

シンポジウム

講演要旨

9月21日（金）13:00～16:50

「最近の発酵食品技術研究の展開」

（2号館2階中会議室）

「微生物の環境適応戦略とその応用」

（三浦幸平メモリアルホール）

「遺伝子の発現制御と天然生理活性物質」

（リサーチセンター2階大会議室）

1. S1-1

紫黒米を利用した有色みりん・食酢の開発

伊藤 彰敏（愛知県産業技術研究所食品工業技術センター 発酵技術室）

昨今の健康志向が進む中で、紅芋、黒大豆、黒ごま等、機能性色素を含有する有色農産物に対する健康効果が注目され、栄養価・機能性等に関する研究が各方面で活発に行われている。また、食品製造メーカーにおいても消費者の健康ニーズに対応するため、「食の安全・安心」志向にマッチしている有色農産物を利用した加工食品の製造・開発を積極的に進め、市場を賑わしている。有色米品種のひとつである紫黒米（しこくまい）は他の米品種と比較して、栄養価が高い他に、糠層（表層 10%部位）にアントシアニン色素（シアニジン-3-グルコシド）を含むため、各種の機能性や調理時の発色効果（色調）等が評価され、健康長寿食材として脚光を浴びている。

愛知県農業総合試験場山間農業研究所では、愛知県東北部に位置する中山間地域振興を目的として、付加価値が高く、安定供給のできる地域農産物の育種・開発を行っている。そのような背景のなかで、アントシアニン色素を含有し、栄養価や機能性に優れた新品種紫黒糯米の育種が行われ、既存の紫黒糯米品種「朝紫」と耐冷・高収量性を有する「イ糯413号」による交配品種「中部糯114号」が開発された。「中部糯114号」は、中山間地域のような冷涼・高標高地域での栽培によりアントシアニン色素が高蓄積される品種で、「朝紫」より約1割収量が高いといった特徴を有している。なお、「中部糯114号」は平成19年8月に品種登録申請を行っている。

愛知県産業技術研究所食品工業技術センターでは、新規に開発された愛知県産紫黒糯米品種「中部糯114号」を使用し、地域ブランド、地域食品の創出の観点から、愛知県の伝統醸造食品である「みりん」及び「食酢」の製造・開発に関する検討を行った。

1) 有色みりんの開発

愛知県は伝統的なみりん醸造県であり、出荷数量全国3位、事業所数全国1位（平成17年工業統計表）の地位を占めている。酒類であるみりんは調味料として用いられているが、製法上の違いは認められるものの、メーカー間の製品品質は画一化しており、消費者の選択幅の狭い商品である。そこで、紫黒糯米を原料に利用し、色調や味にインパクトのある有色みりんの製造・開発について検討を行った。

有色みりんの製造には、クエン酸を含有する焼酎麹を利用することで、アントシアニンの赤い色調をより鮮やかにすることができた。また、有色みりんは紫黒糯米の高い栄養価の他、アントシアニンによる抗酸化活性（DPPH ラジカル消失量、SOD 活性）や焼酎麹の高プロテアーゼ活性

に由来するアンギオテンシン変換酵素阻害活性といった機能性を兼ね備えた、健康みりんであることが確認できた。調理効果では、マスキング効果や過酸化物質の抑制効果を示した。また、色調や呈味（甘味と酸味のバランス）の観点から、デザートリキュールや飲用への可能性も示唆された。

2) 有色食酢の開発

食酢は調味料としての利用の他、黒酢や純米酢等の商品では飲用としての用途が拡大している。

食酢製造に紫黒糯米を利用することにより、低 pH 域で安定なアントシアニンの構造が保持され、鮮やかな赤色を呈することから、ファッション性と機能性を兼ね備えた健康酢の開発が期待できる。そこで、有色食酢の製造・開発にあたり、麹菌株の選択、アルコール発酵・酢酸発酵条件及び有色食酢の機能性に関する検討を行った。有色食酢は、鮮やかな赤い色調を示すとともに、アントシアニンによる抗酸化活性（DPPH ラジカル消失量、SOD 活性）及びアポトーシス誘導能といった機能性を示した。また、アルコール発酵期に焼酎麹を用いることにより（掛米に紫黒糯米を使用、麹米はうるち米）、上記の機能性の他、アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を示す機能性食酢が得られ、4種類の ACE 阻害ペプチドが確認された。

略歴

平成 6 年 3 月 宇都宮大学農学部農芸化学科卒業

平成 8 年 4 月 愛知県食品工業技術センター発酵技術部に配属

平成 19 年 4 月 愛知県産業技術研究所食品工業技術センター発酵技術室主任（現在に至る）

醤油醸造における小麦アレルギー分解の究明

古林 万木夫（ヒガシマル醤油株式会社・研究所）

醤油の主原料の一つである小麦は、省令で定める特定原材料 5 品目の一つとして表示が義務づけられている。小麦アレルギーは乳幼児に多く発症し、成人になっても重篤なアレルギー症状を引き起こす場合があることから、特に問題視されている食物アレルギーの一つである。実際の医師による臨床現場では、小麦アレルギー患者には小麦を原料に含む通常の醤油を使用しないように指導しているのが現状で、小麦アレルギー患者（の家族）は特殊な醤油（米醤油など）を使用せざるを得ない状況にある。

これまで醤油中の小麦アレルギーについて全く研究が行われていなかった。そこで我々は、重症小麦アレルギー患者（小麦 RAST 値として 5~6）の血清（小麦抗体）を用いて、3 種類の免疫学的検査手法を組み合わせた小麦アレルギーの測定系を確立し、醤油醸造中に小麦アレルギーが消失することを明らかにした^{1,2)}。小麦アレルギーの分解機構として、製麺中に塩不溶性タンパク質が塩可溶性タンパク質となり、その後の諸味中で塩可溶性タンパク質が完全に分解を受けて、生揚や火入れ醤油では小麦アレルギーが完全に消失していることが示唆された^{1,3)}。さらに、市販キットを用いても醤油中の小麦アレルギーの定量が十分可能であること、および醤油醸造では小麦アレルギーが消失することを確認することができた⁴⁾。

もう一つの主原料である大豆は、通知で定める特定原材料に準ずる 20 品目の一つとして表示が推奨されている。これまでに大豆については、マウスのモノクローナル抗体を用いて市販醤油から主要な大豆アレルギー（Gly m Bd 30K）が検出されないことが報告されているものの、醤油醸造中において大豆アレルギーがどのように分解を受けているかは不明であった。そこで我々は、大豆の特異的抗体を用いて醤油醸造中に大豆アレルギー（大豆タンパク質）が分解されることや、特に、火入れ、オリ下げ、ろ過の各工程が、火入れ醤油から大豆アレルギーの完全除去に重要であることを明らかにした⁵⁾。大豆の場合、小麦に比べて諸味中での分解を受けにくいものの、生揚に残存する微量の大豆アレルギーは、火入れ、オリ下げ、ろ過により完全に除去されることが示唆された。

原料（小麦、大豆）由来アレルギーの分解・除去の観点から醤油醸造をみると、麴や諸味中での酵素や微生物による分解が最も重要であろう。しかしながら、圧搾で生揚から塩不溶性タンパク質（醤油粕や生揚オリ）を分離すること、火入れで生揚に残存する塩可溶性タンパク質を熱変性させて火入れオリを発生させること、ならびにオリ下げやろ過で火入れオリを完全に除去する

ことなど、物理化学的な要因もまた重要であるといえる。

本研究により、「醤油中には小麦アレルゲンや大豆アレルゲンが残存しない」ことが解明され、アレルギー患者の方々、その家族、担当医師にとって有益な情報の一つになることが期待される。しかしながら、本研究は *in vitro* での試験であり、今後、臨床試験により安全性をさらに確認する必要がある。

[参考文献]

- 1) M. Kobayashi, Y. Hashimoto, S. Taniuchi and S. Tanabe : *Int. J. Mol. Med.*, **13**, 821 (2004)
- 2) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 : 醤研, **30**, 213 (2004)
- 3) 古林万木夫, 谷内昇一郎, 田辺創一 : 醸協, **100**, 96 (2005)
- 4) 吉田多恵子, 橋本裕一郎, 古林万木夫, 高畑能久, 森松文毅, 谷内昇一郎 : 醤研, **30**, 219 (2004)
- 5) 橋本裕一郎, 古林万木夫, 宮澤いづみ, 高畑能久, 田辺創一, 谷内昇一郎 : 醤研, **31**, 217 (2005)

略歴 :

1988年 広島大学工学部第三類 (化学系) 発酵工学課程 卒業
1990年 広島大学大学院工学研究科博士課程前期工業化学専攻 修了
1990年 ヒガシマル醤油株式会社 入社
1990年 広島大学大学院工学研究科博士課程後期工業化学専攻 入学 (出向)
1993年 同上修了 工学博士
1993年 ヒガシマル醤油株式会社研究所 研究員
1997年 同 主任研究員
2003年 同 上席研究員
2005年 兵庫県立大学環境人間学部客員助教授
2007年 兵庫県立大学環境人間学部客員准教授
現在に至る

穀類中の農薬及びカビ毒の分析法

渡井 正俊（財団法人日本食品分析センター）

穀類はそのまま加工・調理をされて消費されるだけでなく、発酵原料としても様々な製品に広く利用されている。近年、食の安心・安全が叫ばれ、食品製造業者にとって製品の安全性を担保することは非常に重要なこととなっている。穀類の安全性を管理する上で極めて重要な指標としてカビ毒の汚染や残留農薬の問題が挙げられる。

本シンポジウムでは、高感度分析という観点から、代表的なカビ毒であるアフラトキシンの分析法とポジティブリスト制が施行され注目されている農薬の一斉分析法について、前者は様々な測定方法を後者は一斉分析を実施する際に発生する様々な問題点を中心に御紹介したい。

食品衛生法ではアフラトキシンを含有している食品の流通は禁止されており、そのための分析法が示されている。昭和 46 年にピーナッツバター等の汚染により法規制が始まったが、その分析法は平成 14 年に高速液体クロマトグラフ法が採用されるまで、薄層クロマトグラフ法(TLC)が採用されていた。多検体を決められた濃度まで分析をする上では TLC にも利点があるが、感度、再現性、特異性、多種類の食品への適用性等を考えるとこの変更は当然のことと言えよう。さらに、昨年には輸入に当って大量検体を短時間で検査するという目的で、トウモロコシの ELISA 法によるスクリーニング法が示された。平成 14 年に示された食監発第 0326001 号における基本的な測定方法は、抽出後に TFA により誘導化し、高速液体クロマトグラフィーを行うものである。さらに別の検出手段として、高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LC/MS)を用いた方法や紫外線照射によるポストカラム誘導化法が示されている。また、最近では高感度分析のために検出器としてタンデム型質量分析計(LC/MS/MS)も利用され始めている。他のカビ毒についても、分析の流れとしては概ね同様であり、前処理では多機能カラムあるいはイムノアフィニティーカラムの利用、測定装置としては HPLC から LC/MS/MS の利用という傾向にある。

一方、農薬については、ポジティブリスト制の導入により一律基準すなわち 0.01ppm までの分析が要求されるのと同時に、多くの農薬を 1 回の分析でカバーできるような分析法の必要性が発生した。その結果、公定法として今までの構造的類似性を有する農薬を同時に分析する系統分析とは考え方の異なるひとつの分析法で多くの農薬を評価してその分析法の中に組み入れるいわゆる一斉分析法が通知された。一般に穀類の農薬分析は野菜・果実類の分析と比較して、脂質の含量が高いことから難しいことが多い。通知法では穀類の分析には、C₁₈ カートリッジカラムを追加することで対応している。また、測定装置として、ガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS、

GC/MS/MS)及びLC/MS(LC/MS/MS)が用いられている。これらの装置は多成分を同時に分析するためには必要不可欠なものであるが、①保持時間のずれ、②マトリックス効果、③イオン化阻害などに留意をして分析を行う必要がある。もちろん、一斉分析法だけですべての残留農薬を検査することは不可能で、抽出方法の変更、誘導体化などの手法を駆使した系統分析や個別分析の併用も必要である。

最近の測定装置や精製カラム等分析技術に関しての進歩は著しいものがあり、高感度分析も以前に比べると遥かに容易なものとなってきた。しかしながら、何の分析でも目的があり、その目的を十分に満足させる手法を選択することが分析をする上で極めて重要なことである。

略歴：

昭和 51 年 3 月	北海道大学農学部農芸化学科卒業
昭和 51 年 4 月	財団法人日本食品分析センター入所
昭和 63 年 10 月	財団法人日本食品分析センター 多摩研究所勤務
平成 14 年 4 月	応用科学事業部長
平成 19 年 4 月	研究開発事業部長兼務

清酒酵母は他の酵母とどこが違うのか？

下飯 仁（独立行政法人酒類総合研究所醸造技術基盤研究部門）
（広島大学大学院先端物質科学研究科客員教授）

清酒（日本酒）は、米のデンプンを麹菌の酵素で糖化し、生じたブドウ糖を清酒酵母で発酵して製造する。清酒酵母は酒類の主成分であるエタノールをつくるばかりでなく様々な香味成分もつくるので、酵母の選択は清酒醸造にとってはきわめて重要である。清酒酵母は分類学的には *Saccharomyces cerevisiae* に属しているが、同じ種に属している実験室酵母や他の醸造用酵母とは異なる性質を数多く持っている。このため、清酒酵母は *S. cerevisiae* の中で独立した1つのグループを形成していると考えられる。我々は、清酒酵母の特性を遺伝子レベルで解明し、その結果を清酒酵母の育種に役立てることを目的として研究を行っている。

清酒酵母の特性をゲノムレベルで解明するために、独立行政法人酒類総合研究所を中心とする産官学 26 グループで構成される清酒酵母ゲノム解析コンソーシアムと独立行政法人製品評価技術基盤機構との共同研究により清酒酵母きょうかい7号のドラフトレベルでのゲノム解析が行われた。その結果、きょうかい7号のゲノムと実験室酵母 S288C のゲノムとの一致度は塩基配列レベルで 96.2% であり、両者は非常によく似ていることがわかった。しかし、逆に言えば、残りの数%の違いの中に清酒酵母の特徴が潜んでいると考えられる。

生物の遺伝的特性は質的形質と量的形質に分けることができるが、清酒酵母に特徴的な質的形質としては、高泡形成やビオチン合成能を挙げることができる。我々は今までに、これらの形質がそれぞれ *AWA1* や *BIO6* という清酒酵母特異的な遺伝子によって支配されていることを明らかにしてきた。今回のゲノム解析の結果から、他にも清酒酵母に存在し他の酵母に存在しない遺伝子や、逆に、実験室酵母 S288C のゲノムには存在するが、清酒酵母のゲノムには存在しない遺伝子が見出されている。現在これらの遺伝子の機能について検討中である。

一方、量的形質は、エタノール発酵性や香味成分の生成量などのように連続した数値で示される形質であり、複数の遺伝子の支配を受けていることが特徴である。量的形質には産業上有用な形質が多いので、これらの原因遺伝子を解明して行くことが、今後の清酒酵母育種には重要であると思われる。たとえば、清酒酵母で清酒を醸造すると 20% 以上にも達するエタノールが生産されるが、実験室酵母を用いた場合、清酒酵母より低い濃度のエタノールしか生産されない。我々は、清酒酵母及び実験室酵母を用いて清酒を製造した場合のもろみ中の酵母の遺伝子発現プロファイルを解析し、両酵母で発現に差異のある遺伝子を抽出した。また、清酒酵母の一倍体を分離

し、実験室酵母の一倍体と掛け合わせた後、孢子分離を行い、多数の一倍体を得た。現在、得られた一倍体の醸造特性と遺伝子型の関係を解析している。これらの解析によって清酒酵母の醸造特性を明らかにすることを目指している。

略歴：

1979年 東京大学大学院農学系研究科農芸化学科修士課程修了

1979年 国税庁醸造試験所

1980年 仙台国税局鑑定官室

1985年 国税庁醸造試験所

1992年 農学博士（東京大学）

1995年 国税庁醸造研究所

2001年 独立行政法人酒類総合研究所

S2-1

食品変敗や食中毒を誘発するグラム陽性菌休眠胞子の 外環境に応答した発芽機構の解明

森山 龍一(中部大学応用生物学部食品栄養科学科)

Bacillus 属や *Clostridium* 属の細菌は乾燥や栄養源の枯渇などの外部環境の悪化に伴い栄養細胞とは機能的・形態的に全く異なる耐久性細胞である胞子を形成し、休眠状態でサバイバルを試みる。米国ユタ州ソルトレイク市の大塩湖周辺から採取された二畳紀(2億5千年〜4億年前)由来の岩塩内で休眠状態を保持していた *Bacillus* 属胞子の発見が報告されており(Vreeland *et al.* (2000) *Nature*, **407**, 897-900)、休眠胞子は我々ヒトの日常生活を取りまく環境に存在する生命体の中で最も耐久性(耐熱・耐薬剤性)に優れた細胞形態の一つと考えられる。このようなサバイバル能力に長けた細菌胞子が食品や医薬品に混入した場合には通常加熱滅菌では容易に殺傷することができず、製造加工終了後やヒト体内での環境好転により栄養細胞に分化(これを発芽という)して食品の変敗や食中毒・感染症などの深刻な社会問題を引き起こす。細菌胞子の発芽を人為的にコントロールして「食と健康」環境の向上をもたらすためには、現象論的解析に基づく「対処療法」に終わることなく、発芽過程の分子論的理解に基づく「根治療法」を目指すことが重要であると思われる。

細菌胞子の優れた耐久性は細胞内(コア)における極度の脱水状態や最外殻から順にタンパク質コート層、リン脂質外膜、胞子固有の構造を持つ分厚いペプチドグリカン(コルテックス)層と幾重にも細胞表層が覆われていること(いわゆる複合装甲)に因ると考えられている。したがって、胞子の発芽は「外界からの刺激に呼応した細胞表層の自己分解とそれに伴う細胞内への吸水過程」と捉えられると考えられてきた。本講演では、胞子発芽時における細胞表層、特に耐熱性と深く関わっていると考えられてきたコルテックスの分解に関わる酵素群の分子論的解析、および胞子外膜形成と発芽時における外界からの刺激応答に関にかんして我々の研究成果を中心に概観したい。

1. 細菌胞子発芽におけるコルテックス層の分解機構

コルテックス分解酵素の存在は古くから指摘されており、Gouldら、Andoら、およびLabbeらによる先駆的な酵素の分画の試みから、発芽にはコルテックス分解酵素の活性化を必要とすること、また基質特異性の異なる複数の酵素が関与することなどが示唆された。また、発芽時に遊離するコルテックス分解物の解析から、複数のコルテックス分解酵素によりコルテックスが逐次的に分解されることが *B. megaterium* 胞子において報告されていた。しかしながら、我々が胞子発芽の研究に取り組み始めた十数年前の時点において、酵素そのものの実体についてはほとんど不明のままであった。我々は

Ando らの結果を踏襲して食中毒の誘因菌である嫌気性のウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) を、また好気性菌としてやはり食中毒の誘因菌であるセレウス菌 (*Bacillus cereus*) を実験対象として、他に先駆けて下表に示す孢子形態を保持したコルテックスに高い特異性を示す酵素 spore cortex-lytic enzyme (SCLE) と、フラグメント化したコルテックスを特異的に加水分解する酵素 cortical fragment-lytic enzyme (CFLE) をそれぞれ複数単離・同定することに成功した。また、それらの酵素的性質、孢子形成時における時期および部位特異的発現ならびに細胞内局在化機構について明らかにするとともに、不活性型酵素 SleC 前駆体の活性化に関わるプロセッシング酵素 GSP の同定にも成功した。

表 細菌孢子の発芽に主要な役割を果たすコルテックス分解酵素の性質

	セレウス菌		ウェルシュ菌	
	SCLE	CFLE	SCLE	CFLE
遺伝子	<i>sleB</i>	<i>sleL</i>	<i>sleC</i>	<i>sleM</i>
生合成	孢子形成第 II-III 期にフォアスポアにおいて分泌シグナル配列を持つ 28-kDa タンパク質として合成される	孢子形成時に母細胞側において 48-kDa タンパク質として合成される	孢子形成時に 4 つのドメインからなる 50-kDa 前駆体タンパク質として合成される	孢子形成時に 38-kDa タンパク質として合成される
休眠孢子における存在様態	24-kDa 成熟型タンパク質 不活性型	48-kDa 成熟型タンパク質 活性型	35-kDa 前駆体タンパク質 不活性型	38-kDa 成熟型タンパク質 活性型
局在性	コルテックス外縁	コルテックス外縁	コルテックス外縁	コルテックス外縁
基質	コート除去孢子	コルテックス断片	コート除去孢子	コルテックス断片
ラクタム環の必要性	あり	あり	あり	あり
酵素活性	amidase(?) 又は <i>lytic transglycosidase</i> (?)	glucosaminidase	Amidase と <i>lytic transglycosidase</i> の両活性を持つ	muramidase
相同性酵素の存在	枯草菌、炭疽菌などの好気性バシラス属細菌		ボツリヌス菌、破傷風菌、アセトン-ブタノール菌などの嫌気性クロストリジウム細菌	

また、休眠孢子のコルテックス外縁部に局在する酵素の孢子内での耐熱性の機構は不明であるものの、発芽時に遊離する活性型コルテックス分解酵素自体は熱感受性である。その結果は、従来の定説とは異なって孢子の熱抵抗性にはコアの脱水状態と関係しないことを強く示唆している。また、孢子構造や発芽時の生化学的事象が *Bacillus* 属、*Clostridium* 属に関わらず普遍的であるために同じく普遍的であると考えられてきた孢子発芽機構についても、少なくとも好気性 *Bacillus* 属と嫌気性 *Clostridium* 属では明らかに異なることが我々の提出した分子論的解析結果は示唆している。

(本節については、引用文献多数のためそれらをあえて本文中には記載しなかった。必要に応じて Makino and Moriyama (2002) Hydrolysis of cortex peptidoglycan during bacterial spore germination. *Med. Sci. Monit.* 8, RA119-127, Masayama et al. (2006) *Genes Genet. Syst.* 81, 163-169, Masayama

et al. (2006) *Genes Genet. Syst.* **81**, 227-234, Kumazawa *et al.* (2007) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 884-892 等を参照されたい。)

2. 胞子外膜のリン脂質に作用するリパーゼ

近年、Kawai らによって *Bacillus subtilis* Marburg 株胞子膜脂質中にカルジオリピンが多量に含まれること、及びカルジオリピン合成酵素欠損株胞子が発芽しないことが示され (Kawai *et al.* (2006) *Genes Genet. Syst.* **81**:69-76)、胞子膜脂質代謝と発芽との間の重要な関連性が示唆された。そこで本研究では、枯草菌 168 株胞子中に見出された新規リパーゼホモログ YcsK (Kuwana *et al.* (2002) *Microbiol.* **148**:3971-3982) について、その性質及び生理的機能について解析した。

ノーザンブロットと GFP 融合タンパク質を用いた解析により、*ycsK* 遺伝子が σ^K 及び GerE に依存して胞子特異的に発現すること、及び YcsK がコート層へ局在することが示唆された。また、同遺伝子欠損により胞子の L-アラニンに応答した発芽能が消失した。さらに、大腸菌に発現させた組換え体を用いた Zymography の結果、YcsK がリパーゼ活性を有することが示唆され、我々は本酵素を LipC と命名することを提唱した (Masayama *et al.* (2007) *J. Bacteriol.* **189**:2369-2375)。LipC が休眠胞子中において外膜近傍に局在することから、膜内リン脂質分解への関与が予測された。そこで、同酵素のホスホリパーゼ活性を検討した結果、多様なリン脂質 (phosphatidic acid, phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine) に対する分解活性を示し、LipC は極性基に対しては広範な特異性を有するホスホリパーゼであることが示唆された。また、休眠胞子中の遊離脂肪酸量を定量した結果、野生株胞子と *lipC* 欠損株胞子に有意な差が見られ、LipC による胞子外膜の脂質代謝と L-アラニンによる発芽開始機構が密接に関連している可能性が示唆された。さらに我々は、*Bacillus cereus* LipC ホモログがリパーゼ活性を有することも見出した。これらの結果から、*Bacillus* 属細菌 (*Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus licheniformis* 等) ゲノムに広く保存されている本酵素の胞子発芽機構への関与が、少なくとも *Bacillus* 属細菌に普遍的な現象であると考えられる。

略 歴:

昭和 56 年	名古屋大学農学部農芸化学科卒業
昭和 58 年	名古屋大学大学院農学研究科 博士前期課程修了
昭和 61 年	名古屋大学大学院農学研究科 博士後期課程単位取得退学
昭和 61 年	名古屋大学農学部 助手
平成 7 年	名古屋大学農学部 助教授
平成 11 年	名古屋大学大学院生命農学研究科 助教授
平成 17 年	中部大学応用生物学部 教授 (現在に至る)

この間

昭和 62 年	博士号(農学)取得(名古屋大学)
平成 2~4 年	米国 Purdue 大学へ留学
平成 10 年	農芸化学奨励賞受賞(日本農芸化学会)

S2-2

放線菌の形態・生理的分化における遺伝子発現制御機構の解明

大西 康夫（東京大学大学院農学生命科学研究科）

はじめに

微生物が自ら生産する拡散性の低分子化合物をシグナル物質として利用している例としては、アシルホモセリンラクトンによるクォーラムセンシングが有名である。これは単細胞微生物が環境中の細胞密度に依存して遺伝子発現を制御する機構であるといえる。近年、バイオフィーム中での異種細胞間のコミュニケーションにも、クォーラムセンシングが関与していることが示唆され、本シンポジウムのタイトルである「微生物の環境適応戦略」という面からも注目を集めている。

本講演において紹介する *Streptomyces* 属放線菌は、菌糸状に生育するという点で通常のバクテリアとは大きく異なっている。放線菌は栄養増殖菌糸（基底菌糸）から空中に向かって菌糸を伸ばし、この菌糸（気中菌糸）が分化して数珠状の胞子を着生するという複雑な形態分化を示す。一方、放線菌は抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝産物を生産することから、発酵工業や医薬産業において重要な菌群である。二次代謝産物生産は、しばしば形態分化と同調しており、二次代謝は形態分化の化学的表現、生理的分化であるといわれる。

演者の所属研究室では、長年、放線菌の二次代謝と形態分化における遺伝子発現制御機構について研究を行ってきた。ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* においては、自身が生産する低分子調節物質（微生物ホルモン）A-ファクターにより、二次代謝と形態分化が同時に誘導される。放線菌は菌糸状に生育することから、A-ファクターによる制御の重要性は、「環境中の細胞密度を感知する」というクォーラムセンシングとは異なり、「同一の菌糸内（あるいは近接した菌糸間）での遺伝子発現を同調する」ことにあると考えられる。本講演においては、A-ファクターによる遺伝子発現制御機構に関する最近の研究成果を発表するとともに、放線菌の環境中での生存戦略について考えてみたい。

（1）A-ファクター生合成酵素 AfsA の機能解析¹⁾

演者の所属研究室では20年以上前にA-ファクター生産に必要な遺伝子として *afsA* を同定し、AfsA がA-ファクター生合成酵素であると提唱してきたが、最近、試験管内反応によって、これを証明することができた。N末端にHisタグを付加した精製AfsAは、 β -ケト酸誘導体（8-methyl-3-oxononanoyl-NAC）からジヒドロキシアセトンリン酸（DHAP）にアシル

基を転移する反応を触媒した。生成する β -ケトアシル-DHAP エステルは *afsA* 破壊株の細胞抽出液によって A-ファクターに変換されたため、生体内でも AfsA が本エステルを合成すること、および本エステルが A-ファクターの前駆体であることが示された。さらに、本エステルから A-ファクターへの変換には 2 通りの経路があることや、そのうちの 1 つの経路に参与する還元酵素が *afsA* のすぐ下流にコードされていることを示した。これらの結果より、A-ファクター生合成経路の全体像が明らかになった。

(2) DNA マイクロアレイを用いた A-ファクター制御カスケードに関する解析

我々はこれまでに図 1 に示した A-ファクター制御カスケードを明らかにしてきたが、A-ファクターによってスイッチが入る遺伝子は、実際にはもっと多いということは容易に想像できる。昨年、我々は北里大、感染研との共同研究により、*S. griseus* の全ゲノム配列 (8,545,929 bp) を決定し、7,138 個の open reading frame (ORF) を同定した。その後、全 ORF に対応するオリゴヌクレオチドマイクロアレイを作製し、この DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行っている。*afsA* 破壊株は A-ファクターを生合成できないために二次代謝および形態分化が行えない株であり、この株に化学合成した A-ファクターを外部から添加すると二次代謝および形態分化が引き起こされる。この系を利用し、A-ファクターによって引き起こされる遺伝子発現変化を経時的に追跡した。一方、A-ファクター制御カスケードにおいて中心的な役割を果たす転写活性化因子 AdpA をコードする遺伝子を破壊した株と野生株の転写の違いについても解析した。この系では、液体培養と固体培養の両方を用いることによって、気中菌糸形成に重要であると考えられる遺伝子群を同定することもできているが、これらの解析結果を発表する。

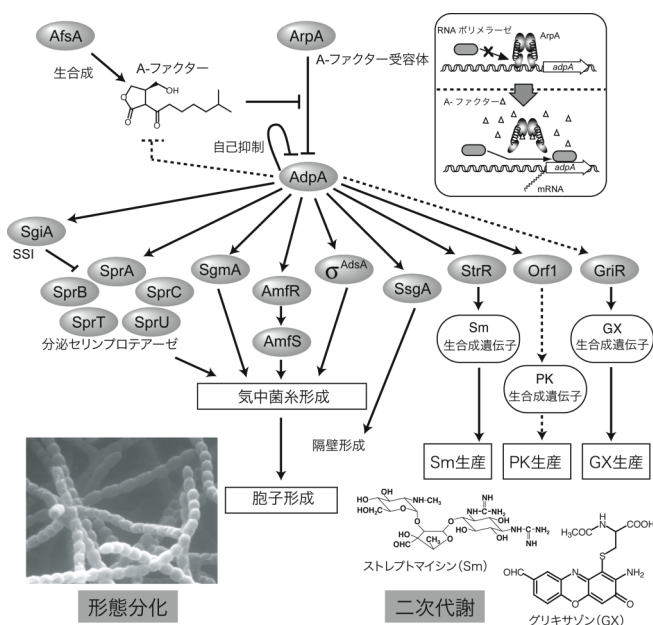


図 1. A-ファクター制御カスケード

A-ファクター受容体 (ArpA) は転写抑制因子であり、A-ファクター非存在下においては、*adpA* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、その転写を抑制している。ArpA は A-ファクターと結合することによって、DNA から解離し AdpA が生産される。AdpA はグローバルな転写活性化因子であり、二次代謝・形態分化に必要な様々な遺伝子の転写を活性化する。

(3) ガンマブチロラクトン生合成酵素とガンマブチロラクトン受容体の進化的考察²⁾

放線菌において、A-ファクターと類似したガンマブチロラクトン化合物による遺伝子発現制御は広く存在している。A-ファクター生合成酵素遺伝子 *afsA* や A-ファクター受容体遺伝子 *arpA* のホモログは様々な放線菌において見出されており、そのうちいくつかは機能解析も行われている。これら放線菌に見られる *AfsA* ホモログ、*ArpA* ホモログを系統解析した結果、以下のことが明らかになった。

(1) *ArpA* ホモログの分布は *AfsA* ホモログの分布より広範であり多様であることから、*ArpA* ホモログのすべてがガンマブチロラクトン受容体であるというわけではないと考えられる。すなわち、*AfsA* が存在・機能する以前に *ArpA* は存在しており、転写調節因子として機能してきたと考えられる。

(2) *ArpA* ホモログのガンマブチロラクトン結合領域は DNA 結合領域よりも進化速度が速いことから、*ArpA* ホモログの中に *AfsA* ホモログが作るガンマブチロラクトンと結合できるものが出現し両者の関係が成立したと考えられる。

(3) *AfsA/ArpA* ホモログのセットは、たとえ両者の遺伝子が隣りあって存在していたとしても、単純に並行進化したのではないことが示された。これはクォーラムセンシングにおけるアシルホモセリンラクトン合成酵素とアシルホモセリンラクトン受容体が並行進化してきたことと対照的である。

(4) 放線菌の抗生物質生産とガンマブチロラクトン

放線菌においては、通常、抗生物質の生産と同時に自己耐性遺伝子の発現が誘導される。菌糸のある部分でだけ抗生物質生産が開始されると、自己耐性遺伝子の発現が誘導されていない他の菌糸は自らの生産した抗生物質により殺されてしまうため、同一の菌糸内（あるいは近接した菌糸間）で、一斉に抗生物質の生産が始まらなければならない。この同一の菌糸内（あるいは近接した菌糸間）での遺伝子発現の同調には、ガンマブチロラクトン制御が大変有効であるため、放線菌はこの制御系を二次代謝のスイッチとして積極的に取り入れてきたと考えられる。（拡散性の低分子化合物は複雑な菌糸ネットワーク全体に素早く行き渡ることができるため。）また、このスイッチは広範な種間のコミュニケーションにも利用されるクォーラムセンシングとは異なり、それぞれの種に特異的である方が好都合である。そのため、*AfsA/ArpA* ホモログのセットの特異化が進んだのかもしれない。

- 1) Kato J, Funa N, Watanabe H, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2007) Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**:2378-2383
- 2) Nishida H, Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S. (2007) Evolution of gamma-butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces*. *Environ. Microbiol.* **9**:1986-1994

略歴：

1991年3月 東京大学農学部農芸化学科 卒業
1993年3月 東京大学大学院農学系研究科応用生命工学専攻 修士課程修了
1996年3月 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 博士課程修了
1996年4月 東京大学大学院農学生命科学研究科 日本学術振興会特別研究員 (PD)
1997年8月 同上 助手
2002年8月 同上 助教授
2007年4月 同上 准教授 (名称変更)

異常タンパク質生成を伴うストレスに対する酵母の適応機構の解析とその応用

高木 博史（奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科）

生物は自然界から受ける温度、水分、浸透圧、栄養飢餓、化学物質など様々な環境ストレスに応答し、ある程度適応する能力を備えている。食品産業において重要な微生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* も、種々の発酵生産環境において、高濃度エタノール、高浸透圧、冷凍、低温、乾燥、酸化、pH などのストレスを複合的に受けている。過酷なストレス下では、細胞内の多くのタンパク質は変性し、正常な構造や機能が損なわれた「異常タンパク質」として蓄積するため、酵母は致命的ダメージを受け、その有用機能（エタノール生産、炭酸ガス発生、味・風味物質生成など）が制限されてしまう。

我々は酵母の新しい「ストレス適応機構」を解析し、得られた基礎的知見を実用酵母の育種に応用することをめざしている。今回は、異常タンパク質の生成回避および検知処理に着目したストレス適応機構（プロリン、抗酸化酵素 Mpr1、ユビキチンシステム）を紹介し、実用酵母の育種への可能性についても触れる。

1. プロリン¹⁾⁻⁹⁾

我々は Pro が冷凍、乾燥、酸化、エタノールなどのストレスから酵母を保護することを見出した。Pro の細胞保護効果は、浸透圧の調節、氷結晶生成や脱水の抑制、タンパク質や細胞膜の安定化、ヒドロキシラジカルの消去などによると考えられている。細胞内に Pro を蓄積する変異株の解析から、Pro 合成系の鍵酵素 γ -グルタミルキナーゼ (GK) に Asp154Asn, Ile150Thr などのアミノ酸置換を導入すると、Pro によるフィードバック阻害感受性が低下し、Pro を過剰合成することが判明した。これらの変異型 GK を酵母で発現させると、Pro 含量の増加と冷凍ストレス耐性の向上が見られ、その有用性が実証できた。一方、多くの細菌や植物はストレスに応答し Pro を蓄積することが知られている。そこで、ストレス下の酵母において Pro などの細胞保護物質含量と遺伝子発現パターンを解析したところ、興味深いことに酵母は細菌や植物と異なり、ストレス時にトレハロースやグリセロールを優先的に蓄積していた。

次に、Pro を蓄積する清酒酵母を作製し、Pro が醸造特性に及ぼす影響について解析した。清酒酵母の GK 遺伝子を変異型に置換し、Pro 分解系酵素遺伝子を破壊したところ、予想通り Pro を蓄積し、エタノールストレス耐性も向上した。Pro 蓄積株を用いた小仕込み試験では、全体的な醸造

特性に変化はなかったが、清酒中の Pro 含量が著しく増加していた。現在、通常の食品微生物と同等に取扱えるセルフクローニング技術により Pro を蓄積する清酒酵母の二倍体を作製し、有用性について検討を重ねている。

2. 抗酸化酵素 Mpr1¹⁰⁾⁻¹⁶⁾

S. cerevisiae の S1278b 株の染色体に見出した *MPR1* 遺伝子は、Pro アナログのアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) を解毒する新規の *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 をコードしている。最近、Mpr1 は構成的に発現しており、熱ショック、冷凍・解凍などの処理で生じる細胞内の活性酸素種 (ROS) レベルを下げ、酵母を酸化ストレスから保護していることが判明した。興味深いことに、Mpr1 は従来の抗酸化酵素のように ROS に直接作用するのではなく、ROS 発生に関与する未同定の化合物を基質としてアセチル化し、その結果、何らかの経路や機構により ROS 生成を抑えていると考えられる。また、Mpr1 は過酸化水素を解毒する酵素 (カタラーゼ、グルタチオンパーオキシダーゼ) の機能を補っていることも示唆され、既存の抗酸化システムのバックアップとして機能している可能性がある。

さらに、エタノールの毒性は ROS 生成と関連しているとの報告に基づき、エタノールストレスにおける Mpr1 の機能を解析した。その結果、Mpr1 遺伝子を破壊すると野生株よりもエタノール存在下での ROS レベルが増加し、生存率も低下した。一方、Mpr1 を発現する酵母では ROS レベルの低下と生存率の向上が見られ、Mpr1 はエタノールストレスから酵母を保護することが示された。現在、Mpr1 を保持しない清酒酵母に導入し、エタノールストレスや醸造特性に及ぼす影響を解析している。

3. ユビキチンシステム¹⁷⁾⁻¹⁹⁾

異常タンパク質生成を伴う AZC ストレスに対し、超感受性を示す変異株を分離した。この株では、酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼの一つで、生育に必須である Rsp5 の遺伝子に変異 (標的タンパク質の認識に関与する WW3 ドメイン内の Ala401Glu 置換) があり、パーミアアーゼ Gap1 がユビキチン化されずに細胞膜上で安定に活性を維持するため、過剰の AZC が細胞内に流入し、超感受性になることが判明した。また、この変異株は細胞内タンパク質のミスフォールディングを誘導し、異常タンパク質を生成するストレス (高温、エタノール、過酸化水素、ソルビトール、塩化リチウム、アミノ酸アナログなど) に対しても超感受性を示した。これらの結果から、Rsp5 の新しい機能として、ストレスで生じる異常タンパク質の処理機構 (修復、分解) への関与が示唆された。

次に、Rsp5 が異常タンパク質の修復機構、具体的には分子シャペロンとして異常タンパク質修復に関わるストレスタンパク質に及ぼす影響を調べた。野生株と Rsp5 変異株を各ストレス培地で培養すると、Rsp5 変異株ではストレスタンパク質遺伝子 (*HSP12*, *HSP42*, *DDR2*) の転写量が低下していた。また、これらを Rsp5 変異株で強制的に過剰発現させると、様々なストレス感受性を相補した。次に、これら遺伝子の転写調節因子 (Hsf1, Msn2/4) の発現についても野生株と Rsp5 変

異株で解析した。その結果、各遺伝子の転写量に有意な差は見られなかったが、Rsp5 変異株では各転写調節因子の存在量が野生株に比べて著しく減少していた。以上の結果から、Rsp5 が転写調節因子の発現制御（mRNA の核外輸送など）を介してストレスタンパク質の発現を調節し、異常タンパク質の修復に関与することが示された。

以上のように、Pro の蓄積、Mpr1 の発現、ユビキチンシステムの強化などにより、実用酵母の機能特性の向上や発酵生産性の改善が期待できる。また、エタノール生産能を強化した酵母によるバイオエタノール生産への応用も考えられる（本研究は新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業の一環である）。

<主な文献>

¹⁾*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **47**, 405, 1997. ²⁾*FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 103, 2000. ³⁾*J. Biosci. Bioeng.*, **94**, 390, 2002. ⁴⁾*Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 212, 2003. ⁵⁾*Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6527, 2003. ⁶⁾*J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 538, 2005. ⁷⁾*Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8656, 2005. ⁸⁾*J. Biosci. Bioeng.*, **103**, 377, 2007. ⁹⁾*Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4011, 2007. ¹⁰⁾*J. Bacteriol.*, **182**, 4249, 2000. ¹¹⁾*J. Biol. Chem.*, **276**, 41998, 2001. ¹²⁾*Yeast*, **19**, 1437, 2002. ¹³⁾*J. Biochem.*, **133**, 67, 2003. ¹⁴⁾*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 12616, 2004. ¹⁵⁾*J. Biochem.*, **138**, 391, 2005. ¹⁶⁾*Appl. Microbiol. Biotech.*, **75**, 1343, 2007. ¹⁷⁾*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11505, 2003. ¹⁸⁾*FEBS Lett.*, **580**, 3433, 2006. ¹⁹⁾*Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2762, 2006.

略歴：

1980年3月 静岡大学 農学部 農芸化学科 卒業
1982年3月 名古屋大学大学院 農学研究科 生化学制御専攻 博士前期課程 修了
1982年4月 味の素株式会社 中央研究所 研究員
1986年3月 New York州立大学Stony Brook校 生化学部 客員研究員
1988年9月 農学博士（東京大学大学院農学研究科）
1994年7月 味の素株式会社 食品総合研究所 主任研究員
1995年4月 福井県立大学 生物資源学部 助教授
2001年10月 福井県立大学 生物資源学部 教授
2006年4月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 細胞生物学専攻 教授
(現在に至る)

自然界におけるC1酵母の環境適応戦略と メタノール誘導性遺伝子発現

阪井 康能（京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻）

1969年にC1化合物であるメタノールに生育する初めての真核微生物としてメタノール資化性酵母が京都大学農学部で発見されて以来、1970年代には高密度培養によるSCP生産が、そして1980年代中頃以降にはメタノールによって誘導される強力なプロモーターと形質転換系が *Pichia pastoris* や *Candida boidinii* などを用いて開発され、メタノール資化性酵母はKチャネルのような膜蛋白質の結晶構造解析、あるいは様々な有用酵素やワクチン・生理活性タンパク質の工業生産のために優れた真核細胞性宿主として用いられている。

1) C1酵母を用いた有用タンパク質生産とそれを支える基礎科学

有用タンパク質の生産を行うにあたり、C1酵母におけるタンパク質合成過程には、メタノール誘導性発現や細胞内タンパク質分解など、まだまだその分子機構が明らかとなっていない生命現象があり、生産性向上のための壁となっていることも事実である。我々は、いくつかの有用酵素生産の高生産技術を開発する過程で、メタノール誘導性遺伝子発現や細胞内タンパク質分解機構に関する新たな現象や分子機構を明らかにしつつある。このような有用タンパク質生産と分子細胞生物学を基盤とする新しい制御発酵学研究の一端を紹介する。

2) C1酵母の植物表層における生存戦略

メタンとCO₂の間の炭素循環であるメタンサイクルは地球温暖化に大きな影響を与えている。従来、このメタンサイクルは、C1微生物により行われていると考えられてきたが、植物からの光合成過程におけるメタン放出が報告され注目されている。一方、C1細菌が、植物表層に広く棲息していることがわかってきたが、C1酵母については知られていない。では自然界で、C1酵母はどのような環境に適応し、どのようにしてメタノールを食べて生きているのだろうか？私たちは、分子遺伝学的手法と一細胞可視化技術を駆使することで、C1酵母が植物表層に生育可能なことを明らかにするとともに、C1代謝遺伝子の発現や環境中のメタノールの挙動を、直接、植物葉上でモニタリングすることに成功した。現在、得られつつある結果をもとに、なぜ、C1酵母がメタノール誘導性遺伝子発現を獲得するに至ったか、C1酵母の自然界における生存戦略から考えてみたい。

略歴：

昭和57年 京都大学農学部農芸化学科卒業

昭和59年 京都大学大学院農学研究科 修士課程修了

昭和63年 同 博士後期課程 退学 (農学博士)

昭和63年 日本学術振興会 特別研究員

昭和63年 京都大学農学部 助手

平成4年 同 助教授

平成17年 京都大学大学院 農学研究科教授

(現在に至る)

肥満・糖尿病を予防・改善する食品由来の生理活性物質

河田 照雄（京都大学大学院農学研究科）

食生活をはじめとするライフスタイルの多様化に伴い、糖尿病、高血圧、高脂血症、動脈硬化症などの、いわゆる生活習慣病が一個人に集積することが、大きな社会的な問題となってきた。昨年、このような代謝異常を合併した動脈硬化を容易に発症しやすい状態としてのあらしい疾患概念としてメタボリックシンドロームが創出された。メタボリックシンドロームの発症要因として内臓脂肪の蓄積が最上流に位置することやその部位の体脂肪を軽減することが病態発症の予防・改善に極めて有効であることが明らかとなってきた。また、病態発症の責任細胞である脂肪細胞とマクロファージから分泌される各種サイトカイン・ケモカインの生成制御が極めて重要であり、従来にはない新規の機能性食品開発の可能性が考えられる。

我々は、遺伝子レベル、細胞レベル、個体レベルでの各種有機化学的、生化学的、生理学的手法を用いて、肥満・糖尿病・メタボリックシンドロームを標的とした植物素材の探索とその作用機序の解析を行っている。特に有効成分の実用化の上で大きな問題となる作用機序の解明は、メタボリックシンドロームの主たる責任細胞である脂肪細胞、肝細胞、マクロファージなどを研究対象としてサイトカイン生成制御機構などについて詳細な検討を行ってきた。

本講演では、脂肪細胞の生理及び病理学的な側面ならびに細胞分化の分子機構と糖尿病、動脈硬化症をはじめとする生活習慣病、さらにはそれらが複合的に絡み合った新しい疾患概念であるメタボリックシンドロームに対する予防・改善の生理・病理学的要点について解説するとともに、抗肥満、抗糖尿病作用を有する食品由来の生理活性物質研究の現状について紹介したい。

略歴：

昭和 58 年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了（食品工学専攻）

京都大学農学博士

昭和 58 年 日本学術振興会奨励研究員（京都大学農学部）

昭和 59 年 京都大学農学部助手（食品工学科）

平成 3 年 文部省在外研究員（フランス科学研究機構生化学研究所）

平成 6 年 京都大学農学部助教授

平成 9 年 京都大学大学院農学研究科助教授

平成 16 年 京都大学大学院農学研究科教授（食品分子機能学分野）

（現在に至る）

骨破壊抑制及び骨形成促進活性を有する 食品由来の生理活性物質

禹 濟泰（中部大学応用生物学部・健康食品科学寄付研究部門）

骨の量と機能は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収(骨破壊)とのバランスによって維持されている。高齢社会の中で患者数が急速に増加している骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収によりこの量的バランスが破綻し、骨量が減少する疾患である。骨粗鬆症の病理学的特徴として骨髄における脂肪組織の顕著な増加が知られている。この脂肪組織の増加は骨芽細胞への分化能を有する間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化促進に起因する。従って、共通の前駆細胞から分化する骨芽細胞の数が減少し、骨形成能が低下すると考えられている。破骨細胞の分化、機能および活性化を阻害する物質は骨破壊抑制剤として、多分化能細胞の脂肪細胞への分化を阻害する物質あるいは骨芽細胞への分化を誘導する物質は骨形成の促進剤として骨粗鬆症の予防や治療にも応用できると考えられる。

我々は、骨粗鬆症を予防可能な食品成分を得る目的で、破骨細胞の分化及び機能発現に作用する活性物質および骨芽細胞の分化を促進する活性物質を食品成分中から探索してきた。その結果、quercetin、luteolin、catechinなどのフラボノイド類、タンニン化合物である furosin やネオリグナン化合物である honokiol などが破骨細胞の分化、生存および機能を阻害すること、honokiol やパッションフラワー由来の harmine、目薬の木由来のジアリールヘプタノイドである acerogenin が骨芽細胞の分化を強力に促進することを見出し、分子、細胞、個体レベルでの作用機構解析を行っている。

本講演では、骨代謝を担う破骨細胞、骨芽細胞の分化や機能の分子機構を解説するとともに、我々が得たこれらの細胞の分化と機能を調節する食品由来の生理活性物質の作用機構について紹介する。

略歴：

1992年 東京農工大学大学院連合農学研究科博士課程修了（生物工学専攻）

農学博士

1992年 財団法人相模中央化学研究所研究員

1995年 東京工業大学生命理工学部助手

1999年 ノーウェスタン大学医学部分子薬学科 客員助教授

2001年 中部大学応用生物学部助教授

2005年 中部大学応用生物学部・健康食品科学寄付研究部門教授

株式会社エリナ研究開発部長（兼務）

（現在に至る）

破骨細胞分化におけるプロテインホスファターゼの役割

大西 素子（中部大学大学院応用生物学研究科）

タンパク質のリン酸化／脱リン酸化は、生物が最も好んで使用する情報伝達の手段の1つである。脱リン酸化反応を触媒する酵素であるプロテインホスファターゼ（PP）は、哺乳類では基質特異性からセリン／スレオニンホスファターゼ、チロシンホスファターゼおよび二重特異性ホスファターゼの3種類に大別されるが、このうちセリン／スレオニンホスファターゼは、歴史的に特異性と二価イオン要求性から、さらにPP1、2A、2B および 2C の主に4種類に分類される。PP2C には、異なった遺伝子にコードされる複数のサブタイプが存在し、脂質代謝やアポトーシスの制御を初め、様々なシグナル伝達系を調節する機能を持つことが知られている。中でもPP2C α 、 β および ϵ は、細胞にもたらされたストレス情報を核に伝える際に働く、ストレス応答情報伝達経路の調節に関与することが報告されてきた。

一方、骨代謝において骨吸収を担う破骨細胞は、造血幹細胞に由来するが、破骨細胞の分化に必須である破骨細胞分化因子（RANKL）下流の情報伝達経路では、ストレス応答情報伝達経路を構成する分子の多くが共通して活性化される。そこで、PP2C が破骨細胞分化の調節に関与する可能性について検討した結果、最近、我々はプロテインホスファターゼ 2C β および ϵ の発現が破骨細胞分化時に一過性に増加することを見出した。さらに分子生物学的手法により、PP2C が RANKL によって活性化される情報伝達経路を負に制御している可能性を明らかにした。

本講演では、破骨細胞分化の制御機構における PP2C の機能について解説するとともに、PP2C の活性を調節する低分子化合物の探索と、これらの化合物による骨代謝疾患治療の可能性について紹介したい。

略歴：

1996年 東北大学大学院医学研究科博士課程修了（生理学専攻）

医学博士

1999年 東北大学加齢医学研究所遺伝子情報研究分野助手

2001年 中部大学応用生物学部助教授

2007年 同 上 准教授

（現在に至る）

レプトマイシン B によるサイクリン D1 遺伝子発現抑制機構

井本 正哉 (慶應義塾大学理工学部生命情報学科)

放線菌由来の小分子化合物であるレプトマイシン B は NES 配列を持つタンパク質の CRM1 依存的な核外移行を特異的に阻害する。タンパク質の核-細胞質シャトルは細胞応答機能を発揮する上で重要であることから、レプトマイシン B はアポトーシス誘導や細胞周期の停止など様々な細胞応答変化を誘導する。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかではなかった。我々は、レプトマイシン B により誘導される NIH3T3 細胞の細胞周期停止機構を解析した結果、G1 期進行にかかわるサイクリン D1 の発現が転写レベルで阻害されることを見いだした。今回はケミカルゲノミクス的手法に基づくレプトマイシン B のサイクリン D1 発現阻害機構解析結果を報告する。レプトマイシン B によるサイクリン D1 mRNA の発現阻害をキャンセルする化合物をケミカルライブラリーから探索したところ、オカダ酸やサイトスタチンなどの PP2A 阻害剤にそのような活性を見いだしたことから、レプトマイシン B によるサイクリン D1 mRNA の発現阻害機構に PP2A が関与することがわかった。さらに、PP2A はレプトマイシン B により核内に蓄積されることを見だし、PP2A の NES 配列を初めて明らかにした。一方、サイクリン D1 の転写活性化は AP1 のコンポーネントである c-Jun のリン酸化により誘導されることが報告されているが、レプトマイシン B 処理により c-Jun の脱リン酸化が誘導されており、さらにこのレプトマイシン B による c-Jun の脱リン酸化誘導はオカダ酸の添加でキャンセルされた。これらの結果より、レプトマイシン B は PP2A の核外移行を阻害することにより核内に蓄積し、PP2A の核内における持続的な脱リン酸化活性を誘導し、その結果 c-Jun が脱リン酸化されて転写因子としての機能を消失し、サイクリン D1 の転写阻害を引き起こすことを明らかにした。

略歴：

1954.11.10 生まれ（京都府）

1978.3	山口大学農学部農芸化学科卒業
1980.3	山口大学農学研究科農芸化学専攻修士課程修了
1980.4	キリンビール株式会社入社
1989.3	キリンビール株式会社退社
1989.4	慶応義塾大学工学部応用化学科助手
1991.4	同 専任講師
1996.4	同 助教授
2002.4	慶応義塾大学工学部生命情報学科教授

この間、

1982.5~1988.9	(財) 微生物化学研究所へ国内留学
1988.2	農学博士号取得（東京大学）
1994.4~1995.3	米国コロンビア大学(Dr. Weinstein)へ留学
1995.3	日本農芸化学会奨励賞受賞（日本農芸化学会）
2000.11	住木・梅沢記念賞受賞（日本抗生物質学術協議会）

受賞記念講演 講演要旨

9月22日（土）11:10～12:00

（三浦幸平メモリアルホール）

農芸化学技術賞

日本農芸化学会賞

食酢の健康機能とおいしさの解明に基づく新飲用黒酢の開発

大島 芳文(株ミツカン マーケティング本部)

多山 賢二(鈴峯女子短期大学)

赤野 裕文(株ミツカン マーケティング本部)

○ 岸 幹也(株ミツカングループ本社 中央研究所)

紀元前から使われ続けてきた食酢には、原料の違いなどに由来する多くの種類が存在する。しかし、特定の種類の食酢だけが伝承的に体に良いとされてきたわけではない。そこで、食酢の健康機能は食酢の酸味を特徴付ける主成分であり、他の食品中には殆ど含まれない「酢酸」によってもたらされるという仮説を立て、様々な機能検証を実施した。その結果、食酢には(a)カルシウム吸収、(b)グリコーゲンの再補充促進(疲労回復)、(c)血圧調整、(d)血中総コレステロール値の調整などの効果があり、その有効成分が酢酸であることが確認できた。

また、食酢の中でも特に健康イメージが強い黒酢に着目し、消費者への飲用嗜好性の評価が悪かった従来の黒酢を改善することに取り組んだ。黒酢の製造工程は多種の発酵微生物が関与する複雑な発酵によるが、目標品質を(a)クセのある香りの低減、(b)酸味の緩和とし、それらに関与する成分を指標として、香味品質を改善する発酵微生物の選抜および発酵工程における諸条件を体系的に検討した。その結果、一般消費者の嗜好にあった品質をもった新飲用黒酢“純玄米黒酢”を商品化することに成功した。

近年、飲用酢の市場は伸長し続けており、食酢を飲用することは一般化してきたと言える。この食酢市場の活性化に、我々が取り組んできた食酢の健康機能解明と、嗜好性が高く飲み易い“純玄米黒酢”の開発の成果が活かしているとすれば、皆様の健康増進に役立っていることでもあり、大変光栄である。

略歴:

平成 8年3月 名古屋大学大学院農学研究科食品工業化学専攻博士課程(前期)修了
平成 8年3月 株式会社中埜酢店(現ミツカングループ本社)入社 中央研究所に配属
平成15年7月 博士(農学)取得
(現在に至る)

微生物「超チャネル」に関する分子生物学的・構造生物学的研究

村田幸作 (京都大学大学院農学研究科)

細胞表面は、局所的、且つ微細な構造と機能を除けば、構造的・機能的に概ね均等と見做され、細胞表面における巨大な構造体の形成は想定し難い。しかし、スフィンゴモナス (*Sphingomonas*) 属細菌A1株は、細胞表面分子の流動・再編により、高分子物質(多糖:アルギン酸)を取り込む巨大な構造体「体腔」を形成する。この体腔と連動した輸送装置を「超チャネル」と命名し、その全容を解析することにより、細胞表面の動的構造と潜在的な機能に関する新たな一面が明らかになった。

本講演では、体腔形成細菌の全ゲノム構造、体腔(器官)の構造と機能、器官の分子移植、糖質関連酵素の構造機能相関及び進化と分類など、主に細菌「超チャネル」に関して得られた成果を紹介する。

I. 細菌「超チャネル」－多糖輸送－

(1) 取り込み系

スフィンゴモナス属細菌(グラム陰性)は、リポ多糖の代わりに真核細胞の膜成分であるスフィンゴ糖脂質を外膜に持つ。一般的に、細胞表面は多数の膜分子で覆われている。人工物質分解能も強く、応用微生物学上重要な菌群である。A1株の更なる特徴は、細胞表面に体腔(腔径 0.1~0.2 μm の孔構造)を形成することにある。体腔形成細菌は、微生物学史上初めての記述である。

スフィンゴモナス属細菌としては初めてA1株のゲノムDNA(4.6Mb)の全塩基配列を決定し、本菌群の特性を総合的に解析する分子基盤を確立した。体腔は、膜分子の流動・再編によって形成される開閉自在の器官であり、その形成と構造、及び機能には鞭毛タンパク質フラジェリンが深く関わる。つまり、鞭毛非形成性のA1株では、フラジェリンは外膜に局在し、強力($K_d \sim \text{nM}$)な多糖(アルギン酸)結合能と細胞の生死を左右する細胞表面(構造・機能)制御能を示す。また、本菌のフラジェリン(INモチーフを持つ)は、 α -ドメインと β -ドメインから成り、前者はアルギン酸の結合に関与し、後者の立体構造はT4ファージの宿主接着関連タンパク質のそれと相同である。

これらの結果は、II. 酵母「超チャネル」－DNA輸送－の結果も含め、細胞表面の流動性と新規な器官創出機構、体腔と未だ明確な理解が得られていない他の細胞表面装置(メソソーム、エンド/ファゴサイトーシスなど)との構造的・進化的相関、及びファージや鞭毛を構成する分子の起源、進化、機能の理解に有用な視座を与えた。

(2) 輸送系

ペリプラズム局在性結合タンパク質は、水1分子の出入を駆動力にした新規なドメイン開閉機構により、多糖(アルギン酸)の結合と解離を繰り返す。結合タンパク質に捕捉された多糖は、内膜のABCトランスポーター(インポーター)に渡され、細胞質に輸送される。この輸送体の立体構造と輸送機構の解析により、体腔と連動した高分子物質特異的ABCトランスポータ

一と高分子物質の資化に関わる細菌の新しい分子機構の存在が明らかになった。

また、体腔を他細菌に分子移植する細胞改変技術(分子移植工学)を確立し、ダイオキシンやポリプロピレングリコールなど、分子構造や分子サイズを問わず多様な物質を強く分解する「スーパー細菌」の創成に途を拓いた。

(3) 分解系

「超チャネル」によって細胞質に輸送されたアルギン酸は、多糖(アルギン酸)リアーゼによって単糖にまで分解され、 α -ケト酸となって代謝される。多糖分解酵素には、多糖ヒドロラーゼ(加水分解反応)と多糖リアーゼ(脱離反応)があるが、後者の研究は遅れている。一次構造上18のファミリーに分類される多糖リアーゼは、一次構造が全く異なるにも拘らず「ウロン酸を認識し、 β -脱離反応で糖鎖を切断する」共通機能を示す。反応様式や作用部位を異にする多糖リアーゼ(10種類)の立体構造を決定することにより、モジュールの運動を伴う新しい β -脱離反応機構の存在や上記共通機能を規定する構造要因を明確にした。多糖リアーゼの反応産物に作用する新規ヒドロラーゼの立体構造を決定し、グリコシド結合ではなく、炭素-炭素二重結合に水分子を付加する新しい加水分解酵素(反応)の存在も示した。また、糖質を基質とするリアーゼ、ヒドロラーゼ、エピメラーゼ(レニン結合タンパク質)、イソメラーゼなどの立体構造解析により、一群の糖質関連酵素が α_6/α_6 -バレルの基本骨格を保存して進化した証拠を明確にした。これは、 α/α -バレルを土台にした新規糖質関連酵素創出の分子基盤と成り得る。

アルギン酸代謝のエネルギー的側面に関連して、微生物NADキナーゼの全容をほぼ明らかにした。特に、ATP依存NADキナーゼとポリリン酸(Pi)_n/ATP依存NADキナーゼの2種類が存在することを証明し、且つ全てのNADキナーゼがホモ多量体構造を取る必然性を分子レベルで示した。また、祖先型(Pi)_n/ATP依存グルコキナーゼの立体構造を決定し、原核細胞型グルコキナーゼから真核細胞型ヘキソキナーゼへの進化に関する長年の論議に最終決着を与えた。(Pi)_n依存酵素の産業への実用化を達成し、ATP依存酵素を(Pi)_n依存酵素に「逆進化」させる手法の重要性を指摘した。

これらの構造生物学的解析により、糖質関連酵素の構造機能相関、進化、分類、更には糖質関連酵素の分子設計論理の構築や細菌感染機構、特に多糖をバイオフィームとしたエコシステムの理解に有用な多くの知見が産み出された。

II. 酵母「超チャネル」－DNA輸送－

酵母(*S. cerevisiae*)の対数増殖期初期細胞に自然形質転換(様)能を見出し、先に開発したリチウム処理法と遜色のない新規な形質転換法を確立した。細胞の死滅・損傷を伴わない本法を用いて遺伝子破壊株(約5,000株)の形質転換能を網羅的に解析し、DNA取り込みが、cAMPの関与も含め複雑に制御されたエンドサイトーシス(様)機構で進行し、核への輸送にはゴルジ体や小胞体が関与していることを示した(詳細略)。

以上、本研究は多分野に渉るが、その内容は「微生物における(巨大)物質の輸送と代謝の高次バイオシステム」として集約される。現在、酸素/窒素チャネルの解析やバイオマス細菌多糖のバイオエネルギーへの変換に関する研究も進めている。

略 歴

村田幸作（京都大学農学博士）

昭和43年 京都大学（農学部食品工学科）

昭和47年 京都大学大学院修士課程（農学研究科食品工学専攻）

昭和49年 田辺製薬株式会社（応用生化学研究所）

昭和55年 京都大学助手（食糧科学研究所）

昭和58年 米国コーネル大学医学部（生化学部門）

昭和63年 京都大学助教授（食糧科学研究所）

平成 7年 京都大学教授（食糧科学研究所）

平成13年 京都大学大学院教授（農学研究科食品生物科学専攻）

現在に至る

公開シンポジウム

講演要旨

22日（土）13：00～16：00

（三浦幸平メモリアルホール）

「食と健康」

主催：日本学術会議農芸化学分科会

主催：日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会

趣旨

今、世の中で、食の安全や機能の問題は注目を浴びています。日本学術会議農芸化学分科会は、食品・食料の生産・製造、食品の機能、食品の安全などに深く関わる学問領域を幅広く対象にしている分科会であり、こうした問題について学術的な見地から、社会に対する説明責任があります。本シンポジウムでは、高校生、社会人、大学生、などを対象として、食の機能と安全、食と発酵、食の生産に関わる土と環境などの問題についての講演を行い、意見交換をします。

S4-1

じょうずに食べて免疫力を高め、病気を防ごう！！ －食品の抗感染・抗アレルギー機能について－

日本大学生物資源科学部 上野川 修一

日本人が最も健康で長生きである理由はその理想的な食生活にあるといわれている。しかし、その日本人でも摂る食物のバランスが悪いと生活習慣病をはじめとした様々な病気となる。

最近、感染症やがんの話題が多い。これらと食の間にも密接な関係がある。量・質とも偏りのある食生活を送ると免疫力が低下し、感染症やがんのリスクは増大する。

しかし、このリスクを低減させる食品の成分のあることがヒトの臨床試験などを通じて明らかになってきた。その代表的なものとして腸内細菌由来の乳酸菌、すなわちプロバイオティクス、ビタミン A、C、E、亜鉛、セレンなどである。

また、免疫系のバランスの異常はアレルギー発症のリスクを増大させるが、このアレルギーを抑える食品成分のあることがヒト臨床試験で確かめられている。特に、前述のプロバイオティクスは免疫バランスの異常を修復することによりアレルギーを抑制する。

以上、免疫系の破綻である感染症、がん、アレルギー予防における食の重要性について述べたい。

履 歴

昭和 41 年	東京大学農学部農芸化学科卒業
昭和 43 年	東京大学大学院修士課程修了
昭和 43 年	東京大学農学部助手
昭和 51 年	東京大学農学部助教授
平成 元年	東京大学農学部教授
平成 6 年	東京大学生物生産工学研究センター長
平成 9 年	東京大学アジア生物資源環境研究センター長
平成 15 年	東京大学名誉教授
平成 15 年	日本大学生物資源科学部教授

学会・社会活動

- ・ 現在、日本食品免疫学会会長、(財)日本ビフィズス菌センター (腸内細菌学会) 理事長、(財)糧食研究会会長、日本栄養食糧学会理事、日本免疫学会評議員、内閣府食品安全委員会専門調査会座長、日本学術会議連携会員など
- ・ 前日本農芸化学学会会長

主な著書

免疫と腸内細菌 (平凡社)、食品とからだー免疫とアレルギー (朝倉書店)、賢い食べ物は免疫力をあげる (講談社)、免疫学キーノート (シュプリンガー)、食品の科学 (東京化学同人)

すごいぞ微生物の力！！

－ 農芸化学分野における微生物研究 －

石川県立大学、生物資源工学研究所 熊谷 英彦

微生物は目に見えない小さな生き物です。微生物は、バクテリア、放線菌、カビ、酵母等に分類されていますが、自然界のどこにでもいます。土の中、水の中、動物や植物の体表面や体の中にさえ棲んでいます。そして、自然の成り立ちや、人間の生活と密接な関係を保っています。

人はこの微生物を有史以前から利用してきました。ビールやワイン、チーズやヨーグルトの醸造あるいは、我が国では清酒、味噌、醤油の醸造などがその例です。

一方で、微生物は生物学の基礎研究に使われ、生命現象の複雑な仕組みの多くが微生物を材料として明らかにされてきました。遺伝子の構造と働きに関する生命の原理が解明されました。これは全ての生物に当てはまるセントラルドグマです。また遺伝子の解析から、全ての生物は共通の祖先から進化によってできたものと考えられるようになってきました。

微生物の積極的な利用は、このような基礎知識や技術の発展を取り込んで活発に行われ続けてきました。それはバイオテクノロジーの主要分野として大きく展開し、今では、食料のみならず、医療、農業、環境分野でも微生物の能力を開発し利用しています。さらにこのような問題解決のため多くの研究が続けられているのです。

この講演ではこのようなことを具体的にお話したいと思います。

履 歴

昭和 44 年 3 月 京都大学大学院農学研究科博士課程修了
昭和 44 年 4 月 京都大学食糧科学研究所 助手
昭和 52 年 7 月 京都大学助教授、農学部食品工学科
平成 3 年 4 月 京都大学教授、農学部食品工学科
平成 9 年 4 月 京都大学大学院教授、農学研究科応用生命科学専攻
平成 11 年 4 月 京都大学大学院教授、生命科学研究科統合生命科学専攻
平成 16 年 3 月 京都大学を定年退官
平成 16 年 4 月 石川県農業短期大学教授、農業資源研究所
平成 16 年 4 月 石川県立大学教授、生物資源工学研究所
平成 19 年 4 月 石川県立大学教授、生物資源工学研究所所長

平成 14 年 4 月から平成 16 年 3 月まで、(社)日本農芸化学会会長

受 賞

昭和 48 年 11 月 第 25 回毎日学術奨励賞受賞「アミン酸化酵素の構造と反応機構に関する研究」
昭和 53 年 4 月 日本農芸化学会奨励賞受賞「多機能ピリドキサールの反応機構とアミノ酸合成への応用に関する研究」
平成 6 年 6 月 日本ビタミン学会賞受賞「ビタミンB6およびグルタチオン関連微生物酵素の触媒機能の解明ならびに応用」
平成 7 年 10 月 有馬 啓記念バイオインダストリー協会賞受賞「L-ドーパの酵素的生産法の開発と実用化」
平成 13 年 3 月 日本農芸化学会賞受賞、「微生物機能タンパク質の分子細胞学的研究」

S4-3

『悲鳴をあげている地球環境』をどうすればよいのか？

－環境変動にともなう農業生産と生き物たち－

北里大学 陽 捷行

わたしたちは、18 cm の土壌と、11 cm の水と、15 km の大気と、3 mm のオゾンによって生かされています。これらの環境資源が、いま悲鳴をあげています。土壌は侵食され、水は枯渇し、大気は温暖化し、オゾン層は破壊されつつあります。

その結果、地球に生きる生き物に大きな影響が及んでいます。エチゼンクラゲ、マイワシ、アルゼンチンアリ、ツボカビカエル、ミズバショウなどの例を紹介します。はたして、人間には影響が及ばないのでしょうか？

このような地球環境の変動は、われわれが便利な文明を謳歌し、毎日の食料を生産していることに由来しているのです。どうすればいいのでしょうか。このことを考えてみましょう。

履 歴

1943 年山口県萩市生まれ。北里大学副学長。前独立行政法人農業環境技術研究所理事長。東北大学大学院農学研究科博士課程修了。

受賞：日本土壌肥料学会賞(1989 年)。環境庁長官賞・優秀賞(1991 年)。日経地球環境技術賞・大賞(1995 年)。日本農学賞・読売農学賞(1996)。国際大気汚染防止団体連合 Yuan T. Lee 国際賞(1998 年)。

著書：「農業が歩んできた道(農文協)」、「日本列島の自然の中で(農文協)」、「環境保全と農林業(朝倉書店)」、地球環境変動と農業(朝倉書店)、「土壌圏と大気圏(朝倉書店)」、「CH₄ and N₂O:Yokendo」、「現代社会における食・環境・健康(養賢堂)」など。その他、共著を含む書籍は和書 60 冊、洋書 30。その他、和英の研究論文多数。

講演、研究、会議など 31 か国歴訪。

教育歴は、アイオワ州立大学客員教授、東京大学農学部講師、筑波大学講師、電気通信大学電気通信部講師、東京農工大学農学部講師、北海道大学北方生物圏フィールド科学センター講師、東京農業大学客員教授など。