

シ　ン　ポ　ジ　ウ　ム

講　演　要　旨

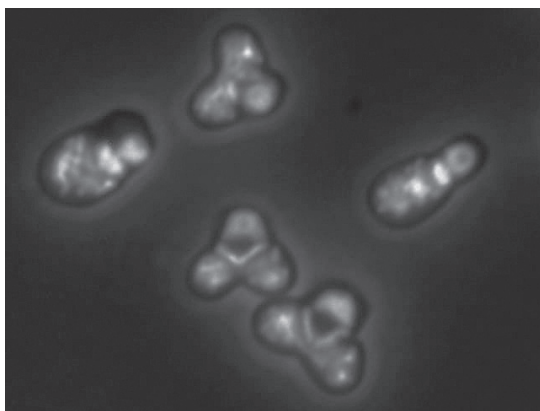
温泉に棲む微小な藻類を用いた細胞の研究

三角修己（山口大院・創科）

地球上の全ての生物の生命活動は細胞が基本単位ですが、そのなかでも真核細胞は核、ミトコンドリア、葉緑体などの細胞小器官を持ち、それらが協調的に働く事によって生命活動を実現しています。私が大学院時代に所属していた研究室では、これら細胞・細胞小器官の分裂や遺伝の仕組みを研究するにあたり、体裁の単純な生物を求めて原始環境が残る温泉に注目し、国内外を探索していました。その中でイタリアのナポリの温泉から、研究対象としてほとんど使われていなかった単細胞藻類の一種、通称「シゾン」(*Cyanidioschyzon merolae*) が採取され、研究室で純化されました。

シゾンを含む紅藻のシアニジウム類は火口湖、温泉などの主に硫酸酸性の環境に (pH 0.1-4, 35-56°C) に光合成生物の優占種として棲息しています。最近の分子系統解析によると、シゾンは、約 13-14 億年前に紅色植物の共通の祖先から出現した、極めて古い真核光合成生物であることが明らかになりました。シゾンの細胞は直径が約 2 μm 程で極小であり、核、ミトコンドリア、葉緑体など、真核生物に共通する細胞小器官を基本的に 1 つずつ持つこと、そして単純 2 分裂で増殖する事など、さらにその細胞には細胞壁がなく、光の明暗で細胞分裂を高度に同調化でき、細胞内物質が取り出し易いなど、細胞や細胞小器官の分裂増殖の仕組みを研究するのに都合の良い特徴を兼ね備えていました。この様なシゾンの利点を生かし、まずは細胞形態学的なアプローチで、葉緑体・ミトコンドリアの分裂の仕組みについて解析が進められ、これら細胞内共生によって誕生したとされる細胞小器官が独自の分裂装置（分裂リング）によって分裂増殖しているという事が初めて明らかにされました。しかしながら、これまで研究材料として殆ど使われていなかったため、その遺伝子（ゲノム）の情報などは全く整備されていませんでした。そこで、細胞小器官の分裂増殖の分子機構や、真核細胞に共通する基本原理の解明に迫るために、全ゲノムの解読を行なうプロジェクトが始まりました。2001 年から約 4 年の歳月をかけて、真核生物として世界ではじめてギャップの無い 100% のゲノム解読に成功しました。

本講演では、微小な真核細胞シゾンを用いて、ゲノム情報を基盤として明らかにされた、ミトコンドリアや葉緑体の分裂増殖の仕組みについて紹介したいと思います。また、基礎研究の立場から、環境やエネルギーなど、人間社会の問題に対する取り組みとして、最近研究を進めているシゾンを用いたバイオマス合成についても紹介したいと考えています。



Cyanidioschyzon merolae の蛍光顕微鏡写真 (DAPI 染色)

モノづくりの道具としての微生物

阿部哲也（協和発酵バイオ（株））

「道具としての微生物」と言うとピンとこなくても、「発酵」と言えば少し親近感が湧くのではないのでしょうか？発酵の代表格であるお酒は、有史以前の昔から人類とともにあったと言われています。およそ 8,000 年前にはメソポタミアでワインづくりが始まっていたと推定されています。ワインだけでなくビールや日本酒など世界各地にはそれぞれ特徴のあるお酒があります。日本酒はかなり複雑な工程を経て作られるお酒ですが、10 世紀ころには既にその製法が使われていたようです。

このように長い歴史をもつ発酵ですが、発酵が微生物の働きによることがわかったのは今から 150 年ほど前のことです。有名なフランスのルイ・パスツールによってワイン発酵は酵母によって起こることが証明されたのがその最初です。人類は、比較的最近まで意識せずに、おいしいお酒や食品を作るための「道具」として微生物を使ってきたのです。

微生物が「汎用性のあるモノづくりの道具」として認知されるようになるのに、日本から大きな貢献がありました。アミノ酸発酵の発明です。タンパク質を構成するのが 20 種類のアミノ酸の一つ、グルタミン酸を微生物によって生産させることに 1956 年に成功したのです。この発明をきっかけにさまざまな物質を微生物に作らせる近代的な発酵技術が開発されました。グルタミン酸や核酸など、調味料用途のものから始まり、リジンやスレオニンなど家畜の飼料に加えて飼料効果を高めるアミノ酸が続きます。アミノ酸や核酸だけでなく、様々な生体内化合物が微生物を用いた発酵生産研究の対象となり、遺伝子組換え技術やバイオインフォマティクスの進展も相まって、生産できる物質の範囲、並びに生産に用いる微生物の種類は大きく拡大しました。今や食の領域にとどまらず、人々の健康や生活の質の向上、地球環境の保全に至るまで、人間社会への貢献は極めて大きなものとなっています。

本発表では、当社の先達による研究事例をご紹介します。発酵生産技術の歴史を振り返り、今後の行く末・課題についても私見を述べたいと思います。

病原体としての微生物 —マラリアー

北 潔（長崎大院・熱医グローバル）

寄生虫の代謝はその生活環において生息環境に対応して大きく変化する。エネルギー代謝もその一例であり多くの場合酸素の供給の十分な自由生活性やベクターである昆虫内では宿主同様に酸化リン酸化で ATP を合成しているが、低酸素環境の宿主体内では酸素を用いない解糖系や、フマル酸を酸素の代わりに最終電子受容体にしたミトコンドリアのフマル酸呼吸など酸素を利用しない戦略で ATP を得ている。このような特殊な系は環境適応の生物進化の戦略の点からも興味深く、同時に格好の薬剤標的になる。

マラリア原虫もその代表的な例であり、クロロキン耐性マラリア原虫にも著効を示すマラロンの主要成分であるアトバコンの標的はミトコンドリアの電子伝達系である。我々は耐性変異株を作成し、その標的が複合体 III のシトクロム *b* である事を耐性変異株の生化学的解析から明らかにし、さらにこの変異株はベクターである蚊の体内では増殖できない事を報告した (Science, 2016)。すなわちマラロン耐性株は流行地においても拡散する危険性は極めて少ないのである。

以前、WHO は天然痘に続いてマラリアの撲滅をめざしたが、薬剤耐性マラリア原虫と殺虫剤耐性の蚊の出現により撲滅から制圧へと目標を後退させた。しかし最近、抗マラリア薬アルテミシニンや殺虫剤浸漬蚊帳などにより死者数は減少しつつあり、世界の流れは制圧から elimination（排除）へと移りつつある。ところがアルテミシニン耐性マラリア原虫が報告され、また上述のマラロンは高価であり、アフリカなどの流行地でマラリアの elimination に用いる事は難しい。そこで優れた標的であるミトコンドリアの呼吸鎖電子伝達系を標的とし、より低コストで供給可能な高マラリア剤の開発を進めている。

現在までに複数の標的と候補化合物を見出しており、抗真菌剤のシッカニンはマラリア原虫ミトコンドリアの複合体 II と III を阻害し、その増殖を抑制する。また我々が見出した抗アフリカトリパノソーマ薬アスコフラノン（原虫ミトコンドリアのシアン耐性酸化酵素のキノン結合部位の競合阻害剤であるが、その誘導体であるアスコクロリンは哺乳類ミトコンドリア複合体 III のキノン結合部位に作用し極めて低濃度でキノール-シトクロム *c* 還元酵素活性を阻害する。アスコフラノンやアスコクロリンはマラリア原虫の酵素を阻害しなかったが、我々は 300 種以上のアスコフラノン誘導体を合成しており、これらを用いてマラリア原虫の酵素を特異的に阻害する誘導体のスクリーニングを開始した。またリンゴ酸-キノン酸化還元酵素 (MQO) など病原性に関わる新たな標的も見出している。さらに直接呼吸鎖を阻害はしないがシトクロムの補欠分子族であるヘムの合成に関わる 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は *in vivo* でもマウスマラリアに治療効果を示し、しかも回復したマウスは再感染に対して 100% の抵抗性を獲得している。すなわち免疫が成立しているのである。現在、5-ALA のヒトでの臨床テストを準備中である。

特 別 講 演

講 演 要 旨

酢酸菌-自然、人、産業とのかかわり

松下一信（山口大・微研セ）

私達は、酢酸菌を古くから食酢の醸造に、ナタデココなどの食品に、近代ではビタミンC生産のためのソルボース発酵などに利用してきており、酢酸菌を「発酵微生物」として認識している。しかしながら、他の発酵微生物、酵母や乳酸菌、と同様に、私達はそれらの微生物をその本来の生息環境から分離し、人為的な産業・発酵醸造として利用してきたにすぎない。

酢酸菌の場合、それらの本来の生息環境は、分離源から考えて、糖・糖アルコールの多い花や果実であると考えられている。それ故、酢酸菌は、その生息場所そのもの、その花や果実を食する昆虫、人が営む発酵醸造などの影響を受けながら、その環境下に共存する他の微生物との相互作用を通じて、進化してきたと考えられる。

今回、①酢酸菌の「自然との関わり」を、特に他の微生物との相互作用や生育環境の違いに基づく「適応進化」について、ゲノムデータを基に考察するとともに、②人為的適応進化である「実験室進化」による酢酸菌育種のいくつかの成果とそれらの産業利用の可能性について紹介したい。

酢酸菌に特徴的な「酸化発酵」呼吸鎖の成立とその適応進化

酢酸菌は「その細胞表層で糖質の酸化反応を行う」という際立った特徴を持っており、その「酸化発酵」能がどのように酢酸菌に確立されたのかは、進化的に興味深い課題である。この酸化発酵は、PQQ 酵素や FAD 酵素を初発脱水素酵素とし、呼吸鎖末端のユビキノール・オキシダーゼに繋がることで、「大量生産」と「エネルギー生成」を両立させるユニークな生物反応である。このシステムに関与する酵素系が、同じ環境に生息すると思われる限定された微生物とのやり取り（水平伝播）を通じて確立されたと推測できる結果が得られている¹⁾。

Acetobacter pasteurianus の近縁種比較から見える適応進化

発酵槽、発酵食品、果実、昆虫から集められた 22 株の *Acetobacter pasteurianus* のゲノムを比較することで、極めて近縁な種間においても、生息環境の違いに基づく遺伝子の変異や獲得（欠損）の様子が見えてきている。特に、それらの中の 12 株については、表現型の比較に基づいて、大きな耐熱性の違いが明らかとなり、その耐熱性を支配する遺伝子の特定も可能となった。

実験室進化による耐熱化株および低栄養に適応した菌株の育種

私達は、酢酸菌の「易変異性」に依拠して、実験室進化による種々の酢酸菌の耐熱化育種を進めてきた²⁾。中でも、*A. pasteurianus* SKU1108 株の耐熱化育種（高温下での継代培養）から、実験室培養条件下で、40℃付近で良好に酢酸発酵を行うことができる耐熱化株が取得できた。しかしながら、この株は実際の食酢製造で用いられる「米もろみ」を発酵培地とするとき、高温下で十分な発酵能力を示せないことも明らかとなった。そこで、その耐熱化株を高濃度エタノールに継代培養し、得られた育種株をさらに「もろみ」もしくは擬似「もろみ」培地の低栄養条件下で継代培養することで、複数の高エタノールおよび低栄養に適応した育種株を取得した。このようにして得られた育種株は「米もろみ」条件下で、高温下での酢酸発酵を良好に行うことが可能となった。

耐熱化株による高温発酵系の開発

私達は、高温環境下で分離された耐熱性株や、実験室進化手法によって取得された食品や発酵醸造にも利用可能な耐熱化株を用いて、種々の高温発酵系の開発を進めている。この開発を通じて、省エネ型で安定な生産を可能にする微生物発酵の確立に寄与できればと願っている。

1) Matsushita & Matsutani: Acetic acid bacteria: Ecology and Physiology, Springer, pp.159-178 (2016)

2) Matsushita et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., **80**, 655-668 (2016)

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 オルガノゲル化能を有する機能性新素材 PELIC の開発 ○白米優一，芦内 誠（高知大・農）

【目的】ヒドロゲルは水を分散媒とする。一方、オルガノゲルは有機溶媒を分散媒とする。オルガノゲルは電子部品や医薬製剤への応用等，先端産業的なものづくりに欠かせない存在になってきている。但し，オルガノゲルの基盤的研究，展開（新用途開発型）研究のいずれも発展途上にある。現代オルガノゲルの合成や製造は石油化学的手法に頼らざるを得ないのも「弱み」である。循環型社会の要請にも堪えるオルガノゲルを得るため，なかでも素材開発戦略について，根本的な見直しが求められている。我々は放線菌のポリεリジン(PEL)に着目した。PELは化成ナイロン様骨格と多数のアミノ基側鎖を持つ。そこで，ポリγグルタミン酸の機能化に実績のある“イオンコンプレックス(IC)法”をPEL改質にも利用した。オルガノゲル化新素材「PELIC」の基本的性質と潜在的応用性についてまとめたので報告する。

【方法・結果】PELと硫酸基を有する界面活性剤を単純混和することでPELICを作製した。溶解性試験の結果から，ラウリル硫酸ナトリウムと混和して作製したPELICのみがクロロホルムを良好な分散媒とするオルガノゲル化能を有することが分かった。バイオベースオルガノゲルの開発例は先に例がない。水を介さない該ゲル空間に疎水性集光触媒素子「クロロフィル」を固定化することで，光関連機能の回復が認められた。以後，油溶有用成分の高密度集積とこれに伴う超機能表面の創出まで視野に入る。再生可能オルガノゲル開発の試みは，該先端材料の環境適性向上にも資するため，引き続き進める必要がある。

A-2 温度制御による細胞脱着が可能な動物細胞の大量培養用マイクロキャリアの開発：温度応答性両イオン性高分子の凍結乾燥によるコーティング法検討と評価 ○小松大貴，大梅有香，高木 睦¹，岩井良輔² (岡山理大・工，¹北大院・工，²岡山理大・技術科学研)

【目的】動物細胞培養用の微粒子（マイクロキャリア：MC）は，少ない培養容積で高効率に細胞が培養できるが，細胞の接着効率と消化酵素を用いたMCからの細胞剥離による細胞障害性を改善する必要がある。一方，我々は温度応答性（温度制御による細胞脱着）と両イオン性（細胞接着促進）との性質を併せ持つ高分子（CAT）を開発した。本研究では，高い細胞接着率で低毒性な細胞回収が可能なMCの開発に向けて，凍結乾燥によるMCへのCATのコーティング法を検討し評価することを目的とした。

【方法と結果】赤色蛍光色素で標識したCAT溶液に浸漬したポリスチレン製のMC粒子（直径約200μm）を凍結乾燥することで，MC全体に均一な赤色蛍光を認めるCATがコートされたMC（CAT-MC）が得られた。培養液中におけるCAT-MCからのCATの溶出量を電気泳動法による電荷競合によって分析したところ，CATの溶出量はコート総量の1%以下であることが確認された。そこで，間葉系幹細胞を播種すると95%以上の細胞がCAT-MC表面に接着するとともに，培養による細胞増殖が認められた。この時，培養温度を37℃から20℃に下げると細胞はほとんど死滅することなくCAT-MCから剥離した。

【結論】我々独自の温度制御による細胞脱着が可能なCAT高分子を凍結乾燥法によりMC表面に均一かつ，培養液中でほとんど流出させることなく堅固にコートすることができた。CAT-MC表面に播種した細胞は高い接着率を示すとともに，培養温度を下げるだけで細胞を死滅させることなく剥離することができたことから，CAT-MCは再生医療や医薬品生産のための有用な培養担体となり得ると期待される。

A－3 接着細胞の自己集合化技術を用いた再生医療用3次元細胞凝集塊の新規作製法の開発と評価 ○草加直幸, 浅見優月, 安部菜月¹, 広井佳臣², 西野泰斗¹, 岩井良輔³ (岡山理大・工,¹日産化工・生物研,²日産化工・材料研,³岡山理大・技術科学研)

【目的】我々の研究グループでは、培養皿上に接着した細胞の自発的な集合（自己集合化）を誘導する細胞操作技術を開発した。本研究では、この細胞の自己集合化技術を再生医療への適用を指向した3次元の細胞凝集塊（スフェロイド）の作製に応用することを目的とした。

【方法と結果】液滴スポンターを用いて細胞の自己集合化誘導剤を細胞非接着性の培養皿の表面にドット状に滴下し（液量: 40～1000 nL, スポット数: 100）乾燥固着させた後、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を 3.0×10^5 cells/cm² 以上の密度で播種した。播種1時間以内に細胞は自己集合化誘導剤の固着表面にのみ接着して隙間のない細胞単層を形成した後、約6～8時間の間に一体凝集化することでスフェロイドが形成した。スフェロイドは自己集合化誘導剤の固着面積に比例して直径約150～450 μmのサイズにて形成し、そのサイズ誤差はいずれも直径に対し10%以内と高いサイズ均一性を有していることが分かった。一方で、これらのスフェロイドを脂肪、骨及び軟骨分化誘導培地にて3週間培養することで、それぞれの分化マーカーである脂肪滴、カルシウム及びⅡ型コラーゲンの顕著な蓄積を認める成熟化組織が得られた。

【結論】我々が独自に開発した細胞の自己集合化誘導剤を固着した培養皿に細胞を播種するだけで、任意のサイズの均一なスフェロイドを一晩足らずの培養で得ることができた。また、それらは高い成熟度で脂肪、骨及び軟骨組織に分化させることもできたことから、本法は再生医療に用いるスフェロイドの作製法として高い利用可能性を有していると考えている。

A－4 ムラサキシジミ幼虫の体色2型の発現調節に関わる要因 山本 響, ○前田瑞生¹, 小島 渉, 北沢千里², 山中 明 (山口大院・創科,¹山口大・理,²山口大・教育)

【目的】ある種のチョウの幼虫は、その体色を周囲の環境に合わせるかのように変化することがある。シジミチョウ科のムラサキシジミの幼虫は、緑色あるいは赤色の体色を呈することが知られている。しかしながら、この体色変化を引き起こす環境要因や内的要因に関する知見はない。本研究では、ムラサキシジミ幼虫の体色と温度との関係、ならびに緑色および赤色幼虫の比較を行った。

【方法・結果】孵化した幼虫を、長日12℃、15℃、20℃、25℃および30℃条件下で飼育し、各齢期の幼虫体色と温度との関係を調査した。その結果、2齢期までは温度に関わりなく緑色であったが、3齢期以降では赤色の幼虫も出現した。20℃以下では90%以上が赤色型の幼虫となり、25℃以上では50%以上が緑色型の幼虫となった。したがって、ムラサキシジミの幼虫は、幼虫期に経験する温度に依存して体色を緑色から赤色に変化させる表現型可塑性をもつことが明らかとなった。次に、緑色型および赤色型の幼虫の内部構造と体液の色を比較した。その結果、赤色型幼虫の縦走気管周辺の組織には緑色型幼虫よりも多くの赤色素が沈着しており、赤色型幼虫の体液の色は、緑色型幼虫の色に比べより濃い黄色味を帯びていた。したがって、この色素沈着は低温刺激により促進されている可能性が示唆された。また、赤色型幼虫の体液中には、緑色型幼虫よりも多くのカロテノイド系色素が含まれている可能性も示唆された。

A-5 ツマグロヒョウモンの蛹体色の調節機構
浜辺真帆, ○馬場彩樺, 藤野遼也, 北沢千里¹, 小島 渉², 山中 明²
(山口大・理, ¹山口大・教育, ²山口大院・創科)

【目的】タテハチョウ科のある種のチョウは、周囲の環境要因の影響を受けて蛹の体色を変化させている。スミレ科植物を食草とするツマグロヒョウモンは、食草の安定的な入手が容易でないことから、本種の生理学的な研究はほとんどなされていない。

本研究では、本種の蛹においても、色彩多型が環境要因により誘起されるかを検討した。

【方法、結果】ツマグロヒョウモンを室温で孵化させ、幼虫を長日 (Long-Day:LD) 20℃, 25℃および 32℃, 短日 (Short-Day:SD) 12℃および 14℃条件下で蛹になるまで飼育した。その結果、蛹の体色は、LD32 条件下で黄土色, SD14 および SD12 条件下で黒色となり、本種の蛹にも色彩多型が確認された。また、背景色や日長は蛹体色変化に影響を及ぼさなかった。温度が色彩多型を生む一つの環境要因であったことから、温度感受性を調べるため、LD25 個体が糸かけ終了段階または前蛹期に達した時点で、SD14 および SD12 条件下に移した。糸かけ終了段階で移した個体の蛹体色は黒色化し、前蛹期に移した個体では黒色や褐色のものが現れた。つまり、前蛹期に温度感受性があり、低温シフトは黄土色化抑制あるいは黒色化促進に作用していることが示唆された。さらに、幼虫の脳神経節連合体粗抽出液を LD32 個体の結紮腹部に投与した時、結紮腹部の黒色化が抑制された。以上より、本種は、外界の温度変化を感受し、神経内分泌因子の分泌調節により蛹の体色を変化させていることが示唆された。

A-6 Mutational analysis of aromatic amino acids biosynthesis genes in *Ralstonia solanacearum*

○張 利春, 張 勇¹, 木場章範, 曳地康史, 大西浩平
(高知大・農林海洋, ¹西南大・資源環境)

[Objective] The expression of the *hrp* regulon, which is responsible for type III secretion system and virulence in the plant pathogen, is regulated in a complex way. We did a random transposon mutagenesis in *Ralstonia solanacearum* and isolated several mutants with reduced *hrp* regulon expression. One of the mutations was mapped on *aroK* encoding shikimate kinase, which is in the pathway of aromatic amino acids biosynthesis. In this study, we investigated the relationship between the aromatic amino acid biosynthesis and virulence in *R. solanacearum*.

[Results and discussion] We made deletion mutants of aromatic amino acids biosynthesis genes, *aroB*, *aroQ*, *aroE*, *aroA*, *aroC*, and *tyrB*. As expected, all the mutants became auxotroph for aromatic amino acids. All the mutants except the *tyrB* mutant grew well in minimal media supplemented with aromatic acids. When casamino acids or yeast extract were added, the growth of the *tyrB* mutant was recovered to some extent. The complemented strain with *tyrB* completely recovered growth in minimal media. While almost all the mutant strains became avirulent, only the *tyrB* mutant retained virulence. We hypothesized that the mutants were avirulent because they could not grow in planta. Addition of plant xylem exudates was most effective for growth recovery of the *tyrB* mutant in minimal media. While all the mutants could not proliferate in planta, the *tyrB* mutant could multiply in planta, although much slower than the wild type. All together, we concluded that the content of aromatic acids in planta was enough to support the *tyrB* growth, but not enough to support the other mutants.

A－7 Functional characterization of the copper resistant system in *Ralstonia solanacearum*

○韓 亮亮, 張 勇¹, 木場章範, 曳地康史, 大西浩平
(高知大・農林海洋, ¹西南大・資源環境)

[Objective] While copper is an essential trace element for all living organisms, it is highly toxic in excess. The best-known copper-resistant bacteria have been isolated from plant-, animal-, and human-associated bacteria. The plant pathogen *Pseudomonas syringae* carries the copper-resistant *copABCD* operon and the two-component system, *copS* and *copR*, for controlling the *copABCD* expression. We have found the *cop* operon in a plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. In this study, we evaluated the *R. solanacearum cop* operon by constructing deletion mutants for each gene. **[Results and discussion]** The *R. solanacearum* Japanese strain OE1-1 could grow in up to 0.8 mM CuSO₄. The $\Delta copABCD$ deletion mutant completely lost copper tolerance, indicating that CopABCD is the major determinant for copper resistance. The $\Delta copD$ mutant showed the same copper resistance as the wild type, which is good agreement with presumed CopD function as copper transport into the cytoplasm. While the deletion mutant of the sensor kinase gene *copS* severely reduced copper resistance, the mutant of the response regulator gene *copR* was almost as resistant to copper as the wild type. The *copABCD* operon was expressed even in the absence of copper in the media and reduced in the deletion mutants of the two-component system. Instead, the operon expression of $\Delta copR$ mutant became much higher in the presence of copper. These results indicate that in the presence of copper, CopR negatively regulates the *copABCD* operon and an unidentified response regulator, which could be phosphorylated by CopS, positively regulates it.

A－8 抗体様分子の酵母細胞内における抗原抗体反応の解析系構築

○幸崎新悟¹, 星田尚司^{1,2,3}, 赤田倫治^{1,2,3}
(¹山口大院・創科, ²山口大・微研セ, ³山口大・生命医工セ)

【目的】

抗体医薬品は抗体を主成分として副作用が少ない効果的な医薬品として利用されている。抗体を人工的に合成することができれば抗体医薬品や検査試薬として利用を拡大することが期待できる。ヒト型の抗体の抗原結合領域は二本のペプチド鎖で構成されているが、ラクダ型抗体の抗原結合部位(VHH)と細胞接着分子であるフィブロネクチン由来の抗体模倣体 Monobody は一本のペプチド鎖の単純な構造であり酵母での生産に有利と考えられる。そこで本研究では GFP 結合性能をもつ VHH と Monobody (eFN1Mono) をそれぞれ酵母内で発現させ、抗体様分子の抗原抗体反応の解析系を構築することを目的とした。

【方法と結果】

VHH の GFP との結合を酵母細胞内で評価するために VHH を RFP 遺伝子と融合させ、GFP と VHH-RFP を同時発現させた。MDM10 を GFP と融合させ VHH-RFP と同時に発現させたところ GFP と RFP の共局在がドット状に観察された。VHH の抗原認識配列にいくつかの変異を与えたところ、I31A の変異では共局在は見られなくなった。また、L33A の変異を与えると共局在が強く現れた。

また GFP 結合性 eFN1Mono を VHH と同様に RFP 遺伝子と融合させ、GFP と RFP-eFN1Mono を同時発現させると細胞内で RFP-eFN1Mono が凝集した。eFN1Mono の deletion 解析の結果、チロシンを多く含む 32-45 の領域のアミノ酸配列で凝集することが分かった。

- A－9 Hydrogen production using the blend of two algal biomass with casamino acids as nitrogen source by *Clostridium butyricum* RAK25832.
OShahira S. Aly, Tsuyoshi Imai, Salah Hassouna¹, Takaya Higuchi, Ariyo Kanno, Koichi Yamamoto, Rinji Akada, Masahiko Sekine (Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ, ¹Inst. Grad. Stud. Res., Alexandria Univ., Egypt)

The ability of *Clostridium butyricum* RAK25832 to use casamino acids as a nitrogen source was investigated. Casamino acids at concentration 26.67 g/L, achieve hydrogen production, and yield of 2505 mL H₂/L, and 1.81 mol H₂/mol glucose, respectively. To identify the most important metals for biohydrogen production eighteen metal elements were screened. Four elements were concern and the optimal composition was MgCl₂ (0.1 g/L), K₂HPO₄ (6.67 g/L), NaHCO₃ (2.6 g/L), and FeCl₂ (0.002 g/L). Under the optimized conditions, hydrogen production reached 3074 mL H₂/L. However, casamino acids are costly, using algal waste as a substrate with different nutrient was expected to increasing biomass hydrogen production effectively. By using *Chlorella fusca* or *Ulva lactuca* as a single substrate, the cultures required casamino acids supplementation at concentrations of 13.33 and 6.67 g/L, respectively. However, using a blend ratio 4:1 of both substrates reduced casamino acids requirement to 3.33 g/L, with a yield of 117 mL H₂/ volatile solids (VS), which decrease the final cost for effective energy production.

- A－10 枯草菌でのペクチン分解に関わる遺伝子群の転写制御機構
○柳井力哉¹, 広岡和丈^{1,2} (¹福山大院・工, ²福山大・生命工)

【目的】根圏に生息する枯草菌は根由来のペクチンも炭素源として利用すると考えられ、本研究ではペクチンのラムノガラクトツロナン I (RG-I) 領域の分解に働く枯草菌遺伝子群 (*rhiLFGN-rhgR-yesTUVWXYZ*) の転写制御について解析を行った。【方法・結果】この遺伝子群内と近傍上流には転写因子をコードする遺伝子が1つずつ (*yesN* と *rhgR*) 存在しており、これらの転写因子が *rhiL* 上流のプロモーターを制御することが予想された。DNA 結合実験によって *rhiL* 上流制御領域に二成分制御系を構成する YesN が特異的に結合することが確認された。また、*rhiL* プロモーターはカタボライト抑制を受けることが予想され、DNA 結合実験でカタボライト制御を司る CcpA/P-Ser-HPr 複合体が *rhiL* 制御領域に結合することを確認した。YesN と RhgR の両転写因子が *rhiL* プロモーター活性制御に寄与するかを確かめるために、*lacZ* レポーター解析を行った結果、*rhiL* プロモーター活性は RG-I によって誘導され、グルコースによって抑制されることがわかった。また、両転写因子の破壊によって RG-I によるプロモーター活性の誘導効果がわずかに低下した。カタボライト抑制に CcpA が関与していることを確かめるために *ccpA* 破壊を導入した各レポーター枯草菌株を用いて同様のレポーター解析を行った結果、*yesN* と *ccpA* の二重破壊によってグルコース存在下での *rhiL* プロモーター活性がある程度上昇し、さらに *rhgR* 破壊を導入することでその効果が消失することがわかった。

A-11 Functional roles of *MIG1* and *RAG5* in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*

○Mochamad Nurcholis, 高坂智之^{1,2}, 山田 守^{1,2}

(山口大院・医,¹ 山口大院・創科,² 山口大・微研セ)

Kluyveromyces marxianus has attractive characteristics including thermotolerance, ability to utilize various sugars and production of several potential metabolites. To understand the functional roles of *MIG1* and *RAG5* in the regulation of sugar uptake and catabolism in *K. marxianus*, those genes were disrupted. *RAG5*-disrupted mutant (*Kmrag5*) exhibited very low activities of gluco-hexokinase and hexokinase, and very low expression of *RAG1* encoding a low-affinity glucose transporter. However, *Kmrag5* exhibited high inulinase activity and *INUI* expression in a glucose medium and exhibited greatly delayed utilization of accumulated fructose in the medium containing both glucose and sucrose. Moreover, *MIG1*-disrupted mutant (*Kmmig1*) was unable to grow well on minimal media without the addition of amino acids. Histidine was found to be essential for the growth of *Kmmig1*, but not for that of *Kmrag5*, suggesting that *MIG1* is involved in expression of some genes related to histidine biosynthesis in *K. marxianus*.

B－1 加熱依存型食品香料の開発と魚肉練り製品への応用
○窪田 暉，眞武佳奈子，河邊真也，宮崎泰幸，臼井将勝（水大校・食品科学）

【目的】魚肉練り製品の原料であるすり身は，その製造過程で水晒し処理により見栄え，弾力，保蔵性等が向上するとともに「臭い」が除去される。しかし，同処理では遊離アミノ酸の多くを除去されるため「香り」の発生源も失っている。本研究では魚肉練り製品へ「香り」を再添加し商品力を高める方法として，メイラード反応を応用した加熱依存型の食品香料の開発を試みた。加えて同香料を水晒しすり身加工品に添加した場合の有用性，および減塩時の呈味増強効果についても検討した。

【方法】加熱依存型食品香料は単一または複数のアミノ酸とラクトースの混合によって作製し，加熱時に発生した香気の種類と優劣を官能試験により判定した。水晒しすり身への香気付加効果は，同香料を添加したケーシング蒲鉾を製造・加熱して官能試験により評価した。呈味増強効果は食塩濃度が1.0%，0.5%のケーシング蒲鉾において同香料の添加時の塩味，旨味を官能試験により評価した。

【結果】水産食品を連想させる食品香料の開発を念頭に，単一アミノ酸とラクトースの官能試験結果から，Gly，Arg，Asp，Glu，Cys，Metを配合候補とした。これら6アミノ酸について組合せとモル比を検討した結果，2Arg + 2Met + Glu + Lac（海苔佃煮），Gly + Cys + Met + Lac（煮付け），1/64Met + Gly + Arg + Lac（甲殻類）の配合が見出された。3種の香料を添加したケーシング蒲鉾を製造して官能試験を行った結果，海苔佃煮または甲殻類の香気を付加した場合に良好な評価が得られた。呈味増強効果においては，食塩濃度1.0%のケーシング蒲鉾で，甲殻類の香気を付加した場合に塩味と旨味の増強効果が確認された。

B－2 養殖アユ内臓廃棄物を用いた“うるか”様発酵食品
○福田 翼，高木茉由子，田中 実¹，岡田恭典¹，横部政明¹，辰野竜平，古下 学（水大校・食品科学，¹榎野川漁協）

【目的】うるかは，アユの内臓を塩蔵した伝統食品である。うるかは，苦味が強く内臓特有の生臭さを有し，嗜好性を損ねている。一方，養殖アユ内臓廃棄物は，養殖アユ加工に伴い大量に廃棄されている。これまでの研究成果により水産物と米麴を組み合わせる事で水産物特有のにおいが低減され，嗜好性が向上することを明らかにしてきた。そこで，米麴を利用した養殖アユで内臓廃棄物を用いた“うるか”様発酵食品の製造を試みた。

【方法】養殖アユ内臓廃棄物は，榎野川漁協（山口県山口市）より冷凍品を入手したものを利用した。緩慢解凍後，フードプロセッサーを用いてペースト化した。次に，米麴をアユ内臓廃棄物の重量に対して0%，10%，20%および40%となる様に加えた（以下，麴添加割合と表記）。さらに最終塩分が10%となる様に食塩を加え，ペースト状にした。ガラス製保存容器に入れ，30℃にて1.5ヶ月まで発酵を行った。適宜サンプリングを行い，実験に使用した。

【結果】麴添加割合0-40%における発酵期間中の一般生菌数は，10³ CFU/g以下で推移した。発酵期間中の10%TCA可溶性窒素量は，発酵1ヶ月目以降は安定した。そこで発酵1ヶ月目の試料を用いて，官能評価を行った。嗜好性評価を行った結果，味および香りについては麴添加割合40%の場合が最も評価が高かった。客観性評価を行った結果，麴添加割合40%の場合，苦味が弱く感じられた。以上の結果より，うるか製造に麴を使用する事で嗜好性の高い発酵食品製造が可能である事が示唆された。

B-3 RBL-2H3 細胞におけるフロロタンニンによる脱顆粒抑制の機序
○杉浦義正, 藤田早織, 鳥居貴佳¹, 近藤温子¹, 臼井将勝, 宮田昌明
(水大校・食品科学,¹ あいち産科技・食工セ)

【目的】肥満細胞モデルの RBL-2H3 細胞をカルシウムイオノフォア (A23187) 刺激した場合において、海藻ポリフェノール (フロロタンニン) による脱顆粒抑制の機序は不明である。これまでに、試料濃度 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ で 30 分間 RBL 細胞を処理したところ、脱顆粒抑制と細胞表面の形状変化がみられたが、顆粒球の細胞表面移行に関与する PKC α タンパク質発現量は影響されないことを報告した¹⁾。本研究では、高濃度 (50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$) と合わせ、低濃度 (6.25, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/mL}$) で 42 時間処理の場合での有効性について、Ca²⁺細胞内流入および PKC α のリン酸化 (p-PKC α) を評価した。

【方法】褐藻サガラメからクロロホルム/メタノール抽出して得られたフロロタンニン濃縮物を試料とした。脱顆粒抑制の評価は RBL 細胞に試料と A23187 を添加し、 β -ヘキソサミニダーゼの遊離阻害活性を指標とした。p-PKC α タンパク質量は、ウェスタンブロット法で評価した。Ca²⁺流入試験では、Fulo-3AM による蛍光検出を行った。細胞表面の形状変化の観察では、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた。

【結果】試料低濃度 42 時間処理の場合も、高濃度 30 分処理と同様に濃度依存的に脱顆粒を抑制した。p-PKC α タンパク質発現量は、低濃度、高濃度いずれの試験区でも低下が確認された。Ca²⁺流入量は、いずれの高濃度でも流入が完全に消失し、低濃度では濃度依存的な抑制であった。また、SEM による観察では、低濃度と高濃度で細胞表面の形状変化に違いがみられた。以上より、フロロタンニンは細胞表面に影響を及ぼして Ca²⁺流入を阻害することで脱顆粒を抑制し、細胞内のリン酸化まで影響が及ぶ可能性が示唆された。1) 杉浦ら, 日本食品科学工学会 第 63 回大会講演集, p138.

B-4 タデアイ葉由来フラボノール類の抗炎症能ならびに体内での分解と吸収
○中井翔太^{1,2}, 木村英人², 地阪光生^{1,3}, 横田一成^{1,3}
(¹鳥取大院・連農,²寿製菓 (株),³島根大・生資料)

【目的】タデアイ (*Polygonum tinctorium* Lour.) は染料原料として知られる一方で、食品原料の他、薬用植物として解毒、解熱、消炎などの目的で古くから利用されてきた。近年、我々は、タデアイ葉に 3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone (TMF) をアグリコンとするフラボノール配糖体が多く含まれることを明らかにした。フラボノールの一種として知られる quercetin の配糖体は、体内でアグリコンに分解後に血中へ吸収されて抗炎症能を発揮する事が報告されており、TMF の配糖体も同様の吸収経路や抗炎症能を有すると期待される。そこで、本研究では、タデアイ葉の主要成分である TMF 配糖体の抗炎症能や体内での分解吸収について調べた。【方法】マウスマクロファージ様細胞 (RAW264) にリポ多糖およびタデアイ由来フラボノールを単独または組み合わせて添加し、24 時間後の細胞上清中一酸化窒素 (NO) およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 濃度を測定した。タデアイ葉の水抽出物を DIAION およびクロマトレックス ODS カラムで精製し、TMF 配糖体を多量に含む精製物を得た。7 週齢の ICR マウスにタデアイ精製物を経口投与し、1 時間後の血液成分を分析した。また、別の試験区ではタデアイ精製物を自由摂食させ、摂食後の糞中成分を分析した。【結果】TMF は RAW264 の NO および PGE₂ 産生を抑制した。マウス血中には TMF が存在し、マウス糞中には TMF と TMF の配糖体が存在した。これらの結果より、タデアイに含まれる TMF 配糖体は体内でアグリコンの TMF に分解され、血中に吸収されて抗炎症能を発揮する事が示唆される。

B－5 Chlorogenic acid ameliorates acetaldehyde-induced cytotoxicity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells

OXu Wensi, Liu Yujia, 宗正晋太郎, 中村俊之, 村田芳行, 中村宜督
(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【Objective】 Aldehyde dehydrogenase (ALDH) catalyzes the conversion from toxic acetaldehyde to its corresponding acid, acetic acid. The ALDH polymorphism leads to the accumulation of acetaldehyde which causes significant damage to the liver. Therefore, the strategy for enhancement of the liver ALDH activity by food phytochemicals is likely to prevent humans from an alcohol-induced abnormal reaction. Chlorogenic acid (CGA), an ester of caffeic acid and (–)-quinic acid, is a phenolic antioxidant found in specific foods, such as lycii fructus, green coffee beans, apples, etc. In the present study, we examined the modulating effects of CGA on the total ALDH activity as well as acetaldehyde-induced cytotoxicity in murine hepatoma Hepa1c1c7 cells.

【Methods and results】 CGA significantly ameliorated cytotoxicity induced by not only ethanol, but also acetaldehyde with the enhancement of the total ALDH activity in Hepa1c1c7 cells. RT-PCR and western blot experiments revealed that CGA significantly increased the gene and protein expression of ALDH1A1, ALDH2 and ALDH3A1. In addition, the gene expression of phase 2 drug-metabolizing enzymes, such as NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and heme oxygenase-1 (HO-1), were increased after the CGA pretreatment. CGA also stimulated the nuclear translocation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) and aryl hydrocarbon receptor (AhR). These results suggested that CGA prevents the acetaldehyde-induced cytotoxicity, possibly through the enhancement of the ALDH expression with the nuclear translocation of Nrf2 and AhR.

B－6 ビタミン B6 は心臓のイミダゾールペプチドを調節する

○大西 魁, 矢中規之, Thanutchaporn Kumurungsee (広島大院・生物圏)

[目的] ビタミン B6(B6)は成長や発達に必須の栄養素であり, B6 の活性体であるピリドキサルリン酸 (PLP) は, アミノ酸代謝を中心とした 100 以上の酵素反応の補酵素として関与する。疫学的調査や動物実験によって B6 の摂取量の低下が心臓病の発症リスクを高めることが明らかにされているが, そのメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では, B6 摂取量が心臓の代謝物に与える影響を解析することで, B6 による心臓保護効果のメカニズムの解明を目的とした。

[結果・方法] 3 週齢の雄性 SD ラットに 1 週間標準食を与え, その後, 低 B6 食群 (1 mg PN/kg diet), 標準 B6 食群 (7 mg PN/kg diet), 高 B6 食群 (35 mg PN/kg diet) の 3 群に分け, 6 週間自由摂取させた。心臓より抽出した代謝物をメタボローム解析に供した。さらに, 心臓中の B6 化合物の濃度を HPLC 蛍光法で測定した。検出された 500 以上の代謝物のうち 12 の代謝物は B6 の摂取量によって変動した。心臓保護効果を持つことが予想されるイミダゾールペプチド, カルノシン, アンセリン, ホモカルノシン, さらにそれらの合成基質である GABA, β -アラニン, 1-メチルヒスチジンの濃度は B6 摂取量の増加によって上昇した。標準 B6 食群と高 B6 食群の間では各代謝物の変動は認められなかった。また, B6 摂取量の増加に伴う PLP 濃度は, 標準 B6 食群において飽和した。以上の結果から, 心臓由来の代謝物の変動は PLP 濃度に依存することが考えられた。本研究によって, B6 による心臓保護効果はイミダゾールペプチドの調節が担う可能性が示された。

B-7 柿葉抽出物の免疫活性化能の解析

○安部博子, 室富和俊, 佐藤彰彦¹, 藤川 護¹, 大西茂彦¹, 井上晶夫²,
西浦博昭², 井上信忠², 齋藤 武³, 阿部大吾³, 中島芳浩 (産総研・健康工学,
¹香川県産技センター, ²生化学研究所, ³農研機構・西日本農研)

【目的】乾燥させた柿の葉を煎じる「柿茶」は、古くから健康茶として利用されており、民間伝承レベルで各種の効能が知られている。本研究では、「柿茶」の健康機能性をさらに強化するために、フラボノイド類をより多く含む柿葉の抽出方法および濃縮・乾燥手法を探索し、その抽出産物の免疫活性化能について解析を行った。

【方法・結果】光毒性を発現するフェオフォーバイド a の溶出を抑えつつ、フラボノイド類を効率よく抽出するための条件検討を行い、最適エタノール濃度にて、柿葉粉末の抽出を行った。ロータリーエバポレータおよびスプレードライヤーを用いた条件検討を重ねた結果、柿葉粉末のアルコール抽出物から、ケルセチン・ケンフェロール配糖体を含み、フェオフォーバイド a が殆ど含まれていない乾燥粉末を得ることに成功した。これら乾燥粉末の免疫活性化能を調べるために、乾燥粉末を 6 週齢の雌性 BALB/c マウスの腹腔内に投与し、腹腔細胞のサイトカイン産生能が活性化されているかどうかについて調べた。種々のサイトカインの産生を促進する作用を持つ LPS の非添加条件では炎症性サイトカインの産生誘導は観察されず、むしろ有意に抑制された。一方、LPS 添加条件下では乾燥粉末非投与群と比べ TNF- α が強く産生誘導され、IL-12 の誘導活性も見られた。また、炎症抑制性のサイトカインである IL-10 については有意に抑制された。本結果から、柿葉抽出物の乾燥粉末には、細菌感染等の細胞に不都合な状況が生じた際に細胞の免疫機能を速やかに活性化させる効果があることが予想された。

B-8 HPLC および LC-MS によるユズ種子油中のフラボノイド・リモノイド分析

○鈴木 悟, 吉金 優¹, 中島悦子², 北川 (木下) あゆみ, 東谷望史,
沢村正義²
(JA 馬路村, ¹ノ清女・食品栄養, ²高知大・土佐 FBC)

【目的】当農協ではユズ (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) の有機栽培ならびに有効利用を基本方針として、地域内での 100% の物質循環を目標としてきた。最近、未利用資源のユズ種子にも有用性が見出されたことで、化粧品、アロマセラピー、サプリメント分野での商品開発を行っている。一方、フラボノイド、リモノイドに関して抗炎症、抗肥満、発がん抑制など様々な機能特性が報告されている。そこで、ユズ種子油からフラボノイド・リモノイドの同時抽出法およびそれらの分析方法を新たに設定した。

【方法・結果】ユズ種子油からのフラボノイドおよびリモノイドの抽出溶媒として、内部標準の Naringenin を含むメタノール - DMSO (1:1) が適当であった。混合試料液を 1 時間振とうした後、遠心分離し、下層をメンブレンフィルターで処理したろ液を以後の分析用試料とした。分析には HPLC を用いた。カラムは Acclaim 120 (C18, 2.1 mm $\times$ 150 mm), 移動相は 0.1% 酢酸水溶液 - アセトニトリルのグラディエント方式とした。さらに目的成分の同定には、HPLC に連結した Thermo LTQ XLMS 分析装置を用いた。

本研究では 13 種類のフラボノイドおよび 3 種類のリモノイドについて分析条件を設定した。精製ユズ種子油にはリモニン、ノミリン、オバクノンがそれぞれ 12.2, 3.6, 21.3 mg/kg 含まれており、一方、未精製のユズ種子油にはそれぞれ、636, 757, 43.6 mg/kg と比較的多く存在することが明らかとなった。いずれの試料にもフラボノイドは検出されなかった。この他、応用事例として、9 種類の食用油脂、16 種類のキャリアオイルについてもフラボノイド・リモノイド分析を行った。

B-9 ダイズ種子オフフレーバーの 1-オクテン-3-オールは配糖体加水分解で生成される

○松井健二，竹本裕之¹，肥塚崇男，大西利幸^{1,2}

(山口大院・創科，¹静岡大・グリーン研，²静岡大・農)

ダイズはその食品機能性から注目されているが，加工に伴いダイズ種子を破碎すると脂肪酸酸化を伴う代謝経路が活性化され，ヘキサナールなどのオフフレーバー化合物が生成されるためその用途が限定されている。1-オクテン-3-オールもダイズ加工時に生成するオフフレーバー化合物で，リノール酸酸素添加と引き続く開裂反応により生成されることが考えられている。我々はダイズ加工時の 1-オクテン-3-オール生成機構解明のためその生成条件を解析した。嫌気条件下でダイズを破碎するとヘキサナールなどの揮発性物質の生成はほぼ完全に抑制されたが，1-オクテン-3-オール生成量は変化しなかった。これは 1-オクテン-3-オールが *de novo* 合成されるのではなく，配糖体などの貯蔵形態をとっていることを示唆している。そこで，ダイズ種子メタノール抽出物を調製し，このものにアーモンド種子由来 β -グルコシダーゼを作用させ，遊離される揮発性化合物を GC-MS 分析に供した。その結果，1-オクテン-3-オールが唯一の揮発性化合物として検出され，1-オクテン-3-オールがダイズ種子で配糖体として蓄積していることが示唆された。本配糖体をダイズ種子メタノール抽出物から精製，機器分析により，1-オクテン-3-イルグリメベロシドと確認した。LC-MS/MS 分析で本配糖体は 1-オクテン-3-オールの唯一の配糖体であった。本配糖体はダイズ種子登熟中に一過的に生成・蓄積し，蓄積組織の破碎によって加水分解が進行して 1-オクテン-3-オールを生成する。ダイズ種子加工時のオフフレーバー生成抑制には酸素依存生成と配糖体加水分解による生成の両プロセスを考慮する必要があることが示された。

B-10 昆虫食の認知と普及について

○宮本実奈，栗林宏美，橋本麻奈美，佐伯真二郎¹，井内良仁

(山口大・農，¹神戸大・農)

新たな食糧源として注目を集めている「昆虫食」であるが，これまで昆虫の栄養価や安全性についての報告はあるものの，その食品としての機能性などについてはほとんど検討されてこなかったために未だにゲテモノ食の域を出ない。そこで本研究では昆虫食の認知と普及を目指し，トノサマバッタをマウスに与える食餌実験を行うことで昆虫食の食品機能性を明らかにすることを目的とした。

まず高脂肪食を与えてメタボリックシンドローム状態にしたマウスに重量の 10% のトノサマバッタ粉末を添加した飼料を与えたところ，肥満マウスの体重増加を抑制した。さらに肝臓重量の増加抑制，脂肪の蓄積抑制が見られ，白色脂肪組織と肝臓のカルボニル化タンパク質を減少させた。抗酸化システムについて検討した結果，バッタ飼料を与えたマウスでいくつかの抗酸化酵素の発現量や酵素活性が有意に高かった。

以上の結果は，昆虫資源の摂取により体重増加抑制・脂肪蓄積抑制・酸化ストレス軽減などの「メタボリックシンドローム抑制効果」が得られる可能性を示唆する。

B-11 昆虫細胞 (BmN4) 発現系を用いたヒト N-ミリスチル化タンパク質の機能解析
○大塚 葵, 吉川祐希, 谷川綾音, 守屋康子, 小林 淳, 内海俊彦
(山口大院・創科)

【目的】我々はこれまでに、ヒト全タンパク質の N 末端配列から網羅的同定を行い、150 個を超える新規ヒト N-ミリスチル化タンパク質を見出し、その中に多数の機能未知遺伝子が存在することを明らかにした。本実験では、これらのヒト N-ミリスチル化タンパク質をカイコ由来 BmN4 細胞で過剰発現させ、細胞の形態や増殖性の変化等を解析することにより、種を超えた重要な機能の検出および解明に有効利用できると考え、細胞形態変化を誘導するヒト N-ミリスチル化タンパク質であるアクチン結合タンパク質 FMNL2, FMNL3 をモデルタンパク質として用いてこの手法の有用性を検討した。

【方法・結果】FMNL2, FMNL3 の C 末端に GFP あるいは FLAG-tag を付加した融合タンパク質 cDNA, およびその 2 位 Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化を阻害した変異体 cDNA を作成し、昆虫細胞由来無細胞タンパク質合成系における代謝標識により N-ミリスチル化の有無を確認するとともに、BmN4 細胞へ遺伝子導入し、GFP 蛍光観察、免疫染色により細胞形態変化を、ファロイジン染色によりアクチンフィラメントとの相互作用を検討した。その結果、野生型 FMNL2, FMNL3 は BmN4 細胞の顕著な伸展を誘導し、アクチンフィラメントと相互作用して著しい細胞形態変化を誘導するのに対し、N-ミリスチル化を阻害した G2A 変異体では、これらの現象が全く生じなかった。以上の結果から、カイコ由来 BmN4 細胞における過剰発現に伴う細胞の表現型の変化から、ヒト N-ミリスチル化タンパク質の機能解析が可能であることが示された。

B-12 タンパク質 N 末端脂質修飾の細胞内局在化シグナルとしての特性解析
○細川拓郎, 谷川綾音, 吉川祐希, 守屋康子, 内海俊彦 (山口大院・創科)

【目的】タンパク質 N-ミリスチル化は、一般に細胞質タンパク質に生じ、膜局在化に機能することが知られている。最近我々はヒト全タンパク質の N 末端配列から網羅的同定を行った結果、核タンパク質、ミトコンドリアタンパク質、分泌タンパク質、膜タンパク質といった種々の細胞内局在を示すタンパク質に N-ミリスチル化が生じている事を見出した。本実験では、N-ミリスチル化を介した膜局在化の機構が、ミトコンドリア移行シグナル、核移行シグナル、シグナルペプチド、シグナルアンカー配列といった他の細胞内局在化シグナルによる細胞内局在とどのような関係にあるかについて CFP, TNF をモデルタンパク質として用いて検討を行った。

【方法・結果】CFP, TNF の N 末端あるいは C 末端に種々の局在化シグナルを融合した融合タンパク質 cDNA を作成し、これを COS-1 細胞に遺伝子導入し、CFP 蛍光、あるいは免疫染色により細胞内局在を検討した。またシグナルペプチド、シグナルアンカー配列の機能は、融合タンパク質の分泌、あるいは小胞体膜上での糖鎖付加により検討した。その結果、細胞質で合成完了後に局在を生じさせる局在化シグナルには互いに優位性はなく、1 分子中に複数のシグナルが存在すると複数の局在を生ずることが示された。これに対し、シグナルペプチド、シグナルアンカー配列では、N-ミリスチル化による膜局在より、小胞体膜上での膜通過、膜局在化が優先して生ずる事が明らかになり、SRP を介して小胞体膜上で生ずるタンパク質の局在化機構は、N-ミリスチル化を介する膜局在化機構より優先して機能することが示唆された。

C-1 青枯病菌の病原因子エフェクターRipAAの機能解析
○白井沙樹, 平田篤司, 北園喬斗, 藤原祥子, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大院・農)

多くの植物やヒトに感染するグラム陰性菌は、III型分泌装置と呼ばれる構造物を介して、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、感染を成立させている。先行研究で、機能未知な青枯病菌エフェクターRipAAを出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で過剰発現させると、酵母に増殖阻害を引き起こし、RipAAの推定活性中心変異体 (C183S) は増殖阻害を引き起こさないことを見いだした。我々は、これらの観点から非宿主植物 *Nicotiana benthamiana* を用いて RipAA の機能の解明を試みた。

RipAA は非病原性遺伝子であり、非宿主植物において過敏感反応を引き起こすことが報告されている。酵母の増殖阻害活性と非宿主植物の過敏感反応の相関性を明らかにするために、酵母で増殖阻害活性の有無を確認した各種変異体をアグロバクテリウム発現系により非宿主植物である *N. benthamiana* で発現させ、過敏感反応を観察した。その結果、WT では過敏感反応が見られ、推定活性中心変異体では見られなかった。酵母の増殖阻害と非宿主植物の過敏感反応に相関性がみられた。このことから RipAA の 183 番目のシステインが活性に関与していると考えられ、酵母の増殖阻害や過敏感反応において重要であることが示唆された。さらに青枯病菌の RipAA 欠損株を作製し、実際の青枯病菌感染系における RipAA の分子機能解析を行っている。

C-2 青枯病菌エフェクターRipAYの宿主チオレドキシシン結合に依存した活性化機構の解析
○藤原祥子, 池尻篤生, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) は、ナス科植物を始めとする 200 種以上の植物に感染し、急激な枯死を引き起こす強力な病原性細菌である。当研究室によるこれまでの研究で、青枯病菌エフェクターの 1 つである RSp1022/RipAY は、宿主チオレドキシシンに依存して、生体内の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 (GGCT) 活性を獲得することが明らかになった。RipAY を酵母で過剰発現させると、WT では酵母に増殖阻害を引き起こし、推定活性中心 (E216Q) を変異させた変異体では酵母増殖阻害を引き起こさない。

植物のチオレドキシシン (Trx-h5) の結合による RipAY の活性化機構を明らかにするため、RipAY 各種変異体と Trx-h5 との結合及び酵母増殖阻害活性を調べた。RipAY の N 末端及び C 末端の配列を欠損させた変異体は Trx-h5 との相互作用を持たず、酵母増殖阻害を起こさないことが分かった。このことから、RipAY の N 末端、C 末端が RipAY の Trx-h5 との結合及び活性に重要であると考えられる。RipAY は酵母内在性の ChaC タンパク質である Gcg1 と比較して非常に強い GGCT 活性を持つが、Gcg1 は ChaC ドメイン以外の配列をほとんど持っていない。そこで、現在、Gcg1 の ChaC ドメインを RipAY の ChaC ドメイン領域に組み込み、RipAY の N 末端と C 末端の構造が Trx との結合に関与するのか調べている。

C-3 網羅的腸内細菌叢解析を行った日本人糞便（消化管）から生菌分離した *Faecalibacterium prausnitzii* の特徴

○藤村勇太, 龍頭壮磨, 藤井祐介, Thi Thuy Tien Nguyen, 荒川健佑, 森田英利
（岡山大院・環境生命）

【目的】 *Faecalibacterium prausnitzii* は、高い嫌気度を要求し酪酸を生成する特徴をもつ。短鎖脂肪酸である酪酸は生体において抗炎症作用等の機能があり、クローン病や潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患の腸内細菌叢では *F. prausnitzii* の構成比が低いことが知られている。本発表では、次世代シーケンサーによる網羅的腸内細菌叢解析を行った日本人の糞便から *F. prausnitzii* を生菌分離し、ドラフトゲノムシーケンスを行い、生理生化学的性状試験などにより菌株間の特徴を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】日本人男性6名（ 21.5 ± 0.5 歳）の糞便を採取し、それらの糞便から細菌ゲノムを精製し次世代シーケンサーの MiSeq（Illumina 社）により 16S rRNA 遺伝子配列を用いた網羅的腸内細菌叢解析を行った。その結果、すべてのボランティアに *Faecalibacterium* 属が存在することを確認した。それらの糞便から生菌分離し、純化して凍結保存後に生菌復帰した菌株の 16S rRNA 遺伝子配列を決定し菌種を推定した。16S rRNA 遺伝子配列の 99%以上の相同性から *F. prausnitzii* と推定された5コロニーを選択し、これら5コロニーは Random Amplified Polymorphic DNA（RAPD）法により2株であることが明らかとなった。本発表では、欧州人の消化管由来の *F. prausnitzii* DSM 17677（type strain）を含めた3株の比較ゲノム解析や生理生化学的性状試験などにより菌株間の特徴について報告する。

C-4 Lipid droplets prevent the toxic accumulation of ceramides at times of impaired transport

○Schlarmann Philipp, 池田敦子, 船戸耕一（広島大院・生物圏）

【Objective】 Accumulation of the sphingolipid precursor ceramide in the endoplasmic reticulum (ER) results in induction of the intrinsic apoptotic pathway. Several commonly used chemotherapeutics induce cell death by this fashion, however the mechanisms that adapt ceramide metabolism to chemotherapy are still poorly understood. In *Saccharomyces cerevisiae* ceramides are synthesized de novo in the ER and are transported to the Golgi where they are converted to inositol phosphorylceramide by vesicular and non-vesicular transport, which require COPII vesicles and tethering factors, respectively. In addition, ceramide can be converted to acylceramide and incorporated into lipid droplets (LD) to lower ER ceramide level. In this study, we tested if lack of ceramide transport impacts on LD development.

【Methods and Results】 Cells were grown over night in synthetic defined medium and LD development was monitored by fluorescent microscopy using the neutral lipid dye Nile Red. As expected, our results showed a rise of LD when vesicular transport was inhibited. Interestingly, loss of tethering factors resulted in a similar increase and LD level peaked when both vesicular and non-vesicular transport of ceramide was shut down. This result supports the model that LD prevent the toxic accumulation of ceramides at times of impaired transport.

C-5 消化汚泥を分解する嫌気菌叢の解析
○藤井克彦, 栗林京平¹ (山口大院・創科, ¹山口大・農)

【目的】活性汚泥法では処理にともない余剰汚泥が発生し、これを減容ならびにバイオガスに変換する手段として嫌気消化を導入する下水処理場が増えている。しかし嫌気消化後の減容率は30程度に留まり、生分解性の低い消化汚泥が発生する。演者らはこれまでに消化汚泥分解能を持つ糸状菌株を研究してきたが、本研究では消化汚泥を基質として水素を生産する微生物を探索し、その性状解析を行った。

【方法】近隣下水処理場より譲渡された脱水消化汚泥の乾燥粉末と水をガラスバイアルに加え、これに土壌などの環境試料の懸濁液を微生物源として接種した。バイアルの気相に窒素充填を施し、45℃で静置培養し、定期的に気相のガス分析を行った。バイアル中で生育している微生物の種類はPCR-DGGE法で解析を行った。

【結果】7箇所の環境試料のうち、5箇所の試料を接種源とした集積培養で水素の生産が確認された。そのうち3箇所の試料では継代培養しても水素が生産されていることがわかった。これらの試料の菌叢解析を行ったところ、汚泥分解や水素発酵では研究報告例がない属 (*Fonticella*, *Gracilibacteri*, *Romboutsia*) の存在が確認された。菌叢上清液からはキシラナーゼ、キチナーゼ、ケラチナーゼといった加水分解酵素の活性が検出された。

C-6 エタノール生産菌 *Zymomonas mobilis* TISTR 548 の高温限界温度での生育に対する金属イオンの影響
○西岡安弥¹, 櫻田朋子², 高坂智之^{1,3}, 山田 守^{1,3}
(¹山口大院・創科, ²山口大院・医, ³山口大・微研セ)

【目的】本研究は、金属イオンがエタノール生産菌 *Z. mobilis* TISTR 548 の生育限界温度での生育に及ぼす影響を明らかにすることを目的に行った。

【方法・結果】まず、TISTR 548 の生育限界温度での生育に金属イオンが及ぼす影響について調べた。いくつかの金属イオン (Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} and Zn^{2+}) は生育限界温度での生育を向上させるような効果は観察されなかったが、5 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl , もしくは 5 mM $MgCl_2$ と 30 mM KCl の両方を培地に添加した場合には高温条件下での生育の向上が確認され、生育限界温度は 39℃に達した。次に $MgCl_2$ と KCl が与える影響の違いを明らかにするために、それぞれの金属イオンを添加した条件での生育限界温度での細胞長、エタノール生産能、細胞内 ROS を測定し比較した。細胞長は $MgCl_2$ を添加した場合に金属イオンを添加していない条件よりも短くなっていることが確認されたが、 KCl を添加した条件と金属イオンを添加していない条件での細胞長に違いは確認されなかった。エタノール生産能は KCl を添加した場合に、金属イオンを添加していない条件よりもやや低い値を示したが、 $MgCl_2$ を添加した場合や $MgCl_2$ と KCl の両方を添加した場合には違いが観察されなかった。また、生育限界温度条件下では細胞内 ROS の蓄積が観察され、 $MgCl_2$ を添加した場合、 KCl を添加した場合、 $MgCl_2$ と KCl の両方を添加した場合の順で細胞内 ROS の蓄積量が高いことが明らかとなった。

C-7 *Gluconobacter* 属酢酸菌の 5-ケトグルコン酸資化を制御する転写因子の探索
○和田征太郎, 阿野嘉孝 (愛媛大院・農)

【目的】 *Gluconobacter* 属酢酸菌による 5-ケトグルコン酸 (5KGA) の発酵生産において、5KGA 生産反応は細胞表層で進行する。一方、それに続いて進行する細胞内での 5KGA 資化反応は、収率の低下に関わる重要な制御点である。本菌はこれまで、生成した 5KGA を細胞外に安定に蓄積するとされていたが、最近、一部の菌株が 5KGA を細胞内に輸送し、資化して再増殖することが分かった。このことは、本菌は 5KGA 資化能を有しながら、それを抑制して細胞外に蓄積していたことを意味し、発酵生理学においても非常に興味深い。我々はこれまでにグルコン酸輸送体 GntP と 5KGA 還元酵素 5KGR が細胞内での 5KGA 資化系に関与していることを示している。本研究では、細胞内 5KGA 代謝の制御機構を明らかにすることを目的とし、そこに関わる転写因子の探索を行った。

【方法・結果】 *Gluconobacter* の *gntP*, *5KGR* はゲノム上で隣接しているが、その周辺に転写因子は存在しなかった。そこで、グルコン酸代謝関連遺伝子群の発現調節を行う GntR が本菌の 5KGA 代謝にも関すると仮定し、*G. thailandicus* NBRC3255 のゲノム情報を調査した。興味深いことに複数の *gntR* ホモログが *gntP*-*5KGR* とは離れた位置に存在した。5KGA 生産条件における *gntR* 遺伝子群の発現誘導を調査したところ、特に *gntR4* と名付けた遺伝子の発現が強く誘導された。そこで、*gntR4* 破壊株を作製し、野生株との比較解析を行った。その結果、破壊株では野生株に比べて 5KGA 資化速度が低下しており、5KGA の取り込み活性、5KGR 活性の低下もみられた。これらのことから、*gntR4* が 5KGA 資化の誘導に関与することが示唆された。

C-8 *Acidomonas* 属酢酸菌の PQQ-アルコール脱水素酵素は、グリセロールをジヒドロキシアセトンに酸化する
○西江百加, 宇都宮大貴, 阿野嘉孝 (愛媛大院・農)

【目的】 酢酸菌はグリセロールを強力に酸化変換するが、細胞膜に局在する PQQ-グリセロール脱水素酵素 (PQQ-GLDH) がジヒドロキシアセトン (DHA) を、PQQ-アルコール脱水素酵素 (PQQ-ADH) がグリセリン酸 (GA) を生成することが報告されている。本研究室ではバイオディーゼル燃料の副生物である廃グリセリンを資源化する触媒として、メタノール資化性酢酸菌 *Acidomonas methanolica* に着目している。本菌はグリセロールから DHA を生成するにも関わらず、そのゲノム上に PQQ-GLDH 遺伝子を持たないことから、他の酢酸菌と異なるグリセロール酸化系を持っていることが示されている。本研究では、*Ac. methanolica* のグリセロール酸化系を明らかにするために、本菌の DHA 生成酵素について調査した。

【方法・結果】 本菌の細胞膜画分に DHA 生成能が見られたことから、細胞膜画分からグリセロール酸化酵素を可溶化・精製を行った結果、グリセロール酸化酵素は PQQ-ADH と同じ画分として精製された。ウェスタンブロッティングを行うと、精製酵素は ADH 抗体と顕著な反応を示した。また、精製酵素をグリセロールと反応させた結果、TLC で DHA の生成が確認された。一方、PQQ-ADH 破壊株ではグリセロールからの DHA 生産が見られなくなったことから、本菌の PQQ-ADH がグリセロールを酸化し DHA を生成していると結論した。このことは、*Acidomonas* 属酢酸菌の PQQ-ADH が、GA を生成する既知の酢酸菌 PQQ-ADH とは異なる性質を示す初めての報告となった。

C-9 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株のトレハロース合成経路を介した代謝制御
○松本奈実¹, 服部浩美¹, 松谷峰之介¹, 外山博英², 片岡尚也^{1,3}, 薬師寿治^{1,3},
松下一信^{1,3} (¹山口大院・創科, ²琉球大院・農, ³山口大・微研セ)

【背景・目的】酢酸菌は、食酢の醸造やビタミン C の前駆体となるソルボース発酵等に用いられる酸化発酵微生物である。これまでの研究で、ソルボース発酵性酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* CHM43 株を高温適応育種し、高温でソルボース発酵が可能な耐熱化株を取得したところ、多剤耐性輸送体への一塩基挿入変異が生じていること、その変異に伴うトレハロース (Tre) 排出の抑制による代謝変動から NADPH/NADP⁺比が増加し、ROS を抑制することで耐熱性を向上させていることが明らかとなった[1]。今回、この代謝変動に関与している Tre 合成経路とペントースリン酸経路 (PPP) 間の代謝制御について、更なる検討を加えた。

【方法・結果】Tre 合成経路破壊株 (Δ otsAB) は、耐熱化株以上に PPP への流入を促進し、耐熱性をより高めることが示されている。そこで、培地の炭素源を変えて比較培養を行ったところ、PPP へ流入しにくい炭素源では、耐熱化株や Δ otsAB 株でも耐熱性を示さなかった。また、炭素源の違いで NADPH の消費も変化し、それが耐熱性に影響していることも示された。さらに、耐熱化株で変異が起きた輸送体は、Tre 排出に加えてソルボースの取り込みへの関与が示され、低濃度のソルボースの取り込みには Tre 合成が必要であることが示された。これらの結果より、Tre 合成は、PPP への流れの調節やソルボースの取り込みを担っていること示された。現在、その生理学的な役割について解析を進めている。

[1] Matsumoto, N., *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, **84**, e00354-18 (2018)

C-10 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の溶血因子の解析
藤田直人, ○甲斐幹世¹, 飯干梨穂, 太田 猛, 阿座上弘行¹
(山口大・農, ¹山口大院・創科)

【目的】歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* 1073 は、血液寒天培地上で β 溶血を示す。我々は、本菌から溶血因子の精製を試み、約 65 kDa のタンパク質を精製した。N 末端配列の解析から、x-プロリルアミノペプチダーゼであることが示唆され、これを HlyA と名付けた。本研究では、HlyA がどのようにして溶血を示すかを調べるため、大腸菌での組換え HlyA やその欠失体の生産と欠損株の作成を行った。また、様々な条件下で溶血活性を調べ、その生理学的意義を考察した。

【方法】*E. corrodens* 1073 のゲノム DNA から *hlyA* 遺伝子や欠失体を増幅し発現ベクターにつなぎ、大腸菌で誘導発現させた。His タグ付きの発現タンパク質を精製後、溶血活性を調べた。また、相同的組換えを利用して *hlyA* 欠損株 (Δ *hlyA* 株) を作成し、溶血活性を調べた。さらに、1073 株を温度や培地組成などを変えて培養し、溶血活性に及ぼす影響を調べた。

【結果】大腸菌で発現した HlyA を精製し溶血活性を測定した結果、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、 Δ *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することが示唆された。また、C 末端からペプチダーゼの活性中心を削った HlyA 欠失体でも溶血活性が見られたことから、溶血活性にはペプチダーゼ活性は不要であることが示唆された。さらに、本菌の溶血活性は鉄欠乏時に誘導されることが示され、本菌において溶血が鉄獲得系の一つであることが示唆された。

C-11 リン脂質を介した転写による小胞輸送の制御
○中村浩樹, 松尾健太郎¹, 加藤萌伊¹ (広島大院・生物圏,¹広島大・生物生産)

【背景】 小胞輸送の素過程である小胞の出芽や膜融合のプロセスはいずれも脂質の構造変化を伴うことから、小胞輸送の制御には脂質が重要な役割を果たしていると考えられる。以前の解析から、リゾリン脂質アシル転移酵素をコードする遺伝子 *SLC1* を破壊すると、*sec12* 変異による表現型が抑圧されることが明らかとなった。また、その抑圧は *OPI1* 遺伝子破壊によって解除されることも分かった。*Opi1* はホスファチジン酸の減少に伴い小胞体から核内へと移行し、転写因子 Ino2/Ino4 と結合する事でリン脂質生合成遺伝子の転写を抑制する。したがって、ホスファチジン酸の代謝変動を介した *Opi1* による転写抑制が COP II 小胞輸送を正に制御していることが示唆される。そこで本研究では、Ino2/Ino4 を介した転写が COP II 小胞輸送を調節しているのかどうかについて解析を行った。

【方法・結果】 *sec12* 変異株の *INO2/INO4* 遺伝子を破壊し、*sec12* 変異による表現型に対する影響について解析を行った。その結果、それらの破壊によって、*sec12* 変異株の表現型が抑圧された。また、他の *sec* 遺伝子変異株についても同様の解析を行った結果、*INO4* 遺伝子を破壊すると、*sec23* 変異株と *sec16* 変異株の表現型も抑圧された。以上の結果から、COP II 小胞輸送の調節に転写因子 Ino2/Ino4 が関与していることが示唆された。

C-12 低温菌を活用したシンプル酵素触媒構築のための基盤技術の開発
○鴨木明子, 田島誉久, 小西正朗¹, 八久保晶弘¹, 坂上寛敏¹, 南 尚嗣¹, 山下 聡¹, 中島田豊, 加藤純一 (広島大院・先端物質,¹北見工業大・工)

【目的】 当研究グループでは低温菌を宿主として有用化学品を効率的に生成するシンプル酵素触媒の構築を行っている。しかし、低温菌の多くは増殖速度が遅く、低収量である。そこで、本研究では低温菌シンプル酵素触媒の効率化に向け、低温菌の増殖に関する基盤技術の開発を目的とした。

【方法・結果】 シンプル酵素触媒の宿主に用いている低温性 *Shewanella* 属細菌の増殖条件を検討した。マリン培地を用いた増殖評価の結果、酸素供給量の増加に伴い増殖が大幅に向上した。さらに、ペプトン、酵母エキス、海水塩を含む複合培地にカザミノ酸を添加することで増殖に正の効果が見られた。カザミノ酸は各種アミノ酸を含んでいるが、そのうち含有量の少ないスレオニンを追加したところ、増殖が向上した。以上より、酸素供給とアミノ酸添加が *Shewanella* 属細菌の増殖向上に重要であることが示された。次に増殖能の高い低温菌を取得するため、北海道道東沖の底泥水や海底泥の反復回分培養により新たな低温菌株を単離した。それらは 16S rRNA 解析により、*Pseudoalteromonas* 属、*Vibrio* 属などであり、*Shewanella* 属細菌より高い増殖能を示すものを見出した。現在、これらの培養条件を検討することでさらなる増殖向上を図っている。

D-1 競合および混合阻害剤との共結晶構造解析により明らかとなった酵母由来 Type II NADH 脱水素酵素のユビキノン結合部位 ○山下哲生, 稲岡健ダニエル¹, 志波智生², 三芳秀人³, 原田繁春², 北 潔¹, 平野勝也 (香川大・医,
¹長崎大院・熱医グローバル, ²京都工繊大・応用生物, ³京大院・農)

【背景と目的】NADH 酸化系呼吸鎖で機能する Type II NADH 脱水素酵素 (NDH-2) はシングルペプチドの膜表面性酵素である。NDH-2 の結晶構造は既に報告されているが、基質ユビキノンの生理的な結合部位は明らかとなっていない。本研究では、阻害剤を用いた構造生物学的および生化学的解析により酵母由来 NDH-2 (Ndi1) のユビキノン結合部位を決定する。

【結果】呼吸鎖酵素のキノン結合に対する阻害剤ライブラリーを用いて Ndi1 の NADH-ユビキノ還元活性を低濃度で阻害する ($IC_{50} < 1 \mu M$) 化合物を探索し、競合阻害剤としてスティグマテリン (STG) が、混合型阻害剤としてミキソチアゾールおよびオーラシン誘導体 AC0-12 が得られた。Ndi1 との共結晶構造解析より、これら 3 種類の阻害剤の結合部位を決定した。いずれの化合物も補欠分子族 FAD の近傍に結合が認められた。STG は 2 つの様式 (STG-1 および STG-2) で結合が認められた。3 種類の阻害剤の結合様式の比較から、STG-1 における脂肪族側鎖の配置が競合阻害剤に特徴的であることが判明した。この脂肪族側鎖と相互作用するアミノ酸残基に変異を有する Ndi1 では、ユビキノンに対する親和性が低下した。

【結論】STG-1 部位におけるスティグマテリンの脂肪族側鎖の位置は、Ndi1 の競合的阻害のための構造的基盤を提供する。ユビキノンの生理的な結合部位は STG-1 部位と重複する。

D-2 *Arthrobacter globiformis* M30 由来トランスケトラーゼを用いた希少糖生産 ○山根一倅, 久住優佳¹, 吉原明秀², 大谷耕平³, 秋光和也², 何森 健²
(香川大院・農, ¹香川大・農, ²香川大・希少糖, ³松谷化学)

【目的】トランスケトラーゼ (TK) はペントースリン酸経路内に存在する酵素で、リン酸化糖のアルドース、ケトース間の転移反応を触媒する。本研究では、TK を用いた希少糖生産を目的として、遊離の単糖に対する反応性を調べるとともにその酵素学的諸性質を検討した。

【方法・結果】*Arthrobacter globiformis* M30 由来 TK を生産する組換え大腸菌は終濃度 100 $\mu g/mL$ アンピシリンを含む SB 液体培地で 12 時間培養した後、終濃度 1 mM IPTG を添加し酵素発現の誘導を 4 時間行った。得られた菌体を超音波破碎し粗酵素を抽出した。TK は Hi Trap Q HP, Hi Trap Phenyl HP, RESOURCE Q カラムを用いたクロマトグラフィーによって単一に精製され、SDS PAGE の結果から単量体分子量は 81 kDa, ゲルろ過クロマトグラフィーの結果から二量体を形成していることがわかった。精製 TK を用いて酵素の諸性質を確認した結果、至適 pH はリン酸緩衝液の pH 8.0, pH 安定性は pH 7.0~9.0 であった。至適温度は 30°C, TK の酵素反応には塩化マンガンなどの二価の陽イオンが必須であることがわかった。*A. globiformis* M30 由来 TK を用いて L-エリスルコースおよび L-スレオースを基質に 30°C, 4 日間酵素反応を行い、反応液中の糖組成を HPLC にて分析した。反応後の HPLC 分析では基質のピークが減少し、生産物のピークが確認された。生産物を分離精製後、HPLC 分析, ¹³C-NMR 分析および比旋光度測定により生産物が L-ソルボースであると同定した。これらの結果から *A. globiformis* M30 由来 TK は遊離の単糖に対しても反応を触媒することが明らかとなり希少糖生産への応用が可能であることが示唆された。

D-3 超好熱菌由来新規2機能性アスパラギン酸キナーゼ／ホモセリンデヒドロゲナーゼ

○大志田達也, 古場康平, 林 順司¹, 米田一成², 大森勇門³, 大島敏久³, 櫻庭春彦 (香川大・農,¹立命大・生命,²東海大・農,³大阪工大・工)

【目的】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。AK/HseDH は幅広い生物種で研究がなされているが, 超好熱菌では全く報告がなく, さらに AK/HseDH の立体構造はどの生物由来のものでも未だに解明されていない。また, 本酵素は L-スレオニンによりフィードバック阻害を受けることが知られているが, この阻害メカニズムの構造生物学的な説明はなされていない。さらに, AK/HseDH 及び AsaDH が複合体を形成し生成産物を直接受け渡す基質伝達メカニズムの存在が予測されているがそれを証明する報告はない。今回我々は, 超好熱性細菌 *Thermotoga maritima* 由来 AK/HseDH の機能解析に成功した。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。

【方法・結果】*T. maritima* AK/HseDH の大腸菌における大量発現系の構築を行い, 精製法を確立した。精製酵素を用いて酵素化学的諸性質を解明した。本酵素における AK 反応の場合では, 非常に薄い濃度の L-スレオニン存在下において阻害を示したが, Hse 反応の場合では, L-スレオニンによる阻害を受けないことが明らかとなった。現在, 構造解析を行うための酵素の結晶化を検討している。

D-4 金属依存性プロテインホスファターゼ PPM1H のリン酸化とリン酸化部位特異的抗体の作製

○大沢 仁, 仲谷美里, 植田早紀, 乾優依子, 秋月一駿, 茂里 康^{1,2}, 石田敦彦³, 亀下 勇, 末吉紀行 (香川大・農,¹産総研・健康工学,²和歌山県立医科大・教養,³広島大院・総合科学)

プロテインホスファターゼは, タンパク質を脱リン酸化することで細胞内情報伝達の制御を行う酵素である。2 価の金属イオン依存的に活性を示す PPM ファミリーホスファターゼの 1 つである PPM1H は, 骨形成関連遺伝子の転写に関与する Smad1/5/8 や, 腫瘍増殖抑制因子 p27 を脱リン酸化するなど, 生体内における重要な働きが報告されているが, その制御機構はほとんど明らかにされていない。

PPM1H の制御機構を解析するにあたり, リン酸化によってその機能が調節されている他の PPM ファミリーメンバーが存在することから, PPM1H もリン酸化により何らかの制御を受けているのではないかと予想された。そこでまず, PPM1H が生理的にリン酸化されているかどうかを Phos-tag SDS-PAGE で解析したところ, PPM1H は細胞内において高い割合でリン酸化されていることが明らかとなった。次に PPM1H をリン酸化するプロテインキナーゼを探索した結果, CaMKI α と PKA によってリン酸化されることが判明した。また, これらのプロテインキナーゼによるリン酸化部位を, 推定リン酸化部位のアミノ酸を Ala に置換した点変異体を用いて解析したところ, PKA によって PPM1H の Ser-123 が, CaMKI α によって Ser-210 がリン酸化されることが明らかとなった。次に, これらの部位のリン酸化が生理的にどのような意味を持つのかを明らかにするため, リン酸化部位特異的抗体(α -pS123, α -pS210)の作製を試みた。その結果, PKA および CaMKI α でリン酸化した PPM1H をそれぞれ 5 ng まで検出できる抗血清を取得することが出来た。

D-5 CaMKI δ の自己リン酸化による新規活性化メカニズムの解析
○小野彩夏, 秋月一駿, 千賀由佳子¹, 亀下 勇, 石田敦彦², 末吉紀行
(香川大・農, ¹産総研・バイオメディカル, ²広島大院・総合科学)

Ca²⁺/カルモジュリン (CaM) 依存性プロテインキナーゼ I (CaMKI) は Ca²⁺シグナリングにおいて重要な役割を果たすプロテインキナーゼであり, 活性化ループ内の Thr 残基が上流の CaMK キナーゼ (CaMKK) によってリン酸化されることで活性化する。CaMKI には α , β , γ , δ の 4 つのアイソフォームが存在するが, その中でも CaMKI α と CaMKI δ の相同性は 83% と最も高く, 細胞内局在や活性化メカニズムも同様であるため, 両酵素の違いに関する報告例は少ない。恒常的活性型として知られる CaMKI α の C 末領域を欠損させた変異体 CaMKI α (1-294) の活性は, CaMKK によるリン酸化を受けて活性化した CaMKI α (WT) の活性にはるかに及ばないのに対し, 大腸菌で発現・精製した CaMKI δ (1-299) は, CaMKK による活性化を受けずに恒常的に高い活性を示すことを私たちは本研究で明らかにした。そこで, CaMKI δ (1-299) の活性化メカニズムを解明するために CaMKI α (1-294) との比較解析を行い, CaMKI δ (1-299) が大腸菌内で高度に自己リン酸化することで完全に活性化していることを見出した。さらに, CaMKK によるリン酸化部位のリン酸化を特異的に検出する抗体を用いた解析により, その自己リン酸化部位は CaMKK によるリン酸化部位とは異なることが明らかとなった。以上の結果から, CaMKI δ には CaMKK に依存しない, δ アイソフォーム特有の自己活性化メカニズムが存在する可能性が示唆された。

D-6 新たな酸性 PNGase 活性測定系の開発と応用利用
小椋美夏子, 山本千晴, 上村亮太¹, 前田 恵¹, ○木村吉伸¹
(岡山大・農, ¹岡山大院・環境生命)

【目的】分化生長中の植物組織には遊離型 *N*-グリカン (FNGs) が蓄積しているが, それら FNGs の生理機能については未だ不明である。FNGs の生理機能解明には aPNGase 発現制御株の構築が必要であり, 植物抽出液中の aPNGase 活性を定量的に測定する必要がある。従来, aPNGase 活性は RI あるいは蛍光標識糖ペプチドを基質として用い, 生成物である脱グリコシル化ペプチドを HPLC 等で定量していた。しかしながらこの方法では, 植物抽出液を用いた場合, 内在性ペプチダーゼにより基質糖ペプチドが分解されるため, 定量的な aPNGase 活性測定は困難になる。そこで本研究では, 植物抽出液中の aPNGase 活性を測定するための新たな分析系の確立を行った。【方法・結果】aPNGase 二重欠損 *A. thaliana* 及び aPNGase 過剰発現トマトの葉部あるいは果実から粗酵素液を調製した。基質としてシアル酸含有 *N*-グリコペプチド (卵黄由来) を, 内部標準糖鎖として NeuNAc2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc1-PA を使用した。aPNGase 発現制御植物の粗抽出液, 基質糖ペプチド (25 μ g), 内部標準糖鎖を 50 mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) 中で 37°C, 1 時間反応させた後, 遊離糖鎖を蛍光標識 (PA 化) した。次いで, それら生成物を ① シアリダーゼ処理/RCA 120 レクチンアフィニティー/RP-HPLC の組み合わせで検出する方法 [1], ② DEAE-HPLC/RP-HPLC で検出する方法について検討を加えた。その結果, いずれの方法でも, aPNGase 二重欠損 *A. thaliana* での活性消失と aPNGase 過剰発現トマトにおける活性昂進が確認された。
[1] Uemura, R., Ogura, M., et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* <https://doi.org/10.1080/09168451.2018.1459464>

D-7 好熱菌 *Thermochromatium tepidum* 由来シトクロム *c'* の熱安定性とガス結合能に関する研究
○小林 悟, 藤井創太郎, 越澤大典, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【目的】 シトクロム *c'* はプロテオバクテリアが広く有するペリプラズム局在ヘムタンパク質である。ヘム鉄は6つの配位座をもつが5配位型を示しており、空位の部分にNOやCOといったリガンドを結合することができる。当研究室では、好熱菌 *Thermochromatium tepidum* 由来シトクロム *c'* (TTCP) の異種発現に成功している。また、TTCPとアミノ酸配列が82%一致している常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム *c'* (AVCP) の熱安定性とガス結合能に関する研究が行われてきた。本研究では、TTCPの熱安定性とNO親和性について調べることで、シトクロム *c'* の構造および機能が高温に対してどのような適応を示しているかをAVCPと比較しながら明らかにし、それに関与するアミノ酸を見出すことを目的とする。

【方法・結果】 TTCPの熱安定性は円偏光二色性スペクトルの昇温に伴う変化から測定した。その変性中点温度 T_m は72℃であった。また、NO親和性は可視吸収スペクトルによって測定した。各NO濃度でのピーク波長における吸光度からNO結合反応における結合定数を算出すると、TTCPのNO結合定数 K は $7.7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ であった。AVCPでは $T_m = 53^\circ\text{C}$ であり、 $K = 5.0 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ であるので、TTCPはAVCPに比べ低いNO親和性を有しており、それはTTCPの熱安定性の高さによるものであると考察した。本研究の目的を遂行するにあたり、Mutagenesis PCRによってTTCP遺伝子に変異を導入し、発現させたTTCPについて同様の実験を行うことで熱安定性とガス結合能に関する知見を深める。

D-8 好熱菌および好冷菌由来シトクロム *c'* のNO親和性の解析
○藤井創太郎, 越澤大典, 小林 悟, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【背景・目的】 シトクロム *c'* は細菌から見いだされるヘムタンパク質である。NO結合能を有することから、細胞毒性を示すNOの解毒にシトクロム *c'* が関わりとされる。これまで当研究室では、好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus*, *Thermochromatium tepidum*, 常温菌 *Shewanella amazonensis*, *Allochromatium vinosum*, および好冷菌 *Shewanella livingstonensis* を由来とするシトクロム *c'* を対象に、その熱安定性が由来する菌の生育温度と相関性を示すことを明らかにしてきた。本研究では、それらシトクロム *c'* のNO親和性を解析し、機能面からも環境への適応性を示すかを明らかにする。

【方法、結果】 還元状態のシトクロム *c'* にNOドナーを添加し、NO結合に伴う吸収スペクトルを測定した。その結果、すべてのシトクロム *c'* で425 nmから399 nmへ吸収スペクトルのピークがシフトしたため、ヘムに対してNOを結合していることが示唆された。NO濃度に対する425 nmの変化からNO親和性を解析すると、安定性の低いシトクロム *c'* ほどNO親和性が高く、そして安定性の高いシトクロム *c'* ほどNO親和性が低く、二つの性質がまるで天秤のような関係にあることが明らかになった。さらに、好熱菌由来シトクロム *c'* のヘム周辺の疎水性度を下げた変異体について同様の実験を行った結果、安定性の低下、およびNO親和性の向上を示した。以上の結果から、NO結合のためには低い安定性が有利に働き、そのコントロールにはヘム周辺の疎水性残基が寄与することが明らかとなった。そして、NO解毒の働きは、高熱環境よりも常温や低温環境でより重要であることが示唆された。

D-9 深海性二枚貝細胞内共生細菌由来の硫黄酸化酵素 SoxAX の機能と熱安定性の解析

○染井希美子, 藤井創太郎, 加藤千明¹, 吉田尊雄¹, 三本木至宏
(広島大院・生物圏, ¹JAMSTEC)

【目的】硫黄酸化細菌 *Candidatus Vesicomysocius okutanii* は、湧水域に広く生息している深海性二枚貝シマイシロウリガイの鰓細胞を宿主とする共生細菌である。両者は、海中の硫化物を宿主から供給してもらう代わりに、自身でのエネルギー産生が不可能な宿主へ *C.V.okutanii* がエネルギーを提供するという相利共生関係にある。本研究では、*C.V.okutanii* の持つ硫黄酸化代謝経路の 1 つ、チオ硫酸酸化に関わる Sox(Sulfur-oxidizing-system)AX の酵素学的特徴に着目することで、*C.V.okutanii* の特殊な 2 つの生育環境(共生・深海)への適応能力を解明することを目的とする。

【方法・結果】データベース上並びに *C.V.okutanii* ゲノム抽出液の PCR 産物との SoxAX の塩基配列を比較したところ、配列は完全に一致した。その塩基配列を基に大腸菌での異種発現系を構築し、*C.V.okutanii* 由来 SoxX を大量に発現した。そこから得られた可溶性画分から各種クロマトグラフィーを用いて精製 SoxX を得た。*C.V.okutanii* 由来 SoxX の酸化還元状態での吸収スペクトルを測定したところ、他種微生物由来シトクロム *c* とピークが一致した。このことから、*C.V.okutanii* 由来 SoxX は 6 配位型ヘムを有することが示唆され、アミノ酸配列が他種微生物由来 SoxX と比較して短いにも関わらずシトクロム *c* としての機能を有するということの予測に至った。また、円偏光二色性スペクトルを指標にした熱安定性測定による変性中点温度は 46.8℃であり、深海性細菌由来シトクロム *c* と比較しても安定性が低いことから、*C.V.okutanii* 由来 SoxX 並びに他のタンパク質も低温で機能を有することが予測された。

D-10 改良型ポリヒスチジンタグを付加したタンパク質の精製法の開発

○柳井和弥¹, 喜納一貴¹, 星田尚司^{1,2,3}, 赤田倫治^{1,2,3}
(¹山口大院・創科, ²山口大・微研セ, ³山口大・生命医工セ)

【目的】6His タグがニッケルに結合する性質を利用することで、タンパク質の精製が可能である。しかし、His 連続配列はタンパク質機能に影響を与えてしまうことから、His 連続配列と特定のアミノ酸を組み合わせた配列を作製すると、タンパク質機能への影響が軽減されニッケルビーズにも結合することが分かった。本研究では、この改良型タグを用いてタンパク質精製を行い、6His タグとの違いを明らかにすること目的とした。

【方法・結果】6His タグ又は His と Glu を組み合わせた 6HE タグ(HEHEHEHEHEH)を C 末に付加した赤色蛍光タンパク質(RFP)を大腸菌で発現させ抽出した。この RFP は可視光下で赤色として見えるので、ニッケルビーズとの吸着を目視で確認できる。6His タグはイオン交換水中でも吸着が起こるのに対し、6HE は吸着しなかった。そこで 6HE の吸着条件を探した。Glu 側鎖の負電荷を打ち消すことを考え、塩存在下で吸着させてみた。すると pH8 付近の高濃度リン酸緩衝液で強く吸着することが分かった。次にリン酸緩衝液で吸着した状態から RFP を溶出するためにイミダゾールを溶出液に用いて、カラムから溶出させた。イミダゾールに濃度勾配をかけながら溶出操作を行うと、6His タグは広い濃度範囲で溶出が起こるのに対し、6HE タグは狭い濃度範囲で溶出が起こることが分かった。これらのことから 6HE タグを用いたタンパク質精製は、6His タグよりも高度な精製ができると考えられた。

D-11 SDS 存在下でも安定な赤色蛍光タンパク質の電気泳動による解析
○山時俊哉¹, 星田尚司^{1,2,3}, 赤田倫治^{1,2,3}
(¹山口大院・創科, ²山口大・微研セ, ³山口大・生命医工セ)

タンパク質の機能と立体構造は密接に関わっており、立体構造を持つことで機能を示す。SDS-PAGE を用いたタンパク質電気泳動では、界面活性剤である SDS を一様に結合させ、変性状態を作ることで分子量依存的にタンパク質が泳動する原理で分析を行う。赤色蛍光タンパク質 (RFP) の SDS-PAGE を行った際、赤色のバンドが視覚的に観察できた。このことから、RFP が SDS のタンパク質変性作用の影響を受けにくいのではないかと考えた。タンパク質電気泳動のサンプルを調整する際、SDS のタンパク質変性作用を補助するため、一般的に加熱が加えられる。そこで、加熱をした場合と加熱をしていない場合で SDS-PAGE を行って比較した。加熱した場合には赤色バンドが見られなかったのに対し、加熱していない場合には電気泳動中においても赤色バンドが観察できた。泳動槽には SDS を含んでいることから、RFP が SDS 存在下においても安定であることが分かった。バンドの移動度を見ると、加熱した RFP は分子量 (28 kDa) に応じた移動度であるのに対し、加熱していない RFP ではバンドが負極側に見られた。これは立体構造を保つ RFP と変性した RFP では結合する SDS の量が変化し荷電状態が異なるためであると考えた。また、様々なペプチドを RFP の末端に付加し、SDS 存在下と非存在下におけるバンドの移動度を比較したところ、付加した配列の長さは同じにも関わらず異なる移動度を示したものが存在したことから、SDS とアミノ酸残基との相互作用を調べるのに利用できるのではないかと考えた。

E-1 リン脂質ホスファチジルコリンの脱メチル化類縁体の合成研究
 ○安部真人, 辻 諄人¹, 三芳秀人¹ (愛媛大院・農, ¹京大院・農)

【背景】細胞膜はリン脂質を主成分とする二重膜を形成し、外層においてホスファチジルコリン (PC) が、内層においてはホスファチジルエタノールアミン (PE) が分布している。PC の外層への輸送 (フロップ) は ABC 輸送体が、PE の内層への輸送 (フリップ) は P 型 ATPase が関与することが指摘されている。しかし、それぞれのタンパクによる基質認識については不明なままである。

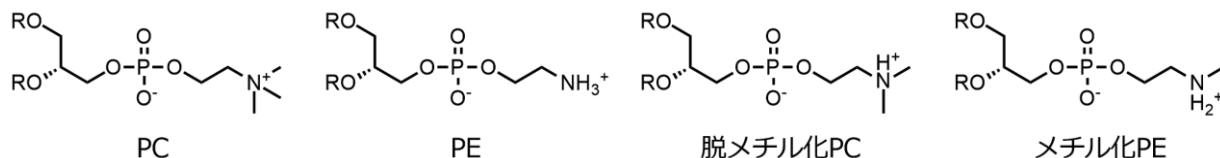


図1 PC, PE および本研究の標的化合物

【目的】本研究では、PC の極性頭部に 3 つあるメチル基を順次脱離させることでいわば PC と PE の中間的な新規分子 (脱メチル化 PC およびメチル化 PE) をデザイン・合成することとした。これらの分子は ABC 輸送体や P 型 ATPase などの層間輸送に供することでその分子認識を浮き彫りにすることができる。

【方法・結果】発表者らがこれまでに確立したリン脂質の合成方法をもとに PC の調製を行い、DABCO を用いた脱メチル化によって所望の脱メチル化 PC を得た。今後、再度の脱メチル化を経てもう一方の合成標的であるメチル化 PE を得る予定である。

E-2 エゾウコギから単離された PTP1B 阻害活性物質の提出構造は誤りである
 ○大西良弥, 三浦香織, 濱田義和¹, 齊藤安貴子¹, 大内秀一², 田井章博³, 野下俊朗³
 (県広大院・生命シ, ¹大阪電通大院・工, ²近畿大・薬, ³県広大・生命環境)

【目的】エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus*) から単離されたジアルデヒド **1** は、強い PTP1B 阻害活性 ($IC_{50}=9.2 \mu M$) を示すことが報告されている¹⁾。これまでに **1** の合成を行ったが、天然物のデータと一致しなかった。そこで、**1** の異性体を合成し単離された化合物の構造を合成化学的手法及び生物活性より確定することを目的とする。

【方法・結果】古典的な Ullmann ether 合成を用いて 4 つのジアルデヒドの合成を完了した。しかし、合成した **2-5** と天然物の ¹H-NMR データはいずれも一致しなかった。また、PTP1B 阻害活性試験を行ったところ、合成した **2-5** は $100 \mu M$ でも活性を示さなかった。以上より、エゾウコギから単離された PTP1B 阻害活性物質の提出構造は誤りである。

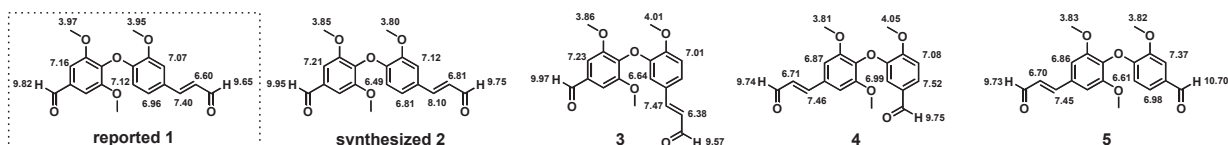


Fig. Comparison of the ¹H-NMR chemical shifts of reported **1** and synthesized **2-5**

1) N. Li *et al.*, *Phytochemistry Lett.*, **13**, 286-289 (2015)

E-3 植物に見出されたグリコシルイノシトールホスホセラミド特異的ホスホリパーゼ D の性質 ○田中 保, 宮城 諒, 辻 和樹, 藤原美奈, 森戸克弥, 石川寿樹¹, 今井博之², 川合真紀¹, 福田達也, 小暮健太郎
(徳島大院・医歯薬, ¹埼玉大院・理工, ²甲南大院・自然)

【目的】我々は以前、キャベツ葉に植物における主要スフィンゴリン脂質のグリコシルイノシトールホスホセラミド(GIPC)を特異的に分解するホスホリパーゼ D(GIPC-PLD)活性が存在することを報告した。一般に、PLD は反応系にアルコールが存在すると切り出されたホスファチジル基がアルコールに転移するホスファチジル基転移活性を示す。本研究では GIPC-PLD についてこの活性を中心に調べた。【方法】ダイコン根のホモジネートより得た膜画分の硫酸沈殿により GIPC-PLD 画分を得た。GIPC はキャベツより得た脂質画分からケイ酸カラム及び TLC によって単離した。種々のアルコールの存在下、GIPC に GIPC-PLD を 30 分間作用させた後、得られた生成物を TLC にて単離した。生成物は常法により定量し、MALDI TOF-MS によりその構造を確認した。【結果・考察】メタノールの存在下、GIPC に大根由来 GIPC-PLD 画分を作用させるとフィト型セラミド 1-リン酸(PC1P)にメタノールが結合した PC1P メタノールを生じることが確認され、この酵素がホスファチジル基転移活性を触媒することがわかった。この活性はブタノールや 2-メチル-1-プロパノールでは観察されたが、ペンタノールや 2-プロパノールあるいはコリンやセリンなどグリセロ型リン脂質の極性頭部を構成する水酸基への転移性は観察されず、本反応の基質は短鎖(C4)の一級アルコールに限定されると思われた。

E-4 植物のフラビン代謝制御に関与する新規調節因子の探索
○難波純也¹, 丸田隆典^{1,2}, 石川孝博^{1,2}, 吉村和也³, 重岡 成⁴, 小川貴央^{1,2}
(¹島根大院・自然科学, ²島根大・生資科, ³中部大・応生, ⁴近畿大・農)

【目的】リボフラビン (RF)を前駆体とする FMN, FAD は植物において光合成などの主要代謝経路に必要な化合物である。しかし、植物におけるフラビン生合成/分解系やその制御機構についてはほとんど未解明である。我々はこれまでに、植物におけるフラビン化合物の代謝制御に関わる新規因子を同定するために、FAD 処理後のトランスクリプトーム解析を行い、FAD 処理により発現変動する転写因子(EAD-responsive transcription factor: FRTFs)を 47 個同定した。そこで本研究は植物のフラビン代謝調節機構を明らかにするために、これら FRTFs の機能解析を行った。

【方法・結果】まず、FRTF 遺伝子群の T-DNA 挿入遺伝子破壊株の単離を行い、24 種類の遺伝子破壊株(KO-*frt1*-24)を単離した。得られた 24 種類の FRTF 遺伝子破壊株の細胞内フラビン化合物レベルを LC-MS/MS を用いて解析した結果、KO-*frt11* および 19 株におけるフラビン化合物レベルは、野生株 (WT) と比較して顕著に減少していた。そこで次に、両株における既知のフラビン代謝系遺伝子群の発現量を定量的 PCR 法により解析した。その結果、KO-*frt11* 株では WT と比較して RF 合成に関わる *AtRibA1*, *COS1* および *RS* の発現量が低下していた。一方、KO-*frt19* 株では RF 合成に関わる *AtRibA1*, *PyrR*, *PyrD* および *COS1*, FMN 合成/分解に関わる *AtFMN/FHy* の発現量の低下、FAD 合成に関わる *AtFADS* の発現量の増加が認められた。以上の結果より、*FRTF11* および 19 は直接的もしくは間接的に植物細胞内のフラビン化合物レベルの調節に関与することが示唆された。

E-5 ジャスモン酸とエチレンのシグナルクロストークによる孔辺細胞原形質膜イオンチャネルの活性制御機構

○宗正晋太郎, 平尾友加里¹, 田浪かすみ¹, 中村宜督, 村田芳行
(岡山大院・環境生命,¹岡山大・農)

主として植物の葉の表皮に存在する気孔は、一对の孔辺細胞から成る小孔であり、二酸化炭素の取り込みや蒸散による水分放出を調節する場所である。また、気孔はいくつかの植物病原菌にとって、重要な侵入経路となっている。ジャスモン酸メチル (MeJA) とエチレンは、成長や病傷害応答の制御を行う植物ホルモンである。最近の研究によって、MeJA とエチレンは気孔開閉運動の制御にも関与することが明らかとなった。成長や病傷害応答の制御系において、MeJA とエチレンのシグナル伝達クロストークが存在することが示唆されている。しかし、気孔開閉運動の制御系、すなわち孔辺細胞内における MeJA とエチレンのシグナル伝達クロストーク機構の詳細は現在不明である。

気孔の開閉運動を制御するシグナル伝達において、孔辺細胞原形質膜イオンチャネルは重要な働きを持つ。本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナを用いて、孔辺細胞における MeJA とエチレンのシグナル伝達クロストークによる孔辺細胞原形質膜 S 型陰イオンチャネルとカリウムイオンチャネルの活性制御機構の解明を行った。

E-6 酸化ストレス条件下におけるアスコルビン酸再生

○田中 滯¹, 上野祐美², 寺井佑介², 小川貴央^{1,2}, Frank Van Breusegem³,
石川孝博^{1,2}, 丸田隆典^{1,2} (¹島根大院・自然科学,²島根大・生資科,
³Plant Systems Biology・VIB/Ghent Univ.)

アスコルビン酸 (ASC) は主要レドックスバッファーとして植物の酸化ストレス耐性・応答に重要な役割を担っている。植物はモノデヒドロアスコルビン酸 (MDHA) およびデヒドロアスコルビン酸 (DHA) にそれぞれ特異的な還元酵素 (MDAR および DHAR) を有しており、これらの酸化型アスコルビン酸の ASC への再生を通してそのプールサイズ維持に貢献すると考えられている。シロイヌナズナにはそれぞれ 5 および 3 つの MDAR および DHAR アイソフォームが存在するが、個々の生理学的重要性や機能的冗長性はあまり調べられていない。そこで我々は、MDAR および DHAR 遺伝子の多重変異株を作出し、酸化ストレス条件下での ASC 再生への影響を調べた。

細胞質型 DHAR1 および 2, 葉緑体型 DHAR3 の三重変異株を作出したが、驚くべきことに、ASC レベルやレドックス状態への影響は限定的であった。しかし、この三重変異株でグルタチオンを欠乏させたところ、ASC レベルの低下と酸化ストレス感受性が著しく亢進した。よって、DHAR の機能はグルタチオンによる非酵素的な DHA 還元反応によって相補されうることが示された。また、細胞質型 MDAR2 および 3 と、ペルオキシソーム型 MDAR1 および 4 の二重変異株の作出をそれぞれ試みた。細胞質型の二重変異株は生存可能であり野生株レベルの ASC レベルを保持したが、ペルオキシソーム型の完全な二重欠損は胚性致死を引き起こす可能性が示唆された。最近、*mdar1* の弱いアレルと *mdar4* 欠損株との二重変異株が作出できたので解析を進めている。

E-7 アクロレインは植物グルタチオントランスフェラーゼの共通基質である
○真野純一, 要田紗也加¹, 松浦風沙², 山内靖雄²
(山口大・総科セ,¹山口大・農,²神戸大院・農)

【目的】グルタチオントランスフェラーゼ (GST) は生体異物や体内で生じる毒物のグルタチオン抱合体化 (解毒) に関わるとされる。シロイヌナズナは約 50 種の GST アイソザイム遺伝子をもつ。われわれは最近、シロイヌナズナの Tau19 アイソザイム (AtGSTU19) が、アクロレイン (Acr) を特異的に認識し解毒することを発見した。Acr は、過酸化脂質から生じる α,β -不飽和アルデヒドのなかでもっとも毒性が高く、植物の酸化障害の原因となる。GST による Acr 解毒は植物のストレス防御に重要な意義を持つ。本研究では、他のシロイヌナズナ GST アイソザイムが Acr 解毒活性をもつか、網羅的に調べた。

【方法・結果】理化学研究所実験植物開発室から提供されたシロイヌナズナの Tau クラスアイソザイム (AtGSTU) 遺伝子 28 種を大腸菌で発現させ、精製タンパク質として 20 種のアイソザイムを得た。これらはいずれも、GST に共通の人工基質である 1-chloro-2,4-dinitrobenzene のグルタチオン抱合体化活性を示した。これらのなかで、10 種のアイソザイムが Acr 解毒活性を示した。また、このなかで AtGSTU5, 17, 18 は、過酸化脂質から生じ高い毒性をもつ 4-ヒドロキシノネナールにも高い活性を示した。アミノ酸配列に基づく AtGSTU の分子系統樹においては、Acr 解毒活性をもつアイソザイムは異なるクレードに散在しており、Acr 解毒活性が進化の過程で複数回独立に獲得されたことが示唆された。シロイヌナズナの 28 種の Tau クラスアイソザイムのうち 1/3 が Acr を解毒することから、Acr は植物 GST に共通の内在性基質であるといえる。これは植物での Acr 解毒に GST が重要な役割を持つことを示唆する。

E-8 カルシウムイオンはシロイヌナズナリポキシゲナーゼ 2 活性化に関与し、オキシリピンバーストを引き起こす
○望月智史, 肥塚崇男, 松井健二 (山口大院・創科)

【目的】植物は傷害を認識し、みどりの香り (GLVs) やジャスモン酸などのオキシリピン類を生成して防御応答を行っている。オキシリピン生成の鍵酵素であるリポキシゲナーゼ (LOX) は未傷害の健全葉でも大量に発現し、基質チラコイド膜と隣接している。しかし、無傷植物はオキシリピンを蓄積せず、傷害を受けてからオキシリピンを生成する。この問題に対し、「LOX は無傷細胞では不活性型であり、刺激認識後に活性化してオキシリピン生成を亢進する (バーストする)」と仮説を立て、解明に取り組んでいる。

【方法・結果】ロイコトリエン合成を担うヒト 5-LOX では Ca^{2+} 結合による活性化が報告されている。 Ca^{2+} 結合による LOX のコンフォメーション変化が基質を含む膜への相互作用を促進することが分かっており、このアナロジーから、植物 LOX の活性化因子として Ca^{2+} の影響を調査した。 Ca^{2+} キレート剤の BAPTA 存在下でシロイヌナズナ葉を破碎したところ、オキシリピン生成が抑制された。一方で、LOX 下流酵素の活性は抑制されず、 Ca^{2+} 添加で GLVs 生成活性が回復したため、 Ca^{2+} がシロイヌナズナ LOX2 の活性化因子となっていることを解明した。シロイヌナズナで Ca^{2+} が LOX 活性化に必須である一方、いくつかの植物種で BAPTA の影響を調査した際、トマトは GLVs 生成が抑制されたが、タバコ、ダイズ、イネでは GLVs 生成に影響がなく、トウモロコシに至っては GLVs 生成が増加した。つまり、 Ca^{2+} による刺激認識は共通の分子機能ではなく、限られた種のみで獲得された機能であることが分かった。LOX 分子系統解析では、近縁の LOX 同士でも Ca^{2+} の影響が異なっており、新たな活性化因子の探索が目指される。

E-9 ショウブ由来レスベラトロール特異的 O-メチルトランスフェラーゼの機能解析
○肥塚崇男, 畑田珠希, 鈴木秀幸¹, 鈴木史朗², 松井健二
(山口大院・創科, ¹かずさ DNA 研・産業基盤, ²京大・生存研)

【目的】植物ポリフェノールであるレスベラトロールは, 抗酸化作用や抗がん作用, アンチエイジング効果など多彩な生理活性を持つこと, さらににはその水酸基がメチル化されると高い抗菌活性を示すことから栄養補助食品としての利用に加え, 様々な分野から注目を集めている。しかし, レスベラトロールを基質とする植物由来の O-メチルトランスフェラーゼ (OMT) が単離, 同定された報告は未だ数少ない。そこで本研究では, レスベラトロールを生成するとの報告があるショウブ属に分類される *Acorus calamus* からレスベラトロールをメチル化する酵素遺伝子を単離, 機能解析することを目的とした。

【方法・結果】ショウブの葉から total RNA を抽出し, RNA-seq を行った。de novo アセンブルによって構築したコンティグに対して, 既知のレスベラトロール OMT をクエリーとして用いて tblastx 解析を行い, 候補遺伝子を探索した。その結果, 2 つの候補遺伝子 *AcOMT1*, *AcOMT2* が見つかった。大腸菌を発現ホストとして組換えタンパク質を調製し酵素アッセイを行ったところ, *AcOMT1* はレスベラトロールおよびイソラボンチゲニンに対して高い OMT 活性を示した。さらに, その酵素反応生成物を GC-MS および ¹H-NMR により解析したところ, レスベラトロールの 4' 位水酸基をメチル化することが明らかとなった。本発表では, *AcOMT1* の基質特異性や組織別遺伝子発現の解析結果についても報告する。

E-10 海藻香気成分中の特徴的ポリエン類の同定
○梅本紗里, 盧 士剣¹, 反田妃香里², 赤壁善彦²
(山口大・農, ¹鳥取大院・連農, ²山口大院・創科)

【目的】陸上植物と同様に, 海藻においても揮発性有機化合物を海中に放出しており, ケミカルコミュニケーションとして機能している。一方, これら揮発性化合物には特徴的香気を持つものもあり, フレーバーやフレグランスの観点からも興味深い。本研究は, 海藻の香気成分に含まれる特徴的ポリエン類に注目して, 同定を行うことを目的とした。

【方法・結果】褐藻ウミトラノオ (*Sargassum thunbergii*) から, 連続蒸留抽出法を用いて精油を調製した。得られた精油を GC-MS 分析したところ, 特徴的な 4 種のポリエン類を見出した。そこで, カラムクロマトグラフィーにより目的とする化合物を単離し, 各種機器分析により推定した構造に基づいた位置及び立体選択的有機化学合成により, 4 種のポリエン類の内, 主要な成分を (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-3,6,9,12,15,18-henicosahexaene 及び (3Z,6Z,9Z,12Z,15Z)-3,6,9,12,15-henicosapentaene, 微量成分を (6Z,9Z,12Z,15Z,18Z)-1,6,9,12,15,18-henicosahexaene 及び (6Z,9Z,12Z,15Z)-1,6,9,12,15-henicosapentaene と同定した。以上の結果より, 褐藻中に末端二重結合型と飽和型のポリエン類の両者を見出すことに成功した。これまで, 末端飽和型のポリエン類は緑藻のみ報告されていたが, 褐藻にも存在することが明らかになった。

E-11 アセロラ果実の香気成分におけるキラルなノルイソプレノイドの同定
○北川恵里佳, 佐久間文¹, 篠田美樹, 赤壁善彦¹
(山口大・農,¹山口大院・創科)

【目的】アセロラ (*Malpighia emarginata* DC.) は、キントラノオ科ヒイラギトラノオ属に属し、果実は酸味種と甘味種に分類され、独特の風味を有する。このアセロラの香気成分には、遊離型と配糖体型の両者が知られており、配糖体中に含まれるキラルなノルイソプレノイド類の同定には至っていない。そこで、本研究では、アセロラ果実から精油を調製してその香気成分を同定する中で、キラルなノルイソプレノイド類に注目し、立体配置ならびに光学純度の決定を試みた。

【方法・結果】アセロラ果実を摩砕後、遠心して上澄みのジュースを得、XAD-2 樹脂を用いて固相抽出を行い、香気成分を配糖体と非配糖体画分に分けた。非配糖体画分は、GC-MS 分析を直接行って香気成分を同定した。一方、配糖体画分は、酵素処理によって加水分解を行い、遊離した香気成分を GC-MS 分析した。その結果、得られた配糖体画分において、ノルイソプレノイド類が検出され、キラルな 3-hydroxy- β -ionone を同定した。そこで、3-hydroxy- β -ionone を MTPA エステル誘導体化することにより、NMR の測定から立体配置および光学純度を決定したところ、70%ee 程度の(*R*)-体であることが分かった。

E-12 SanCat-R によるイオノール類の不斉酸化
○八尋康輝, 松尾弘武¹, 永岡宏行², 赤壁善彦¹
(山口大・農,¹山口大院・創科,²サンヨー食品(株)・開発)

【目的】ノルイソプレノイド類はカロテノイド類の色素の分解によって生成すると考えられ、植物や食品の香気に寄与する重要な成分である。ノルイソプレノイド類の中には、第二級アルコールを官能基として持つキラルな化合物もあり、その鏡像異性体間で香気特徴が異なることも知られている。キラルな第二級アルコールの調製方法として、リパーゼやパン酵母などの生体触媒が利用される場合があるが、近年、えんどう豆由来の鉄結合タンパク質 SanCat-R による、立体選択的な酸化反応が報告された。そこで、本研究では、キラルなノルイソプレノイド類を調製する方法の一つとして、SanCat-R の有効性を精査した。

【方法・結果】ノルイソプレノイドのアルコール類として、 α -inonol および β -ionol を基質として、SanCat-R による不斉酸化を行った。グリニン緩衝液中(pH 9.0)で反応を行ったところ、6-7 週間を要して α -inonol および β -ionol の 50%程度酸化が進行した。そこで、未反応のアルコールを回収し、chiral-GC による立体配置ならびに光学純度を決定したところ、 α -inonol は $89.2 \pm 1.1\%$ ee の(*S*)-体、 β -ionol は $91.7 \pm 2.5\%$ ee の(*S*)-体であり、立体選択的な酸化が進行していることが明らかとなった。

賛 助 企 業

- ・(株)旭製作所 岡山営業所
- ・天野エンザイム(株)
- ・アルファー食品(株)
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・エイチビィアイ(株)
- ・(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)

2018年5月28日 現在 58社

