

日本農芸化学会中四国支部
第38回講演会

講 演 要 旨 集

日時：2014年1月25日（土）13時15分開会
場所：香川大学農学部

日本農芸化学会中四国支部

日本農芸化学会中四国支部第38回講演会（例会）

会場：香川大学農学部

日時：2014年1月25日（土）

11:00～12:00 幹事打合会 (A306講義室)

12:10～13:00 支部参与会 (A308講義室)

13:15～14:45 受賞講演・特別講演 (BW106講義室)

13:15～13:45 日本農芸化学会2013年度農芸化学奨励賞受賞講演

「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの遺伝学的・生物有機化学的解析」

荒川賢治（広島大院・先端物質）

13:45～14:45 特別講演

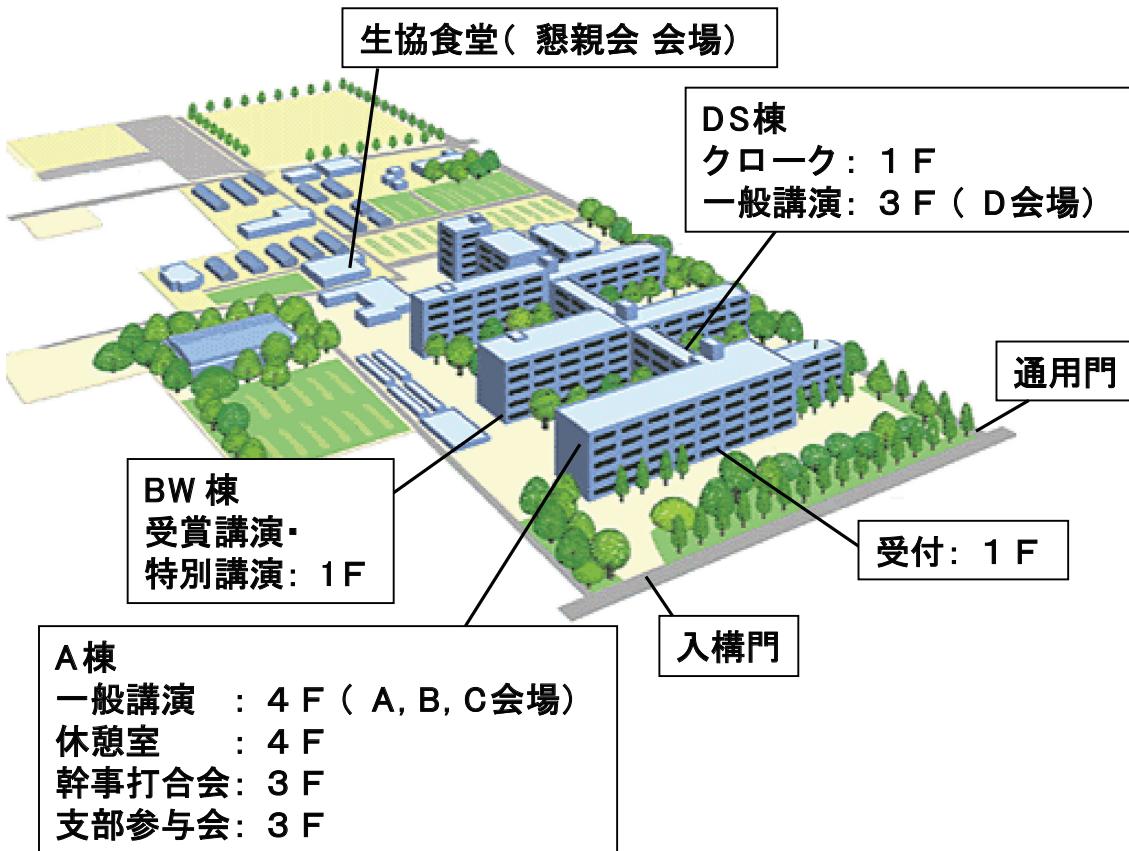
「食品タンパク質の魅力—構造と機能そして美味しさをもとめて」

早川 茂（香川大・農）

15:00～17:36 一般講演 (A402, A403, A404, DS304講義室)

18:00～20:00 懇親会 (農学部生協食堂)

会場案内図（香川大学農学部：香川県木田郡三木町池戸 2393）



受付	DS 棟 1 階	DS101 前
受賞講演・特別講演会場	BW 棟 1 階	BW106
一般講演 A 会場	A 棟 4 階	A402
B 会場	A 棟 4 階	A403
C 会場	A 棟 4 階	A404
D 会場	DS 棟 3 階	DS304
幹事打合会会場	A 棟 3 階	A306
支部参与会会場	A 棟 3 階	A308
休憩室	A 棟 4 階	A401
クローケ	DS 棟 1 階	DS101

一般講演 会場一覧表

会場		講演番号	分類
A	A402	A1-A13	食品・動物・植物・利用
B	A403	B1-B13	微生物-遺伝子・機能解析
C	A404	C1-C13	微生物-代謝-分離・有機・天然物
D	DS304	D1-D13	酵素・タンパク質

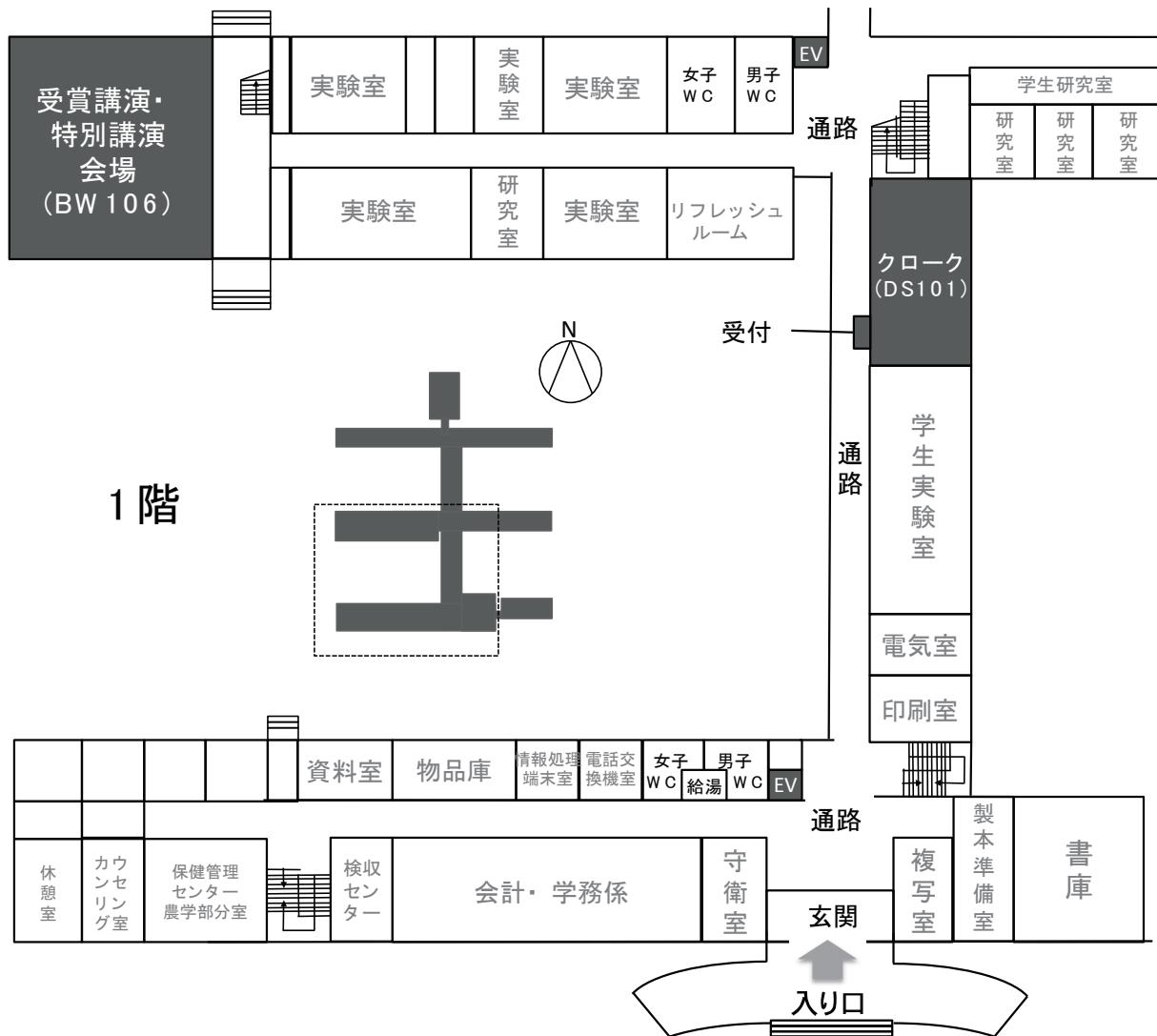
一般講演 座長一覧表

会場		講演番号	座長
A	A402 講義室	A-1 ~ A-4 A-5 ~ A-7 A-8 ~ A-10 A-11~ A-13	田中 保 (徳島大) 前田 恵 (岡山大) 小川雅廣 (香川大) 吉井英文 (香川大)
B	A403 講義室	B-1 ~ B-4 B-5 ~ B-7 B-8 ~ B-10 B-11~ B-13	船戸耕一 (広島大) 田村 隆 (岡山大) 麻田恭彦 (香川大) 森本兼司 (香川大)
C	A404 講義室	C-1 ~ C-4 C-5 ~ C-7 C-8 ~ C-10 C-11~ C-13	渡辺誠也 (愛媛大) 永田信治 (高知大) 上村一雄 (岡山大) 渡辺文雄 (鳥取大)
D	DS304 講義室	D-1 ~ D-4 D-5 ~ D-7 D-8 ~ D-10 D-11~ D-13	三本木至宏 (広島大) 村田芳行 (岡山大) 櫻庭春彦 (香川大) 秋田 充 (愛媛大)

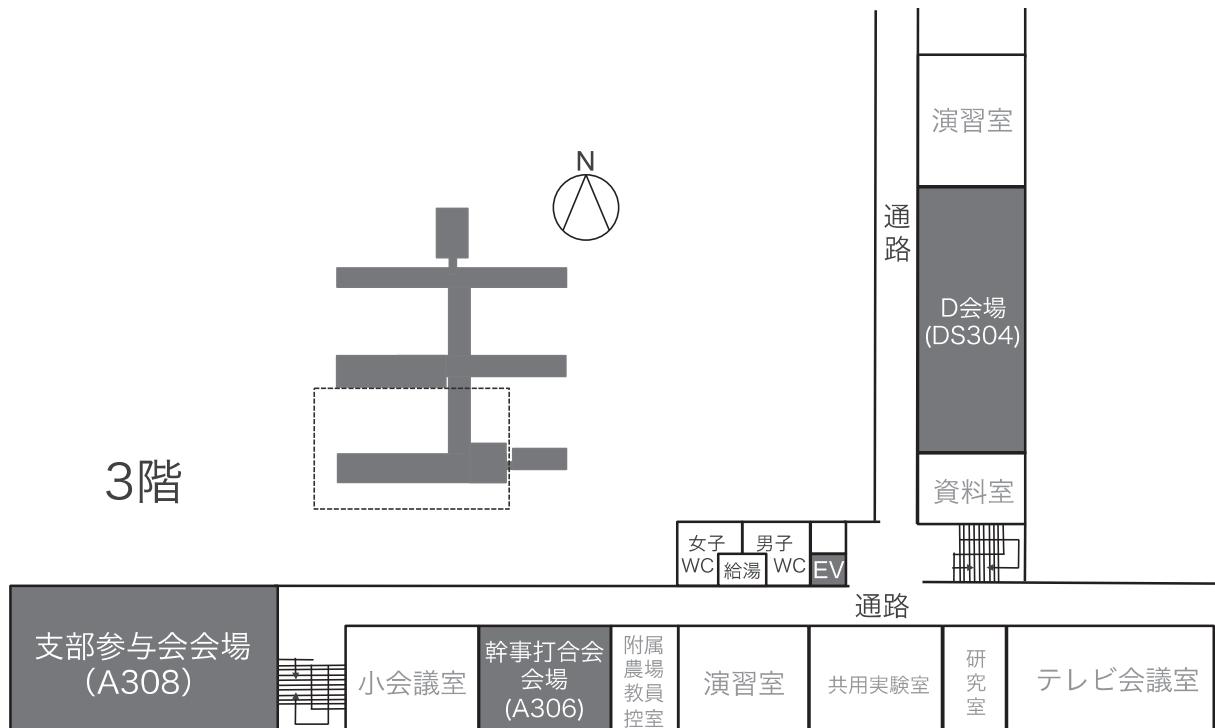
注)

1. 書画カメラを用います。操作は各発表者でお願いします。
2. 発表時間9分、質疑応答3分厳守で進行をお願いします。

香川大学農学部講義棟 1階



香川大学農学部講義棟 3, 4 階



講演会

プログラム

日本農芸化学会中四国支部第38回講演会（例会）

プログラム

会場：香川大学農学部

日時：2014年1月25日（土）

11:00～12:00 幹事打合会 (農学部A306講義室)

12:10～13:00 支部参与会 (農学部A308講義室)

13:15～14:45 受賞講演・特別講演 (農学部BW106講義室)

13:15～13:45 日本農芸化学会2013年度農芸化学奨励賞受賞講演

座長 江坂宗春（広島大院・生物圏）

「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの遺伝学的・生物有機化学的解析」

荒川賢治（広島大院・先端物質）

13:45～14:45 特別講演

座長 稲垣賢二（岡山大院・環境生命）

「食品タンパク質の魅力－構造と機能そして美味しさをもとめて」

早川 茂（香川大・農）

15:00～17:36 一般講演 (農学部A402, A403, A404, DS304講義室)

18:00～20:00 懇親会 (農学部生協食堂)

一般講演プログラム

A 会場（A402 講義室）「食品・動物・植物・利用」

A-1 15:00 食用キノコの新規栽培方法の開発

○川手 亮, 渡邊 彰, 麻田恭彦
(香川大・農)

A-2 15:12 さぬきうどんの破断特性に対する延伸方法の影響と原因

○廣澤秀和¹, 小野 誠², 高木 慶², 真鍋正憲³, 合谷祥一²
(¹香川大院・農, ²香川大・農, ³大和製作所)

A-3 15:24 ニワトリ卵白塩基性タンパク質のアルカリ処理による構造変化

○丹羽貴大, 赤澤隆志, 平田光里, 早川 茂, 小川雅廣
(香川大・農)

A-4 15:36 乳化魚油噴霧乾燥粉末の評価手法について

○四日洋和¹, 足立早映¹, 安達修二², 吉井英文¹
(¹香川大・農, ²京大院・農)

A-5 15:48 肥満白色脂肪組織のマクロファージ浸潤に応答する分子マーカーの探索

真田洋平, ○矢中規之
(広島大院・生物圏)

A-6 16:00 希少糖からの抗老化物質の探索－線虫寿命試験法の改良

○佐藤正資¹, 砂古口博文¹, 新谷知也², 大隈一裕², 何森 健³
(¹香川大・農, ²松谷化学工業, ³香川大・希少糖セ)

A-7 16:12 線虫を用いた葉酸過剰症発症メカニズムの解析

○前川由紀奈, 美藤友博, 薮田行哲, 河野 強, 渡辺文雄
(鳥取大院・農)

A-8 16:24 ホスマチジン酸（PA）の抗消化性潰瘍効果と穀類における PA 含量

○田中 保¹, 生駒 照¹, 森戸克弥¹, 徳村 彰¹, 南 利夫²
(¹徳島大院・HBS (薬学系), ²徳島県西部総合県民局農林水産部)

A-9 16:36 酸性 Peptide:N-glycanase 過剰発現トマトの構築と遊離糖鎖構造特性
○村田翔平, 前田 恵, 中野龍平, 木村吉伸
(岡山大院・環境生命)

A-10 16:48 植物細胞の小胞体品質管理機構に関わる糖鎖関連タンパク質の機能解析
○兵庫彬斗¹, 江原愛美², 前田 恵¹, 木村吉伸^{1,2}
(¹岡山大院・環境生命, ²岡山大院・自然科学)

A-11 17:00 エキナセアの有効利用を目的とした抗インフルエンザウイルス活性物質の探索
○西岡奈々江¹, 常城朱乃², 曽田公輔¹, 小林直哉³, 川端智光⁴, 田平弘基⁵,
景山誠二², 中島廣光¹, 石原 亨¹
(¹鳥取大・農, ²鳥取大・医, ³大山メディカルハーブ, ⁴大山町, ⁵鳥取県
大山普及所)

A-12 17:12 植物性資源の乳酸発酵を利用した餌料の開発と評価
○坂本奈穂¹, 柳 裕子¹, 穴井直博², 河原崎樹子¹, 神坂愛理奈¹, 池上裕倫³,
村松久司⁴, 永田信治⁴
(¹高知大・農, ²アミール動物病院, ³ソフィ, ⁴高知大・生命環境)

A-13 17:24 地場産品を用いた発酵種の評価と利用
○近藤菜月¹, 森 菜津美¹, 高橋 朋¹, 茂野光正², 高橋了子³, 坂本奈穂¹,
柳 裕子¹, 加藤麗奈⁴, 上東治彦⁴, 村松久司⁵, 永田信治⁵
(¹高知大・農, ²ペロリ, ³源水, ⁴高知県工技セ, ⁵高知大・生命環境)

B 会場（A403 講義室）「微生物-遺伝子・機能解析」

- B-1 15:00 分裂酵母のロンボイドプロテアーゼ Rob1 によるゴルジ体膜結合型転写因子の切断機構の解析
○東 玲那¹, 渋谷大介¹, 竹川 薫², 田淵光昭¹, 田中直孝¹
(¹香川大・農, ²九州大院・農)
- B-2 15:12 分裂酵母のゴルジ体膜表在性タンパク質 Gmp ファミリーの機能解析
○兒子隆英, 工藤麻友美, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)
- B-3 15:24 分裂酵母内レクチン Emp43 及び Vip36 の機能解析
○川口宗馬, 梨子木健人, 鈴木章太郎, 田淵光昭, 田中直孝
(香川大・農)
- B-4 15:36 酵母発現系を用いた青枯病菌エフェクターの機能解析
○長谷川純一, 藤原祥子, 東構真城, 中川智絵, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- B-5 15:48 宿主細胞のレドックス環境を搅乱する植物病原菌エフェクターの機能解析
○藤原祥子, 長谷川純一, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- B-6 16:00 酵母のオリゴペプチド輸送体の解析, 及び選択マーカーとしての利用開発
○北村憲司
(広島大・自然科学セ)
- B-7 16:12 酵母スフィンゴ脂質による TOR 複合体の機能制御に関する研究
○中園航太, 廣田彩花, 船戸耕一
(広島大院・生物圏)
- B-8 16:24 酵母による相補性解析は Human ARV1 遺伝子の GPI 生合成における役割を示す
○池田敦子¹, 梶原健太郎², 船戸耕一¹
(¹広島大・生物生産, ²大阪大・微研)

- B-9 16:36 接合伝達を用いた硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* の形質転換法の検討
○伊藤梓美, 井本知志, 稲垣賢二, 田村 隆
(岡山大院・環境生命)
- B-10 16:48 枸杞子抽出物が第2相薬物代謝酵素遺伝子群の発現に与える影響
○齋木俊也¹, 桑鶴祥子², 芦田 均³, 村田芳行¹, 中村宜督¹
(¹岡山大院・環境生命, ²(株) 資生堂, ³神戸大院・農)
- B-11 17:00 組換えバニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼを用いたマンデル酸誘導体の光学分割
○河野和也, 田中三男, 三井亮司
(岡山理大・理)
- B-12 17:12 真核生物の環状染色体維持に必要な遺伝子の探索
田中大樹, ○上野 勝
(広島大院・先端物質)
- B-13 17:24 大腸菌発現系において培地および遺伝子配列が転写プロファイルに及ぼす影響
○安保紘高¹, 三木駿也², 原 啓文³, 山副敦司⁴, 今村維克², 今中洋行²
(¹岡山大・工, ²岡山大院・自然科学, ³マレーシア工科大, ⁴NITE-NBRC)

C 会場 (A404 講義室) 「微生物-代謝-分離・有機・天然物」

- C-1 15:00 *Bacillus* sp. K44 による L-フシトールから 1-デオキシ- L-ブシコースの生産経路の解明
○藤井翔太¹, 吉原明秀², 高田悟郎², 森本兼司²
(¹香川大院・農, ²香川大・希少糖セ)
- C-2 15:12 新規微生物 70A 株による D-フシトールから 6-デオキシ- D-タガトースの生産
○成富 旭, 吉原明秀, 高田悟郎, 森本兼司
(香川大・希少糖セ)
- C-3 15:24 新規微生物 KP21 株による L-ラムニトールから 1-デオキシ- L-フルクトースの生産
○福浦 晃, 吉原明秀, 高田悟郎, 森本兼司
(香川大・希少糖セ)
- C-4 15:36 Production of 6-deoxy- L-talose from L-fucose by microbial enzymatic reactions.
○Sirinan Shompoosang^{1,2}, Akihide Yoshihara², Yasuhiko Asada³, Kenji Morimoto²
(¹Uni. Grad. Sch. Agri. Sci., Ehime Univ, ²RSRC, Kagawa Univ., ³Fac. Agri., Kagawa Univ.)
- C-5 15:48 微生物による第 4 級アンモニウム化合物の分解 (第 12 報) : γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の活性検出と誘導条件の検討
○藤光洋志¹, 福井明子², 岡田一真², 松本 彰², 有馬二朗², 森 信寛²
(¹鳥取大院・連農, ²鳥取大・農)
- C-6 16:00 海藻付着微生物数及び菌相の変化
○垣田浩孝, 小比賀秀樹, 上嶋 洋
(産総研・健康工学)
- C-7 16:12 中等度酸性鉱山廃水中の微生物叢の解析
○王 揚, 安田貴志, 金尾忠芳, 上村一雄
(岡山大院・環境生命)
- C-8 16:24 幼犬の腸内環境に由来する乳酸菌の分離と評価
○柳 裕子¹, 坂本奈穂¹, 穴井直博², 蔭山博子¹, 村松久司³, 永田信治³
(¹高知大・農, ²アミール動物病院, ³高知大・生命環境)

- C-9 16:36 ユズ果皮成分がウシ皮下脂肪由来細胞の分化能に及ぼす影響
○野尻修佑¹, 松川和嗣², 石岡美香³, 難波正徳³, 村松久司², 永田信治²
(¹高知大・農, ²高知大・生命環境, ³四国総研)
- C-10 16:48 栄養補助食品のクロレラ錠剤に含まれるビタミンB₁₂化合物の特性の解明
○多湖一憲¹, 藤田行哲¹, 竹中重雄², 溝口 亨³, 渡辺文雄¹
(¹鳥取大院・農, ²大阪府大院・生命環境, ³（株）サン・クロレラ)
- C-11 17:00 ヒト口腔がん細胞 KB に対する高級アルコール類の作用
○森本将行¹, 牛尾一利¹, 小原 周²
(¹新居浜高専・生化, ²神戸天然物化学)
- C-12 17:12 Synthesis of 6-O-decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose and its biological activity on plant growth
○Md. Tazul Islam Chowdhury, Ryo C. Yanagita, Yasuhiro Kawanami
(Fac. Agri., Kagawa Univ.)
- C-13 17:24 ヒドロキシプロリンを酵素で定量する
○渡辺誠也
(愛媛大・農)

D会場 (DS304 講義室) 「酵素・タンパク質」

- D-1 15:00 Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP/PPM1F) の活性を制御する細胞内タンパク質の探索
○小野内貴士, 馬場裕美, 亀下 勇, 末吉紀行
(香川大・農)
- D-2 15:12 ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口におけるタンパク質リン酸化酵素 SRK2E の役割
○足立優司¹, 銀 叶¹, 宗正晋太郎¹, 中村宜督¹, 森 泉², 村田芳行¹
(¹ 岡山大院・環境生命, ² 岡山大・植物研)
- D-3 15:24 DHFR 融合蛋白質を用いた *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験
○山本祐希, 今井綾奈, 秋田 充
(愛媛大・農)
- D-4 15:36 高基質特異性型グルコースデヒドログナーゼの基質認識機構
○加納義貴¹, 上原成一朗¹, 岩田英之², 大島敏久³, 櫻庭春彦¹
(¹香川大・農, ²耐熱性酵素研究所(株), ³大阪工大・工)
- D-5 15:48 *Shinella* sp. NN-6 由来の希少糖生産関連酵素の基質特異性の解明
○千葉和也¹, 野々垣陽介¹, 吉原明秀², 高田悟郎², 森本兼司²
(¹香川大院・農, ²香川大・希少糖セ)
- D-6 16:00 土壤から単離した *Penicillium* sp. が生産する β-グルカナーゼの解析
○澤井和彦, 新名大輔, 渡邊 彰, 麻田恭彦
(香川大・農)
- D-7 16:12 D 体特異的アミノ酸アミド加水分解酵素によるペプチド結合形成反応：基質認識に関わる残基
○太田朱香, 森 信寛, 有馬二朗
(鳥取大・農)
- D-8 16:24 好冷性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム c のアミノ酸置換による安定性の変化
○政成美沙¹, 若井 晓², 三本木至宏¹
(¹広島大院・生物圏, ²神戸大・自然)

- D-9 16:36 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム *c'*の構造と熱安定性
○藤井創太郎¹, 政成美沙¹, 河原一樹², 大久保忠恭², 沖 大也², 山中 優³,
若井 曜⁴, 三本木至宏¹
(¹広島大院・生物圏, ²大阪大院・薬, ³奈良先端大・物質, ⁴神戸大・自然)
- D-10 16:48 バイオエタノール生産への応用を目的としたサッカロミセス酵母 1200 株の耐
熱性の検討
○笹井雄貴¹, 泉 可也², 渡辺誠也¹
(¹愛媛大・農, ²(株) bits)
- D-11 17:00 酵母セラミド合成の制御に関わる Pkh キナーゼ下流因子の探索
○吉川大地, 津田遼平, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- D-12 17:12 MCC/eisosome における *SLM1* の機能解析
○八重佳織, 津田遼平, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)
- D-13 17:24 *Slm1* は Cell Wall Integrity MAPK Cascade を介して高温ストレスに依存した
Plasma Membrane Quality Control を制御する
○津田遼平, 八重佳織, 田中直孝, 田淵光昭
(香川大・農)

受 賞 講 演

講 演 要 旨

日本農芸化学会 2013 年度農芸化学奨励賞

放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの 遺伝学的・生物有機化学的解析

荒川 賢治（広島大院・先端物質科学研究科）

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は構造の異なる 2 つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産し、それら生合成遺伝子群は全長 210 kb の巨大線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされていた。本研究では pSLA2-L 上にコードされた特異な抗生物質生合成系および生産制御機構の総合的解明を目指し、以下に示す成果を挙げた。本講演では詳細を紹介する。

1. LC の大員環形成機構解析

ポリケチド化合物にはしばしば大環状構造を有するものが見られるが、いずれも分子内脱水縮合による大環状ラクトン・ラクタムであり、LC でみられるような炭素-炭素結合によるものは未だ例がなかった。そこで LC クラスター中に存在するアミンオキシダーゼ遺伝子 *lkcE* の遺伝子破壊株を構築したところ、本株は C2-C18 間の炭素-炭素結合が失われた線状中間体 LC-KA05 を蓄積した。これを *LkcE* との *in vitro* 反応に賦したところ、17員環閉環体が取得できた。以上の結果より、まず線状中間体の C-18 位アミンが酸化されて N-アシリミニニウム中間体が生じ、これが C-2 位エノラートから分子内求核付加反応を受けて 17 員環が形成される、という特異な大員環生合成機構を提唱できた。

2. LC 生合成を司るモジュラー・反復混合型 PKS の解析

LC の骨格形成には 8 分子の酢酸の縮合が必要であるが、縮合に関与するケト合成酵素ドメインは LC 生合成クラスター (*lkcA-lkcO*) 中に 5 つしか存在しておらず、モジュール・反復混合型 PKS であると示唆された。この仮説を証明するために、まず *Streptomyces lividans* での異種発現を行い、LC の骨格形成には *lkcA-lkcO* が必要十分であることを明らかにした。また、3 つのマルチドメイン PKS (*LkcC, LkcF, LkcG*) の翻訳融合実験および各 PKS の変異解析を行ったところ、*LkcF, LkcG* はモジュラー型で機能し、*LkcC* が反復機能型 PKS であることが強く示唆された。

3. LM 生合成経路の全容解明

重水素標識アミノ酸の合成および取り込み実験を行い、LM ポリケチドのスターターユニットはイソロイシン起源であることを明らかにした。また、P450 水酸化酵素遺伝子 *lkmF, lkmK* および糖転移酵素遺伝子 *lkmI, lkmL* 破壊株の代謝産物解析を行い、post-PKS 生合成経路を解明した。

4. 抗生物質制御カスケードの解析と新規シグナル分子の構造決定

Streptomyces 属放線菌の二次代謝はシグナル分子を介した制御カスケードに調節されており、pSLA2-L 上にもこれらのホモログ（シグナル分子合成遺伝子 *srrX; tetR* 型リプレッサー遺伝子 *srrA, srrB, srrC*; SARP 型アクティベーター遺伝子 *srrY, srrZ, srrW*）がコードされていた。我々は遺伝子破壊などにより制御遺伝子群の網羅的解析を行い、*srrX-SRB-srrA-srrY-(LC)-srrZ-LM* という抗生物質制御カスケードの存在を明らかにした。さらに我々は *S. rochei* が生産するシグナル分子 SRB の構造にも注目した。本菌を大量培養 (160 リットル) し、ゲル濾過・シリカゲルクロマトグラフィーにより SRB 画分を精製した (250 μg)。精製した活性成分の高分解能質量分析を行ったところ、2 つの化合物 (SRB1, SRB2) の存在が確認でき、NMR 解析および化学合成を組み合わせて構造決定した。両化合物はいずれも 2,3-二置換 4-ヒドロキシブテノライド骨格を有する新規分子であり、放線菌シグナル分子の構造多様性を示すことが出来た。

特別講演

講演要旨

特別講演

食品タンパク質の魅力－構造と機能そして美味しさをもとめて

早川 茂（香川大学農学部）

1. はじめに

小学校3年生の時に友だちの家に誕生会に招かれた時のことが今でも思い出されます。おやつにカスタードプリンと苺のショートケーキが出てきた。今から50数年前の子供のころのおやつといえば、サツマイモやジャガイモの蒸したもの、サトウキビなど極めて素朴なものでしたから大変なカルチャーショックです。ケーキ屋さんの生クリームケーキなるものはクリスマスの時でも、食べられない時代でした。友達のお母さんに、このプリンの材料は何？、どのようにして作るのか？と真剣に聞いたことを今でも憶えています。へえ～、卵と牛乳と砂糖でこの美味しいものが出来るのか～と。これが40年にわたる研究の原点というのはやや安直過ぎるかなとは思いつつ、振り返ってみます。

2. タンパク質の構造と加工機能

卵は非常に保存性の良い食品であり、種々の卵白タンパク質の働きにより細菌の生育が抑制される。卵黄を中心に保持するゲル状の濃厚卵白が貯蔵により水様化することにより、品質が劣化する。濃厚卵白のゲル状構造を保持するタンパク質であるオボムシンがどのようにして貯蔵中に構造変化するかという研究を大学院時代に行なったことをきっかけに、畜産食品タンパク質、特に卵白タンパク質の構造と加工機能にこれまで取り組んできた。卵の食品加工機能としては、ゲル形成性、起泡性、泡安定性、溶解性、乳化性など様々であり、タンパク質を加熱することにより様々な変化をしていく。いずれの変化もタンパク質の持っている両親媒性すなわち親水性と疎水性に大きく影響を受ける。また、タンパク質分子間の水素結合、静電的相互作用、疎水的相互作用、SH／SS交換反応などの要因が加工機能にさまざまな影響を与える。そこで、これらの要因を多変量解析で解析し、加工機能（特に溶解性と加熱ゲル形成性）をある程度定量的に説明した。

3. 希少糖を含むタンパク質食品の開発

希少糖は自然界にわずかにしか存在しない单糖である。希少糖D-プシコースは、D-フルクトースのエピマーであり、D-フルクトースを原料として異性化酵素により大量生産される。物理学的特性、食品としての安全性、食後血糖値の上昇抑制などの生理的効果が確認された。D-プシコースは砂糖の約70%の甘味を有し、カロリーゼロの甘味料もある。D-プシコースの食品加工における効果などが明らかになり、ベーカリー食品、和菓子、洋菓子、デザート食品などに加えられる砂糖の一部をD-プシコースに置き換えることによりヒトの健康に良い、嗜好性に優れた、美味しい食品が開発できる道が拓けてきた。

4. 卵白塩基性タンパク質の機能特性

卵白には40種以上のタンパク質があると考えられているが、比較的量が多い10数種のタンパク質についてはこれまでに構造と機能の解析がされている。しかし、少量しか存在しないタンパク質は分離精製がされていないために解析が進んでいない。我々の研究室ではアヒル卵白から二種の新規塩基性タンパク質dBPS₁およびdBPS₂を単離精製し、それぞれ39個からなる全アミノ酸配列を決定した。また、分子量や二次構造などの構造的特性を明らかにした。また、血圧上昇抑制の指標となるアンギオテンシン変換酵素阻害作用、リパーゼ阻害作用および細胞増殖促進作用などの機能特性を有することを明らかにすることができた。

— 講演一般 —

講演要旨

A-1 食用キノコの新規栽培方法の開発
○川手 亮, 渡邊 彰, 麻田恭彦 (香川大・農)

【目的】現在、ほとんどの食用キノコは菌床栽培（オガ粉に米ぬかなどの栄養物を添加した培地を用いる栽培方法）で人工栽培されている。しかし、菌床栽培はオガ粉の供給不足や廃菌床（キノコ収穫後の残渣培地）の処理といった問題点がある。そこで本研究では、これらの問題点を解決するために、代表的な食用キノコであるエノキタケ (*Flammulina velutipes*) とヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) を対象として、新規食用キノコ栽培方法を開発することを目的とした。

【方法・結果】(1) 竹粉あるいは竹の抽出成分を用いる食用キノコの高効率栽培

未利用資源である竹をキノコ栽培へ利用することを考え、竹粉、竹リグニンあるいは竹セルロースを添加した菌床培地を用いて、エノキタケとヒラタケの栽培を行った。その結果、すべての培地において子実体形成が認められた。さらに、エノキタケでは竹リグニン添加培地において、コントロール（竹リグニン非添加菌床培地）と比較して、同収量の子実体がより早期に得られることが判明し、栽培日数の短縮化が達せられた。ヒラタケでは竹リグニン添加培地において顕著な子実体収量の増加が認められた。

(2) 菌床を使用しない食用キノコの新規栽培方法

菌床培地の代わりに液体培地（オガ粉と米ぬかの熱水抽出液）とその支持体としてのスポンジあるいは海砂を用いてエノキタケとヒラタケの栽培を行ったところ、両キノコの栽培（子実体形成）が可能であることが判明した。

A-2 さぬきうどんの破断特性に対する延伸方法の影響と原因
○廣澤秀和¹, 小野 誠², 高木 慶², 真鍋正憲³, 合谷祥一²
(¹香川大院・農, ²香川大・農, ³大和製作所)

【目的】讃岐うどんには大きく分けて、手打ちうどんと機械打ちうどんがある。この両者は食感が異なると言われているが、その原因是定かではない。本研究では麺棒あるいは、機械のローラーを用いて延伸した生地を茹でて得たうどんの違いを、色素を用いた水分勾配測定と走査型電子顕微鏡によって調べた。

【方法・結果】小麦粉と塩水を混ぜて生地を作り、28 °Cで2時間熟成し、2分間生地を足踏みで捏ね、18 °Cで一晩熟成させた。この生地を2つに分け、手打ちでは麺棒で延伸し、機械打ちでは製麺機のローラーで延伸した。それぞれを製麺機で切り、生麺とした。生麺を色素で染めた茹で水で10分間茹でた。その後、20 °Cの冷却水で1分間冷却し、サンプルとした。そのサンプルを用いて、2分毎に厚さ1mmに切り、うどん断面をスキャンし、画像解析することで明度を求めた。また、上記のサンプルを固定、脱水、蒸着することで走査型電子顕微鏡用サンプルとした。

16回の測定結果を統計処理したところ、茹で時間2分後において中心部分の水の浸透が手打ちうどんのほうが優位に高かった。しかし、茹で時間が10分に到達するときにはその差が小さくなっていた。また茹で伸びの経過を見たところ、うどん中心部分で機械打ちうどんより手打ちうどんのほうが常に明度が高かった。走査型電子顕微鏡観察では麺棒および機械のローラーの接触面において、手打ちうどんのグルテンネットワークが細く紐状であるのに対し、機械打ちうどんのグルテンネットワークは一部膜状であった。

A-3

ニワトリ卵白塩基性タンパク質のアルカリ処理による構造変化

○丹羽貴大, 赤澤隆志, 平田光里, 早川 茂, 小川雅廣 (香川大・農)

【目的】

本研究室において、鶏卵白から、分子量約 50 kDa の塩基性タンパク質 chicken Basic Protein Large (cBPL) をイオン交換クロマトグラフィーにより新たに単離精製した。部分アミノ酸配列分析の結果から、cBPL はオボアルブミン類似タンパク質であると推察された。オボアルブミンはアルカリ処理により熱安定型に転換するので、同様に cBPL にもアルカリ処理をしたところ、熱安定性が上昇し、酸性画分と塩基性画分の 2 種類の成分に分かれる事が判明した。そこで、本研究ではアルカリ処理前後における cBPL の構造変化及び 2 種類に分離したタンパク質の構造を明らかにし、cBPL の構造を解析することを目的とした。

【方法・結果】

FT-IR による二次構造解析及び蛍光プローブを用いた表面疎水性試験によりアルカリ処理前後における cBPL とオボアルブミンの構造変化の比較を行った。その結果、オボアルブミンはアルカリ処理してもあまり構造が変化していなかったが、cBPL は構造が大きく変化していた。また、二次構造の割合、表面疎水性ともに酸性画分と塩基性画分を平均すると、アルカリ処理後の cBPL と同じくらいであった。この事から、cBPL は酸性サブユニットと塩基性サブユニットの複合体であり、アルカリ処理を行うことで塩基性サブユニットと酸性サブユニットが解離したと考えられた。

A-4

乳化魚油噴霧乾燥粉末の評価手法について

○四日洋和¹, 足立早映¹, 安達修二², 吉井英文¹ (¹香川大・農, ²京大院・農)

【目的】噴霧乾燥法で調製した魚油粉末の包括油率および酸化安定性は、粉末中の油滴の微細化によって顕著に向上去ることが指摘されている。一方で、油滴の微細化によって乳化安定性が向上するため、作製した粉末油脂の含油率や過酸化物価 (POV) 評価の際、抽出条件の最適化に多大な検討を要するといった問題がある。そこで、本研究では、N,N-ジメチルホルムアミド (DMF) を用いた乳化魚油粉末の含油率およびPOV の迅速・簡便な分析手法の確立を目的として検討した。

【方法・結果】魚油・マルトデキストリン・カゼイン Na を含む溶液を攪拌してマイクロまたはナノエマルション溶液を調製し、それぞれの溶液を噴霧乾燥して魚油粉末を作製した。作製した噴霧乾燥粉末の含油率は、粉末を DMF で溶解後、ヘキサン抽出をして TLC-FID 分析から決定した。噴霧乾燥粉末の POV は、粉末を DMF で溶解した後、クロロホルム/酢酸法による分析から決定した。その結果、本法から求めた噴霧乾燥粉末の含油率は、魚油粉末の含油率の分析に広く利用されている Röse-Gottlieb 法から求めた値と殆ど変わらないことが確認された。一方、POV は、公定分析法から得られた値と比較して、僅かではあるが高い値を示した。この詳細について検討したところ、DMF そのものが POV の上昇に若干影響を及ぼす可能性が示唆された。しかしながら、本法の利点として、POV を迅速・簡便に測定できるため、簡易分析法として用いるには有用であると考えられる。本研究は、JST の復興促進プログラム（産学共創）「水産加工サプライチェーン復興に向けた革新的基盤技術の創出」の支援により実施したものである。

A-5 肥満白色脂肪組織のマクロファージ浸潤に応答する分子マーカーの探索
真田洋平, ○矢中規之 (広島大院・生物圏)

【目的】メタボリックシンドロームの発症において、肥満白色脂肪組織への単球・マクロファージの浸潤に伴った慢性炎症が大きく注目されている。本研究では、*in vivo* における肥満白色脂肪組織の網羅的な遺伝子発現解析や、単球・マクロファージと脂肪細胞との相互作用の解析などを通して、肥満白色脂肪組織のマクロファージ浸潤量を反映する脂肪細胞遺伝子の単離を試みた。同候補遺伝子のプロモーター領域を利用することで *in vivo* イメージングモデルマウスの作製へと発展させることを研究目標とした。

【方法・結果】肥満モデルマウス (db/db マウス) の白色脂肪組織で発現変動する遺伝子群の中から肥満発症において単球・マクロファージの浸潤量の増加に応答し、脂肪細胞における慢性炎症に関連した *in vivo* 因子群の選抜を行った。db/db マウスの白色脂肪組織において発現上昇する 1810 遺伝子の中から、マクロファージの浸潤を抑制する vitamin B₆ の摂取によって脂肪組織において発現量が低下する遺伝子群を探索し、262 遺伝子を選抜した。さらに、マウス脂肪細胞株 3T3-L1 細胞とマウス単球系 RAW264.7 細胞の共存培養を行い、単離した候補遺伝子群の中から活性化マクロファージとの相互作用によって脂肪細胞において著しく発現上昇する脂肪細胞因子の絞り込みを行った。肥満を呈した白色脂肪組織内への単球・マクロファージの浸潤量の増加によって発現量が著しく増加する脂肪細胞由来の候補遺伝子を単離した研究結果を報告する。

A-6 希少糖からの抗老化物質の探索－線虫寿命試験法の改良
○佐藤正資¹, 砂古口博文¹, 新谷知也², 大隈一裕², 何森 健³
(¹香川大・農, ²松谷化学工業, ³香川大・希少糖セ)

【目的】カロリー制限 (Calorie Restriction, CR) は様々なモデル動物の寿命を延長することが報告されている。ヒトにおいても、CR は加齢性疾患の発症を遅らせ、寿命を延長すると考えられている。CR によって起こる細胞内エネルギーレベルの低下がインスリン様シグナル経路、サーチュインなど複数の栄養センサーによって媒介され、そのシグナルが抗酸化酵素の発現増強やミトコンドリア機能保全などを誘導、その結果、抗老化・寿命延長が起こると考えられている。しかし、人が CR 食を長期間続けることは困難と苦痛を伴うため、食事と一緒に摂取し、CR と同様の抗老化効果が得られるカロリー制限模倣物質 (Calorie Restriction Mimetics, CRM) の開発が注目されている。我々は、希少糖 D-ブシコース、D-アロースが線虫寿命を延長（抗老化）すること、これらが CRM 候補となることを報告している。しかし、我々の活性物質スクリーニング法（線虫寿命試験）は労力、試料量の点で問題が多く、よりハイスクループットな線虫寿命試験の開発が必要であった。今回、その改良について報告する。

【方法・結果】従来法は 2 ml の液体培地を入れた 3.5 cm 径 culture dish へ線虫成虫 10 頭を入れ、振とう培養を行い、1 日おきに生き残った線虫を新しい培地に移し替えていた。今回、試験容器を 96 well プレートに変え、1 wellあたり 100 μl の液体培地に線虫一頭を入れ、静置培養し、植え替えは行わないこととした。今回報告する 96 well プレート法においては、従来法より低濃度で活性を検出することが可能となった。また、植え替えを行わないと、同時に多数の検体の試験が可能となった。

A-7

線虫を用いた葉酸過剰症発症メカニズムの解析

○前川由紀奈, 美藤友博, 薮田行哲, 河野 強, 渡辺文雄 (鳥取大院・農)

【目的】現在, 葉酸欠乏症の予防策として米国で食品へ葉酸の強化が行われている。一方葉酸強化の結果として高濃度葉酸摂取による有害作用（神経障害, 腎障害等）についての報告も散見されるが, それらの詳細な発症メカニズムについてはいまだ明らかにされていない。そこで, 遺伝学的な情報が多様で, 世代交代時間が短く, 基本的な動物の体制を持つモデル生物の線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて葉酸過剰症の発症メカニズムの解析を試みた。

【方法・結果】線虫の生育培地 (NGM 培地) に葉酸を添加し, 葉酸過剰の飼育条件を検討した。NGM 培地で育てた線虫をコントロール線虫とし, 3.9 mg /plate の葉酸を添加した培地で 5 世代継代的に生育させた線虫を葉酸過剰線虫として実験に用いた。線虫体内の葉酸含量は, 葉酸過剰線虫でコントロール線虫の約 2 倍量の葉酸含量を示し, 産卵数はコントロール線虫に比べ有意に減少した。さらに, 葉酸過剰線虫では, 著しいホモシスティンの蓄積と過酸化脂質の増加がみられた。また, 葉酸過剰線虫において, テトラヒドロ葉酸の増加と 5-メチルテトラヒドロ葉酸の減少が示されたが, 特に未代謝型葉酸はコントロール線虫の 9 倍量に増加した。現在, 未代謝型葉酸のメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素およびメチオニン合成酵素活性に及ぼす影響について検討中である。

A-8

ホスファチジン酸 (PA) の抗消化性潰瘍効果と穀類における PA 含量

○田中 保¹, 生駒 照¹, 森戸克弥¹, 徳村 彰¹, 南 利夫²

(¹徳島大院・HBS (薬学系), ²徳島県西部総合県民局農林水産部)

リゾホスファチジン酸 (LPA) は細胞増殖や遊走応答を誘導する脂質メディエーターの 1 つであり, その特異的受容体は消化管にも発現している。我々は経口摂取したホスファチジン酸 (PA) がアスピリン潰瘍を予防すること, そのメカニズムに PA の胃内消化によって生じる LPA が関与していることを報告している。今回, 我々は LPA の胃に対する作用と抗潰瘍効果の期待される食品について調べたので報告する。

LPA 2 受容体を発現するヒト胃由来の MKN74 細胞に LPA を作用させるとシクロオキシゲナーゼ 2 の mRNA レベルおよびプロスタグランジン E2 産生レベルがそれぞれ約 2 倍および 4 倍に上昇した。また, LPA は胃粘液の主成分であるムチンの分泌も誘導しており, PA の経口摂取は胃粘膜防御機能を強化する可能性が示唆された。PA に富む食品について調べたところ, 動物性食品にはほとんど含まれなかつたが, キャベツなどアブラナ科の野菜に PA が多いことがわかつた。また, 穀類ではソバに多く含まれること, 特に甘皮と呼ばれる部分に PA が多いことが判明し, ソバに抗消化性潰瘍食品としての可能性が見出された。

A-9

酸性 Peptide:N-glycanase 過剰発現トマトの構築と遊離糖鎖構造特性

○村田翔平, 前田 恵, 中野龍平, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】植物特異的な酸性 Peptide:N-glycanase (aPNGase) は、還元末端にキトビオースを有する N-グリカンを生成する脱グリコシル化酵素の一つであり、機能を失った糖タンパク質の代謝分解に関与していると考えられている。しかしながら、組織分布、基質分子の同定、aPNGase によって生成する遊離 N-グリカンの植物生理に係わる機能等については不明な点が多い。本研究では、植物成長に関わる糖タンパク質糖鎖の代謝機構や遊離 N-グリカンの生理機能を明らかにするため、aPNGase を過剰発現させたトマトを構築し、その遊離糖鎖構造や分化・成長に与える影響を調べた。【方法・結果】当研究室にて遺伝子を同定しているトマト aPNGase-Le¹⁾について、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) を用いてトマト ‘Micro-Tom’ に形質転換し、CaMV 35S プロモーターのもとで過剰発現させた。Real-time PCR の結果から、組換え株の *aPNGase* 発現量は数倍～数十倍に増加しており、*aPNGase* 過剰発現トマトの構築に成功したことが確認された。*aPNGase* 過剰発現株 T1 世代は野生株に比べて、果実発育・形態及び植物体の表現形に差違が見られた。遊離 N-グリカンは、今回新しく確立したヒドラジンを用いた脱アセチル化による精製法により、葉から抽出した試料中に混在する細胞壁由来の多糖を除去することが可能となった。遊離 N-グリカンは RP-HPLC、SF-HPLC により構造解析を行った。

1) Hossain, A., et al. *J. Biochem.*, **147**, 157-165 (2010)

A-10

植物細胞の小胞体品質管理機構に関わる糖鎖関連タンパク質の機能解析

○兵庫彬斗¹, 江原愛美², 前田 恵¹, 木村吉伸^{1,2}

(¹岡山大院・環境生命, ²岡山大院・自然科学)

【目的】分泌系タンパク質の殆どは糖タンパク質であり、小胞体中で高次構造が構築される。しかし、新生糖タンパク質の 30% 程度以上は、高次構造構築が正常に行われずミスフォールド構造をとるため小胞体の品質管理機構 (ERQC) で認識され小胞体関連分解 (ERAD) で処理されることになる。本研究では、植物 ERQC 機構においてミスフォールド構造を規定する糖鎖構造の形成に関与すると推定される EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein) の遺伝子同定と諸性質の解明を目指した。

【方法・結果】*H.sapiens* と *A.thaliana* の EDEM 遺伝子情報を基にイネ EDEM 候補遺伝子 (Os01g0773600, Os02g0741300) を選抜した。膜タンパク質予測サイト SOSUI により、前者は膜タンパク質、後者は可溶性タンパク質をコードしていると推測された。クローニング産物は組換えタンパク質の膜貫通領域を除去、N-末端に FLAG tag を融合させた形で発現するよう pFastBac1 ベクターに組み込んだ。DNA シーケンスの結果、Os01g0773600 のクローニング産物は、1 塩基置換 7 塩基挿入 (5'-ATTTAAGG-3') により翻訳が途中で停止することが明らかとなった。Os02g0741300 の組換えプラスミドは昆虫細胞 (Sf9 株) に遺伝子導入し 3 日間培養することによって発現させた。遺伝子産物は、抗FLAG 抗体を用いた Western blotting により、分子量 63 kDa に確認できた。酵素活性は、動物由来の EDEM 同様、pNP- α -D-Man, ハイマンノース型糖鎖に対しては加水分解活性を示さなかった。現在、ハイマンノース型糖鎖含有の変性糖タンパク質に対する α -1,2-Man'ase 活性について解析を進めている。

A-11

エキナセアの有効利用を目的とした抗インフルエンザウイルス活性物質の探索
○西岡奈々江¹, 常城朱乃², 曽田公輔¹, 小林直哉³, 川端智光⁴, 田平弘基⁵,
景山誠二², 中島廣光¹, 石原 亨¹ (¹鳥取大・農, ²鳥取大・医, ³大山メディカルハーブ, ⁴大山町, ⁵鳥取県大山普及所)

【目的】エキナセア (*Echinacea purpurea*) は北アメリカ大陸原産のキク科ムラサキバレン属の多年草である。北米先住民はこの植物を万能薬として、風邪や腫瘍の治療、歯の痛みの緩和などに利用してきた。近年ではインフルエンザの予防・治療にも効果がある可能性が示唆されている。しかし、活性物質の本体は明らかになっていない。そこで、エキナセア抽出物に含まれる抗インフルエンザウイルス活性物質の探索を行った。

【方法・結果】エキナセアをエタノールで抽出した。抽出液を分配抽出し水層と酢酸エチル層を得た。酢酸エチル層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。展開溶媒には 0%, 10%, 30%, 40%, 50%, 70%, 100% アセトン-ヘキサン, およびメタノールを用いた。各画分に対して抗インフルエンザウイルス活性試験を行った。活性試験には H1N1 および H5N1 インフルエンザウイルスを用いた。H1N1 ウィルスの場合, 10%, 70%, 100% アセトン-ヘキサン画分およびメタノール画分が, H5N1 ウィルスの場合は 40%, および 50% アセトン-ヘキサン画分が増殖を抑制した。これらの結果から、エキナセア抽出物にはインフルエンザウイルスの増殖を抑制する物質が含まれており、さらに、ウィルスの種類によって活性物質が異なっている可能性が示唆された。また、エキナセアの植物体を葉、花、茎、根の部位に分け、エタノールで抽出したものについても抗インフルエンザウイルス活性試験を行った。その結果、茎と葉の抽出物が H5N1 ウィルスの増殖を抑制した。

A-12

植物性資源の乳酸発酵を利用した餌料の開発と評価

○坂本奈穂¹, 柳 裕子¹, 穴井直博², 河原崎樹子¹, 神坂愛理奈¹, 池上裕倫³,
村松久司⁴, 永田信治⁴
(¹高知大・農, ²アミール動物病院, ³ソフィ, ⁴高知大・生命環境)

【目的】乳酸菌とその発酵物を含む植物性餌料は、嗜好性を損なわずに保存性を向上し、消化性と嗜好性を高め、それを摂取した動物の腸内細菌の良好な維持に有効であることが期待される。一方、食品加工時に生じる植物性廃棄物を、乳酸発酵によって餌料化できれば、新たな価値を与えることができる。本研究は、ブンタンやユズの柑橘系搾汁残渣や栗焼酎粕、商品価値が劣るが乳酸菌の生育にとって有利なトマトやヤーコンの廃棄物に由来する乳酸菌を探査し、分離した乳酸菌を利用した発酵餌料の作製と、それを摂取した成犬の腸内微生物叢を評価した。

【方法・結果】ブンタンとユズの搾汁残渣、トマト、ヤーコンの破碎物を 30°C で静置した発酵物から、MRS 寒天培地上に嫌気条件下で増殖したコロニーを分離した。その中からグラム陽性桿菌を識別し、糖資化性試験、16S rDNA の塩基配列の解析によって同定した。さらに、至適な培養条件を検討し、人工胃酸胆汁耐性試験を行って経口摂取に有効な乳酸菌を選択した。成犬の腸内微生物叢に対する効果は、バナナを乳酸発酵させた餌料の摂取によって確かめた。餌料の摂取前、摂取 1 週間後、2 週間後、摂取停止 1 週間後の成犬の糞便を採取し、pH、アンモニア濃度、微生物叢を評価した。その結果、生体外では実験的に安定な菌株でも、生体内では不安定な場合も見られ、個体差も含めて摂食による評価が必要であることがわかった。また、乳酸菌による発酵餌料の摂食により、乳酸菌を優勢種とする腸内環境を維持できることから、安定な乳酸菌とその生育に適した植物性資源による餌料開発が期待できる。

地場産品を用いた発酵種の評価と利用

○近藤菜月¹, 森 菜津美¹, 高橋 朋¹, 茂野光正², 高橋了子³, 坂本奈穂¹,

柳 裕子¹, 加藤麗奈⁴, 上東治彦⁴, 村松久司⁵, 永田信治⁵

(¹高知大・農, ²ペロリ, ³源水, ⁴高知県工技セ, ⁵高知大・生命環境)

【目的】乳酸菌や酵母を利用した発酵種は、保存性、嗜好性、機能性に優れた健康志向の発酵食品への効果的利用が期待される。これまでに本研究室では、様々な植物からアルコール醸造、製パン、乳酸飲料の生産に優れた酵母や乳酸菌の探索を行ってきた。これらの培養菌体を活用するだけでなく、地場産品を食品素材として活かすことを目的として、分離菌株の生育適性とスターターとしての評価を行うことで、発酵種としての活用法を検討した。特に高知県の特徴的な植物資源に着目して、発酵種に適した酵母と乳酸菌を選択し、発酵種で製造したパンや乳酸菌飲料の評価を試みた。

【方法・結果】植物資材として高知県の地場産品であるトマト、ヤーコン、ケール、ドクダミや、ブンタンとユズの搾汁残渣を用いた。酵母は、100 ppm のクロラムフェニコールを添加した YM 寒天培地を用いて、乳酸菌は 100 ppm のシクロヘキシミドを添加した MRS 寒天培地を用いて分離後、純粋培養して試験に用いた。酵母は発酵力試験、糖質化性試験、生地膨張力試験で評価した。また、乳酸は糖質化性試験とガス酸性試験で評価した。単離した酵母と乳酸菌は、rDNA の塩基配列の解析によって同定した。選択した酵母や乳酸菌をスターターに用いた発酵種を作製し、製パンと乳酸発酵を行うと共に官能評価も行った。トマト由来の酵母 CHI2305 を用いた発酵種と、ドクダミ由来の酵母 No.9 を用いた発酵種で作製したパンは、味や香りに特徴があり美味しいという評価を得た。また、乳酸菌飲料ではブンタン由来 OR123 とユズ由来 OR302 の乳酸菌を使用した飲料で、酸度が適度で味や香りが良いという評価を得た。

B-1 分裂酵母のロンボイドプロテアーゼ Rob1によるゴルジ体膜結合型転写因子の切断機構の解析

○東 玲那¹, 渋谷大介¹, 竹川 薫², 田淵光昭¹, 田中直孝¹
(¹香川大・農, ²九州大院・農)

【目的】ロンボイドプロテアーゼ（ロンボイド）は、膜内セリンプロテアーゼであり、基質である膜タンパク質の膜貫通領域を切断する。様々な膜内で機能することが報告されているが、ゴルジ体局在のロンボイドについては、真核微生物で解析を行ったという報告はない。そこで本研究では、分裂酵母のゴルジ体膜に局在するロンボイド Rob1 (Rhomboid) の機能の解明と基質の同定、基質の切断機構の解明を目的とした。

【方法・結果】破壊株を単離し、種々の表現型を確認した結果、Rob1 は細胞内の亜鉛・コバルトの恒常性や液胞タンパク質の選別輸送への関与が示唆され、ロンボイドとしてゴルジ体で多面的に機能していることが分かった。また、ロンボイドの基質認識モチーフを有する膜タンパク質の一つである Sre2 (膜結合型転写因子) の細胞内局在及びウェスタンプロットにより、Sre2 が Rob1 によって切断されていることが明らかになり、その切断は、モチーフ内の P1 位である 705 番目のセリンで行われていることが分かった。さらに近年、ヒトの ERにおいてタンパク質の品質管理に関与しているロンボイドである RHBDL4 の C 末端領域にユビキチンと相互作用するモチーフ (Ubiquitin interacting motif: UIM) が存在することが報告された。この UIM が Rob1 にも保存されているのかどうか確認したところ、類似のアミノ酸が保存されていたため、変異導入を行った結果、227 番目のロイシンが Sre2 の切断に必須であることが明らかになった。

B-2 分裂酵母のゴルジ体膜表在性タンパク質 Gmp ファミリーの機能解析

○児子隆英, 工藤麻友美, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】ゴルジ体は真核生物に見られるオルガネラの 1 つであり、一定の間隔で扁平な袋状の膜構造を形成し、タンパク質の糖鎖修飾や選別輸送の機能を有している。ゴルジ体の層板間にはゴルジマトリックスタンパク質と呼ばれる Coiled-coil を含んだタンパク質が存在し、ゴルジ体の構造保持や輸送機能に重要であることが知られているが、不明な部分が多い。分裂酵母のゴルジ体画分からの TOF-MS 解析により Gmp1 (SPCC569.01c) と Gmp2 (SPCC569.03) を、Gmp1 のホモロジー解析により Gmp3 (SPCP20C8.01c) と Gmp4 (SPBC337.02c) を同定した。これらは機能未知であり、2 次構造上の特徴として膜貫通領域やシグナルペプチドはないが、Coiled-Coil を有している。本研究では、互いに相同性の高い Gmp1, 3, 4 に着目し、その機能解析を行った。

【方法・結果】それぞれの破壊株を単離し、その表現型を解析した結果、分泌糖タンパク質の糖鎖修飾異常や輸送異常を示すことがわかった。また Gmp ファミリーを過剰発現させるとゴルジ体が凝集したような大きなドットが観察された。これらはゴルジ体マーカーである Gms1 と共に局在させると、Gmp1 と Gmp4 のみ一部共局在したものの、Gmp3 は全く共局在しなかった。また各破壊株で他の Gmp ファミリーの局在観察を行った結果、Gmp1 と Gmp4 がゴルジ体の凝集化に、Gmp3 がそれらのゴルジ体局在に重要であることがわかった。現在、Gmp1, 3, 4 内の 3箇所の Coiled-Coil 欠損体によるさらなる詳細な機能解析や Gmp ファミリー同士の相互作用などを調べている。

B-3

分裂酵母内レクチン Emp43 及び Vip36 の機能解析

○川口宗馬, 梨子木健人, 鈴木章太郎, 田淵光昭, 田中直孝 (香川大・農)

【目的】 分泌タンパク質や膜タンパク質はER内で輸送小胞に取り込まれ, ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment) やゴルジ体を経由し細胞外や細胞表面に輸送される。こうしたタンパク質の分泌では翻訳後の糖鎖修飾が深く関わっており, 分泌タンパク質の品質管理や適切な輸送小胞への積み込みに必須である。動物細胞ではこの糖タンパク質の輸送にレクチン(糖鎖結合タンパク質)である ERGIC-53 と VIP36 がレセプターとして働き, 糖タンパク質とレクチンの相互作用が正常な小胞分泌に必須であることが明らかになっている。しかしながら, それら糖鎖を介した分泌タンパク質輸送の詳細な機構は未だ不明な部分が多い。そこで, その輸送機構の詳細を明らかにするために, 分裂酵母内での ERGIC-53・VIP36 のそれぞれのホモログである *emp43⁺*・*vip36⁺* の機能解析を行った。

【結果】 Emp43p の細胞質に突出した C 末端や膜直下の Coiled-Coil 領域を変異または欠損させると細胞内局在が変化し, 異常な局在を示した Emp43p はマグネシウム感受性を相補できないことが分かった。また Blue-Native PAGE によって複合体解析を行い, これら機能を持たない Emp43p は複合体を形成できない事を確認した。Vip36p は GFP タグの位置によって細胞内の局在が変化し, 従来の細胞膜へのタンパク質輸送以外に, 液胞へのタンパク質輸送に関わる可能性が示唆された。

B-4

酵母発現系を用いた青枯病菌エフェクターの機能解析

○長谷川純一, 藤原祥子, 東構真城, 中川智絵, 田淵光昭
(香川大・農)

【目的】多くの病原菌は, III型またはIV型などの分泌装置を用いて, エフェクターと呼ばれる病原性に関わるタンパク質を宿主細胞に注入することで感染を成立させている。本研究では酵母発現系を用いて青枯病菌エフェクターの機能解析を行い, 青枯病菌の宿主植物への感染メカニズムを分子レベルで解明することを目的とする。

【方法・結果】青枯病菌ゲノム情報を元に得られたエフェクター遺伝子 37 個を酵母細胞内で発現させたところ, 8 個のエフェクターにおいてその発現により酵母の増殖抑制が見られた。比較的強い増殖抑制を持つ RSp1022 を約 1200 株からなるヘテロ接合体ノックアウトライブラリーに形質転換し, 網羅的な遺伝学的解析を用いた標的遺伝子の探索を行なったところ, レドックス恒常性に関わるチオレドキシンレダクターゼの *TRRI/trr1Δ* 株が野生株と比較してより強い増殖阻害を示した。また, モチーフ検索により RSp1022 は様々な生物種に保存された ChaC ドメインを有し, ChaC は γ -glutamyl cyclotransferase というレドックス恒常性に関わるグルタチオンを分解する酵素であることが判明した。これらのことから RSp1022 は γ -glutamyl cyclotransferase として, 細胞内のレドックス恒常性を乱すことで酵母の増殖を阻害していると考えられた。

B－5 宿主細胞のレドックス環境を攪乱する植物病原菌エフェクターの機能解析
○藤原祥子, 長谷川純一, 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あり、その病原性にはⅢ型分泌装置とそれによって分泌される 70 以上ものエフェクターが深く関与することが知られている。

青枯病菌エフェクターの 1 つである RSp1022 は、その分子内に ChaC ドメインを有しており、酵母で過剰発現させると酵母に増殖阻害を引き起こした。ChaC ドメインを有するタンパク質は全ての生物に保存されており、最近、酵母およびヒトの ChaC タンパク質が、生体内のレドックス恒常性維持に必須なグルタチオンを特異的に分解する γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (γ -GCT) であることが報告された。酵母内在性の ChaC タンパク質である YER163C を酵母で過剰発現させたところ、YER163C 過剰発現では増殖阻害が見られないことから、RSp1022 は YER163C よりもはるかに高い γ -GCT グルタチオン分解活性を有すると考えられた。

RSp1022 を過剰発現させた酵母を用いて γ -GCT グルタチオン分解活性を測定したところ、YER163C と比較してきわめて高い活性が見られた。また、予測活性中心である 216 番目のグルタミン酸残基をグルタミンに変異させた変異体は、活性の消失が確認された。これらの結果から、RSp1022 の宿主標的因子はグルタチオンであることが明らかになった。しかし、興味深いことに大腸菌で発現させた RSp1022 精製タンパク質は、 γ -GCT グルタチオン分解活性を示さなかった。このことから、RSp1022 の γ -GCT 活性は酵母内因子によって活性化されることが予測された。

B－6 酵母のオリゴペプチド輸送体の解析、及び選択マーカーとしての利用開発
○北村憲司 (広島大・自然科学セ)

【目的】 同一細胞への多数の遺伝子導入や、複数遺伝子をノックアウトするニーズがますます高くなっている一方で、利用できる選択マーカーの種類は限られている。遺伝子組換え体の選択にオリゴペプチド輸送体遺伝子が利用できるか検討した。

【方法・結果】 細胞外のジ・トリペプチドは、酵母では Ptr2 輸送体を介して細胞内に入る。Ptr2 が機能しない分裂酵母細胞は増殖自体には何ら問題ないがジペプチドを取込めず、ptr2 変異株は必要なアミノ酸をジペプチドとして供給した時のみ生育できない条件的アミノ酸要求性を示す。ロイシンやリジンなど異なる要求性を持つ ptr2 変異株でも、野生型 $ptr2^+$ 遺伝子の導入でペプチド培地での生育が回復し、更に要求性がない ptr2 株でも窒素源をジペプチドにすれば選択できた。ヒト Ptr2 類似輸送体がオリゴペプチド以外の化合物を取込むなどペプチド輸送体の基質特異性は非常に広く、我々は真核生物の蛋白質合成阻害剤の一種が、酵母 Ptr2 の基質になる事を発見している。 $ptr2$ 変異株が示す本抗生物質耐性形質を利用すると、野生型 $ptr2^+$ 遺伝子導入細胞のみを生育させないネガティブ選択ができた。 $ptr2$ 遺伝子は優性選択マーカーではないため宿主が劣性変異を持つ必要はあるものの、非栄養要求性株にも適用可能で正負いずれの選択にも使える新たな有用マーカーとして利用できる。アミノ酸に比べてジペプチドは高価で種類も限られるため、大豆ペプチド混合物など安価な代替ペプチド源の利用を試すと共に、Ptr2 を優性選択に使えないかも検討している。

B－7 酵母スフィンゴ脂質による TOR 複合体の機能制御に関する研究
○中園航太, 廣田彩花, 船戸耕一 (広島大院・生物圏)

スフィンゴ脂質は細胞膜を構成する脂質のひとつであり、細胞内において蛋白質の選別輸送や情報伝達の場としての役割を担うラフトを構成している分子であるが、その機能については不明な部分が多く残されている。真核細胞にはセリンスレオニンキナーゼである TOR (Target Of Rapamycin) が存在しており、機能が異なる 2 つの TOR 複合体 (TORC) を形成している。そのうちのひとつである TORC1 は液胞に局在しており、リボソーム生合成や寿命といった様々な細胞機能に関与している。以前の我々の解析により、酵母のスフィンゴ脂質が TORC1 の活性を制御している可能性を見出したが、詳細な制御機構は分かっていない。

本研究では、スフィンゴ脂質による TORC1 の活性制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、複合スフィンゴ脂質の量が低下した変異株では TORC1 の直接のターゲットである Sch9p のリン酸化量が減少することがウェスタン解析によって明らかになった。また、複合スフィンゴ脂質の、イノシトールリン酸セラミドからマンノシルイノシトールリン酸セラミド (MIPC) への変換に関わる非必須遺伝子の破壊株で Sch9p のリン酸化量の減少が見られたことから、MIPC の合成量の低下が TORC1 の活性の低下の原因であることが示唆された。

B－8 酵母による相補性解析は Human ARV1 遺伝子の GPI 生合成における役割を示す
○池田敦子¹, 梶原健太郎², 船戸耕一¹ (¹広島大・生物生産, ²大阪大・微研)

グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) はタンパク質を細胞膜に繋ぎ止めるための糖脂質であり、小胞体膜上で 10 以上の反応を経て合成される。当研究室の酵母を用いたこれまでの解析によって、脂質ホメオスタシスに重要な役割を果たす *ARV1* 遺伝子が GPI 生合成を調節する遺伝子であることが明らかになった。また、Arv1p の構造的特性から、Arv1p が GPI 中間体の小胞体膜の細胞質側から内腔側へのフリップを触媒するフリッパーの候補タンパク質である可能性が見出された。

GPI 生合成の反応ステップや各ステップで働く酵素や遺伝子は真核生物で高度に保存されている。しかし、ヒト *ARV1* 遺伝子の GPI 生合成における役割は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、酵母の *arv1* Δ破壊株を用いてヒト *ARV1* 遺伝子の相補性解析を行った。その結果、酵母 *arv1* Δ破壊株の GPI 生合成における表現型がヒト *ARV1* 遺伝子の発現によって補われる事が分かった。このことからヒト *ARV1* 遺伝子は酵母 *ARV1* 遺伝子と同様に、GPI 生合成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

B-9 接合伝達を用いた硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* の形質転換法の検討
○伊藤梓美, 井本知志, 稲垣賢二, 田村 隆 (岡山大院・環境生命)

【目的】水処理施設や埋め立て処分場などの汚水に硫酸還元菌群が急速に増殖すると高レベルの H₂S (硫化水素) が湧き出て問題となる。下水管では H₂S が恒常に発生しており、これがコンクリートを腐食させて設備を老朽化させる原因ともなる。硫酸還元菌群は汚水の有機物を分解して豊富な還元力を生み出す優れた分解者でもあるので、その還元力を水素やメタンの燃料製造に転化できれば、有用なエネルギー源として活用できる可能性がある。本研究では、大腸菌からの接合伝達ベクターを用いて硫酸還元菌 *Desulfovibrio vulgaris* への形質転換法を検討した。

【方法】*D. vulgaris* が有する薬剤耐性を調べた結果、カナマイシン (Kan) に対して高い耐性を持つが、クロラムフェニコール (Cam) には感受性を示した。接合伝達ベクター pK18mobsacB の Kan^R 遺伝子を Cam^R 遺伝子に置換した pC18mobsacB を構築した。接合伝達用大腸菌 *E. coli* S17-1 と *D. vulgaris* の混合比を 30:1, 20:1 として接合伝達を検討した。接合体 *D. vulgaris* の Cam 耐性は一時的で Cam^R が安定に保持されなかった。そこで相同組換えによってゲノム中にベクター配列を取り込むプラスミドを構築するために pC18mobsacB に [NiFeSe] 型ヒドログナーゼ遺伝子の断片を導入した pC18mobsacBH ベクターを構築した。現在、この接合伝達-相同組換えベクターを用いて硫酸還元菌ゲノムへの遺伝子挿入を検討している。

B-10 枸杞子抽出物が第2相薬物代謝酵素遺伝子群の発現に与える影響
○齋木俊也¹, 桑鶴祥子², 芦田 均³, 村田芳行¹, 中村宜督¹
(¹岡山大院・環境生命, ²(株) 資生堂, ³神戸大院・農)

【目的】枸杞子は、寧夏枸杞 (*Lycium barbarum*) 及びナガバ枸杞 (*Lycium chinense*) の果実を原料とする生薬であり、滋養強壯、肝機能強化、眼精疲労の回復、血行不良の改善、免疫機能調節などの薬理効果を有するものと考えられている。しかし、枸杞子の生体防御機能に対する作用については未だ不明な点が多い。そこで本研究では、枸杞子の生体防御機能への直接的な修飾作用を明らかにする目的で、培養肝細胞での第2相薬物代謝酵素遺伝子発現に対する枸杞子抽出物の影響を調査した。

【方法・結果】薬物代謝酵素研究に汎用される hepalc1c7 (マウス肝がん細胞) に、枸杞子の 25 v/v% エタノール抽出物を添加して 24 時間培養し、第1相薬物代謝酵素 (CYP1A1) および第2相酵素 (NQO1, HO-1, GCLC, xCT) の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて評価した。その結果、枸杞子抽出物は CYP1A1 だけでなく、第2相酵素群の遺伝子発現を濃度依存的に増強した。枸杞子抽出物はグルタチオン合成に関わる GCLC の遺伝子発現も有意に増強したことから、次に細胞内総グルタチオン量をグルタチオンレダクターゼ-リサイクル法を用いて定量した結果、枸杞子抽出物は肝細胞の総グルタチオン量を濃度依存的に増加させた。続いて、第2相酵素遺伝子群の共通転写因子である Nrf2 の核内移行に与える影響をウエスタンプロット法で評価した。その結果、枸杞子抽出物添加 1 時間後から 3 時間後において、核内の Nrf2 レベルが有意に増加した。以上の結果から、枸杞子抽出物は生体防御に関わる酵素遺伝子の発現を、転写制御を介して誘導することが明らかとなった。

B-11 組換えバニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼを用いたマンデル酸誘導体の光学分割
○河野和也, 田中三男, 三井亮司 (岡山理大・理)

【目的】私たちは小児に発症例が多いがんである神経芽腫の検査酵素の開発を行ってきた。神経芽腫では尿にカテコールアミンの代謝産物 D-バニリルマンデル酸 (D-VMA) 及び D-ジヒドロキシマンデル酸 (D-DOMA) が過剰に含まれる。このことから VMA を炭素源として生育する酵母 *Rhodosporidium paludigenum* VMA4 由来の D-バニリルマンデル酸デヒドロゲナーゼが検査酵素として応用できることを報告してきた。この酵素は D 体の VMA 及び DOMA の α ヒドロキシ酸の水酸基にのみ作用する光学特異性を持つ。そこで本研究では、本酵素の特異性を利用した VMA および DOMA の光学分割を試みた。これらはカテコールアミン代謝物として重要な物質であり、その光学活性体は医薬等への応用が期待できると考えられる。

【方法・結果】*R. paludigenum* VMA4 から精製した酵素の内部アミノ酸情報をもとに cDNA のクローニングを行った。これに 6xHis タグを付与して大腸菌で発現させ、野生型と同等の酵素を簡便に得られるようになった。そこで得られた酵素を用いて VMA 及び DOMA の光学分割を試みた。ラセミ体に対して酵素反応後、残存基質をメチル化し、光学分割カラムで光学純度の確認を行った。その結果、両基質とも D 体は完全に酸化され、残存する L 体の VMA および DOMA を 100% e.e. の光学純度で回収できた。さらに收率を向上させるため、生成物の 3-メトキシ 4-ヒドロキシフェニルグリオキシル酸に水素化ホウ素ナトリウムを添加して還元し、再度ラセミ体の基質を得た。これに再度酵素を作用させることでさらに高收率化が可能であることが明らかとなった。

B-12 真核生物の環状染色体維持に必要な遺伝子の探索
田中大樹, ○上野 勝 (広島大院・先端物質)

【目的】ある種のがん細胞では高い頻度で環状染色体が見つかるところから、環状染色体の維持に必要な遺伝子産物は、抗がん剤の分子標的となり得る。そこで当研究室では、環状染色体の維持に必要な蛋白質を探している。これまでに分裂酵母の DNA 修復に関係しているヘリケース Rqh1 が環状染色体の維持に必要であることを発見し、報告している（南部ら, *Mol. Cell. Biol.* 2013. p.1175）。本研究では、Rqh1 以外に環状染色体の維持に必要な遺伝子産物の探索を試みた。

【方法・結果】分裂酵母 *pot1* 破壊株は環状染色体を持つことから、*pot1* と合成致死になる遺伝子が環状染色体の維持に必要である可能性がある。そこで *pot1* と合成致死になる遺伝子を探索した結果、*pot1 rad9* 二重変異株が合成致死になることを発見した。*rad9* は DNA ダメージチェックポイントの初期段階に関与していることがわかっている。次にこの合成致死の機構を解明することを試みた。*pot1 rad9* 二重変異株の合成致死の原因は 2 つ考えられる。第一に、*rad9* が欠損すると末端融合が起こらなくなるため。第二に、*Rad9* が環状染色体の維持に必要であるためである。まず、第一の可能性を検証するために、*rad9* が破壊された状態で *pot1* の機能を低下させて、染色体の環状化が起こるかどうかを調べた。その結果、*rad9* が破壊された状態で *pot1* の機能を低下させても、染色体の環状化が起こることを発見した。このことから、*pot1 rad9* 二重変異株の合成致死の原因として、*rad9* が欠損すると末端融合が起こらなくなるためではないことがわかった。現在は、*Rad9* が環状染色体の維持に必要であるという可能性を検証している。

B-13 大腸菌発現系において培地および遺伝子配列が転写プロファイルに及ぼす影響
○安保紘高¹, 三木駿也², 原 啓文³, 山副敦司⁴, 今村維克², 今中洋行²
(¹岡山大・工, ²岡山大院・自然科学, ³マレーシア工科大, ⁴NITE-NBRC)

【目的】増殖が速く、多様な遺伝子ツールの利用が可能な大腸菌は、組換えタンパク質の発現用宿主として最も汎用されている。しかし、活性体収量は、標的遺伝子によってそれぞれ異なる。本研究では、大腸菌を宿主とした難発現タンパク質高発現系の確立を目的とした。そして、発現を規定する因子を絞り込むべく、培地や遺伝子配列が発現および転写に及ぼす影響について調査した。

【方法・結果】野生型配列 (wt) の大腸菌内発現が困難である放線菌 *Streptomyces mobaraensis* 由来 ϵ -リジンアシラーゼ遺伝子 (*Sm-ela*) をモデルとし、培地成分やコドン改変が発現量および活性体回収に及ぼす影響について調べた。各種 *Sm-ela* (wt, 1mut, opt) 断片をそれぞれ pET ベクターに挿入し、大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) の形質転換後、終濃度 0.1 mM の IPTG 添加、20°C、24 時間の条件で発現誘導を行った。その結果、培地成分のリッチ化、5'末端近傍のレアコドン置換 (1mut)、全長領域にわたるコドン最適化 (opt) により、発現量および活性回収量の向上が可能であることがわかった。そこで、発現誘導後 5 時間の各種菌体より total RNA をそれぞれ抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq による転写プロファイルの比較評価を行った。まず、培地成分、特にグルコースの有無により遺伝子転写プロファイルが大きく異なることがわかった。また、*Sm-ela* (opt) 発現時にのみ転写が誘導される熱ショックタンパク質 (IbpA, IbpB) 遺伝子などが見出された。さらに興味深いことに、*Sm-ela* (1mut) 発現菌体でのみ、呼吸鎖関連遺伝子群の顕著な転写抑制が見られた。

C-1 *Bacillus* sp. K44 による L-フシトールからデオキシ-プシコースの生産経路の解明
○藤井翔太¹, 吉原明秀², 高田悟郎², 森本兼司²
(¹香川大院・農, ²香川大・希少糖セ)

【目的】当研究室で単離された *Bacillus* sp. K44 株は L-フシトールから最終的に 1-デオキシ-L-プシコース または 6-デオキシ-D-プシコースを生産することが先行研究によって分かっているが、最適な生産条件、最終産物の同定、反応経路の解明は行われていない。そこで、最終産物の生産に最適な培養炭素源、最適 OD、最適 pH を決定し、さらに最終産物の同定、反応経路を解明することを本研究の目的とした。

【方法・結果】K44 を様々な炭素源を 1% 添加した無機塩液体培地で培養した菌体を用いて L-フシトールを基質とし洗浄菌体反応を行い、最適培養炭素源を検討した。最適培地で本培養した K44 を用いて、L-フシトールを基質として洗浄菌体反応を行い、最適 OD、最適 pH を決定した。また精製した最終産物をシスティンカルバゾール法およびソモジーネルソン法により同定した。さらに予想される中間物質を基質として、洗浄菌体反応を行い最終産物が生産されているかを確認することにより反応経路を推定した。

最適培養炭素源の検討の結果、リビトールを培養炭素源として添加したときに最も多くの最終産物が生産された。最適 OD の検討の結果 $OD_{660nm}=10$ が良いことが分かった。最適 pH の検討では pH6.0 が良いことが分かった。最終産物は比色法により 1-デオキシ-L-プシコースと推定されたが、中間物質と予想される 6-デオキシ-L-タリトールを基質に洗浄菌体反応を行うと最終産物であるデオキシ-プシコースよりも L-フシトールが多く生産されていることから 6-デオキシ-D-プシコースが生産、資化されていると示唆された。

C-2 新規微生物 70A 株による D-フシトールから 6-デオキシ-D-タガトースの生産
○成富 旭, 吉原明秀, 高田悟郎, 森本兼司 (香川大・希少糖セ)

【目的】

デオキシ希少糖である D-フシトールから 6-デオキシ-D-タガトースを生産する微生物、*Enterobacter agglomerans* 221e は転換効率が低いことが問題となっている。そこで土壤から新たに単離した微生物による D-タガトース及び 6-デオキシ-D-タガトース生産の最適反応条件を検討し、イズモリングの経路を補強することを目的とした。

【方法・結果】

ガラクチトールまたは L-フシトールを唯一の培養炭素源として加えた無機塩培地を用いて微生物を探索した。新規微生物である 70A 株は D-フシトールを基質した場合に 6-デオキシ-D-タガトースを効率的に生産した。その効率は *Enterobacter agglomerans* 221e よりも高い傾向が見られたことから 70A 株の至適培養条件、至適反応条件を最適化した。当初、70A 株は基質濃度 0.5% D-フシトールから 6-デオキシ-D-タガトースへの転換率が反応 48 時間後に D-フシトール比で約 75% を示したが、適培養条件として無機塩培地に培養炭素源 1.0% ガラクチトールを添加した培地で 18 時間の本培養後の菌体を用い、至適反応条件として 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、菌体濁度 $OD_{660nm}=30$ 、反応基質 0.5% D-フシトールのときに転換率は反応 24 時間後に最大約 85% まで上昇した。

C－3 新規微生物 KP21 菌株による L-ラムニトールから 1- デオキシ - L-フルクトースの生産
○福浦 晃, 吉原明秀, 高田吾郎, 森本兼司 (香川大・希少糖セ)

【目的】

デオキシ希少糖である L-ラムニトールから 1- デオキシ - L-フルクトースの生産には *Enterobacter aerogenes* IK7 を利用しているがその効率は高くない。そこで新たにスクリーニングした KP21 株の最適培養条件を検討し、IK7 よりも高い収率で 1- デオキシ - L-フルクトースを得ることを目的とした。

【方法・結果】

1% リビトールを含んだ無機塩培地で KP21 株を培養した後、遠心分離にて菌体を回収した。L-ラムニトールを基質に、洗浄菌体反応を行った。本培養における最適培地、最適培養時間、洗浄菌体反応における L-ラムニトールの最適基質濃度、最適菌体濁度を検討した。その結果、最適培地は無機塩培地に 1% のリビトールを添加した培地であり、最適培養時間は 24 時間、最適基質濃度は 5%，最適菌体濁度は OD_{660nm}=30 であった。また KP21 菌株の酸化活性を強化するため反応液中に 2% ヘキサデカン、1%，3%，5% 液体パラフィンを添加して反応を行った。これらのうち 2% ヘキサデカンを基質に添加したときに KP21 菌株は高い酸化活性を示し、L-ラムニトールから 1-デオキシ - L-フルクトースへの最大転換率は 68.6% であった。

C－4 Production of 6-deoxy-L-talose from L-fucose by microbial enzymatic reactions.
○Sirinan Shompoosang^{1,2}, Akihide Yoshihara², Yasuhiko Asada³,
Kenji Morimoto² (¹Uni. Grad. Sch. Agri. Sci., Ehime Univ, ²RSRC, Kagawa Univ.,
³Fac. Agri., Kagawa Univ.)

L-Fucose is a starting material for production of deoxy rare sugar, 6-deoxy-L-talose. It was enzymatically produced based on deoxy-izumoring, a strategy for the production of deoxy rare sugar. Microbial enzymes, D-arabinose isomerase (D-AI) of *Bacillus pallidus* Y25 and L-rhamnose isomerase (L-RhI) of *Pseudomonas stutzerii* LL172 were the biocatalysts using in this study.

In one-pot reactions, L-fucose was isomerized by D-AI to L-fuculose, which was further isomerized to 6-deoxy-L-talose by L-RhI. An equilibrium ratio of L-fucose, L-fuculose, and 6-deoxy-L-talose was 80:9:11. An individual isomerization of L-fucose to L-fuculose with D-AI showed an equilibrium ratio of 88:12. When L-fuculose was isomerized to 6-deoxy-L-talose with L-RhI, an equilibrium ratio was 45:55. The production yield of 6-deoxy-L-talose from L-fucose was 7.1%. Identification of the resulting 6-deoxy-L-talose using polarimetry indicated that specific optical rotation of the product was $[\alpha]_D^{30} - 17.1^\circ$ (c 2, H₂O).

C-5 微生物による第4級アンモニウム化合物の分解（第12報）： γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素の活性検出と誘導条件の検討
○藤光洋志¹, 福井明子², 岡田一真², 松本 彰², 有馬二朗², 森 信寛²
(¹鳥取大院・連農, ²鳥取大・農)

【背景・目的】本研究グループでは、コリンやL-カルニチンなどの第4級アンモニウム化合物の微生物での分解経路・酵素の研究を行っている。第4級アンモニウム化合物のうち、L-カルニチンは真核生物において、脂質代謝に必須の物質である。L-カルニチン製造に関する特許によると、 γ -ブチロベタインは脂肪酸の β 酸化と類似の経路でL-カルニチンに代謝されると言われているが、この経路に関与する酵素の活性検出の報告はない。本研究では、 γ -ブチロベタインを炭素および窒素源として生育する*Agrobacterium* 属細菌を用い、分解経路の初発酵素と考えられる γ -ブチロベタイン CoA 合成酵素活性の検出を試み、本酵素の誘導条件を検討した。

【方法】酵素活性を検出するために1) ミオキナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、乳酸脱水素酵素を用いる酵素カップリング法、2) 基質・生成物をHPLCで検出する方法、3) γ -ブチロベタイン CoA を検出するヒドロキサム酸法を用いた。

【結果】ヒドロキサム酸法により酵素活性が検出できた。種々の酵素誘導条件を検討した結果、D-カルニチンを炭素および窒素源とした培地(5.0 g/L D-カルニチン, 1.0 g/L K₂HPO₄, 1.0 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.5 g/L Yeast extract)で培養した菌体を、 γ -ブチロベタイン培地(0.1 g/L γ -ブチロベタイン, 4.0 g/L K₂HPO₄, 3.0 g/L KH₂PO₄, 0.5 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 1.0 mL/L ビタミン混合液)に移し、6-12時間振とうする条件が最も生産性が高かった。

C-6 海藻付着微生物数及び菌相の変化
○垣田浩孝, 小比賀秀樹, 上嶋 洋 (産総研・健康工学)

【目的】紅藻類オゴノリ科海藻に付着する優勢な微生物を明らかにする目的で、天然海域で生育している海藻及び室内培養した海藻に付着する微生物数及び菌相の変化を調べた。

【方法】天然海域で採取した海藻を滅菌海水で表面を洗浄して環境海水由来の微生物を取り除いたものを天然海藻として使用した。天然海藻を洗浄後、滅菌したナイフで切断し、得られた断片を滅菌海水中で培養した藻体を培養海藻とした。それぞれの試料5gと滅菌した塩化ナトリウム水溶液45mlを混合し付着微生物試料とし、寒天平板に塗沫し20°C、14日間培養し出現した微生物を形態・色素でグループ分けした。各分離微生物について形態観察及び生理学的性状試験を行い、絵面らの方法により分類した。微生物の塩要求性は塩無添加、1%塩化ナトリウム添加、海水添加の3種類の条件での微生物生育状況から判定した。

【結果】天然海藻の付着微生物数は 6.5×10^6 個/g(3月)及び 1.3×10^6 個/g(6月)であった。培養海藻の付着微生物数は 5.4×10^7 個/g(3月)及び 3.4×10^7 個/g(6月)であり、培養により付着微生物数がそれぞれ8.3倍及び26倍上昇した。天然海藻では*Vibrio* sp.の割合が多かったが、培養海藻では*Vibrio* sp.の割合が低下した。培養海藻付着微生物としては*Flavobacterium-Cytophaga* sp.が優勢であった。

C-7

中等度酸性鉱山廃水中の微生物叢の解析

○王 揚, 安田貴志, 金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・環境生命)

【目的】硫化鉱石に起因する酸性鉱山廃水は, Fe^{2+} や重金属を含有する pH 2~4 の酸性水で, 河川や湖に流入すると酸性化や重金属汚染を引き起こすため, 含まれる金属の除去と中和処理が施されている。 Fe^{2+} は Fe^{3+} に変換すると比較的容易に沈殿させることができるために, 廃水処理には酸性環境下で鉄を酸化する鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* が用いられている。この細菌は, 増殖の最適 pH が 2~3 であるため, 鉄を酸化したのちに廃水の中和に比較的多量の CaCO_3 を必要とする。そこで, 本研究では, pH 4 付近で鉄を酸化できる細菌の探索を試みた。【方法】岡山県美咲町の柵原鉱山の山麓から流出している地下水を試料に用いた。採取した試料から DNA を抽出し, 16S rDNA を PCR 増幅して DGGE 解析に供した。検出された DNA バンドの塩基配列を決定することによって, 酸性鉱山廃水中の微生物群集の解析を行った。また, Fe^{2+} を含む無機塩培地 (pH 3~4) を用いて, 化学合成独立栄養的に増殖する中等度好酸性の鉄酸化細菌の集積・単離を試みた。【結果】採取した鉱山廃水は, pH 4.2 で鉄の含有量は 55 mg/L であった。DGGE 解析によって, 鉄酸化能を持ち, 化学合成独立栄養的に生育できる *Ferrovam* 属の細菌や *Gallionella* 属の細菌が検出された。酸性鉱山廃水からこれまでに検出されている鉄酸化細菌である *A. ferrooxidans* や硫黄酸化細菌である *A. thiooxidans*, *A. caldus* などの好酸性の化学合成独立栄養細菌は DGGE 解析では検出されなかった。また, アーキアを分析した結果, *Thermoplasmatales* に属する新規なアーキアが優先種として検出された。酸性で生育する *Gallionella* 属の細菌の分離報告は無いため, 中等度酸性条件下で廃水処理を行うためのシステム構築に向けて, その単離を試みている。

C-8

幼犬の腸内環境に由来する乳酸菌の分離と評価

○柳 裕子¹, 坂本奈穂¹, 穴井直博², 蔭山博子¹, 村松久司³, 永田信治³

(¹高知大・農, ²アミール動物病院, ³高知大・生命環境)

【目的】餌料の乳酸発酵は, その保存性や消化性, 嗜好性を高めるが, 同時に摂取する乳酸菌が, 動物の腸内細菌叢を良好に維持することによって, 動物の健康管理に役立つことが望まれる。一般的に家畜が摂取するサイレージでは, 保存性と機能性を高める目的で乳酸発酵が活用される。また近年, 犬や猫などの伴侶動物のペットフードでは, 乳酸菌の培養菌体を添加したものが流通している。本研究では, 乳酸菌が存在しない固形餌料で飼育された幼犬の腸内細菌叢における乳酸菌の評価と, 腸内環境で安定に生存する乳酸菌を用いた機能性餌料の開発を試みた。【方法・結果】ペットショップで飼育する幼犬の新鮮便から, MRS 培地に嫌気条件下で生育する乳酸菌を分離し, その量的解析と顕微鏡観察を行った。さらに, ガス产生試験や糖資化性試験, 16S rDNA の塩基配列の解析によって分離株を同定し, 胃酸胆汁耐性試験を行った。至適な培養条件を検討後, 乳酸菌を添加した発酵餌料を用いて, 成犬による摂食試験を行った。摂取前, 摂取 1 週間後, 摂取 2 週間後, 摂取停止 1 週間後の糞便を採取し, pH, 水分含量, アンモニア濃度, 微生物叢の評価を行った。摂取前は乳酸菌が確認されない成犬において, 摂食後の糞便中から餌料中のものと同種の乳酸菌を多量に検出した。また, 摂取停止 1 週間後にも摂取した乳酸菌が見られ, 腸内での持続的な生育が認められた。摂食期間中, アンモニア濃度や一般細菌数が著しく減少し, 摂取停止後でもそれらの増加は見られなかった。このように生体中での挙動を評価した乳酸菌を用いた, 発酵餌料による腸内環境の改善が可能であると示唆された。

C-9

ユズ果皮成分がウシ皮下脂肪由来細胞の分化能に及ぼす影響

○野尻修佑¹, 松川和嗣², 石岡美香³, 難波正徳³, 村松久司², 永田信治²

(¹高知大・農, ²高知大・生命環境, ³四国総研)

【目的】我々は、食品バイオマスであるユズ果皮の飼料利用による牛肉の高付加価値化を目指している。しかし、家畜における飼料摂取の効果は、生体の持つ複雑な機構や個体差、環境要因等の影響を受け明確な評価がえられないことが多い。そこで本研究では、ユズ果皮の肉用牛への給餌試験に先立って細胞培養系による評価を行うために、ユズ果皮成分がウシ皮下脂肪由来細胞の脂肪および骨芽細胞への分化能に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】ウシ皮下脂肪をコラゲナーゼで消化し、遠心分離後回収した細胞を継代培養することで細胞株を樹立した。定常期に達した培養細胞を 0, 10, 25, 50, 75 および 100 mg/ml のユズ果皮粉末 (s-02, 四国総研) を添加した脂肪分化誘導培地で培養し、オイルレッド O 染色後、脂肪細胞数を計測し、吸光波長 (540 nm) の測定によって脂肪滴の蓄積を評価した。脂肪細胞への分化は 25 mg/ml 区が最も優れていた。また、増殖期の培養細胞を 0, 1, 5, 10, 25 および 50 mg/ml のユズ果皮粉末を添加した骨芽細胞分化誘導培地で培養し、アルカリリフォスマターゼ陽性細胞数を計測した。骨芽細胞への分化は 10 mg/ml 区が最も優れていた。以上より、ユズ果皮粉末の培地への添加は、ウシ皮下脂肪由来細胞の脂肪および骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。今後は、肉用牛へユズ果皮を給餌しその効果を実証する予定である。

C-10

栄養補助食品のクロレラ錠剤に含まれるビタミン B₁₂化合物の特性の解明

○多湖一憲¹, 薮田行哲¹, 竹中重雄², 溝口 亨³, 渡辺文雄¹

(¹鳥取大院・農, ²大阪府大院・生命環境, ³(株)サン・クロレラ)

【目的】栄養補助食品として流通している食用藍藻類のスピルリナやアフアニゾメノンには、ヒトで生理的に不活性なシュードビタミン B₁₂ が多量に含まれているが、緑藻類のクロレラについてはビタミン B₁₂ 含量や含有されているビタミン B₁₂ 化合物を詳細に検討した報告はない。そこで本研究では、クロレラ錠剤に含まれるビタミン B₁₂ 化合物の特性の解明を試みた。

【方法・結果】クロレラ錠剤を KCN 存在下で加熱抽出をした後、バイオオートグラム分析と LC/MS/MS 分析を行った。その結果、クロレラ錠剤に含まれるビタミン B₁₂ はヒトで活性のある真のビタミン B₁₂ であり、シュードビタミン B₁₂ は含まれていなかった。各種クロレラ錠剤のビタミン B₁₂ の含量は 19 種類のうち 8 種類で非常に高いビタミン B₁₂ 含量 (100 µg/100 g) を示したが、4 種類では検出されなかった。また、ビタミン B₁₂ が検出された 15 種類のクロレラ錠剤に含まれる補酵素型ビタミン B₁₂ の含有率を HPLC を用いて検討した結果、ビタミン B₁₂ 含量が高いクロレラ錠剤において 29~52% と高い割合でアデノシル B₁₂ として存在していた。さらに、ビタミン B₁₂ が検出された 15 種類のクロレラ錠剤のうち 4 種類から未同定のビタミン B₁₂ 化合物が検出され、この未同定物質について詳細に分析を行っている。

C-11

ヒト口腔がん細胞 KB に対する高級アルコール類の作用

○森本将行¹, 牛尾一利¹, 小原 周² (¹新居浜高専・生化, ²神戸天然物化学)

【目的】クサイチゴ (*Rubus hirsutus*) の葉中にヒト口腔がん細胞 KB に対して細胞死誘導活性を示す物質が数種類存在し、一つの有効成分がフィトールであることを、以前報告した。また、他の植物についても、細胞死誘導活性成分としてフィトールが単離されており、数種のがん細胞に対して細胞毒性を示すことが報告されている。今回は、他の高級アルコール類の細胞死誘導特性を調べ、比較することにより、フィトールの特性に独自性が有るものかどうかを検討した。【方法】炭素数が 14~18 の直鎖高級アルコール 5 種、オレイルアルコール、そしてファルネソールをフィトールの場合と同様に、DMSO に溶解させ検定試料とした。検定細胞にはヒト口腔がん細胞 KB TKG4010 を用い、MEM 培地で培養を行った。3,000 cells/well に調整した KB を 96 穴プレート中で 24 時間培養後、培地に対し 1% の検定試料を添加した。添加 24, 48, 72 時間後に WST-8 還元発色試薬を加え、A₄₃₀ の測定により細胞毒性の評価を行った。

【結果】飽和高級アルコール類は、炭素数 15,16 を中心に、一定の細胞毒性を示したが、フィトール、ファルネソール、オレイルアルコールはそれらと比べて高い細胞毒性を示した。このうち、ファルネソールは低濃度領域においてもかなり細胞毒性を有していたが、多少濃度を上げても細胞は生き延びた。一方、フィトールは低濃度領域では毒性を示さず、ある濃度以上で著しい細胞毒性を示すことが、今回の比較の中で再確認でき、そのスイッチ的特性が薬剤として優れているものと判明した。また、オレイルアルコールも比較的高い細胞死誘導能と好ましい作用特性を示したが、フィトールには及ばなかった。

C-12

Synthesis of 6-O-decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose and its biological activity on plant growth

○Md. Tazul Islam Chowdhury, Ryo C. Yanagita, and Yasuhiro Kawanami
(Fac. Agri., Kagawa Univ.)

We have already reported the regioselective synthesis of 6-O-decanoyl-D-allose (C-3 epimer of D-glucose) and its biological activity on plant growth. In this study, we investigated the synthetic procedure of 6-O-decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose having a double bond between C-1 and C-2, and evaluated its biological activity on plant growth in order to examine the structure-activity relationship of D-allose esters.

6-O-Decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose was synthesized by 3 step reactions; bromination, reductive elimination, and hydrolysis. The reaction with vinyl decanoate via lipase-catalyzed transterification afforded 6-O-decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose. Then we performed the bioassay using lettuce (*Lactuca sativa*), cress (*Lepidium sativum*), Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*), and rice (*Oryza sativa* L.cv. Nipponbare) seedlings. Comparing with 6-O-decanoyl-D-allose, this compound showed almost similar inhibitory activity on cress, Italian ryegrass, and rice seedlings but lower inhibitory activity on lettuce. These results suggest that α -axial hydroxyl group at C-3 is important for the inhibitory activity. In addition, co-addition of gibberellin, GA₃, with the D-allose derivative on rice seedlings brought the recovery of inhibition.

C-13 ヒドロキシプロリンを酵素で定量する
○渡辺誠也（愛媛大・農）

【目的】L-ヒドロキシプロリン (L-Hyp) は、コラーゲン以外の一般的なタンパク質には含まれないことから、生体試料中のコラーゲン量を定量する指標物質として広く用いられている。また最近では、ヒトの尿や血清中におけるバイオマーカーとしても注目されている。このように L-Hyp 定量の重要性は高いが、HPLC 法による既存の分析法は汎用性が高いとはいえない。酵素の高い基質特異性を利用した定量法は食品分野や臨床検査分野において広く普及しているが、標的化合物に作用するものが無い場合は対応することができない。そこで、L-Hyp を資化できる細菌の代謝酵素を利用してことで、簡便・安価・迅速な酵素学的定量法の開発を試みた。

【方法・結果】細菌の L-Hyp 代謝経路は 4 個の酵素（遺伝子）からなる。最初の酵素である L-HypE は、他のアミノ酸異性化酵素と異なり補因子非依存的に L-Hyp の異性化反応を触媒し、L-プロリンを含む他のいかなるアミノ酸も基質としない。2 番目の酵素である D-HypDH は、他の D-アミノ酸への相対活性が D-ヒドロキシプロリンの 1%以下という高い特異性を示し、人工電子受容体を用いて O₂ 非依存的に活性測定が可能である。そこで、窒素固定細菌 *Azospirillum brasilense* 由来の L-HypE と D-HypDH 遺伝子を単離し、組み換え酵素の大腸菌での発現系を確立した。精製酵素を用いた分光学的測定により、0.004~1 mM の範囲の L-Hyp を HPLC 法と比較して 10%以内の誤差で定量できることが分かった。

【参考文献】*J. Biol. Chem.* 287, 32674-32688; 特願 2012-147934; 特願 2013-95772

D－1 **Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼホスファターゼ(CaMKP/PPM1F)の活性を制御する細胞内タンパク質の探索**
○小野内貴士, 馬場裕美, 亀下 勇, 末吉紀行 (香川大・農)

【目的】 Ca²⁺/CaM 依存性プロテインキナーゼホスファターゼ (CaMKP/PPM1F) は PPM ファミリーに属する Ser/Thr ホスファターゼである。CaMKP の N 末端領域にはグルタミン酸の連なった特徴的なクラスター配列 (poly E 配列) が存在する。これまでの報告で、CaMKP の N 末端領域は poly(Lys) による活性化において重要な役割を果たすことが明らかにされた。しかし、CaMKP の活性化をもたらす poly(Lys) は生体内に存在しておらず、CaMKP の内在性の活性化因子や活性化機構については未だ不明な点が多い。そこで大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いて結合タンパク質を探索した。

【方法・結果】 大腸菌ツーハイブリッドシステムを用いて CaMKP の N 末端と相互作用する因子の特定を試みた結果、protocadherin gamma subfamily C5 (Pcdhg5) を含む様々な因子が同定された。細胞質領域だけのコンストラクトである Pcdhg5(715-944) は GST-pull down によって CaMKP との相互作用が確認された。また、Pcdhg5 が CaMKP を活性化するのかを調べるために、様々な基質を用いて脱リン酸化アッセイを行った。その結果、poly(Lys) と同様にリン酸化 CaMKI のようなタンパク質基質に対してのみ顕著な活性化を示した。また、細胞内でも CaMKP の活性化が見られるかどうかを調べる目的で、Neuro2a 細胞に CaMKP, CaMKI, Pcdhg5(715-944) を共発現させた。リン酸化 CaMKI を基質に脱リン酸化活性を評価した結果、細胞内でも同様に CaMKP の顕著な活性化が示された。これらの結果より、Pcdhg5 は CaMKP の内在性の活性化因子として機能する可能性が強く示唆された。

D－2 **ジャスモン酸メチル誘導気孔閉口におけるタンパク質リン酸化酵素 SRK2E の役割**
○足立優司¹, 銀 叶¹, 宗正晋太郎¹, 中村宜督¹, 森 泉², 村田芳行¹
(¹岡山大院・環境生命, ²岡山大・植物研)

【目的】 植物ホルモンのジャスモン酸メチル (MeJA) は、気孔閉口を誘導し、活性酸素種 (ROS) や一酸化窒素 (NO) の産生を引き起す。また、植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) も、気孔閉口を誘導し、ROS や NO の産生を引き起す。MeJA 誘導気孔閉口への内生の ABA が要求される。また、ABA 受容体により直接制御されるタンパク質脱リン酸化酵素 2C 型 (PP2Cs) の MeJA 誘導気孔閉口への関与が明らかにされている。以上の事から MeJA 信号伝達経路への ABA 信号伝達の初期応答因子の関与が予想されるが、その詳細な機構は未解明である。そこで ABA 信号伝達の初期応答における鍵酵素であり、PP2Cs により直接制御されるタンパク質リン酸化酵素 SRK2E/SnRK2.6/OST1 の MeJA 誘導気孔閉口における役割を調査した。

【方法・結果】 SRK2E 遺伝子の変異体として *srk2e* を使用した。*srk2e* において MeJA 誘導気孔閉口が欠損していた。*srk2e* 孔辺細胞において MeJA による ROS と NO の産生が欠損していた。以上の結果から MeJA 誘導気孔閉口への SRK2E の関与が示された。そこで MeJA により SRK2E の活性化が誘導されるかどうかをインゲルキナーゼアッセイにより調査した。野生株において ABA による SRK2E の活性化が観察されたが、MeJA による活性化は観察されなかった。また *srk2e* において ABA や MeJA による SRK2E の活性化は共に観察されなかった。以上の結果から MeJA 誘導気孔閉口に SRK2E は関与するが、SRK2E の活性化が関与しない事が示唆された。

D－3

DHFR 融合蛋白質を用いた *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験

○山本祐希, 今井綾奈, 秋田 充 (愛媛大・農)

葉緑体蛋白質の大部分は核ゲノムにコードされ、そのうちの大多数の蛋白質は、葉緑体移行シグナルを N 末端に有する前駆体としてサイトゾルで翻訳後、葉緑体を囲む外・内包膜に存在する蛋白質輸送装置（トランスロコン）を利用して葉緑体内に輸送される。単離葉緑体を用いた *in vitro* 蛋白質輸送実験系では、高濃度 ATP (> 1 mM) 存在下、前駆体蛋白質は葉緑体内部に輸送されるが、低 ATP 濃度 (< 0.1 mM) では、トランスロコン内部で輸送が停止し、トランスロコンとともに初期膜透過中間体を形成する。この初期膜透過中間体の解析により、我々はトランスロコンに関する多くの知見をこれまでに得てきた。しかし、葉緑体への蛋白質輸送をさらに理解するためには、初期膜透過中間体形成以降、輸送が完了するまでの前駆体蛋白質とトランスロコンとの係わりを理解することが不可欠である。そこで、輸送条件下においても前駆体蛋白質がトランスロコン内部に滞留した膜透過中間体を人為的に形成するために、立体障害を導入した前駆体蛋白質にトランスロコンを目指まりさせることを考えた。この目的を達成するために、メトトレキサート存在下でフォールディングするジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を C 末端に連結した前駆体蛋白質を利用することとした。本支部会においては、DHFR 融合前駆体蛋白質の獲得とともにこれらの DHFR 融合前駆体蛋白質を用いて行った *in vitro* 葉緑体蛋白質輸送実験の進捗状況について報告する。

D－4

高基質特異性型グルコースデヒドロゲナーゼの基質認識機構

○加納義貴¹, 上原成一朗¹, 岩田英之², 大島敏久³, 櫻庭春彦¹

(¹香川大・農, ²耐熱性酵素研究所(株), ³大阪工大・工)

Archaea に広く分布する Entner-Doudoroff 経路の始発酵素であるグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH) は、NADP(NAD) 依存的に D-グルコースの C1 から水素を引き抜き NADPH(NADH) とグルコノラクトンを生成する。

好熱性 Archaea *Sulfolobus solfataricus* 由来の GDH-1(ssGDH-1) は、D-グルコースや D-ガラクトースのみならず、アルドペントースである D-キシロースに対しても高い反応性を示すことが知られている。また他の Archaea 由来の GDH においても複数種の糖基質に対して反応性を示すことが報告されている。加えて *S.solfataricus* からは、この GDH-1 とは別に D-グルコースのみに反応性を示す GDH-2(ssGDH-2) も見出されている。

ssGDH-1 については、酵素-NADP-基質の 3 者複合体の結晶構造が解析されているが、複数種の糖基質に対応した基質認識機構の詳細は不明である。我々は、好熱性 Archaea *Thermoplasma volcanium* に、グルコースとガラクトースのみに反応性を示す高基質特異性型の GDH(tvGDH) を見出し、その基質認識機構の解明に取り組んだ。その結果、tvGDH と NADP アナログである NAADP、及び D-グルコースから成る 3 者複合体構造の取得に 2.3 Å の分解能で成功した。この三者複合体構造をもとに tvGDH の活性中心部における糖基質の結合様式の詳細を ssGDH-1 と比較した結果、糖基質の C3 ヒドロキシル基に対する相互作用の違いが、tvGDH の高い基質特異性に関与していると推察された。

D-5 *Shinella* sp. NN-6 由来の希少糖生産関連酵素の基質特異性の解明
○千葉和也¹, 野々垣陽介¹, 吉原明秀², 高田悟郎², 森本兼司²
(¹香川大院・農, ²香川大・希少糖セ)

【目的】 *Shinella* sp. NN-6 株は L-ラムニトールから 1-デオキシ-L-フラクトースを生産する菌として発見された。この NN-6 株は他にも複数の希少糖生産酵素を有していると推測されたため、本研究ではそれらの酵素学的諸性質の解明することを目的とした。

【方法・結果】 NN-6 株を様々な培養炭素源を含んだ無機塩液体培地で培養し、培養上清の分析結果から、D-マンノースイソメラーゼ (D-MI) と L-ラムノースイソメラーゼ (L-RhI) の活性が確認された。これらの酵素反応の結果、粗酵素の段階における D-MI の相対活性は D-MI の D-マンノースに対する活性を 100%としたとき、D-リキソース、L-グロースに対してそれぞれ 0.17%, 0.10% であり、D-MI は基質特異性が極めて高いことが分かった。一方で、L-RhI の相対活性は L-ラムノースに対する活性を 100%としたとき、L-マンノース、D-アロースに対してそれぞれ 18.7%, 4.02% であり、希少糖生産に有用である可能性が示唆されたことから本酵素を精製した。

精製された L-RhI は 47 kDa の分子量をもつ四量体であった。諸性質の検討の結果、至適温度は 60°C、至適 pH は 9.0 であった。熱安定性は 60°Cまで安定であり、pH 安定性は 9.0-11.0 の間で安定であった。本酵素は金属イオン依存性であり、1 mM の MnCl₂ の添加で最も高い活性が得られた。精製酵素の基質特異性を検討した結果、L-ラムノースに対する活性を 100%としたとき、L-マンノース、D-アロース、L-リキソース、L-リボースに対する相対活性がそれぞれ 30.5%, 15.7%, 14.0%, 1.7% であった。

D-6 土壤から単離した *Penicillium* sp. が生産する β -グルカナーゼの解析
○澤井和彦, 新名大輔, 渡邊 彰, 麻田恭彦 (香川大・農)

【目的】 本研究では、 β -グルカンの結合型特異的定量法の開発を目指し、*Penicillium* sp. が生産する β -グルカナーゼに関する知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】 本研究には、土壤から単離された *Penicillium* sp. KU-1 を用いた。 β -グルカナーゼ活性はパヌツラン (β -1,6-結合) あるいはラミナリン (主鎖: β -1,3-, 側鎖: β -1,6-結合) を基質として常法に従って測定した。本菌の培養には小麦フスマ固体培地を用い、28°Cで 7 日間培養した。培養後、10mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) を用いて培地抽出液を調製し、これを粗酵素溶液とした。粗酵素溶液はパヌツランとラミナリンをグルコースにまで完全分解することが明らかとなった。また、本菌は基質特異性が異なる複数の β -グルカナーゼを生産することが判明した。その内の β -1,6-グルカナーゼを各種クロマトグラフィーにより均一に精製した (精製倍率約 310 倍、収率約 3.0%)。本酵素は pH 2.0~8.0 で安定であり、3 時間の保温では 40°Cまで安定であることが判明した。本酵素の反応最適 pH は 3.0、反応最適温度は 50°Cであった。SDS-PAGE とゲルろ過クロマトグラフィーにより本酵素は分子量約 50kDa のモノマー酵素であることが明らかとなった。基質特異性を検討したところ本酵素は多糖類のパヌツラン (相対活性 100), ラミナリン (9) と二糖類のゲンチオビオース (7) に特異的に活性を示したことから、本酵素が β -1,6-グルカナーゼであることが確認された。パヌツランを基質として用いた本酵素反応の最終生成物がグルコースであることが TLC 分析により明らかとなった。

D－7 D 体特異的アミド加水分解酵素によるペプチド結合形成反応：基質認識に関わる残基
○太田朱香, 森 信寛, 有馬二朗 (鳥取大・農)

【目的】*Streptomyces* sp.82F2 由来の D 体特異的アミド加水分解酵素 (DAP) は高いアミノリシス活性を有し, DL 配列を持つペプチドを選択的に合成する。本酵素の加水分解活性とアミノリシス活性には, 基質としての水 (加水分解) とアミン類 (アミノリシス) の認識が関与し, その構造要因に興味が持たれる。これまでに, 本酵素と 1,8-ジアミノオクタンとの複合体構造が X 線結晶構造解析により解明され, ペプチド結合形成反応に関わる重要な残基が推測された。本研究では, アミノリシス反応での基質認識に関わると考えられる DAP のアミノ酸残基を Ala に置換し, 構造置換による機能変化について解析した。

【方法・結果】酵素基質複合体の構造情報から, 14 の候補残基 (Ser143, Thr145, Gln151, Phe155, Ser246, Arg250, Ile266, Met321, Ile338, His339, Ser341, Ser342, Asp362, Asp366) をピックアップし, それぞれの Ala 置換変異酵素の諸性質を野生型酵素と比較した。その結果, Thr145, Ile266, Met321, Ile338 を Ala に置換した変異酵素で, D-Phe-pNA に対する pNA 遊離活性の pH プロファイルが, アルカリ側にシフトした。また, D-Phe-OMe 及び L-Phe-OMe を基質として反応させたところ, Ile266, Met321, Ile338 を Ala に置換した変異酵素では, 野生型酵素では見られないアミノリシス反応の生成物, Phe-Phe-Phe-OMe, Phe-Phe-Phe-Phe-OMe が生成された。本実験結果から, Ile266, Met321, Ile338 側鎖はいずれもアシル受容体の認識に寄与し, Ala への置換によって, その認識が変化したと考えられた。

D－8 好冷性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム c のアミノ酸置換による安定性の変化
○政成美沙¹, 若井 晓², 三本木至宏¹
(¹広島大院・生物圏, ²神戸大・自然)

【目的・背景】本研究の目的は, 深海由来シトクロム c の安定化機構をアミノ酸レベルで解明することである。本研究室ではこれまでに, 深海由来の *Shewanella violacea* と浅瀬由来の *Shewanella livingstonensis* の相同シトクロム c (以下それぞれ SV, SL) の熱安定性を比較してきた。その結果, SV は SL に比べて高い熱安定性を示した。また, SV の構造をシミュレーションし, Lys50 がヘムと水素結合を形成することによって SL よりも安定化している可能性を見出した。

【方法】SV および SL の 50 番目のアミノ酸 (SV は Lys, SL は Leu) を入れ替えた変異体 (以下それぞれ SV-K50L, SL-L50K) を作製し, Differential scanning calorimetry を用いて熱安定性を測定した。また, 分光光度計を用いて GdnHCl に対する耐性も測定した。

【結果・考察】SV-K50L は熱安定性と GdnHCl 耐性のどちらも SV 野生体より下がっていた。これは変異導入によって Lys50 とヘムの間の水素結合が切断されたためであると考えられる。一方, SL-L50K は, 熱安定性は SL 野生体とほぼ同じであったが, GdnHCl 耐性は SL 野生体より低かった。SL-L50K の構造をシミュレーションしたところ, 導入した Lys50 と隣に位置する Asn51 の側鎖同士が立体障害を起こしている可能性を見出した。このため, 導入した Lys50 が水素結合を形成できず, 安定化できなかったと考えられる。今後は, SV-K50L および SL-L50K にそれぞれ 51 番目のアミノ酸も相互に入れ替えた二重変異体を作製し, その熱安定性および変性剤耐性を測定する予定である。

D-9 好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来シトクロム c'の構造と熱安定性
○藤井創太郎¹, 政成美沙¹, 河原一樹², 大久保忠恭², 沖 大也², 山中 優³,
若井 晓⁴, 三本木至宏¹
(¹広島大院・生物圏, ²大阪大院・薬, ³奈良先端大・物質, ⁴神戸大・自然)

【目的】シトクロム c'は細菌から見出されるヘム蛋白質である。4本のヘリックスが束になった筒状構造を持ち、その多くは2量体である。一酸化窒素や一酸化炭素に対する結合能があり、ガスセンサー蛋白質としての応用が期待される。応用する上では、安定性が高いほうが望ましい。当研究室では、生育至適温度 52°C の好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* から新規シトクロム c'の精製に成功し、PHCP と名づけた。本研究の目的は、PHCP の熱安定性を調べることである。比較対照として、アミノ酸配列が 55% 一致する生育至適温度 25 °C の常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来シトクロム c' (AVCP) を用いる。

【方法・結果】CD (円偏光二色性) スペクトルによって、シトクロム c' の加熱に伴う二次構造変化から熱安定性を測定した。その結果、PHCP の変性中点温度 (T_m) は 87°C, AVCP は 52°C であった。変性曲線から熱力学的パラメータを算出すると、PHCP の熱変性に伴う ΔH は AVCP よりも大きく、分子内部の相互作用が安定性に寄与する可能性を見出した。また、PHCP の X 線結晶構造解析から 1.9 Å の解像度でモデル構造を決定した。その構造から、Gln39 の側鎖と Ala105 の主鎖間での水素結合や、Gln97 と Gln116 間での水素結合がヘリックス同士を繋げていることが分かった。さらにヘム周辺に位置する Ala20 は、AVCP での Gly20 より疎水性相互作用を強くしていることで安定化に寄与すると考察した。ヘムとの疎水性相互作用に関して、AVCP の変異体 G20A を作製して熱安定性を測定すると、 T_m は野生型より 6°C 上昇した。

D-10 バイオエタノール生産への応用を目的としたサッカロミセス酵母 1200 株の耐熱性の検討
○ 笹井雄貴¹, 泉 可也², 渡辺誠也¹ (¹愛媛大・農, ² (株) bits)

【目的】サッカロミセス酵母に五炭糖キシロースを発酵させるためには、ピキア酵母由来のキシロース代謝遺伝子 (XR と XDH) を発現させる必要がある。本研究では、宿主酵母有用株の探索を行うとともに遺伝子工学的手法によりさらなるキシロース発酵能の向上を試みた。さらに、耐熱性酵母はバイオマスの同時糖化発酵への応用が期待できるため、1200 株の高温発酵の挙動を解析した。

【方法・結果】球磨焼酎製造に用いられる実用酵母サッカロミセス酵母 1200 株に抗生物質オーレオバシジン耐性をマーカーとして染色体組み込みによりキシロース発酵遺伝子を導入し、キシロースを炭素源とする好気的生育能と嫌気的発酵能を獲得した 1200X 株を得た。本株は、他の産業用酵母と比較して同等の高キシロース発酵能を有し、さらに高い耐熱性も備えていた。

【結論及び展望】キシロース発酵酵母育種における 1200 株の有用性が証明された。高い耐熱性は将来的なセルラーゼ酵素との同時糖化発酵に応用可能である。今後は、キシロース輸送遺伝子の導入が嫌気的キシロース発酵に及ぼす効果を検証すると共に、更なる高温発酵能の向上のためキシロース代謝遺伝子の熱安定性向上変異体導入株の作製及び解析を試みる。

D-11 酵母セラミド合成の制御に関する Pkh キナーゼの下流因子の探索
○吉川大地, 津田遼平, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

Pkh1 とその相同分子である Pkh2 は、哺乳動物において様々な AGC キナーゼの活性化に関わる PDK1 の酵母ホモログとして知られている。Pkh1/2 は、アクチン細胞骨格制御などに機能する Pkc1 や、スフィンゴ脂質合成制御に機能する Ypk1/2 などの AGC キナーゼの活性化に必須であることが知られている。当研究室において、Pkh1/2 がスフィンゴ脂質の一つであるセラミドの合成を制御することが明らかとなっており、この制御は今までに知られている Pkh1/2 の機能とは独立していると考えられる。そこで、本研究では、Pkh キナーゼの下流に存在してセラミド合成を制御する因子を探査し、セラミド合成制御メカニズムを明らかにすることを目的としている。

Pkh キナーゼの下流には複数の因子が存在しており、*pkh1^{ts}/2Δ* 株を用いた解析では複合的な表現型を同時に観察することになり、セラミド合成特異的な表現型を解析することは困難である。そこで、我々は、より特異的にセラミド合成異常を示す *PKH2* 変異アレル (*pkh2^{cer}*) を PCR によるランダムな変異導入を利用して、3 変異株を取得した。これらの変異株は、*pkh1^{ts}/2Δ* 株で見られるような温度感受性をほとんど示さず、セラミド合成酵素の制御サブユニットである *LIP1* を抑制した条件でのみ著しい合成致死性を示した。また、これら *pkh^{cer}* 由来の Pkh キナーゼはシーケンス結果から、C 末端部分の欠損又は変異が確認され、それに伴って細胞内局在にも変化が見られた。これより Pkh キナーゼの C 末端部分に局在シグナルが存在し、セラミド合成と密接にかかわっていることが予測された。

D-12 MCC/eisosome における *SLM1* の機能解析
○八重佳織, 津田遼平, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

エイソームは、酵母膜ドメインの一つである MCC に存在する裏打ち構造であり、膜が細胞質側に陥入した溝を形成する安定した構造を持つ。エイソーム構造維持には複数のエイソーム関連タンパク質が関与し、また、そこには複数のアミノ酸トランスポーターが存在し、これらトランスポーターの形質膜でのリテンションに関与すると考えられている。我々は、エイソームタンパク質の一つである Slm1 の過剰発現は高温感受性を示すとともに、MAP キナーゼ Slt2 の恒常的な活性化を引き起こすことを明らかにしている。Slt2 は、エイソームの主要な構成成分である Pil1 をリン酸化することが報告されている。これより Slm1 は cell wall integrity MAPK cascade を介してエイソームの形態および機能に何らかの影響を与えることが考えられた。本研究は、Slm1 がエイソームにおいて担っている機能を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

これまでにエイソーム関連タンパク質として 23 種類のタンパク質が知られており、これらの内、特に Pil1, Nce102, Seg1 の欠損株においてエイソームの構築に異常が報告されている。そこで、我々は、酵母ノックアウトライブラリーからエイソーム関連タンパク質欠損株を選択し、Slm1 過剰発現株においてそれぞれを欠損させた二重変異株を作製し、*SLM1* とエイソーム関連遺伝子との遺伝的相互作用を解析した。その結果、これまでに *pil1Δ*, *sur7Δ*, *nce102Δ* 株において Slm1 過剰発現単独で見られる温度感受性よりも強い温度感受性が確認された。

D-13 Slm1 は Cell Wall Integrity MAPK Cascade を介して高温ストレスに依存的した
Plasma Membrane Quality Control を制御する
○津田遼平, 八重佳織, 田中直孝, 田淵光昭 (香川大・農)

高温ストレス時に変性した有害な膜タンパク質はユビキチン化を介したエンドサイトーシスにより速やかに分解される。この分解経路は Plasma Membrane Quality Control (PMQC) という概念として提唱されている。しかし、酵母が如何にして高温ストレスを検知し、PMQC を起動しているかについてはほとんど理解されていない。本研究で我々は Slm という Tor 複合体 2 の下流因子が Rho-Pkc1 MAPK cascade を介して MCC/eisosome という形質膜直下のマイクロドメインを制御することで MCC/eisosome に局在する膜タンパク質のエンドサイトーシスを促進し、最終的に PMQC を制御することを見出した。

我々は Slm1 過剰発現による高温感受性の原因を調べる過程で Rho Pkc1 MAPK cascade の MAPK である Slt2 が恒常的に活性化されることを見出した。この Slt2 は Slm1 が局在化する MCC/eisosome の主要な構成タンパクである Pil1 をリン酸化すること、また網羅的な解析により、Slt2 と Pil1 は相互作用することが報告されている。従って、Slm1 過剰発現株における Slt2 の標的因子として Pil1 が考えられた。

アルギニン輸送体 Can1 は通常 MCC/eisosome に局在化しており、高温ストレスに依存して速やかにエンドサイトーシスされ、液胞で分解される。興味深いことに Slm1 過剰発現株では Can1 のエンドサイトーシスに異常が見られ、この表現型はさらに Pil1, Slt2 を欠損させると悪化した。以上の結果から Slm1 は Rho Pkc1 MAPK cascade の活性化を介して、高温ストレス下で変性した MCC/eisosome 膜タンパク質のエンドサイトーシスを制御することによって PMQC を制御することが示唆された。

贊助企業

- ・天野エンザイム(株) 岐阜研究所
 - ・アルファー食品(株)
 - ・アルファバイオ(株)
 - ・(株)井ヶタ竹内
 - ・池田糖化工業(株)
 - ・(株)猪原商会 山口営業所
 - ・(株)大熊
 - ・大塚アグリテクノ(株)
 - ・大塚器械(株) 西条支店
 - ・岡山県酒造組合
 - ・社団法人岡山県農業開発研究所
 - ・オハヨー乳業(株)
 - ・(株)海産物のきむらや
 - ・片山化学工業(株) 岡山営業所
 - ・カバヤ食品(株)
 - ・機能性食品開発研究所
 - ・杏林予防学研究所
 - ・協和発酵バイオ(株)
　　山口事業所生産技術研究所
 - ・キリンビール(株) 岡山工場
 - ・近畿日本ツーリスト中国四国岡山支店
 - ・久保田商事(株) 広島営業所
 - ・高知酒造(株)
 - ・寿製菓(株)
 - ・(株)サンキ精機
 - ・三栄源エフエフアイ(株)
 - ・(株)四国総合研究所
 - ・四国乳業(株)
 - ・(株)シマヤ
 - ・新青山(株)
 - ・神協産業(株)
 - ・(株)酔心山根本店
 - ・諒訪酒造(株)
 - ・正晃(株) 山口営業所
 - ・仙味エキス(株)
 - ・(株)ソフィイ
 - ・(株)大愛
 - ・大興産業(株)
 - ・大山乳業農業協同組合
 - ・大山ハム(株)
 - ・大洋香料(株)
 - ・高塚ライフサイエンス(株)
 - ・(有)タグチ
 - ・中国ケミ一(株)
 - ・帝國製薬(株)
 - ・鳥取科学器械(株)
 - ・(有)友田大洋堂
 - ・日本オリーブ(株)
 - ・(株)日本総合科学
 - ・白牡丹酒造(株)
 - ・(株)林原
 - ・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)
 - ・三島食品(株)
 - ・(株)宮田薬品
 - ・(株)無手無冠
 - ・盛田(株)小豆島工場 技術研究所
 - ・ヤスハラケミカル(株)
 - ・ヤマキ(株)
 - ・(株)やまだ屋
 - ・山本薬品(株)
 - ・(有)藍布屋
 - ・ルナ物産(株)
 - ・湧水製薬(株) 中央研究所
- (五十音順)

日本農芸化学会中四国支部第38回講演会

主 催：日本農芸化学会中四国支部

世話人：合谷 祥一

連絡先：香川大学農学部

T E L : 087-891-3103

E-mail : gohtani@ag.kagawa-u.ac.jp

支部からのお知らせ

1. 第39回講演会（支部例会）

開催日：2014年5月31日（土）

場 所：福山大学

講演申込締切：2014年5月2日（金）

講演要旨締切：2014年5月9日（金）

内 容：特別講演，一般講演

世話人：岩本博行（福山大学生命工学部）

2. 第40回講演会（支部大会）

開催日：2014年9月26日（金）～27日（土）

場 所：徳島大学常三島キャンパス

内 容：シンポジウム，受賞講演，一般講演

世話人：大政健史（徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部）

3. 第41回講演会（支部例会）

開催日：2015年1月24日（土）

場 所：水産大学校

内 容：受賞講演，一般講演

世話人：原田和樹（水産大学校）

4. 第24回市民フォーラム

開催日：2014年11月8日（土）

場 所：愛媛大学

内 容：招待講演

世話人：菅原卓也（愛媛大学農学部）

5. 第17回若手研究者シンポジウム

開催日：2014年5月16日（金）～17日（土）

場 所：岡山大学

内 容：招待講演

世話人：泉 実・荒川健祐・宗正晋太郎（岡山大学大学院環境生命科学研究科）

6. 第18回若手研究者シンポジウム

開催日：2014年9月20日（土）

場 所：愛媛大学農学部

内 容：招待講演

世話人：渡辺誠也（愛媛大学農学部）

日本農芸化学会中四国支部事務局

〒700-8530 岡山市北区津島中1-1-1

岡山大学大学院環境生命科学研究科

農生命科学専攻生物機能化学講座内

支部ホームページ：<http://jsbba-cs.jp>

E-mail : nouka_chushi@okayama-u.ac.jp