

受賞講演要旨

細菌情報伝達ネットワークの分子機構と情報伝達阻害型薬剤の開発

(近畿大農・バイオ) 内海龍太郎

微生物、特に細菌細胞には、ヒト等の高等生物とは異なる情報伝達機構 (two-component signal transduction system, TCS) が発達している。このような TCS によって、動植物病原細菌の病原性、酸耐性、イオン制御、薬剤耐性、細胞分裂・増殖、クオラムセンシング、バイオフィーム形成等が制御されている。細菌細胞は数十種類の TCS を保持し、多様な環境変化に対応して、生育している。また、激変する環境変化に迅速に対応適応するために、各 TCS 間には互いに連結した情報伝達ネットワークの分子機構を発達させてきた。本研究では、このような細菌情報伝達ネットワークの分子機構を解明するために、ゲノムサイエンスならびに分子生物学的研究を行った。

最初に、DNA マイクロアレイ解析を行った結果、特に、EvgS/EvgA TCS を活性化すると同時に PhoQ/PhoP TCS 制御下の遺伝子群が変動することが明らかになった。EvgS/EvgA TCS と PhoQ/PhoP TCS を連結するコネクター遺伝子の探索を行った結果、機能未知の B1500 を同定した。B1500 は 65aa からなる細胞膜蛋白質で、PhoQ のヒスチジンキナーゼ (HK) 活性を制御する機能を見出し、SafA (sensor associating factor) と命名された。EvgS/EvgA の活性化によって、safA 遺伝子発現が誘導され、細胞膜中に移動して、PhoQ のペリプラズム領域に結合して、PhoQ の HK 活性を制御することにより、PhoQ/PhoP 制御下の遺伝子群が制御される新しい情報伝達ネットワークの分子機構が明らかにされた。

代表的なグラム陽性多剤耐性細菌である MRSA や VRE は増殖に必須な WalK (HK) /WalR (response regulator, RR) TCS を保持している。WalK/WalR TCS を標的にした阻害剤は、既存の抗生物質と全く異なる作用機序によって、MRSA や VRE 等の多剤耐性細菌を死滅させることが期待された。本研究において、3 種の新規な WalK 阻害剤と 1 種の WalR 阻害剤 (walrycin B) が見出された。3 種の WalK 阻害剤は、WalK を標的にして、MRSA や VRE を死滅させる新規抗生物質として signermycin、waldiomyacin、walkmycin と命名された。細菌情報伝達ネットワークの分子機構研究の展開のなかで、その情報伝達素過程を阻害する細菌情報伝達阻害型薬剤が種々の多剤耐性細菌に有効な薬効を示すだけでなく、病原性を抑制し、その病害防除を可能にする優れた戦略であることを見出した。これらの研究成果をもとに 21 世紀細菌情報伝達阻害型薬剤がヒト感染症治療ならびに植物病害防除に貢献することが期待される。



名前：内海 龍太郎 (Ryutaro Utsumi)

連絡先：〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

近畿大学 農学部 バイオサイエンス学科

E-mail: utsumi@nara.kindai.ac.jp

略歴：

1974 年 3 月 京都大学 農学部 林産工学科 卒業
1982 年 3 月 京都大学大学院 農学研究科 博士課程修了
1982 年 4 月 近畿大学 農学部 助手
1983 年 1 月 博士（農学） 取得〔京都大学〕
1987 年 4 月 近畿大学 農学部 講師
1988 年 7 月 米国ニュージャージー州立大学 Robert Wood Johnson
Medical School 生化学部研究員（フルブライター）
1990 年 4 月 近畿大学 農学部 助教授
1996 年 4 月 近畿大学 農学部 教授

現在に至る

主な研究テーマ：細菌情報伝達ネットワークの分子機構と情報伝達阻害型薬剤
の開発

その他

1990 年 日本農芸化学会奨励賞

2007 年 バイオビジネスコンペ JAPAN 優秀賞

2006-2010 年 農業食品産業技術総合研究機構 異分野融合研究支援事業 研
究代表

2010-2011 年 科学技術振興機構 研究成果最適展開支援事業 研究代表

2013-2014 年 日本農芸化学会関西支部長 日本農芸化学会理事

2017 年 日本農芸化学会賞

核酸結合タンパク質の構造機能相関と機能開発

(九大院・農・生命機能) 木村 誠

触媒活性を持つ RNA (リボザイム) や RNA 干渉の発見により、RNA が遺伝子の発現調節において重要な役割を担っていることが明らかになっている。これらの機能性 RNA の多くは、RNA のみでは活性を示さず、タンパク質と複合体 (リボ核タンパク質) を形成することにより機能している。従って、機能性 RNA の作用機構を理解するためには、タンパク質と RNA の相互作用を詳細に解析することが必須である。演者は、タンパク質合成を触媒するリボソームと前駆体 tRNA プロセシング酵素であるリボヌクレアーゼ P (RNase P) を研究対象として、RNA 結合タンパク質の構造と機能について研究を進めてきた。本講演では、超好熱性アーキア RNase P を研究対象とした RNA 結合タンパク質の構造機能相関に関する研究を紹介したい。

RNase P は前駆体 tRNA の 5'-末端余剰配列を特異的に切断するエンドヌクレアーゼである。RNase P の機能は生物種間でよく保存されているが、そのサブユニット組成は進化系統ドメイン (真核生物、真正細菌、アーキア) で異なっている。即ち、大腸菌を代表とする真正細菌の RNase P は 1 分子の RNA と 1 分子のタンパク質からなり、RNA 成分のみで前駆体 tRNA 切断活性を示すリボザイムである¹。一方、アーキアと真核生物の RNase P はそれぞれ 1 分子の RNA と、アーキアでは 4~5 種のタンパク質、真核生物では 9~10 種のタンパク質から構成され、RNA 分子のみでは触媒活性を示さず、RNA とタンパク質の相互作用により RNA の触媒活性が活性化される²。このような性質から、アーキアと真核生物の RNase P は、機能性 RNA のタンパク質による活性化機構を解明するうえでの最適なモデル分子と見なされている。

我々は超好熱性アーキア (*Pyrococcus horikoshii*) RNase P の再構成実験から、それが RNA (*PhopRNA*) と 5 種のタンパク質 (*PhoPop5*, *PhoRpp21*, *PhoRpp29*, *PhoRpp30*, *PhoRpp38*) から構成されていることを明らかにした。続いて、各タンパク質の結晶構造を決定するとともに、*PhopRNA* の高次構造モデルを構築した。さらに、*PhoPop5* と *PhoRpp30* は四量体を形成し、*PhoPop5* の C 末端に位置する α ヘリックスが、*PhopRNA* の触媒ドメインに含まれる 2 本のヘリックス (二本鎖構造) を架橋することにより触媒部位の構造を形成していることを明らかにした。一方、*PhoRpp21* と *PhoRpp29* は二量体を形成し、*PhoRpp21* の分子表面に広く存在する塩基性アミノ酸残基を介して *PhopRNA* の P11 と P12 を結ぶ一本鎖領域に結合し、*PhopRNA* の基質結合部位の構造形成に関与するとともに、*PhoRpp29* の C 末端 α ヘリックスが *PhopRNA* の P12 を安定化していることを明らかにした。5 番目のタンパク質 *PhoRpp38* は *PhopRNA* に存在する K-turn モチーフに結合し、その耐熱性向上に関与していることを明らかにした³。本講演では、以上の結果を総合して構築した超好熱性アーキア RNaseP の高次構造モデルを示すとともに、構造既知の真正細菌 RNase P との比較についても考察する。

参考文献

1. Esakova and Krasilnikov, *RNA*, **16**, 1725-1747 (2010).
2. Jarrous and Gopalan, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 7885-7894 (2010).
3. Kimura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 1670-1680 (2017).



名前：木村 誠 (Makoto Kimura)

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

九州大学 大学院農学研究院 生命機能科学部門

E-mail: mkimura@agr.kyushu-u.ac.jp

略歴：

1974 年 3 月 九州大学 農学部 農芸化学科 卒業

1976 年 3 月 九州大学大学院 農学研究科 修士課程修了

1979 年 3 月 九州大学大学院 農学研究科 博士課程修了

1979 年 9 月 マックスプランク分子遺伝学研究所(ベルリン) 研究員

1988 年 7 月 九州大学 農学部 助手

1991 年 4 月 九州大学 農学部 助教授

2001 年 4 月 九州大学大学院 農学研究院 教授

2017 年 4 月 九州大学大学院 農学研究院 名誉教授

現在に至る

主な研究テーマ：超好熱性アーキア RNase P の構造と機能に関する研究

：トキシン/アンチトキシンの構造と機能に関する研究

受賞歴：

1992 年 3 月 農芸化学奨励賞

(耐熱性および好塩性細菌リボソーム蛋白質の構造と進化)

2017 年 3 月 日本農芸化学会功績賞

(核酸結合タンパク質の構造機能相関と機能開発)

特別講演要旨

小胞体の機能と制御のダイナミクス

(京大院理・生物物理) 森 和俊

新規に合成された分泌タンパク質や膜タンパク質の高次構造形成が行なわれる小胞体は、これらのタンパク質が正しい立体構造をとっているかどうか峻別する能力を有し、タンパク質の品質を管理するオルガネラとして知られている。正しく折り畳まれたタンパク質はゴルジ装置以降の分泌過程に進むことが許され、折り畳まれていないタンパク質は小胞体に留められる。小胞体内には高次構造形成を介助・促進する分子シャペロンやフォールディング酵素（小胞体シャペロン）が多種多量に存在し、通常、新生タンパク質は効率よく折り畳まれている。一方、折り畳みに失敗したタンパク質は細胞質に引き出され、ユビキチン・プロテアソーム系により分解される。この廃棄システムは小胞体関連分解機構 **Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation (ERAD)** と呼ばれている。このように、折り畳みと分解という 2 つの相反する仕組みによって小胞体におけるタンパク質品質管理は成立している。

しかしながら、いわゆる小胞体ストレスと総括されている状況下で、小胞体内に高次構造の異常なタンパク質が蓄積すると小胞体ストレス応答（英語では **Unfolded Protein Response; UPR**）が活性化される。UPR は、小胞体ストレスを感知し小胞体膜を貫いたシグナル伝達を行うことができる小胞体膜貫通型タンパク質によって媒介され、哺乳動物では、IRE1、PERK、ATF6 というユビキタスに発現している 3 つのタンパク質が重要な役割を果たしている。これら 3 つの経路の活性化により、新規合成タンパク質がそれ以上小胞体内に送り込まれないように翻訳を抑制する小胞体の負荷軽減、小胞体シャペロンの転写誘導による折り畳み容量の増強、ERAD 因子の転写誘導による分解システムの活性化の 3 つの対応がなされ、小胞体の恒常性は維持される。それでもなお小胞体ストレスが持続する場合は、細胞がアポトーシスを起こし排除される。

本講演では、最先端の研究成果を交えながら、小胞体ストレス応答および小胞体関連分解の分子機構、進化、生理的意義ならびに疾患への関与等についてお話ししたい。



名前：森 和俊 (Kazutoshi Mori)

連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学 大学院理学研究科 生物科学専攻 生物物理学教室

E-mail: mori@upr.biophys.kyoto-u.ac.jp

略歴：

- 1981 年 3 月 京都大学 薬学部 製薬化学科 卒業
- 1983 年 3 月 京都大学大学院 薬学研究科 修士課程修了
- 1985 年 3 月 京都大学大学院 薬学研究科 博士後期課程中途退学
- 1985 年 4 月 岐阜薬科大学 薬学部 助手
- 1987 年 9 月 京都大学薬学博士取得
- 1989 年 4 月 米国テキサス大学 ポストドクトラルフェロー
- 1993 年 10 月 株式会社エイチ・エス・ピー研究所副主任研究員
- 1996 年 4 月 株式会社エイチ・エス・ピー研究所主任研究員
- 1999 年 4 月 京都大学大学院 生命科学研究科 助教授
- 2003 年 11 月 京都大学大学院 理学研究科教授

現在に至る

主な研究テーマ：小胞体ストレス応答の解明

受賞歴

- 平成 9 年 9 月 日本生化学会奨励賞；平成 17 年 4 月 第 4 回ワイリー賞；
- 平成 18 年 10 月 日本生化学会第 1 回柿内三郎記念賞；平成 20 年 10 月 第 26 回大阪科学賞
- 平成 21 年 10 月 カナダガードナー国際賞；平成 22 年 4 月 紫綬褒章；平成 24 年 3 月 上原賞
- 平成 26 年 1 月 朝日賞；平成 26 年 9 月 アルバート・ラスカー基礎医学研究賞；
- 平成 26 年 9 月 ショウ賞生命科学医学分野；平成 27 年 9 月 トムソン・ロイター引用栄誉賞；
- 平成 28 年 6 月 恩賜賞・日本学士院賞

シンポジウム

「豊かな未来を創造する農芸化学

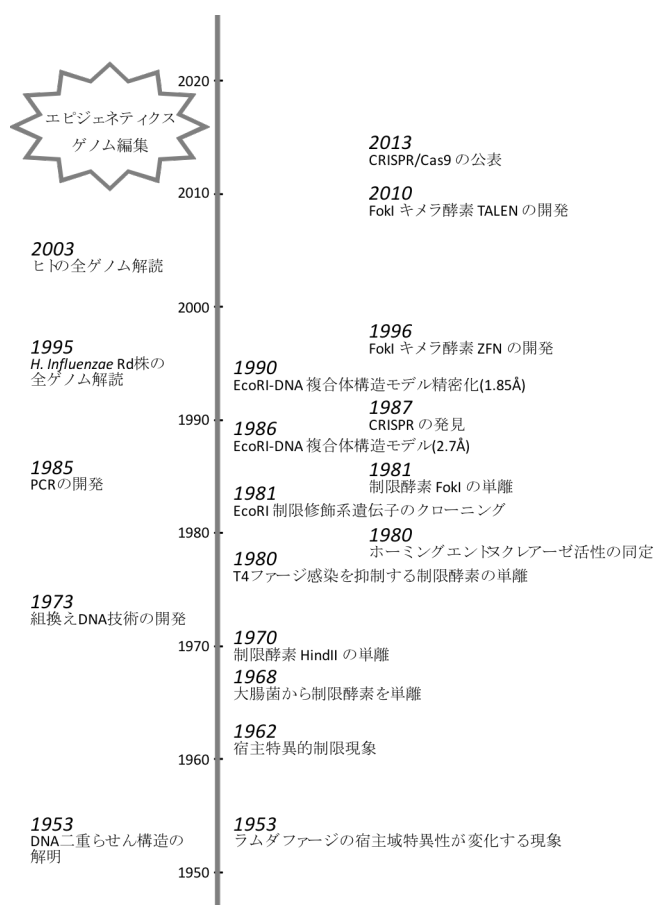
–西からの発信–」

講演要旨

制限酵素から読み解く微生物の生命現象

(京大院農・応用生命) 喜多恵子

大腸菌におけるバクテリオファージの宿主特異的制限現象が今から 60 数年前に発見された。これを契機に制限修飾システムの存在が示唆され、現在 4,000 種類以上の制限酵素がデータベースに登録されている。制限酵素は、二本鎖 DNA の特異的な配列を認識して、配列内または近傍の特異的な位置でホスホジエステル結合を加水分解して、5'-リン酸基と 3'-ヒドロキシ基を生成するエンドヌクレアーゼとして EC 3.1.21 に登録されている。一般的には、4~8 塩基対を認識して切断する制限酵素と、同じ配列を認識するメチルトランスフェラーゼが対をなし、真正細菌とアーキアにおいて外来 DNA の侵入に対する防御システムとしての生理機能を担っていると考えられている。



制限酵素関連領域研究のミニヒストリー

演者は制限修飾システムを対象とする研究を約 40 年足らず継続しているが、制限酵素はその認識切断特異性はいうまでもなく、多様性が極めて高いということに驚きを禁じ得ない。本講演では、常温で生育する真正細菌由来の制限修飾システムを構成するタンパク質に関して、これまで演者らが行ってきた生化学・生理学的解析、立体構造解析および構造情報に基づく特異性の改変等の研究成果の一部を紹介する。未だ謎の多い制限修飾システムに関して、何がどこまで解明されているのかを知っていただくとともに、今後の新たな研究展開に繋がる議論のたたき台になれば幸甚である。



名前：喜多 恵子 (Keiko Kita)

連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学大学院農学研究科 応用生命科学専攻

E-mail: kita@kais.kyoto-u.ac.jp

略歴：

1977 年 3 月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業
1979 年 3 月 京都大学大学院 農学研究科 修士課程修了
1979 年 4 月 寶酒造株式会社 中央研究所 研究員
1990 年 3 月 農学博士取得 [京都大学]
1991 年 3 月 鳥取大学 工学部 生物工学科 教務職員
1993 年 9 月 鳥取大学大学院 工学研究科 助教授
2002 年 10 月 京都大学大学院 農学研究科 教授

現在に至る

主な研究テーマ：

微生物の生産する酵素の構造と機能の解析、および構造情報に基づく機能改変

受賞歴：

大阪工研協会工業技術賞「遺伝子操作用酵素類の開発と生産」(1985 年 5 月)

環境と栄養に資する植物のミネラル輸送

(岡山大・植物研) 馬 建鋒

ミネラルは様々な顔を持つ。人間や植物にとって欠かせないものもあれば、猛毒となるものもある。我々が必要なミネラルはほとんど植物を介して土から由来する。一方、有害なミネラルも食物連鎖を経て摂取され、我々の健康に悪影響を与えてしまう。したがって、植物のミネラル輸送を理解することは作物の生産性や品質、我々の健康と環境に非常に重要である。

土壌中のミネラルはまず植物の根によって吸収されたのに、根から地上部へ転流される。地上部では、各器官や組織の必要量に応じて分配または再分配される。これらの過程では多種多様な輸送体(トランスポーター)が必要である。本シンポジウムでは、環境と栄養に密接な関係のあるイネのリンとケイ素の輸送体に関して紹介する。

ケイ素は植物にとって有用元素であるが、動物にとっては必須元素であり、骨の形成に関わる。イネはケイ素集積植物で、体内で乾物重の 10%を集積する。これまでにイネのケイ酸吸収や分配に関わる輸送体を幾つか同定してきた。Lsi1 と Lsi2 は根の外皮と内皮細胞の遠心側と向心側にそれぞれ偏在し、ケイ酸の吸収を担う。一方、節においては、Lsi2、Lsi3、Lsi6 が異なる細胞層に局在し、種子へのケイ素の優先的分配を担う。

一方、リンは植物の必須元素であり、イネにおいて全体の 6~8 割のリンは最終的に種子に転流され、次世代の発芽や早期成長に備える。しかし、現代農業においては、種子中のリンの過剰蓄積が問題となっている。イネの種子中のリンの 8 割程度はフィチン酸の形態で存在し、人間やウシ以外の家畜が消化できないため、環境に排出され、富栄養化を引き起こす。またフィチン酸は鉄や亜鉛などの金属と強く結合するため、我々のこれらの金属の吸収を阻害する。さらに、大部分のリンが収穫時に種子と共に圃場外に持ち出されるため、収穫量を維持するために、毎年多量のリン酸肥料を施与しなければならない。したがって、種子中のフィチン酸濃度を減らすことは環境だけではなく、我々の栄養や持続的な農業にも大事である。我々はイネの節で発現する新規リン酸輸送体 SPDT1 を同定した。この輸送体は吸収されたリンを分配する際に、スイッチの役割をする。この遺伝子を破壊すると、収量にはほとんど影響せず、種子のフィチン酸濃度が 20-30%減少した。



名前：馬 建鋒 (Jian Feng Ma)

連絡先：〒710-0046 倉敷市中央 2-20-1

岡山大学資源植物科学研究所

E-mail: maj@rib.okayama-u.ac.jp

略歴：

- 1984 年 6 月 南京農業大学土壤及び農業科学部 卒業
- 1988 年 3 月 京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了
- 1991 年 3 月 京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士課程修了
- 1991 年 3 月 農学博士学位取得 [京都大学]
- 1991 年 4 月 財団法人サントリー生物有機科学研究所研究員
- 1995 年 3 月 岡山大学資源生物科学研究所助手
- 1999 年 5 月 香川大学農学部助教授
- 2005 年 5 月 岡山大学資源生物科学研究所教授
- 2010 年 4 月 岡山大学資源植物科学研究所教授

現在に至る

主な研究テーマ：植物のミネラル輸送機構

受賞歴：

Highly Cited Researchers 2015, 2016；

Top authors of American Society of Plant Biologists (ASPB)；

第 12 回（1994 年度）日本土壤肥料学会奨励賞；2006 年 日本学術振興会賞；

2006 年 日本学士院学術奨励賞；2007 年 日本土壤肥料学会賞；

2012 年 木原記念財団学術賞；2014 年 山陽新聞賞（学術功労）；

2016 年 ASPB Corresponding membership award；2016 年 三木記念賞

緑茶カテキンのケミカルバイオロジー

(九州大院・生機科) 立花宏文

緑茶の主成分であるカテキンの生理作用は多くの機能性食品に活用されているが、緑茶カテキンがなぜこうした生理作用を示すのかそのメカニズムの解明が待たれていた。こうした中、緑茶カテキンと結合し、抗がん作用、抗アレルギー作用、炎症抑制作用などの多彩な生理作用の発現に必須な受容体分子として 67 kDa ラミニンレセプター (67LR) を発見した。本講演では、緑茶カテキンの生理活性発現メカニズムとそれを基盤とする応用展開について紹介する。

主要な緑茶カテキンであるエピガロカテキンガレート (EGCG) は幅広い抗腫瘍活性スペクトルを有する。これに関し、多くのがん種において 67LR が高発現しており、EGCG が 67LR 依存的に細胞膜脂質ラフトの構造変化を誘導することで様々な増殖因子受容体シグナリングを阻害することを明らかにした¹⁾。また、EGCG の生理活性発現には、Akt、NO、cGMP、PP2A、PDE5 などが関与する 67LR シグナリングが重要な役割を担っており²⁾、これらの活性を制御することで EGCG の生理作用を増強できることを見出した。

EGCG の膵臓がん幹細胞形質抑制作用のメカニズムを明らかにする過程において、FOXO3/LKB1/AMPK/PGC-1 β 経路が CD44 の発現を正に制御することでがん幹細胞形質を維持していることを明らかにした^{3,4)}。また、67LR シグナリングを強力に活性化することで膵臓がん幹細胞形質を阻害する EGCG 誘導体の合成に成功した⁵⁾。

EGCG は 67LR 分子の特定配列に結合し、分子集合体を形成することで機能性を発現することを明らかにした⁶⁾。この EGCG 結合配列を標的とする抗体は EGCG 様活性 (67LR シグナリングの活性化) を発揮するのではないかと考え、EGCG 結合配列に相当するペプチドをマウスに免疫したところ、EGCG 様活性を示す抗体が産生されるとともに、移植した腫瘍の成長抑制ならびに延命が観察された。

1) Mol. Cancer Ther. 14, 2303–2312 (2015)

2) J. Biol. Chem. 292, 4077–4088 (2017)

3) Oncogene 36, 2643–2654 (2017)

4) J. Biol. Chem. 292, 10813–10823 (2017)

5) Sci. Rep. 7, 1917 (2017)

6) Chem. Commun. 53, 1941–1944 (2017)



名前：立花 宏文 (Hirofumi Tachibana)

連絡先：〒812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

九州大学 大学院農学研究院 生命機能科学部門

E-mail: tatibana@agr.kyushu-u.ac.jp

略歴：

1987 年 3 月 九州大学 農学部 食糧化学工学科 卒業
1989 年 3 月 九州大学 大学院 農学研究科 修士課程修了
1991 年 5 月 九州大学 大学院 農学研究科 博士課程退学
1991 年 6 月 九州大学 大学院 農学研究科 助手
1994 年 7 月 九州大学 大学院 農学研究科 講師
1996 年 12 月 九州大学 農学部 助教授
2012 年 4 月 九州大学 大学院 農学研究院 教授
2012 年 5 月 九州大学 大学院 農学研究院 主幹教授

現在に至る

主な研究テーマ：フードケミカルバイオロジー、食品因子の機能性に関する分子
的基盤の確立とその応用

受賞歴

1998 年 農芸化学奨励賞
2004 年 日本農学進歩賞
2006 年 日本学術振興会賞
2010 年 日本食品免疫学会賞
2016 年 農芸化学技術賞
2016 年 食品免疫産業賞
2017 年 安藤百福賞優秀賞
2017 年 文部科学大臣表彰 科学技術賞（研究部門）

一般講演要旨

A-a01 内在性ラムノース代謝系を利用した組換え大腸菌による1-プロパノール生産 ○服部佑紀, 松原充, 長谷川亮, 片岡道彦 (阪府大院・生命環境)

【目的】ペクチンの構成糖であるラムノースは大腸菌内在性の代謝系により, 1,2-プロパンジオール (1,2-PD) に変換される. 先行研究で 1,2-PD を 1-プロパノール (1-PrOH) に変換する酵素遺伝子群を大腸菌に導入することで, ラムノースからの 1-PrOH 生産を可能にしたが, 副産物生成により低い生産性に留まっていた. そこで本研究では, 宿主大腸菌の代謝改変や培養条件の検討を行い, 1-PrOH 生産量・対糖収率の向上を目指した.

【方法・結果】副産物生成に関わる酵素遺伝子の破壊株を用いて 1-PrOH 生産培養を行った結果, 野生株を用いた場合よりも高い対糖収率を示す株がいくつか得られた. その中から, *aldA* 破壊株を宿主として用い, 培地中に通気する空気と窒素の混合比を変えて, ジャーファーメンター培養を行った結果, 空気:窒素=75:25 の通気条件において, 1-PrOH を最大 113 mM (6.80 g/L) 生成した. さらに生産性向上のため基質であるラムノースを追添加する培養を行った結果, 培養 80 時間で 1-PrOH を 186 mM (11.1 g/L) 生成した.

A-a02 宿主大腸菌への NADH 供給系導入による 1-プロパノール発酵生産の効率化 ○松原充, 山田尚平, 長谷川亮, 片岡道彦 (阪府大院・生命環境)

【目的】近年, 化石資源枯渇に対する懸念から, 化石資源由来ポリマーをバイオマスから生産する技術が求められている. 本研究では, 代表的汎用ポリマーであるポリプロピレンの単量体であるプロピレンへと変換可能な 1-プロパノールに着目し, 組換え大腸菌を用いたバイオマス資源 (グルコース) からの効率的な 1-プロパノール発酵生産について検討を行った.

【方法・結果】これまでに宿主大腸菌の代謝改変および数種の酵素遺伝子の導入により, グルコースからの 1-プロパノール発酵生産が可能となったが, 1-プロパノールの前駆物質であるヒドロキシアセトン (HA) の蓄積が見られた. そこで我々は, HA の蓄積が補酵素 NADH の供給量不足によるものと仮定し, NADH 合成に関与する大腸菌由来の *pncB* 遺伝子と *pntAB* 遺伝子の過剰発現を試みた. その結果, いずれの過剰発現株においても HA 蓄積の解消が見られ, 特に *pntAB* 過剰発現株を用いた嫌気的培養ではグルコースに対する 1-プロパノールの収率が導入前の 0.73 mol/mol から 0.88 mol/mol に向上した.

A-a03 超好熱菌 *Thermococcus kodakarensis* によるキチンからの水素生産株の育種 ○金井保^{1,2}, Mehwish Aslam¹, 堀内あゆみ¹, Jan-Robert Simons^{1,2}, Savyasachee Jha^{1,2}, 山田将大¹, 小谷徹¹, 藤本理夏子¹, 山本康之¹, 郡司遼馬¹, 今中忠行^{2,3}, 跡見晴幸^{1,2} (¹京大院・工, ²JST・CREST, ³立命大・総合科技研)

【目的】キチンは地球上でセルロースに次いで多く存在する天然多糖であるが, その利用は極めて限定的である. 本研究では, 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のキチン分解・資化系の強化により, キチン分解に依存して生育する *T. kodakarensis* 株の育種を試みた.

【方法・結果】*T. kodakarensis* KU216 株 ($\Delta pyrF$) に対し, キチン分解・資化系遺伝子に対する遺伝子工学的育種法と, キチン含有培地を用いた培養工学的育種法を組み合わせることで, キチンを効率良く分解できる *T. kodakarensis* KC04 Δ tM1 株を取得した. さらに本菌が水素を発生することを確認し, その評価を行った結果, キチン分解に依存した水素の発生が確認された. 本菌の取得により, 超好熱菌を用いてキチンをバイオマスとして利用した水素生産系の構築が可能となった.

A-a04 焼酎粕培地中のイソマルトオリゴ糖とクエン酸を炭素源として利用できる大腸菌株の作成

○渡辺大貴¹，宮地真由¹，西川友香理¹，玉置尚徳²，鈴木秀之¹
(¹京工繊大・応生，²鹿児島大・農)

【目的】焼酎粕は非発酵性の糖やクエン酸などの栄養素を含みかつ酸性である。そのためそのまま環境中に廃棄することは許されず、その処分法が問題となっている。本研究では、中和した焼酎粕に大腸菌を生育させることで、環境への負荷の低減を目指した。

【方法・結果】大腸菌は好気条件下では焼酎粕に含まれるクエン酸とイソマルトースを炭素源として利用できない。そこで、大腸菌の嫌気条件下でのみ発現するクエン酸トランスポーター遺伝子と枯草菌のマルトース代謝系遺伝子を *lacI* 遺伝子のプロモーター下にオペロンとなるようにクローニングしたプラスミドを持つ株を作成した。この菌株を中和した焼酎粕で生育したところ、イソマルトースは完全に消費された。一方、菌体外のクエン酸濃度は一端 1/5 程度にまで減少したが、さらに培養を続けると上昇に転じることが分かった。

A-a05 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* カロテノイド生産性向上のための分子育種

○三田将平¹，森川盾毅¹，浦口裕介¹，勝嶋啓介²，徳永早紀²，中川聡^{1,2}，
澤山茂樹^{1,2} (¹京大院・農，²京大・農)

【目的】*Chlamydomonas reinhardtii* は微細藻類のモデル生物で、カロテノイド含量は平均的である。1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*DXR*) 遺伝子は、カロテノイドの前駆物質を合成する非メバロン酸経路の鍵酵素をコードする。本研究では、*C. reinhardtii* において *DXR* を過剰発現させることで、カロテノイド生産性向上を目指した。

【方法・結果】*C. reinhardtii* 用タンパク質発現ベクター pChlamy_4 にクローニングした Cr*DXR* をライゲートし、pC4*DXR* を作成した。得られたベクターを用い、ガラスビーズ法で *C. reinhardtii* を形質転換した。ゼオシン耐性で選抜した形質転換体のルテイン含量、βカロテン含量を高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、野生株と比べて一細胞当たりの両カロテノイド含量が有意に増加していた。

A-a06

アユ冷水病ワクチンへの応用を目的とした組換え *Flavobacterium psychrophilum* コラゲナーゼの調製

○森下諒¹, 森真璃子¹, 中山仁志², 児島憲二¹, 滝田禎亮¹, 保川清¹
(¹京大院・農, ²和歌山県水産試験場)

【目的】*F. psychrophilum* はアユ冷水病 (CWD) の原因菌である。本菌のコラゲナーゼ (fpcol) は CWD の原因毒素である。本研究では組換え fpcol を調製し、アユ血清との結合を調べた。

【方法・結果】fpcol はシグナルペプチド (M1-A22)、触媒領域 (Q23-G883)、Por 分泌配列 (V884-E950) から成る。f367 (T70-G367)、f435 (T70-G435)、f509 (T70-G509)、f593 (T70-G593)、f644 (T70-G644)、f734 (T70-G734)、f832 (T70-G832)、f883 (T70-G883) をコードする DNA を pET22b(+) と大腸菌 BL21(DE3) を用いて発現させた。菌体の不溶性画分を 6 M 塩酸グアニジンで可溶化し、透析により塩酸グアニジンを除くと可溶化物が得られた。いずれもゼラチンザイモグラフィで活性を示さなかった。*F. psychrophilum* に感染後 1 ヶ月間耐過したアユ血清中の IgM を用い ELISA を行ったところ、f644、f734、f832、および f883 の可溶化物との結合がみられ、これら可溶化物の CWD ワクチンとしての可能性が示唆された。

A-a07

Citrobacter sp. No.172 株の Pd²⁺還元に関わる遺伝子の探索

石川泰久, ○東口拓司, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命環境)

【目的】土壌分離菌 *Citrobacter* sp. No. 172 株は、Pd²⁺還元細菌として知られる *Shewanella* 属が持つ Pd²⁺還元活性に勝るとも劣らない高い活性を示す。そこで、*Citrobacter* sp. No. 172 株の Pd²⁺還元に関与する遺伝子を特定することで、その還元機構を解明することを目指した。

【方法・結果】大腸菌に Pd²⁺還元能を付与する遺伝子を同定するため、本菌株ゲノム遺伝子のショットガンクローニングを行い、約 5000 株のゲノムライブラリより Pd²⁺還元能が観察された 4 株の陽性株を取得した。その中で最も高い活性を示した株 (H10 株) が保持するプラスミド挿入断片に存在した Cytochrome *b*₅₆₁ (Cyb₅₆₁) をコードする遺伝子を単独で大腸菌に導入した結果 H10 株と同等の活性が確認され、Cyb₅₆₁ が Pd²⁺還元に関与することが明らかとなった。*Shewanella* 属では、Pd²⁺還元において Cytochrome *c* が細胞内膜から細胞外への電子の輸送に重要な役割を果たしていることが報告されている。したがって Cyb₅₆₁ も同様に電子の輸送に関与していることが推察された。現在、残りの陽性株について検討中である。

A-a08

深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* の構造と熱安定性

○須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【目的】至適生育環境 10℃、50 MPa の *Shewanella benthica* と至適生育環境 8℃、30 MPa の *Shewanella violacea* は、共に深海由来でアミノ酸配列が 92%一致するシトクロム *c'* (SBCP、SVCP) を有する。より高圧下で存在する SBCP は、SVCP に比べ、熱に対する安定性が 10℃近く高い。本研究では、SBCP の熱安定化に寄与する要因をアミノ酸レベルで検討した。

【方法・結果】SBCP と SVCP の結晶構造比較より、43 番アミノ酸が SBCP の熱安定化に寄与し得ると考察した。そこで、SBCP の Ala-43 を SVCP の Thr-43 に取り換える変異を入れ、大腸菌で異種発現、およびカラムで精製した。CD スペクトルの 222 nm を指標とした 25～100℃の昇温測定実験により、SBCP A43T 変異体の変性中点温度 (*T*_m) を測定した結果、SBCP Wt の *T*_m とほぼ同じ値が得られた。43 番アミノ酸置換による熱安定性の変化は見られなかったことから、SBCP は頑強な構造を取っていると考えられる。現在、他の変異体を作製し、SBCP の熱安定化に寄与するアミノ酸残基の特定に取り組んでいる。

A-a09

深海性 *Shewanella* 属細菌由来の 5'-ヌクレオチダーゼの重金属耐性

○藤森貴子, 藤井創太郎, 栗林貴明, 三本木至宏(広島大院・生物圏)

【目的】*Shewanella* 属細菌は、地球生物学的な物質循環に重要な種であり、様々な環境へのタンパク質の適応メカニズムを調べる適切な材料となる。本研究の目的は、深海などの海洋中に含まれる重金属に対して、深海性中度好塩菌 *Shewanella violacea* と浅瀬由来の非好塩菌 *Shewanella amazonensis* の 5'-ヌクレオチダーゼ (NTase) がどのような耐性を示すか比較検討する。

【方法・結果】*S. violacea* と *S. amazonensis* の膜画分を可溶化後、各種カラムによりそれぞれの NTase を精製した。精製した NTase の ATP 分解活性を NiCl_2 、 CoCl_2 存在下で測定した。いずれの NTase 活性は 100 mM の NiCl_2 あるいは CoCl_2 存在下で阻害されたが、*S. violacea* 由来のものは *S. amazonensis* 由来のものよりその程度が低かった。前者は、KCl や NaCl に対しても耐性であり、今回重金属イオンに対しても同様に耐性があることが分かった。現在、他のイオンについても検討している。

A-a10

HUP1 遺伝子導入による緑藻 *Dunaliella salina* への糖利用能付与

○森川盾毅¹, 浦口裕介¹, 三田将平¹, 勝嶋啓介², 徳永早紀², 中川聡^{1,2}, 澤山茂樹^{1,2} (¹京大院・農, ²京大・農)

【目的】緑藻 *Dunaliella salina* は、ストレス条件下で β -カロテンを大量に蓄積する。しかし、その増殖速度は速くないため、実験対象として扱いづらいという欠点がある。そこで我々は HUP1 (Hexose Uptake Protein) 糖輸送タンパク質に注目した。HUP1 はヘキソースとプロトンの共輸送体である。糖利用能を持たない *D. salina* に HUP1 を導入することで、新たな炭素源として糖を利用可能にし、増殖速度の改善を目的として研究を行った。

【方法・結果】*D. salina* にコドン使用頻度を最適化した *Parachlorella kessleri* 由来の HUP1 を用い、HUP1 発現ベクター pDsHRB-HUP1 を作成した。ガラスビーズ法で pDsHRB-HUP1 を *D. salina* に形質転換した。ゼオシン耐性で選抜した形質転換体について、細胞濃度変化を測定した。100 mM のグルコースを含む培地では、形質転換体の細胞濃度は野生株に比べ、3 日後に 1.3 倍、7 日後に 1.9 倍となった。

A-a11

Aspergillus fumigatus が産生する真菌型ガラクトマンナンのコアマンナン鎖生合成に関わる遺伝子の同定

○尾上拓哉¹, 田中大², 後藤正利³, 柴田信之², 太田一良¹, 岡拓二¹ (¹崇城大院・工, ²東北医薬大・薬, ³佐賀大・農)

【目的】*Aspergillus fumigatus* の細胞壁に含まれる真菌型ガラクトマンナン (FTGM) はコアマンナン鎖にガラクトフラノース糖鎖が結合した構造をしている。FTGM は *A. fumigatus* 細胞壁の最表層を覆っていることから病原性への関わりが示唆されている。本研究では、FTGM のコアマンナン鎖の生合成に関わる糖転移酵素遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】*A. fumigatus* には、 α 1,2-マンノース転移酵素パラログが 3 つ存在していることを見出した。このうち *cmsA*, *cmsB* と名付けた 2 つの遺伝子破壊株では、菌糸の生育速度が親株と比較して、 $\Delta cmsA$ で 10.2%, $\Delta cmsB$ で 8.1%にまで低下していた。また、分生子形成能に関しては親株と比較し、共に 2.5%にまで低下していた。また、菌糸が膨らむ構造が高頻度に確認された。各破壊株より FTGM を抽出し、¹H-NMR 解析を行ったところ、コアマンナンの存在を示すケミカルシフトが消失していることが明らかになった。

A-p01 Gut microbiota community structure of Japanese Alzheimer's disease (AD) patients: Insights from high-throughput 16S rRNA gene sequencing

ONguyen TTT^{1,2}, Fujii Y¹, Fujimura Y¹, Hirata A¹, Tomotsune K¹,
Maruyama A¹, Mimura I¹, Arakawa K¹, Urakami K³, Morita H¹
(¹Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., ²Hue Univ.,
³Fac. Med., Tottori Univ.)

【Purpose and Methods】Feces of ten volunteers diagnosed with AD (3 males and 7 females, age: 71~90, 82.7±9.0) were collected. 16S rDNA sequences were obtained by Miseq (Illumina) for insights of their gut microbiota. By using QIIME, gut microbiota community structure of AD and ten healthy (HC) volunteers (6 males and 4 females, age: 76~85, 80.4 ± 3.3) were analyzed.

【Results】Based on UniFrac analysis, a significant difference in gut microbiota community structure was observed between AD and HC groups ($p<0.01$). At genus level, *Bacteroides* and *Blautia* were decreased in AD group ($p<0.05$). On the other hand, *Collinsella*, *Parabacteroides* and *Phascolarctobacterium* of AD group were higher than those of HC group ($p<0.05$).

A-p02 日本人成人における腸内細菌叢と食事の関連性の解析

○内川彩夏¹, 田中優¹, 余田美沙子¹, 中山二郎¹, 池田温子², 河口礼佳²,
十倉充範² (¹九大院・生資環, ²味の素イノベーション研)

【目的】食事がヒトの健康に及ぼす効果について多くの知見が蓄積されているが、その直接的な影響に加えて、腸内細菌叢を介しての作用が昨今注目されている。本研究では、日本人成人の食習慣が腸内細菌叢やその代謝物に与える影響についての基盤データベース構築の一環として、次世代シーケンサーによる網羅的細菌叢解析、便中の短鎖脂肪酸量と食事に関する自記式食事歴法質問票 (DHQ-L) を用いて調査を行った。

【方法・結果】本研究は、日本人 116 名 (19~78 歳) までを対象にした。DHQ-L により得られた主食の摂取量から、白米の摂取量と *Bacteroidetes* 門細菌の占有率、麦飯の摂取量と *Firmicutes* 門細菌の占有率が有意に正の相関を示した。さらに、分岐型短鎖脂肪酸量であるイソ吉草酸、イソ酪酸が麦飯の摂取量と有意に正の相関を示した。以上より、主食の種類が腸内細菌叢及び糞便中の短鎖脂肪酸量に影響を与えることが示唆された。

A-p03 Characterization of *Lactobacillus paracasei* phageΦT25 from fermented milk in Thailand

OSirinthorn Sunthornthummas¹, Onanong Pringsulaka¹, Yasuhiro Fujino²,
Katsumi Doi² (¹Fac. Sci., Srinakharinwirot Univ., ²Fac. Agric., Kyushu Univ.)

Most dairy plants have encountered severe phage contamination, resulting in fermentation failure. Several studies focus on phage infecting *Lactococcus* sp. and *Lactobacillus plantarum*. This study was the first to characterize a *Lactobacillus paracasei* phage, ΦT25, from abnormal fermented milk in a Thailand factory. The phage genome consists of 38.4 kbp with 51 open reading frames. Electron microscopy studies revealed that ΦT25 is a member of the *Siphoviridae* family. The phage formed an inhibitory zone only on *L. paracasei* LPC. Phage ΦT25 was readily inactivated with 75% ethanol, 800 ppm hypochlorite, 0.15% peracetic acid, 1% Virkon, 5% Dettol or 2% Decon 90. This study has provided relevant information about the *L. paracasei* phage and recommendations for phage control in dairy plants.

A-p04 清酒製造場に存在する野生酵母の同定とその性質

○伊藤一成, 谷野有佳, 三宅剛史 (岡山県工技セ)

【目的】現代の清酒製造では一般的に特定の酵母菌株を用いるが、ほぼ全ての工程が開放系で行われている。また、生もとや山廃造りなど一部では蔵付きの酵母菌叢に頼った製造も行われている。従って野生酵母による微生物汚染の防止、腐造リスクの回避のため、環境中の酵母菌叢の影響を意識しておくことが重要である。本研究では、清酒製造場に存在する野生酵母を単離し、それらの耐糖性、耐アルコール性とアルコール発酵性について調べた。

【方法・結果】岡山県内の一製造場において採取した試料を TTC 下層培地に塗布し、培養した。生じたコロニーをランダムに釣菌し各菌株を同定したところ、典型的な野生酵母や *Saccharomyces cerevisiae* も散見された。これらの菌株を用いて、2～20%のグルコースとエタノールを含む YPD 培地を用いた培養試験を実施した。どの株も濃度が高くなるにつれ生育は阻害されたが、耐糖性の高い株が多かった。また、麴エキスをを用いたアルコール発酵性試験の結果、きょうかい酵母と同程度の発酵能を持つ株が存在した。

A-p05 PQQ 生合成に関与する新規な遺伝子の探索

○石川枝里奈, 水谷治, 外山博英 (琉球大院・農)

【目的】ピロロキノリンキノン (PQQ) は、酸化還元酵素の補欠分子族である。これまでに様々な微生物において PQQ 生合成に関与する 6～7 遺伝子が報告されているが、キノン部位の形成に関与する遺伝子が特定されていないことや想定される反応過程に比べ遺伝子数が少ないことから、それら以外の別の遺伝子が PQQ 生合成に関与している可能性が示唆されている。そこで本研究では、*Methylophilum* sp. Yamaguchi (Y 株) の PQQ 生合成に関与する新規な遺伝子の探索を行い、その遺伝子機能の解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】Y 株のトランスポゾン変異株の中から、PQQ が無くても生育できるが、野生株と比べて PQQ 生産量が半分以下に減少した菌株を 19 株選抜した。そのうち、5 株は野生株と同様な生育を示したが、4 株は野生株と比べて生育が遅くなり、残りの 10 株は生育がかなり低下していた。今後得られた変異株のトランスポゾンの挿入部位を同定する。これらの遺伝子は PQQ 生合成に必須ではないが、大きく関与する遺伝子の可能性がある。

A-p06 冬虫夏草の脂質解析

○上田堅人，大塚拓実，阪本鷹行，櫻谷英治（徳島大・生物資源）

【目的】

冬虫夏草とは、昆虫などに寄生して子実体を形成する菌類の俗称であり、温暖且つ湿潤な日本では 400 種近くの報告がある。一部の冬虫夏草は古来より漢方薬として用いられており、近年ではツクツクボウシタケから発見された免疫抑制物質が多発性硬化症の治療に応用されている。しかし、冬虫夏草の脂質についてはほとんど知見がない。そこで、本研究では野生の冬虫夏草を単離し、その脂質組成について解析した。

【方法・結果】

採取した冬虫夏草から単離した菌糸を培養し、ガスクロマトグラフィーを用いて脂質を分析した。その結果、ツバキコナジラミを宿主とする冬虫夏草の菌糸において、ステロールの前駆物質であるスクアレンの蓄積が確認された。ここでは約 20 株の冬虫夏草から単離した培養菌糸の脂質について報告する。

A-p07 廃グリセロール資化性菌による微生物油脂生産

○加納みずほ，亀川優一，栗田千波，阪本鷹行，櫻谷英治
（徳島大・生物資源）

【目的】 近年、廃植物油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、その際に副産物として大量の廃グリセロールが生成される。本研究では廃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とそれらの脂質生産性を評価したので報告する。

【方法・結果】 自然界の土や水を単離源として、高濃度グリセロールあるいは廃グリセロールを含む培地で生育可能な微生物の単離を試みた。得られた菌株を廃グリセロール液体培地で 28℃、7 日間振とう培養し、生育度評価及び脂肪酸組成分析を行った。廃グリセロールにはメタノールなどの生育阻害物質が含まれているため、オートクレーブ未処理の廃グリセロール含有培地で単離菌は生育しなかった。そこで培地の処理条件を検討した結果、80℃で 30 分の熱処理をした培地で菌の生育を確認した。また現在、培養のスケールアップと簡略化、及びテルペン類の分析を検討中である。

A-p08 スクアレン生産性酵母の探索と培養条件の検討

阪本鷹行，太田里咲，○楠美波，高野仁美，櫻谷英治（徳島大・生物資源）

【目的】

ステロールの前駆物質であるスクアレンは、保湿剤や皮膚軟化剤として利用されている。市場のスクアレンは深海鮫の肝油から供給されており、鮫個体数の減少が懸念されている。本研究では、微生物によるスクアレン生産を目指して、自然界から様々な酵母を単離し、スクアレン高生産菌の探索および培養条件の検討を行った。

【方法・結果】

自然界のサンプルからクロラムフェニコール耐性を示す微生物を単離し、菌体の総脂質をけん化処理した後、ガスクロマトグラフィー分析に供した。約 480 株のスクリーニングを行った結果、スクアレンを高蓄積する酵母様微生物を見い出した。培養日数や炭素源などの培養条件の検討を行い、単離株のスクアレン生産性を評価した。また現在、26/28S rDNA D1/D2 領域の遺伝子配列解析による同定を試みている。

A-p09 担子菌の牛乳発酵によるペプチドの生産と機能

○田川瑞季¹, 川村紗瑤¹, 並河徹², 岡本賢治¹

(¹鳥取大院・工, ²島根大・医)

【目的】自然界で木質資源の循環に重要な働きをしている担子菌は、リグノセルロース分解のみならず生理活性物質の生産など多様な変換能を有する。我々は、エタノール生産をはじめ、担子菌に潜在する新たな機能探索を行っている。本研究では、褐色腐朽菌 *Neolentinus lepideus* に着目し、牛乳を原料とした発酵でのペプチド生産について調べた。

【方法・結果】*N. lepideus* 菌糸体を牛乳に接種し、培養したところ、乳中のラクトースからエタノールを生産することを認めた。一方、発酵の経過に伴い培養液の清澄化が観察され、分析の結果、アミノ酸が多く遊離していた。さらに、発酵乳中にアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を検出したことから、カゼインに由来するペプチドの存在が示唆された。現在、発酵乳を逆相高速液体クロマトグラフィーで分画し、ACE 阻害活性画分について各種機器分析によるペプチドの同定を進めており、今後、動物実験での機能評価を予定している。

A-p10 *Pseudomonas stutzeri* がアルカリ条件下で生産する多糖の特性解明

○山田浩之^{1,2}, 築瀬英司¹, 岡本賢治¹ (¹鳥取大院・工, ²和光純薬工業)

【目的】土壌から分離した *Pseudomonas stutzeri* BL58 株が、アルカリ条件下で高粘性の多糖体を生産することを見いだした。本研究では、当該多糖の特性を明らかにするため、構造ならびに生理的特徴について解析を行った。

【方法・結果】BL58 株による多糖 (以下 BL ポリマー) の生産条件を最適化し、pH10、0.5% ペプトン、1%エタノールから成る培地で培養した結果、72 時間後に全糖量約 12.5 g/L の BL ポリマーを得た。BL ポリマー精製品を HPLC 分析、TFA で酸加水分解後、アルジトールアセテート誘導体を GC-MS 及び NMR にて構造解析したところ、構成糖はグルコース、マンノース及び 3-*O*-カルボキシエチルラムノース、構造はグルコースとマンノースが 1, 4 結合し、グルコース分子内にカルボキシエチルラムノースが結合しているものと推定した。また、BL ポリマーの安定性試験の結果において、急性毒性、眼、皮膚への刺激、変異原としての影響は特に認めなかった。

A-p11 コエンザイム Q10 の生合成に関わる新規因子の発見

○西田郁久, 柳井良太, 松尾安浩, 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、真核生物のミトコンドリアにおける呼吸鎖電子伝達系の必須成分としてエネルギー産生に関与する。CoQ は、キノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成され、ヒトや分裂酵母ではその側鎖長が 10 である CoQ10 を生合成する。分裂酵母では少なくとも 11 種の遺伝子が CoQ の生合成に関与するが、キノン骨格の前駆体の生合成に関しては未解明であるため、本研究では新規因子の同定を試みた。

【方法・結果】分裂酵母にはミトコンドリアに局在するタンパク質をコードする遺伝子が、約 400 種ある。それらの遺伝子の破壊株の CoQ10 を網羅的に定量したところ、明確に CoQ10 量が減少し、CoQ 生合成に関与する報告がない遺伝子の破壊株を見出した。その機能未知の遺伝子を *coq12* と命名した。*coq12* の破壊株を、*p*-hydroxybenzaldehyde や *p*-hydroxybenzoate などのキノン骨格の前駆体を含む培地で培養すると、CoQ10 の生産性が回復した。このことから、Coq12 がキノン骨格部分の生合成経路に関与する新規因子であると考えた。

B-a01

海洋性細菌由来シクロアルカノンモノオキシゲナーゼ遺伝子の解析

○山本泰誠、岩木宏明、長谷川喜衛（関西大・化学生命工）

【目的】既報のシクロアルカノンモノオキシゲナーゼ (CAMO) には 5~7 員環あるいは 11 員環以上のケトンを経路とするものがほとんどである。本研究では、シクロオクタノンを基質とする CAMO をコードする遺伝子の取得を目的とした。

【方法・結果】シクロオクタノン還元性菌をスクリーニングした後、シクロオクタノンモノオキシゲナーゼ活性の強い菌株として、*Phaeobacter* sp. KU2B3a 株および、*Lutimaribacter litoralis* KU5D5 株を選択した。これらの菌株の CAMO 遺伝子の塩基配列を取得し、推定アミノ酸配列を既報の CAMO のものと比較したところ、両菌株の CAMO 共に、*Xanthobacter* sp. ZL5 株のシクロヘキサノンモノオキシゲナーゼと最も高い類似性を示した (アミノ酸一致率 78%)。両菌株の CAMO 異種発現大腸菌を構築し、シクロアルカノンに対する活性を測定した結果、両菌株の CAMO 共に 5~9 員環ケトンに対して活性を示した。

B-a02

Caenibacillus caldisaponilyticus B157^T 株由来新規ホスホリパーゼ A₁ (PLA₁) の不活性型の大腸菌大量発現と proteinase K による活性化

○田中秀典¹、齋藤遼¹、古谷洋人¹、辻本善之¹、鶴岡直樹²、茂里康²、渡部邦彦¹（¹京府大院・生命環境、²産総研）

【目的】本研究室で単離された B157^T 株はリン脂質を加水分解する新規 PLA₁ を細胞外に分泌する*。この PLA₁ は C 末端側に pro 配列 (inhibitory domain) を持つ不活性型として分泌され、細胞外でプロテアーゼによって活性化される。そこで、不活性型 PLA₁ を大腸菌で発現させ、*in vitro* でプロセッシングを行うことで、活性型 PLA₁ を調製し、その性質を決定する。

【方法・結果】大腸菌で発現させ精製した不活性型 PLA₁ を、B157^T 株培養上清、proteinase K、trypsin、lysyl endopeptidase で反応させた。反応混合液を SDS-PAGE に供し、PLA 活性染色を行った。その結果、B157^T 株培養上清と proteinase K で処理した時のみ、移動度の同じ活性の強いバンドを得た。今後、proteinase K でプロセッシングした活性型 PLA₁ を精製し、性質を明らかにする。

**Int J Syst Evol Microbiol.*, 66, 2684-2690 (2016)

B-a03

超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* 由来グリセロール 1-リン酸脱水素酵素に見出した新規補酵素結合様式

○林順司¹、山本香季²、米田一成³、大島敏久⁴、櫻庭春彦²
（¹立命大・生命科学、²香川大・農、³東海大・農、⁴大阪工大・工）

【背景】アーキアのリン脂質の基本骨格グリセロール 1-リン酸は、アーキア特有のグリセロール 1-リン酸脱水素酵素 (G1PDH) により生成される。膜脂質合成において G1PDH は重要な役割を担うが、その構造解析は 1 例しか報告が無い。我々は超好熱アーキア *Pyrobaculum calidifontis* G1PDH の構造解析を行い、本酵素が特徴的な補酵素結合様式を示すことを見出した。【方法・結果】大腸菌で生産させた酵素の諸性質解明と X 線結晶構造解析を行った。本酵素には NADPH が結合していたが NADH 特異的で、NADPH は NADH 依存性の活性を強力に阻害した。NADPH はアデニンリボース C2 リン酸基周辺の偏った相互作用の影響で、本来の補酵素結合部位からずれた位置に結合しており、このため反応性が低下することが推定された。この偏りを解消させた変異酵素は NADPH に対する高い活性を新たに獲得した。

B-a04 超好熱性アーキアの含硫化合物への硫黄転移に関わるユビキチン様タンパク質の同定

○秀瀬涼太, 榊原早津季, 藤原伸介 (関学大院・理工)

【目的】多くの常温生物において、硫黄脱離酵素システインデスルフラゼ (CDS) は、モリブドプテリンや鉄硫黄クラスターなど含硫補因子、tRNA のチオ化修飾の硫黄転移に必須である。一方、初期生命の性質を強く残している超好熱性アーキアの多くは、CDS オルソログをもたず、これら含硫化合物の生合成系は不明である。

【方法・結果】含硫化合物への硫黄転移系では、ユビキチン様タンパク質が関与することが大腸菌や好塩性アーキアなどで知られている。*T. kodakarensis* は、3 種のユビキチン様タンパク質 (TK1069, TK1093, TK2118) をもち、これらは、超好熱性アーキアで高度保存されていた。このことから、初期生命はユビキチン様タンパク質を介して含硫化合物への硫黄転移を行っていた可能性が高いことが考えられた。*T. kodakarensis* での各オルソログの特異的遺伝子破壊による生理的機能解析の結果も合わせて報告する。

B-a05 タイの塩蔵発酵食品から分離した *Bacillus* 属細菌の生産する耐塩性プロテアーゼの遺伝子クローニングと特性解析

○竹中慎治¹, 吉波淳¹, 高田愛莉¹, Ampin Kuntiya²,
Phisit Seesuriyachan², Thanongsak Chaiyas², 吉田健一³
(¹ 神戸大院・農, ² チェンマイ大・アグロインダストリー,
³ 神戸大院・科学技術イノベ)

【目的】塩存在下および非存在下両方において安定で同程度の活性を維持できる耐塩性酵素の耐塩性機構を明らかにし、タンパク質工学に応用することを目的とした。

【方法・結果】タイの塩蔵発酵調味料から単離した *B. subtilis* No. 16 の生産する耐塩性セリンプロテアーゼ (Apr_No16) を精製し、同酵素遺伝子をクローニングした。既報の耐塩性 Apr¹⁾ と比較的耐塩性の低い Apr と一次構造を比較して着目した 8 つのアミノ酸残基について Ala 残基に置換し、得られた 8 重変異酵素と Apr_No16 を比較した。アゾカゼインに対する $K_m \cdot V_{max}$ 値には顕著な相違は見られなかったが、塩濃度 0~20% の範囲で 8 重変異酵素はより耐塩性が向上していた。1) Takenaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 75:148-151, 2011.

B-a06 *Aspergillus nidulans* に存在する α -L-アラビノフラノシダーゼの探索
○松永恵美子, 小野健太郎, 豊田早紀, 樋口裕次郎, 竹川薫 (九大院・農)

我々は *Aspergillus nidulans* のゲノムに 2 つの β -D-ガラクトフラノシダーゼ (Galf-ase) が存在していることを見出した。Galf-ase 2 重破壊株を作製して細胞内外の酵素活性を調べたところ、完全に Galf-ase 活性が消失しないことがわかり、両酵素以外にも Galf-ase 活性を持つ酵素の存在が示唆された。 β -D-ガラクトフラノースと類似した構造をもつ α -L-アラビノフラノース (Araf) を加水分解する酵素である α -L-アラビノフラノシダーゼ (Araf-ase) が存在する。最近、Tefsén らによって *A. niger* の GH51 と GH54 に属する Araf-ase が微弱な Galf-ase 活性を有することが報告された。そこで本研究では *A. nidulans* 中の Araf-ase が *A. niger* と同様 Galf-ase 活性を有するのではないかと考え、*A. nidulans* の Araf-ase の探索を行った。解析の結果、GH3, 51, 54, 62 に属する複数の Araf-ase 遺伝子を見出し、これら酵素を大腸菌で生産して Galf-ase 活性を調べたところ、*A. nidulans* の Araf-ase も Galf-ase 活性を示すことがわかった。

B-a07 Identification and characterization of novel fucose-containing oligosaccharides-specific endo- β -N-acetylglucosaminidases from *Sphingobacterium* species.
○Yibo Huang¹, Yujiro Higuchi¹, Takashi Kinoshita², Ai Mitani²,
Yasunari Eshima¹, Kaoru Takegawa¹(¹Kyushu Univ., ²Fushimi Seiyaku)

Endo- β -N-acetylglucosaminidase (ENGase) is useful for assessing N-linked oligosaccharide of glycoproteins. However, no fucose-containing oligosaccharides-specific ENGase has been identified in any organism. To search for a fucose-containing oligosaccharides-specific ENGase, we screened soil samples and discovered a strain, named HMA12, identified as a *Sphingobacterium* species by the 16S ribosomal RNA gene analysis. By draft genome sequencing of the strain HMA12, we found five candidate genes encoding ENGases. Using recombinant proteins expressed in *Escherichia coli*, we found that four out of five candidates displayed the fucose-containing oligosaccharides-specific ENGase activity. In addition, these enzymes were able to release fucose-containing oligosaccharides residue from immunoglobulin G, suggesting that natural glycoprotein could also be substrates.

B-a08 Microbial α -L-rhamnosidases reveal dual α -L-rhamnose and α -L-mannose hydrolyzing activity
○Agape Feunai Papalii Tautau¹, Emiko Matsunaga¹, Minoru Izumi²,
Yujiro Higuchi¹, Kaoru Takegawa¹(¹Kyushu Univ., ²Okayama Univ.)

α -L-Rhamnosidases are responsible for the hydrolytic release of α -L-rhamnose moiety from polysaccharides and glycosides. α -L-Rhamnose is structurally similar to a rare sugar named α -L-mannose. However, there are no reports on α -L-mannosidase and L-mannose-containing oligosaccharides. Therefore, α -L-Mannosidase activity was determined by five microbial α -L-rhamnosidases from *Aspergillus nidulans* (RhaE), *Bacillus* sp. GL1 (RhaA and RhaB), *Klebsiella oxytoca* (KoRha), and *Sphingomonas paucimobilis* (RhaM). All recombinant proteins were expressed in *E. coli*, and purified by Ni affinity column. We found that all α -L-rhamnosidases exhibits dual α -L-rhamnose and weak α -L-mannose hydrolyzing activity. One of these enzymes, RhaM (GH106 family) displayed relatively high α -L-mannose hydrolyzing activity.

B-a09

Gluconobacter 属酢酸菌のジヒドロキシアセトン代謝に関与する3つのジヒドロキシアセトンリン酸化酵素

平田花織¹, 松谷峰之介², 足立収生^{1,2}, 片岡尚也^{1,2,3}, ○薬師寿治^{1,2,3},
松下一信^{1,2,3} (¹ 山口大・農, ² 山口大院・創成科学, ³ 山口大・微研セ)

【目的】酢酸菌 *Gluconobacter thailandicus* NBRC3255 株は、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が、生産した DHA をほぼ完全に消費する。*Gluconobacter* 属酢酸菌における DHA 代謝やその制御に関する知見は乏しいので、本菌の DHA リン酸化酵素 (DHAK) に関する解析を行った。【方法・結果】私たちは、ドラフトゲノム解析から、DHA リン酸化酵素 (DHAK) を2つ見いだしている (DhaK と DerK)。また、生化学的な解析から、グリセロールキナーゼ (GlpK) が DHAK 活性を持つことを見いだしている。以上3つの DHAK 遺伝子の欠損株を作製した。生育能、酵素活性、代謝産物挙動を解析したところ、3つの DHAK 全てが DHA 代謝に役割を持つことが示唆された。

B-a10

大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素におけるユビキノンと相互作用するアミノ酸の解析

○小鉢健樹¹, 篠田華慧¹, 船橋稔孝², 高坂智之², 山田守²
(¹ 山口大・農, ² 山口大院・創成科学)

【目的】大腸菌膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH) はユビキノンを電子伝達体として用い、その相互作用部位は内膜外側表面に位置していると考えられている。しかし、ユビキノンと直接相互作用するアミノ酸残基は未だ明確とはなっていない。そこで、相互作用するアミノ酸残基を同定するため、異なる微生物間で高く保存されている幾つかのアルギニン残基に着目し、アラニンなどのアミノ酸置換体について解析を行なった。

【方法・結果】Arg-93 をアラニンに置換した変異体は、UQ₂ に対する K_M 値が野生型に比べ2倍になったことから、Arg-93 の UQ との相互作用への関与が示唆された。一方、Arg-432 をアラニンに置換した変異体は顕著な活性の低下を示したことから、Arg-432 が分子内電子伝達を含む酵素の活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

B-a11

超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における NAD⁺熱分解産物の代謝

○蜂須賀真一^{1,2}, 佐藤喬章^{1,2}, 跡見晴幸^{1,2} (¹ 京大院・工, ² JST・CREST)

【目的】NAD⁺は代謝における酸化反応に関与する重要な補酵素である。あらゆる生物にその利用が認められているが、NAD⁺は高温で分解されやすいという性質がある。そのため超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* のような高温環境で生育する生物は、NAD⁺の熱分解に対応する何らかの機構を有すると考え、その機構を解明することを目的とした。

【方法・結果】まず、NAD⁺が 85°C で nicotinamide および ADP-ribose に熱分解することを確認した。本菌のゲノム上には ADP-ribose 代謝酵素の候補として ADP-ribose pyrophosphatase と推定される TK2284 が存在した。TK2284 組換え型タンパク質は確かに ADP-ribose を ribose 5-phosphate (R5P) と AMP に分解する活性を示した。また合成培地を用いた増殖実験において、本遺伝子の破壊株は宿主株と比べ最高濁度が低下した。以上より、本遺伝子は NAD⁺熱分解産物である ADP-ribose を再利用可能な R5P と AMP に代謝していることが予測された。

B-p01 フコイダンデアセチラーゼの触媒活性に関する領域

○長尾達彦^{1,2}, 小松史佳¹, 八木寿梓³, 鈴木宏和¹, 大城 隆¹
(¹鳥取大院・工, ²深江化成(株), ³鳥取大・工)

【目的】オキナワモズク由来フコイダンは、主鎖であるフコースに硫酸基、アセチル基、グルクロン酸基が結合した多糖類であると考えられている。当研究室で単離したフコイダン分解菌 *Luteolibacter algae* H18 株では、フコイダンの脱アセチル化の後に低分子化反応が起こる。本研究ではフコイダンデアセチラーゼの触媒活性に関わる領域について検討した。

【方法・結果】本酵素はフコイダンの脱アセチル化以外に *p*-nitrophenyl acetate の加水分解反応も触媒できるので、両基質に対する酵素活性を測定した。SWISS-MODEL による立体構造モデル作成の結果、本酵素は acetylxylin esterase とアノテーションされている TM0077 の N 末端側約 350 残基と類似しており、この領域に Ser、Asp、His 残基が電子リレー可能な位置に局在していた。本酵素は 628 アミノ酸残基から構成されているため、C 末端側の領域を削除した酵素の活性を評価し、触媒活性に関わる領域の決定を試みた。

B-p02 海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン低分子化酵素：精製とクローニング

○荒井良仁¹, 長尾達彦^{2,3}, 小松史佳², 八木寿梓⁴, 鈴木宏和², 大城隆²
(¹鳥取大院・持社創科, ²鳥取大院・工, ³深江化成(株), ⁴鳥取大・工)

【目的】褐藻類に含まれる硫酸化多糖、フコイダンは、抗ガン作用等の生理活性を有し、健康食品成分としての期待がもたれている。しかし、平均分子量が約 200,000 と大きく、消化・吸収や生理活性と構造の相関性について不明な点が多い。当研究室では、フコイダンの構造活性相関の解明を目的に、海洋由来微生物の低分子化酵素を用いた研究を行っている。

【方法・結果】H18 株をオキナワモズクフコイダンを単一炭素源とする合成培地で培養し、菌体を超音波破碎した後、無細胞抽出液を調製した。これを 3 種類のクロマトグラフィーを用いて精製し、N 末端アミノ酸配列を決定した。H18 株のゲノム DNA 情報を基に、このアミノ酸配列をコードする ORF を決定した。DNA 情報から推定される本酵素の分子量は 111.7 kDa であり、これは H18 株から精製した酵素の SDS-PAGE での結果と一致した。

B-p03 *Shewanella* sp. YH1 株が有するアルギン酸リアーゼの特性評価

○八木寿梓¹, 藤瀬麻紗子², 板橋成美³, 磯部菜月³, 鈴木宏和², 大城隆²
(¹鳥取大・GSC, ²鳥取大院・工, ³鳥取大・工)

【目的】アルギン酸は、β-D-マンヌロン酸とα-L-グルロン酸の 2 種のウロン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。本研究では、鳥取県の海水から単離したアルギン酸資化性菌 *Shewanella* sp. YH1 株が有する Polysaccharide lyase family 7 に属する S-QIH、S-QVH の特性評価を行った。

【方法・結果】酵素活性は、アルギン酸ナトリウムを基質とした諸性質（至適温度、至適 pH、熱安定性）と、基質特異性を調べた。S-QVH は大腸菌で異種発現させた精製酵素で調べた。諸性質の検討の結果、S-QIH は化学・熱変性からのリフォールディングが高く、2-5 糖を生成した。他方、S-QVH は、最終分解物として単糖まで分解した。また、S-QVH は 20 日間、30 度で放置しても活性の低下が認められず、金属や塩による活性阻害も見られなかった。本結果から、それぞれにユニークな性質を有することが明らかになり、有用な酵素であることが示唆された。

B-p04

新規[NiFeSe]ヒドロゲナーゼの探索とアフィニティタグ配列導入の検討

○戸田貴裕, 三島朱加, 根本理子, 稲垣賢二, 田村隆 (岡山大院・環境生命)

【目的】水素の酸化, 還元反応を可逆的に触媒するヒドロゲナーゼ (Hase) は, 水素燃料電池の酵素電極としての利用が期待されている。硫酸還元菌が保有する[NiFeSe]ヒドロゲナーゼは酸素耐性が高く, 失活状態からの回復力が高い。微生物のゲノム情報を検索すると未同定セレン含有型 Hase の存在が示唆されるので生化学的同定を検討した【方法・結果】*Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F, *D. alaskensis* G20 の素酵素液から超遠心分離で膜画分を濃縮して Native-PAGE 上で活性染色を行ってから ICP-MS 分析を行った。その結果, この 2 株に[NiFeSe]Hase の発現が確認された。次に簡便精製を目標として *D. alaskensis* G20 の[NiFeSe]Hase 遺伝子にアフィニティタグ配列を導入する方法を検討した。以前当研究室で作成されたアフィニティタグ導入用の接合伝達ー相同組換えベクターは組換え効率が低かったため, リコンビナーゼ遺伝子を付加して新ベクターを構築した。このベクターを用いて *D. alaskensis* G20 株への相同組換えを利用したゲノム上の遺伝子改変を検討した。

B-p05

ムチン分解に関与するビフィズス菌由来スルフォグリコシダーゼ

○加藤紀彦¹, 前渋谷貴子¹, 吉川慶一², 後藤愛那¹, 山口真範³, 芦田久⁴,
山本憲二², 片山高嶺^{1,2} (¹京大院・生命, ²石川県大・生資環,
³和歌山大・教育, ⁴近畿大・生物理工)

【目的】我々はこれまでにヒト腸内に生息するビフィズス菌由来の様々なグリコシダーゼの単離と解析を行い、ビフィズス菌によるムチン糖鎖の分解経路を明らかにしてきた。本研究ではビフィズス菌の硫酸化ムチン分解能と関連酵素について検討した。

【方法・結果】ビフィズス菌 14 菌株の抽出液についてその硫酸化糖鎖分解活性を調べたところ、*Bifidobacterium bifidum* JCM7004 株より GlcNAc-6S を遊離するスルフォグリコシダーゼ活性を見出し、本酵素活性は *bbhII* によってコードされていることを明らかにした。また、本酵素がムチンの糖鎖末端に存在する GlcNAc-6S 残基に対して作用すること、ムチン存在下で発現誘導されることを見出した。本発見はビフィズス菌による硫酸化ムチンの新規な分解経路の存在を示唆するものである。

B-p06 *Penicillium* sp. KU-1 株由来ポリオール酸化酵素を利用する複数種の希少糖生産
○黒石川嵩幸¹, 渡邊彰¹, 吉原明秀², 何森健², 麻田恭彦¹
(¹香川大・農, ²香川大・国際希少糖)

【目的】本研究では、土壌から単離した *Penicillium* sp. KU-1 株由来のポリオール酸化酵素における希少糖生産性を明らかにして、複数種の希少糖の生産への利用面について検討することを目的とした。

【方法・結果】D-ソルビトールを基質とした際の本酵素反応における生成物を HPLC、NMR による分析、および比旋光度の測定により、L-グルコースであることを同定した。また、本酵素の部分精製標品を用いて、各種ポリオール（エリスリトール、リビトール、D-アラビトール、L-アラビトール、キシリトール、アリトール、D-マンニトール、D-ソルビトール、ガラクトール、D-タリトール）と反応させた際に生じる生成物を HPLC により分析した結果、少なくとも 9 種類の希少糖の生成反応を触媒することが明らかとなり、本酵素は複数種の希少糖の生産に応用可能であることが示唆された。

B-p07 超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来アスパラギン酸キナーゼ/ホモセリンデヒドロゲナーゼ融合酵素 (AK/HseDH) の分子特性
○古場康平¹, 林順司², 大志田達也¹, 安部展洋¹, 米田一成³, 大島敏久⁴, 櫻庭春彦¹ (¹香川大・農, ²立命大・生命, ³東海大・農, ⁴大工大・工)

必須アミノ酸であるイソロイシン、メチオニン、スレオニンは、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。本経路にはアスパラギン酸キナーゼ (AK)、アスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (AsaDH)、ホモセリンデヒドロゲナーゼ (HseDH) が存在し、植物、細菌、アーキアでは AK と HseDH が融合し 2 機能性酵素 (AK/HseDH) として働くものが多い。我々は超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* に AK/HseDH のホモログをコードする遺伝子 TM0547 を見出した。

TM0547 を大腸菌で発現させたところ AK 及び HseDH 活性が検出されたため、本酵素を精製し酵素化学的諸性質の解明を行った。これは、超好熱菌において AK/HseDH が存在することを示した初の例となる。現在は、本酵素の結晶化を検討している。

B-p08 *Shinella* sp. NN-6 由来 D-キシロースイソメラーゼの精製と諸性質
○鈴木琢磨¹, 堀玄澄¹, 池田光¹, 森本兼司²
(¹香大院・農, ²香川大・国際希少糖)

【目的】近年希少糖の健康への機能性が注目されている。本研究室で所有する微生物 *Shinella* sp. NN-6 は D-プシコース 3-エピメラーゼと L-ラムノースイソメラーゼを同時に発現するため、安価な D-フルクトースから希少糖 D-アロースを 1 つの反応系で生産できる。また、この微生物は D-キシロースイソメラーゼ (D-XI) も同時に発現することが分かっている。そこで、D-XI を精製し諸性質を明らかにして希少糖生産に応用できるかを検討することを目的とした。

【方法・結果】*Shinella* sp. NN-6 の D-XI 抽出、精製条件を詳細に検討した。超音波破碎は Amplitude 70% で 4 分間を 9 回、熱処理は 55℃ で 10 分、硫酸分画では 50% 画分に活性画分が得られた。さらにカラム処理条件を検討し、D-XI を精製した。得られた精製酵素から本酵素は 45 kDa の二量体であることがわかり、至適温度 65℃、至適 pH 9.0 であった。

B-p09

Shinella sp. NN-6 由来の D-プシコース 3-エピメラーゼの発現条件の検討と D-プシコース生産

○池田光¹, 野崎智帆¹, 堀玄澄¹, 鈴木琢磨¹, 森本兼司²
(¹香川大院・農, ²香川大・国際希少糖)

【目的】先行研究で *Shinella* sp. NN-6 由来の D-プシコース 3-エピメラーゼ (D-PE) は、誘導物質となる D-プシコースが含まれていない培養条件でも発現されることが明らかになっている。本菌の培養コストを削減することを目的として安価な炭素源での D-PE 発現条件を検討し、D-フルクトースからの D-プシコース生産を試みた。

【方法・結果】D-グルコースで誘導した菌体から調製した D-PE の活性を測定したところ、D-プシコース誘導時と比較して約 50%の酵素活性が確認された。この菌体から部分精製酵素を調製し、固定化酵素 (70U) を作製した。50% D-フルクトース (3mL) を反応基質として D-プシコースを生産させたところ約 6 時間後に反応が平衡に達していたことから、D-グルコースを炭素源とした培養でも D-プシコース生産が可能であることが確認された。

B-p10

Aspergillus aculeatus 由来 FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼ AaGDHa のキシロースに対する活性が低下した変異酵素の作製

○岡修司, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命環境)

【目的】自己血糖値測定に使用される酵素センサに応用可能な酵素として FAD 型グルコースデヒドロゲナーゼ (FAD-GDH) が注目されている。我々は以前までの研究で *Aspergillus aculeatus* 由来の 2 つの FAD-GDHs (AaGDHa, AaGDHb) について酵素学的性質の検討を行い、AaGDHa がキシロースに対して若干反応性を示すものの比較的基質特異性が高いことを明らかにした。今回の研究では AaGDHa に変異を導入し、グルコース以外に唯一活性を示したキシロースに対する活性が低下した変異酵素の取得を目的とした。

【方法・結果】AaGDHa のグルコースの 6 位の OH 基周辺に位置すると予想されるアミノ酸残基について部位特異的変異導入を行い、作製した各変異酵素についてグルコースに対するキシロースの相対活性を比較した。その結果、野生型酵素に比べキシロースに対する相対活性が低下した変異酵素 AaGDHa A117S を取得した。

B-p11

Aspergillus aculeatus No. F-50 株由来キシラナーゼ (AaXyn10b) 遺伝子の麹菌における発現

○梶本真由¹, 谷修治², 炭谷順一², 川口剛司²
(¹阪府大・生命環境, ²阪府大院・生命環境)

【目的】*A. aculeatus* No. F-50 株は 3 種類のキシラナーゼを生産するが、その中で AaXyn10b は、N 末端側に GH10 触媒ドメイン(CD)、C 末端側に基質結合ドメイン (CBM1) を有するキシラナーゼである。本研究では、AaXyn10b 遺伝子を麹菌で発現させ、発現産物を精製し、精製酵素を用いて諸性質を検討することを目的とした。【方法・結果】ゲノムを鋳型として AaXyn10b 遺伝子全長および CD をコードする DNA 領域を PCR で増幅し、糸状菌用高発現ベクター pNAN8142 に挿入し、麹菌に導入した。得られた形質転換体を液体培養した培養上清から発現産物を電気泳動的に均一になるまで精製した。Beechwood xylan を基質とした際の比活性は CD のみの方が高く、pH や温度に対する安定性は CBM を含む全長の方が高いことが分かった。現在、他のキシラナーゼとの相乗効果について検討中である。

B-p12 ヒラタケ (*Pleurotus* sp.) 子実体の自己消化におけるトレハラーゼについて
○アラストアリレザ¹, 中澤昌美¹, 阪本龍司¹, 楠田瑞穂¹, 小林仁²,
大内謙二², 稲富聡², 上田光宏¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² ホクト・きのこ総合研)

【目的】キノコの自己消化に関与している酵素としてグルカナーゼなどの細胞壁を分解する酵素が研究されているが、自己消化に関する知見は少ない。そこで本研究では、ヒラタケを用いてトレハラーゼの酵素学的知見を得ると共に、トレハラーゼと自己消化の関係について新たな知見を得ることを目的に研究を行った。

【方法・結果】生育段階ごとのヒラタケ子実体から粗酵素液を調製し、トレハラーゼ活性を測定したところ子実体伸長期に比べ自己消化期においてトレハラーゼ活性が急激に上昇していることが明らかとなった。次に自己消化におけるトレハラーゼの挙動を詳細に調べるため自己消化進行段階の異なる子実体を部位ごとに細かく分画し、それぞれの活性を測定した。その結果、自己消化初期段階では菌傘の外側部における活性が最も高く、自己消化の進行に伴い活性ピークが傘の外側から中心側にシフトしていることが明らかとなった。

C-a01 YgiT antitoxin によるバイオフィーム形成促進および関与する遺伝子の探索
○横井亮磨, 山口良弘 (阪市大院・理)

【目的】Toxin-antitoxin (TA) system は、原核生物において生育および細胞死を制御するシステムである。大腸菌の MqsR-YgiT TA system は、バイオフィーム制御因子として同定された MqsR toxin と YgiT antitoxin から構成される。我々は、YgiT antitoxin が運動性およびバイオフィーム形成を促進することを見出した。そこで、YgiT antitoxin によるバイオフィーム形成機構の解明を目的とした。

【方法・結果】YgiT 高発現株での運動性およびバイオフィームを測定した。その結果、YgiT の発現は大腸菌の運動性およびバイオフィーム形成を促進した。べん毛の発現に関わる二成分制御系や curli 線毛を欠損した株においても YgiT によって運動性およびバイオフィーム形成は促進された。そこで、YgiT が *mqsRygiT* オペロン上流の回文配列に結合することに着目し、同様の配列を上流に持つ 4 遺伝子を同定した。現在、各遺伝子を欠損した株における YgiT によるバイオフィーム形成及び運動性への影響を解析中である。

C-a02 *Aspergillus aculeatus* SepM の生理機能解析
○澤田和美¹, 津村亮輔², 谷修治², 炭谷順一², 川口剛司²
(¹ 阪府大・生命環境, ² 阪府大院・生命環境)

【目的】本研究では、糸状菌 *Aspergillus aculeatus* を用いて、セルロースに応答したセルラーゼ遺伝子の発現を制御する因子として新たに同定された Septation initiation network component (SepM) の生理機能を明らかにすることを目的とした。【方法・結果】Control 株と *sepM* 破壊株 ($\Delta sepM$) において、セルロースに応答した各種セルラーゼ遺伝子の発現量を解析した結果、 $\Delta sepM$ では Control 株と比べ平均 50% から 20% 程度まで遺伝子発現量が減少する中で、*cellobiohydrolase II* の発現量のみが約 5% 程度まで激減していた。また、SepM は *Schizosaccharomyces pombe* の隔壁形成に必須な因子 Cdc14p のオルソログであることから、*A. aculeatus* における SepM の隔壁形成への影響を解析した。 $\Delta sepM$ では Control 株と比べ隔壁数が 16 h 培養で 5%、24 h 培養で 40% 程度に減少しており、SepM が隔壁形成に関与していることを明らかにした。

C-a03 *Aspergillus aculeatus* UDP-glucose 4-epimerase のセルロースに応答した遺伝子発現制御への関与
○白柳英俊, 谷修治, 炭谷順一, 川口剛司 (阪府大院・生命環境)

【目的】糸状菌 *Aspergillus aculeatus* におけるセルロースに応答した酵素生産調節機構を解明する事を目的とし、遺伝学的手法により新たな調節因子を同定し、その機能を解明したので報告する。【方法・結果】アグロバクテリウム形質転換法を用いて作出した T-DNA 挿入変異株ライブラリーの中から、セルラーゼ生産能が低下していた No. 68 株を取得した。No. 68 株では、セルラーゼ遺伝子の発現量が低下していること、T-DNA が UDP-glucose 4-epimerase 遺伝子 (*ugeA*) 内に挿入されていることを明らかにした。そこで新たに $\Delta ugeA$ 株を作出し、種々の炭素源の資化能と菌体外酵素の生産量をコントロール株と比較した。 $\Delta ugeA$ 株におけるガラクトースとガラクトマンナン資化能、及びマンナンナーゼの分泌生産量が有意に低下していた。現在、 $\Delta ugeA$ 株におけるセルロースやガラクトマンナンに応答した各種酵素遺伝子発現量を定量的に解析している段階である。

緑藻 *Dunaliella salina* 形質転換ベクターの開発

C-a04

○浦口裕介¹, 森川盾毅¹, 三田将平¹, 勝嶋啓介², 徳永早紀², 中川聡¹,
澤山茂樹¹ (¹京大院・農, ²京大・農)

【目的】緑藻 *Dunaliella salina* は、 β -カロテン生産の有望な資源生物である。しかし、比較的増殖速度が遅く、形質転換体のコロニー選抜に長時間を要するという欠点がある。より効率的な分子育種のために、我々は HUP1 糖輸送タンパク質に注目した。

【方法・結果】*D. salina* 由来の *HSP70A* と *RbcS2* をデュアルプロモーター、*Parachlorella kessleri* 由来の *HUP1* を選択マーカーとし、自己開裂 2A ペプチドを介して制限酵素サイトと *Chlamydomonas reinhardtii* 由来の *RbcS2* ターミネーターを持つ pDsHRH を作成した。*D. salina* に pDsHRH を導入し、グルコース含有 DA 寒天培地に播種した。20 日後、大きいものから順に 8 つのコロニーをコロニー PCR した結果、4 つにベクターの挿入を確認した。これらの結果から、*HUP1* を選択マーカー遺伝子として、糖利用能を *D. salina* に付与することで、コロニー形成速度の差を利用した形質転換体の選抜が可能であることが示唆された。

酵母アルコール発酵制御遺伝子のゲノムワイド探索から明らかになったリン酸-炭素代謝クロストーク制御

C-a05

○渡辺大輔, 高木健一, 吉岡直哉, 杉本幸子, 高木博史
(奈良先端大・バイオ)

酵母によるアルコール発酵の制御メカニズムの全体像の解明を目的として、遺伝子ノックアウトコレクションを用いて発酵速度に影響を及ぼす遺伝子をゲノムワイドに探索した結果、発酵との関連が未知であった液胞トランスポーターシャペロン (VTC) 複合体の欠損が発酵速度を上昇させることを見出した。以前に清酒酵母の研究を通して同定された発酵阻害因子 Rim15p と本研究で同定した VTC 複合体は共に、リン酸シグナル伝達の鍵因子である Pho80p-Pho85p 複合体によって機能や発現を抑制されることが知られている。したがって酵母細胞は、環境中のリン酸に応答してこれらの発酵阻害因子を抑制し発酵力を高めると推測された。実際に、リン酸が Pho80p-Pho85p 複合体に依存して発酵速度を上昇させる効果を有することも示された。酵母にとっての発酵の意義の一つが ATP の産生であることから、このようなリン酸-炭素代謝クロストーク制御の存在は理にかなっていると考えられる。

C-a06 コリネ型細菌を宿主とした制限修飾系を回避する効率的な DNA ライブラリー構築法の開発

○長谷川智, 城島透, 乾将行 (RITE)

【目的】制限修飾系とは、自己 DNA を特異的にメチル化修飾する一方、異なるパターンで修飾された DNA を異種 DNA と認識して分解する機構である。本機構は細菌などの原核生物において外来 DNA に対する防御機構として重要であるが、遺伝子組換えの際には導入した異種 DNA の分解、すなわち組換え効率の大幅な低下を引き起こす。そこでコリネ型細菌を宿主して、本機構を回避した効率的なゲノムライブラリー構築法の開発を試みた。

【方法・結果】Phi29 DNA ポリメラーゼを用いて大腸菌 DNA から均質かつ長鎖の非メチル化 DNA を複製し、限定分解によりインサート DNA を調製した。これを Inverse PCR により調製した非メチル化ベクター DNA と連結後、直接コリネ型細菌へ導入してゲノムライブラリーを構築した。得られたライブラリーよりキシロース資化能を指標としたキシロース資化遺伝子 *xyLAB* のスクリーニングに成功し、本ライブラリー構築法の実用性を確認できた。

C-a07 好酸性従属栄養細菌への外来遺伝子導入と組換え発現系の開発

○藤原孝太, 中谷安希, 上村一雄, 金尾忠芳 (岡山大院・環境生命)

【目的】酸性環境で鉄や硫黄の酸化能をもつ *Acidithiobacillus ferrooxidans* の様な好酸性菌は、増殖能が低いため菌体が産生するタンパク質の研究を行う際、組換え発現が必要である。しかし、好酸性菌の外膜や分泌系タンパク質には酸性環境で成熟し活性を持つ酵素として機能するもの（例：*A. ferrooxidans* の外膜タンパク質の一種 *Af-Tth*）があり、中性で生育する大腸菌を宿主とした組換え発現では活性型の組換え酵素を獲得できないことも少なくない。本研究では、酸性条件下で良好な生育を示す好酸性従属栄養細菌 *Acidiphilium cryptum* JF-5 株を宿主とした外来遺伝子導入方法を検討し、組換え発現系の開発を目指した。

【方法・結果】エレクトロポレーション法により *Af-tth* 遺伝子を JF-5 株に導入したところ、この形質転換株から Tth 活性が検出された。さらに抗 *Af-Tth* 抗体による Western blot 解析の結果、この形質転換株において *Af-Tth* を検出した。このことから、好酸性従属栄養細菌を宿主とした組換え発現により、*Af-Tth* を活性型酵素として獲得することに成功した。

C-a08 *Methylobacterium extorquens* AM1 のランタノイド濃度に応答したメタノールデヒドロゲナーゼプロモーターのレポーター遺伝子を用いた発現解析

○吉川友理¹, 一小路貴士¹, 中川智行², 谷明生³, 三井亮司¹
(¹岡山理大・理, ²岐阜大・応生科, ³岡山大・資源植物研)

【目的】植物に共生するメチロトロフ細菌 *M. extorquens* AM1 は複数のメタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) を保持し、ランタノイドの有無や炭素源に応答して発現をコントロールしている。今回、ランタノイド依存型 MDH である XoxF1 の発現調節に着目し、レポーター遺伝子を用いた発現解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】*xoxF1* の発現に関与する ORF 上流域と下流のターミネーター領域と考えられるパンドローム配列との間に *lacZ* を挿入した発現系を構築した。ゲノム挿入型とプラスミド複製型の二つの組換え株を作製し、培地中に添加する La^{3+} への発現応答を比較した。その結果、炭素源にかかわらず La^{3+} の濃度の増加に伴い、発現量が増加していた。現在、生育に影響を及ぼすランタノイドとして Ce^{3+} , Pr^{3+} , Nd^{3+} についても検討を行っている。

C-a09 糸状菌 *Mortierella alpina* 1S-4 株における誘導発現プロモーターの探索と評価
○奥田知生¹, 安藤晃規¹, 櫻谷英治^{1,2}, 鎌田望³, 落合美佐³, 小川順¹
(¹京大院・農, ²徳島大院・生物資源産業,
³サントリーグローバルイノベーションセンター)

【目的】*Mortierella alpina* 1S-4 株は長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA) を著量蓄積する糸状菌であり、分子育種によって種々の機能性 PUFA 生産が実現されてきた。しかしながら、本株の遺伝子発現系で利用可能なプロモーターは恒常発現プロモーターのみであり、自由な遺伝子制御には課題が残っていた。本研究では、本株における誘導発現系の確立を目的とし、新規誘導発現プロモーターの取得を試みた。

【方法・結果】本株の全ゲノム情報に基づいて誘導発現プロモーター候補を選択し、 β -glucuronidase (GUS) 遺伝子を活用したレポーターアッセイ法を用いて、それぞれのプロモーター活性および誘導性を評価した。その結果、良好な誘導性を示すガラクトース誘導発現プロモーター *GAL10-1 p* を見出した。

C-a10 植物病原卵菌のシスト発芽を阻害する β -rubromycin を用いた形態形成関連遺伝子の探索
○田所千聖¹, 西尾尚堯², 谷修治², 炭谷順一², 川口剛司²
(¹阪府大・生命環境, ²阪府大院・生命環境)

【目的】*Phytophthora infestans* は低温条件下で形態分化を伴い植物に感染する。しかし、温度に応答した形態分化を制御する分子メカニズムは不明な部分が多い。本実験では、低温における形態分化を制御する分子機構の解明を目的とした。【方法・結果】放線菌二次代謝産物を対象に低温条件下で起きるシスト発芽を阻害する物質の探索を行い、 β -rubromycin が同定された。 β -rubromycin は、*P. infestans* だけでなく *Pythium aphanidermatum* の植物感染も阻害した。そこで、 β -rubromycin 添加、非添加条件下で処理したシストにおいて発現量が変動する遺伝子を RNA-seq 解析及び定量 RT-PCR 解析により探索し、シスト形成後 6 時間で β -rubromycin 非添加時に比べて β -rubromycin 添加条件下で RIO kinase 1 遺伝子 (*riol1*) の発現量が約 60 倍に増大することを明らかにした。

C-a11 病原菌エフェクター RipAA による酵母増殖阻害と植物免疫への影響の解析
○北園喬斗, 白井紗樹, 藤原祥子, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

【目的】植物病原菌は感染成立のための手段として、エフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入し免疫機能を攪乱することが知られている。本研究では、青枯病菌エフェクターの 1 つ RipAA の詳細な分子機構を出芽酵母を用いた発現系で解析した。

【方法・結果】これまで我々は RipAA が N 末端から膜局在化ドメイン、自己阻害ドメイン、増殖阻害ドメインを持つマルチドメインタンパク質であることが明らかしている。また、膜局在性のタンパク質 Psr1 融合変異体を用いた実験から酵母膜局在は増殖阻害を活性化に必須であることが示された。さらに、RipAA は酵母内でリン酸化されていることを見だし、酵母内においては Casein Kinase 1 が RipAA のキナーゼであることを見出している。興味深いことに、RipAA の膜局在はリン酸化レベルを高め、その低下は増殖阻害に影響を及ぼした。また、構造予測サイトを用いた解析から RipAA はある種のシステインプロテアーゼと低い相同性が確認され、推定の触媒残基の変異は RipAA 依存的な酵母増殖阻害を回復した。

青枯病菌エフェクター RipQ の機能解析

C-p01

○佐々奈於美, 白井沙樹, 藤原祥子, 北園喬斗, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)

【目的】ヒトや植物に感染する病原菌の多くは病原因子としてエフェクターを保有する。青枯病菌の RipQ は、酵母で発現させると増殖阻害を引き起こす機能未知エフェクターである。本研究では RipQ の機能を解明することを目的として解析を行った。

【方法・結果】RipQ は酵母で発現させると小胞体に局在が見られた。まず、RipQ が持つ機能ドメインを明らかにするために、N 末端及び C 末端から順次欠失させたアミノ酸欠失変異体を作製し、出芽酵母に対する増殖阻害及び細胞内局在を解析した。その結果、RipQ は増殖阻害活性ドメイン、小胞体局在化ドメイン、自己阻害ドメインを持つことが考えられた。また、各種塩、界面活性剤を用いて可溶化条件の検討を行ったところ、RipQ は TritonX-100, CHAPS, デオキシコール酸などの界面活性剤を加えた時のみ可溶化したため、膜貫通タンパク質であることが示唆された。

青枯病菌エフェクター RipAY の宿主チオレドキシン依存的活性化機構の解析

C-p02

○池尻篤生, 藤原祥子, 林順司, 櫻庭春彦, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)

【目的】青枯病菌病原性タンパク質エフェクターの 1 つである RipAY は、レドックス恒常性維持に必須なグルタチオン (GSH) を特異的に分解する γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (γ -GCT) 活性を持っていること、また、その活性は宿主チオレドキシン (Trx) によって活性化されることが明らかになっている。本研究は、RipAY の Trx 依存的な活性化メカニズムの理解を目的とした。

【方法・結果】RipAY を酵母内で過剰発現させると、RipAY の γ -GCT 活性の影響で酵母増殖阻害が見られることが分かっている。RipAY の各種欠失変異体を作製し、酵母増殖阻害への影響を調べた。RipAY の N 末端側領域は 2-90 アミノ酸、C 末端側領域は 383-416 アミノ酸を欠失させた変異体では増殖阻害が回復した。また、Trx と RipAY を大腸菌に共発現させ複合体を形成した状態で Trx h5-RipAY 複合体を精製する手法の構築を行った。

植物生長促進細菌の機能とその利用

C-p03

○中岡知規¹, 澤田祥子¹, 西山紋加², 小林誠治², 阿野貴司^{1,2}, 岡南政宏^{1,2}
(¹近畿大院・生物理工, ²近畿大・生物理工)

【目的】環境中には植物生長促進細菌 (PGPB) と呼ばれる植物の生長を直接的または間接的に促進する細菌が存在している。植物の生長促進と植物病原菌への感染抑制のための微生物農薬として PGPB を利用すれば化学農薬に頼らない安全な食糧生産が期待できる。

【方法・結果】植物生長促進 (PGP) 作用を持つ細菌を単離するために、まず、環境中から単離した細菌を 1/2×MS 液体培地中でウキクサと共生させ、単離菌の PGP 作用を評価した。その結果、ウキクサの体積を増大、個体数を増加、根の伸長を促進させることができる PGPB を多数単離することができた。これらの PGPB を用いてレタスの養液栽培に対する効果を調べた結果、いくつかの PGPB はレタスの生長を促進することができた。また、PGP 作用の分子メカニズムを解明するために、研究室が保有する PGPB の一つ、*Pseudomonas fluorescens* A-2 株の PGP 作用に関わる遺伝子の同定も試みた。

C-p04 海洋性細菌における分枝鎖脂肪酸特異的な新規リゾリン脂質アシル基転移酵素の生理機能

○豊竹洋佑, 川本純, 小川拓哉, 栗原達夫 (京大・化研)

【目的】南極海水由来 *Shewanella livingstonensis* Ac10 は, 5 種のリゾリン脂質アシル基転移酵素 (PlsC1 ~ 5) を有する. そのうちの PlsC1 は, エイコサペンタエン酸を膜リン脂質に導入し, 本菌の低温での正常な細胞分裂に寄与している. 一方, PlsC4 は分枝鎖脂肪酸を膜リン脂質に導入するが, その生理的意義は分かっていない. そこで, *S. livingstonensis* Ac10 における分枝鎖脂肪酸含有リン脂質の生理的役割を明らかにすることを目的とし, *plsC4* 欠損株の低温での生育特性を解析した.

【方法・結果】生理的環境に近い培地で低温培養した結果, *plsC4* 欠損株は野生株と同様に生育した. 一方, 攪拌した培養液を静置し, 細胞凝集に伴う培地上清の濁度の減少を測定した結果, 定常期以降の *plsC4* 欠損株が野生株と比べて著しい凝集性を示した. 分岐鎖脂肪酸含有リン脂質は定常期以降の細胞膜の表層構造や安定性の維持に関与することが示唆された.

C-p05 栄養状態から見た担子菌 *Coprinopsis cinerea* の生長とオートファジー

○小川直紀, 大野聡一郎, 濱岡修平, 麻田恭彦, 渡邊彰 (香川大・農)

栄養源の減少は、担子菌の子実体発生を誘導する外的環境要因の一つであるだけでなく、バルクな細胞内分解機構であるオートファジーを誘導する条件としても知られている。以上のことから、当研究室では、これまでモデル担子菌 *Coprinopsis cinerea* (ウシグソヒトヨタケ) を対象に、栄養条件に依存する子実体形成とオートファジーについて解析を行ってきた。その際、オートファジー誘導条件の解析は、オートファジー誘導時に液胞に移行するオートファゴソーム構成タンパク質 Atg8 と GFP の融合タンパク質を発現する株を用いて行った。その結果、子実体形成を促す窒素源飢餓条件と糖源飢餓条件において、オートファジーの誘導が観察され、子実体形成過程におけるオートファジーの関与が推測された。さらに解析を進めた結果、*C. cinerea* では、EDTA 添加条件に加え、リン酸源飢餓条件でもオートファジーが誘導されていることが示唆された。現在、上記条件が *C. cinerea* の生長にどのような影響を及ぼすかについて解析を進めている。

C-p06 黄麹菌 *Aspergillus oryzae* の固体培養における初期エンドソーム動態に関する解析

○都甲祐介, 樋口裕次郎, 竹川薫 (九大院・生資環)

【目的】我々はこれまでに黄麹菌において、初期エンドソームとモータータンパク質の推定リンカータンパク質である AoHok1 の遺伝子破壊株を用いて、初期エンドソーム動態が液体培養においてタンパク質分泌に関与することを示した。本研究では、実際の醸造の現場において用いられる固体培養における初期エンドソーム動態の生理的役割について解析した。

【方法・結果】小麦ふすま及び α 米を用いた固体培養で、野生株において初期エンドソーム動態を確認し、*Aohok1* 破壊株において初期エンドソーム動態が停止していることを確認した。次に生育解析を行ったところ、 α 米培養においては通常の寒天培地同様に野生株に比べて *Aohok1* 破壊株で生育の阻害が見られたのに対し、小麦ふすま培養では *Aohok1* 破壊株において著しい生育阻害が見られた。現在、*Aohok1* 破壊株の固体培養において、 α -アミラーゼやグルコアミラーゼといった酵素の分泌生産への影響について解析している。

C-p07 Molecular dissection of unconventional secretion of acyl-CoA binding protein in *Aspergillus oryzae*

OKwon Hee Su¹, Kouhei Kawaguchi², Takashi Kikuma²,
Katsuhiko Kitamoto², Kaoru Takegawa¹, Yujiro Higuchi¹

(¹Dept. Biosci. Biotechnol., Kyushu Univ., ²Dept. Biotechnol., Univ. Tokyo)

It has been reported that there are certain proteins that do not have signal peptides and be secreted via a novel pathway, named unconventional protein secretion (UPS). However, there was few report about UPS in filamentous fungi, including the industrially important fungus *Aspergillus oryzae*. We have previously shown that in *A. oryzae*, an acyl-CoA binding protein AoAcb2 is secreted under starved condition, likely via UPS pathway. Thus, further analyze the molecular mechanisms of AoAcb2 secretion, HA-tagged AoAcb2 was introduced into conditional mutants of autophagy proteins and t-SNARE AoSso1. We then found that AoAcb2 secretion is dependent on AoSso1, but independent of autophagy machinery.

C-p08 分泌経路で機能する細胞内レクチン Vip36 の解析 ○浅野里奈, 川口宗馬, 鈴木章太郎, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

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

【方法・結果】分裂酵母では、ヒト VIP36 と約 20%の相同性を示すホモログ Vip36 が存在する。糖鎖認識領域やジリジンモチーフ類似配列などを保存していたため、分裂酵母 Vip36 もヒト VIP36 と同様に分泌経路で循環しながらレセプターとして機能していると予測した。そこで、GFP タグを付加した Vip36 の局在を確認したところ、GFP-Vip36 は初期分泌経路に局在すると考えられた。また、*vip36* Δ 株では液胞で機能する Cpy1 の輸送遅延が生じていた。

C-p09 大豆と納豆菌との相互作用：納豆菌の大豆発芽能に対する感受性と大豆細胞壁多糖の取り込み

○杉浦春香¹，老木紗予子¹，三上文三¹，村田幸作²，橋本渉¹
(¹京大院・農，²摂大・理工)

【目的】本研究では *Bacillus subtilis* の一種である納豆菌の大豆に対する腐生性のメカニズムを解明することを目的とし、大豆の発芽能が納豆菌の生育に与える影響を調べた。さらに、大豆細胞壁多糖の取り込みに関わる納豆菌由来タンパク質 YesO について構造を解析した。

【方法・結果】発芽能有り的大豆と無し的大豆の各々に対して、大豆固体培地における納豆菌の生育曲線を作製した。その結果、発芽能有り的大豆上では、発芽能無し的大豆と比較して著しく生菌数が減少した。また、大豆細胞壁多糖の取り込みに関わる納豆菌の ABC トランスポーターと協働する基質結合タンパク質 YesO について、その糖との結合構造を精査した。その結果、 $\Delta\text{GalUA-Rha-Gal}$ の三糖が結合しており、YesO が三つ以上のサブサイトを有することが分かった。尚、本研究の一部は不二たん白質研究振興財団の支援を受けた。

C-p10 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株の多糖ペクチン走化性に関わる遺伝子解析

○小西英仁¹，小林将大¹，村田幸作²，橋本渉¹
(¹京大院・農，²摂大・理工)

【目的】グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株 (A1 株) は、酸性多糖であるアルギン酸とペクチンを資化する。非運動性 A1 株の軟寒天培地での継代培養により分離された運動性 A1-M5 株は、アルギン酸に走化性を示し、ペクチンには走化性を示さない。これは高分子である多糖に対して走化性を示す細菌の初めての例である。そこで、本研究では A1 株の多糖走化性の発現機構を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】炭素源を含まない軟寒天培地に、新たに分離した運動性 A1-MP 株の細菌懸濁液と多糖溶液を間隔を空けて接種し、30℃に保温することで走化性 (多糖接近能) を評価した。その結果、A1 株 (A1-MP 株) は本来、アルギン酸とペクチンの両方に走化性を示すことが分かった。そのため、A1-M5 株は遺伝子変異により、ペクチン認識能を失っていることが示唆された。ゲノムの変異箇所を特定するため、次世代シーケンサーによるゲノム解析と相補株の育種を試みた結果、ペクチン走化性に重要なゲノム断片 (5 kbp) を特定した。

C-p11 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株の金属輸送系結合タンパク質の機能と構造

○奥村憲史¹，Kanate Temtrirath¹，村田幸作²，橋本渉¹
(¹京大院・農，²摂大・理工)

【目的】*Sphingomonas* 属細菌 A1 株 (A1 株) は細胞表層に形成した体腔を介して、アルギン酸を取り込む。体腔におけるアルギン酸の結合と濃縮に関わるタンパク質 Algp7 は、鉄輸送 Efe 系を構成するタンパク質の一つである EfeO と高い相同性を示す。A1 株における Efe 系を介した金属取り込み機構を明らかにするため、Algp7 の金属結合性を評価した。

【方法・結果】Algp7 を組換え大腸菌に発現させ、精製した。Algp7 と銅 (Cu^{2+}) の混合溶液を透析し、透析内液と外液の銅濃度を原子吸光計で測定した。外液に比べ、内液に多くの銅が溶存していたことから、Algp7 が銅に対して結合能をもつことが示された。また、Algp7 の金属濃度依存的な蛍光強度変化を測定し、Algp7 と銅との解離定数 ($0.37 \mu\text{M}$) を決定した。さらに、X 線結晶構造解析によって Algp7 の金属結合部位を決定した。その部位に変異を導入すると、金属結合様式が変化することが示唆された。

耐熱性酵母の熱ストレス応答

D-a01

○東崎愛生¹, 松本和¹, 古田雅一², 岸田正夫¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪府大院・工)

【目的】バイオエタノールの製造工程において糖化・発酵・蒸留の三工程で生じる冷却・加温コストは単価上昇の要因の一つである。発酵工程をより高い温度で行えば、従来との温度差分のコスト削減を見込むことができる。本研究では、高温発酵系での利用を最終目標とし、耐熱性を有する野生酵母 *Kluyveromyces marxianus* (以下 Km) の高温培養時の性質解析および熱ストレスに伴うストレス応答機構の検証を行い、高温生育機構の解明を目指した。

【方法・結果】高温培養時における性質解析の結果、Km は高温環境に完全に適した酵母とは言えないが、Km の高温培養時のエタノール生産性は向上していた。また、Km の細胞内酸化について検討したところ、高温培養時、抗酸化物質のグルタチオンは減少、トレハロースは増加する傾向が見られた。また、抗酸化酵素である SOD とカタラーゼ T の発現量が増加していた。現在は、HSP についてその発現量の増減を検討している。

Molecular mechanism of nitrosative stress tolerance in yeast

D-a02

○Khairul Anam, Ryo Nasuno, Daisuke Watanabe, Hiroshi Takagi
(Grad. Schl. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Technol.)

Nitric oxide (NO) functions as a signal molecule like a double-edged sword in biological processes. At a low level, NO confers oxidative stress tolerance, yet at an abundant level, NO induces nitrosative stress, leading to cellular damage and promoting cell death. Even though the NO tolerance processes have been clarified in various organisms, the molecular mechanism of NO tolerance in yeast is still poorly understood. In this study, we aim to identify the novel gene(s) required for NO resistance in yeast. More than 160,000 transformants from the genomic library were screened on the acidified minimal medium containing sodium nitrite, in which NO is generated from nitrite spontaneously. As a result, the *RIB1* gene encoding GTP cyclohydrolase II enzyme, which catalyzes the first step of the riboflavin (RF) biosynthesis, was isolated as an NO-resistant gene. We will analyze the RF content and clarify the molecular mechanism of which related to the RF pathway.

Identification and functional analysis of nitrated protein in yeast

D-a03

○Supapid Eknikom, Ryo Nasuno, Hiroshi Takagi
(Grad. Schl. Biol. Sci., Nara Inst. Sci. Technol.)

【Objective】Protein tyrosine nitration (PTN) is the posttranslational modification of tyrosine residue by peroxynitrite which is a reaction product of nitric oxide with superoxide anion. PTN functions as an inflammation marker and a signal in mammal, but its physiological role in yeast is still unclear. This study aims to identify the target proteins for PTN and clarify its physiological functions.

【Methods and results】Yeast cells were grown in acidified medium followed by the addition of NaNO₂, and then analyzed with western blot using anti-3-nitrotyrosin antibody. Our analysis detected high amounts of nitrated proteins from cells cultured in minimal medium at pH 4.0. On the other hand, in this condition, cell viability was decreased by NaNO₂ in its dose-dependent manner, raising the possibility that PTN affects cell viability. Now we prepare for LC-MS-based screening for PTN substrates from cells prepared under the condition optimized above.

D-a04 葉面微生物 *Methylobacterium* sp. OR01 株の最少培地での生育を回復する化合物の探索

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

【目的】*Methylobacterium* sp. OR01 株は赤シソより単離された菌株であり、赤シソ葉上に定着し優占している。我々はこれまでに、OR01 株が最少培地中での生育にパントテン酸を必要とすること、β-アラニンの添加によって生育が回復することを明らかにした。今回さらにβ-アラニンの前駆体を対象として OR01 株の最少培地中での生育を回復する化合物を探索した。

【方法・結果】OR01 株のドラフトゲノム配列によると、少なくとも 4 つの β-アラニンの合成経路を持つことが推定される。β-アラニン合成経路における前駆体の添加実験を行ったところ、それぞれの合成経路におけるいくつかの前駆体添加が OR01 株の最少培地での生育を回復させた。今回得られた結果から、OR01 株は、葉上環境から供給されるパントテン酸、β-アラニンあるいは β-アラニンの前駆体を利用して植物表層で生存していると考えられる。

D-a05 様々な分離源からの乳酸菌バクテリオシンの探索

○山城圭輔¹, 大橋千紘¹, 善藤威史¹, 園元謙二^{1,2}
(¹九大院・農, ²九大・バイオアーク)

【目的】乳酸菌が生産する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、構造や性質が多様であり、天然の安全な抗菌物質としてその利用が期待される。新しいバクテリオシンの発見を目指し、食品や植物などの分離源から、バクテリオシン生産乳酸菌の探索を行った。

【方法・結果】野菜や花、味噌など 21 種の分離源から得られた 89 株の乳酸菌様分離株について抗菌活性試験を行ったところ、24 株がバクテリオシン様の活性を示した。それらについて生産株の菌種同定、およびバクテリオシンの抗菌スペクトルの評価や精製・構造解析を行ったところ、トウモロコシと水草から分離された株はいずれも乳酸菌 *Lactococcus lactis* と同定され、それぞれ lactococcin A、lacticin Q を生産することが明らかとなった。また、乳酸菌 *Enterococcus faecalis* に分類されるバクテリオシン生産株が味噌などから複数得られた。現在、強力な抗菌活性を示すものについて、バクテリオシンの精製・構造解析を進めている。

D-a06 アミノ酸と C₄-ジカルボン酸による *Acetobacter* 属酢酸菌の耐熱性上昇効果
○中西里菜¹, 松谷峰之介¹, 片岡尚也^{1,2,3}, 薬師寿治^{1,2,3}, 松下一信^{1,2,3}
(¹ 山口大・院創成科学, ² 山口大・農, ³ 山口大・中高温微セ)

【目的】我々は、酢酸発酵を行う *Acetobacter* 属酢酸菌 SKU1108 株を、高温適応育種を行うことによって、高温での優れた酢酸発酵能をもつ TH-3 株を取得した。TH-3 株の耐熱化には、アミノ酸輸送体 (Aat) と C₄-ジカルボン酸輸送体 (Dct) の欠損が寄与している。本研究では、これらの変異と SKU1108 株の耐熱化機構との関連を理解するため、アミノ酸や C₄-ジカルボン酸添加の影響を調べた。

【方法・結果】0.2%アミノ酸 (0.1%チロシン)、10 mM C₄-ジカルボン酸を各々添加した酢酸発酵培地を用い、37℃、40℃で SKU1108 株と Δ aat 株、 Δ dct 株の振とう培養を行った。Asp、Lys、His は SKU1108 株と Δ aat 株、またコハク酸、フマル酸、リンゴ酸は SKU1108 株と Δ dct 株共に高温での生育を向上させた。さらに、発酵培地を分析し、Asp、His、コハク酸、フマル酸の消費を確認した。

D-a07 *Corynebacterium glutamicum* の耐熱性におけるカタラーゼの影響
○村田龍太郎¹, Nawarat Nantapong², 片岡尚也^{1,3,4}, 薬師寿治^{1,3,4}, 松下一信^{1,3,4} (¹ 山口大院・創成科学, ² スラナリー工科大, ³ 山口大・農, ⁴ 山口大・中高温微セ)

【目的】*Corynebacterium glutamicum* はグルタミン酸などの産業的な発酵生産に利用されるアミノ酸生産菌である。このアミノ酸発酵には温度維持に多大なエネルギーが必要となるため、耐熱性を有する菌株を用いることで、生産の安定や冷却コストの削減などが期待できる。我々は *C. glutamicum* の耐熱性と活性酸素種 (ROS) の関係について研究しており、今回は ROS の除去酵素の一つであるカタラーゼの影響を解析した。

【方法・結果】*C. glutamicum* の標準株である KY9002 と温度感受性株である KY9714 のカタラーゼ欠損株及び過剰発現株を構築した。高温での生育と ROS 生成量を比較したところ、欠損株で生育の低下及び ROS 生成量の増加、過剰発現株で生育の向上及び ROS 生成量の低下が確認された。

D-a08 高度好熱性 *Calditerricola* 属細菌の異常な低温応答
○前田一至, 田代幸寛, 酒井謙二 (九大院・生資環)

【目的】当研究室では常温で処理された消化汚泥からも高度好熱性 *Calditerricola satsumensis* DD2 および D3 株を分離し、本菌の生態分布に興味を持たれる。*C. satsumensis* 基準株は 50℃ 以下で増殖できないが、*Calditerricola* 属細菌の低温応答についての知見は皆無である。そこで本研究では、超高温堆肥から分離された *Calditerricola* 属細菌の基準株および消化汚泥から分離された DD2 および D3 株における低温応答を調査した。

【方法・結果】増殖温度を検討した結果、基準株同様に DD2 株は 56℃ 以下で増殖しなかった。さらに、*C. satsumensis* と *C. yamamurae* 基準株および DD2 株、D3 株の 20℃、50℃、75℃ における生存率を測定した結果、50℃ と 75℃ では、60 min 後も全株とも 80%以上維持した。一方、20℃ では、両基準株の生存率は 60 min 後で急激に減少したが、DD2 株と D3 株は 80%以上の生存率を維持し、48 h 後でも 70%を維持した。以上の結果、*Calditerricola* 属細菌の低温応答は株レベルで異なるとともに、両分離株は低温耐性機構を有することが示唆された。

D-a09 分裂酵母において鉄および銅イオンの取り込みは pH ストレス条件下における生育に重要である

○森日香里, 久保田健夫, 樋口裕次郎, 竹川薫 (九大・農)

【目的】本研究では、アルカリ条件でのみ安定に存在するタンパクを分裂酵母を宿主として生産させるため、同条件下でも生存できる分裂酵母を作製することを目的としている。分裂酵母の生育が悪化する中性～アルカリ条件下において鉄・銅イオンの取り込みが生育にどのような影響を与えるかを調べた。【方法・結果】分裂酵母の鉄・銅イオンの取り込みに関与するトランスポーターを破壊した株では野生株と比べてアルカリ感受性を示すことが分かった。また、鉄イオントランスポーター遺伝子の発現を制御する転写因子 *fep1* の破壊株は pH 上昇によるストレスに耐性を持つことが分かった。さらに直接、培地へ鉄・銅イオンを添加すると pH ストレス耐性を獲得した。RT-PCR の結果より弱酸性条件下よりも弱アルカリ条件下で一部のトランスポーター遺伝子の発現量が増加していた。以上の結果より、分裂酵母のアルカリ耐性には鉄・銅イオンの取り込みが重要であることが強く示唆された。

D-a10 分裂酵母における 14-3-3 変異体と有性生殖に関与するタンパク質の相互作用解析

○Zhang Jiajun, 妹尾裕子, 川向誠 (島根大院・生物資源)

分裂酵母の *sam* 変異体は栄養豊富な条件下でも接合・胞子形成を行う変異体である。*sam3* 変異がコードする Rad24(E185K) は、相互作用に重要な疎水性残基を含む溝の 185 番目のグルタミン酸がリジンに置換していることから標的タンパク質と結合できなくなり、その結果として有性生殖が亢進すると推定される。本研究では、Rad24(E185K) が Rad24 や Rad25 とダイマー構造を形成するか、Chk1 や有性生殖に関与するタンパク質 Mei2, Ste11, Byr2 と相互作用するかどうかを、免疫沈降法で検証することを目的としている。

Rad24(E185K)-5FLAG と Chk1-13myc や Rad25-GFP の相互作用は Rad24 と同程度に検出された。一方、Ste11-GFP との相互作用は Rad24(E185K) が Rad24 より弱かったことから、相互作用には違いがあると考えている。

D-a11 Investigation of coenzyme Q species in naturally isolated yeasts

○Jomkwan Jumpathong, Ikuhisa Nishida, Kohei Nishino, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai (Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

【Purpose】Coenzyme Q (CoQ) is an electron carrier in the electron transport system. CoQ with 10 isoprene units, (CoQ₁₀), is produced by humans, so new native producers are being sought as host platforms for commercial production. Various species of CoQ were investigated, of which structurally modified CoQ₁₀ were also found and analyzed.

【Methods and results】Crude lipid extracts obtained from naturally isolated yeasts were analyzed by TLC and fraction of CoQ was obtained. The identification of CoQ species and CoQ₁₀ measurement were done by HPLC and MS analysis. As a result, *Rhodotorula mucilaginosa* could produce 4.72 times higher CoQ₁₀/vol. in average than *S. pombe*. Structurally modified CoQ₁₀ in the side chain was observed in *Aureobasidium pullulans* and was designated as CoQ₁₀(H₂). In *Sydowia polyspora*, modified CoQ₁₀ were proposed for structural formulae as CoQ₁₀(2H₂-CH₃) and CoQ₁₀(3H₂-2CH₃).

D-p01 ミトコンドリア呼吸鎖複合体-I のキノン結合ポケットの位置特異的的化学修飾

○村井正俊, 榎谷貴洋, 伊藤剛, 三芳秀人 (京大院・農)

【目的】ミトコンドリア NADH-キノン酸化還元酵素 (呼吸鎖複合体-I) は、基質の酸化還元と共役したプロトン輸送を行う膜タンパク質複合体である。我々は、タンパク質化学修飾法である“トシル化学法”に着目し、阻害剤をモチーフとしたリガンド分子を合成し、ウシ心筋複合体-I のキノン結合ポケットの最深部を構成する 49 kDa サブユニットの Asp160 (49 kDa-Asp160) を特異的に化学修飾する方法論を確立してきた。本研究では、複合体-I の化学修飾における特異性の向上を目標に、阻害剤リガンドや修飾タグの検討を行った。

【方法・結果】シクロプロペン等の環歪みを持つアルケンは、触媒等を用いることなくテトラジンと水中で反応することが知られている (逆電子要求型 Diels-Alder 反応)。そこで、トシル化学を利用してシクロプロペンを 1 次タグとして 49 kDa-Asp160 に導入し、これを足場として、蛍光基 BODIPY をもつテトラジンを 2 次タグとして反応させることで、49 kDa-Asp160 をピンポイントかつ非破壊的に化学修飾することに成功した。

D-p02 コレラ菌 Na^+ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素における阻害剤結合部位の同定

○伊藤剛¹, ニノ倉聡¹, 村井正俊¹, 北隅優希¹, Blanca Barquera², 三芳秀人¹ (¹京大院・農, ²レンセラー工科大学・生物科学)

【目的】 Na^+ 輸送型 NADH-キノン酸化還元酵素 (Na^+ -NQR) は、基質の酸化還元と共役した Na^+ の輸送を行う膜タンパク質複合体である。 Na^+ -NQR はコレラ菌や緑膿菌などの病原性細菌に分布するため、本酵素の特異的阻害剤の作用機構研究は、病原性細菌のエネルギー代謝を標的とした薬剤開発に資するところが大きい。当グループでは、オーラシン類の一種である AD-42 がコレラ菌 Na^+ -NQR を nM オーダーで特異的に阻害することを見出した。本研究では、 Na^+ -NQR における阻害剤結合部位を光親和性標識実験によって同定することを目的とした。

【方法・結果】AD-42 を鋳型として、光反応基 (アジド基) をキノロン骨格あるいは側鎖末端に導入した [¹²⁵I]PAD-1 および [¹²⁵I]PAD-2 をそれぞれ合成した。コレラ菌 Na^+ -NQR に対して光親和性標識実験を行ったところ、[¹²⁵I]PAD-1 と [¹²⁵I]PAD-2 は、NqrB サブユニットの N 末端領域の Arg43-Lys54 と Trp23-Gly89 をそれぞれ特異的に標識することがわかった。

D-p03 ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体を阻害するエポキシシクロヘキセンジオン類の作用機構研究

○青山綾希, 村井正俊, 三芳秀人 (京大院・農)

【目的】ミトコンドリア ADP/ATP 輸送体 (AAC) は、ミトコンドリア内膜上で ADP と ATP の交換反応を行う膜輸送体であり、ミトコンドリアで生産された ATP を細胞質へ供給する役割を担っている。我々は、AAC に作用する特異的阻害剤の探索過程で、エポキシシクロヘキセンジオン類 (ECH 類) がウシ心筋ミトコンドリア AAC を阻害することを見出した。本研究では、AAC 阻害剤としての ECH 類の作用機構を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】ECH 類はその構造的特徴から、タンパク質中の求核性アミノ酸残基と反応し、共有結合を形成する可能性が高い。この作業仮説に基づいて、アルキル側鎖にクリックケミストリーを指向した末端アルキンを持つ ECH 誘導体 (AY120) を合成した。ウシ心筋重ミトコンドリア粒子を用いて修飾実験を行った結果、AAC に含まれる 4 個のシステイン残基の内、Cys57 および Cys160 が AY120 と特異的に反応することがわかった。

D-p04 *Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養により生産される新規イソキノリンアルカロイドの生成経路

○小川凌太, 齊藤太樹, 仁戸田照彦, 神崎浩 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々は *A. ustus* と *P. aurantiogriseum* の組み合わせ培養により, それぞれの単独培養では生産されない新規イソキノリンアルカロイド TS-1 の生産を確認した¹⁾。さらに *A. ustus* の単独培養で生産が既に報告されている²⁾ 2 種類の類縁体 TMC-120A, TMC-120B に加え, TS-1 と水酸基の位置のみが異なる TS-2 を確認した³⁾。TS-1 は微生物変換によりこれらの化合物を経て生産されると考えられ, その生成経路の確認を行った。【方法・結果】*A. ustus* 単独培養により生産される 3 種の TS-1 類縁体を精製した。*P. aurantiogriseum* を培養後, それぞれを添加してさらに培養し, その培養上清を ODS-HPLC で分析した。その結果, TS-2 から非酵素的脱水により TMC-120B が生産され, さらに水素化により TMC-120A へと変換され, 最終的に *P. aurantiogriseum* による水酸化により TS-1 へと変換される生成経路が示唆された。¹⁾2016 農化札幌大会 4B002 ²⁾*Tetrahedron*, **55**, 11247 (1999) ³⁾2015 農化岡山大会 4E23a13

D-p05 チャシワウロコタケ由来の抗酸化物質

○山下順也¹, 竹内沙緒里¹, 菊地晴久², 大島吉輝², 岡本賢治¹
(¹鳥取大院・工, ²東北大院・薬)

【目的】森の分解者として知られるキノコは, 木質の分解以外に生理活性物質生産など興味深い機能を有する微生物である。本研究では, チャシワウロコタケ *Phlebia acerina* が示す抗酸化作用に着目し, 活性物質を探索した。

【方法・結果】自然界から単離した野生キノコを, グルコース, 酵母エキス, 麦芽エキスを含む培地に接種し, 28℃で静置培養した。培養 14 日後の菌糸体を凍結乾燥後に溶媒抽出し, 抗酸化を DPPH ラジカル捕捉活性で評価したところ, チャシワウロコタケにおいて顕著な活性を認めた。そこで, 大量培養によって取得したチャシワウロコタケ培養菌糸体をメタノール, 酢酸エチルで溶媒分画した結果, 酢酸エチル可溶画分に高い抗酸化活性を検出した。現在はシリカゲルカラム, HPLC にて分画と精製を進めており, 今後, 単離した活性物質の構造決定を行う予定である。

糖加水分解酵素阻害剤を志向した 2-デオキシ-2-ハロゲン化糖の合成

D-p06

○井上千枝李, 岡本有未, 清田洋正, 泉実 (岡山大院・環境生命)

【目的】糖加水分解酵素の阻害剤として、2 位に電子求引性のフルオロ基を有する 2-デオキシ-2-フルオロ糖がある[1]。既報の合成法には、高価な求電子のフッ素化剤を用いていること、及び出発基質によりその立体選択性が異なるなどの問題点があった。そこで本研究では安価な求核的フッ素化剤を用いた汎用性の高い合成法の確立を目的として、*p*-ニトロフェニル 2-デオキシ-2-ハロゲン化糖 (*p*NP-2X-Gly) の調製について検討した。

【方法・結果】竜田らの報告[2]を参考に、トリ-*O*-アセチル-D-グルカールに *N*-ブロモスクシンイミドと *p*-ニトロフェノールを作用させたが、目的の 2-ハロゲン化糖を得ることはできなかった。そこでより反応性の高い *p*-ニトロフェノール銀塩を用いると、目的物のベンゼン環もブロモ化された 2,6-ジブロモ-4-ニトロフェニル 2-デオキシ-2-ブロモ- α -D-マンノピラノシドを得た。諸性質について検討中である。

[1] J. McCarter *et al.*, *Carbohydr. Res.*, **1993**, 249, 77. [2] K. Tatsuta *et al.*, *ibid.*, **1977**, 54, 85.

NAADP アンタゴニスト Ned-19 のプロセス化学研究と生物活性評価

D-p07

○小岩美月, 佐藤瑞穂, 小林教代, 清田洋正, 中島修平, 泉実
(岡山大院・環境生命)

リソソームからの Ca^{2+} イオン放出を誘導するセカンドメッセンジャーとして、NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) が発見された。我々はヴァーチャルスクリーニングを有効活用することにより、NAADP 受容体のアンタゴニストとして Ned-19 を見出した[1]。近年、様々なグループにより Ned-19 を用いた研究が行われ、エボラウイルスの感染防止に効果があること[2]などが報告されている。過去に我々が報告した Ned-19 の合成法は精製作業に煩雑さを伴い、大量合成に適していない。そこで本研究では、Ned-19 の合成経路や精製法の改良を試みた。その結果、シリカゲルカラム精製が必要であった工程を結晶化に代替するなど、Ned-19 合成の効率化に成功した。Ned-19 とその誘導体についての発芽試験など生物活性評価の結果も報告する。

[1] E. Naylor *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5, 220. [2] Y. Sakurai *et al.*, *Science*, **2015**, 347, 995.

ビニロガス向山アルドール反応を利用したブテノリド骨格の構築

D-p08

○森口舞子, 久世雅樹, 滝川浩郷 (神戸大院・農)

【目的】我々はアルキリデンブテノリド骨格を持つ ramariolide 類の合成を達成してきた。しかしながら、アルキリデン部分の *E/Z* 選択性が低いことが問題となっている。そこで本研究では、ブテノリド骨格を構築するビニロガス向山アルドール反応、及びそれに続くアルキリデン部分を構築する脱離反応の立体選択性を向上させることを目的とした。

【方法・結果】まずビニロガス向山アルドール反応におけるジアステレオ選択性について詳細な検討を行った。触媒として $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を用いると *syn* 体が優先され、 CsF を用いると *anti* 体が優先されることが分かった。次に脱離反応における *E/Z* 選択性についても検討した。これまでに TBAF/AcOH 条件下では選択性が低くなることがわかっている。 Et_3N を用いても選択性は向上しなかったが、*t*-BuOK を用いることで選択性を向上させることができた。さらに、この条件を同様のアルキリデンブテノリド骨格を持つ hygrophorone F, G の合成に適用し、その全合成にも成功した。

D-p09 キノリン骨格から誘導されるアライン中間体を利用した環化付加反応
○小玉彩友美, 岡栞里, 久世雅樹, 滝川浩郷 (神戸大院・農)

【目的】キノリンの5位と6位が炭素で置換されているアルカロイド系天然物の化学合成に取り組んでいる。段階的に置換基を導入する方法が一般的であるが、5位-6位間でアライン中間体を発生させ一挙に置換基を導入する新規合成手法の開発を目指している。本研究では、5位と6位に臭素を導入したキノリン誘導体を合成し、アライン中間体を経た環化付加反応によるオキサビシクロ化合物の合成を目的とした。

【方法・結果】出発物質である 1,2-dibromobenzene のニトロ化および還元により 3,4-dibromoaniline を合成した。アセト酢酸エチルと縮合しエナミンへと誘導した後、電子環状化反応によりキノリン骨格を構築した。4位ヒドロキシ基をメトキシ基へと変換してアライン前駆体が合成できた。このアライン前駆体をアルキルリチウムで処理しリチオ化したところ、臭化リチウムの脱離によりアライン中間体が発生した。引き続くフランとの環化付加反応によりオキサビシクロ環が生成し、5位と6位に置換基を同時に導入することができた。

D-p10 発光タンパク質（フォラシン）阻害剤のデザインと合成
○井庭早耶香, 久世雅樹, 滝川浩郷 (神戸大院・農)

【目的】フォラシンを結晶化し活性部位の3次元構造をX線結晶構造解析するためには、立体構造の均一なフォラシンが必要になる。そこで、活性部位に結合するが発光しない基質アナログを用いたフォラシンの結晶化を目指している。本研究では、天然基質であるデヒドロセレンテラジンの窒素原子を全て炭素に置き換えた阻害剤を合成することを目的とした。

【方法・結果】出発物質である 4-ブromo安息香酸をアミドへ変換し、鈴木-宮浦カップリング反応により 4-メトキシフェニル基を導入した。オルトリチオ化した後、ベンズアルデヒドと反応させベンジル基を導入し、還流することでラク톤を得た。DIBAL 還元でラクトールへ誘導した後、Wittig 反応とそれに続くオレフィンの還元、Friedel-Crafts 反応によりインダノン骨格を構築した。p-アニスアルデヒドとのアルドール縮合、および脱水反応により阻害剤のジメチルエーテル体が合成できた。この化合物はフォラシンの発光を阻害することが確認できた。現在、脱メチル化した阻害剤の合成に取り組んでいる。

E-a01 植物の光形態形成の制御を目的としたホウ素錯体系蛍光色素の合成および評価
○種将太郎¹, 辻隆士¹, 園田素啓¹, 前田壮志², 中澄博行³, 谷森紳治¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪大院・工, ³ 阪府大・21世紀研究機構)

【目的】光受容体フィトクロムは、660 nm 付近と 730 nm 付近の波長の光を吸収し、光形態形成反応を誘起することで植物の生育に関与している。そのため、これらの波長域の光量比を調整することで、植物の生育に影響を与えうることが知られている。本研究では、蛍光色素を組み込んだ被覆資材（波長変換フィルム）を作物栽培に用いることで、光形態形成の制御ができることを期待し、波長変換フィルムに利用可能な蛍光色素の合成を目的とする。

【方法・結果】1,2-ナフトキノンと 3-*N,N*-ジブチルアミノフェノールを出発物質とし、マイケル付加、酸化反応、環化反応を順次行うことにより、フラン環あるいはピラン環が縮環したナフトキノン誘導体をそれぞれ合成した。次に様々な置換基を持つフェニルヒドラジンをを用いてヒドラゾンに変換し、三フッ化ホウ素を用いて種々のホウ素錯体を合成した。得られた化合物の UV-Vis および蛍光スペクトル測定を行った結果、極大吸収波長ならびに発光波長はいずれもフィトクロムの吸収波長域にあることがわかった。

E-a02 綿実由来ゴシポールのヒドラゾン誘導体の合成と光物性
○小池隆太郎, 園田素啓, 谷森紳治 (阪府大院・生命環境)

【目的】ゴシポールはワタ科植物の種子に含まれている天然色素であり、細胞毒性を有することが知られている。そのためゴシポールは、精油業において綿実油の精製工程で除去・廃棄されている。しかし、ゴシポールは多置換ビナフチル骨格を有しており、構造化学的な見地から、新しい機能性物質の合成前駆体として興味が持たれる。そこで本研究では、ゴシポールを化学修飾することによって π 共役系を拡張し、新しい発光物質を創出することを目的とした。

【方法・結果】芳香環上に種々の置換基を有するアリーールヒドラジンをを用いてゴシポール酢酸と反応させることにより、ゴシポールのヒドラゾン誘導体を中程度の収率で合成した。得られた誘導体について、紫外-可視吸収ならびに蛍光スペクトル測定を行った結果、パラ位にニトロ基を有するヒドラゾン誘導体において、534 nm ($\lambda_{ex} = 424$ nm) に蛍光極大を有することが明らかとなった。

E-a03 フラバン-3-オール誘導体の配糖体合成研究
○西村拓哉¹, 小堀亮¹, 宮形知美², 柴崎亨¹, 川崎崇³, 齊藤安貴子^{1,2}
(¹ 大阪電通大院・工, ² 大阪電通大・工, ³ 立命館大・薬)

【目的】フラバン-3-オール誘導体は様々な植物体に含まれており、高機能性物質として注目されている。本発表では、シロイヌナズナ由来の糖転移酵素 UGT78D2、および、ブドウ培養細胞を用いて配糖体合成検討を行った。

【方法・結果】フラバン-3-オールのガロイル誘導体を用いて配糖化反応の検討を行なったところ、糖転移酵素 UGT78D2 では、(+)-catechin から誘導した化合物の配糖化生成物が得られた。また、ブドウ細胞 *Vitis vinifera* L. では、アントシアニン色素を生産しない VW 株を用いたとき、quercetin で糖化反応が進行した。また、(-)-epigallocatechin-3-*O*-galalte (EGCG) でも糖化反応が進行したと考えられ、現在単離・構造決定を進めている。本発表では、これらの配糖化反応の詳細について報告する予定である。

E-a04 トリフルオロエチル基ならびにジフルオロエチル基を有するイミダクロプリド類縁体の合成と生物活性評価

○松原祐佳¹, 釘屋敦基², 山内聡², 西脇寿²
(¹愛媛大・農, ²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 (IMI) のイミダゾリジン環 1 位の窒素原子の部分的正電荷は, 受容体の負に帯電した領域と相互作用することが推測されている。そこで, この窒素原子の近傍に電子求引性置換基を導入すれば, より正に帯電させることができると考えた。本研究では, 含フッ素置換基が生物活性に与える影響を明らかにすることを目的として, trifluoroethyl 基および difluoroethyl 基を有する IMI 類縁体を不斉合成し, その生物活性を評価した。

【方法・結果】L-Serine から調製した (*S*)-Garner's aldehyde と TMS-CF₃ または TMS-CHF₂ から 2 級アルコールを合成し, Barton-McCombie 脱酸素反応を経て, 各化合物を合成した。そして, イエバエ成虫に注射投与し, 50%効果薬量 (ED₅₀, pmol/fly) を求めた結果, 合成したどちらの IMI 類縁体も共力剤未処理時の殺虫活性は無置換体より低下した。

E-a05 イミダゾリジン環に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イエバエに対する生物活性

○釘屋敦基¹, 松原祐佳², 山内聡¹, 西脇寿¹
(¹愛媛大院・農, ²愛媛大・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 (IMI) のイミダゾリジン環エチレン部位に関する構造活性相関を解析するために, これまでに様々な置換基を有する IMI 類縁体を合成してきた。本研究では, イミダゾリジン環の 5 位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, それらの殺虫活性 (ED₅₀, pmol/fly) および受容体親和性 (K_i, nM) を評価した。

【方法・結果】原料として (*S*)-Garner's aldehyde や Boc-D-propargylglycine を用いて, イミダゾリジン環の 5 位に vinyl 基, 1-propenyl 基, 1-butenyl 基, propargyl 基などの不飽和結合を有する置換基を導入した IMI 類縁体を合成した。続いて, 得られた類縁体の生物活性を評価した結果, 不飽和結合を有する置換基の導入は, 殺虫活性, 受容体親和性の両活性に対して不利にはたらくことが明らかとなった。

E-a06 Cyclo(Leu-Phe) 酸化酵素が有する広い基質特異性を利用した Met 含有環状ジペプチドの変換反応

○小西健太, 仁戸田照彦, 神崎浩 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々は、放線菌由来の cyclo(Leu-Phe) 酸化酵素が多くの環状ジペプチド (CDP) に対して反応性を示すことを見出してきた。本酵素は、特に芳香族アミノ酸を有する CDP に対して高い反応性を示したが、芳香環を持たない cyclo(Met-Met) に対しても非常に高い反応性を示した。そこで、本研究では今まで変換反応を行ってことがない Met を有する 17 種の CDP を用いた反応を行い、本酵素のさらなる基質特異性の広さを示すことを目的とした。

【方法・結果】基質となる種々の CDP をそれぞれ本酵素により反応させ、その後 HPLC-DAD 分析を行った。その結果、酵素非添加区と HPLC クロマトグラムを比較すると、用いた全ての CDP の反応が確認された。それら生成物の UV スペクトルは脱水素型 CDP に特徴的であることから脱水素されていると考えられた。本酵素が Met 残基を含む CDP に対して反応性が高いことがわかり、基質特異性の広さをさらに確認できた。

E-a07 Rational design of novel non-steroidal compounds targeting 20-hydroxyecdysone (steroid) binding site of ecdysone receptor (EcR)

○Yu-Hui Wang, Taiyo Yokoi, Yoshiaki Nakagawa, Hisashi Miyagawa
(Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ.)

【Objective】Insects grow by repeating molting which is triggered by a steroid hormone, 20-hydroxyecdysone (20E). Administration of compounds that mimic the action of 20E disturb the insect growth, leading to death. In this study, nonsteroidal compounds which can bind to the binding pocket of the receptor were searched by *in silico* methods.

【Method/Results】A potential substructure [-CH₂=N-NH-C(=O)-] was found from the large structure database (5 million structures) by pharmacophore-based *in silico* screening. Compounds with [-CH₂=N-NH-C(=O)-] were rationally modified to enhance the activity using docking simulations. The most potent compound significantly inhibited the hormone binding to the receptor, but showed no agonist activity.

E-a08 ブチロラクトン型リグナンである arctigenin の 4 つの全立体異性体の合成と昆虫細胞 Sf9 に対する細胞毒性活性

○西本明日香, 西脇寿, 西甲介, 菅原卓也, 山内聡 (愛媛大院・農)

【目的】arctigenin は、8 位と 8' 位に不斉炭素を有する lignano-9,9'-lactone (α,β -dibenzylbutyrolactone) 型のリグナンである。以前からがん細胞に対する細胞毒性活性は知られていたが、昆虫細胞に対する活性、立体構造と活性との関係は不明である。今回は、4 つのすべての立体異性体の合成を行い、昆虫細胞である sf9 に対する活性を調べることを目的として実験を行った。

【方法・結果】不斉の構築を、Evans の *anti* アルドール縮合を用いて行い、4 つの立体異性体を 100%ee 以上で得た後、昆虫細胞である sf9 に対する活性を調べた。その結果、天然体である (8*R*,8'*R*)-体、及び、シス体の 1 方である (8*S*,8'*R*)-体の IC₅₀ 値がそれぞれ 6.7 μ M 及び 13 μ M で、(8*S*,8'*S*)-体、(8*R*,8'*S*)-体の IC₅₀ 値が 100 μ M 以上であり、立体特異性が観察された。sf9 に対する活性発現のために 8' 位が *R* 体である事の重要性が示された。

抗かび活性が報告されている 6-alkyl α -pyrone の 4 つの全立体異性体の合成
E-a09 ○越智良太, 西脇寿, 山内聡 (愛媛大院・農)

【目的】6-alkyl α -pyrone 化合物には、殺虫活性、抗菌活性、抗かび活性、植物生長調節活性が知られているが、立体構造を含む構造と活性との関係は不明である。本研究では、植物性病原かびである *Cladosporium cucumerinum* に対して抗かび活性が報告されている、 α -pyrone 環の 6 位に 6-phenyl-2-hydroxyhexyl 基を有する化合物の 4 つの立体異性体の合成を目的とした。

【方法・結果】methyl 2-oxocyclopentylacetate の酵母還元生成物である 99%ee の (1R,2S)-methyl (2-hydroxycyclopentyl)acetate と (1S,6S)-7-oxabicyclo[4.3.0]nonan-8-one をそれぞれ出発化合物としてシクロペンタノール誘導体へ導いた。次に、Grignard 反応のより 6-phenyl-2-hydroxyhexyl 基を構築し、ジアステレオマーの分離を行った後に、シクロペンタノール部位をケトンへ酸化した後、Baeyer-Villiger 酸化を行い、さらに α -pyrone 化合物へ導いた。光学活性カラムにより光学純度が 99%ee および 95%ee と確認した。

極限環境微生物のポリ γ グルタミン酸を利用した超耐久性抗菌ポリマーの創製
E-a10 ○芦内誠^{1,2}, 中山沢水¹, 東内遥菜¹, 白米優一²
(¹高知大・農林海洋, ²愛媛大院・連合農)

【目的】ポリ γ グルタミン酸 (PGA) は、納豆のネバとして有名だが、PGA 合成微生物は他にも存在、その多くが極限環境微生物という事実は注目に値する。立体化学の研究から、納豆 PGA とは異なる「ホモキラル PGA」であることが分かってきた。最近、ホモキラル PGA の画期的な化学改質法を考案した。今回、圧倒的な耐久性能と先進材料特性をあわせ持った新素材の開発に成功したので報告する。【方法と結果】本改質法で生み出される抗菌ポリマーは「PGAIC」と呼ばれている。かかる強靱化の目的から、非共有結合架橋構造に着目した。二頭型第 4 級アンモニウム化合物「dequalinium cation (DEQ⁺)」を採用し、該 PGAIC 新素材を PGA/DEQ と名付けた。NMR・XRD・DSC・抗菌性を指標とした化学的耐久／剥離性試験等の結果から、PGA/DEQ の微細構造上の特徴とともに、特段に優れた抗菌物性まで示された。「捕捉殺菌」として提案した新機作についても触れる。

Tyr 誘導体の抗菌作用
E-a11 一瀬大樹, 前田良枝, 後藤正利, 野間誠司, 関清彦, 光富勝, 宗伸明,
○上田敏久 (佐賀大・農)

【目的】H-Tyr(Bzl)-OR (側鎖 OH 基を benzyl 基で保護した Tyr のアルキルエステル) が抗真菌活性をもつことを報告してきた。しかし、その作用機構はいまだ不明である。今回、細菌への作用も検討し、抗菌作用機構解明への糸口をつかむことを目的として実験を行った。

【方法・結果】H-Tyr(Bzl)-OR 及び類似化合物の真菌 (糸状菌・酵母) と細菌 (グラム陽性菌・陰性菌) 計 8 種に対する活性を測定した。その結果、H-Tyr(Bzl)-OR については、次の点が明らかとなった。(1) ほとんどのエステルが 8 種の菌に対して抗菌活性を示し、その程度はエステル鎖の構造によって差があった。(2) tBu エステルで処理した糸状菌を顕微鏡観察したところ、菌糸の屈折・屈曲が見られた。(3) tBu エステルは殺菌的に細菌に作用していた。また、H-Tyr(Bzl)-OR 類似化合物の場合、抗菌作用は側鎖構造の違いによって大きく異なり、側鎖に 2 個の環構造をもつ化合物だけが、真菌と細菌の両方に効果を示した。

E-p01 糸状菌が産生する殺虫性アルカロイド・コムネシンの活性発現に貢献する標的受容体の構造因子

○橋本杏樹¹, 古谷章悟¹, 野口晃¹, 伊原誠¹, 甲斐建次², 林英雄², 松田一彦¹ (¹近畿大・農, ²阪府大・生命環境)

【目的】コムネシン類はインドールアルカロイドの一種で、海洋の *Penicillium* 属糸状菌が産生する抗がん物質として発見されたが、後にカイコガ幼虫に対する殺虫性物質として再発見された。本研究では、コムネシンの殺虫活性の原因を探るため、カイコガ神経細胞に対するコムネシン類の作用と、標的候補タンパク質の本化合物群の結合部位について検討した。

【方法・結果】パッチクランプ法を用いて調査したところ、コムネシン B はカイコガ幼虫の神経細胞に対して濃度依存的に塩素電流を誘起した。そこで、カイコガの GABA 作動性塩素チャネルおよびグルタミン酸作動性塩素チャネル (GluCl) に対するコムネシン B の作用を比較したところ、本化合物は exon 3 の選択的スプライシングに由来する構造変化によらず、GluCl を選択的に活性化した。このことから、コムネシン類は、exon 3 がコードする領域とは異なる部位と相互作用し、GluCl を活性化することで殺虫活性を示すと推察された。

E-p02 昆虫－脊椎動物ハイブリッド型ニコチン性アセチルコリン受容体に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性に対する loop D-E-G トライアングルと loop C の寄与

○疋田麻衣, 伊原誠, 松田一彦 (近畿大院・農)

【目的】ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に選択的に作用するが、そのメカニズムには不明な点が残されている。今回、昆虫 nAChR の隣接する α サブユニットの境界で形成される Loop D-E-G トライアングル*および Loop C のネオニコチノイドとの相互作用における役割について検討したので報告する。

【方法と結果】ショウジョウバエ D α 1-ヒヨコ β 2 nAChR の Loop D-E-G トライアングルのアミノ酸をヒト α 4 サブユニットの対応アミノ酸に置換すると、D α 1 β 2 nAChR のネオニコチノイド感受性は低下した。さらに、Loop C のアミノ酸を α 4 サブユニットの対応アミノ酸に置換すると、D α 1 β 2 nAChR のネオニコチノイド感受性は一層低下したことから、Loop C は Loop D-E-G トライアングルと協力してネオニコチノイド感受性を決定することが判明した。

*M. Ihara et al., *Br. J. Pharmacol.*, in press.

E-p03 殺線虫活性を示す糸状菌代謝物パラヘルクアミドの活性発現機構の構造生物学的理解

○伊原誠, 野口晃, 二木邦浩, 古谷章悟, 松田一彦 (近畿大・農)

【目的】パラヘルクアミドは *Penicillium paraherquii* の培養液より単離されたオキシインドール化合物であり、とりわけ線虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に対して高活性を示す。これまで我々は、電気生理学的手法を用いて、線虫 *C. elegans* の nAChR に対するパラヘルクアミド A の阻害機構について検討してきた。本研究では、X 線結晶構造解析により本化合物の活性発現機構について新たな知見を得たので報告する。

【方法・結果】*Pichia pastoris* を用いてヨーロッパモノアラガイのアセチルコリン結合タンパク質 (*Ls*-AChBP) を調製し精製した後、これをパラヘルクアミド A とともに結晶化した。本結晶の X 線回折像は SPring-8 BL26B1 にて収集し、その構造は分子置換法によって解析した。その結果、*Ls*-AChBP プロトマー境界部分にパラヘルクアミド A と考えられる電子密度が確認された。現在、この X 線結晶構造モデルの精密化を行っている。

E-p04 ヒメトビウンカ GABA レセプターに対する Gabazine およびその類縁体の作用 ○大谷真緯, 藤江佑紀, 尾添富美代, 尾添嘉久 (島根大・生資料)

【目的】 Gabazine は、脊椎動物の GABA_A レセプターに高活性を示す競合的アンタゴニストであるが、昆虫の GABA レセプター (GABACl) に対しては低活性である。Gabazine 低活性の原因アミノ酸残基を同定し、gabazine とその類縁体の作用を調べることで、昆虫 GABACl に高活性な競合的アンタゴニストの分子設計を行うことを本研究の目的としている。

【方法・結果】 ヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus*) の GABACl サブユニット RDL をコードする遺伝子 *rdl* の変異体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二電極膜電位固定法により gabazine とその類縁体に対する感受性を調べた。WT では 30 μ M gabazine の GABA 応答阻害は弱かったが、二重変異体 F95S/F128Y と三重変異体 Y91F/F95S/F128Y において同濃度での gabazine の阻害率の上昇がみられた。F95S/F128Y における gabazine の IC₅₀ 値を求めたところ、31.4 $\pm$ 9.23 (SD) μ M であった。以上の結果、細胞外ドメインのアミノ酸 F95 と F128 は、gabazine の作用に関係するアミノ酸であることが示唆された。

E-p05 PEG 導入型アフィニティービーズを用いた微量 AHL 合成酵素のプルダウン ○山田将太, 赤川貢, 甲斐建次 (阪府大院・生命環境)

【目的】 細菌はフェロモン様の低分子化合物を介し、同種の菌密度を感知することで遺伝子発現を制御するクオラムセンシング (QS) 機構を有する。我々は、グラム陰性細菌における主要な QS シグナル分子 *N*-acylhomoserine lactone (AHL) の合成酵素を同定するためのアフィニティービーズを開発し、*E. coli* 異種発現系において細胞抽出上清から目的酵素を SDS-PAGE 上で単一バンドとして回収することに成功した。しかし、微量な AHL 合成酵素をプルダウンするには、ビーズの酵素に対する特異性と収量の改善が必要であった。そこで本研究では、微量な AHL 合成酵素をプルダウンできる改良型アフィニティービーズを開発し、細菌 QS 機構の解明を目指した。

【方法・結果】 AHL の生合成中間体アナログ ASI-1 ($K_i=220$ nM) のリンカー部位に鎖長が 2, 4, 6 の PEG を導入したリガンドをそれぞれ合成し、ビーズに固定化した後、*E. coli* の細胞抽出上清と結合実験を行った。その結果、PEG 導入型アフィニティービーズは、改良前のビーズに比べ酵素収量が約 20 倍増加し、非特異的タンパク質との結合も緩和された。

E-p06 ビール酵母由来の多糖によるイネ (*Oryza sativa*) の根張り向上効果と亜鉛吸収能の変化

○持田真歩¹, 中道貴也², 森田智也², 吉永直子², 落合久美子², 小林優², 寺石政義², 奥本裕², 森直樹² (¹京大・農, ²京大院・農)

【目的】ビール酵母の細胞壁由来である β -1,3/1,6-グルカン (以下 CW1) にイネ (日本晴) の根の生育促進作用を確認している。さらに, 同処理が亜鉛イオンの吸収にも影響することを新たに見出した。

【方法・結果】第 4 葉が完全展開したイネを, グルカン相当 50 ppm の CW1 水溶液で 1 週間栽培したところ, 根張りの向上が観察された。しかし, CW1 水溶液に亜鉛イオンを過剰に添加した試験区では, 本来の根張りは観察されなかった。原子吸光分析装置を用いて植物体中の亜鉛含量を測定すると, CW1 処理区で亜鉛含量が増加していた。CW1 処理により, 亜鉛吸収能が変化したと示唆された。

E-p07 岩手産ユズ果皮の精油成分

○杉本圭一郎^{1,2}, 宮里博成¹, 大江健史³, 清宮靖之⁴, 平野高広⁴, 浅川知則⁵, 佐々木真人⁵, 岩波徹⁶, 乾博^{2,7} (¹長岡香料, ²阪府大・生資セ, ³ラピアス電機, ⁴岩手工技セ, ⁵岩手農研セ, ⁶農研機構・果樹茶研, ⁷阪府大・栄養)

【目的】岩手県陸前高田市周辺で栽培されているユズは、「北限のゆず」と称しブランド化が図られているが、四国・埼玉など主要生産地とは異なる香気特徴を有する可能性が示唆されている。果汁搾汁後果皮の有効利用を目的として、精油成分の分析を行った。

【方法・結果】果汁搾汁後のフラベドから、水蒸気蒸留法によりユズ果皮精油を得た (収油率 0.17%)。香気評価では、比較対照の高知産公文系ユズ精油がユズ本来の香りを示したのに対し、岩手産ユズ精油の香りには、カモミール様のフローラルな香りが認められた。GC 及び GC/MS 分析により 150 成分を検出し、56 成分を同定した。高知産ユズ精油と比較したところ、岩手産ユズ精油は、主要成分の含有量に大きな差異は認められなかったが、*p*-cymene、 α -humulene、thymol の含有量が高く、bicyclogermacrene は低かった。

E-p08 シイタケ廃菌床抽出物の植物病害防除効果と抗菌活性物質の単離

後藤典子¹, 吉川実沙¹, 宇部尚樹², 上野琴巳¹, 大崎久美子¹, ○石原亨¹ (¹鳥取大・農学部, ²鳥取大・連合農学研究科)

【目的】多くの食用きのこは、菌床栽培により生産されている。使用済みの菌床 (廃菌床) の利用法を模索する中で、廃菌床を植物に処理すると病害の発生を防除できる可能性が示唆されてきた。そこで、シイタケ廃菌床の熱水抽出物がイネいもち病菌の感染に及ぼす影響を調べるとともに、廃菌床に含まれる抗菌活性物質の探索を行なった。

【方法・結果】シイタケ廃菌床に蒸留水を加え 120°C で 20 分間オートクレーブし、廃菌床熱水抽出物を調製した。播種後 16 日目のイネに熱水抽出物を噴霧し、さらに 2 日後にイネいもち病菌の胞子を接種すると、病斑の形成が顕著に抑制された。また、廃菌床熱水抽出物はイネいもち病菌の胞子発芽を抑制したため、抗菌活性物質の精製を行なった。その結果、新規化合物 1 種を含む 3 種の抗菌活性物質を同定することができた。これらの化合物は化学構造からリグニンの分解物であると推定された。

担子菌類からのアフラトキシン生合成阻害活性物質の探索

E-p09

○井上瑞季¹, 遠藤直樹², 早乙女梢², 前川二太郎², 中桐昭², 上野琴巳³, 石原亨^{2,3} (¹鳥取大院・農, ²鳥取大・菌類きのこセ, ³鳥取大・農)

【目的】アフラトキシンは *Aspergillus parasiticus* などが産生するマイコトキシンである。アフラトキシンの生合成阻害物質を利用することで新たな防除法が開発できると考え、その探索を行ってきた。本研究では、未知の二次代謝産物を多く含むと予想される担子菌の培養物を対象としてアフラトキシン生合成阻害物質を見出すことを目的とした。

【方法・結果】アフラトキシンの生合成中間体であるノルゾロリン酸 (NA) を蓄積する変異株 *A. parasiticus* NFRI95 を用いて、NA 蓄積阻害を指標にしたバイオアッセイを行なった。鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センターの保存菌株 50 種を対象としたスクリーニングによりシワタケ (*Phlebia tremellosus*) の培養ろ液に NA 蓄積阻害活性があることがわかった。そこで、シワタケを麦芽液体培地で培養し、活性物質の単離・精製を行なった。その結果、活性物質としてセスキテルペンのメルリジアル及びメルラクトンが得られた。

ダイズ葉毛茸によるハスモンヨトウ幼虫摂食阻害の検討

E-p10

○中田隆¹, 手嶋伸¹, 吉永直子¹, 寺石政義¹, Eric Schmelz², 奥本裕¹, 森直樹¹ (¹京大院・農, ²UCSD)

【目的】ダイズ葉の毛茸は、病害虫に対する抵抗性の一端を担う。毛茸がハスモンヨトウ幼虫の摂食行動を阻害すると考え、これまでに抵抗性ダイズ品種の毛茸の物理的性質や化学物質を報告してきた。本研究では、毛茸がハスモンヨトウ幼虫の摂食行動に与える影響を正確に観察・記録し、毛茸による摂食阻害効果を定量的に評価することを目的とした。

【方法・結果】毛茸が発達した抵抗性品種「ヒメシラズ」・「IAC100」と感受性品種「タマホマレ」「エンレイ」を用いた。円形に切り抜いた葉を 24 穴プレートに張り付け、各ウェルに 2 齢幼虫を入れ、自作した観察装置で 30 秒に 1 枚の間隔で撮影した。画像は Open CV を用いたアルゴリズムにより解析し、葉の経時的被摂食面積を定量した。その結果、抵抗性品種の被摂食量は感受性品種より少ないが、毛茸を除去しても被摂食量は顕著に増加せず、毛茸による摂食行動への直接的な影響は認められなかった。

青枯病菌株間における C14 型と C16 型の QS シグナル分子の作り分けには合成酵素 PhcB の基質特異性が重要である

E-p11

○氏田夢斗¹, 島谷美香¹, 曳地康史², 甲斐建次¹
(¹阪府大院・生命環境, ²高知大・農)

【目的】青枯病菌は、クオラムセンシング (QS) シグナル分子として (*R*)-methyl 3-hydroxy-myristate (3-OH MAME) を産生する株と (*R*)-methyl 3-hydroxypalmitate (3-OH PAME) を産生する株に分けられる。どちらの分子を産生するかは、合成酵素である PhcB の基質特異性に依存していることが予想される。本研究では両株が持つ PhcB の基質特異性を比較することで、この仮説が正しいかどうかを検証する。

【方法・結果】PhcB は、3-OH MAME 産生型と 3-OH PAME 産生型の株由来の酵素を大腸菌で His タグ融合タンパクとして発現・精製した。基質として C12-C18 の 3-hydroxy fatty acid (3-OH FA) を用意し、PhcB 酵素アッセイに供した。その結果、3-OH MAME 型は C14 の 3-OH FA に、3-OH PAME 型は C16 の 3-OH FA に対して高い活性を示すことが判明した。

F-a01 担子菌 *Serendipita indica* 共生で誘導されるシロイヌナズナの代謝変動の解析
○勝山菜央, 吉川凌香, 稲次葵, 齊藤綾子, 中本雅俊, 小川拓水, 岡澤敦司,
太田大策 (阪府大院・生命環境)

植物は内生共生菌と共生関係を成立することで耐病性増強や生育促進などの恩恵を受けるとともにファイトアレキシンの生産などの防御応答を示す。本研究では、担子菌エンドファイト *Serendipita indica* 共生で誘導されるシロイヌナズナの代謝変動を解析することを目的とした。これまでに、*S. indica* 感染初期にシロイヌナズナの主要なファイトアレキシンであるカマレキシンの生合成誘導に関わる転写因子 *ANAC042* と *DR5rev:GFP* の発現および側根原基誘導部位と根端での *DR5:GUS* 発現誘導を認めた。今回、*S. indica* とシロイヌナズナの共生関係成立に至るまでの防御物質の生合成の調節を明らかにすることを目的とした代謝変動の経時変化の解析結果を報告する。

F-a02 担子菌エンドファイト *Serendipita indica* 由来の低分子化合物によるシロイヌナズナ側根原基誘導の解析
○稲次葵, 吉川凌香, 勝山菜央, 齊藤綾子, 中本雅俊, 小川拓水, 岡澤敦司,
太田大策 (阪府大院・生命環境)

担子菌 *Serendipita indica* は広範囲の植物根に共生し、ストレス耐性増強、生育促進、収量増加などの有用効果をもたらす。シロイヌナズナと *S. indica* をモデル実験系として、共生関係成立と生育促進について多くの知見が集積している。しかし、感染初期 (24 時間以内) の発生・発達プログラムに関わる宿主の細胞応答に明確な説明はない。両者を透析膜で隔離・液体培養した際の培養液 (CCM) を新たな幼植物に与えると側根形成と側根原基誘導部位における *DR5:GUS* が顕著に誘導されたことから、CCM 中には内生オーキシシンレベル変化を介して側根原基を誘導する低分子化合物が存在すると考えられた。今回、シロイヌナズナの *PIN1:GFP* および *DR5rev:GFP* 系統、IAA 生合成酵素反応阻害剤、*cyp79b2/b3*, *cyp71a12/a13* 変異体を用い、CCM による側根原基誘導と内生 IAA 生合成の関与を解析した結果を報告する。

F-a03 シロイヌナズナ *CONSTANS-LIKE* 遺伝子が葉緑体発達に及ぼす影響
○木下寛子, 西田文香, 稲葉靖子, 稲葉丈人 (宮崎大・農)

【目的】葉緑体に局在するタンパク質のほとんどは核ゲノムにコードされている。そのため、葉緑体の分化、維持、増殖には核コード葉緑体タンパク質遺伝子の発現と、それらのタンパク質の葉緑体内への輸送が必要不可欠である。例えば、シロイヌナズナでは *GLK1* 及び *GLK2* が核コード光合成関連タンパク質遺伝子の正の調節因子として知られており、葉緑体発達を促進する働きがある。今回、我々はシロイヌナズナの葉緑体発達の負の調節因子として *CONSTANS-LIKE6* (*COL6*) 及び *COL16* を見出し、その生理的機能の解明を試みた。

【方法・結果】*glk1glk2* 二重変異体、*col6col16* 二重変異体及び *col6col16glk1glk2* 四重変異体を作成し、クロロフィル定量と光合成関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、*col6col16glk1glk2* 四重変異体では *glk1glk2* 二重変異体よりもクロロフィル含量は増加し、光合成関連遺伝子の発現も高い傾向があった。以上のことから、*COL6* 及び *COL16* はシロイヌナズナの本葉における葉緑体発達に負の影響を与えることが明らかになった。

活性染色法によるレタス PPO アイソザイムの発現解析と組織の褐変化

F-a04

○野田孝博¹, 飯牟禮和彦¹, 岡本俊介², 斎藤彰¹
(¹熊本農研セ, ²タキイ種苗(株))

【目的】レタスカット断面等の組織の褐変化に関与すると考えられるポリフェノール酸化酵素(PPO)の活性染色法における検出条件を検討するとともに、検出されたアイソザイムと組織褐変化の関係を明らかにする。

【方法・結果】PPOの活性染色法において、種々のpHで検出されるアイソザイムが異なり、特にアルカリ条件においては酸性条件では染色されない多様なアイソザイムが検出された。次に、検出されたアイソザイムの発現とレタス組織褐変との関係について調査した。その結果2種類のアイソザイムは無傷の時には発現せず、カット等の障害を受けて発現する障害誘導性のPPOであった。その他のアイソザイムは障害の有無に関係なく恒常的に発現していた。検出された障害誘導性PPOの発現の経時的変化は、褐変の経時的変化と同期していたことから、障害誘導性PPOは組織の褐変化に重要な役割を担っていると考えられた。

R4 Gateway リサイクリングクローニングシステムを用いた植物における複数遺伝子の発現解析

F-a05

○小谷真由^{1,2}, 税所利基^{1,2}, 加藤穂波^{1,2}, 木村哲哉³, 中川強²
(¹島根大・生資, ²島根大・総科セ, ³三重大院・生資)

【目的】本研究室ではGatewayテクノロジーを用いた植物形質転換用ベクター開発を行っている。プロモーターとcDNAを任意に組み合わせ、それらを多数順次組み込むことができるリサイクリングクローニングシステムによるコンストラクトの構築および植物での発現解析が進められている。また、複数遺伝子安定発現に有用なプロモーターの探索も行っている。これまでにシロイヌナズナ由来のL15(RubisCoアクチベース遺伝子)プロモーターを用いて3レポーターコンストラクトをシロイヌナズナで安定発現させることに成功している。

【方法・結果】今回、L15プロモーターを用いた5レポーターコンストラクトを導入したシロイヌナズナでの発現解析を行ったので報告する。また、異なるプロモーターを複数用いた際の発現独立性についても解析を行ったので報告する。

塩ストレスがイネのオーキシン代謝に与える影響

F-a06

○西野雄人, 宮川恒 (京大院・農)

【目的】オーキシンは、植物の成長や発達に関わる植物ホルモンである。また、オーキシンはストレス応答にも関わるということが知られており、塩ストレス条件下ではオーキシン代謝酵素の遺伝子発現が上昇すると報告されている。しかし、化合物レベルでの分析はなされていなかったため、今回塩ストレス条件下でのオーキシン代謝物組成の変動を調べた。

【方法・結果】発芽後5日のイネ (cv 日本晴) の根部を 200 mM NaCl 水溶液に浸し、液体室素中で破碎したのち、アセトン水溶液で抽出した。抽出液を濃縮し、固相抽出で精製した後 LC-ESI-MS/MS 分析に供した。代謝物濃度の経時変化を調べたところ、塩ストレス処理後 24 時間でアミノ酸抱合体である IAA-Glu が顕著に増加していた。一方、同じアミノ酸抱合体である IAA-Asp は増加せず、他の代謝物についても濃度変化は見られなかった。また、同様の IAA-Glu の増加はインディカ種 (cv Kasalath) においても観察された。

トマトにおけるアルドケト還元酵素の遺伝子発現機構に関する研究

F-a07

○末川麻里奈, 藤川愉吉, 江坂宗春 (広島大院・生物圏)

【目的】アルドケト還元酵素 (aldo-keto reductase ; AKR) は、植物の一次・二次代謝やストレス耐性に関与する。トマトにおいて、AKR のひとつである SIAKR は、サリチル酸やジャスモン酸などの植物ホルモンや細胞壁の消化により遺伝子発現が誘導されることから、病傷害ストレスに関わっている可能性がある。本研究では、病傷害による SIAKR 遺伝子の発現応答性を解析するとともに、SIAKR 遺伝子のプロモーター解析を試みた。

【方法・結果】SIAKR 遺伝子の発現は、大腸菌由来のリポ多糖によるエリシター処理では誘導されなかった。一方、葉の傷害処理では遺伝子発現量が増加したことから、SIAKR 遺伝子発現は、病気によっては誘導されず、傷害によって特異的に誘導されると考えられる。次いで、SIAKR プロモーター解析を行ったところ、SIAKR プロモーター活性は、5'上流域に認められる G-box 様配列の変異によって低下した。現在、G-box に結合する転写因子として知られる bZIP 転写因子に着目し、ゲルシフト解析等を行っている。

エチルステロールが担う生理機能解明

F-a08

○山六祐果¹, 中本雅俊^{1,2}, 金谷重彦², 太田大策¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 奈良先端大・情報科学)

植物ステロールは、SMT1 によって側鎖 C24 位がメチル化され合成される C24 メチルステロールと SMT2 によってさらにメチル基が付加された C24 エチルステロールに大別される。本研究は SMT2 変異によって C24 エチルステロール生合成能だけを失ったシロイヌナズナ二重変異体 *smt2 smt3* を作出・供試し、C24 エチルステロールの生理機能解明を目的とした。*smt2 smt3* は重篤な矮性やオーキシン分布異常、細胞分裂異常など、様々な異常表現型を示した。*proSMT2* : SMT2-GFP を *smt2 smt3* 変異系統で発現させることにより、異常表現型は完全に回復した。SMT2-GFP は小胞体と想定される細胞内膜系に局在するが、細胞質分裂期の細胞では細胞板に SMT2-GFP が集積し、細胞質分裂に特異的な syntaxin である KNOLLE を含む小胞と共に細胞板に輸送されることが明らかとなった。これらの結果から細胞板における C24 エチルステロールの合成が細胞板形成の進行に重要であることが示唆された。

F-a09 シロイヌナズナの 7TM およびカルシウムチャネル欠損株を用いた 2-hexenal 情報伝達系の解析

○青木仁美¹, 新出ひかる², 山内靖雄¹, 水谷正治¹, 杉本幸裕¹
(¹神戸大院・農, ²神戸大・農)

【目的】植物の香り成分である 2-hexenal は、酸化ストレス応答を引き起こすシグナル分子として働くことから、環境応答情報伝達機構の一端を担っていると考えられている。本研究では、シロイヌナズナ突然変異株を用いての 2-hexenal 情報伝達系の解明を目的としている。

【方法・結果】野生型のシロイヌナズナ Col-0 に様々な薬剤処理を行い、マーカー遺伝子である *ZAT10* 発現量を調べた結果、2-hexenal 情報伝達系における *Gα* タンパク質、環状ヌクレオチドの関与が示唆された。そこから、動物と類似した GPCR が関与する匂い物質の受容メカニズムを想定し、7TM およびカルシウムチャネルに着目した。これらの欠損株に 2-hexenal を処理した際に、Col-0 と比較して *ZAT10* 発現量が半分以下になった系統を選抜した結果、7TM、カルシウムチャネルが関与する 2-hexenal 情報伝達系の存在が示唆された。

F-a10 イネ (*Oryza sativa*) に対する酢酸処理による乾燥耐性付与に伴う代謝変化

○伊左治俊策¹, 吉永直子¹, 土生芳樹², 森直樹¹
(¹京大院・農, ²農研機構)

【目的】近年、乾燥耐性に応答し酢酸を生合成する遺伝子がシロイヌナズナで発見され、イネに酢酸を処理したところ乾燥耐性が付与されることが明らかになっている。また、乾燥ストレスに面した植物の多くは 4-アミノ酪酸 (GABA) を蓄積することが知られている。そこで本研究では、酢酸処理したイネの GABA に関わる代謝を調べた。

【方法・結果】播種後 2 週間生育させたイネ (日本晴) に 30 mM の酢酸を 4 日間処理し、イネ体内の GABA 量を定量した。その結果、根では酢酸処理開始後 1 日目から、地上部では 3 日目から GABA 量が増加した。¹³C で標識した酢酸を用いて実験を行ったところ、GABA の ¹³C ラベル化率が根と地上部の両方で増加した。以上から、処理した酢酸はイネ体内に取り込まれ、GABA に代謝されて蓄積していることが明らかになった。

F-a11 ラズベリーに含まれるフラバン-3-オール誘導体の分析研究

○小堀亮¹, 北岡望¹, 岩崎大地², 道下僚², 八上修一¹, 福島淳仁², 川崎崇³, 齊藤安貴子^{1,2}
(¹大阪電通大院・工, ²大阪電通大・工, ³立命大・薬)

【目的】本発表では、ラズベリーに含まれるフラバン-3-オール誘導体に注目し、果実の生育段階におけるフラバン-3-オール誘導体量、及び、生合成酵素発現量の変化を分析した。

【方法と結果】

ラズベリー 2 品種について、フラバン-3-オール誘導体含有量の変化、及び、生育ステージによるフラバン-3-オール誘導体含有量の変化を追跡した。ラズベリー果実を開花からの経過日数で 8 段階に分類して収穫し、それぞれのメタノール画分について各種分析を行った。その結果、すべての品種において、果実の成熟とともにフラバン-3-オール誘導体量、及び、は減少した。また、カルコン合成酵素 CHS の発現量も減少していた。

F-p01 イネにおける植物ホルモン処理によるフェニルアミド類の誘導
○森本紀子¹, 上野琴巳², 寺石政義³, 奥本裕³, 森直樹³, 石原亨²
(¹鳥取大院・農, ²鳥取大・農, ³京大院・農)

【目的】植物は、病原菌の感染や昆虫による食害などのストレスを受けると桂皮酸類と生体アミンから構成されるフェニルアミド (PA) を生成・蓄積する。イネでも、ストレスに応答して多数の PA が蓄積することがわかってきた。本研究では、イネにおける PA 蓄積に至るメカニズムの解明を目指して、植物ホルモン処理が PA の蓄積に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】イネ (品種、日本晴) を Kimura's B 溶液中で 19 日間生育させた後、幼苗をジャスモン酸 (JA), サリチル酸 (SA), アブシジン酸 (ABA), もしくは、6-ベンジルアミノプリン (BA) を含む Kimura's B 溶液に移植した。一定時間後、地上部および地下部を抽出し、桂皮酸類 5 種とアミン類 5 種からなる計 25 種の PA を LC-MS/MS を用いて定量した。JA と SA, BA は、それぞれ PA の蓄積を誘導したため、これらの植物ホルモンが重要な役割を果たしていることが推定された。

F-p02 フィトエン合成酵素遺伝子を導入したナスのカロテノイド分析
○西田佳永, 岩田雄二, 三柴啓一郎, 小泉望 (阪府大院・生命環境)

【目的】ナスは他の野菜と比べてビタミン等の栄養価が低い。そこで、本研究では代謝工学を用いてナス果実にビタミン A 前駆体である β -カロテンを蓄積させることを試みた。

【方法・結果】フィトエン合成酵素はカロテノイド生合成の律速段階であることが多い。実際、バクテリア由来のフィトエン合成酵素 (*crtB*) を導入したナスカルスはオレンジ色を呈し、HPLC の結果から、このナスカルスでは β -カロテン含量が顕著に増加していた。フィトエン合成酵素がナスのカロテノイド合成経路の律速段階だと考えられたので、果実で強く働く *EEF48* プロモーターの制御下で *crtB* を発現する組換えナスを作出したところ、果実は薄いオレンジ色を呈した。果実において *crtB* が発現していることもノザンブロット法により確認した。次に、HPLC により解析を行ったところ、オレンジ色の果実には野生型と比べ約 15 倍の β -カロテンが蓄積していた。また、組換え果実から種子を採取し、後代に形質が引き継がれることを確認した。

F-p03 熱帯樹木のイソプレン放出制御におけるイソプレン合成酵素の生理学的意義
○比嘉拓也¹, 稲福征志², 屋宏典^{1,2} (¹琉球大院・農, ²琉球大・熱生研)

【目的】植物はイソプレンを放出して、耐暑性形質を獲得していると考えられている。我々は、温帯樹木と熱帯樹木のイソプレン放出特性が異なることを報告しており、その差異はイソプレン合成酵素 (IspS) の性質の違いによるものと考えている。本研究は熱帯樹木のイソプレン放出制御における IspS の生理学的意義を明らかにすべく、熱帯樹木のイソプレン放出特性と IspS の性質について調べた。

【方法・結果】6 種類の熱帯樹木を用いて、環境制御下で光と温度の変化に対するイソプレン放出速度の変動を調べた。また、各樹木の IspS 遺伝子をクローニングして、組換え IspS を用いて基質親和性を測定した。熱帯樹木の温度変化に対するイソプレン放出の応答性と IspS の基質親和性は、温帯樹木よりも高いことが明らかになった。両者の間に相関性があることから、温度変化に対する熱帯樹木のイソプレン放出の高い応答性は IspS の性質によって説明されていることが示唆された。

F-p04 ヤセウツボの発芽に関わる α -ガラクトシダーゼを標的とする阻害剤の探索
○馬場敦也¹, 小川拓水¹, 杉本幸裕^{2,3}, 太田大策¹, 岡澤敦司^{1,3}
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 神戸大院・農, ³ JST/JICA・SATREPS)

ハマウツボ科に属する根寄生雑草はアフリカを中心として農業に甚大な被害を与えている。根寄生雑草は発芽後、すぐに宿主植物と物理的、化学的に結合する。そこで、根寄生雑草選択的な防除法を開発するために発芽過程に着目した。先行研究において、ヤセウツボ (*Orobanche minor*) の発芽時にプランテオースが代謝されており、その代謝が発芽に重要であることが明らかとなった。このことから、プランテオースの代謝に関わる酵素を標的とした阻害剤の探索を行うことで、根寄生雑草選択的な防除法を確立できる可能性が示唆された。そこで、本研究ではプランテオースの加水分解酵素である α -ガラクトシダーゼ (OmAGAL) 阻害剤の探索を行った。5,101 化合物のスクリーニングを行った結果、30 化合物を OmAGAL 阻害剤として選抜した。現在、OmAGAL 阻害剤のヤセウツボ種子への反応について検討を行っている。

F-p05 超低温保存がゼニゴケ精子運動能に与える影響の定量化
○十川太輔¹, 原田大士朗¹, 田中大介^{2,3}, 大和勝幸¹
(¹ 近畿大院・生物理工, ² 基生研 IBBP センター, ³ 現: 農研機構)

【目的】近年モデル生物として注目されているゼニゴケ (*Marchantia polymorpha* L.) は、運動能を有する精子を形成する。ヒトをはじめとする哺乳類では個々の精子を自動追跡し、各種パラメータを計測する画像解析システムが利用されている。近年、市販の動物用システムを利用したゼニゴケ精子の追跡および解析例が報告された。ここで、我々は市販の安価なデジタルカメラとオープンソースの生物画像解析ソフト ImageJ を用いたシステムをゼニゴケ精子向けに最適化し、超低温保存がゼニゴケ精子運動能に与える影響を定量化した。

【方法・結果】著者らが開発した方法で超低温保存した精子を、約 80 万画素にて 5 秒間 (10 fps) 撮影した。背景ノイズを低減するため、画像減算を行なった。Plugin である TrackMate により個々の精子を追跡し、精子の平均速度を算出した。その結果、超低温保存後の精子の生存率および運動能は保存前の 70.4%および 54.3%を維持していた。

F-p06 シロイヌナズナアスコルビン酸生合成の鍵酵素 GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ活性に及ぼすアスコルビン酸の影響

○崎山佳祐, 小川貴央, 丸田隆典, 石川孝博 (島根大・生資科)

GDP-L-ガラクトースホスホリラーゼ (GGP) は、植物のアスコルビン酸 (AsA) 生合成経路構成酵素の一つであり、転写・翻訳レベルで発現調節を受けることで AsA 生合成調節の中心的役割を担っている。最近我々は、GGP が酵素活性レベルでも制御されることを見出し、今回、組換え体酵素による GGP 活性の評価について報告する。

シロイヌナズナ由来 GGP を大腸菌で発現させ、組換え体 GGP を精製した。組換え体 GGP に対して、種々の酸化剤および還元剤の影響を検討した結果、AsA に対して高い感受性を示した。特に酸化型 AsA (DHA) 処理をした場合、4 時間までに約 70% 失活した。同じ効果は、AsA と AsA 酸化酵素を同時処理した場合でも認められた。また DHA による失活は、過剰量の DTT 添加により抑制された。DHA より生成するジケトグルロン酸は、GGP の失活に影響しなかった。以上の結果より、GGP は DHA 特異的に活性調節を受けることが示された。

F-p07 デヒドロアスコルビン酸還元活性を欠くシロイヌナズナ変異体におけるアスコルビン酸再生

○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) の働きによってグルタチオン依存的に還元されると考えられてきたが、決定的な証拠はない。そこで本研究では、3 つの DHAR 遺伝子を全て欠損させた変異体 ($\Delta dh ar$) を作出し、アスコルビン酸再生への影響について検証した。

【方法・結果】 $\Delta dh ar$ では DHAR 活性が検出されなかったにも関わらず、そのアスコルビン酸レドックス状態は野生株のそれと同程度であった。また、 $\Delta dh ar$ の葉に DHA 溶液を処理したところ、著しい総アスコルビン酸量の増加が認められたが、そのほとんどが還元型として検出された。アスコルビン酸の増加量やレドックス状態変化に野生株との差が見られなかったことから、DHAR 非依存的な DHA 還元系の存在が示唆された。

F-p08 植物の強光ストレスにおける H_2O_2 代謝ネットワークの相互作用

○三富弦, 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】植物において、活性酸素種 (ROS) は細胞毒性分子であるが、シグナルとしても機能し、植物にストレス耐性能を付与し得る。アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) とカタラーゼ (CAT) が主要な H_2O_2 消去酵素であり、各酵素の協調的な作用によってストレスに適応していると考えられる。本研究では、 H_2O_2 代謝のクロストークの光ストレス応答への関与を調べることを目的として、シロイヌナズナ H_2O_2 消去酵素の多重変異株を作出した。

【方法・結果】CAT 欠損株 *cat2* は強光ストレスに対して著しい感受性を示し、これは細胞質型 APX1 の欠損 (*cat2 apx1*) により回復した。一方、葉緑体型 APX の欠損 (*cat2 sapx tapx*) では、葉の退色が *cat2* よりも早い段階で観察された。また、通常条件下の *cat2* で見られる湿重量、葉面積および根の伸長の阻害も三重変異株で促進されていた。これらより、 H_2O_2 の生成部位の違いは植物のストレス耐性に異なる影響を与えることが明確になった。

植物のフラビン化合物輸送に関与する新規因子の探索

F-p09

○菊池円架¹, 難波純也¹, 丸田隆典¹, 石川孝博¹, 吉村和也², 重岡成³,
小川貴央¹ (¹島根大・生資科, ²中部大・応生, ³近畿大・農)

【目的】リボフラビン (RF)を前駆体とする FAD や FMN は、生体にとって必須な化合物であり、その細胞内レベルは厳密に制御する必要がある。しかし、これらフラビン化合物の代謝調節や輸送機構については不明な点が多く残っている。本研究では、シロイヌナズナの FAD 処理により発現変動するトランスポーター関連遺伝子 (FAD-responsive transporters: FRTPI-17)について解析を行った。

【方法・結果】RF 合成系遺伝子を破壊し、低濃度 RF 添加培地では生育できない出芽酵母のフラビン要求株 (*rib4Δ*, *rib5Δ*)へ、シロイヌナズナの 17 種類の FRTPI 遺伝子を導入し、相補試験を行った。その結果、FRTPI4 遺伝子導入株が低濃度 RF 添加培地でも生育可能であったことから、FRTPI4 がシロイヌナズナのフラビン化合物輸送に関与する事が示唆された。

葉緑体型 APX 遺伝子の選択的スプライシング制御因子の同定

F-p10

○大原農丞¹, 田部記章², 吉村和也³, 田茂井政宏^{1,2}, 重岡成^{1,2}
(¹近畿大院・農, ²近畿大・農, ³中部大・応生)

【目的】植物の主要な活性酸素消去酵素である葉緑体型 APX の遺伝子は、組織特異的な選択的スプライシング (AS) により sAPX と tAPX を生成している。また、この AS 機構はイントロン 12 に存在するスプライシング制御配列 (SRE) によって制御されていた。そこでシロイヌナズナよりこの SRE を特異的に認識し AS 効率を制御するトランス因子の同定を試みた。

【方法・結果】ルシフェラーゼ (Fluc) 遺伝子と APX 遺伝子の選択的スプライシングに必須な領域を連結してシロイヌナズナに導入し、tAPX 型に選択的スプライシングされた場合のみ Fluc 発光が検出される形質転換体を作出した。次に、この植物を EMS により変異源処理し、AS 効率が変わることによって Fluc 発光が消失する変異株 (*asi1*) を単離した。この表現系が維持された戻し交配 2 世代目 40 株を用いてゲノムシークエンスにより変異箇所を同定し、制御因子の候補となるいくつかの核局在遺伝子を同定した。

シロイヌナズナ bHLH11 が関与する鉄取り込み抑制機構の解析

F-p11

○田部記章^{1,2}, 野志昌弘³, 田茂井政宏^{1,2}, 重岡成^{1,2}
(¹近畿大・農, ²JST・CREST, ³和歌山信愛・生活)

【目的】土壌中に多く存在する鉄 (Fe) は難溶解性であり、植物は直接細胞内に取り込むことができない。そのため、シロイヌナズナなどの双子葉植物は鉄還元酵素および鉄トランスポーターを用いた鉄取り込み機構を発達させてきた。この取り込み機構には bHLH と呼ばれる一連の転写因子が重要な役割を果たすことが明らかにされてきた。本研究ではその中で機能未知である bHLH11 の機能解析を試みた。

【方法・結果】bHLH11 優性抑制株および bHLH11 過剰発現株は、鉄欠乏培地で生育阻害を示し、この生育阻害は外部鉄添加により回復した。酵母 one-hybrid 法により bHLH11 は転写抑制因子であることが明らかとなり、bHLH11 優性抑制株および過剰発現株において、鉄代謝のマスター制御因子である *FIT* の発現は顕著に抑制されていた。これらの結果から、bHLH11 は過剰な鉄取り込みを抑制する転写因子として機能していることが示唆された。

F-p12 リン酸イオンセンサーの開発と水耕栽培への適用

○徐克彬, 白井理, 北隅優希, 加納健司 (京大院・農)

【目的】水耕栽培における培養液中のリン酸イオン濃度は、植物生育における重要な情報であり、そのモニタリングと制御の実現は生産力、品質の向上をもたらすと期待できる。これまで報告されてきたリン酸イオン選択性電極は安定性と応答特性に課題が残り、現時点では実用化されていない。しかし、これらの課題が克服されれば、前処理を要せずにリン酸イオン濃度のモニタリングが可能となり、環境、食品、医療関係など広い分野に応用可能である。

【方法・結果】リン酸イオン選択性電極として、コバルト電極を 0.1 M のリン酸溶液中(pH 7)に入れ、-280 mV (vs. Ag|AgCl|sat.KCl) を印加して電析物を付着させ、リン酸イオン感応型電極を作製した。作製したリン酸イオン選択性電極は pH 4~7 の領域では pH の影響を受けず、リン酸イオン濃度が $10^{-5} \sim 10^{-1}$ M の領域において濃度の対数に対して直線的な電位応答を示した。傾きは -39 mV dec^{-1} 、検出限界は 10^{-5} M であった。作製した電極を用いて、水耕栽培におけるリン酸イオン濃度のモニタリングを実施した。

側枝形成に関わるホルモン代謝を制御する糖シグナリング因子の探索

G-a01

○大鳥久美^{1,2}, 田部記章^{1,2}, 田茂井政宏^{1,2}, 重岡成^{1,2}

(¹近畿大・農, ²JST・CREST)

【目的】これまでに、ソース・シンク器官における糖バランスを変化させた形質転換植物 (AcF 株) では側枝が増加し、その原因がストリゴラクトン (SLs) およびオーキシシン (Aux) 関連遺伝子発現量の変化によることを明らかにした。そこで本研究では、AcF 株における SLs および Aux 制御に関わる糖シグナリング因子を明らかにするために既報の糖シグナリング関連因子破壊株から候補株の単離・解析を行った。【方法・結果】SALK から入手した 9 種類のシロイヌナズナ糖シグナリング関連因子破壊株に糖処理を行い、BRC1 発現の糖応答性が野生株と異なる株を選抜した。その結果、糖トランスポーターSTP1 の遺伝子破壊株 *stp1-1* では糖処理による *BRC1* 遺伝子発現抑制が認められなくなった。また *stp1-1* は野生株と比較して生育が速く、二次側枝数、乾燥重量が増加していた。現在、酵母 two-hybrid 法により STP1 の相互作用因子の同定を試みている。

遺伝子組換え技術を用いたソース/シンク同時強化サツマイモの作出と解析

G-a02

○富本優美¹, 田部記章^{2,3}, 大鳥久美^{2,3}, 田茂井政宏^{1,2,3}, 重岡成^{1,2,3}

(¹近畿大院・農, ²近畿大・農, ³JST・CREST)

【目的】近年バイオエタノール等の再生可能エネルギーに注目が集まっており、実用化のためには植物の生産性を飛躍的に高めることが不可欠である。イモ類は単位耕作面積当たりの収穫量およびハーベストインデックスが栽培作物中でほぼ最大であり、光合成を行うソース器官と、光合成産物を貯蔵するシンク器官が明確に区別されることから、両器官を同時強化した形質転換サツマイモの作出を試みた。

【方法・結果】ソース器官強化遺伝子であるラン藻 *FBP/SBPase* とシンク器官強化遺伝子である野生種スイカ *RAN1* をサツマイモに同時に導入するためのベクターを作製した。アグロバクテリウムを介してサツマイモ胚性カルスへ導入し、抗生物質耐性を示す形質転換サツマイモを得た。現在、FBP/SBPase タンパク質の蓄積が確認された株を用いて、グロースチャンバー内において土耕栽培条件下での生産性評価を行っている。

微細藻類ユーグレナにおけるパラミロン会合タンパク質の包括的解析

G-a03

○後藤京^{1,2}, 田中優史^{1,2}, 西野耕平^{1,2}, 小川貴央^{1,2}, 丸田隆典^{1,2},

石川孝博^{1,2} (¹島根大・生資科, ²JST・CREST)

微細藻類ユーグレナは、好気条件で合成・蓄積したパラミロン (β -1,3-グルカン) を、嫌気条件に移行することで分解しワックスエステル発酵を行う。本研究では、パラミロン代謝調節機構の解明を目的に、パラミロン会合タンパク質の包括的解析を行った。

好気条件下で定常期まで培養したユーグレナおよびその後嫌気 6 時間処理した細胞から、パラミロンを抽出し、パラミロン会合タンパク質を調製した。プロテアーゼ処理後、モノリシスカラムによる nanoLC/MS および Progenesis QI により比較解析した。その結果、総計 395 タンパク質が同定され、このうち好気条件と嫌気条件で有意に検出レベルが増加したタンパク質は、それぞれ 104 および 135 個であった。有意に変動したタンパク質の中には、パラミロン代謝への関与が示唆される複数の糖代謝関連酵素が含まれていた。現在、これらの酵素遺伝子について遺伝子発現抑制を行い、パラミロン代謝に及ぼす影響を検証している。

G-a04 リン酸化による微細藻類ユーグレナのワックスエステル代謝調節機構の解明
○石井侑樹^{1,2}, 木村光宏^{1,2}, 丸田隆典^{1,2}, 小川貴央^{1,2}, 森大^{3,4},
石川孝博^{1,2}
(¹島根大・生資科, ²JST・CREST, ³慶應大・先端生命研,
⁴慶應大・政策)

我々は微細藻類ユーグレナの嫌気条件に応答したワックスエステル (WE) 代謝調節機構の解明を目指しており、これまでに転写や翻訳レベルではなく、翻訳後修飾が制御の鍵である知見を得ている。本研究ではリン酸化修飾に着目し、リン酸化による WE 代謝調節の可能性を検証するとともに、関連するタンパク質因子の同定を試みた。

定常期の SM-ZK 株に対しプロテインキナーゼ阻害剤 K252a 処理した結果、嫌気後の WE 蓄積量が著しく抑制され、リン酸化修飾の関与が強く示唆された。リン酸化プロテオーム解析の結果、好気/嫌気条件の変化に対して有意にリン酸化レベルが変動した約 2,000 ペプチドの中から、26 個のプロテインキナーゼを同定した。現在、これらプロテインキナーゼ遺伝子発現抑制による WE 代謝への影響を検討している。

G-a05 ボツワナ固有ジャトロファの系統間差異に関する解析
○只野翔大¹, 高橋知希¹, 上野山遼¹, 石本雄大², Charles Mazereku³,
明石欣也¹ (¹鳥取大・農, ²青森公立大, ³ボツワナ農務省)

【目的】油糧植物ジャトロファは乾燥耐性を有し、乾燥地でのバイオ燃料生産が期待される。アフリカ・ボツワナ共和国からは多くのジャトロファ固有系統が見いだされている。本研究ではこれら系統の生理特性や遺伝情報、種子の化学組成等を理解することを目指した。

【方法・結果】ボツワナの実験農場で栽培した 86 系統のジャトロファ固有系統は、その生育および種子収量において著しい差異を示した。収穫された種子に含まれる油脂含量は、約 12-46% (w/w) の系統間差異が見いだされ、バイオ燃料の組成として好適なオレイン酸含量についても、33-62%の系統間差異があった。また、ジャトロファの種子に含まれる毒性物質ホルボールエステルの含量には、約 86-1,300 $\mu\text{g gDW}^{-1}$ の系統間差異が存在することが示唆された。これらの結果は、ボツワナのジャトロファ系統群において、栽培生理および生化学的な特性に関して高い多様性が存在することを示唆している。

シロイヌナズナ膜結合型転写因子 bZIP28 の切断様式

G-a06

○長谷川千紗, 芦田誠, 三柴啓一郎, 岩田雄二, 小泉望
(阪府大院・生命環境)

【目的】シロイヌナズナ bZIP28 は小胞体ストレスや熱ストレスによりタンパク質レベルで切断をうけ活性化される膜結合型転写因子である。本研究では、二種類のプロテアーゼ S1P と S2P の bZIP28 切断への関与を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】シロイヌナズナ *s1p* 変異株、*s2p* 変異株、*s1ps2p* 二重変異体を単離し、野生型株と共に小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを処理し、抽出したタンパク質を抗 bZIP28 抗体を用いた免疫ブロットに供して bZIP28 切断パターンを比較した。その結果、*s1p* 変異株は野生型株と同様に bZIP28 活性型が検出された。一方、*s2p* 変異株と *s1ps2p* 二重変異体においては bZIP28 活性型は検出されず、野生型株においては検出されない 2 つの bZIP28 断片が検出された。このことから、bZIP28 の切断に S1P は関与せず、未知のプロテアーゼが bZIP28 を切断した後に S2P が切断を行い活性型 bZIP28 が生成することが示唆された。

形質転換シロイヌナズナによる細胞レベルでの細胞質スプライシングの検出

G-a07

○田原一喜, 三柴啓一郎, 小泉望, 岩田雄二 (阪府大院・生命環境)

【目的】細胞質スプライシングは真核生物に広く保存された遺伝子発現制御機構であり、小胞体ストレス応答に関わる転写因子の活性化を行っており、シロイヌナズナでは *bZIP60* mRNA が標的となっている。私たちは細胞質スプライシングの生理機能を詳細に明らかにすることを目的とし、細胞質スプライシングを細胞レベルで検出することができる形質転換シロイヌナズナの作出を試みた。

【方法・結果】*bZIP60* mRNA のスプライシングサイトをコードする cDNA 領域と YFP 遺伝子の部分断片を融合させることで、細胞質スプライシング依存的に蛍光を発するコンストラクトが *bZIP60* プロモーターの制御下で発現する形質転換シロイヌナズナを作出した。小胞体ストレス誘導剤を処理した結果、蛍光が観察された。また、熱ストレス処理によっても蛍光が観察された。以上のことから、蛍光を指標とした細胞レベルでの細胞質スプライシングの検出が可能になったと考えられた。

ゼニゴケ小胞体ストレスセンサーIRE1 の機能解析

G-a08

○竹田翔¹, 十川太輔², 西浜竜一³, 三柴啓一郎¹, 大和勝幸², 河内孝之³,
岩田雄二¹, 小泉望¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 近畿大院・生物理工, ³ 京大院・生命科学)

【目的】小胞体ストレス応答は植物を含む真核生物で広く保存されているが、基部陸上植物に関する知見は皆無に近い。そこで本研究ではゼニゴケを用いて、特に小胞体ストレスセンサーIRE1 に着目し、分子装置の保存性、多様性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】小胞体ストレス応答関連遺伝子をデータベース検索により見出し、RT-PCR を行った。その結果、小胞体ストレスによる *BiP* の発現やシロイヌナズナの *bZIP60* ホモログの細胞質スプライシングを検出した。小胞体ストレスセンサーとして知られる IRE1 を CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子破壊したところ *bZIP60* ホモログの細胞質スプライシングが見られず、*BiP* の発現抑制が起こっていた。また IRE1 遺伝子破壊株は WT と比べ生育遅延を示した。このことからシロイヌナズナで見られる小胞体ストレス応答の経路が保存されていること、IRE1 がゼニゴケの生育と関連していることが考えられた。

G-a09 イネプロラミンとコレラ毒素Bサブユニットの融合タンパク質を産生するイネ種子の解析

○吉川陽香¹, 佐生愛¹, 沼本穂¹, 森田重人^{1,2}, 増村威宏^{1,2}
(¹京府大院・生命環境, ²京都府農技セ)

【目的】イネ種子胚乳中のプロテインボディタイプ I (PB-I) を経口ワクチン用のキャリアーとして利用するため、ネイティブプロモーター存在下でプロラミン (13kDa-a, 13kDa-b, 10kDa) とコレラ毒素 B サブユニット (CTB) の融合タンパク質を発現するイネを作出し、融合タンパク質の蓄積量、糖鎖付加の有無、局在性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】3種類の形質転換イネ種子の CTB 含有率は総タンパク質あたり 0.14~1.54 % であった。糖鎖分析の結果、13kDa-a と 13kDa-b では糖鎖が付加されており、10kDa では糖鎖が付加されているものといないものがあつた。蛍光顕微鏡観察の結果、13kDa-a, 13kDa-b では内在性プロラミンが層状構造をとっていた。一方 10kDa では内在性プロラミンと CTB 融合タンパク質が不定形の顆粒中に共局在しており、PB-I の形態変化が生じていた。

G-a10 イネグルタレドキシン OsGRXC2;2 による種子休眠の調節

○森田重人^{1,2}, 中村淳一¹, 増村威宏^{1,2}, 佐藤茂³
(¹京府大院・生命環境, ²京都農技セ生資セ, ³龍谷大・農)

【目的】グルタレドキシン (GRX) は、タンパク質のジスルフィド結合を還元する酸化還元酵素であり、標的タンパク質のレドックス調節を通して、様々な細胞内プロセスの調節に関わっている。本研究では、イネ種子特異的に発現しているグルタレドキシン OsGRXC2;2 に着目し、種子におけるその生理的機能の解明を目的とした。

【方法・結果】過剰発現システムを用いた我々のこれまでの研究で、OsGRXC2;2 が発芽調節に関与することが示唆されている。本研究では OsGRXC2;2 の発現抑制システムを作出し、発芽や種子休眠の調節因子の発現をリアルタイム RT-PCR により調査した。その結果、発現抑制システムの登熟種子において、種子休眠を誘導し発芽を抑制する *OsABI3* と *Sdr4* の発現が低下していた。また発現抑制システムの種子はコントロールに比べ、休眠が弱くなっていた。以上の結果から、OsGRXC2;2 は登熟種子における休眠誘導の調節に関与していることが示唆された。

G-a11 海産性緑藻由来 CHRD ドメインタンパク質をコードするストレス応答性遺伝子の同定と特徴付け

○石西諒¹, 松浦秀幸¹, 田中聡², 野澤紗彩¹, 棚田恵介¹, 川下理人³, 宮坂均⁴, 平田収正¹
(¹阪大院・薬, ²関西電力, ³近畿大・理工, ⁴崇城大・応用生命)

海産性緑藻 *Chlamydomonas* sp. W80 は、高塩、酸化、各種重金属毒性等のストレスに非常に高い耐性を持つ。本研究では、ストレス耐性植物の作出に資する、W80 株ストレス耐性機構解明や W80 株由来ストレス耐性遺伝子の単離を目的に、W80 株 EST 解析により見出された機能未知遺伝子 (*Cluster58*; *CL58*) の特徴付けを行った。定量的 RT-PCR 解析により過剰の銅及び低温処理により *CL58* mRNA レベルが 5-10 倍程度増加することが明らかになった。W80 株の近縁種 *Chlamydomonas reinhardtii* を用いて *CL58* の 3'末端にルシフェラーゼ NanoLuc を融合した遺伝子の形質転換株を作成、細胞内及び培地中の NanoLuc 活性を測定することで *CL58*-NanoLuc 融合タンパク質の大部分が細胞外に分泌されることを見出した。上記結果から、*CL58* はストレス応答性の分泌タンパク質をコードすることが示唆された。

乳酸発酵を利用したヘチマの加工技術開発

G-p01 ○広瀬直人¹, 前田剛希¹, 恩田聡¹, 和田浩二² (¹沖縄農研, ²琉球大・農)

【目的】ヘチマは沖縄県の伝統野菜の一つで、葉酸や GABA、シトルリンを多く含み、機能が期待される野菜である。ヘチマは味噌煮などで食されるが、加熱調理や冷凍による褐変が欠点である。そこで、漬物の低 pH を利用した褐変防止を目的に、乳酸菌の選抜を行った。

【方法・結果】1cm 角にカットしたヘチマの可食部 50g を 100mL の漬け液（1%グルコースおよび食塩）に入れ、乳酸菌スターターを添加して 10℃で 7 日間発酵させた。得られた漬物は食味試験、アミノ酸と有機酸、エタノール抽出物の吸光スペクトル測定により評価した。その結果、*Lactococcus lactis* の 2 菌株で褐変が良く抑えられ、食味も良好であった。*Lactobacillus sakei* は生酸性に優れていたが、褐変が生じた。褐変が少ない菌株では、300～350nm の吸収低下が抑制されているようであった。いずれの菌株でも、乳酸発酵によって GABA 含有量は増加したが、シトルリンは菌株によって減少するものがあった。

※本研究は、農林水産省委託プロジェクトの補助を受けて行った。

エディブルフラワーの微生物学的品質と制御法の検討

G-p02 島津恭子¹, ○栗田せりか², 島津光江¹, 秦隆志³, 吉金優² (¹土佐島津農園, ²高知大・土佐 FBC, ³高知高専・ソ工)

【目的】エディブルフラワー（食用花）は、食材を彩る素材として注目され、近年消費量も拡大している。食用花は一般に劣化が速く、見た目を楽しむ素材のため、未洗浄のまま流通されることも多い。また、食用花は生の状態で食されることが多く、微生物汚染が懸念される。これまで食用花の微生物数を調べた報告はごくわずかである。そこで、本研究では食用花の微生物数を調べ、さらに各種洗浄方法による除菌・殺菌効果を調べることを目的とした。

【方法・結果】土佐島津農園（高知県安芸市）の収穫時期別、種類（品種）別、および市販品の食用花を試料として、微生物数を調べた。試験した食用花には 1g あたり $10^5 \sim 10^8$ オーダーの一般生菌が検出され、さらに真菌類も多く検出された。食用花の一般生菌数は種類（品種）で大きく異なった。食用花を水洗浄することにより一般生菌数は 1/10 に減少した。各種除菌・殺菌剤の効果およびファインバブルとの併用効果についても報告する予定である。

鶏卵の卵黄膜強度からみた鮮度評価

G-p03 ○山下真由子¹, 早川岳彦², 八田一¹ (¹京都女子大・家政, ²DSM ジャパン)

【目的】日本は生卵を食べる国であるため、テーブルエッグの安全性を確保する必要がある。その賞味期限は現在 10 万卵に 2-3 個の割合で流通している SE 菌の In Egg 汚染対策として卵黄の膜脆弱化を指標に導入された。SE 菌は鉄要求性であることから、鉄を含有する卵黄の膜強度は卵の安全性に関して非常に重要である。本研究では卵黄膜強度の変化を従来の卵鮮度測定法である卵黄係数 (YI) およびハウユニット (HU) と比較した。

【方法・結果】鮮度の異なる 402 個の卵を調べた。YI と HU は DET6000（株式会社ナベル）を用いて測定した。卵黄膜強度はテキソグラフ（株式会社日本食品開発研究所）により卵黄膜の破断変形点として測定した。その際、卵黄を 20ml ビーカーに入れ、2.0cm² プランジャーを用いた。HU と YI の相関係数は 0.67 で正の相関が得られた。CV 値（標準偏差／平均値×100）は YI が HU よりも優位に小さかった。よって YI は HU よりも良い鮮度指標であると言える。さらに YI は卵黄膜強度とも 0.86 という高い正の相関が得られた。

G-p04 Micro SOAC 法による全国ブランド卵の一重項酸素消去活性の評価 ○王玉, 野原智子, 木村朋美, 八田一 (京都女子大・家政)

【目的】食品の抗酸化力の評価は水溶性のみならず脂溶性抗酸化物質の測定も重要である。本研究では一重項酸素消去活性 (SOAC) 測定法を改良した Micro SOAC 法で全国ブランド卵の抗酸化力を評価した。また、飼料の配合内容や鶏卵鮮度との関係も調べた。

【方法・結果】抗酸化力が期待できる全国のブランド卵 13 種類を用いた。ガラス底の 96 穴プレートと有機溶媒耐性フィルムシールを用いて行う Micro SOAC 法による鶏卵の一重項酸素消去活性を測定した。鶏卵鮮度の指標としてはハウユニット (HU) と卵黄係数 (YI) を測定した。最も抗酸化力が高い卵は、宇治茶粉末を配合したお茶卵であり、最も低い卵は飼料米を 60% 配合したお米たまごであった。全国のブランド卵の SOAC 値と通常卵の SOAC 値と比較すると 1.0—3.5 倍の抗酸化力が認められ、SOAC 値と卵黄色の濃さは正相関した。SOAC 値が高い卵は鮮度も高いと考えていたが、それぞれの相関はみられなかった。

G-p05 小麦粉・米粉混成パンにおける米粉由来グルテリンのグルテン形成に及ぼす影響 ○宮原知華¹, 北村奈生子¹, 喜村美穂¹, 沼本穂¹, 森田重人^{1,2}, 増村威宏^{1,2} (¹京府大・生命環境, ²京都府農技セ・生資セ)

【目的】小麦粉・米粉混成パンは膨張するが、パン生地中のグルテンネットワーク形成が不十分である。その原因は、グルテリンの関与であることがこれまでの研究で示唆されている。本研究では、タンパク質変異系統 (低グルテリン, 26 kDa グロブリン欠損, 二重変異) の米を用いて、グルテリンのグルテン形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】小麦粉と米粉を 7:3 の割合で焼成を行った結果、膨張性は品種間で大きな相違は見られなかった。ウェスタンブロット解析では、グルテンとグルテリンとが分子間ジスルフィド結合によって相互作用をしている可能性が示唆された。電子顕微鏡観察では、醗酵生地内で断片化したグルテリン集合体がグルテン様構造体中に入り込み、ネットワーク伸張を阻害している可能性があることから、グルテリンは負の影響を及ぼすことが示唆された。

G-p06 ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) の生殖機能に及ぼす影響
○森脇涼, 美藤友博, 藪田行哲, 河野強, 渡邊文雄 (鳥取大・農)

【目的】これまでに、ビタミン B₁₂(B₁₂) 欠乏条件下で生育した B₁₂ 欠乏線虫は生殖機能低下や成長障害を引き起こすことを明らかにした。しかし、生殖機能に及ぼす影響についての詳細は未解明である。そこで本研究では、B₁₂ 欠乏と生殖機能低下との関連を詳細に検討し、その作用メカニズムの解明を目的とした。

【方法】コントロール線虫と B₁₂ 欠乏線虫は、B₁₂ 添加および B₁₂ 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。線虫の生殖機能を評価するために、産まれてから産卵するまでの期間、一日毎の産卵数及び孵化数を計測した。

G-p07 低温保持過程における種々の植物油の結晶化挙動の速度論的解析
○吉田茉央¹, 宮川弥生¹, 遅沢優大¹, 安達修二², 谷史人¹
(¹京大院・農, ²京都学園大・バイオ)

【目的】油脂を含む食品は、貯蔵中に油脂が結晶化し、食品の品質を劣化させる場合がある。そのため、高品質な食品を製造するには、油脂の結晶化の挙動を理解することが重要である。本研究では、種々の植物油の結晶化の挙動を巨視的および微視的な観点から測定し、速度過程を解析した。

【方法・結果】低温で等温保持したときの、植物油の体積（比容積）および透過光強度（600 nm）の経時変化をそれぞれ U 字型ディラトメーターおよびタングステン光を用いて測定した。その結果、両パラメーターの変化は保持温度および油の種類に依存した。演者らが提出した動力学モデル[1]に基づいて解析したところ、すべての油において、体積変化に対する合理的な速度定数が得られた。[1] 吉田茉央ら、日本食品科学工学会第 63 回大会、3Da9、低温に保持した植物油の体積および透過光強度の変化

G-p08 機能性大麦 (*Tantangara*) 経口摂取による睡眠改善効果について
○北園英一¹, 三好孝則¹, 西村文¹, 妹脊和男¹, 森田英利²
(¹ 帝人株式会社ヘルスケア新事業部門, ² 岡山大院・環境生命)

【目的】機能性大麦 BARLEYmax (*Tantangara*) は、オーストラリア連邦科学産業研究機構で開発された食物繊維を多く含有する大麦である。本研究では、アテネ不眠尺度に基づく不眠に悩みのある日本人女性を被験者とし、BARLEYmax の経口摂取による睡眠に及ぼす影響について検討し、MiSeq (Illumina 社) によって網羅的に腸内細菌叢を解析した。

【方法・結果】被験者は不眠に悩みのある成人女性 21 名 (36.59±4.45 歳) とした。被験者は BARLEYmax の摂取量が 12 g/day になるように設計したショートバーを 1 日 1 本、4 週間摂取した。脱落者を除く 18 名分のデータを解析した結果、ピッツバーグスコアの平均値の減少、睡眠の質、中途覚醒および日中の眠気スコア値の有意な増加、睡眠困難のスコア値の有意な減少から、BARLEYmax の経口摂取による睡眠改善効果が示唆された。また、安眠に関連するセロトニン合成・制御に関与する *Clostridium* 属の増加を認めた。

G-p09 希少糖 D-Allose が乳酸菌の生産する菌体外多糖の構成糖に及ぼす影響
○吉田大地, 三好望美, Thongkaew Sawarin, 小川雅廣, 早川茂
(香川大・農)

【目的】希少糖 D-Allose (All) は D-Glucose (Glc) の C-3 エピマーであり、抗酸化作用や抗癌作用などの生理活性を有している。All が発酵微生物に及ぼす影響についてはほとんど知見が見られない。乳酸菌が生産する菌体外多糖 (EPS) はその構成糖が培地に含まれる糖の種類によって変化することが知られている。そこで本研究では All が乳酸菌の生育及び生産する EPS の構成糖に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】12% スキムミルク培地に終濃度 5% で All、Glc、D-Mannose (Man)、D-Galactose (Gal) をそれぞれ加えた。この培地に乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NBRC13953 (Lb) を 2% 添加し 37℃ で 24 時間培養した。糖無添加を対照区とした。Glc 以外の糖添加区では Lb の生育が抑制された。All 添加区の EPS の糖組成については対照区や他の糖と比べて EPS 中の Gal の存在比が 2 倍以上に増えていた。このことから、All を添加すると Lb の生産する EPS の糖組成が変わることが示唆された。

G-p10 ミル (*Codium fragile*) 由来多糖の機能性について
○河野勇太, 中澤昌美, 上田光宏, 阪本龍司 (阪府大院・生命環境)

【目的】海藻は陸上植物とは異なる新奇な構造を有する多糖を豊富に含んでいるため、機能性素材として注目されている。しかし、知見が少なく有効利用されているのは一部の海藻に留まっている。そこで、本研究では世界中に分布し、生理活性に関する報告の少ない緑藻ミルに着目し、本海藻の有効利用を目的として、多糖の単離とその機能性評価を行った。

【方法・結果】ミル藻体を乾燥し、エタノール処理を施した後、粉碎ミルより蒸留水で多糖を抽出した。得られた多糖はガラクトースを主成分とする硫酸化多糖であった。ゲル濾過クロマトグラフィーにより分画したところ、3 種の多糖の存在が確認された。構成糖分析の結果、それらは分子量の大きな順にアラビナン、ガラクトン、マンナンであった。多糖の機能性評価として免疫賦活作用に着目し、マクロファージからの一酸化窒素 (NO) 産生量を指標として評価した。その結果、アラビナンが他の 2 種の多糖に比べて高い NO 産生能を有していた。現在、アラビナンの構造に関する解析を行っている。

H-a01 マクロファージにおけるケルセチングルクロン酸抱合体の脱抱合と抗炎症活性 ○福田泰士¹, 河合慶親² (¹徳島大院・栄養生命, ²徳島大院・医歯薬学)

【目的】ケルセチン (Q) は、野菜・果物類に幅広く含まれるフラボノイド類の一種である。Q は摂取された後、ケルセチン-3-グルクロニド (Q3GA) などの抱合体へ代謝される。我々は、Q3GA がマクロファージ細胞表面で、 β -グルクロニダーゼによって脱抱合され抗炎症活性を示すことを報告しているが、Q3GA 自身の抗炎症活性の有無は明らかになっていない。そこで、 β -グルクロニダーゼ阻害剤を用いて Q3GA の抗炎症活性の有無について検討した。

【方法・結果】J774.1 細胞にリポ多糖 (LPS) による炎症誘導および Q3GA 処理を行い、ウェスタンブロット法にて iNOS の発現を測定したところ、LPS 刺激により誘導される iNOS 発現が Q3GA 処理によって顕著に抑制された。この系に β -グルクロニダーゼ阻害剤を添加したところ培養中の脱抱合がほぼ完全に阻害され、Q3GA 処理による iNOS 発現抑制効果も消失した。よって、Q3GA 処理による iNOS 発現抑制作用には β -グルクロニダーゼによる脱抱合が必須であり、Q3GA 自身は活性を持たないことが明らかとなった。

H-a02 金柑果皮成分による NK 細胞の IFN- γ 産生増強 ○寺尾莉奈¹, 村田彬¹, 下條智史¹, 永瀆清子², 渡辺朋子³, 近藤知巳³, 福井敬一³, 服部秀美^{1,2}, 江藤望^{1,2} (¹宮崎大院・応用生物, ²宮崎大院・農工総合, ³宮崎 JA 食品開発研)

【目的】金柑は抗酸化活性や抗菌活性を持つことが報告されているが、NK 細胞への効果は明らかになっていない。我々は金柑果皮成分の NK 細胞賦活効果と作用機序を調査した。

【方法・結果】C57BL/6N マウスに金柑果皮アセトン抽出画分 (KP-AF) を 7 日間経口投与し、水濡れ拘束ストレス負荷後に脾細胞の細胞傷害活性と IFN- γ 産生量を測定した。その結果、どちらもストレスによる低下が抑制された。また、ヒト NK 細胞株 KHYG-1 に、レチノイン酸、又は KP-AF に含まれる成分である β -カロテン、 β -クリプトキサンチンを添加したところ、IFN- γ 産生増強が確認された。しかし、レチノイン酸レセプター (RAR) のアンタゴニストである LE540 処理により、上記 3 化合物の IFN- γ 産生増強活性は失われた。このことから、KP-AF 成分による IFN- γ 産生増強には RAR が関与していることが示唆された。

H-a03 日本固有種・スイゼンジノリの機能性 ○柗田聖孝, 増岡智加子, 松田志織, 須川日加里, 永井竜児, 小野政輝 (東海大学・農学部)

【目的】スイゼンジノリは、日本固有の淡水性ラン藻で、江戸時代から幕府への献上品等として珍重されているが、食品としての機能性等解明されていない部分が多い。演者らは、その保全と活用を目指し、養殖および機能性の検討を継続している。

【方法・結果】スイゼンジノリは、福岡県・黄金川、熊本県・南阿蘇村で養殖した藻体を用いた。抗酸化活性試験 (ロダン鉄法) の結果、各試料の最終濃度 0.02% において、 α -トコフェロール、緑茶、BHA よりも高い活性を示した。同様に、抗アレルギー活性においても、緑茶のメタノールエキスよりも約 3 倍強い活性を示した。さらに、マウスを用いた動物試験の結果、AGE (メイラード反応後期生成物) の一つである CML 含量の減少およびマウス水晶体白濁度の有意な抑制を認めた。

フェルラ酸の水への溶解度の改善と腸管からの吸収改善への取り組み

H-a04

○大松達也¹, 尼子みどり², 菊川昌希¹, 阪本龍司¹, 北村進一¹

(¹ 阪府大院・生命環境, ² (有) IPE)

【目的】植物に含まれるフェルラ酸には、抗酸化作用を初めとした様々な生理活性が報告されている。しかし、これらの化合物は、水への溶解度が高くないため、体内への吸収性が低いことが問題としてある。フェルラ酸の溶解度と腸管吸収性の関係に関する知見を得ることは、非常に重要である。本研究では、様々な手法を用いてフェルラ酸の溶解度を改善させ、その腸管吸収性について評価した。

【方法・結果】まず、フェルラ酸の水溶性を向上させるためにグリセロールを付加した。その結果、溶解度は向上したが、*in vitro* における吸収性の改善は見られなかった。そこで、フェルラ酸の脂溶性を変化させずに溶解度を向上させるために、米糠由来のオリゴ糖を可溶化剤として用いた所、溶解度を 7.2 倍ほど向上させることが出来、さらに *in vitro* における腸管吸収性も 1.3 倍向上させることが出来た。また、ラットにおける体内動態の解析も行った。

マウスにおけるプロシアニジンの体内動態

H-a05

○王柳青, 山下陽子, 芦田均 (神戸大院・農)

【目的】Procyanidin は(-)-epicatechin が重合した flavan-3-ols であり、高い生理活性を有することが報告されている。一方で、その体内動態の詳細は十分に明らかとなっていない。そこで本研究では、procyanidin 高含有食品素材である黒豆種皮抽出物 (Black soybean seed coat Extract: BE) を用いて、procyanidin の体内動態を解明することを目的とした。

【方法・結果】ICR マウスに BE を 250mg/kg 体重で経口投与した 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間後の血漿ならびに肝臓、腎臓、筋肉、小腸、腸間膜脂肪、精巣上体脂肪および腎周囲脂肪を摘出した。HPLC を用いて血漿および臓器中 procyanidin 濃度を定量分析したところ、BE を投与した 0.25 から 0.5 時間後に、マウスの小腸、血漿、肝臓、腎臓、筋肉から、(-)-epicatechin, procyanidin B2, procyanidin C1 および cinnamtannin A2 が最大値を示し、24 時間後に消えることが判った。また、血漿中の(-)-epicatechin 以外、procyanidin はアグリコンで体内に存在していることが示唆された。脂肪組織については現在分析中。

ルテオリンの HepG2 細胞における薬物代謝酵素発現調節機構

H-a06

○北風智也¹, 牧山敦志², 芦田均²

(¹神戸大院・科技イノベ, ²神戸大院・農)

【目的】Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)は、薬物代謝系第Ⅱ相酵素の発現を介して、酸化ストレスなどに対する防御機構を担う転写因子である。これまでに、フラボンの一つであるルテオリンが Nrf2 の活性化を誘導することが報告されている。しかし、その詳細な活性化機構については解明されていない。そこで本研究では、ルテオリンによる Nrf2 の活性化機構に着目し、その薬物代謝酵素発現調節機構を検討した。【方法・結果】ヒト肝癌由来 HepG2 細胞をルテオリン存在下で培養した結果、薬物代謝系第Ⅱ相酵素である HO-1 と NQO1 のタンパク質発現が増加した。Nrf2 の活性化を Nrf2 の核内移行と EMSA で評価した結果、ルテオリンは Nrf2 の核内移行を促進し、抗酸化剤応答配列への結合量を増加させた。Nrf2 はユビキチン-プロテアソーム系を介して分解されるが、ルテオリンは Nrf2 のユビキチン化を減少させた。これらの結果から、ルテオリンは Nrf2 のユビキチン化を介した分解を保護し核内移行を促進することで薬物代謝酵素発現を増加させることが示唆された。

水溶性フラボノイドの消化管吸収と機能性の評価

H-a07

○中村涼, 津田真理依, 大松達也, 中澤昌美, 上田光宏, 北村進一, 阪本龍司

(阪府大院・生命環境)

【目的】フラボノイド配糖体であるルチン (Rut) は多様な生理機能を有するが、水溶性が低く生体利用率が低い。本研究では、Rut に α -グルコースを転移させて水溶性を高めた α -G-Rut について、小腸上皮モデルである Caco-2 細胞単層膜を用いて消化管吸収性を検討した。また、腸内細菌叢の変化や抗酸化能などを測定することで大腸環境改善効果を評価した。

【方法・結果】小腸上皮機能を有した Caco-2 細胞単層膜を用いて膜透過性実験を行ったところ、 α -G-Rut は Rut と比べて小腸で吸収されにくいことが判明した。そこで α -G-Rut をヒト腸内細菌群とともに培養し、腸内細菌叢への影響を検討した。培養液中の優先菌種の変化をリアルタイム-PCR で解析したところ、*Bacteroides* 属及び *Clostridium* 属の割合に変化が見られた。また α -G-Rut には Rut と同様に強力な抗酸化作用があり、さらに β -グルクロニダーゼ阻害活性を示したことから、大腸の環境改善効果を有することが示唆された。

老化促進マウスにおける酒粕機能成分の脳機能保護機構の検討

H-a08

○奥田真友美¹, 柴田紗知², 伊豆英恵³, 藤井力^{3,4}, 松原主典¹

(¹広島大院・教育, ²福山大・生命工学, ³酒総研, ⁴広島大院・生物圏)

【目的】我々は酒粕機能成分であるグリセロホスホコリン (GPC) と S-アデノシルメチオニン (SAM) の抗老化効果について検討を進めている。これまでに、老化促進マウス (SAMP8) における脳機能保護効果等を見出し報告している。本発表では脳機能保護効果の作用機構について、アミロイド形成や炎症への影響について検討した結果を報告する。

【方法・結果】SAM 及び GPC を投与した SAMP8 の脳組織を用い、アルツハイマー病との関連が知られているアミロイド β ($A\beta$) やトランスサイレチン (TTR) について免疫染色を行った。 $A\beta$ については明確な差は見られなかったが、TTR の沈着は SAM や GPC を摂取した群で抑制されていた。ミクログリア細胞を指標とした炎症反応についても、SAM や GPC の摂取により抑制されていた。本研究は SIP (戦略的イノベーション創造プログラム)「次世代農林水産業創造技術」によって実施した。

抗肥満活性を有するうちなー野菜の探索

H-a09

○中村海太¹, 稲福征志², 前田剛希³, 広瀬直人³, 玉城盛俊³,
高江洲賢文³, 砂川春樹⁴, 屋宏典^{1,2}
(¹琉球大院・農, ²琉球大・熱生研, ³沖縄農研, ⁴琉球産経)

【目的】亜熱帯海洋性気候の沖縄県に自生する植物は、様々な環境ストレスに耐える防御機構を備えており、多様な生理活性物質を有する。本研究では、代表的な「うちなー野菜」であるナーベラー、ゴーヤー、サクナ、ニガナ、ウンチェー、フーチバーから我々の健康増進に役立つ機能性物質を探索すべく、それらの抗肥満活性について検証した。

【方法・結果】3T3-L1 細胞を用いて、うちなー野菜 6 種の脂質蓄積抑制活性を評価したところ、サクナ、ニガナ、ウンチェー、フーチバーに有意な活性が認められた。また、サクナの活性寄与成分はジヒドロピラノクマリン (DPC) 類であり、僅かな構造の違いにより活性強度が大きく異なることが明らかとなった。更には、サクナ由来の高純度 DPC は、高脂肪食摂取マウスの体重および白色脂肪組織重量の増加を有意に抑制しており、うちなー野菜サクナが肥満改善食材として有用であることが示された。

発酵茶が脂肪蓄積と高血糖予防に及ぼす効果とその作用機構

H-a10

○山下陽子, 芦田均 (神戸大院・農)

【目的】さまざまな種類の茶が健康の維持増進に寄与することが知られている。これまでに、発酵茶に含まれる主要なポリフェノールであるカテキン類やその重合体のテアフラビン類を筋肉培養細胞に作用させた場合に、糖輸送担体 (GLUT4) の膜移行促進と細胞内へのグルコース取り込みを促進することを明らかにしている。しかしながら、発酵茶が脂肪蓄積や高血糖の抑制に及ぼす作用機構の詳細はまだ十分に明らかとなっていない。【方法・結果】6 週齢雄 ICR マウスに水あるいは発酵茶（ウーロン茶・紅茶・プーアル茶）を自由飲水にて摂取させ、1 週間飼育した。飼育 7 日目に糖負荷試験を行ったところ、発酵茶は糖負荷後の血糖上昇を抑制した。その作用機構には、筋肉組織においてインスリン経路と AMP 活性化キナーゼ (AMPK) のリン酸化による GLUT4 の膜移行促進が関与していた。これらの効果は、特に紅茶で高かった。また、飼育 7 日目の脂肪組織を用いて、脂肪分化ならびにエネルギー代謝に関わる分子マーカー発現量の変化を検証した。発酵茶はエネルギー代謝に関わる AMPK のリン酸化を促進し、UCP1 の発現を上昇させた。また、脂肪分化に関わる PPAR γ と C/EBP α の発現を減少させた。これらの効果も、紅茶で高かった。以上の結果から、発酵茶は AMPK の活性化がキーとなり高血糖と脂肪蓄積抑制に寄与すると示唆された。

緑茶カテキン EGCg のメチル化による糖尿病性腎症改善効果の増強

H-a11

○林大輝, 上田修司, 山之上稔, 芦田均, 白井康仁 (神戸大院・農)

【目的】糖尿病性腎症 (DN) は糖尿病の血管合併症であり、血中高グルコースによるジアシルグリセロール (DG) -プロテインキナーゼ C (PKC) 経路の活性化が発症・増悪の一因である。これまでに我々は、DG をフォスファチジン酸に変換する DG キナーゼ α (DGK α) が DN の改善に寄与すること、さらに緑茶カテキンの一種であるエピガロカテキンガレート (EGCg) が DGK α を活性化し、DN を改善することを明らかにしてきた。しかし、低濃度の EGCg の投与では DN 改善効果が低かったことから、本研究では、EGCg と比べ体内への吸収率が高いメチル化 EGCg である EGCg 3''Me に着目しその DN 改善効果を検討した。

【方法・結果】野生型の雄性 C57BL/6 マウスを STZ 投与により糖尿病を発症させ、0.05% の EGCg 及び EGCg 3''Me を含む飼料を自由摂食させ DN の指標である尿量及び尿アルブミン量を測定した。EGCg 3''Me を摂食させた群では、STZ 投与による血糖値の上昇が僅かだが有意に遅延する傾向が見られ、体重の減少も有意に抑制された。さらに、EGCg 3''Me による DN 改善効果は EGCg と比較して有意に上昇することが明らかとなった。このことから EGCg 3''Me がより効果的に DN を予防・改善する機能性食品となりうることを示唆された。

青ユズ種子エキスの皮膚細胞に及ぼす影響

H-p01

○佐藤美夢¹, 吉金優², 栗田せりか², 鈴木悟¹, 東谷望史¹, 沢村正義²

(¹JA 馬路村, ²高知大・土佐 FBC)

【目的】JA 馬路村では未利用資源であったユズ種子からエキスや種子油を調製し、その特性や機能性を明らかにし、香粧品へと展開させてきた。夏場に収穫される青ユズも特徴的な香気を示し、食品に利用している。そのため、青ユズ種子の有効活用も課題であった。そこで、本研究では青ユズ種子エキスが皮膚細胞に及ぼす影響を、黄ユズと比較しつつ検討した。

【方法・結果】青ユズおよびユズ乾燥種子を、水および各種濃度の 1,3-ブタンジオール溶液に浸漬することにより、種子エキスを調製した。青ユズ種子エキスのほうが、ポリフェノール含量および抗酸化活性が高かった。ユズ種子エキスはマウス B16 メラノーマ細胞のメラニン産生を抑制し、ヒト繊維芽細胞の増殖を促進することが分かった。さらに、その作用は青ユズ種子エキスのほうが有意に高かった。以上より、青ユズ種子エキスは香粧品原料として有用である可能性が示唆された。

シクロアリンのメラニン合成抑制機構の解析

H-p02

○美藤友博, 森口知寛, 藪田行哲, 一柳剛, 渡邊文雄 (鳥取大・農)

【目的】玉ネギやニンニクを加熱することで増加するシクロアリンには血中トリアシルグリセロール低下作用が報告されている。本研究では、シクロアリンから新規にメラニン合成抑制作用を見出したため、その作用機構について分子レベルで解析を行った。

【方法・結果】マウス由来メラノーマ B16 細胞をシクロアリン添加培地 (終濃度: 0~3.4 μ M) (α -MSH 存在下) で 3 日間培養したところ、培地中のシクロアリン濃度依存的に B16 細胞が産生するメラニン量が著しく減少した。メラニン生成に関与するチロシナーゼおよびチロシナーゼ関連タンパク質の遺伝子およびタンパク質発現を解析した結果、シクロアリンはチロシナーゼの転写因子である MiTF の mRNA およびタンパク質の発現を低下させ、チロシナーゼタンパク質の発現を減少させていた。現在は、MiTF の発現を調節する cAMP シグナル伝達経路に着目し、解析を進めている。

育毛促進成分の探索およびその機能性の検証

H-p03

久保智里¹, 松尾花佳², 〇片倉喜範^{1,2,3}

(¹九大院・生資環, ²九大院・シス生, ³九大院・農)

【目的】近年、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) に発毛促進効果があることが報告された。そこで本研究では、ヒト表皮ケラチノサイト由来 HaCaT 細胞を用いて、ヒト TERT 遺伝子 (hTERT) を活性化する食品成分を網羅的に探索し、その育毛促進活性を評価した。

【方法・結果】

イメージングサイトメーターによる解析、リアルタイム PCR による内在性 hTERT 発現検証及び、細胞増殖に対する効果から、3 種類のポリフェノールサンプルが育毛効果を有する食品成分として有望であると考えられた。次に、実際にこれらポリフェノールの育毛効果について、マウスを使用した動物実験により評価した結果、上記 2 種のポリフェノールについて、顕著な育毛促進効果が見られたことから、今回のスクリーニング系が育毛促進物質の探索に有効であることが示された。

H-p04 A link between benzyl isothiocyanate-induced autophagy and Nrf2/Keap1 regulation in human colon cancer cells

○Xiaoyang Liu¹, Naomi Abe-Kanoh^{1,2}, Yujia Liu¹, Shintaro Munemasa¹,
Toshiyuki Nakamura¹, Yoshiyuki Murata¹, Yoshimasa Nakamura¹
(¹Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.,
²Grad. Sch. Nutr. Biosci., Tokushima Univ.)

In the present study, we investigated the regulating role of autophagy in benzyl isothiocyanate (BITC)-induced Nrf2 activation. BITC dose-dependently enhanced the protein levels of the representative molecules of autophagy, including p62 and LAMP1, as well as the conversion of LC3BI into LC3BII in human colorectal cancer HCT-116 cells. BITC concomitantly induced the Nrf2 up-regulation and Keap1 down-regulation. A phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-specific inhibitor significantly attenuated the expression of p62 and Nrf2 proteins as well as HO-1 gene. These results suggested that PI3K plays the key role in the noncanonical Nrf2 activation by BITC.

H-p05 Molecular mechanisms underlying aldehyde dehydrogenase induction by phenolic acid catabolites of quercetin glycosides

○Yujia Liu, Ayuki Kurita, Sayaka Nakashima, Shintaro Munemasa,
Toshiyuki Nakamura, Yoshiyuki Murata, Yoshimasa Nakamura
(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

3,4-Dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and 3-hydroxyphenylacetic acid (OPAC) are the major colonic microflora-produced catabolites of quercetin 4'-glucoside from onion. Here we investigated the molecular mechanisms underlying aldehyde dehydrogenase (ALDH) induction by DOPAC and OPAC. Both DOPAC and OPAC were shown to enhance not only the total ALDH activity, but also the gene expression of ALDH1A1, ALDH2 and ALDH3A1. Both DOPAC and OPAC simultaneously stimulated the nuclear translocation of NFE2-related factor 2 (Nrf2) and aryl hydrocarbon receptor (AhR). The present results suggest that DOPAC and OPAC enhance the total ALDH activity, possibly through the Nrf2- and AhR-dependent transcriptional regulation.

ヒゲナガエビ頭部を原料とした醤油の機能性に関する研究

H-p06

○杉山靖正, 吉岡涼代, 久木野千波, 福山智未, 山田章二, 小松正治
(鹿児島大・水)

【目的】ヒゲナガエビ (*Haliporoides sibogae*) は、駿河湾から九州まで、東アジア、オーストラリア等の周辺海域の水深 200 から 600 メートルの深海の砂底に生息している。鹿児島県ではタカエビと呼ばれ、東シナ海での底引網による漁獲量が多い。このエビは頭部の黒変速度が早いのが特徴であり、その見た目の悪さから頭部を除去して販売されることが多く、除去された頭部は廃棄物として処理されることになる。そこで本研究では、未利用資源であるヒゲナガエビ頭部の有効活用を目的とした。【方法・結果】まず、ヒゲナガエビ頭部を材料に魚醤油を作製した。次に、作製したタカエビ醤油の遊離アミノ酸分析を行ったところ、他の魚醤油と比べ各アミノ酸の含有率に違いが見られ、材料に用いたヒゲナガエビ頭部の影響を大きく受けた。続いて、機能性評価を行ったところ、高い抗酸化活性を示した。そこでタカエビ醤油から抗酸化物質を単離し、その化学構造を機器分析の結果から明らかにした。

高知県産ハブ茶およびキシマメ茶の食品化学的特性

H-p07

土田美穂¹, ○中島悦子², 吉金優², 森山洋憲³, 沢村正義²
(¹香稜苑, ²高知大・土佐 FBC, ³高知県工技セ)

【目的】高知県南国市・香稜苑は、ハブソウ (*Cassia occidentalis* L.) やカワラケツメイ (*Cassia nomae* (Sieb.) Honda) をそれぞれ「ハブ茶」、「キシマメ茶」として栽培、加工販売している。これらの茶は科学的知見が不足しており、①食品化学的特性、②機能性の把握に取り組んだ。

【方法】①ハブ茶およびキシマメ茶と市販茶の間で、茶葉浸出液中のカフェイン、カテキン、遊離糖、アミノ酸等の含量を比較した。ハブ茶とキシマメ茶は、焙煎前後で香気成分を比較した。②市販茶および焙煎前後の茶について、抗酸化能とリパーゼ阻害活性を比較した。

【結果】①ハブ茶、キシマメ茶はカフェイン、カテキンを含んでおらず、遊離糖を 60-90 mg/100 mL 含有していた。また、焙煎後に香気量が増加した。②ハブ茶、キシマメ茶の抗酸化能およびリパーゼ阻害活性は市販茶と比べて低かった。以上のことから、ハブ茶およびキシマメ茶に関する食品化学的特性および機能性についての科学的知見を得ることができた。

食酢に含まれるポリアミンの飛翔昆虫誘引性

H-p08

○石井友理¹, 東久保遥¹, 赤坂直紀², 佐古田久雄², 秀瀬涼太¹, 藤原伸介¹
(¹関学大院・理工, ²マルカン酢)

オウトウショウジョウバエ (Spotted Wing Drosophila, SWD) は、ベリー類に寄生する害虫である。成熟した果実に寄生するキイロショウジョウバエとは異なり、雌の SWD は鋭い産卵管を備えているため、未成熟な果実にも寄生する。この特徴から、北米や欧州の果樹栽培において莫大な被害を引き起こしている。米国農務省によると、SWD の検知にはリンゴ酢を誘引剤とした捕虫器が推奨されている。食酢の香味は、原料及び酢酸菌の代謝に起因する代謝産物(有機酸や揮発性成分)の差異によって決定づけられると考えられる。しかしながら、異なる原料から製造される食酢中の代謝産物の差異と SWD に対する誘引性との相関に関しては依然未知な点が多い。玄米酢とリンゴ酢に含まれる代謝産物(酢酸・アセトイン・ポリアミンなど)の濃度及び両者の SWD 誘引性を比較したところ、玄米酢はリンゴ酢よりも誘引効果を示し、玄米酢に含まれるポリアミンがその高い誘引性に起因するものと考えられた。

H-p09 ブドウ果実由来のフェノール性化合物が食品加工用酵素剤中の Polygalacturonase (PGase) 活性に及ぼす影響

○児玉祥基, 堀西朝子, 尾崎嘉彦 (近畿大・生物理工)

【目的】我々は、果実の酵素剥皮技術の開発の過程で、ブドウの果皮組織の分解性は品種間で異なり、分解性の高い品種（'キャンベルアーリー'、'巨峰'、'シャインマスカット'）と低い品種（'デラウェア'、'ナイアガラ'、'安芸クイーン'）に分けられること、分解性の差には、酵素液に溶出する果実由来のフェノール性化合物が関与することを見出した。本研究では Pectinase-IGA 中の PGase 活性に及ぼす果肉由来フェノール性化合物の影響を検討した。

【方法・結果】各品種の果肉の凍結乾燥粉末を MeOH 抽出し、フェノール画分を調製した。この試料のフェノール性化合物の濃度は Folin-ciocalteu 法により測定した。PGase 活性は粘度低下法で測定し、フェノール画分の添加の影響を評価した。供試品種の中で最も高いフェノール濃度を示した'ナイアガラ'の果肉抽出物に、強い PGase 阻害活性が認められた。現在、フェノール画分に含まれる阻害成分の精製を進めている。

H-p10 リンゴ果実由来のフェノール性化合物が食品加工用酵素剤中の Polygalacturonase (PGase) 活性に及ぼす影響

○吉田光一郎, 松森史哉, 堀西朝子, 尾崎嘉彦 (近畿大・生物理工)

【目的】リンゴ果実の酵素剥皮加工における剥皮性の品種間差は、クチクラ構造の違いに基づくものであると報告されている。我々はこれに加えて、果実由来のポリフェノールによる剥皮用酵素剤の阻害が剥皮性に影響を与えているのではないかと考え検証を行った。

【方法・結果】'紅玉'、'秋映'、'シナノゴールド'、'フジ'を対象に Pectinase-IGA を用いる酵素処理で剥皮性の確認を行ったところ、既報のように、'紅玉'は容易に剥皮できたが、'フジ'は剥皮困難であった。また、'秋映'、'シナノゴールド'はそれらの中間的な性質を示した。各品種の果実から溶出する水溶性フェノール画分は Pectinase-IGA 中の PGase 活性を阻害した。阻害率は品種により異なり、'紅玉'と'フジ'を比較した場合、'紅玉'に対する阻害率が有意に低かった。現在、果皮からメタノール抽出により調製したフェノール画分を、阻害作用を指標に精製し、阻害物質の特定および剥皮性との関連性の解析を進めている。

リソソーム合成転写因子 TFEB が筋分化に及ぼす影響

I-a01

○北野剛大, 下唐湊一矢, 原田直樹, 山地亮一 (阪府大院・生命環境)

【目的】骨格筋は筋損傷を受けると、再生することが可能な可塑性を持つ組織である。その再生機構は複雑で、筋芽細胞同士が融合して筋管細胞を形成する筋分化過程を含む。筋分化中にオートファジーが起こるが、その役割についての詳細な知見はほとんどない。本研究ではオートファジーに関与するリソソームに着目し、リソソーム合成転写因子である transcriptional factor EB (TFEB) が筋分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】TFEB が筋分化に及ぼす影響を検討するため、マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の TFEB を siRNA でノックダウンしたところ筋分化が抑制された。そこで筋分化誘導前後の TFEB の発現量を検討したところ、mRNA とタンパク質の発現量は変わらなかった。そこで、分化誘導前後の TFEB の局在を細胞分画により検討したところ、筋分化誘導後に核の TFEB が増加した。以上より、TFEB によって合成されるリソソームが筋分化に必要であることが示唆された。

血糖調節に及ぼす性成熟期の男性ホルモンの影響

I-a02

○四元優佑¹, 原田直樹¹, 乾博², 山地亮一¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪府大院・栄養)

【目的】近年、糖代謝の制御に男性ホルモンが関与することが明らかになってきた。本研究では、第二次性徴期に上昇する男性ホルモンの血糖調節および膵臓 β 細胞に与える影響についてラットを用いて検討した。

【方法・結果】性成熟前の Wistar 雄性ラット (6 週齢) を擬似手術群、去勢群、去勢+テストステロンエンタート (TesE) 投与群に分けて 10 週間飼育した。糖負荷試験 (14 週齢) では、去勢群で糖負荷 30 分後の血糖値が有意に上昇し、TesE 投与により擬似手術群と同程度にまで低下した。インスリン負荷試験 (15 週齢) では、3 群に有意差は認められなかった。飼育後に求めた膵臓の β 細胞量は去勢により擬似手術群の約 30% にまで低下し、TesE 投与によりこの低下は消失した。去勢による β 細胞量の減少は、細胞増殖と細胞死の両方に起因 (Ki67 陽性細胞の減少と TUNEL 陽性細胞の増加) することが判明した。

タンパク質修飾網目状繊維を用いた神経幹細胞/前駆細胞の接着培養法

I-a03

○藤田雅徳, 森英樹, 原正之 (阪府大院・理)

【目的】神経細胞やグリア細胞への多分化能を有する神経幹細胞/前駆細胞 (NSPC) は、無血清培地を用いた培養過程で細胞集塊を形成し増殖する。培養途中における集塊同士の接着・融合は、連続観察と増殖や分化の制御を困難にする。我々は、マウス及びヒト NSPC を網目状ナイロン繊維上で接着培養できる実験系の構築を試みた。

【方法・結果】網目状ナイロン繊維表面にポリアクリル酸をグラフト重合し、さらに EDC/NHS 法を用いてタンパク質 (gelatin, BSA, Matrigel) を修飾した。この繊維上にマウス及びヒト NSPC を播種し、無血清培地で培養した。いずれの繊維にも神経幹細胞マーカーである nestin 陽性の NSPC の接着が確認できたが、特にマウス NSPC は未修飾ナイロン繊維と Matrigel 修飾繊維への接着細胞数が多く、ヒト NSPC ではそれらの繊維に加え gelatin 修飾繊維でも接着細胞数が多かった。Matrigel 修飾繊維では、接着した NSPC が繊維表面に沿って移動し広がり、最も高い細胞増殖率を示した。

希少糖の線虫成長阻害メカニズム：ATP 関連物質への影響

I-a04

○石井綾佳¹, 新谷知也², 佐藤正資¹ (¹香川大・農, ²愛媛大院・農)

【目的】D-フラクトースの C3 エピマーである希少糖 D-ブシコースは、線虫 *Caenorhabditis elegans* の成長を抑制する。しかし、その作用メカニズムは明らかではない。演者らは、D-ブシコースで処理した線虫では解糖系の阻害が起き、細胞内エネルギーレベル AMP/ATP 比、ADP/ATP 比に変化が起きているのではないかと考えた。本研究では、D-ブシコース処理線虫抽出物中の AMP, ADP, ATP を定量し、この仮説を検証した。

【方法・結果】ふ化直後の幼虫と若成虫を D-ブシコース(25, 50mM) を含む液体培地で培養して D-ブシコース処理線虫を得た。D-ブシコースを含まない培地で培養した線虫を Negative control, 解糖系阻害剤 2-deoxy-D-glucose 処理線虫を Positive control とした。これらの線虫を、緩衝液中で 100℃, 15 分間加熱し、ATP 関連物質の抽出を行なった。分析はルシフェラーゼ法と蛍光 HPLC 法で行った。D-ブシコース処理線虫の AMP/ATP 比、ADP/ATP 比への影響を報告し、D-ブシコースの成長阻害メカニズムについて考察する。

pH 依存性塩素チャネルのイベルメクチン感受性決定因子の解明

I-a05

○奥原大樹, 古谷章悟, 伊原誠, 松田一彦 (近畿大・農)

【目的】pH 変化に応答して自身の塩素チャネルを開口する pH 感受性塩素チャネル (pHCl) は昆虫特有のリガンド作動性塩素チャネルとして知られているが、その機能や殺虫剤感受性の有無については不明である。本研究では、カイコガ幼虫の pHCl の多様性の解析をもとに本受容体のイベルメクチン感受性を決定する構造因子を解明したので報告する。

【方法・結果】カイコガ幼虫の脳、胸部第 3 神経節および中腸から得た cDNA の配列解析により、pHCl には極めて多くのスプライスバリエントがあり、その発現パターンは対象組織に応じて変化した。カイコガ幼虫において高頻度で発現しているバリエントは細胞外の pH によらずイベルメクチンにより活性化されたのに対して、別のバリエントは酸性 pH のときに限り活性化された。このような pHCl バリエント間のイベルメクチン感受性差をもたらす原因を調べた結果、塩素チャネルの一アミノ酸が当該現象に関与していることが判明した*。

*D. Okuhara *et al.*, *Molecular Pharmacology* in press.

ビタミン B₁₂ 欠乏が及ぼす線虫のアルデヒドレベルへの影響

I-a06

○藪田行哲, 吉田佳代子, 美藤友博, 渡辺文雄 (鳥取大・農)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂) の欠乏が痴呆症を引き起こす原因の一つであることが指摘されているがその詳細は明らかではない。これまでに我々は B₁₂ 欠乏の分子メカニズムを明らかにするために、線虫を用いて解析を行ってきた。その結果、脊椎動物と同様に線虫でも B₁₂ 欠乏によりメチルマロン酸およびホモシステインが蓄積すること、記憶・学習能が低下することを見出した。ところでアルツハイマー型認知症などの患者の脳内で脂肪酸の酸化により生じるアクロレイン (AC) や 4-ヒドロキシノネナール (HNE) が蓄積することが報告されている。そこで B₁₂ 欠乏が及ぼす線虫のアルデヒドレベルへの影響について解析した。

【方法・結果】B₁₂ 欠乏培地で 5 世代以上継代した線虫を B₁₂ 線虫とした。AC および HNE を含む 24 種類のアルデヒドはジニトロフェニルヒドラジン誘導体化し HPLC により測定した。その結果、HNE は B₁₂ 欠乏線虫で増加していた。現在、その他のアルデヒドについて詳細な分析を行っている。

ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*Caenorhabditis elegans*) のコラーゲンタンパク質に及ぼす影響

I-a07

○岡本奈穂¹, 勝飛², 美藤友博¹, 藪田行哲¹, 河野強¹, 渡辺文雄¹
(¹鳥取大・農, ²東北農業大・食品学院)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂) 欠乏条件下では、体内ビタミン C 含量の減少に伴い、酸化ストレスが顕著に増大することを明らかにした¹⁾。また、B₁₂ 欠乏線虫では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に関与する変異体が観察された²⁾。コラーゲン合成に必須であるビタミン C が減少することから、本研究では B₁₂ 欠乏が線虫のコラーゲンタンパク質に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】B₁₂ 添加培地 (コントロール培地) と B₁₂ 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 B₁₂ 欠乏線虫を調製した。比色法により、線虫のコラーゲンタンパク質を定量した結果、B₁₂ 欠乏線虫では顕著なコラーゲン含量の減少を示した。

1) Bito *et al.* Redox Biology, 11, 21-29 (2017). 2) Bito *et al.* FEBS Open Bio, 3, 112-117 (2013).

3 食制条件下でのビートファイバーによる摂取エネルギー低下効果に関わる視床下部および小腸粘膜の食欲調節因子の探索

I-a08

○越智博介, 藤原啓士郎, 宗像嶺, 藤谷美菜, 岸田太郎 (愛媛大・農)

我々は、ビートファイバー (BF) を添加した高脂肪 (HF) 飼料でラットを飼育すると、摂取エネルギーが低下することを見出した。本研究では、BF 摂取によって食欲調節因子の遺伝子発現がどのように変化するかを調べた。6 週齢の雄ラットに食物繊維を含まない HF 飼料、または BF を添加した HF 飼料を与えた (各々 NF 群、BF 群)。1 食を 30 分間とした 3 食制で 4 週間飼育した。BF による摂取エネルギーの低下効果が見られた 2 食目の前後で視床下部と小腸粘膜をサンプリングした。BF 群で、4 週間の総摂取エネルギーが有意に低下した。BF 群では、食前の小腸粘膜において、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の前駆体であるプログルカゴンの遺伝子発現が有意に増加し、食前、食後の視床下部において副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンの遺伝子発現も有意に増加した。これらが BF 摂取による摂取エネルギーの低下に関与するかもしれない。

I-a09 河内晩柑果皮ナノファイバーを摂取することにより肝臓脂質量が減少した
○冠野由依¹, 山崎翔悟¹, 福田直大², 藤谷美菜¹, 岸田太郎¹
(¹愛媛大院・農, ²愛媛県産業技術研究所)

【目的】河内晩柑は柑橘の一種である。その果皮は廃棄物として処理されているが、果皮繊維をナノファイバー (NF) 化することによって加工食品への利用が期待できる。河内晩柑果皮とその NF の生理作用はほとんどわかっていないため、本研究では、これらの摂取が脂質代謝に与える影響を検討した。【方法】5 週齢 SD 系雄ラットに AIN-76 組成に基づく無繊維飼料およびろ紙粉末 3% 添加飼料、河内晩柑果皮繊維 3% 添加飼料、河内晩柑果皮 NF3% 添加飼料を与え (各々無繊維群, ろ紙群, 果皮繊維群, 果皮 NF 群), 14 または 28 日間飼育した。【結果・考察】体重, 飼料摂取量, 肝臓重量, 白色脂肪重量, 血清中性脂肪濃度, 血清コレステロール濃度は, 無繊維群に対して果皮繊維群と果皮 NF 群で有意な差はなかった。肝臓総脂質量, 肝臓中性脂肪量は, 無繊維群に対して果皮繊維群と果皮 NF 群で有意に減少した。

I-a10 ダイゼイン摂取による食欲抑制作用と血中エコール濃度の経日変化
○吉良真結, 小林拓広, 阿部恭大, 藤谷美菜, 岸田太郎 (愛媛大院・農)

大豆イソフラボン・ダイゼイン (Dai) の腸内細菌代謝物エコール (Eql) が雌特異的に食欲を抑制することを見出した。我々はその機構解明を目指し、エストロゲン欠乏による過食のために Eql の食欲抑制作用がより顕著に見られる卵巣摘出ラットを用いて、1 日 3 回給餌する 3 食制によってラット間の摂取タイミングを揃えた条件で検討することにした。本研究では、3 食制で飼育した卵巣摘出ラットに Dai を混餌投与したときの、血清 Eql 濃度の経日変化と視床下部の食欲調節因子の遺伝子発現を調べた。7 週齢の卵巣摘出ラットをコントロール (C) 群と Dai 群 (300 mg/kg 飼料) にわけ、3 食制で飼育した。Dai 投与開始 0 日後 (3 時間後)、3、4、8 日後の 2 食目食前に解剖を行った。Dai 投与開始 3 時間後の血清ではエコールは検出されなかったが、3 日後以降では Dai 群の血清 Eql 濃度は経日的に上昇した。Dai 投与 3 日後に C 群と比較して Dai 群で有意に飼料摂取量が減少した。Dai 投与 3 日後の 2 食目食前で視床下部 orexin の遺伝子発現が、C 群と比較して Dai 群で有意に低下した。

ヒト RNase H2 の基質特異性の改変

I-p01

○児島憲二^{1,2}, 馬場美聡¹, 杉浦拓也², 西村拓人², 滝田禎亮^{1,2}, 上原了³,
Robert J. Crouch³, 保川清^{1,2} (¹京大院・農, ²京大・農, ³NIH・NICHD)

【目的】RNase H2 (RH2) は、二本鎖 DNA に 1 塩基だけ埋め込まれたリボヌクレオチド (R) の 5'側ホスホジエステル結合を切断する活性と、RNA/DNA ハイブリッドの連続する R を切断する活性を有する。本研究では、前者の活性を保持したまま、後者の活性が消失したヒト RH2 変異体を作製することを目的とした。【方法・結果】ヒト RH2 と基質との複合体の立体構造モデルにおいて、切断されるホスホジエステル結合の 5'側ヌクレオチドの糖の部分に Val143 が近接していた。Val143 を Trp, Phe, Lys, Arg に置換した変異体を作製し、1 塩基の R を含む 18 bp の二本鎖 DNA (1R) および 18 bp の RNA/DNA ハイブリッド (18R) に対する加水分解活性を測定した。V143W, V143F, V143K, V143R の 1R 分解活性は野生型 (WT) の 26%, 14%, 0.17%, 0.05%であり、18R 分解活性は WT の 4.7%, 6.3%, 0.03%, 0.03%であった。V143W は、WT に比べて 18R より 1R を好むように基質特異性が変化した。

骨格筋重量増加作用を有するスケトウダラタンパク質の有効摂取量の検討

I-p02

○上東亮太¹, 宇都宮さち¹, 澤井真梨子¹, 藤谷美菜¹, 内田健志²,
速水耕介³, 岡田晋治⁴, 岸田太郎¹
(¹愛媛大院・農, ²日本水産(株)生活機能研, ³横浜薬大・薬, ⁴東大院・農)

【目的】我々は、ラットにおいて食餌タンパク質をスケトウダラタンパク質(APP)にすると、カゼイン(Cas)の場合と比較して、投与開始 2 日後より腓腹筋重量が有意に増加することを報告している。本研究では、骨格筋重量増加作用を示す APP の有効投与量を検討した。

【方法】タンパク質源を Cas:APP=1:0, 8:1, 2:1 または 0:1 とした飼料 (AIN-93G 組成) で 3 日間ラットを飼育し、腓腹筋重量を測定した (各々 Cas 群、APP1/9 群、APP1/3 群、APP 群)。

【結果・考察】腓腹筋重量は、Cas 群に比較して APP1/3 群、APP 群で有意に高かった。骨格筋重量増加作用をもたらす APP の最小有効投与量は、59 g/kg 飼料 ~20 g/kg 飼料であると考えられる。

FOXO1 の転写活性化能を調節する物質のスクリーニング

I-p03

○大西拓己¹, 広瀬優真¹, 畑澤幸乃^{1,2}, 亀井康富¹
(¹京府大院・生命環境, ²日本学術振興会)

【目的】骨格筋は運動やエネルギー代謝、糖取込みなどにおいて重要な役割を果たしている。栄養不足や寝たきり時には転写因子 FOXO1 の発現が増加し、筋萎縮が生じることが知られている。そこで本研究では筋萎縮を抑制するために FOXO1 の転写活性を抑制する化合物の探索を行った。

【方法・結果】レポーター (ルシフェラーゼ) 遺伝子の 5'上流に FOXO1-GAL4 融合タンパク質が結合するとルシフェラーゼが発現し、活性を測定することで FOXO1 の転写活性を評価する系を確立した。本実験系を用いて 400 種類の食品・植物由来の化合物をスクリーニングした結果、数種類の化合物で FOXO1 の転写活性が抑制された。これらの化合物は今後新たな筋萎縮抑制食品の開発につながる可能性がある。

FOXO3 依存的な膵臓がん幹細胞制御機構の解明

I-p04

○竹内智枝理, 高井美佳, 廣井舜, 熊添基文, 立花宏文 (九大院・農)

【目的】 これまでに、Forkhead box O3 (FOXO3) が膵臓がん幹細胞性の維持に重要な役割を持つことを明らかにした¹。そこで本研究では、FOXO3 が膵臓がん幹細胞性を制御する詳細なメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】 FOXO3 の発現をノックダウンした膵臓がん細胞において、liver kinase B1 (LKB1) の発現低下を見出した。そこで、ミトコンドリア活性に注目しマイクロアレイ解析を行ったところ、PPAR- γ co-activator-1 β (PGC-1 β) が FOXO3 依存的な経路に関与することを明らかにした。また、PGC-1 β 発現のノックダウンにより、pyruvate dehydrogenase-A1 (PDHA1) の発現が抑制された。これらの分子の発現をそれぞれノックダウンすると、がん幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能が抑制された。以上より、FOXO3/LKB1/PGC-1 β /PDHA1 経路が膵臓がん幹細胞形質を正に制御することが示された²。¹*Oncogene* **36**, 2643-54 (2017), ²*J.Biol. Chem* **292**, 10813-23 (2017)

D-乳酸は L-乳酸に比して脂肪細胞分化を強く促進する

I-p05

○平野以都¹, 原田直樹¹, 乾博², 山地亮一¹

(¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪府大院・栄養)

【目的】 通常ヒト血中には、L-乳酸（ピルビン酸より産生）が 0.3–2.0 mM、D-乳酸は nM オーダーで存在する。腸内細菌は D-乳酸と L-乳酸の両方を産生するために、リーキーガットな状態では流入した D-乳酸も血中で数 mM まで上昇する。本研究では、生理作用の違いが不明である D-乳酸と L-乳酸の脂肪細胞分化に及ぼす作用を検討することを目的とした。

【方法・結果】 マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を D-乳酸または L-乳酸存在下で 8 日間分化させ、脂肪蓄積量への影響を検討した。Oil Red O 染色とトリグリセリド量測定の結果、D-乳酸が L-乳酸より強く脂肪蓄積量を増加させることが判明した。L-乳酸の作用はピルビン酸と同程度であった。D-乳酸と L-乳酸は分化初期の 2 日間に最も強く分化を促進し、分化後期の 4 日間には作用しなかった。現在、D-乳酸と L-乳酸による分化促進機構を解明するため、分化を制御する転写因子群の発現に及ぼす影響を検討している。

I-p06

分子内 FRET を用いたヒト多剤排出ポンプ MDR1 (ABCB1) 変異体の構造変化解析

○二股良太¹, 小笠原史彦², 市川尚文¹, 木村泰久¹, 木岡紀幸¹,
植田和光^{1,2} (¹京大院農・応用生命, ²京大・iCeMS)

【目的】ヒト多剤排出ポンプ MDR1 (ABCB1) は細胞質側に開いた内向き構造と細胞外側に開いた外向き構造を持ち、ATP 加水分解依存的にこれらの構造を交互に繰り返すことで基質を輸送すると考えられている。しかし、構造変化の際に ATP 結合と加水分解が果たす役割は不明である。そこで、MDR1 の構造変化における ATP 加水分解の役割の解明を目指した。

【方法・結果】MDR1 では ATP 結合ができない変異体および ATP 結合はできるが加水分解ができない変異体が知られている。これらの MDR1 変異体発現細胞に基質を添加し、分子内 FRET を用いて構造変化を観察した。その結果、ATP 結合ができない変異体は内向き構造で、ATP 加水分解ができない変異体は外向き構造で停止することが示唆された。これらの結果から、MDR1 は ATP 結合が内向き構造から外向き構造への変化を、ATP 加水分解が外向き構造から内向き構造への変化を誘起することが示唆された。

I-p07

コレステロール結合性細菌毒素ストレプトリジン O を用いた ABC タンパク質の機能解析

○小笠原史彦¹, 加納ふみ^{2,3}, 村田昌之^{2,3}, 木村泰久¹, 植田和光^{1,4}
(¹京大院・農, ²東大・総文, ³東工大・IIR, ⁴京大・iCeMS)

【目的】

細胞膜上の ABC タンパク質によるコレステロール輸送を解析する。

【方法・結果】

コレステロール結合性の細胞溶解毒素であるストレプトリジン O (SLO) の孔形成能が細胞膜におけるコレステロールの動きに応じて変化することがわかった。そこで、細胞膜に発現し脂質輸送能を持ついくつかの ABC タンパク質を HEK293 細胞に発現させ、SLO による孔形成を評価したところ、HDL 産生に関与する ABCA1 や ABCG1、胆汁中へのリン脂質排出を担う ABCB4、機能未知な ABCG4 がコレステロールを輸送していることが示唆された。

I-p08

ヒト ABCB4 の基質取り込み経路の検討

○小川峻¹, 末永健人¹, 木岡紀幸¹, 木村泰久¹, 植田和光^{1,2}
(¹京大院・農, ²京大・iCeMS)

【目的】ABCB4 は毛細胆管においてホスファチジルコリン (PC) を胆汁中へ排出するが、その詳細な機構は明らかでない。ABCB4 と 86% のアミノ酸配列類似性を示す薬物輸送体 MDR1 は膜貫通ヘリックス (TM) 4 と 10 の柔軟と考えられる領域から基質を取り込むと予想されている。そこで、ABCB4 に同様の基質取り込み機構が存在するかどうかを検討した。

【方法・結果】MDR1 の TM4 及び 10 は 3 アミノ酸をバリン置換することにより柔軟性が低下し、基質を取り込めなくなることが先行研究から示唆されている。このことから、ABCB4 についても MDR1 と同様のバリン置換体を作成した。バリン置換体を HEK293 細胞に一過的に発現させ、PC 排出活性を測定した結果、TM4 の置換体は PC 排出活性を持たないことが分かった。また TM10 の置換体は野生型の約 50% の PC 輸送能を保持していた。この結果から、ABCB4 は TM4 の柔軟な領域から PC を取り込むことが示唆された。

I-p09 亜鉛は正常な細胞外アデニンヌクレオチド代謝に必須である
○武田貴成, 宮崎志保, 神戸大朋 (京大院・生命科学)

【目的】

近年、種々の細胞外亜鉛要求性酵素が ZnT 亜鉛トランスポーターを介して活性化されることが次々と明らかになっている。本研究では細胞外アデニンヌクレオチド代謝に関わる細胞外酵素の多くが亜鉛要求性であることに着目し、この代謝における ZnT の機能について解析する。本研究を進めることで、亜鉛欠乏症の発症メカニズムの解明等にも貢献できる。

【方法・結果】

本研究では、主にニワトリ DT40 細胞を用い、ZnT の欠損が細胞外アデニンヌクレオチド代謝にどのように影響するのか、関連酵素の活性測定などの手法を用いて解析した。その結果、いくつかの酵素では ZnT の欠損に応答してその酵素活性を著しく低下させ、ZnT を介した活性化を受けていることが明らかとなった。本解析により、ZnT による亜鉛輸送を介した細胞外アデニンヌクレオチド代謝の調節機構の存在が示唆された。

I-p10 亜鉛の排出に関わる亜鉛トランスポーターZnT1 の機能解析
○西藤有希奈, 神戸大朋 (京大院・生命科学)

【目的】亜鉛は生体内においてタンパク質の構造維持や酵素活性の制御など多岐に渡る機能を担っている。生体内の亜鉛ホメオスタシスは、多数の亜鉛トランスポーターによって厳密に制御されており、中でも細胞膜に局在する ZnT1 は細胞からの亜鉛排出に機能すると考えられているが、タンパク質レベルでの ZnT1 の詳細な機能解析は行われていない。そこで本研究では、ZnT1 タンパク質の亜鉛濃度に応じた発現制御機構について詳細な解析を行った。

【方法・結果】ヒト肝がん由来細胞 HepG2 細胞を、通常・亜鉛欠乏・亜鉛添加培地で培養した後、ウエスタンブロッティング法及び免疫染色法により ZnT1 の発現の変動について解析を行った。その結果、亜鉛欠乏培地で培養した細胞において ZnT1 の発現の低下が認められ、この発現低下は亜鉛を添加することによって安定化することが明らかとなった。以上の結果から、ZnT1 は細胞内亜鉛濃度に応じてその発現を変化させることで、細胞内の過剰な亜鉛の排出において重要な役割を担うことが明らかとなった。

チロシナーゼ-阻害剤複合体の結晶構造

J-a01

○藤枝伸宇¹, 馬越恭平², 伊東忍² (¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪大院・工)

チロシナーゼはヒトを初めとするありとあらゆる生物に存在するユビキタスな銅タンパク質であり、メラニン合成経路における初発反応を触媒する鍵酵素である。また、化粧品における美白を初め、食品の品質を低下させる褐変現象などに関与するため、チロシナーゼ阻害剤の開発が古くから続けられてきた。しかし、最近まで、阻害剤設計の指針となるチロシナーゼ-阻害剤複合体の結晶構造は、これら事象とはあまり関連のない原核生物由来のチロシナーゼに関するものしか得られていなかった。一方、以前から、我々は真核生物（麴菌）由来のチロシナーゼ前駆体に関して、ほぼ原子レベルの分解能で結晶構造を報告してきた。そこで、本研究では阻害剤や基質との結合様式を明らかにすることを目的とし、麴菌由来チロシナーゼについて活性制御ドメインを除去した活性型、さらに、これと阻害剤である L-ミモシンおよび基質である L-チロシンの複合体についてそれぞれ高分解能で結晶構造を決定したので報告する。

イヌアレゲン Can f 6 の X 線結晶構造解析と交差反応性を利用した B 細胞エピトープ決定

J-a02

○山本賢史¹, 大谷拓也¹, 中辻匡俊¹, 福富友馬², 西村重徳¹, 乾隆¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 国立病院機構相模原病院臨床研究センター)

イヌアレルギーの原因となるアレルゲンは現在 7 種類同定されている (Canis familiaris allergen 1-7: Can f 1- Can f 7)。中でも、Can f 6 は比較的高いアレルゲン活性を持つことが報告されている。本研究では、イヌアレルギー治療を目的とした新規ワクチンの開発を念頭に、イヌアレゲン Can f 6 の X 線結晶構造解析による立体構造の決定、および交差反応性を利用した B 細胞エピトープの決定を試みた。Can f 6 の立体構造は、SPRING-8 BL38B1 において X 線回折実験を行い、分解能 2.35 Å までのデータを収集・解析することにより決定した。また、Can f 6 とネコ、およびウマアレルゲンとの交差反応性に注目し、相同性を持つ連続した 3 つのアミノ酸残基を Ala に置換した変異型 Can f 6 を作製した。ELISA により、患者血清中 IgE 抗体と変異型 Can f 6 との反応性を調べたところ、その反応性は有意に低下した。

分子内ジスルフィド結合が生体内輸送蛋白質の安定性に与える影響

J-a03

○厚地省吾¹, 寺岡佳晃^{1,2}, 李映昊³, 後藤祐児³, 乾隆¹ (¹ 阪府大院・生命環境, ² 日本学術振興会特別研究員 DC, ³ 阪大院・蛋白研)

生体内輸送蛋白質であるリポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS) は、難水溶性薬剤に対するドラッグデリバリーシステムの薬剤輸送体としての応用が期待されている。本研究では、リポカリンファミリー間で高度に保存された分子内ジスルフィド (SS) 結合が、L-PGDS の安定性に与える影響について調査した。はじめに、L-PGDS の SS 結合に関与する Cys を Ala に置換した SS 結合欠損体を作製した。次に、L-PGDS、および SS 結合欠損体について、円偏光二色性測定による熱変性実験を行ったところ、SS 結合の欠損に伴い L-PGDS の変性中点温度が 11°C 低下することが示された。また、NMR 測定、および分子動力学計算により、本 SS 結合は近傍の β -ヘアピン構造の安定性、およびダイナミクスに影響を与えることがわかった。さらに、人工胃液を用いた消化実験から、本欠損は L-PGDS のペプシン消化耐性を著しく低下させることが明らかとなった。

J-a04 酵素-電極間直接電子移動型反応を指向した変異導入—フルクトースデヒドロゲナーゼを例として—

○日比野佑哉, 河井翔太, 北隅優希, 白井理, 加納健司 (京大院・農)

【目的】酸化還元酵素反応と電極反応との共役をバイオエレクトロカタリシスとよぶ。これを利用したバイオ電池は次世代エネルギーデバイスとして注目を集めている。とりわけ酵素と電極とが直接電子授受する直接電子移動 (DET) 型のバイオ電池は種々のメリットを有するが、一般に出力が低い。そこで、高い DET 型触媒活性を持つ酵素として酢酸菌由来のフルクトースデヒドロゲナーゼ (FDH) に着目した。本研究では FDH をモデルとし、DET 型バイオ電池の高出力化につながる変異体の構築を目指した。

【方法・結果】先行研究で得た知見をもとに既存の FDH 発現プラスミドを改変し、複数の変異体を作製した。その結果、フルクトース酸化における熱力学的エネルギーロスを低減する変異体と、高い触媒電流密度を実現する変異体の構築に成功した。現在、この2つの変異を複合した変異体を作製しており、その結果についても報告する予定である。

J-a05 グラミシジン A チャネルにおける透過イオン選択性の発現メカニズム 山口拓也, ○白井理, 北隅優希, 加納健司 (京大院・農)

チャネル形成剤であるグラミシジン A を含む脂質二分子膜を介した2水相間のイオン透過挙動から透過選択性の発現機構を議論する。2水相の CsCl 濃度が等しい濃度対称系の場合、単一チャネル電流は印加膜電位に比例した。直線的な電位依存特性が常に成り立つことから、チャネルを介した膜内物質輸送過程が律速段階であり、定常状態となっていることが判明した。但し、同一の印加膜電位における単一チャネル電流は CsCl 濃度が 100 mM 以下では CsCl 濃度に比例したが、100 mM 以上では電流値の増加が抑制される頭打ち現象が観測された。単一チャネル電流の頭打ち現象はチャネル孔内への CsCl の分配が上限に近づくことを意味している。また、2水相の CsCl 濃度が非対称な系では、Cs⁺ と Cl⁻ の膜内拡散係数が異なるため、単一チャネル電流は膜電位に対して非線形的な応答を示した。単一チャネル電流をアニオンとカチオンの輸送に分けて解析した結果、Cs⁺ と Cl⁻ の膜内拡散係数の比は 6 : 1 であった。

植物疫病菌由来 NAD 依存性 L-スレオニン脱水素酵素の機能解析

J-a06

○米田一成¹, 三神卓也¹, 荒木朋洋¹, 櫻庭春彦², 大島敏久³
(¹東海大・農, ²香川大・農, ³大阪工大・工)

【目的】特異的農薬の創製を目的に植物疫病菌 *Phytophthora infestans* 由来 L-スレオニン脱水素酵素 (ThrDH) のクローニング、および大腸菌を用いた大量発現と精製を行った。

【方法・結果】*P. infestans* のゲノム情報から ThrDH ホモログ遺伝子(PITG_05140)を同定し、遺伝子合成後、pET32a (チオレドキシン融合酵素) ベクターにライゲーションを行った。その後、大腸菌 BL21codon plus(DE3)RIPL を用い IPTG による遺伝子発現を行った。遺伝子発現産物は Talon コバルトアフィニティーカラムで精製を行い、NAD 依存性 ThrDH 活性を有する事を明らかにした。しかし、N 末端に融合しているチオレドキシンタグの活性への影響やタグ切断後の ThrDH の回収効率の悪さから、再度タグを持たない ThrDH のクローニングを行ったところ、pET22b で酵素が大量に精製できる事を明らかにし、酵素の結晶化にも成功した。今後、本酵素の詳細な酵素化学的性質の決定、および立体構造解析を行う予定である。

全アミノ酸スクニング変異導入法による *Bacillus* sp. TAR-1 株キシラナーゼの耐熱化

J-a07

○片野裕太¹, 中谷滉太¹, 児島憲二¹, 滝田禎亮¹, 八波利恵², 中村聡², 保川清¹ (¹京大院・農, ²東工大・生命理工)

【目的】キシラナーゼはキシランを分解する酵素で、環境に優しいパルプ漂白法や第二世代バイオエタノール生産に応用されているが、反応効率向上のため耐熱性の付与が望まれている。本研究では全アミノ酸スクニング変異導入法を用いて、*Bacillus* sp. TAR-1 株キシラナーゼ (XynR) の基質ポケットとその周辺領域 (Y44-K115 および A300-N325) に網羅的変異を有するライブラリーを作製し、耐熱性の向上した変異体の選抜を試みた。

【方法・結果】pET-21b(+) に挿入された XynR 遺伝子のライブラリーを作製し、大腸菌 BL21(DE3) に導入した。形質転換菌を培養して IPTG で誘導し、菌体の可溶性画分を回収した。576 クローンについて 80℃15 分間の熱処理後に RBB-xylan を用いてキシラナーゼ活性を測定した。野生型の残存活性は 20%であったが、11 クローンがこれよりも高い残存活性を示し、そのうちの S92E と E324A はそれぞれ 60%および 50%であった。

ビタミン D 水酸化酵素 CYP105A1 とその変異体の精製と安定性の評価

J-a08

○滝田禎亮¹, 佐久間宙¹, 余語祐哉², 安田佳織², 生城真一², 根本翔¹, 榊利之², 保川清¹ (¹京大院・農, ²富山県大・工)

【目的】*Streptomyces griseolus* 由来 CYP105A1 の変異体 R73A/R84A は、ビタミン D3 (VD3) の 25 位と 1 α 位を水酸化し、活性型の 1 α ,25-ジヒドロキシビタミン D3 (1 α ,25(OH)₂VD3) を効率よく生成する。本酵素のビタミン D2 (VD2) の 1 α 位水酸化活性は 25 位に比べ低く、Met239 に変異を導入することで、高い 25(OH)VD2 → 1 α ,25(OH)₂VD2 活性を有する R73A/R84A/M239A (TriA) を得た。WT、TriA および関連変異体を精製し、その安定性を評価した。【方法・結果】WT、R84A、M239A、R73A/R84A、TriA を、Ni カラムを用いて精製し、還元型 CO 結合差スペクトルを測定した。WT、R84A、M239A はジクロフェナク、その他はロバスタチンを基質とした活性を指標に安定性を評価した。各酵素を種々の条件下で保存し、円偏光二色性 (CD) スペクトルやタンパク質蛍光の変化を測定した。結果は、TriA は WT にくらべて安定性が著しく低下し、その主原因が M239A 変異であることを示唆した。

J-a09 シトクロム *c'* ドメインスワップ 2 量体を用いた CO 依存的な多量体形成・解離
○山中優¹, 中山諒子¹, 長尾聡¹, 柴田直樹², 樋口芳樹², 廣田俊¹
(¹ 奈良先端大・物質, ² 兵庫県大院・生命理)

近年タンパク質超分子を人工的に構築する研究が盛んに行われているが、可逆的にサイズ制御できるタンパク質超分子の構築は未だ挑戦的な課題である。本研究では、CO 結合に応答して 2 量体→単量体 4 次構造変化する常温菌由来シトクロム *c'* (AVCP) を用い、サイズ制御可能なタンパク質超分子の構築を試みた。AVCP 2 量体をエタノール処理することで多量化し、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により AVCP 4 量体を精製した。X 線結晶解析から、4 量体は 1 つのドメインスワップ 2 量体 (DS2 量体) および 2 つの単量体サブユニットから成ることが示された。SEC 分析から 4 量体は CO 結合に伴い DS2 量体と単量体に解離し、DS2 量体は単量体非存在下で CO が解離すると高次多量体を形成することがわかった。DS2 量体から形成された高次多量体に再び CO を結合させると、DS2 量体に解離した。以上よりドメインスワップを利用した CO 依存的なタンパク質超分子の形成・解離制御に成功した。

J-a10 異なる CO 応答性を示す相同シトクロム *c'* の変異導入解析
○中山諒子¹, 山中優¹, 藤井創太郎², 越澤大典², 三本木至宏², 廣田俊¹
(¹ 奈良先端大・物質, ² 広島大院・生物圏)

常温菌由来シトクロム *c'* (AVCP) は 4 ヘリックスバンドル構造のサブユニットを有する *c* 型シトクロムであり、酸化型 AVCP はホモ 2 量体を形成する。AVCP のヘム鉄は 5 配位構造をとり、還元型ヘム鉄への CO 結合により AVCP は可逆的に 4 次構造変化 (単量体→2 量体) を示す。好熱菌由来シトクロム *c'* (PHCP) は AVCP とアミノ酸配列相溶性が高く、ホモ 2 量体を形成するが、CO 応答性 4 次構造変化を示さない。PHCP では、一方のサブユニットの F11、T18、F71 ともう一方のサブユニットの W21、T18、F71 との相互作用が 2 量体の構造安定化に寄与する。本研究では、PHCP の F11、T18、F71 を AVCP の相当する残基 T11、F18、D71 に置換した変異体を複数種作製し、CO 結合挙動を調べた。ゲルろ過クロマトグラフィー解析から、F11T/T18F/F71D 変異体は CO 結合により 2 量体から単量体へ解離することが示され、PHCP に特有な 2 量体界面相互作用が CO 応答性に影響していることが示唆された。

J-a11 protease 切断法を用いたシアノバクテリア重炭酸イオン輸送体の植物への導入
○清絢音, 上原晋, 稲葉靖子, 稲葉丈人 (宮崎大院・農)

【目的】多くの植物が分類される「C₃ 植物」は、固定した CO₂ の一部を放出する光呼吸を行うため、これが光合成効率を低下させている。一方、シアノバクテリアは無機炭素濃縮機構を持つため、ほとんど光呼吸を行わない。当研究室の先行研究により、シアノバクテリアの重炭酸イオン輸送体キメラタンパク質のシロイヌナズナ葉緑体への導入に成功した。そこで本研究では、野生型の重炭酸イオン輸送体を葉緑体内で機能させるために、キメラタンパク質から葉緑体内で重炭酸イオン輸送体を分離する系の植物への導入を試みた。

【方法・結果】重炭酸イオン輸送体キメラタンパク質に TEV プロテアーゼ切断部位を挿入したタンパク質と葉緑体移行シグナルを持つ TEV プロテアーゼを、シロイヌナズナで共発現させた。その結果、導入した植物において、切断前のタンパク質より低分子量のタンパク質が検出された。このことから、TEV プロテアーゼとの共発現により、重炭酸イオン輸送体キメラタンパク質が葉緑体内で切断できることが明らかになった。

J-p01 Ca^{2+} 非依存性 C 型レクチン SPL の糖結合能と組換え体発現
○畠山智充, 樋口周平, 板倉周平, 郷田秀一郎, 海野英昭 (長崎大院・工)

【目的】二枚貝の一種であるウチムラサキ (*Saxidomus purpuratus*) から単離された SPL (32 kDa) は、2つのサブユニットから成る GlcNAc 及び GalNAc 特異的レクチンである。両サブユニットは立体構造上 C 型レクチンドメイン構造をとることがこれまでに明らかになっているが、通常の C 型レクチンとは異なり、 Ca^{2+} 非存在下でも糖と結合する性質を示す。今回、SPL の糖結合活性についてさらに詳細に検討するとともに、組換え体の発現を試みた。

【方法・結果】SPL には A-鎖と B-鎖から成るヘテロ二量体 (SPL-a) 及び B-鎖のみのホモ二量体 (SPL-b) が存在するが、等温滴定カロリーメトリー (ITC) による測定で、SPL-a より SPL-b の糖結合能が強く、 Ca^{2+} 依存性も低いことが明らかになった。一方、大腸菌を用いて両サブユニットの組換え体を発現したところ、不溶性画分より目的タンパク質が得られたことから、リフォールディングによって可溶化し、糖結合能を示す可溶性タンパク質を得ることができた。

J-p02 *Penicillium chrysogenum* 由来新規エキソ-ラムノガラクトンリアーゼの X 線結晶構造解析
○國重由花¹, 岩井真凜¹, 中澤昌美¹, 上田光宏¹, 多田俊治², 西村重徳¹, 阪本龍司¹ (¹ 阪府大院・生命環境, ² 阪府大院・理)

【目的】ペクチン中のラムノガラクトン (RG) 領域はラムノースとガラクトン酸の二糖繰返し構造を主鎖に持ち、種々の中性糖側鎖が結合する。我々が単離したエキソ RG リアーゼ (PcRGLX) は側鎖バイパス活性を有する主鎖分解酵素であり、新規 PL ファミリーに属する。本研究では PcRGLX の触媒機構解明を目的に結晶構造解析を行った。

【方法・結果】PcRGLX は大腸菌発現系により調製した。酢酸 Na を沈殿剤として用いて結晶化を行い、得られた結晶の回折データを解析することで、PcRGLX の野生型と生成物および基質複合体の立体構造を決定することに成功した。決定された構造から、側鎖バイパス活性の要因を明らかにし、さらに本酵素は基質の還元末端側から二糖単位で生成物を遊離させることが示唆された。また変異体の活性測定を行うことで本酵素の触媒機構を推測した。

J-p03 リグノセルロース系バイオマスからの D-乳酸生産技術の開発
○岡野憲司¹, 濱真司², 野田秀夫², 近藤昭彦³, 本田孝祐¹
(¹ 阪大院・工, ² Bio-energy, ³ 神大院・科イノ)

【目的】乳酸菌は乳酸と酢酸を等モルで生産するヘテロ発酵経路によりペントースを資化する。本研究ではペントースからのホモ乳酸生産技術を開発し、リグノセルロースよりバイオプラスチックであるポリ乳酸の耐熱化に重要な D-乳酸を生産することを目的とした。

【方法・結果】アラビノース資化性の D-乳酸生産株 *Lactobacillus plantarum* ΔldhL1 株において、ヘテロ乳酸発酵経路の初発反応を担うホスホケトラーゼ遺伝子をトランスアルドラーゼ遺伝子で置換することで、ホモ乳酸発酵経路 (ペントースリン酸経路) の導入を行った。更にキシロースイソメラーゼおよびキシロキナーゼ遺伝子を導入することでキシロースの資化性の賦与を行った。得られた組換え株はアラビノースやキシロースから D-乳酸のみを生産し、グルコースとの同時利用も可能であった。本株を用いて 150 g/L の広葉樹パルプからの同時糖化発酵を行った結果、102 g/L の D-乳酸を生産することに成功した。

J-p04 細胞-ECM 間接着領域の細胞膜は脂質ラフト様の脂質組成を有する
○箕浦広大¹, 市川尚文¹, 木村泰久¹, 植田和光^{1,2}, 木岡紀幸¹
(¹京大院・応用生命, ²京大・iCeMS)

【目的】近年、細胞外マトリクス (ECM) の種類や硬さといった性質により細胞機能が調節されることが分かってきている。細胞は接着斑を介して ECM に接着し、その性質を感知する。接着斑細胞膜の脂質については詳しいことがほぼ分かっておらず、過去の報告から我々は接着斑細胞膜が脂質ラフト様の脂質組成を有すると仮説を立て、これを検証した。

【方法・結果】水流による接着斑細胞膜 (FA 画分) と底面細胞膜 (PM 画分) の単離手法および酵素蛍光法を用いた脂質定量によって、脂質ラフト構成脂質であるコレステロール (Chol) およびスフィンゴミエリンの含有率が FA 画分で高いことが分かった。また、Chol 豊富な細胞膜の特異的プローブである EGFP-D4 を用いて脂質を可視化したところ、EGFP-D4 で染色される膜ドメインが接着斑領域に存在することを見出した。本研究は接着斑の細胞膜が脂質ラフト様の脂質組成を有することを示した初めての報告である。

J-p05 培養マウス神経幹細胞/前駆細胞における亜鉛調節機構の解析
郷司明里, 西川麻裕, ○森英樹, 原正之 (阪府大院・理)

【目的】亜鉛は必須微量元素元素であり、生体維持に重要な役割を果たしている。神経幹細胞/前駆細胞 (NSPC) においても同様であるが、その亜鉛の細胞内調節機構については知られていない点が多い。そこで、本研究では培養したマウス NSPC における細胞内亜鉛濃度の変化や、分化誘導前後における亜鉛トランスポーターの発現変化を解析した。

【方法・結果】実験には EGF、b-FGF、B-27 含有 DMEM/F12 培地で培養した NSPC を用いた。亜鉛不含 DMEM/F12 培地を調製し、1.5 μ M 塩化亜鉛の添加有無による細胞培養 1 週間の細胞増殖変化を測定した。亜鉛添加により細胞の増殖速度はやや高くなり、細胞内亜鉛濃度の増加も観察された。NSPC と分化細胞に塩化亜鉛を添加し 24 時間培養後、亜鉛トランスポーター遺伝子発現量を定量的 RT-PCR 法で測定した。Zip4、Zip8、Zip12 の発現が細胞分化に伴い大きく変化した。亜鉛濃度の違いでは大きく変化しなかった。亜鉛の至適濃度や亜鉛トランスポーターの種類が細胞分化により変化することが示唆された。

D-プシコースと D-アロースの連続生産システムの構築

J-p06

○後藤成暁¹, 野崎智帆¹, 森本兼司²

(¹ 香川大院・農, ² 国際希少糖教育研究機構)

【目的】当研究室が保有している *Shinella* sp. NN6 株は D-プシコース 3-エピメラーゼと L-ラムノースイソメラーゼを同時に発現することから、D-フルクトース (Fru) 基質で反応させると希少糖 D-プシコース (Psi) と D-アロース (All) を同時に生産することができる。今回は、本酵素とボロン酸ゲルを用いて連続生産システムの構築を目指した。

【方法・結果】NN6 株を L-ラムノースを単一炭素源とする酵母エキス培地にて培養し、超音波処理により粗酵素を抽出し、塩化マンガン処理、熱処理、ポリエチレングリコール#6000 分画により両酵素を部分精製した。その後、陰イオン交換樹脂に固定化させ Fru 基質で反応させ、Psi と All を生産した。反応後の糖液をボロン酸ゲルカラムクロマトグラフィーで分離し、得られた Fru 画分を元の基質濃度に調製し再度反応させた。現在、この手順を繰り返して、連続的に Psi と All が生産されるかを検討中である。

プロスタグランジン代謝物のプロスタグランジン受容体への作用解析

J-p07

○黒木勝久¹, 榊原陽一², Ming-Cheh Liu², 水光正仁¹

(¹ 宮崎大・農, ² トレド大・薬)

【目的】生理活性脂質プロスタグランジン D₂ (PGD₂) は、非酵素的に 15d-PGJ₂ へと代謝され、さらなる代謝反応 (グルタチオン化と硫酸化) を受ける。15d-PGJ₂ は、抗炎症・抗腫瘍活性をもつため、代謝によるプロスタグランジンの機能制御機構は生理的に重要な反応であるが、これらの代謝産物のプロスタグランジン受容体への作用は、よくわかっていない。そこで、本研究では、PGD₂ 代謝がおよぼす受容体活性化への影響を検討した。

【方法・結果】15d-PGJ₂ グルタチオン体と硫酸体は、酵素的に調製後、固相抽出および HPLC により精製した。プロスタノイド受容体を一過性に発現させた培養細胞に 15d-PGJ₂ と調製したグルタチオン体または硫酸体を処理し、それぞれのアゴニスト・アンタゴニスト活性を評価した。解析の結果、PGD₂ の異なる 3 つの代謝産物は互いに異なるプロスタグランジン受容体作用機構をもつことが明らかとなった。

組換え葉酸合成酵素を用いた紙基板サルファ剤発光センサーの開発

J-p08

○氏家和紀¹, 松浦秀幸¹, Tran Thi My Duyen², 原田和生¹, 平田収正¹

(¹ 阪大院・薬, ² カントー大)

近年、発展途上国を中心に、サルファ剤の不適切な使用と、それに伴う残留サルファ剤による薬剤耐性菌の発生が問題となっている。そのため、各種資源に乏しい国や地域に適合したサルファ剤モニタリング手法の開発が求められている。本研究では、安価かつ簡便にサルファ剤を検出するための紙基板バイオセンサーを、複数の酵素反応を紙に埋め込み凍結乾燥することで作製した。具体的には、サルファ剤の作用点である葉酸合成酵素の一種 DHPS の触媒作用によりサルファ剤依存的に放出される無機ピロリン酸を ATP に変換し、続いて ATP 依存的なルシフェラーゼ発光反応が進行する酵素反応システムを、安価で生産・廃棄・運搬が容易な紙に埋め込むことで、センサーを構築した。本センサーにより、プレートリーダー等の高価な機器を使用せず、市販のデジタルカメラを用いて、少なくとも 10 種類程度の 50 ng/mL サルファ剤溶液を検出できた。また、本紙基板センサーは 4℃ で少なくとも 1 か月間、性能を保持した状態で保存できた。

【目的】きのこなどの木材腐朽菌は木質材料に含まれる天然の多環式芳香族ポリマーであるリグニンを分解する。自然界で最も分解されにくい高分子化合物であるリグニンを分解する木材腐朽菌の能力とその機構を応用し、人工のポリマー材料の分解と資源リサイクルに役立てる方法を探ることを本研究の目的としている。【方法・結果】本研究では鳥取県東部で採取し、多孢子分離にて分離した食用にもされている白色腐朽、褐色腐朽菌 10 菌株について市販の加硫天然ゴムシートの分解を検討したところ、いくつかの白色腐朽菌は加硫天然ゴムを分解することが明らかとなった。菌処理により顕著な重量減少が見られたゴムシート表面の損傷はそれほど大きくなかったが、物性は大きく変化し、引張強度の低下が見られた。このことは材料内部の化学結合や物理的構造に大きな変化を起こしたことを示唆している。著者がこれまでに報告した海外の木材腐朽菌による分解よりも、鳥取県東部で分離された菌のほうがはるかに分解力が強く、国内で分離された菌による加硫ゴムの分解が初めて認められた。現在、この分解がどのように引き起こされているのかについて分析を行っている。

哺乳動物細胞を用いたゲノムプロファイリング法による変異原アッセイ法の検討

○馬場美聡¹, Parmila Kumari², Sunita Ghimire Gautam², 月足元希¹,
松岡浩司², 西垣功一^{2,3}, 保川清¹
(¹京大院・農, ²埼大院・理工, ³北陸先端大)

【目的】ゲノムプロファイリング法による変異原アッセイ（GPMA）法は、化学物質存在下で大腸菌を培養し、ゲノム DNA に生じた変異を、PCR 増幅産物の DNA 融解温度の変化に基づく温度勾配ゲル電気泳動（TGGE）のパターンの変化から検出する方法である¹⁾。本研究では、大腸菌の代わりにマウス NIH 3T3 細胞を用いた GPMA 法を検討した。

【方法・結果】Ames テストで変異原性が検出される化学物質（ベンゼン、硫酸ジエチル、抱水クロラール、酸化プロピレン）あるいは検出されない化学物質（無水酢酸、メタンスルホン酸）100 ppb 存在下で細胞を 4 世代培養し、ゲノム DNA を抽出し、PCR を行い、増幅産物を TGGE に供した。化学物質添加による TGGE の特徴点の変化を求めたところ、大腸菌を用いた場合とよく相関した。このことから、GPMA 法に任意の哺乳動物細胞が使用可能であると示唆された。1) Futakami *et al.* (2007) *J. Biochem.* **141**, 675-686

農薬のパッシブサンプラーのサンプリングレートに及ぼす水温の影響

○矢吹芳教^{1,2}, 谷森紳治² (¹大阪府環農水総研, ²阪府大院・生命環境)

【目的】パッシブサンプラーを用いた農薬モニタリング法（PS 法）では、水中の農薬を樹脂からなる受容相に吸着・濃縮し、その吸着量から浸漬期間中の平均濃度の算出するため、キャリブレーション実験により見かけ上の吸着速度定数（サンプリングレート； R_s ）をあらかじめ求めておく必要がある。化学物質の樹脂への吸着量は水温に依存するため、 R_s と水温との関係について解析した。

【方法・結果】パッシブサンプラーとして polar organic chemical integrated sampler (POCIS) を用いた。1 L のビーカーに POCIS と農薬混合標準溶液を入れ、0.5 $\mu\text{g/L}$ となるよう調製した。18, 24 および 30 $^{\circ}\text{C}$ に設定した恒温槽内で暗所にて 100 rpm で振とうした。試験溶液は毎日交換し、POCIS を 7, 14, 21 および 28 日後に回収し吸着された農薬量を測定した。 R_s は $R_s = M/(C \cdot t)$ により算出した。ここで、 M は POCIS の農薬吸着量、 C は農薬濃度、 t は浸漬時間である。プレチラクロールの 18, 24 および 30 $^{\circ}\text{C}$ の R_s は、それぞれ 0.171, 0.188 および 0.233 L/day であった。このように、水温上昇に従い約 90 % の農薬の R_s が上昇した。

2017 年度合同大阪大会開催支援企業・団体（50 音順）

日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会の開催にあたり、以下の企業・団体からご援助を賜りました。ここに篤く御礼申し上げます。

< 協賛 >

植田製油株式会社
株式会社ウォーターエージェンシー
株式会社南出理化商会
神戸天然物化学株式会社
辰馬本家酒造株式会社
ハウスウェルネスフーズ株式会社
不二製油グループ本社株式会社

公益社団法人堺観光コンベンション協会
日本化学会中国四国支部

< 飲料等 >

アサヒグループホールディングス株式会社
江崎グリコ株式会社
株式会社ユーグレナ
キリン株式会社
サントリーウェルネス株式会社
ハウスウェルネスフーズ株式会社

< 懇親会 >

灘五郷酒造組合
伏見酒造組合

< 広告 >

株式会社サンキ精機
株式会社島津製作所
株式会社ダイセル
株式会社日本医化器械製作所
サラヤ株式会社
タカラバイオ株式会社
長岡香料株式会社
和研薬株式会社

日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会実行委員会

実行委員長

片岡 道彦

総務

岡澤 敦司

シンポジウム

阪本 龍司

乾 博

谷森 紳治

炭谷 順一

山地 亮一

プログラム

山地 亮一

赤川 貢

石橋 宰

小川 拓水

炭谷 順一

谷 修治

原田 直樹

秋山 康紀

上田 光宏

甲斐 建次

園田 素啓

西村 重徳

藤枝 伸宇

会場

炭谷 順一

赤川 貢

園田 素啓

原田 直樹

甲斐 建次

谷 修治

藤枝 伸宇

日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部 2017 年度合同大阪大会講演要旨集

発行日：2017 年 9 月 21 日

発行人：日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部

2017 年度合同大阪大会実行委員会

〒599-8531 堺市中区学園町 1-1

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

印 刷：株式会社カンプリ
