

日本農芸化学会2020年度中四国支部大会 (第57回講演会)

講 演 要 旨 集

日時：2020年9月17日（木）、18日（金）
オンライン開催（徳島大学 常三島キャンパス）



日本農芸化学会中四国支部

日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）

オンライン開催（徳島大学 常三島キャンパス）

開催日：2020年 9月17日（木），18日（金）

第1日目：9月17日（木）

11:30～12:30 幹事打合会 (Zoom)

13:35～15:20 受賞講演 (Zoomウェビナー)

第5回（2020年）中四国支部技術賞

「機能性表示食品「POMアシタノカラダ河内晩柑ジュース」の開発」

首藤正彦 ((株)えひめ飲料), 古川美子 (松山大・薬),
伊賀瀬道也 (愛媛大院・医), 福田直大 (愛媛県・産技研)

2020年度 中四国支部奨励賞

「清酒酵母の機能性成分高蓄積機構に関する研究」

金井宗良 (酒総研)

「植物のアスコルビン酸生合成に関する研究」

末川麻里奈 (広島大院・統合生命)

2020年度 農芸化学技術賞

「L-グルタミン酸オキシダーゼの発見と応用開発」

日下部 均 ((株)エンザイム・センサ), 野口利忠 (ヤマサ醤油 (株)),
稻垣賢二 (岡山大院・環境生命)

15:35～16:50 産学連携シンポジウム (Zoomウェビナー)

「ヒト皮膚マイクロバイオームのバランス維持を可能とする新素材メチル-L-ソルボシドの可能性」

竹下 圭 ((株)伏見製薬所)

「機能性食品素材の開発ストーリー」

上村知広 (林兼産業 (株))

「次世代超臨界流体抽出分離装置の開発」

馬場健史 (九大・生医研)

第2日目：9月18日（金）

9:30～12:30 一般講演 (A～F会場, Teams)

一般講演 会場一覧表 (Teams)

会場	講演番号	分類・発表部屋名
A	A-1 ~ A-10	微生物 1
B	B-1 ~ B-10	微生物 2, 新技術
C	C-1 ~ C-12	遺伝子, 食品
D	D-1 ~ D-10	植物, 動物
E	E-1 ~ E-10	酵素・タンパク質
F	F-1 ~ F-11	有機化学・天然物, その他

一般講演 座長一覧表

会場	講演番号	座長
A	A-1 ~ A-4	櫻谷英治 (徳島大・生物資源)
	A-5 ~ A-8	田淵光昭 (香川大・農)
	A-9 ~ A-10	櫻谷英治 (徳島大・生物資源)
B	B-1 ~ B-4	阪本鷹行 (徳島大・生物資源)
	B-5 ~ B-8	中村嘉利 (徳島大・生物資源)
	B-9 ~ B-10	阪本鷹行 (徳島大・生物資源)
C	C-1 ~ C-6	大西康太 (徳島大院・医歯薬)
	C-7 ~ C-12	向井理恵 (徳島大・生物資源)
D	D-1 ~ D-4	刑部祐里子 (徳島大・生物資源)
	D-5 ~ D-10	田中 保 (徳島大・生物資源)
E	E-1 ~ E-5	湯浅惠造 (徳島大・生物資源)
	E-6 ~ E-10	川上竜巳 (徳島大・生物資源)
F	F-1 ~ F-5	田井章博 (徳島大・生物資源)
	F-6 ~ F-11	宇都義浩 (徳島大・生物資源)

(注意)

1. Teams会議を用いた口頭発表にて行います。各演者が共有機能を用いて発表を行います。
2. 1演題目 9:30~, 5演題目 10:30~, 9演題目 11:30~ に開始いたします。
3. 発表 9分, 質疑応答 2~3分, 交代 1分を目安として進行いたします。

講演会

プログラム

日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）

プログラム

第1日目：9月17日（木）

(Zoomウェビナー)

◇ 第5回（2020年）中四国支部技術賞 受賞講演

13:35～13:55

座長 菅原卓也（愛媛大院・農）

「機能性表示食品「POMアシタノカラダ河内晩柑ジュース」の開発」

首藤正彦（(株)えひめ飲料）、古川美子（松山大・薬）、
伊賀瀬道也（愛媛大院・医）、福田直大（愛媛県・産技研）

◇ 2020年度 中四国支部奨励賞 受賞講演

14:05～14:45

座長 水沼正樹（広島大院・統合生命）

「清酒酵母の機能性成分高蓄積機構に関する研究」

金井宗良（酒総研）

「植物のアスコルビン酸生合成に関する研究」

末川麻里奈（広島大院・統合生命）

◇ 2020年度 農芸化学技術賞 受賞講演

14:55～15:20

座長 神崎 浩（岡山大院・環境生命）

「L-グルタミン酸オキシダーゼの発見と応用開発」

日下部 均（(株)エンザイム・センサ）、野口利忠（ヤマサ醤油（株））、
稻垣賢二（岡山大院・環境生命）

◇ 産学連携シンポジウム

15:35～16:50

座長 田井章博（徳島大・生物資源）

「ヒト皮膚マイクロバイオームのバランス維持を可能とする新素材メチル-L-ソルボシドの可能性」

竹下 圭（(株)伏見製薬所）

「機能性食品素材の開発ストーリー」

上村知広（林兼産業（株））

「次世代超臨界流体抽出分離装置の開発」

馬場健史（九大・生医研）

第2日目：9月18日（金）

(Teams)

◇一般講演プログラム

A会場「微生物1」

9:30～

A-1*

酵母及びアグロバクテリウム発現系を用いた青枯病菌エフェクターRipAAの活性化機構の解析

○平田篤司, 北園喬斗, 白井沙樹, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大院・農)

A-2*

Pseudomonas syringae pv. *actinidiae* biovar 3における病原性に重要なエフェクターの探索

○川口瑞生, 斎藤美桜, 山田涼華, 藤原祥子, 平田篤司, 佐々奈於美,
生咲 巍¹, 秋光和也, 五味剣二, 杉田(小西)左江子, 濱野康平¹, 田中直孝,
大谷 衛¹, 片岡郁雄, 田淵光昭
(香川大・農, ¹香川県府中果樹研)

A-3*

食用きのこ成分による歯周病原性細菌のバイオフィルム阻害

○谷口彰吾, 濱治百々子¹, 飯田亮平², 阿座上弘行
(山口大院・創科, ¹山口大・農, ²鳥取大院・連農)

A-4*

Screening for substances that inhibit biofilm of the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*

○Ayesha Siddiqa, Naoya Asaeda¹, Syogo Taniguchi, Hiroyuki Azakami
(Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., Yamaguchi Univ., ¹Dept. Biol. Chem., Yamaguchi Univ.)

10:30～

A-5*

分裂酵母 *ura4* 変異体の細胞溶解現象とアデニン要求性との関連

○岩崎雅史¹, 戒能智宏^{1,2}, 松尾安浩^{1,2}, 川向 誠^{1,2}
(¹島根大院・自然科学, ²島根大・生資科)

A-6*

分裂酵母 *Mug14* の転写因子 Rst2による発現制御機構

○稻村真一¹, 田部卓磨², 川向 誠^{1,2}, 松尾安浩^{1,2}
(¹島根大院・自然科学, ²島根大・生資科)

A-7*

Fission yeast glycogen synthase kinase homologs, gsk3 and gsk31, are synthetically lethal with telomere protection gene pot1

○Eman Bahaaeldeen, Ahmed Habib, Masaru Ueno

(広島大院・統合生命)

A-8*

3,3'-Diindolylmethane induces autophagy and apoptosis in fission yeast

○Parvaneh Emami, Masaru Ueno

(広島大院・統合生命)

11:30~

A-9*

出芽酵母のトランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析

○益村晃司, 金井宗良¹, 河田美幸^{2,3,4}, 関藤考之^{2,3}, 曽我朋義⁵, 水沼正樹

(広島大院・統合生命, ¹酒總研, ²愛媛大院・農, ³愛媛大・プロテオセ,

⁴愛媛大・学術支援セ, ⁵慶應大・先端生命)

A-10*

Bioconversion of C-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol under aerobic conditions by a novel mouse intestinal bacterium

○Uswatun Hasanah, Kasumi Miki, Hideaki Kawakami¹, Yosuke Nishitani¹,

Hiroshige Kuwahara¹, Teruhiko Nitoda, Hiroshi Kanzaki

(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., ¹Maruzen Pharm. Co.)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

B会場「微生物2, 新技術」

9:30～

B-1*

大腸菌の定常期から死滅期におけるタンパク質発現能力の1細胞定量解析

○川畠龍司, 青井議輝, 中島田豊, 加藤 節
(広島大院・統合生命)

B-2*

1-ブタノール添加時に観察される大腸菌の異常な細胞構造についての解析

○新里海咲, 荒木勇登, 川畠龍司¹, 青井議輝¹, 中島田豊¹, 加藤 節¹
(広島大・工, ¹広島大院・統合生命)

B-3*

分裂酵母のロンボイドプロテアーゼ Rbd4 のタンパク質輸送への影響について

○松浦汐里, 野村勇太, 渋谷大介, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)

B-4*

液胞ドメインを介した TORC1 の活性制御における GPI lipid remodeling の役割

○荒木美彩子¹, 關川裕一郎², 傅田博人², 梶原健太郎², 船戸耕一^{1,2}
(¹広島大院・統合生命, ²広島大院・生物圏)

10:30～

B-5*

油糧糸状菌の Seipin 様タンパク質遺伝子の機能解析

○東 洋希, 中村和弘, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

B-6*

アグロバクテリウム法を用いたシイタケ形質転換法の開発

○北口直樹, ○楠 真緒¹, 阪本鷹行², 櫻谷英治²
(徳島大院・創成科学, ¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

B-7*

遺伝子組換え *Moorella thermoacetica* による合成ガスからのエタノール生産高速化

○竹村海生, 加藤淳也, 加藤 節, 藤井達也¹, 和田圭介¹, 青井議輝,
松鹿昭則¹, 村上克治¹, 中島田豊
(広島大院・統合生命, ¹産総研・機能化学)

B-8*

増殖の開始を制御する微生物間相互作用：環境中の微生物コミュニティにおける増殖制御ネットワーク

○鈴木陸太, Eunyoung Seo, 加藤 節, 中島田豊, 青井議輝
(広島大院・統合生命)

11:30~

B-9*

酸・熱ストレスによる核酸系抗生物質の増産効果と品質管理遺伝子群の発現誘導効果

○山形 遥, 中島佑里子, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆

(岡山大院・環境生命)

B-10*

植物葉上共生細菌 *Methylococcus extorquens* AM1 のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼアイソザイム XoxF2 の解析

○竹内赴登, 山下颯太, 谷 明生¹, 中川智行², 矢野嵩典, 三井亮司

(岡山理大・理, ¹岡山大・植物研, ²岐阜大・応生科)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

C会場「遺伝子、食品」

9:30～

C-1*

好熱菌トランスポゾンベクターの転位特性解析

○小原未愛，大城 隆¹，鈴木宏和¹
(鳥取大院・持社創生，¹鳥取大・工)

C-2*

R4 Gateway Recycling Cloning System を用いて作出された複数遺伝子コンストラクト導入植物における発現解析

○大屋卓博，蜂谷卓士，中川 強
(島根大・総科セ)

C-3

植物プロモーターの特異性を維持して目的遺伝子を高発現させる Boost Gateway システムの開発

○山田裕也，塚越啓央¹，石黒澄衛²，蜂谷卓士，中川 強
(島根大・総科セ，¹名城大・農，²名大院・生命農)

C-4*

ツタンカーメンエンドウの加熱による着色反応機構の解析：着色源の単離および同定

○前川優樹，近藤（比江森）美樹¹
(徳島文理大院・人間生活，¹徳島文理大・人間生活)

10:30～

C-5*

ビートファイバー摂取は高脂肪食摂取ラットの摂取エネルギーを低下させ，GLP-1 の分泌を増加させる

○岡本直大，前野元希¹，長森公寛¹，藤谷美菜¹，名倉泰三²，岸田太郎¹
(愛媛大・農，¹愛媛大院・農，²日本甜菜製糖・総研)

C-6*

アマニ水溶性食物繊維摂取による高スクロース食摂取ラット肝臓脂質減少作用

○松岡亜祐，稻田真子¹，池田直人¹，福光 聰²，藤谷美菜¹，岸田太郎¹
(愛媛大・農，¹愛媛大院・農，²筑波大・グローバル教育院)

C-7*

デーツ残渣発酵物による免疫調節作用の探索

○服部圭優，三本木至宏¹，長谷川桃子²，吉田充史²，山本祥也¹
(広島大・生物生産，¹広島大院・統合生命，²オタフクソース（株）)

C-8*

Mφにおける異常タンパク質分解を促進するイソラムネチンの作用機序解析
○坂井麻衣子, 大西康太, 増田真志, 大南博和, 奥村仙示, 板倉英祐¹,
原 太一², 竹谷 豊
(徳島大院・医歯薬, ¹千葉大院・理, ²早稲田大・人間科学)

11:30~

C-9*

*In vivo*イメージングを利用した腎障害の非侵襲的食品評価系の構築
○八澤菜央, 橋本孝太郎, 仮屋大志, 眞田洋平, 橋本貴生,
Fons AJ van de Loo¹, Thanutchaporn Kumrungsee, 矢中規之
(広島大院・統合生命, ¹Radboud Univ.)

C-10*

桃の香りがする日本酒の醸造方法の開発
○新藤葉月, 岡崎達郎¹, 宮下晃一¹, 田中晃一
(岡山県大院・保健福祉, ¹宮下酒造(株))

C-11

固定化グルタミン酸 (Glutamate-Sepharose) の志賀毒素吸着
○山崎義輝, 山下晶央, 金丸 芳
(徳島大・生物資源)

C-12

STEC O157:H7 産生志賀毒素の分離と細胞毒性
○山下晶央, 山崎義輝, 金丸 芳
(徳島大・生物資源)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

D会場 「植物、動物」

9:30～

D-1*

Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate from cabbage leaves and their chemical stabilities

○Rumana Yesmin Hasi, Yashimichi Takai¹, Hanif Ali, Kentaro Kogure, Junji Hayashi¹, Ryushi Kawakami¹, Mutsumi Aihara¹, Kaori Kanemaru¹, Tamotsu Tanaka¹

(Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ., ¹Grad. Sch. Technol. Industrial and Soc. Sci., Tokushima Univ.)

D-2*

Polyhistidine peptides を利用した植物細胞内へのタンパク質直接導入法の開発

○田中淑乃, 大村昂誠, 河野 強, 岩崎 崇

(鳥取大院・持社創生)

D-3

オオムギにおけるフラボノイド型ファイトアレキシン

○宇部尚樹, 勝山由郁¹, 假谷佳祐², 手林慎一³, 武田 真⁴, 上野琴巳¹, 石原 亨¹

(鳥取大・乾燥地研, ¹鳥取大・農, ²鳥取大院・持社創生, ³高知大・農,

⁴岡山大・植物研)

D-4*

イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン蓄積に関するナチュラルバリエーション

○假谷佳祐, 宇部尚樹¹, 上野琴巳², 寺石政義³, 奥本 裕⁴, 森 直樹³, 石原 亨²

(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・乾燥地研, ²鳥取大・農, ³京都大院・農,

⁴摂南大・農)

10:30～

D-5*

低分子量 G タンパク質 Rab-18 はコレステロールトランスポーターの膜輸送を介して線虫 *C. elegans* の幼虫休眠制御に関与する

○皆木友花, 栗津利邦, 松浦雅実, 松永洋平¹, 岩崎 崇, 河野 強

(鳥取大・農, ¹ (株) SRL)

D-6*

線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-2 の分子機構に関する研究

○影山なつみ¹, 松永洋平², 国松友香³, 岩崎 崇^{1,3}, 河野 強^{1,3}

(¹鳥取大院・持社創生, ² (株) SRL, ³鳥取大・農)

D-7*

モデル生物を用いた長寿に関わる代謝産物の探索

○青原 幸, 馬場真衣子, 久米一規, 水沼正樹
(広島大院・統合生命)

D-8*

Class C CpG オリゴ DNA による抗菌ペプチド Lipocalin2 の誘導効果

○山口智史, 鈴木卓弥¹, 山本祥也¹
(広島大・生物生産, ¹広島大院・統合生命)

11:30~

D-9*

抗悪性腫瘍薬ブルファンの若齢期暴露による無精子症発症予測マーカーの探索

○川畑海渡, 樋口雅司, 梅田拓実, 山野好章
(鳥取大・農)

D-10

Muscle regeneration ability and satellite cell content in a new muscle atrophy model, GDE5 transgenic mice

○小丸拓海, 佐藤可奈子, 矢中規之, Thanutchaporn Kumrungsee
(広島大院・統合生命)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

E会場「酵素・タンパク質」

9:30～

- E-1 好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来シトクロム c' の熱安定性に関する研究
○吉見太佑, 三本木至宏¹, 藤井創太郎¹
(広島大・生物生産, ¹広島大院・統合生命)

- E-2* 耐熱性レポータータグの開発を志向した好熱菌 LacZ の特性評価
○吉村俊祐, 大城 隆¹, 鈴木宏和¹
(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・工)

- E-3* L-アラビノース 1-脱水素酵素の酵素-基質-補酵素複合体の立体構造解析
○吉原健太郎, 渡辺誠也^{1,2}, 渡邊康紀^{1,3}
(愛媛大・農, ¹愛媛大院・農, ²愛媛大・沿岸環境科研セ, ³山形大・理)

- E-4* 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム c' の構造と機能の関係
○坂口 陸, 藤井創太郎, 三本木至宏
(広島大院・統合生命)

10:30～

- E-5 *Luteolibacter algae* SW フコイダン低分子化酵素遺伝子の高発現と酵素の特性
○新宮由奈子, 小谷健太¹, 藤原卓人¹, 八木寿梓¹, 鈴木宏和¹, 大城 隆¹
(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・工)

- E-6* 高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した L-チロシンオキシダーゼの性質検討
○矢野佳果, 松尾慎作, 伊藤菜奈子¹, 今田勝巳¹, 日下部 均², 根本理子, 田村 隆, 稲垣賢二
(岡山大院・環境生命, ¹阪大院・理, ²エンザイムセンサ)

- E-7* Reverse genetics on two membrane-bound aldehyde dehydrogenases of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5
○Roni Miah¹, Minenosuke Matsutani¹, Takeru Murate¹, Naoya Kataoka^{1, 2, 3}, Kazunobu Matsushita^{1, 2, 3}, Toshiharu Yakushi^{1, 2, 3}
(¹Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., ²Fac Agric, ³RCTMR, Yamaguchi Univ.)

E-8*

Characterization of a cryptic, membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. CHM43

○Thuy Minh Nguyen¹, Naoya Kataoka^{1, 2, 3}, Osao Adachi¹, Kazunobu Matsushita^{1, 2, 3}, Toshiharu Yakushi^{1, 2, 3}

(¹Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., ²Fac Agric, ³RCTMR, Yamaguchi Univ.)

11:30～

E-9*

ナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-C のグアニンヌクレオチド交換因子 GEF-H1 を介した新たなシグナル伝達機構

○西田充芳¹, 嶋田真紀², 宮本賢治¹, 辻 明彦^{1, 2}, 湯浅恵造^{1, 2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

E-10

S. marcescens LipC を利用したラクダ科動物由来 VHH (Nanobody) の分泌生産

○浅田知範¹, 高木大地¹, 中井美邑², 湯浅恵造^{1, 2}

(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

F会場「有機化学・天然物、その他」

9:30~

F-1*

きのこ廃菌床熱水抽出物に含まれるファイトアレキシン誘導物質の探索

○西村純美, 宇部尚樹¹, 福島(作野)えみ², 手林慎一³, 上野琴巳⁴,
大崎(岡)久美子⁴, 石原亨⁴

(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・乾燥地研, ²日本きのこセンター菌蕈研,
³高知大・自然科学農, ⁴鳥取大・農)

F-2*

エラジタンニン代謝物 urolithin A の抱合体の構造

○細川夏菜乃, 新實祐理, 森彩夏, 岩岡裕二, 伊東秀之
(岡山県大院・保福)

F-3*

O-マンノシルグリカン部分構造, Xyl α 1-3GlcA β 1-4Xyl β 1-4Rbo の合成

○田村敬裕, 田村純一
(鳥取大院・連農)

F-4*

ナマコ由来フコシルコンドロイチン硫酸の組成分析

○美船好香, 九里幸汰, 武田-奥田尚子, 田村純一
(鳥取大・農)

10:30~

F-5*

5-ALAを用いた光線力学療法における新規シップ塩基併用による増強作用

○篠原侑成, 遠藤良夫¹, 安部千秋², 小幡徹³, 小倉俊一郎⁴, 米村豊⁵,
宇都義浩⁶

(徳島大院・先端技術, ¹金沢大・がん研, ²先端医療研セ・老化機構研,

³愛知学院大・薬, ⁴東工大院・生命理工, ⁵腹膜播種治療支援機構,

⁶徳島大・生物資源)

F-6*

ヒマワリ種子由来のPC12細胞における神経突起形成促進作用物質

○古賀武尊, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹, 田井章博¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

F-7

中国産ハーブから単離されたマオエクリスタルVのモデルおよび全合成研究

○片山峻樹, 佐藤勇気, 浦達哉, 井田浩介, 泉実, 清田洋正
(岡山大院・環境生命)

F-8 イネいもち病菌毒素ピリキュラリオールおよび生合成中間体の合成研究
○王 子依, 桑名晶妃, 平岡諒也, 小野田祐子, 泉 実, 清田洋正
(岡山大院・環境生命)

11:30~

F-9 農産廃棄物（稻わら）を原料とした CNF の製造
○六車知晃, 中村嘉利¹, 浅田元子¹
(徳島大院・創成科学, ¹徳島大・生物資源)

F-10 リグノセルロース系バイオマス利用のための深共晶溶媒処理の検討
○吉田 優, 浅田元子¹, 中村嘉利¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

F-11* 農業廃棄物（ユズの皮）を原料とした CNF の生産と分析
○Yilamu Dilimulati（ディイリ）, 浅田元子¹, 中村嘉利¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

下線* の演題は、支部優秀発表賞審査の対象発表となります。

受 賞 講 演

講 演 要 旨

第5回（2020年）日本農芸化学会中四国支部技術賞受賞講演

機能性表示食品「POM アシタノカラダ河内晩柑ジュース」の開発

首藤正彦 ((株)えひめ飲料), ○古川美子 (松山大・薬),
伊賀瀬道也 (愛媛大院・医), 福田直大 (愛媛県・産技研)

(株)えひめ飲料・松山大学・愛媛大学・愛媛県は共同で、中高年者の認知機能の一部である記憶力を維持・改善する機能性表示食品「POM アシタノカラダ河内晩柑ジュース」を開発した。本講演では、その開発過程を紹介したい。

松山大学薬学部では 2008 年から愛媛県特産の柑橘の機能性を網羅的にスクリーニングし、1) 河内晩柑果皮にオーラプテン(aurantene ; AUR) やヘプタメトキシフラボンなど、脳機能に作用する成分が含まれること、2) 中でも AUR 含量は他の柑橘に比べると圧倒的に高く、搾汁の過程で果皮から果汁に移行すること、3) AUR は脳内に入って脳内炎症を抑制し、脳保護効果を示すこと等を見出した。一方、近年、認知症等多くの疾患に共通する基盤病態のひとつとして、体内で長期間くすぶり続ける「慢性炎症」が注目されている。これらの知見を考え合わせると、AUR を摂取し脳内炎症作用を抑制すれば、認知症の予防・進行抑制が期待できるのではないかと考えられた。そこで、2013 年愛媛県の産官学 11 団体が集まって「河内晩柑研究会」を形成し、「毎日の食生活に認知症予防を取り入れる」を目標に、河内晩柑の機能性を活かした機能性食品創生をめざすこととなった。2014 年には愛媛県戦略的試験研究プロジェクトに採択され、愛媛県・松山大学・愛媛大学・株えひめ飲料が共同で、AUR の脳保護効果を果汁飲料として活かす研究を開始した。1 日 1 本 (125 mL) の摂取で認知症予防が図れるような AUR 濃度とするため、1) AUR 等の機能性成分を高める栽培貯蔵技術の開発、2) AUR 等の機能性成分を富化した果汁調製法 (搾汁法等) の開発、3) 果汁等の安全性の検討、4) 果汁等における AUR 等の機能性成分の安定性の検討などを行った。その結果、果皮ペーストをブレンドした「AUR 高含有河内晩柑果汁飲料」を創出することができ、2017 年に共同で特許出願した。本製品は河内晩柑特有の爽やかで心地よい苦みを有しており、従来の河内晩柑果汁とは一味違う味わいを楽しむことができる。本製品の有効性は、一過性脳虚血モデルマウスを用いて解析した。その結果、果汁飲料の濃縮サンプルをあらかじめ投与しておくと、虚血手術により引き起こされる神経細胞死や過剰な炎症反応が抑制されることが明らかになった。ヒト介入臨床試験は、愛媛大学附属病院抗加齢予防医療センターにおいて平均年齢 71 歳の健康な 82 名の被験者 (認知症でない方) を対象とする二重盲検比較試験を実施した。その結果、本果汁飲料を 6 ヶ月摂取した被験者において、軽度認知障害スクリーニングテスト「あたまの健康チェック」(株ミレニア) で用いる「10 単語想起テスト」で有意な効果が認められた。以上の成果を基に、2018 年に機能性表示食品の消費者庁届出を行い、9 月に受理され、12 月に機能性表示食品「POM アシタノカラダ河内晩柑ジュース」の販売が開始された。

本商品の画期的な点は、1) 全国で初めて AUR が機能性関与成分として認められた機能性表示食品である；2) これまで機能性表示食品の機能性関与成分は、伝承的に体によい食品や疫学調査から有効とされる食品から見出されたものであるのに対し、「神経細胞における情報伝達機構に関わる分子を活性化させる成分を探索する」という基礎研究の結果見出された；3) 認知機能の維持をヘルスクレームにした機能性表示食品のうち、最終製品で臨床試験を行ったサプリメント形状ではない唯一の食品である(2020 年 7 月末現在)；4) これまで果汁を絞った後の柑橘果皮残渣は廃棄されその処理に多大な費用が必要であったのに対し、河内晩柑搾汁残渣を利活用すれば農家の収入アップを図ることができる；5) 超高齢社会で生じる種々の問題 (自立を妨げる認知機能の衰え・老人医療費の高騰等) の解決に役立つ等である。柑橘果皮は機能性成分の宝庫であるにもかかわらず、これまで充分に活用されていたとは言い難い。本商品開発が、今後、柑橘類の機能性を活かした食品開発の起爆剤となることを期待したい。

2020 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

清酒酵母の機能性成分高蓄積機構に関する研究

金井宗良（酒総研）

清酒酵母は、昔から長い年月をかけて、清酒造りに最も適した酵母として自然に選抜されてきた醸造用酵母であり、アルコール高発酵性・低温増殖性・乳酸耐性・香気成分高生成など様々な特性を有している。我々は、様々な微生物の中でも酵母、特に清酒酵母に高含有している機能性成分である S-アデノシルメチオニン (SAM) と葉酸に着目し、清酒酵母における SAM 及び葉酸高蓄積機構の解明及び生理学的意義を理解することで、最終的には清酒酵母の様々な特性の全容を分子レベルで把握することを目的とし研究を行っている。

SAM は生体内の主要なメチル基供与体として働くなど含硫アミノ酸代謝の key 物質であるため、アルコール性肝機能障害、うつ病、関節炎などの疾病に予防・治癒効果が認められている機能性成分である。また葉酸については、1 炭素代謝反応に重要な役割を果たし、造血機能による貧血の抑制、神経管閉鎖障害、動脈硬化、がん等に治癒効果が認められる機能性成分である。

そこで、まず我々は、酵母細胞内での SAM 高蓄積機構の理解を目的に SAM 高蓄積に寄与する新規遺伝子を同定するため、実験室酵母の一倍体による非必須遺伝子破壊株セットを用いて、メチオニン耐性を指標に新規 SAM 高蓄積株の探索を試みた。結果、アデノシンキナーゼをコードする *ADO1* 遺伝子が SAM 高蓄積に寄与するという新規な知見を見出した。また、*ADO1* 遺伝子破壊株が示すコルディセピン耐性を指標に、遺伝子組換え体にあたらない実用可能な SAM 高蓄積酵母の取得方法を開発し実用清酒酵母の育種に成功した。

次に、清酒酵母の SAM 及び葉酸高蓄積能に寄与する遺伝子を同定するため、清酒酵母と実験室酵母の交配による QTL (量的形質遺伝子座) 解析を行った。結果、出芽酵母の第 8 番染色体に存在した有意な QTL から *ERC1* 遺伝子 (多剤・毒性化合物排出活性を持つ膜タンパク質) を同定し、清酒酵母が持つ SAM 及びテトラヒドロ葉酸高蓄積能に清酒酵母型 Erc1 の機能が深く関与していることを見出した。さらに、清酒酵母型 Erc1 の機能はストレス耐性及び寿命の延長にも影響しており、様々なストレス耐性と寿命との関連性も明らかとしている。

今後は、これらの知見を基に、高品質な酒質を可能とする新たな優良清酒酵母の育種方法の開発、及び清酒酵母を用いた機能性食品等への応用展開を目指している。

2020 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

植物のアスコルビン酸合成に関する研究

末川麻里奈（広島大院・統合生命）

ビタミン C として知られるアスコルビン酸 (ascorbic acid; AsA) は、ヒトの健康の維持・促進に必須の栄養素である。ヒトは食事から十分量の AsA を摂取する必要があり、その主要な供給源となるのが野菜や果物などの植物である。一方、植物においても AsA は様々な生理機能を担っている。特に、AsA は植物の主要な水溶性抗酸化物質であり、種々の環境ストレスによって植物体内に生じた活性酸素を除去して酸化ストレスの軽減に寄与する。こうした背景から、植物における AsA 生合成調節機構の解明や、その知見を応用した高 AsA 植物の作出は、長年の課題になっている。植物はグルコースを初発物質とする経路から主に AsA を生合成する。また、主経路以外に複数の副経路が示唆されているが、副経路の存在や、それら副経路がいつ、どこで機能するのかについては、未だ議論の余地が残る。

本講演では、ガラクツロン酸を中間体とする AsA 生合成副経路（ガラクツロン酸経路）に関する酵素の遺伝子発現に関する研究について発表する。また、AsA 生合成酵素の発現調節による植物の AsA 強化を目的として、高 AsA 植物であるアセロラにおける主経路の酵素群に関する研究について発表する。

【トマトのガラクツロン酸還元酵素の遺伝子発現に関する研究】

ガラクツロン酸還元酵素 (galacturonate reductase; GalUAR) は、2003 年にイチゴにおいて同定されたガラクツロン酸経路に関わる酵素である。本研究では、トマトにおけるガラクツロン酸経路の働きを知るため、イチゴ GalUAR の一次構造と相同性がある遺伝子をトマト GalUAR とし、その遺伝子発現を解析した。トマト GalUAR はトマト葉において、塩や酸化ストレス、植物ホルモンおよび細胞の損傷によって著しく遺伝子発現が増加することが明らかになった。また、トマト葉プロトプラストを用いて、トマト GalUAR 遺伝子のプロモーター領域について解析したところ、トマト GalUAR 遺伝子プロモーターは植物の高発現プロモーターであるカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターと同程度の高い転写活性を有することが明らかになった。さらに、そのストレス誘導的な高発現に重要なシス因子を同定した。興味深いことに、このプロモーターはトマトだけでなく、シロイヌナズナ葉プロトプラストにおいても非常に高い転写活性を示したことから、植物種間に共通で機能するストレス誘導的高発現プロモーターとしての応用利用の可能性も見出された。

【アセロラにおける主経路の酵素群に関する研究】

植物における AsA 生合成の主経路では、6 種の酵素が反応を触媒している。それらの反応のうち、どの反応段階の調節が植物の AsA 強化に効果的であるかは意見が分かれている。そこで、レモンの 25 倍もの AsA を含有するアセロラに着目し、AsA 含有量が異なる 2 品種の果実で主経路の酵素遺伝子群の発現量を比較した。その結果、6 種のうち特に上流 3 種の酵素の遺伝子発現量が AsA 含有量と正に相関しており、アセロラの高 AsA 含有量はこれら 3 種の酵素遺伝子の高発現に起因すると推測された。そこで、トマト葉プロトプラストにおいてアセロラの主経路の酵素遺伝子群を一過的に過剰発現させて AsA 量への影響を評価した。その結果、上流 3 種の酵素遺伝子をそれぞれ単独に過剰発現させた場合には AsA 量が 1.2 - 2.3 倍に増加したのに対し、複数同時に過剰発現させた場合には AsA 量が 4 倍まで増加した。これらの結果より、植物の AsA 強化には AsA 生合成主経路の上流 3 種の酵素遺伝子の複数同時過剰発現が有効であることを示した。

今後は、トマト GalUAR プロモーターを利用したストレス誘導性 AsA 強化植物の作出や、アセロラにおける AsA 生合成酵素遺伝子のプロモーター解析を進めていきたいと考えている。

2020 年度農芸化学技術賞受賞講演

L-グルタミン酸オキシダーゼの発見と応用開発

日下部 均 ((株) エンザイム・センサ), 野口利忠 (ヤマサ醤油 (株)),
○稻垣賢二 (岡山大院・環境生命)

1. L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)の発見、組換え酵素生産の確立、構造解析と機能改変

我々は土壤分離菌が生産する抗腫瘍性物質を探索する過程で *Trichoderma* 属糸状菌が生産する高分子抗がん物質を見出し、1980年に新酵素 L-リシン α -オキシダーゼと同定した。これは、高基質特異性を示すアミノ酸オキシダーゼの初めての例であった。この後、特異的なアミノ酸オキシダーゼの探索を開始し、1982年に放線菌 *Streptomyces* sp. X-119-6 の固体培養により, L-Glu だけに作用する新酵素 LGOX を発見した。同遺伝子を取得し解析したところ、 α , β , γ の各サブユニットに相当する ORF は確認されず 1 本のポリペプチドとして発現した。このポリペプチドはホモ二量体を形成し、弱い活性を有していたが、元菌由来酵素と比較して基質親和性に劣り、熱にも不安定であった。しかし、この前駆体酵素を、プロテアーゼ処理すると、元菌 LGOX と同じ構造となり、酵素化学的性質も同等となることを発見した。この発見を応用し、本酵素を大腸菌で大量生産する組換え LGOX の工業的製造法を確立した。更に決定した X 線結晶構造を、低基質特異性の蛇毒 L-アミノ酸オキシダーゼの構造と比較したところ、活性中心に特徴的な残基が確認され、それらの中で 305 番目の Arg 残基が基質認識の鍵残基であることと、この残基の置換により基質特異性を完全に変換した酵素の作成ができることが発見した。

2. LGOXを応用した多彩な測定キットの商品化

L-Glu は調味料として大量に製造されているが、生体内においては様々な生理的機能を担っている重要なアミノ酸である。また L-Gln は、血中で一番多い遊離アミノ酸であり、腸管粘膜細胞の再生や免疫機能促進などの様々な生理的機能が報告されている。 γ -アミノ酪酸 (GABA) は、抑制系の神経伝達物質であり、GABA を添加した多くの機能性表示食品が商品化されている。これらのアミノ酸は、代謝経路においてお互いに直接的な基質と反応生成物の関係にあり、分析化学的な観点から、同様な方法で簡便に測定することが求められていた。我々は LGOX を応用して、生成する過酸化水素の発色系による L-Glu 測定キットを 1986 年に発売した。その後、組換え LGOX を使用して、常温で安定な二つの試薬溶液で構成し L-Glu 測定キットを開発し、先のキットに替えて販売している。また LED 比色計付の L-Glu 簡易測定セット「うまミエール」を理科実験教材用に製品化した。更に LGOX, グルタミナーゼ及びペルオキシダーゼ (POD) を用いて新規な L-Gln 測定キットを、GABA トランスアミナーゼ反応、LGOX 及び POD 反応をカップリングして、エンドポイント法による新しい GABA 測定キットを開発した。

3. 国内外企業のバイオセンサーへの貢献

1982 年、LGOX を酸素電極へ固定化したバイオセンサーを構築し、1984 年に欧洲バイオテクノロジー会議で発表した。その後、大学及びセンサーメーカーとの共同開発で、醤油分析用の卓上型 L-Glu センサー及び肝機能測定センサーチップの研究開発を行った。特に肝機能測定センサーによる GOT/GPT 測定値は、市販診断薬キットの測定値と高い相関性を示し、今後の更なる開発が期待される。LGOX を長年にわたり市場へ供給したことにより、国内外の会社が、L-Glu センサー及び L-Gln センサーを応用した多項目センサー分析機を商品化した。食品分析のみならず、抗体医薬品の細胞培養による生産工程管理に広く使われている。また、マウスやラットの脳内へ挿入する無線の *in vivo* 実験用センサーにも使用されている。今後、精神神経疾患の基礎研究あるいは新薬開発においても、LGOX による脳内の L-Glu 測定が大いに寄与すると期待される。最後に本研究及び技術開発に携わって頂いた数多くの共同研究者に、心より感謝致します。

産学連携シンポジウム

講演要旨

産学連携シンポジウム

ヒト皮膚マイクロバイオームのバランス維持を可能とする 新素材メチル-L-ソルボシドの可能性

竹下 圭 ((株) 伏見製薬所)

近年、細菌叢（マイクロバイオーム）に関する研究が進み、ヒトの体内外には多種類の細菌が共生しており、それらのバランス維持がヒトの健康に重要であることが明らかになってきた。

例えば、腸内では様々な菌がバランスよく生育しており、食物の分解、免疫の調整、便秘の予防、細菌感染の抑制などの効果をもたらしている。腸内細菌叢は、偏食や抗菌剤の服用などで破壊され、下痢や便秘をはじめとする体の不調がもたらされることは経験的に知られている。

食品分野では、お腹の調子を整えるために、オリゴ糖を食することで乳酸菌などの善玉菌を増やしたり、直接的にヨーグルトなどで乳酸菌を摂取したりすることが行われてきた。前者の方法はプレバイオティクス、後者はプロバイオティクスといわれている。

近年、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析技術が進歩し、細菌叢の役割が急速に解明されつつある。それにより、食品で生まれた細菌叢のバランスの維持の概念が皮膚表面にも適応できると報告がなされ、新しい認識が広がっている。

しかしながら皮膚表面の細菌叢のバランスをコントロールする素材はほとんど報告がなく、製品として市場に供給されていない。

これまでニキビや体臭の改善目的に添加される剤は主として「抗菌剤」であり、細菌に殺菌的作用するものであった。このような抗菌剤は、皮膚表面の細菌の除去を目的とするものであるが、細菌叢破壊によって皮膚の状態悪化を引き起こしたり、肌に対して刺激性、アレルギー性を示したりすることがあるといわれ、それら問題の解決が望まれている。

私たちは皮膚細菌叢のバランス維持の概念を具体化する化合物としてメチル-L-ソルボシド(MLS)という天然の配糖体を見出したのでここに報告する。

MLSはインド、パキスタンなど南アジアで広く栽培されている亜高木 *Grewia asiatica* の果実(ファルサ)に含まれる糖である。果実は肌や消化管によいと古くから知られ、その効果を期待し、直接またはジュースに加工され食されている。

MLSの構造はビタミンCの原料として知られる单糖L-ソルボースの2位(還元末端)の水酸基にメチル基が α 位にグリコシド結合したものである。

これまでMLSの機能性に関する報告はほとんどないが、特徴的な抗菌活性があることを確認した。その活性は殺菌的でなく静菌的で、過剰増殖により皮膚の状態を悪化させる細菌(ニキビ菌、加齢臭菌)に選択的に生育を抑制するがその以外の菌には効果を示さないものであった。

機能性としては、選択的抗菌性の他に高い吸湿性、保湿性もつことを確認している。

機能性の他、変異原性や皮膚刺激性などの各種安全性試験を実施、すべての試験において毒性、刺激性がないとの結果が得られている。食経験があることも併せて鑑みると極めて安全性が高い素材であると考えられる。

以上からMLSは安全で、皮膚の細菌叢のバランスを崩さず、皮膚の状態悪化要因菌選択的に静菌し、適度に乾燥から皮膚を守るという他剤では見られない効果を示すと期待される。

事業を推進するにあたり香川県の「新たな希少糖生産に係る研究開発補助金」を活用し、また、九州大学農学部竹川薰教授、香川大学創造工学部石井知彦教授、同農学部古本敏夫准教授のご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

機能性食品素材の開発ストーリー

上村知広（林兼産業（株））

弊社は山口県下関市に本社を置く食品メーカーです。今年度で80周年を迎える弊社はこれまでに魚肉ソーセージやハムなどの食肉加工品、養魚用飼料の製造を主に手掛けてきました。近年は「機能性食品素材」という新たな事業分野の展開にも取り組んでいます。「カツオエラスチン」および「ヒシエキス」というオリジナリティの高い弊社の機能性食品素材について、产学連携によるエビデンス取得の具体例を交えながら、開発ストーリーをご紹介させていただきます。

エラスチンとは全身の臓器、組織に広く分布し、弾性を与えていたるタンパク質です。弊社製品の「カツオエラスチン」とはカツオの動脈球と呼ばれる魚類特有の組織から抽出したペプチドです。開発当初、美容関連食品市場ではコラーゲン、ヒアルロン酸などの素材は消費者への認知度上昇により、多くの食品や化粧品などに使用されていました。一方、エラスチンも化粧品素材として牛項韌帯由来のエラスチンが古くから使用されていましたが、BSE問題により牛由来素材が懸念される傾向がありました。そこで安全性の面から水産分野を得意とする弊社は海洋性由来のエラスチン素材の開発に着目し、カツオの動脈球から高品質のエラスチンを分離、抽出する技術研究を進め大量製造法を確立し、カツオエラスチンの上市に至りました。しかし、魚類エラスチンについては学術報告がほとんどなかったため、大学と共同で物性、機能性研究を実施しました。さらに、大学との共同研究によるカツオエラスチン経口摂取後の血中移行ペプチドの検出によりヒトへの有効性に関する研究が飛躍的に進みました。ヒト臨床試験も積極的に実施しており、弊社素材を配合したサプリメントが機能性表示食品として受理されています。

「ヒシエキス」とはトウビシと呼ばれる植物の果皮の熱水抽出エキスです。「抗酸化」に関する研究テーマが多かった、今から10年よりも前に、「抗糖化」に着目して約800種類の生薬について抗糖化活性のスクリーニング評価を行いました。その結果、トウビシ果皮に高い抗糖化活性があることを発見し、原料検討や製造検討を経てヒシエキスを上市しました。その後、抗糖化研究の実績が豊富な大学と共同でヒト臨床試験を行い、有効性を確認しました。現在、作用機序解明のため、ヒシエキスに含まれる成分の解析を大学と共同で進めています。

近年、機能性表示食品制度発足により、信頼性のあるエビデンス取得はもとより、他社製品との差別化に繋がるエビデンスが改めて重視されてきていると感じています。今後も大学と連携して独自性の高いエビデンス取得を進めて参ります。

産学連携シンポジウム

次世代超臨界流体抽出分離装置の開発

馬場健史（九大・生医研）

超臨界流体は、液体の溶解性と気体の拡散性の両方の性質を持ち、さらに温度や圧力を変化させることによりその密度が連續的かつ大幅に変化させることができることから、溶媒物性(溶解力、誘電率、拡散係数、粘度など)を精密に制御することにより使用目的に応じた溶媒性能を付与できる高機能の媒体である。また、有害で高コストの有機溶媒の使用量を軽減でき、さらに分離や反応における効率の向上も見込めることがから、超臨界流体を利用した技術はハイコストパフォーマンス・低環境負荷の有用技術として注目されている。

超臨界流体クロマトグラフィー (Supercritical Fluid Chromatography, SFC) は、温度や背圧を変化、すなわち、移動相の状態を変化させることにより GC や HPLC に幅広い分離モードを選択できる特徴を有する。また、各種 HPLC 用カラムが使用でき、カラムや移動相に添加するモディファイアを選ぶことによって、幅広い化合物の分離に適用可能である。さらに、低粘性であるためカラム背圧が低いことを利用して、高速モードでの分離やカラム長を伸ばすことにより分離能を向上させることが可能である。超臨界流体抽出 (Supercritical Fluid Extraction, SFE) は抽出媒体として超臨界流体を用いることにより目的物質をマイルドな条件で高効率に抽出・精製することができ、また、クロマトグラフィーとの実用的なオンライン化も可能であることから、通常の溶媒抽出法では酸化などの変化を受けやすい不安定な代謝物の解析に好適である。しかし、現在のところ SFC, SFE の用途は限定されたものになっており、代謝物解析、特にメタボロミクスにおいては適用例がほとんどないのが現状である。

そこで、我々のグループでは、他にないユニークな性質を有する超臨界流体を代謝解析に効果的に適用することを目的として、種々の超臨界流体抽出分離技術の開発を試みている。また、超臨界流体を代謝物の分離分析に用いるための装置開発にも取り組んでいる。本講演では、SFE をオンライン接続した SFE-SFC/MS 装置の開発について解説するとともに、超臨界流体を用いた代謝物解析技術についても紹介し、代謝プロファイリングの有用な分析ツールとなりうる超臨界流体抽出分離技術の可能性について皆様と共有させていただきたい。

参考文献

1. T. Bamba *et al.*, *J. Chromatogr. A*, **1250**, 212-219 (2012).
2. 田口歌織、福崎英一郎、馬場健史、超臨界流体クロマトグラフィー/質量分析のメタボロミクスへの応用. 化学と生物, **52**(10), 693-698 (2014).
3. 馬場健史、超臨界流体抽出分離技術が拓く新しい分離分析の世界, *LCtalk*, **95**, 2-4 (2015).
4. 藤戸由佳、馬場健史、進歩総説 超臨界流体技術を用いた分離分析法. ぶんせき, **8**, 344-350 (2019).

— 講演一般 —

講演要旨

A-1 酵母及びアグロバクテリウム発現系を用いた青枯病菌エフェクターRipAA の活性化機構の解析
○平田篤司, 北園喬斗, 白井沙樹, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大院・農)

【目的】多くの植物病原菌は、III型分泌装置を用いて病原因子であるエフェクターを宿主細胞内に直接注入することで感染を成立させている。当研究室では、青枯病菌エフェクターRipAA を酵母で過剰発現させると、酵母の娘細胞膜に局在化することでリン酸化され、増殖阻害を引き起こすことを明らかにしている。RipAA のN末端部分にはカゼインキナーゼ1(CK1)のリン酸化モチーフが複数存在しており、これらのリン酸化部位の変異体(RipAA^{12SA})ではWTのRipAAと同様に娘細胞膜に局在しているにも関わらず、著しくリン酸化が低下しており、増殖阻害活性についても消失していた。本研究では、アグロバクテリウム発現系を用いることでRipAA が植物においてもリン酸化によって活性化されているかについて明らかにすることを目的としている。**【方法・結果】**RipAA は非病原力遺伝子であり、非宿主植物であるベンサミアナタバコにおいて過敏反応(HR)を引き起こすと報告されている。先行研究において、酵母での増殖阻害とベンサミアナタバコでのHRは、相関性があることが明らかになっている。そのため、アグロバクテリウム発現系を用いてベンサミアナタバコにRipAA^{12SA}を発現させ、HRが起るか確認を行ったところ、WTのRipAA ではHRが生じたが、RipAA^{12SA}ではHRを生じなかった。興味深いことにWTのRipAA はベンサミアナタバコにおいてもリン酸化を受けていたが、RipAA^{12SA}においては著しいリン酸化の低下が確認された。これらの結果から、RipAA は宿主である植物においてもリン酸化を受けることが機能に重要であることが示唆された。

A-2 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3における病原性に重要なエフェクターの探索
○川口瑞生, 齋藤美桜, 山田涼華, 藤原祥子, 平田篤司,
佐々奈於美, 生咲巖¹, 秋光和也, 五味剣二, 杉田(小西)左江子, 濱野康平¹,
田中直孝, 大谷衛¹, 片岡郁雄, 田淵光昭 (香川大・農, ¹香川県府中果樹研)

【目的】 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*)はキウイフルーツに感染する重大病害として知られている。*Psa*は5種類のbiovarに分類され、そのうちbiovar 3 (*Psa3*)は強い病原力があるとされている。*Psa*の病原因子としてエフェクターが知られているが、*Psa3*は40種類以上のエフェクターを有しており、その病原性に特に重要なエフェクターは未だ明らかになっておらず、本研究では*Psa3*の病原性に重要なエフェクターを明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法・結果】本研究ではまず、*Psa3*が特に強い病原性を持っていることから、*Psa3*が特異的に所有しているエフェクターが強い病原力に寄与しているのではないかと考え、これらエフェクター遺伝子を全て欠損させた株を作製し、宿主であるキウイフルーツの葉に接種して、葉内での生育を確認した。しかし、野生株と比べ大きな変化が見られなかったため、*Psa3*特異的なエフェクター以外に*Psa3*の病原性に大きく関与しているエフェクターの存在が考えられた。当研究室では、タバコおよび酵母発現系により、それぞれ過敏反応(HR)および増殖阻害を指標として病原性に特に重要と考えられるエフェクター14個を選抜している。この中でタバコ発現系において選抜されたエフェクター遺伝子を全て欠損させた株はタバコの防御応答であるHRを引き起こさなかった。また、酵母発現系によって選抜されたエフェクター遺伝子を全て欠損させた株は宿主内での増殖がエフェクターを分泌できない株(*hrcCΔ*)と同等まで減少し、タバコおよび酵母発現系により特に重要なエフェクターの選抜が可能であると考えられた。

A - 3

食用きのこ成分による歯周病原性細菌のバイオフィルム阻害
○谷口彰吾, 濱治百々子¹, 飯田亮平², 阿座上弘行
(山口大院・創科, ¹山口大・農, ²鳥取大院・連農)

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のバイオフィルム形成に対するシイタケメタノール抽出物及びヤマブシタケ水抽出物の阻害効果を調べた。新鮮な生シイタケの傘部分からの抽出物は *E. corrodens* のバイオフィルム形成を強く阻害した。バイオフィルム阻害効果は用量依存的で、殺菌活性によるものではなかった。また *luxS* 株に対しても用量依存的な阻害効果を示したが、野生株の効果ほどではなかった。抽出物は *E. corrodens* 培養上清中の AI-2 の生産を大幅に減少させた。以上より、シイタケメタノール抽出物による AI-2 生産の減少が *E. corrodens* によるバイオフィルム形成を阻害することを示唆した。

次に、ヤマブシタケの水抽出物が *E. corrodens* のバイオフィルム形成を阻害することを発見した。ヤマブシタケのバイオフィルム阻害効果は用量依存的に見られ、それは *E. corrodens* に対する殺菌作用によるものではなかった。ヤマブシタケ抽出物を硫安分画したところ、70%画分から阻害活性が見られた。この画分を熱処理したところ、バイオフィルムの阻害は完全にはならなかった。これらのことから、部分的に熱に安定なタンパク質性の成分がバイオフィルムの阻害に関与することが示唆された。さらに、この画分を限外ろ過によって分画を行った。その結果、分子量が 60-100 kDa 程度のタンパク質が *E. corrodens* のバイオフィルムを阻害することが示唆された。さらに、ヤマブシタケの抽出物が一旦形成されたバイオフィルムを分解する能力があることも示唆された。

A - 4

Screening for substances that inhibit biofilm of the cariogenic pathogen *Streptococcus mutans*
○Ayesha Siddiq, Naoya Asaeda¹, Syogo Taniguchi, Hiroyuki Azakami
(Grad Sch Sci Tech Innov, Yamaguchi Univ, ¹Dept Biol Chem, Yamaguchi Univ)

In this study, we investigated the biofilm formation of *Streptococcus mutans* on three substances including shiitake methanol extracts, yamabushitake water extracts and catechin. The strains used in this study are *S. mutans* MT8148, OMZ175 and UA159.

First, the biofilm-forming ability of the three *S. mutans* strains was compared. When cultured in the absence of sucrose, biofilm formation was observed in all three strains. Furthermore, the addition of sucrose significantly promoted biofilm formation in MT8148 and UA159 strains. In subsequent experiments, the effects of each candidate inhibitor on biofilm formation were investigated in the presence and absence of sucrose.

Addition of shiitake extract did not show inhibition of biofilm formation in all strains regardless of the presence or absence of sucrose. Addition of epigallocatechin gallate significantly suppressed biofilm formation in two strains, OMZ175 and UA159, in the absence of sucrose. In addition, in the presence of sucrose, MT8148 strain showed suppression of biofilm formation. Furthermore, in the yamabushitake water extract, biofilm formation was suppressed in all strains only in the environment without sucrose.

S. mutans forms a viscous insoluble glucan from sucrose, which causes attachment, but it is also known that there is an attachment mechanism independent of sucrose. The inhibition of biofilm formation seen in the presence and absence of sucrose may be due to a completely different effect.

A - 5

分裂酵母 *ura4* 変異体の細胞溶解現象とアデニン要求性との関連

○岩崎雅史¹, 戒能智宏^{1,2}, 松尾安浩^{1,2}, 川向 誠^{1,2}
(¹島根大院・自然科学, ²島根大・生資料)

当研究室では、分裂酵母の *ura4* 遺伝子破壊株 ($\Delta ura4$ 株) を YPD 培地で培養した時に、劇的な細胞溶解を誘導することを見出している。そして、 $\Delta ura4$ 株においては Ura4 の反応の前駆体である Orotidine-5-monophosphate (OMP) が蓄積し、OMP の蓄積が起こらない株では細胞溶解は誘導されないことを報告している。しかし、OMP が細胞壁や細胞形態にどの様に関与するかは明らかではない。本研究ではこの細胞溶解現象の詳細な仕組みを明らかにすることを目的としている。

分裂酵母の $\Delta ura4$ 株で *ade6-M210* の変異を持つ株が、YPD 培地では細胞溶解を抑圧し、YPAD 培地では細胞溶解を起こしている結果を得た。そこで、アデニンの要求性と細胞溶解抑圧現象に関連があると考え、アデニン要求性を示す変異体, *ade1*, *ade2-17*, *ade3*, *ade4*, *ade5*, *ade6-M26*, *ade6-M216*, *ade6-M375*, *ade7-L465*, *ade10* と $\Delta ura4$ 株の 2 重変異体を作製し、細胞の観察を行った。その結果 *ade6-M26*, *ade6-M216*, *ade6-M375*, *ade7-L465* の変異を持つ株では、アデニン添加の有無に関わらず、細胞溶解を抑圧した。*Ade6* は、IMP 合成の 6 段階目の反応を触媒し、5-アミノイミダゾールリボシドの炭素化反応を触媒し、*Ade7* は次の反応を触媒する。*ade6* と *ade7* 変異体では、ポリリボシルアミノイミダゾールが蓄積することで赤色を呈することで知られていることから、この化合物の蓄積が細胞溶解に影響している可能性を考えられる。これらの変異体で、OMP の蓄積が関与しているかについて、質量分析器で OMP を定量することで、さらなる細胞溶解の解明を目指している。

A - 6

分裂酵母 Mug14 の転写因子 Rst2 による発現制御機構

○稻村真一¹, 田部卓磨², 川向 誠^{1,2}, 松尾安浩^{1,2}
(¹島根大院・自然科学, ²島根大・生資料)

cAMP/PKA (プロテインキナーゼ A) 経路は、細胞外の豊富な炭素源に応答して触媒サブユニット Pka1 が活性化され、様々な生体内反応を調節することが報告されている。分裂酵母で Pka1 は、いくつかのストレスやグルコース濃度に応答して機能していることが示唆されているが、その詳細な標的因子はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、網羅的解析によって、*pka1* 欠損株でタンパク質量が増加している因子の同定とその制御機構を明らかにすることを目的とした。

野生株と *pka1* 欠損株からタンパク質を抽出し、ナノ LC-MS/MS 解析によって発現量の変化を解析した。その結果、野生株に比べ、*pka1* 欠損株で複数のタンパク質の発現量が変化しており、その中で、顕著に発現量が増加していた Mug14 に注目した。Mug14-GFP 株を作製し、実際の局在と発現を解析したところ、野生株に比べ *pka1* 欠損株では細胞全体で強い蛍光がみられ、発現が増加していた。次に、*mug14* mRNA の発現を解析したところ、*pka1* 欠損株で増加していた。Pka1 の下流には転写因子 Rst2 があり、Pka1 によって負に制御されている。*pka1 rst2* 二重欠損株を解析したところ Mug14 は Rst2 によって転写レベルで制御されていることが明らかになった。また、*mug14* 遺伝子のプロモーター上にある Rst2 特異的な結合配列がその転写に重要であり、*mug14* が転写レベルで Rst2 によって制御されていると明らかになった。また、Mug14 と同様の機能を持つと考えられている Mde1 および Mta3 に関しても、*pka1* 欠損株で mRNA の発現が増加しており、これらが、Pka1 経路を介して発現制御されていることが明らかになった。

- A – 7 Fission yeast glycogen synthase kinase homologs, gsk3 and gsk31, are synthetically lethal with telomere protection gene pot1
○Eman Bahaaeldeen, Ahmed Habib, Masaru Ueno (広島大院・統合生命)

Schizosaccharomyces pombe (Fission yeast) is a good model organism to study genes which are responsible for the telomere and chromosome stability. Deletion of *pot1* gene leads to telomere loss and chromosome circularization. To find genes which are important for the maintenance of circular chromosomes, we screened the chemical that inhibits the growth of the strain that have circular chromosomes. We found that human Gsk3 inhibitor IX inhibits the growth of *S. pombe* *pot1Δ* cells with circular chromosomes. Gsk3 (serine threonine kinase protein) in *S. pombe* is encoded by *gsk3* and *gsk31* which are 67% identical to mammalian *gsk3*. If *gsk3* and/or *gsk31* are required for the maintenance of circular chromosomes, *gsk3Δ gsk31Δ* could be synthetically lethal with *pot1Δ* cells. We found that *gsk3Δ gsk31Δ* are synthetically lethal with *pot1Δ* cells. To know the mechanism of that synthetic lethal interaction, I am constructing *gsk31* mutant which could become lethal with *gsk3Δ pot1Δ* cells at high temperatures. These triple mutants could be useful to understand something about the cause of the *pot1Δ gsk3Δ gsk31Δ* synthetic lethal interaction.

- A – 8 3,3'-Diindolylmethane induces autophagy and apoptosis in fission yeast
○Parvaneh Emami, Masaru Ueno (広島大院・統合生命)

DIM (3,3'-Diindolylmethane) is a compound derived from the digestion of indole-3-carbinol, found in broccoli family looks like cabbage and broccoli (Verhoeven *et al.*, 1996). It is anti-cancer drug by apoptosis induction in some types of cancer such as breast (Wang *et al.*, 2008) and prostate cancer (Nachshon-Kedmi *et al.*, 2003). In addition, study by Kandala and Srivastava (2012) showed DIM induces autophagy in ovarian cancer cells also. Recent studies by Stephan *et al.* (2013) showed that it increases the lifespan in fission yeast but the main mechanism of lifespan expansion in *S. pombe* still unclear. To study the effect of DIM more deeply, we analyzed the viability in fission yeast with 20 ug/ml DIM in log phase and stationary phase cells. Surprisingly, we found the dual effects of DIM on fission yeast. Not only it extends fission yeast lifespan but also kills about 99% of cells in log-phase and condenses nuclei and by extended treatment duration, it induces apoptosis but does not promote apoptosis in stationary cells. We confirmed apoptosis by nuclear fragmentation and nuclear membrane disruption in cells. We found nuclear membrane disruption is appeared more faster than nuclear fragmentation. In the other hand our recent results showed that the DIM effects are dose-dependent and in lower level (5 ug/ml) it induces autophagy and sporulation in fission yeast. In conclusion, it seems that there are wide range-dose dependent effects for DIM on fission yeast which could be an important factor to use it in human health.

A-9 出芽酵母のトランスポーターと予想される寿命延長因子 Ssg1 の機能解析
○益村晃司, 金井宗良¹, 河田美幸^{2,3,4}, 関藤考之^{2,3}, 曾我朋義⁵, 水沼正樹
(広島大院・統合生命, ¹酒總研, ²愛媛大院・農, ³愛媛大・プロテオセ,
⁴愛媛大・学術支援セ, ⁵慶應大・先端生命)

【目的】メチオニン代謝経路において *S*-アデノシルメチオニン (SAM) は、生体内の主要なメチル基供与体として様々な物質のメチル化に利用される。SAM はメチル基を供与後、*S*-アデノシルホモシスティン (SAH) となる。SAH は SAM の構造アナログとしてメチル化反応を阻害するため、SAH 水解酵素 *SAHI* によって速やかに分解される。我々の研究室では、*SAHI* 遺伝子に変異を有する *sahI-1* 変異株のスクリーニングから、寿命を延長する機能獲得型の優性変異 *SSG1* を取得した。*SSG1* は対数増殖期に液胞膜に局在し、イオン濃度勾配に依存して多剤の輸送に関わる MATE family と相同なドメイン配列を持っていた。さらに液胞に SAM および SAH を高蓄積した。このことから、*SSG1* は SAM および SAH を液胞に輸送・蓄積することで寿命延長に関わるトランスポーターと予想し、その解析を目的とした。

【方法・結果】*SSG1* の機能には液胞のプロトン濃度勾配の形成が重要であると予想し、液胞型 ATPase のサブユニット *VMA2* を破壊した。その結果、*SSG1* 変異が示すストレス耐性や寿命延長が消失し、SAM/SAH の蓄積が観察されなかった。このことから、*SSG1* の機能には液胞のプロトン濃度勾配の形成が重要であることが明らかになった。さらに、*SSG1* を SAM および SAH を液胞に輸送・蓄積するトランスポーターと同定するため、*SSG1* 変異株と機能関連する遺伝子との二重変異株を用いて SAM および SAH の局在を観察した。これらの結果より、*SSG1* が SAM および SAH の液胞輸送に関わることが予想された。

A-10 Bioconversion of C-glycoside mangiferin into its aglycone norathyriol under aerobic conditions by a novel mouse intestinal bacterium ○Uswatun Hasanah, K. Miki, H. Kawakami¹, Y. Nishitani¹, H. Kuwahara¹, T. Nitoda, H. Kanzaki
(Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ., ¹Maruzen Pharm. Co.)

【Purpose】Norathyriol, an aglycone of C-glycoside mangiferin, possesses high bioactive properties yet low in natural occurrence. Mangiferin-deglycosylation is difficult due to the resistance of the C-C bond. So far, only two strictly anaerobic bacteria isolated from the human intestine were reported to convert mangiferin. We previously reported the isolation of mouse intestinal bacteria that possess the activity¹⁾. This study aimed to identify and characterize the isolated bacterium KM7-1, as well as the mangiferin conversion reaction by using resting cells.

【Method/Results】16S rDNA sequencing indicated that KM7-1 belongs to the genus *Bacillus*. Experiments of bacterial cultivation were conducted under different conditions of aeration, temperature, vessel, and incubation time. Although it was isolated under anaerobic conditions at 37°C, *Bacillus* sp. KM7-1 grew better under aerobic conditions and the optimum temperature was 50°C. Static culture in an Erlenmeyer flask was more suitable for bacterial growth. By using resting cells grown under aerobic conditions, 1 mM of mangiferin was converted into high level of norathyriol, either under aerobic or anaerobic conversion reaction conditions. Despite the same growth characteristic to the taxonomically similar *Bacillus* strains, only *Bacillus* sp. KM7-1 deglycosylated mangiferin. Mangiferin deglycosylation by resting cells was time-dependent and bacterial-amount dependent. This study provided a new method to produce norathyriol by bacterial conversion under aerobic conditions.

¹⁾Miki, Nitoda, Kanzaki et al. 53rd Lecture Meeting of the JSBBA, Chushikoku Branch (Kochi), 2019.

B-1 大腸菌の定常期から死滅期におけるタンパク質発現能力の1細胞定量解析
○川畠龍司, 青井議輝, 中島田豊, 加藤 節 (広島大院・統合生命)

【背景・目的】微生物は定常期において栄養飢餓などのストレスによって増殖できない状態にあり、一見代謝が行われていないように思われる。しかし、定常期初期では代謝活性が保持されていることが報告されている (Gefen *et al.* PNAS, 2014)。つまり、細胞は定常期において増殖停止後、一定期間代謝が維持された後に代謝能力を失い、最終的には再増殖能を失う（細胞の死）。では、再増殖能力の喪失はどのような代謝活動の停止により生じるのだろうか。このことを明らかにするために、本研究では、まず定常期以降のタンパク質発現能力に着目し、再増殖能力との関連性を大腸菌をモデル微生物として解析した。

【方法・結果】タンパク質発現能力の指標として、アラビノースの添加により Green Fluorescent Protein (GFP) 発現が誘導されるプラスミドを大腸菌野生株に導入した GFP 株を製作した。GFP 株を LB 培地で回分培養して 1 日毎、計 4 日間サンプリングを行った。ここで得られた菌体をマイクロ流体デバイスに植菌し、同一細胞におけるアラビノース誘導による GFP 生産能力と、増殖基質の添加による再増殖能力を測定した。観察の結果、GFP を発現可能な細胞の割合は経時に低下したが、どの時点においても再増殖する細胞の割合よりも僅かに高かった。これは、再増殖できない細胞の中にタンパク質発現能力を保持しているものが常に一定数存在することを意味しており、細胞はタンパク質発現能力を喪失する前にすでに再増殖能力を失っている可能性を示唆している。

B-2 1-ブタノール添加時に観察される大腸菌の異常な細胞構造についての解析
○新里海咲, 荒木勇登, 川畠龍司¹, 青井議輝¹, 中島田豊¹, 加藤 節¹
(広島大・工, ¹広島大院・統合生命)

【目的】近年、低炭素社会実現のために世界的にバイオ燃料の導入が進められており、エタノールだけでなく燃料としての適性が高いことからブタノールにも注目が集まっている。しかしブタノールは強い細胞毒性を示すため、ブタノールの実用的な発酵生産のためには毒性機構の解明と耐性付与が重要である。我々は 1-ブタノールの細胞毒性機構を解明するための研究を進め、1-ブタノール添加によって大腸菌に異常な細胞構造が引き起こされることを発見した。そこで本研究では、①1-ブタノールの添加による大腸菌の異常な細胞構造形成と細胞死との関連性、および、②異常な細胞構造を形成する原因を調べた。

【方法・結果】①について調べるために、ブタノール無添加条件で培養した大腸菌細胞を、スライドガラス上に製作した 5%ブタノール濃度および細胞死の指標である Propidium Iodide (PI) を含むアガロースパッドに固定化し、細胞の形態変化を経時的に顕微鏡観察した。その結果、異常な細胞構造が形成された細胞が、その後に PI により染色されていることがわかった。このことから異常な細胞構造の形成は細胞死に関連がある現象だと示唆された。②について調べるために、異常な細胞構造が形成された細胞と正常細胞を比較したところ、細胞膜・細胞壁の変形、もしくは細胞質成分の流出や凝集が原因として考えられた。そこで、まず細胞膜および細胞壁に対し特異的に結合する蛍光染色試薬を用いた顕微鏡観察を行ったところ、どちらもブタノールを添加しても正常な細胞と同様の構造を維持していることがわかった。このため、現在、細胞質成分が異常な細胞構造の形成に関与するかどうかを検討中である。

B-3 分裂酵母のロンボイドプロテアーゼ Rbd4 のタンパク質輸送への影響について
○松浦汐里, 野村勇太, 渋谷大介, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】ロンボイドプロテアーゼファミリーは基質となる膜タンパク質を分解するものと、タンパク質の細胞内輸送や品質管理に関与するものが存在する。分裂酵母のロンボイドプロテアーゼファミリーである Rbd4 は機能未知であるが、欠損株がトランスゴルジネットワーク領域の小胞の逆行輸送を阻害するモネンシンに感受性を持つことが明らかになっている。このことから Rbd4 は細胞内のタンパク質輸送に関与すると推定し、その機能と他タンパク質との関連について解析することを目的とした。

【方法・結果】*rbd4* 欠損株と同様にモネンシンに感受性を示す *vps* 欠損株との関連性について調べたところ、*rbd4*⁺で形質転換させた *vps901* 欠損株や *vps3* 欠損株等で感受性が抑制された。さらにコロニープロットの実施により *rbd4*⁺で形質転換させた *vps901* 欠損株において、液胞タンパク質である Cpy1 の細胞外漏出が見られなくなった。*Vps901* はエンドソーム形成の初期に関わるタンパク質であり、Ent3 や Gga21Gga22 と深く関連し、これらの欠損株はモネンシンに感受性を示す。*rbd4*⁺でこれらの欠損株を形質転換させた場合でも、モネンシンの感受性が抑制された。このことから Rbd4 はゴルジ体から液胞間のタンパク質輸送に関わることが考えられた。さらに Cpy1 と異なる輸送経路を持つ Cps1 の輸送に Rbd4 が関与するのか確認するため、Cps1 の蛍光観察及びウェスタンプロットを行った。結果、*vps901* 欠損株では Cps1 の輸送異常が見られる一方で *rbd4* 欠損株では見られなかった。以上のことから Rbd4 は小胞輸送、特にエンドソーム形成の前後に関わるか、輸送されるタンパク質の選別に関わることが考えられる。

B-4 液胞ドメインを介した TORC1 の活性制御における GPI lipid remodeling の役割
○荒木美彩子¹, 關川裕一郎², 傳田博人², 梶原健太郎², 船戸耕一^{1,2}
(¹広島大院・統合生命, ²広島大院・生物圏)

【目的】生体膜には不飽和脂質に富む液体無秩序相 (Ld ドメイン) とスフィンゴ脂質とステロールに富む液体秩序相 (Lo ドメイン) の二つのドメインがあり、Lo ドメインには膜タンパク質の一つである GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカータンパク質 (GPI-AP) が集積することが知られている。Lo ドメインに GPI-AP が集積することから、多くの研究者は Lo ドメインが GPI-AP の選別輸送のプラットホームとして機能していると考えている。しかし反対に、GPI-AP が Lo ドメインの形成・維持に重要な役割を持つ可能性も否定できない。最近我々は、液胞膜上で機能する TORC1 (target of rapamycin complex 1) の活性が Lo ドメインによって調節される可能性を報告した。そこで本研究では、Lo ドメインを介した TORC1 の活性制御に GPI-AP が関与するのではないかと考え解析を行った。

【方法・結果】Rapamycin 含有培地で GPI の生合成やリモデリングに関わる遺伝子の変異株の生育を観察した。その結果、野生株と比較して、GPI の生合成やリモデリングに障害を持つ変異株で生育の悪化が確認された。Rapamycin は TORC1 の特異的な阻害剤である。従って、GPI 合成遺伝子の変異株では TORC1 活性が低下していると推察される。次に、GPI のリモデリング遺伝子の変異が液胞膜 Lo ドメインの形成に及ぼす影響について解析を行ったところ、変異株では Lo ドメインの形成が減少していることが確認された。このことから、GPI-AP は液胞膜の Lo ドメインの形成を調節することで TORC1 の活性をコントロールしている可能性が示唆された。

B-5 油糧糸状菌の Seipin 様タンパク質遺伝子の機能解析
○東 洋希, 中村和弘, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

【背景・目的】*Mortierella alpina*は多価不飽和脂肪酸生産能や脂質生産性に優れた油糧糸状菌である。これまでに, *M. alpina*を用いた変異や分子育種によって様々な機能性脂質生産株が構築されており, より効率的な脂質生産に向けて脂肪酸蓄積能の更なる向上が望まれている。細胞内の貯蔵脂質は脂肪滴(LD)と呼ばれる細胞小器官に蓄積されることが知られており, ヒトやマウスにおいてLDを被覆するPerilipinや小胞体からLDを切り出すSeipinなどのLD形成関連タンパク質の解析が進んでいる。本研究では微細藻類ラビリンチュラ由来LD形成関連タンパク質(TLDP1)遺伝子, および, *M. alpina*内在性のSeipin様タンパク質遺伝子を*M. alpina*において過剰発現させ, *M. alpina*におけるそれら発現タンパク質の機能性を評価した。

【方法・結果】ラビリンチュラ類の*tldp1*遺伝子については*Aurantiochytrium limacinum*由來のものを利用した。また, *seipin*遺伝子については*M. alpina*のゲノムデータベースを用いてモチーフ検索を行った結果見い出された2つの遺伝子をそれぞれ*sipn1*, *sipn2*としてクローニングした。次に, これら3つの遺伝子の過剰発現株を構築し, LDの蛍光顕微鏡観察および脂質分析を行った。その結果, *tldp1*過剰発現株では野生株よりも大きなLDが観察され, *sipn1*および*sipn2*過剰発現株では野生株より小さなLDが多数観測された。また, *sipn2*過剰発現株においては脂質生産性の向上が確認された。これらの結果から, TLDP1はLDの肥大化, Seipin様タンパク質はいずれもLDの切り出しに関与することが示唆され, 特に, *sipn2*は脂質生産における新たな育種ターゲットになり得ることが示唆された。

B-6 アグロバクテリウム法を用いたシイタケ形質転換法の開発
北口直樹, ○楠 真緒¹, 阪本鷹行², 櫻谷英治²
(徳島大院・創成科学, ¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

【目的】キノコは我が国の食文化に深く根付いた食材であり, 現在では健康食品としても利用され, 様々な種が栽培されている。しかし, いずれのキノコにおいても子実体形成メカニズムは未解明な点が多く, 育種や品種改良に向けた子実体形成関連遺伝子の機能解析が求められている。シイタケ(*Lentinula edodes*)は代表的な食用キノコであり, トランスクリプトーム解析やプロテオーム解析によって子実体形成関連候補遺伝子が幾つもリストアップされている。一方, 主流とされるプロトプラストを介した形質転換法は効率が低く, これらのゲノミクス研究の律速となっている。そこで, 本研究ではシイタケ XR-1 株を供試菌として, 植物感染性細菌 *Agrobacterium* を介した形質転換(ATMT 法)を用いた高効率形質転換系の開発を試みた。【方法・結果】形質転換株の選択マーカーには, 既存の担子菌用ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた。XR-1 株の菌体については寒天培地上で生育させた二核菌糸をホモジナイズして用い, また *Agrobacterium* については Mg 含有 LB 培地で簡易的に培養した菌体を用いた。さらに, アセトシリソゴン含有培地においてこれらを共培養した後, ハイグロマイシン含有の選抜培地において薬剤耐性株を選抜した。得られた株については, PCR によって目的遺伝子の導入を確認した。また, 本手法を用いて緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子発現カセット導入株を構築し, 形質転換株菌糸における蛍光を確認した。本手法では, それぞれの培養条件を簡略化することで, 一般的な ATMT 法の操作と比べてより簡便かつ高効率な形質転換プロトコルを確立したといえる。

B-7 遺伝子組換え *Moorella thermoacetica* による合成ガスからのエタノール生産高速化
○竹村海生, 加藤淳也, 加藤 節, 藤井達也¹, 和田圭介¹, 青井議輝,
松鹿昭則¹, 村上克治¹, 中島田豊
(広島大院・統合生命, ¹産総研・機能化学)

【背景と目的】バイオマスの熱化学的変換により生成する水素, 一酸化炭素, 二酸化炭素からなる合成ガスを微生物の作用で燃料や化成品へと変換する合成ガス発酵法は, 原料の多様性の面で糖発酵法と比較して有利である。我々は, ガス資化性好熱性ホモ酢酸菌 *Moorella thermoacetica* の代謝を改変し, 合成ガスからのエタノール生産に成功した。しかし, 実用化には更なる生産速度の高速化が必要である。そこで本研究ではこの代謝改変株を用い, 高密度培養法によるエタノール生産の高速化を検討した。

【結果と考察】合成ガスを封入したバイアル瓶に前培養液 5% (v/v) を添加することにより行ったエタノール発酵試験において, 比生産速度は 0.07 [g-Ethanol/g-dry cell/L] であったが生産速度は 0.003 g-Ethanol/L/h と低かった。そこで, 0.5 g-dry cell/L の濃縮菌体を用いて発酵試験を行ったところ, 生産速度は 0.06 g-Ethanol/L/h に向上し, このとき比生産速度は 0.10 [g-Ethanol/g-dry cell/L] であった。しかし, さらに生産速度を向上させるために 5 g-dry cell/L の高濃縮菌体条件で培養を行ったところ, 生産速度は 0.08 [g-Ethanol/L/h], 比生産速度は 0.02 g-Ethanol/g-dry cell/L となり, 0.5 g-dry cell/L の濃縮菌体条件と比較して, 菌体濃縮量に応じた生産速度の向上は見られず, 比生産速度はむしろ低下していた。これは培地中への一酸化炭素や水素などの難水溶性気体の供給不足が原因ではないかと考えられた。そこで現在, 培地への合成ガス供給速度を高めることで, エタノール生産の更なる高速化を試みている。

B-8 増殖の開始を制御する微生物間相互作用 : 環境中の微生物コミュニティにおける
増殖制御ネットワーク
○鈴木陸太, Eunyoung Seo, 加藤 節, 中島田豊, 青井議輝
(広島大院・統合生命)

【目的】環境中に存在するほとんどの微生物は培養できないことが知られている。我々は, 1) 非増殖状態の微生物が相互作用によって増殖状態に遷移する, 2) 微生物間相互作用を活性化することで多くの微生物の増殖を促すことができるという仮説をたて, それを検証することを目的とした。

【方法・結果】従来の培養法では相互作用を活性化させるには植菌密度が低い。そこで我々は従来の 1 万倍以上もの初期植菌密度($10^6\sim10^7$ cell/mL)で共培養することができる新たな培養法を開発した。これは W/O エマルジョンを作成する手順で, 一細胞ずつ菌体を直径 10-30 μm のゲルのドロップレットに封入し, ドロップレットを油中で凝集させた状態で培養するというものである。これにより各々のクローンが培養期間中分離状態を保った状態で実環境中と同等の高い植菌密度での培養が可能となった。また, 個々のゲルを標識することによりサンプルごとに増殖を追跡することができる。

上記培養法を用いて環境サンプルを培養した結果, 従来法の十倍以上ものコロニーの生成を確認することができた。さらに土壌サンプルを培養し, 獲得した分離株を用いて各菌体の相互作用による増殖特性の評価を行なったところ, 特定の異種間または同種間における相互作用により, それらの増殖の開始が誘導されるという現象が確認された。以上の結果から, 実環境中では, 複雑な微生物間相互作用により, 各々の微生物の増殖が制御されている「増殖制御ネットワーク」が形成されているという可能性が示唆された。

B-9 酸・熱ストレスによる核酸系抗生物質の増産効果と品質管理遺伝子群の発現誘導効果

○山形 遙, 中島佑里子, 根本理子, 稲垣賢二, 田村 隆
(岡山大院・環境生命)

[目的] 放線菌による抗生物質などの二次代謝産物の生産は、温度、pH、培地組成など外的要因の影響を強く受ける。近年、酸性条件下での培養、菌体への熱処理など化学的・物理的ストレスにより二次代謝産物の生産性が向上する報告が多数なされている。本研究では、生合成遺伝子群が未同定の場合でも飛躍的増産を可能にする生物生産技術を開発するために、核酸系抗生物質シネフンギンを生産する *Streptomyces incarnatus* に酸、熱などのストレスを与え、その増産効果を検討した。また、本菌のドラフトゲノム解析情報から同定されている品質管理システムのホモログ遺伝子の転写解析を行い、ストレスへの応答機構を検討した。[方法] 放線菌 *S. incarnatus* を pH6.0 に調整した SF4 液体培地で培養し、HPLC を用いて培養上清のシネフンギン生産量を測定した。酸ストレス条件では HCl で培地 pH を 4.0 に調整することで、培地 pH のシネフンギン生産への影響を検討した。ヒートショック条件は培養開始より 24 時間を 42°C で培養し、以降 30°C で培養した。そして定量的 RT-PCR 法により品質管理遺伝子群である *dnaK*, *dnaJ*, *hspR*, *groEL*, *groES* の転写産物を測定した。[結果と考察] 中性培地と比較して酸性培地ではシネフンギン生産量が増加した。また、ヒートショックを与えた菌体も対照区と比較して高生産であった。転写産物の qRT-PCR 解析の結果、酸ストレス、ヒートショック条件において *dnaK*, *dnaJ*, *groEL*, *groES* は培養初期のみ対照区よりも高発現となった。これら品質管理遺伝子群の高発現が、シネフンギン生合成酵素群の安定稼働に寄与して二次代謝産物の高生産をもたらす可能性が示唆された。

B-10 植物葉上共生細菌 *Methylorum extorquens* AM1 のランタノイド依存型メタノールデヒドロゲナーゼアイソザイム XoxF2 の解析

○竹内赴登, 山下颯太, 谷 明生¹, 中川智行², 矢野嵩典, 三井亮司
(岡山理大・理, ¹岡山大・植物研, ²岐阜大・応生科)

【目的】*Methylorum extorquens* AM1 は植物に生育促進物質を供給して生育を促し、それにともない放出されるメタノールを利用して植物と相利的に共生している。*M. extorquens* AM1 はメタノール代謝の初発酵素であるメタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) を複数保持し、ランタノイドの有無や炭素源に応答して発現をコントロールしている。本研究では *M. extorquens* AM1 が保持する代表的な 3 つの MDH のうち、ランタノイド依存型の XoxF1, XoxF2 の 2 つについて酵素を精製して比較した。

【方法と結果】XoxF1 と XoxF2 のアミノ酸配列の相同性は 87% と高いものの、*xoxF2* の破壊による生育への影響がほとんどないことから、XoxF2 に対する検討はほとんど行われてこなかった。しかし、XoxF1 が炭素源によらず La³⁺ 存在下で発現が誘導されるのに対し、XoxF2 はメタノールを炭素源として La³⁺ 存在下で培養したときのみ発現することが明らかになっており、XoxF2 にも何らかの生理的な役割があることが示唆された。このことから XoxF2 の役割を明らかにするために両酵素を精製して比較を試みた。C 末端に His-tag が付与された XoxF1 または XoxF2 を発現する *M. extorquens* AM1 を用いて、メタノールを炭素源として La³⁺ を添加して生育した菌体から Ni アフィニティカラムを用いて单一にまで精製した。エドマン分解による N 末端アミノ酸シーケンスの結果、XoxF2 も XoxF1 と同様にシグナル配列が存在しており、ペリプラズムに局在することが示唆された。精製した XoxF2 の比活性は XoxF1 より低かつたが、最適 pH や温度に関しては大きな差は見られなかった。

C-1

好熱菌トランスポゾンベクターの転位特性解析

○小原未愛, 大城 隆¹, 鈴木宏和¹ (鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・工)

【目的】 *Geobacillus* 属細菌は環境に広く分布した中等度好熱菌で、そのゲノム配列中には転位因子らしき配列が数多く見出される。しかし、その機能性に関する知見は少なく、それを応用した好熱菌トランスポゾンベクターも開発されていない。我々は、*G. kaustophilus* HTA426 の転位因子 (ISGka3) が細胞内で機能的であることを見出し、それを利用したトランスポゾンベクター (pGKE118) を構築した。本研究では、*venus* 遺伝子を連結した pGKE118 (pGKE118-*venus*) を *G. kaustophilus* MK244 と *G. thermodenitrificans* K1041 に導入し、pGKE118-*venus* からの *venus* 転位特性を解析した。

【方法・結果】 pGKE118-*venus* を導入した *G. kaustophilus* MK244 を、選択圧下 50°C で液体培養した後、LB プレート上でコロニー化させた。コロニー化のための培養は、pGKE118-*venus* を消失させるために非選択圧下で行った。得られたコロニー100 株のうち 90 株がプラスミドを消失しており、そのうちの 60 株が *venus* 遺伝子を染色体上に挿入していた。29 株についてサザンプロット解析したところ、25 株で同位置に 1 本の *venus* バンドが検出された。Arbitrary PCR で挿入先を解析したところ、5'-TTTGTN₃AAN₆TTT-3' 配列に挿入されていた。pGKE118-*venus* を *G. thermodenitrificans* K1041 に導入し、同様な解析を行ったところ、本好熱菌中でも *venus* 転位が確認できた。転位は 60°C で高頻度であったが、プラスミド消失は 50°C~55°C で高効率だった。サザンプロット解析では、多様な位置に 1~4 本のバンドが見られた。pGKE118 は、*Geobacillus* 属細菌に汎用的なトランスポゾンベクターとして有用と期待できる。

C-2

R4 Gateway Recycling Cloning System を用いて作出された複数遺伝子コンストラクト導入植物における発現解析

○大屋卓博, 蜂谷卓士, 中川 強 (島根大・総科セ)

【目的】 複数遺伝子クローニング技術は、タンパク質複合体の細胞内機能や局在の解析など様々な目的に重要である。また、植物へ複数遺伝子を簡便に導入し、安定に発現する技術は食糧問題などの解決策となりうる。しかし、植物の遺伝子発現において多用されている 35S プロモーターは共通プロモーターとして用いるとサイレンシングが高頻度で起こってしまうため、構成的な強い発現が可能であり、複数遺伝子コンストラクトでもサイレンシングが起こりにくいプロモーターが望まれる。シロイヌナズナ由来の UHQ10(Ubiquitin 10)プロモーターは強力な構成的発現プロモーターとして使われるようになってきている。そこで本研究では、UBQ10 プロモーターを共通プロモーターとして用い、R4 Gateway Recycling Cloning System で作製されたコンストラクトを導入した植物における発現解析を行った。

【方法・結果】導入する遺伝子として GUS, G3GFP, mRFP, LUC, XYL を用いた。各レポーター遺伝子 1 つのみが導入された植物及び XYL を除く 4 つのレポーター遺伝子が導入された植物、5 つのレポーター遺伝子が導入された植物間でリアルタイム PCR 絶対定量により mRNA のコピー数を比較した。その結果、各レポーター遺伝子の mRNA のコピー数に有意な差はなく、複数遺伝子が良好に発現していることが確認された。また内在性 UBQ10 遺伝子の mRNA コピー数も比較し、同遺伝子プロモーターの複数使用による転写因子の不足が生じていないことも確認した。以上の結果より、複数遺伝子発現におけるこのシステムの有用性が大いに証明された。

C－3 植物プロモーターの特異性を維持して目的遺伝子を高発現させる Boost Gateway システムの開発

○山田裕也, 塚越啓央¹, 石黒澄衛², 蜂谷卓士, 中川 強
(島根大・総科セ, ¹名城大・農, ²名大院・生命農)

【目的】プロモーターの特異性を維持して発現量を増強させるシステムは大変有用である。そこで特定の植物プロモーターで強力な転写因子を特異的に発現させ、それが働きかけるプロモーターで目的遺伝子を発現させることで植物プロモーターの発現をブーストする Boost Gateway システムの開発を試みた。

【方法・結果】本研究では、目的遺伝子を蛍光タンパク質とし、植物プロモーターにより直接蛍光タンパク質遺伝子を発現させる比較用コンストラクトと、新たに開発した転写因子を介する Boost Gateway のコンストラクトをそれぞれ作製した。蛍光タンパク質遺伝子は NLS-sGFP、植物プロモーターにはノパリシンシンターゼ遺伝子プロモーター(Pnos)、シロイヌナズナユビキチン 10 プロモーター (ProUBQ10)、FILAMENTOS FLOWER プロモーター (ProFIL) を用いた。転写因子として、酵母 GAL4 の DNA 結合ドメインとヘルペスウイルス由来 VP16 の転写活性化ドメインを融合した GAL4-VP16 および VP16-GAL4、その標的プロモーターとして、GAL4 結合配列と CaMV35S の最小プロモーター領域を連結した 6x, 3xUAS-35S_minimal_promoter (6x, 3xUAS) を用いた。それぞれのコンストラクトをアグロインフィルトレーション法を用いてタバコ葉で発現させ細胞核における蛍光を観察した。その結果、GAL4-VP16 を用いた二つの Boost Gateway のコンストラクト(6xUAS, 3xUAS)については、プロモーターで直接 GFP を発現させたコントロールと比較して GFP の蛍光輝度が大きく上昇していた。これらの結果から、Boost Gateway システムがプロモーターの遺伝子発現を増強させるのに有効であることが示された。

C－4 ツタンカーメンエンドウの加熱による着色反応機構の解析：着色源の単離および同定

○前川優樹, 近藤(比江森)美樹¹
(徳島文理大院・人間生活, ¹徳島文理大・人間生活)

【目的】エンドウ(*Pisum sativum L.*)の古代品種であるツタンカーメンエンドウは、水中で加熱すると緑色から赤褐色に変化する。既に我々は、種皮に局在する (エピ) ガロカテキン ; (E)GC の 1, 2, 3 量体が着色に関与していることを報告している。主要な着色源は(E)GC の 2 量体であるが、未単離であり、さらに構成するフラバン-3-オールの分子構造は解明されていない。今回は、(E)GC の 2 量体を単離してフラバン間開裂反応により断片化し、質量分析により上部および下部ユニットの構造解析を行った。

【方法・結果】ツタンカーメンエンドウ種皮の水抽出物を Sep-Pak C₁₈ カートリッジを用いて濃縮し、ODS および HILIC カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により着色源である(E)GC の 2 量体を単離した。次いで、ブタノール-塩酸反応、チオール分解および酸加水分解を行い、得られた反応生成物を液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC/MS)に供した。ブタノール-塩酸反応によりデルフィニジンが生成され、着色源はプロデルフィニジンであることが明らかとなった。また、チオール分解により(-)EGC が生成され、下部ユニットは(-)EGC であることが示された。さらに、酸加水分解では(-)EGCのみが生成された。これらの結果から、着色源は上下ユニットを(-)EGC とするプロデルフィニジンと同定した。次いで、着色源を加熱し、得られた着色成分を LC/MS により分析した。着色源の質量比-2 に相当する m/z 607 [M-H]⁻ および m/z 609 [M+H]⁺ のイオンが検出されたことから、当該エンドウの着色は(-)EGC からなる 2 量体の脱水素反応（酸化）により生じることが示唆された。

C-5 ビートファイバー摂取は高脂肪食摂取ラットの摂取エネルギーを低下させ、
GLP-1 の分泌を増加させる
○岡本直大, 前野元希¹, 長森公寛¹, 藤谷美菜¹, 名倉泰三², 岸田太郎¹
(愛媛大・農, ¹愛媛大院・農, ²日本甜菜製糖・総研)

【目的】我々は、砂糖を甜菜から抽出する際の残渣であるビートファイバーをラットに摂取させると摂取エネルギーが減少し、体脂肪蓄積が抑制されることを見出し、その機構解明を目指して研究を続けてきた。その中で、BF摂取が胆汁酸排泄および胆汁酸プール量を増加させることができた。小腸粘膜の胆汁酸受容体 TGR5 の活性化が食欲抑制性消化管ホルモン GLP-1 分泌を促進することが報告されていることから、我々は BF摂取が胆汁酸プール量を増加させることにより、小腸粘膜の TGR5 を活性化させ GLP-1 分泌を増加させることで摂取エネルギー低下作用をもたらすのではないかと考えた。これまでの研究で BF の摂取エネルギー低下効果は 2 週間の摂取で顕著に見られていたことから、本研究では 2 週間の BF 摂取が GLP-1 分泌を増加させるのかを検討した。**【方法】**6 週齢の雄 SD ラットを脂質含量 20% の高脂肪無纖維飼料(C 飼料)および C 飼料に BF を 7% 添加した飼料(BF 飼料)で 14 日間飼育し、麻酔下で門脈血を採取した。さらに、同様の実験を行い、小腸内容物と回腸粘膜を採取した。**【結果および考察】**2 週間の BF 摂取により総摂取エネルギーが有意に減少した。この際、門脈血中総 GLP-1 濃度の有意な上昇が見られた。さらに、2 週間の BF 摂取により小腸内容物中胆汁酸量の有意な増加が確認され、回腸粘膜で GLP-1 前駆体プレプログラカゴン遺伝子発現の増加傾向も見られた。これらの結果から、BF 摂取は胆汁酸プール量の増加を介して GLP-1 分泌を促進することで摂取エネルギー低下作用をもたらすことが示唆された。

C-6 アマニ水溶性食物纖維摂取による高スクロース食摂取ラット肝臓脂質減少作用
○松岡亜祐, 稲田真子¹, 池田直人¹, 福光 聰², 藤谷美菜¹, 岸田太郎¹
(愛媛大・農, ¹愛媛大院・農, ²筑波大・グローバル)

【目的】我々は、高スクロース無纖維飼料で飼育したラットにアマニ搾油粕またはこれより抽出した水溶性食物纖維(アマニ SDF)添加飼料を与えると、肝臓脂質量が減少することを見出した。水溶性食物纖維の脂質代謝改善作用には短鎖脂肪酸(酢酸、酪酸、プロピオン酸)による肝臓の脂質合成抑制が関与していると考えられている。そこで、本研究では、肝臓および血清脂質量および盲腸中短鎖脂肪酸量に与える影響を、アマニ SDF 摂取の場合と機能性食品素材として利用されている水溶性食物纖維の難消化性デキストリン摂取の場合で比較した。**【方法】**5 週齢の雄 SD ラットを AIN-93G に基づく高スクロース-無纖維飼料摂取群、アマニ SDF3%または難消化性デキストリン 3%添加飼料摂取群に分け、14 日間飼育した。**【結果・考察】**最終体重および総飼料摂取量にアマニ SDF または難消化性デキストリン摂取の影響は見られなかった。肝臓中性脂肪量は、無纖維群と比較してアマニ SDF 群で減少傾向を示したが、難消化性デキストリン群では変化がなかった。肝臓総コレステロール量でも、無纖維群と比較してアマニ SDF 群で有意に減少したが、難消化性デキストリン群では変化がなかった。血清中性脂肪および総コレステロール濃度では、いずれの食物纖維の影響も見られなかった。一方、盲腸中総短鎖脂肪酸量では難消化性デキストリン摂取により増加傾向が見られたが、アマニ SDF 摂取の影響は見られなかった。アマニ SDF 摂取による肝臓脂質減少作用は短鎖脂肪酸による脂質合成抑制とは異なる未知の機構で引き起こされていることが示唆された。

C-7

デーツ残渣発酵物による免疫調節作用の探索

○服部圭優¹, 三本木至宏¹, 長谷川桃子², 吉田充史², 山本祥也¹

(広島大・生物生産, ¹広島大院・統合生命, ²オタフクソース(株))

【目的】ナツメヤシの実であるデーツは主に中東や北アフリカで栽培されており、糖や食物繊維、ミネラル分を豊富に含む果物である。我々は食品加工の廃棄物として生じるデーツの残りかす（デーツ残渣）を乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 1059^T 株で発酵させることにより、ストレスや血圧の低減効果のある機能性成分 γ -アミノ酪酸（GABA）を大量に含む「デーツ残渣発酵物」の開発に成功している。そこで本研究では、デーツ残渣発酵物の免疫調節作用の解明を目的とし、多様な免疫細胞を含むマウスの脾臓細胞を用いて、細胞傷害性の検討および免疫因子の誘導効果の網羅的な解析を進めた。

【方法】 Balb/c (6-8 週齢, ♀) マウスより脾臓細胞を調製し、未発酵デーツ残渣あるいはデーツ残渣発酵物（最終濃度 0.01%, 0.1%, 1%）で刺激した。培養 24 時間後、各刺激細胞を MTT 試薬で処理し、細胞傷害性を検証した。また、培養 72 時間後の培養上清における各種免疫因子（TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-12p70, IL-4, IL-1 β , TGF- β ）の産生量について、ELISA 法により測定した。

【結果と考察】 対照群と比較して、デーツ残渣発酵物刺激群では、全ての試験濃度で細胞傷害性が認められなかった。さらに、対照群と比較してデーツ残渣発酵物刺激では生体防御に寄与する TNF- α , IFN- γ および IL-10 の産生量が有意に増加した。一方、IL-12p70, IL-4, IL-1 β および TGF- β の産生量の差は見られなかった。以上から、デーツ残渣発酵物による免疫調節作用が確認された。

C-8

Mφ における異常タンパク質分解を促進するイソラムネチンの作用機序解析

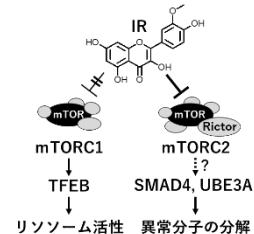
○坂井麻衣子, 大西康太, 増田真志, 大南博和, 奥村仙示, 板倉英祐¹,

原 太一², 竹谷 豊

(徳島大院・医歯薬, ¹千葉大院・理, ²早稲田大・人間科学)

【目的】マクロファージ(Mφ)は、生体内に生じた死細胞や異常高分子の貪食および除去を担うため、この細胞のリソソーム機能が低下するとアテローム性動脈硬化症の発症リスクが高まる。我々はこれまでに、タマネギなどに含まれるイソラムネチン(IR)が、Mφによる異常タンパク質の分解を亢進させること、またその作用機序が、既知のリソソーム活性制御機構である mTORC1-TFEB 経路に依存しないことを明らかにしている。そこで本研究では、mTORC2 に着目しながら IR の作用機序を解析し、Mφにおいて異常分子の分解を制御する新規な分子機構の解明を試みた。

【方法・結果】 J774.1 マウス Mφ 標細胞株に対して IR を処理したところ、mTORC2 活性の顕著な阻害が認められた。さらに、Rictor 欠損細胞を用いた検討から、IR は mTORC2 を介して異常タンパク質の分解を亢進することが明らかとなった。また、本活性は転写阻害剤により抑制されたことから、その作用機序に遺伝子発現調節が関与すると想定し、IR 処理により変動する遺伝子群をマイクロアレイにより網羅的に解析した。この遺伝子発現情報をインフォマティクス解析した結果、IR の活性発現に関与する 5 種類の転写調節因子を推定できた。各因子の欠損細胞を作出したところ、SMAD4 もしくは UBE3A を欠損した細胞において異常タンパク質の分解活性が顕著に減弱した。現在、これらの転写調節因子と mTORC2 との関連性、および IR の作用機序への関与性を検証している。



C-9

In vivo イメージングを利用した腎障害の非侵襲的食品評価系の構築

○八澤菜央, 橋本孝太郎, 仮屋大志, 真田洋平, 橋本貴生, Fons AJ van de Loo¹, Thanutchaporn Kumrungsee, 矢中規之 (広島大院・統合生命, ¹Radboud Univ.)

【目的】近年、慢性腎臓病患者は増加し、その中でも特に糖尿病性腎症は糖尿病罹患者が増加している点や人工透析移行率の高さから注目されており、腎障害に対して予防効果を示す食品素材が求められている。発表者らは炎症性マーカー遺伝子である *serum amyloid A3 (Saa3)* 遺伝子プロモーターに *luciferase* 遺伝子を連結したキメラ遺伝子を導入した Saa3-luc マウスを作製し、*in vivo* イメージングを用いた炎症モデル動物の構築を行っている。本研究では、Saa3-luc マウスをアデニン誘導性腎症、および糖尿病性腎症モデルへと応用し、腎症を対象とした実験動物に対して非侵襲的な食品評価系の構築を試みた。

【結果、および考察】Saa3-luc マウスに 0.2% adenine を含む食餌を 1 週間摂取させたところ、血中の尿素窒素(BUN)や creatinine が上昇しない病態初期において *in vivo* イメージング解析によって体外から腎臓由来の化学発光が観察された。さらに腎臓ホモジネートの *luciferase* 活性の有意な上昇が認められ、*collagen* 遺伝子などの組織線維化マーカーの発現量と正に相関していた。次に、8 週齢雄性 C57BL マウスに 45% 高脂肪食を与え、4 週間後 streptozotocin を 5 日間腹腔内投与 (40 mg/kg) した。さらに 8 週間高脂肪食を負荷した。その結果、血中の BUN や creatinine の上昇は認められない病態初期において、腎重量の増加、糸球体肥大、*TGF β* や *Saa3* などの遺伝子発現量の有意な増加が認められた。そこで Saa3-luc マウスに対して同様に糖尿病性腎症を誘導し、*in vivo* イメージング解析に供したところ、体外から腎臓由来の化学発光が検出されたことから、糖尿病性腎症を非侵襲的に観察可能であると考えられた。

C-10

桃の香りがする日本酒の醸造方法の開発

○新藤葉月, 岡崎達郎¹, 宮下晃一¹, 田中晃一
(岡山県大院・保健福祉, ¹宮下酒造(株))

【目的】フルーティーで華やかな香りと軽快な味わいを特徴とする吟醸酒は、女性や海外の人にも人気の高い日本酒である。吟醸酒の主な香り成分はリンゴ様やバナナ様の香りがするエステル類であり、モモ様の香りがするラクトン類は見いだされない。一方、一部のモルトウイスキーからは微量のラクトン類が検出されることが知られている。そこで、モルトウイスキーにおけるラクトン類生成経路を参考にして、岡山県の特産品であるモモの香りを有する日本酒の醸造方法の開発を試みた。

【方法・結果】モルトウイスキーのラクトン類は、不飽和脂肪酸のオレイン酸が乳酸菌により水酸化され、さらに酵母による β -酸化を受けることで生成する可能性が示唆されている。そこで、白桃を分離源として収集した 243 株の乳酸菌の中から、オレイン酸水酸化能を指標とするスクリーニングをおこない、強い水酸化活性を有する 3 株 (白桃乳酸菌) を分離した。次に、この白桃乳酸菌をパン酵母が共存する条件でオレイン酸と反応させたところ、モモの主要な香氣成分の一つである γ -ドデカラクトンの生成が確認された。さらに、白桃乳酸菌と清酒酵母を利用して、玄米から γ -ドデカラクトンを生成することに成功した。

C-11

固定化グルタミン酸 (Glutamate-Sepharose) の志賀毒素吸着
○山崎義輝, 山下晶央, 金丸 芳 (徳島大・生物資源)

【目的】志賀毒素産生性大腸菌 STEC O157 の志賀毒素(Stx1・Stx2)は出血性大腸炎や溶血性尿毒症症候群(HUS)を発症し死に至る場合もある。Stx は A1B5 型 subunit 構造で, B-subunit が結腸上皮細胞のグロボ三糖(Gb3)に結合し A-subunit が細胞に侵入し細胞を死滅させる毒性を示す。抗菌薬は菌内毒素を放出し逆効果もあり得るため, Stx 阻害薬の需要が高まっている。B-subunit は 3 種類の Gb3 結合部位を持ち, 強固な結合 (クラスター効果) を示ため, Gb3 を高密度に集積した化合物が阻害薬として開発されている。しかし食品成分による阻害剤はほとんどない。そこで我々は安全で安価な吸着除去剤の実用化を目指し, Stx 吸着能を有する食品由来成分を探索している。納豆のポリ- γ -グルタミン酸(PGA)を固定化した PGA-Sepharose が Stx2 のみを吸着することを明らかにした。本研究では PGA を構成するグルタミン酸に着目し, Glutamate-Sepharose を作成し, Stx1・Stx2 の吸着能を検討した。【方法】STEC O157:H7sakai を 37°C・20 時間振盪培養し, 菌体外液 (上清) と菌体内液 (菌摩碎) に分けた。グルタミン酸を Sepharose に固定化した Glutamate-Sepharose を作成した。まず Glutamate-Sepharose のカラムで菌体内液・外液の吸着能をみた (カラム法)。次に Stx と Glutamate-Sepharose を 30 分混和して吸着能をみた (混和法)。Stx 量は VTEC-RPLA (生研) で測定した。【結果】カラム法では Stx1, Stx2 共に吸着し, 0.5 M NaCl で溶出された。混和法では Stx2 は吸着した(32 ng /mL のうち 24 ng /mL)が, Stx1 は吸着しなかった。Glutamate-Sepharose では Stx2 吸着は可能であるが, Stx1 吸着は多量 (カラム) の場合に可能とわかった。

C-12

STEC O157:H7 産生志賀毒素の分離と細胞毒性
○山下晶央, 山崎義輝, 金丸 芳 (徳島大・生物資源)

【目的】志賀毒素産生性大腸菌(Shiga toxin-producing *Escherichia coli* ; STEC) O157:H7 は志賀毒素(Stx)を產生し, 溶血性尿毒症症候群(HUS)を併発して致死もあり得る。Stx(約 72 kDa)には菌体内 Stx1 と菌体外 Stx2(5 種のバリエント)がある。Stx は A-subunit 1 個と B-subunit 5 個で構成され, B-subunit が細胞の Gb3 受容体に結合し A-subunit が細胞内に侵入し毒性を示す。抗菌剤は菌体内の Stx が放出され重篤化もある。そのため Stx が細胞内に侵入する前に吸着し体外に除去する「吸着除去剤」が有効と考えている。当研究室では食品由来成分による吸着除去能の有用化を目的に, 緑藻スジアオノリのラムナン硫酸と納豆のポリ- γ -グルタミン酸(PGA)に Stx 吸着能を見出し, 固定化した PGA (PGA-Sepharose)が Stx2 を吸着することを明らかにした。今後, 菌培養から Stx の分離調整まで一連で行うことが食品由来成分の吸着除去能の検討に必須と考えている。本研究では Stx の分離方法の確立を目的に, O157:H7sakai を培養し Stx1・2 の分離を検討した。【方法】STEC O157:H7sakai を 37°C・20 時間振盪培養し, 菌体外液 (上清) と菌体内液 (菌摩碎) を得た。PGA, グルタミン酸, グルタル酸を Sepharose に固定化し, これらのカラムにより菌体内液・外液の分離を行った。Stx は VTEC-RPLA (生研) で測定した。CACO-2 細胞は Stx 存在下で培養し増殖を測定した。【結果】PGA-, Glutarate- Sepharose は Stx1 を吸着せず, Stx2 を吸着し 0.5 M NaCl で溶出された。CACO-2 に細胞毒性を示した。Stx2 吸着量, Stx1 非吸着量は PGA-Sepharose より Glutarate-Sepharose の方が優れていた。Glutarate-Sepharose カラムにより Stx1・2 の分離が可能となった。

- D – 1 Isolation of glycosylinositol phosphoceramide and phytoceramide 1-phosphate from cabbage leaves and their chemical stabilities
○Rumana Yesmin Hasi, Yashimichi Takai¹, Hanif Ali, Kentaro Kogure, Junji Hayashi¹, Ryushi Kawakami¹, Mutsumi Aihara¹, Kaori Kanemaru¹, Tamotsu Tanaka¹ (Grad. Sch. Biomed. Sci., Tokushima Univ., ¹Grad. Sch. Technol. Industrial and Soc. Sci., Tokushima Univ.)

【Objective】

Glycosylinositol phosphoceramide (GIPC) is a predominant sphingolipid in plants and fungi. Recently, we found that phytoceramide 1-phosphate (PC1P) is generated from GIPC by novel phospholipase D (PLD) activity in cabbage leaves. Here, we developed methods for isolation of these sphingolipids and examined their chemical stabilities.

【Method, Results and Discussion】

Total lipids were extracted from cabbage leaves using a lower layer of mixed solvents consisting of isopropanol: hexane: water (55:20:25, v/v; solvent A). Because the solvent A extracts contained a large amount of hydrophilic materials, direct application of the extract to TLC results in poor separation. This problem was overcome by removal of those hydrophilic materials from the extract by Sephadex column chromatography. We successfully isolated GIPC by TLC from the resulting GIPC-rich fractions. PC1P was isolated by Bligh and Dyer method followed by TLC. The total yields of GIPC and PC1P were both around 50-70% by our methods. Physicochemical stability experiments were performed using the purified GIPC or PC1P. Results showed that GIPC but not PC1P was degraded at high temperature (over 125°C) and high concentration of acid (over 1.0 M HCl), indicating that the inositol glycan moiety of GIPC is liable under these conditions.

- D – 2 Polyhistidine peptides を利用した植物細胞内へのタンパク質直接導入法の開発
○田中淑乃, 大村昂誠, 河野 強, 岩崎 崇 (鳥取大院・持社創生)

植物細胞に様々な機能性タンパク質を直接導入することができれば、遺伝子組換えに頼らない植物の機能改変・制御が実現する。しかし、現時点では植物細胞にタンパク質を直接導入する簡便な方法は少ない。そこで本研究では、新たな植物細胞へのタンパク質直接導入法の開発を試みた。これまでに我々の研究室では、植物細胞に対して有効な細胞膜透過ペプチドとして、Polyhistidine peptides (PolyHis)を開発した。このPolyHisを利用して、植物細胞内にタンパク質（酵素）を直接導入する手法の開発に挑戦した。RFPにPolyHis (His残基数: 0, 8, 12, 16, 20) を融合したRFP-PolyHisを調製し、細胞壁を有した状態のタバコ細胞、スギ細胞、イネ細胞にそれぞれ添加した。蛍光顕微鏡観察及び細胞内の赤色蛍光強度を測定した結果、His残基数が増えるほどRFPの細胞内導入量が増加し、His20が植物細胞に対する有効なタンパク質導入配列であることが示唆された。次いで、導入されたタンパク質が活性を保持しているかを検証するため、細胞質中のATPをcAMPに変換する酵素であるCyaAを融合したRFP-CyaA-PolyHis (His残基数: 6, 20)を調製し、タバコ細胞、スギ細胞、イネ細胞に添加した。細胞内蛍光強度はいずれの細胞株においてもRFP-CyaA-His20で有意に上昇した。さらに細胞質中のcAMP濃度をELISA法により定量した結果、RFP-CyaA-His20処理細胞中でcAMP濃度の有意な上昇が確認された。以上の結果より、PolyHis(特にHis20)は植物細胞に対して、酵素活性を保持したままタンパク質を輸送する有効なキャリアであることが示唆された。

D-3

オオムギにおけるフラボノイド型ファイトアレキシン

○宇部尚樹¹, 勝山由郁¹, 假谷佳祐², 手林慎一³, 武田 真⁴, 上野琴巳¹,

石原 亨¹ (鳥取大・乾燥地研, ¹鳥取大・農, ²鳥取大院・持社創生,

³高知大・農, ⁴岡山大・植物研)

【目的】植物は病原菌の感染を受けると、誘導性の抗菌性物質であるファイトアレキシンを蓄積する。イネやトウモロコシでは、様々な種類の化合物がファイトアレキシンとして機能する。しかしながら、オオムギのファイトアレキシンに関する研究は限られている。そこで、オオムギの葉をエリシターで処理することで防御応答を誘導し、ファイトアレキシンの単離・同定を試みた。

【方法・結果】オオムギ（品種しゅんれい）の第3葉を約1cmの長さに切断し、0.5 mMの塩化銅溶液に浸漬した。その後処理葉を80%メタノールで抽出し、抽出液をLC-MSで分析すると、塩化銅処理によって3つのピークが増加していた。それぞれのピークに対応する化合物を1-3とした。化合物1-3を各種クロマトグラフィーにより精製し、機器分析に供した。化合物2はLC-MS/MS分析の結果から、オキシリピン類の一一種12-oxo-phytodienoic acidと同定した。化合物1および3は、¹H NMRおよびHR LC-MS分析の結果から、2',3,4,4',6'-pentamethoxychalconeおよび2'-hydroxy-3,4,4',6'-tetramethoxychalconeであることがわかった。化合物1-3はオオムギ斑点病菌(*Bipolaris sorokiniana*)を接種した場合にも蓄積した。また、オキシリピン類であるジャスモン酸や2の処理でも1および3は誘導された。化合物1および3の抗菌活性を調べたところ、病原性糸状菌の胞子発芽を阻害することがわかった。これらの結果から、病害ストレスを受けたオオムギでは、メトキシカルコン類がファイトアレキシンとして機能していることが明らかになった。

D-4

イネにおけるテルペノイド型ファイトアレキシン蓄積に関するナチュラルバリ

エーション ○假谷佳祐, 宇部尚樹¹, 上野琴巳², 寺石政義³, 奥本 裕⁴,

森 直樹³, 石原 亨² (鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・乾燥地研, ²鳥取大・農,

³京都大院・農, ⁴摂南大・農)

【目的】植物は病原菌感染に応答して、抗菌活性を有する低分子化合物ファイトアレキシンを蓄積する。イネでは15種類以上のファイトアレキシンが報告されており、ほとんどが、モミラクトン類やファイトカサン類などのテルペノイドである。世界のイネ・コレクション(WRC)に含まれる品種を分析すると、既知のファイトアレキシンと異なる化合物を蓄積する品種があることがわかった。これらの化合物は特定の品種にのみ蓄積するファイトアレキシンであると推定された。そこで、イネにおけるファイトアレキシン生合成の進化に関する知見を得るために、これらの化合物を同定するとともに、WRCに含まれる品種における蓄積量を調べた。

【方法・結果】イネの葉に紫外線を照射しファイトアレキシンの蓄積を誘導した。72時間インキュベートした後、80%メタノールで抽出し、得られた抽出物をLC-MSで分析した。品種Jaguaryからは化合物1と3が、Basilanonからは化合物2と3が検出された。これら化合物を単離し、機器分析により構造を解析した。1は、既知のファイトアレキシンと異なりアビエタン骨格を持つラクトン化合物だったため、オリザラクトンと命名した。2および3は、ファイトカサン類縁化合物だったため、それぞれファイトカサンGおよび11-ジヒドロファイトカサンGと名付けた。1は限られた系統からのみ検出されたのに対し、2および3は、ほとんど全ての品種に存在した。特定の品種が1を獲得した過程や、2および3を失った経緯を明らかにすることは、ファイトアレキシン生合成の進化を考える上で興味深い。

D-5 低分子量 G タンパク質 Rab-18 はコレステロールトランスポーターの膜輸送を介して線虫 *C. elegans* の幼虫休眠制御に関与する
○皆木友花, 粟津利邦, 松浦雅実, 松永洋平¹, 岩崎 崇, 河野 強
(鳥取大・農, ¹(株) SRL)

【背景・目的】低分子量 G タンパク質である Rab family タンパクは、メンブレントラフィック（膜輸送）に関与し、タンパク・ペプチド等の小胞輸送・分泌を制御する。我々は、線虫 *C. elegans* の休眠制御機構の解明を目指しており、休眠制御ホルモンの分泌・受容体等の膜タンパクの輸送に関与する Rab family タンパクに着目した研究展開を図った。まず、RNAi スクリーニングを行い、Rab family タンパクの一つである Rab-18 が休眠制御に関与する可能性を見出した。次いで、①Rab-18 は主に腸で機能して休眠制御に関与すること、②Rab-18 は最終的に休眠を制御するステロイドホルモンシグナル伝達経路に寄与することを明らかにした。本研究では、Rab-18 がどのようにステロイドホルモンシグナルを制御し休眠制御に関与するのか、その分子メカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】Rab-18 が腸においてステロイドホルモンシグナルに寄与することから、主に腸で発現するコレステロール類トランスポーターである NCR-1 に着目した。まず、レポータータンパク NCR-1::mRFP 発現線虫を作出し、腸細胞内の局在を検証したところ、頂端側への局在が認められた。一方、Rab-18 非存在下 (*rab-18* 破壊線虫) では頂端側への局在性が消失した。このことから、Rab-18 は NCR-1 の頂端側への膜輸送に関与する可能性が示された。また、①*rab-18* 破壊線虫ならびに *ncr-1* 破壊線虫は同等の休眠率上昇を示すこと、②二重破壊による相加的効果はないこと、を確認した。今後、Rab-18 と NCR-1 の共局在を検証する予定である。

D-6 線虫 *C. elegans* の幼虫休眠を制御する短鎖神経ペプチド FLP-2 の分子機構に関する研究
○影山なつみ¹, 松永洋平², 国松友香³, 岩崎 崇^{1,3}, 河野 強^{1,3}
(¹鳥取大院・持社創生, ²(株) SRL, ³鳥取大・農)

【目的】線虫 *C. elegans* は生育環境の悪化（個体密度上昇、エサの枯渇、高温）に応答して、幼虫時に一時的に生育を停止し休眠する。環境因子（個体密度、エサ、温度）は頭部感覺神経で受容され、下流の TGF- β 様シグナル（リガンド：DAF-7）並びにインスリン様シグナル（リガンド：DAF-28, INS-35 など）を制御し、通常生育/休眠を決定する。一方、短鎖神経ペプチド FMRFamide-Like Peptides (FLPs) による休眠制御機構は不明な点が多い。本研究では、FLPs による休眠制御機構の全貌解明を目的として、休眠制御に関わる FLPs の探索とその分子機構の解析を行った。

【方法・結果】過剰発現株を作出して休眠制御に関わる FLPs を探索した結果、FLP-2 を見出した。個体密度（休眠誘導フェロモン濃度）に対する応答性を検証したところ、①高濃度下では FLP-2 の分泌が促進されること、②一方、FLP-2 の産生量は変動しないことが示唆された。次に、既存の休眠制御シグナル経路との関連性を検証し、①FLP-2 は頭部神経細胞で產生される DAF-7 ならびに DAF-28 の分泌を促進しないこと、②一方、FLP-2 は腸で產生される INS-35 の分泌を促進することを明らかにした。また、FLP-2 による INS-35 の産生量の変動は認められなかったことから、FLP-2 は INS-35 の分泌制御のみに関与すると推定した。また、INS-35 は成虫寿命にも関与することから、FLP-2 の成虫寿命への関与を検証した。*flp-2* 過剰発現株では寿命短縮が認められ、これは INS-35 の過剰分泌に起因すると推定した。現在、同じく腸で產生され成虫寿命に関与するインスリン様ペプチド INS-7 と FLP-2 の関係性を検証中である。

D-7

モデル生物を用いた長寿に関する代謝産物の探索

○青原 幸, 馬場真衣子, 久米一規, 水沼正樹 (広島大院・統合生命)

メチオニン代謝経路において, S-アデノシルメチオニン(SAM)は, メチル基供与体としてさまざまな生体物質のメチル化反応に利用される。SAM はメチル基を供与後, S-アデノシルホモシステイン(SAH)となる。SAH は SAM の構造アナログでありメチル化反応を競合阻害するため, SAH 水分解酵素 *SAHI* によって速やかに分解される。これまでに出芽酵母を用いた実験から, *SAHI* 遺伝子に変異を有する *sah1* 変異株が, 顕著な増殖遅延と短命を示すことを見出した。そこで, *sah1* 変異株の増殖遅延の抑圧を指標にスクリーニングを行い, その抑圧変異株 *SSGI*(Spontaneous Suppressor of Growth-delay in *sah1*)を取得した。*sah1* 変異株の増殖遅延は *SSGI* 変異により抑圧され, 期待通り経時の寿命(定常期以降, 分裂を停止した酵母が限られた栄養下で生存できる期間)が延長した。また, SAM 合成が Snf1(酵母における長寿遺伝子 AMPK)の活性を促進し, 寿命を延長することを見出し, さらにメチオニン代謝産物そのものが寿命延長することも見出した。そこで多細胞生物でも同じことが確認されるかどうか線虫を用いて検証している。また, 線虫の寿命を延長させる代謝産物の探索も行っている。

代謝産物そのものが寿命延長することを見たことから, 他にもこのような代謝産物があると予想した。そこで, 線虫の健康マーカーの発現の活性化を指標に代謝産物の探索を実施した。その結果, 活性が増加した代謝産物は 80 種あった。次に, これらの代謝産物について, 実際に線虫の寿命を延長させる代謝産物かどうか寿命測定を行い, それぞれの代謝産物が線虫の寿命に与える効果を検証した。

D-8

Class C CpG オリゴ DNA による抗菌ペプチド Lipocalin2 の誘導効果

○山口智史, 鈴木卓弥¹, 山本祥也¹ (広島大・生物生産, ¹広島大院・統合生命)

【目的】細菌ゲノム DNA 配列に由来するオリゴ DNA (CpG ODN) は, 感染症, アレルギー, がんおよび炎症性疾患など多様な疾病の予防や軽減効果が期待される機能性核酸素材である。CpG ODN は塩基配列のパターンの違いにより, A, B, C の 3 つの Class に分類され, 多彩な免疫効果を発揮することが知られている。我々は CpG ODN による感染症の制御を目指し, 抗菌作用や抗炎症作用を発揮する Lipocalin2 (Lcn2) との関連に注目している。本研究では, Lcn2 を制御する CpG ODN のスクリーニングを細胞培養試験により行った。また, 強力な Lcn2 産生誘導が認められた Class C CpG ODN (CpG-C2395) を用いて, リポ多糖 (LPS) により誘導される炎症応答に対する抑制効果を検証した。

【方法】マウスマクロファージ RAW264.7 細胞を 3 μ M の各種 CpG ODN で処理した。培養 24 時間後の培養上清における Lcn2 産生量について, ELISA 法により測定した。続いて, CpG-C2395 で処理した RAW264.7 細胞に 100 ng/mL の LPS を加え, さらに 24 時間培養した。培養後, 培養上清における TNF- α , Lcn2 および IL-10 の産生量を測定した。

【結果・考察】対照群と比較して, CpG-C2395 処理群では Lcn2 産生の有意な増加が認められた。さらに, 対照群と比較して CpG-C2395 前処理群では, LPS により誘導される TNF- α 産生量が有意に減少し, Lcn2 および IL-10 産生量が有意に増加した。以上の結果より, CpG-C2395 は強力に Lcn2 を誘導し, 炎症応答を制御することが明らかになった。

D-9 抗悪性腫瘍薬 ブスルファンの若齢期暴露による無精子症発症予測マーカーの探索
○川畠海渡, 樋口雅司, 梅田拓実, 山野好章 (鳥取大・農)

【目的】アルキル化抗悪性腫瘍薬ブスルファン (Bus) を投与された小児ガン患者は将来的に無精子症を発症する可能性が高くなる。そのため、性成熟前にこれを予測できる技術の開発が望まれる。本研究では若齢期の Bus 暴露により無精子症を発症させたラットをモデルとし、無精子症の発症予測マーカー分子の探索を行った。

【方法・結果】3 週齢 SD ラットに 0, 10, 40 mg/kg の Bus を腹腔内単回投与した後、4 週齢 (若齢期; Y) および 9 週齢 (成熟期; A) の精巣を採材し、HE 染色による組織学的解析、DNA マイクロアレイおよび qRT-PCR による遺伝子発現解析を行った。また、0, 300 μg/mL の Bus 暴露 48 時間後のセルトリ細胞株 TM4 およびライディッヒ細胞株 MA10 において、ケモカイン関連遺伝子 *Ccl2* の発現量を測定した。Y の体重、精巣重量およびその比は Bus 暴露で変化しなかったが、A ではいずれの数値も有意に減少した。Bus 暴露による Y の精細管病変は軽度萎縮を認める程度であったが、A では著しい萎縮および生殖細胞の消失が認められた。DNA マイクロアレイ法により選抜した Y 精巣における発現変動遺伝子のうち *Ccl2* の発現量は Bus 濃度依存的に減少した。また、TM4 では Bus 暴露濃度依存的に *Ccl2* 発現量が増加したが、MA10 では暴露の有無にかかわらず発現量が微弱であった。今後、免疫組織化学により Bus 暴露ラット精巣における CCL2 発現細胞と発現量の変化を分析する必要がある。

D-10 Muscle regeneration ability and satellite cell content in a new muscle atrophy model, GDE5 transgenic mice
○小丸拓海, 佐藤可奈子, 矢中規之, Thanutchaporn Kumrungsee
(広島大院・統合生命)

[Introduction] Previously, we have established a new age-related muscle atrophy model, transgenic mice overexpressing a truncated mutant of Glycerophosphodiesterase 5 (GDE5Tg mice). In this model, accumulation of abnormal protein induces cellular stress, resulting in decreased muscle mass and function. We hypothesized that mechanisms underlying muscle atrophy in this model may involve in muscle regeneration and satellite cells (SCs). Thus, in the present study, we determined if muscle regeneration ability and SC content alter in GDE5Tg mice.

[Methods and Results] To examine the impact on SC content, single fibers were isolated from EDL muscles, immediately fixed, and immunostained for Pax7 (an SC marker). The number of SCs on the GDE5Tg mouse muscle fibers was significantly lower than that in the WT mouse muscle fibers, suggesting that the quiescent SCs declined in GDE5Tg mice. Next, to evaluate muscle regeneration ability, cardiotoxin was injected into TA muscle of GDE5Tg and WT mice. In the uninjured muscles, GDE5Tg mice had significantly lower muscle mass and smaller muscle fiber area than WT mice. Surprisingly, after 10 days of injury, there was no significant difference in regenerating muscle mass and fiber area between GDE5Tg and WT mice, indicating no change in muscle regeneration ability in GDE5Tg mice. This suggests that muscle degradation possibly due to cellular stress rather than impaired muscle regeneration may be a major cause of muscle atrophy in GDE5Tg mice. The present study highlights that cellular stress due to protein aggregation may be a new cellular target for muscle atrophy prevention.

E-1 好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来シトクロム *c'* の熱安定性に関する研究
○吉見太佑, 三本木至宏¹, 藤井創太郎¹
(広島大・生物生産, ¹広島大院・統合生命)

【目的】シトクロム *c'* はグラム陰性細菌から見い出されるヘム蛋白質である。中度好熱菌 *Methyrococcus capsulatus* (Bath) 由来のシトクロム *c'* (MCCP) は高い熱安定性をもつことが分かっている。*M. capsulatus* (Bath) よりもさらに高温環境に生育する高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来のシトクロム *c'* (TTCP) は MCCP とアミノ酸配列が類似しており、MCCP よりもさらに高い熱安定性を示すことが予測される。本研究では、MCCP と同様の手法でその熱安定性を測定することで、TTCP が MCCP よりも高い熱安定性を示すことを証明する。

【方法・結果・考察】 TTCP タンパク質を大腸菌で異種発現し、各種カラムクロマトグラフィーにより精製した。TTCP タンパク質溶液の CD スペクトル 200-250 nm 測定を 10°C 間隔で昇温しながら行ったところ、215-220 nm の変化が顕著であり、この結果は MCCP と類似していた。TTCP の CD スペクトル 215 nm を指標とした 30-140°C の昇温実験により熱安定性を解析すると、その変性中点温度 T_m は 117°C となり、MCCP の T_m よりも約 20°C 高い数値となった。この結果から TTCP は MCCP よりも高い熱安定性を示すと言える。TTCP の X 線結晶構造解析の結果、TTCP はヘム周辺、ダイマー界面に MCCP では見られない付加的な相互作用が存在することが明らかとなった。さらに TTCP のループ中には、プロリン残基が 9 個多く存在しており、エントロピー減少による構造安定化が示唆された。これらの分子間相互作用およびループの安定化が TTCP の熱安定化に寄与すると考えている。

E-2 耐熱性レポータータグの開発を志向した好熱菌 LacZ の特性評価
○吉村俊祐, 大城 隆¹, 鈴木宏和¹ (鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・工)

【目的】大腸菌由来の β -ガラクトシダーゼ (LacZ) は、不活性型の小さい断片 (α -ペプチド) と大きい断片 (ω -ペプチド) に分割でき、それらは再会合することで β -ガラクトシダーゼ活性を回復する。よって α -ペプチドは、標的タンパク質を検出するためのタグとして利用できる。本研究では、*Geobacillus* 属好熱菌で利用できる耐熱性かつ小型のペプチドタグの開発を目的とし、耐熱性 LacZ の探索および特性評価を行った。

【方法・結果】*Geobacillus* 属細菌のゲノム配列をマイニングしたところ、*G. stearothermophilus* 10 から大腸菌 *lacZ* のホモログ (*GSlacZ*) が見出された。*GSlacZ* を、pTrcHisB を用いて高発現させ、その発現産物 (*GSLacZ*) を均一に精製した。*GSLacZ* の特性を詳細に調べたところ、*GSLacZ* は耐熱性の β -ガラクトシダーゼであることが確認できた。ゲルろ過カラムクロマトグラフィーからは、本酵素が二量体を形成していることが示唆された。*GSLacZ* の ω -ペプチドと、黄色蛍光タンパク質の C-末端側に融合させた α -ペプチド (Venus- α) を調製した。 ω -ペプチドは弱い β -ガラクトシダーゼ活性を示し、Venus- α と混合することで活性が増加した。Venus- α は熱処理後も ω -ペプチドとの再会合能を維持した。大腸菌および好熱菌中で產生させた Venus- α は、 ω -ペプチドと発色基質を混合することで、相対的に定量できた。黄色蛍光タンパク質の N-末端側に融合させた α -ペプチド (α -Venus) も、同様に相対定量できた。以上の結果から、*GSLacZ* の α -ペプチドは耐熱性ペプチドタグとして実用可能と考えられる。

E – 3

L-アラビノース 1-脱水素酵素の酵素-基質-補酵素複合体の立体構造解析

○吉原健太郎, 渡辺誠也^{1,2}, 渡邊康紀^{1,3}

(愛媛大・農, ¹愛媛大院・農, ²愛媛大・沿岸環境科研セ, ³山形大・理)

【背景】細菌の L-アラビノース 1-脱水素酵素 (AraA) は Gfo/Idh/MocA タンパク質ファミリーに属するが、他の機能性酵素のメンバーとの相同性は 30%程度と低い。実際、以前決定した酵素-補酵素複合体構造をもとに行った基質のドッキングシミュレーションでは、Lys91・Glu147・His153・Asp169・Asn173 が基質の周辺に位置する可能性を示唆したが、これらに相当する残基は他の Gfo/Idh/MocA 酵素にないだけでなく、基質の C1-OH 近辺には触媒塩基として高度に保存されているチロシンもしくはヒスチジン残基も見当たらなかった。**【実験・結果】**今回我々は、野生型の 3%程度の活性しかない E147A 変異体を用いて結晶化およびソーキングを行うことで、酵素-基質-補酵素複合体の構造を 2.1 Å 分解能で決定した (Yoshiwara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020, 530, 203-208)。この結晶構造をもとに、上記 5 残基に加えて新たに Trp152・Trp231・His119 が基質結合部位として同定された。このうち、Trp152・Trp231 は L-アラビノースと CH/π 相互作用をしており、His119 は C1-OH と水素結合を形成できる位置する触媒塩基の有力候補と考えられた。これらのアラニン変異体を解析したところ、活性は 1/8000・1/100・1/30 へと劇的に低下し、構造的知見を裏付けた。また、NADP⁺ の 2'-リン酸基と水素結合する残基を改変した S37D/R38A 変異体では、NADP⁺/NAD⁺ 比が 58 から 0.07 へと変化し補酵素特異性が完全に逆転した。**【結論】**AraDH の基質認識及び触媒機構は他の Gfo/Idh/MocA とは大きく異なる一方、基質特異性を決定するメカニズムは似ていることが明らかとなった。

E – 4

深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム c' の構造と機能の関係

○坂口 陸, 藤井創太郎, 三本木至宏 (広島大院・統合生命)

【目的】 至適生育環境 4°C, 50 MPa の *Shewanella benthica* DB6705 と至適生育環境 8°C, 30 MPa の *Shewanella violacea* DSS12 は、アミノ酸配列が 92%一致するシトクロム c' (それぞれ SBCP, SVCP) を持つ。SBCP は SVCP に比べ、変性温度 (T_m) が 7°C高い。本研究では、両シトクロム c' の安定性と構造の差異が機能にどのように影響するかを検討した。

【方法】シトクロム c' は還元型、NO 結合時に特異的な吸収スペクトルを示す。還元型シトクロム c' は 425 nm にピークが生じ、NO 型シトクロム c' となった時に 399 nm ヘビークが遷移する。アスコルビン酸を用いてシトクロム c' を還元した蛋白質溶液に、NO 発生剤である Proli NONOate を希釈した溶液を 10 μL ずつ滴下し、吸収スペクトルを測定した。そして 425 nm の吸光度変化から、遷移推移から両シトクロム c' の NO 結合親和性を算出した。

【結果・考察】SBCP および SVCP の NO 結合定数はそれぞれ $4.46 \times 10^4 \pm 0.21 \times 10^4$, $1.83 \times 10^5 \pm 0.12 \times 10^5$ M⁻¹ であり、どちらも NO 結合タンパク質として機能しうること、タンパク質の構造変化による熱安定化は、NO 親和性に影響することが示唆された。SBCP と SVCP の熱安定性と親和性の結果を比較すると、安定性と機能は逆相関を示す。このことから SBCP および SVCP は安定性と機能のトレードオフを由来する菌の生育環境に応じて細かく調節している可能性が考えられる。

E-5 *Luteolibacter algae* SW フコイダン低分子化酵素遺伝子の高発現と酵素の特性
○新宮由奈子, 小谷健太¹, 藤原卓人¹, 八木寿梓¹, 鈴木宏和¹, 大城 隆¹
(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・工)

【目的】褐藻類の粘質成分に含まれるフコイダンは、抗ガン作用や血液凝固防止等の生理活性を有し、健康食品素材としての応用が期待されている。しかし、化学構造が不規則であり分子量が約 20 万と大きいことから、生理活性と構造の相関性解明は進んでいない。当研究室では、オキナワモズク由来フコイダンを対象に、海洋由来微生物の低分子化酵素を用いた研究を進めてきており、すでにフコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 株から低分子化酵素 (Fct114) を精製し、クローニングおよび異種発現を行っている。今回、H18 株とは異なる *L. algae* SW 株のフコイダン低分子化酵素について、研究を実施した。

【方法・結果】H18 株のフコイダン低分子化酵素遺伝子 *fctII4* の塩基配列をもとに、SW 株のドラフトゲノム情報より目的遺伝子を探索した結果、比較的の相同性の高い ORF が 1 つ見出され、*swfct* と命名した。*Swfct* の分子量は 93 kDa と見積もられ、*Fct114* と比較すると、全体のアミノ酸配列の相同性は 40% であり、N 末端領域よりも C 末端領域に相同性の高い配列が見られた。*swfct* から、シグナル配列をコードする 72 bp を除いた DNA 断片 (*swfct'*) をクローニングし、大腸菌で発現させたところ、可溶性画分に目的タンパク質の著量生産が確認された。得られた無細胞抽出液を用いて酵素反応を行ったところ、脱アセチル化フコイダンの低分子化が起こることが確認できた。*Fct114* はフコイダン、脱アセチル化フコイダンの両方に対して活性を有するのに対し、*Swfct'* は、アセチル基を有するフコイダンに対する活性は示さなかつたことより、両酵素の特性は異なることが示唆された。

E-6 高基質特異性 L-グルタミン酸オキシダーゼから作製した L-チロシンオキシダーゼの性質検討
○矢野佳果, 松尾慎作, 伊藤菜奈子¹, 今田勝巳¹, 日下部 均², 根本理子,
田村 隆, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命, ¹阪大院・理, ²エンザイムセンサ)

【目的】L-グルタミン酸オキシダーゼ(LGOX)は L-Glu の酸化的脱アミノ反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼの一種である。本酵素は L-Glu のみを基質とする極めて厳格な基質特異性を示し、高活性かつ熱、pH に対して安定な性質から、バイオセンサ等に国内外で利用されている。我々は LGOX の 305 番目のアルギニン残基が基質認識における鍵残基であることを明らかにし、R305 への部位特異的変異導入により、基質特異性改変酵素の作製に成功した。特に R305E 変異 LGOX は L-Arg に対して厳格な基質特異性を示す L-アルギニンオキシダーゼであった。その複合体結晶構造では、基質 Arg が E305 以外に E617 や D433 と相互作用していた。最近我々は LGOX の E617 への変異導入でも基質特異性の改変ができるを見いだした。今回は L-Tyr に対して高い活性を示す L-チロシンオキシダーゼとなった E617K 変異 LGOX の性質検討を行った。【方法】クイックチェンジ法による部位特異的変異導入により作製した E617K 変異 LGOX 発現ベクターを *E. coli* JM109 に導入し、E617K 変異酵素を発現、精製した。酵素活性は、反応生成物である過酸化水素や α-ケト酸を定量する方法を用いて測定した。【結果】E617K 変異 LGOX は L-Glu, L-Arg に反応せず、L-Tyr に対して高い活性を示した。L-Tyr に対する見かけの *Km* は 1.2 mM, *k_{cat}* は 3.9 s⁻¹ であった。また反応最適温度は 50°C、最適 pH は 8.5 で、LGOX とほぼ同等の pH 安定性、熱安定性を示した。本酵素は以前作製した R305H 変異 LGOX よりも、より厳格な基質特異性で高活性な L-チロシンオキシダーゼであることが分かった。現在、E617K 変異 LGOX の結晶化・X 線結晶構造解析を試みている。

E – 7 Reverse genetics on two membrane-bound aldehyde dehydrogenases of
Gluconacetobacter diazotrophicus PAL5 OMiah, R.¹, Matsutani, M. ¹,
Murate, T. ¹, Kataoka, N. ^{1, 2, 3}, Matsushita, K. ^{1, 2, 3}, Yakushi, T. ^{1, 2, 3}
(¹Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., ²Fac Agric, ³RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Acetic acid fermentation is carried out by two-step oxidation of ethanol to acetic acid with the membrane-bound alcohol and aldehyde dehydrogenases (ADH and ALDH) of acetic acid bacteria. ADH is pyrroloquinoline quinone (PQQ)-dependent, whereas prosthetic groups associated with ALDH remains a matter of debate. A biochemical study reported that the prosthetic group of ALDH of *Gluconoacetobacter diazotrophicus* PAL5 is PQQ in 2010 (1), although we reported that of another strain of acetic acid bacteria is not PQQ by genetic study long time ago (2). This study is aimed at identification of the prosthetic group of *Ga. diazotrophicus* PAL5 ALDH by reverse genetic study. Because the PAL5 strain possesses two different ALDH gene clusters *aldFGH* and *aldSLC*. Here, we eliminated the *aldFGH* and *aldSLC* genes as well as the *pqqABCDE* genes (genes for PQQ biosynthesis). Under acetic acid fermentation conditions the single mutant Δ *aldFGH* strain less produced acetic acid than wild type, while the Δ *aldSLC* strain did it similarly as wild type, suggesting *aldFGH* acts as major ALDH. We observed the Δ PQQ strain lost ADH activity but has ALDH activity similar to wild type, suggesting that PQQ may not be the prosthetic group of ALDH. We will try to determine the prosthetic group of ALDH in near future.

- (1) Gomez-Manzo et al. (2010) J Bacteriol 192, 5718-5724.
(2) Takemura, et al. (1994) Biosci Biotechnol Biochem 58, 2082-2083.

E – 8 Characterization of a cryptic, membrane-bound PQQ-dependent dehydrogenase of *Gluconobacter* sp. CHM43
ONguyen, M. T.¹, Kataoka, N.^{1, 2, 3}, Adachi, O. ¹, Matsushita, K. ^{1, 2, 3}, Yakushi, T. ^{1, 2, 3}
(¹Grad. Sch. Sci. Tech. Innov., ²Fac Agric, ³RCTMR, Yamaguchi Univ.)

Gluconobacter sp. strain CHM43, a species of acetic acid bacteria, possesses 4 uncharacterized membrane-bound, PQQ-dependent dehydrogenases in the genome. We constructed host *Gluconobacter* strains to characterize them. In the CHM43 genome, we eliminated the genes for alcohol dehydrogenase (*adhAB*) and glycerol dehydrogenase (*sldBA*) to minimize the ability to oxidize primary and secondary alcohols, respectively. We transformed the Δ *adhAB* Δ *sldBA* strain with the plasmid carrying the GLF_2583-2584 genes. The membranes of the transformant showed the considerable D-arabitol dehydrogenase activity, while the reference strain harboring the empty vector did not. These results indicate functional expression of the GLF_2583-2584 proteins and suggest that these proteins are not expressed in the wild-type strain. Since the predicted amino acid sequence showed 83% identity to that of glycerol dehydrogenase (GLDH), that enzyme was tentatively named as glycerol dehydrogenase 2 (GLDH2). Here, we compared GLDH2 with GLDH by using the membranes of the Δ *adhAB* strain. The both enzymes oxidized *cis*-1,2-cyclohexanediol, while only GLDH oxidized the *trans* form; GLDH2 did not. The K_M values for D-arabitol were 5.5 mM and 88 mM of GLDH and GLDH2, respectively, while those for L-ribose were 61 mM and 41 mM of GLDH and GLDH2, respectively. We suggest that GLDH2 oxidizes cyclic compound preferably with a strict stereospecificity. Another examination was focused on how strong the PQQ-binding in the two enzymes are. GLDH2 was more prone to lose PQQ and more sensitive to EDTA to release PQQ than GLDH.

E-9 ナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-C のグアニンヌクレオチド交換因子
GEF-H1 を介した新たなシグナル伝達機構
○西田充芳¹, 嶋田真紀², 宮本賢治¹, 辻 明彦^{1,2}, 湯浅恵造^{1,2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

【目的】ナトリウム利尿ペプチドの受容体の一つである NPR-C は血中ナトリウム利尿ペプチドのクリアランスの役割を担っているが、それ以外の生理機能も有する可能性が示唆されている。また、近年では、NPR-C 特異的リガンドとして osteocrin/musclin が同定され、新たな NPR-C の機能の解明が期待されている。これまでに我々は、NPR-C の細胞内相互作用タンパク質として Rho グアニンヌクレオチド交換因子である GEF-H1 を同定し、osteocrin を含むリガンドが NPR-C に結合すると GEF-H1 が解離することを明らかにした。本研究では、NPR-C から解離した GEF-H1 の細胞内挙動の解明を目指した。

【方法・結果】GEF-H1 の活性は 886 番目 Ser のリン酸化によって制御されることから、まず初めに NPR-C と GEF-H1 を共発現させた HEK293T 細胞を osteocrin で処理し GEF-H1 の 886 番目 Ser のリン酸化を調べた。その結果、osteocrin 処理によって 886 番目 Ser の強いリン酸化が認められた。この 886 番目 Ser を含めた周辺配列は、リン酸化依存的に結合する 14-3-3 タンパク質の結合モチーフと一致していることから、続いて GEF-H1 と 14-3-3 タンパク質との相互作用を調べた。osteocrin 処理によって GEF-H1 と 14-3-3 タンパク質の結合量が増加することが明らかとなった。さらに、NPR-C から解離した GEF-H1 の活性化状態を検証した。活性化 GEF-H1 と選択的に結合するヌクレオチドフリー-RhoA G17A 変異体を用いたプルダウンアッセイを行った結果、osteocrin 処理によって GST-RhoA G17A と GEF-H1 の結合量が増加し、解離した GEF-H1 は活性化されることが示唆された。

E-10 *S. marcescens* LipC を利用したラクダ科動物由来 VHH (Nanobody) の分泌生産
○浅田知範¹, 高木大地¹, 中井美邑², 湯浅恵造^{1,2}
(¹徳島大院・先端技術, ²徳島大・生物資源)

【背景・目的】大腸菌を用いた組換えタンパク質生産のほとんどすべてがペリプラズムを含む菌体内での生産であり、タンパク質の抽出・精製に複数の工程を要するため、新たな生産系の構築が求められている。これまでに、我々はグラム陰性菌 *Serratia marcescens* の I 型タンパク質分泌装置のひとつである Lip system (LipB, LipC, LipD) の LipC を導入した大腸菌がラクダ科動物由来 VHH (Nanobody; Nb) の C 末端に FLAG タグを付加させた Nb-FLAG を分泌することを見出している。本研究では、LipC による分泌に関わる基質認識部位の同定と Nb の分泌生産を試みた。【方法・結果】先行研究において Lip system は基質の C 末端より十数アミノ酸に位置する VAL 配列を認識し、その配列と C 末端からの位置が分泌に重要であることが示されている。Nb-FLAG の C 末端より 16~18 番目には VTV 配列が存在することから、分泌との関連を調べた。Nb-FLAG の N 末端に Strep タグを付加させた後 (Strep-Nb-FLAG), C 末端側を数アミノ酸ずつ欠損させた変異体を複数個作製したが、FLAG タグを除去した Strep-Nb を含む C 末端欠損変異体はいずれも LipC により分泌された。一方、VTV 配列の 2 つの Val を Ala に置換した Nb_{ATA}-FLAG 変異体および Strep-Nb_{ATA} 変異体はいずれも分泌されなかった。これら結果より、C 末端からの位置は関係なく、配列のみが分泌に関わることが考えられた。また、VTV 配列は重鎖定常領域中の配列で、全ての Nb で保存されており、他の抗原に対する Nb も LipC によって同様に分泌された。最終的に、Strep-Tactin Sepharose を用いてアフィニティー精製したところ、培養液 1 L 当たり >5 mg の Nb を得ることができた。

F-1 きのこ廃菌床熱水抽出物に含まれるファイトアレキシン誘導物質の探索
○西村純美, 宇部尚樹¹, 福島(作野)えみ², 手林慎一³, 上野琴巳⁴,
大崎(岡)久美子⁴, 石原亨⁴(鳥取大院・持社創生, ¹鳥取大・乾燥地研,
²日本きのこセンター菌蕈研, ³高知大・自然科学農, ⁴鳥取大・農)

【目的】近年, きのこの多くは, おが粉や, コーンコブ, 米ぬか, フスマなどから作られる菌床を用いて栽培されている。きのこ収穫後の菌床(廃菌床)には使い道がなく, 多量の廃棄物となる。廃菌床の新たな利用法を模索する中で, 廃菌床の熱水抽出物をイネに処理すると, ファイトアレキシンの蓄積や病害関連遺伝子の発現などの防御応答が誘導され, イネいもち病菌に対する抵抗性が増大することが発見された。そこで, ブナシメジ廃菌床熱水抽出物に含まれる防御応答誘導物質の探索をおこなった。

【方法・結果】ブナシメジ廃菌床熱水抽出物を分配抽出や, イオン交換およびODSカラムクロマトグラフィー, 限外ろ過などで分画したところ, 防御応答誘導物質は極性が大きく中性の低分子化合物であることがわかった。このような物質の一つとして糖類が推定される。そこで, ブナシメジ廃菌床の熱水抽出物中に含まれる糖類をHPLCで定量した。すると, グルコースが18 mM程度の濃度で含まれており, 加えて, スクロースとフルクトースも検出された。これらの糖類を10 mMの濃度でイネの葉に処理すると, いずれもファイトアレキシンの蓄積を強く誘導した。また, これらの糖類の処理は, 防御応答の活性化に関与するサイトカインの一種, イソペンテルアデニンの蓄積や, 病害関連遺伝子 *PRIb* および *PBZ1* の発現も誘導した。さらに, マイクロアレイ解析から, 廃菌床熱水抽出物を処理した葉とグルコースを処理した葉で多数の遺伝子が共通した変動を示すことがわかった。以上の結果から, これらの糖類が廃菌床熱水抽出物に含まれる防御応答誘導物質の一つであると結論した。

F-2 エラジタンニン代謝物 urolithin A の抱合体の構造
○細川夏菜乃, 新實祐理, 森彩夏, 岩岡裕二, 伊東秀之(岡山県大院・保福)

【目的】エラジタンニンの主要代謝物の urolithin A は抗酸化, 抗炎症や抗腫瘍作用, さらに最近ではマイトファジー促進活性や, 線虫の延命効果など様々な機能性が報告され, 医薬品候補化合物としても注目されている。我々は, urolithin A の生体内挙動について検討を行い, urolithin A をラットに経口投与後, urolithin A は血漿中ではほとんどが抱合体として存在し, 腸肝循環などにより比較的長時間体内に滞留した後, ほとんどが未変化体として尿中排泄されることを報告してきた。さらに本研究では, 血中に存在している urolithin A の抱合体の構造を明らかにすることを目的として, 経口投与後の胆汁中に排泄される抱合体を単離し, その構造解析を行った。

【方法・結果】urolithin A (1または10 mg) をSD系雄性ラットに経口投与し, 経時的に胆汁を採取した。採取した胆汁について, 各種カラムクロマトによる分離, 精製を行い, 抱合体の単離を行った。単離した抱合体についてNMRおよびMSを測定した結果, urolithin A の3-O-glucuronideと8-O-glucuronideのおよそ2:3の混合物であることが明らかとなった。この混合物について, 順相系および逆相系HPLC等各種分離条件を検討したが, この2種の抱合体は分離困難であった。以上の諸データから, エラジタンニンの活性代謝物である urolithin A は, 経口投与後, 体内で主に2種のモノグルクロン酸抱合体が生成することを明らかにでき, エラジタンニン活性代謝物 urolithin A の機能解明に向けた基礎的データを提供することができた。

F – 3 O-マンノシルグリカン部分構造, Xyl α 1-3GlcA β 1-4Xyl β 1-4Rbo の合成
○田村敬裕, 田村純一 (鳥取大院・連農)

O-マンノシルグリカンは細胞外マトリックスであるラミニンと細胞骨格とを架橋することにより, 筋細胞膜を安定化させており, その欠損は, 筋ジストロフィー症の発症原因の一つである。O-マンノシルグリカンの形成は還元側から逐次相当する糖転移酵素により行われるため, どの部分が欠損しても発症に至る。それに対して, ラミニンと強く相互作用する糖鎖部分を, 別途酵素的に合成しジストログリカンと結合させることで, ラミニンと細胞骨格とを架橋することができると考えた。非還元末端側を形成する糖転移酵素である LARGE や B4GAT1 の糖鎖伸長のプライマー構造を明らかにするため, "Xyl α 1-3GlcA β 1-4Xyl β 1-4Rbo"を合成の標的化合物とした。

既知の GlcA 誘導体(1)から誘導した 3 位水酸基遊離の(2)と既知である Xyl 誘導体(3)から誘導した单糖供与体(4)とを縮合し Xyl-GlcA(5)を合成した。得られた二糖を酸加水分解による脱保護後, アノマーを分離し, 遊離となった水酸基を保護して(6)を得た。こののち, 2 工程で相当するイミデートへと誘導し, 二糖供与体(7)を得た。他方, 以前我々が合成した Xyl-Rbo(8)[1]から 2 工程で 4 位水酸基遊離の 9 へ誘導し, これを 7 と縮合して, 四糖(10)を得た。最後に全ての保護基を除去し, 標的化合物の合成に成功した。

[1] T. Tamura and J. Tamura, *Tetrahedron Lett.*, **60**, 2019, 465-468.

F – 4 ナマコ由来フコシルコンドロイチン硫酸の組成分析
○美船好香, 九里幸汰, 武田-奥田尚子, 田村純一 (鳥取大・農)

[目的]

棘皮動物であるナマコの体壁には, 硫酸化多糖であるフコシルコンドロイチン硫酸(FCS)が存在する。FCS は, D-グルクロン酸(GlcA)と N-アセチル-D-ガラクトサミン(GalNAc)の二糖繰返しで構成されるコンドロイチン硫酸(CS)と同じ構造の多糖を基本骨格に持ち, GlcA の 3 位水酸基に L-フコースが α 結合している。その特徴的な構造から, ヘパリンに類似した抗凝血作用を経口投与で得られることが知られており, 新たな抗凝血薬として期待されている。一方, FCS の水酸基は位置特異的に硫酸化されており, ナマコの種によって硫酸化パターンが異なることが報告されている[1]。そこで本研究では, 異なる種のナマコ体壁から FCS を単離し, その組成を明らかにすることとした。

[方法・結果]

ナマコ体壁を脱脂乾燥後, タンパク分解と透析を行い, エタノールを用いて粗糖鎖を沈殿させた。この粗糖鎖は陰イオン交換樹脂で精製し, 脱塩して精製糖鎖を得た。得られた精製糖鎖は, NMR 解析により, FCS およびフコース側鎖と CS 様糖鎖骨格の硫酸化パターンを明らかにした。

[1] P. Myron et al., *Carbohydr. Polym.*, **112**, 173-178 (2014).

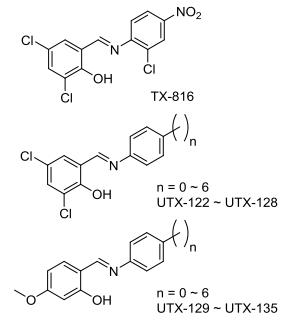
F – 5

5-ALA を用いた光線力学療法における新規シップ塩基併用による増強作用

○篠原侑成¹, 遠藤良夫¹, 安部千秋², 小幡 徹³, 小倉俊一郎⁴, 米村 豊⁵, 宇都義浩⁶（徳島大院・先端技術, ¹金沢大・がん研, ²先端医療研セ・老化機構研, ³愛知学院大・薬, ⁴東工大院・生命理工, ⁵腹膜播種治療支援機構, ⁶徳島大・生物資源）

【目的】5-アミノレブリン酸（5-ALA）を用いた光線力学療法（ALA-PDT）は低侵襲的であるため、種々のがんに対し、広く用いられている治療法である。我々は、TX-816を当研究室の所有するケミカルライブラリーより見いだし、本化合物がALA-PDTの増感効果を向上させ、細胞内PpIXの蓄積量も増加することを明らかにした。しかし、TX-816は極めて容易に加水分解されるという問題点があった。そこで加水分解耐性を持たせた化合物（UTX-122～UTX-135）を合成し、それらのALA-PDT増感効果およびPpIXの蓄積量を評価した。

【方法・結果】TX-816及びUTX-122～UTX-135は常法により合成した。ALA-PDT増感活性は、5-ALA及び化合物添加4時間後に630 nmの赤色可視光を照射し、MTTアッセイにより評価すると、特にUTX-134及びUTX-135のALA-PDT増感効果がそれぞれ5.03倍、6.96倍に向上した。化合物の加水分解耐性は、GC/MSを用いてDMSO(10%含水)中の化合物量を経時的に測定した。UTX-134及びUTX-135は70分経過後90%以上がシップ塩基を保持していたため、これらの誘導体はTX-816に比べて加水分解耐性が顕著に向上した。また、細胞内の蛍光強度を測定し、播種した細胞数からPpIX量を計算すると、UTX-134及びUTX-135とALAを併用した場合、ALA単独群と比較して細胞内PpIX量も上昇した。以上より、UTX-134及びUTX-135は有用なALA-PDT増感剤として期待できる。



F – 6

ヒマワリ種子由来のPC12細胞における神経突起形成促進作用物質

○古賀武尊¹, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹, 田井章博¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

【目的】近年、急速に進む高齢化に伴いアルツハイマー型認知症患者が増加傾向にあり、治療法や予防法の確立が急務である。アルツハイマー型認知症患者は、神経細胞の生存、分化、再生を促進する神経成長因子(nerve growth factor; NGF)が不足している。そのため、NGFは治療薬への応用が期待されたが、NGFの分子量では血液脳関門を通過せず、脳内へ移行できない。そこで、NGF様作用またはNGF増強作用を示す低分子物質の探索研究が進められている。本研究では、NGF増強作用の1つである神経突起形成促進作用に着目し、ヒマワリ種子より活性物質を単離・同定することを目的とした。

【方法・結果】本研究では、NGFと同様にPC12細胞の神経突起分化を促すdibutyryl-cAMP(Bt₂cAMP)を用いて、ヒマワリ種子に含有する神経突起形成促進作用を示す物質の探索を行った。ヒマワリ種子の抽出物を、活性を指標にして、分液とカラムクロマトグラフィーによって精製し、1つの活性画分を得た。得られた活性画分について¹H-NMRとGC-MSによる分析を行った結果、活性画分は、 β -sitosterolを主成分とした、 β -sitosterol, stigmasterol, campesterolの混合物であることが判明した。次に、これらのステロール物質とcholesterolを用いて活性を比較したところ、 β -sitosterolとstigmasterolは最も強い活性、campesterolは弱い活性を示し、cholesterolは活性を示さなかった。これらの結果より、ステロール物質の神経突起形成促進作用は、24位の側鎖の長さと正の相関があることが示唆され、ヒマワリ種子より得られた活性画分は、 β -sitosterolが活性本体であることが明らかとなった。

F-7

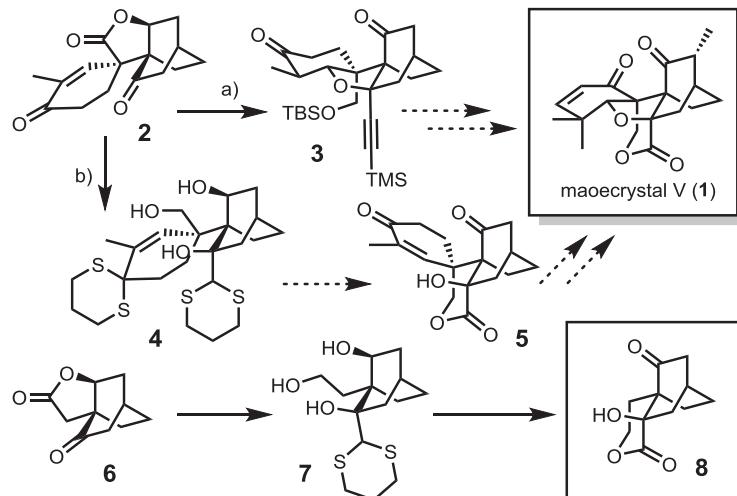
中国産ハーブから単離されたマオエクリスタルVのモデルおよび全合成研究
 ○片山峻樹, 佐藤勇氣, 浦 達哉, 井田浩介, 泉 実, 清田洋正
 (岡山大院・環境生命)

【目的】中国産ハーブ *Isodon eriocalyx* から単離された、複雑な五環性化合物 maoecrystal V (1) は、HeLa 細胞に対して選択的に強い増殖阻害活性を示すことから、抗がん剤リードとして期待されている^[1]。我々は、1 の全合成を目的としている。

【方法・結果】(ルート a) ラクトン 2 から数工程で四環式化合物 3 を得た。3 から 6 員環化を行い 1 の合成を目指す。

(ルート b) 2 から 2 工程でトリオール 4 に導いた。4 から 6 員環ラクトンを構築して 5 とする。その後、エーテル環化を行って 1 の合成を目指す。ルート b に先立つモデル合成では、6 からトリオール 7 を経てラクトン環モデル 8 の合成に成功した。

[1] S. H. Li et al., *Org. Lett.* **2004**, 6, 4327.

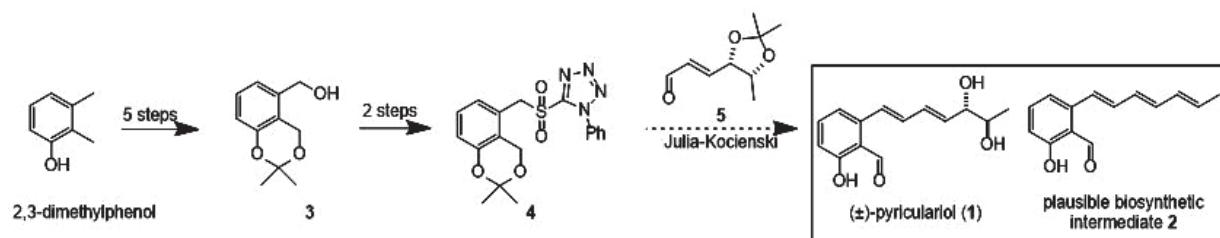


F-8

イネいもち病菌毒素ピリキュラリオールおよび生合成中間体の合成研究
 ○王 子依, 桑名晶妃, 平岡諒也, 小野田祐子, 泉 実, 清田洋正
 (岡山大院・環境生命)

【背景・目的】ピリキュラリオール (1) はイネいもち病の原因菌 *Pyricularia oryzae* の培養液から単離された^[1]サリチルアルデヒド型植物毒素である。ピリキュラリオールおよび生合成中間体の構造活性相関の解明を目的とし、合成研究を行った。

【結果】2,3-Dimethylphenol からアセタール 3 を 5 工程で合成し、アセタール 3 から 2 工程で PT-スルホン 4 を調製した。その後、PT-スルホン 4 と側鎖アルデヒド 5 は Julia-Kocienski オレフィン化反応による、ピリキュラリオールおよび生合成中間体の合成を検討中である。



[1] M. Nukina et al., *Agric. Biol. Chem.*, **1981**, 45, 2162.

F-9 農産廃棄物（稲わら）を原料とした CNF の製造
○六車知晃，中村嘉利¹，淺田元子¹
(徳島大院・創成科学，¹徳島大・生物資源)

【目的】世界では、化石資源などの枯渇が懸念されており、その使用に伴い発生する CO₂ の影響が問題視されている。そこで、バイオマスに着目した。本実験では稲わらからセルロースナノファイバー(CNF)を作製することにした。そして、目的として前処理後漂白過程の有無が CNF の強度にどのような影響を及ぼすかの検討を行った。

【方法・結果】稲わらに対して、15 atm, 20 atm, 25 atm の圧力で 5 min の水蒸気蒸煮処理を行い、その後ミル処理 10 秒を行った。その後前処理サンプルを水抽出、アセトン抽出、漂白処理を施しグラインダーによる解纖を経て CNF を得た。その過程での漂白の有無 3 種類の条件差により、合計で 6 サンプルを作成した。この作成した CNF を吸引ろ過後プレスし、CNF シートを作り、引張試験を行うことによって強度を調べた。また、各圧力条件において前処理後のサンプルに対して成分分析を行い、水可溶成分、アセトン可溶成分、NaClO₂ 可溶成分、ホロセルロース成分の割合を測定した。

成分分析の結果、最もリグニンの除去効率が高く、ホロセルロースの割合が高かったのは 20 atm の時であった。また、引張試験において比強度の最高値は 49.1 MPa/g/cm³ であり、前処理条件が 15 atm, 5 min, 漂白無しのサンプルであった。

F-10 リグノセルロース系バイオマス利用のための深共晶溶媒処理の検討
○吉田 優，淺田元子¹，中村嘉利¹
(徳島大院・先端技術，¹徳島大・生物資源)

【目的】近年、再生可能資源としてリグノセルロース系バイオマスが注目されている。リグノセルロース系バイオマスの主成分はセルロース、ヘミセルロース、リグニンである。このうちセルロース、ヘミセルロースは酵素糖化による糖生産や発酵による燃料生産等が、リグニンは樹脂や硬化剤としての利用等が模索されている。リグノセルロースはセルロース、ヘミセルロースがリグニンに囲まれた強固な構造を形成しているため、これらを利用するためには前処理が必要となる。本研究では、溶媒による前処理として深共晶溶媒(DES)の使用を検討した。DES は常温常圧で液体として存在する塩であり、その成分として、毒性が低く、持続性のある物質を利用できる点から、環境に低負荷で効果的溶媒として注目した。

【方法・結果】バイオマスとしてタケを用いた。深共晶溶媒の構成成分としては水素結合供与体として乳酸を、水素結合授与体として塩化コリンを用いた。成分構成比は乳酸:塩化コリン=1:2 で行った。タケを 1 min ミルした後、10 g を 100 g の深共晶溶媒に含浸し、油浴にて 500 rpm で攪拌しながら加熱した。90~180°C, 1~24 h の範囲で処理条件を検討した。処理後、のサンプルをろ過、洗浄し、残渣とろ液に分けた。残渣は成分分析、酵素糖化を行った。酵素糖化にはアクラレモニウムセルラーゼ（明治製菓株式会社）を用い、50°Cで 72 h 糖化を行った。ろ液は、沈殿が確認されるまで水を添加し、沈殿物をろ過で回収した。沈殿物の成分分析を行った。結果として、バイオマスから純度の高いリグニンを抽出することに成功した。また、酵素糖化において、未処理と比較して大幅な糖化率向上が見られた。

農業廃棄物（ユズの皮）を原料とした CNF の生産と分析
○Yilamu Dilimulati (ディリ), 淺田元子¹, 中村嘉利¹
(徳島大院・先端技術, ¹徳島大・生物資源)

本研究目的はユズ廃棄部を原料として安全, 環境に低負荷な実験方法を使用した CNF の製造です。地球温暖化対策, また農業廃棄物の有効利用を図る目的から, 廃棄植物由来の「セルロースナノファイバー (CNF)」が注目されています。ユズは国内生産量は約 18,000 トンであり, 四国 (高知, 徳島, 愛媛) 3 県で約 4 分の 3 を占めています, 榨汁後の残滓は 1 万トン近くになっています。

本実験で前処理として水のみを使用し高温高圧下と短時間粉碎処理処理をする前処理を行った後, 異なる圧力下処理したサンプルの不純物を取るために水抽出とアセトンを行います, その後サンプルをろ過し, 揚拌しながら亜塩素酸 Na 添加して漂白処理します。ここまで操作でホロセルロースが得られます, 得たホロセルロースをグランダ法で処理して CNF 懸濁液を得ました, CNF 懸濁液を吸引濾過し, 乾燥させ CNF シートを得ました, できた CNF シートから引張試験を行いました, 残りの CNF 懸濁液は, 遠心分離して凍結乾燥させ重合度測定を行いました。

引張強度の結果, ゆず皮から作られた CNF の引張強度が最も高く, 重合度の結果から処理圧力が高くなるにつれて重合度が低くなる傾向が見られることから成分の分解が進んでいることが確認できました。ユズ廃棄部を原料として低コスト, 環境に悪影響を及ぼさない製造プロセスにより, 引張強度において市販の CNF と同程度の強度を持った CNF を製造することができました。

贊 助 企 業

- ・天野エンザイム(株)
- ・アルファ一食品(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)えひめ飲料
- ・(株)エンザイム・センサ
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・岡山県酒造組合
- ・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)醉心山根本店
- ・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)
- ・(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)
- ・(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
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製薬(株)
- ・マルトモ(株)
- ・(株)三ツワフロンティック
- ・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)

2020年9月1日現在 55社

日本農芸化学会 2020 年度中四国支部大会の開催にあたり、以下の皆様のご支援を賜りました。
ここに厚く御礼申し上げます。

日本化学会中国四国支部（協賛）

徳島化学工学懇話会（協賛）

国立大学法人徳島大学（後援）

日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）実行委員会

実行委員長 田井章博（徳島大・生物資源）

総務 大西康太（徳島大院・医歯薬）

会計・大会HP 浅田元子（徳島大・生物資源）

要旨集・プログラム

櫻谷英治（徳島大・生物資源），田中 保（徳島大・生物資源），
向井理恵（徳島大・生物資源），阪本鷹行（徳島大・生物資源），
田井章博，大西康太

WEB会場

湯浅恵造（徳島大・生物資源），田井章博，櫻谷英治，田中 保，
向井理恵，浅田元子，阪本鷹行，大西康太

日本農芸化学会2020年度中四国支部大会（第57回講演会）

主 催：日本農芸化学会中四国支部

実行委員長：田井章博

連絡先：770-8513 徳島市南常三島町2-1

徳島大学大学院社会産業理工学研究部

生物資源産業学域

T E L : 088-656-7526

E-mail : atai@tokushima-u.ac.jp

支部からのお知らせ

1. 第58回 講演会（例会）

開催日：2021年1月23日（土）

場 所：香川大学

内 容：シンポジウム、一般講演、（受賞講演）

世話人：田淵光昭（香川大学）

2. 支部創立20周年記念 第59回 講演会（例会）

開催日：2021年6月12日（土）

場 所：広島大学

内 容：シンポジウム、一般講演

世話人：羽倉義雄（広島大学）

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒770-8513 徳島県徳島市南常三島町 2-1

徳島大学生物資源産業学部内

支部ホームページ：<http://chushikoku.jsbba.or.jp/>

E-mail : chushikoku@jsbba.or.jp