# 日本農芸化学会 2015年度中四国・西日本支部合同大会

中四国支部第43回講演会西日本支部第312回講演会

# 講演要旨集

日時:2015年9月17日(木), 18日(金)

場所:愛媛大学 農学部

【 日本農芸化学会中四国支部・西日本支部

## 日本農芸化学会2015年度中四国 · 西日本支部合同大会

(中四国支部第43回・西日本支部第312回講演会)

会 場:愛媛大学樽味キャンパス(農学部)

開催日:2015年9月17日(木),18日(金)

第1日目:9月17日(木)

11:00~13:00 支部幹事打合会, 支部参与会

11:00~12:00 日本農芸化学会中四国支部幹事打合会 2 号館 3 階 31 講義室

12:10~13:00 日本農芸化学会中四国支部参与会 本館 3 階多目的ホール

12:00~13:00 日本農芸化学会西日本支部参与会 本館 2 階大会議室

13:30~16:40 シンポジウム A 会場 (大講義室)

18:30~20:30 懇親会 松山全日空ホテル

(〒790-8520 松山市一番町 3-2-1 TEL 089-933-5511)

当日参加費:一般 8,000円, 学生 4,000円

第2日目:9月18日(金)

9:00~15:18 一般講演 A~F会場

## ◇一般講演 会場一覧表

	会場	講演番号	分類
Α	大講義室	A-1 <b>∼</b> A-23	食品機能
В	第 22 講義室	B−1 ~ B−21	有機天然物化学
С	第 23 講義室	C-1 ~ C-21	動物・植物、食品加工
D	第 31 講義室	D-1 ~ D-22	微生物(遺伝子・機能)
E	第 32 講義室	E-1 ~ E-18	微生物(分離・代謝)
F	多目的ホール	F-1 ~ F-21	酵素・タンパク質

## ◇一般講演 座長一覧表

	会場	講演番号	座長
A	大講義室	A-1 ~ A-4 A-5 ~ A-9 A-10 ~ A-14 A-15 ~ A-19 A-20 ~ A-23	榊原陽一(宮崎大院・農) 井上祐一(北九州高専・物質化) 河本正次(広島大院・先端研) 佐藤匡央(九大院・農) 岡本威明(愛媛大・教育)
В	第 22 講義室	B-1 ~ B-6 B-7 ~ B-10 B-11 ~ B-13 B-14 ~ B-17 B-18 ~ B-21	西 甲介(愛媛大・農) 増田俊哉(阪市大院・生活) 野下俊朗(県広大・生命環境) 山内 聡(愛媛大・農) 柳田 亮(香川大・農)
С	第 23 講義室	C-1 ~ C-4 C-5 ~ C-8 C-9 ~ C-11 C-12 ~ C-14 C-15 ~ C-17 C-18 ~ C-21	菅原卓也(愛媛大・農) 稲葉丈人(宮崎大・農) 中川 強(島根大・総科セ) 羽倉義雄(広島大院・生物圏) 渡邉義之(近畿大院・シスエ) 吉金 優(高知大・土佐 FBC)
D	第 31 講義室	D-1 ~ D-4 D-5 ~ D-9 D-10 ~ D-13 D-14 ~ D-17 D-18 ~ D-22	三井亮司(岡山理大・生化) 阿野嘉孝(愛媛大・農) 阿座上弘行(山口大・農) 畠山智充(長崎大院・エ) 三本木至宏(広島大院・生物圏)
E	第 32 講義室	E-1 ~ E-5 E-6 ~ E-9 E-10 ~ E-14 E-15 ~ E-18	丸山雅史(愛媛大・農) 川向 誠(島根大・生資) 芦内 誠(高知大・農) 善藤威史(九大院・農)
F	多目的ホール	F-1 ~ F-5 F-6 ~ F-9 F-10 ~ F-13 F-14 ~ F-17 F-18 ~ F-21	角田佳充(九大院・農) 関藤孝之(愛媛大・農) 太田広人(熊本大院・自然) 若松泰介(高知大・農) 平 大輔(崇城大・応生命)

## 注意)

- 1. パソコンを用いた口頭発表にて行います。操作は各発表者でお願いします。
- 2. 発表時間 9分, 質疑応答 2分, 交代 1分 厳守で進行お願いします。

## 愛媛大学樽味キャンパス(農学部)へのアクセス

〒790-8566 松山市樽味三丁目5番7号 TEL 089-946-9803(代)



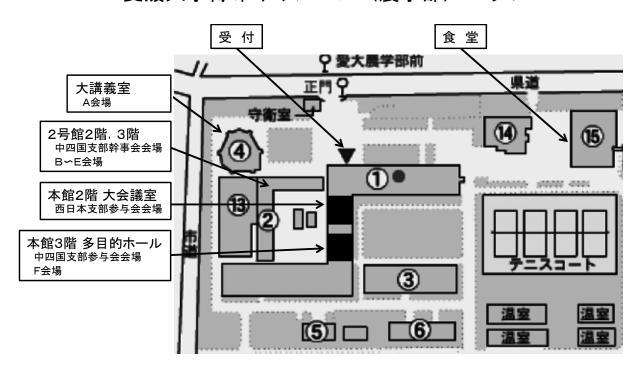
●松山空港からJR松山駅, 松山市駅まで

伊予鉄バスをご利用の場合

JR松山駅まで:空港リムジンバス「JR松山駅前」下車 松山市駅まで:空港リムジンバス「松山市駅」下車

- ●JR松山駅→愛媛大学樽味キャンパス 伊予鉄バスをご利用の場合 8番線(東野経由 道後温泉駅前行き)「愛大農学部前」下車
- ●松山市駅→愛媛大学樽味キャンパス 伊予鉄バスをご利用の場合 8番線(東野経由 道後温泉駅前行き)「愛大農学部前」下車

## 愛媛大学樽味キャンパス(農学部)マップ



#### ①本館

玄関前:受付

2階 大会議室:西日本支部参与会会場

3階 多目的ホール: (9/17) 中四国支部参与会会場

(9/18) F 会場

## 22号館

1階第11講義室:休憩室 2階第22講義室:B会場 2階第23講義室:C会場 2階第24演習室:休憩室

3階 第31講義室:(9/17)中四国支部幹事打合会会場

(9/18) D 会場

3階 第32講義室: E 会場

#### ④大講義室: A 会場

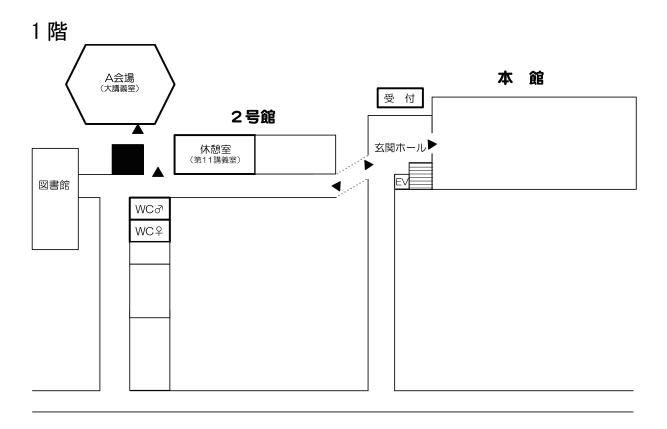
## ①農学部会館

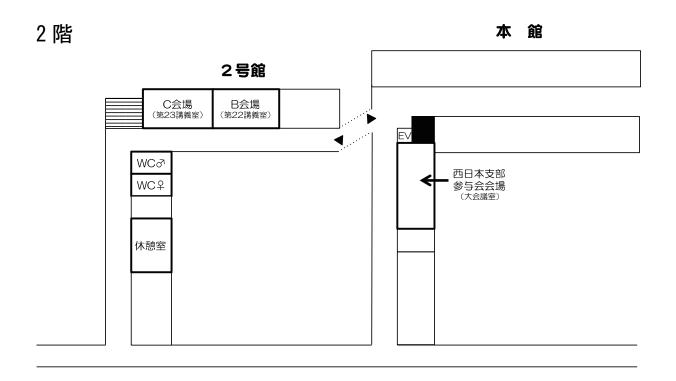
## 食堂

大会当日,食堂は営業しております。また、農学部周辺,特に西側に飲食店があります。

## 会場案内図1

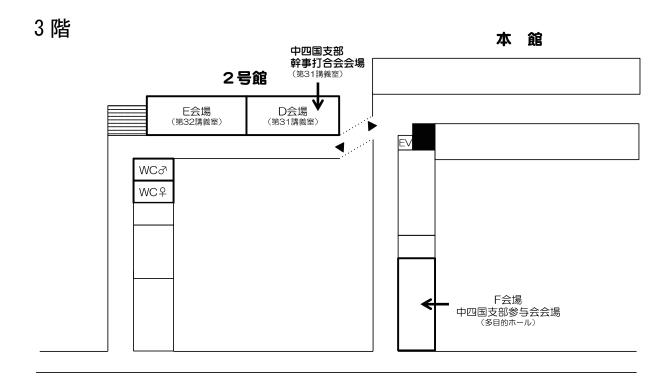
## A~C会場





## 会場案内図2

## D~F 会場



## 懇親会会場へのアクセス

会場:松山全日空ホテル

〒790-8520 松山市一番町 3-2-1 TEL 089-933-5511



- ●懇親会会場(松山全日空ホテル)へは、農学部 17 時 10 分と 17 時 45 分発の送迎バスをご用意いたします。
- ●一般の交通手段での移動の場合.
  - 経路1:「愛大農学部前」バス停から、松山市駅行き、あるいは JR 松山駅前行きバス(8番線)に乗り、「大街道口」で下車してください(12分, 160円)。 上地図に従って、徒歩15分です。
  - 経路 2:「愛大農学部前」バス停から,道後温泉駅前行きバス(8番線)に乗り,終点「道後温泉駅前」(約15分,160円)で路面電車(3番,5番,6番線)に乗り換え,「大街道」で下車してください(約10分,160円)。電停から徒歩 2分です。
- ●農学部前からタクシーをご利用される場合は、所要時間 15 分、料金 1,000 円程度です。

 講
 演
 会

 プログラム

## 日本農芸化学会 2015 年度中四国 · 西日本支部合同大会

(中四国支部第43回·西日本支部第312回講演会)

## プログラム

第1日目:9月17日(木)

◇ シンポジウム 13:30~16:40(A会場(大講義室))

「ケミカルバイオロジーの基礎研究から応用まで」

座長 菅原卓也 (愛媛大・農)

13:30~14:30 「がんイメージングにおける蛍光顕微鏡とケミカルバイオロジーの進歩」 今村健志 (愛媛大院・医)

14:35~15:35 「天然のプロテインキナーゼ C リガンドの単純化による抗がん剤シーズ の開発研究」

入江一浩 (京大院・農)

15:40~16:40 「硫酸化の基礎研究から応用研究へ」

水光正仁 (宮崎大・農)

## 第2日目:9月18日(金)

## ◇ 一般講演

A 会場(大講義室) <食品機能>

午前

- A-1 9:00 ダイゼインの雌特異的食欲低下作用と食欲制御因子の変動 ○泉 智明,阿部恭大,藤谷美菜,岩原麻美,岸田太郎 (愛媛大・農)
- A-2 9:12 体エネルギー蓄積に基づくビートファイバーのエネルギー評価 ○宗像 嶺, 土井 悟, 岸田太郎 (愛媛大・農)
- A-3 9:24 OVX ラット 3 食制におけるダイゼイの食欲抑制の機構の検討 ○阿部恭大,泉 智明,岸田太郎 (愛媛大・農)
- A-4 9:36 ビートファイバーの摂取エネルギー低下効果の機構解明─3 食制条件下・DIO 解析によるアプローチ─○土井 悟, 宗像 嶺, 岸田太郎 (愛媛大・農)
- A-5 9:48 LED 照射リポソーム膜モデルとマウス繊維芽細胞の光増感酸化反応に対するフュキサンチン・ネオキサンチンの作用解明
  ○岩中麻美,曽我真美子,小竹(奈良)英一¹,長尾昭彦¹,高橋 章²,寺尾純二(徳島大院・食品,¹食総研,²徳島大院・予防)
- A-6 10:00 血管内皮細胞における酸化ストレス誘導の caveolin-1 リン酸化に対するケルセチン及びその代謝物の効果

  ○近藤あかり、鎌田智英実、向井理恵、寺尾純二

  (徳島大院・栄養)
- A-7 10:12 *S*-ニトロシル化をターゲットとした抗酸化食品成分探索法の検討 ○芳村俊広<sup>1</sup>, 黒木勝久<sup>1,2</sup>, 水光正仁<sup>1,2</sup>, 榊原陽一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>宮崎大院・農工, <sup>2</sup>宮崎大・農)

- A-8 10:24 黒酢の脱顆粒抑制作用に関する研究 ○栗根聖次,石田萌子,西 甲介,長野正信<sup>1</sup>,橋口和典<sup>1</sup>,藤井 暁<sup>1</sup>,菅原卓也 (愛媛大・農, <sup>1</sup>坂元醸造)
- A-9 10:36 ホウレンソウ水溶性抽出物の免疫賦活活性に関する研究 〇石田萌子,大瀬彩文,西 甲介,菅原卓也 (愛媛大・農)
- A-10 10:48 スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランのマクロファージ刺激抑制作用に関する研究 井坂章吾,山口健一,上野幹憲,○小田達也 (長崎大・水産)
- A-1111:00緑茶カテキン EGCG のメラノーマにおける microRNA 発現調節作用<br/>
  ○山田脩平, 牧尾彰子, 立花宏文<br/>
  (九大院・農)
- A-12 11:12 PDE3 阻害剤は緑茶カテキン EGCG の膵臓がん転移抑制作用を増強する ○熊添基文,高井美佳,立花宏文 (九大院・農)
- A-13 11:24 イチゴ由来ペクチンの IgE 産生抑制作用 ○矢野 栞, 井上祐一, 川原浩治 (北九州高専・物質化)
- A-14 11:36 乳酸菌の菌体表面 GAPDH による IgE 産生抑制作用 ○熊谷祐二,井上祐一,川原浩治 (北九州高専・生産デ)

### 午 後

- A-15 13:30 老化促進マウス (SAMP8) における酒粕含有機能性成分摂取の影響 ○伊豆英恵 ¹, 柴田紗知 ², 飯島遼平 ³, 藤井 力 ¹,³, 松原主典 ² (¹酒総研, ²広島大院・教育, ³広島大院・生物圏)
- A-16 13:42 ビタミン B<sub>12</sub>欠乏が線虫(C. elegans)の学習能と記憶保持能に及ぼす影響 ○美藤友博, 薮田行哲, 河野 強, 渡邉文雄 (鳥取大・農)

- A-17 13:54 ピータンに含まれるビタミン B<sub>12</sub>化合物の特性 ○滕 飛,竹中重雄<sup>1</sup>,薮田行哲,渡邉文雄 (鳥取大院・連農, <sup>1</sup>阪府大院・生命環境)
- A-18 14:06 魚肉タンパク質摂取による筋重量増加効果はアルギニンによるものではない ○原 由真,澤井真梨子,山本晋平,速水耕介¹,韓 力²,辻 智子²,岸田太郎 (愛媛大・農,¹横浜薬大・薬科,²日本水産(株))
- A-19 14:18 魚肉タンパク質摂取による筋重量増加効果─様々なタンパク質源との比較─
   ○澤井真梨子,原 由真,山本晋平,速水耕介¹,韓 力²,辻 智子²,岸田太郎(愛媛大・農,¹横浜薬大・薬科,²日本水産(株))
- A-20 14:30 3T3-L1 脂肪細胞のケモカイン発現に及ぼすノビレチンの効果に関する研究 ○道免未来,安永 翔,大田美和,西 甲介,菅原卓也 (愛媛大・農)
- A-21 14:42 ラットにおける米α-グロブリンの抗肥満作用 福田優美, 宮後元徳, 鈴木隆久, 田中愛健, 城内文吾, ○佐藤匡央 (九大院・農)
- A-22 14:54 アマニ食物繊維による肝臓中性脂肪・コレステロール低下作用 ○福田真子,川口康平<sup>1</sup>,福光 聡<sup>1</sup>,岸田太郎 (愛媛大・農, <sup>1</sup>日本製粉)
- A-23 15:06 かつお節の血糖低下作用 ○関 英治,藤原佳史,朝田 仁,小塚美由記¹,山本晃久²,薩 秀夫², 大久保岩男³,山根拓也⁴ (ヤマキ(株),¹北海道文教大,²前橋工大,³天使大,⁴北大院・薬)

#### B会場(2号館2階 第22講義室) <有機天然物化学>

_	
4	ĦΠ

- B-1 9:00 天然物由来成分によるヒト血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果について ○黒田 怜,南 雄二,加治屋勝子 (鹿児島大・農)
- B-2 9:12 血管を正常に収縮・弛緩させる機能性成分の探索 ○鶴留奈津子,南 雄二,加治屋勝子 (鹿児島大・農)
- B-3 9:24 メラニン産生抑制効果を有する新規生薬成分の同定及びその作用機序の解明 ○伊藤千尋,吉田一郎<sup>1</sup>,辻 明彦,矢中規之<sup>2</sup>,湯浅恵造 (徳島大院・STS, <sup>1</sup>四国大・短大, <sup>2</sup>広島大院・生物圏)
- B-4 9:36 オガタマノキに含まれるミカドアゲハ幼虫の摂食刺激物質の探求 ○義本裕介, 伊藤 剛, 影本貴大, 中道貴也, 金 哲史 (高知大・農)
- B-5 9:48 2-アミノアスコルビン酸とその酸化重合物の神経突起形成促進作用 〇岩岡裕二,池田奈央,大野朝子,伊東秀之<sup>1</sup>,田井章博 (県広大・生命環境,<sup>1</sup>岡山県大・保健)
- B-6 10:00 レモンフラボノイドの PC-12 細胞における神経突起形成促進作用と構造活性相関 ○池田奈央, 野下俊朗, 田井章博 (県広大・生命環境)
- B-7 10:12 レモンフラボノイドの RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制活性と構造活性相関

  ○池田 郁, 野下俊朗, 田井章博

  (県広大・生命環境)
- B-8 10:24 バニリン酸エステルの RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制作用と構造活性相関

  ○石股 直, 伊東秀之 <sup>1</sup>, 田井章博

  (県広大・生命環境, <sup>1</sup>岡山県大・保健)
- B-9 10:36 アルブチンの ABTS radical cation 消去における反応特性 ○大野朝子, 伊東秀之 <sup>1</sup>, 田井章博 (県広大・生命環境, <sup>1</sup>岡山県大・保健)

- B-10 10:48 ピシフェリン酸の新規生理活性作用の検討 ○柴田紗知,谷田貝光克<sup>1</sup>,立石能子<sup>2</sup>,松原主典 (広島大院・教育,<sup>1</sup>農生命支援,<sup>2</sup>広島大院・生物圏)
- B-11 11:00 システイン置換ポリフェノールによるメトミオグロビンのオキシ化と維持研究 ○本田沙理 <sup>1,2</sup>, 三浦ゆか理 <sup>1</sup>, 増田俊哉 <sup>2</sup>, 増田晃子 <sup>3</sup> ( <sup>1</sup> 徳島大院・総合, <sup>2</sup> 阪市大院・生活, <sup>3</sup> 四国大・生活)
- B-12 11:12 食用キノコ処理木質バイオマスの家畜飼料素材としての利用

  ○永谷直哉 <sup>1</sup>, 小島 豪 <sup>1</sup>, 柏野泰章 <sup>1,2</sup>, 長尾伸一郎 <sup>3</sup>, 時本景亮 <sup>4</sup>, 西野直樹 <sup>1</sup>, 仁戸田照彦 <sup>1</sup>, 神崎 浩 <sup>1</sup>

  ( <sup>1</sup> 岡山大院・環境生命, <sup>2</sup>浅野産業, <sup>3</sup> 岡山県・畜産研, <sup>4</sup>日本きのこセ)
- B-13 11:24 オリーブ葉二次代謝産物 oleuropein aglycon を効率的に還元する微生物の探索 ○巻尾沙織,乗松 毅,徐 恵美<sup>1</sup>,菊池敬一<sup>1</sup>,仁戸田照彦,神崎 浩 (岡山大院・環境生命,<sup>1</sup>日本オリーブ)

#### 午 後

- B-15 13:42 Hindsiilactone A の合成研究

  ○稲見俊伸, 野下俊朗 <sup>1</sup>

  (県広大院・生命シ, <sup>1</sup>県広大・生命環境)
- B-16 13:54 Apteniol D の合成研究 ○野下俊朗, 松本光平 (県広大・生命環境)
- B-17 14:06 アラビノース脂肪酸エステルの合成と植物生長抑制活性評価
  ○安藤 光, Chowdhury Md. Tazul Islam <sup>1</sup>, 松尾麻未 <sup>2</sup>, 柳田 亮 <sup>2</sup>, 川浪康弘 <sup>2</sup>
  (香川大院・農, <sup>1</sup>愛媛大院・連農, <sup>2</sup>香川大・農)

- B-18 14:18 ノルリグナン構造を有するインペラネン誘導体の細胞毒性活性
   ○庄司有璃子,谷村亮介,Wukirsari Tuti,西脇寿,西 甲介,菅原卓也,秋山浩一¹,岸田太郎,山内 聡
   (愛媛大・農,¹愛媛大・学術支援セ)
- B-19 14:30 γ-ブチロラクトン型リグナンの HL-60, HeLa 細胞に対する細胞毒性活性 Tuti Wukirsari, ○越智吉明, 西脇 寿, 西 甲介, 菅原卓也, 秋山浩一¹, 岸田太郎, 山内 聡 (愛媛大・農, ¹愛媛大・学術支援セ)
- B-20 14:42 愛媛県東温市住民の血清中リグナン濃度と食生活・臨床パラメータとの関係 ○三宅志歩、福田真子、河村夏美、松木 翠、斉藤 功¹、谷川 武²、 丸山広達²、江口依里³、西脇 寿、山内 聡、岸田太郎 (愛媛大・農、¹愛媛大・医、²順天堂大・医、³岡山大・医)

## C 会場 (2 号館 2 階 第 23 講義室) <動物・植物、食品加工> 午 前 C-1 9:00 生産性向上を目指した CHO 細胞のメタボローム解析

- C-1 9:00 生産性向上を目指した CHO 細胞のメタボローム解析
   ○井川翔太,鬼塚正義<sup>1</sup>,大政健史<sup>2</sup>
   (徳島大院・先端,<sup>1</sup>徳島大院・STS,<sup>2</sup>阪大院・工)
- C-2 9:12 GMP 対応バイオ医薬生産用ヒト細胞株の樹立 ○榮田佳那子,井上祐一,川原浩治 (北九州高専・生産デ)
- C-3 9:24 柑橘由来乳酸菌によるがん細胞死誘導作用について
   ○高岡昂汰, 圖子晧祐, 二宮由利絵, 山下由加里, 早瀬伸樹, 牛尾一利, 石塚盛雄<sup>1</sup>
   (新居浜高専・生化, <sup>1</sup>中央大・理工)
- C-4 9:36 長鎖ノンコーディング RNA による RB/p53 経路の制御機構 ○神武洋二郎,苗村円佳,紫 千大,井上恭敏,岡本春奈 (近畿大・産理工)
- C-5 9:48 フォールドしたポリペプチドを成熟部位に有する人工前駆体蛋白質を用いた葉緑体への蛋白質輸送実験

  ○秋田 充,大畠侑乃,石川貴美子,Pohare Manoj
  (愛媛大・農)
- C-6 10:00 一価性ストレプトアビジン 4 量体を付加した前駆体蛋白質を用いた葉緑体への蛋白質輸送実験
  ○Pohare Manoj, 秋田 充 (愛媛大・農)
- C-7 10:12 シロイヌナズナ由来前駆体 tRNA プロセシング酵素 PRORP の基質認識機構に関する研究
   ○今井崇喜,中島 崇¹,角田佳充¹,木村 誠¹
   (九大院・生資環,¹九大院・農)
- C-8 10:24 シロイヌナズナ気孔形成突然変異体 bagel3 の機能解析
   ○山田千聖,鈴木孝征<sup>1</sup>,東山哲也<sup>1,2</sup>,中川 強
   (島根大・総科セ, <sup>1</sup>ERATO 東山, <sup>2</sup>名大・生命分子)

- C-9 10:36 孔辺細胞アブシシン酸信号伝達におけるグルタチオンの役割 ○長橋大樹,宗正晋太郎,森泉<sup>1</sup>,中村俊之,中村宜督,村田芳行 (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・植物研)
- C-10 10:48 プラスチドシグナル誘発処理に対する植物ホルモン生合成経路の応答 ○廣澤嘉洸,多田朱里,稲葉靖子<sup>1</sup>,松浦恭和<sup>2</sup>,森 泉<sup>2</sup>,稲葉丈人 (宮崎大・農, <sup>1</sup>宮崎大・テニュア, <sup>2</sup>岡山大・植物研)
- C-11 11:00 シロイヌナズナの水中栽培法を用いた低温馴化機構の解析
   ○上村沙織、稲葉靖子¹、稲葉丈人
   (宮崎大・農、¹宮崎大・テニュア)
- **C-12** 11:12 タイ発酵ソーセージ「Nham」のタンパク質, アミノ酸の発酵過程による変化 ○杉岡和貴, Supaluk Sorapukdee <sup>1</sup>, Rachakris Lertpatarakomol <sup>1</sup>, 堺 翔平, 荒木朋洋 (東海大・農, <sup>1</sup>KMITL)
- C-13 11:24 赤身牛肉中のタンパク質および遊離アミノ酸における熟成評価について ○細澤知香,杉岡和貴,境 翔平,福留彰宏,家入誠二¹,堺 久弥¹,荒木朋洋 (東海大・農,¹熊本県・農研セ)
- C-14 11:36 海藻遊離糖の迅速分析 〇垣田浩孝,小比賀秀樹 (産総研・健康工)

#### 午 後

- C-15 13:30 レトルトパウチに封入した液体・固体食品の未開封非破壊粘弾性測定に及ぼす包装容器の影響 ○田添由真、川井清司、羽倉義雄
  - (広島大院・生物圏)
- C-16 13:42 蒸気吹き込み法によるエマルションの調製 -蒸気の吹き込み及び攪拌条件が分散 粒子に及ぼす影響-○村上亮介,川井清司<sup>1</sup>,羽倉義雄<sup>1</sup>
- C-17 13:54 共振振動分析装置を用いたメロン 'アールス雅'の食べ頃判定および予測 ○山本博志, 吉金 優¹, 中島悦子¹, 栗田せりか¹, 樋口慶郎¹, 沢村正義¹ (山長, ¹高知大・土佐 FBC)

(広島大・生物生産, 「広島大院・生物圏)

- C-18 14:06 米飯中のオリゴ糖含有量と食味の関係
   ○横野一歩,高津地志¹,藤田明子¹,岡田芳治,渡邉義之,野村正人
   (近畿大院・シスエ,¹(株)サタケ)
- C-19 14:18 鰹節切削細片集合体の細片厚と静的粘弾性の関係○朝田 仁 (ヤマキ (株))
- C-20 14:30 レオロジー特性の比容積による鰹節切削細片集合体の評価 ○佐々木淳, 朝田 仁 (ヤマキ (株))
- C-21 14:42 電子スモーク法による低ベンゾピレン鰹節の製法 ○浅山 拓,朝田 仁 (ヤマキ (株))

## D会場(2号館3階 第31講義室) <微生物(遺伝子・機能)>

午 前

- D-1 9:00 *Thermococcus kodakarensis* の DNA 複製関連因子間(GAN-GINS)相互作用解析 ○綿谷江梨, 石野園子, 小林康平, 大山拓次 <sup>1</sup>, 山上 健, 石野良純 (九大・農, <sup>1</sup>山梨大・生命環境)
- D-2 9:12 *Pyrococcus furiosus* 由来 Endonuclease Q と PCNA との相互作用解析 ○吉田光太郎, 石野園子, 白石 都, 山上 健, 石野良純 (九大・農)
- D-3 9:24 分裂酵母のロンボイドプロテアーゼによるゴルジ体膜タンパク質切断機構の解析 〇田中直孝,田邊 寛,宮下理沙,東 玲那,田淵光昭 (香川大・農)
- D-4 9:36 乳酸菌由来新奇環状バクテリオシンの生合成関連遺伝子の同定と機能解析 ○高城博也 <sup>1</sup>, 石橋直樹 <sup>1</sup>, 沢 稔彦 <sup>1</sup>, 善藤威史 <sup>1</sup>, 園元謙二 <sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>九大・バイオアーク)
- D-5 9:48 麹菌の機能未知遺伝子破壊株ライブラリーの表現型解析 井丸 直 <sup>1,2</sup>, ○川村 昂 <sup>1,2</sup>, 妹尾史子 <sup>1,2</sup>, 池田優理子 <sup>1</sup>, 岩下和裕 <sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>広島大・工)
- D-6 10:00 液胞型 ATPase 膜内在性ローターサブユニットの変異体解析 河田美幸, ○西谷幸大 ¹, 柿沼喜己 ¹ (愛媛大・学術支援セ, ¹愛媛大・農)
- D-7 10:12 深海底コア試料を用いた SIGEX 法による D-アミノ酸/希少糖代謝酵素遺伝子の網羅的探索
  ○添田愛理沙,諸野祐樹¹,寺田武志²,稲垣史生¹,芦内 誠,若松泰介
  - 〇称ロ复理抄,語野和樹 , 守田武志 , 相垣丈生 , 戸内 一誠, 石松泰介 (高知大・農,  $^1$  JAMSTEC,  $^2$  マリンワーク)
- D-8 10:24 深海底コア試料を用いた SIGEX 法によるレアメタル応答遺伝子の網羅的探索と解析
  - ○尾崎和弘,諸野祐樹<sup>1</sup>,寺田武志<sup>2</sup>,西川聡美,北村 萌,稲垣史生<sup>1</sup>, 芦内 誠, 若松泰介

(高知大・農, <sup>1</sup>JAMSTEC, <sup>2</sup>マリンワーク)

- **D-9** 10:36 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるオートインデューサー不活化機構の解析
  - ○Jasin Mansur, 森重なつみ, 飯田亮平, 島谷雅文, 阿座上弘行 (山口大・農)
- D-10 10:48 宿主グルタチオンを分解する植物病原菌エフェクターRipAY は宿主チオレドキシンにより活性化する

藤原祥子,大西浩平<sup>1</sup>,川添智貴,田中直孝,○田淵光昭 (香川大・農,<sup>1</sup>高知大・遺伝子)

- D-11 11:00 バクテリアのオピンコンセプトに関わるフラビン依存性オピン脱水素酵素 ○渡辺誠也 (愛媛大・農)
- D-12 11:12 植物葉上より分離した Methylobacterium spp.の系統解析とカルシウム依存的 PQQ 分泌機構の解析

  ○矢野裕之, 髙濵絵里香, 田中三男, 三井亮司

〇矢野裕之,髙濵絵里香,田中三男,三井亮司 (岡山理大・理)

D-13 11:24 *Gluconobacter thailandicus* に見出された *sldBA* パラログ遺伝子の機能解析 ○数田皓平,数井彩加,松谷峰ノ介¹,薬師寿治¹,松下一信¹,阿野嘉孝 (愛媛大・農,¹山口大・農)

#### 午 後

- D-14 13:30 anammox 菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析 ○平 大輔,古川憲治<sup>1</sup>,藤井隆夫 (崇城大・応生命,<sup>1</sup>熊本大院・自然)
- D-15 13:42 anammox 菌のヒドラジン合成酵素の X 線結晶構造解析 ○北村龍史, 平 大輔, 中村照也 ¹, 山縣ゆり子 ¹, 古川憲治 ², 藤井隆夫 (崇城大・応生命, ¹熊本大院・薬, ²熊本大院・自然)
- D-16 13:54 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c*'の熱安定性の比較研究
  ○加藤雄基、藤井創太郎、栗林貴明、政成美沙、三本木至宏(広島大院・生物圏)

- D-17 14:06 変異を導入した好熱菌由来シトクロム c'の熱安定性比較 ○山根大典,藤井創太郎<sup>1</sup>,三本木至宏<sup>1</sup> (広島大・生物生産,<sup>1</sup>広島大院・生物圏)
- D-18 14:18 大腸菌 K5 株へパロサン糖鎖合成酵素 KfiA の X 線結晶構造解析 ○堀 啓華, 大西 桃, 木村 誠, 角田佳充 (九大・農)
- D-19 14:30 超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp38 による RNA 活性化の作用機構に関する研究

   垣内洋祐,大嶋浩介¹,中島 崇¹,角田佳充¹,田中良和²,姚 閔²,木村 誠¹
   (九大・農,¹九大院・生資環,²北大院・先端生命)
- D-20 14:42 超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp29 の構造機能相関
  ○泉 健太,中島 崇¹,角田佳充¹,木村 誠¹
  (九大院・生資環,¹九大院・農)
- D-21 14:54 超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp21 の RNA 活性化部位の同定
   ○江 丹,泉 健太¹,中島 崇¹,角田佳充¹,木村 誠¹
   (九大院・シス生命,¹九大院・農)
- D-22 15:06 腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) のトキシン/アンチトキシンの機能解析
  ○張 晶,伊藤寛倫¹,棗 智紀¹,日野まど香²,中島 崇¹,角田佳充¹,
  木村 誠¹
  (九大院・シス生命,¹九大院・農,²西九州大・健康)

## E会場(2号館3階 第32講義室)<微生物(分離・代謝)>

午前

- E-1 9:00 簡便・高速な微生物分類・定量システムの解析精度向上のための PCR プライマー の検討
  - ○松本邦成,渡辺克二,堀西直人 (福岡工大・工)
- E-2 9:12 分裂酵母 coq5 破壊株において蓄積する 2 つの中間体の解析 ○柳井良太,赤井華子,西野耕平,戒能智宏,川向 誠 (島根大・生資)
- E-3 9:24 接合-相同組換えによる *rpoB* 遺伝子の部位特異的改変とシネフンギン増産効果 ○田村 隆,清水 瞳,小川沙織,根本理子,稲垣賢二 (岡山大院・環境生命)
- E-4 9:36 自然発生的変異による酢酸菌のケトグルコン酸代謝の変換 ○西原 彬, 片岡尚也¹, 藥師寿治¹, 松下一信¹, 阿野嘉孝 (愛媛大・農, ¹山口大・農)
- E-5 9:48 Gluconobacter 属酢酸菌におけるジヒドロキシアセトン代謝の生化学的解析
  ○平田花織, 阿野嘉孝¹, 松谷峰之介, 足立収生, 片岡尚也, 藥師寿治, 松下一信
  (山口大・農,¹愛媛大・農)
- E-6 10:00 Gluconobacter oxydans による 5-ケトグルコン酸発酵におけるグルコノ-δ-ラクトナーゼの役割 片岡尚也, 吉田知世, 種場理絵, 阿野嘉孝<sup>1</sup>, 松谷峰之介, 藥師寿治, 足立収生, ○松下一信 (山口大・農, <sup>1</sup>愛媛大・農)
- E-7 10:12 Bacillus 属細菌が生産するピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の同定と諸性質の解析
  ○松藤仁美,樋口裕次郎,竹川 薫
  (九大院・生資環)
- E-8 10:24 Penicillium multicolor が生産する 2 種類の  $\beta$  グルコシダーゼの基質特異性に関する 研究
  - ○菅沼笙子, 寺坂美紀, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命)

- E-9 10:36 糸状菌が生産する β-N-Acetylglucosaminidase 阻害剤 pochonicine の 6,7-ジデオキシ 類縁体
  - ○虫明優一, 土田 彩, 奥田 徹<sup>1</sup>, 神崎 浩, 仁戸田照彦 (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>東大・理)
- E-10 10:48 紅麹を用いたアルコール飲料の試醸とその特性 ○竹下良一,川野徳嗣,三枝敬明,寺本祐司 (崇城大院・応微工)
- E-11 11:00 小仕込みモデルを用いた生もと酒母における酵母の有機酸代謝特性 ○伊藤一成, 三宅剛史 (岡山県・工技セ)
- E-12 11:12 柑橘残渣利用を目的とした分離酵母のアルコール発酵特性 ○西村杏奈,松本優子,丸山雅史 (愛媛大・農)
- E-13 11:24 鮒ずしから分離した *Bacillus* sp. F-31 株の抗菌物質に関する研究 ○近藤慎之介,清水樹朗,丸山雅史 (愛媛大・農)
- E-14 11:36 ウシの糞便から分離された乳酸菌が生産するバクテリオシンの同定 ○大橋千紘¹, 杉野春貴¹, 須志田浩稔¹, 襲 皛¹, 石橋直樹¹, 善藤威史¹, 園元謙二¹,2 (¹九大院・農, ²九大・バイオアーク)

#### 午 後

- E-15 13:30 フィリピンの都市部と農村部に住む児童の腸内細菌叢の比較解析
  ○山本麻寿紗,本田倫子,田中 優,百田理恵¹, Ladie Palermo², Julie Tan²,
  Yuan Kun Lee³, 園元謙二¹, 中山二郎¹
  (九大院・生資環,¹九大院・農,²ビサヤ州大,³シンガポール国大)
- E-16 13:42 青枯病菌の持つ TonB-dependent receptor はバイオフィルム形成に関与する○渡邊諒介,木場章範,曳地康史,大西浩平(高知大・農)

- E-17 13:54 Effect of land-use change from paddy field on soil bacterial community in the hilly and mountainous area
  - OMd Rokunuzzaman, Yumiko Ueda <sup>1</sup>, Sota Tanaka <sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi <sup>1</sup> (Ehime Univ., <sup>1</sup> Kochi Univ.)
- E-18 14:06 バイオベース新素材「ポリ $\gamma$ グルタミン酸デカリニウム」の抗菌コーティング剤としての応用
  - 〇中山沢水,白米優一 $^{1}$ ,白馬弘文 $^{2}$ ,柴谷滋朗 $^{2}$ ,小林久人 $^{2}$ ,芦内 誠 $^{1}$  (高知大・農, $^{1}$ 高知大院・総人自, $^{2}$ 東洋紡(株))

#### F会場(本館3階 多目的ホール) <酵素・タンパク質>

午前

- F-1 9:00 67-kDa Laminin receptor 由来ペプチドを用いた抗腫瘍ワクチンの作製 ○日高詩織、鶴留ゆかり、熊添基文、立花宏文 (九大院・農)
- F-2 9:12 Effect of P2RY12 and CYP2C9 gene polymorphisms on the anti-platelet response of clopidogrel in the Bangladeshi percutaneous coronary intervention patients

  OMohammad Safiqul Islam, Mohammad Shahidur Rahman, Michael N. N. Nartey,
  Kazushige Yokota
  (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.)
- F-3 9:24 Crucial interactions of insect GABA receptors leading to competitive antagonism 
  Ogenyan Liu, Bente Frølund<sup>1</sup>, Fumiyo Ozoe, Yoshihisa Ozoe

  (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ., <sup>1</sup>Dept. Drug Des. Pharmacol.,
  Univ. Copenhagen)
- F-4 9:36 エクオリンカルシウムアッセイを利用したカイコオクトパミン受容体 BmOAR1 の 薬理解析 ○崎田 遼¹, 菅野暉子², 尾添嘉久³, 朝岡 潔⁴, 田中良明⁴, 森村 茂¹,², 新留琢郎¹,², 太田広人¹,² (¹熊本大・工,²熊本大院・自然,³島根大・生資,⁴生物研)
- F-5 9:48 カイコ生体アミン受容体 BmOAR1 と BmDopR2 の機能及び薬理学的性質の比較

  ○太田広人 <sup>1,2</sup>,菅野暉子 <sup>1</sup>,崎田 遼 <sup>2</sup>,平野汐奈 <sup>1</sup>,野田啓太 <sup>1</sup>,尾添嘉久 <sup>3</sup>,

  光増可奈子 <sup>1</sup>,柳沼利信 <sup>4</sup>,朝岡 潔 <sup>5</sup>,平島明法 <sup>6</sup>,森村 茂 <sup>1,2</sup>,新留琢郎 <sup>1,2</sup>

  (「熊本大院・自然, <sup>2</sup>熊本大・工, <sup>3</sup>島根大・生資, <sup>4</sup>名大院・生命農, <sup>5</sup>生物研, 
  <sup>6</sup>九大院・農)
- F-6 10:00 イシワケイソギンチャク由来新規 Ca<sup>2+</sup>依存性レクチン GJL-I の構造解析と糖認識機構の解明 〇中村 梓,及川大翔,森 紳伍,郷田秀一郎,海野英昭,畠山智充 (長崎大院・工)
- F-7 10:12 ウチムラサキ由来レクチン SPL の cDNA クローニング及び構造機能解析 ○板倉周平,細田耕平,須川穣二,郷田秀一郎,海野英昭,畠山智充 (長崎大院・工)

- F-8 10:24 ポア形成レクチン CEL-III の溶血活性に関与するアミノ酸残基の機能解析 ○長尾知直, 真崎理沙, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充 (長崎大院・工)
- F-9 10:36 アフリカパンノキレクチンの諸性質と結晶化 ○大西真人,下川倫子,加治屋勝子,南雄二,八木史郎 (鹿児島大院・農)
- F-10 10:48 マウス PAP ホスファターゼ gPAPP の結晶化及び硫酸転移活性測定への応用
  ○鶴田 萌 <sup>1</sup>, 劉 佳恒 <sup>2</sup>, 木村 誠 <sup>1,2</sup>, 角田佳充 <sup>1,2</sup>
  (<sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>九大院・シス生命)
- F-11 11:00 ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素の結晶構造に基づく硫酸化機構解明 ○田中槙之助,西依利晃,古城英貴,坂上功樹<sup>1</sup>,黒木勝久<sup>2</sup>,榊原陽一<sup>2</sup>, 水光正仁<sup>2</sup>,木村 誠<sup>1</sup>,角田佳充<sup>1</sup> (九大院・生資環,<sup>1</sup>九大・農,<sup>2</sup>宮崎大院・農)
- F-12 11:12 ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素を用いた硫酸化 Hirudin の調製 ○坂上功樹,田中慎之助 <sup>1</sup>,西依利晃 <sup>1</sup>,古城英貴 <sup>1</sup>,木村 誠 <sup>1</sup>,角田佳充 <sup>1</sup> (九大・農, <sup>1</sup>九大院・生資環)
- F-13 11:24 プロテオミクスによるゼブラフィッシュ PAPS 合成酵素の機能解明

  ○上中勝護 <sup>1</sup>, 上地珠代 <sup>2</sup>, 黒木勝久 <sup>1,3</sup>, 剣持直哉 <sup>2</sup>, Ming-Cheh Liu <sup>3</sup>, 水光正仁 <sup>1</sup>, 榊原陽一 <sup>1</sup>

  ( <sup>1</sup> 宮崎大・農, <sup>2</sup> 宮崎大・フロンティア, <sup>3</sup> トレド大・薬)

#### 午 後

- F-14 13:30 病原性真菌の持つ糖脂質分解酵素 EGCrP2 の基質認識機構解析

  ○本田智美 <sup>1</sup>,渡辺 昂 <sup>2</sup>,石橋洋平 <sup>2</sup>,沖野 望 <sup>2</sup>,木村 誠 <sup>1,2</sup>,伊東 信 <sup>2</sup>,

  角田佳充 <sup>1,2</sup>

  (<sup>1</sup>九大院・シス生命, <sup>2</sup>九大・農)
- F-15 13:42 結晶構造によるギンネム Mimosine 分解酵素の解析
  ○澤田玲良,鬼塚まなみ<sup>1</sup>, Dulal Borthakur<sup>2</sup>, Qing X.Li<sup>2</sup>, Ho Ng<sup>2</sup>, 木村 誠<sup>1,3</sup>, 角田佳充<sup>1,3</sup>
  (九大・農, <sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>Univ. Hawaii, <sup>3</sup>九大院・農)

- F-16 13:54 カイコ低分子量 GTP 結合タンパク質 RabX6 の結晶構造解析 ○劉 佳恒,梅本洋介,木村 誠¹,宇野知秀²,角田佳充¹ (九大院・シス生命,¹九大院・農,²神戸大・農)
- F-17 14:06 タンパク質結晶構造解析に基づく PKGII の活性化機構の解明
  ○小松弘明, 松田真弥, James C. Campbell <sup>1</sup>, 辻 明彦, Choel Kim <sup>1</sup>, 湯浅恵造(徳島大院・STS, <sup>1</sup>Baylor College of Medicine)
- F-18 14:18 GH2 ファミリー由来エキソ-β-D-ガラクトフラノシダーゼの基質特異性の解析 ○松永恵美子,八色奈央,豊田早紀,岡 拓二<sup>1</sup>,樋口裕次郎,竹川 薫 (九大院・農, <sup>1</sup>崇城大・生物生命)
- F-19 14:30 Comparative analysis of ulvan-degrading enzymes from various ulvan-degraders

  ○何 川, 高橋 亮 ¹, 大西浩平 ¹

  (愛媛大院・連農, ¹高知大・農)
- F-20 14:42 *Nostoc punctiforme* 由来 L-トリプトファン脱水素酵素の構造機能解析 ①北村 萌,櫻庭春彦 <sup>1</sup>,芦内 誠,大西浩平 <sup>2</sup>,大島敏久 <sup>3</sup>,若松泰介 (高知大・農, <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>高知大・総研セ, <sup>3</sup>阪工大・工)
- F-21 14:54 イタドリ(Polygonum cuspidatum) の葉に含まれるチロシナーゼ阻害物質○野村 凜, 栗田せりか, 木下あゆみ, 市田彩香, 島村智子, 柏木丈拡, 受田浩之(高知大・農)

## シンポジウム

- がんイメージングにおける蛍光顕微鏡とケミカルバイオロジーの進歩
- 2. 天然のプロテインキナーゼ C リガンドの単純 化による抗がん剤シーズの開発研究
- 3. 硫酸化の基礎研究から応用研究へ

#### S-1 がんイメージングにおける蛍光顕微鏡とケミカルバイオロジーの進歩

今村健志 (愛媛大院・医)

近年、がん研究分野において、ケミカルバイオロジーの導入・応用展開が飛躍的に進み、 従来の化合物を用いたがんの病態解明研究や分子標的治療薬など創薬へのケミカルバイオロジー 応用のみならず、化学のデザイナビリティーやフレキシビリティーを駆使したがんイメージングプローブへのケミカルバイオロジー応用に大きな期待が集まっている。

本発表では、蛍光技術を駆使して生体内で細胞や分子を解析するイメージング技術について、がん研究分野における応用展開を、ケミカルバイオロジーを応用したがんイメージングプローブ開発を含めて紹介する。特に、機能的蛍光タンパク質を発現するがん細胞やケミカルバイオロジーを駆使したさまざまな蛍光有機小分子プローブを用いたマウスがん移植モデルにおけるがんとがん微小環境の相互作用の研究例を紹介する。具体的には、蛍光有機小分子プローブを用いたがん新生血管のイメージング、血管新生阻害剤の治療効果判定におけるそのイメージングの有用性、蛍光有機小分子プローブを用いた血管、プロテアーゼ活性とがん細胞などの多元的蛍光イメージングの例を紹介する。さらに、細胞や動物が生きたまま細胞周期を解析できる Fluorescent Ubiqutination-based Cell Cycle Indicator (Fucci)システムを用いて、骨に転移したヒト乳がん細胞の細胞周期のイメージングをおこなった実験結果を紹介する。

一方, 蛍光顕微鏡の技術革新として, より生体深部のイメージングのためにわれわれが開発した新規補償光学型長波長2光子励起顕微鏡の開発研究例を示す。具体的には, 骨のように散乱や屈折率差によるインデックスミスマッチにより, 画像が劣化しやすい組織において深部観察を実現するために, まず, 散乱の問題問題を解決するために, 光パラメトリック発振による既存の超短パルスレーザーの長波長化, さらに, 屈折率差の問題を解決するために, 補償光学を応用して波面を補正し, 屈折率差によるインデックスミスマッチを改善することを試みた。

以上を踏まえ、蛍光生体イメージングの技術革新とケミカルバイオロジーの応用の現状と 今後、さらにその医学研究・創薬応用の可能性について考察する。 参考文献:

- 1) Sakaue-Sawano A *et al.*: Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell.* 132, 487-98, 2008.
- 2) Katsuno Y *et al.*: Bone morphogenetic protein signaling enhances invasion and bone metastasis of breast cancer cells through Smad pathway. *Oncogene.* 27, 6322-33, 2008.
- 3) Hanyu A *et al.*: Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Sci.* 100, 2085-92, 2009.
- 4) Dan S *et al.*: ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. *Eur. J. Cancer*. 48, 936-43, 2012.
- 5) Oshima Y *et al.*: Intravital multiphoton fluorescence imaging and optical manipulation of spinal cord in mice, using a compact fiber laser system. *Lasers Surg. Med.* 46, 563-72, 2014.
- 6) Koga S *et al.*: In vivo subcellular imaging of tumors in mouse models using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody in TPEM. *Cancer Sci.* 105, 1299-306, 2014.
- 7) Maruyama A *et al.*: Wide field intravital imaging by two-photonexcitation digital-scanned light-sheet microscopy (2p-DSLM) with a high-pulse energy laser. *Biomed. Opt. Express.* 29, 3311-25, 2014.
- 8) Kiyomatsu H *et al.*: Quantitative SHG imaging in osteoarthritis model mice, implying a diagnostic application. *Biomed. Opt. Express.* 6, 405-20, 2015

## S-2 天然のプロテインキナーゼCリガンドの単純化による抗がん剤シーズの 開発研究

入江一浩(京大院・農)

天然には特異な生理活性を有する複雑な化合物が数多く存在しており、これらは様々な疾病に対する治療薬の候補化合物として注目されてきた。しかしながら、天然物が医薬品になった例はそれほど多くない。天然物は多くの生物に対して毒性を示すように複雑化した一種の鍵束と考えられることが、その理由の一つと思われる。従って、構造が複雑な天然物を単純化することにより、特定の生理活性のみを示す鍵に分解できれば、それらは有望な医薬品シーズになるかも知れない。本講演では、がん細胞増殖抑制活性とともに発がん促進活性や激しい炎症活性を有するアメフラシ由来の天然毒である debromoaplysiatoxin (DAT) の骨格を利用した、新規抗がん剤シーズの開発に関する筆者らの試みを紹介する(Irie, K. and Yanagita, R. C., Chem. Rec. 2014, 14, 251)。

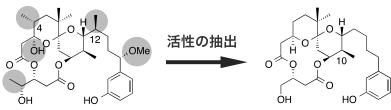
ホルボールエステルに代表される天然のプロテインキナーゼ C (PKC) リガンドは,数種のがん細胞に対して顕著な細胞増殖抑制活性を示すことが知られていたが,その強力な発がん促進活性と炎症作用のため,抗がん剤としての使用は制限されている。一方,フサコケムシ由来のブリオスタチンのような発がん促進活性をもたない PKC リガンドも存在し,抗がん剤としての応用が精力的に進められている (Wender, P. A. et al., Acc. Chem. Res. 2015, 48, 752)。筆者らは、PKC の内因性リガンドであるジアシルグリセロールの配座固定アナログと考えられる DAT に注目し,本化合物の構造単純化による新規抗がん剤シーズの開発に着手した。

天然 PKC リガンドにおいて,発がん促進活性と分子疎水性との間に相関が認められていたことから, DAT の不斉メチル基,メトキシ基を取り除き,さらに脱水の原因となるヘミアセタール性水酸基を水素で置換した aplog-1 を設計した。本化合物は,数種のがん細胞に対して顕著な細胞増殖抑制活性を示した一方で,DAT のような発がん促進活性や炎症作用を示さなかった(Nakagawa, Y. et al., J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 7573)。しかしながら,本化合物のがん細胞増殖抑制活性は DAT と比べて低かったので,本化合物の構造最適化を行った。

まず側鎖の芳香環に様々な置換基を導入したところ,分子疎水性の最適値が存在することが明らかになった( $\log P \sim 4.5$ )。次に,スピロケタール部分の不斉メチル基を系統的に導入した誘導体を合成したところ,10-methyl-aplog-1 が aplog-1 の約 10 倍高いがん細胞増殖抑制活性ならびに PKC への結合能を示した一方で,発がん促進ならびに炎症活性をもたないことが判明した(Kikumori, M. et al., J. Med. Chem. 2012, 55, 5614)。それに対して,4位あるいは12位へのメチル基の導入によるがん細胞増殖抑制活性の増強は,あまり認められなかった。

10-Methyl-aplog-1 の 39 種類のヒトがん細胞パネルにおけるプロファイル (選択性) は,既存の抗がん剤とは異なっており,新規抗がん剤シーズとして有望と考えられた。そこで, in vivo での抗がん試験を行うとともに作用機構を明らかにするため,本化合物の合成経路の改善に取り組んだ。当初は 28 段階の反応が必要であったが,連続不斉中心の構築の簡略化と保護基の不要な官能基選択的反応などを検討することにより,23 段階,数百ミリグラムスケールでの合成に成功した (Kikumori, M. et al., Tetrahedron 2014,70,9731)。10-Methyl-aplog-1 は,移植がん動

物モデルを用いた抗がん 試験においても,がん細胞 増殖抑制活性を有意に示 すことを確認した。さら に,がん細胞増殖抑制機構 を明らかにするため, aplog-1 の分子プローブを 合成し,細胞内における標 的探索も行っている。



Debromoaplysiatoxin

発がん促進性・炎症性 がん細胞増殖抑制活性

10-Methyl-aplog-1

非発がん促進性・非炎症性 強力ながん細胞増殖抑制活性

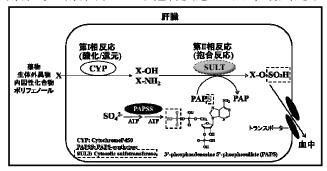
水光正仁(宮崎大・農)

生体にとって異物である医薬、農薬および食品成分等は、体内で様々な代謝を受ける。殺虫剤は、昆虫の皮膚を透過しやすいように、極性が比較的小さい親油性の化合物が多いが、 生化学的構造変化は、極性を高める方向に進行するのが普通である。

薬物代謝酵素による解毒代謝機構は、第I相反応と第II相反応、そして第III相反応の3つに大別されている。第I相反応とは、チトクロム P450(CYP)を代表とする酵素群による生体外異物の酸化、還元、加水分解反応によって、OH 基あるいは COOH 基、NH2 基などの極性官能基が生成・導入される反応をいう。CYP は、薬物代謝反応の約8割に関与するといわれ、現在、哺乳動物において約200の分子種が確認されている。それに続く第II相反応は、グルクロン酸転移酵素、硫酸転移酵素、グルタチオン転移酵素等の酵素群による抱合反応であり、第I相反

応で導入される官能基よりも極性の高い置換基を導入し、さらに高度な水溶性を獲得することから、真の解毒作用とされる。最終的に、第III相反応として、ABC または SLC トランスポーターなどの薬物トランスポーターが、受動輸送や能動輸送により代謝物を尿中、胆汁中へ排泄する。

第II相反応の酵素の一つである硫酸転移酵素による抱合反応は、図に示すように生



体内で唯一の硫酸供与体である活性硫酸 PAPS(3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate)の硫酸基をヒドロキシル基またはアミノ基を有する化合物に転移する反応である。我々は、これまで、この細胞質硫酸転移酵素(SULT)に焦点を当て、網羅的な SULT ファミリーのクローニングと基質特異性等の検討を行ってきた。その結果、他の第II相反応酵素と同様、SULT ファミリーは遺伝子スーパーファミリーを形成しており(現在、ヒト 14 種類、マウス 17 種類、ゼブラフィッシュ 18 種類の存在が確認されている)、基質となる化合物は、内分泌撹乱物質等の生体外異物、医薬品、食品成分、内因性化合物(ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン等)と多岐におよぶことが明らかとなった。本シンポジウムでは、これまでに得られた生体内における無機硫酸の活性化と硫酸転移酵素に関する知見、特に興味ある機能を持つプロリン/セリンリッチC末端付加配列を有する硫酸転移酵素(SULT2B1)について紹介したい。

また,近年,通常は不活性化されると考えられていた第Ⅱ相反応後の代謝産物(メタボライト)が,様々な細胞応答に関与し、多くの疾病に関わる G タンパク質共役型受容体(GPCR)に作用し機能することが報告された。メタボライトである硫酸抱合体においても同様に GPCR へ作用する可能性が想定されるが,硫酸抱合体の生理機能は未解明のままである。そこで本シンポジウムでは,もう一つのトピックである生体外分子硫酸抱合体の GPCR への作用に焦点をあて、GPCR に対する機能評価系の構築および硫酸抱合体の生理機能についても紹介したい。

以上の研究は、生体外異物分子硫酸抱合体が GPCR を介して細胞のシグナル伝達系に関与する可能性が示唆されるなど、これまでの硫酸化の常識を一新させる大きな成果となった。

- 参考文献 1) Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Eur. J. Pharm. Sci., 62, 40-48 (2014)
- 2) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Kurogi, K., Suiko, M., J. Biochem., 155, 91-97 (2014)
- 3) Kurogi, K., Sakakibara, Y., Suiko, M., Drug Metab. Rev., 45, 431-440 (2013)
- 4) Hashiguchi, T., Sakakibara, Y., Suiko, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 434, 829-835 (2013)
- 5) Biosci. Biotechnol. Biochem., 75, 1951-1956 (2011), 6) FEBS J., 277, 3804-3811 (2010)

 一般
 講演

 講演
 要旨

### A-1 ダイゼインの雌特異的食欲低下作用と食欲制御因子の変動 〇泉 智明,阿部恭大,藤谷美菜,岩原麻美,岸田太郎(愛媛大・農)

【目的】我々は大豆イソフラボン・ダイゼインに雌特異的な食欲低下作用があることを既に明らかにしている。この機構解明の一助として、エネルギー恒常性と体重を制御する多くの末梢シグナルや神経経路の焦点である視床下部での神経伝達物質の発現プロファイル変動をとらえることに取り組んでいる。本研究では、1日3回一定時刻、一定時間食餌を与えることで摂食パターンを揃え、視床下部の食欲に関連する神経伝達物質を測定した。

【方法・結果】6週齢のSD雌ラットにコントロール飼料またはダイゼインを150 mg/kg添加したダイゼイン飼料を与え、2週間飼育した。実験1では、暗期開始直後、3時間後、6時間後に、実験2では、暗期開始直後、4時間後、8時間後に飼料を与えた。解剖は3食それぞれの摂食前後に行った。実験1ではNPY、実験2ではPOMC、CARTにおいてダイゼインの効果に関与すると推測される変化がみられた。

### A-2 体エネルギー蓄積に基づくビートファイバーのエネルギー評価 〇宗像 嶺, 土井 悟, 岸田太郎 (愛媛大・農)

【目的】ビートファイバー (BF) エネルギーのエネルギー価は、1.5 kcal/g とされているが動物実験における根拠は示されていない。本研究ではラット体エネルギー蓄積を指標に BF のエネルギーを調べた。

【方法】4週齢オスSD系ラットに毎日、7gの基本飼料にスクロースまたはBFを $0\sim2.0$ gを添加した飼料をそれぞれ摂食させ20日間飼育した。飼育後、体組成を分析し、体エネルギーを算出した。なおラットを飼育初日に解剖・分析し体エネルギー蓄積の原点とした(baseline)。

【結果】体エネルギー蓄積量(kcal)と 20 日間で摂取されたスクロースまたは BF 量(g)の関係は、スクロース群: y=1.3829x+49.523,BF 群: y=0.2992x+51.75 であった。スクロースのエネルギーを 4 kcal/g として関係式の傾きから比例計算すると BF のエネルギーは 0.87 kcal/g と推定された。この値は 1.5 kcal/g に比べ低い値のため BF の熱量は見直されるべきであると考えた。

# A - 3 OVX ラット 3 食制におけるダイゼイの食欲抑制の機構の検討 ○阿部恭大、泉 智明、岸田太郎(愛媛大・農)

【目的】大豆イソフラボンの一種であるダイゼインは、腸内細菌によってエコールへと代謝され、メス特異的な摂食抑制効果を示す。機構解明を目指し、1日3回決まった時間・時刻に摂食させる3食制を導入し食餌タイミングを揃えて食欲制御因子をプロファイリングすることを試みている。以前の実験ではIntactのラットにおいてダイゼイン摂取により飼料摂取量が低下したものの効果が小さく、食欲制御因子の変化にも乏しかった。一方卵巣摘出(OVX)ラットは摂食量が安定し過食傾向にあるためダイゼインの効果が顕著に現れることが分かっている。そこで本研究ではOVX ラットを用いた検討を試みた。

【方法・結果】5週齢SD系雌Intact および卵巣摘出(OVX)ラットをそれぞれコントロール飼料(C),0.03%ダイゼイン飼料(D)の飼料を与える群にわけ、計4群とした。1日3回の各1時間飼料を与え、摂食量を測定し、本飼育を2週間行った。2食目の食前に解剖を行い、断頭後視床下部を採取し、遺伝子発現を測定した。結果は総飼料摂取量、体重、体重増加においてダイゼイン摂取により、有意に減少し、視床下部では食欲抑制因子であるPOMCの発現が有意に減少した。

### A-4 ビートファイバーの摂取エネルギー低下効果の機構解明 —3 食制条件下・DIO 解析によるアプローチ— 〇土井 悟, 宗像 嶺, 岸田太郎(愛媛大・農)

【目的】これまでの実験でビートファイバー (BF) によるラットの摂取エネルギー低下作用は脳の視床下部でのレプチンレセプター (Ob-Rb) 遺伝子発現の増加が関与していることが示唆された。そこで、BF 摂取の視床下部遺伝子発現への影響さらに明確に捉えるために1日に3回の摂食に制限する3食制実験を試みた。

【方法・結果】SD 系雄ラットを搬入後、コントロール飼料またはBF を 7%添加したBF 飼料を与え4週間飼育した。毎日暗期開始直後、5 時間後、10 時間後に30 分間飼料を与えた。BF 摂取により摂取エネルギーが顕著に減少した2 食目の摂食前後に解剖を行った。飼育期間中の体重の増加量をもとに体重増加量の大きいもの上位2/3 を肥満傾向性ラット、下位2/3 を肥満抵抗性ラットと細分化し、データを解析した。摂食前の肥満抵抗性ラットのOb-Rb が BF 摂取により増加傾向を示した。その他遺伝子発現は現在測定中である。

A - 5LED 照射リポソーム膜モデルとマウス繊維芽細胞の光増感酸化反応に対するフコキサンチン・ネオキサンチンの作用解明〇岩中麻美,曽我真美子,小竹(奈良)英一¹,長尾昭彦¹,高橋 章²,寺尾純二(徳島大院・食品,¹食総研,²徳島大院・予防)

カロテノイドは、光増感酸化反応を抑制することにより皮膚の光老化を抑制することが期待されている。本研究の目的は、LED 照射による光増感反応に対するフコキサンチン (FX) とネオキサンチン (NX) の作用を明らかにすることである。照射光源として LED(波長 463 nm)を用い、光増感物質としてヘマトポルフィリン (HP) 含むリポソーム膜に光増感作用を惹起させ、生成する PC-hydroperoxides (PC-OOH)を TLC 定量した。LED 照射に対して FX、NX 自体には光増感能はみられず、一方で HP 増感酸化反応の抑制作用が示された。その少なくとも一部は一重項酸素消去作用に由来することが明らかであった。次に、マウス繊維芽細胞(NIH-3T3) 培養系においても FX と NX は光増感酸化反応を抑制することを TBRAS法、DCFH 法により確認した。本培養細胞においてコラーゲン分解酵素である matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) のタンパク発現に対する LED 照射と FX、NX 添加の影響についても報告する。

A-6 血管内皮細胞における酸化ストレス誘導の caveolin-1 リン酸化に対するケルセチン及びその代謝物の効果 〇近藤あかり、鎌田智英実、向井理恵、寺尾純二(徳島大院・栄養)

【目的】血管内皮細胞の細胞膜に存在する caveolae の主要構成タンパク質である caveolin-1 (cav-1)のリン酸化は血管透過性の亢進を介して動脈硬化発症に寄与することが示唆されている。一方,食事由来フラボノイドは血管透過性を抑制することが知られている。そこで,本研究は内皮細胞培養系を用いて,酸化ストレスにより誘導される cav-1 のリン酸化およびその上流におけるシグナル経路に対する quercetin (Q) 及び Q 代謝物の作用を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC) に,  $2 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ を 0.5 時間処理することで cav-1 のリン酸化が誘導されることを確認した。Q あるいは Q の O-メチル化体である isorhamnetin ( $10 \, \mu$  M) を 24 時間前処理した場合, $H_2\text{O}_2$  による cav-1 のリン酸化は抑制されたが,抱合体代謝物である quercetin 3-glucuronide では抑制効果がなかった。Q 抱合体はアグリコンに変換後,caveolae 中の cav-1 のリン酸化抑制を介して血管透過性を抑える可能性が示された。

### A - 7 s-ニトロシル化をターゲットとした抗酸化食品成分探索法の検討 〇芳村俊広<sup>1</sup>, 黒木勝久<sup>1,2</sup>, 水光正仁<sup>1,2</sup>, 榊原陽一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>宮崎大院・農工, <sup>2</sup>宮崎大・農)

【目的】タンパク質のシステイン残基に一酸化窒素 (NO)が付加する s-ニトロシル (SNO) 化と呼ばれる翻訳後修飾がタンパク質機能制御の新しいパラダイムとして注目されている。SNO 化はタンパク質の機能を負に制御することで様々な疾病の原因となることが知られ, SNO 化を抑制することができれば関与する疾病の予防または治療に繋がると考えた。そこで、我々が以前検討した蛍光色素を用いた SNO 化タンパク質検出方法を利用することで食品成分の中から SNO 化還元能を持つ成分のスクリーニングを行った。

【結果および考察】モデル化合物として Trolox を CyDye-Switch 法で評価したところ SNO 化還元能を検出することができた。また、一般的に抗酸化能を持つと言われる 11 種類の食品成分を評価したところ Gluthathione (GSH)、Epigallocatechin gallate (EGCG) において非常に強い SNO 化還元能を検出することができた。本研究より CyDye-Switch 法は食品成分における SNO 化還元能の評価に利用可能であることを示し、GSH、EGCG は SNO 化による疾病の予防・治療に有効である可能性が示された。

### A - 8 黒酢の脱顆粒抑制作用に関する研究 〇粟根聖次、石田萌子、西 甲介、長野正信<sup>1</sup>、橋口和典<sup>1</sup>、藤井 暁<sup>1</sup>、 菅原卓也(愛媛大・農、<sup>1</sup>坂元醸造)

【目的】黒酢の様々な保健機能性はこれまでに報告されているものの、脱顆粒抑制作用による抗アレルギー効果に関する報告はない。そこで本研究では、ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 細胞、および受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルマウスに対する黒酢の脱顆粒抑制効果と作用機構の解明を目的とした。

【方法・結果】凍結乾燥を繰り返すことで酢酸を除去し、10 倍濃縮した黒酢を用いた。RBL-2H3 細胞の脱顆粒に及ぼす影響を検討した結果、黒酢は濃度依存的に脱顆粒を抑制した。その作用機構を検討したところ、脱顆粒シグナル伝達分子である Syk、および PI3 キナーゼのリン酸化による活性化を下方制御することで、脱顆粒を抑制することが示唆された。さらに、生体内での脱顆粒に及ぼす黒酢の影響について、PCA モデルマウスを用いて検討した。その結果、黒酢を経口投与することで、アレルゲン刺激による血管透過性亢進の抑制が認められた。これらのことから、黒酢は生体内においても脱顆粒を抑制し、抗アレルギー効果を示すことが示唆された。

### A - 9 ホウレンソウ水溶性抽出物の免疫賦活活性に関する研究 〇石田萌子、大瀬彩文、西 甲介、菅原卓也(愛媛大・農)

【目的】ホウレンソウには多様な保健機能成分が含まれているが、免疫賦活活性を有する水溶性成分に関する報告はない。本研究では、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞、およびマウス腹腔内マクロファージに対するホウレンソウ水溶性抽出物 (SAE) の免疫賦活活性とその作用機序の解明を目的とした。

【方法・結果】SAE を添加した培地で各細胞を培養し、培養上清中の IL-6、および TNF- $\alpha$  産生に及ぼす影響を検討した。その結果,J774.1 細胞,および腹腔内マクロファージの両方で,サイトカイン産生の促進が認められた。リアルタイム RT-PCR の結果から,SAE はサイトカイン遺伝子の転写活性を促進してサイトカイン産生を活性化することが示唆された。その作用機序を検討したところ,SAE は MAPK ファミリーである JNK,および p38 のリン酸化,および NF- $\kappa$ B の核内移行を上方制御することで,サイトカイン遺伝子の転写活性を惹起することが明らかになった。さらに SAE は,J774.1 細胞の貪食活性を促進した。これらのことから,SAE は JNK や p38 のリン酸化,および NF- $\kappa$ B の核内移行を上方制御することで,マクロファージを活性化する免疫賦活活性を有することが明らかになった。

# A-10 スサビノリ由来硫酸化多糖体ポルフィランのマクロファージ刺激抑制作用に関する研究

井坂章吾、山口健一、上野幹憲、〇小田達也(長崎大・水産)

【目的】スサビノリの主要成分である硫酸化多糖体ポルフィランは、様々な生理活性を示す事が知られている。近年、生長不良による色落ちノリ問題が深刻化している。本研究では、色落ち及び正常ノリからポルフィランを抽出し、その生物活性について比較検討した。

【方法】熱水抽出によりポルフィラン画分を得,種々のクロマトグラフィーに供した。生物活性として LPS 刺激 RAW264.7 細胞に対するポルフィランの影響を調べた。

【結果】ポルフィランの収率は色落ちノリの方が正常ノリより約2 倍高かった。正常ノリ及び色落ちノリ由来粗ポルフィランの平均分子量はそれぞれ220,000 及び30,000 であったが、糖組成は両者で大差なかった。LPS 刺激によるRAW264.7 細胞からのNO 産生に対して色落ちノリ由来ポルフィランのみ強い抑制効果がみられた。活性のみられた色落ちノリ由来粗ポルフィランを陰イオン交換クロマトグラフィーに供し、素通りした画分に強い活性が検出された。

### A - 11 緑茶カテキン EGCG のメラノーマにおける microRNA 発現調節作用 〇山田脩平、牧尾彰子、立花宏文(九大院・農)

【目的】緑茶カテキンの主成分である (一)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) は67-kDa laminin receptor (67LR) を介して抗がん作用や抗アレルギー作用など多彩な生体調節作用を発揮する。近年,機能性短鎖RNAであるmicroRNA (miRNA) が遺伝子の発現調節に重要な役割を担っており,様々な生命現象に関与することが明らかとなってきた。本研究では,メラノーマにおけるEGCGのmicroRNA発現調節作用を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】マウスメラノーマ細胞株B16において,miRNA発現に対するEGCGの影響をマイクロアレイにより網羅的に解析し,EGCGが発現を増加させるmiRNAとしてlet-7bを同定した。また,EGCGがlet-7bの発現を増加させることでがん遺伝子の一種であるhigh mobility group A2 (HMGA2) の発現を低下させることを明らかにした。EGCGがlet-7bの発現を増加させるメカニズムを解明するため,EGCGの抗メラノーマ作用を仲介する経路を担う分子である67LRおよびprotein phosphatase 2A (PP2A) の関与を検討した。67LRのノックダウンおよびPP2Aの阻害により,EGCGのlet-7b発現増加作用が消失したことから,EGCGは67LR/PP2A経路を介してlet-7bの発現を増加させることが示された。

### A - 12 PDE3 阻害剤は緑茶カテキン EGCG の膵臓がん転移抑制作用を増強する の熊添基文、高井美佳、立花宏文(九大院・農)

【目的】我々は緑茶ポリフェノール Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) が腫瘍細胞に高発現する 67-kDa Laminin Receptor (67LR) への結合を介し、cGMP 産生を誘導することで抗がん作用を発揮することを明らかにした¹。そこで本研究では cGMP 分解酵素の一種である Phosphodiesterase 3 (PDE3) を阻害することによる EGCG の膵臓がんに対する抗がん作用の増強を試みた。

#### 【方法・結果】

ヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 を移植した BALB Cnu/Crlj マウスに EGCG 及び PDE3 阻害剤を投与し、腫瘍成長に対する影響を検討した。その結果、EGCG もしくは PDE3 阻害剤を単独で投与した群では抗がん作用が観察されなかったのに対し、EGCG と PDE3 阻害剤を投与した群では顕著な腫瘍成長抑制作用及び転移抑制作用を示した。

1) J. Clin. Invest. 123, 787-799 (2013)

### A-13 イチゴ由来ペクチンの IgE 産生抑制作用 〇矢野 栞、井上祐一、川原浩治(北九州高専・物質化)

【目的】これまでに我々は、ヒト末梢血単核球を用いた in vitro アレルギーモデルにおいて特定品種のイチゴ抽出物が IgE 産生を抑制することを見出した。また、イチゴ成分の解析により、IgE 産生抑制因子の一つがペクチンなどの多糖類であることが示唆された。そこで本研究では、イチゴ由来ペクチンの IgE 産生への影響について検討した。

【方法・結果】イチゴから性質の異なる4種類のペクチンを抽出し、ヒト多発性骨髄腫由来細胞株 U266 を用いて IgE 産生への影響を調べた。その結果、アルカリ可溶性ペクチンが有意に IgE の産生を抑制することが分かった。また、ヒト末梢血単核球を用いた場合でもアルカリ可溶性ペクチンは IgG や IgM の産生には影響を及ぼすことなく、IgE を抑制していた。したがって、イチゴ由来ペクチンの中でもアルカリ可溶性ペクチンがイチゴ抽出物中の抗アレルギー因子の一つであると考えられた。

### A-14 乳酸菌の菌体表面 GAPDH による IgE 産生抑制作用 〇熊谷祐二, 井上祐一, 川原浩治 (北九州高専・生産デ)

【目的】これまでに我々は特定品種のイチゴ抽出物が in vitro アレルギーモデルにおいて IgE 産生を抑制すること,そしてアトピー性皮膚炎モデルマウスのアレルギー症状を改善することを明らかにしてきた。また,イチゴ成分の解析により,IgE 産生抑制因子の一つが Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) であることを見出した。そこで本研究では,抗アレルギー作用が報告されている Lactobacillus rhamnosus の菌体表面 GAPDH の IgE 産生抑制作用の検討を行った。

【方法・結果】37°Cで 24 時間嫌気培養した *L. rhamnosus*(NBRC3831)を超純水で洗浄した後に、4°Cの PBS で 30 分間インキュベートし、菌体表面タンパク質を抽出した。抽出物から、疎水性相互作用クロマトグラフィーにて GAPDH を精製し、ヒト末梢血単核球を用いた *in vitro* アレルギーモデルにおいて IgE 産生への影響を調べた。その結果、*L. rhamnosus* 表面 GAPDH は IgE 産生を抑制した。したがって、乳酸菌の抗アレルギー作用に GAPDH が関与している可能性が示唆された。また、イチゴと乳酸菌 GAPDH の共通配列である IGRL のオリゴペプチドも IgE 産生を抑制した。

### A - 15 老化促進マウス(SAMP8)における酒粕含有機能性成分摂取の影響 〇伊豆英恵<sup>1</sup>, 柴田紗知<sup>2</sup>, 飯島遼平<sup>3</sup>, 藤井 カ<sup>1,3</sup>, 松原主典<sup>2</sup> (<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>広島大院・教育, <sup>3</sup>広島大院・生物圏)

【目的】清酒醸造副産物の酒粕は米麹と清酒酵母を含む発酵食品で、体内でメチル基供与体、コリン供給源となる S-アデノシルメチオニン(SAM)、 $\alpha$ -グリセロホスホコリン(GPC)を含有する。我々は酒粕の機能性解明を最終目的とし、まずこれらの経口摂取の影響を SAMP8 で検討した。

【方法・結果】SAMP8(4 週齢,オス,各群 10 匹)に(A)水,(B)SAM 水溶液(0.1 mg/mL),(C)  $\alpha$ -GPC 水溶液(0.07 mg/mL),(D)SAM+ $\alpha$ -GPC 水溶液を 10  $\gamma$ 月間,自由摂取させた。明暗箱試験で(B)群が抗不安作用を示し,(C)(D)群も同様な傾向が見られた。(B)群の握力が増加し,(C)(D)群も傾向が見られた。(B)(C)(D)群とも日周期異常が改善傾向で,(D)群で最も効果が高かった。現在,11  $\gamma$ 月齢であるが,(D)群の生存率が最も高く,SAM と $\alpha$ -GPC の両成分摂取による抗老化及び加齢に伴う疾病リスク低減の可能性が示唆された。今後,酒粕摂取で検討を行う予定である。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」で実施した。

### A-16 ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏が線虫(C. elegans)の学習能と記憶保持能に及ぼす影響 〇美藤友博, 薮田行哲, 河野 強, 渡邉文雄(鳥取大・農)

【目的】ビタミン  $B_{12}$  ( $B_{12}$ ) 欠乏性神経障害の詳細な発症メカニズムを解明するために、記憶・学習能の評価が容易である線虫 (*Caenorhabditis elegans*) に着目した。これまでに  $B_{12}$  欠乏線虫は著しい酸化ストレス障害を呈することを明らかにしたため、本研究では  $B_{12}$  欠乏が線虫の学習能および記憶の保持に及ぼす影響を詳細に検討すると共に、抗酸化物質の学習および記憶障害の予防効果を検討した。

【方法・結果】コントロール線虫と  $B_{12}$ 欠乏線虫は  $B_{12}$ 添加および  $B_{12}$ 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。線虫に食餌と NaCl を関連付けさせる連合学習アッセイで線虫の学習能を測定したところ, $B_{12}$ 欠乏線虫はコントロール線虫と同程度の学習能を示したが,学習により獲得した記憶の保持能を継時的に評価した結果, $B_{12}$ 欠乏線虫はコントロール線虫に比べて記憶保持能が顕著に低下していた。また,ビタミン E やグルタチオン等の抗酸化物質を添加した培地で調製した  $B_{12}$ 欠乏線虫は、酸化ストレスが解消されたものの記憶保持能の低下は完全には緩和されなかった。以上の結果から, $B_{12}$ 欠乏線虫の記憶保持能の低下には酸化ストレス以外の要因も関連していると推察された。

### A - 17 ピータンに含まれるビタミン B<sub>12</sub> 化合物の特性 〇滕 飛, 竹中重雄<sup>1</sup>, 薮田行哲, 渡邉文雄 (鳥取大院・連農, <sup>1</sup>阪府大院・生命環境)

【目的】ピータン (Pidan) はアヒルの卵を強いアルカリ性の条件下で貯蔵して製造する中国の食品である。ビタミン  $B_{12}$  ( $B_{12}$ ) はアルカリ性で不安定なため,卵に含まれる  $B_{12}$  が分解して  $B_{12}$  含量が著しく減少する可能性がある。しかし,ピータンの  $B_{12}$  含量や  $B_{12}$  化合物に関する知見は少ない。そこで,今回ピータンの  $B_{12}$  含有量と  $B_{12}$  化合物の特徴を検討した。【方法・結果】ピータンから  $B_{12}$  の抽出・定量は,日本食品成分表で採用される Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis ATCC 7830 を用いた微生物的定量法で測定した。また,含有される  $B_{12}$  化合物は  $E.\ coli\ 215$  による TLC バイオオートグラムと LC/ESI-MS/MS で詳細に分析を行った。ピータンの卵黄の  $B_{12}$  含量は  $100\ g$  あたり約  $1.90\ \mu g$  であったが,卵白にも  $0.83\ \mu g$  程度の  $B_{12}$  が検出された。 $E.\ coli\ 215$  のバイオオートグラムと LC/MS/MS 分析では,卵黄と卵白の両方おいて真の  $B_{12}$  のみが検出された。ピータンの卵黄及び卵白の  $B_{12}$  の存在量を検討中である。

### A-18 魚肉タンパク質摂取による筋重量増加効果はアルギニンによるものではない 〇原 由真,澤井真梨子,山本晋平,速水耕介<sup>1</sup>,韓 カ<sup>2</sup>,辻 智子<sup>2</sup>, 岸田太郎(愛媛大・農,<sup>1</sup>横浜薬大・薬科,<sup>2</sup>日本水産(株))

【目的】これまでにラットにおいてスケトウダラ魚肉タンパク質(APP)の摂取は、カゼイン摂取と比較して有意な骨格筋重量の増加をもたらすことを見出した。しかし、APP の筋重量増加効果の機構は不明である。我々は、タンパク質源のアミノ酸組成において APP のアルギニン含量がカゼインの約2倍であることに着目した。アルギニンの摂取は成長ホルモンの分泌を促進し、筋肥大を導くことが知られている。そこで、カゼインをタンパク質源とした飼料に APP と等量のアルギニンを添加し飼料のアルギニン含量が筋肉に与える影響を検討した。【方法・結果】6週齢、雄ラットに AIN-93G 組成に基づくタンパク質源がカゼインまたは APP の飼料、タンパク質源がカゼインで APP と等量のアルギニンを添加した飼料を与え7日間飼育した。カゼイン摂取と比較して APP 摂取では有意な筋重量の増加がみられたがアルギニンを添加した飼料では差はみられなかった。

A-19 魚肉タンパク質摂取による筋重量増加効果—様々なタンパク質源との比較— 〇澤井真梨子,原 由真,山本晋平,速水耕介<sup>1</sup>,韓 カ<sup>2</sup>,辻 智子<sup>2</sup>, 岸田太郎(愛媛大・農,<sup>1</sup>横浜薬大・薬科,<sup>2</sup>日本水産(株))

【目的】我々は加工食品として広く利用されているスケトウダラ魚肉タンパク質(APP)に着目し、機能性について検討している。これまでにラットにおいて APP の摂取は、カゼイン摂取と比較して有意な骨格筋重量の増加をもたらすことを見出した。しかし、この効果は APP 特有の効果であるかは分かっていない。本研究では、比較対象として様々なタンパク質を用い、APP の筋重量増加効果を評価した。また、ひふく筋の遺伝子発現を測定し、筋重量増加の機構を検討した。

【方法・結果】6週齢、SD系の雄ラットにAIN-93G組成に基づくタンパク質源がカゼイン、APP、ホキタンパク質(HP)、ホエイ、大豆、卵白である飼料を与え7日間飼育した。カゼイン摂取と比較してAPP、HP摂取では有意な筋重量の増加がみられたが、ホエイ、大豆、卵白の摂取では筋重量に差はみられなかった。ひふく筋における遺伝子発現では、APP または HP摂取によりタンパク質分解促進因子であるMuRF1と atrogin-1の減少がみられた。

### A-20 3T3-L1 脂肪細胞のケモカイン発現に及ぼすノビレチンの効果に関する研究 〇道免未来、安永 翔、大田美和、西 甲介、菅原卓也(愛媛大・農)

【目的】近年,ケモカインの一種である MCP-1 が,肥満により肥大化した脂肪細胞から分泌されることで,脂肪組織に浸潤したマクロファージが脂肪組織内において慢性炎症を引き起し,糖尿病など種々の疾患を誘発していると考えられている。そこで本研究では,3T3-L1 脂肪細胞のケモカイン発現に及ぼすノビレチンの効果について検討した。【方法・結果】マウス由来前駆脂肪細胞である 3T3-L1 細胞を脂肪細胞へと分化誘導すると同時に,ポリメトキシフラボノイドの一種であるノビレチンを作用させ,培地中の MCP-1 産生量を ELISA 法で,MCP-1 遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。その結果,ノビレチンは MCP-1 産生量および遺伝子発現量を顕著に抑制した。また,未分化状態,および肥大化脂肪細胞へと分化した 3T3-L1 細胞にノビレチンを作用させたところ,いずれも MCP-1 産生量および遺伝子発現量が濃度依存的に抑制された。作用機構を明らかにするため,MAPK ファミリーのリン酸化レベルを解析したところ,ノビレチンは ERK のリン酸化を下方制御することで MCP-1 発現を抑制していることが示唆された。

### A-21 ラットにおける米α-グロブリンの抗肥満作用 福田優美, 宮後元徳, 鈴木隆久, 田中愛健, 城内文吾, 〇佐藤匡央(九大院・農)

【目的】米胚乳タンパク質のうち塩可溶性である $\alpha$ -グロブリンに抗動脈硬化作用があることを見出した (Food Chemistry. 2012;132:194-200)。その過程で,体重減少を観察したため,本研究では米 $\alpha$ -グロブリンの抗肥満作用に焦点を絞って検討した。【方法・結果】SD 系ラットに米胚乳タンパク質あるいは米 $\alpha$ -グロブリンを毎日経口投与(100 mg/kg 体重)し,5 週間飼育した。大動脈採血により屠殺し,肝臓,白色脂肪組織(WAT;腹膜後腔・腎臓周囲・腸間膜周囲・睾丸周囲・皮下)を摘出した。米 $\alpha$ -グロブリン 投与群において睾丸周囲および皮下 WAT 重量が有意に減少し,腸間膜周囲 WAT 重量が減少傾向を示した。また,作用機序の推定のため,重量減少の前段階と考えられる腎臓周囲 WAT において,膜構成成分であるリン脂質量およびコレステロール量を測定したところ,コレステロール量は変化しなかったが,米 $\alpha$ -グロブリン投与群でリン脂質量が有意に増加した。また,米 $\alpha$ -グロブリン投与群で脂肪細胞面積が減少傾向を示した。【結論】米 $\alpha$ -グロブリンは,脂肪細胞の膜組成を変化させるとともに,脂肪細胞の肥大化を抑制し,抗肥満作用を示すと考えられる。

### A-22 アマニ食物繊維による肝臓中性脂肪・コレステロール低下作用 〇福田真子、川口康平<sup>1</sup>、福光 聡<sup>1</sup>、岸田太郎 (愛媛大・農、<sup>1</sup>日本製粉)

【目的】アマニは亜麻という植物の種子である。とくに欧米でパンの材料や食用油として食されており、 $\alpha$ -リノレン酸による動脈硬化の予防・免疫機能の改善などが報告されている。アマニには食物繊維が約24%含まれており、そのうちの約3割が水溶性食物繊維であるが、これらの効果に関する報告はわずかである。そのため、本研究ではアマニ水溶性および複合型食物繊維摂取による効果を調べることを目的とした。【方法】5週齢SD系雄ラットにAIN93G組成に基づくコントロール飼料およびアマニ水溶性食物繊維3%添加飼料、複合型食物繊維10%添加飼料を与え、14日間飼育した(各群n=7)。【結果・考察】アマニ水溶性および複合型食物繊維の摂取により、血中中性脂肪および肝臓総脂質、肝臓中性脂肪、肝臓コレステロールが有意に減少した。また、複合型食物繊維の摂取により糞中総脂質が有意に減少した。肝臓での脂質代謝に関わる遺伝子発現については現在検討中である。

#### A-23 かつお節の血糖低下作用

〇関 英治,藤原佳史,朝田 仁,小塚美由記 $^1$ ,山本晃久 $^2$ ,薩 秀夫 $^2$ ,大久保岩男 $^3$ ,山根拓也 $^4$ 

(ヤマキ (株), 1北海道文教大, 2前橋工大, 3天使大, 4北大院・薬)

【目的】プロテアーゼ分解物から派生するペプチドには多くの健康機能があり、降圧作用、脂質代謝改善作用が知られている。今回、かつお節からジペプチジルペプチダーゼIV阻害活性を有した  $2\sim5$  残基のペプチドが同定され、トクホ食品において DPP IV阻害を介した血糖値上昇抑制作用を謳っているものは無く、関与成分ともに新規性は高いといえる。【方法・結果】かつお節のプロテアーゼ分解物の DPP IV阻害活性を測定、H-Gly-Pro-7-アミノ-4-メチルクマリンを疑似基質とし DPP IVの 50%阻害の各種試料濃度 (IC50 値)を算出した。XevoG2-qTOF (Waters) ACQUITY UPLC M-Class HSS T3 (1.8  $\mu$ m,7.5×150 mm,Waters),BioLynx ソフトウエア(Waters)を用い、de novo sequence を行った。かつお節の Aspergillus oryzae 起源酵素分解物を Sep-Pak C18 カラムに負荷し 10%エタノール溶出画分 (Y-2 画分) に高い DPP IV阻害活性が示され、LC-MS/MS 分析でトリペプチドを同定、高寄与率であった。Y-2 画分は  $\alpha$ -グルコシダーゼ活性、ACE 活性を阻害しないことも分かった。

### B-1 天然物由来成分によるヒト血管内皮細胞の一酸化窒素産生改善効果について 〇黒田 怜,南 雄二,加治屋勝子(鹿児島大・農)

動脈硬化を始めとした血管関連疾患は、主に血管内皮機能が低下してしまうことで起こる。血管の最も内側に位置している血管内皮細胞(VECs)は、一酸化窒素(NO)を放出し、血管の収縮や弛緩を調節したり、血栓が形成されるのを防いだりしている。しかしながら、酸化ストレスや酸化 LDL の発生によりNO の産生が抑制されると、血管内皮機能は低下する。従って本研究では、約 200 種類の鹿児島県産天然物の中から、血管内皮機能改善効果のある機能性成分の探索を目的とした。まず、天然素材を可食部と非可食部に分類して凍結乾燥粉末にした後、水溶性成分と脂溶性成分を抽出した。次に、機能性評価に用いる試料を絞り込むため抗酸化活性試験を行ったところ、根菜類に高い活性が得られた。更に、根菜類による NO 産生量の測定を行うため VECs に対する細胞傷害性を調べたところ、本研究で評価した濃度範囲では細胞毒性を示さなかった。そこで、根菜類における VECs からの NO 産生量を測定したところ、優位に上昇させる機能性素材を見出した。

### B-2 血管を正常に収縮・弛緩させる機能性成分の探索 〇鶴留奈津子、南 雄二、加治屋勝子(鹿児島大・農)

心筋梗塞,脳梗塞,高血圧などの循環器疾患は,血管の柔軟性を維持することで発症を未然に防ぐことができる。そこで,血管の柔軟性に最も寄与している血管平滑筋細胞の収縮・弛緩反応に着目し,島嶼を含む鹿児島県で成育した天然素材の中から,血管を正常に収縮・弛緩させる機能性成分を探索した。約 200 種類の天然物素材は,可食部と非可食部に分類して凍結乾燥粉末にした後,水溶性抽出物と疎水性抽出物を得た。今回,柑橘類の機能性について報告する。細胞を用いた機能性評価試験に供する試料を絞り込むため,それぞれの抽出物を用いて抗酸化活性試験を行いトロロックス相当量にて評価した。その結果,水溶性抽出物、疎水性抽出物においてはともに鹿児島県特産柑橘類に高い効果を示した。更に,ヒト血管平滑筋細胞に対する各抽出物の細胞毒性試験を行い,細胞傷害性を示さない濃度で張力測定を行った。同時に,血管の収縮を制御している細胞質 Ca²+濃度の測定を行い,正常な血管機能を保持できる成分の探索を行った。

### B-3 メラニン産生抑制効果を有する新規生薬成分の同定及びその作用機序の解明 〇伊藤千尋、吉田一郎<sup>1</sup>、辻 明彦、矢中規之<sup>2</sup>、湯浅恵造 (徳島大院・STS、<sup>1</sup>四国大・短大、<sup>2</sup>広島大院・生物圏)

生薬は多成分からなり、成分同士の複雑な相互作用により薬効が発揮される。これまでに数多くの生薬成分が単離されているが、個々の薬効作用に関する研究は不十分であり、新たな効能の発見が期待されている。そこで、美白有効成分の開発を目的として、80種の漢方化合物ライブラリーよりメラニン産生抑制効果を有する新規生薬成分の探索を行った。マウス B16 メラノーマ細胞を用いて、フォルスコリン/IBMX 処理によって促進されたメラニン産生の抑制を指標としたスクリーニングを行った。その結果、沢瀉の成分である Alisol B が同定された。次に、メラニン生合成の律速酵素であるチロシナーゼの阻害活性および遺伝子発現について解析した結果、Alisol B はチロシナーゼ活性を直接的に阻害せず、その発現を抑制することによりメラニン合成を抑制することが示された。さらに、Alisol B はチロシナーゼの発現を制御している転写因子 MITF の発現抑制に加えて、その転写調節を担う CREB のリン酸化も抑制した。現在、Alisol B の作用機序に関して、更なる詳細な解析を進めており、併せて報告したい。

### B-4 オガタマノキに含まれるミカドアゲハ幼虫の摂食刺激物質の探求 〇義本裕介、伊藤 剛、影本貴大、中道貴也、金 哲史 (高知大・農)

[目的] アゲハ亜科に属するキシタアゲハ属,及び真正アゲハ属の食性進化に関する報告は多数挙げられているが,その中間層に属すアオスジアゲハ属の食性進化に関しては,ほとんど解明が進んでいない。そこで本研究では、アオスジアゲハ属の食性進化の解明のため、オガタマノキを寄主とするミカドアゲハ (Graphium doson) の摂食刺激物質の探求を試みた。

[方法・結果] 摂食刺激活性を有するオガタマノキの葉の MeOH 粗抽出物を水層とヘキサン層に分液すると双方に高い摂食刺激活性が見られた。そこで水層を ODS 中圧カラムにより,H2O 画分,20%MeOH/H2O 画分,40%MeOH/H2O 画分,及び MeOH 画分に分画して生物試験に供したところ,複数の画分を合一したときのみ活性の回復が認められた。生物検定を指標にさらに分画・精製を繰り返したところ,H2O 画分よりシュークロース,20%M/H 画分より桂皮酸誘導体,MeOH 画分よりフラボノイド配糖体が摂食刺激物質として単離・同定された。現在,ヘキサン層の活性成分についても単離・精製中である。

### B-5 2-アミノアスコルビン酸とその酸化重合物の神経突起形成促進作用 〇岩岡裕二,池田奈央,大野朝子,伊東秀之<sup>1</sup>,田井章博 (県広大・生命環境,<sup>1</sup>岡山県大・保健)

【目的】食品の劣化原因の一つである褐変化には 2-アミノアスコルビン酸(2-amino-AA)の酸化重合物が関与していると言われている。しかし、この化合物に関する生理活性の報告はこれまでにほとんどない。そこで、本研究では 2-amino-AA 及びその酸化重合物の神経突起形成作用評価を行った。

【方法・結果】従来の方法により 2-amino-AA 及びその酸化重合物を合成した。次に合成した化合物に対し、PC-12 細胞を用いた神経突起形成作用評価を行った。その結果、いずれも 3  $\mu$  M で Bt<sub>2</sub>cAMP 誘導性の神経突起形成を促進した。そこで、2-amino-AA 及びその酸化重合物の活性と細胞内への輸送の相関を調べるため、数種のトランスポーター阻害剤の存在下で神経突起形成作用評価を行った。その結果、いずれもアスコルビン酸特異的トランスポーター(SVCT)の阻害により活性を示さなかったため、活性の発揮には SVCT を介した細胞内への輸送を要することが明らかとなった。本研究より、我々は 2-amino-AA 及びその酸化重合物が SVCT を介して細胞内へ輸送され、神経突起形成を促進することを見出した。

### B-6 レモンフラボノイドの PC-12 細胞における神経突起形成促進作用と 構造活性相関 〇池田奈央,野下俊朗,田井章博(県広大・生命環境)

【目的】天然植物成分であるフラボノイドには、血圧上昇の抑制、抗アレルギー作用など様々な作用が報告されている。その中で、レモンに特徴的なフラボノイドに eriocitrin と hesperidin がある。本研究では、この 2 つのレモンフラボノイドとその構造類似体の神経突起形成作用評価を行い、活性を比較することで、化学構造と活性の相関を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】神経分化モデルである PC-12 細胞を用いて、レモンフラボノイドとそのアグリコンの神経突起形成作用評価を行った。その結果、eriocitrin と hesperidin は活性を示さないが、アグリコンである eriodictyol と hesperetin に  $Bt_2cAMP$  誘導性の神経突起形成促進作用を示すことが認められた。また、アグリコンの構造類似体を評価し、比較した結果、 $\mathbf{0}B$  環の水酸基の有無は活性に影響しないが、メトキシ化すると活性を示さないこと、 $\mathbf{0}C$  環の  $\mathbf{3}$  位の水酸基の有無は活性に影響しないこと、 $\mathbf{0}C$  環の  $\mathbf{2}$  位と  $\mathbf{3}$  位の結合に二重結合を有する方がより強い活性を示すことが明らかとなった。

### B-7 レモンフラボノイドの RBL-2H3 細胞における脱顆粒抑制活性と構造活性相関 〇池田 郁, 野下俊朗, 田井章博(県広大・生命環境)

【目的】レモンに多量に含まれるフラボノイド配糖体である eriocitrin, hesperidin は, RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制活性試験において抑制活性を示さないが, それぞれのアグリコンである eriodictyol, hesperetin は強い抑制活性を示すことが知られている。そこで本研究では, eriodictyol, hesperetin を基に複数の構造類似体を用いて脱顆粒抑制活性試験を行い, それぞれの活性を比較することで構造と活性の相関を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】代表的なレモンフラボノイドとして知られる eriocitrin, hesperidin のアグリコンである eriodictyol, hesperetin とその構造類似体を用いてラット好塩基性白血病細胞(RBL-2H3)の脱顆粒に対する抑制活性を $\beta$ -ヘキソサミニダーゼ遊離抑制活性を指標として比較検討した。その結果,①eriocitrin, hesperidin と異なる糖が結合しても脱顆粒抑制活性を示さないこと,②B 環の水酸基数に依存して抑制活性が上昇すること,③C 環の 2 位と 3 位が二重結合することで抑制活性が著しく上昇すること,④C 環の 3 位の水酸基の有無は抑制活性に無関係であることが明らかとなった。

### B-8 バニリン酸エステルの RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制作用と構造活性相関 〇石股 直, 伊東秀之<sup>1</sup>, 田井章博 (県広大・生命環境, <sup>1</sup>岡山県大・保健)

【目的】I型アレルギーは肥満細胞の脱顆粒反応によって惹起されるため、脱顆粒抑制物質の開発が求められている。 脱顆 粒 抑制 作用 を示す 化合物 として、 我々は バニリン酸エステルの Butyl 3-methoxy-4-hydroxybenzoate (BVA) を見出している。本研究では、BVA 類似体を合成して脱顆粒抑制活性試験を行うことで、脱顆粒抑制活性を示す構造と活性の相関を明らかとすることを目的とした。

【方法・結果】BVA の類似体を合成し、ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) を用いて脱顆粒抑制活性試験を行った。その結果、ベンゼン環とエステル基の間にアルキル鎖のリンカーを導入することで、活性が著しく低下することが認められた。さらに、ベンゼン環上の 3 または 4 位に水酸基を有していれば活性を示し、BVA においてベンゼン環上のメトキシ基は活性に関与していないことが示唆された。従って、脱顆粒抑制活性を示す構造としてベンゼン環に直接エステル基が結合し、3 または 4 位に水酸基を一つ有することで活性構造の最小単位と成り得ることを明らかとした。

### B - 9 アルブチンの ABTS radical cation 消去における反応特性 〇大野朝子,伊東秀之 <sup>1</sup>,田井章博 (県広大・生命環境, <sup>1</sup>岡山県大・保健)

【目的】アルブチンは、ABTS radical cation (ABTS \*\*) 法において高いラジカル捕捉活性を示す。ABTS \*\* 法はラジカルが消去されるとラジカル特有の緑色が退色していく。しかし、アルブチンを ABTS \*\* と反応させたところ瞬時に紫色へと変化したことから、アルブチンは固有のラジカル消去メカニズムを有していると考え、本研究ではアルブチンの ABTS \*\* 消去における反応特性を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】アルブチンと ABTS \*\* を反応させてカラムに供し、反応生成物と思われる紫色と白色の化合物を精製した。得られた紫色の化合物は、ABTS \*\* の一部とアルブチンが付加体を形成したものであり、白色の化合物は付加体形成における ABTS \*\* の分解産物であることが明らかとなった。アルブチンは 1分子あたり約4分子の ABTS \*\* を消去したが、2つの反応生成物はラジカル捕捉活性を示さなかったことから最終生成物であると考えられた。従って、アルブチンは ABTS \*\* を即時的に約4分子捕捉し、最後の4分子目の ABTS \*\* と反応する際、ABTS \*\* の一部と付加体を形成することが明らかとなった。

#### B - 10ピシフェリン酸の新規生理活性作用の検討 〇柴田紗知、谷田貝光克 1、立石能子 2、松原主典 (広島大院・教育、<sup>1</sup>農生命支援、<sup>2</sup>広島大院・生物圏)

【目的】ピシフェリン酸はヒノキ科サワラから単離されたジテルペンで、ローズマリー由来カルノシン 酸と類似の化学構造を有する。これまでに我々はカルノシン酸の血管新生及びリンパ管新生抑制作用と 神経細胞保護作用を明らかにしているが、ピシフェリン酸の生理活性に関する報告は僅かである。そこ で、ピシフェリン酸の新規生理活性作用として、血管及びリンパ管新生抑制作用等を検討した。

【方法・結果】血管新生及びリンパ管新生抑制作用については、血管片やリンパ管片をコラーゲンゲル 中で培養する ex vivo モデルと血管及びリンパ管内皮細胞 (HUVEC, LEC) を用いる in vitro モデルで評 価を行った。神経細胞保護作用については、SH-SY5Y 細胞を用い検討した。その結果、ex vivo モデルに おいて、ピシフェリン酸が血管新生及びリンパ管新生を抑制することを明らかにした。また、in vitro モ デルでは、HUVEC 及び LEC の増殖と管腔形成に対して抑制的に働くことを見出した。さらに、神経細 胞保護作用では、飢餓に対して保護効果を示すことが明らかとなった。

#### B - 11システイン置換ポリフェノールによるメトミオグロビンのオキシ化と維持研究 〇本田沙理<sup>1,2</sup>, 三浦ゆか理<sup>1</sup>, 増田俊哉<sup>2</sup>, 増田晃子<sup>3</sup> (<sup>1</sup>徳島大院・総合, <sup>2</sup>阪市大院・生活, <sup>3</sup>四国大・生活)

【目的】システイン類のチオールを置換したポリフェノールを調製し、その物質により褐色の食肉色素 メトミオグロビンを還元して、鮮赤色のオキシミオグロビンとし、その維持の可能性を検証する。

【方法・結果】これまで還元能の高い抗酸化ポリフェノールにシステインを共存させることにより、メ トミオグロビンが効率的に還元され、鮮赤色を有するオキシミオグロビンにでき ることを報告してきた。今回、あらかじめシステインをS置換したポリフェノー ルを調製し、そのメトミオグロビンに対する還元・オキシ化能を測定した。その 結果,多くのシステイン置換ポリフェノールに還元オキシ化能を確認した。さら にヒドロキシチロソールを用いて、システイン置換数を検証したところ、2置換

HO.

が最も効果的であることがわかった。「本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団学術研究奨励金(代表: 増田晃子)および科研費(15K12326)(代表:増田俊哉)によって行いました。]

#### B - 12食用キノコ処理木質バイオマスの家畜飼料素材としての利用 〇永谷直哉<sup>1</sup>, 小島 豪<sup>1</sup>, 柏野泰章<sup>1,2</sup>, 長尾伸一郎<sup>3</sup>, 時本景亮<sup>4</sup>, 西野直樹<sup>1</sup>, 仁戸田照彦 1, 神崎 浩 1 (1岡山大院・環境生命, 2浅野産業, 3岡山県・畜産研, 4日本きのこセ)

【目的】我々は、針葉樹木粉に食用キノコを植菌・培養し、食用キノコ処理菌床とすることで、木粉の 糖化性が牛の発酵混合飼料(発酵 TMR)素材として利用可能なレベルまで向上することを実験室スケール で実証してきた。今回,通常の発酵 TMR 素材であるバガスの代替として,食用キノコ処理針葉樹菌床を 用いた発酵 TMR を生産現場スケールで調製し、有効性を乳牛への給餌試験で確認した。

【方法·結果】2 トンのシイタケ処理ヒノキ菌床を調製して菌床 2,5%を含む発酵 TMR を作成し,それぞ れ乳牛 15, 20 頭に 2 週間給餌した。乳量、乳脂肪、乳蛋白を通常の発酵 TMR 給餌の場合と比較すると負 の影響はなく、食用キノコ処理針葉樹菌床が発酵 TMR 素材として利用可能とわかった。ヒノキ菌床の糖化 率はシイタケ処理により 9%未満から 15%以上に上昇した。また、キノコ生産現場で使われる広葉樹菌床 の糖化率も針葉樹の場合と同様に上昇し、広葉樹菌床も発酵 TMR に利用可能であると判明した。

### B-13 オリーブ葉二次代謝産物 oleuropein aglycon を効率的に還元する微生物の探索 〇巻尾沙織、乗松 毅、徐 恵美¹、菊池敬一¹、仁戸田照彦、神崎 浩 (岡山大院・環境生命、¹日本オリーブ)

【目的】オリーブ葉中の二次代謝産物である oleuropein は高い抗酸化活性を有しており、近年、食品や化粧品素材としての応用が期待されている。当研究室では、パン酵母を用いた微生物変換によって oleuropein aglycon が高い抗酸化活性を有する新規化合物の oleuropein aglycon 還元型に変換されることを見出した。しかし、パン酵母による変換反応では変換効率が悪いなどの問題点があった。そこで本研究では、酵母の良い単離源として知られている花からより効率的な変換反応を行う微生物の探索を試みた。

【方法・結果】オリーブ 5 種を含む 35 種類の花から、酵母選択液体培地を用いた集積培養によって 196 菌株の微生物を単離した。同じ菌体量で行った oleuropein aglycon の微生物変換反応液の TLC 分析および HPLC 分析によるスクリーニングの結果、短時間かつ高効率での変換が可能なオリーブ花由来高活性株 3 菌株を得た。26S rRNA-D1/D2 塩基配列解析の結果、これら 3 株は全て Aureobasidium pullulans と同定された。今後、これら高活性株を利用したより効率的な oleuropein aglycon 還元型の生産が期待される。

#### B-14 サリチルアルデヒド型イネいもち病菌毒素の合成研究

~o-Formyl-m-hydroxycinnamic Acid の合成~

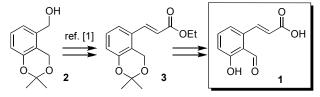
〇清田洋正<sup>1</sup>, 齋藤昭人<sup>2</sup>, 平松幸之助<sup>2</sup>, 操 海群<sup>1,2,3</sup>, 長島優太<sup>2</sup>, 田中功二<sup>2</sup>, 佐々木郁香<sup>2</sup>, 桑原重文<sup>2</sup>(<sup>1</sup>岡山大院・環境生命, <sup>2</sup>東北大院・農, <sup>3</sup>中国・安徽農大)

我々は、サリチルアルデヒド型イネいもち病菌毒素の合成研究を通じて、培養条件の違いにより、 毒素が光学活性体或いはラセミ体になることを見出した[1]。今回、単離されたうち、最も酸化が進んだ 類縁体である *o*-Formyl-*m*-hydroxycinnamic Acid (1) [2]の合成を行った。

2,3-Dimethylphenol を出発物質として、鍵中間体  $\mathbf{2}$  [3]を経て、以前報告したエステル  $\mathbf{3}$  [1]を調製した。アセタール保護基を除去した後、生じたベンジル位ヒドロキシ基を酸化、エステルを加水分解して、

望む 1 の合成に成功した[4]。

[1] K. Tanaka et al. Tetrahedron **2009**, 65, 6115. [2] 貫名学, 化学と生物 **1998**, 36, 582. [3] M. Suzuki et al., Agric. Biol. Chem. **1987**, 51, 1121. [4] A. Saito et al. Heterocycl. Commun. **2014**, 20, 185.



### B-15 Hindsiilactone A の合成研究 〇稲見俊伸,野下俊朗 <sup>1</sup> (県広大院・生命シ, <sup>1</sup>県広大・生命環境)

【目的】Hindsiilactone A(1)はニシキギ科の *Celastrus hindsii* から単離され構造決定されたオキシネオリグナンである。本化合物はヒト癌細胞 HCT116 などに細胞毒性を示すことが報告されているものの全合成は未だ達成されていない。そこで本研究では hindsiilactone A の全合成を目的とした。

【方法・結果】4-0-メチル没食子酸メチルから5ステップで調製したカルボン酸と,4-ブロムベンズアルデヒドから3ステップで調製したアルコールとを,山口エステル化法で中間体2とした。次いでメトキシメチル(MOM)基の除去を行い,環化前駆体であるエステル3とした。現在,環化を検討中である。

### B-16 Apteniol D の合成研究 〇野下俊朗、松本光平(県広大・生命環境)

【目的】Apteniol 類は *Aptenia cordifolia* から単離されたジアリールエーテル型オキシネオリグナンであると報告されている。我々はこれまで合成例のない apteniol D の合成を行なうことを目的とした。

【方法・結果】フェノール 1 とハロゲン化アリール 2 の Ullumann エーテル合成によるカップリングを試みた結果,N,N-dimethylacetamide を溶媒とし過剰量の銅粉を用いる古典的な条件でのみカップリングに成功した。得られたジアルデヒド 3 は数工程で apteniol D (4)として報告されている化合物へ導くことができたが,合成品の NMR データは天然物のそれと一致しなかった。現在,4 の異性体の合成を検討中である。

### B - 17 アラビノース脂肪酸エステルの合成と植物生長抑制活性評価 〇安藤 光, Chowdhury Md. Tazul Islam <sup>1</sup>, 松尾麻未 <sup>2</sup>, 柳田 亮 <sup>2</sup>, 川浪康弘 <sup>2</sup> (香川大院・農, <sup>1</sup>愛媛大院・連農, <sup>2</sup>香川大・農)

【目的】現在、アロースは最も研究が進んでいる希少糖の一つであり、C-6 位の水酸基を直鎖脂肪酸エステルにすると、植物生長抑制活性が向上することを報告している。今回、ペントースの希少糖の一つである D-アラビノースの直鎖脂肪酸エステルおよび、そのエナンチオマーである L-アラビノース直鎖脂肪酸エステルを合成し、レタスおよびイネに対する生長抑制活性を検討した。

【方法・結果】リパーゼを用いて直鎖脂肪酸ビニルとのエステル交換反応を行い、位置選択的に 5-*O*-デカノイル-D-アラビノースを合成した。同様に、5-*O*-デカノイル-L-アラビノースも合成した。レタスおよびイネに対する生物活性試験を行ったところ、5-*O*-デカノイル-D-アラビノースは、5-*O*-デカノイル-L-アラビノースよりも約 2 倍強い生長抑制活性を示した。さらに、5-*O*-デカノイル-D-アラビノースは、6-*O*-デカノイル-D-アロースよりもイネに対して約7倍強い生長抑制活性を示すことが分かった。

### B-18 ノルリグナン構造を有するインペラネン誘導体の細胞毒性活性 〇庄司有璃子、谷村亮介、Wukirsari Tuti、西脇 寿、西 甲介、菅原卓也、 秋山浩一 <sup>1</sup>、岸田太郎、山内 聡(愛媛大・農、 <sup>1</sup>愛媛大・学術支援セ)

【目的】ブタン型リグナンの1つである dihydroguaiaretic acid には細胞毒性活性が報告されている。 今回は,dihydroguaiaretic acid のメチル基が細胞毒性活性に与える影響を明らかにする事を目的として基本骨格から1つのメチル基を欠く,ノルリグナン構造を有するインペラネン誘導体の立体異性体,誘導体を合成し,細胞毒性活性を調べた。

【方法・結果】Evans の anti 不斉アルドール縮合を用いて立体構造を構築し、Grubbs 反応により 7位、8 位間の C-C 結合を構築する事によって(R)-, (S)-9'-dehydroxyimperanene (I, I) および(S)-, (I)-7,8-dihydro-9'-dehydroxyimperanene (I) およびほ虫細胞 Sf9 に対する細胞毒性活性を調べたところ、I が最も高い活性を示し、それぞれの IC I0 値は、I1 I2 I2 I3 が最も高い活性を示し、それぞれの IC I3 値は、I4 I5 I6 I7 I7 I7 I8 があった。この事から、dihydroguaiaretic acid のメチル基を欠く方が、高い細胞毒性活性を示す事が分かった。次に、I8 の 7 位のベンゼン環上の置換基が活性に与える影響を評価した。

B-19 γ-ブチロラクトン型リグナンの HL-60, HeLa 細胞に対する細胞毒性活性 Tuti Wukirsari, 〇越智吉明, 西脇 寿, 西 甲介, 菅原卓也, 秋山浩一<sup>1</sup>, 岸田太郎, 山内 聡 (愛媛大・農, <sup>1</sup>愛媛大・学術支援セ)

【目的】食品性植物に多く含まれるセコイソレリシレジノールについては、これまで、9 および 9' 位の水酸基が細胞毒性活性を弱める事を示し、さらに、ベンゼン環上の構造と活性との関係を明らかにした。本研究では、HL-60、HeLa 細胞に対して細胞毒性が弱いか認められないマタイレジノールについて、特にベンゼン環上の構造と細胞毒性活性との関係について調べた。

【方法・結果】(-)-マタイレジノールは L-グルタミン酸から,(+)-マタイレジノールは D-グルタミン酸から調整した。WST-8 法で HL-60,HeLa 細胞に対する細胞毒性活性を調べたところ(-)-体の IC<sub>50</sub> 値が 74  $\mu$  M で,(+)-体が  $100\,\mu$  M 以上であった。そこで,7'位を無置換のフェニル基に固定し,(-)-体の立体構造を有する 7 位の誘導体を合成し細胞毒性活性を評価した結果,7-(モノブトキシフェニル)体(ClogP=4.6)が IC<sub>50</sub> 値約  $20\,\mu$  M と最高の活性を示した。また,ClogP 値がこれ以上の誘導体では活性が低下した。

B-20 愛媛県東温市住民の血清中リグナン濃度と食生活・臨床パラメータとの関係 〇三宅志歩、福田真子、河村夏美、松木 翠、斉藤 功<sup>1</sup>、谷川 武<sup>2</sup>、 丸山広達<sup>2</sup>、江口依里<sup>3</sup>、西脇 寿、山内 聡、岸田太郎 (愛媛大・農、<sup>1</sup>愛媛大・医、<sup>2</sup>順天堂大・医、<sup>3</sup>岡山大・医)

【目的】多くの植物由来の食品にはリグナンが存在しており、食事されると哺乳類の腸内細菌によりEnterolacton (ENL) と Enterodiol (END) に代謝される。日本においては、食事リグナンや ENL や END の血中濃度についての報告例は少ない。本研究では、愛媛県東温市の住民を対象に大規模な疫学調査・東温スタディの保存血清を用いて、血清中リグナン濃度(Secoisolariciresinol, Matairesinol, END, ENL)を測定し、血清中リグナン濃度と食生活・臨床パラメータとの関係について検討を行った。【方法】血中リグナン濃度は、酵素による脱抱合、固相抽出(C18)のあと UPLC-TOF-MS で定量した。【結果】食事リグナンは SECO の平均血清中濃度が最も高くなった。血清中 ENL 濃度が高い集団において、野菜類、果実類、豆類の摂取量が多かった。血清中 ENL 濃度が高い人ほど血清中 TG 濃度は有意に減少した。

B-21 血中 Enterolactone 濃度と肝臓機能指標の関係 〇河村夏美, 三宅志歩, 福田真子, 松木 翠, 斉藤 功<sup>1</sup>, 谷川 武<sup>2</sup>, 丸山広達<sup>2</sup>, 江口依里<sup>3</sup>, 山内 聡, 西脇 寿, 岸田太郎 (愛媛大・農, <sup>1</sup>愛媛大・医, <sup>2</sup>順天堂大・医, <sup>3</sup>岡山大・医)

【目的】リグナンは植物由来のポリフェノールの一種であり、腸内細菌により Enterolactone(ENL) や Enterodiol (END) に変換される。本研究では、愛媛県東温市住民を対象に行われた大規模疫学調査・東温スタディの保存血清を用い血中リグナン濃度(Secoisolariciresinol, Matairesinol, ENL, END) を測定し、健康パラメータと血中リグナン濃度との関係について検討した。【方法・結果】血中リグナン濃度は酵素による脱抱合、固相抽出(C18)の後 UPLC-TOF-MS によって定量した。肝臓機能指標である ALTと AST は男性で ENL 濃度が高いほど減少傾向が見られた。男性集団での ALTと ASTへの飲酒習慣とENL濃度の影響は、習慣の有無に関わらず ENL 濃度が高いほど ALTと AST は減少傾向が見られた。また肥満度と ENL 濃度の影響により、BMI25以上の肥満者で ENL 濃度が高いほど減少傾向が見られた。このことから、ENLによる肥満者での肝臓機能の低下抑制が示唆された。

### C-1 生産性向上を目指した CHO 細胞のメタボローム解析 〇井川翔太、鬼塚正義 <sup>1</sup>、大政健史 <sup>2</sup> (徳島大院・先端、<sup>1</sup>徳島大院・STS、<sup>2</sup>阪大院・エ)

【目的】CHO (Chinese hamster ovary) 細胞は、大腸菌や酵母より汎用されているバイオ医薬品の宿主細胞で、その理由として安定な高発現株の取得が可能であることや、高度な翻訳後修飾が可能であることが挙げられている。これまで、遺伝子増幅現象や小胞体ストレス応答を利用した生産性向上の試みが行われてきたが、そのアプローチにも限界がある。そこで本研究では、メタボローム解析を通じて細胞内における代謝物流束の変動を捉え、CHO 細胞の代謝の最適化を目指し、同時にタンパク質生産性を向上させることを目的とした。【方法・結果】 対象とする CHO 細胞として、CHO-K1 細胞を宿主として構築した抗体産生細胞を用いた。本細胞は無血清培地に馴化しており、浮遊培養が可能である。細胞内代謝物測定は、CE-TOFMS 及び QqQMS を用いて代謝物質 116 種の濃度の測定を HMT 社に依頼して行った。培養中の代謝物変動を測定した結果、TCA 回路の代謝物質が顕著に減少する傾向にあり、特にリンゴ酸、フマル酸、イソクエン酸に関しては、培養 3 日目から 5 日目にかけて濃度が約 10 分の 1 に減少した。

# C-2 GMP 対応バイオ医薬生産用ヒト細胞株の樹立〇榮田佳那子, 井上祐一, 川原浩治(北九州高専・生産デ)

【目的】 ヒト細胞により生産されたタンパク質にはヒト型の糖鎖修飾がなされるため、生体内で異物として識別されず、目的の生理作用をスムーズに発揮することが期待される。また、バイオ医薬の生産には安全性を保証するための様々な対策が必要不可欠である。そこで本研究では、生物製剤製造の国際基準である GMP (Good Manufacturing Practice) に準拠し、実験室レベルでタンパク質の安定生産可能な手法の構築及び取得した細胞の識別同定を試みた。

【方法・結果】 ヒト末梢血から分離したリンパ球に強力な発ガンプロモーターとして知られるホルボール-12-ミリステート-13-アセテート (PMA) を添加し、培養を行った。その結果、リンパ球の通常の寿命である 2 週間を超え増殖可能な細胞を 3 種類取得した。これらの細胞をフローサイトメーターで解析したところ、CD19 陽性であることが分かった。したがって、取得した 3 種類の細胞は全て B 細胞であり、本実験方法では高確率で B 細胞が取得されることが示唆された。

### C-3 柑橘由来乳酸菌によるがん細胞死誘導作用について 〇高岡昂汰, 圖子晧祐, 二宮由利絵, 山下由加里, 早瀬伸樹, 牛尾一利, 石塚盛雄<sup>1</sup>(新居浜高専・生化, <sup>1</sup>中央大学・理工)

【目的】人類が未だ克服できていない病苦の代表は悪性新生物であるが、それに対する3大療法などの既存療法は、どれも重大な副作用が存在しており決定的なものにはなっていない。他方、近年、乳酸菌について、間接・直接のがん抑制作用が報告されてきている。本研究では、可食植物から単離した乳酸菌類を用いて、がん細胞を直接細胞死させる可能性を調査した。

【方法・結果】柑橘類その他各種可食植物の果皮,葉,花などから乳酸菌を中心とした細菌類を単離し、培養後凍結乾燥を行った乾燥菌体を一定量 PBS に懸濁し、ヒトロ腔がん細胞 (KB cell) の培養系に1%添加した後、顕微鏡観察を行い、またがん細胞の生存率は、培地交換後、マクロプレートリーダを用いた WST-8 の還元力測定によって検定した。その結果、柑橘由来の乳酸菌にがん細胞に対する高い細胞死誘導能力を見いだした。柑橘類からはいくつかの有効株を単離できたが、典型例は、みかんから分離された、Enterococcus durans M-1 株で、顕著な細胞死誘導活性を認めた(IC50=約 20 mg/L)。

### C-4 長鎖ノンコーディング RNA による RB/p53 経路の制御機構 〇神武洋二郎,苗村円佳,紫 千大,井上恭敏,岡本春奈(近畿大・産理工)

【目的】長鎖ノンコーディング RNA(IncRNA)は、ヒトにおいて1万4千個以上存在することが分かっている。近年、いくつかの IncRNAが、分化、増殖、細胞死といった細胞運命決定において、重要な役割を担っていることが分かってきた。本研究では、 INK4 遺伝子座に存在する IncRNA、ANRIL と、CDKインヒビターp21 上流に存在する IncRNA、PANDAの機能を明らかとすることを目的とした。

【方法・結果】ヒト正常線維芽細胞において ANRIL をノックダウンした結果, INK4 遺伝子座の p15 及び p16 の mRNA 量が増加し、細胞増殖が顕著に抑制された。RIP アッセイ及び ChIP アッセイの結果, ANRIL は転写抑制因子であるポリコーム複合体と結合し、INK4 遺伝子座にリクルートする機能を有することが分かった。これらの結果から、ANRIL は p15/p16 の転写を抑制し、RB 経路を負に制御する機能を持つことが考えられた。一方、ヒト骨肉腫細胞において、PANDA をノックダウンすると、ガン抑制因子である p53 タンパク質が不安定化することが明らかとなった。本発表では、RB/p53 経路の制御に関与する ANRIL と PANDA の細胞機能とその作用機構を中心に、最近得られた知見を伴わせて紹介したい。

### C-5 フォールドしたポリペプチドを成熟部位に有する人工前駆体蛋白質を用いた葉 緑体への蛋白質輸送実験

〇秋田 充,大畠侑乃,石川貴美子,Pohare Manoj(愛媛大・農)

葉緑体への蛋白質輸送では、エネルギーを制限することで、前駆体蛋白質は、in vitroでドッキングと呼ばれる葉緑体表層で不可逆的に結合し、外・内包膜に存在する蛋白質輸送装置(トランスロコン)とともに初期膜透過中間体を形成する。初期膜透過中間体に捕捉されていた前駆体蛋白質は、十分なエネルギーの供給により、膜を透過し、葉緑体内部に達する。しかし、膜透過中の前駆体蛋白質を停止させることはできないので、膜透過中の前駆体蛋白質がどのようにトランスロコン因子と関わり合いを持つのかについては理解が進んでいない。そこで、我々は、前駆体蛋白質のC末端に立体障害を導入することで、膜透過中の前駆体蛋白質の動きを止めることはできないかと考えた。葉緑体移行シグナルであるトランジット配列に大腸菌内在性蛋白質や蛍光蛋白質等の可溶性蛋白質を連結した人工前駆体蛋白質を作製したところ、これらの人工前駆体蛋白質を可溶性状態を保ったまま大腸菌で過剰発現させることができた。今回はこれらの前駆体蛋白質を蛋白質輸送実験に供することで得られた実験結果について発表する。

### C-6 一価性ストレプトアビジン4量体を付加した前駆体蛋白質を用いた葉緑体への 蛋白質輸送実験

OPohare Manoj, 秋田 充(愛媛大・農)

Most of nuclear encoded precursor proteins are imported into chloroplasts through translocation apparatus (translocon), embedded at the outer and the inner envelope membranes. Our current knowledge of chloroplastic translocon is based mainly on the biochemical analysis of protein translocation intermediates (PTIs) formed during early stages of protein import *in vitro* under limited energy conditions. Due to the inability of isolating PTIs once after precursors are released from the early PTIs, little is known regarding molecular mechanisms at the latter stages of translocation. We expect to isolate latter PTIs generated by precursors bearing a rigid or bulky structure at their C-termini to plug translocon channels. Because the interaction between biotin and streptavidin is known to be one of the strongest, we attempt to apply biotin-streptavidin interaction to block protein import by attaching a monovalent streptavidin to the precursor biotinylated at the C-terminal end. Our current effort of obtaining the precursor-streptavidin complex and applying this complex to the *in vitro* protein import assay will be presented.

C-7 シロイヌナズナ由来前駆体 tRNA プロセシング酵素 PRORP の基質認識機構に関する研究

〇今井崇喜, 中島 崇<sup>1</sup>, 角田佳充<sup>1</sup>, 木村 誠<sup>1</sup> (九大院·生資環, <sup>1</sup>九大院·農)

【目的】シロイヌナズナの葉緑体とミトコンドリアに局在する蛋白質(PRORP)は、前駆体tRNA (pre-tRNA)の5'末端のプロセシングを触媒する酵素で、リボザイムであるRNase P様の触媒活性を示す。本研究では、PRORPの基質認識ドメイン(PPRドメイン)の基質認識機構について検討した。

【方法・結果】現在までに得られている生化学的データと、PRORP および tRNA の結晶構造に基づき、PRORP と tRNA の複合体モデルを構築した。その結果、生化学的データとよく一致して、PRORP の PPR2 と PPR3 を T ループの C56 と A57 に結合させたときにのみ妥当な複合体モデル構造が得られた。以上の結果より、リボザイムである RNase P RNA が pre-tRNA の D ループの G19 と T ループの C56 をスタッキング相互作用により認識しているのに対して、PRORP の PPR1 と PPR2 モチーフは pre-tRNA の T ループの C56 と A57 を水素結合ネットワークにより認識していることが示唆され、PRORP はリボザイムである RNase P とは異なる基質認識機構を持つように進化したことが示唆された。

C-8シロイヌナズナ気孔形成突然変異体 bagel3 の機能解析<br/>〇山田千聖, 鈴木孝征 1, 東山哲也 1,2, 中川 強<br/>(島根大・総科セ、1 ERATO 東山、2 名大・生命分子)

気孔は表皮に存在する 2 個 1 組の孔辺細胞とそれらの隙間の孔から構成され、植物の重要な生理現象を調節している。また、植物の形態形成のモデルとしても注目されており、近年では突然変異体を用いた分子遺伝学的研究が活発になってきている。当研究室でも、孔辺細胞の異常を指標に EMS 変異シロイヌナズナより単離された bagel3 変異体の解析が進められたが、原因遺伝子の同定には至らなかった。そこで今回は次世代シークエンサーを用いた bagel3 原因遺伝子の同定と解析を目的とした。

次世代シークエンサーによる bagel3 変異体ゲノム DNA の解析と以前のマッピング結果より 4 番染色体上の遺伝子 AT4G16120 にナンセンス変異が見出され検証を進めた。結果,この遺伝子が bagel3 原因遺伝子であると結論した。AT4G16120 の解析のため,BAGEL3 のプロモーター:GUS 解析と BAGEL3 遺伝子内部に sGFP を挿入したコンストラクトを用いた局在解析,解析用ベクターの構築を行った。

C-9 孔辺細胞アブシシン酸信号伝達におけるグルタチオンの役割 〇長橋大樹、宗正晋太郎、森 泉 <sup>1</sup>、中村俊之、中村宜督、村田芳行 (岡山大院・環境生命、<sup>1</sup>岡山大・植物研)

【目的】植物表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞に囲まれた小孔である。植物ホルモンであるアブシシン酸 (ABA) は、乾燥ストレスに応答して生合成され、気孔閉口を誘導する。グルタチオン (GSH) は、細胞の酸化還元恒常性の制御に関与するトリペプチドである。以前我々は、GSH が ABA 信号伝達において負の制御因子として働くこと、そして孔辺細胞内の GSH 量が ABA 誘導気孔閉口に伴い減少することを報告した。しかし ABA による GSH 量の減少がどのように起こり、ABA 信号伝達に影響を与えるのか、詳細は不明である。本研究は、それらを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ABA 受容体の変異体である pyr1/pyl1/pyl2/pyl4 四重変異体を用いて、ABA による GSH 量の減少が、ABA 受容体を介した信号伝達により行われるかを調査した。また、ABA 信号伝達においてセカンドメッセンジャーである活性酸素種 (ROS) 産生への、酸化還元制御に関わる GSH の関与が考えられる。そこで、ROS 産生酵素欠損変異体を用いて、ABA による ROS 産生への GSH の関与を調査した。

### C-10 プラスチドシグナル誘発処理に対する植物ホルモン生合成経路の応答 〇廣澤嘉洸, 多田朱里, 稲葉靖子<sup>1</sup>, 松浦恭和<sup>2</sup>, 森 泉<sup>2</sup>, 稲葉丈人 (宮崎大・農, <sup>1</sup>宮崎大・テニュア, <sup>2</sup>岡山大・植物研)

【目的】植物ホルモンは複雑なシグナル伝達経路を介して植物の成長や発達,環境ストレス応答において重要な役割を果たしている。また,プラスチドが発するシグナルであるプラスチドシグナルは核遺伝子発現を調節すると考えられているが,植物ホルモンとの関わりについては明らかになっていない。以前の研究でプラスチドシグナル誘発処理により特定の植物ホルモン量が変化することが示された。そこで本研究ではプラスチドシグナルと植物ホルモンの相互関係を解明するため,プラスチドシグナル誘発処理した植物体を用いて各植物ホルモン生合成における鍵酵素の遺伝子発現量を調査した。

【方法・結果】シロイヌナズナの野生型, gun1 及び ppi2 変異体を MS 培地で生育させた後, DMSO また は NF で処理した。それらの植物から RNA を抽出しリアルタイム PCR を行った結果, 植物ホルモン生合成における鍵酵素の遺伝子発現量が変化していた。このことから, プラスチドシグナル誘発処理した植物体における植物ホルモン応答は, 遺伝子発現調節により制御されることが示唆された。

### C-11 シロイヌナズナの水中栽培法を用いた低温馴化機構の解析 〇上村沙織、稲葉靖子<sup>1</sup>、稲葉丈人 (宮崎大・農、<sup>1</sup>宮崎大・テニュア)

【目的】シロイヌナズナを含む多くの植物は、夏から冬への移行に伴い生理機能や細胞の構造を大きく変化させることで高い耐寒能力を獲得する。このような現象を「低温馴化」と呼び、高い耐寒能力の獲得には低温応答性遺伝子が関与している。低温応答性遺伝子の発現に影響を及ぼす化合物を同定することができれば、植物の低温耐性獲得機構をより詳細に理解できる。そこで本研究では前述のような化合物のスクリーニングを目指したシロイヌナズナの水中栽培法と評価系の確立を行った。

【方法・結果】低温応答性遺伝子 COR15A の promoter と Luciferase (LUC) 遺伝子を融合したコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに導入した。 さらに導入が確認できた植物体を液体培地で低温馴化して LUC 活性と内在性 COR15A の発現を調べた。その結果、水中で低温馴化した葉一枚でも LUC 活性、内在性 COR15A の発現がともに増加することが明らかになった。

C-12 タイ発酵ソーセージ「Nham」のタンパク質、アミノ酸の発酵過程による変化 〇杉岡和貴、Supaluk Sorapukdee<sup>1</sup>、Rachakris Lertpatarakomol <sup>1</sup>、堺 翔平、 荒木朋洋(東海大・農、<sup>1</sup> KMITL)

【目的】タイの伝統的な発酵ソーセージである「Nham」(ネーム)が熟成する過程で、ブタ肉中のタンパク質、遊離アミノ酸にどのような変化が起こるかを分析することを目的とした。

【方法・結果】冷蔵または冷凍ブタ肉のミンチ、湯煮したブタ皮及びタイ米、ニンニク、青トウガラシ、砂糖、亜硝酸塩、リン酸塩、及びグルタミン酸ナトリウムを混ぜ合わせビニール袋に詰め、脱気した。その後 7 日間  $30^{\circ}$ Cでインキュベートしネームを作成した。その過程でインキュベート 1 日おきにブタ肉の pH の変化、SDS 電気泳動を用いた肉タンパク質のバンドの変化、及び遊離アミノ酸の組成を調べ比較した。その結果、インキュベートの日数の経過に伴い、pH は下がり、6 日目に約 pH4.3 となり、7 日目以降では pH の低下は見られなかった。SDS 電気泳動の結果、特定の肉タンパク質で減少が見られた。遊離アミノ酸分析では、タンパク質由来アミノ酸に増加が多く見られたが、Arg など減少するアミノ酸も見られた。一方で、非タンパク性アミノ酸の  $\gamma$ -aba は増加が見られた。

### C-13 赤身牛肉中のタンパク質および遊離アミノ酸における熟成評価について 〇細澤知香,杉岡和貴,境 翔平,福留彰宏,家入誠二<sup>1</sup>,堺 久弥<sup>1</sup>,荒木朋洋 (東海大・農,<sup>1</sup>熊本県・農研セ)

【目的】牛肉は熟成でタンパク質が分解され味に関係する遊離アミノ酸の量が増加することがわかっている。熟成に伴い変動するタンパク質や遊離アミノ酸を調べることで熟成の指標として利用できる可能性がある。肉中のタンパク質や遊離アミノ酸を調べるには通常肉の組織を破砕し溶媒で抽出する方法が一般的である。本研究ではより簡便な評価法として肉の解凍後に生じるドリップを用いて熟成評価が可能であるか検討を行った。【方法・結果】試料は牛肉を凍結後解凍した際に得られたドリップを 30 倍に希釈したものを SDS-PAGE と遊離アミノ酸の組成分析に使用した。これまで SDS-PAGE では熟成に伴い特定のタンパク質が減少すること、遊離アミノ酸の組成分析では特定の遊離アミノ酸を用いて熟成評価が可能であることを報告している。そこで抽出操作を行った試料を用いた SDS-PAGE パターンと遊離アミノ酸の組成分析のパターンをドリップの結果と比較したところほぼ同様の結果であった。これらの結果から食肉の抽出操作を省きドリップを用いる方法でも同様に熟成評価が可能であると考えられた。

### C-14 海藻遊離糖の迅速分析 〇垣田浩孝, 小比賀秀樹(産総研・健康工)

【目的】主な食用海藻の一般成分(水分、たんぱく質、脂質、炭水化物及び灰分)、無機質及びビタミンの含有量情報は食品成分データベースより得ることができる。その中で炭水化物は全体の質量から水分、たんぱく質、脂質、及び灰分の合計の質量を差し引いた値で示されている。しかしながら炭水化物の中で単糖、オリゴ糖、多糖は生体内機能及び栄養価が異なる。また食用海藻の糖質分析において多糖の分子量分布や構成糖組成についての報告は多いが、遊離の単糖・二糖についての報告例は少ない。そこで本研究では海藻遊離糖の HPLC による迅速分析を開発することを目的とした。

【方法・結果】食用海藻を 85%エタノール中で1時間沸騰抽出し海藻抽出液を得た。分析カラムとしてアミノシリカカラム及びアミドシリカカラムを用いて遊離糖の分析条件を検討した。糖の検出は示差屈折計を用いた。海藻遊離糖を迅速に分析できる条件を明らかにした。海藻加工食品中の遊離糖が原料海藻の違いによって異なることを明らかにした。

### C-15 レトルトパウチに封入した液体・固体食品の 未開封非破壊粘弾性測定に及ぼす包装容器の影響 〇田添由真,川井清司,羽倉義雄(広島大院・生物圏)

【背景・目的】高齢者の人口増加に伴い、レトルトパウチ介護食品の需要が高まっている。食品の物性(硬さや粘度)を、製造後にパウチの外側から測定することが出来れば、個人の食べる能力に適切に対応した食品を提供することが可能になる。本研究では、非破壊測定が可能な動的粘弾性に注目した。パウチに液体・固体混合系食品を封入し、パウチの外側から動的粘弾性測定を行い、内部の食品の物性評価を試みた。また、パウチが動的粘弾性パラメータ(貯蔵弾性率 G'・損失弾性率 G') に及ぼす影響についても合わせて検討を行った。【方法】試料には、市販のとろみ調整食品(濃度 0.5~4.0%)と豚もも肉を用いた。肉の硬さを調整するために、豚もも肉を蒸留水と共にオートクレーブ(0~120 分、0.16 MPa)で加熱した。これらをパウチに封入し、材料試験機を用いて単軸圧縮振動試験を行い、試料の動的粘弾性測定を行った。【結果・考察】パウチの影響は G'、G"とも一定のオフセットとして現れた。従ってこのオフセットを差し引くことでパウチ内の食品の物性を測定出来ることが明らかになった。

【目的】蒸気吹き込み法とは、水と分散相となる精油の共沸混合蒸気を単孔ノズルより連続相中に吹き込むことでエマルションを調製する方法である。吹き込まれた共沸混合蒸気は、冷却された連続相中で凝縮しエマルション化する。本研究では、蒸気吹き込み法によるエマルション調製での蒸気の吹き込み条件及び攪拌条件が分散粒子に及ぼす影響について検討した。

【方法】連続相にはジェランガムゾル (0.4%),分散相には d-リモネンを用いた。共沸混合蒸気を吹き込む時間や吹き込みノズルの方向,攪拌条件(回転数,邪魔板の存在)を変えエマルションを調製し,分散粒子の粒度分布をレーザー回折式粒度分布測定装置で測定した。

【結果・考察】邪魔板が存在する場合、攪拌機の回転数により分散粒子の粒度分布が変化した。ノズルの方向を下向きにした場合、共沸混合蒸気が凝縮するまでの間に他の気泡との合一が認められた。

C-17共振振動分析装置を用いたメロン 'アールス雅' の食べ頃判定および予測〇山本博志, 吉金 優 ¹, 中島悦子 ¹, 栗田せりか ¹, 樋口慶郎 ¹, 沢村正義 ¹(山長, ¹高知大・土佐 FBC)

【目的】「夜須のエメラルドメロン(以下、メロン)」は、高知県香南市夜須町で栽培されるメロン 'アールス雅'である。食べ頃を正確に推定できれば、商品価値を高めることが可能となる。本研究では、食味と非破壊硬度や各種分析結果の相関を調べ、メロンの食べ頃の判定や予測の可能性を検討した。

【方法】平成26年7月中旬に適期収穫したメロンを異なる温度で保蔵し、共振振動分析装置を用いた非破壊硬度を経日的に測定した。16日間保蔵後のメロンの官能評価を行うとともに、果肉硬度、色調、果汁のBrix、アスコルビン酸およびグルタミン酸量を分析した。

【結果】メロンの非破壊硬度値は、保蔵期間とともに直線的に減少した。食味は、Brix 等の果汁成分とは相関せず、実測した果肉硬度値と強く相関した。メロンの実測果肉硬度は、非破壊硬度と相関した。以上のことから、共振振動分析装置を用いて非破壊硬度を測定することにより、メロンの食べ頃を判定および予測できることが明らかとなった。

C-18 米飯中のオリゴ糖含有量と食味の関係 〇横野一歩、高津地志<sup>1</sup>、藤田明子<sup>1</sup>、岡田芳治、渡邉義之、野村正人 (近畿大院・シスエ、<sup>1</sup> (株) サタケ)

【緒言】米は世界三大穀物の一つであり、アジア地域で多く栽培されている。日本人は米を主食としており、米に関する物理、化学および調理学的研究を行ない、おいしさについて追及している。特に米飯の食味には硬さや粘りなどのテクスチャーとともに呈味成分である糖質およびアミノ酸などが寄与している。その中でも単糖であるグルコースは食味に良い影響があると報告されている。しかし、オリゴ糖に関しては研究報告が少ない。そこで本研究では、米飯中のオリゴ糖含有量と食味の関係について検討した。

【方法・結果】平成25年度に収穫された米16種類を同条件で炊飯し、凍結乾燥したものを試料とした。 粉砕した試料に50%EtOHを加え超音波洗浄機で抽出した。その後イオンクロマトグラフィーを用いてオ リゴ糖を分析した。次に食味鑑定団(炊飯食味計、硬さ・粘り計、シンセンサ)をもちいて食味評価を 行なった。その結果、オリゴ糖含有量と食味評価に相関関係があることを確認した。

### C-19 鰹節切削細片集合体の細片厚と静的粘弾性の関係 〇朝田 仁(ヤマキ(株))

【目的】 鰹節を薄く切削して料理のトッピング用途とした「かつおパック」は、この切削細片の物性が商品品質を左右する。ところが、この切削物の力学解析はなく経験値による。そこで、鰹節切削細片集合体の物性を力学解析し、切削加工の設計での示唆を導いた。

【実験方法】 鰹節切削細片は,鰹節の種類,切削方法の異なる実商品を用いた。さらに切削細片厚みの異なるサンプルも作製した。物性値としては静的粘弾性を測定した。各切削細片サンプルを,集合体のまま圧縮,徐重してクリープ特性を算出した。クリープ曲線から切削細片の静的粘弾性はフォークト型となり、最初の瞬間弾性と最後の遅延粘性を算出した。

【結果】 各鰹節切削細片集合体の弾性率,粘性率はアイテム固有の値として評価できた。弾性率,粘性率ともに鰹節成分には依存しなかった。粘弾性よりも弾性率と粘性率の比で評価するとアイテムの物性の特徴を把握できた。切削片の厚みと粘性率,弾性率は、明確な関係はなかったが、粘性率/弾性率の比と厚みでは、切削片が厚いと粘性率/弾性率の比率は小さくなり、厚みとの傾向が認められた。

### C-20 レオロジー特性の比容積による鰹節切削細片集合体の評価 〇佐々木淳, 朝田 仁(ヤマキ(株))

【目的】鰹節を薄く切削して料理のトッピング用途とした「かつおパック」は、この切削細片の物性が 食感を左右する。しかしながら、食感の評価方法は経験や官能によるものしかなかった。従って、鰹節 切削細片の食感の評価方法を見出すことを目的とした。

【実験方法】鰹節切削細片集合体の物性を評価するために、タッピング法を用いた。空隙率の大きい鰹節切削細片集合体をタッピングし、その状態変化を緩め比容積及び硬め比容積により把握した。併せて、物性がどんな要素(鰹節の水分・脂肪分等)に関与しているかも検討した。

【結果】タッピング回数と体積減少の程度は、「かつおパック」商品固有のものとして評価できた。また、 緩め比容積と硬め比容積並びに、タッピング前後の体積減少率は切削方法に起因すると推察された。

### C-21 電子スモーク法による低ベンゾピレン鰹節の製法 〇浅山 拓. 朝田 仁(ヤマキ(株))

【目的】鰹節は焙乾と呼ばれる燻製工程を2~3週間繰り返して製造される。この時,燻煙に含まれるベンゾピレン等の多環芳香族炭化水素類が鰹節に付着する。これらの物質には発がん性があり、その濃度は諸外国での規制値に抵触している。この課題を解決する鰹節の製造方法の検討を行った。

【方法】鰹節製造における長期間の焙乾がベンゾピレン含有量増加の要因であることから、乾燥と燻付けの工程を完全分離し、短時間での燻付けを実施した。鰹節の模擬サンプルとして、①鰹の魚体を挽き、成型、ボイルした後、熱風乾燥した。②鰹成型乾燥品を電子スモーク装置に入れ、0~240分間燻付け処理した。③作成した鰹節模擬サンプルのベンゾピレン含有量を HPLC で、香り成分を GC-MS のヘッドスペース法で分析するとともに、官能評価を実施した。

【結果】鰹成型品を機械乾燥させた後、電子スモーク装置を用いて木材チップの燃焼温度と燻煙量を制御しつつ燻付けして製造した鰹節模擬サンプルの場合、燻付け時間 240 分以内ではほとんどベンゾピレンが検出されなかった。

### D-1 Thermococcus kodakarensis の DNA 複製関連因子間(GAN-GINS)相互作用解析 〇綿谷江梨、石野園子、小林康平、大山拓次<sup>1</sup>、山上 健、石野良純 (九大・農、<sup>1</sup>山梨大・生命環境)

【目的】真核生物の DNA 複製ヘリカーゼ複合体は、Cdc45、MCM および GINS から成り、CMG 複合体と呼ばれる。アーキアでは、GAN (GINS-associated nuclease) が Cdc45 とアミノ酸配列上の相同性を有する。本研究では、アーキアの複製ヘリカーゼ複合体について詳細に理解するために、Thermococcus kodakarensis の GAN と GINS との相互作用を調べた。

【方法・結果】GAN のヌクレアーゼ活性は GINS の構成タンパク質である Gins51 により促進され、両者は安定な複合体を形成した。Gins51 の B ドメインと GAN との複合体の X 線結晶構造から、両タンパク質の接触面を同定し、その領域である GAN (F55-S58) および Gins51 (D163-I166) に種々の変異を導入した。Gins51 の D163A および M164A/I166A 変異体は野生型 GAN のヌクレアーゼ活性を促進せず、複合体も形成しなかった。一方、Gins51 の M164A は GAN の F55A に対してヌクレアーゼ活性促進が見られなかった。この結果を考察するとともに、真核生物の Cdc45-GINS 構造と比較して相互作用様式を議論する。

# D-2 Pyrococcus furiosus 由来 Endonuclease Q と PCNA との相互作用解析 O吉田光太郎,石野園子,白石 都,山上 健,石野良純(九大・農)

【目的】我々が超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* (Pfu) から発見した Endonuclease Q (EndoQ) は, DNA の脱アミノ化塩基であるヒポキサンチン, ウラシルおよびキサンチンの 5'側を切断し, DNA 損傷修復に関与すると考えられている。今回我々は、PfuEndoQ に PCNA と相互作用する配列 (PIP-box 様) を見出したので、この配列を欠失させた変異体 (PfuEndoQ  $\Delta$  PIP) を作製し、PfuPCNA との相互作用を調べた。

【方法・結果】PfuEndoQ  $\Delta$  PIP を大腸菌で産生させ,種々のクロマトグラフィーにより精製した。野生型と変異体の PfuPCNA 存在下におけるヌクレアーゼ活性を測定した結果,野生型では活性が約 7 倍促進されたが,変異体では促進されなかった。また,表面プラズモン共鳴(SPR)解析では,野生型はポジティブシグナルを示したが ( $K_D$  = 996 nM),変異体はレスポンスを示さなかった。さらにそれぞれのタンパク質に対する抗体を用いて,P. furiosus 細胞抽出液からの免疫沈降を行なった結果,EndoQ と PCNA は共沈殿した。以上の結果から,P. furiosus 細胞内における EndoQ が関与する DNA 修復過程に PCNA が関与していることが示唆された。

# D-3 分裂酵母のロンボイドプロテアーゼによるゴルジ体膜タンパク質切断機構の解析

〇田中直孝, 田邊 寛, 宮下理沙, 東 玲那, 田淵光昭(香川大・農)

ロンボイドプロテアーゼ(以下,ロンボイド)は膜内セリンプロテアーゼであり,基質である膜タンパク質の膜貫通領域または近傍を認識し切断する。分裂酵母のゴルジ体膜で機能するロンボイドは,細胞の非性的凝集に関わる遺伝子の転写抑制因子である Sre2 のゴルジ体膜からの遊離を行っていることが分かってきたが,遊離を制御する機構は不明である。本研究では,人工基質 GFP-Sre2 および Ura4-Sre2 を用いて,Sre2 非切断変異株 ( $\underline{S}re2$   $\underline{C}leavage$   $\underline{D}efect:scd$ ) のスクリーニング系を確立し Sre2 切断機構を解析することを目的とした。 Sre2 の N 末側から核移行シグナルまで (1-523 aa) を Ura4 と入れ替えた Ura4-Sre2 は,MM (-ura) 培地において野性株では生育するが,rob1 破壊株では著しく生育が抑えられた。野性株を ura4-sre2 で形質転換した株に対して,生存率 40%の条件で UV 照射を行い,MM (5-FOA) 培地で生育する株をスクリーニングした結果,20 株の scd 変異株を単離した。scd 変異株の解析によりロンボイドを介した切断機構の解明につながることが期待される。

D-4乳酸菌由来新奇環状バクテリオシンの生合成関連遺伝子の同定と機能解析<br/>〇高城博也 <sup>1</sup>, 石橋直樹 <sup>1</sup>, 沢 稔彦 <sup>1</sup>, 善藤威史 <sup>1</sup>, 園元謙二 <sup>1,2</sup>(<sup>1</sup> 九大院・農、 <sup>2</sup> 九大・バイオアーク)

【背景・目的】バクテリオシンは細菌によってリボソーム上で合成される抗菌性ペプチドで、広範な細菌種に対して抗菌活性を示す。中でも環状構造を有する環状バクテリオシンは高い安定性を有し、食品保存料や医薬品への応用が期待されている。本研究では新奇環状バクテリオシン lactocyclicin Q (LycQ)の生合成(環化・分泌・自己耐性)機構の解明を目指し、生合成関連遺伝子群の同定を試みた。

【方法・結果】LycQ 構造遺伝子である lycQ 周辺領域の塩基配列解析の結果,生合成への関与が予想される 6 つの推定 orf を発見した。相同性検索の結果,トランスポーターや他の環状バクテリオシンに共通して見られるタンパク質をコードする orf が存在した。これらの推定生合成遺伝子を  $P_{32}$  プロモーター下流に挿入した種々の異種発現株を構築・解析したところ,orf6 が LycQ に対する自己耐性を単独で担うことが明らかとなったが,LycQ の分泌は全ての異種発現株で見られなかった。現在は,LycQ の環状化や分泌までを賄う最小遺伝子領域の決定を目的として,orf6 下流に存在する遺伝子の同定を進めている。

D-5 麹菌の機能未知遺伝子破壊株ライブラリーの表現型解析 井丸 直 <sup>1, 2</sup>, 〇川村 昂 <sup>1, 2</sup>, 妹尾史子 <sup>1, 2</sup>, 池田優理子 <sup>1</sup>, 岩下和裕 <sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>広島大・エ)

【目的】麹菌など糸状菌のゲノム解析が進むにつれ、糸状菌のゲノム中には、高度に保存され、かつ高発現する機能未知遺伝子 (cff 遺伝子) が多く存在することが明らかとなってきた。これらの遺伝子は糸状菌固有の性質に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、我々は130個の遺伝子 (cff 遺伝子) について、麹菌をホストに破壊株ライブラリーを作成し、表現型解析を行ったので報告する。

【方法と結果】cff 遺伝子破壊株について、生育、分生子形成の検討や、薬剤耐性、天然培地での生育などの表現型について検討を行った。その結果、プレート培地での菌糸成長に影響が見られたのは 4 遺伝子と少なかったが、糸状菌特有の形質である分生子の形成率に異常が見られたものは 41 遺伝子と非常に多く、保存された多くの遺伝子は糸状菌固有の性質に関わるものが多いことが示唆された。さらに、細胞壁合成阻害やアゾール系抗生物質耐性に関わるものは、それぞれ 6,11 遺伝子と比較的多くの遺伝子で異常が見られた。今回の解析により、糸状菌遺伝子について多くの基礎的知見が得られた。

D-6 液胞型 ATPase 膜内在性ローターサブユニットの変異体解析 河田美幸、〇西谷幸大<sup>1</sup>、柿沼喜己<sup>1</sup>(愛媛大・学術支援セ、<sup>1</sup>愛媛大・農)

【目的】液胞型 ATPase (V-ATPase) は植物や真菌の液胞および動物細胞のリソソームなどのオルガネラ内部の酸性化に必須の酵素である。腸球菌  $Enterococcus\ hirae$  の V-ATPase は, $H^+$ ではなく  $Na^+$ および  $Li^+$ を輸送する点で特徴的な V-ATPase である。V-ATPase のイオン輸送メカニズムの解明を目的として,腸球菌 V-ATPase を対象とし,膜内在性サブユニット NtpK リングにおける重要なアミノ酸残基の同定を試みた。【方法・結果】腸球菌において,高  $Na^+$ 濃度,アルカリ条件下での生育には本酵素活性が必須である。部位特異的変異導入により NtpK (E50K) 変異体を作製し,酵素活性に対する変異の影響を調べた。E50K 変異により,生細胞からの  $Na^+$ 排出活性ならびに高  $Na^+$ 濃度,アルカリ条件における生育が野生株の 50%程度に低下したことから,E50 残基は本酵素活性に影響を及ぼす重要なアミノ酸残基であることが分かった。E50 残基は NtpK リングと回転軸を構成する NtpC サブユニットとの相互作用に関わると考えられることから,V-ATPase 複合体形成や酵素の回転反応に関与している可能性がある。

D-7 深海底コア試料を用いた SIGEX 法による D-アミノ酸/希少糖代謝酵素遺伝子の網羅的探索

〇添田愛理沙, 諸野祐樹<sup>1</sup>, 寺田武志<sup>2</sup>, 稲垣史生<sup>1</sup>, 芦内 誠, 若松泰介 (高知大・農, <sup>1</sup>JAMSTEC, <sup>2</sup>マリンワーク)

【目的】D-アミノ酸や希少糖の生理機能や効能が明らかになるにつれ、分析や物質生産のための酸化還元 酵素など新規代謝系酵素の発見が待たれている。深海底(下)微生物は、有機物や呼吸に用いる酸化的 物質が欠乏した超貧栄養状態で生息すると考えられる。本環境では、海中や海底下表層部で消費されず 埋没した D-アミノ酸や希少糖などを用いることは生存戦略としてある種有利であるとも考えられ、代謝 系酵素を持つ可能性がある。そこで、深海底コア試料を用い該酵素遺伝子の網羅的探索を行った。

【方法・結果】深海底(下)微生物遺伝子の大半は機能未知配列であるので、南太平洋環流と南海トラフ熊野灘の深海底コア試料由来メタゲノムショットガンライブラリーを用い、基質依存的な遺伝子発現誘導を指標としたメタゲノム法 SIGEX により該酵素遺伝子の網羅的探索を行った。D-アミノ酸や希少糖に対する多数の陽性クローン候補が存在することを確認し、幾つかの陽性クローン候補を単離した。

D-8 深海底コア試料を用いた SIGEX 法によるレアメタル応答遺伝子の網羅的探索と解析

〇尾崎和弘, 諸野祐樹<sup>1</sup>, 寺田武志<sup>2</sup>, 西川聡美, 北村 萌, 稲垣史生<sup>1</sup>, 芦内 誠, 若松泰介(高知大・農, <sup>1</sup> JAMSTEC, <sup>2</sup>マリンワーク)

【目的】近年、深海底堆積物からレアメタルを高度に含む堆積物が発見されている。深海底堆積物には多くの微生物が存在しており、特に有機物や呼吸に用いる酸化的物質に乏しい深海底におけるレアメタルと生命活動の関わりに興味が持たれる。そこで、深海底コア試料からレアメタル応答遺伝子を探索・解析することで、レアメタルと深海底微生物の生命活動との関わりについて解析することを目指した。 【方法と結果】基質誘導型遺伝子発現を指標としたメタゲノム法 SIGEX を用いた実験を行い、南海トラフ熊野灘深海底コア試料から Ni や Ga に応答する 5 つの陽性クローンを単離し、挿入塩基配列を決定した。また、地球上で最も貧栄養な生命圏環境とされる南太平洋環流の深海底コア試料からは Mo, Dy, La に応答する陽性クローン候補の存在が確認できた。現在のところ必須元素とされる Ni, Mo では深海底微生物におけるレアメタルの利用法の解明が、Ga, Dy, La では新規生命現象の解明が期待される。

D-9 歯周病原性細菌 Eikenella corrodens におけるオートインデューサー不活化機構の解析

OJasin Mansur, 森重なつみ, 飯田亮平, 島谷雅文, 阿座上弘行(山口大・農)

歯周病原性細菌 Eikenella corrodens 1073 株は対数増殖期で AI-2 を大量生産するが、定常期に入ると急激に減少させる。そこで、本菌の培養上清からイオン交換クロマトグラフィーにより AI-2 の不活化因子の精製を行い、N 末端アミノ酸シークエンスを行った結果、E. corrodens 23834 株の外膜ポーリンのものと一致した。そこで、ポーリン遺伝子 porA の欠損株を作成し、AI-2 の生産量を調べた。その結果、野生株で見られた定常期における AI-2 の著しい減少が porA 欠損株では見られなかった。また、精製したポーリンと MHF をインキュベートすることで、MHF の AI-2 活性が減少した。これらのことから、外膜ポーリンが AI-2 の不活化に関与していることが示唆された。さらに、ポーリンとインキュベートすることにより、MHF は逆相クロマトグラフィーにおいてピークのシフトが見られた。しかし、ポーリンとインキュベーションした前後の MHF を LC-MS 解析したところ、構造の違いは見られなかった。現在、ポーリンがどのように AI-2 を不活化するのかを調べている。

# D-10 宿主グルタチオンを分解する植物病原菌エフェクターRipAY は宿主チオレドキシンにより活性化する 藤原祥子、大西浩平<sup>1</sup>、川添智貴、田中直孝、〇田淵光昭(香川大・農、<sup>1</sup>高知大・遺伝子)

我々は、青枯病菌が有する病原因子エフェクターの一つ RipAY がその発現により酵母に強い増殖阻害を引き起こすこと、また、RipAY はレドックス恒常性維持に必須なグルタチオンを特異的に分解する $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラー(GGCT)活性を有することを明らかとしている。興味深いことに RipAY は、酵母で発現させた場合において強い GGCT 活性を有するが、大腸菌で発現させた組換えタンパク質では全く GGCT 活性を示さなかった。また、組換え RipAY タンパク質に酵母タンパク質抽出液を添加することにより GGCT 活性の活性化が見られた。これより RipAY の活性化には、真核生物特異的な因子が必須であることが考えられた。そこで、RipAY の GGCT 活性の活性化を指標として酵母抽出液から RipAY 活性化因子の同定を試みたところ、チオレドキシン(Trx1/2)が同定された。さらに植物チオレドキシンについて RipAY の活性化能を調べた所、病原菌感染時に特異的に誘導され、免疫応答活性化に必須なチオレドキシンである Trx-h5 が最も効率的に RipAY の GGCT 活性を活性化した。

### D-11 バクテリアのオピンコンセプトに関わるフラビン依存性オピン脱水素酵素 〇渡辺誠也(愛媛大・農)

植物の根頭癌腫病の原因菌である Agrobacterium tumefaciens は、宿主のゲノム上へオピン(オパイン)と呼ばれるアミノ酸誘導体を合成する遺伝子を挿入する。これにより、根に生じる虫こぶ(クラウンゴール)内では植物の栄養源を用いて恒常的にオピンが作られるだけでなく、オピン資化能を持つ病原菌のみが独占的に生育することになる(オピンコンセプト)。このオピン資化遺伝子の候補の機能的解析の成功例はいまだない。今回我々は、Pseudomonas putida のホモログ遺伝子を P. putida 自身を宿主として発現させる系を用いて、安定した組み換えタンパク質を調整することに成功した。精製されたタンパク質は異なる3種類のサブユニットからなり、FADと FMNを補因子として含んでいた。また、人工電子受容体存在下で、代表的なオピンの1つであるノパリンに対する特異的な脱水素酵素活性が確認された。本酵素のアミノ酸配列は、我々が以前見出した細菌由来の D-ヒドロキシプロリン脱水素酵素の各サブユニットと相同性を示した。非植物病原菌からの本酵素の発見は、自然界におけるオピンの存在意義を再考する契機になるかもしれない。(参考文献)Watanabe et al. PLoS One (2015) in press

### D-12 植物葉上より分離した Methylobacterium spp.の系統解析とカルシウム依存的 PQQ 分泌機構の解析 〇矢野裕之,髙濵絵里香,田中三男,三井亮司(岡山理大・理)

【目的】植物の生長に伴い放出されるメタノールは葉上で Methylobacterium 属の炭素源となるなど、植物周辺の菌叢形成に影響を与える。一方 Methylobacterium 側からは植物ホルモンや PQQ が供給され、生長を促すことにより共生関係が成り立っている。 Methylobacterium はメタノールへの生育に Ca または希土類である La, Ce 等を必要とし、それぞれ対応する酵素系も異なっている。そこで本研究では PQQ 分泌に及ぼす金属の影響を明らかにすることを試みた。【方法と結果】各種植物より分離した菌株を系統分類した結果、いくつかのクラスターに帰属する菌株が分離されていた。メタノールを単一炭素源とする培養を行った結果、すべての菌株が Ca または La を含む培地に良好に生育した。しかし PQQ の分泌量の違いを比較したところ、いずれの菌株も Ca を添加した培養液において顕著な PQQ 分泌が見られた。現在PQQ 生合成系遺伝子の発現量の変化を RT-PCR 法により確認している。これらの金属に対する応答は葉上と土壌環境を反映しているとも考えられ、植物との共生に重要な役割を持っていることが推測される。

D-13 Gluconobacter thailandicus に見出された sldBA パラログ遺伝子の機能解析 〇数田皓平,数井彩加,松谷峰之介<sup>1</sup>,藥師寿治<sup>1</sup>,松下一信<sup>1</sup>,阿野嘉孝 (愛媛大・農, <sup>1</sup>山口大・農)

【目的】sldBA は Gluconobacter 属酢酸菌に特徴的なキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素(GLDH)の構造遺伝子であり,L-ソルボースやジヒドロキシアセトンの工業生産に重要である。G. thailandicus NBRC 3255 のゲノム解析の結果より,本菌のゲノム上に sldBA のパラログ遺伝子が見出された  $^{11}$ 。本研究では,sldBA パラログ遺伝子が生育と物質生産に与える影響を示し,機能を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】G. thailandicus NBRC 3255 の GLDH 活性をもつ構造遺伝子を sldA1,パラログ遺伝子を sldA2 として作製された欠損株を用いて,グリセロールおよびソルビトールを単一炭素源とした培地での生育挙動及び物質生産能を比較した。その結果,SldA2 は物質の生産には直接寄与しないが,sldA2 破壊によって生育の遅延を引き起こすこと,野生株よりも高い物質生産能を示すことが明らかとなった。現在,His6 タグ融合 SldA2 発現と酵素学的性質の解明を目指しているところである。

1) Matsutani M, et al., Genome Announc., 1 (2) e00118-13 (2013)

D-14 anammox 菌の銅型亜硝酸還元酵素の立体構造解析 〇平 大輔, 古川憲治 <sup>1</sup>, 藤井隆夫(崇城大・応生命, <sup>1</sup>熊本大院・自然)

【目的】嫌気性アンモニア酸化(anammox)反応では、亜硝酸とアンモニアから窒素ガスが生じる。その反応過程では、まず亜硝酸が一酸化窒素へと還元されると考えられており、anammox 菌 KSU-1 株では 銅型亜硝酸還元酵素(CuNIR)が機能すると推定されている。本研究では anammox 菌の CuNIR について その立体構造を X 線結晶構造解析により解明することを目的とした。

【方法】anammox 菌 KSU-1 株 CuNIR を構築済みの大腸菌発現系により発現・精製した。精製したタンパク質を結晶化し、SPring-8 で回折データ収集を行い、分子置換法による構造決定を行った。

【結果】PEG を含む結晶化条件で単結晶が得られ、anammox 菌 CuNIR の立体構造を決定することが出来た。得られた構造から、anammox 菌 CuNIR は既知の脱窒菌 CuNIR に類似する 3 次構造と銅中心を有していた。さらに、既知の CuNIR と類似する 3 量体の形成も確認されたが、その 3 量体がさらに S-S 結合で 2 量化した 6 量体構造が形成されていることがわかった。

D-15 anammox 菌のヒドラジン合成酵素の X 線結晶構造解析 〇北村龍史, 平 大輔, 中村照也<sup>1</sup>, 山縣ゆり子<sup>1</sup>, 古川憲治<sup>2</sup>, 藤井隆夫 (崇城大・応生命, <sup>1</sup>熊本大院・薬, <sup>2</sup>熊本大院・自然,)

【目的】嫌気性アンモニア酸化(anammox)反応では中間体  $N_2H_4$  を経たのちに  $N_2$  が生成される。我々は  $N_2H_4$  の合成を担うヒドラジンシンターゼ(HZS)の精製,性質の解明を進めてきた。本研究では X 線結晶構造解析による HZS の 3 次元構造の解明を目的とした。

【方法】anammox 菌 KSU-1 株優占汚泥から HZS を精製し、蒸気拡散法による結晶化を行った。得られた結晶を用いて SPring-8 BL44XU で 0.9 Å と 1.7 Å の波長でデータ収集を行い、Fe-SAD 法により構造決定を試みた。

【結果】結晶化から約3ヶ月で単結晶が得られた。回折実験により分解能4.0Åのデータが得られた。全体構造の決定には至っていないが、電子密度の解釈から分子の一部に $\beta$ -プロペラ構造が形成されていることが推定された。結晶サイズ及び析出までの時間短縮を目指した結晶化条件の再検討を行っている。

### D-16 Shewanella 属細菌由来シトクロム c'の熱安定性の比較研究 〇加藤雄基,藤井創太郎,栗林貴明,政成美沙,三本木至宏(広島大院・生物圏)

【目的】Shewanella 属細菌は、高圧から常圧域、そして低温から常温域に生息している。シトクロムc' は、Shewanella 属細菌に共通してみられ、その構造は4本の $\alpha$ ヘリックスが束になった4-helix bundle であり、多くは2量体として存在する。本研究の目的は、Shewanella 属シトクロムc' を調べることで、生育圧力と生育温度が、タンパク質の安定性にどのように関係しているかを調べることである。

【方法・結果】至適生育環境が 37°C, 0.1 MPa である Shewanella amazonensis 由来シトクロム c' (SACP), 15°C, 0.1 MPa である Shewanalla livingstonensis 由来シトクロム c' (SLCP), そして 8°C, 30 MPa である Shewanella violacea 由来シトクロム c' (SVCP)を用いた。SACP は元菌から精製し、SLCP、SVCP は大腸菌で異種発現させた。CD スペクトルによる熱安定性測定の結果,生育環境に対応する安定性の違いが現れ,アミノ酸配列比較の結果,水素結合の数やヘム周辺のアミノ酸残基の違いによる安定性の違いを見出した。

### D-17 変異を導入した好熱菌由来シトクロム c'の熱安定性比較 〇山根大典,藤井創太郎<sup>1</sup>,三本木至宏<sup>1</sup> (広島大・生物生産,<sup>1</sup>広島大院・生物圏)

【目的】好熱菌 Hydrogenophilus thermoluteolus 由来シトクロム c' (PHCP) は,アミノ酸配列が 55%一致 する常温菌 Allochromatium vinosum 由来シトクロム c' (AVCP) よりも高い安定性を持つ。本研究の目的は,PHCP の安定化機構をアミノ酸レベルで解明することである。

【方法・結果】変異導入 PHCP を Escherichia coli で異種発現,および精製を行い,CD スペクトルで 222 nm の温度に依存する変化を指標に,変異体の変性中点温度  $T_{\rm m}$  を測定した。へムと相互作用している残基を置換した T17E,A20G 変異体では  $T_{\rm m}$  がそれぞれ 2.0 ℃,3.6 ℃低下した。また,サブユニット間での相互作用をなくす変異である F71D,F11T 変異体では  $T_{\rm m}$  がそれぞれ 5.6 ℃,6.3 ℃低下した。一方,サブユニット内での水素結合をなくす変異である Q39A 変異体では  $T_{\rm m}$  が 0.3 ℃しか低下しなかった。これらのことより,PHCP の安定化にはヘムと周囲の側鎖の相互作用とサブユニット間での相互作用が大きく寄与していると考察した。

### D-18 大腸菌 K5 株へパロサン糖鎖合成酵素 KfiA の X 線結晶構造解析 〇堀 啓華、大西 桃、木村 誠、角田佳充(九大・農)

【目的】KfiA は大腸菌 K5 株の莢膜成分であるヘパロサン糖鎖の合成酵素である。ヘパロサン糖鎖は、N-アセチルグルコサミン(GleNAc)とグルクロン酸(GleA)の二糖繰り返し構造をもつ。また、医療分野において有効な抗血液凝固剤として知られているヘパリンの前駆体である。ヘパロサン糖鎖の合成は、KfiA による GleNAc 転移反応と、Kfic による GleA 転移反応によることが明らかとなっている。本研究では、KfiA の立体構造を明らかにすることで、ヘパロサン糖鎖合成メカニズムの一端を構造的に解明することを目的としている。

【方法・結果】KfiA は、N 末端に His タグを付加し、C 末端の 28 残基を欠損させることにより、大量に発現・精製・結晶化することに成功した。X 線回折実験により、分解能 1.75 Åの回折強度データが得られた。KfiA のアミノ酸配列と高い相同性を持つタンパク質の立体構造は報告されていないが、DXD モチーフを持つことと、 $Mn^{2+}$ イオンを要求することから GT-A 型糖転移酵素であると予想されている。そこで、複数の GT-A 型糖転移酵素をテンプレートとして分子置換法による位相決定を目指している。

D-19 超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp38 による RNA 活性化 の作用機構に関する研究

〇垣内洋祐, 大嶋浩介<sup>1</sup>, 中島 崇<sup>1</sup>, 角田佳充<sup>1</sup>, 田中良和<sup>2</sup>, 姚 閔<sup>2</sup>, 木村 誠<sup>1</sup> (九大・農, <sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>北大院・先端生命)

【目的】超好熱性アーキア RNase P 構成タンパク質 Rpp38 は、K-turn モチーフを認識する RNA 結合タンパク質で、RNA サブユニット(pRNA)の 2 本のステムループ構造 (SL1 と SL2) に結合する。本研究では、Rpp38 の SL1 と SL2 に対する結合部位 (site1 と site2) について検討した。

【方法・結果】まず、Rpp38の site1 と site2 を決定するために、Rpp38の K-turn 認識配列(NExxK)と推定される Asn38、Glu39、Lys42 を Ala に置換した変異体を調製し、pRNA および SL1 を欠失した変異体  $\Delta$  SL1 と SL2 を欠失した変異体  $\Delta$  SL2 に対する結合能をゲルシフトアッセイにより検討した。その結果、その変異体は pRNA と  $\Delta$  SL1 に対しては野生型 Rpp38 と同等の結合能を維持していたが、  $\Delta$  SL2 に対しては結合能を消失していた。この結果から、Rpp38の Asn38、Glu39、Lys42が SL1 への結合部位(site1)を形成していることが分かった。現在、pRNA-Rpp38のモデル構造を作成し site2 について検討中である。

D-20超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P 構成タンパク質 Rpp29 の構造機能相関〇泉 健太, 中島 崇 ¹, 角田佳充 ¹, 木村 誠 ¹ (九大院・生資環, ¹九大院・農)

【目的】リボヌクレアーゼ P(RNase P)は前駆体 tRNA (pre-tRNA) から成熟体 tRNA へのプロセシング 反応を触媒する酵素で、1分子の RNA(pRNA)と数種類のタンパク質で構成されている。超好熱性アーキア RNase P 構成タンパク質の 1 つである Rpp29 は pre-tRNA 切断活性に寄与しているが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、Rpp29 の機能解明のため、Rpp29 の pRNA と pre-tRNA への結合を検討した。 【方法・結果】 Rpp29 の C 末端領域の塩基性アミノ酸を置換もしくは欠失した 4 種の変異体(K121A、K122A、K121/122A、 $\Delta$ 10C)を作成し、再構成実験により pre-tRNA に対する切断活性を検討した。その結果、K121A と K122A を含む再構成酵素は、Rpp29 を含む再構成酵素と同程度の値を示したが、K121/122A と  $\Delta$ 10C を含む再構成酵素の活性は下がった。次に、Rpp29 と  $\Delta$ 10C の pRNA または pre-tRNA に対する結合能を蛍光偏光法により検討した。その結果、Rpp29 と  $\Delta$ 10C は pRNA に対して同程度の結合能を示したが、 $\Delta$ 10C は Rpp29 よりも pre-tRNA に対する結合能が低下した。この結果より、Rpp29 の塩基性アミノ酸を含む C 末端の 10 アミノ酸が、基質である pre-tRNA との結合に関与していることが示唆された。

D-21 超好熱性アーキアリボヌクレアーゼ P構成タンパク質 Rpp21 の RNA 活性化部位 の同定

O江 丹, 泉 健太<sup>1</sup>, 中島 崇<sup>1</sup>, 角田佳充<sup>1</sup>, 木村 誠<sup>1</sup> (九大院・シス生命, <sup>1</sup>九大院・農)

【目的】超好熱性アーキア RNase P 構成タンパク質 Rpp21 は RNA サブユニット (pRNA) を活性化し、前駆体 tRNA (pre-tRNA) の切断活性に寄与しているが、その pRNA 活性化機構は不明である。本研究では、Rpp21 の機能解明のため、Rpp21 の pRNA 活性化部位について検討した。

【方法・結果】Rpp21 の塩基性アミノ酸を網羅的に置換した 5 種の変異体を作成し、再構成実験により pre-tRNA に対する切断活性を検討した。その結果、Lys53、Lys54、Lys56 をともに Ala に置換した変異体 を含む再構成酵素だけが、pre-tRNA 切断活性を減少していた。次に、その変異体の pRNA または pre-tRNA に対する結合能を蛍光偏光法により検討した。その結果、その変異体は pre-tRNA に対して野生型 Rpp21 と同程度の結合能を示したが、pRNA に対する結合能が低下していた。この結果より、Rpp21 の塩基性アミノ酸 Lys53、Lys54、Lys56 が、pRNA に結合し pRNA の活性化に関与していることが示唆された。

D-22腸炎ビブリオ (Vibrio parahaemolyticus) のトキシン/アンチトキシンの機能解析○張 晶, 伊藤寛倫 ¹, 棗 智紀 ¹, 日野まど香 ², 中島 崇 ¹, 角田佳充 ¹,木村 誠 ¹ (九大院・シス生命, ¹九大院・農, ²西九州大・健康)

【目的】真正細菌や古細菌はストレス条件下で蛋白質合成や DNA 複製を抑制し、細胞増殖を抑えるトキシン/アンチトキシン(TA)システムを有している。本研究では、腸炎ビブリオの TA システムの一つである *vp1842/vp1843* のトキシン VP1843 の生理活性について検討した。

【方法・結果】現在までの研究から、腸炎ビブリオのトキシン VP1843 は、大腸菌の TA システム dinJlyafQ のホモログである YafQ とは異なり、タンパク質合成を阻害しないことが分かった。一方、VP1843 を大腸菌内で発現すると、YafQ の発現とは異なり、大腸菌の形態をフィラメント状に変形することが分かった。そこで、この変形した大腸菌のゲノム DNA を蛍光顕微鏡で観察したところ、ゲノム DNA が分解されていることが示唆された。このことから、VP1843 の発現により DNA が障害を受け、SOS 応答によりゲノム DNA が分解されていることが推定された。そこで、VP1843 の DNA ジャイレースに対する阻害活性を弛緩型 pUC19 を基質として検討したところ、VP1843 が DNA ジャイレースを阻害していることが分かった。

# E-1 簡便・高速な微生物分類・定量システムの解析精度向上のための PCR プライマーの検討

〇松本邦成、渡辺克二、堀西直人(福岡工大・工)

[目的]本研究室では、微生物の新しい同定・定量法の検討を行っている。その結果、より広範囲の微生物を正確に解析するためには、幅広い菌の増幅効率を上げることが必要と判明した。そこで、旧PCRプライマーの塩基配列を変更して新プライマーを設計し、旧プライマーと併用することでどの程度解析範囲を広げられるか検討した。またPCRで実際に増幅を行い、この新旧プライマーをそれぞれ単独で使用した場合、混ぜて使用した場合について微生物叢の調査を行った。[結果] アニーリング時のプライマーへのミスマッチの許容限界を 2 塩基とし、理論上増幅される微生物について調査した結果、旧プライマーは 337 属増幅されたが、新プライマーで新たに 169 属が増幅できることが明らかとなった。また、両方のプライマーで増幅出来た属に関しても、新プライマーではより多くの種が確認出来る場合もあった。実際に市販のヨーグルトの菌叢をこれらのプライマーで増幅した結果、Lactococcus 属、Streptcoccus 属が両方のプライマーで確認され、新プライマー単独では Bifidobacterium 属が新しく確認された。

### E-2 分裂酵母 coq5 破壊株において蓄積する 2 つの中間体の解析 〇柳井良太,赤井華子,西野耕平,戒能智宏,川向 誠(島根大・生資)

【背景・目的】 コエンザイム Q(CoQ) は生体内で合成される脂溶性抗酸化物質であり、ミトコンドリア 呼吸鎖における電子伝達系の必須因子である。分裂酵母では CoQ 生合成に関与する遺伝子を 1 つでも破壊すると、最終産物である CoQ10 は生合成されないが、coq7 破壊株では Coq7 の基質である DMQ10 (Demethoxyubiquinone-10) が蓄積することを過去に報告した。そこで本研究では、新たに見出した coq5 破壊株で蓄積する 2 つの中間体様物質の解析を目的とした。

【結果】 まず、coq5 破壊株で蓄積する物質を TOF-MS で解析したところ、2 つの物質は CoQ10 と比較して、ともにキノン骨格部分の修飾に違いがあることが分かった。さらに、PHB (p-hydroxybenzoic acid)と pABA (p-aminobenzoic acid)の安定同位体を用いた実験より、蓄積している物質が同一経路で生合成されていることが示唆された。また、coq5 と coq7 との二重破壊株で蓄積する物質を測定した結果,DMQ10は検出されず、coq5 破壊株で蓄積する中間体様物質が検出されたことから、これまでに知られている合成経路の通り Coq5、Coq7 の順に合成していることが示唆された。

### E-3 接合-相同組換えによる rpoB 遺伝子の部位特異的改変とシネフンギン増産効果 〇田村 隆、清水 瞳、小川沙織、根本理子、稲垣賢二(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の増産を目的として RNA ポリメラーゼ rpoB 遺伝子に任意に多重変異を導入して増産効果を検討した。【方法】 rpoB 遺伝子の 5'末端 500 bp を削除して接合伝達ベクターpK18mob に連結した。二次代謝活性化効果が報告されている 4 残基 (D447, S453, H457, R460) を組合せた多重変異をプラスミド上に構築した。接合伝達-相同組換えを経てプラスミドから宿主ゲノムに多重変異配列を移して rpoB 改変株のシネフンギン生産量を HPLC で評価した。【結果・考察】三重変異導入 (D447G/H457R/R460C) は野生株の約 3 倍の生産性を示したが,四重変異 (D447G/S453L/H457R/R460F) 株では生産能が消失した。立体構造モデリングの結果,これらの残基は新生 mRNA 鎖と強く相互作用する位置にあり,残基の改変により転写調節ブレーキが緩むことで転写の活性化 (または不活性化) が起こる機構が示唆された。

E-4 自然発生的変異による酢酸菌のケトグルコン酸代謝の変換 〇西原 彬, 片岡尚也<sup>1</sup>, 藥師寿治<sup>1</sup>, 松下一信<sup>1</sup>, 阿野嘉孝 (愛媛大・農, <sup>1</sup>山口大・農)

【目的】 Gluconobacter 属酢酸菌によって生産されるケトグルコン酸は、キシリトールや酒石酸、ビタミン C、生分解性プラスチック等の合成中間体となり汎用性の高い化学素材である。最近、G. frateurii NBRC 3285 の保存菌株からコロニー形態、生育、ケトグルコン酸生産能が異なる自然突然変異株が単離された。本研究ではこれら変異株を比較解析し、ケトグルコン酸生産能が異なる要因を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】変異株の生育および培養液中のケトグルコン酸濃度を測定し、ケトグルコン酸代謝に関わる酵素群の活性を比較した。その結果、変異株は細胞外で一度生産・蓄積したケトグルコン酸を細胞内で資化し再び増殖をはじめるという表現型を示すことが明らかとなった。この表現型は、発酵生理学的に興味深い現象であるだけでなく、ケトグルコン酸の大量生産を実現するための重要な情報を提供する可能性がある。現在、ケトグルコン酸の細胞内への取り込みに機能する輸送体の探索を行っている。

E-5 Gluconobacter 属酢酸菌におけるジヒドロキシアセトン代謝の生化学的解析 〇平田花織,阿野嘉孝 <sup>1</sup>,松谷峰之介,足立収生,片岡尚也,藥師寿治, 松下一信(山口大・農, <sup>1</sup> 愛媛大・農)

【目的】 Gluconobacter 属酢酸菌はペリプラズムにあるキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) によってグリセロールを酸化し、ジヒドロキシアセトン (DHA) へと変換、蓄積することができる。生産された DHA は、Gluconobacter oxydans 621H ではほとんど消費されないが、Gluconobacter thailandicus NBRC 3255 ではほぼ完全に消費される。本研究では、NBRC 3255 と 621H の DHA 代謝の違いについて生化学的解析を行った。

【方法・結果】DHA の細胞内代謝の指標になる、休止菌体による DHA オキシダーゼ活性を測定すると NBRC 3255 で高く、621H は非常に低かった。この DHA の細胞内代謝に関連すると予想される酵素である DHA キナーゼ (DHAK) と DHA レダクターゼの活性を621H と NBRC 3255 で比較すると、特に DHAK の活性が NBRC 3255 で非常に高いことが示された。培養時の DHA 消費が活発な際に NBRC 3255 の DHAK 活性が高かったことからも、DHAK が重要な役割をもつと示唆された。

E-6 Gluconobacter oxydans による 5-ケトグルコン酸発酵におけるグルコノ-δ-ラクトナーゼの役割 片岡尚也, 吉田知世, 種場理絵, 阿野嘉孝 <sup>1</sup>, 松谷峰之介, 藥師寿治, 足立収生, 〇松下一信(山口大・農, <sup>1</sup>愛媛大・農)

【目的】 Gluconobacter oxydans は、グルコースを初発基質にグルコノ- $\delta$ -ラクトン、グルコン酸を経ることで、国内での年間生産量が 1000 トンを越える酒石酸の合成中間体として有用である 5-ケトグルコン酸を生成する。この一連の反応は、ペリプラズム領域で行われ、グルコースの酸化、ラクトンの開環、グルコン酸の酸化、の三段階で構成される。本研究では、二番目の段階であるラクトンの開環に関わると推測されるグルコノ- $\delta$ -ラクトナーゼの 5-ケトグルコン生産における役割を解明することを目的とした。【方法・結果】 5-ケトグルコン酸生産能の高い G. oxydans NBRC 12528 を対象として選抜した。全ゲノム配列が明らかになっている G. oxydans 621H のゲノム情報をもとに、グルコノ- $\delta$ -ラクトナーゼをコードする遺伝子を探索したところ、GOX1381 を見出した。そこで、GOX1381 欠損株を作製し、5-ケトグルコン酸生産を評価した。その結果、欠損株は、親株と比較して顕著に 5-ケトグルコン酸生産量が低下した。

### E-7 Bacillus 属細菌が生産するピルビン酸化ガラクトース含有糖鎖分解酵素の同定と 諸性質の解析 〇松藤仁美, 樋口裕次郎, 竹川 薫(九大院・生資環)

### E - 8 Penicillium multicolor が生産する 2 種類の β-グルコシダーゼの基質特異性に関する研究

○菅沼笙子, 寺坂美紀, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々はアスコルビン酸(AA)に対して糖転移活性を有する酵素を探索する中で、由来の異なる  $\beta$ -グルコシダーゼには糖転移活性の強さや配糖化の位置選択性、糖供与体に対する特異性が異なるもの があることを明らかにしてきた。その一つとして *Penicillium multicolor* 由来  $\beta$ -グルコシダーゼの精製を行ったが、その過程で酵素製剤中に 2 種類の *p*-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (*p*NPG) 分解酵素を見出した。これら 2 種類の酵素について行った基質特異性を中心とした性質検討について報告する。

【方法・結果】P. multicolor 由来酵素製剤アロマーゼを精製し SDS-PAGE に供したところ,分子量  $102~\mathrm{kDa}$  と  $117~\mathrm{kDa}$  の  $p\mathrm{NPG}$  分解酵素を見出した。N 末端アミノ酸配列解析によりこれらの酵素は異なる遺伝子がコードすると推定した。 $p\mathrm{NPG}$  分解活性を揃え種々の糖供与体を用いて AA への糖転移活性を測定した結果,前者は芳香環を有する配糖体を糖供与体とした時に高い活性を示すという特徴的な基質特異性を示し,後者はそれらに加えてセロオリゴ糖や $\beta$ -グルコ二糖を糖供与体とした時も高い活性を示した。

# E - 9 糸状菌が生産する β-*N*-Acetylglucosaminidase 阻害剤 pochonicine の 6, 7-ジデオキシ類縁体

〇虫明優一, 土田 彩, 奥田 徹<sup>1</sup>, 神崎 浩, 仁戸田照彦 (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>東大・理)

【目的】当研究室では $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) 阻害剤 pochonicine を糸状菌 Pochonia suchlasporiaの培養物中に見出した。本菌株の培養物中にはpochonicineとは水酸基の数が異なる類縁体が複数存在することが明らかになっているが,平面構造の決定に至っていないものがある。そこで,本研究ではpochonicine及びその類縁体の精製・単離を行い,平面構造未決定であった類縁体の1つについて構造解析を行った。【方法・結果】すでに確立されたpochonicine精製法を参考にして,ハスモンヨトウ蛹GlcNAcaseに対する阻害活性を指標に精製を行い,最終的にpochonicine及びその類縁体A, B, D, Eを単離した。これらのうち,類縁体Dの構造解析を行った。高分解能質量分析により,類縁体Dの分子式は $C_{11}H_{20}N_2O_3$ であることが明らかとなった。さらに, $^1H$ -NMR, $^1H$ - $^1H$  COSYの測定結果より,類縁体Dはpochonicineの6位と7位の水酸基が水素に置換された平面構造をもつと推定された。

### E-10 紅麹を用いたアルコール飲料の試醸とその特性 〇竹下良一,川野徳嗣,三枝敬明,寺本祐司(崇城大院・応微工)

【目的】 白米, 黒米, およびワイルドライスを発酵原料とし, 白米を用いた紅麹 (Monascus purpreus NBRC 5965 株) と黄麹 (糖化用麹, 河内源一郎商店) を各々糖化剤として発酵酒を試醸し, 抗酸化能および組成について比較検討した。

【方法・結果】抗酸化能は,DPPH ラジカル消去能と $\beta$ -カロテン脂質過酸化阻止能により評価した。 紅麹の割合を  $10\sim100\%$ と変えて,白米を原料に試醸したところ,発酵は全てほぼ一週間で終了した。一方,紅麹の割合を変えたことによる両抗酸化能には大きな差異は確認されなかった。また,黄麹を用いて試醸した白米酒の抗酸化能と比べて,紅麹を用いた白米酒の DPPH ラジカル消去能は 4.6 倍, $\beta$ -カロテン脂質過酸化阻止能は 2.6 倍高かった。次に黒米あるいはワイルドライスを各々原料に,紅麹を糖化剤として用いた発酵醸造酒を試醸した。黒米あるいはワイルドライスを用いて 30%麹で試醸した紅麹酒は,8% (w/v) 程度のアルコール度数を示し,白米を用いたものと同様の芳香を有した。DPPH ラジカル消去能及び $\beta$ -カロテン脂質過酸化阻止能は黄麹を用いたものに比べ,各々約 10 倍,3.5 倍高い値を示した。

### E-11 小仕込みモデルを用いた生もと酒母における酵母の有機酸代謝特性 〇伊藤一成,三宅剛史(岡山県・工技セ)

【目的】清酒成分と味・香味との関係について様々な報告があるが、有機酸は清酒に多く含まれ味覚に大きな影響を与える。有機酸は主にもろみで生成するため、酒母工程で酵母が得た代謝特性がその後の有機酸生成に大きく影響すると考えられる。本研究では生もと酒母における酵母の有機酸代謝特性を解明するため、小仕込みモデルを用いて作製した生もとと速醸もと酒母の成分分析を行った。

【方法】精米歩合 60%の  $\alpha$  米と乾燥麹を用い、麹歩合 32.5%、汲水歩合 110%で総米 200 g の小仕込みを行った。生もとでは仕込み時に  $NaNO_2$  と酒造会社の生もと酒母から分離した乳酸菌の培養液を加え、その後酵母培養液 (K701) を添加した。速醸もとでは仕込み時に乳酸と酵母培養液を加えた。温度管理は恒温槽で行い、それぞれ経時的にサンプリングし各種成分分析を行った。

【結果】生もと酒母ではグルコースが高濃度で維持され、ピルビン酸も高生産していた。また酵母添加後、TCA回路から生成されるアミノ酸の蓄積が見られ、リンゴ酸は徐々に減少、コハク酸は発酵後半に急激な上昇が見られた。以上から発酵後半でもTCA回路が酸化的方向へ動いていることが推察された。

### E-12 柑橘残渣利用を目的とした分離酵母のアルコール発酵特性 〇西村杏奈、松本優子、丸山雅史(愛媛大・農)

【目的】柑橘残渣バイオマスの利用法は古くから検討されているが、未だ飼料への利用が主であり、過剰なものは埋め立てなど廃棄され、それによる環境問題やコストなどが問題となっている。そこで本研究では、微生物発酵によるバイオマス変換利用の試みとして酵母によるアルコール発酵を検討した。

【方法・結果】発酵酵母の獲得にあたって、微生物生育阻害要因である柑橘果皮中のリモネンおよび高い酸性度に耐性を有する株(TN-3 株)を発酵漬物から取得することができた。清酒酵母 K701 株,ワイン酵母 RIB1052 株を比較対象として本菌株の発酵特性(リモネン耐性、耐酸性など)を試験した結果、対象株と比べ高い耐性を示すことが分かった。すなわち、リモネン耐性試験では、対象株がリモネン 1.0% 存在下で全く発酵しなかったのに対し、本菌株では約 74%のアルコール生産がみられた。さらに同リモネン濃度での試験結果から、 4%、 15%の低温、また pH2.5、3 の酸性の条件で、発酵時間の遅れはあるもののアルコール生産がみられた。これより、獲得した株は 4%000 幅広い温度帯、pH2.5~4.5 の弱酸性~酸性域までの範囲で一定のアルコール生産が見込まれることが分かった。

#### 

【目的】グラム陰性菌はその特徴的な細胞構造により毒性や薬剤耐性など有害性が高いものが多く、そのため食品産業や医療分野などにおいて効果的な抗菌剤が求められている。本研究室では、滋賀県特産の鮒ずしから分離した微生物株がこれら微生物に対する生育阻害活性を示すことを見出した。そこで、得られた F-31 株の産生する抗菌物質について精製および性状について検討を行った。

【方法・結果】培養上清液を初発試料として,硫安分画,透析,ブタノール抽出を試みた結果,357 倍にまで精製された。その粗精製画分を試料として性状について試験した。抗菌スペクトルでは,グラム陰性菌 17 株のうち 8 株に対して生育阻害活性を示した。中でも食中毒の原因菌である E.coli O-157 や Salmonella 属の他,Serratia 属,Edwardsiella 属に対し効果があることが確認された。プロテアーゼ消化試験では Proteinase K,Trypsin 処理後の残存活性を調べた。その結果, Proteinase K によって  $15\sim20\%$  に活性の低下が認められた。さらに安定性試験では,弱アルカリ領域でもっとも安定であった。このことは,既知の Bacillus 属由来の抗菌物質が酸性領域に安定であることと対象的であった。

E-14 ウシの糞便から分離された乳酸菌が生産するバクテリオシンの同定 〇大橋千紘<sup>1</sup>、杉野春貴<sup>1</sup>、須志田浩稔<sup>1</sup>、龔 皛<sup>1</sup>、石橋直樹<sup>1</sup>、善藤威史<sup>1</sup>、 園元謙二<sup>1,2</sup>(<sup>1</sup>九大院・農、<sup>2</sup>九大・バイオアーク)

【目的】バクテリオシンは細菌により生産される抗菌性ペプチドで、乳酸菌由来のものは天然由来の安全な抗菌剤としての利用が期待されている。抗菌スペクトルや安定性などの性質の異なる種々のバクテリオシンの複合的な利用により、標的選択性の高い微生物制御技術の実現も期待される。そこで本研究では、新奇乳酸菌バクテリオシンの獲得を目的とし、バクテリオシン生産乳酸菌の探索と同定を行った。【方法・結果】家畜の糞便など、37の分離源から269株を単離し、48株がバクテリオシン様の抗菌活性を示した。その中で、ウシの糞便から単離されたMC1株は、抗菌スペクトルが広くBacillusやListeriaなどに対して抗菌活性を示し、16SrRNA解析によりEnterococcus faeciumと同定された。MC1株の培養液上清から陽イオン交換クロマトグラフィーや逆相HPLCで精製したバクテリオシンについて、質量分析やN末端アミノ酸配列解析を行った。さらに、得られたアミノ酸配列等を基にPCR・シーケンス解析を行った結果、MC1株はenterocin L50A、L50B、Pの3種のバクテリオシンを生産することが示唆された。

E - 15 フィリピンの都市部と農村部に住む児童の腸内細菌叢の比較解析 〇山本麻寿紗,本田倫子,田中 優,百田理恵 <sup>1</sup>,Ladie Palermo <sup>2</sup>,Julie Tan <sup>2</sup>, Yuan Kun Lee <sup>3</sup>,園元謙二 <sup>1</sup>,中山二郎 <sup>1</sup> (九大院・生資環, <sup>1</sup>九大院・農, <sup>2</sup>ビサヤ州大, <sup>3</sup>シンガポール国大)

【目的】ヒトの腸内細菌叢は食と健康を繋ぐ重要なインターフェースであり、多様な食文化の根付くアジア人の腸内細菌叢は大変興味深い。本研究では、都市部と農村部に住むフィリピン人児童の腸内細菌叢を比較し、腸内細菌叢に影響する因子や健康との関連を明らかにすることを目指した。【方法・結果】フィリピン人児童 43 名から糞便を採取し、全細菌のゲノム DNA を抽出した。次に 16S rRNA 遺伝子配列の V6-V8 領域を対象として、次世代シーケンサー (454 FLX titanium) を用いた配列解析を行った。得られた約 60 万本の配列データに対して、解析ソフトウェア QIIME を用いて解析を行い、各被験者の細菌叢組成を明らかにした。農村部ではエンテロタイプの特徴菌である Prevotellaceae 科 (18.7 $\pm$ 10.7%) や、フィリピン人に特徴的に見られる Rhizobiales 目(13.4 $\pm$ 10.1%)が多いのに対し、都市部では Bacteroidaceae 科 (4.8 $\pm$ 4.4%) や Lachnospiraceae 科 (21.0 $\pm$ 13.7%) が多く、農村部と都市部では異なる細菌叢の傾向が見られた。

### E-16 青枯病菌の持つ TonB-dependent receptor はバイオフィルム形成に関与する 〇渡邊諒介、木場章範、曳地康史、大西浩平(高知大・農)

【目的】グラム陰性細菌の TonB-dependent receptor (TBDR) は、鉄ーシデロフォア複合体やビタミン  $B_{12}$ 、糖類のペリプラズムへの取り込みに関与する外膜タンパク質である。 TBDR の数は細菌種によって様々で、物質の取り込み以外の機能が予想されていたが、最近、バイオフィルムの形成に関与する TBDR の存在が明らかとなった。植物病原細菌の青枯病菌は比較的多い 15 種類の TBDR を持つことから、TBDR のバイオフィルム形成への関与について解析を行った。【方法】野生株 OE1-1 から 15 個の TBDR 遺伝子のそれぞれを欠損させた 1 遺伝子変異株及び複数の TBDR 遺伝子を欠損させたマルチ変異株を作成した。菌株を最少培地もしくは植物細胞間隙液を用いてマイクロプレート内で培養し、クリスタルバイオレットによる染色でバイオフィルム量を測定した。【結果・考察】15 種類の 1 遺伝子変異株のうち、2 種類の変異株が野生株と比較してバイオフィルム形成量が有意に増加していた。そのうちの 1 つ rsp0416 変異株は、鉄欠乏の培地において生育が抑制された。この結果は、青枯病菌においては、鉄の取り込みと関連してバイオフィルム形成を抑制する TBDR が存在する可能性を示唆している。

E – 17 Effect of land-use change from paddy field on soil bacterial community in the hilly and mountainous area

OMd Rokunuzzaman, Yumiko Ueda <sup>1</sup>, Sota Tanaka <sup>1</sup>, Kouhei Ohnishi <sup>1</sup>

OMd Rokunuzzaman, Yumiko Ueda ¹, Sota Tanaka ¹, Kouhei Ohnishi ¹ (Ehime Univ., ¹ Kochi Univ.)

Most of the terraced rice-fields in the hilly and mountainous area at Nuta, Otoyo in Kochi were abandoned or have been changed to citron fields, forest lands, and bamboo thickets. Soil bacterial community structures of these different land usages were analyzed using 16S rRNA partial gene sequences. DGGE band patters of each soil were quite similar, although several paddy-field specific DNA bands were observed. Based on pyrosequencing data, bacterial species richness was slightly higher in paddy fields than in other soils. While overall bacterial community structures of soils at different land usages were similar, beta-diversity analysis clearly indicated that there are three clusters. Detail bacterial community structure of paddy fields was different from those of non-paddy field land usages. Interestingly, community structure of crop fields, which have not been used as paddy field, was different from those of at least one-time paddy fields. This might reflect the history of land usage.

E-18 バイオベース新素材「ポリ $\gamma$ グルタミン酸デカリニウム」の抗菌コーティング剤 としての応用

〇中山沢水、白米優一 $^{1}$ 、白馬弘文 $^{2}$ 、柴谷滋朗 $^{2}$ 、小林久人 $^{2}$ 、芦内 誠 $^{1}$  (高知大・農、 $^{1}$ 高知大院・総人自、 $^{2}$ 東洋紡(株))

【目的】近年、食品や医療分野において衛生環境に対する関心が高まり、人体に安全でかつ十分な抗菌性を有する抗菌材料が強く求められている。最近になって、化粧品に利用されるなど皮膚への高い安全性と生分解性を持つポリッグルタミン酸(PGA)と2頭型第4級アンモニウム化合物「デカリニウム」からなる新素材「PGA デカリニウム」の合成に成功した。今回、PGA デカリニウムの抗菌活性、並びにその効果の持続性について検討するとともに、新たな抗菌コーティング剤としての応用法を検討した。

【方法・結果】PGA デカリニウムを母材(合成繊維)表面で合成した後、ハロ試験より顕著な抗菌活性を確認した。さらに、本抗菌材料を液体培地に投入し、枯草菌と大腸菌の生育速度に対する影響を調査するともに、現在、PGA デカリニウムによる活性炭表面のコーティング、並びにその除菌担体としての機能性と持続性について検討している。

#### F-1 67-kDa Laminin receptor 由来ペプチドを用いた抗腫瘍ワクチンの作製 〇日高詩織、鶴留ゆかり、熊添基文、立花宏文(九大院・農)

【目的】我々はこれまでに、がん細胞表面で高発現する膜タンパク質 67-kDa Laminin receptor (67LR) がデスレセプターとして機能することを報告した  $^1$ 。そこで本研究では、67LR を標的とする抗腫瘍ワクチンの開発を目的とした。

【方法・結果】67LR 由来ペプチドを抗原としてマウスに免疫した。抗体価の上昇を確認後、がん細胞をマウス背面皮下に移植し、2日毎に腫瘍体積を測定した。その結果、腫瘍成長の抑制作用および生存期間の延長が確認された。また、ペプチドを免疫したマウスから摘出した腫瘍の免疫組織染色により、67LR 依存的な細胞致死経路によって活性化される eNOS(内皮型一酸化窒素合成酵素)/ PKC(プロテインキナーゼ C)  $\delta$ /ASM(酸性スフィンゴミエリナーゼ)の各酵素が活性化されることを確認した。

<sup>1</sup>Journal of Clinical Investigation **123**, 787-799 (2013)

F – 2 Effect of P2RY12 and CYP2C9 gene polymorphisms on the anti-platelet response of clopidogrel in the Bangladeshi percutaneous coronary intervention patients. OMohammad Safiqul Islam, Mohammad Shahidur Rahman, Michael N. N. Nartey, Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.)

P2RY12 gene product and enzymes encoded by CYP2C9 gene are involved in the antiplatelet action of clopidogrel. Genotyping of P2RY12\*rs2046934 and CYP2C9\*2 and \*3 was performed by polymerase chain reaction restriction length polymorphism. Percent (%) inhibition of P2Y12 receptor of all patients was measured by the VerifyNow assay. Patients carrying variant genotypes AG and AA of rs2046934 showed significantly (p<0.05) lower levels of percent inhibition of P2Y12 receptor as compared to GG genotype (61.64, 57.86 and 88.5% for AG, AA and GG genotypes, respectively). Combined AG + AA genotype carriers also had a lower level of percent inhibition (58.83%) compared to GG genotype. No association of the CYP2C9\*2 polymorphism was found with the percent inhibition of P2Y12 receptor whereas CYP2C9\*3 polymorphism was absent in the studied population. Our result indicates that rs2046934 polymorphism reduces the levels of percent inhibition of P2Y12 receptor i.e. this polymorphism reduces the antiplatelet activity of clopidogrel.

F – 3 Crucial interactions of insect GABA receptors leading to competitive antagonism OGenyan Liu, Bente Frølund <sup>1</sup>, Fumiyo Ozoe, Yoshihisa Ozoe (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ., <sup>1</sup> Dept. Drug Des. Pharmacol., Univ. Copenhagen)

[Objective] Insect GABA receptors (GABARs) are important targets for insecticides. In the present study, we seek to identify effective competitive antagonists for the development of novel insecticides targeting GABARs.

[Methods and Results] GABARs from three insect species were expressed in *Xenopus laevis* oocytes. 4-Aryl/arylalkyl-5-(4-piperidyl)-3-isoxazolols and related compounds were examined for their effects on three insect GABARs by two-electrode voltage clamp electrophysiology. Of the tested compounds, 4-(3-biphenylyl)-5-(4-piperidyl)-3-isoxazolol showed the greatest antagonism in common cutworm and housefly GABARs. In contrast, this compound exhibited partial agonism in small brown planthopper GABARs. Homology modeling and ligand docking simulation predicted that a cation- $\pi$  interaction between the biphenylyl group and an Arg residue of the orthosteric site is a key element of antagonism. These findings provide important information for designing and developing novel insecticides.

F - 4 エクオリンカルシウムアッセイを利用したカイコオクトパミン受容体 BmOAR1 の薬理解析

〇崎田 遼<sup>1</sup>, 菅野暉子<sup>2</sup>, 尾添嘉久<sup>3</sup>, 朝岡 潔<sup>4</sup>, 田中良明<sup>4</sup>, 森村 茂<sup>1,2</sup>, 新留琢郎<sup>1,2</sup>, 太田広人<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>熊本大・エ, <sup>2</sup>熊本大院・自然, <sup>3</sup>島根大・生資, <sup>4</sup>生物研)

【目的】オクトパミン(OA)は、昆虫の生理調節を担う生体アミンである。この受容体(OAR)は、アミジン系殺虫剤や殺虫性精油の標的として知られている。OARのリガンド結合部位の薬理性質を知ることは、新しい害虫防除剤を開発する上で重要である。本研究では、エクオリン(AEQ)カルシウムアッセイを用いて、カイコOARの一種BmOAR1の薬理解析を行った。

【方法・結果】HEK293 に BmOAR1 と AEQ を発現させ、セレンテラジン処理後の細胞懸濁液と化合物を混合後、発光量を測定した。その結果、OA 濃度依存的な発光が得られた。他の生体アミンのうちシネフリンに OA と同程度の活性が見られた。現在、精油の活性を調べている。この簡便な AEQ アッセイをペプチド受容体 BmETHR にも適用した所、ETH による応答を検出できた。その結果も合わせて報告する。

F-5 カイコ生体アミン受容体 BmOAR1 と BmDopR2 の機能及び薬理学的性質の比較 〇太田広人 <sup>1, 2</sup>、 菅野暉子 <sup>1</sup>、 崎田 遼 <sup>2</sup>、 平野汐奈 <sup>1</sup>、 野田啓太 <sup>1</sup>、 尾添嘉久 <sup>3</sup>、 光増可奈子 <sup>1</sup>、 柳沼利信 <sup>4</sup>、 朝岡 潔 <sup>5</sup>、 平島明法 <sup>6</sup>、 森村 茂 <sup>1, 2</sup>、 新留琢郎 <sup>1, 2</sup> ( <sup>1</sup> 熊本大院・自然, <sup>2</sup> 熊本大・エ, <sup>3</sup> 島根大・生資, <sup>4</sup> 名大院・生命農, <sup>5</sup> 生物研, <sup>6</sup> 九大院・農)

【目的】カイコのオクトパミン(OA)受容体 BmOAR1 とドーパミン(DA)受容体 BmDopR2 は進化系統的に近縁関係にある。本研究では、両受容体の機能及び薬理学的性質を比較した。

【方法・結果】SEAP アッセイとエクオリンアッセイを用いて、HEK293 に発現させた BmOAR1 と BmDopR2 の機能を比較した。その結果、両者共  $G_s$ 及び  $G_q$ 経路を活性化することが分かった。SEAP アッセイによる薬理解析では、BmOAR1 のアゴニスト活性順位は、クロニジン >TO-12>DMCDM>OA>CDM>DA となったが、BmDopR2 は DA のみ活性が見られた。アンタゴニスト活性には、多少の類似性が認められたものの、活性順位が明確に異なる点も見られた。以上の結果から、BmOAR1 と BmDopR2 は、同じシグナル経路を活性化するが、薬理性質はかなり異なることが分かった。

F - 6 イシワケイソギンチャク由来新規 Ca<sup>2+</sup>依存性レクチン GJL-I の構造解析と糖認 識機構の解明

> 〇中村 梓,及川大翔,森 紳伍,郷田秀一郎,海野英昭,畠山智充 (長崎大院・エ)

【目的】一般に無脊椎動物レクチンは生体防御に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、 海産無脊椎動物である刺胞動物由来のレクチンに関しては、これまでに構造や機能に関する詳細な報告 は少ない。そこで今回、イシワケイソギンチャク(*Gyractic japonica*) から Ca<sup>2+</sup>依存性ガラクトース特異的 レクチン GJL-I を精製し、その構造解析を行うとともに糖認識機構を検討した。

【方法・結果】GJL-IのcDNA クローニングを行った結果,アミノ酸 186 残基から成り,既存のレクチンとの相同性を持たないことが明らかになった。一方,種々の糖との結合特異性を検討した結果 galactose に最も高い親和性を示したが, $\alpha$ -galactoside に対してはやや親和性が低いことがわかった。さらに,GJL-I/lactose 複合体の X 線結晶構造解析を行った結果,GJL-I は同一のサブユニットから成る二量体であるが,立体構造及び糖認識機構はこれまでに知られていない新規なものであることが確認された。

#### F-7 ウチムラサキ由来レクチン SPL の cDNA クローニング及び構造機能解析 〇板倉周平、細田耕平、須川穣二、郷田秀一郎、海野英昭、畠山智充 (長崎大院・エ)

【目的】海産無脊椎動物において、レクチンは生体防御因子として重要な役割を果たしていることが示唆されているが、その詳細な構造と機能について明らかになったものは少ない。そこで今回、二枚貝の一種であるウチムラサキ(*Saxidomus purpuratus*)から単離した Ca<sup>2+</sup>依存性 GleNAc 特異的レクチン SPL (32 kDa) の構造機能解析を行った。

【方法・結果】ウチムラサキ抽出液から GlcNAc 固定化カラムを用いて SPL を精製し、その N-末端配列をもとに cDNA クローニングを行った結果、 SPL は C型レクチンに属しているが、2 つの異なるサブユニットから成る珍しいものであることが明らかになった。 SPL の X 線結晶構造解析を行ったところ、基本的な C型レクチンフォールドが確認されたが、その糖結合部位には通常の C型レクチンに見られる QPD または EPN 配列ではなく、RPD 及び KPD 配列が存在することが明らかになった。また糖結合ポケットも通常より幅広い構造をとっており、標的糖鎖構造との関連性が示唆された。

#### F-8 ポア形成レクチン CEL-III の溶血活性に関与するアミノ酸残基の機能解析 〇長尾知直, 真崎理沙, 郷田秀一郎, 海野英昭, 畠山智充(長崎大院・工)

【目的】海産無脊椎動物グミ(Cucumaria echinata)由来レクチン CEL-III は、ドメイン 1、2 を介して標的細胞表面糖鎖に結合後、ドメイン 3 内の $\alpha$  ヘリックス領域が大きく構造変化することで七量体として膜貫通 $\beta$  バレルを形成する。そこで今回、ドメイン 3 内の個々のアミノ酸残基の役割を明らかにすることを目的として種々の部位特異的変異を作製し、その溶血活性に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】大腸菌を用いて Lys405, Asp373 及び Asn369 に変異を導入した CEL-III 変異体を作製し、それらの溶血活性への影響を検討した。その結果、K405A 及び K405S は溶血活性が大きく上昇したが、K405E, K405R では活性が低下した。このことから、Lys405 の比較的小さなアミノ酸への変異はドメイン 3 の構造をやや不安定化し七量体形成を促進させるが、大きなアミノ酸への変異は構造への影響が大きく活性低下を引き起こしたものと考えられた。一方、D373A、N369A について活性を検討したところ、両者ともに活性が著しく低下したことから、これらの残基は七量体形成においてプロトマー間での相互作用に重要であることが示唆された。

#### F-9 アフリカパンノキレクチンの諸性質と結晶化 〇大西真人、下川倫子、加治屋勝子、南 雄二、八木史郎(鹿児島大院・農)

【目的】アフリカパンノキ種子では、ガラクトース認識ジャカリン近縁レクチン gJRL の TAA-G とマンノース認識ジャカリン近縁レクチン mJRL の TAA-M の存在と性質が先行研究により明らかになっている。しかし、TAA-M の一次構造は解析されておらず、抗体との反応により mJRL であることがわかっている。本研究では、TAA-M の一次構造を解析することと、構造解析のための結晶化を目的とした。

【方法・結果】 2 つのレクチンをメリビオース・アガロース、マンノース・アガロースアフィニティクロマトグラフィー、DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。TAA-M を Trypsin 消化し、C18 逆相クロマトグラフィーによりペプチドを回収後、質量分析装置で一次構造を解析した。 2 つのレクチンは、HAMPTON 社 Crystal Screen キットを用いてハンギングドロップ蒸気拡散法により結晶化した。一次構造解析の結果、TAA-M のアミノ酸配列の一部が明らかになり、その配列は mJRL と相同性が高かった。TAA-G の結晶は得られず、TAA-M は、20 mg/ml、 $4^{\circ}$ C、0.01M Zinc sulfate heptahydrate,0.1 M MES monohydrate pH6.5、 25%v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550 で最もよい結晶が得られた。

F - 10 マウス PAP ホスファターゼ gPAPP の結晶化及び硫酸転移活性測定への応用 〇鶴田 萌 <sup>1</sup>、劉 佳恒 <sup>2</sup>、木村 誠 <sup>1, 2</sup>、角田佳充 <sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>九大院・生資環、<sup>2</sup>九大院・シス生命)

【目的】  $\underline{G}$  olgi-resident  $\underline{PAP-P}$  hosphatase (gPAPP) は、マウスのゴルジ体内において 3'-ホスホアデノシン 5'-リン酸 (PAP) を特異的に 5'-AMP と無機リン酸に分解する膜タンパク質である。 gPAPP と硫酸転移酵素は共役して生体内での硫酸化反応に関与している。 gPAPP をコードする遺伝子が欠損すると PAP が蓄積し、軟骨の主成分であるコンドロイチン硫酸の合成が阻害され、軟骨無形性症などの難病を引き起こす。本研究は、結晶構造解析により gPAPP の PAP 特異的な基質認識機構を明らかにすることを目的としている。また、生体内での共役反応を利用した、硫酸転移酵素の活性測定系の確立も目的とした。

【方法・結果】膜貫通領域を除いた gPAPP の N 末端に MBP, Trigger Factor をそれぞれ融合することで、大腸菌で大量発現させることに成功した。各種クロマトグラフィーに供し精製した MBP 融合 gPAPP では、Liker 配列の最適化・MBP 表面のエントロピーを下げる変異を加え結晶化スクリーニングを行った。また、Trigger Factor 融合 gPAPP を用いて硫酸転移酵素の活性測定系の確立に成功した。

- F-11 ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素の結晶構造に基づく硫酸化機構解明 〇田中槙之助, 西依利晃, 古城英貴, 坂上功樹<sup>1</sup>, 黒木勝久<sup>2</sup>, 榊原陽一<sup>2</sup>, 水光 正仁<sup>2</sup>, 木村 誠<sup>1</sup>, 角田佳充<sup>1</sup>(九大院・生資環, <sup>1</sup>九大・農, <sup>2</sup>宮崎大院・農)
- 【目的】ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素(hTPST)は、翻訳後修飾として蛋白質の特定のチロシン残基を硫酸化する酵素である。hTPST は様々な基質蛋白質を硫酸化するが、その機構の詳細は明らかとなっていない。本研究は、結晶構造解析により、3種類の基質ペプチドと hTPST の複合体の立体構造を決定し、hTPST が様々な基質蛋白質を硫酸化する機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】3 種類の基質ペプチドと hTPST の複合体の X 線結晶構造解析を行った。また,相互作用 エネルギーを計算した。いずれの基質ペプチドも L 字型に折れ曲がり,hTPST の深い溝に結合していた。また,基質ペプチドの硫酸化されるチロシン残基  $(0 \, \text{位})$  とその  $1 \, \text{ON}$  末端側の酸性残基  $(-1 \, \text{位})$  の結合 への寄与が大きかった。さらに,異なる基質ペプチドにおいて  $0 \, \text{位}$ , $-1 \, \text{位以外の位置の残基は,hTPST}$  の別々の側鎖と相互作用するケースが見られた。これらのことを満たしながら,hTPST は様々な基質のチロシン残基を硫酸化すると考えられた。

- F-12 ヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素を用いた硫酸化 Hirudin の調製 〇坂上功樹,田中慎之助<sup>1</sup>,西依利晃<sup>1</sup>,古城英貴<sup>1</sup>,木村 誠<sup>1</sup>,角田佳充<sup>1</sup> (九大・農,<sup>1</sup>九大院・生資環)
- 【目的】Hirudin はヒルの唾液腺から分泌されるタンパク質である。Hirudin には血液凝固に関わる Thrombin を阻害する抗血液凝固活性があり、抗凝固薬として一部で用いられている。Hirudin は特定のチロシン残基の硫酸化により Thrombin の阻害能が上昇する。しかし、その位置特異的なチロシン残基が硫酸化された Hirudin の調製は困難である。本研究ではヒト蛋白質チロシン硫酸転移酵素 1 (hTPTS1) を用いて硫酸化 Hirudin の調製を行うことを目的とする。

【方法・結果】Hirudin と hTPST1 を大腸菌で発現,精製後,硫酸転移活性を測定した。その結果, hTPST1 による Hirudin への硫酸転移活性が確認された。硫酸化 Hirudin を用いて Thrombin に対する阻害活性測定を行ったところ,硫酸化による Thrombin 阻害活性の上昇が確認され, hTPST1 を用いた硫酸化 Hirudin の調製に成功した。このことから, hTPST1 は硫酸化生理活性物質の合成やタンパク質の硫酸化翻訳後修飾のツールとして広く用いられると考えられる。

F - 13 プロテオミクスによるゼブラフィッシュ PAPS 合成酵素の機能解明 〇上中勝護 <sup>1</sup>, 上地珠代 <sup>2</sup>, 黒木勝久 <sup>1,3</sup>, 剣持直哉 <sup>2</sup>, Ming-Cheh Liu <sup>3</sup>, 水光正仁 <sup>1</sup>, 榊原陽一 <sup>1</sup> (<sup>1</sup>宮崎大・農, <sup>2</sup>宮崎大・フロンティア, <sup>3</sup>トレド大・薬)

【目的】PAPS synthetase (PAPSS) は、無機硫酸( $SO_4^2$ )と ATP から活性硫酸 PAPS を合成する酵素である。脊椎動物ゲノムには複数の PAPSS 遺伝子が存在し、ヒトでは PAPSS1/2a/2b の三種類が知られる。これらの遺伝子欠損時にそれぞれ特徴的な病態を示すことが知られ、異なる生理学的意義を有していることが推察される。本研究では、各 PAPSS アイソフォームの生理機能解明を目的として研究を行った。

【方法】 脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュの受精卵にモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) をマイクロインジェクションし、各 PAPSS 遺伝子をノックダウンした。24 時間経過後、胚から全タンパク質を抽出し、蛍光ディファレンシャル二次元電気泳動を用いてタンパク質発現解析を行った。

【結果および考察】各 PAPSS 遺伝子をノックダウンにおいて、タンパク質発現量の変化が見られた。これらの結果より、PAPSS はそれぞれ機能的な役割を分担していることが推察された。

F-14 病原性真菌の持つ糖脂質分解酵素 EGCrP2 の基質認識機構解析 〇本田智美 <sup>1</sup>, 渡辺 昂 <sup>2</sup>, 石橋洋平 <sup>2</sup>, 沖野 望 <sup>2</sup>, 木村 誠 <sup>1, 2</sup>, 伊東 信 <sup>2</sup>, 角田佳充 <sup>1, 2</sup> (<sup>1</sup>九大院・シス生命, <sup>2</sup>九大・農)

病原性真菌である Cryptococcus neoformans は日和見感染症のクリプトコッカス症の原因菌である。この真菌が持つ糖脂質分解酵素である EGCrP2 は、生体内ではエルゴステリル- $\beta$ -グルコシドの加水分解を担っており、in vitro では様々な $\beta$ -グルコシドを分解する。EGCrP2 の欠損株では菌の生育が抑えられることが明らかになっており、創薬のターゲットになると有望視されている。本研究は EGCrP2 の X 線結晶構造解析によって立体構造を明らかにし、基質特異性の構造基盤を解明することを目的とする。

X 線結晶構造解析によって分解能  $2.1\,\mathrm{Å}$ で EGCrP2 の立体構造を決定した。基質のドッキングモデルを作成し,EGCrP2 の基質認識機構の解析を目指した。その結果,EGCrP2 の基質結合部位は単糖と大きさが一致する親水性の糖結合部位と,広く 2 股に分かれた脂質結合部位からなっていた。また,グルコース選択性は糖結合部位付近のループと 2 Trp 20 によるものだと推測された。今後は基質複合体の 20 線結晶構造解析を行う予定である。

F-15 結晶構造によるギンネム Mimosine 分解酵素の解析 〇澤田玲良,鬼塚まなみ<sup>1</sup>,Dulal Borthakur<sup>3</sup>,Qing X.Li<sup>3</sup>,Ho Ng<sup>3</sup>,木村 誠<sup>1,2</sup>, 角田佳充<sup>1,2</sup>(九大・農, <sup>1</sup>九大院・生資環, <sup>2</sup>九大院・農, <sup>3</sup>Univ. Hawaii)

【目的】マメ科植物ギンネムは、様々な環境ストレスに耐性があり、飼料として有益である。しかし、 毒性のあるアミノ酸 Mimosine を有しており、過剰摂取した家畜に生理的異常を起こすことが知られてい る。一方、ギンネムは生体内で Mimosine 分解酵素 (Mimosinase) によって Mimosine を分解し、生育に利 用していることが予測されている。そこで、本研究では Mimosinase の触媒メカニズムを解明することを 目的とした。

【方法・結果】大腸菌を用いて発現・精製した Mimosinase を結晶化し、分解能 1.8 Åの Mimosinase-補酵素 PLP 複合体の結晶を得た。構造精密化の結果、Mimosinase は 4 量体を形成しており、PLP と Lys257 が Schiff 塩基を形成していることが確認された。

現在、これらの構造情報をもとに、Mimosine 認識様式と触媒反応メカニズムを考察中である。

#### F-16 カイコ低分子量 GTP 結合タンパク質 RabX6 の結晶構造解析 〇劉 佳恒、梅本洋介、木村 誠<sup>1</sup>、宇野知秀<sup>2</sup>、 角田佳充<sup>1</sup> (九大院・シス生命、<sup>1</sup>九大院・農、<sup>2</sup>神戸大・農)

【目的】低分子量 GTP 結合タンパク質(Rab)は、昆虫においては、神経ペプチドホルモンなどを体液中に分泌することにより、昆虫特異的な現象である羽化、休眠、変態に関与することが知られている。 本研究は、 カイコの精巣に局在する昆虫特異的な RabX6 の立体構造を決定することで、昆虫における Rabが関わる分子メカニズムの一端を解明することを目指した。

【方法・結果】RabX6 は、GST 融合タンパク質として発現、精製した。X 線結晶構造解析により、RabX6-GDP-Mg $^{2+}$ 複合体の立体構造を決定することに成功した。RabX6 の全体構造は、これまで報告されている Rab と非常に類似したものであった。しかし、 エフェクタータンパク質や GTPase 活性促進タンパク質との予想相互作用領域には、大きな構造の違いみられた。したがって、この領域の構造の違いが、相互作用する蛋白質の選択に関与していると推測された。

#### F - 17 タンパク質結晶構造解析に基づく PKGII の活性化機構の解明 〇小松弘明、松田真弥、James C. Campbell <sup>1</sup>、辻 明彦、Choel Kim <sup>1</sup>、湯浅恵造 (徳島大院・STS、 <sup>1</sup> Baylor College of Medicine)

ナトリウム利尿ペプチドやNOの刺激によって産生される細胞内セカンドメッセンジャーcGMP は3種の cGMP-dependent protein kinase(PKG I $\alpha$ , I $\beta$ , II)を活性化し、様々な生理作用に関与する。いずれも 2 つの cGMP 結合ドメイン(CNBD)を有し、これに cGMP が結合することによって活性化されるが、PKG II に関して十分な解析が行われていない。そこで、cGMP/PKG II 複合体の立体構造解析を行い、PKG II の活性化機構の解明を試みた。2 つの CNBD の中で cGMP とより強い親和性を示す CNBD-B と cGMP の 結晶構造解析により、Asp<sup>412</sup> と Arg<sup>415</sup> が結合に重要な部位であることが示された。そこで、両アミノ酸を Ala へ置換した DA/RA 変異体を作製し、細胞内での活性化に及ぼす影響を調べた。野生型では膜透過性 8-bromo-cGMP の濃度依存的に VASP のリン酸化が増加されたのに対して、DA/RA 変異体ではそのリン酸化が有意に抑制された。また、心房性ナトリウム利尿ペプチドを用いても同様な結果が得られた。以 上より、PKG II の Asp<sup>412</sup> および Arg<sup>415</sup> が cGMP との結合、さらには活性化に重要であることが示された。

#### F-18 GH2 ファミリー由来エキソ-β-D-ガラクトフラノシダーゼの基質特異性の解析 〇松永恵美子,八色奈央,豊田早紀,岡 拓二<sup>1</sup>,樋口裕次郎,竹川 薫 (九大院・農,<sup>1</sup>崇城大・生物生命)

Aspergillus 属の糖鎖の末端やガラクトマンナンの側鎖にはガラクトフラノース (Galf) が結合している。この Galf の生合成は以前より研究がなされているが、代謝に関してはあまりなされていない。  $\beta$ -D-ガラクトフラノシダーゼ (Galf-ase) はこの Galf のグリコシド結合を加水分解する酵素である。これまで、本酵素は精製に関する報告はあるが、遺伝子の同定までには至ってはいない。そこで我々は Galf-ase を産生する放線菌(Streptomyces 属)を単離し、そのゲノム配列を決定して本酵素の同定に成功し、本酵素が Galf 特異的な新奇なエキソ型グリコシダーゼであることを明らかにした。さらに、本酵素のアミノ酸配列を用いて相同遺伝子産物が Galf-ase 活性を有しているか調べた。BLAST 検索の結果、本酵素のホモログはグラム陽性細菌から、糸状菌まで幅広く存在していることがわかった。その中のひとつ、A. nidulans FGSC A4 株にはホモログが 2 つ (AN2395 と AN3200) 存在しており、この 2 つの遺伝子を大腸菌で発現させて調べた結果、pNP-Galf に対し活性を示したため、両酵素ともに Galf-ase であることが明らかになった。

#### F - 19 Comparative analysis of ulvan-degrading enzymes from various ulvan-degraders 〇何 川, 高橋 亮 ¹, 大西浩平 ¹ (愛媛大院・連農, ¹高知大・農)

Ulvans are complex sulfated polysaccharides in the cell walls of green algae belonging to the genus *Ulva*. The objective of this study is to discover ulvan-degrading enzymes (UDEs) for production of oligosaccharides. Ulvan-degrading bacteria were collected from feces of the molluscs and shrimps living on the surface of *Ulva ohnoi*, and enriched in artificial seawater medium containing ulvan as the sole carbon source. Five ulvan-degraders were finally isolated on ulvan plates by visualizing ulvan-degrading activity using cetylpyridinium chloride (CPC). They were demonstrated to be different species with 16S rRNA partial sequences. Secreted proteins were prepared and separated by SDS-PAGE. Enzymes with ulvan-degrading activity were visualized with CPC after overlay assay on ulvan gel. From culture supernatant of all five strains, UDEs with different molecular masses were identified, indicating that each strain produces different types of UDEs. Since enzymes from one strain KUL10 was already presented at the previous meetings, we are focusing on KUL42 in this study. A 55 kDa UDE was purified and demonstrated to be modified in KUL42 cells to become an active form.

#### F - 20 Nostoc punctiforme 由来 L-トリプトファン脱水素酵素の構造機能解析 〇北村 萌, 櫻庭春彦<sup>1</sup>, 芦内 誠, 大西浩平<sup>2</sup>, 大島敏久<sup>3</sup>, 若松泰介 (高知大・農, <sup>1</sup>香川大・農, <sup>2</sup>高知大・総研セ, <sup>3</sup>阪工大・エ)

【目的】2008年、原核生物として初めてシアノバクテリア Nostoc punctiforme が L-トリプトファン脱水素 酵素を有することが報告されたが、本酵素の詳細な機能解析はされていない。また全生物を通して本酵素の立体構造は決定されておらず、基質特異性の高さの要因は不明のままである。

【方法・結果】N. punctiforme NIES-2108 由来 L-トリプトファン脱水素酵素を組み換え酵素として発現,精製した。ゲル濾過より溶液中では二量体で存在することが明らかになった。本酵素は NAD を補酵素として L-トリプトファンの可逆的な酸化的脱アミノ反応を触媒したが,還元的アミノ化反応はインドール-3-ピルビン酸により著しく阻害された。また,植物由来とは異なり活性発現に金属イオンを要さなかった。NMR 解析から,Glu/Leu/Phe/Val 脱水素酵素と同じく NADH の pro-S 水素を脱プロトン化することが解った。更に蒸気拡散法により結晶を作製し,アポ型の X 線結晶構造を決定した。現在,部位特異的変異体の解析を行っている。

#### F-21 イタドリ (Polygonum cuspidatum) の葉に含まれるチロシナーゼ阻害物質 〇野村 凜、栗田せりか、木下あゆみ、市田彩香、島村智子、柏木丈拡、 受田浩之(高知大・農)

チロシナーゼは、動植物中におけるメラニンの合成過程の初期段階の反応を触媒する酵素であり、この酵素の働きを制御することで、メラニン合成を抑えることができる。発表者は、高知県の地域資源であるイタドリの葉の80% MeOH 抽出部が高いチロシナーゼ阻害活性を示すことを見出した。本研究では、本種に含まれるチロシナーゼ阻害物質の単離・同定を試みた。イタドリ葉80% MeOH 抽出物を液液分配、ODS 中圧カラムクロマトグラフィー、限外ろ過で分画し、高い活性を示す20% MeOH 溶出部を得た。この画分を逆相系の HPLC により、8 つの画分に分画し活性を測定したところ、各 Fr.単独での活性は低いものの、全ての Fr.を合わせると分画前と同等の活性が認められた。従って、Fr.1~8 の全てが活性に関与していると推察された。各 Fr.に含まれる物質を単離し、構造解析を行った結果、Fr.3 から Orientin、Fr.4 から Isoorientin、Fr.5 から Vitexin が同定された。また、イタドリ葉1 g 中の含量は、Orientin 2.40 mg、Isoorientin 1.99 mg、Vitexin 1.82 mg であった。

#### 2015 年度合同支部大会協賛企業・団体(50音順)

㈱アプロサイエンス

伊方サービス㈱

㈱イナ・オプティカ

(株)愛媛洋行

四国乳業㈱

四国八洲薬品㈱

四国理科㈱

㈱島津アドコム

株島津製作所

仙味エキス㈱

㈱トミー精工

西日本薬業㈱

日進商事件

() 松山観光コンベンション協会

マルトモ(株)

和光純薬工業㈱





## 西日本薬業株式会社

〒791-8042 愛媛県松山市南吉田町 2186 番地1 ILO89-965-3600 faxO89-965-3601

http://www.nisiyaku.co.jp

<取扱品目>

試薬、研究用試薬、輸入試薬、工業薬品、理化学機器、器材 事業法アルコール、エタノール製剤(自社製造)、業務用洗浄剤



IS09001 品質マネジメントシステム認証取得

ISO9001

## 界面活性剤を含むタンパク質サンプルでも定量できる!!

# XL-Bradford

【エクセル ブラッドフォード】

アプロサイエンスが開発した XL-Bradford は、各種界面活性剤の干渉を受けない、改良版 Bradford 試薬。 SDS-PAGEサンプルバッファーをそのまま適応でき、電気泳動前に簡単に正確なタンパク質定量ができます。

#### 試してください! SDS-PAGEサンプルを直接タンパク質定量!

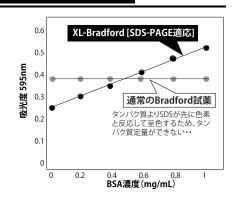
#### XL-Bradford [SDS-PAGE適応] (型番 KY-1030)

#### ■ 特長

- ・ SDS-PAGE sample buffer (≦2% SDS) に溶解したタンパク質の定量が可能
- ・還元剤やBPB色素を含有したサンプルバッファーもそのまま適応可能
- ・ 簡便な操作で多検体処理などのルーチンワークにも最適

<右図> SDS-PAGEサンプルバッファー(2%SDS含有)で調製した各濃度の標準タンパク質(BSA)溶液を本製品および通常Bradford試薬を用いて定量を試みたところ、本製品を用いた場合、SDS-PAGEサンプルバッファー中のタンパク質でも正確に定量できる事が分かりました。

Cat No.KY-1030 容量100mL 定価¥14,000(稅別)



#### 様々な界面活性剤に広く適応できるのはコチラ!

#### XL-Bradford [界面活性剤適応] (型番 KY-1040)

#### ■ 特長

- ・様々な界面活性剤(≦1%)に溶解したタンパク質の定量が可能
- ・ Detergent ベースのタンパク質抽出試薬で抽出したタンパク質定量に最適
- ・ 簡便な操作で多検体処理などのルーチンワークにも最適

#### 適応できる界面活性剤(例)

o- $\beta$ -glucoside NP-40 Tween 20 Zwittergent

Briji35 SDS

o- $\beta$ -maltoside Sodium Deoxycholate

Triton X-100

Cat No.KY-1040 容量100mL 定価¥14,000(稅別)

#### 日本農芸化学会2015年度 中四国•西日本支部合同大会

↓ ↓ ↓ ご参加の研究者様 限定ウェブサイト ↓ ↓ ↓ https://aproscience.com/campaign/74/



愛媛のみかん。 Web公開期間は 2015年 10月16日(金)

■ 特典1 プレゼント!

XL-Bradford 無料お試しパッケージ (約125検体分)

■ 特典 2 限定プライスダウン!

各種タンパク質定量試薬・キットを限定特価



株式会社 アプロサイエンス © 088-683-7211 □ info@aprosci.com http://aproscience.com/

【**徳島本社】** 〒771-0360 徳島県鳴門市瀬戸町明神字板屋島124-4 TEL:088-683-7211 FAX:088-683-7212 電気泳動・WesternBlotting・プロテオーム関連など タンパク質解析関連製品なら APRO Science!



# SuperClear<sup>™</sup> Centrifuge Tubes









## **Super Seal**

Flat Caps Offer Unsurpassed Sealing

The flat style caps can be easily labeled and the 50ml caps include an integral elastomeric seal that eliminates leaking.



Elastomeric seal

## **Better Labeling Area**

Patented ViewPoint<sup>TN</sup> Labeling Surfaces

ViewPoint™ surface shows contents in tube clearly but labels easily. ViewPoint™ helps reduce smearing and protects your writing when you store or centrifuge these tubes.



## **Ultra High Speed Tubes**

15ml: 17,000RCF 50ml: 20,000RCF

## **Lab Tested and Certified**

Lot by lot certification of Purity

Every Lot of SuperClear™ Centrifuge Tubes are tested and rtified free of detectable RNase, DNase, and Protease Each lot is also certifed non pyrogenic with a chromogenic assay to 0.05/EU mL.

http://www.bio-bik.co.jp

INA · OPTIKA

株式会社 イナ・オプティカ

本 社 〒530-0043 大阪市北区天満 2-1-29 (オフテックダイエービル) TEL: 06-6882-6006 FAX: 06-6882-6116

E-mail: info@bio-bik.co.jp

福岡営業所 TEL: 092-477-2620 FAX: 092-477-2621

**長野営業所/信州配送センター** TEL: 0265-86-2434 FAX: 0265-86-5613

おいしさは、いつも自然から。

# ジミカンの力に注目!! N+ドリンクヨーグルト

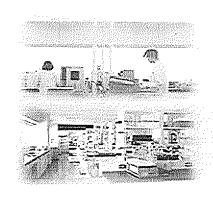




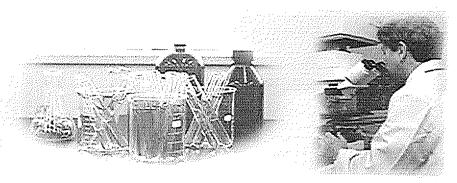
愛媛大学農学部附属食品健康科学研究センター菅原卓也教授の研究成果を活用し、愛媛大 学と共同研究しました。

ヨーグルトの機能性に、柑橘の皮に多く含まれる ノビレチンと、牛乳に含まれる β - ラクトグロブリン の2つのチカラをプラスしたドリンクヨーグルトです。

## 地域の発展と豊かな環境を目指し、我々は進化します



本



# 四国八洲薬品株式会社

## www.shikoku-yashima.co.jp

社 〒770-0873 徳島県徳島市東沖洲2丁目17番地

TEL (088)664-6321(代表)

高 松 営 業 所 〒761-0301 香川県高松市林町148-19

TEL (087) 815-1111(代表)

松山営業所 〒791-1102 愛媛県松山市来住町1445番1

TEL (089)960-0260(代表)

新居浜営業所 〒792-0050 愛媛県新居浜市萩生545-3

TEL (0897)43-8001(代表)

高知営業所 〒780-0082 高知県高知市南川添21番13号

TEL (088)884-8881(代表)

取扱品目

試験、研究用試薬

一般試薬、輸入試薬

体外診断薬

化成品及び工業薬品

医薬品及び動物薬品

試験研究用分析機器、器材

バイオ関連機器、器材

臨床検査用機器、器材

コンピューターのハードウェアとソフトウェア



ISO9001 品質マネジメントシステム認証取得



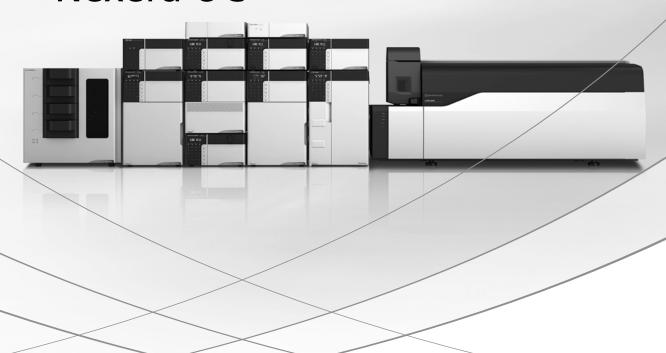
ISO14001 環境マネジメントシステム認証取得



超臨界流体抽出/超臨界流体クロマトグラフシステム

Supercritical Fluid Extraction/Chromatograph System

## Nexera UC



## Unified Chromatographyという もうひとつの可能性、ただ一つの可能性

- **▶ 目的成分の抽出から分析までを自動化** 超臨界流体で固体試料から成分を自動抽出し、そのままオンラインで分析。
- 不安定な化合物もそのまま分析 これまで試料の前処理操作で酸化や加水分解されやすい不安定な化合物の分析も可能。
- 究極の高速・高分離・高感度を実現 高感度/高分離分析を超臨界流体によって実現し、多成分一斉分析をより短時間に行うことができます。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部

もっと詳しく知りたい方は Nexera UC 検索

http://www.an.shimadzu.co.jp/

#### 日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同大会実行委員会

実 行 委 員 長:柿沼喜己(愛媛大・農) 副実行委員長:山内 聡(愛媛大・農)

実 行 委 員:

総務・会計・広報

○岸田太郎 (愛媛大・農), 阿野嘉孝 (愛媛大・農), 渡部保夫 (愛媛大・農)

プログラム・要旨集

○菅原卓也 (愛媛大・農), 岡本威明 (愛媛大・教育) 受付・会場

○河田美幸(愛媛大・学術支援セ), 秋田 充(愛媛大・農), 秋山浩一(愛媛大・学術支援セ), 西 甲介(愛媛大・農), 丸山雅史(愛媛大・農)

シンポジウム (変援大・農) 懇親会 (関藤孝之(愛媛大・農)

#### 中四国支部

1. 支部創立15周年記念第44回講演会(支部例会)

開催日:2016年1月23日(土)

場 所:岡山県立大学

内 容:特別講演, 一般講演

世話人:伊東秀之(岡山県立大学)

2. 支部創立15周年記念第26回市民フォーラム

開催日:2015年11月28日(土)

場 所:サンポート高松

内 容:招待講演

世話人: 櫻庭春彦(香川大学)

3. 支部創立15周年記念第20回若手研究者シンポジウム

「若手研究者による農芸化学の将来の展望」

開催日:2015年10月17日(土)

場 所:島根大学生物資源科学部

内 容:招待講演

世話人:松尾安浩(島根大学)

#### 西日本支部

1. 第313回日本農芸化学会西日本支部例会および講演会

開催日:2016年1月23日(土) 場 所:九州大学農学部

内容:受賞講演,招待講演世話人:園元謙二(九州大学)

詳しくは支部ホームページをご覧下さい

中四国支部 http://jsbba-cs.jp

西日本支部 http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/jsbba-west/

#### 日本農芸化学会中四国支部事務局

〒783-8502 高知県南国市物部乙 200 高知大学総合研究センター

遺伝子実験施設内

支部ホームページ: http://jsbba-cs.jp

E-mail: jsbbacs@kochi-u.ac.jp