

シンポジウム

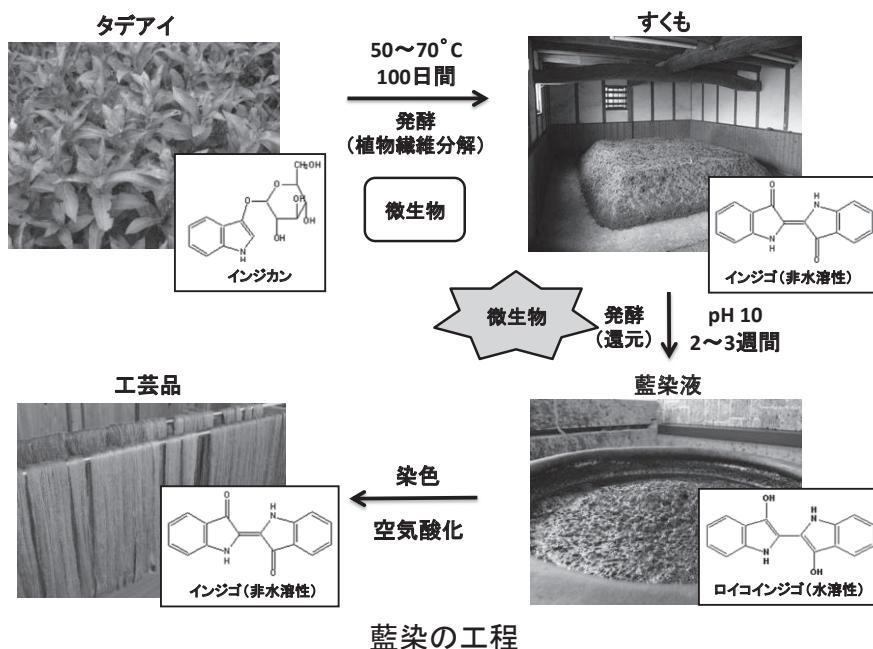
講演要旨

藍をはぐくむ微生物の力

櫻谷英治（徳島大・生物資源）

徳島県の伝統工芸である藍染はタデ科植物の葉に含まれる色素を染料とした染物である。日本において江戸時代には多くの藍染が行われ、かつては阿波藩における生産が盛んであり、現在でも徳島県の藍染は全国的に有名である。藍染液の製造過程は、「すくも作り」と「染液作り」の二段階に大別され、いずれも微生物による発酵が関与する（下図）。すくも作りでは、乾燥させたタデアイの葉を50°C以上の高温で約100日間発酵させることで、セルロースなどの植物成分が分解され、青色色素であるインジゴが合成される。染液作りでは、すくもに水や灰、酒などを加え、pH 10以上の高アルカリ条件において2~3週間発酵させることで、非水溶性のインジゴが水溶性のロイコインジゴへと還元され、染液が完成する。これまでに、インジゴ還元能を有する微生物の報告例はあるが、微生物群がどのように藍染工程に関わっているかについては不明な点が多い。我々は染液製造工程の短縮化及び簡便化を目指し、本講演ではまず藍染液から単離した微生物群の機能について紹介する。

藍染液作りに関与する微生物について、発酵中の藍染液などから高アルカリ条件下で生育可能な微生物の単離を行った。これらの菌株についてインジゴ還元評価を行ったところ、いくつかの菌株が高いインジゴ還元能を示した。それらを簡易同定した結果、*Enterococcus* 属、*Alkalibacterium* 属、*Chryseomicrobium* 属の細菌であることが示唆された。次に、インジゴ還元反応液における培地組成を検討したところ、グルコース濃度の増加に伴ってインジゴ還元力が増加した。また、選抜株において湿菌体だけでなく、風乾菌体及び凍結乾燥菌体を用いても同等のインジゴ還元能を示すことがわかった。さらに、インジゴを還元するための電子伝達にメディエーターが関わっていると仮定し、数種のメディエーターの効果を確認したところ、アントラキノンを用いた場合にインジゴ還元力が約1.5倍向上した。本発表では、単離された微生物の機能だけでなく、すくもを用いて独自に発酵建てを行うことで得られた藍染液の状態観察やその中に含まれる有機酸分析結果についても紹介したい。



おいしさとテクスチャー

合谷祥一（香川大・農）

テクスチャーは本来は食品に対する用語では無く、生地、織り方、組織、肌理（きめ）などを表す用語であるが、1930年代頃からチーズ、ジャガイモ粉末、食肉などの固形状食品のもろさ、硬さなどの食感即ち力学的特性及び粒状などと関連づけられてきていた¹⁾。そのような中で、Szczesniak は食品におけるテクスチャーを特性によってクラス分けした²⁾。これは、現在も食品のテクスチャープロファイルとして、食品の分析によく用いられている。

食品のおいしさとテクスチャーの関連に対する有名な研究として、松本らの研究³⁾が挙げられる。松本らは調理師 32 名と調理学担当の教師 50 名に対し、16 種類の料理のおいしさに貢献する食品の特性（甘味、酸味、旨味などの味、香り、色や形などの外観、硬軟、滑らかさ等の力学的特性、そして温度）についてアンケート形式の調査を実施した。前述の特性のうち、味と香りを化学的味、視覚特性である外観と力学的特性を物理的味として、各料理に対する貢献度を算出した。その結果、卵豆腐、煮豆、練りようかん、ニンジンのグラッセ及び白飯などの固体状食品のおいしさに対する物理的味の貢献度は、それぞれ 72.7, 67.4, 62.7, 62.1 及び 62.0% であった。一方、オレンジジュース及び清酒の液体状食品のおいしさに対する物理的味の貢献度は、それぞれ 18.3 及び 10.7% であった。即ち、固体状食品のおいしさには物理的味、いわゆる広義のテクスチャー（視覚特性と力学的特性を含める）が大きな影響を及ぼす。

このように固体状食品のおいしさにはテクスチャーの影響が大きい。広義のテクスチャーは力学的特性と視覚特性を含めるが、一般に食品のテクスチャーというと力学的特性を表すことが多い。即ち、狭義のテクスチャーは力学的特性と言うことになる。この食品の力学的特性には、食品の構造が大きく影響する。

さぬきうどんのコシは有名であるが、茹で直後はコシを有してるうどんも茹でてからの時間が経過すると、コシが無くなる、即ち茹で延びすることは一般によくしられている。三木⁴⁾によると、茹で直後のうどんは茹で延びしたうどんよりも歪率 60%付近までは応力が小さくそれ以上は高くなる。即ち、コシのあるうどんは噛み始めは柔らかく、かみ切るには強い力を必要とする。一方茹で延びしてコシの無いうどんは、表面付近は茹で直後よりむしろ硬くなり中心付近は柔らかい。木村⁵⁾ や三木⁴⁾によると、茹でうどんの表面付近はデンプンが完全に糊化しているが中心部分ではデンプンが残存しており、これが、表面が柔らかく中心付近が硬い食感の原因と考えられる。一方茹で延びでは、表面が硬くなり中心部分の硬さが低下するが、これには表面付近の糊化したデンプンの老化や表面から中心部への水分移動が考えられる。しかし、表面付近のデンプンの老化は X 線散乱で観察されず⁶⁾ 主に水分移動によると考えられる。

ヨーグルトのような油滴含有ゲルの力学特性は、油滴とゲルを形成するネットワークの相互作用の影響を大きく受ける⁷⁾。講演では、これらについても紹介する。

1) 合谷祥一, おいしさの科学とビジネス展開の最前線 (都甲 潔, 柏柳 誠 編著), pp.53-65(2017), シーエムシー出版, 東京。

2) Szczesniak S. Alina, J. Food Sci., 28, 385-389(1963).

3) 松本仲子, 松元文子, 調理科学, 10, 97-101(1977).

4) 三木英三, 進化する食品テクスチャー研究 (山野善正 監修), pp.277-288, NTS(2011).

5) 木村利昭ら, 農化, 70, 1343-1350(1996).

6) 廣澤秀和ら, 農化中四国支部第 36 回講演会講演要旨集, 33(2013).

7) Gohtani Shoichi, et al., Food Colloids, Biopolymers and Materials, ed. By Dickinson E. and van Vliet T., pp.100-108, The Royal Society of Chemistry(2003).

シンポジウム講演

酵素を使った好ましい味の作り方

鈴木秀之*（京工織大・応用生物学系）

食品の味は基本味といわれる五味、すなわち、甘味、酸味、塩味、苦味、うま味からなる。うま味は、西洋で広く認知されていたそれ以外の四基本味では説明できないことから日本発の基本味となつたが、その定着には長い時間がかかった。しかし、少なくとも食品科学の研究者の間では“umami”として世界中で通用するようになつた。一方、日本人は“コク味”あるいは“コク”という言葉を使うが、その用法にはかなりの個人差がある。ラーメンのコクとビールのコクは明らかに異質なものであるが、私達はおなじ“コク”という言葉で「コクがある」とか「コクがない」とかいうのである。上田らは「コク味物質とは、それ自身は弱い香りと甘味を持っており、それを少量添加することにより、例えば、持続性、口の中での広がり、厚みといった料理の風味を増強するもの」と定義し、¹⁾ 食品科学の研究者の間ではこの定義がおおむね受け入れられている。上田らのこの論文中でも、グルタチオン（ γ -グルタミルシステイニルグリシン）がコク味をもたらすことを述べているが、ドイツの Hofmann のグループが 2007 年以降、立て続けに γ -グルタミル化合物がコク味物質であるという報告²⁾を出して以降、世界の食品科学の研究者の間では“kokumi”が注目されるようになっている。

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) は γ -グルタミル化合物の合成反応と加水分解反応を触媒する生物界に広く存在する酵素である。演者は細菌の GGT の基礎から応用まで幅広く研究してきた。その過程で、苦味アミノ酸を γ -グルタミル化するとその苦味が劇的に低減することを見出しており、³⁾ コク味調味料の製造法の開発など、GGT を用いた食品の呈味性改変について研究を行ってきた。⁴⁾ 今回の講演では、演者のこれまでの研究を中心に GGT の食品への応用について紹介したい。

- 1) Y. Ueda *et al.* Characteristic flavor constituents in water extract of garlic. **Agric. Biol. Chem.** 54:163–169 (1990).
- 2) Dunkel *et al.* Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **J. Agric. Food Chem.** 55:6712–6719 (2007).
- 3) H. Suzuki *et al.* Improvement of the bitter taste of amino acids through the transpeptidation reaction of bacterial γ -glutamyltranspeptidase. **J. Agric. Food Chem.** 50:313–318 (2002).
- 4) H. Suzuki *et al.* New method to produce kokumi seasoning from protein hydrolysates using bacterial enzymes. **J. Agric. Food Chem.** 65:10514–10519 (2017).

* E-mail: hideyuki@kit.ac.jp

特別講演

講演要旨

特別講演

芳香資源としての柑橘類 —その特性と利用—

沢村正義（高知大・土佐 FBC）

カンキツ属 (*Citrus*) は、2000～3000 万年前に、インド・アッサム地域で発生したといわれている。長い時間をかけてゆっくりと東に西に移動し、各地で多くの品種を生み出してきた。今日、北半球から南半球の温帶～熱帯地域にかけて一万種類以上のカンキツが生育・栽培されている。FAOSTAT (2016)によれば、世界の四大果実（カンキツ、バナナ、リンゴ、ブドウ）のうち、カンキツの生産量は約 1.46 億トンであり、1985 年以降第 1 位である。言い換えれば、カンキツ類は世界の人々にもっとも食され、好まれている果実といえよう。また、天然香料市場においても、カンキツ系が香料全体の約 65% を占めている。香料は食品、香粧品、香水、洗剤、芳香剤、アロマ環境などの幅広い分野で利用されていることから、私たちはカンキツ系のフレーバー、フレグランスに日常的に無意識的に接していることになる。このようなことから、カンキツ系の香りは万人に好まれ、受け入れられやすい香りであることが大きな特徴の一つといえよう。今回、カンキツ類、とりわけ、四国三県（高知、徳島、愛媛）で全国生産量の四分の三以上を占めるユズ (*Citrus junos*) を中心に、その特性と利用について身近な事例で紹介する。

果実類の中でもカンキツ類は、芳香の源となる精油が果皮のみに集積しており、かつ精油量も 0.1～2% と他の果実に比べてはるかに多い。カンキツの場合、外果皮をフラベド、その内側の白い部分をアルベドとよんでいる。フラベド表面には無数の小粒の油胞がみられ、この中に精油が蓄積されている。搾汁後のカンキツ果皮残渣にはまだ多くの精油が残存している。精油の用途は広く、また資源の有効利用の点からも残渣からの精油回収は重要である。私たちは、より効率的な超音波印加型ならびにマイクロ波照射型減圧水蒸気蒸留法を開発し、現在実用化されている¹⁾。

カンキツの香りは前述のように、好ましい香りとして、食品・香粧品分野などで広く利用されている。カンキツの精油・香りについて、免疫賦活作用、抗菌作用、抗肥満作用、自律神経系への作用、ホルモンバランス調節、抗酸化作用、がん細胞の増殖抑制、発がん性物質の生成抑制作用など様々な機能性に関する研究報告がされてきた。一方、わが国のアロマ環境分野は 1985 年頃から着実に発展し、補完代替療法としても取り入れられてきている。本講演では、ユズ精油の入院患者に対するリラックス効果²⁾、「ゆず湯」の効果³⁾について研究事例を紹介する。

カンキツ類は生食や加工の過程で約 46% が残滓として廃棄されている。芳香資源としてのカンキツ類は果実、果汁、果皮は可能な限り有効利用されてきたが、種子だけは利用されていないのが現状である。私たちは、ユズ種子からシードオイルを抽出し、化粧品原料やアロマテラピーにおけるキャリアオイルとしての利用の道を拓いてきた。最近、ユズシードオイルに保湿効果、美白効果が見出された⁴⁾。資源を 100% 活用することは、芳香資源としての価値をさらに高めることにもなる。最近は海外でも“YUZU”として知られるようになり、ユズの精油とともに和のアロマ基材として発展がさらに期待される。

日本各地には数多くの種類の香酸カンキツがあり、それぞれ独特のフレーバーを持ち古くから日本人の食習慣に馴染まってきた。多くの種類の香酸カンキツが賞用されてきたことは、レモンやライム一辺倒ともいえる諸外国と比較した場合、日本の食文化の多様性あるいは日本人の細やかな味覚センスの表れの一つともいえるのではないだろうか。

1) 沢村、柏木、田邊、におい・かおり環境学会誌, **43**, 102-111 (2012). 2) 沢村他、アロマテラピー学雑誌, **9**, 55-65 (2009). 3) 前田, *Aroma Research*, **12**, 317-320 (2011). 4) 吉金他、アロマテラピー学雑誌, **15**, 54-62 (2015).

— 講演一般 —

講演要旨

A-1

蛍光誘導体を用いたアスコルビン酸のライブセルイメージング

○青田湧介, 加来田博貴¹, 田井章博 (県広大・生命環境, ¹岡山大院・医歯薬)

【目的】アスコルビン酸(AA)は多様な生理作用を有するが、その作用メカニズムの多くは未解明な点が多い。AA の作用点ならびに細胞内分布を解析するツールとして AA の還元作用を利用した蛍光イメージングが行われている。しかし、既知の方法は AA により還元されて蛍光強度が強くなった分子を観察する間接的な手法のため、還元型 AA の経時的な観察が困難である。本研究では、AA に蛍光分子を導入した AA 蛍光誘導体による直接的かつ経時的な AA の生細胞内イメージングを行うことを目的とした。

【方法・結果】AA の 2 位または 6 位に蛍光分子(NBD 基, Dansyl 基)を導入した安定型蛍光誘導体を合成した。これらを用いて、それぞれの蛍光誘導体の細胞内取り込み量を測定し、取り込み量が比較的多い蛍光誘導体に対しては AA との共添加による取り込み競合阻害試験を行った。その結果、6 位 NBD 誘導体(6N)は細胞内に多く取り込まれており、また AA との共添加によって取り込み量が減少したため、6N は AA と同じトランスポーターによって取り込まれていることが認められた。次に、6N の生細胞内イメージングを行ったところ、細胞内局在が見られた。また、AA 及び AA の 5 位立体異性体であり AA よりも取り込み量が劣るエリソルビン酸(EA)をあらかじめ細胞内に分布させることで、6N の局在がどのように変化するか検討した。その結果、AA の前処理では 6N の局在化が低下したが、EA の前処理では 6N の局在化がほぼ変化しなかった。この結果より、6N は AA の分布を反映していることが示唆された。現在、6N が細胞内小器官に局在しているか、また 6N の経時的なイメージングについて検討中である。

A-2

3-ドデシルアスコルビン酸の脱顆粒抑制作用発現に関する標的タンパク質の探索

○竹元 聰, 伊東秀之¹, 田井章博 (県広大・生命環境, ¹岡山県大・保健福祉)

【目的】これまでにアスコルビン酸の安定化や脂溶化を図った誘導体の開発が行われている。その一つにアスコルビン酸の 3 位にアルキル鎖を導入した 3-アルキルアスコルビン酸がある。我々は RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒抑制作用評価において、炭素数 12 の 3-ドデシルアスコルビン酸(3-DodecylAA)に強い脱顆粒抑制作用を見出している。そこで、本研究では、3-DodecylAA の作用発現メカニズムを解明するために、3-DodecylAA 誘導体を固定化した磁性ビーズを作製し、RBL-2H3 細胞抽出タンパク質から 3-DodecylAA 標的タンパク質の探索を行うことを目的とした。

【方法・結果】3-DodecylAA のエンジオールラクトン構造及びアルキル鎖を標的タンパク質に認識させるために、3-DodecylAA の 6 位からの固定化が適当であると考えた。磁性ビーズへの固定化には分子内に一級アミノ基が必要である。そのため、3-DodecylAA の 6 位水酸基を一級アミノ基に変換した 6-Amino-3-dodecylAA を合成した後、磁性ビーズに固定化した(3-DodecylAA ビーズ)。また、コントロールとしてエタノールアミンを固定化した磁性ビーズ(コントロールビーズ)を作製した。標的タンパク質の探索は SDS-PAGE により解析し、3-DodecylAA ビーズに吸着したバンドの中で、コントロールビーズに吸着していないバンドに対して 3-DodecylAA 構造に特異的な吸着であるかを競合阻害により検討した。その結果、3-DodecylAA ビーズに特異的に吸着したバンドを数個見出すことができた。今後は標的タンパク質を同定し、3-DodecylAA の脱顆粒抑制作用発現メカニズムを明らかにしていきたい。

A-3

ゴマ培養根におけるアントラセサモン類間での生合成経路の差異 佐藤龍太, ○古本敏夫 (香川大・農)

【目的】アントラセサモン類は、ゴマ (*Sesamum indicum L.*) によって生産されている二次代謝産物であり、共通の炭素骨格として C₆側鎖が結合したアントラキノン環を有しているアントラキノン系化合物である。アントラセサモン類の生合成経路については、これまで共通の生合成中間体として MPAQ (メチルペンテニル側鎖を持つアントラキノン) や GNHQ (ゲラニル側鎖を持つナフトヒドロキノン) が関与していると考えられてきた。今回、重水素標識した MPAQ と GNHQ のゴマ培養根への投与実験の結果、およびその結果から推測されたアントラセサモン類の生合成経路について報告する。

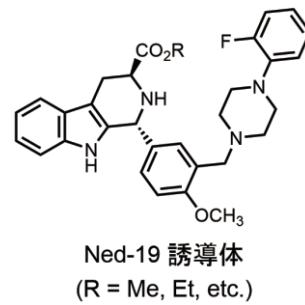
【方法・結果】化学合成した[²H₅]GNHQ と[²H₄]MPAQ をゴマ培養根に投与したところ、GNHQ はその閉環体である MPAQ に変換されること、および MPAQ はその側鎖脱水素体である(Z)-MPDEAQ に変換されることが明らかとなった。一方、MPAQ のジヒドロキシアントラキノン体であるアントラセサモン B とそのエポキシ体への変換は認められなかった。[²H₄]MPAQ の投与量や培養条件を変更した再実験においても、アントラセサモン B とそのエポキシ体には変換されず、さらにアントラセサモン B の側鎖脱水素体である(Z)-デヒドロアントラセサモン B への変換も認められなかった。以上の結果より、(Z)-MPDEAQ は予想通り GNHQ と MPAQ を経て生合成されているが、アントラセサモン B などのようなアントラキノン環に酸素官能基を持つアントラセサモン類は、GNHQ や MPAQ の生成より上流段階で分岐した代謝経路を経て生合成されている可能性が示唆された。

A-4

NAADP アンタゴニスト Ned-19 が有する植物生長阻害活性 ○小出祐実, 小岩美月, 清田洋正, 泉 実 (岡山大院・環境生命)

【背景・目的】リソゾームからの Ca²⁺ イオン放出を誘導するセカンドメッセンジャーとして、NAADP (nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) が発見された。我々はヴァーチャルスクリーニングを有効活用することにより、NAADP 受容体のアンタゴニストとして Ned-19 を見出した[1]。近年、様々なグループにより Ned-19 を用いた研究が行われ、エボラウイルスの感染防止に効果があること[2]などが報告されている。そこで我々も、合成した Ned-19 誘導体を用いて種々の生物活性評価を行ったところ、Ned-19 誘導体が植物の発芽を阻害することを見出した。本研究ではさらに詳細な検討を行った。

【方法・結果】ハツカダイコン、ロメインレタス、葉ネギの種子を Ned-19 誘導体を塗布したシャーレに播種する発芽試験を行った。その結果、Ned-19 誘導体が葉ネギに対して発芽阻害活性を有することが示唆された。一方でハツカダイコン及びロメインレタスに対する発芽阻害は見られなかったが、根の成長に異常が見受けられた。そこで、Ned-19 誘導体を塗布した海砂を入れた円筒形ガラス容器に種子を播種して 7 日間培養した後に、地上部と地下部の長さを測定する生長試験を試みた。その結果、Ned-19 誘導体が植物に対して生長阻害活性を有することが明らかになった。



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

A-5 オリーブ葉二次代謝産物 oleuropein aglycon のエピマーとその微生物還元生成物の構造解析

○栗原小蒔, 古賀まり子, 長谷井拓真¹, 菊地敬一¹, 徐 恵美¹, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命, ¹日本オリーブ(株))

【目的】我々はこれまでにオリーブ葉抽出物のパン酵母処理により oleuropein aglycon (**1**)のアルデヒド基が還元され reduced oleuropein aglycon (**2**) が生成すること、また抽出物中では **1** は主に(5S,8R,9S)体の **1a** として存在し、その還元生成物である **2a** も同じ立体配置であることを見出した。一方で、**1a** には立体異性体の存在が報告されており、当研究室でも HPLC 分析において基質溶液では **1a**、反応液では **2a** のピーク付近に類似の UV 吸収スペクトルを持つ化合物(それぞれ **1b**, **2b**)が検出された。そこで、これらの化合物の構造解析を行った。【方法・結果】分取 ODS-HPLC を用いて、オリーブ葉抽出物から **1b** を主に含む画分を得た。**1b** を **1a** の立体異性体であると推測し、¹H-NMR データを論文データと比較したところ、化学シフト値及び結合定数が **1** の(5S,8S,9S)体の文献値と一致した。また全ての ¹H シグナルを矛盾無く帰属できたことから、**1b** は **1** の(5S,8S,9S)体、即ち **1a** の 8 位のエピマーであると示された。次に **1b** を含む抽出物の変換反応で生成した **2b** を単離し、全ての ¹H シグナルを **1b** の還元生成物の構造に帰属することができた。NOE 相関から、H-6 と H-8 がセコイリド構造の環平面に対して同じ側に、H-1, H-5, H-10 がその反対側に位置すると考えられ、**2b** は **1b** と同じ立体配置を有することが示唆された。また、**1b** 及び **2b** の不斉中心付近のプロトンの結合定数の値が類似の傾向を示したことからも、これらが同じ立体配置を有することが支持された。更に、異なる比率で **1a** と **1b** を含む複数の抽出物を変換反応に供したところ、同じ比率で **2a** と **2b** が生成し、立体を保持して変換することが示された。

A-6 マウス腸内細菌叢による C-配糖体 mangiferin からそのアグリコン norathyriol への変換

○三木香澄, 川上秀昭¹, 西谷洋輔¹, 桑原浩誠¹, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命, ¹丸善製薬(株))

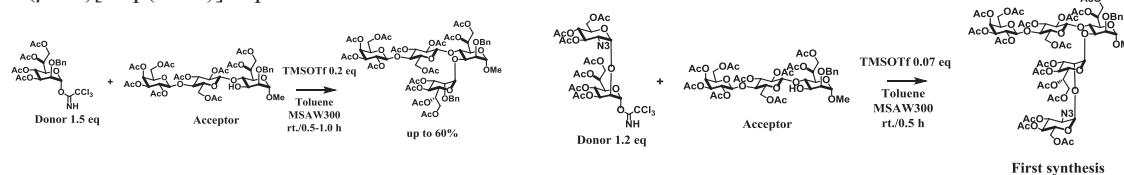
【目的】Mangiferin は植物に豊富に含まれる C-配糖体であり、そのアグリコン norathyriol は mangiferin とは異なり血糖降下作用などの生理活性を持つことから、mangiferin からの norathyriol の生産が望まれる。一方で C-グリコシド結合は O-グリコシド結合と比べ分解されにくく、この変換活性を有する細菌の報告は少ない。そこで、我々はヒト腸内細菌叢に確かに本活性が存在することを確認し、その細菌叢を利用する効率的な変換条件の検討を行った¹⁾。本研究では活性の有無が未だ報告されていないマウス腸内細菌叢を用いて mangiferin 変換反応を行い、その結果活性が認められたため、その反応の詳細検討を行った。

【方法・結果】ヒト、マウスのそれぞれ異なる個体から採取した糞便から腸内細菌懸濁液を直接調製し、mangiferin 変換反応を行ったところ、ヒト糞便では従来通り個体差はあるものの全ての試料で活性が認められたが、マウス糞便では今回調製した試料に活性は認められなかった。しかし、それぞれの糞便由来腸内細菌叢を嫌気条件下で液体培養すると、ヒトに加えマウス糞便由来の試料にも活性を示すものがあり、マウス腸内細菌叢も活性を有することが分かった。続いてマウス腸内細菌叢の希釈平板培養を行ったところ、単独コロニーを得られる希釈率で生育した菌体は活性を示さなかったが、それを液体培養すると活性が認められた。そこで希釈平板培養と液体培養を繰り返して変換活性株を濃縮し、コロニーを形成し活性を示す菌体が生育した培地から菌株の単離を行った結果、休止菌体反応で活性を示す単離株を得た。1) 角南・仁戸田・神崎ら, Active Enzyme Molecule 2014 (富山) 酵素工学研究会第 72 回講演会

A-7

ナイセリア属 LOS の中性コア 4 糖および 5 糖の合成研究
○大谷直輝, 一柳 剛 (鳥取大院・農)

【目的】グラム陰性細菌が細胞外膜に產生する複合糖脂質 (LPS/LOS) は, O 抗原多糖, コア糖鎖および Lipid A からなる。このうちコア糖鎖には, 7 炭糖の L-glycero-D-manno-heptose (Hep) が存在する。その中でもとりわけ Hep の 3,4 位で分岐した糖鎖構造が多くの属に保存されている。このような分岐構造を合成する場合, Hep の 3,4 位の水酸基が *trans*-equatorial 配向であるため, 立体的要因から合成が困難であると考えられる。Oscarson らはグリコシル化反応において Hep 受容体のピラノース環の配座反転 (${}^4\text{C}_1 \rightarrow {}^1\text{C}_4$) を行うことで問題解決が可能であること報告しているが, 合成工程数が増えることが問題となっている。今回, 我々は受容体 Hep の立体配座を ${}^4\text{C}_1$ 型から変換することなく, 3,4 分岐 Hep 含有糖鎖 「Lac(β1-4)[Hep(α1-3)]Hep」 を合成することを試みた。

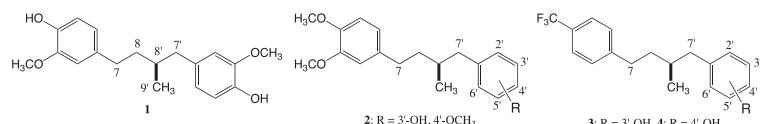


【方法・結果】条件検討の結果, トルエンがグリコシル化反応の溶媒として重要であること見いだした。さらにこの反応をブロック縮合反応に展開し, Neisseria 属 LOS の分岐コア 5 糖 「Lac(β1-4)[GlcNAc(α1-3) Hep(α1-3)]Hep」 の最初の合成を達成した。

A-8

ブタン型リグナンの 9 位を欠くノルリグナンのベンゼン環上の置換基がガン細胞, 昆虫細胞に与える影響
○卯津羅萌音, 庄司有璃子, 西本明日香, 西脇 寿, 西 甲介, 菅原卓也, 山内 聰 (愛媛大院・農)

【目的】過去の研究で(S)-体のノルリグナン **1** に HL-60 および HeLa 細胞に対して $\text{IC}_{50} = 6 \mu\text{M}$ の細胞毒性活性を確認した。(R)-体の活性は約 3 倍低かった。また, ヨトウの細胞である Sf9 に対しては $\text{IC}_{50} = 12 \mu\text{M}$ であり, (R)-体よりも 2 倍活性が高かった (Bioorg. Med. Chem. Lett., **26**, 3019-3023, 2016)。そこで, 立体構造を(S)-体に固定してベンゼン環上の置換基を変換した誘導体を合成し, 細胞毒性活性を比較した。

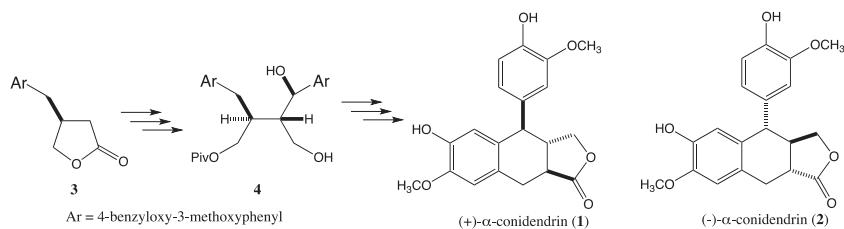


【方法・結果】まず, 7'位を 4-hydroxy-3-methoxyphenyl 基に固定して 7 位のベンゼン環上に様々な置換基を有する誘導体を合成し細胞毒性を比較したところ, HeLa 細胞に対しては 7-(3,4-dimethoxyphenyl)体が ($\text{IC}_{50} = 4.0 \mu\text{M}$), HL-60 細胞の対しては 7-(4-trifluoromethylphenyl)体が ($\text{IC}_{50} = 1.8 \mu\text{M}$)最も高い活性を示した。Sf9 細胞に対しては $\text{IC}_{50} = 15-30 \mu\text{M}$ で誘導体間の大きな差は認められなかった。そこで 7 位をそれぞれの細胞に対して最も効果の高かった phenyl 基に固定して HeLa 細胞, HL-60 細胞に対する活性を調べたところ, **2** が $\text{IC}_{50} = 0.9 \mu\text{M}$ の活性を示し, **3** と **4** が $\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$ の活性を示した。Sf9 細胞に対しては 7-(4-trifluoromethylphenyl)体で誘導体間での差が大きく $\text{IC}_{50} = 5-100 \mu\text{M}$ だった。そのうち最も活性が高かった **3** はヒトスジシマカ細胞に対しても IC_{50} 値が $5.4 \mu\text{M}$ だった。

食品性植物中のリグナンの代謝産物である α -conidendrin の立体異性体を含めた合成
 ○白方陽菜子, 西脇 寿, 山内 聰 (愛媛大院・農)

【目的】 α -conidendrin は、食品性植物に含まれるマタイレジノールの代謝産物として知られている (J. Chromatogr. B 816, 87-97, 2005)が、生体内での立体構造に関する報告はなく、その立体構造の生物活性に対する効果も知られていない。同様の骨格を有する podophyllotoxin は、有名な細胞毒性を有するリグナンであり、殺虫活性、抗かび活性、植物生長調節活性も知られている。本研究は、 α -conidendrin の立体構造が生体に与える効果を調べるために、立体異性体を含めた合成を目的としたものである。

【方法・結果】 S-体の Evans の不斉補助基と anti-Aldol 縮合を利用して得られた立体構造を利用してラクトン 3 を得た後、環化基質 4 へ導き CSA を用いたベンゼン環とベンジル位との分子内 Friedel-Crafts 反応を行った。さらに、酸化によりラクトン化を行い (+)- α -conidendrin (1) へ導いた。R-体の Evans の不斉補助基を用いて同様に (-)- α -conidendrin (2) も合成した。光学純度は (+)-体が 100%ee, (-)-体が 99%ee であった。



B-1 トマトの糖度に及ぼすパルス光照射の影響
○神内奈々子, ○上田愛巳, 谷川浩司, 前田淳史, 梶山博司 (徳島文理大・理工)

【目的】 近年、トマトのビニールハウス栽培が盛んになっている。なかでも、高糖度トマトの需要は年々高まっている。これまで、水分量を絞ったり、塩分濃度を高めたりして、糖度を高めているが、この方法だと小玉トマトしか栽培できないという問題がある。本研究の目的は、光が当たっていない暗期に微弱なパルス光を照射することで、高糖度トマトの栽培技術を確立することである。

【実験方法・結果】 トマトは水耕方式で3ヶ月栽培した。蛍光灯を昼間の光源として12時間照射後、パルス光を8時間照射した。光合成有効量子束密度 (PPFD) は、蛍光灯が130、パルス光が0.05であった。パルス光の中心波長は449 nm、デューティー比は20%以下にした。蛍光灯のみで栽培したトマトの花、蕾、実の総数と糖度、生育状況を基準にして、パルス光照射の効果を定量化した。

パルス光照射により、木の全長は1.5倍近くにまで高くなり、花、蕾、実の総数は2倍近くに増加した。果実の糖度は部位によって異なっていたが、平均して1.5-2.0度高くなっていた。本研究と同じようなパルス光照射をレタス栽培に応用したところ、生育速度が向上し、ビタミンCが増加するという結果が得られている。トマトの場合には、生育が促進されるだけでなく、果実の数が増え、糖度が高くなることが明らかになった。パルス光照射が花芽生成や糖度に及ぼす生理学的な影響は不明であり、今後の研究課題である。

B-2 レタスのビタミンCに及ぼすパルス光照射の影響
○米村彩乃, 谷川浩司, 梶山博司, 前田淳史 (徳島文理大・理工)

【目的】 植物は光が当たっている明期に光合成と呼吸をするが、光がない暗期は呼吸のみをしている。この暗期に微弱なパルス光を照射することでレタスの生育が促進するとの報告がある。本研究の目的は、暗期のパルス光照射がレタスのビタミンC量にどのように影響するかを明らかにすることである。

【方法・結果】 レタスは水耕方式で栽培した。明期には、LEDの赤色(660 nm)と青色(450 nm)を12時間照射した。LEDの赤色と青色のPPFDは、それぞれ48.3, 8.3及び1.5であった。LED照射終了後の暗期に、中心波長450 nm、デューティー比が0.05、PPFDは0.1のパルス光を照射した。栽培したレタスは所定の時間が来たところで採集した。レタスは採集した後、すぐに-80°Cにて保存しレタス内のビタミンCが分解されることを防いだ。このレタスをミキサーで粉碎処理した後、酸化および2,4-ジニトロフェニルヒドラジン(以下DNPHと略す)を用いてDNPH誘導体化を行い、吸光度計及びHPLCにてUV吸収を測定することでビタミンC含有量を求めた。

その結果、パルス光をLEDとともに照射したレタスのビタミンCは4.30 mg/レタス100 g、照射していないもの及び市販レタスは3.10 mg/レタス100 g、と有意差を示し、パルス照射によりビタミンC量が増加することが示唆された。植物は光ストレスを受けると内在成分が変化するが、パルス光照射もレタスにストレスを与えている推定できる。このことより、暗期のパルス光照射は、生育促進同時にビタミンC含有量に効果があることがあきらかになった。

B-3

エラジタンニン代謝物 Urolithin A の生体内挙動

○新實祐理, 森 彩夏, 岩岡裕二, 伊東秀之 (岡山県大・保健福祉)

【目的】 Urolithin A を代表とするエラジタンニンの代謝物は、腸内細菌によりエラジタンニン分子中の hexahydroxydiphenoyl 基由来の ellagic acid を経由して生成後、生体内に吸収されることが知られている。各種代謝物のなかでも urolithin A は抗酸化作用、抗炎症作用や抗腫瘍作用などの活性を有することが報告されているが、urolithin A そのものの生体内挙動についてはほとんど報告されていない。本研究では、エラジタンニンの主要な代謝物である urolithin A の経口投与後の生体内挙動の検討を行った。

【方法・結果】 Urolithin A を 1 または 10 mg を SD 系雄性ラットに経口投与し、投与 1, 3, 6, 12, 24 時間後の血漿を採取した。また、投与後 48 時間までの糞および尿の採取も行った。採取したサンプルは脱抱合後、酢酸エチルにより抽出、乾固し、調製したサンプルを逆相系 HPLC および HPLC-MS/MS にて urolithin A の定量を行った。Urolithin A は血漿中ではほとんどが抱合体として、尿中ではほとんどがフリーアンドとして存在していた。また、最高血中濃度到達時間は投与後 3~6 時間で、尿中排泄は投与 48 時間後においても排泄されていることから、比較的長時間体内に滞留していることが示された。これらの結果から、urolithin A は吸収後、腸肝循環し、腎臓で脱抱合をされてから尿中に排泄されていることが示唆された。

B-4

防災植物の栄養成分分析および機能性評価

○斉藤香織, 澤良木庄一, 栗田せりか¹, 樋口慶郎², 吉金 優³

(日本防災植物協会, ¹高知大・土佐 FBC, ²小川商会, ³ノ清女・食品栄養)

【目的】 近年、大きな災害が多発している。本協会は、災害時に安全かつ簡易な調理法で食料に供される植物を「防災植物」と名付け、全国にその活用方法を広めている。しかし、防災植物の栄養学的価値などの科学的知見は乏しい。そこで本研究は、数種の防災植物の栄養成分と機能性（抗酸化活性）を分析し、データベース化することを目的とした。

【方法】 高知県四万十市に自生する 12 種類の防災植物、市販ニラおよびホウレンソウを供試試料とした。一般成分（水分、タンパク質、脂質、炭水化物、食物繊維、灰分）、カルテノイド、アスコルビン酸、カルシウム、鉄、硝酸態窒素、総ポリフェノール、および抗酸化活性（SOD 様活性、DPPH ラジカル消去活性）を分析項目とした。

【結果】 多くの防災植物は、ホウレンソウやニラと比べて水分含量が低く、タンパク質、脂質、炭水化物の含量が高かった。 β -カルテンはドクダミが特に多く、ホウレンソウの 3.6 倍の含量であった。カルシウムと鉄はオオバコが最も多く、ホウレンソウよりも高い含量であった。ヨモギ、ドクダミ、カキドオシはポリフェノール含量が高く、相関して高い抗酸化活性も示した。一方で、自生する防災植物の硝酸態窒素量はきわめて低かった。これら分析結果に基づき、12 種の防災植物の栄養成分データベースを作成した。

B-5 後発酵茶の抗糖化活性及び関与成分

○亀永康太, 三浦恭平, 柏木丈拡, 石田智滉¹, 石田七生¹, 常風興平¹,
森田靖代¹, 宮村充彦¹, 島村智子, 受田浩之²
(高知大・農, ¹高知大・附属病院薬剤部, ²高知大・地域セ)

【目的】二段階発酵茶の碁石茶に関する過去の機能性研究では、抗酸化作用 (*in vitro*), 高脂血症・動脈硬化抑制作用, 脂肪細胞の肥大化抑制作用 (動物試験), インフルエンザウイルス感染予防効果, 血中脂質改善効果 (ヒト試験) が明らかとされてきた。関与成分としては, カテキン類, ピロガロールが同定されているが, 上記の機能性を十分に説明できるものではなく, 検討の余地が残されている。本研究では, 生活習慣病と関連の深い後期糖化生成物 (AGES) の生成阻害活性 (抗糖化活性) を指標とし, 碁石茶, 及び各種後発酵茶の活性評価を行うとともに, 関与成分の追究を行った。

【方法】緑茶, 好気発酵茶のプーアル茶, バタバタ茶, 嫌気発酵茶のミエン, 阿波晩茶, 二段階発酵茶の碁石茶, 石鎚黒茶を試料とした。抗糖化活性測定はフルクトース (Fru)-BSA 系, 及びグリセルアルデヒド (GA)-BSA 系にて行い, AGES の生成を蛍光強度にて測定した。抗糖化成分の追究の際はアセトン抽出物を調製し, 各種クロマトグラフィーにて順次分画を行い, 各画分の抗糖化活性評価を行った。

【結果】今回測定に用いたすべての茶類に抗糖化活性が認められた。中でも, 緑茶に最も高い活性が認められ, 次いで碁石茶に高い活性が認められた。緑茶の抗糖化活性にはカテキン類の関与が大きく, Fru 系では約 60%, GA 系では約 90% の寄与率を示した。一方, 碁石茶の場合, カテキン類の寄与率は Fru 系で約 10%, GA 系で約 55% であった。このことから, 碁石茶中にはカテキン類以外の関与成分が存在すると考えられたため, 現在, 分析を進めている。

B-6 食餌誘導性肥満マウスの肝臓および腸内細菌叢に裸麦茶が及ぼす影響

○阿部大吾, 斎藤 武, 野方洋一 (農研機構・西日本農研)

【目的】近年, 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) /非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の病態に腸内細菌叢の変化が影響を与えていていることが明らかになってきており, 腸内細菌叢に影響を与える食品についての研究も進められている。本研究では高脂肪食を摂取させた肥満モデルマウスに麦茶を与え, 麦茶が肝臓の炎症や腸内細菌叢に与える影響を調査することを目的とした。

【方法】5 週齢の雄性 C57BL/6J マウスに高脂肪食 (D12492, 60kcal%) を 11 週間与え, 水もしくは麦茶 (仙系 SA0196, 200°C 焙煎) を自由飲水させた。実験終了後, 採血, 肝臓および糞便の採取を行った。血漿はインスリン, PAI-1, TBARS 値等の測定に用い, 肝臓からは total RNA を抽出し, 糞便の腸内細菌叢は T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法を用いて分析した。肝臓からは RNA を抽出した後, リアルタイム PCR 法により遺伝子発現 (TNF α , acta2, colla1 等) 解析を行った。

【結果】腸内細菌叢解析の結果, 高脂肪食群では Clostridium cluster XI および XIVa の増加, Prevotella/Bacteroides 比の減少が認められたが, 麦茶群ではこれらの腸内細菌叢の比率が改善していた。麦茶群では高脂肪食群に比べ, 血漿インスリンおよび TBARS 値に有意な改善が見られ, 血漿 PAI-1 も改善傾向が認められた。高脂肪食群において発現が増加していた肝臓の遺伝子発現 (acta2 や TNF α 等) は麦茶群では発現が低く, 麦茶摂取による肝臓炎症進行の抑制が認められた。以上の結果より, 高脂肪食摂取により誘導される腸内細菌叢や肝臓状態の悪化が, 麦茶摂取により改善される可能性が示唆された。

B-7 脂肪性肝疾患モデルマウスの魚油添加笹かまぼこ摂取による脂質代謝への影響
○宮田昌明, 木下智貴, 宮原佳歩, 杉浦義正 (水大校・食品科学)

【目的】魚油は多くの機能性を有することが知られており、脂質低下作用等が注目され、魚油を添加した多くの機能性食品が開発されている。ところが脂質代謝異常や脂肪肝などの病態の改善に必要な機能性食品への魚油の添加量、食するべき摂取量や期間については詳細には明らかになっていない。本研究では魚油添加濃度を変えた笹かまぼこ成分を脂肪性肝疾患モデルと考えられ、肝臓や血中の脂質レベルが高値を示す胆汁酸受容体の farnesoid X receptor (FXR)の欠損したマウス(*Fxr*欠損マウス)に摂取させ、その脂質代謝に与える影響について明らかにすることを目的とした。さらに脂質レベルと脂肪酸組成の組織間変動についても解析した。

【方法・結果】原材料のスケソウダラに対し 0%, 2.5%, 5%の割合で魚油を添加して作製した笹かまぼこの凍結乾燥成分を AIN-93M 精製飼料と 50%あるいは 25%の割合で混合して飼料を作製した。その飼料を *Fxr* 欠損マウスに 4 週間摂取させた後、肝臓、脳と血液を採取した。魚油添加笹かまぼこ成分の 50%あるいは 25%添加飼料の両方で肝臓のトリグリセリド、総コレステロール量が魚油添加濃度に依存して低下し、50%添加飼料では 1.4%魚油添加から有意な低下が認められた。一方脳と血中においては 50%添加飼料で遊離脂肪酸の有意な減少とリン脂質の有意な増加が認められた。脂肪酸組成については肝臓と血中で同様の変動が認められ n-3 系多価不飽和脂肪酸の魚油濃度依存的な濃度増加が認められたが、脳ではエイコサペンタエン酸の増加は認められず、肝臓や血中とは異なる変動パターンを示した。

B-8 食用花に含まれる色素 aureusidin の合成と生体内抗酸化作用
○中島清花, 清田洋正, 中村俊之, 宗正晋太郎, 村田芳行, 中村宜督
(岡山大院・環境生命)

【目的】オーロンはフラボノイドサブクラスの一つであり、観賞用・食用花であるキンギョソウやコスマス、ダリアなどの花弁に黄色色素として存在する。近年フラボノイドは健康増進作用を持つ食品成分として注目を集め、その生理活性についての様々な研究が行われている。しかし、オーロンは限られた植物中にしか存在しないため、その生理活性はほとんど明らかにされていない。そこで本研究では代表的なオーロンである aureusidin を合成により調製し、その抗酸化作用を評価した。

【方法・結果】まず phloroglucinol を出発物質とした全 4 段階の合成反応を行い、総収率 1.4%で aureusidin を合成した。次に過酸化水素が誘導する細胞毒性への aureusidin の影響を、Hepalclc7 細胞を用いた MTT アッセイによって評価した。6 時間の過酸化水素処理は細胞死を有意に誘導したが、aureusidin の 16 時間前処理は過酸化水素が誘導する細胞死を有意に抑制した。次に細胞内抗酸化作用に寄与することが知られている第二相薬物代謝酵素の NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) と heme oxygenase-1 (HO-1) の遺伝子発現に対する影響を RT-PCR 法を用いて評価したところ、aureusidin は NQO1 と HO-1 の遺伝子発現を濃度依存的に増強した。加えて、aureusidin は芳香族炭化水素受容体 (AhR) に発現が制御される CYP1A1 遺伝子の発現も濃度依存的に増強した。これらの結果より、aureusidin は第二相薬物代謝酵素の発現を増強することで細胞を酸化ストレスから保護すること、また aureusidin は Keap1/Nrf2 経路だけではなく、AhR 経路も活性化することで第二相薬物代謝酵素の発現を増強することが示唆された。

B-9 ナリンゲニンによる大腸炎回復作用には、抗炎症型マクロファージと制御性T細胞の増加、低酸素環境の軽減が関与する
○茶園悠太、山本祥也、鈴木卓弥（広島大院・生物圏）

【背景・目的】炎症性腸疾患は、炎症状態の再燃と寛解を繰り返すことを特徴とするため、炎症の惹起を抑えるとともに、炎症状態から速やかに回復させる事が大切である。これまでに私たちは、柑橘系ポリフェノールのナリンゲニンの摂取がマウスの実験的大腸炎の回復を早めることを見出しているが、その詳細な作用メカニズムはほとんどわかっていない（2017年度本大会）。そこで本研究は、炎症状態にあるマウス大腸の組織培養法を用い、ナリンゲニンによる炎症回復メカニズムを探査した。

【方法・結果】マウスにデキストラン硫酸ナトリウム（DSS、2%）を飲水投与して大腸炎を発症させた。この炎症状態にある大腸組織を採取し、ナリンゲニン存在下（~200 μM）で24時間培養して各種解析を実施した。ナリンゲニンは、組織の修復に重要な役割をもつIL-10の遺伝子発現量を高めた。このときIL-10の主な産生細胞群である抗炎症型のマクロファージ（F4/80⁺ CD206⁺），制御性T細胞（CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺）が増加した。ナリンゲニンによるCD206とIL-10遺伝子発現量の増加は、PI3キナーゼとMEKキナーゼの阻害剤により消失したが、FOXP3遺伝子発現には影響しなかった。さらに、DSS投与は炎症維持に深く関わる低酸素状態の誘導因子HIF-1α発現を増加させたが、ナリンゲニンはこの増加を抑えた。以上の結果から、ナリンゲニンによる大腸炎回復作用には、抗炎症型マクロファージと制御性T細胞の増加によるIL-10の産生上昇、大腸組織内の低酸素環境の軽減が関わることが提案された。また、少なくとも抗炎症型マクロファージの誘導には、PI3キナーゼとMEKシグナル経路が関わることが示唆された。

B-10 割裂荷重による魚体の切断加工～くさび型治具による亀裂発生位置の制御と応力低減効果の検討～
○廣本好美、佐藤允郎¹、村山文仁¹、川端康之亮¹、前川貴浩¹、川井清司、羽倉義雄（広島大院・生物圏、¹（株）極洋・塩釜研）

【目的】一般に中型～大型の凍結魚は漁獲直後から加工・流通の段階で凍結と解凍が繰り返され、その間に品質の低下が進む。凍結魚の切断加工には通常バンドソーを用いるが、作業者の安全性や欠けた刃の混入による危険性などの問題がある。そのため刃物を使用しない凍結魚の切断加工技術が求められている。本研究では割裂荷重による凍結魚の縦割り切断加工について検討を行った。すなわち、魚体へのV字型切り欠きの導入およびくさび型治具の使用による亀裂発生位置の制御と応力低減効果を検討した。

【方法・結果】凍結カツオを流水解凍した後、輪切りの状態に切断し、腹部試料（平均直径約φ94 mm×長さ66 mm程度）を調製した。これを-70～-40°Cで凍結し、実験試料とした。割裂試験には温度調節可能な材料試験機を用いた。また、スリット状の溝加工（幅15 mm×深さ3 mm×長さ100 mm、魚体の回転防止用）を施した加圧板を使用した。くさび型治具を上部の加圧板のスリットに固定した。魚体背側にV字型切り欠きを導入した試料では、切り欠きにくさび型治具を押し込んで割裂試験を行った。試験後、得られた荷重-変位曲線と目視による魚体の観察により評価を行った。その結果、くさび型治具の使用により50～70%程度の応力低減効果が認められた。切り欠き未導入の試料では、凍結温度により亀裂の発生状況が異なっていた。-70°Cでは亀裂が魚体の正中面上に生じず、縦割り切断とはならなかった。-60～-40°Cでは魚体正中に沿った亀裂が発生した。切り欠き未導入の凍結カツオ試料では、-60～-40°Cでくさび型治具を使用することにより亀裂発生位置の制御および応力の低減が可能であった。

【目的】 食品の香気成分には多くの種類があり、それぞれが食品の嗜好性に大きく影響を与えている。しかし、香気成分には熱に弱いものが多く、殺菌等の加熱処理により香気が失われることがある。本研究では、加熱殺菌が可能な食品への香気成分の新たな導入方法を検討した。具体的には、蒸気吹き込み法を用いて加熱殺菌と同時に香気成分を液状食品に連続的に導入する方法を検討した。蒸気吹き込み法とは、水と香気成分（例えば、精油）の共沸混合蒸気を単孔ノズルより微細気泡として液状食品に吹き込み、冷却により共沸混合蒸気を凝縮させ、香気成分を液状食品に分散させる方法である。

【方法・結果】 香気成分のモデルとしてD-リモネン、液状食品のモデルとしてアラビアガム水溶液（0, 1, 2, 3, 5, 10, 20 w/w%）を用いた。耐圧容器にD-リモネンを3 ml入れ、水蒸気を導入し、共沸混合蒸気を発生させた。この共沸混合蒸気を連続相に吹き込みエマルションを調製した。蒸気吹き込み法では、連続式及びバッチ式を用いた。得られたエマルションをバイアル瓶に15 ml量り取り、5°Cと20°Cで5日間保存し、エマルションの安定性を評価した。その結果、アラビアガム濃度0%のエマルションでは、保存直後に解乳化による2層分離が生じた。一方、アラビアガムを加えたエマルションでは、エマルションは比較的安定していたが、保存後期にはクリーミングが生じていた。解乳化やクリーミングの速さは保存温度が高いほど早くなる傾向を示した。また、アラビアガムの濃度が低いほどクリーミングが起き易く、濃度が10%以上では保存温度による差は認められなかった。

C-1

多価化分子認識素子の創製を志向した CutA1 足場タンパク質の改変
○東 秀隆, 笹井友菜¹, 石田尚之, 今村維克, 今中洋行
(岡山大院・自然科学, ¹岡山大・工)

【目的】細胞内外の生命現象は、各種生体分子間で生じる相互作用を通じて厳密にコントロールされている。それらの生体分子間相互作用を検出あるいは制御する技術は、医療診断、創薬、環境・食品分析やバイオイメージングなどにおいて広く応用されているが、その際に標的分子と結合する分子認識素子を要する。したがって、高い特異性を有し、より強く相互作用する分子認識素子を開発することは、技術精度の向上を図る上で極めて重要である。一方、分子内及びサブユニット間相互作用を通じて極めて安定なコア三量体構造を維持する超好熱菌由来 CutA1 は、既報タンパク質の中で最も高い変性温度（約 150°C）を有する。その高い構造安定性ゆえにアミノ酸配列の挿入・連結を許容することから、本研究では CutA1 を足場タンパク質とした高機能な多価化分子認識素子の創製を目指した。

【方法・結果】二次構造形成配列あるいはサブユニット間相互作用への寄与が少ないと考えられる部位を 4 カ所設定し、それぞれリガンドペプチド STII を挿入したところ可溶化発現がみられた。各種タンパク質を用いて ELA による相互作用解析を行ったところ、いずれも相互作用が検出でき、CutA1 上のペプチド提示が確認できた。続いて、分子内の 2 カ所の部位にそれぞれ STII 等のペプチドを挿入した結果、可溶化発現する挿入位置の組合せを見出した。したがって、サブユニットあたり 2 カ所、三量体あたり計 6 カ所にペプチドを挿入し得ると考えられた。これらの検討を通じ、複数リガンド配列を構造と配置を規定しつつ CutA1 に挿入し得る、多価化 CutA1 の創生が可能であることが強く示唆された。

C-2

シアリル Tn 抗原に結合する緑藻ミル(*Codium fragile*)レクチン CFL のタンパク質構造解析
○吉岡優花, 川上祐佳, 竹内良太¹, 前田 恵², 木村吉伸²
(岡山大・農, ¹一丸ファルコス, ²岡山大院・環境生命)

【目的】緑藻ミルには Tn 抗原や TF 抗原に特異的なレクチンが存在することが知られている。我々は瀬戸内海産の緑藻ミル (*Codium fragile*) 由来のレクチン (CFL) を精製し、N-末端アミノ酸配列、糖鎖結合特異性を明らかにしてきた。CFL は、う蝕の原因菌である *Streptococcus mutans* の歯面付着を競合阻害すると考えられ、オーラルケアへの利用が期待されている。しかしながら、CFL の立体構造は未だ解明されていない。そこで本研究では、昨年度報告したシアリル Tn 抗原特異的なアフィニティークロマトを用いて [1], CFL を精製し、X 線結晶構造解析に必要となる全アミノ酸配列の決定を目的とした。

【方法・結果】CFL はミル (瀬戸内海産、沖縄産) のアセトン脱脂物から、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) / 0.1 M NaCl によりタンパク質を抽出後、疎水クロマトにより部分精製した。次いで、豚ムチン由来糖ペプチドを結合させたアフィニティーカラムに供し、0.1 M グリシン - HCl 緩衝液 (pH2.0), 4M グアニジン塩酸塩 (GnHCl) を含む 40 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) により CFL の溶出を行った。GnHCl 画分は、20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) に対して透析し、ヒト A 型赤血球に対する赤血球凝集活性を確認した。精製 CFL を還元条件下で SDS-PAGE に供したところ、瀬戸内海産はこれまでと同様に 14 kDa を示したが、沖縄産は 12 kDa の分子量を有することが明らかになった。現在、N 末端アミノ酸配列を解析中である。また内部アミノ酸配列の解析のため、CFL (14 kDa) はプロモシアン分解を行い、アミノ酸配列の決定を試みている。[1] 川上ら 農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会要旨集 p64 (2018 年 1 月 広島)

C-3

遊離 N-グリカン (FNGs) のアミロイド β 線維化抑制活性

○杉本 楓, 前田 恵¹, 木村吉伸¹ (岡山大・農, ¹岡山大院・環境生命)

【目的】我々はハイマンノース型 (HMT-) FNGs が変性タンパク質の正常フォールディングを促進し, ミスフォールドタンパク質の凝集を阻害することを見出している。既に抗体 L 鎖可変部領域 v λ 6 の変異体 (3Hmut.Wil) をモデルタンパク質として用い, HMT-FNGs がアミロイド纖維形成阻害活性をもつことを明らかにしている^[1]。そこで本研究では, アルツハイマー病の原因タンパク質となるアミロイド β (A β) をモデルタンパク質として用い FNGs のアミロイド線維化抑制活性の普遍性について調べた。

【方法・結果】アルツハイマー病患者の脳内には, β -セクレターゼによりアミロイド前駆体タンパク質から生成された A β ペプチドが存在している。主に A β ペプチドの 40 残基 (A β 1-40) と 42 残基 (A β 1-42) が凝集に関与し, 線維構造を形成することで神経毒性を有する。本実験ではより速く β シート構造を形成し, 線維化の核となる A β 1-42 を用いた。HMT-FNGs はローヤルゼリー糖タンパク質 (主要構造 Man₉GlcNAc₂) とアズキ糖タンパク質 (主要構造 Man₈GlcNAc₂) より, 動物複合型 (ACT-) FNGs は卵黄糖ペプチド (主要構造 Neu₂Gal₂GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂) より精製し, 構造均一性を確認後, 実験に用いた。アミロイド線維形成量は, アミロイド線維に特異的に結合する蛍光プローブ ThioflavinT を用いて測定し, FNGs 添加時のアミロイド線維形成量の変化を測定した。その結果, A β ペプチドのアミロイド線維化に対する FNG の抑制活性が観察された。

[1] 勝部ら 農芸化学会中四国支部第 50 回記念講演会要旨集 p62 (2018 年 1 月 広島)

C-4

シロイヌナズナフラジェリン受容体の flg22 誘導性エンドサイトーシスの分子機構に関する研究

○吉村庄悟, 常 愛花, 塚本真嗣, 清水英寿, 地阪光生, 横田一成, 中川 強¹, 西村浩二 (島根大・生資科, ¹島根大・総科セ)

【背景と目的】シロイヌナズナフラジェリン受容体 FLS2 (Flagellin-sensing 2) は, PAMP (Pathogen-associated molecular pattern) の一種である植物病原細菌鞭毛タンパク質フラジェリンに対する細胞膜受容体であり, 植物病原菌の防御応答である植物免疫に関わる。本研究では植物病害応答のダウントレギュレーションと考えられる FLS2 の flg22 誘導性エンドサイトーシスに, クラスリン輸送経路がどのように関わっているのか明らかにすることを目的としている。

【方法と結果】FLS2 エンドサイトーシスのクラスリン依存性を調べるために, FLS2 の細胞質尾部 (FLS2-CT) とクラスリン AP2 複合体 σ サブユニット (AP2S) との相互作用を二分子蛍光相補 (Bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 法で解析した。その結果, AP2S は FLS2-CT と相互作用することが示された。さらに, FLS2 などの膜タンパク質のようなクラスリンの積荷タンパク質と AP2S との結合に関わることが予想される AP2S 中のアミノ酸に変異を導入した変異型 AP2S では, FLS2-CT との相互作用が有意に抑制された。したがって FLS2 のエンドサイトーシスはクラスリン依存性であることが示唆され, さらにこの変異型 AP2S は FLS2 のクラスリン輸送に関する AP2S のドミナントネガティブ体 (AP2S-DN) として機能することが予想された。そこでフラジェリンペプチド flg22 で誘導される FLS2 のエンドサイトーシスにおけるクラスリン依存性を調べるために, タバコ葉の一過的発現系を用いて FLS2-RFP の flg22 誘導性エンドサイトーシスに対する AP2S-DN-GFP の作用機序を解析したので, 本発表で議論したい。

C－5 膜貫通タンパク質のトポロジーを評価する新規な蛍光レポーター系の構築に関する研究

○久我一弘, 吉田昇平, 吉原えりか, 清水英寿, 地阪光生, 横田一成,
中川 強¹, 西村浩二 (島根大・生資科, ¹島根大・総科セ)

蛍光タンパク質を適切な位置で切断して得られる二つの断片が自己集合能をもつことがある。この性質を利用して、膜タンパク質のトポロジーや細胞内コンパートメントを評価することが可能である。当研究室では、黄色蛍光タンパク質の Venus に自己集合能を持たせた split Venus 断片 (interactive Venus, iVenus) を用いて、膜タンパク質のトポロジー解析ができるアッセイ系 (iVenus システム) の開発が行なわれてきた。iVenus システムは膜貫通タンパク質である液胞膜タンパク質のトポロジーや葉緑体タンパク質の葉緑体内の局在区画の解析を可能にした。しかし、小胞体 ER に局在する一回膜貫通型タンパク質のトポロジーの評価では、細胞質側に iVenus 断片を付加すると Venus 複合体に由来すると考えられる ER の凝集化が見られ、ER の形態が変化するという問題点があった。凝集化の原因としては、従来の iVenus 断片のオーバーラップ領域の立体構造が影響している可能性がある。そこで従来の iVenus 断片よりオーバーラップしている領域が短い一連の改良型 iVenus 断片の発現ベクターを構築し、この問題が解決するか検討した。その結果、これまでに改良型 iVenus 断片で従来型よりも凝集体が軽減されるもの見つかってた。この改良型 iVenus 断片からなる iVenus システムを用いて、自己集合能と蛍光の回復の有無を検証し、細胞内の様々なエンドソーム膜における膜タンパク質のトポロジー評価を行ったので、報告したい。

C－6 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 によって分泌されるキチン結合性タンパク質の解析

○東谷洸里, 仁木大輔¹, 美藤友博, 清水克彦², 有馬二朗
(鳥取大・農, ¹鳥取大院・持社創生, ²鳥取大・CoRE)

【目的】 我々はこれまでに、カニ殻／廃菌床の完熟堆肥から、キチン分解菌である *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (NTK2 株) を見出した。NTK2 株は、キチンの添加によって顕著に生育が促進され、それに伴い分泌タンパク質の生産が著しく向上する。また、N 末端アミノ酸配列解析によりキチン添加時に特異的に発現するタンパク質のいくつかが同定された。本研究では、特異的に発現するタンパク質の中で結晶性キチンの分解に先立って結晶性キチンに結合するタンパク質に焦点をあて、その解析を行った。

【方法・結果】 キチン添加培地に特有のタンパク質の N 末端解析から、キチン添加時に特異的に発現するタンパク質は bacterial extracellular solute-binding protein や GH family 18, キチン結合タンパク質であった。これらのうち結晶性キチンに対して特異的に結合するタンパク質を得るために、簡易的なキチンカラムを作成し、キチンに結合するタンパク質の分離を試みた。アセトン沈殿後の培養上清をキチンカラムに供して、素通り、洗浄、酸溶出画分の SDS-PAGE 及び(GlcNAc)₂-pNP 分解活性、キチンオリゴ糖分解活性を評価した。SDS-PAGE の結果、複数のタンパク質が酸溶出画分で確認され、(GlcNAc)₂-pNP 試験やキチンオリゴ糖分解活性評価の結果、元のサンプルと比較して素通り画分は分解活性が低く、洗浄画分から分解活性が確認されたことから GH family 18 も弱くキチンと結合することが示唆された。今後は、これらのタンパク質を N 末端解析により確認していく予定である。

C-7 シリカ粒子形成タンパク質“グラシン”の構造に由来するシンプルな可溶性タンパク質固定化タグ
○小林大起, 西美智佳, 坂手勇斗¹, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二朗¹
(鳥取大院・農, ¹鳥取大・農, ²鳥取大・CoRE)

【目的】グラシンは、ガラスカイメン類カイロウドウケツのシリカ骨格から見出された可溶性タンパク質(24.6 kDa)であり、室温・中性pH条件下でケイ酸から速やかにシリカ粒子を形成する。また、グラシンはシリカに強く吸着する性質も持ち、これらの機能がタンパク質の簡易かつ精製不要なシリカ粒子への固定化に利用できると考えられた。これまでに、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)とグラシンを融合することで、GST呈示シリカ粒子の構築を実現したが、グラシンの全長は比較的長く、グラシン断片の分解やGST活性の低下が問題点として挙げられた。本研究では、より最適化されたタンパク質固定化タグの構築を目指し、グラシン中のシリカ粒子形成に重要となるHis-Aspリッチなドメイン(HD2ドメイン, 5.6 kDa)のみをGSTと融合し、固定化への影響や無細胞抽出液からの固定化を試みた。

【方法・結果】グラシンのシリカ粒子形成に関わるとされるHD2ドメインとGSTとの融合タンパク質(HD2-GST)を構築し、本実験に用いた。HD2-GSTはNi-NTAアフィニティカラムによる精製が可能であったほか、断片の分解は殆ど確認されなかった。またHD2-GSTは十分なシリカ粒子形成能を有していたことに加え、シリカに対する吸着能も十分保持しており、これらの機能を利用して構築されたGST呈示シリカ粒子はこれまでの融合タンパク質よりも高いGST活性や熱安定性を示した。更には無細胞抽出液にシリカ粒子を添加しても、HD2-GSTが特異的に固定化された。

C-8 アルツハイマー病の腸内細菌叢を用いたヒト型ノトバイオートマウスの構築
○藤井祐介^{1,3}, Thi Thuy Tien Nguyen^{1,2}, 藤村勇太¹, 中村昇二³, 荒川健佑¹, 森田英利¹
(¹岡山大院・環境生命, ²Hue Univ・Agri, ³オハヨー乳業・基礎研)

【目的】アルツハイマー病は進行性の神経変性疾患で現在のところその原因や有効な治療方法は明らかになっていない。一方で、ヒトの腸と脳は腸脳相関と言われるネットワークを形成しており、ある種の生理活性物質を介して脳に種々の影響を及ぼすことが報告されている。そこで我々は、腸内細菌叢がアルツハイマー病発症の原因になりうるのではないかと考え、本研究では、アルツハイマー病患者(AD)と高齢健常者(HC)の腸内細菌叢を移植したノトバイオートマウスの構築を基盤とした、新たなアルツハイマー病モデルマウスの作出、およびその有効性を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】HCおよびADの糞便の腸内細菌叢を指標に、無菌マウス(C57B/6)に移植するサンプルを選抜した。選抜したサンプルを1週間馴化した4週齢のC57B/6に経口投与し、ノトバイオートマウスを構築した。作出したノトバイオートマウスは定着した細菌叢を確認するために6週齢で糞便を採取し、細菌叢を確認した。その後、10週齢から5週間ごとに糞便(細菌叢解析およびメタボローム解析)の採取および行動試験(物体認識試験および位置認識試験)を実施した。その結果、HC群およびAD群では異なる腸内細菌叢の定着がみられ、その違いは長期飼育においても維持されていた。また、メタボローム解析において認知機能への影響が報告されているいくつかの物質に変化がみられた。さらに、55週齢において物体認識試験および位置認識試験において有意な認知機能の低下を示したことから、本研究で作出したノトバイオートマウスはアルツハイマー病モデルとして有効であることが強く示唆された。

C-9

線虫を用いたビタミンB₁₂欠乏による生殖及び産卵機能への影響について

○岡本奈穂¹, 森脇涼², 美藤友博², 薮田行哲^{1,2}, 河野強^{1,2}, 渡邊文雄^{1,2}
(¹鳥取大院・連農, ²鳥取大・農)

【背景・目的】ビタミンB₁₂(B₁₂)欠乏線虫では産卵数が減少することが報告されているが¹⁾, 生殖機能に及ぼすB₁₂の影響は不明である。そこで, B₁₂欠乏線虫で引き起こされる生殖機能低下の原因を解明するために本研究を行った。

【方法・結果】B₁₂添加線虫(コントロール線虫)とB₁₂欠乏線虫は, B₁₂添加培地とB₁₂無添加培地でそれぞれ5世代間の継代培養を行い調製した。線虫の生殖機能は総産卵数および孵化数, また1日毎の産卵数を計測することで評価した。RNA-seq解析により, B₁₂欠乏が線虫の生殖機能に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。総産卵数および孵化数においてB₁₂欠乏による顕著な差異は示されなかった。しかし, 1日毎の産卵数を比較した結果, コントロール線虫の産卵数は産卵開始1日目に最大となり, 産卵期間は3日間であった。一方, B₁₂欠乏線虫は産卵開始2日目に産卵のピークを迎える, その期間は5日間であった。これらの結果から, B₁₂欠乏は線虫の生殖機能を抑制し産卵期間を延長させることができることが示唆された。また, RNA-seqにより線虫の精子および卵に関与する遺伝子の発現量を評価した結果, B₁₂欠乏は線虫の精子数および卵子数には影響を及ぼさないと推察された。しかし, 産卵口である陰門の発達に関与する遺伝子の発現量はB₁₂欠乏により減少していた。以上のことから, B₁₂欠乏線虫における産卵期間の延長は陰門の発達不全によると推察される。

1) Bito *et al.* FEBS Open Bio, 3, 112-117 (2013)

C-10

パルス光照射によるレタスの生育促進

○木村祐太, 武田真樹, 神内奈々子, 上田愛巳, 谷川浩司, 前田淳史,
梶山博司(徳島文理大・理工)

【目的】LEDや蛍光灯などの人工光を用いる植物工場や, 太陽光を用いる施設園芸では, 制御された環境のもとで葉物野菜などが栽培されている。本研究の目的は, 明期には人工光や太陽光はそのまま利用して, 光がない暗期にも微弱な光を照射することで, レタスの生育速度を向上させることである。

【方法・結果】レタスは水耕方式で栽培した。明期には, LEDの赤色(660 nm)と青色(450 nm)を12時間だけ同時に照射した。光合成有効光量子束密度(PPFD)は, 赤色LEDは48.3, 青色LEDは8.3と1.5であった。明期のLED照射のPPFDは, 赤色を固定して, 青色を変えた。LED照射終了後の暗期に, 中心波長=450 nm, デューティー比=0.05, PPFD=0.1のパルス光を照射した。暗期における照射プロファイルは次の4通りであった。①LED(8.3)=4時-16時, ②LED(8.3)=4時-16時, パルス光=4-16時, ③LED(1.5)=4-16時, パルス光=4-16時, ④LED(1.5)=4-16時, パルス光=16-4時。栽培中は, 温度22°C, 湿度40-50%に保った。定植後28日間観察した。最も外側の葉の面積は, ①177 cm², ②182 cm², ③123 cm², ④230 cm²であった。すなわち, 暗期パルス光を照射することで, LEDのみに比べて葉面積は最大で1.25倍であった。葉幅が広がり, 茎の根元まで葉が伸びていたが, 葉の数も増していた。これにより, PPFDが0.1という微弱光は, パルス光にすることで, レタスの生育促進と徒長抑制に効果があることがわかった。

水菜の生育に及ぼすパルス光照射の影響

○武田真樹, 木村祐太, 上田愛巳, 神内奈々子, 大畠朋彬, 永原詩乃, 前田 葵,
前田淳史, 梶山博司 (徳島文理大・理工)

【目的】 本研究では、水菜の生育に及ぼすパルス光照射の影響を調べ、光利用効率がパルス周期に依存することを明らかにする。得られた結果に基づき、光化学系 (PS) IIにおける電子移動過程について考察する。

【方法・結果】 水菜は温度 22°C, 湿度 40~50%の環境で、発芽後 30 日間栽培した。青色 (450 nm ピーク) と赤色 (580~720 nm) のパルス光を、1 日に 12 時照射し、水菜の生育に及ぼすパルス間隔 Δt と光合成光量子密度 (PPFD) の影響を調べた。パルス光の Δt は 6.6 μs, 250 μs, 500 μs, それぞれの光合成有効量子束密度 (PPFD) は 27, 0.9, 0.5 であり、1 パルスの光子数は同じであった。

茎長は $\Delta t=250 \mu s$ で一番長くなり、 $500 \mu s$, $6.6 \mu s$ では約 30% 減少した。すなわち、PPFD と生育速度の比例関係は、パルス照射では成立しないことがわかった。茎の長さを光子数で規格化して求めた光合成光利用効率は、 $\Delta t=500 \mu s$ で最大であった。以上の結果は、水菜の PSII の反応時間はおよそ 250 μs であること、 Δt が PSII の反応時間より長くなると光合成の機会損失により生育速度は減少することを示している。一方、PPFD が一番大きい $\Delta t=6.6 \mu s$ の時に生育速度が減少したことから、PSII の反応途中段階での P680 励起は PSII の電子伝達系を阻害要因になっていると推定している。

D-1 デヒドロキナ酸脱水酵素を *Gluconobacter* 属酢酸菌のペリプラズムに発現させデヒドロシキミ酸の生産性を向上させる試み
中村謙太郎, 松谷峰之介, 片岡尚也¹, 松下一信¹, 足立収生, ○薬師寿治¹
(山口大院・創科, ¹山口大・微研セ)

シキミ酸は生理学的には芳香族アミノ酸合成経路の共通中間体である一方で、炭素六員環から成り3つの不斉炭素を有する事から各種の合成原料として有用である。特に抗インフルエンザ薬であるタミフル (oseltamivir) の原料として重要な化合物である。酢酸菌 *Gluconobacter oxydans* NBRC 3244 は、キナ酸脱水素酵素、デヒドロキナ酸脱水酵素 (DQD)、シキミ酸脱水素酵素の3つの酵素を持ち、キナ酸からのシキミ酸発酵を行う可能性を有している。*G. oxydans* の DQD はII型 (AroQ) であり、至適 pH が塩基性の12量体酵素である。I型 DQD (AroD) は、至適 pH が中性から弱酸性の2量体であるが、*Gluconobacter* 属酢酸菌は保有していない。私たちは以前、培養途中に培地の pH を DQD の至適 pH である塩基性にシフトすることによって、*G. oxydans* でデヒドロシキミ酸の生産速度を上げることを報告した⁽¹⁾。本研究では、近縁の酢酸菌 *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 株が保有する *aroD* 遺伝子を *G. oxydans* NBRC 3244 に発現させることを試みた。次に、この AroD を *G. oxydans* のペリプラズムへと分泌させるために、TAT 依存性シグナルペプチドを人工的に融合させた *TAT-aroD* を発現させた。*G. oxydans* NBRC 3293 株の *kgds* 遺伝子由来の TAT 依存性シグナルペプチドを用いた。我々は、*G. oxydans* において、キナ酸からデヒドロシキミ酸への一連の変換をペリプラズムで行うことにより、デヒドロシキミ酸の産生を、pH シフトをすることなく効率的に行うことができると推測した。

⁽¹⁾Nishikura-Imamura et al. (2014), Appl Microbiol Biotechnol 98: 2955.

D-2 清酒酵母の新規高アルコール耐性変異株の原因変異の探索
○小林めぐみ^{1,2}, 五島徹也¹, 福田 央¹, 赤尾 健^{1,2}
(¹酒総研, ²広島大院・先端物質)

【目的】清酒醸造では、発酵末期のもろみ中の酵母は高濃度エタノール等のストレスにより死滅傾向にある。酵母死滅による細胞内容物漏出は酒質に悪影響を及ぼすため、その対策の一つとして、エタノール耐性清酒酵母が育種されてきた。実用菌株 K11 株は K7 の高アルコール耐性変異体だが、この株の原因変異は、*CYR1* 遺伝子上の一塩基置換 (2066 G>A) であることが分かっている。一方で、当研究室で新たに分離した K6 由来の高アルコール耐性変異体 K6AT3 では、*CYR1*²⁰⁶⁶ は野生型であったことから、別の耐性変異の存在が示唆された。そこで本研究では、K6AT3 のアルコール耐性の原因変異及びアルコール耐性機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】まず、K6AT3 におけるストレス応答遺伝子の発現について qRT-PCR により mRNA 発現量の定量解析を行った結果、K6AT3 では、非ストレス条件下でも K6 よりストレス応答遺伝子群が高発現していた。これは、K11 などの K7 系耐性株と同様で、K6AT3 においても、何らかの理由でストレス応答系が活性化することで耐性を獲得したと考えられた。次に、耐性の原因変異の探索を行った。親株と変異株のゲノムの比較から、アルコール耐性原因変異の候補として 7 つの SNP サイトを抽出した。これらについて、K6 型、K6AT3 型アレルの遺伝子破壊株等を作製し、急性ストレス試験 (22%EtOH) により、耐性への関与について評価を行ったところ、*CDC55* 遺伝子上の変異がアルコール耐性に関与することを示すデータが得られた。現在、アレル導入株や遺伝子破壊株等を用いた各種分析を行っている。

D－3

高エタノール耐性清酒酵母に見られる高エタノール耐性機構の解析

○山下にに子^{1,2}, 五島徹也¹, 赤尾 健^{1,2} (¹酒総研, ²広島大院・先端物質)

【目的】 代表的な清酒酵母きょうかい7号(K7)から育種された高アルコール耐性株きょうかい11号(K11)の高エタノール耐性の原因変異は、ゲノム情報の比較によりアデニル酸シクラーゼ *CYR1* 上の一塩基変異 *CYR1^{A/G2066A/A}* であることが既に明らかになっている。Ras/cAMP/PKA 経路は、通常、ストレス応答を負に制御するものであるが、これまでの検討の結果、K11ではストレス応答経路が活性化している一方で、cAMP 含量が増加し、PKA の活性も亢進していた。そこで本研究では、K11における高エタノール耐性の発現機構の解明を目的として、変異型 *CYR1* が Ras/cAMP/PKA 経路に及ぼす影響について検討することとした。

【方法・結果】 まず、エタノール耐性株における PKA の高活性化に注目し、PKA の触媒サブユニットである Tpk1, Tpk2, Tpk3 のそれぞれの高エタノール耐性への関与について調べることにした。実験室酵母 BY4742 と清酒酵母 K7, K11において *TPK1/2/3* 破壊株を作製し、エタノールストレス耐性への影響について調べた。実験室酵母では、*TPK2* 単一破壊株においてストレス耐性の顕著な低下がみられ、Tpk2 はストレス耐性の発現に多大な貢献をしていることが示唆された。現在、清酒酵母における *TPK1/2/3* 破壊株の表現型を調べており、アルコール耐性株における PKA 高活性化の意義について検討中である。

D－4

風鳴子に代わる新たな高知県酒造好適米品種の開発

○甫木嘉朗, 加藤麗奈, 赤木浩介¹, 坂田雅正¹, 加藤翔子², 糀谷啓仁²,
内山貴雄², 高橋 朋², 渡邊宗平², 村松久司², 永田信治², 上東治彦
(高知県・工技セ, ¹高知県・農技セ, ²高知大・農)

【目的】 高知県において酒造業は品目別製造品出荷額(食料品)の 6%を占め、さらに輸出額は 7 年間で 3.7 倍に伸びている重要な産業である。しかし、原料である酒米の県産米使用率は 30%と四国一低い。対策として、これまでに「土佐錦(とさにしき)」、「風鳴子(かぜなるこ)」、「吟の夢(ぎんのゆめ)」が開発されたが、「吟の夢」以外の生産量は近年低下している。これは「土佐錦」は収穫時の脱粒性が強く、収量が低下するため、「風鳴子」は心白が大きすぎて米粒が脆く、精米時に割れ米が多く発しやすいためである。そこで本研究では、「風鳴子」に代わる平野部での栽培が可能な早生品種の有望系統の育種を試みた。

【方法・結果】 有望系統の選抜は酒造適性試験と醸造試験、精米試験によって行った。平成 26 年度から平成 28 年度までは高知県農業技術センターが栽培した米を、平成 29 年度は高知県平野部の生産者が栽培した米を試料とした。酒米統一分析法による酒造適性試験、総米 155 g または 600 g の小仕込み試験による醸造試験、玄米 60 kg の精米試験(平成 27-29 年度のみ)を行った結果、「高育酒 80 号」は「風鳴子」に比べて心白率が高過ぎず、精米試験においても 3 年間を通じて低い碎米率を維持していた。また、酒造適性試験や醸造試験の結果でも風鳴子と同等の酒造適性を維持していた。

D-5

吟醸酒醸造のための香気成分生成能を改良した高知酵母の育種

○糀谷啓仁, 甫木嘉朗¹, 加藤翔子, 渡邊宗平, 高橋 朋, 村松久司, 永田信治,
上東治彦¹ (高知大・農, ¹高知県・工技セ)

【目的】吟醸酒は、香りの少ない米から造られるため、香りの高さは発酵中の酵母の働きに大きく依存している。吟醸酒中の主な香気成分は、バナナ様の香りの酢酸イソアミルとリンゴ様の香りのカプロン酸エチルである。これらの量とバランスが清酒の香味の特徴となり、製品の多様化と個性化を図る上で重要である。高知県ではこの2種類の香気成分を高生産するAC-95を開発した。AC-95を用いた清酒は市販酒品評会において高い評価を得ている。しかし、酒造会社によって香りの出方が異なること、不快臭の原因となるピルビン酸が高いことがわかっている。そこで本研究では、AC-95に代わる新規酵母の開発を目的とし、酢酸イソアミルを生産する酵母を親株として、カプロン酸エチル生産能を向上させるセルレニン耐性株を得ることで、2種類の香気成分をバランス良く高生産する新規酵母の育種を試みた。

【方法・結果】高知県内で用いられている清酒酵母A-14, AA-41, H-21, KA-1, 熊本系低酸性酵母を親株とした。変異処理は15 μg/ml エチルメタンスルホン酸によって行った。変異処理した酵母を5.6mg/L セルレニンを含む寒天培地に塗布し、生育した株をセルレニン耐性株とした。得られた耐性株を用いて小仕込み試験を行い、遠心分離によって上槽酒を得た。上槽酒をヘッドスペースガスクロマトグラフィーによって香気分析し、親株と同等の酢酸イソアミルを生産し、カプロン酸エチルを高生産した株を選抜した。セルレニン含有培地で培養した結果、セルレニン耐性株を数百株取得した。小仕込み試験の結果から香気成分をバランス良く高生産し、吟醸酒醸造への使用が期待できる耐性株を数株選抜した。

D-6

嗜好の多様化に資するワイン酵母を用いた吟醸酒醸造法の検討

○加藤翔子, 甫木嘉朗¹, 糀谷啓仁, 内山貴雄, 村松久司, 上東治彦¹, 永田信治
(高知大・農, ¹高知県・工技セ)

【目的】近年、国内市場の清酒消費量は減少傾向にあり、人口減少も伴い今後大幅な増加は見込めないと考えられる。一方、海外市場においては日本食ブームなどを背景に清酒の輸出が増加し、嗜好の多様性を視野に入れた清酒醸造が重要視されている。それに対応する製品としてワイン酵母を使用した清酒が存在するが、ワイン酵母は清酒酵母と比較してアルコール耐性が弱く、香気成分生成量も少ないと認められ、清酒醸造においてはこれらを改善する必要がある。そこで本研究では、ワイン酵母に適した吟醸酒醸造法を検討するため、発酵に影響を与えるチアミンの添加試験と発酵日数を短縮した低アルコール酒の醸造試験を行った。

【方法・結果】ワイン酵母へのチアミン添加試験では、ワイン酵母61株を用いて、1 g/ton のチアミンを添加した総米155 g の小仕込み試験を行った。遠心分離による上槽後の清酒の一般成分と香気成分を分析した。その結果、61株中49株で日本酒度のキレが良くなり、45株で酢酸イソアミル量が増大するなど発酵改善の効果が見られた。低アルコール酒の醸造試験は、ワイン酵母61株を用いて、総米155 g の小仕込み試験を行った。発酵はアルコール度数が11%から13%に達したところで終了させた。遠心分離による上槽後の清酒の一般成分と香気成分を分析し、官能評価を行った。その結果、過去の4週間発酵試験と比較して、死滅率が低下していた。また、清酒酵母に比べ、酸度や高級アルコールに特徴が見られた。官能評価した結果、10株の低アルコール酒が高い評価を得られた。

D－7 高知県産薬草茶の乳酸菌による発酵とその評価～特に竹葉とヤーコンについて
○松尾優氣, 横山麻香, 井ノ上侑奈, 山岸義弘¹, 中島悦子², 河邑龍二³,
加藤麗奈⁴, 上東治彦⁴, 村松久司, 永田信治
(高知大・農, ¹山岸竹材店, ²土佐 FBC II, ³本山村農業公社, ⁴高知県・工技セ)

【目的】近年, 微生物発酵を利用した後発酵茶は, 抗酸化能などの機能性向上によって, 従来の茶葉に付加価値を与えることが知られている。本研究では, 植物から比較的安定な乳酸菌を分離し, その培養菌体を用いた県産の薬草茶葉の発酵方法を検討し, 発酵助剤の添加効果や抗酸化活性の評価を試みた。

【方法・結果】県産茶葉(ハブ, 桑, キシマメ, ドクダミ, グアバ, 竹, ヤーコン)の粉末を添加した MRS 液体培地を用いたオリーブ由来乳酸桿菌 *Lactobacillus plantarum* HRS15-8 とビワ由来乳酸球菌 *Pediococcus lolii* HRS5-32A の静置培養試験では, 各種茶葉による顕著な生育抑制効果は見られなかった。次に, この二種の乳酸菌培養液をスターターに用いて各種茶葉発酵試験を行い, 生菌数, pH, 酸度, DPPH ラジカル消去活性などを測定した。さらに, 黒酵母 β -グルカン, ミナミアオノリ, ユズ果汁, ヤーコンなどの天然物を発酵助剤とした発酵試験を試みた。一般に茶葉のみでは, 乳酸菌の増殖に充分な栄養分を欠くので, 乳酸菌培養液をスターターに用いても生菌数の増大を認めるのは難しく, 生菌数を長時間維持することが重要になる, 発酵助剤としての天然物と茶葉の組合せによっても効果が異なるので, 生菌数と抗酸化能の変化が指標となる。今回, 特に新たな地場産品の活用と高付加価値化を目指した竹葉とヤーコン葉は, 発酵助剤の有無に関わらず生菌数の維持が顕著であったが, いずれの茶葉に対してもミナミアオノリの添加効果が認められた, また, ヤーコン葉ではヤーコンの添加が生菌数の維持や DPPH ラジカル消去活性の増大に効果的であった。

D－8 ヨーグルトの乳酸菌発酵とカード形成に及ぼす黒酵母 β -グルカンの効果
○岡本和華, 池上裕倫¹, 奥原歩音, 遠藤 恵, 井上侑紀奈, 岡林倫史²,
加藤麗奈³, 上東治彦³, 村松久司, 永田信治
(高知大・農, ¹ソフィイ, ²ひまわり乳業, ³高知県・工技セ)

【目的】黒酵母 *Aureobasidium pullulans* は菌体外多糖として β -グルカン (SBG) を生産する。SBG は, 増粘多糖類として食品添加物に使用されている一方で, 乳酸菌の耐性強化にも寄与することが報告されている。本研究では, ヨーグルトスターーター乳酸菌を用いて乳酸菌の生育やヨーグルト製造における試菌として, SBG の効果を検討した。

【方法・結果】4つのスターーター乳酸菌 *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* N027 を用いた。MRS 液体培地にて 37°C, 120 rpm で 48 時間振とう培養し, 経時的に生菌数を測定した。10%脱脂粉乳にて各菌株を単独で植菌, もしくは *S. thermophilus* とそれ以外の 3 菌株を各々組み合わせて植菌して発酵試験を行った。37°C で 24 時間静置培養し, 経時的に pH, 酸度, カード形成, ホエイの離水を測定した。カード形成は B 型粘度計による粘度で評価した。各試験で SBG は AFO-202 株, NN 株由来の 2 種を用いて各 3%ずつ添加した。結果, MRS 培地では *L. helveticus*, *L. casei* で SBG 添加により生菌数の増加がみられた。脱脂粉乳の試験では *L. bulgaricus* と *L. helveticus* について SBG 添加により早い pH の低下と酸度の上昇がみられた。共発酵ではいずれの組み合わせにおいても単発酵と比較し, pH, 酸度だけでなくカードの粘度の増強が観察された。さらにカード形成及びホエイの離水は添加する SBG の種類によって差がみられた。SBG の添加により乳酸菌生育・発酵促進, カード形成力の向上がみられ, ヨーグルト製造における有用性が示唆された。

D-9 高知県産ミナミアオノリのメタノール抽出物がもつ抗菌活性

○野口麻衣, 村松久司, 塚本沙恵香, 浜元和輝, 恩田歩武¹, 平岡雅規²,
島村智子, 柏木丈拡, 永田信治
(高知大・農, ¹高知大・理工, ²高知大・総研セ)

【目的】海洋性藻類は陸上植物と比べて成長速度が早く、柔らかい植物構造をもつことが特徴である。また、海洋性藻類は貴重な淡水中ではなく海水中で生育するため、循環型のバイオマス資源として期待される。本研究ではミナミアオノリの新しい利用法を開発するために、高知大学海洋生物教育研究施設で陸上養殖されたミナミアオノリのメタノール抽出物がもつ抗菌活性を試験した。

【方法・結果】抗菌活性試験の被検菌として、食中毒菌と近縁な細菌4株、食中毒細菌1株、食品の腐敗に関わる細菌1株と酵母2株、乳酸菌1株を用いた。ミナミアオノリ粉末をメタノールに懸濁し、4℃で3日間攪拌した後、ろ過してメタノール画分を分取した。残渣にメタノールを加えて抽出操作を繰り返し、二度のメタノール抽出操作で得たろ液を混合して濃縮乾固したものをメタノール抽出物とした。ジメチルスルホキシドでメタノール抽出物を溶解し、5 mlの液体培地に0, 2.5, 5, 10, 20 mg eq./mlとなるように加えた。被検菌を植菌して生育最適温度で振とう培養し、OD₅₉₅を測定して微生物の成育阻害率を算出した。その結果、被検菌10株うちグラム陽性細菌3株に対して生育阻害活性が観察され、中でも *Jonesia dentrificans* NBRC15587^T はメタノール抽出物 20 mg eq./ml で完全に生育が阻害された。液体培養で生育が阻害された3株に対して平板培地を用いた抗菌活性試験を行い、各被検菌の阻止円の直径を計測して阻害活性の有無を調べた。その結果、液体培養で生育阻害が観察された被検菌は平板培地を用いた抗菌活性試験でも生育阻害活性が観察された。

D-10 鮓ずしから分離した *Bacillus* sp. F-31 株の產生する抗菌物質の性状

○岡野紗季, 丸山雅史 (愛媛大院・農)

【目的】微生物制御は食品、医療など様々な産業分野で課題とされている。特にグラム陰性細菌は有害性が高いものが多く制御が望まれるが、外膜という特有の膜構造により抗菌物質が効きにくい。本研究ではグラム陰性細菌を標的とし、また安全性の観点から発酵食品を抗菌物質生産菌の分離源として調査を行った。その結果、鮓ずし由来の *Bacillus* sp. F-31 株が得られたため、本講演では F-31 株およびその生産物である抗菌物質の性状について報告する。

【方法・結果】生産菌の同定および毒性調査を行った結果、本菌株が遺伝的および生理学的に *Bacillus* 属であり、溶血性およびエンテロトキシン生産性といった毒性が見られないことが分かった。次に、硫安沈殿法および Sep Pak C18 カラムによる固相抽出により抗菌物質を約 90 倍に精製した。以降の性状試験では精製サンプルを使用し、Tricine SDS-PAGE を用いた分子量測定、トリプシン、プロテイナーゼ K を用いたプロテアーゼ消化、熱、pH に対する安定性試験、抗菌スペクトルの調査を行った。その結果、本抗菌物質は分子量 3,300 Da ほどの疎水性ペプチドであり、熱に安定であると共に pH 安定領域が中性から弱アルカリ性であることが分かった。また、抗菌スペクトルでは、細菌および真菌に広く活性を有することが分かった。これらの結果は、*Bacillus* 属が生産するバクテリオシン様物質の特徴と類似することが示唆された。

D-11 酸耐性ユスリカ幼虫内の微生物叢の解析

○藤井創太郎, 河合幸一郎, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【目的】 酸性環境に適応して生息するユスリカ幼虫は、飼育水質が pH 2.0 以下でも正常に生育でき、主に *Chrionomus* 属のユスリカから見いだされる。本研究では、酸ユスリカ幼虫内の微生物群集を解析し、それを通常環境に生きるユスリカ幼虫と比較することで、酸性環境への適応機構とユスリカ幼虫内の微生物叢の関係性を明らかにする。

【方法】 *Chrionomus* 属の酸耐性ユスリカ *C. sulfurosus*, *C. fusciceps*, *C. acerbiphilus*, そして *C. riparius* の幼虫(第4齢)から DNA を抽出した。比較対象として、通常環境に生息するユスリカ 8 種, *C. yoshimatsui*, *C. nippodorusaris*, *C. nipponensis*, *C. javanus*, *C. okinawanensis*, *C. flaviplumus*, *C. kiinensis*, *C. plumosus* の幼虫からも同様に DNA を抽出した。それらの DNA から、細菌の 16S rRNA 遺伝子 515–806 bp 領域を対象にライブラリーを作製し、MiSeq300 によりメタゲノム解析を行った。

【結果】 多様性解析によって全ユスリカ幼虫内の微生物叢を比較すると、4 種の酸耐性ユスリカの菌相が非常に良く似ており、微生物叢がユスリカ幼虫の酸耐性に関わる可能性が示唆された。特に九州地方から見いだされる *C. sulfurosus* 幼虫および *C. fusciceps* 幼虫には *Nocardiaceae* (放線菌科) が、また東北地方から見いだされる *C. acerbiphilus* 幼虫および *C. riparius* 幼虫には *Enterobacteriaceae* (腸内細菌科) が特徴的な菌相として現れることが明らかとなり、共生細菌による酸性適応はユスリカの生息する気候により異なる可能性が示唆された。

E-1

Rhodococcus sp. KO20 に由来するアミン酸化酵素の諸性質

○枡田優菜, 村松久司, 山本 薫, 柳川知樹, 新居直人, 林 素子¹,
山本浩明¹, 加藤伸一郎, 永田信治 (高知大・農, ¹(株) ダイセル)

【目的】医薬品原料として有用な 3-アミノキヌクリジン (3-AQ) の不斉合成を指向し, 土壤から分離した *Rhodococcus* sp. KO20 の粗酵素液中に 3-AQ に作用する酸化酵素活性を見出した。そこで、大腸菌を宿主とした遺伝子発現系を構築し、本酵素を精製して酵素化学的諸性質を調べた。

【方法・結果】アミン酸化酵素遺伝子を連結した pSE420U で形質転換した *Escherichia coli* JM109 を培養し, 1 mM IPTG を加えて本酵素遺伝子の発現を誘導した。培養菌体を 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2) に懸濁し、氷上で超音波破碎して粗酵素液を調製し、硫安分画 (30~50%飽和硫安), トヨパール DEAE 650M カラムクロマトグラフィー, トヨパール Butyl 650M カラムクロマトグラフィーに供し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動的に均一に精製した。精製酵素を用いてアミン酸化酵素の基質特異性、温度と pH に対する安定性並びに依存性、化合物の影響を検討した。本酵素反応の最適 pH は 8.5 (トリス塩酸緩衝液) で最適温度は 40~45°C であった。また、1 時間加温した酵素標品は、40°Cまで活性を 100% 保持したが、それ以上の温度では徐々に活性は減少した。さらに、様々な pH で 1 時間、30°Cで加温すると、pH 5.0~8.5 の範囲で 80%以上の活性を保持したことから、本酵素を用いた物質生産は中性付近で実施するのが望ましいことがわかった。本酵素は R 体よりも S 体の 3-AQ に対して高い活性を示し、二級アミン、三級アミンには作用せず、一級アミンに作用することがわかった。また、本酵素反応に対する金属イオンの影響についても検討した。

E-2

過酸化水素定量を利用した Cyclo(Leu-Phe) oxidase の活性測定法の確立と基質特異性検討

○小西健太, 仁戸田照彦, 神崎 浩 (岡山大院・環境生命)

【目的】我々は、放線菌由来の環状ジペプチド脱水素酵素 cyclo(Leu-Phe) oxidase が幅広い基質特異性を示すことを見出してきた。また、本酵素の活性値を求めるための活性測定法として、電子受容体 phenazine methosulfate (PMS) と 2, 6-dichloroindophenol (DCIP) を添加し吸光度測定を行う PMS-DCIP 法を確立した。しかし本酵素は本来酸素を最終電子受容体としており、その電子伝達経路の違いから、HPLC で生成物が確認されているが PMS-DCIP 法で反応性が確認できない基質が存在していた。そこで本来の電子伝達経路における、より高感度で定量的な活性測定法の確立とそれによる基質特異性の検討を行った。

【方法・結果】本酵素と環状ジペプチドの反応により、最終電子受容体である酸素が電子を受け取ることで過酸化水素を発生させ、蛍光物質である 4-hydroxyphenylacetic acid と horseradish peroxidase を利用して過酸化水素を定量した。測定機器にはマイクロプレートリーダーを用いて 1 分ごとの蛍光強度の増加量を測定した。Cyclo(Leu-Phe)を基質として用いたところ、酸素を最終電子受容体とする電子伝達経路において、本酵素の反応初速度を連続的かつ定量的に測定することが可能であることが分かった。また、PMS-DCIP 法において反応が確認できなかった基質に対して本方法を用いたところ、酵素活性を確認することができた。これらのことから、本来の電子伝達経路における基質特異性検討のための新たな活性測定法を確立することができた。さらに、本方法を用いて *Km* 値と *Vmax* 値を算出し速度論検討を行ったところ、同じ基質でも電子伝達経路の違いにより反応性が異なることが明らかになった。

E – 3 海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* 由来 CTQ 依存性グリシンオキシダーゼの精製と性質検討
○平岩祥太朗, 梶山雄輝, 溝端佐津紀, 赤地周作, 根本理子, 田村 隆,
稻垣賢二 (岡山大院・環境生命)

【目的】グリシンオキシダーゼ(GlyOX)は、グリシンを酸化しグリオキシル酸を生じる反応を触媒する。近年、海洋性細菌 *Marinomonas mediterranea* に新奇な GlyOX が見いだされた。本酵素はビルトイン型補酵素であるシステイントリプトフィルキノン(CTQ)を含有すると推定されている。また本酵素はグリシンに対する厳格な基質特異性を有することからグリシンセンサーとして利用が期待される。しかし、本菌における生産量が少ないため精製が極めて難しく、これまで部分精製酵素を用いた性質検討しか行われていない。本研究では *M. mediterranea* 由来 GlyOX を高純度に精製し、その酵素学的性質や CTQ 形成機構、立体構造を解明し応用につなげることを目的とする。【方法】*M. mediterranea* は培地として、マリンプロスを用いて 3 日間程度培養した。培養上清から 70% 硫安沈殿によりタンパク質を回収した後、DEAE-Toyopearl 650M, Sephadryl S 300-HR のカラムクロマトグラフィーに供して精製を行った。GlyOX 活性は反応生成物である過酸化水素の量を 4-アミノアンチピリン法で定量することにより測定した。

【結果】*M. mediterranea* GlyOX をほぼ均一に精製することに成功した。精製した GlyOX の基質特異性を調べたところ、天然アミノ酸 20 種の内ではグリシンのみに作用し、基質構造類似体ではエチルグリシンに対して微弱な活性を示す程度で他には反応しなかった。D-アミノ酸やサルコシンに対して高い特異性を示す従来の他種由来 GlyOX とは対照的に、本酵素は極めて厳格な基質特異性を示した。グリシンに対する見かけの *Km* は 0.5 mM であり、活性は D-, L-ペニシラミンやフェニルヒドラジンで阻害された。

E – 4 Functional characterization of enzymes involved in the late steps of ulvan degradation
○Ratna Mondal, Kouhei Ohnishi¹ (UGAS, Ehime Univ, ¹RIMG, Kochi Univ.)

Ulvan is a complex water soluble sulfated polysaccharide in the cell wall of green algae belonging to Genus *Ulva*. It is composed of 3-sulfated rhamnose (Rha3S) and either glucoronic acid (GlcA), iduronic acid (IdoA) or xylose in smaller amounts. Bacterial degradation of ulvan is a multistep process and genes responsible for ulvan degradation are clustered at polysaccharide utilization locus (PUL). The first step is an endo-cleavage of the β -(1→4)-glycosidic bond between Rha3S and GlcA, IdoA or xylose, through β elimination catalyzed by ulvan lyase. We had cloned and characterized two ulvan lyase genes belonging to polysaccharide lyase family 24 (PL24), KUL10_22730 and KUL10_26790, from *Glaciecola* sp. KUL10. PUL was found around KUL10_26790. We have searched genes responsible for the late steps of ulvan degradation in PUL and found several genes encoding glycoside hydrolases, rhamnosidases, and sulfatases. We cloned the candidate genes, expressed in *E. coli*, and purified with His-tag form at C-terminus. When two gene products, KUL10_26540 and KUL10_26770, belonging to GH105 family, were reacted with unsaturated oligo-ulvan released by PL24 ulvan lyases with a degree of polymerization higher than two, the smaller products were obtained; DP8, DP6, DP4, and DP2 were catalyzed to DP7, DP5, DP3, and DP1, respectively. We concluded that KUL10_26540 and KUL10_26770 are β -glucuronyl hydrolase. Four gene products, KUL10_26590, KUL10_26600, KUL10_26760, and KUL10_26780, showed a weak rhamnosidase activity, indicating they are likely to be involved in further breakdown of oligo-ulvan.

E-5 シロイヌナズナ由来 MSH1 C 末端 GIY-YIG ヌクレアーゼドメインの機能解析
○美濃部亜衣, 大下紘貴, 福井健二¹, 原田明子¹, 矢野貴人¹, 芦内 誠,
若松泰介 (高知大院・農, ¹大阪医大・医)

【目的】植物オルガネラゲノムは多くの反復配列を有しており、その配列内の相同であるが完全には一致しない配列間の組換え (homeologous recombination) は、MutS ホモログタンパク質である MutS homolog 1 (MSH1) の機能不全により増加することで知られる。しかし、本タンパク質の生化学的機能解析は行われておらず、この抑制に関する詳細な分子機構は不明のままである。本タンパク質はミスマッチ認識ドメイン, ATPase ドメイン、さらに C 末端に植物 MSH1 に特徴的な GIY-YIG ヌクレアーゼドメインを有している。本研究ではシロイヌナズナ由来 MSH1 の C 末端 GIY-YIG ヌクレアーゼドメイン (AtMSH1 CTD) について組換えタンパク質を調製し、生化学的機能解析を行った。

【方法・結果】pET-15b/atmsh1 ctd で大腸菌 Rosetta2(DE3) pLysS を形質転換し、N 末端 His₆ タグ付き AtMSH1 CTD を大量発現させ、2 種のカラムクロマトグラフィーにより高純度で精製した。精製標品を用いて、ゲルシフトアッセイを行ったところ、相同組換えの抑制や促進に働く真正細菌 MutS2 と同様に、組換え中間体に特徴的な D-loop や Holliday junction など分岐鎖 DNA に対して強い結合能を有していた。しかし、Smr ドメインを有する MutS2 とは異なり、エンドヌクレアーゼ活性を有していなかった。GIY-YIG サブファミリータンパク質の中にはヌクレアーゼ活性の発現に他のタンパク質を必要とするものがある。つまり、AtMSH1 においても N 末端に存在するミスマッチ認識ドメインが、GIY-YIG ドメインによる DNA 切断に必須である可能性が示唆された。

E-6 巨大ウイルスが持つ R3H ドメイン含有推定上エキソヌクレアーゼ MIMI_R431 の機能解析
○大久保秀平, 大下紘貴¹, 福井健二², 矢野貴人², 芦内 誠¹, 若松泰介¹
(高知大・農, ¹高知大院・農, ²大阪医大・医)

【目的】巨大ウイルスは数百から数千もの遺伝子を持ち、その大半は通常のウイルスや細胞性生物には見られない独自のものである。特に、異なるドメインから成る融合タンパク質が多いことで知られる。Mimivirus shirakomae 由来 MIMI_R431 は中間領域に 3'-5' エキソヌクレアーゼドメインとして知られる WRN_exo ドメイン、C 末端には核酸結合ドメインとして知られる R3H ドメインを持つ巨大ウイルスに高度に保存されたタンパク質である。新規エキソヌクレアーゼの同定はバイオテクノロジーへの寄与だけでなく、巨大ウイルスの分子レベルでの理解に繋がると考え、本機能未知タンパク質の生化学的機能解析を行った。

【方法・結果】pET-15b/mimi_r431 で大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、N 末端 His₆ タグ付き MIMI_R431 を大量発現させ、Ni-NTA アガロース、ヒドロキシアパタイト、TOYOPEARL DEAE により高純度で精製した。また R3H ドメインを欠損させた R3H_del 変異体も同様の方法で、発現と精製を行った。FAM でラベルしたオリゴヌクレオチドを用いた活性測定を行ったところ、MIMI_R431 は二本鎖 DNA 特異的な 3'-5' エキソヌクレアーゼであることが解った。一方で、R3H_del 変異体ではその活性は大幅に減少していた。

E-7 巨大ウイルス由来推定上 DNA ミスマッチ修復酵素 MutS7 の生化学的機能解析
○大下紘貴, 美濃部亜衣, 福井健二¹, 矢野貴人¹, 芦内 誠, 若松泰介
(高知大院・農, ¹大阪医大・医)

【目的】ほぼ全ての細胞性生物は複製の正確度を高めるために、DNA ミスマッチ修復機構を持つ。この系で特に重要なのはミスマッチ塩基を認識する MutS1 とエラー鎖の切断を行う MutL である。興味深いことに巨大ウイルスに固有の遺伝子群の中には、通常のウイルスが持たない MutS1 や他の修復酵素と高い相同性を示す遺伝子が存在する。巨大ウイルスは MutL を持たないが、この MutS1 と高い相同性を示す MutS7 が C 末端に推定上スクレアーゼドメイン(HNH ドメイン)を併せ持つことから、巨大ウイルスは細胞性生物とは異なる新規ミスマッチ修復機構を持つと予想される。本機構を明らかにすることはゲノム維持の研究だけでなく、巨大ウイルス研究にも大きく寄与すると考えた。そこで中心的役割を担うことが予想される MutS7 に着目し、まず HNH ドメイン、その後全長の生化学的機能解析を行った。

【方法・結果】N 末端 ProS2 融合型 HNH ドメインを大腸菌内で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーにより高純度で精製した。野生型と部位特異的変異体を用いた DNA 切断活性測定より、本ドメインはニッキングエンドスクレアーゼ活性を有していたが、基質特異性は検出されなかった。N 末端と C 末端を少し削った全長領域も N 末端 ProS2 融合型として大腸菌内で大量発現させ、カラムクロマトグラフィーにより高純度で精製した。ミスマッチ DNA への結合能と切断活性は確認されたが、パーフェクトマッチ DNA との特異性の差は 10 倍程であった。また ATPase 活性も一般的な MutS タンパク質の 10 分の 1 程度だった。現在は ProS2 を切断した全長領域を用いて解析を行っているところである。

E-8 鉄硫黄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 由来 Sulfide:Quinone oxidoreductase に関する研究
○井原里弥, 上村一雄¹, 金尾忠芳¹ (岡山大・農, ¹岡山大院・環境生命)

【目的】Sulfide:Quinone oxidoreductase (SQR) は、原核生物・真核生物を問わず広く生物界に分布し、主にサルファイド (S^{2-}) を電子供与体としてキノンを還元する反応を触媒する。本研究では、好酸性の鉄硫黄酸化細菌の一種 *Acidithiobacillus ferrooxidans* の SQR について、反応速度論的解析など、その性質と生理的役割について検討を行った。

【方法・結果】*At. ferrooxidans* 23270 株の全ゲノムデータから SQR をコードすると推定される遺伝子 (AFE_1792) を見出し、デザインしたプライマーと本菌のゲノム DNA を鋳型として PCR をを行い、目的遺伝子 *Af-sqr* を単離した。この遺伝子をプラスミドベクター pET21a に組込み、組換え発現ベクターを構築した。このプラスミドで大腸菌 BL21(DE3) 株を形質転換し、組換え型 *Af-Sqr* の大量取得を試みた。その結果、組換え型 *Af-Sqr* の多くは不溶性であったが、一部は可溶性画分から獲得され、そこから高い SQR 活性が検出された。組込んだ *Af-sqr* 遺伝子にはヒスチジンタグのコドンを付加しているため、組換え型 *Af-Sqr* はアフィニティカラムによって精製された。得られた *Af-Sqr* についてはキノンの還元活性、および硫化水素の酸化活性を測定し、SQR の活性としてそれぞれの反応速度論的解析を行った。本酵素のサルファイド、およびキノンに対しへミカエリス-メンテンの式に従い、それぞれの K_m 値はサルファイドに対して $31 \mu M$ 、キノンに対して $87 \mu M$ と算出された。現在、*At. ferrooxidans* を二価鉄、硫黄、チオ硫酸、テトラチオニ酸と異なる生育基質で培養し、本酵素遺伝子発現への影響を調べている。

- E-9 Biochemical and physiological properties of the two type-II NADH dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans* NBRC3293
○Feronika Heppy Sriherfyna, Shoko Emoto, Minenosuke Matsutani, Hisashi Koike, Naoya Kataoka, Tetsuo Yamashita¹, Eiko Nakamaru-Ogiso², Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi (Yamaguchi Univ., ¹Kagawa Univ., ²Univ. Pennsylvania)

One of advantageous microorganisms in a broad range of biotechnological applications, *Gluconobacter oxydans*, an obligate aerobe, is used in oxidative biotransformation to produce L-sorbose, 2-ketogluconic acids, or dihydroxyacetone. This microorganism is a member of acetic acid bacteria and uses pentose phosphate pathway or Entner-Doudoroff pathway as the central metabolism due to a deficiency of enzyme in Embden-Myerhof-Parnas pathway. Oxidation of NADH but also NADPH is most likely important for the central metabolism. *G. oxydans* strain 621H that has only one type-II NADH dehydrogenase (NDH2) shows poorer growth than the strain DSM3504 that possesses two phylogenetically distinct NDH2s. These were tentatively named general NDH2 (gNDH2) and specific NDH2 (sNDH2). Transduction of the gene for sNDH2 to *G. oxydans* 621H has been shown to improve its poor growth (Kostner *et al.*, 2014). Like the strain DSM3504, *G. oxydans* strain NBRC3293 possesses both gNDH2 and sNDH2. Here, we compared substrate specificity of the two NDH2s by constructing recombinant *Escherichia coli* strain that solely expresses either NDH2. The recombinant gNDH2 showed a strict specificity on NADH, but sNDH2 oxidized NADPH as well as NADH. We constructed an NBRC3293 derivative defective in the gene for sNDH2 to investigate the growth behavior. This mutant strain showed less growth in mannitol medium than wild type.

- E-10 微生物由来アセチルコリンエステラーゼが触媒するアセチル化反応における基質認識
○井上 尚, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二朗¹
(鳥取大院・農, ¹鳥取大・農, ²鳥取大・CoRE)

【目的】アセチルコリンエ斯特ラーゼ (AChE) は活性中心に Ser 残基を持ち, アセチルコリン (ACh) を酢酸とコリンへ加水分解する反応を触媒する。我々はこれまでに, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株から AChE (Pa-AChE) を見出し, 本酵素が副反応として, ACh を材料としてアミノ基や水酸基のアセチル化反応を触媒することを明らかにした。また, ACh より安価な酢酸エチル (EtOAc) もアセチル供与体として利用できることも確認されたことから, 本研究ではアセチル供与体と受容体の組合せの違いによる Pa-AChE のアセチル化反応への影響を評価した。

【方法・結果】アセチル受容体として 1,6-Diaminohexane (1,6-DAH) と 6-Amino-1-hexanol (6-A-1-H), アセチル供与体として ACh と EtOAc を選択し, 各組合せでの Pa-AChE によるアセチル化反応を評価した。その結果, アセチル化された 1,6-DAH 量は ACh よりも EtOAc を供与体とした場合が多く, 対照的に, アセチル化 6-A-1-H は ACh を供与体とした場合でより多く合成された。またアセチル受容体に対する K_m 値は, ACh を供与体として用いた場合, 1,6-DAH よりも 6-A-1-H の方が低くなり, EtOAc をアセチル供与体として用いると, 逆の結果が得られた。更には, pH の活性への影響も各受容体で異なったプロファイルが示された。以上の結果から, アミノ基のアセチル化には EtOAc, 水酸基のアセチル化には ACh を供与体として利用することで, より効率的なアセチル化反応を触媒できることが示唆された。

E-11 *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 由来キチン結合タンパク質による様々なキチナーゼ活性への効果
○仁木大輔, 東谷洸里¹, 長田晴季¹, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二朗¹
(鳥取大院・農, ¹鳥取大・農, ²鳥取大・CoRE)

【目的】 キチンは生理活性物質の生産や次世代バイオマス資源としての利用に期待されているが、その強固な構造から難分解性を示し、分解には繁雑な工程や環境への負荷が問題とされている。これらの問題を改善するため、酵素によるキチン分解が試みられているが、効率が悪く、未だ工業利用に至っていない。我々はこれまでに、カニ殻や廃菌床の完熟堆肥から、高いキチン分解能を持つ放線菌, *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (NTK2 株) を単離した。本菌はキチン存在下での培養で、Chitin-binding protein (CBP) を多く菌体外に分泌する。本研究では、CBP の機能とキチン分解との関連を解き明かすため、異種発現系を構築し、様々なキチナーゼの活性に対する CBP の添加効果を調べた。

【方法及び結果】 NTK2 株のゲノム情報から、2 種の CBP と 8 種のキチナーゼをピックアップし、それぞれの組換えタンパク質を構築すると共に、CBP のキチナーゼ活性への影響を網羅的に解析した。キチンオリゴ糖分解活性に対する CBP 添加効果を調べた結果、いくつかのキチナーゼにおいて、アルカリ条件下 (pH9.0) でのキチンオリゴ糖分解速度の向上が観察された。また、水溶性キチンを基質としたザイモグラフィーにおいても、同様の効果が観察された。現在、様々なキチナーゼを対象に、より結晶性キチンに近い基質での CBP 添加の影響を調べている。

F – 1

出芽酵母の寿命制御に関する Ssg1 の機能解析

○益村晃司, 金井宗良¹, 久米一規, 水沼正樹 (広島大院・先端物質, ¹酒總研)

【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ィン(SAH)となり, SAH は SAM のメチル化反応を競合的に阻害するため, SAH 水解酵素 *SAHI* によって速やかに分解される。我々は, *SAHI* 遺伝子に変異を有する *sah1* 変異株を取得し, 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 the *sah1*)を取得した。期待通り, *SSGI* 単独変異株は経時的寿命が延長し, 野生株に比べて SAM および SAH を高蓄積することが分かった。このことから, Ssg1 は SAM/SAH が関わる新規寿命延長因子であると予想し, その機能の解明を目的とした。

【方法・結果】Ssg1 の N 末端に EGFP を融合した株を構築し, その局在を観察した結果, Ssg1 は液胞膜に局在した。さらに, *SSGI* 変異株は液胞内に SAM および SAH を高蓄積した。また, *SSGI* はプロトン濃度勾配を利用して薬剤や毒物を排出するトランスポーターである MATE family と相同な配列を持っていることから SAM および SAH を液胞に運ぶことで寿命延長していると予想した。そこで, 液胞型 ATPase サブユニット *VMA2* を破壊したところ, *SSGI* 変異株は SAM および SAH の蓄積量が消失し, 短命となつた。このことから, *SSGI* 変異株の寿命延長には液胞の酸性化が重要であることが予想された。

F – 2

微細藻類ユーグレナのワックスエステル発酵制御因子 WSRK の同定

○石井侑樹, 木村光宏, 小川貴央, 丸田隆典, 森 大^{1,2}, 石川孝博
(島根大・生資科, ¹慶應大・先端生命研, ²慶應大・政策メディア)

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は, 嫌気条件下において貯蔵多糖パラミロン (β -1,3-グルカン) をグルコース単位に分解した後, ワックスエステル発酵によりミリスチルミリスチン酸 (C28) を主成分とするワックスエステルを生産する。我々はこれまでに, 嫌気に応答したワックスエステル発酵制御にはリン酸化による翻訳修飾が重要であることを明らかにした上で, リン酸化プロテオーム解析を実施し, 嫌気条件に応答してリン酸化レベルが有意に変動する 26 種類のプロテインキナーゼを選抜してきた。そこで今回, これらプロテインキナーゼ候補の中からワックスエステル発酵制御に関わるキナーゼの同定を試みた。

各プロテインキナーゼ候補に対して二本鎖 RNA (dsRNA) を合成した後, エレクトロポレーションにより各々の遺伝子ノックダウン (KD) ユーグレナ細胞を作出した。各 KD 細胞における嫌気処理後のワックスエステル合成におよぼす影響を検討した結果, 一つのプロテインキナーゼ KD 細胞においてワックスエステルの蓄積が著しく抑制されていたことから, このプロテインキナーゼを WSRK (Wax Ester Synthesis Regulation Kinase) と命名した。従属栄養条件下定常期まで培養した WSRK_KD 細胞を嫌気 24 時間処理し, 各種代謝物を測定した結果, Mock コントロールと比較してパラミロンの蓄積および分解には影響が見られなかったが, 嫌気処理後の C12~C15 までの各種脂肪酸の蓄積が顕著に抑制されていたことから, WSRK はパラミロン分解以降脂肪酸合成に至る経路の制御に関与していることが示唆された。

F – 3 海底下微生物遺伝子を対象とした基質誘導性遺伝子発現解析法（SIGEX）による基質応答解析 ○溝渕早紀，若松泰介，森澤高至，西川奈七¹，寺田武志²，稻垣史生³，芦内 誠，諸野祐樹³（高知大院・農，¹高知大・土佐さきがけプログラム，²マリンワークジャパン，³JAMSTEC・高知コア）

【目的】現在、大規模シークエンス技術が発達し、生命を形作る塩基配列情報は膨大に得られる時代にある。一方で配列からの機能推測は既知配列との類似性による探索によるところが大きく、ORF 遺伝子の 30% 以上は機能が不明など、依然として機能未知遺伝子配列が多く存在する。そこで遺伝子発現応答を鍵として機能性遺伝子断片を釣り上げる Substrate Induced Gene Expression method (SIGEX 法) を用いて、未知遺伝子の機能特定を目指した。未知微生物群が大半を構成する海底下生命圏を対象とし、海底下地層環境を代表する物質に対する基質応答解析を行った。

【方法・結果】日本海上越沖航海 NT13-15 にて海底下 0-10 cm, 10-20 cm, 20-30 cm から採取された堆積物を用いて、*evoglow* をレポーター遺伝子としたそれぞれ総挿入遺伝子断片長 >2Gbp の SIGEX ライブラーを作製した。その後嫌気条件下並びに好気条件下でメタン、ギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、D-アミノ酸などの基質を用い、発現誘導を行った。3 種のライブルーとも好気条件下では顕著な応答を示さなかった。対照的に嫌気条件下では、数種の D-アミノ酸に対し >0.1%，ギ酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、メタンに対し >0.2% の応答を示した。また、3 種のライブルー間で応答を示す基質に統一性はみられなかった。このことは海底下からの深さの違いにより地層環境が大きく異なり、海底下微生物が栄養源とする物質の特異性に違いがみられたためではないかと考えられる。

F – 4 ゲノム未知の珪藻からの遺伝子転写調節領域の取得及びそれを利用した形質転換用ベクターの構築
○白石幸音，田村 隆，稻垣賢二，真山茂樹¹，根本理子
(岡山大院・環境生命，¹東京学芸大・教育)

【目的】珪藻の被殻は、シリカ(SiO₂)を主成分としており、複雑で種特異的な 3 次元ナノ・マイクロパターン構造を有している。珪藻による被殻形成機構を解明できれば、新しいセラミックス材料の合成に応用できる可能性がある。我々は、異なる微細構造の被殻を持つ珪藻の比較解析から、その構造制御因子の解明を目指す研究を行っている。珪藻は膨大な種数を持つにもかかわらず、ゲノム解析及び遺伝子組換え技術の確立が報告されている種はごくわずかである。より多くの種で解析を進めるために、本研究では、ゲノムが未解読の珪藻種から遺伝子転写調節領域を取得し、これをを利用して形質転換を行う実験を試みた。【方法】複数の珪藻の既知 *fucoxanthin chlorophyll a/c-binding protein(fcp)* 遺伝子配列を参考に設計したプライマーを用いて、対象の珪藻のゲノム中から FCP 遺伝子を增幅した。得られた配列が転写されていることを RT-PCR によって確認し、この遺伝子の上流 500 bp を推定プロモーター、下流 300 bp を推定ターミネーターとした。上記の DNA 断片を用いて、ゼオシン耐性遺伝子(*Sh ble*)またはノーセオシリシン耐性遺伝子(*nat*)と GFP 遺伝子を発現する形質転換用ベクターを構築した。このベクターをパーティクルガンにより藻体に導入した。【結果・考察】*Nitzschia palea* 由来の推定プロモーターを用いて構築したベクター pNpfcp-ble は、複数種の羽状目珪藻の形質転換に利用できることが示された。この推定プロモーター領域の配列について、現在詳細に解析中である。本研究で得られた成果は、ゲノム未知の珪藻における遺伝子組換え技術の確立のために役立つことが期待される。

F – 5

放線菌 *Streptomyces incarnatus* のストレス応答における転写解析

○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】放線菌の抗生物質生産の促進のために、転写因子やプロモーターの解析などが取り組まれてきた。近年、補酵素を要求する代謝系酵素は、立体構造の形成や維持に分子シャペロンなどの品質管理システムに強く依存することが解明されつつある。本研究では、核酸系統抗生物質シネフンギンを生産する *Streptomyces incarnatus* に酸性ストレス、熱ショックなどのストレスを与えたシネフンギン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 *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ* などの品質管理システムのホモログ遺伝子群の転写解析を行い、ストレスへの応答発現について調べた。【方法】放線菌 *S. incarnatus* を液体培地で培養し、培養上清のシネフンギン生産量を HPLC を用いて測定した。HCl または NaOH を用いて培地 pH を 4.0, 6.0, 8.0 に調製して、培地 pH のシネフンギン生産への影響を検討した。熱ストレス条件は本培養開始より 24 時間を 40°C で培養し、以降 30°C で培養した。そして、qRT-PCR 法によりストレス条件下での *groEL*, *groES*, *dnaK*, *dnaJ* の発現量を測定した。【結果と考察】中性、塩基性培地と比較して酸性培地でのシネフンギン生産量が高かった。また、熱ストレス条件ではコントロールと比較して約 3 倍高生産であった。転写解析の結果、酸、熱ストレス条件において *groEL*, *groES* は培養初期のみコントロールより高発現となつたが、*dnaK*, *dnaJ* は抗生物質が盛んに生産される期間においても高発現であり、*dnaK* オペロンの高発現が抗生物質生合成酵素群の安定稼働に寄与している可能性が示唆された。

F – 6

放線菌 *Streptomyces rochei* 二次代謝制御系の解析

○見崎裕也, 岩國美由季, 高橋 謙, 鈴木敏弘, 木梨陽康, 荒川賢治
(広島大院・先端物質)

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の持つ線状プラスミド pSLA2-L 上には、ポリケチド抗生物質 Lankacidin(LC)・Lankamycin(LM)の生合成遺伝子クラスターがコードされている。LC・LM の生産は *tetR* 型抑制遺伝子 (*srrA*, *srrB*), SARP 型活性化遺伝子 (*srrY*, *srrZ*), さらにシグナル分子 SRB の生合成遺伝子 *srrX* など、複数の制御遺伝子により制御されている。本研究では、二次代謝生合成制御系の理解を目指した。

リプレッサータンパク SrrB は、高い pI 値を有するシグナル伝達分子受容体ファミリーに属しており、*Streptomyces virginiae* (バージニアマイシン生産菌) のバージニアマイシン生産抑制タンパク BarB などと同様に、抗生物質生産を負に制御する役割を持つ。そこで、*srrB* が抗生物質生産に与える影響を調べるため、親株, $\Delta srrB$ 株, $\Delta srrAsrrB$ を培養し、酢酸エチルを用いて抽出を行なった。酢酸エチル抽出物を HPLC に供し、LC 生産量を比較したところ、 $\Delta srrB$ 株, $\Delta srrAsrrB$ 株共に 5 倍以上も高生産していた。転写産物の発現解析を行ったところ、親株では *srrY* の発現が 48 時間で終結していた。一方、 $\Delta srrB$ 株では *srrY* の発現が 72 時間に至るまで継続していることが明らかになった。また、親株, $\Delta srrB$ 株および $\Delta srrA \Delta srrB$ 株では生育に差異がないことを見出している。このことから *srrB* は培養後期における *srrY* の転写抑制を担っていることが示唆された。

F – 7 放線菌 *Streptomyces rochei* のシグナル分子 SRB の生合成に関する還元酵素遺伝子 *srrG* の機能解析
○手島愛子, 謝 麗, 河原弘幸, 荒川賢治 (広島大院・先端物質)

【目的】*Streptomyces rochei* は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、それらの生合成はシグナル分子 *Streptomyces rochei* butenolide (SRB) によって厳密に制御されている。当研究室ではこれまでに SRB1 および SRB2 の化学構造を決定しており、現在は *S. rochei* の SRB 合成遺伝子 *srrX* 近傍にコードされていた遺伝子から推定した生合成経路を元に、生合成経路の解明を目指している。これまでに *srrO* (P450 モノオキシゲナーゼ) が 6' 位の酸化反応に関与することを明らかにしている。今回は *srrG* (還元酵素遺伝子) の解析を行った。

【方法・結果】*srrG* は、SRB 生合成において C-1' 位ケトンの還元に関与すると考えられ、遺伝子破壊により抗生物質生産が消失したことから、本遺伝子産物の SRB 生合成への関与が示唆された。 $\Delta srrG$ 株と $\Delta srrX$ 株の共培養で抗生物質生産が回復したことから、中間体の存在が示唆されたため SRB 中間体の取得を試みたが、本株の代謝産物は $\Delta srrX$ 株に添加しても抗生物質生産の回復が見られなかった。このことから、中間体の構造が不安定であることが示唆された。次に、HPLC により親株との代謝産物の比較を行ったところ、いくつか親株には見られないピークが確認された。現在、蓄積が見られた代謝産物の解析を行っている。本発表ではこれらの結果を報告する。

F – 8 *Streptomyces cinnamoneus* ゲノム情報を用いた有用酵素の探索
東海彰太, 裏地美杉¹, ○畠中唯史 (岡山生物研, ¹神戸大院・科技イノベ)

【背景と目的】放線菌は、さまざまなタンパク質を菌体外に分泌することが知られ、タンパク質生産の有用宿主として、近年注目されつつある。しかしながら、放線菌によるタンパク質菌体外発現に関する報告例は少ない。我々は、*Streptomyces cinnamoneus* TH-2 株由来金属プロテアーゼ (SCMP) のプロモーターを利用した放線菌強発現ベクター (pTONA6) を開発した。これを利用し、遺伝子源として、安全である属種として厚労省で認可されている *S. cinnamoneus* 株ゲノム情報を用いた有用酵素の探索を行っている。本発表では、我々が開発した放線菌発現系を利用して、食品の食感改善に役立つ酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) の探索を目的としている。

【結果と考察】*S. cinnamoneus* NBRC13864 株から、ゲノム DNA を調整し、MiniON シークエンサー (オックスフォードナノポア・テクノロジー社製) により、ドラフトゲノム配列を得た。市販品である *S. mobaraensis* NBRC13819 株由来 TGase (SMTG) 遺伝子の相同配列検索を行い、*S. cinnamoneus* NBRC13864 株由来 TGase (SCTG) 遺伝子情報を得た。SCTG, SMTG 遺伝子を挿入した発現ベクターを作成し、*S. lividans* 1326 株に形質転換した。培養上清の SDS-PAGE を行った結果、2%グリセロール、0.8%K₂HPO₄、0.05%MgSO₄·7H₂O、0.5%ポリペプトン、0.5%酵母エキスを含む培地で、5 日間培養を行った上清において、成熟酵素のみのバンドを認めた。培養上清を陰イオン交換体による簡易精製を行い、アシルドナーとして Z-Gln-Gly を用い比較検討した。

F-9 ポリ ε リジンベースオルガノゲル
○武田隼平, 白米優一, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】放線菌の作り出すポリ ε リジン (PEL) はナイロン6と同質の主鎖構造とアミノ基側鎖をあわせ持った（他に例のない）ハイブリッド型ポリマーとみなすことができる。そのため、機能材料としての新たな可能性を秘めた有望素材として注目されている。当研究室では、他に先駆けてオルガノゲル化に成功した。実際、クロロホルムを良好な分散媒としてゲルになることが分かっている。オルガノゲルは先端産業的なモノづくりに欠かせない材料になってきているが、オルガノゲルの研究は発展途上であり、ゲル開発を石油化学に頼らざるを得ない状況が続いている。今回、本 PEL ベースオルガノゲルの性質について触れる。さらに、本ゲル性を發揮させる上で重要となる基盤的情報まで得られたので報告する。

【方法・結果】オルガノゲルの開発には、当研究室で考案された「イオンコンプレックス化法」が有効であった。水溶性 PEL に耐水プラスチックとしての物性を与えるには、PEL のアミノ基側鎖のカチオン化と対電荷をもつパートナー分子の探索が重要な課題であった。本研究では、電子親和力の大きい硫酸基を備えたラウリル硫酸 Na (SDS), スルホコハク酸ジオクチル (DSS), リグニンスルホン酸 Na (LAS) に着目した。種々検討の結果、オルガノゲルとしての性能に適うパートナー分子としては SDS が最適であることが判明した。適用分散媒についても精査した。分析結果は一般的なゲル化則には従わないものであったが、一方でクロロホルムを含む含ハロ系溶剤が分散媒になるという興味深い傾向も認められた。

F-10 超好塩アーキアのポリ- γ -グルタミン酸合成遺伝子
○左々玲奈, 佐藤あゆみ, 福永 愛, 白米優一, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】ポリ- γ -グルタミン酸 (PGA) は、生分解性を備えた天然高分子でありながら、化成ナイロンと同一の主鎖構造とポリアクリル酸類似の側鎖周囲構造をあわせ持つ、ハイブリッド材料として見なすことができる。PGA は納豆の糸の主成分として広く知られているが、納豆菌の他にも PGA を生産する微生物として、極限環境微生物である超好塩アーキア *Natrialba aegyptiaca* が存在する。納豆菌 PGA とは異なりホモ L 型 PGA を生産する。その優れた立体規則性を活かした新産業応用が期待されている。当研究室では *N.aegyptiaca* の PGA 合成遺伝子（便宜上, *plgA/plgB* と呼ぶ）の同定に成功した。今回、この新奇合成システムに着目し、各遺伝子の構造的特徴・機能に関する研究を行なったので報告する。

【方法・結果】取得したオペロンを PGA 合成オペロン (*pgs*) と比較した。結果、既知の *pgs* オペロンが 4 つの構造遺伝子からなるのに対し、この新オペロンは極めて単純な構成であるとの結論に至った。構造予測モデルによる相同性分析を実施したところ、*PlgB* はアーキアには存在しないはずのペプチドグリカンを合成する酵素群との類似性が見られる一方、*PlgA* についてはバイオポリマー合成に関わる既知のいかなる酵素にも似ていなかった。各遺伝子の大腸菌発現ベクターを構築し、同発現クローニング株を作製した。次いで、PGA 生産能の分析、かかる再現性を調査した。結果、そのいずれの遺伝子産物も単独で PGA 生産能を有している可能性が強く示唆された。

F-11 ポリγグルタミン酸の効率回収に向けた検討

○山内七海, 宮田真帆, 白米優一, 尾池翔太, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】ポリγグルタミン酸 (PGA) は納豆菌等の該産生微生物の培養液に約4倍量のエタノールを添加して生じる沈殿物から得られる。ただし、該純度が低いため、さらなる精製工程を要する。PGA 價格の高止まりの大きな要因の一つとされる。2013年、高知大学の尾池らは他に先駆けて PGA イオンコンプレックス (PGAIC) を介した新たな回収方法を提案した。2018年ごろには大阪市立大学の東らが PGAIC を利用した回収技術の確立に挑んだが、実用化に向けて残された課題が多い。今回、PGAIC 経由の「PGA 効率回収法」確立のため、基盤的課題に取り組んだので報告する。

【方法・結果】東らは PGAIC をエタノールに溶解後、NaCl 溶液を添加することで該結合構造部が解除され、PGA の効率回収も可能と報告している。ところが実質的な回収率は~60%に止まること、加えて大過剰の塩（想定されるイオン結合数の約10倍モル）を含む水溶液を要する点等、かかる方法論には根本的な見直しが必要との指摘がある。今回、該回収率の低下に過剰量の水分が関わるとの予測に至った。まず、想定イオン結合数と等モルの HCl 分子を含む濃塩酸 (12N; 低用量) を添加する工程に改良したところ、事実上の PGA 完全回収まで望めることが確認できた。次いで、過剰の水分混入が回収不全の最大要因であることを立証するため、上述と同モル条件下、塩酸のみ希釀する方法(0.2N 水溶液)に変更したところ、PGA の回収率は~10%に止まった。PGAIC 経由の「PGA 効率回収法」では過剰な水分の混入を避ける工夫／戦略が特に重要であることが判明した。

贊 助 企 業

- ・(株)旭製作所 岡山営業所
- ・天野エンザイム(株)
- ・アルファー食品(株)
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・エイチビィアイ(株)
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・AuB(株)
- ・岡山県酒造組合
- ・(社)岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・(株)機能性食品開発研究所
- ・協和発酵バイオ(株)
　　山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・(株)近畿日本ツーリスト中国四国 広島支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)サン・クロレラ
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)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)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・鳥取サイエンス(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・(有)ビーエムステーション
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製薬(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)

2018年12月25日 現在59社

SHINWA

高品質な不織布づくり、半世紀。



5 Technologies of nonwovens

ゆたかな自然と水資源に恵まれた四国の地から、
全国のお客さまへ、
高品質な不織布をお届けしてすでに半世紀。
シンワ株式会社は、時代ごとの市場ニーズを反映した
製品開発をつねに行っています。

シンワ株式会社

<http://www.shinwacorp.jp>

□ 本社 愛媛県四国中央市妻鳥町249-2 ☎799-0113
TEL 0896-58-1100 FAX 0896-58-1106
info@shinwacorp.co.jp

□ 営業所 東京・大阪・名古屋・仙台・福岡

私たちが探求しているのは健康という名の創造力です。



四国全域をカバーするネットワーク

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



alfresa

アルフレッサ篠原化学株式会社

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

事業所／本社	高知県高知市南御座9-41	Tel. 088-882-5000
高知支店	高知県高知市南御座9-41	Tel. 088-882-5000
香川支店	香川県高松市国分寺町福家甲1255-10	Tel. 087-816-2001
愛媛支店	愛媛県伊予市下三谷1-6	Tel. 089-994-8825
徳島支店	徳島県徳島市川内町平石夷野224-29	Tel. 088-678-2201
四万十営業所	高知県四万十市中村東町1-81	Tel. 0880-34-4361
西条営業所	愛媛県西条市飯岡261-10	Tel. 0897-47-5662

これまでも、これからも。
ポリリジンが届ける食の安心と笑顔。

独自のバイオ技術でつくられる保存料“ポリリジン”は、
高い制菌力、安全性、幅広いpH領域での効果などが評価され、
これまで多様なシーンで活躍してきました。
美味しさそのままに、保存性を高める特徴は
近年の“食品ロス”対策にも効果的。
“もったいない”を減らす、新しい食の可能性を
お客様にご提案しております。

パンや惣菜
デザート等に
ガードロング
(グリシン製剤)

サニテーション
等に
ガードパワーアップ
(アルコール製剤)

米飯や
パスタ等に
ガードエース
(酢酸製剤)

他にも豊富なラインナップを取り揃え、様々な用途に対応しております。
詳しくはお問合せください。

優れた技術で、社会の進歩に貢献する先端化学企業。

JNC株式会社

ライフケミカル推進室 www.jnc-corp.co.jp

〒100-8105 東京都千代田区大手町2-2-1 tel.03-3243-6150

科学の未来を創造する。
臨床検査に貢献。
多様化するニーズに対応する。

科学研究と臨床検査機器・臨床検査用試薬の総合商社

日進商事株式會社

本 社 〒780-0901 高知市上町5丁目6番15号
中村営業所 〒787-0019 四万十市具同 8608番地1(3-305)
松山オフィス 〒791-1115 松山市土居町 842-1(201)
T E L(088)822-3141(代) F A X(088)822-3140
<http://www.nisshin-syouji.co.jp>

