講　演　会

プ　ロ　グ　ラ　ム

日本農芸化学会中四国支部第54回講演会（例会）
プログラム

会場：岡山理科大学　岡山キャンパス
日時：2019年 6月 1日（土）

11:00～12:00　幹事打合会　（A1号館3階 A0131セミナー室）
12:10～13:00　支部参与会　（A1号館2階 A0122講義室）

13:10～13:25　中四国支部奨励賞　授賞式　（C1号館8階理大ホール）

13:25～14:30　受賞講演　（C1号館8階理大ホール）

中四国支部奨励賞受賞講演

「極限環境生物由来タンパク質の構造および安定化機構に関する研究」
藤井創太郎（広島大院・統合生命）
座長：羽倉義雄（広島大院・統合生命）

「分裂酵母のストレス応答経路に関する研究」
松尾安浩（島根大・生資科）
座長：石川孝博（島根大・生資科）

農芸化学奨励賞受賞講演

「正常な細胞機能を保証する細胞構造の制御機構に関する研究」
久米一規（広島大院・統合生命）
座長：羽倉義雄（広島大院・統合生命）

14:30～15:40　ミニシンポジウム・特別講演　（C1号館8階理大ホール）

ミニシンポジウム「企業研究者による乳酸菌研究の最前線」

「植物成分を活かす乳酸菌によるモノづくり」
西谷洋輔（丸善製薬（株）・研究開発本部）

「乳酸菌*Lactobacillus casei*シロタ株の酸化ストレス耐性機構」
世良田雅紀（ヤクルト中研）
座長：三井亮司（岡山理大・理）

特別講演

「植物ホルモン・オーキシンのケミカルバイオロジー」
林謙一郎（岡山理大・理）
座長：南　善子（岡山理大・理）

15:50～17:50　一般講演　（A1号館 A～G会場）

18:00～19:45　情報交換会　（A1号館11階ラウンジ（大会議室））

一般講演プログラム

Ａ会場（A0122 講義室）「微生物-1」

A-1　15:50　分裂酵母核膜タンパク質による核内因子の動態制御機構の解析
○伊藤航希，高山雄揮，粟津暁紀，上野　勝
（広島大院・統合生命）

A-2　16:02　分裂酵母の核小体動態の解析
○澤井謙吾，高山雄揮，粟津暁紀，上野　勝
（広島大院・統合生命）

A-3　16:14　Effects of DIM (3, 3′-Diindolylmethane) on chromosome function in fission yeast
○Parvaneh Emami，Masaru Ueno
（Hiroshima Univ. Grad. Sch. Int. Sci.）

A-4　16:26　分裂酵母 Pka1 の標的因子の探索および解析
○稲村真一 [1]，田部卓磨 [2]，川向　誠 [1,2]，松尾安浩 [1,2]
（[1] 島根大院・自然科学，[2] 島根大・生資科）

A-5　16:38　分裂酵母 *S. japonicus* と *S. pombe* の CoQ 欠損株を用いた表現型の比較
○楢原拓之，渡子　開 [1]，西田郁久 [1]，戒能智宏 [1,2] 川向　誠 [1,2]
（島根大院・自然科学，[1] 島根大・生資科，[2] 島根大・農生命系）

A-6　16:50　酵母の COPII 小胞輸送と遺伝学的に相互作用するキナーゼ遺伝子の探索
○宗野有雅，加藤萌伊，船戸耕一
（広島大院・生物圏）

A-7　17:02　酵母細胞膜に局在化する病原菌エフェクターRipAA の機能解析
○平田篤司，北囿喬斗，白井沙樹，藤原祥子，田中直孝，田淵光昭
（香川大・農）

A-8　17:14　酵母およびタバコ発現系を用いた青枯病菌の病原性因子 RipAA の機能解析
○白井沙樹，平田篤司，北囿喬斗，藤原祥子，田中直孝，Marc Valls [1]，
田淵光昭
（香川大院・農，[1] Universitat de Barcelona）

A-9　17:26　*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 における病原因子の解析

○齊藤美桜，藤原祥子，平田篤司，佐々奈緒美，生咲　巖[1]，秋光和也，
五味剣二，杉田（小西）左江子，濱野康平[1]，田中直孝，大谷　衛[1]，片岡郁雄，
田淵光昭
（香川大・農，[1] 香川県府中果樹研）

Ｂ会場（A0123 講義室）「微生物-2」

B-1　15:50　Characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase activity in *Frateuria* sp.
○Roni Miah, Minenosuke Matsutani, Takeru Murate, Naoya Kataoka, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi
（Yamaguchi Univ.）

B-2　16:02　Glucose metabolism in the *Gluconobacter* mutant strain that lost the glucose-oxidation ability
○Feronika Heppy Sriherfyna, Kensuke Hirano, Hisashi Koike, Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Tetsuo Yamashita [1], Eiko Nakamura-Ogiso [2], Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi
（Yamaguchi Univ., [1] Kagawa Univ., [2] Univ. Pennsylvania）

B-3　16:14　Characterization of the 5-keto-fructose reductase derivatives of *Gluconobacter* sp.
○Nguyen Minh Thuy, Masaru Goto [1], Shohei Noda [1], Naoya Kataoka, Osao Adachi, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi
（Yamaguchi Univ., [1] Toho Univ.）

B-4　16:26　*Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースが制御するエタノール酸化
宇都宮大貴，稗田莉奈，西江百加，○阿野嘉孝
（愛媛大院・農）

B-5　16:38　Analysis of indigenous soybean-nodulating rhizobia in Japan in relation to climate and soil
○Md Hafizur Rahman Hafiz，Ahsanul Salehin，Shohei Hayashi [1]，Kazuhito itoh [1]
（UGSAS，Tottori Univ.，[1] Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.）

B-6　16:50　Effects of the biofertilizer ‘OYK’ inoculation on plant growth promotion
○Ahsanul Salehin，Md Hafizur Rahman Hafiz，Shohei Hayashi [1]，Kousuke Suyama [1]，Kazuhito Itoh [1]
（UGSAS，Tottori Univ.，[1] Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.）

B-7　17:02　ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA135 におけるクオラムセンシングの調査
○小川智之，東　貴司 [1]，井藤和人 [1]，巣山弘介 [1]，林　昌平 [1]
（筑波大院・生命環境，[1] 島根大・生資科）

B-8　17:14　ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA4 におけるクオラムセンシングでのオートインデューサーへの反応性の調査

○東　貴司，井藤和人[1]，巣山弘介[1]，林　昌平[1]，小川智之[2]
（島根大院・自然科学，[1]島根大・生資科，[2]筑波大院・生命環境）

B-9　17:26　Isovaleric acid production as the response to acid stress in *Shewanella violacea*

○Lisa Lisdiana，Hisashi Ômura，Sotaro Fujii，Yoshihiro Sambongi
（Grad. Sch. Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ.）

B-10　17:38　高濃度 $MgCl_2$ が *Shewanella violacea* の生育及び 5'-ヌクレオチダーゼの活性に与える影響

○猪原雅司，　藤森貴子[1]，　藤井創太郎[1]，　三本木至宏[1]
（広島大・生物生産，[1] 広島大院・統合生命）

C会場（A0126 講義室）「酵素・タンパク質，微生物-3」

C-1　15:50　深海性細菌 *Shewanella benthica* DB6705 由来シトクロム *c'*の安定化機構の解明
○坂口　陸，須賀朝子[1]，藤井創太郎[1]，三本木至宏[1]
（広島大・生物生産，[1] 広島大院・統合生命）

C-2　16:02　海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン脱硫酸化酵素の精製とクローニング
○倉本弥栄，　小谷悠輔[1]，　山岡美花[2]，　長尾達彦[2,3]，　八木寿梓[2]，鈴木宏和[2]，大城　隆[2]
（鳥取大院・持社創生，[1] 鳥取大・工，[2] 鳥取大院・工，[3] 日本ジッコウ）

C-3　16:14　*Geobacillus* 属好熱菌を宿主とした異種タンパク質高生産のためのベクター開発
○倉敷凌太，　大城　隆[1]，　鈴木宏和[1]
（鳥取大院・持社創生，[1] 鳥取大・工）

C-4　16:26　VHH 抗体提示型分子認識素子を用いた AuNP のワンステップ機能化
○池田　湧，今村維克，石田尚之，今中洋行
（岡山大院・自然科学）

C-5　16:38　ペーパーベース過酸化水素センサの開発
○永谷尚紀
（岡山理大・工）

C-6　16:50　L-メチオニン γ-リアーゼ基質特異性改変酵素基質複合体の結晶構造解析
○大川敦司，半田暖尚，安田江里，室田昌輝[1]，原田繁春[1]，志波智生[1]，根本理子，田村　隆，稲垣賢二
（岡山大院・環境生命，[1] 京工繊大院・応生）

C-7　17:02　オートファジー誘導条件が担子菌 *Coprinopsis cinerea* の生育に与える影響
○今村友紀，小川直紀，麻田恭彦，渡邉　彰
（香川大・農）

C-8　17:14　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株におけるランタノイドスイッチのメカニズム
○宮本稚子，　谷　明生
（岡山大・植物研）

C-9　17:26　*Lactobacillus plantarum* 22A-3 のフェニルプロペン酸代謝酵素の誘導に関する研究

○若槻壮哉，西谷洋輔[1]，川上秀昭[1]，桑原浩誠[1]，矢野嵩典，三井亮司
（岡山理大・理，[1] 丸善製薬（株）・研究開発本部）

C-10　17:38　桜花およびブドウから分離された酵母の同定と発酵特性

○平松　歩，　滝澤　昇
（岡山理大院・工）

Ｄ会場（A0125 講義室）「有機化学・天然物化学-1」

D-1　15:50　線虫における希少糖 D-プシコースのグルコース取り込み阻害活性
○管波大貴，　新谷知也 [1]，　佐藤正資
（香川大・農，[1] 愛媛大院・連農）

D-2　16:02　*Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養により生産される新規フロイソキノリンアルカロイドの絶対立体配置の決定
○山田光代，　齊藤太樹，　小川凌太，　仁戸田照彦，　神崎　浩
（岡山大院・環境生命）

D-3　16:14　ハタケシメジに含まれるチロシナーゼ阻害物質
須貝直美，　美藤友博，　宇部尚樹 [1]，　上野琴巳，　奥田康仁 [2]，
福島（作野）えみ [2]，○石原　亨
（鳥取大・農，[1] 鳥取大院・連農，[2] 日本きのこセンター・菌蕈研）

D-4　16:26　抗腫瘍物質 Maoecrystal Ｖのラクトン環モデルの合成研究
○片山峻樹，　井田浩介，　佐藤勇気，　泉　実，　清田洋正
（岡山大院・環境生命）

D-5　16:38　抗腫瘍物質 Sanctolide A の 14 員環モデルの合成研究
○岩崎聡美，　田中善將，　平田智大，　長尾実佳，　林　建太，　泉　実，　清田洋正
（岡山大院・環境生命）

D-6　16:50　海洋環形動物から単離された Thelepamide のオキサゾリジン環モデルの合成研究
○芦田直樹，井田浩介，泉　実，清田洋正
（岡山大院・環境生命）

D-7　17:02　Herbicidal effects and chemical constituents of essential oils from *Piper cubeba* and *Piper nigrum*
○Yusuf Andriana, Tran Ngoc Quy, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

D-8　17:14　Phenolic Contents, Antioxidant, Antibacterial and Pharmaceutical Potentials of *Celastrus hindsii*
○Tran Duc Viet, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

D-9　17:26　Inhibitory activities of momilactones A, B, E, and 7-ketostigmasterol isolated from rice husk on paddy and invasive weeds

○Nguyen Van Quan, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

Ｅ会場（A0124 講義室）「有機化学・天然物化学-2，食品-1」

E-1　15:50　Effect of different solvents on the antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Agrimonia pilosa* Ldb. extracts
○Yang Anhao, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

E-2　16:02　Allelopathic activity and identification of allelochemicals from fruiting body of *Cordyceps mililatis* (L.) Link
○Tran Ngoc Quy, Yusuf Andriana, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

E-3　16:14　Environmental Interactions of Momilactones and Phytochemicals Between Rice and Weeds in Paddy Fields
○Truong Mai Van, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

E-4　16:26　Effects of music on phytochemical interactions in rice
○Kifayatullah Kakar, Tran Dang Xuan, Nguyen Van Quan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

E-5　16:38　Identification of phenolics and antioxidant properties of a white rice mutant
○Can Thu Huong, Nguyen Van Quan, Tran Dang Xuan
（IDEC, Hiroshima Univ.）

E-6　16:50　骨格筋におけるホモカルノシンの生合成を誘導する食品因子の探索
○佐藤可奈子，有馬岳志[1]，小丸拓海[2]，矢中規之，Thanutchaporn KUMRUNGSEE
（広島大院・統合生命，[1] 広島大院・生物圏，[2] 広島大・生物生産）

E-7　17:02　ハチミツの培養細胞におよぼす影響
○河野浩也[1]，山田芽吹[2]，山本和彦[1,2]
（[1] 近畿大・工，[2] 近畿大院・システム工）

E-8　17:14　ウンシュウミカン葉水溶性抽出物の抗炎症効果に関する研究
○伊藤誉子，石田萌子，門田　歩[1]，西　甲介
（愛媛大院・農，[1] 伊方サービス（株））

E-9　17:26　食品由来ポリフェノール類がアセトアルデヒドの皮膚表皮細胞への毒性に与える影響

○明神　匠，　Xu Wensi，　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）

Ｆ会場（A0132 講義室）「食品-2，動物」

F-1　15:50　さつま砂糖漬け鯛製法における味噌と砂糖の漬け込み効果
○福田　翼，　嵩慎太郎，　小林聡子，　辰野竜平，　古下　学
（水産機構・水大校）

F-2　16:02　腎臓近位尿細管細胞に対する本ワサビ成分 6-MSITC の効果に関する検証
○桑田冬馬，　今津星奈子[1]，　池野　瞳[1]，　西村浩二[1]，　地阪光生[1]，横田一成[1]，清水英寿[1]
（島根大院・自然科学，[1] 島根大・生資科）

F-3　16:14　レスベラトロールによる低栄養，低酸素状態のラット筋芽細胞生存率の向上
○内藤恭子，神吉けい太
（岡山理大・工）

F-4　16:26　刺胞動物ミズクラゲの変態に関する組織化学的研究
○藤井夏鈴，国吉久人[1]
（広島大院・生物圏，[1] 広島大院・統合生命）

F-5　16:38　ナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-C の新たなシグナル伝達機構
○西田充芳，　宮本賢治，　清水友紀，　辻　明彦[1]，　湯浅恵造[1]
（徳島大院・先端技術，　[1] 徳島大・生物資源）

F-6　16:50　柑橘類果皮ポリメトキシフラボンであるスダチチンは，MAPK 経路を介してアポトーシスを誘導する
○安部庄剛，　西谷真美，　辻　明彦[1]，　湯浅恵造[1]
（徳島大院・先端技術，　[1] 徳島大・生物資源）

F-7　17:02　過酸化水素の反復的な曝露は真皮線維芽細胞の黄変化を促進する
○江口琴音，　吉本　聖，　吉田萌生，　八木政幸[1]，　山下裕司[2]，　平尾哲二[3]，市橋正光[4]，　安藤秀哉
（岡山理大院・工，[1] ロゼット（株），[2] 千葉科学大・薬，[3] 武庫川女子大・薬
[4] 同志社大・生命医科）

F-8　17:14　細胞の自己凝集化技術を用いた血管毒性試験用の毛細血管球体の作製
○橋本真悟[1,2]，　滝澤　昇[1]，　岩井良輔[2]
（[1] 岡山理大院・工，　[2] 岡山理大・フロンティア）

F-9　17:26　農医薬スクリーニング用途を指向した細胞の自己凝集化技術を用いた新規の立体細胞組織体作製法の開発

○草加直幸，安部菜月[1]，鈴木康平[2]，広井佳臣[2]，西野泰斗[1]，岩井良輔
（岡山理大院・工，[1]日産化学・生物研，[2]日産化学・材料研）

F-10　17:38　DNA トポイソメラーゼ IIα の核小体局在と酵素活性制御機構の解析

○安田和史，池田正五，河野真二
（岡山理大・理）

Ｇ会場（A0133 講義室）「植物」

G-1　15:50　タデアイの生育過程におけるフラボノイド配糖体の成分変化
○中井翔太 [1,2]，木村英人 [2]，平林　侑 [2]，石原朋恵 [2]，地阪光生 [1,3]，横田一成 [1,3]
（[1] 鳥取大院・連農，[2] 寿製菓（株），[3] 島根大・生資科）

G-2　16:02　ゼニゴケ油体特異的テルペン集積機構
○滝澤遼典，畑田珠希，森脇佑太，肥塚崇男，松井健二
（山口大院・創科）

G-3　16:14　気孔開度の調節にかかわる孔辺細胞カルシウムイオンチャネルの機能解析
○宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行
（岡山大院・環境生命）

G-4　16:26　Mechanisms of Reactive Carbonyl Species Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis* Guard Cells
○Mohammad Saidur Rhaman，宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行
（Grad. Sch. Environ. Life Sci., Okayama Univ.）

G-5　16:38　リンゴ酸誘導気孔閉口におけるシグナル分子の同定
○三俣好令，宗正晋太郎，中村俊之，中村宜督，村田芳行
（岡山大院・環境生命）

G-6　16:50　アブシシン酸による孔辺細胞内グルタチオン量調節機構の解明
○石原慈心，長橋大樹，横井隆志，宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行
（岡山大院・環境生命）

G-7　17:02　植物生殖器官発達における COPⅡ小胞輸送因子の機能解析
○柴原　葵 [1,2]，Aboulela Mostafa [1]，田中優史 [1]，蜂谷卓士 [1,2]，中川　強 [1,2]
（[1] 島根大・総科セ，[2] 島根大院・自然科学）

G-8　17:14　植物ホルモン・オーキシンの再活性化酵素に関する研究
○村上寿基，新井一司，川渕　拓，笠原博幸 [1]，福井康祐，林謙一郎
（岡山理大・理，[1] 東京農工大院・グローバルイノベーション）

G-9　17:26　オーキシン代謝酵素 GH3 に対する阻害剤の速度論的解析
○新井一司，赤嶺孝太，福井康祐，笠原博幸 [1]，林謙一郎
（岡山理大・理，[1] 東京農工大院・グローバルイノベーション）

G-10　17:38　新規 HTL/KAI２アゴニストの創製研究

○福井康祐，浅見忠男[1]，林謙一郎

（岡山理大・理，[1] 東大院・応生化）

受　賞　講　演

講　演　要　旨

2019 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

極限環境生物由来タンパク質の構造および安定化機構に関する研究

藤井創太郎（広島大院・統合生命）

高温や酸性など，通常の生物が生育できない環境は「極限環境」と総称される。極限環境はタンパク質を変性・失活させる要因となりうるが，そこに生息する生物は熱や酸に対して安定なタンパク質を持つことで，特殊な環境下でも生命を維持できる。本研究では，高温や酸性環境に生息する微生物やユスリカについて，それらを由来とする二原子ガス結合ヘムタンパク質に着目し，分子レベルでの環境適応機構を探った。

好熱菌由来シトクロム *c′*の NO 親和性と熱安定性の関係

シトクロム *c′*は一酸化窒素（NO）結合能を有するヘムタンパク質である。好熱菌 *Hydrogenophilus thermoluteolus* 由来のシトクロム *c′*（PHCP）について，NO 結合に伴う吸収スペクトル変化から NO 親和性を解析した。その結果，常温条件下では，PHCP の NO 親和性が常温菌 *Allochromatium vinosum* 由来のシトクロム *c′*（AVCP）よりも 100 倍程度低いことを明らかにした。さらに，CD スペクトル変化を指標として各シトクロム *c′*の熱安定性を測定すると，変性中点温度が PHCP では 87ºC，AVCP では 53ºC であった。よって，PHCP の NO 親和性の低さは，その熱安定性の高さに起因する可能性が示唆された。

シトクロム *c′*の熱安定性の高さと NO 親和性の関係性を明らかにするために，X 線結晶構造解析により PHCP の立体構造を決定した。PHCP と AVCP のヘム周辺環境を比較すると，PHCP の Thr-17 とヘムが水素結合を形成しており，これは AVCP の Glu-17 には見られない相互作用であった。さらに PHCP の Ala-20 は，AVCP の Gly-20 と比べてメチル基がひとつ増えることで，ヘムとの疎水性度が向上していた。変異導入実験により，これら PHCP でのヘム周りの相互作用形成が，NO 親和性の低さ，そして PHCP の高い熱安定性に寄与することを明らかにした。すなわち，PHCP のヘム周辺の構造が，高温環境適応に重要な役割を果たす可能性を見出した。

酸耐性ユスリカの酸性条件下で誘導されるヘモグロビンの解析とその特徴

ヘモグロビン（Hb）は O_2 輸送体として機能するヘムタンパク質である。霧島山の河川から採集されたフトゲユスリカ *Chironomus sulfurosus* の幼虫は，pH 3.1 の酸性水域に生息する酸耐性ユスリカの 1 種であり，1 個体あたり 10 種類以上の多様な Hb を有する。Hb の O_2 親和性は酸性条件により低下してしまうことから，*C. sulfurosus* 幼虫の持つ多様な Hb の中には酸性環境適応に特化した Hb が存在する可能性があった。そこで本研究では，酸性環境に必要となる Hb を *C. sulfurosus* 幼虫から探索し，それが酸性環境へ適応するための分子機構を明らかにする。

酸性および中性で *C. sulfurosus* 幼虫を飼育し，RNA-seq により全トランスクリプトームの発現量を解析することで，酸性環境で発現誘導される Hb があるか調査した。34,964 種類のうちの Hb 遺伝子が 21 種類同定でき，そのうち約 11 種の Hb 遺伝子の発現量が酸性条件で上昇していた。それら Hb のアミノ酸配列を用いた三次構造予測を行うことで，発現量が上昇した Hb はヘム周辺がより疎水的であることが明らかになった。つまり *C. sulfurosus* 幼虫は，酸性環境に適応するために，ヘム周辺の疎水性度を上げた Hb を発現誘導することにより，酸性環境に適応していることが示唆された。

以上の研究成果から，極限生物の持つヘムタンパク質は，高温や酸性環境への適応のためにヘム周辺に疎水性度の高いアミノ酸残基を選択しており，それによって高温や酸性での機能性を獲得していることを見出した。

2019 年度日本農芸化学会中四国支部奨励賞受賞講演

分裂酵母のストレス応答経路に関する研究

松尾安浩（島根大・生資科）

細胞はストレスや薬剤, 栄養源の枯渇などの環境にさらされた際, それに適応するために種々のシグナル伝達経路を活性化させる。ストレスや栄養源などの環境条件に応答する主要なシグナル伝達経路として，MAP キナーゼ経路，TOR 経路および cAMP/PKA 経路が知られている。MAP キナーゼ経路および TOR 経路に関しては，これまでに多種のモデル生物を用いて，多くの研究が行われてきた。しかしながら，cAMP/PKA 経路に関しては，グルコース応答経路としての研究は行われてきたが，ストレス応答経路としての知見は非常に少ない。ヒトやマウスには PKA の触媒サブユニットが複数存在しており，解析が困難である。また，出芽酵母は PKA の触媒サブユニットが 3 つ存在し，完全欠損株は致死であるため，完全な機能欠損状態での解析ができない。一方で，分裂酵母は PKA の触媒サブユニットが 1 つしか存在しておらず，遺伝子の欠損株は正常に生育でき，完全な機能欠損株で解析が行える。そのため，分裂酵母の *pka1* 欠損株を用いて研究を行った。

cAMP/PKA 経路は，ストレス応答に関する知見が少ない。そのため，どのストレスに応答しているのかを明らかにするために, 分裂酵母 *pka1* 欠損株を用いて様々な薬剤や塩ストレスに対する感受性を解析した。結果として，新たにいくつかの条件下で感受性を示した。その中で，今回塩化カルシウムへの感受性に焦点をおいた。塩化カルシウムへの感受性に対して，遺伝学的解析を行ったところ，PKA の活性に依存して塩化カルシウム感受性を示していることを明らかにした。塩化カルシウム存在下では，Pka1 の核局在が徐々に細胞質局在に変化していたが，タンパク質発現には大きな変化はなく，Pka1 の細胞内局在変化によって塩化カルシウムへの応答をしていることが示唆された。次に，PKA の標的としてカルシウムシグナル経路の主要な転写因子である Prz1 に注目した。*pka1* 欠損株で，Prz1 の細胞内局在は変化はなかったが，*prz1* mRNA 発現が顕著に増加していた。また，野生株で Prz1 を高発現させると塩化カルシウム感受性を示したことから, *pka1* 欠損株では Prz1 の発現増加が塩化カルシウム感受性の原因であると結論づけた。また，Pka1 経路によって，*prz1* mRNA の発現が制御されていたため，グルコース制限下で *prz1* mRNA の発現が変化するのかを解析した。結果として，グルコース制限下で *prz1* mRNA 発現が上昇していた。以上のことから，カルシウムシグナル経路の Prz1 は Pka1 経路とグルコース制限によって転写レベルで発現制御されることを明らかにした。

Pka1 の標的因子の 1 つとして転写因子 Rst2 があり, これまでに有性生殖過程への移行と糖新生でそれぞれ Ste11（有性生殖過程誘導転写因子）と Fbp1（フルクトース 1,6-ビスホスファターゼ）をコードする遺伝子の mRNA 発現を制御していることが報告されている。しかしながら，それ以外の機能は，ほとんど解析されていない。網羅的な解析では Rst2 高発現が細胞生育に影響を及ぼすことが報告されているが，その詳細は解明されていない。そこで，Rst2 高発現下での細胞への影響を解析することで Rst2 の機能を明らかにすることを試みた。野生株で Rst2 を高発現させたところ，細胞増殖阻害，細胞形態の異常，減数分裂過程の誘導，核の断片化，微小管の湾曲および塩ストレス感受性を示した。また，*pka1* 欠損株での Rst2 高発現は，野生株よりも細胞増殖が阻害されたため，Pka1 経路を介していることが明らかになった。次に，Rst2 高発現の表現型が, 転写制御によるものかを DNA 結合ドメインを欠損させた Rst2(C2H2Δ)を用いて解析した。結果として，減数分裂課程への移行と核の断片化の一部は，転写を介した制御であり，それ以外は転写以外の影響であることが示唆された。

以上のことから，分裂酵母において，cAMP/PKA 経路がカルシウムシグナル経路に関係しており，転写因子 Rst2 が様々な細胞内制御機構に関与することを明らかにした。

2019 年度日本農芸化学会農芸化学奨励賞受賞講演

正常な細胞機能を保証する細胞構造の制御機構に関する研究

久米一規（広島大院・統合生命）

生命の基本単位である細胞が，正常な機能を発揮するためには，細胞増殖と連動した細胞構造の制御が必須である。つまり，正常な細胞機能を保証する細胞構造の制御機構（以後，本機構）の存在が示唆される。実際，細胞機能に異常を示す癌細胞や老化した細胞では，核サイズや細胞極性など，細胞を構成する細胞構造にも異常を示すことから，本機構の破綻が，細胞の癌化や老化を誘導・促進する要因となることが示唆されている。それゆえ，本機構の解明は，細胞の癌化や老化を理解するうえで重要であるが，その実態については，未だ不明な点が多い。

私は，細胞の癌化や老化の解明を念頭に，真核細胞のモデル生物である酵母を用いて，細胞構造の中でも特に，核サイズと細胞極性に焦点をあて，本機構の解明を目指し，研究に取り組んできた。そして，細胞増殖と連動する核サイズの制御機構，細胞増殖と連動する細胞極性の制御機構，それぞれの機構の解明につながる重要な研究成果を得た。以下にその概要を記す。

1. 細胞増殖と連動する核サイズの制御機構の解明

ほとんどの真核細胞の核サイズは，細胞サイズと比例関係にあり，核と細胞の体積比（以後，N/C ratio）は一定に維持されている。しかし，細胞がいかにして核サイズを決定し，制御しているのか，その実態については不明な点が多い。また，癌細胞や老化した細胞では，核サイズや核形態に異常を示すことから，核サイズ制御機構の解明は，細胞の癌化や老化を理解するうえで重要である。

私は，真核細胞に普遍的な核サイズ制御機構を解明するために，分裂酵母の遺伝子破壊株ライブラリー（約 3,000 株）を用い，核サイズ異常変異体の網羅的スクリーニングを実施した。そして，N/C ratio に異常を示す変異体の選抜に成功した。さらに，選抜した N/C ratio 変異体の解析から，核サイズ制御には，核と細胞質間の輸送と核膜供給に関わる脂質代謝の両プロセスの適切な制御が重要であることを明らかにした。

2. 細胞増殖と連動する細胞極性の制御機構の解明

分裂酵母は，細胞増殖と連動して細胞極性をダイナミックに変化させる。私は，細胞増殖と連動する細胞極性の制御機構を理解するため，高温で増殖停止し，かつ細胞極性に異常を示す 2 つの変異体に注目し，その解析を行った。

1 つめの変異体は，分裂酵母における細胞極性の変換点，NETO（new end take off）の制御が破綻する変異体（原因遺伝子：DNA ポリメラーゼ alpha）で，当該変異体の解析から，DNA 複製チェックポイント経路が，細胞極性の変換点を制御する，CCT 経路（Cds1-Calcineurin-Tip1：Cds1，DNA 複製チェックポイントキナーゼ；Calcineurin，Ca^{2+}/カルモデュリン依存性プロテインホスファターゼ；Tip1，微小管結合因子）を発見した。さらに，CCT 経路の新規関連因子を多数同定するとともに，Calcineurin 活性を阻害する生理活性物質探索系の開発に成功した。

2 つめの変異体は，細胞極性を完全に失い（アクチンが細胞全体に分散），野生株が示す円筒形の細胞形態から球形となる細胞極性異常変異体で，当該変異体の解析から，細胞極性の確立と維持に重要な，細胞形態形成ネットワーク・MOR 経路（Morphogenesis Orb6 network 経路）を発見した。さらに，MOR 経路の新規関連因子を同定し，その機能を明らかにした。

核サイズと細胞極性に焦点をあてた本研究から，それぞれの制御に関わる細胞内プロセスや因子を同定し，制御メカニズムの一端を解明してきた。同定した因子は，進化上保存されていることから，本研究成果は，普遍的な細胞構造の制御機構の基盤となる基礎的知見であり，細胞の癌化や老化の理解に貢献しうるものである。

ミニシンポジウム

講演要旨

ミニシンポジウム講演

植物成分を活かす乳酸菌によるモノづくり

西谷洋輔（丸善製薬（株）・研究開発本部）

Lactobacillus plantarum は，世界中の植物性発酵食品から高頻度に分離される乳酸菌である。植物の種類や環境が異なるにもかかわらず発酵できるのは，植物に含まれる成分を利用できるために他ならない。当社丸善製薬は，植物の抽出エキス製造メーカーである。我々は，この植物発酵に特化した乳酸菌の性質を利用し，より付加価値の高い植物由来成分の研究開発を進めており，その一例を紹介したい。

植物に含まれる機能性成分としてポリフェノール化合物（緑茶に含まれるカテキン，コーヒーに含まれるクロロゲン酸，ウコンに含まれるクルクミン等）が知られている。ヒトに対して様々な作用が報告されているこれらの成分は，食品として摂取した場合，大腸へ到達すると食物繊維などと同様に腸内細菌の影響を受ける。一般的にはより低分子の化合物へと代謝され，一部は消化管から吸収されたり，または便中へと排泄されたりする。例えば，ヒト試験による報告から，コーヒーを摂取した場合，クロロゲン酸類の大部分は大腸へと流れ込み，腸内細菌による代謝を受けた後に吸収されて血液中に入り，最終的には尿として排出されることが知られている。血中にあるクロロゲン酸類の代謝産物を分析したところ，最も多い化合物のひとつに 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propionic acid（以下，HMPA）が報告されている。クルクミンにおいては，ヒトの糞便に含まれる細菌と混ぜて一定時間培養したとき，培養液中に産生される主要な化合物の一つに HMPA が報告されている。これら以外にも，機能性が知られている複数のポリフェノール化合物について，血中や尿中に共通する代謝産物として HMPA が認められること，さらに生体への作用には血流にのり作用点へと運ばれる必要があることから，我々は HMPA が活性本体の一つではないかと注目した。腸内細菌叢の構成は個人によって異なることが知られているため，HMPA として摂取すれば，作用に個人差のない食品素材の開発が可能になるのではないかと着想し，研究開発を行っている。

我々はこの HMPA について，*L. plantarum* の有するポリフェノール代謝能を利用して，その前駆物質である 4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid（以下，HMCA）から発酵生産する検討を行っている。*L. plantarum* には，ポリフェノール代謝能として，加水分解型タンニンを代謝するタンナーゼ活性，またフェノール酸を脱炭酸するフェノール酸脱炭酸活性などが報告されている。当社独自株である *L. plantarum* 22A-3 を用いたこれまでの研究により，本菌株には HMCA から HMPA へと還元する代謝経路と，4-vinylguaiacol へと脱炭酸する代謝経路があることが明らかになった。また，この還元反応および脱炭酸反応には，生育する環境の酸素条件が関係していることが明らかになった。現在，効率的な発酵生産を目指し，取り組みを続けている。

HMPA の生体における作用としては，これまでのところ報告が少なく不明な点が多い。我々は現在，抗肥満作用に注目して研究を進めている。肥満モデルマウスを用いた検討から，肥満状態における血中コレステロール値などを有意に改善する作用が認められた。

本研究開発は，乳酸菌を用いた植物からの高付加価値成分の発酵生産，およびその成分の機能性を解明することを目指している。その要となる HMCA の還元酵素については，酵素学的な性質や生物学的な意義などは不明である。また，抗肥満作用についてもメカニズムが明らかになっていない。今後，発酵生産および成分の機能性研究を進めることにより，モノづくりを成功させるとともに，科学的にも新たな知見が得られることを期待している。

ミニシンポジウム講演

乳酸菌 *Lactobacillus casei* シロタ株の酸化ストレス耐性機構

世良田雅紀（ヤクルト中研）

嫌気性菌に分類される乳酸菌は，一般的な生育環境下においては呼吸鎖が機能していないため，酸素は生育に不要であるが，好気的な条件下でも生育することが可能である。これまでに酸素や活性酸素を消去する種々の因子が報告されているが，菌種や菌株に特異的であり，個々の菌株の消去機構は異なっている。そして，この消去機構の違いが，乳酸菌の菌株間で酸素や活性酸素耐性に差が生じている原因であると考えられている。

Lactobacillus casei シロタ株は，古くから発酵乳の製造に使用されており，産業上において非常に有用な菌株である。本菌株は，好気的な環境での発酵乳の製造が可能で，その後の流通や賞味期限日までの保存の過程で常に好気的な環境に置かれているにもかかわらず，製品中の高い生菌数の維持が可能である。このことから，本菌株はいくつもの酸化ストレス耐性の機構が機能していることが予想された。そこで，我々は *L. casei* シロタ株が持つ酸化ストレス耐性に関与する遺伝子を同定し，その耐性機構について明らかにすべく，研究を行ってきた。本講演では，それらの研究成果を中心に紹介する。

L. casei シロタ株のゲノム上にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 遺伝子がコードされているが，この遺伝子は機能していなかった。そして，複数のマンガントランスポーターによって細胞内に蓄積したマンガンがスーパーオキシド耐性に関わっていることを明らかにした[1]。また，酸化還元調節に関与するチオレドキシンの遺伝子が 4 つ，チオレドキシンレダクターゼの遺伝子が 1 つゲノム上にコードされていた。遺伝子破壊株の解析から，これらの遺伝子が *L. casei* シロタ株の酸化還元状態を維持する主要なシステムであり，好気条件下での生育に必須であることが示唆された[2]。さらに，酸化ストレス下で高発現する遺伝子として新たに見出した *hprA1* 遺伝子 (hydrogen peroxide resistance gene) 破壊株は過酸化水素ストレスに対する感受性が野生株よりも増加した。また，この遺伝子にコードされるタンパク質は，細胞内で鉄と結合しヒドロキシルラジカルの生成を抑制する可能性を示した[3]。これらの知見や更なる酸化ストレス耐性のメカニズムの解明は，製造技術の改良や生理機能の向上に役立てるために利用できるものと期待される。

参考文献

(1) Serata, M. *et al*., *Biosci Microbiota Food Health*, **37**, 31-38 (2018).
(2) Serata, M. *et al*., *Microbiology*, **158**, 953-962 (2012).
(3) Serata, M. *et al*., *Microbiology*, **162**, 1885-1894 (2016).

特　別　講　演

講　演　要　旨

特別講演

植物ホルモン・オーキシンのケミカルバイオロジー

林謙一郎（岡山理大・理）

植物ホルモンであるオーキシンは胚発生，花芽形成，側根形成，頂芽優勢，光・重力屈性など，植物の分化・成長のあらゆる局面で働く。植物の複雑な形態形成や多様な環境応答には，組織・細胞のオーキシン濃度の動的制御が重要とされている。オーキシン濃度の調節には，その生合成・輸送および不活性化の３つの経路が関わるとされている。その中でも組織や細胞間のオーキシン分布（濃度勾配）は，極性輸送とよばれるオーキシンの能動的輸送で形成される。この輸送により生じるオーキシン分布の変化を可視化する技術は，長年待ち望まれている。タンパク質の体内分布の可視化では，GFP 融合タンパク質の *in vivo* 蛍光イメージング技術が基盤技術として幅広く活用されている。一方，低分子有機化合物の可視化については，^{14}C のような放射線同位体やポジトロン核種でラベル化した化合物の検出によって解析可能であるが，高度な検出機器を要し，また空間分解能が低く動的な解析はいまだ難しい。一方，低分子の生理活性物質を蛍光基で標識し，共焦点顕微鏡などで可視化する例がこれまで多く報告されているが，元の活性物質の分布を本当に反映しているのかについては常に疑問が残る。本講演では，オーキシン濃度分布を可視化・制御するケミカルバイオロジーによる 2 つのアプローチを紹介する。

【１】<u>新しいコンセプトに基づいた蛍光ラベル化オーキシン</u>

植物ホルモンに蛍光基を導入し，その蛍光像から植物体内での分布を解析するという着想は古くからあった。しかしながらオーキシンであるインドール 3-酢酸（IAA）に蛍光基を導入すると，そのオーキシン活性が消失する。オーキシン受容体 TIR1 と IAA の共結晶構造からも，その活性を保持したまま，IAA に蛍光基を導入することは不可能であることが分かった。我々は，オーキシン分布の解析には，蛍光ラベル化オーキシン（蛍光オーキシン）が本当にホルモン活性を保持する必要があるのか？と再考し，蛍光オーキシンに必要な特性は受容体への結合活性ではなく，極性輸送タンパクにより細胞内外へオーキシンと同様に輸送されることであると推定した。この仮説に基づき，オーキシンと同様に輸送タンパク質 PIN などにより認識・輸送される蛍光オーキシンの分子設計を行い，生理活性を検討した。新たなコンセプトのもと設計した蛍光オーキシンは，これまで推測されてきたオーキシンの組織・細胞分布と一致し，さらに細胞内では ER に偏差分布することが示された。また，下等植物である蘚類でのオーキシン分布解析への適用なども紹介する。

【２】<u>細胞内オーキシン濃度分布の能動的制御</u>

オーキシン濃度制御と分化制御・生理応答の関係を理解するためにはオーキシン量を自在に制御する技術が欠かせない。ワセリンや寒天などにオーキシンを混合し植物に微量を塗布する方法が広く用いられている。しかしながら，これらの方法は簡便な反面，時空間的な分解能に乏しく，厳密なオーキシン濃度の制御も困難である。今回，細胞レベルの分解能をもつ新しいコンセプトのオーキシン投与システムを紹介する。我々は植物体内で安定なオーキシンのプロドラッグを設計・合成するとともに，そのプロドラッグのみを選択的に分解してオーキシンを遊離する活性化酵素を土壌微生物からスクリーニングした。同定した分解酵素遺伝子をクローニングし，植物体内で細胞特異的プロモーターの制御下で GFP 融合酵素として発現させた。この形質転換体にオーキシンプロドラッグを作用させると，GFP 融合酵素が発現する細胞のみで選択的にオーキシン濃度を増加させることができた。また従来不可能であった，ER や核に直接かつ選択的にオーキシンを投与することに成功した。

一　般　講　演

講　演　要　旨

Ａ－１　　分裂酵母核膜タンパク質による核内因子の動態制御機構の解析

〇伊藤航希，高山雄揮，粟津暁紀，上野　勝（広島大院・統合生命）

【目的】核膜や核小体は人々の健康に大きく関わっているが，これらの動態制御機構は未解明な部分も多い。本研究では，モデル生物として分裂酵母を用いて核膜に存在するタンパク質が核小体や SPB などの核内因子の動態への影響を解明することを試みた。

【方法】核膜と SPB に局在する Lem2 や，核膜全体に局在してテロメアを核膜に繋ぎ止める働きを持つ Bqt4，テロメアの DNA リピートに結合する Taz1 などのタンパク質を破壊した株を作製し，核膜を Cut11-GFP，SPB を Sid4-mCherry，核小体は Gar2-mCherry で可視化した。標識した株を用いて生細胞蛍光顕微鏡によるライブイメージングを行い，それぞれの核内因子の輝度中心の 3 次元座標を数値化して，核の中心を基準とした距離を算出し，核内の動態を定量化した。

【結果】*bqt4* 破壊株では SPB や核小体の動きは，野生株と比べて大きく変わらなかったが，*lem2* 破壊株では SPB の動きが大きくなった。これらの結果から Lem2 には SPB の動きを抑制する働きがあると考えられる。我々は，核小体の体積が周期的に変動することを発見した。さらに，*lem2* 破壊株，*taz1* 破壊株，*bqt4* 破壊株，*taz1 bqt4* 二重破壊株では，野生型と比べて核小体の体積変化の周期的が変化することを発見した。今後は Lem2，Bqt4，Taz1 が核小体の体積変化にどのように関与するのかを解析していく。

Ａ－２　　分裂酵母の核小体動態の解析

〇澤井謙吾，高山雄揮，粟津暁紀，上野　勝（広島大院・統合生命）

【目的】当研究室では，分裂酵母の核小体には動きが見られ，それは様々な条件によって変化することを発見しているが，その重要性や役割は未だに解明されていない。そこで本研究では様々な条件かにおける核小体動態変化の解析を試みる。

【方法】核小体(Gar2-mCherry)，RNA ポリメラーゼのサブユニット(Nuc1-GFP)，核膜(Cut11-GFP)などを標識とした株を用いて生細胞蛍光顕微鏡観察を行い，観測データをトラッキング解析することによって核小体内の核内動態を定量化した。

【結果】まず，DNA 複製阻害剤を添加し核小体の動態変化を観測した。すると核小体全体の動きが大きくなることが分かった。また同様にタンパク合成阻害剤や核小体の相分離を阻害する薬剤を加えることでも核小体の動きは大きくなった。また Nuc1 の体積変化を定量化した時核小体が正常に機能している際には RNA ポリメラーゼ I 複合体が周期的に膨張と縮小を繰り返していることが分かったが，DNA 複製阻害剤や転写阻害剤を加えることにより規則的な膨張と縮小ができなることを発見した。また核小体も同様に周期的に膨張と縮小を繰り返しているが，その周期性は転写阻害剤を加えることにより崩れるが DNA 複製阻害剤では変化しないことが分かった。今後はこれらの動きや周期的な膨張と縮小の生物的意義を明らかにしていきたい。

Ａ－３　Effects of DIM (3, 3'-Diindolylmethane) on chromosome function in fission yeast

〇Parvaneh Emami, Masaru Ueno (Hiroshima Univ. Grad. Sch. Int. Sci.)

DIM (3, 3'-Diindolylmethane) is considered as a promising anticancer agent derived from the digestion of indole-3-carbinol, found in broccoli family. DIM inhibits human mitochondrial H^+-ATPase and COX1/2 protein kinase activities in vitro. It induces proteasome-mediated degradation of class I histone deacetylases and decreases the aromatase expression. However, the direct target of DIM in human cells not fully understood. Recent studies mentioned that DIM can extend lifespan in fission yeast. However, the mechanism of DIM in life extension is still unknown. In this study we studied the effect of DIM on the growth of fission yeast.

Surprisingly, we showed that during the first day of the drug usage, most of the cells were killed by DIM. We also found that DIM induces nuclear condensation even after 10 minutes. It reduced the cytoplasmic microtubules length. DIM did not inhibit entering mitosis, but it induced degradation of mitotic spindle probably at anaphase. In contrast, microtubule inhibitor, carbendazim, inhibited entering mitosis, suggesting that DIM does not work as just microtubule inhibitor. DIM also changed mitochondrial morphology, possibly by inhibiting mitochondrial H^+-ATPase.

In conclusion DIM is a powerful compound that may have the different targets to change chromosome function and cell cycle process in fission yeast. More studies are required to find the exact functional mechanism for this compound.

Ａ－４　分裂酵母 Pka1 の標的因子の探索および解析

〇稲村真一[1]，　田部卓磨[2]，　川向　誠[1,2]，　松尾安浩[1,2]
（[1]島根大院・自然科学，[2]島根大・生資科）

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され，様々な生体内反応を調節することが報告されている。分裂酵母で *pka1* 欠損株は，いくつかのストレスに感受性を示すが，その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では，網羅的解析によって，Pka1 の標的因子を同定し，その詳細な制御機構を解析することで，細胞内での機能を明らかにすることを目的とした。

Pka1 経路の下流因子を同定するために，野生株と *pka1* 欠損株からタンパク質を抽出し，ナノ LC-MS/MS 解析によって発現量の変化を解析した。その結果，野生株に比べ，*pka1* 欠損株で発現量が変化している複数のタンパク質を同定した。その中で，顕著に発現量が増加していた Mug14 に焦点を置いた。まず，Mug14-GFP 株を作製し，局在解析を行ったところ，野生株に比べ *pka1* 欠損株は細胞全体で強い蛍光が観察された。次に，タンパク質発現および mRNA 発現の解析をしたところ，*pka1* 欠損株で増加していた。Pka1 の下流には，転写因子 Rst2 があり，Pka1 によって負に制御されているため，*pka1 rst2* 二重欠損株を解析したところ Mug14 は Rst2 によって転写レベルで制御されていることが明らかになった。また，分裂酵母では Mug14 のホモログ Add2 が存在していたため，発現解析を行ったところ，Mug14 と同様に *pka1* 欠損株で発現が増加していた。現在，*pka1* 欠損株で Mug14 および Add2 の発現が増加している意義を明らかにするために，単独欠損株，二重欠損株および三重欠損株の表現型解析を行っている。

Ａ－５　分裂酵母 *S. japonicus* と *S. pombe* の CoQ 欠損株を用いた表現型の比較

〇楢原拓之，渡子　開[1]，西田郁久[1]，戒能智宏[1]，川向　誠[1]
（島根大院・自然科学，[1]島根大・生資科）

【背景・目的】コエンザイム Q(CoQ)は，ミトコンドリア電子伝達系の必須因子であり，抗酸化能をもつ物質である。モデル生物として知られている分裂酵母 *S. pombe* において，CoQ を生合成することのできない CoQ 欠損株は，呼吸欠損，高濃度の硫化水素の発生，最少培地での生育遅延，酸化ストレス感受性といった特徴的な表現型を示す。CoQ は呼吸を行う生物にとって極めて重要な物質であるが，*S. japonicus* は CoQ 生合成遺伝子がゲノム上にあるにもかかわらず，細胞内の CoQ_{10} 量が *S. pombe* の約 220 分の 1 と極微量であることが明らかとなっている。そこで，*S. japonicus* において，極微量の CoQ_{10} がどのような機能を持っているかを調べるために，完全 CoQ 欠損株を作製し，表現型の解析を行った。

【方法・結果】*S. japonicus* のプレニル基転移酵素遺伝子を破壊することで，CoQ_{10} を完全に欠損させた *ΔSjppt1* 株を作製し，CoQ_{10} が極微量である野生株と表現型の比較を行った。非発酵性炭素源培地，H_2O_2 またはパラコート添加培地，最少培地にて生育試験を行ったところ，いずれの培地においても，*ΔSjppt1* 株は野生株とほぼ同様の表現型を示した。H_2O_2 またはパラコート添加培地では，*S. pombe* の CoQ 欠損株よりも，強い感受性を示した。また，完全培地で 48 時間培養し，経時的に硫化水素の発生量を測定したところ，*ΔSjppt1* 株では *S. pombe* の CoQ 欠損株とは異なり，高濃度の硫化水素の発生はみられず，野生株と同程度であった。これらの結果から，*S. japonicus* の野生株と *ΔSjppt1* 株の表現型に差は見られなかったが，*S. pombe* の CoQ 欠損株とは異なる表現型を示した。

Ａ－６　酵母の COPII 小胞輸送と遺伝学的に相互作用するキナーゼ遺伝子の探索

〇宗野有雅，加藤萌伊，船戸耕一（広島大院・生物圏）

【目的】

細胞やオルガネラの機能や維持に小胞輸送は必要不可欠であり，その出発点である COPII 小胞の形成は重要なステップである。現在，COPII 小胞の形成に関与するタンパク質とその翻訳後修飾が明らかにされているが，COPII 小胞の形成の調節機構は不明である。Sec12 と Sec13 を除いた他の COPII 小胞形成に関与するタンパク質 Sar1, Sec16, Sec23, Sec24, Sec31 は全てリン酸化されることから，それらのタンパク質はリン酸化によって活性化あるいは調節されていると考えられるが，それらを担うタンパク質キナーゼは未だ同定させていない。そこで本研究では，*SEC* 遺伝子と遺伝学的に相互作用するキナーゼ遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】

出芽酵母のキナーゼ遺伝子群を過剰発現用ベクターに挿入したプラスミドライブラリーを温度感受性変異株 *sec12-4* に形質転換し，*sec12-4* 変異株の生育に影響を与えるキナーゼ遺伝子を探索した。その結果，変異株の温度感受性を抑圧する遺伝子が 7 種類取得された。それら 7 種類のキナーゼが COPII 小胞形成の調節に関与しているかどうかについて，現在解析中である。

Ａ－７　酵母細胞膜に局在化する病原菌エフェクターRipAA の機能解析

○平田篤司，北囿喬斗，白井沙樹，藤原祥子，田中直孝，田淵光昭
（香川大・農）

植物やヒトに感染する病原性のグラム陰性細菌は，Ⅲ型分泌装置と呼ばれる注射針様の構造物を介してエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入することで，宿主内の様々な機能を撹乱することによって感染を成立させている。エフェクターの分子機能を解明することは，病原菌の感染戦略を理解する上で非常に重要であるが，未だに多くのエフェクターの分子機能については明らかになっていない。そこで，真核生物のモデル生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 発現系を用いて，青枯病菌機能未知エフェクターRipAA の詳細な機能解析を行った。RipAA を酵母に過剰発現させると，増殖阻害を引き起こすことを見いだした。GFP を指標として RipAA の細胞内局在を観察した結果，RipAA は酵母の娘細胞膜に極性輸送されており，ウエスタンブロット解析の結果から RipAA は酵母内で高度にリン酸化されていることが明らかになった。そのため，これらの観点から RipAA の機能解析を試みた。

まず，これまでの結果から RipAA は細胞膜に局在することで同じく細胞膜に局在する酵母カゼインキナーゼ 1 (CK1)にリン酸化されることによって活性化し，酵母に増殖阻害を引き起こしているという仮説を立てた。この仮説を証明するために，Rapamycin の有無で局在を変化させることができるシステムを構築した。このシステムにおいて，RipAA の細胞膜に局在化しなくなった不活性型変異体を，Rapamycin で処理することで再び細胞膜に局在化させた。Rapamycin によって膜局在化させた RipAA が再びリン酸化され，増殖阻害を引き起こすかについて詳細な解析を行っている。

Ａ－８　酵母およびタバコ発現系を用いた青枯病菌の病原性因子 RipAA の機能解析

○白井沙樹，平田篤司，北囿喬斗，藤原祥子，田中直孝，Marc Valls[1]，田淵光昭
（香川大院・農，[1]Universitat de Barcelona）

多くの植物やヒトに感染するグラム陰性菌は，Ⅲ型分泌装置と呼ばれる構造物を介して，エフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主細胞内に直接注入し，感染を成立させている。これまで我々は，植物病原性細菌である青枯病菌が有するエフェクターについて酵母発現系を用いて解析してきた。そして機能未知なエフェクターRipAA を酵母で過剰発現させると，酵母に増殖阻害を引き起こすことを見出した。また，RipAA は，ある種のプロテアーゼと弱い相同性を有することを見出し，相同性に基づいて作製した推定活性中心変異体（C183S）は増殖阻害活性を失った。本研究では，酵母発現系で得られた結果をもとに，青枯病菌の非宿主植物 *Nicotiana benthamiana* を用いてさらに RipAA の機能の解明を試みた。

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

Ａ－９　*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* biovar 3 における病原因子の解析

〇齊藤美桜，藤原祥子，平田篤司，佐々奈緒美，生咲　巖[1]，秋光和也，
五味剣二，杉田（小西）左江子，濱野康平[1]，田中直孝，大谷　衛[1]，片岡郁雄，
田淵光昭（香川大・農，[1]香川県府中果樹研）

キウイフルーツかいよう病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*:Psa)は表現性や遺伝型の違いに基づき，現在 5 種類に分類されており，その中でも特に biovar 3 (Psa3)は強い病原力を持つとされているが，その病原因子は未だ明らかになっていない。多くのグラム陰性細菌はⅢ型分泌装置(T3SS)を有し，宿主細胞内にエフェクターを注入することで感染を成立ることが知られており，エフェクターは病原性に必須な因子であると考えられている。Psa3 もエフェクターを持ち，その数は 40 種類以上にのぼる。本研究では，Psa3 の病原性に関係する因子がエフェクターであると考え，T3SS 欠損株と Psa3 特異的なエフェクターを欠損した株を作製した。T3SS 欠損株を非宿主植物であるタバコに接種したところ，野生株で見られる過敏感反応（HR）は見られなかった。これより T3SS 欠損株は，エフェクターの宿主細胞への分泌能を欠損していることが考えられた。次に，T3SS 欠損株についてキウイフルーツの葉への噴霧接種をおこない，葉の中での菌体増殖から病原性を評価した。その結果，T3SS 欠損株は野生株に比べ，菌体の増殖が 10,000 分の 1 程度しか見られなかった。遺伝子を回復させた株を接種した場合の結果と比較しても，感染にはエフェクターが重要であることが示唆された。

本事業は生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）課題番号 16822474：野生種遺伝資源を利用したキウイフルーツ Psa3 系統耐病性付加による競争力強化戦略」の支援を受けて行われた。

B－1 Characterization of membrane-bound aldehyde dehydrogenase activity in *Frateuria* sp.

○Roni Miah, Minenosuke Matsutani, Takeru Murate, Naoya Kataoka, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi (Yamaguchi Univ.)

Acetic acid fermentation is carried out by two-step oxidation of ethanol to acetic acid with the membrane-bound alcohol and aldehyde dehydrogenases (ADH and ALDH) of acetic acid bacteria. The genus *Frateuria* that is taxonomically distant from acetic acid bacteria has ADH. This study is aimed at purification and characterization of ALDH of *Frateuria aurantia*. *Acetobacter* sp. has two different ALDH genes *aldFGH* and *aldSLC* that phylogenetically different from each other (Yakushi et al., 2018). We retrieved ALDH homologs from the genome data open to public and examined their phylogenetic relationships. According to the phylogenetic analyses, we proposed four subgroups for ALDH homologs: *aldFGH*, *aldSLC1*, *aldSLC2*, *aldXYZ*. *Frateuria aurantia* LMG1558 the type strain possesses the *aldXYZ* genes. The growth of the LMG1558 strain was strongly inhibited by ethanol even at the concentrations of 0.06%(v/v). Specific activity of ALDH and ADH was 0.9 U/mg and 0.7 U/mg, respectively in the membrane suspension when cultured without ethanol. Addition of ethanol did not dramatically increase the both activities. ALDH was stable against heat treatment up to 50°C where ADH lost its activity in the membrane suspension. These data clearly indicate that the LMG1558 strain produces ALDH of independent molecular species from ADH. ALDH was solubilized with Mydol-10 or Mydol-12 and 0.3 M KCl. We attempt to purify ALDH to characterize the properties.

Yakushi et al. (2018), Appl Microbiol Biotechnol., 102: 4549.

B－2 Glucose metabolism in the *Gluconobacter* mutant strain that lost the glucose-oxidation ability

○Feronika Heppy Sriherfyna, Kensuke Hirano, Hisashi Koike, Minenosuke Matsutani, Naoya Kataoka, Tetsuo Yamashita[1], Eiko Nakamura-Ogiso[2], Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi (Yamaguchi Univ., [1]Kagawa Univ., [2]Univ. Pennsylvania)

Gluconobacter oxydans is an obligate aerobe, and used in oxidative biotransformation to produce L-sorbose, gluconic acid, and 2-ketogluconic acid. The oxidation of glucose is catalyzed by the membrane-bound glucose dehydrogenase, encoded in the *gdhM* gene, located on outer surface of the cytoplasmic membrane. Wild-type *G. oxydans* takes gluconic acid into the cell as well as glucose, but the Δ*gdhM* mutant takes only glucose. As to the cytoplasmic metabolism, *G. oxydans* utilizes pentose phosphate pathway or Entner–Doudoroff pathway as the central metabolism due to a deficiency of enzyme in Embdem-Myerehof-Parnas pathway. Oxidation of NADH but also NADPH is most likely important for the central metabolism. *G. oxydans* strain NBRC3293 has two type-II NADH dehydrogenases (NDH) that are phylogenetically distinct from each other. We constructed mutant stains lost the gene (*ndhS*) for one of NDHs, s-NDH that can also oxidizes NADPH. The Δ*ndhS* strain grew similarly to the wild-type strain on glucose, but the Δ*gdhM* Δ*ndhS* double mutant strain grew worse on glucose than the Δ*gdhM* stain. We suggest that cell-surface oxidation of glucose may skip over production of one molecule of NADPH, which should be reoxidized. Thus, the loss of NADPH-oxidizing enzyme s-NDH under the Δ*gdhM* background showed a more severe impact to the growth on glucose than that under the *gdhM*$^+$ background.

Ｂ－３　Characterization of the 5-keto-fructose reductase derivatives of *Gluconobacter* sp.

○Nguyen Minh Thuy, Masaru Goto[1], Shohei Noda[1], Naoya Kataoka,
Osao Adachi, Kazunobu Matsushita, Toshiharu Yakushi
(Yamaguchi Univ., [1]Toho Univ.)

[Background] Acetic acid bacteria oxidize various sugars and alcohols incompletely to produce corresponding ketones and acids on the cell surface. *Gluconobacter frateurii* strain CHM43 oxidizes mannitol to fructose and does fructose to 5-keto-fructose (5KF). We identified *GLF_2050* as the gene for NADPH-dependent 5KF reductase (KFR). In this study, we attempted to characterize the structure and function of KFR.

[Methods & Results] We constructed over expression strain for KFR, which showed specific activity about 40-times higher than wild type. KFR activity in the mutant strain defective of the *GLF_2050* gene (Δ*GLF_2050*) was lower than that of wild type but still remained activity at approx. 29% of wild type. The results indicate that the *GLF_2050* gene encodes one of the KFR genes in the CHM43 genome. We purified the recombinant KFR. Molecular mass of the purified KFR in the native state was determined by gel filtration to be approx. 71 kDa, i.e. KFR is dimer of approx. 30-kDa protomer in solution. The crystal structure revealed that KFR is similar to $NADP^+$-dependent shikimate dehydrogenase, which catalyzes the reversible $NADP^+$-dependent oxidation of shikimate. We found that two amino acid residues Asn^{21} and Pro^{227} in the putative substrate-binding site are the major differences between the two enzymes. We constructed several KFR derivatives with amino acid substitution including the two residues. The mutagenesis study suggested that Asn^{21} is important for the substrate binding.

Ｂ－４　*Acidomonas* 属酢酸菌のレアアースが制御するエタノール酸化

宇都宮大貴，稗田莉奈，西江百加，○阿野嘉孝（愛媛大院・農）

【目的】酢酸菌にとって，エタノールの酸化は酢酸の生成とともにエネルギー獲得にかかわる重要な反応である。そこには，細胞膜の PQQ 依存性アルコール脱水素酵素 (PQQ-ADH) が呼吸鎖の初発酵素として機能している。我々は，メタノール資化性能をもつ酢酸菌 *Acidomonas methanolica* が，レアアース (La^{3+}) に応答してメタノール酸化系を切り替えているが，La^{3+}の存在下では PQQ-ADH 活性が大きく低下することを報告している。[1)] しかし，エタノール培地での生育に支障がないことから，本菌は複雑なエタノール酸化系を有していると考えられる。本研究では，La^{3+}存在下で機能するエタノール酸化系を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】La^{3+}の有無でエタノール培地で生育させた細胞を調製し，エタノールを呼吸基質とした酸素消費活性を比較したところ，細胞膜画分では活性が低下していたものの，細胞懸濁液ではほとんど変化が見られなかった。細胞内 NAD 依存性 ADH の活性も大きな変化が見られなかったことから，未知の細胞表層のエタノール酸化系の関与が示唆された。そこに関与する酵素として XoxF および Pqq6 に着目し欠損株を作製して検討したところ，一遺伝子破壊では生育に全く影響が見られなかったものの，二重および三重破壊株で初めて影響が確認できた。これらの結果から，La^{3+}存在下で本菌は，PQQ-ADH, XoxF, Pqq6 の少なくとも３つの酵素で機能を相補しながらエネルギーを獲得していることが明らかとなった。

１）宇都宮ら，日本農芸化学会 2017 年度大会 2C24a08

B－5 Analysis of indigenous soybean-nodulating rhizobia in Japan in relation to climate and soil

○Md Hafizur Rahman Hafiz, Ahsanul Salehin, Shohei Hayashi[1], Kazuhito Itoh[1]
(UGSAS, Tottori Univ., [1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

To examine the isolated indigenous soybean rhizobia from root nodules, the experiment was conducted in two successive years in 2016 and 2017. The soybean plants were cultivated in three different soils (like Fukagawa, Matsue, and Miyazaki) and locations (like Fukagawa, Matsue, and Miyazaki) combinations. Bacterial isolates were characterized based on their morphologies and the representative colonies were purified for identification by analysing the partial 16S rRNA gene sequences. Nodule occupancy was measured based on the presence of *Bradyrhizobium japonicum* (*Bj*) or *Bardyrhizobium elkanii* (*Be*). About 700 nodules were studied from different soils and locations for both the year 2016 and 2017. Fukagawa soil strongly maintained the occupancy of *Bj* in the soil in Fukagawa location but reduced in Matsue and Miyazaki location. When Matsue soil used in Matsue and Miyazaki location the dominance of *Be* was higher than *Bj* in 2016 but, in Fukagawa locations the abundances of *Be* was lower than *Bj*. However, in 2017 *Be* has maintained its dominance in all locations. Almost similar results were observed in Miyazaki soil except in Matsue location in 2016 where the abundance of *Bj* was higher than *Be*. The overall results we observed that All the soils behaved differently in the cooler environment like Fukagawa location. In conclusion, the occupancy of *Bj* and *Be* of different soil in the cooler environment may be due to the temperature or the strains. How these stains behave in different soil is needed to confirm by further experiment.

B－6 Effects of the biofertilizer `OYK` inoculation on plant growth promotion

○Ahsanul Salehin, Md Hafizur Rahman Hafiz, Shohei Hayashi[1], Kousuke Suyama[1], Kazuhito Itoh[1].
(UGSAS, Tottori Univ., [1]Fac. Life Environ. Sci., Shimane Univ.)

The use of microbial inoculants containing plant growth-promoting rhizobacteria as a promoter of plant fitness and health is becoming increasingly popular in agriculture. OYK is a biofertilizer, an important member of plant growth promoting bacteria (PGPB) and *consists mainly of Bacillus subtilis*, a group of which induces plants to tolerate abiotic and/or biotic stresses in a comprehensive manner. In 2010, OYK was applied approximately 80 different types of crops across Japan to prevent continues cropping injuries, increased in yield, removed infecting bacteria, and enhanced crops quality**.** During the course of study, it was found that OYK consisted of a mixture of two different strains, a bacterial *Bacillus* sp. and a fungus *Candida* sp. Among two strains, *Bacillus* sp. exhibited neither cellulase nor pectinase activities, and was neither able to produce auxin nor solubilize phosphate. On the other hand, *Candida* sp. produced auxin and had phosphate solubilizing ability. Then, inoculation experiments were conducted at several times using this two isolates to confirm its plant growth promotion. Among measured plant growth parameters, inoculated plants showed statistically superior growth performance and significant difference over control. *Bacillus* sp. was re-isolated from its rhizosphere and root interior parts, while *Candida* sp. was only from its rhizosphere. *Bacillus* sp. and *Candida* sp. both might be a potential isolates for plant growth promotion. After confirming the mechanisms, these isolates will be applied in field condition to confirm in plant growth improvement.

Ｂ－７　ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA135 におけるクオラムセンシングの調査

○小川智之，東　貴司[1]，井藤和人[1]，巣山弘介[1]，林　昌平[1]
（筑波大院・生命環境，[1]島根大・生資科）

【目的】クオラムセンシングとは，細菌がアシルホモセリンラクトン(AHL)などのオートインデューサーを生産・分泌・感知することで自らの密度を感知し，特定の形質を制御する仕組みである。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA135 のゲノムには, AHL 生合成遺伝子と推定される 3 つの遺伝子遺 *bjaI*, *luxI*，*traI* がある。本研究では，*B. japonicum* USDA135 はどの遺伝子を用いてクオラムセンシングを行っているか，AHL の濃度はどの時期に最も濃くなるのか，同種他株が生産した AHL を受容することが出来るかを調べるために実験を行った。

【方法・結果】*bjaI*，*luxI*，*traI* を *lacZ* に置換したバイオレポーター株を作成した。*B. japonicum* USDA135，*B. japonicum* USDA110，*B. japonicum* USDA4 を 7 日間培養し，1 日毎にバイオレポーターと混合して，野生株が生産した AHL によってバイオレポーター株の *lacZ* が誘導され，青色に呈色するかを調べた。培養 4 日目の *B. japonicum* USDA135 と混合すると，*traI* を置換したバイオレポーター株のみ青色に呈色した。培養 5 日目の *B. japonicum* USDA135 と混合した場合は呈色しなかった。いずれの培養日数でも *bjaI* か *luxI* を置換したバイオレポーター株と混合した場合は呈色しなかった。培養 4，5 日目の *B. japonicum* USDA110，*B. japonicum* USDA4 と混合すると，*traI* を置換したバイオレポーター株のみ青色に呈色した。これらの結果から，*B. japonicum* USDA135 は，*traI* を用いてクオラムセンシングを行っていること，培養 4 日目以降に AHL を分解すること，同種別株が生産した AHL を受容できることが示唆された。

Ｂ－８　ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA4 におけるクオラムセンシングでのオートインデューサーへの反応性の調査

○東　貴司，井藤和人[1]，巣山弘介[1]，林　昌平[1]，小川智之[2]
（島根大院・自然科学，[1]島根大・生資科，[2]筑波大院・生命環境）

【目的】細菌が自身の菌密度に応じて生理機能の発現を調整する仕組みをクオラムセンシングという。オートインデューサー(AI)と呼ばれる物質を生産・分泌し，それを感知する頻度により特定の遺伝子の発現が切り替わる。ダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA4 のゲノムには，既知の AI 合成酵素遺伝子と相同性の高い 2 つの遺伝子 *4bjaI15*，*4luxI81* がある。本研究では，それら 2 つの遺伝子のクオラムセンシングへの関与の有無や，AHL への濃度や時間による反応の違いを調査した。

【方法・結果】*4bjaI15*，*4luxI81* を *lacZ* に置換したバイオレポーター株をそれぞれ作成した。*B. japonicum* USDA4 を 6 日間培養し，そこから 1 日毎に酢酸エチルで抽出物を作成した。1 日前培養した後に吸光度を調整したバイオレポーターと，酢酸エチルを揮発させた抽出物を混合し，X-gal を加えて培養を行い，AI により lacZ が誘導され青色に呈色するかを調べた。*4bjaI15* のバイオレポーターでは，野生株の前培養日数などは結果に影響が見られず，いずれも培養 2 日目で呈色が確認された。また，バイオレポーターと X-gal のみでも呈色は確認されたが，抽出物と混合した場合よりも呈色までの時間が長かった。*4luxI81* のバイオレポーターでは，呈色が確認されたのは 1 週間の培養後に 3 週間静置された後であり，野生株の前培養が 1~3 日の場合のみ呈色が確認された。これらの結果から，*4bjaI15* が AI による促進がなくとも恒常的に発現している遺伝子であること，*4luxI81* の発現が *4bjaI15* と比較してとても小さいこと，そして *4luxI81* により合成される AI は，培養の 1~3 日目にのみ存在していることが示唆された。

Ｂ－９　Isovaleric acid production as the response to acid stress in *Shewanella violacea*

○Lisa Lisdiana, Hisashi Ômura, Sotaro Fujii, Yoshihiro Sambongi
(Grad. Sch. Integr. Sci. for Life, Hiroshima Univ.)

Neutrophilic *Shewanella violacea* is isolated from deep-sea sediments. Its response to high-pressure and high-salinity has been investigated but nothing is known about the response of this bacterium to acid stress. Here, the pure effects of acidic pH on *S. violacea* physiology were examined, aiming at further understanding of its stress response mechanism. *S. violacea* could grow at initial pHs of 5.0 – 7.0 without pH adjustment during the test at atmospheric pressure, and the lowest growth rate was obtained at pH 5.0. The pH of the same growth culture with an initial pH of 5.0 rose toward a neutral pH of ~7.0 at the exponential growth phase, indicating that *S. violacea* has a mechanism for acid neutralization. When *S. violacea* cells were grown at the fixed pH of 5.0, about six times higher concentrations of isovaleric acid was produced than at pH 7.0. The expression level of the genes encoding three enzymes for isovaleric acid synthesis from L-leucine were also found to be upregulated in *S. violacea* cells grown at the fixed pH of 5.0 compared with at pH 7.0 through RNA-seq analysis. Therefore, *S. violacea* at least produces isovaleric acid in its response to acid stress, which may contribute to acid neutralization through a chemical decrease in acidity during the conversion of L-leucine (pK_a of the carboxyl group = 2.36) to isovaleric acid (pK_a = 4.77) and an NADH production leading to proton pumping across the membrane by membrane-bound NADH dehydrogenase.

Ｂ－10　高濃度 $MgCl_2$ が *Shewanella violacea* の生育及び 5′-ヌクレオチダーゼの活性に与える影響

○猪原雅司，藤森貴子[1]，藤井創太郎[1]，三本木至宏[1]
（広島大・生物生産，[1]広島大院・統合生命）

【背景と目的】我々のこれまでの研究で，好冷中度好塩菌である *Shewanella violacea* 及び常温非好塩菌である *Shewanella amazonensis* の 5'-ヌクレオチダーゼ（それぞれ SVNTase 及び SANTase）の活性の温度と NaCl 濃度に対する依存性は，由来する菌の生育条件の違いに対応することが分かっている。さらに，SVNTase 及び SANTase のアミノ酸配列が 70%一致しているにもかかわらず，塩や有機溶媒存在下で両者の活性が大きく異なり，特に 500 mM $MgCl_2$ 存在下で SVNTase 活性は 2 倍に上昇するが，SANTase 活性は半分に低下することを見い出している。本研究では，高濃度 $MgCl_2$ の両酵素の構造及び由来する細菌の生育への影響について，分子と細胞の観点から調べた。

【方法と結果】*S.violacea* と *S.amazonensis* の膜画分から SVNTase 及び SANTase を精製し，500 mM $MgCl_2$ 存在下でそれぞれの CD スペクトルを測定し，αヘリックス含量を見積もった。その結果，両酵素のヘリックス含量は一様に低下していた。つまり，500 mM $MgCl_2$ 存在下での両酵素の活性の差は，ヘリックス構造の安定性の差とは関係ないことが分かった。一方, Marine Broth 液体培地に 100 から 500 mM の $MgCl_2$ を加えて，*S. violacea* と *S. amazonensis* の生育試験を行ったところ，両者とも 300 mM $MgCl_2$ 添加でも同様に生育することが分かった。以上の結果から，高濃度 $MgCl_2$ は，*S. violacea* と *S. amazonensis* の生育特性に違いをもたらさないが, SVNTase と SANTase のヘリックス含量を低下させるものの SVNTase に対しては特異な活性上昇効果があることが明らかになった。

Ｃ－１　深海性細菌 *Shewanella benthica* DB6705 由来シトクロム *c*′ の安定化機構の解明

○坂口　陸，須賀朝子[1]，藤井創太郎[1]，三本木至宏[1]
（広島大・生物生産，[1]広島大院・統合生命）

【目的】 至適生育環境 4℃，50 MPa の *Shewanella benthica* DB6705 と至適生育環境 8℃，30 MPa の *Shewanella violacea* DSS12 は，アミノ酸配列が 92%一致するシトクロム *c*′ （それぞれ SBCP，SVCP）を持つ。SBCP は SVCP に比べ，変性温度（T_m）が 7℃高い。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】 SBCP と SVCP の結晶構造を比較したところ，ループ上にある SBCP の Pro-62 がループ構造を強固にしていること，また SBCP の Lys-87 が表面で塩橋を形成することで熱安定化していると考えた。そこで，SBCP の Pro-62，Lys-87 を SVCP で対応する Gln，Val にそれぞれ置換した変異，逆に SVCP の Gln-62，Val-87 を SBCP で対応する Pro，Lys に置換した変異体を作製した。CD スペクトルの 222 nm を指標とした 25－100℃の昇温測定実験を行い，SBCP と SVCP の変異体の T_m を測定した。

【結果・考察】 SBCP 変異体は野生型と比べて T_m の低下が見られた。また SVCP 変異体は野生型と比べて T_m の上昇が見られた。以上の結果から Pro-62，Lys-87 が SBCP の熱安定化に寄与していることが明らかとなった。SBCP と SVCP が由来する菌は，いずれも低温かつ高圧の極限環境である深海から単離された好冷好圧菌である。シトクロム c′ の熱安定性と菌の圧力適応との関係性は分からないが，深海由来の *Shewanella* 属細菌の持つこれらのシトクロム c′ は，複雑で多面的な安定化機構を持つ可能性がある。

Ｃ－２　海洋由来 *Luteolibacter algae* H18 のフコイダン脱硫酸化酵素の精製とクローニング

○倉本弥栄，小谷悠輔[1]，山岡美花[2]，長尾達彦[2,3]，八木寿梓[2]，鈴木宏和[2]，
大城　隆[2]（鳥取大院・持社創生，[1]鳥取大・工，[2]鳥取大院・工，[3]日本ジッコウ）

【目的】フコイダンは，モズク，コンブ，アカモクなどの褐藻類の粘質物に含まれるヘテロ硫酸化多糖で，平均分子量約 200,000 の高分子と提唱されており，抗ガン作用や抗ウイルス作用などの様々な生理活性を有すると報告されている。しかしながら，フコイダンが関与するこれら生理活性がフコイダン分子中のどの構造に起因するかについては不明な点が多いのが現状である。そのために当研究室では，酵素的なフコイダンの分解についての検討を行っている。オキナワモズクフコイダン資化性菌 *Luteolibacter algae* H18 は，フコイダンの分解過程において脱硫酸化反応が進行する。この酵素を利用すれば，脱硫酸化フコイダンを調製することができ，フコイダンの硫酸基が生理活性に及ぼす影響を検討することができる。そこで今回，オキナワモズクフコイダンスルファターゼを H18 株から精製し，その酵素遺伝子の特定を行った。

【方法・結果】H18 株をフコイダンを単一炭素源とする合成培地で大量培養して得られた無細胞抽出液から，フコイダンスルファターゼを各種クロマトグラフィーにより，高度に精製した。活性測定はバリウム沈殿法で行った。精製酵素タンパク質の N 末端 10 残基のアミノ酸配列を決定後， H18 株のドラフトゲノム情報から目的酵素遺伝子 *fsut107*（1512 bp）を同定した。本酵素遺伝子断片を PCR 増幅して pCold I ベクターにクローニングし，大腸菌に導入後，異種発現産物の活性を調べたところ，フコイダンを基質としたスルファターゼ活性を確認することができた。

Ｃ－３　*Geobacillus* 属好熱菌を宿主とした異種タンパク質高生産のためのベクター開発

○倉敷凌太，大城　隆[1]，鈴木宏和[1]（鳥取大院・持社創生，[1]鳥取大・工）

【目的】*Geobacillus* 属細菌は優れた増殖特性やタンパク質生産能をもつ好熱菌で，その遺伝子改変ツールの開発が広く進められている。本好熱菌を宿主とした遺伝子高発現ベクターは確立されていないが，それは当該好熱菌群の改変のみならず，タンパク質生産宿主の拡張にもつながると期待できる。本研究では，*Geobacillus kaustophilus* で機能する遺伝子高発現ベクターの開発を目的とした。

【方法】マルトース誘導型プロモーター（P_{gk704}），*lacZ* α 遺伝子，および T7 ターミネーター配列を大腸菌–*Geobacillus* シャトルプラスミドに導入した。得られたプラスミド pKR01 の P_{gk704} の下流に，さらに黄色蛍光タンパク質（Venus）の遺伝子を挿入し，HTA426 の派生株（MK244）に導入した。得られた形質転換体中で生産された Venus 量を分析することで，pKR01 の有用性を評価した。

【結果】P_{gk704} は，*G. kaustophilus* HTA426 由来のマルトース誘導型のプロモーターで，大腸菌内でも機能する。任意 DNA の挿入をスクリーニングしやすいように，P_{gk704} の下流に *lacZ* α 遺伝子とマルチクローニングサイトを配置した。pKR01 をもつ大腸菌は X-gal を分解し，青色のコロニーを呈したが，当サイト中に Venus 遺伝子が挿入された場合は，呈色しなかった。リードスルーの抑制を目的とし，その下流には T7 ターミネーター配列を配置した。これにより得られたプラスミドを MK244 株に導入し，60℃で培養したところ，Venus の生産がしっかりと確認できた。T7 ターミネーター配列がない場合は，Venus 生産がほとんど見られなかった。

Ｃ－４　VHH 抗体提示型分子認識素子を用いた AuNP のワンステップ機能化

○池田　湧，今村維克，石田尚之，今中洋行（岡山大院・自然科学）

【目的】

金ナノ粒子（AuNP）は LSPR（局在表面プラズモン共鳴）という特徴的な光学特性を有し，この性質を生かして，体外診断薬や細胞内プローブなどバイオ，医学分野で幅広く利用されている。本研究では，AuNP の分散安定性を維持しつつ表面を生体分子で機能的に修飾する簡便な手法の開発を狙い，足場として超好熱菌由来タンパク質 CutA1，リガンド分子として VHH 抗体，そして独自に取得した金表面親和性ペプチドタグを用いた標的分子認識素子の分子デザインならびにそれらの評価を目的とした。

【方法・結果】

まず VHH 抗体を CutA1 に挿入する際のスペーサー長が発現に及ぼす影響を調べ，十分に可溶化が可能なスペーサー長を見出した。続いて CutA1 を足場としてデザインした各種 VHH 抗体提示型分子認識素子，あるいは VHH 抗体で修飾した AuNP の懸濁液と標的分子である緑色蛍光タンパク質 EGFP を混合し，蛍光強度の差異を指標に相互作用を評価した。その結果，クッション性足場として CutA1 を用い，VHH 抗体を挿入あるいは連結することによって，相互作用量の顕著な増加がみられた。したがって，デザインした分子を用いることで，VHH 抗体を金ナノ粒子表面に機能的にワンステップで修飾することができたと考えられた。

Ｃ－５　ペーパーベース過酸化水素センサの開発

〇永谷尚紀（岡山理大・工）

【目的】紙をベースとしたセンサはインフルエンザの簡易検査，尿糖試験紙など既に広く利用されている。これらの方法は測定機などを使用する必要がなく目視で簡単に測定可能な方法である。今回の報告では，紙をベースとしたオキシダーゼ系酵素センサの開発の目的で検討を行った流路を持った過酸化水素センに関して報告する。【方法・結果】ろ紙を B5 サイズにカットしソリッドプリンターにてペルオキシダーゼ（POD），発色試薬（TMBZ-HCl）を乾燥固定できる箇所と発色色素が展開可能な流路（3 mm）を持った試験紙（81 mm× 11 mm）を印刷した。印刷したろ紙は 100℃で 3 分間加熱することでインクをろ紙に染み込ませ，ラミネーターで試験紙の部分以外をラミネートした。試験紙に POD（1000 U/mL）を 1.5 μL，TMBZ-HCl（10 mg/mL）を 1.5 μL 滴下し一晩 4 ℃で乾燥させ過酸化水素センサとした。各種濃度の過酸化水素水を 50 μL 滴下したところ，TMBZ-HCl を乾燥した部分が茶色に発色し，流路中を発色した色素が流れて行くのが観察された。過酸化水素水を滴下後 30 分後に流路を流れた色素の長さを測定したところ，濃度に応じて色素の長さが変化し 0.1 ～1 mM の過酸化水素が測定可能であった（図）。

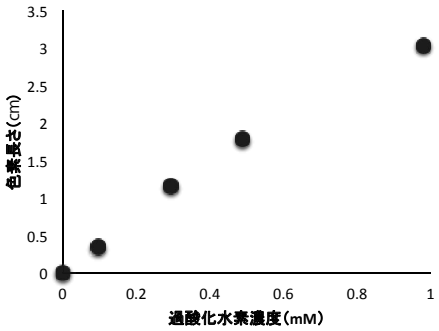


図　過酸化水素濃度と色素長さ

Ｃ－６　L-メチオニン γ-リアーゼ基質特異性改変酵素基質複合体の結晶構造解析

〇大川敦司，半田暖尚，安田江里，室田昌輝[1]，原田繁春[1]，志波智生[1]，
根本理子，田村　隆，稲垣賢二
（岡山大院・環境生命，[1]京工繊大院・応生）

【目的】L-メチオニン γ-リアーゼ(MGL)はピリドキサール 5'リン酸(PLP)依存性の酵素であり，主に L-Met とその誘導体の α，γ-脱離反応を触媒する。L-Met 以外に L-ホモシステイン(L-Hcy)を良い基質とする。本研究室では MGL 活性中心に存在するアミノ酸残基の機能解析及び基質特異性の改変を行ってきた。Q349 残基は基質と PLP の外部アルジミン形成時に約 4Å 離れたところにあり，直接基質と水素結合は形成しないが，MGL で重要な水素結合ネットワーク形成に関与していることが推測された。この残基を Ser 残基に置換した MGL_Q349S 変異酵素は L-Met への活性が減少し，L-Hcy への活性が増加した。この基質特異性変化の要因を解明することを目的として基質複合体の X 線結晶構造解析を行った。【方法】結晶化は PEG6000 を沈殿剤として行い，得られた結晶に基質（L-Met, L-Hcy 及び L-Cys）をソーキングした。X 線回折強度測定は KEK-PF BL17A と SPring-8 BL44XU にて行った。【結果】MGL_Q349S 基質複合体の構造解析から，Thr355 が Ser349 と水素結合が形成できないことがわかった。そのため，Thr355 の側鎖が回転して，PLP-Met 中間体のカルボキシ基との間で水素結合を形成していた。また， L-Met を基質に用いた場合には，Asn161 と PLP-中間体のカルボキシ基が水素結合を形成せず，L-Hcy を基質に用いた場合には，Asn161 と PLP-中間体のカルボキシ基が水素結合を形成することが分かった。よって，MGL_Q349S の L-Hcy 複合体では PLP-Hcy と MGL との間の水素結合が多く形成されるため，反応中間体と酵素タンパク質の相互作用が強くなり，野生型 MGL と比較して L-Hcy に対する活性が増加したと考えられる。

Ｃ－７　オートファジー誘導条件が担子菌 *Coprinopsis cinerea* の生育に与える影響

〇今村友紀，小川直紀，麻田恭彦，渡邉　彰（香川大・農）

【目的】真核生物細胞内のバルクな分解系であるオートファジーは，各種飢餓状態に応答するだけでなく，近年の解析から，分化などの様々な生命現象にも密接に関与することが明らかとなってきている。一方，担子菌は，栄養飢餓などの外的要因が付与されることにより，菌糸生長から子実体形成へとその生育様式を変化させる。以上のことから，本研究では，担子菌 *Coprinopsis cinerea*（ウシグソヒトヨタケ）を用いて，オートファジーの誘導条件が同菌の生育に与える影響について解析を行った。

【方法・結果】まず，*C. cinerea* を，栄養合成培地で菌糸が十分に生長するまで培養を行い，その後，同条件の栄養合成培地の他，*C. cinerea* においてオートファジーを誘導する窒素源飢餓培地，糖源飢餓培地，およびリン酸源飢餓培地へと移し替え，これらの条件への変化が *C. cinerea* の生育に及ぼす影響について解析を行った。その結果，栄養合成培地に移し替えた場合では，その後の菌糸生長に差はなく，子実体は形成されなかった。それに対して，窒素源飢餓培地，糖源飢餓培地，およびリン酸源飢餓培地へと移し替えた場合では，それぞれの飢餓条件下で，その後の菌糸生長や子実体形成までの時間に差は見られるものの，いずれの条件下でも子実体の形成が観察された。また，*C. cinerea* では，上記飢餓条件の他，EDTA の添加条件においてもオートファジーの誘導が観察される。そこで現在，栄養合成培地中に含まれる金属イオンに着目し，それら金属イオンが *C. cinerea* の生育に及ぼす影響について解析を進めているのであわせて報告する。

Ｃ－８　*Methylobacterium aquaticum* 22A 株におけるランタノイドスイッチのメカニズム

〇宮本稚子，谷　明生（岡山大・植物研）

【目的】*Methylobacterium* 属細菌は Ca^{2+}に依存する MxaFI とランタノイド（Ln）に依存する XoxF という二種類のメタノール脱水素酵素（MDH）を持っている。本属細菌は Ln 存在下では XoxF を利用し，非存在下では MxaFI を利用する。この発現切り替えは Ln スイッチと呼ばれているが，その作用機構は不明であるため，本研究では *M. aquaticum* 22A 株をモデルとしてその解明を試みた。

【方法・結果】*mxaF* の発現は *xoxF* の存在に依存しており，Δ*xoxF* 株は *mxaF* が存在するにもかかわらずメタノールで生育しないが，生育が回復した突然変異株 Δ*xoxF1*Sup 株のゲノムリシーケンスにより，膜局在型ヒスチジンキナーゼをコードする *mxbD* に変異が見つかった。Δ*mxbD* 株は *mxaF* の発現が低く，*xoxF* が La^{3+}非存在下でも高発現することから，*mxbD* は *mxaF* 発現および *xoxF* 抑制に関わっている。また Δ*mxbD* 株に変異型 *mxbD* を導入すると La^{3+}非存在下での生育が回復したことから，Ln スイッチを司るのは MxbD である。MxbD は転写調節因子 MxbM と共に二成分系シグナル伝達経路を構成する。MxbM は La 非存在下でリン酸化されること，*xoxF* 欠失株ではリン酸化されないこと，Δ*xoxF1*Sup 株では La の存在にかかわらずリン酸化されることが分かった。このことから，MxbD/M は，La が存在しないことを感知して MxaF を正に制御していると考えられた。また，野生株，Δ*mxaF*，Δx*oxF1*Sup 株を遺伝的背景とした *mxbM* 欠失株は，La の存在にかかわらずメタノールに生育しないことから，*mxbM* は両 MDH の発現に必要であることがわかった。

Ｃ－９　*Lactobacillus plantarum* 22A-3 のフェニルプロペン酸代謝酵素の誘導に関する研究

○若槻壮哉，西谷洋輔[1]，川上秀昭[1]，桑原浩誠[1]，矢野嵩典，三井亮司
（岡山理大・理，[1]丸善製薬（株）・研究開発本部）

【目的】植物性の発酵食品より分離された乳酸菌 *L. plantarum* 22A-3 はファイトケミカルであるフェルラ酸などのフェニルプロペン酸を還元してフェニルプロパン酸を最終産物として生成する経路と，脱炭酸を経て分解する 2 つの系を有している。フェルラ酸を基質とした際に還元産物として生成するジヒドロフェルラ酸 (DFA) は，マウス実験などにおいて各種の生理活性を発現することから，新たな機能性食品素材として注目している。*L. plantarum* 22A-3 において培養液中にフェルラ酸を基質として添加した場合には両経路が誘導され，DFA と脱炭酸された 4-ビニルグアヤコール (4-VG) の生成が見られた。そこで本研究では，この 2 つの経路へ導く鍵酵素であるフェニルプロペン酸還元酵素と脱炭酸酵素の誘導条件を明らかにすることを目的として，様々なフェニルプロペン酸を使用して検討した。
【方法と結果】*L. plantarum* 22A-3 を用いて MRS 培地で培養した。このとき基質としてフェルラ酸の添加と非添加で誘導される遺伝子を RNA-seq 解析で比較したところ，フェニルプロペン酸還元酵素，脱炭酸酵素，および電子伝達に関わると考えられる FMN レダクターゼの 3 つの遺伝子のみが特異的に誘導されることが明らかとなった。そこで *p*-クマル酸やイソフェルラ酸などフェニル基の側鎖構造の異なる各種のフェニルプロペン酸を加えて培養し，得られた菌体の粗酵素液中の還元活性と脱炭酸活性を比較した。その結果，還元酵素と脱炭酸酵素の活性比はフェニル基の側鎖構造により大きく変化することが明らかになった。

Ｃ－10　桜花およびブドウから分離された酵母の同定と発酵特性

○平松　歩，滝澤　昇（岡山理大院・工）

【目的】 近年，地域おこしの一つとして，各地域で採取した花や果物由来の天然酵母を利用したパン作りや酒造りが注目されている。酵母は自然界に広く分布し，発酵による高いガス生産能・エタノール生産能といった有用な特性を備えているものも存在する。中でも，代表種の *Saccharomyces cerevisiae* はアルコール類からパンの製造まで多種の用途に用いられる。本研究では，兵庫県産の桜，岡山県産のブドウから単離した酵母の特性解析を行い，発酵食品への応用が可能か検討した。
【方法・結果】 はじめに，糖資化性試験により，桜由来酵母群とブドウ由来酵母群ともにグルコース，フルクトース，スクロース，マルトース，ガラクトースを炭素源として利用することを確認した。しかし，ブドウ由来酵母群ではグリセロール，キシロース，ソルビトールも炭素源として利用していた。続いて，培養液にグルコースなどの糖を添加した条件において，48 時間培養中の経時的な炭酸ガス生成量および 7 日間培養中の経時的なアルコール生成量を測定した。桜由来酵母群はブドウ由来酵母群と比較して，多量の炭酸ガスおよびエタノールを生成した。また，DNA シークエンサーによる 18S rRNA 塩基配列特定と相同性評価の結果より，桜由来酵母群のみ *Saccharomyces cerevisiae* であった。現在，桜由来酵母を利用した発酵食品への応用を目指して，パン生地の膨張力試験および，アルコール耐性や亜硫酸耐性の検討を進めている。

Ｄ－１　線虫における希少糖 D-プシコースのグルコース取り込み阻害活性

○管波大貴，新谷知也[1]，佐藤正資（香川大・農，[1]愛媛大院・連農）

【目的】希少糖 D-プシコース(D-フルクトースの C3 エピマー，D-Psi)は，線虫 *Caenorhabditis elegans* の寿命を延長し，高濃度ではその成長を抑制する活性をもつ。しかし，その作用メカニズムは明かではない。本研究では，*C.elegans* において D-Psi が線虫の D-グルコース(D-Glc)取り込みを阻害するか評価した。

【方法】D-Glc 取り込み阻害活性の評価は，線虫に供試糖と 2-デオキシ-D-グルコース (2-DG)を同時に処理し，線虫抽出物中の 2-DG 代謝産物（2-デオキシ-D-グルコース 6-リン酸，2-DG6P）を定量することで行なった。試験法：2 日齢の若成虫を，2-DG (50 mM)と D-Psi (10~200 mM)を含む液体培地中で 6 時間培養した。回収した線虫はビーズ破砕法により抽出を行い，抽出液に含まれる単糖類を蛍光標識し，逆相 HPLC 分析を行った。比較のため，希少糖 D-アロース(D-Glc の C3 エピマー，D-All)も同様の方法で実験を行った。

【結果及び考察】D-Psi 処理濃度依存的に線虫抽出物中の 2-DG6P の減少が確認されたため，*C.elegans* において D-Psi はグルコース取り込み阻害効果があると判断できた。D-Glc と D-Psi は，少なくとも一部は同じ糖輸送体を通過していると考えられた。このことが D-Psi の生物活性の原因になっている可能性がある。一方，D-All には D-Glc 取り込み阻害は認められなかった。現在，線虫糖輸送体 *fgt-1* の欠損ミュータントを用いて同様の実験を行っている。

Ｄ－２　*Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養により生産される新規フロイソキノリンアルカロイドの絶対立体配置の決定

○山田光代，齊藤太樹，小川凌太，仁戸田照彦，神崎　浩
（岡山大院・環境生命）

【目的】我々は *Aspergillus ustus* と *Penicillium aurantiogriseum* の組み合わせ培養で初めて生産される化合物 TS-1 [1)] とその類縁体 TS-2 [2)], TS-3, TS-4 を単離し，それらの平面構造について全てフロイソキノリンアルカロイドであり，更に TS-1, TS-2 は新規，TS-3, TS-4 は既知化合物であると報告してきた。更に TS-1 は *P. aurantiogriseum* によって *A. ustus* 代謝物 TS-2, TS-3, TS-4 からこれらの順で変換生成されると推測してきた [3)]。本研究では不斉中心を持つ TS-1, TS-2, TS-3 の絶対立体配置の決定を行うことを目的とした。

【方法・結果】円偏光二色性 (CD) スペクトル測定法を用い，TS-1, TS-2, TS-3 が持つ α-β 不飽和ケトン構造の n→π*遷移に基づく 350 nm 付近でのコットン効果の符号から，経験則であるオクタント則を適用することで絶対立体配置の決定を行った。TS-1 は *A. ustus* と *P. aurantiogriseum* の組み合わせ培養の培養液を，TS-2, TS-3 は *A. ustus* 単独培養の培養液を酢酸エチル抽出し分取 HPLC により精製した。まず TS-3 は，*A.ustus* から精製され X 線結晶構造解析により *S* 体と報告されている TMC-120A と比旋光度が一致しため，平面構造に加え立体配置も TMC-120A と同じ *S* 体と推測してきたが，今回の CD スペクトル測定で負のコットン効果を示したことから *S* 体であると決定できた。次に TS-1, TS-2 にもこの CD スペクトル測定法を適用したところ，共に負のコットン効果を示したことから TS-1, TS-2 は *S* 体であると決定した。この結果より TS-2 から TS-1 への変換反応において立体が保持されていることがわかった。

[1)] 2016 農化大会 (札幌) 4B002 [2)] 2015 農化大会 (岡山) 4E23a13 [3)] 2017 農化合同支部大会 (大阪) D-p04

Ｄ－３　ハタケシメジに含まれるチロシナーゼ阻害物質

須貝直美，美藤友博，宇部尚樹[1]，上野琴巳，奥田康仁[2]，福島（作野）えみ[2]，
〇石原　亨（鳥取大・農，[1]鳥取大院・連農，[2]日本きのこセンター・菌蕈研）

【目的】シミやそばかすなど皮膚の色素沈着はメラニンの過剰生産により生じる。メラニン生成にはチロシナーゼが関与している。そのため，チロシナーゼ阻害剤は多くの美白化粧品で利用されているが，さらに安全で効果的な化合物が求められている。食用きのこのハタケシメジ子実体の抽出物には，チロシナーゼ阻害活性の存在が知られていた。そこで，ハタケシメジ（*Lyophyllum decastes*）子実体に含まれるチロシナーゼ阻害活性物質の単離・同定を目的として研究をおこなった。

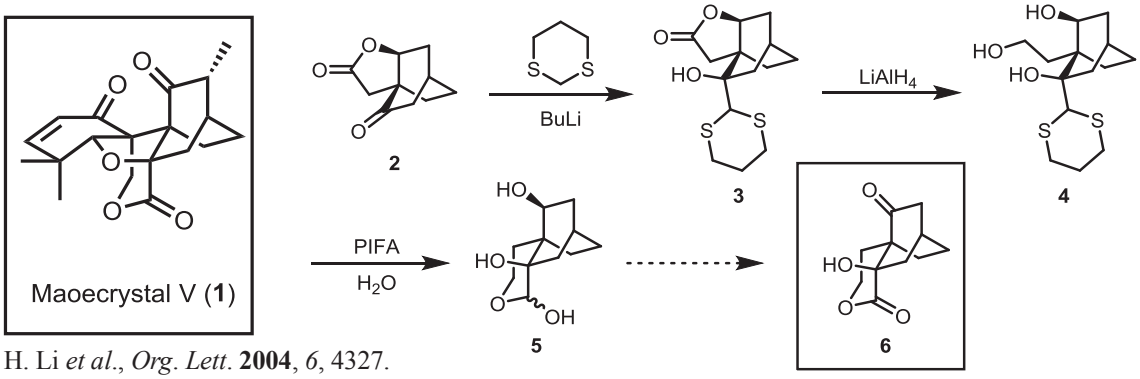
【方法・結果】凍結乾燥したハタケシメジ子実体を粉砕し，蒸留水を加えて熱水で抽出した。抽出物存在下 L-DOPA を基質としてマッシュルーム由来のチロシナーゼによる酵素反応を行った。一定時間後に DOPA chrome の生成量を吸光度により測定し，チロシナーゼ阻害活性を評価した。ハタケシメジ抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーと，ODS および HILIC カラムを用いた分取 HPLC により分画した。その結果，チロシナーゼ阻害活性物質 2.4 mg を得た。化学構造を NMR およびマススペクトルを用いて解析したところ，6-hydroxytryptophan であった。さらに，Fenton 反応により，6-hydroxytryptophan の L-体 2.9 mg と D-体 5.8 mg を調製した。CD スペクトルの比較と誘導体の HPLC 分析により，活性化合物を 6-hydroxy-L-tryptophan と同定した。6-hydroxy-L-tryptophan のチロシナーゼに対する IC_{50} は 0.23 mM であり，阻害様式は拮抗阻害であった。

Ｄ－４　抗腫瘍物質 Maoecrystal V のラクトン環モデルの合成研究

〇片山峻樹，井田浩介，佐藤勇気，泉　実，清田洋正（岡山大院・環境生命）

中国産ハーブ *Isodon eriocalyx* から単離された，複雑な五環性骨格を有する maoecrystal V (**1**) は，HeLa 細胞に対して選択的に強い増殖阻害活性を示すことから，新規抗がん剤リードとして期待されている[1]。我々は，**1** の全合成を目的に合成研究を行っている。

ラクトン **2** に 1,3-dithiane 単位を付加させた後，$LiAlH_4$ で還元してトリオール **4** を調製した。**4** を $PhI(OCOCF_3)_2$ (PIFA) によって脱保護し，六員環ヘミアセタール中間体 **5** に導いた。**5** は目的とする炭素骨格を備えており，酸化によりモデル **6** へ変換可能である。

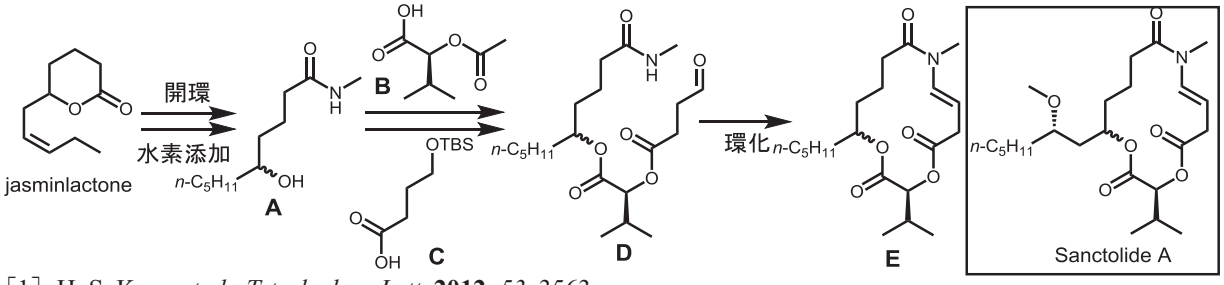


[1] S. H. Li *et al*., *Org. Lett*. **2004**, *6*, 4327.

Ｄ－５　抗腫瘍物質 Sanctolide A の 14 員環モデルの合成研究

○岩崎聡美，田中善將，平田智大，長尾実佳，林　建太，泉　実，清田洋正
（岡山大院・環境生命）

【目的】Sanctolide A はユレモ属藍藻類 *Oscillatoria sancta* から単離された14員環マクロリドである。抗腫瘍活性（殺ブラインシュリンプ：LD_{50} 23.5 μM）を示す［1］ことから医薬リードとして期待される。Sanctolide A の構造活性相関の解明を目的とし，14員環コア構造を有する誘導体 **E** の合成研究を行った。
【結果】Jasminlactone の開環と二重結合の還元で得たアルコール **A** から L-valine 誘導体 **B** と butyrolactone から誘導した **C** との二度の縮合を経てジエステル **D** を合成した。 **D** の酸触媒を用いた環化反応により目的物 **E** の合成を確認した。

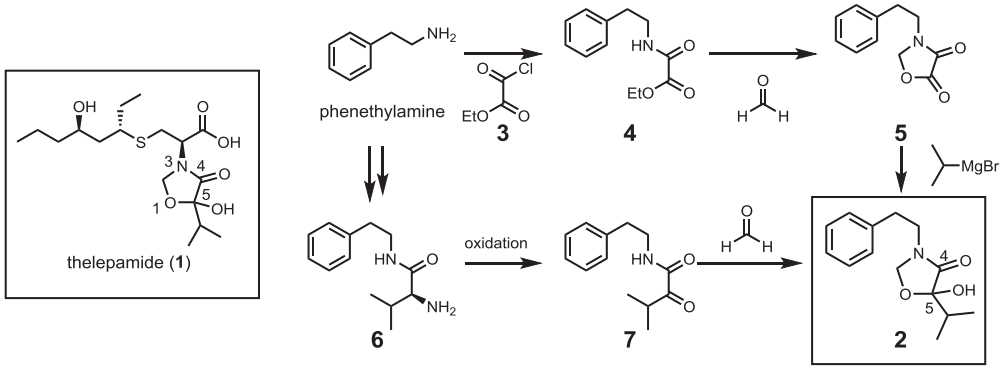


［1］H. S. Kang *et al., Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3563.

Ｄ－６　海洋環形動物から単離された Thelepamide のオキサゾリジン環モデルの合成研究

○芦田直樹，井田浩介，泉　実，清田洋正（岡山大院・環境生命）

【目的】海洋環形動物の一種フサゴカイ *Thelepus crispus* から単離された thelepamide (**1**) は抗白血病細胞活性を示す[1]。我々は，天然物に類例のない 5-hydroxyoxazolidin-4-one 環骨格の合成を目的とした。
【結果】Phenethylamine と酸クロリド **3** との縮合より **4** を得た。**4** のアセタール環化により生じた **5** に Grignard 反応で *i*-Pr基を選択的に導入し，**2** の合成を達成した。一方，予め *i*-Pr基をもつ L-Val を出発物質に用いる経路も検討した。**7** の分子内ヘミアセタール化反応は，酸触媒存在下で進行し **2** を得た。



[1] J. Rodriguez *et al*., *Org. Lett*. **2014**, *16*, 464

D－7 Herbicidal effects and chemical constituents of essential oils from *Piper cubeba* and *Piper nigrum*

○Yusuf Andriana, Tran Ngoc Quy, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objectives

The objectives of this study were to evaluate herbicidal effects of essential oils (EOs) from *Piper cubeba* and *Piper nigrum*, two pepper species widely distribute in tropics and examine their chemical compositions.

Methods and Results

Dried berries of *P. cubeba* and *P. nigrum* were hydro-distillated to yield essential oil of 1.23 and 1.11% dry weight, respectively. These EOs were then assayed on germination and growth of *Bidens pilosa* and *Echinochloa crus-galli*. The results showed that *P. cubeba* EO exhibited more inhibitory effects on germination and growth of the two indicator plants than *P. nigrum*. *P. cubeba* EO decreased photosynthesis pigments and electrolyte leakages of *B. pilosa* and *E. crus-galli*, while lipid peroxidations, prolines, phenolics, and flavonoids accumulations were increased. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography–electrospray inonization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) analyses revealed that terpinen-4-ol (42.41%), alpha-copaene (20.04%), and γ-elemene (17.68%) were the major compounds of *P. cubeba* EO, whereas β-caryophyllene (51.12%) and β-thujene (20.58%) were the dominant components of *P. nigrum* EO. Findings of this study suggest that *P. cubeba* and *P. nigrum* EOs may be useful to control *B. pilosa* and *E. crus-galli*, two of invasive and problematic weeds in agriculture.

D－8 Phenolic Contents, Antioxidant, Antibacterial and Pharmaceutical Potentials of *Celastrus hindsii*

○Tran Duc Viet, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objective

This study aims to examine total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, and antibacterial activities of *C. hindsii*.

Methods and Results

Dry powder of *C. hindsii*. leaves were extracted by methanol and fractionated using hexane, chloroform, ethyl acetate (EtOAc), and water. EtOAc extract, the most active extract in a preliminary assay, was separated in several fractions. The results showed P12 fraction (C: M = 1:1) exhibited the highest total phenolic, flavonoid contents, and antioxidant activities. In antibacterial activity, P10 (C: M = 8:2) fraction presented the most effective inhibition on the growth of some bacteria. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) results revealed that bioactive components identified in *C. hindsii* have been reported to wide spectrum of pharmaceutical properties such as anticancer, antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory, antinociceptive, antihyperglycemic, antifungal, biproduct, therapeutic value, antidiabetic, diuretic and laxative and antimalarial activities. This plant is promising potential source to treat oxidative stress, bacterial infections, and development pharmaceutical.

D－9 Inhibitory activities of momilactones A, B, E, and 7-ketostigmasterol isolated from rice husk on paddy and invasive weeds

○Nguyen Van Quan, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objectives

This study aims to isolate and purify four bioactive compounds including orizaterpenoid or momilactone E (ME), 7-ketostigmasterol (7KS), momilactone A (MA), and momilactone B (MB) from rice husk; and to evaluate their inhibitory activities on growths of paddy weed *Echinochloa crus-galli* (barnyard grass) and invasive species *Solidago altissima* (tall goldenrod).

Methods and Results

By column chromatography, ME, 7KS, MA, and MB were obtained with yields of 2.7, 0.3, 11.7, and 8.3 mg/kg rice husk, respectively. The structures of isolated compounds were identified and confirmed by various reliable spectroscopic techniques. The inhibitory activity of isolated compounds was examined on indicators plants by in vitro bioassays. Results showed that both MA and MB exhibited stronger inhibitory activity than ME and 7KS. MB exerted greater inhibition than MA but the mixture of MA and MB (1:1, v/v) possessed a similar level of inhibition with MB. On the other hand, although ME and 7KS presented non-significant inhibition, but their mixture of ME-7KS (1:1, v/v) displayed a remarkable inhibition on growth of tall goldenrod. Findings of this study revealed that MA, MB, and the mixture ME-7KS were potential to control the invasive goldenrod *S. altissima* and the noxious paddy weed *E. crus-galli* in vitro, but their mode of actions should be further investigated.

E－1 Effect of different solvents on the antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of *Agrimonia pilosa* Ldb. extracts

○Yang Anhao, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objectives

In this study, total phenolic content, flavonoid content, in vitro xanthine oxidase (XOD) inhibitory activity and antioxidant activities of *Agrimonia pilosa Ldb* (AP) extracts by five solvents including petroleum ether (PET), chloroform ($CHCl_3$), ethyl acetate (EtOAc), ethanol (EtOH) and water were investigated.

Methods and Results

The antioxidant activity investigations included DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) assay, ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging assay and reduce power test. The results showed the total phenolic contents and DPPH radical scavenging activity of EtOAc, EtOH, $CHCl_3$ and water extract were no significant difference. In contrast, EtOAc extract showed the highest contents of total flavonoids (195±17.27 mg RE/10g dry sample), ABTS radical scavenging activity (IC50= 94.06±2.00 ug/ml) and the strongest XOD inhibitory activity (IC50 = 81.25 µg/mL). Except PET extract solution, other extract solutions with the same concentration (0.6mg/ml and 1mg/ml) showed stronger reducing power than BHT (Butylated hydroxytoluene), a positive control group. This study suggested the solution by EtOAc extract contains more major compounds which contribute to antioxidant activities, XOD inhibitory activity and can be purified and identified for the future study.

E－2 Allelopathic activity and identification of allelochemicals from fruiting body of *Cordyceps mililatis* (L.) Link

○Tran Ngoc Quy, Yusuf Andriana, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objectives

The current study investigates the inhibitory potential of *Cordyceps militaris* on the germination and growth of *Raphanus sativus*, and isolates bioactive components from this mushroom.

Methods and results

The aqueous residue of this mushroom was extracted by methanol and then subsequently fractionated by hexane, chloroform, ethyl acetate and water. The ethyl acetate extract, an extract possessed the highest inhibition against *R. sativus,* was separated to different fractions by column chromatography. Each fraction was evaluated for allelopathic activity in comparison with benzoic acid and cordycepin standard solution. The results showed that the CM4 fraction presented the strongest inhibitory level on the germination, root length and shoot height of *R. sativus* (IC_{50} = 0.078, 0.043 and 0.036 mg/mL, respectively). Furthermore, herbicidal activity of this fraction was reflected five-fold greater than that of benzoic acid, but it was statistically similar to those of cordycepin. Among identified compounds from the CM4 fraction, cordycepin (0.23 g/gfraction) was the major bioactive compound, so it explained why inhibitory level of this fraction was close to that of cordycepin standard. According to these results, our study undoubtedly confirmed that cordycepin possessed a strong allelochemical against *R. sativus*. This is the first study revealed that fruiting body of *C. militaris* possessed remarkable allelopathic capacity.

E－3 Environmental Interactions of Momilactones and Phytochemicals Between Rice and Weeds in Paddy Fields

○Truong Mai Van, Tran Dang Xuan (IDEC, Hiroshima Univ.)

Objectives The purposes of this study were to investigate the signaling chemicals responsible for rice-weed communication in Japanese paddy fields and the mode of action of two putative rice-derived allelochemicals, momilactones A (MA) and B (MB), in field experiments.

Methods and Results The determination of total phenolic and flavonoid contents generated from rice *Oryza sativa* (cv. Koshihikari) and weed (*Monochoria vaginalis* and *Eleocharis acicularis*) plants in single and coexistence species system, revealed that competitive stress led to the modification of endogenous allelochemical concentrations of plants. Under limited resources, the allelochemical production of plants might be affected by their morphology characteristics. The toxicity of rhizome soil derived extracts against the growth of indicator plants in bioassays suggests that non and less polar chemicals might be more involved in plant defense systems than polar constituents. By using GC-MS analysis, two fatty acids were tentatively found as chemical mediators of rice-weed communication in soils. The mobility of MA and MB from rice plants to *M. vaginalis* via soils was determined using UPLC/MS method. The results showed that 72.96% - 87.68% of phytoalexins released into soils were absorbed by *M. vaginalis* plants, suggesting that these compounds exerted allelopathic effects on the target plants mostly via the direct way. This research enhances the current understanding of the chemical-mediated communication between rice and weed under natural conditions, which may be useful for defining sustainable weed management strategies.

E－4 Effects of music on phytochemical interactions in rice

○Kifayatullah Kakar, Tran Dang Xuan, Nguyen Van Quan
(IDEC, Hiroshima Univ.)

Objective

This experiment was conducted to find out the communication behavior among rice seedlings by influence of music on the production of phytochemicals in rice seedlings.

Methods and Results

Koshihikari rice variety was selected as a test crop and pre-germinated seeds were sown on agar media (5%). Sound (Symphony No. 9 Beethoven) was applied on seedlings with three-days interval for 1 h at 1 m distance. Treatments were (1) music as a control, (2) music + leaf cut, and (3) music + nutrient application. Yoshida solution was used for music + nutrient application treatments. Growth parameters (plant length, root length, seedling fresh and dry weights) and biological activities including antioxidant activities and total phenolic content were measured. The results revealed that the seedlings in music + leaf cut treatment faced with stress and the seedlings were thinned as well as they decreased their fresh and dry weights compare to other treatments. Antioxidant activities (DPPH and ABTS) and total phenolic content were higher in music + leaf cut treatment. It is reported that stresses from music incorporated with physical affect induced the increase of antioxidant activities and production of phenolic content in plants.

Ｅ－５　Identification of phenolics and antioxidant properties of a white rice mutant

○Can Thu Huong, Nguyen Van Quan, Tran Dang Xuan
(IDEC, Hiroshima Univ.)

Objective　This study was conducted to investigate the differences in total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity of mutant line TBR1/KD18 and its parents with nutrient and without nutritional condition.

Methods and Results　TPC and TFC of rice at seedling stage were estimated using Folin-Ciocalteu and Aluminium chloride methods, respectively; and their antioxidant capacities were determined by DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS•+ (2,2'-azino-bis radical cation), and NO (Nitric Oxide) scavenging assays (IC_{50} values). The results showed that the TPC, TFC, and the antioxidant activities of rice grown in Yoshida solution was higher than those of rice in normal condition (with distilled water only). Significantly, the TPC of mutant progeny (4.26 mg GAE g^{-1} DW) was much greater than that of parental cultivars (1.49 mg GAE g^{-1} DW) in the medium with Yoshida solution. It continuously performed stronger inhibitory values of DPPH, ABTS, and NO methods compared to their parents. In which, the IC_{50} values of DPPH, ABTS, and NO for the mutant line with Yoshida nutrient were 0.29, 0.45, and 0.70, respectively. The outcomes confirmed that phenolics and their relevant antioxidants of rice improved in the nutrient medium rather than in normal condition. Furthermore, created mutation may enhance the biological activities of rice at the seedling stage through secondary metabolite pathways.

Ｅ－６　骨格筋におけるホモカルノシンの生合成を誘導する食品因子の探索

○佐藤可奈子，有馬岳志[1]，小丸拓海[2]，矢中規之，
Thanutchaporn KUMRUNGSEE
（広島大院・統合生命，[1]広島大院・生物圏，[2]広島大・生物生産）

【目的】カルノシン(β-alanine-histidine)は骨格筋において高濃度で存在し，抗酸化作用や pH 緩衝作用など骨格筋の機能に重要な役割を果たす。そこで近年, 運動機能の向上を目的としたカルノシンやβ-alanine の投与試験が広く行われているが，血中での不安定性などが問題となっている。本研究ではカルノシンと類似の構造を持つホモカルノシン(GABA-histidine)に着目し，GABA のような食品因子を用いて骨格筋のホモカルノシンの生合成を誘導することでカルノシンの代替成分として提案することを目的とした。

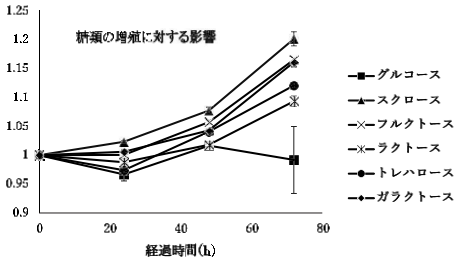
【方法･結果】5 週齢の雄性 ICR マウスに 1 週間標準食与え, その後 AIN93 標準食群, および 0.5, 2, 5%GABA 添加食群の 4 群に分けた。6 週間自由摂取させた後，骨格筋組織より抽出したホモカルノシンなどペプチド量を LC-MS/MS 法により測定した。さらに内在性の GABA 分解酵素がホモカルノシン合成量に関連するのかを検討するために GABA 分解酵素阻害剤である vigabatrin(250 mg/ kg body weight)を雄性 ICR マウスに 2 週間皮下投与した。標準食群では GABA，およびホモカルノシンはともに低濃度で存在していたが，GABA 添加食群では，骨格筋の GABA，およびホモカルノシン量は有意に増加した。一方，2%および 5%GABA 摂食による他のイミダゾールペプチド量の変化は認められなかった。さらに GABA 分解酵素阻害剤と GABA 摂取の併用は骨格筋のホモカルノシン量を相乗的に増加させた。以上の結果から，骨格筋において低濃度に存在するホモカルノシンは組織内 GABA 量の上昇によって著しく増加させることが可能であると考えられ，GABA 摂取による骨格筋機能を向上させる可能性が示された。

Ｅ－７　　ハチミツの培養細胞におよぼす影響

○河野浩也[1]，山田芽吹[2]，山本和彦[1,2]（[1]近畿大・工，[2]近畿大院・システム工）

【目的】　近年，先進国では糖尿病や高血圧などを原因とするメタボリックシンドロームが医療面だけでなく社会的な問題となっている。これらの疾患はエネルギー代謝や物質代謝が健康状態から逸脱しており，その予防のためにも食生活を見直すことが重要であると考えられている。糖尿病患者は砂糖や果糖を含め，糖質の制限が求められている。しかし，ハチミツは 80%と高い糖含量に係わらず，同量の糖摂取と比較し悪影響が出ないと，一般に言われている。また，清涼飲料水に含まれるフルクトースが悪影響を及ぼすことが多く報告されているが，フルクトースを含むハチミツでは悪影響は認められないなどとされている。一見すると矛盾するこの様なことが事実なのか確認し，ハチミツに含まれる糖あるいはそれ以外の物質による，代謝制御など細胞に及ぼす影響などを明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】　チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株 (CHO) 細胞を用い，ハチミツやグルコース，フルクトース，スクロースが胞増殖にどのような影響を及ぼすか調べた。結果，グルコースは低濃度で用いた場合に，他の糖に比べ増殖が抑えられる傾向が見られた。また，二糖類のスクロースも他のグルコース以外の単糖と同様の増殖パターンを示し，糖の膜輸送に興味が持たれる。



Ｅ－８　　ウンシュウミカン葉水溶性抽出物の抗炎症効果に関する研究

○伊藤誉子，石田萌子，門田　歩[1]，西　甲介（愛媛大院・農，[1]伊方サービス（株））

【目的】国内で最も生産量の多い柑橘であるウンシュウミカンは，β クリプトキサンチンをはじめとする様々な保健機能成分を含んでいる。これら有効成分の多くは，果肉よりも果皮に多く含まれていることが知られているが，フラボノイド類などは，葉にも多く含まれている。そこで本研究では葉の機能性に着目し，ウンシュウミカン葉の水溶性抽出物が過剰炎症状態のマクロファージに及ぼす効果について検討した。

【方法】凍結乾燥し，粉末化したウンシュウミカン葉を 0.1 g/mL となるように蒸留水に懸濁し，水溶性成分を抽出した。遠心処理により抽出液を回収し，pH を 7.4 に調整した後，分画分子量 1,000 の膜で限外ろ過して得られたろ液を，ウンシュウミカン葉水溶性抽出物（UCLE）とした。リポ多糖（LPS）で炎症誘導したマウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞に対する UCLE の抗炎症効果を検討した。

【結果】UCLE は細胞毒性を示すことなく，RAW264.7 細胞のインターロイキン(IL)-6 および一酸化窒素の産生量を有意に抑制した。また，UCLE の IL-6 産生抑制効果は遺伝子発現の抑制によるものであることが明らかになった。そこで，シグナル伝達因子に与える影響について検討したところ，MAPK 経路の ERK と JNK のリン酸化を抑制することが明らかになった。以上の結果から，UCLE は Toll 様受容体から MAPK 経路を介した細胞内シグナル伝達を下方制御することによって，RAW264.7 細胞の炎症性応答を抑制すると考えられる。

Ｅ－９　食品由来ポリフェノール類がアセトアルデヒドの皮膚表皮細胞への毒性に与える影響

○明神　匠，Xu Wensi，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】アルデヒドデヒドロゲナーゼ（ALDH）は，エタノールの代謝で生成する有毒なアセトアルデヒドの酢酸への変換を触媒する。ALDH の遺伝子多型は飲酒などによるアセトアルデヒド（AA）の蓄積を促進し，肝臓だけでなく，食道や皮膚の損傷を増悪させることが示唆されている。我々はこれまでに，ケルセチン及びクロロゲン酸（CGA）が肝細胞において ALDH や抗酸化酵素の発現を増強し，AA に対する保護効果を発揮することを明らかにした。しかし，AA の皮膚表皮細胞への毒性に対して保護作用を示す食品成分についてはほとんど調査されていない。そこで本研究では，ケルセチンや CGA が皮膚表皮細胞での AA 毒性に与える影響を調査し，その分子機構について考察した。

【方法・結果】ケルセチン及び CGA をヒト表皮角化細胞株 HaCaT に 24 時間前処理した後，AA を処理し，MTT 法により細胞生存率を測定した。その結果，ケルセチンと CGA は AA の細胞毒性を緩和する傾向を示した。そこでケルセチンを HaCaT 細胞に処理し，ALDH 分子種（ALDH1a1，ALDH2，ALDH3a1）の遺伝子発現を測定したところ，ケルセチンはどの分子種の発現も増強しなかった。AA は細胞内の酸化ストレスを亢進することで細胞毒性を誘導することから，次に細胞内酸化ストレスの軽減に寄与する第 2 相薬物代謝酵素群の遺伝子発現への影響を調査した。その結果，ケルセチン及び CGA は第 2 相薬物代謝酵素群の遺伝子発現を増強した。以上の結果から，ケルセチン及び CGA は酸化ストレスの軽減を介して，HaCaT 細胞での AA 毒性に対し保護作用を示すことが示唆された。

Ｆ－１　さつま砂糖漬け鯛製法における味噌と砂糖の漬け込み効果

○福田　翼，嵩慎太郎，小林聡子，辰野竜平，古下　学（水産機構・水大校）

【目的】さつま砂糖漬け鯛は，江戸時代の料理集「鯛百珍料理秘密箱」（1785 年）に記載されている薩摩地方の保存食である。さつま砂糖漬け鯛は，三年間発酵させた味噌（以下，三年味噌）への漬け込みと，砂糖への漬け込みの二段階により製造される。本研究では，さつま砂糖漬けにおける味噌の種類および砂糖添加割合が官能評価に及ぼす影響を明らかとし，脂質酸化へ及ぼす影響を評価した。

【方法・結果】さつま砂糖漬け鯛は，「鯛百珍料理秘密箱」を参考にして製造した。すなわち，三枚おろしにしたマダイ魚肉に食塩を振り，4°C で一昼夜保存した。その魚肉を 1 cm 幅に切断した後，滅菌ガーゼに包み，4°C で 48 時間味噌に漬け込んだ。さらに，砂糖を魚肉に揉み込み，20°C で保存した。味噌は，三年味噌，速醸系味噌，加熱殺菌した三年味噌（以下，殺菌三年味噌）とした。比較対象として，味噌漬けしていない試料（以下，未処理）を用いた。砂糖添加割合は，味噌漬け後の魚肉重量に対して 20% とした。砂糖漬けへの漬け込み効果を調査する場合，砂糖添加割合は魚肉重量に対して 0，10，20，40% とした。異なる味噌を用いたさつま砂糖漬け鯛の官能評価を行った結果，三年味噌，速醸系味噌および殺菌味噌の香りおよび味は，未処理よりも向上した。酸価および TBARS 値を調査した結果，差は見られなかった。三年味噌漬け条件下にて異なる砂糖添加割合のさつま砂糖漬け鯛の官能評価を行った結果，砂糖添加により香りおよび味は向上した。未処理条件下の酸価は，砂糖添加割合が高い程，酸価の上昇が抑制された。一方，三年味噌漬け条件下の酸価は，砂糖添加割合による影響は見られなかった。

Ｆ－２　腎臓近位尿細管細胞に対する本ワサビ成分 6-MSITC の効果に関する検証

○桑田冬馬，今津星奈子[1]，池野　瞳[1]，西村浩二[1]，地阪光生[1]，横田一成[1]，清水英寿[1]（島根大院・自然科学，[1]島根大・生資科）

慢性腎不全患者には食事療法が課されるが，その調理の際に減塩の目的として，香辛料である本ワサビも用いられる。しかし，慢性腎不全の進行抑制に対する本ワサビの含有成分の効果は不明である。そこで本研究では，本ワサビ成分の 1 つである 6-Methylsulfinylhexyl Isothiocyanate (6-MSITC)に着目し，慢性腎不全の進行と関わりのある近位尿細管細胞の細胞株である HK-2 細胞に対する 6-MSITC の効果について解析を行った。まず，他の細胞と同様に 6-MSITC 処理で Nrf-2-HO-1 経路が活性化するのか確かめたところ，5 μM の 12 時間処理で同様の結果が得られた。さらに，近位尿細管細胞の機能障害に関与する ERK，p38，JNK，Akt の活性化について調べたところ，JNK の活性化及びその下流の c-Jun のリン酸化のみ，5 μM の 30 分処理で抑制した。また，細胞内のエネルギーセンサーとして働く AMPK の活性化についても確かめた。5 μM で 5 分処理後から時間依存的にその活性化が観察された。AMPK はオートファジーに関与しているため，そのマーカーである LC3B について調べたところ，6-MSITC 処理によりオートフォジーの誘導が示唆された。続いて，細胞増殖能に関して検討したところ，48 時間処理後，濃度に応じて HK-2 細胞の増殖が認められ，特に 2.5 μM 処理で細胞増殖のピークが観察された。以上の結果より，6-MSITC は腎臓近位尿細管細胞において，HO-1 の発現増加による抗酸化作用の亢進，JNK-c-Jun 経路の活性低下による細胞機能障害の抑制，オートファジーの惹起，細胞増殖の誘導，これら 4 点を導くことで，慢性腎不全の進行に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

Ｆ－３　レスベラトロールによる低栄養，低酸素状態のラット筋芽細胞生存率の向上

〇内藤恭子，神吉けい太（岡山理大・工）

【目的】現在再生医療分野において体組織の機能を再現した立体組織の構築が試みられている。しかし実質細胞を凝集させた立体組織では毛細血管系が無いため，組織内部が低栄養，低酸素状態に陥り急速に細胞死を起こしてしまう。したがって立体組織構築時の細胞死を回避する手法が必要とされる。レスベラトロールは解糖系抑制や細胞分化促進効果などの効果が知られる植物由来ポリフェノールである。そこでレスベラトロールの機能を立体組織培養法へ応用することを考え，低栄養，低酸素に晒した筋芽細胞の生存に与える影響について検討を行った。【方法】ラット筋芽細胞 H9C2 を用い，低栄養モデルとしてグルコース濃度を 0~4.5 mg/mL 含む培地で 3 日間培養を行った。また低酸素モデルとして酸素吸収剤を用い 0.1%酸素条件で 2 日間培養を行った。各実験において DMSO およびレスベラトロール 100 μM の処理を行い，WST アッセイにより細胞生存率を求めた。【結果】0.5 mg/ml グルコース培地では細胞生存率の低下が認められたが，レスベラトロール処理することによりこれは回避された。レスベラトロール処理により筋芽細胞の増殖は抑制傾向が認められた。また低酸素，低栄養状態では細胞生存率は 2 日目までに約 20%に低下したが，レスベラトロール処理することで生存率は約 70%に維持された。【結論】レスベラトロール処理により低栄養，低酸素状態の筋芽細胞生存率が向上した。レスベラトロール処理により筋芽細胞の栄養要求性が弱められ，細胞死が回避されたと考えられる。今後，スフェロイドなど立体組織において組織内部の細胞死を軽減できるかどうか検討を行う。

Ｆ－４　刺胞動物ミズクラゲの変態に関する組織化学的研究

〇藤井夏鈴，国吉久人[1]（広島大院・生物圏，[1]広島大院・統合生命）

【背景】刺胞動物ミズクラゲ *Aurelia coerulea* の生活環は，雌雄異体で浮遊性の成体クラゲが有性生殖を行う有性世代と固着性のポリプが出芽や分裂によって無性的に増殖する無性世代から成る。海水温が低下するとポリプの胴体部分にくびれができ，分節を持ったストロビラへと変態する。分節は口側から反口側に向かって数を増やし（分節形成），その後，それぞれの分節は 8 個の弁を持ったディスクに変化する（形態形成）。各ディスクは 1 枚ずつ遊離して浮遊生活を始める。この遊離したディスクはエフィラと呼ばれ，成長して成体クラゲとなる。本研究では，各種の組織染色法によりミズクラゲの変態中の形態学的変化を明らかにすることを目的とした。

【方法】ポリプからエフィラへの変態の各ステージで切片標本を作製し，①ヘマトキシリン・エオシン染色による内部形態の観察，②内在性アルカリホスファターゼの活性染色による内胚葉性細胞層の染色，③BrdU ラベル法による細胞増殖の可視化を行った。

【結果】①②全てのステージで外胚葉と内胚葉の二層からなり，その間にゼリー状の組織である中膠があることを確認した。ストロビラのくびれは，二層構造を維持したまま胃腔側へ陥入していることを明らかにした。③ポリプではほとんど細胞増殖が検出されなかった。分節形成期では，すでに形成された分節部分で細胞増殖は盛んに起きており，次の分節が形成される領域でも細胞増殖が観察された。形態形成期では，すでにエフィラへの形態形成が完了した部分では細胞増殖はほとんど観察されなかった。

Ｆ－５　ナトリウム利尿ペプチド受容体 NPR-C の新たなシグナル伝達機構

○西田充芳，宮本賢治，清水友紀，辻　明彦[1]，湯浅恵造[1]
（徳島大院・先端技術，[1]徳島大・生物資源）

【目的】ナトリウム利尿ペプチド（natriuretic peptide; NP）ファミリーの受容体の一つである natriuretic peptide receptor C（NPR-C）は血中 NP クリアランスの役割を担っているが，それ以外の生理機能も有する可能性が示唆されている。また，近年では，NPR-C 特異的リガンドとして osteocrin／musclin が同定され，新たな NPR-C の機能の解明が期待されている。本研究では，NPR-C の相互作用タンパク質の探索およびそのタンパク質との相互作用の詳細の解明を目指した。
【方法・結果】はじめに NPR-C と相互作用するタンパク質の探索を行った。Strep タグ NPR-C を HEK293T 細胞に遺伝子導入し，Strep プルダウンアッセイを行った。特異的なバンドについて質量分析法により解析した結果，guanine nucleotide exchange factor（GEF）の一つである GEF-H1 を同定した。GEF-H1 は NPR-C と約 70%のアミノ酸相同性を示す NPR-A には結合を示さず，NPR-C と特異的に相互作用した。また，NPR-C と GEF-H1 の領域欠損変異体を作製し，それぞれの相互作用領域を調べた結果，NPR-C は細胞内の約 40 アミノ酸を介して相互作用した。次に，リガンド処理による相互作用への影響を調べた。NPR-C と GEF-H1 を共発現させた HEK293T 細胞を，NPR-C のリガンドである ANP, CNP, osteocrin および osteocrin の C 末端領域に保存された NP モチーフ（NM）と類似した 2 種類の配列をそれぞれ含む NM1，NM2 ペプチドでそれぞれ処理した。プルダウンアッセイにより，いずれのリガンド処理においても GEF-H1 が NPR-C から解離することが明らかとなった。

Ｆ－６　柑橘類果皮ポリメトキシフラボンであるスダチチンは，MAPK 経路を介してアポトーシスを誘導する

○安部庄剛，西谷真美，辻　明彦[1]，湯浅恵造[1]
（徳島大院・先端技術，[1]徳島大・生物資源）

【目的】多種多様なポリフェノールが植物から同定されており，それらの多くが抗酸化活性や抗癌作用などの生理活性を示すことが報告されている。ポリフェノールの一種であるスダチチンは，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り，抗炎症性を有することが報告されている。これまでに我々は，スダチチンがヒトケラチノサイト HaCaT 細胞に対してアポトーシスを誘導することを見出しており，本研究ではスダチチンによるアポトーシス誘導機構を解明することを目的とした。
【結果】多くの化合物が活性酸素種（ROS）を介してアポトーシスを誘導していることから，まずスダチチンが ROS 産生を促進するか検証した。その結果，スダチチンは ROS 産生を濃度・時間依存的に促進した。ROS が MAPK を介してアポトーシスを誘導している可能性があるため，スダチチンによる MAPK のリン酸化レベルの変化を定量化した。スダチチン処理により p38 MAPK のリン酸化は上昇し，下流の HSP27 のリン酸化も確認された。スダチチンによって誘導された HSP27 のリン酸化およびアポトーシスの指標である PARP 切断はいずれも p38 阻害剤である SB203580 によって抑制された。一方，ERK1/2 は一時的に不活性化され，24 時間後には処理前レベルまで回復した。ERK1/2 は，EGF などの増殖因子が細胞膜に存在する受容体に結合することで活性化される。スダチチンは，血清飢餓後の FBS 処理および EGF 処理による ERK1/2 活性化を抑制した。これらの結果より，スダチチンが ROS-MAPK 経路，特に p38 経路活性化および ERK1/2 経路不活性化を介してアポトーシスを制御していることが示唆された。

Ｆ－７　過酸化水素の反復的な曝露は真皮線維芽細胞の黄変化を促進する

○江口琴音，吉本　聖，吉田萌生，八木政幸[1]，山下裕司[2]，平尾哲二[3]，
市橋正光[4]，安藤秀哉（岡山理大院・工，[1]ロゼット（株），[2]千葉科学大・薬，
[3]武庫川女子大・薬，[4]同志社大・生命医科）

【目的】美容上の問題の一つである皮膚の黄くすみは，真皮組織がカルボニル化を受けて黄変化することで生じると報告されているが，我々は長期継代培養により老化した真皮線維芽細胞，及び過酸化水素処理による短期誘導老化モデル細胞が黄変化するという現象を見出した。今回，細胞黄変化のメカニズム解析を目的として，老化細胞がアルデヒドなどの黄変化を促進する物質を産生している可能性について検討を行った。

【方法・結果】無色の正常細胞，黄変化が生じた複製老化細胞，及び過酸化水素誘導老化細胞において，Dihydrorhodamine123 染色によって細胞内 ROS の検出を行ったところ，正常細胞と比較して二種の老化細胞では細胞内 ROS が増加した。黄変化を促進する物質として，マロンジアルデヒドなどの反応性の高い脂質過酸化生成物及びアクロレインの細胞内産生量を，TBARS Assay 及び AcroleinRED による蛍光染色法で検出して比較すると，黄変化した細胞ではマロンジアルデヒド・アクロレイン量ともに増加が確認された。特に，短期間で黄変化が生じる過酸化水素誘導老化細胞では，顕著な増加が認められた。また，過酸化水素誘導老化細胞作製の過程で，正常細胞に過酸化水素と抗酸化剤の同時処理を行ったところ，過酸化水素のみを処理した細胞と比較して細胞黄変化が抑制された。これらの結果から，老化細胞では黄変化反応の中間生成物であるアルデヒドを自ら産生し，黄変化が促進されると考えられた。さらに，抗酸化剤処理によって酸化ストレスが軽減されることで，細胞黄変化が抑制される可能性が示唆された。

Ｆ－８　細胞の自己凝集化技術を用いた血管毒性試験用の毛細血管球体の作製

○橋本真悟[1,2]，滝澤　昇[1]，岩井良輔[2]
（[1]岡山理大院・工，[2]岡山理大・フロンティア）

【背景・目的】農医薬の血管毒性評価においては，倫理面，種差や個体差の問題から実験動物を用いず細胞培養による多剤スクリーニング試験系の開発が望まれているが，培養皿上で平面培養した細胞では細胞機能の変化は評価できるが，立体的な管腔構造の変化までは評価できない。我々は細胞の自己凝集化技術（CAT）として，立体的な細胞組織体を任意サイズで均一かつ大量に作製することに成功した。本研究では，CAT を用いた組織作製を管腔構造を有する毛細血管体の作製に応用することを目的とした。

【方法・結果】96 穴プレートの底面全体に CAT 用ポリマーを印刷した後，ヒト血管内皮細胞を 5-160×10^4 cells/cm^2 の異なる密度で，ヒト血管周皮細胞を 50×10^4 cells/cm^2 の一定密度で播種した。細胞群はいずれの播種密度においても培養皿表面への接着を経て剥離，凝集化し，内皮細胞の含有率が概ね 20%より低いと播種 2 日以内に球状の凝集塊が形成し，40%より高いと凝集化に要する時間が 3 日以上に遅延し円盤状の凝集塊が形成した。ここで，これらの凝集塊の薄切片を作製し組織分析を行ったところ，円盤状凝集塊においては毛細血管の管腔構造はほとんど見られなかったが，球状凝集塊においては全体に緻密な毛細血管様の管腔構造が認められた。

【結論・展望】CAT を用いた組織作製において，内皮細胞と周皮細胞を播種するだけで毛細血管様の立体管腔構造を有する毛細血管球体を作製することに成功した。動物実験を代替し得る培養による農医薬の血管毒性試験系開発への応用が期待される。

Ｆ－９　農医薬スクリーニング用途を指向した細胞の自己凝集化技術を用いた新規の立体細胞組織体作製法の開発

○草加直幸，安部菜月[1]，鈴木康平[2]，広井佳臣[2]，西野泰斗[1]，岩井良輔
（岡山理大院・工，[1]日産化学・生物研，[2]日産化学・材料研）

【背景と目的】農医薬の薬効・毒性の多剤スクリーニング試験においては，生体の臓器や組織に近似した細胞組織体を用いた培養試験系の開発が望まれているが，細胞を凝集化させた立体的な組織体を均一かつ大量に得られる方法は確立されていない。本研究では，我々が開発した細胞の自己凝集化技術（Cell self-Aggregation Technology: CAT）を用いることで，薬効・毒性スクリーニング試験への応用を指向した高いサイズ均一性（高精度）と量産性に優れた立体細胞組織体の作製法を開発することを目的とした。
【方法と結果】独自に合成した CAT 用のポリマーを細胞非接着性の培養皿に 0.4-2.5 mm^2 の面積でドット印刷し，ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を 30×10^4 cells/cm^2 の密度で播種した。細胞は 1 時間以内に CAT ポリマーのドット印刷表面にのみ接着し，1 晩の培養の間に一体凝集化することで，印刷面積に応じて約 250-500 μm の任意の異なるサイズの立体的な球形の細胞組織体を形成した。ここで，それらの直径に対するサイズ誤差を計測したところ，約 2-7%とバラつきが生じ，従来法の約 6%と比べて精度が低い条件もあった。そこで，$10\text{-}30\times10^4$ cells/cm^2 の異なる播種密度において細胞を播種すると，概ね $20\pm2\times10^4$ cells/cm^2 の播種密度帯で従来法より高い 6%以下の精度で細胞組織体を作製できることが分かった。
【結論】我々が独自に開発した細胞の自己凝集化技術において，播種密度を至適化することで，従来法より高い精度で立体細胞組織体を量産可能であることが示された。安定で高効率な農医薬スクリーニングの実現に向けた細胞組織体の作製法として有用であると考えている。

Ｆ－10　DNA トポイソメラーゼ IIα の核小体局在と酵素活性制御機構の解析

○安田和史，池田正五，河野真二（岡山理大・理）

DNA トポイソメラーゼ IIα（トポ IIα）は，二重鎖 DNA の切断と再結合を触媒することで，DNA を基盤とした代謝反応によって生じる DNA のねじれやよじれを解消する酵素である。これまでに，トポ IIα の細胞核内動態についていくつか報告がなされており，間期の細胞核内では核小体と核質に局在し，両者の間を絶えずシャトリングしていることが明らかにされている。核小体に局在しているトポ IIα の酵素活性は抑制された状態にあることが示唆されているが，その詳細な分子メカニズムについては不明なままである。我々は，間期細胞核内におけるトポ IIα の核小体局在と酵素活性制御機構を明らかにすることを目的として解析を行った。EGFP タグを融合したラットのトポ IIα の各欠質変異体を使った細胞核内局在の解析結果から，1192-1289 領域が核小体局在に必要であることを見出した。試験管内酵素反応では，RNA 存在下で酵素活性が抑制されること，C 末端領域（CTD）を欠くことで RNA による抑制から免れることが明らかになった。さらに，試験管内での RNA 結合反応の結果から，トポ IIα の CTD に RNA が結合することが示された。これらの結果から，間期細胞核内におけるトポ IIα の核小体局在と酵素活性の抑制にトポ IIα の CTD と RNA との相互作用が関わっていると考えられる。

Ｇ－１　タデアイの生育過程におけるフラボノイド配糖体の成分変化

○中井翔太[1,2]，木村英人[2]，平林　侑[2]，石原朋恵[2]，地阪光生[1,3]，横田一成[1,3]
（[1]鳥取大院・連農，[2]寿製菓（株），[3]島根大・生資科）

タデアイ(*Polygonum tinctorium* Lour.)は，東南アジア原産の一年生植物で，古くから藍染めの染料原料や解毒, 解熱, 消炎などの目的で利用されてきた。最近, 我々の研究グループではタデアイ葉に, quercetin, kaempferol，isorhamnetin，3,5,4'-trihydroxy-6,7-methylenedioxyflavone(TMF)をアグリコンとするフラボノイド配糖体が含まれることを確認した。TMF の配糖体は，タデアイ葉に特徴的に含まれる物質群で，これらが種子にも存在するのか，あるいは生育過程で生合成されているのかは不明である。そこで，タデアイ種子，スプラウトおよび生育後の地上部の抽出物を成分分析した。また，それぞれの抗酸化能を評価した。【方法】タデアイ種子，スプラウト，生育後の地上部の乾燥物に 80%メタノールを加え，超音波破砕機内で 30 分間抽出した。抽出液のろ液を 40℃で減圧濃縮後，DIAION HP-20 カラムで蒸留水，メタノールの順に精製し，メタノール溶出画分を乾固させた。各乾固物に 80%メタノールと内部標準として hesperetin を加え，3000 rpm で 5 分間遠心分離後の上清を UPLC-ESI-TOF/MS^{E} または HPLC にて分析した。また, 抗酸化能は AWA 溶液で抽出したサンプルを H-ORAC 法で評価した。【結果】種子では quercetin と kaempferol のアセチルラムノース配糖体が主成分であるが，生育が進むにつれ TMF の配糖体が主成分となることが分かった。総ポリフェノール量は生育段階が進むにつれて増加し, これと相関して H-ORAC 値も高くなった。以上より，抗酸化物質のソースとして生育後の地上部を利用するのが適切と考えられる。

Ｇ－２　ゼニゴケ油体特異的テルペン集積機構

○滝澤遼典，畑田珠希，森脇佑太，肥塚崇男，松井健二（山口大院・創科）

【目的】苔類は進化の過程で最初に陸上化した植物と系統的に近い植物群で，陸上植物初期の化学防御機構の名残を有していると考えられ，陸域生態系における適応進化機構の解明に適した研究対象である。ゼニゴケ亜綱を代表に，多くの苔類の葉状体には油体と呼ばれる細胞小器官を高度に蓄積した油体細胞が散在している。この油体内には，抗菌活性，植食者忌避活性をもつセスキテルペン類やビスビベンジル類が局在しているが，油体細胞の発生機構や油体細胞特異的化学防御物質の生成・集積機構はまだ解明されていない。そこで，本研究ではゼニゴケ油体へのセスキテルペン集積機構の解明を進めた。
【方法・結果】ゼニゴケゲノムには少なくとも 30 個のテルペン合成酵素遺伝子が存在し，そのうち 10 個はセスキテルペン合成酵素と考えられる。そのうち 8 個は第 6 染色体上で近接して存在し，その一部は DNA レベルで 99%相同で, 比較的近い過去に高度に重複したことが示唆された。また, 定量的 RT-PCR でこれらセスキテルペン合成酵素遺伝子は貧栄養培地で誘導されることが明らかとなっており，その誘導様式は油体分化とそれに伴うセスキテルペン量増加と正の相関を示した。その中の 1 つである *MpFTPS1* のプロモーター活性を蛍光タンパク質 [TdTomato (NLS)]を指標に精査したところ，油体特異的に高いプロモーター活性を見いだした。以上の結果から，ゼニゴケでは十分な化学防衛のためにセスキテルペン生合成能を急速に高めた時期があり，セスキテルペン合成系を油体細胞特異的に持つことで，油体細胞以外の細胞活動に支障を与えずに十分な化学防衛システムを構築したことが示唆された。

Ｇ－３　気孔開度の調節にかかわる孔辺細胞カルシウムイオンチャネルの機能解析

○宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行（岡山大院・環境生命）

植物の葉の表皮に存在する気孔は，一対の孔辺細胞から成る通気孔であり，開閉運動を行うことで酸素と二酸化炭素のガス交換や蒸散を調節する重要な場である。孔辺細胞は，乾燥ストレスや光，病原菌感染，大気中の二酸化炭素の濃度変化など，周囲の環境からの様々な刺激に応答して気孔の開度を最適化し，植物が環境変動に適応する手助けをしている。気孔閉口を制御する孔辺細胞シグナル伝達において，カルシウムイオン（Ca^{2+}）が重要なセカンドメッセンジャーとして機能していることが古くから知られている。孔辺細胞$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇は，気孔閉口を調節するシグナル伝達において，重要なイベントの一つであり，孔辺細胞$[Ca^{2+}]_{cyt}$上昇の抑制や孔辺細胞$[Ca^{2+}]_{cyt}$センサータンパク質の機能欠損が，気孔閉口応答を阻害することが数多くの研究で明らかとなっている。しかしながら，孔辺細胞$[Ca^{2+}]_{cyt}$の調節機構の詳細は，現在不明である。我々は，気孔開閉運動の調節に関わる Ca^{2+}輸送体の探索を進めている。本発表では，これまでの研究によって同定した原形質膜カルシウムイオンチャネル候補遺伝子の一つに関して，その解析結果を紹介する。

Ｇ－４　Mechanisms of Reactive Carbonyl Species Mediated Stomatal Closure in *Arabidopsis* Guard Cells

○Mohammad Saidur Rhaman，宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行
(Grad. Sch. of Environ. Life Sci., Okayama Univ.)

【Objective】Stomatal pores, which are surrounded by a pair of specialized guard cells, serve as major gateways for regulating gas exchange and transpirational water loss. Abscisic acid (ABA) is the most important hormone in stimulating stomatal closure. Reactive carbonyl species (RCS) have been reported to be involved in ABA-induced stomatal closure in Arabidopsis. However, the mechanism by which RCS mediates ABA signaling in Arabidopsis guard cells remains to be clarified.

【Methods and Results】*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia-0 was used as a wild-type plant and its Yellow Cameleon 3.6 (YC3.6)-expressing plant was used for $[Ca^{2+}]_{cyt}$ measurement. We used a pH-sensitive fluorescent dye, BCECF-AM, to observe a change in cytosolic pH in guard cells. Acrolein induced stomatal closure in the wild-type plants and triggered cytosolic alkalization and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation in their guard cells. These results indicate that RCS functions upstream of cytosolic alkalization and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ oscillation in ABA signaling in Arabidopsis guard cells. We also used certain types of ABA signaling-related mutants to further investigate the roles of RCS.

Ｇ－５　リンゴ酸誘導気孔閉口におけるシグナル分子の同定

〇三俣好令，宗正晋太郎，中村俊之，中村宜督，村田芳行（岡山大院・環境生命）

【目的】植物は，乾燥に応答して葉の表皮に存在する気孔を閉口し，水分損失を調節する。気孔は，一対の孔辺細胞により形成され，孔辺細胞が膨張・収縮することで開閉する。気孔開閉は代謝変動を伴い，リンゴ酸量は著しく変化する。気孔開口時には，デンプン分解や CO_2 固定によるリンゴ酸生成，輸送体を介したリンゴ酸取り込みの結果，孔辺細胞内にリンゴ酸が蓄積する。一方で，気孔閉口時には，デンプン合成や TCA 回路によるリンゴ酸代謝，チャネルを介したリンゴ酸排出の結果，細胞内のリンゴ酸が減少する。リンゴ酸添加は気孔閉口を誘導することから，気孔閉口におけるリンゴ酸の重要性は広く認識されているにも関わらず，リンゴ酸誘導気孔閉口のシグナル伝達機構は不明である。そこで，本研究ではシグナル分子を同定し，リンゴ酸がチャネル活性を制御するかを評価した。
【方法・結果】モデル植物であるシロイヌナズナを用い，リンゴ酸応答に関わる遺伝子を順遺伝学的に選抜し，シグナル分子を探索した。その結果，アニオンチャネルである SLAC1 を同定した。異種発現系としてアフリカツメガエル卵母細胞を用い，シロイヌナズナ由来 SLAC1 を卵母細胞に発現させた。その後，卵母細胞にリンゴ酸を処理し，SLAC1 活性を電気生理学的手法により解析した。その結果，SLAC1 単独発現では，リンゴ酸は SLAC1 活性へ影響を及ぼさなかったのに対し，SLAC1 リン酸化キナーゼである OST1 を共発現させると，SLAC1 活性がリンゴ酸により増加した。さらに，OST1 非依存的に活性型となる SLAC1 リン酸化ミミック変異体を単独発現させたところ，SLAC1 活性がリンゴ酸により増加した。

Ｇ－６　アブシシン酸による孔辺細胞内グルタチオン量調節機構の解明

〇石原慈心，長橋大樹，横井隆志，宗正晋太郎，中村宜督，村田芳行
（岡山大院・環境生命）

【目的】植物表皮に存在する気孔は，一対の孔辺細胞に囲まれた小孔である。乾燥ストレスに応答して生合成される植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) は，シグナル伝達経路を介して気孔閉口を誘導し，蒸散による水分損失を抑制する。環境刺激による孔辺細胞の酸化還元状態の制御は，気孔の開閉運動の調節に関わっている。グルタチオンは，細胞内に豊富に存在するチオール化合物であり，還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) が存在する。細胞内の酸化還元状態の変化に応じて，GSH と GSSG の濃度比 (GSH/GSSG) が変化する。また，シロイヌナズナの孔辺細胞には周囲の表皮細胞と比較して高濃度の GSH が存在する。当研究室の研究より，シロイヌナズナにおける ABA 誘導気孔閉口が，孔辺細胞内の GSH 量の減少を伴い，また，孔辺細胞内 GSH 量の人為的な減少によって促進されることから，GSH は孔辺細胞 ABA 信号伝達において負の制御因子として働くことが示された (Okuma *et al*., 2011)。しかし，ABA が GSH 量を減少させるメカニズム，そして GSH 量の減少が ABA 誘導気孔閉口を強めるメカニズムは不明である。本研究ではこれらのメカニズムを明らかにすることを目的とした。
【方法・結果】シロイヌナズナの野生株と ABA シグナル因子の遺伝子を破壊した変異植物体を用いて，ABA が誘導する気孔閉口および孔辺細胞における ABA が及ぼす GSH 量への影響を調査した。さらに，細胞内 GSH/GSSG 比の測定を可能にする２励起１蛍光のプローブ (GRX1-roGFP2) を発現させた株を用いて，ABA による孔辺細胞内 GSH/GSSG 比への影響を調査した。

Ｇ－７　植物生殖器官発達におけるCOPⅡ小胞輸送因子の機能解析

○柴原　葵[1,2]，Aboulela Mostafa[1]，田中優史[1]，蜂谷卓士[1,2]，中川　強[1,2]
（[1]島根大・総科セ，[2]島根大院・自然科学）

【背景・目的】植物の生殖器官，特に花粉の発達において小胞輸送が重要な役割を果たしていることが明らか機能解析を行うことにした。シロイヌナズナには，7 種類の Sec23 ホモログ（AtSec23A~G）が存在しており，当研究室において AtSec23A 単独破壊株および AtSec23D 単独破壊株で花粉の表層構造であるエキシンの網目パターンが異常になること，また *atsec23ad* 二重破壊株ではエキシンやタペート細胞（葯の最内層に位置し，花粉形成に働く）の発達が大きく阻害されることが見いだされ，AtSec23A および AtSec23D が花粉壁形成に必要な脂質およびタンパク質の ER 排出を調節することによって花粉壁の発達およびエキシンのパターン形成の役割を担っていることが示唆された。本研究では他の Sec23 ホモログである AtSec23F について，単独あるいは二重破壊株を用いて花粉形成への影響を調べることにした。
【方法・結果】AtSec23F の単独破壊では表現型が観察されなかった。次に AtSec23A との二重破壊株 *atsec23af* および AtSec23D との二重破壊株 *atsec23df* を作製して観察した。*atsec23af* 二重破壊株では *atsec23a* に起因するエキシンパターン異常(網目が荒い)に加え，新しい表現型として花粉がつぶれ葯からの放出が低下すること，稔性が低下することが見いだされた。*atsec23df* 二重破壊株では花粉の発達が大きく阻害され，稔性が大きく低下することが見いだされた。

Ｇ－８　植物ホルモン・オーキシンの再活性化酵素に関する研究

○村上寿基，新井一司，川渕　拓，笠原博幸[1]，福井康祐，林謙一郎
（岡山理大・理，[1]東京農工大院・グローバルイノベーション）

【目的】オーキシンであるインドール 3-酢酸（IAA）は胚発生，花芽形成，側根形成，頂芽優勢，光・重力屈性など，植物の分化・成長のあらゆる局面に関与する。オーキシンの組織・細胞濃度の調節には，生合成とともに不活性化による制御が重要であることが示唆されている。IAA の不活性化については，酸化，アミノ酸複合体化，配糖体化，エステル化など複数経路の存在が示唆されている。また一時的な IAA の不活性化（貯蔵体化）と不可逆的な分解では，その生理的意義が全く異なると推測されるが，これまで，IAA 貯蔵体の再活性化については明らかでなかった。我々は，これまでオーキシンの不可逆的な不活性化体であると考えられてきた IAA-アミノ酸複合体（IAA-Asp・IAA-Glu）が一時的な IAA の不活性化による貯蔵体として機能している結果を得た。また，それらの IAA-アミノ酸複合体の植物体内での再活性化に ILR1/ILL 群の酵素遺伝子が関与していることを確認した。
【方法・結果】ILR1/ILL 酵素遺伝子の欠失変異体に対して，IAA-アミノ酸複合体の誘導体を投与したところ，*ilr1 ill2 iar3* 三重変異体は，感受性を示さなかった。その中で ILR1 酵素が IAA-アミノ酸複合体の再活性化の主要な役割を果たしていると考えられた。そこで，ILR1 酵素の大腸菌での発現を試みたが，封入体としての発現は認められたものの可溶性酵素としては得られなかった。最終的に ILR1 酵素をコムギ無細胞発現系で発現させることに成功した。この組換え酵素を用いて，IAA-アミノ酸複合体に対するカイネティクスを決定した。

Ｇ－９　オーキシン代謝酵素 GH3 に対する阻害剤の速度論的解析

○新井一司，赤嶺孝太，福井康祐，笠原博幸[1]，林謙一郎
（岡山理大・理，[1]東京農工大院・グローバルイノベーション）

【目的】植物ホルモンの一種であるオーキシンは，植物の様々な形態形成や環境応答の制御に関与する。オーキシンの濃度調節には，生合成とともに不活性化経路が重要と考えられるが，オーキシン不活性化経路はいまだ明らかとされていない。GH3 遺伝子は IAA-アミノ酸複合体の合成酵素をコードしており，IAA の代謝不活性化に重要であることが示唆されている。GH3 は 20 以上の相同性の高い遺伝子からなり互いに機能を相補するため，欠失変異による遺伝子学的アプローチでは，GH3 の生理的機能の解析は困難であった。我々は GH3 酵素に対して特異的できわめて強力な活性を示す阻害剤を創製した。今回, GH3 阻害剤の作用機序を明らかにするため，数種類の GH3 について各基質（IAA,ATP，Amino acid）に対する阻害剤の阻害様式を検討した。

【方法・結果】大腸菌で発現させたシロイヌナズナの GH3-5, GH3-6, GH3-17 について，酵素反応を行い，反応生成物である IAA-アミノ酸複合体を蛍光 HPLC で定量し，酵素反応の速度論的解析を行った。阻害剤の濃度を 200-800 nM の濃度で加え，それぞれの基質に対する阻害剤存在下での反応速度を測定し，Sigma Plot で解析した。その結果，GH3 阻害剤は，基質である IAA に対して拮抗阻害を示し，ATP に対して不拮抗阻害を示した。

Ｇ－10　新規 HTL/KAI2 アゴニストの創製研究

○福井康祐，浅見忠男[1]，林謙一郎（岡山理大・理，[1]東大院・応生化）

【背景・目的】

HTL/KAI2 加水分解酵素は，煙由来の物質である Karrikin を受容し，種子発芽を誘導する。また，赤色光下や遠赤色光下での胚軸伸長を抑制するなど，光形態形成に関わっていることも報告されてきた。しかしながら，内在性の HTL/KAI2 活性化物質はこれまで明らかとされておらず，HTL/KAI2 の生理的な意義は未解明な部分が多い。従って，さらに研究を進展させていく上で，関連する変異体の取得を目的としたスクリーニングや，分子生物学的に HTL/KAI2 の機能を解析することが不可欠である。そこで，大量に供給可能な合成 HTL/KAI2 アゴニストの開発が有用であると考え，創製を試みた。

【方法・結果】

HTL/KAI2 タンパク質は，植物ホルモン・ストリゴラクトンの受容体である D14 のパラログであり，これまでに合成ストリゴラクトンの一種によって活性化されることが明らかにされている。しかしながら，この化合物を得るためには光学分割やエナンチオ選択的な合成法を必要とするため，入手に困難が伴う。また，Karrikin も少量で非常に高価なため多量に用いることは困難である。我々の研究グループでは，これまでに D14 選択的に作用する化合物の開発を目的とした合成研究を行い，デブラノン類と名付けた一連の化合物群を取得してきた。本研究ではこれまでに得られてきた知見をもとに，HTL/KAI2 選択的に作用する化合物の探索を行い，目的とする HTL/KAI2 選択的合成アゴニストの創製を達成した。

賛　助　企　業

・㈱旭製作所　岡山営業所
・天野エンザイム㈱
・アルファー食品㈱
・池田糖化工業㈱
・㈱猪原商会　山口営業所
・エイチビィアイ㈱
・㈱大熊
・大塚器械㈱　西条支店
・岡山県酒造組合
・オハヨー乳業㈱
・片山化学工業㈱　岡山営業所
・カバヤ食品㈱
・㈱機能性食品開発研究所
・協和発酵バイオ㈱
　　山口事業所生産技術研究所
・キリンビール㈱　岡山工場
・㈱近畿日本ツーリスト中国四国　広島支店
・久保田商事㈱　広島営業所
・寿製菓㈱
・三栄源エフエフアイ㈱
・㈱サン・クロレラ
・㈱四国総合研究所
・四国乳業㈱
・新青山㈱
・神協産業㈱
・㈱酔心山根本店
・正晃㈱　山口営業所
・㈱ソフィ
・㈱大愛
・大興産業㈱
・大山乳業農業協同組合
・大洋香料㈱
・㈲タグチ
・中国ケミー㈱
・鳥取科学器械㈱
・鳥取サイエンス㈱
・㈲友田大洋堂
・日本オリーブ㈱
・白牡丹酒造㈱
・㈱林原
・㈲ビーエムステーション
・備前化成㈱
・ひまわり乳業㈱
・㈱氷温研究所
・広島和光㈱　岡山営業所
・㈱フジワラテクノアート
・㈱扶桑理化
・プロテノバ㈱
・丸善製薬㈱
・マルトモ㈱
・㈱三ツワフロンテック
・宮下酒造㈱
・㈱宮田薬品
・ヤスハラケミカル㈱
・ヤマキ㈱
・㈱やまだ屋
・八幡物産㈱　　（五十音順）

2019年5月8日現在 56社