

日本農芸化学会中四国支部

第 50 回記念講演会特集

第50回記念講演会を祝して

日本農芸化学会中四国支部長 川向 誠

日本農芸化学会中四国支部第50回記念講演会が、盛大に開催されることに心よりお慶び申し上げます。

中四国支部は、2001年4月に、関西支部と西日本支部に所属していた中四国地域9県が独立して7番目の支部として発足しました。新支部の設立には幾多の困難がありましたが、関係者のご努力の賜物、順調に今日まで活発に支部活動が運営されて来ております。『日本農芸化学会中四国支部の歩み』にありますように、これまで、年1回の支部大会と年2回の例会を軸に、市民フォーラムや若手シンポジウムなどの行事に加え、各種支部賞の授与など活発な活動を行って来ました。2004年度（広島）と2015年度（岡山）に全国大会を開催し、成功裡に運営できたことから、中四国支部は現在安定期にあると言えます。支部創設時から今日に至るまで、中四国支部の発足、発展に貢献されました諸先生方、積極的な支部活動を頂いた幹事、参与、会員の皆様に感謝申し上げます。

中四国支部は本年度で創立17年目になります。事務局を2年ごとに9県の中で持ち回りし、運営しておりますことから、各県の代表者も運営に責任感を感じ、そのことが中四国支部の活力になっております。このような方式をとって運営しておりますのは、中四国支部のみです。再来年度からの徳島事務局で、中四国を1周することになり、どの県でも運営ができるという、全国でも例がない支部の運営体制が確立します。私ごとですが、設立当初から今日の第50回記念講演会まで、大半の例会、支部会に参加しておりましたが、毎回の例会にたくさんの先生が参加され、さながら、年3回支部大会を開催しているような感想も持ちます。全国でも中四国支部が最も活発に活動していると自信を持って良いのではないのでしょうか。

一方で、現在の中四国支部の会員数は900名を少し超えるぐらいで、1,000人を超えていた時期からしますと、少し減少しておりますことは残念です。今年度から発足する学生会員の延長制度（社会人の3年間は学生会員費で会員が維持される）を、是非活用されて、社会人になられた後も会員を維持していただけますとありがたいと思います。

日本農芸化学会は、国内外におけるバイオサイエンス・バイオテクノロジーを中心とする多彩な科学領域をその領分として、「生命」「食糧」「環境」に関する科学、技術、文化の発展に寄与してきています。全国の大学で農芸化学の名前が失われてきた中で、中四国支部の大学では農芸化学の名前が復活してきております。高知大学では農芸化学科が、岡山大学や鳥取大学には農芸化学コースがあります。日本農芸化学会の中四国地域で果たす役割は今後とも益々大きくなっていくものと思われます。加えて、中四国にはそれぞれ連合農学研究科が設置されておりまして、各大学の連帯が強いことも特徴です。

日本農芸化学会は2024年度に100周年を迎えることになり、先日も徳島大学で、Visionary100と冠した講演会が開催されました。会長、副会長、前会長、前副会長含め多数の方が参加されて、その熱気に私も驚きました。広島での全国大会も2023年度に予定されております。このよ

うな全国レベルの活動に加え、支部活動を引き続き活発に維持するためには、次世代を担う若手会員の皆様の活躍が大事です。是非積極的に例会で発表し、支部奨励賞（学生部門）や支部奨励賞に応募し、若手シンポジウムを企画していただければと思います。本年度より支部奨励賞（学生部門）の大学院生の受賞者に例会発表交通費の補助制度を設定しました。従前のように支部では技術賞も設定しておりますので、企業の方の積極的な応募を期待しております。支部会員や賛助企業の皆様の引き続きの温かなご支援を賜りますよう宜しくお願い申し上げます。

結びに、支部内の会員皆様の一層のご発展とご健勝をお祈りいたしまして、支部長からの挨拶とさせていただきます。

2018 年 1 月 27 日

日本農芸化学会中四国支部のあゆみ

年月日	活動、支部講演会	全国大会、市民フォーラム、若手研究者シンポ
1994年4月	中四国支部設立準備会発足	
1994年7月	中四国支部設立の希望に関するアンケート調査	
1995年8月	日本農芸化学会1995年大会(北海道大学)において、 中四国支部設立についての話し合い	
1995年11月～ 1997年5月	関西支部、西日本支部への中四国支部設立の働きかけ	
～2000年6月	中四国ブロック市民フォーラム開催 第1回 岡山大学(食の科学)1997年5月24日 第3回 島根大学(「いのち」と「食」を考える)1998年5月23日 第5回 鳥取県民文化会館(環境とバイオ)1999年5月22日 第7回 愛媛大学(食とバイオテクノロジー)2000年11月11日	第2回 山口大学(遺伝子組換え植物の現状と将来)1997年12月12日 第4回 高知女子大学(食と健康)1998年10月11日 第6回 広島大学(環境保全とバイオテクノロジー)2000年6月3日
2000年7月	関西支部、西日本支部が支部評議員会において 中四国支部設立を了承	
2000年7月8日	中四国支部設立準備会執行部会議(岡山大学) 17名参加	
2000年11月24日	全国評議員会で中四国支部設立承認	
2000年12月9日	中四国支部設立準備会執行部会議(岡山大学) 26名参加	
2001年4月21日	中四国支部設立総会(岡山ロイヤルホテル)100名参加	
2001年4月 ～2003年3月 事務局:岡山 支部長 田中英彦	第1回 講演会(支部大会) 岡山大学 2001年10月12日-13日 第2回 講演会(支部例会) 香川大学 2002年1月26日 第3回 講演会(支部例会) 岡山県立大学 2002年5月25日 第4回 講演会(支部大会) 島根大学 2002年9月19日-20日 第5回 講演会(支部例会) 高知大学 2003年1月25日	第1回 市民フォーラム 岡山ロイヤルホテル 2001年4月21日 第2回 市民フォーラム 松江テルサ 2002年9月21日 第3回 市民フォーラム 広島県民文化センターふくやま 2002年11月30日 第1回 若手研究者シンポ 島根大学 2002年9月20日 第2回 若手研究者シンポ 徳島大学 2002年10月22日
2003年4月 ～2005年3月 事務局:広島 支部長 宮川都吉	第6回 講演会(支部例会) 広島大学 2003年5月31日 第7回 講演会(支部大会) 鹿児島大学 2003年9月19日-20日 第8回 講演会(支部例会) 愛媛大学 2004年1月24日 第9回 講演会(支部例会) 鳥取大学 2004年6月12日 第10回 講演会(支部大会) 徳島大学 2004年9月17日-18日 第11回 講演会(支部例会) 岡山大学 2005年1月22日	全国大会2004年度 広島大学 2004年3月28日-31日 第4回 市民フォーラム 高松市生涯学習センター 2003年11月8日 第5回 市民フォーラム 山口大学 2004年11月3日 第3回 若手研究者シンポ 岡山大学 2003年6月14日 第4回 若手研究者シンポ 広島大学 2003年8月2日 第5回 若手研究者シンポ 鳥取大学 2004年6月11日 第6回 若手研究者シンポ 広島大学 2004年11月27日
2005年4月 ～2007年3月 事務局:愛媛 支部長 海老原清	第12回 講演会(支部例会) 山口大学 2005年5月21日 第13回 講演会(支部大会) 大阪大学 2005年9月30日-10月1日 第14回 講演会(支部例会) 福山大学 2006年1月28日 第15回 講演会(支部例会) くびきメッセ(島根) 2006年5月13日 第16回 講演会(支部大会) 愛媛大学 2006年9月15日-16日 第17回 講演会(支部例会) 香川大学 2007年1月27日	第6回 市民フォーラム 東広島市民文化センター 2005年10月6日 第7回 市民フォーラム 岡山大学 2006年9月2日 第8回 市民フォーラム 山口大学 2007年2月3日 第9回 市民フォーラム 米子コンベンションセンター 2007年3月17日 第7回 若手研究者シンポ 山口大学 2005年5月20日 第8回 若手研究者シンポ 岡山大学 2006年12月9日-10日
2007年4月 ～2009年3月 事務局:鳥取 支部長 和泉好計	第18回 講演会(支部例会) 県立広島大学 2007年5月12日 第19回 講演会(支部大会) 山口大学 2007年9月14日-15日 第20回 講演会(支部例会) 徳島大学 2008年1月26日 第21回 講演会(支部例会) 岡山理科大学 2008年5月24日 第22回 講演会(支部大会) 鳥取大学 2008年9月12日-13日 第23回 講演会(支部例会) 高知大学 2009年1月24日	第10回 市民フォーラム 高知市文化プラザ 2007年9月22日 第11回 市民フォーラム 徳島大学 2008年12月6日 第9回 若手研究者シンポ 岡山大学 2008年5月23日-24日
2009年4月 ～2011年3月 事務局:香川 支部長 早川茂	第24回 講演会(支部例会) くびきメッセ(島根) 2009年5月23日 第25回 講演会(支部大会) 琉球大学 2009年10月30日-31日 第26回 講演会(支部例会) 愛媛大学 2010年1月23日 第27回 講演会(支部例会) 広島大学 2010年6月5日 第28回 講演会(支部大会) 香川大学 2010年9月24日-25日 第29回 講演会(支部例会) 徳島大学 2011年1月22日	第12回 市民フォーラム 鳥取県立生涯学習センター 2009年11月7日 第13回 市民フォーラム 愛媛大学 2010年10月2日 第10回 若手研究者シンポ 岡山大学 2009年5月8日-9日 第11回 若手研究者シンポ 岡山大学 2010年5月7日-8日 第12回 若手研究者シンポ 島根大学 2010年10月30日
2011年4月 ～2013年3月 事務局:山口 支部長 山田守	第30回 講演会(支部例会) 岡山大学 2011年5月21日 第31回 講演会(支部大会) 宮崎大学 2011年9月16日-17日 第32回 講演会(支部例会) 鳥取大学 2012年1月21日 第33回 講演会(支部例会) 愛媛大学 2012年6月2日 第34回 講演会(支部大会) 山口大学 2012年9月21日-22日 第35回 講演会(支部例会) 高知大学 2013年1月26日	第14回 市民フォーラム 岡山大学 2011年5月21日 第15回 市民フォーラム 松江テルサ 2011年11月3日 第16回 市民フォーラム 鳥取大学 2012年1月21日 第17回 市民フォーラム 広島大学 2012年3月17日 第18回 市民フォーラム 愛媛大学 2012年5月26日 第19回 市民フォーラム サンポートホール高松 2012年6月23日 第20回 市民フォーラム 福山大学 2012年9月15日 第21回 市民フォーラム 山口大学 2012年9月22日 第22回 市民フォーラム 高知大学 2013年1月26日 第13回 若手研究者シンポ 岡山大学 2011年5月20日-21日 第14回 若手研究者シンポ 徳島大学 2012年10月27日
2013年4月 ～2015年3月 事務局:岡山 支部長 稲垣賢二	第36回 講演会(支部例会) 島根大学 2013年6月8日 第37回 講演会(支部大会) 県立広島大学 2013年9月5日-6日 第38回 講演会(支部例会) 香川大学 2014年1月25日 第39回 講演会(支部例会) 福山大学 2014年5月31日 第40回 講演会(支部大会) 徳島大学 2014年9月26日-27日 第41回 講演会(支部例会) 水産大学校 2015年1月24日	全国大会2015年度 岡山大学 2015年3月26日-29日 第23回 市民フォーラム 中国新聞ホール(広島) 2013年9月7日 第24回 市民フォーラム 愛媛大学 2014年11月8日 第15回 若手研究者シンポ 岡山大学 2013年5月10日-11日 第16回 若手研究者シンポ 高知大学 2013年11月2日 第17回 若手研究者シンポ 岡山大学 2014年5月16日-17日 第18回 若手研究者シンポ 愛媛大学 2014年9月20日
2015年4月 ～2017年3月 事務局:高知 支部長 大西浩平	第42回 講演会(支部例会) 鳥取大学 2015年6月13日 第43回 講演会(支部大会) 愛媛大学 2015年9月17日-18日 第44回 講演会(支部例会) 岡山県立大学 2016年1月23日 第45回 講演会(支部例会) 香川大学 2016年6月11日 第46回 講演会(支部大会) 高知大学 2016年9月15日-16日 第47回 講演会(支部例会) 島根大学 2017年1月28日	第25回 市民フォーラム サテライトキャンパスひろしま 2015年7月25日、8月1日 第26回 市民フォーラム サンポートホール高松 2015年11月28日 第27回 市民フォーラム 岡山県立大学 2016年1月23日 第28回 市民フォーラム 広島県民文化センター 2016年9月3日 サテライトキャンパスひろしま 2016年9月10日 第29回 市民フォーラム 高知会館 2016年9月17日 第30回 市民フォーラム 鳥取短期大学シグナスホール 2016年10月8日 第31回 市民フォーラム カリエンテ山口 2016年11月5日 第19回 若手研究者シンポ 岡山大学 2015年5月15日-16日 第20回 若手研究者シンポ 島根大学 2015年10月17日 第21回 若手研究者シンポ 香川大学 2015年10月31日 第22回 若手研究者シンポ 高知大学 2016年4月23日 第23回 若手研究者シンポ 岡山大学 2016年5月20日-21日 第24回 若手研究者シンポ 水産大学校 2016年7月28日-29日
2017年4月 ～2019年3月 事務局:島根 支部長 川向誠	第48回 講演会(支部例会) 徳島大学 2017年6月17日 第49回 講演会(支部大会) 大阪府立大学 2017年9月21日-22日 第50回 講演会(支部例会) 広島大学 2018年1月27日	第32回 市民フォーラム 広島県民文化センター 2017年7月22日、8月5日 広島大学 2017年9月2日、9月9日 第33回 市民フォーラム 松江テルサ 2017年9月9日 第25回 若手研究者シンポ 岡山大学 2017年5月19日-20日 第26回 若手研究者シンポ 酒類総合研究所 2017年10月6日-7日

農芸化学奨励賞受賞講演
農芸化学研究企画賞受賞講演

講演要旨

食品機能学によるプレニルフラボノイドの特性解明

向井理恵（徳島大院・生物資源）

Diphenylpropane 構造を共通骨格とするフラボノイドは植物が生産する二次代謝物であり、重要な食品機能成分として注目されている。プレニルフラボノイドは、diphenylpropane 構造に 1 つ以上の C5 isoprene (dimethylallyl) unit (s) が結合した構造を有する一連の化合物群である。プレニルフラボノイドは、非プレニル型よりも *in vitro* において高い生理活性を持つことが報告されてきた。植物においてフラボノイドへのプレニル基転移酵素が同定され、遺伝子操作作物においてこれらプレニルフラボノイドを生産する研究も進んでいる。これらの背景から、プレニルフラボノイドは食品機能成分の有力な候補物質であると考えた。そこで、本研究課題では各種プレニルフラボノイドを用いて、非プレニル型のフラボノイドと比較することで、食品機能成分としてのプレニルフラボノイドの特性を下記のとおり明らかにした。

1. 新規生理活性の発見—廃用性筋萎縮の予防・改善へ向けて—

近年、廃用性筋萎縮への対応策が求められている。骨格筋タンパク質萎縮の経路では、IGF-1/mTOR/Akt のリン酸化カスケードが抑制され、筋タンパク質分解に特異的に関与するユビキチンリガーゼ (Atrogin-1 等) が発現することが知られている。ナリングениンの 8 位にプレニル基が結合した 8-プレニルナリングениンを廃用性筋萎縮モデルマウスに摂取させた場合、Akt のリン酸化を活性化することで Atrogin-1 の発現を抑制し、骨格筋量低下を予防した。非プレニル型のナリングениンでは効果が認められなかったことから、プレニル基の優位性が明らかとなった。同研究において 8-プレニルナリングениンの骨格筋蓄積量を HPLC で分析したところ、ナリングениンに比較して約 10 倍高いことが認められた。また、8-プレニルナリングениンの血中濃度を測定した結果では、ナリングениンよりも血中からの消失が遅かった。このように、プレニルフラボノイドの強い生理活性の要因のひとつに体内動態の向上が関与することが示唆された。

(*PLoS One*, Vol.7, e45048, 2012; *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol.311, R1022, 2016)

2. プレニルフラボノイドの標的臓器と生体利用性

経口で摂取したフラボノイドの活性発現は体内動態と関連することから、その解明は重要である。マウスに 8-プレニルケルセチンを混餌により 2 週間摂取させた場合、肝臓や腎臓における蓄積量はケルセチンの場合よりも 10 倍以上多いことが示された。一方で、生体吸収性の指標である単回摂取後の血中とリンパ液中の濃度を測定した結果では、8-プレニルケルセチンで低く、小腸上皮モデル Caco-2 細胞を用いた腸管透過実験でも 8-プレニルケルセチンの基底膜側への移行量が極めて少ないことを発見した。このように 8-プレニルケルセチンは吸収されにくいものの、一部の臓器で高い蓄積性を示すという矛盾した結果が示された。この矛盾を解明するために、臓器モデル細胞への取り込み実験を行った。その結果、8-プレニルケルセチンの細胞内取り込み量はケルセチンよりも 10 倍程度多くなり、プレニル型の細胞内蓄積は非プレニル型よりも長い時間維持された。さらに 8-プレニルケルセチンはケルセチンとは異なり、ABC トランスポーターを介した細胞外への排出をほぼ受けなかった。これらの実験事実から、プレニルフラボノイドは臓器構成細胞への取り込み率が高くかつ細胞から排出されにくいことで、低い吸収性を補い臓器内での蓄積が上昇すると結論した。

(*J Nutr*, Vol.143, p1558, 2013)

謝辞 本研究は、主に徳島大学において実施されたものです。本研究を支えてくださいました皆様に感謝いたします。特に徳島大学名誉教授（現甲南女子大学）・寺尾純二先生には本研究課題への多くのご指導と励ましをいただきましたことを深謝いたします。

消化汚泥を基質とした水素発酵に関するバイオテクノロジー基盤研究

藤井克彦（山口大院・創科）

我が国では全国約 2,100 箇所の下水処理場で年間 145 億 m^3 の下水が浄化され、主に活性汚泥法と呼ばれる処理法が採用されている。この処理法は、好気性微生物により下水中の有機物を無機化する技術であり、処理効率と稼動コストの面で優れているが、処理にともなって微生物の増殖菌体が大量に発生するという課題がある。この増殖菌体は余剰汚泥と呼ばれ、年間 77,000 千 t が排出されている。

余剰汚泥の減容や有効利用法には多くの研究例があるが、その中で実用技術として普及しているものは嫌気消化法であり、嫌気菌叢により余剰汚泥の可溶成分からバイオガスを得ることができる。しかし、嫌気消化による汚泥減容率は一般に 30% 程度に留まり、残りの 70% は『これ以上は消化（生分解）しにくい残渣』となる。この残渣は消化汚泥と呼ばれ、ここからさらにバイオガスを生産する微生物利用技術は実用化されていない。申請者らは最近になって、この消化汚泥を分解できる糸状菌 6 株を森林土壌から見つけ、論文発表および特許出願を行った。消化汚泥分解菌はキチナーゼ、キシラナーゼ、ケラチナーゼといった酵素によって消化汚泥を可溶化することがわかった。

他方、嫌気消化で働くバイオガス生産菌叢は多様な属種の嫌気菌で構成され、その役割に応じて①加水分解菌、②酸・水素生産菌、③メタン生産菌の 3 者に分類できる。彼らが協同的に働くことで余剰汚泥の可溶成分をバイオガスへと変換している。しかしメタン生産菌の生育が遅いことがバイオガス生産速度のボトルネックとなっていることから、加水分解菌と酸・水素生産菌の併用（メタン生産菌を使わない）で再生可能エネルギーとして期待されている水素を生産する試みも増えつつある。

申請者は、消化汚泥分解菌と酸・水素生産菌を使って消化汚泥から水素を含むバイオガスを生産できるのではないかと着想した。すなわち、消化汚泥分解菌で消化汚泥を低分子化し、これを基質として酸・水素生産菌が水素を発酵生産できるのではないかと考えた。この一連の微生物反応を実現するバイオプロセスを開発したいと考えており、具体的には以下の 3 項目に取り組んでいるところである。

（1）消化汚泥分解菌の凝集剤耐性を改善する

消化汚泥分解菌は、汚泥脱水時に使用される凝集剤（ポリ塩化アルミニウム）が存在すると生育が遅くなるという弱点がある。このような事情から、これまでは凝集剤を酸で溶出除去した汚泥を用いて試験を行ってきた。しかし分解菌を廃棄物資源技術として応用するためには酸処理をしない汚泥で分解菌を生育させられることが望ましい。現在、高濃度の汚泥を含む培養液で長期培養することにより凝集剤耐性が向上した株が得られないか検討中である。

（2）汚泥分解酵素と併用可能な水素生産菌叢を開発する

消化汚泥分解菌は 30℃ を至適生育温度とし 37℃ 以上では生育できないが、分解菌が生産する酵素（キチナーゼ、キシラナーゼ、ケラチナーゼ）は 50℃ でも酵素活性が高い。そこで 50℃ で水素を生産できる菌叢を開発しているところであり、少量ながらも水素を生産する菌叢を得ることができた。今後は菌叢の水素生産能の改善を目指すとともに、分解菌の酵素と組み合わせた際に菌叢の水素生産量が増加するかを検討していきたい。

（3）消化汚泥資源化プロセスを試作する

得られた知見を基に実験台配置型のバイオプロセスを試作する。生育温度の差を利用して、異種微生物によって汚泥からの水素生産を両立できるリアクターを構築することを目指して努力していきたい。

特 別 講 演

講 演 要 旨

チョコレートのおいしい科学 ―チョコレートのおいしさは何で決まるか？―

上野 聡（広島大院・生物圏）

一般に、食品を物理化学的に表現すると、「多成分系であり、熱力学的に非平衡状態にあるコロイド分散系」と表現される。チョコレートもその例外ではない。チョコレートは、製品の裏面の成分表示を見ると明らかなように、油脂（特にカカオ脂（以下、ココアバター））・カカオマス・砂糖および乳脂などから構成され、これにナッツや香料など他成分が加わって構成されている。このうち、品質に直接かわり、したがって品質制御に密接に関係しているのはココアバターである。一般にチョコレートは、ココアバターの多結晶から成り、その他の成分が、ココアバター多結晶に分散した状態である。ココアバターには、6種類の異なる結晶状態、いわゆる多形が存在し、I型からVI型まで存在し、その数字が大きくなることにより安定な状態となる。我々が、普段、店で購入し、部屋に放置しておくと、その形を保って融けず（保形性・高融点）、光沢感があり指でパチンと割れて（スナップ性）、口に入れるとスムーズなとろけ感を示す（融解性・レオロジー）、特徴的な物性は、6種類の多形うち、V型多形の特徴である。言い換えれば、V型多形のココアバターが、我々にとっておいしい食感を生じさせる。したがって、おいしいチョコレートの作製では、ココアバターのV型結晶化が中心課題となる。そのため世界中のチョコレート作製メーカーは、いかに短時間で効率よくココアバターをV型に結晶化させるかについて試行錯誤を繰り返し、今日では、「テンパリング」と呼ばれる温度調節法が確立している。この方法では、温度を40℃以上から25～29℃に冷却してIV型多形の結晶化を促した後、温度を30～31℃に加熱してIV型多形を融解させ、その融液からV型多形の出現を促した後に、温度を15～20℃に冷却し長時間放置することにより、すべてのココアバター結晶をV型に結晶化させる方法である。本講演では、ココアバターの物性（油脂分子組成・結晶多形ごとの構造と融点など）およびテンパリングについて説明した後、チョコレートの物性とおいしさ（とくにテクスチャーとの関係で）との関係について紹介する。テンパリングによる多形制御以外にも、製造工程のうち、カカオ碎片（カカオニブ）の微細化工程により、より滑らかな食感が得られる。講演では、この点についても紹介したい。

日本ワインの発展をめざして

後藤奈美（酒総研）

【はじめに】 「日本ワイン」とは、大まかに言うと日本で栽培されたブドウから国内で製造されたワインと定義され、平成30年10月30日から日本ワインの新しい表示方法が適用開始になる。近年、日本のワイン消費量は大きく増加しているが、その約2/3は輸入ワインで、輸入原料を使用して国内で製造されたワインも多く、日本ワインは5%程度にすぎない。TPPや日EU EPAなど関税撤廃の動きが強まる中、輸入ワインに対抗し、日本ワインを発展させていくには、生産の拡大とともに品質の向上が不可欠と考えられる。ここでは、赤ワインを中心に品質向上に向けた取組を紹介したい。

【栽培条件の影響】 ワインの品質にはブドウの品質が直接反映され、ブドウの品質は栽培地の気象や土壌の影響を受ける、と言われる。伝統的なワイン用ブドウ品種はヨーロッパブドウ（*Vitis vinifera*）に属し、地中海性気候に適しているため、日本の高温多湿な条件では、病害が発生しやすいことに加え、特徴香が出にくく、赤ワイン用品種では着色不良になりやすいという問題がある。赤色色素であるアントシアニンの蓄積については、我々のグループの研究で高温では一度生合成されたアントシアニンが減少することが明らかになっている。また、ブドウの着色開始前後にやや乾燥した状態（水分ストレス）になると、植物ホルモンのアブシジン酸の濃度が高まり、アントシアニンの生合成が促進されることも知られている。日本各地のワイナリーの協力を得て、ワイン用ブドウのアントシアニン濃度を調査したところ、夏の雨量や平均気温との逆相関が認められた。一方、赤ワインの渋味成分である縮合タンニン（プロアントシアニジン）の生合成は、白色光によって促進されることが明らかになったが、栽培条件との影響についてはまだ未解明の点が多い。現在、共同研究*としてブドウ樹の剪定方法等の影響についても研究を進めており、日本の風土に適した栽培法の開発と共有を目指している。

【醸造条件の影響】 醸造の影響も大きい。赤ワイン醸造では、ブドウを除梗・破碎した後、果皮・種子とともに発酵させる醸し発酵中にアントシアニンや縮合タンニンが抽出される。従来、縮合タンニンとアントシアニンはフェノール化合物として一括して考えられることが多かったが、両者は抽出の挙動が異なる。また、アントシアニンは不安定な化合物であるが、発酵・熟成中にアントシアニン誘導体の生成による色の安定化が起こる。当所や海外の研究で、発酵開始前に低温で一定期間おく初期低温醸しを行うと、果皮由来成分の抽出が促進されること、醸し発酵中にある程度高温条件にすることでアントシアニンの誘導体生成が促進され、赤色が安定化されることが明らかになっている。現在、ワイン生産地との共同研究*として、これらの方法を実際の日本のワイナリーで実施した場合の効果や課題について、実証試験を実施しており、普及に向けた情報提供につなげる計画である。

【日本ワインの品質向上に向けて】 日本ワインの品質向上には、日本の風土にあった栽培と日本のブドウにあった醸造のための研究が不可欠であり、両分野の関係者が協力した研究の継続・発展が望まれる。また、日本ではワイン関係の研究・教育はまだマイナーな分野であり、社会人教育を含めた教育体制の充実と情報の共有が必要と考えられる。

*「日本ワインの競争力強化コンソーシアム」として、生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）」の支援を受けて実施。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A－1 Improving permeability of whole-cell catalyst by heat-permeabilized psychrophile cells
○Luo Gonglinfeng, Takahisa Tajima, Syo Nakano, Junichi Kato
(Hiroshima University, Grad. Sch. Adv. Sci. Matter)

The semipermeable cell membrane has been an obstacle on substrate uptaking for whole-cell catalyst. The cell membrane of psychrophilic bacteria is highly flexible and easy to be permeabilized by heating in a moderate condition. In our research, we constructed a whole-cell catalyst based on heat-permeabilized psychrophile to solve the permeability issues. The productivity of heat-permeabilized psychrophile cells is significantly higher than non-permeabilized psychrophile cells as well as *E.coli* cells expressing the same heterologous enzymes.

A－2 好熱性嫌気性細菌 *Moorella thermoacetica* のガス資化経路の強化に関する研究
○中路 彩, 岩崎祐樹, 吉田嵩一郎, 石垣元務¹, 喜多晃久, 中島田豊
(広島大院・先端物質,¹ 広島大・工)

【目的】CO₂排出削減を目的とする太陽光，風力，バイオマスなど再生可能資源・エネルギーを統合的に利用した液体燃料，化学原料製造には，合成ガス (H₂+CO₂+CO) を経由したガス発酵技術が有望である。当研究室では，合成ガス資化能を有する好熱性 *Moorella thermoacetica* ATCC39073 株を宿主とする遺伝子組換えエタノール生産株の作製に成功した。しかし，本代謝改変株はフルクトースを基質として培養した時にはエタノールを生産したが，合成ガス，H₂+CO₂ ガスにおいて生育しなかった。この時，ギ酸の蓄積が確認されたことから，Formate-tetrahydrofolate ligase (FTL) が律速となっている可能性が考えられた。そこで，本研究では FTL 遺伝子を導入した変異株を作製し，その特性を解析した。

【方法及び結果】ATCC39073 株由来のウラシル要求性変異株 (dpyrF) を宿主として，酢酸生成経路遺伝子 (*pdul1*, *pdul2*) を破壊するとともに，アルデヒドデヒドロゲナーゼ (*aldh*) 遺伝子，及び FTL 遺伝子を導入した FTL 強化エタノール生産株 (*adhE::FTL::Δpdul12*) を構築した。本変異株の FTL 転写活性は野生株と比較して 4 倍程度上昇しており，フルクトース培養時に FTL 非導入株と比較して非増殖速度がわずかに上昇していた。しかし，H₂+CO₂ を基質とした場合，増殖は見られなかった。フルクトースに加え H₂+CO₂ をヘッドスペースに添加して培養したが，増殖に大きな変化は見られなかった。本結果から，FTL 遺伝子の導入により転写レベルを向上させたとしても，ガス資化能力の回復には大きく寄与しないと考えられた。

A-3 オーランジオキトリウム属キサントフィル高生産性株の単離とその生産性の改良

○上原莉世, 東 莉沙, 渡邊研志, 松山恵介¹, 秋 庸裕
(広島大院・先端物質,¹長瀬産業(株))

【目的】赤やオレンジ色の脂溶性色素であるアスタキサンチン, カンタキサンチンなどのキサントフィル類(XAN)は, その分子構造に起因する高い抗酸化作用を持ち, 健康食品や化粧品などの原料として需要が高い。しかし現在の供給源である化学合成や, 藻類・酵母による発酵生産等は安全面やコスト面で課題があるため最適とは言い難い。ラビリントウ類オーランジオキトリウム属は増殖性が高く, 高度不飽和脂肪酸やテルペン系炭化水素に加えて XAN を生産する株も見出されており, XAN の新たな供給源として期待できる。本研究では化学薬剤を用いた突然変異誘発によるオーランジオキトリウム属 XAN 高生産性株の単離と, 異なる培養環境下における XAN 生産特性の解析を通じて, その生産性の向上を試みた。

【方法・結果】XAN 生産能は低いが高増殖性のオーランジオキトリウム属 RH-7 株に対して, 1-メチル-3-ニトロ-1-ニトロソグアニジンにより突然変異を誘発した。寒天培地上のコロニーを目視で観察し, 色調が橙赤色に変化した株を単離培養して高速液体クロマトグラフで XAN 生産量を定量した。その結果, 親株と比較してカンタキサンチンとアスタキサンチン生産性がそれぞれ顕著に向上した RH-7A 株および RH-7A-7 株を単離した。親株と XAN 高生産株の細胞内メタボロームを比較解析したところ, XAN 高生産株においてストレス応答物質の顕著な増加が認められ, XAN 生産と環境ストレスの関係が示唆された。そこで RH-7A-7 株を種々のストレス条件下で培養し, XAN 生産量を解析したところ, 低温, 低 pH, 酸化ストレス等の, 本株のアスタキサンチン生産性を顕著に向上させる培養条件を見出した。

A-4 オーランジオキトリウム属への CRISPR-Cas9 システムの適用

○畑 浩介, 青井真人, 渡邊研志, 北堀智希, 高橋宏和, 岡村好子, 松山恵介¹,
伊藤真治², 秋 庸裕
(広島大院・先端物質,¹長瀬産業(株),²出光興産(株))

【目的】ラビリントウ類オーランジオキトリウム属は, 高度不飽和脂肪酸やカロテノイドなどの機能性油脂・色素のほか, 化学素材やバイオ燃料として利用可能な長鎖脂肪酸や炭化水素も顕著量生産することから, 各種有用油脂の新たな工業生産微生物としての活用が期待される。本研究では, オーランジオキトリウム属では未確立のゲノム編集技術として, CRISPR-Cas9 システムの適用を試みた。

【方法・結果】 β -カロテンやアスタキサンチンを生産するオーランジオキトリウム属 RH-7A 株の β -カロテン合成酵素 CrtI_{BY} 遺伝子を標的として, ゲノム編集の成否をコロニーの色調の変化で判別することとした。RH-7A 株に *Streptococcus pyogenes* 由来 Cas9 遺伝子を相同組み換え法で導入し, ウェスタン解析で Cas9 発現が認められた RH-7A-CH 株を得た。CrtI_{BY} 遺伝子上の 5ヶ所を標的とする guide RNA を *in vitro* 転写反応で合成し, エレクトロポレーション法で RH-7A-CH 株に導入した。その結果, 親株と比較してコロニーの色が白く変化した Wc 株を取得することができた。HPLC 分析でも, Wc 株では CrtI_{BY} の生成物である β -カロテンやその代謝物の蓄積は認められず, カロテノイド生産能を失ったことが示唆された。Wc 株の標的部位付近のゲノム DNA 塩基配列を解析したところ, 標的とした 5ヶ所のうち, 約 1.4 kb を隔てた 2ヶ所で挟まれた領域が欠失しており, いずれも PAM 配列の 3塩基上流で二本鎖切断が起こったことが分かった。以上のことから, オーランジオキトリウム属で初めてのゲノム編集技術として, CRISPR-Cas9 システムの導入に成功したと判断した。

A-5 エネルギー代謝の改変による *Corynebacterium glutamicum* でのピルビン酸生産
○片岡尚也, Alisa S. Vangnai¹, 薬師寿治, 和田 大², 横田 篤², 松下一信
(山口大院・創科,¹チュラロンコン大,²北大院・農)

【背景・目的】*Corynebacterium glutamicum* は、グルタミン酸やリジンといったアミノ酸の工業的発酵生産に用いられている産業微生物である。ピルビン酸は、解糖系の最終代謝産物であるとともに、分岐鎖アミノ酸や TCA 回路の燃料分子であるアセチル CoA の供給源となる重要な代謝中間体である。本研究では、*C. glutamicum* のエネルギー代謝を改変することで効率的にピルビン酸を生産しうる菌株の構築に成功したので報告する。

【方法・結果】*C. glutamicum* ATCC 13032 株を親株として用いた。ピルビン酸の高生産を目指す場合、TCA 回路への炭素流量を減衰させる戦略が有効である。RamA は、特に、酸化 TCA 回路の活性化に関与する包括的転写制御因子で、その欠損株では、TCA 回路への流量抑制が期待された。そこで、*ramA* 欠損株 ($\Delta ramA$ 株) を作製し、グルコースを唯一炭素源とした最小培地でピルビン酸生産を評価した。その結果、親株と比較して最大で 1.8 倍のピルビン酸を生成したが、親株と同様、著量の乳酸、酢酸を副生した。そこで、これらの生成に関与する遺伝子 (*ldhA*, *pqo*, *cat*, *pta-ackA*) を $\Delta ramA$ 株で欠損させ、再度評価を行った。その結果、生産収量がさらに 3.3 倍に増加した。さらなる改善を行うべく、TCA 回路と同時に機能する呼吸鎖に着目し検討を行った。その結果、シトクロム *bd* 酸化酵素の高発現で、還元的 TCA 回路への流量低下とともに、グルコース消費速度の上昇、ピルビン酸収量の増加 (1.2 倍) が観察された。最終的な構築株をジャー培養したところ、556 mM のグルコースから 341 mM のピルビン酸を生産した。

A-6 *Gluconobacter* 属酢酸菌から精製した PQQ 依存型グリセロール脱水素酵素を用いた L-リボースの酸化 ○寺田優花¹, 尾崎聖士朗², 片岡尚也^{1,2,3}, 足立収生¹, 赤壁善彦^{1,2}, 薬師寿治^{1,2,3}, 松下一信^{1,2,3}
(¹山口大院・創科,²山口大・農,³山口大・微研セ)

【目的】*Gluconobacter* 属酢酸菌はビタミン C 生産に用いられるソルボース発酵を行う。ソルボース発酵には広範な基質を酸化するキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) が関与する。GLDH の酸化反応は、第 1 級アルコールの隣にある 2 つの水酸基がエリスロ配置である糖アルコールの、2 位の水酸基を酸化するという法則に従っている。しかし、この法則に従わない構造をもつ D-リキソースが、*Gluconobacter oxydans* の GLDH によって酸化されることが報告された。私たちは以前、*Gluconobacter frateurii* CHM43 と、その GLDH 欠損株の 2 菌株の膜画分を用い、いくつかの糖アルコール、アルドース、ケトースの酸化活性を測定して GLDH の基質特異性を調べた。その結果、法則に従わない構造である L-リボースが新たに GLDH の基質であること、また、その酸化物が L-リボン酸であることを報告した。水酸基を酸化する酵素である GLDH がアルドースを酸化してカルボン酸を生じるという結論を補強するため、本研究では精製した GLDH を用いて L-リボースの酸化を試みた。

【方法・結果】広宿主域ベクターを用い、GLDH を過剰発現する組み換え *G. frateurii* CHM43 株を構築し、GLDH の精製に用いた。精製 GLDH と人工電子受容体、カタラーゼを用いて L-リボースの酸化を試みた。この反応系でも L-リボン酸生産が確認できた。カタラーゼ存在下の方が L-リボン酸生産が高かった。以上より、GLDH が環状 L-リボースの 1 位の水酸基を酸化して L-リボノラクトンを生成し、これが非酵素的に加水開環して L-リボン酸へ変化したと考えた。

A-7 希少糖 D-Allulose による酢酸菌 *Acetobacter aceti* の生育抑制の作用機構
○吉田大地, 小川綾子, 小川雅廣¹, 赤澤隆志², 吉原明秀³, 早川 茂¹
(香川大院・農,¹香川大・農,²愛媛大院・連合農,³香川大・国際希少糖)

【目的】希少糖 D-Allulose (Alu) とは D-Fructose (Fru) の C-3 エピマーであり, 抗肥満抑制作用などの優れた健康機能を有している。近年, Alu を含む発酵食品が数多く販売されている。しかし, 発酵食品の製造に使用する発酵微生物に対して希少糖が及ぼす影響については, その基礎的な知見が不足している。これまでの研究で, Alu が酢酸菌の一種である *Acetobacter aceti* の①生育を抑制することと, ②酢酸発酵の速度を遅らせることが分かった。本研究では, Alu が *A. aceti* の生育抑制と酢酸発酵遅延を引き起こす原因を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】①*A. aceti* の生育抑制: 1%エタノールと 10%Alu または Fru を含む培養液で *A. aceti* を生育させた(糖を含まない培養液を Ct とした)。培養後, *A. aceti* から ATP を抽出し, その量を比較したところ Alu 添加区では Ct や Fru 添加区よりも ATP 量が低下していた。

②*A. aceti* の酢酸発酵遅延: ①と同様の条件で *A. aceti* を培養した。菌体を回収し, 膜結合型酵素を含む粗酵素液を調製した。Alu 添加区での粗酵素液の PQQ-ADH 活性は Ct や Fru 添加区より低かった。また, ELISA により粗酵素液中の PQQ-ADH を定量したところ, Alu 添加区では PQQ-ADH 量が Ct や Fru 添加区より高かった。このことから, Alu 添加区において PQQ-ADH はタンパク質としては発現しているが, 不活性型の状態で存在していることが示唆された。これらの結果から, Alu による *A. aceti* の生育抑制と発酵遅延は ATP 生産量の低下と PQQ-ADH の不活性化が原因であることが示唆された。

A-8 シネフンギン生産菌 *Streptomyces incarnatus* への *rpoB* 多重変異導入効果
○小川沙織, 中島佑里子, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆(岡山大院・環境生命)

【目的】放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質シネフンギンは, s-アデノシル-L-メチオニンの構造アナログであり, *in vitro* では強いメチラーゼ阻害活性を示し, *in vivo* では RNA ウイルスの mGppp キャッピングを強く阻害する機構によりワクシニアウイルス, ヘルペスウイルスに対する抗ウイルス増殖抑制活性を示す。(マウス毒性 LD₅₀185 mg/kg /皮下注射) 本研究では, *S. incarnatus* によるシネフンギン生産の増産を図るために転写活性化をもたらす RNA ポリメラーゼの *rif-1* 領域への多重変異効果を検討した。

【方法と結果】*S. incarnatus* の *rpoB* 遺伝子をクローニングして, その 5'末端 500 bp を削除した ORF 断片を接合伝達ベクター pK18mob に連結した。次に *rif-1* 領域の 4 残基 (D447, S453, H457, R460) の組合せによる多重変異を PCR を用いて導入した。*E. coli* 17S-1 による異種間接合伝達-相同組換えにより *rif-1* 領域への変異導入はリファンピシン (Rif) 耐性という表現形としてスクリーニングできるので, 接合体から *rif* 耐性株を選抜して DNA シーケンスによりゲノム上の *rpoB* 遺伝子の改変を確認した。培養液中のシネフンギン生産量はフォトダイオードアレイ検出器を装備した HPLC により経時的に測定した。野生株のシネフンギン生産は培養初期 3-4 日間に見られたが生産物が蓄積せずに培養液から消滅するのに対して *rif-1* 領域の H457, R460 の残基を Cys や Phe など疎水性の高い残基に置換した RNA ポリメラーゼを持つ変異株ではより長い生産期間を保持する特性を示した。

A-9 *Tremella mesenterica* が生産する菌体外多糖類の解析
○高岡里菜, 渡邊 彰, 吉原明秀¹, 中北慎一², 何森 健¹, 麻田恭彦
(香川大・農,¹香川大・国際希少糖,²香川大・総合生命)

【目的】キノコ類が生産する多糖類は高い生理活性を示すことが明らかとなってきた。本研究では、一倍体時に酵母状単細胞で旺盛に生育し、菌体外に多糖類を生産するキノコ、*Tremella mesenterica* (コガネニカワタケ) に着目し、本菌の糖資化性および生産される菌体外多糖類について解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】本菌の単糖類の糖資化性を解析するために、本菌を各種単糖類(終濃度2%)と Yeast Nitrogen Base (1%) を含む液体培地を用いて培養し、経時的に培養液の濁度を測定した。その結果、本菌は D-Glucose, D-Mannose, D-Xylose, D-Allose, L-Arabinose, D-Fructose, L-Sorbose, D-Mannitol, D-Sorbitol および Xylitol に対して資化性を示し、D-Galactose, D-Psicose, Allitol および Glycerol に対しては資化性を示さなかった。また、D-Allose, L-Arabinose および L-Sorbose を添加した培地では生育が確認できるまでにタイムラグが認められたことから、それぞれの糖類の存在によりその代謝系酵素の誘導が起こることが示唆された。さらに、ジャガイモ抽出液に希少糖である D-Allose, D-Psicose あるいは Allitol, コントロールとして D-Glucose を3%添加した培地で本菌を培養し、多糖類の生産性を検討した。その結果、希少糖の中では D-Allose を添加した培地において、他の希少糖と比べて多量の多糖類が生産されることが確認できた。現在、生産された多糖類の構成単糖類の組成解析を行っている。

A-10 低温条件下でアンモニア酸化能を有する菌叢の構築
○宮地可奈, 長村治紀, 美藤友博, 清水克彦¹, 有馬二郎
(鳥取大・農,¹鳥取大・CoRE)

【目的】近年の養殖業において、生産性が高く場所を選ばない等の理由から、閉鎖循環式陸上養殖に注目が集まっている。一方で、魚の生育には水温や水質維持が重要であり、水質維持には硝化細菌の働きが必須とされる。しかし、鮭などの低温条件で生育する魚の養殖では低い水温で維持する必要があり、そのような環境下での微生物によるアンモニア酸化能は低いことが問題とされる。そこで本研究では、低温淡水養殖を想定し、低温下でアンモニア酸化能を有する菌叢の構築を試みた。

【方法・結果】鮭の養殖場の微生物槽から微生物固着用プラスチック材を採取し、アンモニア酸化に特化した培地を使用して 15℃・好気条件で集積培養を行った。培地のアンモニア濃度・亜硝酸濃度を随時測定したところ、約22日でアンモニア濃度が0 ppm となり、亜硝酸濃度は400 ppm 程度まで増加し頭打ちとなった。この結果から、培地内におけるアンモニア酸化菌の存在が示唆された。また、培養を進めるにつれてフラスコの壁面には付着物の増加も観察された。そこで亜硝酸濃度250~400 ppm 期間の19~25日目と亜硝酸濃度400 ppm で横ばいの47~53日目の培養液と壁面付着物の菌叢を、次世代シーケンサーを使用したアンブリコンシーケンセスにより解析した。菌叢解析の結果、アンモニア酸化菌が培養液中に約5%と壁面付着物に約26%存在することが確認された。現在は、実用化に向けて水を循環させた状態でのアンモニア酸化能の確認を行っている。

A-11 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 のキチン分解酵素及びキチン代謝
○仁木大輔, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²鳥取大・産学)

【目的】キチンの加水分解物は様々な生理活性を持ち、様々な分野への利用が期待されている。しかし、工程の複雑さや環境への負荷といった問題が残されているため、キチンの利用率は低いものとなっている。我々はこれまでに、カニ殻廃棄物の速やかな堆肥化を可能とする完熟コンポストから、結晶性キチン分解菌 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 株を単離した。本研究では、本菌が分泌するキチン分解系タンパク質と全ゲノムの情報を基に、本菌によるキチン分解と取込み経路について予測した。

【方法及び結果】結晶キチンを2%含有する培地で本菌を25℃、1週間培養した結果、約70%のキチンを分解した。培養上清によるキチンオリゴ糖分解活性を確認したところ、3糖以上のオリゴ糖は分解されたが、キトビオースの分解は見られずに蓄積が確認されたため、キトビオースを分解しないキチン分解酵素を主に分泌していることが予測された。本菌の全ゲノムを解析した結果、8種類のキチン分解酵素の遺伝子の存在が明らかとなった。一方で、確実にキトビオースに対して反応する酵素を検索したが N,N-diacetyl chitobiose phosphorylase しか見つからず、本菌はキトビオースを取り込んで分解する経路を持つことが考えられた。現在は、キチン分解酵素の異種発現系構築を進めており、キトビオース蓄積に係る酵素の取得を試みている。

A-12 網羅的転写変動解析に基づく好熱菌低温誘導プロモーターの探索
○奥村友太, 高橋正裕¹, 大城 隆², 鈴木宏和²
(鳥取大院・持社創生,¹イムラ・ジャパン,²鳥取大院・工)

【目的】好熱菌 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 は、遺伝子改変技術が確立された *Geobacillus* 属モデル株の1つである。これまでに我々は、推定マルトース代謝遺伝子群のプロモーターが本好熱菌内における誘導的遺伝子発現に有用であることを見出した。本研究では、HTA426 株で機能する低温誘導型プロモーターを、網羅的転写変動解析を利用しながら探索した。

【実験】HTA426 株を60℃で増殖期まで液体培養し、細胞を回収した。同様にして HTA426 株を増殖期まで培養し、さらに低温下(42℃, 30℃, および 18℃)で1時間および6時間培養した後、細胞を回収した。得られた細胞から total RNA を抽出し、網羅的 RNA シークエンス解析 (RNAseq) に供することで、各培養条件で高発現する遺伝子を調べた。見出された候補遺伝子のプロモーター領域と黄色蛍光タンパク質遺伝子を連結し、HTA426 の染色体に導入した。得られたレポーター株を様々な条件で培養し、各プロモーターの発現条件を検討した。

【結果と考察】60℃培養菌体の RNAseq から、低温ショック応答遺伝子 *cspB* が高度に発現していることが示唆された。本プロモーターは、低温培養においても高発現していた。それに加えて、低温時に高度に誘導される遺伝子が複数見出された。レポーター分析の結果も、これらプロモーターが低温下で高発現であることを支持した。これらプロモーターは、低温培養時における好熱菌バイオプロダクションに有用かもしれない。

A-13 生育阻害で誘導される *Geobacillus kaustophilus* HTA426 の遺伝的多様化
竹谷達成, 田藤実咲¹, 大城 隆¹, 〇鈴木宏和¹
(鳥取大院・持社創生,¹鳥取大院・工)

【目的】我々は、*Geobacillus kaustophilus* HTA426 細胞内の自発的変異を利用した酵素遺伝子変異法を研究している。その過程では、本好熱菌は生育阻害ストレス下で細胞内変異率を上昇させること、さらには染色体上に存在する多数の挿入配列を転位誘発することが見出された。本発表では、このような本好熱菌の遺伝的不安定性を総括し、その理由について考察する。

【結果と考察】HTA426 株を、抗生物質リファンピシンとストレプトマイシンを含む固形培地上で培養すると、*rpoB* 変異と *rpsL* 変異による耐性株が各々発生した。耐性株の発生率は、定常期細胞よりも増殖期細胞を固形培地に塗布した場合に高く、この現象は増殖期特異的な誘導変異であることが示唆された。DNA 修復系遺伝子の 1 つである *mfd* を破壊すると、増殖期細胞と定常期細胞からの耐性株発生頻度が同等になった。本結果は、増殖期細胞が生育阻害ストレスを受けると *mfd* 遺伝子の機能が抑制され、細胞内変異率が上昇することを示唆している。また、HTA426 株をウラシル飢餓条件下で固形培養すると様々な挿入配列が染色体上を転位した。彷徨変異試験は、当該転位が誘導的であることを支持した。転位した転位因子は複数種あったが、IS0302 系が最も高頻度に見えた。サザンブロット解析から、IS0302 系転位因子は無作為かつ Copy & Paste 型で転位することが示唆された。上述した両現象は、生育阻害ストレス下で誘導され、遺伝的多様性の原因になるものである。これらは *Geobacillus* 属好熱菌の効率的な環境適応に利用されているのかもしれない。

B-1 出芽酵母の S-アデノシルメチオニントランスポーターSAM3 が関与する寿命制御機構の解析

○種谷麻由佳, 小川貴史, 金井宗良¹, 久米一規, 藤井 力¹, 曾我朋義², 水沼正樹 (広島大院・先端物質,¹酒総研,²慶應大・先端生命)

【目的】近年, モデル生物を用いた解析から, 寿命制御経路や分子が生物種間で保存されていることが明らかになりつつある。これまでに我々は, S-アデノシルメチオニン (SAM) 合成の活性化が寿命延長することを見出した。その研究過程で, 細胞膜に局在する SAM トランスポーターSAM3 の破壊株を取得し, $\Delta sam3$ 株は野生株よりも顕著に長寿命となることを見出した。そこで, 本研究では $\Delta sam3$ 株の寿命延長機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】カロリー制限は酵母から哺乳類まで保存された寿命延長機構で, AMPK (AMP-activated protein kinase) の活性化や TOR (target of rapamycin) 経路の不活性化により, オートファジーの活性化や翻訳の抑制により長寿命となる。そこで, $\Delta sam3$ 株において酵母 AMPK である Snf1 活性を調べたところ, 野生株よりも高い活性を示した。また, TOR 経路の下流因子である Sch9 のリン酸化レベルについても調べたところ, リン酸化レベルが低かったことから, TOR 経路は不活性化されていることが示唆された。さらに, $\Delta sam3$ 株についてマイクロアレイ法により遺伝子発現解析を行ったところ, 野生株と比較してカロリー制限で発現が誘導される遺伝子 (*HXX1*, *GLC3* など) が $\Delta sam3$ 株で上昇していたことから, カロリー制限を模倣して寿命延長していることが予想された。加えて $\Delta sam3$ 株でポリアミントランスポーター遺伝子 (*UGA4*, *TPO4*) が高発現していたことから, ポリアミンによる寿命延長の可能性も考えられた。現在, $\Delta sam3$ 株とカロリー制限およびポリアミンとの関連について詳細を解析中である。

B-2 出芽酵母の寿命制御に関わる Ssg1 の機能解析

○益村晃司, 竹内悠人¹, 小川貴史¹, 金井宗良², 久米一規¹, 水沼正樹¹
(広島大・工,¹広島大院・先端物質,²酒総研)

【目的】メチオニン代謝経路において, S-アデノシルメチオニン (SAM) は, 生体内の主要なメチル基供与体としてタンパク質, 核酸, リン脂質など様々な物質のメチル化反応に利用される。SAM はメチル基を供与後, S-アデノシルホモシステイン (SAH) となり, SAH は SAM のメチル化反応を競合的に阻害する。従って, SAH 水解酵素 *SAH1* によって速やかに分解される必要がある。我々は, *sah1* 変異株を取得し, 顕著な増殖遅延と短命を示すことを見出した。そこで, *sah1* 変異株の増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを実施し, その抑圧変異株 *SSG1* (Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the *sah1*) を取得した。期待通り, *SSG1* 変異株は経時的寿命が延長し, 野生株に比べて SAM および SAH を高蓄積することが分かった。このことから, Ssg1 は SAM/SAH が関わる新規寿命延長因子であると予想し, Ssg1 の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】液胞の酸性化の維持が寿命延長に重要であることが報告されていることから, Ssg1 は液胞の酸性化の維持に関与するか解析を行った。液胞の酸性化を阻害する V-ATPase (液胞型 ATP 分解酵素) 阻害剤コンカナマイシン A を加えたところ, *sah1 SSG1* 二重変異株は感受性を示した。さらに, V-ATPase 制御サブユニット *VMA2* を破壊し, 液胞の酸性化維持を阻害しても, *SSG1* $\Delta vma2$ 二重変異株は短命となった。このことから, Ssg1 は液胞の酸性化の維持により寿命制御を行っていることが予想された。液胞の酸性化と SAM/SAH の濃度調節についても解析中である。

B-3 出芽酵母の液胞膜に局在する寿命制御因子 Ssg1 の機能解析
○竹内悠人, 金井宗良¹, 久米一規, 水沼正樹
(広島大院・先端物質,¹酒総研)

【目的】我々は、出芽酵母の *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) 水解酵素の変異株 *sah1-1* 変異株の寿命が著しく短く増殖遅延を示すことを見出した。さらに、*sah1-1* 変異株の増殖遅延を抑圧することを指標に、長寿変異株である *SSG1-1* (*Spontaneous Suppressor of Growth-delay of the sah1-1*) を取得した。Ssg1-1 タンパク質は対数増殖期初期において液胞膜に局在し、*SSG1-1* 変異株は野生株に比べ、*S*-アデノシルメチオニン (SAM) および *S*-アデノシルホモシステイン (SAH) を高蓄積した。本研究では、寿命制御における Ssg1-1 の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】*SSG1-1* は SAM および SAH を高蓄積し、液胞膜に局在していたことから、液胞と細胞質における SAM および SAH 量を銅処理法によって解析した。その結果、*SSG1-1* は野生株よりも SAM と SAH 両物質とも液胞内に高蓄積することが観察された。したがって、*SSG1-1* は液胞内への SAM および SAH の取り込みを促進するということが予想された。さらに、液胞膜で局在する Ssg1-1 において、膜合成に関与するホスファチジルコリン生合成経路上の遺伝子 *OPI3* を破壊した影響を解析した。その結果、*SSG1-1Aopi3* では対数増殖期初期における Ssg1-1 の液胞膜局在が消失した。さらに、*SSG1-1Aopi3* は、*SSG1-1* と比べて、液胞内の SAH 蓄積量が少なかった。以上より、Ssg1-1 は液胞膜において SAH の細胞内濃度調節に関わって機能する因子であると予想された。

B-4 スフィンゴ脂質を介した TOR 複合体間連携
○衛藤克樹, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

【目的】

TOR (Target Of Rapamycin) は酵母からヒトにまで真核生物において広く保存されたプロテインキナーゼであり、構成因子と機能の異なる 2 つの複合体、TORC1 と TORC2 を形成する。出芽酵母において Tor2 が両複合体の構成因子として機能しているため、TORC2 と TORC1 の間にシグナルネットワークが存在する可能性が考えられるが、その実体は不明である。最近我々は、TORC2 が TORC1 を制御しており、その制御に Ypk1 の活性が関与していることを見出した。そこで、本研究では、Ypk1 を介した TORC2 による TORC1 の制御のメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】

Avo3 は TORC2 の構成因子のひとつで、その変異株 (*avo3-30*) はラパマイシンに対して高感受性を示す。Ypk1 はその下流の Orm1/2 を制御することで、スフィンゴ脂質生合成の初期ステップを正に制御していることから、スフィンゴ脂質の前駆体であるスフィンゴイド塩基 (フィトスフィンゴシン; PHS) を培地に添加し、*avo3-30* 変異株のラパマイシン感受性を観察した。その結果、PHS の濃度依存的にラパマイシン感受性が回復した。これらの結果は、スフィンゴ脂質が 2 つの TOR 複合体をつなぐ重要な役割を果たしていることを示唆している。

B-5 出芽酵母スフィンゴ脂質代謝における機能未知転写因子 Com2 の解析
○石野裕子, 吉川大地, 谷 元洋¹, 橋井圭介, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農,¹九州大院・理)

【目的】我々は、セラミド合成制御機構の解析を目的として、セラミド合成酵素 Lag1/Lac1 の制御サブユニットと考えられる *LIP1* をドキシサイクリン (Dox) 依存的に発現の制御が可能な Tet-off プロモーターで置換した *P_{tetoff}-LIP1* 株を作製した。複数得られた株の中で、*lip1-1* 株において Dox 依存的な増殖阻害が見られ、スフィンゴ脂質合成阻害剤である Myriocin に対して強い感受性が見られた。この *lip1-1* 株の Myriocin 感受性を抑圧する因子をマルチコピーライブラリーにより取得を試みたところ、転写因子をコードする *COM2* を複数取得した。*COM2* 過剰発現は、*lip1-1* 株のみならず野生株においても Myriocin に対して強い耐性を付与した。一方、*com2* Δ 株は Myriocin に感受性を示した。本研究では、スフィンゴ脂質合成に関与する転写因子 Com2 の機能の解明を目的とした。

【方法・結果】*com2* Δ 株が Myriocin に感受性を示したことから、Myriocin 処理時における Com2 の局在を解析したところ、Com2 は Myriocin 未処理時において細胞質に局在を示し、Myriocin 処理によって核へ移行することが明らかになった。また、スフィンゴ脂質合成経路の初発酵素であるセリンパルミトイルトランスフェラーゼの触媒サブユニット Lcb1 の発現量を解析したところ、*COM2* 過剰発現時において Lcb1 の発現量が増加していた。これらの結果から、Com2 はスフィンゴ脂質合成に転写レベルで関与していると唆された。興味深いことに、Com2 はスフィンゴ脂質代謝に必須なキナーゼ Ypk1 による推定リン酸化部位を有しており、TORC2-Ypk1 経路の新たな下流因子であることが考えられた。

B-6 Sur7 family タンパク質と Pil1 は eisosome において協調的に働き、ストレス応答に関与する
○坂田健太郎, 橋井圭介¹, 田原悠平², 宮田真人², 田中直孝¹, 田淵光昭¹
(¹香川大・農,²大阪市大院・理)

酵母細胞膜ドメイン MCC (Membrane Compartment occupied by Can1) には膜が内側に陥入した溝を形成する eisosome が存在する。近年の報告によると、分裂酵母の eisosome は低浸透圧時の膜の膨張に対する膜のリザーバーとして機能することで細胞破裂を防いでいることが報告されたが、出芽酵母 eisosome の機能については未だ明らかになっていない。eisosome には 23 種類のタンパク質が局在することが知られており、その中には輸送体や機能未知の 6 種類の 4 回膜貫通タンパク質が存在する。この 4 回膜貫通タンパク質は Sur7 family と Nce102 family に分けられ、それぞれ互いに高い相同性を有することから、重複した機能を持つことが考えられるが、その詳細な分子機能は不明のままである。当研究室において Pil1 と Sur7 family を欠損させた変異株 (*pil1* Δ *sur7-family* Δ) を作製したところそれぞれ単独の変異株では見られない高温・高浸透圧ストレス感受性が見られた。

本研究では Pil1 と Sur7 family の五重欠損株を使用し、高温ストレス条件において細胞膜の統合性 (PMI: plasma membrane integrity) を検証した。その結果、五重欠損株では高温ストレス処理時において顕著な異常が見られた。これは *pil1* Δ 株および *sur7-family* Δ 株では確認されなかった。このことから、Pil1 と Sur7 family タンパク質は協調的に働きストレス応答に関与していることが示唆された。また、五重欠損株の各種薬剤への感受性も確認しており、これらの結果も併せて報告したい。

B-7 分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 欠損株と種々の破壊株の酸化ストレス感受性

○戒能智宏, 竹内佳奈, 川向 誠 (島根大・生資料)

コエンザイム Q (CoQ) は、電子伝達系の必須成分として機能するだけでなく、抗酸化作用を持つことが知られている。分裂酵母 *S. pombe* の CoQ 欠損株は、最少培地での生育遅延、呼吸欠損、sulfide の発生など様々な表現型を示し、酸化ストレス感受性も示すことが知られており、これらの表現型はシステイン (Cys) やグルタチオン (GSH/GSSG) の添加により部分的に回復する。また、CoQ 欠損株では抗酸化作用を持つ Cys やグルタチオンの量が減少しており、酸化ストレス感受性を示す原因の一つと考えられる。一方で、細胞の抗酸化には、抗酸化物質の働きやスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼなどの抗酸化酵素による活性酸素種 (ROS) の消去も重要である。本研究では、分裂酵母の CoQ 欠損株と種々の遺伝子破壊株を用いて、酸化ストレス感受性と ROS の発生を比較した。

分裂酵母 CoQ 欠損株は、過酸化水素 (H_2O_2) やパラコート (PQ) に対して感受性を示したが、細胞内の ROS 量に顕著な変化は見られなかった。Cys 合成酵素遺伝子 (*cys1a*) 破壊株では、 H_2O_2 や PQ に対して強い感受性を示し、特に PQ 処理で細胞内の ROS が顕著に増加していた。一方、グルタチオン合成に関与する *gcs1* の破壊株では、CoQ 欠損株よりも H_2O_2 に対して強い感受性を示し ROS の発生も確認できたが、PQ 処理では感受性を示すものの ROS の増加は観察されなかった。また、*sod1* 破壊株では H_2O_2 、PQ とともに強い感受性を示し ROS も発生していたが、*sod2* 破壊株においては、 H_2O_2 、PQ とともに強い感受性を示したが、PQ では ROS の発生はほとんど観察されなかった。

B-8 分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 完全欠損株の作製とその表現型

○渡子 開, 望月汐美, 戒能智宏, 川向 誠 (島根大・生資料)

【背景・目的】 コエンザイム Q (CoQ) は、呼吸鎖の必須成分であり、抗酸化能をもつ重要な物質である。ヒトと同じ CoQ₁₀ を合成する分裂酵母 *S. pombe* に対して、分裂酵母 *S. japonicus* は *S. pombe* より細胞が大きく 42℃ の高温でも生育可能であるうえ、細胞内の CoQ₁₀ 量が極微量であり、*S. pombe* の CoQ 欠損株よりも強い酸化ストレス感受性を示す。これまで、この極微量の CoQ₁₀ が *S. japonicus* の性質にどのように影響しているかは明らかになっていない。そこで、*S. japonicus* の CoQ 完全欠損株を作製し、どのような表現型を示すのかを調べることを目的とした。

【方法・結果】 *S. japonicus* のプレニル基転移酵素遺伝子である *Sjppt1* 遺伝子を破壊した株を作製した。作製した破壊株を用いて CoQ 抽出を行ったところ CoQ 欠損であることが確認できた。さらに、最少培地において生育試験を行った結果、野生株と同様の生育を示し、*S. pombe* の CoQ 欠損株の最少培地における生育遅延を部分的に回復するシステインを加えても *S. japonicus* の野生株と CoQ 欠損株に生育の差はみられなかった。酸化ストレス感受性をみるために過酸化水素と Paraquat (PQ) を加えた培地で生育の試験も行ったが、野生株と CoQ 欠損株に生育の差は見られなかった。次に、*S. pombe* と *S. japonicus* のそれぞれの野生株と CoQ 欠損株を用いて生存率を調べたところ、*S. japonicus* の野生株は *S. pombe* の野生株と比べて最少培地では 1 日目で生存率が大きく低下したが、完全培地においてはかなり緩やかに生存率が減少していた。現在、*S. japonicus* の野生株と CoQ 欠損株の生存率について検討している。

B-9 分裂酵母の分泌経路で機能する細胞内レクチン Vip36 の解析 ○浅野里奈, 川口宗馬, 鈴木章太郎, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】糖鎖を特異的に認識するレクチンの中には分泌経路でカーゴレセプターとして機能するものもあり、動物細胞ではその一つに VIP36 が同定されている。しかし、VIP36 によって輸送されるカーゴタンパク質は数例報告されているものの、それらを区別する機構や VIP36 の局在化機構など詳細な機能については不明な点が多い。そこで、動物細胞と類似した分泌経路を持つ分裂酵母を用いて、分裂酵母ホモログ Vip36 の局在と機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】分裂酵母では、ヒト VIP36 と約 20%の相同性を示すホモログ Vip36 が存在する。糖鎖認識領域やジリジンモチーフ類似配列など特徴的なドメインを保存していた。そのため、分裂酵母 Vip36 もヒト VIP36 と同様に分泌経路で循環しながらカーゴレセプターとして機能していると予測した。そこで、GFP タグを付加した Vip36 の局在を確認したところ、GFP-Vip36 は初期分泌経路に局在すると考えられた。一方で、Vip36-GFP は液胞膜に局在していた。

また、Vip36 によって輸送されるカーゴの探索をおこなったところ、*vip36* 欠損株では液胞で機能する Cpy1 が細胞内でプロ配列が切断されていない状態で蓄積していることが明らかになった。通常、Cpy1 は液胞内でプロ配列が切断されることが知られている。それに加え、*vps* 変異株では Cpy1 が細胞外へ漏出してしまいが、*vip36* 欠損株では漏出していなかった。これらの結果から、Vip36 は小胞体-トランスゴルジネットワーク間における Cpy1 の効率的な輸送に関与していると考えられる。

B-10 分裂酵母 *Reb1* 依存的な染色体異常の研究 ○野口弘一, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】スピンドルチェックポイント (SAC) は染色体分配において重要な役割を担っている。当研究室では、分裂酵母 RecQ ヘリケース Rqh1 のヘリケース活性欠損株 *rqh1-hd* 株において、HU (dNTP 阻害剤) 処理後に SAC 活性化が起こり、rDNA 結合タンパク遺伝子 *reb1*⁺破壊により活性化が抑圧されることを発見している。また *rqh1-hd* 株は HU 存在下の TBZ (微小管阻害剤) に感受性を示し、この感受性が *reb1*⁺破壊により抑圧されることも発見している。これらの *Reb1* 依存的な表現型についてさらなる研究を行い、新たな知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】当研究室ではこれまでの知見から、*rqh1-hd* 株においては *Reb1* 依存的な複製および組換え中間体が、SAC の活性化および HU+TBZ 感受性を引き起こしており、中間体構造は rDNA に存在している。また *reb1*⁺破壊により中間体構造は減少し、表現型の抑圧が見られるというモデルを構築していた。本研究では、rDNA に中間体構造が存在するのであれば、rDNA は非常に不安定な状態であると考えられるため、この不安定性の検出および定量を試みた。我々の予想では、*rqh1-hd* 株における rDNA の不安定性は *reb1*⁺破壊によって減少すると考えていたが、予想に反して *reb1*⁺破壊により不安定性は増大するという結果が得られた。*Reb1* は高度に転写されている rDNA において、複製フォークと転写の衝突を防ぐ働きをしているため、*reb1*⁺破壊によって複製フォークと転写の衝突が起こり、これによって rDNA の不安定性が増大したものと考えられる。

B-11 染色体動態に影響を与える因子の探索
○伊藤寛朗, 上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】 染色体は細胞核の中で規則的な配置をとると考えられている。体細胞分裂間期の細胞核では、セントロメアは核膜の外層にあるスピンドル極体 (SPB) にクラスターし、テロメアは核膜上にクラスターする。スピンドル極体 (SPB) とセントロメアは微小管依存的に細胞長に沿って往復運動することが知られている。本研究では、セントロメアとサブテロメアの動態に影響を与える因子の探索と解析を行うことで、染色体の動きの意義や制御機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 セントロメアを標識するため、SPB 構成因子である Sid4-GFP を発現させた。またサブテロメアから約 80kb 離れた sod2 遺伝子の近傍に lacO 反復配列をもち、LacI-GFP を発現させることで一か所のサブテロメアを標識する分裂酵母株を用いた。さらにセントロメア・サブテロメアの動態を評価するため、核小体を Gar2-mCherry で標識した。高グルコース (10%) 培地、及び低グルコース (0.04%) 培地を用いて観察・解析を行ったところ、セントロメアの MSD は高グルコースに比べ、低グルコースで著しく低下した。このことからセントロメアの運動は、細胞外グルコース濃度に依存することが示唆された。一方で、サブテロメアの MSD は高グルコース・低グルコースでもほぼ同じ値を示した。またセントロメアの MSD は ATP 阻害剤や微小管阻害剤を加えることで著しく低下したのに対し、サブテロメアの MSD はこれらの影響を部分的にしか受けなかった。これらのことから、セントロメアとサブテロメアの動きはそれぞれ独立に制御されていることが示唆された。

B-12 優良清酒酵母菌株群 (K7 グループ) における各系統の識別に有効な SNP マーカーの探索
○櫻井省吾^{1,2}, 五島徹也¹, 赤尾 健^{1,2} (¹酒総研, ²広島大院・先端物質)

【目的】 実用清酒酵母菌株の多くは、きょうかい6号 (K6:以下同様), K7, K9, K10 及びこれらの誘導体であり、K7 グループと呼びならわされている。これらの相互識別のニーズは高く、これまでに生理的性質を活用した方法、縦列反復配列 (STR) を利用した DNA マーカーの探索などが試みられてきたが、現状では、簡便で高精度かつ汎用性の高い識別法の確立には至っていない。結果的に K7 グループの菌株は、遺伝的に極めて近縁な関係にあることが判明している。近年我々は、K7 グループの多数の菌株のゲノム情報を NGS を利用し蓄積しており、本研究ではこれを活用した SNP マーカーの探索と検証を目的とした。

【方法・結果】 各菌株のゲノム情報をイルミナ HiSeq により解読、リファレンス (K7) にマッピングして得た変異情報のデータベースを用い、基幹系統である K6 系 7 株, K7 系 15 株, K9 系 18 株, K10 系 4 株の間で遺伝型の分布が系統ごとに異なる SNP の探索を行って、424 個の SNP を候補として得た。全菌株でホモ接合のものは 2 個のみであった。遺伝型の安定性はホモ接合が高いが、各系統の識別には不足であり、ヘテロ接合の SNP も利用することとした。各 SNP 位置の遺伝型の菌株間分布や SNP 間のゲノム上の位置関係を考慮し、12 個の SNP を検討対象とした。SNP タイピングには、高解像度融解曲線 (HRM) 法を用いることとした。ゲノム既読の上記 44 株及び、ゲノム未解読の K7 グループ 77 株を対象にタイピングを行い、各マーカーの有効性の検証を行うこととしている。その後、有効性が確認されたマーカーを用いて、K7 グループに属するが系統が未知のいくつかの菌株について系統識別を試みる予定である。

B-13 担子菌 *Flammulina velutipes* の子実体形成とラッカーゼの関係について
○須鼻浩平, 山本亮輔, 麻田恭彦, 渡邊 彰 (香川大・農)

【目的】当研究室では、担子菌 *Flammulina velutipes* (エノキタケ) の正常な子実体を形成する株と形成しない株の比較解析から、*F. velutipes* の子実体形成には同菌の菌体外に生産するラッカーゼ (特定のアイソザイム) が深く関わっているのではないかと推測している。そこで本研究では、担子菌 *F. velutipes* の子実体形成とラッカーゼの関連性を明らかにするため、ラッカーゼの誘導因子として知られる銅イオンの添加が、*F. velutipes* のラッカーゼ生産と子実体形成に及ぼす影響について解析を行った。

【方法・結果】*F. velutipes* の培養には、米ぬかと木粉を成分とする固体培地を使用した。また、*F. velutipes* の子実体形成は、培地中への菌糸蔓延後、培養温度を 23℃から 15℃へ移行 (低温処理) させることで行った。解析の結果、*F. velutipes* の子実体形成過程におけるラッカーゼ活性は、低温処理を付加することで急激に上昇し、その後減少していくが、CuSO₄ の添加条件下では、低温処理後のラッカーゼ活性の上昇が CuSO₄ 濃度依存的に増大した。また、*F. velutipes* の子実体発生時期においても、CuSO₄ の濃度依存的に早まる傾向が観察された。さらに、*F. velutipes* は複数のラッカーゼアイソザイムを生産することから、Native-PAGE・活性染色法を用いて、アイソザイムレベルでの解析を行ったところ、前述した特定のアイソザイムは、培地中の CuSO₄ 濃度に比例して高く発現していることが確認された。現在、CuSO₄ の添加効果についてさらに解析を進めている。

C-1 電気物性を用いたレトルト殺菌工程中の米飯の品質評価 ○桑原悠史, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】レトルト殺菌中の食品は、高温・高圧下にあるため、その物性は殺菌の進行とともに変化していることが予想される。しかし、殺菌中の食品の状態を連続的に計測する技術は確立されていない。そこで本研究では、レトルト殺菌中の食品（トレー入り米飯）に対して未開封かつ連続的に内部の食品の加工程度を計測する方法を検討した。測定手法として、電気インピーダンス法に注目し、インピーダンスのベクトル軌跡の傾き（ p 値）により米飯試料の加工程度を評価した。

【方法・結果】 吸水生米（もしくは米澱粉）と水をトレー状容器に密封し試料とした。殺菌装置内に設置したフッ素樹脂加工電極と外部の LCR メータを同軸ケーブルで接続することにより、電気物性測定を行った。電極間に試料を挿入し、昇温開始から冷却終了までの電気物性を 2 分ごとに測定した。殺菌時間を変化させたトレー入り米飯から 3 粒の米粒を取り出し硬さ測定用試料とした。小型材料試験機を用いて米粒を歪み 20% まで圧縮し、硬さ測定を行った。防水処理を施した電極を使用することによって、昇温、殺菌工程中の庫内で安定したインピーダンスの測定が可能であった。トレー入り米飯の p 値は殺菌工程中に時間の経過とともに減少していた。この変化は澱粉組織の変化（糊化もしくは澱粉粒の崩壊）であると予想される。また、異なる殺菌時間の米粒の硬さも、殺菌時間の経過とともに減少していた。 p 値と硬さの関係を調べたところ、両者の間には非常に高い相関が見られた。この結果は、トレー入り米飯の加工程度をレトルト殺菌装置内で連続的に評価出来る可能性を示している。

C-2 割裂荷重を受ける円錐台状凍結魚体の応力集中とその切断加工に関する研究 ○廣本好美, 川井清司¹, 羽倉義雄¹ (広島大・生物生産, ¹広島大院・生物圏)

【目的】一般に冷凍の中型～大型魚は漁獲・加工・流通の段階で凍結と解凍が繰り返され、その間に品質の低下が進む。解凍を伴わない魚体の切断加工では、通常大型の電動のこぎりを用いるが、作業者の安全性や破損した刃物の混入等に問題がある。そのため、刃物を使用しない凍結魚の切断加工技術が求められている。そこで、本研究では割裂破壊を利用した凍結魚の縦割り切断加工について検討を行った。

【方法・結果】凍結カツオを流水解凍した後、輪切りの状態に切断し、腹部試料（平均径約 ϕ 860 mm×長さ 64 mm 程度）と尾部試料（平均径約 ϕ 830 mm×長さ 64 mm 程度）とした。これを $-120 \sim -20^{\circ}\text{C}$ で凍結し、実験試料とした。温度調節可能な材料試験機に、スリット状の溝（幅 15 mm×深さ 3 mm×長さ 100 mm、魚体の回転防止用）を施した加圧板を取りつけ、試料の割裂試験を行った。魚体背側に V 字型の切り欠きを導入した試料では加圧板の溝にくさび状の治具を設置し、試料の割裂試験を行った。割裂試験終了後、得られた荷重-変位曲線と目視による魚体の観察により評価を行った。その結果、 $-70 \sim -40^{\circ}\text{C}$ の温度帯が縦割り切断加工に適していることが明らかとなった。この温度帯では、脊椎骨に沿った割裂および内臓の分離が可能であった。切り欠きを導入した試料では、切り欠きと治具の併用で、① 40～70% の割裂破断応力の低減、② 破断時に発生する破片の抑制、③ 脊椎骨・内臓に沿った良好な亀裂の進展が期待できることが明らかになった。以上のことから、脊椎骨・内臓の分離およびフィレー状に低温切断加工できる可能性が示唆された。

C-3 2次元応力センサーを利用したレトルトパウチ内容物の非破壊全数硬さ測定 ○横田紗希, 川井清司¹, 羽倉義雄¹ (広島大・生物生産,¹ 広島大院・生物圏)

【目的】 レトルトパウチ封入食品の硬さの評価は抜き取り検査による破壊試験で行われている。しかし、より高品質な商品を提供するためには全品検査が望ましい。そこで、本研究では2次元応力センサーを利用した、レトルトパウチ内容物の非破壊全数硬さ測定の可能性を検討した。

【方法・結果】 異なる物性の食品及び工業用ゴムを用いて2次元応力センサーの精度を確認した。小型の材料試験機のステージに置いた2次元応力センサー上に試料を静置し、60 mm/min で圧縮した。2次元応力センサーで得られた応力-歪み曲線と材料試験機に取り付けたロードセルから得られた応力-歪み曲線を比較し、2次元応力センサーの任意の位置で正確な応力が読み取れることを確認した。また、センサー上に置く試料の個数を変化させ応力-歪み曲線を比較したところ、複数の試料の応力を同時に読み取れることが明らかになった。次に未包装試料の圧縮試験を行い、2次元応力センサーで求められた未破断領域での弾性率と破断時の硬さとの相関関係を検討した。その結果、両者には強い正の相関性 ($R^2=0.9037$) が認められた。包装試料についても同様の試験を行ったところ、未包装試料の相関性よりはわずかに低いものの、良好な正の相関性 ($R^2=0.8522$) が認められた。以上の結果から、2次元応力センサーを用いることによりパウチ内の複数の食材の弾性率を計測することができ、また弾性率と破断応力との関係から、食材の硬さを間接的に把握できることが明らかになった。この結果はレトルトパウチ内容物の非破壊全数硬さ測定に利用できる可能性を示唆している。

C-4 動的衝撃力計測による餅搗き工程の連続的物性評価 ○植松周作, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】 餅の材料力学的物性は、伸びやコシといった餅の品質を左右する重要な要素である。また加工の過程でその物性は大きく変化することが知られている。したがって、餅の品質を管理・制御するためには、加工中の連続的な物性評価が重要になってくる。しかし、従来の材料試験機を用いた物性測定では、測定の度に試料を取り出す必要があり、加工中の連続的な物性評価は困難である。そこで本研究では、餅の加工法の一つである搗き加工に注目し、杵が餅に衝突した際の衝撃力を計測することで餅の物性変化を連続的に捉える方法を開発することを目的とした。

【方法・結果】 実験試料として蒸したもち米を使用した。杵部にロードセルを取り付けた自作の餅搗き機を使用し、もち米を連続的に搗きながら、杵が受ける衝撃力を測定した。具体的には、杵と試料の衝突時にロードセルが受ける力の経時変化（衝撃力波形）を連続的に測定した。また、任意の搗き時間における試料（もち米→餅）の物性測定として、材料試験機を用いて圧縮試験を行った。

衝撃力波形には、谷部と山部が確認できた。谷部の幅には、搗き時間の増加に伴い増加する傾向が見られた。一方、圧縮試験においては、荷重-変位曲線のピーク荷重までの仕事量が搗き時間の増加に伴い減少する（軟らかくなる）傾向が見られた。これら2つの相関関係を確認したところ、良好な負の相関が認められた。以上の結果より、衝撃力波形における谷部の幅を測定することで、搗き操作における餅の硬さの変化を連続的に捉えられる可能性が示唆された。

C-5 凍結含浸法により軟化処理した豚モモ肉の加熱過程における粘弾性変化の非破壊・連続計測
○梶原 翼, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】凍結含浸法は、酵素を用いて食材を軟化させる方法であり、介護食の加工技術として注目されている。しかし、酵素処理時間や加熱時間が食材の硬さに及ぼす影響については十分に明らかにされていない。ところで、現状の食材の硬さ測定では、試料の破壊が伴うため、加熱中の経時的な変化を連続的に測定することは困難である。そこで本研究では、自作の動的粘弾性測定装置を用いて、凍結含浸処理を行った豚モモ肉の加熱過程における粘弾性変化を連続的に測定し、従来法によって求められる硬さとの対応関係を検討した。

【方法・結果】市販の豚モモ肉に対して、凍結含浸処理剤を用いて凍結含浸操作を行い、これを実験試料とした。動的粘弾性測定装置に加熱用ヒータを取り付けたアルミニウム製容器を設置し、試料と蒸留水を入れ、茹で加熱を行いながら試料の動的粘弾性測定を行った。動的粘弾性測定では、試料に対して圧縮の正弦波振動を印加し、得られたリサージュ図から動的粘弾性パラメータ (E' , E'' , $\tan \delta$) を算出した。さらに、同条件で加熱処理を行った試料の破断特性の経時変化を材料試験機により測定した。酵素処理時間の増加に伴い、試料の貯蔵弾性率 (E') は減少した。また、加熱時間の増加に伴い、 E' は増加し、その後、ほぼ一定の値を示した。試料の E' の変化と破断特性の変化を比較したところ、両者には一定の関係が認められた。以上の結果より、動的粘弾性により、凍結含浸処理を行った豚モモ肉の加熱過程における硬さの変化を連続的に測定できる可能性が示唆された。

C-6 凍結方法の違いが解凍後のカキの電気物性に与える影響
○平良佳雅, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】本研究では、前処理時に浸透圧脱水を行い、その後に緩慢凍結する方法により、冷凍生カキを製造する方法を検討した。この方法では、浸透圧脱水により、凍結時の氷結晶生成が抑制され、細胞の損傷が低減されと考えられる。また、冷凍生カキの解凍後の状態を評価する方法として、電気インピーダンス法を検討した。インピーダンス計測は、生体細胞の状態を評価する物理的な手法の1つであり、簡便かつ短時間で測定が可能であるという利点がある。本研究では、凍結方法（急速凍結と浸透圧脱水後緩慢凍結）の違いが、カキの品質に与える影響について評価することを目的とした。あわせて、電気インピーダンス法によるカキの品質評価の可能性を検討した。

【方法・結果】試料として、広島県産のむき身カキを用いた。緩慢凍結試料では、2, 3, 5, 7w/v (%) の塩水で浸透圧脱水を行い、その後、新たな塩水と共に保存容器に封入し、 $-20 \sim -25^{\circ}\text{C}$ に設定した冷凍庫内で凍結を行った。また、急速凍結試料として、アイスグレーズを施した急速凍結カキを用意した。各試料の評価では、最初のインピーダンス測定を保存開始から1週間後に行い、以降は保存6ヵ月後まで1ヵ月毎に測定を行った。試料のインピーダンスのベクトル軌跡を用いて解析を行った。急速凍結カキは緩慢凍結カキよりも高いインピーダンス値を示した。緩慢凍結カキでは、脱水時の塩濃度が低いほど高いインピーダンス値を示した。特に、脱水時塩濃度2%の試料が急速凍結カキに最も近い値を示した。

C-7 鰹節細片の切削幅が集合体の構造物性に与える影響 ○朝田 仁（ヤマキ（株））

【目的】 鰹節切削細片の集合体である「かつおパック」のボリューム感、ふわふわ感などの見た目の物性が、切削条件にどのような影響を受けているかを検討してきた。その上で切削細片の厚みと粘弾性比率に高い相関が認められたが、今回は切削細片の幅が集合体の静的粘弾性、比容積に与える影響を調べることで集合体の組織構造についても考察した。

【方法】 鰹節の製造において制御できる漁獲、製法、屋号を同じにした鰹節を用いた。切削条件は、鰹節の繊維に垂直になるように、さらに鉋刃の切込み深さで切削片の厚みを一定にし、鉋刃自身の切込み幅を変えることで、切削細片の幅（鉋の切込み幅に依存）の異なる5種類の試料を作製し、それらの集合体の静的粘弾性と比容積を測定した。

【結果】 細片の切削細片幅（鉋刃の切込み幅）が小さくなるほど、その集合体の弾性率は大きくなる負の相関が認められた。また、同様に細片幅が小さくなるほど比容積も小さくなり、見た目のボリューム感がなくなった。鰹節切削細片幅が集合体の弾性率と比容積にそれぞれ相関があったことから、弾性率と比容積も比例することが認められた。すなわち、細片幅が小さくなると一定容量での集合体の細片数が増加するとともに細密充填となり、組織構造が強固になるために弾性率が大きくなると推察し、細片幅は集合体の組織構造の骨格の強さに影響を与えることが推察された。

C-8 オリーブ葉給餌がブリとマダイの歯ごたえに与える効果 ○野崎智絵，日比光磨，赤澤隆志¹，西山智朗²，小川雅廣，早川 茂， 大山憲一³，吉田 誠⁴，向井龍男⁴ （香川大院・農，¹愛媛大院連合・農，²香川大・農，³香川県庁，⁴香川水試）

【目的】 オリーブ葉の乾燥粉末（OLF）を2.0%含む飼料を給餌した養殖ブリ（オリーブハマチ）は香川県で人気である。現在、OLF 給餌ブリに続いて OLF 給餌マダイの試験的な養殖も行われている。しかしOLF 給餌が魚体に与える効果の知見は少なく、刺身の歯ごたえにOLF 給餌が与える効果は明らかでない。そこで、本研究ではOLF 給餌がブリ及びマダイ普通肉の歯ごたえに与える効果の解明を目的とした。

【方法・結果】 OLF 添加飼料を給餌したブリ（25 日給餌）とマダイ（115 日給餌）と、対照として OLF 無添加の飼料を給餌したブリとマダイを生簀から採取後、即殺し背側普通肉を切り出し各試験に供した。①破断強度測定：即殺当日と、1・3 日間 4℃で保存した切り身の破断強度をレオメーターによって測定した。その結果、即殺当日の OLF 給餌ブリの普通肉は対照より破断歪率が低く、歯切れが良かった。さらに OLF 給餌ブリは貯蔵しても硬さを維持しており、軟化しにくいことが明らかになった。また OLF 給餌マダイの場合、即殺当日は対照より歯切れが良く、貯蔵後も歯切れの良さを維持することが分かった。OLF 給餌ブリを用いて歯ごたえが向上した要因を調べた。②普通肉の脂質含量：脂質はクロロホルム・メタノールによって抽出し、溶媒を留去後、脂質量を秤量した。OLF 給餌は脂質量には影響を与えていなかった。③普通肉のコラーゲン含量：普通肉を乾燥後アルカリ加水分解し、アミノ酸溶液中のヒドロキシプロリン（Hyp）を定量し、Hyp 量からコラーゲン量を推定した。コラーゲン量は OLF 給餌ブリが有意に高かった。以上から OLF 給餌には2種の魚を新鮮な状態で保つ効果があることが分かった。

C-9 ポリγグルタミン酸イオンコンプレックスの高機能化と強靱化

○島田幸育, 中山沢水, 白米優一, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】これまで困難とされていたポリγグルタミン酸 (PGA) のプラスチック化に成功した。PGA イオンコンプレックス (PGAIC) と名付けたこの新素材は、PGA 由来の高い接着性と、抗菌・抗ウイルス活性を備えている。しかし、過酷な環境下では、その能力を十分に発揮できないことが課題となっていた。PGAIC のさらなる強靱化が望まれた。そこで種々検討の結果、PGAIC のカウンターパートナーにトローチの薬用成分として知られる二頭型第四級アンモニウム塩の塩化デカリニウム (DEQ) を架橋剤として導入することで、PGA/DEQ を得るに至った。今回、従来型 PGAIC を遥かに凌駕する PGA/DEQ の化学的耐久性と抗菌能力等について報告する。

【方法・結果】まず、種々の有機溶媒に対する各 PGAIC の化学的耐久性を調査した。従来型がアルコール類やクロロホルムに脆弱であったのに対し、PGA/DEQ は試験した全ての有機溶媒に対して高度な耐久性を示した。次いで、PGAIC の抗菌性能を試験した。各 PGAIC をコーティングした合繊不織布を過酷な環境 (有機溶媒中、高塩濃度等) に曝した後、大腸菌培養液に投入し、菌体増殖への影響を調べた。従来型では容易に機能が失われる一方、PGA/DEQ の場合、興味深いことに、顕著な抗菌能が認められた。また、熱重量測定 (TG) の結果、PGA/DEQ は従来型よりも優れた耐熱性 (～250℃) を有していること、pH 応答試験では幅広い pH 領域 (2.5～12) で抗菌能力が保たれることが判明した。以上より、PGAIC の高機能化と強靱化の両方で実現できたと結論づける。

C-10 昆虫食に伴う甲殻類アレルギーリスク

○出水聡之, 杉浦義正¹, 川邊真也¹, 宮崎泰幸¹, 臼井将勝¹
(水大校院・水産,¹水大校・食品科学)

【目的】甲殻類アレルギー主要アレルゲンのトロポミオシンは無脊椎動物において高い相同性を示し、広範囲に共通する汎アレルゲンとして報告されている。昆虫類も分子系統樹において汎甲殻類に含まれており、甲殻類と相同性の高いトロポミオシンを有すると考えられ、甲殻類アレルギー患者の昆虫類摂食にはアレルギー発症リスクが伴うことが懸念される。そこで本研究では、調理済み昆虫に含まれるトロポミオシンの抗原性と濃度について検討し、アレルギーリスクについて考察した。

【方法】市販の昆虫甘露煮4種 (イナゴ成虫, カイコガ蛹, ハチ幼虫, トビケラ幼虫) を購入し、実験に用いた。各試料を約1g量りとりFAテストⅡ抽出用試薬「ニッスイ」を19倍容量となるよう加え、25℃で15時間振盪抽出したものを検体抽出液とした。検体抽出液中のエビトロポミオシン様タンパク質濃度はFAテストEIA-甲殻類Ⅱ「ニッスイ」を用いて求め、同濃度をもとに昆虫摂食時のアレルゲン総摂取量を算出しリスク評価した。加えて、同タンパク質の分子量をウエスタンブロット法で解析した。

【結果】各検体抽出液中のエビトロポミオシン様タンパク質濃度を測定した結果、全ての試料で食品表示義務である10ppmを上回った。各濃度はイナゴでは209.263±138.213ppm, カイコの蛹では18.863±14.437ppm, ハチノコでは128.343±17.281ppm, ザザムシでは62.143±17.976ppmであった。抗エビトロポミオシン抗体を用いたウエスタンブロット解析において、すべての昆虫で35kDa付近に特異的なバンドが検出された。

C-11 タウリン摂取によるマウス Cyp7a1 遺伝子の発現上昇機序
○船木萌浩, 住屋由紀乃, 福原千晶, 杉浦義正, 宮田昌明 (水大校・食品科学)

【目的】タウリンはイカ、タコ、ホタテガイ等の魚介類に多く含まれているアミノ酸の一種である。タウリンには多くの機能性があるとされ、そのうち体内のコレステロールの低下作用は広く知られている。しかし、タウリンによるコレステロール低下作用の詳しい機序については明らかになっていない。本研究では胆汁酸受容体の farnesoid X receptor (FXR) シグナルに着目し、タウリン摂取によるコレステロール異化酵素である肝臓 CYP7A1 遺伝子の発現上昇機序を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】8週齢の雄性野生型マウスおよび Fxr 欠損マウスに 2%タウリン含有水を 10 日間自由摂取させた。10 日間の摂取後、血液、肝臓と小腸上皮細胞および小腸の管腔内容物を採取した。野生型マウスの肝臓 Cyp7a1 の mRNA レベルがタウリン投与群で有意に上昇したが、Fxr 欠損マウスでは上昇しなかった。そこで、Fxr 標的遺伝子で Cyp7a1 発現の抑制因子である Shp, Fgf15 の mRNA レベルを解析した。両マウスで肝臓 Shp の mRNA レベルは変化しなかった。一方、野生型マウスの小腸 Fgf15 および Shp の mRNA レベルがタウリン投与群で有意に減少した。野生型マウスの肝内、小腸管腔内の総胆汁酸量および胆汁酸組成は有意に変化しなかったが、小腸上皮細胞内の総胆汁酸量がタウリン投与群で有意に低下した。これらの結果から、タウリンは小腸上皮細胞内の胆汁酸レベルを低下させ、小腸 Fxr シグナルを減弱させることにより、Fgf15 を介して肝臓 Cyp7a1 遺伝子の発現レベルの上昇に関与する可能性が示された。

C-12 脂肪性肝疾患モデルの魚油添加笹かまぼこ摂取による脂質含量と脂肪酸組成の組織間変動
○木下智貴, 宮原佳歩, 高倉茉由, 杉浦義正, 宮田昌明 (水大校・食品科学)

【目的】魚油は多くの機能性を有することが知られており、近年では魚油を添加した機能性食品が多く開発されている。そのため、魚油の機能性については様々な研究がなされている。しかし、魚油の機能性発現時における組織中の脂質含量と脂肪酸組成の組織間変動との関連については詳細には明らかになっていない。そこで本研究では魚油添加した笹かまぼこを含む飼料を肝、血中の脂質レベルが高値を示す脂肪性肝疾患モデルの farnesoid X receptor (Fxr) 欠損マウスに摂取させ、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (TC)、リン脂質 (PL)、遊離脂肪酸 (NEFA) などの脂質レベルと脂肪酸組成の組織間変動について解析した。

【方法】0%, 2.5%, 5%の魚油を添加した笹かまぼこの凍結乾燥成分を AIN-93M 精製飼料と 50%の割合で混合して 3 種類の飼料を作製した。その飼料を Fxr 欠損マウスに 4 週間摂取させた。マウスを解剖後、組織中の脂質含量と脂肪酸組成を測定した。脂肪酸測定にはガスクロマトグラフィーを用いた。

【結果】脂質含量については魚油添加笹かまぼこ群の血中と脳内で同様の変動が認められ、NEFA が減少し、PL は増加した。肝内では NEFA, PL は変動せず、TG と TC が減少した。一方、脂肪酸組成については血中と肝内で同様の変動が認められ n-3 系多価不飽和脂肪酸のみが増加したが、脳ではエイコサペンタエン酸を除くほとんどの脂肪酸が増加した。以上のことから、脂肪性肝疾患モデルへの魚油添加食品の摂取による脂質含量と脂肪酸組成の変動は肝臓と脳の臓器間で異なることが示唆された。

C-13 黒ゴマ種子の抗酸化成分アントラセサモンFの含有量差異
谷口凜伽子, ○古本敏夫 (香川大・農)

【目的】ゴマは健康に良い食品として世界中で重宝されてきた作物であり、昔から黒ゴマの方が白ゴマより健康に良いとも言われている。アントラセサモンFはアントラキノン誘導体であり、白ゴマ種子には含まれない、黒ゴマ種子に特徴的な抗酸化成分として知られている[1]。一方、この抗酸化成分は黒ゴマの種皮に局在していることから、保存や加工の際に含有量に変化しやすい可能性がある。本研究では、アントラセサモンF含有量に対する光（明所）と加熱（焙煎）の影響、および市販の黒ゴマ種子（食品用）での含有量について調査した。

【方法・結果】我々の研究グループで栽培・収穫して得た黒ゴマ種子に、白色蛍光灯を用いた光照射処理（明所）を0～35日間、室温で行った。その結果、アントラセサモンF含有量の有意な変化は認められなかったが、若干の減少傾向が見られた。次に、アルミブロック恒温槽を用いた加熱処理（焙煎）（150℃, 170℃, 190℃および200℃）を0～60分間行なった。その結果、150℃と170℃での加熱処理において有意な含有量変化は見られなかったが、190℃と200℃での加熱処理において有意な含有量の減少が認められた。最後に、市販の黒ゴマ種子（食品用：炒りゴマ4種、洗いゴマ1種）中のアントラセサモンF含有量を分析したところ、我々が栽培・収穫した黒ゴマと比較して、これらの市販黒ゴマでは顕著に含有量が低いことが示された。

[1] T. Furumoto, K. Nishimoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **80**, 350-355 (2016).

D－1 はだか麦を用いたパンの低糖化によるラット血糖値上昇の抑制
○岸田太郎，逢阪江理¹，前田耕作²，内田敏之³，藤谷美菜
(愛媛大院・農，¹愛媛県・産技研，²(株)マエダ，³(有)内田パン)

【背景・目的】急激な食後血糖値の上昇は肥満や糖尿病の原因の一つであり，高炭水化物な食品の問題点である。本研究は代表的な高炭水化物食品であるパンについて，難消化性澱粉，小麦粉よりも食物繊維を高含有するはだか麦粉，およびグルテンを主原料の小麦粉と代替することにより，低糖質化を試み，試作したパンの食後血糖値上昇をラット経口耐糖性試験により調べることを目的とした。予備検討で低糖化のための材料が，ドウを硬化させたため，セルラーゼの添加による部分分解による製パン性の向上が，低糖化に与える影響も検討した。【実験方法】対照区：小麦粉 100%，試験区 A：はだか麦粉 50%，難消化性澱粉 30%，グルテン 20%，および試験区 B：試験区 A にセルラーゼ 0.1%を添加，の 3 試験区について，それぞれ食パンを製パンした。SD 系雄ラット 6 週齢を 4 日間精製飼料で予備飼育後一夜絶食し，各種パン凍結乾燥物 (30 メッシュスルー) を 1 または 0.5 g 再給餌させ，4 時間または 3 時間経時的に尾静脈血を採取し，簡易血糖値測定装置にて血糖値を測定した (各試験区 8 匹)。【結果】0.5 g 再給餌させた場合，試験区 A および B で血糖値の上昇が抑えられ，試験区 A では 30 分目，1 時間目に，試験区 B では 1 時間目のみ対照区より有意に低い値となった。曲線下面積は試験区 A および B と対照区より有意に低い値となった。1 g 再給餌した場合もほぼ同様の結果となった。以上よりはだか麦および難消化性澱粉による低糖化は血糖値上昇を抑制し，セルラーゼ添加は効果をやや減弱させることが分かった。

D－2 ニコチンアミドの脳機能保護効果の検討
○杉本紗羅，奥田真友美¹，柴田紗知²，伊豆英恵³，藤井 力^{3,4}，松原主典¹
(広島大・教育，¹広島大院・教育，²福山大・生命工学，³酒総研，⁴広島大院・生物圏)

【目的】酒粕には様々なビタミンや機能成分が含まれており，これらの抗老化効果について検討を進めている。近年ニコチンアミドモノヌクレオチド (NMN) の抗老化作用が明らかにされたことから，その前駆体であるニコチンアミド (NA) にも同様の効果があるかどうか検討を進めている。本研究では，加齢に伴う脳機能低下に対する保護効果について老化促進マウスを用いて検討した。

【方法・結果】老化促進マウス (SAMP8) に NA 溶液 (0.1 mg/ml) を経口投与し，60 週齢まで飼育した。この間に握力測定と各種行動試験 (握力測定・オープンフィールド試験・新奇物体認識試験・明暗箱試験・受動的回避試験) を実施し，脳機能の評価を行った。また，脳については免疫染色 (アミロイド β 染色，トランスサイレチン (TTR) 染色) により検討した。餌，飲料の摂取量については有意な差は見られなかったものの，NA 群の方が多い傾向が見られた。また，体重についても NA 群の方が重く，体重が維持されていたが握力には差は認められなかった。幾つかの行動試験において両群の間に有意な差が見られたことから，NA 摂取により脳機能が維持されたことが示唆された。脳の免疫染色では，海馬での TTR 及びアミロイド β の沈着に差が見られた。これらの結果から，NA は脳でのアミロイド形成を抑制し，脳機能保護効果を示すことが示唆された。

本研究は SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

D-3 可食性植物由来乳酸菌のがん細胞死誘導機構の探索

○圖子皓祐, 鈴木雄大, 兼重 陸, 近藤史歩, 紙本葉月, 松岡絹華,
二宮由利絵, 牛尾一利, 早瀬伸樹, 石塚盛雄¹
(新居浜高専・生化, ¹中央大・理工)

【目的】乳酸菌はヒトの腸内細菌叢の改質や免疫賦活作用など, さまざまな機能を有することが知られている。我々は柑橘類果皮などの可食性植物から採取・単離した乳酸菌株がヒト口腔がん細胞 KB に対し顕著な細胞死誘導活性を有することを見出してきた。乳酸菌のがん抑制作用については *in vitro* 系・*in vivo* 系においていくつかの報告例があるが, その正確な機構については不明な場合が多い。本研究では, KB のほか, ヒト大腸がん細胞 DLD-1 および HCT-15 を用いて, 細胞死誘導作用を有する乳酸菌株の作用機構の検討を行った。【方法・結果】凍結乾燥後 PBS で一定量懸濁した乳酸菌をがん細胞培養系に 1% 添加後培養し, 経時的な顕微鏡観察を主たる手段として, 細胞の生存率および形態変化を調べた。その結果, 柑橘類などから単離した複数の乳酸菌株が口腔がんおよび大腸がん細胞株のいずれにも細胞死誘導効果を示すことが明らかとなった。これらの細胞死誘導効果を有する柑橘由来乳酸菌は, M1, K1, Z2 の 3 株を得ていたが, それらはいずれも, *Enterococcus durans* と同定され, また他に玄米から単離された興味深い菌株は *Pediococcus pentosaceus* と同定された。これらの乳酸菌についてガラスビーズを用いた破碎により菌体成分を分画し, 同様に細胞死誘導を検定したところ, 菌株により異なる画分に活性がみられた。また, 乳酸菌の化学修飾や細胞-乳酸菌共存培養系への試薬添加などを行い細胞死誘導への影響を検討したところ, 柑橘由来 *E. durans* と判明している 3 株については, 過酸化水素生産ががん細胞死と強く関連していることが示唆された。ただ, *P. pentosaceus* については, この機構は当てはまらなかった。

D-4 Benzyl isothiocyanate enhances glucose uptake and lipid accumulation via PI3K/Akt signaling pathway in 3T3-L1 adipocytes

○Ying Liang, 佐々木郁実, 竹田有希, 中村俊之, 宗正信太郎, 村田芳行,
中村宜督 (岡山大院・環境生命)

[Objective] Adipose tissue plays an important role in the regulation of glucose uptake and lipid metabolism. Adipose tissue dysfunction in obesity and lipodystrophy is closely related to incidence of type 2 diabetes. Benzyl isothiocyanate (BITC) is an isothiocyanate (ITC) derived from cruciferous vegetables and papaya seeds. In this study, we investigated the effect of BITC on glucose uptake and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

[Methods and Results] Mouse 3T3-L1 preadipocytes were differentiated using the media containing insulin, dexamethasone and 1-methyl-3-isobutylxanthine. The quantification of intracellular 2-deoxyglucose (2DG) level was done using a fluorometric enzyme assay. Lipid accumulation in adipocytes was determined by the Oil Red O staining. We observed that BITC significantly potentiated the glucose uptake and lipid accumulation with the enhanced phosphorylation of PI3K, Akt and ERK. LY294002, a PI3K inhibitor, impaired the BITC-enhanced glucose uptake, lipid accumulation and Akt phosphorylation. Although PD98059, a MEK inhibitor, attenuated the enhanced phosphorylation of ERK, it did not inhibit but rather enhanced the BITC-induced glucose uptake and lipid accumulation. These results suggest that BITC increases the glucose uptake, possibly through the promotion of the PI3K/Akt signaling in 3T3-L1 adipocytes.

D-5 Methyl- β -cyclodextrin potentiated the BITC-induced anti-cancer effect through modulation of the survival pathway in human colorectal cancer cells
OQifu Yang, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督
(岡山大院・環境生命)

【目的】 Isothiocyanates (ITCs), derived from cruciferous vegetables, have a potential to suppress the cancer cell proliferation. Benzyl isothiocyanate (BITC), one of the ITCs, exerts the antiproliferative effects by inducing cell cycle arrest and apoptosis through specific pathways in various human cancer cells. Cholesterol plays critical roles in maintaining the plasma membrane fluidity and permeability. It is also important for membrane trafficking, cell signaling, and, lipid and protein sorting. Methyl- β -cyclodextrin (M β CD) is the most effective agent for removal of plasma membrane cholesterol. M β CD can increase the membrane permeability by deleting cholesterol from the plasma membrane, and enhances the susceptibility of cancer cells to anti-cancer drugs. Our objective is to reveal the modulating effects of M β CD on the BITC-induced antiproliferation in human colorectal cancer cells.

【方法・結果】 M β CD dose-dependently increased the cholesterol level in the medium, possibly through its removal from the plasma membrane. Next, we examined the effect of the nontoxic concentration of M β CD (2.5 mM) on the BITC-induced antiproliferation using an MTT assay. The pretreatment with M β CD (2.5 mM) significantly enhanced the BITC-induced cytotoxicity and apoptosis induction in human colorectal cancer cells. Although BITC activated the PI3K/PDK1/Akt pathway, M β CD dose-dependently inhibited the phosphorylation level of Akt. These results suggested that M β CD might potentiate the BITC-induced anti-cancer by inhibiting the PI3K/PDK1/Akt-dependent survival pathway.

D-6 ベンジルイソチオシアネートの脂肪蓄積抑制作用とその分子機構
O佐々木郁実, Liang Ying, 竹田有希, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行,
中村宜督 (岡山大院・環境生命)

【目的】 ベンジルイソチオシアネート (BITC) は、アブラナ科野菜に由来するイソチオシアネートの一つであり、抗がん作用、抗炎症作用、解毒作用の亢進など、様々な健康維持機能を有することが報告されている。我々の研究グループは最近、前駆脂肪細胞の特徴を有する 3T3-L1 細胞を用いて、BITC の脂肪蓄積に対する効果を評価している。脂肪の蓄積は、脂肪形成転写因子の発現を介したグルコース取込みや脂肪酸合成の促進により引き起こされる。しかしながら、BITC がこれらの脂肪合成メカニズムにどのような影響を与えるのかについてはいまだ不明な点が多い。そこで本研究では、分化誘導期における BITC 処理の脂肪蓄積への影響を明らかにすることを目的として、細胞内グルコース取込みだけでなく、分化誘導や脂肪合成に関与する遺伝子及びタンパク質の発現に対する BITC の効果を調査した。

【方法・結果】 マウス線維芽細胞株 3T3-L1 を分化誘導培地及び分化維持培地にて培養し、脂肪細胞へと分化させた。まず、BITC による脂肪蓄積調節作用を確認するために、分化誘導培地に交換した際に、BITC を添加した。その後、分化維持培地に交換して脂肪蓄積を促し、細胞内脂肪蓄積量を Oil Red O 染色を用いて評価した。また、主要な脂肪形成転写因子及びグルコーストランスポーター4 (GLUT4) の遺伝子発現量を評価した。その結果、分化誘導期における BITC の処理は有意に脂肪蓄積を抑制した。また BITC は脂肪形成転写因子及び GLUT4 の遺伝子発現を抑制するだけでなく、グルコース取込みも抑制した。現在、さらに上流に位置するシグナル分子を解析中である。

D－7 ザクロの果皮に含まれる抗発がん活性成分の探索
○横井里香，北井友里加，米倉リナ，田村啓敏（香川大院，農）

【目的】日本の乳がん患者数は年々上昇している。食物により，乳がんの予防や治療ができれば女性にとって朗報になることが期待される。これまでに，ザクロ種子の脂肪酸には乳がん細胞増殖抑制効果があることが報告されている。そこで，本研究ではザクロの未利用資源である果皮に着目した。乳がん細胞増殖作用について，ホルモン依存性乳がん治療薬のタモキシフェンと比較し，活性の程度を調べた。

【方法・結果】乳がん細胞の増殖阻害活性は，ホルモン依存性乳がん細胞(MCF-7)と HER-2 陽性乳がん細胞(SK-BR-3)の2タイプについて CCK-8 試験により調べた。各細胞は 10%牛胎児血清(FBS)含有 RPMI-1640 培地を用い，37℃，CO₂5%の条件下で継代培養を行った。試験では，各細胞は 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地を用いて 2×10^3 cells/well 播種した。24 時間後，DMSO(終濃度 0.1%)で溶解した試料(終濃度 0～250 µg/mL の間で7段階の濃度を用意)を 10 µL/well 添加した。試料には，ザクロの種子，果皮，果汁の QuEChERS 抽出物と，比較試料として抗エストロゲン作用を有するタモキシフェンを用いた。試料添加 72 時間後，CCK-8 溶液によりホルマゼン生成量を測定し，細胞生存率を求めた。その結果，果皮抽出物で濃度依存的な細胞生存率の減少が，どちらの細胞に対しても顕著に見られ，高い増殖抑制効果が確認できた。抽出物の毒性を表す IC₅₀ 値を算出したところ，MCF-7 細胞に対する IC₅₀ 値は 105.3 µg/mL になった。これは，タモキシフェンの IC₅₀ 値と近い値で，約 1.2 倍の濃度であり，果皮は有用な天然未利用資源だと考えられた。

D－8 ケルセチンは酸化ストレスによる腸管バリア損傷を抑制する
○井上友里，鈴木卓弥（広島大院・生物圏）

【背景・目的】腸管上皮細胞のもつタイトジャンクション（TJ）構造は，腸管内異物に対するバリアとして重要であり，その損傷は炎症を基盤とした疾患の発症に深く関与する。これまでに私たちは，フラボノール系のポリフェノールの1つであるケルセチンが腸管 TJ バリアを増強させることを見出している。本研究では，腸管バリア損傷を引き起こす酸化ストレスに暴露した腸管上皮細胞を用いて，ケルセチンおよびその類縁体（ケルセチンと水酸基数や位置が異なる）による TJ バリア保護作用を探索した。

【方法・結果】Transwell システムに培養したヒト腸管上皮 Caco-2 細胞を酸化ストレス（過酸化水素，H₂O₂）に暴露したところ，TJ バリアの指標である経上皮電気抵抗値 TER が大きく減少した。蛍光免疫染色法により，TJ 分子の ZO-1，claudin-3，claudin-4 の細胞内局在を観察したところ，H₂O₂ は細胞膜のラフリングを引き起こしており，バリア損傷と関連付けられた。一方で，ケルセチンを作用させた Caco-2 細胞では，酸化ストレスによる TER 減少とラフリングが明確に抑制された。またケルセチンは，H₂O₂ による p38MAPK の活性化も抑制した。ケルセチンより水酸基数の少ない 3-ヒドロキシフラボンとフィセチンも TJ バリア損傷と p38MAPK 活性化を抑制したが，1つの水酸基の位置の異なるモリンは，抑制作用を示さなかった。これらの結果より，ケルセチンは p38MAPK 活性化と細胞膜のラフリングを抑えて，酸化ストレスから腸管 TJ バリアを保護すること，この保護作用にはケルセチンあるいはフラボノール類のもつ水酸基数と位置が重要な役割をもつことが示された。

D-9 放線菌 *Streptomyces rochei* の二次代謝生産を誘導するシグナル分子 SRB の生合成解析
○手島愛子, 波多江希, 荒川賢治 (広島大院・先端物質)

【目的】 *Streptomyces rochei* は抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産し、それらの生合成はシグナル分子 *Streptomyces rochei* butenolide (SRB) によって厳密に制御されている。当研究室ではこれまでに SRB1 および SRB2 の化学構造を決定しており、現在は *S. rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍にコードされていた遺伝子から推定した生合成経路を元に、生合成経路の解明を目指している。今回は、これまでに 6' 位の酸化反応に関与することが明らかとなった *srrO* (P450 モノオキシゲナーゼ) のさらなる機能解析および *srrG* (還元酵素遺伝子) の解析を行った。

【方法・結果】 *SrrO* 発現ベクターを組み込んだ *S. lividans* の形質転換体に 6'-deoxy-SRB の (1'R)(1'S) 体混合物を添加培養し、生成物の経時変化をキラル HPLC 解析によって確認したところ、両異性体とも同程度の割合で SRB に変換された。このことから、*SrrO* は C-1'位の立体化学に寛容であることがわかった。*SrrG* は遺伝子破壊により抗生物質生産が消失したことから、本遺伝子産物の SRB 生合成への関与が示唆された。また、SRB 非生産菌 ($\Delta srrX$ 株) との共培養によって抗生物質生産が回復することから $\Delta srrG$ 株が SRB の中間体を生合成している可能性が考えられた。そこで、30L 培養液の酢酸エチル抽出物をカラムによって精製し、バイオアッセイを行うことで中間体の取得と構造決定を試みた。本発表ではこれらの結果を報告する。

D-10 アゾキシアルケン化合物 KA57-A の生合成解析
○岸本拓也, 國武博文, Yosi Nindita, 木梨陽康, 福本 敦¹,
安齊洋次郎¹, 荒川賢治 (広島大院・先端物質, ¹東邦大・薬)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、通常培養において 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を主に生産する。LC・LM 生合成遺伝子および転写リプレッサー遺伝子 *srrB* に変異を加えた三重破壊株 ($\Delta srrB \Delta lkmE \Delta lkcF-KRI$) では通常非生産のアゾキシアルケン化合物 KA57-A の生産が確認でき、遺伝子工学による休眠二次代謝の覚醒に成功した。本化合物はアゾキシ結合を有しており、近年アゾキシアルケン化合物 (maniwamycin) において Quorum Sensing 阻害活性を示した報告がされており、生合成や生理活性の観点から大変興味深い。

【方法・結果】

本化合物は $C_{10}H_{20}N_2O_3$ のアゾキシアルケン化合物であり、Quorum Sensing 阻害活性を測定したところ、*Chromobacterium violaceum* を $IC_{50}=500 \mu g/ml$ の濃度で阻害することが分かった。さらに、次世代シーケンサー解析から、*S. viridifaciens* 由来のアゾキシ化合物 valanimycin 生合成クラスター (*vlm*) と高い相同性を示すクラスターが *S. rochei* 染色体上に検出できた。そこで KA57-A 生合成経路において Hexylamine の水酸化反応に関与する *azxH* 遺伝子の破壊株を構築し代謝産物解析を行ったところ、本遺伝子産物の生合成への関与が明らかになった。本発表では *azxH* 遺伝子破壊株に加え、キナーゼ、縮合酵素などの遺伝子破壊株の代謝産物解析についても報告する。

D-11 *Streptomyces rochei* 変異株が高蓄積するポリケチド化合物の生合成解析
○山手直貴, 片岡憂祐, Yosi Nindita, 木梨陽康, 荒川賢治
(広島大院・先端物質)

【目的】 放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は主に 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産する。当研究室では, LC 生合成研究の一環で生合成遺伝子の破壊株を多数構築している。その中で *lkcA* 遺伝子破壊株 (FS18 株) は LC を生産せず, ペンタマイシンとシトレオジオールを過剰生産していた。そこで本研究では, 両化合物の生合成遺伝子クラスター (*pem*, *ctr*) の特定と遺伝子改変による構造多様化を目指す。

【方法・結果】

① シトレオジオール生合成遺伝子の特定および生物活性

シトレオジオール生合成には 3 分子の S-アデノシルメチオニンの関与が考えられるため, C-メチル基転移酵素が含まれる PKS 遺伝子クラスターを精査したところ 2 つ見出した。まずペンタマイシン生合成遺伝子クラスター近傍の SRO_7330 遺伝子の破壊株を作製した。取得した変異株 (NY01 株) を親株と比較したところ, シトレオジオールの生産が失われており, シトレオジオール生合成への関与が示唆された。

② ペンタマイシン生合成における水酸化酵素の機能解析

pem クラスター上において 3 つの P450 水酸化酵素 (*pemC*, *pemD*, *pemI*) が見出され, 各々ペンタマイシンポリケチドの C26, C1', C14 位の水酸化に関与することが示唆された。現在, これらの遺伝子破壊株を構築し, 水酸基の生合成順序やデオキシペンタマイシンの生物活性を解析している。

D-12 希少糖 D-アラビノース生理活性メカニズムの解明—解糖系酵素への阻害活性
○小山麻理子, 新谷知也¹, 佐藤正資 (香川大・農, ¹愛媛大院・連合農)

【目的】 演者らは, 希少糖 D-アラビノース (D-Ara) が線虫 *Cenorhabditis elegans* の成長を阻害することを報告している。しかし, その作用メカニズムは明らかではない。D-Ara の成長阻害活性は D-フルクトース (D-Fru) 添加で打ち消されるが, D-グルコース (D-Glc) 添加では打ち消されない。このことから D-Ara (あるいはその代謝物 D-アラビノース 5-リン酸 (D-Ara-5P)) は, 解糖系酵素であるヘキソキナーゼ (HXK) とグルコースリン酸イソメラーゼ (GPI) に対して阻害活性をもつ可能性があると考えた。この仮説を検証するため, まず市販の酵母由来酵素を用いて予備試験を行なった。

【方法・結果】 ① HXK 阻害実験: 基質 D-Glc と ATP, 阻害剤 D-Ara, 酵母 HXK (Sigma), $MgCl_2$ を Tris-HCl 緩衝液中で反応させた (pH 7.5, 30°C)。生成した ADP を HPLC で定量し, 反応を解析した結果, D-Ara は酵母 HXK を阻害しないことが明らかになった。また, D-Ara が酵母 HXK の基質にならないことも確認した。② GPI 阻害実験: 基質 D-Glc-6P, 阻害剤 D-Ara-5P, 酵母 GPI (Sigma) を Tris-HCl 緩衝液中で反応させ (pH 7.5, 30°C), 生成した D-Fru-6P をシステインカルバゾール法で検出し, 反応を解析した。その結果, D-Ara-5P は酵母 GPI を阻害することが判明した (IC_{50} : 3.66 mM)。陽性対照として用いた GPI 阻害剤 6-ホスホグルコン酸の IC_{50} は 1.66 mM であった。D-Ara は細胞内でリン酸化され D-Ara-5P となり, GPI を阻害することで糖代謝を抑制し, 結果として成長阻害を引き起こすというメカニズムが推測された。

D-13 β -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 TMG-chitotriomycin 類縁体の LC-MS による安定性および構造の検討
○田淵 勇, 浅尾昂平, 水田雄大, 神崎 浩, 仁戸田照彦 (岡山大院・環境生命)

【背景】放線菌 *Streptomyces anulatus* の培養液中から β -N-acetylglucosaminidase 阻害物質である TMG-chitotriomycin (HU-1) が当研究室において見出された。さらに HU-1 の特徴的なプロダクトイオンを利用した LC-MS/MS 分析により本菌株培養液中から HU-1 のジアセチル体と考えられる類縁体 KA-1 と、モノアセチル体と考えられる類縁体 KA-2 が見出された。KA-2 は $^1\text{H-NMR}$ により構造が推定されているが、これらの類縁体は単離後、脱アセチル化により HU-1 へと変化するため、KA-1 の構造解析は進んでいない。この変化は精製過程においても示唆されているため、本研究では各精製段階における KA-1, KA-2, HU-1 の相対存在比を LC-MS 分析により求め、KA-1 の安定性について検討を行った。

【方法・結果】本培養液を活性炭カラム、陽イオン交換カラム、脱塩のための活性炭カラムに供し KA-1 の精製を行った。各精製後試料について LC-MS 分析を行い、KA-1, KA-2, HU-1 の相対存在比を求めた結果、培養液から陽イオン交換カラム後までは、いずれの精製段階においても KA-1 の相対存在比は 93% 以上であった。一方、脱塩のための活性炭カラムによる精製 1 日後の KA-1 の相対存在比は 87% であった。このことから KA-1 は脱塩のための活性炭カラム後において、より不安定となる可能性が示唆された。また、KA-2 は LC-MS 分析において、アノマー分離により 2 つのピークとして検出されるはずであるが、3 つのピークとして確認された。そこでこれら 3 つのピークについて LC-MS/MS 分析を行い、プロダクトイオンスペクトルの解析を行ったところ、KA-2 には 2 つの異性体が存在することが明らかとなった。

E-1 *E. arvense* フェレドキシンのジチオナイト還元による構造変化
○藤田明大, 金 宙妍¹, 栗栖源嗣¹, 手島圭三
(広島大院・生物圏, ¹阪大・蛋白研)

【目的】 フェレドキシン (Fd) は葉緑体チラコイド膜の光化学系 I から電子を受け取り, 主に Fd-NADP⁺還元酵素 (FNR) に電子を供与するタンパク質で, 円滑な電子伝達のため酸化還元状態で FNR との親和性が約 20 倍異なる。その構造的要因を明らかにするために, ジチオナイトにより還元型 Fd を調製して, 異種核多次元 NMR 測定を用いて酸化還元による Fd の構造変化に関する情報を得たので報告する。

【方法・結果】 Fd は酸化還元電位が -400mV と低く溶存酸素へ電子がリークするなど還元型が不安定であるので, *E. arvense* Fd I の ¹⁵N-および ¹⁵N, ¹³C-ラベル化体を用いて, 嫌気チャンバー内でのジチオナイト還元による還元型 Fd の安定性をまず調べた。モル比 (ジチオナイト/Fd) が 1.3 よりも高くなると, 嫌気試料管による ¹H-¹⁵N HSQC 測定の各ピークは時間とともにランダムコイルを示す位置に集まり, [2Fe-2S]クラスターが外れて変性することがわかった。この変性による Fd の半減期はモル比 3 と 4 の場合, 25°C でそれぞれ 31 と 22 時間であった。これから, 過剰のジチオナイトで還元型 Fd を維持できないことがわかった。モル比 1.3 で還元型 Fd はほぼ 100% の状態が 25°C で約 13 時間維持され, 温度を 18°C に下げると約 33 時間維持された。ほぼ 100% の還元型 Fd が 10 時間以上維持される条件下で各種多次元 NMR 測定を行い, [2Fe-2S]クラスター付近 (Leu24, Gly48, Lys49, Gly60 と Ile79) と C 末端領域 (His89, Lys90, Glu91, Glu92, Leu94 と Phe95) のアミノ酸残基の化学シフトが大きく変化することがわかった。これから, Fd の FNR との相互作用部位の 1 つである C 末端領域の構造が還元により変化することが示唆された。

E-2 ニワトリ卵白タンパク質 Ovalbumin-related protein X のホモログは他の鳥類に存在するのか
○佐藤加奈恵, 赤澤隆志^{1,2}, 小川雅廣
(香川大・農, ¹香川大院・農, ²愛媛大院・連合農)

【目的】 ニワトリ卵白にはオボアルブミンのアミノ酸配列と 62% の相同性を持つタンパク質 Ovalbumin-related protein X (OVAX) が存在する。OVAX はヘパリンに結合することから生理機能に関与していることが考えられる。一方, ニワトリ以外の鳥類の卵白に OVAX ホモログが存在するかは明らかになっていない。そこで本研究ではウズラ及びダチョウの卵白中に OVAX ホモログが存在するか否かを明らかにすることを目的とした。

【結果・考察】 ウズラ [*Coturnix japonica*], ダチョウ [*Struthio camelus*] の卵白からヘパリン結合樹脂を用いてヘパリン結合タンパク質を分取した。ニワトリ OVAX を抗原として作製した OVAX ポリクローナル抗体を用いてウズラ及びダチョウのヘパリン結合タンパク質の Western blotting を行った結果, OVAX の分子量と同じ 50 kDa 付近にバンドが検出された。検出されたウズラの 50 kDa のタンパク質の部分アミノ酸配列を, MALDI-TOF-MS/MS を用いて解析したところ, ウズラのゲノムから推定されたタンパク質 OVAX-like isoform X1 (XP_015709960.1) の内部アミノ酸配列と一致した。このことからウズラには OVAX ホモログが存在することがわかった。ダチョウについては部分アミノ酸配列の解析を終えていないが, ヘパリン結合能を持つこと, OVAX 抗体と反応したことよりウズラと同様に OVAX ホモログの存在が示唆された。ウズラ及びダチョウの卵白にもヘパリンと結合する OVAX ホモログが存在したことから, OVAX は進化の過程で受け継がれてきた可能性が推察された。

E-3 天然由来硫酸多糖による新規タンパク質凝集抑制物質の探索 ○石丸隆行, 松富直利 (宇部フコ短大・食物栄養)

【目的】蛋白質は加熱等により変性し、しばしば白濁凝集を引き起こす。以前の研究で、様々な蛋白質にデキストラン硫酸 (DS) を添加することで、加熱による白濁凝集を抑制できることを報告している。そこで本研究ではヘパリン、コンドロイチン硫酸、カラギーナン、フコイダン及びポルフィラン白子の5種の硫酸多糖に DS と同様に様々な蛋白質に対し白濁凝集抑制能力があるのか調べた。

【方法】モデル蛋白質として、オボアルブミン (OVA), β -ラクトグロブリン (β -LG), オボトランスフェリン (OT), ソーマチン (TAU) の4種類を用いた。各蛋白質溶液の pH は最も凝集しやすい等電点付近に調製した。各蛋白質に対し、各種硫酸多糖を終濃度 0.05% になるように添加し、80℃, 10 分加熱後、白濁凝集抑制能の観察及び分子形態を解析した。

【結果及び考察】DS をコントロールとし、白濁凝集抑制能を比較した。結果、ヘパリンが DS と同程度の凝集抑制能を持っていた。他の硫酸多糖ではカラギーナン、フコイダン、コンドロイチン硫酸の順であった。加熱後の分子形態を調べると、高分子化抑制能は DS, ヘパリン=カラギーナン、フコイダン、コンドロイチン硫酸の順番であった。効果の高かったヘパリン、カラギーナン、フコイダンに絞り、白濁凝集抑制効果がある最低濃度を調べた。結果、DS とヘパリンが同程度の濃度で凝集抑制能を示したが、フコイダン、カラギーナンはより高濃度必要であった。以上の結果から、DS とヘパリンが同程度の白濁凝集抑制能を持つが、他の硫酸多糖は DS と比較すると凝集抑制能がやや低いことが示唆された。

E-4 シリカ粒子形成促進タンパク質“グラシン”の構造と性質 ○西美智佳, 小林大起¹, 美藤友博, 有馬二郎, 清水克彦² (鳥取大・農,¹鳥取大院・農,²鳥取大・CoRE)

【目的】海綿動物門六放海綿綱カイロウドウケツのシリカ骨格中より発見された“グラシン”は、His に富む水溶性タンパク質であり、His・Asp に富む HD 領域、Pro に富む P 領域、His・Thr に富む HT 領域が spacer を挟んで繰り返される構造を特徴とし、他のタンパク質との相同性をもたない。グラシンは常温・中性条件下でケイ酸からシリカ粒子の形成を促進するため、この性質を利用した有用タンパク質のシリカ固定化ツールとしての応用を検討している。一方で、グラシンのシリカ形成能の作用機序は未解明である。本発表では、グラシンの構造的特徴や、グラシンのシリカ形成能と関係すると考えられる特徴を見出したので報告する。

【方法・結果】大腸菌で発現させた組換えグラシンを用いた CD スペクトル解析と Chou-Fasman 法による二次構造予測から、グラシンは天然状態で大部分がランダムコイルで一部に β シート・ α ヘリックスの両方を含むタンパク質であることが分かった。これより、グラシンは天然変性タンパク質の一種である可能性が浮上した。普通海綿綱から見つかっているシリカ形成促進タンパク質シリカテインが、システインプロテアーゼスーパーファミリーの一員で、その活性に立体構造や特定のアミノ酸が重要であることと対照的である。また、組換えグラシンをシリカゲルと混合し、10 分後に上清とシリカゲルを分離し SDS-PAGE で分析した。グラシンはシリカゲルの画分に含まれており、この結果はグラシンがシリカに対し高い親和性を有することを示唆している。

E-5 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素における一次構造の新規性

○荒井良仁, 長尾達彦^{1,2}, 小松史佳¹, 八木寿梓³, 鈴木宏和¹, 大城 隆¹
(鳥取大院・持社創科,¹鳥取大院・工,²日本ジッコウ(株),³鳥取大・GSC)

【目的】 フコイダンとは藻類等に含まれる硫酸化多糖類であり, 抗ガン作用, 腎不全防止など医学的に有用な働きをもつ。当研究室では, オキナワモズク由来フコイダンの生理活性と構造との関連の解明を目的とした研究をしており, そのためには, フコイダンを加水分解する酵素の利用が有効であると考えた。そこで, フコイダン産生性細菌 *Luteolibacter algae* H18 株からオキナワモズク由来フコイダンの低分子化酵素を精製し, その酵素遺伝子の特定を行うとともに, 一次構造を既知情報と比較検討した。

【方法・結果】 H18 株由来のフコイダン低分子化酵素遺伝子を特定するために, 野生株からの精製を行い, N 末端アミノ酸配列を特定した。そして, H18 株のドラフトゲノム DNA 情報を基に, その配列をコードする一つの ORF を見出した。本酵素のアミノ酸配列に対して BLAST 検索を行ったところ, 相同性の高いタンパク質の多くは機能未知で, アノテーションされた中で最も相同性が高いものでは, *Sphingomonas sanguinis* 由来の glycosyl hydrolase (相同性 26%) であった。今までにフコイダン低分子化酵素遺伝子の報告は 5 例しかない。それらは *Mariniflexile fucanivorans*, *Formosa algae* などの海洋細菌由来であり, 全て GH ファミリー107 に属している。これら 5 種と本酵素の相同性を比べてみたところ, どれも 25% 以下の低い相同性しか示さなかった。また, 一次構造から本酵素を GH ファミリーに帰属させようとしても, どのファミリーにも属さない結果となり, 本酵素が新規な糖質加水分解酵素である可能性が示唆された。

E-6 ダイコンの発芽過程における各種システインプロテアーゼの発現解析

○奥田匡洋, 湯浅恵造¹, 辻 明彦¹
(徳島大院・先端技術,¹徳島大院・生物資源)

植物システインプロテアーゼ (CP) は, 発芽過程における貯蔵タンパクの分解, セネッセンス, 生体防御反応など様々な生理現象に関与していると考えられるが, 多くの CP は遺伝子レベルでの研究に限られ, 酵素活性レベルでの作用機構の解析は殆ど行われていない。本研究では, 発芽過程におけるダイコン子葉中の CP の酵素レベルでの解析を試みた。まず発芽 1, 2, 3, 5, 7 日目のダイコン子葉に含まれる CP の活性 (Z-FR-MCA 切断活性) を比較した。発芽 2 日目以降は成長と共に増加し, 発芽 5 日目に最大となり, その後減少した。その活性画分を回収し, Responsive to Dehydration-19 (RD19), Responsive to Desiccation-21 (RD21), Cathepsin B-like Cysteine Protease (CBCP) の抗体を用いてウェスタンブロットで解析した。RD19 と RD21 は発芽 3 日目から発現が増加し, 5 日目から 7 日目にかけて急激に増加した。CBCP は発芽 2 日目から発現が増加し, 以後はほぼ一定の発現を示した。CP の活性と mRNA レベルでの発現解析より, 発芽初期の活性は Germination-specific Cysteine Protease 1 (GCP1) に由来することが示唆された。RD19 と RD21 と CBCP のタンパクレベルと mRNA レベルでの発現変化とが異なることから, 翻訳後修飾による活性制御が行われ, GCP1 は mRNA レベルで活性制御していると考えられる。

E-7 遊離 N-グリカン (FNGs) のタンパク質フォールディング活性とアミロイド線維形成阻害活性に及ぼす糖鎖構造の差異

○勝部 諒, 阿部義人¹, 前田 恵, 植田 正¹, 木村吉伸
(岡山大院・環境生命,¹九州大院・薬)

【目的】我々はハイマンノース型 FNGs (HMT-FNGs) が変性タンパク質の正常フォールディングを促進し、ミスフォールドタンパク質の凝集を阻害することを見出している。本研究では、小胞体 (ER) 中の存在を既に証明している HMT-FNGs のシャペロン様活性を構造・機能相関の観点から解析した。

【方法・結果】FNGs のシャペロン様活性は、抗体 L 鎖可変部領域 $\nu\lambda 6$ の変異体 (3Hmut.Wil) をモデルタンパク質に用いて、FNGs 添加による変性 3Hmut.Wil の ^1H - ^{15}N HSQC スペクトル変化を指標に解析した。FNGs のアミロイド形成抑制活性は、アミロイドに特異的に結合する蛍光プローブ (Thioflavin T) を用いて、FNGs 添加による 3Hmut.Wil のアミロイド形成量変化を測定した。その結果、GN2 及び GN1 型 HMT-FNGs は濃度依存的に変性 3Hmut.Wil をネイティブ構造へとフォールディング誘導し、アミロイドの形成を抑制したが、その活性は GN2 型で特に強かった。従って、HMT-FNGs 還元末端に存在するキトビオース構造がシャペロン様活性に重要である可能性が示唆された。一方、植物複合型 FNGs はシャペロン様活性を殆ど示さず、アミロイド線維形成にも何ら影響を及ぼさなかった。それに対して、動物複合型 FNGs はシャペロン様活性を殆ど示さなかったものの、シアル酸含有 FNG はアミロイド線維形成をむしろ促進させた。以上の結果は、ER 中での存在を明らかにしている HMT-FNGs のみがタンパク質フォールディング促進活性とアミロイド線維形成抑制活性をもつことを示しており、ER 中でのタンパク質品質管理系において FNGs が積極的な機能を司っている可能性を示唆している。

E-8 抗原性糖鎖の多量調製法確立を目指したタケノコ糖タンパク質糖鎖の構造解析

○田邊千夏, 古田佳織, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々は既にスギ花粉アレルゲン (Cry j1, Jun a1) 及びヒノキ花粉アレルゲン (Cha o1, Cha o3) に結合する N-グリカン構造を決定し、花粉アレルゲンには共通して哺乳動物に対して抗原性を示す植物複合型糖鎖が結合していることを明らかにしている[1-3]。抗原性糖鎖の細胞性免疫活性解析には、その糖鎖を多量調製する有効な方法が必要とされる。タケノコが予備実験的に有用供給源であることが示されていたため、本研究ではタケノコに発現される全糖タンパク質の糖鎖構造解析を行った。

【方法・結果】タケノコ (732 g) をペプシン消化、透析、陽イオン交換、ゲルろ過、疎水クロマトにより、糖ペプチド (233 mg) を調製した。その後、アクチナーゼ消化、親水クロマトにより短鎖糖ペプチド (15.7 mg) を精製した。糖鎖構造を同定するため、糖ペプチドをヒドラジン分解後、遊離した N-グリカンを N-アセチル化し、ピリジルアミノ化により蛍光標識した。RP-HPLC 及び SF-HPLC により糖鎖を分離後、ESI-MS 及び逐次酵素消化法により構造解析を行った。その結果、タケノコ糖タンパク質糖鎖の殆どは植物複合型構造であり、主要糖鎖の組成は $\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (32.6%), $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (26.1%), $\text{Gal}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (9.0%), $\text{Gal}_2\text{Fuc}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{Xyl}_1\text{Fuc}_1\text{GlcNAc}_2$ (10.0%) であった。この結果はタケノコが抗原性糖鎖の優れた供給源であることを示唆した [4]。

[1] Kimura, Y., *et al. B. B. B.*, **69**, 137-144 (2005); [2] Maeda, M. *et al., B. B. B.*, **69**, 1700-1705 (2005); [3] Osada, T., *et al. Carbohydr. Res.*, **448**, 18-23 (2017); [4] Tanabe, C., *et al. B. B. B.*, **81**, 1405-1408 (2017)

E-9 キトオリゴ糖のアミロイド線維形成促進活性

○平石綾香, 勝部 諒¹, 阿部義人², 前田 恵¹, 植田 正², 木村吉伸¹
(岡山大・農,¹岡山大院・環境生命,²九州大院・薬)

【目的】遊離 *N*-グリカン (FNGs) の生理機能解明研究の途上, 我々はハイマンノース型 FNGs (HMT-FNGs) が変性タンパク質の正常フォールディングを促進し, ミスフォールドタンパク質の凝集を阻害することを見出している[1,2]。また, HMT-FNGs では還元末端に存在する GlcNAc 残基の個数により凝集阻害活性の程度が異なり, GN1 型 FNGs よりも GN2 型 FNGsの方がより低濃度で作用することも分かっている。本研究では, FNGs の還元末端の GlcNAc 残基に着目し, アミロイド線維形成に及ぼすキトオリゴ糖の活性を調べた。【方法・結果】キチンの部分酸加水分解により, 重合度の異なる数種のキトオリゴ糖を調製した。アミロイド線維形成促進活性は, モデルタンパク質として抗体 L 鎖可変部領域 $\nu\lambda 6$ の変異体 (3Hmut.Wil) とアミロイド線維に特異的に結合する蛍光プローブ (Thioflavin T) を用いて, GlcNAc 及び数種の可溶性キトオリゴ糖 (GlcNAc2, GlcNAc3, GlcNAc4) 添加によるアミロイド形成量変化を測定した。HMT-FNGs は約 5 mM で 86%アミロイド線維形成を抑制するのに対して, キトオリゴ糖は GlcNAc 残基の数に関わらず 20 mM で 66%以上アミロイド線維形成を促進した。また, GlcNAc のみでもアミロイド線維形成促進が見られた。以上の結果及び GN1 型 HMT-FNGs よりも GN2 型 HMT-FNGsの方がアミロイド線維形成抑制に効果的であることから, HMT-FNGs によるアミロイド線維形成抑制には, マンノシルオリゴ糖の親水性とキトビオースの疎水性からなる両親媒性が必要であることが示唆された。[1] Tanaka, *et al.*, *Glycoconj. J.* 32, 193 (2015), [2] Katsube, M., *et al.* 19th Eurocarb, Abstract p299 (2017)

E-10 新規人工糖鎖ポリマーを利用したダイズ核/細胞質レクチンの同定

○高瀬美穂, 前田 恵¹, Els JM Van Damme², 木村吉伸¹
(岡山大・農,¹岡山大院・環境生命,²ベルギー・ゲント大)

【目的】分化・成長中の植物細胞には, 細胞質でミスフォールド糖タンパク質からエンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) の作用により生成した還元末端に *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を 1 残基有するハイマンノース型遊離 *N*-グリカン (HMT-FNGs) が μ M 濃度で遍在している。HMT-FNGs は胚軸の伸長や果実の熟成を促進するホルモン様活性を有すると推測されているものの, 生化学的・分子生物学的な見地からの確証は未だ得られていない。そこで本研究では, 細胞質に局在する HMT-FNGs が核/細胞質レクチンと相互作用し「糖鎖シグナル」として植物の分化・生長に関与する遺伝子の発現を制御すると予想し, ハイマンノース型糖鎖に結合する核/細胞質レクチンの同定を新規人工糖鎖ポリマーにより試みることを目的とした。【方法・結果】Asn-糖鎖 (Man₅₋₉GlcNAc₂-Asn) はローヤルゼリー糖タンパク質からペプシン消化, アクチナーゼ消化, ゲルろ過, 逆相クロマト, 親水性クロマトを組み合わせることにより調製・精製し, その構造はアミノ酸組成分析と糖鎖構造解析 (RP-, SF-HPLC, MS 分析) により確認した。糖鎖ポリマーは Asn-糖鎖のアミノ基をポリ- γ -L-グルタミン酸 (γ -PGA) のカルボキシル基に結合させ合成した。まず糖鎖ポリマーが既報のマンノース特異的細胞質レクチン Morniga M [1] と結合することをゲルろ過により確認し, 次いで, 糖鎖ポリマーがダイズ実生胚軸由来可溶性タンパク質と複合体を形成することを, ゲルろ過により確認した。現在, 糖鎖ポリマーに結合したタンパク質の同定を試みている。[1] Els JM Van Damme, *et al.*, *Plant Physiology*, **130**, 757-769 (2002)

E-11 ミルレクチンのアフィニティークロマトによる精製法の確立と化学構造解析
○川上祐佳, 縄田苑子, 竹内良太¹, 前田 恵², 木村吉伸²
(岡山大学・農, ¹一丸ファルコス, ²岡山大学・環境生命)

【目的】緑藻ミルには Tn 抗原や TF 抗原に特異的なレクチンが存在することが知られている。我々は瀬戸内海産のミル (*Codium fragile*) レクチン (CFL) の精製法を確立し, N-末端アミノ酸配列, 糖鎖アレイによる糖鎖結合特性を明らかにしている。他種のミル (*Codium barbatum*) 由来のレクチン (CBL) については既にアミノ酸配列が明らかになっているが [1], CFL とは糖鎖結合特性及び N-末端アミノ酸配列が少し異なっているため, CFL と CBL は異なるレクチンであると考えられる。そこで, 本研究では CFL の化学構造及び糖鎖結合特性の詳細な解析を目的として簡易精製法確立を行った。

【方法・結果】豚ムチンタンパク質には CFL のリガンドである糖鎖が存在することを明らかにしているため, まずアクチナーゼ消化により糖ペプチドを調製し, 親水性クロマトによる糖ペプチド精製を行った。次いで, 得られた糖ペプチドを CNBr 法で Sepharose 4B にカップリングさせアフィニティークロマトを調製した (糖ペプチド結合率 95%)。一方, CFL については, ミル (2.5 kg) からトリス緩衝液 (pH 8.0) でタンパク質を抽出後, 疎水クロマトにより部分精製を行った。次いで, ムチン由来糖ペプチドを結合させたアフィニティークロマトによる CFL 精製を試みた。その結果, 1.5 M 硫酸アンモニウム溶出画分 (約 1 mg) 及び 4 M グアニジン塩酸塩 (GnHCl) 溶出画分 (約 4 mg) に CFL が回収され, いずれの画分についても, N-末端分析から CFL が単一精製されていることが明らかになった。GnHCl 画分の CFL については, 透析法によりレクチン活性の回復を確認した。[1] Praseptianga, D. et al., *B.B.B.*, **76**, 805-811 (2012)

E-12 海洋性細菌 KUL106 の有する多種類のウルバンリアーゼに関する研究
○小林慎太郎, 大西浩平 (高知大学・農)

【目的】高知に自生するアオサ属の緑藻類であるミナミアオサとミナミアオノリは構造の異なる硫酸化多糖ウルバンを生成することが予想される。我々はこれまでミナミアオサ由来のウルバンを分解する海洋性細菌を探索し, ウルバン分解酵素の解析を行ってきた。本実験ではミナミアオノリ由来のウルバンを分解する海洋性細菌 KUL106 を用いた。KUL106 は, 粗精製した酵素液を用いた実験でミナミアオサ由来のウルバンに対しても活性があることが分かっている。本研究では KUL106 の有するウルバンリアーゼ遺伝子のクローニングと組換え酵素の解析を目的とした。

【方法・結果】ドラフトゲノム解析から KUL106 は少なくとも 4 種類のウルバンリアーゼを持つことが分かった。KUL106 のウルバン含有培地での培養上清中から菌体外タンパク質を調製し, 陰イオン交換 Q カラムを用いてウルバン分解活性を持つ画分を分離した。その画分を限外ろ過で濃縮後, SDS-PAGE に供し KUL106 の菌対外タンパク質を分離した。複数の分離タンパク質についてペプチドマスフィンガープリンティング法により同定を行ったところ, 分子量 50 k 付近に 2 種類のウルバンリアーゼが検出され UIIA1, UIIA2 と名付けた。UIIA1 はこれまでに研究室で単離されたミナミアオサウルバン分解細菌が有しているリアーゼと高い相同性を示した。UIIA2 は UIIA1 と 60%程度の相同性しか示さず, ミナミアオサウルバン分解細菌には存在していない。現在, UIIA1 と UIIA2 をコードする遺伝子をクローニングし, 大腸菌で発現させた組換え酵素を用いて, ウルバン基質特異性の解析を行っているところである。

F-1 海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株のテトラチオン酸ハイドロラーゼに関する研究 ～第2報～
○金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・環境生命)

【背景と目的】我々は当研究室にて単離された海洋性硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus thiooxidans* SH 株の異化的硫黄代謝を解明するために、その鍵酵素の1つであるテトラチオン酸ハイドロラーゼに着目し、研究を進めている。既に本酵素をコードする遺伝子 (SH-*tth*) を同定し、これの組換え型酵素 (SH-Tth) による諸性質の検討を行った。今回は更に詳細な SH-Tth の性質検討を行い、本酵素の特徴とその生理的意義の解明を目的として実験を行った。

【結果および考察】大腸菌を宿主として組換え型 SH-Tth を封入体として回収した後、酸性 refolding 法によって可溶化し、活性の回復を行った。本酵素は分子質量 50 kDa のサブユニットから成るホモダイマー構造、pH 3.0 において最も高い活性を示し、1 M NaCl 存在下において約 2.5 倍活性が上昇した。一方、淡水性の *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来の同酵素 (Af-Tth) は NaCl によって活性が阻害されるため、このような活性化は、SH-Tth が海洋性細菌由来の酵素の特徴を示している。組換え型 SH-Tth によって作成された抗 SH-Tth 抗体による Western blot 解析および RT-PCR による SH-*tth* 遺伝子の発現は、生育基質として硫黄・チオ硫酸・テトラチオン酸を用いた場合、程度の差は認められたものの全てにおいて確認できた。淡水性 *A. thiooxidans* 標準菌株では *tth* 遺伝子は、硫黄生育菌体では発現しないが、テトラチオン酸生育菌体において発現することが報告されている。したがって SH 株の硫黄生育菌体では、標準菌株とは異なり SH-Tth が関係する硫黄代謝経路が機能していると考えられた。

F-2 海藻分解性好熱菌が有する新奇糖加水分解酵素の触媒活性
○藤井健太, 八木寿梓¹, 大城 隆, 鈴木宏和
(鳥取大院・工,¹鳥取大・工・GSC)

【目的】我々は、様々な海藻多糖類を資化できる好熱菌 *Geobacillus thermodenitrificans* OS27 を鳥取県沿岸から単離した。本会では、OS27 株ゲノムに特徴的な糖加水分解酵素遺伝子の探索と、その発現産物が有する触媒活性について報告する。

【方法と結果】OS27 株の全ゲノム配列 (ドラフト) を MiSeq により解析したところ、34 個の糖加水分解酵素 (GH) 遺伝子が見出された。それらのうち2つ (GT3485 と GT3489) は、*Geobacillus* 属ゲノムにおける保存性が低く、OS27 株に特有な遺伝子であることが示唆された。GT3485 発現産物は、その一次構造からファミリー3に分類された。GT3489 発現産物の N-末端領域は、ファミリー1のタンパク質と相同性を示したが、C-末端領域は他如何なるタンパク質とも類似しなかった。ファミリー1は $\alpha_8\beta_8$ 立体構造をもつことが知られているが、GT3489 の二次構造予測では β_7 領域が α -ヘリックスに置換されているように見えた。さらにファミリー1の C-末端領域にある酸性触媒残基も予測できなかった。GT3489 発現産物を、大腸菌を用いて調製し、その触媒残基を調べたところ、*p*-ニトロフェニル- β -D-xylopyranoside を良好な基質とした。反応至適温度は 65℃で、反応至適 pH は 5.5~6.0 であった。本酵素は 65℃以下で 1 時間は安定で、とくに pH 5.0~6.5 で安定だった。メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド存在下でも比較的安定であったが、二価銅イオンによる可逆的な阻害を受けた。天然基質としては、キシロオリゴ糖を良好な基質として、D-キシロースを生成した。

F－3 組換え L-メチオニン脱炭酸酵素の迅速簡便な精製法確立と構造解析に向けた結晶化 ○大川敦司, 林 将也, 室田昌輝¹, 志波智生¹, 原田繁春¹, 根本理子, 田村 隆, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命, ¹京工繊大院・工芸)

【目的】放線菌 *Streptomyces* sp. 590 由来 L-メチオニン脱炭酸酵素 (MetDC) は, L-メチオニンの脱炭酸を触媒し, 補酵素としてピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) を有するビタミン B6 酵素である。この MetDC を持つ生物は少数で, MetDC の立体構造の解析例は未だない。我々は, MetDC が抗腫瘍活性を有することや, L-メチオニンの定量用酵素として利用できることを明らかにしてきた。しかしながら放線菌の MetDC 生産量は極微量のため, 大腸菌組換え発現による MetDC の大量発現系, 大量精製系の構築をめざした。また, 本酵素の立体構造を明らかにするため, 結晶化を行った。【方法】*Streptomyces* sp. 590 由来 MetDC 遺伝子を含む発現ベクター pET52b / MetDC-KanR 構築し *E. coli* BL21(DE3) を形質転換した。MetDC は, Ni-NTA Agarose アフィニティークラムクロマトによって精製した。酵素活性は, アミン酸化酵素を併用した 4-アミノアンチピリン法により過酸化水素を定量し決定した。【結果】アフィニティータグとして当初用いていた His6-Tag から His10-Tag に変更したことにより, 迅速簡便な精製が可能となり, 形質転換体を細胞破碎後 Ni-NTA Agarose アフィニティークロマトグラフィーの 1 ステップで 40-50% の高収率で高純度の MetDC を得ることが出来た。培養終了後 1 日で酵素精製が完了できた。結晶化は, MetDC を 10 mM Mes buffer pH 6.6, 0.2 M MgCl₂, 100 μM PLP, 20-25% PEG1500, 5 mM DTT, 0.5% β-OG の条件下で行い, 4 Å の分解能の結晶が得られた。現在この結晶について解析を進めている。精製酵素の L-メチオニンに対する Km 値は 9.3 mM であった。これを利用して現在 L-メチオニン定量法の確立及び, 試料中の L-メチオニンの効率的な除去の条件について検討を行っている。1) Hayashi, *et al.*, *J. Biochem.*, **161**, 389 (2016)

F－4 革新的分子認識素子開発に向けたクッション性足場タンパク質 CutA1 の適用性拡大 ○今中洋行, 伊達弘輝, 石田尚之, 今村維克 (岡山大院・自然)

【目的】生体分子間相互作用は生命活動の厳密な制御に寄与する中心的な現象であるが, これを細胞内外で検出・利用する技術は, 生命現象の解明のみならず, 医療診断, 創薬, 環境分析など幅広い応用に役立つ基盤となりうる。我々は新規な生体分子間相互作用精密制御法の確立を目指し, 超好熱菌由来タンパク質でホモ三量体の CutA1 をモデル足場分子とした革新的分子認識素子の開発に向けた取り組みを進めている。本研究では, CutA1 の分子デザインの適用可能性について検討を進めた。

【方法・結果】CutA1 の N, C 末端の連結による単量体化を図り, さらにリガンド (ペプチド (StrepTagII) あるいはタンパク質 (VHH 抗体)) の挿入数, 挿入位置の異なる各種足場タンパク質の発現ベクターをそれぞれ構築した。大腸菌 BL21 (DE3) を宿主とした発現を進め, 各種タンパク質を調製した。まず, 可溶性を評価した結果, ペプチド挿入サンプルについては熱処理後も可溶化を維持していた。すなわち, 極めて高い構造安定性を有する CutA1 は, 全長配列を複数連結した場合でも, 野生型三量体と同様に安定な折り畳み構造を素早く形成しうることが示された。さらにタンパク質の挿入が可能であることもわかった。調製した各種足場タンパク質を QCM センサーチップ上に固定化し, 相互作用検出を評価したところ, リガンド挿入位置は相互作用量に差異を生じさせず, 各部位への等価なりガンド挿入が可能であった。さらに挿入数の増加に伴い相互作用量が増加したことから密度の制御も可能であった。したがって, 分子デザインを施すことにより革新的分子認識素子の開発が可能であることが強く示唆された。

F-5 常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* の熱安定性向上とガス結合能の解析
○越澤大典, 藤井創太郎, 三本木至宏 (広大院・生物圏)

【目的】生育至適温度 25℃の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* (AVCP) は, 生育至適温度 52℃の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来ホモログ (PHCP) よりも安定性が低く, 前者にはなく後者にある 6 つのアミノ酸残基が安定化に寄与していることが分かっている。本研究の目的は機能を欠損させることなく, 好熱菌ホモログ PHCP をモデルに AVCP を安定化させることである。

【方法・結果】AVCP 変異体 (T11F, E17T, F18T, G20A, D71F, V76L) を *Escherichia coli* で異種発現し, 4 種類のカラムを用いて精製した。超遠心分析の結果, すべての変異体が野生型と同様に 2 量体を形成していることを確認した。円偏光二色性スペクトルを用いて 222 nm の温度変化を指標に, 変異体の変性中点温度 T_m を測定した。ヘムとの相互作用に関する残基を置換した E17T, G20A 変異体では, T_m がそれぞれ 8.1, 5.7℃上昇し, V76L 変異体では 2.9℃低下した。また, サブユニット間の相互作用に関する残基を置換した T11F, F18T, D71F 変異体では, T_m がそれぞれ 0.3, 3.2, 0.7℃上昇した。安定性の大きく上昇した 3 残基を同時に置換した E17T/F18T/G20A 変異体では T_m が 6.3℃上昇したが, 加成性は見られなかった。また, シトクロム *c'* の機能であるとされる CO 結合能の有無を可視吸収スペクトルによって確認したところ, 変異は CO 結合能に影響しないことが明らかになった。これらの結果から, AVCP の 2 量体形成と CO 結合能を阻害することなく, 安定性を向上させることのできるアミノ酸残基を特定した。

F-6 線虫 *C. elegans* の Rab ファミリータンパク RAB-6.2 の休眠制御機構
○大西潤実, 岩崎 崇, 河野 強 (鳥取大院・農)

【背景と目的】モデル生物・線虫 *C. elegans* の生育/休眠はインスリン様シグナルの制御下にある。我々は主要な生育/休眠制御インスリン様ペプチドの 1 つである INS-35 の分泌方向 (偽体腔側か腸管内腔側か) の変動が生育/休眠の決定要因であることを明らかにしている⁽¹⁾。本研究では, ペプチド分泌制御による生育/休眠制御機構を明らかにすることを目的として, まず Rab ファミリータンパクに対する RNAi スクリーニングに着手した。

【方法・結果】全 Rab ファミリータンパク 31 種を対象とした RNAi スクリーニングを行った。INS-35 の偽体腔側への分泌量の変動を検証するために, *ins-35p::INS-35::VENUS* 発現線虫における INS-35::VENUS の体腔細胞への蓄積を指標とした。その結果, *rab-6.2RNAi* ならびに *rab-14RNAi* が有意に分泌量を減少させることが判明した。さらに, *rab-6.2* 遺伝子破壊下での INS-35::VENUS の分泌量を測定したところ, 有意な低下が認められた。以上の結果から, RAB-6.2 は INS-35 の分泌に関与することが示唆された。次いで, 休眠誘導条件下における *rab-6.2* 遺伝子破壊線虫と *ins-35* 遺伝子破壊線虫の休眠率を比較した。*rab-6.2* 遺伝子破壊線虫は *ins-35* 遺伝子破壊線虫の約 2 倍の休眠率上昇を示したことから, RAB-6.2 が他のインスリン様ペプチドの分泌も制御する可能性が示唆された。現在, INS-35 以外の代表的な生育/休眠制御インスリン様ペプチド DAF-28 の分泌制御の有無を検討している。

(1) Matsunaga, Y., et. al. (2016) *Nat. Commun.*, 7:10573, doi : 10.1038/ncomms10573.

F-7 ツマグロヒョウモンの人工飼料とその性能

○藤野遼也, 原田誠大, 竹元寛徳, 清永晋平¹, 富田雅隆¹, 山本 響¹,
北沢千里², 小島 渉¹, 山中 明¹
(山口大・理, ¹山口大院・創科, ²山口大・教育)

【目的】ツマグロヒョウモンはスマレ類を食草とするチョウであり, その大量飼育においては年間を通じてスマレ生葉を大量かつ安定的に入手せねばならず, 多大な時間と労力を必要とする。本研究では, 同じタテハチョウ科の幼虫に用いられている人工飼料を改良し, スマレの葉を用いた人工飼料での飼育を試みた。生葉飼育個体群と同等の性能をもつ人工飼料を選抜することを目的とした。

【方法・結果】人工飼料は主成分を小麦胚芽またはセルロース粉末, カゼイン, スクロース, ビール酵母とし, ミネラル, ビタミン, 抗生物質等を加えたものに, スマレ葉の煮汁を混合した。煮汁にはスマレ葉乾燥粉末を用いたもの2種類 (AD6, BD12), スマレ葉冷凍粉末を用いたもの2種類 (AF6, AF24), スマレ葉乾燥粉末の煮汁に非加熱スマレ葉乾燥粉末および非加熱スマレ葉冷凍粉末を加えたもの各1種類 (AD6UhD18, AD6UhF24) を用意し, 計6種類の人工飼料を作成した。孵化後 24 時間以内の幼虫に各人工飼料を与え, 各齢期の日数, 蛹の体重を調べた。その結果, 最も成長の早かった人工飼料 AF24 飼育個体群は, 蛹化までの成長速度は生葉飼育個体群と比較して 5.6 日遅く, 蛹化 1 日目の体重は 0.23 g 軽かった。生存率は 62% であった。以上より, 人工飼料作成にはスマレ冷凍葉を含む煮汁が有効であることが分かった。また, スマレの葉は乾燥させることによってツマグロヒョウモンの成長に適さなくなることが示唆された。今後, 冷凍粉末の添加量の増量や生葉煮汁の使用が, 幼虫の摂食をより誘引する可能性があるかどうかを検討することが必要である。

F-8 細胞死関連キナーゼ DRAK1 と p53 の細胞内局在とその役割

○村上彩良¹, 大上友菜¹, 辻 明彦^{1,2}, 湯浅恵造^{1,2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

【目的】DAPK-related apoptosis inducing protein kinase 1 (DRAK1) は death-associated protein kinase (DAPK) ファミリーに属する Ser/Thr キナーゼの一つであり, 細胞死をはじめとする多彩な生理機能に関与している。これまでに DRAK1 は癌抑制遺伝子 p53 によって遺伝子発現制御を受け, アポトーシス制御に関わることが報告されているが, その分子機構は未だ不明であり, 本研究ではその解明を目的とした。【方法・結果】野生型 p53 を発現するヒト骨肉腫細胞 U2OS 細胞に Strep タグ DRAK1 を遺伝子導入し, 免疫細胞染色法により細胞内局在を調べた結果, DRAK1 は主に核内に局在した。そこで, Strep プルダウンアッセイを行い, p53 との相互作用を調べた。未処理 U2OS 細胞では, p53 の発現が確認されたが, DRAK1 との相互作用は認められなかった。しかしながら, DNA 損傷性抗癌剤である cisplatin 処理によって p53 の発現が高まるとともに, DRAK1 と p53 は相互作用することが判明した。一方, DRAK1 と同様に核に局在し, アミノ酸ホモロジーも高い DRAK2 は p53 との相互作用が認められなかった。cisplatin 濃度依存的に DRAK1 の発現上昇が認められたため, DRAK1 ノックダウンによる影響を調べた。cisplatin 処理によって p53 の DNA 結合能に関わる Ser³⁹² のリン酸化および p53 転写活性が増大されたが, DRAK1 ノックダウンによりいずれも有意に抑制されることが明らかとなった。これらの結果より, DRAK1 は DNA 傷害性アポトーシス誘導において, p53 による発現誘導を受け, 核内で p53 と相互作用し, その正の調節因子として機能することが考えられた。

F-9 きのこ廃菌床抽出物によるイネの防御応答の誘導

安藤郁奈, 小久保悠, 村田晃一, 森本紀子, 宇部尚樹¹, 上野 誠², 手林慎一³,
上野琴巳, 大崎久美子, 〇石原 亨
(鳥取大・農,¹鳥取大院・連農,²島根大・生資科,³高知大・農林海洋)

食用きのこのほとんどは菌床栽培により生産されている。菌床は、おが粉を主成分とし、米ぬかなどを栄養補助剤として添加したものである。きのこを収穫した後の菌床（廃菌床）は廃棄されるが、捨て場所に困る場合も多い。廃棄される菌床は鳥取県だけでも 3000 トンにのぼる。廃菌床の活用法を見出し、新たな価値を付与することが強く求められている。私たちは、廃菌床の熱水抽出物をイネの葉に処理した後、イネいもち病菌を接種すると病斑の形成が著しく抑制されることを見出した。そこで、廃菌床熱水抽出物の処理がイネの防御応答を誘導しているものと推定し、その解析を行った。

シイタケとブナシメジの廃菌床に蒸留水を加えてオートクレーブし、熱水抽出物を調製した。これを、播種後 14 日目のイネの幼苗にスプレーし、一定時間後に 80%メタノールで抽出した。イネのファイトアレキシンであるサクラネチン、モミラクトン A および B, オリザレキシン A を LC-MS/MS を用いて定量した。

廃菌床熱水抽出物のスプレーは、分析したすべてのファイトアレキシンの蓄積を誘導した。最も高濃度に蓄積したのはモミラクトン A であった。ファイトアレキシンの蓄積量は処理 24 時間後から増加し始め、72~96 時間後に最大となった。蓄積量は病原菌の接種や紫外線照射による場合と同程度であった。以上の結果から、廃菌床熱水抽出物は、ファイトアレキシンの蓄積を含む防御応答を誘導するため、いもち病に対する防除効果を示すことが示唆された。

F-10 耐塩性ジャポニカイネ品種の選抜と Na 蓄積特性

〇南平眞実, 川下真奈¹, 実岡寛文¹, 上田晃弘¹
(広島大・生物生産,¹広島大院・生物圏)

【目的】イネは一般的には塩ストレスに弱い作物とされるが、イネの耐塩性には大きな品種間差がみられる。これまでに見つかった耐塩性に優れたイネはインディカ種がほとんどであり、その多くが葉身部への Na 蓄積を抑制するタイプの耐塩性機構を有している。本研究では、これまでに耐塩性品種が見つからないジャポニカ種から耐塩性に優れた品種を選抜し、その耐塩性機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】水耕栽培で生育させた 3 週齢のジャポニカイネ 96 品種に塩ストレス処理を行った (NaCl を 3 日ごとに 25 mM ずつ段階的に上昇、終濃度を 75 mM とした)。14 日間の塩ストレス処理後、地上部の乾物重量を指標として、耐塩性および感受性品種の選抜を行った。その結果、ジャポニカ品種群の中にも耐塩性に優れた品種が存在することが分かった。器官別 Na 蓄積パターンについて耐塩性インディカ品種と比較したところ、耐塩性ジャポニカ品種ではより多くの Na を葉身部に蓄積していることが分かった。このことから、耐塩性ジャポニカ品種は葉身部への Na 蓄積の抑制機構は持たず、葉での Na 蓄積に耐えうる組織耐性機構を有していることが推察された。

F-11 イネの耐塩性に及ぼす鉄過剰処理の影響
○幸西絵梨, Thanakorn Wangsawang¹, Tanee Sreewongchai¹, 実岡寛文,
上田晃弘 (広島大院・生物圏, ¹カセサート大・農)

【目的】高濃度の塩類蓄積を原因として発生する塩ストレスは、作物の生育を大きく阻害する環境ストレスの1つである。近年、植物の塩ストレス耐性についての研究に注目が集まっているが、それらの多くは植物に対する塩ストレス単体の影響を調査したものであり、他の必須元素の過不足との関係を調べた事例は少ない。本研究では鉄に着目し、鉄過剰処理がイネの耐塩性にどのような影響を与えるのか調べた。

【方法・結果】イネ (*Oryza sativa* L.) 実生を対照区、鉄過剰区、塩処理区、鉄過剰・塩処理区の4処理区で水耕栽培した。様々な品種を用いて栽培を行った結果、いくつかの品種では鉄過剰処理が塩ストレスによる生育阻害を更に増加させていた。一方で、鉄過剰処理が塩ストレス下での更なる生育阻害を引き起こさない品種も見られたことから、塩ストレス下における鉄過剰処理の生育への影響には品種間差が存在することが明らかとなった。塩ストレス下における器官別 Na 濃度を調べたところ、鉄過剰処理により葉身部の Na 濃度が減少する傾向にあった。以上の結果から、塩ストレス下における鉄過剰の影響が生育阻害を引き起こすメカニズムについて考察する。

F-12 微細藻類ユーグレナにおける貯蔵多糖パラミロン分解酵素群の探索
後藤 京^{1,2}, 田中優史², 西野耕平², 小川貴央^{1,2}, 丸田隆典^{1,2}, 石川孝博^{1,2}
(¹島根大・生資科, ²JST/CREST)

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は、嫌気条件下において貯蔵多糖パラミロン (β -1,3-グルカン) をグルコース単位に分解し、ワックスエステル発酵経路によりワックスエステルを生産する。本研究では、嫌気条件下におけるパラミロン分解機構を明らかにすることを目的に、単離パラミロン会合タンパク質を包括的に解析することで、パラミロン分解酵素の同定を試みた。

好気条件下で定常期まで培養したユーグレナおよびその後嫌気6時間処理した細胞から、それぞれパラミロンを抽出し、界面活性剤を用いてパラミロン会合タンパク質を調製した。得られたタンパク質画分はプロテアーゼ処理後、モノリシスカラムを用いた nanoLC/MS により分析し、Progenesis QI により比較解析した。その結果、総計 395 タンパク質を同定し、このうち好気条件と嫌気条件で有意に検出レベルが増加したタンパク質は、それぞれ 104 個および 135 個であった。そのうち糖代謝関連酵素は全部で 25 個見出され、嫌気特異的に応答する酵素としてエンド型- β -1,3-グルカナーゼおよびホスホリラーゼ様タンパク質などパラミロン分解への関与が示唆される酵素が含まれていた。これらの酵素遺伝子について、ユーグレナ細胞に二本鎖 RNA を導入することで遺伝子サイレンシングを行い、パラミロン代謝に及ぼす影響を検証したところ、2つのエンド型- β -1,3-グルカナーゼおよび3つのホスホリラーゼ様タンパク質を同時にサイレンシングした細胞において、嫌気応答後のパラミロン分解が有意に抑制された。

G-1 脱グリコシル化酵素を欠損した *A. thaliana* の構築と遊離 *N*-グリカン構造解析
○上村亮太, 前田 恵, 三崎 亮¹, 藤山和仁¹, 木村吉伸
(岡山大院・環境生命,¹ 阪大・国際交流セ)

【目的】植物細胞には、糖タンパク質や糖ペプチドを脱グリコシル化する酵素として、酸性 PNGase (aPNGase)、細胞質 PNGase (cPNGase) 及び ENGase が存在する。老化糖タンパク質分解の際、aPNGase はプロテアーゼにより生じた糖ペプチドから還元末端にキトビオースを有する遊離 *N*-グリカン (GN2-FNGs) を生成する。一方、新生糖タンパク質の小胞体関連分解において、cPNGase と ENGase はミスフォールド糖タンパク質からハイマンノース型遊離 *N*-グリカン (HMT-FNGs) を生成する。これらの FNGs は植物の分化生長に関わるシグナル分子としての機能が推定されており[1]、本研究では FNGs 生理機能解明研究の一環として、aPNGase 欠損体と cPNGase/ENGase 欠損体の構築を行い、FNGs 構造解析を行った。【方法・結果】(1) 野生株と aPNGase 欠損株の地上部からオリゴ糖鎖を抽出し、透析を行った。透析外液をイオン交換、ゲルろ過に供し FNGs を精製した。FNGs を蛍光標識し、逆相及び順相 HPLC により FNGs を分離・精製後、MS、MS/MS 分析及び酵素消化により構造解析を行った。その結果、いずれの植物体からもトリマンノシルコア構造にβ1,2キシロース残基を有する植物複合型 GN2-FNGs が主要構造として検出された。以上の結果から、脱グリコシル化酵素非依存的な FNGs 産生機構が存在し、小胞体中でオリゴ糖転移酵素が HMT-GN2-FNGs を生成する可能性が示唆された。(2) 交配により cPNGase/ENGase 欠損株を作製した。T-DNA 挿入による遺伝子欠損は、ロゼッタ葉から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR 法により行った。[1] Priem, B., *et al.*, *Plant Physiol.*, **98**, 399-401 (1992)

G-2 小胞体関連分解に関わる糖鎖認識タンパク質を欠損した *A. thaliana* が産生する遊離 *N*-グリカン (FNGs) の構造解析
○古田佳織, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】真核生物において、ミスフォールドした新生糖タンパク質は小胞体関連分解 (ERAD) 機構により小胞体 (ER) から細胞質へ逆輸送されプロテアソームで分解を受ける。ミスフォールドした糖タンパク質上の *N*-グリカンは、ER 内腔でα-1,2-Manase 4/5 (MNS4/5) の作用により特定のα1,2-Man 残基が除去されα1,6-Man 残基が露出した構造へと変換される。この *N*-グリカンを持つミスフォールド糖タンパク質は、レクチン様受容体 OS9 によって認識され、次いで SEL1L, HRD1 から成る ERAD 複合体 (ディスロン) を経由して細胞質へと逆輸送される [1]。そして細胞質では、PNGase 及び ENGase による脱グリコシル化反応を受け還元末端側に GlcNAc を1残基有する GN1 型 FNGs が生じる。本研究では、糖タンパク質糖鎖の生理機能研究の一環として、*A. thaliana* をモデル植物として用いて MNS4 及び MNS5 の二重欠損株 (MNS4/5)、OS9 欠損株、SEL1L 欠損株および HRD1 欠損株が産生するハイマンノース型遊離 *N*-グリカン (GN1 HMT-FNGs) の構造特性解析を行った。【方法・結果】*A. thaliana* の野生株と各欠損株について地上部を液体窒素中で破碎後、0.1 N アンモニア水でオリゴ糖鎖を抽出した。抽出液を透析し、透析外液を陽イオン交換及び陰イオン交換に供して非吸着画分に FNGs を回収した。次いで、ピリジルアミノ (PA) 化により FNGs を蛍光標識した後、ConA カラム、RP-HPLC、SF-HPLC により GN1 HMT-FNGs を調製した。現在、ESI-MS 及び酵素消化法により FNGs の構造特性解析を行っている。[1] Hüttner, S., *et al.*, *Plant Cell.*, **26**, 1712-1728 (2014).

G-3 酸性 PNGase 過剰発現トマト (T4 世代) の PNGase 活性と遊離糖鎖構造解析 ○小椋美夏子, 前田 恵¹, 木村吉伸¹ (岡山大・農,¹ 岡山大院・環境生命)

【目的】植物特異的な酸性ペプチド: *N*-グリカナーゼ (aPNGase) は, キトビオースを有する遊離型 *N*-グリカン (free *N*-glycans, FNGs) を生成する脱グリコシル化酵素であり, 糖タンパク質の代謝分解系に関わる。分化生長中の植物組織には, aPNGase により生成したと考えられる遊離型 *N*-グリカンが μM で存在するが, その生理機能については未だ明らかにされていない。我々は, トマト aPNGase 遺伝子 (aPNGase-Le) を過剰発現させたトマトを構築し, T2 世代果実では, aPNGase 活性の昂進, FNGs 生産量増加を確認するとともに, 成熟促進を観察した [1]。本研究では植物の分化生長に関わる FNGs の生理機能解明研究の一環として, aPNGase-Le 過剰発現トマトを継代育種し, T4 世代について果実成熟促進特性, aPNGase 活性及び FNGs 生産量の変動について解析した。【方法・結果】aPNGase-Le 過剰発現トマト (T4 世代) の葉部からゲノム DNA を抽出後, PCR 法により aPNGase-Le 遺伝子の挿入を確認した。続いてトマト果実 (Green 期) から RNA を抽出し, cDNA を合成後, 定量 RT-PCR 法により aPNGase-Le 遺伝子の発現解析を行った。その結果, T4 世代でも遺伝子挿入が確認された個体は, aPNGase-Le 遺伝子を強く発現することを確認した。しかしながら, 着花日から Breaker 期までの日数を測定したところ, T2, T3 世代で観察された果実成熟の促進は確認されなかった。以上の結果から, 継代育種による aPNGase-Le のサイレンシングが予想されたため, 現在, aPNGase-Le 過剰発現体の Green 期果実における aPNGase 活性及び FNGs の構造解析を行っている。[1] 松丸ら 2016 年度日本糖質学会年会要旨集 p135.

G-4 トマト導管液中に存在する Le^a 抗原含有 *N*-グリカン代謝関連酵素の活性と遊離 *N*-グリカン構造解析 ○辻森祐太, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】植物が産生する分泌型糖タンパク質糖鎖には非還元末端に Le^a 抗原 (Gal β 1-3(Fuc α 1-4)GN β 1-) が存在する場合が多い。近年, 糖タンパク質糖鎖の生合成や分解に関与する酵素群が植物の分化・成長に関与することが明らかになりつつある。我々は植物複合型 *N*-グリカンの代謝分解機構を解明する研究の一環として, トマト α 1,3/4-Fuc'ase の遺伝子クローニングを完了し, 組換え酵素の詳細な基質特異性を明らかにした[1]。更に, 細胞内局在解析を行ったところ, 本酵素は分泌型タンパク質である可能性を得た。そこで本研究では, 細胞外空間 (アポプラスト) として捉えられる導管液に注目し, トマト導管液中に存在する種々のグリコシダーゼ活性と遊離 *N*-グリカンの構造解析を試みた。【方法・結果】導管液は播種後 55 日目のトマトの茎を切断し採取した。導管液 (4.7 mL) を遠心濃縮し, グリコシダーゼ活性測定 (MW>10,000, 660 μL) と, 遊離 *N*-グリカンの構造解析 (MW<10,000, 4 mL) に供した。濃縮導管液 (80 μL , 57 μg protein)を用いた各種グリコシダーゼ活性測定により, α 1,3/4-Fuc'ase 活性 (基質: Le^a₂Man₃Fuc₁Xyl₁GN₂-PA), β -Gal'ase 活性 (基質: Gal₂GN₂Man₃Fuc₁Xyl₁GN₂-PA), β -GlcNAc'ase 活性 (基質: GN₂Man₃Fuc₁Xyl₁GN₂-PA) α -Man'ase 活性 (基質: Man₉GN₂-PA) を検出した。遊離 *N*-グリカンの構造解析は, ゲルろ過後, ピリジルアミノ化による蛍光標識を行い, RP-, SF-HPLC による分画後, エンドおよびエキソグリコシダーゼ消化により行った。その結果, 還元末端にキトビオースを有する植物複合型遊離 *N*-グリカンが検出された。[1] Rahman, Md. Z., et al. *J.Biochem.*, **161**, 421-432 (2017)

G-5 *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成を抑制する植物抽出物の探索 ○守屋拓真, 実岡寛文, 上田晃弘 (広島大院・生物圏)

【目的】高いバイオフィルム形成能を持つ *Streptococcus mutans* はう蝕の原因となる口腔細菌である。バイオフィルムは細菌が生産・放出する多糖類や DNA に細菌自身を取り込まれた膜状構造物であり、細菌の物質表面での定着能を向上させる。う蝕は *S. mutans* が放出する酸による歯質の脱灰により進行するものの、*S. mutans* の歯表面でのバイオフィルム形成がう蝕発生の第一段階であると考えられている。よって、う蝕予防には *S. mutans* のバイオフィルム形成を抑制することが重要となる。本研究では、*S. mutans* のバイオフィルム形成に抑制効果を持つ植物抽出物の探索を行った。

【方法・結果】36 種類の植物からメタノール抽出画分を調整した。*S. mutans* 培養液にメタノール抽出物を添加して 96 穴プレート内で 10 時間静置培養を行い、クリスタルバイオレット染色によりバイオフィルム形成量の評価を行った。その結果、*S. mutans* のバイオフィルム形成抑制に効果がある植物抽出物が 17 種類見つかった。最も効果が高かったのはローズマリーであり、94% のバイオフィルム形成抑制効果を示した。これら抽出物は高濃度で使用した際には殺菌作用を示したものの、0.03% であればバイオフィルム形成のみを抑制したことから、抗バイオフィルム剤として有望であると考えられた。

G-6 植物のプロリンによる褐変の抑制機能 ○重森稜太, 藤川愉吉, 江坂宗春 (広島大院・生物圏)

【目的】植物においてプロリンは蛋白質を構成するアミノ酸であると共に、浸透圧調節のための適合溶質としても機能している。また、浸透圧調節のほかに、脂質酸化の防止、蛋白質や細胞膜を保護することが知られている。当研究室ではこれまでに、プロリンがイネ培養細胞において褐変を抑制することを示している。褐変は植物細胞内でポリフェノール酸化酵素 (PPO) がポリフェノールを酸化することで起こる現象である。本研究では、タバコの培養細胞を用いて、プロリンの褐変抑制機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】本研究では褐変を誘引する PPO に着目し、タバコ培養細胞を用いて実験を行った。まず最初に培養後 8 日目のタバコ培養細胞から粗抽出液を調製し、PPO 活性を評価した。その結果タバコ培養細胞粗抽出液の PPO 活性はプロリン (最終濃度 500 mM) により有意に抑制された。このことからプロリンが PPO の酵素活性を阻害することが示唆された。次にプロリン含有培地でタバコ培養細胞を 8 日間培養したところ、プロリンを含有していない培地 (コントロール) と比べて細胞内プロリン含量の影響は認められなかったが、培養細胞の新鮮重量は減少した。一方、プロリン生合成遺伝子を過剰発現させた組換えタバコ培養細胞では野生型に比べてプロリン含量が 2 倍以上に増加し、褐変が抑制された。現在、プロリン含量が増加した組換えタバコ培養細胞に着目し、プロリンの PPO 活性への影響を評価している。

G-7 乾燥地植物の光反射特性および表皮に蓄積する化合物プロファイルの解析
○山田みな美, 只野翔大, 留森寿士¹, 辻本 壽¹, 明石欣也
(鳥取大院・農,¹鳥取大・乾燥地研)

乾燥地の植物の中には、光反射能力を高め、過剰光による障害を回避する機構を有するものが存在する。しかし、乾燥地植物における光反射の分光的特性や生理的意義については詳細が明らかとなっていない。そこで本研究では、鳥取大学乾燥地研究センターが保有する乾燥地植物から 23 種類を選び、シロイヌナズナおよびソルガムを対照群として、葉表面の光反射特性と、表皮に沈着するワックス等の蓄積量と組成の解析、および電子顕微鏡による表面構造の形態観察を行った。様々な波長の光を植物葉に照射し、その反射、吸収および透過率を測定した結果、シロイヌナズナにおける光の反射率が平均 16%なのに対し、乾燥地の植物は概して光の反射率が高く、最大で照射光の 92%を反射する植物が見いだされた。また、いくつかの植物は短波長側の可視光をよく反射することが示された。また、表皮クチクラ層のワックス蓄積量を測定した結果、今回測定した全ての乾燥地の植物は、シロイヌナズナに比べて単位面積当たりのワックス蓄積量が多かったが、光反射率とワックス蓄積量の相関は必ずしも高くはないことが示された。さらにワックス組成は、植物毎に著しく異なることが観察された。葉表面の構造を電子顕微鏡により観察したところ、光反射率の高い植物には、繊維層状構造や針状突起構造、繊維半球構造など特徴的な幾何学的構造を持つものが多く観察された。これらの結果から、乾燥地植物の葉が光の反射率を高める形質を発達させていること、さらにその高い反射率を担う要因として、ワックス蓄積量だけでなく、その組成または葉表面の幾何学構造が寄与する可能性が考えられた。

G-8 リンゴ酸がもたらす S タイプアニオンチャネルへの影響
○三俣好令, 宗正晋太郎, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行 (岡山大院・環境生命)

【目的】高等植物は、一对の孔辺細胞からなる気孔と呼ばれる小孔を葉の表皮に持ち、気孔を介して、ガス交換や蒸散を行なう。乾燥ストレスに応答して生合成される植物ホルモンであるアブシシン酸は、孔辺細胞の受容体に作用し、シグナルが一連の伝達経路を経ることで気孔閉口を誘導し、過剰な水分損失を防ぐ。この作用機序において、原形質膜チャネルタンパク質は重要であり、中でも活性化の解除が遅い S タイプアニオンチャネルは中心的役割を果たす。リンゴ酸は、活性化の解除が速い R タイプアニオンチャネルの活性化剤であることが報告されたが、S タイプアニオンチャネルへの影響は不明であるため調査した。

【方法・結果】シロイヌナズナ野生株において、気孔開度はリンゴ酸処理によって有意に減少したが、S タイプアニオンチャネル機能喪失変異体では有意差はなかった。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた異種タンパク質発現系で S タイプアニオンチャネル活性を測定した。その結果、リンゴ酸処理によるチャネル活性への影響はなかった。

G-9 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口における孔辺細胞内アブシシン酸濃度の変化
○石川晴香, 宗正晋太郎, 森 泉¹, 松浦恭和¹, 中村俊之, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・植物研)

植物の葉の表皮に多く存在する気孔は、一対の孔辺細胞と呼ばれる細胞から形成された小孔である。この気孔はガス交換や蒸散の調節を行う。植物ホルモンであるアブシシン酸 (ABA) は、乾燥ストレス下で生合成され、気孔閉口を誘導し、蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。同じくジャスモン酸メチル (MeJA) は、植物の発達や病傷害応答などを含む様々な生理学的過程の制御を行う。MeJA もまた気孔閉口を誘導することで知られている。

これまでの研究で、孔辺細胞内において、MeJA 信号伝達には内因性の ABA が必要であることが示唆されている。しかしながら、MeJA 誘導気孔閉口と孔辺細胞内 ABA の濃度変化との関係については未だに明らかとなっていない。また、ABA の合成酵素は、維管束組織周辺や孔辺細胞において発現することが報告されている。しかし、孔辺細胞 MeJA 信号伝達に必要な ABA はその由来についても不明のままである。

本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、MeJA 誘導気孔閉口における孔辺細胞内 ABA 濃度変化について調査した。ABA 濃度変化に応答する蛍光センサータンパク質である ABAleon を孔辺細胞に高発現した遺伝子組換え植物を新たに作出し、無傷の孔辺細胞における ABA 濃度変化のリアルタイム測定を行った。また、LC-MS/MS を用いて孔辺細胞プロトプラスト中の ABA 定量を行った。

G-10 ペプチドホルモン CLE14 がシロイヌナズナの根毛形成機構に及ぼす影響
○林 直人, 鉄村琢哉¹, 澤進一郎², 和田拓治, 富永るみ
(広島大院・生物圏,¹宮崎大・農,²熊大院・自然科学)

【目的】 植物ペプチドホルモンは、微量で生理活性を示す比較的短鎖のアミノ酸配列である。植物の生長を制御する手段としてペプチドホルモンが注目されている。しかし、植物ペプチドホルモンについては未知の部分も多く、農業等へ積極的に利用する段階には至っていない。ペプチドホルモンの1つ、CLV3/ESR-related 14 (CLE14) はシロイヌナズナの主根を短くし、根毛数を増やすと報告されている。CLE14 をコードする遺伝子、*CLE14* はシロイヌナズナの根毛、根冠を含む根の表皮組織で発現している。また、シロイヌナズナの根毛形成を転写因子群の最下流で制御している遺伝子として *GLABRA2(GL2)* が知られている。我々は CLE14 を根に投与したときの、*GL2* 遺伝子の相対的発現量を解析することで、CLE14 がシロイヌナズナの根毛形成機構に与える影響を明らかにできると考える。

【方法・結果】 本実験には、シロイヌナズナの野生型 Col-0 を用いた。CLE14 ペプチドは化学合成したものを使用した。シロイヌナズナの根への投与は、必要な栄養素 (1/2 MS) を含む寒天培地に CLE14 ペプチドを添加し培養することで行った。その結果、CLE14 ペプチド投与により、シロイヌナズナの根の伸長阻害、および根毛数増加を確認した。リアルタイム PCR による発現解析の結果、CLE14 ペプチド投与による *GL2* 遺伝子の相対的発現量の低下が明らかになった。これらの結果から、合成 CLE14 ペプチド投与により、シロイヌナズナの表現型に影響を与えることが確認できた。また遺伝子レベルでは、CLE14 ペプチドが *GL2* 遺伝子の発現量を低下させていることから、CLE14 が *GL2* に関与する経路で根毛形成機構に影響を及ぼしている可能性が示された。

G-11 アズキファゼオリンの液胞輸送機構の解析

○森木公平, 高畑周平, 久我一弘¹, 和田郁夫², 岩瀬駿志¹, 清水英寿¹,
地阪光生¹, 横田一成¹, 中川 強, 西村浩二
(島根大・総科研セ,¹島根大・生資科,²福島県医・医)

【目的】植物細胞には分解型液胞と貯蔵型液胞の二種類があり, 後者は貯蔵タンパク質を蓄積, そして種子の発芽過程を支え, 植物の成長に重要な役割を果たしている。しかし, 貯蔵タンパク質の液胞への輸送経路は, 全容が明らかになっていない。また輸送の分子機構は, 貯蔵タンパク質のもつ液胞輸送配列を特異的な液胞輸送体が認識し, その複合体ごと膜輸送小胞により輸送されることがこれまでに報告されているが, 輸送配列や輸送体についても不明な点が多い。本研究ではアズキの液胞貯蔵タンパク質ファゼオリンに着目し, これらの機構を調べることを目的とした。

【方法・結果】白ネギ表皮細胞の一過的発現系を用いて, ファゼオリン蛍光レポーターの細胞内挙動を各種オルガネラマーカースと比較解析し, ファゼオリンの液胞輸送経路及び, 輸送に関わる輸送配列の解析を行った。その結果, 白ネギ表皮細胞においてファゼオリンは, 小胞体から COP II を介し, ゴルジ体, TGN, 後期エンドソームを経由し液胞に輸送されていることが示唆された。またファゼオリンの C 末端に位置する液胞選別決定様配列 PFVY の欠損変異体の細胞内動態を解析したところ, 野生型のものと比較して変化が観察された。現在, アズキ登熟種子を用いてこれらの結果と同様になるかを解析するために, アズキを用いた一過的発現系の構築を試みている。

G-12 システインフリー蛍光レポーターシステムの構築に関する研究

○久我一弘, 岩瀬駿志, 和田郁夫¹, 清水英寿, 地阪光生, 横田一成,
中川 強², 西村浩二² (島根大・生資科, ¹福島県医・医, ²島根大・総科研セ)

GFP に代表される蛍光タンパク質の多くは分子内に複数のシステインを含む。そのため小胞体内腔やアポプラストのような酸化的环境下ではジスルフィド結合を形成し, 蛍光タンパク質がオリゴマー化する傾向がある。ゆえに酸化的环境下におけるタンパク質の動態を蛍光タンパク質で標識して可視化すると, 異常なジスルフィド結合が形成されて, 本来のタンパク質の挙動を示さなくなる可能性がある。そこで蛍光特性を変えないようにシステインを適当なアミノ酸に置換した改変型 RFP を用いて標的分子を標識して可視化することを試みたところ, ER ルーメンで従来の RFP ではオリゴマー化が認められたが改変型 RFP では認められなかった。この結果から ER ルーメンのような酸化的環境のイメージングには改変型 RFP が有用であることが考えられる。すでに哺乳動物ではうまく機能しているシステインフリー蛍光タンパク質が報告されている。植物細胞でもシステインフリー蛍光タンパク質が酸化的环境下でオリゴマー化が起こらないことを実験的に証明し, 植物細胞でも有用な蛍光レポーターシステムの構築を試みている。本発表では様々なオルガネラマーカースを使って, オリゴマー化を評価した結果を報告する。

賛 助 企 業

- ・(株)旭製作所 岡山営業所
- ・天野エンザイム(株)
- ・アルファー食品(株)
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・エイチビィアイ(株)
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・AuB(株)
- ・岡山県酒造組合
- ・(社)岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・(株)機能性食品開発研究所
- ・協和発酵バイオ(株)
- 山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・(株)近畿日本ツーリスト中国四国 広島支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)サン・クロレラ
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)酔心山根本店
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・(株)ソフィ
- ・(株)大愛
- ・大興産業(株)
- ・大山乳業農業協同組合
- ・大洋香料(株)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・鳥取サイエンス(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・(有)ビーエムステーション
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製菓(株)
- ・マルトモ(株)
- ・宮下酒造(株)
- ・(株)宮田薬品
- ・ヤスハラケミカル(株)
- ・ヤマキ(株)
- ・(株)やまだ屋
- ・八幡物産(株) (五十音順)

2017年12月20日 現在 58社

