

農芸化学奨励賞受賞講演
農芸化学研究企画賞受賞講演

講演要旨

植物香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構に関する研究

肥塚崇男（山口大院・創科）

現存の生物種は進化上極めてわずかな成功例であり、植物はさまざまな外的環境に適応するため、情報化学物質や自己防衛物質として機能する「香気成分」を生産する能力を獲得、進化させてきた。しかし、植物がいつ頃から、どのようにして多様な香気成分を生成するようになったのかを明らかにした事例は数少ない。演者は、ほぼすべての種子植物が生産する「脂肪族香気成分」ならびに構造多様性の高い「芳香族香気成分」を研究対象として、化学構造を規定する生合成酵素の機能解析に取組み、脂肪族、芳香族香気成分の生合成酵素の機能進化と反応制御機構の全容解明を目指して研究を行ってきた。本講演では一連の研究のうち、短鎖アルデヒドおよび揮発性フェニルプロパノイド類の生成に関わる鍵酵素について紹介させていただく。

膜脂質から酸化的に代謝されて生成される脂肪族化合物は、動物細胞では炎症や免疫を制御し、植物では生体防御応答や生育制御を駆動する脂質メディエーターとして知られている。その中でも、炭素数 6 の短鎖アルデヒドは、「みどりの香り」と呼ばれ、植物界に広く分布している。短鎖アルデヒドは、脂肪酸がリポキシゲナーゼ（LOX）で酸素添加され、脂肪酸ヒドロペルオキシドとなり、このヒドロペルオキシドがシトクロム P450（CYP74）ファミリーに属する脂肪酸ヒドロペルオキシドリナーゼ（HPL）により開裂することで生合成される。このような生合成系を植物が進化の過程でいつ獲得したのか定かではなかった。演者は、*in silico* によるゲノム解析ならびに酵素活性に基づく生化学的解析から、LOX がラン藻を含めた藻類にも存在することを世界で初めて証明した。一方、車軸藻類のクレブソルミディウムや苔類のゼニゴケで HPL ホモログが見つかるものの、短鎖アルデヒド生成活性はなく、その HPL ホモログは植物ホルモンのジャスモン酸前駆体生成能を示すことを明らかにした。蘚類ヒメツリガネゴケでの HPL 活性の報告と合わせると、生物進化の過程で植物は最初にジャスモン酸を生成する能力を獲得し、陸上進出した後、蘚類以降に、植食性昆虫などへの適応として、短鎖アルデヒドを作り出すために CYP74 ファミリーの酵素機能、代謝系を進化させたことが考えられた。

芳香族香気成分として知られる揮発性フェニルプロパノイド類は、ベンゼン環（C6）に直鎖状プロペン（C3）が結合した C6-C3 を基本骨格とし、C3 側鎖の立体構造、ベンゼン環（C6）構造に多様性が見られる。しかしながら、その生合成経路はいくつかの中間体の構造を除いて未解明であった。そこで、香気成分が器官特異的に生合成、蓄積されるという特徴に着目し、バジルのトライコームおよびペチュニア花卉から EST データベースを構築し、揮発性フェニルプロパノイド類のアリル型、イソ型骨格の形成を制御するオイゲノール/イソオイゲノール合成酵素（EGS/IGS）を単離することに成功した。さらに、基質類縁体を用いた X 線結晶構造解析による構造生物学的アプローチから酵素活性中心を明らかにし、キノンメチド中間体を介する反応機構を実証した。この発見を皮切りに、さまざまな植物種から本酵素遺伝子を同定し、わずかなアミノ酸残基によって活性中心における基質のポジショニングが変わり、生成物特異性が決定されることを明らかにした。

植物香気成分は、生物間相互作用のシグナル物質としての生態学的機能を果たしているほか、医療分野や食品フレーバーとしての利用が期待されている。今後は植物のもつ代謝力を最大限に活用した物質生産を目指し、香気成分の研究を進めることで、基礎から応用につながる農芸化学研究の発展に貢献していきたい。

“ホモキラルポリ- γ -グルタミン酸” 生合成装置の分子解析と微生物工学利用

芦内 誠（高知大・農林海洋）

微生物は肉眼では見ることのできない微小な生物であるが、地球上のほとんどあらゆる環境に生息し、地球環境や私たちの生活と密接な関わりをもっている。熱水が噴出する海底の高温環境、極地等の低温環境、深海のような高圧／超貧栄養環境、塩湖のような高塩環境等、極限的な環境にも微生物は適応している。地球外生命探索のモデルにもなりそうな、いわゆる極限環境微生物の適応戦略を深く理解し、新たな産業応用にまで繋げることへの期待は大きい。

最近、環境適応因子¹⁻⁴⁾としての“ポリ- γ -グルタミン酸 (PGA)”に注目が集まっている。PGA は納豆の糸の主成分として知られるが、納豆菌の他にも PGA を作る微生物は存在し、その多くが極限環境微生物という事実は注目に値する。一方、立体化学分析からは納豆 PGA とは異なる点が指摘された。“ホモキラル PGA”と呼ばれる類縁高分子であることが分かってきた。この発見で、納豆 PGA で浮き彫りになった致命的な欠点にも解決の糸口が見えてきた。まずは“立体規則性”強化の戦略である。納豆 PGA はグルタミン酸 (Glu) の両光学異性体が γ アミド結合（タンパク質やポリ α グルタミン酸との明確な相違点；高分子機能に大きな影響を与える主鎖はナイロン様）でランダムに連なるため、キラル高分子材料としての性能低下を招いていることが指摘されていた。

もう一つは、納豆 PGA 合成に D-Glu が大量消費される問題である。D-Glu は真正細菌群（大腸菌等）の正常な生育／生存に必須であることから、納豆菌 PGA 合成装置“PGS 複合体”の単純な強制誘導は D-Glu の内部枯渇を招き、実際、生育不全を引き起こす⁵⁾だけで PGA の増産には繋がらない。最新知見だが、納豆菌類縁種のゲノム縮小株を利用して代謝設計工学で達成された増産率は、野生株の 1.3 倍程度に止まった⁶⁾。結局は D-Glu の外部からの補充が求められるのだが、今度は D-アミノ酸の毒性が問題になってくる。他方、微生物には D-アミノ酸の流入を防ぐ能力もある。実際、納豆菌 D-Glu 要求変異株⁵⁾の場合、5%にも達する高濃度の D-Glu を培地に加えなければ（受動拡散レベル）、生存要求量さえ満たさないことが示された。我々は、以後、研究の軸足を“極限環境微生物が作り出すホモキラル PGA”に移すことになる。

我々が注目したのは、超好塩アーキア *Natrialba aegyptiaca* が生産するホモ L 型 PGA である。このタイプならば、立体規則性の問題も遺伝子導入株の生育不全の問題も解消できる。ただし、肝心の遺伝子情報が欠落していたのが問題であった。そこで、標的遺伝子の同定研究に着手し、陽性クローン 2 株を得た。両株に共通して存在する 2 つの ORF を“ORF1/ORF2”と呼ぶ。実際、ORF1 の上流域にプロモータ推定配列が存在するとともに、両 ORF の一部がオーバーラップするポリシストロニックな遺伝子構成を持つことが分かったためである。納豆菌をはじめとする細菌の PGA 合成オペロンが少なくとも 4 つの構造遺伝子で構成されていることを考えると、著しく単純化されたバイオシステムといえる。遺伝子発現レベルで ORF1 の支配を受けると予想される ORF2 は、細菌ペプチドグリカン合成に係る酵素種と部分的な構造類似性を持つが、ペプチドグリカンを持たない超好塩アーキアになぜこのような遺伝子が存在するのか興味深いところである。さらに最近になって、同アーキアには遺伝子構成の似たアイソオペロンまで存在することを見いだした。現在、これらの構造遺伝子を保持する一連の大腸菌発現ベクター群を完成させ、ホモキラル PGA 等のエクストリモライト（環境適応因子）合成にどのように関与しているかを解き明かすための遺伝子機能分析に利用している。

引用文献：1) *Eur. J. Biochem.* **249** (1997) 905; 2) *J. Bacteriol.* **181** (1999) 6600; 3) *Environ. Technol.* **31** (2013) 1129; 4) *Biopolymers* **7** (2002) 123 [Wiley-VCH, Weinheim, Germany]; 5) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **362** (2007) 646; 6) 日本農芸化学会大会 2016 年度大会講演要旨集 2F20.

シ　ン　ポ　ジ　ウ　ム

講　演　要　旨

シンポジウム講演

ウシ初乳タンパク質を用いたマクロファージ作用剤の開発と 自己免疫疾患に対する臨床応用

宇都義浩（徳島大院・生物資源）

現在、第4の癌治療法として免疫療法が大変注目されている。免疫療法は主にTリンパ球やNK細胞、樹状細胞といった免疫細胞を活性化させる細胞療法と、抗原提示能を有するがんペプチドやアジュバントを投与する薬物療法に大別される。一方、我々は、自然免疫の主要なプレーヤーであるマクロファージに着目し、血清糖タンパク質でアルブミンスーパーファミリーの1種であるGc protein（別名：ビタミンD結合タンパク質）が生体内で糖鎖修飾されて生成するマクロファージ活性化因子GcMAFについて長年研究してきた。これまでに、GcMAFの糖鎖構造とマクロファージ食食活性化能、スーパーオキシド産生能、血管新生阻害作用、抗腫瘍活性との関係を明らかにしてきたが^{1, 2)}、GcMAFは血清糖タンパク質であるため医薬品としての開発には多くの技術的課題があり、臨床応用は極めて限定的であった。

そこで我々は、患者のヒト血清から直接GcMAFを調製して投与する治療法を考案し、GcMAF含有ヒト血清（血清MAF）がGcMAFと同様にマクロファージ食食活性化能および*in vivo*抗腫瘍活性を有することを明らかにした³⁾。また、血清MAFを用いて1500症例を越える癌治療の実績を挙げてきた⁴⁾。

一方、腸管免疫系は最も大きな免疫系で免疫系全体の約60%の細胞や抗体から構成されており、経口摂取された食物や病原菌に対する免疫反応を担っていることが知られている。そこで、抗体や成長因子などの血清タンパク質を豊富に含有することが知られている初乳（ウシ）を用いて、経口摂取が可能なマクロファージ活性化剤（初乳MAF）を開発し、初乳MAFが腸管マクロファージの食食能を活性化し、高い*in vivo*抗腫瘍活性を有することを明らかにした⁵⁾。現在、種々の自己免疫疾患に対して初乳MAFの臨床研究を実施中である⁶⁾。

よって本講演では、GcMAF・血清MAF・初乳MAFそれぞれの基礎および臨床に関する研究成果について概説したい。

References

- 1) Nagasawa, H. Uto, Y. *et al.*, *Anticancer Res.*, **25**, 3689-3695 (2005).
- 2) Nonaka, K. *et al.*, *J. Surg. Res.*, **172**, 116-122 (2012).
- 3) Kuchiike, D. Uto, Y. *et al.*, *Anticancer Res.*, **33**, 2881-2885 (2013).
- 4) Inui, T. *et al.*, *Anticancer Res.*, **33**, 2917-2919 (2013).
- 5) Uto, Y. *et al.*, *Anticancer Res.*, **35**, 4487-4492 (2015).
- 6) Inui, T. *et al.*, *Anticancer Res.*, **35**, 4545-4549 (2015).

フラボノイド配糖体代謝物の生体防御賦活作用

中村宜督（岡山大院・環境生命）

ケルセチンは、植物界において最もユビキタスに分布しているフラボノイドであるが、近年抗肥満や血糖値調節などの健康に関する機能性に注目が集まり、市場において最も期待されている食品成分のひとつである。ケルセチンは、我々の主要な摂取源である野菜や果物において主に配糖体として存在しており、調理過程でも糖部分の加水分解はほとんど進行しない。従って、食品に由来するケルセチンの機能性を評価する場合、ケルセチン配糖体の吸収代謝を考慮する必要がある。例えば、天然に遍在するケルセチン-3-グルコシドは、一部が小腸上皮細胞に局在しているナトリウム依存性グルコーストランスポーターを介して、或いは乳酸脱水素酵素による加水分解でアグリコンに変換された後、受動的に輸送される経路で吸収されると考えられている。しかし、タマネギに含まれるケルセチン-4'-グルコシド (Q4'G) やルチン (ケルセチン-3-ルチノシド) は小腸でほとんど吸収されず、多くはそのまま大腸に達し、大腸の腸内細菌叢により様々なフェノール酸異化物へと変換される。これまでに、3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), 3-hydroxyphenylacetic acid (OPAC), protocatechuic acid (PCA), 馬尿酸 (HPA) が、Q4'G の主要なフェノール酸異化物として同定されている。これらフェノール酸異化物は主要臓器での蓄積が報告されているだけでなく、一部の代謝物についてはヒトにおいても検出されているが、これらの潜在的な機能性については未だ不明な点が多い。このような背景から、我々の研究グループはケルセチン配糖体が与える生体への影響を分子レベルで理解することを目標として、生体防御賦活作用を有するケルセチン配糖体代謝物の探索と、その作用分子機構に関する研究を行ってきた。本講演では、これまでの研究成果を中心に、フェノール酸異化物の潜在能力を紹介したい。

我々はこれまでに、1) ケルセチン配糖体フェノール酸異化物のなかで、DOPAC と PCA が有意なラジカル消去作用を示すこと、2) マウス肝がん由来 Hepalclc7 細胞において、DOPAC のみが第2相薬物代謝酵素の遺伝子発現を有意に増強すること、3) DOPAC の24時間処理は過酸化水素が誘導する細胞毒性を完全に抑制することなどを明らかにしており、これらの結果はDOPACが経口摂取されたケルセチン配糖体の、特に生体内抗酸化作用という機能性を担う代謝物であることを示唆している。一方、DOPACの生理機能の一部はそのタンパク質修飾作用に起因するものと考えられることから、我々は“クリックケミストリー”プローブのDOPAC propargyl ester (DPE) を合成し、細胞内のDOPAC標的タンパク質の検出を試みている。これまでに、様々な分子量のDPE修飾タンパク質を観察するだけでなく、第2相薬物代謝酵素の遺伝子発現に関与するKeap1及び芳香族炭化水素受容体(AhR)とDPEの結合を確認している。以上の結果は、ケルセチン配糖体代謝物のワクチン的な利用が、生体内の抗酸化機能を高めるだけでなく、求電子性外来異物などの様々なストレスに対して抵抗性を賦与する可能性も期待させる。

【参考文献】

- 1) Tang, Y., *et al.*, *Food Res. Int.*, **89**, 716-723 (2016).
- 2) Nakashima, S., *et al.*, *Biochem. Biophys. Rep.*, **7**, 240-245 (2016).
- 3) Nakamura, Y. *Agri-Biosci. Monogr.*, **6**, 1-57 (2016).
- 4) Nakamura, Y., Miyoshi, N. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 242-255 (2010).

これからの地球社会が目指している持続的社会は、健やかな物質循環と、授受関係にある生物間の健全な相互作用が保たれている社会と言える。このような社会の実現に、地球上に広く存在し多様な働きを担う微生物が果たす役割はとても大きい。微生物は、単一種としても集団で、また、多数種が共存したコミュニティとして存在し機能を発現している。さらには、微生物間のみならず、植物、動物といった異種生物間のインターフェースにおける微生物の機能が、生態系における物質循環を駆動している。このような生態系における微生物機能の解析と応用（エコミメティクス）に関する取り組みを紹介する。

1) 作物生産における根圏微生物の科学

土壌での有機成分の無機化を担う複合微生物系を解析すべく、有機態窒素の硝化に必須な複合微生物系を水系にて構築する手法が確立されるとともに、この手法を活用した有機水耕栽培技術の開発、さらには人工土壌の開発が進んでいる。我々は、本系を用い、硝化機能を構成する微生物群の解析、モデル化、機能利用を試みた。高い硝化能を有するバーク堆肥を微生物源とし、水系に硝化微生物群を集積した。この集積過程における窒素化合物と微生物叢の動態を解析し比較することで、硝化におけるアンモニア生成、アンモニア酸化、亜硝酸酸化に機能する微生物種を特定した。その結果、硝化に有用な微生物群集が、一般的な従属栄養微生物と硝化細菌からなる単純な微生物群により再構成される可能性を示した。本微生物群を用いた種々の作物栽培を検討するとともに、適当な担体に固定化することで人工土壌作成に向けた基盤技術開発に取り組んでいる。また、従属栄養細菌としての *Bacillus badius* とアンモニア酸化細菌（AOB）、亜硝酸酸化細菌（NOB）の3菌種からなるモデル硝化微生物系を構築した。本モデル硝化微生物系が良好な硝化能を有することを示すと同時に、その硝化におけるアンモニア酸化、亜硝酸酸化過程において、難培養とされる AOB、NOB が特異的に増殖していることを確認した。

2) 健康増進における腸内細菌の科学

食品成分は、私たちの体内で様々な化合物へと変換され吸収される。この過程には私たち自身の代謝活性のみならず、腸内細菌による代謝が関わっている。したがって、腸内細菌による食品成分の代謝を把握し、代謝産物が与える影響を評価することは、健康維持にとって重要である。我々は、腸内細菌の一つであり食品産業にて広く利用されている乳酸菌を対象に、食品成分代謝の解明ならびに代謝産物の生理機能解析に取り組んでいる。本講演では、脂肪酸の腸内細菌代謝を取り上げる。食事脂質に由来する不飽和脂肪酸が、腸内細菌により飽和化される新規な代謝を見いだした。この飽和化代謝系の解析を通して、水酸化脂肪酸、オキシ脂肪酸、部分飽和脂肪酸、共役脂肪酸を代謝中間体として同定し、これらの脂肪酸の宿主組織における存在を確認した。これらの飽和化代謝中間体の生理機能を評価した結果、リノール酸由来の初期代謝産物である水酸化脂肪酸（HYA）がマウス腸細胞ならびに骨髄系樹状細胞を用いた *in vitro* 評価系において、炎症性サイトカインの産生を抑制することを見いだした。また、HYA が、リポ多糖が誘発する骨髄系樹状細胞の成熟化を抑制し、その際、抗酸化や解毒代謝を担う遺伝子群の転写を活性化することで細胞保護作用を示すことを見いだした。さらに、HYA が腸管上皮バリアの損傷を回復する機能を有することを見いだしたことから、HYA が腸管において抗炎症作用を示すことが期待された。一方、水酸化脂肪酸、オキシ脂肪酸が核内受容体 PPARs や LXR の制御を介して脂肪酸代謝を制御することを見いだした。また、共役エノン構造を有するオキシ脂肪酸中間体が、Nrf2 の活性化を介して抗酸化酵素の発現を促進することで、細胞の酸化ストレス防御を亢進させることを見いだした。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるアミノペプチダーゼの溶血機構の解析

島谷雅文, ○甲斐幹世, 阿座上弘行^{1,2}

(山口大・農,¹山口大院・創科,²山口大・微研セ)

【目的】歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* 1073 株は、羊血液寒天培地上で β 溶血を示す。我々は、細胞外被 (CE) 画分に溶血活性を確認し、CE 画分から溶血因子の精製を試みた。その結果、約 65 kDa のタンパク質が精製され、N 末端アミノ酸配列の解析から、X-プロリルアミノペプチダーゼと相同なタンパク質であることが示唆され、このタンパク質を HlyA と名付けた。本研究では、HlyA タンパク質が溶血因子であるかどうかを確認するため、大腸菌での組換えタンパク質生産と、欠損株の作成を行った。

【方法】*E. corrodens* 1073 のゲノム DNA から *hlyA* 遺伝子を増幅し、大腸菌発現ベクター pET22b につないだ。組換えプラスミドを *E. coli* BL21 (DE3) に導入し、IPTG により誘導発現させた。His タグ付きの発現タンパク質を Ni-カラムで精製後、溶血活性を調べた。また、*hlyA* 遺伝子の中央付近をカナマイシン耐性遺伝子に置き換えた断片を *E. corrodens* 1073 に導入し、相同的組換えを利用して *hlyA* 欠損株 ($\Delta hlyA$ 株) を作成し、溶血活性を調べた。遺伝子の欠損は PCR により確認した。

【結果】大腸菌内で約 65 kDa の可溶性タンパク質の発現が確認された。このタンパク質を精製し、兎赤血球に対する溶血活性を測定した。その結果、精製タンパク質の濃度に依存して溶血活性が見られた。さらに、*hlyA* 遺伝子欠損株 ($\Delta hlyA$ 株) では、溶血活性は見られなかった。これらの結果から、*hlyA* が溶血因子をコードしている可能性が示唆された。現在、溶血活性に X-プロリルアミノペプチダーゼ活性が必要かどうか、また、どのようなメカニズムで溶血を引き起こすのか調べている。

A-2 酵母に対する紫外線-A とフェルラ酸の併用殺菌力とその殺菌機構

○國見明加, 長宗秀明¹, 白井昭博¹

(徳島大院・先端技術,¹徳島大院・生物資源)

【目的】我々は紫外線-A (UV-A) の殺菌力向上を目的とし、食品添加物として利用されている天然物フェルラ酸 (FA) を併用した相乗殺菌について調べてきた。FA を併用した UV-A 殺菌は、食品媒介病原性細菌に対して、低濃度かつ低照射量で高い殺菌性能を示している。しかし、真菌に対する殺菌力は細菌と比較して低いため、その殺菌力を向上させる手法の構築を目指している。本研究では、酵母に対する UV-A と FA の併用殺菌特性及び殺菌機構について調べた。

【方法・結果】*Saccharomyces cerevisiae* NBRC1136 を試験酵母とし、光源には UV-A LED (365 nm, 4.77 mW/cm²) を使用した。併用殺菌力は、酵母懸濁液 (2×10^5 cells/ml) に FA (1000 mg/l) を添加後、光照射時間に対する残存生菌数を測定することにより評価した。細胞壁への FA の吸着、さらに取り込みによる併用殺菌力の変化を検討するため、酵母と FA の無照射接触時間による殺菌力への影響を調べた。また、FA の細胞膜局在及び併用殺菌による呼吸活性への影響を調べるために、CTC Rapid Staining Kit (CTC, 同仁化学) を用いた呼吸活性を指標とした CTC 蛍光染色を行い、フローサイトメトリー (FC) で解析した。併用殺菌処理は、5 分間で 1.56-log, 10 分間で 3.01-log の生菌数を減少させた。無照射下での FA と酵母の接触は、接触時間に依存し併用殺菌力が上昇した。また FC 解析により、FA と酵母の接触及び併用殺菌処理において、CTC 生成の低下が確認された。以上の結果から、FA は細胞膜に取り込まれ、UV-A 照射により呼吸活性に伴う電子伝達系の活性阻害を引き起こしていることが示唆された。

A-3 分裂酵母 *S. pombe* におけるアミノ酸・ペプチド輸送体の発現制御 ○北村憲司（広島大・自然セ）

【目的】 自然環境など実験室外での酵母の生育では、アミノ酸やオリゴペプチドが重要な窒素源であり、細胞膜上の特異的な輸送体から取込まれる。輸送体の発現と機能は細胞内外の条件で厳密に調節され、発現制御機構が出芽酵母 *S. cerevisiae* で詳しく調べられているものの、制御因子が保存されておらず一般性がないなど、他の酵母での制御には不明点が多く残されている。本研究では、モデル生物として汎用される分裂酵母 *S. pombe* のアミノ酸、ペプチド輸送体の発現制御機構について調べた。

【方法・結果】 ペプチド輸送体 Ptr2 の発現は、出芽・分裂酵母のいずれの種でも Ubr ユビキチンリガーに依存する。Ubr 蛋白質が分解する標的は出芽酵母ではホメオドメイン蛋白質の Cup9 だが、分裂酵母の標的として *ptr2* 遺伝子の発現制御領域に結合して転写を抑制する HLH 型 DNA 結合蛋白質の Upa1 を同定した。出芽酵母には Upa1 相同蛋白質がない一方で、出芽酵母では細胞外アミノ酸を感知する Ssy1-Ptr3-Ssy5 複合体が Stp 転写因子を活性化して輸送体の発現を誘導するが、分裂酵母はいずれの相同蛋白質も有さない。貧栄養で発現が増加する輸送体の発現は、栄養状態と細胞内イベントを連携させる TOR 複合体の支配下にある GATA 型転写因子に依存したが、分裂酵母のペプチド輸送体 *ptr2* の発現における Gaf1 依存性は *upa1* 欠損でバイパスされた。輸送体の発現制御では、分裂・出芽酵母間で、共通因子と種特異的因子が混在しつつ使い分けられている様である。更に、ロイシンをはじめ複数の細胞外アミノ酸が利用できない分裂酵母の変異株を見つけたため、その原因について調べている。

A-4 インジゴ還元能の定量的評価法を用いたインジゴ還元菌の探索及び機能解析 ○清藤鈴奈，竹内道樹，久郷将見，四方田和哉¹，阪本鷹行¹，櫻谷英治¹， 小川 順（京大院・農，¹徳島大・生物資源）

【目的】 日本の伝統産業である藍染めは、タデアイ葉由来インジゴの微生物還元を利用して行われている。藍色成分である非水溶性色素のインジゴは、アルカリ条件下で微生物により水溶性のロイコインジゴへと還元され、布に吸着できるようになる。現在、インジゴ還元菌の単離に成功した報告¹⁾はあるが、インジゴ還元能を定量的に評価した報告はない。そこで本研究では、インジゴ還元能の定量法を確立し、これを用いたインジゴ還元菌の探索及び機能解析を目的とした。

【方法・結果】 藍染めの染色液や染料の素であるすくも、タデアイの乾燥葉などを菌の分離源とし、アルカリ・嫌気条件下で微生物の単離を行った。得られた微生物について、0.03%インジゴを含むアルカリ標準培地で3日間培養を行い、還元能を評価した。評価方法としては、遠沈後の培養液上清に溶けているロイコインジゴを空気に晒すことでインジゴへと酸化させ、600 nm における吸光度を測定することでインジゴ還元能を定量的に評価した。それにより得られたインジゴ還元能の高い菌株に対して16S rDNA解析を行い、それぞれの菌の同定を試みた。さらに、得られたインジゴ還元菌を用いて、インジゴ還元反応における還元力供給系やメディエーターの影響等の条件について検討を行った。

1) Aino K. et al., *FEMS Microbiol Ecol* **74**, 174-183. (2010)

A－5 乳酸菌におけるシニグリン代謝に関わる酵素系の解析

○渡邊寛子, 岸野重信, 宇佐美陸, 小佐田健吾, 青木雄大¹, 菅沼大行¹, 青木 航, 小川 順 (京大院・農, ¹カゴメ (株)・イノベーション本部)

【目的】 シニグリンはアブラナ科植物に含まれる辛味関連成分であり, *S*-グリコシド結合型配糖体の一種である。シニグリン自身は, 摂取後に特定の腸内細菌により硫黄及び窒素原子を含むアリルイソチオシアネート (AITC) へと分解される。AITC は, 抗炎症・抗ガン・抗酸化作用などの生理機能を有する化合物である一方, シニグリンはこれらの生理機能を示さない。このため, 腸内細菌によるシニグリンの代謝に注目が集まっているが, 詳細な代謝機構は未だ解明されていない。そこで本研究では, 乳酸菌におけるシニグリン代謝機構の解明を試みた。

【方法・結果】 乳酸菌を対象にスクリーニングを行い, 培養中にシニグリンを分解し, AITC を産生する活性を示した *Lactobacillus farciminis* KB1089 を選抜した。本菌におけるシニグリン分解活性は, 生育時においてグルコース枯渇後にシニグリンが存在することによって誘導されることが明らかとなった。そこで, 本活性に関わる酵素を特定するために, 比較定量プロテオーム解析により誘導菌体と非誘導菌体の発現タンパク質の差を評価した。誘導菌体に特異的に発現するタンパク質のうち, PTS sugar transporter, aryl-phospho- β -D-glucosidase の 2 種のタンパク質に着目し, 2 段階で進行するシニグリン代謝機構を予測した。両タンパク質について大腸菌及び乳酸菌を宿主とする形質転換体を作成し活性を評価したところ, どちらの宿主の 2 遺伝子共発現株においても, シニグリン分解及び AITC 産生を確認した。これにより, 着目した 2 つのタンパク質がシニグリン代謝に関与することを明らかにした。

A－6 *Shewanella violacea* genes expressed under acidic and neutral conditions

○Lisa Lisdiana, Sotaro Fujii, Mizuki Fukunaga, Yoshihiro Sambongi
(広島大院・生物圏)

Piezophilic and psychrophilic *Shewanella violacea* produces salt-tolerant enzymes, such as 5'-nucleotidase (NTase), which appear to be promising catalysts for industrial application. Microorganisms, in general, evolve adaptive strategies against variable pH conditions, exhibiting differed gene expression pattern. This study aimed at revealing the gene expression in *S. violacea* cells under acidic and neutral pH conditions in order to explore adaptive strategies of this bacterium. We first showed that the *S. violacea* cells could grow at pH 5.0 ~ 7.0, but not at pH 4.5. The *S. violacea* cells were then exposed with pH 5.0 and 7.0 conditions for 4 hours, and the gene expression patterns were compared by transcriptome analysis. Genes for acyl-CoA dehydrogenase and acetyl-CoA synthetase were upregulated at pH 5.0, both of which appeared to enhance propanoate production, leading to adaptive strategy against acidic pH. In contrast, gene for glutamate decarboxylase, which is known to alleviate acidic pH conditions in some of lactic acid bacteria, was downregulated at pH 5.0. Therefore, *S. violacea* survives against acidic pH through propanoate metabolism enzymes, not through glutamate decarboxylase. The gene expression of NTase was elevated six fold at pH 7.0 compared with at pH 5.0, thus this enzyme should be efficiently prepared from the cells growing at pH 7.0. The information obtained in this study provided us with appropriate pH conditions for the *S. violacea* growth for further enzyme production.

A-7 転写因子 Rst2 の高発現による細胞への影響

○竹中航平, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資科)

分裂酵母のプロテインキナーゼ A である Pka1 は、活性化時に核内に移行し、下流因子をリン酸化制御している。Pka1 の標的の 1 つである転写因子 Rst2 は、減数分裂への移行やグルコース制限下で下流因子の発現を制御している。これまでに網羅的な解析によって、Rst2 の高発現が、細胞生育に影響をおよぼすことが報告されているが、その詳細は解明されていない。そこで、本研究では *rst2* 遺伝子の高発現による細胞への影響および標的因子を単離することを目的とした。

nmt1 プロモーター下で、*rst2* 遺伝子を高発現させた形質転換体 (*nmt1-rst2*) を解析したところ、以前の報告どおり、明らかに生育が阻害されていた。次に、細胞形態を観察したところ、隔壁形成が増加した細胞と形態が丸くなったものがみられ、細胞形態の異常を示した。隔壁を形成した細胞の割合を解析したところ、vector 株では約 5% であったが、*nmt1-rst2* 株では、約 40% 以上と大幅に増加していた。また、*nmt1-rst2* 株では、マルチセプタムを形成している細胞が約 10% 観察された。丸い形態を解析したところ、形態形成に重要な微小管が湾曲していることが明らかになった。さらに、*nmt1-rst2* 株が若干ではあるが、塩化カリウムに対して、感受性を示した。*rst2* 高発現による生育阻害を抑圧する変異体を単離するために、EMS 処理によって変異を導入し、スクリーニングした結果、1 株単離した。今後、この株を次世代シーケンスによって変異を同定し、解析していく予定である。

A-8 海洋性細菌の有する緑藻由来硫酸化多糖ウルバン分解酵素の基質特異性に関する研究

○小林慎太郎, 大西浩平 (高知大・農林海洋)

【目的】日本各地に自生するアオサ属は種ごとに構造の異なる細胞内粘質硫酸化多糖ウルバンを生成する。我々はこれまでミナミアオサの生成するウルバンを分解する海洋細菌を探索し、ウルバン分解酵素の解析を行ってきた。異なるアオサ属の生成するウルバンの分解細菌は性質の異なるウルバン分解酵素を有することが予想される。そこで、本研究ではミナミアオノリウルバン分解酵素に着目しミナミアオサウルバン分解酵素との比較を行うことを目的とした。

【方法・結果】ミナミアオサおよびミナミアオノリの乾燥粉末を原料として熱水抽出によりウルバンを調製した。それぞれのウルバンを唯一の炭素源とする培地を用いて集積培養を行い、ウルバン分解細菌のスクリーニングを行った。その結果、ミナミアオサウルバン、ミナミアオノリウルバン分解細菌として KUL49 と KUL106 をそれぞれ単離した。分解細菌をウルバン含有培地で培養し、培養上清から菌体外タンパク質を調製した後、ウルバン分解活性のある酵素を陰イオン交換 Q カラムで粗精製した。ミナミアオノリ由来ウルバン分解細菌から粗精製された分解酵素はミナミアオサとミナミアオノリ両ウルバンに対してほぼ同等の活性を示したが、ミナミアオサ由来ウルバン分解細菌から粗精製された分解酵素はアオサウルバンにより特異的であることが確認された。現在、これらの粗酵素液からウルバン分解酵素の同定を行っているところである。

A－9 Negative chemotaxis to maleate in *Ralstonia solanacearum*
○Mattana Tunchai, Akiko Hida, Takahisa Tajima, Junichi Kato
(Grad. Sch. Adv. Sci. Matter, Hiroshima Univ.)

Ralstonia solanacearum, the causal agent of bacterial wilt disease, is regarded as one of the world's most destructive plant pathogenic bacteria. Previous studies found that chemotaxis is an essential trait for the early stage of host invasion and pathogenic fitness in *R. solanacearum*, so we have attempted to functionally characterize chemoreceptors, so called methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs), in this pathogen. Negative chemotaxis is the movement of cells away from certain chemicals. The results obtained from computer-assisted capillary assay method revealed that *R. solanacearum* strain Ps29 is drastically repelled by maleate. Like most of reported repellents, maleate is harmful to *R. solanacearum* Ps29 by reducing its growth rate. By screening of a complete collection of single-*mcp*-gene deletion mutant of Ps29, *McpP* was identified as a specific chemoreceptor mediating negative chemotaxis against maleate. Interestingly, the *mcpP*-deletion mutant exhibited attractive responses to maleate, indicating that this bacterium possesses MCPs for both positive and negative chemotaxis to maleate. *McpP*, besides, was found to sense and facilitate positive chemotactic response toward citrate and inorganic phosphate. To the best of our knowledge, this is the first report of negative chemotaxis in *R. solanacearum* species complex.

A－10 分裂酵母における抗がん剤 Fudr の新しい作用機構の発見
○上野 勝, 南結香子, Hossain M. Shamim (広島大院・先端物質)

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

【方法・結果】分裂酵母のテロメア維持因子 *pot1* を破壊するとテロメアが分解される。その後、染色体内で末端融合が起こった環状染色体を持った株が生き残る。本研究では、DNA ダメージチェックポイントの活性化に必要な *rad9* と *pot1* の二重変異株が Fudr (2'-deoxy-5-fluoro-uridine) 存在下において致死になることを発見した。Fudr は抗がん剤としてアメリカで使用されており、チミジンキナーゼの存在下で活性を発揮することがわかっているが、分裂酵母はチミジンキナーゼ遺伝子を持っていない。さらに我々は、Fudr が HU と同様に DNA 複製を阻害することを発見した。このことから、分裂酵母において、Fudr が新しい機構で生理活性を発揮することが示唆された。また、DNA ダメージチェックポイントが機能しない上に環状染色体を持った酵母は DNA 複製阻害剤に高い感受性を示すことがわかった。

B-1 超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT-3 のアミノ酸ラセマーゼホモログの酵素化学的解析

○川上竜巳¹, 藤原 拓¹, 金茂里沙¹, 辻奈々子¹

(徳島大院・生物資源,¹ 徳島大・総合科学)

【目的】これまでに、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii* OT-3 が D-アミノ酸を利用して積極的に増殖できること、D-アミノ酸代謝酵素である低基質特異性アミノ酸ラセマーゼ (BAR) が存在すること、培地への D-アミノ酸添加と BAR 発現量に相関があることなどを明らかにしている。さらに、BAR と高い相同性を示す、3 種類のラセマーゼホモログ (PH0782, PH1423, PH1501) が存在することも明らかにしており、現在その機能解析を進めている。この報告では、BAR と 45% の相同性を示す PH0782 の解析結果を中心に報告する。

【方法・結果】3 種類の BAR ホモログの発現系は pET11a を発現ベクターとして用いて構築し、大腸菌 BL21 (DE3) に導入して酵素を発現させた。粗酵素液を熱処理したサンプルを用いて各ホモログ酵素のアミノ酸ラセマーゼ活性を解析した結果、PH0782 からは Ala, Ser, Thr に対して高い活性を検出できた。PH1423 や PH1501 のアミノ酸ラセマーゼ活性は検出されないか、あっても低く、さらなる解析が必要であった。PH0782 の酵素化学的性質を明らかにするため、粗酵素液を熱処理した後、Butyl-Toyopearl と DEAE-Cellulofine により精製した。PH0782 は、pH 5-10 の範囲で 80℃2 時間熱処理しても安定で、pH 7 では 80℃6 時間処理しても全く失活しないことから、BAR と同様に温度や pH に対して高い安定性を示した。現在、各基質に対する反応速度論解析を行っており、その結果も合わせて報告する。

B-2 大腸菌を用いた低分子抗体の分泌生産系の構築

○高木大地, 浜垣秀平, 辻 明彦¹, 大森謙司², 湯浅恵造¹

(徳島大院・先端技術,¹ 徳島大院・生物資源,² 名古屋大院・創薬)

標的分子への特異的な作用により、副作用が少なく、優れた治療効果が期待できる抗体医薬品に注目が集まっている。その一方、抗体生産の宿主として CHO 細胞を用いるため、莫大なコストがかかり、高額となった薬剤費が問題となっている。宿主代替候補の 1 つとして大腸菌が挙げられるが、そのほとんどが菌体内での生産であり、コスト効率改善のため、分泌生産系の構築が望まれている。グラム陰性菌 *Serratia marcescens* には 2 つの I 型タンパク質分泌装置 (T1SS) [Lip system, Has system] が備わっており、選択的なタンパク質分泌を行っている。T1SS は ABC protein, MFP, OMP によって構成される単純な分泌装置であり、分泌タンパク質は N 末シグナルペプチドを持たず、C 末側領域が分泌に関わっている。これまでに我々は、Lip system (LipB-LipC-LipD) を利用して、大腸菌によって力価を有した一本鎖抗体 (scFv) が分泌されることを見出した。しかしながら、十分な分泌量が得られていないため、本研究では高効率分泌生産システムの構築に向けて、scFv 分泌の分子機構の解明を試みた。初めに ABC protein が基質認識に関わっていることから、LipB を除いた LipC-LipD によって scFv が分泌するかを調べた。予想に反して、LipC-LipD によって scFv が分泌し、さらに、LipC 単独で scFv の分泌が可能であることが判明した。LipC は何らかの大腸菌タンパク質と共役して scFv の分泌を行っていることが考えられたため、外膜チャネル TolC を欠損した大腸菌株を用いて LipC による scFv の分泌を調べたが、その分泌が認められ、TolC 以外の因子が関与する可能性が考えられた。現在、LipC と相互作用する大腸菌タンパク質を探索しており、併せて報告したい。

B-3 生体分子間相互作用の制御を志向した分割型 CutA1 の開発

○東 秀隆, 石田尚之¹, 今村維克¹, 今中洋行¹

(岡山大・工, ¹岡山大院・自然科学)

【目的】生体分子間相互作用は生命活動の厳密な制御に寄与する中心的な現象であるが、これを細胞内外で検出・利用する技術は、ライフサイエンス分野において、生命現象の解明のみならず、医療診断、創薬、環境分析など幅広い領域への応用に役立つ基盤となりうる。そこで本研究では新たな生体分子間相互作用精密制御技術の開発を目指し、超好熱菌由来タンパク質でホモ三量体の CutA1 をリガンドのモデル足場分子として用い、分割型 CutA1 開発のための分子デザインの可能性について調べた。

【方法・結果】CutA1 を N 末端領域と C 末端領域に分割し、末端に様々な荷電特性を有するペプチドを連結させた各種タンパク質の発現ベクターをそれぞれ構築した。発現ベクターを用いて大腸菌 BL21 (DE3) あるいは Rosetta2 (DE3) の形質転換を行った後、LB (+Amp) 培地中、IPTG で発現誘導後、カラム精製により各種タンパク質を調製した。そして、それぞれのタンパク質に関し、発現後の可溶性ならびに熱安定性について調べた。その結果、連結ペプチドの荷電特性が相反しない場合では、共発現させた分割型 CutA1 が熱処理後も可溶化を維持していた。すなわち、極めて高い構造安定性を有する CutA1 は、全長配列を分割し共発現させても、野生型三量体と同様に安定な折り畳み構造を素早く形成しうることがわかった。したがって、分子デザインを施した分割型 CutA1 を用いた固定化リガンドの高密度配向制御や精密分子認識素子の開発が可能であることが強く示唆された。

B-4 担子菌 *Flammulina velutipes* の液体培養条件において生産されるラッカーゼアイソザイムについて

○渡邊 彰, 名田悠矢, 麻田恭彦 (香川大・農)

【目的】ラッカーゼは、リグニン分解酵素として作用するだけでなく、環境汚染物質の分解、各種色素化合物の脱色、食品の機能性の向上、バイオ電池への活用など、非常に幅広い応用面を持つ。一方、担子菌は、このようなラッカーゼのアイソザイムを複数生産することが知られており、それらの生産は生育条件などにより巧みに制御されている。本研究では、担子菌 *Flammulina velutipes* (エノキタケ) の生産する複数のラッカーゼアイソザイムの中でも、調製やその生産制御に優れる液体培養系で生産されるアイソザイムに焦点を当て、その諸性質の解析を行った。

【方法および結果】木粉と米ぬかを成分とした固体培地および液体培地を用いて、固体培養、液体培養、そして再び固体培養の順に培養条件を移行させ *F. velutipes* の培養を行った。その後、各条件の培地中に生産されるラッカーゼアイソザイムを Native-PAGE および 2,2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) を基質とした活性染色に供した結果、固体培養で検出されず液体培養において検出される特徴的なアイソザイムを見出すことができた。引き続き、この液体培養条件で生産されるアイソザイムを硫酸分画および各種クロマトグラフィーを用いて精製し、解析を行った結果、本酵素は、分子量約 52,000 のモノマー酵素であった。また、本酵素は、30℃以下、pH 4.0 から 6.0 までの範囲で安定であり、ABTS の他、2,6-Dimethoxyphenol および Guaiacol を基質とした。さらに本発表では、本酵素活性に対する金属イオンや阻害剤の及ぼす影響についても併せて報告する。

B-5 エリンギ由来プロリルオリゴペプチダーゼの基質特異性に関わる2つのMet残基
○東海彰太, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹
(鳥取大院・連農,¹鳥取大・農,²鳥取大・産学)

【目的】エリンギ由来のプロリルオリゴペプチダーゼは、加水分解と拮抗してペプチド結合形成反応を触媒する。従って、本酵素の基質認識機構の解明は、様々な有用ペプチド合成ツールとしての応用に繋がる。一方で、本酵素は過酸化水素で酸化されると基質特異性が変化する。これまでに非触媒β-プロペラドメイン上のMet203の酸化が、特異性の変化に関わることを明らかにしたが、Met203以外のMet残基も過酸化水素で酸化されることが考えられ、それらの酸化と特異性変化との関係は不明である。そこで本研究では、本酵素のMet残基に焦点を当て、特異性に影響するMetの特定と機能解析を行った。

【方法及び結果】既に特定済みのMet203は、酸化やAla置換により、芳香族アミノ酸-pNAに対して厳格な特異性に変化する。本酵素は4つのMet残基を持つため、それらの構造置換を行い、特異性への影響を評価した。その結果、Met570をAlaに置換すると酸化と同様の特異性変化が観察された。Met203とMet570は、それぞれ非触媒β-プロペラドメインと触媒ドメインに存在するが、立体構造上、両残基は基質の通り道と考えられる通路を構成し、基質取り込みに重要な役割を持つと考えられた。そこで、570番目の側鎖の構造置換による特異性への影響を評価した結果、Glu, Gln, Phe, Lysのいずれの残基に置換しても、芳香族アミノ酸-pNA基質に対して活性が保持された。この結果から、570番目のMet側鎖構造が芳香族アミノ酸-pNA以外の基質認識に深く関わり、基質の通り道上の両Met残基による基質アミノ酸側鎖の認識が、本酵素の基質選択性の一部を担っていると考えられた。

B-6 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株由来アセチルコリンエステラーゼの応用に向けた諸性質検討
○井上 尚, 吉田知寛¹, 佐伯 将¹, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²鳥取大・産学)

【目的】アセチルコリンエステラーゼ (AChE) はアセチルコリンの加水分解を触媒し、動物や昆虫体内では神経伝達に寄与している。一方で微生物由来のAChEの存在もこれまでに報告されているが、その役割については知られておらず、利用に向けても発展途上の段階である。我々は *Pseudomonas aeruginosa* PAO1株の培養上清からAChE活性を持つ酵素を取得した。本酵素の単離は既に別の研究グループで報告されているが、本研究ではその利用に向け、大量生産系の構築と、諸性質の検討を行った。

【方法・結果】pET-24bベクターを利用して大腸菌による大量生産系を構築し、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製したAChEを使用して諸性質の検討を行った。本酵素はエステル化されたコリン系物質を強く基質として認識して加水分解を触媒することが明らかとなり、熱安定性は40℃、pH安定性は5~9、最適pHは8.0であった。残留農薬分析等への利用可能性を評価するため、AChE阻害剤である4種類の農薬による本酵素活性への影響を評価した結果、いずれの化合物においても強い阻害活性はみられなかった。一方で、本酵素は酢酸エチルに対する加水分解活性も保持しており、反応液に酢酸エチルとのエマルジョンを形成させてAChEを添加すると、早いエマルジョンの消失とエタノールの遊離が確認された。更には、酢酸エチルとの反応系にアルキルアミンを添加すると、アセチル化されたアルキルアミンが生成されたことから、本酵素は、化合物のアセチル化ツールとして利用できる可能性が見出された。

B－7 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 の結晶性キチン分解メカニズム解明に向けた菌体外タンパク質の網羅的な解析

○仁木大輔, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²鳥取大・産学)

【目的】キチンの加水分解物は様々な生理活性を持つため、幅広い分野への利用が期待されている。しかしキチンの化学的分解には、工程の複雑さや環境への負荷が問題として残されている。また、結晶性キチンを直接分解する酵素化学的な手法も未だに確立されていない。我々はこれまでに、カニ殻廃棄物の速やかな堆肥化を可能とする完熟コンポストから、結晶性キチンをダイレクトに分解できる *Cellulosimicrobium* 属細菌を単離・同定した。本研究では、結晶性キチンの酵素によるダイレクトな分解を目指し、本菌由来のキチン分解に関わる菌体外タンパク質を網羅的に解析した。

【方法及び結果】本菌の培養上清における SDS-PAGE 及びキチンザイモグラフィ解析により、キチンを培地に添加することで、複数（10 種程度）の菌体外に発現するタンパク質が確認された。N 末端アミノ酸配列を行った結果、これらの菌体外タンパク質のうち 5 種類を同定することができ、そのうち 4 種類はキチン分解酵素（30, 37, 40 及び 55 kDa）であり、もう一つは GlcNAc-binding protein（20 kDa）であることが明らかとなった。更には、本菌の全ゲノムを解析した結果、同定された菌体外タンパク質以外にも、本菌には 5 種類のキチン分解酵素と 1 種類の GlcNAc-binding protein の遺伝子の存在も明らかとなった。現在、これらのタンパク質の異種発現系の構築を行っており、酵素が得られ次第、結晶性キチンに対する分解活性を評価していく予定である。

B－8 アーキア由来機能未知 MutS ホモログ MutS5 の DNA 結合特異性解析
○大下紘貴, 福井健二¹, 佐藤瑞希, 森澤高至, 白米優一, 諸野祐樹²,
稲垣史生², 矢野貴人¹, 芦内 誠, 若松泰介
(高知大院・農,¹大阪医大・医,²JAMSTEC)

【目的】既知の MutS ファミリータンパク質はミスマッチ塩基対や Holliday junction 等を認識し、DNA ミスマッチ修復や組換え等で重要な役割を果たす。しかし、近年のゲノム解析技術の発展により多くの機能未知 MutS ホモログが原核生物、真核生物、巨大ウイルスに存在することが解り、特に、アーキアが持つ全ての MutS ホモログの生体機能は不明のままである。そこで、ユリアーキアに高度に保存され、Walker モチーフを含む ATPase ドメインのみを持つ MutS5 の生体機能に関する知見を得るため、超好熱性アーキア *Pyrococcus horikoshii* 由来 MutS5 (phMutS5) の DNA 結合特異性解析を中心とした機能解析を行った。

【方法・結果】pET-15b/phmutS5 で形質転換した大腸菌 Rosetta 2 (DE3) pLysS を培養し、N 末端 His₆ タグ付き phMutS5 を大量発現させ、熱処理と 2 本のカラムクロマトグラフィーにより高純度で精製した。精製標品を用いたゲルシフトアッセイによる DNA 結合特異性解析から、真正細菌由来 MutS2 や真核生物由来 MSH4/MSH5 と同様に、直鎖状 DNA やその他の分岐鎖 DNA よりも Holliday junction と非常に強く結合することが明らかとなった。しかし、真正細菌由来 MutS2 とは異なりヌクレアーゼ活性は検出されなかった。ATPase 活性は Ca²⁺ 依存的であり、DNA 存在下で非存在下と比べ活性が増加した。この時、直鎖状 DNA よりも Holliday junction で有意な活性増加が見られた。一方、Walker A モチーフ内の部位特異的変異体 K384A は野生型と比べ ATPase 活性が大きく減少した。これらの結果からアーキア由来 MutS5 は組換え時に働くタンパク質で、真核生物由来 MSH4/MSH5 の機能ホモログである可能性が示唆された。

C-1 タウリンによる肝機能改善作用の解析-リトコール酸誘発性肝障害の防御-
○船木萌浩, 杉浦義正, 宮田昌明 (水大校・食品科学)

【目的】タウリンはいか, たこ, はたてがい等の魚介類に多く含まれているアミノ酸類縁体の一種である。タウリンには多くの機能性があるとされ, 体内での濃度が低下すると様々な障害を誘起するとされる。タウリンは胆汁酸の抱合反応に関与し, 胆汁酸代謝を介して肝臓の機能調節因子になっている可能性が考えられる。本研究ではリトコール酸 (LCA) 肝障害モデルを用い, 体内の胆汁酸組成変動を解析してタウリンの肝機能改善作用の機序を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】8週齢の C57BL/6N 雄性マウスのうち, LCA 投与群及びタウリンと LCA 併用群には 0.8% LCA を含む精製飼料を 10 日間自由摂取させた。また, タウリン群と併用群には 2% タウリンを含む水を事前に 3 日間, その後 10 日間与えた。10 日間の摂取後, 血液, 肝臓および胆嚢内の胆汁, 小腸の管腔内容物を採取し解析を行った。HE 染色により併用群では LCA 群で見られた肝細胞障害の軽減が認められ, 胆嚢での胆汁蓄積の低下も認められた。胆汁うっ滞型肝障害の指標である alkaline phosphatase 活性と総ビリルビンレベルに関しては LCA 投与群では高値を示し, 併用群では有意に減少した。LCA 投与群に比べて併用群では肝内の TLCA 濃度が顕著に減少し, 小腸管腔内では併用群で LCA の代謝物と考えられる胆汁酸が高値を示した。タウリンは LCA 代謝を介して肝障害を軽減させる可能性が示された。

C-2 自然界より単離したエタノール生産性酵母の諸性質解明
○松家彩恵, 阪本鷹行, 櫻谷英治 (徳島大・生物資源)

【背景・目的】近年, 多くの酒蔵において, 地域オリジナルの酵母を使用した話題性のあるお酒造りが広まっており, なかでも花から単離した「花酵母」は華やかなイメージがあるだけではなく, お酒に新たな香りや味わいを付加するとして注目されている。本研究では徳島県の特産品となるお酒の商品化を目指し, 徳島県の花や葉, 果実から実用的な醸造酵母の単離を試みた。

【方法・結果】3%, 7%, 10% のエタノールを含むグルコースおよびスクロース培地を用い, 徳島県内から採取した花や果実, 葉などのサンプルからエタノール耐性菌を単離した。その結果, 3% 以上のエタノール耐性を示す酵母を約 300 株取得した。得られた菌株について, アルコールデヒドロゲナーゼを用いた比色法によってエタノール生産性を評価し, 比較的エタノール生産性が高い 12 株を選抜した。特に, 12 株のうち 3 株は実際に醸造に用いられている清酒酵母である *Saccharomyces cerevisiae* K-7 株, およびビール酵母である *S. cerevisiae* Safale US-05 株と同程度の高いエタノール生産性を示した。選抜株 12 株について, グルコースやマルトース, ガラクトースの資化性評価を行った結果, 選抜したエタノール高生産菌株のうち 2 株は K-7 株と同様のガラクトース資化性を示した。また, ビール醸造に適している酵母の凝集性についても評価したところ, いずれの株も中程度の凝集性が確認された。

C-3 GC-MS および LC-MS によるユズ種子油中のフロクマリン分析
○鈴木 悟, 浅野公人, 佐藤美夢, 東谷望史, 中島悦子¹, 吉金 優¹,
沢村正義¹ (JA 馬路村, ¹高知大・土佐 FBC)

【目的】 ユズ果実には1個あたり約30個の種子が含まれているが、その利用についてはほとんどなされてこなかった。当農協では種子油を採取し、その機能性の究明ならびに有効利用を図ってきた。これまで、ユズ種子油においてメラニン生成抑制作用および抗アレルギー作用などが明らかにされる一方、化粧品原料およびトリートメントオイルとしての実用化が図られてきた。今回、ユズ種子油の安全性ならびに品質管理の視点から、光感作作用を有するフロクマリン類について、内部標準を用いた GC-MS および LC-MS による分析法の設定および市販の種子油の分析を行った。

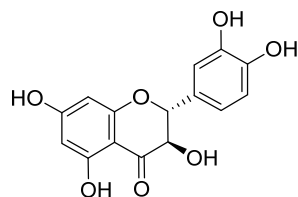
【方法・結果】 GC-MS 分析において、既報¹⁾の5種類のフロクマリンの他に今回 Angelicin, Osthol, Trioxalen を加えた一括分析法を新たに設定した。Xanthotoxin, Bergapten, Isopimpinellin がほとんどの試料で検出されたが、とくに未精製ユズ種子油に 300 mg/kg 以上検出された。一方、Bergamottin (BEM) と 6',7'-Dihydroxybergamottin (DHB) の分析には島津 LC-20A Prominence および Thermo LTQ XL を、カラムは Acclaim 120 (C18, 2.1 mm×150 mm) を使用した。HPLC の移動相は 0.1% 酢酸水溶液-メタノールのグラディエント方式とした。標準液による検量線は良好な直線性を示し、変動係数は1%以下であった。試料分析の結果、DHB は不検出で、BEM は未精製種子油に 3~4 mg/kg 含まれていた。未精製種子油を皮膚に直接塗布する場合は、その濃度に配慮する必要性が示唆された。

1) 吉金, 熊谷, 沢村他: アロマセラピー学雑誌, 15, 54-62 (2015).

C-4 天然フラボノイド・タキシフォリンの化学的特性と生体利用性の解析
○新井ひかる, 小池泰介¹, 河合慶親²
(徳島大院・栄養生命,¹三菱ケミカルフーズ,²徳島大院・医歯薬)

【目的】フラボノイドは基本構造の違いにより様々なタイプに分類されるが、その基本骨格の違いと生体利用性や機能性との関連性については明確になっていない。本研究では、カラマツに含まれているタキシフォリン (Tax) および Tax と同じく 3,3',4',5,7 位に水酸基を有するペンタヒドロキシ型のフラボノイドであるケルセチン (Q), エピカテキン (EC), シアニジン (Cya) について、これらの化学的特性や生体利用性について比較検討することを目的とした。

【方法・結果】4種類のフラボノイドのラジカル捕捉活性について DPPH 法を用いて検討したところ、Tax のラジカル捕捉活性は他の半分程度であった。また、生理条件下 (PBS 中, 37°C) での安定性について検討した結果、Q は顕著に分解したが、Tax は極めて安定であることが明らかとなった。そこで、Q と Tax に着目し、ICR マウスへ胃内強制投与した際の吸収性について比較したところ、投与 30 分後の血中総 Q 濃度が約 2 μ M であったのに対して、Tax では約 13 μ M となり、Tax の吸収効率が非常に高いことが明らかとなった。また、RAW264 細胞への蓄積性について検討を行ったところ、Q が最も顕著に蓄積し、Tax はその 1/10 程度であった。一方、EC や Cya では細胞への蓄積性はほとんど見られなかった。また、本研究で用いた Tax についてキラルカラムを用いて HPLC 分析したところ、ほとんどが 2R3R 型 (右図) であることが分かった。



C-5 トチノミのフラボノール配糖体の構造と抗酸化性

○中井翔太^{1,2}, 木村英人¹, 石原朋恵¹, 圓岡真帆子¹, 小川智史¹, 地阪光生^{2,3}, 横田一成^{2,3} (1 寿製菓 (株), 2 鳥取大院・連農, 3 島根大・生資科)

【目的】トチノミはトチノキの種子である。トチノミは餅や団子などの食品原料として利用されている。これまでに我々は、トチノミの機能性物質として、実に局在するサポニンのエスシンや種皮に含まれるプロアントシアニジンについて報告してきた。過去に、トチノミ抽出物の抗酸化性について報告されているが、活性成分の詳細は不明なままであった。今回、トチノミ全体、皮剥トチノミ、種皮のそれぞれに由来する抗酸化性物質の構造を決定し各成分の抗酸化性を検討した。【方法および結果】トチノミ全体、皮剥トチノミ、および種皮の各凍結乾燥物を、アセトン/水/酢酸 (70:29.5:0.5, v/v) の混合溶媒で抽出した後、各抽出物の抗酸化能を hydrophilic oxygen radical absorption capacity (H-ORAC) 法と 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去能で評価した。種皮の H-ORAC 値は皮剥トチノミの 3 倍であったが、DPPH 法では 23 倍高かった。これは、種皮と皮剥トチノミに含まれている抗酸化成分が異なることを示す。ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) で各抽出物を分析したところ、種皮には高分子化合物が主に含まれており、以前報告したとおり、種皮では A-タイプのプロアントシアニジンが抗酸化性の活性本体と考えられた。一方、皮剥トチノミでは、GPC、超高速液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー方式イオン化飛行時間型質量分析計、¹H-核磁気共鳴スペクトル (NMR), ¹³C-NMR など成分の構造解析をしたところ、8 つのフラボノール配糖体を確認した。これらのトチノミ由来の抗酸化性を有するフラボノール配糖体は、食品由来の抗酸化物質として食品添加物などへの応用が期待できる。

C-6 電気化学的抗酸化力評価法の開発と食品分析への応用

○上田忠治, 奥村卓史¹, 赤瀬早紀¹, 谷口美菜¹, 田中由季乃¹, 長谷川拓哉, 島村智子, 受田浩之² (高知大・農林海洋, ¹高知大・理, ²高知大・地域協働)

【目的】近年、食品類や飲料類の抗酸化力を評価する方法の開発が行われている。抗酸化力を評価する主な方法として、ORAC 法および DPPH 法などがある。これらの評価法は、分析機器が高価である点、煩雑な操作が必要である点および有色のサンプルや懸濁したサンプルは正確に評価出来ない点等が問題である。当研究室では、ポリオキソメタレート錯体 (POM) の電気化学的酸化還元特性を利用して、POM の平衡電位の差を測定するだけで抗酸化力を評価出来る、安価かつ簡便な抗酸化力評価法を開発し、食品分析への応用を試みた。開発した方法によって代表的な抗酸化物質の抗酸化力を測定し、ORAC 法および DPPH 法で得られた抗酸化力との相関を調べた。さらに、日本酒の抗酸化力を、本方法によって評価し、日本酒に含まれる各成分濃度等との関連性を調べた。

【方法・結果】測定対象として、代表的な抗酸化物質としてカテキンなど 10 種類、日本酒は精米歩合が 50% 程度の 31 種類を選択した。POM ($[PVW_{11}O_{40}]^{4-}$ および $[SV_2W_{10}O_{40}]^{4-}$) が生成している水-エタノール溶液を調製した。その POM 溶液に、抗酸化物質あるいは日本酒のサンプル溶液を添加して、時間とともに変化する平衡電位を調べた。抗酸化物質および日本酒を添加する前の初期電位と、添加後約 10 分から 1 時間程度で安定する限界電位との差を調べた。その平衡電位の差を、他の方法によって測定した抗酸化力の値や、日本酒の様々な成分濃度との相関関係を調べた。その結果、開発した方法でも、従来の方法と同等レベルで抗酸化力を評価出来ることが示唆された。

C-7 徳島県育成品種フキノトウ「あわ春香」の抗酸化性
○近藤（比江森）美樹，新居美香¹，梯 美仁²
（徳島文理大・人間生活，¹徳島農技セ・資源環境，²吉野川農セ）

【目的】 フキノトウは代表的な山菜の一つであり，独特な芳香と苦味を特徴としている。徳島県では，高品質かつ需要期に収穫可能で収益性が高いフキノトウを得る目的で，フキノトウ品種として「あわ春香」を選抜育成している。山菜は，様々な機能を有することが報告されているが，「あわ春香」の機能性に関する情報は無い。本研究では，「あわ春香」の抗酸化性を他品種と比較検討するとともに，抗酸化成分を探索した。

【方法・結果】 2016年の春に徳島県下で採取したフキノトウ（あわ春香，みさと）を凍結乾燥後に粉碎した。粉碎試料に10倍量の80%エタノールを添加し，37℃で30分間振盪抽出後，遠心分離により上清を得た。この操作を3回繰り返して得られた上清を濃縮・定容したものを抽出液とした。各抽出液について，抗酸化性の指標としてDPPHラジカル消去活性を測定した。その結果，「あわ春香」抽出液は高い抗酸化活性を示した。次いで，「あわ春香」に含まれる抗酸化成分をDPPH-HPLC法により探索し，複数の抗酸化成分を含むピークの存在を認めた。これらピークに含まれる成分の多くは，UV-Visスペクトル，LC-MS/MS解析，さらに加水分解物の挙動からCaffeic acid (CA)誘導体類であることが示唆された。標品との比較から，5つの成分を5-caffeoylquinic acid (5-CQA)，CA，3,4-diCQA，3,5-diCQA，および4,5-diCQAと同定した。さらに，フキノトウの抗酸化活性に関与するこれらCA誘導体類のうち，含有量と標品の抗酸化活性から5-CQAや3,5-diCQAの寄与が大きいことが明らかになった。

C-8 徳島県産食用植物クサギ *Clerodendrum trichotomum* のガン細胞増殖抑制
○生杉 笙，金丸 芳¹，横井川久己男¹，小山保夫¹
（徳島大院・総合科学，¹徳島大院・生物資源）

【目的】 地域の活性化は必須であり，地域の農産物の有用性やその廃棄物や未利用部位の利用が望まれている。徳島県西部の山間部に位置する那賀町も同様である。そこで徳島県那賀町で採取した食用植物8種（ワラビ，葉ワサビ，ゼンマイ，イタドリ，スイバ，ドクダミ，クレソン，クサギ）と柑橘（柚香）の葉の計9種についてガン細胞増殖抑制を検討し，イタドリ，スイバ，クサギに顕著な効果を確認した。今回さらに，徳島県那賀町産のクサギ (*Clerodendrum trichotomum*) についてガン細胞増殖抑制を検討した。

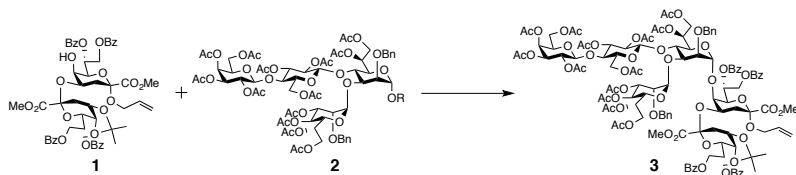
【方法】 クサギ葉は乾燥してメタノールで抽出した。メタノール抽出物をDimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し，培養開始時に添加した。ガン細胞はヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 とヒト大腸ガン細胞株 CACO-2 を用いた。10%FBS 添加 RPMI-1640 培地で37℃・CO₂ 5%で培養した。増殖はMTT法で，Cell CycleはPropidium iodide (PI)染色でDNA量を，Apoptosisの確認はAnnexin-V-FLUOS染色で測定した。

【結果】 正常細胞に影響のない濃度（～200 µg/mL）で増殖抑制を検討した。K562 には20 µg/mL で，CACO-2 には30 µg/mL で，増殖の遅延によって80%増殖を抑制し，それ以上の濃度では増殖を阻止した。30 µg/mL では，K562，CACO-2 の Cell cycle を G2/M 期で停止した（培養24時間後）。K562 では濃度依存的にApoptosisが誘導された。クサギはシソ科の食用植物であるが，悪臭をもつため湯がいて水にさらして料理する。那賀町ではクサギとジャガイモを炊いた料理があるが，今は食べられていない。今後は加熱した時の効果を見たうえで，クサギの機能性と有用な食し方を示して地域での利用を促す予定である。

D-1 リポ多糖 (LPS) の酸性コア糖鎖の合成研究
○一柳 剛, 成瀬裕文, 野添未来 (鳥取大・農)

【目的】グラム陰性細菌が細胞外膜にリポ多糖 (LPS) を産生する。LPS には構造変異が少ないコア糖鎖領域が存在し、その構造は属によって異なる。近年コア糖鎖が免疫原性を示すことが明らかになり、そのエピトープ解明の観点から単一構造の糖鎖が必要となっている。我々は *Neisseria* 属をモデルとしてコア糖鎖の効率的合成法の開発に取り組んでおり、これまでに 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) の合成、および Kdo2 糖誘導体 **1** と中性糖を加えた分岐 3 糖合成を達成してきた。本研究では、この経路での合成限界を探るためオリゴ糖供与体を用い、ブロック縮合によるコア糖鎖合成を試みた。

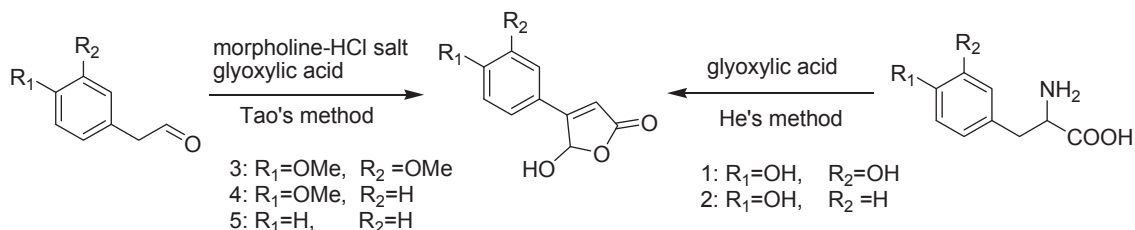
【方法・結果】オリゴ糖供与体として Heptose 上の保護基が異なる直鎖型、および分岐型を作成し、縮合反応を試みることにした。直鎖オリゴ糖供与体では結合位置、保護基の種類を問わずブロック縮合が可能であった。加えて分岐オリゴ糖供与体 **2** との縮合も良好な収率で得られ、連続分岐したオリゴ糖 **3** の合成が達成できた。これにより LPS のコア糖鎖合成では、Kdo の 4 位に糖を導入後 5 位にオリゴ糖を導入する方法が合成経路の 1 つとなり得ることが分かった。



D-2 Bracteanolide A 及び類縁体の合成とその生理活性
○田邊 聖, 野下俊朗¹, 三浦香織, 田井章博¹
(県広大院・生命システム, ¹県広大・生命環境)

【目的】ムラサキオモト (*Tradescantia spathacea*) から単離された bracteanolide A(**1**)は PTP1B 阻害活性を示すことが報告されている。¹⁾ 我々はこれまでに合成例のない bracteanolide A 及びその類縁体 (**2**~**5**) を合成し、構造活性相関を解明することを目的とした。

【方法・結果】Tao らの方法²⁾を用いて類縁体 **3**~**5** の合成を完了した。しかしながら、類縁体 **3** から **1** への変換及び類縁体 **4** から **2** への変換は困難であったため別法での合成を試みた。その結果 He らの方法³⁾によって類縁体 **2** を得た。現在、同法を用いた bracteanolide A の合成を検討中である。また、得られた化合物を用いた生理活性試験を検討中である。



1) Hung et al., *Fitoterapia*, **103**, 113-121 (2015), 2) Tao et al., *J.Med.Chem.*, **55**, 414-423 (2013)

3) He et al., *Tetrahedron Lett.*, **58**, 1034-1036 (2017)

D-3 **きのこ抽出物ライブラリーからのチロシナーゼ阻害物質の探索**
井手ゆり¹, 宇部尚樹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¹, ○石原 亨^{1,2} (¹鳥取大・農, ²鳥取大・菌類きのこセ)

【目的】「きのこ」とは、大型の子実体をつくる菌類で、その多くは担子菌門に属する。きのこ種からは様々な有用生理活性物質が発見されているが、研究対象とされているのはその一部に過ぎず、新たな化合物が発見される可能性も大きい。そこで、私たちは様々なきのこ種から抽出物ライブラリーを作成し、生理活性物質の探索を行なっている。「美白」は美容における主要な関心事の一つである。シミやそばかすなどにおける色素沈着はメラニンの過剰生産により生じる。そのため、メラニン合成に関与するチロシナーゼの阻害剤が多くの化粧品で利用されている。しかし、中には細胞毒性を示すものもあり、効果的で安全な化合物が求められている。このような背景をもとに、食用きのこ抽出物からチロシナーゼ阻害物質を見出すことを目的とした。

【方法と結果】食用きのこ抽出物 95 サンプルを用いてスクリーニングを行った。L-ドーパを基質として酵素反応を行い、生成したドーパクロムを吸光度から定量することによりチロシナーゼ活性を評価した。きのこ抽出物の中で、マツオウジ (*Neolentinus lepideus*) の培養ろ液抽出物が最も強いチロシナーゼ阻害活性を示した。そこで、各種クロマトグラフィーによりマツオウジの培養ろ液抽出物から阻害活性物質を精製した。その結果、化合物 **1** (9.1 mg) および **2** (3.5 mg) が得られた。分光学的手法により構造を解析したところ、**1** と **2** は、いずれも新規のヒドロキノン誘導体と判明した。それぞれのチロシナーゼに対する IC₅₀ 値は 1.0 mM および 1.4 mM であった。

D-4 **メラニン産生抑制効果を有する沢瀉成分 Alisol B の作用機序の解明**
○吉田一郎, 伊藤千尋¹, 松田真弥¹, 辻 明彦², 矢中規之³, 湯浅恵造²
(四国大・短大・食物栄養, ¹徳島大院・先端技術, ²徳島大院・生物資源,
³広島大院・生物圏)

我々はこれまでに、天然素材からの美白有効成分の開発を目的として、80 種の漢方化合物ライブラリーのうち、沢瀉成分である Alisol B がメラニン産生抑制効果を有する新規生薬成分であることを見出した。さらに、Alisol B はメラニン生成酵素であるチロシナーゼ活性を直接阻害せず、チロシナーゼやその転写因子である MITF の遺伝子発現を抑制することによりメラニン産生を抑制することを明らかにした。本研究では、Alisol B のメラニン産生抑制作用機序についてマウス B16 メラノーマ細胞株を用いてさらに詳細に検討した。まず、MITF の転写調節を担う CREB 及び MITF を分解しメラニンの産生を抑制に制御する ERK の活性化に及ぼす Alisol B の影響を検討した。その結果、Alisol B は forskolin/IBMX 処理後の CREB のリン酸化の上昇を抑制したが、ERK1/2 ではリン酸化のさらなる上昇が認められた。また、ERK1/2 の上流である MEK1/2 でも ERK1/2 と同様にリン酸化の上昇が認められた。さらに、MEK 特異的阻害剤である U0126 で処理することにより、Alisol B により発現が減少した MITF の発現の回復が認められた。以上の結果から、Alisol B は PKA/CREB 経路を抑制することで MITF の発現を阻害するとともに、MEK/ERK 経路を活性化して MITF を分解するといった 2 種類の作用機序を介して、メラニンの産生を抑制していることが明らかとなった。今後、沢瀉成分である Alisol B がより安全なメラニン産生抑制剤として有用な美白素材の開発に貢献できる可能性が示された。

D-5 細胞死関連プロテインキナーゼ DRAK1 の細胞内局在化機構
○大上友菜, 村上彩良, 辻 明彦¹, 湯浅恵造¹
(徳島大院・先端技術,¹ 徳島大院・生物資源)

【目的】Death-associated protein kinase (DAPK) ファミリーは Ser/Thr キナーゼの一つであり, 細胞死をはじめとする多彩な生理機能に関与している。このファミリーに属する DAPK-related apoptosis inducing protein kinase 1 (DRAK1) は染色体転座切断点近傍に位置し, ヒトには存在するが, げっ歯類には存在しないユニークな遺伝子であり, アポトーシスを促進することが知られている。このファミリーメンバーの DRAK1 は, Ser-308 の脱リン酸化を伴う細胞質移行によって活性化し, 細胞骨格動態などの生理機能に関与することが報告されている。しかしながら, DRAK1 の局在及びアポトーシス制御機構の詳細は未だ不明のままであり, 本研究ではその解明を目的とした。【方法・結果】まず, ヒト骨肉腫由来 U2OS 細胞に Strep タグ DRAK1 を遺伝子導入し, 免疫細胞染色によりその細胞内局在を調べた。野生型 DRAK1 は主に核に局在したのに対して, N 末端側の塩基性アミノ酸残基に富んだ領域 (⁹³RKRRKG) を Ala 置換した DRAK1 K94A/R95A/R96A 及び C 末端側の塩基性アミノ酸残基に富んだ領域 (³⁹⁵SKRFFK) を Ala に置換した DRAK1 K396A/R397A は細胞質に局在した。また, C 末端領域 (³⁹⁵SKRFFK) 中に存在する PKC の推定リン酸化部位 Ser³⁹⁵ を Asp に置換した擬似リン酸化変異体 DRAK1 S395D も細胞質に局在し, PKC 活性化剤である PMA や OAG 刺激によって野生型 DRAK1 は核から細胞質へ移行することが明らかとなった。これらの結果より, DRAK1 は細胞外刺激に応答して細胞内局在制御を受け, 通常核内において機能することが推測された。現在, DRAK1 結合タンパク質の探索を行っており, 併せて報告したい。

D-6 ¹³C 標識した D-Glu を用いた線虫 *Caenorhabditis elegans* のビタミン C 生合成経路の解明
○藪田行哲, 柳本綾子, 原 寛佳, 岡本奈穂, 美藤友博, 吉田晋一¹, 石原 亨,
石川孝博², 渡辺文雄 (鳥取大・農,¹ 鳥取県産技セ,² 島根大・生命工)

【目的】無脊椎動物である線虫もビタミン C (VC) を生合成できることが最近報告されたが, その生合成経路は不明である。哺乳動物と植物の VC の生合成経路は既に明らかにされており, とともに D-グルコース (D-Glu) を初発物質として合成されるが経路は異なっており, 動物では D-Glu の 1 位の炭素は VC の 6 位へと転位がおこるが, 植物では起こらない。そこで, 1 位の炭素を ¹³C で標識した D-Glu を与えた線虫から合成された VC のどの部分に標識された ¹³C が取り込まれるかを GC-MS を用いて解析した。

【方法】¹³C で標識した D-Glu を 2% 含む M9 培地で培養した大腸菌 OP50 株を食餌とし, 線虫を培養した。線虫より 0.5 mM butylated hydroxytoluene を含むメタノールで VC を抽出し, 乾燥後, トリメチルシリル化した。これを GC-MS により分析した。また, 1 位の炭素を ¹³C で標識した D-マンノース (D-Man) を取り込ませたハウレンソウも同様に分析した。

【結果】線虫およびハウレンソウ共に標識化合物から VC が合成されていた。しかしながら, 線虫の VC には 6 位を含むとされているフラグメントイオンに ¹³C が取り込まれていたのに対し, ハウレンソウでは取り込まれていなかった。以上の結果より, 線虫もまた哺乳動物と同様の経路で VC が生合成されている事が明らかとなった。現在, 哺乳類の VC 生合成に関わる酵素と相同性を示す遺伝子を検索し, RNAi 法により発現を抑制させた線虫の VC レベルの測定している。

D-7 希少糖の線虫成長阻害活性-D-プシコース処理による ATP レベルへの影響
○石井綾佳, 新谷知也¹, 佐藤正資 (香川大・農, ¹愛媛大院・農)

【目的】希少糖とは、自然界に存在量の少ない単糖及びその誘導体と定義される。このうち D-フラクトースの C3 エピマーである D-プシコースは、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かではない。演者らは、D-プ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 ATP レベル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-プシコース処理線虫の ATP レベルを測定し、この仮説を検証した。

【方法・結果】同調培養によって得た第一期幼虫を、D-プシコースを含む液体培地で 72 時間培養して成長抑制線虫を得た。D-プシコースを含まない培地で培養した線虫をコントロールとした。これらの線虫を、界面活性剤を含む緩衝液中で 100℃、15 分間加熱し、ATP の抽出を行なった。ATP 濃度測定はルシフェラーゼ法 (市販キット) で行い、得られた値をタンパク質濃度で割り、ATP レベル ($\mu\text{mol/g protein}$) として結果を比較した。合計 11 回の測定結果を平均したところ、コントロール、D-プシコース 25 mM および 50 mM 処理線虫の ATP レベルには有意な差が見られなかった。また、比較のために解糖系阻害剤 2-deoxy-D-glucose (2-DG) を含む培地で培養した線虫の ATP レベルを測定した。その結果、2-DG 処理濃度が高いほど、ATP レベルが高くなるという結果が得られた。以上の結果から、線虫において D-プシコースの成長阻害メカニズムは単純な解糖系阻害でないことが推測された。

D-8 グリコシルイノシトールホスホセラミドの抽出と精製
○宮城 諒, 喜田孝史, 辻 和樹, 小暮健太郎, 田中 保 (徳島大院・医歯薬)

【目的】グリコシルイノシトールホスホセラミド (GIPC) は植物における主要スフィンゴ脂質である。GIPC は多くの植物性食品に含まれるが、普段の摂取量や消化吸収の可否は不明で、産業的にも利用されていない。研究が遅れている理由の一つは GIPC の単離精製法が開発されていないためと思われる。本研究では、簡便な GIPC の単離方法を開発することを目的とした。

【方法・結果】キャベツを当量の 2-プロパノール/ヘキサン/水=55:20:25 (v/v/v) の下層 (solventA) と混合し、ホモジナイズを行った。この溶媒抽出法で得られる遠心上清は GIPC を含むが、大量の水溶性成分が混入しており、TLC は困難であった。クロロホルム/メタノール/水系およびブタノール/水系の液/液分配における GIPC の有機溶媒への分配率は前者で 70%、後者で 80%であったが、先の solventA 抽出物をこれらの液/液分配に供しても、夾雑物質の影響のため、GIPC の回収率はそれぞれ約 40%、約 60%に止まった。ケイ酸カラムによる solventA 抽出物の分画を検討した結果、GIPC はメタノールで溶出する一方で、大半の夾雑物質はクロロホルム/メタノール混液画分に溶出した。このことを利用すると約 90%の夾雑物質を除去することができた。以上よりケイ酸カラムクロマトグラフィーを介在させることで GIPC の単離精製の効率が格段に上がる可能性が示された。

D-9 光合成レドックスを介した光ストレス応答機構
○亀岡峰志, 岡安嵩也, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典
(島根大・生資科)

強光下での光合成電子伝達系 (PET) の過還元は活性酸素種 (ROS) の生成を助長する。ROS は細胞毒性作用と防御遺伝子誘導のシグナル機能を有するため、その量的バランスの制御は極めて重要である。葉緑体型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) を中心とした抗酸化系と、サイクリック電子伝達系 (CEF) を介した光エネルギーの散逸系 (NPQ) は、光合成レドックス制御の要である。そこで両者の相互関係を解明すべく、ストロマおよびチラコイド膜型 APX (sAPX および tAPX) と CEF の主要コンポーネントである PGR5 の多重変異株を作出し、光ストレス応答への影響を解析した。

野生株, *pgr5*, *sapx tapx* および *sapx tapx pgr5* に強光 ($1,500 \mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) を 24 時間照射した。その結果、野生株や *sapx tapx* と比較して *pgr5* では葉の退色が見られ、それは *sapx tapx pgr5* でより顕著であった。また、この表現型は分単位で光強度を変更する変動光ストレス条件でも見られ、両経路が相補的に働くことが示された。*pgr5* では強光下での NPQ 誘導が抑制されるが、興味深いことに、それは *sapx tapx* バックグラウンドで回復することが分かった。次に、これらの変異株に強光を照射したときのトランスクリプトーム変化について RNA-seq 解析により調べた。*pgr5* では熱ショック応答系遺伝子の発現が顕著に高かったが、それは *sapx tapx pgr5* でさらに促進された。興味深いことに、三重変異株ではサリチル酸関連遺伝子の発現が亢進されたのに対し、ジャスモン酸応答性の遺伝子は抑制されていた。これらのストレスホルモンのバランス変化が三重変異株の表現型に関与する可能性が示唆された。

D-10 シロイヌナズナ NADH 加水分解酵素, AtNUDX6,7 の相互作用因子の同定と解析
○野津昌史, 丸田隆典, 澤 嘉弘, 石川孝博, 吉村和也¹, 小川貴央,
重岡 成² (島根大・生資科, ¹中部大・応生, ²近畿大・農)

【目的】我々はこれまでにシロイヌナズナ Nudix hydrolase (AtNUDXs) の中で、NADH に対して加水分解活性を有する AtNUDX6 および 7 が、それぞれ NPR1 およびポリ ADP リボシル化 (PAR) 反応の制御を介して生物的/非生物的ストレス応答の制御に関与することを示してきた。さらに AtNUDX6, 7 の一過的発現株を用いた解析から、PAR 反応の制御には細胞内 NADH レベルが直接関与しており、一方で NPR1 依存的サリチル酸 (SA) シグナル経路の制御には AtNUDX6 および 7 タンパク質と他の因子との相互作用が重要であることが示唆された。そこで本研究では、酵母 two-hybrid 法を用いて AtNUDX6, 7 タンパク質の相互作用因子の探索を行った。

【方法・結果】AtNUDX6 の一過的発現株から得た cDNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、AtNUDX6 の相互作用因子として低分子量 GTPase タンパク質の一つ (RGP1) を同定した。そこで、組換えタンパク質を用いた *in vitro* プルダウンアッセイを行った結果、RGP1 が AtNUDX6 と相互作用することを確認した。さらに、BiFC 法による解析の結果、AtNUDX6 と RGP1 はシロイヌナズナ葉細胞内の細胞質で相互作用することが明らかになった。また、シロイヌナズナ野生株における RGP1 の発現は、AtNUDX6 と同様に SA 処理により経時的に増加した。さらに、SA 処理後の NPR1 依存的 SA 応答遺伝子の発現量は、野生株と比較して KO-*nudx6* 株および KO-*rgp1* 株で減少していた。以上より、AtNUDX6 は RGP1 と共役して NPR1 依存的 SA シグナル経路の制御に関与していると考えられた。

賛 助 企 業

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

2017 年 5 月 10 日 現在 58 社

人と人、人と夢をつなぐ、大きな架け橋。 四国全域をカバーするネットワーク。

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



理化学

Physics and Chemistry

検査部門

検査部門は、私たちを取り巻く環境の“今”を知る部門でもあります。食の安全や環境問題等に対して、保健・食品・環境等、各種の検査機関への試薬・器材・分析機器の販売を通じ、人々が安心して暮らすことのできる環境の実現を目指しています。

研究支援部門

各分野の最先端の研究開発をあらゆる方面からサポートする研究支援部門。研究者にとって最適な環境づくりから、各種の試薬・器材・機器の販売等、ハードとソフトの両面に渡ってサポートします。

教育・産業部門

スペシャリストの育成に貢献するとともに、地域の産業を支援する製造資材・品質管理器具を提供し、地場産業の発展を応援しています。

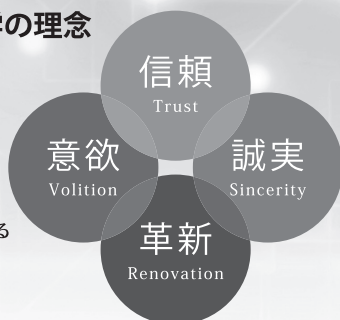
社員一人ひとりにやどる、 アルフレッサ篠原化学の理念

私たちはお客様のためになる
必要とされる会社を目指します。

私たちはお客様に信頼される
誠実な会社を目指します。

私たちは常に革新し続ける勇氣ある
会社を目指します。

私たちは常に努力しがいのある
会社を目指します。



事業案内

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

alfresa

アルフレッサ篠原化学株式会社

事業所／本 社	〒780-8506	高知県高知市南御座9-41
高知支店	〒780-8506	高知県高知市南御座9-41
香川支店	〒769-0103	香川県高松市国分寺町福家甲1255-10
愛媛支店	〒799-3105	愛媛県伊予市下三谷1-6
徳島支店	〒771-0132	徳島県徳島市川内町平石夷野224-29
四万十営業所	〒787-0023	高知県四万十市中村東町1-81
西条営業所	〒793-0010	愛媛県西条市飯岡261-10

Tel. 088-882-5000	Fax. 088-882-5152
Tel. 088-882-5000	Fax. 088-882-5152
Tel. 087-816-2001	Fax. 087-816-2002
Tel. 089-994-8825	Fax. 089-994-8826
Tel. 088-678-2201	Fax. 088-678-2203
Tel. 0880-34-4361	Fax. 0880-34-4365
Tel. 0897-47-5662	Fax. 0897-47-5663

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

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

カガクで ネガイを カナエル会社

たとえば“飛行機の軽量化を支える”樹脂や
“おいしいスイーツをつくる”ホイップクリーム、
“スマホに使われている”フィルムなど。
カネカは、今までになかったものを
カタチにする「カガク」を通して、
みんなの「ネガイ」を「カナエル」会社です。

Kaneka

株式会社 カネカ

大阪本社／〒530-8288 大阪市北区中之島2-3-18

東京本社／〒107-6028 東京都港区赤坂1-12-32 www.kaneka.co.jp



物流管理

Logistics management

商品管理部

お客様とメーカーのインター
フェースとして商品の安定
供給を担います。

物品管理の
合理化

物品管理の
合理化

医療機器

Medical Equipment

医療機器事業部

最新の医療機器の提供を通して、人々の
健康と豊かな地域社会の実現に
貢献いたします。

科学機器

Scientific Equipment

科学機器事業部

豊富な仕入先から研究に必要な機器を
厳選して提案し、研究者の皆様を
バックアップいたします。

Nisshin Policy

医療機器の
設置

科学機器の
設置

アフターケア

アフターケア

メンテナンス

Maintenance

メンテナンス事業部

納入した機器を安全に長くご使用頂く為に
メンテナンス業務を行います。定期点検から
緊急の修理対応まで万全の体制で
アフターフォローいたします。



医科器械・病院設備・理化学機器・実験動物

日新器械株式会社
NISSHIN INSTRUMENT CO., LTD.

本 社

〒771-1156 徳島市応神町応神産業団地12番1
TEL 088-641-5111 FAX 088-641-5511

埼玉営業所

〒350-1249 埼玉県日高市高麗川一丁目13番地2
TEL 042-985-9061 FAX 042-985-9063



本社取得