

支部功勞賞受賞者紹介

支部奨励賞受賞講演

支部技術賞受賞講演

---

講演要旨



## 第 6 回（2016 年）日本農芸化学会中四国支部功労賞 受賞者紹介

### 稲垣 賢二 岡山大学大学院環境生命科学研究科教授

2001 年 4 月に創立された中四国支部の初代庶務幹事。今日の支部活動，運営の基礎を築く。  
2001 年－2012 年中四国支部幹事。副支部長を経て 2013 年 4 月第 7 代目の支部長に就任。2015 年 3 月岡山で開催された日本農芸化学会全国大会では大会実行委員長として成功に導いた。  
生物化学，応用微生物学が専門領域。実用化の見込まれる医用酵素研究で大きな成果。

### 江坂 宗春 広島大学大学院生物圏科学研究科教授

2003 年－2014 年，中四国支部幹事。2004 年 3 月の日本農芸化学会広島大会では総務担当，成功に導いた。2005 年より日本農芸化学会 JABEE 対応委員会委員長として学会要務も担う。  
人間にとっても大切なビタミン C について植物を対象に世界に先駆けた研究を展開。

### 尾添 嘉久 島根大学生物資源科学部教授

2006 年 5 月に開催された日本農芸化学会中四国支部第 15 回講演会の世話人。2007 年，2008 年の中四国支部幹事（県代表）を務める。有機化学の知識をベースに生物の仕組みを明らかにする研究（化学生物学という場合もある），昆虫などのイオンチャンネルの研究で有名。

### 沢村 正義 高知大学農学部名誉教授

#### 高知大学土佐フードビジネスクリエーター人材創出拠点事業特任教授

2005 年－2008 年，中四国支部幹事。2014 年より日本農芸化学会フェロー。本支部を支える地域の農芸化学人材の育成にも尽力。食品分析学，フレーバー研究の第一人者。

### 寺尾 純二 徳島大学医学部名誉教授，甲南女子大学看護リハビリテーション学部教授

2004 年 9 月，徳島県で開催された日本農芸化学会中四国支部大会の実行委員長。2007 年，2008 年の中四国支部幹事。2014 年より日本農芸化学会フェロー。ポリフェノールの世界的権威。

### 森 信寛 鳥取大学農学部名誉教授

2005 年－2010 年，中四国支部幹事。2007 年，2008 年には支部事務局庶務幹事を担当。2015 年より日本農芸化学会フェロー。農芸化学（微生物・酵素）の教育・研究・社会貢献に尽力。微生物アセチルコリンエステラーゼの基礎応用研究（残留農薬の簡易簡易検出等）の先駆者。

文責 芦内 誠（高知大・農）

（50 音順，敬称略）

## 蛋白質の構造安定性に対する理解とアレルギーリスクとの関係

臼井将勝（水大校・食品科学）

食物アレルギーにおけるリスクマネジメントにおいて、アレルゲンに対する理解を深めることは非常に重要である。我々は水産物において代表的なアレルゲンであり、特定原材料にも指定されているエビアレルゲンについて研究を行ってきた。その過程で、アレルゲンを本来の姿である「タンパク質」として見つめ直すことで、エビアレルギー対策の軸となる知見を得ることができたので本講演で紹介させて頂きたい。

### 1. エビアレルゲンに対するタンパク質科学的理解

エビの主要アレルゲンであるトロポミオシンは加熱後のエビ筋肉や煮汁から分離同定されるために漠然と熱安定アレルゲンとされていた。我々は、①一般的にトロポミオシンは  $\alpha$ -ヘリックスのみの単一構造であること、② $\alpha$ -ヘリックスは加熱により容易に崩壊すること、③（一般的に）タンパク質構造の崩壊に伴い抗原構造もまた崩壊すること、と「エビトロポミオシンが熱安定アレルゲンである」という事実との間に矛盾を感じたため、その熱安定化機構について検討した。

始めにエビトロポミオシンの耐熱性について円二色性（CD）による解析を行ったところ、エビトロポミオシンの二次構造は加熱によって容易に崩壊することが明らかとなった。次に加熱時の凝集体形成について検討した結果、不溶性の凝集体を生じないことが明らかになり、この非凝集性が熱安定アレルゲンとなる一因と予想された。さらに、加熱で崩壊したエビトロポミオシンの構造が冷却時に元通りに巻き戻るという仮説を立て、これについて検証した結果、加熱処理後のエビトロポミオシンでも 25°C に冷却すると天然型エビトロポミオシンと同様の CD スペクトルが得られ、46°C、80°C でも両者の CD スペクトルは重なった。この結果から、エビトロポミオシンは高い構造可逆性を有することを証明できた。以上の結果より、エビトロポミオシンの熱安定性は、非凝集性に加えて立体構造（抗原構造）の可逆性によって成立していることが明らかになった。

### 2. エビアレルゲンに対する食品科学的理解

エビトロポミオシンは構造可逆性により熱安定アレルゲンとなるという予防対策の軸となる知見を得たが、食物は多種多様な物質の複合体であり、単一タンパク質に対する理解のみでは食物レベルでのアレルギーリスクの全容を解明したとは言い難い。実際に、エビアレルギー患者の中には「生エビでは発症するが加熱すれば大丈夫」などの経験的理解も散見される。

そこで我々はエビトロポミオシンの濃度をアレルギーリスクの指標として、調理方法や鮮度の異なるエビについて、リスク評価を行った。その結果、生エビと加熱調理したエビ筋肉の全てにおいて非常に高濃度のトロポミオシンが検出され、加熱調理の有無において有意な差は見られなかった。さらに、鮮度の異なるエビについても、高い鮮度がアレルギーリスクを軽減できる事実は見出されなかった。以上の結果からトロポミオシンは食物レベルでも熱の影響を受けにくいアレルゲンであることが明らかとなった。

ひとつのタンパク質について詳しく研究することは、一見すると複合タンパク質系である食品において、机上の空論的作業で実学的でないように思われがちであるが、単一タンパク質の分子レベルでの研究も食品業界全体に貢献できること、より理想的なアレルギーリスクマネジメントには分子レベルと食物レベルでの理解の両立が重要であることをご理解頂ければ幸いである。

## 分散進化に基づく有用酵素の探索と創出

鈴木宏和（鳥取大院・工）

ある機能をもった遺伝子の変異によって多様化し、機能を変化させていくことを分散進化という。講演者らは、病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* の病原性株 BM939 と非病原性株 Af293 が産生する毒素プロファイルに相違点があることを見出し、その原因が毒素生合成遺伝子中にある唯一の点変異にあることを明らかにした。その点変異は、遺伝子発現産物の活性を減少させるものであったが、本事実“遺伝子のわずかな変異が新奇酵素を発生させる可能性”を示しており、これを契機に講演者は分散進化に基づく有用酵素の探索と創出について研究を行っている。本講演では、それに関連する研究成果を発表する。

### 【モチーフ配列の分散進化に着目した新奇酵素探索】

糖加水分解酵素ファミリー1 (GH1) の基質には様々なものが知られているが、これまでの研究で機能が同定された GH1 の基質特異性は、あるモチーフ配列により規定されることを見出した。そこで本モチーフ配列が奇異な GH1 遺伝子をゲノム情報から探索し、その発現産物を酵素学的に調べたところ、GH1 としては前例のなかったアラビノオリゴ糖加水分解酵素を発見した。本成果は、触媒重要モチーフに注目した分散進化遺伝子の探索が、新奇酵素の発掘に効率的であることを示している。

### 【高変異性好熱菌を利用した耐熱化指向性の分散進化】

酵素は優れた触媒であるが、常温菌酵素は容易に熱変性してしまうため、産業的には利用しにくい。このことから触媒を常温で利用したい分野では、しばしば“常温高活性の非耐熱性酵素から常温高活性の耐熱化変異酵素を創る”ことが求められる。*Geobacillus kaustophilus* HTA426 株はマリアナ海溝深海底泥から単離された好熱性細菌で、同属としては最初に全ゲノム配列が公開された。本菌は増殖特性に優れ、生育温度範囲が広く、遺伝子操作技術も確立されている。また大腸菌や枯草菌よりも自発的変異能が高いことから、HTA426 細胞内における耐熱化指向性の酵素遺伝子分散進化を検討した。本手法では、まず対象遺伝子を HTA426 株に導入し、その細胞内の自発的変異を利用しながら変異遺伝子を発生させる。それと同時に、対象遺伝子発現産物（酵素）の活性に依存した生育選択圧をかけることで、高温培養下でも活性を示す（すなわち耐熱化された）酵素を選別する。変異導入効率を向上させるために、DNA 修復系遺伝子を破壊した HTA426 派生株 (MK480) を構築した。MK480 株中では、親株よりも  $10^3$  倍ほど高い頻度で自発的変異が起こり、あらゆる塩基置換も起こりうる。培養と変異原処理を併用することで、変異導入効率をより向上させることも可能であった。また HTA426 株の幅広い生育温度は、常温から高温にかけての段階的な耐熱化選択圧を可能としており、この点も HTA426 株を使う大きなメリットといえる。

本手法の有効性は、いくつかのモデル実験により確認した。枯草菌由来のオロチジン 5'-リン酸脱炭酸酵素の耐熱化では、半数変性温度が  $10^{\circ}\text{C}$  ほど向上した変異体を得られた。概して 1ヶ所の変異導入により  $5^{\circ}\text{C}$  程度の耐熱化が達成された変異体を得られており、本手法は耐熱性を中程度向上させる低頻度変異の探索に有効といえる。またクロラムフェニコール耐性酵素の耐熱化では、プラスミド複製領域に変異が入ることで高温下クロラムフェニコール耐性を付与する予想外のプラスミドも得られた。本結果は、この手法が耐熱化変異酵素の創出だけでなく、予想外の変異を通じた機能的プラスミドの創出にも利用できることを示唆している。

高変異性好熱菌では、低頻度変異に基づく分散進化が容易に発生する。今後は、本菌を分散進化研究のツールとして利用しながら、より幅広い、そして効率的な酵素機能化について研究していきたい。

## 天然生物活性リガンドの探索と誘導体開発

柳田 亮（香川大・農）

天然物は医薬品として、それらのリード化合物として医薬品開発において重要な位置を占めてきた。しかしながら、天然物そのものが医薬品として使用される例はそれほど多くなく、天然物の誘導体あるいは天然物のファーマコフォアに基づいて設計された化合物が大半である。その理由としては、天然物が本質的に複数の標的と結合するために医薬品として望ましくない活性を示すことや、構造の複雑さ、体内での薬物動態上の問題等が挙げられる。こういった理由から天然物創薬の地位は低下傾向にあったが、近年、スクリーニング技術の進歩や機能指向型合成の登場等によって天然物が再び医薬品ソースとして再浮上している。本演者らはこれまで、抗腫瘍活性といった有用な生物活性を示す天然物の探索ならびにそれらの誘導体化による活性向上・作用機構解析に関する研究を行ってきた。本講演では、それらの一部について紹介させていただきたい。

### 1. C1 ペプチド結合活性を指標とした新規プロテインキナーゼ C リガンドの探索

プロテインキナーゼ C (PKC) は脂質メディエーターによって活性化される細胞内情報伝達の鍵酵素である。PKC はがんやアルツハイマー病、AIDS に対する治療薬の標的として注目されており、PKC リガンドはこれらの疾患に対する治療薬のリード化合物となり得る。しかし、多くの PKC リガンドが発がんプロモーション活性や炎症誘導活性を示すため、これらの副作用を示さない新規 PKC リガンドの探索が求められている。本演者らは、C1 ドメインを化学合成した C1 ペプチドを利用した新規 PKC リガンドスクリーニング法の確立を目指して研究を行った。はじめに、C1 ペプチド結合活性を指標として、PKC リガンド bryostatin 類を含有する海洋動物フサコケムシ抽出物の精製を行ったところ、数種の既知 bryostatin 類縁体と 2 種類の新規 bryostatin 類縁体の単離に成功した。このスクリーニング法を用いて、カイメンや微細藻類、植物の抽出物から PKC リガンドの探索を行ったところ、PKC リガンドの単離報告のないいくつかの抽出物から高い PKC C1 ドメイン結合活性を見出した。

### 2. がん細胞増殖抑制活性を示す単糖誘導体の開発

糖は生物のエネルギー源として、その構造組織の成分として重要な役割を果たしている。自然界に多量に存在する糖は D-glucose, D-mannose, D-galactose, D-fructose, L-arabinose 等一部に限られるが、近年、D-allose や D-psicose といった天然存在量の少ない単糖の生物活性が注目されている。D-Allose は D-glucose の C-3 位エピマーであり、植物生長阻害活性やがん細胞増殖抑制活性を示すことが明らかにされている。しかし、D-allose がこういった活性を示すためには比較的高い濃度を要することから、本演者らはその活性向上を目指し D-allose 誘導体の開発を行った。D-Allose が活性を示すためには、細胞内に取り込まれた後に C6 位がリン酸化され生成した D-allose-6-phosphate (A6P) が細胞によって感知される必要がある。したがって、D-allose の低い活性の原因は、細胞への低い取り込み効率やリン酸化を触媒するヘキソキナーゼに対する親和性の低さにあると考えられた。そこで、D-allose の C6 位を中鎖脂肪酸エステル化した誘導体や、A6P に細胞膜透過性を付与した誘導体を合成し活性を評価したところ、D-allose の 1/20-1/200 の濃度で同等の活性を示した。これらの誘導体は新規作用機序を有する抗がん剤シーズとなり得る。また、プローブ化することにより、不明な点が多い細胞による糖センシングに関する研究への応用が期待できる。

機能性食品素材「黒酵母β-1,3-1,6-グルカン」の開発—定量分析から機能性評価まで

池上裕倫 ((株)ソフィ)

β-1,3-1,6-グルカンは、体内の免疫応答を調節して正常化する生物応答調節剤 BRM (Biological Response Modifiers) として働き、摂取することで、日常の疾病リスクの低減や、ガンなどの治療効果を増強する。β-1,3-1,6-グルカンは、パン酵母やシイタケを含めた担子菌類の構造多糖の成分であるが、細胞壁より抽出することで初めて BRM として働き、さらに精製することでその効果は強化される。そのため、効果の高いβ-1,3-1,6-グルカンの収率は悪く、高価格となり、利用分野が医薬品と一部の健康食品に限られていた。

我々は、菌類等の由来種から抽出・精製する従来のβ-1,3-1,6-グルカン製造方法に代わり、微生物の菌体外多糖 EPS (Exopolysaccharide) を利用した製造方法を開発した。EPS は構造多糖と異なり、多糖が菌体から遊離しており、数種多糖が産生される場合でもそれぞれは別離しているため、簡便な精製方法で目的の多糖を得やすい。そこで、β-1,3-1,6-グルカンを EPS として産生する微生物を土壤中より探索し、黒酵母 *Aureobasidium pullulans* AFO-202 株を単離した。AFO-202 株は、二形性真菌であり様々な細胞形態をとる複雑な生活環を持つ菌であったが、細胞形態とβ-1,3-1,6-グルカンの産生能との関係を明らかにして、安定したβ-1,3-1,6-グルカンの生産を可能にした。こうして得られた黒酵母β-1,3-1,6-グルカンの安全性は、急性毒性試験、遺伝毒性試験、反復投与試験などにより確認した。

β-1,3-1,6-グルカンには特異的な定量方法がなく、食品中の含有量の測定値にはβ-グルカン量が用いられていた。しかし、β-グルカン量にはセルロースなどβ-結合したグルカンが全て含まれるため、分析値はβ-1,3-1,6-グルカン量を示していなかった。そこで我々は、微生物2種の産生するβ-グルカナーゼを組み合わせることで、β-1,3-1,6-グルカンを特異的に分解し、分解産物を測定する酵素定量法を確立した。酵素定量法では、由来種によらず測定することが可能であり、黒酵母β-1,3-1,6-グルカンの定量的な機能性評価が可能となった。

黒酵母β-1,3-1,6-グルカンの BRM 機能の評価は、NK 細胞の活性を指標とした。健常者および NK 細胞の活性が低いとされる担癌患者や高齢者を試験対象者として、臨床試験を行った。黒酵母β-1,3-1,6-グルカンを毎日 150 mg 摂取した場合、4 週間で健常者や担癌患者で NK 細胞の活性が上昇した。また 12 週間後には高齢者でも活性の上昇が確認できた。この結果から、抽出と精製を行っていない黒酵母β-1,3-1,6-グルカンが、生体内で BRM として働くことが示された。

さらに、水溶性の性質を持つ EPS を利用したことで、黒酵母β-1,3-1,6-グルカンは水溶性食物繊維の機能も示した。黒酵母β-1,3-1,6-グルカン 150 mg を 4 週間摂取した結果、LDL-コレステロール値は大きく低下した。また 35 mg を食事に添加した場合には、食後の血糖値は低く抑えられた。さらに 100 mg を 6 週間摂取した試験では、空腹時の血糖値の改善が見られた。他の臨床試験では、糖尿病や脂質異常症の治療に大きく寄与した報告がなされた。また、入院患者を対象とした臨床研究結果からは、便秘症状の改善、腸機能の改善による高齢者特有の低栄養状態の改善などが示された。これらの機能性は、従来の構造多糖を利用したβ-1,3-1,6-グルカンにはない特徴である。

我々が開発した黒酵母β-1,3-1,6-グルカンは、担子菌類から精製した従来のβ-1,3-1,6-グルカンに比べ、価格が約 20 分の 1 と安価であり、汎用性に優れる。平成 8 年に食品添加物として認可を受け、現在は健康食品だけでなく健康志向の加工食品の原材料としても使用されている。嗜好性は開発当初に比べ格段に向上し、近年は菓子や酒といった嗜好品にも利用されている。今後はさらに、免疫力の強化が求められる介護施設や病院での食事に、黒酵母β-1,3-1,6-グルカンの導入を進めていく。



シ　ン　ポ　ジ　ウ　ム  
ミニシンポジウム  
特　　別　　講　　演

---

講　　演　　要　　旨



## シンポジウム講演

### 真核生物における D-アミノ酸の機能とその代謝

吉村 徹（名大院・生農）

D-アミノ酸は、以前は細菌に特有で細胞壁ペプチドグリカンや抗生物質の構成成分など極めて限られた機能しか持たないと考えられていた。しかし1990年代に入り、分析技術の進展に伴って哺乳動物を含む真核生物にも様々な遊離D-アミノ酸が存在し、多様な生理機能を担っていることが明らかとなってきた。例えばD-アスパラギン酸(D-Asp)は松果体でのメラトニンの分泌抑制、下垂体前葉でのプロラクチンの分泌促進、精巣でのテストステロンの合成・分泌促進など、ホルモンの合成や分泌制御に関与する他、その卵巣での濃度が受精効率に影響することなどが報告されている。D-セリン(D-Ser)は、シナプス後膜のイオンチャネル型グルタミン酸受容体の一種であるN-メチルD-アスパラギン酸受容体(NMDAR)のコアゴニストとして機能する。NMDARは脳の高次機能に関連しており、脳内でのD-Serの挙動は記憶や学習などの制御に機能するとともに、統合失調症をはじめとする様々な神経疾患に係わると考えられている。D-Serは小脳では $\delta$ 2型グルタミン酸受容体に結合することにより、シナプスでの運動記憶・学習を促進すると報告されている。NMDARは腎臓や腸など末梢組織にも存在しており、D-SerがNMDARを通じてこれらの臓器の機能を制御している可能性も指摘されている。

我々はD-アミノ酸の機能を分子レベルで理解するためには、その代謝酵素の解明が不可欠であると考え、真核細胞においてD-AspやD-Serの生合成や分解を触媒する酵素について研究してきた。哺乳動物において、D-SerはビタミンB6の補酵素型であるピリドキサル5'-リン酸(PLP)を補酵素とするFold-type II型セリンラセマーゼによって生合成される。同酵素は真核生物に広く存在し、セリンのラセミ化とともにD-Serをピルビン酸とアンモニアに分解するデヒドラーゼ反応も触媒する点で、Fold-type III型の細菌酵素と異なる。我々は分裂酵母由来のセリンラセマーゼの結晶構造を解明するとともに、生理的に重要と思われるデヒドラーゼ反応の機構について検討した。哺乳動物でのD-セリン分解は主としてフラビン酵素であるD-アミノ酸オキシダーゼが触媒するが、哺乳動物を除く脊椎動物、菌類および一部細菌にはPLPを補酵素としてD-Serのデヒドラーゼ反応を触媒するFold-type III型D-セリンデヒドラーゼ(Dsd)も存在する。我々はDsdを出芽酵母に初めて見出すとともに、同酵素の高い基質特異性を利用したD-Ser定量法の開発などを行ってきた。上述のように、D-Ser動態は中枢および末梢組織の制御に関わる可能性があり、本定量法は様々な方面への応用が期待される。現在は本法を用いて尿中のD-Ser動態と腎機能の関連について検討中である。我々はまたD-Aspの生合成系についても検討している。米国の研究グループによって、哺乳動物においてD-Aspはアスパラギン酸トランスアミナーゼのホモログ(GOT1L1)であるアスパラギン酸ラセマーゼによって生合成されるとの報告がなされた。が、しかし我々の研究ではGOT1L1はラセマーゼを示さず、現在までのところ哺乳動物でのD-Aspの生合成経路は不明である。

本講演ではこれまで明らかにされたD-アミノ酸の生理機能と、その代謝関連酵素に関する我々の研究について紹介する。

### 海洋性細菌由来のポリエステル分解酵素の構造と機能

粕谷健一（群馬大院・理工）

プラスチック廃棄物は、世界中で年間 14,300 万トンも海洋に流出し、海洋環境を汚染している。生分解性プラスチックは、それらに対する有力な解決策の一つになる可能性がある。細菌が菌体内貯蔵物質として蓄積する、ポリ(3-ヒドロキシブタン酸) (P(3HB)) は、典型的な生分解性プラスチックの一つである。P(3HB) の生分解性機構は、土中や淡水中ではよく研究されているが、海洋環境中ではほとんど研究例がない。そこで、著者は、海洋中での P(3HB) の生分解機構を明らかにするために海洋から P(3HB) 分解細菌を単離し、その性質を詳細に調べた。さらに単離細菌が生産する P(3HB) 分解酵素の構造と機能との関係を明らかにした。

海洋性 P(3HB) 分解細菌 (JKCM-AJ-6,1 $\alpha$  株) を、日本の静岡県焼津港の海岸海洋水から単離した。単離株およびその近縁株の 16S リボゾーム DNA 配列に基づき近接接合法により遺伝系統樹を発生させたところ、単離株は *Shewanella* 属の細菌であることがわかった。また、本株は系統樹解析から典型的な海洋性細菌に属していることが示された。単離株は 15°C で P(3HB) を最も速く分解した。本株の増殖における最適塩濃度を調べたところ、本株の最大比増殖速度は 0.2 M の NaCl 存在下で得られ、0.8 M まで増殖することがわかった。これらの値は、典型的な海洋性細菌が示すものと類似していた。*Shewanella* 属細菌は、海洋中で様々な難分解性有機化合物を分解することで知られているが、本報告は、P(3HB) 分解能力のある *Shewanella* 属細菌の初めての例である。このことから、*Shewanella* 属細菌は、海洋環境中において種々の有機化合物のみだけでなく、P(3HB) 分解においても重要な役割を果たす微生物群の一つであると結論付けた。

単離細菌株のゲノム DNA からサザンハイブリダイゼーション法により P(3HB) 分解酵素遺伝子をクローニングした。目的の P(3HB) 分解酵素遺伝子は、2,049 塩基対からなり 683 個のアミノ酸をコードしており、計算上 70,382 ダルトンの分子量を有していた。また、当該遺伝子を相同的組み換え法により破壊したところ、野生株の P(3HB) 分解活性が消失したことから、野生株内に P(3HB) 分解酵素遺伝子は単一コピーで存在していることがわかった。野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>)、および、大腸菌内で生産された組み換え型酵素 (rbPhaZ<sub>She</sub>) の温度安定性が 15°C 以下であることから、両酵素ともに温度不安定性を示すことがわかった。野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) の分子量は、46 kDa であり、想定される分子量 (70 kDa) よりも小さかった。一方、組み換え型酵素 (rbPhaZ<sub>She</sub>) は、配列から推定される分子量と同程度の分子量を示した。酵素活性染色実験から、野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) は、インタクトな酵素の分解物であること推定された。また時間飛行型質量分析法により、インタクトな酵素のリカードメイン中に切断サイトがあることが判明した。このことから、野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) は、野生株内で発現後、タンパク質分解的にプロセッシングを受けていることが推定された。野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) と組み換え型酵素 (rbPhaZ<sub>She</sub>) の基質特異性を調べたところ、両酵素ともに、P(3HB)、その共重合体、およびポリエチレンスクシネートを分解した。このことは、両酵素とも同一の触媒ドメインを有しているためであると考えられる。野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) は、0.4 M 以下の低塩濃度では活性が低く、海洋での塩濃度に近い 0.5 M 付近で高い活性を示した。一方で、組み換え酵素 (rbPhaZ<sub>She</sub>) は塩濃度が上がると活性は低下した。さらに野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) は、0.5 M 以上の高塩濃度でも自己阻害効果が見られなかった。このことは、野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) が海洋中で P(3HB) を分解する際に有利にはたらく。これらを総合的に考慮すると、野生型酵素 (wPhaZ<sub>She</sub>) は、海洋中での活性を上昇させるためにプロセッシングを受けている可能性がある。

## シンポジウム講演

### 最先端技術を用いた深海底微生物の生態解明 ～SIGEXを用いたレアメタル応答遺伝子の同定など～

若松泰介（高知大・農）

地球深部探査船「ちきゅう」をはじめとした海底掘削技術と高精度・高感度細胞計数法 (Morono *et al.*, (2009) *JSME J.* **3**, 503-511; Morono *et al.*, (2013) *Environ Microbiol.* **15**, 2841-2849), 超高解像度質量分析 (Morono *et al.*, (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 18295-18300) などの細胞解析技術の大進歩により, 地球全体の海底下には  $2.9 \times 10^{29}$  乗細胞という, かつては想像もつかない程の微生物が存在することが現在知られている。その一方で 2015 年には, 青森県八戸市沖においては水深 1,180m の海底からさらに海底下 2,466 m に生命圏の限界域が存在することが報告された (Inagaki *et al.*, (2015) *Science* **439**, 420-424)。彼ら深海底微生物の生存環境は高圧, 低温, 暗黒なことに加え, 有機物や呼吸に用いる酸化物質が欠乏した状態にあり, 彼らはエネルギー消費を極力抑えゆっくりと生き続け, その細胞分裂は千年か一万年に一回とも考えられている。つまり地表面や海水中の生物とは異なる物質の代謝能力を獲得することは, 彼らの生存戦略として有利に働きうると考えられる。実際に, 仲間の死骸の細胞膜成分をリサイクルするアーキア (Takano *et al.*, (2010) *Nat. Geoscience* **3**, 858-861) や一般的な生物が圧倒的に多く生産する L-アミノ酸ではなく D-アミノ酸を選択的に利用する微生物 (Kubota *et al.*, (2016) *Front. Microbiol.* **7**, 511) が報告されている。このように, 地球の深部である海底下には大きく, 静かで, そして新規な生命圏が広がっており, 現在その研究が世界中で多く行われているが, 海底下生命圏は未だ多くの謎に包まれている。

我々は深海底微生物の生命活動について遺伝子レベルでの知見を得るため, 基質誘導を指標としたメタゲノム法 SIGEX (Uchiyama *et al.*, (2005) *Nat Biotechnol.* **23**, 88-93) を用いて, レアメタル, D-アミノ酸/希少糖, 難分解性物質などの代謝に関わる機能性遺伝子の網羅的探索を行っている。本方法は, 遺伝子発現スイッチの ON/OFF に基づき機能性遺伝子を探索する方法であり, 多くの転写因子とその代謝系酵素は基質や反応生成物等に依存して誘導的に発現する, 微生物の代謝系酵素遺伝子の多くはオペロンを形成しており転写因子の近傍に存在することが多い, という二つの知見に基づいて考案されたメタゲノム法である。基質依存的な遺伝子発現が起きたクローンの検出を挿入遺伝子断片の下流に存在する蛍光タンパク質遺伝子の発現で行い, 陽性クローンの単離に蛍光活性化セルソーターを用いることが可能なため, ハイスループットに機能性遺伝子の探索, 同定ができる。更に深海底微生物は純粋培養が困難であることに加え, その遺伝子の大半が未知配列である (Biddle *et al.*, (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 10583-10588) ことから, 活性発現が必須であり多大な労力を必要とする酵素活性の検出や, 新規遺伝子の探索が困難な既知遺伝子情報に依存した探索, など従来のメタゲノム法ではなく本方法を用いてアプローチしている。本シンポジウムではこれまでに得られているレアメタル応答遺伝子の同定結果を中心に話したい。マンガン団塊やコバルトリッチクラストを例とするように深海底には様々な種類のレアメタルが濃集した形で多数の場所に存在することが明らかになっているが, そこに生存する深海底微生物のレアメタル利用に関する知見はほぼない。深海底微生物が持つと予測されるレアメタル代謝関連遺伝子を同定, 解析することは彼らの生存戦略だけでなく深海底環境におけるレアメタルの濃集や移動についての新たな知見となるであろう。我々は現在, 南海トラフや外洋の南太平洋環流の掘削コア試料由来メタゲノムを対象に, ニッケルなどの必須レアメタルだけでなく, ガリウムやレアアースなど現在のところ生物がその生命活動に用いないとされるレアメタルにも応答する遺伝子を網羅的に同定することを試みている。

## シンポジウム講演

### 接着性高分子型抗菌素材（イオンコンプレックス）の開発

白馬弘文（東洋紡（株）・総合研）

近年、天然物資源の有効利用の観点から、バイオベースポリマーが注目を集めている。ポリ- $\gamma$ -L-グルタミン酸（L-PGA）は、L-グルタミン酸のみから構成されるキラルポリマーであり、塩水湖沿岸の高塩濃度の土壌に生息する好塩古細菌（*Natrialba aegyptiaca*）により生産され、生体適合性、生分解性に優れたバイオベースポリマーとして期待されている<sup>1)</sup>。当社では、*Natrialba aegyptiaca* の発酵技術により、L-PGA の工業生産に成功しており、化粧品原料（AminoPGA<sup>®</sup>）として販売している。L-PGA は、キラルポリマーの構造的特徴と生体適合性に興味を持たれるが、遊離のカルボン酸基を化学修飾すれば、新たな機能を付与した材料を創出することが可能である。L-PGA のカルボン酸基に対し、抗菌剤として使用される第4級アンモニウムをイオン結合させて形成したイオンコンプレックス（PGAIC）は、成形加工性、接着性、耐水性を有する新規な高分子型抗菌素材として非常に興味深い性質を有している<sup>2)</sup>。本講演では、PGAIC の基本性能および産業用途への応用について紹介する。

PGAIC は、L-PGA と各種第4級アンモニウム塩（CPC：塩化セチルピリジニウム、LPC：塩化ラウリルピリジニウム、BAC：塩化ベンザルコニウム、BTC：塩化ベンゼトニウム）を水中で反応させることで、水不溶性固体として得られた。PGAIC の抗菌性は、細菌類（*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*）及び真菌類（*C. albicans*, *A. niger*）に対する抗菌性試験により、第4級アンモニウム塩と同様の抗菌性を示すことが分かった。さらに、0.1% PGAIC エタノール溶液をスプレー試験液とし、各種基材（ポリ塩化ビニル、PET、ポリプロピレン、金属、セラミックス）へ噴霧し、水に浸して洗浄した試験片をハロー試験に付した結果、水洗前のみならず、水洗後にも明瞭なハローが形成された。本現象は、第4級アンモニウム塩単独では得られない効果であり、PGAIC が持続性の抗菌・防黴性を付与するコーティング剤として有用であることが示唆された。さらに、PGAIC は、A型およびB型インフルエンザウイルスに対する不活化効果、藻類に対する抑制効果を示し、水洗しても優れた持続効果を有することを確認している。PGAIC は、スプレーによる基材への固定化以外に、フィルム、ナノファイバーへの成形加工も可能である。

PGAIC は、様々な基材に接着し、従来の第4級アンモニウム塩型抗菌剤よりも、水洗後の抗菌持続性が高いことが認められ、産業資材への固定化が可能な抗菌・抗ウイルス剤として期待される。

1) 芦内 誠, D-グルタミン酸とポリ- $\gamma$ -グルタミン酸合成システム, 生化学 80, 316-323 (2008)

2) 芦内 誠, ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸のイオンコンプレックス化とその応用, プラスチックス 9, 6-11 (2011)

## ミニシンポジウム講演

### 高知県産物の6次産業化と地産外商に向けた研究開発

森山洋憲（高知県・工技セ）

高知県では、産業振興計画に基づき、食品産業の活性化に向けた取り組みが進められている。食品を中心とした産業振興が進められている中、高知県工業技術センターでは産学官連携により、特徴的な県産物の加工利用又は高付加価値化に関する研究開発を行ってきた。本シンポジウムでは、県産物の6次産業化と地産外商に向けた研究開発の取組を紹介します。

#### 1) 酵素剥皮によるブンタンのカットフルーツ化

土佐ブンタン (*Citrus grandis*) は高知県特産果実のひとつであり、需要拡大に向けた取り組みが進められている。爽やかな芳香と独特の食感が特徴的であるものの、果皮が厚く、剥皮が煩雑であることが消費拡大に向けた課題である。一方、酵素剥皮処理は従来の剥皮方法と比べ、簡便でかつ、品質劣化を抑制できる果実加工方法とされている。この酵素剥皮処理をブンタンに適用することで、消費拡大に向けた課題の解決が期待できる。そこで、ブンタンの酵素剥皮条件を検討するとともに、酵素剥皮処理と従来の剥皮方法で得られた果肉の品質を比較し、剥皮処理の品質への影響を検討した。

#### 2) ブンタン果汁を用いた懸濁結晶法凍結濃縮装置の検証

スラリーアイス製造装置と遠心分離機を組み合わせた懸濁結晶法による凍結濃縮システムにて、ブンタン果汁を用い濃縮を行ったときの成分分析、濃縮果汁の回収率から同システムの性能の有効性を調べた。実験では 11.0%Brix のブンタン原液果汁を濃縮装置に投入し、13.2~38.7%Brix の濃縮果汁を得た。HPLC 分析により、濃縮果汁の遊離糖、有機酸、アスコルビン酸等の各含量の分析を行った。その結果、すべての成分が原液果汁よりも濃縮され、各成分と Brix 値の濃縮倍率には相関があり、線型的な関係が見られた。濃縮果汁の回収率を調べる実験では、約3倍に濃縮したときの平均回収率が 87.9%であった。ブンタン果汁以外の液体食品への適用性を検証しつつ、凍結濃縮装置の実用化に向けて研究開発に取り組んでいる。

#### 3) ショウガを利用した嚥下機能改善品の開発

嚥下障害は、飲食物を飲み込むことが困難になる障害をいう。嚥下反射を改善する物質として、バニロイド受容体 (TRPV1) のアゴニストであるトウガラシのカプサイシン、ショウガのジンゲロール、ショウガオールが期待できる。一方、高知県はショウガ生産量全国1位である。この県特産品であるショウガに含まれている機能性成分に着目し、高知大学医学部附属病院を中心とした産学官連携による嚥下機能改善品の開発に取り組んだ。

## ミニシンポジウム講演

### 高知県の酒造りと商品開発

加藤麗奈（高知県・工技セ）

高知県には現在 18 の酒造会社があり、出荷額は約 80 億円、県内の食品製造業の 10% を占める重要な産業です。清酒醸造といえば寒冷地のイメージがある方も多いと思いますが、高知県は清酒県としては最南端に位置する酒どころです。このため、暖地醸造となり、県内の酒造場は全国に先駆けて仕込み蔵に冷房装置を導入し、また酒造好適米を多用して高精白まで磨くことにより、酒質の向上を図ってきました。

県産酒の味の特徴として、普通酒が全国屈指の淡麗辛口であることが知られています。これは、カツオのたたきに代表されるように高知の魚は脂ののった赤みの魚が多く、それには淡麗辛口が合うからだと言われています。一方、吟醸酒も辛口ではありますが、淡麗タイプもあれば濃醇タイプもあり、各蔵が個性的な味の商品を醸しています。また、県内で消費される清酒の県産酒の割合、地酒占有率が約 80% と高いのも本県の大きな特徴です。

高知県でも、全国的な傾向と同様に、日本酒離れによる消費低迷で生産量は減少傾向にあります。特に普通酒は製造量が著しく減少しました。しかしながら、吟醸酒などの特定名称酒に関しては、土佐酒としての個性化、差別化をはかるため、県独自の酒米や吟醸酵母の開発、県内酒造場の『麴』や『もろみ』の分析などによる醸造技術の向上に努めてきたことが奏功し、出荷額の減少を食い止めることができています。

本日は、当センターを中心にした『土佐酒』の品質向上に向けた取り組みと、近年の成果についてご紹介します。

## ミニシンポジウム講演

### 高知県の食品産業を担う人材の育成 ～課題研究事例紹介～

中島悦子（高知大・地域セ）

#### 背景

高知県は豊富な農産物を生産している地域でありながら、生鮮出荷に依存しており、国内・国際的な競争力に乏しく、経済的に脆弱な産業構造である。そこで、県内の食品産業の人材育成を目的として、大学、地域企業、自治体との連携を深め、食品産業の中核を担える「フードビジネスクリエーター」を養成するプログラム、土佐フードビジネスクリエーター人材創出事業（以下「土佐 FBC」という。）を、平成 20 年から文部科学省科学技術戦略推進事業として実施した。5 年間の事業終了後にも、高知県、高知大学、県内自治体、銀行、JA 等の協力により、高知大学と高知県との包括的連携協定に基づき、高知県の寄附講座として高知大学が事業を継続するに至っている。平成 28 年度からは文部科学省「職業実践力育成プログラム (BP)」、「食の 6 次産業化プロデューサー (食 Pro.)」育成プログラムに認定され、知の拠点として地域に貢献することを目指して、高知県の食品産業の中核を担う専門人材及び高知県の食品産業の拡充に資する基礎人材の育成に取り組んでいる。

#### 内容

本事業で実施する教育プログラムは、4 つの座学（「食品製造・加工」、「マネジメント」「品質管理」「食品機能」）、2 つの技術習得メニュー（「実験技術」、「現場実践学」）、さらに企業の商品開発などを OJT（On the Job Training）で実施する「課題研究」から構成される。座学指導には県内外の専門家が当たるが、技術習得や課題研究には、高知県工業技術センター職員および土佐 FBC の特任教員が指導にあっている。また、上記カリキュラムとは別に、高知県中部以外の地域においても、食品の基礎知識を学ぶ機会を提供するため、「学外教室」をこれまで西部（幡多）、東部地域において実施している。今年度で事業は 9 年目を迎え、これまで 8 年間のプログラム（平成 20 年～27 年度）で延べ 354 名が修了している。さらに、修了生を輩出した企業との共同研究 3 件を実施し、受講生（課題研究生及び共同研究生）が学会で研究発表にも取り組むなど、地域産業を担う高度な専門人材育成拠点として重要な役割を果たしている。

#### 事例紹介

本日のシンポジウムでは、土佐 FBC 事業の教育プログラムのうち、課題研究および共同研究で取り組んだ研究テーマの中から、地場製品の強みを明確にしたり、商品開発や品質管理に取り組んだりした事例を紹介する。とくに本事業の「課題研究」においては、地域企業が抱える様々な課題あるいは商品開発に関して、高知県工業技術センター職員および土佐 FBC の特任教員が綿密な指導を行い、受講生が自立して課題を解決できる知識や技術を習得することを主眼においており、本事業の中でも好評の教育プログラムとなっている。

## ミニシンポジウム講演

### 高知大学と地域の食産業をつなぐ ―地域コーディネータの活動を通じて―

岡村健志（高知大・地域セ）

高知大学では高知県内各地にコーディネータ（UBC: University Blocked Cordinator）を常駐させ、学内の研究者らとともに、組織的に地域の課題収集から課題解決に参画している。本稿では、UBCである筆者が、そのような地域連携活動について紹介するほか、UBCの活動を通じて取り組む地域の食品産業との連携内容や課題について報告する。

高知大学では、地域と大学をつなぐ手段の一つとして、平成25年より高知県内7箇所にサテライトオフィスを設置したほか、サテライトオフィスには4名のUBCが常駐させている。UBCの役割は地域のなかで大学が役に立てることを探し、実践することにある。具体的には、UBCには「アウトリーチ」「課題収集・分析・相談」「マッチング」「企画立案・実施」などの役割があり、対応する課題の内容や状況、課題相談者（地域パートナー）の属性や技術に応じて対応する。筆者はこれまでの2年間で、述べ約130件の課題に応じ、うち約20件の課題について、地域パートナーとともに解決に向けた取り組みを実施した。

現在実施している課題解決の取り組みから、食品関係の2つの連携内容を紹介する。1つめは黒潮町の缶詰プロジェクトである。黒潮町は想定津波最大高34メートルと言われるなか、それを逆手に取って黒潮町缶詰製作所を立ち上げたもので、地域でとれる農産物などを使った高付加価値な缶詰食品や非常食用の缶詰食品を製造、販売している。高知大学は、プロジェクトの進捗状況に応じて、様々な協力を行っている。UBCが経営支援の役割を担っており、週に1回程度の頻度で定期的に社内会議に参加し、社内の仕組みづくり、PDCA運営やプロジェクト管理の技術的サポートや指導を行っている。このような機会を通じて、様々な課題相談を実施し、これまでに高知大学では食品分野の研究者らが、食物アレルギー検査の方法について協同で開発した。このほか、他機関の支援者や原料供給者、取引先らの紹介やマッチング、ネットショップ等の事業開発を支援してきた。

ふたつ目の高知県四万十町の生姜プロジェクトについて紹介する。四万十町は生姜日本一の生産量と言われる町であり、地元JAや道の駅、役場、生産者などによって構成されるメンバーが、生姜をテーマにした地域イベント開催や商品開発をするなど、生姜を使った地域おこしを始めている。高知大学では、四万十町のメンバーらの要望により、収穫後すぐの堀立ち生姜や予冷庫に貯蔵した困り生姜など、多様な生姜の青果商品の機能性成分や呈味成分について計測したほか、その経時的変化や味パターンなどの比較も行った。また、現在では分析で得たデータや知見を活用し、生姜の販売促進を展開しようとしている。

このように、どちらのプロジェクトでも、地域パートナーが所有していない知識、技術や経験に対して、大学の研究者やUBCが連携して担当したものである。筆者のこれまでの経験では、このような関わり方が外部支援者よりも主体者よりの立場を期待されているようにも思える。これには、UBCが地域に常駐するなど、大学が地域に対してより積極的に連携する態度を表明したことなども一員であろう。一方でこのような期待や関係は、地域の主体性への危惧やパートナーとしての期待不足などへの懸念もあろう。

地域での食品産業は、地域のイメージアップとしても使いやすい上、地域活性化手段としてもスタートしやすいテーマであろう。一方で、競争相手も多く、ビジネスとして成立するためには多様な知識や技術、人材も重要となってくる。そのため、特に経験や人材不足な地域では、大学のみならず多くの協力者との連携が必要と考える。今後も、高知大学には地域の一員として、地域パートナーと一体となった活動が必要であろう。

特別講演

ホモポリアミノ酸を合成する新奇ペプチド合成酵素の反応メカニズム

濱野吉十（福井県大・生物資源）

微生物によって生産されるペプチド化合物は、リボソーム関与あるいは非リボソームペプチド合成酵素（NRPS）によって生合成される。NRPSは、タンパク性アミノ酸以外のアミノ酸も基質として利用できることから、合成されるペプチド化合物の化学構造は多様である。その一方で、ペプチド鎖長（アミノ酸残基数）については、NRPSのドメイン構造によって厳密に制御されており一般的に多様性は認められない。しかし、最近我々は、ペプチド鎖長に多様性があり、また、単純な化学構造である  $\epsilon$ -poly-L-lysine (25~35 残基) と streptothricin の  $\beta$ -リジンオリゴペプチド構造 (1~7 残基) が、新奇反応メカニズムを有する NRPS によって合成されることを見出した (Fig. 1) (*Nature Chem. Biol.*, 4, 766-772, 2008; *Nature Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)。本講演では、これら新奇 NRPS の反応メカニズムと最近の知見について紹介する。

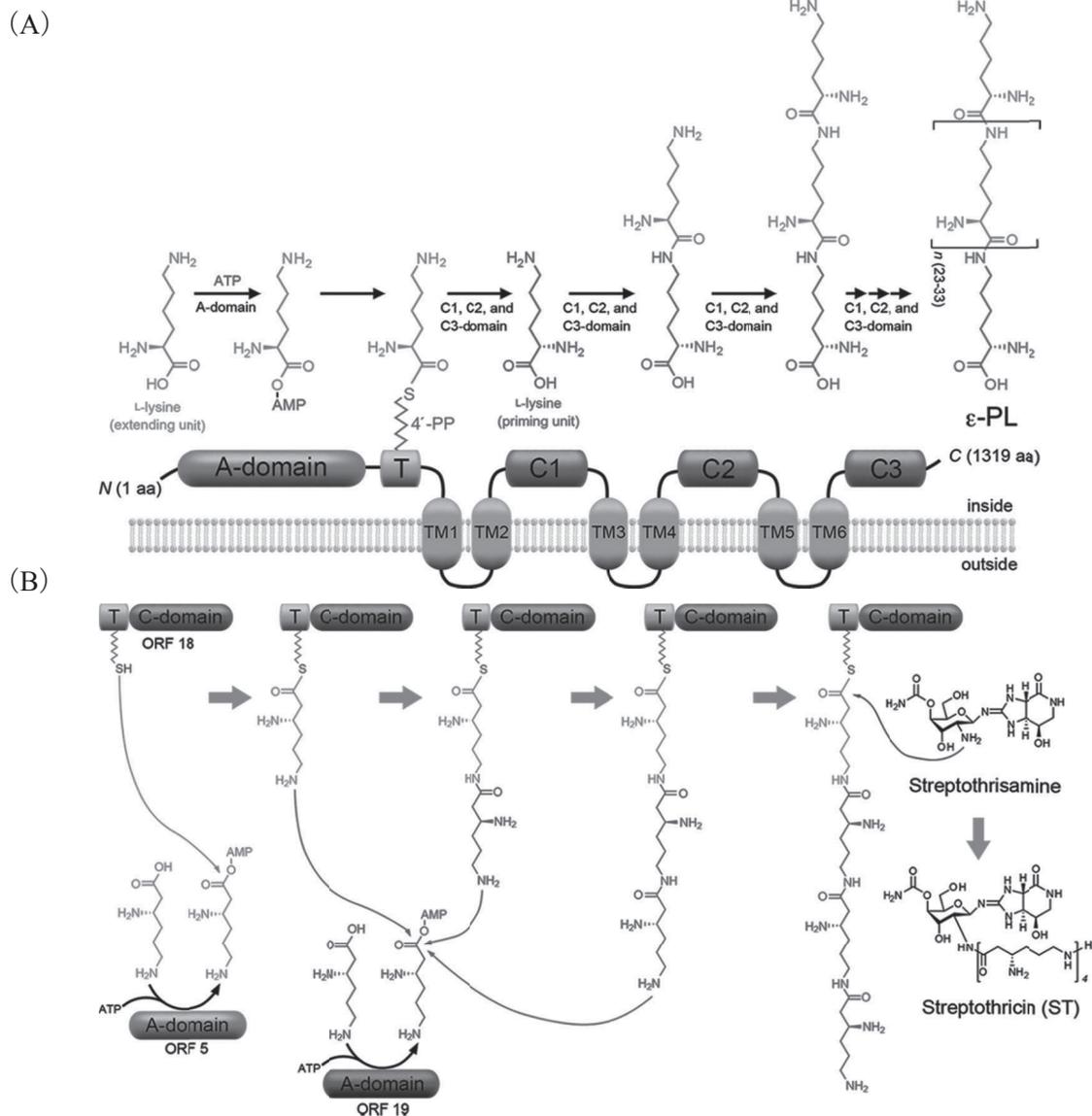


Fig. 1  $\epsilon$ -poly-L-lysine (A) と  $\beta$ -リジンオリゴペプチド (B) を合成する NRPS のドメイン構造と反応機構



一 般 講 演

---

講 演 要 旨



A-1 立体障害を有する組換え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, Manoj Pohare<sup>1</sup>, 大畠侑乃<sup>2</sup>, 滝川悠介<sup>2</sup>, 菊地琢磨<sup>2</sup>  
(愛媛大院・農, <sup>1</sup>愛媛大院・連合農, <sup>2</sup>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。そして、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、前駆体蛋白質の透過を途中で停止させることはできないので、前駆体蛋白質が膜透過中に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、どのようなトランスロコン因子が膜透過に関与しているのか、等の疑問に対する理解は進んでいない。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留めることができないかを考えた。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の状態、すなわち、C 末端側にフォールドした蛋白質を有する前駆体蛋白質の大腸菌過剰発現に成功した。これらの前駆体蛋白質を蛋白質輸送実験に供したところ、膜透過が完了したことから、前駆体蛋白質の構造が膜透過中に一旦ほぐれてしまった可能性が示唆された。次に、連結した可溶性蛋白質の両端を共有結合させることで、蛋白質が仮にほぐれても大きなループ構造は維持されるような前駆体蛋白質を設計した。今回は、これらの新たに作製した前駆体蛋白質を用いて実施した *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験により得られた結果について発表する。

A-2 植物のフラビン代謝制御に関与する新規因子の探索と機能解析  
○小川貴央, 菊池円架, 吉村和也<sup>1</sup>, 石川孝博, 重岡 成<sup>2</sup>  
(島根大・生資科, <sup>1</sup>中部大・応生, <sup>2</sup>近畿大・農)

【目的】リボフラビン (RF) の補酵素型である FAD や FMN は、光合成、電子伝達系および脂肪酸酸化などの主要代謝経路に必須であるため、細胞内におけるフラビン化合物レベルは厳密に制御されなければならない。植物において RF は葉緑体のみで合成されるが、FAD や FMN の代謝に関与する酵素群は葉緑体に限らず、細胞質やミトコンドリアにも存在する。しかしながら、フラビン化合物の代謝系の制御機構や、オルガネラ間の輸送の詳細は未だ不明である。そこで本研究では、植物におけるフラビン化合物の調節に関わる新規因子を同定することを目的として、植物細胞内のフラビン化合物レベルの変化により発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。

【方法・結果】FAD 外部添加 1 時間後のシロイヌナズナ葉におけるトランスクリプトーム変化を解析した結果、発現量が 2 倍以上および 0.5 倍以下に増加/減少した遺伝子をそれぞれ 262 個、198 個同定した。これらにはフラビン化合物の調節に関わる因子の候補としてトランスポーター関連遺伝子が 17 個、転写因子関連遺伝子が 47 個含まれていた。そこで次に、同定した転写因子関連遺伝子群の T-DNA 挿入遺伝子破壊株の単離を行った。得られた遺伝子破壊株の細胞内フラビン化合物レベルの解析を行った結果、29 種類の遺伝子破壊株のうち 1 株において、野生株と比較して FAD が 0.6 倍に減少、FMN および RF が 1.4 倍に増加しており、フラビン代謝系遺伝子群の発現も増加/減少していた。以上より、本転写因子が直接もしくは間接的に細胞内フラビン化合物レベルの調節に関与していることが示唆された。

### A-3 葉緑体レドックス多重変異体における強光ストレス応答 ○岡安嵩也, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典 (島根大・生資料)

強光下での光合成電子伝達系 (PET) の過還元は活性酸素種 (ROS) の生成を助長する。ROS は細胞毒性作用と防御遺伝子誘導のシグナル機能を有するため、その量的バランスの制御は極めて重要である。そのため、植物はアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) を中心とした抗酸化系に加え、サイクリック電子伝達系 (CEF) の働きに起因する光エネルギーの散逸系を発達させてきた。これまでに、個々のシステムの生理機能は深く解析されてきたが、両者の相互関係については不明である。そこで本研究では、ストロマおよびチラコイド膜型 APX (sAPX および tAPX) と CEF の主要コンポーネントである PGR5 の多重変異株を作出し、強光ストレス応答への影響を解析した。

野生株, *pgr5*, *sapx tapx* および *sapx tapx pgr5* に強光 (1,500  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ) を 24 時間照射した。その結果、野生株と *sapx tapx* では明確なストレス感受性の表現型が見られなかったが、*pgr5* の葉は退色し、それは *sapx tapx pgr5* でより顕著であった。この表現型の違いはクロロフィル量やイオン漏出量のそれと一致していた。次に、各 PET パラメーターを測定した。野生株や *sapx tapx* と比較して、*pgr5* および *sapx tapx pgr5* では強光後の光化学系 II の量子収率 ( $\phi\text{PSII}$ ) の低下が著しく、これは PET の過還元 (1-qP) を伴っていた。また、両株では非光化学的消光 (NPQ) の誘導が抑制されていたが、これは三重変異株で緩和される傾向が見られた。これらの結果から、APX と PGR5 は互いのシステムを補完しあうことが示された。現在、より自然環境に近い変動光ストレス条件下で同様の解析を試みている。

### A-4 タバコ葉アグロインフィルトレーションでの 2 遺伝子同時一過的発現が可能な Dual Site Gateway Binary Vector (DSpGWB) の開発 ○横山頌弥, 西村浩二<sup>1</sup>, 中川 強<sup>1</sup> (島根大・生資料, <sup>1</sup>島根大・総科セ)

アグロインフィルトレーション法は、シリンジを用いて生きた植物の葉にアグロバクテリウムを強制的に注入することにより、植物細胞に遺伝子を導入する方法である。この方法は、植物の葉のみにアグロバクテリウムを感染させ、導入遺伝子の一過的な発現を促す系であり、短期間で解析を行うことができるという利点を持っている。我々は、Gateway クローニングの技術を利用して 2 遺伝子を任意の組み合わせでクローニングできる Dual site Gateway binary ベクターを開発してきた。本研究では、2 種類の蛍光タンパク質をモデルとし、2 つの蛍光タンパク質遺伝子 (sGFP と mRFP, もしくは eCFP と eYFP) を組み込んだ Dual site Gateway binary ベクターを保持するアグロバクテリウム 1 種を導入する方法 (新たな方法) と、単一の蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだベクター (sGFP と mRFP, もしくは eCFP と eYFP) をそれぞれ保持したアグロバクテリウム 2 種を混合して導入する方法 (従来の方法) とを比較し、2 つの遺伝子の同時発現について検討を行うこととした。

今回は、タバコ葉にアグロインフィルトレーションにより遺伝子を導入し、Dual site Gateway binary ベクターによるアグロバクテリウム 1 種感染の場合と、単一蛍光タンパク質遺伝子のアグロバクテリウム 2 種混合感染の場合とで、同一細胞において 2 つの蛍光タンパク質が検出される割合を比較した結果について報告する。

A-5 デヒドロアスコルビン酸還元酵素の三重変異体におけるアスコルビン酸の再生  
○寺井佑介, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典 (島根大・生資科)

【目的】アスコルビン酸は植物の成長や生存に不可欠な多機能性レドックス化合物である。その生理作用の多くは還元型に依存するため、酸化型からの再生が重要となる。二電子酸化型のデヒドロアスコルビン酸 (DHA) は、その特異的な還元酵素 (DHAR) の働きにより、グルタチオン依存的にアスコルビン酸へと還元されると考えられている。この説が有力とされる一方で、DHA はタンパク質チオール基を容易に酸化し、自身は還元されうるため、DHAR という特異的な酵素の存在を疑問視する報告も存在し、議論の決着はついていない。そこで本研究では、シロイヌナズナに存在する 3 つのアイソフォームを全て欠損させた三重変異体 ( $\Delta$ dhar) を用いて検証した。

【結果】 $\Delta$ dhar が DHAR 活性を持たないことは、異なる 2 つの DHAR 活性測定方法により確認された。3 週齢の野生株および  $\Delta$ dhar に強光ストレスを付与し、葉のアスコルビン酸量を測定したところ、 $\Delta$ dhar における総アスコルビン酸量およびレドックス状態に野生株との明確な違いは見られなかった。in vivo における DHA 還元能力を調べるために、野生株および  $\Delta$ dhar の葉に水または DHA 溶液を処理した。その結果、水処理と比較して、DHA 処理下では著しい総アスコルビン酸量の増加が認められ、そのほとんどは還元型として検出された。しかしながら、このときのアスコルビン酸量およびレドックス状態に DHAR 欠損の影響は見られなかった。これらの結果から、 $\Delta$ dhar のアスコルビン酸再生能力は野生株のそれと同程度であることが示唆された。

A-6 微細藻類ユーグレナにおけるワックスエステル合成酵素の機能解析  
○栗原佳恵子<sup>1,2</sup>, 富山拓矢<sup>1,2</sup>, 丸田隆典<sup>1,2</sup>, 小川貴央<sup>1,2</sup>, 澤 嘉弘<sup>1</sup>,  
石川孝博<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>島根大・生資科, <sup>2</sup>JST/CREST)

微細藻類ユーグレナは、嫌気条件下でワックスエステル発酵によりミリスチルミリスチン酸 (C28) を主成分とするワックスエステルを合成する。ワックスエステルの代謝は好気/嫌気条件に応答して制御されているが、その分子機構は未解明である。これまでに我々は、ワックスエステル代謝制御機構の解明を目的に網羅的な遺伝子発現解析を行い、同代謝関連酵素遺伝子の同定と機能解析を進めている。今回、ワックスエステル合成関連酵素遺伝子の機能解析について報告する。

ユーグレナ RNA-seq データに対し、*Acinetobacter baylyi* ADP 由来 *Wax Synthase/Diacylglycerol acyltransferase (WSD)* 遺伝子をクエリに相同性検索を行ったところ、既知の wax synthase (WS) 以外に、WSD に高い類似性を示す 6 遺伝子を見出した (*EgWSD1-6*)。このうち発現量の高い 3 つの WSD (WSD2, WSD3, WSD5) を酵母のトリアシルグリセロール合成変異株 H1246 で発現させ、C28 合成能の評価を行った。その結果、WSD2 と WSD5 に顕著な C28 合成能が認められた。対照的に、WS 発現酵母では C28 の合成が観察されなかった。また、二本鎖 RNA 導入により WS および各 WSD 遺伝子を発現抑制した結果、WSD2 と WSD5 を同時にノックダウンした細胞において、コントロールと比較して嫌気処理 24 時間後の C28 蓄積量が約 80%にまで減少した。以上の結果より、ユーグレナでは WSD がワックスエステル合成の主要酵素として機能していることが示された。

A-7 Salicylic acid signaling in Arabidopsis guard cells  
OMd. Yeasin Prodhan, Shintaro Munemasa, Toshiyuki Nakamura, Yoshimasa Nakamura, Yoshiyuki Murata (Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

Stomatal pore in the epidermis of plant leaves is formed by a pair of guard cells. The guard cells regulate stomatal apertures in response to a variety of stimuli such as light, drought and phytohormones and consequently control gas exchange, transpirational water loss, and innate immunity. The phytohormone salicylic acid (SA) induces stomatal closure in plants but the molecular mechanisms of SA-induced stomatal closure are yet to be elucidated. In this study, we investigated the involvement of calcium-independent protein kinase OST1 (Open Stomata 1), calcium-dependent protein kinases, CPK3 and CPK6, and S-type anion channel SLAC1 in SA-induced stomatal closure using Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) protein kinase knock-out mutants *ost1-3*, and *cpk3 cpk6*, and anion channel disruption mutants *slac1-1* and *slac1-3*. Stomatal bioassay revealed that SA triggered stomatal closure in a concentration-dependent manner in the wild-type plant and the *ost1-3* mutant but not in the *cpk3 cpk6*, *slac1-1*, or *slac1-3* mutant plants. Histochemical analysis using 3,3'-diaminobenzidine showed that SA elicited accumulation of reactive oxygen species (ROS) in whole leaves both of the wild type and of the *cpk3 cpk6* mutants in time- and concentration-dependent manners, which suggests that CPK3 and CPK6 functions downstream of ROS production in the SA signal pathway. These results suggested that CPK3, CPK6, and SLAC1, but not OST1 act as signaling components downstream of ROS accumulation in SA-induced stomatal closure in Arabidopsis.

A-8 *C. elegans* の ASJ ニューロンに発現する SRH-11 の機能解析  
○高須 浩, 金川陽祐, 河野 強<sup>1</sup>, 尾添嘉久 (島根大・生資料, <sup>1</sup>鳥取大・農)

【目的】土壌自活線虫 *Caenorhabditis elegans* は、生育環境が悪化すると休眠し、環境が改善すると休眠打破が起こり、元の生活環に復帰することが知られている。最近、研究の進展があり、ウラシルが休眠打破シグナルの一つとして推測された。休眠打破には、頭部感覚ニューロンである ASJ ニューロンが関与しているので、このニューロンに特異的に発現している G タンパク質共役型受容体 (GPCR) SRH-11 がウラシル受容体ではないかと考え、本研究では SRH-11 のウラシルに対する応答を調べた。

【方法・結果】HEK-293T 細胞に SRH-11 を安定発現させ、<sup>3</sup>H]ウラシルの特異的結合とセカンドメッセンジャーレベルの変動を測定した。結合活性試験では、SRH-11 安定発現細胞の膜画分と<sup>3</sup>H]ウラシルを反応させ、ウラシルが膜画分に特異的に結合することを確認した。次に、GPCR のセカンドメッセンジャーである Ca<sup>2+</sup>および環状ヌクレオチドのウラシル投与時の細胞内レベルを測定した。cAMP 測定では cAMP 結合部位導入改変ホタルルシフェラーゼ遺伝子を、Ca<sup>2+</sup>測定ではエクオリン遺伝子を細胞に一過性発現させ、それぞれのシグナル発生時に生じる発光を測定した。その結果、どちらのシグナルも検出されなかった。cGMP 測定では、cGMP 抗体とアセチルコリンエステラーゼ cGMP コンジュゲートを用いた酵素抗原抗体反応を利用した。これについては、ウラシルを投与した細胞での cGMP レベルの上昇を示す結果が得られた。以上のように、HEK-293T 細胞に発現させた SRH-11 にウラシルが結合し、その結果、細胞内 cGMP レベルが上昇することから、SRH-11 はウラシル応答性 GPCR であることが示唆された。

A-9 線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のビタミン C 生合成経路の検討  
○岡本奈穂, 原 寛佳, 美藤友博, 藪田行哲, 河野 強, 渡邊文雄 (鳥取大・農)

【目的】ビタミン B<sub>12</sub> (B<sub>12</sub>) 欠乏線虫では体内の酸化ストレスが顕著に増大し、頻度は低いものの太短い形態をした *Dumpy* と呼ばれるコラーゲン代謝異常の変異体が観察された。また、近年では線虫にもビタミン C の生合成能を有していることが報告されたが、その生合成経路の特定には至っていない。そこで、本研究では 3 種のビタミン C 生合成経路の中で動物と同様の D-GlcUA 経路に着目し、線虫のビタミン C 生合成経路を検討した。

【方法・結果】B<sub>12</sub> 添加培地 (コントロール培地) と B<sub>12</sub> 無添加培地で線虫を 5 世代間生育させることで、コントロール線虫と B<sub>12</sub> 欠乏線虫を調製した。線虫の体内ビタミン C 含量は DNPH 誘導体化法 (HPLC) により測定した。ビタミン C 生合成に関与する遺伝子発現はリアルタイム PCR 法により評価した。D-GlcUA 経路の関与が推定される酵素遺伝子をノックアウトさせた線虫を用いて、体内ビタミン C 含量を測定した。また、ビタミン C 生合成の最終段階に関与する酵素の活性を測定した。

B<sub>12</sub> 欠乏線虫ではコントロール線虫と比較して、顕著なビタミン C 含量の減少を示した。B<sub>12</sub> 欠乏線虫に B<sub>12</sub> を添加すると、コントロールの値にまでビタミン C 含量が回復した。D-GlcUA 経路に関与する酵素遺伝子の発現を評価したところ、B<sub>12</sub> 欠乏線虫において 3 つの遺伝子発現がコントロールの約 2.5~4 倍に上昇した。また、ビタミン C 生合成の最終段階に関与する酵素遺伝子をノックアウトさせた線虫の体内ビタミン C 含量は減少傾向にあった。

A-10 線虫を用いた抗肥満活性希少糖のスクリーニング法の検討  
○山崎誠志郎, 新谷知也<sup>1</sup>, 佐藤正資 (香川大・農, <sup>1</sup>愛媛大院・連農)

深刻化する肥満のまん延によって、世界の成人 3 分の 1 以上が健康上の悪影響を受けていると言われている。そのため、世界的に抗肥満 (脂肪蓄積抑制) 物質の探索が行われている。希少糖とは「自然界にその存在量の少ない単糖及びその誘導体」と定義され、そのうちのひとつ D-プシコース (D-フルクトースの C3 エピマー) には、内臓脂肪の蓄積を抑える効果が報告されている。演者らは、モデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、希少糖の生物活性の探索を行ってきた。本研究は、この *C. elegans* を用いて、数多く存在する希少糖から脂肪蓄積抑制物質をスクリーニングするための簡便な試験法の確立を目的とした。

線虫は野生型 N2 とインスリン/IGF 様シグナル受容体遺伝子 (*daf-2*) 欠損変異体 CB1370 株を用いた。培養は大腸菌を餌とした液体培養法で行い、培養後、回収した線虫はビーズ破砕機により破砕・抽出し、脂肪の定量は市販の定量キット (トリグリセライド E-テストワコー) を用いた。本発表では、培養条件、脂肪抽出条件、試験物質の処理タイミングの検討、N2 と *daf-2* 変異体の比較について報告する。

## B-1 高知県土佐山産有機生姜の食品化学的特性

○池田耕一, 中島悦子<sup>1</sup>, 吉金 優<sup>1</sup>, 大崎裕一, 沢村正義<sup>1</sup>  
( (財) 夢産地とさやま, <sup>1</sup>高知大・地域セ)

【目的】一般財団法人夢産地とさやま開発公社は、高知市土佐山地区の有機 JAS 認証農場において生姜の栽培を行っている。生姜は収穫後に貯蔵し、新生姜とは区別して「罎(かこい)生姜」と称して通年出荷するが、貯蔵中の成分変化について情報が乏しい。そこで本研究では、公社有機生姜の品質管理を目的とし、①生姜の貯蔵による成分変化の把握に取り組んだ。さらに販売促進活動の一助とすることを目的とし、②他産地の生姜と公社有機生姜の成分比較にも取り組んだ。

【方法】生姜試料：収穫した公社有機生姜を約 17℃で貯蔵し、0~11 ヶ月間において約 3 ヶ月毎にサンプリングした。他産地との比較には、海外(2ヶ国)、国内(県外：2ヶ所、県内：3ヶ所)から市販の生鮮生姜を入手した。分析項目：上記の試料について、辛味成分 4 種(6-, 8-, 10-ジングロール, 6-ショウガオール)、香気成分(ヘキササン抽出物)を分析した。また、抗酸化能としてスーパーオキシドアニオン消去活性(以下「SOD 様活性」)を測定した。辛味成分と SOD 様活の測定には、生姜を凍結乾燥処理した。

【結果】公社有機生姜の貯蔵による成分変化を調べた結果、辛味成分量が増加する傾向が見られた。また香気成分を分析した結果、貯蔵により生姜様の香りを呈する Zingiberene の割合が減少し、フローラル様の香りを呈する Geranyl acetate の割合が増加した。さらに SOD 様活性も貯蔵によって高くなる傾向であった。公社有機生姜中の辛味成分の含量は、高知県内の他産地と比べるとやや低く、県外産や海外産よりも明らかに低かった。一方、公社有機生姜の SOD 様活性は県外や海外産よりも高い活性を示した。

## B-2 ブドウ飲料中に含まれるポリフェノールの抗炎症作用の解析

○齋藤豪紀, 河合慶親<sup>1</sup>(徳島大院・栄養生命, <sup>1</sup>徳島大院・医歯薬)

【目的】近年「フレンチパラドクス」として赤ワインに含まれるポリフェノールの心血管疾患への予防効果が注目されている。赤ワイン中には様々なポリフェノールが混在しているが、その効果に本質的に寄与する成分については十分に理解されていない。本研究では、ブドウ飲料として赤ワイン(RW)と白ワイン(WW)、グレープジュース(GJ)に含まれるポリフェノールの抗炎症作用について検討し、ブドウ飲料に含まれるポリフェノールの種類と抗炎症活性との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】市販の RW 2 種類, WW 2 種類, GJ 4 種類から固相抽出法により色素成分を濃縮し、リポ多糖(LPS)とともにマウスマクロファージ様細胞株(RAW264)に処理し、ウェスタンブロット法よりシクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)のタンパク質発現量を解析した。その結果、RW および GJ 試料の処理により COX-2 発現量が顕著に減少した。また、各試料において DPPH 法によって求めたラジカル捕捉活性とフォリンチオカルト法を用いて求めたポリフェノール量は、いずれも COX-2 発現抑制活性と高い相関を示した。次に、最も強い抗炎症活性が確認された GJ 試料を、HPLC を用いて溶出時間 5 分ごとに分画し、各画分における COX-2 発現抑制活性を比較した。その結果、フラボノイドやアントシアニンのピークが複数見られた画分に顕著な抑制活性が認められた。以上の結果より、ブドウ飲料に含まれるポリフェノールは顕著な抗炎症活性を有することが示された。現在、LC-MS/MS 分析により各試料に含まれるポリフェノールの同定を試みており、活性との関連性について解析中である。

**B-3 糖尿病モデルマウスにおける酒粕機能成分の糖尿病予防効果と作用機構の検討**  
○奥田真友美, 日下部咲月, 柴田紗知, 飯島遼平<sup>1,2</sup>, 伊豆英恵<sup>1</sup>, 藤井 力<sup>1,2</sup>,  
松原主典 (広島大院・教育,<sup>1</sup>酒総研,<sup>2</sup>広島大院・生物圏)

【目的】近年健康機能が注目されている発酵食品の一つである酒粕は様々な食品機能成分を含んでいる。S-アデノシルメチオニン (SAM) 及びグリセロホスホコリン (GPC) は酒粕に含まれている機能成分であり、脳機能保護効果など多彩な生理機能が示されている。我々は、SAM 及び GPC の糖尿病モデルマウスにおける予防効果の可能性とその作用機構について検討を進めている。

【方法・結果】糖尿病モデルマウス (KKA<sub>y</sub>, オス) に、飲料として水 (対照), SAM 溶液 (0.1 mg/mL), GPC 溶液 (0.07 mg/mL), SAM+GPC 溶液を 6 週齢から 10 週間与え、飼料は AIN-76 飼料を与えた。16 週齢で解剖を行い、血液生化学検査や定量 RT-PCR により評価・検討した。餌の摂食量と体重については各群間に差はみられなかったが、摂水量については SAM や GPC の摂取により減少傾向がみられた。SAM や GPC の摂取により高血糖が改善され、両方の摂取により改善効果が高まる傾向がみられた。また、食欲・代謝調節ホルモンであるレプチンや血糖値調節を行うインスリンも、SAM や GPC の摂取により減少していた。関連する遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法で検討した結果、糖代謝に関与する遺伝子 *irs2* の発現量は SAM 及び GPC の摂取で高かった。また、SAM 代謝に関与する遺伝子 *gnmt* についても変化が見られたが、抗酸化系の酵素に変化は認められなかった。以上の結果から、SAM や GPC の摂取により、肝臓での糖代謝機能の維持がもたらされることが示唆された。なお、本研究は SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施された。

**B-4 タイ科魚類に潜在する甲殻類アレルギーリスク**  
○新井健太, 西尾郁也, 安本信哉<sup>1</sup>, 近藤昌和<sup>1</sup>, 宮崎泰幸, 前田俊道, 臼井将勝  
(水大校・食品科学,<sup>1</sup>水大校・生物生産)

【目的】本研究は、未知の甲殻類アレルゲンの存在を明らかにすることで甲殻類アレルギー患者が偶然または予想できない状況でアレルゲンを摂取してしまうことを未然に防ぐことを目的としている。エビアレルギーの主要アレルゲンであるトロポミオシンは、甲殻類において広範囲に共通するアレルゲンとして報告されている。そこで、今回はタイ科魚類に寄生しているウオノエ科の甲殻類タイノエも同様のトロポミオシンを有していると予想し、そのリスク評価を行った。

【方法】タイノエの誤食が想定される調理法のあら汁をモデルに実験を行った。同調理は魚の頭部と背骨を分取し、重量比で 2.5 倍量の 1%食塩水を加えて 80°C で 5 分間加熱して行った。寄生状態・タイノエ除去後・寄生なしの 3 種のタイを調理し、筋肉・煮汁およびタイノエ虫体をサンプルとして得た。リスク評価は、ドットプロットと甲殻類トロポミオシン定量 ELISA によって行った。

【結果】ドットプロット解析の結果、タイノエ虫体抽出液と寄生マダイ煮汁において、エビ陽性患者血清および抗エビトロポミオシン Polyclonal IgG との交叉反応が確認された。甲殻類トロポミオシン濃度は、タイノエ虫体で 39,116.0±24,082.8 ppm, 寄生マダイ煮汁で 62.5±22.9 ppm であり、いずれも加工食品においてアレルギー表示が必要な濃度を上回っていた。以上の結果より、ウオノエ科甲殻類であるタイノエはエビ陽性患者のアレルギーリスク因子であり、そのリスクは調理品において残存および拡散することが強く示唆された。

**B-5**      **ダイゼイン代謝物であるエコールは視床下部での Urocortin mRNA の上昇を引き起こすことでメスラットの飼料摂取量を低下させる**  
○小林拓広, 阿部恭大, 岸田太郎 (愛媛大・農)

【目的】大豆イソフラボン的一种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、雌特異的な食欲抑制効果を示す。過去の実験では血中エコール濃度と飼料摂取量で負の相関が見られている。しかしこの際、食欲を制御している視床下部の遺伝子発現の有意な変化が観察されているが実験ごとに動く因子が異なり一貫性がなく、飼料摂取量との関係も明確にされていない。そこで、視床下部の食欲関連遺伝子と飼料摂取量の2つの要因に着目し、各群の相関性を比較することでダイゼインの効果による遺伝子の本質的な動きが捉えられると考え実験を行った。【方法・結果】6週齢SD系雌ラットに卵巣摘出(OVX)を行い、3食制に順化させた。コントロール飼料を与えるC群、ダイゼインを混餌させるD150群(150 mg/kg 飼料)、D300群(300 mg/kg 飼料)各n=8に分けて2週間飼育した。解剖は飼料摂取量の減少が最も大きい2食目の食前に行った。結果は、飼料摂取量でD300群において有意に減少した。視床下部の分析では食欲抑制因子であるUrocortin mRNAがD300群で上昇傾向があった。飼料摂取量と血中エコール濃度、Urocortin mRNAで相関をとると、飼料摂取量に対して血中エコール濃度とUrocortin mRNAで負の相関が見られ、血中エコール濃度とUrocortin mRNAの2つの因子は正の相関が見られた。以上のことから、ダイゼインの雌特異的な食欲抑制効果にはエコールによるUrocortin mRNAの上昇が関与することが示唆された。

**B-6**      **スケトウダラタンパク質摂取はメスラットにおいても骨格筋重量を増加させる**  
○宇都宮さち, 澤井真梨子, 原由真, 内田健志<sup>1</sup>, 速水耕介<sup>2</sup>, 岸田太郎  
(愛媛大・農, <sup>1</sup>日本水産(株), <sup>2</sup>横浜薬大・薬科)

【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。これまでにオスラットにおいてAPPは摂取2日でカゼイン摂取と比較して腓腹筋重量の増加してきた。本研究では、APPの筋量増量作用について、雌ラットと卵巣摘出雌ラットを用いて性差や閉経の影響を検討する。

【方法・結果】

実験1:6週齢,SD系の雌ラットにAIN-93G組成に基づくタンパク質源がカゼイン(Cas)およびAPPの飼料を2日間または7日間与え飼育した。実験2:6週齢SD系雌ラットに卵巣摘出(OVX)を行い、AIN-93G組成に基づくタンパク質源がCasおよびAPPの飼料を2日間または7日間与え飼育した。

飼料の脂肪含有量や卵巣の有無に関わらずAPP摂取7日で腓腹筋重量が増加した。このことから、オスより効果は弱いメスでもAPPの摂取は筋重量を増加させ、この作用にエストロゲンは関与しないことが示唆された。

**B-7 3食制条件下におけるビートファイバーの摂取エネルギー低下効果について  
—食餌性肥満度の違いによる解析—  
○藤原啓士郎, 宗像 嶺, 岸田太郎 (愛媛大・農)**

【目的】これまで我々は、ビートファイバー (BF) をラットに摂取させると摂取エネルギーが低下し、体脂肪の蓄積が抑制されることを見出した。この際、視床下部のレプチンレセプター (Ob-Rb) 遺伝子発現の増加が見られた。このことから BF 摂取による摂取エネルギー低下効果は Ob-Rb の増加が関与していることが示唆された。ラットの自由摂食下での飼育では、ラット個体ごとに摂食のタイミングが異なる。そこで、本研究ではラットに一定時間・時刻に飼料を与える食制実験に取り組んだ。ラットの摂食のタイミングを揃えその前後に解剖することで、より明確にラットの BF 摂取による影響を捉えることができるのではないかと考え試みた。BF の摂取エネルギー低下効果と食餌性肥満度の関連性についても比較検討した。

【方法・結果】4週齢 SD 系雄ラットを搬入後、1週間環境に順化させ、HF 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。飼料は毎日暗期開始 30 分後、5.5 時間後、10.5 時間後に 30 分間計 3 回与えた。これまでの実験で、BF 摂取により摂取エネルギーが顕著に減少していた 2 食目の食前食後に解剖を行った。さらに飼育期間中の体重増加量をもとに体重増加量の大きい上位 2/3 を肥満傾向性ラット (DIO ラット)、下位 2/3 を肥満抵抗性ラット (DR ラット) と細分化し、データ解析を行った。摂取エネルギー低下作用は肥満傾向性ラットにおいて顕著に確認された。Ob-Rb 遺伝子発現に関しては現在測定中である。

**B-8 愛媛県東温市住民の血清中リグナン濃度調査—リグナン供給源および健康影響の探索—  
○冠野由依<sup>1</sup>, 河村夏美<sup>1</sup>, 三宅志歩<sup>1</sup>, 福田真子<sup>1</sup>, 松木 翠<sup>1</sup>,  
齊藤 功<sup>2</sup>, 谷川 武<sup>3</sup>, 丸山広達<sup>3</sup>, 江口依里<sup>4</sup>, 山内 聡<sup>1</sup>, 西脇 寿<sup>1</sup>,  
岸田太郎<sup>1</sup> (<sup>1</sup>愛媛大・農, <sup>2</sup>愛媛大・医, <sup>3</sup>順天堂大・医, <sup>4</sup>岡山大・医)**

【目的】植物ポリフェノールであるリグナンは、広範な食品に存在しており、哺乳動物の腸内細菌によりエンテロリグナンに代謝される。日本ではヒトの血清中リグナン濃度調査の報告例は少ない。そこで本研究では、愛媛県東温市にて実施している疫学調査：東温スタディの参加者 1577 名の保存血清を用いて、血清中リグナン濃度 (Secoisolariciresinol (SECO), Matairesinol (MAT), Enterodiol, Enterolactone (ENL)) を測定し、リグナンの供給源および健康影響への探索を行った。

【方法】東温スタディの参加者全員に対して、身体測定・血液検査、食物摂取頻度調査 FFQg による食事調査を行った。血清中リグナン濃度は酵素による脱抱合、固相抽出 (C18)、蒸発乾固、メタノール抽出の後、UPLC - TOF - MS によって定量した。

【結果】血清中に最も高濃度に存在したのは、食事性リグナンでは SECO、エンテロリグナンでは ENL であった。血清 SECO・ENL 濃度が高くなるほど、緑黄色野菜・果実類・種実類の摂取量は有意に高く、主なリグナン供給源であることが示唆された。また、血清 ENL 濃度が高くなるほど、血清中性脂肪値は有意に低くなり、さらに男性肥満者においては肝臓機能指標が低くなった。一方で、血清 MAT 濃度が高くなるほど、血清 LDL コレステロール値は有意に低くなった。

## B-9 コリアンダー (*Coriandrum sativum* L.) 種子水溶性抽出物の免疫賦活活性に関する研究

○石田萌子<sup>1</sup>, 國廣菜波<sup>1</sup>, 西 甲介<sup>1,2</sup>, 恩田浩幸<sup>3</sup>, 西本壮吾<sup>4</sup>, 菅原卓也<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>愛媛大院・農, <sup>2</sup>愛媛大院・食健セ, <sup>3</sup>エスビー食品(株), <sup>4</sup>石川県大)

【目的】 コリアンダー (*Coriandrum sativum* L.) 種子には、抗酸化作用や抗菌作用などの多様な保健機能成分が含まれていることが報告されている。本研究では、コリアンダー種子成分の新規保健機能として、マクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、およびマウス腹腔内マクロファージ (P-Mac) に対するコリアンダー種子水溶性抽出物 (CAE) 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】 CAE 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、RAW264.7 細胞、および P-Mac のいずれにおいても、両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、CAE はサイトカイン遺伝子の転写活性を上方制御することで、サイトカイン産生を促進することが示唆された。さらに、CAE は RAW264.7 細胞の一酸化窒素産生、および貪食活性を有意に促進した。CAE がマクロファージを活性化作用機序を検討したところ、CAE は MAPK ファミリーのリン酸化、および NF- $\kappa$ B の核内移行を上方制御することが明らかになった。また、CAE による MAPK、および NF- $\kappa$ B カスケードの活性化は、Toll 様受容体 4 (TLR4) の活性化シグナル伝達経路によるものであることが強く示唆された。これらの結果から、コリアンダー種子には TLR4 を介した MAPK、および NF- $\kappa$ B カスケードを刺激することでマクロファージを活性化し、水溶性物質が含まれていることが明らかになった。

## B-10 パッションフルーツ種子エタノール抽出物の IgE 産生抑制効果に関する研究

○水崎 愛<sup>1</sup>, 西 甲介<sup>1,2</sup>, 玉元武司<sup>3</sup>, 菅原卓也<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>愛媛大院・農, <sup>2</sup>愛媛大院・食健セ, <sup>3</sup>オキナワ宮古市場)

【目的】 パッションフルーツの葉、果実、果皮および種子中には、多様な生理活性成分が含まれている。しかし、抗アレルギー効果、特に IgE 産生抑制効果に関してはほとんど報告例がない。そこで、ジュースなどへの加工の際に廃棄される種子の機能性食品素材としての応用を目的として、種子エタノール抽出物 (PFS) の IgE 産生に与える影響を検討した。

【方法・結果】 IgE 産生細胞株であるヒト骨髄腫細胞株 U266 細胞およびマウス初代脾臓細胞を用いた。U266 細胞は、成長因子を加えた RPMI 1640 培地、マウス初代脾臓細胞は、5% FBS-RPMI 1640 培地に PFS を添加し、培養した。培養後、培地中に分泌された IgE 量を酵素抗体法、細胞毒性をトリパンブルー色素排除法、IgE 遺伝子発現は Real-time RT-PCR を用いて評価した。その結果、PFS の添加によって、細胞毒性なく濃度依存的に IgE 産生量が減少した。その際、IgE の mRNA 発現が下方制御されたことから、PFS は IgE 遺伝子の転写を阻害することで IgE 産生抑制効果を示すことが明らかになった。さらに、液体クロマトグラフィーを用いた分析により、PFS 中にはレスベラトロールとピセアタンノールが含まれていることが確認され、これらの成分に IgE 産生抑制効果があることを確認した。また、マウスへの経口投与による生体内における IgE 産生抑制効果を検討したところ、PFS 投与群では脾臓リンパ球の IgE 産生の抑制傾向が、レスベラトロールおよびピセアタンノール投与群では IgE 産生が有意に抑制された。これらのことから、PFS の IgE 産生抑制活性にはこれらのポリフェノール類の関与が示唆された。

**B-11 温州ミカン果皮水溶性抽出物の抗アレルギー効果に関する研究**  
○中田晶大<sup>1</sup>, 西 甲介<sup>1,2</sup>, 門田 歩<sup>3</sup>, 菅原卓也<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>愛媛大院・農, <sup>2</sup>愛媛大院・食健セ, <sup>3</sup>伊方サービス(株))

【目的】 温州ミカンは、日本で最も収穫量の多い果実であるが、摘果された未熟果や、搾汁残渣として排出される果皮の多くは廃棄されている。しかし近年、柑橘の果皮に多く含まれるノビレチンやβクリプトキサンチンなどの様々な成分の保健機能が注目されている。本研究では、温州ミカン果皮の抗アレルギー効果に着目し、成熟した温州ミカンの果皮および摘果青ミカンに含まれる水溶性成分の抗アレルギー効果を明らかにし、未利用資源の利用価値を高めることを目的とした。

【方法・結果】 温州ミカン果皮凍結乾燥粉末および摘果青ミカン乾燥粉末をリン酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、成分を抽出した。抗アレルギー効果の評価には、ラット好塩基球由来細胞株である RBL-2H3 細胞を用いた。RBL-2H3 細胞を抗 DNP-IgE で感作した後、抽出物を培地に添加し、さらに DNP-HSA で抗原刺激することで脱顆粒を誘導し、顆粒内に含まれる β-Hexosaminidase の放出率を指標として評価した。その結果、温州ミカン果皮および摘果青ミカンの水溶性抽出物はいずれも RBL-2H3 細胞の脱顆粒を抑制した。また、抽出物の透析処理により、活性物質の少なくとも 1 つは分子量 14,000 以上であることが明らかとなった。このとき透析処理した抽出物は細胞毒性を示さず、また、細胞表面上における抗原抗体反応を阻害しなかった。BALB/c マウスに 7 日間抽出物を経口投与した後、耳介において受動皮膚アナフィラキシー反応を誘導したところ、抽出物の摂取で顕著な抑制が認められ、生体内においても I 型アレルギー反応を緩和することが明らかになった。

**B-12 黒酢のスギ花粉症症状緩和効果に関する研究**  
○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(愛媛大院・農, <sup>1</sup>坂元醸造(株))

【目的】 これまでに、マスト細胞に対する黒酢の脱顆粒抑制作用による抗アレルギー効果について検討を行ってきた。本研究では、生体内における黒酢の脱顆粒抑制効果およびスギ花粉症モデルマウスに対する症状緩和効果について検討した。

【方法・結果】 凍結乾燥を繰り返すことで、酢酸を含まない 10 倍濃縮黒酢を調製した。遠心分離による不溶物の除去後、pH を 7.4 に調整し、実験に用いた。生体内における黒酢の脱顆粒抑制効果については、受動皮膚アナフィラキシー (PCA) モデルマウスを用いて検討した。7 週齢のメス BALB/c マウスの耳介に IgE を皮内投与し、23 時間後に黒酢 (6 mg または 60 mg タンパク質/kg 体重) を経口投与した。さらにその 1 時間後、抗原とエバンスブルー色素を尾静脈注射して PCA 反応を惹起した。その結果、黒酢投与によって血管透過性の低下による耳介における色素の浸潤が抑制され、生体内における脱顆粒抑制効果が確認された。また、スギ花粉症モデルマウスに対する黒酢の経口投与の効果を検討した。5 週齢のメス BALB/c マウスの鼻腔内へのスギ花粉抗原 Cry j1 による刺激を繰り返すことで、スギ花粉症を誘導した。最後の抗原刺激の 1 週間前から毎日、黒酢 (6 mg または 60 mg タンパク質/kg 体重) を経口投与した。その結果、くしゃみの回数および血中 IgE 濃度が、対照群に比べ、黒酢の経口投与群では有意に低下し、黒酢のスギ花粉症に対する症状緩和効果が確認された。また、血中 IL-12 濃度が有意に促進されたことから、Th1/Th2 細胞バランスの改善が示唆された。

- C — 1 Bio-activities of Cardanol isolated from *Anacardium occidentale* (Cashew nut) shell liquid against *Tribolium castaneum* Hebst (Coleoptera: Tenebrionidae)  
O Thomas Buxton, Shiori Takahashi, Ebenezer Owusu<sup>1</sup>, Chul-Sa Kim  
(Kochi Univ., <sup>1</sup>Univ. Ghana)

**Objective:** *Tribolium castaneum* Hebst is one of the serious pests of stored grains in the world. Several types of plant materials have been used to control this pest in West Africa including Ghana. As cashew nut shell liquid (CNSL) was found to show insecticidal and progeny growth and development inhibition activities against this insect, this study was done to isolate and determine the active compounds from it.

**Method and result:** A bioassay guided approach was used for the isolation of the active compounds from CNSL. Three major derivatives of cardanol were isolated from CNSL and of the three, the most bioactive compound was identified by Carbon-13 and Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy to be 3-(8Z, 11Z)-pentadeca-, 8,11,14-trienylphenol. It yielded a percentage survival of 20% against adult *T. castaneum* in the insecticidal bioassay. For the progeny growth and development inhibition bioassay, 46.7% of larvae were recorded dead and 20.7% adults without deformities emerged for the 3-(8Z, 11Z)-pentadeca-, 8,11,14-trienylphenol treatment after the six week period of studies. On the other hand the control recorded no larval mortality and 100.0% of adult without deformities emerged. The amount of isolated cardanol in the extracted CNSL was found to be 420.0 mg/mL with LC<sub>50</sub> value of 48.98 mg/mL against adult *T. castaneum*.

- C — 2 Antituberculosis Potential of Five Plants from Indonesia against *Mycobacterium smegmatis* JCM 6386T  
O Desmila Idola<sup>1</sup>, Tsubasa Niki, Zhi-hui Zhan, Hisashi Muramatsu, Shinji Nagata, I Made Artika<sup>1</sup>, Wien Kusharyoto<sup>1</sup>, Chul-Sa Kim  
(Kochi Univ., Bogor Agri. Univ.<sup>1</sup>)

**Object** This study aimed at obtaining antituberculosis compounds from Indonesian medical plants.

**Method and result** The effects of the methanol extract of tuber of lempuyang (*Zingiber aromaticum*), fruit of buah makasar (*Brucea javanica*), leaves of tabat barito (*Ficus deltoidea*), leaves of srigunggu (*Clerodendrum serratum*), leaves and stems of sidaguri (*Sida rhombifolia*) obtained from Jogjakarta, Indonesia, on the antituberculosis were tested against *Mycobacterium smegmatis* JCM 6386<sup>T</sup>. The growth inhibition of extracts of *Z. aromaticum*, *B. javanica*, *F. deltoidea*, *C. serratum* and *S. rhombifolia* are 84.0%, 54.3%, 48.0%, 57.1%, 59.7% in 20 mg of the extract eq./mL, respectively. As the extract of tuber of *Z. aromaticum* showed the highest growth inhibition among these extracts, bioassay guidance separation was conducted. As a result of separation by using HPLC, analysis of GC-MS and NMR, (2E,6E,10E)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one (zerumbone) was isolated and identified as an antituberculosis active compound. The IC<sub>50</sub> value of zerumbone was 38.5 µg/mL.

C-3 ガーナ産 *Zanthoxylum xanthoxyloides* の根に含まれるコクゾウムシに対する殺虫成分  
○高倉眞子, トーマス・ブックストン, 高橋詩織, 庭田一平, オウス・エベネンザ<sup>1</sup>, 金 哲史 (高知大・農, <sup>1</sup>ガーナ大)

【目的】コクゾウムシ (*Sitophilus zeamais*) は日本のみならず, アフリカ大陸を含む世界中に生息しており, イネ科穀物の貯穀害虫として広く知られている。本研究では, ガーナの一部の地域で古くから *Zanthoxylum xanthoxyloides* の根が本種の防除に用いられてきたことから, 本種の防除効果を検討するとともに, その活性成分の単離・同定を試みた。

【方法・結果】乾燥した *Z. xanthoxyloides* の根 100 g 相当量を MeOH で抽出・濃縮し MeOH で 2 g 乾燥重量相当量/mL に調整したものをサンプルとした。このサンプルにコクゾウムシを 3 秒間浸け, 24 時間おきに生存数を数えた。強い殺虫成分を示した MeOH 抽出物を水層, Ether 層, AcOEt 層に分配し生物試験を行った結果, Ether 層のみに強い活性が認められた。更にこの層をシリカゲル中圧カラムにチャージし, 極性を変化させながら分画したところ, 30% AcOEt/Hexane 画分に元の Ether 層と同様の強い活性が認められた。次いで, この画分を HPLC 分析に供したところ, 単一ピークに活性が認められたため, LC-MS 及び NMR を用いて構造解析を行った。その結果, 活性成分の構造は (2*E*,4*E*)-*N*-isobutyl-2,4-decadieneamide であると同定した。

C-4 オガタマに含まれるミカドアゲハの摂食刺激物質の探求  
○中安有朔, 義本裕介, 庭田一平, 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。当研究室では, 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ており, 現在までに水層から Secrose と Chlorogenic acid , 7-*O*-Methylkaempferol 3-*neohesperidoside* の 3 つの化合物を同定した。今回, ヘキサン層の活性について検討を行った。

【方法・結果】オガタマの葉の MeOH 粗抽出物を水層とヘキサン層に分画し, ヘキサン層を ODS 中圧カラムにより 60%MeOH/H<sub>2</sub>O 画分, 80%MeOH/H<sub>2</sub>O 画分, MeOH 画分に分画したところ, 60%と MeOH 画分を合一した場合にのみ, ヘキサン層に相当する活性が回復した。更なる分画・精製により 60% MeOH/H<sub>2</sub>O 画分からは, Echinacoside と Rhamnetin 3-*O*-β-*neohesperidoside*, 11,13-Dehydrolauginolide の 3 成分を, MeOH 画分から 1 つの化合物 (Fr 2) を活性成分として新たに単離した。先に水層から単離された 3 つの化合物とともに 7 成分を合一すると, 粗 MeOH 抽出物に相当する活性が認められた。現在, Fr2 の構造解析中である。

C-5 不飽和結合を有する置換基を導入したイミダクロプリド類縁体の受容体親和性と殺虫活性

○釘屋敦基, 福島菜央, 城埜歩美<sup>1</sup>, 山内 聡<sup>1</sup>, 西脇 寿<sup>1</sup>  
(愛媛大・農,<sup>1</sup>愛媛大院・農)

【目的】 ネオニコチノイド系殺虫剤であるイミダクロプリドのイミダゾリジン環エチレン部位の構造活性相関を解析するために、これまでに4位または5位に様々な置換基を有する化合物を合成し、その殺虫活性および受容体親和性を評価してきた。さらに、合成した類縁体とモデル受容体との *in silico* ドッキングスタディを試み、その結果から、受容体にはイミダゾリジン環の5位の置換基と相互作用し得る領域が存在しており、その領域は芳香族アミノ酸残基から構成されていることが示唆されている。本研究では、この領域を構成するアミノ酸残基とイミダゾリジン環上の置換基との相互作用を明らかにするために、不飽和結合を有する置換基を導入した類縁体を不斉合成し、それらの生物活性を評価した。

【方法・結果】 L-Serine から (S)-Garner's aldehyde を調製し、Wittig 反応により不飽和結合を有する化合物へと変換した。次に、酸による脱保護を行うことで各種アミノアルコールを調製した後、既報の方法[1]に従って vinyl 基などの置換基を有するイミダクロプリド類縁体を合成した。そして、得られた類縁体をイエバエ (*Musca domestica*) メス成虫に注射投与することで 50%効果薬量 (ED<sub>50</sub>, pmol/fly) を算出し、殺虫活性の指標とした。Vinyl 類縁体の殺虫活性は、共力剤未処理の時には、無置換体のものより弱かったものの、共力剤として piperonyl butoxide および NIA16388 を処理した時には大きく上昇し、共力剤の高い効果が確認できた。

[1] Nagaoka *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 2015

C-6 ジメチル化されたイミダゾリジン環を有するイミダクロプリド類縁体の殺虫活性

○城埜歩美, 長岡ひかる, 山内 聡, 西脇 寿 (愛媛大院・農)

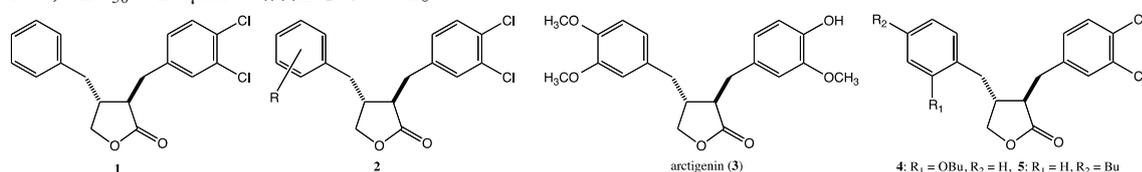
【目的】 イミダクロプリド (IMI) はニコチン性アセチルコリン受容体に作用するネオニコチノイド系殺虫剤の1つである。IMI が昆虫体内においてうける代謝分解経路の1つに、イミダゾリジン環エチレン部位の酸化的代謝があり、水酸化された IMI は昆虫体外に排出されることが示唆されている。このエチレン部位の酸化的代謝を阻害する効果を狙って、この部位を不斉メチル化した類縁化合物をこれまでに合成してきた。それらの殺虫活性を比較したところ、メチル化されている位置の違いで代謝を受ける効果が異なることが示唆された。本研究では、4位および5位の両方に不斉メチル基を導入したジメチル IMI 類縁体を合成し、それらの殺虫活性を比較することによって、この置換基修飾が殺虫活性ならびに代謝分解過程に与える影響を明らかにすることを試みた。

【方法・結果】 2,3-Butanediol を出発原料として、イミダゾリジン環がジメチル化された IMI 類縁体をラセミ混合物として合成した。得られたラセミ混合物から OD-H カラムを用いた HPLC によって光学純度の高いジメチル IMI 類縁体を精製した。これら類縁体の殺虫活性をイエバエ (*Musca domestica*) メス成虫に注射投与することにより測定した。さらに、共力剤として piperonyl butoxide (PBO) および propargyl propyl phenylphosphonate (NIA16388) を用いて殺虫活性を測定し、共力効果を調べた。その結果、ジメチル化された IMI 類縁体は、モノメチル化された IMI 類縁体と比べて殺虫活性が低下した。また、置換位置によりそれぞれ PBO, NIA16388 による共力効果に違いが認められた。

C-7 ジクロロベンジル基を有するブチロラクトン型リグナン類の細胞毒性活性  
○越智吉明, 庄司有璃子, 西脇 寿, 西 甲介, 菅原卓也, 山内 聡  
(愛媛大院・農)

【目的】これまで、 $\beta$ 位を無置換のベンジル基に固定して、 $\alpha$ 位に様々なベンジル基を有するブチロラクトン型リグナンを合成し、ベンゼン環上の構造が細胞毒性に与える影響を調べてきた。その結果、3,4-ジクロロベンジル基を有する誘導体 **1** が HL-60 細胞に対して最も高い活性 ( $EC_{50} = 19 \mu M$ ) を示したため、本実験では、 $\alpha$ 位を 3,4-ジクロロベンジル基に固定し、 $\beta$ 位にさまざまなベンジル基を有する化合物 **2** を合成して構造と活性との関係を明らかにする事を目的とした。また、その結果を、高い細胞毒性活性を有する事が知られている天然のブチロラクトン型リグナンである arctigenin (**3**) と比較した。

【方法・結果】L-グルタミン酸の立体を利用して誘導体を合成し、HL-60 細胞に対する活性を調べたところ、ベンゼン環上の置換基の性質が **3** と異なる誘導体 **4** ( $EC_{50} = 10 \mu M$ ) 及び **5** ( $EC_{50} = 9.4 \mu M$ ) が **3** ( $EC_{50} = 12 \mu M$ ) とほぼ同程度活性を示した。また、HeLa 細胞に対しては、**3** は活性を示さなかったが、**4** は、 $EC_{50} = 27 \mu M$  の活性を示した。



C-8 ゴマにおける anthrasesamone 類の生合成：推定中間体 MPAQ について  
佐藤龍太, ○古本敏夫 (香川大・農)

【目的】ゴマは、薬用植物ムラサキの根（紫根）において生産されているナフトキノ系化合物のシコニン類と構造が類似しているアントラキノ系化合物の anthrasesamone 類を生産している。Anthrasesamone 類の生合成経路において、MPAQ [2-(4-methylpent-3-en-1-yl)anthraquinone] が共通の生合成中間体であることが化学構造の比較などから類推されてきたが、これまで実験的な証拠は得られていない。そこで、本研究では MPAQ の anthrasesamone 類生合成中間体としての可能性を検討するため、安定同位体標識 MPAQ の合成、およびゴマ培養根を用いた標識 MPAQ の投与実験（anthrasesamone 類への代謝変換）を行った。

【方法・結果】重水素化ナフタレンから3ステップの反応により、アントラキノ環の5～8位が重水素化された<sup>2</sup>H<sub>4</sub>MPAQ を調製した。合成した標識 MPAQ をゴマ毛状根培養に投与し、培養物から anthrasesamone 類を分離・精製した後、<sup>1</sup>H-NMR 測定により代謝変換の有無および変換率を調べた。投与実験の結果、MPAQ は側鎖が脱水素化されたジエン誘導体である (Z)-MPDEAQ に変換されていることが示された。一方、anthrasesamone B などのアントラキノ環が酸化された anthrasesamone 類への有意な変換が確認されなかったことから、MPAQ のヒドロキノン体 (MPAHQ) や未同定の三環性化合物などが生合成中間体として存在している可能性が示唆された。

### C-9 オリーブ葉二次代謝産物 oleuropein aglycon を reduced oleuropein aglycon へと変換する *Saccharomyces cerevisiae* 由来酵素の探索

○巻尾沙織, 森 吉弘, 仁戸田照彦, 守屋央朗<sup>1</sup>, 神崎 浩  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup> 岡山大・異分野コア)

【目的】我々は、パン酵母を用いた微生物変換によって oleuropein aglycon (1)がより高い抗酸化活性を有する新規化合物の reduced oleuropein aglycon (2)へと変換されることを見出し、この反応を触媒する酵素を明らかにするための検討を行ってきた。化合物 2 は化合物 1 のアルデヒド基がヒドロキシメチル基に還元された化合物であることから、数種のアルデヒド還元酵素を候補に検討したところ、ADH6 等の複数の酵素の関与が示唆された<sup>1)</sup>。本研究では *Saccharomyces genome database* を参考に *Saccharomyces cerevisiae* 由来のアルコールをアルデヒドへと変換しうる全ての遺伝子群を候補遺伝子として検討した。

【方法・結果】多コピー性プラスミド pTOW を利用して、*S. cerevisiae* BY4741 にそれぞれの候補遺伝子を高発現させた目的酵素高発現株を用いて、同じ菌体量で変換反応を行ない、化合物 1 と化合物 2 を HPLC で分離定量することにより、変換活性評価を行った。その結果、ADH6, ARI1, AAD4 の 3 種の酵素高発現株はコントロール株の 3 倍以上という特に高い変換活性を示した。このことから、この変換反応には複数の酵素が関与していることが改めて示唆された。*S. cerevisiae* 由来 ADH6 と ARI1 は長鎖アルコールや芳香族アルコールなどの比較的大きなアルコールをアルデヒドへと還元する活性を示すことが報告されている一方で、*S. cerevisiae* 由来 AAD4 の機能は相同性解析による知見のみであった。本研究によって AAD4 がアルコールからアルデヒドへの還元反応を行うことがタンパク質レベルで初めて示された。

1) 森, 仁戸田, 守屋, 神崎, 日本農芸化学会中四国支部第 41 回講演会要旨集, p.51 (2015)

### C-10 オリーブ葉二次代謝産物 oleuropein aglycon 及びその微生物変換により生成する reduced oleuropein aglycon の詳細構造解析

古賀まり子, ○栗原小蒔<sup>1</sup>, 徐 恵美<sup>2</sup>, 菊地敬一<sup>2</sup>, 仁戸田照彦, 神崎 浩  
(岡山大院・環境生命,<sup>1</sup> 岡山大・農,<sup>2</sup> 日本オリーブ(株))

【目的】我々はこれまでにオリーブ葉抽出物中に含まれる oleuropein aglycon (1)のアルデヒド基がパン酵母により還元され、reduced oleuropein aglycon (2) が生成することを見だし、その化粧品素材としての有効利用を検討してきた。化合物 1 と 2 はキラル化合物であるが、その立体化学についてはまだ明らかにしていなかった。そこで、化合物 1 と 2 の立体配置を含む構造の詳細検討を行った。

【方法・結果】分取 ODS-HPLC を用いて、オリーブ葉抽出物から化合物 1 を、抽出物のパン酵母変換生成物から化合物 2 を精製し、機器分析に供した。オリーブオイル中には、(5*S*,8*R*,9*S*), (5*S*,8*S*,9*S*), (5*S*,8*R*,9*R*) の立体配置を有す 3 種の化合物 1 の立体異性体が存在し、主成分は (5*S*,8*R*,9*S*) であることが合成品との比較から報告されていた。今回我々が精製した化合物 1 の各種 NMR データを詳細に検討し、全てのプロトンシグナルを矛盾無く oleuropein aglycon の構造上のプロトンに全て帰属した後で、論文データと比較したところ、その化学シフト値およびカップリング定数が (5*S*,8*R*,9*S*) の報告値と一致し、残り二つの立体異性体の値と一致しなかったことから、我々の精製した化合物 1 は (5*S*,8*R*,9*S*) の立体構造を有することが明らかとなった。次に化合物 2 についても各種 NMR データの解析から全てのプロトンシグナルを帰属できた。次に、NOE 関連の測定結果から、H-6, H-9, H-10 が secoiridod 構造の環平面に対して同じ側に位置することが強く示唆されたこと、酵素変換により化合物の 3 カ所の立体配置が全て反転することは考えにくいことから、化合物 2 も (5*S*,8*R*,9*S*) の立体配置を保持していることが分かった。

C-11  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase 阻害物質 pochonicine およびその類縁体の構造活性  
相関：6位と7位の水酸基の寄与

○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>東大院・理)

【目的】当研究室ではキチン分解関連酵素  $\beta$ -N-acetylglucosaminidase (GlcNAcase) の阻害物質である pochonicine を糸状菌 *Pochonia suchlasporia* の培養物中に見出している。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わかっている。本研究では pochonicine およびその類縁体の各種 GlcNAcase に対する阻害活性を調べることで, pochonicine の複数の水酸基のうち, 阻害活性に寄与する水酸基についての知見を得ることを目的とした。【方法・結果】すでに確立された pochonicine 精製手順に従い, ハスモンヨトウ蛹 GlcNAcase に対する阻害活性およびアセチル化物の GC-MS 分析における特徴的なフラグメンテーションを指標として *P. suchlasporia* 培養物の MeOH 抽出物より精製を行った。最終的に pochonicine およびその類縁体 A, B, D, E を単離し, これらの類縁体のうち, 6-deoxypochonicine の構造を有する類縁体 B, 6,7-dideoxypochonicine の構造を有する類縁体 D の各種 GlcNAcase に対する阻害活性を測定した。その結果, 類縁体 B は pochonicine の数百分の一から数千分の一の活性で, pochonicine の6位の水酸基が活性に寄与していることが示唆された。また類縁体 D は類縁体 B のさらに数分の一から数十分の一の活性だったため, pochonicine の7位の水酸基も活性に寄与していることがわかり, 加えて6位の水酸基の方が7位の水酸基よりも活性への寄与が大きいことが示唆された。阻害活性に対する6位および7位の水酸基それぞれの寄与についてさらなる考察を行うため, 7-deoxypochonicine の構造を有する類縁体 A の阻害活性についても評価する予定である。

C-12 キカラスウリ (*Trichosanthes kirilowii*) 塊根 (中薬名: 栝楼根) に含まれる抗高血  
圧成分の単離と合成 ○羽賀真優, 陳 新陽, 井川千鶴, 大塚祐季, 市田彩香,

野村 凜, 矢野由佳, 庭田一平, 柏木丈拵, 島村智子, 陳 暁輝<sup>1</sup>, 金 哲史  
(高知大・農, <sup>1</sup>瀋陽薬大)

【目的】キカラスウリ (*Trichosanthes kirilowii*) の塊根は栝楼根という生薬で解熱, 止渴, 消腫などの作用があり, 塊根からとれる澱粉は古くから天花粉の原料として用いられてきた。我々は, *T. kirilowii* の塊根の EtOH 抽出物が非常に強いアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害活性を示すことを見出した。そこで本研究では, 本種に含まれる ACE 阻害活性物質の単離と同定を試みた。

【方法・結果】ACE 阻害活性測定は同仁化学研究所製 ACE Kit-WST を用い, プロトコルに従って行った。瀋陽薬科大学にて抽出した *T. kirilowii* 塊根 80%抽出物を液液分配, 透析, ODS カラムクロマトグラフィーにより順次分画した結果, 水層-透析外液-水溶出部に活性成分が分画された。この画分を HPLC により Fr.1-3 の3つの画分に分画し活性を測定した結果, Fr. 2 および Fr. 3 に活性が認められた。この二つの画分はともにニンヒドリン発色で陽性を示した。LC-MS の分析結果より, Fr. 2 および Fr. 3 は Citrulline および Arginine に六単糖が結合した糖アミノ酸を含むと予想された。そこで, これら二つのアミノ酸と D-Glucose を脱水縮合させ,  $N^{\alpha}$ -(1-deoxy-D-glucose-1-yl)-L-citrulline および  $N^{\beta}$ -(1-Deoxy-D-glucose-1-yl)-L-arginine を合成し, それぞれの ACE 阻害活性を測定した。その結果, 原料のアミノ酸と比較して糖アミノ酸は 5-30 倍活性が強くなることが明らかとなった。また糖の結合位置によっても活性が変化することが示唆された。

C-13      ワタアブラムシの寄主転換に関与する植物成分  
○庭田一平, 金 哲史, 陳 暁輝<sup>1</sup> (高知大・農, <sup>1</sup>瀋陽薬大)

【目的】ムクゲを一次寄主とするワタアブラムシ個体群は非常に複雑な生活環を持つ。春先にムクゲ上で卵から孵化した幹母が、単為生殖により爆発的に数を増やし、春の終わりごろに二次寄主植物であるナス科やウリ科、キク科などの多種多様な植物へと移動する。そこで吸汁加害を行ないながら数を増やした後、秋には再びムクゲに戻り、有性生殖を行い産卵する。卵態で越冬し、再び幹母を出現させるというサイクルを繰り返す。なぜ本種個体群は、このような「複雑な生活環を持つのか？」また、「なぜ寄主を換えなければならないのか？」この謎を解明するため、本研究ではムクゲ内成分の季節変動に注目し、化学生態学的視点からこの寄主転換機構の解明を試みた。

【方法及び結果】両切りガラス管を用いた生物試験装置に、春にムクゲから採取したワタアブラムシ無翅雌成虫 5 匹を導入し、これを被検液 1 種類につき 20 連行なった。被検液には、有機酸やアミノ酸等を加えた 35%シュークロース溶液をコントロールとして用い、これにムクゲ内で季節的な成分量の変化がみられた Uridine を 50, 75, 150 ppm の濃度となるように添加したもの、Fumaric acid (FA) を 400, 500, 525, 550, 575, 600, 700 ppm の濃度となるように添加したものの計 11 種類を用いた。

その結果、600 ppm の FA を与えた区では、有翅虫の発生が他の区に比べ有意に生じたこと、また、150 ppm の Uridine を添加した区では一切、有翅虫の発生が認められなかったことから、FA は寄主転換を促す方向に、Uridine は有翅虫の発生抑制に関与しているものと考えられた。

D-1 Identification of genes related to ulvan-degradation in *Alteromonas* strains  
OChuan He, Ryo Takahashi, Kouhei Ohnishi (Kochi Univ.)

We had isolated two closely related *Alteromonas* strains KUL17 and KUL42, which could use ulvan from *Ulva ohnoi* as a sole carbon source. Ulvans are sulfated polysaccharides composed mainly of L-rhamnose 3-sulfate and uronic acid in the cell walls of green algae *Ulva* spp. We already demonstrated that these ulvan-degraders contain ulvan lyases, which break down polysaccharides endolytically into oligosaccharides, and cloned genes *ulla* encoding ulvan lyases. The similarity of *ulla* genes from two strains is 97% at the amino acid level.

In this study, we looked for genes related to ulvan degradation surrounding *ulla* gene on the genome of two strains. As a result, we found one gene encoding unsaturated glucuronyl hydrolase belonging to GH family 88. The similarity of two gene from KUL17 and KUL42 is 86% at the amino acid level. Moreover, the same gene with 64% similarity was found on the genome of another ulvan-degrader *Glaciecola* sp. KUL10. We already cloned the gene from KUL10 and demonstrated that the gene product showed cleavage activity of dimer form into monomers. We are now in progress of cloning and expressing the GH family 88 genes from both KUL17 and KUL42.

Besides the GH family 88 genes, several sulfatase genes and a gene necessary for L-rhamnose metabolism were also found on both strains. The order of *ulla*, GH family 88 gene, and sulfatases on the genomes of two strains are relatively conserved, indicating that genes related to ulvan utilization are clustered on the genome and probably transferred horizontally in the environment.

D-2 褐藻分解能を有する好熱菌の探索  
O藤井健太, 奥中純平<sup>1</sup>, 八木寿梓<sup>2</sup>, 大城 隆, 鈴木宏和  
(鳥取大院・工,<sup>1</sup>鳥取大・工,<sup>2</sup>鳥取大・工・GSC)

【目的】海藻は食糧と競合しないバイオマスで、褐藻類などの有効利用が広く検討されている。以前の研究で我々は、海藻抽出物中において増殖する好熱菌 13 株を得た。本研究では、これら好熱菌の微生物学的特性を詳細に解析し、それらの褐藻糖化における有用性を評価した。

【方法・結果】得られた好熱菌は、全て同一配列の 16S rRNA 遺伝子を持ち、その系統解析から *Geobacillus thermodenitrificans* に分類できた。いずれもグラム染色陽性で、1 株を除いては芽胞形成能が確認できた。同一配列の 16S rRNA 遺伝子をもつにも関わらず、生育特性（生育 pH、耐塩性、生育温度、および資化性）は多様であった。よって、得られた 13 株は系統学的に極めて近縁であるものの、異なる菌株であると考えられる。13 株のうち最も生育特性が優れていたのは、OS27 株であった。その生育可能温度は 38～70℃であり、生育至適温度は 60℃であった。本菌は、硝酸塩呼吸ができる通性嫌気性菌で、耐アルカリ性（生育可能 pH、6.0～9.5）と耐塩性（生育限界塩濃度、5.0%）を示した。糖類資化性にも優れており、褐藻に豊富な糖類（マンニトール、フコイダン、およびアルギン酸）やそれ以外の多糖類（カルボキシメチルセルロース、可溶性デンプン、キシラン、およびマンナンなど）を資化できた。さらに、褐藻の一種であるワカメを栄養源として有意に増殖できた。以上の結果は、OS27 株が褐藻類などバイオマスからの物質生産に利用できること、ならびに様々な耐熱性糖類分解酵素の供給源として有用であることを示唆している。

D-3 *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, 大前英司<sup>1</sup>, 三本木至宏  
(広島大院・生物圏, <sup>1</sup>広島大院・理)

【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。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), 20°C, 0.1 MPa である *Shewanella 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) を用いて菌の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た。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。

【方法・結果】SACP, SLCP, SVCP は、全て大腸菌で異種発現させた。CD スペクトル測定の結果、208 nm および 222 nm に負のピークを持つことがわかった。そして、222 nm の負のピークの値を追うことによって熱安定性を測定した。CD スペクトルによる熱安定性測定の結果、変性温度は SACP が 63.6°C, SLCP が 51.8°C, SVCP が 46.5°C となった。アミノ酸配列比較の結果、水素結合ネットワーク形成の有無やダイマー間での水素結合の数による安定性の違いを見出した。以上の結果から、シトクロム *c'* の安定性は菌の生育温度と相関していることが明らかとなった。現在、生育圧力に対応する安定性について知るために、Native-PAGE による高圧下での電気泳動を行っている。

D-4 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるオートインデューサーの生産と不活化が病原性に及ぼす影響  
○飯田亮平, 島谷雅文, Fariha Jasin Mansur<sup>1</sup>, 阿座上弘行<sup>2</sup>  
(山口大院・農, <sup>1</sup>鳥取大院・連農, <sup>2</sup>山口大院・創成科学(農))

【目的】多くの病原菌において、オートインデューサー (AI) をシグナルとするクオラムセンシングが病原性の制御に関わっている。歯周病菌 *Eikenella corrodens* は対数増殖期中期から後期にかけて AI-2 を生産するが、定常期に入ると AI-2 量は激減する。最近、この定常期における AI-2 の不活化に外膜ポーリンが関係することを明らかにした。ポーリン欠損株を作成したところ、定常期における AI-2 の不活化が見られなくなった。本研究では、AI-2 の生産と不活化が本菌の病原性に及ぼす影響について調べた。

【方法・結果】*E. corrodens* の野生株, *luxS* 欠損株 (AI-2 の合成に必須な *luxS* 遺伝子を欠損させ、AI-2 を生産できない株), ポーリン欠損株 (AI-2 の不活化に関与するポーリン遺伝子を欠損させ、AI-2 は生産するが定常期になっても不活化せず生産し続ける株) の 3 株を以後の実験に使用した。3 株のバイオフィーム形成量を調べたところ、*luxS* 欠損株, ポーリン欠損株ともに野生株に比べて見かけ上増加していた。また、3 株の表面疎水性を調べたところ、*luxS* 欠損株, ポーリン欠損株ともに野生株に比べて低下していた。以上の結果から、両欠損株において表面疎水性の低下によりバイオフィーム形成に影響を及ぼすことが示唆された。さらに、3 株の自己凝集能を調べたところ、*luxS* 欠損株において著しい凝集性の低下が見られた。3 株の膜画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE で解析したところ、*luxS* 欠損株において他の 2 株と異なる発現パターンが観察された。表層タンパク質の組成の違いが、自己凝集能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

D-5 分裂酵母 *S. japonicus* の CoQ 生合成能と呼吸欠損  
○渡子 開, 望月汐美, 戒能智宏, 川向 誠 (島根大・生資料)

【背景・目的】 コエンザイム Q (CoQ) は、呼吸鎖の必須成分であり、抗酸化能をもつ重要な物質である。分裂酵母 *S. japonicus* は、*S. pombe* より細胞が大きく 42°C の高温でも生育可能であるうえ、細胞内の CoQ 量が極微量であるため非発酵性培地で生育せず、酸素消費もごくわずかである。しかし、CoQ 生合成に関わる遺伝子はゲノム上に全て保存されており、イソプレノイド側鎖合成酵素遺伝子の *Sjdp1* と *Sjdlp1* は機能性を有していることが分かっている。そこで、今回は新たに *Sjppt1* と *Sjcoq9* 遺伝子の相補試験を行った。また、嫌気条件下における CoQ 合成の変化と、CoQ 生合成の基質類を培地に添加した時の生育試験と CoQ 量の定量を行った。

【方法・結果】 側鎖転移酵素遺伝子である *Sjppt1* と機能未知の *Sjcoq9* を *S. pombe* の各破壊株に導入したところ、*Sjppt1* は最少培地での生育遅延と CoQ 生合成能の回復が見られた。しかし、*Sjcoq9* では相補がみられなかった。次に、*S. japonicus* を嫌気条件下で培養した結果、*S. japonicus* から極少量であるが CoQ<sub>10</sub> が検出された。また、*p*-hydroxybenzoic acid (PHB) と *p*-aminobenzoic acid (pABA)、CoQ 生合成の中間体類似物質の vanillic acid (VA) を加えた培地での生育試験では、高濃度 (1 mg/ml) の添加では生育阻害がおきるものの、低濃度 (100 μg/ml) の添加では生育の阻害は見られなかった。さらに CoQ 抽出を行ったところ、PHB と VA の添加で CoQ 量が増加した。これらのことから、*S. japonicus* は CoQ の生合成に PHB と VA を利用することができることが示唆された。

D-6 スピンドルチェックポイント Bub1 の局在と Bub3 の発現はプロテインキナーゼ A によって制御されている  
○野路佳佑, 大宮早貴, 酒井智健, 山家雅之, 川向 誠, 松尾安浩  
(島根大・生資料)

【目的】 分裂酵母でプロテインキナーゼ A (Pka1) は有性生殖、浸透圧ストレス、糖新生などに関与していることが知られている。当研究室では、*pkal Δ* が微小管重合阻害剤に感受性を示し、その解析から、Pka1 がスピンドルチェックポイントを制御していることを見出した。スピンドルチェックポイント (SAC) は、有糸分裂期中期から後期への移行の際に、姉妹染色分体が正しく分配できるように監視する細胞周期抑制機構である。SAC 因子はキネトコアにおいて 3 層構造で局在し、活性化される。SAC 因子である Bub1 と Bub3 は、第二階層に位置し、複合体を形成している。本研究では、*pkal Δ* における Bub1 と Bub3 への影響を解明することを目的とした。

【方法・結果】 酵母ツーハイブリッド法で、Pka1 と Bub1 及び Bub3 のタンパク質間相互作用を解析した。その結果、Pka1 は Bub3 と相互作用せず、Bub1 とはキナーゼドメイン以外の部分で相互作用した。次に、*pkal Δ* で、Bub1 と Bub3 のキネトコア局在を解析した。その結果、*pkal Δ* において Bub1 のキネトコア局在が低下していたが、Bub3 は影響がなかった。また、発現への影響を解析したところ、*pkal Δ* で Bub1 は特に変化はなかったが、Bub3 の発現が増加していた。有性生殖過程で Pka1 は、転写因子 Rst2 を制御していることが報告されているため、Bub3 の発現増加に Rst2 が関与しているかを解析したところ、Bub3 の発現が Rst2 を介していることが示唆された。以上のことから、Pka1 は Bub1 のキネトコア局在と Bub3 の発現制御に関与していることが示唆された。

#### D-7 核酸系抗生物質の生産性向上を目的とした転写マシナリーの最適化検討 ○田村 隆, 清水 瞳, 根本理子, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命)

【目的】核酸系抗生物質は抗真菌, 抗ウイルス, 抗原虫活性を示す一群の有用代謝産物であるが, 核酸系の生合成遺伝子に特徴的な保存配列が同定されていないため相同性検索による同定が困難である。また経験的に, 核酸系は変異と選抜による通常の育種が困難とされている。そこで生合成遺伝子群が未同定でも, 転写装置の活性化による増産を図るため RNA ポリメラーゼ (RNAP) の *rpoB* 変異法が検討されてきた。本研究では RNAP の分子動力学計算モデルを構築してシネフンギン生産菌 *S. incarnantus* を用いて *rpoB* 変異の分子メカニズムを考察した。【方法】高度好熱菌の RNA ポリメラーゼ/DNA/RNA 複合体 (2o5i.pdb) を鋳型として放線菌の配列からホモロジーモデルを構築し, 分子動力学計算による最適化を行った。【結果】多重変異を導入した残基群は  $\beta$  サブユニットの D447, S453, H457, R460 の残基群である。新生 RNA 鎖に直接的な作用する残基は R460 で, H457 は水素結合を介して R460 と相互作用を持つ。D447 と S453 も間接的ではあるが新生 RNA 鎖と相互作用する極性残基としての位置を占めていた。抗生物質の増産効果を示した変異をみると Arg から Cys や Gln への置換など, RNAP-mRNA 分子間相互作用が弱められる置換が高頻度に認められた。*rpoB* 多重変異による増産のしくみとは, 転写の正確性を維持しつつも転写効率を上げることで, 生育とともに二次代謝産物の増産にも寄与していると示唆される。

#### D-8 ジ・トリペプチド輸送体の基質特異性 ○北村憲司 (広島大・自然セ)

【目的】細胞外オリゴペプチドは細胞へのアミノ酸や窒素源の供給源になる他, 血圧低下をはじめ特異的な生理作用を示すものも存在する事から, ペプチド含量を高めた食品やサプリメントなども上市されている。ジ・トリペプチド輸送体としては, 原核・真核細胞を問わず保存性の高い POT ファミリー輸送体を持つが, 一部のワイン醸造用 *S. cerevisiae* 株は, 実験室株や日本酒醸造用株には無い新たなファミリーのペプチド輸送体を有する事が報告された。本研究では酵母の二種のペプチド輸送体の基質特異性を調べた。

【方法・結果】 POT ファミリー輸送体 (酵母 Ptr2, マウス PepT1) と, ワイン酵母由来の新たな輸送体ファミリーである Fot1 について, 実験室株の *S. cerevisiae ptr2* 破壊株で発現し, ジペプチドの利用能を指標に各々の基質特異性を評価した。また, 各種実用 *S. cerevisiae* 株そのもののジペプチド利用能についても調べた。マウス PepT1 は酵母でも機能したが, ヘテロな系での発現のためか, 酵母自身の輸送体に比べ活性は低かった。Ptr2 と Fot1 は共に, 調べたジペプチドの多くを利用できたが, 一方の輸送体を発現する細胞でのみ利用できるペプチドも存在した。更に, 人工甘味料である非天然ジペプチドのアスパルテムは, Ptr2 ではほとんど取り込まないものの, Fot1 の良い基質である事がわかった。一般的にペプチド輸送体の基質特異性は厳密ではなく, オリゴペプチド類に加えて多種多様な薬物も輸送できるため, ヒト PepT1, PepT2 はドラッグデリバリーの観点からも注目されている。ペプチド性抗生物質について調べたところ, Ptr2, Fot1 のいずれか一方が優先的に輸送すると思われるものが見つかった。

D-9 *Gluconobacter* 属酢酸菌由来膜結合型キナ酸脱水素酵素の高発現  
小松和貴<sup>1</sup>, ○薬師寿治<sup>1,2,3</sup>, 松谷峰之介<sup>1,2</sup>, 吉原 望<sup>1</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>,  
足立収生<sup>1,2</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup>  
(<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創科, <sup>3</sup>山口大・微研セ)

【目的】キナ酸はシキミ酸に1分子の水を付加した様な構造で, 4つのキラル炭素を含む6員環炭素骨格の化合物である。単体として, あるいはカフェ酸とのエステルとして広く植物に存在する。私たちは酢酸菌の酵素を用いて, キナ酸からのシキミ酸合成システムを構築した。しかし, このシステムの第1酵素であるキナ酸脱水素酵素(QDH)は, シキミ酸も基質にしてしまうなど, 克服すべき課題が残されている。QDHは5つの膜貫通セグメントを持つ内在性膜タンパク質であり, 大腸菌が生合成できないピロキノリンキノンを補欠分子族とする。ここでは, 本酵素の生化学的解析を加速すること, また遺伝子工学的改変を施すための発現系の構築を目的に, QDHの高発現を試みたので報告する。

【方法・結果】本酵素活性を有する *Gluconobacter oxydans* NBRC3244 株を次世代シーケンサーでドラフトゲノム解析を行い, QDHをコードする *quiA* 遺伝子の候補を見いだした。この遺伝子をPCRクローニングし, *Gluconobacter* で機能するプラスミド pBBR1MCS-4 を基に発現プラスミドを構築した。作製したプラスミドを, 本酵素活性を持っていない *Gluconobacter frateurii* CHM43 株で発現させたところ, *G. oxydans* NBRC3244 野生株の約8倍高い比活性を示した。開始コドンがTTGであったため, ATGに置換したが, 顕著な高発現化には至らなかった。組み換え *G. frateurii* CHM43 株とその対照株をSDS-PAGEで解析したところ, 期待されるサイズに特異的なバンドを確認した。そのN末端アミノ酸配列は遺伝子の配列と一致した。

D-10 酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* のジヒドロキシアセトンキナーゼに関する遺伝学的解析  
○平田花織<sup>1</sup>, 松谷峰之介<sup>1,2</sup>, 足立収生<sup>1,2</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>, 薬師寿治<sup>1,2,3</sup>,  
松下一信<sup>1,2,3</sup> (<sup>1</sup>山口大・農, <sup>2</sup>山口大院・創科, <sup>3</sup>山口大・微研セ)

【目的】*Gluconobacter* 属酢酸菌はペリプラズムに存在するキノプロテイン・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。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 株は621H 株より高いDHAキナーゼ活性を示すため, この酵素の解析を進めている。これまでの逆遺伝学的解析から, NBRC 3255 株のドラフトゲノム解析より示唆されていた2つのDHAキナーゼ候補遺伝子は, いずれも本酵素活性とは無関係であることが明らかになっている。本研究では, この二重遺伝子破壊株からDHAキナーゼを部分精製した。

【方法・結果】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(*glpK*; NBRC3255\_0651)と一致した。この部分精製標品はDHAだけでなくグリセロールのリン酸化も行うことができた。そこで, NBRC 3255 株から *glpK* 遺伝子破壊株( $\Delta glpK$  株)を作製し, DHAキナーゼ及びグリセロールキナーゼの活性を測定したところ, 野生株に比べ非常に低い活性を示した。そのためGlpKは, NBRC 3255 株においてDHAキナーゼとグリセロールキナーゼの2つの役割を持っていることが示唆された。しかしグリセロール培地では, 破壊株は野生株に比べ生育速度は遅れるものの到達点は変わらず, DHAの消費速度はほぼ同じだった。 $\Delta glpK$  株は弱いながらもDHAキナーゼ活性を持っていたため, GlpK以外のDHAキナーゼがDHA資化を担うことが考えられる。

D-11 *Gluconobacter* 属酢酸菌のキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新しい基質特異性と反応メカニズムの提唱  
○寺田優花<sup>1</sup>, 尾崎聖士朗<sup>2</sup>, 片岡尚也<sup>1,2,3</sup>, 足立収生<sup>1,2</sup>, 赤壁善彦<sup>2</sup>,  
薬師寿治<sup>1,2,3</sup>, 松下一信<sup>1,2,3</sup> ( <sup>1</sup>山口大院・創科, <sup>2</sup>山口大・農, <sup>3</sup>山口大・微研セ)

【目的】*Gluconobacter* 属酢酸菌はビタミンC生産に用いられるソルボース発酵を行う。ソルボース発酵には広範な基質を酸化するキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) が関与する。GLDHの酸化反応は、第1級アルコールの隣にある2つの水酸基がエリスロ配置である糖アルコールの2位の水酸基を酸化するという法則に従っている。しかし本研究では、この法則に従わないL-riboseが、*Gluconobacter frateurii* CHM43株のGLDHによって酸化されることを発見した。そこで、GLDHの基質特異性と反応メカニズムを考察した。

【方法・結果】*G. frateurii* CHM43と、そのGLDH欠損株の2菌株の膜画分を用い、いくつかの糖アルコール、アルドース、ケトースの酸化活性を測定してGLDHの基質特異性を調べた。その結果、GLDHがD-arabitol, L-tagatose, D-及びL-lyxose, D-及びL-riboseに対して酸化活性を持つことが示唆された。また、膜画分とL-riboseを反応させた溶液を調べた結果、L-riboseの消費とL-riboseの酸化物とみられる物質の蓄積が確認された。あわせてpH低下も認められた。L-riboseの酸化物の精製を行い、構造を決定したところ、L-ribonateであることが判明した。したがって、GLDHが環状L-riboseの1位の水酸基を酸化してL-ribonolactoneを生成し、これが加水開環してカルボキシ基を持つL-ribonateへ変化したと考えた。

E-1 ホモキラルポリ- $\gamma$ -グルタミン酸を用いたレアメタルイオン吸着能解析  
○白米優一, 尾池翔太, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸 (PGA) は、ナイロン様主鎖骨格とアクリル酸同様のカルボキシル基側鎖を備える超親水性バイオポリマーである。最近の研究により、比較的広い生物種で生産されることが明らかになってきた。特に、極限環境微生物の一種である超好塩古細菌が生産する PGA は従来の納豆菌由来 PGA と比べ、優れた立体規則性を保持していることから、より高性能なバイオ新素材として期待されている。本研究では、この新たな PGA を利用したレアメタルイオン吸着実験に着手した。

【方法・結果】対照材料には金属イオン吸着材として利用されるポリアクリル酸 (PAC)、一般的な金属吸着実験条件下では吸着性を示さないとされるポリビニルアルコール (PVA) を選択した。また、工業的重要度の高い計 6 種、コバルト ( $\text{Co}^{2+}$ )、ニッケル ( $\text{Ni}^{2+}$ )、マンガン ( $\text{Mn}^{2+}$ )、ガリウム ( $\text{Ga}^{3+}$ )、インジウム ( $\text{In}^{3+}$ )、ジスプロシウム ( $\text{Dy}^{3+}$ ) を吸着対象金属イオンとした。実験の結果、2 価金属イオンでは、吸着能を示さなかった。一方、3 価金属イオンに対して、ホモキラル PGA は PAC を凌駕する優れた吸着能や、一般的な化成ポリマーの描く双曲線型吸着曲線とは異なるシグモイド型吸着曲線を描くことも示した。本金属イオン吸着能の仕組みを理解するため、両ポリマーの吸着曲線に対して、Hill 式を用いて解析を行った。ホモキラル PGA における Hill 係数  $n$  は、PAC を大きく上回る正の協同性を示した。さらに、吸着サイトあたりの親和性を示す  $K_D$  を計算すると、金属イオン吸着材に利用される PAC と比較して数倍から十数倍の親和性を有することが判明した。

E-2  $\beta$ -1,3-1,6-グルカン生産性黒酵母の代謝産物が微生物の生育に与える影響  
○井上侑紀奈, 齋藤寛俊, 河原崎樹子, 池上裕倫<sup>1</sup>, 永田信治, 村松久司  
(高知大・農,<sup>1</sup> (株) ソフィ)

【目的】菌の代謝物が、宿主の生理活性を向上させたり、腸内細菌叢に働きかけたりすることが報告されている。黒酵母 *Aureobasidium pullulans* のつくる代謝産物 (SBG) は、菌体外多糖  $\beta$ -1,3-1,6-グルカンなどが主成分であり、ヒトに対する生理機能が多数報告されている。本研究では、SBG が微生物の生育に与える影響について検討した。

【方法】被検菌として枯草菌 *Bacillus subtilis*, 大腸菌 *Escherichia coli*, 酵母 *Saccharomyces cerevisiae*, 乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* No.18, *L.reuteri* KRN-12 の 5 菌株を用いた。SBG を EtOH によって不溶性画分 (F1), 水溶性低分子画分 (F2), 水溶性高分子画分 (F3) に分画した。被検菌を懸濁した生理食塩水に、これらの SBG 標品を添加して、30°C または 37°C, 60 min 振とう後の生菌数を測定した。特に乳酸菌は、高濃度のグルコースや NaCl, EtOH 共存下の増殖を検討すると共に、人工胃酸処理後の生菌数を測定した。

【結果】枯草菌は、60 min 処理後の F2 画分と SBG 共存下の増殖試験で生菌数の減少が見られた。大腸菌では、60 min 処理後の SBG 標品で生菌数が減少したが、酵母も含めて増殖への影響は見られなかった。乳酸菌 *L.plantarum*, *L.reuteri* 共に、増殖時に SBG の影響は見られなかったが、高濃度のグルコースや NaCl 共存下で、SBG 添加群の方がより増殖した。人工胃酸試験では SBG 添加により生菌数の減少が抑制された。乳酸菌を各 SBG 標品で 60 min 処理した時、生理食塩水に比べ F1, F2 添加群で多くの生菌数が確認された。以上の結果から、SBG は過酷な生育環境下でも乳酸菌の生菌数を維持することが示された。

E-3 イヌの消化器官由来の乳酸菌と黒酵母βグルカンを用いた餌料の評価  
○神坂愛理奈, 二木 翼, 穴井直博<sup>1</sup>, 池上裕倫<sup>2</sup>, 村松久司, 永田信治  
(高知大・農,<sup>1</sup>アミール動物病院,<sup>2</sup>(株)ソフィ)

【目的】餌料の乳酸発酵は、その保存性や嗜好性を高めるが、同時に摂取する乳酸菌には、動物の腸内細菌叢を良好に維持して健康管理に寄与するプロバイオティクス効果を持つことが望まれる。また黒酵母 *Aureobasidium pullulans* が生産するβ-1,3-1,6-グルカンは、多彩なバイオジェネクスとプレバイオティクス効果が期待される。本研究では、動物の腸内環境由来の乳酸菌とβグルカンを用いて調製した餌料が、犬の健康状態と腸内環境に及ぼす影響を評価した。

【方法】幼犬の新鮮便から MRS 培地で嫌気条件下に生育する細菌を単離した。試験菌株のうち *Lactobacillus reuteri* ER115 を用いて、イヌの健康管理を目的とした発酵餌料を調製し、更に餌料に対するβグルカンの添加量とその効果を検討した。2%βグルカンを添加した無発酵餌料、*L. reuteri* ER115 を添加した発酵餌料、2%βグルカンと *L. reuteri* ER115 を添加した発酵餌料の3種を、成犬4検体に2週間経口投与(5g/日)した新鮮便のpH、アンモニア濃度、水分含量、乳酸菌数と一般細菌数を測定し、餌料が成犬の腸内環境に与える影響を比較した。

【結果】*L. reuteri* ER115 の発酵餌料を摂取した成犬では、摂取期間中の腸内において乳酸菌が安定に生育した。また、2%濃度のβグルカン添加 *L. reuteri* ER115 発酵餌料を用いた摂食試験では、水分含量の有意な増加がみられ、効果的な整腸作用を示した。βグルカンの添加は、乳酸菌の生育維持に有効であり、腸内環境における乳酸菌数の維持にも優れていることが示唆された。

E-4 高知県産植物資源の発酵に適した乳酸菌の探索と植物葉発酵法の検討  
○蔭山博子, 市田彩香, 島村智子, 氏原 学<sup>1</sup>, 村松久司, 永田信治  
(高知大・農,<sup>1</sup>大豊町怒田)

【目的】乳酸菌生産物質であるバイオジェニクスは、生体機能に直接働きかけることで、身体の健康維持に役立つと考えられている。高知県の山間部には、野草茶などの植物資源が豊富に存在しており、これらの植物資源の利活用のために、乳酸発酵を用いて付加価値を付けることができれば、地域活性化に貢献できると考えられる。そこで、高知県産植物資源から分離した乳酸菌を用いて、バイオジェニクス効果を有する微生物発酵茶の製造工程の確立を目的とし、様々な茶葉の乳酸発酵条件の検討を行った。

【方法】高知県産植物資源から単離した乳酸菌と動物由来乳酸菌を茶培地(茶葉粉末2.0gを蒸留水200mLに懸濁後、高圧蒸気滅菌したもの)に植菌し、37℃と25℃で静置培養した際の乳酸菌の生菌数を測定した。さらに、ユズ果汁(5%)添加による発酵促進効果の検討も行った。次に、茶培地で生育が良好であった乳酸菌を用いて、微生物発酵茶のモデル実験を行った。茶葉5gと調製した菌液5mLをシリンジに入れ、25℃で嫌氣的に培養し、茶葉液中の生菌数およびpH、酸度、DPPHラジカル消去活性を測定した。また、異なる種類の茶葉における乳酸菌の生育の変化についても調べた。

【結果】茶培地での生育はユズ果汁添加に関わらず、動物由来乳酸菌より植物由来乳酸菌の方が良好であった。植物由来乳酸菌の茶培地での生育温度は37℃より25℃が適していた。発酵茶のモデル実験では、茶葉の種類ごとに同じ菌株間での生育に差異がみられた。また、ユズ果汁添加は乳酸菌の生育促進と生菌数維持に有効であることが示唆され、DPPHラジカル消去活性は乳酸発酵前より後の方が高くなった。

## E-5 廃グリセロールを利用した微生物油脂生産 亀川優一, 加納みずほ, ○栗田千波, 阪本鷹行, 櫻谷英治 (徳島大・生物資源)

【背景・目的】 近年, 廃植物油に含まれるトリアシルグリセロール (TAG) を原料としてバイオディーゼル燃料が製造されているが, その過程において副産物として大量の廃グリセロールが生成される。廃グリセロールから酵素法や超臨界法などにより高純度グリセロールを得ることができるが, 日本では供給過多にあることや, 小規模分散型の変換設備では十分な生産量を得ることができないことなどが問題となっており, より効率的かつ有効な用途開発が希求されている。

これまでに, グリセロールを炭素源とした発酵生産研究として, 嫌気性菌による 3-ヒドロキシプロピオン酸や 1,3-プロパンジオール生産研究, 油糧微生物 *Mortierella* 属糸状菌による油脂生産研究などが知られている。しかし, これらの菌における最適グリセロール濃度は 2~5% であり, 20% 以上では生育阻害が起こる。本研究では, 高濃度グリセロールを炭素源とした培地で良好に生育する菌の選抜を行い, 得られた菌について廃グリセロールを炭素源とした培地で生育および脂質生産性の評価を試みた。

【方法・結果】 自然界よりサンプリングした土や水から 50% グリセロールを含む培地で良好に生育する糸状菌 N1, N3, W1 株を得た。これらの株を廃グリセロールを含む培地で培養すると良好に生育し, 培養 7 日目には 3 株の乾燥菌体重量が約 5 mg/mL に達した。また, ガスクロマトグラフィー分析および薄層クロマトグラフィー分析を行ったところ, いずれの株もオレイン酸およびリノール酸を主成分とした TAG を蓄積することが明らかになった。

## E-6 チアミンの吟醸酒醸造に及ぼす影響 ○高橋 朋, 内山貴雄, 上東治彦<sup>1</sup>, 加藤麗奈<sup>1</sup>, 甫木嘉朗<sup>1</sup>, 森山洋憲<sup>1</sup>, 近森麻矢<sup>1</sup>, 村松久司, 永田信治, 伊藤伸一<sup>2</sup>, 神谷昌宏<sup>2</sup> (高知大・農,<sup>1</sup>高知県・工技セ,<sup>2</sup>国税局)

【目的】 チアミン (ビタミン B<sub>1</sub>) は発酵中の清酒モロミにおけるピルビン酸の代謝の補酵素であり, チアミンが不足するとアルコール生成が停滞し, 不快臭であるアセトアルデヒドやダイアセチルが増大することがある。本研究では, 高知県で使用している酵母の中でピルビン酸が残存しやすい AC-95 株を用いて, 吟醸酒醸造へのチアミン添加量や添加時期による発酵改善効果について検討した。さらに, チアミン添加によるピルビン酸の低下を利用して, 低アルコール酒の試験醸造を行った。

【方法】 YM 培地で培養した AC-95 株と精米歩合 50% の県産酒米を用いた総米 698 g の仕込み試験において, チアミン添加量を原料米 1 トン当たり 0 g, 0.01 g, 0.03 g, 0.1 g, 0.3 g, 1 g の 6 区分とし, 添に添加した。さらに同条件でチアミン 1 g/トン を添, 留, 留後 3 日後, 6 日後, 9 日後に各々添加した。それぞれの試験で得られたサンプルの一般成分, ピルビン酸濃度, 香気成分を測定した。低アルコール酒の試験醸造では, チアミン 0.3 g/トン, 1 g/トン を添に添加して得られた製成酒中のダイアセチル濃度を測定した。

【結果】 チアミンを 1 g/トン 添加することで, ピーク時のピルビン酸濃度が減少した。酸度とアミノ酸度も減少し, 香気成分は増加した。ピルビン酸を低減させつつ酒質が大きく変化しないチアミン添加量は 0.1~0.3 g/トン が適当であった。チアミンの添加時期に関しては添加時期が早い程高い効果が得られた。さらに, 低アルコール酒ではチアミン添加によってピルビン酸濃度が減少し, 不快臭であるダイアセチルの発生が抑えられた。

- E-7 Comparison of glucose repression between thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*  
OMochamad Nurcholli<sup>1</sup>, Noppon Lertwattanasakul<sup>2</sup>, Suprayogi<sup>1</sup>,  
Sukanya Nitiyon<sup>1</sup>, Savitree Limtong<sup>2</sup>, Tomoyuki Kosaka<sup>3</sup>, Mamoru Yamada<sup>1,3</sup>  
(<sup>1</sup>Grad. Sch. Med., Yamaguchi Univ., <sup>2</sup>Fac. Sci., Kasetsart Univ., <sup>3</sup>Grad. Sch. Sci.  
Tech. Inno., Yamaguchi Univ.)

Glucose repression is a common phenomenon in budding yeast, which causes the delayed utilization of other sugars. In order to analyze the glucose repression in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*, disrupted mutants of orthologues (Mig1 and Rag5) to Mig1 and Hxk2 in *Saccharomyces cerevisiae* were constructed by homologous recombination. The growth and metabolic profiles including sugars uptake speed and ethanol production in mutants and parental strains of *K. marxianus* and *S. cerevisiae* were compared under conditions with different types of sugar. *Kmmig1* exhibited similar growth characteristics to those of its parent on YNB plates and YP plates containing 2-deoxyglucose (2-DOG). In the liquid YPX, *Kmmig1* produced high ethanol and accumulated xylitol at 48 h and 24 h, respectively. However, *Kmrag5* showed strong resistance to 2-DOG, growth defect on YNB containing glucose and antimycin A, very slow growth and low ethanol production in the liquid YPD, and delayed utilization of xylose in the liquid YPD. *Schxk2* exhibited strong resistance to 2-DOG on YP sucrose containing 2-DOG compared to those of *Scmig1* and its parent. Unlike *S. cerevisiae*, the increase in glucose concentration had no effect on sucrose utilization in *K. marxianus*.

- E-8 キシロースからのエタノール変換に優れたストレス耐性*Kluyveromyces marxianus* ○高坂智之, スカンヤ・ニチヨン, チャンソム・ケオオウドン<sup>1</sup>, 村田正之, ノッポン・ラートワッタナサクル<sup>2</sup>, サビトリー・リムトン<sup>2</sup>, 山田 守 (山口大院・創科, <sup>1</sup>ラオス国立大・理, <sup>2</sup>カセサート大・理)

【目的】リグノセルロースを多く含む第2世代バイオマスからのエタノール生産を酵母によって行うためには、五炭糖であるキシロースからのエタノール生産性が高いことが望ましい。さらに、糖化処理の際に生成されるヒドロキシメチルフルフラールやフルフラールは酵母の生育を阻害することから、ストレス耐性も求められる。我々が研究している耐熱性酵母*Kluyveromyces marxianus* は一般的にエタノール生産に用いられている *Saccharomyces cerevisiae* に比べ耐熱性及び糖資化性において優れているが、キシロースからのエタノール生産性は *Scheffersomyces stipitis* に及んでいない。今回、我々はラオスにおいて分離された、新規な耐熱性酵母*K. marxianus* BUNL-21について、発酵特性等を調べた。

【方法・結果】これまでに最もよく調べられてきている *K. marxianus* DMKU3-142 と比べて、*K. marxianus* BUNL-21 はキシロースから高いエタノール生産性を示した。さらに、2-デオキシグルコース、高温及び過酸化水素への耐性を示した。また、BUNL-21 のキシロースからのエタノール生産性は *S. stipitis* と比べて30°Cにおいて若干低かったが、高温においては *S. stipitis* より高いエタノール生産性を示した。この時、30°Cでのエタノール生産性の低さは酢酸の蓄積によるものであると考えられた。一方、BUNL-21 のエタノール生産性を10 mM ヒドロキシメチルフルフラールもしくはフルフラール存在下で確認したところ、通常とほぼ同等の生産性であったことから、BUNL-21 はリグノセルロースを含むバイオマスからのエタノール生産に適した酵母であることが示された。

E-9 白桃酵母の香味特性とアルコール耐性強化による苦味生成の改善  
○伊藤一成, 尾崎陽子, 三宅剛史 (岡山県・工技セ)

【目的】清酒の多様化に伴い全国各地で自然界からの清酒酵母の分離育種が盛んに行われている。岡山県でも清水白桃の果皮から清酒製造に適した酵母(白桃酵母)の分離に成功している。白桃酵母はすでに県内の酒造場において純米酒や純米吟醸酒を中心とする製造に使用され、特徴ある香味特性を有し好評を得ている。しかし近年、白桃酵母を使用した製成酒に苦味の指摘が散見されようになってきた。アルコール耐性の低い酵母は、醗後半で酵母細胞の死滅溶解による内容物の漏出が起こり、酒質に悪影響(苦味を含む)を及ぼす。本研究では白桃酵母の特性を明らかにし、苦味が生じる要因を精査した。

【方法・結果】YPD培地に30℃で培養した白桃酵母およびきょうかい酵母を用いて、総米200gの小仕込み試験を行った。成分分析の結果、きょうかい酵母と比べ有機酸はリンゴ酸が約2倍であり、製成酒に爽やかな酸味を与えていると思われた。香気成分はカプロン酸エチルが多く、濃厚で複雑味を示すブロパノールが少なかったことから、これらが複合的に白桃酵母の香味特性に寄与していると思われた。一方、苦味・渋味を呈するアルコール類はやや少なかったものの、苦味アミノ酸は多く、これが苦味指摘の要因になっていると考えられた。また、白桃酵母のアルコール耐性について調べたところ、きょうかい酵母よりも耐性が低い事が分かった。このためアルコール耐性強化を20%エタノール含有YPD培地での訓養により行った。アルコール耐性が向上した白桃酵母を用いた小仕込み試験では、苦味アミノ酸の減少が確認された。この白桃酵母を清酒製造に使用すれば、苦味の軽減が期待できると思われる。

E-10 Comprehensive screening for tobacco host proteins targeted by type III effectors of a plant pathogen *Ralstonia solanacearum* OE1-1  
○Laxmi Kharel, Amol Dahal, Li Chen, Kouhei Ohnishi (Kochi Univ.)

*Ralstonia solanacearum* is a soil-borne plant pathogen. As other gram-negative animal and plant pathogens, *R. solanacearum* secretes type III (T3) effectors into host cells in order to escape from host immune systems and disturb host cell functions. *R. solanacearum* Japanese strain OE1-1 possesses more than 70 T3 effectors. However, their mode of action is determined in a limited number of T3 effectors. The objective of this study is to elucidate comprehensively the mode of action for T3 effectors by using yeast two-hybrid system (Y2H).

We cloned genes encoding two family T3 effectors (7 members for GALA family and 3 members for HLK family) and seven T3 effectors on the bait vector of Y2H from OE1-1 strain and screened against cDNA prey library of *Nicotiana tabacum* and *N. benthamiana*. We got positive prey clones against GALA family and RSc2101 T3 effectors. Although we do not have a clue, we did not get positive prey clones against other T3 effectors.

We focused on tobacco proteins interacting with RSc2101 T3 effector in this study. We had isolated several different kinds of host proteins interacting with RSc2101 T3 effector; Golgi to ER traffic protein, oxygen-evolving enhancer protein, chlorophyll a-b binding protein, photosystem II CP47 reaction center protein, ATP synthase delta-subunit, ribulose biphosphate carboxylase large chain and others. There is no common feature of these proteins, although some of them are chloroplastic proteins, suggesting that RSc2101 T3 effector might disturb photosynthesis by interfering with chloroplastic proteins in the cytoplasm.

F-1 大腸菌の3種のシステインデスルフラゼの生理機能  
○森本真之佑, 大橋奈奈, 加藤伸一郎<sup>1</sup> (高知大・農, <sup>1</sup>高知大・総研セ)

【目的】システインデスルフラゼ (CDS) は L-システインに作用し, L-アラニンと硫黄を生成する PLP 酵素である。反応によって生成された硫黄は CDS 上に保持された後, 特異的相互作用により様々なタンパク質に受け渡され, 鉄-硫黄クラスターやチアミン, tRNA に含まれるチオウリジンなどの含硫化合物の生合成に利用される。大腸菌には3種の CDS パラログ (IscS, SufS, CsdA) が存在しており, いずれも含硫化合物の生合成において硫黄原子の供給を担っていると考えられるが, それぞれの生理的な役割については不明な点が残されている。そこで, 放射性同位元素により標識されたシステイン (L-[<sup>35</sup>S] Cys) を用いて硫黄原子の転移反応を解析することで, 鉄欠乏条件下において硫黄原子の授受に関わるタンパク質を検出することを目的とした。【方法】3種の CDS 遺伝子の高発現ベクターを用いて CDS を調製した。大腸菌 MG1655 を 1 mM または 10 mM 2',2'-Bipyridyl を含む LB 培地で培養して無細胞抽出液を調製し, CDS, L-[<sup>35</sup>S] Cys, タンパク質合成阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤を添加してインキュベートした。これを SDS-PAGE に供して <sup>35</sup>S により標識されたタンパク質をオートラジオグラフィーで検出した。【結果および考察】鉄欠乏条件にて培養した大腸菌の無細胞抽出液に CsdA を添加しトレーサー実験を行うと 50 kDa タンパク質の <sup>35</sup>S による標識量が増大していた。また, IscS を添加した場合には 60 kDa タンパク質の <sup>35</sup>S による標識量が増大していた。これらの硫黄原子受容能を有するタンパク質は鉄欠乏条件下において発現誘導されるとともに, 特異的な生理機能していることが示唆された。

F-2 南海トラフ深海底コア試料を対象とした基質誘導型遺伝子発現解析法 SIGEX による Ni<sup>2+</sup>, Ga<sup>3+</sup> 応答遺伝子の同定 ○森澤高至, 諸野祐樹<sup>1</sup>, 寺田武志<sup>2</sup>, 西川聡美, 尾崎和弘, 北村 萌, 大下紘貴, 佐藤瑞希, 稲垣史生<sup>1</sup>, 芦内 誠, 若松泰介 (高知大・農, <sup>1</sup>JAMSTEC・高知コア, <sup>2</sup>マリンワークジャパン)

【目的】深海底には様々な種類のレアメタルが濃集した形で多数の場所に存在しているが, そこに生存する深海底微生物のレアメタル利用に関する知見はほぼない。彼らが持つレアメタル代謝機能性遺伝子を同定, 解析することは彼らの生存戦略だけでなく深海底環境におけるレアメタルの濃集や移動についての新たな知見となると考えられる。そこで, 南海トラフ深海底コア試料由来メタゲノムから必須レアメタルであるニッケルと現在のところは生物がその代謝に用いないとされるガリウムに応答する遺伝子を探索・同定する。

【方法・結果】深海底微生物の大半は純粋培養が困難且つ機能未知遺伝子を多く有するため, 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。南海トラフ深海底コア試料由来メタゲノムを用いて作製したショットガンライブラリーから, Ni<sup>2+</sup>あるいは Ga<sup>3+</sup> に対し応答を示す計 7 つの陽性クローンを単離し, 応答に関与する塩基配列を決定した。

### F-3 2-アミノ-3-ヒドロキシ-3-シクロヘキシルプロピオン酸に作用する酵素の探索と精製

○田中美沙, 尾崎 旬, 村松久司, 林 素子<sup>2</sup>, 山本浩明<sup>2</sup>, 加藤伸一郎<sup>1</sup>,  
永田信治 (高知大・農,<sup>1</sup>高知大・総研セ,<sup>2</sup>ダイセル)

【目的】β-ヒドロキシ-α-アミノ酸は医薬品などの合成中間体として重要である。β-ヒドロキシ-α-アミノ酸の一種である 2-アミノ-3-ヒドロキシ-3-シクロヘキシルプロピオン酸 (ACHP) には立体異性体が 4 種類存在し, 高い光学純度の標品を生成するには複雑な工程が必要となる。そこで本研究では ACHP に立体特異的に作用する酵素の探索を試みた。

【方法】土壌試料を滅菌水に懸濁し ACHP 液体培地 (0.05%DL-エリスロ-ACHP, 0.2%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2%NaCl, 0.01%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, 0.01%酵母エキス; pH7.3) に加え, 30°Cで 3 日間振とう培養した。微生物が生育した培養液を ACHP 平板培地に塗付して 30°Cで 3 日間静置培養し, コロニーを単離した。ACHP 液体培地で培養した分離株を超音波破碎して粗酵素液を調製し, 酵素活性を測定した。活性測定は, 20 mM DL-エリスロ-ACHP を含む 0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に粗酵素液を添加して 30°Cで一晩反応させ, 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法で行った。分離株の中でも最も高い ACHP 代謝酵素活性を示した YR1 株から本酵素の精製を試みた。

【結果】DL-エリスロ-ACHP 資化性微生物を 12 菌株分離し, ACHP 代謝酵素活性が最も高かった YR1 株の 16S rDNA 塩基配列を解析すると *Pseudomonas* 属細菌と同定された。YR1 株を LB 培地で培養しても酵素活性が見られたため, LB 培地で培養した YR1 株の粗酵素液から硫酸分画と 3 種類のカラムクロマトグラフィーにより目的酵素を部分精製して N 末端アミノ酸配列を決定した。

### F-4 3-アミノキヌクリジン資化性微生物 KO20 株を由来とするアミン酸化酵素の精製

○大草 綾, 山本 薫, 村松久司, 林 素子<sup>2</sup>, 山本浩明<sup>2</sup>, 加藤伸一郎<sup>1</sup>,  
永田信治 (高知大・農,<sup>1</sup>高知大・総研セ,<sup>2</sup>ダイセル)

【目的】医薬品合成中間体として有用な光学活性 3-アミノキヌクリジン (3-AQ) の生産に利用できる新しい酵素が望まれている。我々は, 土壌から 3-AQ 資化性微生物として分離した KO20 株に 3-AQ 酸化酵素活性を見出した。そこで, KO20 株の粗酵素液から本酵素の精製を試みた。

【方法】3-AQ 酸化酵素活性は 10 mM 3-AQ を基質として測定した。3-AQ 資化性微生物 KO20 株を 3-AQ 培地 (0.35% 3-AQ, 0.5% グルコース, 0.02% MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O, 0.2% クエン酸, 1.0% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7.2) に植菌して, 30°Cで 7 日間振とう培養した。培養液を遠心分離して得た集菌体を 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニルを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し, 氷中で冷却しながら超音波破碎した後, 4°C下で遠心分離した上清を粗酵素液とした。硫酸分画, トヨパール DEAE-650M, トヨパールブチル-650M カラムクロマトグラフィーで KO20 株の粗酵素液中から 3-AQ 酸化酵素を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一に精製した。

【結果】KO20 株の 3-AQ 酸化酵素の立体特異性を粗酵素液を使って調べたところ, 本酵素は (S)-3-AQ に作用したが, (R)-3-AQ を基質にすると酵素活性を検出できなかった。精製した 3-AQ 酸化酵素の分子質量をスーパーデクス<sup>TM</sup>200 10/300 GL を用いたゲルろ過で測定したところ 140 kDa であった。また, SDS-PAGE で測定された本酵素のサブユニットの分子質量は 71.7 kDa であったことから, 本酵素はホモ二量体であることがわかった。

F-5 ナス科植物に存在するアミノ酸ラセマーゼ遺伝子の探索  
○宇田幸司, 枝重裕美香 (高知大・理)

【目的】生体内で L 型のアミノ酸から D 型のアミノ酸を合成する酵素がアミノ酸ラセマーゼであり、これまでに植物からは単子葉類のイネとオオムギ、及び真正双子葉類のシロイヌナズナからセリンラセマーゼ (SerR) 遺伝子が単離されている。本研究では真正双子葉類のナス科植物に存在するアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の探索を行った。

【方法と結果】NCBI に存在するナス科植物由来のゲノム配列データ及び SRA データ等からアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子を探索した。その結果、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) とトマト (*Solanum lycopersicum*) のゲノムからそれぞれ 2 種類の SerR ホモログ遺伝子が見つかった。それらの cDNA を単離し、酵素活性を確認したところ、2 種類の SerR ホモログは、SerR 及びアスパラギン酸ラセマーゼ (AspR) であることが確認された。トマト同様にトウガラシ (*Capsicum annuum*) やヒヨス (*Hyoscyamus niger*) のゲノムにも SerR と AspR 遺伝子が存在した。一方で、タバコ (*Nicotiana tabacum*) のゲノムには SerR 遺伝子のみが存在し、AspR 遺伝子が存在しなかった。また、ナス属以外のナス目の植物にもゲノム中に SerR 遺伝子は存在するが、AspR 遺伝子は存在しなかった。これらのことと、塩基配列やイントロンの挿入位置の比較から、ナス属の一部の植物の祖先種において、SerR 遺伝子が重複して、AspR 遺伝子が生じたことが推測された。

F-6 L-グルタミン酸オキシダーゼから 1 アミノ酸置換で作成した新規 L-アルギニンオキシダーゼ (R305E 変異酵素) の精製と特性解析  
○松尾慎作, 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 の酸化的脱アミノ反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である。LGOX の基質特異性は極めて厳格であり、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を明らかにし、R305 への部位特異的変異導入により、L-Glu に活性を示さず他のアミノ酸に活性を示すような基質特異性改変酵素の作成に成功している。今回 R305E 変異 LGOX が既報の R305D 変異酵素より更に高い L-Arg 酸化活性を示すことが判明したので、均一に精製し性質検討を行った。【方法】変異酵素発現ベクターは LGOX 発現ベクター pGOx\_mal1 を用いて部位特異的変異法により作成し、*E. coli* JM109 を形質転換して変異酵素を発現させた。酵素活性は、反応生成物の  $\alpha$ -ケト酸を MBTH 法により、または過酸化水素を 4-アミノアンチピリン法により定量することで測定した。【結果】R305E 変異 LGOX は、L-Arg を最も良い基質とし、L-His、L-Tyr と L-Lys に極微弱的な活性を示す L-アルギニンオキシダーゼと呼べる酵素であった。他の R305 変異 LGOX と同様に L-Glu には全く活性を示さなかった。本酵素の最適温度は 40°C、最適 pH は 7.5 であった。一方、R305E 変異 LGOX の L-Arg に対する  $K_m$  は 0.46 mM、 $k_{cat}$  は  $8.3 s^{-1}$  であり、触媒効率  $k_{cat}/K_m$  は R305E 変異 LGOX の値が R305D 変異 LGOX の値より約 2 倍高いことが分かった。以上のことから R305E 変異 LGOX は新規 L-アルギニンオキシダーゼとして、バイオセンサー等への活用が期待される。現在精製酵素を用いて結晶化を試みている。

F-7 工業利用に向けた推定上新規 DNA ミスマッチ修復タンパク質の機能解析  
○大下紘貴, 福井健二<sup>1</sup>, 北村 萌, 佐藤瑞希, 森澤高至, 白米優一,  
矢野貴人<sup>1</sup>, 芦内 誠, 若松泰介 (高知大・農, <sup>1</sup>大阪医科大・医)

【目的】好熱菌由来 DNA ミスマッチ修復タンパク質に PCR での増幅エラーの抑制効果が見出されているが、基質特異性や安定性などの問題からその応用は限られており、工業利用可能な新規 DNA ミスマッチ修復タンパク質の発見が待たれている。そこで、本研究では一次構造から推定上新規 DNA ミスマッチ修復タンパク質と予想される、アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 MutS5 全長 (PhMutS5) と、ミミウイルス *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* 由来 MutS7 (ApmMutS7) 中に存在する HNH ドメイン (ApmHNH, 969-1,051 残基領域) の機能解析を行う。

【方法・結果】pET15b-*phmutS5* を用いて大腸菌 *Rosetta2(DE3)* *pLysS* を形質転換した後、IPTG による誘導を行い、phMutS5 を大量発現させた。菌体破碎後、熱処理 (80°C)、TALON レジン、Toyopearl Phenyl により phMutS5 を精製した。精製標品から ATPase 活性は検出されたが、ミスマッチを含む各種 DNA 基質との結合はゲルシフトアッセイでは観測されなかった。そこで精製標品をアガロース電気泳動に供したところ宿主由来の一定の長さの核酸が強く結合していることが明らかとなった。一方 ApmHNH は、pCold ProS2-*amphnh* を用いて大腸菌 BL21 (DE3) を形質転換した後、IPTG と低温による誘導を行い、大量発現させた。菌体破碎後、TALON レジン、ヒドロキシアパタイトにより精製を行った。野生型は大腸菌由来ゲノム DNA に対するヌクレアーゼ活性を持つものに対し、H1009A/H1010A 変異体は持たなかったことから *ApmHNH* が本酵素活性を有することが明らかとなった。

F-8 酸性ペプチド:*N*-グリカナーゼ (aPNGase) 候補遺伝子ノックアウト植物体の aPNGase 活性、遊離糖鎖構造解析及びストレス感受性解析  
○上村亮太, 秋山 剛, 前田 恵, 三崎 亮<sup>1</sup>, 藤山和仁<sup>1</sup>, 木村吉伸  
(岡山大院・環境生命, <sup>1</sup>阪大・国際交流セ)

【目的】還元末端側にキトビオースユニットを有する植物複合型遊離 *N*-グリカンには、酸性ペプチド:*N*-グリカナーゼ (aPNGase) の作用により糖タンパク質の代謝分解過程で生成すると考えられているが、その生理機能は未だ明らかにされていない。当研究室では同定したトマト aPNGase-Le のアミノ酸配列<sup>[1]</sup>を基に *A.thaliana* の 2 種 aPNGase 候補遺伝子 (*At3g14920*, *At5g05480*) を見出し、それらの二重欠損株を構築した。本研究では FNGs の生理機能解明研究の一環として、aPNGase 候補遺伝子欠損株における (1) aPNGase 活性測定、(2) FNGs 構造解析、(3) ストレス感受性解析、(4) aPNGase 候補遺伝子産物の細胞内局在解析を行った。

【方法・結果】(1) 野生株と二重欠損株の葉から粗酵素液を抽出した。動物複合型 *N*-グリカン含有ペプチドを基質として反応させ、 $\beta$ 1,4Gal 残基特異的な RCA120 アフィニティクロマト、逆相 HPLC により反応生成物の解析を行った。その結果、二重欠損株における aPNGase 活性の消失が確認された。(2) 野生株と二重欠損株の地上部から遊離糖鎖を抽出し、ゲルろ過、逆相 HPLC、順相 HPLC により PCT-FNGs の精製を行った。その結果、二重欠損株におけるオリゴ糖鎖量の減少が確認された。以上の結果から、2 種 aPNGase 候補遺伝子は、aPNGase をコードしており、遊離 *N*-グリカンの生成に関与していることが明らかになった。現在、aPNGase 二重欠損株におけるストレス感受性と細胞内局在について解析を進めている。[1] Hossain, A., et al., *J. Biochem.*, 147, 157-165 (2010)

- F-9 Molecular characterization of second tomato  $\alpha$ 1,3/4-fucosidase ( $\alpha$ -Fuc'ase S1-2) involved in degradation of plant complex type *N*-glycans.  
OMd. Ziaur Rahman, Megumi Maeda, Satsuki Itano, Yoshinobu Kimura  
(Grad. Sch. Environ. Life Sci, Okayama Univ.)

In previous study, we have molecular-characterized a tomato gene (*LOC101254568*, *Solyc03g006980*) encoding  $\alpha$ 1,3-fucosidase ( $\alpha$ -Fuc'ase S1-1). In this study, we have characterized another tomato gene (*LOC101249430*, *Solyc11g006910*) encoding  $\alpha$ 1,3-fucosidase ( $\alpha$ -Fuc'ase S1-2), which may be involved in degradation of plant complex type *N*-glycans. The Baculovirus-Insect cell expression system was used to express that  $\alpha$ -Fuc'ase S1-2 and the expression product (rFuc'ase S1-2) was found as a 55 kDa protein on SDS-PAGE and western blotting using anti-Flag tag antibody. The rFuc'ase S1-2 with optimum pH between 4.5 and 5.0 strongly hydrolyzed the non-reducing terminal  $\alpha$ 1,3-fucose residue on Lacto-*N*-fucopentaose (LNFP) III chain and  $\alpha$ 1,4-fucose residues of Le<sup>a</sup> epitopes (Gal $\beta$ 1-3 (Fuc $\alpha$ 1-4) GlcNAc $\beta$ 1-) on plant complex type *N*-glycans but not  $\alpha$ 1,2-fucose residue on LNFP I nor  $\alpha$ 1,3-fucose residue on Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc-PA. In addition, we found that this tomato  $\alpha$ -Fuc'ase S1-2 was active toward  $\alpha$ 1,3- fucose residue linked to the innermost GlcNAc residue on GlcNAc $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3) GlcNAc-PA), but was inactive against Fuc $\alpha$ 1-3GlcNAc-PA and the core penta-oligosaccharide unit (Man $\beta$ 1-4 (Xyl $\beta$ 1-2) GlcNAc $\beta$ 1-4 (Fuc $\alpha$ 1-3) GlcNAc-PA) of plant complex *N*-glycans.

- F-10 高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼに関する研究  
○大志田達也, 林 順司, 里村武範<sup>1</sup>, 川上竜巳<sup>2</sup>, 大島敏久<sup>3</sup>, 櫻庭春彦  
(香川大・農,<sup>1</sup>福井大・工,<sup>2</sup>徳島大・生物資源,<sup>3</sup>大工大・工)

【目的】アルドラーゼは光学活性化合物の合成に利用できる。中でも、2-デオキシリボース-5-リン酸アルドラーゼ (DERA) は、多様なアルデヒド分子間の縮合反応を触媒出来るため、抗高脂血症剤等のビルディングブロック合成などへの産業利用が期待される。しかし、通常微生物由来の酵素は、高濃度のアルデヒドで失活するため、実用化はされていない。また先行研究で調べられた超好熱菌由来の酵素は、アルデヒド存在下では安定であるが、工業的に用いる常温付近において活性が低いことが判明している。一方、高度好塩菌由来の酵素は高濃度の塩存在下のような水分活性の低い環境でのみ立体構造を維持することが可能であり、アセトアルデヒド等の存在下でも安定で高活性を示すことが期待できる。今回、我々は高度好塩菌に初めて DERA を見出し、その機能解析に成功した<sup>1)</sup>。

【方法・結果】高度好塩菌 *Haloarcula japonica* 由来 DERA (HjaDERA) ホモログ遺伝子のクローニングを行い、大腸菌による発現系を構築した。発現させたタンパク質を精製途中で高濃度塩処理を行うことにより、活性化リコンビナント酵素を取得することに成功した。精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を解析したところ、HjaDERA は大腸菌由来 DERA よりも熱耐性に優れ、超好熱菌由来 DERA よりも常温で高活性を示した。また、様々な有機溶媒に対して耐性を示すことが明らかとなった。今後は様々なアルデヒド類を用いた合成反応を検討し、高度好塩菌由来 DERA の応用面に向けての展開を図る。

1) T. Ohshida *et al.*, *Protein Expression and Purification* 126, 62-68, 2016

F-11 PKGIIによるFGF/FGFR/ERK経路阻害機構の解明  
○村上彩良<sup>1</sup>, 亀村典生<sup>2</sup>, 小松弘明<sup>1</sup>, 辻明彦<sup>1,2</sup>, 湯浅恵造<sup>1,2</sup>  
(<sup>1</sup>徳島大院・先端技術, <sup>2</sup>徳島大院・生物資源)

【目的】cGMP-dependent protein kinase II (PKGII)は、その活性化に関わるC型ナトリウム利尿ペプチドおよび受容体であるNPR-Bの解析やノックアウトマウスの解析より内軟骨性骨化において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。これまでにPKGIIはFGF/FGFR/ERK経路を負に制御することが示されているが、未だその作用機構の決定的な報告はない。そこで本研究では、PKGIIが作用するFGF/FGFR/ERK経路に関わるシグナル伝達因子あるいは制御因子の探索を行い、軟骨形成におけるPKGIIの役割を明確にすることを目的とした。【方法・結果】まず、RCS (rat chondrosarcoma)細胞を用いて、PKGIIによるFGF/FGFR/ERK経路の阻害作用を調べた。FGF2刺激によって活性化されたMEK/ERKのリン酸化は、膜透過性cGMPである8-*p*CPT-cGMP処理によって阻害されることを確認した。このとき、その上流因子であるRaf1の活性化に関わる338番目Serのリン酸化が抑制されたのに対して、抑制に関わる43番目Serが有意にリン酸化されることが明らかとなった。一方、forskolin刺激はPKAの活性化を介してMEK/ERKのリン酸化を同様に阻害したが、Raf1に関してcGMP/PKGとは異なるリン酸化パターンを示した。Raf1のSer<sup>43</sup>のリン酸化はその活性を負に制御することから、PKGIIがSer<sup>43</sup>を直接リン酸化するのか検討した。PKGIIはcGMP依存的にRaf1のSer<sup>43</sup>をリン酸化したのに対して、Raf1 S43A変異体のリン酸化は認められなかった。以上のことから、PKGIIは軟骨細胞においてRaf1のSer<sup>43</sup>のリン酸化を介してFGF/FGFR/ERK経路を負に制御することが示された。

## 2016年度中四国支部大会協賛企業・団体 (50音順)

日本農芸化学会 2016年度中四国支部大会の開催にあたり、以下の皆様のご援助を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

アルフレッサ篠原化学(株)  
(株)アミノアップ化学  
四国理科(株)  
ナカライテスク(株) 西日本営業所  
日進商事(株)  
和光純薬工業(株)

日本化学会中国四国支部

## 賛助企業

- ・(株)旭製作所 岡山オフィス
- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
- ・アルファ食品(株)
- ・アルファバイオ(株) 岡山営業所
- ・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
- ・AuB(株)
- ・岡山県酒造組合
- ・(社)岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・(株)機能性食品開発研究所
- ・杏林予防学研究所
- ・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 広島支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)サンキ精機
- ・(株)サン・クロレラ
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)酔心山根本店
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・(株)ソフィ
- ・(株)大愛
- ・大興産業(株)
- ・大山乳業農業協同組合
- ・大山ハム(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)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・鳥取サイエンス(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・(有)ビーエムステーション
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製薬(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
- ・八幡物産(株) (五十音順)

2016年8月1日現在60社

# 医療を通じて人々の健康をサポート。 四国全域をカバーするネットワーク。

医療部門・理化学部門では四国4県の支店・営業所を通じ、きめ細やかなサービス、安心できる商品を迅速に提供できるよう努めています。



## 医療

Medical

### 診断・診断薬部門

各種の検査に必要な検査薬や診断薬を提供。診断薬部門では高知県内トップのシェアを誇っています。ハードの販売だけでなく、情報というソフト面を重視し、人々の健康をやさしく見守っています。

### 衛生部門

医療に従事する方々のために、各種の衛生材料から消毒関連の資材までを取り扱っています。医療の現場をより清潔に保つ、大切な脇役を努めています。

### 医療機器部門

各種分析装置をはじめ、顕微鏡や遠心分離機等、医療に必要な機器を取り扱っています。常に最先端の機器を扱うため、リサーチ活動も欠かせません。

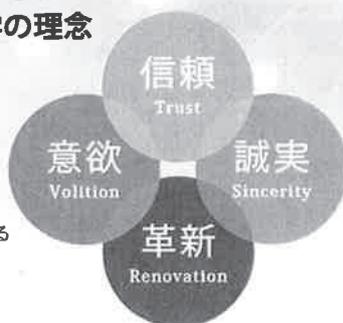
## 社員一人ひとりにやどる、 アルフレッサ篠原化学の理念

私たちはお客様のためになる必要とされる会社を目指します。

私たちはお客様に信頼される誠実な会社を目指します。

私たちは常に革新し続ける勇気ある会社を目指します。

私たちは常に努力しがいのある会社を目指します。



## 事業案内

医療	臨床診断薬・医薬品、医療材料・医療機器・在宅酸素、感染予防用品・衛生材料
理化学	研究・分析用試薬、理化学器材・機器、理科教材・設備全般
環境	食品検査用品、環境検査管理用品、廃棄品収集運搬、工業用薬品、浄化槽・プール管理用品、太陽光発電
介護用品	介護・福祉用品の販売並びにレンタル、保健・看護用品、住宅改修
介護サービス	居宅介護支援事業所、デイサービスセンター、老人ホームの運営
薬局	調剤薬局、一般医薬品の販売

# alfresa

## アルフレッサ篠原化学株式会社

事業所／本社	〒780-8506	高知県高知市南御座9-41	Tel. 088-882-5000	Fax. 088-882-5152
高知支店	〒780-8506	高知県高知市南御座9-41	Tel. 088-882-5000	Fax. 088-882-5152
香川支店	〒769-0103	香川県高松市国分寺町福家甲1255-10	Tel. 087-816-2001	Fax. 087-816-2002
愛媛支店	〒799-3105	愛媛県伊予市下三谷1-6	Tel. 089-994-8825	Fax. 089-994-8826
徳島支店	〒771-0132	徳島県徳島市川内町平石夷野224-29	Tel. 088-678-2201	Fax. 088-678-2203
四万十営業所	〒787-0023	高知県四万十市中村東町1-81	Tel. 0880-34-4361	Fax. 0880-34-4365
西条営業所	〒793-0010	愛媛県西条市飯岡261-10	Tel. 0897-47-5662	Fax. 0897-47-5663

<http://www.e-shinohara.co.jp>

e-mail: info@e-shinohara.co.jp



私たちは  
ライフサイエンスの  
発展により  
「優しさ」の心が  
あふれることを  
目指しております。

<http://www.shikokurika.co.jp>

国内外の優秀な理化学分析機器やバイオ関連機器、試薬を販売する専門商社です。



**四国理科株式会社**

SHIKOKURIKA CO.,LTD.

本 社 〒781-5103 高知県高知市大津乙1067番地6  
TEL : 088-866-5000 FAX : 088-866-5015  
kochi@shikokurika.co.jp

徳島営業所 〒771-1201 徳島県板野郡藍住町奥野字山畑39-3  
TEL : 088-693-4660 FAX : 088-693-4661  
tokushima@shikokurika.co.jp

香川営業所 〒761-0313 香川県高松市下田井町25番地2  
TEL : 088-840-7727 FAX : 088-840-7728  
kagawa@shikokurika.co.jp

愛媛営業所 〒790-0924 愛媛県松山市南久米町798-7  
TEL : 089-907-3130 FAX : 089-907-3140  
ehime@shikokurika.co.jp

科学の未来を創造する。

臨床検査に貢献。

多様化するニーズに対応する。

科学研究と臨床検査機器・臨床検査用試薬の総合商社

**日進商事株式会社**

本 社 〒780-0901 高知市上町5丁目6番15号  
中村営業所 〒787-0019 四万十市具同8608番地1(3-305)  
松山オフィス 〒791-1115 松山市土居町842-1(201)  
TEL(088)822-3141(代) FAX(088)822-3140

<http://www.nisshin-syouji.co.jp>