyuki KUCHITSU[1] ([1]Tokyo Univ. of Sci., [2]Univ. of Tokyo)

エチレンはバナナの成熟やモヤシの胚軸肥大、パイナップルの開化促進など様々な農業現場で利用されている。一方で、エチレンは気体であるため、圃場での取り扱いが難しいことから、この欠点を補えるエチレン代替物には潜在的な需要がある。我々はエチレン代替化合物の創製を目的として、ケミカルスクリーニングを行った。エチレンは、シロイヌナズナの暗所芽生えにトリプルレスポンスと呼ばれる一連の特徴的な形態変化を誘導する。この形態変化を指標として、市販のケミカルライブラリーからエチレン様の作用を持つ化合物の探索を行い、リード化合物を選抜した。さらに、関連化合物の構造活性相関を解析し、エチレン様活性に必要な構造を明らかにするとともに、より高いエチレン様活性を持つ化合物を選抜した。

選抜したエチレン様活性化合物の構造はエチレンと全く異なることから、化合物の作用機構を明らかにするために、エチレンの生合成経路やシグナル伝達経路に対する化合物の影響を調べた。化合物とエチレン生合成阻害剤の共処理により、暗所芽生えにトリプルレスポンスの形態が誘導された。また、内生のエチレン量は、化合物処理したシロイヌナズナと無処理の植物との間に有意差はみられなかった。これらの結果から、この化合物はエチレンの生成量に影響を与えないことが示唆された。

一方でこの化合物は、*etr1* や *ein2* といったエチレン非感受性変異体に対して、トリプルレスポンスを誘導できなかった。この結果から、化合物は受容体の近傍に作用してエチレンのシグナル伝達系を活性化する化合物であると考えられた。エチレンは、EIN3 などの転写因子を介して遺伝子発現を活性化する。そこで、マイクロアレイ法により遺伝子発現の変動を網羅的に解析した結果、意外なことに、本化合物は、エチレン前駆体 ACC 処理で誘導される遺伝子群の一部しか誘導しなかった。このことから、本化合物は、単純にエチレンアゴニストとしてエチレンシグナル伝達経路を活性する化合物ではない可能性がある。

そこで、ケミカルジェネティクスの手法を用いて、化合物の作用に関連する因子の探索を進めている。T-DNA タグラインを用いて、暗所芽生えの形態を指標とした化合物耐性変異体の探索を行い、いくつかの候補株を単離した。現在、原因遺伝子の同定とその機能解析を進めている。

ethylene

発表責任者：北畑　信隆（kitahata@rs.tus.ac.jp）

発表番号：4H010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ストリゴラクトン生合成経路の多様性の解析

# Analysis of various biosynthetic pathways toward strigolactones

○井関 萌絵、水谷 正治、滝川 浩郷、杉本 幸裕（神戸大院・農）
○Moe ISEKI, Masaharu MIZUTANI, Hirosato TAKIKAWA, Yukihiro SUGIMOTO (Grad. School of Agric., Kobe Univ.)

【目的】ストリゴラクトン（SL）には根寄生植物の種子発芽誘導、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導、植物ホルモンとしての枝分かれ抑制等の機能が知られている。植物が生産する SL の多様性は、deoxySL（5-deoxystrigol（5-DS）または 4-deoxyorobanchol（4-DO））の A・B 環の修飾による。イネでは MAX1 ホモログ Os900 により carlactone（CL）が 4-DO に変換され、続いて別の MAX1 ホモログ Os1400 により 4-DO の 4 位に水酸基が導入され orobanchol へと変換されることが報告された。また、ソルガムでも 5-DS の 9 位に水酸基が導入され sorgomol に変換されることが明らかにされた。我々は様々な SL を効率よく作る植物を選抜してきた。その中には、生産する SL に対応した deoxySL が検出されない植物もあった。本研究では、異なる SL を生産する様々な植物に CL と deoxySL を投与し SL への変換を調べることで、SL 生合成の多様性を解析することを目的とした。

【方法】SL 高生産植物としてワタ（検出される SL: strigol, 5-DS）、コウモリカズラ培養根（strigol）、ソルガム（sorgomol, 5-DS）、ササゲ（orobanchol）を用いた。市販のドナリエラ乾燥藻体から 9-*cis*-β-carotene を単離し、組換え CCD7、CCD8 酵素を用いて CL を合成した。カロテノイド生合成阻害剤であるフルリドンを用いて SL 生成を抑えた植物に CL あるいは deoxySL を投与した。24 時間後に根滲出物を回収し、LC-MS/MS 分析により変換を調べた。

【結果】 Strigol と 5-DS を生産するワタでは、CL は 5-DS と strigol へ変換され、5-DS は strigol に変換された。これに対し、同じく strigol を生産するものの 5-DS は検出されないコウモリカズラ培養根では、CL は strigol に変換されたが 5-DS には変換されず、5-DS の strigol への変換も認められなかった。ソルガムでは CL は 5-DS と sorgomol へ変換され、5-DS は sorgomol に変換された。ササゲでは、CL は orobanchol に変換されたが 4-DO への変換は認められなかった。4-DO の orobanchol への変換も認められなかった。これらの結果から、CL は調べた全ての植物において SL に変換されたが、SL 生合成は必ずしも deoxySL を経由しないことが示唆された。他の SL 高生産植物についても同様の解析を進めている。DeoxySL を経由しないと考えられる経路での生合成中間体の同定も進めている。

strigolactone, biosynthesis, precursor

発表番号：4H011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Identification of duckweed growth-promoting factor produced by bacteria

○Desi UTAMI[1], Kyoko MIWA[1,2], Hideyuki TAMAKI[2,3], Masaaki MORIKAWA[1,2] ([1]Hokkaido University, [2]JST-ALCA, [3]AIST)

Several microbes are capable of promoting plant growth, and their products that stimulate plant growth have been marketed for terrestrial plants. We have focused on the symbiotic relationships of duckweed, an aquatic plant, with surface bacteria. The objective of this research was to find new plant growth-promoting factor, PGF, from our previously isolated bacteria. Three bacteria, named as MRB1 (*Bacillus pumilus*), MRB3 (*Pelomonas saccharophila*) MRB4 (*Bacillus pumilus*) were used in this experiment. P23 (*Acinetobacter calcoaceticus*) whose PGF has already been identified was used as a reference strain. To confirm the activity of bacteria, each cell suspension was added to 50 ml of Hoagland medium containing two-fronds of *Lemna minor* as test plant. After 10 days, the frond number in MRB1 and MRB3 cell suspension was 3 times more than no cell control, and in MRB4 cell suspension was 2.5 times more than no cell control. Extracellular products of bacteria were recovered by centrifuge of the cell suspension and applied for PD10 size exclusion column chromatography for preparing High Molecular Weight compounds (HMW) and Vivaspin20 ultrafiltration membrane for Low Molecular Weight compounds (LMW). It was found that HMW of MRB4 apparently increased the frond numbers compare to other treatments. In order to further purify PGF of MRB4, cell free supernatant was prepared in DSMZ 81 medium, and subjected to ammonium sulfate precipitation followed by PD10 column. Protein compounds were denatured and removed by autoclaving the sample. Data suggested that the duckweed growth-promoting activity of the autoclaved sample was decreased from 1.8 times to 1.2 times compare to control. It has been suggested that PGF of MRB4 is protein.

plant growth-promoting factor, duckweed, *Lemna minor*

発表責任者：Masaaki MORIKAWA（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

発表番号：4H012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネにおいて過酸化水素プライミングは環境ストレスの抵抗性を付加する
# Hydrogen peroxide priming enhances environmental stress tolerance in rice

○流石 有希子[1]、三ツ井 敏明[1,2] ([1]新大農、[2]新大院)
○Yukiko SASUGA[1], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Niigata Univ., [2]Grad.Sch.Niigata Univ.)

近年の地球温暖化による気温上昇に伴って、米の内部が白濁化するという外形的品質低下が問題となっている。そこで我々は高温条件下でも高品質の米ができるように、イネに高温登熟耐性を付加する研究を行っている。我々は以前の研究で、高温ストレスがかかる前段階でイネを低濃度の過酸化水素水に曝すと高温登熟耐性を付加できることを見出した。この手法をプライミングと呼び、これは高温時の栽培技術として重要であると考えられる。一方で、この手法において過酸化水素プライミングによる植物体内の残留と環境下で過酸化水素が残留したときの影響が危惧される。

そこで我々はプライミングで添加した過酸化水素の動態と植物体内の過酸化水素濃度を地上部と根に分けて調べた。その結果、プライミングのために添加した過酸化水素は速やかに 5 時間でほぼ分解され、地上部においてはプライミング後も過酸化水素の増加は確認されなかった。一方、根においてはプライミングしてから 1～2 日後に過酸化水素の増加が確認されたが、その後は過酸化水素無処理区と同程度の過酸化水素濃度であったため、収穫後の残留はないと考えられる。以上の結果から過酸化水素プライミングが米の高温登熟耐性を向上させる手段として有益な方法であることが示唆された。

H2O2, priming, rice

発表番号：4H013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 塩ストレス応答時の植物根蛍光滲出物の解析

# Analysis of fluorescent root exudates in response to salt stress

○菊地 俊介、須山 隆大、城所 美紀、安保 充 (明大農)
○Shunsuke KIKUCHI, Takahiro SUYAMA, Miki KIDOKORO, Mitsuru ABO (Meiji Univ.)

【背景・目的】

植物根は有機酸やタンパク質、多糖類、アミノ酸など、多くの化学物質を分泌するが、その一方で、土壌環境あるいは水耕環境からのストレスを受けやすい組織でもある。そのストレスに応答して、有機酸やフラボノイドを分泌するという報告もある。本研究ではストレスに応じてどのような滲出物が生産されるのか、また、その滲出量に影響するのかについて、高感度に分析可能な蛍光物質に着目して調べた。植物中の蛍光物質として、NAD(P)H や芳香族アミノ酸、リグニンやその中間体、フミン酸などの腐植成分などが知られているが、水質分析では 3D 励起蛍光スペクトル測定により、フミン酸様物質、フルボ酸様物質のスポットが検出されている。本研究ではこの手法を用いて水耕液中のストレス応答物質の解析を行った。具体的には塩(NaCl) ストレス下で滲出する蛍光物質の蛍光スペクトルを測定し、その蛍光を指標に、化合物を HPLC で分取し、LC-MS による構造解析を試みた。また、比較のために、$AlCl_3$ ストレスや根の切断などの傷害ストレスを加えての蛍光分析も行った。

【方法・結果】

植物試料として、1 mM $CaCl_2$ 溶液で 24 時間水耕した発芽ダイズを用いた。ストレスとしては塩ストレス(0－3%)をエッペンチューブ中で 24 時間負荷し、そのインキュベーション溶液を 3D 励起蛍光スペクトル測定および、HPLC 分析に使用した。3D 励起蛍光スペクトルは励起波長 200－450 nm、蛍光波長 250－550 nm の範囲で測定した。その結果、複数のスポットが見られた。そのスポットは 1 mM $CaCl_2$ 溶液、1/2 MS 培地など、インキュベーション溶液によって現れるスポットの数や波長が異なったが、塩ストレスを負荷した場合に検出された 1 つのスポットは、根を切断した場合や、$AlCl_3$ ストレスを負荷した場合にも現れることが分かった。現在、HPLC によりこの蛍光物質を含む画分を分取し、LC-MS による構造解析を試みており、その結果も併せて報告する。

stress response, 3D fluorescence spectrum

発表番号：4H014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 低温順化のバイオマーカーを利用した水稲苗の低温耐性強化方法の開発

# Development of cold treatment method of rice seedling by using a biomarker of cold acclimation

○提箸 祥幸、佐藤 裕（農研機構・北農研）
○Yoshiyuki SAGEHASHI, Yutaka SATO (NARO Hokkaido Agr Res Cent)

熱帯起源の植物であるイネは、品種改良などを経て高緯度地域でも栽培が可能になり、北海道が我が国の主産地を占めるまでになった。北海道のイネ栽培では低温障害が克服すべき課題であり、厳しい気象条件に曝される移植後の苗の低温ストレス耐性強化は重要である。通常の育苗はハウス内等の外気よりも暖かい環境で行われるが、移植期が近づくと外気に慣らす硬化処理を行う。我々はこれまでイネの低温順化能力について研究を行ってきており、イネは一定期間弱い低温に曝されるとその後の強い低温ストレスに耐えられる能力を獲得することを確認している。本研究では、イネ苗の最適な硬化処理条件を低温順化のバイオマーカーを指標として検討することで、簡便な処理で低温に強い苗の作成方法を提案することを目的とする。

幼苗期のイネを弱い低温で数日間処理する（低温順化処理）と、通常であれば枯死してしまうような低温環境下でも無処理のものと比べて長く生き延びることができる。これは弱い低温処理によりイネ幼苗の低温ストレス耐性が向上したことを意味する。低温順化処理の有無により変化する代謝物をメタボローム解析により網羅的に調べた結果、複数の糖質とアミノ酸の低温順化処理特異的な蓄積が観察された。その中でも、Sucrose が低温順化処理に伴い急激に蓄積し、効果の継続中にもその蓄積が継続したことから、低温順化処理のバイオマーカーとした。Sucrose の蓄積量を指標としてイネ幼苗に対して様々な低温処理条件とそれにより得られる低温耐性を検討した結果、12℃5 日間処理が最も低温耐性向上効果が高いことが判明した。

最適低温順化処理の実際の効果について通常育苗した苗を用いて検証を行った。ハウス内で育苗したイネ苗に硬化処理後の段階で、12℃5 日の低温順化処理を行ったところ、高いレベルの Sucrose の蓄積が観察された。このときの低温耐性を無処理の苗と比較すると、4℃10 日処理により無処理の苗は全個体が枯死したのに対し、低温順化処理後の苗は 50%を超える高い生存率であった。このことは、苗の低温ストレス耐性強化のためには、従来の硬化処理条件よりも本研究で提案する処理条件がより有効であることを示すものであった。また、移植時期の前倒しについても本研究で見出した低温順化処理が有効であることを示した。

以上のことから、本研究では低温順化機構を利用した簡便なイネ幼苗の低温ストレス耐性強化方法を提案するとともに、本方法が実際の移植苗の低温ストレス耐性強化に有効であることを実証した。本方法は北海道のような寒地の稲作における生産の安定化に貢献できるものと期待できる。

rice, cold acclimation, biomarker

発表責任者：提箸祥幸（sagehasi@affrc.go.jp）

発表番号：4H015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Exploring the biosynthetic pathway of phytocassane in rice by using feeding approach with 13C-labeled diterpene substrate.

○Zhongfeng YE[1], Kazuya NAKAGAWA[2], Hiroshi KAWAIDE[2], Hideaki NOJIRI[1], Kazunori OKADA[1] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. Agric. Technol.)

**[Background]** Phytocassanes(A-E) are major diterpenoid phytoalexins in rice plant and are induced by abiotic and biotic stresses such as UV-irradiation, jasmonic acid treatment, and blast fungus infection. The diterpene hydrocarbon *ent*-cassa-12,15-diene is thought to be a committed intermediate of phytocassane biosynthesis through series of experiments that show accumulation of *ent*-cassa-12,15-diene in elicited rice calli and enzymatic conversion of this hydrocarbon to hydroxycassadienes by P450 monoxygenases. However, understanding of a pathway and enzymes involved in the biosynthesis of phytocassanes from *ent*-cassa-12,15-diene has been insufficient. Our current study confirmed the *de novo* conversion of *ent*-cassa-12,15-diene to phytocassanes by feeding experiment using rice plant.

**[Methods]** For preparation of the stable isotope-labeled substrate, [U-$^{13}C_{20}$]-*ent*-cassa-12,15-diene was enzymatically synthesized *in vitro* from [U-$^{13}C_6$]-Mavelonate ($^{13}$C-MVA) in the presence of seven biosynthetic enzymes consisted of five enzymes for GGDP synthesis *via* the MVA pathway, rice copalyl diphosphate synthase and rice *ent*-cassa-12,15-diene synthase. For feeding experiments, [U-$^{13}C_{20}$]-*ent*-cassa-12,15-diene (15 μg) was applied to leaves of rice (cv. Nipponbare) treated with 500 μM $CuCl_2$ elicitor, and incubated for 3 days. Metabolites exracted with methanol were analyzed by GC-MS and LC-MS/MS.

**[Result]** Enzymatically synthesized [U-$^{13}C_{20}$]-*ent*-cassa-12,15-diene (yield 80%, 0.8 mg) was analyzed by GC-MS and $^{13}$C-$^{13}$C COSY-NMR, confirming that all carbons were substituted by $^{13}$C stable isotope (>99%). The conversion of [U-$^{13}C_{20}$]-*ent*-cassa-12,15-diene to $^{13}$C-phytocassanes (B, C and E) after 3-day incubation was determined by LC-MS/MS. These data indicate that *ent*-cassa-12,15-diene is the unequivocal biosynthetic precursor of the phytocassanes in rice. Other intermediates upstream of phytocassane biosynthesis such as 1-deoxyphytocassanes C and B, which would be precursors of phytocassanes C and B will also be investigating in this experiment. Further analyses using phytocassaes-deficient rice lines such as *CYP71Z7* T-DNA mutant and *CYP76M7/M8* RNAi plant are explored to detect unknown intermediates in the phytocassane biosynthetic pathway in rice.

Feeding, [U-13C20]-ent-cassa-12,15-diene, Phytocassanes

発表番号：4H016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 異なる濃度の過酸化水素によって誘導される一過的酸化ストレスによるリーフレタスの $H_2O_2$ 濃度, CAT, APX 活性の経時変化

# Time-dependent changes of $H_2O_2$ content, APX and CAT activities in leaf lettuce under transient oxidative stresses induced by different concentration of $H_2O_2$

○森 直哉、渡邊 博之（玉川大院農）
○Naoya MORI, Hiroyuki WATANABE (Tamagawa Univ.)

［背景・目的］

活性酸素種（ROS）は，細胞障害の主要因子である一方，形態形成やストレス応答のメディエーターとして重要な役割を担っている．また，ROS の量的な差異や組織内の局在性はこれらの生理応答に様々な変化をもたらすことが多くの研究によって示されてきた．我々はこれまでに，リーフレタスに低濃度の過酸化水素（$H_2O_2$）を付与した時，生育促進が引き起こされることを見出した．この時，葉および根内 $H_2O_2$ およびスーパーオキシド（$O_2^-$）が一過的に増加し，空間分布に変化が起きることを確認した．それに伴い抗酸化酵素であるアスコルビン酸ペルオキシダーゼ（APX)およびカタラーゼ(CAT)の活性が一過的に高くなった．今回，異なる強度の一過的酸化ストレスを受けたリーフレタスにおけるレドックス応答の経時変化を，$H_2O_2$ 含量と APX および CAT 活性を指標に評価した．また，光周期を明期 16 時間/暗期 8 時間(LD)と連続明期(LL)にした際の周期変動性も合わせて調査することで，根へ酸化ストレスを与えた時葉内の $H_2O_2$ 分解応答に対して光環境が影響を与えているか検討した．

［方法・結果］

供試植物にはリーフレタス *Lactuca sativa* L.‘Red Fire’を使用した．十分に吸水させたウレタンマットに播種し，24 時間暗処理後，17 日間昼白色蛍光灯下の DFT 式水耕栽培装置で育苗した．その後，18 日齢苗を $H_2O_2$ 含有水耕液（0，0.1，1.0 mM）に移し，LD および LL 条件下で栽培した．

LD 条件下における無処理区の葉内 $H_2O_2$ 濃度は，明期と比べて暗期は 20-25 %に抑えられた．また，明期への切り替わり後，時間経過と共に $H_2O_2$ 濃度が上昇した．一方 LL 条件下では，無処理区の葉内 $H_2O_2$ 濃度に変化が見られないことから，葉内 $H_2O_2$ の周期変動性は光環境に影響されることが確認された．LD 条件下における $H_2O_2$ 処理区では無処理区に比べて，葉内 $H_2O_2$ 濃度および APX，CAT 活性の増加が認められた．0.1 mM $H_2O_2$（LC）処理区と 1.0 mM $H_2O_2$（HC）処理区を比較すると，いずれの測定項目も HC 区で増加の割合が高かった．$H_2O_2$ 処理後の葉内 $H_2O_2$ 増加・減少傾向は，LC 区では処理 3 時間後まで増加し，その後速やかに減少した後，処理 6 時間後には無処理区と同レベルとなった．それに対して HC 区では，処理 6 時間後まで $H_2O_2$ は高い濃度で維持され，無処理区と同レベルに低下するまで 18 時間を要した．LL 条件下においても，$H_2O_2$ 付与における酸化ストレス時の植物内 $H_2O_2$ 挙動は LD 条件下と同様の傾向を示した．以上の結果から，根への酸化ストレスにより起こる葉内 $H_2O_2$ の分解速度に対しては，栽培中の光周期が影響を与えないことが確認された．

Hydrogen peroxide, Oxidative stress, Temporariness

発表番号：4H017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# LED 光源藻類培養装置の開発及びラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の生育および光合成特性に及ぼす照射光波長の影響

# Development of algal cultivation system with LED light source and the effects of irradiation wavelength on growth and photosynthetic characteristics in *Synechococcus elongatus* PCC7942

○三根 彩佳[1]、木口 洋輔[1]、江口 雄己[1]、原田 京一[1]、田茂井 政宏[2]、重岡 成[2]、雉鼻 一郎[1]([1]（株）日本医化器械製作所、[2]近畿大・農・バイオ)
○Ayaka Mine[1], Yosuke Kiguchi[1], Masami Eguchi[1], Kyoichi Harada[1], Masahiro Tamoi[2], Shigeru Shigeoka[2], Ichiro Kijihana[1] ([1]NKsystem Co., Ltd, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr., Kinki Univ.)

近年、発光ダイオード（LED）は植物工場での省エネ光源など、様々な用途で使用が進められている。LED 光源は照射する光波長を選択することができ、照射光波長の制御により生育促進や有用成分の増加などの効果も報告されている。一方、微細藻類はバイオ燃料の原料として注目を浴びているが、照射光波長が藻類の生育や光合成特性に及ぼす影響について詳細に検討された例はほとんど無い。その一つの原因として、照射光を厳密に制御できるような藻類培養装置がなく、詳細な解析が不可能であったことが考えられる。そこで、我々は赤（R)、緑（G)、青（B）の３色のダイオードを個別に光量調節できる 3in1 LED を搭載し、光条件の詳細な設定が可能な小型の藻類培養装置の開発を試みた。

さらに本装置を用いて様々な光条件（R, G, B, RB, RGB：約 60 µmol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$）下でラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の培養を行い、生育および光合成特性などに及ぼす影響について検討した。その結果、RGB, R, RB 照射条件下と比較して B および G 照射条件下では生育遅延が見られた。細胞体積に関してはすべての波長条件下において有意な差は見られなかった。また、細胞当たりの光合成活性およびバイオマス量は RB 照射条件下で高値を示した。

以上の結果から、本装置を用いる事によりラン藻の生育および光合成特性に及ぼす照射光波長の影響を再現性良く解析可能であることが示された。

algae, Light emitting diode, Environmental responses

発表番号：4H018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ストレス応答に関与する低分子リン酸化合物の分析法の開発

# Development of analytical method for low-molecular phosphorus compounds involved in the stress response

○江口 朋宏[1]、長谷部 誉人[1]、戸澤 譲[2]、安保 充[1]([1]明治大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻、[2]埼玉大学大学院 理工学研究科 戦略的研究部門)
○Tomohiro EGUCHI[1], Takato HASEBE[1], Yuzuru TOZAWA[2], Mitsuru ABO[1] ([1]Department of Agricultural Chemistry, Graduate School of Agriculture, Meiji univ., [2]Graduate School of Science and Engineering, Saitama univ.)

【背景・目的】

生体内でヌクレオチドから合成されるユニークな低分子リン酸化合物として、ppGpp（guanosine 3'-, 5'-bisdiphosphate）が知られている。ppGpp は、バクテリアにおける緊縮応答の遺伝子発現のスイッチとなり、rRNA 合成などの抑制によりエネルギー消費を節約し、アミノ酸合成を促進することでアミノ酸飢餓に順応させるはたらきを持っている[1)]。ppGpp はバクテリアに特異的な化合物であると考えられてきたが、エンドウ葉緑体の抽出液から ppGpp が検出され、広範なストレスによりその濃度が変化する報告がある[2)]。このような背景から、一連の低分子リン酸化合物の簡便迅速な分析手法が望まれている。

既に陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた ppGpp の分析例が複数報告されているが、さらにヌクレオチドとの分離を向上させ分析時間を短縮するために、本研究では、キャピラリー電気泳動法（CE）を使用し、キャピラリーおよび分析条件の検討を行った。

【方法・結果】

一連の低分子リン酸化合物はマイナスチャージを持つため、CE 分析においては電気浸透流（EOF）をどのように抑制または反転させるかが重要になる。そこで、未修飾のキャピラリー，中性コーティングキャピラリー，陽イオン性ポリマーコーティングキャピラリーを用い、EOF を抑制または反転させて分析した。具体的には、EOF を抑制する方法として①一般的な未修飾の fused silica capillary（GL Sciences），酸性泳動液（pH 2.6）を用いる方法および②内壁が polyvinyl alcohol でコーティングされた PVA coated capillary（Agilent Technologies），50 mM 酢酸アンモニウム溶液（pH 9.0）を用いる方法を、EOF を反転させる方法として③内壁が陽イオン性ポリマーでコーティングされた COSMO(+) capillary（nacalai tesque），塩基性泳動液（pH 9.0）を用いる方法を検討した。分析対象は、ppGpp，GMP，GDP，GTP の 100 μM 標準液とした。

キャピラリーおよび分析条件を検討した結果、②PVA coated capillary を用いた方法が、最も分析時間が短く分離が良好だったため、これらについて報告する。

【参考文献】

1) 戸澤ら，植物化学調節学会誌「植物の生長調節」, 45, 119-124 (2010).
2) Takahashi K *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 4320-4324 (2004).

stringent response, ppGpp (guanosine 3',5'-bisdiphosphate), capillary electrophoresis

発表番号：4H019
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# EF-Tu によって誘導されるイネ免疫反応に対する特異的阻害剤の探索
# Identification of inhibitor for rice immune responses induced by EF-Tu

○古川 岳人[1]、武岡 啓伍[2]、浅見 忠男[3]、蔡 晃植[1,2]（[1]長浜バイオ大バイオ、[2]長浜バイオ大院バイオ、[3]東大院農生科）
○Takehito FURUKAWA[1], KEIGO TAKEOKA[2], TADAO ASAMI[3], FANG-SIK CHE[1,2] ([1]Dept. of Biosci., Nagahama Inst. of Biosci. and Tech., [2]Grad. Sch. of Biosci., Nagahama Inst. of Biosci. and Tech., [3]Dept. Appl. Biol. Chem., Univ. of Tokyo)

植物は、病原菌が共通して持つ Pathogen-Associated Molecular Patterns（PAMPs）を認識し、活性酸素の発生や抗菌性物質であるファイトアレキシンの蓄積などの PAMP-Triggered Immunity（PTI）という免疫反応を誘導する。これまでの我々の研究で、イネは *Acidovorax avenae* N1141 菌株の翻訳伸長因子 Elongation Factor Tu（EF-Tu）の中央領域 50 アミノ酸からなる EFa50 を認識し PTI を誘導することを明らかにした。しかし、イネにおける EF-Tu 認識とその認識情報の伝達機構については明らかになっていない。この様な情報伝達経路の解析に特異的阻害剤は有効なツールとなり得る。そこで、今回は EF-Tu によって誘導される PTI を特異的に阻害する化合物を探索し知見を得たので報告する。

まず、イネの EF-Tu 認識領域である EFa50 を含んでおり、最も PTI 誘導活性の高い EF-Tu-a 101-300 を用いて、PTI の一つである活性酸素発生を指標とした植物免疫阻害剤のスクリーニング系の構築を試みた。効率的に PTI 阻害剤を選抜するために、96 穴プレートにイネ培養細胞を分注し、検定化合物と EF-Tu-a 101-300 を同時に加え、発生する活性酸素量をルミノールで定量する系を構築した。この系を用いて、イネ培養細胞に EF-Tu-a 101-300 を処理することによって発生する活性酸素量を 10%以下に抑制する化合物を 10,000 個の化合物を含むケミカルライブラリーから選抜したところ、115 個がイネ PTI を阻害することが明らかになった。次に、これら 115 個のイネ PTI 阻害剤候補化合物自身が活性酸素消去能を有しているかどうかを調べるために、各化合物を過酸化水素水に添加し、ルミノールを用いて活性酸素量の変動を測定した。その結果、96 個の化合物が活性酸素消去能を持つことが明らかとなった。そこで、活性酸素消去能を持たない 19 個の化合物のイネ PTI 阻害活性が、イネ培養細胞自身の細胞死を誘導したことによる可能性を調べるため、イネ培養細胞に化合物を添加し、2 時間後の細胞死誘導を調べたが、いずれも細胞死誘導活性は認められなかった。

現在、これらの 19 個の化合物が活性酸素発生以外の PTI 反応についても抑制するかどうかを調べている。

Plant immune, Chemical screening, Inhibitor

発表番号：4H020
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 窒素固定能を持つシアノバクテリア *Nostoc* sp.を共生させる蘚類 *Pleurozium schreberi* が産生するホルモゴニア分化誘導因子の探索

# Search for hormogonia-inducing factor from a green moss, *Pleurozium schreberi* that accepts a nitrogen-fixing cyanobacterium *Nostoc* sp. as a symbiont

○西塚 紘明[1]、Thomas DeLuca[2]、橋床 泰之[1] ([1]北大院農、[2]Silver Museum, Sweden)
○Hiroaki Nishizuka[1], Thomas DeLuca[2], Yasuyuki Hashidoko[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Silver Museum, Sweden)

【背景】窒素固定能を持つ *Nostoc* 属シアノバクテリアは複数の光合成植物と相利的共生関係を構築する。*Nostoc* sp.は宿主植物から放出されるホルモゴニア分化誘導因子（hormogonia-inducing factor, HIF）によってホルモゴニアと呼ばれる運動性を有する形態へと分化し、宿主の特定部位へ誘因されると考えられているが、それらの生理活性化合物に関する知見は極めて少ない。常時低窒素環境の北方林生態系で主たる窒素供給源となる蘚類 *Pleurozium schreberi* は、その葉片に *Nostoc* sp.を着生させており、*P. schreberi* による共生系構築化学因子の産生と放出が予想される。本研究では、HIF の探索を試みた。
【方法】本研究で用いた *P. schreberi* は、2014 年 8 月下旬に北部スウェーデン・デッテノイベ近郊のヨーロッパトウヒ研究林林床で採取したもので、植物体は特徴的な黄色を呈し、その葉片表面にシアノバクテリアを着生させている。HIF 活性の検定では、まず、窒素源を含まない BG-$11_0$ 平板培地（agar 1.5%, sucrose 0.2%）で 2 週間培養したソテツ・サンゴ状根由来の *Nostoc* sp. 継代株コロニーを金属製メッシュ（70 mesh/inch）で濾過し、凝集体と呼ばれる非運動性の塊状コロニーを径サイズ 0.2 mm 以下に整えた。これを明所で 1 週間プレ培養し、検定試料をロードしたペーパーディスクを凝集体コロニー平板上に乗せ、周辺の凝集体の応答を蛍光顕微鏡下で経時観察した。陽性対照には本研究室で単離同定された HIF、(±)-1-palmitoyl-2-linoleoylglycerol（60 μg/disc）を合成し、これを用いた。
【結果・考察】半乾燥状態の *P. schreberi* を RO 水に浸漬し、回収水層を等量の *n*-hexane、EtOAc、*n*-BuOH で順次液液分配を行い、水層と各溶媒転溶部をそれぞれ HIF 活性検定試験に供したところ、EtOAc 転溶画分（コケ 0.2 g 相当量/disc）に強い HIF 活性が認められた。この活性画分を C18-逆相 HPLC（移動相 $H_2O$-$CH_3CN$ (9:1)、流速 1 mL/min、検出波長 UV220 nm）で追跡し、t*R* 10.6 min に検出されるシングルピーク成分で活性が認められ、ESI-MS 正イオンモードでコリン $C_5H_{14}NO$（*m/z* 104.1074）の存在を認めたが、この化合物単独では HIF 活性はなかった。一方、ESI-MS 負イオンモードでは m/z 265 にコリンの対イオンを与える化合物が検出された。この化合物の大量調製を試みるべく、*P. schreberi* メタノール抽出物（total 33.2 g）を用いて、同様に各転溶画分の HIF 活性検定試験を行ったところ、EtOAc 転溶画分（コケ 0.01 g 相当量/disc）に強い HIF 活性が認められ、水抽出物から得られた HIF に一致する挙動を示した。現在、メタノール抽出物からこの活性化合物の単離精製に取り組んでいる。*P. schreberi* 植物体水抽出物に強い HIF 活性が認められ、ジアシルグリセロールに比べ安定であることから、*P. schreberi* 由来 HIF は、実際に自然界で機能している可能性が高い。

hormogonia-inducing factor, cyanobacteria, *Pleurozium schreberi*

発表責任者：橋床　泰之（yasu-h@abs.agr.hokudai.ac.jp）

発表番号：4H021
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# キトサンオリゴ糖によるイネ根におけるアーバスキュラー菌根誘導性遺伝子の発現誘導
# Induction of arbuscular mycorrhiza-inducible gene expression by chitosan oligomers in rice roots

○秋山 康紀、辰己 雄亮（阪府大院・生命環境）
○Kohki Akiyama, Yusuke Tatsumi (Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.)

【目的】アーバスキュラー菌根菌（arbuscular mycorrhizal fungi, AM 菌）は 80%以上もの陸上植物と共生する有用土壌微生物である。AM 共生において，宿主植物と AM 菌はそれぞれが生産するシグナル物質により互いの存在を認識する。AM 菌が生産するシグナル物質は Myc ファクターと呼ばれ，現在までにリポキトオリゴ糖（Myc-LCO）とキチンオリゴ糖が報告されている。しかしながら，Myc-LCO とキチンオリゴ糖による共生応答誘導は部分的かつ限定的であることが明らかになってきており，真の共生シグナル物質が別に存在することが強く示唆されている。植物における AM 菌の共生シグナル物質の受容には LysM 型キチン受容体が関与していると考えられている。昨年度の本大会において，我々は AM 菌 *Rhizophagus irregularis* の主要な細胞壁成分であるキチン質について構造解析を行い，本菌の細胞壁キチンが *N*-アセチルグルコサミンだけでなく，グルコサミンを含むヘテロ多糖構造を有していることを示した。このようなヘテロ多糖から生成し得るオリゴ糖である部分 *N*-脱アセチルキチン 4 糖がイネの根における AM 共生マーカー遺伝子の発現を顕著に誘導すること，さらに，本オリゴ糖による共生マーカー遺伝子の発現誘導がイネの LysM 型キチン受容体である OsCERK1 を介さない新規のシグナル経路によるものであることを報告した。そこで今回，グルコサミンのみからなるキトサンオリゴ糖および鎖長の短い部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖についてイネの根における AM 共生マーカー遺伝子の発現誘導解析を行うと共に，これらキトオリゴ糖が実際に AM 菌の菌体から分泌されているのかどうかについて分析を行ったので報告する。
【方法および結果】キトサン 2-6 糖およびグルコサミンをそれぞれイネ（*Oryza sativa* cv. Nipponbare BL2）の発芽 3 あるいは 4 日後の実生に処理し，6 時間後の根における AM 共生マーカー遺伝子（*AM1, AM2, AM3, RAM1*）の発現量を qRT-PCR により測定した。その結果，キトサン 2-6 糖について発現誘導活性が見られ，特にキトサン 3-5 糖が強い活性を示した。部分 *N*-脱アセチルキチン 3 糖はキトサン 3 糖をメタノール - 水中で無水酢酸および Dowex1-X8（HCO3-）を用いて部分 *N*-アセチル化することにより調製した。本オリゴ糖は部分 *N*-脱アセチルキチン 4 糖よりも高い濃度でマーカー遺伝子を顕著に誘導した。AM 菌 *R. irregularis* の菌体を滅菌水に懸濁し，2% $CO_2$ 条件下 30°C で 1 週間培養後，菌体を濾別して培養濾液を得た。現在，LC-MS により本培養濾液中にキトサンオリゴ糖や部分 *N*-脱アセチルキチンオリゴ糖が含まれているのか分析を行っている。

arbuscular mycorrhizal fungi, chitosan, rice

発表責任者：秋山　康紀（akiyama@biochem.osakafu-u.ac.jp）

発表番号：4H022
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# バイオ肥料微生物 *Bacillus pumilus* TUAT1 株芽胞接種がイネ幼苗期に与える生理的・遺伝学的影響
# The physiologic and genetic effect of inoculation by *Bacillus pumilus* TUAT1 spores on rice seedlings

○伊藤（山谷） 紘子[1]、大川 泰一郎[2]、細野 真弘[2]、外舘 千尋[2]、寺内 良平[3]、阿部 陽[3]、高木 宏樹[3]、大津 直子[2]、横山 正[2] ([1]日大生物資源、[2]農工大農学研究科、[3]岩手生工研)
○HIroko ITO-YAMAYA[1], Taiichiro OOKAWA[2], Masahiro HOSONO[2], Chihiro TODATE[2], Ryohei TERAUCHI[3], Akira ABE[3], Hitoki TAKAGI[3], Naoko Ohtsu[2], Tadashi Yokoyama[2] ([1]Nihon Univ., [2]TUAT, [3]IBRC)

宿主となる作物の生育を促進させ、生産性を向上させる植物生育促進根圏微生物（PGPR; Plant Growth Promoting Rhizobacteria）は農業分野における実用化に向け、多くの菌株が分離されている。しかし、PGPR として注目されている菌の中にはキャリア中での生存性が短く品質のコントロールに難点があるなど、実用性に関する問題点も多く指摘されている。農工大圃場から単離された *Bacillus pumilus* TUAT1 株は、イネの育苗段階での接種により収量を 10~20%増加させることが報告されている。さらに、芽胞形成する *Bacillus* 属細菌は劣悪環境下の生残率が高く、接種剤としての品質保持が簡易であると考えられ、バイオ肥料として実用的な利用も容易であると期待されている。そこで我々は、どのようなイネの量的形質または遺伝因子が *Bacillus pumilus* TUAT1 に応答しているのかを明らかにする目的で、TUAT1 株芽胞接種がイネ幼苗期に与える生理的・遺伝学的影響に注目し、その解析を行った。

イネ品種コシヒカリ（粳、水稲品種）、リーフスター（粳、水稲品種、飼料イネ）を用い、TUAT1 接種により変化する量的形質について調べた。接種源は、*Bacillus pumilus* TUAT1 RS 株（リファンピシン、ストレプトマイシン耐性株）を Trypticase Soy 培地中にて 14 日間 28 度で培養し、集菌・洗浄したのち、65℃ 1 時間の処理により栄養体細胞を死滅させ、芽胞体になった菌のみが生菌として存在するように調整した。4 週間の生育を通じて、根新鮮重あたり $10^5$ CFU 以上の TUAT1 が根から検出された。接種により地上部・根部新鮮重、根数、分げつ数が増加する傾向がみられ、両品種とも根数、分げつ数に 5%水準以上の有意差が検出された。一方、草丈と SPAD 値は、リーフスターでは菌接種の影響をほとんど受けず、コシヒカリでは逆に減少した。これらのことから、TUAT1 接種効果は根部、特に根数に顕著に表れることが示唆された。

次に、陸稲・水稲、粳・モチ、ジャポニカ・インディカなど様々な異なる特性を持つ 14 品種のイネを用い接種効果を調べたところ、ひとめぼれ（粳、ジャポニカ水稲品種）で有意に根数増加が認められ、逆にタカナリ（粳、インディカ水稲品種）では有意に減少した。この対照的な 2 品種間の組み換え固定系統（RILs）を用いた QTL（量的形質遺伝子座）解析の結果、TUAT1 接種に応答して根数を増加させる QTLs 領域が 2 つの染色体で検出されることが示された。

本発表ではこれらの TUAT1 株応答性のイネ表現形質と品種特異的な接種効果、そして QTL 解析について報告する。

plant-microbe interaction, bio-fertilizer, *Bacillus pumilus*

発表責任者：伊藤（山谷） 紘子（ito.hiroko@nihon-u.ac.jp）

発表番号：4H023
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# バッカクキン科真菌に幅広く保存されている輸送体候補遺伝子の解析
# Functional analysis of a transporter candidate gene conserved among Clavicipitaceae fungi

○稲葉 尚子[1]、シュタイナー ユーリケ[2]、ライストナー エックハルト[3]、杉山 暁史[1]、矢崎 一史[1]（[1]京大生存圏研究所、[2]INRES-Phytomedizin、[3]Institut fur Pharmazeutische Biologie）
○Shoko INABA[1], Ulrike Steiner[2], Eckhard Leistner[3], Akifumi SUGIYAMA[1], Kazufumi YAZAKI[1]（[1]Kyoto Univ., [2]INRES-Phytomedizin, [3]Institut fur Pharmazeutische Biologie）

麦角アルカロイドは高い生理活性をもつ真菌毒である。主にボタンタケ目に属する真菌バッカクキン科 Clavicipitaceae の真菌により生成される。バッカクキンは昆虫や菌に寄生する種の他、植物を宿主とする種としては、イネ科植物に寄生する *Claviceps* 属、相利共生的な *Epichloë* 属が知られていた。近年、ヒルガオ科植物と共生する新種のバッカクキン *Periglandula* 属が発見された（Kucht et al., 2004; Steiner et al., 2006）。エピファイトであるこの属の菌糸はヒルガオ科植物の葉表面の分泌腺周辺に付随する。これまでに菌糸と葉の麦角アルカロイド含量の測定結果などから、麦角アルカロイドは菌側で生成され植物側で蓄積されることが知られている。本研究ではこの共生間の麦角アルカロイド輸送を担う菌側の輸送体の同定を目的としている。

*Periglandula* 属などいくつかのバッカクキンではゲノム解読が進められており、麦角アルカロイドの生合成遺伝子クラスターが明らかになっている。輸送体遺伝子を生合成クラスター付近から探索するため、まず生合成クラスターの両側にある程度長い配列を有するコンティグを探したところ、*Claviceps purpurea* のコンティグが一つみつかった。このコンティグにおいて生合成クラスター付近の塩基配列から輸送体の特徴である膜貫通領域を有すると予測される ORF を探索したところ、２つの候補配列がみつかった。そのうち一つは生合成クラスターの 5’側にあり probable UDP-N-acetylglucosamine:dolichyl phosphate N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase とアノテーションされていた。一方、3’側にある 867 bp の ORF の機能は全くわかっていないが、６回の膜貫通領域がある。

この配列とアミノ酸配列の類似性の高いものを blastp 検索するとバッカクキンの *Ustilaginoidea virens*, *Metarhizium* 属などに幅広く保存されており、いずれも機能未知であった。特に *Periglandula* 属や *Epichloë* 属のデータベースを探索するとこれらの菌も同様の配列を有することがわかった。そこで、現在この ORF を麦角アルカロイド輸送体の第一候補とし、機能解析を行っている。

ergot alkaloid, Clavicipitaceae, Convolvulaceae

発表責任者：矢崎一史（yazaki@rish.kyoto-u.ac.jp）

発表番号：4H024
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネの病害抵抗性に関与する *OsPR7* と *OsPR8* の OsNTF1 転写調節因子による発現制御機構の解析
# Transcriptional regulation of OsNTF1 on disease resistant-related genes, *OsPR7* and *OsPR8*

○奥山 愛梨[1]、平井 洋行[1]、宇野 雄太[1]、堀家 史哉[1]、國枝 拓哉[2]、久保 健一[3]、仲下 英雄[4]、蔡 晃植[1]([1]長浜バイオ大院、[2]長浜バイオ大、[3]奈良先端科学技術大院、[4]福井県大・生物資)
○ Eri OKUYAMA[1], Hiroyuki HIRAI[1], Yuta UNO[1], Fumiya HORIIE[1], Takuya KUNIEDA[2], Kenichi KUBO[3], Hideo NAKASHITA[4], Fang-Sik Che[1] ([1]Graduate School of Biosciences, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [3]Nara Institute of Science and Technology, [4]Fukui Prefectural University)

植物は病原菌が共通して持つ PAMPs（Pathogen-associated Molecular Patterns）と呼ばれる分子群を認識することで、様々な免疫反応を誘導する。これまで我々は、イネはイネ褐条病細菌 *Acidovorax avenae* の鞭毛タンパク質であるフラジェリンや翻訳伸長因子 EF-Tu（Elongation factor Tu）を PAMP として認識し、活性酸素の発生などの PAMP-Triggered Immunity（PTI）という免疫反応を誘導することを明らかにした。また、これら PAMP をイネに処理すると、実際に *A. avenae* の生育が抑制されることも明らかにした。そこで、PAMP を処理したイネで認められる病害抵抗性の機構を明らかにするため、PAMP をイネ培養細胞に処理した後に蓄積するタンパク質をプロテオーム法で調べた。その結果、システインエンドペプチダーゼである OsPR7 やキチナーゼである OsPR8 が蓄積することが明らかとなった。次に、*OsPR7* と *OsPR8* の過剰発現形質転換イネを作製し、これらの PR タンパク質が病害抵抗性に関与するか調べたところ、これら形質転換体はイネ白葉枯病菌 *Xanthomonas oryza* pv. *oryzae*(*Xoo*) に対して病害抵抗性を示すことが明らかとなった。また、大腸菌を用いて作製した OsPR7 と OsPR8 のリコンビナントタンパク質をそれぞれ *Xoo* に処理したところ、どちらを処理した場合でも *Xoo* の生育抑制が認められた。そこで、*OsPR7* と *OsPR8* の発現を制御する転写因子を明らかにするため、フラジェリンや EF-Tu を処理したイネにおいて発現が上昇する遺伝子を 44K オリゴマイクロアレイで解析したところ、5 個の転写因子をコードする遺伝子がフラジェリンや EF-Tu を処理した時に共通に発現上昇することが明らかになった。これらの転写因子の中から、*OsPR7* または *OsPR8* の発現を制御する転写因子を選抜するため、それぞれの転写因子を発現するベクターと各 *PR* 遺伝子の上流 2kb 領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に連結したベクターをイネプロトプラストに同時導入し、導入 16 時間後におけるルシフェラーゼの発光量を測定した。その結果、OsNTF1（NAM domain-containg transcription factor）が *OsPR7* および *OsPR8* の特異的発現を制御することが明らかになった。そこで、OsNTF1 による *OsPR7* の転写誘導に必要なプロモーター領域を調べるため、*OsPR7* の上流 1 kb, 0.5 kb, 0.27 kb をルシフェラーゼの上流に連結したベクターをそれぞれ作製し、OsNTF1 による転写誘導を解析した。その結果、1 kb のベクターを導入した場合はルシフェラーゼによる発光が認められたが、0.5 kb と 0.27 kb のベクターを導入した場合は認められなかった。以上のことから、OsNTF1 が *OsPR7* の転写を制御するのに必要な領域は *OsPR7* の上流 1 kb～0.5 kb の領域内に存在することが示された。

plant immunity, transcription factor, PR protein

発表番号：4H025
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

タバコ細胞におけるショ糖飢餓に依存した TGN 局在タンパク質の減少とゴルジ装置の機能変換
Sucrose-starvation-dependent decrease of Trans Golgi Network localized proteins and functional changes of Golgi apparatus in tobacco cells

○小田 大和人[1]、浅妻 悟[2]、仲宗根 弘晃[1]、Moses O Abiodun[2]、豊岡 公徳[3]、松岡 健[1,2,4,5] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]理研 CSRS、[4]九大生還セ、[5]九大オルガネラセ)
○ Yamato ODA[1], Satoru ASAZUMA[2], Hiroaki NAKASONE[1], Abiodun Moses O[2], Kiminori Toyooka[3], Ken MATSUOKA[1,2,4,5] ([1]Kyushu Univ. Glad. Sch. Biores. Bio-env. Sci., [2]Kyushu Univ. Fac. Agr., [3]RIKEN CSRS, [4]Kyushu Univ. Biotron Appl Ctr., [5]Kyushu Univ. Organelle Ctr.)

細胞の物流システムである小胞輸送系の中間に存在する細胞内構造体として、ゴルジ装置、それに引き続くトランスゴルジネットワーク（TGN）が存在する。植物細胞では、ゴルジ装置は細胞内輸送や細胞壁構成成分のペクチン等の多糖の合成を担うことも知られている。我々は、タバコ培養細胞 BY-2 株をショ糖欠乏条件におくと、その細胞で発現させた TGN 局在タンパク質である、NtSYP41 や NtSUT2 と GFP 等の蛍光タンパク質の融合体の量が著しく減少することを見出している。しかし、これらのタンパク質が減少する機構については解明されていない。そこで本研究ではまず、蛍光変換タンパク質 monomeric kikume green red (mKikGR) と NtSYP41 の融合タンパク質 mKikGR-NtSYP41 を用い、この減少が分解の促進によるものかについて検討した。

この融合タンパク質を発現させた、BY-2 細胞中の融合タンパク質の蛍光を紫光照射により変換後、ショ糖を含む通常の培養に用いる培地とその培地からショ糖を欠乏させた培地に再懸濁し、暗所で培養を行った。この培養過程で経時的にサンプリングを行い、抽出タンパク質中に存在する蛍光変換された mKikGR-NtSYP41 の赤色蛍光と変換後に合成されたタンパク質の緑色蛍光の強度を定量することにより、ショ糖の存在の有無という二つの条件における、BY-2 細胞内における NtSYP41 の合成と減少について速度論的に解析した。またこの解析の際に、mKikGR を単独で発現させた細胞をコントロールとした。通常培地における mKikGR-NtSYP41 と mKikGR の減少の半減期はそれぞれ１９時間、７７時間と計算されたことから、mKikGR-NtSYP41 はゆっくりとではあるが細胞内で分解を受けていると考えられた。ショ糖飢餓条件において、赤色蛍光変換された mKikGR-NtSYP41 は１２時間以内に殆ど検出されなくなったが、この条件においても蛍光変換された mKikGR の大幅な減少は認められなかった。これらの結果は、ショ糖欠乏条件下では mKikGR-NtSYP41 がショ糖存在下条件下と比較して、より積極的に分解されることを示していた。

現在、この mKikGR-NtSYP41 の積極的な分解がオートファジーによるものか、またショ糖飢餓条件においてゴルジ装置等の機能がどのように変化するか、についての解析も進めており、これらの結果についても報告したい。

Sucrose starvation, Trans Golgi Network, Protein degralation

発表責任者：小田 大和人（coruja_gufo_chouette@yahoo.co.jp）

発表番号：4H026
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 における光酸化的ストレス耐性へのカルビン回路調節因子 CP12 の関与

# Function of CP12 on photooxidative stress tolerance in *Synechococcus elongatus* PCC7942

○田茂井 政宏、松井 伶真、重岡 成 (近畿大・農・バイオ)
○Masahiro TAMOI, Ryoma MATSUI, Shigeru SHIGEOKA (Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr. Kinki Univ.)

ラン藻カルビン回路を構成する酵素群は、高等植物由来のそれらとは異なり、フェレドキシン/チオレドキシンシステム（Fd/Trx）を介した光還元力による活性調節を受けないことを明らかにしてきた。その代わりに、ラン藻細胞内では、明暗条件下での NAD(P)H/NAD(P)量変化に応じて、小タンパク質 CP12 がグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)およびホスホリブロキナーゼ(PRK)と複合体を形成/解離することによってこれら酵素の活性調節を介して炭素代謝を制御していた（Tamoi et al. *Plant J.* 42, 504, 2005)。事実、ラン藻 CP12 遺伝子破壊株は、恒明条件下では正常に生育するが、明暗条件下では GAPDH および PRK 活性が制御できず、炭素代謝異常の結果として生育遅延を示す。さらに興味深い事に、ラン藻 CP12 遺伝子破壊株は、強光条件下やパラコート処理などの光酸化的ストレスに対する感受性が高くなることを見いだした。近年、シロイヌナズナにおいて CP12 は GAPDH および PRK の活性制御に関わる SH 基をストレス条件下での酸化状態から保護する機能があることが報告されている（Marri et al. *Biochimie* 97, 228, 2014)。しかし、ラン藻の GAPDH および PRK にはこの SH 基が欠如しており、ストレス感受性の増大が CP12 による SH 基の保護機能の喪失が原因とは考えられず、CP12 による新たな防御機構の存在が考えられる。GAPDH および PRK はカルビン回路酵素の中で NADPH および ATP を利用する酵素であること、また CP12 は NAD(P)(H)と結合する能力を有することから、CP12 が光合成電子伝達系に直接もしくは NADP(H)代謝を介して関与していると考え、本研究ではラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 CP12 欠損株を用いて、光酸化的ストレス条件下における電子伝達活性に及ぼす CP12 欠損の影響を検討した。

Calvin cycle, photosynthetic electron transport system, photooxidative stress

発表責任者：田茂井政宏（tamoi@nara.kindai.ac.jp）

発表番号：4H027
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アメリカネムノキの就眠を制御する K⁺チャネル SPORK2 の機能解析

# Functional analysis of SPORK2, an outward-rectifying $K^+$ channel involved in leaf folding of *Samanea saman*

○及川 貴也[1]、石丸 泰寛[1]、宗正 晋太郎[2]、村田 芳行[2]、鷲山 研人[1]、浜本 晋[3]、魚住 信之[3]、吉川 信幸[4]、上田 実[1]（[1]東北大院理、[2]岡山大院環境生命、[3]東北大院工、[4]岩手大農）

○Takaya OIKAWA[1], Yasuhiro ISHIMARU[1], Shintaro MUNEMASA[2], Yoshiyuki MURATA[2], Kento WASHIYAMA[1], Shin HAMAMOTO[3], Nobuyuki UOZUMI[3], Nobuyuki YOSHIKAWA[4], Minoru UEDA[1] ([1]Grad. Sch. Sci., Tohoku Univ., [2]Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., [3]Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., [4]Fac. Agr., Iwate Univ.)

アメリカネムノキ（*Samanea saman*）は、昼に開いていた葉を、夜になると閉じる就眠運動を行う。この運動は葉の付け根（葉枕）部分に存在するエクステンサー運動細胞（向軸側）の収縮およびフレクサー運動細胞（背軸側）の膨張によって引き起こされ、$K^+$の流出入が運動細胞の浸透圧調節を担っている。これまで、我々は、次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、アメリカネムノキの葉枕特異的に発現する外向き整流性 $K^+$チャネル SPORK2 を単離している。今回、我々は、アメリカネムノキの就眠運動における SPORK2 の生理学的役割を理解することを目的として研究を行った。

アメリカネムノキの葉枕部分の免疫染色により、SPORK2 のタンパク質は、葉が閉じはじめる前にエクステンサー運動細胞に多く発現していた。また、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的実験を行ったところ、SPORK2 の電位依存的なチャネル活性化キネティクスは、シロイヌナズナの気孔閉口に関わる $K^+$チャネルである GORK のものと比べて、劇的に遅いことを明らかにした。加えて、SPORK2 由来の $K^+$電流は、GORK 由来の $K^+$電流と比べて、急激な膜電位の変化に対する感受性が低いことを明らかにした。さらに、アメリカネムノキのエクステンサー運動細胞のプロトプラストを用いたパッチクランプ実験により、エクステンサー運動細胞由来の $K^+$電流は、SPORK2 を発現させた卵母細胞由来のものと類似した性質を有していた。これらの結果より、SPORK2 は、エクステンサー運動細胞特異的な発現分布と、急激な環境変化に影響されにくい独特なチャネル性質によって、アメリカネムノキの葉を閉じさせる運動を安定的に制御することが示唆される。

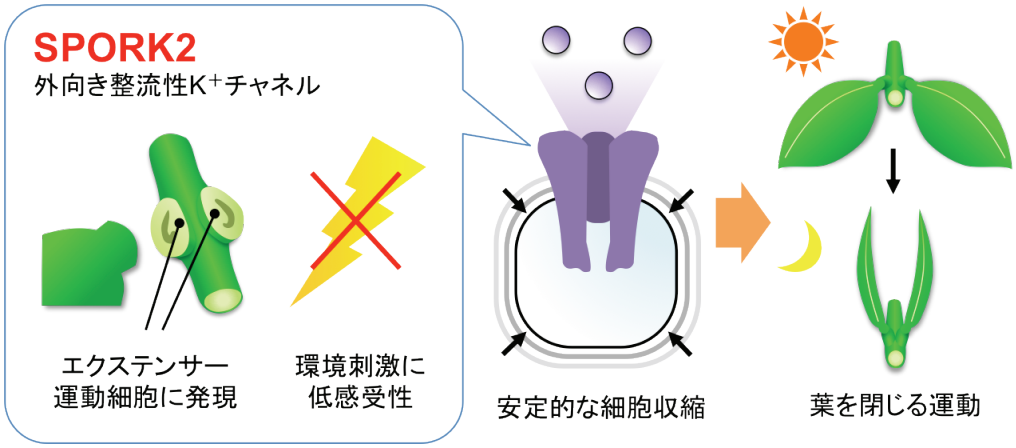



図　SPORK2 の特性がアメリカネムノキの葉を閉じる運動を制御する

$K^+$ channel, nyctinasty, ion transport

発表責任者：上田実（ueda@m.tohoku.ac.jp）

発表番号：4H028
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 原始葉緑体が保持する細胞壁ペプチドグリカン結合型外膜チャネル

# Peptidoglycan-associated outer membrane diffusion channels in Cyanophora paradoxa chloroplasts

○児島 征司[1,2]、村本 光二[2]、草野 友延[2] ([1]東北大・学際研、[2]東北大院・生命)
○Seiji KOJIMA[1,2], Kouji Muramoto[2], Tomonobu Kusano[2] ([1]Tohoku Univ. FRIS, [2]Tohoku Univ. Graduate School of Life Sciences)

**【背景・目的】**

グラム陰性細菌の細胞表層は内膜、細胞壁ペプチドグリカン (PG) 、外膜で形成される。外膜は生育阻害物質の細胞内への流入および細胞内成分の細胞外への漏出を阻止する透過障壁としての機能を持つ。一方、外膜の安定的維持には細胞あたり $10^6$ 分子程度の外膜－PG 間接着蛋白質を必要とする。葉緑体の祖先とされる藍色細菌（藍藻）はグラム陰性細菌であり、外膜を保持する。従って藍藻が細胞小器官である葉緑体へと変換する過程では、外膜の安定性を保持しつつ、宿主との物質のやり取りを可能にするための外膜機能の変換が必要である。本変換過程をより詳しく理解するため、藍藻と類似した表層構造を残す、最も原始的な葉緑体とされる cyanelle と呼ばれる灰色藻葉緑体（藍藻由来の細胞壁ペプチドグリカンを有する）を本研究の対象とし、外膜－PG 間接着蛋白質および外膜チャネルを探索した。

**【方法・結果・考察】**

灰色藻 *Cyanophora paradoxa* のゲノム配列からは既知の外膜－PG 間接着蛋白質および外膜チャネルは検出されないため、生化学的手法による探索を行った。Cyanelle から PG－外膜画分を分取して 42 および 40 kDa の PG 結合蛋白質を単離し、それぞれ PapC1, PapC2 (peptidoglycan-associated protein of cyanelle) と名付けた。機能解析のため、PapC1, C2 をリポソームに再構成し各種アミノ酸や糖を基質としてチャネル活性を測定したところ、還元条件下で基質非特異的な拡散チャネルを形成することがわかった。チャネル活性はシステイン残基の再酸化防止処理（アルキル化）を行うことで最大化した。チャネルサイズの排除限界はおおよそ分子量 1,000 程度と見積もられた。また、PapC1, 2 は非還元条件では高分子複合体を形成しており、電子顕微鏡観察で厚さ 5~7 nm の単層状の構造物として観察された。N 末端アミノ酸配列解析と質量分析法を併用して遺伝子を同定し、配列解析を行ったところ、いずれも *Planctomycetes* 門細菌の表層蛋白質とわずかな相同性 (25% identity) を示すのみで、藍藻門からは相同蛋白質は全く見出されなかった。これらの結果は、PapC1, C2 が cyanelle の外膜－PG 間の接着に関与する構造蛋白質であると同時に拡散チャネルとしての機能を有することを示しており、藍藻から葉緑体への進化過程における外膜機能変換に深く関与する蛋白質であると推察された。一方でその起源は非藍藻系統にあると考えられ、葉緑体成立過程における外来因子の関与が強く示唆された。

Peptidoglycan, Channel, Outer membrane

発表責任者：児島征司（skojima0801@gmail.com）

発表番号：4H029
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 農地の土壌環境と微生物叢の解析
# Analysis of soil environment and microorganisms in agricultural fields

○荒木 希和子、アディカリ ディネッシュ、向 真樹、久保 幹（立命大生命）
○Kiwako S. ARAKI, Dinesh ADHIKARI, Masaki MUKAI, Motoki KUBO (Ritsumeikan Univ.)

SOFIX（Soil Fertile Index）は、土壌中の物質循環に基づいて再現性よく農業を行うために開発した、土壌肥沃度の診断手法である。従来の肥料成分の化学分析に加え、物質循環に関与する生物指標を解析することが特徴である。生物指標として、環境バクテリア量と土壌バイオマス量（有機物を含む物質量とその割合）および窒素・リン循環（有機物からの養分供給速度）を調べる。これまで、この手法を用いて日本各地のあらゆる農地の土壌を分析し、データベースの構築を行ってきた。
そこで、このデータベースを元に農耕地の土壌中の成分と生物作用の関係について解析を行った。その結果、総炭素量が 30,000mg/kg 以上、総窒素量が 3,000mg/kg 以上、かつ C/N 比が 8 から 17 の土壌では、窒素循環活性が高く（総菌数 4.6 億個/g、アンモニア酸化活性 40%、亜硝酸酸化活性 75%、窒素循環活性 40 点以上)、微生物の栄養分となる物質量とその割合が適切な状態であることが明らかとなった。さらに、この条件の土壌では植物の生育も促進されることが確認された。炭素は有機資材に含まれる成分であることから、このような土壌では有機資材の投入により、微生物の餌資源となる炭素成分が適切に供給されていることが示唆された。
一方、肥料成分の中で炭素のみが不十分な土壌も存在し、これらの土壌は化学肥料による施肥が続けられていることがわかった。さらに、全ての肥料成分が十分であるにも関わらず、微生物がほとんど検出されず、物質循環活性の非常に低い土壌が存在することが明らかとなった。これらの農地の管理方法を調べたところ、連作障害や害虫を防ぐための土壌燻蒸や殺虫剤、農薬が継続的に使われていることがわかった。このことから農地土壌に対する薬剤の使用は土壌微生物に致命的な影響を与え、このような土壌では土壌微生物の働きを回復させない限り、有機資材を使用しても肥料として効果を期待できないと考えられる。

organic agriculture, material circulation, soil environment

発表責任者：荒木　希和子（kiwakosa@fc.ritsumei.ac.jp）

発表番号：4H030
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

シロイヌナズナにおけるクラスリン被覆タンパク質の積荷認識機構の解析
Analysis on molecular mechanism of clathrin coat proteins for their cargo-recognition in *Arabidopsis thaliana*

高畑 周平[1]、吉田 昇平[2]、松波 絵里香[2]、山内 淳司[3,4]、地阪 光生[1]、長屋 敦[1]、横田 一成[1]、中川 強[2]、○西村 浩二[2] ([1]島根大・生物資源、[2]島根大・総科セ・遺伝子、[3]国立成育セ研・薬剤治療研、[4]東京医歯大院・医歯総研)
Shuhei Kohata[1], Shohei Yoshida[2], Erika Matsunami[2], Junji Yamauchi[3,4], Mitsuo Jisaka[1], Tsutomu Nagaya[1], Kazushige Yokota[1], Tsuyoshi Nakagawa[2], ○Kohji Nishimura[2] ([1]Fac. Life Env. Sci., Shimane Univ., [2]Inter. Cent. Sci. Res., Shimane Univ., [3]Dept. Pharm., Nat. Res. Inst. for Chi. Heal. Dev., [4]Grad. Sc. Med. Dent. Sci., Tokyo Med. Dent. Univ.)

クラスリン被覆小胞（CCV）は、真核生物におけるトランスゴルジ網（TGN）や細胞膜（PM）の膜タンパク質、いわゆる積荷タンパク質を種々のエンドソームに輸送する役割をもつ。CCV の被覆タンパク質はクラスリントリスケリオンとアダプタータンパク質 AP 複合体からなる。AP 複合体には 5 つのサブタイプがあり、特有のタンパク質の輸送経路を担っている。AP 複合体は、CCV で運ばれる積荷タンパク質に存在する積荷認識配列（CRS）に結合して、積荷タンパク質を選抜する機能をもつことが広く知られている。植物の液胞貯蔵タンパク質（VSP）は特異的な受容体により小胞体から液胞へ輸送されるが、その受容体の 1 つに液胞選別受容体 VSR があり、AP により積荷タンパク質として認識される。本研究では、植物の CCV による小胞輸送経路における CRS の役割を解明するために、液胞選別受容体 VSR の CRS 変異体の細胞内局在とその相互作用因子を調べた。その結果、VSR 中にある、CCV 輸送の CRS であるチロシンモチーフが VSR を介する VSP の輸送に重要である事が示唆された。この発表では、AP 複合体による VSR の認識に対する特異性と VSR の輸送経路における CRS の役割について議論する。

BiFC, arabidopsis, membrane trafficking

発表責任者：西村　浩二（knishimu@life.shimane-u.ac.jp）

発表番号：4H031
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# *Populus trichocarpa* のオルト位水酸化酵素は caffeoyl CoA に対して触媒活性を示す

# *Ortho*-hydroxylases from *Populus trichocarpa* have a catalytic activity for caffeoyl CoA.

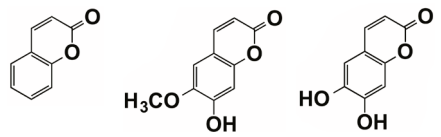
○稲葉 暁佳里、清水 文一（東洋大生命）
○Akari Inaba, Bun-ichi Shimizu (Toyo Univ.)

【背景】

クマリン化合物は植物の二次代謝産物で植物の生体防御に関わっている (図 1)。Scopoletin はシロイヌナズナで feruloyl CoA のオルト位が水酸化されることにより進行する。この鍵段階を触媒している酵素遺伝子 (*C2H*) はシロイヌナズナを含むいくつかの草本でクローニングされているが、木本では報告例が少ない。

2015 年度の農芸化学会大会で、我々はヤナギ科植物 *Populus trichocarpa* から *C2H* をクローニングしたことを報告した。そこでは、*C2H* として *PtC2H1* および *PtC2H3* 遺伝子配列を取得し、これらがコードするタンパク質は feruloyl CoA に対してオルト位水酸化活性を示した (図 2)。

本発表では、PtC2H1 および PtC2H3 の caffeoyl CoA に対する触媒活性を検討した。

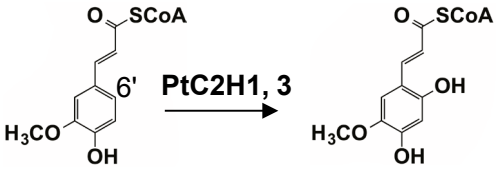



Coumarin　Scopoletin　Esculetin

図1 クマリン化合物

【結果】

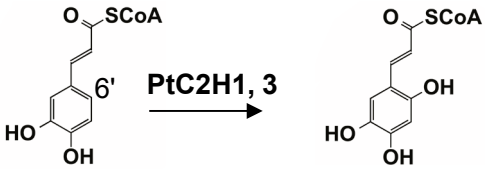
*P. trichocarpa* の樹皮のメタノール抽出物に対して、ポジティブモードで質量分析（LC/ESI-Q-TOF MS）を行った。その結果、2.4 分に *m/z*=179.0333 $[M+H]^+$ (calc. 179.0344: $C_9H_7O_4$) の esculetin 分子量関連イオンが検出された。またこのイオンの MS/MS 分析で、*m/z*=123.0408 $[M+H-2CO]^+$および *m/z*=133.0266 $[M+H-CO-H_2O]^+$ が主なフラグメントイオンとして検出された。これらは esculetin 標品のスペクトルと一致した。




Feruloyl CoA　6’-Hydroxyferuloyl CoA

図2 Feruloyl CoAに対する触媒反応

一方、caffeoyl CoA を基質として PtC2H1 および PtC2H3 の酵素反応液を HPLC にて分析した。その結果、反応生成物である 6'-hydroxycafferate および esculetin が検出された。このことから PtC2H1 および PtC2H3 は caffeoyl CoA に対してオルト位水酸化活性を示すことが明らかとなった (図 3)。




Caffeoyl CoA　6’-Hydroxycaffeoyl CoA

図3 Caffeoyl CoAに対する触媒反応

Caffeoyl CoA, *Ortho*-hydroxylases, *Populus trichocarpa*

発表番号：4H032
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 高温登熟乳白と酒米心白の生化学的比較解析による白濁化メカニズムの解明

# Clarification of chalking mechanism of rice grains by biological comparative analysis of chalky rice grain caused by high temperature and white core of Sake-brewing rice

○栗林 なな子[1]、佐々木 麻衣子[1]、鈴木 浩武[1]、流石 有紀子[2]、金古 堅太郎[2]、三ツ井 敏明[1,2]（[1]新潟大院、[2]新潟大）
○Nanako KURIBAYASHI[1], Maiko SASAKI[1], Hiromu SUZUKI[1], Yukiko SASUGA[2], Kentaro KANEKO[2], Toshiaki MITSUI[1,2] ([1]Grad. Sch. Niigata Univ., [2]Niigata Univ.)

イネの登熟期間中での高温ストレスは玄米外観品質の低下をもたらす。その一つが高温登熟乳白の発生である。玄米外観品質の低下は生産者の収入減、長期的には産地のブランドイメージを壊すことになりかねない。そのため高温登熟乳白の発生を抑制することが望まれている。一方で酒造好適米、いわゆる酒米には米粒の中心に白濁化した心白部位が存在する。この心白部位は通常温度で発生し、清酒造りに適した望まれる形質とされているが栽培環境や品種によって発現率が変化することが知られている。これまでに高温登熟乳白と酒米心白ともに発生要因を解明するための試みが行われてきているが、両者を比較した研究は無かった。本研究では高温登熟乳白と酒米心白の生化学的比較解析を行い、各々の白濁化メカニズムの解明を目指している。

白濁化した米は胚乳細胞に集積したデンプン顆粒間に生じた空隙で光が乱反射するため白く濁って見える。走査型電子顕微鏡によるデンプン顆粒の観察において、高温登熟乳白のデンプン顆粒は大きさや形が不均一で、デンプン顆粒の表面に分解されたような小さなクレーター状の穴が多数観察されたのに対し、酒米心白部位のデンプン顆粒は比較的大きさや形の揃った球状をしており、高温登熟乳白と酒米心白ではデンプン顆粒の大きさ、形状に違いが見られた。

ウエスタンブロット解析によって、デンプン生合成関連酵素の発現量を比較してみたところ、高温登熟乳白ではα - アミラーゼアイソフォームの発現が上昇していた。一方で、酒米では心白部位と無心白部位で顆粒結合型デンプン合成酵素（GBSS I）のデンプン顆粒への吸着性が異なっていた。

これらのことから高温登熟乳白はα - アミラーゼアイソフォームの発現が顕著に増加し、デンプン顆粒表面に多数の穴が見られたのではないかと考えられる。一方で、酒米心白では GBSS I の発現もしくは結合様式が変化している可能性がみられた。高温登熟乳白と酒米心白の発生要因は異なるが、共にデンプン生合成・分解酵素のバランス異常が白濁化をもたらしているのだろうと示唆された。

chalky rice grain, high temperature, Sake-brewing rice

発表番号：4H033
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アラビノガラクタンタンパク質前駆体に存在する GPI アンカー付加シグナルの意義
# Roles of GPI-anchoring signal in precursor to arabinogalactan proteins

○杉田 雄斗[1]、津野 雄平[1]、松岡 健[1,2,3,4] ([1]九大院生資環、[2]九大院農、[3]九大生環セ、[4]九大オルガネラセ)
○YUTO SUGITA[1], YUHEI TSUNO[1], KEN MATSUOKA[1,2,3,4] ([1]Kyushu univ. Grad. Sch. Bio-env. Sci., [2]Kyushu univ. Fac. Agr., [3]Kyushu univ. Biotron Appl. Ctr., [4]Kyushu univ. Organelle Ctr.)

タンパク質の翻訳後修飾として、糖鎖修飾、脂質修飾などが知られている。植物において、O-結合型の糖鎖修飾を受ける代表的なものとして、アラビノガラクタンタンパク（AGP）と呼ばれる細胞外マトリクスタンパク質が存在する。AGP は植物の生育や成長、プログラム細胞死、花粉管の伸長、シグナル伝達など様々な現象に関与していると考えられている。多くの AGP 前駆体は、シグナルペプチド、引き続く O-結合型糖鎖修飾モチーフが複数回繰り返された糖鎖付加ドメイン、及び C-末端に GPI-アンカーと呼ばれる糖鎖とリン脂質の複合体構造が付加されるために必要な配列を持つ構造をとる。タバコの AGP の一種である NtAGP1 はこの構造からなる典型的な AGP であり、他の GPI-アンカーを持つタンパク質と同様にこの構造を介して細胞膜に係留されていると考えられている。GPI-アンカーは小胞体で合成された後、タンパク質と結合し、生じた GPI-アンカー結合タンパク質はゴルジ装置を経由して細胞膜へと輸送され，またその一部は GPI-アンカーの切断により細胞外に放出されるが、AGP に GPI-アンカーが付加される意義については明らかにされていない。

そこで我々は、小胞輸送系において高速に輸送されるスポラミンをタグとして付加した NtAGP1 誘導体(SPO-AGP)、そこから GPI-アンカー配列を除去した（SPO-AGPΔC)、さらにコントロールとして使用するスポラミン単体（SPO）をタバコ培養細胞 BY-2 で発現させることで、AGP 前駆体への GPI-アンカーの付加が糖鎖修飾に影響を及ぼすかについて解析を進めている。まず、形質転換体懸濁培養中のタンパク質を SDS-PAGE により分離後、発現産物について坑スポラミン抗体を用いた免疫ブロッテイングにより解析を行った。SPO-AGP は分子量 15 万以上の位置にスメアに泳動されるバンドとして細胞と培地に共に検出され、一方 SPO-AGPΔC は分子量 10 万程度のスメアなバンドとして細胞と培地に、4 万程度のシャープなバンド及びスポラミン単体と同じ位置に泳動されるバンドとして細胞画分に検出された。このことから、GPI-アンカーの付加が起らないことが、糖鎖修飾に変化を引き起こすこと、また一部の GPI-アンカーが分解されることで SPO-AGP が培地に分泌されていることが示唆された。次いで、細胞分画法を用いてそれぞれの発現産物の細胞内局在を解析した.。SPO-AGP は 1,000 x g 遠心の沈殿、100,000 x g 遠心の沈殿び可溶性画分に回収されたが、10,000 x g 遠心の沈殿には回収されなかった。一方、SPO-AGPΔC の由来のポリペプチドは、そのフォームにより回収される画分が異なっていた。このことから、脂質修飾はタンパク質の輸送や局在に影響を及ぼすという可能性が考えられた。

arabinogalactan proteins, post-translational modification, protein transport

発表責任者：杉田雄斗（k.univer35@gmail.com）

発表番号：4H034
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ由来二量体型チロシル tRNA 合成酵素の機能解析

# Functional analysis of double-length tyrosyl-tRNA synthetase from *Arabidopsis thaliana*

○豊田 陽平[1]、川島 萌華[1]、佐賀 裕亮[1]、和田 美紀[2]、伊藤 耕一[3]、久城 哲夫[1]([1]明大農、[2]東大・医科研、[3]東大・新領域)
○Yohei TOYODA[1], MOEKA KAWASHIMA[1], YUSUKE SAGA[1], MIKI WADA[2], KOICHI ITO[3], TETSUO KUSHIRO[1] ([1]Meiji Univ., [2]Inst. Med. Sci., Univ. of Tokyo, [3]Univ. of Tokyo)

アミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)は、アミノ酸と tRNA を結合させるアミノアシル化反応を触媒し、タンパク質の翻訳で中心的役割を担っている。シロイヌナズナ由来の三種類のチロシル tRNA 合成酵素(TyrRS)の一つ At1g28350 は、全長と思われる配列がタンデムに 2 つ連結した特異な遺伝子構造を有している。このような配列を持つ TyrRS は他の生物種でも珍しく、アブラナ科の植物以外では線虫とトリパノソーマなどのキネトプラスト類のみで見つかっている。通常の TyrRS は分子間でホモダイマーを形成することで機能するが、この二量体型 TyrRS に関しては未知である。そこで、本研究では特異な配列を有するシロイヌナズナ由来の二量体型 TyrRS がどのように機能しているのかを検討した。本二量体型 TyrRS の前半部分の全長相当配列(TyrRS-1N)と後半部分の全長相当配列(TyrRS-2C)は 74％のアミノ酸配列同一性を有し、TyrRS に特徴的な配列モチーフは保存されている。そこで、この TyrRS の活性には 2 つの連結した配列が両方とも必要なのか、あるいは片方のみで活性があるのか、またその場合、もう片方はどのような働きを持っているのか、これらの点に関して検討を行った。

シロイヌナズナの cDNA から PCR 法により At1g28350 の全長相当配列ならびに TyrRS-1N と TyrRS-2C の三種類のコンストラクトを作製し、それらを出芽酵母の TyrRS 条件 KO 株に組み込み、それぞれの機能活性を検討した。なお、TyrRS-1N と TyrRS-2C 共にリンカー部位の配列(10 残基)は削除した。その結果、全長配列および TyrRS-2C では酵母の生育が確認され、TyrRS 活性を有していたが、TyrRS-1N では、酵母の生育が見られず、TyrRS 活性を有していなかった。このことから、シロイヌナズナ由来の TyrRS は、2 つの全長相当配列のうち TyrRS-2C 同士が分子間でダイマーを形成し、機能している、または分子内で疑似ダイマーを形成し、TyrRS-1N は補助的な役割のみを有していると考えられる。

今後、この二量体型 TyrRS が実際に分子内で疑似ダイマーを形成するのか、あるいは後半の TyrRS-2C 同士が分子間でダイマーを形成するのか等、検討を行っていく予定である。

amino-acyl tRNA synthetase, Tyrosyl-tRNA synthetase, *Arabidopsis thaliana*

発表責任者：久城　哲夫（kushiro@meiji.ac.jp）

発表番号：4H035
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# オジギソウ由来ミモシナーゼ及びシスタチオニン β-リアーゼの酵素学的・分子進化的比較

# Enzymatic and molecular evolutionary comparison of *Mimosa* mimosinase and cystathionine ß-lyase

○大貝 茂希[1]、屋 宏典[2]、福田 雅一[1] ([1]琉球大農、[2]琉球大熱生研)
○Shigeki OGAI[1], Hirosuke OKU[2], Masakazu FUKUTA[1] ([1]Ryukyu Univ., [2]Ryukyu Univ Comb.)

ミモシン(β-〔N-(3-hydroxy pyridone-4)-α-aminopropionic acid) は、熱帯・亜熱帯性マメ科植物であるギンネム (*Leucaena leucocephala*) とオジギソウ (*Mimosa pudica*) にのみ含まれる非タンパク質性アミノ酸である。ミモシンやその代謝産物である 3H4P (3-hydroxyl-4-(1H)-pyridone) は、周辺の植物や微生物、草食動物にアレロパシー作用を引き起こすことが知られている。ギンネム及びオジギソウは、ミモシンを分解し 3H4P、ピルビン酸およびアンモニアを生成する反応を触媒するミモシナーゼ(EC 3.5.1.61)という酵素を持っている。当研究室では、ギンネム・オジギソウの持つミモシナーゼや類似酵素の遺伝子を単離し、ミモシナーゼがメチオニン合成に必須の酵素であるシスタチオニン β-リアーゼ (CBL, EC 4.4.1.8) から、遺伝子重複を経て生じた酵素である可能性を明らかにした。CBL は炭素と硫黄の間の結合を切る C-S リアーゼに、ミモシナーゼは炭素と窒素の間の結合を切る C-N リアーゼにそれぞれ分類される。本研究では、オジギソウ由来ミモシナーゼ及び CBL の cDNA をクローニングし、組み換えタンパク質を作成し、酵素学的性質を解析した。

オジギソウ由来ミモシナーゼの最適 pH は 8.5~9.0、最適温度は 50℃であった。ミモシンを基質とした際の Km 値は $4.1\times10^{-3}$ M、$V_{max}$ は $7.5\times10^{-5}$ mol.s$^{-1}$.mg$^{-1}$ であった。L-シスタチオニンも基質として認識し、Km 値は $4.0\times10^{-4}$ M、$V_{max}$ は $2.3\times10^{-6}$ mol.s$^{-1}$.mg$^{-1}$ という値を示した。これはミモシンよりもシスタチオニンとの親和性が高いことを示している。オジギソウ由来 CBL の最適 pH は 8.5、最適温度は 50℃であった。L-シスタチオニンとの Km 値は $2.7\times10^{-4}$ M、$V_{max}$ は $2.1\times10^{-5}$ mol.s$^{-1}$.mg$^{-1}$ という値を示したが、ミモシンは基質として認識しなかった。

また、オジギソウ由来ミモシナーゼと CBL のホモロジーモデリングを行い、他の植物 CBL において完全保存されている基質結合ポケットを構築する 10 残基の比較を行うと、オジギソウ CBL では保存されていたが、ミモシナーゼは 4 つの残基が変異していた。これは、ミモシナーゼは 4 つの残基の変異によりミモシンを基質として認識できるようになったが、L-シスタチオニンを認識しなくなるまでには至っていないものと考えられる。これらの結果は、ミモシナーゼが CBL から進化した可能性を裏付けるものであると考えられる。

Mimosine, Mimosinase, Molecular evolution

発表番号：4H036
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ由来カロテノイド異性化酵素の探索

# Search for carotenoid isomerase genes from *Arabidopsis thaliana*

○川名 誠[1]、相馬 史幸[1]、小竹 英一[2]、都築 和香子[2]、長尾 昭彦[2]、川上 直人[1]、久城 哲夫[1] ([1]明大農、[2]農研機構食総研)
○Makoto KAWANA[1], Fumiyuki SOMA[1], Eiichi KOTAKE[2], Wakako TSUZUKI[2], Akihiko NAGAO[2], Naoto KAWAKAMI[1], Tetsuo KUSHIRO[1] ([1]Meiji Univ., [2]National Food Research Institute)

カロテノイドは動物、植物、微生物など様々な生物種に存在する天然色素で、8 個のイソプレン単位から成る炭素数 40 のテルペノイド骨格を持つ化合物群であり、その生理活性は光捕集、活性酸素除去、光傷害防御など多岐にわたることが知られている。植物においてカロテノイドの生合成経路は phytoene より lycopene を経て carotene が生成するまでの段階はほぼ共通であり、その後、様々な経路を経ることで多様なカロテノイドが生成する。なかでも、all-*trans* 型のカロテノイドから *cis* 型に異性化して生じる 9-*cis*-violaxathin などは、植物ホルモンであるアブシジン酸の前駆体となるなど重要なカロテノイドである。また、葉緑体において neoxanthin は 9'-*cis*-neoxanthin として存在している。近年、植物ホルモンであるストリゴラクトンの生合成経路の一部が解明され、β-carotene の 9 位二重結合を *trans* から *cis* に異性化する酵素遺伝子 *OsD27* がイネにおいて発見された。そこで、シロイヌナズナにおいて同様の *trans-cis* 異性化酵素遺伝子の探索と機能解析を行い、*cis* 型カロテノイドの生合成に関わる遺伝子の同定を試みた。

系統樹解析の結果より、シロイヌナズナのゲノム中には *OsD27* オルソログが 1 つと *OsD27* ホモログが 2 つ存在していることが明らかとなり、*OsD27* オルソログを *AtD27*、2 つの *OsD27* ホモログを *NCEI-1*,*NCEI-2* と命名した。これら 3 種類の遺伝子の全長配列をクローニング後、大腸菌の発現ベクターpMAL-c5X に導入し MBP との融合タンパク質として発現させた。発現誘導条件を種々検討した結果、3 種類とも可溶性タンパク質として良好に発現することが出来た。発現タンパク質をアミローストレジンを用いて精製後、調製した酵素液と β-carotene, all-*trans*-violaxanthin 及び all-*trans*-neoxanthin を加えて酵素アッセイを行った。ヘキサン-酢酸エチルを用いて生成物を抽出後、現在、HPLC を用いて生成物の解析を行っている。

carotenoid biosynthesis, *Arabidopsis thaliana*

発表番号：4H037
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナシグナルペプチドペプチダーゼの基質の探索と特異性の検証

# Investigation of Substrates required for intramembrane proteolysis by Arabidopsis thaliana signal peptide peptidase

○楠木 賢太[1]、星 雅子[1]、石丸 喜朗[1]、阿部 啓子[1,2]、朝倉 富子[1] ([1]東大院農生科・応生化、[2]神奈川科学技術アカデミー)
○ Kenta KUSUNOKI[1], Masako Hoshi[1], Yoshiro Ishimaru[1], Keiko Abe[1,2], Tomiko Asakura[1] ([1]Tokuo Univ., [2]KAST)

【目的】AtSPP(*Arabidopsis thaliana* signal peptide peptidase)は、小胞体膜に局在し、N 末端が小胞体内腔側に、C 末端が細胞質側に存在する 9 回膜貫通型プロテアーゼで、基質を膜内で加水分解し、生理活性を有するペプチドを放出する I-Clip ファミリーに属している。AtSPP のシロイヌナズナのノックアウト株は花粉管が伸長せず、受精障害のため致死になることが報告されている(Plant Physiol,149(3),1289-301,2009)。今回は、AtSPP の基質候補を探索し、生理機能を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】AtSPP の基質候補は花粉に発現し、膜貫通領域を有すると予想されるため、花粉特異的に基質候補を以下の通りに絞り込んだ。TAIR(The Arabidopsis Information Resource)を用いて、pollen と membrane を GO term に含むものとして 373 個を抽出した。Arabidopsis eFP Browser と SignalP を用いて、373 個のうち、シグナル配列を持ち花粉に発現し小胞体に局在する分子として 9 個が抽出された。そのうち ANX1(ANXUR1)と ANX2(ANXUR2)はホモログで、ANX1 と ANX2 のノックアウト株は花粉管の先端の破裂を引き起こし、花粉管が伸長しなくなることが報告されている(Current Biology 19,1327-1331,2009)。

基質候補のシグナル配列が AtSPP による切断を受けるかどうかを前年度大会で報告した酵母のレポーターアッセイ系で検証した。その結果、ANX1 は AtSPP による切断を受けないが、ANX2 は切断を受けることが確かめられた。

次に、AtSPP の切断に重要な箇所を特定するため、ANX1 と ANX2 の配列を基に ANX の変異体を作製し、AtSPP による切断の有無を同様のレポーターアッセイ系で検証した結果、シグナルペプチド配列の C 末端側に正電荷アミノ酸があること、膜貫通領域内にスレオニンやセリンなどのヘリックスブレーカーのアミノ酸が含まれないことによって AtSPP による切断を受けにくくなることが確かめられた。

さらに他の基質候補でもヘリックスブレーカーとなるアミノ酸をロイシンに置換すると、AtSPP の切断を受けにくくなることが確かめられた。この AtSPP の基質特異性の特徴は、HsSPP(Homo Sapiens SPP)で検証された基質特異性と類似の結果となった(Molecular Cell,10,735-744,2002)。

signal peptide peptidase, Arabidopsis thaliana, pollen

発表番号：4H038
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# モリンガ種子に含まれる多機能性タンパク質

# A multifunctional protein in *Moringa Oleifera* seeds

○桝谷 滉[1]、尾山 廣[1]、杉村 順夫[2] ([1]摂南大理工、[2]公益財団法人衣笠繊維研究所)
○ Hroshi MASUTANI[1], Hiroshi OYAMA[1], Yukio SUGIMURA[2] ([1]Setsudai Univ, [2]Kinugasa Research Foundation for Textile Science)

【目的】モリンガ(*Moringa oleifera*、和名：ﾜｻﾋﾞﾉｷ)はインド北部原産の熱帯性樹木植物である。我々は、モリンガ種子の水抽出液から、濁水中に浮遊する土壌粒子や微生物を凝集・沈殿させる濁水浄化タンパク質(MFP)を精製し、S サブユニット(SS)と L サブユニット(LS)からなる約 12-kDa の二量体タンパク質であることを明らかにした。一方、モリンガ種子には MFP のほかに、抗バクテリア活性、レクチン活性、キチン結合活性をもつタンパク質が存在し、これらのアミノ酸配列は LS のそれと類似することが報告されている。本研究では、モリンガ種子タンパクで検出されている諸活性機能と MFP との関連性を調べるために、MFP 試料と SS 及び LS 試料を用いて、これらの諸活性を測定した。
【方法】モリンガ種子の水抽出液から CM-Sepharose と SP-Sepharose のクロマトグラフィーにより MFP を精製した。また、SS と LS は、精製 MFP を還元条件下で CM-Sepharose により分離・精製し、諸活性を評価した。(1) 濁水浄化活性：人工土壌懸濁液に試料を混合した後の濁度低下率を測定した、(2) キチン結合活性：キチン粉末懸濁液に試料を添加した後、遠心分離した上清タンパクの濃度低下率を測定した、(3) 抗バクテリア活性：大腸菌、黄色ブドウ球菌、枯草菌を検定菌にペーパーディスク法で調べた、(4) レクチン活性：血球浮遊液と試料を混合後、血球凝集の有無を目視で判定した、(5) 酵素阻害活性：アミラーゼ(Amy)とキモトリプシン(Chy)に試料を混合後、残存活性から阻害活性率を算出した。
【結果・考察】MFP、SS、LS には濁水浄化及びキチン結合活性があった。濁水浄化活性は LS＞SS＞MFP の順に強く、キチン結合活性は MFP、SS、LS のいずれにも確認された。レクチン活性については、SS および LS には活性がなく、MFP には活性が検出された。MFP には抗バクテリア活性は検出されず、Amy、Chy の阻害活性もなく、むしろ、両酵素活性を上昇させたことから、酵素の安定化に寄与することが示された。これらの結果より、濁水浄化活性の作用部位が LS のアミノ酸配列中にあり、その活性は SS の付加により低下することが分かった。SS と LS にはレクチン活性がなく、MFP にのみ見られることから、ヘテロ二量体を形成することでレクチン活性を発現することが分かった。一方、キチン結合活性は、MFP、SS、LS の全てに見られたことから、SS と LS のアミノ酸配列中に結合作用部位があることが推察された。以上より、MFP は濁水浄化作用に加えて、他の活性を保持している多機能性タンパク質であることが明らかになった。

Functional protein, Water purification, Lectin

発表番号：4H039
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# Tobacco plants overexpressing UDP-Gal epimerase show Gal tolerance

○ TAYEBEH ABEDI[1], TOSHIHISA KOTAKE[2], NOBOKAZU TANAKA[1] ([1]Hiroshima Univ., [2]Saitama Univ.)

**Background:** Galactose has been known to be toxic to plant species, it inhibits root and hypocotyl elongation besides leaf expansion. This toxicity may result from galactose-1-phosphate accumulation generated by endogenous galactokinase after galactose uptake. Lignin is a rigid structural polymer in the secondary cell walls of specialized cell types. Previous studies reported that genes encoding lignin biosynthetic enzymes are induced by sugar signaling. In plants, conversion of galactose-1-phosphate to metabolisable glucose-1-phosphate requires the action of galactose-1- phosphate uridyltransferase converting galactose-1-phosphate to UDP-galactose and UDP-galactose epimerase (UGE) interconverting UDP-galactose (UDP-Gal) to UDP-glucose (UDP-Glc).

**Results:** To examine the influence of UGE2 overexpression on galactose resistance in tobacco, seedlings of *AtUGE2* transgenic lines and pBIN19 (control) ones were cultured in MS medium containing different concentration of Gal (0 to 15% Gal w/v). After 2 weeks their morphological characters in all Gal concentration, and lignification (Microscopic and histochemical staining techniques and thioglycolic acid quantification) in 0 and 0.4% Gal were analyzed. Shoot growth and root elongation on pBIN19 control were strongly inhibited from 0.4% Gal and finally completely suppressed on 4% Gal. However, *AtUGE2* transgenic lines grew normally on 0.4 to 8% Gal without any Gal toxicity, although root elongation decreased. Transgenic lines showed root tip necrosis and leaf chlorosis at 12% Gal and they completely died on 15% Gal. Lignin quantification showed amount of lignin in pBIN19 control increased about 4.3 folds on 0.4% Gal compared with 0% Gal. While lignin in transgenic lines showed no significant increase on 0.4% Gal compared with 0% Gal. Microscopic analyses exhibited similar visible results. It is likely that the conversion of UDP-Gal to UDP-Glc by AtUGE2 gave increased Gal resistance on transgenic tobacco plants. To certify our hypothesis, analysis of starch content in the *AtUGE2* transgenic plants is in progress.

Galactose, Lignin, Epimerase

発表責任者：Nobokazu Tanaka（ntana@hiroshima-u.ac.jp）

発表番号：4H040
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# CRISPR/Cas9 システムによる複合病害抵抗性遺伝子 *BSR1* のノックアウトイネ系統の作出
# Knockout of the broad-spectrum disease resistance gene *BSR1* using CRISPR/Cas9 system in rice.

○神田 恭和[1,2]、前田 哲[1]、鎌倉 高志[2]、森 昌樹[1]（[1]農業生物資源研究所、[2]東理大院・理工）
○ Yasukazu KANDA[1,2], Satoru MAEDA[1], Takashi KAMAKURA[2], Masaki MORI[1]（[1]NIAS, [2]Graduate School of Science and Technology, Tokyo Univ. of Science）

【目的】*BSR1*（*Broad-Spectrum Resistance 1*）はイネより単離された、複数の病害細菌及び病害糸状菌に対する抵抗性遺伝子である。病害抵抗性スクリーニングにおいて *BSR1* 過剰発現シロイヌナズナ系統がトマト斑葉細菌病菌とアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する抵抗性を示したことで見出された。*BSR1* を過剰発現させたイネは、白葉枯病菌といもち病菌に対する抵抗性が顕著に向上することが報告されていた。*BSR1* は 406 アミノ酸からなる受容体様細胞質キナーゼをコードしていた。既知の受容体様細胞質キナーゼには、シロイヌナズナの BIK1 のように防御応答においてシグナル伝達に関与するものが知られている。BSR1 も本来の機能として防御応答シグナル伝達に関与しており、過剰発現に伴うシグナルの増幅が病害抵抗性を向上させたのではないかと推測している。イネの本来有する病害抵抗性への BSR1 の寄与の検証を目的として、*BSR1* ノックアウトイネを作製し、病害抵抗性に与える影響を観察することを試みた。
【方法・結果】植物において高効率にノックアウト体を取得できる方法として、本研究では最近イネへの適用法が確立された CRISPR/Cas9 システムに注目した。CRISPR/Cas9 システムを利用して両アリルの *BSR1* コード領域の 5’末端付近に二本鎖切断を誘導し、非相同末端結合に伴うフレームシフト変異によって正常な BSR1 タンパク質の発現を失わせたホモノックアウト系統を作製することを計画した。CRISPR/Cas9 システムのオフターゲット効果を除いた *BSR1* ノックアウトの影響をみるために、標的配列を *BSR1* コード領域上に 3 か所設計した。これらの配列を標的とする CRISPR/Cas9 システムを野生型イネ（日本晴）に導入した形質転換体を取得し、ゲノムシーケンシングによって標的配列周辺の変異解析を行った。その結果、3 か所を独立に標的とした CRISPR/Cas9 システムについてそれぞれ 82.8%、95.0%、100.0%の形質転換体で両アリルの *BSR1* への標的配列特異的な挿入欠失変異が認められた。両アリルで同じフレームシフト変異をもつ形質転換体を *BSR1* ホモノックアウト系統として標的配列ごとに 2 系統以上選抜した。選抜した *BSR1* ホモノックアウト系統と日本晴イネとの間で生育に差はみられなかった。今回作出された *BSR1* ホモノックアウト系統について、今後 T1 世代の植物体を取得して病害抵抗性への影響を評価する予定である。

CRISPR/Cas9 system, disease resistance, rice

発表責任者：森昌樹（morimasa@affrc.go.jp）

発表番号：4H041
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# シロイヌナズナ HsfA2 を介した Hsf ファミリー の転写活性化機構の解析

# Molecular mechanism of Arabidopsis HsfA2-mediated transactivation

○川端 彬未[1]、田部 記章[2]、藪田 行哲[3]、田茂井 政宏[1,2]、重岡 成[1,2] ([1]近畿大院・農・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]鳥取大・農・生資環)
○Akimi KAWABATA[1], Noriaki TANABE[2], Yukinori YABUTA[3], Masahiro TAMOI[1,2], Shigeru SHIGEOKA[1,2] ([1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ., [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr. Kinki Univ., [3]Fac. Agr., Tottori Univ.)

【目的】これまでに、シロイヌナズナにおいて熱ショック転写因子 HsfA2 が光酸化的ストレスに迅速に応答すること、熱ショックタンパク質（HSP）などの防御遺伝子の発現を誘導することによるストレス耐性能獲得に寄与する重要な転写因子である事を明らかにしている（*Plant J.* 2006）。また、HsfA2 の発現はプロモーター領域に存在する熱ショックエレメント（HSE）を介して HsfA1d および HsfA1e により制御されること（*Plant Cell Physiol.* 2011）、さらに酸化的ストレスにより生じた活性酸素種に起因する 26S プロテアソームの不活性化は、細胞質に存在する HsfA1d-Hsp90 複合体の解離を引き起こし、解離した HsfA1d が核へ移行して HsfA2 の発現を誘導するシグナル伝達経路を提唱してきた（*Plant Cell Physiol.* 2010）。通常、Hsf の HSE への結合には三量体形成が重要であり、ヒトなどの脊椎動物の Hsf ファミリーはホモ/ヘテロ複合体を形成することでターゲット遺伝子の発現調節を行うことが明らかとなっている。植物では、トマトの HsfA1 と HsfA2 がヘテロ複合体を形成することでターゲット遺伝子の転写活性化を促進することが報告されている。シロイヌナズナ HsfA2 による転写制御にも他の Hsf ファミリーが関与することが明らかとされているが、転写活性化機構には不明な点が多く残されている。そこで本研究では、HsfA2 とクラス A Hsf ファミリーとの複合体系性能について解析した。

【方法・結果】HsfA2 の N 末端側に His x 6 タグを付加した遺伝子と HsfA1a、A1b、A1d、A1e、および A3 遺伝子を共発現ベクターへクローニングし、大腸菌へ形質転換した。リコンビナントタンパク質を His-trap アフィニティーカラムおよびゲル濾過カラムを用いて精製した結果、5 種類全てのクラス A Hsfs は HsfA2 と同時に精製されたことから、これらは *in vitro* でヘテロ複合体を形成することが明らかとなった。一般に、Hsf の複合体形成には、Hsf の中央付近に保存されている複合体形成ドメインが重要であると考えられている。そこで、クラス A Hsf ファミリーのアミノ酸配列を比較した結果、HsfA2 とこれら 5 種類の複合体形成ドメインに存在する疎水性アミノ酸の連続配列（HR-A/B）が高く保存されていた。一方で、同じクラス A Hsf ファミリーに属する HsfA4 や HsfA5 の HR-A/B 配列は、HsfA2 のそれと比較して保存性は低かった。現在、保存性の低い HR-A/B 領域を有する Hsf ファミリーと HsfA2 との複合体形成能解析している。さらに、これまでに HsfA2 と複合体を形成することが明らかになった HsfA1d の HR-A/B 配列を、HsfA5 の配列と入れ替えた際の複合体形成能を解析している。

heat shock factor, arabidopsis, interaction

発表番号：4H042
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 新規エフェクタータンパク質である植物病原細菌 *Acidovorax avenae* 由来 IPPT の機能解析

# Functional analysis of IPPT effector proteins from plant pathogenic bacteria, *Acidovorax avenae*

○鈴木 愛芽[2]、川口 雄正[2]、近藤 真千子[1]、蔡 晃植[1,2] ([1]長浜バイオ大・バイオ、[2]長浜バイオ大院・バイオ)
○ Aika Suzuki[2], Takemasa Kawaguchi[2], Kondo Machiko[1], Fang-Sik Che[1,2] ([1]Bio-Science, Graduate School of Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, [2]Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology)

植物病原細菌 *Acidovorax avenae* のシコクビエを宿主とする N1141 菌株をイネに接種すると過敏感細胞死などの植物免疫反応が誘導される。一方、イネを宿主とする K1 菌株をイネに接種するとイネは植物免疫反応を誘導することが出来ず、病徴が形成される。我々はこれまでに、*A. avenae* の菌株間に存在するこの様な特異的免疫反応誘導にこの菌の Type III 分泌装置を介して分泌されるエフェクタータンパク質が関与することを示した。そこで、このエフェクタータンパク質を同定するため N1141 菌株のトランスポゾン挿入変異体を作製したところ、*isopentenylpyrophosphate transferase* (*IPPT*)遺伝子にトランスポゾンが挿入された菌株がイネの過敏感細胞死誘導能を失っていることが明らかになった。そこで、N1141 菌株の *IPPT* 欠損株を作製し、イネに接種したところ過敏感細胞死誘導能が減少した。また、N1141 菌株の IPPT が実際に TypeIII 分泌装置を介してイネ細胞内に輸送されているかどうかを CyaA の融合タンパク質を用いて調べたところ N1141 菌株の IPPT は実際にイネ細胞内に輸送されることが示された。これらのことから、N1141 菌株の IPPT はイネ細胞内に輸送され、過敏感細胞死を誘導することが明らかとなった。興味深いことに、IPPT は K1 菌株にも存在し N1141 菌株と K1 菌株の IPPT 間には 350 アミノ酸のうち 13 アミノ酸の違いがあることがわかった。そこで、N1141 菌株と K1 菌株の IPPT をイネプロトプラスト内で一過的に発現させたところ、N1141 菌株の IPPT を発現させた場合には過敏感細胞死が誘導されたが、K1 菌株の IPPT は過敏感細胞死を誘導しなかった。さらに、K1 菌株の IPPT の機能を明らかにするため、K1 菌株の *IPPT* 欠損株を作製しイネに接種したところ、過敏感細胞死が誘導されることが示された。また、K1 菌株の *IPPT* 欠損株を宿主であるイネに接種したところ、病徴の縮小が認められた。以上のことから、K1 菌株の IPPT はイネ細胞内において植物免疫反応を抑制している可能性が示された。このような結果から、N1141 菌株と K1 菌株の IPPT は数個のアミノ酸配列の違いによってそれぞれ異なる機能を有することが明らかになった。

immune response, plant, effector

発表責任者：鈴木 愛芽（b111073@m.nagahama-i-bio.ac.jp）

発表番号：4H043
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# ヤマノイモ属のステロイドサポニン生合成に関わる CYP90B 遺伝子の機能解析

# Characterization of CYP90Bs involved in steroidal saponin biosynthesis of *Dioscorea* spp.

○宮地 陽香[1]、李 ヒョンゼ[1]、山村 理恵[1]、川崎 崇[1]、中安 大[1]、遠城 道雄[2]、杉本 幸裕[1]、水谷 正治[1] ([1]神戸大学院農、[2]鹿児島大農)
○Haruka Miyachi[1], Hyoung Jae Lee[1], Rie Yamamura[1], Takashi Kawasaki[1], Masaru Nakayasu[1], Michio Onjyo[2], Yukihiro Sugimoto[1], Masaharu Mizutani[1] ([1]Grad. school of Agric. Kobe Univ., [2]Kagoshima Univ.)

ステロイドの 3 位水酸基にオリゴ糖が結合したステロイドサポニンは、様々な生理活性をもつ天然の界面活性剤である。ヤムイモとして知られるヤマノイモ属（*Discorea* spp.）の塊茎にはステロイド薬剤の合成原料として利用されるステロイドサポニンのジオシンが多量に含まれている。これらのステロイドサポニンはコレステロール（CHR）に由来し、酸化反応や糖転移反応などの連続的な修飾により生合成される。我々の先行研究により、CHR の酸化反応に関わる P450 遺伝子として De90B1, De90B2, De90B3 が同定された。これら 3 種の De90B はシロイヌナズナのブラシノステロイド（BR）22*S*位水酸化酵素である DWF4 (CYP90B1)と高い相同性を示し、組換え酵素を用いた in vitro 酵素アッセイの結果、De90B1 は 16*ß*,22*S*位水酸化酵素、De90B2 は 22*R*位水酸化酵素で共にジオシン生合成に関わっており、De90B3 は 22*S*水酸化酵素で BR 生合成に関わると推定された。そこで本研究では、シロイヌナズナ *dwf4* 矮性植物体を用いた *in vivo* 実験によって De90B 遺伝子の機能をより確実なものにすることを目的とした。MS 培地で 23℃、16 時間明条件下で育てた *dwf4* 変異体を各 De90B の酵素反応生成物である 16ß, 22*S*-diOH-CHR、22*R*-OH-CHR、22*S* –OH-CHR を含む MS 液体培地に移し、ロータリーシェイカーを用いて 4 日間 120 rpm で振とう培養した。22*S*-OH-CHR を添加した *dwf4* 変異体では表現型が回復したのに対して、16ß, 22*S*-diOH-CHR および 22*R*-OH-CHR を添加した場合、*dwf4* の矮性表現型は回復しなかった。この結果より De90B3 が *DWF4* オルソログ遺伝子であり、De90B1, De90B2 は BR 生合成経路には関与しないホモログ遺伝子であることが示唆された。現在、シロイヌナズナの *dwf4* 変異体を用いて、Floral Dip 法により De90B1, De90B2, De90B3 を過剰発現する形質転換植物の作成を進めている。

steroidal saponins, P450, *Arabidopsis thaliana*

発表番号：4H044
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# アブラナ科植物の葯タペート組織で見られるヘテロクロマチン化の免疫組織化学的解析

# Immunohistochemical analysis of tapetum-specific heterochromatin formation in Brassicaceae

○川又 奨[1]、木本 剛彰[2]、岩野 恵[3]、高山 誠司[2]、柴 博史[1]([1]筑波大・院生命環境、[2]奈良先端大・バイオサイエンス研究科、[3]大阪大・工学研究科)
○Tasuku KAWAMATA[1], Takaaki KIMOTO[2], Megumi IWANO[3], Seiji TAKAYAMA[2], Hiroshi SHIBA[1] ([1]Graduate School of Life and Environmental Sciences, The University of Tsukuba, [2]Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology, [3]Graduate School of engineering,Osaka Univ.)

【背景・目的】

タペート組織は葯壁の最も内側に存在する一層の細胞で、形成中の小胞子または花粉粒に接し、花粉の形成や稔性に重要な役割を果たす事が知られている。このタペート組織は多核化が確認されること、また花粉の成熟に伴い崩壊することが知られているが、そのメカニズムは未だ不明である。最近、演者らのグループでは、アブラナ科植物 *Brassica rapa* の葯を用いた免疫組織化学染色により、崩壊前のタペート組織でヒストン H3K9 のジメチル化が見られることを明らかにしている。

本演題では、タペート組織で観察されるヒストン H3K9 のジメチル化の分子機構を調べ、細胞死あるいは多核化との関係を明らかにする事を目的として、同じアブラナ科植物に属しゲノム情報や変異体リソースが充実しているシロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）でも *B. rapa* と同様、タペート組織のヘテロクロマチン化が見られるかどうか確認した。

【方法と結果】

シロイヌナズナは *B.rapa* と同様に細胞死や多核化が観察されることが知られている。そこでタペート組織崩壊直前の時期に相当する花粉一核期の葯を用いてシロイヌナズナ葯切片を作成し、免疫染色を行ったところ、タペート組織特異的なヒストン H3K9 のジメチル化が観察された。さらに、タペート組織特異的なヘテロクロマチン形成が葯発達段階のどの時期から起こるのかを明らかにするために、花粉四分子期から三核期における葯についても免疫染色を行ったところ、タペート組織が正常な状態にある四分子期からタペート組織崩壊直前に相当する花粉一核期にかけては、タペート組織特異的なヒストン H3K9 のジメチル化が観察されたものの、タペート組織の崩壊が見られる花粉二核期以降ではヒストン H3K9 のジメチル化は観察されなかった。また、タペート組織周辺の葯壁細胞や花粉粒ではその様なヒストン H3K9 のジメチル化は観察されなかった。一方、ユークロマチン化の指標となる抗アセチルヒストン H3K27 抗体を用いて、同様に葯発達段階に沿った免疫染色を行ったところ、初期の小胞子でヒストン H3K27 のアセチル化が観察されたものの、それ以外の細胞では顕著なユークロマチン化は観察されなかった。

Tapetum, Heterochromatin, epigenetics

発表番号：4H045
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# RNA-seq 解析によるサツマイモ不定根原基形成機構の解明
# Transcriptomic profiling of sweet potato associated with adventitious root formation

○伊藤 茜[1]、田部 記章[2,4]、田茂井 政宏[1,2,4]、横田 明穂[3,4]、重岡 成[1,2,4]（[1]近畿大・院・バイオ、[2]近畿大・農・バイオ、[3]奈良先端大・先端科技推進セ、[4]JST, CREST）
○Akane Ito[1], Noriaki Tanabe[2,4], Masahiro Tamoi[1,2,4], Akiho Yokota[3,4], Shigeru Shigeoka[1,2,4]（[1]Dept. Adv. Biosci., Grad. Sch. Agr., Kinki Univ, [2]Dept. Adv. Biosci., Fac. Agr. Kinki Univ., [3]Front. Sci. Tech. Promo. Ctr., NAIST, [4]JST, CREST）

【目的】サツマイモはシンク能力が高く、バイオマス増産のための重要な作物である。光合成産物を蓄積する器官である塊根は不定根が肥大したデンプン貯蔵組織であり、不定根原基の発達はまず太さを、ついで長さと太さを増す。また、同じ節から遅れて出る原基は早めに最大径に達し、根長は短いことから塊根へ成長することは少ない。つまり、塊根を形成するための不定根原基の数は初期に決定し、塊根分化に際して重要な因子となる。しかし、これまでにゲノム未解読のサツマイモを用いてこの段階における遺伝子発現解析を行った例はほとんど報告されていない。そこで本研究はバイオマス増産サツマイモ作出のために、次世代シーケンサーを用いて不定根形成時に発現誘導される遺伝子を網羅的に解析した。
【方法・結果】人工気象室内（14 時間/10 時間　明期/暗期、400 µmol photons $m^{-2}$ $s^{-1}$、28℃）で水耕槽を用いて栽培したサツマイモ（*Ipomoea batatas* (L.)Lam. cv.*Kokei14*）の茎および不定根原基を含む節より抽出した total RNA から cDNA ライブラリーを作成し、Illumina Hiseq を用いて遺伝子発現比較解析を行った。リードデータを用いて Trinity を用いた de novo transcriptome アセンブルを行い、総 2 億 2 千コンティグ長、平均 869 bp からなる約 25 万のコンティグを得た。Trinity により出力された推定 Transcript に対し BLAST 検索によって各遺伝子のアノテーションを行った。その結果、茎と比較して節での発現が 2 倍以上高い 6219 コンティグを得た。また、節での発現が最も高い 100 遺伝子には他の植物における胚発生や細胞肥大に関するホモログが多数存在しており、このことはサツマイモにも他の植物同様の胚発生機構が保存されていることを強く示唆する。また、50 遺伝子は他の植物の既知遺伝子と相同性を示さず、この中にはサツマイモ特有の不定根形成に関与するものが含まれていることを示唆した。次に、半定量的 RT-PCR によって、RNA-seq 解析より得られた 39 の節高発現遺伝子の発現量を再検討した。その結果、39 遺伝子中 22 遺伝子に関して不定根原基での発現が茎より高いことを確認した。現在これらの遺伝子の完全長 cDNA を取得し、シロイヌナズナに導入することで、それぞれの遺伝子の根の生育に及ぼす影響を解析している。今後、ジャガイモもしくはサツマイモを用いて、塊茎、塊根形成因子を同定する。

sweet potato, RNA-seq, root formation

発表番号：4H046
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 形質転換ゼニゴケにおける外来遺伝子の発現に対する 5'-UTR の効果

# Effect of the 5'-untranslated region on the expression of transgene in liverwort, Marchantia polymorpha

○竹村 美保、長屋 進吾、木田 遥（石川県大・資源研）
○Miho TAKEMURA, Shingo NAGAYA, Haruka KIDA (Ishikawa Pref. Univ.)

ゼニゴケは、最近になって形質転換系が確立され、ゲノムプロジェクトも進むなど、コケ植物（苔類）のモデル植物として注目されている。またゼニゴケは、高等植物にはない代謝産物を蓄積しており、独自の代謝経路を有している。我々は、このような特徴を生かし、ゼニゴケを用いた物質生産を行っているが、高い生産性を持つ形質転換ゼニゴケを作出するためには、より高効率の遺伝子発現系の構築が必要である。

植物に外来遺伝子を導入し発現させる場合、CaMV 35S プロモーターが広く用いられており、ゼニゴケにおいても 35S プロモーターが用いられることが多い。これまでに我々は、ゼニゴケ培養細胞を用いた一過的発現アッセイによって、ゼニゴケの ADH-like glucose dehydrogenase (*MpUDP*)遺伝子の 5’非翻訳領域(5’-UTR)を 35S プロモーターに付加することによって、外来遺伝子の発現を増強できることを明らかにしている。そこで、形質転換ゼニゴケにおいても、*MpUDP* 5’-UTR が外来遺伝子の発現を強めることができるか調べた。

方法としては、オゴノリ由来のシクロオキシゲナーゼ(*GvCOX*)遺伝子をゼニゴケに導入し、*GvCOX* 遺伝子の mRNA および GvCOX 活性の分析を行った。具体的には、*GvCOX* 遺伝子の上流に 35S プロモーター、下流に NOS ターミネーターを連結したゼニゴケ形質転換用ベクターpBCKH-p35S-GvCOX、ならびに、35S プロモーターと *GvCOX* の間に *MpUDP* 5’-UTR 配列を連結したベクター pBCKH-p35SU-GvCOX を作成した。さらに、*MpUDP* 5’-UTR と *GvCOX* の境界部分の *Bam*HI サイトを除去したベクターpBCKH-p35SUGvCOX を作成した。次に、これらのベクターをアグロバクテリウム感染法によりゼニゴケに形質転換した。得られた複数の形質転換体について解析した結果、*GvCOX* 遺伝子の発現量は pBCKH-p35SU-GvCOX > pBCKH-p35S-GvCOX > pBCKH-p35SUGvCOX の順に高い傾向が見られたが、GvCOX 活性は pBCKH-p35SU-GvCOX > pBCKH-p35SUGvCOX > pBCKH-p35S-GvCOX の順に高い傾向が見られた。これらの結果から、35S プロモーターのみの場合、mRNA は蓄積するが、翻訳が効率よく行われていないことが考えられた。それに対して、*MpUDP* 5’-UTR を付加すると、翻訳が効率よく行われ、GvCOX の活性が上昇することがわかった。また、*MpUDP* 5’-UTR と *GvCOX* の連結の仕方によって、活性が異なることがわかった。以上のことから、*MpUDP* 5’-UTR の付加は、形質転換ゼニゴケにおける外来遺伝子の発現を増強させるが、連結の仕方が重要であることが明らかとなった。

5'-UTR, transgene expression, liverwort

発表番号：4H047
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 遺伝子多重改変に対応したイネ用の新規ゲノム編集ベクターおよびインキュベーターを用いた簡便な高密度水耕栽培法

# A novel binary vector for genome editing of rice and a versatile idea for high-density crop hydroponics in a plant incubator

○黒田 昌治[1]、山口 知哉[1]、山川 博幹[1]、池永 幸子[2]([1]農研機構・中央農研、[2]農研機構・東北農研)
○Masaharu Kuroda[1], Tomoya Yamaguchi[1], Hiromoto Yamakawa[1], Sachiko Ikenaga[2] ([1]NARO Agric. Res. Cent., [2]NARO Tohoku Agric. Res. Cent.)

ゲノム編集技術は、ゲノム上の特定部位の配列を設計通りに改変することを可能とし、今後の農作物育種のキーテクノロジーとなるものである。そこで我々は、この技術をイネ研究に導入するべく、以前に開発した制限酵素のみで遺伝子多重連結ができるバイナリーベクター[1]を基盤として、新規なイネ用ゲノム編集ベクター（TALEN版とCRISPR/Cas版）を作製した。これらは最小限の手順でベクター構築が出来るよう設計されており、かつ複数の標的遺伝子の改変にも対応しうる構造となっている。

次に、GFPを過剰発現するイネ（コシヒカリ）を作出し、それから誘導したカルスに上記ベクターを利用したGFP破壊コンストラクトを導入して機能評価を行った。その結果、選抜時間の経過とともにGFP蛍光が消失した形質転換カルス数が増大し、それらの塩基配列を調べたところ、確かにGFP遺伝子が破壊されていた。以上から、我々が作製したベクターを用いてコシヒカリのような実用品種のゲノム編集ができることが示された。なお、破壊効率はCRISPR/Casのほうが高く、ベクター構築の容易さ考え合わせると、今後の研究にはCRISPR/Cas版ベクターがより有望と判断した。現在はCRISPRベクターを用いて1ないし数種のイネ内在性遺伝子の破壊を試みており、その結果を取りまとめて報告する。

一方で、作物は植物体が大きくて種子の収穫まで時間がかかるため、ゲノム編集研究を行うには隔離温室等の設備的ハードルが研究発展の阻害要因となる。そこで我々は、簡便に植物体を高密度に水耕栽培する方法(Single-tube hydroponics）を開発した[2]。元々イネ用に開発した本方法は、ダイズやアズキ等の畑作物にも適用できる汎用性があり、インキュベーターあたりイネで288個体、ダイズで72個体を設置できる。また、汎用型のインキュベーターと汎用機材を用いる省力・低コストの設計となっていることから、ゲノム編集研究をはじめとした基礎研究全般に極めて有用である。栽培方法をより理解いただくために、当日は実際に栽培した植物をポスター前に展示する予定である。

[1]Kuroda M.(2010) Biosci. Biotechnol. Biochem.74, 2348-2351 [2] Kuroda M.(2015) Biosci. Biotechnol. Biochem.79, 63-67

rice, genome editing, hydroponics

発表責任者：黒田昌治（kurodama@affrc.go.jp）

発表番号：4H048
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# トマト新品種作出に有用な DNA マーカーの探索ならびにその活用

# Search of Convenient DNA Markers for Creating New Cultivar of Tomato and Its Application

平岡 幸浩[1]、大畑 宏史[1]、○吉金 優[2]([1]井上石灰工業（株）、[2]高知大土佐 FBC)
Yukihiro HIRAOKA[1], Hirofumi OOHATA[1], ○Yu YOSHIKANE[2] ([1]Inoue Calcium Corp., [2]Kochi Univ.)

【目的】ミニトマト新品種‘スウィーティア’は、「涙」の形をした特異な果実形態を有する特徴をもつ。現在、この形を活かしたミニトマト新品種の作出を目指している。そこで、‘スウィーティア’果実の形態形成に関与する遺伝子マーカーを探索し、活用することを目的とした。
【方法・結果】データベースなどを活用し、果実の形質に関係する遺伝子として、*ovate* と *sun* の 2 種類をマーカー候補として選抜した。*ovate* は塩基置換による Ovate タンパク質機能抑制、*sun* はレトロトランスポゾン挿入による Sun タンパク質の発現量増加により、トマトの形質に影響を与えることが知られている。そこで、さまざまな形を有する 30 品種のミニトマトを供試試料として、ゲノム DNA を調製し、PCR 法を用いて *ovate* と *sun* の遺伝子型の分布を調べた。その結果、30 品種は 7 つのグループに分類された。なかでも、‘スウィーティア’は、ゲノム DNA 中に *ovate* の塩基置換および *sun* のレトロトランスポゾン挿入が認められ、他の 29 品種とその遺伝子型パターンが完全に異なっていた。以上より、上記 2 遺伝子マーカーは、ミニトマト果実形状に関する DNA マーカーとして、幼苗段階での選抜に応用できることが期待された。

続いて、その実用性を試験するため、‘スウィーティア’純系の選抜に適用させた。この選抜には、選択性を向上させるために、上記 DNA マーカーに加えて、トマトの選抜 DNA マーカーとしての応用が文献で示唆されている病害に対する抵抗性遺伝子 4 種類（タバコモザイクウイルス、葉カビ病、黄化葉巻病 2 種類）を加えた。また、調査項目は、子孫の遺伝子型および果実形態調査に加えて、果実の市場適応性も考慮して果実重量、糖度も調査した。全ての子孫で *ovate* の塩基置換および *sun* のレトロトランスポゾン挿入が認められ、‘スウィーティア’と同じ形状を示した。このことは、この 2 遺伝子を解析することにより、ミニトマトの新品種作出に適用可能であることが分かった。その他の遺伝子型に関して、*ovate* とタバコモザイクウイルス抵抗性遺伝子の変異パターンが連鎖した。葉カビ病抵抗性に関わる遺伝子型では抵抗性ホモ、ヘテロ、罹病性ホモが存在し、残りの黄化葉巻病に関する 2 つの遺伝子型は全ての株で罹病性ホモを示した。このことから、遺伝的に葉カビ病抵抗性の分離株を得ることができた。果実品質は 6 遺伝子型のパターンと相関が無かったが、約 7%の総合的に優良な株の選抜に成功した。

以上より、*ovate* および *sun* の遺伝子を解析することで、‘スウィーティア’の特異な果実形態を有するトマトを選抜することが可能となり、新品種作出に適用可能であることが分かった。

Tomato, DNA marker, Breeding

発表責任者：吉金　優（yoshikane@kochi-u.ac.jp）

発表番号：4H049
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# 公共データベースを利用した栽培品種シソのトランスクリプトーム解析

# Global analysis of cultivar green Perilla (Perilla frutescens) using the public database

○谷垣 悠介[1]、東 孝信[2]、福田 弘和[1,3] ([1]大阪府大院・工、[2]大阪府大院・生命、[3]JST さきがけ)
○Yusuke TANIGAKI[1], Takanobu HIGASHI[2], Hirokazu FUKUDA[1,3] ([1]Grad. Sch. Eng. Osaka Pref. Univ, [2]Grad. Sch. life and Env. Sci. Osaka Pref. Univ, [3]JST PRESTO)

【諸言】農業現場において付加価値の高い作物を安定的に生産することは、商業として重要である。しかし、従来の農業手法における有用成分の増大や効率的な育成手法は、従事者の経験に基づいており、それを安定的に増大させることは、環境変動の影響などから困難であった。つまり、正確な生体情報、栽培環境が与える影響の把握が重要である。これらを解決する有効な手法として網羅的な遺伝子発現解析、代謝産物解析がある。しかし、これら網羅的解析には、専門的知識、技術が必要とされ、その結果を栽培現場に迅速に還元するといった、商業を見据えた解析やその迅速な手法の開発は、まだまだ発展途上である。さらに農業現場で栽培されている植物は非モデル植物である栽培品種であり、網羅的な解析に必要な分子情報が充実していない。そこで本研究では、網羅的な遺伝子発現解析を行うにあたり、種の類似性に着目し公共データベースにある植物データを用い解析を行った。解析対象は、栽培品種であり食用、薬用として栽培されている青シソを対象とした。

【方法】発芽処理した青シソは Deep Flow Technique (DFT) hydroponic システムに定植し、光条件は 12-h light:12-h dark で LED と蛍光灯で栽培した。定植後 7、14、35 日目に葉と根に分けてサンプリングし網羅的遺伝子発現解析を行った。網羅的な遺伝子発現解析の参照配列は JGI database から取得した全 45 種の植物体データを使用し、マッピングデータは Expectation Maximization (RSEM) software で定量化したものを用いた。

【結果】シソの網羅的遺伝子発現解析の結果、多くの遺伝子について遺伝子情報を推定することができた。遺伝子発現量は栽培期間ごとに推移しており、LED と蛍光灯でそのパターンは異なっていた。その遺伝子発現量の推移を GO 解析でクラスタリングした結果、LED と蛍光灯、地上部と地下部でその推移は異なっており、蛍光灯地上部では発現量が変化しないか減少する遺伝子が多く、地下部では増加する遺伝子が多かった。しかし、LED では蛍光灯と同様の傾向は認められなかった。また、この遺伝子発現量の推移を代謝経路に注目し解析したところ、フェノームとの相関性が認められると考えられる経路が複数存在していた。これらのことは、公共データベースの情報と遺伝子の類似性を用いた栽培品種の網羅的遺伝子発現解析であっても、生体内情報を取得できること示している。

cultivar, transcriptome analysis, agriculture

発表責任者：谷垣悠介（tanigaki.bio@gmail.com）

発表番号：4H050
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア H

# イネ種子プロテインボディタイプ I 内部の特定部位へのワクチンモデル抗原の局在化に関する研究
# Controlling the localization of the vaccine model antigen in the specific region of rice seed protein body type I

○佐生 愛[1]、大西 真耶[1]、齊藤 雄飛[1]、重光 隆成[1]、森田 重人[1,2]、増村 威宏[1,2]（[1]京都府立大学・生命環境、[2]京都府農技セ・生資セ）
○Ai SASOU[1], Maya OHNISHI[1], Yuhi SAITO[1], Takanari SHIGEMITSU[1], Shigeto MORITA[1,2], Takehiro MASUMURA[1,2] ([1]Kyoto Pref. Univ., [2]Kyoto Pref. Agri., Forestry and Fisheries Technol. Res. Center)

【研究背景と目的】

感染症を予防するための新たなアプローチとして，形質転換植物を用いた粘膜免疫用経口ワクチンの開発が進められている．しかし，胃酸や消化酵素の分解作用からワクチン抗原を保護し免疫原性を保ったまま，粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達させるのが困難であった．そこで本研究では，イネ種子タンパク質顆粒の一種であるプロテインボディタイプI（PB-I）に着目した．PB-Iは，プロラミン分子種が層状構造を形成しており，ヒトの消化管では難消化性であることをこれまでに明らかにした．また，分子種の異なる各プロラミンのプロモーターと成熟ポリペプチド配列を利用することで，GFPをPB-I内部の最外周層や中間層，中心部に局在させることに成功している．

PB-Iを経口ワクチン用のキャリアーとして利用するため，本研究ではワクチン抗原として広く用いられているコレラ毒素Bサブユニット（CTB）をレポーターとして用い，PB-I内部における局在性を明らかにすることを目的とした．

【材料・方法と結果】

PB-I内部の最外周層に局在する13b-2プロラミン，中間層に局在する13a-1プロラミン，中心部に局在する10 kDaプロラミンとCTBとの融合タンパク質をそれぞれのネイティブプロモーター制御下で発現する遺伝子組換えイネ（13b-2P-CTB，13a-1P-CTB，10kP-CTB）を作出し，$T_2$種子を用いてCTBの蓄積量と局在部位について解析を行った．

各種プロラミン-CTB系統のイネ種子から抽出したタンパク質とリコンビナントCTB（rCTB）を用いたウエスタンブロット法を行った．その後，バンド強度を数値化することにより，CTB量を算出した．その結果，総タンパク質に対するCTBの割合は13b-2P-CTB系統では0.83%，13a-1P-CTB系統では1.34%，10kP-CTBでは6.67%であった．また，各系統のイネ種子より樹脂切片を作製し，抗CTB抗体と16 kDaプロラミン抗体を用いた免疫蛍光顕微鏡観察を行ったところ，13b-2P-CTB系統ではPB-Iの最外周層に，13a-1P-CTBではPB-Iの中心付近にCTB抗体が反応した．10kP-CTB系統ではPB-Iの形態が小型の不定形の顆粒状に変形しており，CTB抗体はこの顆粒に均一に反応した．この形態観察の結果は，免疫透過型電子顕微鏡を用いても同様であった．今後，本研究で解析したイネ種子が経口ワクチンとして利用可能であるかを検証するため，小動物を用いた投与実験を行う必要があり，準備を進めている．

protein body, prolamin, cholera toxin B subunit

発表責任者：増村威宏（masumura@kpu.ac.jp）

発表番号：4I001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリアⅠ

# 脂質ラフトの機能解明に向けた光反応性ガングリオシドプローブの開発

# Development of photoaffinity ganglioside probes for the investigation of the function of lipid raft

○河村 奈緒子[1,2]、鈴木 健一[2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Naoko KOMURA[1,2], Kenichi SUZUKI[2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】細胞膜上の GPI アンカー型受容体や三量体 G 蛋白質、膜貫通蛋白質などのシグナル分子受容体は脂質ラフトに局在してスフィンゴ糖脂質やコレステロールと相互作用することが知られており、この相互作用が細胞の分化、接着、シグナル伝達などの多くの事象に深く関与すると考えられている。我々はスフィンゴ糖脂質の中でもガングリオシド GM3 及び GM1 がラフトの主要な構成成分（=ラフト分子）であることに着眼し、ガングリオシドとシグナル分子受容体の相互作用を明らかにしたいと考えている。本研究では、その解析手法として光反応性標識法[1]を採用し、化学合成した光反応性プローブを用いてガングリオシド GM3 及び GM1 に会合するシグナル分子受容体を検出することを目的とした。
【結果】光反応性基(Trifluoromethylphenyl diazirine 基)含有 Biotin をガングリオシドのシアル酸 9 位へ導入した光反応性 GM3 及び GM1 を標的分子として設計した。そこで、これらの標的分子の合成に向け、シアル酸 9 位水酸基を TFA アミド基で置換したシアリルガラクトース共通中間体を合成した。この中間体から GM3 合成に向けた二糖供与体及び GM1 コア四糖供与体へそれぞれ誘導した後、グルコシルセラミドの導入によりそれぞれのガングリオシド骨格を構築した。続いて保護基を除去し、シアル酸 9 位アミノ基へ別途合成した光反応性基含有 Biotin を導入することにより目的化合物の合成を達成した。さらに、合成した分子のラフト分配特性を DRM 分配実験[2]により評価した結果、これらの光反応性プローブが天然のガングリオシドと同様に高いラフト高親和性を示すことを確認したので報告する。

[1] A. Singh, E. R. Thornton, F. H. Westheimer, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3006-3008.
[2] A. K. Kenworthy, B. J. Nichols, C. L. Remmert, G. M. Hendrix, M. Kumar, J. Zimmerberg, J. Lippincott-Schwartz, *J. Cell Biol.* **2004**, *165*, 735-746.

lipid raft, ganglioside, photoaffinity probe

発表責任者：河村　奈緒子（komura@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# シアロ糖鎖の効率的合成に向けた 5-Ureido 型シアル酸供与体の開発

# Development of Neu-5-ureido donors for the efficient synthesis of sialoglycans

○棚瀬 舞子[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Maiko TANASE[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

シアロ糖鎖の化学合成を指向した場合、シアリル化反応における立体制御や煩雑な精製工程が大きな課題である。本研究ではこれらの課題を克服し、効率的かつ実用的なシアロ糖鎖合成法の確立を目指し、新規シアル酸供与体の開発を行うこととした。本研究における鍵反応は、「α-シアロシドのみを特異的に分離可能とするラクタム化反応」であり、これにより反応混合物からα-体を単一化合物として容易に取り出すことができる。しかし、ラクタム化の際にアシル系保護基が脱離してしまうという合成戦略上深刻な課題が残されていた。

本研究では、5 位に Ureido 基を有するシアル酸供与体を新たに設計、合成することでラクタム化におけるアシル基の脱離を抑制しようと考えた。実際に、設計した新規供与体をグルコース受容体と縮合反応に供することでα-シアロシド、β-シアロシド、シアル酸 2,3-ene 体の混合物が得られた。それらを比較的温和な条件下でラクタム化反応に供することでα-シアロシドのみをラクタム体として単離した。この際、狙い通りアシル基の脱離は見られず、従来の課題を克服することに成功した。これは、シアル酸の 5 位に Ureido 基があることで、従来法とは異なる機構でラクタム化が進行するためである。アミンを遊離させた後にラクタム環を形成する従来法とは異なり、本手法では初めにラクタム環の形成が起こり、その後 Ureido が 2-オキサゾリジノンとして脱離することでアシル系保護基に影響を与えることなく目的のラクタム体が得られる。また、Ureido 基を有するシアル酸供与体によるシアリル化の検討も行った。5 位に Ureido 基を有するシアル酸供与体はこれまでに報告例がないため、シアリル化反応における反応性や立体選択性に関する知見がない。そこで、本研究では水酸基の保護基、反応溶媒、反応温度、活性化剤などの条件検討を行い、5-Ureido 型シアル酸供与体を用いたシアリル化反応の最適条件を模索した。その結果、-80 ℃、プロピオニトリル溶媒中、活性化剤には IBr および AgOTf を用いる条件が最適であることを見出した（収率 80%, α/β = 10.3/1)。また、異なる受容体を用いてシアリル化を行った結果、二級水酸基に対しても良好な立体選択性を示すことがわかった。

sialoglycan, glycosylation, lactamization

発表責任者：今村彰宏（aimamura@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 脂質ラフトの一分子イメージングに向けた GPI アンカープローブの合成研究

# Development of GPI-anchor probe useful for single molecule imaging of lipid raft

○小西 美紅[1,2]、鈴木 達哉[1,2]、パル リタ[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Miku KONISHI[1,2], Tatsuya SUZUKI[1,2], Rita PAL[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】機能性細胞膜ドメインである脂質ラフトは、シグナル伝達、細菌やウイルスの感染等に密接に関わっている。我々はラフト分子の離合集散を一分子観察法により直接観察することで、脂質ラフトの形成機構及び脂質ラフトを介したシグナル伝達の仕組みの解明を目指している。GPI アンカー型受容体の一種である CD59 は、細胞外のシグナル分子との結合によってクラスターを形成し、そこにガングリオシドやコレステロールが集積することで、ラフトを構築する。また CD59 クラスターは、拡散運動と STALL と呼ばれる一時停留を繰り返し、STALL 時に細胞内へのシグナル伝達が行われることが知られている[1]。その際に共役して働くガングリオシドの挙動を解明するため、これまでに我々は、糖鎖末端に蛍光分子を導入したガングリオシドプローブの開発に取り組んできた。本研究では、ガングリオシドと共局在する GPI アンカーに着目し、GPI アンカープローブの合成を目指した。
【結果】GPI アンカーは、ホスファチジルイノシトールにグルコサミン残基とマンノース 3 残基が結合した直鎖構造から成る。まず、1 位水酸基をアリル基、3 位、4 位水酸基をブタンジアセタール基で保護したマンノースを共通ユニットとし、立体選択的なグリコシル化反応によりα結合を介したトリマンノシド骨格を構築した。続いて、Bruzik らの手法[2]に従いスピロケタール形成による光学分割を経て、*myo*-イノシトール受容体を合成した。得られたイノシトール受容体と 2 位にアジド基を有するグルコサミン供与体を縮合反応に供した後、イノシトール 1 位水酸基が遊離のグルコサミニルイノシトール誘導体へと変換した。次に、ホスホロアミダイト法を用いて、イノシトールへグリセロリン脂質を導入し、グルコサミン 4 位を遊離の水酸基にすることで、グルコサミニルホスファチジルイノシトール受容体を合成した。この受容体に対し、トリマンノシド供与体を作用させることで、GPI アンカー骨格の構築に成功した。続いて、還元末端側マンノース 2 位水酸基にエタノールアミンリン酸を、非還元末端マンノース 6 位水酸基にシステインがアミド結合したエタノールアミンリン酸をホスホロアミダイト法により導入した後、保護基の脱保護を行うことで、GPI アンカー脱保護体の合成を達成した。さらに、末端に位置するシステイン残基のチオール基に対し、蛍光分子の導入を検討した。本発表では、これらの詳細について報告する。

[1] K. G. N. Suzuki, *et. al. J. Cell Biol*. **2007**, *177*, 717−730.
[2] K. S. Bruzik, *et. al. Carbohydr. Res*. **1989**, *195*, 67−73.

lipid raft, GPI-anchor, phosphoramidite

発表責任者：小西美紅（konishi@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

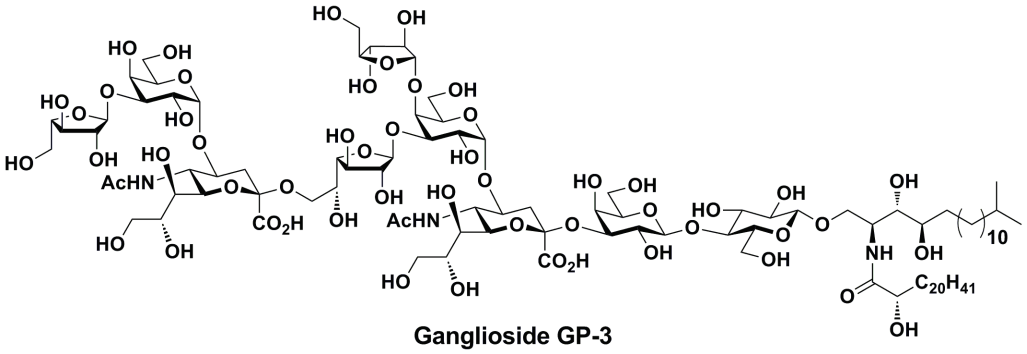
# イトマキヒトデ由来ガングリオシド GP-3 の全合成

# Total synthesis of ganglioside GP-3 isolated from *Asterina pectinifera*

○後藤 健太[1]、澤 真希[1]、玉井 秀樹[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Kenta GOTO[1], Maki SAWA[1], Hideki TAMAI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】ヒトデやナマコなどの棘皮動物に由来するガングリオシドは特異な修飾を受けたシアル酸を有するものが多く、その多くは強力な神経突起伸展活性を示すことが明らかとなっている。その構造と神経突起伸展活性の相関を解明することにより、神経疾患に対する治療薬が開発できるのではないかと期待されている。当研究室では構造活性相関の解明に向け、棘皮動物ガングリオシドの合成に取り組んでいる。イトマキヒトデから単離されたガングリオシド GP-3 [1]は、これら棘皮動物ガングリオシドの中でも、特に複雑な構造を有している。その特徴としては、糖鎖内部に二つのシアル酸残基を有していること、それらのシアル酸 4 位がα–ガラクトピラノシル化を受けていること、特殊な分岐構造をもつガラクトピラノースを有することなどが挙げられ、その構造の複雑性から GP-3 は未だに全合成が達成されていない。そこで本研究では、糖鎖合成化学における新たな一歩となることを期待し、複雑奇異な構造を有する GP-3 の全合成を行うこととした。

【方法・結果】本研究では GP-3 を、非還元末端側四糖、還元末端側四糖、グルコシルセラミドの各ユニットに分け、収斂的に合成することとした。シアリル化反応においては、新規の 4,7,8-*O*-CAc-Neu5*N*Troc 供与体を用いることで高収率かつα選択的に各種二糖を得た。さらに、それらの CAc 基の除去及び 7,8-*O*-isopropylidene 化を行うことで受容体へと誘導した後、それぞれを立体選択的に内部 Galα(1-4)Neu 配列を有する四糖構造へと導いた。次に、各四糖を受容体と供与体に変換した後、グリコシル化反応に供することで高収率にて八糖骨格を得ることに成功した。最後に、グルコシルセラミドカセットアプローチによる脂質部分の導入及び脱保護を行うことにより、GP-3 の全合成を達成した。




[1] R. Higuchi *et al. Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 462-463.

ganglioside, total synthesis, echinoderms

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# *Ogataea minuta* 由来 endo-β-*N*-acetylhexosaminidase の変異酵素の解析

# Analysis of mutant endo-β-*N*-acetylhexosaminidase from *Ogataea minuta*

○喜多島 敏彦[1]、賈 元苓[1]、高 暁冬[1]、千葉 靖典[2] ([1]江南大学・生工学院、[2]産総研・創薬基盤)
○Toshihiko Kitajima[1], Yuanling Jia[1], Xiao-dong Gao[1], Yasunori Chiba[2] ([1]Jiangnan Univ., [2]AIST)

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ（ENGase, EC 3.2.1.96）は *N* 型糖鎖のコア部分の *N*-アセチルグルコサミン間のグリコシド結合を加水分解する酵素である。中でも Cazy データベースで GH85 ファミリーに分類される幾つかの ENGase は *N* 型糖鎖の加水分解のみならず、糖鎖の複合糖質への転移反応も触媒することから、ネオグライコプロテインの調製や糖タンパク質の糖鎖部分の均一化、さらには薬物により修飾された糖鎖の導入といったバイオ医薬品生産における利用が期待されている。ENGase の産業利用を目的としてこれまで *Mucor hiemalis* 由来の ENGase（Endo-M）における糖転移反応機構が詳細に解析されており、加水分解反応を抑えつつ、且つ糖転移反応を優位に進める変異体も単離されている。一方、ENGase の基質糖鎖の認識機構については不明な点も多く、目的とするタンパク質へ転移する糖鎖の構造は酵素が本来有している基質特異性に依存するところが大きい。本研究では Endo-M と同様に、高マンノース型、混成型、複合型のいずれの *N* 型糖鎖に対して加水分解活性及び糖転移活性を示す *Ogataea minuta* 由来の新規 ENGase（Endo-Om）を対象として、立体構造モデルに基づいて作成した変異体の生化学的解析を行うことで基質糖鎖認識機構の解明を目指した。

GH85 ファミリーの中ですでに結晶構造が明らかとなっている *Arthrobacter protophormiae* 由来の ENGase (Endo-A) を鋳型として、Endo-Om の活性ドメインの構造をホモロジーモデリングで構築した。さらにピボットモデリング法で基質糖鎖（$Man_3GlcNAc_2Asn$）がドッキング可能な場所を空間的に探索することで、Endo-Om の酵素-基質複合体モデルを得た。その結果、295 番目のトリプトファン残基（Trp-295)は *N* 型糖鎖のコア部分のα1,3 結合したマンノースと相互作用していることが示唆された。そこで Trp-295 に変異を加えた酵素の各種ピリジルアミノ化糖鎖に対する反応性を確認したところ、W295F や W295Y で観測された加水分解活性が W295A、W295E、W295Q のいずれにおいても見られなかった。以上の結果は Trp-295 とα1,3 結合したマンノースの疎水性相互作用を示すものでる。加えて Trp-295 は Endo-M など複合型糖鎖を認識する ENGase においてのみ保存されていることから、ENGase による複合型糖鎖の認識に深く関わっていることが示唆された。また興味深いことに、W295F の比活性は高マンノース型や複合型のいずれの糖鎖に対して野生型よりも高かった。同様の結果は RNaseB やトランスフェリンといった糖タンパク質を基質とした場合でも得られた。ENGase による加水分解反応と糖転移反応の触媒残基は共通なことから、W295F の糖転移活性も同様に上昇していることが予想され、より効率よく糖転移反応を行うために有用な変異体として利用されることが期待される。

Endo-β-*N*-acetylhexosaminidase, Oligosaccharide recognition, Protein modeling

発表責任者：喜多島敏彦（kitajima@jiangnan.edu.cn）

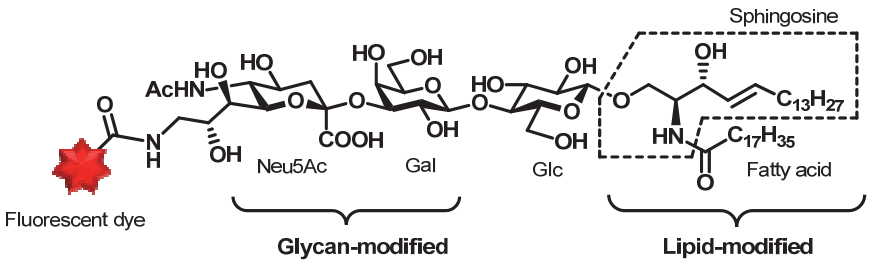
発表番号：4I006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 脂質ラフトの一分子観察に向けた脂質および糖鎖変換型蛍光 GM3 プローブの合成と機能評価

# Synthesis and characterization of lipid- and glycan- modified ganglioside GM3 probes for the single molecule imaging of lipid raft

○山崎 彩乃[1]、河村 奈緒子[1,2]、鈴木 健一[2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大、[2]京都大・iCeMS)
○Ayano YAMAZAKI[1], Naoko KOMURA[1,2], Kenichi G. N. SUZUKI[2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】
脂質ラフトとは、細胞膜上に存在するメソスケールの機能性ドメインであり、シグナル伝達や膜輸送において重要な役割を担っている。我々は、ラフト形成機構および機能解明を一分子観察法で行う上で必要となる蛍光プローブの開発を進めている。これまでに、脂質ラフト構成分子であるガングリオシド GM1、GM3 をはじめとする様々な糖脂質蛍光プローブの合成を行ってきた。本研究では、脂質ラフトへの集積に関与すると示唆されている糖鎖間および脂質間相互作用の詳細研究を進めるために、糖鎖部分および脂質部分の構造を変換した GM3 蛍光アナログの合成を行い、一分子観察により性質の比較を行うこととした。
【方法・結果】
本研究で合成する GM3 アナログは、これまでの蛍光 GM3（天然型）の機能評価の結果を踏まえ、標識位置をシアル酸 9 位に設定した。糖鎖変換型 GM3 蛍光アナログの合成は、N-Troc-Neu-Gal[1]を出発物質とし、各々の部分構造を換えた Neu-Gal 供与体へと誘導した後、共通の Glc-Cer 受容体と縮合反応させることで合成を行った。脂質変換型 GM3 蛍光アナログのファイト型については、新規スフィンゴシン供与体の開発、飽和型については、合成の終盤の PMB 基の脱保護と同時にオレフィンの還元を行うことで合成を行った。また、昨年度大会[2]にて合成結果を報告した脂肪酸の長さを換えた脂質変換型 GM3 アナログの一分子観察を行った結果、脂質の長さの違いが分子同士の集合に影響を与えることが明らかとなった。




[1] (a) *Tetrahydron Lett*. **2003**, *44*, 6883-6886. (b) *Glycoconjugate J*. **2006**, *23*, 329-343.
[2] 日本農芸化学会 2015 年度大会 3D34p11

ganglioside, lipid raft, single molecule imaging

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 糖供与体の反応性に及ぼす遠隔置換基効果の詳細検証

# Detailed examination of remote substituents effect on the reactivity of glycosyl donors

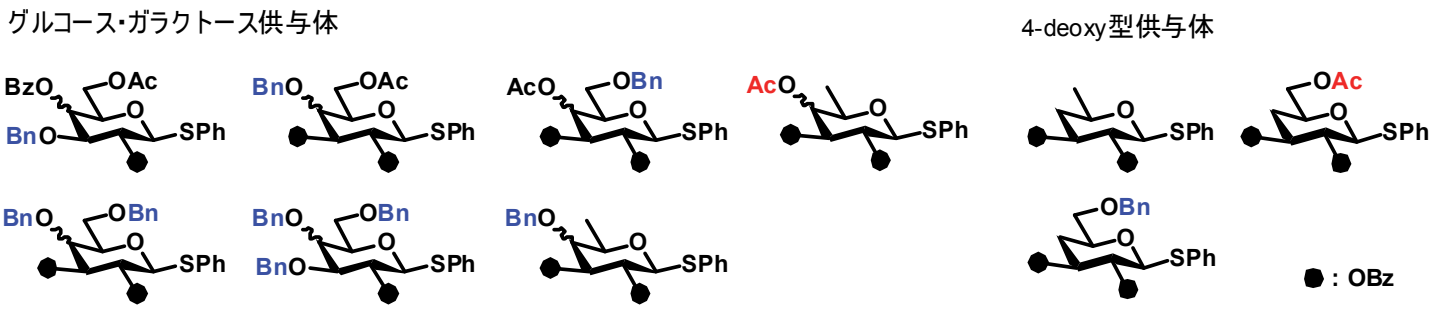
○堀 綾香[1]、小西 美紅[1,2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曾 真[1,2] ([1]岐阜大学、[2]iCeMS)
○Ayaka HORI[1], Miku KONISHI[1,2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景・目的】

グリコシル化反応は糖鎖合成の成否を左右する鍵反応であり、反応に影響を与える要因は数多く存在する。標的となる糖鎖の合成を達成するため、糖供与体及び受容体の反応性を調整することは非常に重要であり、これまで供与体の反応点であるアノマー位に隣接する置換基の影響がよく研究されている。一方、遠隔位の置換基に関する研究は少なく、その知見は乏しい。そこで当研究室では遠隔置換基に関心を持ち、種々の保護基を有する供与体の反応性を調べている。本研究では、種々の供与体の反応性を検証し、遠隔置換基が及ぼす影響を知ると共に、その詳細な作用機構の解明を目的としている。

【方法・結果】

2 位水酸基を Bz 基で統一し、Bn 基、Ac 基、Bz 基のいずれかを遠隔位(3、4、6 位)に導入したグルコース及びガラクトース供与体を合成し、競合グリコシル化反応に供することで、各供与体の反応性の差を比較した。その結果、グルコース・ガラクトース間で遠隔位に同じ保護基を有する場合でも顕著な反応性の違いが見られ、4 位の立体配置及び 6 位の優先配座が反応性に影響を与えることを示唆した。また、4 位及び 6 位をデオキシ化した各供与体を用いることで、酸素原子の有無が反応性に与える影響を検証した。これら各競合グリコシル化反応の結果の詳細と反応性差に関しての考察を報告する。




Glycosylation, Glycosyl donor, Remote substituents

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# バイオレイヤー干渉法による糖鎖-タンパク質相互作用解析の検討

# Examination of carbohydrate-protein interaction analysis by biolayer interferometry

○小川 淳矢[1]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]（[1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS）
○Junya OGAWA[1], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2]
([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【背景】ガングリオシドなどの生理活性糖鎖の機能解明の手段として、それらの糖鎖を認識するレクチンなどのタンパクとの水素結合・疎水結合などの相互作用の強さを調べることは大変有用であり、これまでも様々な手法を用いて、糖鎖–タンパク質相互作用解析が行われてきた。最近注目されている手法に、バイオレイヤー干渉法（以下 BLI）がある。これは、バイオセンサー上端から照射される白色光干渉波の波長シフトの大きさにより、相互作用強度を測定する手法である。BLI の特徴は、サンプル量が 4 μL と少量で解析が可能であること、SPR で解決の難しい試料の屈折率・流速変化による干渉波への影響が少ないこと、また非結合分子などが含まれる混合試料の測定が可能であることが挙げられ、本手法により相互作用解析の汎用性の向上が期待されている。BLI を用いた様々な生理活性物質の相互作用研究の報告が増えてきており、糖鎖–タンパク相互作用解析においては、糖鎖分子量 1500～10000 の比較的分子量が大きい化合物を用いた研究が行われてきている[1)]。しかし、BLI を用いた低分子量の生理活性糖鎖（分子量：500~1000）の相互作用解析は例がない。本研究では、有機化学的手法により合成された構造が均一で純度の高い低分子量の生理活性糖鎖とそれを認識するレクチンとの相互作用解析の実験系の確立を目的としている。

【方法・結果】ストレプトアビジン（以下 SA）バイオセンサーを用いた実験系では、センサーチップに末端ビオチン標識合成糖鎖を固定化し、タンパクとの結合評価を行った。その結果、SA とタンパクとの非特異的結合が顕著にみられた。タンパクに比べ分子の大きさが小さい低分子の糖鎖を固定化したことにより、SA 表面の露出が容易な環境であったことが考えられる。これらの結果より、SA バイオセンサーは $K_D$ 値算出などカイネティクス解析に適当ではないことがわかった。

一方、アミンリアクティブ（AR2G）バイオセンサーを用いた系では、活性化剤 WSC/NHS によるセンサーチップ表面のカルボン酸の活性化、アミド結合による末端アミン合成糖鎖の固定化を行い、タンパクとの結合評価を行った。その結果、バイオセンサーとタンパクとの非特異的結合をほぼ抑制することに成功した。また、カイネティクス解析に向けたバイオセンサーへの固定化用糖鎖溶液濃度の最適化、生理活性糖鎖に存在するカルボン酸含有糖鎖活性化抑制のためのバイオセンサー活性化剤の洗浄・除去ステップの導入による構造の正しい均一な糖鎖の固定及び固定量の安定化を実現した。

[1)] W. Lian *et al*. *Biochimica et Biophysica*. **2013**, *1830*, 4681-4691.

Biolayer interferometry, Carbohydrate-protein interaction, Organic synthesis

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

DDS を指向したシアリルルイス X ミミック修飾リポソームの合成と機能評価
Synthesis and Evaluation of Novel Sialyl Lewis X mimic coated Liposomes as Drug Carrier for DDS

○大山 龍太郎[1]、植木 章晴[1,2]、Johan Unga[3]、樋口 ゆり子[3]、川上 茂[3]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰浩[1]、石田 秀治[1]、山下 富義[3]、橋田 充[2,3]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS、[3]京都大・薬)
○Ryutaro Ohyama[1], Akiharu Ueki[1,2], Unga Johan[3], Yuriko Higuchi[3], Shigeru Kawakami[3], Hiromune Ando[1,2], Akihiro Imamura[1], Hideharu Ishida[1], Fumiyoshi Yamashita[3], Mitsuru Hashida[2,3], Makoto Kiso[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS, [3]Kyoto Univ.)

【目的】薬剤送達システム（DDS）は、標的とする患部へと薬剤を高効率で送達することが可能であり、その中でもがんや肝臓病などの難病への治療法として非常に有用である。近年、我々は、糖鎖修飾リポソームを利用した DDS 法の開発を行なっており、肝細胞表面上の各種糖受容体を標的とする糖鎖修飾リポソームの合成、および選択的な取り込み作用の評価を行なってきた。[1)] また、マイクロバブルへの超音波照射により引き起こされるバブル崩壊（キャビテーション）を利用した、超音波応答性ナノバブルリポソームへの応用にも取り組んでいる。さらに、炎症性サイトカインにより血管内皮細胞上に発現誘導される E-セレクチンを標的分子とした DDS 法として、その特異的リガンドであるシアリルルイス X (sLe$^X$) 糖鎖エピトープを利用した、sLe$^X$ 修飾リン脂質の合成、糖鎖修飾リポソームの調製、及び炎症モデルにおける糖鎖修飾リポソームの E-セレクチンに対する特異的結合能の評価を行ってきた。今回、我々は sLe$^X$ 修飾リン脂質の合成の簡便化、更なる機能向上を目論み、新たな糖鎖修飾リポソームの開発を行った。E-セレクチンに対し、高い活性を示す GSC150 をモチーフとして、内部の *N*−アセチルグルコサミンをグルコースに、末端のシアル酸を酸性置換基へと変更し、構造を単純化した新規 sLe$^X$ -ミミック修飾リン脂質を合成した。また、それを用いた糖鎖修飾リポソームの調製、及び炎症モデルにおける糖鎖修飾リポソームの E-セレクチンに対する特異的結合能の評価を行った。

【方法】リンカーを導入したラクトースにフコースを結合させ、三糖共通中間体とした後、スズアセタールを用いた反応を利用し、ガラクトース 3 位に酸性置換基を導入し、三糖エピトープを合成した。続くリンカー導入、カップリング反応により sLe$^X$ -ミミック-PEG-DSPE の合成を達成した。さらに、これを用いて蛍光標識を導入したリポソームを調製しその結合能を評価した。HUVEC 細胞を TNF-α 及び IL-1β で処理し、そこに PEG リポソーム、sLe$^X$ 修飾リポソーム、新規 sLe$^X$ -ミミック修飾リポソームを投与したところ、糖脂質の含有量に依存して結合量が増加することが明らかとなった。この結果から新規 sLe$^X$ -ミミック修飾リポソームは炎症性サイトカインにより発現した E-セレクチンに対し特異的結合能を有していることが示唆された。

1) Ueki, A.; Un, K.; Mino, Y.; Yoshida, M.; Kawakami, S.; Ando, H.; Ishida, H.; Yamashita, F.; Hashida, M.; Kiso, M. *Carbohydr. Res.* **2015**, 405, 78-86

glycolipid, glyco coated liposomes, sialyl Lewis X epitope

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 脂質ラフトの一分子観察に向けた蛍光ラクトシルセラミドの合成

# Synthesis of fluorescent Lac-Cer probes for the single molecule imaging of lipid raft

○山口 英利子[1]、河村 奈緒子[1,2]、鈴木 健一[2]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、楠見 明弘[2]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○ Eriko YAMAGUCHI[1], Naoko KOMURA[1,2], Kenichi G. N. SUZUKI[2], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Akihiro KUSUMI[2], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】細胞膜上に存在するスフィンゴ糖脂質、コレステロール、タンパク質などは、必要に応じて集合・分散し、脂質ラフトと呼ばれる集合体を形成する。近年、この脂質ラフトが、シグナル伝達や膜輸送などの動的な現象に深く関与していることが明らかになってきた。ガングリオシドは脂質ラフトを構成する重要なスフィンゴ糖脂質の一つであり、その糖鎖構造に基づく特異的な膜分子間相互作用が、脂質ラフトの形成と機能制御に密接に関係していると考えられている。その相互作用を明らかにする方法として、膜分子一つの挙動を直接観察する一分子観察法が有力であり、我々はガングリオシドの一分子観察により、ラフトの形成機構及び機能解明を目指している。本研究では、様々なガングリオシドの基本骨格であり、重要なラフト関連糖脂質の一つであるラクトシルセラミド（Lac-Cer）の一分子観察用の蛍光プローブの合成を目的とした。
【結果】これまでの蛍光ガングリオシドの研究より、ラフト構成分子としての機能を保持するためには、ラフト形成の足場となる脂質部分と蛍光標識の距離を確保する必要があることが明らかとなっている。そこで、ガングリオシドよりも糖鎖が短い Lac-Cer を適切に標識するために、糖鎖末端の水酸基へトリエチレングリコールスペーサーを介して蛍光を導入することとした。これに基づき、本研究では標識位置の候補を末端水酸基である Gal3 位または Gal4 位に設定して二種類の蛍光 Lac-Cer を合成し、ラフト分子としての性質を検証することとした。二種類のプローブを合成するにあたり、蛍光標識は合成の最終段階でアミド結合により導入することとし、蛍光標識導入に向けて、末端が $NH_2$ 基のスペーサーを標的水酸基に導入させた Lac-Cer の合成を目指した。合成において最も重要な段階は、Gal3 位及び Gal4 位への位置選択的なスペーサーの導入であるが、スズアセタールを経る位置選択的アルキル化反応を利用することで、Gal3 位及び Gal4 位へスペーサーを導入した Gal 中間体を合成した。その後はそれぞれを糖供与体へと導き、Glc-Cer 受容体との縮合反応を行い、Lac-Cer 骨格を合成した。さらに、保護基の除去、アミド化によるスペーサー末端への蛍光標識の導入を行い、目的化合物である蛍光 Lac-Cer プローブの合成を達成した。また、合成した蛍光 Lac-Cer プローブを用いて生細胞での Lac-Cer の分子挙動を一分子観察法により解析したので、この結果も報告する。

Lac-Cer, lipid raft, single molecule imaging

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

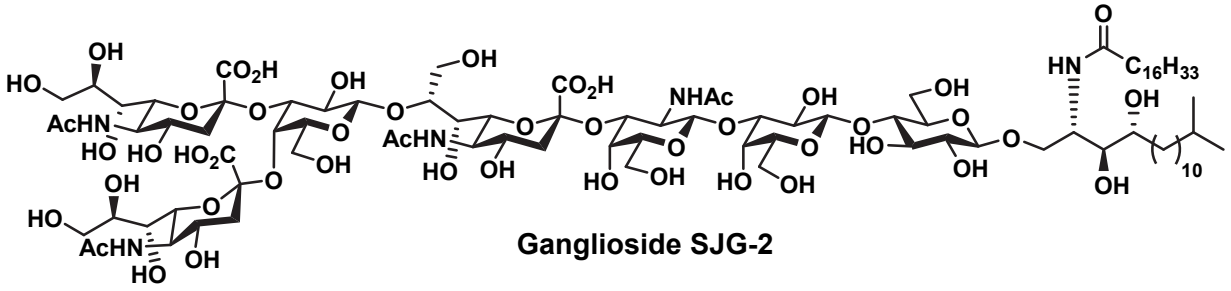
発表番号：4I011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# マナマコ由来ガングリオシド SJG-2 の全合成研究

# Study on the total synthesis of ganglioside SJG-2 from *Stichopus japonicas*

○真野 寛之[1]、大山 龍太郎[1]、坂本 紘一[1]、安藤 弘宗[1,2]、今村 彰宏[1]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2] ([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Hiroyuki MANO[1], Ryutaro OHYAMA[1], Koichi SAKAMOTO[1], Hiromune ANDO[1,2], Akihiro IMAMURA[1], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]iCeMS)

【目的】ガングリオシドは分子内にシアル酸を含むスフィンゴ糖脂質の総称であり、細胞の分化・増殖・細胞間認識・免疫といった複数の生命現象に関わっている生体分子である。近年、棘皮動物から様々なガングリオシドが発見され、それらが神経細胞モデルであるラット副腎髄質由来褐色細胞 PC12 に対して強い神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、医薬品のシード化合物として注目されている。本研究では、これまでに調べられた棘皮動物由来ガングリオシドの中でも最も強い神経突起伸展活性を示したマナマコ由来ガングリオシド SJG-2 [1]に着目し、全合成を目指した。
【方法・結果】ガングリオシド SJG-2 の七糖骨格を非還元末端三糖、還元末端側三糖、グルコシルセラミドの三ユニットに分けて合成を進めることとした。非還元末端三糖はガラクトース 3、4 位に嵩高いシアル酸二残基が結合しているという他に類を見ない特異な構造を有している。本研究では合成が困難と予想されるこの特異な三糖構造の構築を最初に検討することとした。結果として、シアリルガラクトースから誘導した 1,5-ラクタム型シアリルガラクトースユニットを糖受容体として用いることでα優先的に 3,4-ジシアリルガラクトース骨格を合成することに成功し、さらにこの三糖を糖供与体へと誘導することに成功した。次に還元末端側三糖の構築を検討した。SJG-2 は末端三糖のガラクトース 1 位水酸基が還元末端側三糖のシアル酸 8 位に結合している。そのため、シアル酸 8 位水酸基の反応性並びに末端三糖の嵩高さから縮合反応を行う際に反応性の低下が予想される。そこで、還元末端側三糖のシアル酸において 8 位水酸基の反応性向上を期待し 1,5-ラクタム型へと変換を行った。最後に合成した非還元末端三糖、還元末端側三糖を縮合反応に供し非還元末端六糖骨格を構築した。現在は、六糖供与体への変換を試みている。




[1] M. Kaneko, F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, R. Higuchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1004-1008.

gandlioside, echinoderm, synthesis study

発表責任者：安藤弘宗（hando@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 低分子型シアロ糖鎖クラスターの合成とウイルス架橋形成能評価

# Synthesis of tetravalent sialo-glycocluster as cross-linker against MCV-LP

○尾形 慎[1]、小野田 崇司[1]、朴 龍洙[2]、碓氷 泰市[2]、鈴木 哲朗[3] ([1]福島高専・物質工、[2]静岡大院・創科技、[3]浜松医大・医)
○Makoto OGATA[1], Takashi ONODA[1], Enoch PARK[2], Taichi USUI[2], Tetsuro SUZUKI[3] ([1]NIT, Fukushima College, [2]Shizuoka Univ., [3]Hamamatsu Univ. School of Medicine)

【背景および目的】

糖鎖と糖結合性タンパク質（レクチン）との相互作用は、生体内のさまざまな生物学的プロセスにおいて非常に重要な役割を担っている。一般的に、これら異分子間の一対一の相互作用は構造特異的ではあるが、その結合親和性は弱いことが知られている。自然界では、これら微弱な相互作用を増強する手段として糖クラスター効果と呼ばれる多価性相互作用を介した現象が見られる。近年我々は、この糖クラスター効果を糖阻害剤合成に応用することで、植物由来のレクチンに対して高結合親和性と架橋複合体形成能の双方を合わせ持った低分子型糖鎖クラスターの開発に成功している[1-3]。本研究では、この植物レクチンに対する高親和性架橋剤の設計原理をウイルスに適用することで、ウイルス架橋性低分子型糖鎖クラスターの合成を目的とした。

【方法】

骨格となるグリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）の四価カルボキシ基に対してアグリコン部末端にアミノ基を有する LacNAc（Galβ1,4GlcNAc）配糖体を導入し LacNAc 含有四価糖鎖クラスター（アシアロ型糖鎖クラスター）を収率 82%で得た。次に、組換え α2,6-シアリルトランスフェラーゼを用いてアシアロ型糖鎖クラスターの非還元末端ガラクトース残基に位置選択的なシアリル化を行い、Neu5Acα2,6LacNAc 含有四価糖鎖クラスター（シアロ型糖鎖クラスター）を収率 63%で得た。続いて、これら化合物のウイルスに対する架橋複合体形成能を動的光散乱法（DLS）およびフィルターろ過法により評価した。本実験に使用するウイルスには、メルケル細胞ポリオーマウイルス様粒子（MCV-LP）を用いた。

【結果】

MCV-LP に対する架橋複合体形成能をアシアロ型糖鎖クラスターとシアロ型糖鎖クラスターの添加時でそれぞれ比較したところ、ある特定の濃度でシアロ型糖鎖クラスターを添加した時にのみ MCV-LP の粒子径増加が DLS によって確認された。その粒子径は、MCV-LP 単独の粒子径（約 45 nm）と比較して、約 40 倍の平均粒子直径（2000 nm）を示した。また、このシアロ型糖鎖クラスター／MCV-LP 架橋複合体は、一般的な微生物ろ過用滅菌フィルターで除去することが可能であった。この結果は、ナノサイズのウイルス粒子が、シアロ型糖鎖クラスターの添加によって構造選択的にマイクロサイズの架橋複合体を形成したことを示している。

【参考文献】

1) Ogata, M., *et al. Bioorg. Med. Chem.*, (2015) in press.
2) Ogata, M., *et al. Bioconjugate Chem.*, *23*, 97-105, (2012).
3) Masaka, R., *et al. Bioorg. Med. Chem.*, *18*, 621-629, (2010).

Carbohydrate, Cluster effect, Multivalency

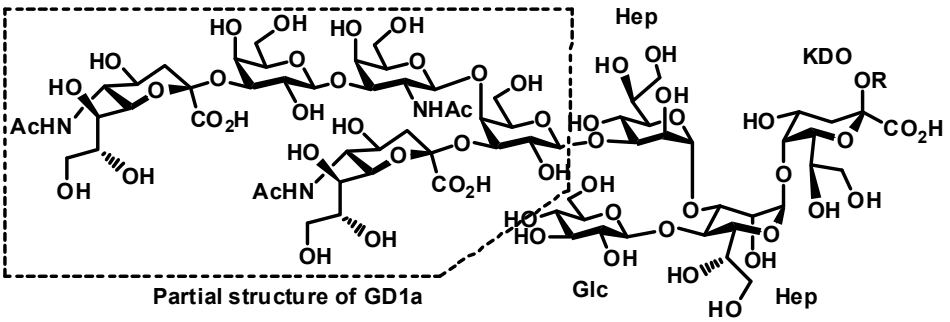
発表責任者：尾形慎（ogata@fukushima-nct.ac.jp）

発表番号：4I013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

ギランバレー症候群の発症機構解明に向けたリポオリゴ糖鎖の合成
Chemical synthesis of a lipo-oligosaccharide of *C. jejuni*

○吉仲 宏揮[1]、今村 彰宏[1]、安藤 弘宗[1,2]、石田 秀治[1]、木曽 真[1,2]([1]岐阜大・応用生物、[2]京都大・iCeMS)
○Hiroki YOSHINAKA[1], Akihiro IMAMURA[1], Hiromune ANDO[1,2], Hideharu ISHIDA[1], Makoto KISO[1,2] ([1]Gifu Univ., [2]Kyoto Univ. iCeMS)

【目的】自己免疫疾患の一種であるギランバレー症候群（GBS)は、*C. jejuni* が先行感染することにより発症することが知られている。これは *C. jejuni* の細胞壁に存在するリポオリゴ糖鎖（LOS)の構造がヒトの末梢神経にあるガングリオシドと分子相同性を有していることから、感染源に対して産生された抗体が誤って自己の末梢神経も攻撃してしまうことに起因する。このように GBS の発症メカニズムは大まかに解明されているが、抗原抗体反応における分子レベルでの詳細な認識機構は未解明である。そこで、本研究では *C. jejuni* の LOS を化学的に合成することによって、GBS 発症における分子基盤の解明を目指すことを目的とする。
【方法・結果】目的とする LOS 九糖の合成にあたり、オリゴ糖鎖を還元末端側四糖と非還元末端側五糖に分割する戦略を立案した。まず、還元末端側四糖の合成に際し、マンノースから合成したヘプトースとグルコースを順次グリコシル化させることにより三糖を構築した。次に、市販のマンノフラノースを出発物質とし、鍵反応として RCM 法を用いて八炭糖である KDO を構築し、先の三糖とのグルコシル化を経て四糖とした。続いて、非還元末端側五糖は更に還元末端側三糖と非還元末端側二糖に分けて合成する戦略を立てた。非還元末端側五糖は分子内にシアル酸を有するガングリオシド GD1a 様構造であることから、まずシアル酸とガラクトースからシアリルガラクトース（NeuGal)を調製し、これを共通ユニットとして供与体と受容体を各々合成した。次に NeuGal 受容体に *N*-アセチルガラクトサミンを導入し三糖を構築後、受容体へと変換した。続いて、NeuGal 供与体と三糖受容体をグリコシル化反応に供することで五糖骨格へ導いた。得られた非還元末端側五糖を供与体へと変換し、先に合成した還元末端側四糖とのグリコシル化を行い、目的とする九糖骨格の合成を達成した。




目的とする LOS 九糖の構造

Autoimmune disease, Ganglioside, Lipopolysaccharide

発表責任者：今村彰宏（aimamura@gifu-u.ac.jp）

発表番号：4I014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 多価性効果を利用した糖-タンパク質間相互作用を基盤とするオーガニックフレームワークの創成研究

# Investigation of organic framework based on multivalent carbohydrate-protein interactions.

○小宮 忍[1]、中川 篤[3]、蟹江 治[1,2,3] ([1]東海大学大学院工学研究科、[2]東海大学工学部生命多様性研究会、[3]東海大学糖鎖科学研究所)
○Shinobu Komiya[1], Atsushi Nakagawa[3], osamu Kanie[1,2,3] ([1]Tokai University, Graduate School of Engineering, [2]Tokai University, Faculty of Engineering Research Alliance for Diversity of Life, [3]Tokai University, Institute of Glycoscience)

糖-タンパク質間相互作用は細胞間の接着やアポトーシスの制御など細胞間認識に深く関与している。生体内において、糖-タンパク質間の相互作用は小さいが多価性効果により結合力が増強する。多価性の可逆反応による架橋ネットワーク構造の形成も知られているがネットワーク構造自体がある種の機能を有する可能性については情報がない。当研究室では、天然に存在する糖鎖リガンドとレセプタータンパク質から形成される特異的なネットワーク構造に着目し、価数制御した糖鎖リガンドとレセプタータンパク質の特異的な分子認識を利用したオーガニックフレームワークの合成研究に取り組んでいる。これまでに、2 価のガレクチン-3(Gal-3)とスペーサーとして柔軟なヘキサエチレングリコール誘導体を用い LacNAc 構造を 2 つ有する糖リガンドにより高次構造体が形成されることを AFM 観察により確認した。その上、3 価の Gal-3 と LacNAc を有する 2 価の糖リガンドでは環状の高次構造体を確認した。

本研究では、糖リガンドがもつスペーサーの構造が高次構造体に与える影響を検討するため、スペーサーとして柔軟なヘキサエチレングリコールではなく堅牢な環状ペプチドを有する 2 価の糖リガンドの合成を行った。CLEAR Amide Resin を用い、Fmoc 固相合成法によりペプチド鎖を伸長した。糖アミノ酸はセリン側鎖の水酸基に LacNAc を有する LacNAc-Ser 誘導体を合成し、HOBt-DIC 法により導入した。ペプチド鎖伸長後、MPAA とのチオエステル交換反応により目的とするペプチドチオエステルを得た。次に、HOOBt, DIEA を用いて環化反応を行い、Ac 基の脱保護を行うことで目的とする環状糖ペプチドを得ることに成功した。今後、得られた環状糖ペプチドを用いて AFM 観察によりスペーサーが与える高次構造体への影響を検討する。

organic framework, carbohydrate-protein interactions, multivalency

発表責任者：蟹江　治（kanie@tokai-u.jp）

発表番号：4I015
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# アノメリック水酸基の立体特異的 TMS 化反応

# Stereospecific trimethlsilylation of anomeric hydroxide

○河口 優香[1,2]、蟹江 治[2,3]（[1]東海大学工学部、[2]東海大学工学部生命多様性研究会、[3]東海大学糖鎖科学研究所）
○ Yuka Kawaguchi[1,2], Osamu Kanie[2,3] ([1]Tokai University, Faculty of engineering, [2]Tokai University, Faculty of Engineering Research Alliance for Diversity of Life, [3]Tokai University, Institute of Glycoscience)

細胞間認識や感染にも深く関与している糖鎖は化学合成によって構造の明確な単一化合物を得ることができる。糖鎖の合成においては、保護基の位置選択的な導入とそれらの選択的な脱保護に加え、適切に保護された単糖間のグリコシル化反応が重要である。このグリコシル化反応は一般的にアセタール位に脱離基を導入しこれを活性化して炭素陽イオン種を形成すること基礎とする。この時、環酸素の非共有電子対の隣接効果によって $sp^2$ 混成のオキソカルベニウムイオンとなりしばしば SN1 機構に依存する。このため立体選択的なグリコシル反応は原理的な問題を含んでいる。一方限定的ではあるが、ヘミアセタール性水酸基を用いるアルキル化によるグリコシド形成反応も知られている。本研究では、アセタール性水酸基を TMS エーテルとして保護し、この酸素原子による求核置換反応を試みることとした。この際、立体特異的に TMS アセタールを合成できれば、新たなグリコシド形成反応となることが期待できる。

まず、糖鎖合成のモデルケースとしてβ-TMS ガラクトシドの合成に着手した。検討の結果 Bn 基で保護したガラクトースチオグリコシド体の加水分解により得られるヘミアセタール混合物を、反応温度 0℃、$CH_2Cl_2$ 溶液中 TMS-DEA を用いてβ-TMS ガラクトシドを定量的に得ることに成功した。α/β比は塩基としても用いる TMS 化剤の種類によって影響され、特にβ立体特異的な TMS 化反応には、立体的にかさ高い TMS-DEA が有効であったが、α体のみを得ることはできなかった。一方、TMS-Imidazole を用いる反応において、開環した混合アセタール化合物が形成されることが判明した。さらに、この物のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製過程において閉環し、α-TMS グリコシドのみが得られることを見出した。(収率 60%)次に、このようにしてα-β-、各々の TMS アセタールを立体特異的に合成することに初めて成功した。

stereospecificity, glycoside, TMS

発表責任者：蟹江治（kanie@tokai-u.jp）

発表番号：4I016
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

*Asaia bogorensis* におけるセルロース合成関連タンパク質 CesD の機能解明
Analysis of cellulose synthase subunit D from *Asaia bogorensis*
○永谷 良騎[1]、水野 正浩[1,2]、天野 良彦[1] ([1]信大院理工、[2]信大 IFES)
○Yoshiki NAGATANI[1], Masahiro MIZUNO[1,2], Yoshihiko AMANO[1] ([1]Shinshu Univ., [2]IFES, Shinshu Univ.)

【背景・目的】酢酸菌によるセルロースの合成および菌体外への排出は、細胞膜に存在するターミナルコンプレックス (TC) と呼ばれるタンパク質複合体で行われている。我々はセルロース合成のモデル生物となっている *Gluconacetobacter xylinus* よりもより微細なセルロース繊維 (繊維幅 5-20 nm) を生産する *Asaia bogorensis* に着目し、TC を構成するタンパク質の中でセルロース鎖の会合および排出に関与すると考えられる CesD タンパク質 (AbCesD) について研究を進めてきた[1)]。これまでの研究で、X 線結晶構造解析により AbCesD は *G. xylinus* の CesD (GxCesD) と同様に 8 量体環状構造を有していることが判明したが、環状構造内部の形状が異なっており、これが両菌によって生産されるセルロースリボンの形態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、*A. bogorensis* のゲノム中に存在する AbCesD 遺伝子を破壊すると、気液界面に形成されるペリクルが野生株に比べて非常に脆くなることが確認されている。本研究では、AbCesD 欠損株に対して、AbCesD を相補させることでその表現型がどのように変化するのかを確認するために、相補用のプラスミドシステムの構築を試みた。また、CesD の 8 量体環状構造内部の形状の違いが両菌によって生産されるセルロースリボンの形態に影響を及ぼすか確認するために、形状の違いに起因している AbCesD の N 末端配列を、GxCesD の N 末端配列に変更した変異型 AbCesD の構築も試みた。
【方法・結果】*A. bogorensis* はカナマイシンに対する感受性が高いため、相補株の選択にはカナマイシン耐性遺伝子を用いた。相補株の作製に使用する *A. bogorensis* での発現ベクターには、*G. xylinus* での発現報告もあるグラム陰性菌用の広宿主ベクター pBBR122 (MoBiTec) を用い、*A. bogorensis* で発現の確認できている同ベクターに既存のクロラムフェニコール耐性遺伝子下に目的遺伝子の挿入が可能になるように制限酵素部位を挿入した。AbCesD の N 末端は GxCesD よりも 4 残基短いため GxCesD と同じ N 末端配列になるように 1 残基ずつ伸長した 4 種類の変異型 AbCesD (ΔN3K、ΔN3KK、ΔN3EKK、ΔN3FEKK) を PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) により作製した。いずれの変異型 AbCesD も、pET21a と *E. coli* BL21 (DE3) を用いた異種発現系システムを用いて、可溶性画分への発現が確認できている。現在、これらの発現用ベクターおよび変異体を用いて *A. bogorensis* の形質転換を試みている。
1) A. Kumagai, *et al*. *Biomacromolecules*, **12**, 2815-2821 (2011).

bacterial cellulose, cellulose synthesis, *Asaia bogorensis*

発表責任者：永谷良騎（15tm419f@shinshu-u.ac.jp）

発表番号：4I017
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# DOI 発酵液に含まれる 1-*epi*-DOI を原料とした 5a-カルバ-α-D-グルコースの合成

# Synthesis of 5a-carba-α-D-glucose from 1-*epi*-DOI included in the DOI fermentation liquor produced by the recombinant *E. coli*

○伊藤 祐介[1]、佐藤 裕紀[2]、鯵坂 勝美[2]、石黒 正路[1,2]、宮崎 達雄[2]（[1]新潟 BRP、[2]新潟薬大・応用生命）

○Yusuke Ito[1], Yuuki Sato[2], Kastumi Ajisaka[2], Masaji Ishiguro[1,2], Tatsuo Miyazaki[2] ([1]Niigata Bio-Research Park, Inc, [2]Niigata Univ. of Pharmacy and Applied Life Sciences)

近年、2-デオキシ-*scyllo*-イノソース（DOI）を高効率的に生産する組み換え大腸菌が作成されたことにより、DOI を高濃度（40 g / L 程度）含む発酵液の入手が可能となった。しかしながら、発酵液から容易に DOI を精製する手法がなかったので、DOI を化学合成原料として利用することは困難であった。その問題を解決するために、当研究室は DOI 発酵液から 1）メンブレンフィルターによる菌体除去、2）イオン交換樹脂による脱塩処理、3）晶析法による DOI の結晶化の 3 工程からなる簡便な DOI 精製法を確立している。さらに、得られた DOI がβ-D-グルコースの 1～4 位のヒドロキシ基と同じ立体配置を有するシクロヘキサノン誘導体であることより、これを合成前駆体として、高効率的な 5a-カルバ-β-D-グルコース（8 工程、47%）および 5a-カルバ-α-L-イドース（8 工程、48%）の合成を達成している。このように DOI は、β-D 系列およびα-L 系列カルバ糖の合成前駆体として有用である。また、我々は DOI 精製における晶析操作後の母液に 1-*epi*-DOI が含まれることを見出している。1-*epi*-DOI は、α-D 系列およびβ-L 系列カルバ糖の合成前駆体として期待される。そこで、DOI 精製時に副生する母液より 1-*epi*-DOI を単離する手法を検討し、それを原料とした 5a-カルバ-α-D-グルコースおよび 5a-カルバ-β-L-イドースの合成を試みた。

晶析法により結晶 DOI を濾別後に得られる母液は黒褐色であった。そのため、母液（残渣 78.7 g）に活性炭 140 g を加え 24 時間攪拌させて溶液中の色素成分を除去した。次いで、活性炭により脱色した溶液を減圧濃縮し、得られた残渣（48.6 g）を原料にオルトギ酸トリメチルによるジメチルケタール化反応を試みた。その結果、1-*epi*-DOI のジメチルケタール体を主成分とした混合物（4.0 g）を得た。マイナー成分を NMR により構造解析した結果、1-OMe-ジメチルケタール体が含まれることが判明した。この化合物は、母液に含まれる DOI のα, β-不飽和ケトン体由来の生成物と推測している。得られた 1-*epi*-DOI 誘導体を含む混合物をベンジル化、続いてトシル酸を作用させ脱ジメチルケタール化を試みた。この工程で、1-*epi*-DOI のベンジル誘導体（1.3 g）を単離することに成功した。その後、得られた 1-*epi*-DOI のベンジル誘導体を Tebbe 試薬と反応させることにより、収率 80%にて *exo*-オレフィン体に変換した。次いで、9-BBN によるヒドロホウ素化/酸化反応を試みた。反応は高収率にて進行し、その立体選択性は *gluco* 型:*ido* 型 = 1:5.7 であった。一方、$BH_3$·THF を用いた場合は、*ido* 型生成物のみを与えた。得られた立体異性体混合物はアセチル化後、それぞれ単離し、最後に脱保護することで、5a-カルバ-α-D-グルコースおよび 5a-カルバ-β-L-イドースの合成を達成した。

2-deoxy-*scyllo*-inososе, carba-α-D-glucose, carba-ß-L-idose

発表責任者：宮崎 達雄（tmiyazaki@nupals.ac.jp）

発表番号：4I018
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア I

# 複合糖質合成マイクロバイオリアクターシステムの構築と応用
# Application of micro-bioreactor systems for glyco-conjugate synthesis

○大石 岳史、羽田 勝二、木村 啓志、稲津 敏行 (東海大学)
○Takefumi Oishi, Katsuji Haneda, Hiroshi Kimura, Toshiyuki Inazu (Tokai Univ)

*Mucor hiemalis* 由来 endo-$\beta$-*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) は，糖タンパク質の N-結合型糖鎖を加水分解するのみならず，糖鎖転移活性を有する．そのシンターゼ型変異酵素 Endo-M-N175Q（Glycosynthase）は糖鎖オキサゾリン誘導体を糖鎖供与体として高効率で糖鎖転移を起こす．

我々は，Endo-M 酵素および Glycosynthase 酵素を固定化したリアクターを組み込んだ複合糖質合成システムの構築を目指している． Endo-M 酵素による糖鎖調製プロセス，糖鎖オキサゾリン誘導体合成プロセスおよび Glycosynthase 酵素による糖鎖転移生成物合成プロセスからなる．いずれの工程も，酵素あるいは化学触媒を樹脂に固定化したリアクターを用いる．糖鎖を調製するプロセスでは，Endo-M 酵素の加水分解活性を利用し，鶏卵黄から調製したシアロ複合型糖ペプチド SGP を加水分解してシアロ複合型糖鎖 SG を調製する．次に糖鎖オキサゾリン誘導体 SG-oxazoline の調製工程では，固定化 DMC (2-chloro-1,3-dimethylimidazolinium chloride)カラムで SG をオキサゾリン化する．最後に糖鎖転移反応生成物の合成は，Glycosynthase マイクロバイオリアクターを用い，SG-oxazoline を供与体として *N*-acetylglucosamine（GlcNAc）あるいは 1,3-diol 基を有する適当な受容体に糖鎖を転移して複合糖質を合成する．

本稿では，Glycosynthase をセファロース系ゲルに固定化した後，酵素固定化担体をカラムに充填して，マイクロバイオリアクターを作製した[1,2]. そのマイクロバイオリアクター内に, 鶏卵黄由来のシアロ複合型ペプチド(SGP)から調製した糖鎖(SG)のオキサゾリン誘導体を糖鎖供与体， Fmoc-*N*-acetylglucosaminyl asparagine [Fmoc-Asn(GlcNAc)-OH]を受容体とする反応液を連続的に送液し，糖鎖転移反応を行った．また，流量変化による転移率変化，供与体当量比の検討，反応液連続投与による反応の持続性などの要因について検討し，糖鎖転移反応の高効率化を図った．

その結果，流動を伴う動的な系で糖鎖転移反応を行う事により，糖鎖転移反応の高効率化を確認できた．また本実験で用いたマイクロバイオリアクターは極めて安定であり，長期保存，繰り返し使用が可能であった．

これらの知見を抗体医薬等の複合糖タンパク質に応用することを検討している．

[1] 大石ら、日本化学会第 95 春期年会（2015 船橋）
[2] 羽田ら、第 34 回日本糖質学会年会（2015 東京）

Glyco-conjugate, Endo-M, Micro-bioreactor

発表番号：4J001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 麹菌のハイドロフォービンを用いた重金属回収システムの構築

# Construction of the heavy metal recovery system using functionalized hydrophobins derived from *Aspergillus oryzae*.

○中野 宏軌[1]、中間 聖[1]、阿吹 綾香[2]、加瀬 明日香[2]、中島 春紫[2]（[1]明治大院農・農化、[2]明治大農・農化）
○Hiroki NAKANO[1], Satoshi NAKAMA[1], Ayaka ABUKI[2], Asuka KASE[2], Harushi NAKAJIMA[2]
([1]Grad. Sch. Agric. chem., Meiji univ., [2]Agric. chem., Meiji univ.)

【背景・目的】

ハイドロフォービンとは、糸状菌や担子菌の細胞表層に局在する両親媒性タンパク質であり、気相−液相および液相−固相界面への自己集合能をもつ。固体培養時に発現し、単量体として分泌され、細胞表層で強固な重合体を形成し、菌体に撥水性を付与する性質をもつ。また、テフロン板やガラス板など各種基材表面へ強く吸着し、表面の「ぬれ性」を改変する性質をもつ。一方、ハイドロフォービンは吸着性が非常に強いため、タンパク質の精製に用いられる一般的な取り扱い手法の多くが適用できず、回収・精製が困難なタンパク質である。

筆者らは、麹菌 *Aspergillus oryzae* からハイドロフォービンをコードする遺伝子(*hypA-D*)を単離し、各々の遺伝子について機能性解析を行ない、HypA と HypD が分生子に、HypB と HypC が菌糸に局在し、局在性がプロモーター領域に依存することを明らかにしている。

本研究ではハイドロフォービンの強い吸着性に着目し、C 末端に重金属吸着ペプチドを融合した機能性ハイドロフォービンを設計し、各種基材表面および麹菌の細胞表層への機能性ペプチドの固定化・機能性提示について検討を行った。

【方法・結果】

基材表面に機能性ハイドロフォービンを吸着させるため、エノラーゼプロモーター制御下で、液体培養により機能性ハイドロフォービンを生産・精製した。ハイドロフォービン水溶液を基材表面に滴下して乾燥させたところ、テフロン板などの疎水性基材表面に強く吸着して表面の「ぬれ性」を改変すること、および機能性付与に伴う 2 次構造の顕著な変化がないことが観察された。また、精製した機能性ハイドロフォービンをポリエステル綿に吸着させ、乾燥してシリンジに詰めることにより、重金属吸着カラムを作製し、重金属回収能を検討している。

一方、麹菌の細胞表層へ機能性ハイドロフォービンを提示するため、*hypB* プロモーター制御下で機能性ハイドロフォービンを発現する組換え株を作製し、菌糸表層への重金属吸着ペプチドの固定化を確認した。さらに、組換え菌株をポリエステル綿上で生育させ、シリンジに詰めることにより、生物性の重金属吸着カラムを作製した。作製したカラムを $Ni^{2+}$ を含む水溶液に浸漬し、カラムに吸着した $Ni^{2+}$ を回収し、ICP-OES 法により定量化した結果、重金属吸着ペプチドの固定化により $Ni^{2+}$ の回収量が最大で 40%向上した。

Hydorophobin, *Aspergillus oryzae*, Heavy metal

発表責任者：中島春紫（harushi@isc.meiji.ac.jp）

発表番号：4J002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 大腸菌コドン再定義株を用いた二種非天然型アミノ酸同時導入法の開発

# Development of a novel platform for enzyme engineering with multiple nonnatural amino acids

○大竹 和正[1]、春名 健一[2]、坂本 健作[1] ([1]理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター、[2]味の素 イノベーション研究所)
○ Kazumasa OHTAKE[1], Kenichi HARUNA[2], Kensaku SAKAMOTO[1] ([1]RIKEN CLST, [2]AJINOMOTO Inst. for Innovation)

われわれは、これまでに大腸菌のゲノムエンジニアリングを通して翻訳終結因子 1(RF-1)遺伝子破壊株の作製を可能にし、UAG 終止コドンの意味を非天然型アミノ酸へと再定義することに成功している[1,2](図中央)。RF-1 遺伝子破壊株を用いることにより既存の方法(図左)では実現することの出来なかった部位特異的かつ多数箇所へと非天然型アミノ酸を導入したタンパク質の生産が可能になった。実際にタンパク質中の多数箇所にハロゲン化チロシンを導入することにより、タンパク質の安定化が可能であることを報告している[3]。また、大腸菌における最も使用頻度の低いセンスコドンである AGG アルギニンコドンを限定された条件下ではあるが非天然型アミノ酸へと再定義できることも報告した[4]。これらの知見を融合することにより、本研究では UAG コドンと AGG コドンを異なる非天然型アミノ酸へと定義し、二種類の非天然型アミノ酸をタンパク質へと導入することを目的としている(図右)。本発表では、ハロゲン化チロシンを導入して安定化した有用な酵素を、α-ヒドロキシ酸を用いてタグ配列の除去及び活性化を行う手法について、最新の研究結果を報告する。

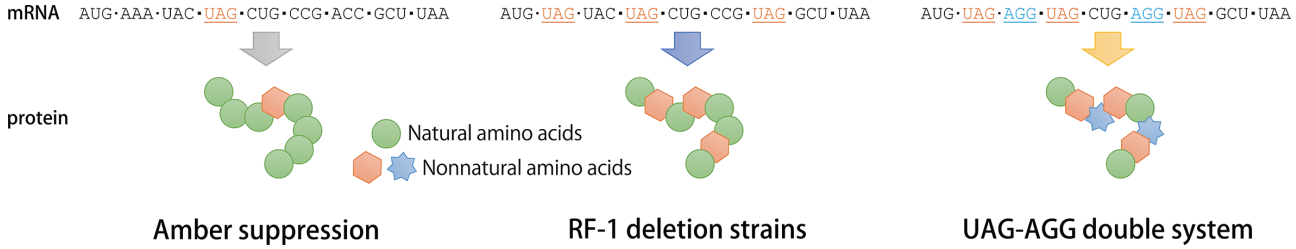



図 本研究における各株でのタンパク質翻訳(概念図)

1. Mukai, T. et al., “Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code” Nucleic Acids Res. 2010, 38 (22), 8188-95
2. Mukai, T. et al., “Highly reproductive *Escherichia coli* cells with a blank assignment for the UAG codon” Sci. Rep. 2015, 5, 9699
3. Ohtake, K. et al., “Protein stabilization utilizing a redefined codon” Sci. Rep. 2015, 5, 9762
4. Mukai, T. et al., “Reassignment of a rare sense codon to a non-canonical amino acid in *Escherichia coli*” Nucleic Acids Res. 2015, 43(16), 8111-22

Protein engineering, Nonnatural amino acid, Codon reassignment

発表責任者：大竹 和正（kazumasa.ohtake@riken.jp）

発表番号：4J003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 不凍タンパク質の構造を用いた、固体表面に結合する新規タンパク質の創出

# Engineering of novel material-binding proteins using antifreeze protein structure.

○土井 奨平、石田 丈典、池田 丈、廣田 隆一、黒田 章夫（広大院先端物質）
○Shohei DOI, Takenori ISHIDA, Takeshi IKEDA, Ryuichi HIROTA, Akio KURODA (Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

【背景・目的】*Tenebrio molitor* 由来の不凍タンパク質 (TmAFP) は、平行な β シートからなる平面構造を持つ円筒型分子で、この平面構造内に規則正しい間隔で提示されたスレオニン残基を用いて、氷の結晶表面に結合する。我々は、TmAFP が持つこの平面構造が、様々な固体表面を認識する足場として利用できるのではないかと考えた。そこで本研究では、当該平面構造内に提示されたスレオニン残基をランダムに変異させることで、様々な固体表面との親和性を持つタンパク質の作製を試みた。

【方法・結果】平面構造内のスレオニン残基をランダムに変異させた TmAFP の組み換えタンパク質を提示したファージライブラリを構築した。このファージライブラリを用いて、酸化チタンに結合するファージの選別を行った。具体的には、調製したファージライブラリを酸化チタン粒子と混合し、数回の洗浄操作を行うことで、酸化チタンと高い親和性を持つファージを回収した。得られたファージはその後、大腸菌を宿主とし増幅させた。一連の操作を数回繰り返すことで、酸化チタンに結合するファージを選別した。結合したファージの遺伝子を解析することで、酸化チタンに結合した TmAFP のアミノ酸配列を同定した。その結果、平面構造内に塩基性アミノ酸を多く提示した TmAFP の組み換えタンパク質が酸化チタンとの親和性を持つことが分かった。この結果から我々は、TmAFP が持つ平面性の高い特徴的な分子骨格を利用すれば、酸化チタンの他にも、様々な固体表面に対し結合するタンパク質を作製できると考えている。現在、その他の無機固体を結合対象とした同様の実験を進めており、今後は、TmAFP の組み換えタンパク質のみを精製し、結合対象との親和性などについて詳細に解析する予定である。

antifreeze protein, binding protein, phage display

発表番号：4J004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 大腸菌無細胞タンパク質合成系を用いたウサギモノクローナル抗体高速スクリーニング法の開発

# Development of high throughput screening system of rabbit monoclonal antibody using *E.coli* in vitro expression system

○加藤 晃代[1,2]、永井 里美[2]、兒島 孝明[2]、中野 秀雄[2]([1]（公財）科技財団、[2]名大院生命農)
○Teruyo KATO[1,2], Satomi NAGAI[2], Takaaki KOJIMA[2], Hideo NAKANO[2] ([1]ASTF, [2]Nagoya Univ.)

【背景・目的】我々のグループでは、迅速なモノクローナル抗体スクリーニング法を開発してきた。動物の末梢血から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントを無細胞タンパク質合成系にて Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する方法である（SICREX[single-cell RT-PCR linked in vitro expression]法)。本法はすべてが in vitro で行われるため、細胞培養を要するスクリーニング系と比較しハイスループット化が容易である。しかしながら､抗体クローンによっては 1) L 鎖と H 鎖の分子間 SS 結合が掛からず Fab が形成されない、および 2) 無細胞系における発現効率が悪い、という場合があることが課題であった。そこで今回は上記課題の克服と、スクリーニング系の更なるハイスループット化を目指した。

【方法と結果】抗体の抗原決定部位のバリエーションが豊富であり、免疫化や採血がマウスに比べ容易なウサギを対象動物とし SICREX を実施した。ウサギ抗体は無細胞蛋白質合成系における Fab 形成効率ならび発現量が共に低く、得られた抗体クローンの性能評価が困難であった。そこで、まず L 鎖と H 鎖の C 末端にそれぞれ接着性のあるペプチド（ロイシンジッパー）を付加し発現させたところ、活性型 Fab の形成効率を改善できることがわかった。さらに、4 アミノ酸から成るペプチドタグを N 末端に付加し発現させることにより､活性型抗体発現量を飛躍的に増大可能であった｡最後に､SICREX のすべての工程を見直し簡略化することにより、これまで数日間要していたスクリーニング系をわずか 1 日以内に完了できるスキームを完成させた。

【結論】In vitro の迅速抗体スクリーニング法 SICREX の課題を解決し、ウサギ由来モノクローナル抗体を従来よりもさらにハイスループットに獲得可能な手法を開発した。

【謝辞】本研究は、知の拠点あいち重点研究プロジェクト２「食の安心・安全技術開発プロジェクト」による成果のひとつである。

rabbit monoclonal antibody, peptide tag, leucine zipper

発表責任者：中野　秀雄（hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp）

発表番号：4J005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 微生物環境応答システムの速度論的解析と応用開発

# Kinetic Studies of Bacterial Response System and its Application Development

○日高 將文[1]、後藤 愛那[1]、清水 泰希[1]、南澤 究[2]、今村 博臣[3]、内田 隆史[1] ([1]東北大農、[2]東北大生命科学、[3]京都大生命科学)

○Masafumi HIDAKA[1], Aina GOTOH[1], Taiki SHIMIZU[1], Kiwamu MINAMISAWA[2], Hiromi IMAMURA[3], Takafumi UCHIDA[1] ([1]Agri. Sci.,Tohoku Univ., [2]Life Sci., Tohoku Univ., [3]Kyoto Univ.)

**[目的]**

微生物は化学物質の濃度、温度変化などのストレスに応答し、遺伝子発現、タンパク質発現、酵素活性などを制御することで環境の変化に対応する。その分子レベルのメカニズムは、タンパク質のリン酸化を伴う二成分制御系などが知られているが、応答速度、ストレスに対する感度などの解析は難しい。根粒菌は、細胞内硝酸濃度に応じて脱窒系の酵素の発現レベルをコントロールしている [1]。我々は、根粒菌内で硝酸・亜硝酸濃度変化を検出するタンパク質・NasS-NasT を利用した硝酸・亜硝酸濃度変化検出システム sNOOOpy（sensor for $NO_3^-$/$NO_2^-$ in physiology）を開発し、NasS-NasT の速度論的解析を可能とした [2]。本研究は sNOOOpy を用いて、根粒菌の環境応答システムについて分子レベルの知見の獲得を目的とした。

**[方法・結果]**

sNOOOpy は NasS、NasT にそれぞれ YFP（Yellow Fluorescent Protein）、CFP（Cyan Fluorescent Protein）を付加しており、硝酸・亜硝酸の濃度変化によって変化する NasS-NasT の解離・非解離状態を蛍光タンパク質の FRET（Fluorescence Resonance Energy Transfer）の変化によって検出する手法である。

- sNOOOpy を用いて NasS-NasT の特異性を調べたところ、硝酸・亜硝酸によってのみ解離し、硝酸・亜硝酸に対する高い特異性が確認された。
- NasS-NasT は硝酸・亜硝酸濃度の上昇に応じて速やかに解離しており、環境変化に対する即応性が確認された。
- NasS と NasT の結合定数を調べたところ 0.1 μM であり、比較的強い相互作用を形成していた。
- 40 μM の硝酸で 50%の NasS-NasT が解離したことから、NasS-NasT の感度はμM オーダーであると見積もられた。
- 硝酸濃度が低下すると NasS と NasT は再び複合体を形成し、硝酸濃度の上昇のみならず減少に対しても応答することが示唆された。

また、sNOOOpy を用いた哺乳動物細胞内の硝酸・亜硝酸濃度変化の検出にも成功しており、合わせて報告する。

[1] Sanchez *et al*., *Environ Microbiol*., 16(10):3263-74, (2014)

[2] Hidaka, Gotoh *et al*., *J. Biol. Chem*., in press.

FRET, Bacterial Response System, Biosensor

発表責任者：日高將文（asafumi@biochem.tohoku.ac.jp）

発表番号：4J006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# オリーヴ果実の乳酸発酵メカニズムの解析

# Analysis of lactic acid fermentation of olive fruits

○岸本 憲人[1]、内海 淳彦[2] ([1]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所、[2]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴの森創生組合)
○Norihito KISHIMOTO[1], Atsuhiko UTSUMI[2] ([1]Central Institute of Olive and Health Sciences, Shodoshima Healthyland Co., Ltd, [2]Shodoshima Healthyland Co., Ltd)

【目的】オリーヴは健康や美容に優れた効果を有し、ヨーロッパなどで古来より利用されている。近年、健康志向を背景としたオリーヴオイルの需要が増加しており、オリーヴの栽培が国内の様々な地域で急速に進められている。小豆島は国内最大のオリーヴの産地であり、１９０８年の栽培開始から１００年以上の歴史を誇っている。当社は、自社農園で栽培したオリーヴ果実を搾油して得られるオリーヴオイル（化粧用、食用）をはじめ、搾油後に排出される果実粕を原料とした化粧品等のオリーヴ加工品を製造している。特に、当社のオリーヴオイルは、オリーヴ果実を収穫後に乳酸発酵させてから搾油することによって引き出される甘くフルーティーな香りを特徴としている。本研究では、オリーヴ果実の乳酸発酵のメカニズムを解明することを目的としている。
【方法】種々の発酵条件でオリーヴ果実を塩水に浸漬することによって乳酸発酵を行い、漬込み液中の乳酸濃度及び pH を測定することにより乳酸発酵を評価した。
【結果】オリーヴ果実の乳酸発酵を開始すると漬込み液中の乳酸の蓄積に伴い、漬込み液中の pH の急激な低下が認められた。各発酵時間で回収したオリーヴ果実を搾油して得られたオリーヴオイル中のポリフェノール含量を測定したところ、発酵時間の経過に伴いポリフェノール含量の増加が認められた。次いで、熟度別のオリーヴ果実を用いて乳酸発酵を行ったところ、果実熟度が進むにつれて、乳酸発酵の進行速度が増すことがわかった。また、オリーヴオイルの香りについて調べた結果、乳酸発酵させたオリーヴ果実由来のオリーヴオイルと未発酵の場合のオリーヴオイルを比較したところ、甘くフルーティーな香り成分が顕著に増加していることが確認された。以上の結果から、オリーヴ果実の乳酸発酵の一端が明らかになった。

olive, lactic acid fermentation, polyphenol

発表番号：4J007
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 未利用資源であるオリーヴ枝の有効活用法の検討

Utilization of olive resources

○岩田 佳奈[1]、内海 淳彦[2]、岸本 憲人[1]([1]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴ健康科学研究所、[2]小豆島ヘルシーランド株式会社オリーヴの森創生組合)
○Kana IWATA[1], Atsuhiko UTUMI[2], Norihito KISHIMOTO[1] ([1]Central Institute of Olive and Health Sciences, Shodoshima Healthyland Co.,Ltd, [2]Shodoshima Healthyland Co.,Ltd)

【目的】オリーヴは健康や美容に優れた効果を持ち、ヨーロッパ等で古来より利用されている。オリーヴの果実を搾って得られるオリーヴオイルは、動脈硬化、高血圧、高コレステロール血症などの予防に有効性が示されている。また、オリーヴオイルは高い保湿性を有していることから、化粧用としても利用されている。近年、オリーヴは木材としても需要が増加しており、今後、木材としての利用が進むと、葉、枝、根などが大量に排出され、未利用資源となる。しかしながら、果実以外の部位(葉、枝、根など)の活用方法については、十分に検討されていないのが現状である。我々は、オリーヴの果実以外の部位についても健康・美容素材へ転換することを試みており、本発表では美容素材としてのオリーヴ枝の可能性について報告する。
【結果及び考察】オリーヴの枝から抽出物(以下、オリーヴ枝エキス)を調製し、オリーヴ枝エキス中に高濃度のポリフェノールが含まれていることが分かった。次に、オリーヴ枝エキスの ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity, 活性酸素吸収能力)を測定し、抗酸化作用を持つことが示された。また、紫外線（UV）吸収能を調べたところ、UV-A 波、UV-B 波に相当する波長領域において高い吸収効果が認められた。さらに、オリーヴ枝エキスは、しみの原因となるメラニンの産生を抑制する作用、繊維芽細胞の増殖促進作用、肌にハリや弾力を与えシワやたるみを防ぐコラーゲンの産生を促進する作用を持つことが分かった。上記の結果から、オリーヴ枝エキスは、肌の酸化や老化（しみ、シワ、たるみなど）を防ぐだけでなく、肌の代謝を促進することによって、肌にダメージを蓄積させない美容効果を持つことが示唆された。

olive, polyphenol, branch

発表番号：4J008
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# ε-PL とアニオン性界面活性剤から成る抗菌性プラスチックの調製及び特性評価

# Preparation and characterizations of an antimicrobial plastic composed of ε-PL and anionic detergent.

○牛丸 和乗、濱野 吉十、片野 肇 (福井県大)
○Kazunori USHIMARU, Yoshimitsu HAMANO, Hajime KATANO (Fukui Pref. Univ.)

【諸言】ε-ポリ-L-リジン (ε-PL) はある種の放線菌が合成するホモポリアミノ酸で、25～35 残基の L-リジンが直鎖状に結合した構造を有している。ε-PL はアミノ酸から成る化合物であるため、人体に対してほとんど毒性を示さないのみならず、側鎖アミノ基のカチオン性に由来する優れた抗菌活性を示す。このような特徴から食品防腐剤として広く利用されており、微生物を用いた工業生産プロセスも確立されている。上記の利用例に加え、ε-PL はナイロン 6 に類似した分子構造を有することから、微生物合成可能な環境調和型プラスチックとしての応用も期待されているが、高極性構造に起因する高い吸湿性を有するため、プラスチックとしての利用が困難であり、上記のような応用例は報告されていない。本研究ではε-PL をプラスチック材料として利用することを目指し、ε-PL とアニオン性界面活性剤から成る複合体の調製・評価を行った。

【方法および結果】ε-PL (25 %溶液, JNC 株式会社) を塩酸で希釈・カチオン化し、Bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate sodium salt [NaBEHS] 溶液 (溶媒 : $H_2O$/エタノール = 60/40) と混合することで、水に不溶な白色沈殿を得た。この白色沈殿を遠心回収し、種々の有機溶媒への溶解性を評価したところ、エタノール、イソプロパノールなど種々のアルコール類やアセトン、ジメチルスルホキシドなど様々な有機溶媒に可溶であることが確認された。また、元素分析及び $^1$H-NMR 測定による組成解析の結果から、上記の沈殿はε-PL のアンモニウム基と BEHS アニオンが 1:1 の組成で構成される複合体であることが示された。上記のε-PL と BEHS アニオンから成る複合体に対して熱重量分析を行ったところ、230℃付近から重量減少が始まる高い熱安定性を有する材料であることが示され、示差走査熱量測定から 75℃付近にガラス転移点を、157℃付近に融点を持つ熱可塑性材料であることも明らかとなった。加えて、この複合体をホットプレスによりフィルム化し、引張試験による力学物性評価を行った。

また、応用利用例として、上記複合体の抗菌コーティング材料としての利用を検討した。ε-PL と BEHS アニオンから成る複合体のエタノール溶液をセルロースアセテートメンブレン上にコーティングし、純水で洗浄した後に *Escherichia coli* (グラム陰性菌) もしくは *Staphylococcus aureus* (グラム陽性菌) を接種し、メンブレン上での菌体増殖を評価した。ε-PL-BEHS アニオン複合体でコーティングしたメンブレンは、グラム陰性菌・陽性菌のいずれに対しても抗菌活性を示した。これらの結果から、ε-PL と BEHS アニオンの複合体が抗菌プラスチック材料や抗菌コーティング材料として利用できる可能性が示された。

ε-polylysine, antimicrobial plastic, thermoplastic

発表番号：4J009
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# ポリフェノールの酸化架橋を利用した生体組織用ゼラチン接着剤
# Gelatin adhesives conjugating oxidative crosslinking by polyphenols

○山内 朝夫、畠中 芳郎（大阪市工研）
○Asao YAMAUCHI, Yoshiro HATANAKA (Osaka Municipal Tech. Res. Inst.)

＜目的＞

ゼラチンは接着性を備えた天然由来の繊維状タンパク質であり、生体親和性が高いことから組織用接着剤として利用が期待できる。しかしながら、ゼラチンは 30℃前後の体温下で水に曝すと、容易に軟化し接着力が失われる。細胞組織を接着するには、温度や湿度に敏感なゼラチンを耐水化する必要がある。タンパク質を不溶化（固化）する一般的な方法として、アルデヒド類の架橋剤を使用することが挙げられるが、炎症を誘引するアルデヒドの使用は安全性に欠ける。そこで、安全性の高い架橋法として当研究室では天然のポリフェノールを使った架橋を用いることで、ゼラチンの耐水接着性が改良できるのかを調べた。

＜方法と結果＞

ポリフェノールとしてヒドロキノンを用い、ゼラチン溶液にポリフェノールと酸化酵素（チロシナーゼ）を加えることで行った。まず、ヒドロキノンが酸化して生成するキノン化合物がタンパク質分子と結合することで、安定な架橋が形成することを確認した。次に、植物ポリフェノールの選定と反応条件を最適化することで、45℃の温水中でもゼラチンゲルが融解しない条件を決定した。その結果、植物ポリフェノールのカフェ酸が選定され、18wt%のゼラチン溶液中で 6mM のカフェ酸を添加した条件で目的の架橋ゼラチンが得られた。また、ゼラチンのゲル融点はポリフェノールの添加濃度に依存し、チロシナーゼの添加濃度が高いほど架橋形成速度が速くなることがわかった。

得られた結果を基に、ブタ皮を基材とする接着試験を行った。ATSM 規格 F2255-05 を参考に引張せん断試験を行うことで接着力を測定した。ヒドロキノンで架橋したゼラチンは、未架橋のゼラチンと比較して約 24 倍強力に接着することがわかった（約 70kPa)。同様に、カフェ酸で架橋したゼラチンについても架橋度の増加とともに接着力が高まり、未架橋のゼラチンの約 15 倍の接着力を示すものも調製することができた。

以上の結果から、天然物のポリフェノールを用いてゼラチンを架橋することで、生体組織を接着する機能を付与できることを示せた。

Biotissue adhesive, Gelatin, Quinone crosslinking

発表番号：4J010
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# 連続生成系によるリポソームの調製および修飾

# Analysis and modification of liposomes produced by continuous flow system

○牧野 祥嗣、岩上 千華、池田 奈央、長森 駿太朗、伊藤 伸哉（富県大工）
○Yoshihide MAKINO, Chika IWAKAMI, Nao IKEDA, Shuntaro NAGAMORI, Nobuya ITOH (Toyama Pref. Univ.)

リポソームはドラッグデリバリーシステム（DDS）の薬物担体として利用される。DDS 担体の粒子径が 100～200 nm であれば、EPR（enhanced permeability and retention）効果により、血管から腫瘍組織周辺への薬物送達が期待できる。そこで本研究では、100～200 nm の粒子径を持つリポソームの簡便な調製手順およびその修飾法の確立を目指した。

まず、エタノール水和法にもとづいた連続生成ラインを構築し、リポソームを調製した。生成した粒子の粒度分布は動的光散乱（DLS）法により解析した。リポソームの封入効率はカルセインを用いて求め、回収率は脂質定量によって見積もった。緩衝液と脂質溶液の流速比、合流点の形状等の様々な条件を検討したところ、流速比を変化させることで 50～250 nm の任意の粒子径を持つリポソームが生成可能であることがわかった。平均 100 nm 程度の粒子径を持つリポソームを安定的に調製可能な条件を決定し、生成したリポソームを解析した。カルセインの蛍光消光の抑制より、リポソーム内水相への封入が確認され、封入効率が計算された。濃縮操作後の脂質定量の結果、投入した脂質はほぼすべてリポソームとして回収されたと見積もられた。

ポリエチレングリコール（PEG）によるリポソームの修飾により、ステルス性が備わり血中滞留時間の増加が期待される。そこで次に、上で調製したリポソームをもとに PEG 修飾リポソームを調製し、粒子径、封入率等を解析した。PEG 修飾脂質の添加量に依存して粒子径が増大し、PEG 修飾脂質のリポソームへの取り込みが見られる条件が見出された。PEG 修飾リポソーム構築に最適な条件を決定し解析したところ、リポソーム回収率はカルセイン非存在下では８割程度、カルセイン存在下では１割程度であった。

以上の検討により、直径 100 nm 程度のリポソームを簡便かつ連続的に生成する手法を確立し、また生成したリポソームを簡便に PEG 修飾体とする手順も確立した。加えて、機能性分子を用いた表面修飾を検討したので、その結果と合わせて報告する。

Liposome, EPR, DDS

発表責任者：牧野祥嗣（makino@pu-toyama.ac.jp）

発表番号：4J011
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

*Magnetospirillum magneticum* RSS-1 株における $Fe_3O_4$-$Sm_2O_3$ コアシェルナノ粒子の形成
Formation of magnetite at samarium oxide core-shell nanoparticles in *Magnetospirillum magneticum* RSS-1

○下重 裕一[1]、中島 義賢[1]、柳澤 圭一[1]、小林 英城[2]、水木 徹[1]、島村 繁[2]、井上 明[1]、前川 透[1]
([1]東洋大、[2]海洋研究開発機構)
○ Hirokazu SHIMOSHIGE[1], Yoshikata NAKAJIMA[1], Keiichi YANAGISAWA[1], Hideki KOBAYASHI[2], Toru MIZUKI[1], Shigeru SHIMAMURA[2], Akira INOUE[1], Toru MAEKAWA[1] ([1]Toyo Univ., [2]JAMSTEC)

磁性細菌は鉄イオンを菌体内に取り込み、マグネトソームと呼ばれる細胞内小器官で種特異的な形状のマグネタイト結晶（$Fe_3O_4$）またはグレイガイド結晶（$Fe_3S_4$）から成る磁性粒子を合成する。近年、鉄イオン以外の遷移金属イオンを磁性粒子に含有させた報告例がある（1,2)。本研究では、強力な永久磁石材料として知られる希土類元素に着目し、磁気特性に影響が期待される希土類元素を含有する磁性粒子を形成可能な磁性細菌の探索を行った。

分離源は主に水環境中の底泥とした。希土類元素を含む磁性細菌用培地に磁気回収操作で濃縮した磁性細菌を植菌し、28℃、暗所で約 1 週間培養を行った。培養後、磁石を用いて磁性細菌を回収し限界希釈法にて単離を行った。単離株から磁性粒子を抽出および精製し、エネルギー分散型 X 線分析(EDS)装置による磁性粒子の元素分析を行い、希土類元素の有無を確認した。希土類元素の存在が確認された菌株を候補株とし、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析による近縁種の推定を行った。候補株が形成した磁性粒子の元素および化学結合状態を明らかにするために、X 線光電子分光（XPS）装置による表面元素分析を行った。また、候補株の磁性粒子の磁気特性を明らかにするために、超伝導量子干渉磁束計（SQUID）で磁化測定を行った。さらに、その磁性粒子の結晶構造を明らかにするために、ラマン分光光度計および X 線回折（XRD）装置による結晶構造解析を行った。

埼玉県内の農業用水路からサマリウムをマグネトソームに含有する RSS-1 株の取得に成功した。その RSS-1 株は、既知近縁種と 99%の相同性を示し、*Magnetospirillum magneticum* の近縁種であることが判った。XPS の分析結果より磁性粒子からサマリウムの存在が確認され、酸化サマリウム（$Sm_2O_3$）であることが明らかとなった。また EDS の分析結果からサマリウムが磁性粒子の表面付近に多く存在することが確認され、$Fe_3O_4$ 粒子表面が $Sm_2O_3$ で覆われたコアシェル構造のナノ粒子であることが明らかとなった。また SQUID 測定結果から、そのコアシェルナノ粒子は、$Fe_3O_4$ ナノ粒子と比較して飽和磁化および残留磁化はそれぞれ 22%および 35%減少したが、保磁力は 34%増加した。ラマン分光分析および XRD 解析結果から、シェル層の $Sm_2O_3$ は非晶質であることが示唆された。

【参考文献】

(1) S. Staniland *et al.Nature Nanotechnol*, 3, pp158-162, 2008.
(2) M. Tanaka *et al.J. Mater. Chem*, 22, pp11919-11921, 2012.

Magnetotactic bacteria, Rare earth metal, Magnetosomes

発表番号：4J012
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# バキュロウイルスを利用した *Neospora caninum* に対するワクチン作製

# Preparation of vaccines against *Neospora caninum* using baculoviruses

○朴 龍洙[1,2]、板垣 滉平[1]、加藤 竜也[1,2]、高坂 哲也[1] ([1]静大農、[2]静大グリーン科学技術研究所)
○Enoch Y. PARK[1,2], Kouhei ITAGAKI[1], Tatsuya KATO[1,2], Tetsuya KOUSAKA[1] ([1]Shizuoka Univ., [2]Res. Inst. Green Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

【目的】ネオスポラ原虫(*Neospora caninum*) はイヌ科動物を終宿主とし、ウシを始め幅広い動物種を中間宿主とする細胞内寄生性原虫である。*N. caninum* により引き起こされる症状はネオスポラ症と呼ばれ、特にウシでは流産、死産または子牛の神経症状を主徴とする異常出産を高率に引き起こし、胎仔の損失による直接的な被害に加え、診断やミルクの収量減少など畜産業に大きな経済損失を与えている。これまでに、牛のネオスポラ症を対象にワクチン開発がいくつか試みられているが、効果的なワクチンは現在のところ市販されていない。本研究では、*N. caninum* に対するワクチン候補の開発を目指し、バキュロウイルスを利用したウイルスベクター型ワクチンの作製を目的とした。
【方法】*N. caninum* の表面抗原である Surface Antigen 1(SAG1)遺伝子をバキュロウイルスのエンベロープ糖タンパク質(GP64)に融合させた融合タンパク質遺伝子をポリヘドリンプロモーター下流に、同じく *N. caninum* の表面抗原である SAG1-related sequence 2 (SPS2)遺伝子をサイトメガロウイルス由来プロモーター（CMV プロモーター）下流に挿入した組換え AcMNPV バクミドを Bac-to-Bac システム（Life Technologies）で構築した。構築した組換え AcMNPV バクミドを Sf-9 細胞にトランスフェクションして組換え AcMNPV を調製した。組換え AcMNPV 表面への SAG1 の提示および哺乳動物細胞への形質導入を確認した。またこの組換え AcMNPV をマウスへ免疫化することで、in vivo での免疫原生評価を行った。
【結果】構築した組換え AcMNPV を Sf-9 の培養上清から回収し、ウイルスへの SAG1-GP64 融合タンパク質の発現をウェスタンブロットで確認した。この組換えウイルスを使用して感染多重度（M.O.I.） 150 で HEK293 細胞への形質導入を行ったところ、SRS2 の発現が確認された。現在マウス 1 頭あたり $1\times10^8$ pfu の組換え AcMNPV を免疫化して、in vivo での免疫原生評価を行っている。この組換え AcMNPV は、バキュロウイルス外被に抗原を提示し、さらに CMV プロモーターにより哺乳類細胞内で抗原遺伝子を発現させることが可能であり、サブユニットワクチンと DNA ワクチン両方の機能を備えたワクチンとなり得るものと期待される。

*Neospora caninum*, Baculovirus, Silkworm

発表責任者：朴　龍洙（park.enoch@shizuoka.ac.jp）

発表番号：4J013
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# カイコを用いたインフルエンザウイルス由来ヘマグルチニンを提示させたウイルス様粒子の発現
# Expression of hemagglutinin-displaying influenza virus-like particles in silkworms

原田 みづ帆[1]、○加藤 竜也[1,2]、朴 龍洙[1,2] ([1]静大農・応生化、[2]静大グリーン研)
Mizuho Harada[1], ○Tatsuya Kato[1,2], Park Enoch Y.[1,2] ([1]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Shizuoka University, [2]Research Institute of Green and Science Technology, Shizuoka University)

【背景・目的】現在インフルエンザウイルスワクチンとしてニワトリの有精卵を用いて製造されたヘマグルチニン(HA)ワクチンが利用されているが、安定的なワクチン供給には課題が多い。将来危惧されている新型インフルエンザウイルスのパンデミックに備えるためには、より安全で迅速な供給に対応できる新しいワクチン開発が急務である。インフルエンザウイルスの感染には、トリ型インフルエンザウイルスでは上気道の粘膜上皮細胞のガラクトースにα-2,3 結合したシアル酸、ヒト型インフルエンザウイルスではα-2,6 結合したシアル酸が深くかかわっていることが明らかになっている。また、インフルエンザウイルスを構成しているタンパク質の一つである HA は、抗原として重要な役割を持つといわれている。本研究では、カイコを用いて活性を有する HA とマトリックスタンパク質(M1)と共発現させて、HA を提示させたインフルエンザウイルス様粒子(VLP)を作製することを目的とした。
【方法】カイコで発現させたトリ型インフルエンザウイルス A/Vietnam/1194/2004 (H5N1)由来 HA とブタ型インフルエンザウイルス A/Lowe/15/30 (H1N1)由来 M1 タンパク質遺伝子をそれぞれ、pFastbacdual ベクターに挿入し、組換え *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV)バクミドを構築した。このときに HA の膜貫通領域の代わりに、BmNPV エンベロップタンパク質 GP64 の膜貫通領域を融合させた融合 HA 遺伝子も構築した。この組換え BmNPV をカイコに注射し、HA を提示するインフルエンザ VLP をカイコ体液に発現させた。発現させた VLP をショ糖密度勾配超遠心分離及び fetuin-agarose ゲルを用いて精製を行った。
【結果】組換え BmNPV バクミドを注射したカイコの体液中において、ウェスタンブロットにより、HA および M1 タンパク質の発現が確認できた。この体液を用いてショ糖密度勾配超遠心分離を行ったところ、同じフラクションに HA および M1 タンパク質の発現が確認されたため、HA が M1 タンパク質からなる VLP 上に提示されていることが示唆された。カイコ体液からショ糖密度勾配超遠心法及び fetuin-agarose ゲルを用いて精製を行い、免疫透過型電子顕微鏡で確認したところ、HA が提示された M1 VLP が確認された。現在この VLP に提示されている HA 量の測定、インフルエンザ VLP の免疫原性の有無の確認を行っている。

Influenza virus, Hemagglutinin, silkworm

発表番号：4J014
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア J

# カタクチイワシ（*Engraulis japonicus*）における外来遺伝子発現系の構築

# Transgenic gene expression in Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*)

○坂口 圭史[1]、長野 直樹[1]、北野 載[1]、松山 倫也[2] ([1]九大院農唐津水研セ、[2]九大院農)
○Keishi SAKAGUCHI[1], Naoki Nagano[1], Hajime Kitano[1], Michiya Matsuyama[2] ([1]Fisheries Res. Inst. of Karatsu, Dept. of Joint Res., Fac. of Agr., Kyushu Univ., [2]Lab. of Mar. Biol., Fac. of Agr., Kyushu Univ.)

**【目的】**バイオ医薬品を製造するにあたり、魚類を宿主としたタンパク質生産系が注目を浴びている。すなわち、魚類は大規模飼育が可能でコストが安いこと、ヒトと共通の感染症を持たないこと、翻訳後修飾機構がヒトと似通っているなどの利点を有する。しかし、その技術開発は発展途上であり、産業レベルでの実用例は皆無である。そこで我々は、海産魚カタクチイワシに着目した。本種は飼育が容易で、環境条件が整えば年間を通じ多量の卵を産卵し続ける。このことから、産出卵に外来遺伝子を過剰発現させる技術基盤を整えれば、本種を利用したバイオ医薬品生産法の確立が期待される。本研究はその端緒として、本種の外来遺伝子発現系の構築を試みた。

**【方法と結果】**先ず、水温と光周期の人工制御によって、任意の時間帯に受精直後の卵を採取可能な環境を構築した。また、胚の生存率を指標として諸条件を検討したところ、処理後の胚の生存率がほとんど低下しないマイクロインジェクション条件を見出した。さらに、*in vitro*転写反応により調製したGFP mRNAを導入した胚には、強度のGFP蛍光が観察された。以上の結果から、カタクチイワシ受精卵に対するマイクロインジェクション法の確立が示された。そこで引き続き、GFP遺伝子をCMVプロモーターで駆動する発現ベクターを構築し、マイクロインジェクション法によって本種の受精卵に導入した。その結果、導入胚の一部にGFP蛍光が観察されたが、その導入効率は低いことが分かった。現在、遺伝子導入効率の改善を目的として、様々な条件の検討を行っている。

Jananese anchovy, Biomedicine, Transgene expression

発表責任者：坂口圭史（keishi_s@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：4K001
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# アンビエントイオン化を利用したユリ香のリアルタイム分析
# Real time flavor monitoring from lilium flower with DART Mass Spectrometer

○坂倉 幹始[1]、塩田 晃久[1]、渡辺 淳[2] ([1]エーエムアール株式会社、[2]株式会社島津製作所)
○MOTOSHI SAKAKURA[1], TERUHISA SHIOTA[1], JUN WATANABE[2] ([1]AMR Inc., [2]SHIMADZU Corp.)

【目的】
香気成分のリアルタイム分析には通常PTR－MS（陽子移動反応質量分析計）やSIFT－MS（CIイオン選択型質量分析計）が用いられる。しかしながら市販の装置では接続できる質量分析計に制限があり、分析にも制約が生じていた。本研究では、汎用の質量分析計にリアルタイム直接分析イオン源（Direct Analysis in Real Time）を接続し、香気成分の測定系を構築した。サンプルとしてユリを直接測定し、特徴的な成分の検出を行い、開花日からの香りの変化の数値化を目標に実験を行った。
【方法】
測定には、リアルタイム直接分析イオン源DART－OS（IonSense, Inc., Saugus, MA, USA）を装備した質量分析計LCMS－2020（島津製作所）を用いた。サンプルはユリ（カサブランカ ／ オリエンタル・ハイブリッド種）を用いた。ガスを吸い込むためにクローズチャンバーを作成し、ユリ花から生じる香気を吸い込む系を構築した。今回使用した質量分析装置は高速極性切り替え（15msec）が可能であるため、ポジティブ、ネガティブ両極性のMSスペクトルをLoop time 1秒以内に設定してデータ取得を行った。
【結果】
DARTイオン化法はプロトン授受を起点にするイオン化法であるため、同様のイオン化手法であるPTR－MSの結果と比較を行った。リナロール、リモネン等を測定したところPTR－MSと同様のピークが得られていることが確認できた[2]。この結果を元にユリ香を測定したところ、主成分としてオシメン及びリナロールが特徴的に検出されており、これらは過去の報告と一致することが分かった[1]。開花直前、開花日、翌日と香りの変動を追跡した結果、Positive m／z118, 205, Negative m／z 151が増加する傾向が見られた。これらより汎用の装置を利用しても香気成分のリアルタイム分析が可能であることが分かった。
[1] http:／／www. naro. affrc. go. jp／publicity__report／publication／files／case__studies__fragrance__of__the__lily__pre. pdf
[2]Anita Lee et al., JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH, 111, 2006, D17305.

Mass Spectrometry, Real time flavor analysis, terpenoids

発表責任者：坂倉　幹始（m-sakakura@amr-inc.co.jp）

発表番号：4K002
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 植物における質量分析イメージング法の最適化

# Optimization of mass spectrometry imaging techniques in plants

○一瀬 智美[1]、早川 英介[1]、中村 純也[3]、中家 修一[2]、山崎 雄三[2]、藤村 由紀[1]、割石 博之[1]、三浦 大典[1] ([1]九大・レドックスナビ、[2]島津製作所、[3]九大院・生資環)
○ Tomomi ICHINOSE[1], Eisuke HAYAKAWA[1], Jyunya NAKAMURA[3], Shuuichi NAKAYA[2], Yuuzou YAMAZAKI[2], Yoshinori FUJIMURA[1], Hiroyuki WARIISHI[1], Daisuke MIURA[1] ([1]ICMRN, Kyushu Univ., [2]Shimadzu Co., [3]Kyushu Univ.)

［緒言］植物は生存戦略の一つとして複雑多岐にわたる生理機能を有する 20 万種を超える代謝物を合成することが知られている。さらに、これらの多彩な代謝物群は生育段階や部位において厳密な制御を受けて生合成されると考えられる。従って、植物組織における生理応答機構を高度に理解するためには、時空間的に変動する代謝物ネットワークを捉えることが極めて重要であると考えられる。近年、生体分子の分布を標識すること無く質量/電荷比（*m/z*）に基づいて直接検出できる新たなラベルフリーの分子マッピング法として、マトリックスレーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）を用いた質量分析イメージング（MSI）が注目されている。これまでに主に動物組織を用いた技術開発が進められており、様々な低分子量化合物のイメージングが報告されている。しかしながら植物組織はその形態的な特性からイメージング試料の調製法は確立されておらず、再現性よく高感度な代謝物の分布情報を得ることは困難であった。そこで本研究では、植物組織における内在性代謝物の高感度可視化を目的として MALDI イメージング法の最適化を行った。
［材料および方法］供試試料としてシロイヌナズナ Col-0 系統の葉(発芽後 2 週間)および花弁組織（発芽後 4 週間）を用いた。また、MALDI マトリックスとして 9-aminoacridine を使用した。試料へのマトリックス塗布方法として、汎用されているスプレーコーティング法と蒸着法に加え、蒸着後に試料上でのマトリックス再結晶化処理を行い、三者間でのイメージング解析結果を比較した。
［結果と考察］スプレーコーティング法および蒸着法を用いたところ、代謝物に由来するピーク数が少ないことに加えピーク強度が弱く、これらの代謝物分布画像は取得できなかった。一方、蒸着後にマトリックス再結晶化処理を行うことにより、組織上に存在する複数の代謝物の同時可視化に成功した。これは組織上におけるマトリックスと代謝物との共結晶化が促進された結果であると推察される。さらに、イメージング結果より得られた各代謝物ピークの MS/MS フラグメントスペクトルを用いて、複数の代謝物（一次・二次代謝産物）構造の同定に成功し、一度の測定で構造の全く異なる代謝物の分布情報を得るに至った。今後、本技術を用いて植物代謝生理・形態学的情報を与える基盤技術の構築を進める。

mass spectrometry imaging, metabolite, *Arabidopsis*

発表責任者：三浦大典（daipon@agr.kyushu-u.ac.jp）

発表番号：4K003
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# イオンモビリティー質量分析法を用いた糖鎖解析

# Analysis of carbohydrate chains by ion mobility mass spectrometry

○伊奈 隆年[1,2]、淺野 泰久[1,2] ([1]富山県大・生工研セ、[2]JST, ERATO)
○Atsutoshi INA[1,2], Yasuhisa ASANO[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., Biotech. Res. Center & Dept. Biotech., [2]ERATO, JST)

【目的】

タンパク質の翻訳後修飾である糖鎖修飾は、高等生物で多く見られる修飾形態であり、ヒトでは50%以上のタンパク質で糖鎖修飾を受けているといわれている。また、糖鎖は、タンパク質の立体構造の維持や可溶化、がんの転移と浸潤、細菌・ウイルス感染など生体反応に重要な役割を果たしている。さらに、抗体医薬品など高分子医薬品は、糖鎖の差により薬効が異なることがあるため、糖鎖解析が重要とされている。現在、糖鎖配列解析をおこなうには、多段階での分離が異なるカラムクロマトグラフィーや質量分析により行われている。しかしながら糖鎖は、単糖の組み合わせで構成されており、化学的性質が似た構造を持っていることから、化学的性質で分離するカラムでの分離は不利とされている。一方、質量分析法は、質量分離のみでは分離不可能な *m/z* が同一の成分などがあり、技術的な改善が期待されている。そこで、分子の形状、電荷、質量に依存する新たな分離技術であるイオンモビリティー分離に着目し、イオンモビリティー質量分析法を用いた糖鎖分離法の検討を行った。

【方法】

標準糖鎖は、増田化学株式会社、ProZyme から購入した。非ラベル化糖鎖については、糖鎖標識部位として、N-ヒドロキシスクシンイミドカルバメート、蛍光発色団であるキノリン、強塩基性の三級アミンを構造に持つ RapiFluor-MS 試薬で標識した。標識後、HILIC モードによる固相抽出により精製を行った。質量分析計は、イオンモビリティー機能を有する Synapt G2Si (Waters) を用いた。イオン化モードは、ポジティブイオンモードで測定した。データは、MS、並びに $MS^E$ モードで測定を行った。イオンモビリティー分離は、ヘリウムガスをバッファーガスとして用い、Wave Velocity；400 m/sec、Wave height ；40 V を基準として行った。 データ解析には、Masslynx 並びに DriftScope を用いた。

【結果】

イオンモビリティー質量分析を行った結果、糖鎖標準品の *m/z*、イオンモビリティー分離より得られるドリフトタイム (msec) をプロットすると、分散した傾向が確認された。さらに、構造異性体である GlcNAc 4-β1 GlcNAc 4-β1 Man( 6-α1 Man 2-β1 GlcNAc) 3-α1 Man と GlcNAc 4-β1 GlcNAc 4-β1 Man( 6-α1 Man) 3-α1 Man 2-β1 GlcNAc のドリフトタイムを比較すると、Δ1 msec の差が観察され有意に分離できることが示された。イオンモビリティー質量分析は、糖鎖の質量とイオンモビリティー分離より得られる衝突断面積とで分離でき、糖鎖解析の新たな指標になりうることが示唆された。

Ion mobility separation, Mass spectrometry, Carbohydrate chain

発表番号：4K004
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 非対称 PCR により増幅した一本鎖 DNA の HPLC による分析と表面プラズモン共鳴分析を用いる相補鎖との応答解析

# HPLC analysis of single strand DNA amplified with asymmetric PCR and surface plasmon resonance analysis of its response to a complementary strand probe

○奥村 史朗[1]、長井 晴香[2]、冨岡 寛治[2]、岩倉 宗弘[3]、東 信哉[3]、井上 國世[4] ([1]福岡県工技セ、[2]久留米工業高等専門学校、[3]九州計測器、[4]京大名誉教授)
○ Shiro OKUMURA[1], Haruka NAGAI[2], Kanji TOMIOKA[2], Munehiro IWAKURA[3], Shinya AZUMA[3], Kuniyo INOUYE[4] ([1]Fukuoka ITC, [2]Kurume NCT, [3]Kyushu Keisokki, [4]Kyoto Univ. Prof. Emeritus)

【目的】食品製造産業では、食中毒防止の観点から定期的に一般生菌数等の検査を行っているが、食中毒の原因となる菌の特異的な検査は、時間とコストの観点から、不定期に行われる場合が多い。そこで、特異的検査の簡便化を目指して、小型の表面プラズモン共鳴（SPR）センサーを用いた食中毒菌の迅速・簡易判定システムの開発を進めている。本システムにおいては、サンプルを液体培地に加えて前培養した後、培養液から抽出したゲノム DNA をテンプレートとして非対称 PCR により食中毒菌固有の配列の一本鎖 DNA を増幅し、その相補鎖との相互作用を小型 SPR センサーで検出する。検出感度は一本鎖 DNA の増幅量に依存することから、一本鎖と二本鎖 DNA が同時に増幅される非対称 PCR の最適条件の検討のために、増幅物中の一本鎖 DNA 濃度の定量方法を確立する必要がある。
【方法および結果】黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子である thermostable nuclease の遺伝子を対象に検討を行った。標準サンプルとして PCR による増幅物と同じ配列をもつ 123mer の Forward 鎖（F 鎖）と Reverse 鎖（R 鎖）を合成し、ODS カラムを用いる HPLC により F 鎖と R 鎖の定量法を検討した。検出は UV（260nm）吸光度を用いて、アセトニトリルと TE バッファー（pH 7.4）を移動相としてグラジエントを行い、流量 1.0 ml/min、カラム温度 50℃で HPLC を行うことで、F 鎖と R 鎖が分離し、個別の定量が可能となった。両者の定量値差を求めることにより、一本鎖 DNA 濃度が簡易的に推計できるものと考えられた。次に標準サンプルをテンプレートとして非対称 PCR を行い、増幅産物をエタノール沈殿で精製後 TE バッファーに溶解し、前記条件により一本鎖 DNA を定量した。増幅物中における一本鎖 DNA 濃度の測定値は、簡易的な計算による理論値とよく一致した。また、一本鎖 DNA の相補鎖を、SPR センサーのチップにプローブとして固定化し、このプローブと増幅産物の SPR 応答を測定したところ、一本鎖 DNA 濃度とかなり良い相関性が認められ、増幅物中の一本鎖 DNA 濃度の簡便かつ迅速な定量方法として HPLC による本法が有効であることが示された。

surface plasmon resonance, asymmetric polymerase chain reaction, HPLC

発表責任者：奥村史朗（sokumura@fitc.pref.fukuoka.jp）

発表番号：4K005
発表日時：3 月 30 日 13:15～14:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 発汗代謝と表在微生物叢の変動に基づくヒトの体内外環境評価法

# Evaluation for human internal and extracorporeal environment based on variations in sweat metabolites and superficial microorganisms

○筒井 聡志[1]、三澤 拓真[1,2]、伊達 康博[1,2]、菊地 淳[1,2,3]（[1]横市大院、[2]理研　CSRS、[3]名大院）
○Satoshi TSUTSUI[1], Takuma MISAWA[1,2], Yasuhiro DATE[1,2], Jun KIKUCHI[1,2,3] ([1]Yokohama City Univ., [2]Riken CSRS., [3]Nagoya Univ.)

【背景・目的】ヒトは膨大な数の微生物と共生関係にあり、超有機体として振る舞うヒトの共代謝反応を理解するためには、両者の総合的かつ詳細な関係性を評価することが極めて重要である。しかしながら、従来の要素還元的アプローチでは各々の複雑な代謝系に加え、両者の相互作用を網羅的に解析することは時間的および労力的に困難であることから、網羅的に取得したデータから統計的な手法を用いて関係性を明らかにする方法論が発達してきた。中でも代謝物を主対象としたメタボノミクスは高い網羅性を持ち、サンプル調製が簡便である NMR は当該研究において広く用いられている。とりわけ、ヒトを対象とした NMR メタボノミクスでは侵襲性の低い尿や糞便といった試料が好んで用いられるが、これらの試料とは異なり、血液から即時に産生、排出されるため、短期間の体内環境を反映することが期待できる汗を用いた NMR メタボノミクスはほとんど行われていない。そこで本研究では汗に含まれる代謝物及び表在微生物叢の解析を行い、発汗代謝変動と表在微生物叢の関係性を明らかにすることで、汗を用いたヒトの体内外環境評価法の構築を目的とした。
【方法】試料は複数人のボランティアから、日時と採取部位に関する情報も添えて提供された。得られた汗は、独自に最適化した分析プロトコルを用いて NMR 計測および微生物叢評価を行った。シグナル帰属は、当研究室で開発した Spin couple および Spin assign などを中心に、既存報告等も参考にして行った。得られた各々のデータは数値化し、多変量解析等に供試した。
【結果】汗の NMR メタボノミクス研究においては研究報告例も極めて少ないことから、最初に汗のサンプリング方法に関する検討を行い、NMR 計測を行う上で必要な汗の量が確保でき、かつ比較的迅速に採取可能なサンプリングプロトコルを確立した。次に、サンプリングに要した時間や採取後冷凍庫に保存するまでにかかった時間が代謝プロファイルにどの程度影響を与えるかについて調べるために、常温静置実験を行い代謝プロファイルの経時変化を評価したところ、採取後一時間程度までは代謝プロファイルの変化がほとんどないことを明らかにした。また、一時間以上経過すると微生物の発酵産物が徐々に増加してくる様子が観察され、これらの物質がサンプル劣化のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。さらに、二次元 NMR 法により、乳酸やピルビン酸を始めとする有機酸、セリンやロイシンなどのアミノ酸を中心とする 25 種類以上の代謝物の帰属に成功した。現在、これらの代謝物データ及び表在微生物叢のデータに対して多変量解析や相関解析、統合解析等を行っており、個体間変動の可視化や代謝物―表在微生物叢間の関係性等に関して得られた最新の知見についても本会で議論したい。

metabonomics, nmr, data mining

発表責任者：筒井聡志（formalhaut@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp）

発表番号：4K006
発表日時：3 月 30 日 14:15～15:15、発表場所：ポスター会場エリア K

# 二次元セルブロット法の開発

# Development of 2-DE Cell Blot Method

○北田 洋平[1]、ビンティムハンマドユソップ シティマイサラ[2]、向井 有理[1]、寺崎 武夫[1] ([1]明大理工、[2]明大院電気)
○Youhei KITADA[1], SITI MAISARAH Binti Muhamad Yusop[2], Yuri MUKAI[1], Takeo TERASAKI[1] ([1]Meiji Univ. Sch. Sci. & Tech., [2]Meiji Univ. Grad. Sch. Sci. & Tech.)

実験材料に含まれるタンパク質成分から目的とするタンパク質を精製するには硫安分画法、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィーのような様々な分画法及び電気泳動等を用いる。これには多くの手順と時間、実験材料を必要とする。このような背景から、より少ない手順と時間、実験材料で全タンパク質成分から目的のタンパク質を網羅的に検出する方法を開発した。我々はこの方法を「二次元セルブロット法」と名付け、今回は細胞の形態変化に影響を与えるタンパク質の検出に適用した。

「二次元セルブロット法」では、変性剤非存在下で実験材料に含まれるタンパク質成分の等電点電気泳動を一次元目に行い、二次元目に Native-PAGE によるタンパク質の電荷、形態、分子量の相違での分離を行う。本研究では、二次元に分離されたタンパク質を転写した PVDF 膜上に細胞を培養し、タンパク質及び細胞を染色することで、細胞の形態変化に影響を与えるタンパク質を確認した。実験材料にモンシロチョウの蛹および成虫の体液を用い、モンシロチョウの体液に含まれる細胞死誘導タンパク質のピエリシンを HeLa 細胞(ヒトがん細胞)の形態変化に影響を与えるタンパク質の検出を試みた。

1 枚の PVDF 膜上で、分離されたタンパク質の分布状態と細胞の形態を同時に観察したところ、HeLa 細胞が特異的に死滅しているスポットを明瞭に確認した。このスポットからタンパク質成分を抽出し、SDS-PAGE で分子量を確認したところ、モンシロチョウに含まれる細胞死誘導タンパク質ピエリシン（Swiss-prot ID：PRSN_PIERA）と同程度の分子量をもつことがわかった。今後、MALDI-TOF-MS 等によるアミノ酸配列解析を行い、このタンパク質がピエリシンであるか否かを確認する予定である。「二次元セルブロット法」は細胞の形態変化を誘導するタンパク質の検出の他、細胞に核酸・タンパク質・脂肪等の発現を誘導するタンパク質の検出にも応用可能である。

[1]Manabe T., Jin Y., Analysis of E.coli soluble proteins by non-denaturing micro2-DE/3-DE and MALDI-MS-PMF. Electrophoresis, 31, 2740-2748, (2010)
[2]Koyama K., et. al. Presence in pieris rapae of Cytotoxic Activity against Human Carcinoma Cells. Jpn. J. Cancer Res. 87, 1259-1262, (1996)

cell blot, non-denaturing 2-de, pierisin

# シンポジウムプログラム

## 3 月 28 日（月）9:00〜11:30，または 15:30〜18:00

### 2SY01　パスウェイエンジニアリングによる機能性テルペン生産研究の新展開

3 月 28 日（月）9:00〜11:30　会場：E（小ホール，2F）
世話人：三沢典彦（石川県大），村中俊哉（阪大）
座　長：2SY01–1〜2SY01–3：村中俊哉（阪大），2SY01–4〜2SY01–5：三沢典彦（石川県大）

9:00　2SY01–1　機能性テルペン生産の生物宿主として何を選ぶか？……○三沢典彦（石川県大・生資研）
9:30　2SY01–2　セスキテルペン合成酵素遺伝子の正確な機能同定法の確立
……○新藤一敏[1]，八反順一郎[2]，三沢典彦[2]（[1]日女大・家政，[2]石川県大・生資研）
10:00　2SY01–3　テルペノイド生合成経路の進化分子工学……○梅野太輔（千葉大院工）
10:30　2SY01–4　生合成酵素カクテルを用いた標識テルペノイド合成と環化反応機構解析への応用
……○川出　洋（東京農工大院）
11:00　2SY01–5　高度機能分化した植物組織培養による有用サポニン生産技術開発……○村中俊哉（阪大工）

### 2SY02　農芸化学としての酵素学からメディカルサイエンスへの展開

共同主催：日本学術会議 農学委員会・食料科学委員会合同 農芸化学分科会
3 月 28 日（月）9:00〜11:30　会場：D（107/108，1F）
世話人：人見清隆（名大院創薬科学），吉村　徹（名大院生命農学）
座　長：人見清隆（名大院創薬科学），吉村　徹（名大院生命農学）

9:00　開会挨拶……○清水　誠（日本学術会議第 2 部会員 , 東農大応生科）
9:05　2SY02–1　タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ活性で病態を診断する
……○人見清隆（名大院創薬科学）
9:25　2SY02–2　新規バイオマーカーとしての D–アミノ酸とその酵素的定量法
……○吉村　徹，邊見　久，伊藤智和（名大院生命農学）
9:50　2SY02–3　タンパク質切断酵素カルパインの基質特異性が個体の健康を規定する……○反町洋之（都医学研）
10:15　2SY02–4　環状ヌクレオチド分解酵素の研究基盤構築と創薬への展開
……○大森謙司[1,2]（[1]田辺三菱製薬，[2]名大院・創薬）
10:40　2SY02–5　薬剤標的としてのミトコンドリアー寄生虫からがん細胞までー……○北　　潔[1,2]（[1]東大医，[2]長崎大）
11:05　2SY02–6　新規アミノ酸定量用酵素の開発……○浅野泰久[1,2]（[1]富山県立大工，[2]JST, ERATO）

### 2SY03　食品タンパク質由来の健康機能性ペプチド研究の最先端

3 月 28 日（月）9:00〜11:30　会場：C（中ホール B，1F）
世話人：長岡　利（岐阜大・応用生物），松井利郎（九大・農学研究院）
座　長：長岡　利（岐阜大・応用生物），松井利郎（九大・農学研究院）

9:00　2SY03–1　脂質代謝改善ペプチド……○長岡　利（岐阜大応生）
9:30　2SY03–2　糖代謝改善ペプチド……○比良　徹，原　　博（北大院農）
10:00　2SY03–3　血管機能改善ペプチド……○松井利郎（九大院農）
10:30　2SY03–4　脳機能改善ペプチド……○片山　茂（信州大農）
11:00　2SY03–5　廃用性筋萎縮改善ペプチド…○二川　健[1]，赤間一仁[2]（[1]徳島大学医学部医科栄養，[2]島根大学生物資源学部）

### 2SY04　Biofilm/cell-cell communication 研究が切り開く農芸化学分野〜食品・環境から医薬まで〜

3 月 28 日（月）9:00〜11:30　会場：B（中ホール A，1F）
世話人：森永　康（日大），池田　宰（宇都宮大），野村暢彦（筑波大）
座　長：池田　宰（宇都宮大），野村暢彦（筑波大）

9:00　はじめに……○池田　宰（宇都宮大）
9:10　2SY04–1　食品関連微生物が形成するバイオフィルムの制御と利用……○森永　康（日大生物資源科学部）
9:40　2SY04–2　口腔という特殊環境において繰り広げられる Biofilm/cell–cell communication
……○泉福英信（国立感染症研究所）
10:05　2SY04–3　新規な分離培養戦略が切り拓く難培養性硝化細菌の獲得と生理・ゲノム特性
……○藤谷拓嗣，牛木章友，常田　聡（早大院生医）
10:30　2SY04–4　Quroum Sensing 阻害技術の開発と微生物制御への応用……○諸星知広，池田　宰（宇都宮大院工）
10:55　2SY04–5　細菌の集団形成と社会性の創発……○野村暢彦，豊福雅典，尾花　望（筑波大・生命環境）
11:20　おわりに……○野村暢彦（筑波大）

## 2SY05　γ-グルタミルトランスペプチダーゼ研究の過去・現在・未来

3 月 28 日（月）15:30～17:30　会場：F（204，2F）
世話人：鈴木秀之（京工繊大），平竹　潤（京大）
座　長：鈴木秀之（京工繊大），和田　啓（宮崎大テニュアトラック推進機構）

15:30　2SY05–1　γ–グルタミルトランスペプチダーゼの応用……○鈴木秀之（京都工繊大）
16:00　2SY05–2　γ–グルタミルトランスペプチダーゼの結晶構造から反応機構を探る
……○和田　啓（宮崎大テニュアトラック推進機構）
16:30　2SY05–3　ポリγグルタミン酸の局在性を決める分断酵素～GGT 類縁の CapD とアミダーゼ類縁の PgdS を中心に～
……○芦内　誠，白米優一，若松泰介（高知大農）
17:00　2SY05–4　***Lactobacillus brevis*** によるアルコール性肝障害の抑制作用
……○瀬川修一（サッポロビール株式会社　価値創造フロンティア研究所）

## 2SY06　大豆の健康成分を科学する～大豆の生理活性成分とその生理作用の科学～

3 月 28 日（月）15:30～18:00　会場：C（中ホール B，1F）
世話人：増田誠司（京大院生命），山地亮一（大阪府大院生命環境）
座　長：増田誠司（京大院生命），山地亮一（大阪府大院生命環境）

15:30　はじめに……○増田誠司（京大院生命）
15:35　2SY06–1　大豆イソフラボンによる胎生期・新生仔期マウスの脂質代謝遺伝子のエピジェネティクス制御
……○亀井康富（京都府立大生命環境）
15:55　2SY06–2　成体海馬神経新生促進を介した大豆イソフラボンによる脳機能改善の可能性……○神野尚三（九大院医）
16:20　2SY06–3　大豆イソフラボン類の神経幹/前駆細胞の細胞増殖・分化に対する作用の解析
……○守屋孝洋（東北大学）
16:45　2SY06–4　大豆ペプチドの優れた生体吸収性に寄与する **POT** ファミリー輸送体の基質多選択性
……○伊藤圭祐[1]，河合　駿[2]，本山貴康[3]，加藤竜司[2]，河原崎泰昌[1]
（[1]静県大院・薬食，[2]名大院・創薬，[3]不二製油・基盤研）
17:05　2SY06–5　脱ユビキチン化酵素 **19** と大豆イソフラボンによる骨格筋量の制御…○山地亮一（大阪府大院生命環境）
17:25　2SY06–6　大豆中の **mRNA** 成熟阻害活性の同定・構造活性相関・作用基盤の解明……○増田誠司（京大生命）
17:45　おわりに……○山地亮一（大阪府大院生命環境）

## 2SY07　複合系微生物が切り拓く環境バイオテクノロジー～社会実装技術のための複合微生物の有効利用と機能理解～

共　催：環境バイオテクノロジー学会
3 月 28 日（月）15:30～18:00　会場：B（中ホール A，1F）
世話人：前田憲成（九州工大・院生命体），加藤純一（広島大・先端物質）
座　長：野尻秀昭（東京大・生物生産工学研究センター），福田雅夫（長岡技科大・工）

15:30　はじめに……○遠藤銀朗（東北学院大・工）
15:35　2SY07–1　海藻バイオマスの徹底利用……○中島田豊[1,2]（[1]広大先端，[2]JST・CREST）
16:00　2SY07–2　複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物変換法の制御と体系化
……○田代幸寛，酒井謙二（九大院・農）
16:20　2SY07–3　下水汚泥のメタン発酵向上化のための細菌間相互作用の解明……○前田憲成（九州工大・院生命体）
16:40　2SY07–4　複合微生物系における細胞間シグナル伝達とその応用
……○豊福雅典[1]，諸星知広[2]，池田　宰[2]，野村暢彦[1]（[1]筑波大・生命環境，[2]宇大・工）
17:00　2SY07–5　海底メタン生産環境中の共生関係機構の解析……○森川正章（北大環境）
17:25　2SY07–6　放射能汚染バイオマスの資源化と減容化総合技術の開発
……○加藤純一[1]，金原和秀[2]，中村雅哉[3]，大塚祐一郎[3]，佐々木健[4]，
佐々木慧[4]，中島田豊[1]，松尾健司[1]，新谷政己[2]，平井浩文[2]
（[1]広島大先端物質，[2]静岡大工，[3]森林総合研究所，[4]広島国際学院大工）
17:50　おわりに（総合討論）……○倉根隆一郎（中部大・応用生物）

## 2SY08　植物をとりまく生態系の環境応答鍵因子：オキシリピン類の新展開

3 月 28 日（月）15:30〜18:00　会場：D（107/108，1F）
世話人：松浦英幸（北大），岡田憲典（東大），松田一彦（近畿大）
座　長：松浦英幸（北大），岡田憲典（東大），松田一彦（近畿大）

15:30　2SY08–1　植物における **JA–Ile** 以外の **JA** が司る生物現象 …… ○松浦英幸（北大院農）
16:00　2SY08–2　植物組織破砕によるオキシリピン類の一過的生成制御はリポキシゲナーゼの活性化が担う
…… ○松井健二，肥塚崇男，望月智史（山口大農）
16:30　2SY08–3　ジャスモン酸の新規生理活性－ **COI1** を介さないオーキシンとのクロストーク－
…… ○石丸泰寛[1]，鈴木健史[1]，Meesters Christian[2]，Kombrink Erich[2]，知念拓実[3]，臼井健郎[3]，高橋公咲[4]，松浦英幸[4]，柿本辰男[5]，深城英弘[6]，林謙一郎[7]，上田　実[1]
（[1]東北大院理，[2]Max Planck Institute for Plant Breeding Research，[3]筑波大院生命環境，[4]北大院農，[5]大阪大院理，[6]神戸大院理，[7]岡山理大理）
17:00　2SY08–4　イネのアレロケミカル生産におけるジャスモン酸応答性転写因子の働き
…… ○岡田憲典[1]，宮本皓司[2]，光田展隆[3]，森　昌樹[4]，山根久和[2]
（[1]東大生セ，[2]帝京大バイオ，[3]産総研生物プロセス，[4]生物研遺伝子組換センター）
17:30　2SY08–5　ピレスリン生合成から導かれるオキシリピン経路の理解 …… ○松田一彦（近大農・応生化）

## 2SY09　農芸化学とバイオインフォマティクスとの接点から見える新たな生命科学

協　賛：創薬等支援技術基盤プラットフォーム
3 月 28 日（月）15:30〜18:00　会場：E（小ホール，2F）
世話人：清水謙多郎（東大院農生科），永田宏次（東大院農生科）
座　長：清水謙多郎（東大院農生科），永田宏次（東大院農生科）

15:30　2SY09–1　創薬等支援基盤技術プラットフォームにおけるバイオインフォマティクスの支援と高度化
…… ○清水謙多郎，永田宏次（東大農）
15:40　2SY09–2　配列から機能まで，統合解析のための **VapRoS** …… ○池尾一穂（国立遺伝学研究所）
16:00　2SY09–3　構造生命科学データクラウド **VaProS** による生命科学ビックデータへの挑戦
…… ○由良　敬[1,2]（[1]お茶大・院人間文化，[2]遺伝研）
16:20　2SY09–4　天然リガンドデータベースの開発とタンパク質低分子相互作用解析への応用
…… ○木下賢吾[1,2,3]（[1]東北大院情報，[2]東北大加齢研，[3]東北大メディカルメガバンク）
16:40　2SY09–5　分子モデリングを活用した創薬支援研究 …… ○広川貴次（産総研・創薬プロ研）
17:00　2SY09–6　分子シミュレーションで探るタンパク質－リガンド間相互作用
…… ○寺田　透，森脇由隆，根上　樹，吉野龍ノ介，清水謙多郎（東大農）
17:20　2SY09–7　分子動力学計算と **X** 線小角散乱の連携によるタンパク質の動的構造解析
…… ○池口満徳（横浜市大生命医）
17:40　2SY09–8　**G** タンパク質共役受容体とペプチドリガンドの ***in vitro*/*in silico*** 相互作用解析
…… ○永田宏次（東大院農生科）

# 3 月 29 日（火）9:00〜11:30，または 15:30〜18:00

## 3SY01　身近で多様なイソプレノイドの生合成“薬品，香料，バイオ燃料から天然ゴムまで”

協　賛：イソプレノイド研究会
3 月 29 日（火）9:00〜11:30　会場：B（中ホール A，1F）
世話人：川向　誠（島根大），葛山智久（東大），邊見　久（名大）
座　長：邊見　久（名大），葛山智久（東大），川向　誠（島根大）

9:00　はじめに …… ○邊見　久（名大）
9:02　3SY01–1　イソプレノイドに関する最近の話題 …… ○葛山智久（東大・生物工学セ）
9:13　3SY01–2　龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成 …… ○佐藤　努（新潟大院自然）
9:35　3SY01–3　組換え酵母による植物由来トリテルペン配糖体生産に向けた研究 …… ○關　　光（阪大院工）
9:57　3SY01–4　コエンザイム **Q10** の生合成と微生物生産 …… ○川向　誠，戒能智宏（島根大生資）
10:19　3SY01–5　植物の適応代謝産物モミラクトンの生合成経路と農薬としてのポテンシャル
…… ○岡田憲典[1]，川出　洋[2]，林謙一郎[3]，宮本皓司[4]，山根久和[4]，豊増知伸[5]
（[1]東大生セ，[2]東京農工大，[3]岡山理大，[4]帝京大，[5]山形大）
10:41　3SY01–6　パラゴムノキの天然ゴム生合成機構の解明 …… ○高橋征司（東北大工）
11:03　3SY01–7　バイオ燃料源として有望な微細緑藻 ***Botryococcus braunii*** によるトリテルペン炭化水素の生合成・代謝
…… ○岡田　茂[1,2]（[1]東大農，[2]JST CREST）
11:25　おわりに …… ○川向　誠（島根大）

## 3SY02　バイオ医薬品製造に向けたエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変技術の新展開

3 月 29 日（火）9:00〜11:30　会場：D（107/108，1F）
世話人：竹川　薫（九大），山本憲二（石川県大）
座　長：竹川　薫（九大），山本憲二（石川県大）

9:00　3SY02–1　エンドグリコシダーゼ：糖鎖の機能・構造解析用試薬からバイオ医薬品製造ツールへの変遷
……◦竹川　薫（九大院農）
9:20　3SY02–2　エンドグリコシダーゼはヒト遺伝疾患の治療のターゲットになり得るか？……◦鈴木　匡（理研）
9:45　3SY02–3　部位特異的変異導入によるエンドグリコシダーゼの糖鎖特異性の改変
……◦加藤紀彦[1]，山本憲二[2]（[1]京大院生命，[2]石川県大）
10:10　3SY02–4　エンドグリコシダーゼの糖鎖転移反応を利用した糖鎖複合体合成システムの開発
……◦稲津敏行（東海大学）
10:35　3SY02–5　バイオ医薬品糖鎖分析のための糖タンパク質校正品の開発……◦千葉靖典（産総研・創薬基盤）
11:00　3SY02–6　エンドグリコシダーゼによる糖鎖改変技術開発とそのバイオ医薬品トラスツズマブへの応用
……◦白井　孝[1]，黒河内政樹[1]，月村　亘[1]，森　昌子[1]，大隅賢二[1]，戸治野真美[1]，
高島　晶[1]，菅原州一[1]，弘瀬友理子[1]，高柳　淳[3]，水野真盛[1]，天野純子[1]，
松田昭生[1]，正田晋一郎[4]，木下崇司[6]，竹川　薫[5]，冨田正浩[2]
（[1]公益財団法人野口研究所，[2]株式会社免疫生物研究所，[3]慶応義塾大学，
[4]東北大学，[5]九州大学，[6]株式会社伏見製薬所）
11:25　おわりに……◦山本憲二（石川県大）

## 3SY03　食品機能研究なう！：食品機能研究の過去、現在、そして未来

共　催：日本フードファクター学会，フードサイエンスフォーラム
3 月 29 日（火）9:00〜11:30　会場：A（特別会議場，1F）
世話人：榊原陽一（宮崎大農），榊原啓之（宮崎大農），藤村由紀（九大レドックスナビ）
座　長：榊原陽一（宮崎大農），中村宜督（岡山大農），室田佳恵子（近畿大農），藤村由紀（九大レドックスナビ），榊原啓之（宮崎大農）

9:00　はじめに……◦榊原陽一（宮崎大農）
9:05　3SY03–1　食品機能研究の過去と現在：私のフラボノイド研究に影響を与えたトピックス
……◦寺尾純二（徳島大院医歯薬）
9:50　3SY03–2　要素還元的手法の限界とメタボロミクスの挑戦：食品機能性評価への応用
……◦藤村由紀[1]，三浦大典[1]，割石博之[1,2,3]，立花宏文[1,3,4]
（[1]九大レドックスナビ，[2]九大基教，[3]九大農，[4]九大機能デザイン）
10:10　3SY03–3　体内のリズムを考慮に入れた食品の機能性研究……◦榊原啓之（宮崎大農）
10:30　3SY03–4　食品機能研究を支える分子細胞生物学研究の重要性……◦佐藤隆一郎（東大院・農生科）
11:00　3SY03–5　食品機能評価の新たな視点……◦立花宏文（九大農）

## 3SY04　美と健康〜みんなが気になる基礎から学ぶ食品の機能性や微生物の役割

3 月 29 日（火）9:00〜11:30　会場：C（中ホール B，1F）
世話人：高木　忍（ノボザイムズ ジャパン），北本宏子（農環研），五味恵子（キッコーマン）
座　長：高木　忍（ノボザイムズ ジャパン），北本宏子（農環研），五味恵子（キッコーマン）

9:00　3SY04–1　乳酸菌を使った子宮頸がん特異的な免疫療法の開発……◦川名　敬（東京大学医学部）
9:30　3SY04–2　ヨーグルト発酵を担う 2 種の乳酸菌のゲノム進化と共生関係……◦佐々木泰子（明治大学農）
10:00　3SY04–3　乳酸菌を利用した皮膚性状改善へのアプローチ……◦今岡明美（ヤクルト本社中央研究所）
10:30　3SY04–4　筋肉の衰えをアミノ酸で防げ……◦小林久峰（味の素株式会社）
11:00　3SY04–5　皮膚における様々な遊離 D–アミノ酸の分布と生理機能……◦東條洋介（資生堂リサーチセンター）

## 3SY05　名古屋議定書時代、海外遺伝資源を用いた研究開発をいかに進めていくか？ —これまでの取り組みと世界動向－

3 月 29 日（火）9:00～11:30　会場：F（204，2F）
世話人：川崎浩子（製品評価技術基盤機構），大熊盛也（理研）
座　長：川崎浩子（製品評価技術基盤機構），大熊盛也（理研）

9:00　はじめに……○大熊盛也（理研）
9:05　3SY05–1　農業や環境保全への応用用途をもつ土壌細菌資源の探索
……○大塚重人[1]，スディアナイマデ[2]（[1]東京大学，[2]インドネシア科学院）
9:33　3SY05–2　家畜プロバイオティクスの分離・機能開発と応用……○入澤友啓[1,2]（[1]農大 農 畜，[2]理研 BRC JCM）
10:01　3SY05–3　大阪大学生物工学国際交流センターの東南アジア諸国との共同研究
……○藤山和仁（阪大生物工学国際交流セ）
10:29　3SY05–4　生物多様性条約と名古屋議定書……○須藤　学（製品評価技術基盤機構）
10:57　3SY05–5　インドネシア国立微生物資源センター **InaCC** の概要と期待される役割
……○鈴木健一朗（製品評価技術基盤機構 NBRC）
11:25　おわりに……○川崎浩子（製品評価技術基盤機構）

## 3SY06　光プローブによるタンパク質プロファイリングと創薬

3 月 29 日（火）15:30～18:00　会場：F（204，2F）
世話人：橋本　誠（北大院農），高橋公咲（北大院農），重冨顕吾（北大院農）
座　長：橋本　誠（北大院農），高橋公咲（北大院農），重冨顕吾（北大院農）

15:30　3SY06–1　光アフィニティーラベルにおける光反応性基……○橋本　誠（北大農）
16:05　3SY06–2　光架橋法による細胞膜透過ペプチドの取込受容体の同定と機序解明……○二木史朗（京大化研）
16:40　3SY06–3　光ラベル法による同位体蛍光標識導入と標的同定戦略
……○友廣岳則[1]，森本正大[1]，畑中保丸[2]（[1]富山大院薬，[2]富山大学副学長）
17:15　3SY06–4　アデノシン $\mathbf{A_{2A}}$ 受容体の光アフィニティーラベリング
……○村仲秀幸，百瀬隆喜，半田千彰，小澤基裕，小沢知永，田中信之，菊池伸次（キッセイ薬品工業株式会社）
17:50　3SY06–5　ユニークなリンカーを用いた生物活性物質の標的タンパク質同定法……○高橋公咲（北大農）

## 3SY07　新たな機能性糖質，アンカー型イソマルトメガロ糖の生産と特性

3 月 29 日（火）15:30～18:00　会場：E（小ホール，2F）
世話人：原　　博（北大院農），木村淳夫（北大院農）
座　長：原　　博（北大院農），木村淳夫（北大院農）

15:30　はじめに……○木村淳夫（北大院農）
15:35　3SY07–1　直鎖のアンカー型イソマルトメガロ糖：生産・機能・応用……○木村淳夫（北大院農）
16:10　3SY07–2　アンカー型環状イソマルトメガロ糖の酵素生産……○舟根和美（農研機構食総研）
16:45　3SY07–3　アンカー型イソマルトメガロ糖の分子特性の解析……○北村進一，鈴木志保（大阪府大院 応用生命）
17:20　3SY07–4　アンカー型イソマルトメガロ糖の生理作用……○原　　博（北大院農）
17:55　まとめ・総括……○原　　博（北大院農）

## 3SY08　酸素微生物学 ～微生物に学ぶ「酸素リモデリング」とその応用～

共　催：新学術領域研究「酸素を基軸とする生命の新たな統合的理解」
3 月 29 日（火）15:30～18:00　会場：B（中ホール A，1F）
世話人：高木博史（奈良先端大バイオ），新井博之（東大院農生科）
座　長：高木博史（奈良先端大バイオ），新井博之（東大院農生科），藤田祐一（名大院生命農）

15:30　はじめに……○高木博史（奈良先端大バイオ）
15:35　3SY08–1　酵母における酸化ストレス下における一酸化窒素の合成機構と生理機能の解析
……○高木博史（奈良先端大バイオ）
15:59　3SY08–2　糸状菌 ***Aspergillus nidulans*** の低酸素環境への代謝応答
……○高谷直樹，志水元亨，桝尾俊介（筑波大生命環境）
16:23　3SY08–3　酸素発生型光合成を行うシアノバクテリア（藍藻）の低酸素適応機構……○藤田祐一（名大院生命農）
16:47　3SY08–4　ニトロ化環状ヌクレオチドによる感染防御機構と細菌由来硫化水素による制御
……○藤井重元，松永哲郎，井田智章，赤池孝章（東北大医）
17:11　3SY08–5　嫌気性菌と酸素……○川崎信治，岡田拓也，新村洋一（東農大バイオ）
17:35　3SY08–6　酸素高親和性呼吸酵素による微生物の環境適応と呼吸防御……○新井博之（東大院農生科）
17:59　おわりに……○新井博之（東大院農生科）

## 3SY09　微生物メタボリズム研究の最前線

3 月 29 日（火）15:30～18:00　会場：C（中ホール B，1F）
世話人：小林達彦（筑波大），西山　真（東大）
座　長：小林達彦（筑波大），中山　亨（東北大），西山　真（東大）

15:30　はじめに……○小林達彦（筑波大）
15:33　3SY09–1　微生物酵素から考える腸内細菌とヒトの共生～ビフィズス菌と母乳オリゴ糖～
……○片山高嶺[1,2]（[1]京大生命，[2]石川県大）
15:57　3SY09–2　習慣的多量飲酒と大腸発がんリスク：微生物アルコール代謝から眺めたヒトと腸内細菌の相互作用
……○中山　亨（東北大院工）
16:21　3SY09–3　代謝フラックスを基盤とする物質生産法 の開発……○清水　浩，松田史生，戸谷吉博（阪大情報）
16:45　3SY09–4　合成生物工学の新展開……○近藤昭彦（神大工）
17:09　3SY09–5　アーキアにおけるアミノ酸生合成関連遺伝子の発現制御機構
……○跡見晴幸[1,2]，金関剛史[1]，山本康之[1]，今中忠行[2,3]，金井　保[1,2]
（[1]京大工，[2]JST, CREST，[3]立命館大生命科学）
17:33　3SY09–6　発酵生産とトランスポーター：エネルギー生成に共役するトランスポーターを例に
……○阿部敬悦[1,2]，七谷　圭[1]（[1]東北大院農，[2]東北大未来研）
17:57　おわりに……○西山　真（東大）

# 3 月 30 日（水）9:00～11:30

## 4SY01　皆に知って欲しい（意外と知らない）酵素の産業利用～その２～

協　賛：酵素工学研究会
3 月 30 日（水）9:00～11:30　会場：D（107/108，1F）
世話人：廣瀬芳彦（EnzymeWorks, Inc.），上田　誠（小山高専），高木　忍（ノボザイムズ ジャパン）
座　長：廣瀬芳彦（EnzymeWorks, Inc.），上田　誠（小山高専），高木　忍（ノボザイムズ ジャパン）

9:00　4SY01–1　まだまだ続くルシフェラーゼの産業利用……○五味恵子（キッコーマン研究開発本部）
9:30　4SY01–2　麹菌チロシナーゼを利用した新規染毛料の開発……○秦　洋二（月桂冠(株)総研）
10:00　4SY01–3　化学産業での酵素の活用……○水無　渉（三菱レイヨン株式会社）
10:30　4SY01–4　飼料用酵素～畜産生産者と持続可能な畜産の為に～
……○ジョーンズ美幸，齋藤太郎，小本勝利（DSM ニュートリションジャパン(株)）
11:00　4SY01–5　酵素利用で実現！「見た目」と「軟らかさ」を両立するバリアフリー型介護食品
……○柴田賢哉（広島総研食品工技セ）

## 4SY02　タウリンの多彩な生理作用と産業・医療への新展開

協　賛：国際タウリン研究会
3 月 30 日（水）9:00〜11:30　会場：G（206，2F）
世話人：村上　茂（福井県大），清水　誠（東農大），薩　秀夫（前橋工大）
座　長：村上　茂（福井県大），薩　秀夫（前橋工大），宮﨑照雄（東京医大）

9:00　はじめに……◦村上　茂（福井県大生物資源）
9:05　4SY02–1　タウリンの生理作用と産業応用……◦村上　茂（福井県大生物資源）
9:25　4SY02–2　タウリン欠乏モデルマウスから見たタウリンの生理的役割……◦伊藤崇志（兵庫医療大薬）
9:50　4SY02–3　養魚飼料とタウリン……◦佐藤秀一（東京海洋大）
10:15　4SY02–4　腸管におけるタウリンの吸収および生理機能
……◦薩　秀夫[1]，清水　誠[2]（[1]前橋工大工，[2]東農大・応用生科）
10:40　4SY02–5　運動とタウリン……◦大森　肇（筑波大体育系）
11:05　4SY02–6　ミトコンドリア病 **MELAS** に対するタウリン補充療法
……◦砂田芳秀[1]，太田成男[2]（[1]川崎医大，[2]日本医大）

## 4SY03　環境中の遺伝情報トラフィックと細菌ゲノム進化について考える

3 月 30 日（水）9:00〜11:30　会場：F（204，2F）
世話人：大島　拓（奈良先大），西田洋巳（富山県大）
座　長：大島　拓（奈良先大），西田洋巳（富山県大）

9:00　はじめに……◦大島　拓（奈良先端大）
9:05　4SY03–1　ウイルスから探る生命の起源と初期進化
……◦望月智弘[1,2]（[1]東京工業大学・地球生命研究所，[2]海洋研究開発機構）
9:34　4SY03–2　**CRISPR** の解析に基づくラン藻とファージのせめぎ合い……◦吉田天士（京大院農）
10:03　4SY03–3　遺伝子水平伝播への細胞外プラスミドの寄与の可能性
……◦高橋裕里香[1]，中野椋太[1]，宮西謙弥[1]，畠　俊郎[2]，西田洋巳[1]
（[1]富県大生工科・生工セ，[2]富県大環工科）
10:32　4SY03–4　プラスミドの宿主適応とゲノム組成……◦鈴木治夫（慶應）
11:01　4SY03–5　**RNA** を介した細菌ゲノムと外来性遺伝因子のクロストーク……◦宮腰昌利（秋田県大生資科）

## 4SY04　消化管研究の最前線　“三次元培養法を用いた消化管の機能解析”

3 月 30 日（水）9:00〜11:30　会場：A（特別会議場，1F）
世話人：園山　慶（北大），清水　誠（東京農大），岩槻　健（東京農大）
座　長：園山　慶（北大），清水　誠（東京農大），岩槻　健（東京農大）

9:00　4SY04–1　腸管細胞培養系の歴史と課題……◦清水　誠（東農大応生科）
9:30　4SY04–2　オルガノイドの培養法とその有用性……◦粟飯原永太郎（シンシナティ大学）
10:00　4SY04–3　腸管オルガノイドを用いた腸粘膜上皮セロトニンシステムの解析……◦園山　慶（北大農）
10:30　4SY04–4　**Enteroid** を用いた **Paneth** 細胞の機能可視化－顆粒分泌・再形成および免疫系クロストーク
……◦綾部時芳，横井友樹，櫻木直也，中村公則（北大生命）
11:00　4SY04–5　オルガノイド培養系を用いた味蕾および消化管の機能解析
……◦岩槻　健[1]，大木淳子[1]，熊木竣佑[1]，山根拓実[1]，Jiang Peihua[2]，大石祐一[1]
（[1]東農大応生科，[2]モネル化学感覚研）

## 4SY05　生合成研究の多様化が生み出す新潮流

3 月 30 日（水）9:00〜11:30　会場：E（小ホール，2F）
世話人：勝山陽平（東大），大利　徹（北大）［若手枠］
座　長：大利　徹（北大），勝山陽平（東大）

9:00　はじめに……◦勝山陽平（東京大学）
9:03　4SY05–1　放線菌のもつ二次代謝産物生合成に関わる新規亜硝酸生合成経路……◦勝山陽平，大西康夫（東大院）
9:27　4SY05–2　微生物発酵法による植物アルカロイド生産と創薬展開……◦南　博道（石川県大資源研）
9:51　4SY05–3　放線菌に見出されたペプチドライゲースオルソログの機能解析
……◦小笠原泰志[1]，川田純平[1]，佐藤康治[1]，降旗一夫[2]，大利　徹[1]（[1]北大院工，[2]東大院農生科）
10:15　4SY05–4　***In silico*** 代謝設計ツールの開発とその展開……◦荒木通啓（神戸大自然）
10:39　4SY05–5　ポリケタイド生合成酵素の構造機能解析……◦宮永顕正，工藤史貴，江口　正（東工大院理工）
11:03　4SY05–6　難培養微生物を起源とする海綿由来生物活性物質の生合成研究……◦脇本敏幸（北大薬）
11:27　おわりに……◦大利　徹（北海道大学）

## 4SY06　人工的な生物はどこまで創れるか？使えるか？―拡大する合成生物学―

共　催：デザイン生命工学研究会
3 月 30 日（水）9:00～11:30　会場：B（中ホール A，1F）
世話人：柘植謙爾（慶應大先端生命研），松本謙一郎（北大工），田川陽一（東京工大生命理工）［若手枠］
座　長：柘植謙爾（慶應大先端生命研），松本謙一郎（北大工），田川陽一（東京工大生命理工）

9:00　4SY06–1　細胞間等コミュニケーションを考慮した合成生物学－デザイン生命工学－
……◦田川陽一（東工大生命理工）
9:10　4SY06–2　試験管内ウイルス合成……◦町田幸大，重田友明，今高寛晃（兵庫県立大学）
9:30　4SY06–3　**Synthetic xenobiology: making new biosystems by introducing artificial components**
……◦Ichiro Hirao（Institute of Bioengineering and Nanotechnology, Singapore）
9:50　4SY06–4　合成生物学による人工生命システムの創生における理論に基づく実装の重要性
……◦木賀大介[1,2]（[1]東工大総理工，[2]東工大地球生命研）
10:10　4SY06–5　バイオマスを利用した非天然バイオプラスチックの生合成
……◦松本謙一郎[1,2]，門屋亨介[1,3]，滝沢憲治[1,3]，大井俊彦[1,3]，田口精一[1,3]
（[1]北大工，[2]JST PRESTO，[3]JST CRESTO）
10:30　4SY06–6　組換え植物製造医薬品の開発と実用化……◦松村　健（産総研）
10:50　4SY06–7　哺乳類 ***in vitro*** モデル構築の試み
……◦玉井美保[1]，藤山陽一[2]，田川陽一[1]（[1]東工大院生命理工，[2](株)島津製作所デバイス）
11:10　4SY06–8　合成生物学を巡る国際的な課題……◦白江英之（一般財団法人バイオインダストリー協会）

## 4SY07　微生物エコシステムを制御せよ！最先端テクノロジーがもたらす複合微生物系研究のパラダイムシフト

3 月 30 日（水）9:00～11:30　会場：C（中ホール B，1F）
世話人：福田真嗣（慶大先端生命研），大坪嘉行（東北大生命科学）
座　長：福田真嗣（慶大先端生命研），大坪嘉行（東北大生命科学）

9:00　はじめに……◦福田真嗣（慶大先端生命研）
9:05　4SY07–1　腸内エコシステムの制御による新たな健康維持基盤技術の創出……◦福田真嗣（慶大先端生命研）
9:30　4SY07–2　微生物生態を利用した害虫制御の展望……◦菊池義智（産総研）
10:00　4SY07–3　土壌微生物のノトバイオロジー
……◦加藤広海[1]，森　宙史[2]，永山浩史[1]，大坪嘉行[1]，永田裕二[1]，黒川　顕[2]，津田雅孝[1]
（[1]東北大院生命，[2]東工大院生命理工）
10:30　4SY07–4　**DNA** 情報とネットワーク理論で微生物生態系を読み解く……◦東樹宏和（京大人環）
11:00　4SY07–5　微生物群集を理解するための群集生態学理論とその手法……◦鈴木健太（国立環境研）

講演番号：2SY01-1
講演日時、会場：3 月 28 日 9:00～ E 会場

# 機能性テルペン生産の生物宿主として何を選ぶか？
# Which hosts should be selected for the production of functional terpenes ?

○三沢 典彦（石川県大・生資研）
○NORIHIKO MISAWA (Ishikawa Pref. Univ.)

パスウェイエンジニアリングにより機能性のあるセスキテルペン、ジテルペン、トリテルペン、またはカロテノイド（テトラテルペン）を効率的に生産させようとする時、そのための生物宿主として何を用いればよいかは重要な課題であるが、研究を始める最初に直面する課題でもある。この分野における最初の実用化例は、アミリス社（Amyris Inc.）によるアルテミシニン酸とファルネセンといったセスキテルペン生産で、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）により 25 g/L 以上のレベルで生産され、販売されている。アミリス社では、莫大な労力とお金をかけて効率的セスキテルペン生産に特化した出芽酵母を作り上げてきたと考えられる。したがって、出芽酵母はセスキテルペンの生産用宿主として第一に検討すべき微生物であると思われるが、技術レベルでアミリス社に大きく水をあけられているという問題点がある。一方、出芽酵母以上に（少なくとも文献上は）テルペン生産の宿主として最もよく検討されてきた微生物は大腸菌（*Escherichia coli*）である。たとえば、アルテミシニン酸（105 mg/L）、ジテルペンのタキサジエン（300 mg/L）とその 5α-水酸化体（58 mg/L）、及びカロテノイドのリコペン（22 mg/g DCW）が大腸菌により生産できると報告されている（カッコ内は報告された最大生産量 ; M. Jiang et al. *Appl Environ Microbiol* 78:2497-2504, 2012）。演者らは長年、テルペン生産やその生合成遺伝子の機能解析における大腸菌宿主の実用可能性を広げるべく研究を進めてきた。セスキテルペンについては次の演者（新藤）が報告するので、ここでは、今回初めて可能になった植物に特異的なトリテルペンの大腸菌での生合成について報告したい。さらに、パスウェイエンジニアリングのターゲットとして最もよく検討されてきたカロテノイドの生産を指標に、出芽酵母や大腸菌を含む種々の微生物や高等植物を宿主とする場合の長所や短所についてもレビューしたい。

本研究の一部は経済産業省委託事業「革新的バイオマテリアル実現のための高機能化ゲノムデザイン技術開発」として実施された。

functional terpene, triterpene, pathway engineering

発表責任者：三沢典彦（n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：2SY01-2
講演日時、会場：3 月 28 日 9:30～ E 会場

# セスキテルペン合成酵素遺伝子の正確な機能同定法の確立

# Isolation and structural determination of sesquiterpene synthase products

○新藤 一敏[1]、八反 順一郎[2]、三沢 典彦[2] ([1]日女大・家政、[2]石川県大・生資研)
○Kazutoshi Shindo[1], Jun-ichiro Hattan[2], Norihiko Misawa[2] ([1]Japan Women's Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

芳香植物に存在する精油成分であるモノテルペン、セスキテルペンを単離精製し、その化学構造を解明する研究は、半世紀ほど前を最盛期として精力的に実施されてきた。当時、セスキテルペンの単離精製には、蒸留、分取 GC などの手法が主力として利用されていたようであり、また、構造解析においても、NMR は現在のように主力分析機器としては用いられていなかったと推定される。我々は 10 年前から、様々な芳香植物からセスキテルペン合成酵素（TPS）遺伝子（*Tps*）を単離し、メバロン酸経路を導入した組換え大腸菌で発現させることにより、各種 *Tps* と生産されるセスキテルペンの関係を解明する研究を実施中である。その過程で、同種の研究で主に用いられている方法、すなわち、産物のセスキテルペンを粗抽出後 GC-MS 分析して、MS ライブラリーから化合物を同定または推定する方法は、多くの場合（特に合致率が 95%を切る化合物の場合）、誤った化合物としての同定・推定がなされるという大きな問題が生じていることが明らかとなった。すなわち、生産された各種セスキテルペンの確実な同定には、各化合物を単離精製して、その構造を NMR 解析して同定しなければならないことがわかったが、この手法の確立には、以下の２つの問題をクリアする必要があった。

① かつて用いられた蒸留、分取 GC は、当研究室をはじめ通常の化学研究室設備としては無いため、現在主に用いられるカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC 等の手法に切り替えて、組換え大腸菌が生産するセスキテルペンを単離精製する手法を確立する。

② セスキテルペンの構造解析において、効率的な NMR 解析法を確立する。

①への対応としては、組換え大腸菌の培養時に培地に *n*-octane を重層して培養することで、大腸菌の生育を阻害することなく培養でき、*n*-octane 層にトラップされたセスキテルペンを回収して精製を開始するのが効率的であることが明らかとなった。また、培養終了後は、アルカン/アルカリ水で分配してアルカン層を回収すると効率的であること（除遊離脂肪酸）、またシリカゲルカラムの適用も可能であるが、逆相系 HPLC カラムを用いて効率的な精製が可能であることが判明した。②への対応としては、特に HSQC-TOCSY スペクトルを測定して解析に利用することが大変有効であることが判明した。

上記検討の結果、種々の *Tps* 遺伝子の機能を効率的に同定することが可能となった。現在までに、ツバキ、フリージア、ウド、紫ウコン、コシアブラ、及びタラノキ等由来の TPS により生産される各種セスキテルペンの単離精製・構造決定を行うことができた。

Sesquiterpene synthase, Purification, Structural determination

発表責任者：新藤一敏（kshindo@fc.jwu.ac.jp）

講演番号：2SY01-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ E 会場

# テルペノイド生合成経路の進化分子工学
# Directed evolution of terpenoid pathways

○梅野 太輔（千葉大院工）
○Daisuke Umeno (Chiba University)

この15年，代謝工学研究によって，大腸菌や酵母によるテルペノイドの生産性は飛躍的に向上した。しかし最近は生産効率にみるべき飛躍はなく，横ばい状態が続いている。テルペノイドの代謝工学に関わる多くの研究者は，現在のボトルネックが，テルペノイド生合成を担う酵素の活性そのものにあると感じ初めている。
このような背景をもとに，私たちは，テルペン合成酵素の細胞内での活性を進化工学的に改良することを目指している。まず，それぞれの酵素のつくるテルペノイドひとつひとつに対して生産物ベースでスクリーニングするのは困難であるので，テルペノイド前駆体の基質消費活性をハイスループットに測定する手法を幾つか考案した。本講演では、この手法で得た幾つかのテルペン酵素変異体をつかったテルペン生産の試みについて紹介するとともに，さらなるテルペン酵素のための新手法の開発、あるいは前駆体供給酵素の活性改良のためのスクリーニング手法などを紹介する。

directed evolution, metabolic engineering, terpenoids

発表責任者：梅野太輔（umeno@faculty.chiba-u.jp）

講演番号：2SY01-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ E 会場

# 生合成酵素カクテルを用いた標識テルペノイド合成と環化反応機構解析への応用

# Enzymatic synthesis of terpenoids for determination of structures and cyclization mechanisms

○川出 洋（東京農工大院）
○Hiroshi Kawaide (Tokyo Univ. Agric. Technol.)

生物間で共通性の高いテルペノイド生合成の特徴を活かして，ゲノム情報から機能未知のテルペノイド合成酵素遺伝子のマイニングを進める独自の基盤を構築しようと研究を開始した。酢酸からメバロン酸を経由して，生合成酵素のみを用いて炭素数の異なるプレニル二リン酸を合成し，そこへさらに環化酵素を加えればセスキテルペン（炭素数 15），ジテルペン（同 20）等の多環性テルペン合成が試験管 1 本で可能となると考えた。この生合成酵素群を組み合わせた反応溶液を［酵素カクテル］と呼ぶことにする。酢酸からメバロン酸を経由してプレニル二リン酸を合成する組換え酵素群を大腸菌で容易に生産可能な分子種を選抜し，プレニル二リン酸合成のための酵素カクテルの反応条件を最適化させた。本シンポジウムでは，炭素数 20 のジテルペン類を中心とした研究を紹介する。

生合成酵素と補酵素のみを用いてどこまで複雑なジテルペノイドの酵素的合成ができるかに挑戦し，植物ホルモンのジベレリン（GA）の酵素的全合成に取り組んだ。合成化合物を特徴づけるため，$^{13}$C 標識された酢酸ナトリウムを出発原料にして炭素数 20 のゲラニルゲラニル二リン酸（GGDP）から *ent*-カウレンまでを試験管 1 本で合成した。一旦 *ent*-カウレンを抽出し，2 本目の試験管に GA 生合成に関わるシトクロム P450 酸化酵素と可溶性ジオキシゲナーゼ群を含む酵素カクテルを調製して *ent*-カウレンから $GA_4$ を全合成した。出発原料に $^{13}$C 標識酢酸を用いたので，全標識された *ent*-カウレンでは $^{13}$C-NMR スペクトルにおいて C-C カップリングが観測され，natural abundant による希釈が起こらないので最終合成産物の $GA_4$ まで標識率を落とすことなく合成できた。次に，生成物未知のジテルペン環化酵素遺伝子（SmMDS）をシダ植物（イヌカタヒバ）からクローニングし，*ent*-カウレン合成酵素を SmMDS に置き換えて上記の酵素カクテルに加えて標識ジテルペンを合成した。二次元 $^{13}$C-$^{13}$C COSY，三次元 HCC COSY 等の多次元 NMR 測定により，SmMDS が多機能型 miltiradiene（タンジン由来の生薬タンシノンの生合成中間体）合成酵素であることを明らかにした。酵素カクテル中の生合成酵素を入れ替えるだけで多様なテルペンを同一反応条件下で合成できる利点を活かし，$^{12}$C 元素と $^{13}$C 同位体をイソプレンユニット毎に標識化するアイソトポマー（Isoprene-Unit Isotopomer, IUI）の合成にチャレンジした。菌類からクローニングした新規ジテルペンの構造を $^{13}$C 標識化と多次元 NMR から解析し，次いで標識部位を変えた IUIs の合成と $^{13}$C-NMR 解析から炭素転移反応の機構を解析することができた。酵素カクテルと多次元 NMR の手法はテルペノイド生合成を進めるうえでの新たな方法論となり得るが，さらに標識化技術を応用した展開についても紹介したい。

biosynthesis, isotopomer, NMR

発表責任者：川出　洋（hkawaide@cc.tuat.ac.jp）

講演番号：2SY01-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ E 会場

# 高度機能分化した植物組織培養による有用サポニン生産技術開発

# Production of useful saponins by highly functional-developed plant tissue cultures

○村中 俊哉（阪大工）
○Toshiya Muranaka (Osaka Univ.)

植物に含まれるサポニンは、不快味や食中毒の原因になるものがある一方、医薬品原料、機能性食品素材となる有用なものが多数ある。これら有用サポニンの多くは、栽培植物ではなく自生植物から抽出・精製することで生産されている。そのため、品質のばらつき、価格の不安定化、資源植物の枯渇化、砂漠化を含む環境破壊などの問題があり、有用サポニン生産のための新たな生産技術の開発が求められてきた。わたくしたちは、「代謝スイッチング」と名付けた、サポニン生合成における不要サポニンの生合成酵素を遺伝子発現抑制し、有用サポニン生合成遺伝子を導入する代謝制御する技術開発により、不要サポニン産生植物を有用サポニンに産生植物に変換することを目的に研究を行ってきた。その結果、これまでに、トリテルペノイドサポニン産生作物として、ダイズに甘味成分グリチルリチンの生合成中間体を、また、ステロイド産生作物として、ジャガイモにヤムイモの有用ステロイドを産生させることに成功した。これらのサポニン改変植物は遺伝子組換え技術を用いて作られたものであるため、現状ではフィールドでの生産が困難である。一方、我が国には優良種苗の大量増殖をはかるため高度に機能分化した植物組織を作出し、簡便な培養システムにより実生産する技術が存在する。そこで、現在、代謝スイッチング技術と高度機能分化した植物組織培養とを融合した、あらたな物質生産システムの開発を行っている。本シンポジウムでは組換え植物組織培養を用いた物質生産研究について、現状とその展望について議論する。

本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（シーズ創出ステージならびに発展融合ステージ）により実施した。

terpenoid, P450, plant tissue culture

発表責任者：村中俊哉（muranaka@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：2SY02-1
講演日時、会場：3 月 28 日 9:05～ D 会場

# タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ活性で病態を診断する
# Diagnosis by a protein-cross linking enzyme, transglutaminase activity

○人見 清隆（名大院創薬科学）
○Kiyotaka Hitomi (Nagoya Univ., Grad. Sch. Pharma. Sci.)

生体内にはタンパク質間を架橋する酵素反応が存在して、血液凝固、皮膚形成、細胞外マトリクスの強化など多彩な生命現象に必須な役割を果たしている。そのためこの酵素活性の異常な活性レベルは、架橋されるタンパク質産物量の制御破綻をもたらし、様々な疾患状態（血液凝固異常、皮膚疾患、腎臓や肝臓における線維症、神経変性疾患）に関連している。

この反応を担う酵素、トランスグルタミナーゼ（以下 TGase）は、組織分布と役割の異なる８つのアイソザイムからなる酵素ファミリーで、特定のグルタミン残基とリジン残基の間に共有結合レベルの架橋（イソペプチド結合）形成を触媒する。基質タンパク質のグルタミン残基は、アイソザイム各々によって認識されやすい周辺の配列が異なるため、基質特異性を産み出す。

我々はこれまでペプチドライブラリから、天然の基質を上回る反応性を有する、グルタミン残基側の「高反応性基質ペプチド」を同定してきた。これらは高感度で特異的な活性検出や基質探索に有用である。本発表では、ペプチドを診断や発症機構解明に活用する方法論と成果について紹介したい。

（１）蛍光標識基質ペプチドによる高感度な活性検出系の確立

基質ペプチドを蛍光標識して、組織内に存在する TGase 活性を可視化することができる。凍結組織切片に対して蛍光基質ペプチドを添加すれば、酵素活性の高い領域に内在する基質タンパク質（リジン残基提供側）に基質ペプチドが架橋し、蛍光観察で容易に活性を可視化できる。

この方法により、活性のある領域を可視化することが正常な皮膚組織や立体培養系でも可能であり、TGase 活性の異常を起因とする皮膚疾患の判定が可能になった。さらに腎臓および肝臓で、マウスに人為的に線維症（fibrosis）を起こすと、その進行状態に相関して TGase 活性の増加を観察することができた。

（２）標識基質を用いた基質の網羅的探索系の確立

疾患の進行に伴い TGase 活性が上昇する際、どんな分子が基質として架橋され疾患状態をもたらすかを突き止めることは、治療に向けた基礎的知見として重要である。ビオチン標識した基質ペプチドを組織抽出液に加え、内在する TGase 活性によって基質タンパク質（リジン残基提供側）に架橋されたペプチドのビオチンを介して、精製・同定が可能である。この方法により、腎臓および肝臓の線維症進行に伴う基質タンパク質を網羅的に解析することができた。

JBC 281, 17699 (2006), Amino Acids 36, 619 (2009), J Cytochem Histochem 61, 793 (2013)

transglutaminase, fibrosis, skin

発表責任者：人見清隆（hitomi@ps.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2SY02-2
講演日時、会場：3 月 28 日 9:25～ D 会場

# 新規バイオマーカーとしての D-アミノ酸とその酵素的定量法
# D-Amino acids as new biomarkers and their enzymatic assay methods

○吉村 徹、邊見 久、伊藤 智和 (名大院生命農学)
○Tohru Yoshimura, Hisashi Hemmi, Tomokazu Ito (Nagoya Univ.)

近年哺乳動物を含む真核生物にも様々な遊離 D-アミノ酸が存在し、重要な生理機能を果たしていることが明らかとなってきた。中でも D-Ser は哺乳動物脳内において記憶や学習といった脳の高次機能と関わる *N*-メチル D-アスパラギン酸レセプター(NMDAR)のコアゴニストとして機能する。これに関連して中枢神経系での D-Ser の挙動と様々な神経疾患の関連が示唆されており、例えば統合失調症では血清中の D-Ser 濃度の低下が、また筋萎縮性側索硬化症(ALS)では脊髄での D-Ser の蓄積が報告されている。このような背景から、D-Ser の簡便で正確な分析法や生体内 D-Ser 濃度の制御法の開発は、基礎･臨床医学に貢献するものと考えている。

我々が *Saccharomyces cerevisiae* から見出した D-セリンデヒドラターゼ(DsdSC)はピリドキサル 5'-リン酸(PLP)を補酵素とし、D-Ser をピルビン酸とアンモニアに分解する反応を触媒する。DsdSC のホモログは脊椎動物から菌類などの下等真核生物、一部の細菌にまで存在するが、脊椎動物の中で唯一哺乳類には分布しない。DsdSC が D-Ser に対する高い特異性を示すことから、我々は DsdSC を用いた D-Ser の酵素定量法を構築した。なお現在最もよく用いられる D-アミノ酸の定量法は、D-アミノ酸を蛍光ジアステレオマー化した後、逆相 HPLC により分離定量する方法であるが、これは高感度ではあるが煩瑣で測定に時間がかかる。DsdSC を用いた酵素定量法では、DsdSC によって D-Ser から生成したピルビン酸を乳酸脱水素酵素によって還元し,その際の NADH の減少量から D-Ser 量を算出する。この方法は 10 μM オーダでの D-Ser 定量を可能とし、標品中に L-Ser を始めとする他のアミノ酸や血清成分が夾雑しても影響されない。なお本法はすでにキット化され販売されている。また遺伝子工学的に Ser に対するラセミ化活性を付与した *Geobacillus stearothermophilus* 由来の変異型アラニンラセマーゼを共役させることで, D-, L-Ser の同時定量も可能である。一方、D-Ser から生成するピルビン酸を、ピルビン酸オキシダーゼと反応させ、その際に生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと蛍光基質を用いて定量することにより、1 μM 程度までの D-Ser 定量が可能であり、この方法によってウシ血清中の D-Ser 量を定量したところ、HPLC 法による定量結果とよい一致をみた。

我々はまた DsdSC を体内 D-Ser 濃度を制御するツールとして用いることも試みた。DsdSC をポリエチレングリコール（PEG）により修飾し、免疫源性を低下させるとともに血中での滞留時間を増加させた。この PEG 化 DsdSC をマウス腹腔内に投与した結果、海馬での D-Ser 濃度の有意な減少が認められた。

生体物質の特異的な定量法としては ELISA が主流となったように思われるが、D-Ser と L-Ser を分別するといった用途においては、酵素の高い立体選択性はなお有効であると考えている。

D-serine, D-serine dehydratase, enzymatic assay

発表責任者：吉村　徹（yosimura@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：2SY02-3
講演日時、会場：3 月 28 日 9:50～ D 会場

# タンパク質切断酵素カルパインの基質特異性が個体の健康を規定する

# Substrate specificity of calpain in health and disease

○反町 洋之 (都医学研)
○Hiroyuki Sorimachi (Igakuken)

カルパインは、主に細胞質内に存在して、基質タンパク質を限定的に切断することで、基質の構造・機能を変換（モジュレート）・調節 する $Ca^{2+}$要求性の「モジュレータ」プロテアーゼである。その作用は、活性調節、細胞内局在変化、寿命調節、構造変換など多岐にわたっており、様々な生理機能を果たしている。カルパインの機能の重要性は、ヒト・マウスの遺伝学からも示されている。即ち、哺乳類には十数種のカルパイン遺伝子（ヒトでは *CAPN1～3, 5～16* の 15 種）が存在し、各遺伝子の変異などによりカルパイン機能不全が生じると、各カルパインに応じた様々な病態が生じる。例えば、組織普遍的に発現する CAPN2 や CAPN7 のノックアウトマウスは致死となり、骨格筋特異的に発現する CAPN3 の不全では筋ジストロフィー、胃腸特異的な CAPN8, CAPN9 の欠損ではストレス性胃出血を引き起こす。このように、カルパインは個体の健康維持に必須な役割を果たしているが、その作用機序には不明な部分が多い。上記の通りカルパインは、プロテアソームなどとは異なり、基質の限定切断こそが機能の要（かなめ）であるため、その切断位置は本質的に重要な意味を持つ。言い換えると、カルパインがタンパク質のどの位置を切断するかという特異性、即ち、カルパインの基質特異性は、カルパインの機能を規定し、多くの生理機能を支えているわけである。

ところが、カルパインの具体的な基質特異性はほとんど解明されていない。カルパインによる基質の切断配列の比較から切断部位周辺の配列嗜好性を解析する、いわゆる部位特異的スコア行列（PSSM）法による研究は数多く行われてきた。しかし、そのようなアプローチではカルパインはほとんど特異性を示さず、基質特異性は不明のままであった。そこで私たちは機械学習とアミノ酸属性を用いて、さらに、ペプチドライブラリーのデグラドミクス（切断部位の網羅的同定）により、カルパインの基質特異性の解明を試みた。PSSM 法では各部位のアミノ酸の出現頻度が独立に考慮されるだけであるが、上記の方法では、アミノ酸の様々な属性（疎水性、二次構造のとりやすさ、大きさ、極性、など独自に計算したものを含め 1,315 項目が AAindex などとして数値化されている）を利用したり、配列の context を扱かったりすることが可能である。その結果、これまでのどの切断部位予測器よりも精度の高い予測器を開発でき、カルパインアイソザイムの特異性の差異など今まで得られていなかった新規知見を見出すことができた。その生物学的な意義について考察したい。

calpain, substrate specificity, QSAR

発表責任者：反町洋之（sorimach@gmail.com）

講演番号：2SY02-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:15～ D 会場

# 環状ヌクレオチド分解酵素の研究基盤構築と創薬への展開

# Research on molecular basis of cyclic nucleotide phosphodiesterases toward drug discovery

○大森 謙司[1,2] ([1]田辺三菱製薬、[2]名大院・創薬)
○Kenji Omori[1,2] ([1]Mitsubishi Tanabe Pharma., [2]Nagoya Univ.)

医薬品は生体分子に作用して機能調節することにより薬効を発揮する。生体機能調節に関わる生体分子の発見および機能解明が創薬標的分子輩出に繋がるため世界中で日々研究が進められている。ヒトゲノム配列決定後の新規遺伝子発掘の時代を経て、個々の遺伝子の遺伝子産物の分子機能、機能調節機構、立体構造、分子間相互作用、発現調節機構および分子間ネットワークなどが網羅的に解明され、それぞれの生体における位置づけが定められようとしている。創薬標的分子は生体においてピボタルな役割を演じているものが多く、進化の過程で派生したファミリーを形成し、それぞれの分子が時間的・空間的に固有の役割を持つものも少なくない。副作用を低減し、薬効を最大に発揮することを目指した創薬のためには、単に目的とする創薬標的分子の機能調節する薬物の探索・創製だけでなく、創薬標的分子のファミリーとしての研究基盤構築も創薬研究の両輪として必要である。

環状ヌクレオチド(cAMP、cGMP)はセカンドメッセンジャーとして種々の細胞機能調節に関わるシグナル伝達を行う。cAMP は G 蛋白質共役受容体（GPCR）の刺激によって産生が調節され、cGMP は細胞質内可溶性グアニル酸シクラーゼ（GC）の一酸化窒素（NO）による活性化、あるいは膜結合型 GC のナトリウム利尿ペプチド[natriuretic peptides (NPs)]類による活性化によって産生される。cAMP、cGMP は環状ヌクレオチド分解酵素[cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE)]によって分解され、負の制御機構となっている。この信号伝達を調節する薬物は創薬に直結しており、GPCR に対するアゴニストおよびアンタゴニスト、GC に対する NO アナログおよび NPs が創薬されている。信号伝達増強によって薬効を発揮させる場合には産生系刺激が効果的に思われるが、分解系である PDE を阻害することでも目的を達せられる。病態では内因性刺激の低下が病因であることもあり、分解系抑制による内因性刺激依存的な信号伝達増強は創薬として合理的であるといえる。

ヒト PDE はアミノ酸配列および酵素化学的性質の違いから 11 のサブファミリーに大分類され、いくつかのサブファミリーにはアミノ酸配列の相同性が高いアイソザイムがあり計 21 遺伝子から構成されている。さらにそれぞれの遺伝子に多彩なスプライスバリアントが存在するためスーパーファミリーを形成している。本シンポジウムでは、創薬標的分子として酵素 PDE に対する阻害薬創製研究とその医薬品開発を支えた PDE ファミリーに対する基盤研究を紹介する。基盤研究の展開を通じて生まれた新しい創薬の種についても紹介したい。

PDE, drug discovery, cyclic nucleotide phosphodiesterase

講演番号：2SY02-5
講演日時、会場：3 月 28 日 10:40～ D 会場

# 薬剤標的としてのミトコンドリアー寄生虫からがん細胞までー
# Mitochondria as a drug target - from parasites to cancer cells -

○北 潔[1,2] ([1]東大医、[2]長崎大)
○Kiyoshi Kita[1,2] ([1]Tokyo Univ., [2]Nagasaki Univ.)

ヒトをはじめとする好気性生物の生存には酸素が不可欠である。一方、宿主体内の低酸素分圧環境に生息する寄生虫は宿主である哺乳類とは大きく異なった独自のエネルギー代謝系を用いて環境に適応している。すなわち寄生虫の種類，寄生環境また寄生様式によって，それぞれ特異的な代謝系を発達させ，そのミトコンドリアの呼吸鎖も極めて多様なものとなっている。また、ほとんどの寄生虫は宿主内ではたとえ周囲の環境中に酸素があってもこの酸素を利用せず，酸化的リン酸化以外の系を用いて ATP を合成している。これは，酸素分圧の低い小腸に寄生する回虫，また膣に寄生するトリコモナスなどばかりでなく，酸素が充分存在する血液中に寄生するマラリア原虫や住血吸虫でも同様である。寄生虫のもうひとつの特徴はその生活環において，宿主内への寄生の時期に加え、宿主外の自由生活性の時期の少なくとも二つの時期を持つことである。そして、多くの場合，自由生活性時は哺乳類同様に好気的代謝を行っている。

さらに興味深いことに、多くの寄生虫は宿主体内に侵入した後、すぐに最終の寄生部位に到達はせず、体内移行と呼ばれる「回り道」をする。これは蠕虫ばかりでない。マラリア原虫では、蚊の吸血によって注入されたスポロゾイトは最初から赤血球に感染するのでなく、まず肝臓の細胞に侵入し、そこで数週間増殖を続ける。そして、感染性のメロゾイトとなって血流中に遊離し、最終的な寄生部位である赤血球に入り込む。

そしてこの様な寄生虫の特殊なエネルギー代謝は格好の薬剤標的である。例えば、私達は変異株を用いた研究から、最新の抗マラリア薬アトバコンの標的がミトコンドリアのシトクロム *b* である事を証明した。また多様性ばかりでなく、その普遍性も明らかになって来た。本シンポジウムではアフリカトリパノソーマのシアン耐性酸化酵素と回虫のフマル酸呼吸を例にとり、エネルギー代謝の研究からその多様性を示すとともに、ヒトにおいてもある種のがん細胞が特殊な環境においては寄生虫同様のフマル酸呼吸による低酸素適応戦略を利用している事実を報告する。そしてこの特殊なエネルギー代謝系が実際に寄生虫特異的な阻害剤の標的となり、標的の立体構造解析から *in vivo* で顕著な効果を示す薬剤開発の例として、シアン耐性酸化酵素に対するアスコフラノン、回虫のキノールーフマル酸還元酵素（複合体 II）に対するフルトラニルをはじめとする複数の特異的阻害剤を紹介する。

mitochondria, parasite, drug development

発表責任者：北　潔（kitak@m.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY02-6
講演日時、会場：3 月 28 日 11:05～ D 会場

# 新規アミノ酸定量用酵素の開発

# Newly developed enzymes for amino acid determination

○浅野 泰久 [1,2] ([1] 富山県立大工、[2]JST, ERATO)
○Yasuhisa Asano[1,2] ([1]Toyama Pref. Univ., [2]JST, ERATO)

近年、血中アミノ酸濃度をバイオマーカーとする疾病診断法の開発に伴い、選択性に優れた新しいアミノ酸定量用酵素の開発が注目を集めている。最近われわれが、各種の L-アミノ酸に選択的に作用する各種微生物酵素（系）を開発した結果について報告する。

1.（酸化酵素あるいは脱水素酵素）L-リシンα-酸化酵素(*Pseudomonas* sp.）、L-リシン ε-酸化酵素（*Marinomonas mediterranea*）、L-トリプトファン酸化酵素（*Streptomyces* sp.、*Chromobacterium violaceum*）、L-アルギニン酸化酵素（*Pseudomonas* sp.）などを単離し、定量用酵素としての有用性を明らかにした。同様に、トリプトファン脱水素酵素（*Nostoc punctiforme*）の有用性について研究し、さらに変異により安定性を向上させた。
2.（複合酵素系）L-メチオニン、L-シトルリンおよび L-アルギニンの定量法を、*Propionibacterium freudenreichii* 由来の酵素を用いるピロリン酸検出反応と組み合わせて構築した。また、各種アミノ酸に対応するアミノアシル-tRNA 合成酵素を上記ピロリン酸検出反応と共役させ、各種アミノ酸の定量法を開発した。さらに、乳酸菌のタンパク質翻訳に基づく新規アミノ酸バイオアッセイ法を開発した。

amino acid oxidase, tryptophan dehydrogenase, amino acid determination

発表責任者：浅野泰久（asano@pu-toyama.ac.jp）

講演番号：2SY03-1
講演日時、会場：3 月 28 日 9:00～ C 会場

# 脂質代謝改善ペプチド

# Hypolipidemic peptide

○長岡 利 (岐阜大応生)
○Satoshi NAGAOKA (Gifu Univ.)

高脂血症、とくに高コレステロール（CHOL）血症は、心臓病、脳卒中などの心臓血管疾患の重要な危険因子の一つである。WHO の統計では、世界の死因の第 1 位は、依然として心臓血管疾患である。食品による高 CHOL 血症の予防改善も重要な方策である。本講演では、国内外の脂質代謝改善ペプチド研究の紹介を含め、下記の我々の成果を概説する。

[1]ラクトスタチン（IIAEK）の媒介する新規 CHOL 代謝調節系
牛乳 β-ラクトグロブリン加水分解物から、動物実験で活性を発揮する CHOL 代謝改善ペプチド(IIAEK)を世界に先駆けて発見し、IIAEK をラクトスタチン（lactostatin）と命名した(1)。ラクトスタチンは、ヒト肝臓由来培養細胞 HepG2 において、Ca チャンネルに関連した MAP キナーゼ依存型の新しい CHOL 分解調節系を介して CHOL 分解系律速酵素である CHOL 7 α-水酸化酵素遺伝子を転写活性化し、CHOL 分解を促進する(2)。一方、ラクトスタチンは腸では ABCA1 の発現低下を介して、CHOL 吸収抑制作用を発揮する。CHOL 代謝改善作用を発揮するタンパク質から派生するオリゴペプチドであるラクトスタチンの研究成果に基づいて、従来から考えられてきたタンパク質の疎水性、アミノ酸組成、含硫アミノ酸含量、リジン/アルギニン比、レジスタントプロテインなどとは一線を画す新しい考え方を提示し、外因性ペプチドの CHOL 代謝調節に関する新しい学問領域を開拓した。これらのラクトスタチンの標的遺伝子を含む新しい CHOL 代謝調節系の発見は、現在不可能である CHOL 代謝改善ペプチドデザインや新しい CHOL 代謝改善ペプチドの効率的スクリーニングにも道を拓くものである。
[2]大豆タンパク質由来の新規 CHOL 代謝改善ペプチド
CHOL 代謝改善作用を発揮するリン脂質結合大豆ペプチドを含む特定保健用食品を創成した(3)。動物実験で CHOL 吸収抑制作用を発揮する大豆グリシニン由来 VAWWMY（soystatin）(4)を発見し、ペプチドアレイの活用により、VAWWMY の高機能化や新規 CHOL 吸収抑制ペプチドである大豆 β-コングリシニン由来 VVFLASVS、大豆オレオシン由来 FGLTALSS を発見した。
[3]ローヤルゼリー特異的タンパク質（MRJP1）及びペプチドの CHOL 代謝改善作用
MRJP1 は動物実験で CHOL 代謝改善作用を発揮することを発見した。上述[1]のラクトスタチンと同様に、MRJP1 由来ペプチドは HepG2 細胞において、CYP7A1 mRNA を有意に増加させた(5)。

(1) Nagaoka, S. *et al.*: *Biochem.Biophys.Res.Commun*., 281, 11-17 (2001)
(2) Morikawa, K. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 352, 697-702 (2007)
(3) Nagaoka, S. *et al.*: *J.Nutr.,* 129, 1725-1730 (1999)
(4) Nagaoka, S. *et al.*: *Biosci.Biotechnol.Biochem.(Communication),* 74, 1738-1741 (2010)
(5) Kashima, Y. *et al.*: *PLOS ONE* 9, e105073 (2014)

peptide, cholesterol, lipid

発表責任者：長岡　利（nagaoka@gifu-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-2
講演日時、会場：3 月 28 日 9:30～ C 会場

# 糖代謝改善ペプチド

# Improvement of glucose metabolism by dietary peptides

○比良 徹、原 博（北大院農）
○Tohru Hira, Hiroshi Hara (Res Fac Agr, Hokkaido Univ.)

食品たんぱく質の摂取により消化管腔内に流入する食品ペプチドは、アミノ酸の供給源だけでなく、管腔内で様々な生理作用を発揮する。我々は、食品ペプチドが消化管内分泌細胞に直接作用して、消化管ホルモン分泌を促す機構の解明を目指す中で、ある種の食品ペプチドが血糖上昇を抑制できる可能性について検討してきた。消化管ホルモン GLP-1 は消化管内分泌 L cell より分泌され、インスリン分泌促進、膵β細胞保護、食欲抑制など多様な生理作用を持ち、この作用を強めるインクレチン関連薬は近年の糖尿病治療に広く導入されている。食品成分や薬剤の経口投与により内因性 GLP-1 分泌を高めることで、食後高血糖の抑制、耐糖能障害の予防に有効であると期待されている。

培養細胞ならびに麻酔下ラットでの腸管内投与試験により、トウモロコシ由来の難消化性たんぱく質 Zein の加水分解物（ZeinH）に強い GLP-1 分泌促進作用があることを見出した。この ZeinH を覚醒下ラットの回腸内に直接投与し、腹腔内耐糖能試験を行ったところ、GLP-1 分泌促進、インスリン分泌促進を介して、糖負荷後の血糖上昇が抑制されることが確かめられた。また、ZeinH は Dipeptidyl peptidase-IV の活性を抑制して、血中での GLP-1 の分解を抑制することも示唆された。さらに、ZeiH の経口投与は、正常ラットおよび糖尿病モデルラットにおいて、GLP-1 分泌促進を介して血糖上昇を抑制することが示された。以上により、食品ペプチドの経口摂取により GLP-1 分泌を促進し、これによる血糖上昇抑制が可能であることが示された。

一方で、カルシウム感知受容体（CaSR）のアゴニストとして知られるペプチド（プロタミン、ポリリジン、γGlu-Cys）の経口投与により、経口糖負荷後の血糖上昇が抑制されることを見出した。この作用は CaSR の薬理アゴニストで再現され、さらに十二指腸への CaSR アンタゴニスト投与により解除されたことから、小腸の CaSR 活性化が血糖上昇の抑制に寄与することが示された。この作用はインスリン分泌促進を介さず、胃排出抑制の寄与が大きいと考えられた。また、CaSR アゴニストペプチドによる血糖上昇抑制には、enterochromaffin 細胞からのセロトニン分泌が関与することが示唆された。これにより、食品ペプチドによる消化管の CaSR 活性化もまた、血糖上昇抑制に有効であることが示された。

以上のように、多様な構造（アミノ酸配列、鎖長）を有する食品ペプチドは、経口摂取により異なるターゲット（GLP-1 産生細胞、CaSR）に作用することで、様々な経路を介して血糖応答に影響することが明らかとなった。

enteroendocrine, GLP-1, calcium-sensing receptor

発表責任者：比良　徹（hira@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2SY03-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:00～ C 会場

# 血管機能改善ペプチド
# Peptides with vasorelaxation effect

○松井 利郎（九大院農）
○Toshiro MATSUI (Kyushu Univ.)

アンジオテンシン I 変換酵素（ACE）阻害作用はペプチド機能の代表例であり、評価の簡便性から多くの研究がなされ、これまでに多種類の ACE 阻害ペプチドが報告されている。ACE は昇圧代謝系として知られる循環レニン–アンジオテンシン（RA）系でのアンジオテンシン II 産生を担う金属酵素である。したがって、ACE 阻害による RA 系の制御は血圧決定因子である体液量と血管抵抗性の改善が期待される良策と考えられてきたが、循環 RA 代謝系の複雑性からその有効性は疑問視されつつある[1]。他方、ペプチドが直接的に血管に作用し、収縮血管を弛緩させることが報告されている。これまでに、His 残基を有するペプチドの一部が内皮非依存的に弛緩作用を示し、弛緩要件としてイミノ基プロトンが重要であることを明らかにしている。ペプチド以外の化合物においてもプリン塩基で同様の作用を認めている。Trp-His の場合、ジヒドロピリジン系カルシウムチャンネルブロッカーと弛緩作用が拮抗すること、細胞内においてカルシウムイオン–カルモジュリン複合体形成を阻害する可能性を報告している[2,3]。これら血管弛緩作用を有するペプチドは若齢期からの投与によって血管系疾患（動脈硬化）の進展を予防可能であるが、加齢血管（VDCC 量の減少、AT1R 量の増大）、あるいは炎症誘導後の血管に対して作用が減弱あるいは消失する[4]。これらの知見は、血管弛緩に対するペプチド機能の限界を示すものである。他方、PKA 活性を誘導し、PLC/CaMK II/p-MLC 系を間接的に制御するアデニンレセプター（AdeR）が血管に存在することは、加齢血管でのアデニン類似塩基性ペプチドによる弛緩性発現を示唆する点で興味深い。

1) 松井利郎, *化学と生物*, **53**, 228 (2015).
2) Y.Kobayashi, *et al., FEBS Open Bio.*, **2**, 83 (2012).
3) T.Kumrungsee, *et al.*, *Biochim.Biophys. Acta*, **1840**, 3073 (2014).
4) T.Fukuda, *et al.*, *PLoS ONE*, **9**, e88985 (2014).

peptide, vasorelaxation, vessel

発表責任者：松井利郎（tmatsui@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ C 会場

脳機能改善ペプチド
Neuromodulatory pepitdes for improving brain function
○片山 茂（信州大農）
○Shigeru Katayama (Shinshu Univ.)

健康寿命の延長のためには脳機能を健全に維持することが重要であり、近年、種々の食品成分による脳神経機能に関する研究が盛んに行われている。我々は大豆ペプチドの新たな機能性として脳神経系に対する影響に着目し、研究を行ってきた。本シンポジウムでは大豆ペプチドの脳機能改善作用について、これまでの検討結果について紹介する。

老化促進モデルマウス（Senescence accelerated mouse, SAM）は早期に老化兆候を示す近交系マウスであり，SAMP8 系は，早期学習・記憶障害モデル動物として確立されている。そこで我々は、SAMP8 を用いた *in vivo* 実験系により、大豆ペプチドの長期摂取が SAMP8 の認知機能に及ぼす影響について検討した。大豆ペプチドとしてハイニュート AM（不二製油社製，分子量 500 以下 72%含有）を使用し，AIN-93M 飼料のカゼイン半量を置換した飼料（ハイニュート AM7%含有飼料）を 16 週齢の雄性 SAMP8 に 26 週間自由摂取させた。モリス水迷路試験を行い、空間記憶学習能力に及ぼす影響を検討した結果、大豆ペプチド摂取群はコントロール群と比較して逃避台への到達時間（Escape latency）を短縮させる傾向を示した。一方，目標とする四分割の領域に滞在した時間（Time in target quadrant）は大豆ペプチドの摂取により有意な増加が認められた。以上より、大豆ペプチド摂取は空間記憶学習能力の低下を抑制することが示された。続いて脳内の神経調節系遺伝子群の発現解析を行ったところ、大豆ペプチド摂取により神経栄養因子である脳由来神経栄養因子（BDNF）およびニューロトロフィン-3（NT-3）の発現量が有意に増加することが明らかになった。次に、脳切片を用いて免疫組織染色法を行った。その結果、脳海馬 CA1 領域において NT-3 の発現が顕著に増加すること、さらには脳海馬歯状回においてアストロサイトの増加が観察された。アストロサイトはグリア細胞の一種であり、神経細胞（ニューロン）間の隙間を埋めるとともに、神経細胞への栄養因子の供給やシナプス活動の調節など多岐に渡る機能を有することが知られている。そこでマウス胎児由来初代培養アストロサイトに大豆ペプチドを添加したところ、BDNF 発現量が有意に増加することを見出した。現在、神経栄養因子の発現促進作用を有するペプチドを同定しており、これらの活性ペプチドが作用し、その結果、SAMP8 の認知機能が改善したものと考えられる。

本研究により、大豆ペプチドが脳神経系に作用し、脳機能を改善しうる新たな機能性食品因子として利用できる可能性が示唆された。

Neuromoduratory activity, soy peptides, SAMP8

発表責任者：片山茂（skata@shinshu-u.ac.jp）

講演番号：2SY03-5
講演日時、会場：3 月 28 日 11:00～ C 会場

# 廃用性筋萎縮改善ペプチド

# Functional peptides effective to unloading-mediated muscle atrophy

○二川 健[1]、赤間 一仁[2] ([1]徳島大学医学部医科栄養、[2]島根大学生物資源学部)
○Takeshi Nikawa[1], Kazuhito Akama[2] ([1]Tokushima Univ., [2]Shimane Univ.)

無重力環境や寝たきりなど、筋肉に機械的な負荷がかからない状態を Unloading という。Unloading 状態では、筋肉が萎縮し、運動能力の著しい障害が起こる。これを廃用性筋萎縮という。廃用性筋萎縮が社会問題となる一方で、未だ予防法・治療法は開発されていない。今回、我々は栄養学的な廃用性筋萎縮の治療法の開発を目的とした。

無重力や寝たきりなどの Unloading 状況下ではユビキチンリガーゼ Casitas B-lineage Lymphoma b (Cbl-b) の発現が増大し、筋細胞の成長に重要な IGF-1 の細胞内シグナル分子である Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) をユビキチン化することで、その加水分解を促進することが筋萎縮の原因の一つであることを明らかにした。さらに、DGpYMP の配列を有するペプチドが、Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を抑制し、廃用性筋萎縮を抑制することがわかった。我々は、これを Cblin (Cbl-b inhibitor)と名付けた。このペプチドの機能性を向上させるため、具体的には、筋細胞への取り込み効率を上げるため、Cblin の N 端のミリストイル化修飾やアテロコラーゲンとの同時投与を行った。両者とも細胞内への吸収効率が上昇し、Cblin 単独処理より低濃度でグルココルチコイドや飢餓による筋萎縮を抑制することができた。一方、我々は Cblin 活性を有する食材を検討したところ、大豆蛋白質の一つであるグリシニンに Cblin 様ペプチドが存在することを見いだした。そこで、大豆食を用いた臨床食材介入試験を実施し、大豆蛋白質食が、部分的ではあるが、寝たきり患者の筋萎縮にも有効であることを証明した。最後に、島根大学の赤間教授らとともに、この Cblin 配列を沢山有する(Tandem に 15 個)グルテリン蛋白質を発現させた米(Cblin 米)を開発し、その抗筋萎縮効果を検討した。この Cblin 米は、パンクレアチンによる消化を受け Cblin 様ペプチドを派生した。また、Cblin 米の経口摂取は坐骨神経切除による IRS-1 の分解を阻害し、筋萎縮を抑制した。さらに、Cblin 米を経口摂取したマウスの門脈中に Cblin 様ペプチドが存在することを確認した。以上の知見は、Cblin を利用した高機能性食材の開発に繋がるだけでなく、ペプチドの生体内代謝経路の解明にも通じると考えられた。

以上のように、廃用性筋萎縮に有効なペプチドを通して、機能性ペプチドの代謝や実用性などについて皆様と議論したい。

ubiquitin ligase inhibitor, muscle atrophy, Cblin rice

発表責任者：二川　健（nikawa@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：2SY04-1
講演日時、会場：3 月 28 日 9:10～ B 会場

# 食品関連微生物が形成するバイオフィルムの制御と利用
# Control and application of biofilm formed by food related microorganisms

○森永 康（日大生物資源科学部）
○Yasushi Morinaga (Nihon Univ. Bioresource Sci.)

バイオフィルム（以下 BF）は、野菜や肉などの食材の表面や食品製造ライン内部に形成され、食品の微生物汚染源となることから、食品製造現場における BF 制御は産業上重要である。これまでに強酸、強アルカリによる製造ライン洗浄法（cleaning in place, CIP）が開発されているが、作業安全面で課題がある。また、食品に対してはこうした過酷な方法は適用できない。したがって、BF の形成を未然に防止することが望ましいが、形成阻害技術は十分検討されていない。

我々は食品分野で応用可能な安全性の高い BF 形成阻害剤の開発を目指して研究を進めており、これまでに、食品添加物の乳化剤やある種の香辛料が BF 形成阻害活性を有することを見いだした。乳化剤の中でもショ糖脂肪酸エステルは特に活性が強く、細胞表面や固体表面に結合して、BF 形成の初期段階である細胞付着を阻害することを確認した。また、多様な香辛料の熱水抽出物が BF 形成阻害作用を示すことを見いだした。それらの中で、緑膿菌に対して高い効果を示すポアブルローゼ熱水抽出物に着目して研究を進め、水溶性画分に活性物質が存在することを確認した。さらに、食品添加物でもある L-トリプトファンが大腸菌の形成した BF を崩壊させることを見いだし、その作用機序を解析した結果、L-トリプトファンの欠乏や過剰が BF 形成を誘発することを明らかにした。

以上の様に BF の制御技術が注目されている一方で、BF の食品分野での利用についてはほとんど検討されていない。我々は、伝統発酵の発酵安定化に BF が寄与しているのではないかと考え、福山酢由来微生物による BF 形成について検討を進めた。その結果、乳酸菌と酵母の共培養により特異な構造の BF（以下複合 BF）が形成されることを見いだした。また、乳酸菌表層のレクチン様タンパク質と酵母表層マンナンのマンノース分岐鎖の相互作用による細胞接着が複合 BF 形成に重要な役割をもつことを示してきた。一方、共培養で酵母を容易に担体に定着できる複合 BF は、固定化菌体としての可能性が期待される。そこで、複合 BF を固定化菌体とするアルコール発酵を試みた結果、機械的な安定性も高く、雑菌侵入に対する抵抗性をもち、長期間反復使用してもアルコール生成活性が低下しない等、半連続あるいは連続発酵に適したロバスト性を有していることが明らかとなった。

食品の安全、安心の確保のために、BF の制御技術については今後も継続的な検討が必要である。また、食品分野における BF の固定化菌体としての利用については、次世代の発酵技術としての進展を大いに期待したい。以上のように、BF は食品微生物分野における新しく重要な視点である。

（*本発表は昨年 3 月急逝された古川壮一先生と共に実施してきた研究の成果に基いています。）

biofilm, food contamination, fermented food

発表責任者：森永　康（yasushi.morinaga@gmail.com）

講演番号：2SY04-2
講演日時、会場：3 月 28 日 9:40～ B 会場

# 口腔という特殊環境において繰り広げられる Biofilm/cell-cell communication

# Biofilm and cell-cell communication developed in the special environment such as oral cavity

○泉福 英信（国立感染症研究所）
○Hidenobu Senpuku (National Institute of Infectious Diseases)

口腔では、歯の表面にバイオフィルムが形成される。歯牙は常に唾液成分に曝されてため、歯牙に吸着した唾液蛋白質と相互作用できる細菌が歯牙表面に付着し、歯表面細菌叢が形成される。初期付着菌（*Actinomyces naeslubdii, Streptococcus gordonii, Streptococcus oralis* など）が最初の菌叢を形成する。その後、時間と共に菌どうしが結合、凝集が起こり、バイオフィルムの厚みが増していく。食物摂取の際に入ってくる栄養物は、口腔微生物にも栄養源として利用される。口腔に砂糖を含む食物が摂取されると、菌体が分泌する酵素による砂糖を利用した多糖合成が起こる。そうすると、多糖を介して様々な菌の付着および凝集がさらに起こりバイオフィルムが成熟してくる。この多糖形成には、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* や *Streptococcus sobinus* が分泌する酵素（GTF-I, GTF-SI, FTF）が関与している。この両菌は、砂糖を摂取した際に酵素により砂糖から多糖（不溶性グルカン, 水溶性グルカン、フルクタン）を合成することで歯表面への付着および凝集を起す。よって、食生活が大きく口腔バイオフィルム形成およびう蝕発症に影響を与えることになる。

このバイオフィルムには、１mg あたり $10^9$ 個の微生物がいる。歯牙表面の微生物叢と口腔粘膜、義歯表面の細菌叢を比較した研究が近年報告された。16S ｒＲＮＡを対象とするプライマーおよびプローブを用いた菌叢遺伝子に対する解析により、歯牙表面の細菌叢は他の細菌叢に比べより多様な菌種により構成されていることが明らかとなった。よって、歯牙表層細菌叢は様々な要因に影響を受けやすく、独特な細菌叢を形成すること考えられる。

**一方、**口腔粘膜上の細菌叢は歯科表面よりも多様性がない。そこで、口腔粘膜に多く存在する *Streptococcus salivarius* を *S. mutans* と混合しプレート上で培養すると、バイオフィルム形成が抑制されることが明らかとなった。この理由を検討すると、*S. salivarius* がバイオフィルム形成抑制物質のフルクタナーゼを分泌していることが明らかとなった。このフルクタナーゼは、砂糖を分解してバイオフィルムに必要な基質を壊すことでバイオフィルムを抑制していた。

このように口腔では、食物摂取、宿主成分との相互作用、菌間の相互作用により、バイオフィルム形成が制御される。このようなメカニズムを把握することで、う蝕や歯周病などのバイオフィルム形成に関与する疾患の予防システムを開発できると考える。このバイオフィルム形成に着目した予防システムの開発は、今後の新しい医療に大きく貢献するものと考えている。

biofilm, cell cell communication, oral cavity

発表責任者：泉福英信（hsenpuku@nih.go.jp）

講演番号：2SY04-3
講演日時、会場：3 月 28 日 10:05～ B 会場

# 新規な分離培養戦略が切り拓く難培養性硝化細菌の獲得と生理・ゲノム特性

# Physiological and genomic characteristics of uncultured nitrifiers illuminated by novel cultivation and isolation strategies

○藤谷 拓嗣、牛木 章友、常田 聡（早大院生医）
○Hirotsugu Fujitani, Norisuke Ushiki, Satoshi Tsuneda (Waseda Univ.)

新規で有用な微生物の獲得や個々の微生物の詳細な生理・生態機能を解明するためには，環境中から微生物を純粋培養することが必須である。しかし，分離培養技術は今もなお，大きな技術革新には至っておらず，地球上に生息する 99%以上の微生物は未だ培養できない難培養微生物として認識されている。特に，硝化細菌は環境中の硝化反応（アンモニア酸化と亜硝酸酸化）を担う唯一の生物であるが，実験室で分離培養することが難しい。近年，硝化反応を触媒する機能遺伝子やメタゲノム等の遺伝子解析により，環境中には系統学的に新規な硝化細菌が豊富に存在している可能性が示唆されているにも関わらず，平板プレートや限界希釈法などの古典的な培養手法で獲得される硝化細菌は，易培養性の偏った系統グループばかりである。

そこで我々は，古典的な培養手法が獲得可能な硝化細菌の数や種類を制限してしまうと考え，工学的アプローチによるオリジナルな分離培養手法を確立してきた。硝化反応が活発な排水処理場の活性汚泥，硝化グラニュール，河川水をサンプルソースとして，基質を連続的に供給することが可能なバイオリアクターを開発し，目的の硝化細菌を選択的に集積できることを見出した。次に，セルソーターを用いて，前方散乱光と側方散乱光により硝化細菌のマイクロコロニーを生きたまま物理的に分取できる方法を確立した。その結果，様々な環境から新規な硝化細菌を複数種獲得することに成功した。

つづいて，新規性が高く，活性汚泥で最も優占度の高い亜硝酸酸化細菌 *Nitrospira* 属に含まれる 2 種の純菌株 ND1 株，NJ1 株（*Nitrospira japonica*）を対象に，生理学的解析およびゲノム解析を実施した。両株において，基質に対する感受性や有機窒素化合物を介した共生関係に顕著な違いが見られた。ゲノム配列では，ND1 株は鞭毛合成に関わる遺伝子群と走化性に関わる遺伝子群を保持していたのに対し，NJ1 株はほとんど保持していなかった。また，ND1 株は窒素固定に必要な亜硝酸還元酵素を複数種類保持し，亜硝酸をアンモニアへと還元することで窒素源として利用しているのに対し，NJ1 株は細胞外のアンモニアを取り込むのに必要なアンモニア透過酵素を複数保持し，アンモニアを直接窒素源として利用していると予測された。さらに，NJ1 株はクォーラムセンシング機構に関与するシグナル因子 AHL の産生･受容タンパク質をコードする遺伝子を保持していることが明らかになった。以上を踏まえると，両株の生理的機能およびゲノムの違いは，活性汚泥内において 2 種類の *Nitrospira* が異なる生存戦略を持ち，生態学的ニッチを形成していることを示唆している。

microcolony, nitrification, Nitorospira

発表責任者：常田　聡（stsuneda@waseda.jp）

講演番号：2SY04-4
講演日時、会場：3 月 28 日 10:30～ B 会場

# Quroum Sensing 阻害技術の開発と微生物制御への応用

# Development of quorum-sensing inhibition technique and its application for controlling bacterial behavior

○諸星 知広、池田 宰（宇都宮大院工）
○Tomohiro MOROHOSHI, Tsukasa IKEDA (Utsunomiya Univ.)

単細胞生物である細菌も、個々の細胞が互いにコミュニケーションを取り合い、集団として様々な生命活動を行っていることが明らかとなってきた。これらの細菌間コミュニケーションの中でも、細胞密度依存的コミュニケーション機構の一つである Quorum Sensing に注目が集まっている。Quorum Sensing では、細菌がシグナル物質を介して周囲の菌体密度を感知し、一定の細胞密度を超えたところで様々な遺伝子の発現を活性化する。グラム陰性細菌の場合、Quorum Sensing のシグナル物質として主に *N*-acyl-L-homoserine lactone (AHL）を用いており、病原性発現やバイオフィルム形成等の機能を Quorum Sensing により制御している。Quorum Sensing が機能しない変異株は、これらの機能の発現が大幅に低下することから、Quorum Sensing 阻害技術は、病原性及びバイオフィルムの抑制技術への応用が期待されている。

本研究グループでは、AHL を介した Quorum Sensing を阻害する技術として、(1) AHL 構造類似体を用いた阻害、(2) AHL トラップ化合物を用いた阻害、(3) AHL 分解機構を利用した阻害の 3 種類について研究を行ってきた。まず (1) について、AHL の基本骨格であるホモセリンラクトン部位をシクロペンタンに置換した *N*-acyl cyclopentylamide（Cn-CPA）を合成したところ、*Serratia marcescens* や *Pseudomonas aeruginosa* など、様々なグラム陰性細菌の Quorum Sensing を阻害可能であることを明らかにした。(2) について、AHL のアシル鎖を疎水性空洞内に包接可能なシクロデキストリン（CD）を投与することで、ある程度 Quorum Sensing を阻害可能であることを明らかにしている。そこで、CD に様々な置換基を修飾した化合物を合成したところ、CD にアルキルアミノ基を修飾することにより、AHL の結合能が向上し、高い Quorum Sensing 阻害効果を示すことを明らかにした。(3) について、環境中から AHL を分解する能力を有する細菌をスクリーニングしたところ、植物の葉表面からは *Microbacterium* 属細菌と *Solibacillus* 属細菌、植物の根表面からは *Chryseobacterium* 属細菌、活性汚泥からは *Acinetobacter* 属細菌を AHL 分解細菌として単離し、個々の細菌から新規 AHL 分解遺伝子をクローニングするとともに、これらの遺伝子を病原菌に導入することで、AHL の自己分解を引き起こし、病原性の発現を大幅に低下させることに成功した。現在、これらの Quorum Sensing 阻害技術を実環境中で利用する手法の検討を行っている。

quorum sensing, acylhomoseine lactone, inhibition

発表責任者：諸星知広（morohosi@cc.utsunomiya-u.ac.jp）

講演番号：2SY04-5
講演日時、会場：3 月 28 日 10:55～ B 会場

# 細菌の集団形成と社会性の創発
# Biofilm and Social emergence

○野村 暢彦、豊福 雅典、尾花 望 (筑波大・生命環境)
○Nobuhiko Nomura, Masanori Toyofuku, Nozomu Obana (Univ. Tsukuba)

細菌は単細胞生物として、互いにわれ関せずに生きていると長い間信じられてきた。しかしながら、その細菌も会話をし、集団生活をしていることが明らかになってきた。すなわち、言葉としてシグナル化合物を用いて、細菌間でコミュニケーションをしながら、バイオフィルムと呼ばれる組織化された集団で環境適応し生活していることがわかってきた。それらは、健康（感染症・プロバイオティクス)、食品（発酵・危害菌)、金属腐食、水処理（活性汚泥・膜処理)、バイオマスエネルギーなど正負の両面で様々な産業に関わっている。以上の背景より、バイオフィルムおよび Cell-cell communication の研究が世界中で盛んに進められている。

「バイオフィルム」は、単純な「薄膜（＝フィルム)」ではない。時折、バイオフィルムは驚くほどに精巧な立体構造を示すことがある。１種類の細菌からなるバイオフィルムでさえもその立体構造は栄養状態による異なり、つまり環境状態によってその立体構造に規則性つまり特徴が存在している。さらに近年、バイオフィルムからの多様な自然突然変異株の出現が報告されている。つまり、細菌にとってバイオフィルムは、環境適応のみでなく進化的側面からも重要な「場」であることが示唆される。一方、こうした集団形成には細胞間コミュニケーションつまり微生物の社会性（微生物社会学）が深く関与する事が示されている。細菌は自身でシグナル物質を生産し、細胞密度の上昇に伴いシグナル物質が蓄積していく。その後、蓄積したシグナル物質は細胞質あるいは細胞膜に局在するレセプターによって認識され、シグナル物質産生に関与する遺伝子発現を活性化する(Quorum Sensing(QS))。このようなフィードフォワードループ機構は、細胞集団の同調性を促進していると考えられる。QS は特定の遺伝子発現を同調的に調節し、様々な集団活性（group activities）を制御する。それらのシグナルは細胞外に放出される膜小胞（メンブランベシクル）によって運ばれることも明らかになってきている。

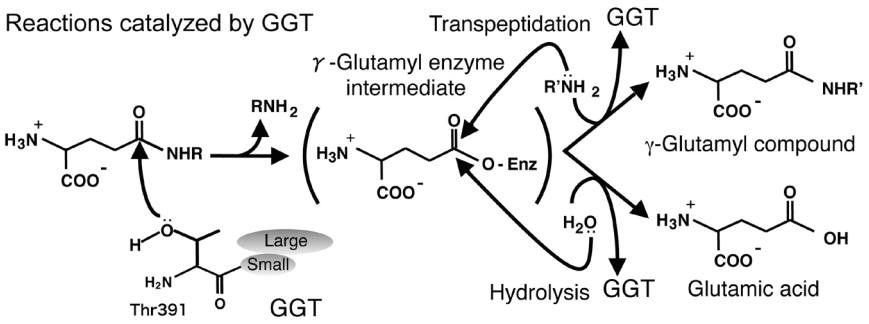
単細胞の生命体である微生物も、地球上のその８割以上がバイオフィルム形態つまり集団で存在していることが明らかとなってきた。つまり、微生物研究も「個から集団」を意識していく微生物社会学の理解が必須になる。バイオフィルムおよび Cell-cell communication などの微生物社会学また集団微生物学について、そしてそれらを考慮した新たな集団微生物制御の可能性について述べさせて頂く。

Biofilm, Cell-cell communication, Membrane vesicle

発表責任者：野村暢彦（nomura.nobuhiko.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2SY05-1
講演日時、会場：3 月 28 日 15:30～ F 会場

γ-グルタミルトランスペプチダーゼの応用
Application of γ-glutamyltranspeptidase
○鈴木 秀之（京都工繊大）
○Hideyuki Suzuki (Kyoto Inst. Technol.)




γ−グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT, EC 2.3.2.2)は、グルタチオンなどのγ−グルタミル化合物の加水分解反応とγ−グルタミル基をアミノ酸やペプチドなどのアミノ基を持つ化合物へ転移する反応を触媒する。両反応の至適 pH は大きく異なっており、反応液の pH を調整することにより、いずれか一方の反応を選択的に進行させることが可能である。

**加水分解反応の応用**：(1)基質がグルタミンだと加水分解反応は食品産業で重要なグルタミナーゼ反応である。醤油や味噌醸造時に大豆タンパク質から遊離するグルタミン残基は、グルタミナーゼによってグルタミン酸に変換され旨味に寄与するが、麹菌由来のグルタミナーゼは高食塩濃度にある醤油や味噌の醪中では強く阻害されている。私達は枯草菌の GGT が耐塩性であることを見出し、醤油醪に添加すると添加しない場合に比べてグルタミン酸を 50 mM 以上多く醤油中に蓄積できることを示した。(2)大腸菌の GGT は本来グルタリルアミノセファロスポラン酸アシラーゼ活性を持っていないが、その活性を持つクラス IV セファロスポリンアシラーゼとアミノ酸配列がよく似ている。そこで、変異の導入とスクリーニングを行い、大腸菌の GGT をグルタリルアミノセファロスポラン酸アシラーゼに変換することに成功した。 **転移反応の応用**：転移反応のγ-グルタミル基受容体となる化合物を変え、反応条件を検討することにより、様々なγ-グルタミル化合物の酵素合成法を開発してきた。(1)苦味アミノ酸をγ−グルタミル化することにより、苦味を劇的に低減する方法の開発、(2)ATP を必要としないグルタチオンアナログの酵素合成法の開発、(3)溶解度の高いパーキンソン病の治療薬γ-Glu-L-DOPA、抗結核剤γ-D-Glu-Trp、お茶の旨味成分であるテアニン、水溶液で安定なγ-Glu-Gln、コク味ペプチドであるγ-Glu-Val やγ-Glu-Val-Gly の酵素合成法の開発を行った。

Suzuki, and Yamada. Improvement of the flavor of amino acids and peptides using bacterial γ-glutamyl-transpeptidase. *In* **Recent Highlights in Flavor Chemistry & Biology,** p. 227-232 (2008).
Suzuki, Yamada, and Kato. γ-Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ-glutamyl-transpeptidase. **Amino Acids**, *32*, 333-340 (2007).

γ-glutamyltranspeptidase, glutaminase, γ-glutamyl compound

発表責任者：鈴木秀之（hideyuki@kit.ac.jp）

講演番号：2SY05-2
講演日時、会場：3 月 28 日 16:00～ F 会場

# γ-グルタミルトランスペプチダーゼの結晶構造から反応機構を探る

# Reaction mechanisms of γ-glutamyltranspeptidases based on its crystal structure

○和田 啓（宮崎大テニュアトラック推進機構）
○Kei Wada (Univ. of Miyazaki)

生体にとって必須の抗酸化物質であるグルタチオン（GSH; γ-Glu-Cys-Gly）は、グルタミン酸側鎖を介した特殊なペプチド結合（γ-グルタミル結合）を有し、一般的なプロテアーゼによる分解を受けない。γ-グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は、GSH のγ-グルタミル結合を切断できる唯一とも言える酵素であり、GSH 代謝と生体異物解毒の初期反応を担う鍵酵素として抗酸化ストレスに決定的な役割を果たし、動脈硬化症や腎障害、パーキンソン病、ガン細胞の多剤耐性など広範囲の疾患に深く関与している。GGT は、いわゆる Ntn-ヒドロラーゼファミリーに属し、不活性な前駆体は自己触媒的プロセッシングにより活性型ヘテロダイマーに成熟する。また、GGT はグルタチオンなどのγ-グルタミル化合物からγ-グルタミル基を切断し、他のアミノ酸やペプチドに受け渡す転移反応とγ-グルタミル基を加水分解してグルタミン酸を生成する反応を触媒する。これらの反応はγ-グルタミル化合物から引き抜かれたγ-グルタミル基が GGT に結合した「γ-グルタミル酵素中間体」を経て進行する。本研究では、さまざまな状態（酵素反応中や阻害剤結合状態）における本酵素の立体構造を決定し、これらを時間軸に沿って追跡することで GGT の分子機構に迫った。

【酵素反応機構】
基質の結合様式や反応機構の詳細を明らかにするために大腸菌 GGT の X 線結晶構造解析を行い立体構造を 1.9 Å 分解能で決定した。更に GSH を含む溶液に短時間(10 秒)浸けた結晶を急速凍結させることにより「γ-グルタミル酵素中間体」をトラップし、その構造を実験的に明らかにした[1, 2]。

【阻害剤結合様式】
古典的な GGT 阻害剤であるアシビシンの結合様式を用いて決定し、阻害剤の構造変換を伴う新規な結合機序を提唱した [3]。さらに、バクテリア GGT は一見すると同じ基質結合ポケットを持つように見えるが、枯草菌 GGT-アシビシンの構造からバクテリア GGT がもつ阻害剤結合様式の多様性が見えてきた [4, 5]。現在、ヒト GGT を用いて、様々な阻害剤の結合様式の決定を進めている。

本発表では、以上を踏まえて、本酵素の分子機構の全容を議論させて頂く。

[1] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 6471- (2006); [2] *J. Biol. Chem.*, 288, 2433-(2007); [3] *J. Mol. Biol.*, 380, 361 - (2008); [4] *FEBS J.*, 277, 1000 - (2010); [5] *Acta Cryst.* D, 607- (2014)

x-ray crystallography, glutathione, Ntn-hydrolase family

講演番号：2SY05-3
講演日時、会場：3 月 28 日 16:30～ F 会場

# ポリγグルタミン酸の局在性を決める分断酵素 ～ＧＧＴ類縁のＣａｐＤとアミダーゼ類縁のＰｇｄＳを中心に～

# Depolymerases for localization of poly-γ-glutamate in *Bacillus*: GGT-like CapD and amidase-like PgdS enzymes

○芦内 誠、白米 優一、若松 泰介（高知大農）
○Makoto Ashiuchi, Yuichi Hakumai, Taisuke Wakamatsu (Kochi Univ.)

ポリγグルタミン酸（ＰＧＡ）はグルタミン酸がγアミド結合で連結したバイオポリマーである。化成ナイロン様の主鎖骨格に加え、化成ポリアクリル酸様の側鎖周辺構造まで備えていることから、新機能性高分子材料としての応用展開に大きな期待が寄せられている。さて、ＰＧＡは「納豆の糸」の主成分としてあまりにも有名だが、実は、炭疽菌・好アルカリ性細菌・古細菌・無脊椎動物等にもその生産が広く認められている。かかる生理的役割に目を向けると、納豆菌については判然としない状況が続いているのに対し、炭疽菌では動物免疫網から逃れる「隠れ蓑」として、好アルカリ性細菌ではアルカリｐＨを中和するバリア層成分として、超好塩古細菌では高塩環境下で発生する脱水現象から身を守るため、さらに、無脊椎動物のヒドラでは獲物を捕らえて離さないための粘着剤としての機能が明らかにされている。ＰＧＡ研究は、これまでその多くが産生機構の調査に費やされてきたが、遂に生理機能を理解するための本格的な分子解析が進みはじめた。突破口は、意外にもＰＧＡの分解（劣化）を連想させる「ＰＧＡ切断酵素」にあった。ここでは、γグルタミルトランスペプチダーゼ（ＧＧＴ）類縁のＣａｐＤ酵素とグルタミルアミドヒドロラーゼ（アミダーゼ）類縁のＰｇｄＳ酵素に焦点を当て、ＰＧＡの機能発現を考える上で極めて重要な「局在性」との関わりについて詳解する。

**ＣａｐＤ酵素**：これをコードする *capD* 遺伝子は、炭疽菌の莢膜（capsule）成分の産生に関わる *cap* オペロンより初めて見いだされた。これは *capBCADE* で構成され、*capD* 以外は莢膜性高分子としてのＰＧＡの合成に関わる。ＧＧＴ類縁のＣａｐＤは「ＰＧＡの細胞壁へのペプチド転移反応」を触媒するとされる。実際に本遺伝子破壊株では著しい毒性低下が確認されたが、これは免疫網から逃れる術を失ったためと示唆されている（炭疽菌ＰＧＡ自体は完全に無毒）。土壌細菌で産業的にも有用な巨大菌にも *cap* オペロンが見いだされている。興味深いことに *capBCADEF* で構成され、新規同定のＣａｐＦもまたＧＧＴに類縁の酵素であった。なお、炭疽菌ＰＧＡが D-グルタミン酸で作られているのに対し、巨大菌ＰＧＡは逆にＬ体で占められており、立体化学上、明らかに異なる高分子といえる。

**ＰｇｄＳ酵素**：該 *pgdS* 遺伝子は、納豆菌の細胞外高分子としてのＰＧＡの合成に係る *pgs* オペロンのすぐ下流に見いだされた。具体的には、*pgsBCAE-pgdS* で構成されていた。該 *pgs* オペロンに *capD* に相当する *pgsD* が存在しない点は注目に値する。ＰｇｄＳはアミダーゼ類縁酵素である。納豆菌の DL 混成型ＰＧＡの内部構造において「D 体が連続する領域」を認識して切断することが分かっている。また、生理的には「ＰＧＡの菌体外放出の促進」に関わっている可能性が高いと推察されている。

poly-γ-glutamate, localization, depolymerase

発表責任者：芦内　誠（ashiuchi@kochi-u.ac.jp）

講演番号：2SY05-4
講演日時、会場：3 月 28 日 17:00～ F 会場

# *Lactobacillus brevis* によるアルコール性肝障害の抑制作用

Oral administration of *Lactobacillus brevis* ameliorates alcoholic liver disease

○瀬川 修一 (サッポロビール株式会社　価値創造フロンティア研究所)
○Shuichi Segawa (Frontier Laboratories of Value Creation, Sapporo Breweries Ltd.)

酒を適度に飲むことは飲み過ぎや、まったく飲まないよりも、死亡率が低くなるというＪカーブ効果が報告されている。しかし、現代のような日常飲酒の時代では、酒はいつどこでも安価に手に入れることができるようになり、その結果として、飲酒量の増大に伴うアルコール中毒、肝機能障害などの健康上の弊害といった問題が浮上してきている。いくつかの食品素材はアルコール摂取に起因するこれらの障害に影響を与えることが報告されている。我々は乳酸菌 *Lactobacillus brevis* が小腸のバリア機能を強化し、アルコール性肝障害を予防する効果を有することを明らかにしてきた。

アルコールの摂取は腸管バリア機能の低下を促し、腸管から肝臓へのエンドトキシンのトランスロケーションがアルコール性肝障害発症の一つの要因であると報告されている。我々はビール大麦から分離された *L. brevis* SBC8803 株についてマウス小腸を用いた ex vivo ループアッセイにより腸管バリア機能を評価した。その結果、マウス小腸への *L. brevis* SBC8803 株の刺激は酸化ストレスによる小腸からのマンニトール漏出を抑制し、バリア機能を増強する効果が認められた。次に、Lieber-Decarli エタノール飼料を C57BL/6N マウスに投与するアルコール性肝障害モデルマウスに対して、*L. brevis* SBC8803 株を経口投与し、そのアルコール性肝障害抑制効果を検証した。4～5 週間のエタノール飼料の投与はマウス血清中の肝機能マーカー(AST、ALT)の上昇を認めたが、*L. brevis* SBC8803 株の投与はその上昇を抑制し、さらに肝臓における炎症性サイトカイン TNF-α、脂質合成に関与する転写因子 SREBPs の発現を抑制した。

*L. brevis* SBC8803 株の経口投与はアルコール性肝障害モデルマウスに対して予防効果を示したことから、当該菌株についてヒトでの試験を実施した。試験は週 5～7 日の飲酒習慣があり血清 GGT が高目で AST、ALT が正常範囲内の被験者 64 名で実施した。試験デザインは二重盲検並行群間比較試験とし、乳酸菌摂取群とプラセボ摂取群の 2 群とした。乳酸菌サンプルは生菌 400 億 CFU 入りのカプセルとし、プラセボは生菌の入っていないカプセルとした。被験者はサンプルを毎日 1 日 1 回、8 週間摂取した。主要評価項目として GGT、副次評価項目として AST、ALT、TG を設定し、試験を実施した。試験開始時には、群間の体重、BMI、血清 GGT、AST、ALT、TG には有意差は認められなかったが、試験開始 4 週間後に乳酸菌摂取群の血清 GGT、TG の有意な減少が認められた。これらの結果から、まだ臓器障害に至っていない飲酒家の食事指導の中に乳酸菌摂取を取り入れていくことが、脂質代謝異常および肝障害発症予防に有効と考えられる。

lactic acid bacteria, alcoholic liver disease, intestinal barrier function

発表責任者：瀬川修一（syuuichi.segawa@sapporobeer.co.jp）

講演番号：2SY06-1
講演日時、会場：3 月 28 日 15:35～ C 会場

# 大豆イソフラボンによる胎生期・新生仔期マウスの脂質代謝遺伝子のエピジェネティクス制御

# Epigenetic regulation of lipid metabolism gene expression by soy isoflavone during embryonic and neonatal period of mice

○亀井 康富（京都府立大生命環境）
○Yasutomi Kamei (Kyoto Prefectural Univ)

多くの疫学調査により、胎生期や新生児期の栄養環境が成人期に発症する肥満や生活習慣病に関連する可能性が指摘されている。また、アジア人の肥満の発生率が欧米と比較して少ないことは大豆の消費量と相関があるとされる。一方、子供の成長後の肥満・生活習慣病の発症には、母親の妊娠期・授乳期の栄養環境が影響すると考えられている。核内受容体は DNA 結合領域をもつ転写因子で細胞外の化合物に直接応答して遺伝子の転写を調節している。そのなかで、Peroxisome proliferator-activated receptor （PPAR）は脂質代謝の遺伝子発現を制御することが報告されている。PPARαは脂溶性リガンドに応答し、脂肪酸のβ酸化経路における遺伝子の転写を制御している。大豆イソフラボンであるダイゼインは PPARαのリガンドとなり、PPARαを活性化することが報告されている。一方、大豆イソフラボンを含む飼料で妊娠マウスを飼育すると、産仔において DNA メチル化変化が生じ、成長後肥満しにくいことが報告されている。

我々はダイゼインを妊娠期・授乳期の母マウスに投与し、さらに離乳後、仔マウスに普通食または高脂肪食を与えた。そして母親の妊娠期・授乳期の環境がその後の仔マウスの肥満表現型・遺伝子発現にどのような影響を与えるかを検討した。新生仔マウスでは体重、脂肪組織重量がダイゼイン投与群で減少傾向にあった。さらにダイゼイン群の仔マウスに高脂肪食を与えたところ、vehicle 群で見られた体重・脂肪重量の増加がダイゼイン群で抑制されていた。母親の妊娠期・授乳期の栄養環境が仔の表現型に影響をあたえ、仔マウスにエピジェネティクスな変化が起こっている可能性がある。本報告では、これらの分子メカニズムについて論じる。本研究成果を、新生児期の栄養学的介入の形で応用することにより、肥満・生活習慣病の新しい予防戦略の手がかりになることが期待される。

epigenetics, isoflavone, lipid metabolism

発表責任者：亀井康富（kamei@kpu.ac.jp）

講演番号：2SY06-2
講演日時、会場：3 月 28 日 15:55～ C 会場

# 成体海馬神経新生促進を介した大豆イソフラボンによる脳機能改善の可能性

# Potential involvement of soy isoflavone in adult hippocampal neurogenesis

○神野 尚三（九大院医）
○Shozo Jinno (Kyushu Univ., Grad. Sch. Med. Sci.)

ヒトを含む哺乳類の脳の一部の領域 (海馬歯状回や脳室下帯) では、生涯にわたって新たなニューロンが産生され続ける。近年の研究によって、成体の海馬で産生されるニューロンは、認知や記憶、気分や情動などの高次脳機能に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。成体海馬神経新生と呼ばれるこの現象は、炎症性サイトカインやホルモンの影響を受けており、加齢に伴って減少することが報告されているが、その制御機序については不明な点も多い。本研究で我々は、初老期メスマウス (10 カ月齢) に大豆イソフラボンの一種であるダイゼイン (30mg/kg) を 28 日間連続で腹腔内投与し、海馬の新生ニューロンへの作用について、免疫組織化学的な検討を行った。ステレオロジー定量解析の結果、記憶や認知に関わる背側海馬では、ダイゼイン投与によって Mash1 陽性一過性増幅前駆細胞やカルレチニン陽性幼若顆粒細胞の空間分布密度が増加したが、Sox2 陽性神経前駆細胞に変化は認められなかった。また、ダイゼイン投与によって新生ニューロンの樹状突起の伸長が促進されていた。その一方で、気分や情動の制御に関わる腹側海馬では、神経新生にほとんど変化は認められなかった。これらの結果は、ダイゼインが背側海馬の神経新生の促進を介し、加齢に伴う脳機能低下を改善する可能性を示唆している。シンポジウムでは、大豆イソフラボンによる成体海馬神経新生現象の制御機序と、その機能的意義について議論する予定である。

Adult neurogenesis, Hippocampus, Soy isoflavone

発表責任者：神野尚三（sjnno@med.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2SY06-3
講演日時、会場：3 月 28 日 16:20～ C 会場

# 大豆イソフラボン類の神経幹/前駆細胞の細胞増殖・分化に対する作用の解析

# The effect of soy isoflavone on the proliferation and differentiation of the neural stem cells

○守屋 孝洋（東北大学）
○Takahiro Moriya (Tohoku Univ.)

大豆はダイゼインやゲニステインなどの大豆イソフラボン類を含有し、抗酸化作用などを介して肥満予防効果などの有益な作用を有する食材として注目されている。さらに大豆イソフラボン類は中枢神経系にも作用し、アルツハイマー病などの認知症を改善する効果を示すことがヒトおよび実験動物モデルを用いた研究により明らかにされている。しかしながら、大豆イソフラボンのどのような成分が、中枢神経系のどのような細胞種に対してどのように作用しているのかについては十分には明らかにされていない。一方、自己複製能とニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分可能を有する神経幹/前駆細胞は個体発生期の中枢神経系の構築に重要な役割を果たしているが、成熟後の脳内においても、側脳室下帯や海馬歯状回・顆粒細胞下層などに限局して存在し、それぞれ嗅球や海馬歯状回に新生ニューロンを供給していることが知られるようになってきた。特に海馬歯状回におけるニューロン新生は記憶学習だけでなく、気分調節、情動機能、抗うつ薬の薬効発現など、生理的および薬理学的にも極めて重要な役割を果たしている。神経幹/前駆細胞の細胞増殖やニューロン等への分化、および新生細胞の生存は細胞内外のシグナル物質によって厳密に調整されており、ストレスや加齢等の生理的イベントだけでなく、アルツハイマー病やうつ病などの神経系疾患などによっても変化することが知られている。したがって、多くの生理活性成分を含む食材の摂取によっても海馬歯状回ニューロン新生が変化し、それが脳機能の変化をもたらすことは多いに予想できる。そこで本研究では、大豆イソフラボンの摂取が海馬ニューロン新生にどのような作用を及ぼすのかをマウスモデルで検討し、さらに分離培養した神経幹細胞を用い、その細胞増殖活性やニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの分化能に与える影響について明らかにすることを目的とした。本シンポジウムにおける発表では、代表的な大豆イソフラボンであるダイゼインやゲニステインの効果についてご紹介する予定であり、特に大豆イソフラボンの作用発現において投与経路や投与期間が重要であることを示す予定である。また、分離培養した神経幹細胞に大豆イソフラボン類を直接的に作用させた場合の効果についても発表する予定である。

neurogenesis, soy isoflavone, neural stem cell

発表責任者：守屋孝洋（moriya@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2SY06-4
講演日時、会場：3 月 28 日 16:45～ C 会場

# 大豆ペプチドの優れた生体吸収性に寄与する POT ファミリー輸送体の基質多選択性

# Substrate multispecificity of proton-coupled oligopeptide transporter

○伊藤 圭祐[1]、河合 駿[2]、本山 貴康[3]、加藤 竜司[2]、河原崎 泰昌[1] ([1]静県大院・薬食、[2]名大院・創薬、[3]不二製油・基盤研)
○Keisuke Ito[1], Shun Kawai[2], Takayasu Motoyama[3], Ryuji Kato[2], Yasuaki Kawarasaki[1] ([1]Univ. Shizuoka, [2]Nagoya Univ., [3]Fujioil Co., Ltd.)

大豆たん白質加水分解物（大豆ペプチド）は、その優れた栄養価と生体吸収性からスポーツ用途食品、経腸栄養剤、発酵原料等に利用されている。特にジ・トリペプチド含量の高い大豆ペプチドはアミノ酸混合物よりも速やかに生体に吸収され、またジ・トリペプチドには降圧作用や脂質代謝改善作用等の生理活性も数多く報告されている。そのため、ジ・トリペプチドの生体吸収性は大豆の健康機能とその応用を考える上で重要である。

ジ･トリペプチドは Proton-coupled oligopeptide Transporter (POT)ファミリー輸送体により生体内へ吸収される。POT は全生物に保存されており、8,400 種類のジ・トリペプチド、および類似構造の医薬品等を輸送するユニークな“基質多選択性”をもつ。しかし膨大な数の基質についての親和性解析は容易ではなく、基質多選択性の詳細はいずれの POT についても不明であった。

そのような背景において、我々は POT のハイスループット解析システム（Fluorescence-based Competitive Uptake (F-CUp) assay system）を開発し、ペプチドライブラリーの網羅的解析によって各種 POT の基質多選択性の全貌を明らかとしてきた[1)]。例えば出芽酵母 Ptr2p の場合、ジ・トリペプチドの親和性は>48～0.020 mM（*Ki*）と幅広く分布しており、これまで一括りに考えられてきたペプチドの生体吸収性は、実際には個々のペプチドごとに、最大で数千倍以上も大きく異なることが明らかとなった。興味深いことに、ヒト PEPT2 と出芽酵母 Ptr2p は 30%程度のアミノ酸配列相同性にも関わらず、共に芳香族・分岐鎖アミノ酸含有ジペプチド群が高親和性であり、酸性アミノ酸含有ジペプチド群が低親和性であった。*in silico* 解析の結果、親和性に寄与する基質の物理化学的特徴には真核生物 POT 間で類似性がみられたことから、これらの POT が共通して、生合成負荷の高い芳香族・分岐鎖（ヒト必須・準必須）アミノ酸を高効率に取り込む役割を担うことが示唆された。食品たん白質のヒト必須・準必須アミノ酸含量が生成ペプチドの生体吸収性と関連することは、大豆の高いアミノ酸スコアが大豆ペプチドの優れた生体吸収性を説明する科学的根拠ともなりうることを意味する。

講演では、大豆由来の生理活性ペプチドの探索例として、抗 2 型糖尿病効果の期待できるヒトジペプチジルペプチダーゼ IV 阻害ジペプチドの網羅的解析についても合わせて概説する[2) 3)]。

１）K. Ito* et al. ***Nature Commun.*** 2013
２）Lan V.T.T. and K. Ito* et al. ***Food Chem.*** 2015
３）伊藤圭祐等 日本農芸化学会 2015 年度大会 トピックス賞

peptide transporter, bioactive peptides, *Saccharomyces cerevisiae*

発表責任者：伊藤圭祐（sukeito@u-shizuoka-ken.ac.jp）

講演番号：2SY06-5
講演日時、会場：3 月 28 日 17:05～ C 会場

# 脱ユビキチン化酵素 19 と大豆イソフラボンによる骨格筋量の制御

# Regulatory mechanism of skeletal muscle mass by ubiquitin-specific peptidase 19 and soy isoflavones

○山地 亮一（大阪府大院生命環境）
○Ryoichi Yamaji (Osaka Pref. Univ.)

骨格筋は人体で最大量を占める組織であり、姿勢保持や筋収縮のような運動機能の他に、インスリンの主要な標的組織としてグルコースを取り込んで代謝する機能も担う。骨格筋量は、ギプス固定や寝たきりによる活動量の低下、加齢、ストレス、筋損傷、あるいは極度のダイエットや絶食などの栄養不良によって減少する。したがって骨格筋量が低下することで、運動機能が低下し、また肥満や糖尿病のような代謝疾患の発症するリスクが高まるので、骨格筋量の維持・増加を制御する仕組みを理解することは、これらの身体にもたらされる不利益の予防・改善に寄与する。

骨格筋量は男性と女性で異なるが、その要因のひとつとして性ホルモンの作用があげられる。女性ホルモンのエストロゲン（17β-エストラジオール、E2）は転写因子として機能する 2 つの特異的なエストロゲン受容体アイソフォーム（ERα と ERβ）を介して標的遺伝子の発現を制御する。骨格筋にはこれらの 2 つのアイソフォームが発現しているが、E2 と 2 つの ER アイソフォームの骨格筋における役割は不明である。そこで男女間での骨格筋量を制御する仕組みの違いが、骨格筋量を制御する仕組みを理解するために重要な情報となるとの仮説を立てた。我々は E2 が筋芽細胞の分化を抑制したので、E2 による分化抑制時に発現の変動するタンパク質を探索し、E2 によって発現が増加するタンパク質として脱ユビキチン化酵素の USP19 を同定した [1]。筋分化時に USP19 をノックダウンすると筋分化は促進し、また生理的条件下でのメスマウスの骨格筋の USP19 をノックダウンすると筋量が増加した [2]。USP19 の発現は E2 によって活性化された ERα に依存して増加するが、その作用を ERβ アゴニストが阻害することも明らかにした。

本講演では大豆イソフラボンのダイゼインが、筋細胞において ERβ アゴニスト活性を示し、また若齢マウスの骨格筋で USP19 の発現を抑制して筋量を増加させることも概説したい。

[1] Ogawa M. *et al., J. Biol. Chem*. 2011
[2] Ogawa M. *et al., J. Endocrinol*. 2015

soy isoflavones, skeletal muscle, estrogen receptor

発表責任者：山地亮一（yamaji@biochem.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：2SY06-6
講演日時、会場：3 月 28 日 17:25～ C 会場

# 大豆中の mRNA 成熟阻害活性の同定・構造活性相関・作用基盤の解明

# Identification, structure-activity relationship and molecular mechanism for the inhibition of mRNA processing from soy-bean

○増田 誠司（京大生命）
○Seiji Masuda (Kyoto Univ.)

日本は他に例を見ないスピードで高齢化社会を迎えつつある。ガンによる死亡は 1981 年に第 1 位となって以降、第 1 位を占めている。よってガンを抑制する活性化合物を様々な食資源から探索し、積極的に活用することは、健康な長寿社会の実現に一助となる。

近年、細胞増殖を阻害する薬剤の作用機序の 1 つが mRNA 成熟過程にあることがわかってきた。このため mRNA 成熟過程は、抗ガン剤のターゲットの 1 つと見なされつつある。そこで、mRNA の成熟過程の阻害に絞った全く新しい探索系を確立し、この探索系を用いて mRNA 成熟過程を阻害する食品に由来する天然物成分を探索した。

まず、様々な食品とその活性成分を探索した。その結果、大豆由来のイソフラボン画分を添加するとレポーター･ルシフェラーゼ活性の低下が観察された。mRNA は核で mRNA 前駆体として合成され、すべてのプロセシングを完了して成熟 mRNA となる。その後、核から細胞質へと移行し、タンパク質生合成の鋳型となる。このため、プロセシングが阻害されると未成熟の mRNA は核内にとどまる。そこで、観察した効果が mRNA の成熟阻害を介しているかについて、RNA-FISH により mRNA の局在を観察した。すると、濃度依存的に mRNA の局在が細胞質から核へと変化した。よってイソフラボン画分には mRNA 成熟阻害活性の存在が示唆された。

次いで、イソフラボン画分のなかで活性成分の同定を行った。イソフラボンの主要な成分であるダイゼインやゲニスタインには mRNA 成熟阻害活性は見いだせなかったが、アピゲニンを代表とするいくつかのフラボノイドに活性が認められた。またこれらのフラボノイドは、濃度依存的に細胞増殖を詐害した。

そこで、mRNA 成熟阻害活性を発揮するために必要な構造活性相関を解析した。その結果、特定の構造が mRNA 成熟阻害活性の発揮に必須である事が判明した。さらにアピゲニンによる mRNA 成熟阻害活性の分子基盤を明らかにするために、核内標的の探索をプルダウンと質量分析解析により行った。最もよく結合が確認されたのは、mRNA スプライシングの 3’スプライス部位に結合し、スプライシング反応を開始するために必須の因子である U2 SnRNP とその関連因子の構成成分であった。

以上の結果から、今回見いだした大豆由来のフラボノイド成分は、mRNA のプロセシング過程を阻害することで mRNA の成熟を阻害、これにより mRNA の細胞質への移行を妨げることで細胞増殖を負に制御すると考えられた。

mRNA, apigenin, splicing

発表責任者：増田誠司（masuda@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：2SY07-1
講演日時、会場：3 月 28 日 15:35～ B 会場

# 海藻バイオマスの徹底利用

Complete biological conversion of seaweed

○中島田 豊[1,2] ([1]広大先端、[2]JST・CREST)
○Yutaka Nakashimada[1,2] ([1]Hiroshima Univ., [2]JST・CREST)

世界第 6 位の排他的経済水域をもつ我が国は、豊富な海洋バイオマス資源の利用が可能な立場にある。そこで我々は、海洋大型藻類の耐塩無加水メタン発酵技術を中心とする海洋藻類のエネルギー・資源化要素技術を確立し、経済性とエネルギー回収効率のベストミックスを可能とするプロセスの提案を目的として研究を進めている。

メタン発酵におけるエネルギー回収率を改善するためには、生藻体を乾燥せずそのまま発酵する必要がある。しかし、生藻体には海水と同程度の約 2-3%の塩分が含まれており、従来の淡水系メタン発酵では塩阻害によりメタン発酵することは困難であった。そこで我々は、特殊環境ではなく大量に入手可能な海洋底泥に着目し、褐藻類であるマコンブ粉砕物からの海水塩条件下でのメタン発酵性能を検討した。その結果、日本国内の複数の海洋底泥微生物群が、マコンブを容易に分解し、天然ガス代替再生可能エネルギーであるメタンを海水塩濃度条件下でも高効率に生成できることを発見した。さらに、この大型褐藻類を容易にメタン化する微生物菌群の集積法を開発するとともに、未希釈・高塩条件下での海洋大型藻類からの長期・安定メタン発酵試験に成功した。

オーランチオキトリウム属はドコサヘキサエン酸、アスタキサンチンなど高付加価値油脂を大量生産できる。しかし、海藻特有糖質のアルギン酸やマンニトールを資化しない。我々は、*Gluconobacter oxydans* がマンニトールをオーランチオキトリウム属が資化できるフルクトースに変換することを発見した。本知見に基づき二段階共生培養を行うことで、海洋藻類基質から遺伝子組換えによらずに高付加価値油脂を生産することを可能とした。さらに、アルギン酸を利用可能とする二段階培養系も開発中であり、非遺伝子組換え系での高付加価値油脂生産基盤技術として高い価値を持つ。

海洋藻類には藻体表面の分泌性酸性多糖への吸着により、有害な重金属やレアメタル・レアアースを含む様々な金属イオンが濃縮されていることが知られている。そこで、様々な海水サンプルから各種金属イオンに対する耐性、または蓄積能を持つ海洋性光合成細菌を探索し、銅、カドミウム、亜鉛などの重金属イオンを 90%以上菌体内に蓄積するものや、藻体に集積されているレアアースであるイットリウムを 95%以上回収できる細菌群を見いだした。これらの菌群を段階的、複合的に使用することで、コンブバイオマス中の重金属およびレアアースを完全に除去・回収することができると試算された。また、光合成細菌は、メタン発酵残渣中の有機酸を好んで消費するので、同時に排水処理も可能な金属回収が期待できる。

Seaweed, Anaerobic digestion, Marine microorganism

発表責任者：中島田豊（nyutaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2SY07-2
講演日時、会場：3 月 28 日 16:00～ B 会場

# 複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物変換法の制御と体系化

# Control and organization of meta-fermentation for value-added substance conversions with controlled mixed culture systems

○田代 幸寛、酒井 謙二（九大院・農）
○Yukihiro Tashiro, Kenji Sakai (Fac. Agr., Kyushu Univ.)

我々は、複合微生物系による有価物生産のための発酵法として『メタ発酵』を提唱している[1)]。単一微生物が資化できない複合基質（廃棄物など）を複合微生物系では資化できる、殺菌が不必要、雑菌混入に対して強い、設備やエネルギーコストが低いなどがメリットに挙げられる。しかしながら、デメリットとしては、単一基質の変換が非効率的、生成物が複雑（ヘテロ発酵となりやすい）、微生物解析が複雑、発酵制御が困難、などがある。単一微生物を対象とする多数の有価物生産プロセスにおける種々のファクター（pH、温度、炭素源、溶存酸素、酸化還元電位、電子キャリヤー物質など）の最適化に関する知見は長年の研究成果により蓄積されている。一方、複合微生物系によるメタ発酵プロセスでも、それらのファクターが生産物挙動にも微生物群集構造にも劇的に変化させるという知見が得られつつあるが、まだ学問分野における理論体系の構築は端緒についたばかりである。本講演では、特に、グリーンケミカルとして注目されている L-乳酸のメタ発酵による生産プロセスに関する演者らの研究成果を紹介し、メタ発酵研究の体系化に向けた知見・情報を提供する。

[1] 温度が生産物および微生物群集構造におよぼす影響[2)]

まず、制御因子として発酵温度に着目し、標準生ゴミ培地およびコンポストを用いて、pH を 24 h 毎に 7.0 に振動制御しながら、温度 30ºC-65ºC でメタ発酵を行った。30ºC と 37ºC では、酪酸生産が主となる一方、45ºC-55ºC では、L-乳酸生産が主となった。特に、温度 50ºC では、光学純度 100%で L-乳酸生産にメタ発酵で初めて成功し、*Bacillus coagulans* が優占菌であった。本成果は、発酵温度が微生物群集構造を変化させる重要因子であり、温度により有価物を選択できる可能性を示唆した。

[2] pH が生産物および微生物群集構造におよぼす影響[3)]

本項では、[1]と同じ培地、複合種菌を用いて、温度 50ºC で、pH7.0 における制御法を検討した。発酵初期より一定制御した場合、発酵終了時間は約 3 分の 1 に短縮されたが、L-乳酸蓄積濃度および選択性は大幅に減少し、優占菌が *Bacillus thermoamylovorans* へ変化した。一方、発酵初期に pH を振動制御後、24 h 以降に一定制御してメタ発酵を行ったところ、発酵時間をさらに短縮でき、高い L-乳酸蓄積濃度、選択性、生産性、光学純度を得た。本成果は、単一微生物とは異なる pH 制御法で L-乳酸生産を効率化および制御できる一例である。

1) 田代、酒井, バイオインダストリー, 72, 486-487, 2014. (2) Tashiro et al., Bioresour. Technol., 146, 672-681, 2013. (3) Tashiro et al., submitted.

Meta-fermentation, Optically pure lactic acid, Fermentation factors

発表責任者：田代幸寛（tashiro@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：2SY07-3
講演日時、会場：3 月 28 日 16:20～ B 会場

# 下水汚泥のメタン発酵向上化のための細菌間相互作用の解明

# Investigation of Bacterial Cell-to-Cell Interaction for Enhanced Methane Fermentation of Waste Activated Sludge

○前田 憲成（九州工大）
○Toshinari MAEDA (Kyushu Inst. Technol.)

都市部で日々大量に発生している下水汚泥は、産業廃棄物の一つであり、一部はリサイクル利用されるようになってきたが、そのほとんどは廃棄されており、埋め立て地不足が顕在化しつつある現在において、環境負荷を低減するという視点からも、下水汚泥の効果的な減量化は今後の重要な課題となっている。古くから、下水汚泥から資源回収法として、メタン発酵が行われているが、メタン発酵速度が非常に遅く、日々大量で排出される下水汚泥の連続的なメタン発酵処理が実現していないのが現状である。

通常の下水汚泥のメタン発酵は、下水汚泥中の微生物群による下水汚泥中に存在している高分子物質の加水分解、その後は酸生成、メタン生成の主に３つ反応プロセスを経て起こる。それぞれのプロセスでは、様々な微生物同士が複雑に相互作用しながら、最終的にはメタンが生成される。この微生物間相互作用は、阻害、抑制、依存、促進などが考えられ、例えばメタン細菌を阻害・抑制する微生物の働きを抑えれば、メタン生成は必然と高まる。このように、下水汚泥中の複合微生物の機能を覚醒し、バイオエネルギーの高度生産化のために、複合系微生物ではあまり研究が進んでいない「微生物間相互作用」という着眼点で取り組んだ研究成果を紹介する。

下水汚泥中に低濃度の抗生物質を添加し、下水汚泥中の微生物群活性を変化させたところ、アジスロマイシンを添加した際に、メタン生成が向上することが明らかとなった。一方、クロラムフェニコールの場合はメタン生成が減少した。アジスロマイシンを添加した下水汚泥では、pH の低下が早く、有機酸（特に酢酸）の生成が向上していることがわかった。この結果は、有機酸を生成する細菌数が、アジスロマイシン無添加の下水汚泥よりも多く検出されたという結果と一致している。また、アジスロマイシンを添加した下水汚泥では、メタン細菌の活性が 3.2 倍増加していた。さらに、アジスロマイシン添加・無添加の下水汚泥における細菌群集構造解析を行ったところ、アジスロマイシン添加の下水汚泥では、3 種のクロストリジウム属の菌種が活性化していることが明らかとなった。これらの菌種は、主にセルロース、デンプンの分解、そして高いプロテアーゼ活性を持っているものであり、これらの菌種が活性化したことにより、下水汚泥の加水分解が促進し、最終的にはメタン生成が増加したことが示唆された。

Waste activated sludge, Methane fermentation, Bacterial interaction

発表責任者：前田憲成（toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp）

講演番号：2SY07-4
講演日時、会場：3 月 28 日 16:40～ B 会場

# 複合微生物系における細胞間シグナル伝達とその応用
# Cell-cell signaling in polymicrobial communities

○豊福 雅典[1]、諸星 知広[2]、池田 宰[2]、野村 暢彦[1] ([1]筑波大・生命環境、[2]宇大・工)
○MASANORI TOYOFUKU[1], TOMOHIRO MOROHOSHI[2], TSUKASA IKEDA[2], NOBUHIKO NOMURA[1] ([1]Tsukuba Univ., [2]Utsunomiya Univ.)

活性汚泥を利用した生物学的水処理は世界中で汎用され，微生物複合系を利用した環境バイオテクノロジーの中では最も成功している例の一つであると言える。しかしながら，余剰汚泥の発生や水処理膜へのバイオフィルムの目詰まり(バイオファウリング)など，課題が残っている。こうした課題の解決は複合微生物系制御の基盤技術となることが期待される。不特定多数の微生物が入り混じる複合系において特に問題となるのは，いかにして特定の細菌を制御するかである。既存の工学的処理技術はすでに最適化されており，さらなる技術開発が必要である。

近年の研究により，細菌は低分子化合物(シグナル物質)を介してお互いにコミュニケーションを行うことが明らかとなっている。一般的にシグナル物質は種特異的に働く。すなわち，産生されるシグナル物質の種類が細菌種によって異なり，特異的な受容体によって認識される。我々は，微生物間コミュニケーションを利用することにより，複合微生物系で特定の細菌群を制御できるのではないかと考えてこれまでに研究を進めてきた。実際に活性汚泥中にはシグナル物質生産菌やシグナル物質様化合物が存在するが，活性汚泥における微生物間コミュニケーションの役割はほとんど分かっていない。

これまでの研究の結果，微生物間コミュニケーションが脱窒や硝化活性に影響を与えることを明らかにした。さらには，活性汚泥中にはメンブランベシクル(MV)と呼ばれる膜小胞が多く存在することが示唆された。MV は多くの細菌が放出する 20-400nm 程度の膜小胞であり，細胞間の物質輸送に関わることがこれまでに明らかとなっている。今回我々は新たに MV にシグナル物質が含まれていることを見出した。MV はその特性上シグナル物質の効率的な運搬に利用できる可能性がある。これらの知見を踏まえ，複合系微生物制御とその解析技術について議論する。

Cell-cell communication, Membrane vesicle, Biofilm

発表責任者：豊福雅典（toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：2SY07-5
講演日時、会場：3 月 28 日 17:00～ B 会場

# 海底メタン生産環境中の共生関係機構の解析
# Syntrophic mechanism in a deep-sea methanogenic condition

○森川 正章（北大環境）
○Masaaki Morikawa (Hokkaido Univ.)

メタンはバイオマス燃料として重要な資源のひとつであり、都市ゴミや活性汚泥から家畜糞尿にいたるまでさまざまなバイオマス廃棄物を利用した、高効率メタン発酵技術が近年開発されている。メタンを生成できるのはメタン菌だけでありその基質は酢酸、あるいは水素と二酸化炭素である。すなわち、メタン菌がメタンを生成するには酢酸や水素＋二酸化炭素を供給する微生物との栄養共生が必須となっている。メタン発酵槽におけるメタン菌およびそこに共生する微生物群の解析については報告例が多いが、メタンを主成分とする天然ガスを産生している海底油田における微生物群の相互作用については未だ不明な点が多い。

マレー半島東部沖の南シナ海に位置する海底油田 PM9 も天然ガスを産生しており、そこから採取した石油随伴水には Na, Mg, Ca など海水に多く含まれる金属元素は極めて少なく、 Si など非金属元素を多く含んでいることから海水の侵入がほとんどない隔絶した環境であることが示唆されている。この随伴水からさまざまな培地で微生物の単離を試みた結果、酢酸および水素を生成する絶対嫌気性の好熱性発酵細菌である *Coprothermobacter* 属細菌が得られ PM9-2 株と命名した。PM9-2 株の生育最適温度は 65℃であり、好熱性メタン菌 *Methanothermobacter thermautotrophicus* $\Delta H^T$ と共培養することによって水素を介した栄養共生が確認できた。顕微鏡観察からは、PM9-2 株と $\Delta H^T$ 株は多糖をマトリックスとする共凝集体を形成していることが判った。多糖を精製したのち、組成分析したところ Man:Glc=5:1 からなるグルコマンナンであった。一方、PM9-2 株は原油成分である炭化水素類の分解活性を有さなかったが、分子量 76kDa のプロテアーゼを細胞外に分泌していた。このプロテアーゼは高温メタン発酵槽から単離された *Coprothermobacter proteolyticus* $DSM5265^T$ のものとは異なっており、ドラフトゲノム解析の結果 782 アミノ酸（含、プレプロ配列）からなる新規セリンプロテアーゼであることが示唆された。

以上のことから、海底油田 PM9 では高温メタン発酵槽と同様にタンパク質性有機物を分解する *Coprothermobacter* sp. PM9-2 と好熱性メタン菌との共生によってメタンが生成していることが示唆される。

Coprothermobacter, syntroph, extreme thermophile

発表責任者：森川正章（morikawa@ees.hokudai.ac.jp）

講演番号：2SY07-6
講演日時、会場：3 月 28 日 17:25～ B 会場

# 放射能汚染バイオマスの資源化と減容化総合技術の開発

# Development of integrated energy production and volume reduction system for radiation-contaminated biomass

○加藤 純一[1]、金原 和秀[2]、中村 雅哉[3]、大塚 祐一郎[3]、佐々木 健[4]、佐々木 慧[4]、中島田 豊[1]、松尾 健司[1]、新谷 政己[2]、平井 浩文[2] ([1]広島大先端物質、[2]静岡大工、[3]森林総合研究所、[4]広島国際学院大工)

○Junichi Kato[1], Kazuhide Kimbara[2], Masaya Nakamura[3], Yuichiro Ohtsuka[3], Ken Sasaki[4], Kei Sasaki[4], Yutaka Nakashimada[1], Kenji Matsuo[1], Masaki Shintani[2], Hirofumi Hirai[2] ([1]Hiroshima Univ., [2]Shizuoka Univ., [3]Forestry Forest Production Res. Inst., [4]Hiroshima Kokusai Gakuin Univ.)

福島第一原子力発電所の事故により広範囲の植物、農作物が放射線汚染を被っている。この膨大な量の植物バイオマスを処理するためには、まずはその減容化を図る必要がある。福島復興のためには、こうした放射能汚染植物バイオマスを除去し、処理しなければならない。現在、汚染植物バイオマスを収集して中間貯蔵地に集積し、放射活性が減衰するまで長期安定保存する方策が考えられている。しかし、中間貯蔵地の面積は限られたものであるので、中間貯蔵地に移送する前になるべく容積を減らす（減容化する）必要がある。また、貯蔵中に植物バイオマスが腐敗し、硫化水素やアンモニアなどの有害ガスが発生しないよう、植物バイオマスを安定化することも必須である。焼却処分は放射能汚染した植物バイオマスの減容化および安定化の有効な方法の一つである。焼却により植物バイオマス量は容量的にも重量的にも大幅に減容化できる。しかし、放射性物質の飛散という大きな問題を抱えている。セシウムは比較的沸点が低い金属（沸点：641℃）であるので、焼却処理により容易に気化してしまうことが予想される。したがって、放射性セシウムの飛散を完全に防止する工夫を加えなければならない。日本の技術力をもってすれば、そのような焼却施設を実現するのは十分可能であろう。しかし、その焼却施設をどこに設置するのか、という問題もある。したがって、焼却に頼らない減容化技術も開発し、状況に応じて減容化技術を使い分けるのが得策であると考える。そこで、我々は焼却に依存しない植物バイオマス減容化法としてメタン発酵に着目した。その理由は、1）メタン発酵は下水余剰汚泥や農産廃棄物などのバイオマスの減量化技術としてすでに確立されており実用化が容易である、2）低温（30～60℃）で処理が可能なので焼却処理で不安視される放射性セシウムの気化の問題を回避できる、3）処理産物は腐敗に対し耐性となり長期貯蔵に適することが挙げられる。一方、メタン発酵は確立された技術であるが、そのまま放射能汚染植物バイオマスの減容化に適用することはできない。なぜなら、これまで放射能汚染したバイオマスをメタン発酵した実績はなく、その処理により放射性物質がどの画分（ガス、固形、液状のそれぞれの画分）にどれだけ移行するかについてのデータはまったくない。そこで本研究では、主に湿式ミリング前処理、メタン発酵（乾式メタン発酵および UASB）、光合成細菌を用いた放射性物質回収から構成される放射性物質汚染バイオマスの総合処理システムを開発し、どの程度までの減容化およびメタン生成が可能かを評価するとともに、それぞれの過程での放射性物質の動態について調査した。本発表では、福島県西白河郡西郷村で実施した現地実証実験の成果について報告する。

radiation-contaminated biomass, volume reduction, anaerobic digestion

発表責任者：加藤純一（jun@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：2SY08-1
講演日時、会場：3 月 28 日 15:30～ D 会場

植物における JA-Ile 以外の JA が司る生物現象
Plant Biological response controled by JA derivatives other than JA-Ile
○松浦 英幸（北大院農）
○Hideyuki Matsuura (Hokkaido Univ.)

植物がその生活環を制御する上で、植物ホルモンと呼称される生理活性物質は不可欠な存在である。そのうちの一つとしてジャスモン酸(JA)があげられる。JA に関してはその生理活性、生合成、作用機序、不活性化機構に関して、多くの研究者が鋭意研究に携わり、かなりの部分が明らかとなっている。この過程で、傷害応答時には JA とイソロイシンが縮合した JA-Ile が主要な因子であることが明らかとなっており、傷害葉から非傷害葉への移動も明らかとされている。しかしながら、JA が活躍する他の生物現象は多々あり、本講演ではその具体例ついて紹介したい。

【バレイショの塊茎誘導】　主要作物の一つであるバレイショ(*Solanum tuberosum*)の塊茎誘導は日長の影響を強く受ける。長日高夜温条件下では、茎の基部に近い部分からストロンと呼称される地下茎が水平方向へ伸長するが，地上部が短日低夜温条件に晒されるとストロンの伸長は停止し，先端が肥大して塊茎が形成される。バレイショ茎断片組織培養法を用いた *in vitro* 実験では、多くの JA 類が塊茎形成誘導活性を持つことが明らかとなった。そこで実際の植物内で作用する化合物を検討した所、短日条件に呼応した地上部から地下部への移動、ストロン部での活性型ジベレリンの不活性化酵素をコードする遺伝子の転写産物の蓄積誘導を加味して、JA の 12 位が酸化された 12OHJA が実際の植物で作用する化合物と確認した。

【非傷害葉での後期傷害応答】　植物が毛虫などの虫害を受けた場合、傷害を受けた部位より緊急を知らせるシグナルが非傷害部位へ発せられ更なる攻撃に備える。その特徴として、傷害直後の初期傷害応答と 1 時間以降のこれに続く後期傷害応答の 2 段構えであることが知られている。非傷害葉での初期応答では上述の JA-Ile が Key Player であることは明らかであるが、後期応答を誘導する移動性の活性因子は未解明である。これに対し、JA 生合成不全のトマトを用いた接木実験（穂木：野生株/台木：JA 生合成不全株）で、後期傷害応答誘導においても JA 類が候補化合物であることが明らかとでき、後期応答時の非傷害葉において JA-Ile のさらなる蓄積は観察されないことも明らかとした。これを受けて後期応答時に茎を切断し、断面からの浸出液を解析した所、12OHJA が後期の応答誘導に呼応して蓄積量の上昇が観察できた。12OHJA が第一の候補化合物と絞り込めたので、生物学的に許容な量の 12OHJA を上記の接木の台木に投与した所、穂木で JA 応答性の傷害応答を誘導できた。以上のことから、後期傷害応答を誘導する化合物は 12OHJA であると結論した。

Potato tuber, Plant wound response, jasmonic acid

発表責任者：松浦　英幸（matsuura@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：2SY08-2
講演日時、会場：3 月 28 日 16:00～ D 会場

# 植物組織破砕によるオキシリピン類の一過的生成制御はリポキシゲナーゼの活性化が担う

# Lipoxygenase takes the regulatory role in oxylipin burst accelerated with wounding plant tissues

○松井 健二、肥塚 崇男、望月 智史（山口大農）
○Kenji Matsui, Takao Koeduka, Satoshi Mochizuki (Yamaguchi Univ.)

植物の葉を揉み潰すと独特の青臭みが生じる。これはみどりの香りと呼ばれる炭素数６の揮発性化合物群による匂いで、植物組織が破砕されるのが引き金となって膜脂質から酸化過程を経て合成されるオキシリピンの１種である。植物は食害や風雨により組織損傷を受けると損傷部位を防御、あるいは治癒するために様々な代謝を亢進させる。みどりの香り生成も傷害応答を担っているようで、傷口からの病原菌の侵入を阻止することに寄与していると考えられている。

無傷組織のみどりの香り量は低く抑えられているが、傷つけると数秒以内に代謝経路が活性化され、みどりの香りバーストが引き起こされる。このとき主にガラクト糖脂質量が減少する。このガラクト糖脂質の減少は、ガラクト糖脂質からリパーゼによる加水分解によるもので、この反応で生じたリノレン酸にリポキシゲナーゼが作用し、過酸化脂肪酸ができ、オキシリピン類生成に至るため、と考えられてきた。しかし、これまでにオキシリピン類生成に寄与することが立証されたガラクトリパーゼは数例しかない。一方、我々はガラクト糖脂質からの脂肪酸遊離なしにみどりの香りが生成される経路を見いだした。この新規経路ではガラクト糖脂質が直接リポキシゲナーゼにより酸化されており、生成されたガラクト脂質ヒドロペルオキシドが開裂反応を受けてみどりの香りを生成する。シロイヌナズナでみどりの香り生成に寄与しているリポキシゲナーゼは葉緑体ストロマに局在しており、またガラクト糖脂質はチラコイド膜に多い。つまり、酵素と基質は近接しており、何らかの反応抑制機構がないと反応が進んでしまう状況にある。この結果から、みどりの香り生成のオン・オフはリポキシゲナーゼの活性調節に依存していることが示唆された。破砕植物組織ではジャスモン酸類も一過的に生成される。ジャスモン酸類生合成経路とみどりの香り生合成経路は少なくともリポキシゲナーゼのステップまでは共有しており、お互いに競合する代謝経路となっている。ところが、ジャスモン酸類生成はみどりの香り生成と異なる制御を受けていた。

まだ全容は明らかになっていないが、みどりの香りやジャスモン酸などの組織破砕が引き金となるオキシリピン類バーストのリポキシゲナーゼによる制御機構に関する私たちの最近の検討結果を紹介したい。

【参考文献】

Mwenda & Matsui (2015) The importance of lipoxygenase control in the production of green leaf volatiles by lipase-dependent and independent pathways. *Plant Biotechnol*., 31, 445-452.
Mwenda, et al. (2015) Spatial expression of the Arabidopsis hydroperoxide lyase gene is controlled differently from that of the allene oxide synthase gene. *J. Plant Interact*., 10, 1-10.
Nakashima, et al. (2013) Traumatin- and dinortraumatin-containing galactolipids in Arabidopsis: Their formation in tissue-disrupted leaves as counterparts of green leaf volatiles. *J. Biol. Chem.* 288, 26078-26088.

green leaf volatiles, lipoxygenases, oxylipins

発表責任者：松井健二（matsui@yamaguchi-u.ac.jp）

講演番号：2SY08-3
講演日時、会場：3 月 28 日 16:30～ D 会場

# ジャスモン酸の新規生理活性　－COI1 を介さないオーキシンとのクロストーク－
# A novel bioactivity of jasmonic acid -crosstalk with auxin independent of COI1-

○石丸 泰寛[1]、鈴木 健史[1]、Meesters Christian[2]、Kombrink Erich[2]、知念 拓実[3]、臼井 健郎[3]、高橋 公咲[4]、松浦 英幸[4]、柿本 辰男[5]、深城 英弘[6]、林 謙一郎[7]、上田 実[1]（[1]東北大院理、[2]Max Planck Institute for Plant Breeding Research、[3]筑波大院生命環境、[4]北大院農、[5]大阪大院理、[6]神戸大院理、[7]岡山理大理）
○Yasuhiro Ishimaru[1], Takeshi Suzuki[1], Christian Meesters[2], Erich Kombrink[2], Takumi Chinen[3], Takeo Usui[3], Kosaku Takahashi[4], Hideyuki Mastuura[4], Tatsuo Kakimoto[5], Hidehiro Fukaki[6], Ken-ichiro Hayashi[7], Minoru Ueda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Max Planck Institute for Plant Breeding Research, [3]Tsukuba Univ., [4]Hokkaido Univ., [5]Osaka Univ., [6]Kobe Univ., [7]Okayama Univ. of Sci.)

ジャスモン酸（JA）類は，病傷害などの環境ストレスへの応答や果実や花粉の成熟など植物の生長を制御する植物ホルモンである．これらの生理活性のほとんどは，JASMONATE RESISTANT1 (JAR1)によって生合成された JA イソロイシン（JA-Ile）が CORONATINE INSENTIVE1（COI1）に受容され，その下流のシグナル伝達によって引き起こされる．一方で，その前駆体である JA 自身の生理活性は明らかではない．今回，我々は JA 自身に COI1 シグナルを介さない固有の生理活性があることを見出し，そのメカニズムを明らかにした．

我々は，シロイヌナズナに高濃度の天然型 JA（(-)-JA）を投与したところ側根形成が阻害されることを見出した．また，*coi1* 欠損株においても高濃度(-)-JA 処理時により側根形成阻害が観察されたことから，COI1 経路非依存の生理活性であることが示された．一方で，低濃度の(-)-JA 処理時には，これまでの報告にあるように COI1 経路を介した側根形成促進が観察された．JA-Ile，12-ヒドロキシル JA，JA トリプトファン処理時には側根形成阻害が誘導されないこと，*jar1* 欠損株でも高濃度(-)-JA 処理によって側根形成阻害が誘導されることから，この側根形成阻害は(-)-JA 自身の生理活性であることが示唆された．また，インドール-3-酢酸（IAA）との共添加によって，高濃度(-)-JA 処理によって誘導される側根形成阻害活性が失われたことから，この側根形成阻害はオーキシンシグナリングに関与していると考えられた．側根形成を正に制御するオーキシン誘導性の遺伝子 *LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 29*（*LBD29*）や *PUCHI* の発現様式を詳細に調べたところ，mock 処理時に内鞘で観察されるこれらの発現が，高濃度(-)-JA 処理時には抑制された．興味深いことに，一般的なオーキシン誘導性のレポーターラインである $P_{DR5}$-*GUS* における IAA 処理時に誘導される GUS の発現も，高濃度(-)-JA 処理によって抑制されたことから，側根形成阻害以外のオーキシン応答の抑制にも関わっていることが示唆された．また，高濃度(-)-JA 処理時の *DR5* の発現抑制の様式が，オーキシンシグナル阻害剤処理時のものと類似していたことから，(-)-JA がオーキシンシグナルに関わっているかどうかを調べるために DII-VENUS レポーターラインを用いて解析した．mock 条件では VENUS の蛍光は観察されなかったのに対し，高濃度(-)-JA 処理により VENUS の蛍光が蓄積したことから，高濃度(-)-JA 処理によって Aux_IAA の分解が阻害されていると考えられた．

近年，低濃度(-)-JA 処理によって COI1 経路を介してオーキシン応答が活性化される JA 類とオーキシンのクロストークが注目されている．一方で，我々は，高濃度(-)-JA 処理によって COI1 介さない経路で Aux_IAA の分解が阻害されオーキシン応答が抑制されるという現象を見出した．JA 濃度の違いに応じて，全く別の経路でオーキシン応答を調節するというユニークな制御機構の発見は，植物体内で行われる JA 類とオーキシンの複雑なクロストークを紐解く上で重要な手がかりになるであろう．

jasmonic acid, auxin, inhibitor

発表責任者：上田実（ueda@m.tohoku.ac.jp）

講演番号：2SY08-4
講演日時、会場：3 月 28 日 17:00～ D 会場

# イネのアレロケミカル生産におけるジャスモン酸応答性転写因子の働き

# Jasmonic acid inducible transcriptional regulators involved in productions of allelochemicals in rice

○岡田 憲典[1]、宮本 皓司[2]、光田 展隆[3]、森 昌樹[4]、山根 久和[2] ([1]東大生セ、[2]帝京大バイオ、[3]産総研生物プロセス、[4]生物研遺伝子組換センター)
○ KAZUNORI OKADA[1], KOJI MIYAMOTO[2], NOBUTAKA MITSUDA[3], MASAKI MORI[4], HISAKAZU YAMANE[2] ([1]The Univ. of Tokyo., [2]Teikyo Univ., [3]AIST, [4]NIAS)

ジャスモン酸は病虫害、傷害などの環境ストレス応答におけるシグナル物質として機能するだけでなく、花粉の成熟、塊茎形成、蔓の巻き付きなど、植物の生長を様々なステージにおいて制御する重要な植物ホルモンである。ジャスモン酸を介したシグナル伝達経路については、活性型ホルモンのジャスモノイルイソロイシン（JA-Ile）の受容体として F-box タンパク質の COI1 が同定され、さらに JA-Ile 依存的な COI1 による JAZ リプレッサータンパク質の分解によって下流遺伝子発現のスイッチングがおこることが幅広い植物種で証明されている。一方、ジャスモン酸シグナルにより駆動される様々な植物の生理応答においては、マスターレギュレーターである bHLH 型転写因子 MYC2 を中心とした転写制御のモデルが良く知られているが、個々の遺伝子発現における発現制御の詳細についてはあまり良くわかっていない。我々はイネの病虫害抵抗性におけるジャスモン酸の寄与を追究する過程で、様々な新規転写制御因子を取得し、それらの機能同定を進めてきた。これまでに、いもち病菌抵抗性に関わる抗菌性低分子化合物ファイトアレキシンの生産に関わる bZIP および bHLH 型転写因子や昆虫とのコミュニケーションに寄与すると考えられる揮発性テルペンの生産に関与する bHLH 型転写因子などの機能を明らかにした。生物学的ストレスに対するイネの抵抗性発現のなかでも、上述のアレロケミカルと称される種々の化学物質の生産は、外生的に与えたジャスモン酸によっても誘導が認められる。これらの生産に関与する転写因子もまたジャスモン酸応答性を示すことから、アレロケミカルの生産にはジャスモン酸シグナルの下流で働くこれらの転写因子の機能が重要な役割を果たしていることが覗える。本発表では、これまでに明らかになったイネのジャスモン酸シグナル伝達経路で働く種々の新規転写因子の機能を紹介すると共に、これらの転写因子の発現誘導機構についても最新のデータを交えて議論する。

Jasmonic acid, transcription factor, allelochemical

発表責任者：岡田憲典（ukokada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY08-5
講演日時、会場：3 月 28 日 17:30～ D 会場

# ピレスリン生合成から導かれるオキシリピン経路の理解

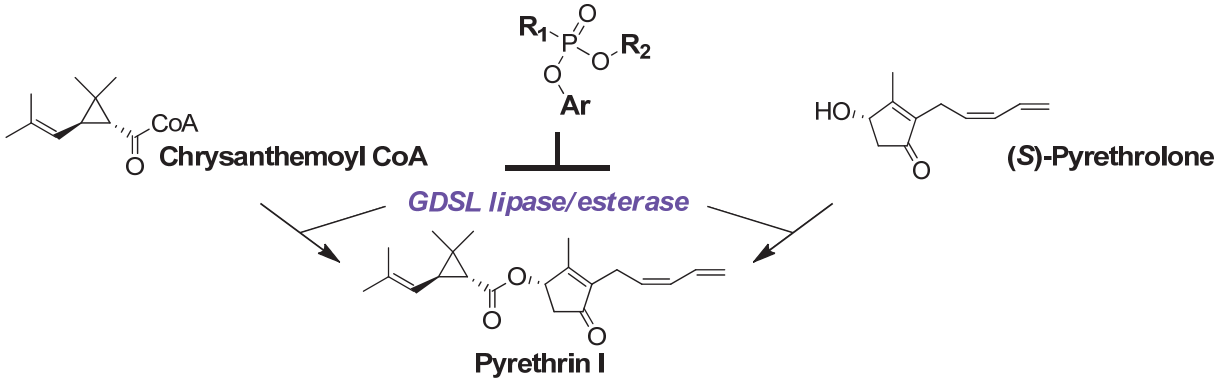
# Understanding of the oxylipin pathway from pyrethrin biosynthesis

○松田 一彦（近大農・応生化）
○Kazuhiko Matsuda (Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University)

ピレスリンは除虫菊が植食者に対する防除物質として生合成する神経作用性の天然殺虫剤である。ピレスリンは、シクロプロパン環をもつ 2 種の酸部（第一および第二菊酸）とシクロペンテノン構造をもつ 3 種のアルコール部（ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロロン）とがエステル結合により連結されることで生合成される。演者らはこれまでに、酸部は非メバロン酸経路によりつくられるのに対して、アルコール部はオキシリピン経路によりつくられることが明らかにした。さらに演者らは、その生合成の最終ステップが GDSL リパーゼ/エステラーゼ（TcGLIP）のアシル基転移反応によって触媒されることを初めて明らかにした。これらの成果をふまえて、さらに以下の研究を行った。

ピレスリン生合成における TcGLIP の役割を理解する方法として、遺伝学的手法と化学的手法があるが、前者は方法論が未開発である。そこで、下図のような有機リン酸エステル構造をもつ阻害剤を合成し、それらの TcGLIP 阻害活性を評価した。その結果、TcGLIP を数 μM あるいはそれ以下の濃度で阻害する化合物を得た。本阻害剤は、*in vivo* でのピレスリン生合成の抑制のみならず、TcGLIP の触媒機構および基質認識機構の解明にも利用可能である。

こうした阻害剤を作出する一方で、部位、形態変化、揮発性物質の処理の有無に応じた除虫菊での遺伝子の発現変動を RNA-seq により解析した。その一例として、除虫菊の分化状態の変化に伴い酸部とアルコール部の生合成遺伝子の発現が対照的に変動することを見出した。ピレスリンのアルコール部の生合成経路は、植物ホルモンの一種ジャスモン酸（JA）のそれに類似するが、未同定の生合成遺伝子が多く、謎に包まれている。本講演では、その解明に向けた取り組みについても言及する。




Oxylipin pathway, Pyrethrin, Biosynthesis

発表責任者：松田一彦（kmatsuda@nara.kindai.ac.jp）

講演番号：2SY09-1
講演日時、会場：3 月 28 日 15:30～ E 会場

# 創薬等支援基盤技術プラットフォームにおけるバイオインフォマティクスの支援と高度化

# Bioinformatics activities in the Platform for Drug Discovery, Informatics, and Structural Life Science

○清水 謙多郎、永田 宏次（東大農）
○Kentaro Shimizu, Kouji Nagata (The University of Tokyo)

創薬等支援技術基盤プラットフォーム（PDIS）は、平成 23 年に発足し、今年で 5 年目を迎える。PDIS は、解析拠点、制御拠点、情報拠点の 3 つの拠点から構成され。そのうち、解析拠点のバイオインフォマティクス領域と情報拠点で、バイオインフォマティクスの支援と高度化が行われている。本講演では、バイオインフォマティクスに関わる PDIS の活動の現状について紹介する。

bioinformatics, drug design, structural life science

発表責任者：清水謙多郎（shimizu@bi.a.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY09-2
講演日時、会場：3 月 28 日 15:40～ E 会場

# 配列から機能まで、統合解析のための VapRoS

VapRos: System for Data Analysis from Genome to Phenomenon

○池尾 一穂（国立遺伝学研究所）
○KAZUHO IKEO (National Institute of Genetics)

次世代型シークエンサーの出現により、ゲノム研究はゲノム他旺盛の研究の時代に入った。集団内の多様性にとどまらず、時には個体内の多様性まで対象となっている。ゲノム多様性は、自然が行ってきた変異実験とも言え、このような情報を有効に利用することで、研究がより促進されることが期待できる。同時に、ゲノム配列データ以外の関連データも大規模化が進んでいる。その結果、様々な生物種にわたってゲノムから遺伝子発現、タンパク質、表現型までの多様なデータがネットワークを通じて利用可能な時代になった。しかし、このような多様な情報を、ネットワーク上から収集い一元的に扱うためには、そのための知識と技術、また相応の時間も必要とする。また、この様なアプローチにおいて重要になってくるのは研究者の経験と知識に基づく、情報の再構築で、全体像の俯瞰である。我々は、創薬等支援事業において、大規模かつ多様な情報から真に必要とする知識を抽出する研究者の作業を支援するための仕組みとして VapRoS を開発提供している。今回は、VapRoS 開発における狙いと、システムのオーヴァービューを紹介する。

Data analysis, Bioinformatics

発表責任者：池尾一穂（kikeo@nig.ac.jp）

講演番号：2SY09-3
講演日時、会場：3 月 28 日 16:00～ E 会場

# 構造生命科学データクラウド VaProS による生命科学ビックデータへの挑戦

# VaPros -Structural Life Science Data Cloud- for Life Science Big Data

○由良 敬[1,2] ([1]お茶大・院人間文化、[2]遺伝研)
○Kei Yura[1,2] ([1]Ochanomizu Univ., [2]NIG)

生命科学研究における測定技術の進展により、大量の生命科学データが産出されるようになった。遺伝情報（ゲノム塩基配列）は多くの生物種で明らかにされ、ゲノムにコードされている遺伝子がいつ発現し、どのような相互作用を構築しているかも次々に明らかにされてきている。これらの遺伝子がコードするタンパク質の立体構造も、実験科学と計算科学の双方の発展により、半分以上が明らかになった。これらのデータは、現在では一研究者の記憶に収まる量ではなくなってしまい、データを活用して新規の関係や仮説を生み出すことが困難になってきたといえる。つまり、生命科学研究の分野において、これらの「ビッグデータ」をどのように利用すれば、価値ある情報を抽出することができるかが問題となってきた。そこで創薬等支援技術基盤プラットフォーム情報拠点では、「構造生命科学データクラウド：VaProS」を構築し、構造生命科学に関するビッグデータから、研究者が新たな知見（仮説）を見いだすことを支援するプラットフォームを開発してきた（http://pford.info/vapros/)。これは、国立遺伝学研究所に集積されたデータベース群、および分担機関が独自に構築しているデータベースとウェブツール、さらには他機関で公開されているデータベースやウェブツールを、情報技術を駆使して一つの大きなかたまり（クラウド）として扱えるプラットフォームである VaProS のユーザーは、データベースやウエッブツールによって異なるユーザーインタフェースに煩わされることなく、クラウドにおける一貫した操作によって、求めるデータや意外なデータを手に入れることができる。VaProS を用いると、たとえば、タンパク質コード領域に見つかる変異がタンパク質にどのような変異をもたらし、その変異が機能にどのような影響をもたらすかを検討することができる。ここでは、VaProS の利用実績の中から、ゲノムからわかる変異とタンパク質の立体構造との関係からわかること、および、生命科学実験を構築するための仮説構築ツールとしての利用を紹介しながら、農芸化学とバイオインフォマティクスとの接点を探る。

structural bioinformatics, genome bioinformatics, big data

講演番号：2SY09-4
講演日時、会場：3 月 28 日 16:20～ E 会場

# 天然リガンドデータベースの開発とタンパク質低分子相互作用解析への応用

# Development of Natural Ligand Database and its application to the analyses of protein-ligand interactions

○木下 賢吾 [1,2,3] ([1] 東北大院情報、[2] 東北大加齢研、[3] 東北大メディカルメガバンク)
○Kengo Kinoshita[1,2,3] ([1]Tohoku Univ, [2]IDAC, [3]ToMMo)

多くの生物でゲノム解析やタンパク質立体構造解析が進んだが、未だ機能が解明されていない遺伝子は多い。生物の分子レベルでの理解のためには、これら機能未知遺伝子の機能を明らかにする必要がある。実験的に全ての機能をチェックするのは困難であり、計算科学的な手法により可能性を絞ることが有用なアプローチとなることも多いが、これまで開発された方法やデータベースは、実験系研究者がこれらの手法を駆使するにはまだハードルが高い点がいくつもある。例えば、ある特定の低分子を認識するタンパク質の立体構造を網羅的にリストアップして、共通の特徴を抽出するだけでも、パスウェイデータベース、タンパク質の立体構造データベースを併用しないといけない。また、これらを併用する段階で、低分子の名前の不一致や、アナログ低分子での構造解析データしか利用できない場合には、低分子の類似性検索を利用する必要が出てくるなどの問題が発生する。その結果として、タンパク 3000 やターゲットタンパク質で蓄積されたタンパク質立体構造情報は十分に活用されているとは言いがたい状況となっている。これに対して我々は、創薬等基盤プラットフォーム事業として、立体構造情報の活用促進のために、様々なデータベースをインタフェースの違いを意識しないで活用を行うための基盤として VaProS の開発を行ってきた。VaProS はその要素データベースとして、様々なデータベースを内包するが、その一つとして、天然の基質とタンパク質の相互作用をまとめた天然リガンドデータベースの紹介を行う。

PDB 中には多くのタンパク質と低分子の複合体構造の情報が登録されているが、多くの場合は反応が起こらないように、基質のアナログ分子を利用して構造解析がなされている。一方で、代謝パスウェイデータベースである KEGG を利用することで、各タンパク質天然状体で認識することが分かっている低分子の情報は取得することができる。そこで、これら２つの情報を利用しつつ、我々がこれまで開発を行ってきた低分子複合体予測法を利用して、天然のリガンドを結合した状態のタンパク質複合体構造のモデルを構築する。モデルはあくまでもモデルであり、天然リガンドとの複合体構造をデータベース化することにより、特定低分子を認識するタンパク質とそのおおよその結合部位を網羅的に観察することができる基盤を提供する。天然リガンドデータベースでは、ヒト限られるが、個人毎の違いを生むゲノムの違い（多型）による変異の影響を立体構造の観点から考察できるように既知の変異の可視化も行った。

本講演では、天然リガンドデータベースの紹介を応用例を含めて紹介したい。

PDIS, Protein Structure, Bioinformatics

発表責任者：木下賢吾（kengo@ecei.tohoku.ac.jp）

講演番号：2SY09-5
講演日時、会場：3 月 28 日 16:40～ E 会場

# 分子モデリングを活用した創薬支援研究

# In silico drug discovery and design using molecular modeling techniques

○広川 貴次（産総研・創薬プロ研）
○Takatsugu Hirokawa (molprof, AIST)

近年の計算機性能の向上とタンパク質立体構造解析技術の発展が相俟って、タンパク質立体構造に基づく創薬支援研究が本格的に促進されている。しかし、タンパク質立体構造データの中には、特定の条件や環境に依存した構造情報により、そのままのデータでは創薬へ適用が難しいものある。分子モデリングや分子シミュレーションは、このような問題を補完できる要素技術であり、構造生物データと融合させることで、より高度な創薬支援研究が実現可能となる。本年会では、創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業を通じて実施した、タンパク質立体構造データと分子モデリングの融合による支援研究および高度化研究の事例を発表する。

創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業の支援研究において、我々の研究グループは、ホモロジーモデリング、分子動力学シミュレーション、ドッキング計算（化合物-タンパク質、タンパク質-タンパク質）、ポストドッキング処理などの幅広い要素技術を供する体制を構築しており、支援申請者の研究内容に応じて、必要な要素技術を選定し、ソリューションのためのプロトコールを構築後、支援研究で活用している。例えば、天然化合物に代表されるような生物活性リガンドは、一般的な合成医薬品と異なる構造特徴を有しており、一般に普及しているインシリコ解析ソフトのみを利用しても対応できないことが多く、より多角的で高度な解析が必要とされている。このようなケースでは、我々は、ドッキング計算のスコアやランキングではなく、分子動力学シミュレーションによって、多様な天然化合物の結合モードを評価することで、特定の結合モードが存在することを予想し、その後、NMR でそのモデルを実証することに成功している（Chemical Science 5, 1860-1868 (2014)）。

発表では、「どのような問題の時に、どの要素技術を組み合わせて処方するのか」、我々の支援研究の経験を広く参加者と共有することを目的としたい。また可能な限り、高度化研究に対する取り組みも紹介したい。

in silico drug discovery, molecular modeling, molecular simulation

発表責任者：広川貴次（t-hirokawa@aist.go.jp）

講演番号：2SY09-6
講演日時、会場：3 月 28 日 17:00～ E 会場

# 分子シミュレーションで探るタンパク質－リガンド間相互作用

# Protein-ligand interactions studied by molecular simulations

○寺田 透、森脇 由隆、根上 樹、吉野 龍ノ介、清水 謙多郎（東大農）
○Tohru Terada, Yoshitaka Moriwaki, Tatsuki Negami, Ryunosuke Yoshino, Kentaro Shimizu (Univ. Tokyo)

タンパク質は他のタンパク質や低分子化合物（リガンド）等と相互作用することで、その機能を発揮する。タンパク質の機能を理解し、さらに薬剤等を用いて制御するためには、相互作用メカニズムの理解が欠かせない。これらの分子の間の相互作用をコンピュータの中に再現する分子シミュレーションは、原子レベルで相互作用の解析を可能にする強力な手法である。例えば、ドッキングシミュレーションを用いると、タンパク質とリガンドとの複合体の立体構造を予測することができる。逆に、リガンド結合構造からリガンドを取り去り、長時間の分子動力学シミュレーションを行うことで、リガンド非結合構造を予測し、さらにリガンド結合に伴う立体構造変化を予測することができる。長時間の分子動力学シミュレーションは、ホモロジーモデルを精密化する際にも有用である。また、活性中心に対して量子化学計算を行うことで、タンパク質が触媒する化学反応のメカニズムと、活性中心周辺に存在するアミノ酸残基の役割を明らかにすることができる。分子動力学シミュレーションに基づく自由エネルギー摂動法や、Molecular Mechanics/Poisson-Boltzmann Surface Area (MM/PB-SA)法を用いると、リガンドの結合自由エネルギーを求めたり、タンパク質－リガンド原子ペアごとに、原子間相互作用の結合自由エネルギーへの寄与を求めたりすることができる。本講演では、最近の応用事例の中から、黄色ブドウ球菌のヘム輸送タンパク質（Iron-regulated surface determinant; Isd）群に含まれるヘム結合ドメイン（near transporter domain; NEAT domain）について、ヘムに対する親和性に違いが生じるメカニズムを明らかにした研究を紹介する。ここでは、立体構造は類似しているがヘムに対する親和性が異なる 3 つのドメイン、IsdH-NEAT3、IsdA-NEAT、IsdC-NEAT について、MM/PB-SA 法を用いて、ヘムの各ドメインへの結合自由エネルギーを計算した。この結果、実験的に示されている親和性の順、IsdH-NEAT3 < IsdA-NEAT < IsdC-NEAT が、分子シミュレーションにおいても再現されることが示された。次いで、各残基の結合自由エネルギーへの寄与に基づいて、親和性の違いを生み出している残基を明らかにした。IsdH-NEAT3 と IsdA-NEAT の間でこれらの残基を入れ替えた変異体を作成し、ヘムに対する親和性を測定したところ、予想通り、親和性が逆転することが示された。また、IsdC-NEAT において、親和性の違いを生み出していると予想された残基に変異を導入したところ、実際に親和性が大きく低下することが示された。このように、分子シミュレーションの結果の信頼性は、近年のコンピュータの性能向上や、分子力場の精度向上、計算手法の発展に伴い、大きく向上している。今後も、分子シミュレーションの生命科学の発展への更なる貢献が期待される。

protein-ligand interaction, molecular dynamics, free energy

発表責任者：寺田　透（tterada@iu.a.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：2SY09-7
講演日時、会場：3 月 28 日 17:20～ E 会場

# 分子動力学計算と X 線小角散乱の連携によるタンパク質の動的構造解析

# Protein dynamics analysis using molecular dynamics simulations and small-angle x-ray scattering

○池口 満徳 (横浜市大生命医)
○Mitsunori Ikeguchi (Yokohama City Univ.)

タンパク質の立体構造を知ることは、そのタンパク質の機能発現機構を理解することに繋がるのみならず、創薬などの応用面でも重要である。X 線結晶解析では、原子レベルの高精度な立体構造情報を得ることができるが、結晶状態の構造であるため溶液中の構造と異なることがありうる。そのような溶液中の構造を測定可能な方法が X 線溶液散乱である。特に、構造全体の情報を与える小角領域の散乱が、X 線小角散乱（SAXS）と呼ばれる。しかしながら、溶液中の散乱では、タンパク質の向きや構造ゆらぎによって平均されてしまうため、低解像度にとどまってしまうという問題点がある。

一方、分子動力学（MD）シミュレーションは、溶液中でタンパク質等の動きを運動方程式に基づいて計算する理論的方法である。近年の計算機能力の進歩に伴い、MD シミュレーションは急速に適用範囲を広げてきた。近年では、多くの生物学的にも重要なタンパク質に次々と適用されて成果をあげている。しかし、一方で、近年、発展してきたとはいえ、未だ、計算機の計算能力の問題から、扱える時間スケールに限りがあり、その動的構造の妥当性について実験的に検証されることが望ましい。

以上のように、SAXS では溶液構造情報を与えることができるが、低解像度であるという問題点があり、MD では動的情報を与えることができるが，実験による検証があると望ましい。そこで、MD と SAXS を相補的に用いることで、お互いの課題を解決できるのではないかと思われる。つまり，MD-SAXS 法では、まず対象に対し、MD シミュレーションを行い、MD で得られた構造群に対して理論 SAXS プロファイルを計算し、それを実験 SAXS プロファイルと比較することで，実験的に整合性のある構造を検討する。

MD 計算では、近年，原子レベルのシミュレーションのみならず、より大きな構造を扱うことのできる粗視化 MD シミュレーション技術も進展してきた。我々は、そのような粗視化 MD を用いた MD-SAXS 法も開発しつつあるので、その進展も報告する。

protein dynamics, molecular dynamics simulation, SAXS

発表責任者：池口 満徳（ike@tsurumi.yokohama-cu.ac.jp）

講演番号：2SY09-8
講演日時、会場：3 月 28 日 17:40～ E 会場

# G タンパク質共役受容体とペプチドリガンドの *in vitro/in silico* 相互作用解析

*in vitro/in silico* interaction analysis of a G protein-coupled receptor and its peptide ligand

○永田 宏次（東大院農生科）
○Koji NAGATA (UTokyo)

【背景・目的】　本発表では、G タンパク質共役受容体とペプチドリガンドの *in vitro/in silico* 相互作用解析の一例を紹介する。多くの蛾類昆虫において性フェロモンの生合成は、フェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）によって制御されている。PBAN は 33 アミノ酸残基のペプチドであり、その活性部位として C 末端の FXPRLamide モチーフが特定されている。また、PBAN 受容体（PBANR）は、G タンパク共役型受容体（GPCR）クラス A に属する。本研究では害虫防除の観点から、PBAN との相互作用に重要な PBANR のアミノ酸残基を変異体解析により特定し、PBAN アンタゴニストの設計に有用な知見を得ることを目的として、PBANR のホモロジーモデリングと PBAN－PBANR のドッキングシミュレーションを行った。
【方法】　PBAN の活性発現に重要な C 末端部のアミノ酸残基および PBANR の立体構造モデルから PBAN 認識に関与する可能性のあるアミノ酸残基を 1 個ずつアラニン残基に置換し C 末端側に緑色蛍光タンパク（EGFP）を付加した PBANR-EGFP 変異体を Sf9 昆虫培養細胞に発現させ、カイコガ PBAN の C 末端 10 残基ペプチド（C10PBAN(R2K); SKTRYFSPRLamide）に対する応答性をカルシウム指示薬 Fura Red-AM と共焦点レーザ走査型顕微鏡を用いるカルシウムイメージング法により評価した。さらに、PBANR-EGFP 変異体と Rhodamine Red で蛍光標識した C10PBAN(R2K)（RR-C10PBAN(R2K)）との結合を共焦点レーザ走査型顕微鏡にて観察した。また、PBANR のホモロジーモデリングおよび PBAN とのドッキングシミュレーションから変異導入した各アミノ酸残基の役割を考察した。
【結果】　27 種類の PBANR-EGFP 変異体のカルシウムイメージングによる解析の結果、17 種類の変異体で野生型 PBANR-EGFP と比較し C10PBAN(R2K)に対する応答性の低下が観察され、それらは膜貫通ヘリックス II, III, V, VI, VII 上に位置していた。これらリガンド応答性が低下した PBANR-EGFP 変異体は RR-C10PBAN(R2K)との結合力も低下していた。また、すでに X 線結晶構造が解かれている A2a アデノシン受容体（A2aAR）や β2 アドレナリン受容体（β2AR）とのアミノ酸配列や立体構造の比較から、今回特定した PBANR のリガンド認識残基は A2aAR や β2AR のリガンド認識残基にほぼ対応する位置に存在していた。AutoDock Vina によるドッキングシミュレーションから PBAN C 末端の活性部位は β ターンを形成した状態で A2aAR 等の低分子リガンド結合部位に相当する部位に結合しているドッキングモデルが得られた。このモデルは PBAN および PBANR の点変異体解析の結果をよく説明するものであった。文献　Kawai, Katayama *et al.* (2014). *J. Biol. Chem.* **289**, 19150-19163.

docking simulation, G protein-coupled receptor, pheromone biosynthesis-activating neuropeptide receptor

発表責任者：永田　宏次（aknagata@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY01-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:02～ B 会場

# イソプレノイドに関する最近の話題
# Recent Topics on Isoprenoids

○葛山 智久（東大・生物工学セ）
○Tomohisa Kuzuyama (BRC, Univ. Tokyo)

イソプレノイド（テルペノイド）は、isopentenyl diphosphate、およびその異性体である dimethylallyl diphosphate という 2 種類のイソプレンユニットを基本構成単位とする化合物の総称である。これまでに微生物や植物などから 50,000 以上の化合物が単離されており、その構造多様性に呼応するように様々な生物活性を示すことが報告されている。例えば、抗マラリア剤の artemisinin や、抗癌剤の paclitaxel はその代表例である。多様な構造のイソプレノイドは、基本単位となるイソプレン骨格の縮合や環化、転移、修飾によって生合成される。その生合成機構を明らかにすることで、汎用宿主を利用した効率的な物質生産や変異酵素を利用した新規類縁体の合成が可能になると期待される。また、特徴的な骨格を生合成する酵素には、独自の反応を触媒するものが多く存在するため、イソプレノイドの生合成経路の解明はイソプレノイドの構造多様性を生み出す分子機構を理解するうえで重要であり、生合成研究から得られた知見を利用して新たな生物活性物質を創製することが期待される。この発表では、イソプレノイドの生化学、合成生物学、有機化学に関する最近の話題について紹介する。

isoprenoid, biosynthesis, cyclase

講演番号：3SY01-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:13～ B 会場

# 龍涎香の主成分アンブレインの酵素合成

# Enzymatic synthesis of ambrein, a major constituent of ambergris

○佐藤 努（新潟大院自然）
○Tsutomu Sato (Niigata Univ.)

我々は、これまでほとんど研究されてこなかった $C_{35}$ の炭素数を有する、セスクアテルペン（我々が提案している分類名）の研究を行ってきている[1,2]。我々は、一連のセスクアテルペンの生合成酵素の同定・酵素機能解析研究の過程で、*Bacillus* 属細菌由来のテルペン環化酵素（TC）を用いると、$C_{35}$ の単環性の基質からは五環性セスクアテルペンが、$C_{30}$ のスクアレンからは二環性トリテルペンが得られることを明らかにした[3]。興味深いことに、TC は二環性トリテルペンのさらなる環化を触媒し、オノセロイド（スクアレンの両末端環化によって生合成されるトリテルペン）を与える。これにより、TC が $C_{35}$ と $C_{30}$ の基質から異なるモードの環化反応を触媒する、二機能性酵素であることを初めて示した[4－6]。

アンブレインは龍涎香（りゅうぜんこう）と呼ばれるマッコウクジラの結石の主成分である。龍涎香は、古くから高級香料として世界各地で利用されていたが、商業捕鯨が禁止されてからは入手困難な「幻の香り」となっている。アンブレイン自身に香りはなく、酸化分解されて生成する 31 種類以上の香気成分が混ざり合うことで、特有の香気を示す。代用品として分解物の一つアンブロックスが販売されているが、香りは龍涎香本来のものとはほど遠く、アンブレインそのものの供給が待たれている。しかし、その化学合成は高コストで収率（1.3～3.8%）も低く、少なくとも数十億円の市場があると見込まれているにもかかわらず、産業化には至っていない。また、龍涎香は、漢方薬としての生理活性やリラックス効果・催淫効果との関連も示唆されている。しかし、天然から得ることに限界があるため、研究が進んでいない。アンブレインを供給することができれば、アンブレインの生物機能を探る研究にも貢献できるようになると考えられる。

我々は、ごく最近、アンブレインと TC 生成物の構造の類似性に着目し、酵素を用いたアンブレインの合成を試みた。その結果、我々が以前報告した変異型スクアレン-ホペン環化酵素[7] と TC の２つを用いて、安価なスクアレンから短段階で合成を可能にすることに成功した[4－6,8]。現在、効率的合成法の確立を目指した研究を進行中である。本シンポジウムでは、最新の成果も含めて紹介する。

【文献】1) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 9734. 2) T. Sato, *BBB*, 2013, 77, 1155. 3) T. Sato, T. *et al.*, *JACS*, 2011, 133, 17540. 4) D. Ueda, T. *et al.*, *JACS*, 2013, 135, 18335. 5) 上田ら、*バイオサイエンスとインダストリー*, 2014, 72, 410. 6) 上田ら、*Aroma Research*, 2015, 16, 142. 7) T. Sato and T. Hoshino, *BBB*, 1999, 63, 2189. 8) 佐藤ら、特許出願 2013-18414.

perfume, terpene cyclase, triterpene

発表責任者：佐藤努（satot@agr.niigata-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:35～ B 会場

# 組換え酵母による植物由来トリテルペン配糖体生産に向けた研究
# Production of plant-derived triterpenoid saponins in engineered yeast

○關 光（阪大院工）
○Hikaru SEKI (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

植物は多様なトリテルペン配糖体（サポニン）を生産する。代表的なものとしては、マメ科の薬用植物カンゾウ（甘草）が生産するグリチルリチンや薬用ニンジンが生産するジンセノサイドなど、生薬の主活性成分とされる化合物も多い。その生合成には、トリテルペンの共通前駆物質である炭素数 30 の 2,3-オキシドスクアレンを環化し、β-アミリンやルペオールに代表される多様な環化骨格を生成するオキシドスクアレン環化酵素（OSC)、炭素骨格の部位特異的な酸化修飾を触媒するシトクロム P450 酸化酵素（P450)、さらに、配糖化を触媒する UDP 糖依存型糖転移酵素（UGT）が重要な役割を果たしている。

カンゾウが生産する「グリチルリチン」は、肝炎治療剤の他、天然甘味成分としても重要なサポニンである。私達は、カンゾウの地下茎を材料とする EST を構築し、これまでにグリチルリチン生合成に関わる 2 種の P450、CYP88D6(β-アミリン 11 位酸化酵素)および CYP72A154（β-アミリン 30 位酸酵素）を同定している。さらに、これら 2 種の P450 遺伝子をβ-アミリン合成酵素遺伝子とともに酵母に導入することで、ステロール生合成経路の中間産物として酵母に内在するオキシドスクアレンからグリチルレチン酸（グリチルリチンの非糖部で、薬理活性本体）とその類縁化合物を *de novo* 生産することに成功している。

また、マメ科モデル植物であるタルウマゴヤシの遺伝子共発現解析データベースを利用して、β-アミリンの 28 位炭素の酸化を触媒しオレアノール酸を生成する CYP716A12 を同定した。CYP716A12 はルペオール、α-アミリンといったβ-アミリンとは異なる骨格に対しても活性を示し、抗腫瘍活性、抗 HIV 活性などが報告されているベツリン酸、ウルソール酸をそれぞれ生成することを明らかにした。

さらに、上記で作出した植物トリテルペノイドを *de novo* 生産する組換え酵母に、新たに UGT 遺伝子を導入することで、組換え酵母内部におけるサポニン生合成を試みた。

グリチルレチン酸、あるいは、4-エピ-ヘデラゲニンを生産する組換え酵母に、カンゾウ由来のある UGT 遺伝子を導入したところ、それぞれの配糖体と推定される化合物が生成した。

以上の結果から、外部からの基質の供給を必要とせず、酵母内在の 2,3-オキシドスクアレンおよび糖供与体を利用して酵母細胞内でのトリテルペン「配糖体」の *de novo* 生産が可能であることを示した。

triterpenoid saponins, cytochrome P450s, engineered yeast

発表責任者：關　光（hseki@bio.eng.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-4
講演日時、会場：3 月 29 日 9:57～ B 会場

# コエンザイム Q10 の生合成と微生物生産

# Biosynthesis of Coenzyme Q10 and microbial production

○川向 誠、戒能 智宏（島根大生資）
○MAKOTO KAWAMUKAI, TOMOHIRO KAINO (Shimane Univ.)

コエンザイム $Q_{10}$（$CoQ_{10}$）はエネルギー産生と抗酸化に関わることを背景に、食品サプリメントとして、広く知れ渡ってきている。コエンザイム Q は別名ユビキノンとも呼ばれ、イソプレノイド側鎖を有するキノンの一種で、広く生物界に分布している。$CoQ_{10}$ は側鎖に 10 単位のイソプレンを有する。CoQ の種類は生物種で異なり、出芽酵母は $CoQ_6$、大腸菌は $CoQ_8$、ラットやイネは $CoQ_9$ を有する。分裂酵母(*S. pombe*)は $CoQ_{10}$ を合成することから、$CoQ_{10}$ 生産に有用な微生物である。

CoQ の生合成経路は大腸菌においては、ほぼ明らかにされているのに対して、真核生物においては、まだ完全には解明されていない[1]。真核生物の中でも出芽酵母が一番よく解析されており、遺伝学的には、9 種の遺伝子が CoQ の合成に関わることが判明しているが、Coq4 や Coq9 タンパク質の機能が不明である。キノン骨格を形成するのに必要な脱炭酸酵素は、まだ見つかっていない。イソプレノイド鎖とヒドロキシ安息香酸（PHB）が縮合する反応が合成の初発であると考えられてきたが、出芽酵母では *p*-アミノ安息香酸(pABA)も初発の基質となっている。そこで、我々が分裂酵母内でも pABA が基質となるかを調べたところ、分裂酵母も pABA を利用できることが判明した。分裂酵母の *coq* 遺伝子欠損株の中には、前駆体と思われる化合物の蓄積が見られるものがあり、分裂酵母は CoQ の生合成の解明に貢献できると考えている。

ヒトの遺伝病との関連を理解する上で、ヒトの CoQ 合成系遺伝子の解析が重要になることから、酵母と相同性の高いヒトの遺伝子を検索して、それらの遺伝子を分裂酵母内で発現させると、*COQ9* 遺伝子以外は相補的に働くことがわかった [2]。このことは、酵母内での CoQ の合成を完全解明していくことが重要であることを意味している。

分裂酵母内で $CoQ_{10}$ の合成を高生産させることを検討したところ、個々の CoQ 合成酵素遺伝子を単独あるいは複数で発現させても生産性の上昇には結びつかなかったが、上流の経路を増強すると生産性の上昇が見られた[3]。

[1] Kawamukai M. Biosynthesis of coenzyme Q in eukaryotes. Biosci. Biotechnol. Biochem. on line (2015)
[2] Hayashi K, Ogiyama Y, Yokomi K, Nakagawa T, Kaino T, Kawamukai M. Functional conservation of coenzyme Q biosynthetic genes among yeasts, plants, and humans. PLoS One. 9(6):e99038 (2014)
[3] Moriyama D, Hosono K, Fujii M, Washida M, Nanba N, Kaino T, Kawamukai M. Production of $CoQ_{10}$ in fission yeast by expression of genes responsible for $CoQ_{10}$ biosynthesis. Biosci. Biotechnol. Biochem. 79:1026-1033 (2015)

coenzyme Q, ubiquinone, yeast

発表責任者：川向誠（kawamuka@life.shimane-u.ac.jp）

講演番号：3SY01-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:19～ B 会場

植物の適応代謝産物モミラクトンの生合成経路と農薬としてのポテンシャル
Momilactone, a specialized metabolite in plants: its biosynthetic pathway and potential use as agrochemicals.

○岡田 憲典[1]、川出 洋[2]、林 謙一郎[3]、宮本 皓司[4]、山根 久和[4]、豊増 知伸[5] ([1]東大生セ、[2]東京農工大、[3]岡山理大、[4]帝京大、[5]山形大)
○KAZUNORI OKADA[1], HIROSHI KAWAIDE[2], KENICHIRO HAYASHI[3], KOJI MIYAMOTO[4], HISAKAZU YAMANE[4], TOMONOBU TOYOMASU[5] ([1]The Univ. of Tokyo, [2]Tokyo Univ. of Agri. and Tech., [3]Okayama Univ. of Sci., [4]Teikyo Univ., [5]Yamagata Univ.)

ジテルペン化合物であるモミラクトンは、病原菌感染時の防御物質として、また、近傍の植物の生育を妨げるアレロパシー物質として機能することが知られており、イネが生物学的なストレスに適応するために進化の過程で獲得してきた適応代謝産物と言える。モミラクトンはイネの根から恒常的に根圏に滲出されているだけでなく、いもち病菌などの病原菌感染や塩化銅などの重金属ストレスによってもイネ全身で誘導される。我々は、その誘導性を指標に生合成遺伝子群の取得を進め、イネのモミラクトン生合成遺伝子が 4 番染色体上でクラスターを形成していること、クラスター内の全遺伝子が同調的な発現誘導を示すことを明らかにした。さらに祖先種である野生イネを用いた解析から、イネ栽培品種である *Oryza sativa* 以前の野生種において、モミラクトンの生産能および遺伝子クラスターを保持することになったであろう進化上の分岐点を突きとめることができた。これによって、イネにおけるモミラクトン生合成遺伝子クラスター形成の進化は、*Oryza* 属の中でも *O. panctata* で完成しており、それはすなわち約 500 万年前の鮮新世の時代に、既にこの生理活性イソプレノイドを利用することができていたことを意味する。一方、イネ以外の植物では、現在のところ蘚類ハイゴケがアレロパシー物質としてモミラクトンを恒常的および誘導的に生産していることが報告されているほか、ある種の水田雑草にも微量ながらモミラクトンの蓄積が認められている。他の植物の繁殖を許さないハイゴケの占有化は、アレロパシー物質としてのモミラクトンの恒常的な生産に起因していると理解されている。進化的にかけ離れたハイゴケとイネが、いつ、どうやってモミラクトン合成能を獲得し、また、その生合成遺伝子群はイネと同様にクラスターを保持しているのかどうか、さらには、生産誘導機構には植物共通なシステムが機能しているのか？このような疑問を明らかにすることで、植物における適応代謝産物モミラクトンの生産と制御機構の進化を紐解くことができると考えている。植物に競争力を与える適応代謝産物モミラクトン。本発表では、イネにおけるこの有用形質獲得までの進化軌跡について紹介すると共に、天然農薬としての可能性とイネが自然に備えているモミラクトン耐性機構についても合わせて考えてみたい。

Momilactone, Specialized metabolite, Agrochemicals

発表責任者：岡田憲典（ukokada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY01-6
講演日時、会場：3 月 29 日 10:41～ B 会場

パラゴムノキの天然ゴム生合成機構の解明
Molecular mechanism of natural rubber biosynthesis in the Para rubber tree *Hevea brasiliensis*
○高橋 征司（東北大工）
○Seiji Takahashi (Tohoku Univ.)

天然ゴムは優れた材料特性を示す天然ポリマーであり，今日に至るまで，これに匹敵する合成ゴムの開発には成功していない．特にタイヤ製造には必須であるため，近年のモータリゼーションの加速に伴い天然ゴムの需要が著しく増大しており，近い将来，需要が供給を上回ることも予想されている．工業的な天然ゴムの大部分は，熱帯～亜熱帯地域のプランテーションで大規模栽培されているパラゴムノキ（*Hevea brasiliensis*）のラテックスより生産されているため，天然ゴム生産量の増大のためには，パラゴムノキの栽培地域拡大だけではなく，天然ゴム高生産型パラゴムノキの開発が重要となる．遺伝子工学的手法による分子育種の場合，天然ゴム生合成経路の酵素をラテックス特異的に過剰発現させるアプローチが想定されるが，1960 年代に rubber transferase としてその活性が確認されて以降，天然ゴム生合成酵素の実体は未解明のままであった．そこで我々は，パラゴムノキの天然ゴム生合成酵素の解明を進めてきた．

天然ゴムの基本骨格構造は，炭素数 5 のイソプレン単位（イソペンテニル二リン酸，IPP）が *cis* 型に 300～5,000 以上重合した *cis*-1,4-ポリイソプレンであり，そのω末端には数個の *trans* イソプレン単位を有する．この様なポリイソプレノイドは，*cis* イソプレン単位の重合度に大きな違いはあるものの全ての生物で普遍的生合成されており，主に糖鎖生合成における膜上の担体脂質として細胞維持に重要な役割を果たしている．それらの生合成は *cis* 型プレニルトランスフェラーゼ（cPT）と総称される酵素により触媒されることから，天然ゴム合成酵素も cPT より派生した酵素であることが予想された.そこで我々は,パラゴムノキのラテックスで特異的に発現している cPT 相同遺伝子(*HRT1*, *HRT2*) を単離した. 大腸菌で異種発現させた組換え型酵素は全く活性を示さなかったが, それをラテックス成分とともに反応させることで，ラテックス成分に含まれる天然ゴム生合成活性が大きく上昇したことから，これらが天然ゴム生合成における鍵酵素であることを初めて明らかにした．一方，これらの酵素を酵母で発現させた場合は，明確な重合活性を示すものの，その生成物の重合度は 20 程度であったため,HRT1,HRT2 が天然ゴム生合成活性を示すためには,真核生物特有の活性化機構に加え，ラテックス内に特有な因子が必要であることが示唆された．そこで我々は天然ゴム生合成酵素の活性発現機構の解明を進め，*in vitro* の酵素反応で天然ゴムに相当する超長鎖ポリイソプレノイドを生合成させることに初めて成功した.

isoprenoid, natural rubber, Hevea brasiliensis

発表責任者：高橋征司（takahasi@seika.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：3SY01-7
講演日時、会場：3 月 29 日 11:03～ B 会場

# バイオ燃料源として有望な微細緑藻 *Botryococcus braunii* によるトリテルペン炭化水素の生合成・代謝

# Biosynthesis and metabolism of triterpene hydrocarbons as promising biofuels by the green microalga *Botryococcus braunii*

○岡田 茂[1,2] ([1]東大農、[2]JST CREST)
○Shigeru Okada[1,2] ([1]The University of Tokyo, [2]JST CREST)

群体性微細緑藻 *Botryococcus braunii* は、大量の液状炭化水素を生産・蓄積する。本種は生産する炭化水素のタイプにより、A、B、L および S の 4 品種に分けられる。この内 B 品種は、botryococcene 類およびメチルスクアレン類というトリテルペン炭化水素を生産する。これらのトリテルペン炭化水素からは、軽質化によりガソリン相当留分が得られるため、本藻種は再生産可能なバイオ燃料としての利用が期待されている。本藻 B 品種の炭化水素の主成分は botryococcene 類であり、メチルスクアレン類は微量成分に過ぎない。その一方、メチルスクアレン類にはエポキシ化等の修飾を受けた様々な誘導体が存在するのに対し、botryococcene 類ではその様な誘導体が殆ど見られないことから、同じトリテルペン炭化水素でも、botryococcene 類とメチルスクアレン類とでは、生物学的存在意義が異なる可能性がある。そこで、これらのトリテルペン炭化水素が、どの様に生合成されるかを調べるため、その合成酵素の同定を試みた。その結果、本藻種には他の真核生物にも普遍的に存在するスクアレン合成酵素（Botryococcus Squalene Synthase=BSS）に加えて、BSS と相同性を示すスクアレン合成酵素様タンパク質（Squalene Synthase-Like protein=SSL）が 3 種類（SSL-1、2、3）も存在することが分かった。上記酵素類の機能を調べたところ、BSS は他生物由来 SS 同様、ファルネシル二リン酸（farnesyl pyrophosphate=FPP）からスクアレンを生成した。それに対し、SSL-1 は FPP を基質として、スクアレン生合成の中間体であるプレスクアレン二リン酸（presqualene pyrophosphate=PSPP）のみを生成した。一方、SSL-2 および SSL-3 は、FPP では無く PSPP を基質として、それぞれスクアレンおよび $C_{30}$ botryococcene を生成した。したがって、通常は SS が単独で行う二段階反応の前半部と後半部を、それぞれ別の酵素が分担して触媒するという特異なメカニズムにより、本藻種のトリテルペン炭化水素が生合成されていることが明らかになった。

上記トリテルペン炭化水素を構成する全てのイソプレン単位は、メチルエリスリトールリン酸(MEP)経路に由来することが、$^{13}C$ グルコース投与実験により示された。本藻種では、MEP 経路の第一段階を触媒する 1-deoxy-D-xylulose 合成酵素遺伝子が 3 種も存在し、それらが同時に発現している。また本藻種には、スクアレンモノオキシゲナーゼ遺伝子も複数種存在する。これらのことは、本藻種は単細胞生物であるにも関わらず、テルペンの生合成・代謝に関与する酵素遺伝子を重複して持つことにより、大量のトリテルペン炭化水素の生産・代謝を制御している可能性を示唆している。

biofuel, triterpene hydrocarbon, *Botryococcus braunii*

発表責任者：岡田　茂（aokada@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY02-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:00～ D 会場

エンドグリコシダーゼ：糖鎖の機能・構造解析用試薬からバイオ医薬品製造ツールへの変遷
Endoglycosidase: Tools for structural analysis of N-linked oligosaccharides and enzymatic synthesis of biopharmaceuticals
○竹川 薫（九大院農）
○Kaoru Takegawa (Kyushu Univ.)

エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ(ENGase)は糖タンパク質 *N*-結合型糖鎖の根本部分に存在するジアセチルキトビオース部分を切断して、糖鎖をエンド型に遊離する酵素である。ENGase は 1974 年に放線菌(Endo-H)とバクテリア(Endo-D)から初めて報告された。現在では、ENGase は *N*-結合型糖鎖を合成しないバクテリアからヒトを含む高等動物まで広く生物界に存在することがわかっている。ENGase は、糖タンパク質糖鎖を GlcNAc-Asn 間でエンド型に遊離する Peptide N-glycanase (PNGase) とともに、糖タンパク質 *N*-結合型糖鎖の構造および機能解析用試薬として広く研究に用いられてきた。演者らはバクテリア由来の ENGase (Endo-A)が糖鎖を転移できる能力を有していることを見いだし、不均一な構造を持った糖タンパク質の糖鎖部分を、均一な構造へと変換できることを 1995 年に初めて報告した。しかし、Endo-A は *N*-結合型糖鎖の中で高マンノース型糖鎖のみに作用すること、また加水分解活性を有しており、転移反応により新たに合成された糖タンパク質糖鎖を再び遊離してしまうため、ヒト適応型の均一糖鎖構造を有するバイオ医薬品糖タンパク質の製造は困難であると考えていた。山本らは糸状菌由来の ENGase (Endo-M)が、高等動物由来の糖タンパク質に見られる複合型糖鎖を遊離・転移可能であり、さらに Endo-M のアミノ酸の点変異により加水分解活性をほとんど持たない変異体酵素(Glycosynthase)を創りだすことに成功した。抗体などのバイオ医薬品は、現在は主に CHO 細胞等の動物細胞から生産されており、生産された糖タンパク質の糖鎖構造は不均一である(バイオシミラー)。また付加されている糖鎖の構造により医薬品としての生物活性が異なっていることも報告されている。そのため、将来的にはタンパク部分のみならず、糖鎖構造も均一なバイオ医薬品糖タンパク質の製造方法が望まれており、ENGase を利用した均一糖鎖への酵素的変換技術は最も実現可能性が高い手法の１つである。以上の理由から、複合型糖鎖を転移可能な Endo-M は均一糖鎖構造を有するバイオ医薬品製造に利用可能な酵素として、現在世界中で広く研究されている。
本シンポジウムでは、抗体などの糖タンパク質性バイオ医薬品製造に重要なツールとして、ENGase を利用するための問題点や今後の改良すべき点などを、実際に ENGase による糖鎖改変研究を実施しているグループ（加藤・千葉・稲津・白井）により紹介する。また最近 PNGase のヒトにおける欠損患者が報告された。鈴木らは PNGase の欠損により引き起こされる重篤な疾患は、ENGase の欠損により軽減されることを明らかにした。本シンポジウムでは PNGase および ENGase の高等動物における役割についても紹介したい。

Endoglycosidase, Glycoprotein, Biopharmaceuticals

発表責任者：竹川　薫（takegawa@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3SY02-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:20～ D 会場

# エンドグリコシダーゼはヒト遺伝疾患の治療のターゲットになり得るか？
# Can an endoglycosidase be a drug target for a human genetic disorder ?

○鈴木 匡 (理研)
○Tadashi Suzuki (RIKEN)

哺乳動物において、アスパラギン結合(N)型糖鎖修飾の生合成機構はその殆どが解明されているのに対し、分解機構には未だ不明な点が多く残されている。例えば N 型糖鎖の代謝はリソソームで行われることが広く知られているが、近年細胞質においてもリソソーム系とは異なる代謝系が存在することが知られている[1,2]。哺乳動物の細胞質においては、糖鎖脱離酵素である PNGase（ペプチド:*N*-グリカナーゼ ; Ngly1）[3]、ENGase（エンド-β-*N*-アセチルグルコサミニダーゼ）[4, 5] と Man2C1（α-マンノシダーゼ）[6] が N 型糖鎖糖鎖の代謝に関わることが明らかにされてきている。近年 Ngly1 の遺伝子に変異を持つヒト遺伝子疾患が発見された(*NGLY1* 欠損症)[7]。その症状は全身的な生育遅延、四肢の筋力低下、不随意運動など全身的に重篤な症状を呈するものの、その病体発現のメカニズムは不明である[8-10]。

我々は、*NGLY1* 欠損症を引き起こす分子メカニズムの解明に取り組んだ。まず Ngly1 の機能を明らかにするために、小胞体関連分解（ERAD）の新規なアッセイ法を確立した。このアッセイ法を用いて、Ngly1-KO マウス由来の胚性線維芽細胞（MEF）においてこのモデルタンパク質の分解過程を調べたところ、野性型マウス由来の MEF よりも分解が遅延することが明らかとなった。興味深いことに、Ngly1-KO 細胞においてもそのモデルタンパク質の N 型糖鎖は脱離されており、その反応は細胞質内の別の脱糖鎖酵素である ENGase によって行われることが明らかとなった。ENGase による糖鎖脱離は、PNGase と異なりタンパク質に *N*-アセチルグルコサミン(GlcNAc)一残基を残す。興味深いことに、今回用いたモデルタンパク質においては ENGase の反応産物である *N*-GlcNAc タンパク質が細胞内凝集体として蓄積し、結果分解が遅れることが分かった。一方驚いたことに、ENGase と Ngly1 の両方を欠損した細胞ではモデルタンパク質の分解は正常に行われることが分かった。以上の結果により、ENGase が特に Ngly1 が機能不全の状況で糖タンパク質に直接作用し、*N*-GlcNAc タンパク質を生成することが明らかとなり、この現象が *NGLY1* 欠損症の病態発現に関わる可能性が示唆された[11]。

最近のわれわれのマウス表現型解析からも ENGase の阻害が Ngly1 の病態改善に繋がり得ることを示す結果が得られつつある。本シンポジウムでは最新の研究成果について紹介するとともに、ENGase 阻害剤の開発に向けた取り組みについて紹介する。

文献

(1) Suzuki and Harada, ***BBRC* 453,** 213 (2014). (2) Harada, *et al.* ***Cell Mol. Life Sci.* 72,** 2509 (2015). (3) Suzuzki *et al.* ***J. Cell Biol.* 149,** 1039 (2000). (4) Suzuki *et al.* ***PNAS* 99,** 9691 (2002). (5) Harada, *et al.* ***Glycobiology* 25,** 1196 (2015). (6) Suzuki, *et al.* ***Biochem. J.* 400,** 33 (2006). (7) Need, *et al.* ***J. Med. Genet.* 49,** 353 (2012). (8) Enns, *et al.* ***Genet. Med.* 16,** 751 (2015). (9) Caglayan, *et al.* ***Eur. J. Med. Genet.* 58,** 39 (2015). (10) Heeley and Shinawi, ***Am. J. Med. Genet.* 167A,** 816 (2015). (11) Huang, *et al.* ***PNAS* 112,** 1398 (2015).

Ngly1, ENGase, ER-associated degradation

発表責任者：鈴木　匡（tsuzuki_gm@riken.jp）

講演番号：3SY02-3
講演日時、会場：3 月 29 日 9:45～ D 会場

# 部位特異的変異導入によるエンドグリコシダーゼの糖鎖特異性の改変

# Alteration of the glycan specificity of endoglycosidase by site-directed mutagenesis

○加藤 紀彦[1]、山本 憲二[2] ([1]京大院生命、[2]石川県大)
○Toshihiko Katoh[1], Kenji Yamamoto[2] ([1]Kyoto Univ., [2]Ishikawa Pref. Univ.)

糸状菌 *Mucor hiemalis* 由来 endo-β-*N*-acetylglucosaminidase (Endo-M) は、アスパラギン結合型糖鎖のキトビオース部分に作用するエンド型グリコシダーゼである。本酵素は加水分解活性のみならず、遊離した糖鎖を適切な受容体に転移付加する糖転移活性をも有するユニークな酵素である。本酵素活性を利用してこれまでに様々な糖ペプチド、糖タンパク質の糖鎖改変が行われてきた。また本酵素の変異体（N175Q: グライコシンターゼ）は、加水分解活性の抑制と、糖オキサゾリン中間体を糖鎖供与体として用いた場合の高い糖転移反応効率のために、均質な糖鎖構造を持つバイオ医薬品を創出するツールとしての応用が試みられている。本酵素は基質特異性が比較的低く、高マンノース型糖鎖からシアロ複合型二本鎖に作用できるものの、コアフコシル化糖鎖やその他の糖鎖に対する作用は限定されていた。そこで本研究では Endo-M の部位特異的アミノ酸置換を行い、基質特異性の異なる新規変異体の作成を試みた。

Glycoside Hydrolase Family 85 に属する酵素の立体構造情報に基づく Endo-M の部位特異的変異導入の結果、コアフコシル化糖鎖に対して作用できる Endo-M 変異体が得られた。Endo-M-W251N 変異体はコアフコースを有する糖鎖基質に対する加水分解活性について WT と比べ約 350 倍の上昇が見出された。さらにグライコシンターゼとの二重変異体（N175Q/W251N）と糖オキサゾリン基質を供与体とした反応によって、ビオチン化 Fucosylα1-6GlcNAc を受容体とした糖転移反応で糖転移産物の生成が認められた。さらなる糖転移効率の向上によってコアフコシル化糖鎖を有するバイオ医薬品合成への応用が可能となる。今後もこのような部位特異的変異導入による酵素改変によって、本エンドグリコシダーゼの応用可能範囲の拡大が予想され、Endo-M 変異体のバイオ医薬品生産分野における化学-酵素合成のツールとしての幅広い利用が期待できる。

Endo-β-N-acetylglucosaminidase, Endo-M, N-glycan

発表責任者：加藤紀彦（tkatoh@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3SY02-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:10～ D 会場

# エンドグリコシダーゼの糖鎖転移反応を利用した糖鎖複合体合成システムの開発

# Glycoconjugate Synthesizing System Using Immobilized Endo-M

○稲津 敏行（東海大学)
○Toshiyuki INAZU (Tokai Univ.)

1990 年代に開発された *Mucor hiemalis* 由来の Endo-β-*N*-acetyl-D-glucosamidase (Endo-M)を用いる糖鎖転移反応は、N-グリカンを有する様々な糖鎖複合体を調製できる唯一の実用的方法といっても過言ではない。その後の技術革新、特に、改変型酵素の創製と糖鎖供与体としてオキサゾリン誘導体を用いる化学の発展により、今や定量的に糖鎖複合体が得られるレベルに達している。

我々は、糖鎖受容体の構造に着目し、その必須構造が、GlcNAc の 4 位から 6 位に至る 1,3-ジオール構造であることを見出した [1)]。また、GlcNAc 誘導体を天然タンパク質に付加させ、その後糖鎖転移反応を行うことで、タンパク質の非天然型糖鎖修飾が可能であることを明らかにし、シュガーリングタグ法と名付けた。この手法により、糖鎖修飾インスリンを調製した [2)]。さらに、この二つの方法論を融合させ、1,3-ジオール構造による修飾を行う新たなシュガーリングタグ法を開発した。すなわち、リジンの側鎖アミノ基に、1,3-ジオール構造を有するカルボン酸を縮合させ、これを用いてペプチド合成を行った後に、糖鎖転移反応に供し、糖鎖修飾ペプチドの合成を達成した [3)]。

こうした結果を背景に、様々な官能基を有する 1,3-ジオール誘導体を合成し、ライブラリー化を図った。このライブラリー誘導体を用いることで、種々の官能基に 1,3-ジオール構造を付与できるようになった。従って、抗体などの糖タンパク質に限らず、様々な小分子、中分子化合物を糖鎖転移反応の糖鎖受容体にすることができるようになった。現在、そのモデル反応を検討している。

しかし、従来技術はいずれも研究室レベルであることは否めない。酵素や天然糖鎖（糖鎖供与体）が市販されるようになった今、その工業的な利用を考える時期が来たといえる。そこで、大量に糖鎖転移反応を行う手法を目指し、Endo-M の固定化を検討した。その結果、固定化 Endo-M は高活性を保持できるばかりか、極めて安定で長期保存が可能であることが分かった。特に、マイクロバイオリアクターを用い、反応を連続的に行うとほぼ定量的に糖鎖転移反応が進行することが明らかになった。

本講演では、Endo-M を用いる糖鎖転移反応が産業的に利用されることを期待し、現在確立を急いでいる糖鎖複合体の連続合成システムを中心に、これまでの成果を概説する。

引用文献: 1）Y. Tomabechi et al, *Bioorg. Med. Chem.*, **18**, 1259-1264(2010)；2）Y. Tomabechi et al, *Carbohydr. Res.*, **345**, 2458-2463(2010)；3）Y. Tomabechi and T. Inazu, *Tetrahedron Lett.*, **52**, 6504-6507(2011).

transglycosylation reaction, Endo-M, immobilyzed enzyme

発表責任者：稲津敏行（organic@tokai-u.jp）

講演番号：3SY02-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:35～ D 会場

# バイオ医薬品糖鎖分析のための糖タンパク質校正品の開発
# Development of a calibrator for glycan analysis of biologics

○千葉 靖典（産総研・創薬基盤）
○Yasunori Chiba (BRD, AIST)

抗体医薬に代表されるバイオ医薬品は、主に動物細胞を利用して生産されていることから、バイオ医薬品製造の観点から翻訳後修飾などによる構造の不均一性が課題となっている。特に糖鎖は、その構造に依存してバイオ医薬品の有効性や安全性に大きな影響を及ぼす可能性があり、品質管理において詳細に糖鎖構造を解析することが要求されている。従って、研究開発段階から実製造まで糖鎖構造を常に分析することが必要となり、現在、糖鎖修飾による分子構造の不均一性や医薬品の生物学的特性に影響する糖鎖構造の迅速、簡便、かつ信頼性高く解析する様々な技術や製品の開発が試みられている。そこで、我々はこれらの糖鎖分析方法の適合性を支援する体制作りの一環として、糖タンパク質の校正品開発およびそれらを利用した分析法の評価、開発を進めている。

抗体の糖鎖構造解析では、抗体から糖鎖を切り出す際、高価な糖加水分解酵素を使用して調製した糖鎖を標識し、高速液体クロマトグラフィーや質量分析により構造が推定される。これらの方法は前処理工程が煩雑であり、分析者の手技の熟練度や使用装置の特性に基づく誤差が伴うため、同じ標品を分析しても異なる結果が得られる場合が多い。そこで、我々は２つの方法を検討した。一つはより安価なトリプシンを用いて抗体を消化し、キャピラリー電気泳動により、異なる糖鎖を有する糖ペプチドの分離と糖鎖不均一性を解析する技術の開発である。この分析には分析標準となる糖ペプチドが必要となるため、化学-酵素合成法で IgG1 のトリプシン消化産物に相当する 16 種類の糖ペプチドを調製した。この方法の実用化によって、より簡便かつ安価な糖鎖構造解析法が提供できる。もう一つは、分析校正用糖タンパク質を利用した分析手法の評価、開発である。提供する分析校正用糖タンパク質を並行して解析することにより、分析システムの適合性を評価することが可能となる。我々は、酵母で生産した抗体 Fc 領域の糖鎖を酵素的に処理し、化学合成した糖鎖と酵素的に付け替えることにより、均一な糖鎖構造を提示する 3 種類の Fc タンパク質の調製技術を開発した。これを定量的に混合した標品について評価を進めているところである。

本研究の一部は、経済産業省の「平成２５年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び平成２６年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業（国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))」、及び日本医療研究開発機構（AMED）の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた。

glycan, yeast, endo-ß-N-acetylglucosaminidase

発表責任者：千葉　靖典（y-chiba@aist.go.jp）

講演番号：3SY02-6
講演日時、会場：3 月 29 日 11:00～ D 会場

# エンドグリコシダーゼによる糖鎖改変技術開発とそのバイオ医薬品トラスツズマブへの応用
# Chemoenzymatic glycoengineering of trastuzumab

○白井 孝[1]、黒河内 政樹[1]、月村 亘[1]、森 昌子[1]、大隅 賢二[1]、戸治野 真美[1]、高島 晶[1]、菅原 州一[1]、弘瀬 友理子[1]、高柳 淳[3]、水野 真盛[1]、天野 純子[1]、松田 昭生[1]、正田 晋一郎[4]、木下 崇司[6]、竹川 薫[5]、冨田 正浩[2] ([1]公益財団法人野口研究所、[2]株式会社免疫生物研究所、[3]慶応義塾大学、[4]東北大学、[5]九州大学、[6]株式会社伏見製薬所)
○Takashi Shirai[1], Masaki Kurogochi[1], Wataru Tsukimura[1], Masako Mori[1], Kenji Osumi[1], Mami Tojino[1], Akira Takashima[1], Shu-ichi Sugawara[1], Yuriko Hirose[1], Atsushi Takayanagi[3], Mamoru Mizuno[1], Junko Amano[1], Akio Matsuda[1], Shin-ichiro Shoda[4], Takashi Kinoshita[6], Kaoru Takegawa[5], Masahiro Tomita[2] ([1]The Noguchi Institute, [2]Immuno-Biological Laboratories Co.,Ltd., [3]keio Univ., [4]Tohoku Univ., [5]Kyushu Univ., [6]FUSHIMI Pharmaceutical Co.,Ltd.)

2014 年の医薬品売上トップ10のうち、バイオ医薬品は7品目（Humira, Remicade, Enbrel, Lantus, Rituxan, Avastin, Herceptin）を占めこのうち5品目が抗体医薬である。IgG 抗体は2つの重鎖と2つの軽鎖から成り、抗原と結合する Fab 領域、白血球や、マクロファージ等の細胞と結合する Fc 領域を持っている。Fc 領域の297番目のアスパラギンには糖鎖が結合している。一般に動物で産生する糖タンパク質の糖鎖は複数の糖鎖転移酵素・糖加水分解酵素の働きと制御等の要因により不均一な糖鎖が結合した形で作成される。この不均一な N 結合型糖鎖が抗体依存性細胞障害活性（ADCC 活性）、補体依存性細胞障害活性（CDC 活性）、薬理活性に寄与している事は良く知られている。その例として N 結合型糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンに結合しているフコース（コアフコース）が欠失している抗体は Fc γ RIIIa を介する ADCC 活性が高まる事が判明しており、これを利用した抗体医薬（糖鎖は不均一、obinutuzumab,mogamulizumab）も既に市販されている。我々は、トラスツズマブをモデルとして酵素化学合成法を用いて均一な糖鎖だけが付加している糖鎖均一化抗体の製造、及びその生理活性を測定し、コアフコースの有無と共に糖鎖構造の違いによって Fc γ RIIIa を介する ADCC 活性に差が出る事を見出した。酵素化学合成法とは、①抗体に結合している不均一な N 結合型糖鎖を複数のエンド酵素（endo-β-N-acetylglucosaminidase）で加水分解し、297番目のアスパラギンに N-アセチルグルコサミン（±フコース）のみが付加した均一糖鎖抗体（アクセプター）を用意②卵黄から抽出されるシアリル糖ペプチド（SGP）から調製（A2,G2, G1a,G1b,G0）、あるいは合成（M3）した N-結合型糖鎖のオキサゾリン体（ドナー）を作製③改変エンド酵素（合成酵素）によりドナーをアクセプターに転移させ、この転移産物をイオン交換カラムによる精製を行う事で、任意の均一な N 結合型糖鎖を持つ抗体を作製する手法である。アクセプター調製に遺伝子組換えカイコを用いて生産したトラスツズマブ（糖鎖はハイマンノース型、パウチマンノース型、複合型、いずれもコアフコースは検出できない）を用いた場合はコアフコースのない均一糖鎖トラスツズマブ（A2,G2,G1a,G1b,G0,M3）が製造でき、アクセプター調製に CHO 細胞から製造された市販品のトラスツズマブを用いた場合はコアフコースが付加した均一糖鎖トラスツズマブ（A2F,G2F,G1aF, G1bF、G0F,M3F）が製造できる。市販のトラスツズマブにはコアフコースを持たない不均一な N 結合型糖鎖が15%程度含まれ、これを除去する必要がある。この除去にもエンド酵素が使用できる。上記①, ②、③及び精製の各ステップで重要な役割を果たすのはエンド酵素であり、この酵素の認識する糖鎖構造、アグリコンを知る事が重要である。

Glycoengineering, ENGase, trastuzumab

発表責任者：白井　孝（shirai.tb@noguchi.or.jp）

講演番号：3SY03-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ A 会場

# 食品機能研究の過去と現在：私のフラボノイド研究に影響を与えたトピックス
# Functional Food Research in Retrospect:Topics influencing my flavonoid research

○寺尾 純二 (徳島大院医歯薬)
○Junji Terao (Tokushima University)

1984 年我が国の研究者達は、文部省特定研究「食品機能の系統的解析と展開」により、疾病予防に寄与することを目指した「機能性食品」の国家的プロジェクトを開始した。本プロジェクトは、1991 年に世界に先駆けて食品の三次機能を対象とした法律である「特定保健用食品制度」を生み出すという画期的な成果をもたらした。この制度により、科学的根拠に基づいて健康強調表示が許可された健康食品、すなわち、特定保健用食品（トクホ）が誕生した。その後 2001 年の保健機能食品制度への変更等を経て、1000 品目以上のトクホが表示許可されている(2015 年 10 月 27 日現在：1203 品目)。さらに、2015 年 4 月 1 日からトクホとは別基準による機能性表示食品の制度がスタートしたことにより、我が国における機能性食品の開発と応用は活発化しつつある。したがって、食品の機能性と安全性に科学的根拠を与える食品機能研究は今後も重要な学術分野となることが期待される。そのためには、プロジェクト開始当初には予想されなかったヒトゲノムの完全解読をうけた網羅的解析技術であるオミクスの誕生やナノテクノロジーの発展による高感度バイオマーカーの開発など急激に発展する生命医科学と連動した新しいアプローチによる研究への展開が望まれる。

演者は、過酸化脂質の毒性および食品抗酸化物質の機能性を課題としてプロジェクト開始当初から食品機能研究に関わり、現在に至っている。その間自身の研究に大きな影響を与えた 3 つのトピックスがある。(1)1983 年、食品抗酸化剤 BHA の発ガン作用が発表された(当時、演者は留学先で BHA の抗ガン作用の研究を行っており、BHA が解毒代謝酵素を誘導するという論文を読んでいた)。(2)1994 年、β―カロテン摂取が肺がん罹患リスクを増大することが報告された（当時、演者はカロテノイドの抗酸化作用を研究しており、それらの血漿濃度を検討していた)、(3)同じ 1994 年、食品フラボノイドの摂取が心臓病を予防することを示唆する疫学データが報告された（当時、演者はフラボノイドの研究をスタートしたところであり、抗酸化活性と構造との関係を検討していた)。本講演では、これらのトピックスが演者の主要研究課題である食品由来フラボノイドの生理機能研究に対してどのように影響を与えたかを述べることで、食品機能の過去と現在を語ることにしたい。

functional Food, flavonoid, antioxidant

発表責任者：寺尾純二（terao@tokushima-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:50～ A 会場

# 要素還元的手法の限界とメタボロミクスの挑戦：食品機能性評価への応用

# Limitation of reductionistic approach and challenge of metabolomics: Application to evaluation of food functionality

○藤村 由紀[1]、三浦 大典[1]、割石 博之[1,2,3]、立花 宏文[1,3,4] ([1]九大レドックスナビ、[2]九大基教、[3]九大院農院、[4]九大機能デザイン)
○Yoshinori Fujimura[1], Daisuke Miura[1], Hiroyuki Wariishi[1,2,3], Hirofumi Tachibana[1,3,4] ([1]ICMRN, Kyushu Univ., [2]Fac. Arts & Sci., Kyushu Univ., [3]Fac. Agric., Kyushu Univ., [4]FFDRC, Kyushu Univ.)

近年、複合成分系である食品の機能性を捉えるために、機能性を単一成分の含量情報のみで帰属しようとする現行の「要素還元的手法」では対応困難な場合が多々指摘されている。そのため、従来の分析技術の未熟さゆえに排除されてきた“共存多成分情報”を機能性に帰属できる新たな科学的評価法の創出、すなわち、着目する機能性成分とその効果に干渉しうる複数の共存成分の挙動を一斉に捉え、それらの機能性に対する寄与度を包括的に評価できる分析技術が求められている。

低分子化合物群の量比バランスで試料間の性質（表現型）を客観的に評価できる代謝物解析技術（メタボロミクス）の一つである代謝物プロファイリング法は、食品（農林水産物）中の低分子量成分（代謝物）を標的とし、それらの品質鑑定・予測ならびに要因解析の新たな手法として注目を集めている。しかしながら、現状ではそれらの食品機能性（生体調節機能）分野への応用は皆無であった。これに対して、我々は高速液体クロマトグラフ質量分析・多変量統計解析に基づく代謝物プロファイリング法が数十種類の茶（*Camellia sinensis* L.）品種の機能性評価（血管内皮障害の抑制に関わるミオシン軽鎖リン酸化抑制活性を有する品種の識別化やその活性予測モデルの構築／生理活性因子や共存成分バランスの解明等）に有効であることを世界に先駆けて報告してきた（***PLoS One***, 6, e23426, 2011）。すなわち、本成果は既存の機能性評価法で汎用されている単一成分評価系では対応できない、複合成分系である緑茶の機能性をその成分量比バランスで簡便に評価できる計量化学的技法を提示した。

一般的に、粗抽出物中からの生理活性成分の探索では、粗抽出物の分画・精製とバイオアッセイ評価を複数回繰返すことで目的成分の同定に至るが、代謝物プロファイリング法ではそうした付加的な分画や活性測定無しに、バイオアッセイされたサンプル群の単回分析での活性寄与成分・バランスの同定を可能にしている。このことは、本法が既存法と比べて時間・コスト・労力浪費の改善に寄与する革新的スクリーニング法であることを意味している。また、このような緑茶の機能性を捉える新技法は、機能性を付与した新規品種開発や既存品種の有用性発掘に役立つことが期待される。さらに、試料中の複数成分間の相関関係を捉える本法は、緑茶をはじめ様々な食品の機能性理解に不可欠な成分間／食品間相互作用に関する基礎情報の取得を可能にし（***Sci. Rep.***, 5, 9474, 2015）、機能性成分を活用した食品開発や食品の食べ合わせに役立つ新たな科学的根拠の創出に寄与すると思われる。

reductionistic approach, metabolomics, food functionality

発表責任者：藤村由紀（fujimu@redoxnavi.med.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:10～ A 会場

# 体内のリズムを考慮に入れた食品の機能性研究

Functional food researches in consideration for biological rhythm

○榊原 啓之（宮崎大学 農学部）
○Hiroyuki Sakakibara (University of Miyazaki)

我々ヒトを含めた生物は、日常の基本的な生命活動を営むために必要な成分（栄養成分）や補助する成分（機能性成分）を食事から摂取している。興味深いことに、このような食事由来成分を摂取した後、それらの成分が体内で効果を発揮するまでの過程に関連している多くの生体イベントには、一日の中で活性（分泌量）が高い時間帯と低い時間帯が存在している。つまり日周リズムがあることが知られている。例えば、一般的に体温や血圧は活動期の後半に向けて上昇し、休眠期に入ると低下する。血中のグルココルチコイドやテストステロンは活動期が始まる直前、コレステロールやカテコールアミン類は活動期の真中、好中球やリンパ球は活動期の後半、成長ホルモンは休眠期に最大値を示す。また、休眠期には、主要な内因性の抗酸化システムであるスーパーオキシドジスムターゼやカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼの活性が高まることは、多くの食事由来抗酸化成分が体内から消失する休眠期には、体内で生じる酸化的損傷を防ぐために生体防御システムが活性化されている可能性を示唆している。実際にマウス体内で刻まれているリズムを調べてみると、自由摂食条件下であっても、主に食事をする時間帯は 1 日の中で 2 回のピークを刻み、そのピークに連動するように血中の脂質や糖質の濃度も変動していることが分かる。一方で、肝臓中の脂質量は摂食パターンとは独立した明確な日周リズムを刻んでいる点は興味深い。自由摂食条件下で見られる 1 日 2 回の摂食ピークは、一般的に活動期の開始直後のピークの方が活動期の後半よりも高まるが、1 日 2 回の摂食ピークの時間帯だけ食餌を与える時間制限給餌にすると、摂食量は活動期の後半の方が高くなる。このような違いは、自由摂食条件下での試験と時間制限給餌下での試験とで得られる結果を比較するときには、考慮すべき点である。以上のように、生体レベルで食品成分の効果を評価するときには、標的となる効果に関連した生体イベントが刻んでいる日周リズムを考慮することが重要である。本講演では、我々が得た試験結果を中心に、生物体内で刻まれているリズムを考慮に入れた食品の機能性研究について紹介したい。

Functional foods, Biological rhythm, Mice

発表責任者：榊原啓之（hiroyuki@cc.miyazaki-u.ac.jp）

講演番号：3SY03-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:30～ A 会場

# 食品機能研究を支える分子細胞生物学研究の重要性

# The importance of molecular cell biological studies for developing a food science research area

○佐藤 隆一郎（東大院・農生科）
○Ryuichiro Sato (Univ. of Tokyo)

食品の三次機能が提唱されて以来、最近 20～30 年の間に、農芸化学領域における栄養・食品研究の大半は、食品機能学研究へとシフトしたと言っても過言でない。その結果として、機能性食品創製が盛んになり、イノベーションへと繋がる流れの定着したことは、研究者にとっても歓迎すべきトレンドとして捉えることができる。しかしこれから 20～30 年間、同様の試みを継続しているとやがてネタは尽き、研究分野の大きな発展は望めないと危惧するのは演者一人のみではないだろう。次世代の食品科学研究を展開する斬新な試みが今後は一層必要となろう。

食品の三次機能解析は、生体内で生じる代謝応答に、食品成分が直接、間接的に作用し、結果的に健康維持へと導く過程を科学的エビデンスとして提示することから始まる。従って、より信頼性、精度の高いエビデンスを得るためには、生体側の生命活動を詳細に解析する技術、基礎知見の集積を必要とする。この目的のために、演者らは分子細胞生物学的基礎研究に力点を置きつつ、そこから得られる知見を食品機能と結びつけるストラテジーで研究を進めてきた。

脂肪酸、コレステロール代謝を制御する転写因子 SREBP は、不必要に活性化されることによりメタボリックシンドローム等の疾患発症の引き金となる。SREBP 活性化を抑制する食品成分としてホップ成分 Xanthohumol を見出し、その作用機序を明らかにした(1)。肝臓において、脂質代謝、糖新生の制御を担う核内受容体 HNF4 の活性を抑制する食品成分として、フラボノイド類の Luteolin を見出した(2)。肝臓からリポタンパク質分泌に関与する Apolipoprotein B の発現を抑制する成分として、Quercetin が転写因子 C/EBP 類に作用する分子機構を明らかにした(3)。さらに、コレステロール異化産物である胆汁酸が G タンパク質共役受容体である TGR5 のリガンドとして、代謝改善効果を有するという新たな知見に基づき、TGR5 アゴニスト活性を有する成分 Nomilin を柑橘類より見出し(4)、そのリガンド-受容体結合様式を明らかにした。生体内の機能性標的分子を定め、それに対してアクセス活性を有する食品成分を分子細胞生物学的手法により探索し、機能解析する演者らの知見を紹介する。

(1) Miyata et al. ***J. Biol. Chem***. 290, 20565-20579 (2015)
(2) Li et al. ***J. Biol. Chem***. 290, 24021-24035 (2015)
(3) Shimizu et al. ***PLoS ONE*** 10, e0121784 (2015)
(4) Ono et al. ***Biochem Biophys Res Commun***. 410, 677-681 (2011)

food science, SREBP, bile acid

発表責任者：佐藤隆一郎（aroysato@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY03-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:00～ A 会場

# 食品機能評価の新たな視点

# A novel viewpoint for evaluation of food functionality

○立花 宏文 (九大農)
○Hirofumi Tachibana (Kyushu Univ.)

機能性食品は機能性因子の探索、同定、作用メカニズムの解析、介入試験などの機能性評価を経て生み出される。本シンポジウムでは、現在我々が取り組んでいる新たな視点での食品の機能性評価ならびにその潜在的なパワーを引き出す試みについて紹介する。

**１　食品因子の機能性実行因子としてのノンコーディング RNA**

ノンコーディング RNA の一種である microRNA（miRNA）が遺伝子の発現調節に重要な役割を担っており，様々な生命現象に関与することが明らかとなってきた。緑茶カテキン、大豆イソフラボン、アントシアニジンなどのポリフェノールの機能性発現における miRNA の関与ならびにその発現制御について述べる。

**２　食品因子による細胞膜脂質ラフトの制御**

緑茶カテキン EGCG は細胞膜脂質ラフトに対して、EGCG センサー67LR 依存的なセラミド産生を介して構造変化を誘導し、多様な細胞膜受容体からのシグナル伝達に影響を及ぼす。

**３　フードケミカルバイオロジーによる食品因子の潜在的パワーの解明**

緑茶カテキン EGCG の機能性発現に、67LR を起点とするシグナル伝達関連分子（Akt、cGMP、PDE3、PDE5、 PP2A、Sphingosine kinase-1 など）が重要な役割を担っていることを見出した。これら分子の活性制御に基づいた EGCG の生理活性の増強法について紹介する。

**４　食品因子感知力から観る日本食の機能性：食品の組み合わせ効果**

農林水産省・異分野融合研究として進められているプロジェクト「世界の健康に貢献する日本食の科学的・多面的検証」において、生体の食品因子感知力をアップさせる効果が期待できる食品素材や食品因子の組み合わせを明らかにする研究に取り組んでいる。

**５　カテキナイゼーション：カテキン機能を持った抗体の体内誘導**

EGCG は 67LR 分子の特定配列に結合することで、その機能性を発現する。そこで、この EGCG 結合配列を標的とする抗体は 67LR に対して EGCG 様のアゴニスト活性を示すのではないかと考えた。EGCG 結合配列を免疫したマウスでは、移植腫瘍の成長抑制ならびに顕著な延命が観察された。また、免疫マウス由来の血清や脾臓細胞から作成したモノクローナル抗体はいずれも EGCG 様活性（細胞増殖抑制活性ならびに 67LR シグナリングの活性化）を示した。

food factor sensing, functional RNA, food combination

発表責任者：立花宏文（tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp）

講演番号：3SY04-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:00～ C 会場

# 乳酸菌を使った子宮頸がん特異的な免疫療法の開発

# Development of immunotherapy using Lactobacillus-based cervical cancer vaccine

○川名 敬（東京大学医学部）
○Kei Kawana (University of Tokyo)

乳酸菌 Lactobacillus casei は、細胞性免疫を活性化させることが報告されている。乳酸菌食品、乳酸菌製剤等で最もヒトに食されている微生物である。一方、子宮頸がんは国内で年間約 3000 人が死亡する病気で、発がん性ヒトパピローマウイルス（HPV）が原因となっている疾患である。HPV の E7 癌蛋白質は、子宮頸癌の前癌病変から癌形質の維持に必須であり、外来性遺伝子であることから子宮頸癌に対する分子標的治療の良い標的である。そこで、乳酸菌に HPV の E7 分子を発現させた製剤が子宮頸がんに対する特異な免疫誘導の可能性がある。我々は、E7 発現乳酸菌を経口投与して、腸管由来の粘膜リンパ球が子宮頸部病変にホーミングすることを利用したがん免疫療法を考えた。乳酸菌 Lactobacillus casei に E7 を発現させた E7 発現乳酸菌(GLBL101c)を GMP 製造し、前臨床試験としてマウスへの経口投与にて抗 E7 IFNγ産生細胞が誘導されることを確認した。第 I/IIa 相自主臨床研究として、HPV16 型陽性の子宮頸がん前がん病変（CIN3）の 17 例に対して GLBL101c(0.25-1.5 g/日 x20 日)経口投与した。内服後 1 週間の病理学的有効性は、病変退縮率が 70%となった。子宮頸部粘膜リンパ球中の抗 E7 IFNγ産生細胞数が病理学的退縮と相関した。現在、検証的臨床研究として二重盲検ランダム化比較試験を実施している。これらの研究は、乳酸菌を利用した世界初の HPV 標的がん免疫療法になりうる。乳酸菌を応用したがん抗原特異的な治療法の開発の基礎になるかもしれない。

Cervical cancer, Lactobacillus casei, Immunotherapy

発表責任者：川名　敬（kkawana-tky@umin.org）

講演番号：3SY04-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:30～ C 会場

# ヨーグルト発酵を担う 2 種の乳酸菌のゲノム進化と共生関係

# The genome evolution and protocooperation between two lactic acid bacteria in yogurt fermentations

○佐々木 泰子（明治大学農）
○Yasuko Sasaki (Meiji Univ.)

腸内環境を整えるなどによって健康や美容に効果が期待され、かつ食品として美味しいヨーグルトは世界中で食されている。伝統的なヨーグルトは *Lactobacilus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*)と *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*)の 2 種の乳酸菌によって作られる。ヨーグルトの小スプーン一杯、5 グラム中には 10 の 8 乗から 9 乗の生きた菌体が含まれており、大量の生菌体を摂取する点においてヨーグルトは特殊な食品である。近年プロバイオティクスとして種々の機能性ヨーグルトがあるが、機能性を持つ乳酸菌・ビフィズス菌を添加する場合が多く、その土台となるヨーグルトは基本的に上記 2 種の乳酸菌の共生発酵によって作られている。

両菌の共生によって、その発酵速度は数分の 1 に短縮されるほかに、最終到達 pH の低下、代謝変化による特有の揮発成分（芳香化合物）生産の促進、細胞外多糖生産の促進、*S. thermophilus* の著しい菌数増加などが観察される。主要な共生因子として *L. bulgaricus* のカゼイン分解プロテアーゼにより分解されたペプチド・アミノ酸の *S. thermophilus* への供与、*S. thermophilus* から *L. bulgaricus* へのギ酸供与などが報告されている。しかし菌株の組み合わせによって、発酵促進などへの共生の効果は著しく異なり、ヨーグルト発酵における共生の全容解明への道は未だ半ばである。

(1) ゲノム解析より明らかになった共生がもたらす両菌のゲノム縮小という進化：紀元前 5000～6000 年頃からの歴史を持つヨーグルトの発酵を担う 2 種の乳酸菌は、ミルクと言う特殊な環境で共生してきたためにゲノムが独自の変化を遂げてきたことが明らかになってきた：すなわち (i) 両菌ともにゲノムサイズの短縮と偽遺伝子による代謝系の欠落 (ii) グルコースより乳糖を優先する乳糖代謝 (iii) 代謝物のみならず代謝経路共有の可能性 などである。両菌はあたかも 1 つの菌のように振る舞うことが観察され、長い歴史の中でヨーグルト発酵という目的のために選別が繰り返されてきた結果、両菌は「遺伝子操作をしていない天然遺伝子組換え菌」と表現できる。

(2) 共生関係を決定する因子の同定：我々は共生を多数の組合せで検討し、共生がもたらす発酵促進効果に *S. thermophilus* の溶存酸素消費能が大きく関わっていることを見出した。ヨーグルト発酵では当初 7 ppm 程度存在するミルク中の溶存酸素をゼロ近くまで消費してから、急激な酸度上昇が始まる。重要な共生因子である *S. thermophilus* のギ酸を生産する酵素（Pyruvate formate-lyase）が好気条件では不活化するためと考えられる。単菌培養を行うと両菌ともに溶存酸素を消費できることが認められ、*L. bulgaricus* は溶存酸素を過酸化水素に変換・産生し、*S. thermophilus* は過酸化水素を産生しない。そして共生させると溶存酸素消費時に過酸化水素は殆ど産生されない。そこで *S. thermophilus* の主たる溶存酸素消費を担う NADH oxidase のノックアウト株で検討したところ、ヨーグルト発酵は著しく抑制され、*S. thermophilus* の溶存酸素消費能がヨーグルト発酵の共生因子として極めて重要であることが明らかとなった。さらに *S. thermophilus* の urease ノックアウト株を用いた二酸化炭素などの共生因子に関する検討も紹介する。

yogurt, *Lactobacillus bulgaricusi,Streptococcus thermophilus*, NADH oxidase

発表責任者：佐々木泰子（y_sasaki@meiji.ac.jp）

講演番号：3SY04-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:00～ C 会場

# 乳酸菌を利用した皮膚性状改善へのアプローチ

# Two different approaches to the improvement of skin condition using lactic acid bacteria.

○今岡 明美（ヤクルト本社中央研究所）
○Akemi Imaoka (Yakult Central Institute)

乳酸菌を利用して皮膚性状を改善するために、(1)乳酸菌・ビフィズス菌などのプロバイオティクスの摂取による腸内環境の改善を介して皮膚生理へ作用する、(2)発酵により産生される物質を化粧品素材とする、という２つの異なるアプローチを紹介する。

(1)　腸内環境と皮膚生理

腸内細菌の産生する代謝産物（フェノール類）に注目して腸内環境と皮膚生理の関わりが検討されている。食品由来のチロシンを腸内細菌が代謝することによりフェノール類が産生されるが、マウスへのチロシン負荷試験では、腸内容物中、血中のフェノールの増加とともに、皮膚におけるフェノールの蓄積が示された。フェノールを腹腔投与したマウスでは角層細胞のサイズの減少が認められた。また、ヒトでは血清フェノール濃度と角層細胞のサイズに有意な相関が認められた。フェノール類は培養ヒト表皮角化細胞の分化マーカーである K10 の発現を抑制することが明らかになった。以上の結果より、腸内細菌により産生されたフェノール類は皮膚に移行し、皮膚性状を悪化させている可能性が示された。一方、プレ/プロバイオティクスの摂取により、血清中のフェノール濃度の低下とともに、角層水分含量の減少が抑制されることが、プラセボ対照二重盲検試験で明らかになり、腸内環境の改善を介して皮膚性状が正常化されることが示唆された。

さらに、腸内細菌が皮膚のアレルギーや免疫機能に与える影響も示唆されており、プレ/プロバイオティクスの摂取が紫外線暴露後の皮膚における局所の免疫機能を改善することが報告されている。

(2)　発酵産物を利用した化粧品素材開発

乳酸菌を用いた発酵上清が化粧品素材として利用される理由の１つは、角層中の水分保持において重要な役割を担っているアミノ酸、乳酸が含まれるためである。他にも発酵により生成する成分による保湿作用、抗酸化作用等、種々の有効性が報告されている。発酵の特性としては、発酵による効果の増大や、新たな機能付加が挙げられる。例えば、アロエベラを乳酸菌で発酵させたものは、基質単独より保湿効果が高まった。また、ビフィズス菌を用いた発酵豆乳には、未発酵豆乳では認められないヒアルロン酸産生促進作用が認められた。今後も、菌種・菌株と基質の組み合わせおよび培養条件の最適化により、発酵素材の機能性の拡大が期待される。

Skin physiology, Pre/probiotics, Fermented material

発表責任者：今岡明美（akemi-imaoka@yakult.co.jp）

講演番号：3SY04-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:30～ C 会場

# 筋肉の衰えをアミノ酸で防げ

# Amino acid prevents muscle weakening

○小林 久峰 (味の素株式会社)
○Hisamine Kobayashi (Ajinomoto Co., Inc.)

人の体では、加齢によって骨格筋の量が徐々に減少する。この現象はサルコペニアと呼ばれ、ロコモティブシンドロームやフレイルの一要素である。サルコペニアは、筋力や移動能力など身体機能の低下を起こすため、高齢者が要介護となる主な要因となっている。地域在住高齢者の 15~20%がサルコペニアであるとされており、健康寿命の延伸や介護予防の観点で、その予防・改善が重要な課題となっている。また「美」の観点でも美しい身体や姿勢には筋肉・筋力の維持が必要である。

筋肉の減少は、筋タンパク質代謝のうえでは筋タンパク合成量を分解量が上回ることによって起こるが、正常な老化過程で生じるサルコペニアでは、栄養（タンパク質・アミノ酸）摂取に対する筋タンパク質合成反応が加齢に伴い減弱していくことがその原因の一つと考えられる。栄養素として摂取されたタンパク質は一旦分解されアミノ酸となるが、アミノ酸はそれ自身がタンパク質合成の基質となるばかりでなく、タンパク質合成を促進するシグナルともなる。筋タンパク質合成シグナルとしては、ロイシンの働きが知られている。我々は、安定同位体標識アミノ酸を使用したトレーサー実験により、高齢者において必須アミノ酸の摂取が筋タンパク質合成増加のために重要であること。またロイシンを 40%に増量した必須アミノ酸混合物「Amino L40」が効率良く高齢者の筋タンパク質合成を高めることなどを見出した。そして日本人の地域在住のサルコペニア高齢女性を対象とした RCT 試験により、運動と「Amino L40」の組合せにより、筋量、歩行速度、筋力が有意に改善することを確認している。

自治体における健康増進・介護予防事業や、病院・介護施設における「Amino L40」を利用した取組みの最近の成果も合わせて紹介し、古典的なマクロ栄養素であるタンパク質・アミノ酸の機能性と重要性について考察したい。

amino acids, sarcopenia, leucine

発表責任者：小林久峰（hisamine_kobayashi@ajinomoto.com）

講演番号：3SY04-5
講演日時、会場：3 月 29 日 11:00～ C 会場

# 皮膚における様々な遊離 D-アミノ酸の分布と生理機能

# Free D-amino acids as new intrinsic molecules relating to maintenance of cutaneous homeostasis

○東條 洋介（資生堂リサーチセンター）
○Yosuke Tojo (Shiseido research center)

グリシンを除くタンパク質構成アミノ酸はα位に不斉炭素を有する為に鏡像異性体が存在し、D/L 体として区別されている。L-アミノ酸が栄養成分や機能性分子として知られて来た一方で、近年はアミノ酸鏡像異性体分析技術の発展に伴い、遊離 D-アミノ酸の哺乳類における生体内分布や生理機能が明らかになってきた。遊離アミノ酸は哺乳類皮膚においてもバリア機能、保湿、情報伝達等に関与することが報告されているが、鏡像異性体を区別した報告は極めて限定的である。そこで我々は二次元 HPLC システムを基盤としたキラルアミノ酸メタボローム解析を応用し、皮膚中遊離 D/L-アミノ酸含量変化の解明と共に、皮膚における機能解明を目的として検討を行った。

ヒト皮膚におけるキラルアミノ酸メタボローム解析の結果、真皮及び表皮には Asp、Glu、Ala、Ser、Pro の D 体が遊離体として存在することが明らかになった。表皮における D-Ala 含量は、マウスにおいて D-Ala が局在することが報告されている下垂体、肝臓中含量（約 20 nmol/g）と同等の水準であった。そこでヒト表皮角化細胞（hKC）に及ぼす遊離 D-Ala の機能を検討した結果、濃度依存的に hKC のラミニン 332 産生を促進することが明らかになった。ラミニン 332 は表皮と真皮の境界にある基底膜の表皮側との結合に関与し、hKC の正常な分化に必要な因子であることが報告されている。三次元培養皮膚モデルにおいても、D-Ala が基底膜におけるラミニン 332 含量を増加させることを免疫化学染色により確認した。一方、真皮では Asp の%D（D/(D+L)×100）が 2%を超え、皮膚組織において最も高い値であった。そこで遊離 D-Asp が真皮繊維芽細胞に及ぼす影響について検討したところ、I 型コラーゲンの産生を促進し、真皮におけるコラーゲン線維束の形成を促進することが示された。また、ヒドロキシラジカルや過酸化ラジカルによる細胞生存率の低下を抑制する抗酸化作用を有することも示された。これらの D 体の機能は全て、同アミノ酸の L 体には認められないか、より強いものであった。内在性 D-アミノ酸の由来のうち経口摂取の寄与に関する検証では、遊離 D-アミノ酸が特定の発酵食品にサブ mM から mM オーダーで存在することに着目し、健常者を対象に遊離 D-アミノ酸含有食品の継続摂取試験を行った。その結果、2 か月後に角層中遊離 D-アミノ酸含量が有意に増加することが示された。本研究で明らかになった遊離 D-アミノ酸の皮膚における機能や遊離 D-アミノ酸動態は、D-アミノ酸の経口摂取によるスキンケア効果への関与を示唆するものと考えられる。本発表ではこの他、皮膚における遊離 D-アミノ酸に関する最新の研究成果を紹介すると共に、遊離 D-アミノ酸の経口摂取や塗布によるスキンケアへの応用に向けた展望について述べる。

D-amino acid, skin homeostasis, analysis

発表責任者：東條洋介（yousuke.toujo@to.shiseido.co.jp）

講演番号：3SY05-1
講演日時、会場：3 月 29 日 9:05～ F 会場

# 農業や環境保全への応用用途をもつ土壌細菌資源の探索

# Searching for soil bacterial resources to potential application in agriculture and environment conservation

○大塚 重人[1]、スディアナ イマデ[2] ([1]東京大学、[2]インドネシア科学院)
○Shigeto OTSUKA[1], I-Made SUDIANA[2] ([1]Univ. Tokyo, [2]Indonesian Institute of Science)

インドネシアの農耕地土壌から、持続的農業や環境保全型農業への将来的な応用が期待される細菌として、脱窒細菌、根粒細菌、窒素固定／リン酸可溶化／インドール酢酸生産細菌、およびメタン酸化細菌を分離し、その活性を測定した。

１．インドネシアで採取された水田土壌を試料移転に係る協定に基づいて日本に移送し、脱窒細菌を分離した。分離株の大半は、日本などの温帯域からもよく分離される脱窒細菌と共通の属に分類された。しかし、これまで日本の水田からは報告されていない属の脱窒細菌や、これまで脱窒能を持つ個体群が知られていない属に分類される脱窒細菌も得られた。また、既知の脱窒細菌と同属に属しながら、独自の機能遺伝子の系統をもつものも分離された。脱窒率（$NO_3 \rightarrow N_20$ 変換率）はおおむね高く、$N_20 \rightarrow N_2$ 変換率の高い分離株の割合も多かった。

２．インドネシア国内において、土壌およびダイズの根粒から窒素固定細菌を分離し、ダイズ根粒の形成能を試験した。分離株をインドネシアで普及しているダイズ品種 Grobogan へ接種し、根粒の数や重量の測定に加え、Grobogan の生育も試験した。その結果、Grobogan に共生し、良好な生育促進（窒素供給）効果を示す根粒菌株を獲得した。インドネシアにおけるダイズ畑への応用が期待される。なお、これまでダイズ根粒菌として知られていない分類群に属す細菌も得られた。これらの根粒形成能について、現在さらなる試験を行っている。

３．インドネシア国内において、畑地および水田の土壌から、無機リン酸塩（リン酸カルシウムおよびリン酸鉄）を溶解し、かつ有機態リンからリン酸を取り出す細菌を分離した。さらに分離株の中から、窒素固定活性およびインドール酢酸（IAA）生産能をもつ株を選別した。これまでの試験で、これらの窒素固定／リン可給化／IAA 生産細菌の中には、イネの幼植物体に対し生育促進効果を示すものが認められている。

４．インドネシア国内において、水田土壌を接種源としてメタン酸化細菌の集積培養を行い、メタン酸化活性およびメタンモノオキシゲナーゼ遺伝子の存在が認められた培養から、メタン酸化細菌の分離を行った。結果として 2 系統のメタン酸化細菌を獲得した。いずれもトリクロロエチレン分解能を有していた。

Indonesia, soil bacteria, potential application

発表責任者：大塚重人（almond@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY05-2
講演日時、会場：3 月 29 日 9:33～ F 会場

# 家畜プロバイオティクスの分離・機能開発と応用

# Isolation and application of bacteria for the livestock probiotics

○入澤 友啓[1,2] ([1]農大 農 畜、[2]理研 BRC JCM)
○TOMOHIRO IRISAWA[1,2] ([1]Tokyo Univ. of Agricul., [2]RIKEN BRC JCM)

インドネシアは赤道付近に位置する国であり、10,000 以上の島から構成される国である。現在では人口が 2 億 5000 万人を超えており、近年では経済成長も著しい。インドネシアの気候は熱帯雨林気候であることから、世界第二位とも言われる生物多様性を有している。

インドネシアで生産されている家畜として牛、水牛、羊、豚、鶏(地鶏、ブライラー、卵用鶏)、アヒル、馬などがあげられる。その中でも主要な家畜は牛と鶏である。鶏の中でもブロイラーは企業家畜の代表格であり、インドネシア国内で生産されているブロイラーの飼養羽数は東南アジアでも最も多い。これはインドネシアの食文化にも反映されており、鶏を使った多くの料理がある。牛についても肉牛だけでなく乳製品の需要が高まっていることからも東南アジアではトップクラスの飼育数になっている。これらの家畜は今後の人口増加や経済発展に伴い、今後もその需要が高まるものと予想されている。

本プロジェクトにおける我々の目的はインドネシア原産の有用微生物の探索を行い、分離菌株が誰にでもアクセス可能な微生物資源として利用できるように新たに設立された Indonesian Culture Collection (InaCC)に寄託を行うこと、さらには、それらを用いた応用技術の開発の一つとして畜産業への応用として、『乳酸菌の家畜プロバイオティクスへの応用』を行うことである。プロバイオティクスに関する研究はこれまでに多くの研究者によって行われており、その対象も人間に限らず、犬や猫といった愛玩動物や魚など様々な動物が対象となってきている。

家畜の生産現場においては抗生物質の投与による薬剤耐性菌の出現や畜産物中の残留など多くの問題が生じている。我々の生活を豊かにするための家畜が我々の生活を脅かす可能性が出てきている。このような背景からも家畜の疫病に対して薬剤で対抗するのではなく、感染そのものに対しての抵抗性を高める必要性がより一層高まると考えられる。よって、家畜の腸内菌叢の改善し、抗生物質をはじめとする医薬に依存しない家畜の生産を実現するとともに家畜の健康や増産に貢献することが我々の研究グループに期待されることであると考えている。

本研究の対象は牛と鶏(主にブロイラー)を対象とした。試料は牛の場合はルーメンから、鶏の場合は盲腸を採取し、それぞれから嫌気性細菌や乳酸菌の分離を行った。分離菌株のうち嫌気性細菌については分類学的試験を行い、乳酸菌については家畜プロバイオティクスに利用可能な菌株のスクリーニングを行ったので、その結果を紹介する。

livestock, probiotics, Indonesia

発表責任者：入澤　友啓（t3irisaw@nodai.ac.jp）

講演番号：3SY05-3
講演日時、会場：3 月 29 日 10:01～ F 会場

# 大阪大学生物工学国際交流センターの東南アジア諸国との共同研究

Collaborative research with South-East Asia countries of ICBiotech, Osaka Univ

○藤山 和仁（阪大生物工学国際交流セ）
○Kazuhito Fujiyama (Osaka Univ)

大阪大学生物工学国際交流センターは、1978年、拠点大学方式学術交流最初のプログラムの一つとして、タイ国と二国間交流「Agro-industryにおける微生物学」を、続いて他の東南アジア諸国へと交流を拡大し、当センターが拠点大学となり運営した。共同研究は現在も続き、40年の研究実績を有する。日本における研究では、微生物の分離同定、その応用を目指した酵素工学・培養工学などの研究が推進された。

東南アジア諸国の研究レベルが向上し、また生物多様性の概念や知的財産の意識が浸透した結果、これまでとは異なり、MTAや共同研究契約などを交わし、研究を進めるようになってきた。

本発表では、これまで経験してきたいくつかの共同研究の例を挙げながら、理解と誤解が入り混じっている状況で研究が進んでいる（あるいは、進めている）状況を紹介したい。

ASEAN, Biotechunology, Collaborative research

発表責任者：藤山和仁（fujiyama@icb.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3SY05-4
講演日時、会場：3 月 29 日 10:29～ F 会場

# 生物多様性条約と名古屋議定書
# Convention on Biological Diversity and Nagoya Protocol

○須藤 学 (製品評価技術基盤機構)
○Manabu Suto (National Institute of Technology and Evaluation)

１９９３年１２月に発効した生物多様性に関する条約（Convention on Biological Diversity、CBD）は、(1)生物多様性の保全、(2)生物多様性の構成要素の持続可能な利用、(3)遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分を目的とする国際条約で、日本を含むほとんどの国が締結している。CBD 第１５条では、遺伝資源へのアクセスと利益配分（Access to Genetic Resources and Benefit-sharing、ABS）について規定されていて、９回の作業部会を経て、２０１０年に名古屋で開催された第１０回締約国会議（COP-10）で、「生物の多様性に関する条約の遺伝資源の取得の機会及びその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分に関する名古屋議定書」（名古屋議定書）として採択された。その後、議定書の発効要件である締約国数が５０か国に達したため、２０１４年１０月１２日に発効した。

すでに締約国となっている欧州連合（EU）では、利用国措置として名古屋議定書を担保する EU 規則第 511/2014 号が２０１４年に施行され、その実施規則にあたる実施法第 2015/1866 号が２０１５年に施行されている。また、ブラジルは名古屋議定書を締結していないものの、提供国措置としての遺伝財産に関する法律（2015 年 5 月 20 日付法律第 13123 号）が２０１５年に施行されている。

これら名古屋議定書に関連する各国の情報について概説する。

CBD, Nagoya Protocol, ABS

発表責任者：須藤　学（suto-manabu@nite.go.jp）

講演番号：3SY05-5
講演日時、会場：3 月 29 日 10:57～ F 会場

# インドネシア国立微生物資源センターInaCC の概要と期待される役割

# Outlines and the roles of the national microbial resource center of Indonesia, InaCC

○鈴木 健一朗（製品評価技術基盤機構 NBRC）
○Ken-ichiro Suzuki (NBRC, NITE)

近年、生物多様性条約・名古屋議定書（CBD･NP）により、生物遺伝資源に対する主権的権利が国家にあることが認められ、特に高い生物多様性を有する諸国ではその管理と活用が課題となっている。日本は微生物分野において東南アジア諸国と長期にわたり研究者交流が盛んで、多くの成果があげられてきた。しかし、新規に国際的共同研究を開始することはもとより、今までに得られた研究成果及び微生物株の継続的な使用はどのようにしたらよいのか、不安がぬぐえないと言う声をよく聞く。一つには、CBD･NP に対する所轄の部局の指定や国内法規制の遅れがある。一方、現場レベルでは、生物資源を管理する原産国の研究施設と、分類学者をはじめとする生物資源に対する知識を持った人材の不足により、適切な生物資源の管理体制が作れず、アクセスに対して必要以上の規制をかけ、提供国、利用国双方の研究者や産業の活動の障害となっている。われわれは 2011 年よりインドネシアに微生物資源利用の拠点を構築し、利用促進を図るため、2011 年より JICA と JST による SATREPS プロジェクト「生命科学研究及びバイオテクノロジー促進のための国際標準の微生物資源センター構築」を実施してきた。インドネシア側カウンターパートは動植物においてすでに生物資源管理を実施しているインドネシア科学院(LIPI)生物学研究センターを中心にボゴール農科大学、森林研究所(FORDA)、日本側は微生物資源センターInaCC の構築と 5 分野（カビ、酵母、放線菌、細菌、アーキア/ファージ）でのインドネシア由来の有用機能を有する微生物を NBRC が、農林業分野での有用微生物を東大が、畜産業に資するプロバイオティック微生物を理研がそれぞれ分担して共同研究により微生物の探索、分離と分類学、応用研究を実施してコレクションの充実を目指した。その結果、2000 株を超える微生物株を分離･選抜して InaCC に寄託した。InaCC は微生物株を登録、保存し、分譲に供せられるよう文書管理システムを作成し、ISO9001:2008 認証を取得した。微生物を適切に保存･提供できることは、それらの発展的研究や産業化への活用が期待できる。幸い、プロジェクト期間中にインドネシア政府予算で InaCC 専用のビルが建設された。また、LIPI はインドネシアの生物資源管理の Scientific authority とされている。InaCC の事業整備によりインドネシアの微生物資源の法令を遵守したアクセスを可能にし、積極的な利用と国際共同研究を促進することが期待される。さらに留学生が自国の微生物株を材料とした研究にも活用できると考えられる。現在、このスキームを積極的に利用し、実績を上げ、経験を積むことが必要である。プロジェクトは今年度で終了するが、InaCC が発展的に活動を強化していくことが求められている。

biological resource center, Convention on Biological Diversity, microorganisms

発表責任者：鈴木健一朗（suzuki-ken-ichiro@nite.go.jp）

講演番号：3SY06-1
講演日時、会場：3 月 29 日 15:30～ F 会場

# 光アフィニティーラベルにおける光反応性基

# Photophores for photoaffinity labeling

○橋本 誠（北大農）
○Makoto Hashimoto (Hokkaido Univ.)

１９６０年代初めにジアゾケトンを用いて最初の報告がなされた光アフィニティーラベル法は、１）光照射によりクロスリンク可能な反応活性種を発生する前駆体化合物（光反応性基）の開発、２）対象生体高分子に認識される生理活性物質（リガンド）骨格への光反応性基の導入法の開発、３）対象生体高分子とリガンド誘導体の複合体形成後、光照射によるクロスリンク形成法の開発４）光反応性リガンド誘導体とクロスリンクした生体高分子群の効率的解析法の開発　等が同時進行的に検討されることにより、ケミカルバイオロジーの重要な手法の一つとして発展してきた。

このシンポジウムでは、この光アフィニティーラベル法の基礎から実際の創薬現場における応用の最新例までを網羅する事により、有機合成から生体分子解析までを網羅しなくてはならず一見敷居が高いように感じられるこの解析手法に対する理解の一助になればと考え企画したものである。

最初のトピックスでは前項１～３）の歴史的開発過程、最新技術への展開等について述べる。
現在光反応性基としてよく用いられる化合物としては、アリールアジド、ベンゾフェノン、（トリフルオロメチル）フェニルジアジリンの３種が挙げられる。それぞれ光照射により反応性の高い反応活性種を発生するが、その化学的特徴は光アフィニティーラベル実験全体の成否を左右するものとなる事が経験的に知られている。（有機）合成的簡便さもこの実験には重要なファクターの一つとなる事があるが、クロスリンク前後での化学的挙動も重要となることから、その例を挙げながら詳細に説明する予定である。特に合成が他の光反応性基よりも難しいとされているトリフルオロメチルフェニルジアジリンを例に挙げ、その光反応性基骨格形成反応の最新の進歩もあわせて報告する。生理活性物質（リガンド）骨格への導入法としてよく用いられてきた、リガンド骨格内に縮合容易なアミノ基等の官能基を導入した後光反応性基誘導体を縮合する方法のみならず、リガンド骨格中に直接光反応性基を構築する例として、光学活性フェニルアラニン分子中への光反応性基構築を紹介する。
生体高分子–リガンド複合体形成後の光照射によるクロスリンク形成法に関しては、有機光化学で確立している反応形態が実際の光アフィニティーラベルで設定される薄いリガンド濃度による光活性化反応とは異なる場合がある事等を実際の生体高分子でのラベル実験例を紹介する。

これまでクロスリンクした生体高分子を単離するための様々な工夫がされてきたが、近年の質量分析計の進歩は光アフィニティーラベル解析にも大きな影響を与え安定同位体と組み合わせた解析が盛んに行われており、光反応性基内への安定同位体導入法についてもあわせて紹介する。

photoaffinity labeling, photophore, diazirine

発表責任者：橋本　誠（hasimoto@abs.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3SY06-2
講演日時、会場：3 月 29 日 16:05～ F 会場

# 光架橋法による細胞膜透過ペプチドの取込受容体の同定と機序解明

# Identification and functional studies of cellular-uptake receptors for cell-penetrating peptides by photo-crosslinking

○二木 史朗（京大化研）
○Shiroh Futaki (ICR, Kyoto Univ.)

アルギニンに富む細胞膜透過ペプチド(アルギニンペプチド)は薬物送達やタンパク質導入を効率的に実現するツールとして広く利用されている。アルギニンペプチドの膜透過には、エンドサイトーシスが関与することが知られている。この受容体の同定と細胞内への取込機序の解明は、さらに効率的な細胞内送達法の開発につながると期待される。特に、アルギニンペプチドの細胞内移行においては、マクロピノサイトーシスと呼ばれるアクチン駆動性の液相エンドサイトーシスが誘導されることが知られており [1]、これにより細胞内移行が一層促進されることが示唆されている。

我々の研究室では、アルギニンペプチドの細胞内移行機序に関する情報を得ることを目的として、光架橋法を用いて、取込促進受容体の同定を行っている。高い細胞内移行性を示すペプチドの例として、高い細胞内移行性を有するドデカアルギニン(R12)を取り上げ、光反応基として phenylalanine の trifluoromethyl diazirine 誘導体(TmdPhe)[2]、精製用タグとしてビオチンをこれに導入した bio-TfmdPhe-R12 を合成した。bio-TfmdPhe-R12 と相互作用する細胞表面分子を光架橋により捕捉し、peptide mass fingerprint 法で解析した結果、ケモカイン受容体 CXCR4 の内在化に強く関与することが知られている myosin-9 が同定された。そこで CXCR4 が R12 の内在化に関与しているか検討を行った。siRNA で CXCR4 の発現を抑制した細胞では、コントロールと比較し 40%程度 R12 ペプチドの細胞内移行量が減少した。また、CXCR4 と共役する Gi タンパク質のシグナル伝達を阻害すると、R12 ペプチドの細胞内移行量が 30%程度減少した。他のアルギニンペプチドであるオクタアルギニン(R8)や Tat ペプチドではこのような現象は見られなかった。これらのことから、アルギニンペプチドによるマクロピノサイトーシスの誘導には複数の経路が関与しうること、また、R12 はアルギニン残基数の違いに加え CXCR4 を介する取り込み活性化を誘導することで、他のアルギニンペプチドと比較し効率的に細胞内に移行する可能性が示された [3]。

本シンポジウムでは上記の結果に加え、より汎用される膜透過ペプチド、オクタアルギニン (R8)受容体同定の試みについても紹介する。

1) Nakase *et al*., *Acc. Chem. Res*. **2012**, *45*, 1132
2) Nakashima *et al*., *J. Am. Chem. Soc*. **2006**, *128*, 15092
3) Tanaka *et al*., *Chem. Biol*. **2012**, *19*, 1437

cell-penetrating peptide, cellular-uptake receptor, photo-crosslinking

発表責任者：二木史朗（futaki@scl.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3SY06-3
講演日時、会場：3 月 29 日 16:40～ F 会場

# 光ラベル法による同位体蛍光標識導入と標的同定戦略

# Photoaffinity labeling-based target identification with isotope-coded fluorescent tag

○友廣 岳則[1]、森本 正大[1]、畑中 保丸[2]([1]富山大院薬、[2]富山大学副学長)
○Takenori Tomohiro[1], Shota Morimoto[1], Yasumaru Hatanaka[2] ([1]Univ. of Toyama, Grad. Sch. Med. & Pharm. Sci., [2]Univ. of Toyama)

生理活性物質の標的同定法である光アフィニティーラベル法（PAL）は、汎用アフィニティー精製法では困難な相互作用系、例えば低親和性や変性／分解性受容体などに対応可能であり非常に優れた方法である。また相互作用部位近傍を標識することから、標的同定の他に結合構造情報が得られる。しかし、極微量タンパク質／ラベルペプチド操作は極めて煩雑であり、しばしば標的同定／ラベル部位特定は長期化する。最近、我々は同位体と蛍光特性を有する高性能タグ（IsoFT）を光標識することで標的同定効率を向上することに成功した。

用いた光反応基は桂皮酸骨格を有するジアジリン誘導体であり、光クロスリンク反応と光 *E-Z* 異性化により誘導される分子内環化反応を起こす。これを搭載したリガンドプローブは、最初の光照射で標的タンパク質と共有結合でクロスリンクし、次の光照射で蛍光基クマリンに変化する。結果、リガンド分子を切除しつつ相互作用部位近傍に蛍光基を標識する。この光ビオチンプローブを作製し、４種タンパク質混合系および細胞ライセートを用いて、PAL を基盤とする結合タンパク質同定とそのラベル部位特定の解析効率を評価した。

４種タンパク質混合物系では、PAL 消化産物の HPLC において２つのクマリン由来の蛍光ピークが明瞭に観測された。続く各蛍光ピークの ESI-MS では多くの夾雑物が観測されたが、IsoFT は安定同位体を含むため標的 MS ピークは多重化されており、結果、複数ラベルの MS/MS 配列解析およびラベル部位特定を光照射開始より１週間で終了した。次に細胞ライセート中のビオチン結合タンパク質同定を行った。プロテオームではラベルタンパク質量が極端に少ないことから、光切断機能を利用して選択的濃縮した後に消化し、上記 LC-MS/MS 解析を行った。その結果、比較的短期間で複数カルボキシラーゼの同定に成功し、そのラベル部位から酵素のアロステリック構造変化情報が得られた。本法では標的を多重差別化し一気に絞り込むことで、細胞ライセートから極微量ラベルペプチド同定を短期間で特定することに成功した。同じ消化産物のペプチドマスフィンガープリンティング（PMF）解析では膨大な数の候補リストが列挙され標的特定が困難だったことから、プロテオームにおける IsoFT-PAL 標的同定戦略の有効性は明瞭に示された。

photoaffinity labeling, target identification, fluorescence

発表責任者：友廣　岳則（ttomo@pha.u-toyama.ac.jp）

講演番号：3SY06-4
講演日時、会場：3 月 29 日 17:15～ F 会場

# アデノシン $A_{2A}$ 受容体の光アフィニティーラベリング

# Photoaffinity Labeling of adenosine $A_{2A}$ receptor

○村仲 秀幸、百瀬 隆喜、半田 千彰、小澤 基裕、小沢 知永、田中 信之、菊池 伸次（キッセイ薬品工業株式会社）
○Hideyuki Muranaka, Takaki Momose, chiaki Handa, Motoyasu Ozawa, Tomonaga Ozawa, Nobuyuki Tanaka, Shinji Kikuchi (KISSEI Pharmaceutical Co.,LTD)

光アフィニティーラベリング法は、光クロスリンク反応を用いて、タンパク質 - 低分子、タンパク質 - タンパク質間に共有結合を形成させる方法である。近年の質量分析装置の発展により、微量のタンパク質を用いてリガンド結合部位をアミノ酸残基レベルまで同定する事が可能になってきている。

G タンパク質共役受容体（GPCR）は、神経伝達物質やホルモン等のシグナルを細胞外から細胞内に伝達する膜タンパク質であり、医薬品のターゲット分子の約半数を占めるとも言われている。これら GPCR に対し、光アフィニティーラベリング法を用いたリガンド結合部位解析手法が適用できれば有用なドラッグデザインツールとなる。

アデノシン受容体は、アデノシンの持つ様々な生理活性を伝達する GPCR である。これまでに 4 つのサブタイプ($A_1$、$A_{2A}$、$A_{2B}$、$A_3$)が知られており、その中でも脳の線条体に高密度に分布するアデノシン $A_{2A}$ 受容体はパーキンソン病との関連が各種動物モデルで示され、既にアデノシン $A_{2A}$ 受容体アンタゴニストがパーキンソン病治療薬として国内承認されている。その他にもアルツハイマー病などの神経変性疾患や癌免疫療法といった新しい適応への研究が進められている。

我々は、光反応性基としてトリフルオロメチルフェニルジアジリン基を導入した新規アデノシン受容体リガンドを合成し、酵母発現系を用いて調整したアデノシン $A_{2A}$ 受容体との光アフィニティーラベリングを検討した。光照射後のアデノシン $A_{2A}$ 受容体のインタクト MS 解析により、光反応性リガンドのクロスリンクを確認し、酵素消化ペプチド断片の MS/MS 解析によりリガンド結合部位の同定に成功した。光アフィニティーラベリング法の GPCR への適用事例においてアミノ酸残基レベルでの同定例は少なく、本シンポジウムにて我々の検討結果について紹介すると共に、創薬研究における光アフィニティーラベリング法の活用法について議論したい。

Photoaffinity Labeling, Adenosine $A_{2A}$ receptor

発表責任者：村仲　秀幸（hideyuki_muranaka@pharm.kissei.co.jp）

講演番号：3SY06-5
講演日時、会場：3 月 29 日 17:50～ F 会場

# ユニークなリンカーを用いた生物活性物質の標的タンパク質同定法
# Target protein identification of a bioactive small molecule using a unique linker

○高橋 公咲（北大農）
○Kosaku Takahashi (Hokkaido Univ.)

光親和性標識法は，生物活性物質の標的タンパク質を同定する手法として最も良く知られている方法の一つである．その一方で，光親和性標識法で必須な光親和性標識基および検出基の光親和性標識プローブへの導入は，もとの生物活性物質の活性にしばしば影響を与えてしまう事が問題としてあげられる．生物活性物質の修飾を最小限にし，標的タンパク質との親和性が保持されたプローブを用いた標的タンパク質検出法が開発できれば，上述の光親和性標識法の問題点が解決できる．演者らは，本問題点を解決するため，立体障害が少ないアジド基（$N_3$）のみを導入したプローブと標的タンパク質との複合体に対し，末端アルキン，ビオチンおよびベンゾフェノンを有するリンカーをクリック反応および光照射により反応させ，得られたプローブ，リンカーおよび標的タンパク質の 3 者複合体をウェスタンブロットにより検出する方法を考案した（図 1）．植物ホルモンのジャスモン酸生合成酵素の一種であるアレンオキシドシンターゼ（AOS），その阻害剤（プローブ）**1** およびリンカー**2**（図 2）を用いたモデル実験で本方法の有効性が示された．また，新たに末端アルキン，ビオチンおよびアミノ基を有するリンカー**3** を合成し（図 2），AOS と複合体を形成した **1** とのクリック反応後，タンパク質架橋剤により **3** のアミノ基とタンパク質を共有結合させウェスタンブロットすることで AOS の検出に成功した．本方法はリンカー**2** を用いた方法より検出感度に優れていた．

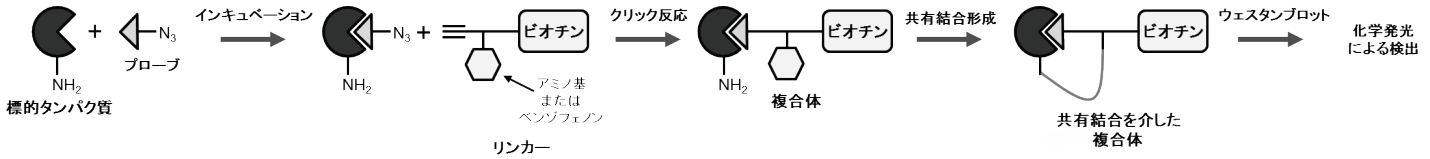



図 1．本標的タンパク質同定法の概略.

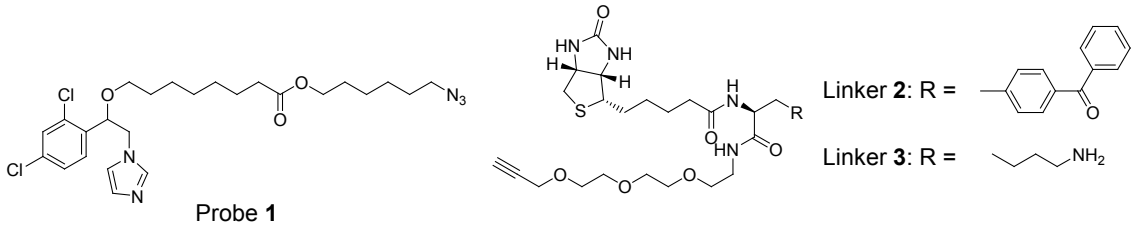



図 2．プローブ **1**，リンカー**2** および **3** の構造.

Target protein, Linker, Western blotting

発表責任者：高橋公咲（kosaku@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3SY07-1
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ E 会場

# 直鎖のアンカー型イソマルトメガロ糖：生産・機能・応用

# Anchor-type linear isomaltomegalosaccharides: productions, functions, and applications

○木村 淳夫（北大農）
○Atsuo Kimura (Hokkaido Univ.)

メガロ糖は『構成単糖の重合度が 10～100（あるいは 200）の糖質』を指す科学用語である。本定義は 1959 年に French ら [1]によって唱えられたが、メガロ糖の生産技術がなく用語自体が忘却された。一方、糖質が示す機能には鎖長依存的な特徴があり、メガロ糖にも優れた性質が予想される。　我々は、デキストラン合成酵素（デキストラン デキストリナーゼ; DDase と略）を用いて直鎖型のイソマルトメガロ糖の生産に初めて成功し（構造は後述）、宿願であった機能解析を行うことができた。今回、本糖質の生産方法・機能解析・応用について報告する。

DDase は、マルトオリゴ糖を供与体および受容体として連続的なグルコース 1 残基転移反応を触媒し、α-1,6 グルコシド結合を形成する [2]。従って、生産されたメガロ糖の非還元末端構造はα-1,6 型となり、還元末端部分はα-1,4 結合から形成される。我々は、本糖質を「直鎖のシングルアンカー型イソマルトメガロ糖（SA-IMS）」と命名し、α-1,6 結合のみからなる直鎖メガロ糖と区別した。すなわち、SA-IMS の「アンカー」はα-1,4 グルコシド結合からなる領域を指す（還元末端に存在するアンカー）。興味深いことに、DDase の C 末端領域の削除体が親酵素より多量の SA-IMS を生産した。本結果は、C 末端領域がメガロ糖生産に関与することを意味する。

SA-IMS は、環境汚染物質である難溶性ベンジル系アゾ色素のエチルレッド（ER と略）を可溶化した [3]。水溶化した ER はアゾ還元酵素 [4]により分解された。一方、β-サイクロデキストリンも ER を可溶化し、その能力は SA-IMS より高かったが、形成された包接構造がアゾ還元酵素の反応を阻害した。SA-IMS にはこのような活性低下が観察されなかった。リアクター [ER・SA-IMS・アゾ還元酵素・$NADH_2^+$（グルコース 1-脱水素酵素で供給）を含む] の活用で ER の連続分解に成功した [3]。従って、アジア諸国で深刻な環境問題となっているアゾ色素汚染を解決できる可能性を得た。

最近、SA-IMS の非還元末端にα-1,4 グルコシド結合からなる糖残基（非還元末端アンカー）を有する「ダブルアンカー型イソマルトメガロ糖（DA-IMS）」の酵素合成に成功した。生産は、SA-IMS に対しサイクロデキストリン グルカノトランスフェラーゼを用いた糖転移反応で行った。DA-IMS のイブプロフェン（難水溶性の消炎鎮痛剤）に対する可溶化能は SA-IMS より高く、DA-IMS を用いた新たな応用にも期待したい。

1) Arch Biochem Biophys 85:452-460, 1959.　2) Biochem Biophys Res Commun 456:500-505, 2015.　3) Bioresour Technol 169:518-524, 2014.　4) Bioresour Technol 150:298-306, 2013.

megalosaccharide, dextran dextrinase, solubilization

発表責任者：木村 淳夫（kimura@abs.agr.hokudai.ac.jp）

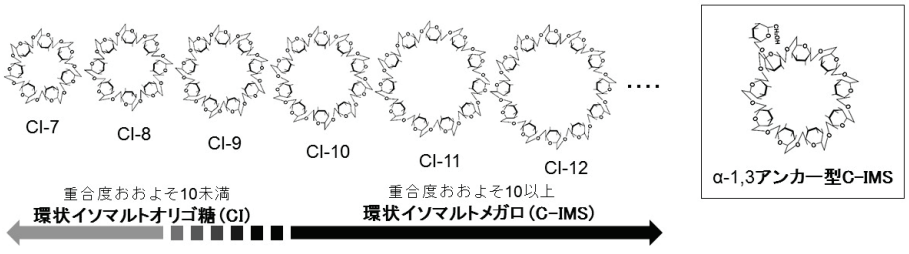
講演番号：3SY07-2
講演日時、会場：3 月 29 日 16:10～ E 会場

# アンカー型環状イソマルトメガロ糖の酵素生産
# Enzymatic production of α-1,3-branched cycloisomaltomegalosaccharides

○舟根 和美（農研機構食総研）
○Kazumi Funane (NFRI, NARO)

環状イソマルトメガロ糖（C-IMS）はグルコース 10 分子以上が α-1,6 結合で環状に連なった構造の環状糖である。これまでにグルコース 17 分子までの C-IMS が構造決定されており、30 分子程度のものまで存在すると示唆されている。C-IMS は *Bacillus circulans* T-3040 株、*Paenibacillus* sp. 598K 株などの細菌がデキストランあるいはでんぷんから環状イソマルトオリゴ糖（CI、グルコース 7、 8、または 9 分子が α-1,6 結合で環状に連なった構造で CI-7、CI-8 および CI-9 と表す）および C-IMS を酵素生産する[1]。デキストラン基質の場合GH66酵素である環状イソマルトオリゴ糖グルカノトランスフェラーゼ(CITase)が、でんぷんが基質の場合は α-1,6 転移活性を持つ GH31 酵素(AGL)および CITase が作用して CI および C-IMS を生成する[2]。CI、C-IMS とも強い抗プラーク作用を有するが、不安定な物質の安定化、難溶性物質の可溶化などの包接作用は CI よりも C-IMS が、さらに α-1,3 分岐が付加したアンカー型 C-IMS が、より強い作用を持つことが示唆された。環状糖のサイズを決定する酵素は CITase であるが、本酵素は CI を主として生産し、C-IMS の生産量は少量である。

*B. circulans* T-3040 株由来の CITase はオリゴ糖である CI-8 を主として生産する。本酵素の結晶構造情報をもとに触媒ドメインに近接する糖結合モジュール 35(BcCBM35-1)および触媒ドメインの一部に変異導入を行い、CI-8 の生産量を抑制し、メガロ糖である CI-10 の生産量を 3 倍以上に高めた変異酵素 Mutant-R (F268V, D469Y, A513V, Y515S)を作製した[3]。CI、C-IMS とも基本的には α-1,6 グルコシド結合のみから成る環状イソマルトオリゴ糖で分岐構造はほとんど無い。これに α-1,3 結合を生成するグルカンスクラーゼおよびスクロースを加えることによりグルコースを α-1,3 結合で C-IMS に導入することができた。以上、α-1,3 アンカー型C-IMSの酵素生産法開発の試みについて紹介する。




図．CI、C-IMS、α-1,3 アンカー型 C-IMS の構造

1) Suzuki R et al., Biochim. Biophys. Acta, **1824**, 919-924 (2012).
2) Funane K et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., **98**, 3947-3954 (2014).
3) Suzuki R et al., Biochem. J., **467**, 259-270 (2015).

cycloisomaltomegalosaccharide, cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase, glucansucrase

発表責任者：舟根和美（funane@affrc.go.jp）

講演番号：3SY07-3
講演日時、会場：3 月 29 日 16:45～ E 会場

# アンカー型イソマルトメガロ糖の分子特性の解析

# Physical properties of linear and cyclic isomaltooligosaccharides in aqueous solution

○北村 進一、鈴木 志保（大阪府大院 応用生命）
○Shinichi Kitamura, Shiho Suzuki (Osaka Prefecture Univ.)

アンカー型イソマルトメガロ糖は、構成糖はグルコースのみであるが、一次構造から直鎖状糖と環状糖の 2 種類に大別される。アンカー型直鎖状イソマルトメガロ糖は、還元末端側にα-(1→4)グリコシド結合からなる 2 から 4 糖程度のマルトオリゴ糖部分を持つイソマルトメガロ糖である。一方、アンカー型環状イソマルトメガロ糖は、α-(1→3)グリコシド結合で分岐したグルコース残基を持つ環状イソマルトメガロ糖である。シンポジウムでは、まず一次構造の特徴について、NMR の分析結果と併せて紹介する。

アンカー部位のない、直鎖状イソマルトオリゴ糖と環状イソマルトオリゴ糖の、水溶液中のコンフォメーションと慣性半径に関しては、固有粘度、SPring-8 における放射光を使った小角 X 線解析、コンピュータシミュレーションにより詳細に解析し、次の結果を得た。イソマルトオリゴ糖のα-(1→6)グリコシド結合は、グルコース残基間に 3 つの回転角を持つため可撓性が大きく、直鎖状糖では重合度 4 以上で、すでにフレキシブルポリマーとしての挙動を示す。環状イソマルトオリゴ糖は、直鎖状のものと比較してコンパクトな構造を持つ。シクロデキストリンがリジッドであるのに対し、ある程度のフレキシビリティーを持ち、慣性半径も少し大きい。またいずれも水への溶解度は高い。

アンカー部位を持つと、イソマルトオリゴ糖鎖の特徴をある程度維持して、特異な分子特性を示す。その端的な例は、フラーレンの水への可溶化の促進である。環状部分が 8 糖からなるアンカー型環状イソマルトメガロ糖(CIb9)は、分岐のないものと比較して約 2 倍その溶解度を増す。これは、明らかにアンカー部位が相互作用に重要な役割を果たしていることを示している。フラーレンとの相互作用を分子動力計算法でシミュレートしたところ、フラーレン一分子に対して、二分子の CIb9 が複合体を形成すること、分岐のないものと比較すると、ファンデルワールス力の寄与が大きいことが示唆された。

現在は、食品に含まれる難溶性の機能性成分、特にフラボノイドの水への可溶化について検討を進めている。ヘスペレチンの可溶性は、アンカー型直鎖状イソマルトメガロ糖を添加することにより、約 2 倍増加すること、アンカー型環状イソマルトメガロ糖の CIb10 では 10 倍以上増加することを、現在までに明らかにしている。このような難溶性化合物の水への可溶化は、バイオアベイラビリティーの面から重要である。いわゆる BCS2 化合物に分類される難水溶性の食品機能性成分や薬剤を、体内へ効率良く吸収促進させる基材として広い応用が期待される。

isomaltooligosaccharide, conformation, physical properties

発表責任者：北村進一（skita@bioinfo.osakafu-u.ac.jp）

講演番号：3SY07-4
講演日時、会場：3 月 29 日 17:20～ E 会場

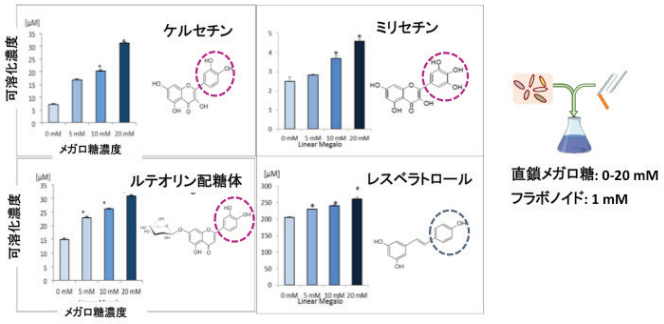
# アンカー型イソマルトメガロ糖の生理作用

# Physiological effects of isomaltomegarosaccharides with an anchor structure

○原 博（北大農）
○HIROSHI HARA (Hokkaido Univ.)

メガロ糖は重合度 10-100 程度、すなわちオリゴ糖と多糖の中間の鎖長を持つ糖質の総称であり、その生理作用は未知である。私どもはα-1.6 結合で D-グルコースが重合したイソマルトメガロ糖を開発し、難溶性のフラボノイドの水溶解度を増加させること、その還元末端にα-1.4 結合からなる D-グルコース鎖の付加がフラボノイド可溶化を促進することを見いだした。これには、柔軟な構造をもつメガロ糖のα-1.6 糖鎖とフラボノイド複合体をα-1.4 鎖（アンカー構造と命名）が安定化させることが寄与すると思われた。そこで、食品中に多数存在するフラボノイドの、直鎖および環状のアンカー型イソマルトメガロ糖による可溶化作用の特異性、ならびにラットを用いたフラボノイドの吸収への影響を検討した。

アンカー型イソマルトメガロ糖による、各種フラボノイド類の可溶化作用は、アグリコンおよびその配糖体に対してみられたが、フラボノイドの種類により違いが見られた。可溶化が強く促進されるフラボノイドは、ケルセチンなど B 環に複数の水酸基を持つものであった。また、直鎖と環状のメガロ糖は同様の特性を示した。フラボノイドと同様、難溶性のポリフェノールであるクルクミンやレスベラトロールに対する、メガロ糖の可溶化能は低かった。麻酔下のラット小腸結紮ループを用いた試験により、ケルセチン配糖体の吸収が直鎖イソマルトメガロ糖添加により大きく促進されるのに対し、イソマルトオリゴ糖の作用は弱かった。この時、小腸管腔内の可溶化ケルセチン量は、イソマルトメガロ糖により増加することが確認された。




**アンカー型直鎖イソマルトメガロ糖のフラボノイド可溶化作用**

特異性：B環に複数水酸基（抗酸化性強）

フラボノイド類には、耐糖能改善作用や末梢血流改善作用、抗動脈硬化作用など様々な生理作用が報告されている。しかし、その吸収率は一般に低く、また食品からの摂取量も少ないため血液中での有効な濃度が得られ難い。アンカー型イソマルトメガロ糖は、これらフラボノイドの持つ様々な生理作用を、その吸収率の向上を介して発現させることが期待される。また本講演では、新たに見いだされたイソマルトメガロ糖の生理作用である、タイトジャンクションを介した腸粘膜バリア機能増強効果を合わせて報告する。

Flavonoid absorption, Intestinal barrier function, non-digestible saccharides

発表責任者：原　　博（hara@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：3SY08-1
講演日時、会場：3 月 29 日 15:35～ B 会場

# 酵母における酸化ストレス下における一酸化窒素の合成機構と生理機能の解析

# Synthetic mechanism and physiological function of nitric oxide in yeast under oxidative stress conditions

○高木 博史（奈良先端大バイオ）
○Hiroshi Takagi (Nara Institute of Science and Technology)

好気性生物は酸素呼吸により効率的にエネルギーを獲得するが、細胞内では活性酸素種（ROS）が発生しやすい。ROS の制御は細胞の生命維持に重要であり、通常は抗酸化酵素や抗酸化物質により ROS を消去しているが、ROS が蓄積し、生育阻害や細胞死を引き起こす状態が「酸化ストレス」である。一方で、酸化ストレスで生成する ROS や活性窒素種（RNS）が、細胞内のシグナル分子として様々な生命現象に関与することが分かってきた。今回、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における ROS・RNS の分子機能や生理的役割に関する知見を紹介するとともに、その産業利用について議論したい。

１）酵母において酸化ストレス下でアルギニンから NO が生成し、細胞を保護することを見出した。

実験室酵母Σ1278b 株において、高温処理（25℃→39℃）のような ROS レベルが上昇する酸化ストレスに伴い、*N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 を介したアルギニン（Arg）合成が亢進されること、増加した Arg から NO が合成されることを見出した。また、NOS 活性依存的に生成する NO が細胞の酸化ストレス耐性に寄与することも判明した。さらに、パン酵母にも同様の機構が存在し、NO 合成系の強化により製パン過程の酸化ストレス（乾燥、冷凍）に対する耐性と発酵力の向上に成功した。

２）酵母においてアルギニンからの NO 合成に関与するタンパク質として Tah18 を同定した。

酵母の推定オキシドレダクターゼ遺伝子のうち、機能未知の遺伝子を発現させた大腸菌の解析から、Tah18 が Arg からの NO 合成（NOS 活性）に関与し、酵母の高温ストレス耐性に寄与することを見出した。Tah18 は Dre2 と複合体を形成し、NADPH の電子を Dre2 に渡すことで細胞質の鉄-硫黄タンパク質生成に関わるジフラビン還元酵素であるが、NO 合成への関与は初めての知見である。

３）酵母における NO の生理機能の一つとして、酸化ストレス耐性に関わる機構を明らかにした。

高温ストレス下で Tah18 依存的に合成される NO が銅代謝に関する転写因子 Mac1 を活性化し、銅の取込み系の亢進を介して銅依存型スーパーオキシドジスムターゼ Sod1 活性を上昇させることで、高温に伴い生成する ROS を除去し、酸化ストレス耐性に寄与することを見出した。

４）酵母においてストレスに応答した NO の合成制御機構と多様な生理機能が明らかになってきた。

Dre2 が Tah18 依存的な NOS 活性を阻害すること、酸化ストレス（高温、過酸化水素）に応答し、Tah18-Dre2 複合体が解離することから、Dre2 による新規な NO 合成制御機構を提唱した。また、Tah18、Dre2 の過剰発現株や発現抑制株、NOS 阻害剤を用いた実験から、過酸化水素存在下で Tah18 依存的に合成される NO がアポトーシス様細胞死を誘導することが示唆された。

yeast, nitric oxide, oxidative stress

発表責任者：高木博史（hiro@bs.naist.jp）

講演番号：3SY08-2
講演日時、会場：3 月 29 日 15:59～ B 会場

# 糸状菌 Aspergillus nidulans の低酸素環境への代謝応答

# Metabolic changes of the fungus Aspergillus nidulans under hypoxic conditions

○高谷 直樹、志水 元亨、桝尾 俊介（筑波大生命環境）
○Naoki Takaya, Motoyuki Shimizu, Shunsuke Mauo (Univ. Tsukuba)

アスペルギルス属の糸状菌は、醸造や有機酸などの工業生産に用いられるものが多く知られており、これらの培養プロセスにおける通気条件の制御は重要であると考えられている。一方、糸状菌が通気（酸素）不足に陥ったときに起こる細胞応答についての多くが未解明であった。そこで、我々は、アスペルギルス属のモデルである Aspergillus nidulans の培養の低酸素条件に対する応答機構を明らかにすることを目的として研究を進めてきた。

最少液体培地中で培養した際のトランスクリプトーム、プロテオーム解析および生化学的解析を行ったところ、生育が制限される 0.1%酸素の低酸素条件にさらされた時に、*A. nidulans* の解糖系の遺伝子の多くが発現上昇することが示されるとともに、最終電子受容体である酸素の不足に伴う NADH:NAD+比の上昇が見られた。また、低酸素条件下では、アルコールおよび乳酸発酵のレベルが高くなるだけでなく、分岐鎖アミノ酸の合成に伴うピルビン酸の還元によって NAD+の再生を亢進することが明らかとなった（分岐鎖アミノ酸発酵）。また、我々が新たに見出した NAD+/NADH hydrolase (NdxA)は、細胞内に蓄積した NADH の濃度を低下させることによって、解糖系の律速酵素であるグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素の NADH による阻害を軽減させていた。即ち、本菌は、複数の機構によって NADH:NAD+比を調節し低酸素環境でのエネルギー/炭素代謝を制御し適応していることが明らかとなった。

上記のオミクス解析などにより、低酸素条件下では、RNA ポリメラーゼ II による転写に関わるタンパク質の転写産物が減少し、mRNA の総量も減少していた。また、酸化傷害を受けた核酸塩基の蓄積量の増加とヌクレオチド生合成系の活性化も観察された。さらに、サーチュインにより抑制されるステリグマトシスチンやペニシリンといった二次代謝産物の生産の脱抑制も観察された。このように、*A. nidulans* は、低酸素環境に対応し多面的に応答・適応していると考えられる。

filamentous fungi, hypoxia, glycolysis

発表責任者：高谷直樹（takaya.naoki.ge@u.tsukuba.ac.jp）

講演番号：3SY08-3
講演日時、会場：3 月 29 日 16:23～ B 会場

# 酸素発生型光合成を行うシアノバクテリア（藍藻）の低酸素適応機構

# Adaptation mechanisms for low oxygen in cyanobacteria

○藤田 祐一 (名大院生命農)
○Yuichi Fujita (Nagoya Univ.)

シアノバクテリア（藍藻、藍色細菌）は、酸素発生型光合成を行う原核生物であり、植物の葉緑体の進化的起源と考えられている。光合成による独立栄養的生育が可能なシアノバクテリアの生育環境は、太陽光が届く地球上のあらゆる環境（海洋、河川、湖沼、陸上、温泉等）に及ぶ。それらの環境には、水田や河口の底、富栄養湖、微生物マットという酸素レベルが低いもしくは嫌気的環境も含まれる。また、シアノバクテリア細胞がおかれた微環境の酸素レベルは、日中は光合成で発生する酸素により過飽和にも達する一方、夜間は共存する従属栄養性微生物や自身の呼吸により嫌気的なレベルまで低下する。すなわちシアノバクテリアは環境において日常的に低酸素環境にさらされている。光合成により酸素を生成することからシアノバクテリアは好気的環境に適応した生物として捉えられてきたため、低酸素への適応機構についての知見はとぼしかった。私たちは、最近、クロロフィルやヘムなどテトラピロール色素生合成系と窒素固定系において、低酸素環境を感知して特定の遺伝子の発現を活性化する２つの転写制御タンパク質 ChlR と CnfR を同定した。

クロロフィル *a* は光合成に必須の色素であり、その生合成系は 15 種類の酵素によって構成される。その前半の９つの酵素群はヘム生合成系と共有され、ヘムの開裂で生じるビリン色素は、集光性色素として光合成に利用される。これらのテトラピロール性色素の生合成系には、反応に酸素を要求する酵素が３つ存在する。このため低酸素や嫌気的環境においてはこれらの酵素反応が滞りクロロフィルやヘムなどのテトラピロール性色素の生合成が停滞し、光合成や呼吸が大きく阻害されることになる。このテトラピロール合成系の低酸素障害を回避するために、シアノバクテリアは、低酸素に応答して、酸素に依存せずに反応を触媒できる嫌気型酵素・低酸素でも作動する低酸素型アイソフォームをコードする遺伝子群の発現を誘導し、低酸素環境においてもテトラピロール色素供給を維持することができる。この低酸素誘導を担う転写活性化タンパク質が ChlR である。

空気中の窒素分子をアンモニアに変換する酵素ニトロゲナーゼは、酸素に脆弱な酵素としてよく知られており、多くのシアノバクテリアはニトロゲナーゼによる窒素固定が可能である。これら窒素固定性シアノバクテリアは、ニトロゲナーゼが作動可能な低酸素条件に限って、ニトロゲナーゼをコードする *nif* 遺伝子群の発現を誘導する。この低酸素に応答した転写活性化を担う転写制御タンパク質が CnfR である。

本講演ではこれら酸素センサー型の転写制御タンパク質の作用と生理学的役割について考察する。

nitrogen fixation, chlorophyll biosynthesis, cyanobacteria

発表責任者：藤田祐一（fujita@agr.nagoya-u.ac.jp）

講演番号：3SY08-4
講演日時、会場：3 月 29 日 16:47～ B 会場

# ニトロ化環状ヌクレオチドによる感染防御機構と細菌由来硫化水素による制御

# Nitrated nucleotide-mediated antibacterial host defense and its regulation by hydrogen sulfide produced by bacteria

○藤井 重元、松永 哲郎、井田 智章、赤池 孝章（東北大医）
○Shigemoto Fujii, Tetsuro Matsunaga, Tomoaki Ida, Takaaki Akaike (Tohoku Univ. Grad. Sch. Med.)

細菌感染によりマクロファージが産生する活性酸素・一酸化窒素（NO）は、感染防御において重要な役割を果たしている。最近我々は、活性酸素と NO に依存して細胞内で生成するニトロ化環状ヌクレオチド 8-ニトロ-cGMP が、タンパク質中のシステイン残基に cGMP を付加する翻訳後修飾（タンパク質 S-グアニル化）を介して酸化ストレス応答やオートファジー誘導などのシグナルとして機能していることを明らかにした。また、チオール基に過剰にイオウ原子が付加したシステインパースルフィドなどの活性イオウ分子が 8-ニトロ-cGMP を分解・代謝し、そのシグナル活性を制御していることを見いだした。一方、サルモネラなどの一部の細菌が産生する硫化水素は 8-ニトロ-cGMP のシグナル活性に影響を与えている可能性が考えられるが、オートファジー制御における活性酸素や活性イオウ分子の役割には不明な点が多く残されている。そこで今回、サルモネラ感染マクロファージのオートファジー誘導における 8-ニトロ-cGMP の役割と、サルモネラが産生する硫化水素が与える影響を解析した。

ネズミチフス菌（*Salmonella* Typhimurium LT2）を感染させたマウスマクロファージ RAW264.7 細胞では、8-ニトロ-cGMP の生成に伴いオートファジーの誘導が観察された。感染細胞内では、菌体タンパク質が著明に S-グアニル化を受けており、免疫細胞染色により、S-グアニル化された菌体とオートファジー関連タンパク質（p62、LC3）との共局在が観察されたことから、S-グアニル化が菌体のオートファゴソームへの選択的取込みに関わることが示唆された。硫化水素産生酵素遺伝子を欠損させたネズミチフス菌株では、野生型菌に比べ、マクロファージ感染後の菌体の S-グアニル化およびオートファゴソームへの菌体の取込みが有意に増加し、菌の増殖は野生型菌に比べ有意に低下した。また、硫化水素ドナーである NaHS を添加すると、硫化水素産生酵素欠損菌株の細胞内増殖は著明に増加した。以上より、8-ニトロ-cGMP は菌体タンパク質の S-グアニル化を介してオートファジーの誘導と細胞内殺菌に関与しており、サルモネラが産生する硫化水素・活性イオウ分子は、8-ニトロ-cGMP を分解し S-グアニル化を低下させることによりオートファジーを抑制し、菌の細胞内増殖に寄与していることが示唆された。

本研究の結果は、硫化水素産生細菌の病原性発現機構の解明、およびオートファジーをもとにした新規抗菌薬剤の開発や治療戦略への応用が期待される。

reactive sulfur species, hydrogen sulfide, 8-nitro-cGMP

発表責任者：藤井重元（sigemoto@med.tohoku.ac.jp）

講演番号：3SY08-5
講演日時、会場：3 月 29 日 17:11～ B 会場

嫌気性菌と酸素
Oxygen and anaerobes
○川崎 信治、岡田 拓也、新村 洋一（東農大バイオ）
○Shinji Kawasaki, Takuya Okada, Youichi Niimura (TUA bio.)

嫌気性菌は古くから「$O_2$ 存在下では生育できない微生物」と解説されることが多い。しかし我々は嫌気性菌の酸素感受性に関する研究を通じて、「$O_2$ 存在下では生育しない」というポジティブな意志を持った生物である印象を強く得てきた。本講演では、クロストリジウム菌やビフィズス菌、乳酸菌など絶対嫌気性から通性嫌気性に分類される細菌が様々な低 $O_2$ 濃度下で見せる生育挙動の紹介と、その解析結果から推定される自然界での姿を考察したい。

**絶対嫌気性菌と $O_2$**

絶対嫌気性菌は活性酸素消去酵素のカタラーゼや SOD を欠如する $O_2$ に弱い生物と考えられていた。代表的な絶対嫌気性菌である *Clostridium* 属のタイプ種である *C. butyricum* を供試菌として、ジャーファーメンターを用いて様々な $O_2$ 濃度下での菌の生育を解析した結果、本菌は $O_2$ の吹き込みにより生育を停止するが、生育を停止している間も積極的に $O_2$ を還元することが判明した。アセトン・ブタノール発酵菌の *C. acetobutylicum* にも優れた $O_2$ 消費能力が存在した。低 $O_2$ 通気後に発現誘導される酵素群の解析を行った結果、NADH:rubredoxin oxidoreductase（NROR）と rubredoxin (Rd) を介して 3 つのタンパク質{A-type flavoprotein-2 (FprA2), desulfoferrodoxin (Dsr), rubrerythrin homolog (Rpr)}が共役し、３つの基質（$O_2$, $O_2^-$, $H_2O_2$）を高速度で同時に還元・無毒化する複合酵素系が同定された。本酵素系の $O_2$ に対する $K_m$ は 3μM 未満と好気性菌に匹敵し、$H_2O_2$ に対する $K_m$ は 1μM 未満であり、既知の分解系の中でも最も反応性に優れる酵素系の１つであることが判明した。現在は $O_2$ 存在下で増殖を停止する分子機構の解析を進めている。

**ビフィズス菌の様々な $O_2$ 濃度下での生育**

1899 年に Tissier によるビフィズス菌の発見以降、単離菌株の多くは大気下でコロニー形成が認められないとの記述がある。そこで我々は 20%以下の様々な低 $O_2$ 濃度下で液体振盪培養を行い生育を観察した。その結果、大部分の株は 5% $O_2$ 以上の濃度下で生育が阻害されたが、1% $O_2$ 下でも生育しない $O_2$ 高感受性株や、20% $O_2$ 下でも生育可能なミツバチ由来の $O_2$ 耐性株、さらには 20% $O_2$ 下で良好に生育するウシ由来の株などが存在した。$O_2$ 感受性～高感受性に分類された株の培養液からは $H_2O_2$ の蓄積が検出された。現在までに $H_2O_2$ 生産に直接関与する２種類の酵素を精製し解析を進めている。これら酵素の $O_2$ 感受性への関与やその役割について考察したい。

Clostridium, Bifidobacterium, anaerobe

発表責任者：川崎信治（kawashin@nodai.ac.jp）

講演番号：3SY08-6
講演日時、会場：3 月 29 日 17:35～ B 会場

# 酸素高親和性呼吸酵素による微生物の環境適応と呼吸防御

# Bacterial environmental adaptation and respiratory protection mediated by high affinity terminal oxidases for aerobic respiration

○新井 博之（東大院・農生科・応生工）
○Hiroyuki Arai (Dept. of Biotechnol., Univ. of Tokyo)

好気呼吸において酸素を水に還元する反応は末端酸化酵素（シトクロム *c* 酸化酵素およびキノール酸化酵素）によって触媒される。一般的に低酸素環境での微好気呼吸によるエネルギー生産には、酸素に対するアフィニティーが高い $cbb_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素や *bd* 型キノール酸化酵素などの「高親和性酵素」が働いている。これらの酵素は nM レベルの酸素に対して活性を示し、酸素をほぼ完全に除去することができるため、活性酸素(ROS)の発生を抑止し、酸化ストレスに対する耐性に寄与したり、酸素感受性酵素を保護したりする役割もあることが知られている。また、抗生物質による殺菌作用は多くの場合、抗生物質の直接の作用ではなく、代謝が低下することで発生する ROS によるものであると考えられている。このため、酸素除去は抗生物質耐性にも寄与している可能性が高い。我々は高親和性酵素によるこれらのストレス耐性効果を「呼吸防御」と名付け、微生物の環境適応や生存戦略の一つと考えている。本講演では、呼吸防御について、いくつかの実例を紹介すると共に、複数の呼吸酵素を使い分けることにより高度な環境適応能力を持つ緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)の呼吸制御システムについて解説する。

日和見感染菌である緑膿菌は高度に分岐した呼吸鎖電子伝達系を持ち、複数の末端酸化酵素を使い分けることで、低酸素もしくは嫌気的環境である感染病巣を含めた様々な環境下で生育することができる。緑膿菌は好気呼吸用の末端酸化酵素として、酸素低親和性の $aa_3$ 型シトクロム *c* 酸化酵素と２種のキノール酸化酵素(*bo*$_3$, CIO)、および、$cbb_3$ 型の高親和性酵素を持っているが、酸素濃度に依らず $cbb_3$ 型酵素が主要に働くという独特な特徴がある。従来、緑膿菌の $cbb_3$ 型酵素は２種類と考えられていたが、我々の最近の発見により、ストレス特異的に発現する新規の主要型イソサブユニットがさらに２種類存在し、他のサブユニットとハイブリッドを形成することで、性質の異なる 16 種類の活性型アイソフォームの発現が可能であることが明らかとなった。一般的に高親和性酵素は低酸素条件特異的に発現し機能するが、緑膿菌では高酸素条件でも $cbb_3$ 型酵素により酸素濃度を下げ、自ら低酸素または還元的環境を作り出している可能性が考えられる。さらに、低酸素環境では性質の異なる複数の $cbb_3$ アイソフォームを使い分けることでストレス耐性化している。これらの機能が本菌の特徴である各種ストレスに対する高い耐性や病原性の大きな要因になっていると予想される。

cytochrome *c* oxidase, quinol oxidase, *Pseudomonas aeruginosa*

発表責任者：新井博之（aharai@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：3SY09-1
講演日時、会場：3 月 29 日 15:33～ C 会場

# 微生物酵素から考える腸内細菌とヒトの共生～ビフィズス菌と母乳オリゴ糖～

# Bifidobacterial enzymes that act on human-derived glycans ~human milk oligosaccharides as the bifidus factor~

○片山 高嶺[1,2] ([1]京大生命、[2]石川県大)
○Takane KATAYAMA[1,2] ([1]Kyoto Univ, [2]Ishikawa Pref. Univ.)

最近、腸内細菌と宿主の共生に関する研究が注目を集めている。腸内細菌と言えば昔はビタミン産生や整腸作用などが知られていただけであったが、現在では免疫・炎症・エネルギー収支の制御にとどまらず、行動や精神疾患との関係も取りざたされている。腸内細菌は宿主にとってもはや一つの器官であると言っても過言ではない。では、何が腸内細菌と宿主の共生を支えているであろうか。従来、腸内細菌は宿主が摂取した食餌成分のうち難消化性の繊維を栄養にして生息していると考えられてきた。最近の研究により、食餌成分が腸内細菌叢の変化に大きな影響を与えていることが確かに明らかとされている。だがそれだけではなく、宿主自体が腸管内に分泌する糖質も重要な因子であるというのが我々の考え方である。それは、特に授乳期（離乳食を経験する前）において言えることである。

ヒトの腸内細菌叢は一生の間で少なからず変動するが、最も大きな変化が見られるのは出生から離乳時にかけてである。母乳栄養児の腸管においては授乳開始後ビフィズス菌が速やかに増殖し優占種となる。このビフィズス菌叢は離乳とともに消失し、成人型の腸内細菌叢が形成される。このことはつまり、人乳（宿主が腸管内に分泌する）中にはビフィズス菌を選択的に増殖させるビフィズス因子が存在することを示唆しており、これはビフィズス菌が発見された当初から言われていたことであった。ビフィズス菌の産生する乳酸や酢酸は、腸内の pH を低下させて有害菌の増殖を防ぐのみならず、これら有機酸は宿主上皮細胞や脂肪細胞の G タンパク質共役型受容体を介して、上述した炎症応答やエネルギー収支を調節する。おそらくヒトは、その乳児期にビフィズス菌と積極的に共生しようとしていると思われる。では、そのビフィズス因子とは何であろうか。

人乳は、ラクトースおよび脂質に次ぐ成分としてオリゴ糖（ここでは重合度 3 以上のものを指し母乳オリゴ糖と総称されている）を含んでいる。前者 2 成分が乳児の栄養源となるのに対し、母乳オリゴ糖は消化酵素に耐性であるために乳児の栄養源とはならない。それにも関わらず母親は乳腺で多量の母乳オリゴ糖を合成して児に与えている。我々は、母乳栄養児の糞便から頻繁に単離されるビフィズス菌種が、この母乳オリゴ糖を分解する酵素群を有していることを見出した。これら酵素群は乳児型ビフィズス菌にのみ存在し、他の腸内細菌には全くと言ってよいほど存在しない。おそらく母乳オリゴ糖はヒト腸管内においてビフィズス因子として機能していると考えられる。本講演では、ビフィズス菌が有する母乳オリゴ糖分解経路について紹介することで、ヒトミルクオリゴ糖のビフィズス因子としての実体に迫りたい。

Symbiosis, Bifidobacteria, Human milk oligosaccharides

発表責任者：片山高嶺（takane@lif.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：3SY09-2
講演日時、会場：3 月 29 日 15:57～ C 会場

# 習慣的多量飲酒と大腸発がんリスク：微生物アルコール代謝から眺めたヒトと腸内細菌の相互作用

# Ecophysiological consequences of habitual heavy drinking on human gut microbiota and bacterial ethanol metabolism

○中山 亨（東北大院工）
○Toru Nakayama (Tohoku Univ.)

疫学的研究により，習慣的多量飲酒と大腸発がんのリスク増大には明確な相関があることが示されている．例えば大腸鏡検査による腺腫や上皮内がんの発見率は，習慣的な多量飲酒家であるアルコール依存症（アルコール使用障害）患者（ア症患者）においてそれぞれ 54%および 6%であり，これらの値は非患者における発見率より格段に高い．飲酒にともなって体内で生成するアセトアルデヒド（AcH）は，国際がん研究機関によってグループ 1 の発がん物質（ヒトに対して確実に発がん性を示す）に分類されている．習慣的多量飲酒がもたらす大腸発がんのリスク増大についても，大腸内で生成する AcH が関わる可能性が推察され，AcH の生成における腸内細菌の関与も指摘されてきた（Seitz & Stickel, 2007）．そこで，習慣的多量飲酒による大腸発がんのリスク増大への AcH や腸内細菌の関わりについての手がかりを得るため，ア症患者と非患者の糞便の菌叢構造を比較した．大腸がんは上皮性の悪性腫瘍であり，大腸粘膜近傍は好気的であるとされていることから（Wilson, 2004），糞便分離微生物のエタノール代謝能を好気的条件下で評価した．

ア症患者群（治療のために来院した断酒後まもない患者 16 名）と非患者群（40 名）の糞便の菌叢構造を，次世代シーケンサーを用いた 16S rDNA アンプリコン解析により比較した．その結果，糞便菌叢の菌種数については両群で有意差が認められなかったが，菌叢構造の個体間多様性はア症患者群で有意に増大していることがわかった．詳細な解析の結果，ア症患者では，大腸内優占種（*Bacteroides* や *Ruminococcus* など）の存在比が有意に減少し稀少菌種の存在比が有意に増大しており，こうした変化がア症患者における糞便菌叢構造の多様性の増大に反映されていると考えられた．一方，当初の予想に反して，患者の糞便中の AcH 濃度は非患者の同濃度よりも有意に低く，またエタノールからの AcH の生成速度も，ア症患者の糞便の方が非患者の値より有意に小さいことがわかった．ア症患者の糞便から 500 以上の嫌気性細菌を分離してそれらの好気的エタノール代謝能を評価したところ，飲酒後の大腸粘膜近傍の好気的条件下で AcH を蓄積する能力をもつ菌種（potential AcH accumulator, PAA）が多数同定され，上述のア症患者の糞便のエタノール代謝能は，糞便中の PAA の存在比に基づいて合理的に説明できた．PAA の多くは偏性嫌気性細菌であることから，PAA によるエタノールからの AcH の生成が PAA の酸化ストレス応答の一環として起こる可能性が考えられた．

【参考文献】Seitz HK, Stickel F. (2007) Nat Rev Cancer 7:599–612 ; Wilson M. (2004) In: Microbial Inhabitants of Humans: Their Ecology and Role in Health and Disease. Cambridge University Press.

gut microbiota, acetaldehyde, ethanol-related colorectal cancer

発表責任者：中山　亨（nakayama@seika.che.tohoku.ac.jp）

講演番号：3SY09-3
講演日時、会場：3 月 29 日 16:21～ C 会場

# 代謝フラックスを基盤とする物質生産法 の開発

# Metabolic Engineering based on Metabolic Flux Analysis and Design

○清水 浩、松田 史生、戸谷 吉博（阪大情報）
○Hiroshi Shimizu, Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya (Osaka Univ.)

微生物の代謝を効率的に改良し、収率や生産速度を向上させていくことが重要であるのは論を待たない。代謝工学においては、細胞内の代謝を多段階反応プロセスとして捉え、細胞内の代謝の流れ（代謝フラックス）を統一的に扱えるよう情報を整理し、「目的物質を高収率で生産可能な代謝経路をデザインできないか？」あるいは、「実際に細胞内で起こっている代謝フラックスを精度よく捉えられないか？」というような問題設定を行い、多くの成果が生まれている。本講演では、我々がこれまでフラックスレベルでの代謝の理解にむけて取り組んできた代謝シミュレーション法および $^{13}C$ 代謝フラックス解析法について述べ、代謝改変への応用例や、得られた知見について紹介するとともに、タンパク質濃度などの定量データとの統合、代謝の可視化やプロセス開発への展開について議論したい。

代謝フラックスバランス（FBA）法では、微生物の代謝を量論的に表現することによって代謝反応を統一的に表現することを可能とした。ここでは、ゲノムスケールの代謝モデル開発とフラックスバランス法に基づく代謝改変法について述べる。代謝改変デザインの実例として、大腸菌の 3 ヒドロキシプロピオン酸生産、シアノバクテリアにおけるエタノール生産において FBA により標的物質の生産性を向上させた結果について述べる。次に、遺伝子操作により代謝改変を実施した場合に細胞が望みのパフォーマンスを発揮できているかを実験的に評価する必要がある。我々は、$^{13}C$ 標識化合物を取り込ませ代謝物質中の $^{13}C$ 標識割合を質量分析法によって解析することで、代謝フラックスを実験的に決定する方法について開発してきた。$^{13}C$ 標識グルコースを取り込ませた培養実験から得られた代謝物質の質量分析データを取得することで、$^{13}C$ 標識割合を最もよく説明する代謝フラックスを自動決定する方法を開発した。大腸菌、枯草菌、出芽酵母、シアノバクテリアなどの実験的代謝フラックス解析とこれに基づく更なる代謝改良戦略立案について述べる。

さらに、我々が最近力を入れている代謝物質の絶対定量濃度決定や定量プロテオミクスについて述べる。これらの分析法の開発により、細胞内の代謝物質濃度やタンパク質量を定量的に取り扱うことができ、$^{13}C$ 代謝フラックス解析のデータと統合することで、熱力学的な解析による代謝反応の実現可能性の解析、トランスオミクス解析などが高精度に行えるようになってきた。今後、動的モデリングを用いた解析を行って、物質生産の収率だけでなく、律速点同定と、その戦略的改良を行うことで、生産性を最大化する方法を開発することが可能となると考えられる。また、代謝活性を可視化し、代謝状態を即時的に捉える方法を開発することで新しいプロセス開発の可能性について議論したい。

metabolic engineering, flux balance analysis, 13C based metabolic flux analysis

発表責任者：清水浩（shimizu@ist.osaka-u.ac.jp）

講演番号：3SY09-4
講演日時、会場：3 月 29 日 16:45～ C 会場

# 合成生物工学の新展開
# Future prospects of synthetic biology

○近藤 昭彦 (神大工)
○Akihiko Kondo (Kobe Univ.)

遺伝子組換え技術を活用して微生物や動物細胞において，有用物質やエネルギーなど多くのものが工業的に生産されてきている．しかしながら，目的物質の生産性を十分なレベルに上げるのに，試行錯誤的に長い研究開発期間と多額の資金が必要な場合が多く，ビジネス的にはニーズがあっても，実際に生産できない物質も多いのが現状である．合成生物学（Synthetic Biology）は，こうした問題を克服し，目的とする高い生産性を短時間で達成すること，さらには生物が今まで生産できないと考えられてきた物質を生産することで，バイオ生産できる物質の範囲を飛躍的に拡張できる技術として期待されている．

合成生物工学による有用物質生産のアプローチは，従来の分子生物学アプローチとは異なる．分子生物学アプローチでは，スクリーニングにより，たとえば新奇な二次代謝産物を作る微生物を発見すると，その化合物を生産する遺伝子クラスターを発見し，クラスター内の各遺伝子の機能を明らかにした上で，生産性を上げるべく，微生物などで遺伝子組換えを行うことになる．すなわち，「発見（Discover）⇒解析（Analysis）⇒設計（Design）⇒組換え（Built）⇒試験（Test)」という流れで開発が進むことになる．人の知恵と経験にたよるアプローチである．一方の合成生物工学アプローチでは，設定する目的物質に対して，データベースや人工代謝設計プログラムを活用して分子パーツをアセンブルして人工遺伝子クラスターを設計し，実際に DNA として合成して微生物などに組み込み，生産性を測定し，得られた結果から機械学習などを活用して改善方策を見つける，ということになる．すなわち，「設計（Design）⇒構築（Built）⇒試験（Test）⇒学習（Learn)」のサイクル（DBTL サイクル）をまわして目的とするシステムを作り上げることになる．コンピュータ支援型のデザインである．近年のバイオ研究により，ゲノムデータベースや酵素データベースなどがさまざまなデータベースの整備が飛躍的に進んだ結果，可能になったアプローチと言える．実際のバイオ生産においては，分子生物学アプローチと合成生物工学アプローチは補完的であり，これらを統合するプラットフォームを作り上げることが重要である．本講演では合成生物工学の未来展望の観点から，先進的で創造的な研究や産業化を目指した取組みを紹介する

synthetic biology, metabolic engineering, biorefinery

発表責任者：近藤昭彦（akondo@kobe-u.ac.jp）

講演番号：3SY09-5
講演日時、会場：3 月 29 日 17:09～ C 会場

# アーキアにおけるアミノ酸生合成関連遺伝子の発現制御機構
# Regulation of genes involved in amino acid biosynthesis in Archaea

○跡見 晴幸[1,2]、金関 剛史[1]、山本 康之[1]、今中 忠行[2,3]、金井 保[1,2] ([1]京大工、[2]JST, CREST、[3]立命館大生命科学)
○Haruyuki Atomi[1,2], Tsuyoshi Kaneseki[1], Yasuyuki Yamamoto[1], Tadayuki Imanaka[2,3], Tamotsu Kanai[1,2] ([1]Kyoto Univ., [2]JST, CREST, [3]Ritsumeikan Univ)

アーキア（Archaea）は系統学的に真核生物（Eucarya）・細菌（Bacteria）とは異なる第３の生物ドメインを構成する。いままでの研究を通じて、アーキアは数多くの特徴的代謝（メタン生成等）や生体分子（イソプレノイド型膜脂質等）を有することがわかってきた。我々は超好熱性アーキアの１種 *Thermococcus kodakarensis* を対象とし、研究を進めている。*T. kodakarensis* は鹿児島県小宝島の硫気孔から単離され、至適生育温度 85˚C、絶対嫌気性、絶対従属栄養性のアーキアである。本菌はゲノム解析が完了し、さらに遺伝子操作系が構築されている数少ない超好熱菌でもある。我々は本菌の特異な代謝機構に興味をもち、その解糖・糖新生、ペントース・核酸代謝、アミノ酸異化代謝・生合成などに関与する酵素の同定を進めてきた。ここでは本菌のアミノ酸生合成に関わる遺伝子の発現制御機構に焦点を当てる。

*T. kodakarensis* において、Trp/Tyr/Phe 生合成を担う遺伝子群は、(i) コリスミ酸合成を担う *aro* operon、(ii) コリスミ酸から Trp への合成を担う *trp* operon、(iii) コリスミ酸から Tyr/Phe への合成を担う *tyr/phe* operon、の３つの operon から構成される。*trp* operon の promoter 領域をプローブとし、特異的に結合する転写制御因子をスクリーニングした結果、TK0271 タンパク質を同定することができた。本タンパク質に対して、EMSA や *in vitro* 転写などの解析を進めた結果、TK0271 タンパク質は *trp* operon の上流領域のみならず、*aro* operon、*tyr/phe* operon の promoter 領域にも結合し、各 operon の転写を活性化することがわかった。また TK0271 タンパク質はこれらの promoter 中に存在する共通配列を特異的に認識して結合することも明らかとなった。興味深いことに、我々は本菌のもう一つの芳香族アミノ酸である His の生合成オペロン(*his* operon)の promoter 領域にも TK0271 が結合する可能性のある配列を発見した。*T. kodakarensis* のゲノム情報から判断すると、本菌の His 生合成経路は Trp/Tyr/Phe の各生合成経路とはオーバーラップしないことが予想されるので、代謝経路の観点からは共通の機構により制御されていることは考えにくい。

本発表では、*T. kodakarensis* の TK0271 タンパク質の機能を中心に、4 種のアミノ酸 Trp、Tyr、Phe、His の生合成に関与する遺伝子の発現（転写）がどのような機構を介して制御されているのかについて報告する。

Archaea, Transcription, Regulation

講演番号：3SY09-6
講演日時、会場：3 月 29 日 17:33～ C 会場

# 発酵生産とトランスポーター：エネルギー生成に共役するトランスポーターを例に
# Transporter Technology for Fermentation: Transporters Coupled with Eneregy Generation

○阿部 敬悦[1,2]、七谷 圭[1] ([1]東北大院農、[2]東北大未来研)
○Keietsu Abe[1,2], Kei Nanatani[1] ([1]Tohoku Univ. Grad. Sch. Agricult. Sci., [2]Tohoku Univ. NICHe)

微生物を用いた物質生産においては、長らく細胞内代謝系の改変により生産性の向上が図られてきた。さらなる生産性の向上や代謝酵素の人為的改変による新規化合物の発酵生産では、代謝反応の初期段階である基質の菌体内への取り込みや最終段階にあたる生産物の菌体外への排出が律速となる事例が増えている。そのため、基質輸送能および産物排出能の強化・改変による生産性の改善が望まれているが、輸送体を制御して物質生産を行うテクノロジーは未だ殆ど実現していない。

我々は方策の一つとして、輸送・排出過程でエネルギーを消費せずにエネルギーを生産しつつ物質生産を高効率に行う代謝系の探索を行い、アスパラギン酸(Asp)：アラニン(Ala)交換系を見出して、生化学的解析から産業応用までを行ってきた[1]。本講演では、発酵生産における輸送体の重要性について概説し、さらに我々が応用を図っている Asp：Ala 交換輸送体 AspT の生化学研究について紹介する。乳酸菌 *Tetragenococcus halophilus* から単離された AspT は、菌体外の Asp を取り込み, Asp の脱炭酸反応によって生じた Ala を菌体外に排出する [2]。AspT は Asp:Ala Exchanger (AAEx) ファミリーと呼ばれる独自ファミリーの最初の事例で、 近年、*Corynebacterium glutamicum* の AAEx ファミリーに属する輸送体 SucE1 が、コハク酸発酵におけるコハク酸排出輸送体であることも明らかにした[3]。これ迄に AspT の構造と基質認識・輸送機構の解析を進めてきた。AspT の輸送解析では、AspT 発現大腸菌の細胞膜より AspT を可溶化・精製を行った後に、精製 AspT を人工膜小胞に再構成し、膜小胞内への放射性基質の取り込みを計測して輸送解析を行った。各種基質アナログの Asp, Ala 輸送反応への阻害様式の解析から、AspT は Asp, Ala に対して独立した結合部位を有することを推論した[4]。我々は、AspT が 10 本の膜貫通領域（TM）を有し、第 3 膜貫通領域が基質透過経路に位置することを生化学的に示したが[5]、蛍光修飾剤を用いた解析から Asp, Ala 結合時には其々異なる基質結合コンフォメーションを取ることが確認され、Kinetics 解析の推論を支持した(under revision)。講演の最後に、これ迄の研究から輸送体の産業応用へ向けた可能性と課題を議論する。

1) 福井啓太, 七谷　圭, 阿部敬悦, 化学と生物 52: 111-118 (2012)
2) Abe K. et al., *J. Bacteriol.*, 184: 2906-2913 (2002)
3) Fukui K. et al., *J. Biotech.* 154: 25-34 (2011)
4) Sasahara A. et al., *J. Biol. Chem.* 286: 29044-29052 (2011)
5) Nanatani K. et al., *J. Bacteriol.* 191: 2122-2132 (2009)

transporter, fermentation

発表責任者：阿部敬悦（kabe@niche.tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY01-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:00～ D 会場

# まだまだ続くルシフェラーゼの産業利用

# Luciferase for industrial use

○五味 恵子（キッコーマン研究開発本部）
○Keiko Gomi (Kikkoman R&D)

ホタルルシフェラーゼは発光反応を行う非常にユニークな酵素であり、レポーターアッセイ等研究ツールとしての利用を始めとして、検査測定分野においても様々な形で活用されている。

我々は、初夏の夜を彩るゲンジホタル、ヘイケホタルの発光器からルシフェラーゼを単離し、遺伝子のクローニングを進め、1980 年代終わりには大腸菌での異種発現に成功した。その結果、組換え発現した酵素を潤沢に利用できるようになったことから、ホタルルシフェラーゼの産業利用について様々な可能性を探ってきた。

ホタルルシフェラーゼが発光反応に必要とする ATP（アデノシン三リン酸）は、地球上の生物がくまなく持つエネルギー物質である。すなわち、動植物や微生物を含む生物由来の多岐にわたる汚れの中には少なからず ATP が残存し､その ATP の存在をホタルルシフェラーゼにより検出することにより、高感度に汚れや残存微生物の存在を検出できることが見出された。我々は、遺伝子組換えにより量産化したホタルルシフェラーゼを用いた ATP 検査の実用化に取り組み、様々な技術開発を経て、事業化に至っている。特に、ATP 関連物質である AMP の測定を可能にする酵素の開発にも成功しており、単なる ATP 検出だけではなしとげることができない高感度測定が可能となっている。現在では、衛生検査、清浄度検査において、ホタルルシフェラーゼを利用した検査キットの活躍の場が拡大している。

本講演では、ATP 検査や、その他ホタルルシフェラーゼ関連製品について、産業利用を進める過程で必要となった弊社の研究開発の一端を紹介する。

Luciferase

発表責任者：五味 恵子（kgomi@mail.kikkoman.co.jp）

講演番号：4SY01-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:30～ D 会場

# 麹菌チロシナーゼを利用した新規染毛料の開発
# The Novel Hair Dyeing Technology by Aspergillus Tyrosinase

○秦 洋二（月桂冠（株）総研）
○Yoji Hata (Gekkeikan Co., Ltd.)

1950 年代に清酒醸造において、酒粕が褐変する「黒粕」現象が問題となり、その原因の究明と発生防止に様々な対策が検討された。その結果、黒粕の原因は麹菌のチロシナーゼによってチロシンが酸化され、最終的に黒色色素のメラニンが生成することが明らかとなった。その後、麹菌のチロシナーゼ遺伝子（*mel0*、*mel1B*）が単離され、メラニンの生成機構の解明がさらに進むようになった。中でも *mel1B* は、麹菌の固体培養特異的に発現し、米麹の褐変や黒粕に直接関与すること示されている。

このように清酒醸造では、チロシナーゼから作られるメラニン色素は、不必要なもので、メラニンの生成を極力抑制するための研究が行われてきたが、異分野ではむしろ必要性が高い物質である場合もある。たとえば、毛髪ケアにおいては、白髪の原因は毛髪内のメラニン量の減少であり、メラニンはむしろ増加させたい物質である。今回は、麹菌のチロシナーゼを用いた新規染毛料の開発について紹介する

毛髪の色素であるメラニンで毛髪を染めることができれば、生体成分と全く同一物質で毛髪を「染める」ことができる。しかし、メラニンは非常に分子量の大きな物質であり、毛髪の内部に浸透させることはできないため、そのまま染料として使用できない。ただし、メラニン合成経路の中間体を用いれば、分子量が小さく、毛髪内部に浸透し、髪の毛を染めることが可能である。そこで、麹菌のチロシナーゼを用いて、染毛力を有するメラニン前駆体のバイオ合成について検討を行った。

染色性を有するメラニン前駆体としては、染色性能や保存安定性などから、5-6 ジヒドキシインドール（DHI）を選択した。また酵素のチロシナーゼについては、*mel1B* 遺伝子を清酒酵母に導入し、チロシナーゼを大量に生産する組換え酵母を反応触媒として利用した。DHI はチロシナーゼの酸化反応によって生成するが、同時にチロシナーゼによってさらに酸化されて、メラニンにまで変換される、極めて不安定な中間体である。これらの酸化反応を DO と pH を適宜制御することによって、不安定な DHI を大量に蓄積する製造プロセスを開発した。DHI は、毛髪に浸透後、その内部で酸化重合して高分子のメラニンになるため、まさしく毛髪内部にメラニンを導入することが可能となった。

メラニン前駆体を使用した染毛試験を行った結果、黒髪に近い色合いになり、肌へのダメージが少ないことが明らかとなった。また市販染毛料より染色性が低いことが、「徐々に染まる」といった新たな白髪染めニーズの発掘にも繋がった。なお本研究は、月桂冠株式会社総合研究所と花王株式会社ビューティーケア研究センターとの共同研究の成果である。

Tyrosinase, Hair dye, Aspergillus oryzae

発表責任者：秦　洋二（y_hata@gekkeikan.co.jp）

講演番号：4SY01-3
講演日時、会場：3 月 30 日 10:00～ D 会場

# 化学産業での酵素の活用
# The Appication of enzyme for Chemical Industry

○水無 渉（三菱レイヨン株式会社）
○Wataru Mizunashi (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.)

酵素反応を化学産業に利用する場合の最大の利点は、温和な条件で副生物の極めて少ない選択性の高い反応が可能になることである。この特長を活かすことで目的とするケミカルスを高効率で環境負荷の少ない合理的なプロセスで合成することが可能となる。

三菱レイヨン（日東化学工業）は、世界に先駆けて 1995 年バイオ法アクリルアミド製法を工業化した。さらに技術ブラッシュアップを進め、プロセスは、省エネ低エネルギーコスト、低廃棄物であることから環境調和型のプロセスとして、アクリルアミド製造法のスタンダード技術として世界中で使用されている。これは、酵素の性能改良と性能改良された酵素の特徴を生かしたプロセス開発によるものと考えている。

本講演では、バイオ法アクリルアミドをはじめとして事業化にまで至らなかったものも含めて、三菱レイヨンの酵素変換技術について紹介して、酵素の産業への活用について議論したい。

enzyme, bioconversion, Nitrile Hydratase

発表責任者：水無　渉（mizunashi_wa@mrc.co.jp）

講演番号：4SY01-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:30～ D 会場

# 飼料用酵素～畜産生産者と持続可能な畜産の為に～

# Feed Enzyme ~For livestock producers and sustainable livestock production~

○ジョーンズ 美幸、齋藤 太郎、小本 勝利 (DSM ニュートリションジャパン（株）)
○Miyuki Jones, Taro Saitoh, Katsutoshi Komoto (DSM Nutrition Japan)

飼料用酵素は、家畜の飼料として使用される飼料原料の栄養素をより効率的に動物に消化・吸収させることを目的に開発、販売されている。動物用飼料に使用されている主要な原料はトウモロコシなどの穀類、食用油の搾り粕である大豆粕やカノーラ粕などの植物である。これらの植物性飼料原料に含まれる栄養成分は豚や鶏といった単胃動物自身が持つ酵素では分解できない成分が含まれている。飼料用酵素はそれらの成分を分解する酵素であり、飼料に添加することで動物が消化・吸収できず体外へ排泄していた栄養素の有効利用に役立っている。

飼料用酵素でもっとも一般的なフィターゼは、飼料原料に含まれるフィチン酸を分解し、リンやその他のミネラルを放出させる。これによって、飼料中に添加する鉱物由来のミネラルの分量を低減でき、畜産生産者にとっては飼料価格の低減、環境中へのリンの排出量が減ることによる環境負荷の低減という利点がある。また、鉱物由来のリンの使用を減少させることにより、鉱物資源の保全にも役立っている。

また、最近注目されている NSP(Non Starch Polysaccharide)分解酵素は、動物の内在性酵素では分解できない植物壁の分解をすることにより、植物壁に囲まれて利用出来なかった、でんぷん質やたんぱく質を動物が栄養として消化吸収することを可能にする。これは、既存の飼料原料を効果的に利用するという利点だけでなく、以前であれば消化率が悪いため利用が難しかった飼料原料を利用しやすくする利点もある。これも畜産生産者にとっては飼料価格の低減という利点となるが、それとともに、より少ない飼料で畜産を営むことができる、あるいは人間の食糧と競合しない飼料を使用できるなど持続可能な畜産にも貢献している。

世界の人口は近年爆発的に増加しており、2050 年までに 90 億人を超えると予測されている。この人口増加や途上国の経済成長により、タンパク質の消費量も年々増加傾向にある。そのような中で、タンパク質の主な供給源となる畜産の生産にかかわる穀物等の生産と人間の食糧となるべき作物の生産が競合する状況が生まれてきつつある。今後、飼料用酵素は畜産の生産者にとって、経済的な恩恵をもたらす製品という側面のみならず、持続可能な畜産にとっても必要不可欠な製品となるものと考えられる。

Feed Enzyme, Livestock, Sustainability

発表責任者：ジョーンズ　美幸（miyuki. jones@dsm.com）

講演番号：4SY01-5
講演日時、会場：3 月 30 日 11:00～ D 会場

# 酵素利用で実現！「見た目」と「軟らかさ」を両立するバリアフリー型介護食品

Development of barrier-free nursing care food with good appearance and softness by enzyme impregnation technology

○柴田 賢哉（広島総研食品工技セ）
○KENYA SHIBATA (Hiroshima Pref. Tech. Res. Ins.)

「酵素」は様々な食品製造に用いられている。酵素は食品成分の分解や結合反応の触媒として働き、例えば調味エキスの製造や、醸造での糖化や液化工程などに利用されている。通常、食材などの固形物を酵素分解するには、予め細断あるいはペースト化し、酵素接触面積を増やして酵素処理する。そのため酵素分解生成物はペースト状や液状であることが多い。

著者らは、酵素を食材に急速含浸して酵素処理する凍結減圧酵素含浸法を開発した。凍結工程と減圧による含浸工程が特徴であることから「凍結含浸法」と呼んでいる（特許第 3686912 号）。本法は、植物素材を酵素処理して単細胞化し、細胞内に栄養素、色素、香気成分等を保持した高品質ペーストを調整する研究の過程で見出した。細断した食材を酵素液中で撹拌すると細胞は遊離したが、水溶性成分が細胞外へ溶出した単細胞残さであった。そこで細断した食材を酵素液中で酵素処理せず、食材に酵素液を含浸し、食材内で酵素処理するように発想を転換した。凍結・解凍は食材組織を緩和させ酵素含浸効率を飛躍的に向上させる。減圧による食材内空気の膨張・収縮が駆動力となり、酵素液が食材中心部まで急速に含浸する。一口サイズの食材では、わずか５分程度で含浸でき、含浸後は食材自体が反応器となり、内部で酵素反応が進行する。

現在、凍結含浸法は「形状保持軟化食品」の製造方法として利用されている。食材の細胞間隙物質や結合繊維物質を分解すると、食材本来の見た目のまま軟化する。軟化度は、食材に含浸する酵素種類や酵素量、酵素反応時間を制御することにより自由に調整できる。ユニバーサルデザインフード（ＵＤＦ）の区分「容易にかめる」、「歯茎でつぶせる」、「舌でつぶせる」への調整にも対応できる。従来から提供されている介護食品は、ミキサー食や刻み食が主であり、「見た目のおいしさ」は失われ、食欲が湧くとは言い難い。長時間の煮込み工程を必要としないため、加熱とは比較にならない軟らかさに調整しても、栄養素は残りやすく、加熱による退色も少なく鮮やかな緑色を保持できる。野菜、肉や魚介にも幅広く対応でき、通常の見た目と変わらない食事、周りの人と同じ見た目の食事である「バリアフリー型介護食品」を提供できる。

凍結含浸法は、酵素利用への着眼と、食材内への酵素含浸発想の組合せでなし得た新技術で、全く新しい食品を提供できる。バリアフリー型介護食品の提供による高齢者のＱＯＬ向上への貢献はもちろん、新規機能性食品、新食感食品の製造技術として、あるいは既存工程の省エネルギー化技術として、食品産業にも貢献できる。

freeze-thaw impregnation, nursing care food, enyzme

発表責任者：柴田賢哉（k-shibata86629@pref.hiroshima.lg.jp）

講演番号：4SY02-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:05～ G 会場

# タウリンの生理作用と産業応用

# Physiological role and industrial application of taurine

○村上 茂（福井県大）
○Shigeru Murakami (Fukui Prefectural Univ.)

タウリンは、硫酸基を有する広義のアミノ酸で、タンパク合成に利用されないことから遊離の形で動物の体内に広く存在し、浸透圧調節、カルシウムイオン調節、膜安定化、抗酸化作用などを介して、細胞の機能調節において重要な役割を担っていると考えられている。タウリンはまた、コレステロールから生成する胆汁酸、炎症細胞が異物排除のために産生する次亜塩素酸、アルコール代謝で生成する酢酸などと結合することにより、生体物質の代謝促進や解毒にも関与している。タウリンの作用の本質は未だ十分に解明されていないが、魚介類に多く含まれることや反応性が低く遊離の形で存在していることから、もともと海に生息する生物が浸透圧調節物質としてタウリンを利用してきた可能性が高い。

日本では、タウリンが添加された栄養ドリンクが OTC 医薬品として販売されてきた。また、医療用医薬品としては、心不全と肝機能改善の効能を有する。タウリン要求性の高いネコでは、タウリン不足により失明や心不全を起こすことが良く知られている。これ以外にも、培養細胞やモデル動物を用いた研究から、タウリンの多彩な薬理作用が報告されている。脂質異常症、糖尿病、肥満、高血圧、脂肪肝、動脈硬化など、近年患者数が急激に増加しているメタボリックシンドロームに対する作用も数多く報告がある[1-3]。最近、皮膚における保湿や紫外線障害抑制作用、筋力低下抑制作用、筋肉疲労や運動能に対する作用など、美容やアンチエイジング領域における作用も明らかになりつつある。体内のタウリン量が低下しているタウリントランスポーターのノックアウトマウスの解析からも、これらの作用が確認されている。このように、タウリンの持つさまざまな作用が明らかになるとともに、医療や水産業などへの産業利用も拡大している。タウリン研究における問題点として、細胞や動物実験に比べ臨床評試験例の少ないことがある。動物で見られるタウリンのさまざまな薬理作用がヒトでも認められるのか、投与量や投与期間を含めヒトでの確認が今後の課題である。

本講演では、タウリンの基本的な生理作用、生活習慣病予防・進展抑制作用を中心とする薬理作用、産業的な応用例について紹介する。

[1] Murakami S, *Amino Acids* 46, 73 (2014)
[2] Imae M, Asano T, Murakami S, *Amino Acids* 46, 81 (2014)
[3] Murakami S, *Mol Nutr Food Res* 59 1353 (2015)

metabolic syndrome, taurine

発表責任者：村上　茂（murakami@fpu.ac.jp）

講演番号：4SY02-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:25～ G 会場

# タウリン欠乏モデルマウスから見たタウリンの生理的役割

# The physiological role of taurine - a study from taurine deficient mouse

○伊藤 崇志（兵庫医療大薬）
○Takashi Ito (Hyogo Univ. Health Sci.)

タウリンは心不全や筋疾患等、様々な疾患に対しての有効性が報告されている。また、多彩な細胞生理活性をもつが、不明な点が多い。一方、タウリンはヒトをはじめ動物の生体内に高濃度に存在する物質であり、生体機能に重要な役割を担うと考えられる。1980 年代にはタウリン合成能がないネコではタウリン欠乏食での飼育が原因で心筋症を引き起こすことが報告され、タウリンの重要性が認識された。我々のグループはタウリンの生体における重要性をより詳細に検討するために、タウリントランスポーター欠損マウス（以下、TauTKO マウス）を作出し、タウリン欠乏の生体への影響を解析してきた。その中で、このマウスは心臓や骨格筋などタウリン生合成能の低い組織においてはタウリンがほとんど欠乏し、心臓においては心室壁の菲薄化や心不全マーカーの発現亢進が認められ、心筋症を呈することが明らかになった。また、運動耐用能の顕著な低下が見られ、骨格筋における筋繊維の異常やエネルギー代謝の変化がその原因であることが明らかになった。また、このマウスには心繊維化や骨格筋老化といった加齢依存的な組織異常が早期に認められ、さらに、寿命が短くなることが分かった。一方で、タウリン欠乏の細胞への影響について分子レベルでの解析を進め、蛋白ホールディング応答やオートファジー、カルシウムハンドリングとの関連が明らかになってきた。本発表ではこれまでに明らかになった TauTKO マウスの表現型をまとめ、また、分子レベルでのタウリン欠乏による生体への影響について最近の知見も含めて紹介したい。

taurine, knockout mouse, aging

発表責任者：伊藤崇志（tito@huhs.ac.jp）

講演番号：4SY02-3
講演日時、会場：3 月 30 日 9:50～ G 会場

# 養魚飼料とタウリン

# Aquaculture feed and taurine

○佐藤 秀一 (海洋大)
○Shuichi Satoh (Tokyo Univ. Marine Sci. & Tech.)

世界的な水産養殖産業の発展に伴い，養魚用飼料の生産が急激に増加した。養魚用飼料の主な原料である魚粉は，現在主に南米のペルーやチリで生産されているが，原料魚であるアンチョビやジャックマッカレルの水揚げ量は資源保護の為に減少しており、魚粉の生産量は期待できず，むしろ減産の方向にある。このように魚粉の需要の拡大と生産量の減少により，魚粉価格が著しく高騰している。これらのことより，魚粉に代わるタンパク質源の探索が急務である。そこで、魚粉を用いない無魚粉飼料を作製し、ニジマスおよびブリに給餌した結果、ニジマスでは魚粉主体飼料と同等の成績を示したが、ブリでは最初の 50 日ほどは魚粉主体飼料と同等の成長を示したがその後は、成長が劣り、緑肝症を示す個体も多数出現した。これは、ブリなどの海水魚ではシステインスルフィン酸脱炭素酵素の働きが弱いため、メチオニン等の含硫アミノ酸をタウリンにできないことが原因であるとが報告された。そこで、濃縮大豆タンパク質を主要な原料とした無魚粉飼料へタウリンを添加した飼料を作製し、ブリに給餌すると魚粉飼料と同様に成長し、緑肝症の発生もみられなかった。一方、濃縮大豆タンパク質は高価な飼料原料なので、一般には養魚飼料には使用できない。そこで、海水魚用飼料において、どのくらいまで、魚粉の配合率を低減できるか、どのくらいからタウリンの添加が必要かについて、ブリ幼魚を用いて試験した。その結果、ブリが活発に摂餌する飼料であれば、魚粉の配合率を 30%まで低減しても、魚粉主体飼料と同様の飼育結果が得られること、また、魚粉の配合率を 20%に低減すると成長が劣るが、魚粉飼料と同じレベルとなるようにタウリンを添加すると魚粉主体飼料と同様の成長を示すことがわかった。このことにより、活発に摂餌し、タウリンを必要量添加した飼料であるならば、魚粉の配合率をさらに低減できることが示唆された。そこで、マダイおよびブリにおいて、摂餌が活発になるように調整した無魚粉飼料を作製し、タウリンを必要量添加すると、魚粉主体飼料と同様の飼育成績が得られた。また、タウリンを添加する必要がないと思われていたニジマスにおいても、タウリンの添加により摂餌が活発になり飼育成績が向上することがわかった。他方、マグロ仔魚においては、ふ化後 10 日目でタウリンの含量がふ化直後の 2%まで、減少することがわかった。その後、タウリンを含んだ他のふ化仔魚を摂餌することにより、タウリン含量が回復した。また、他の海水魚の稚魚においてもタウリンを摂餌することにより行動が活発になることが報告されている。

このように、タウリンは魚類にとってはなくてはならない重要な栄養素であることがわかった。

feed, aquaculture, taurine

発表責任者：佐藤秀一（ssatoh@kaiyodai.ac.jp）

講演番号：4SY02-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:15～ G 会場

# 腸管におけるタウリンの吸収および生理機能

# Absorption and physiological function of taurine in the intestine

○薩 秀夫[1]、清水 誠[2] ([1]前橋工大・工・生物工学、[2]東農大・応用生物科学・栄養科学)
○Hideo Satsu[1], Makoto Shimizu[2] ([1]Maebashi Institute of Technology, [2]Tokyo University of Agriculture)

多彩な生理作用を有することが知られるタウリンは、その供給方法として体内でメチオニンやシステインから生合成される場合と、食品として経口摂取され腸管で吸収される場合がある。しかしながら、乳幼児期などにおいてはタウリンの生合成能は十分ではなく食品からの供給が重要となり、実際母乳には高濃度のタウリンが含まれていることが知られている。その他食品の中では、タウリンはイカやタコ、カキといった魚介類に多く含まれる。食品として摂取されたタウリンは、腸管の最表面に位置する腸管上皮細胞に発現するタウリントランスポーター（TAUT;SLC6A6）によって吸収されると考えられる。そこで演者らは腸管上皮におけるタウリン吸収の特性・制御に注目し、ヒト腸管上皮モデル Caco-2 細胞を用いて解析を進めた。その結果、Caco-2 細胞におけるタウリン取込活性はナトリウム/クロライドイオン共輸送かつβ-アミノ酸特異的であり、これらは他の組織で報告されている TAUT の特性と一致するものであった。また腸管上皮 TAUT は、細胞外タウリン濃度変化や高浸透圧条件、ある種の食品成分によって制御・調節を受けることを明らかにした。さらに TAUT は炎症性サイトカインの一種である TNFαによって制御されることを見出し、タウリンと炎症との関連が推察された。そこで次に、タウリンが腸管に及ぼす影響について検討をすすめることとし、特に腸炎症に対するタウリンの作用を解析した。その結果 Caco-2 細胞にて、炎症ストレス条件下で誘導されるインターロイキン 8（IL-8）の産生をタウリンが抑制すること、また Caco-2 細胞と活性化マクロファージモデル THP-1 細胞との in vitro 腸炎症モデル系においてもタウリンは抗炎症作用を示すことを見出した。そこで実際に、デキストラン硫酸ナトリウム誘導大腸炎モデルマウスにタウリンを前もって投与したところ、体重の減少、結腸の短縮といった大腸炎症状が有意に軽減され、in vivo においてもタウリンの腸炎症予防作用が確認された。そこで、タウリンによる大腸炎予防メカニズムの一端を明らかにするために、DNA マイクロアレイを用いてタウリンが Caco-2 細胞の遺伝子発現全般に及ぼす影響を解析した。その結果、Thioredoxin interacting protein (TXNIP)の mRNA 発現量がタウリンによって顕著に増加した。TXNIP の発現増加はタンパク質レベルでも確認され、またタウリンは TXNIP のプロモーター活性を亢進したことから、タウリンは TXNIP の発現を転写レベルで制御していることが明らかとなった。現在さらに、タウリンによる TXNIP プロモーター制御の詳細について解析を進めている。

taurine, transporter, intestine

発表責任者：薩　秀夫（satsu@maebashi-it.ac.jp）

講演番号：4SY02-5
講演日時、会場：3 月 30 日 10:40～ G 会場

# 運動とタウリン
# Exercise and taurine

○大森 肇（筑波大学体育系）
○Hajime Ohmori (Univ. of Tsukuba)

タウリンは含硫アミノ酸の一つであり、哺乳類の骨格筋をはじめ、心臓、神経細胞、脳、肝臓などに多く存在する。生理作用としては細胞膜の安定化、抗酸化、細胞内カルシウムイオンの恒常性維持、降圧、血糖調節などが知られている。これらの生理作用は運動時にも関わりがあるため、運動とタウリンの関係に浅からぬものがあることが想定されるが、不明な点は多い。本シンポジウムでは、我々のグループの知見を交え、運動とタウリンについて二つの視点から考えてみたい。

一つ目は、運動によりタウリンが体内でどう変化するかという視点である。増えるのか、減るのか？それはどの臓器、組織においてなのか？増加や減少は合成や分解に起因するのか？臓器間の移動なのか？例えば、持久性運動によって、ラット骨格筋のタウリンは減少する（Miyazaki et al., 2004）、ヒトの血漿タウリンと尿排泄量は増加する（Cuisinier et al., 2001）とされている。重要なことは、運動という状況がどのような合目的性を持って、そうした応答をもたらすのかという点である。運動は一種のストレスであり、遂行のエネルギーを必要とする。ストレスや疲労に対する応答として、タウリンが変化する可能性は十分に考えられる。実際、3 日間の連続したサッカーの試合で疲労した若年男性では、唾液タウリン濃度が上昇することが示されている（Ra et al., 2014）。また、このような応答を繰り返した結果、鍛錬者の骨格筋でタウリンが高くなる（Graham et al.,1995）のかもしれない。

二つ目は、運動時の現象がタウリンの摂取によってどう影響されるのかという視点である。例えば、伸張性レジスタンス運動によって遅発性の筋痛・筋損傷が起こるが、BCAA とタウリンの併用摂取によりその程度は減弱し、血清 8-OHdG の上昇は抑制される（Ra et al., 2013）。我々はその機序として、BCAA とタウリンの抗酸化作用が奏功したと考えている。また、長時間運動時に起こる血糖低下がタウリン摂取によって抑制される（石倉ら，2008；小峰ら，2012）。機序として、タウリン摂取による肝糖新生の亢進が想定されるが、脂質代謝との関連も興味深い。

運動による生体応答は一様ではない。運動の種類、様式（連続的、間欠的など）、強度、時間・回数などの違いで一過性の応答は異なる。また運動を慢性的に継続する場合、その頻度、期間はもちろん、トレーニングや脱トレーニング、再トレーニングという局面の違いも考慮に値する。さらに対象の年齢、性別、鍛錬度、疾患の有無・種類など、処方は一筋縄ではいかない。ゆえに運動の状況に応じたきめ細かな検証が必要とされるが、「運動とタウリン」に関して系統的な研究はほとんど行われていない。ヒトにおいても動物においても、多様なニーズに応える精度の高い実験モデルの構築が今後の課題となるであろう。

Exercise, Taurine, Supplementaiton

発表責任者：大森　肇（ohmori@taiiku.tsukuba.ac.jp）

講演番号：4SY02-6
講演日時、会場：3 月 30 日 11:05～ G 会場

# ミトコンドリア病 MELAS に対するタウリン補充療法

# Taurine supplemental therapy for mitochondrial disease MELAS

○砂田 芳秀[1]、太田 成男[2] ([1]川崎医科大学、[2]日本医科大学)
○Yoshihide Sunada[1], Shigeo Ohta[2] ([1]Kawasaki Medical School, [2]Nippon Medical School)

【背景】ミトコンドリア機能の異常に起因する疾患はミトコンドリア病と総称され、エネルギー産生障害による細胞機能不全が多臓器に生じる。なかでもエネルギー需要度の高い脳と筋肉が障害されやすく、ミトコンドリア脳筋症と呼ばれる。MELAS はミトコンドリア脳筋症の中で最も頻度の高い病型で、ミトコンドリア DNA がコードする $tRNA^{Leu(UUR)}$遺伝子の一塩基変異に起因し、脳卒中様発作を反復しながら進行する難病である。MELAS の変異 $tRNA^{Leu(UUR)}$においては翻訳におけるコドン認識に重要な役割を果たすアンチコドンのタウリン修飾が欠損しており、このため蛋白質合成障害が惹起される。そこで高用量のタウリン投与により MELAS の病態が是正されるか検討した。
【方法】不死化 Hela 細胞に MELAS 患者ミトコンドリアを導入したモデル細胞（サイブリッド細胞）にタウリンを添加しミトコンドリア機能（酸素消費量、ミトコンドリア膜電位、酸化還元状態）を解析した。さらに先行臨床研究として 2 例の MELAS 患者にタウリン補充療法（12g/日）を行った。
【結果】タウリン添加により MELAS モデル細胞の酸素消費量とミトコンドリア膜電位は時間依存性、濃度依存性に増加した。また、また、サイブリッド細胞に redox-sensitive GFP 遺伝子を導入し、410 nm と 490 nm における蛍光シグナル比によりミトコンドリアの酸化還元状態を解析したところ、MELAS 細胞ではタウリン添加により酸化ストレス状態から還元状態への変化が示された。2 例の MELAS 患者への高用量タウリン経口投与(12g/日)によって反復していた脳卒中様発作が長期間抑制された。
【結語】タウリンの添加により MELAS モデル細胞のミトコンドリア機能が改善し、タウリン補充療法により MELAS 患者 2 名で脳卒中様発作の再発が長期間にわたり抑制された。こうした研究成果を基盤として 10 症例の MELAS 患者を対象にタウリンの MELAS 脳卒中様発作再発予防の適応拡大を目指す医師主導治験を実施しており、その結果についても紹介する。

mitochondria, taurine, tRNA modification disorder

発表責任者：砂田芳秀（ysunada@med.kawasaki-m.ac.jp）

講演番号：4SY03-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:05～ F 会場

ウイルスから探る生命の起源と初期進化
A Viral approach for Origin and Evolution of Life
○望月 智弘 [1,2] ([1] 東京工業大学・地球生命研究所、[2] 海洋研究開発機構)
○Tomohiro Mochizuki[1,2] ([1]Titech, ELSI, [2]JAMSTEC)

20 世紀後半以降、系統解析法の発展により地球上の全(細胞性)生物は古細菌・細菌・真核生物の３ドメインから成るということが見出され、さらに 80℃以上の高温熱水中から発見された超好熱菌などがその根元近辺に位置することが明らかになるなど、「生命の起源と進化」に関わる多くの重要な知見が得られてきた。しかしながら、３ドメインの全てから発見されており、細胞性生物の少なくとも 10 倍以上存在し、この地球上最大の biological entity と言われるウイルスは、長らくその議論の枠外に追いやられていた。これはウイルスに 16S rRNA のような共通遺伝子が存在しないため、”Universal” Tree of Life（全生命の系統樹)に反映させることができなかったことが最大の要因である。

しかしながら昨今の研究により、その存在が数十億年前の３ドメインの分岐以前の共通祖先時代にまで遡ると推察されるウイルス群が発見されるなど、今世紀に入って以来、ウイルスから生命の起源と初期進化を探る研究が活発化している。例えば、広く受け入れられている RNA ワールド仮説において、DNA を最初に発明したのはウイルスであり、その後細胞性生物がより化学的に安定である DNA をゲノムとして取り込むことにより今日見られる DNA ワールドが形成された、とする説などもその一例である。また、古細菌と細菌の分岐、真核生物の核の起源、線状ゲノムの起源など、これまでは「突然変異の蓄積」で片づけられようとしていた多くの生物進化上の大事件も、ウイルスによる寄与を考慮するとより綺麗に説明できるものが多く存在している。

中でも興味深いのは古細菌に感染するウイルスである。一般的にバクテリオファージと呼ばれる細菌に感染するウイルスの分離株の多くは頭部と尾部から成る構造を有しており、細菌が優占する土壌や水圏表層などの天然環境中でもそのようなウイルス種が圧倒的な割合で優占している。しかしながら、熱水や塩湖に生息する古細菌に感染するウイルスは、レモン型、線形、正多面体、ボトル型、バネ型など、非常に多様な形状特性を有している。また遺伝子配列においても、機能未知遺伝子が大多数を占め、完全に独立した virosphere を構成している。細菌や真核生物に感染するウイルスは既に数千株以上発見されているが、古細菌ウイルスはようやく 100 株近く分離されたに過ぎず、まだまだ完全に未知なウイルス群が多数存在している。

本シンポジウムでは、ウイルスと生命の起源・初期進化に関する説を、演者自身による古細菌ウイルスハンティングの例とともに紹介する。

virus, archaea, origin of life

発表責任者：望月　智弘（tomo.mochiviridae@elsi.jp）

講演番号：4SY03-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:34～ F 会場

# CRISPR の解析に基づくラン藻とファージのせめぎ合い

# Population dynamics of cyanobacteria based on analysis for CRISPR fragments.

○吉田 天士（京大院農）
○Takashi Yoshida (Kyoto Univ.)

バクテリオファージ(以下､ファージ)は､水圏生態系おいて高密度に存在し(粒子密度$10^7$～$10^8$/ml)、極めて大きな遺伝的多様性を含有する生物学的存在である。そのため微生物-ファージ間相互作用は、環境微生物の動態を理解する上で重要な生物現象と認識されるに至っている。

淡水域、特に富栄養化した湖沼では、ラン藻類の大量発生現象であるアオコが世界各地で頻発している。*Microcystis aeruginosa* は主要なアオコ原因ラン藻であり、本種の中にはミクロシスチンという強力な肝臓毒でかつ発癌プロモーター活性を有する毒を産生する株が存在し、水源管理の上で問題となっている。

筆者らは、*M. aeruginosa* に感染するファージ(Ma-LMM01) を世界に先駆け分離し、本ファージが本種の動態に影響を及ぼす可能性を示した。しかしながら、MaLMM01 は宿主域が非常に狭く（１株にのみ感染性を示す)、環境における本種-ファージの相互作用の一端を知るにとどまっていた。そこで本種分離株に対して、CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) を解析した。CRISPR は､原核生物ゲノム上の繰り返し配列であり､ファージ遺伝子の一部配列(スペーサー)を取り込むことでそのファージに対する耐性を付与する。すなわち、スペーサー組成は宿主ゲノム上の「ファージ感染履歴」となる。解析の結果、スペーサー組成は本種株間で大きく異なり、本種アオコは、感受性の異なる複数の種内個体群が共存していることを示した。解析した 1200 以上のスペーサーのごく一部は Ma-LMM01 と相同性を示すものの、大部分（96%）は公開データに相同性を示さなかった。すなわち本種が想像をはるかに超える極めて多様な未知ファージと相互作用していることを示唆している。また、環境 DNA からの本種 CRISPR 配列の超並列解析に基づき次の結論を得た。環境中で偶発的に増加した本種個体群においてまれにファージによる淘汰が生じるらしい。次に新たなスペーサーを獲得し淘汰を回避する株が出現し、新たな個体群として環境で優占する。しかし既存の個体群も完全には淘汰されずに残るため、個体群全体の多様性が維持されている。一方、本種を含む微生物と相互作用するファージとの組み合わせに関する情報は依然として限定的である。また、上記のデータは、微生物とファージとの特異的な感染の組み合わせがより細分化する可能性が示唆しており、多様なファージを特定の微生物株を宿主として分離することは不可能だと予測される。筆者らは環境 DNA からのウイルスゲノムを再構築することでこの課題を克服しようと取り組んでいる。本解析内容についても合わせて論じたい。

cyanobacteria, bacteriophage, CRISPR

発表責任者：吉田天士（yoshiten@kais.kyoto-u.ac.jp）

講演番号：4SY03-3
講演日時、会場：3 月 30 日 10:03～ F 会場

# 遺伝子水平伝播への細胞外プラスミドの寄与の可能性

# Potential contribution of extracellular plasmids to horizontal gene transfer

○高橋 裕里香[1]、中野 椋太[1]、宮西 謙弥[1]、畠 俊郎[2]、西田 洋巳[1]([1]富県大生工科・生工セ、[2]富県大環工科)
○ Yurika TAKAHASHI[1], Ryota NAKANO[1], Kenya MIYANISHI[1], Toshiro HATA[2], Hiromi NISHIDA[1] ([1]Dep. of Biotech. and Biotech. Res. Center, Toyama Prefectural Univ., [2]Dep. of Environ. Eng., Toyama Prefectural Univ.)

プラスミドは細菌の新規形質獲得の大きな原動力となる可動性遺伝因子である。薬剤耐性などの特殊な機能を持つ遺伝情報はプラスミド上にコードされていることが多く、工業的にもプラスミド(ベクター)が遺伝子工学技術に重要な位置を占め、有用物質生産に広く利用されている。

ところで、DNA は細胞外で従来考えられた以上に安定に存在できることが分かってきており、これまでに河川や海水、土壌などの様々な環境における存在量・分子量・半減期が測定されている。また、ある種の細菌は能動的に細胞外に DNA を輸送していること、遺伝情報の保持以外にも栄養源としての役割があることや、バイオフィルム形成の際の足場となること等も報告されており、機能的な細胞外核酸(functional extracellular nucleic acids)という概念は新たな研究分野になりつつある。しかし、機能的細胞外核酸中でプラスミドがどれほど存在しているのかについてはほとんど分かっていない。また、プラスミド研究においても、性繊毛(pili)を介した細胞間接合による水平伝播については詳細な解析が行われてきた一方で、一度細胞外に放出されたプラスミドが自然形質転換等で再び細胞内に取り込まれる機構についてはほとんど研究されていない。

そこで我々は、環境中での細胞外プラスミド DNA の存在量や種類、細胞内プラスミドとの関係を明らかにし、プラスミドを介した遺伝子の水平伝播に細胞外プラスミドがどのように寄与しているのか解析している。

富山湾の海水及び海底堆積物から φ0.2 μm フィルターで細胞を除去し（フィルター付着より細胞収集)、φ0.02 μm フィルターでウィルス粒子を除去して（フィルター付着よりウイルス収集)、細胞外 DNA を精製した（細胞外プラスミド含有画分)。フィルター捕集物より細胞内 DNA、ウィルス DNA も同時に抽出し、得られた各 DNA を全ゲノム増幅し、次世代シーケンサー(MiSeq)で塩基配列を決定した。既知のプラスミド複製制御タンパク質(Rep)のアミノ酸配列に対して検索を行ったところ、それぞれの画分に特有の塩基配列の特徴を明らかにした。さらに、環状 DNA 特異的に増幅された塩基配列についても明らかにした。現在、データ解析を進めており、本講演では、その詳細について報告する。

extracellular DNA, plasmid, Toyama Bay

講演番号：4SY03-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:32～ F 会場

プラスミドの宿主適応とゲノム組成
Plasmid host adaptation and genome signature
○鈴木 治夫 (慶應)
○Haruo Suzuki (Keio Univ.)

細菌間を伝達する染色体外 DNA（プラスミド）は、宿主細菌に薬剤耐性、病原性、難分解性物質分解能などの機能を付与し、遺伝子工学ツールとしても利用されている。細菌におけるプラスミドの重要性を理解し有効活用するためには、プラスミドが過去に滞在してきた宿主と将来伝達する可能性のある宿主を予測することが不可欠である。多様な細菌において、プラスミドと染色体の DNA 配列は、塩基組成（G+C 含量、オリゴヌクレオチド組成、リーディング鎖とラギング鎖の非対称性）が類似する傾向を示すことから、同じ DNA 複製・修復システムを利用することにより、類似の変異圧・選択圧を受けてきたことが示唆された。様々な不和合性グループ（IncA/C、IncF、IncH、IncI、IncN、IncP-1 等）に属するプラスミドのコンプリート配列を比較したところ、同一グループ内のプラスミドに共有された遺伝子群は、プラスミドの複製や接合伝達の機能に関与するものが含まれていた。同じ不和合性グループのプラスミドは、多くの遺伝子を共有しているので、系統的に近縁であることが示唆された一方、異なる不和合性グループのプラスミドは、遺伝子をほとんど共有していないので、系統的に遠縁または独立した起源を持つことが示唆された。同じ不和合性グループに属するプラスミドは、類似の複製装置を持っているので、類似の宿主域に制限されてきた結果として、類似の塩基組成を形成したと考えられた。

**References**

1. Suzuki H, Sota M, Brown CJ, Top EM. "Using Mahalanobis distance to compare genomic signatures between bacterial plasmids and chromosomes", Nucleic Acids Res., vol.36, no.22, pp.e147, Dec 2008
2. Arakawa K, Suzuki H, Tomita M. "Quantitative analysis of replication-related mutation and selection pressures in bacterial chromosomes and plasmids using generalised GC skew index", BMC Genomics, vol.10, pp.640, Dec 2009
3. Suzuki H, Yano H, Brown CJ, Top EM. "Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature", J Bacteriol., vol.192, no.22, pp.6045-6055, Nov 2010
4. Suzuki H, Brown CJ, Top EM. "Genomic Signature Analysis to Predict Plasmid Host Range", Molecular Life Sciences, DOI 10.1007/978-1-4614-6436-5_574-1, Springer Science+Business Media New York 2014

plasmid, host, genome

講演番号：4SY03-5
講演日時、会場：3 月 30 日 11:01～ F 会場

# RNA を介した細菌ゲノムと外来性遺伝因子のクロストーク

# RNA-mediated crosstalk between bacterial genome and foreign genetic elements

○宮腰 昌利（秋田県大生資科）
○Masatoshi Miyakoshi (Akita Pref. Univ.)

細菌のゲノムは数分の一が外来性遺伝子で構成され、遺伝子の再編成や水平伝播によって世代の間にも常に変化を続けている。外来性遺伝子を獲得することで宿主細菌は様々な形質を獲得するが、外来性遺伝子が発現するためには宿主細菌の転写、翻訳装置を利用しなければならない。このとき宿主細菌が本来備えている遺伝子発現制御ネットワークはその中に外来性遺伝子を組み込むだけでなく、外来性遺伝子が持つ制御因子によって改変される。このような外来性遺伝子による発現制御ネットワークの変化について、これまでマイクロアレイや RNA-seq を用いて転写産物の変動が詳細に解析され、転写レベルでの発現制御に注目が集められてきた。最近、外来性遺伝子が制御性 RNA によって転写後レベルで制御され、外来性遺伝子によってもたらされた RNA が宿主遺伝子を制御する例が報告されてきている。本演題では、原核生物における *trans* に作用する RNA による転写後調節機構について概説し、RNA を介した宿主細菌ゲノムと外来性遺伝子の双方向の遺伝子発現制御について、サルモネラ病原性遺伝子の発現制御を例として紹介する。

small RNA, post-transcriptional regulation, Salmonella

発表責任者：宮腰昌利（mmiyakoshi@akita-pu.ac.jp）

講演番号：4SY04-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:00～ A 会場

# 腸管細胞培養系の歴史と課題
# Development of intestinal cell culture system - history and problems

○清水 誠（東農大応生科）
○Makoto Shimizu (Tokyo Univ. Agric.)

食品にいわゆる五大栄養素のみならず、生体調節機能を有する非栄養素成分も含まれることが明らかになってきた 30 年前、この食品機能研究の推進力となった方法論の一つが動物細胞培養であった。各種の培養細胞を用いて免疫・循環・代謝系の調節、抗ガンなどの食品機能研究が始まった。しかし食品成分が直接かつ高濃度で作用し得る腸管上皮細胞を用いた研究は、当時はほとんどなかった。

腸管上皮は、物質吸収・代謝、異物侵入阻止（バリア、）シグナル情報・伝達・応答などの機能を有する重要な組織である。我々は 1980 年代の終盤から、腸管細胞と食品の関わりを調べるべく、小腸上皮細胞の初代培養に挑戦した。しかしその試みは成功せず、その後は主にヒト大腸がん由来の細胞株を用いて研究を進めるざるをえなかった。大腸がん由来とは言え、1974 年に米国で樹立された Caco-2 細胞は、培養すると単層を形成し、各種の小腸上皮機能を発現する。薬学分野では薬剤の腸管透過性の評価に使用されていた経緯があるが、我々はこの細胞を栄養素や食品機能成分の研究に応用しようと考えた。その結果、その後の 20 年余の間に、腸管上皮におけるトランスポーター（吸収機能）、タイトジャンクション（吸収・バリア機能）、解毒酵素（バリア・代謝機能）、炎症反応（シグナル応答機能）の特性や食品成分によるそれらの制御に関する多くの知見を得ることができた[1]。また、これらの研究が食品機能における腸管の重要性を顕在化したことにより、その後多くの研究者が Caco-2 細胞等を用いて研究を展開し、多くの成果を挙げたことは喜ばしいことであった。

しかし研究の過程で腸管株化細胞の限界も明らかになってきた。優れた特性を持つ Caco-2 でさえ、研究室間の特性の違い（Lab-to-Lab difference）、形態の不均一性、発現している分子や機能の限定、機能性発現の維持の難しさなどの課題が見出された。それらを改善するために培養法の改変、他細胞との共培養、遺伝子操作なども試みたものの、Caco-2 細胞を使用して意味のあるデータが出せる場合と出せない場合があることを痛感した。動物胎仔の腸を用いた初代培養なども技術が向上し、以前よりは実用性が増したと思われるが、それでも発現する機能は限定的で、問題は多かった。

そのような中で、腸管オルガノイド培養系が登場した。現在のところ、オルガノイドとして培養した腸管細胞は本来の腸管機能をきちんと発現するものと考えられ、現実の食生活の中で起こっている食品―腸管上皮相互作用を正しく解明する上で強力な武器になると考えられる。現在注目度が急上昇している腸管を作用の場とする機能性食品の開発にも資するところは大きいと期待している。

[1] Shimizu, M. Biosci. Biotechnol. Biochem., 74(2): 232-241(2010)

intestinal cell function, cell culture system, food function

発表責任者：清水　誠（ms205346@nodai.ac.jp）

講演番号：4SY04-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:30～ A 会場

# オルガノイドの培養法とその有用性

# Organoid models and its applications

○粟飯原 永太郎（シンシナティ大学)
○Eitaro Aihara (Univ. of Cincinnati)

オルガノイドは採取した各組織の幹細胞をマトリゲル中で培養した三次元組織構造体の総称であり、マウスのみならずヒトから単離した幹細胞からも作製可能である。またヒト胚性幹細胞やヒト多能性幹細胞を分化誘導して作製もすることができる。現在では、消化管に加えて舌、肝臓、膵臓など、複数の組織の幹細胞からのオルガノイド作製法が確立されている。オルガノイドは培養細胞同様に半永久的に継代が可能であり、研究者間で試料を共有することも容易である。オルガノイドの培養には多様な増殖因子が必要であるが、最近ではそれらを分泌する培養細胞が開発され、これらの馴化培地を代用することでオルガノイドを低コストで維持・培養することが可能となっている。オルガノイドは幹細胞と分化した上皮細胞から成っており、幹細胞の機能および上皮細胞の分化経路を解析することもできる。また各臓器由来のオルガノイドはその臓器特有の分化細胞が得られ、種々の解析実験において in vivo と同等の機能を有することが示されており、発生学や生理学研究に飛躍をもたらすことが期待される。一方、オルガノイドへの細菌感染や遺伝子導入を行うことにより実際の病態に類似した状態を再現することができることや、病態組織から作製したオルガノイドがその状態を反映することなどから、オルガノイドが病態機序の解明に貢献するのみならず薬剤のクスリーニングや臨床診断においても一躍を担うことが期待される。

本講演ではオルガノイド培養法の基本と応用を概説するとともに、オルガノイドの有用性について in vivo と比較しながら幅広く紹介したい。

gastrointestinal epithelial organoids, organoid culture, research applications of organoids

講演番号：4SY04-3
講演日時、会場：3 月 30 日 10:00～ A 会場

# 腸管オルガノイドを用いた腸粘膜上皮セロトニンシステムの解析

# Analysis of serotonin system in the intestinal epithelium using organoid culture system

○園山 慶（北大農）
○Kei Sonoyama (Hokkaido Univ.)

セロトニン（5-hydroxytryptamine, 5-HT）は、腸粘膜上皮細胞の一種である腸クロム親和性（enterochromaffin, EC）細胞が産生・分泌する生理活性アミンであり、消化管運動および水・電解質輸送の調節に機能する。5-HT 利用性は EC 細胞による産生・分泌ならびに 5-HT 輸送体を介した各種細胞内への取り込みにより規定され、また 5-HT の認識は各種細胞の細胞膜受容体によりなされる。消化管におけるこのような 5-HT システムの全貌は明らかではない。我々は現在、腸粘膜上皮細胞のみによって構成される組織構造体である腸管オルガノイドを用い、腸粘膜上皮における 5-HT システムの解析を行っており、本講演ではこれまでに得られた知見を紹介する。

先行研究（Sato *et al.* 2009 *Nature*, Sato *et al.* 2011 *Gastroenterology*, Miyoshi *et al.* 2012 *Science*）を参考にしてマウスの小腸および結腸粘膜の陰窩から作成したオルガノイドは、5-HT 合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase-1（TPH-1）の遺伝子を発現し、5-HT を含有し、カルシウムイオノフォア刺激に対して 5-HT を放出した。5-HT 含量および TPH-1 mRNA レベルは、*in vivo* においては小腸に比して結腸で顕著に高かったが、オルガノイドで差は見られなかった。EC 細胞のマーカーである chromogranin A（CgA）の mRNA レベルも同様の傾向を示したので、オルガノイドの EC 細胞分化が *in vivo* を反映していない可能性がある。オルガノイドにおいて Notch 阻害剤が EC 細胞分化を促進することを確認しているので、このものが 5-HT システムにおよぼす影響を解析中である。一方、5-HT 輸送体遺伝子は *in vivo* と一致してオルガノイドにおいて小腸で高発現していた。また、5-HT 受容体 HTR2A、HTR2B、HTR2C、HTR3A、HTR3B および HTR4 の遺伝子発現を調べたところ、オルガノイドにおいて HTR2A、HTR2B および HTR4 のみが発現しており、*in vivo* においてこれらが上皮細胞で発現することが示唆された。さらに、免疫組織染色により、小腸および結腸に由来するオルガノイドにおいて CgA、5-HT、TPH-1 および HTR2A タンパクが共局在することが明らかとなり、これは EC 細胞において 5-HT が HTR2A を介してオートクラインに作用することを示唆する。一方、HTR2B、HTR4 および 5-HT 輸送体タンパクは、吸収上皮細胞に観察された。

以上のように、腸管オルガノイドは 5-HT システムに関わる分子を発現し、おそらく *in vivo* を反映して 5-HT 産生、分泌、再取り込み、認識を行うと考えられるので、腸粘膜上皮における 5-HT システムの生理的意義および恒常性維持機構の解析に有用な組織モデルとなりうる。

本研究は、内閣府の SIP(戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」 (管理法人：生研センター)により実施されたものです。

Serotonin, Intestine, Organoid

発表責任者：園山慶（ksnym@chem.agr.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY04-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:30～ A 会場

# Enteroid を用いた Paneth 細胞の機能可視化－顆粒分泌・再形成および免疫系クロストーク

# Live imaging of Paneth cell functions using enteroids - granule secretion, granulogenesis and immune crosstalk

○綾部 時芳、横井 友樹、櫻木 直也、中村 公則（北大生命）
○Tokiyoshi Ayabe, Yuki Yokoi, Naoya Sakuragi, Kiminori Nakamura (Hokkaido Univ. Life Sci.)

【背景と目的】腸は病原体をすばやく排除する自然免疫がはたらき、同時に、腸内細菌叢を構成する常在菌と共生することで恒常性を維持している。小腸陰窩基底部に位置する Paneth 細胞は、抗菌ペプチド αディフェンシン（α-defensin）を産生・分泌する。 われわれは、マウスの α-defensin である cryptdin は病原菌を強く殺菌するが、常在菌にはほとんど殺菌活性を示さず、その選択性によって腸内細菌叢を制御することを明らかにしてきた（Masuda K et al., *J Innate Immun* 2011)。また、移植片対宿主病モデルマウスでは Paneth 細胞が傷害され cryptdin 分泌が著しく低下し、菌交代現象で感染死に至ることや、腸炎モデルの IL10 欠損マウスで cryptdin 分泌が低下することを報告した。近年、腸内細菌叢の構成異常（dysbiosis)と炎症性腸疾患、肥満症、癌など様々な疾病との関与が知られている。Paneth 細胞の分泌機能は疾病と深く関わることが推測されるが、顆粒分泌の機序は未だ不明である。本研究は、マウス小腸 organoid (enteroid)を用いて、陰窩様構造基底部の Paneth 細胞に注目し、顆粒分泌反応を可視化することによって分泌機能の機序に迫ることを目的とした。【方法】C57BL/6 マウスの空腸近位部 10 cm を摘出し、30 mM EDTA 含有培地中で振動を加えて得た小腸陰窩画分を Matrigel で包埋し、EGF、Noggin、R-spondin 1 を含む培地にて enteroid を培養した。コリン作動性刺激である carbachol (CCh)および IFN-γ刺激等による enteroid の Paneth 細胞顆粒分泌反応について、共焦点レーザー顕微鏡を用いて time-lapse 観察を行った。Enteroid を抗 cryptdin-1 抗体、抗 E-cadherin 抗体を用いて蛍光免疫二重染色を行った。【結果】 播種した陰窩は 1 時間以内に円形となり、2 日目に陰窩様構造が出芽して 4 日目には陰窩・絨毛様構造を有する enteroid を形成した。陰窩様構造の基底部に cryptdin-1 陽性の顆粒を有する Paneth 細胞を確認した。Paneth 細胞の顆粒分泌を time-lapse 解析したところ、CCh を加えると、すみやかに内腔側への顆粒分泌が始まり、12 分ほどで順次ほとんどの顆粒が分泌された。さらに、分泌後の Paneth 細胞の形態変化を追跡し、顆粒再形成を確認した。一方、IFN-γを加えると、これより長い時間経過後に Paneth 細胞の顆粒全体が内腔に放出された。免疫染色法で、CCh による顆粒分泌後の enteroid では陰窩様構造に cryptdin-1 はほとんど発現を認めなかった。本研究により、enteroid の Paneth 細胞は、分泌誘導刺激によって、分泌までの時間および分泌様式という点で異なる顆粒分泌反応を示すことが明らかとなった。腸内細菌、食品成分や病原体および Paneth 細胞が担う腸管機能によって規定される“腸内環境”という視点から、α-defensin 分泌現象と様々な疾病との関係、延いては疾病の機序に迫りたい。

enteroid, Paneth cell, secretion

発表責任者：綾部時芳（ayabe@sci.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY04-5
講演日時、会場：3 月 30 日 11:00～ A 会場

# オルガノイド培養系を用いた味蕾および消化管の機能解析

# Functional analysis of taste and gastrointestinal cells using organoid culture system

○岩槻 健[1]、大木 淳子[1]、熊木 竣佑[1]、山根 拓実[1]、Jiang Peihua[2]、大石 祐一[1] ([1]東農大、[2]モネル化学感覚研)
○Ken Iwatsuki[1], Junko Ohki[1], Shunsuke Kumaki[1], Takumi Yamane[1], Peihua Jiang[2], Yuichi Oishi[1] ([1]Tokyo Univ. Agri., [2]Monell Center)

消化管上皮細胞と口腔内味蕾細胞は、いずれも内胚葉由来の上皮細胞である。これまでの研究から、消化管に存在する内分泌細胞と口腔内の味細胞には味覚受容体および共通のシグナル伝達分子が発現している事が報告されており、これらの細胞では味および栄養素を感知するメカニズムは同じであると予想されている。しかしながら、消化管では内分泌細胞以外の細胞にも味覚関連分子を発現している事が我々や他のグループが明らかにしており、消化管には少なくとも２種類の味細胞様細胞が存在すると考えられる［１］。本研究では、これらの細胞がどの味・栄養素を受容し、どのような方法でそれら栄養素の情報を中枢に伝えるのかなどの基礎的情報を明らかにする事を目的としている。

消化管や味細胞の研究の難しさは、in vitro培養系が限られている事にある。最近になり、消化管幹細胞が特定され、続いて消化管幹細胞の三次元幹細胞培養系（オルガノイド培養法）が開発されたことで、これまで困難であったin vitroにおける消化管および味蕾機能の解析が可能となった。我々は、先行研究を参考にオルガノイド培養系を導入し、消化管および味蕾オルガノイドの作製を行なっている。免疫組織化学染色や遺伝子発現解析により、これら作製したオルガノイドでは元組織のマーカー分子を忠実に発現している事が分かり、生体組織モデルとして利用できると判断した。

そこで我々は、消化管オルガノイドにおいて生体組織と同様に２種類の味細胞様細胞が存在するかを調べた。その結果、これまで報告されてきたように甘味・うま味受容体を発現する内分泌細胞と、その性質が未だ不明のブラッシュ細胞を同定した。興味深い事に、それぞれが別の味覚受容関連分子を発現しており、細胞形態も異なる事から、それぞれ全く異なる栄養素を受容する感覚受容細胞であると推察される。現在、これらの細胞が蛍光標識されているトランスジェニックマウスを用いて腸管オルガノイドを作製し、in vitroにおいて機能アッセイができるかを検討中である。

本シンポジウムでは、上記の腸管における味細胞様細胞の解析に加え、味蕾オルガノイドの作製と機能解析についても紹介したい。

［１］ Iwatsuki K and Torii K. ***Current Opinion in Endocrinology and Diabetes***, 19, 19-25 (2012)

Organoid, Intestine, Taste

発表責任者：岩槻　健（ki204886@nodai.ac.jp）

講演番号：4SY05-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:03～ E 会場

# 放線菌のもつ二次代謝産物生合成に関わる新規亜硝酸生合成経路

# Novel nitrous acid biosynthesis pathway involved in secondary metabolism in actinomycetes

○勝山 陽平、大西 康夫（東大院）
○Yohei Katsuyama, Yasuo Ohnishi (The University of Tokyo)

窒素-窒素（N-N）結合を持つ化合物は自然界より 200 種類以上単離されており、重要な化合物群である[1]。多くの研究者がその生合成経路の解明を試みたが、N-N 結合の形成機構が明らかとなった例はない。そこで我々は N-N 結合の中でも、ジアゾ基を持つ化合物の生合成経路の解明を目指した。ジアゾ基を持つ天然物の中でも最も構造が単純な *Streptomyces cremeus* の生産する cremeomycin[2]に着目し研究を行った（図 A)。Cremeomycin 生合成遺伝子クラスターをクローニングし、その解析を行った結果、cremeomycin は図 A に示した経路で生合成されることが明らかとなった[3]。この生合成経路において、ジアゾ基は亜硝酸が 3-amino-2-hydroxy-4-methoxybenzoic acid のアミノ基と反応することで形成される。この亜硝酸は 2 つの酵素（CreE, CreD）によりアスパラギン酸から合成される。亜硝酸は窒素循環やニトロ化合物の分解の過程で生成されることは知られているが、アスパラギン酸を用いた亜硝酸生合成経路はこれまで知られておらず、この経路は二次代謝産物の生産に用いるために放線菌が独自に進化させたものであると考えられた。この 2 つの酵素の遺伝子は *Stpreptomyces* 属のみならず *Kutzneria, Microbispora, Mycobacterium, Nocardia* などの様々な属のアクチノバクテリアでオペロンを形成して存在していた（図 B)。本発表ではこの新規亜硝酸生合成経路と放線菌の二次代謝産物の生合成に関わる最新の研究について紹介する。

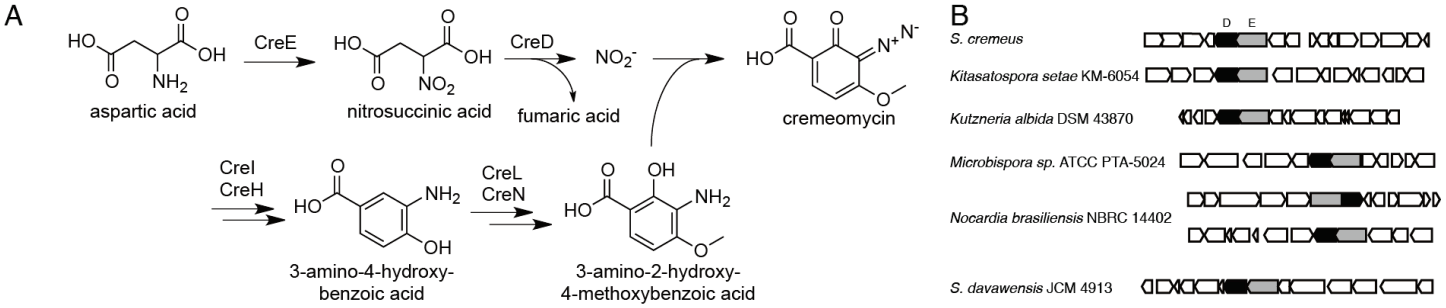



図 Cremeomycin の生合成経路（A）と *creED* オペロンを持つ菌の例（B）

1) Blair and Sperry, *J. Nat. Prod.* 2013, 76, 794. ;2) McGuire et al., *J. Antibiot.* 1995, 48, 516.; 3) Sugai et al., 2015, *Nat. Chem. Biol.*, in press

secondary metabolite, nitrous acid, biosynthesis

発表責任者：勝山　陽平（aykatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp）

講演番号：4SY05-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:27～ E 会場

# 微生物発酵法による植物アルカロイド生産と創薬展開

# Fermentative production of plant alkaloids for drug development

○南 博道（石川県大資源研）
○Hiromichi MINAMI (Res. Inst. Biores. Biotechnol., Ishikawa Pref. Univ.)

植物の産生する多様な二次代謝産物のなかでも、アルカロイドは少量で顕著な生理活性を示すため、医薬品原料として非常に高い需要がある。植物の産生するアルカロイドの中で、イソキノリンアルカロイドと呼ばれるグループは、モルヒネやコデインをはじめ、多くの薬理学的に有用な化合物を含む。しかし、植物体に乾燥重量の数パーセント程度しか含まれていないものも多く、植物体の生育には数ヶ月～数年を要するため、大量に供給する方法が検討されている。

多くのイソキノリンアルカロイドはチロシンを出発物質として、重要な中間体である (*S*)-レチクリンを経由して生産される。そこで我々は、植物のイソキノリンアルカロイド生合成酵素と微生物由来の酵素を組み合わせて、チロシンからレチクリンまでの改変型生合成経路を構築し、チロシン生産大腸菌に導入することで、レチクリン発酵生産システムを確立した。また、酵母においても、イソキノリンアルカロイド発酵生産に関する研究成果が相次いで報告されており、微生物発酵法によるアルカロイド生産は注目を集めている。

最近になって、モルヒネの重要な生合成遺伝子が単離され、酵母においてテバインやヒドロコドンといったケシアルカロイドの発酵生産システムが構築された（Galanie *et al.*, *Science* 349, 1095-1100）。我々のグループも、グルコースからテバインまでの生合成経路を大腸菌 4 菌株に再構築し、単純な炭素源からのテバインの直接発酵法を確立した（Nakagawa *et al.*, *Nat. Commun.* in press）。我々の構築したテバイン生産系では、13 酵素遺伝子を 4 つの大腸菌株に導入し、それぞれの株を段階的に培養することによって、酵母生産系よりも 300 倍以上効率的なテバイン生産（2.1 mg/L）に成功している。今後、より実用化に向けた生産システムが確立されることで、需要の高まる医薬品への安定した供給方法になるだけでなく、創薬をはじめとした様々な分野に大きく貢献することが可能であり、微生物発酵における新たな展開が期待される。本講演では、微生物発酵法によるケシアルカロイド生産、さらには創薬を目的とした新規アルカロイド生産について、最新の実験結果を含めて紹介する。

isoquinoline alkaloid, reticuline, microbial production

発表責任者：南　博道（minami@ishikawa-pu.ac.jp）

講演番号：4SY05-3
講演日時、会場：3 月 30 日 10:01～ E 会場

# 放線菌に見出されたペプチドライゲースオルソログの機能解析

# Characterization of novel peptide ligase orthologs in actinomycetes

○小笠原 泰志[1]、川田 純平[1]、佐藤 康治[1]、降旗 一夫[2]、大利 徹[1] ([1] 北大院工、[2] 東大院農生科)
○ Yasushi Ogasawara[1], Junpei Kawata[1], Yasuharu Satoh[1], Kazuo Furihata[2], Tohru Dairi[1] ([1]Hokkaido Univ., [2]Univ. of Tokyo)

【目的】 我々は放線菌が生産するペプチド系抗生物質であるpheganomycinの生合成に関与する新規ペプチドライゲース（PGM1）を見出した。本酵素はアミジノフェニルグリシン誘導体のカルボキシル基をATPの存在下でリン酸無水物へと活性化させ、ここにリボソームによって生合成されたオリゴペプチドのN末端を求核攻撃させることでアミド結合形成を触媒する。本酵素はATP grasp型のアミド結合形成酵素の中で、ペプチドを求核剤として用いる初めての例である。興味深いことに本酵素は求核剤基質の認識が非常に緩く、様々なペプチドを受容可能であったことから、本酵素はペプチドのN末端修飾酵素として応用面でも興味が持たれた。本ペプチドライゲースのオルソログをゲノムデータベースに探索した結果、一部の放線菌に見出せた。そこで、これら酵素群の一般性と多様性についての知見を得るため機能解明を試みた。

【方法と結果】本酵素のオルソログの近傍には何れも固有な遺伝子群が存在し、クラスターをなしていた。これら遺伝子クラスターおよびその中のオルソログの機能を解明するため、初めに3つの菌株（*Streptomyces mobaraensis*、*Salinispora tropica*、*Micromonospora* sp.）を選択し、推定生合成遺伝子クラスターを*Streptomyces lividans*で異種宿主発現し、クラスター由来の代謝産物の解析を試みた。いずれの場合において特異的な生産物を確認できたことから、これらを精製後、構造解析を行い生産物の平面構造を決定した。その結果、得られた代謝産物はすべて、通常のペプチド結合がカルボニルメチレン構造に置き換わったシュードジペプチド構造を持ち、そのN末にアミジノアミノ酸がアミド結合したシュードトリペプチド構造を有していた。

３つのクラスターには６つの遺伝子が共通でコードされているが、このうちアミジノ基転移酵素とペプチドライゲースのオルソログがそれぞれアミノ酸のアミジノ化とシュードジペプチドへのアミド結合を触媒すること、また残りの４つの遺伝子が関与してシュードジペプチド部が生合成されることが予想される。ペプチドライゲースのオルソログについては組換え酵素を用いて機能解析を行った結果、アミジノアミノ酸を活性化後、ジペプチドを求核剤に用いてアミドを形成することを確認した。現在シュードペプチド部の生合成についても解析を進めており、本発表ではこれらの結果の詳細について報告する。

peptide ligase, pseudopeptide, biosynthesis

講演番号：4SY05-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:25～ E 会場

*In silico* 代謝設計ツールの開発とその展開
Development and Application of *In silico* Metabolic Design Tool
○荒木 通啓（神戸大自然）
○Michihiro Araki (Kobe Univ.)

合成生物学の進展により様々な細胞改変プロセスの開発が加速化してきているなか、特に生合成研究・代謝工学といった分野においては、医薬原料・バイオ燃料・バイオプラスチック原料を提供していくために、代謝パスウェイの最適化が実現されてきている。近年では、これに未知代謝パスウェイの設計・構築といった研究も進められてきており、モデル生物において、有用物質を高効率で生産していくためには、これまでに蓄積された網羅的情報を利用し、実効性の高い代謝パスウェイを推定、設計していくことが必要となってきている。

我々は新たに代謝パスウェイの *In silico* 設計技術を開発し、これをもとにした代謝パスウェイの設計ツール開発を行っている。具体的には、合成生物学の考え方をもとに、代謝パスウェイの表現型として代謝産物の構造に着目し、機能単位である反応（構造変化）定義とその組合せ最適化技術の開発を行うことで、効率的に未知代謝パスウェイを設計する基盤ならびにユーザインターフェイスの開発を行っている。当設計ツールの特徴は、反応データの種類・量にかかわらず、実効性の高い代謝パスウェイの設計を効率的に出力できるという点にあり、未知代謝パスウェイの設計を大幅に効率化することが期待できる。また当設計ツールをもとに、既知および未知化合物・酵素で構成される代謝ネットワークのスコープを拡張した知識ベースを構築しており、特定のモデル生物種に関しては定量的解析に向けたゲノムスケール代謝モデルの統合基盤を構築している。

Synthetic Biology, Metabolic Pathway, Bioinformatics

発表責任者：荒木通啓（araki@port.kobe-u.ac.jp）

講演番号：4SY05-5
講演日時、会場：3 月 30 日 10:49～ E 会場

ポリケタイド生合成酵素の構造機能解析
Structural and functional analysis of polyketide synthase
○宮永 顕正、工藤 史貴、江口 正（東工大院理工）
○Akimasa MIYANAGA, Fumitaka KUDO, Tadashi EGUCHI (Tokyo Tech.)

微生物が生産するポリケタイド化合物は多様な化学構造と生物活性を有している。その構造多様性の一因としてポリケタイド合成酵素（PKS）が用いる開始基質や伸長鎖基質の多様性が挙げられる。開始基質や伸長鎖基質として一次代謝産物由来の低級脂肪酸が用いられる場合に加え、その生合成系に特化した独自の基質を利用する場合があり、ポリケタイド骨格の多様性を拡げている。アシル基転移酵素（AT）は目的の開始基質や伸長鎖基質を対応するアシルキャリアータンパク質（ACP）に受け渡すために、基質を厳密に認識すると共に、ACP についても他の ACP と区別して認識していると考えられる。このため、ポリケチド生合成経路のエンジニアリングを行うにあたって、AT と ACP 間の相互作用の機構を解明する必要性は以前から認識されていた。ACP は、AT 以外の PKS 触媒ドメインとも相互作用してポリケタイド鎖伸長反応に携わるため、各触媒ドメインと ACP 間の相互作用は一時的なものであり比較的弱いと考えられている。したがって、これらの複合体構造解析が難しく、ACP の認識機構に関する詳細な知見は得られていなかった。

我々はビセニスタチン生合成に関わるアシル基転移酵素 VinK を対象に ACP との複合体の構造解析を行った。クロスリンク反応により VinK と ACP の安定な複合体を得た後に、VinK と ACP との複合体構造を決定し、AT と ACP 間に存在する静電的相互作用と疎水性相互作用を明らかにした。本シンポジウムでは、これらの研究の経緯と成果について紹介する。

polyketide, crystal structure, biosynthesis

発表責任者：宮永顕正（miyanaga.a.aa@m.titech.ac.jp）

講演番号：4SY05-6
講演日時、会場：3 月 30 日 11:03～ E 会場

# 難培養微生物を起源とする海綿由来生物活性物質の生合成研究

# Biosynthesis of sponge-derived bioactive molecules produced by uncultured bacteria

○脇本 敏幸（北大薬）
○Toshiyuki Wakimoto (Hokkaido Univ.)

地球上に生息する多種多様な微生物の中で、培養可能な微生物の割合は数%程度とごくわずかであることが分かってきた。そのわずかな割合に含まれる培養可能な放線菌や真菌から、これまで数多くの天然医薬品が見出されてきたことを考慮すると、残りの大部分を占める未培養微生物は、未開拓かつ有望な医薬品資源として位置づけられる。このような未培養あるいは難培養微生物による物質生産が顕在化した事例の１つが、本研究で着目する海綿動物である。

海綿動物からはこれまで多数の生物活性物質が報告されてきた。それらの中にはハリコンドリン B など抗がん剤のリード化合物として重要な化合物も数多く存在する。海綿由来生物活性物質は構造的にも複雑かつ特異な化合物が多く、陸上の放線菌やカビなどが生産する化合物とは異なる骨格構造が見出されている。そのため、天然医薬品資源として海綿動物はユニークかつ重要な位置づけにある。しかしながら、海綿由来医薬品資源の有効利用を目指す場合、海綿動物自体が稀少生物資源であるため、十分な量の二次代謝産物を供給することが難しい。この点が放線菌や真菌が生産する天然物に比較して、有効利用を妨げる大きな足かせとなってきた。一方で、これら海綿を起源とする生物活性物質の多くは共生微生物によって生産されることが示唆されてきた。生産菌に関する知見は異種発現や生産菌自体の培養方法を確立する上で重要な基盤的知見となるため、我々は海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子を明らかにするとともに、その真の生産者の特定を目指した。

海綿動物の中でもとりわけ多様な二次代謝産物を含むイシカイメン目（Lithistid)、Theonellidae 科の *Discodermia* 属の海綿動物に着目し、二次代謝産物の生合成遺伝子と生産菌の解析を進めた結果、伊豆諸島および伊豆半島に生息する *Discodermia calyx* について、主要二次代謝産物の生合成遺伝子と生産菌 Entotheonella の同定に成功した。同時に、J. Piel、竹山、松永らとの共同研究によって、Entotheonella 属バクテリアが海綿 *Theonella swinhoei* 由来の生物活性物質の生産を担っていることが明らかになった。16S rRNA の解析から、他のバクテリアと相同性を示さないことから、新門 Tectomicrobia 門を提唱している。さらに、*D. calyx* においては、Entotheonella が生産した低毒性な phosphocalyculin A が、海綿組織の傷害に伴って、強力な細胞毒性物質 calyculin A へ変換される機構が明らかになった。

本研究成果は、物質生産能に秀でた未培養微生物が、我々の身近な環境に存在すること示すとともに、これら重要な生物資源、あるいはその遺伝子資源の有効利用の可能性を提示している。

marine sponge, calyculin, biosynthesis

発表責任者：脇本敏幸（wakimoto@pharm.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY06-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:00～ B 会場

# 細胞間等コミュニケーションを考慮した合成生物学ーデザイン生命工学ー

# Cell-Cell or Cell-ECM Communication-Introducing Synthetic Biology -Design Biotechnology-

○田川 陽一（東工大生命理工）
○Yoh-ichi Tagawa (Tokyo Inst. Tech.)

生命工学は生命体を眺めて理解するだけでなく、生命体の遺伝子を操作し、人類のために新しい生命体を創造することができるようになってきた。既存の生物に新しい生理機能を導入するために、例えば他の生物の代謝経路を導入することを考え、各代謝反応とその経路全体反応を数理モデル化することによりシミュレートし、最適な遺伝子発現回路を提案し、目的の新しい生理機能を有した生物を創造する技術が開発されつつある。この技術は合成生物学と言われている。合成生物学的手法を用いて、すでにバイオ燃料や特定の医薬化合物を産生する微生物等が産業化されようとしているが、これまでの合成生物学の対象となる生物は単細胞生物である微生物や珪藻に留まっている。一方、微生物にとどまらず、高等植物や哺乳類個体でも、遺伝子操作は可能である。トランスジェニック・遺伝子ノックアウト動物や核移植によるクローン動物作製といった発生工学技術は、すでに時空間を任意に制御する発現誘導システムやゲノム編集技術を組み合わせた最新の遺伝子工学的技術を導入しており、合成生物学的検証をおこなうことは可能になりつつある。しかし、そのまま個体を利用する合成生物学的アプローチは、動物愛護、経済、スペースや時間的にも不可能に近い。高等植物や哺乳類個体などでは、細胞ー細胞間、細胞ーマトリクス間による組織、さらに組織ー組織間による個体形成、個体ー微生物やウイルス間という各々の「コミュニケーション」を理解した数理モデル、および、それを検証する *in vitro*（個体外）実験系が必要である。それらを応用して、生命体をゲノムレベルから表現型までをデザインし、新しい生命体を創造する技術、【デザイン生命工学】の確立を目指している。

synthetic biology, living system, chip

発表責任者：田川陽一（ytagawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4SY06-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:10～ B 会場

# 試験管内ウイルス合成

# Synthesis of viruses *in vitro*

○町田 幸大、重田 友明、今高 寛晃 (兵庫県立大学)
○Kodai Machida, Tomoaki Shigeta, Hiroaki Imataka (Univ. of Hyogo)

ウイルスの本体は遺伝子（DNA または RNA）であり、それを保護するために、またはそれを細胞内に導くためにタンパク質の殻（カプシド）が外側を覆っている。ウイルスは単独で複製することができず、宿主である細胞に侵入し、そのタンパク質合成システムを利用してウイルスタンパクを合成する。個々のウイルスの複製機構の解明は感染対策や治療法の開発に繋がるため、各ウイルスの合成システムの開発は急務である。我々はヒト細胞抽出液から成る試験管内ウイルス合成を用いて RNA ウイルスの一つである脳心筋炎ウイルス（EMCV）の合成に成功している。しかし、抽出液は無数の因子を含んでおり、このシステムを用いてウイルス複製のメカニズムを研究することには限界がある。そこで、我々はヒト因子由来再構成型翻訳システムを開発し、EMCV を合成することを試みた。

EMCV の翻訳はゲノム RNA の IRES (Internal ribosome entry site) と呼ばれる 5’非翻訳領域にリボソームが結合することにより開始する。そこでまず、EMCV の翻訳開始に必要なヒト因子（eIF1, eIF1A, eIF2, eIF2B, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF5, eIF5B, PTB）を精製した。次に、翻訳伸長・終結に関わるヒト因子（eEFs, eRFs,）を精製した。そして、ヒト由来リボソーム、ヒト由来 tRNA を精製し、tRNA にアミノ酸を結合させる酵素（アミノアシル tRNA 合成酵素：20 種類）も精製した。これらの因子と ATP, アミノ酸などの小分子を混合し、そこに T7 RNA polymerase と T7 promoter の制御下にある全長 EMCV の cDNA を添加し、インキュベーションを行った。その結果、殻タンパク質である L-2A（約 120 kDa）に加え、制御タンパク質である 2B-3D（約 140 kDa）が合成された。更に、processing 産物の 1 種である 3CD（約 75 kDa）も検出できた。ただ、殻タンパク質のプロセッシングが行われていないため、新生鎖が正しく折り畳まれていないことが予想された。そこでこの合成系にシャペロンタンパクを添加し、正しくプロセッシングが行われるか確認している。

また、細胞内でのウイルス合成を再現するために、この再構成型翻訳システムをリポソームに包み、人工細胞の作成も試みている。

*in vitro* protein synthesis, virus, artificial cells

発表責任者：町田幸大（machida@eng.u-hyogo.ac.jp）

講演番号：4SY06-3
講演日時、会場：3 月 30 日 9:30～ B 会場

# Synthetic xenobiology: making new biosystems by introducing artificial components

○Ichiro Hirao (Institute of Bioengineering and Nanotechnology, Singapore)

Current terrestrial organisms store genetic information within sequences consisting of the four standard bases, A, G, C, and T, in nucleic acids. Through the complementarity of the specific A-T and G-C base pairs, the genetic information in DNA is replicated itself, transcribed to RNA, and translated into the amino acid sequences of proteins, making up 4-base and 20-amino acid world. In other words, the limited numbers of the components might restrict the ability of the present biology system and constrain even the Darwinian evolution. If we could expand the numbers of the nucleic acid and protein components, new biology systems could be generated by introducing new artificial components. Synthetic xenobiology is a new discipline to pursue the creation of an artificial biology world by expanding the genetic information of DNA. Here, I will introduce synthetic xenobiology focusing on the genetic alphabet expansion system by developing artificial base pairs that function as a third base pair in the central dogma and their applications.

Synthetic xenobiology, Genetic alphabet expansion, Unnatural base pairs

発表責任者：Ichiro Hirao（ichiro@ibn.a-star.edu.sg）

講演番号：4SY06-4
講演日時、会場：3 月 30 日 9:50～ B 会場

# 合成生物学による人工生命システムの創生における理論に基づく実装の重要性

# Model-based implementation of artificial life systems in synthetic biology

○木賀 大介 [1,2] ([1] 東工大総理工、[2] 東工大地球生命研)
○Daisuke Kiga[1,2] ([1]Tokyo Tech., [2]Tokyo Tech. ELSI)

合成生物学アプローチは、生体分子もしくは分子システムを組み合わせることで、上位階層の人工生命システムをつくることを研究手段とする。生命システムの高機能性の本質が組み合わせの場合の数巨大さにあることのトレードオフとして、研究目的に必要な組み合わせを得るための効率の良い手法が必要となる。このため、合成生物学では、数理モデルを基盤とする生命システムの構築を行うことで、効率化を達成してきた。実際、発表者のグループは、細胞内の動作と理論上の動作がおおむね一致する人工遺伝子ネットワークを組み合わせることで、より大きなサイズのシステムを構築し、その動作が種々の実験条件で設計通りとなることを確認してきた。例えば、２種類のリプレッサーが互いの発現を抑制する人工遺伝子回路“トグルスイッチ“により、ラムダファージの溶菌・溶原の運命決定と同様に、同じ回路を持つ細胞の遺伝子発現状態が２種類のどちらかになる、という双安定性の発揮が知られていた。われわれは、これにリプレッサーの任意の量の大量発現を組み合わせることで、片方の状態のみを持つ単峰性の細胞集団が、中間の単一分布状態を経て、元の２種類の安定状態のそれぞれに分配される二峰性の分布なることが、理論と生物実験のどちらでも生じることを示してきた。さらにわれわれは、トグルスイッチと細胞間通信を組み合わせることで、発生の地形としての Waddington landscape をデザインし、計算機実験と生物実験の双方で、細胞の内部状態がこの地形の上を転がるボールのように変化することを示してきた。本発表では、より上位の階層として、細胞間通信を組み込んだ場合の、（１）細胞を液体培養ではなく個体培地上でコロニー形成させた場合の遺伝子発現状態の差異の空間パターンの形成や、（２）二種類の細胞によるポジティブフィードバックを介した共生系の作成について、システムデザインにかかわる理論と実験の整合性ついて報告する。

synthetic biology, mathematical model, artificial genetic circuit

発表責任者：木賀大介（dddkiga@gmail.com）

講演番号：4SY06-5
講演日時、会場：3 月 30 日 10:10～ B 会場

バイオマスを利用した非天然バイオプラスチックの生合成
Biosynthesis of unusual polyesters from renewable biomass
○松本 謙一郎[1,2]、門屋 亨介[1,3]、滝沢 憲治[1,3]、大井 俊彦[1,3]、田口 精一[1,3]([1]北大工、[2]JST PRESTO、[3]JST CRESTO)
○ Ken'ichiro Matsumoto[1,2], Ryosuke Kadoya[1,3], Kenji Takisawa[1,3], Toshihiko Ooi[1,3], Seiichi Taguchi[1,3] ([1]Hokkaido Univ., [2]JST PRESTO, [3]JST CREST)

近年、再生可能なバイオマス資源から有用な化製品を合成するプロセスの開発が盛んである。とくに、バイオマスから化学変換または微生物発酵を利用して低分子化合物を合成し、それらをモノマーとして高分子材料を合成する方法がよく研究されている。これらのプロセスでは、多段階からなる反応を効率よく進めることが重要な課題の一つになっている。一方、ある種の微生物は、糖や脂質などを出発物質としてプラスチックとして利用できる脂肪族ポリエステルを合成することが知られる。本プロセスは、バイオマスから一段階の発酵プロセスでポリマー材料を合成できるため、モノマーの合成や精製のプロセスが必要ないことが特徴である。一方で、ポリマー合成に必要な反応をすべて細胞内の酵素反応により行わなければならないため、合成できるポリマーの化学構造に制限があるのが弱点であった。また、天然の微生物が合成するポリ-3-ヒドロキシ酪酸[(P(3HB)]は、脆い物性を有しているため、汎用プラスチックとして利用するには物性が不十分であることが知られていた。

この弱点を克服するため、微生物の生合成系を改良し、天然では合成されない非天然型のポリマーを合成することが試みられている。筆者らは、D 乳酸ポリマーの合成が可能な変異型重合酵素の発見をきっかけとして、遺伝子組換え大腸菌を用いた乳酸、2-ヒドロキシ酪酸、グリコール酸などの 2-ヒドロキシ酸をモノマーユニットとして含むポリマーの合成系を構築した。とくに、乳酸と 3HB との共重合体の合成系は、天然ポリマーである P(3HB)を上回る生産性で合成できることが分かった。本ポリマー合成系は、酸素供給速度に対して特徴的な挙動を示すが、これは嫌気条件で合成が促進される乳酸と、好気条件で合成される 3HB との共重合体であるためだと考えられた。また、これらの 2-ヒドロキシ酸ユニットを含むポリマーは、熱的性質が P(3HB)とは異なっており、これにより透明性や柔軟性など、P(3HB)とは異なる優れた物性を示すことを見出した。

さらに最近、ポリマー生合成関連酵素だけでなく、生産宿主の細胞の改変についても検討を加えている。我々が最近見出した大腸菌の変異株は、ペプチドグリカンの生合成系の一部を欠失しており、通常は明確な表現系を示さないが、細胞内のポリマーの蓄積に伴い細胞体積が増大し、より多くのポリマーを合成することができる。また、構築した生合成系は光合成生物を含む様々な宿主で機能させることができ、その可能性についても検討を加えている。

本演題では、上記の実験結果を例としながら、人工的なポリエステル合成系のデザインと、その制御がどのように行われるかについて議論する。

Biobased plastic, biodegradable material, polyhydroxyalkanoate

発表責任者：松本謙一郎（mken@eng.hokudai.ac.jp）

講演番号：4SY06-6
講演日時、会場：3 月 30 日 10:30～ B 会場

# 組換え植物製造医薬品の開発と実用化

# Development and practical application of plant-made-pharmaceuticals

○松村 健（産総研）
○Takeshi Matsumura (A.I.S.T.)

植物に抗体遺伝子を導入し、哺乳類の免疫系物質を発現する植物が開発されてから、およそ四半世紀が経過した。この間、作物の農業形質の改変目的とは別に、植物に有用な物質を生産させる、すなわち、これまで植物が体内で生産し得ない物質を高生産する「新しい植物」の作出に関する多くの研究が行われてきた。これらの新しい植物は、研究用試薬、化粧品材料から、人や動物の医薬品原材料（遺伝子組換え植物培養細胞による生産）として実用化されている。特に、現時点での実用化例は無いが、付加価値の高い抗ガン剤やワクチンなどを植物生産させようとする研究開発は、非常に盛んに行われてきている。

植物は、光合成による独立栄養型の生物のため、他の生物生産系と比較して低エネルギーで効率的な増殖・生産が期待される。しかし、その一方で、本来植物に無い遺伝子を植物体内で高効率に機能させる、あるいは、生産物質を安定的に植物体内で保持させる等の点において、種々の技術的課題が残されている。実際に、植物体内で、異種遺伝子が効率的に機能した場合、それを抑制しようとするメカニズムが働くことは知られている。

加えて、これら物質生産する遺伝子組換え植物の実用化に関しても、“どこで”、“どのように”生産（栽培）すべきか、また、新たな植物による生産物を、これまでの基準や規則等に対応させていくための検討等、技術的課題以外にも前例の無い実用化課題が多数存在している。

我々は、完全人工環境型の植物工場技術を基盤とする、種々の遺伝子組換え植物の栽培（物質生産）に対応可能な「医薬品原材料生産のための密閉型遺伝子組換え植物工場」を開発し、これを用いて「イヌインターフェロン遺伝子組換えイチゴ」をモデルケースとして、イヌ歯肉炎軽減剤としての動物薬承認、実用化を目指した研究開発を行ってきた。すなわち、新たな植物を用いて、植物工場でありながら、食料ではなく、動物薬を製造するという新規事業の創製を試みてきた。

本講演では、上記内容について詳細に紹介すると共に、抗エボラウイルス抗体等、近年の海外での植物工場と一過性発現系を用いた開発状況に関しても簡単に紹介する。

transgenic plant, antibody, interferon

発表責任者：松村　健（matsumura-t@aist.go.jp）

講演番号：4SY06-7
講演日時、会場：3 月 30 日 10:50～ B 会場

# 哺乳類 *in vitro* モデル構築の試み

# Mammal *in vitro* model using fluidic culture device

○玉井 美保[1]、藤山 陽一[2]、田川 陽一[1] ([1]東工大院生命理工、[2]（株）島津製作所デバイス)
○Miho Tamai[1], Yoichi Fujiyama[2], Yoh-ichi Tagawa[1] ([1]Tokyo Tech., [2]Shimadzu Corp.)

近年のマイクロ流路を有する培養デバイス技術の発展は著しい。それぞれの臓器に対応して樹立され利用されている各々の細胞株をマイクロ流路培養デバイスで培養し､各々を連結した *in vitro* システムは、body (living system) on a chip と呼ばれている。しかし、このデバイスは生物という概念からはほど遠い。まず、 哺乳類の臓器は、複数種の細胞が秩序的な配列で構成される組織構造により構築されて、各々の特異的な機能が発揮されている。単一の細胞種では動的な反応は再現できないことが多い。さらに、用いられている細胞が腫瘍に由来する細胞であり、細胞の有している特異的な機能は低いかほとんどない。腫瘍細胞で構成されているシステムは正常な生命体とは言えない。

我々は、シングル細胞から樹立されているＥＳ細胞やｉＰＳ細胞を用いてモノクローナルな *in vitro* 生命システムを作出することを試み、1 つの系内に、「拍動心筋」、内皮細胞ネットワークと肝細胞からなる「肝様組織」、インスリンとグルカゴンを独立で産生する細胞集団である「膵島様組織」へ分化誘導・組織構築することに成功した。また、培養環境を常に一定に保ち、生体環境に近づけることを目的に、独自に開発したポリジメチルシロキサン製のマイクロ流体デバイスを用いて、血液の流れを模した培地の流れ（フロー）やシェアストレスを付与した。培地を常にフローで供給したマイクロ流体デバイス中では、系内の肝組織における機能指標の一つである尿素合成が静置培養と比較して有意に促進することが確認された。現在、デバイスに人工透析機能を付与した透析チップも開発しており、さらに腸管吸収を考慮したモデルも作製を試みている。これらを連結した哺乳類 *in vitro* モデルは動物実験や前臨床試験の代替システムとして応用展開したいと考えている。

stem cell, cell polarity, fluidic device

発表責任者：田川　陽一（ytagawa@bio.titech.ac.jp）

講演番号：4SY06-8
講演日時、会場：3 月 30 日 11:10～ B 会場

# 合成生物学を巡る国際的な課題

# International social science issues around the synthetic biology

○白江 英之（一般財団法人バイオインダストリー協会）
○HIDEYUKI SHIRAE (Japan Bioindustry Association)

２１世紀に登場した合成生物学は、IT 技術を駆使してこれまでの遺伝子組換え技術を飛躍的に発展させ、幅広い技術領域に応用され始めている。そしてその技術が生命の根源である遺伝子を操作するという事実が、この技術の発展と反比例して、科学者と民間人と理解の乖離を増大させている。合成生物学を理解できない恐怖や、理解不足から生じる懐疑心が民間の科学に馴染みのない人たちに存在することを、科学者は忘れてはならない。今回の講演では、合成生物学を取り巻く社会環境として、1）バイオセーフティ・バイオセキュリティの課題、2）倫理的な課題、そして3）生物多様性条約に係る条約（CBD）の締約国会議（COP）での新たな規制の策定への動きついて紹介し、この分野に携わる科学者の方たちに、一般社会の人々が今何を合成生物学に対して思い描いているのか知っていただきたいと思う。

１）合成生物学は、病原体などの生命機能の操作を可能とするため、当初は生物兵器製造やバイオテロへの応用の懸念が過大視され、各国において合成生物学によって作出される生物に対するバイオセキュリティ対策の検討が真剣になされた。ここでいうバイオセキュリティとは故意や悪意による反社会的な目的のために生体システムが作製・利用されることへの対策を指す。様々な国の政府機関や学術団体によって、これまで合成生物学に対するどのようなバイオセキュリティ対策が取られているかについてまず紹介する予定である。

２）次に、合成生物学は、生命の源となる遺伝子の改変操作を伴うことから、様々な種類の倫理的な課題が生じている。特に合成生物学に対する人々の捉え方が、専門家が考えるこれまでの遺伝子組換え技術の発展形としてとらえるのか、それとも一般の人が思い描くような全く未知の新しい学問体系として捉えるのかで、その倫理的な考え方も変わってくる。米国では2014年に国立科学財団より3000万ドルの資金を得て、合成生物学に対する民間人の懸念を払拭させるために多施設での科学理解のための民間活動を開始した。この活動は、合成生物学に関心を持つ民間人を集めて全米200か所で科学者と民間人の対話を通じて、合成生物学に対する理解をともに深めていくというものである。そして時間経過とともに、その集会の人数を増やしていき、最終年度の2016年度には合成生物学 EXPO の開催も計画されていると聞く。英国でも、NGO 団体との間で、合成生物学に対する理解を深める活動が2014年より開始されている。このような活動を通じて、科学者と民間人の理解や意識の乖離を埋めようと努力しているのだ。

３）最後に、生物多様性の維持と保全を国際的に議論しているCBD の COP で、合成生物学を新規の議題と設定して、新たな規制を制定するか否か議論が欧州委員会を中心に進められている。今回特にインターネット等で得られるデジタル遺伝情報が、地球上の生物多様性に影響を与えるとして、論文や各種データーベースのインターネット上でのやり取りを規制し、その情報供与によって生じる利益を公平かつ衡平に配分するように求める途上国の主張についてご紹介する予定である。

social science issues of synthetic biology, biosecurity of synthetic biology, the convention on biological diversity

発表責任者：白江英之（shiraehdyk@jba.or.jp）

講演番号：4SY07-1
講演日時、会場：3 月 30 日 9:05～ C 会場

# 腸内エコシステムの制御による新たな健康維持基盤技術の創出

# Development of a health promoting platform based on gut ecosystem regulation

○福田 真嗣（慶大先端生命研）
○Shinji Fukuda (Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.)

地球環境上のあらゆる場所には微生物生態系が存在しているが、とりわけわれわれの腸管内には数百種類以上でおよそ 100 兆個にもおよぶ腸内細菌群（腸内細菌叢）が高密度に生息している。これら腸内細菌叢は細菌同士あるいは宿主の腸管細胞群と相互作用することで、複雑で洗練された腸内生態系、すなわち「腸内エコシステム」を形成している。腸内エコシステムは通常はこれらの同種あるいは異種細胞間の絶妙なバランスの元に恒常性を維持しているが、過度の遺伝的要因あるいは外環境由来の要因によりその恒常性が破綻してしまうと、最終的には粘膜免疫系や神経系、内分泌系の過剰変動に起因すると考えられる炎症性腸疾患や大腸癌などの腸そのものの疾患に加えて、自己免疫疾患や代謝疾患、細菌感染症といった全身性の疾患に繋がることが報告されている。従って、腸内エコシステムの破綻に起因するこれらの疾患を正しく理解し制御するためには、その構成要素のひとつである腸内細菌叢の機能やそれらと腸管細胞群とのクロストークについて統合的な観点からアプローチする必要がある。われわれはこれまでに、腸内細菌叢の遺伝子地図と代謝動態に着目したメタボロゲノミクスを基盤とする統合オミクス解析技術を適用し、腸内細菌叢から産生される代謝産物の一つである酢酸や酪酸などの短鎖脂肪酸が、腸管上皮細胞のバリア機能を高めることで腸管感染症を予防することや、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞の分化を促すことで、大腸炎を抑制できることを明らかにした。しかし、この複雑で洗練された腸内エコシステムを意のままに制御するには、微生物生態系を一つのシステムとして捉え、その安定化機構や破綻のメカニズムを理解する必要がある。本発表では、この複合微生物叢調和システムから学び、その法則や概念を適用することで、腸内エコシステムの人為的修飾による新たな健康維持や疾患予防・治療方法の創出について議論したい。

gut microbiota, metabologenomics, microbial ecosystem

発表責任者：福田　真嗣（sfukuda@sfc.keio.ac.jp）

講演番号：4SY07-2
講演日時、会場：3 月 30 日 9:30～ C 会場

# 微生物生態を利用した害虫制御の展望

# Pest control from the viewpoint of microbial ecology

○菊池 義智（産総研）
○Ysohitomo Kikuchi (AIST)

多くの動植物がその体内に共生微生物を持ち、緊密な相互作用を行っている。昆虫は 100 万種以上が知られる陸上最大の生物グループであり、その半数以上が共生微生物を持つと推定されている。これら共生微生物の多くは、餌の分解や不足する栄養素の補償など宿主昆虫の栄養代謝において極めて重要な役割を果たすことが知られている。さらにこれまでの研究により、病原菌耐性や高温耐性、生殖操作、体色変化など、宿主昆虫の環境適応に関わる様々な性質においても共生微生物が決定的な役割を果たすことが明らかとなってきた。そして近年、我々は害虫に農薬抵抗性を賦与する共生微生物がいることを明らかにした。

ダイズの害虫であるホソヘリカメムシ *Riptortus pedestris* は環境土壌中から *Burkholderia* 属の共生細菌を取り込み、消化管に発達した「盲嚢（もうのう）」と呼ばれる袋状の組織に保持することが知られている。これまでの研究により、（１）農耕地土壌には有機リン系殺虫剤であるフェニトロチオンを分解できる *Burkholderia* 共生細菌株が存在すること、（２）このフェニトロチオン分解株はホソヘリカメムシに取り込まれ盲嚢内に定着すること、そして（３）フェニトロチオン分解株が共生したカメムシはフェニトロチオン抵抗性を獲得することが明らかとなった。さらに興味深いことに、分解菌の多くはフェニトロチオンを炭素源として利用可能であり、土壌にフェニトロチオンを散布すると土壌中の分解菌が増殖し、これに伴って分解菌に感染するカメムシが増加することが明らかとなってきた。このことは、土壌中の微生物群集動態が害虫の農薬抵抗性獲得に大きく影響しうることを強く示唆している。従来から害虫の農薬抵抗性は虫自身の性質と考えられており、当然のごとく害虫の遺伝学や個体群動態を主眼にその防除や対策が考案され実施されてきた。しかし、農薬抵抗性に限らず農耕地にみられる様々な害虫問題の裏には、実はそこに暮らす微生物の営みがあり、それら諸問題の解決のためには微生物群集を理解し彼らを手なずける必要があるのかもしれない。本発表では、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系を対象に現在我々が進めている研究について紹介し、害虫制御と土壌微生物生態の接点について議論する。

Symbiotic bacteria, Microbial ecology, Pest control

発表責任者：菊池義智（y-kikuchi@aist.go.jp）

講演番号：4SY07-3
講演日時、会場：3 月 30 日 10:00～ C 会場

# 土壌微生物のノトバイオロジー
# Gnotobiology of soil microbiota

○加藤 広海[1]、森 宙史[2]、永山 浩史[1]、大坪 嘉行[1]、永田 裕二[1]、黒川 顕[2]、津田 雅孝[1]([1]東北大院生命、[2]東工大院生命理工)
○Hiromi Kato[1], Hiroshi Mori[2], Hirofumi Nagayama[1], Yoshiyuki Ohtsubo[1], Yuji Nagata[1], Ken Kurokawa[2], Masataka Tsuda[1] ([1]Tohoku Univ., [2]Tokyo Tech)

土壌環境は、地球上で最も微生物多様性の高い環境である。人間にとって重要である農業生産や環境浄化などの土壌機能を最大限に活かすためには、この複雑な土壌菌叢の形成原理が土壌の物理・化学的性質とどのような因果関係にあるかを追求する必要がある。我々はこれまでに、化学物質で撹乱された土壌を経時的にメタゲノム解析することで、機能遺伝子組成の変動パターンや、菌叢復元性（レジリエンス）におけるファージの役割を明らかにし、撹乱に対する土壌の頑健性を示してきた。一方、その頑健性は、土壌改良やバイオオーギュメンテーション等、人間が望んだ菌叢へと変化させる技術に対しては大きな障壁となっている。このような頑健性の問題をシステマティックに追求するためには、自然界そのものの土壌サンプル自体では扱いづらいため、ノトバイオロジー技術を用いたアプローチが期待されている。ノトバイオロジーは腸内細菌を対象とした研究分野で近年目覚ましい成果を上げており、本アプローチが土壌生態系においても可能になれば、菌叢変動と環境因子の因果関係の提示も容易となる。しかし、土壌の移植実験は、世界的に見てもほとんど例がないのが現状である。

そこで土壌生態系のノトバイオロジー技術の可能性を検討する目的で、その前提条件でもある、①土壌微生物コミュニティを元の土壌に“戻し”移植した場合、元の菌叢を再現できるのか、②並列して移植した複数サンプル間に再現性はあるのか、という点について、畑土壌をモデルケースとして実験を行なった。畑土壌から抽出した微生物コミュニティを滅菌処理を施した土壌に移植し、安定した条件下（暗所、25℃、水分添加なし）で 2 年間培養した。次世代シーケンサーにて 16S rRNA 遺伝子の PCR 産物の大規模シーケンスを実施することで、移植直後から 2 年間におよぶ長期間の菌叢モニタリングを行なった。その結果、移植直後に *Firmicutes* や *Proteobacteria* による一時的な優占化が起きたものの、半年後には *Acidobacteria* 等の由来土壌で優占していたグループの割合が回復し、移植後の菌叢は Class レベルで見れば由来土壌を約半年で再現する傾向を示した。また並列サンプル間の比較により、移植直後の大きな変動においても、半年以降の安定型においても、それらサンプル間で極めて高い再現性を示した。これらの結果は、土壌のような複雑系であっても、生物学的因子と物理・化学的因子が同一である限りは、菌叢形成プロセスは予想以上に determinative（決定論的）な現象であることを意味し、土壌におけるノトバイオロジーの可能性を示している。

Soil, Transplantation, Resilience

発表責任者：加藤広海（katee@ige.tohoku.ac.jp）

講演番号：4SY07-4
講演日時、会場：3 月 30 日 10:30～ C 会場

# DNA 情報とネットワーク理論で微生物生態系を読み解く
# High-throughput DNA sequencing and network science for understanding microbial ecosystems

○東樹 宏和（京大人環）
○Hirokazu Toju (Kyoto Univ.)

次世代シーケンサーが登場して久しいが、微生物が構成する複雑な群集・生態系の理解はまだ始まったばかりである。技術革新によって膨大なシーケンス・データが得られたとしても、微生物群集を駆動する原理についての私たちの知識はまだ乏しく、「複雑な群集が観察された」といった記載的な研究成果ばかりが蓄積されがちである。本発表では、次世代シーケンスデータを用いた超多検体解析の手順を紹介するとともに、ネットワーク理論や生態学におけるデータ解析手法について議論する。現在、数百から 1000 サンプルほどの検体を 1 ランのアンプリコン・シーケンシングで解析することが可能になっているが、そうしたデータをもとにして、微生物群集にみられるパターンを見いだすことができる。ネットワーク理論は、ともすれば複雑すぎて把握しきれない情報を要約する極めて効率的な解析手順を提供するが、その生態学的な解釈はまだあまり進んでいない。本発表では、次世代シーケンシング・ネットワーク理論・生態学理論の３つの軸で現在の研究の進展具合を解説しながら、解析対象の微生物系の枠組みを越えて適用できる共通の研究戦略について考えたい。

Microbial ecosystems, Species interactions, Next-generation sequencing

発表責任者：東樹宏和（hiro.toju@gmail.com）

講演番号：4SY07-5
講演日時、会場：3 月 30 日 11:00～ C 会場

# 微生物群集を理解するための群集生態学理論とその手法
# Community ecology and analytical tools for studying microbiome

○鈴木 健太（国立環境研）
○Kenta Suzuki (NIES)

大規模ゲノム解析により得られる微生物群集の複雑性と機能性を理解し利用するために、最新の群集生態学理論（メタ群集理論や機能形質アプローチ）を応用する試みが進んできている。しかしながら、これまでの群集生態学理論はどちらかと言えば生物分布の空間パターンの理解・予測に偏っており、群集構造の時間変化を理解・予測するための理論枠のさらなる構築・充実が望まれる。本講演では、まずこのような問題意識の共有のために、これまで行われてきた研究を整理しつつ紹介したい。その上で、群集構造の時間変化を理解・予測していくための基盤となるアプローチとして、微生物群集の時系列データから種間相互作用を推定するための方法論、同様にその振る舞いを記述する動力学モデルを推定するための方法論などを具体的な応用例を交えて紹介する。

Microbial community ecology, Mathematical simulation, Time series analysis

発表責任者：鈴木健大（suzuki.kenta@nies.go.jp）

# ランチョンシンポジウムプログラム

本大会でのランチョンシンポジウムのチケットは，札幌コンベンションセンター１階の「LS チケット配布デスク」で開催日当日，8:00 より配布します．チケットを受け取り，開始 5 分前までに会場にお越しください．空席がある場合は，チケットがなくても入場できます．

## 2LS01　男女共同参画ランチョンシンポジウム「私のしごと」

後　援：男女共同参画学協会連絡会
3 月 28 日（月）12:00〜13:00　会場：F（204, 2F）
世話人：裏出令子（京大院農），越阪部奈緒美（芝浦工大システム理工），川向　誠（島根大生物資源），合谷祥一（香川大農），
　　鈴木義人（茨城大農），辻　智子（(株)吉野家ホールディングス），中島春紫（明治大農），福士幸治（北大院農），
　　山下まり（東北大院農），山篠貴史（名大院生命農）
座　長：越阪部奈緒美（芝浦工大システム理工），合谷祥一（香川大農），山下まり（東北大院農）

12:00　**講演 1**……○保田倫子（静岡県立大学大学院食品栄養環境科学研究院）
12:10　**講演 2**……○小川雅廣（香川大学農学部）
12:20　**講演 3**……○大室　繭（アサヒビール(株)研究開発本部酒類技術研究所）
12:30　フリーディスカッション

## 4LS01　**JABEE** ランチョンシンポジウム「技術者・研究者人生における技術士資格の意義とメリット」

3 月 30 日（水）12:00〜13:00　会場：F（204, 2F）
世話人：江坂宗春（広大院生），浅野行蔵（北大院農）
座　長：榊原陽一（宮崎大農），金沢和樹（吉備国際大地域創成農）

12:00　4LS01–1　**JABEE と技術者教育**……○江坂宗春（広大院生，JABEE 対応委員会委員長）
12:10　4LS01–2　**研究者にとって技術士資格は切り札となるか**……○藤田　聡（福井大院工）
12:30　4LS01–3　**生物工学技術士の進む道(道半ば)**……○東田英毅[1,2]（[1]株式会社ちとせ研究所，[2]東工大情報生命博士教育院）
12:50　**閉会の挨拶**……○浅野 行蔵（北大院農，JABEE 対応委員会委員）

講演番号：4LS01-1
講演日時、会場：3 月 30 日 12:00～ F 会場

# JABEE と技術者教育

# JABEE and Engineering Education

○江坂 宗春（広大院生）
○Muneharu Esaka (Hiroshima Univ.)

JABEE（Japan Accreditation Board for Engineering Education：日本技術者教育認定機構）は、大学や高専の技術者教育プログラムの審査・認定を行う一般社団法人で、技術者教育の振興、国際的に通用する技術者の育成を目的として、1999 年に設立された（http://www.jabee.org を参照）。

これまでの新規認定プログラムの累計は、172 教育機関の486プログラムになり、認定プログラムの修了生の累計は、約22 万人に達した。

認定・審査分野は 16 分野あるが、農芸化学会は「農学一般関連分野」に所属し、農学系 17 学会が加盟する農学会技術者教育推進委員会のもとで、「生物工学および生物工学関連分野」とも連携しながら、審査、普及、指導等を行っている。

これまでに、「農学一般関連分野」で、農芸化学領域が含まれる JABEE プログラムは 6 プログラム、「生物工学および生物工学関連分野」でも 6 プログラムが認定されており、したがって、12 プログラムが農芸化学・生物工学系で認定された JABEE プログラムと考えられる。

日本農芸化学会では、JABEE 対応委員会で、JABEE 対応の活動を行うとともに、全国大会時に、以下のような JABEE・教育シンポジウムを開催してきている。

- 2007 年度　「日本農芸化学会と JABEE」
- 2008 年度　「農芸化学における魅力ある大学教育と JABEE」
- 2009 年度　「農芸化学分野の大学院における技術者、研究者養成教育の改革」
- 2010 年度　「農芸化学における教育改革と分野別質保証」
- 2011 年度　「JABEE とキャリア教育」（東日本大震災で中止）
- 2012 年度　「農芸化学における人材育成」
- 2013 年度　「大学・大学院での教育改革と人材養成」
- 2014 年度　「農学系人材養成に関する最近の取り組みについて」
- 2015 年度　「グローバル人材育成と教育改革」

JABEE 認定のメリットとして、「JABEE 修了生は、技術士の第一次試験が免除され、登録を行えば、すぐに技術士補となれる」があげられる。しかし、農芸化学・生物工学分野において、技術士資格の意義とメリットが十分理解されていない。今回、「技術者・研究者人生における技術士資格の意義とメリット」と題したシンポとし、農芸化学・生物工学分野における技術士に焦点をあて議論したい。

JABEE, Engineering education, Engineer

発表責任者：江坂宗春（mesaka@hiroshima-u.ac.jp）

講演番号：4LS01-2
講演日時、会場：3 月 30 日 12:10～ F 会場

# 研究者にとって技術士資格は切り札となるか
# "Professional Engineer" as the hope for a stray researcher

○藤田 聡（福井大院工）
○SATOSHI FUJITA (Univ. Fukui)

JABEE 認定課程を修了することで技術士第一次試験の受験が免除となることをご存知の方でも，技術士とは実際どのような資格なのかは有資格者以外，あまり知られていないように思う。「技術士」は名称独占資格であり，特定の業務を独占的に取り扱うことのできる業務独占資格ではない。技術士としての業務範囲が規定されているわけではないため，現実的なリターン（すなわち業務の対価としての報酬）がよく見えない。本発表では， JABBE 修了生や，将来に不安を抱えた若い研究者にとっての技術士資格のメリットを，筆者の業務経歴や見聞きしてきた例をもとに議論したい。

技術士は，勤務形態により，独立技術士（いわゆる技術コンサルタント）と企業や大学に勤める技術士（便宜的に非独立技術士と呼ぶ）に分けられる。JABEE 修了生や若い研究者がまず目指すのは，非独立技術士であろう。非独立技術士になることで，技術士となる以前と比較して本職の仕事の質や報酬がアップすれば，技術士取得の意義があると言える。

勤務先が民間企業であれば，手当や昇進といった直接的なリターンも期待されるだろう。しかし，アカデミアに属する研究者にとって，技術士を取得したところで給与も上がらないし，ポストも降ってこない。まれに技術士資格を有することが資格要件に掲げられた公募もあるが，決して多くはない。研究者にとっては，難関だが役に立たない資格のように見える。しかし果たして本当にそうだろうか。

現在，大学をとりまく環境はまことに厳しい。産官学連携に加え，グローバル教育，地域貢献等と，研究者に期待されている業務は非常に多い。こうしたわかりやすいアウトプットを掲げた研究に，リソースや経費が重点配分されているのが現状であり，研究者は，社会活動からかけ離れた仕事をするわけにはいかなくなっている。この是非は本稿の主旨から外れるので議論は避けるが，ともかくも，研究者には，これまで同様研究業績をあげるのは当然のこと，それに加えて，社会に貢献する視点での仕事が期待されているのである。こうした観点から見ると技術士たる研究者は，自身の問題意識やスタンスを示しやすく，社会の要請にきわめてマッチした人材であるとのアピールも可能である。

昨今，生物系研究者にとって安定した就職先を得ることが厳しい状況が続いている。こうした環境を生き残るには，オンリーワンにならなければならない。そのためには，自身の専門分野を研ぎ澄ます方法だけでなく，専門分野の幅を広げる方法もある。複数の専門分野を持つダブルディグリーが研究者としての価値を高めるのと同様，技術士資格も自身を差別化するための価値を与えてくれる。何が自分の強みになりうるのか。それを考えることで資格取得の意義が見えてくる。

Professional Engineer, JABEE, career

発表責任者：藤田　聡（fujitas@u-fukui.ac.jp）

講演番号：4LS01-3
講演日時、会場：3 月 30 日 12:30～ F 会場

# 生物工学技術士の進む道（道半ば）

# The (under)way forward for professional engineer in biotechnology

○東田 英毅[1,2] ([1]株式会社ちとせ研究所、[2]東工大情報生命博士教育院)
○Hideki TOHDA[1,2] ([1]Chitose Laboratory Corp., [2]ACLS, Tokyo Tech)

JABEE は、大学における技術者教育の質保証を担保する、優れた認証システムです。国際標準となっている他のマネッジメントシステムと同様、外部認証の考え方を取り入れており、国際的にも通用するものです。しかしながら日本国内では、その位置づけが、分野によってはあいまいです。その一つの原因として、出口の一つである技術士資格の、社会における位置づけが見えにくいことが挙げられます。建設等の一部の部門では、公共事業の受注要件として、技術士資格の必要性が明確です。環境コンサルティングなどの業務でも、技術士が積極的に登用されています。しかしながら農芸化学や生物工学分野では、そのようなメリットや独占的業務がなく、技術士の数も少ないのが現状です。

それではなぜここで技術士資格の取得を勧めるのでしょうか。その理由について、自らの進んできた道を例としてお話しします。大学の修士課程から民間企業の研究員へ、その中で社会人博士課程に入学し、技術士第二次試験にも合格しました。会社では、研究所のプロジェクトマネージャーや本社の技術企画部門を経験したのち、現職の研究・開発受託型の企業に転じました。この過程で、技術士資格とどのように向き合い、活用してきたかについてお示しします。

昨今は特にそうなのですが、われわれの世代でも、入社した企業に最後まで所属して定年を迎える人が減ってきています。自身が転職しなくても、事業部ごと他社に移籍したり、会社自体の構成が企業買収や合併等で激変することも、まれなケースではなくなりました。そして、属する会社が変わらない場合でも、自身の職種が変わることはしばしば起こります。入社時に研究・開発を希望し、その通りに配属されたとしても、一生涯研究者・技術者を続ける人は、もう一人もいないのではないでしょうか。

そういう現実を見据えて、それでは自らは何によって立つべきか、その一つの手段としての技術士資格の可能性に期待しています。第一次試験では基礎知識の棚卸ができます。第二次試験では専門領域の説明能力と問題解決能力が問われます。そして技術士登録後には高度な専門家としての活躍が期待されています。生涯現役を可能にするための、継続研鑽や業務獲得のシステムも整いつつあります。

いかがでしょう、あなたも技術士を目指しませんか？

professional engineer, JABEE, life plan

発表責任者：東田英毅（htohda@tt.rim.or.jp）

# ランチョンセミナー　プログラム

本大会のランチョンセミナーのチケットは，セミナー開催当日の 8:00〜10:00 に札幌コンベンションセンター 1 階の「LS チケット配布デスク」にて配布します．

チケット配布の際，大会参加証にチケット受領の押印をしますので，大会参加登録をお済ませの上，チケットをお受け取り下さい．

チケット配布は，定員に達した時点で終了します．

チケットは，12:00 を過ぎると無効になります．その後はチケットをお持ちでない方と同等の扱いとなりますのでご注意ください．チケットをお持ちでない方は，ランチョンセミナー・ランチョンシンポジウムに参加できません．ただし，空席がある場合はこの限りではありません．



## 3 月 28 日（月）12:00〜12:50

### LS 2–1　ライオン株式会社　　会場：B（札幌コンベンションセンター 中ホール A）

座長：内山　章（ライオン株式会社 機能性食品研究所）

睡眠改善サプリメントの開発研究
－睡眠の質向上作用を示す「清酒酵母」を中心として－

裏出 良博（筑波大学 WPI 国際統合睡眠医科学研究機構）

### LS 2–2　日東薬品工業株式会社　　会場：C（札幌コンベンションセンター 中ホール B）

座長：小川　順（京都大学大学院農学研究科）

腸内細菌とつむぐ健康
〜人と腸内細菌との多様な対話を紐解く〜

木村 郁夫（東京農工大学大学院農学研究院）
岸野 重信（京都大学大学院農学研究科）

### LS 2–3　株式会社島津製作所　　会場：D（札幌コンベンションセンター 107/108 会議室）

司会：奥村　毅（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

島津製作所の最新質量分析ソリューションご紹介

**1.** 高解像度イメージング質量顕微鏡 **iMScope TRIO** によるイメージング **MS** 分析
緒方 是嗣（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

**2. LC/MS/MS** を用いたメタボロミクス研究へのアプローチ
渡辺　淳（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

**3. LC/MS/MS** を用いた培養上清の一斉分析
豊田 健一（株式会社島津製作所 分析計測事業部）

### LS 2–4　バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社　　会場：E（札幌コンベンションセンター 小ホール）

抗体を用いたタンパク質定量アプリケーションの最新情報

**1.** 抗体を用いた前処理，**MS** アプリケーションのご紹介
中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 マーケティング）

**2.** ウェスタンブロッティングにおける最新情報と正確なデータ取得について
熊谷 剛史（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 フィールドアプリケーションソリューション）

### LS 2–5　株式会社エービー・サイエックス　　会場：G（札幌コンベンションセンター 206 会議室）

ポリアミン誘導体の検出並びに同定とその生理的意義
浅見 忠男（東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻生物制御化学研究室）

## 3 月 29 日（火）12:00〜12:50

**LS 3–1　ブルカー・ダルトニクス株式会社**　　会場：B（札幌コンベンションセンター 中ホール A）

座長：前田 斉嘉（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

タバコ変異株の網羅的代謝物測定と解析

〜ターゲットパスウェイのスクリーニングと新規バイオマーカー探索〜

吉田 達成（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

---

**LS 3–2　アジレント・テクノロジー株式会社**　　会場：C（札幌コンベンションセンター 中ホール B）

座長：福島 道広（帯広畜産大学 食品科学研究部門 加工・利用学分野）

伝統発酵食品の機能性とマイクロフローラ

榎本 俊樹（石川県立大学生物資源環境学部 食品科学科 食品機能系）
滝埜 昌彦（アジレント・テクノロジー株式会社）

---

**LS 3–3　味の素株式会社**　　会場：D（札幌コンベンションセンター 107/108 会議室）

血中アミノ酸プロファイリングの有用性

〜アミノインデックス®〜

安東 敏彦（味の素株式会社 ウェルネス事業部 アミノインデックスグループ）

---

**LS 3–4　森永乳業株式会社**　　会場：E（札幌コンベンションセンター 小ホール）

座長：河田 照雄（京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻）

アロエステロール®の機能性研究における新展開

1. アロエステロール®の生理機能について

後藤　剛（京都大学大学院農学研究科 食品生物科学専攻）

2. アロエステロール®経口摂取による皮膚に対する作用とそのメカニズム

田中 美順（森永乳業株式会社 素材応用研究所）

---

**LS 3–5　株式会社 明治**　　会場：F（札幌コンベンションセンター 204 会議室）

座長：上野川 修一（東京大学 名誉教授）

乳酸菌のあらたな可能性

〜ヨーグルトの免疫効果への期待〜

竹田 和由（順天堂大学大学院医学研究科 研究基盤センター 細胞機能研究室）

---

**LS 3–6　サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社**　会場：G（札幌コンベンションセンター 206 会議室）

高速溶媒抽出装置を用いた迅速前処理から Orbitrap 質量分析計による高精度測定まで様々な化学特性の化合物の前処理・分離・検出

高原 健太郎（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）

---

## 3 月 30 日（水）12:00〜12:50

**LS 4–1　よつ葉乳業株式会社**　　会場：**B**（札幌コンベンションセンター 中ホール **A**）

座長：元島 英雅（よつ葉乳業株式会社 研究統括部 中央研究所）

古代から受け継がれる乳業技術

－バターつくりの民族学－

平田 昌弘（帯広畜産大学 地域環境学研究部門）

---

**LS 4–2　物産フードサイエンス株式会社**　　会場：**C**（札幌コンベンションセンター 中ホール **B**）

座長：中村 圭伸（物産フードサイエンス株式会社 研究開発センター）

ケストースのプレバイオティクス効果

～アトピー性皮膚炎の改善効果等生理機能～

古賀 泰裕（東海大学 医学部）

栃尾　巧（物産フードサイエンス株式会社 研究開発センター）

---

**LS 4–3　日清食品ホールディングス株式会社**　会場：**D**（札幌コンベンションセンター **107**/**108** 会議室）

腸内細菌と健康

**1.** 腸内細菌と生体防御・免疫系－統合オミクス手法によるアプローチ

大野 博司（理化学研究所 統合生命医科学研究センター）

**2.** 乳酸菌 ***Lactococcus lactis*** **T21** 株の抗アレルギー作用

砂田 洋介（日清食品ホールディングス株式会社 健康科学研究部）

---

**LS 4–4　日本ウォーターズ株式会社**　　会場：**E**（札幌コンベンションセンター 小ホール）

最新 **Q-Tof MS** を用いた食品メタボロミクスの分析と包括的解析手法

～有意な差の成分の抽出・同定はどのように行う？～

佐藤 信武（日本ウォーターズ株式会社）

---

日本農芸化学会2016年度大会
ライオン株式会社 ランチョンセミナー LS2-1

# 睡眠改善サプリメントの開発研究
## ー「睡眠の質向上作用を示す清酒酵母」を中心としてー

**3月28日(月)12:00~12:50**
**会場:札幌コンベンションセンター**
**中ホールA(B会場)**
**席数:190席**



講 師

**裏出 良博 先生**
筑波大学 WPI
国際統合睡眠医科学研究機構 教授

座 長

**内山 章**
ライオン株式会社
機能性食品研究所長

本邦において成人の5人に1人が睡眠不満を訴えており、大きな社会問題となっている。睡眠不足は学習能力や判断力の低下、さらには肥満、糖尿病、高血圧、うつや認知症などの生活習慣病のリスクを高めることが明らかになっている。日本人の睡眠時間は極端に短く、日本の睡眠に関連する経済支出は、生産性の低下や睡眠薬などの医療費を含め、年額6兆円に迫る。この状況を改善する新たな手段として睡眠改善サプリメントが注目されている。

我々は、実験動物の脳波周波数解析に基づく睡眠覚醒判定システムおよびヒト用の携帯型脳波計を開発し、その貸出しと睡眠解析を行う体制を構築した。これらの活動を通じて、多くの企業が睡眠改善サプリメントの開発に参入した。

現在、多数のサプリメントが開発されているが、2015年にJournal of Sleep Researchで発表された「清酒酵母」は、$PGD_2$・アデノシン系の睡眠調節メカニズムによって、睡眠の質を向上させることが明らかになっている。「清酒酵母」は、ヒト試験においても睡眠を深くし、成長ホルモンの分泌量を増加させること、さらに主観評価として起床時の眠気を低減することが示されている。

本講演では、「清酒酵母」を中心として、我々が開発に協力した睡眠改善サプリメントの開発研究について、具体的に紹介する。

今日を愛する。
LION

ライオン株式会社

日本農芸化学会2016年度大会
日東薬品工業株式会社ランチョンセミナーLS2-2

# 「腸内細菌とつむぐ健康」

## ～人と腸内細菌との多様な対話を紐解く～

2016年3月28日(月) 12:00～12:50

会場：C 会場（札幌コンベンションセンター 中ホール B）




座長：小川 順 先生
（京都大学大学院農学研究科 教授）

講師：木村 郁夫 先生
（東京農工大学大学院農学研究院 准教授）

講師：岸野 重信 先生
（京都大学大学院農学研究科 助教）

私たちの健康に、内なる住人である腸内細菌が深く関わっていることが、最近の研究からますます明らかになってきています。しかし、腸管内での人と細菌との対話は、あまりにも多様で、無数の糸電話が絡まった状態にあるとも言えます。その一本一本を丁寧にひも解き、どのような会話がなされているかに耳を傾け、大切な会話をまとめあげ、あらたな意味ある糸をつむぎあげていくことが、健康生活を導く大切な作業であると考えます。本セミナーでは、これらの会話の言葉とも言える、腸内細菌の代謝物に焦点を当てた研究例、また、代謝産物の応用例を紹介し、腸内細菌との上手な対話をとおして健康をつむぐことに思いを馳せてみたいと思います。
おなかに耳を当ててみると、健康につながる何かが聴こえてくるかも・・・・。

---

日東薬品工業株式会社
医薬品・乳酸菌原料の製造販売
www.nitto-pharma.co.jp

SHIMADZU
Excellence in Science

# 日本農芸化学会2016年度大会
# ランチョンセミナーのご案内

## LS2-3 島津製作所の最新質量分析ソリューションのご紹介

**日時** 2016年3月28日(月) 12:00～12:50

**会場** D会場(札幌コンベンションセンター 107/108会議室)

### 講演1 高解像度イメージング質量顕微鏡iMScope TRIOによるイメージングMS分析

**緒方　是嗣** (株式会社島津製作所 分析計測事業部)

イメージング質量分析では、組織切片上でダイレクトに質量分析を行うことで、生体分子や投与薬剤を直接検出し、生体組織上における目的化合物の分布を画像として表示することで生体成分の分布可視化と同定を可能にします。このイメージング質量分析に特化したイメージング質量顕微鏡 iMScope TRIOは、顕微鏡で観察される生体切片上の生体分子や代謝物の局在を、サンプルの抽出・標識・染色をせずに、質量分析によって可視化(イメージング)することができます。本講演では、iMScope TRIOの概要、医学・薬学・農学分野での応用例を紹介します。

### 講演2 LC/MS/MSを用いたメタボロミクス研究へのアプローチ

**渡辺　淳** (株式会社島津製作所 分析計測事業部)

メタボロミクス研究では、アミノ酸、糖、脂質など、分析対象化合物が多岐にわたります。島津製作所ではこれらの化合物の一斉分析条件をパッケージ化したLC/MS/MSメソッドパッケージを用意しております。本講演では、島津製作所LC/MS/MS最新情報のご紹介とあわせ、このメソッドパッケージを用いたメタボロミクス研究への活用例として、一次代謝物メソッドパッケージを用いた生体試料の代謝物一斉分析、食品中の機能性成分の網羅的分析と多変量解析、脂質メディエーターメソッドパッケージを用いた生理活性を示す生体内脂質代謝物の一斉分析などを紹介します。

### 講演3 LC/MS/MSを用いた培養上清の一斉分析

**豊田　健一** (株式会社島津製作所 分析計測事業部)

発酵による有用物質や抗体医薬品の生産性向上のために、遺伝子組換えによる有用株の探索や培養プロセスの最適化が実施されています。培養上清成分を一斉に分析し、培養経過に伴う変化を連続的にモニタリングすることは、上記の目的に有用な情報を与えることが期待されます。本講演では、培地成分および主要分泌代謝物の計95 成分を17 分間で一斉分析可能な細胞培養プロファイリングメソッドパッケージを用いた、大腸菌の分析例を紹介します。

司会:**奥村　毅** (株式会社島津製作所 分析計測事業部)

お問合せ
(株)島津製作所　分析計測事業部　グローバルマーケティング部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町 1　TEL:075-823-1352

# 日本農芸化学会2016年度大会

## バイオ・ラッド　ラボラトリーズ

ランチョンセミナー　LS2-4

3月28日（月）　12:00～12:50
会場：札幌コンベンションセンター
小ホールE会場




# 抗体を用いた
# タンパク質定量アプリケーションの
# 最新情報

演題１　抗体を用いた前処理、MSアプリケーションのご紹介
中田 宣之（バイオ・ラッド ラボラトリーズ　マーケティング）

演題２　ウェスタンブロッティングにおける最新情報と正確なデータ取得について
熊谷剛史（バイオ・ラッド ラボラトリーズ　フィールドアプリケーションソリューション）

タンパク質の定量は、タンパク質の発現レベル確認や実験の前処理など研究には不可欠な作業ですが、夾雑物の存在や目的タンパク質の低い発現量（絶対量）、実験手法自体が持つ再現性や正確性の問題等により、再現性高く、正確なデータを得ることが難しいものでもあります。

実験手法による様々な問題点

◆ ウェスタンブロッティング
数多くのステップを経るウェスタンブロッティング実験では、手技や装置に起因する誤差やバックグラウンド、非特異的反応など、定量性の確保が難しい
近年、抗体品質の確認（Validation）が議論されている

◆ 免疫沈降
非特異的に結合したタンパク質の混入
回収効率

◆ Immuno-MRM (Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry)
目的タンパク質（ペプチド）を内在性レベルで検出するために前処理として濃縮が必要だが、濃縮に用いる抗体の作成にかかる時間やコスト、品質の確保が難しい

本ランチョンセミナーでは、抗体を用いたそれぞれの実験手法においていかに問題点を克服し、正確で再現性の高いデータを得るにはどうしたらよいかについて、Tipsや製品ソリューションをご紹介いたします。

BIO-RAD

**バイオ・ラッド　ラボラトリーズ株式会社**
www.bio-rad.com

# 日本農芸化学会2016年度大会

サイエックス ランチョンセミナー

プログラムNo.
**LS2-5**

## ポリアミン誘導体の検出並びに同定とその生理的意義

講演：　東京大学大学院　農学生命科学研究科
応用生命化学専攻　生物制御化学研究室
教授　浅見 忠男　先生

**3月28日(月)　12:00 ～**

会場：G会場(札幌コンベンションセンター 206会議室)

【要旨】　変異体の新しい形質について解析を行うことにより、原因遺伝子の機能を明らかにし続いての応用展開が可能になる。原因遺伝子が物質変換酵素であった場合には、その遺伝子機能と関連した生体内での物質について質量分析計を用いて解析することにより、変異体形質の原因となっている物質の同定と機能追究が可能となる。今回アシル転移酵素が活性化することにより病害抵抗性を示すようになったイネ*OsAT1*中で蓄積される新奇物質について有機合成と質量分析計による測定を併せた同定を行い、新しい病害抵抗性誘導剤としての可能性を追究したので、その概略について説明する。

スペルミジン(Spd)は植物に含まれる代表的なポリアミン類の一つであり、老化やストレス応答など様々な生理機能に関わっている。一方、そのヘキサノイル化された誘導体が老化と共に蓄積することが報告されていることから、Spdだけでなくアシル化されたSpd (acylSpds) が植物体において重要な機能を果たしている可能性が期待できる。我々は前回の本研究会で、スペルミジン中央の$N^4$位に炭素数12個でその11位に水酸基を持つ直鎖型アシル基を修飾した$N^4$-(11-hydroxylauroyl)spermidine (4N 11HydLau)と、4N 11HydLauの水酸基の位置が一つずれた$N^4$-(10-hydroxylauroyl)spermidine (4N 10HydLau)の2種類のacylSpdsが、病害抵抗性を示す組み換え体である*OsAT1*過剰発現体イネに蓄積する新規天然型acylSpdsであることを示した。続いて合成した4N10HydLauもしくは4N11HydLauを処理したイネではいもち病やごま葉枯病に対する病害抵抗性が誘導されることを明らかにした。また、イネには4N10HydLauや4N11HydLau以外にも脂肪酸とポリアミンがアミド結合したアシル化ポリアミンが内生していることも明らかにした。これらのアシル化ポリアミンの、イネ以外の植物における存在可能性やその構造の分布についても検討を行っている。

## *New! 新製品ご紹介*　SCIEX X500R QTOF system

*特徴*

- *簡単に精密質量が測定可能*
- *1台のプラットフォームで定性分析と定量分析が可能*
- *代謝物探索・定量に必要なソフトウェアを標準搭載*
- *最新のSCIEX OS*

お問い合わせはこちら >> E-mail: Japan.mkt@sciex.com



注)SWATH®ワークフローによりデータを取りこぼしません！

SCIEX　株式会社エービー・サイエックス

本社：〒140-0001　東京都品川区北品川4-7-35　御殿山トラストタワー21F
TEL:0120(318)551　FAX:0120(318)040
大阪：〒531-0072　大阪府大阪市北区豊崎3-19-3　ピアスタワー
http:www.sciex.jp　Email : jp_sales@sciex.com

© 2015 AB Sciex. For Research Use Only.  Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners.  AB SCIEX™ is being used under license

MKT13-310A

タバコ変異株の網羅的代謝物測定と解析

～ ターゲットパスウェイのスクリーニングと新規バイオマーカー探索 ～

座長　前田　斉嘉（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

発表者　吉田　達成（ブルカー・ダルトニクス株式会社）

代謝物を網羅的に測定し、生体活動を物質変化としてその機能を解明する研究が盛んに行われている。しかし、前処理法から測定法、解析に至る全てのプロセスを誰でも簡単に実施できるとは言い難い。特に、測定法に関しては測定対象物質により、GC/MS や LC/MS、NMR など様々な方法があり目的に応じ使い分けがされており、総ての物質を一つの測定法で検出しようとする事は困難である。一方、解析法は大きく分けて２つの目的に分類でき、目的に応じた解析ソフトが使われている。解析法の一つはターゲット代謝物の変動を詳細に検討するターゲットメタボロミクスであり、もう一方はストレスに応じ存在量を変動するバイオマーカーを見つける探索メタボロミクスが主流である。特にターゲットメタボロミクスでは注目するパスウェイに注目する事で効率よく分析、解析可能な環境が望まれる。難点は目的とするパスウェイが複数ある場合にはターゲット化合物数が多くなり解析にも時間がかかる事がネックである。

ブルカーが提案するメタボロミクス研究ソリューションは LC/MS,GC/MS、NMR の分析機器とそれぞれの測定結果を解析するソフトウエアで構成されている。解析ソフト PathwyScreener はパスウェイ情報をベースにしたターゲット解析とパスウェイ上に存在しない化合物を同時に見つけ出すことが可能で、注目する物質や酵素から目的のパスウェイを選択する事で研究を迅速に進める事ができる。

今回、野生タバコに内在する 17-Hydroxygeranyllinalool Diterpene Glycosides (HGL-DTGs)が、植食性阻害に大きく関係している事を、メタボロミクス手法を用いて解析した。その結果について報告する。HGL-DTGs 生合成ステップは、ジャスモン酸パスウェイ上で関係している酵素より解明し、更にその遺伝子レベルでの解析も考察した。

ブルカーが提案するメタボロミクストータルソリューションの活用例をやさしく解説しながら研究者の想像力を刺激する内容を展開する。

日本農芸化学会2016年度大会
アジレント・テクノロジー株式会社ランチョンセミナー

# 伝統発酵食品の機能性とマイクロフローラ

No.LS3-2

The Measure of Confidence

共催　日本農芸化学会 2016 年度大会／アジレント・テクノロジー株式会社

発酵食品と言えば、酒、味噌、醤油、納豆、ヨーグルトなどを連想しますが、これら以外に、日本各地には、なれずし、魚の糠漬け、魚醤油などのめずらしい伝統発酵食品も存在します。石川県は、上述の代表的な発酵食品の製造が盛んであるばかりでなく、かぶらずし、あじのすすき、フグ卵巣の糠漬、いしるなど数多くの伝統発酵食品が存在している地域でもあります。石川県が発酵王国と呼ばれているのは、上述の代表的な発酵食品のみならず多様な伝統発酵食品が同時に存在しているからです。

本ランチョンセミナーでは、北陸、特に石川県の伝統発酵食品を中心に、呈味や香りなどの化学特性やマイクロフローラ、単離した乳酸菌の特性や機能性について講演します。さらには、これらの研究と関連して、産学官連携による新商品開発事例やアジアの発酵食品の化学特性及び微生物学的特徴についても説明を行います。また、アジレント最新分析機器による機能性成分の分析についても紹介します。

座　長

**福島　道広　先生**
帯広畜産大学　食品科学研究部門
加工・利用学分野　教授

演　者

**榎本　俊樹　先生**
石川県立大学　生物資源環境学部
食品科学科　食品機能系　教授

**滝埜　昌彦**
アジレント・テクノロジー株式会社

日　程

2016 年 3 月 29 日（火）
12 : 00 ～ 12 : 50

会　場

C会場
札幌コンベンションセンター
中ホール B

参加には、ランチョンセミナーチケット（入場券）が必要です。開催当日、大会受付にて配布しております。

アジレント・テクノロジー株式会社
〒192-8510 東京都八王子市高倉町 9-1
フリーダイヤル：0120-477-111
www.agilent.com/chem/jp

Agilent Technologies

日本農芸化学会 2016 年度大会　ランチョンセミナー LS3-3

アミノ酸を測る。今のからだを知る。
aminoindex®
アミノインデックス®



# 血中アミノ酸プロファイリングの有用性
## ～アミノインデックス® ～


演者：**安東 敏彦**

味の素株式会社ウェルネス事業部
アミノインデックスグループ


近年のバイオインフォマティクスの流れは、遺伝子の解析 ( ゲノミクス ) から蛋白質の解析と機能の把握 ( プロテオミクス )、そして代謝物の解析 ( メタボロミクス ) へと発展している。これらの一連の流れは、生体システムの構成因子の理解の積み重ねから全体を把握しようと試みるアプローチと言える。我々は、代謝物ネットワークの中心的存在であるアミノ酸の濃度パターン ( アミノグラム ) によって生命現象レベルの複雑な関係の多元的解析から構成因子や機能を予測するアプローチを試みてきた。その研究の成果として、生体アミノ酸プロファイルを指標に健康状態を解析できる可能性を示した。

**日時：2016 年 3 月 29 日（火）12：00 ～ 12：50**

**会場：D 会場（札幌コンベンションセンター 107/108 会議室）**

**共催：味の素株式会社**

**定員 240 名**

# 日本農芸化学会2016年度大会
# LS3-4



テーマ

# アロエステロール®の機能性研究における新展開

**日　時**

2016年 3月29日 火　　第3日目 12：00～12：50

**場　所**

E会場（札幌コンベンションセンター 小ホール）

〒003-0006 札幌市白石区東札幌6条1丁目1-1　　TEL　011-817-1010（代）

**座　長**

京都大学　大学院農学研究科
食品生物科学専攻　　教授　　**河田 照雄 先生**

**講　演**

① **アロエステロール®の生理機能について**

京都大学　大学院農学研究科
食品生物科学専攻　　准教授　　**後藤　剛 先生**

② **アロエステロール®経口摂取による皮膚に対する作用とそのメカニズム**

森永乳業株式会社
素材応用研究所　　主任研究員　　**田中 美順**

共　催　　日本農芸化学会2016年度大会・森永乳業株式会社

明日をもっとおいしく
meiji

LS3−5　日本農芸化学会2016年度大会

**株式会社 明治** ランチョンセミナー

# 乳酸菌のあらたな可能性～ヨーグルトの免疫効果への期待～

2016年3月29日（火）　12:00−12:50

F会場（札幌コンベンションセンター・204号室）



座長　**上野川 修一先生**

（東京大学名誉教授）



講演者　**竹田 和由 先生**

（順天堂大学大学院医学研究科
研究基盤センター細胞機能研究室 准教授）

1991年東北大学大学院歯学研究科博士課程修了。1991年南カルフォルニア大学医学部微生物学教室、1995年新潟大学医学部医動物学講座助手。1996年順天堂大学医学部免疫学講座助手、1999年同講師、2007年同准教授。また、2005年豪州Peter MacCallum Cancer Centre, Cancer Immunology Program 客員准教授併任。2014年より現職。
2000年には日本癌学会奨励賞を受賞。専門は、腫瘍免疫、NK・NKT細胞の機能解析。

免疫は病気から体を守り健康を保つための生体防御機構です。

近年の健康ブームからTVや雑誌等でも「免疫」という言葉を頻繁に見かけるようになりました。

このように多くの方に関心を持たれるようになった免疫ですが、誤解されている所も多々あるようです。たとえば、免疫を上げると健康になると思われている方も多い様ですが、それは間違いです。免疫を上げると病気になりにくく（ならなく）なり健康を害しにくくなるだけで、免疫を上げても健康が増進されるわけではありません。

そこで「免疫」と免疫の最前線で働くNK細胞について分かりやすく解説した後に、TVや雑誌等で取り上げられている生活の中で免疫を上げるということについて、お話ししたいと思います。特に、乳酸菌を使用したヨーグルトは、腸内細菌叢に影響を及ぼすだけではなく、直接的に免疫を調整する作用があることで広く注目されています。

最近の研究で、乳酸菌にはNK活性を上げるだけではなく、ワクチンの効果を高めるアジュバンド効果もあり、免疫機能全体を上げる可能性が示されました。食品等が直接的に、また腸内細菌叢の変化により間接的に免疫に影響を与えることは最近次々と明らかにされており、一般からも広く注目されています。今後の研究の進展が非常に期待されている食品免疫において、その一端である私たちの研究についても御紹介したいと思います。

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　ランチョンセミナー LS3-6

3 月 29 日（火）12：00～12：50、G 会場（札幌コンベンションセンター 206 会議室）

# 高速溶媒抽出装置を用いた迅速前処理から Orbitrap 質量分析計による高精度測定まで様々な化学特性の化合物の前処理・分離・検出

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社　高原　健太郎

研究過程で求められる測定対象化合物には、アルコール、アミノ酸、糖、脂質、二次代謝物など、極性分子あるいは非極性分子、液体あるいは気体と化学特性が多岐にわたります。選択性高く測定対象を検出することはもちろんですが、そのためには、検出器の特性を理解した適切な前処理や適切なクロマトグラフによる分離が必要です。特に参考できる既存の測定系が存在する場合は良いですが、測定対象物が増えるとそれらを網羅する測定系を新規開発する必要が生じる場合が多く、労力がかかります。本発表では、広いラインナップの分析装置を提供しているサーモフィッシャーならではの、化合物特性に応じた前処理・分離・検出を網羅した分析機器横断的な測定系をご提案します。その中でも、下記に示す弊社に特徴的な分析技術に関しては実用例をご紹介いたします。

―高速溶媒抽出装置（**A**ccelerated **S**olvent **E**xtractor: ASE）

ASE は、固体あるいは半固体のサンプルから溶媒を使い高温・高圧条件で迅速に自動抽出するシステムです。数分でサンプルから化合物を抽出・ろ過・クリーンアップ可能です。操作が簡単で、使用溶剤量が少ない費用対効果の優れた手法です。***脂質、バイオディーゼル、二次代謝物に見られる芳香族化合物***など**疎水性の高い化合物の前処理**に適しています。

―イオンクロマトグラフ（**I**on **C**hromatography: IC）

IC は、移動相に超純水を使用し、極性官能基を持つポリマーカラムに化合物を保持させて、塩のグラジエントで溶出する手法です。***有機酸***、***糖***、***核酸***、そして***リン酸化合物***といった一般的な液体クロマトグラフィーで分離困難な**親水性化合物の分離**に非常に適しています。

―Orbitrap 質量分析計

Orbitrap 質量分析計は、2005 年にリリースされた、わずかな質量の違いを識別できる極めて選択性に優れた先端技術を搭載した質量分析計です。検出した精密質量で、化合物を分離・識別できるため、***複雑なサンプルの測定***や***微量成分の検出***に適しています。さらに、一度の分析で数千もの化合物を検出できる能力を持つので、サンプルの性質に関わる未知化合物を探索する研究にも用いられます。得られた質量が正確であるため、観測値から**分子式が決定**できます。その上、3000 種を超える既知化合物の実測 MS/MS スペクトルを集積した mzCloud ライブラリにより、**未知化合物の構造推定**を強力にサポートします。

本セミナーでは、これから分析装置を用いて生体低分子を測定する研究者に、どのような分析装置を採用あるいは導入すべきかについてご提案いたします。

日本農芸化学会2016年度大会
よつ葉乳業株式会社ランチョンセミナー

L 4-1

# 古代から受け継がれる乳業技術

## -バターつくりの民族学-

**2016年3月30日（水） 12:00-12:50**

**B会場**



**講師：平田 昌弘 先生**

（帯広畜産大学　地域環境学研究部門　准教授）

**座長：元島　英雅**

（よつ葉乳業(株)　研究統括部中央研究所　首席研究員）

搾乳は今から約1万年前に西アジアで発明されました。以後、乳加工技術はユーラシア大陸で多様に発達し、乳製品は人びとの生活を大きく支えてきました。西アジアでは、ヒツジの革袋をチャーンに用い、酸乳を2時間かけて振盪し、発酵バターを加工しています。高温下で保存するために、バターはバターオイルにします。南アジアでは、酸乳をバター加工に用いるものの、チャーンに壷と回転式攪拌棒を用いています。一方、冷涼な北方アジアでは、生乳からクリームを掬い取り、クリームを加熱してバターオイルに加工しています。このようにバター加工などの乳脂肪分画は地域的な特徴を示し、そうした在来知は現在の技術革新の源泉となり、洗練されて現代に脈々と受け継がれています。

本講演では、これまでのフィールドワークから得られた知見に基づいて、乳加工体系の特徴を説明するとともに、バターを中心とする伝統的加工技術について具体例を示します。合わせて、現在の乳業工場で行われている最新のバター製造技術についても紹介し、その関連性について述べます。

北海道のおいしさを、まっすぐ。
よつ葉

日本農芸化学会2016年度大会

# 物産フードサイエンス株式会社 ランチョンセミナー

**LS4-2**

# ケストースのプレバイオティクス効果

## ～アトピー性皮膚炎の改善効果等生理機能～

**日時：** 2016年3月30日（水） 12:00～12:50
**会場：** 札幌コンベンションセンター C会場（中ホール B）

**講 師：古賀 泰裕 先生** /東海大学 医学部 教授

**演 者：栃尾 巧**/物産フードサイエンス（株） 研究開発センター 副センター長
**座 長：中村 圭伸**/物産フードサイエンス（株） 研究開発センター センター長

「ケストース」は、自然界ではタマネギやアスパラガスなどに含まれる糖質で、スクロースのフルクトース残基に1分子のフルクトースが結合した構造を有するプレバイオティクス素材の1つである。砂糖に類似した良好な味質を示し、血糖値に影響を与えず、かつ結晶性糖質であるため加工特性や汎用性が非常に高い食品である。

プレバイオティクスとは「腸内細菌を活性化することで宿主の健康に寄与する、非生物性の食品成分」と定義される。ケストースはこれまでの試験検討により、他のプレバイオティクス素材と比べ、ビフィズス菌やそれ以外の有用菌に対する選択的増殖促進効果が高いことが明らかとなっている。またアトピー性皮膚炎症状の改善、脂質代謝改善などの作用が示されており、その他にも様々な機能が明らかになりつつある。

本ランチョンセミナーでは、この機能性糖質「ケストース」について、乳幼児アトピー性皮膚炎に対するケストース摂取時の改善効果の検証を中心に、生理機能に関する各種知見を紹介する。

日本農芸化学会2016年度大会

日清食品ホールディングス株式会社
ランチョンセミナー　LS4-3

# 腸内細菌と健康

日時：3月30日(水) 12:00～12:50
会場：D会場(札幌コンベンションセンター　107/108会議室)

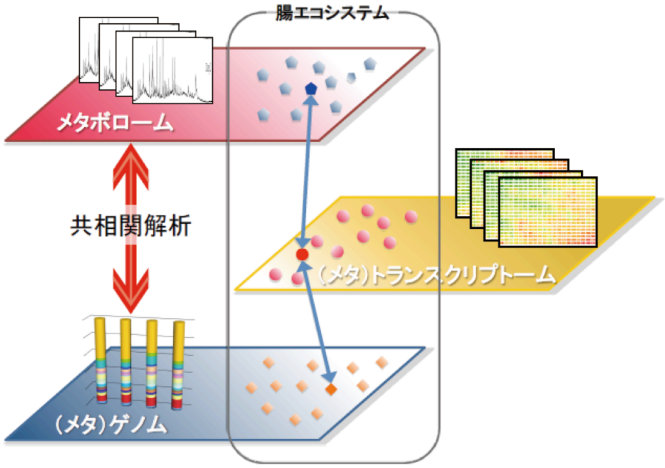
## 1. 腸内細菌と生体防御・免疫系－統合オミクス手法によるアプローチ

### 大野　博司 先生

理化学研究所 統合生命医科学研究センター　グループディレクター

腸内細菌叢は、多種多様な菌同士の相互作用により複雑な代謝系を形成するとともに、宿主との相互作用により「腸エコシステム」と呼ばれるユニークな環境系を構築し、ヒトの生理・病理に多大な影響を与えている。演者らは、ゲノム（DNA レベル）、トランスクリプトーム（RNA レベル）、メタボローム（代謝産物レベル）など異なるレベルの網羅的解析法を組み合わせた統合オミクス手法を提唱し、その有用性を示してきた。

本講演では、統合オミクス統合解析法の応用により得られた成果として、1）ビフィズス菌が産生する酢酸による大腸上皮細胞保護作用に基づくマウスの O157 感染死予防のメカニズム、ならびに、2）腸内細菌叢が産生する酪酸による、エピゲノム制御を介した大腸制御性 T 細胞の分化誘導メカニズムについて概説する。




**大野先生略歴**

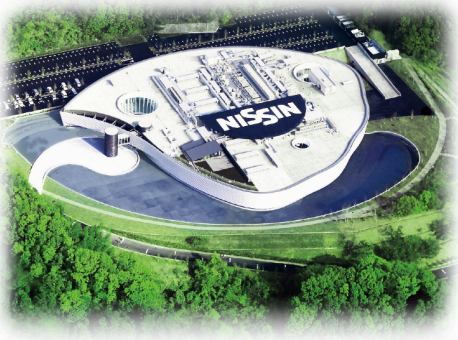
1983 年　千葉大学医学部卒業、1991 年 千葉大学大学院修了（医学博士）
1997 年～ 1999 年 千葉大学医学部　助教授、1999 年～ 2004 年　金沢大学がん研究所　教授
2002 年～ 2013 年 理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター　チームリーダー
2013 年～　理化学研究所 統合生命医科学研究センター粘膜システム研究グループ　グループディレクター

## 2. 乳酸菌 *Lactococcus lactis* T21株の抗アレルギー作用

### 砂田　洋介

日清食品ホールディングス株式会社　健康科学研究部

弊社では免疫調節作用の強い乳酸菌 *Lactococcus lactis* T21 株を選抜しました。ここでは T21 株の鼻アレルギーに対する効果について検証した結果を紹介させていただきます。




**司会：田辺　創一**
日清食品ホールディングス株式会社　健康科学研究部

NISSIN 日清食品ホールディングス

日本農芸化学会 2016 年度大会
日本ウォーターズ株式会社

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

# ランチョンセミナー

**日時：3月30日（水）12:00～12:50**

**会場：E 会場（札幌コンベンションセンター 小ホール）**

プログラム No.：LS4 - 4

## 最新 Q-Tof MS を用いた 食品メタボロミクスの分析と包括的解析手法

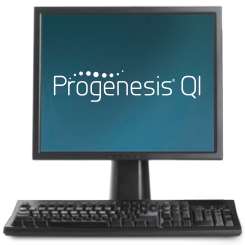
### ～有意な差の成分の抽出・同定はどのように行う？～

環太平洋パートナーシップ（TPP）協定の大筋合意に伴い輸出入の規制緩和が見込まれるとともに、付加価値が高く良質の日本食品の海外進出が期待されます。

Q-Tof MS を用いた食品のメタボロミクス分析は良質な製品の開発・生産を支援する手法の1つです。食品メタボロミクス分析では、アルコールやアミノ酸を始めとする一次代謝物、カロテノイドや色素などの二次代謝物、製造工程で生じるメイラード化合物、香り成分のフレーバーなど対象化合物が多岐にわたります。

このため、Q-Tof MS 前段のクロマトグラフィーも LC（逆相および HILIC）、GC など様々な分離モードが要求され、得られた膨大な情報から差異成分を効率よく抽出、同定することが必要です。

本セミナーでは最新の Q-Tof MS に LC や GC を組み合わせた網羅的分析システムと視覚的で効率的な解析が行えるソフトウェアを用いた食品製品や植物サンプルについてのアプリケーションをご紹介します。







イオンモビリティー質量分析計

**日本ウォーターズ株式会社** www.waters.com
東京本社 〒140-0001 東京都品川区北品川 1-3-12 第5小池ビル TEL 03-3471-7191（代表） FAX 03-3471-7118
大阪支社 〒532-0011 大阪市淀川区西中島 5-14-10 新大阪トヨタビル 11F TEL 06-6304-8888（代表） FAX 06-6300-1734
ショールーム 東京 大阪
サービス拠点 東京 大阪 札幌 福島 静岡 富山 名古屋 徳島 福岡

本書の内容の一部または全部を無断で複写複製(コピー)及び転載することは、法律で認められた場合を除き、権利の侵害となりますので、あらかじめ本会あて許諾を求めてください。
Copyright © 2016 by Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry

日 本 農 芸 化 学 会 2016 年 度 大 会 講 演 要 旨 集 (オンライン)
Proceedings (online) of the Annual Meeting 2016 Sapporo of
Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry
2016 年 3 月 5 日公開　　Published online 5 March 2016　　ISSN 2186-7976

発行者　　公益社団法人日本農芸化学会　　JSBBA　　http://www.jsbba.or.jp/
PUBLISHER　113-0032 東京都文京区弥生 2-4-16 学会センタービル 2 階　　Phone 03-3811-8789

データ作成者 株式会社ダイナコム　　DYNACOM　　http://www.dynacom.co.jp/
ASSISTS　　261-7125 千葉県千葉市美浜区中瀬 2-6-1WBG マリブイースト 25 階　　Phone 043-213-8131
小宮山印刷工業株式会社　　COMOIYAMA PRINTING　　http://www.kopas.co.jp/