

受 賞 講 演

講 演 要 旨

新しい水溶性食物繊維イソマルトデキストリン（ファイバリクサTM）の開発

渡邊 光，谷口美文，井上紳一郎，石田有希（（株）林原）

野菜，果物，海藻やきのこなどに含まれる食物繊維は第六の栄養素とも呼ばれ，生活習慣病の予防に重要な役割を果たすことが知られている。一方で，推奨される量を摂取することは容易ではなく，慢性的な食物繊維不足となっている。従って，食品や飲料に無理なく配合し食物繊維を補給できる素材のニーズはこれまで以上に高まると考えられた。このような状況の中，我々は林原の基幹技術である微生物酵素を用いて，澱粉から食物繊維として機能する新しい糖質素材の開発を試みた。

その結果，土壌由来微生物の一菌株 *Paenibacillus alginolyticus* PP710 の培養上清中に，澱粉から消化酵素耐性の糖質を生成する活性を見出した。この糖質の構造を決定したところ， α -1,6 結合， α -1,3 結合および α -1,3,6 結合を含む，多分岐の α -グルカンであることがわかった。我々は本糖質をイソマルトデキストリン(IMD)と命名した。IMD は基質である澱粉に比べ枝分かれ構造が増加しており，そのため消化酵素に耐性を示すと考えられた。なお，IMD の食物繊維含量は酵素-HPLC 法により約 80%であった。PP710 株の培養上清から IMD の生成に関与する酵素を精製したところ，6- α -グルコシルトランスフェラーゼと α -アミラーゼの2種の酵素が見出され，IMD の生成にはこれら2種の酵素が協同的に作用する必要があることが分かった。我々はこれら2種の酵素を利用して IMD の工業製造プロセスの開発を行い，食品原料としての販売に耐えうるプロセス開発に成功した。

IMD は温和な条件の酵素反応で製造されるため，製品粉末の白度が高い点が大きな特徴である。また，甘さはほとんどなく（砂糖の20分の1程度），水に良く溶けながらもその粘度は低いため，配合される食品や飲料の本来のテクスチャーに影響を与えにくい。また，安定性にも優れており，熱，酸，レトルト，冷凍などの食品加工上の様々なストレスに対しても非常に安定である。さらに，生理作用に関しても多くの検討が行われており，腸内細菌叢改善作用，便秘改善作用，血糖上昇抑制作用，食後中性脂肪上昇抑制作用などの知見が明らかとなっている。IMD は食品加工上の物性・安定性や生理作用の観点から他の水溶性食物繊維にはない価値を提供できる素材として，2015年11月より販売を開始している(商品名：ファイバリクサTM)。現在，色，におい，味の観点から飲料，製菓，乳製品，主食，調理加工品などのあらゆる食品に食物繊維補給や糖質低減目的で IMD の配合が検討されている。また，生理作用を活用した健康訴求目的での配合も可能な素材と考えており，「機能性表示食品制度」にも対応できる素材として鋭意開発を行っている。

水溶性食物繊維の世界市場は今後も成長していくことが見込まれている。日本でも同様の成長が見込まれており，将来性の高い市場であると考えられる。これからもイソマルトデキストリンの独自機能を明らかにしていくことで，更なる市場拡大を実現し，世界中の人々の食と健康に貢献していきたい。

本成果は株式会社林原の多くの方々のご指導とご協力によって得られたものであり，関係したすべての皆様に心より御礼申し上げます。

分裂酵母を用いたコエンザイム Q の合成と機能の解明

戒能智宏（島根大・生資科）

コエンザイム Q（ユビキノン，CoQ）は，原核生物の原形質膜や真核生物のミトコンドリアの電子伝達系で機能し，ATP 生産に関与する非常に重要な物質である。CoQ は，抗酸化剤としての機能を持つことでも知られ，近年では生物種によって異なるものの CoQ が硫化物の代謝やピリミジン合成に関与していることなどの新たな機能も報告され，注目されている。CoQ はキノン骨格とイソプレノイド側鎖から構成される脂溶性の化合物であり，古くからキノン骨格の合成基質は *p*-ヒドロキシ安息香酸（PHB）であることが知られていたが，出芽酵母 *S. cerevisiae* では *p*-アミノ安息香酸（pABA）も基質として利用されることが報告された。われわれヒトは，CoQ₁₀ を自身の細胞で合成することが出来るが，その量は加齢とともに減少する。また，重篤な病気と，CoQ 合成酵素遺伝子の変異による CoQ 量の減少の関係も多数報告されるなど，CoQ 生合成に関する基礎研究は非常に重要である。

本講演では，分裂酵母 *S. pombe* の CoQ₁₀ 合成経路の中間体様物質の同定に関する研究と，細胞内の CoQ₁₀ 量が極微量であるという極めて特徴的な分裂酵母 *S. japonicus* を用いた CoQ の研究について紹介したい。

1. 分裂酵母の CoQ₁₀ 合成経路の中間体様物質の同定

出芽酵母では，CoQ 生合成経路の *COQ1*，*COQ2* を除くどの遺伝子の破壊株でも，初期中間体である 3-hexaprenyl-4-hydroxybenzoate（HHB）が蓄積することが報告されている。これに対して分裂酵母を用いた実験では，*coq7* 破壊株において CoQ 生合成の中間体である 5-demethoxy-ubiquinone₁₀（DMQ₁₀）の蓄積が認められるため，CoQ 合成酵素遺伝子の破壊株を用いて CoQ 合成中間体の同定を LC-MS/MS で行った。その結果，*coq5* 破壊株においては *m/z* 820 [M+H]⁺ とさらに反応が進んだ *m/z* 850 [M+H]⁺ の中間体様物質が，*coq6* 破壊株においては *m/z* 790 [M+H]⁺ と *m/z* 792 [M+H]⁺ の中間体様物質がそれぞれ蓄積することを見出した。また，*coq3*，*coq4*，*coq6*，*coq8*，*coq9* の各破壊株では，培地に PHB を添加した場合と pABA を添加した場合とでは，異なる中間体様物質が蓄積していることを見出した。以上の結果から，*S. pombe* では pABA を基質とする経路と，PHB を基質とする経路が存在すること，および Coq5 の反応までは別々の経路で合成されていることが示唆された。

2. *S. japonicus* を用いた CoQ の研究

分裂酵母 *Schizosaccharomyces* 属には，モデル生物としてよく使用されている *S. pombe* 以外に *S. cryophilus*，*S. octosporus*，*S. japonicus* の 4 種が知られている。*S. pombe* の CoQ 欠損株では，最少培地での生育遅延，呼吸欠損，酸化ストレス感受性，硫化水素の発生など多くの表現型が見られることを明らかにしてきた。一方，*S. japonicus* のゲノム上には既知の CoQ 合成酵素遺伝子がすべて保存されていながら，CoQ は検出されないと報告されている。そこで，実際に CoQ₁₀ 量を測定すると *S. pombe* の約 220 分の 1 という極めて特徴的な性質を発見した。また，培地に [Ring-¹³C₆] PHB や [Ring-¹³C₆] pABA を添加するとこれらを基質として CoQ₁₀ を合成でき，培地に基質を添加することで少ないながらも CoQ₁₀ 量が増加した。次に，*S. japonicus* の性質を調べたところ，酸素消費量はごくわずかであり，嫌気条件での生育がよく，硫化水素発生量が少ないこと，そして *S. pombe* に比べると酸化ストレス感受性を示すことなどを見出した。以上のことから，*S. japonicus* は細胞内の CoQ₁₀ 量が極微量でありながら，*S. pombe* の CoQ 欠損株とは異なる表現型を示すことが明らかとなった。

今後は，機能が同定されていない CoQ 合成酵素遺伝子の解明と CoQ₁₀ を極微量しか合成しない *S. japonicus* の性質の原因の特定に向けた研究を進めていきたいと考えている。

機能未知タンパク質の新規アノテーション手法の開発と産業応用

渡辺誠也（愛媛大院・農）

1950-1980 年代には、ユニークな表現型を持つ微生物の無細胞抽出液中に見られる活性を指標に多くの酵素が精製され生化学的解析がなされてきたが、いまだ正体が分からず残っているものも多い。「リン酸化無しの L-アラビノース代謝酵素群」もその一例で、この代謝様式は後に明らかとなる古細菌由来の特殊解糖経路（Entner-Doudoroff 経路のリン酸化無しバージョン）と反応が（少なくとも一部）相同である。発表者は 2006 年から 2007 年にかけて、その代謝酵素（遺伝子）を世界に先駆けて報告した（*J. Biol. Chem.* 2006, 281, 2612-2623; *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 28876-28888; *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 33521-33536; *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 6685-6695）。細菌や古細菌から L-アラビノースや D-キシロースの類似の経路がその後見つかったが、興味深いことに①相同な反応を触媒する酵素でも進化的に関連性があるとは限らないがタンパク質ファミリーの数は限定されている、②代謝遺伝子はゲノム上でクラスター化している、ことに気づかされた。これを利用することで、酵母菌にありとされていたリン酸化無しの L-ラムノース代謝遺伝子群、さらに報告例すらなかった細菌の D-アラビノース代謝遺伝子群を簡単なバイオインフォマティック解析だけで同定することができた（*J. Biol. Chem.* 2008, 283, 20372-20382; *Sci. Rep.* 2018, *in press*）。本法は糖代謝関連以外にも、コラーゲンやある種のペプチド系抗生物質に特異的に含まれる L-ヒドロキシプロリンの細菌による分解遺伝子群（*J. Biol. Chem.* 2012, 287, 32674-32688; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2017, 82, 110-113）、植物の根頭癌腫病の原因菌のオパイン資化酵素（*PLoS One* 2015, 10, e0138434; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2016, 80, 2371-2375）、プロリンと L-ヒドロキシプロリンの両方を異性化可能な古細菌由来の新規アミノ酸ラセミ化酵素（*PLoS One* 2015, 10, e0120349）、などの発見にもつながっている。

一方で、これらの酵素をコードする遺伝子としては初めての報告ではあるが、予想される経路のイメージとアミノ酸配列の相同性から機能や基質候補の推定が一部可能であり、全く新しい触媒反応の発見は難しい。上記のようにクラスター化している遺伝子の機能には相関があるが、そこには一見すると予想される経路には不必要な遺伝子が含まれる場合がある。例えば、L-ヒドロキシプロリン代謝遺伝子クラスターにある機能未知遺伝子アコニターゼ X (AcnX) はその典型である。AcnX は、（推定）二次構造要素が保持されていたことからアコニターゼスーパーファミリーに最後に加えられたが、一次構造レベルでは相同性がほぼなくアコニターゼ様の活性もない。そこで、あらゆるヒドロキシプロリン異性体を基質候補として与えた結果、AcnX が *cis*-3-ヒドロキシ-L-プロリン (C3LHyp) 脱水酵素として機能することを世界で初めて明らかにした（*Sci. Rep.* 2016, 6, 38720, 2016; *J. Bacteriol.* 2017, 199, e00255）。アミノ酸配列に固執していたならば、C3LHyp を基質として選ぶ必然性は皆無であることは疑いようがない。C3LHyp は、自然界ではテロマイシンという抗生物質に含まれるのみであり、生物学的代謝の多様性を考えるうえでも興味深い。最近成功した X 線結晶構造解析からも、本酵素の驚くべき触媒反応機構が明らかになりつつある（口頭発表参照）。*in vivo* のみならずターゲットタンパク質の立体構造に基づく基質候補化合物のスクリーニングを組み合わせることで、さらに面白い酵素が発見できるに違いない。

基質特異性が高い酵素反応は多くの分野で使われているが、目的の反応を行う酵素がない場合はまったく適応できない。別の言い方をすると、ニーズが高い化学反応（用途）を行う酵素がいまだ未発見であれば大きな技術シーズとなりうる。例えば、前述の L-ヒドロキシプロリンは、コラーゲン量を見積もる指標物質であるだけでなく、血中や尿中における重要なバイオマーカーでもある。そこで、細菌の L-ヒドロキシプロリン代謝に関わる酵素（群）の分光学的活性測定法を応用し、煩雑な HPLC 法に替わる簡便・安価・低環境負荷な定量法を確立した（*J. Biotechnol.* 2015, 199, 9-16; PCT/JP2014/065019）。

シ　ン　ポ　ジ　ウ　ム

講　演　要　旨

ビタミン B₁₂ をめぐる生物間相互作用

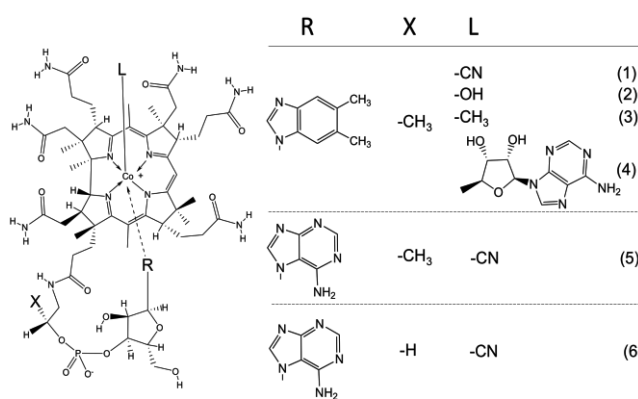
渡邊文雄（鳥取大・農）

ビタミン B₁₂ (B₁₂) はコリン環の中心にコバルトを配位した化合物であり、アデノシルコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキシコバラミン、シアノコバラミンなどがある（図 1）。一般に B₁₂ と言えばシアノコバラミンのことを指すが、生体内で B₁₂ は補酵素のアデノシルコバラミンとメチルコバラミンとして機能する。B₁₂ はある種の細菌やアーキアのみが生合成能を有しており、概して食物連鎖により動物の体内に吸収・蓄積されるため、主として動物性食品に B₁₂ が含まれている。高等植物には B₁₂ の生合成系も B₁₂

依存性酵素も存在しないため、植物性食品には B₁₂ が含まれないと考えられていた。しかし、一部の食用藻類は牛肝臓と同程度の B₁₂ を含んでおり、日本人にとって食用藻類は魚介類と共に B₁₂ のよい供給源となっている。食用藻類から B₁₂ 化合物を単離・同定した結果、一部の藻類には多量の B₁₂ が含まれていたが、藍藻類では哺乳動物において生理的に不活性なシュード B₁₂ が含まれていた（図 1）。紅藻類や緑藻類は概して B₁₂ 要求性・非要求性に関わらず外界（あるいは B₁₂ 合成細菌の共生）から B₁₂ を取込み、メチオニン合成酵素の補酵素として機能する。藍藻類はシュード B₁₂ の生合成能を有し、メチオニン合成酵素の補酵素となる。

近年の分析技術の進歩により、海洋環境科学の分野で B₁₂ がホットな話題になっている。最近の研究では、藍藻類が有光層（～200 m）の主要なシュード B₁₂ 生産者であり、タウム古細菌は深海層の主要な B₁₂ 生産者であることが明らかとなった。これら細菌によって産生された B₁₂ は、植物プランクトンや動物プランクトンを介して稚魚や小魚に濃縮され、イワシ（飼料魚）などの体内に蓄積され、海鳥や海洋哺乳類ならびに大型魚類の餌となる。したがって、我々もまた魚介類を介して深海のタウム古細菌が生産した B₁₂ に依存していることになる。

一方、西洋諸国では、牛乳が最も重要な B₁₂ 供給源であると報告されている。牛や羊は B₁₂ を含まない牧草を主たる食餌とするが、これら動物は様々な微生物（B₁₂ 合成菌を含む）が住む反芻胃を有している。反芻胃で細菌により合成された B₁₂ は、腸で吸収され、血液に移行し、牛の肝臓や筋肉に貯蔵され、乳汁に分泌される。私たちが日常的に摂取する牛肉・牛乳・チーズなど乳製品に含まれる B₁₂ が反芻胃に生息する B₁₂ 合成細菌に由来することを再認識したい。

図1 ビタミンB₁₂化合物の構造

1, ビタミンB₁₂ (シアノコバラミン); 2, ヒドロキシコバラミン; 3, メチルコバラミン;
4, アデノシルコバラミン; 5, シュードビタミンB₁₂; 6, ノルシュードビタミンB₁₂

食事由来フラボノイドの吸収経路と代謝物分布

室田佳恵子（島根大・生資科）

フラボノイドは植物性食品中に豊富に含まれており、様々な疾病に対する予防作用などが期待される機能性成分である。フラボノイドが摂取後に機能性を発揮するためには、期待する活性が吸収代謝後にも維持されていることが必要である。また、標的部位において作用発揮に十分な濃度で存在することも必要である。フラボノイドの構造は多岐に渡るが、最も生体利用性研究が進んでいるのは、フラボノール的一种であるケルセチンである。ケルセチンはタマネギに豊富に含まれるが、その他の多くの野菜や果物にも存在しており、日常的に最も多く摂取しているフラボノイドの1つである。我々のグループでも、ケルセチンを中心にフラボノイドの生体利用性について研究しており、得られる情報は機能性食品の開発や作用機序の解明に役立つことが期待できる。

フラボノイドの基本構造が異なると、吸収性には大きな違いが見られるようである。ヒトにおけるフラボノイドの血中濃度は、ケルセチンやイソフラボンでは最大数 μM になることが報告されているが、代表的な緑茶カテキンであるEGCGやアントシアニン類では、 $0.1\ \mu\text{M}$ 程度かそれ以下の報告が多い。これは、フラボノイドの安定性や水溶性の違いによるものと考えられる。生体利用性研究は、機能性評価と合わせて主に動物実験で行われるが、ほとんどの場合、実験動物はヒトが摂取するよりもかなり大量のフラボノイドを投与されており、動物モデルで見られる機能がヒトでも実際に発揮されるかどうかを考えると、体内濃度という点では多くの場合一致しない。フラボノイドの作用機序は現在でも研究途上の分野であり、細胞レベルや動物レベルでは観察できていない代謝物や相互作用による効果なども存在するかもしれない。

食品からの摂取の際に重要となるのが配糖体の構造である。フラボノイドは植物中ではほとんどが配糖体として存在しているが、配糖体そのまま体内に吸収される例はほとんど報告がない。ケルセチンを用いた研究によると、配糖体のうち、グルコースが結合した分子は小腸上皮に存在するLactase-phlorizin hydrolase (LPH) によって糖鎖の加水分解が起こり、アグリコンとして腸管細胞に取り込まれることが報告されている。また、グルコース配糖体の一部は、小腸のグルコース輸送担体 (SGLT1) によって細胞内に取り込まれた後、細胞質に存在する β -glucosidase (CBG) によって糖鎖の加水分解が起こる場合もある。一方、ルチンなど二糖類（この場合ルチノース）が結合した配糖体や、ガラクトースなどのグルコース以外の単糖類が結合した配糖体の場合、LPHの基質とはならず、腸内細菌の作用によって糖が脱離した後、大腸から吸収が起こる。腸内細菌代謝が起こると、糖鎖の加水分解に加えて、フラボノイド骨格の開裂反応なども起こるため、様々なフェノール酸化合物も異化代謝物として生じることが知られている。これらの異化代謝物もフラボノイドアグリコンと共に吸収され、機能性化合物として体内で作用していると考えられている。

我々のグループでは、ケルセチン配糖体の標品、あるいはタマネギ加工品などを用いて、ラットおよびヒトにおける配糖体の吸収性評価を行ってきた。本講演では、様々なケルセチン配糖体の吸収性に関してこれまで行ってきた研究結果について紹介する予定である。

アスコルビン酸誘導体を用いた基礎研究から応用研究まで

田井章博（県広大・生命環境）

ビタミンCとして知られるアスコルビン酸（AA）は抗壊血病作用、抗酸化作用など多様な生理作用を有している。また、その多様な生理作用より健康食品、医薬品、化粧品などの成分として幅広く利用されている。しかし、AAは、光、熱、酸化に対して極めて不安定で、分解されてしまうため、基礎から応用研究において安定型AA誘導体の利用が有効ではないかと考えられる。

AAは抗壊血病作用など多様な生理作用を有しているが、その生理作用メカニズムは未だ不明な点が多い。その理由の一つは、メカニズム解明に有用とされる細胞などの *in vitro* 評価系においてAAの生理作用を再現できないことである。例えば、AAは免疫賦活作用を示すことが知られているが、*in vitro* で通常の免疫賦活作用物質に見られる様な抗体産生増強作用を示さない。しかし、安定型AA誘導体であるアスコルビン酸2-グルコシド（AA-2G）は、*in vitro* において抗体産生増強作用を示すという報告がある。このAA-2Gの抗体産生増強作用はAA-2G自身によるものではなく、AA-2Gが α -グルコシダーゼにより加水分解されて持続的に生じたAAによるものであった。つまり、AA-2Gの様な誘導体を用いることにより、AAの生理作用を *in vitro* で再現することが可能となった。また、AAの標的分子が不明なことも生理作用メカニズムの解明に至らない理由である。最近、我々はAA標的タンパク質を探索するため、不安定なAAを安定的かつその特徴的な化学構造を維持して固定化したアフィニティーゲルを新たに作製し、AA標的タンパク質候補として酸化型シトクロムcを見出すことに成功している。従って、AA誘導体はAAの生理作用メカニズム解明に利用できるといえる。

AAは極めて不安定であるため、古くより安定型AA誘導体の開発が試みられている。その中で、AA-2Gは、国内で医薬部外品や食品添加物として認可された安定型AA誘導体であり、化粧品や健康食品に広く利用されている。AA-2Gは、生体内で α -グルコシダーゼにより加水分解され、AAを供給するプロビタミンC剤である。我々はAA-2GのプロビタミンC剤としての利用効率を向上させた親油性安定型AA誘導体（6-Acyl-AA-2G）の合成とその生理活性評価を行ってきた。6-Acyl-AA-2Gは、AA-2GのAA側6位の水酸基にC4からC18の偶数の炭素鎖を持つ直鎖飽和脂肪酸またはC6からC16の偶数の炭素鎖を持つ分岐鎖飽和脂肪酸をエステル結合させた一連の誘導体の総称である。6-Acyl-AA-2Gは酵素的に加水分解されてAAとなり、従来から知られているビタミンCの作用を効率よく発揮することを明らかにしている。これまでプロビタミンC剤は、代謝後のAAとしての作用を期待されてきたためか、それ自身の作用についてはほとんど研究されていなかった。AA-2Gや6-Acyl-AA-2GがDPPHラジカルやABTSラジカルカチオンに対して特徴的なラジカル捕捉活性を示すという発見をきっかけに、我々は医薬品応用への可能性を模索するためAA誘導体自体の様々な薬理作用の評価を行ってきた。最近、6-Acyl-AA-2Gのうち、C16の直鎖アシル基を持つ6-sPalm-AA-2Gが脱顆粒抑制活性を発揮し、経皮投与においてマウス受動皮膚アナフィラキシー反応を抑制することを見出した。すなわち、AA誘導体はプロビタミンC剤としての利用だけではなく、AA誘導体自身の示す生物活性から医薬品として利用できる可能性がある。

以上のように、安定型AA誘導体は基礎研究から応用研究まで幅広く利用することができる。今後、さらに優れたAA誘導体が開発され、様々な用途に利用されることに期待したい。

贊 助 企 業 交 流 企 画

講 演 要 旨

アルファー食品と農芸化学会との関わり

矢富伸治（アルファー食品（株））

当社は島根県出雲市大社町に本社を構え、全国の学校給食関連、スーパー関連、非常食関連市場に主に加工米を販売し、その主商品は乾燥アルファ化米です。この加工米はお米を調理後に急速に乾燥させ製造しますので、乾燥後もアルファー化デンプン構造を維持している事から調理時間が短く簡単に炊けます。また水分活性が低いので細菌の増殖を防ぎ、長期保存が可能となります。

研究開発面においては、保存中の加工米品質の変化がどのように生じるからスタートし、米飯の評価方法の研究、商品に応じた加工米の開発、お米の美味しさに関する研究、機能性を付加した加工米の開発、米自体が持つ機能性の研究を行ってまいりました。特にその中でも2002年に「新規機能性を付加した開発研究」にて農芸化学技術賞を受賞させて頂きました。この概要は玄米の中に含まれる3つの機能性成分（ γ アミノ酪酸、イノシトール、オリザノール）を白米に吸収させ加工した米を食すことで、総コレステロールの低減効果を報告したものです。ポイントは見た目、味は白米と同じにし、日々のご飯に普通に食べてもらえるようにしたこと。これを機に農芸化学会には大変お世話になり現在に至ります。また直近は、如何に早く復元するかなどの物理的機能性に着目し商品開発を行っており、農芸化学会を通し新たな商品誕生を夢見しています。

寿製菓株式会社と農芸化学会との関わり

石原朋恵（寿製菓（株）・研究開発部）

弊社は、観光及びギフト市場の焼菓子、餅菓子及び生菓子の製造販売をしています。これらの商品を開発、製造し、流通する過程で、すべてに「農芸化学」が関わっており、日本農芸化学会の学術誌「化学と生物」や講演会で得られる情報は有益であります。弊社が、より一層、農芸化学会に参画するようになったのは 16 年前になります。弊社では、主力商品として「とち餅」を製造販売しておりますが、「とち餅」の原料である栃の実は、古くから健康に良いといわれていたことから、2003 年から島根大学と共同研究を開始し、今日まで継続して共同研究を行っております。2009 年には、日本農芸化学会中四国支部第 12 回市民フォーラム「海の幸・山の幸 新たな機能性発掘～山陰からの情報発信～」に参画させて頂き、「栃の実の健康機能～生活習慣病予防素材としての可能性～」と題した講演をさせて頂きました。この市民フォーラムでは、一般の方々へ栃の実の機能についてお話しすることができ、非常に有意義でした。また、2013 年からは、タデアイについても島根大学と共同研究を行っています。タデアイは、主に藍染めの原料として利用されていますが、一部の地方では食品として利用されています。現在は主に、栃の実及びタデアイのポリフェノール成分の分析と機能について研究しており、これらの研究成果は日本農芸化学会の講演会で発表させて頂いております。また、農芸化学会の講演会では、様々な研究分野の大学や企業の研究者の方々の発表を拝聴することができ、弊社の研究活動に非常に役立っています。弊社にとって農芸化学会は、研究内容の発信及び情報収集のための重要な研究プラットフォームであります。

株式会社サン・クロレラが農芸化学会へ期待すること

藤島雅基（(株) サン・クロレラ・生産開発部）

緑藻類に分類されるクロレラは、たんぱく質、葉酸、ビタミン B₁₂、ルテインに富み、生体へ有益性を示す食品【food】や食物【diet】として利用されているが、未だ健康への有益性の全貌は明らかではない。明らかにする方法として、クロレラは他の食品と同様に種々の栄養素や成分で構成される多成分系であり、生体で示される有益性は生体内外での物理的な刺激や個人の遺伝子特性、時間軸など多因子系の結果に発現するものであると捉えた『複雑系の解析・解釈』を利用することが考えられる。そこで、農芸化学の研究の領域を考えると食品・食物に含まれる生理活性物質の同定・機能性、食品・食物の栄養、感覚（嗜好）、体調調節の機能性の探究以外に、食の文化や選択のための情報提供など生命・食・環境を総合的に包含する基礎科学であり、複雑系の解析・解釈は農芸化学が得意とするものと想像できる。そして、農芸化学がヒトの健康について臨床から評価を担う医師や薬学と連携することで複雑系の解析・解釈から生み出される『食への行動による健康への有益性』のめざましい進展があると考ええる。今後、日本は世界に先駆け超高齢社会を迎え、その対応は各国のモデルケースとなり得ることが予想される。1993 年に Nature で日本の取り組みである Functional Food が紹介されて約 30 年後である現在、新たな食への行動による健康への有益性の概念・評価方法を提唱していくことが健康長寿社会の構築に向けた超高齢社会への対応の 1 つであると考ええる。そこで、農芸化学を担う本会が各種医学会や産官との連携により、食への行動による健康への有益性を国内外へ提唱する主体として発展・拡大することを期待する。

池田糖化工業株式会社と農芸化学会との関わり

竹中 涼（池田糖化工業（株）・研究室）

当社の創業は 1904 年（明治 37 年）で、広島県福山市に本社がある 100 年企業です。1922 年、独自の焙焼技術から生まれる着色料（カラメル）の製造・販売を開始し、現在は国内外 2,000 社を超えるお客様（食品会社）に、最終製品を構成するパーツとして様々な食品の中間原料を製造・販売しています。

当社は、飲料、製菓、外食、コンビニなど、食品業界の様々なニーズにお応えするために、約 200 名の研究開発スタッフを擁しており、また、調味料、甘味料、乾燥食品など幅広い製品を製造するため、スプレードライ、ドラムドライ、フリーズドライ、レトルト、アセプティック殺菌、各種包装設備など、さまざまな設備とノウハウも有しています。

当社の研究部門は、機能性油脂や発酵食品などの本業と関連した食品素材をテーマとする部門と、私が所属する酵素をテーマとする部門に分かれています。酵素部門では、これまでに糖類酸化還元酵素やアミノ酸酸化酵素など、主には臨床検査用の酵素製品を開発してまいりました。

本講演では、当社のご紹介をさせていただくとともに、農芸化学分野の先生方のご指導も頂きながら、当社が開発した「血糖測定用 FAD グルコース脱水素酵素の開発」についてお話させていただきます。

一 般 講 演

講 演 要 旨

A-1 サンゴジュに含まれるビブサニン類のプロテインキナーゼ C 結合活性の評価と結合様式の予測

○植松紗和子, 柳田 亮¹, 三宅翔太¹, 川浪康弘¹, 入江一浩²

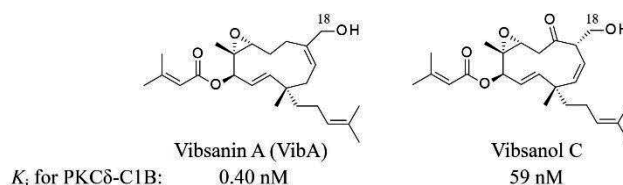
(香川大院・農,¹香川大・農,²京大院・農)

【目的】 Vibsanin A (VibA) はサンゴジュ (*Viburnum odoratissimum*) に含まれるビブサン型ジテルペノイドの一種であり, 最近プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化剤であることが明らかにされた¹⁾。PKC 活性化剤は, がんやアルツハイマー等の難治性疾患に対する治療薬候補の一つとして注目されているが, 多くの天然 PKC 活性化剤は強力な炎症誘導活性を示す。一方, VibA はマウス皮膚において抗炎症活性を示すことから¹⁾, 副作用の少ない新規医薬品シードとして注目されている。しかし, VibA 以外のビブサニン類縁体の PKC 活性化能は不明である。そこで本研究では, サンゴジュに含まれるビブサニン類縁体の単離と PKC 結合能の評価を行った。

【方法・結果】サンゴジュの葉 (乾燥重量: 1.0 kg) のメタノール抽出物を, PKC 結合能等を指標として分画・精製を進め, 既知化合物である VibA および vibsanol C²⁾ を単離した。Vibsanol C の PKC 結合能は, VibA と比べて 100 倍以上低かった。この結果は, 18 位水酸基の空間配置が PKC との水素結合に重要であることを示唆している。分子モデリングによる VibA と PKC δ C1B ドメインとの推定結合様式についても報告する。

1) Yu, Z.-Y. *et al.*, *Cancer Res.* **2016**, 76, 2698-2709.

2) He, J. *et al.*, *Fitoterapia* **2016**, 109, 224-229.



A-2 ミトコンドリア膜表在性リモデリング酵素タファジンにおけるエーテル型 PC の基質認識

○安部真人, 千ヶ崎修平¹, 奥 公秀¹, 阪井能義¹, 三芳秀人¹

(愛媛大院・農,¹京大院・農)

【目的】ミトコンドリアは, 中性リン脂質ホスファチジルコリン (PC) と陰性リン脂質カルジオリピン (CL) から成るミトコンドリア膜を有している。ミトコンドリア膜では, 絶え間ない脂質の代謝によって脂質組成の恒常性が保たれると考えられているものの, その分子機構は不明である。CL の生合成では, 一旦は飽和脂肪酸を有する分子種が生成されたのちにタファジンによる PC とのリモデリングによって不飽和脂肪酸を獲得する。本研究ではこのタファジンの分子認識を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】これまでに確立した CL 全合成の手法を応用してエーテル型 PC を含む一連の PC 類縁体を合成し, タファジンのアシルドナーとして用いることとした。また, タファジンのアシルアクセプターとしては CL のアシル鎖を加水分解して得たリゾ CL を調製した。得られた PC 類縁体とリゾ CL を用いてエクストルージョン法によってリポソームを調製することでミトコンドリア膜のモデル系とした。別途, 酵母由来タファジンを GST 融合タンパクとして大腸菌に発現させ, アフィニティ精製を行うことで精製タファジンを準備した。任意の脂質組成で調製したリポソームに対し, 精製タファジンを添加して進行するトランスアシル化反応を生成 CL および PC 類縁体の定量によって評価した。脂質定量は ion pair HPLC-ELSD を用い, 標品となる CL および PC 類縁体の検量線を作成して行った。その結果, エーテル型 PC を用いた場合にはリゾ CL 同士のトランスアシル化が進行することが初めて分かった。

A-3 アスコルビン酸標的タンパク質の探索のためのアフィニティーゲルの創製
○岩岡裕二, 西野耕平¹, 石川孝博¹, 伊東秀之², 澤 嘉弘¹, 田井章博
(県広大・生命環境, ¹島根大・生資科, ²岡山県大・保健福祉)

【目的】アスコルビン酸(AA)は抗壞血病作用, 抗酸化作用など多種多様な生理作用を有するが, その生理作用メカニズムは不明な点が多い。その一因として, 化学的に不安定な AA をメカニズム解明に有効な *in vitro* 系で評価することが困難であるためとされる。また, AA はその化学構造を認識する種々のタンパク質と関連し, 生理作用を発揮する場合があることから, *in vitro* 系における AA 標的タンパク質の探索は AA の生理作用メカニズムの解明へ有効であると考えられる。本研究では, 不安定な AA を安定的かつその特徴的な化学構造を維持して固定化したアフィニティーゲル(AA ゲル)を作製し, 作製した AA ゲルを用いて, AA 標的タンパク質の探索を行った。

【方法・結果】AA の特徴的な化学構造をタンパク質から認識させるべく, 誘導体化した AA を用いて, 固定化位置の異なる 2 種の AA ゲルを作製した。次に, 両 AA ゲルにマウスの脳ホモジネートを供し, 吸着したタンパク質を nanoLC-MS/MS で解析したところ, 両 AA ゲルへの特異的結合タンパク質としてシトクロム c (cyt c)が検出された。また, 活性中心の鉄イオンの酸化還元状態の異なる酸化型(Fe^{3+})及び還元型(Fe^{2+}) cyt c の内, 酸化型 cyt c にのみ両 AA ゲルは結合した。そこで, 酸化型 cyt c に対する還元効率を AA とその他還元剤で比較した結果, AA が最も高いことから, AA は酸化型 cyt c と特異的に結合することで効率的に還元することが示唆された。以上から, 本研究で新たに作製した 2 種の AA ゲルを用いて, AA 標的タンパク質の候補として酸化型 cyt c を同定した。

A-4* リンカー構造の異なる新規アスコルビン酸固定化アフィニティーゲルの作製とタンパク質結合性評価
○竹元 聡, 岩岡裕二, 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】多様な生理作用を有するアスコルビン酸 (AA) の作用機構を明らかにするために, 我々は AA 誘導体を固定化したアフィニティーゲル (AA ゲル) を用いて, AA の標的タンパク質の探索を行っている。しかし, AA ゲルに関して, リンカー構造 (結合様式やスペーサー長) の違いがタンパク質との結合性に与える影響を検討していない。そこで, 本研究ではこれまでに作製した AA ゲルのリンカー構造を変更した AA ゲルを作製し, リンカー構造の違いがタンパク質との結合性に与える影響を検討した。

【方法・結果】先行研究で作製した結合様式がアミド結合である AA-N (11)-ゲル (スペーサー: 11 原子) とは異なるリンカー構造を有する AA ゲルの作製のために, 新たに 2 種類の AA 誘導体を合成し, ゲルへの固定化を行った。これにより, 結合様式がアミド結合でスペーサーを伸長した AA-N (14)-ゲル (スペーサー: 14 原子) および結合様式がエーテル結合でスペーサーを伸長した AA-O (14)-ゲル (スペーサー: 14 原子) を作製した。作製したゲルに対して, 先行研究で AA-N (11)-ゲルとの結合性が確認された酸化型シトクロム c (酸化型 cyt c) を供し, 結合性を評価した。その結果, AA-N (14)-ゲル, AA-O (14)-ゲルは酸化型 cyt c との結合性を示したが, 従来の AA-N (11)-ゲルより結合性が低くなった。また, AA-O (14)-ゲルは AA-N (14)-ゲルよりも酸化型 cyt c との結合性が高かった。したがって, 酸化型 cyt c に関しては AA ゲルの結合様式やスペーサー長の違いが結合性に影響を与えることが明らかとなった。

A-5* PC12 細胞において神経突起形成促進作用を示す鶏冠加水分解物由来物質
○古賀武尊, 伊東秀之¹, 若山祥夫², 田井章博
(県広大・生命環境, ¹岡山県大・保健福祉, ²(株)らいむ)

【目的】近年, 高齢化に伴いアルツハイマー型認知症などの認知症患者が増加傾向にある。アルツハイマー型認知症患者は, 神経細胞の生存, 分化, 再生を促進させる神経成長因子 nerve growth factor (NGF) が不足している。そのため, NGF は治療薬への応用が期待されたが, 高分子であるため, 血液脳関門を通過できない。そこで, NGF 様作用または NGF 作用の増強効果を示す低分子化合物の探索研究が進められている。本研究では鶏冠を食物由来のプロテアーゼを含む酵素類によって分解処理した鶏冠加水分解物に着目し, 鶏冠加水分解物の脂溶性画分に含まれる神経突起形成促進作用を示す化合物の単離, 同定を目的とした。

【方法・結果】本研究では, NGF と同様に PC12 細胞の神経突起分化を促す dibutyl-cAMP (Bt2cAMP) を用いて, 鶏冠加水分解物に含まれる神経突起形成作用の増強効果を示す化合物の探索を行った。まず, 鶏冠加水分解物をエタノール沈殿させ, 得られた上清からエタノールを除去した。その後, 酢酸エチルで分液し, 酢酸エチル層をカラム精製した結果, Bt2cAMP 誘導下で神経突起形成を促進する化合物を単離した。活性化合物は NMR と MS による構造解析の結果, β -sitosterol と同定された。また, β -sitosterol の神経突起形成について今まで報告がないため, β -sitosterol 類似体である, stigmaterol, cholesterol, campesterol を用いて構造活性相関を検討した。その結果, 22 位の二重結合は活性に影響しないことと, 24 位側鎖の長さ依存的に活性が増強されることが明らかとなった。

A-6* 3-アルキルアスコルビン酸の脱顆粒抑制活性
○前 史織, 大野朝子, 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】アスコルビン酸は親水性であり, 熱や光に対して不安定であるため, 脂溶化や安定化を目的とした様々なアスコルビン酸誘導体の開発が行われている。アスコルビン酸誘導体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。代表的な 3-アルキルアスコルビン酸である 3-O-ethylascorbic acid (3-O-ethylAA) は美白剤として利用されている。しかし, 3-アルキルアスコルビン酸の生物活性はほとんど研究されていない。そこで, 3-アルキルアスコルビン酸の生物活性を見出すことを目的として 3-アルキルアスコルビン酸の脱顆粒抑制活性評価を行った。

【方法・結果】炭素数 4, 8, 12, 16, 18 のアルキル鎖を有する 3-O-アルキルアスコルビン酸の合成をし, ラット好塩基球性白血病細胞(RBL-2H3)を用いた脱顆粒抑制活性評価を行った。その結果, 炭素数 12 の 3-O-dodecylAA と 16 の 3-O-hexadecylAA に有意な活性が認められ, 3-O-dodecylAA が最も強い脱顆粒抑制活性を有することが明らかになった。さらに, 最も強い活性を示した 3-O-dodecylAA を用いてアスコルビン酸とアルキル鎖の結合を介する原子が活性に及ぼす影響を明らかにすることにした。アスコルビン酸とアルキル鎖の O 原子を介した結合から N 原子を介した結合に変換した 3-amino-N-dodecylAA を合成し, 脱顆粒抑制活性評価を行った。その結果, 3-O-dodecylAA と 3-amino-N-dodecylAA は同等の活性を示した。従って, 炭素数 12 の 3-dodecylAA が最も強い脱顆粒抑制活性を示し, アスコルビン酸とアルキル鎖の結合を介する原子は活性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

A-7*

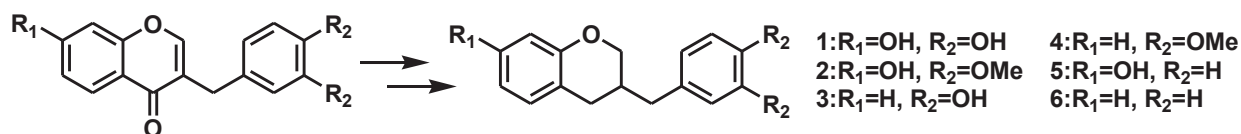
Dracaena cambodiana から単離された AChE 阻害活性を示すホモイソフラバン 及びその類縁体の合成と生物活性

○藤田健太郎, 大内秀一¹, 野下俊朗²,

(県広大院・生命シ,¹ 近畿大・薬,² 県広大・生命環境)

【目的】*Dracaena cambodiana* から単離されたホモイソフラバン(**1**)はアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害活性を示すことが報告されている¹⁾。本化合物と認知症治療薬ドネペジルとの構造の類似性より、その構造と活性との関連性は興味を持たれる。そこで、ホモイソフラバン類の構造と AChE 阻害活性の相関関係を明らかにすることを目的とし、化合物(**1**)とその類縁体を合成する。

【方法・結果】2',4'-Dihydroxyacetophenone と 3,4-dimethoxybenzaldehyde を原料とし、Gan らの方法²⁾を用いてホモイソフラボンへと導き、続く接触水素添加反応と脱メチル化反応により目的としたホモイソフラバン(**1**)を合成した。同様の方法を用いて類縁体 **2-6** の合成も行った。現在、得られたホモイソフラバン類及びホモイソフラボン類を用いた生物活性試験を検討中である。



1) Fei-Xiang Li, *et al.*, *J. Asian Nat. Prod. Res.*, **20**, 55-61, (2018)

2) Li-She Gan, *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1441-1445, (2017)

A-8*

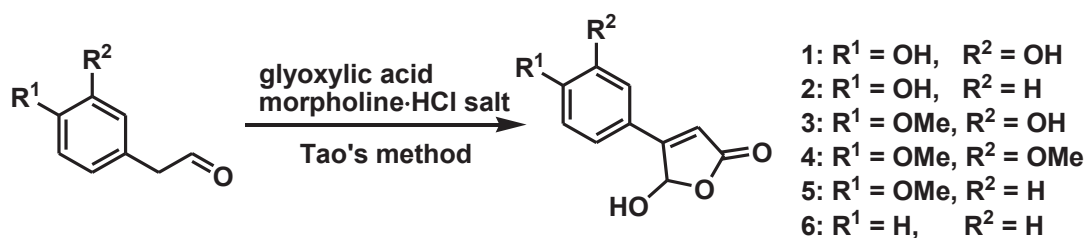
Bracteanolide A 及びその類縁体の合成と生物活性

○田邊 聖, 三浦香織, 大内秀一¹, 田井章博², 野下俊朗²

(県広大院・生命シ,¹ 近畿大・薬,² 県広大・生命環境)

【目的】ムラサキオモト(*Tradescantia spathacea*)から単離された bracteanolide A(**1**)は PTP1B 阻害活性を示すことが報告¹⁾されている。Bracteanolide A と同じ骨格を有する hydroxybutenolide(**2**)はミズゴケの一種(*Sphagnum* sp.)や霊之(*Ganoderma lucidum*), クレマチス(*Clematis aethusifolia*)など幅広い生物種から単離されているが、その生物活性に関する報告は少ない。そこで我々はこれまでに合成例のない **1** と **2** を合成し、さらにその類縁体 **3-6** を用いて構造活性相関を解明することとした。

【方法・結果】オイゲノール及び 2-(4-hydroxyphenyl)ethanol からそれぞれ調製したフェニチアルデヒドを Tao らの方法²⁾を用いてラクトン化し、目的とした **1** 及び **2** の合成を達成した。同様の方法を用いて類縁体 **3-6** の合成も行った。現在、得られた化合物を用いて PTP1B 阻害活性試験を検討中である。



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

【目的】演者らは、希少糖 D-アラビノース (D-Ara) が線虫 *Cenorhabditis elegans* の成長を強く阻害することを報告した。しかし、その作用メカニズムは明らかではない。線虫体内に取込まれた D-Ara はリン酸化され D-アラビノース 5-リン酸 (D-Ara-5P) となり、それが糖代謝酵素を阻害し、その結果、成長阻害を示すと推測した。D-Ara 成長阻害活性は、線虫培地への D-フルクトース (D-Fru), あるいは D-リボース (D-Rib) 添加で打ち消されることから、その阻害活性は D-Fru と D-Rib 代謝に関連することが予想された。そこで、D-Ara-5P の標的酵素として解糖系のグルコースリン酸イソメラーゼ (GPI) およびペントースリン酸経路のリボースリン酸イソメラーゼ (RPI) に注目し、それぞれについて酵素阻害実験を行なった。

【方法・結果】粗酵素溶液として *C. elegans* 成虫のホモジネートを使用した。①GPI 阻害実験：基質 D-Fru-6P, 阻害剤 D-Ara-5P と粗酵素を Tris-HCl 緩衝液中で反応させた (pH 8.0, 30°C)。生成した D-Glc-6P を酵素的定量法で分析し、反応を解析した。その結果、D-Ara-5P は GPI を弱く阻害することが判明した。②RPI 阻害実験：基質 D-Rib-5P, 阻害剤 D-Ara-5P と粗酵素を Tris-HCl 緩衝液中で反応させた (pH 7.5, 30°C)。生成した D-リブロース 5-リン酸をプレカラム蛍光標識 HPLC 法により定量分析し、反応を解析した。その結果、D-Ara-5P は RPI を顕著に阻害することが明らかになった。D-Ara には GPI, RPI 阻害活性はなかった。D-Ara による成長阻害は、D-Ara-5P が GPI と RPI を阻害することでエネルギー産生と D-Rib (核酸) 合成を抑制することにより起きる可能性が示された。

B-1* 1,4-ベンゾジオキサン環を有する幼若ホルモンアンタゴニストの合成と構造活性
相関
○末吉歩夢, 山田直子, 古田賢次郎 (島根大・生資科)

【目的】幼若ホルモン (JH) は、昆虫において脱皮・変態や生殖腺成熟など多様な生理作用に関与する重要なホルモンであり、その受容体である Methoprene-tolerant は、JH のシグナル伝達を特異的に制御することから、新たな昆虫成育制御剤の標的分子として注目されている。これまでに当研究室で合成された NY52 は、*in vivo* および *in vitro* において、高い JH アンタゴニスト活性を示すことを見出している。そこで、本研究では NY52 をリード化合物として誘導体の合成を行い、その生理活性を評価することで、構造と生理活性の関係を検討した。

【方法・結果】NY52 の 1,4-ベンゾジオキサン環 7 位のベンジルオキシ基に着目して、様々な置換基に導入した誘導体を合成し、それらの *in vivo* における抗 JH 活性をカイコ幼虫に対する早熟変態誘導活性試験で評価した。その結果、NY52 の 4-メトキシカルボニル基をメチル基、クロロ基、シアノ基、トリフルオロメチル基に改変してもいずれも活性の低下が見られ、二置換体では活性がさらに低下した。さらに、*in vitro* における JH アンタゴニスト活性を JH 応答配列を用いたレポータージーンアッセイによって評価したところ、*in vivo* と同様の構造活性相関が得られた。これらの結果から、NY-52 のベンジルオキシ基の置換基は 4-メトキシカルボニル基が最適であることが明らかになった。

B-2* 不飽和結合を有する置換基または含フッ素置換基をもつイミダクロプリド類縁
体の受容体親和性と殺虫活性との相関関係
○松原祐佳, 釘屋敦基, 山内 聡, 西脇 寿 (愛媛大院・農)

【目的】イミダクロプリドのニトロメチレン体 (CH-IMI) のイミダゾリジン環エチレン部位における構造活性相関を解析するために、同部位に様々な置換基を立体選択的に導入した類縁体が合成され、それらのイェバエに対する受容体親和性ならびに殺虫活性が評価されてきた。その結果、置換基の物理化学的性質により生物活性が大きく変動することが明らかとなった。一方、モデル受容体との *in silico* docking study により、リガンド結合領域にこれら置換基と相互作用し得る空間が存在していることが示唆されている。本研究では、生物活性に影響をおよぼすこの置換基に関する構造活性相関をより詳細に解明するために、不飽和結合を有する置換基ならびに含フッ素置換基を導入した類縁体を不斉合成し、その生物活性を評価した。

【方法・結果】(S)-Garner's aldehyde または (R)-N-glycidyl phthalimide を原料として、vinyl 基、1-propenyl 基、propargyl 基、methylthioethenyl 基などの不飽和結合を有する置換基ならびに monofluoromethyl 基などの含フッ素置換基を導入した CH-IMI 類縁体を合成した。得られた各種類縁体の受容体親和性は、 $[^3\text{H}]$ イミダクロプリドを用いた競合的結合阻害実験により結合阻害定数 (K_i (nM)) を算出した。殺虫活性は、共力剤 (PBO, NIA16388) 処理時ならびに未処理時における 50% 効果薬量 (ED_{50} (pmol/fly)) を算出した。本研究により得られた化合物を含む CH-IMI 類縁体の各生物活性間の相関関係を解析したところ、不飽和結合を有する置換基をもつことは CH-IMI 類縁体の殺虫活性において有利となることが示唆された。

B-3*

Bacillus subtilis が生産する殺虫成分の単離

○鈴木翔太, 花崎健吾¹, 西脇 寿¹ (愛媛大・農, ¹愛媛大院・農)

【目的】 害虫を標的とした微生物農薬は, 人や環境に対して安全性が高く, 抵抗性種が出現しにくい利点があるものの, 上市している種類は少なく, 新規開拓が急務である。その中, 新規微生物農薬の探索源として肉食性昆虫の共生微生物に着目した研究がすすめられ, ハスモンヨトウに対して殺虫活性を示す *Bacillus subtilis* A1-3 株が単離された。この菌株が生産する殺虫成分を特定し, その安全性が確認できれば, 新規微生物農薬として役立つことが期待できる。本研究では, この菌株が生産する殺虫成分を単離し, その構造を解明することを試みた。

【方法・結果】 *B. subtilis* A1-3 株を SCD 培地で振とう培養し, 遠心分離により菌体と上清に分画した。アカイエカ 3 齢幼虫およびイエバエ成虫に対する殺虫活性を評価したところ, 両画分に殺虫効果が認められた。なお, イエバエ成虫には即効的な効果が確認され, アカイエカ 3 齢幼虫には 24 時間以内に効果が確認された。次に, 上清から硫安沈殿や各種カラムクロマトグラフィーを用いて殺虫成分を精製することを試みた。その結果, イエバエ成虫とアカイエカ 3 齢幼虫に効果を発揮する殺虫活性成分は異なる分子量を有することが確認された。イエバエ成虫に殺虫活性が認められた画分を回収し, MALDI-TOF/MS によりその質量を解析したところ, 約 3 kDa であることが明らかとなった。

B-4*

ハイブリッド型コンドロイチン硫酸オリゴ糖の合成

○上村明寿美¹, 松下健也², 中田有美³, 武田-奥田尚子⁴, 田村純一^{1,2,3,4}

(¹鳥取大院・農, ²鳥取大院・工, ³鳥取大・地域環境, ⁴鳥取大・農)

【目的】コンドロイチン硫酸 (CS) は, D-グルクロン酸 (GlcA) と N-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) で構成される二糖ユニットが繰返しからなる直鎖状多糖であり, 硫酸基の結合する位置や数によって CS-O, -A, -D などの型に分類される。通常, 単一な硫酸化パターンのみで構成される合成 CS オリゴ糖を使用した生理活性分析が行われる。しかし, 生体内に存在する CS は様々な硫酸化パターンをもつ二糖ユニットがランダムに結合しており, 同一の型で構成されていない。そこで本研究では, より天然に近い糖鎖を研究するため, D 型と A 型からなる CS-DA ビオチン化四糖の合成を行った。

【方法・結果】 ビオチン化 CS-DA 四糖を合成するには, 3 か所の水酸基を硫酸化する必要がある。予備実験から, CS-D オリゴ糖の GalNAc 6 位水酸基と GlcA 2 位水酸基を同時に硫酸化すると反応が途中で停止することがわかっている。そのため, 化学的にオルソゴナルな関係にある二種の保護基をそれぞれの位置に使用した CS-D 二糖ユニットを合成した。得られた CS-D 二糖ユニットは, 数工程を経て CS-D 二糖供与体へと誘導し, 別途合成した CS-A 二糖受容体と縮合した。その結果, β 選択的に CS-DA 四糖保護体の合成に成功した。また, 二糖同士の縮合収率を向上させるため検討した保護基の組合せについてもあわせて報告する。

B-5*

O-マンノシルグリカン部分構造Xyl β 1-4Rbo5Pの合成 ○田村敬裕, 田村純一¹ (鳥取大院・農, ¹鳥取大・農)

【目的】ジストログリカン(DG)はジストロフィン-糖タンパク質複合体の成分として骨格筋に存在する。DGは α と β の二つのサブユニットからなり、 α -DGは高度に糖鎖で修飾されている。O-マンノシルグリカンは α -DGを修飾する糖鎖の一つであり、その糖鎖修飾は筋ジストロフィー症と密接な関係にある。最近、O-マンノシルグリカンのcore M3の全体構造が報告された¹⁾。我々はcore M3中に含まれる還元側のキシロース(Xyl)残基に着目した。還元側のXylはリビトール(Rbo)に β 1-4結合しており、GlcAはこのXylに β 1-4結合している。そして、xylosyltransferaseであるTMEM5はcore M3上に連続して二つあるRbo5Pのうち非還元側だけを受容体として認識する²⁾。本研究ではcore M3の再構築による構造決定とXyl転移酵素の基質特異性などの生合成機構の解明のため、core M3の部分構造を精密化学合成する。

【方法・結果】Riboseから1位と4位水酸基が遊離のRbo誘導体を7段階で合成し、その1位水酸基をTBDPSで保護した。これにxylosyl chlorideをAgOTfとcollidine存在下、1,2-dichloroethane中で縮合させることで β 選択的にXyl1-4Rboを高収率で得た。保護二糖Xyl β 1-4RboのXyl残基は安定な1CとC1の配座異性体で構成されていた。その後、リン酸化および適切に脱保護を行うことで標的化合物を得た。標的化合物のXyl残基はC1formのみで得られた。

1) M. Kanagawa *et al.*, *Cell Rep.*, **2016**, 14, 2209-2223. 2) H. Many *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **2016**, 291, 99-111.

B-6*

シアル酸 1 位置換誘導体の合成研究

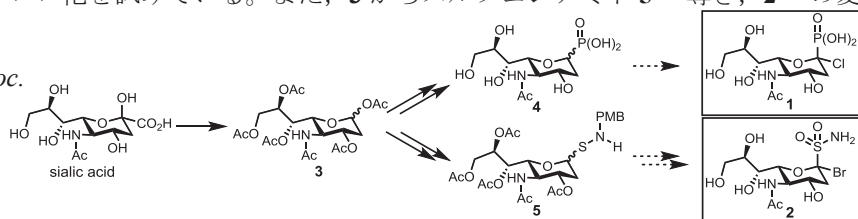
○松本達磨, 武藤千明, 森さおり, Christopher J. Vavricka¹,
蓮沼誠久¹, 泉 実, 清田洋正 (岡山大院・環境生命, ¹神戸大院・イノベ)

新規なインフルエンザ治療薬の開発はパンデミックに備えるため重要な課題である。これまで、ウイルスの出芽段階で機能するシアリダーゼを標的とした創薬展開の結果、リレンザ、タミフル等が上市されてきたが、抵抗性株の出現や異常行動などの副作用が問題となっている。これら市販薬を中心に、酵素基質であるシアル酸を鋳型とする構造改変が行われてきたが、1位カルボキシ基に関しては、ホスホノ基への変換が有望と報告があるのみであった¹⁾。電子求引性の大きいホスホノ基への置換は、シアリダーゼの活性中心に存在する三つのアルギニン残基とのイオン結合性を高める効果がある。我々は、さらに電子求引性の大きいスルホ基へ置換し、より強力な酵素阻害活性を示すことを明らかにした²⁾。そこで本研究では、結合能の向上を目的にホスホン酸 **1** とスルホンアミド **2** を設計し、合成を試みた。

シアル酸を出発物質としてアセチル化を行い、アセタート **3** を得た。**3** に対しホスホノ基を導入することでホスホナート **4** に対するクロロ化を試みている。また、**3** からスルフェンアミド **5** へ導き、**2** への変換を検討中である。

1) J. J. Shie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 17959.

2) C. J. Vavricka *et al.* *Sci. Rep.* **2017**, 7, 8239.



B-7 外部寄生虫薬フルララネルの活性発現に重要な役割を果たす GABA 作動性 Cl⁻チャネルのアミノ酸残基の同定

○山藤康平, 旭 美穂¹, 小林正樹¹, 尾添富美代², 尾添嘉久²
(島根大院・自然科学,¹日産化学・生科研,²島根大・生資科)

【目的】フルララネルは, GABA 作動性 Cl⁻チャネル (GABACl) に対して強いアンタゴニスト作用を示すイソキサゾリン系外部寄生虫薬である。この外部寄生虫薬は, 既存 GABACl アンタゴニストとは作用点が異なると考えられているが, 正確な結合部位は明らかになっていない。本研究では, フルララネルが相互作用する GABACl のアミノ酸残基を同定することを目的とした。

【方法・結果】イエバエ (*Musca domestica* L.) GABACl サブユニット境界面の第 1 (TM1) および第 3 (TM3) 膜貫通領域に存在するアミノ酸残基に注目し, Q271L, I274A, I274F, D329G, G333S, G333M, および F336L 変異体をコードする cDNA を作製した。これらを鋳型として合成した cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞にインジェクションし, 二電極膜電位固定法を用いて, 発現したチャネルのアゴニスト (EC₅₀ 濃度) 応答電流を阻害するフルララネルの活性 (IC₅₀ 値) を測定した。

Q271L 変異体ではフルララネル感受性が約 60 倍低下した。I274A, I274F 変異体は野生型と同程度のフルララネル感受性を示した。D329G 変異体は機能発現できなかった。G333S, G333M 変異体ではフルララネル感受性が著しく低下し, IC₅₀ 値が求められなかった。F336L 変異体は自然開口チャネルを形成し, 解析不能であった。以上の結果から, GABACl のサブユニット境界面に存在する TM1 Q271 と TM3 G333 がフルララネルの活性発現に重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後は, これらのアミノ酸残基がフルララネルの結合に直接関わっているか明確にする必要がある。

B-8 連続分岐構造を有する LPS 内部コア 6 糖の合成

○一柳 剛, 成木裕文, 大谷直輝 (鳥取大・農)

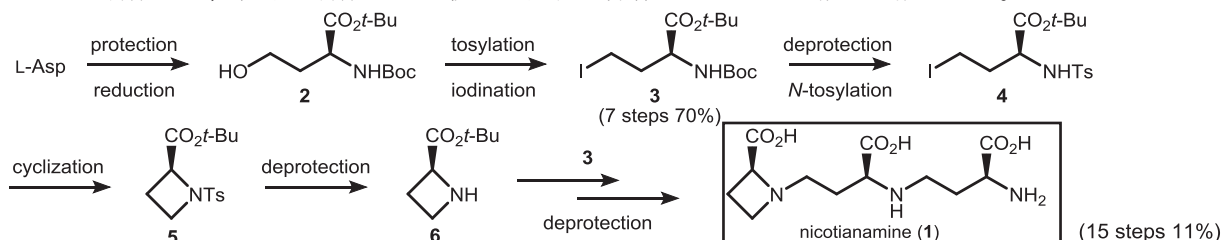
【目的】リポ多糖(LPS)はグラム陰性菌が細胞外膜に産生する複合糖脂質である。LPS は O 抗原多糖が構造の変異が少ないコア糖鎖を介して Lipid A に結合した構造である。LPS は免疫原性を示すが, このうちコア糖鎖を認識するヒト抗体が見いだされたことから, コア糖鎖がワクチン開発の標的分子として注目されている。我々は *Neisseria* 属をモデルとしてコア糖鎖の効率的合成法の開発に取り組んでいる。本研究では, 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) の 2 糖受容体と中性オリゴ糖供与体とのブロック縮合によるコア糖鎖合成を試みた。

【方法・結果】オリゴ糖供与体として Heptose 上の保護基が異なる直鎖型, および分岐型糖鎖を作成し, Kdo 2 糖受容体との縮合反応を試みた。直鎖オリゴ糖供与体では結合位置, 保護基の種類を問わずブロック縮合が可能であった。加えて分岐オリゴ糖供与体との縮合も良好な収率で得られ, 連続分岐したオリゴ糖の合成が達成できた。糖水酸基の保護基の除去においては, イソプロピリデン基の酸加水分解, エステル保護基をアルカリ加水分解したのち, 水素化分解によるベンジル保護の除去を行うことが効率が良かった。

B-9 植物が生産する金属輸送物質 Nicotianamine のプロセス化学研究
 ○脇坂暁介, 高石茂宏, 清田洋正, 泉 実 (岡山大院・環境生命)

【目的】タバコの葉から単離された nicotianamine (1) は, 植物体内で鉄や銅, 亜鉛などの金属イオンを植物体内に輸送するキレーターとして働くことが分かっている。本研究では, 1 のキレート様式や機能, 構造活性相関の解明に向け, 試料供給のための大量合成法の開発を目的とした。

【方法・結果】1 の 3 つのアミン部位に共通なホモアラニン骨格を共通の合成中間体から導くため, 安価な L-Asp を出発物質に選んだ。L-Asp の選択的保護と還元によって 2 へと変換し, さらに *O*-Ts 化に続くヨウ素化を経て, 合成中間体 3 を得た。次に, 3 の Boc 基を Ts 基にかけ替えて 4 に変換後, Cs₂CO₃ を作用させ, アゼチジン-2-カルボン酸誘導体 5 を定量的に得た。Ts 基を脱保護した 6 に対し 3 を順次 *N*-アルキル化させ, 脱保護を経て, 1 の合成を達成した。この合成経路は単一の出発物質 (L-Asp) から 1 を合成でき, 従来の合成法と比較して簡便な操作でコストを大幅に削減できた。



C-1*

Saccharomyces cerevisiae 由来 alcohol dehydrogenase 6 は 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid の還元を触媒する

○松川加奈, 巻尾沙織, 仁戸田照彦, 守屋央郎¹, 神崎 浩
(岡山大院・環境生命, ¹岡山大・異分野コア)

【目的】我々は *Saccharomyces cerevisiae* がオリーブ葉抽出物中の 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid (3,4-DHPEA-EA) の還元を触媒し, reduced 3,4-DHPEA-EA が生成することを見出した¹⁾。 *S. cerevisiae* に存在する多くの酸化還元酵素のうちどの酵素が本反応を触媒するのかプラスミド pTOW を用いて各候補酵素を高発現させた菌体の反応により検証したところ, 複数の酵素が還元を触媒する可能性が示された²⁾。本研究ではその中で alcohol dehydrogenase 6 (Adh6) の精製を行い, 目的の反応が確認されるか検証した。

【方法・結果】Adh6 を GST 融合タンパク質として電気泳動的に単一にまで精製した。また, 3,4-DHPEA-EA をオリーブ葉抽出物から固相抽出によって精製した。NADPH 存在下で 3,4-DHPEA-EA を基質とした反応を行ったところ, NADPH の減少が観察され, GST-Adh6 は NADPH 依存的に 3,4-DHPEA-EA の還元反応を触媒することが明らかとなった。このときの還元活性は芳香族アルデヒドである cinnamaldehyde を基質としたときの約 4% であった。この反応液を HPLC 分析に供したところ, reduced 3,4-DHPEA-EA の生成とそれに伴う 3,4-DHPEA-EA の減少が確認された。以上のことから, GST-Adh6 は NADPH 依存的に 3,4-DHPEA-EA の還元を触媒して reduced 3,4-DHPEA-EA が生成することが初めて確認された。今回, GST-Adh6 が cinnamaldehyde や benzaldehyde の還元反応に加えて, 3,4-DHPEA-EA の還元も触媒することから, 比較的高い置換基を持つアルデヒドも基質として認識することが証明された。

¹⁾神崎, 仁戸田, *Fragrance J.*, **63** (2008) ²⁾巻尾ら, 日本農芸化学会中四国支部第46回講演会要旨集, p.54 (2016)

C-2*

抗腫瘍性酵素 L-リシン α-オキシダーゼ活性中心残基への変異導入による基質認識機構の解析

○松本侑也, 天野万里, 北川雄輝¹, 今田勝巳¹, 根本理子, 日下部均², 田村 隆, 稲垣賢二 (岡山大院・環境生命, ¹阪大院・理, ²エンザイム・センサ)

【目的】L-リシン α-オキシダーゼ (LysOX) は L-リシン (L-Lys) の酸化的脱アミノ化反応を触媒する L-アミノ酸オキシダーゼ (LAO) の一種である。本酵素は抗腫瘍性を有する上, 基質特異性が厳格であるため L-Lys の微量定量に有用であり, バイオセンサー等としての活用が期待されている。本酵素についてはこれまでに放線菌と大腸菌において異種発現系が構築され, Native 酵素の X 線結晶構造解析に成功している¹⁾。また基質複合体の構造解析から D212 および D315 残基が基質と相互作用していることが明らかになっている。今回は, 基質認識に関与していると考えられるこれら両残基に変異導入を行い, 基質認識機構の解析を目指した。【方法】部位特異的変異は D212, D315 残基を Ala 置換した変異導入プライマーを用いたクイックチェンジ法で行った。活性測定は反応産物 H₂O₂ の定量によって行った。【結果】D212A, D315A 変異酵素では野生型 LysOX と比較して比活性や k_{cat}/K_m 値の減少が確認されたものの, 基質特異性には極端な変化が現れなかった。一方で, D212 および D315 残基の両方に Ala 変異を導入した二重変異酵素では片方の変異導入酵素よりも顕著な活性と k_{cat}/K_m 値の減少が確認されただけでなく, 基質特異性が大きく低下し, 芳香族アミノ酸を中心に種々のアミノ酸に対する活性が検出された。D212 と D315 残基への変異導入により活性と基質特異性に顕著な影響が現れたことから両残基は LysOX の基質認識に関与している残基であることが明らかとなった。現在, 精製した二重変異酵素の X 線結晶構造解析を行うとともに, 他の変異導入による基質特異性への影響を解析中である。1) *J. Biochem.*, **157**, 549-559 (2015).

C-3* *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来アセチルコリンエステラーゼが触媒するアミノリシス反応とアルコリシス反応

○井上 尚, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹

(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²鳥取大・CoRE)

【目的】アミノリシス反応及びアルコリシス反応は、アミノ基もしくは水酸基がエステルのカルボニル炭素を求核攻撃し、アミド結合形成もしくはエステル交換が起こる反応である。我々はこれまでに Ser 残基を活性中心に持つ *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 株由来のアセチルコリンエステラーゼ (Pa-AChE) が、加水分解の副反応としてアミノリシス反応やアルコリシス反応を触媒し、アミノ基と水酸基をアセチル化することを見出した。本研究では、Pa-AChE を化合物合成ツールとしての利用に向け、本酵素が触媒するアミノリシス反応とアルコリシス反応の諸性質を評価した。

【方法・結果】Pa-AChE の副反応は、緩衝液、酵素、Triton X-100、アシル受容体、アシル供与体の存在下で行った。生成物は TLC または LC/MS により確認した。アシル受容体には 1,6-Diaminohexane と 6-Amino-1-hexanol, アシル供与体には Pa-AChE の基質であるアセチルコリンとその類似化合物である酢酸エチルを用いた。pH 条件検討の結果、アセチル化された 1,6-Diaminohexane の量は、pH 10 において最大となったが、一方で 6-Amino-1-hexanol においては pH によるアセチル化産物量の大きな変化は見られなかった。また、6-Amino-1-hexanol では一度増えたアセチル化産物が減少していく傾向が見られ、アルコリシス反応により生成したエステル結合を Pa-AChE が加水分解していることが考えられた。しかし、アセチル化された 1,6-Diaminohexane は減少せず、本酵素はアミノリシス反応により形成するアミド結合を分解しないことが確認され、Pa-AChE のアミド結合形成ツールとしての利用可能性が見出された。

C-4* *Cellulosimicrobium* sp. NTK2 株が生産する Chitin-binding protein のキチナーゼ活性への影響

○仁木大輔, 東谷洸里¹, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹

(鳥取大院・持社創生,¹鳥取大・農,²鳥取大・CoRE)

【目的】キチンは次世代のバイオマス資源としての利用に注目されているが、その分解には酸・アルカリ処理や物理的破砕などの複雑な工程が必要であり、環境への負荷も大きい。現在、酵素による結晶キチンの分解も試みられているが、効率的に分解できる酵素は未だ見つかっていない。我々はこれまでに、カニ殻や廃菌床の完熟堆肥から、 α -キチンを直接分解する放線菌、*Cellulosimicrobium* sp. NTK2 (NTK2 株) を単離した。本菌は、キチン存在時に約 20 kDa の Chitin-binding protein (CBP) を菌体外に分泌する。本研究では、CBP の異種発現系を構築し、そのキチン分解への役割を検証した。

【方法及び結果】NTK2 株のゲノム情報から、2 種の CBP と 8 種のキチナーゼが同定された。キチナーゼのうち、*Cellulosimicrobium* sp. NTK2 の培養液から同定されたものと、CBP を選抜し、それぞれの組換えタンパク質を構築した。様々な基質に対する組換えタンパク質の分解活性を調べた結果、キチナーゼはキチンオリゴ糖や GlcNAc2-pNP に対して分解活性を示したが、CBP は分解活性を持たないことが示唆された。次に、CBP とキチナーゼを混ぜて、GlcNAc2-pNP に対する活性を調べた結果、pH9.0 の条件でキチナーゼの GlcNAc2-pNP 分解活性が約 1.5 倍向上した。現在、他のキチナーゼに対する CBP 添加の影響を調べている。

C-5* *Penicillium* sp. KU-1 株が生産するポリオール酸化酵素の固定化条件の検討と希少糖生産

○黒石川嵩幸, 渡邊 彰¹, 吉原明秀², 何森 健², 麻田恭彦¹
(愛媛大院・連農,¹香川大・農,²香川大・国際希少糖)

【目的】希少糖は自然界に存在量が少ない単糖とその誘導体と定義されている。近年、大量生産方法が確立された一部の希少糖は、血糖値降下作用 (D-Psicose) や癌細胞増殖抑制作用 (D-Allose) などの有用な生理活性を有することが明らかにされ、それら以外の希少糖においても大量生産方法の確立や生理活性の解明が期待されている。従来、酵素を利用する各種希少糖の生産は、主として異性化酵素が利用されてきたが、異性化酵素は、基質と生成物の平衡反応 (可逆反応) を触媒するため、生産における収率の低さや基質と生成物の分離が必要となることが問題となってきた。そこで、本研究では、不可逆反応を触媒する *Penicillium* sp. KU-1 株が生産するポリオール酸化酵素を利用する新規の希少糖生産方法の確立を目的として、本酵素の固定化条件の検討および作製した固定化酵素を利用する希少糖生産について検討を行った。

【方法・結果】本酵素の粗酵素溶液は、本菌株を培養した小麦フスマ固体培地から抽出した。固定化条件の検討および希少糖の生産には、粗酵素溶液を硫酸分画および液体クロマトグラフィーで精製することにより得られた部分精製酵素を用いた。また、本酵素の固定化は、各種イオン交換樹脂やグルタルアルデヒドを利用する担体結合法や金属イオンを利用する包括法により検討を行った。その結果、イオン交換樹脂を用いる担体結合法により作製した固定化酵素と各種ポリオールを基質とする反応において、9 種類の希少糖を生成することに成功した。

C-6* *Rhizobium*.sp S10 株由来の D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの変異体作製と希少糖生産への応用

○長谷川妙恵, Yotsombat Akkharapimon, 高田悟郎 (香川大・農)

【目的】

D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼは、様々な単糖や二糖の炭素第 3 位を酸化し、3-ケト糖や 3-ケト二糖を生成する酵素である。D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼによって酸化された糖を還元することで希少糖の生産も可能である。本研究では、D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼによる希少糖生産を目的に、反応に関与するアミノ酸の探索と触媒機能の向上を行うべく、変異酵素の作製を試みた。

【方法・結果】

まず、*Rhizobium*.sp S10 株由来の D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼの遺伝子を鋳型にし、D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼ遺伝子上の 440bp の領域に点変異を導入した合成 DNA を 5 種類設計した。続いて、この合成 DNA を D-グルコシド 3-デヒドロゲナーゼ遺伝子と置換させ、変異酵素を生産させた。これらのうち、P199R 変異酵素は活性を失った為、その他 4 種類の変異酵素を精製し、諸性質の検討を行った。温度と pH の影響についてはオーセンティックの酵素との違いは見られず、反応の最適温度は 50℃、最適 pH は 6.5~7.5 であった。一方、基質特異性では D133ER134G 変異酵素に顕著な違いがみられ、オーセンティックの酵素に比べ、パラチノース、マルトース、スクロースのセロビオースに対する相対活性がそれぞれ、27.7%, 26%, 23%向上した。この変異酵素を用いて、希少糖の生産を試みることにした。

C-7 *Komagataeibacter* 属酢酸菌の膜結合型アルコール脱水素酵素の機能解析
○薬師寿治¹, 向井妃奈, ニタヤ ピティウィッタヤクル², 松谷峰之介, ポーンチャノック タウィーチープ³, 片岡尚也¹, ガンジャナ ティーラゲール³, 松下一信¹
(山口大院・創科,¹山口大・温微研セ,²ラジャマンガラ工大,³カセサート大)

【目的】酢酸発酵は、酢酸菌が行うエタノールから酢酸への二段階の酸化反応によって行われる。一段階目の反応はアルコール脱水素酵素 (ADH) によって行われる。本酵素はエタノール:ユビキノン酸化還元活性をもち、本菌のエタノール酸化系呼吸鎖の初発脱水素酵素として働く。*Acetobacter* 属と *Gluconobacter* 属酢酸菌の ADH は3つのサブユニット:PQQ とヘム C を1分子ずつ含む大サブユニット、3つのヘム C を含むユビキノンとの反応を司るシトクロムサブユニット、大サブユニットの成熟過程で必要となる小サブユニットから構成される。一方、*Komagataeibacter* 属酢酸菌から精製された ADH は、小サブユニットを含まないので、大サブユニットとシトクロムサブユニットのみから構成される。しかし、*Komagataeibacter medellinensis* NBRC 3288 株の完全ゲノムには、小サブユニットをコードする *adhS* 遺伝子のホモログが存在する。本研究では、この *adhS* 遺伝子ホモログの遺伝子破壊株とシトクロムサブユニットの遺伝子破壊株を作製し、これらの解析を行った。

【結果】NBRC 3288 株には、*adhS* 遺伝子ホモログが2つあったので、それぞれの破壊株を作製したが、いずれもエタノール酸化活性を持っていた。シトクロムサブユニットの遺伝子破壊株はエタノール酸化活性を失ったが、人工電子受容体を用いたエタノール脱水素酵素活性を示した。この活性は酸化剤によって著しく減少した。基質エタノールの存在下にはこの不活性化は見られなかった。この不活性化は野生型酵素では見られず、還元剤処理によって回復した。

C-8 *Gluconacetobacter* 属酢酸菌のピロロキノリンキノン依存型ソルボソン脱水素酵素の解析
○高橋亮太, 松谷峰之介, 片岡尚也¹, 薬師寿治¹, 松下一信¹
(山口大院・創科,¹山口大・温微研セ)

【背景・目的】工業的ビタミン C 生産において、D-ソルビトールは *Gluconobacter* 属酢酸菌によって L-ソルボースへ酸化される。新しいビタミン C 生産として、一部の酢酸菌の膜結合型ソルボース脱水素酵素による L-ソルボースから L-ソルボソンへの酸化、さらに酢酸菌 *Gluconacetobacter liquefaciens* の膜結合型ソルボソン脱水素酵素 (SNDH) を用いて L-ソルボソンを、ビタミン C 生産の重要中間体 2-ケト-L-グルロン酸に変換することが試みられている (Shinjo et al., 1995)。SNDH は N 末端に1ヶ所の推定膜貫通領域を持つと考えられる膜タンパク質である。本研究では、未だその詳細が明らかでない SNDH の解析を行った。

【方法・結果】*Ga. liquefaciens* の *sndh* を発現する組換え大腸菌株を作製した。大腸菌はピロロキノリンキノン (PQQ) を生合成できないので、この組換え大腸菌の膜画分を調製し、PQQ によるホロ酵素形成後に L-ソルボソン酸化活性 (酸素消費能) を調べた。組換え株の膜画分は、PQQ 依存的に L-ソルボソン酸化活性を持っていた。すなわち、SNDH が PQQ 依存酵素であることが明らかとなった。また、大腸菌はユビキノール酸化系のみを持つので、SNDH の電子受容体がユビキノンである事が強く示唆された。実際に膜画分と膜から可溶化させた標品を用いて、ユビキノン類縁体の還元活性が確認できた。*Pseudomonas* には SNDH の水溶性ホモログ (同一性 63%) が知られており、膜結合能やユビキノン還元活性について比較研究を現在行っている。

C-9 Purification of two subunits from a peanut allergen, Ara h1.
OMd. Asaduzzaman, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

[Introduction] Peanut allergy is one of the most severe food allergies, and many allergenic proteins have been identified from peanut seeds; Ara h 1~ Ara h 17. Most predominant species among these peanut allergens is Ara h 1 consisting of three subunits, which accounts for nearly 15% of total proteins. Although the molecular characterization of Ara h 1 has almost been completed, several variant molecules of Ara h1 have been found and the molecular and immunoreactive differences between each variant remain to be clarified. As a first step to clarify these differences, in this study, we purified several variant molecules of Ara h1 and analyzed their partial amino acid sequences and *N*-glycan structures. **[Methods]** Ara h1 was extracted from the defatted peanut powder in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.3), containing 0.2 M NaCl. From the crude proteins, several variants of Ara h 1 were purified by a combination of (NH₄)₂SO₄ precipitation, anion exchange, gel-filtration, and hydrophobic interaction chromatography. The structural features of *N*-glycan linked to each variant were analyzed after hydrazinolysis and pyridylation. **[Results and discussion]** The molecular mass of each subunit of Ara h 1 were estimated 68 kDa and 64 kDa and N-terminal amino acid sequence of each subunit was RS/HPPGER and EGREGEQ, respectively. These sequences were found in the deduced amino acid sequences of Ara h 1 (clone P41B), suggesting that a different processing mechanism by endogenous protease(s) produced two variant subunits. Furthermore, we found different degree of *N*-glycosylation on each variant, although Ara h1 has only one *N*-glycosylation site.

C-10 爬虫類卵白における Ovalbumin-related protein X (OVAX) の探索
○野々村直樹, 赤澤隆志¹, 佐藤加奈恵², 小川雅廣, Irma Isnafia Arief³,
Cahyo Budiman³
(香川大院・農,¹愛媛大院・連農,²香川大・農,³ボゴール農科大・畜産)

【目的】ニワトリ卵白に存在する Ovalbumin-related protein X (OVAX) は、生理的機能が分かっていないタンパク質の一つである。OVAX は *in vitro* でヘパリンに結合すると最近報告されたことから (Réhault-Godbert et al. J. Biol. Chem., 2013), 生理的機能をもつことが考えられる。昨年度の支部例会において、OVAX はニワトリだけでなくウズラやダチョウの卵白においても存在することを報告した。しかし、鳥類以外の卵生生物に OVAX が存在するかどうかは明らかとなっていない。そこで本研究では、爬虫類の卵において OVAX 様タンパク質が存在するかどうかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】ヘパリン結合樹脂を用いて、ワニ、ウミガメ、コブラの卵からヘパリン結合タンパク質 (HBP) を回収した。精製したニワトリ OVAX (cOVAX) をウサギに免疫して得られた cOVAX ポリクローナル抗体を用いて、HBP を含む画分を Western blotting したところ、ワニの画分の 50 kDa 付近に発色が見られた。一方、ウミガメとコブラの画分においては、50 kDa 付近に発色は見られなかった。また、cOVAX のヘパリン結合部位に相当する 16 アミノ酸残基のペプチドをウサギに免疫して得られた cOVAX_{16AA} ポリクローナル抗体を使って同様に Western blotting を行ったところ、いずれの画分においても発色が見られなかった。cOVAX_{16AA} 抗体ではいずれの爬虫類の画分からも発色は見られなかったが、cOVAX 抗体ではワニの画分において、cOVAX の分子量 50 kDa とほぼ同じ分子量に発色がみられたことから、本研究に使用した 3 種類の爬虫類の卵の中では、ワニのみに OVAX 様タンパク質が存在することが示唆された。

C-11 水草から単離されたセルラーゼ生産菌の同定とその酵素学的性質の決定
○浦田健司, 渡邊康紀, 渡辺誠也¹ (愛媛大院・農, ¹愛媛大・CMES)

【目的】リグノセルロース系（木質系）バイオマスからのバイオエタノール生産には、未だに様々な課題が残っている。本研究では、琵琶湖をはじめとする淡水湖で毎年異常繁茂し環境問題にもなっている外来水草を原料としエタノール生産を行うことを目的としている。今回は、水草からセルラーゼ生産菌を単離・同定し、生産されたセルラーゼについての性質を調べた。

【方法・結果】これまでの実験で使用していた水草の粉末を用いて、カルボキシメチルセルロース（以下 CMC）を含む培地で液体培養することで菌のスクリーニングを行なった。さらに、プレート上でコロニーを単離し、抽出した DNA を鋳型に 16S rRNA を PCR で増幅させ塩基配列を読んだ。系統解析の結果、2 種類の菌が同定され、それぞれ *Paenibacillus elgii* と *Bacillus cereus* に近かった。このうち、前者を CMC を含む培地で培養しセルラーゼを生産させ、硫酸分画・凍結乾燥させた粗精製酵素を調整した。SDS-PAGE で見られた主要なバンドを N 末端アミノ酸配列解析に供したところ、*P. elgii* の（推定）エンドグルカナーゼと最も相同性が高かった。AZCL-HE-セルロースを用いた活性測定では、著名なセルラーゼ生産糸状菌である *Trichoderma reesei* のセルラーゼと最適温度・pH いずれも類似していた。

D-1 生体膜主要リン脂質の生合成を担う PS 脱炭酸酵素の構造機能解析 ○渡邊康紀¹, 渡辺誠也^{1,2} (¹愛媛大院・農, ²愛媛大・CMES)

【背景・目的】細胞やオルガネラが正常に機能するには生体膜を構成するリン脂質組成が正しく保たれていることが重要である。例えば大腸菌の細胞膜は約 75%がホスファチジルエタノールアミン(PE)から構成されており、ホスファチジルセリン (PS) から PE の生合成を担う PS 脱炭酸酵素 (EC 4.1.1.65; Psd) をコードする *psd* 遺伝子は大腸菌の生育に必須であることが知られている。Psd は細菌からヒトに至るまで広く保存されており、新規抗菌薬の開発やリン脂質代謝異常による疾患の治療のための標的分子として適していると考えられるが、これまでに Psd の立体構造の報告例は無い。そこで本研究では、Psd による PE 生合成の分子メカニズムを明らかにすることを目指し、Psd の X 線結晶構造解析を行った。

【方法・結果】大腸菌由来 Psd を大腸菌の系を用いて調製し、結晶化を試みたが良質な結晶を得ることはできなかった。そこでアフィニティータグの位置の検討や、フレキシブルと予測される領域の切除を試みたところ、良質な結晶を得ることに成功した。SPRING-8 で回折データを収集し、セレンメチオニン置換体結晶を用いた SAD 法により位相決定を行い、最終的に 3.1 Å 分解能で構造を決定した。Psd はフォールドの片側に正電荷が優勢な窪みを形成しており、その周囲は疎水性アミノ酸残基が多く存在していた。活性中心を形成すると考えられる Psd の α サブユニットの N 末端に存在するピルボイル基は窪みの底部に位置していたことから、負電荷を持つ PS 頭部は窪みに入り反応が起こることが示唆された。今後は、PS との複合体構造の解明および変異体解析により PE 生合成メカニズムのさらなる知見を得たい。

D-2 アメフラシ消化液に含まれるフロロタンニン結合タンパク質の性質 ○辻 明彦, 湯浅恵造 (徳島大・生物資源)

【目的】アラメ等の褐藻類には、フロロタンニンと呼ばれる海藻ポリフェノールが含まれる。フロロタンニンは、フロログルシノールが 3 から 6 個結合した構造を持ち、潮の満ち干による太陽光露光の防御作用やウニ、貝類等の摂食動物に対する摂食阻害作用を果たしている。近年、フロロタンニンは抗酸化作用に加えて、抗炎症作用や血糖値低下作用などの生理作用を持つことが報告され、食品機能成分として注目されている。私たちは、海藻を主食とするアメフラシの消化液中にフロロタンニンと特異的に結合するタンパク質 (EHEP) を発見した。フロロタンニンはアメフラシ消化液の β グルコシダーゼに対して強い阻害活性を持つが、EHEP はその阻害作用を抑制した。本研究では EHEP の応用を目指して、フロロタンニンとの作用機構と大腸菌による EHEP 発現について解析を行った。

【方法・結果】カジメよりアルコール抽出、TLC で精製した各種フロロタンニンと精製 EHEP と反応し、生成した沈殿物の量から EHEP の特異性について検討した。EHEP は、フロロタンニンの中では *eckol* より *dieckol*, *bieckol* がよく反応した。また pH 4-6 の間でよく反応し、フロロタンニンと EHEP 複合体は pH 7 以上では解離した。GST-EHEP 融合タンパク質は大腸菌で不溶性のタンパク質として発現されたが、8 M 尿素で溶解後、徐々に尿素濃度を減じることにより、可溶性で活性のある EHEP を得ることができた。現在、変異体のフロロタンニン結合活性を調べているので、フロロタンニンとの結合に重要なアミノ酸残基の同定についても報告したい。

D-3 *cis*-3-ヒドロキシ-L-プロリン脱水酵素の X 線結晶構造解析
○村瀬陽介, 渡邊康紀¹, 渡辺誠也^{1,2}
(愛媛大・農,¹愛媛大院・農,²愛媛大・CMES)

【目的】2003 年にアコニターゼスーパーファミリーに属する新規の酵素としてアコニターゼ X (AcnX) が見つかって以来, その機能は不明のままであったが, 当研究室の解析により AcnX は細菌のヒドロキシプロリン代謝に関わり, *cis*-3-ヒドロキシ-L-プロリン (C3LHyp) から Δ^1 -ピロリン-2-カルボン酸への反応を触媒する C3LHyp 脱水酵素であることが明らかになった。そこで, 本研究ではさらなる AcnX の性質や反応触媒機構の解明を目的として, AcnX の X 線結晶構造解析を行った。

【方法・結果】大腸菌の系を用いて調製した AcnX について結晶化に成功し, 得られた結晶から大型放射光施設 SPring-8 にて回折データを収集した。セレンメチオニンを利用した SAD 法により位相を決定し, 最終的に 1.6Å 分解能での構造決定に成功した。アコニターゼスーパーファミリーに属する他の酵素が活性中心に[4Fe-4S]クラスターを保持しているのに対し, AcnX には予想外にも[2Fe-2S]クラスターが存在することが明らかになった。また, 他のアコニターゼとの比較から AcnX の Ser70 が塩基触媒として C3LHyp の α -プロトンを引き抜く役割を担うことが示唆された。さらに, AcnX の S70A 不活性変異体と C3LHyp の共結晶を作製し, C3LHyp 結合型 AcnX の結晶構造を 2.0Å 分解能で決定した。C3LHyp の α -炭素は Ala70 の近くに位置し, 3 位ヒドロキシ基は[2Fe-2S]クラスターの鉄原子に配位していた。以上のことから, AcnX の Ser70 により C3LHyp の α -プロトンが引き抜かれ, 3 位ヒドロキシ基が[2Fe-2S]クラスターの鉄原子の一つに移る, という反応触媒機構が示された。

D-4 L-アラビノース 1-脱水素酵素の構造解析
○伊賀千夏, 渡邊康紀¹, 渡辺誠也^{1,2}
(愛媛大・農,¹愛媛大院・農,²愛媛大・CMES)

【背景・目的】窒素固定細菌 *Azospirillum brasiliense* の L-アラビノース代謝は, 古細菌のリン酸化を伴わない Entner-Doudroff 経路と相同な経路でありその遺伝子はオペロンを形成するが, よく知られた *araBAD* オペロンとは全く異なる。*araA* 遺伝子がコードする NAD(P)⁺依存性 L-アラビノース 1-脱水素酵素 (EC 1.1.1.46) は, この代謝経路の最初の反応である L-アラビノースから L-アラビノ- γ -ラクトンへの変換を触媒する (Watanabe *et al. J. Biol. Chem.* 2006, 281, 2612-2623)。興味深いことに, 同じ五炭糖である D-キシロースの k_{cat}/K_m 値は, L-アラビノースの 790 倍も低い。本酵素の反応触媒メカニズム及び基質特異性の分子基盤を明らかにするため, X 線結晶構造解析を行った。

【方法・結果】ヒスチジンタグを N 末端に付与した組み換え AraA を大腸菌の系を用いて発現させ, 精製酵素を用いてリン酸アンモニウムを沈殿剤とした条件で良質な結晶を得た。SPring-8 で回折データを収集し, 分子置換法により 1.4Å 分解能でアポ構造の決定に成功した。さらに, NADP⁺をソーキングで導入した複合体構造も 2.5Å 分解能で決定した。AraA の全体構造および NADP⁺との結合様式は, D-キシロースを基質とする *Caulobacter crescentus* 由来 aldose-aldose oxidoreductase とよく似ていた。この酵素の D-キシロースとの複合体構造と比較することで, AraA の E147 および H153 が L-アラビノースの認識に関与することが示唆され, 実際に両残基のアラニン変異体の活性は顕著に低下した。今後は, L-アラビノースとの複合体構造を明らかにすることでさらに詳細な基質認識の知見を得たい。

D-5* 超好熱古細菌由来プロリンラセマーゼの構造機能解析
○伊藤愛香, 渡邊康紀¹, 渡辺誠也^{1,2}
(愛媛大・農,¹愛媛大院・農,²愛媛大・CMES)

【背景・目的】プロリンラセマーゼ (EC 5.1.1.4; ProR) と 4-ヒドロキシプロリンエピメラーゼ (EC 5.1.1.8; HypE) は、同じピリドキサルリン酸非依存的ラセマーゼファミリーに属している。反応機構はいずれも α -プロトンの引き抜き及びピロリジン環の反対面からの付加だが、両者の基質特異性はきわめて厳格である。一方、OCC_00372 は古細菌 (*Thermococcus litoralis* DSM 5473) から初めて見出された ProR-like protein (TlProR) だが、既知酵素とは大きく異なりプロリン、4-ヒドロキシプロリン、3-ヒドロキシプロリンのすべてを基質にできる (Watanabe *et al.*, *PLoS One* 10, e0120349, 2015)。本研究では、TlProR のユニークな基質認識メカニズムを明らかにするため X 線結晶解析による構造決定を行った。

【方法・結果】ヒスチジントグを N 末端に付与した組み換え TlProR を大腸菌の系を用いて発現させ、ニッケルアフィニティクロマトグラフィーとゲル濾過で精製した酵素を用いて良質な結晶を得ることに成功した。SPRING-8 で回折データを収集し、分子置換法により 2.7 Å 分解能で構造を決定した。TlProR の活性部位には大腸菌より持ち込まれたプロリンと考えられる電子密度が見られ、トリパノソーマ由来 ProR の結合様式とよく似ていた。Asn169, Tyr171 の側鎖がプロリンの 3 位および 4 位炭素の近くに位置しており、両アミノ酸残基は既知の ProR や HypE には保存されていないことから基質特異性に関与することが示唆された。

D-6* 昆虫細胞発現系を用いたヒト Formin ファミリータンパク質に生じる N-ミリスチル化の解析
○大塚 葵, 谷川綾音, 守屋康子, 小林 淳, 内海俊彦 (山口大院・創科)

【目的】我々はこれまでに、ヒト Formin ファミリータンパク質 FMNL2, FMNL3, FMN2 が N-ミリスチル化されること、このうち FMNL2, FMNL3 は N-ミリスチル化依存的に細胞の形態変化を誘導することを明らかにした。本研究では、これら 3 つのタンパク質に生ずる N-ミリスチル化の機能の違いを明らかにすることを目的として、球形の付着細胞であり、細胞の形態変化の観察が容易であるカイコ由来 BmN4 細胞を用いてこれらのタンパク質の発現に伴い誘導される形態変化の違いについて検討を行った。

【方法・結果】FMNL2, FMNL3, FMN2 の C 末端に GFP あるいは FLAG-tag を付加した融合タンパク質 cDNA、およびその 2 位 Gly を Ala に置換し N-ミリスチル化を阻害した変異体 cDNA を作製した。これらの cDNA を BmN4 細胞あるいはサル由来 COS-1 細胞に遺伝子導入し、GFP 蛍光観察、免疫染色により細胞形態変化を、ファロイジン染色によりアクチンフィラメントとの相互作用を検討した。その結果、COS-1 細胞では、FMNL2, FMNL3, FMN2 はいずれも N-ミリスチル化依存的に細胞の顕著な伸展とアクチンフィラメントとの相互作用による著しい細胞形態変化を誘導し、3 つのタンパク質で差異が認められなかったのに対し、BmN4 細胞では FMN2 は細胞形態変化を誘導せず、FMNL2, FMNL3 ではいずれも細胞形態変化を誘導するもののそのパターンが異なり、特に FMNL3 が細胞の顕著な進展を伴う形態変化を誘導することが明らかになった。以上の結果から、ヒトと異なる生物由来の BmN4 細胞発現系を用いることで、ヒト N-ミリスチル化タンパク質の特異的な機能の解析が可能であることが示された。

D-7* 二重アシル化を生じる膜貫通タンパク質 ANKRD22 の特異な膜上トポロジーの解析
○細川拓郎, 黄波戸亜哉, 吉川祐希, 守屋康子, 内海俊彦 (山口大院・創科)

【目的】タンパク質 *N*-ミリスチル化は、一般に細胞質タンパク質に生じ、膜局在化に機能する事が知られている。最近我々は、ヒト *N*-ミリスチル化タンパク質の網羅的同定を行った結果、多数の *N*-ミリスチル化された膜貫通タンパク質が存在する事を見出した。これらの中に、*N*-ミリスチル化に加え *S*-パルミトイル化を生じた、一回膜貫通型タンパク質と推定される ANKRD22 が存在した。本研究では、この ANKRD22 の細胞内局在、膜局在化及び膜上トポロジーについて検討を行った。

【方法・結果】ANKRD22 及びその各種変異体の C 末端に FLAG-tag, あるいは *N*-グリコシル化部位を導入した TNF(GLC-TNF)を結合させた融合タンパク質 cDNA を作成した。これらを COS-1 細胞に遺伝子導入し、免疫染色により細胞内局在を、膜タンパク質分画により膜挿入を、糖鎖付加により膜上トポロジーを検討した。その結果、ANKRD22 は、一つの疎水性領域を介して小胞体膜に特異的に局在する膜タンパク質であり、通常の一回膜貫通型タンパク質とは異なり、N 末端と C 末端をいずれも細胞質側に向けた、ヘアピン状に屈曲した一つの膜挿入領域を持つ膜タンパク質であることが明らかになった。

D-8* シリカ粒子形成促進タンパク質 “グラシン” の機能により構築された GST 呈示シリカ粒子の性質
○小林大起, 西美智佳, 美藤友博¹, 清水克彦², 有馬二郎¹
(鳥取大院・農,¹鳥取大・農,²鳥取大・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水溶性タンパク質であり、室温・中性 pH 条件下でケイ酸を添加すると、速やかにシリカ粒子が形成される。そのため、遺伝子工学的手法にグラシンを別のタンパク質と融合することにより、タンパク質のシリカ粒子への固定化が可能であると考えられた。これまでに、GST とグラシンの融合タンパク質 (GST-グラシン) にケイ酸を添加することで、GST 呈示シリカ粒子の形成が認められた。本研究では、様々なシリカ粒子形成反応の条件下で得られた GST 呈示シリカ粒子の性質を検討した。

【方法・結果】組換え GST-グラシンを大腸菌で発現後、Ni アフィニティーカラムを使用して精製した。シリカ粒子形成の条件は、pH・反応時間・ケイ酸量について検討した。また本検討ではケイ酸前駆体としてテトラエトキシシラン (TEOS) の酸加水分解物、TEOS の塩基加水分解物、そしてメタケイ酸ナトリウム水溶液を用いた。その結果、pH 6.0 ~ 6.5, 20 min, 50 mM ケイ酸の条件下で良好なシリカ粒子形成が確認された。また、ケイ酸前駆体として TEOS の塩基加水分解物を使用して得られた GST 呈示シリカ粒子は、他のケイ酸前駆体を使用して得られたものより GST 活性が高く、TEOS の酸加水分解物を使用したものとの質の違いも観察された。この結果から、シリカ粒子形成に用いるケイ酸前駆体を検討することで、様々な性質を持つ GST 固定シリカ粒子の構築が可能であることが明らかとなった。

D-9* 深海及び浅瀬由来 *Shewanella* 属細菌の 5'-ヌクレオチダーゼの安定性に関する比較研究
○藤森貴子, 藤井創太郎, 栗林貴明, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【目的】深海は、マンガンや鉄、コバルトから構成されているマンガングラストなどが存在し、金属イオンが豊富な環境だと言える。また地上と比べて過酷な環境である深海は、有機溶媒耐性微生物が多く存在することが調査されている。すなわち深海に生息する微生物は、その環境に順応するために、金属イオンや有機溶媒に対して安定な酵素を持つ可能性が示唆されている。本研究の目的は、深海性 *Shewanella violacea* と浅瀬由来 *Shewanella amazonensis* の 5'-ヌクレオチダーゼ (NTase) の金属イオンそして有機溶媒に対する安定性について機能と構造の面から比較する。

【方法・結果】*S.violacea* と *S.amazonensis* の膜画分を可溶化後、各種カラムによりそれぞれの NTase を精製した。精製した NTase を用いて 10 mM の $MgCl_2$ 存在下で、様々な金属イオン ($MnCl_2$, $CaCl_2$, $LiCl$, $CoCl_2$, $CsCl$, $NiCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$) そして、有機溶媒 (DMSO, N-N ジメチルホルムアミド, エタノール, メタノール, 2-プロパノール, アセトニトリル, アセトン) を加えて ATP 加水分解活性を測定した。その結果 *S.violacea* 由来の NTase は、 $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $LiCl$ に対して *S.amazonensis* 由来のものよりも安定であった。その他の金属イオンに対しては、両酵素とも同様に活性が阻害された。また有機溶媒に対しては、*S.amazonensis* 由来の NTase の方が活性が高く維持され、安定であった。構造面では、CD (円偏光二色性) スペクトルの測定により、有機溶媒中でも *S.amazonensis* 由来 NTase は二次構造形成能が高いことが明らかになった。

D-10* λ フォスファターゼ共発現系を用いた非リン酸化／高活性型カゼインキナーゼ 1 の簡便な調製法の開発
○秋月一駿, 遠山 拓, 山下雅史, 杉山康憲, 石田敦彦¹, 亀下 勇, 末吉紀行 (香川大・農, ¹広島大院・総科)

【背景・目的】カゼインキナーゼ 1 (CK1) は真核生物において幅広い組織で発現し、概日リズムやアポトーシス, DNA 損傷応答などの様々な細胞プロセスに関与する Ser/Thr キナーゼである。そのため、高活性な CK1 を大腸菌から調製し、*in vitro* で本酵素の諸性質を詳細に解析することは、CK1 の関わる生命現象を理解する上で非常に重要である。しかしながら、大腸菌で発現させたリコンビナント CK1 は、菌体細胞内での高度な自己リン酸化により不活性化することから、高活性な CK1 の調製はこれまで容易でなかった。そこで本研究では、フォスファターゼ共発現系を用いて、非リン酸化／高活性型 CK1 の簡便な調製法の開発を試みた。

【方法・結果】CK1 の不都合な自己リン酸化を抑制するために、 λ フォスファターゼを恒常的に発現する大腸菌株 BL21(DE3)p λ PP を用いたタンパク発現システムを開発した。この系を用いて各リコンビナント CK1s (α , δ , ϵ) を発現／精製したところ、ほぼ完全に非リン酸化型のキナーゼとして簡便に調製できることが明らかになった。また、既存の大腸菌株である BL21(DE3)を用いて調製した CK1s とキナーゼ活性を比較したところ、BL21(DE3)p λ PP を用いて調製した方が非常に高いキナーゼ活性 (CK1 δ では 27 倍) を有することが示された。このことから、BL21(DE3)p λ PP を用いたタンパク質発現系は高活性型 CK1s の調製に非常に有用であることが示された。また本発現システムは、リン酸化が原因で大腸菌からの調製が難しい他のキナーゼへの応用も期待できる。 Akizuki *et al.*, Anal. Biochem., 549 (2018) 99–106

E-1 清酒製造場に存在する野生酵母の生理的性質 ○伊藤一成, 谷野有佳, 三宅剛史 (岡山県工技セ)

【目的】衛生的に整備された食品製造工場と比較して清酒製造場は伝統的な製造現場である場合が多く、多種多様な微生物が定着していることが考えられる。また清酒はほぼ全ての工程が開放系で製造されているため、微生物汚染の危険性が常につきまとう。本研究グループではこれまでに実際の清酒製造現場から数種の野生酵母を単離・同定しており、その危険性について考察を行ってきた。今回は単離した野生酵母がどのような生理的性質を保持しているのか把握することを目的とし、培養中の糖、アルコール、酸の濃度が増殖に及ぼす影響（耐糖性・耐アルコール性・耐酸性）について経時的に調べたので報告する。

【方法・結果】岡山県内の同一製造場から得られた野生酵母の中から選択した代表株について、グルコース、エタノール、乳酸を添加し所定の濃度になるように YPD 培地を調製した。これに初発酵母濃度が 1×10^5 個/ml となるよう前培養物を植菌し、30℃で静置培養した。所定日数培養した培養液を波長 600 nm での吸光度を測定しこれを生育度とした。この結果、清酒酵母と同程度の耐糖性や耐アルコール性および耐酸性を持ち経時的な生育がよく似た菌種と、生育が明らかに異なる菌種の 2 つに大別でき、清酒酵母とは生理的性質が異なると考えられる野生酵母の存在が確認できた。さらに生育が異なる菌種間でも増殖プロファイルに若干の違いが見られ、多種多様な菌種の存在が伺えた。

E-2 *Acidithiobacillus ferrooxidans* のチオ硫酸代謝に関する研究 ○池田くみ子, 金尾忠芳, 上村一雄 (岡山大院・環境生命)

【背景・目的】鉄硫黄酸化細菌 *A. ferrooxidans* は、鉄と還元型無機硫黄化合物をエネルギー源として増殖できる、好酸性の独立栄養細菌である。本菌の鉄代謝には *aa₃* 型シトクローム酸化酵素が、元素硫黄 (S^0) 代謝には *bd* 型ユビキノール酸化酵素が関与している。一方、チオ硫酸は、チオ硫酸デヒドロゲナーゼ (Tsd) で酸化されることを明らかにしているが、生体内の電子受容体は不明である。チオ硫酸代謝では、613 nm に吸収極大を持つ新たな末端酸化酵素の関与が示唆されたため、その性質を明らかにすることを目的とした。【実験方法・結果】チオ硫酸生育細胞の細胞膜画分から、n-Dodecyl- β -D-maltopyranoside (DM) を用いて可溶化画分を調製した。末端酸化酵素活性測定には人工基質である TMPD を用いた。Q-Sepharose, ゲルろ過, ハイドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーによって、TMPD 酸化活性は可溶化画分から約 7 倍に精製された。最終標品にはキノール酸化活性も検出され、その活性は可溶化画分から約 56 倍に精製された。最終標品に及ぼす阻害剤の影響を検討したところ、ユビキノール酸化酵素活性のみ KCN と HQNO で阻害された。最終標品のスペクトル解析は 528 nm, 560 nm, 610 nm, 630 nm 付近に吸収極大を示し *b* 型と *d* 型のヘムの存在が示唆された。主要タンパク質を LC/MS/MS で解析した結果、*bd*-型ユビキノール酸化酵素のサブユニットと *o* 型シトクローム酸化酵素のサブユニットが検出された。また、最終標品には鉄酸化に関与する *aa₃* 型シトクローム酸化酵素は検出されなかったが、鉄酸化酵素である cytochrome *c* (Cyc2) が検出され、チオ硫酸代謝への関与が示唆された。

E-3 CoQ₁₀の生産性に影響を及ぼす遺伝子の探索と解析及び培養条件の検討
○高田将伍, 戒能智宏¹, 川向 誠¹ (島根大院・生資科, ¹島根大・生資科)

【目的】

コエンザイム Q(ユビキノン, CoQ)は, 生物界に広く存在する脂溶性抗酸化物質であり, 真核生物ではミトコンドリアで合成され, 電子伝達系を構成し電子の授受に關与する重要な成分である。ヒトは体内で CoQ₁₀を合成できるが細胞内の CoQ₁₀量は 20 歳を過ぎてから加齢に伴い減少するため, CoQ₁₀を摂取することが大変重要であると考えられており, 近年ではサプリメントとしての需要が高まっている。

これまでにヒトと同じ CoQ₁₀を生合成する分裂酵母 *S. pombe* を用いて, CoQ 合成酵素遺伝子の高発現などを試みたが顕著な高生産菌の育種にはつながらなかった。そこで本研究では, 別のアプローチで CoQ₁₀を高生産する株を育種することを目的とし, 遺伝子の過剰発現及び培地の条件等を検討した。

【方法・結果】

プロテインフォスファターゼ 2A のサブユニットである *ScTPD3* のホモログである *Sppa1* を *S. pombe* の野生株及び $\Delta pk1$ 株で高発現させると CoQ₁₀量はそれぞれ, 野生株の 1.6 倍, 2.8 倍に増加した。また, 完全培地にコハク酸ナトリウムを添加し培養を行ったところ 0.5%コハク酸ナトリウム添加時に 1.3 倍に増加することがわかった。次に, 新たな CoQ 生産に影響を及ぼす遺伝子の探索のために, Bioneer 社の破壊株ライブラリーよりオートファジーに關係することが予想される 35 株の CoQ₁₀量の測定を行ったところ, 野生株に対し CoQ₁₀量が 1.5 倍以上に増加した株が 2 株, 0.5 倍以下に減少した株が 1 株得られた。

E-4 オクラの根粒状構造内から単離された細菌の同定
○山根早紀子, 林 昌平¹, 上野 誠¹, 井藤和人¹, 巢山弘介¹
(島根大院・自然科学 ¹島根大・生資科)

【目的】

根粒は根粒菌によりマメ科植物の根に形成されることがよく知られているが, これまでにオクラでの根粒形成や内生菌に關する報告例はない。しかし島根大学の圃場で収穫されたオクラの根に根粒状構造が確認されたことから, マメ科植物と根粒菌のようにオクラも何らかの微生物と共生關係にあるのではないかと考えた。そこで本研究では, オクラの根粒状構造中の細菌の同定し, 細菌とオクラとの關係を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

島根県内で栽培されたオクラの根から根粒状構造を採取し, 表面殺菌後 YMA 培地にて細菌を単離した。得られた細菌について 16S rRNA を PCR 増幅させ, 塩基配列を決定して近縁種を推定した。

オクラの根の根粒状構造には多種多様な内生菌が存在しているということが分かった。それらにはマメ科植物の根粒菌が属す *Rhizobium* 属細菌, 非根粒菌種・非マメ科植物の内生菌と近縁な細菌が含まれた。これらのことから, マメ科植物と根粒菌のように今回単離できた細菌はオクラと共生關係にあり, さらにお互いに栄養や生育場所等を提供し合っている可能性が示唆された。

E-5 巨大菌レアメタル依存的応答因子の探索と機能性解析 ○白米優一, 松村歩梨, 芦内 誠 (高知大・農)

【目的】“産業のビタミン”とも呼ばれるレアメタルは産業と密接な関わりがある一方、微生物との関わりについて未だに解明されていない部分を多く残している。最近、レアメタル（特にジスプロシウム）を共存させることで、深海底から堆肥中に至るまで生育可能な巨大菌にレアメタル依存的な応答現象が発見された。具体的には巨大菌の代謝産物であるポリγグルタミン酸（PGA）の増産と対数増殖期における生育速度の増加である。これまでレアメタルを含めた重金属類では生物毒性としての関わり方が知られている中で、代謝の活性を促す該応答現象は新しい知見をもたらさう。今回、PGA 増産現象が観察されたことを契機に、PGA 合成オペロンとその周辺遺伝子配列を中心に解析を行なった。

【結果】巨大菌 PGA 合成オペロンと同じく PGA を生産する納豆菌の PGA 合成オペロンを比較した。結果、両者の合成オペロンについては大きな差を認められなかった。しかし、その上流にまで目を向けたところ、注目すべき違いがあった。広域調節因子として知られる DegU の認識配列が納豆菌では存在しなかったのに対し、巨大菌には複数カ所存在していることが明らかとなった。そこで該上流域をさらに精査した。その結果、一塩基の増減でその構造を激しく変化させるリボスイッチ様構造モチーフの存在が示唆された。現在、これらの結果を踏まえて該領域部分の増幅を行ない、レアメタル応答性との関連を調査している。

E-6* グルコース制限はスピンドルチェックポイント因子である Mad1 の機能低下をひきおこす ○田部卓磨, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資科)

炭素源は生物において必要不可欠な栄養素である。単細胞生物である分裂酵母は、細胞外環境の栄養状態を素早く認識し、応答する必要がある。近年我々は、培地の炭素源であるグルコースを通常の 3% からグルコース制限として用いる 0.1% にまで濃度を下げた際、有糸分裂期進行を阻害する微小管重合阻害剤への感受性が増加することを見出した。そこで、我々是有糸分裂期のスピンドルチェックポイント (SAC) に着目した。SAC は有糸分裂期で姉妹染色体分配を監視するシステムである。我々は、グルコース制限下における SAC の制御系が存在すると考え、その関連性を明らかにする解析を行なっている。

グルコース制限下で、SAC 因子を解析した結果、Mad1 のタンパク質発現が特異的に低下していた。グルコースに応答する経路として、cAMP/PKA 経路が存在する。cAMP/PKA 経路は、受容体タンパク質である Git3 がグルコースを認識し、下流へとシグナルが伝達する。それにより PKA 複合体の触媒サブユニットである Pka1 が活性化され、グルコース濃度に依存して様々な調節をしている。そこで、我々は、*pkal* 破壊株での Mad1 の発現量を解析した。その結果、通常状態でもグルコース制限下と同様に Mad1 のタンパク質発現量が低下していた。また、*pkal* 破壊株では、微小管重合阻害剤感受性や染色体分配異常などの Mad1 の発現低下によって引き起こされたとされる表現型が見られた。このことから、cAMP/PKA 経路が、Mad1 のタンパク質発現量調節に関与しており、SAC がグルコース濃度に応答して機能していることが示唆された。

E-7*

pkal1Δ の TBZ 感受性を抑圧する転写因子の解析

○竹中航平, 酒井智健, 田部卓磨, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資科)

プロテインキナーゼ A(PKA)は, 調節サブユニットである Cgs1 と触媒サブユニットである Pka1 からなるヘテロ 4 量体である。炭素源が豊富な条件下では, Cgs1 から Pka1 が解離して核内に移行することで下流因子をリン酸化制御している。これまでに分裂酵母では, 糖新生, 減数分裂過程への移行の制御, ストレス応答, 経時的寿命などへの関与が報告されている。我々は, 新たに *pkal1Δ* 遺伝子欠損株が微小管重合阻害剤に対して感受性を示すことを発見した。そこで, 本研究では, Pka1 の下流因子の探索のために, 転写因子に焦点をおいて, 関係因子の単離と解析を目的とした。

Pka1 の下流に位置する転写因子を単離するために, 非必須遺伝子破壊株ライブラリーから転写因子欠損株 90 株と *pkal1Δ* 株との掛け合わせを行い, 二重破壊株を作製した。その株を用いて *pkal1Δ* 株の TBZ 感受性を抑圧する株を選抜し, 4 つの転写因子欠損株を取得した。その中でも特に TBZ 感受性の抑圧が強い Tfs1 と Mks1 に着目した。この 2 つの転写因子を解析したところ, それぞれの単独欠損株は *pkal1Δ* 株の塩化カリウム感受性も抑圧し, 塩化カルシウムではさらに感受性が増す結果となった。このことから 2 つの転写因子は, 複数のストレスに応答する際に cAMP/PKA 経路に関与している可能性が示唆された。現在, Tfs1 と Mks1 の転写因子が, *pkal1Δ* 株の染色体分配異常を抑圧することで, TBZ 感受性を抑圧するのではないかと考え, 解析を進めている。

E-8*

Analysis of coenzyme Q species from naturally isolated yeasts and the gene responsible for the isoprenoid side chain modification in *Aureobasidium pullulans*

○Jomkwan Jumpathong, Ikuhisa Nishida, Kohei Nishino, Yasuhiro Matsuo, Tomohiro Kaino, Makoto Kawamukai (Fac. Life Environ. Sci. Shimane Univ.)

【Purpose】 Coenzyme Q (CoQ) is an electron transporter in the electron transport system of both prokaryotes and eukaryotes. The length of the isoprenoid side chain in its structure vary amongst organisms. In fungi, coenzyme Q with a partially reduced isoprenoid side chain is observed. This experiment aims to observe CoQ species in natural yeasts and yeast-like fungi, and analyze the gene responsible for the reduction in the side chain of CoQ in yeast-like fungi that belong to *Aureobasidium* species.

【Methods and results】 Multiple-alignment was done for *A. pullulans* proteins with other geranylgeranyl oxidoreductases from various organisms, and the genes were selected for cloning in *Schizosaccharomyces pombe*. The lipid extracts were separated for CoQ fraction by TLC and was analyzed by HPLC. CoQ extract from *S. pombe* harboring plasmid pREP1-*aKEQ87278* was analyzed by mass spectrometry (LC/MS/MS). The peak corresponded to 883 *m/z* which resembles to CoQ₁₀(H₂) in *A. pullulans* type strain was identified, nevertheless with a large amount of CoQ₁₀ production. Also, CoQ extracts from various strains of *A. pullulans* were analyzed by LC/MS/MS. Two types CoQ intermediates were found in a reduced and non-reduced forms; DMQ₁₀ and DMQ₁₀(H₂), in the different strains, implying that the enzymatic step of the isoprenoid reduction vary amongst strains. Tetra-hydrogenated CoQ₁₀ was found in *A. namibiae* for the first time. The quantitation by HPLC showed that CoQ₁₀(H₂) is converted to CoQ₁₀(H₄) in the later stages of growth and eventually becomes a dominant CoQ species.

E-9* シネフンギン生産菌 *Streptomyces incarnatus* の二次代謝誘導とストレス応答
○中島佑里子, 小川沙織, 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、核酸系抗生物質シネフンギンを生産する *S. incarnatus* を酸性ストレス、熱ショック、エタノールや塩の添加など様々なストレスを与えてシネフンギン増産効果を検討した。【方法】放線菌 *Streptomyces incarnatus* を液体培地で 10 日間培養して、培養 4-10 日目の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。熱ショック処理は 50°C, 60°C, 70°C において菌体を 1 分間加熱した。さらにエタノールや塩ストレス条件も検討した。[結果・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く、硫酸で調製した酸性培地において生産増加が得られた。高温ストレスでは 60°C, 1 分間の加熱処理でコントロールと比較して約 1.2 倍高生産であった。そして、CaCl₂ を終濃度 100 mM で添加して培養した結果、コントロールと比較して約 1.5 倍高生産であった。本菌のドラフトゲノム解析情報から *groES*, *groEL*, *dnaK*, *dnaJ* などの品質管理システムの高ホモログ遺伝子群が同定されており、上記ストレスへの応答発現、または生合成系酵素群の安定稼働に寄与している可能性に興味を持たれる。

E-10* 深海性 *Shewanella* 属細菌由来シトクロム *c'* のアミノ酸レベルでの安定化機構の解明
○須賀朝子, 加藤雄基, 藤井創太郎, 三本木至宏 (広島大院・生物圏)

【背景・目的】深海は低温、高圧力という極限環境のひとつである。深海に生息する微生物は、そのような生育環境に適応したタンパク質を有するとされる。至適生育環境 8°C, 30 MPa の *Shewanella violacea* と、至適生育環境 10°C, 50 MPa の *Shewanella benthica* は、共に深海由来でアミノ酸配列が 92% 一致するシトクロム *c'* (SBCP, SVCP) を有する。より高圧条件下に生きる細菌を由来とする SBCP は、SVCP に比べ、熱に対する安定性が 9°C 高いことを明らかにしている。本研究では、SBCP の熱安定化に寄与する要因をアミノ酸レベルで検討した。

【方法・結果】SBCP の熱安定化要因を特定するため、SBCP と SVCP の X 線結晶構造を決定し、比較した。Pro-62 はループ上に存在するため、ループ構造を安定化する可能性がある。Lys-87 は Asp-91 と塩橋を形成しているため、SBCP の安定化要因となり得る。また、SVCP では、疎水性残基である Val-87 が分子表面を向いているため、疎水性相互作用により不安定化している可能性がある。以上の理由から、Pro-62, Lys-87 が SBCP の熱安定化に寄与し得ると考察した。そこで、SBCP の 62, 87 番アミノ酸を SVCP の対応する残基に取り換える変異を導入した変異体 SBCP P62Q, SBCP K87V を大腸菌による異種発現により作製した。CD スペクトルの 222 nm を指標とした昇温測定実験の結果、SBCP P62Q では、SBCP Wt の変性温度より 2°C の低下、また SBCP K87V では、4°C の低下が見られた。よって、62, 87 番アミノ酸は SBCP の熱安定化に寄与していることが明らかとなった。

F－1*

植物寄生菌の脂質解析

○大塚拓実, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹ (徳島大院・先端技術,¹ 徳島大・生物資源)

【目的】 近年, $\omega 3$ や $\omega 6$ の必須脂肪酸が健康食品として, リシノール酸などの水酸化脂肪酸がポリマー原料として利用されることから, 様々な機能性脂質の供給源開発が求められている。これらの脂肪酸は高等植物の他に, 微細藻類や乳酸菌, 糸状菌などからも見いだされており, 微生物やその酵素を用いた発酵生産プロセスの開発が期待されている。キノコやカビなどを含む糸状菌は自然界に多種存在するが, 脂質生産性について研究されている種は限られており, 特に植物病原菌などの他生物寄生菌については培養が困難であり脂質に関する情報も乏しい。そこで, 本研究では植物病原菌に注目し, 機能性脂質の新たな供給源の探索を目的として, 脂質の定性分析を行った。

【方法・結果】 自然界より病原菌に罹患した植物組織を採取し, それぞれの特徴から感染菌を推定した。また, 植物病原菌はその生活環において病変部や菌糸体で形態が異なるため, 採取した 16 株についてそれぞれにおける脂質組成の分析を試みた。さらに, 未知の化合物に対してはガスクロマトグラフィーマスマススペクトル分析を行った。その結果, 絶対寄生菌に属するメダケ赤衣病菌やビャクシンさび病菌等から炭素鎖中に水酸基を 2 つ有するユニークな水酸化脂肪酸が検出され, それら検出された水酸化脂肪酸の構造決定を試みた。

F－2*

藍染液より単離した微生物の解析

○多田真奈巳, 中川香澄, 阪本鷹行¹, 清藤鈴奈², 竹内道樹², 小川 順², 櫻谷英治¹ (徳島大院・先端技術, 徳島大・生物資源¹, 京大院農・応用生命²)

【目的】 藍染は青色色素であるインジゴを染料とした染物であり, 発酵建てにより独特の色合いが表現される。藍染液では, タデアイを原料とした染料に含まれるインジゴが微生物によって水溶性のロイコインジゴへと還元され, セルロース系繊維に親和性を持つようになる。染液の中の微生物叢の個々の役割を解明し, 応用することで染液の使用期間の延長や染まりの安定化, 藍染液発酵過程の簡便化につながると考えられる。本研究では, 染液発酵過程に関連する微生物を単離し, インジゴ還元力を指標として, 安定した還元力を示す菌株の選定および還元力向上のための条件検討を行った。

【方法・結果】 染色に用いられるいくつかの藍染液より, 好アルカリ性細菌を単離した。得られた菌株について, インジゴ還元力を評価した結果, 42 株のインジゴ還元菌を選抜した。また, 高い還元力を示した菌株について 16S ribosomal DNA 領域の遺伝子配列を決定し比較することにより, それらは *Enterococcus* 属, *Alkalibacterium* 属, *Chryseomicrobium* 属の細菌であることが示唆された。インジゴ還元力を高めると予想される 3 種類の酸化還元メディエーターを用いた還元評価の結果, 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 倍に向上した。また, アントラキノン存在下でのみインジゴを還元する株も確認した。さらに, アントラキノン類を生産する糸状菌 O5-9 株の菌体抽出物を仮定の酸化還元メディエーターとして使用したところ, 同様に還元力の向上が観察された。

F-3*

油糧微生物ラビリンチュラにおける DHA 生産条件の検討

○中村悠嗣, 阪本鷹行¹, 櫻谷英治¹ (徳島大院・先端技術,¹ 徳島大・生物資源)

【目的】 ドコサヘキサエン酸 (DHA, 22:6 ω 3) やエイコサペンタエン酸 (EPA, 20:5 ω 3) などの ω 3 脂肪酸は、心血管疾患のリスク軽減や乳児の脳機能発達補助などの機能性があると報告されている。しかし、ヒトは ω 3 脂肪酸を *de novo* 合成できないため、食事などから経口摂取しなければならない。現在、DHA の主な供給源はイワシなどの魚油であるが、1 人当たりの摂取量や漁獲量そのものの低減から、魚に代わる DHA 供給源の確保が希求されている。ラビリンチュラ類は海水域や汽水域など幅広い海域に生息する従属栄養性微細藻類であり、DHA の生産性が高く、大量培養が容易であるなどの理由から新たな DHA 供給源として注目されている。そこで、本研究では DHA 高生産ラビリンチュラをスクリーニングし、DHA 高生産条件の検討を行った。

【方法・結果】 沖縄県海域のマングローブなどの落葉や海水から微生物を単離し、ガスクロマトグラフィーを用いた脂肪酸組成分析によって DHA 生産菌のスクリーニングを行った。その結果、339 株において DHA の生産が確認され、その中でも安定して高い DHA 生産性を示す SE-1U 株を選抜した。まず、本菌について DHA 生産に適した培地条件の検討を行った。また、培養後の菌体が浮遊層と沈殿層に分離する現象が確認されたため培地組成の検討を行ったところ、この現象には培地の C/N 比が影響していることが示唆された。さらに、DHA のさらなる生産性向上を目的として DHA 生産性向上変異株の育種を試みている。

F-4*

柑橘類果皮ポリメトキシフラボンであるスダチチンとノビレチンは、異なる細胞応答を誘導する

○安部庄剛, 廣瀬早咲, 吉田一郎¹, 辻 明彦², 湯浅恵造²

(徳島大院・先端技術,¹ 四国大・短大・食物栄養,² 徳島大・生物資源)

【目的】 スダチチンは、徳島特産のスダチの果皮から単離されたポリメトキシフラボンである。スダチチンは今までに抗炎症活性を有することが報告されているが、他の生理活性についてほとんど明らかにされていない。本研究では、アポトーシスおよびオートファジーに焦点を当て、ヒトケラチノサイト HaCaT 細胞に対するノビレチンおよび 3'-デメトキシスダチチンを含めた 3 種類のポリメトキシフラボンの新たな生理活性およびそのメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】 まず、ポリメトキシフラボンの細胞増殖抑制能を MTT assay によって測定した。3 種類すべてのポリメトキシフラボンが HaCaT 細胞の細胞増殖を高濃度 (100 μ M) で抑制し、特にスダチチンおよびノビレチンは 30 μ M においても増殖を抑制した。次に、ポリメトキシフラボンがアポトーシス誘導またはオートファジー誘導を行うか検証した。その結果、スダチチンのみが濃度および時間依存的にアポトーシスを誘導することが分かった。これに対して、ノビレチンはオートファジーを誘導し、3'-デメトキシスダチチンはいずれの作用も示さなかった。アポトーシス・オートファジーと密接に関連している MAPK ファミリーに注目したところ、スダチチンでのみ p38 および JNK のリン酸化 (活性化) が見られた。これらの結果は、ポリメトキシフラボンが構造の違いにより異なる経路を介して生理活性を発揮することを示唆しており、構造活性相関およびメカニズムを理解することによって副作用の少ない抗癌剤の開発に繋がることが期待される。

F-5*

ビタミン B₁₂ 欠乏が線虫 (*C. elegans*) のコラーゲン代謝に及ぼす影響
○岡本奈穂, 藤 飛¹, 美藤友博², 藪田行哲², 河野 強², 渡邊文雄²
(鳥取大院・連農,¹東北農業大・食品学院,²鳥取大・農)

【背景・目的】線虫 (*C. elegans*) は生育にビタミン B₁₂ (B₁₂) を要求することから, B₁₂ 欠乏状態では体内の抗酸化力の低下により著しい酸化ストレス障害を引き起こすことが明らかになっている。また, B₁₂ 欠乏線虫では頻度は低いものの太短い形態をしたコラーゲン代謝異常の変異体が観察されている。そこで, B₁₂ 欠乏が線虫のコラーゲタンパク質に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】B₁₂ 添加培地 (コントロール培地) と B₁₂ 無添加培地で線虫を 5 世代間生育させることで, コントロール線虫と B₁₂ 欠乏線虫を調製した。コラーゲタンパク質の定量は比色法およびアミノ酸分析法により行った。B₁₂ 欠乏が線虫のプロリル 4-ヒドロキシラーゼの遺伝子発現に及ぼす影響を検討するために qPCR 法を用いた。線虫のコラーゲタンパク質を定量した結果, コントロール線虫と比較して B₁₂ 欠乏線虫では顕著にコラーゲン量が減少した。また, プロリル 4-ヒドロキシラーゼの補酵素であるビタミン C を添加して調製した B₁₂ 欠乏線虫では, コラーゲン量がコントロールのレベルにまで回復したことから, B₁₂ 欠乏による体内ビタミン C 量の減少がコラーゲン量の減少の原因であることが推察された。さらに, コントロール線虫と B₁₂ 欠乏線虫におけるプロリル 4-ヒドロキシラーゼの遺伝子発現量を比較したが, 有意な差は示されなかった。現在はコラーゲン架橋に着目し, B₁₂ 欠乏のコラーゲンへの質的影響について検討している。

F-6

ビタミン B₁₂ 欠乏による線虫のカルボニル化合物の増加
○藪田行哲, 萩野 侑, 井上 和, 吉田佳代子, 美藤友博, 渡邊文雄
(鳥取大・農)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂) は主に動物性食品に含まれており, 生体内では分岐鎖アミノ酸に代謝関わるメチルマロニル CoA ムターゼとメチオニン合成酵素の補酵素として機能している。その欠乏はメチルマロン酸尿症やホモシステイン血症の他, 手足のしびれや痛みなどの神経障害や認知症を引き起こす。またその欠乏は痴呆症を引き起こす原因の一つであることが指摘されているが, その詳細は明らかではない。これまでに我々は B₁₂ 欠乏の分子メカニズムを明らかにするために, 線虫を用いて解析を行ってきた。その結果, 脊椎動物と同様に線虫でも B₁₂ 欠乏によりメチルマロン酸およびホモシステインが蓄積すること, 記憶・学習能が低下することを見出した。ところでアルツハイマー型認知症などの患者の脳内で脂肪酸の酸化により生じるアクロレイン (AC) や 4-ヒドロキシノネナール (HNE) などのカルボニル化合物が蓄積することが報告されている。そこで B₁₂ 欠乏線虫のカルボニル化合物レベルを測定した。

【方法・結果】B₁₂ 欠乏培地で 5 世代以上継代した線虫を B₁₂ 線虫とした。AC および HNE を含む 24 種類のアルデヒドはジニトロフェニルヒドラジン誘導体化し HPLC により測定した。その結果, HNE を含む幾つかのカルボニル化合物が B₁₂ 欠乏線虫で増加していた。またカルボニル化合物の蓄積による影響を解析するため, 0.5 mM HNE で 24 時間処理した線虫の遺伝子発現の変化を RNA-seq により解析した。その結果, HNE 処理により 181 遺伝子の発現が上昇し, 15 遺伝子の発現は低下した。

- F-7 Up-regulation of adipogenesis program during the maturation phase of cultured adipocytes by the prostanoid DP receptors DP₁ and CRTH2
OPinky K. Syeda, M. Shahidur Rahman, Michael N. N. Nartey, Nafisa Kabir, Kohji Nishimura, Hidehisa Shimizu, Mitsuo Jisaka, Fumiaki Shono¹, Kazushige Yokota (Dept. Life Sci. Biotechnol., Shimane Univ.; ¹Dept. Clin. Pharm., Tokushima Bunri Univ.)

Prostaglandin (PG) D₂ exerts its biological activity through two types of cell-surface receptor subtypes, DP₁ and DP₂ alternatively called chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2) in certain mammalian cells. We have recently shown the gene expression of both DP₁ and CRTH2 receptors during the maturation phase of cultured adipocytes. The expression of those receptors occurred earlier than that of lipocalin-type PGD synthase responsible for PGD₂ biosynthesis. This study investigated the gene expression profiles of adipogenic markers in cultured adipocytes treated with selective agonist for either DP₁ or CRTH2 along with indomethacin, a well-known inhibitor for cyclooxygenase, during the maturation phase. Treatment of cultured adipocytes with indomethacin alone suppressed the transcript levels of typical adipogenesis markers, indicating the involvement of endogenous pro-adipogenic prostanoids in promoting adipogenesis. The suppressed expression of the adipogenesis markers by indomethacin was rescued by the co-incubation with specific selective agonists for either DP₁ or CRTH2. These findings implicate that both DP₁ and CRTH2 receptors can be activated to induce adipocyte maturation through the positive regulation of adipogenesis program.

- F-8 若齢期アルキル化制癌剤ブスルファン暴露による精巣毒性の評価
○梅田拓実¹, 岡本崇志², 樋口雅司^{1,2}, 坪田健次郎³, 山野好章^{1,2}
(¹鳥取大・共同獣医, ²山口大・連獣, ³アステラス・安全性研)

【目的】ブスルファンは慢性骨髄性白血病の治療薬として使用されるアルキル化制ガン剤であり DNA 複製阻害による抗ガン作用を示す。一方で正常幹細胞にも重篤な障害を与え、特に雄性生殖障害の発症が知られているが、その作用メカニズムは十分に解明されていない。本研究では幼児期に投与されたブスルファンが将来的に無精子症を誘発するか、そのリスクを評価するマーカーを取得する目的で若齢期精巣に存在する精原細胞由来の GC-1spg 細胞および動物をブスルファン暴露し、形態および発現変動する遺伝子を解析した。

【方法・結果】10 μg/mL 濃度のブスルファン存在下で GC-1spg 細胞を 72 時間培養し、細胞形態観察およびマイクロアレイ法による発現変動遺伝子のスクリーニングを行った。また、qRT-PCR により遺伝子発現を分析した。次に、3 週齢 SD ラットに 10 mg/kg あるいは 40 mg/kg のブスルファンを腹腔内に単回投与し、4 週齢において精巣を摘出して HE 染色による病理変化を評価した。

GC1-spg 細胞のブスルファン暴露により膨潤した細胞骨格の異常な細胞、死細胞の出現が認められた。DNA マイクロアレイ法の結果、ブスルファン暴露により 20 の遺伝子が三倍以上発現上昇した。また、qRT-PCR によってもサイトカイン、細胞周期関連遺伝子の発現量が有意に上昇することが確認された。ブスルファン暴露動物においても濃度依存的に精巣病変を認めており、摘出精巣において細胞実験で検証した遺伝子の発現変動が起こるのかどうかを分析中である。

F-9 分裂酵母におけるリン脂質ホスファチジルイノシトール合成酵素 Pis1 の機能解析
○直塚豪気, 川向 誠¹, 松尾安浩¹ (島根大院・自然科学,¹島根大・生資科)

細胞膜を構成するリン脂質はスフィンゴリン脂質とグリセロリン脂質の2種類が存在する。分裂酵母におけるグリセロリン脂質合成は、ホスファチジン酸(PA)から CDP-ジアシルグリセロール(CDP-DAG)が合成され、その後ホスファチジルセリン(PS)とホスファチジルイノシトール(PI)に分岐する。PS はその後、ホスファチジルエタノールアミン(PE)とホスファチジルコリン(PC)の合成に用いられる。これまでに分裂酵母では、PS 合成酵素 Pps1, PE 合成酵素 Psd1, Psd2, Psd3, PC 合成酵素 Cho1 および Cho2 に関しては機能解析が進んでおり、PE が分裂酵母の細胞生育や細胞形態維持に重要であることが明らかになっている。一方、分裂酵母において、PI 合成酵素である Pis1 に関する報告はない。そこで、本研究では、細胞内での PI の役割を明らかにするため、Pis1 の機能解明を目的とした。

pis1 遺伝子は必須であるため、完全欠損株での解析が行えない。そこで、はじめに Pis1 を高発現した際の細胞への影響を解析した。その結果、Pis1 を高発現させた細胞では、細胞増殖に影響を及ぼし、細胞の先端がしぼんだり、細胞が丸くなったり、マルチセプタムを形成する異常な細胞が見られた。また、細胞骨格で重要な微小管を解析したところ、微小管の湾曲と本数が増加した表現型が観察された。さらに、Pis1 高発現時に細胞が微小管重合阻害剤に弱いながらも感受性を示した。以上のことから、Pis1 の高発現は、細胞内で微小管に影響を及ぼすことが示唆された。今後、条件的に *pis1* 遺伝子発現を低下させる株の作製を行い、細胞内での Pis1 の機能を解析していく。

F-10 分裂酵母 *pka1* 破壊株において高発現する Mug14 の解析
○稲村真一, 田部卓磨, 川向 誠, 松尾安浩 (島根大・生資科)

分裂酵母におけるプロテインキナーゼ A(PKA)は、細胞外の豊富な炭素源に応答して触媒サブユニットが活性化し有性生殖過程、糖新生、様々なストレス応答、継時的寿命などの生体内反応を調節することが報告されている。分裂酵母の *pka1* 欠損株は、様々なストレスに感受性を示すことが報告されているが、その原因の解明には至っておらず、未知のターゲットの存在は大いに期待される。今回、私達はナノ LC-MS/MS 解析によって *pka1* 破壊株において Mug14 という因子が高発現していることを見出した。そこで本研究では Mug14 の高発現するメカニズムとそれがもたらす影響について解析した。Mug14-GFP タギング株を作成しタンパク質発現解析を行ったところ、Pka1 の下流因子である *rst2* 破壊株では発現の抑圧が見られた。さらに Rst2 は転写因子であるため、半定量的 PCR によって *mug14* の転写レベルを解析したところ、タンパク質発現と同様に野生株と *rst2* 破壊株に比べて *pka1* 破壊株で発現が増加していた。これらの結果から転写因子 Rst2 が Mug14 の発現を制御していることが示唆された。また野生株における *mug14* プラスミドによる高発現、*mug14* 破壊株によるストレス感受性試験を行い、Mug14 の表現型について現在解析している。

G-1* 脂質代謝関連遺伝子の発現制御に対する 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネートの影響 ○渡辺優太, 蔵田航一¹, 河原秀明¹, 湯浅佳奈, 西村浩二², 地阪光生², 横田一成², 清水英寿²
(島根大院・自然科学,¹島根大院・生資科,²島根大・生資科)

6-methylsulfinylhexyl-isothiocyanate (6-MSITC) は、西洋ワサビには含有されていない本ワサビ特有の成分の 1 つであり、これまでに抗酸化作用や抗炎症作用を有することが報告されている。本研究では、肝細胞に対する 6-MSITC の新たな機能性を見出し、そのメカニズムを明らかにすることを目的としている。解析には、培養肝細胞である HepG2 細胞を使用し、タンパク質量やそのリン酸化はウェスタンブロット法で、mRNA 量は定量的 real-time PCR 法を用いた。6-MSITC で HepG2 細胞を刺激したところ、細胞内シグナル伝達分子である 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化 (活性化) が誘導された。さらに、その下流にある Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α) のタンパク質量が 6-MSITC 刺激によって上昇し、AMPK の阻害剤である Compound C 処理によって、そのタンパク質増加は抑制された。次に、PPAR α の標的遺伝子について調べたところ、6-MSITC 刺激による PPAR α のタンパク増加に伴って、その標的遺伝子のタンパク質量も上昇していた。加えて、6-MSITC で PPAR α のタンパク質量を増加させた後、そのリガンドである高脂血症治療薬のフェノフィブラートで刺激を行なったところ、PPAR α 標的遺伝子の mRNA 量増加が増強された。以上の結果から、6-MSITC は AMPK の活性化を介して PPAR α の発現増加を導き、脂質代謝関連遺伝子の発現上昇を制御することが可能であることが明らかとなった。したがって、6-MSITC の新たな機能性として、AMPK-PPAR α 経路を介した脂質代謝亢進に伴う高脂血症・脂肪肝発症予防への寄与が期待される。

G-2* 高圧下における加水分解酵素反応による醤油粕の可溶化
○村林 優, 白井貴広¹, 渡邊義之, (近畿大院・システム工,¹近畿大・工)

【目的】醤油粕は醤油製造時にもろみから分離される副産物であり、日本では年間約 10 万トン発生している。また、醤油粕は塩分や水分を多く含むためその用途は限られており、産業廃棄物として焼却処分されてきた。しかし、醤油粕には可溶無窒素物、粗タンパク質および微量成分としてポリフェノールの一種であるダイゼインやゲニステインなどの未利用成分が豊富に含まれていることがわかっている。また、高圧処理技術は有効成分抽出量の増加、酵素反応の促進による低分子化や可溶化などが期待できる。そのため本研究では、醤油粕の新たな有効利用法を模索すべく高圧酵素処理を試み、その操作条件が残渣量や処理液の機能性に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】粉砕した醤油粕と加水分解酵素を蒸留水または緩衝液に加え、所定の圧力 (100~400 MPa) を加えた。濾過後の残渣を乾燥させ、その重量を測定した。また、測色色差計を用いて濾液の色調を測定し、Lowry 法を用いて総タンパク質量を測定した。また、濾液中のポリフェノールおよびフラボノイド量を測定し、さらにその SOD 様活性および DPPH ラジカル消去活性の評価を行った。酵素を加えずに醤油粕を加圧した場合、処理圧力が高くなるにつれて、濾液中のタンパク質、ポリフェノールおよびフラボノイド量がいずれも高くなる傾向が確認された。また、濾液中の SOD 様活性および DPPH ラジカル消去率も処理圧力の増加に伴い、高くなった。また、酵素の触媒作用を利用した醤油粕の加水分解反応速度には、加圧の影響が著しく大きいことが示された。

G-3 **ビタミン B₁₂ 欠乏が筋組織に及ぼす影響とその原因について**
○美藤友博, 後井俊哉, 真鍋若菜, 岡本奈穂¹, 藪田行哲, 河野 強, 渡邊文雄
(鳥取大・農,¹鳥取大院・連農)

【目的】ビタミン B₁₂ (B₁₂)欠乏では運動機能障害を伴う症例が報告されるが、その詳細な発症メカニズムに不明な点が多い。B₁₂ 欠乏線虫はレドックス制御機構の破綻で著しい酸化ストレス障害を呈することが明らかになった。そこで、酸化ストレスが大きな発症要因とされる加齢性筋肉減弱症に着目し、B₁₂ 欠乏が線虫(*Caenorhabditis elegans*)の筋組織に及ぼす影響を検討した。

【方法】コントロール線虫と B₁₂ 欠乏線虫はそれぞれ B₁₂ 添加および B₁₂ 無添加培地で 5 世代間生育させ調製した。線虫の運動機能は、水中での 30 秒間のむち打ち運動をビデオ撮影し評価した。B₁₂ 欠乏が線虫の筋組織構築に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響を qPCR 法で解析した。筋組織の主構成タンパク質であるアクチンをアクチン抗体で蛍光検出を行った。

【結果・考察】水中でのむち打ち運動回数を比較した結果、コントロール線虫より B₁₂ 欠乏線虫の方が約 20%程度の運動機能の低下を示した。コントロール線虫と B₁₂ 欠乏線虫の筋組織の構築に関与する 15 個の遺伝子の発現を比較したが、顕著な発現量の差異は示さなれなかった。アクチンタンパク質の抗体染色を行ったところ、コントロール線虫と比べ、B₁₂ 欠乏線虫では老化線虫(20 日齢)と同様な、アクチン繊維の歪みや繊維間に間隙が多く見られる傾向を示した。これらの結果から、B₁₂ 欠乏線虫は軽度な筋肉減弱症様の症状を呈したことが運動機能の低下の原因であることが推測された。アクチン繊維の歪みや間隙の原因として、筋組織中への脂肪の蓄積が考えられ、現在は脂肪滴の蓄積部位の特定を試みている。

G-4* **陰イオン交換樹脂を用いた単糖のアルカリ異性化に及ぼす反応条件の影響**
○田原裕介, 横町直人, 渡邊義之, 向井克之¹, 安達修二²
(近畿大院・システム工,¹(株)ダイセル,²京都学園大)

【目的】アルカリ環境下で糖が異性化することは古くから知られており、陰イオン交換樹脂を用いた糖の異性化反応も一部で工業的に実施されている。しかしながら、D-フルクトースなどを原料として、D-マンノースや D-アルロースを得る場合、その収率の低さが課題となっている。そこで本研究では、各種の陰イオン交換樹脂を用いて D-フルクトースを基質とした回分式反応によるアルカリ異性化を実施し、各種生成物の収率に及ぼす反応条件の影響について検討した。

【方法・結果】水酸化ナトリウム水溶液を用いて強塩基性イオン交換樹脂のコンディショニングを行い、OH 形の湿潤樹脂を得た。所定量の D-フルクトースと湿潤樹脂を超純水に加えて、反応液を調製した。反応液を所定温度の振とう恒温槽内にインキュベートした。経時的に反応液を採取し、反応液中の生成物濃度を示差屈折率検出器を用いた HPLC にて測定した。

フルクトースのアルカリ異性化反応では、生成物としてグルコース、アルロース、マンノースの順に収率が多く得られた。いずれも 4~24 時間で反応平衡に到達した。また、ポーラス型樹脂に比べてゲル型樹脂の方が、僅かながら生産性が高い傾向が観察された。さらに、異性化反応中に糖の分解により生じた有機酸などが樹脂に吸着し、生産性を低下させる一因となっていることが示唆された。

G-5* **グルコサミンはオートファジーを誘導して線虫 *C.elegans* の寿命を延伸する**
○新谷知也^{1,2}, 小菅雄平³, 佐藤正資⁴, 芦田 久⁵
(¹愛媛大院・連農, ²松谷化学工業(株), ³京大院・生命, ⁴香川大・農,
⁵近畿大・生物理工)

【目的】関節の健康増進を目的として利用されてきたグルコサミン(GlcN)は, 近年その効果に懐疑的な報告がある。しかし, 疫学研究では日常的な摂取者において寿命が長いとの報告がある。我々は, 寿命と関係するオートファジー(細胞質成分の分解系)が種々の単糖によって誘導される可能性に興味を持ち, 哺乳類培養細胞を用いてスクリーニングを行ったところ, GlcN に強い誘導活性を見出した。¹⁾ 本研究では, モデル生物・線虫 *C.elegans* におけるオートファジー誘導の有無と, 寿命への影響を検討した。

【方法】オートファジーのマーカータンパク質である哺乳類 LC3 の線虫オースログである LGG-1 に GFP を融合させたトランスジェニック線虫のウェスタンブロットを行った。また顕微鏡観察にて, 細胞中のオートファジーを示すドットを計測した。次に寿命測定を行った。まず, 初齢幼虫 100 匹に GlcN と生殖細胞の分裂抑制剤 FUDR を添加した。その後, 2 日おきに線虫の生死を観察し寿命曲線を作成した。メカニズム解析のため, 野生株 N2 と寿命シグナルに関わる変異体 3 種 *daf-16* (インスリンシグナル関連遺伝子), *sir-2.1* (サーチュイン遺伝子), *atg-2* (オートファジー関連遺伝子)欠損株を, 寿命測定に供した。

【結果】GlcN 投与によって, 線虫においてもオートファジーを誘導した。GlcN は 20%の線虫寿命を延長した。オートファジー依存的に寿命を延長していると結論づけた。²⁾ 本研究により, 実験上の制約はあるものの, GlcN によるオートファジー誘導活性は疫学研究の一部を説明できる可能性が考えられた。

1) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 1775-1779 (2010). 2) *J. Appl. Glycosci.* 65, in press (2018).

G-6 **アマニ食物繊維摂取によるラット血清および肝臓脂質濃度低下と肝臓脂質代謝関連遺伝子発現の変更**
○滝澤萌子, 冠野由依, 山崎翔悟, 福田真子, 川口康平¹, 福光 聡¹,
藤谷美菜, 岸田太郎(愛媛大院・農, ¹日本製粉(株))

【背景・目的】アマニは α -リノレン酸やリグナン, 食物繊維を豊富に含み, その健康効果が注目されているが, アマニ食物繊維の効果に関する報告はわずかである。我々は, 水溶性繊維(SDF)と不溶性繊維(IDF)の両方を含むアマニ搾油残渣(複合型繊維)をラットに摂取させると, 肝臓および血清の脂質が減少することを見出した。このアマニ複合型繊維から抽出した SDF を摂取させた場合でも類似した効果が見られたが, 複合型繊維と比較するとその効果は小さかった。そこで, 本研究では, アマニ SDF に加え IDF 摂取による効果についても検討し, それらの効果を複合型繊維摂取による効果と比較した。【方法】アマニ複合型繊維を 90℃の熱湯中で 1 時間攪拌後, 遠心ろ過し, SDF と IDF に分画した。SDF はエタノール洗浄, IDF は熱湯で 3 回洗浄したものをを用いた。5 週齢 SD 系雄ラットに無繊維高スクロース飼料またはアマニ複合型繊維, SDF, IDF を各々添加した飼料を 2 週間摂取させた(各々無繊維群, 複合群, SDF 群, IDF 群)。SDF および IDF の添加率は, 複合型繊維 10%添加の場合と等価になるよう各々 3%, 4.1%とした。【結果・考察】無繊維群と比較して, いずれの繊維摂取群でも肝臓中性脂肪量が有意に減少し, それらの効果に有意差はなかった。糞中脂質排泄量は, 無繊維群と比較していずれの繊維摂取群でも有意に増加したが, 3%SDF 群より複合群で有意に多かった。血清中性脂肪濃度は IDF 群, 複合群で有意に低下し, IDF 群より複合群で低い傾向が見られた。アマニ SDF 摂取と IDF 摂取はそれぞれ脂質代謝改善効果を示し, 複合型繊維摂取の効果はそれらの相加効果であると推測される。

G-7 ビートファイバー摂取は摂取エネルギーを低下させ、視床下部レプチン-Ob-Rb シグナルの下流の食欲調節因子の遺伝子発現を変更する

○越智博介, 藤原啓士郎, 宗像 嶺, 土井 悟, 藤谷美菜, 岸田太郎
(愛媛大院・農)

【目的】我々は、ビート食物繊維(BF)をラットに摂取させると、摂取エネルギーが低下し体脂肪蓄積が抑制されることを見出した。その際、視床下部レプチン受容体(Ob-Rb)の遺伝子発現が有意に増加していた。さらに、Ob-Rb 機能欠損ラットに BF を摂取させても有意な効果は確認されず、BF の効果には Ob-Rb が関与することが示唆された。レプチンは視床下部 Ob-Rb を介して食欲調節因子の遺伝子発現を変更することにより食欲を低下させることから、本実験では、BF の摂取によって Ob-Rb の遺伝子発現が増加し、その下流の食欲調節因子の遺伝子発現が変化するのかについて、1 日 3 回(30 分/回)に摂食を制限する 3 食制により摂食タイミングを揃えたラットを用いて検討した。【方法・結果】3 食制に慣れさせた 6 週齢の雄 SD 系ラットを高脂肪飼料または BF 添加飼料で 28 日間飼育した(各々 C 群, BF 群)。摂取エネルギーの低下が顕著であった 2 食目の前後で視床下部食欲調節因子の遺伝子発現を測定した。Ob-Rb 遺伝子発現に群間で有意差はみられず、BF の効果に Ob-Rb の増加は必須ではないことが示唆された。Ob-Rb 遺伝子発現は絶食によって増加し再給餌によって低下することが報告されており、以前みられた BF 摂取による Ob-Rb 遺伝子発現の増加は摂取エネルギーの低下に対する反応であったのかもしれない。下流の食欲調節因子の遺伝子発現では、2 食目 1 時間前に食欲促進因子 galanin が BF 群で有意に増加したが、2 食目直前では食欲抑制因子 POMC のみが BF 群で有意に増加した。レプチン-Ob-Rb シグナル下流の POMC の増加がその直後の摂取エネルギーの低下に関与していることが示唆された。

G-8 ファインバブルを用いた清酒醸造

○遠藤路子^{1,4}, 日野英壺², 西内悠祐³, 多田佳織³, 藤井雄三⁴
(¹広島大院・生物圏, ²米子高専・技セ, ³高知高専・ソーシャルデザイン,
⁴米子高専・物質)

【目的】ファインバブル (FB) とは球相当直径が 100 μ m 以下の気泡で、気泡中のガスの種類、サイズ、濃度により作用は様々である。FB 処理水は原核生物には殺菌作用を示し、真核生物には増殖活性作用を示すこと、また FB 処理水を仕込水に用いて醸造した焼酎はまろやかであることが氷室らにより明らかにされた。本研究では、FB 処理水に対する清酒酵母の挙動と FB 処理水を用いて醸造した清酒が酒質に影響を与えるかを調査した。

【方法・結果】FB 処理水は H 型 FB 発生装置を用いて調製された。FB 処理条件は容量 5L に対し、流量 10 mL/min とした。FB 処理をしていない水を対照 (FB 無処理区) とし、FB 処理時間による酵母の増殖試験を行った。各試験区培地にきょうかい酵母 901 号を添加し培養を行った。培養 12 時間程度で、FB 処理区において酵母増殖の活性化が確認された。清酒小仕込みは α 米を用いて一段仕込みにて同様の試験区で試験を行った。日本酒度、酸度、アルコール度、アミノ酸度、有機酸、アミノ酸、味認識装置により酒質の評価を行った。その結果、FB 処理 120 分においてアルコール度が高かったが、その他の酒質では顕著な差を示さなかった。

G-9 光障害下におけるトチノキ種皮ポリフェノールとルテインの網膜保護効果
○石原朋恵, 木村英人, 海津幸子¹, 小山泰良¹, 松岡陽太郎¹, 横田一成^{2,3}, 大平明弘¹
(寿製菓(株)・研究開発部,¹島根大・医,²島根大・生資科,³鳥取大院・連農)

【目的】 網膜光障害モデルラットを用いた加齢黄斑変性 (AMD) 研究において, 抗酸化物質は光障害を抑制することが明らかとなっている。以前に, 我々の研究グループは, トチノキ種皮から抽出・分画したポリフェノールは光障害下における網膜保護作用を示すことを報告した。一方, ルテインは, 光刺激から網膜を保護する素材としてすでに認知されている。今回, トチノキ種皮ポリフェノールがリノール酸ヒドロペルオキシドによるルテインの退色を抑制するかを評価した。さらに, トチノキ種皮ポリフェノールとルテインの混合物の光障害に対する網膜保護作用について検討した。

【方法・結果】 トチノキ種皮熱水抽出物を DIAION HP-20 および Chromatorex ODS カラムで分画して, ポリフェノールを回収した。ルテインとリノール酸のエマルジョンを調製し, 自動酸化により生成したリノール酸ヒドロペルオキシドによるルテインの退色をトチノキ種皮ポリフェノールが抑制するかを調べた結果, ルテインの退色を抑制した。トチノキ種皮ポリフェノール, ルテインおよびトチノキ種皮ポリフェノールとルテインの混合物を経口投与し, 投与4日目に光照射を12時間行い, 光照射後, 網膜外顆粒層 (ONL) の菲薄化, 網膜電位 (ERG) を評価した。この結果, ONL の菲薄化および ERG の低下を抑制しなかった投与量のトチノキ種皮ポリフェノールおよびルテインの混合物を投与したところ, 有意な網膜保護効果が認められた。

G-10 粉末化エゴマ油の摂取によるラット血漿脂肪酸組成への影響
○吉清恵介, 高橋美穂, 本田樹人, 成宮 優, 清水英寿, 山本達之
(島根大・生資科)

【目的】 食事中の n-3 系と n-6 系脂肪酸の比率の重要性が明らかになって以来, n-3 系脂肪酸の摂取を目的とした様々なサプリメントやヘルシーオイルが注目を集めている。エゴマ油は, n-3 系脂肪酸の一種である α -リノレン酸を約6割と高濃度で含む, 植物由来のヘルシーオイルとして注目されている。我々は, 環状オリゴ糖の一種である γ -シクロデキストリン (γ -CD) を用いて島根県産のエゴマ油を粉末化し, その体内吸収性をラットを用いて評価した。体内吸収の指標として, 血漿中の総脂肪酸濃度を用いた。

【方法・結果】 本実験には, 健常な近交系ラットである Wistar-King Aptekman Hokkaido (WKAH) を使用した。正常食である AIN93G を用いて WKAH を5日間予備飼育した後に, 正常食 (AIN93G) を与える「コントロール群」, AIN93G の食物繊維を γ -CD で置き換えた食餌を与えた「CD 食群」, AIN93G の大豆油の一部を液体のエゴマ油で置き換えた食事を与えた「液体エゴマ油食群」, AIN93G の食物繊維と大豆油の一部をエゴマ油粉末で置き換えた食餌を与えた「エゴマ油粉末食群」の, 全4群に分け2~6週間飼育した。血漿の脂肪酸分析結果から, 「液体エゴマ油食」群及び「エゴマ油粉末食」群において, α -リノレン酸濃度の有意な上昇が確認された。さらに, エゴマ油粉末食群の α -リノレン酸及びエイコサペンタエン酸濃度は, 液体エゴマ油食群のそれらよりも高く, 一方でアラキドン酸の血中濃度は低かった。これらの結果から, γ -CD により粉末化したエゴマ油は, 体内吸収性に優れた n-3 脂肪酸源として, 食品加工分野での応用が期待されると考えられた。

H-1 タバコ低分子量ホスホリパーゼ A₂ の遺伝子発現応答と生理機能
○宇野貴俊, 宮崎友輔, 末川麻里奈, 富永るみ, 藤川愉吉, 江坂宗春
(広島大院・生物圏)

【目的】ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) はグリセロリン脂質の 2 位のエステル結合を加水分解する酵素であり, 植物では低分子量と高分子量の 2 つに分類されている。低分子量 PLA₂ は植物の細胞伸長や重力屈性に関与していると考えられているが, その詳細は未だ不明である。そこで本研究では, タバコにおける 2 種の低分子量 PLA₂ (Nt1PLA₂, Nt2PLA₂) に着目し, それらの生理機能の解明を試みた。

【方法・結果】まず最初に, タバコの葉に, インドール酢酸 (IAA), サリチル酸 (SA), およびジャスモン酸 (JA) を処理し, PLA₂ の発現応答を調べた。その結果, Nt1PLA₂ は JA によって mRNA の発現量が増加したのに対して, Nt2PLA₂ は JA と SA によって mRNA 発現量が低下した。次いで, タバコ低分子量 PLA₂ を過剰発現させた組換えタバコ培養細胞 BY-2 を解析したところ, Nt1PLA₂ または Nt2PLA₂ の過剰発現により病傷害応答遺伝子であるキチナーゼの mRNA 発現量が増加した。さらに興味深いことに, Nt1PLA₂ 過剰発現組換え体では Nt2PLA₂ の mRNA, また, Nt2PLA₂ 過剰発現組換え体では Nt1PLA₂ の mRNA の発現量が増加した。

現在, タバコ低分子量 PLA₂ による傷害応答遺伝子の遺伝子発現や生長における役割を評価するために, それら 2 種の低分子量 PLA₂ をそれぞれ過剰発現させたシロイヌナズナの作出を行っている。

H-2 Genome wide expression pattern analysis of LRR-RLP genes
○Sultana Mst Momtaz^{1, 2}, Amit Kumar Dutta^{1, 2}, Kohji Nishimura³,
Tsuyoshi Nakagawa¹ (Int. Cen. Sci. Res. Shimane Univ., ²The UGSAS. Tottori Univ., ³Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

Leucine Rich Repeat-Receptor like Proteins (LRR-RLPs) are cell surface receptors that characteristically consist of an extracellular leucine-rich repeat domain, a transmembrane domain, and a short cytoplasmatic tail lacking kinase motifs. In order to search a novel gene like CLAVATA2 (CLV2) and TOO MANY MOUTHS (TMM) in signal transduction and information transmission process, in total, 70 LRR-RLP genes have been identified in the Arabidopsis genome. Phylogenetic analysis divided RP (Receptor Proteins) genes into 12 distinct clades, each having distinct conserved domains and specific functions. To systematically investigate the roles of LRR-RLPs in regulating plant growth, development and stress adaptations, we generated promoter::GUS and promoter::GFP transgenic plants for all 70 LRR-RLP genes in *A. thaliana* and analyzed their detailed expression patterns at various developmental stages. Gene expression analysis in various tissues demonstrated that most of LRR-RLP genes exhibited a tissue- and development stage-specific expression pattern, exposing their imminent functions in growth and development. We have analyzed expression pattern in detail with promoter-NLS-GFP strategy for some RP genes and estimated a prospective fundamental function in plant development. Moreover, 70 LRR-RLP genes were differentially expressed under biotic, abiotic and hormone treatments and provides an impression of biological processes and presents valuable resources for future functional investigations.

H-3 *SHABONDAMA1* regulates the G2/M transition in cell cycle of *Arabidopsis thaliana* ○Amit Kumar Dutta^{1,2}, Takuma Tanabe³, Yasuhiro Matsuo³, Tsuyoshi Nakagawa¹ (¹Int. Cen. Sci. Res. Shimane Univ., ²The UGSAS. Tottori Univ., ³ Fac. Life Environ. Sci. Shimane Univ.)

Stomata play a pivotal role in the regulation of gas exchange between the aerial organs of plant and atmosphere, and their aperture and distribution were regulated by a number of factors, such as sunlight, humidity, temperature, and internal plant chemistry. In *Arabidopsis thaliana* EMS mutant *shabondama1* (*sha1*), about one fourth of stomata showed single guard cell phenotype with spherical shape and larger area size compared with normal guard cell. *SHA1* encodes a DEAD/DEAH box helicase family protein. In this study, we tried identifies the function of *SHA1* in cell cycle regulation.

sha1 mutant showed reduced growth and less photosynthesis capacity compared with wild-type in optimum growth environment. Single guard cells of *sha1* and chemically induced single guard cells arrested division in the M-phase by disrupting microtubules showed similar result in cell size and DNA content suggest that *SHA1* promote G2/M transition in cell cycle. The flow cytometry results also showed abnormality in ploidy distribution of *sha1* mutant. Loss of *SHA1* function showed uninucleate and 4C single guard cells where plastid number are similar with WT paired guard cells (stoma) confirming that the mutation blocked guard mother cell division in the G2 to M phase of cell cycle. So, The Nucleus-localized *SHABONDAMA1* regulates cell cycle progression in *Arabidopsis thaliana*.

H-4 光ストレス応答における H₂O₂ 代謝酵素のクロストーク
○菊樂香奈, 三富 弦, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典
(島根大・生資科)

【目的】活性酸素種 (ROS) の毒性とシグナル機能のバランス制御はストレス順応に重要である。植物では、ペルオキシソームのカタラーゼ (CAT) に加えて、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX) が各細胞内コンパートメントに主要H₂O₂消去酵素として分布しており、これらの協調がROSの作用バランスの決定に寄与すると考えられている。最近我々は、細胞質型APX1とCAT2の二重欠損株、そして葉緑体型sAPX, tAPX, CAT2の三重変異株を用いた解析から、*cat2*の光ストレス感受性が葉緑体型APXの欠損により促進されるのに対し、細胞質型APX1の欠損により回復することを見出した。そこで、より詳細な解析のために、全てを欠損させた四重変異株を作出し、光ストレス感受性や細胞内レドックスパラメータを他の多重変異株と比較した。

【方法・結果】二重および三重変異株と比較して、*apx1 sapx tapx cat2*四重変異株は著しく矮性であり、光ストレスに対してもっとも顕著な感受性を示した。したがって、細胞質型APX1の欠損による*cat2*の感受性の回復は、葉緑体型APXの欠損により打ち消されることがわかった。*cat2*の細胞死は酸化型グルタチオン (GSSG) の蓄積に起因することが知られている。事実、GSSG蓄積は*apx1 cat2*で緩和されており、その表現型と一致したが、もっとも強い細胞死の表現型を示す四重変異株においてもGSSGの蓄積は抑制されることがわかった。現在、各多重変異株における酸化損傷度合いについてタンパク質や脂質の酸化の側面から調べている。

H-5 グルタチオン依存的なアスコルビン酸再生は光ストレス耐性に必須である
○上野祐美, 寺井佑介, 小川貴央, 澤 嘉弘, 石川孝博, 丸田隆典
(島根大・生資科)

【目的】植物において、アスコルビン酸 (ASC) は主要なレドックスバッファーであり、ストレス応答・耐性を含む種々の生理学的プロセスに関与する。ASC は酸化により不安定なデヒドロアスコルビン酸 (DHA) となるため、その生理作用を最大限に発揮するためには DHA から ASC への再生が不可欠である。植物にはグルタチオン (GSH) 依存的な DHA 還元酵素 (DHAR) が存在し、さらに GSH そのものも DHA 還元作用を持っているが、これらの酵素および非酵素反応の ASC 再生への寄与は詳しく調べられていない。そこで本研究では、シロイヌナズナに存在する全 DHAR を欠損させた三重変異株 ($\Delta dh ar$) とグルタチオン欠乏変異株 ($pad2$) を用いて解析した。

【方法・結果】野生株、 $\Delta dh ar$ および $pad2$ を弱光条件下で栽培した後、ASC 代謝が活発になる強光ストレスを付与した。 $pad2$ の GSH 量は野生株の 20%程度だったが、驚くべきことに、 $pad2$ 変異は弱光および強光条件の ASC 量およびレドックス状態にほとんど影響しなかった。一方、 $\Delta dh ar$ では強光に伴う ASC 蓄積が有意に抑制されたが、野生株との差はわずかであった。そこで次に、 $\Delta dh ar$ と $pad2$ を掛け合わせた四重変異株を作出したところ、強光条件での ASC 蓄積がほとんど完全に抑制され、さらに $\Delta dh ar pad2$ は著しい強光感受性を示した。これらのことから、GSH 依存的な酵素 (DHAR) および非酵素反応の両方が ASC 再生および光ストレス耐性に必須であることが明らかになった。また現在、GSH 非依存的な DHA 還元系についても調べており、最近の結果を合わせて報告する。

H-6 トマト導管液に存在する遊離 N-グリカン (FNGs) の構造特性及び FNGs とオーキシンの相互作用について
○辻森祐太, 勝部 諒, 前田 恵, 木村吉伸 (岡山大院・環境生命)

【目的】近年、糖タンパク質糖鎖の生合成や分解に関与する酵素群が植物の分化・生長に重要な寄与を有することが明らかになりつつある。我々は植物複合型 N-グリカンの代謝分解機構を解明する研究の一環として、トマト $\alpha 1,3/4\text{-Fuc'ase}$ の 2 種遺伝子の同定と異種発現系を構築し、本酵素のユニークな基質特異性を明らかにした[1,2]。更に、本酵素が液胞での限定局在ではなく、細胞外に分泌されている可能性を見出した。そこで、アポプラスト液として捉えられる導管液に着目し、導管液中のグリコシダーゼ活性と遊離 N-グリカン (FNGs) の構造特性解析を行った。【方法・結果】トマト導管液を採取後、導管液中の $\alpha\text{-Man'ase}$, $\alpha 1,3/4\text{-Fuc'ase}$, $\beta\text{-GlcNAc'ase}$ 及び $\beta\text{-Gal'ase}$ を N-グリカン基質を用いて解析した結果、いずれのグリコシダーゼ活性も検出されたが $\beta\text{-GlcNAc'ase}$ 活性が顕著であった。FNGs の主要構造は $\beta\text{-GlcNAc'ase}$ で分解を受けた $\text{Man}_3\text{Fuc}_1\text{Xyl}_1\text{GN}_2$ (M3FX) であった。一方、我々は M3FX が変性タンパク質中の Trp 残基に結合することを見出している。M3FX はフォールディング促進活性を持たないものの、遊離 Trp とも特異的相互作用することを明らかにした。そこで、FNGs がオーキシン類と特異的に相互作用しオーキシンの植物細胞間における輸送に関与する可能性を想定し、今回はオーキシン類 (3-インドール酢酸, 3-インドール酪酸) と植物複合型 N-グリカン及びハイマンノース型 N-グリカンとの相互作用について、蛍光測定法による解析を進めている。 [1] Rahman, Md. Z., et al. *J.Biochem.*, **161**, 421-432 (2017) [2] Rahman, Md. Z., et al. *J.Biochem.*, **164**, 53-63 (2018)

H-7 アフィニティーゲルによる植物アスコルビン酸結合タンパク質の包括的探索 ○西原好美, 西野耕平, 岩岡裕二¹, 小川貴央, 丸田隆典, 田井章博¹, 石川孝博 (島根大・生資科, ¹県広大・生命環境)

植物組織は mM オーダーの高濃度でアスコルビン酸を含んでいるが, その必要性はまだ十分に説明できていない。最近, 我々はアスコルビン酸の C2 位あるいは C6 位に官能基を導入した安定型アスコルビン酸プローブ (2-amino-2-deoxy-L-ascorbic acid; 2-AsA および 6-amino-6-deoxy-2-O-methyl-L-ascorbic acid; 6-AsA) を作出し, これらを固定化したアフィニティー樹脂により新規アスコルビン酸結合タンパク質としてシトクロム C を同定している。本研究では植物アスコルビン酸の役割解明を目的に, 安定型アスコルビン酸プローブを用いて, シロイヌナズナからアフィニティー精製したタンパク質の解析を行うことで, 植物アスコルビン酸結合タンパク質の探索を試みた。

実験材料は, 野生株の約 20% までアスコルビン酸量が低下した, アスコルビン酸欠乏変異体 *vtc2-4* を用いた。*vtc2-4* の葉, 花, 果実の各組織から得られた粗抽出液に対し, 透析によりアスコルビン酸を除去後, 2-AsA および 6-AsA カラムに供した。カラム洗浄後, 2-O-メチル-アスコルビン酸で各結合タンパク質を溶出した。各溶出タンパク質画分をトリプシン処理後, 得られたペプチド断片を nano LC/MS を用いて分析し, Progenesis QI によりデータ解析を行った。その結果, 樹脂のみのネガティブコントロールに比べ, 2-AsA もしくは 6-AsA カラムで結合量の増加が認められたタンパク質として総計 45 タンパク質を得た。葉から得られたタンパク質のうち 45% に相当する 13 タンパク質が葉緑体局在であり, 細胞内のアスコルビン酸レベルを反映する結果であった。

H-8* 微細藻類ユーグレナのワックスエステル代謝調節に関わるタンパク質キナーゼの探索 ○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慶応大・先端生命研, ²慶応大・政策)

微細藻類ユーグレナ (*Euglena gracilis*) は, 好気条件下で貯蔵多糖パラミロンを蓄積する。嫌気条件下においてパラミロンはグルコース単位に分解され, 独自の発酵経路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へと代謝変換する。本研究は, 嫌気条件に応答したワックスエステル代謝制御機構の解明を目的としており, これまでに発現遺伝子およびタンパク質の網羅的解析によりワックスエステル代謝制御には, 嫌気に応答したタンパク質リン酸化調節が重要であるとの知見を得ている。そこで今回, 嫌気応答時のワックスエステル代謝調節を担うタンパク質キナーゼの同定を試みた。

嫌気処理前後のユーグレナ SM-ZK 株に対するリン酸化プロテオーム解析により, 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た。各プロテインキナーゼに対して二本鎖 RNA を合成し, 各々の遺伝子ノックダウン (KD) 細胞を作出し, 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。その結果, あるプロテインキナーゼの 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。WSRK 特異的抗リン酸化ペプチド抗体によるイムノブロットの結果, WSRK は嫌気条件に応答してリン酸化レベルが変動することが確認された。また WSRK_KD 細胞の各種代謝物を測定した結果, 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強く示唆された。

H-9* シロイヌナズナのフラビン化合物輸送に関与する新規因子の探索と解析
○菊池円架, 難波純也, 杉本琢隼, 丸田隆典, 石川孝博, 吉村和也¹,
重岡 成², 小川貴央 (島根大・生資科, ¹中部大・応生, ²近畿大・農)

【目的】リボフラビン (RF)を前駆体とする FAD や FMN は, 生体にとって必須な化合物であり, 植物においてこれらのフラビン化合物は, 光合成・呼吸電子伝達系, DNA 修復などの主要な代謝経路に必要な化合物であることから, 細胞内のフラビン化合物レベルは厳密に制御される必要がある。しかし, これらフラビン化合物の代謝調節機構や輸送機構については不明な点が多く残っている。そこで本研究では, シロイヌナズナ葉の FAD 処理により発現変動するトランスポーター関連遺伝子 (FAD-responsive transporters: FRTP1~17)について解析を行った。

【方法・結果】出芽酵母の RF 合成に必須な遺伝子を破壊することで, 高濃度の RF 添加培地のみで生育可能なフラビン要求株 (*rib4Δ*, *rib5Δ*)を作出した。得られたフラビン要求株に *FRTP1~17* を導入し, 低濃度 RF 添加培地での生育能を評価した。その結果, *FRTP4* を導入した株のみが低濃度 RF 添加培地で生育可能であった。また, *FRTP4* 導入株は低濃度 FMN および FAD 添加培地においても生育可能であったことから, *FRTP4* はフラビン化合物の輸送に関与する新規因子である可能性が示唆された。そこで現在, *FRTP4* の細胞内局在性やシロイヌナズナの *FRTP4* 遺伝子破壊株を用いた解析を行っている。

H-10* シロイヌナズナフラジェリン受容体 FLS2 (Flagellin-sensing 2) の flg22 誘導性
エンドサイトーシス機構の解析
○吉村庄悟, 常 愛花, 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を担う植物免疫に関わる。本研究では, 植物病害応答のダウン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。FLS2-CT には, 哺乳動物のクラスリン AP 複合体との結合に関わる酸性ジロイシンモチーフが存在する。そこで, このモチーフが FLS2 と AP2S との相互作用に関わっているかを調べた。その結果, FLS2 は AP2S と相互作用し, 酸性ジロイシンモチーフ変異体では, AP2S との相互作用が弱まったことから, FLS2 と AP2S との相互作用には, 酸性ジロイシンモチーフが関わるのが強く示唆された。また, FLS2 と酸性ジロイシンモチーフ変異体について, フラジェリンペプチド flg22 で誘導されるエンドサイトーシスの動態を蛍光ライブイメージングにより調べた結果, 野生型 FLS2 に比べ, 変異体では, エンドサイトーシスが著しく弱まった。したがって, FLS2 の flg22 誘導性エンドサイトーシスには, クラスリン AP2 複合体が関わるのが強く示唆された。

賛 助 企 業

- ・(株)旭製作所 岡山営業所
- ・天野エンザイム(株)
- ・アルファー食品(株)
- ・池田糖化工業(株)
- ・(株)猪原商会 山口営業所
- ・エイチビィアイ(株)
- ・(株)大熊
- ・大塚器械(株) 西条支店
- ・AuB(株)
- ・岡山県酒造組合
- ・(社)岡山県農業開発研究所
- ・オハヨー乳業(株)
- ・片山化学工業(株) 岡山営業所
- ・カバヤ食品(株)
- ・(株)機能性食品開発研究所
- ・協和発酵バイオ(株)
山口事業所生産技術研究所
- ・キリンビール(株) 岡山工場
- ・(株)近畿日本ツーリスト中国四国 広島支店
- ・久保田商事(株) 広島営業所
- ・寿製菓(株)
- ・三栄源エフエフアイ(株)
- ・(株)サン・クロレラ
- ・(株)四国総合研究所
- ・四国乳業(株)
- ・新青山(株)
- ・神協産業(株)
- ・(株)酔心山根本店
- ・正晃(株) 山口営業所
- ・(株)ソフィ
- ・(株)大愛
- ・大興産業(株)
- ・大山乳業農業協同組合
- ・大洋香料(株)
- ・高塚ライフサイエンス(株)
- ・(有)タグチ
- ・中国ケミー(株)
- ・鳥取科学器械(株)
- ・鳥取サイエンス(株)
- ・(有)友田大洋堂
- ・日本オリーブ(株)
- ・白牡丹酒造(株)
- ・(株)林原
- ・(有)ビーエムステーション
- ・備前化成(株)
- ・ひまわり乳業(株)
- ・(株)氷温研究所
- ・広島和光(株) 岡山営業所
- ・(株)フジワラテクノアート
- ・(株)扶桑理化
- ・プロテノバ(株)
- ・丸善製菓(株)
- ・マルトモ(株)
- ・(株)三ツワフロンテック
- ・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8月20日 現在 59社

日本農芸化学会 2018 年度中四国支部大会の開催にあたり，以下の皆様のご支援を賜りました。
ここに厚く御礼申し上げます。

国立大学法人島根大学（共催）

日本化学会中国四国支部（協賛）

日本ビタミン学会（シンポジウム共催）

