

# 市民フォーラム

## 講演要旨

## 第27回市民フォーラム「食品と発酵技術」

### 微生物のチカラはすごい！—発酵食品から医薬品・食品・化粧品素材まで—

神崎 浩（岡山大院・環境生命）

ノーベル生理学・医学賞を北里大学の大村智先生が受賞されました。日本の応用微生物学の実力が改めて証明されたことを大変うれしくかつ誇りに思っています。先生が土壤から単離された放線菌が生産するアベルメクチンという新規化合物の関連化合物が抗寄生虫薬として利用され、それが感染症予防に大いに貢献した事が受賞理由になっています。大村先生は受賞決定の記者会見で「私の仕事は微生物の力を借りているだけのもの」と発言され大変話題になっています。マスコミは「謙虚で誠実な言葉に日本中感動」とこぞって報道していますが、本当のところは、大村先生が、「さまざまな微生物を効率良く地道に土壤などから単離するセンスを有しておられ、その微生物が持っている力を（培養条件などを工夫されることによって）最大限に発揮するようにされ、多くの共同研究者とのキャッチボールで、多くの新規構造、新規活性を有する化合物を見出してこられた」ということが高く評価されたからだと思います。農芸化学会ではこの大村先生の受賞を祝して学会誌の特集号（化学と生物54巻1号）を発刊し、HP上（<https://katosei.jsbba.or.jp>）で公開しています。たいへん充実した内容となっており、農芸化学会員の方はもちろん、会員でない一般の方にもぜひ読んでいただきたいと思っています。

日本人は日本酒、味噌、醤油、酢、納豆など多くの発酵食品と慣れ親しんできており、その生産には麹菌をはじめとして多くの微生物が関わってきています。ユネスコの世界文化遺産に登録された「和食」にも発酵食品が欠かせないことはご承知の通りで、麹菌は『国菌』として世界に知られています。このような発酵食品を古の昔から利用し、「微生物のチカラ」をうまく引き出す発酵技術が確立されてきた土台があったからこそ、日本で多くの発酵産業が発展し、アミノ酸発酵、抗生物質発酵が工業的に確立され、大村先生の受賞にもつながったと思います。

本講演では、我々の研究室が「微生物のチカラ」により研究・開発してきた例を紹介します。

#### 【1】岡山大学農場の農産物を使った酒「おお岡大」

岡山大学農場では米・果物・野菜など多くの農産品を生産していますが、それらを使った加工品を送り出していました。農場教員の指導で学生諸君が生産した農産物から酒を作つて彼らに飲んでもらいたいというコンセプト（学産学消）で製造をしている酒類を紹介します。

#### 【2】カビの生産物を放線菌の酵素で変換してできる新規抗ガン化合物

微生物が作る化合物にはユニークな構造が多く、有用な活性を有している物も存在しますが、その多くは生理活性が低いなどの理由で人類は利用できません。カビが生産するアミノ酸2分子からなる化合物を、別の微生物（放線菌）で構造の一部を変換することで強力な抗ガン活性を有す新規化合物（現在アメリカで臨床試験中）が得られることを見出しました。

#### 【3】オリーブ葉に含まれる成分の微生物変換で生成する新規抗酸化活性化合物

植物も人間にとて有用な生理活性を示し、かつユニークな構造を有する化合物を有しています。オリーブに含まれる化合物をパン酵母で処理することで一部の構造のみが変換されることを見出し、現在その化合物を含む素材を化粧品・食品として開発する研究を行っています。

#### 【4】食用キノコ処理木質バイオマスを素材とする発酵完全混合飼料による乳牛の飼育

経済的になりたつ木質バイオマス利用には、バイオマス生産地近隣で無駄なく有効利用する（カスケード利用）ことが不可欠です。我々は、ヒノキ木粉でも、食用キノコ生産が可能であり、キノコ処理により牛胃液による木粉の消化率が向上することを明らかにし、その処理木粉を素材とする発酵完全混合飼料により、乳牛の飼育、牛乳生産が可能であることを明らかにしました。

このように「微生物のチカラ」は無限で、工夫次第で人類にとって有効に利用できる可能性を多く秘めていると思います。隠れたチカラを今後もみつけていきたいと思っています。

## 第27回市民フォーラム「食品と発酵技術」

### 微生物の関わらない食品の発酵加工

北畠直文（ノ清女大・人間科学）

発酵とは、「微生物の働きで有機物が分解され、特定の物質を生成する現象」のことであり、広義には、「微生物活動による食品の製造」をいう。わが国には数多くの発酵食品があり、長い歴史のなかで、微生物と一緒にになって「日ごとの糧」を作ってきたと言っても過言ではない。しかし、微生物の働きによらぬ“発酵”食品もある。おそらく、当初は微生物が関与していると思われていたのが、よくよく調べてみると微生物は関与していないかった、というのが実際のところであろう。であるが、この微生物無関与の発酵食品の“発酵”過程はなかなかに巧妙で複雑である。採取した植物を放置するうちに、植物自体が持っている内因性酵素の反応によって自身の有機物が変化して、特定の物質を生成するのである。あたかも微生物が働いているように見える。その代表的なものは、茶とバニラであろう。カカオとコーヒーもわずかながら“発酵”もしくは発酵の過程が入る。いずれも嗜好品であるところが興味深い。

茶には、大別すると、緑茶、烏龍茶、紅茶、普洱茶（プーアル茶）がある。緑茶は、摘み取った茶葉の生葉を直ちに加熱処理を行うために、“発酵”していないが、烏龍茶、紅茶、普洱茶は摘み取った後、一定期間の熟成を置くために、その間に茶葉のなかで“発酵”が生じて、特有の色や味わいが生成する。烏龍茶、紅茶、普洱茶の順で、“発酵”期間が長くなり、その風味も複雑となる。普洱茶については、かつては長期熟成をおこなっていたらしいが、今日ではカビ付け加工、つまりいわゆる本物の発酵処理が主流である。烏龍茶、紅茶の“発酵”的主体は、内因性のポリフェノールオキシダーゼによるカテキン類の重合であり、生成した様々な重合体が、個々の茶特有の渋味や色合いを呈して、味わい深いものとなるのである。

バニラは、アイスクリームなどの冷菓に加え、クッキー、ケーキなど様々な菓子類や食品に広く用いられており、多くの人々がこの香りをおいしさの要素と考えている。バニラの香りは植物のバニラビーンズに由来する。収穫後のバニラビーンズは、香りもなく水分量が多く、緑色をしているが、キュアリングと呼ばれる加工工程を経て、黒褐色の、バニラ特有の香りをもつバニラビーンズとなる。すなわち、キュアリングで、バニラビーンズに含まれるバニラ香気成分の前駆体に内因性の酵素が作用して特有のバニラ香気成分が生じ、私たちが普段見ている黒色と光沢を帯びた、香り高いバニラビーンズになる。また、水分量も収穫後当初は70%以上もあるが、キュアリングで15–30%程度まで低下する。このキュアリングを含む工程が“発酵”である。バニラの香りの主成分はバニリンである。バニラビーンズにおいては、“発酵”過程において、フェニルアラニンを出発物質として、4-hydroxybenzaldehydeを経て生成される。上記のキュアリング工程は2か月から3か月に及び、その管理は容易ではなく、そのため様々な品質のバニラビーンズが見られる。わが国では、バニラビーンズは海外の様々な地域から輸入しており、産地の違いによる品質、特性の違いなどが指摘されている。バニラビーンズには主たる香気成分であるバニリンとその前駆体や代謝物である成分が含まれている。その中の4成分 (4-hydroxybenzaldehyde, 4-hydroxybenzoic acid, バニリン, vanillic acid) の存在比からバニラビーンズの熟成度合いが推測される。産地によっては、著しく4-hydroxybenzaldehydeや4-hydroxybenzoic acidの値が高く、キュアリングが不十分であることをうかがわせるものもある一方、これらの値が低く、過成熟のために品質が変わってしまったものも観察され、キュアリングの難しさを物語っている。バニラビーンズの品質は、これらの化合物の存在割合によってのみ決定されるのではなく、色つややしなやかさ、それに実際の香りや、口にした時の香りが最も重要なことは言うまでもない。また、食品中においては、バニリンが様々な他の食品成分と相互作用しているために、匂いの質をより複雑にしている可能性もある。とりわけ、バニラエッセンスを添加する場合はその影響を無視できない興味のある課題である。

茶やバニラなどの微生物の関わらない“発酵”がどのようにして成立し、どのような恩恵を現在のわれわれに与えているかを考えたい。

# 特 別 講 演

---

講 演 要 旨

## 特別講演

### メチル化アルギニン代謝系の発見と NO 産生調節機構としての機能解析

木本真順美（岡山県大・保健福祉）

単純なガス状物質である一酸化窒素（NO）は血管弛緩因子として見いだされ、アルギニンから生成する内因性の生体調節因子である。NO はその产生に係わる酵素群（ecNOS, ncNOS, iNOS）の細胞への働きかけによって様々な機能を發揮し、諸刃の剣と呼ばれているように、nNOS の働きにより生体の恒常性を維持する一方、iNOS の活性化により多量产生される NO は細胞傷害を引き起す。その当時、生命現象で分からぬことがあれば “Just say NO” といえば何でも通用しそうな勢いであった。このように、NO の発見は生化学的研究分野では画期的な出来事であり、1998 年のノーベル医学・生理学賞に輝いたことには領ける。現在は NO の病態生理学的役割についての研究が盛んに行なわれ、NO の機能障害（产生系の障害）は高血圧や動脈硬化症などの多くの病気の発症に関連していることが明らかにされている。

私たちは、NO が発見されたと同時に翻訳後修飾アミノ酸の一種であるメチル化アルギニン類が、動物体内で活発に代謝されることを初めて見いだした<sup>1)</sup>。この事実に基づいて、それらの代謝系に関与する新規な酵素、 $N^G,N^G$ -dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)<sup>2)</sup> と dimethylarginine aminotransferase<sup>3)</sup> をラット腎臓より精製し、その酵素学的性質を解明してメチル化アルギニン類の代謝系（分解系）の全体像を初めて明らかにした（図 1）。本研究結果は、3-メチルヒスチジンによって代表される修飾アミノ酸は未代謝のまま尿中に排泄されるという既成概念を否定すると同時に NO 產生系にも新しい知見を与えた。すなわち、メチル化アルギニン類のうち、 $N^G,N^G$ -dimethylarginine (別名 : asymmetric dimethylarginine [ADMA]) と  $N^G$ -mono-methylarginine (MMA) は DDAH の基質となり、NOS の阻害剤でもあったことから、DDAH を介した ADMA の代謝系が NO 產生の調節系として注目されるようになり、現在、本代謝系は上記した NO の病態生理学的役割を研究する上で重要な活発な研究分野を形成している。さらに、私たちは DDAH に関する分子生物学的研究を進め、ラットおよびヒト由来の DDAH に対するモノクローナル抗体の作製ならびに本酵素をコードする cDNA のクローニングに成功した。この二つの成果が国内外の NO 研究者との共同研究を展開する大きな基盤となり、血中 ADMA 濃度の上昇が動脈硬化症さらには心血管疾患のリスクファクターになるという新しい見解を導いた。

本講演では、メチル化アルギニン類の異化反応系発見の経緯と DDAH による ADMA 分解系の NO 產生調節機構としての役割について概説する。

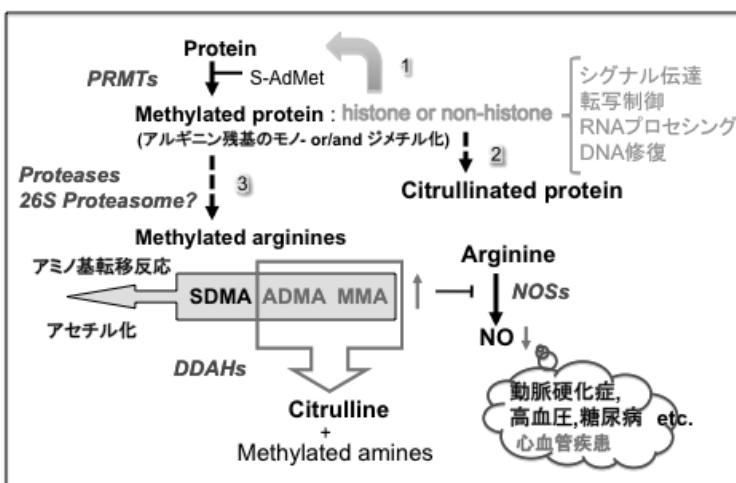


図1. メチル化アルギニン代謝系と生理的役割

- 1) *Arch. Biochem. Biophys.*, 252, 426-437 (1986)
- 2) *J. Biol. Chem.*, 264, 10205-10209 (1989)
- 3) *J. Biol. Chem.*, 265, 20938-20945 (1990)



# — 般 講 演

---

講 演 要 旨

A - 1       $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 pochonicine のアセチル化による NOE 相関への影響  
○江本啓輔, 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>東大院・理)

【目的】我々は以前の研究において、新規  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase 阻害物質 pochonicine を糸状菌 *Pochonia suchlasporia* 培養物中に見出した<sup>1)</sup>。本菌株の培養物中には pochonicine と水酸基の数が異なる類縁体 A~E が見出されている。これらの類縁体の構造決定は pochonicine の構造活性相関研究のために重要である。多くの化合物において、相対立体配置の決定には <sup>1</sup>H-NMR シグナル間の NOE 相関が重要な手がかりとなる。しかし、pochonicine ではその母骨格であるピロリジン環上のプロトンにおいて、互いに *trans* の関係にありながら *cis* と同程度の NOE 相関を示すものが確認されている。このことから、pochonicine 類縁体についても NOE 相関のみから相対立体配置を決定することは困難と考えられた。そこで、水酸基をアセチル化し、立体配置を反映した NOE 相関を得ることができないか検討した。

【方法・結果】Pochonicine のペーアセチル化を行い、<sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C- および 2D-NMR 分析を行った。NOESY 測定の結果、pochonicine において互いに *cis* の関係にあるプロトン同士の NOE 相関はアセチル化前と同様に確認することができた。一方で、*trans* の関係にあるにも関わらず *cis* と同程度の NOE 相関を示した 2 つのプロトンは、アセチル化によってその NOE 相関の強度が *cis* に比べてはるかに弱くなつておらず、立体配置に対応する NOE 相関を得ることができた。このことから、pochonicine 類縁体についてもアセチル化を行うことで、ピロリジン環上のプロトンについての立体配置をより反映した NOE 相関が得られる可能性が示唆された。<sup>1)</sup> *Bioorg. Med. Chem.*, **17** (20), 7248-7253, (2009)

A - 2      Cyclo (Leu-Phe) oxidase を用いた酵素変換法により見出される  
*Mucor petrinuscularis* の生産する環状ジペプチド  
○徳島將光, 高橋佳子, 福田 優, 仁戸田照彦, 神崎 浩  
(岡山大院・環境生命)

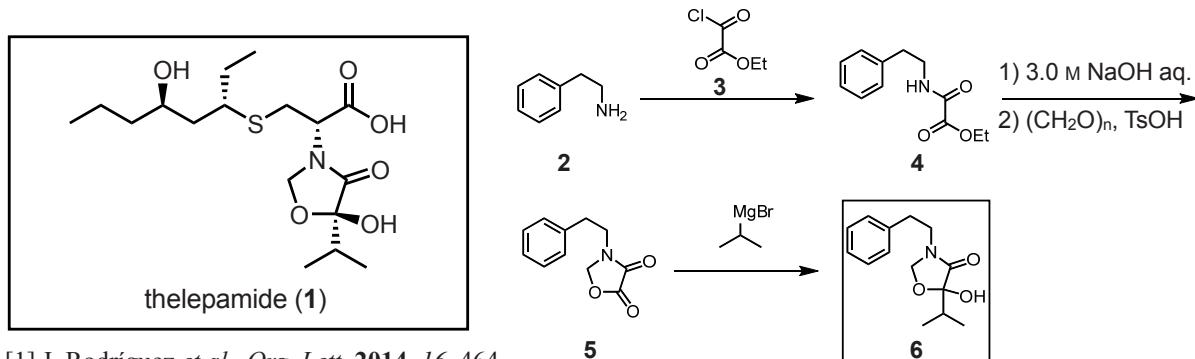
【目的】我々は放線菌 *Streptomyces albulus* KO23 株から環状ジペプチド類 (CDPs) を脱水素体へ変換する反応を触媒する cyclo (Leu-Phe) oxidase (CFL oxidase) を見出し、本酵素による酵素反応と多波長を検出可能な DAD-HPLC を組み合わせた CDPs の検出法を確立した<sup>1)</sup>。糸状菌のスクリーニングの結果、KP 培地で培養した *Mucor petrinuscularis* AKU3019 株の培養上清抽出物中に CDP と考えられる化合物 MT-1 の存在が確認された。本研究では MT-1 の単離・精製を行い、構造決定を行った。

【方法・結果】*M. petrinuscularis* AKU3019 株を 8 日間 (前培養 2 日、本培養 6 日) 培養し、培養上清 (5 L) を EtOAc 抽出することにより得られた培養上清抽出物に対して Oasis HLB カートリッジによる部分精製を行った後、分取 DAD-HPLC に供することにより 1.34 mg の MT-1 を得た。MS 分析の結果より MT-1 の分子量は 182 と推定された。また、<sup>1</sup>H-NMR 分析の結果より一方のアミノ酸残基は環状ジペプチドに特徴的なアミノ酸残基の  $\alpha$  プロトン由来の  $\delta$  3.97 (1H, ddd) とイソブチル基のメチレンプロトン由来の  $\delta$  1.57 (1H, dd) と  $\delta$  1.55 (1H, dd)、メチソプロトン由来の  $\delta$  1.79 (1H, sep) が検出されたことから leucine と推測した。もう一方のアミノ酸残基は通常  $\delta$  4 付近に検出される環状ジペプチドに特徴的なアミノ酸残基の  $\alpha$  プロトン由来のシグナルが検出されず、オレフィンプロトン由来と思われる  $\delta$  5.17 (1H, s) と  $\delta$  4.77 (1H, s) が検出されたことから dehydroalanine と推測した。以上の結果と文献値との比較から MT-1 は cyclo (dehydroAla-Leu) であると同定した。<sup>1)</sup> P. Arunrattiyakorn, T. Nitoda, H. Kanzaki, *Peptides*, **27**, 633 (2006)

A – 3 海洋環形動物より単離された Thelepamide の合成研究  
 ~oxazolidinone 環部のモデル合成~  
 ○井田浩介, 泉 実, 清田洋正 (岡山大院・環境生命)

海洋環形動物 *Thelepus crispus* から単離された thelepamide (**1**) は類例のない骨格を有し、抗白血病細胞活性を示すことから注目されている[1]。我々は、**1** の全合成の達成と絶対立体配置の決定を目的に合成研究を行っている。

$\beta$ -Phenethylamine (**2**) と酸クロリド **3** の縮合によってアミド **4** を調製した。エステル部の加水分解を行った後に、環化反応を行うことで中間体 **5**を得た。**5**に対して Grignard 反応を行うことで oxazolidinone 環モデル化合物 **6** の合成に成功した。



[1] J. Rodríguez *et al.*, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 464.

A – 4 抗カビ活性が報告されている 6 位がアルキル化された  $\alpha$ -ピロン化合物の合成  
 ○越智良太, 渡部加奈, 西脇 寿, 山内 聰 (愛媛大・農)

【目的】これまでに、6 位が置換された  $\alpha$ -ピロン骨格を有する化合物の合成を行い、立体構造と抗菌活性、抗カビ活性、植物生長調節活性との関係を報告してきた。今回の実験は、抗カビ活性が報告されている、 $\alpha$ -ピロン骨格の6 位に 2-hydroxy-6-phenylhexyl 基を有する4 つの立体異性体の合成を行い、構造と抗カビ活性との関係を解明する事を目的としている。6 位が置換された  $\alpha$ -ピロン化合物の構造活性相関研究はあまり知られておらず、新たなケミカルライブラリー構築が期待される。過去の研究で、methyl 2-oxocyclopentylacetate の酵母還元生成物を用いる事により、高い光学純度を有する6 位に置換基を有する  $\alpha$ -ピロン化合物が得られたことから、今回も、この酵母還元生成物を利用する事にした。

【方法・結果】methyl 2-oxocyclopentylacetate の酵母還元生成物である (*1R,2S*)-methyl (2-hydroxycyclopentyl)acetate の  $\text{LiAlH}_4$  還元、1 級水酸基のトリチル化、2 級水酸基の酸化、Baeyer-Villiger 酸化によって、6員環ラクトンを構築した。次に、エタノリシスによってラクトン環を開環した後、生じた2 級水酸基をアセチル化して、さらに、脱トリチル化を行った。続いて、Dess-Martin 酸化を行った後、得られたアルデヒドに対して allyltrimethylsilane と  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  を用いた反応を行い、allyl alcohol を得た。ジアステレオマーの分離を行った後、allyl 位の水酸基の立体構造を Mosher 法により決定したところ、*R* 体と *S* 体の比は 4/3 であった。さらに、Grubbs 触媒を用いた allylbenzene とのカップリング、メタノリシス、酸触媒下での6員環ラクトンの再構築を行った。

## A-5

### 血糖値上昇抑制作用を有するザクロ葉の成分研究

○赤井衣里阿, 河辺聰子, 加藤奈々, 我如古菜月, 好村守生<sup>1</sup>, 天倉吉章<sup>1</sup>,  
伊東秀之 (岡山県大・保健福祉, <sup>1</sup>松山大・薬)

**【目的】** 先に、我々はマウスにおける糖負荷後のザクロ葉エキスの血糖値上昇抑制作用、さらにザクロ葉に含まれるエラジタンニン4種を単離し、それらの  $\alpha$ -glucosidase 阻害活性について報告した。今回、さらに成分の分離、精製を行い、新たに4種の成分を単離、構造解明を行い、それらの  $\alpha$ -glucosidase 阻害活性を評価した。さらに、単離、同定した既知エラジタンニンの granatin A および granatin B の立体構造について詳細に検討を加えたので、それらの結果について報告する。

**【方法・結果】** ザクロ葉を 70%含水アセトンでホモジナイズし、ろ過、濃縮したエキスについて、エーテル、酢酸エチル、ブタノールにより順次抽出を行い、各エキスを得た。 $\alpha$ -glucosidase 阻害活性が最も強かつた酢酸エチルエキスについて、各種カラムクロマトにより分離、精製を行い、新たに4種の既知成分（エラジタンニン1種、フラボノイド配糖体3種）を単離し、NMR, MS 等の解析結果から、corilagin, isoquercitrin, luteolin 3'- $\beta$ -xyloside, luteolin 4'- $\beta$ -glucoside と同定した。さらに、ザクロ葉に含まれる主要成分の granatin A および granatin B のアシル基の糖への結合様式については、2D-NMR 解析により確認した。アシル基のうち hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基および dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHD) 基の立体構造については、本化合物をメチル化、メタノリス分解後に得られたアシル基のメチル化物の CD データ等の結果から、granatin A および granatin B の HHDP 基の立体はそれぞれ S 体および R 体、DHHD 基のメチル部分の立体はいずれも S 体であることを明らかにした。

## A-6

### ルイボスティー中のラット好塩基球性白血病細胞株における脱顆粒抑制物質

○池田 郁, 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・保健福祉)

**【目的】** ルイボスティーには抗酸化作用や免疫賦活作用をはじめ、多様な生理・薬理作用が報告されている。ルイボスティーの抗アレルギー作用として、アトピー性皮膚炎に対して有効であるという報告はあるが、脱顆粒抑制やその作用物質に関する報告例はない。本研究では、ラット好塩基球性白血病細胞株 RBL-2H3 に対するルイボスティーの脱顆粒抑制活性評価と、これに含まれる脱顆粒抑制物質の単離・同定を目的とした。

**【方法・結果】** 抗 DNP-IgE で感作した RBL-2H3 細胞にルイボスティーを作用させた後、DNP-HSA で抗原刺激することで脱顆粒を誘導した。その結果、ルイボスティーは RBL-2H3 細胞の脱顆粒を濃度依存的に抑制した。ルイボスティーを酢酸エチル、水飽和 1-ブタノールで分液し、各画分の脱顆粒抑制活性を比較したところ、酢酸エチル画分に最も強い脱顆粒抑制活性が認められた。脱顆粒抑制活性を指標に酢酸エチル画分を TOYOPEARL HW-40F, Sephadex LH-20 等のカラムで精製し、ルイボスティーに含まれる脱顆粒抑制物質として、quercetin, luteolin, chrysoeriol の単離・同定に成功した。このうち、chrysoeriol の脱顆粒抑制活性に関する報告は本研究が初である。単離した脱顆粒抑制物質について、ルイボスティー中の濃度を HPLC で定量後、標品を用いてルイボスティー中の濃度比率を再現したものを標品混合液として脱顆粒抑制活性を評価した。その結果、標品混合液の脱顆粒抑制活性はルイボスティーと一致し、ルイボスティーの脱顆粒抑制活性は今回単離した3種の化合物によって示されると考えられた。

A-7 ガンピ (*Diplomorpha sikokiana*) 皮に含まれるチロシナーゼ阻害活性物質  
○羽二生綾, 陳 新陽, 久保田夕貴, 柏木丈拡, 金 哲史  
(高知大・農)

【目的】ガンピ (*Diplomorpha sikokiana*) はジンチョウゲ科ガンピ属に属する落葉低木であり、古代から日本独特の製紙原料とされている。その纖維は短く光沢があり、粘着性に富むことから、これを原料に作られた雁皮紙は緻密で平滑性が高く、筆記性に優れた高級紙として古くから重用されているものの、纖維以外の有効利用方法がなく、他の植物成分は捨てられている。今回、その廃棄物中に高いチロシナーゼ阻害活性を示す成分が存在することを見出したことから、その単離・精製を試みた。

【方法・結果】ガンピ皮の 80% MeOH/H<sub>2</sub>O 抽出物を H<sub>2</sub>O に転溶後、Ether 次いで AcOEt で抽出した。20 μg 抽出物相当量/mL の濃度で活性を示した有機層を合一後、シリカゲルの中圧カラムにチャージし、30%, 50%, 60%, 70%, 75% AcOEt / Hexane を用いて順次溶出させたところ 50% AcOEt/Hexane 画分にのみ活性が確認された。この画分を更に ODS 中圧カラムにチャージし、10%, 20%, 40%, 60% MeOH/H<sub>2</sub>O を用いて順次溶出させ、各々のチロシナーゼ阻害率を調べた。その結果 10% MeOH/H<sub>2</sub>O 画分にのみ活性は局在し、この活性は逆相系の HPLC を用いると 8 つのピークに分かれることが分かった。各々のピークの阻害率を測定した結果、単独での活性は弱いものの、3 つのピークを合わせると元の活性に近い活性が確認できた。NMR および LC-MS を用いてこれらの構造解析を行った結果、それぞれ 3-(2,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid, Caffeic acid, Syringic acid であると同定し、3-(2,4-Dihydroxyphenyl)propionic acid が主要活性成分であると結論づけた。

A-8 烏梅（ウバイ）に含まれるヒアルロニダーゼ阻害成分の研究  
○道町晃平, 野下俊朗, 高村るり子, 齊藤安貴子<sup>1</sup>, 濱田義知<sup>1</sup>, 山口秀明<sup>2</sup>,  
大浦 健<sup>2</sup> (県広大・生命環境, <sup>1</sup>大電大院・工, <sup>2</sup>名城大・農)

【目的】烏梅はバラ科サクラ属のウメ (*Prunus mume*) の未熟果実を燻製にした生薬であり、主成分としてクエン酸、リンゴ酸などの有機酸を含む。下痢止め、駆虫、止渴を目的として漢方に処方されている。これまでの予備研究において烏梅にはヒアルロニダーゼ阻害活性を示すことが明らかとなつたが、烏梅にヒアルロニダーゼ阻害成分が含まれるという報告はこれまでされていない。そこで本研究では烏梅に含まれるヒアルロニダーゼ阻害成分を単離・構造決定することとした。

【方法・結果】烏梅を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O で順次抽出しそれぞれの抽出画分を得た。各画分を用いてヒアルロニダーゼ阻害活性を検討したところ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 抽出画分がもっとも強い阻害活性を示した。そこで阻害活性を示した CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと PTLC によって精製し、ヒアルロニダーゼ阻害活性を有する一成分を得た。本成分を各種機器分析により構造解析した結果、5-hydroxymethyl-2-furaldehyde と決定した。5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde のウメからの単離報告はあるが、そのヒアルロニダーゼ阻害活性についての報告はこれまでなされていない。

一方、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 抽出画分の精製を行なう過程で同画分中より、低極性化合物を単離した。これを各種機器分析によって構造解析したところ長鎖のアルカンであることが明らかとなつた。これまでに GC-MS によるウメ果実の香気成分分析によって、トリアコンタンなどの長鎖アルカンの存在が報告されているが、単離および機器分析による構造決定の報告例はこれまで知られていない。

A-9 コエンザイム Q10 生合成酵素 Ppt1 の変異体解析  
○大森夕貴, 戒能智宏, 川向 誠 (島根大・生物資源)

【目的】コエンザイム Q (CoQ) は好気呼吸によるエネルギー合成の必須因子である。生体内ではイソブレノイド側鎖であるポリプレニル二リン酸がキノン骨格の基となる *p*-ヒドロキシ安息香酸 (PHB) に PHB-ポリプレニル二リン酸転移酵素 (PPT) によって転移されることで生合成が開始される。ヒトの PPT をコードする *COQ2* には 5 種の変異が知られており、いずれも CoQ<sub>10</sub> 量の減少がみられ、重篤な疾患の原因遺伝子として報告されていることから重要な遺伝子と考えられる。本研究では、ヒトと同じ側鎖長 10 の CoQ<sub>10</sub> を合成する分裂酵母において PPT をコードする *ppt1* に変異を導入し、活性に重要なアミノ酸残基の解析を行った。

【方法・結果】PPT には基質認識に重要であると考えられる 2 つのアスパラギン酸 (D) リッチモチーフなど、生物種を超えて高く保存されているアミノ酸残基がある。このうちの 9 つのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異型 *ppt1* 遺伝子を作製し、分裂酵母の *ppt1* 破壊株 (*Δppt1*) に導入し最少培地における生育の比較と HPLC を用いた CoQ<sub>10</sub> 合成量の測定を行った。*Δppt1* 株は、CoQ 生合成不能となり最少培地で生育の遅延を示すが、D リッチモチーフの変異体など 7 つの変異体を導入した株はいずれも生育遅延の回復が見られず、CoQ<sub>10</sub> のピークも検出されなかった。以上の結果より、分裂酵母 *ppt1* の CoQ 生合成能には D リッチモチーフなどが活性に重要なアミノ酸残基であることが示唆された。

A-10 酸性環境で高発現する耐酸性ユスリカ幼虫由来遺伝子の網羅的解析  
○藤井創太郎, 河合幸一郎, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【目的】霧島山で採集したフトゲユスリカ (*Chironomus sulfurosus*) は耐酸性ユスリカの 1 種であり、その幼虫は pH 3.1 の酸性水域に生息する。酸性環境で生きることで、天敵であるトリやカエルから身を守っていると考えられる。しかし酸性環境では、ヘモグロビン (Hb) が酸素を結合しにくくなるなどの不利益が多く、なぜユスリカ幼虫が酸性環境中で生存できるのかは不明である。本研究では、フトゲユスリカ幼虫の酸性環境適応機構を解明する。

【方法】フトゲユスリカ幼虫を pH 2.0 および pH 7.0 の飼育環境中で、3, 4 歳まで飼育した。それぞれの幼虫から全 RNA を抽出し、mRNA 次世代シーケシングを用いた全遺伝子の発現量の比較により、pH 2.0 で飼育した時に特異的に発現する遺伝子を探査した。

【結果】解析した 34964 個の遺伝子のうち、1208 個が pH 2.0 で発現量が増加した。Hb 遺伝子は 21 種類同定でき、そのうち約 11 種の Hb 遺伝子の発現量が pH 2.0 で上昇していた。Hb の三次構造予測から、ヘム周辺がより疎水的である Hb 成分の発現が誘導されており、より安定性の高い Hb 成分が多いことが分かった。また pH 2.0 で飼育した幼虫の体液 pH は 6.8 と中性付近であり、pH 7.0 で飼育した際の体液 pH 7.8 と pH の差は 1.0 であった。プロトン排出に関わる V 型 ATPase 遺伝子の全サブユニットの発現量が増加しており、直接プロトン排出に関わる c-サブユニットは pH 2.0 での発現量が pH 7.0 の約 2 倍であった。この結果は、ユスリカ体内の pH 恒常性に V 型 ATPase が関わっていることを示唆している。

## B-1 海藻遊離单糖の高感度分析

○垣田浩孝, 小比賀秀樹 (産総研・健康工学)

【目的】海藻は糖質を多く含むため、海藻由来食品中の成分の中で糖質は主成分となっている。海藻由来食品中の糖質の高感度分析法の開発は、海藻由来食品の加工工程の品質管理、改良、原料海藻の品質管理などの点で重要である。前回、発表者らは TSKgel NH2-100 を用いて、食用海藻中の单糖・二糖を高分離で分析できることを報告した。標準還元单糖については单糖の帰属が可能であったが、海藻由来食品実試料では单糖溶出領域に糖アルコール等の成分が検出され、還元单糖の帰属が困難であった。そこで、海藻中の单糖の帰属が可能な分析法の開発を目的として、還元糖を分析カラムから溶出した後で蛍光誘導体に変換して蛍光検出する方法を検討した。

【方法】順相 HPLC カラムとして TSKgel Amide-80 を用い、移動相としてアセトニトリル／水の系で流速 0.6 ~ 1.2 mL/min で分析した。発色試薬は移動相の 1/2 の流速で流し、カラム出口で移動相と混合した。混合液を加熱し還元糖の蛍光誘導体を生成させた後で蛍光検出器により検出した。【結果】本方法では還元糖のみ検出され、糖アルコールやその他の非還元糖が検出されないため、クロマトグラムが比較的単純で還元单糖の帰属が容易であった。【考察】本分析法は海藻由来食品中の单糖分析に有効であると考えられた。

## B-2 ケルセチン配糖体代謝物プローブの合成と特性評価

○中島清花, 劉 哲, 山口佑也, 斎木俊也, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督 (岡山大院・環境生命)

【目的】3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOAPC) は、ケルセチン配糖体の腸内細菌代謝物の一つであり、第二相薬物代謝酵素誘導作用や、SH 基を介したタンパク質修飾作用を持つことが明らかにされている。本研究では、DOPAC 標的タンパク質の同定を目的として、プローブの開発とそのプローブの特性評価を行った。【方法・結果】本研究では、copper (I)-catalyzed alkyn azide 1,3-dipolar cycloaddition (CuAAC) を利用した DOPAC プローブを設計した。DOPAC と 2-propyn-1-ol のフィッシャーエステル化反応を行い、DOPAC propargyl ester (DPE) を合成した。DPE を glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と反応させ、エルマン試薬を用いて SH 基定量を行ったところ、DPE は DOPAC と同等の SH 基修飾作用を持つことが示された。また、DPE とビオチニアジドとの click 反応による 1,2,3-triazole の形成を NMR 及び質量分析によって確認した。さらに、DPE を GAPDH とカテコールオキシダーゼ存在下で反応させた後、ビオチニアジドとの CuAAC 反応を行い、標識ストレプトアビシンを用いた検出を試みた。その結果、DPE 修飾 GAPDH の生成を確認できたことから、本プローブが DOPAC 標的タンパク質の探索に有用であることが示唆された。

**B－3**

ベンジルイソチオシアネートによる大腸がん細胞の増殖抑制メカニズム  
○岡澤沙央理, 安部奈緒美, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督  
(岡山大院・環境生命)

【目的】ベンジルイソチオシアネート (BITC) は、アブラナ科野菜に由来するイソチオシアネート類の一つであり、NF-κB 経路の活性化を介して大腸がん細胞の増殖を抑制することが示唆されている。しかし、BITC による NF-κB 経路活性化メカニズムの詳細は未だ明らかになっていない。その一方で、NF-κB 経路の上流には、MAPK 経路や PI3K/Akt 経路、DNA 修復経路が存在することを示唆する報告も多い。そこで本研究では、大腸がん細胞の増殖抑制における BITC の標的を調査することを目的として、NF-κB 経路へのこれらの経路の寄与を調査した。

【方法・結果】BITC を処理した細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE、ウェスタンブロット法に供することで、NF-κB の核内移行とその上流の IκB kinase (IKK) 及び IκB のリン酸化を解析した。その結果、5 μM の BITC は NF-κB の核内レベルと IKK 及び IκB のリン酸化レベルを上昇させた。続いて、NF-κB 経路に至る経路について検討したところ、MAPK 経路の ERK 及び PI3K/Akt 経路の Akt、それぞれのリン酸化レベルが BITC により増加した。以上の結果より、BITC は NF-κB 経路に加えて、MAPK 経路並びに PI3K/Akt 経路を活性化することが示された。現在、MAPK 経路及び PI3K/Akt 経路に対する阻害剤を用いて、NF-κB 経路の活性化へのこれらの経路の寄与を検討している。

**B－4**

Effect of Phosphatidic acid on NSAIDs-induced stomach ulcer and its content in cereals. ○Sheuli Afroz, Teru Ikoma, Ayano Yagi, Shiro Watanabe<sup>1</sup>, Akira Tokumura<sup>2</sup>, Tamotsu Tanaka (Inst. Biomed. Sci., Tokushima Univ. Grad. Sch.,<sup>1</sup> Inst. Nat. Med., Univ. Toyama Grad. Sch.,<sup>2</sup> Fac. Pharm. Sci., Yasuda Women's Univ.)

Phosphatidic acid (PA) and Lysophosphatidic acid (LPA) are signaling molecules that induce various cellular responses via binding to intracellular targets and its specific receptors, respectively. Recently, we found that orally administrated synthetic PA and LPA ameliorate aspirin-induced stomach mucosal injury in mice. We also found that various vegetables contain abundant PA (Cabbage PA-700 nmole/g). Cereal grains are daily taken food in worldwide. To produce anti-ulcer diet recipe, we examined PA content in cereals. Results showed that Buckwheat dattan contains higher amount of PA (1500 nmole/g) than rice, wheat, corn. We also examined PA content in different parts of cereals. In all cereals examined, bran of the seeds contains PA abundantly than any other parts of the seeds. PA content of buckwheat does not change even after boiling. Animal experiments showed that PA isolated from buckwheat significantly prevents aspirin-induced stomach ulcer in mice. These results indicate a possibility that daily intake of buckwheat is protective from NSAIDs-induced ulcer.

B－5 清酒粕中の機能性成分  $\alpha$ -グリセロホスホコリン含有量の解析と保存安定性に関する研究

○小山賀奈子<sup>1,2</sup>, 原田啓子<sup>2</sup>, 原田春佳<sup>1,2</sup>, 塚本 香<sup>2</sup>, 飯島遼平<sup>1,2</sup>, 矢中規之<sup>1</sup>, 藤井 力<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>広島大院・生物圈, <sup>2</sup>酒総研)

【目的】

清酒粕には  $\alpha$ -グリセロホスホコリン (GPC) 等の多くの機能性成分が含まれているが, 広く含有量を調査した研究はほとんどない。我々は全国の清酒粕 109 点を分析し, GPC がどのような清酒粕にどれくらい含まれているかを解析, GPC 高含有条件を明らかにすることを目標として実験を行った。

【方法・結果】

全国の清酒粕 109 点を収集し, GPC 含有量を LC/MS 法により測定したところ, GPC 含有量には高いものや低いものがあることがわかった。最も高含有していた清酒粕は 100 gあたり 272 mg で, これは 634 食品<sup>1)</sup>中 3 位に相当する含量であった。低アルコール清酒粕の GPC 高含有を確認するため, 低アルコール清酒の清酒粕 3 点を収集し, GPC 含有量を測定したところ, 同程度の GPC を含有していることがわかった。また, 低アルコール清酒の仕込み試験で得られた清酒粕でも同様に高含有することがわかった。清酒粕を 4℃で保存する試験を行ったところ, GPC 含有量は速やかに減少したが, ほぼ等モルのコリンが増加していた。一方, -30℃の保存や凍結乾燥後 4℃保存ではあまり減少せず, 安定性が大幅に向上升ることがわかった。これらの結果は 4℃の保存で GPC からコリンに変換されていることを示唆している。

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

1)K. Y. Patterson *et al.*, USDA Database for Choline content of Common Foods (2008)

B－6 アレルギー様食中毒予防に有効なハーブ・香辛料抽出液の探索

○新田陽子, 江戸良也子, 安方美実子<sup>1</sup>, 北元憲利<sup>1</sup>, 菊崎泰枝<sup>2</sup>  
(岡山県大・保健福祉, <sup>1</sup>兵庫県大・環境人間, <sup>2</sup>奈良女大・生環)

【目的】 ヒスタミンを食品から摂取すると, 顔面紅潮などのアレルギー症状が現れることがあるため, アレルギー様食中毒の原因物質とされている。ヒスチジン含量が多い赤身魚内で, 微生物のヒスチジンデカルボキシラーゼ (HDC) を介した脱炭酸反応でヒスタミンが生成し, 蓄積することが多い。ヒスタミンが一旦蓄積すると加熱による無毒化はできないため, 食中毒予防の方法としてヒスタミン蓄積を抑えることが有効であると考える。本研究では, ハーブ・香辛料由来成分を用いて赤身魚中での HDC 活性を阻害することで, ヒスタミン生成を抑制し, 食品からのヒスタミン摂取を減らす方法を検討することを目的とした。

【方法・結果】 赤身魚のヒスタミン產生菌として代表的な *Morganella morganii* の HDC をコードする cDNA を組み込んだプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し, 誘導・発現後アフィニティカラム, イオン交換カラムで精製したものを組換え体 *M.morganii*HDC として使用した。ハーブ・香辛料は 2~10wt% になるように蒸留水に浸漬させ, 90°C以上で 5 分加熱後ろ過したものを抽出液とし, 最終濃度は 0.1~0.5v/v%で使用した。メドウスイート, ローズペタル, クローブ, オールスパイスの抽出液の添加は *M.morganii*HDC の活性を強く阻害した。最も強力に阻害したメドウスイート抽出液にサバ筋肉を浸漬させ, 室温での保存時間の経過に伴うヒスタミン量の変化を調べたところ, PBS に浸漬させた場合と比べてヒスタミン蓄積が大幅に抑制された。

**B-7****河内晩柑ジュースの成分プロファイリングと安定性**

○山田梨愛，杉脇秀美，福田直大<sup>1</sup>，玉井敬久<sup>1</sup>，好村守生，奥山聰，中島光業，古川美子，天倉吉章（松山大・薬，<sup>1</sup>愛媛県・産技研）

**【目的】** 愛媛県は柑橘の国内有数の生産県であり，温州みかんの他にも様々な品種が特産として生産されている。我々は，愛媛県産柑橘類を対象に，健康促進素材の創生を目的とした検討を実施しており，中枢神経系に作用する柑橘成分の探索から，河内晩柑果皮に特異的に含まれる auraptene (AUR), heptamethoxyflavone (HMF) に脳機能改善作用を見出し，報告している。本研究では，河内晩柑ジュースの成分プロファイリングを行い，これら果皮成分含有の確認と安定性について検討した。

**【方法】** 試料となる河内晩柑ジュースは，2014 年に収穫した果実をインライン搾汁機及びベルト式搾汁機により搾汁し調製した。成分分析については RP-HPLC により行った。安定性については，ジュースを熱湯処理したものについて，成分の経時変化を RP-HPLC により分析した。

**【結果】** 河内晩柑ジュースの成分を分析した結果，naringin を主ピークとして，narirutin, AUR, HMF 等，13 種のピークが検出されることを明らかにした。すなわち，果皮成分である AUR, HMF もジュースに含有されることを確認することができた。搾汁法を比較すると，AUR, HMF 含量とともにベルト式圧搾機で調製した場合の方の高いことが判明した。安定性を確認するため，ジュースを熱湯処理した結果，AUR は 6 時間後から若干の分解が認められたが，他の成分は 10 時間後においても分解は認められず安定であることが確認できた。熱湯処理 3 時間以降には分解物と見られるピークが観察され，これを単離し構造解析した結果，糖分解物と見られる 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde と同定することができた。

**B-8****高齢動物の骨格筋性状に及ぼす酢酸摂取の影響**

○阿部伶奈，丸田ひとみ，吉村征浩，木本眞順美，高橋吉孝，山下広美  
(岡山県大・保健福祉)

**【目的】** 加齢に伴う筋肉の萎縮や機能障害により QOL が低下するサルコペニアが問題となっている。サルコペニア発症の予防は健康寿命を延長する観点から重要な課題である。本研究室ではこれまで若齢のラットに 3 ヶ月間酢酸を摂取させることにより，遅筋線維割合の増加，さらにミトコンドリアの増加により脂質利用が増加し，運動持久力が向上することを明らかにした。本研究では，37 週齢のラットに酢酸を 5 ヶ月間継続的に摂取させた場合の骨格筋性状に及ぼす影響について検討した。

**【方法・結果】** 32 週齢の SD 系雄性ラット 12 匹を無作為に酢酸投与群 (ace 群) および水投与群 (water 群) に分けた。5 週間の予備飼育後 37 週齢から 56 週齢の約 5 ヶ月間，週 5 日間の割合で酢酸または蒸留水をそれぞれ胃ゾンデ法により経口的に摂取させた。飼育期間中に体重および摂餌量の測定ならびに小動物代謝計測システムによる代謝測定を行った。56 週齢時に解剖を行い骨格筋を採取して ATPase 染色，HE 染色，筋線維横断面積測定およびリアルタイム PCR を行った。酢酸摂取により水摂取に比較してエネルギー代謝の促進，ヒラメ筋における遅筋線維数の増加，MEF2A 発現量の増加および TGF-β 発現量の減少，腓腹筋における Atrogin1, MuRF-1, TGF-β 発現量の減少がみられた。これらの結果から，継続的な酢酸摂取により特にヒラメ筋において老化に伴う筋線維数低下抑制およびエネルギー代謝の低下抑制効果が示唆された。

B－9 フコキサンチン投与による脂肪性肝疾患モデルである *Fxr* 欠損マウスの脂質代謝への影響  
 ○木下智貴, 木下佑一, 杉浦義正, 宮田昌明 (水大校・食品科学)

【目的】フコキサンチンは褐藻に含まれている主要なカロテノイドである。抗肥満作用, 抗糖尿病作用, 抗癌作用等を有すると報告されているが, 非アルコール性脂肪性肝疾患への影響については十分に明らかにされていない。核内受容体 farnesoid X receptor (*Fxr*) は, 脂質やグルコースのホメオスタシスの調節において重要な役割を担っており, *Fxr* 欠損マウスは肝内 triglyceride (TG), total cholesterol (TC) および血中の肝障害マーカーレベルが高い。このため, *Fxr* 欠損マウスは, 脂肪肝や脂肪性肝炎を含む非アルコール性脂肪性肝疾患のモデル動物であると考えられている。本研究では, *Fxr* 欠損マウスを用いて, フコキサンチン投与による非アルコール性脂肪性肝疾患や疾患時の脂質代謝に対する影響を明らかにすることとした。

【方法と結果】8~10 週齢の雄性の *Fxr* 欠損マウスと野生型マウスに 50 mg/kg のフコキサンチンを 1 週間経口投与し, 最終投与の 24 時間後に解剖を行った。フコキサンチン投与は *Fxr* 欠損マウスの血中肝障害マーカーのレベルを変動させなかつたが, 肝内と血中における TG レベルを有意に低下させ, TC レベルを有意に上昇させた。コレステロール合成関連酵素の肝内 mRNA レベルの有意な上昇が認められた。一方, 野生型マウスにおいては血中 TC レベルの上昇以外の脂質レベルの変動は認められなかつた。これらの結果より, フコキサンチンの投与は非アルコール性脂肪性肝疾患時において TC やコレステロールなどの代謝を変動させる可能性が示唆された。

B－10 ノブドウ抽出物のアルコール代謝に及ぼす影響  
 ○屋敷圭子, 大戸信明, 木曾昭典 (丸善製薬(株)・総合研究所)

【目的】ノブドウ (別名蛇葡萄, 学名 *Ampelopsis brevipedunculata* Trautv.) は, 北海道から沖縄, 中国, 朝鮮半島の山野に自生するぶどう科の落葉つる植物である。ノブドウは古くから大腸桿菌, ブドウ球菌の抑制作用, 利尿作用あるいは止血作用があることから, 慢性腎炎や肝炎に効果があるとされている。また, ノブドウの肝機能保護作用は従来から幾つか報告されている。本研究では, 肝機能保護作用が報告されているノブドウ抽出物に着目し, 肝臓におけるアルコール代謝に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】肝臓中にはアルコール代謝酵素 (ADH), アルデヒド代謝酵素 (ALDH) が存在し, これら代謝酵素により体内に取り込まれたアルコールは ADH によりアセトアルデヒドに, ALDH により酢酸, 水に代謝される。エタノールまたはアセトアルデヒドに ADH または ALDH を加え, 酵素反応させる過程にノブドウ抽出物を加えたところ, ALDH の反応が亢進した。次に, ラットにおける血中アルコール濃度に及ぼすノブドウ抽出物の影響を検討した。7 週齢 Wister 系雄性ラットを用いて, ノブドウ抽出物を経口投与し, 対照群には生理食塩水を投与した。1 時間後に, エタノールを 3.0 g/kg 体重になるよう経口投与した。エタノール投与前, 投与 1, 2, 3, 4, 5, 6 時間後に採血を行い, 血中エタノール濃度を測定した。エタノール投与 1 時間で, 両群において血中アルコール濃度の上昇が確認された。また, ノブドウ抽出物の投与により血中アルコール濃度は対照群と比較し, 1, 3, 4 および 5 時間後に有意に低値を示した。以上の結果から, ノブドウ抽出物には肝臓でのアルコール代謝を亢進させる作用が期待できる。

B-11 オオタカネバラ (*Rosa acicularis*) の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の解明  
○中谷暢男, Enkhtsetseg Enkhtuya<sup>1</sup>, 森本ゆかり, 柏木丈拡, 島村智子,  
受田浩之<sup>2</sup> (高知大・農, <sup>1</sup>モンゴル科技大・食品加工, <sup>2</sup>高知大・地域協動)

【目的】オオタカネバラ (*Rosa acicularis*) はバラ科バラ属の落葉低木で、本州中部以北に分布する高山植物である。その実はハーブティーなど、健康効果や美容効果を目的とした食品に利用されている。一方、葉はモンゴルでステーツアイ（乳茶）用の茶葉の原料として広く飲用されている。しかしながら、オオタカネバラのもの機能性についての報告はほとんどない。本研究室では、オオタカネバラの葉の MeOH 抽出物が高い  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を示すことを見出した。そこで、本研究ではオオタカネバラが示す  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性の関与成分の単離と同定を行った。

【方法・結果】モンゴル産のオオタカネバラの葉を 50% EtOH で抽出した。この抽出液を液液分配で水層、酢酸エチル層、ヘキサン層に分画した。ラット腸管由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼを用いてマルトースの分解能を指標に、分画した各画分の  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定した結果、酢酸エチル層が高い活性を示した。この画分をシリカゲル中圧カラムに供し、ヘキサン/酢酸エチル系の溶離液を用いて分画し、 $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害活性を測定したところ、80% 酢酸エチル/ヘキサン溶出部に高い活性を見出した。この画分を ODS 中圧カラムに供し、水, 20%, 40%, 100% MeOH/水溶出部に分画したところ、40% MeOH/水溶出部に高い活性が認められた。この画分を逆相系の HPLC に供し、Fr. A~E に分画したところ、Fr. B および Fr. C のみが高い活性を示した。構造解析の結果、Fr. B および Fr. C から活性成分としてエラジタニンの一種である Eugeniin およびその異性体 Davidiin を同定した。

## C-1

### カマボコ廃棄物を利用した豆腐よう様発酵食品

○福田 翼, 鍬崎かれん, 辰野竜平, 古下 学, 原田和樹 (水大校・食品科学)

**【目的】** カマボコ廃棄物は、成型不良の規格外品や切れ端などの加工残滓として大量に廃棄されている。これらのかまぼこ廃棄物の有効利用法は、堆肥化や魚醤利用に限られている。本研究では、かまぼこ廃棄物の新規有効利用法の確立を目的とし、沖縄の伝統食品である豆腐ようの製造原理を応用した豆腐よう様発酵食品の製造を試みた。さらに、漬け汁に使用する麹ならびにアルコール濃度条件が品質に及ぼす影響を評価した。

**【方法】** 麹は、米麹および米麹と紅麹を等量で混合した麹（以下、米紅麹）を使用した。漬け汁は、アルコール濃度 0-40% の溶液を使用し、各麹を 30°C で 2 週間発酵させたものを利用した。豆腐よう様発酵食品は、これらの漬け汁に漬け込み、30°C で 2 ヶ月間発酵を行った。適宜、一般生菌数測定、SDS-PAGE、破断強度測定を行い、さらにデジタルマイクロスコープを用いてカマボコ表面観察を行った。

**【結果】** 米麹の漬け汁を用いた場合、アルコール濃度 20-40% の範囲で一般生菌数は検出限界以下となった。一方、米紅麹の場合、アルコール濃度 30-40% の範囲で一般生菌数は検出限界以下となった。発酵期間中の各試料におけるタンパク質組成の変化を調査した結果、いずれの条件においても発酵に伴い低分子化する傾向があり、発酵開始 2 ヶ月後には大部分のバンドが消失した。破断強度を調査した結果、発酵期間が経過するほど低下し、アルコール濃度が高い程、低下が抑制された。アルコール濃度 0-40% の各カマボコの表面を観察したところ、アルコール濃度が低い程、表面が荒れている事が確認された。

## C-2

### 粒子混入液状食品の流動挙動に関する研究

○徐 微, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

#### 【目的】

粒子を含む液状食品（例えば、コーンスープ、ドレッシングなど）では、粒子濃度（液体部分と粒子部分の比率）や粒子サイズなどにより、食感はもとより流動特性も大きく変化する。従って、このような液状食品を製造・管理する際には、粒子部分のサイズだけではなく、粒子濃度、粒子密度、分散媒（液体部分）の密度や粘度などについても把握する必要がある。本研究では、粒子を含む液状食品の性質を定量的に評価する新たな方法について検討を行った。具体的には、粒子混入液状食品の粒子濃度及び分散媒濃度(粘度)が円管内の流動挙動に及ぼす影響について検討を行った。

#### 【方法・結果】

アルギン酸ナトリウム水溶液を DL-乳酸カルシウム水溶液に滴下し、粒子を調製した。この粒子を、キサンタンガム水溶液(0.1, 0.3, 0.5wt%)に分散させ、粒子混入液状食品（粒子濃度：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.75 wt%）を調製した。この液状食品を 60~70 kPa の圧力で円管状の流路内で流動させ、流路途中に設置したコリオリ式流量計を用いて液状食品の流量の変動を測定し、同時にその波形を記録計で記録した。

液状食品の流量変動の頻度および変動幅に注目し、評価を行った。その結果、粒子濃度の増加に伴い、流量変動の頻度が増加した。また、粒子濃度を一定としてキサンタンガム水溶液の濃度を増加させたところ、流量変動の頻度が減少した。これは、粘度増加に伴う流速の減少に起因するものであった。

C-3 包装容器入り固体・液体食品の粘弾性パラメータの非破壊測定  
 一動的粘弾性を用いたモデル評価—  
 ○田添由真, 川井清司, 羽倉義雄 (広島大院・生物圏)

【目的】近年, 高齢者の人口増加に伴い, レトルトパウチに封入された介護食品の普及が進んできた。商品の製造後に, パウチの外側から内部食品の物性（硬さや粘度）を測定することができる、原料由来や調理過程における物性のばらつきを数値化することが可能である。そこで本研究では、非破壊測定が可能な動的粘弾性に注目し、単軸圧縮振動試験から得られるリサージュ図を用いて、パウチ内の食品の動的粘弾性パラメータ（貯蔵弾性率  $G'$ , 損失弾性率  $G''$ ）の測定を試みた。演者らは、固体・液体食品をそれぞれパウチに封入した場合、パウチの存在が測定値に一定の影響を与えること、また固体と液体を混合して封入した場合、封入液の量と濃度が測定値に一定の影響を与えることを既に明らかにした。そこで本研究では、固体と液体を混合した食品をパウチに封入した場合の動的粘弾性モデルを設定し、このモデルの弾性項及び粘性項と食品の静的弾性率及び粘性率との関係を検討した。

【方法・結果】固体食品のモデルとして、消しゴム（株トンボ鉛筆）と工業用ゲル（㈱タイカ）を用いた。液体食品のモデルとして、とろみ調整食品（㈱明治）を用いた。これらをパウチに封入し、材料試験機（㈱島津製作所 EZ-SX）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。得られた測定値をもとに粘弾性モデルを設定し、固体・液体食品のバネ要素とダッシュポット要素の寄与割合について検討を行った。その結果、固体と液体を混合した食品の動的粘弾性パラメータから固体・液体食品それぞれの物性を推定できる可能性が示唆された。

C-4 FT-NIR 法を用いた高温フライ油中の水の蒸発挙動の定量化  
 ○中津 祐, 川井清司<sup>1</sup>, 羽倉義雄<sup>1</sup> (広島大・生物生産, <sup>1</sup>広島大院・生物圏)

【目的】食品産業において、食材を油で揚げる調理（フライ操作）は一般的な調理法であり、幅広く使用されている。フライ工程において、フライ油の劣化は品質管理の面で最も大きな問題である。フライ油の劣化現象のひとつに、揚げ種から発生する水が高温の油と接触して起こる加水分解反応がある。加水分解によって、油はグリセロールと遊離脂肪酸に分解され、油の風味が落ち、食用油としての寿命が短くなる。フライ工程での水分の挙動を把握し、その現象を理解できれば、油の劣化の抑制や制御法の確立が期待できる。油の評価法のひとつにフーリエ変換近赤外分光法（FT-NIR）がある。FT-NIR 法は、高温試料の非破壊的かつ迅速な測定が可能であり、油中の水分の状態を測定できる可能性がある。そこで本研究では、FT-NIR 法を用いて高温油中の水分を測定し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】カール・フィッシャー法で水分を求めた菜種油試料を、FT-NIR 法を用いてスペクトルを獲得した。次に、水分濃度によってスペクトルが変化する波長域でバンド面積を求めたところ、温度・水分量によって直線的な関係が認められた。フライ工程を模したモデル実験を行い、フライ工程中の油を採取し、獲得したスペクトルからバンド面積を求めたところ、カール・フィッシャー法により得られた水分量変化と同様の変化を示し、FT-NIR 法で高温のフライ油中の水分定量の可能性が示唆された。また、TAG（トリオレイン）と DAG（ジオレイン酸グリセロール）に水を強制的に導入し、水の蒸発挙動を測定したところ、初期（飽和）水分量には差があったが、水の減少率（速度）には差はなかった。

**C－5****ヒメアカタテハの蛹体色の白色化に関する内分泌学的研究**長谷川尋士, 林 絵里, 河崎秀平, 森岡 律, 渕上惣一郎, 北沢千里<sup>1</sup>,落合正則<sup>2</sup>, ○山中 明<sup>3</sup>(山口大・理, <sup>1</sup>山口大・教育, <sup>2</sup>北大・低温研, <sup>3</sup>山口大院・医)

**[目的]** ヒメアカタテハの蛹体色は、金色もしくは銀色を基調とした黄土色（あるいは淡色）から暗褐色の色彩多型が存在する。本種の蛹体色は、温度の影響を受け、25℃以下では暗褐色に、32℃では黄土色（あるいは淡色）になる。しかし、蛹体色基調色に関しては詳細な研究が行われていない。本研究では、本種の蛹体色の白色化に関する発現調節機構を検討した。

**[方法・結果]** 卵から孵化した幼虫を、長日 (LD) 条件下の様々な温度下で飼育し、蛹の体色を調べた。蛹の基調色は、低温条件下で金色、高温条件下で白色を基調とした蛹となることが判明した。次に、蛹体色の基本色を確認するため、5齢幼虫を結紩したところ、頭部の蛹体色は金色となり、腹部の蛹体色は白（銀）色となった。つまり、蛹体色の基本色は白（銀）色であることがわかった。温度入れ替え実験により、基調色は蛹化脱皮の直前に決定されることが示唆された。また、蛹化直前の LD36 幼虫を LD15 条件下に移した時、基調色に変化はなかったが、黒色化が認められた。つまり、基調色発現と黒色化は独立していることが示唆された。基調色の白色化を誘導する神経内分泌因子の存在を検討したところ、LD25 条件下で Br-SG-TG<sub>1</sub> 連合体の 80% EtOH 粗抽出液を投与した個体では蛹体色の基調色の白色化が顕著に見られた。一方、LD36 条件下で同様の生物検定を行うと、全ての実験系個体で頭胸腹部側、腹部側ともに白色化した。以上から、Br-SG-TG<sub>1</sub> 連合体に白色化を誘導する因子が存在し、TG<sub>2,3</sub>-AG<sub>1-7</sub> 連合体のいずれかに白色化因子が存在することが示唆された。

**C－6****ルリタテハ成虫の季節型の違いによる翅の紋様と形状の解析**○平木佳奈, 山本 韶, 北沢千里<sup>1</sup>, 落合正則<sup>2</sup>, 山中 明<sup>3</sup>(山口大・理, <sup>1</sup>山口大・教育, <sup>2</sup>北大・低温研, <sup>3</sup>山口大院・医)

**[目的]** ルリタテハ成虫は、季節的な環境変化によって表現形質が変化する季節型をもつチョウである。本種成虫には夏型と秋型の季節型があり、成虫の出現する季節によって翅の紋様と形状が変する。雌雄で翅の紋様に大きな差はなく、夏型は腹側の面の地色が黄褐色をおびて明るく、白い斑紋があり、秋型は黒味が強く白い斑紋がない。また背側面の瑠璃色帯の太さが一般的に秋型>夏型、メス>オスである。本研究では季節型による本種の翅の紋様と形状の違いに着目し、各種指標を数値化し、学術的な季節型の違いについて検討した。

**[方法・結果]** ルリタテハ幼虫を、長日および短日条件下で飼育し、羽化させた成虫の左右の前・後翅の翅の面積、瑠璃色帯の面積、背側の白い斑紋の面積、後縁の長さおよび後縁の角度を計測した。それらのデータから翅の面積に占める瑠璃色帯の面積と白い斑紋の面積の割合を求めた。その結果、雌雄にかかるわらず夏型成虫よりも秋型成虫において瑠璃色帯の占める割合が大きくなかった。翅の面積に占める白い斑紋の割合は夏型、秋型で変化はなかった。前・後翅の後縁のくぼみの角度を比較した結果、夏型では雌雄ともに前翅で 140–150 度、後翅で 120–135 度であった。一方、秋型では雌雄ともに前翅で 120–125 度、後翅で 100–110 度であった。つまり、夏型よりも秋型で後縁のくぼみは鋭角になっており、秋型成虫の翅の輪郭は切り込みが深くなることが判明した。

## C-7

### 種々のマウス組織におけるセラミド-1-リン酸分子種とその代謝

○山下量平, 柿内直哉, 伊賀永里奈, 田畠優美香, 島田明奈, 徳村 彰<sup>1</sup>,  
田中 保 (徳島大院・医歯薬, <sup>1</sup>安田女大・薬)

【目的】セラミド-1-リン酸 (C1P) はセラミドのセラミドキナーゼによるリン酸化で生じ、新たな生理活性リン脂質として注目されている。動物組織には長鎖塩基と N-アシル鎖構造の違いによって多様な C1P 分子種が存在すると考えられるが、各組織の C1P 分子種組成、分子種による活性及び代謝経路の差異は不明である。本研究では種々の組織の C1P の分子種分析を行い、生理活性と代謝について調べた。

【方法・結果】マウスの各組織より Bligh&Dyer 法によって脂質を抽出し、TLC により C1P 画分を得た。これを Phos-tag を用いた MALDI-TOF MS に供し、分子種別定量解析を行った。その結果、皮膚よりヒドロキシパルミチン酸を有する C1P (hC1P) を見出した。肝臓、脳、腎臓、小腸における C1P 画分について調べた結果、肝臓では d18:1/24:1-, 小腸では d18:1/16:0-, 腎臓では d18:1/16:0- と d18:1/22:0-, 脳では d18:1/22:0-C1P が主に検出されたが、hC1P は検出されなかった。各組織の C1P 量を定量した結果、90 pmol/g から 344 pmol/g であった。また、CHO-K1 細胞に UV 照射してアポトーシスを誘導し、直後に C1P, hC1P、フィトセラミド-1-リン酸 (PC1P) を試験物質として添加して抗アポトーシス活性を調べた。その結果、N-アシル鎖構造の違いによって抗アポトーシス効果が異なることが明らかになった。また、C1P について CHO 細胞内への取り込みとセラミドへの代謝について調べた結果、インキュベート 3 時間程で C1P の約 10~20%が細胞内に取り込まれ、その内の約半分がセラミドへと代謝されていることがわかった。

## C-8

### 2-アミノアスコルビン酸の抗酸化特性

○岩岡裕二, 岸本祥穂, 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・保健福祉)

【目的】活性酸素種・フリーラジカルはヒトにおいて種々の疾病に関わっていると言われている。従ってこれらを体内で消去する、抗酸化物質の日常的な摂取が推奨されている。代表的な抗酸化物質であるアスコルビン酸 (AA) は我々の体内において活性酸素種などを消去し、還元状態を維持する上で重要な役割を担う。一方、AA の構造類似体であり、食品の褐変化に関わるとされる 2-アミノアスコルビン酸 (2-Amino-AA) の抗酸化作用に関する報告はほとんどない。従って、本研究では 2-Amino-AA の抗酸化特性を調べるため、3 種のモデルラジカルに対する 2-Amino-AA のラジカル消去活性を調べた。

【方法・結果】まず、評価に使用する 2-Amino-AA を化学的に合成した。次に DPPH ラジカル、ガルビノキシルラジカル及び ABTS ラジカルカチオンの 3 種のモデルラジカルに対し、2-Amino-AA 及び AA を反応させた。反応開始から 120 分後までの吸光度の変化を経時的に測定し、ラジカル残存率を求めて比較した。その結果、ガルビノキシルラジカルでは 2-Amino-AA と AA の間にラジカル残存率の差は見られなかつたが、DPPH ラジカル及び ABTS ラジカルカチオンでは 2-Amino-AA の方が AA よりもラジカル残存率は低く、強いラジカル消去活性を示した。更に HPLC 分析から DPPH ラジカルでは AA との反応では見られない 2-Amino-AA 特有の反応物の生成が確認された。以上から DPPH ラジカル、ABTS ラジカルカチオンに対し 2-Amino-AA は AA よりも強いラジカル消去活性を示すことが明らかになった。また、DPPH ラジカルでは AA と異なる機構でラジカル消去活性を示す可能性が示唆された。

C-9 アスコルビン酸のハイスループット高感度分析法  
○富澤真由子, 田井章博 (県広大・生命環境)

【目的】アスコルビン酸 (AA) の定量は, HPLC を用いた紫外光での定量分析が一般的である。しかし、細胞中の AA 量は微量であり、紫外光での定量分析には限界がある。AA 分析として、AA を酸化させ *o*-phenylenediamine (OPD) で蛍光誘導体化し、マイクロプレートリーダーの分析により、AA を高感度・簡便な分析を可能にした報告がある。また、HPLC 分析で 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (MDB) と  $\alpha$ -ケト酸の蛍光誘導体は、OPD 誘導体の 150 倍の感度を有する報告がある。従って、MDB を使用し、マイクロプレートリーダーを用いた AA のハイスループット高感度分析法の確立を目的とした。

【方法・結果】AA を OPD と MDB で蛍光誘導体化し、マイクロプレートリーダーと HPLC で分析した。まず、OPD を用いたマイクロプレートリーダーと HPLC の分析は、それぞれ 1.6~50  $\mu\text{M}$ , 50 nM~50  $\mu\text{M}$  の間で定量が可能であった。次に、MDB を用いたマイクロプレートリーダーと HPLC の分析は、それぞれ 50 nM~50  $\mu\text{M}$ , 0.50~250 nM の間で定量が可能であった。MDB を用いることでマイクロプレートリーダーは約 30 倍、HPLC で約 100 倍感度の向上が認められた。また、生体内に存在する  $\alpha$ -ケト酸 3 種 ( $\alpha$ -ケトグルタル酸、オキサロ酢酸、ピルビン酸) と MDB を反応させたところ、3 種の  $\alpha$ -ケト酸は蛍光を示さなかった。つまり、MDB は AA と特異的に反応すると言える。さらに、この方法を用いて細胞内 AA の分析も可能であった。以上のことから、MDB を使用したマイクロプレートリーダーの分析は、AA のハイスループット高感度分析法として有用である。

C-10 生細胞内のアスコルビン酸濃度分布のイメージング化  
○石股 直, 加来田博貴<sup>1</sup>, 田井章博  
(県広大・生命環境, <sup>1</sup>岡山大院・医歯薬)

【目的】ビタミン C として知られるアスコルビン酸 (AA) には多様な生理作用が報告されているが、意外にもその多くの生理作用メカニズムについては未解明である。本研究では、AA の生理作用メカニズム解明の一助と成り得る細胞内の AA 濃度分布のイメージング法の可能性を探ることを目的とした。

【方法・結果】生理条件下と同様に AA の 3 位水酸基を解離させ、かつ AA を安定化させ、5 位水酸基の立体を認識させるために、2 位の水酸基に蛍光プローブを導入すれば良いと考えた。2 位に蛍光プローブを導入するに当たり、AA の 2 位選択的に蛍光プローブを導入するため、2 位水酸基を反応性の高いアミノ基に変換した。その後、アミノ基の蛍光ラベル化剤である NBD-Cl と反応させ 2-NBD-AA を合成したが、2-NBD-AA は蛍光を発しなかった。そこで、NBD 基の代わりに Dansyl 基を導入した 2-Dansyl-AA を合成し、蛍光を発することを確認した。次に、2-Dansyl-AA の RBL-2H3 細胞への取り込みを検討したところ、細胞内蛍光量の増加が見られた。また、AA の供添加によって 2-Dansyl-AA の取り込み阻害傾向が見られたことから、2-Dansyl-AA は AA トランスポーターを介して細胞内へ取り込まれていることが考えられた。さらに、細胞内へと取り込まれた 2-Dansyl-AA の大部分がミトコンドリアに局在することが共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかとなった。

以上の結果より、蛍光プローブを導入した AA 誘導体は、生細胞内の AA 濃度分布のイメージング法への利用が可能ではないかと思える。

C-11 アスコルビン酸 2-グルコシドの抗腫瘍作用  
○三浦香織, 田井章博 (県広大・生命環境)

【目的】高濃度アスコルビン酸 (AA) 点滴療法は、近年注目されているがんの治療法である。AA は生体内で高濃度に存在するとプロオキシダントとして働き、がん細胞選択的に酸化ストレスを与える。日本でもいくつかのクリニックで治療が可能である。しかし、AA は非常に不安定な物質であり、水溶液中で容易に酸化され、活性を失うという問題点がある。このため、AA 製剤は液体での保存に向かず、使用時に調製しなければならない。そこで、AA の安定型誘導体であり、プロビタミン C 剤として実用化されているアスコルビン酸 2-グルコシド (AA-2G) が、AA の問題点を解決した薬剤として開発できるのではないかと考え、がん病態モデルマウスに対する抗腫瘍作用の評価を行った。

【方法・結果】CDF1 マウスの背部皮下に、マウス結腸がん由来 Colon-26 細胞を移植して固形化させ、がん病態モデルマウスを作製した。1.7 mmol/kg の AA, AA-2G (AA 300 mg/kg 相当) を隔日で計 4 回尾静脈投与し、その間の腫瘍体積を測定した。また、AA-2G の体内動態を検討するため、投与後、肝臓、腎臓、血漿、腫瘍を採取し、HPLC にて代謝物の分析を行った。AA 及び AA-2G 投与群の腫瘍の増殖は、コントロールである PBS 投与群と比較し、有意に抑制された。AA-2G の活性は AA とほぼ同等であり、HPLC 分析の結果からも、AA と同様のメカニズムで活性を発揮していると考えられる。以上より、AA-2G は AA の問題点を解決し、点滴療法の薬剤として開発できると考えられる。

D-1 細胞質型アセチル CoA 合成酵素の核内移行シグナル配列の解析  
○赤田千佳, 吉村征浩, 山下広美 (岡山県大院・保健福祉)

【目的】アセチル CoA 合成酵素 (AceCS) は酢酸と CoA からアセチル CoA を生成する酵素であり、細胞内分布や発現組織が異なる AceCS1 と AceCS2 の 2 種類の AceCS が存在している。AceCS1 は細胞質に存在するとされてきたが、近年の研究では核にも存在し、低酸素誘導因子 HIF2- $\alpha$  のアセチル化を介したエリスロポエチン遺伝子発現や、ヒストンのアセチル化を介した遺伝子発現の制御に関与することが報告されている。しかし、AceCS1 の核移行メカニズムや核へ移行する意義についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究では、AceCS1 の核移行メカニズムを解明するため、アミノ酸配列中の核移行シグナル配列 (NLS) を同定することを目的とした。

【方法・結果】NLS 予測プログラムを用いた解析から、AceCS1 推定アミノ酸配列中に NLS が存在することが推測された。そこで、AceCS1 の推定 NLS を C 末端に付加した GFP (GFP-NLS)，NLS 中のリシン残基をアラニン残基に置換した配列を付加した GFP (GFP-mutNLS) を HepG2 細胞に発現させ、それらの細胞内分布を観察した。その結果、GFP-NLS は核に局在し、GFP-mutNLS は GFP 同様細胞全体に分布した。また、AceCS1 アミノ酸配列中の 271 番目のリシン残基をアラニン残基に置換した変異体タンパク質 (AceCS1K271A) の細胞内分布を観察したところ、野生型 AceCS1 では一部が核に分布していたが、AceCS1K271A は核における発現が顕著に減少した。以上のことから、本研究で同定した配列は核移行シグナルとして機能し、その配列中のリシン残基が核移行に重要であることが明らかになった。

D-2 L-グルタミン酸オキシダーゼの基質特異性改変を目的とした変異酵素の作成と性質検討  
○藤野志保子, 根本理子, 田村 隆, 日下部均<sup>1</sup>, 稲垣賢二  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>(株) エンザイムセンサ)

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ (LGOX) は、L-Glu の酸化的脱アミノ化反応を触媒するフラビン酵素である。LGOX は安定かつ基質特異性が厳格なため、種々のバイオセンサーに活用されている。我々は LGOX の 305 番目のアルギニン残基 (R305) が LGOX の基質認識に最も重要であること明らかにし、R305 への部位特異的変異導入により、L-His に酸化活性を示す R305L 変異 LGOX など、基質特異性改変酵素の作成に成功している。今回は、R305L 変異 LGOX と共に L-His に酸化活性を示した R305T と R305I を精製し性質検討を行うと共に、活性中心近傍に存在する W564 の機能解析を行う目的で、新たに 3 種の変異 LGOX (W564A, W564F, W564M) を作成し、性質検討を行った。【方法】変異酵素は、LGOX 発現用ベクター pGOx\_mal1 を有する *E. coli* JM109 を用いて発現させ、精製を行った。酵素活性は、反応生成物である  $\alpha$ -ケト酸を定量することで測定した。【結果】R305T, R305I 変異 LGOX はいずれも L-His を最も良い基質とし、その他には L-Phe, L-Leu, L-Tyr などの疎水性側鎖を有する L-アミノ酸に酸化活性を示した。L-His に対する触媒効率  $k_{cat}/K_m$  は、R305T, R305I とともに R305L より約 1.3 倍高い値であった。一方 W564A, W564F, W564M の L-Glu に対する活性は顕著に低下したが、著しい基質特異性の変化は見られなかった。触媒効率は、W564F, W564M, W564A の順で高くアミノ酸側鎖の嵩高さに比例していた。この結果から Trp564 は LGOX の基質 L-Glu の認識に決定的な役割は果たしていないが、活性中心の空間保持に重要なことが示唆された。

D－3  **$\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ欠損 *Arabidopsis thaliana* に存在する遊離糖鎖の構造解析**  
前田 恵, ○高田 駿<sup>1</sup>, 石水 肇<sup>2</sup>, 木村吉伸  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・農, <sup>2</sup>立命館大・生命科学)

**【目的】** *A. thaliana* の  $\alpha$ 1,3/4-フコシダーゼ (AtFUC1) は、植物複合型 N-グリカンのルイス a 抗原 ( $\text{Gal}\beta 1\text{-}3[\text{Fuc}\alpha 1\text{-}4]\text{GlcNAc}-$ ) や、GlcNAc2Fuc1 構造 ( $\text{GlcNAc}\beta 1\text{-}4[\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3]\text{GlcNAc}-$ ) の  $\alpha$ 1,3/4 結合したフコース残基を加水分解する。本研究では  $\alpha$ -Fuc'ase の内在性基質を同定し、植物複合型 N-グリカンの代謝機構を解明する研究の一環として、AtFUC1 をコードする *At2g28100* 遺伝子に T-DNA の挿入した AtFUC1 欠損 *A. thaliana* 植物体中に発現される遊離糖鎖の構造解析を行った。**【方法・結果】** *A. thaliana* の野生株と AtFUC1 欠損株について葉 (約 1 g) を液体窒素中で粉碎後、0.1 N アンモニア水で抽出し、透析後、透析外液を濃縮して陽・陰イオン交換に供し中性糖を含む素通り画分を回収し、濃縮後、ゲルろ過により脱塩を行った。次いで、ピリジルアミノ化 (PA 化) により蛍光標識した後、得られた PA 糖鎖を RP-HPLC および SF-HPLC で分析した。野生株と比較して AtFUC1 欠損株で新しく検出された PA 糖鎖を酵素消化と質量分析に供し構造解析を行った。その結果、非還元末端にルイス a 抗原を 2 ユニット有するとともに、還元末端側に GlcNAc を 1 残基のみ有する GN1 タイプの植物複合型遊離 N-グリカン ( $\text{Gal2Fuc2GlcNAc2Man3Xyl1GlcNAc1-PA}$ ) が同定された。ルイス a 抗原は  $\alpha$ 1,4 結合したフコース残基の存在により  $\beta$ 1,3-ガラクトシダーゼ以降の代謝分解が進まない。従って、AtFUC1 は GN1 タイプの植物複合型遊離 N-グリカンのルイス a 抗原に存在する  $\alpha$ 1,4 結合したフコース残基の加水分解にも関与しており、野生株では複合型遊離 N-グリカンが速やかに代謝分解されていることが示唆された。

D－4 ***Shewanella violacea* 由来シトクロム c の構造、変異導入による安定性の変化**  
○政成美沙, 河原一樹<sup>1</sup>, 沖 大也<sup>1</sup>, 大久保忠恭<sup>1</sup>, 三本木至宏  
(広島大・生物圏, <sup>1</sup>阪大・薬)

**【目的・背景】** 深海は低温、高圧力という極限環境の一種である。深海に生息する微生物は、低温や圧力に適応した蛋白質を生産している。本研究ではこれまでに、深海および浅瀬由来の相同シトクロム c の安定性を比較し、由来する細菌の生育圧力が高いほどシトクロム c の安定性も高いことを示している。そこで、深海由来シトクロム c の安定化機構を立体構造に基づいて解明することを目指した。

**【方法・結果】** 深海に生息する *Shewanella violacea* 由来のシトクロム c (SV) を結晶化し、X 線回折により立体構造を決定した。比較対象として、浅瀬に生息する *Shewanella livingstonensis* 由来シトクロム c (SL) の構造を、データベース上にある浅瀬由来の相同シトクロム c の構造を基にモデリングした。得られた構造を比較すると、SV は SL にない特異的なアミノ酸相互作用をいくつか持っていた。それらのアミノ酸について、SV と SL で相互に置換する変異体を作製した。Differential scanning calorimetry (DSC) を使用して変異体の熱安定性を測定した結果、SV の 50, 51 番のアミノ酸を同時に置換した変異体は野生体と比べて熱安定性が下がっていた。これに対して、SL の同じ箇所の変異体は野生体と比べて熱安定性が上がっていた。

**【考察・展望】** SV は特異的なアミノ酸相互作用を持つことで安定化していることが分かった。SV は深海細菌由来であることから、SV の特異的なアミノ酸相互作用は圧力への適応手段であると考えられる。今後は高圧力下での構造を調べることで、アミノ酸相互作用の圧力適応への役割を解明したい。

## D-5 耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素の機能、構造解析

○瀬戸智成、秋田紘長<sup>1</sup>、林 順司、大島敏久<sup>2</sup>、櫻庭春彦  
(香川大・農、<sup>1</sup>産総研、<sup>2</sup>大工大・工)

D-アミノ酸は、L-アミノ酸と光学異性体の関係にあり、化粧品、医薬品、甘味料の原料として応用利用が期待できる。しかしD-アミノ酸の合成方法は限られている。我々の研究グループでは好熱菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 由来 meso-ジアミノピメリン酸脱水素酵素 (DAPDH) の活性中心に5カ所のアミノ酸変異を行い、D-アミノ酸合成に有用な耐熱性 D-アミノ酸脱水素酵素 (D-AADH) を作製した。C末端に His-Tag を付加した親酵素 DAPDH の構造解析より本酵素がホモ二量体の構造であり、C末端領域が片方のサブユニットに入り込む構造を取ることが判明している。このC末端領域が酵素活性に重要な役割を持つと推測された。そこで、Tagなし D-AADH の精製を行い、Tagありの D-AADH と機能の比較を行った結果、各基質に対する比活性の上昇や耐熱性の上昇が見られた。具体的には、D-リジンの酸化について約40倍の比活性の上昇、D-ロイシンの合成反応については約8倍の比活性の上昇が見られた。耐熱性では両酵素ともに30分間の処理で65°Cまで安定であり、30分間、70°Cで処理した際、Tagあり DAADH は完全失活するのに対して、Tagなし DAADH は30%程度残存活性を示した。また Tagなし DAADH の構造解析を行い、Tagあり DAPDH と構造比較を行った結果、His-Tag の有無が活性に大きく影響を与えることが確認された。

## D-6 超好熱アーキア由来ホモセリンデヒドロゲナーゼが示す新奇な補酵素結合様式

○林 順司、井上翔太、米田一成<sup>1</sup>、大島敏久<sup>2</sup>、櫻庭春彦  
(香川大・農、<sup>1</sup>東海大・農、<sup>2</sup>大工大・工)

**【目的】**スレオニン、メチオニン、イソロイシンは微生物や植物にのみ存在するアスパラギン酸経路によってアスパラギン酸から生合成される。ホモセリンデヒドロゲナーゼ (HseDH) は本経路においてスレオニン、メチオニン、イソロイシンの前駆体であるホモセリンを生成する酵素であり、本経路における鍵酵素の一つとして重要な役割を持つ。また HseDH はヒトには存在しないため、新規抗菌剤設計のための分子標的としても注目されている。これまで常温微生物の経路については詳細な研究がなされているが、超好熱アーキアにおける本経路関連酵素の研究は少なく、特に HseDH に関する研究報告は無い。今回、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 HseDH の酵素化学的諸性質の解明、X線結晶構造解析に成功したので報告する。**【結果】**構造解析の結果、結晶作製中に補酵素を添加していないにも関わらず、その構造中に NADP (H) の存在が確認された。しかしながら、本酵素は NADP を補酵素とした活性を示さず、逆に NAD 依存性の反応が NADP によって強力に阻害されることが明らかとなった。構造解析の結果から、アミノ酸残基 R40 と K57 が NADP (H) のアデニンリボースリン酸基と相互作用を形成していた。これらアミノ酸残基をアラニンに変異させた酵素を作製したところ、変異酵素は NADP に対する高い特異性を獲得した。また、K57A の構造解析の結果から NADP (H) のアデニンリボースリン酸基周りの水素結合が減少していることを確認した。これらの結果から、野生型酵素の NADP による強力な阻害は NADP のアデニンリボースリン酸基が非常に強力に保持されているためであることが示唆された。

D-7 超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来グリセロール-1-リン酸デヒドロゲナーゼの機能構造解析  
○山本香李, 林 順司, 米田一成<sup>1</sup>, 大島敏久<sup>2</sup>, 櫻庭春彦  
(香川大・農, <sup>1</sup>東海大・農, <sup>2</sup>大工大・工)

アーキアのリン脂質の骨格はグリセロール-1-リン酸 (G1P) が利用され, これは真核生物や真正細菌が利用するグリセロール-3-リン酸と鏡像異性体の関係にある。G1P を生成する酵素として, アーキア特異的にグリセロール-1-リン酸デヒドロゲナーゼ (G1PDH) が存在しており, 本酵素はジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール-1-リン酸 (G1P) を生成する。G1PDH の構造情報は不足しており, これまで *Methanocaldococcus jannaschii* 由来の酵素しか報告例が無い<sup>1)</sup>。我々は超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来 G1PDH について X 線結晶構造解析を行った。既知のすべての G1PDH は NADH より NADPH に対して高い反応性を示すのに対し, 本酵素の NADPH に対する活性は NADH を用いたときのわずか 4.6 %であるという特徴を持つ。しかしながら, 構造解析と HPLC 解析の結果, 結晶作製中に補酵素を添加していないにもかかわらず NADPH が結合していることが判明した。*M. jan naschii* G1PDH との構造比較において, 本酵素の NADPH は通常の補酵素結合部位から 2.5 Å ほど押し出された状態で結合することが観察された。この NADPH のアデニンリボース C2 リン酸基は Ser 40, Thr 42 により強固に保持されていた。興味深いことに S40A/T42A ダブルミュータントは NADPH に対する高い反応性を獲得した。これらの結果は, NAD (P) 依存性デヒドロゲナーゼの補酵素特異性の決定メカニズムに新しいバリエーションが存在することを示唆している。

1) Vincenzo Carbone et al, *J Biol Chem.* 2015 Aug 28;290 (35):21690-704

D-8 好熱菌由来シトクロム c'への変異導入による熱安定性変化  
○山根大典, 藤井創太郎<sup>1</sup>, 三本木至宏<sup>1</sup>, 山中 優<sup>2</sup>, 丸野孝浩<sup>3</sup>  
(広島大・生物生産, <sup>1</sup>広島大院・生物圏, <sup>2</sup>奈良先大・物質,  
<sup>3</sup>大阪大院・工学研)

【目的】シトクロム c' はヘムタンパク質の 1 種であり, その多くはホモ 2 量体で存在する。各サブユニットは 4 本の  $\alpha$ -ヘリックスからなる筒状構造をとる。生育至適温度 52°C の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム c' (PHCP) は, アミノ酸配列が 55%一致する生育至適温度 25°C の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム c' (AVCP) よりも高い安定性を持つことが以前の研究によりわかっている。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】PHCP 変異体を *Escherichia coli* で異種発現し, 4 種類のカラムを用いて精製した。超遠心分析によつていずれの変異体も 2 量体であることを確認し, CD 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  $T_m$  を測定した。ヘムと相互作用している残基を置換した, T17E, A20G, L76V 変異体では,  $T_m$  がそれぞれ 2.0, 3.6, 2.6°C 低下した。また, サブユニット間で相互作用している残基を置換した, F11T, T18F, F71D 変異体では,  $T_m$  がそれぞれ 6.4, 5.8, 5.6°C 低下した。以上 6 つの残基すべてを置換した 6 残基置換体では  $T_m$  が 17.4°C 低下し, AVCP の  $T_m$  に大きく近づいた。また, シトクロム c' の機能であるとされる NO の結合能の有無を可視吸収スペクトルによって確認したところ, 変異によって機能へ影響しないことが分かった。これらの結果から, PHCP の 2 量体形成と機能にはかかわらないが, 安定性にかかわるアミノ酸を特定できた。

D-9 *Cellvibrio* sp. 由来のキシラン分解酵素遺伝子の大腸菌へのクローニング  
○坂口直人, 山崎和真, 有賀 修 (高知工大・環境理工)

【目的】キシロオリゴ糖の様々な生理活性が報告されている。寒天分解細菌として単離した *Cellvibrio* sp. OA-2007 の全ゲノムを解析した結果、ゲノム中に幾つかのキシラン分解酵素遺伝子を見出した。本研究ではこれらの情報を基にキシラン分解酵素遺伝子の大腸菌へのクローニングを行なうとともに、組換えキシラン分解酵素の精製を行った。

【方法・結果】BLAST 検索により、他のキシラナーゼ遺伝子と相同性の高い配列を *Cellvibrio* sp. OA-2007 のゲノム中で探索し、Forward 及び Reverse primer を設計し、染色体 DNA を鋳型として、PCR を行った。この PCR 産物を pUC19 と連結し、大腸菌を形質転換した。組換え菌を超音波破壊し、粗酵素液を回収した。粗酵素溶液によるキシランの分解を行い、HPLC 及び TLC で分解産物の分析を行った。また、還元糖を測定し、活性を算出した。FPLC による組換えキシラナーゼの精製を行った。

*Cellvibrio japonicus* のキシラナーゼ遺伝子と高い相同性を示す配列を大腸菌にクローニングしたところ、組換え菌の粗酵素液はキシランを分解し、キシロオリゴ糖を生産した。また、その塩基配列を調べたところ、キシラン分解酵素が推定分子量 37,099 を持ち、351 アミノ酸残基から成り、シグナル配列を持つ GH11 に属する糖分解酵素であると推定された。

D-10 *Cellvibrio* sp. 由来のネオアガロオリゴ糖を分解する酵素の精製  
○有賀 修 (高知工大・環境理工)

【目的】寒天からの生理活性を持つオリゴ糖の生産やエネルギー生産を目的に、我々はこれまで、*Cellvibrio* sp. OA-2007 から  $\alpha$  および  $\beta$ -アガラーゼ遺伝子のクローニングを行ってきた。最近、4 糖や 6 糖などのネオアガロオリゴ糖をネオアガロビオースに分解する酵素を見出した。本研究ではその精製と酵素の特性について報告する。

【方法・結果】寒天分解細菌 *Cellvibrio* sp. OA-2007 の培養液から菌体を濃縮した後、超音波破壊し、粗酵素液を回収した。陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いて、FPLC により目的酵素の精製を行った。 $\beta$ -アガラーゼ遺伝子をクローニングした組換え大腸菌を用いて、アガロースの分解を行い、4 糖、6 糖を含むネオアガロオリゴ糖混合液を調製した。HPLC を用いてネオアガロオリゴ糖を測定し、4 糖、6 糖のネオアガロビオース (2 糖) への分解速度を酵素活性として評価した。TLC により、寒天オリゴ糖の分解様式を調べた。

精製酵素は 41 kDa の分子量を持つ 2 つのサブユニットからなるたんぱく質であると思われる。精製酵素のオリゴ糖分解の最適温度は 35°C、最適 pH は 6.5、また、30°C 以下で安定であることが分かった。精製酵素はアガロースを僅かに分解し、分解初期に 4 糖を生産するが、さらに 2 糖に分解した。精製酵素は Neoagarohexaitol の非還元末端側の 4 糖を認識し、4 糖と 2 糖に分解すると思われる。

D-11 大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素におけるN末端荷電アミノ酸とユビキノンとの相互作用  
○船橋稔孝, 山崎理恵子, 高坂智之<sup>1</sup>, 山田 守 (山口大院・医, <sup>1</sup>山口大・農)

**【目的】**大腸菌の膜結合型グルコース脱水素酵素(mGDH)は、呼吸鎖電子伝達系の初発酵素であり、5回の膜貫通配列をもつN末側膜貫通領域とグルコースの酸化を担うC末側触媒領域の2つの機能領域で構成される。mGDHはプロトンポンプ能をもたないことから、N末側膜貫通領域の複雑な構造の生理的役割に興味がもたれている。Friedrichらは、他の初発酵素との構造的類似性から、N末側膜貫通領域が電子受容体であるキノンと相互作用する可能性を示唆している(*FEBS*. 1990, **265**, 37-40)。本研究では、複数のアミノ酸置換体を作製し、N末側膜貫通領域に存在する荷電アミノ酸とキノンとの相互作用の解明を試みた。

**【結果・考察】**E82A-mGDHとR93A-mGDHは、野生型と比べて、膜画分および精製酵素で酵素活性の低下が確認された。また、酵素化学的解析により、R93A-mGDHは、キノンへの親和性が低いことやキノン含有量が1.3倍多いことも示された。これらの結果よりR93とキノンとの相互作用が示唆された。加えて、E82とR93において電荷をもたない変異体(E82Q, R93N)、側鎖の大きさが異なる変異体(E82D, R93K)の膜画分での酵素活性の比較より、側鎖の電荷が酵素活性に関与していることが示唆された。一方で、ユビキノンと相互作用するアミノ酸をユビキノン類似体やクイックケミストリーを用いて試みている。UQ<sub>2</sub> reductase assayにおいて、ユビキノン類似体を結合させたmGDHで活性の低下を確認し、ウエスタンプロットにおいてストレプトアビシン抗体でのアジュダ化mGDHを検出した。

## E－1 褐藻類に含まれる摂食阻害物質に対する巻貝の戦略

○川端友里恵, 桑村修司, 澤田茉奈, 湯浅恵造, 辻 明彦 (徳島大・工)

**【目的】** 褐藻類に含まれるフロロタンニンは、フロログルシノールのオリゴマーであるが、アミラーゼをはじめグルコシダーゼ等多くの酵素に対して阻害活性を有し、海草類を主食とする動物（ウニや巻貝等）からの食害を防ぐ摂食阻害物質として機能していると考えられている。しかし、腹足綱に属するアメフラシ消化液から精製した $\beta$ -グルコシダーゼ (BGL) は、アラメフロロタンニンにより強く阻害されるものの、消化液で分解すると海藻の中ではアラメからが最もグルコースが遊離することが判明した。即ち、消化液にはフロロタンニンによる阻害を抑制する機能が有ると推定され、本研究ではアメフラシ消化液によるアラメ糖化機構を解明することを目的とする。

**【方法・結果】** アラメと精製 BGL にクロマトグラフィーで分画した消化液蛋白質を反応させ、グルコース遊離を促進する蛋白質をスクリーニングした結果、消化液の硫安分画 (0-35%), phenyl-Sepharose, Sephadryl S-100 により分子質量 25 kDa の蛋白質 EHEP (Eisenia hydrolysis enhancing protein) を精製できた。EHEP は、アラメより抽出したフロロタンニンによる BGL 阻害を抑制した。また、フロロタンニン、タンニン酸、没食子酸、フロログルシノールと特異的に反応し凝集した。クローニングした結果、EHEP はキチン結合タイプ 2 ドメインを分子内に 3 つ含むことが判明したが、EHEP にはキチン結合活性は認められなかった。EHEP 存在下で精製 BGL とアラメを反応させると、消化液と反応した場合と同じ量のグルコースが遊離した。

## E－2 *Cobetia* sp. NAP1 株由来新規アルギン酸リアーゼの特性評価

○藤瀬麻紗子, 八木寿梓<sup>1</sup>, 板橋成美<sup>1</sup>, 鈴木宏和, 大城 隆  
(鳥取大院・工, <sup>1</sup>鳥取大・工)

**【目的】** バイオマス原料の一つとして海藻が注目されている。海藻表面のヌメリ成分の一つで粘質多糖類であるアルギン酸は海藻に多く含まれ、構成糖は $\beta$ -D-マンヌロン酸と $\alpha$ -L-グルロン酸である。アルギン酸はマンヌロン酸のみが連なった polyM、グルロン酸のみが連なった polyG、マンヌロン酸とグルロン酸がランダムに並ぶ polyMG の各ブロックから構成される。アルギン酸を单糖類まで速やかに糖化できればバイオマスとしての利用が期待できるため、アルギン酸分解酵素の基質特異性や分解産物等の評価は重要である。本研究では海藻褐藻類ウミウチワを分離源として得られたアルギン酸資化性菌 *Cobetia* sp. NAP1 株が有するアルギン酸リアーゼの基質特異性等の特性評価を行った。

**【方法・結果】** アルギン酸リアーゼの酵素活性はアルギン酸ナトリウムを基質とし、アルギン酸が分解されたことによって生じる分解産物の炭素一炭素二重結合の増加を、232 nm の吸光度の経時変化から求めた。基質特異性は polyM, polyG, polyMG を調製し、評価した。分解産物は ESI-MS を用いて評価した。

本酵素の活性至適温度は 42°C 付近であり、90°C, 1 時間の処理後も約 30%, 15 分の処理後も 75% の残存活性を有したことから、これまでに報告されているアルギン酸リアーゼよりも高い熱安定性を持つと考えられた。本酵素は polyMG に関して高い活性を示す一方、polyM と polyG には同程度作用し、広い基質特異性を持っていた。また ESI-MS の結果より、单糖まで分解していることが分かった。これらの結果から、本酵素が産業利用において有用な酵素の一つであることが示唆された。

E-3 Polysaccharide lyase family 7 に分類される *Shewanella* sp. YH1 株由来  
 アルギン酸リアーゼの特性評価  
 ○八木寿梓, 藤瀬麻紗子<sup>1</sup>, 板橋成美, 鈴木宏和<sup>1</sup>, 大城 隆<sup>1</sup>  
 (鳥取大・工, <sup>1</sup>鳥取大院・工)

【目的】海藻由来のアルギン酸は、 $\beta$ -D-マンヌロン酸と $\alpha$ -L-グルロン酸の2種のウロングルコサミノ酸から構成される細胞間粘質多糖成分の一つで、polyG, polyM そして polyMG の3つのブロックの組み合わせで形成している。アルギン酸ナトリウムはすでに多くの分野に利用されており、特に最近ではバイオマスとしての利用が期待されている。バイオマスとして利用するためには、単糖類まで糖化する必要がある。本研究では、鳥取県の海水から得られたアルギン酸資化性菌 *Shewanella* sp. YH1 株が有するアルギン酸分解酵素の中で Polysaccharide lyase family 7 に属するアルギン酸リアーゼの特性評価を行った。

【方法・結果】アルギン酸リアーゼの酵素活性は、アルギン酸ナトリウムを基質とし、基質の分解によって生じる分解産物の二重結合の増加を、232 nm の吸光度の経時変化測定から求め、諸性質（至適温度、至適 pH、熱安定性）を調べた。基質特異性に関しては、polyG, polyM, polyMG に対して評価した。これらの性質においては大腸菌の系で発現させて調製した粗酵素溶液でも調べた。

Polysaccharide lyase family 7 に分類されるアルギン酸リアーゼには基質認識に重要なアミノ酸配列として QIH (polyG 特異的), QVH (polyM 特異的) が報告されている。本菌でもそれぞれの配列を有するアルギン酸リアーゼが存在しその基質特異性を比較したが、どちらも polyG に対する特異性が高く、両酵素の大きな違いは至適 pH であった。これらの結果より、基質特異性はその特異配列だけでなくその酵素の構造にも起因することが示唆された。

E-4 放線菌由来 cyclo (Leu-Phe) oxidase の脱水素反応における電子伝達に関する検討  
 ○間野なお美, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々は放線菌 *Streptomyces albulus* KO23 株由来 cyclo (Leu-Phe) (以下 CFL) oxidase が CFL の脱水素反応を触媒し、その際に酸素に電子を渡して過酸化水素を生成する事を明らかにしてきた。一方、本酵素が phenazine methosulfate-dichlorophenol indophenol (PMS-DCIP) 共役系への電子移動も行う事を明らかにした。さらに、CFL 以外の多くの環状ジペプチド類の脱水素反応 (50°C, 24 時間) を触媒し脱水素体を生成することを反応液の HPLC 分析により明らかにしてきたが、いくつかの基質において、PMS-DCIP への電子移動が起こりにくい事も予備的な知見として得ていた。そこで、酸素への電子移動と、PMS-DCIP への電子移動が基質の違いにより変化するかどうかを検討した。【方法・結果】HPLC 定量で脱水素反応の進行が良好であると確認できた環状ジペプチド類のうち、CFL, cyclo (Met-Met), cyclo (His-Phe), cyclo (Phe-Trp), cyclo (Phe-Pro), cyclo (Trp-Trp), cyclo (Trp-Tyr) の 7 基質を用いて酸素への電子移動と、PMS-DCIP への電子移動の 2 種類の検討を行った。その結果、cyclo (Trp-Trp), cyclo (Trp-Tyr) に対して 2 種の検討とともに同程度の CFL に対する相対活性が示された一方で、cyclo (Met-Met), cyclo (His-Phe) に対しては PMS-DCIP への電子移動において、酸素への電子移動よりも明らかに低い相対活性が示された。また、cyclo (dehydroLeu-Phe), cyclo (Leu-dehydroPhe) を基質とする脱水素反応において、Phe 側の脱水素は PMS 添加により促進されるが、Leu 側は促進されないという以前の結果も併せて考えると、活性中心が 2 カ所存在し、基質のアミノ酸側鎖によって PMS-DCIP への電子移動に違いがあることが示唆される。

E – 5      Identification of the Gene Responsible for *shabondama1* mutation in *Arabidopsis thaliana*  
○Amit Kumar Dutta, Nakagawa Tsuyoshi (Int. Cen. Sci. Res., Shimane Univ.)

【目的】 Stomata are found as a minute aperture structures in the plant epidermis that serve as the duct for gas exchange between the plant and the atmosphere. Stomata development has received significant deliberation as a model for cell lineage and cell fate determination. We isolated stomata mutant *shabondama1* (*sha1*), generates undivided guard mother cell with undivided nucleus from screening of EMS mutagenized *Arabidopsis thaliana*. In this study, we tried identification of responsible gene for *shabondama1* mutation.

【方法・結果】 For identification of SHABONDAMA1 gene, we performed bulk sequence analysis of F2 plants by next generation sequencing, and analyzed phenotype of T-DNA tag line. Finally we identified SHABONDAMA1 gene by molecular complementation. We analyzed expression of SHABONDAMA1 by histochemical straining in transgenic *Arabidopsis thaliana* carrying SHABONDAMA1 promoter:GUS construct.

E – 6      Functional analysis of two thiol-metabolic enzymes, glutathione and trypanothione reductases, in the phytoflagellated protozoan, *Euglena gracilis*  
○Hafiz Md Hafizur Rahman, Shun Tamaki, Takanori Maruta, Yoshihiro Sawa, Takahiro Ishikawa (Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

*Euglena gracilis* is a unicellular phytoflagellate, which belongs to the protist phylum Euglenozoa as well as trypanosomatids. As ROS metabolism in eukaryotic algae has not yet been established, we have been studying molecular mechanisms of ROS metabolism in *Euglena*. Regarding thiol-redox compounds, beside glutathione (GSH), *Euglena* contains unusual thiol compound trypanothione (T (SH) 2), usual form of GSH involving two molecules of GSH joined by a spermidine linker, which was found in pathogenic protists such as Trypanosomatida. However, little is known about physiological roles and functional relationship of these thiol-based redox compounds. To clarify physiological significance of GSH and T (SH) 2-mediated metabolisms in *Euglena* cells, we identified the cDNA sequences encoding GSH reductase (GR) and T (SH) 2 reductase (TRYR), and characterized physiological role of them. *Euglena* TRYR contained two peptide sequences identified from native *Euglena* TRYR previously. *Euglena* GR has been shown to localize in the cytosol, TRYR is also predicted in the cytosol. The suppression of GR and TRYR gene expression by gene silencing resulted in significant growth inhibition, but not in simultaneous suppressed cells of both genes, in which total GR activity was nearly disappeared. These results suggested that GSH and T (SH) 2-mediated redox systems were physiologically important in *Euglena* cells, whereas this organism may be capable of growing by GSH and T (SH) 2-independent manner.

## E-7 孔辺細胞におけるアブシジン酸シグナル伝達のカルシウム依存性を決定する分子機構の解明

○宗正晋太郎, Benjamin Brandt<sup>1</sup>, 村田芳行, Julian I. Schroeder<sup>1</sup>  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>UC San Diego)

主として植物の葉の表皮に存在する気孔は、一対の孔辺細胞から形成された小孔であり、ガス交換や蒸散による水分放出の制御を行う重要な場所である。乾燥ストレス下で合成される植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は、気孔閉口を誘導し、蒸散による水分損失を抑制する働きを持つ。孔辺細胞の ABA シグナル伝達において、カルシウムイオンがセカンドメッセンジャーとして機能することが 20 年以上前から明らかとなっている。ABA は、カルシウム依存性タンパク質リン酸化酵素 CPK とカルシウム非依存性タンパク質リン酸化酵素 OST1 を活性化する。CPK と OST1 は、S 型陰イオンチャネルタンパク質 SLAC1 を活性化し、孔辺細胞から陰イオンの放出を誘導する。近年、アフリカツメガエル卵母細胞を用いた *in vitro* 解析によって、PYR/PYL/RCAR による ABA の受容から SLAC1 活性化までの孔辺細胞 ABA シグナル伝達の再構築が達成され、孔辺細胞におけるカルシウム依存性・カルシウム非依存性 ABA シグナル伝達の分子機構の一端が明らかとなってきた。本研究で我々は、電気生理学的手法と生化学的手法を駆使し、この二つのシグナル伝達、すなわちカルシウム依存性・カルシウム非依存性 ABA シグナル伝達経路がクロストークすることを明らかにした。我々の研究成果は、これまで不明であった孔辺細胞 ABA シグナル伝達のカルシウムイオン依存性を決定する分子機構の理解に貢献する。

## E-8 孔辺細胞アブシシン酸信号伝達においてグルタチオンが果たす役割の解明

○長橋大樹, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉<sup>1</sup>, 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。植物ホルモンのアブシジン酸 (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。ABA は受容体によって認識されると、ABA 信号伝達を正に制御するキナーゼである OST1 を活性化する。活性化した OST1 は NADPH オキシダーゼによる活性酸素種 (ROS) の産生や S 型アニオンチャネルの活性化を誘導し、最終的に気孔閉口を導く。グルタチオン (GSH) は、細胞の酸化還元恒常性の維持に寄与するトリペプチドである。近年、シロイスナズナにおいて、GSH 合成に関わる酵素の変異による遺伝的な GSH 量の減少、並びに 1-chloro-2,4- dinitrobenzene (CDNB) 処理による化学的な GSH 量の減少が、ABA 誘導気孔閉口を強めたことから、GSH は孔辺細胞 ABA 信号伝達において負の制御因子として働くことが示された。また、孔辺細胞内の GSH 量は ABA 誘導気孔閉口に伴い減少することも示された。しかし ABA による GSH 量の減少メカニズム、そして GSH 量の減少が ABA 誘導気孔閉口を強めるメカニズムは不明である。本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

**【方法・結果】**材料として、シロイスナズナの ABA 受容体を 4 つ欠損した変異体である *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* 四重変異体、OST1 の変異体である *ost1-3*、そして NADPH オキシダーゼを欠損した *rbohD/F* 二重変異体を用いて ABA による GSH 量の減少を調査した。さらに、CDNB や遺伝的に GSH 量が減少した *cad2-1* 変異体を用いて、GSH 量の減少が ABA 誘導気孔閉口に及ぼす影響を調査した。

E-9 アブシジン酸誘導気孔閉口に伴う孔辺細胞内グルタチオン減少メカニズムの解明  
○横井隆志, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉<sup>1</sup>, 村田芳行  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・植物研)

【目的】植物には、一対の孔辺細胞から成る気孔と呼ばれる小孔が存在する。植物ホルモンであるアブシジン酸 (ABA) は、気孔閉口を誘導する。還元型グルタチオン (GSH) は細胞内に存在するトリペプチドである。GSH は酸化型グルタチオン (GSSG) と共に細胞内の酸化還元電位の維持や、様々な生理的過程の制御を担う。ABA 誘導気孔閉口に伴い孔辺細胞内の GSH 量が減少すること、GSH 量減少は ABA 誘導気孔閉口を強めることが知られている。しかし、その GSH 減少メカニズムの詳細は不明である。孔辺細胞内の GSSG に対する GSH の比 (GSH/GSSG) を測定することは、この GSH 減少メカニズムを解明する手がかりとなる。しかし、GSH 検出試薬である monochlorobimane を用いた既存の方法は、急速に変化する GSH/GSSG の測定が困難である。本研究の目的は、GSH/GSSG に依存して蛍光強度を変化させる蛍光タンパク質を用いた GSH/GSSG のリアルタイム測定系を確立し、ABA 誘導気孔閉口に伴う GSH 減少メカニズムを解明することである。

【方法・結果】本研究では、GSH/GSSG に依存して蛍光強度を変化させる蛍光タンパク質を孔辺細胞に発現するシロイヌナズナを作出した。まず、酸化剤である過酸化水素や還元剤であるジチオスレイトールを用いて、孔辺細胞内の酸化還元電位変化に伴う GSH/GSSG 変化を測定可能かどうか検証した。続けて、ABA 誘導気孔閉口に伴う GSH/GSSG 変化の測定を試みた。

E-10 ヒ酸ストレス下のタバコ培養細胞に対するプロリン処理の影響  
○米澤杏奈, Mst. Nur-E-Nazmun Nahar, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉<sup>1</sup>,  
村田芳行 (岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・植物研)

【目的】植物は、塩やカドミウムなどのさまざまな環境ストレスに応答してプロリンを蓄積する。蓄積したプロリンは、活性酸素種の消去や酵素の保護を介して環境ストレスが誘起する酸化的損傷を軽減し、成長抑制を緩和する。また外からのプロリン処理も同様に、塩やカドミウムストレスに対する耐性を向上させていることが報告されている。

ヒ素は、ヒ酸や亜ヒ酸として土壤に存在し、植物の成長を抑制する。この成長抑制の原因もまた、塩やカドミウムストレスの場合と同様に、活性酸素種による酸化的損傷であることが報告されている。しかし、ヒ素ストレスの緩和にプロリンが寄与するかどうかは不明である。そのため本研究では、好気的土壤に主に存在しているヒ酸に着目し、ヒ酸ストレス下の植物における内生プロリンの役割、及びプロリン処理の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】材料はタバコ培養細胞を用いた。ヒ酸ストレスが誘導する成長抑制に対するプロリン処理の影響を、細胞の新鮮重量・乾燥重量を測定することにより調査した。さらに、細胞内プロリン濃度を決定した。また、成長抑制が細胞死によって引き起こされるかどうかをエバンスブルー染色により評価した。

E-11 孔辺細胞における一酸化窒素レベルと活性酸素種レベルの変化がアブシン酸  
誘導気孔閉口に与える影響  
○仙波貴雅, Rayhanur Jannat, 宗正晋太郎, 中村宜督, 森 泉<sup>1</sup>, 村田芳行  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・植物研)

**【目的】**植物には、一对の孔辺細胞に囲まれた気孔と呼ばれる小孔がある。植物ホルモンであるアブシン酸 (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。その結果、蒸散による水分損失が減少する。この ABA 誘導気孔閉口を導く信号伝達経路において、活性酸素種 (ROS) とその下流の一酸化窒素がセカンドメッセンジャーとして機能することが明らかとなってきている。

過去の研究より、シロイヌナズナにおいて、ROS 消去酵素の一つであるカタラーゼを欠損した変異株 (*cat3-1*, *cat1 cat3*, *cat2-1*) では、野生株と比べて ABA 未処理の場合、恒常的な ROS 蓄積が増加しているにも関わらず、気孔の開度に差は見られないことが明らかとなった。しかし、カタラーゼ欠損変異株において、ABA によって誘導される ROS 蓄積の増加と気孔閉口は、野生株と比べて増強されていた。これらの結果は、恒常的な ROS レベルの上昇ではなく、ABA によって誘導される ROS レベルの上昇が気孔閉口の誘導に必要であることを示す。この ROS レベルの上昇と恒常的な ROS レベルの上昇のシグナルの間にある違いをより明確にするために、その下流の一酸化窒素に着目した。

**【方法・結果】**カタラーゼ欠損変異株における恒常的な ROS レベルの上昇が一酸化窒素蓄積に与える影響を調べ、それらが一酸化窒素ドナーと ABA によって誘導される気孔閉口、並びに一酸化窒素蓄積に与える影響を調べた。これらの実験結果は、ROS と同様に、恒常的な一酸化窒素蓄積ではなく、ABA によって誘導された一酸化窒素蓄積が気孔閉口を誘導することを示唆した。

F – 1 環状染色体を持つ分裂酵母の生育を選択的に阻害する薬剤の探索  
Ahmed G.K. Habib, ○上野 勝（広島大院・先端物質）

【目的】ヒトの染色体は線状であるが、ある種のがんでは高い頻度（異型脂肪腫様腫瘍で 85%）で環状染色体が見つかる（Trombetta ら, *Genes Chromosomes Cancer*. 2009. p993）。また、先天的に環状染色体を持つ遺伝病患者は、精神遅延が見られる上に、その環状染色体を失うとがんのリスクが上がる。しかしながら環状染色体の安定性制御にかかわる因子はほとんど分かっていない。そこで本研究では、分裂酵母をモデルに環状染色体の安定性制御に関する生理活性物質を発見することを目的とした。

【方法・結果】分裂酵母のテロメア保護に必要な蛋白質 Pot1 をコードした遺伝子の破壊株（*pot1* 破壊株）は、染色体が 3 本とも環状化した株だけが生育できる。そこで、この株を用いて、環状染色体を持つ分裂酵母 *pot1* 破壊株の生育を阻害するが、線状染色体を持つ野生株の生育を阻害しない生理活性物質を探査した。その結果、化合物 X と化合物 Y が環状染色体を持つ分裂酵母 *pot1* 破壊株の生育を阻害するが、線状染色体を持つ野生株の生育を阻害しないことを発見した。化合物 X と化合物 Y のヒトにおける標的蛋白質はすでに同定されており、それらの分裂酵母ホモログ geneX と geneY が存在する。もし化合物 X と化合物 Y が分裂酵母 geneX や geneY から作られる蛋白質を阻害するとすると、*pot1 geneX* 二重変異株や、*pot1 geneY* 二重変異株が合成致死となる可能性が考えられる。そこで、この可能性を検証したところ、*pot1 geneX* 二重変異株や *pot1 geneY* 二重変異株は、合成致死となることがわかった。このことから、化合物 X と化合物 Y は、分裂酵母 geneX や geneY から作られる蛋白質を阻害することが示唆された。

F – 2 *pot1 rad9* 二重変異株の合成致死の機構の解明  
○南結香子、田中大樹、Hossain M. Shamim, 湯川格史, 上野 勝  
(広島大院・先端物質)

【目的】ある種のがん細胞では高い頻度で環状染色体が見つかる。このようながん細胞において環状染色体の維持に必要な蛋白質を特異的に阻害することができれば、このようながん細胞を特異的に殺せる可能性がある。このことから環状染色体の維持に関する蛋白質は、抗がん剤の分子標的となり得る。当研究室では、分裂酵母をがん細胞の特徴を持たせたがん細胞ミックモデル生物として用いて、がん細胞のあらたな脆弱性の発見を試みている。これまでに分裂酵母の DNA 修復に関するヘリカーゼ Rqh1 が環状染色体の維持に必要であることを発見している（南部ら, *Mol. Cell. Biol.* 2013. p1175）。本研究では、Rqh1 以外に環状染色体の形成や維持に必要な遺伝子産物の探索を試みた。

【方法・結果】分裂酵母のテロメア維持因子 *pot1* を破壊するとテロメアが分解される。その後染色体内で末端融合が起こった環状染色体を持った株が生き残る。環状染色体の形成および維持に必要な遺伝子は、*pot1* と合成致死になることが予想される。そこで *pot1* と合成致死になる遺伝子を探索した結果、DNA ダメージチェックポイントの活性化に必要な *rad9* が *pot1* と合成致死になることを発見した。一方、DNA ダメージチェックポイントで中心的な機能を持つ *rad3* と *pot1* との二重破壊株が合成致死にならないことから（Wang ら, *Mol. Cell.* 2008. p463）、*rad9 pot1* 二重破壊株が合成致死になる原因は、DNA ダメージチェックポイント機能の欠損によるものではないことが予想される。本研究ではさらに、*rad9 pot1* 二重破壊株が合成致死を抑圧する変異株を二種類取得したので、それらの解析結果についても紹介したい。

#### F – 3

#### 酵母のプラストサイジン耐性機構の解析

Eldaa Zefany Banami Kinsui, 阿部文快<sup>1</sup>, ○北村憲司<sup>2</sup>

(広島大・工, <sup>1</sup>青学大・理工, <sup>2</sup>広島大・自然研セ)

**【目的】** 抗生物質のプラストサイジン S 耐性遺伝子は、外来遺伝子導入細胞の選択マーカーに使われている。分裂酵母 *S. pombe* は耐性遺伝子を持たないためプラストサイジン S に感受性だが、Ubr11 が機能を失うと耐性化する事を見つけている。本研究では酵母での耐性化の分子機構について調べた。

**【方法・結果】** *ubr11* 機能欠損変異株ではジ・トリペプチド輸送体(Ptr2)が発現しない事を報告しているが、*ubr11* 変異株と同様に *ptr2* 欠損株がプラストサイジン S 耐性である事がわかった。野生型の *ptr2<sup>+</sup>* 遺伝子を強制的に発現すると *ubr11* 変異株のプラストサイジン S 感受性が復活し、更に野生型株の感受性は培地にジペプチドを添加すると緩和された。出芽酵母 *S. cerevisiae* の *ptr2* 欠損株も耐性を示す事から、プラストサイジン S は酵母では Ptr2 輸送体を介して細胞に取込まれ、*ptr2* 機能欠損時の耐性化は細胞への本葉剤の取込み不全が原因と考えられる。酵母の Ptr2 輸送体が多様な配列のジ・トリペプチドを取り込む事、ヒトの PepT1, PepT2 はジ・トリペプチドのみならず様々な構造の薬物をも輸送できる事から、ペプチド輸送体の基質認識機構に興味が持たれている。ヌクレオシド系抗生物質のプラストサイジン S の構造にはシトシンとアルギニン類縁体が含まれ、Ptr2 による天然ジペプチドとプラストサイジン S の認識と輸送について共通点・相違点を調べている。更に、*S. cerevisiae* の一部の系統のみが有している、Ptr2 とは異なるファミリーのジ・トリペプチド輸送体についても、プラストサイジン S 感受性への関与を調べている。

#### F – 4

#### 脂質代謝異常が酵母のアミノ酸量に及ぼす影響

○岡野 晃, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

スフィンゴ脂質はスフィンゴイド塩基を骨格に持つ脂質であり、シグナル伝達や蛋白質の選別輸送など細胞にとって重要な役割を果たしていることが知られている。当研究室の以前の解析により、出芽酵母においてスフィンゴ脂質がオートファジーや寿命、ストレス応答などの多くの機能を制御するセリン・スレオニンキナーゼ TOR (Target of Rapamycin) 複合体 1 (TORC1) を正に制御することが示唆された。しかし、その詳細な機構は明らかではない。TORC1 はアミノ酸レベルによって活性が制御されることが知られている。このことからスフィンゴ脂質による TORC1 の制御に、アミノ酸レベルが関与する可能性が考えられる。そこでスフィンゴ脂質生合成に関わる遺伝子の変異株を用いて細胞内アミノ酸量を測定した。まずイノシトールリン酸セラミドの合成に関与する *AURI* の変異株について調べた。その結果、WT では  $462 \pm 47.3$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) であったのに対して、変異株 *aur1-1* では  $304 \pm 40.1$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), *aur1-18* では  $331 \pm 26.3$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) で細胞内アミノ酸量が減少していた。またスフィンゴ脂質生合成の初期ステップに関与する遺伝子 *LCBI* の変異株も同様に細胞内アミノ酸量を測定した。その結果 WT では  $334 \pm 29.1$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) であったのに対して変異株 *lcb1-100* では  $200 \pm 7.7$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) であり、*aur1* 変異株と同様に細胞内アミノ酸が減少していた。これらの結果は、スフィンゴ脂質によるアミノ酸量の調節が TORC1 の活性に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

F-5 清酒酵母のカプロン酸エチル高生産の遺伝的背景に関する研究  
○西村航平<sup>1,2</sup>, 五島徹也<sup>1</sup>, 福田 央<sup>1</sup>, 赤尾 健<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>広島大・先端研)

【目的】近年の清酒醸造では、吟醸香の構成成分の一種であるカプロン酸エチル (EC) を高生産する酵母が好んで使用されている。AK1 株は、きょうかい 7 号株 (K7) を添加した清酒もろみから分離された自然突然変異体であり、EC を適度に高生産する株として知られるが、その遺伝的変異や高生産の機構は明らかでない。本研究では AK1 の EC 高生産の原因変異の特定を目的とし、当研究室で保有する各清酒酵母菌株のゲノム情報を基に、AK1 と K7 間での比較ゲノム解析を行った。

【方法及び結果】EC 高生産菌として AK1 原株と 2 つの派生株 (AK1R, K1501) を用いた。これらの EC 高生産原因変異は共通のはずである。対照には K7 標準株である K7 (H16BY) と、AK1 により近縁である K7 (S60BY) の 2 株を用いた。これら菌株の EC 生産性を清酒小仕込試験によって評価したところ、AK1 系統 3 株は K7 (H16BY) よりもやや高く、K7 (S60BY) は AK1 系統 3 株よりもさらに高かった。

上記の結果から、AK1 系統 3 株に加え K7 (S60BY) も EC 高生産原因変異を有することが推測された。その場合、AK1 系統 3 株と K7 (S60BY) の EC 高生産について、原因変異が同一の場合と別の場合の 2 とおりが考えられた。両者の仮定の下で、原因変異候補として ORF 上の非同義置換の検索を行ったところ、前者の場合で 29 個の遺伝子上の 34箇所、後者の場合で 8 個の遺伝子上の 10 篇所が候補として抽出された。現在、これらの多型を持つ遺伝子について K7 型、AK1 型のアレルをそれぞれ導入したプラスミドで形質転換した酵母を用いて発酵試験を行い、各アレルの EC 生産性への影響について評価を行っている。

F-6 清酒の老香成分ジメチルトリスルフィド (DMTS) を生成しにくい清酒酵母の育種  
○山脇好裕<sup>1,2</sup>, 池田優理子<sup>1</sup>, 神田涼子<sup>1</sup>, 若林 興<sup>3</sup>, 井上豊久<sup>3</sup>, 中江貴司<sup>3</sup>,  
磯谷敦子<sup>1,2</sup>, 松丸克己<sup>1</sup>, 藤井 力<sup>1</sup> (<sup>1</sup>酒総研, <sup>2</sup>広島大院・先端研, <sup>3</sup>日本盛)

【目的】ジメチルトリスルフィド (DMTS) は、清酒を貯蔵する事で生じる劣化臭 (老香) の主要な香気成分である。これまでの研究で DMTS の前駆物質の一つである 1,2-dihydroxy-5-(methylsufinyl)pentan-3-one (DMTS-P1) の生成に酵母の *MDE1*, *MRI1* 遺伝子が関与し、これらの遺伝子を破壊することで清酒の貯蔵中に生成する DMTS を著しく抑制できることが明らかとなっている。しかし、遺伝子組換え体を用いて清酒を製造するためには難しい課題が多く、実用化は難しいのが現状である。そこで、本研究では突然変異により DMTS-P1 低生産酵母を取得する事を目的とした。

【方法・結果】*MDE1* および *MRI1* 遺伝子は、5'-メチルチオアデノシン (MTA) からメチオニン (Met) への変換に関与している。Met 要求性を持つ実験室酵母の *Δmri1* 株は、Met の代わりに MTA を添加した最少培地で生育できないことが報告されている。清酒酵母きょうかい 7 号 (K7) は Met 要求性を持たないため、まず K7 より Met 要求性変異株を得た。この Met 要求性変異株を親株として UV 変異処理を行い、YPD プレートに播種した。これをマスタープレートとして MTA もしくは Met を添加した最少培地にレプリカし、増殖に差が見られるコロニーを候補株として選抜した。これらの候補株を用いてスポット法により増殖差を確認し、DMTS-P1 の生成量を調べた。約 40,000 コロニーからスクリーニングを行った結果、親株よりも DMTS-P1 生成量の少ない株を 2 株取得した。

F – 7 大腸菌での *pdhR* 欠損および NADPH 供給の強化は 1,3-ブタンジオール生産を向上させる

○片岡尚也, Vangnai Alisa S.<sup>1</sup>, 薬師寿治, 加藤純一<sup>2</sup>, 和田 大<sup>3</sup>, 横田 篤<sup>3</sup>, 松下一信 (山口大・農, <sup>1</sup>チュラロンコン大, <sup>2</sup>広島大院・先端研, <sup>3</sup>北大院・農)

【目的】1,3-ブタンジオール (1,3-BD) は、産業用ケミカルの原料や β-ラクタム系抗生物質の重要中間体として広く用いられている炭素数 4 の光学活性ジオールである。我々はこれまでの研究で、1,3-BD 合成代謝経路を設計し、大腸菌内で構築することで、グルコースから 1,3-BD を生産することに成功している。本研究では、大腸菌での 1,3-BD 生産の更なる効率化に向けた代謝変更を検討したので報告する。

【方法・結果】我々の設計した 1,3-BD 合成代謝経路では、1,3-BD は、アセチル CoA を中間代謝物として 3 段階の還元反応（うち 1 反応は NADPH、残りの 2 反応は NAD (P) H を還元力とする）を経ることで生成される。そのため、効率化の戦略として、アセチル CoA 及び還元力供給の強化が有効であると考えられた。*PdhR* は、ピルビン酸脱水素酵素複合体をコードする *pdh* オペロンの負の転写制御因子であり、*pdhR* 欠損変異株は、アセチル CoA 及び NADH 供給が増加した表現型を示すことが明らかにされている。そこで、BW25113 株を親株に、*pdhR* 欠損変異株 ( $\Delta$ *pdhR* 株) を作製し 1,3-BD 生産を評価した。その結果  $\Delta$ *pdhR* 株での 1,3-BD 収量は、親株と比較して 1.24 倍に增加了。しかし、菌体当たりの生産性に変化はなかった。そこで、 $\Delta$ *pdhR* 株で供給が強化されていると考えられる NADH ではないもう一つの還元力である NADPH 供給の強化が 1,3-BD 生産におよぼす影響を評価した。副産物であるギ酸から NADPH を生じるギ酸脱水素酵素 (Fdh) をタンパク質工学的に作製し、1,3-BD 合成代謝経路と共に  $\Delta$ *pdhR* 株で発現させた。その結果、Fdh の共発現により 1,3-BD 収量はさらに 1.2 倍に、菌体当たりの生産性は 1.26 倍に增加了。

F – 8 酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトンキナーゼの精製

○平田花織, 松谷峰之介, 足立収生, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 (山口大・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。NBRC 3255 は 621H にはない独特な DHA 代謝能を持っていることが示唆されるので、NBRC 3255 の DHA 代謝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、休止菌体を用いた DHA 依存の酸素消費活性を測定すると 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。NBRC 3255 のドラフトゲノム解析から、DHAK をコードする遺伝子が 2 つアノテートされているので、それぞれの破壊株、および両方破壊した株を作製した。いずれの破壊株も、DHA の消費は野生株と同等で、DHAK 活性も野生株並みであった。そのため、二重破壊株の可溶性画分から DHAK を精製した。精製酵素の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、グリセロールキナーゼ (NBRC3255\_065I) と一致した。また、この部分精製標品はグリセロールのリン酸化も行うことが出来た。

F - 9

*Gluconobacter oxydans* における細胞内グルコース代謝の活性化

○小池尚史, 松谷峰之介, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信 (山口大・農)

【目的】*Gluconobacter* 属酢酸菌は、多くの膜結合型酸化還元酵素を有し、その酸化代謝産物は産業的に有用なものが多い。しかし、本菌を用いた細胞内代謝に関する知見は少ない。その足掛かりとして細胞内グルコース代謝の理解に取り組んでいる。本菌において、グルコースの約 90%は細胞の外側で機能するグルコースデヒドロゲナーゼ (mGDH) によって酸化され、残りの約 10%のグルコースが細胞内に取り込まれ代謝される。本研究では細胞内グルコース代謝を活性化するために、mGDH をコードする遺伝子を破壊し、その破壊株で生じる代謝変動を酵素活性を測定することで考察することを目的とした。

【方法・結果】本研究では、*Gluconobacter oxydans* IFO 3293 株を使用し、野生型を親株として膜結合型グルコースデヒドロゲナーゼ破壊 ( $\Delta gdhM$ ) 株を作製した。親株と  $\Delta gdhM$  株の比増殖速度は変わらず、 $\Delta gdhM$  株の最終到達 OD は親株に比べて約 5 倍高かった。グルコースをすべて消費するまでの時間は  $\Delta gdhM$  株の方が親株よりも長かった。ただし親株で消費されたグルコースは、ほとんどがグルコン酸までの代謝で停止していると考えられる。細胞内グルコース代謝の最終産物の一つである酢酸生産量を比較すると、親株に比べて  $\Delta gdhM$  株の方が約 7 倍高かった。また、グルコース代謝に関わる NADP<sup>+</sup> 依存型細胞内酵素活性を親株と  $\Delta gdhM$  株との間で比較したところ、NADP<sup>+</sup> 依存型グルコースデヒドロゲナーゼは、 $\Delta gdhM$  株の方が親株より低く、NADP<sup>+</sup> 依存型アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼの比活性は、 $\Delta gdhM$  株の方が親株より高かった。

F - 10

*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 の耐熱性獲得株の変異遺伝子の機能

○小田みすず, 伊藤光平, 松谷峰之介, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信  
(山口大・農)

【目的】酢酸菌 *Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株を 34°C, 34.5°C, 35°C で順次、適応育種を行い、ITO-1, ITO-2, ITO-3 とそれぞれ名付ける耐熱性を獲得した変異株を取得した。これらの株は高温下で親株よりも良好な生育や発酵能を持つことを明らかにした。さらに、比較ゲノム解析を行い、ITO-1, ITO-2, ITO-3 それぞれには 3, 6, 8 ヶ所の変異が起こっていることを明らかにした。本研究では、ITO-1 株の 3 つの変異遺伝子が耐熱性の獲得に関わっていると考え、変異した遺伝子の機能解明を行った。

【方法・結果】ITO-1 の 3 つの変異遺伝子 (*gyrB*, *degP*, *spoT*) のうち GyrB と DegP の過剰発現株を作成した。親株、ITO-1 株と過剰発現株でドットスポットテストにより生育比較を行ったが、耐熱性を示すものはなかった。次に、DegP と SpoT の破壊株 ( $\Delta degP$ ,  $\Delta spoT$ ) を作成し生育比較を行った。高温で  $\Delta degP$  株は親株より生育が悪くなったが、 $\Delta spoT$  株は ITO-1 とほぼ同等の生育を示した。さらに、これらの破壊株での DegP や SpoT の過剰発現株を作成し生育比較を行った。その結果、 $\Delta degP$  株での野生型、変異型 DegP の過剰発現は高温での生育を阻害した。一方、 $\Delta spoT$  株での野生型 SpoT の過剰発現は生育に影響を与えるなかつたが、変異型 SpoT の過剰発現は高温での生育を改善した。

F-11 新たな好熱菌細胞工場を志向した *Geobacillus kaustophilus* HTA426 のプラスミドキュアリングと影響評価  
○水野 樹, 八木寿梓<sup>1</sup>, 大城 隆, 鈴木宏和 (鳥取大院・工, <sup>1</sup>鳥取大・工)

**【目的】** *Geobacillus kaustophilus* HTA426 は、中等度好熱性のグラム陽性桿菌で、1つの大型プラスミド (pHTA426; 48 kb) を有する。これまでに我々は、本プラスミドを利用した新たな好熱菌宿主ベクター系の構築を目指し、pHTA426 をキュアリングした株 MK633 を構築した。本大会では、MK633 株と、その親株 MK244 の生物学的特性を詳細に比較し、MK633 株のモノづくり宿主としての有用性を評価した。

**【方法・結果】** pHTA426 は、II 型制限修飾系遺伝子を含む推定 46 個の ORF をもつ。MK633 株は LB 培地において親株と同じく良好に増殖し (50~70°C), 最大濁度も同様であった。耐塩性や最少培地中の増殖特性についても大差なかった。MK633 株は、pHTA426 の消失に伴い DNA メチル化酵素遺伝子を欠失したが、DNA 自発的変異の増加は見られず、メチル基依存的 DNA 修復系の不機能化はないと考えられた。その一方で、MK633 株は MK244 株よりもプラスミド pUCG18T を安定に維持した。さらに、MK244 株への DNA 導入には DNA 供与体の大腸菌がメチル化酵素遺伝子 *dam* をもっていることが必須だったが、MK633 株は *dam* 欠失大腸菌からの DNA も効率よく受容した。これらの差異は、MK633 株が II 型制限修飾系遺伝子を欠失したことで説明でき、MK633 株の大きな特長と言える。一般に微生物によるプラスミドの複製や維持は、エネルギー負荷が高いことが知られていることから、現在、タンパク質生産性についても解析している。

## G-1

### *Acidithiobacillus ferrooxidans* の新規チトクローム c の機能解析

○高田弓梨乃, 大西裕有<sup>1</sup>, 金尾忠芳, 上村一雄  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>岡山大・農)

【目的】*Acidithiobacillus ferrooxidans* は、2価鉄と還元型無機硫黄化合物を酸化してエネルギーを獲得する化学合成独立栄養細菌である。鉄や硫黄代謝の酸化還元に重要な因子の一つにチトクローム c がある。本菌のゲノム中には 11 個のチトクローム c をコードする遺伝子が存在するが、その中の 3 個の機能は不明である。細胞レベルの解析で、本菌はチオ硫酸の代謝にチトクローム c を電子受容体に使用すると推測されたため、硫黄生育細胞でその転写が活性化される *Lferr\_1630* にコードされている分子量約 15 kDa のチトクローム c の機能解析を試みた。【方法・結果】*Lferr\_1630* のシグナル配列をコードする部分を削除した遺伝子領域を PCR 増幅し、PelB リーダー配列によってペリプラズムに目的遺伝子産物を発現させる pET22b(+) に導入して、pET-Lferr1630 を構築した。このプラスミドを、ヘム合成に必要な遺伝子 (pEC86 プラスミド) を保持した *E. coli* BL21 (DE3) に導入した。プラスミド導入株では、約 15 kDa のタンパク質が新たに検出された。タンパク質を CM セルロースカラムクロマトグラフィー、Sephadex-G100 によるゲルろ過クロマトグラフィーによって部分精製したものを解析に用いた。*Lferr\_1630* タンパク質のスペクトル解析は、チトクローム c に特徴的な 551 nm に  $\alpha$ -ピークの吸収極大を示した。チオ硫酸をテトラチオニ酸に変換するチオ硫酸デヒドロゲナーゼ (Tsd) がこのシトクロームを電子受容体に用いるかどうかを検討した結果、Tsd とチオ硫酸存在下で酸化型 *Lferr\_1630* タンパク質が還元されたため、Tsd の電子受容体として *Lferr\_1630* タンパク質が機能していることが示唆された。

## G-2

### 好酸性従属栄養細菌 *Acidiphilium cryptum* の形質転換

○中谷安希, 上村一雄, 金尾忠芳 (岡山大院・環境生命)

【目的】*Acidithiobacillus ferrooxidans* に代表される好酸性独立栄養細菌は生育が遅く、増殖能が低いため、それらの菌体が生産するタンパク質を研究利用する際、十分量の目的タンパク質を獲得するために組換え発現は必須の手法である。しかし *A. ferrooxidans* の様な好酸性菌のタンパク質には、酸性条件下に曝されることで成熟し、活性を持つ酵素として機能するものがあり、大腸菌など中性で生育する従来の宿主を利用した組換え発現では機能性酵素を獲得することに限界があった。そこで本研究では、酸性条件下良好な増殖を示す好酸性従属栄養細菌 *Acidiphilium cryptum* を宿主とした外来遺伝子の導入方法を検討した。【方法・結果】以前の研究により、*A. cryptum* は外来遺伝子を自身の制限-修飾系により分解することが示唆されたため、標準菌株 *A. cryptum* JF-5 の全ゲノムデータを利用し、DNA 修飾遺伝子と推定される *Acry\_1449* (DNA methylase N-4/N-6 domain-containing protein) を、pGLO ベクターの *gfp* 遺伝子と入れ替え、大腸菌内で組換え発現させた。*Acry\_1449* タンパク質が可溶性タンパク質として発現していることを確認した上で、この組換え大腸菌に広宿主域プラスミド pBBR122 を導入した。導入された pBBR122 は *Acry\_1449* タンパク質の作用で修飾保護されていることを期待し、この組換え大腸菌より抽出した pBBR122 を用いて *A. cryptum* 菌体細胞に対し、エレクトロポレーション法によって導入した。この結果、*A. cryptum* のカナマイシン耐性コロニーを獲得した。これらからプラスミドを抽出し、PCR や制限酵素処理により、これが pBBR122 であることを確認した。

### G-3

#### 乳酸菌菌体外多糖の生産性、構成糖および抗酸化活性に関する研究

○西川大貴<sup>1</sup>, 荒川健佑<sup>1</sup>, 松永佳奈子<sup>2</sup>, 烏力吉徳力根<sup>2</sup>, 宮本 拓<sup>1,2,3</sup>,  
森田英利<sup>1</sup> (<sup>1</sup>岡山大院・環境生命, <sup>2</sup>(株)機食研, <sup>3</sup>作陽大・食文化)

【目的】乳酸菌の產生する菌体外多糖（EPS）は粘性、被膜性、離水防止性などの産業利用上重要な物性を有しているだけでなく、免疫賦活作用、抗腫瘍作用、抗酸化作用などの保健機能を有していることが知られる。そこで本研究では、乳酸菌 EPS の産業利用を目指し、当研究室保有の 4 菌株について、EPS 最適產生条件の検討、EPS 構成糖の分析および抗酸化能の評価を行うこととした。

【方法・結果】EPS 產生乳酸菌として *Lactobacillus helveticus* 4024M2, *Lactobacillus plantarum* 301102S, *Streptococcus thermophilus* 2330M2 および *Pediococcus pentosaceus* FFC3 の 4 菌株を用いた。4024M2 株では還元脱脂乳が EPS 產生最適培地であったが、その他の 3 菌株では MRS 培地が最適培地であった。また、いずれの菌株においても至適生育温度よりも低い温度で 24 h 培養した際に最も高い EPS 產生が認められた。次いで、最適培養条件における產生 EPS をフェノール硫酸法にて定量したところ、301102S 株が他の 3 菌株の 10 倍程度の產生量 (1,050 mg/L) を示した。各菌株 EPS の構成糖分析は、濃塩酸にて加水分解した後に HPLC を用いて行った。その結果、4024M2 株の EPS はグルコースとガラクトース (3:1) で構成されるヘテロ多糖であり、他の 3 菌株の EPS はグルコースのみで構成されるホモ多糖であることが明らかとなった。さらに、各菌株の EPS の抗酸化能を HORAC 法にて評価したところ、いずれにおいても濃度依存的に高い抗酸化能が検出され、その活性は既知の抗酸化物質よりも高い値を示した。以上の結果から、供試 4 菌株の EPS 產生能、構成糖および機能の一端が解明され、その有用性が示唆された。

### G-4

#### ザイモモナス菌への金属イオン添加による耐熱化の検討

○櫻田朋子<sup>1</sup>, 高坂智之<sup>2</sup>, 山田 守<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>山口大院・医, <sup>2</sup>山口大・農)

【目的】化石燃料の代替エネルギーとしてバイオエタノールの大幅な需要拡大が見込まれる中、耐熱性微生物を用いる高温発酵は冷却コストの削減などが可能であると期待されている。エタノール生産性細菌である *Zymomonas mobilis* TISTR 548 株は、高温側生育限界温度が 39°C で、高温条件下でのエタノール生産が可能である。我々は、これまで TISTR 548 株の耐熱性機構の解析を進め、生育限界温度に必要な耐熱性遺伝子を同定してきた。本研究では、金属イオン添加による耐熱性遺伝子破壊株への影響や耐熱化効果を検討した。

【方法・結果】*Z. mobilis* TISTR 548 株で特定されている 26 個の耐熱性遺伝子のうち 10 個の遺伝子が膜関連タンパク質をコードし、これらの耐熱性遺伝子破壊株にマグネシウムを添加したところ高温での生育が改善された。この結果、マグネシウムが膜の安定化に寄与することが示唆された。そこで、金属イオンが野生株の耐熱化に効果があるか否かを検討するため、塩化マグネシウムと塩化カリウムを添加し、それぞれ高温条件下での生育を検討した。その結果、10 mM 塩化マグネシウムまたは 20 mM 塩化カリウムの添加によって野生株の通常の生育限界温度を超える 39.5°C で生育することが示された。また、両方の金属イオンの添加によってさらに生育の向上が見られた。これらのことから、金属イオンは耐熱性の強化に利用できることが示唆された。

## G-5

### プロピオン酸酸化細菌のべん毛による細胞運動性の評価 ○合田 瞳, 井上真菜美, 高坂智之<sup>1</sup>, 山田 守<sup>1,2</sup> (山口大院・農, <sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・医)

**【目的】** 高温性プロピオン酸酸化細菌である *Pelotomaculum thermopropionicum* SI (SI 株) は、電子顕微鏡によりべん毛の存在が確認されており、さらに、このべん毛キップタンパク質が水素資化性メタン生成菌との共生関係を強化していると示唆されているが、べん毛自体が実際どのように機能しているかは明らかではない。本研究では、SI 株のべん毛が細胞運動に関与しているか、そしてどのように駆動しているかについて解析を試みた。

**【方法・結果】** まず、軟寒天培地を用いて細胞運動による細胞の広がりを観察したところ、SI 株は広がりが観察されたが、べん毛を持たない中温性プロピオン酸酸化細菌ではその広がりが観察されなかつた。次に、べん毛駆動に関わる共役イオン選択性を決定することが報告されているべん毛固定子 MotB の最初の膜貫通領域のアミノ酸配列を解析したところ、SI 株におけるべん毛駆動はプロトンによるものであると予測された。このことを確かめるために、軟寒天培地中に脱共役剤である carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) を添加してその影響を調べたところ、CCCP 存在下では細胞の広がりの速度は抑えられていた。このことから、SI 株が遊泳をしていることとプロトン駆動力によりべん毛を動かしているという予測は裏付けられた。さらに、CCCP 添加により、SI 株の膜電位がどのように変化するかを明らかにするため、膜電位感受性の蛍光色素である DiOC<sub>2</sub>(3) を用いた実験を行ったが、結果が安定せず、膜電位の変化を確認することはできなかった。

## G-6

### 大腸菌が耐熱性向上のために獲得した変異の解析 ○加藤薰平<sup>1</sup>, 石井あやな<sup>1</sup>, 村田正之<sup>1</sup>, 高坂智之<sup>2</sup>, 山田 守<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>山口大院・医, <sup>2</sup>山口大・農)

#### [目的]

生物は環境中で様々なストレスを受け、それを乗り越えるために遺伝子の変異を獲得し適応してきた。このストレスに適応するなかで獲得した変異はストレス応答や代謝経路などを変化させている可能性がある。これまで高温適応の研究はいくつか実施されているが、獲得された変異がどのようなメカニズムによって高温での生育向上に寄与するかは、ほとんど明らかになっていない。本研究では、高温側の生育限界温度での生存機構を理解するために、生育限界温度での適応育種により耐熱化した変異株の遺伝的変異を解析し、耐熱化に必要な分子機構を推測した。

#### [方法, 結果]

大腸菌 W3110 株を高温で継代培養し、Im2B と Im4B という 2 株の高温適応株を単離した。これらの株は親株と異なる表現型を示したことから。次世代シーケンサーによる解析を行ったところ緊縮応答に関連した遺伝子などに変異が見られた。そこで、どの遺伝子の変異が耐熱化の獲得に関与しているか調べるために、耐熱化変異株の 1 遺伝子の変異だけを大腸菌 BW25113 株に戻した変異株を作製し、生育限界温度付近での培養を行った。その結果、RNA ポリメラーゼの変異株において耐熱性の向上がみられた。現在のところ、RNA ポリメラーゼの変異により、無駄なエネルギー消費を抑えることで、高温条件下で有利に生育できていると推測している。

## G-7

### 長期定常期における大腸菌の増殖の可視化

○増田知美<sup>1</sup>, 長光博史<sup>2</sup>, 村田正之<sup>1</sup>, 高坂智之<sup>3</sup>, 山田 守<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>山口大院・医, <sup>2</sup>中村短大・食物栄養, <sup>3</sup>山口大・農)

【目的】大腸菌は、死滅期後に長期定常期に移行し、数年間生き延びることができる。この長期定常期の形成機構は不明であるが、Colony forming units (CFU) が計測できることから生菌が維持されている。少なくとも長期定常期初期において CFU の増減が観察されることから、長期定常期では継続的な細胞集団の入れ替わりが推測され、また、生育優位性を示す変異株が分離されることから、この細胞集団の変遷は培地環境に適応できる変異を獲得した細胞が既存の細胞集団と逐次入れ替わるものと考えられている。これまで、我々はシグマ E 依存性の溶菌機構が存在することを示し、さらに、この溶菌機構が長期定常期に不可欠であることを示してきた。このことから、シグマ E 依存性の溶菌機構によって新たな生育優位性細胞の増殖のための栄養源が供給されている可能性が考えられる。しかし、長期定常期における細胞集団の変遷の全体像はまったく分かっていない。本研究では、対数増殖期に溶存酸素が消費される点に着目し、継続的な溶存酸素の測定によって、長期定常期における細胞増殖の可視化を試みた。

【方法・結果】大腸菌 W3110 株を LB 培地で 36 度, 100 rpm の条件で培養し、培地中の溶存酸素濃度を測定した。DO 電極を使用した場合は、1.5 L の培地で 30 分毎に溶存酸素濃度を測定した。非破壊酸素濃度計 Fibox3 を用いた場合は、150 mL の培地で 10 分毎に溶存酸素濃度を測定した。その結果、長期定常期においても溶存酸素の消費が複数回確認された。また、溶存酸素濃度の減少に伴って CFU が増加することが確認された。したがって、長期定常期における CFU の変動を溶存酸素の測定で追えることが示唆され、この方法により長期定常期の細胞集団の変遷を俯瞰的に観察できると期待される。

## G-8

### 水素資化性のメタン菌である *Methanothermobacter* sp. CaT2 における高塩濃度下におけるギ酸資化能への影響の解析

○田中友彬, 高坂智之<sup>1</sup>, 山田 守<sup>2</sup>

(山口大院・農, <sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・医)

【目的】 *Methanothermobacter* sp. CaT2 は、嫌気的メタン発酵槽から得られた凝集能およびギ酸資化能を有する高温性水素資化性メタン生成菌であり、発酵槽内に蓄積しやすいプロピオン酸のプロピオン酸酸化細菌による分解を促進する。嫌気的な発酵においては、有機物の分解より発生するアンモニアが蓄積しやすく、その結果メタン生成を阻害することが知られている。また、発酵槽内の陽イオン ( $K^+$ ,  $Na^+$ ) 濃度が高い場合では同様にメタン生成が阻害されることも知られている。本研究では、メタン生成を阻害するアンモニアや陽イオンが CaT2 の生育やメタン生成に及ぼす影響を解析した。

【方法・結果】 CaT2 における生育の知見を得るために、静置条件下でギ酸ナトリウムもしくは水素を基質に培養したところ、ギ酸の方が早く生育した。また、ギ酸ナトリウムの濃度を変化させ培養したところ、300 mM からメタン生成量の低下が観察された。この低下には培地中の pH の影響が考えられたことから、pH による影響を観察したところ、pH が 9 を超えるとメタン生成がほぼ見られないことが分かった。次に、培地に  $NH_4Cl$ ,  $NaCl$ , もしくは  $KCl$  を加え水素やギ酸を基質として CaT2 を培養し、これらが与える影響を観察した。イオンの添加が高濃度である程生育を阻害し、ギ酸の場合では水素よりも影響が大きく見られた。 $NH_4Cl$  は 100 mM 以上において立ち上がりが大きく阻害し、 $NaCl$  は濃度が上昇するにつれ徐々に生育速度を抑制し、 $KCl$  は 50 mM において  $NaCl$  よりも強く生育速度を抑制した。これらの結果から、 $NH_4^+$  および  $K^+$  の濃度は CaT2 のギ酸資化に大きく影響することが示唆された。

G-9 遺伝子導入した耐熱性ザイモモナス菌のアラニン生産性の改善  
○鬼石智子<sup>1</sup>, 村田正之<sup>1</sup>, 高坂智之<sup>2</sup>, 山田 守<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>山口大院・医, <sup>2</sup>山口大・農)

【目的】高温発酵による有用物質生産には冷却コストの低減をはじめとする多くのメリットが見込まれるため、高温発酵により如何なる問題が生じるのかを理解することは重要である。そこで、我々は耐熱性 *Zymomonas mobilis* の優れたエタノール生産能力を利用して高温での有用物質生産系の構築を進めている。耐熱性 *Z. mobilis* に *B. subtilis* 由来のアラニン脱水素酵素をコードしている *alaD* 遺伝子を導入し、高温発酵によるアラニン生産を行ったところ、40°Cでも30°Cと同程度のアラニンが生産されたが、アラニン生産量が理論収率の約1.4%と非常に少なく、エタノールがホスト株と同程度生産されていた。そこで、本研究では、導入酵素の酵素化学的解析を行うとともにアラニン生産性の改善を試みた。

【方法・結果】導入酵素の基質であるピルビン酸に対する  $K_M$  値は、エタノール合成経路に関するピルビン酸デカルボキシラーゼ (PDC) と同程度であり、基質親和性には問題ないと推察した。しかしながら、エタノール生産性が高いことから、エタノール生産経路を抑制するために PDC の補因子であるチアミンの要求株を作製し、アラニンの生産性を検討した。その結果、アラニン生産量は理論収率の約27%まで改善した。さらに、アラニン生合成に必要な  $\text{NH}_4^+$ について、培地中の  $\text{NH}_4^+$  源の濃度を変えてアラニン生産性の検討を行った。その結果、 $\text{NH}_4^+$  濃度が高くなるにつれて菌体の生育は悪化したが、アラニン生産量は増加した。

G-10 巨大菌のポリ-γ-グルタミン酸生産に及ぼす重希土類（主にディスプロシウム）の影響  
○松村歩梨, 白米優一<sup>1</sup>, 柴田由香, 芦内 誠<sup>1</sup>  
(高知大・農, <sup>1</sup>高知大院・総人自)

【目的】昨今、先端産業のビタミンとも称されるレアメタルとバイオメタルとの接点を探り、新産業技術への創出に繋げる試みが始まっている。依然としてその関係性には未解明な部分が多いものの、レアメタルと生物の関わりが少しずつ明らかになってきた。例えば、バナジウムはヒトの糖尿病予防に効果があるとの報告や、ビタミン B<sub>12</sub>はその活性中心にコバルトを含有しているという事実、植物から鉄イオンを奪う緑膿菌がガリウムを認識することを利用した微生物病害を予防する新技術の確立等、これまで非生物的で毒性を示す重金属類が主体と考えられていたレアメタルに対し、より深い理解が求められるようになってきた。

【方法・結果】今回、堆肥中に存在する巨大菌を対象に、ディスプロシウム (Dy) をはじめとする重希土類の存在下でポリ-γ-グルタミン酸 (PGA) 生産性を調査した。具体的には、30°C, 120 rpm, 5日間の培養後、その培養液を遠心分離し回収した上清を精製、サフラニン法により精製液に含まれる PGA 量を測定した。結、Dy 存在下で顕著な PGA 増産を確認することができた。一方、レアメタルの代表格であるインジウム (In) を添加した培養培地では巨大菌そのものの生育が阻害されるとともに、PGA の生産もほとんど認められなくなった。

G-11 好塩古細菌由来ポリ- $\gamma$ -L-グルタミン酸のレアメタル吸着性  
白米優一, ○柴田由香<sup>1</sup>, 松村歩梨<sup>1</sup>, 芦内 誠  
(高知大院・総人自, <sup>1</sup>高知大・農)

【目的】近年、幅広い産業分野において利用されているレアメタルの回収・再利用が注目されている。レアメタルは、「先端産業のビタミン」と言われていることからも我が国においても安定的な供給経路の構築が極めて重要な課題となっている。そこで、バイオポリマーであるポリ- $\gamma$ -グルタミン酸 (PGA) を用いたレアメタル回収の可能性について検討した。

【方法・結果】金属は  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{In}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  を用いた。金属水溶液の濃度は 0.042 mM から 2.1 mM とした。各金属水溶液 1 mL に対し、PGA, ポリアクリル酸 (PAC), ポリビニルアルコール (PVA) の各ポリマーを添加した後、遠心分離後の上清に残る金属イオン量を測定することで PGA への吸着量を算出した。この際、金属イオンと有色のキレートを形成する 4-(2-Pyridylazo) resorcinol 及び 3,3'-Bis [*N,N*-bis (carboxymethyl) aminomethyl]-*o*-cresolphthalein による比色定量法を採用した。現在レアメタル回収材として有望視されている PAC だが、二価のレアメタルイオンに対する吸着性は乏しかった。PGA でも二価のレアメタルイオンに対する吸着は認められなかったが、三価のレアメタルイオンに対しては PAC よりもはるかに優れた吸着能を有していた。なお、PVA はいずれのレアメタルイオンにも吸着性を示さないことも判明した。PGA の機能改良を進めることでさらに高性能なレアメタル吸着回収材料の開発につながるものと期待される。

## 謝　　辞

日本農芸化学会中四国支部創立 15 周年記念第 44 回講演会、第 27 回市民フォーラムの開催にあたり、下記の企業からご支援を賜りました。

ここに厚くお礼申し上げます。

2016 年 1 月

日本農芸化学会中四国支部第 44 回講演会・  
第 27 回市民フォーラム実行委員会

ト部産業(株)

(株)大熊

片山化学工業(株)

(株)旭製作所

高塚ライフサイエンス(株)

林兼産業(株)

宮下酒造(株)



**最新のバイオテクノロジーをサポートします  
KATAYAMACHEMICAL**

輝く命を守りたい  
健やかな命を育みたい

いつまでも健康でいたい、健やかな人生を過ごしたい…

それは世界共通の願いです

私たち片山化学は創業以来80有余年、一貫して試薬で多分野に参画

いま最も重要視される予防医学、環境分析、バイオテクノロジーに必要な

試薬・消耗品及び機器等の提供を通じて生活環境に貢献し、健康という人類共通の

願いにお役に立ちたいと、信頼性の高い製品の研究・開発に全力を傾けています

岡山営業所 〒703-8236 岡山市中区国富1丁目11番3号 TEL. (086)271-6511 FAX. (086)271-9176

URL : <http://www.katayamakagaku.co.jp>

**片山化学工業株式会社**

SPEEDY &  
RELIABLE



人と人とのふれあいを大切に  
より良い明日をめざして  
医療と研究を総合的にご支援いたします。

昭和23年の創業以来、  
長年にわたって積み上げてきた「知識・技術・信頼」を生かして、  
お客様満足の向上を追及し、  
高品質なサービスの提供を常に心がけてまいります。  
特に専門的な研究開発・臨床検査の分野において、  
研究用試薬・体外診断用医薬品・分析機器・器材を  
「安全・正確・迅速」に最新情報と共に届けします。



高塚ライフサイエンス株式会社 [岡山本社] 〒700-8577 岡山市北区今1丁目3番9号 TEL:086-241-5221 FAX:086-241-3600  
<http://www.takatsuka.co.jp/>



すべての研究者をトータルサポート

## 株式会社 大熊

ライフサイエンス機器・試薬・設備・消耗品 販売のスペシャリストとして  
すべての研究者をトータルサポートさせていただき、弊社も共に発展していきたいと考えております。



本 社 〒701-0204 岡山市南区大福 378 番地 1  
TEL 086-209-0102 FAX 086-209-0103  
倉敷支店 〒712-8044 倉敷市東塚 6 丁目 4 番 51 号  
TEL 086-455-8895 FAX 086-456-2057  
津山営業所 〒708-0871 津山市中島 233-7 A 号  
TEL 0868-26-8701 FAX 0868-26-8702  
福山営業所 〒721-0963 福山市南手城町 4-7-6 1-1  
TEL 084-973-9540 FAX 084-973-9541  
姫路営業所 〒670-0949 姫路市三左衛門堀東の町 80  
TEL 079-280-3515 FAX 079-280-3516

## 贊助企業

- ・(株)旭製作所
- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
- ・アルファー食品(株)
- ・アルファアバイオ(株)
- ・(株)井ヶタ竹内
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・岡山県酒造組合
- ・社団法人岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・機能性食品開発研究所
- ・杏林予防医学研究所
- ・協和発酵バイオ(株)  
　　山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・(株)近畿日本ツーリスト中国四国岡山支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・(株)サンキ精機
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)醉心山根本店
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・(株)大愛
- ・大興産業(株)
- ・大山乳業農業協同組合
- ・大山ハム(株)
- ・大洋香料(株)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・帝國製薬(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製薬(株)
- ・マルトモ(株)
- ・(株)宮田薬品
- ・ヤスハラケミカル(株)
- ・ヤマキ(株)
- ・(株)やまだ屋
- ・(有)藍布屋 (五十音順)

2015年12月28日現在 57社