



日本農芸化学会中部支部 第 158 回例会

講演要旨集

受賞講演・シンポジウム
「農芸化学分野における酵素・微生物の
フロンティア研究」

日時：平成 22 年 6 月 26 日（土）12 時 40 分～

場所：石川県女性センター

金沢市三社町 1 番 44 号

代表電話 (076) 263-0115

金沢駅から徒歩 15 分 無料駐車場あり

(<http://www.pref.ishikawa.jp/jyoseicenter/access.html>)

日本農芸化学会中部支部第 158 回例会
受賞講演・シンポジウム「農芸化学分野における酵素・微生物のフロンティア研究」

日時：平成 21 年 6 月 26 日（土） 12:40～
場所：石川県女性センター
金沢市三社町 1 番 44 号

プログラム

12:40-13:00 総会

13:05-14:35 受賞講演（座長 石川県大食科 矢野俊博、後藤秀幸）

13:05-13:35 平成 22 年度日本農芸化学会技術賞

「新奇蛋白質修飾酵素プロテイングルタミナーゼの発見と食品加工用酵素としての開発」

山口 庄太郎、天野 仁、○佐藤 公彦、松原 寛敬（天野エンザイム㈱）

13:35-14:05 平成 22 年度日本農芸化学会奨励賞

「枯草菌のクオラムセンシングフェロモンに見られる新規翻訳後修飾の解明」

岡田正弘（東北大院理・化）

14:05-14:35 平成 22 年度日本農芸化学会奨励賞

「ホモポリアミノ酸の生合成に関する研究」

濱野吉十（福井県大・生資源）

14:50-16:50 シンポジウム「農芸化学分野における酵素・微生物のフロンティア研究」
（座長 石川県大食科 海老原 充、本多裕司）

14:50-15:10 「石川での微生物・酵素研究」

熊谷英彦（石川県大・生資工研）

15:10-15:35 「ヒトの糖質に作用するビフィズス菌のグリコシダーゼ ～その作用と生理的意義～」

片山高嶺（石川県大・生資工研）

15:35-16:00 「改変型放線菌由来シトクロム P450 を用いた活性型ビタミン D の生産」

榑 利之（富山県大工・生物工学）

16:00-16:25 「超好熱菌酵素の機能・構造解析と応用」

櫻庭晴彦（香川大農・応生科）

16:25-16:50 「乳酸菌バクテリオシン ―戦略的な探索・発見・活用とゼロエミッション P J まで―」

園元謙二（九大院農院・生機科）

17:00-18:30 懇親会（参加費：無料）

問合せ先

鈴木隆元（石川県立大学生物資源環境学部食品科学科）

〒921-8836 石川県石川郡野々市町末松 1-308

Tel&Fax：076-227-7463

E-mail：t-suzuki@ishikawa-pu.ac.jp

新奇蛋白質修飾酵素プロテイングルタミナーゼの発見と食品加工用酵素としての開発

天野エンザイム(株)	産業用酵素開発部	部長	山口 庄太郎
天野エンザイム(株)	マーケティング推進室	チームリーダー	天野 仁
○天野エンザイム(株)	産業用酵素開発部	研究員	佐藤 公彦
天野エンザイム(株)	フロンティア研究部	研究員	松原 寛敬

はじめに

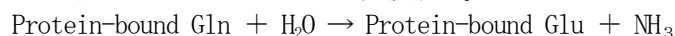
食品用酵素市場において、蛋白質加工・修飾分野は、今後の成長が見込まれる領域である。この分野においては、近年までもっぱらプロテアーゼが用いられてきた。プロテアーゼは、機能性ペプチドの製造やアミノ酸系調味液製造用のほかに、ペプチド結合の限定分解による蛋白質の溶解性、乳化特性、泡沫特性、凝固性などの機能性の向上にも用いられている。チーズ製造におけるキモシン（レンネット）の利用も、カゼインの限定分解による凝固性付与であり、その例と言える。一方、プロテアーゼ以外の蛋白質修飾酵素としては、近年わが国において微生物から初めて見出された蛋白質架橋重合酵素トランスグルタミナーゼが、世界の食品産業に大きなインパクトを与えているのは周知の通りである。

1. スクリーニングと発見

我々は、食品加工分野において社会に貢献できる新たな酵素の提供を目指し、一連の蛋白質修飾酵素のスクリーニングに取りかかった。蛋白質に作用する酵素をリストアップし、その中から反応がシンプルである、安全性の面から生体内での反応が知られているなどの観点からいくつかの酵素ターゲットを選び、並行してスクリーニングを行った。その中から、蛋白質を脱アミドする酵素を土壌由来菌株から見出し、本酵素をプロテイングルタミナーゼ（以後PGと呼ぶ）と命名した。PGは、高分子蛋白質に作用可能な世界で初めての微生物由来蛋白質脱アミド酵素であり、生産菌は、*Chryseobacterium*に属する新菌種と同定され、*C. proteolyticum*と命名した。

2. 性質と構造

本酵素は蛋白質中のGln残基を脱アミドしてGlu残基に変換する。



短鎖ペプチドより蛋白質や長鎖ペプチドに良く作用する。カゼイン、小麦グルテンが良い基質であり、血清アルブミン、オバルブミンなどには反応性が低い。蛋白質中のAsn残基や他のアミド化合物には作用しない。トランスグルタミナーゼは一級アミン非存在下では脱アミド活性を示すが、本酵素は、カゼインへのモノダンシルカダベリンの取り込み活性は見られず、蛋白質架橋活性は有していなかった。本酵素は、分子量20 kDa、等電点10の単量体の酵素であり、305アミノ酸からなるプレプロ体として合成され185アミノ酸からなる成熟体として分泌される。

一次構造上、既知のデータベース中にホモロジーのあるものは見出されず、X線結晶構造解析からも新しい折り畳みを有する蛋白質であることが判明した。（図1）プロ体の構造解析にも成功し、Cys42を活性中心とする活性部位がプロ領域によって覆われていること、またプロ領域の変異体の構造解析から基質Glnの側鎖が基質結合ポケットに結合する様子を明らかにし、反応中間体の観察にも成功した。

3. 作用と効果

一般に、脱アミド化された蛋白質は、生じたカルボキシル基の増加により等電点が低下し、より酸性域での溶解性が向上する。これは、弱酸性域で不溶性である多くの食品蛋白質の、食品中（多くが弱酸性域）での溶解性を向上させることを意味し、用途拡大が期待できる。また、生じたカルボキシル基同士の分子内静電反撥力のため、蛋白質の高次構造がほぐれ、その結果分子内に埋もれていた疎水性領域が分子表面へ暴露されると考えられる。これによって、その蛋白質に優れた乳化

剤、起泡剤としての機能性が付与される。これらのことを各種の食品蛋白質を用いて実証した。

また、本酵素はトランスグルタミナーゼと同じGln残基をターゲットとするが、それぞれの速度定数を比較すると、基質との親和性、触媒活性いずれもPGの方が高かった。このことは、両者が共存した場合、PG反応が優先して起こることを示す。実際、トランスグルタミナーゼによるカゼインの架橋反応中に本酵素を添加すると架橋反応が停止した。この性質は、トランスグルタミナーゼによるゲル形成において、その反応を制御して望ましい物性のゲルを形成させることが出来ることを示す。(表1)

4. 工業化と安全性評価

食品加工用酵素としての上市に際し、産業用酵素としては最高レベルの純度の酵素原体を、実用レベルのコストで製造する方法を確立し、製品化を実現した。また、食品用として新しい酵素を提供するための安全性確認にも時間を費やした。生産菌について、ラットを用いた病原性試験及びトキシン生産性試験を行い安全性を確認した。酵素剤については、三種類の変異原性試験及びラット90日反復投与試験を実施し、最大無毒性量と推定一日摂取量との比較から十分高い安全マージンが得られることを示した。また蛋白質としてのアレルギー誘発性評価を行い、そのリスクの低いことも証明した。2009年7月、米国FDAからGRAS Noticeを得ることが出来た。日本の規制においては、食品用酵素は他の天然物由来の物質と共に「既存添加物」の位置づけであり、本既存添加物制度の導入以後に開発された新しい酵素は、他の化学物質添加物と同様に指定添加物のガイドラインに沿った審査を受ける必要がある。PGは、この新規指定要請を実施し審査を受けている最初の酵素であるばかりでなく、最初の天然物でもあり、食品業界に先駆的な役割を担っている。

5. おわりに

本開発により、これまでに成し得なかった蛋白質の特異的な脱アミド化法を社会に提供することが出来た。その過程で行っている新規指定添加物申請は、今後の新しい酵素や天然物の実用化に道を開くものであろう。一方、新奇な酵素蛋白質であるPGの構造解析、触媒機構の解明を通じて、学術的にも貢献できたと思われる。今後も産業界、農芸化学会の発展に貢献できる新しい酵素の提供に微力を尽くして行きたい。

最後に、本研究開発を進めるに当たり、ご指導、ご支援いただきました諸先生方、共同開発先の皆様方に厚く御礼申し上げます。特に、本酵素発見当時からご理解いただき、食品蛋白質に対する作用の基礎的研究においてご指導いただきました京都大学大学院農学研究科農学専攻・松村康生教授には深く感謝いたします。また、高次構造解析と作用機序の解明は同じく京都大学大学院農学研究科応用生命専攻・三上文三教授の下で行われたものであり、感謝いたします。

また、本研究開発の基礎研究、工業化から商品開発まで、ご協力いただいた当社の数多くの皆様に御礼申し上げます。

表1. プロテイングルタミナーゼの食品への応用

- ・ 蛋白質の機能性の向上
- ・ グルテン・ドウの軟化
- ・ 酵素的HAP/HVP
- ・ Ca/蛋白質溶解性の向上
- ・ 蛋白質抽出効率の向上
- ・ 蛋白質の低アレルギー化
- ・ トランスグルタミナーゼの反応制御
- ・ 蛋白質中のグルタミン残基の定量

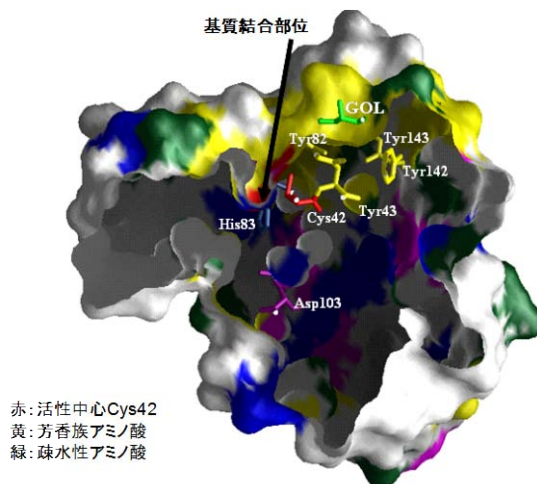


図1. プロテイングルタミナーゼの高次構造—断面図—

細菌にとって自らの集団密度は重要な外的環境の一つであり、細菌は細胞密度の変化に応答して様々な現象を引き起こす。このような細胞密度依存的な遺伝子発現制御機構は、定足数という意味の "クオラム" という単語を用いてクオラムセンシングと呼ばれている。細菌は実に単純明快な方法で細胞密度を監視しており、それは常に細胞外にフェロモンを分泌することである。言い換えれば、細菌は細胞密度をフェロモン濃度に置き換えて感知しているのである (図 1)。このクオラムセンシングフェロモンは種特異的に作用し、一般にその化学構造は、グラム陰性菌においてはアシルホモセリンラクトンであり、グラム陽性菌ではペプチドである。

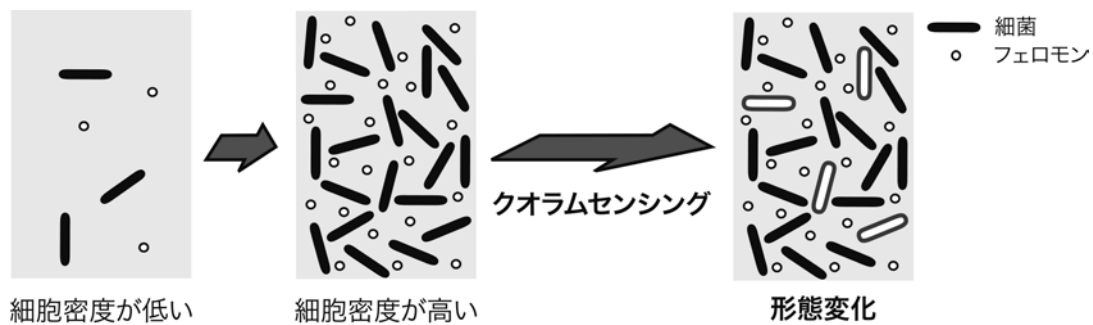


図 1. クオラムセンシングの概略

細菌の細胞密度が低いうちは細胞外に分泌されたフェロモンの濃度も低いので何も起こらない。これに対し、細胞密度の上昇に伴って細胞外に分泌されたフェロモンの濃度も高くなり、ある一定の閾値を超えた場合に細胞膜上のフェロモン受容体を介してクオラムセンシングが働き、形態変化など様々な現象が引き起こされる。

グラム陽性菌である枯草菌は、バイオフィルムや胞子の形成、抗生物質の生産、DNA 形質転換を行うことが特徴として挙げられるが、これらの現象はいずれもクオラムセンシングによって制御されている。このなかの DNA 形質転換を主に誘導するフェロモンがオリゴペプチドである ComX フェロモンである。枯草菌はグラム陽性菌のモデル細菌として、網羅的な分子遺伝学的解析が行われており、形質転換における ComX フェロモンのシグナル伝達機構については既に詳細に解析されていた。さらに、分子生物学的研究から、ComX フェロモンは、菌株によって全く異なるアミノ酸配列を有しているものの、共通して未知の翻訳後修飾を受けたトリプトファン残基を含んでおり、その修飾様式はイソプレニル化ではないかと推定されていた。もしこれが本当ならば、新規な翻訳後修飾様式となるのだが、ComX フェロモンに関する化学的研究は、遺伝学的解析とは対照的に全く進んでおらず、新規翻訳後修飾であることがほぼ明らかであるにもかかわらず、化学構造はおろか分子式すら確定していなかった。そこで筆者らは、RO-E-2 株由来の ComX_{RO-E-2} フェロモンの化学構造の決定を目的として研究を開始した。

共同研究者らによって RO-E-2 株由来の *comQXP* クラスタを導入した大腸菌が作製され、ComX_{RO-E-2} フェロモンの量的な供給がある程度可能となったのだが、それでもなお、ComX_{RO-E-2} フェロモンは不安定で回収率が低く、100 L 規模の培養によっても精製することが困難であると推測された。そこで、筆者は、LC/MS を用いた定量法を確立し、それを指標に回収率の向上と精製条件の検討を重ねた。最終的にわずか 5 L の培養液から 0.20 mg の ComX_{RO-E-2} フェロモンを単離し、各種 NMR スペクトル解析により化学構造を決定した。続いて、計算化学的手法による立体配座解析により立体構造を推定した。さらに、可能性の残された全ての立体異性体を含めた 4 種類の ComX_{RO-E-2} ペプチドをそれぞれ合成した結果、推定構造を有する ComX_{RO-E-2} ペプチドのみの NMR スペク

トルや生物活性が、天然フェロモンと一致した。以上の結果から ComX_{RO-E2} フェロモンの絶対立体化学を含めた化学構造を決定することができた (図 2)。^[1,2]

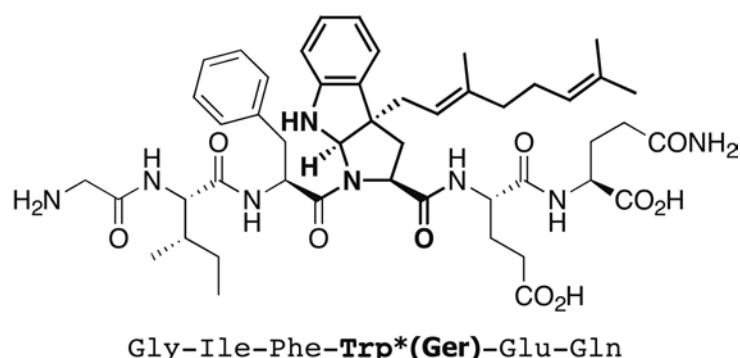


図 2. ComX_{RO-E2} フェロモンの化学構造

ComX_{RO-E2} フェロモンはトリプトファン残基のインドール環の 3 位がゲラニル化されており、さらに、新たにプロリン様の 5 員環が形成しているというユニークな化学構造であった。この修飾様式はトリプトファン残基における新規翻訳後修飾であるだけでなく、翻訳後修飾によるゲラニル化の初の報告例であった。

続いて ComX_{RO-E2} フェロモンの構造活性相関研究を行った結果、修飾トリプトファン以外の他のアミノ酸残基は活性発現にそれほど重要ではないことが明らかとなった。^[3] 一方、修飾トリプトファン残基は立体化学を含めた厳密な化学構造が活性発現に必須であることが明らかとなった。^[3,4] これは既知のシステインイソプレニル化ペプチドとは大きく異なった傾向で、ComX_{RO-E2} フェロモンにおけるゲラニル修飾が、単に細胞表面へのアンカーとしての役割だけでなく、受容体との特異的結合に直接関与していることが強く示唆された。さらに、他の菌株由来の ComX フェロモンの化学構造の決定を行い、ComX フェロモンの修飾様式が、トリプトファン残基の環化を伴うゲラニル化とファルネシル化の 2 種類であることを明らかにした。^[5,6] この結果から、ComX フェロモンの種特異的活性発現の要因は、アミノ酸配列よりもむしろイソプレニル側鎖の炭素数であると考えられた。

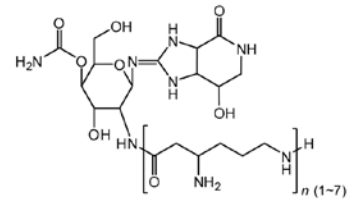
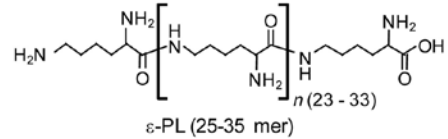
謝辞

本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科・生理活性物質化学研究室にて行われたものです。日本の農芸化学の伝統である"ものとり"を主体として研究を展開していき、名誉ある農芸化学奨励賞を受賞できたことは筆者にとって望外の喜びであります。興味深いテーマを与えて下さり、終始ご指導を頂きました坂神洋次教授に厚く御礼申し上げます。また、小鹿一教授、松林嘉克准教授を初めとするスタッフの皆様、共に研究を行った研究室の諸氏、共同研究者である D. Dubnau 博士に感謝申し上げます。最後に、ご推薦下さいました日本農芸化学会中部支部長 小林哲夫教授、並びにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

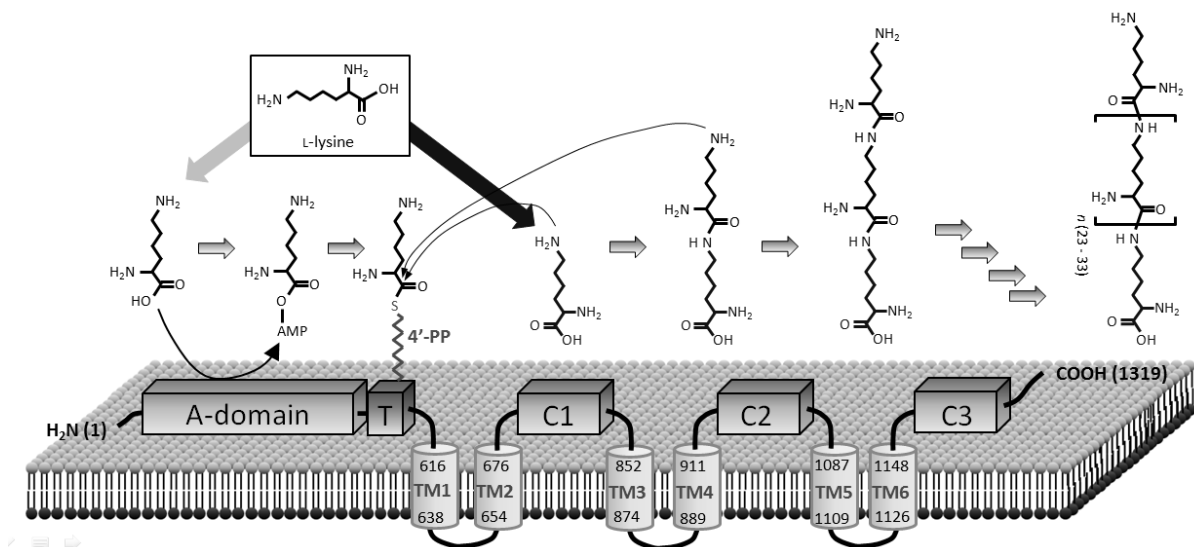
参考文献

- [1] M. Okada, I. Sato, S.J. Cho, H. Iwata, T. Nishio, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 23-24 (2005).
- [2] M. Okada, I. Sato, S.J. Cho, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Tetrahedron*, **62**, 8907-8918 (2006).
- [3] M. Okada, H. Yamaguchi, I. Sato, S.J. Cho, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 1705-1707 (2007).
- [4] M. Okada, I. Sato, S.J. Cho, Y. Suzuki, M. Ojika, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2374-2387 (2004).
- [5] M. Okada, H. Yamaguchi, I. Sato, F. Tsuji, J. Qi, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1807-1810 (2007).
- [6] M. Okada, H. Yamaguchi, I. Sato, F. Tsuji, D. Dubnau, Y. Sakagami. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **72**, 914-918 (2008).

【はじめに】天然に存在するホモポリアミノ酸は、たった2種類しか知られていない。すなわち、枯草菌が生産するポリ- γ -グルタミン酸 (納豆のネバネバ成分) と ϵ -ポリ-L-リジン (ϵ -PL) である。放線菌が生産する ϵ -PLの化学構造は、そのペプチド鎖長に多様性があることを除けば、極めて単純と言えるが、その生合成メカニズムは長らく未解明のままであった。最近我々は、 ϵ -PL合成酵素 (Pls) を同定し、本酵素が極めて新奇性の高い非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) であることを明らかにした (Yamanaka K *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 4, 766-772, 2008)。さらに、 β -リジンのホモオリゴマー構造を有する抗生物質ストレプトスリシン (ST) について、STの生理活性における β -リジンオリゴマー構造の重要性を明らかにすると共に (Hamano Y. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281, 16842-16848, 2006)、その生合成に関与する新規ペプチド合成酵素の存在を示唆している。本講演では、これら新規アミノ酸ホモポリマー合成酵素の触媒機能について紹介する。



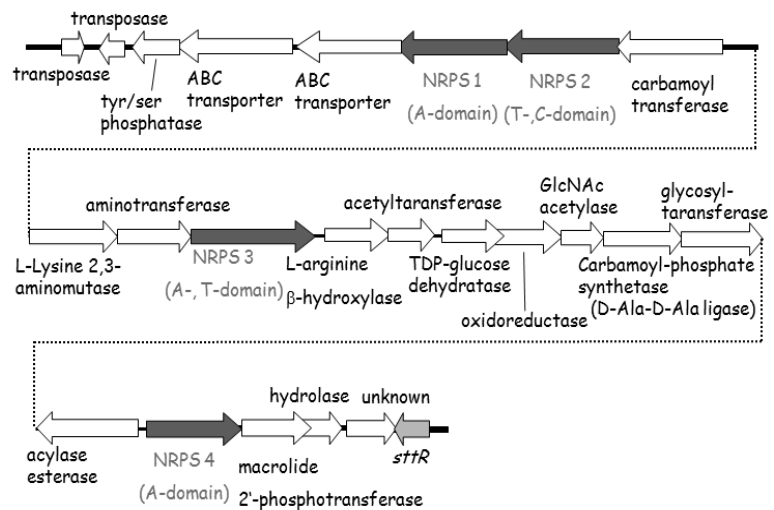
【Plsの同定とその反応機構】放線菌 *Streptomyces albulus*の二次代謝産物として生産される ϵ -PLは、L-リジンがイソペプチド結合でつながった25~35残基からなる直鎖状のアミノ酸ホモポリマーである。Plsの活性は膜画分に認められたことから、膜画分からの各種クロマトグラフィーによるPlsの精製を種々検討した。精製には困難を極めたが、SDS-PAGE上で単一バンドとして精製することに成功し、*in vitro*の反応において ϵ -PLの生成を確認した。本酵素の内部アミノ酸配列を決定し、定法に従って本酵素遺伝子 (*pls* 遺伝子) の取得を行った。また、本遺伝子の破壊株は ϵ -PLを生産しないことから、実際に ϵ -PL生合成遺伝子であることを明らかにした。*pls* 遺伝子



産物 (P1s) のドメイン解析を行ったところ、N 末側領域に基質アミノ酸の活性化 (アデニル化) に関与する A-ドメイン、そして、活性化アミノ酸の結合ドメインである T-ドメインが存在した。これらドメインは、ペプチド系抗生物質の生合成に関与する NRPS に認められるドメインであることから、P1s は NRPS 関連酵素であることが判明した。しかしながら、NRPS のペプチド合成ドメインとして知られている C-ドメインと相同性を示すものは P1s には存在しておらず、興味深いことに、NRPS としては初めての例となる 6 ケ所の膜貫通ドメインが見出された。さらに、これら膜貫通ドメインによって挟まれた 3 つのタンデムドメイン (C1-, C2-, C3-ドメイン) が存在し、これらドメインが L-リジンポリマー化におけるペプチド合成を触媒することが判明した。

【ST 生合成におけるβ-リジンオリゴマー合成酵素】 タンパク質合成阻害剤として知られている ST は、その構造に 1~7 残基のβ-リジンからなるホモオリゴマーを有していることを特徴としており、そのオリゴマー鎖長が長いほど ST の抗菌活性および細胞毒性が強くなることが知られている。このように、生理活性に大きな影響を与えるβ-リジンオリゴマーについて、その生合成

メカニズムは大変興味深く、その解明を試みた。ST 生産菌である *Streptomyces rochei* NBRC12908 のゲノムライブラリーより、ST 自己耐性遺伝子 (*sttR* 遺伝子) を含むゲノム断片を有するコスミドを取得した。本コスミドの全塩基配列を決定したところ、NRPS 遺伝子を含む遺伝子群が見出され、ST 生合成の一部に NRPS が関与していると推測された。さらに、



本コスミドを異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に導入した結果、ST 化合物を生産したことから、このゲノム断片には ST の生合成に必要な全ての遺伝子セットが含まれていることを明らかにし、また、全ての ST 生合成遺伝子を同定できた初めての例である。

ST 生合成遺伝子クラスター内に存在する 4 つの NRPS 遺伝子において、A-ドメインは 3 つ存在する (NRPS 1、NRPS 3、NRPS 4)。そこでこれら 3 つの A-domain の組換え酵素を構築し、各種アミノ酸における基質特異性を評価した。その結果、NRPS4 がβ-リジンに特異的な活性を示した。さらに、オリゴマー合成に関与する他の酵素遺伝子を探索するために、コスミド上の各遺伝子を破壊した破壊コスミドを構築し同じく *S. lividans* TK23 に導入し、その導入株における ST 生産性を評価した。その結果、NRPS1 遺伝子破壊コスミドの導入株において、ST-F のみの生産を確認したことからオリゴマー合成への関与を強く示唆した。そこで、NRPS1、2、4 それぞれの組換え酵素を構築し、*in vitro* でのβ-リジンオリゴマー合成を試みた。その結果、これらの 3 つの酵素すべてを用いた条件でのみβ-リジンオリゴマーの合成が観察され、これら 3 つの酵素がオリゴマー合成を触媒していることを明らかにした。これまでに、通常知られている NRPS が繰り返し反応にてアミノ酸のホモオリゴマー化を触媒する例は報告されておらず、本酵素群は、新規ペプチド合成機構を有する NRPS 様酵素である可能性を見出すことができた。

石川での微生物・酵素研究

熊谷 英彦（石川県大・生資工研）

京都大学を定年になって、石川県へ来て 7 年目です。この間に公表されたデータを中心に微生物と酵素に関する研究の紹介をしたいと思います。実際には、私がやった研究ではなく、私の周りの人たちがやった研究です。

1) 大腸菌の γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) に関する研究

GGTは、グルタチオンを基質としてその γ -グルタミル結合を加水分解する酵素でありまして、広く動植物、微生物に存在し、生体内で解毒や抗酸化、システイン供給などの重要な機能を果たしている酵素です。動物での研究が先行しましたが、動物の GGT は膜結合型であり、糖鎖が存在し結晶がとれず、構造解析が出来ませんでした。私達は、大腸菌にこの酵素を見つけ、活性中心アミノ酸残基を明らかにし、反応機構を解明しました。さらに GGT の自己プロセッシングの機構も明らかにしました。また、この酵素の結晶構造解析に成功し、 γ -グルタミル酵素中間体の捕捉解析にも成功しました。反応機構や自己プロセッシングの機構解明も三次元構造のレベルでなされました。またこの結果は、ピロリ菌の GGT の構造解析にも役立ちました。

2) Puu 代謝経路の発見と関連タンパク質の性質解明

大腸菌には GGT 以外に γ -グルタミル化合物の分解活性があることに端を発し、ポリアミンの一種であるプトレシンの新しい代謝経路を見つけることができました。この経路では細胞外のプトレシンが細胞内で γ -グルタミル化を経て全部で5段階の酵素反応により、コハク酸セミアルデヒドにまで分解されます。この代謝経路に含まれるタンパク質の遺伝子は、7つの遺伝子を含むクラスターを作って存在しています。これらのタンパク質は、トランスポーターが1つ、転写調節因子が1つ、あとは、ATP 依存性 γ -グルタミルプトレシン (γ -GluPut) 合成酵素、 γ -GluPut 酸化酵素など5段階の酵素反応を触媒する酵素です。この経路は細胞内で γ -アミノブチルアルデヒドの自然閉環を防ぎつつ、細胞外プトレシンを栄養源として利用するためのものと考えられます。

3) 耐熱性セルラーゼに関する研究

自然界に大量に存在する未利用バイオマス、リグノセルロースの有効利用を目指して、耐熱性セルラーゼ群のクローニング、酵素の性質解明、耐熱性酵母での発現等を行って来ました。耐熱性酵母ではその β -グルコシダーゼの結晶構造解析に成功しました。

以下は現在進行中でありますのでタイトルだけにします。

4) 微生物アミノ酸脱炭酸酵素の研究と植物アルカロイドの微生物による生産

5) 豆腐ホエーでの乳酸菌培養とおからの乳酸菌発酵物の利用

6) 石川県の伝統発酵食品の微生物叢解析、機能性の顕在化、新規発酵食品、新規発酵プロセスの開発

ヒトの糖質に作用するビフィズス菌のグリコシダーゼ

—その作用と生理的意義—

片山高嶺 (石川県大・生資工研)

[はじめに]

ビフィズス菌は健康なヒトの腸管に生息し、整腸作用や抗感染症作用など宿主に良い影響を及ぼすプロバイオティクスとして知られている。また最近では、抗アレルギー作用や抗腫瘍作用なども報告されており、宿主腸管内での免疫調節機能の点からも注目されている。ビフィズス菌は宿主の小腸下部から大腸に生息しているが、宿主が摂取した糖成分は宿主自身による消化吸収および消化管上部に生息する腸内細菌によって消費されてしまうため、本菌の生息する消化管下部には容易に分解し得る糖成分はほとんど届かない。そのため、ビフィズス菌は多種多様な糖質分解酵素(グリコシダーゼ)を分泌生産して、難分解性とされる糖成分から栄養を獲得している。

我々は、宿主腸管内における本菌の生息を理解するためには、その特異な糖代謝経路を理解することが重要であると考えて研究を行ってきた。その過程で、ある種のビフィズス菌がヒト由来の糖質に作用する特異なグリコシダーゼ群を分泌発現していることを見出した。従来、ビフィズス菌は食餌性由来の難分解性オリゴ糖を利用して腸管内で生息していると考えられていたが、実はヒト自身が分泌する糖質を利用しているとも考えられ、「ヒトとビフィズス菌の共生」を考える上で新たなパラダイムとなった。本講演では、以下に述べる「ヒトミルクオリゴ糖」の資化経路を中心に、ビフィズス菌とヒト(特に乳児)との共生を支える分子基盤について紹介したい。

[母乳栄養児とビフィズス菌、およびヒトミルクオリゴ糖]

母乳栄養児の腸管は、生後速やかにビフィズス菌寡占状態になることが知られており(ビフィズスフローラの形成)、このことは乳児の腸管の発達や感染症からの防御に重要な役割を果たしている。このビフィズス菌の選択的増殖には、母乳に含まれているオリゴ糖成分(ヒトミルクオリゴ糖)が関与していることが50年以上も前の研究から示唆されていたが、その分子基盤は全く明らかとなっていなかった。

ヒトミルクオリゴ糖は、ラクトース・脂質に次ぐ3番目に多い成分として母乳中に10~20 g/L程度含まれているが、乳児自身はこれを栄養とすることは出来ない。現在までに100種類を超えるヒトミルクオリゴ糖分子種が同定されており、その主成分は2'-フコシルラクトース、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-フコペンタオース I、および、ラクト-N-ジフコヘキサオース I であることが知られている。このうち後者3種は1型糖鎖とよばれる Gal β 1, 3GlcNAc 構造(ラクト-N-ビオース I 構造)を非還元末端側に有しており、この構造は哺乳類の中でも人乳にのみ多量に含まれているこ

とが特徴である。

[ビフィズス菌に特異的なヒトミルクオリゴ糖資化経路]

我々は、*Bifidobacterium bifidum*や*B. longum*といったヒト乳幼児の腸管に生息するビフィズス菌が、1型糖鎖構造を有するラクト-N-テトラオースをラクト-N-ビオース I とラクトースに分解する酵素ラクト-N-ビオシダーゼを分泌発現することを見出し、本酵素の構造機能解析を行った。一方、食品総合研究所の北岡らは*B. bifidum*や*B. longum*の細胞質よりラクト-N-ビオース I を加リン酸分解する酵素ラクト-N-ビオース I ホスホリラーゼを単離していた。つまり、これらのビフィズス菌は細胞外においてはラクト-N-ビオース I を遊離する酵素、および細胞内においてはラクト-N-ビオース I を代謝する酵素を有していることとなり、このことからラクト-N-ビオース I を選択的に取り込むトランスポーターの存在が示唆された。ラクト-N-ビオース I ホスホリラーゼ遺伝子上流を調べたところABCトランスポーターをコードすると推察される遺伝子クラスターが存在しており、構造機能解析の結果、予想通りラクト-N-ビオース I トランスポーターであることが明らかとなった。次に、これら酵素群の生理機能を調べる目的で、人乳より単離したミルクオリゴ糖混合物を炭素源として*B. bifidum*を培養し、その上清中のオリゴ糖成分を解析した。その結果、*B. bifidum*における1型糖鎖の優先的な資化が確認された。

これらのことから、ある種のビフィズス菌は、1型ヒトミルクオリゴ糖に特異的な資化経路を有していること明らかとなった。注目すべきは、ラクト-N-ビオシダーゼおよびラクト-N-ビオース I トランスポーターのホモログが、これまで知られている腸内細菌ゲノム中ではビフィズス菌ゲノム中にしか存在しないこと、および、ビフィズス菌以外のほとんどの腸内細菌がラクト-N-テトラオースなどの1型糖鎖構造を分解できないことである。この事実は、「母乳栄養児の腸管では何故ビフィズスフローラが速やかに形成されるのか」という長年の疑問を解明する糸口となると考えている。

本研究は、山本憲二先生(京都大学・現石川県立大学)、北岡本光先生(食品総合研究所)、浦島匡先生(帯広畜産大学)、芦田久先生(京都大学)、および伏信進矢先生(東京大学)と共に行われたものである。

改変型放線菌由来シトクロム P450 を用いた活性型ビタミン D の生産

榊 利之 (富山県大工・生物工学)

1. はじめに

シトクロム P450 は原核微生物から哺乳動物、高等植物にいたるまで生物界に広く存在するヘム酵素であり、最近のゲノム解析の結果から、きわめて多種類のシトクロム P450 の存在が明らかになった。我々は放線菌 *Streptomyces griseolus* 由来の水溶性シトクロム P450 である CYP105A1 がビタミン D₃ に対して 25 位および 1 α 位を水酸化して活性型ビタミン D₃ を生産することを見出した (図 1) ¹⁾。したがって、CYP105A1 は実用的に魅力的なシトクロム P450 である。しかし、その活性はきわめて低く、実用化にはほど遠いものであったため、活性を上昇させることを試みた。進化工学的手法も有効な手段だと思われるが、我々は、まず、CYP105A1 の立体構造を明らかにし、その構造に基づいて変異導入する方法を選択した。

2. CYP105A の立体構造

CYP105A1 精製標品を用いて 2000 を超える条件を試みた結果、結晶化に成功した。SPring-8 にてシンクロトロンにより X 線回折データの収集を行い、最高分解能 1.5 Å のデータを得た。CYP105A1 は 13 本の α -ヘリックス (A-L) 3 つの β -シートからなり、全体としては典型的なシトクロム P450 の形状、すなわち三角おにぎり形をしていることがわかった ²⁾。全体構造は P450 として最初に立体構造が解明された P450cam によく似ているが、基質の取り込みや基質結合に関与している領域は大きく異なっていた。

3. CYP105A1 と基質のドッキングモデル

基質結合型 CYP105A1 の結晶化が困難であったため、基質であるビタミン D₃ のドッキングモデルを作成した。CYP105A1 はビタミン D₃ に対して 25 位および 1 α 位水酸化活性を示すが、基質であるビタミン D₃ の近傍に存在するアミノ酸残基の中には Leu-180、Val-181、Ile-243、Ile-293 といった疎水性のアミノ酸残基のほかに、特徴的なアルギニン残基 (Arg-73、Arg-84、Arg-193) が存在することが明らかになった。

4. 変異体のビタミン D₃ 水酸化活性

それぞれのアミノ酸残基について Ala 変異体を作製し、基質ビタミン D₃、1 α , (OH)D₃ および 25(OH)D₃ に対する活性を測定した。その結果、L180A、V181A、R193A、I243A において著しい活性低下が認められ、これらのアミノ酸残基が活性に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、R73A や R84A においては、25 位水酸化活性および 1 α 位水酸化活性ともに著しい上昇 (k_{cat}/K_m で 10~30 倍) が見られた。ドッキングモデルから、Arg193 はビタミン D₃ の 3 位の水酸基と何らかの相互作用をし得る距離に存在しており、基質の認識に重要な働きをしている可能性が示唆された。一方、Arg84 はビタミン D₃ の C 環および D 環の疎水性領域の近くに存在しており、正電荷をもつ側鎖部分が基質の結合に悪影響を与えている可能性が考えられた。Arg73 はビタミン D₃ をはさんで Arg84 とは逆側で CD 環と相互作用している可能性が示唆され、Arg84 と同様、側鎖部分が基質結合に悪影響を与えている可能性が考えられた。

5. 二重変異体の活性

Arg73 および Arg84 について種々のアミノ酸に置換した変異体を作製し、活性を比較したところ、それぞれ R73V および R84A が最大活性を示した。次に、二重変異体 R73V/R84A を作製し、その活性を調べたところ、25 位水酸化活性は野生型の約 400 倍、1 α 位水酸化活性は約 100 倍上昇

したことがわかった³⁾。

6. 二重変異体を発現する放線菌を用いた活性型ビタミンDの生産

CYP105A1 の二重変異体 R73V/R84A 遺伝子発現プラスミドを放線菌 *S. lividans* に導入し、チオスプレプトンの添加により発現誘導した。基質ビタミンD₃を添加（終濃度 20 mg/L）したところ、経時的に基質ビタミンD₃が減少し、25-ヒドロキシビタミンD₃（25D₃）および1 α ,25-ジヒドロキシビタミンD₃（1 α ,25D₃）が増加し、24時間後における両者への変換率はそれぞれ40%および15%であった。コントロール株ではこうした変換は見られなかったことから、放線菌内で発現したR73V/R84Aが内在性の電子伝達系との相互作用により活性を発揮し、ビタミンD₃から25D₃を経て1 α ,25D₃に変換したと考えられる。

7. おわりに

CYP105A1の立体構造に基づき変異を重ねることにより、野生型の400倍以上高い活性（25位水酸化活性）をもつ変異体を作製することに成功した。今後、さらに高い活性を有する変異体の作製や培養条件の改良などにより生産性を向上させる予定である。また、立体構造に基づき基質特異性や反応特異性の異なる新規酵素を創製することができれば、骨粗鬆症や癌などの治療薬として期待される新規ビタミンD誘導体の生産に応用できる可能性がある。

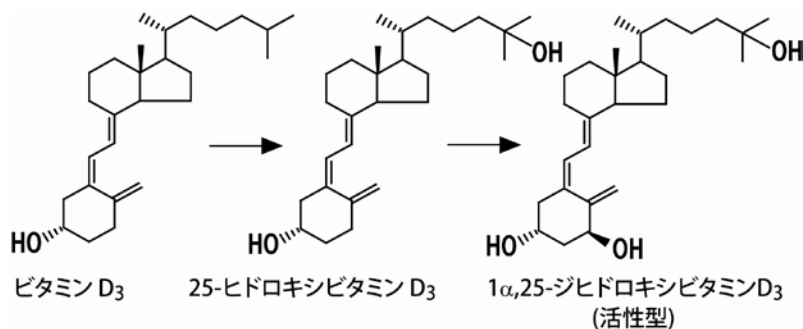


図1 放線菌由来 CYP105A1 によるビタミンD₃から活性型ビタミンD₃への変換

参考文献

- 1) Sawada, N. et al.: *Biochem Biophys Res Commun* 320: 156-164 (2004)
- 2) Sugimoto, H. et al.: *Biochemistry* 47: 4017-4027 (2008)
- 3) Hayashi, K. et al.: *Biochemistry* 47: 11964-11972 (2008)

1. はじめに

色素依存性デヒドロゲナーゼは、電子伝達系などに連結して酸化還元反応を触媒する一群の酵素であり、糖・有機酸・アミノ酸など各種生体成分から電子を取り出す初発酵素として機能している。また生体外では、ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) やフェリシアン化カリウムなど人工の酸化還元色素にその電子を渡すことができる。これらの酵素は、酸化還元色素をメディエータとして基質の電子を電極へ直接導入できることから、バイオセンサーやバイオ電池の素子としての利用が期待されている。しかしながら膜結合性の酵素が多く、総じて不安定であり応用研究は遅れている。さらに、複合体を形成するなど複雑な構造をとるために、機能・構造解析例も少ないのが現状である。

一方、90°C以上の高温で生育可能な超好熱菌の酵素は、極めて耐熱性が高いだけでなく、有機溶剤や種々の薬品処理などに対しても高い安定性を示す。我々は、超好熱菌において色素依存性デヒドロゲナーゼをスクリーニングし、これまでに L-プロリン、D-プロリン、D-乳酸、糖などを基質とする安定性の高い酵素を見出している。これらのうち、超好熱アーキアに分布する色素依存性 L-プロリンデヒドロゲナーゼ (PDH) について、最近の我々の研究成果を中心に述べる。

2. *Thermococcus profundus* の色素依存性 L-プロリンデヒドロゲナーゼ (PDH)

数種の超好熱アーキアを培養し、それらの細胞抽出液を用いて色素依存性デヒドロゲナーゼを検索した。その結果、L-プロリンの脱水素反応を行う PDH を *Thermococcales* 目に属する超好熱アーキアに見出した。そのなかで比活性が最も高かった *T. profundus* を選び、酵素の精製を行った。この酵素は、膜結合性ではなく細胞抽出液中の可溶性画分に存在した。分子質量はゲルろ過法で約 120 kDa、SDS 電気泳動法により 4 種類の異なるバンドが検出され、サブユニットの分子質量はそれぞれ α : 54、 β : 43、 γ : 19、 δ : 11 kDa と算出されたので、 $\alpha\beta\gamma\delta$ 型ヘテロテトラマー複合体構造をとることが明らかになった。本酵素は 70°C の熱処理や pH 4-10 (50°C) の広い pH 領域で失活せず、この種の酵素としては非常に高い安定性を示した。次に遺伝子クローニングを行い、全長の塩基配列を決定した。 $\alpha\beta\gamma\delta$ の各サブユニットの遺伝子はクラスターを形成しており、これと類似した遺伝子クラスターが *Thermococcales* 目のアーキアに特異的に存在することが明らかになった。

3. *Pyrococcus horikoshii* の 2 種の色素依存性 L-プロリンデヒドロゲナーゼ複合体

PDH のスクリーニングの過程において、*P. horikoshii* の Native 電気泳動後の活性染色では、移動度が大きく異なる 2 本の活性バンドが検出できた。このことから、我々は *P. horikoshii* には *Tp*-PDH と同タイプの PDH に加えて、別に新規な PDH が存在すると予想した。これら 2 種類の PDH (電気泳動で移動度が小さい *Ph*-PDH1 と大きい *Ph*-PDH2) をそれぞれ細胞粗抽出液から精製し、両酵素の特徴を解析した。その結果、移動度の大きい *Ph*-PDH2 が *Tp*-PDH と同様の 4 種類のサブユニットからなる酵素であり、移動度が小さい *Ph*-PDH1 は 56 (α) と 43 kDa (β) の 2 種類のサブユニットからなる $\alpha_4\beta_4$ のヘテロオクタマー構造をとることが分かった。この α と β の各サブユニットをコードする遺伝子もクラスターを形成し、*Thermococcales* 目に共通に存在が認められた。

4. *Ph*-PDH1 の X 線結晶構造解析と新規な電子伝達系の存在

X 線結晶構造解析の結果、*Ph*-PDH1 は $\alpha\beta$ ヘテロダイマーが基本となる $(\alpha\beta)_4$ オクタマー構造をとることが明らかになった。また、FAD が β サブユニットに、ATP が α サブユニットに存在し、FMN が α β サブユニットの境界に存在することが明らかになった。

構造解析の結果から、次のような電子伝達系が存在すると考えられる。まず、1) 電子供与体の L-プロリンから、電子が β サブユニットの FAD に取り込まれ FADH₂ が形成される。2) 次に電子は、FAD から 12Å 離れ、 β と α サブユニットの接触面に位置する FMN へと伝達され、さらにその FMN から 12Å の距離にある α サブユニットのシステインクラスタードメインの鉄へと伝達される。3) 最終的に電子は α サブユニット中の疎水性に富むトリプトファンクラスタードメインに結合すると予想される未同定の電子受容体へと流れる。なお、 α サブユニットに存在する ATP の役割については現在のところ不明であるが、電子伝達には直接関与せず、高次構造の保持に関係していることが予想される。

5. 色素依存性デヒドロゲナーゼのバイオセンサーへの応用

超好熱菌由来の色素依存性デヒドロゲナーゼを利用したバイオセンサーを作成したところ、常温下でのセンシングに十分利用可能であることや、常温生物の酵素に比べセンサーの加工時に酵素の劣化が起こりにくいことがわかってきた。データベースによると、超好熱菌には数十種を越える色素依存性デヒドロゲナーゼの存在が示唆されているが、機能や構造についての知見は極めて少なく応用面の研究も始まったばかりである。安定性に優れた超好熱菌酵素の機能・構造解析が進展すれば、バイオセンサーやバイオ電池素子の応用開発において新たな展開が期待できる。

○園元謙二^{1,2}、善藤威史¹ (¹九大院・農、²九大・バイオアーク)

乳酸菌の中には、バクテリオシンと総称される抗菌性ペプチドを生産するものが存在する。乳酸菌バクテリオシンは主にグラム陽性菌の生育を阻害し、発酵食品の保存性の向上に寄与していると考えられている¹⁾。乳酸菌バクテリオシンは一般の抗生物質と比べて低濃度で高い活性を示す一方、無味無臭で、ヒトの体内の消化酵素で分解され、耐性菌を誘導しにくく、さらには安全性の高い乳酸菌によって生産されることから、安全・安心な抗菌剤として食品保存をはじめ、近年では医療や畜水産分野などの多様な用途への利用が期待されている。実際に、最も代表的なバクテリオシンで、乳酸菌 *Lactococcus lactis* の一部の株が生産するナイシン A は世界 50 ヶ国以上で食品保存料として利用されている。ナイシン A は、日本においても 2009 年 3 月 2 日に食品添加物として指定され、今後広く利用されることが予想される^{2,3)}。

乳酸菌バクテリオシンにはさまざまなタイプのものがあり、多様なバクテリオシンを適材適所に利用することで、より高度な微生物制御の実現が期待される。そこで我々は、新奇バクテリオシン生産乳酸菌を探索し、その結果見出された新奇バクテリオシンの構造や特性の解析を行っている。また、乳酸菌バクテリオシンのさまざまな分野への応用にも取り組んでいる。

新奇乳酸菌バクテリオシンの探索

多様な新奇乳酸菌バクテリオシンを獲得するには、バクテリオシンの迅速な評価方法が必要である。そこで、抗菌スペクトルと分子量を指標とした方法を構築した^{4,5)}。すなわち、乳酸菌分離株の培養液上清を試料とした、検定菌 10 株程度に対する抗菌スペクトルの統計学的評価と LC/MS による分子量決定から成る迅速スクリーニング法を確立した (図 1)。本法によって、多数の新奇バクテリオシン生産乳酸菌を得られた (表 1)。特に、ナイシンに匹敵する強力な抗菌活性を有するラクティシン Q、*Lactococcus* 属由来としては初めての環状バクテリオシン、ラクトサイクリン Q を見出した。

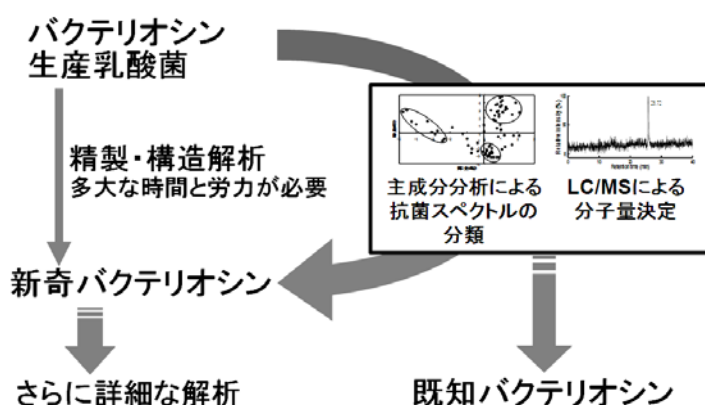
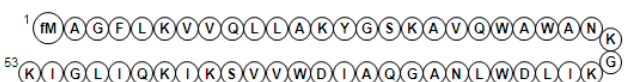


図 1 新奇乳酸菌バクテリオシンの迅速スクリーニング法
バクテリオシン生産乳酸菌の培養液上清レベルで新奇性の評価 (既知バクテリオシンとの判別) を行うことでスクリーニングの迅速化が図られる。新奇性の高いものについては、さらに詳細に解析する。

新奇バクテリオシンの構造・特性の解析

L. lactis QU 5 が生産する新奇バクテリオシン、ラクティシン Q (図 2) は、ナイシン A と同様に広い抗菌スペクトルと強力な抗菌活性を有し、ナイシン A などの多くのバクテリオシンが活性を失うアルカリ条件下を含む広い pH 条件下で安定であった⁶⁾。さらに、ラクティシン Q は、特定のレセプターを必要とせず、細菌細胞膜に巨大な孔を形成して細胞内内容を流出させることで、強力な抗菌活性を示すことが明らかとなった^{7,8)}。一方、*Lactococcus* sp. QU 12 が生産する新奇バクテリオシン、ラクトサイクリン Q (図 2) は、N 末端と C 末端のアミノ酸がペプチド結合した環状構造を有していた⁹⁾。環状構造は抗菌活性に必須であり、高い熱安定性にも寄与していると考え

ラクティシン Q



ラクトサイクリン Q

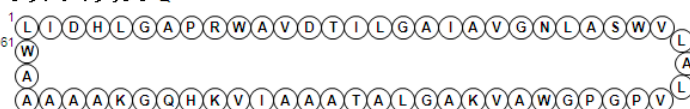


図 2 我々が見出した新奇乳酸菌バクテリオシンの構造
ラクティシン Q は N 末端のメチオニンがホルミル化している。ラクトサイクリン Q は N 末端と C 末端のアミノ酸残基がペプチド結合した環状構造を有する。

えられる。この種の環状抗菌ペプチドの作用機構や環化機構には不明な点が多く、現在、検討を進めている。将来的には、このような多様なバクテリオシンの中から、それらの特性を考慮し用途に応じた最適なバクテリオシンの選択が可能となることが期待される。

表 1. 我々が見出した乳酸菌バクテリオシン (*印は新奇バクテリオシン)

菌種	株名	バクテリオシン	抗菌スペクトル・特徴
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 1 他	ナイシン Z	広い・ランチビオティック
<i>Lactococcus lactis</i>	61-14	ナイシン Q*	広い・ランチビオティック
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 4	ラクトコッシン Q*	<i>L. lactis</i> 特異的・2 ペプチド
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 5 他	ラクティシン Q*	広い
<i>Lactococcus lactis</i>	QU 14	ラクティシン Z*	広い
<i>Lactococcus sp.</i>	QU 12	ラクトサイクリシン Q*	広い・環状
<i>Enterococcus faecalis</i>	NKR-4-1	エンテロシン W*	広い・2 ペプチドランチビオティック
<i>Enterococcus faecium</i>	NKR-5-3	プロコシン A, ペプチド Z* ペプチド B* ペプチド C* ペプチド D*	狭い 広い 中程度 (抗リステリア) 狭い (生産誘導活性)
<i>Enterococcus faecium</i>	KU-B5	エンテロシン X* エンテロシン A, B	中程度・2 ペプチド 中程度 (抗リステリア)
<i>Enterococcus faecium</i>	WHE81	エンテロシン A, B	中程度 (抗リステリア)
<i>Enterococcus mundtii</i>	QU 2	ムンジチシン	中程度 (抗リステリア)
<i>Enterococcus durans</i>	QU 49	デュランシン TW49-M*他	狭い、誘導ペプチドも存在
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	TISTR 536	ペディオシン PA-1	中程度 (抗リステリア)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	QU 15	ロイコシン A, Q*, N*	中程度 (抗リステリア)
<i>Weissella hellenica</i>	QU 13	ワイセリシン Y*, M*	中程度

乳酸菌バクテリオシン活用への取組み

経済産業省・地域新生コンソーシアム研究開発事業等によってナイシンの利活用の基盤を確立し、手指用殺菌洗浄剤 (写真 1) 等を開発した。特に、ナイシンの活性と安定性について、最適な配合剤の選択などを検討し、抗菌性の相乗効果なども確認され、既存品と同等以上の優れた製品が調製できた¹⁰⁾。

また、医療分野や畜産分野等への展開も図っている。乳房炎は酪農経営の収益性を左右する重大な疾病であり、ナイシンを利用した牛乳房炎の予防剤・治療剤を開発した (農林水産省・先端技術を活用した農林水産研究高度化事業)。ナイシンとクエン酸などから成る乳房炎予防剤 (乳頭消毒剤) は規定時間以内 (60 秒) で 99.9% 以上の強力な殺菌効果を乳房炎原因菌に示した¹¹⁾。ナイシンと油性軟膏から成る乳房炎治療剤 (乳房内注入剤) (写真 2) は、潜在性乳房炎および比較的軽度の臨床型乳房炎に対して有効であり、抗生物質に代替する治療薬として期待される¹²⁾。

最近では、特に九州地方で廃棄処理方法が問題となっている焼酎蒸留粕を乳酸菌用の培地として利用し、ナイシンの低コスト大量生産を試みている。さらに、ナイシン分離後の発酵残渣は機能性発酵調味液として使うことができ、ものづくりと廃棄物有効利用を両立した環境調和型生産プロセスの実現 (ゼロエミッション PJ) を展開中である (経済産業省・戦略的基盤技術高度化支援事業)。



写真 1 手指用殺菌洗浄剤



写真 2 乳房炎治療剤

参考文献

- 1) 善藤ら、防菌防黴、**37**, 903-911 (2009).
- 2) 善藤ら、乳業技術、**59**, 77-86 (2009).
- 3) 益田ら、ミルクサイエンス、**59**, 59-65 (2010).
- 4) 澤ら、醸造協会誌、**103**, 223-229 (2008).
- 5) Zendo *et al.*, J. Appl. Microbiol., **104**, 499-507 (2008).
- 6) Fujita *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., **73**, 2871-2877 (2007).
- 7) Yoneyama *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., **75**, 538-541 (2009).
- 8) Yoneyama *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother., **53**, 3211-3217 (2009).
- 9) Sawa *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., **75**, 1552-1558 (2009).
- 10) 特開 2007-99809.
- 11) 特願 2009-121295. 12

平成 22 年度農芸化学会中部支部役員
(平成 22 年 6 月現在)

- 支部長 小林哲夫 名古屋大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Phone: 052-789-4085, E-mail: koba@agr.nagoya-u.ac.jp
- 副支部長 牧 正敏 名古屋大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Phone: 052-789-4088, E-mail: mmaki@agr.nagoya-u.ac.jp
- 副支部長 山口庄太郎 天野エンザイム株式会社
〒509-0108 岐阜県各務原市テクノプラザ 1 丁目 6 番
天野エンザイム株式会社 岐阜研究所 産業用酵素開発部
Phone: 058-379-1222, Fax: 058-379-1227, E-mail: syamaguc@amano-enzyme.ne.jp
- 庶務幹事 松林嘉克 名古屋大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Phone: 052-789-4117, E-mail: matsu@agr.nagoya-u.ac.jp
- 庶務幹事 灘野大太 名古屋大学大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Phone: 052-789-4130, E-mail: nadano@agr.nagoya-u.ac.jp
- 会計幹事 山篠貴史 名古屋大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Phone: 052-789-4090, E-mail: yamasino@agr.nagoya-u.ac.jp
- 支部監事 山上圭吾 株式会社ミツカングループ本社
〒475-8585 愛知県半田市中村町 2-6 株式会社ミツカングループ本社中央研究所
Phone: 0569-24-5139, Fax: 0569-24-5029, E-mail: kyamagami@mizkan.co.jp
- 支部監事 前島正義 名古屋大学院生命農学研究科
〒464-8601 名古屋市千種区不老町
Tel: 052-789-4096, E-mail: maeshima@agr.nagoya-u.ac.jp

日本農芸化学会中部支部 維持会員企業（五十音順）

	アサヒビール（株）名古屋工場	http://www.asahibeer.co.jp/
	旭松食品（株）食品研究所	http://www.asahimatsu.co.jp/
	アステラス製薬（株）CSR 部	http://www.astellas.com/jp/
	天野エンザイム（株）岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/index.html
	イチビキ（株）研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	（株）伊藤園中央研究所	http://www.itoen.co.jp/
	伊藤忠製糖（株）	http://www.itochu-sugar.com/
	科研製薬（株）生産技術研究所	http://www.kaken.co.jp/
	加藤化学（株）	http://www.katokagaku.co.jp/
	カネハツ食品（株）技術部	http://www.kanehatsu.co.jp/
	（株）岐阜セラツク製造所	http://www.gifushellac.co.jp/
	キリンビール（株）名古屋工場	http://www.kirin.co.jp/
	金印（株）	http://www.kinjirushi.co.jp/
	サンエイ糖化（株）	http://www.sanei-toka.co.jp/
	サンジルシ醸造（株）	http://www.san-j.co.jp/
	（株）三和化学研究所三重研究所	http://www.skk-net.com/
	（株）J-オイルミルズ	http://www.j-oil.com/
	敷島スターチ（株）	http://www.shikishima-starch.co.jp/index.html
	新日本化学工業（株）	http://www.e-snc.co.jp/
	太陽化学（株）研究所	http://www.taiyokagaku.com/jp/index.html
	大和製罐（株）清水研究所	http://www.daiwa-can.co.jp/

	竹本油脂（株）情報調査室	http://www.takemoto.co.jp/
	竹屋（株）研究所	http://www.takeya-miso.co.jp/
	東海物産（株）食品研究所	http://www.tokaibsn.co.jp/
	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所	http://www.toyobo.co.jp/index.htm
	中日本冰糖（株）	http://www.nakahyo.co.jp/
	名古屋製酪（株）	http://www.sujahta.co.jp/
	物産フードサイエンス（株）	http://www.bfsci.co.jp/
	（株）ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/
	日本食品化工（株）研究所	http://www.nisshoku.co.jp/
	フジ日本精糖（株）	http://www.fnsugar.co.jp/
	フジパン（株）本社生産部	http://www.fujipan.co.jp/company/index.html
	（株）ポッカコーポレーション	http://www.pokka.co.jp/
	三井農林（株）食品総合研究所	http://www.mitsui-norin.co.jp/
	（株）ミツカングループ本社	http://www.mizkan.co.jp/company/
	名糖産業（株）	http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/index.html
	盛田（株）小鈴谷工場	http://www.moritakk.com/
	焼津水産化学工業（株）	http://www.yskf.jp/
	ヤマモリ（株）	http://www.yamamori.co.jp/
	養命酒製造（株）中央研究所	http://www.yomeishu.co.jp/

会場案内図



日本農芸化学会中部支部第 158 回例会要旨集

平成 22 年 6 月発行

発行所 日本農芸化学会中部支部

〒464-8601

名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科内

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~jsbba/>