



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
日本農芸化学会創立 90 周年・中部支部創立 60 周年記念
第 171 回例会

講演要旨集

ミニシンポジウム

生物機能をひもとく
ケミカルバイオロジー研究の最前線

および

一般ポスター発表

平成 26 年 10 月 11 日(土)
会場: 名古屋大学シンポジオン

13:00 開会の辞 中部支部支部長 小鹿 一
会長挨拶 日本農芸化学会会長 清水 誠
支部功労者表彰

ミニシンポジウム

「生物機能をひもとくケミカルバイオロジー研究の最前線」

13:15 「DNA グアニン四重鎖を標的とするケミカルバイオロジー研究」
長澤 和夫(東京農工大学大学院)

14:00 「タンパク質膜挿入の鍵を握る糖脂質」
島本 啓子(サントリー生命科学財団)

15:00 一般ポスター発表

16:30 中部支部学術奨励賞および中部支部企業奨励賞表彰式
懇親会

ミニシンポジウム

生物機能をひもとく ケミカルバイオロジー研究の最前線 (S01, S02)

- S01 DNA グアニン四重鎖を標的とする
 ケミカルバイオロジー研究
 長澤 和夫(東京農工大学大学院)
- S02 タンパク質膜挿入の鍵を握る糖脂質
 島本 啓子(サントリー生命科学財団)

DNA グアニン四重鎖を標的とするケミカルバイオロジー

長澤和夫（東京農工大学大学院）

遺伝子の発現は、転写因子とよばれるタンパク質により調節され、これにより様々な生命活動が制御されていることはよく知られている。一方最近、核酸の特殊な構造の一つであるグアニン四重鎖 (G-quadruplex、以下 G-q と略す) が関与する、新たな転写調節機構が発見された。これを契機に G-q 構造は、生命現象を司る新たな因子として注目されている。また G-q とがんとの関連も見いだされており、G-q は現在、がんの分子標的としても盛んに研究されている。

グアニン残基を豊富に含む DNA の一本鎖配列において、一価のカチオン（ナトリウムやカリウムなど）が存在すると四分子のグアニン残基が Hoogsteen 型塩基対を介して G-quartet とよばれる平面構造を形成する。これが π - π 相互作用を介して層状に重なることで（通常三層構造）、G-q 構造が形成される。

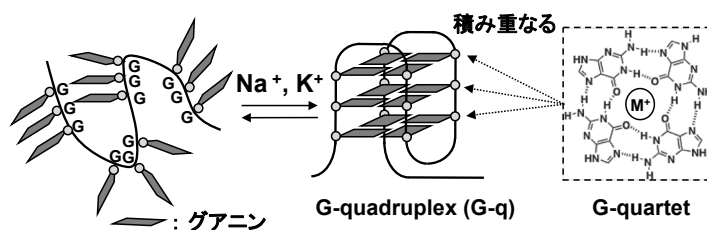


図1 グアニン残基が豊富な配列で形成される G-quartet 平面とグアニン四重鎖の構造

G-q 構造を形成する配列は、当初テロメア領域から発見されたが、その後がん関連遺伝子のプロモーター領域 (*c-myc*, *c-kit*, *bcl-2*, *k-ras* 等) から約十種類の配列が見いだされた。これらの G-q は、構造安定化によりタンパク質との結合もしくは解離が促進され、G-q に由来する機能が制御される。現在、G-q を形成する可能性のある DNA 配列は、配列相同性解析から、ヒト遺伝子プロモーターの約 40%以上に存在することが示唆されている。

これらの背景の中で、私達は低分子化合物を用いて G-q を選択的に安定化することで、(a) G-q に由来する生命現象の制御、また (b) 新たな G-q 形成配列の探索研究、を行っている。

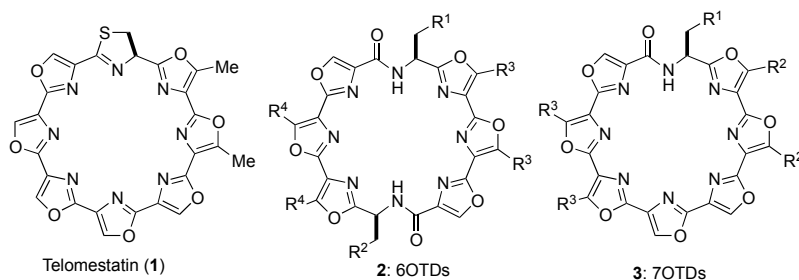


図2 Telomestatin (1) およびその合成誘導体 6OTD (2)、7OTD (3) の構造

本講演では、放線菌の二次代謝産物から単離された天然 G-q リガンド Telomestatin (1) の構造をもとに合成展開した、6OTD (2)、7OTD (3) について、G-q 機能制御に関する最近の知見¹⁾、G-q 形成配列の網羅的探索法に関する成果²⁾について述べる。

参考文献: (1) K. Iida, K. Nagasawa, *The Chemical Record*, **2013**, 13, 539. (2) K. Iida, T. Nakamura, W. Yoshida, M. Tera, K. Nakabayashi, K. Hata, K. Ikebukuro, K. Nagasawa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, 52, 12052.

タンパク質膜挿入の鍵を握る糖脂質

島本 啓子（公益財団法人 サントリー生命科学財団）

膜タンパク質が正常な機能を発現するには、細胞内のリボゾームで合成されたタンパク質が正しい三次元構造と配向性をもって細胞膜へ挿入される必要があり、その挿入機構の解明は生命現象の理解という点から重要な課題である。一般に、リボゾームで翻訳されたタンパク質は、トランスロコンという複数のタンパク質群によって構成される膜透過/挿入装置を介して膜へ導入される。細菌類においては、Sec と呼ばれるトランスロコンに依存する経路と依存しない経路の 2 種類が知られているが、最近我々は、どちらの経路にも必須の新たな因子を大腸菌内膜から見出し、その機能から MPIase (Membrane Protein Integrase)と命名した(図 1a)。

この新規膜挿入因子 MPIase を大腸菌内膜から精製したところ、酵素様活性にもかかわらず、MPIase はタンパク質構造をもたないことが明らかになった。MS, NMR を組み合わせて構造解析を進め、3 種のアミノ糖から成るユニットが 10 回程度繰り返した糖鎖部とジアシルグリセロールがピロリン酸を介して結合した糖脂質であると推定した。次いで 3 糖ユニット部を化学合成し、糖の結合位置とアノマー位の立体配置を図 1b のように確定させた。さらに、構造活性相関を調べるために、化学変換や酵素により MPIase の脂質部を除去したところ、天然型よりも強い挿入活性を示すことが分かった。MPIase の糖鎖部が翻訳直後の膜タンパク質と相互作用して凝集を防ぎ、膜挿入が可能なタンパク質構造を維持すると考えられる(図 1c)。これまでに、糖脂質が膜挿入に関わることは知られておらず、我々は、glycolipozyme (糖脂質酵素) という新しい概念を提唱した。

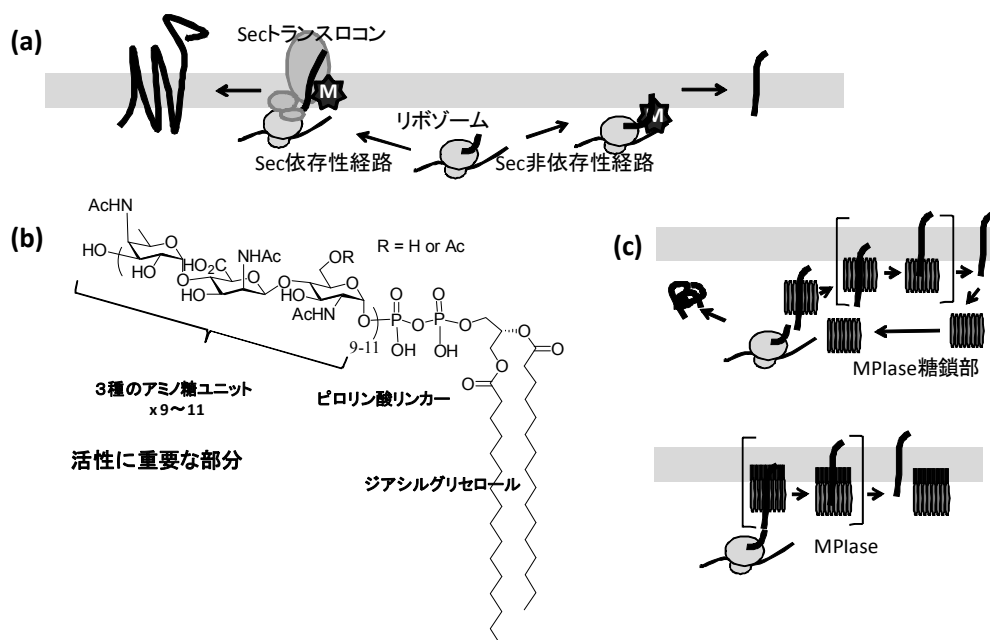


図 1 (a)大腸菌膜タンパク質挿入機構：Sec トランスロコン依存性・非依存性のどちらの経路にも、新規に見出した挿入因子 MPIase (M)が必須である。(b) MPIase の化学構造 (c) 推定される挿入機構：上 糖鎖部がリボゾームから翻訳されてくるタンパク質を捕捉して凝集を防ぎ、挿入可能な構造を維持する。膜にターゲットする過程([]内)は推定。下 天然型 MPIase も同様に膜上で会合し、タンパク質を捕捉する機構が推定される。

Nishiyama K. et al., *Nature Commun.* **3**, 1260, Doi: 10.1038/ncomms2267 (2012).

一般ポスター発表

(P01～P65)

P01

イメージング質量分析による食品機能性成分の局在解析
○平 修, 植松 宏平, 高橋 正和, 片野 肇 (福井県大生物資)

【目的】

食品に含まれる機能性成分がリッチな部位は経験的に分かっているながらも、低分子化合物が多く、抗体などの作成が難しい。そのため、免疫染色のように科学的に、かつ 2 次元的に成分リッチな部位を視覚的に表すことは困難となっている。

我々はこれまで、「イメージング質量分析」¹⁾という新規手法で、食品成分の可視化、食品成分摂取後の体内動態²⁾を、抗体、蛍光物質を用いずに示してきた。本研究では、食品（主に野菜）に含有する成分群を視覚的に示す事で簡便な食品評価技術の確立を目的とする。

【方法・結果】

イメージング質量分析を用いて、トウガラシ、ジャガイモなどの野菜に含まれる、カプサイシン類、または天然毒で知られるソラニン類の局在を解析した。

その結果、視覚的に、トウガラシ含有カプサイシン³⁾は、胎座（中心にある芯）に、ソラニン類はジャガイモの芽の表面および周皮に局在していることが明らかとなった。

- 1) S. Taira, Y. Sugiura, S. Moritake, S. Shimma, Y. Ichianagi, M. Setou. Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Anal. Chem.* 80: 4761-4766, 2008.
- 2) S. Taira, M. Hashimoto, K. Saito, O. Shido. Visualization of decreased docosahexaenoic acid in the hippocampus of rats fed an n-3 fatty acid-deficient diet by imaging mass spectrometry. *J. Biophys. Chem.* 3: 221-226, 2012.
- 3) S. Taira, S. Shimma, I. Osaka, D. Kaneko, Y. Ichianagi, R. Ikeda, Y. Konishi-Kawamura, S. Zhu, K. Tsuneyama, K. Komatsu. Mass Spectrometry Imaging of the Capsaicin Localization in the Capsicum Fruits. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind* 1: 61-65, 2012.

P02

微細水滴の過冷却現象を利用した微生物の低温保存の検討
○山根 克己, 岩本 悟志, 中川 智行, 山内 亮 (岐阜大院・応生科・応用生命)

【目的】

微生物を凍結して保存する方法は有効であるが、長期の保存は氷結晶が成長して細胞に損傷を与える。微細な空間に閉じ込められた水は、過冷却解除温度が低下することが報告されている。そこで、本研究では 0℃以下でも氷結晶が生じない水の過冷却現象に着目し、微細水滴内に微生物を内包させた油中水滴型(W/O)エマルションを作成して、過冷却現象を利用した微生物の低温保存について検討した。

【方法・結果】

微生物のモデルとして出芽酵母野生株 BY4741 を用いた。酵母を内包する W/O エマルションは、水相には培養した BY4741 株を含む YPD 液体培地を、油相には乳化剤を溶解した n-ヘプタン溶液として、ボルテックスミキサーあるいは貫通型マイクロチャネル(MC)基板を用いて調製した。W/O エマルションの微細水滴過冷却解除温度は、示差走査熱量計を用いて測定した。

酵母内包 W/O エマルションは、ボルテックスミキサーを用いて調製した場合には多分散エマルションであったが、MC 基板を用いて調製すると液滴径が均一な単分散エマルションが調製できた。この単分散エマルションの過冷却解除温度は-35℃であった。調製した 2つの酵母内包エマルションを-10℃で保存した結果、多分散エマルションでは氷結晶が生じたが、単分散エマルションでは 1 週間後でも氷結晶は生じなかった。1 週間後の酵母生存率をメチレンブルー染色法により測定したところ、単分散エマルションに内包した場合の生存率は、多分散エマルション中に保存した場合に比べて高い値を示した。以上の結果より、液滴径の均一な微細水滴に酵母を内包することで、過冷却状態での低温保存の可能性が示された。

Methylobacterium 属細菌の REE 依存的メタノール代謝は自然界に広く分布している
 ○日比野歩美¹, 山浦瑞穂², 早川享志¹, 中川智行¹, 田中三男², 三井亮司² (¹岐阜大応生, ²岡山理大理)

【目的】

植物葉上主要共生細菌である *Methylobacterium* 属細菌は、植物が蒸散するメタノールを主要な炭素源として利用できるメチロトロフの一種である。私たちは *M. extorquens* AM1 株がレアアース (REE), 特に軽希土類の La, Ce, Pr, Nd に依存的なメタノール代謝を持つことを示し、その鍵酵素メタノールデヒドロゲナーゼ (MDH) が REE を補因子として要求することを解明してきた¹⁾。一方、*Methylobacterium* 属細菌は 40 種以上知られており、AM1 株だけの解析では REE 依存的メタノール代謝が *Methylobacterium* 属細菌において普遍的な能力なのか、さらには自然界に広く分布するかどうかは明らかにはできない。そこで、本研究では *Methylobacterium* 属細菌における REE 依存的メタノール代謝の自然界における分布とその分子系統解析を行った。

【方法・結果】

自然界から *Methylobacterium* 属細菌を採取し、Ca および La に依存したメタノール生育能を観察した。その結果、単離された株は (1) Ca と Ca+La で生育が変わらないグループ I, (2) La を添加することで Ca より生育が良くなるグループ II, (3) Ca では生育を示さず、La のみで生育できるグループ III, に分類できた。また、グループ III の菌株は、16S rDNA 配列による系統樹だけでなく、*xoxF* の配列による系統樹においても独立したクラスターを形成した。以上より、REE 依存的メタノール代謝は *Methylobacterium* 属細菌に広く分布するというだけでなく、XoxF の機能は *Methylobacterium* 属細菌の進化と相関していると考えられる。

¹⁾ Nakagawa T *et al.*, 2012. *PLoS ONE* 7: e50480.

各種レアアースを特異的に要求する新規 *Methylobacterium* 属細菌のスクリーニング
 ○濱田 昂志, 日比野 歩美, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大応生)

【目的】

レアアース (REE) は、様々な高度工業製品の性能向上に広く用いられているにもかかわらず、日本では REE を輸入に頼っていることから、自国における REE の安定供給が課題となっている。私たちのグループでは、メタノール資化性細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 株が REE である La に依存したメタノール生育を持つことを示し¹⁾、本菌の有する La 依存型メタノール脱水素酵素 MDH が REE 回収ツールとして応用が可能であると考えている。しかし、AM1 株は原子量が小さい LREE でのみメタノール生育を示し、原子量が比較的大きい MREE および HREE をメタノール生育に要求しないため、本菌株の MREE・HREE の回収技術への応用は期待できない。そこで、本研究では MREE および HREE をメタノール生育に要求する新たなメタノール資化性細菌を探索し、MDH を利用した REE 回収技術の開発に向けた基盤構築を目的とした。

【方法・結果】

様々な植物サンプルから、LREE (Ce), MREE (Gd), HREE (Lu) にそれぞれ依存的なメタノール生育を示す微生物のスクリーニングを試みた。その結果、メタノール生育に Ce または Gd を要求する株は 34 サンプルからそれぞれ 33 株、Lu を要求する株は 12 サンプルから 11 株獲得できた。これら REE 依存的メタノール生育を示す菌株のうち、16S rDNA 配列から *Methylobacterium* 属を 12 株、*Methylophilus* 属、*Methylovorus* 属をそれぞれ 1 株ずつ同定した。以上より、自然界には MREE または HREE に生育できる *Methylobacterium* 属細菌は存在し、それら菌株の持つ REE 依存型 MDH が REE リサイクル技術に利用できる可能性が示唆された。

¹⁾ Nakagawa T *et al.*, 2012. *PLoS ONE* 7: e50480.

P05

亜鉛トランスポーターZIP4 発現促進活性を示す大豆サポニン分子種の効率的精製条件の確立

○岡本亘弘¹, 片野 肇¹, 橋本綾子², 永尾雅哉², 神戸大朋², 入江一浩³, 高橋正和¹

(¹ 福井県大院・生物資源, ² 京大院生命・統合生命, ³ 京大院農・食生科)

【目的】

亜鉛はタンパク質の構成因子や酵素の補因子, 細胞内シグナル伝達因子として働く必須金属元素である。そのため, 亜鉛欠乏症は味覚障害や皮膚疾患, 免疫機能の低下などを引き起こす。亜鉛イオントランスポーターZIP4 (Slc39a4) は先天性腸性肢端皮膚炎の原因遺伝子であり, ZIP4 タンパク質は小腸上皮細胞の apical 側細胞膜に局在し, 亜鉛の腸内吸収に必須な役割を果たす。このため ZIP4 タンパク質量を増加させる食成分は, 亜鉛欠乏症の予防・改善に役立つと期待される。我々はこれまでに ZIP4 タンパク誘導作用を示す食成分として大豆サポニン分子を同定しているが, その詳細な解析には必要な化合物精製には時間がかかる。そこで本研究では, 大豆サポニン分子の効率的精製条件の確立を目的とした。

【方法・結果】

マウス Hepa 細胞株は小腸上皮細胞と同様 ZIP4 を発現しており, 亜鉛欠乏条件下で ZIP4 タンパク量が増加するなど, 制御機構も類似している。この Hepa 細胞をサンプル含有培地で 24 時間培養後, 細胞溶解物を調製し, Western 解析にて ZIP4 誘導活性を判定した。活性を示した大豆抽出物を逆相液体クロマトグラフィーに供して活性化合物を単離し, NMR や LC-MS などの機器分析に供して, 特定の大豆サポニン分子種を同定した。さらに, 大豆抽出物を水・有機混合溶媒系を活用して分画し, 活性を示す特定の大豆サポニン分子群を選択的に得られる精製条件を確立した。

P06

福井県の伝統野菜および特産作物に含まれるラジカル産生抑制活性の検討

○小川貴子¹, 加藤絵里菜¹, 橋本直哉², 小林恭一², 村上 茂¹, 高橋正和¹

(¹ 福井県大・生物資源, ² 福井県食品加工研究所)

【目的】

食細胞は各種の活性酸素種(ROS)やフリーラジカルを産生し, 生体防御に利用している。しかし, 慢性炎症状態においては過剰な ROS やラジカル類が産生され, 各種炎症性疾患の原因となる。このような過剰なラジカル産生を抑制する化合物には健康維持に役立つ潜在的機能が期待され, これまでに多数報告されている。しかし, 地域の伝統作物・特産作物においては必ずしも十分な解析が行われておらず, 福井県でも伝統野菜等の機能解析は比較的遅れている。そこで本研究では, このような伝統野菜・特産農作物に注目し, ラジカル産生抑制活性の検討を行った。

【方法・結果】

食細胞が産生する ROS やラジカルの代表例として, スーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)および一酸化窒素(NO)に注目した。 O_2^- 産生については, DMSO 分化 HL-60(ヒト前骨髄性白血病株)を TPA 刺激して過剰産生を誘導し, WST-1 試薬で比色定量した。また NO 産生は RAW264(マウスマクロファージ細胞株)を大腸菌 LPS 刺激して過剰産生を誘導し, Griess 試薬で比色定量した。

福井県伝統野菜や特産作物(ウメ etc.)などについて溶媒抽出物を調製し, エバポレーター濃縮後, 水・酢酸エチル分配した。酢酸エチル画分は顕著な活性を示し, 板垣大根などのアセトン抽出物に特に強い NO 産生抑制活性が認められた。50%阻害濃度(IC₅₀)を示す抽出物量を 1 unit として, 作物 100 g の活性量(U/100 g・作物)を比較した結果, 板垣大根や穴馬カブラは一般作物(他県産)の 2~5 倍強い活性を示すと判明した。さらに O_2^- についても穴馬カブラと板垣大根に顕著な産生抑制活性が認められた。

P07

組換え大腸菌による *Candida antarctica* lipase B の菌体外分泌発現
○氏家彩奈¹, 中野秀雄¹, 岩崎雄吾¹ (¹ 名大院生命農)

【目的】

担子菌類酵母 *Candida antarctica* 由来 lipase B (CALB) は優れた立体選択性を持つため医薬中間体等、多くの光学活性物質の製造に用いられる非常に重要な酵素である。CALB は有機溶媒中での反応特性が他の多くのリパーゼと異なるなど、酵素科学的にも非常に興味深い性質を示す。CALB の蛋白工学的手法による高機能化や機能解析の基盤となるのは、組換え大腸菌による効率的な発現系の構築と精製法の確立である。現在 CALB の大腸菌による発現は細胞内であり、細胞外に分泌された例はない。CALB の蛋白工学が目的であれば、組換え大腸菌は第一の選択肢である。そこで本研究では CALB の組換え大腸菌での菌体外分泌発現系の構築を目的とする。

【方法・結果】

大腸菌に適したコドンに変換した *CALB* 遺伝子配列に *pelB* signal 配列を付加し、pET システムを用いて発現実験を行った。その結果、CALB の培養上清中での発現が確認された。

次に発現量を上げるため培地の検討を行った。LB 培地、2xYT 培地、スーパースト、SOB 培地、Terrific broth の5種類の培地を用いて発現量の比較を行った。その結果、Terrific broth を用いた場合、発現量が最も多くなった。そこで Terrific broth を用いて CALB 発現後、培養上清を限外ろ過により濃縮し、Resource Q、HiPrep butyl FF により精製した。45 mL の培養上清から約 6 mg もの精製 CALB を調製することに成功した。また、精製 CALB の比活性から培養上清中の発現量を算出すると、1 L 当たり 300 mg 相当であった。

以上より、組換え大腸菌による菌体外分泌発現系の構築と精製法の確立に成功した。

P08

Asaia bogorensis のセルロース合成における CesD タンパク質の機能解析

○小竹一樹¹, 水野正浩¹, 野崎功一¹, 伏信進矢², 天野良彦¹ (¹ 信州大院 理工, ² 東京大院 農生)

【目的】

Asaia bogorensis は、超微細セルロース繊維合成能を有する酢酸菌の一種である。酢酸菌によるセルロース合成のモデル生物 *Gluconacetobacter xylinus* においては、セルロース合成タンパク質複合体中の CesD タンパク質 (GxCesD) の立体構造解析が既に報告されており、内部に仕切りを有する環状 8 量体構造であることが明らかとなっている。GxCesD 中の仕切られた微細孔は、菌体内で合成されたグルカン鎖のランダムな会合を防ぎ、効率的な合成および排出に寄与している可能性が示唆されている。一方、*A. bogorensis* の CesD (AbCesD) においては、GxCesD において仕切りを構成している N 末端アミノ酸残基が存在しておらず、微細孔を形成していないと考えられる。よって本研究では、AbCesD の立体構造解析を行い、*A. bogorensis* の超微細セルロース繊維排出メカニズムの解明を目的とする。

【方法・結果】

AbCesD は、大腸菌 BL21 (DE3) plysS を用いて C 末端に His-Tag を付加させて異種発現させた後、His-Trap カラムにて精製を行った。この AbCesD 溶液を 2.5 mg/ml となるよう濃縮、脱塩しハンギングドロップ蒸気拡散法にて結晶化を行った。

得られた AbCesD 結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った結果、GxCesD と同様の 8 量体環状構造を形成していることが判明したが、内部の仕切りおよび微細孔の形成は確認されなかった。また、グルカン鎖の配位を確認するため、セロペンタオース溶液でのソーキングによる共結晶の X 線構造解析を行ったが、グルカン鎖の配位は確認できなかった。以上の結果から、AbCesD はグルカン鎖を効率的に会合させる機能を有しておらず、微細セルロース合成能に AbCesD 立体構造が起因している可能性が示唆された。

P09

酒造用野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S03 株の

NC/Nga 系マウスにおけるアトピー性皮膚炎抑制作用

○河原岳志¹, 渡辺毅哉¹, 中山大地¹, 保井久子² (¹信州大院農, ²木曽町地域資源研)

【目的】

果実や土壌には *Saccharomyces* 属酵母の野生株 (野生酵母) が存在し, 産業用酵母とは異なる特有の風味特性をもつ菌株を利用した清酒やパンなどの製品開発が盛んに行われている. 我々はこれまで, *Saccharomyces* 属野生酵母の IgE 抑制作用を明らかにし, 野生株には産業用酵母にはみられない機能性を備えているものが存在することを報告してきた. 今回, 酒造用酵母として選抜した野生酵母 *Saccharomyces cerevisiae* S03 株について NC/Nga 系マウスへの経口投与を行い, アトピー性皮膚炎様の皮膚症状に対する効果を検証した.

【方法・結果】

S03 株を 0.05% 添加した飼料と無添加のコントロール飼料を調製し, NC/Nga 系マウス (5 週齢♀) に対し自由摂取による 217 日間の経口投与を行った. 試験開始 21 日後に 5% ピクリルクロライド溶液を腹部に塗布し, その 7 日後から週 1 回の間隔で 1% ピクリルクロライド溶液を耳介に塗布して皮膚炎の誘導を行った. 試験期間中は 7 日おきの全身皮膚炎症の評価を行うとともに, 14 日おきの血中の総 IgE 濃度の測定を行った. 試験終了後は, 脾臓細胞を無菌的に調製して 7 日間培養を行い, 上清中に産生される IgE 抗体量を ELISA 法で測定した. 検討の結果 S03 株添加飼料群は, 皮膚症状が顕在化する投与開始 49 日目以降に Control 飼料群と比較して皮膚症状の重症化が抑制される傾向がみられ, 196 日目以降では有意な差が観察された. また, 血清中総 IgE 量ならびに採取された脾臓細胞からの IgE 産生も有意に抑制されていた. これらの結果から, S03 株は生体において IgE 産生抑制に基づくアトピー性皮膚炎抑制作用を示す可能性が示された. 今後, 機能性と風味特性を兼ね備える *Saccharomyces* 属野生酵母を用いた機能性食品開発が期待される.

P10

ソバ乳酸発酵食品由来降圧ペプチドの生体組織における ACE 阻害特性

○小山正浩¹, 服部成治², 石田竜也², 中村浩蔵^{1,2,3} (¹信州大農, ²信州大院農, ³信州大学術研究院農)

【目的】

ソバ乳酸発酵食品から 7 種の降圧ペプチド (FQ, GHG, VAE, VVG, DVWY, WTFR, FDART) が単離された. 降圧メカニズム検討のため, 単離ペプチドの *in vitro* および *in vivo* アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害活性を測定したところ, *in vitro* 活性から期待されるよりも強力な *in vivo* 活性を高血圧自然発症ラット (SHR) 組織において示した. 本研究では, より詳細な ACE 阻害メカニズムを検討するために *ex vivo* ACE 阻害活性試験を行い, 単離ペプチドの生体 ACE 阻害活性を評価するとともに, *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* ACE 阻害活性の差異について考察した.

【方法・結果】

ex vivo 試験には, 雄性 13 週齢 SHR 由来胸部大動脈から作製した血管内皮除去リング標本を用いた. リング標本は, マグナス実験装置にセットして平衡化後, 単離ペプチドを添加しインキュベートした. この操作で血管組織 ACE と単離ペプチドを十分に相互作用させた. その後, 基質としてアンジオテンシン (Ang) I を添加し, 組織 ACE により生成した Ang II により引き起こされる血管張力の変化と生成 Ang II の LC-MS 定量により *ex vivo* ACE 阻害活性を評価した. その結果, 単離ペプチドは *in vitro* 活性の 1/1000 以下という低濃度で組織 ACE を有意に阻害し, 血管収縮を抑制した. そこで *in vitro*, *ex vivo*, *in vivo* 活性の差を考察するために, 各活性間で相関分析を行った. *ex vivo* および *in vivo* 活性間には強い相関が認められたが, *in vitro* 活性は *ex vivo* および *in vivo* 活性ともに有意な相関を示さなかった. つまり, 単離ペプチドと ACE との結合力以外に, 生体吸収率や組織親和性などの生体利用能が高い組織 ACE 阻害活性に関与していると推測された.

P11

植物におけるイソチオシアネートの熱ショック応答誘導に関する研究

○松原匠¹, 栗田郁也¹, 高橋郁夫¹, 原崎安紀乃¹, 原正和^{1,2} (¹静岡大・農, ²静岡大・グリーン研)

【目的】

近年多発する夏季の熱波は、農業に深刻な影響を与えている。植物の高温障害を防ぐため、植物工場など環境制御型栽培技術の開発、耐暑性品種の育種が進められているが、コストや育種効率上の制限がある。そこで、散布するだけで、後天的に植物の耐熱性を向上させる資材（植物耐熱性向上剤）が注目されているが、研究の歴史が浅く、候補物質は限られている。最近当研究室では、植物の辛味成分フェネチルイソチオシアネート（PEITC）が、シロイヌナズナの熱ショック応答を誘導し、耐熱性を高めることを見出した。このように、PEITCは耐熱性向上剤の良い候補であるが、PEITC以外のイソチオシアネートが、熱ショック応答を誘導するのかは不明であった。本研究では、脂肪族イソチオシアネート 11 種及び芳香族イソチオシアネート 5 種、合計 16 種のイソチオシアネートの植物熱ショック応答誘導活性を測定し、高活性イソチオシアネートを見出すことを目的とする。

【方法・結果】

植物の熱ショック応答誘導物質として知られるゲルダナマイシン、PEITC、サンギナリンに関し、共通して発現が顕著に高まる熱ショック蛋白質 X を選定した。本遺伝子上流配列 1 kb にレポーター遺伝子（β-グルクロニダーゼ、GUS）を連結したコンストラクトを導入したシロイヌナズナを作成し、GUS 活性を蛍光で定量する方法を確立した。16 種のイソチオシアネートを作用させたところ、総じて、脂肪族イソチオシアネートの方が、芳香族イソチオシアネートより熱ショック応答誘導活性が高かった。効果の高かったイソチオシアネートを実際に耐熱性試験に供したところ、熱ショック後の障害が軽減されることが判明した。以上より、脂肪族イソチオシアネートは、効果的な植物耐熱性向上剤となりうることが示唆された。

P12

シロイヌナズナにおける熱ショック応答のシャペロン阻害剤による誘導

○村野宏樹¹, 栗田郁也¹, 高橋郁夫¹, 松原匠¹, 原正和^{1,2}

(¹静岡大・農, ²静岡大・グリーン研)

【目的】

地球温暖化は夏季の異常高温を引き起こし、植物の成長に深刻なダメージを与える。そこで、植物の耐熱性向上技術が求められている。ところで、抗がん剤のリード化合物に、ゲルダナマイシン（GDA）がある。GDA は、シャペロン（熱ショック蛋白質 90、HSP90）阻害剤であり、HSP90 が不活化している熱ショックファクターを、遊離・活性化し、熱ショック応答を誘発する。GDA をシロイヌナズナに投与すると、HSP 遺伝子群が活性化し、耐熱性が向上する。しかし、耐熱性の向上が GDA に限った活性なのか、HSP90 を阻害した場合に起こる一般的な現象なのかは不明である。最近、GDA 以外に、多くの HSP90 阻害剤が開発されてきた。そこで、GDA を含めた 5 種の HSP90 阻害剤をシロイヌナズナに与え、熱ショック応答及び耐熱性を比較調査した。

【方法・結果】

HSP90 阻害剤 5 種は、薬品会社から購入した。熱ショック応答は、GDA によって活性化するシロイヌナズナの HSP 遺伝子上流 1 kb をレポーター遺伝子（β-グルクロニダーゼ）に連結した遺伝子を組換えしたシロイヌナズナを使った。耐熱性は、シロイヌナズナ芽生えを高温処理（47℃、1 時間）した後のクロロフィルの残存を指標に評価した。また、HSP90 阻害剤のシャペロン阻害活性を小麦胚芽抽出物の変性ルシフェラーゼ回復試験で調査した。その結果、熱ショック応答が強いもののほど、耐熱性向上活性が高く、シャペロン阻害活性も高い傾向にあることが分かった。以上の結果、シロイヌナズナでは、HSP90 を効率よく阻害すると、熱ショック応答が強く惹起され、耐熱性が向上することが示唆された。植物耐熱性向上剤の開発には、HSP90 を標的にすべきだといえる。

P13

植物における His リッチデハイドリンの銅ストレス保護作用

○中野太陽¹, 門奈修平¹, 村田尊英¹, 原正和^{1, 2} (¹静岡大・農, ²静岡大・グリーン研)

【目的】

デハイドリンは、種子の胚形成後期の乾燥段階で発現するタンパク質であり、成長した植物でも、乾燥や低温などの非生物学的ストレスを受けて発現する。デハイドリンは特定の構造をもたない天然変性タンパク質であり、その機能は十分解明されていない。近年、当研究室では、デハイドリンが重金属を結合することを見出し、本タンパク質が、植物における重金属ストレスの緩和に関与すると推定した。植物の主要な重金属障害に、酵素の失活による代謝不全が挙げられる。そこで、本研究では、デハイドリンが、銅による酵素失活を抑制するか、デハイドリンを高発現させた植物が銅ストレスに耐性を示すかを明らかにする。

【方法・結果】

銅により失活しやすいモデル酵素（ウサギ乳酸脱水酵素）に、大腸菌発現系で得たシロイヌナズナ由来のデハイドリン AtHIRD11 を作用させたところ、銅による失活を濃度依存的に抑制した。次に、デハイドリンの His 含量を変化させた変異タンパク質を作成し同様の試験を行ったところ、His 含量を低下させた AtHIRD11 変異タンパク質は、銅により失活した乳酸脱水酵素の活性を AtHIRD11 ほど回復させることができなかった。AtHIRD11 過剰発現シロイヌナズナは、銅ストレス下でも成長を維持する傾向があったが、His 含量を低下させた AtHIRD11 の過剰発現体では、AtHIRD11 過剰発現体に比べて、銅ストレス下での成長が劣る傾向にあった。以上の結果から、AtHIRD11 は、植物体内で酵素を銅から保護し、結果として植物の銅耐性を高めると考えられる。また、この効果には、His が関与すると思われる。

P14

食中毒菌の産生する不快臭の前駆体を利用した簡易・迅速微生物検査法の確立

○藤野陽子, 島村裕子, 池辺美香, 増田修一（静岡県大・食品栄養）

【目的】

これまでに食中毒菌が培地中で増殖する際に、不快臭を産生することが知られている。そこで、本研究では、食中毒菌の産生する不快臭およびその前駆体を利用した、簡易・迅速微生物検査法の開発を目的に研究を行った。

【方法・結果】

Bacto tryptone を含む培地中で黄色ブドウ球菌を培養すると不快臭が生じる。そこで、Bacto tryptone 中の不快臭の前駆体を分離・精製したところ、L-leucine (Leu), L-tyrosine (Tyr), L-methionine (Met) であることが明らかになった。次に、これら前駆体を培地に添加し、黄色ブドウ球菌を接種して培養した後、生じた臭気物質を GC および GC/MS により同定・定量した。その結果、黄色ブドウ球菌が前駆体を代謝して生じる臭気物質として isovaleric acid, 2-hydroxy-4-methylpentanoic acid (Leu 由来), 2-phenylpropanoic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, *p*-hydroxyphenylacetate (Tyr 由来), dimethyl sulfide, 3-(methylthio)propionaldehyde (Met 由来) を同定した。また、不快臭の前駆体添加時における菌の増殖と毒素の産生量について、平板希釈法による菌数測定およびウエスタンブロットを用いて調べたところ、これら前駆体は本菌の増殖と毒素の産生に影響を及ぼさなかった。現在、同定した臭気物質を用いてモデル臭気を作製し、臭気物質の組み合わせによる臭気の相乗効果を検討している。

P15

カゼインホスホペプチドの抗 FCV 効果に及ぼすリン酸化度の影響
○ンシェピサ・レベトゥワ, 片山茂, 大野史晃, 中村宗一郎 (信大農・応用生命)

【目的】牛乳カゼインにはホスホセリン (SerP) を多く含む領域が存在する。牛乳カゼインをトリブシン消化して得られ、SerP-SerP-SerP-Glu-Glu の基本構造を持つ部分分解物は総称してカゼインホスホペプチド (CPP) と呼ばれる。本研究では明治 CPP-Ⅲ (株明治フードマテリア) をベースにドライヒーティング法によるリン酸化と希薄アルカリ溶液処理法による脱リン酸化によってリン酸化度が異なる 5 種類の CPP を調製し、抗ウイルス効果に及ぼすリン酸化度の影響について調べたので報告する。

【方法・結果】0.1 M ピロリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0) に 1mg/mL になるよう CPP-Ⅲ を溶解し、凍結乾燥して得られた粉末を 85℃ で乾燥加熱することによってリン酸化を行った。5 日間乾燥後、透析 (MWCO 1000) して遊離リン酸塩を除去し、再び凍結乾燥してその後の実験に供した。一方、脱リン酸化は、希薄アルカリ溶液 (0.1M~0.4M) に 5mg/mL になるよう CPP-Ⅲ を溶解し、37℃ で最長 3 時間処理することによって行った。所定の時間処理後、0.4M 塩酸を用いて中和し、透析 (MWCO 1000)、凍結乾燥して供試試料とした。リン酸化度は、モリブデンブルー法によって行った。抗ウイルス試験には、供試ウイルスにノロウイルスと同じ科に属するネコカリシウイルス (Feline Calicivirus, FCV) を用いた。また FCV の宿主細胞にはネコ腎臓細胞 (Crandell-Reese Feline kidney, CRFK) を用いた。コンフルエント状態の CRFK にリン酸化度の異なる CPP-Ⅲ を含む MEM 培地で 1 日間インキュベーション後、FCV を曝露し、引き続き 2 日間インキュベーションして、リン酸化度の違いが感染細胞の生体防御能に及ぼす影響を中心に調べた。生体防御能は、I 型インターフェロン (IFN) を指標とした。IFN- α には 5'-CAC GTG ACG AAC CAG AAG ATC TT-3' 及び 5'-GAG GGT GGT GTT CCA AGC A-3' を、IFN- β には 5'-GAG GGT GGT GTT CCA AGC A-3' 及び 5'-GAG GGT GGT GTT CCA AGC A-3' をそれぞれプライマー対として用いた。その結果、CPP-Ⅲ のリン酸化度は CPP-Ⅲ が抗 FCV 効果を発揮する際、特に今回の標的ウイルスの複製を抑制し宿主細胞の生体防御を高める際に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

P16

コンセンサス法を用いた深海微生物 *S. violace* の AP エンドヌクレアーゼの耐熱化
○前田裕規、佐久間一石、志田敏夫 (信大院・理工学系 応用生物)

【目的】

Shewanella violace は深海 4,000 m 以上の高圧・低温下に生息する細菌である。当研究室では DNA の塩基除去修復過程で働き、大腸菌からヒトに至る全ての生物で高度に保存されている AP エンドヌクレアーゼに注目して解析を行っている。この深海微生物由来の AP エンドヌクレアーゼに関して、すでにその諸性質を明らかにしている。その至適反応温度は 34℃ であるが、それ以上の温度では急激に熱失活した。一方、0℃ であっても最大活性の 40% を保持していて、低温下においても働くように適応した酵素であった。今回、*S. violace* の AP エンドヌクレアーゼ (SviExo) について、コンセンサス法を用いて酵素の耐熱化を試み、熱耐性がかなり上昇した変異体を得られたので報告する。

【方法・結果】

大腸菌で SviExo、および部位特異的変異を導入した SviExo を発現させ、HisTag アフィニティークトマトグラフィーと陽イオン交換クロマトグラフィー (SP) で精製し、テトラヒドロフラン環からなる AP 部位を含む合成 DNA を基質に用いて酵素の諸性質を調べた。SviExo の熱安定性を向上させるため、海洋に生息する低温菌 6 種と中温菌 10 種の計 16 種のマルチプルライメントをとり、最頻出するアミノ酸残基に置換するというコンセンサス法を用いた。まず SviExo の各 8 アミノ酸残基を置換した変異体を作出した。2 つの変異体 (E120P、I254M) で活性が 6 割程度に減少したものの熱安定が上昇していたので、二重変異体である SviExoE120P/I254M を作成した。活性が野生型の 2 割ほど上昇し、熱耐性が約 20℃ ほど大幅に上昇した。

P17

米糠タンパク質による新規コレステロール代謝改善食品開発に関する研究

○王 吉力特¹, 加藤由喜奈¹, 下田博司², 島田昌也¹, 長岡 利¹

¹岐阜大学応用生物科学部, ²オリザ油化(株)

【目的】

食餌タンパク質の血清コレステロール(CHOL)低下作用が報告され、高CHOL血症の予防や改善に非常に有効な方策と考えられている。米糠は米の製粉プロセスに伴う主要な副産物であり、良質のタンパク質源である。本研究では、in vivo 及び in vitro 実験により米糠タンパク質のCHOL代謝改善作用の機構を解明するとともに、製品化のための有効成分の特定解明を目的とした。

【方法・結果】

Wistar 系雄ラット(5週齢)に高CHOLカゼイン食(20%カゼイン)または、高CHOL米糠タンパク質食(10%米糠タンパク質+10%カゼイン)を10日間摂取させた結果、米糠タンパク質はカゼインと比較して血清総CHOLを有意に低下させ、糞中酸性ステロイド及び中性ステロイド排出を有意に増加させた。米糠タンパク質を[¹⁴C]-CHOLを含むミセル溶液に添加し、in vitro でのCHOLミセル溶解性に対する影響を評価し、また、[¹⁴C]-タウロコール酸を含むタウロコール酸溶液に添加し、in vitro での胆汁酸結合能を評価した。その結果、米糠タンパク質はカゼインと比較してCHOLミセル溶解性を有意に低下させ、胆汁酸とも有意な結合能を示した。さらに、胆汁酸結合 EAH Sepharose 4B カラムにより、米糠タンパク質から胆汁酸結合タンパク質精製を行い、精製画分の SDS-PAGE 及び MALDI-TOFMS 分析を行った。その結果、複数の胆汁酸結合タンパク質が得られ、その中に仮定たんぱく質 OsJ_13801 (NCBI accession no. EAZ29742) のアミノ酸配列と高い相同性を示すタンパク質(分子量 55.1kDa)が含まれることを発見した。新規胆汁酸結合タンパク質の発見は高CHOL血症を予防改善する食品開発に繋がると期待される。

P18

太田ポンカン果皮抽出物中の苦味化合物

○黒田侑希, 池田りこ, 山崎豊実, 中村俊之, 宇田一成, 若林敬二, 渡辺達夫(静岡県大院・食栄環)

【目的】

太田ポンカンは、静岡市清水区発祥の柑橘類である。太田ポンカンの果皮には、認知症の予防に効果があるとされるノビレチンをはじめ、発ガン抑制効果が認められているβ-クリプトキサンチンなど様々な機能性成分が含まれている。その為、太田ポンカンの果皮を利用した食品の開発が望まれている。しかし太田ポンカンの果皮には、強い苦味がある事が食品へ応用する際の難点となっている。そこで、本研究では太田ポンカンの果皮に含まれる苦味成分を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

太田ポンカン果皮抽出液の苦味は、培養細胞を用いたセル・ベース・アッセイにより評価した。¹⁾ G タンパク質安定発現 Flp-In™ T-Rex™ 293T 細胞(Flp-In G 細胞)細胞に、苦味受容体を発現させ、96 穴プレートに播種して実験に使用した。苦味成分により苦味受容体が活性化されると、細胞質中のカルシウムイオン(Ca²⁺)濃度が上昇する事を利用し、Ca²⁺と結合する蛍光色素試薬(Fluo-8 AM)を細胞に取り込ませ、苦味受容体の活性を蛍光量で評価した。その結果、太田ポンカン果皮抽出液に対し、ヒト苦味受容体(hTAS2R)の 14,16,38,39 番で苦味応答が確認された。さらに、太田ポンカン果皮に含まれる主要成分のタンゲレチンに対し hTAS2R14 で応答が認められ、太田ポンカン果皮の苦味に、少なくともタンゲレチンが寄与している事が明らかになった。

¹⁾ T Yamazaki, et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **77**, 1981 (2013)

P19

Synthetic Studies on Lycopodine A

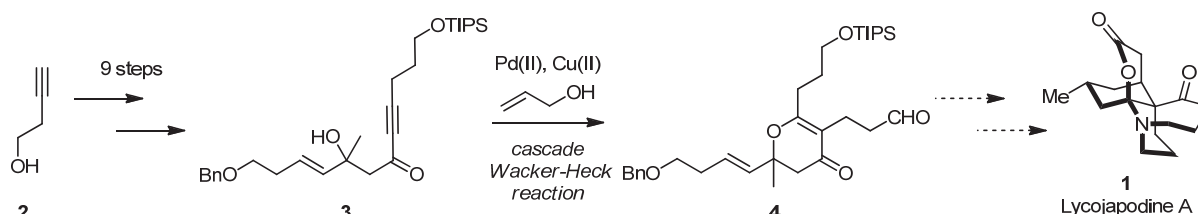
○Wen-Yu Huang, Toshio Nishikawa, Atsuo Nakazaki
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

【Objectives】

Lycopodium alkaloids, elaborated by plants of the genus *Lycopodium*, are a group of structurally diverse alkaloids that usually show distinctive structures and exhibit potent acetylcholinesterase inhibitory activity. As a member of the group, lycopodine A (**1**) was isolated from *Lycopodium japonicum* THUNB by Zhao and co-workers in 2009. It possesses a unique unprecedented 6/6/6/7 tetracyclic ring system which was confirmed by X-ray analysis. Being expected as a potential medicine for Alzheimer's disease, **1** inhibited acetylcholinesterase with an IC₅₀ value of 90.3 μM. Due to the biological activity as well as the challenging structure, we embarked on the synthesis of **1**.

【Methods and Results】

The synthesis of **1** began with commercially available alcohol **2**. 9 steps-transformation provided **3**, which underwent cascade Wacker-Heck reaction with allyl alcohol, leading to the desired dihydropyrone **4**. Further transformations towards **1** are underway.



P20

mTORC1 is involved in the regulation of BCAA catabolism in mouse heart

○ Hongmin Zhen, Yoshihiro Kadota, Yasuyuki Kitaura, Minjun Xu, Yusuke Kondo, Takuya Ishikawa, and Yoshiharu Shimomura

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Branched-chain α -ketoacid dehydrogenase (BCKDH) complex regulates branched-chain amino acid (BCAA) metabolism at the level of branched-chain α -ketoacid catabolism. In the present study, we examined the effect of mTORC1 inhibitor rapamycin on cardiac BCKDH activity *in vivo* experiment using male ddY mice. Oral administration of leucine significantly activated cardiac BCKDH complex with an increase in the plasma leucine concentration. On the other hand, oral administration of leucine after treatment of rapamycin showed no significant activation on the BCKDH complex although the plasma leucine concentration was similarly increased. The increased leucine concentration in heart tissue after the leucine administration was not affected by the rapamycin treatment. These results suggest that mTORC1 is involved in the regulation of cardiac BCAA catabolism.

P21

ビタミン B₆ 欠乏に起因する肝臓脂質蓄積の改善

○藤下万結子¹, 太田勇氣², 北川絵里奈³, 中川智行^{1,2,3}, 早川享志^{1,2,3}

(¹ 岐阜大院応生, ² 岐阜大応生, ³ 岐阜大院連合農学)

【目的】 ビタミン B₆ 欠乏下のラットにメチオニン (Met) を負荷した飼料を与えると、高ホモシステイン (Hcy) 血漿となるとともに、肝臓に脂質が蓄積することを見出した。これまでの研究で、B₆ 欠乏時の肝臓脂質蓄積は、Met 代謝異常が間接的に関与するホスファチジルコリン (PC) の合成量低下と、肝外へ脂質を運搬する VLDL の分泌低下が引き起こるためだと示唆され、PC や PC の前駆体であるコリンは B₆ 欠乏に起因する肝臓脂質蓄積を改善することを示してきた。本研究では、コリンから一部変換され Hcy から Met への再メチル化経路に関与するベタインに着目し、B₆ 欠乏時の脂質代謝異常へ及ぼすベタインの効果を Met 代謝の観点から検討することを目的とした。

【方法・結果】 4 週齢の Wistar 系雄ラットを 5 群に分け (n=7)、全ての群の飼料に 9g/kg の L-Met を添加し、コントロール飼料 (C 群) と B₆ 欠乏飼料 (D 群)、および B₆ 欠乏飼料にベタイン 0.1, 0.2, 0.4% 添加した飼料 (B1D 群, B2D 群, B4D 群) を、D 群に対するペアフィーディングで 35 日間与えた。解剖後、血漿および肝臓 Hcy、総コレステロール (T-Chol)、血漿 HDL コレステロール (HDL-Chol)、血漿リン脂質、肝臓総脂質および肝臓 PC・PE 等を測定した。その結果、血漿および肝臓 Hcy は C 群と比べて D 群で増加し、ベタイン添加濃度に応じて減少傾向または有意に減少した。また肝臓総脂質、T-Chol も Hcy と同様の様相を示した。これとは逆に、血漿中 LDL+VLDL-Chol とリン脂質、肝臓 PC/PE 比は C 群と比較して D 群または B1D 群で有意に減少または減少傾向にあり、ベタイン添加濃度に応じて増加傾向がみられ、B4D 群では D 群と比較して有意に増加した。以上の結果から、ベタインは B₆ 欠乏に起因する VLDL 生産低下を改善し、脂質代謝異常を改善することを明らかにした。

P22

抗 CD98 依存性細胞融合の阻害物質探索を目的とした新規評価系の構築

○鵜飼 容子¹, 青山 友果¹, 伊藤 守弘², 禹 濟泰¹, 中川 大¹, 大西 素子¹

(¹ 中部大学応用生物学部, ² 中部大学生命健康科学部)

【目的】

破骨細胞は造血幹細胞が融合して生じる多核の巨大細胞であり、骨吸収を担っているが、その過剰な活性化は骨粗鬆症を引き起こすことが知られている。一方、CD98 は T 細胞活性化抗原として見出された重鎖 (CD98hc) と、アミノ酸輸送体である軽鎖から成る膜貫通タンパク質であり、破骨細胞分化における細胞融合過程に関与することが知られている。これまで我々は、破骨細胞分化の制御物質の探索を目的として、抗 CD98hc 抗体によって細胞融合を誘導される U2ME-7 細胞を用いた細胞融合阻害物質の探索システムを構築してきた。このたびより定量的な細胞融合の評価系の構築を目指し、検討を行った。

【方法・結果】

U2ME-7 細胞は、HIV のエンベロープタンパク質 gp160 を融合ペプチドとして発現するために、10 μ M の CdCl₂ 存在下で 1 時間培養し、その後抗 CD98hc 抗体を添加した。抗体添加 3 時間後には、個々の細胞が互いに接着して細胞の凝集塊を形成するとともに、凝集塊の中に融合細胞を生じた。融合細胞を含む凝集塊の数は、抗体添加 24 時間後に最大に達したが、ピペッティングにより凝集塊から融合細胞の分離を検討した結果、得られた融合細胞数は 30 時間で最大となった。これらの結果から、融合細胞の回収は抗体添加 36 時間後と決定した。分離された融合細胞は、25% のホルムアルデヒド溶液中で、遠心分離することによって固定することができた。さらに陽性対照物質として ouabain をこの評価系に加えて融合細胞数を計測した結果、濃度依存的な細胞融合阻害効果を確認できた。以上より、この新規評価系により抗 CD98hc 抗体依存性細胞融合を定量的に評価できると考えられる。

P23

Water-soluble fractions from defatted sesame seed flour protect cells against oxidative stress

○Sana Ben Othman¹, Nakako Katsuno¹, Makoto Fujimura², Kohji Kitaguchi¹, and Tomio Yabe¹
(¹Unit. Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ., ²Shinsei CO. Ltd.)

[Objective] In this study, we focus on water-soluble extracts from defatted sesame seed flour obtained as a byproduct from sesame oil extraction process. White and gold sesame seed crude extract were extracted by 70 % ethanol from defatted sesame seed flour. These extracts exhibited a strong free radical scavenging capacity *in vitro*. Here we attempted to purify and identify hydrophilic antioxidant from these water-soluble extracts. Moreover, in order to determine the potential physiological function of the purified water-soluble fractions, we assessed the capacity of their capacity to protect cells against oxidative stress.

[Methods & Results] Purification of the water-soluble fraction by butanol extraction showed that the crude extract contained relatively hydrophobic antioxidant compounds extracted in the butanol fractions such as sesaminol glucosides. On the other hand, we found that the purified water-soluble fraction mainly composed of oligosaccharides also contained ferulic and vanillic acids that might be responsible of its antioxidant capacity. Protective effect of white and gold sesame seed water-soluble fractions as well as ferulic and vanillic acids was investigated in human lymphocyte Raji cell line. Oxidative stress was induced by peroxy radical initiator, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), which induced significant decrease in cell viability. Pretreatment for 24 h with white and gold sesame seed water-soluble fractions significantly reduced AAPH-induced cytotoxicity in Raji cells; this protective effect was correlated with the antioxidant activity of ferulic and vanillic acids contained in these fractions. Further studies are needed to elucidate the mechanism of action involved in protecting Raji cells against oxidative stress.

P24

ロイシン酸生産能強化麹菌の作製と利用

○喜多あいり¹, 山本竜也¹, 小出恵美理¹, 安田(吉野) 庄子², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²あいち産科総セ・食工技セ)

【目的】

カプロン酸エチルや酢酸イソアミルといった清酒の代表的な香気成分は酵母単独で生合成できるため、それらの生産能を高めた酵母の育種は盛んに行われている。一方、香気成分の中で清酒の香気増強に重要なロイシン酸エチルの生合成経路については麹菌 *Aspergillus oryzae* により、米に含まれるロイシンがロイシン酸へと変換され、さらに酵母のリパーゼ作用によりロイシン酸エチルが生成される事が報告されているが、これまで *A. oryzae* によるロイシンからロイシン酸の生合成に関与する候補遺伝子についての知見はなかった。本研究では、*A. oryzae* においてロイシン酸の前駆体と考えられた 4-methyl-2-oxopentanoic acid (MOA) をロイシン酸に変換する酵素である MOA レダクターゼの探索を行った。さらに、見出した酵素をセルフクロニングによって高発現させた麹菌を作製した。将来的には、MOA レダクターゼを高発現させた吟醸酒用麹菌を用いることで香味豊かな吟醸酒生産への展開も期待できる。

【方法・結果】

麹菌のゲノム情報から MOA レダクターゼが属すると考えられる 2-ケト酸デヒドロゲナーゼファミリーに属する 5 種の遺伝子を選抜した。これらの遺伝子について、大腸菌を宿主として組換え酵素を異種発現させ精製後、MOA 存在下における NAD(P)H の減少をモニターすることで MOA レダクターゼ活性の有無を調べた。その結果、5 種のうち 1 種は NAD(P)H 存在下で MOA をロイシン酸に還元した。さらに、その酵素をセルフクロニングによって高発現させた麹菌を作製した。この MOA レダクターゼ高発現株のロイシン酸生産能について、LC-MS/MS (API4000) を用いて解析した。ロイシン酸の生産量を定量したところ、この株では野生株に比べて 108 倍ロイシン酸を生産していた。現在、作製したロイシン酸生産能強化麹菌を使用した日本酒の小規模醸造試験を行っている。

P25

DNA 結合タンパク質を用いたタンパク質の新規ビーズディスプレイ法の構築と

トランスグルタミナーゼアッセイへの応用

○溝口琢郎¹, 児島孝明¹, 人見清隆², 中野秀雄¹

(¹名大院・生命農学、²名大院・創薬科学)

【背景と目的】

本研究室では、エマルジョン内での PCR と無細胞タンパク質合成系を組み合わせた機能性生体分子 *in vitro* ハイスクリーン解析手法、ビーズディスプレイ法の開発に成功している。これまで本手法を様々なタンパク質・酵素機能改変に用いるために、DNA 結合タンパク質である一本鎖 Cro (scCro) を用いたビーズ当たりの提示タンパク質分子数の増大や、マイクロフォーカシングデバイスを利用した提示タンパク質分子数の均一化といった改良を行ってきた。そこで本研究では、この改良したビーズディスプレイ法の、架橋酵素であるマウス由来トランスグルタミナーゼ(TGase)2 のターゲット配列の探索への応用を目的とした。

【方法と結果】

TGase2 の基質ペプチドである T26 を scCro との融合タンパク質として無細胞蛋白質合成系で発現させ、scCro の DNA 結合配列を用いてビーズ上へ提示した。その後、マウス由来 TGase2 ともう一方の基質である蛍光標識化カダベリンを用いて酵素反応を行い、フローサイトメトリーによる解析を行った。その結果、T26 と scCro との融合タンパク質がマウス由来 TGase2 の基質として機能したことを確認できた。以上の結果より、DNA 一分子から TGase の基質ライブラリーをビーズ上に構築し、FACS を用いたトランスグルタミナーゼの HTS 基質スクリーニング系が構築できた。

P26

ゼブラフィッシュ由来細胞を用いた DNA 複製の解析

○東山恵理子¹, 栗谷健志¹, アヴシャル恵理子², 田丸浩², 緒方進¹, 奥村克純¹

(¹三重大院・生資・分子細胞生物学、²三重大院・生資・水圏生物利用学)

【目的】

ゼブラフィッシュは、発生が早く発生期間を通して胚が透明な魚類であり、ヒトに近いゲノム配列を持つ。近年では、生体内組織の観察や遺伝子操作の簡便さという特徴から、肥満ゼブラなどヒトの生活習慣病研究などのモデル生物として注目されており、個体レベルの研究材料として幅広く利用されている。一方、食品の機能性などを詳細に研究するには、細胞レベルの研究が必須である。しかしながら、ゼブラフィッシュの細胞レベルでの情報は乏しく、ヒトやマウスをはじめとする哺乳類と比較して不明な点が多い。そこで、本研究では、個体レベルでの現象を分子レベルで詳細に解明する前段階として、まずは細胞周期や DNA 複製を中心に細胞レベルの基本情報を集めることを目的とした。

【方法・結果】

ゼブラフィッシュ由来細胞 (AB9) を用いて細胞周期や DNA 複製の解析を行なった。DNA 複製の解析には、ゲノム上で複製フォークを可視化し、複製の進行方向を示した上で、複製起点を捉えることが有効な手段であると考え、分子コーミング法を用いた。この手法により、DNA 分子を一分子単位で可視化し、DNA 複製フォークの進行速度と複製起点間距離を解析した。その結果、AB9 はヒト由来細胞 (HeLa) と比較して、複製起点間距離に有意な差はないが、複製フォーク速度は速いことが示された。さらに、増殖速度は遅いにも関わらず S 期が比較的短いことから、AB9 は間期が長いことが示唆された。一方、ゼブラフィッシュ初期胚についても、胚発生時における DNA 複製の解析を検討した。

DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷におけるヘミメチル化 DNA の寄与
○生野彰宏¹、吉村健¹、緒方進¹、奥村克純¹ (¹三重大院生物資源学)

【目的】

DNA メチル化は、クロマチン構造や遺伝子発現を制御するエピジェネティック修飾の一種である。ヒトの DNA メチル化は DNA 配列中の CpG の C に修飾され、DNA 複製時に、親鎖 CpG のメチル化修飾を DNA 維持メチル化酵素(DNMT1)が娘鎖 CpG へコピーしメチル化レベルを維持する。DNMT1 の減少や阻害剤処理による DNA メチル化レベルの低下は、DNA 複製依存的に DNA 損傷を誘導するが、DNA 損傷により細胞のがん化や生活習慣病が引き起こされることが示唆されており、低メチル化に伴う DNA 損傷誘導メカニズムの解明は重要な意味を持つ。当研究室では、DNMT1 の足場となるタンパク質(UHRF1)が、低メチル化処理によって機能を果せず DNA 上に残り、次の DNA 複製時に DNA 複製フォーク進行の障害として、DNA 損傷を誘導するモデルを推定した。このモデルの裏付けとして、維持メチル化不全で生じたヘミメチル化 CpG の増加が必須であり、本研究では、DNMT1 減少または阻害剤処理条件での、ヘミメチル化 CpG 解析を目的とする。

【方法・結果】

ヒト結腸腺癌細胞 (HCT116) を siDNMT1 によって DNMT1 減少処理、または DNMT1 阻害剤 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)処理し、hairpin-bisulfite sequence 法を用いてヘミメチル化 CpG の解析を行った。その結果、siDNMT1、5-aza-dC 処理細胞ともにヘミメチル化 CpG の増加が明らかとなり、前述のモデルに則ったヘミメチル化 CpG の DNA 損傷への寄与を明らかにした。DNA メチル化は栄養素に影響を受ける報告があり、本研究で示すモデルは、偏食等による生活習慣病の発症メカニズムを解き明かす手がかりとなるかもしれない。

DNA 脱メチル化に伴う DNA 損傷機構へのヘミメチル化 DNA 結合タンパク質 UHRF1 の関与
○柴田隆豊¹、吉村健¹、緒方進¹、奥村克純¹ (¹三重大院・生物資源)

【目的】

DNA のメチル化は、遺伝子発現やクロマチン構造の制御に関わるエピジェネティック修飾のひとつである。近年、この DNA のメチル化の異常が代謝変動などでも生じることが示唆されており、生活習慣病の発症や予防と関連する可能性がある。DNA のメチル化パターンは、UHRF1 がヘミメチル化 CpG 部位を認識して結合し、DNA 維持メチル化酵素 (DNMT1) をリクルートすることで維持される。このとき DNMT1 を阻害し、DNA メチル化レベルを低下させると DNA 損傷が誘導される。一方、UHRF1 の機能を DNMT1 と同時に阻害すると、DNA 損傷のレベルが低下することから、これらの DNA 損傷には UHRF1 が関与していると考え、UHRF1 が関与する DNA 損傷のメカニズムを解明することを目的とした。

【方法・結果】

ヒト網膜上皮細胞 (RPE 細胞) を DNMT1 阻害剤である 5-aza-dC で処理し、ChIP 法により DNA 二本鎖切断マーカーである γ -H2AX の蓄積する領域を回収した後、メチル化 CpG リッチな遺伝子領域を、リアルタイム PCR によって定量した。その結果、5-aza-dC 処理により、メチル化 CpG リッチな遺伝子領域において DNA 損傷が誘導されることが明らかとなった。これらの DNA 損傷が、ヘミメチル化部位に結合した UHRF1 によって誘導されるのかを検証するため、5-aza-dC 処理後、一度 DNA 複製期を通過させ、同調後、リリースした RPE 細胞の UHRF1 が蓄積する領域を ChIP 法によって経時的に回収し、メチル化 CpG リッチな遺伝子領域において UHRF1 の定量を行った。その結果、5-aza-dC 処理によって γ -H2AX が蓄積した領域で UHRF1 の蓄積が確認されたことから、ヘミメチル化部位に結合したままになった UHRF1 が、損傷を引き起こしていることが示唆された。本研究で示した DNA メチル化レベルの低下による DNA 損傷誘導が、生活習慣や食生活の乱れにより生じる DNA 脱メチル化が、生活習慣病やガンなどにつながるメカニズムを解明する手がかりとなるかもしれない。

コンポストからのセルロース分解好熱細菌の単離と同定
および蓄積された疎水性物質の解析

岡田智八¹, Weera Piyatheerawong², 児島孝明¹, 岩崎雄吾¹, 中野秀雄¹
(¹名大院・生命農、²Kohon Kaen University・Technology・Biotechnology)

【目的】CO₂ 排出量を削減し、持続可能な化学工業システムを構築するためには、再利用可能な生物由来の炭素源を利用するバイオリファイナリー技術を確認する必要がある。しかしながら代替エネルギーの代表ともいえるバイオエタノールの原料の多くは穀物由来の糖であり、食糧との競合が問題となっている。このため、セルラーゼを用いたセルロース系バイオマス資源の利用する、新たなバイオプロセスが望まれている。

そこで本研究では、農業廃棄物を炭素源として利用するバイオプロセスに適した微生物の候補として、セルロースを唯一の炭素源として生育しする好熱菌の探索を行った。

【方法・結果】バイオマスを主要原料とするコンポスト中の微生物を、カルボキシメチルセルロース (CMC) のみを炭素源とする培地を用い、50℃で単離した。得られた菌株を CMC 培地で培養後 CongoRed 溶液で染色し、コロニー周辺でのハローを形成する菌株を選別した。さらにリン酸処理セルロース (PASC) もしくは CMC のみを炭素源とする培地での生育がみられた菌株を選別した。得られた菌株について、16s rRNA 遺伝子配列解析を行ったところ、それらは *Streptomyces* 属もしくは *Bacillus* 属および *Aeribacillus* 属に属する細菌であった。

現在、*Aeribacillus* 属の細菌に関して、生育条件や、生産する疎水性物質、セルラーゼ活性等について調べている。

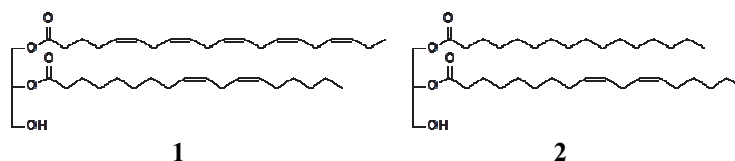
ジャガイモ疫病菌のファイトアレキシン誘導性エリシターとしてのジアシルグリセロール
○天廣志保, 松田健太郎, 川北一人, 小鹿一 (名大院生命農)

【目的】

ジャガイモ疫病菌 *Phytophthora infestans* はジャガイモ・トマト等に感染し、葉や果実を軟化腐敗させ、世界中で甚大な被害を及ぼしている。この被害を減らすための一つの有用な防除法が「エリシター」の応用である。エリシターとは植物にファイトアレキシン（低分子抗菌物質）の蓄積などの抵抗反応を誘導する生理活性物質の総称であり、疫病菌や昆虫などから得られる。従って、エリシターの性質を上手く応用することができれば、植物の抵抗力を向上させる自然農薬の開発につながると考えられる。本研究では、ファイトアレキシン誘導活性を示すエリシターの単離同定を目的とする。

【方法・結果】

ファイトアレキシン誘導活性検定は、まずジャガイモ塊茎に直径 9 mm の穴をあけ、サンプルの 5% DMSO 溶液をいれ、48 時間インキュベート後に穴の中の溶液を取り出し、酢酸エチル抽出、シリカゲル TLC 分析することでファイトアレキシン（リシチン、ルビミン、オキシルビミン）を検出した。活性物質の精製は *P. infestans* の菌糸のメタノール抽出物をブタノールと水で分配し、ブタノール画分を 2 回のシリカゲルカラムクロマトと逆相 HPLC によって分画した。NMR から、これらの画分が様々なジアシルグリセロール類であることがわかった。この中で 1 はファイトアレキシン誘導活性を示したが、2 は示さなかったことから、構成脂肪酸が活性に重要であることが示唆された。



P31

In Vitro Synthesis of Horseradish Peroxidase with DNA binding tag and its fluorogenic assay for bead display-based ultra-high-throughput screening

○Bo Zhu, Takuro Mizoguchi, Takaaki Kojima, and Hideo Nakano
(Grad. Sch. Bioagric. Sci., Nagoya Univ.)

A cell-free protein synthesis (CFPS) system can produce various types of proteins directly from DNA templates such as PCR products. As a CFPS-based ultra-high-throughput screening platform [1], bead display requires a strong association between the synthesized protein and micro-bead. However, the previous design using antibody is relatively complicated and the association is not strong enough when only few protein molecules can be synthesized in single-bead emulsion CFPS. Here, we report on successful expression of active horseradish peroxidase (HRP) and single-chain lambda Cro repressor (scCro, $K_D=2 \times 10^{-12}$ M) fusion protein in an *Escherichia coli* CFPS system to increase the efficiency of protein immobilization for bead display.

According to the experience in synthesizing manganese peroxidase [2], the reaction conditions of CFPS were optimized to increase the solubility and activity of HRP. Then, the HRP with N-terminal and C-terminal scCro-tag were synthesized. The scCro-tag on both positions increased the solubility of HRP. Next, the two kinds of HRP fusions were displayed on micro-bead via scCro-DNA interaction. The activities of immobilized HRP fusions were detected by a tyramide-based fluorogenic assay using flow cytometer. Moreover, a model bead library containing genes of wild-type HRP (WT) and inactive mutant (MUT) was screened, and an enrichment of the wild-type gene from the 1:100 (WT:MUT) library was achieved.

[1] Kojima, et al., J. Biosci. Bioeng., 114, 671-676 (2012).

[2] Ninomiya, et al., J. Biosci. Bioeng., 117, 652-657 (2014).

P32

DNA 結合タンパク質を用いたビーズディスプレイ法による
糸状菌由来マンガンペルオキシダーゼのハイスループットスクリーニング系の開発
○太田英里¹, 朱博¹, 兒島孝明¹, 中野秀雄¹ (¹名大院・生命農)

【背景・目的】

我々は、エマルジョン内での PCR と W/O エマルジョン内での無細胞蛋白質合成系を組み合わせ、磁性マイクロビーズ上に変異蛋白質ライブラリーを作製し、Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)を用いて、機能性生体分子をハイスループットに解析、取得するビーズディスプレイ法を開発している。一方、白色腐朽菌の分泌性リグニン分解酵素の Manganese peroxidase (MnP) は、大腸菌での発現が困難であり、酵素機能の向上を目的とした進化分子工学の適用が課題であった。

そこで、本研究では DNA 結合タンパク質である scCro をタグとして MnP をビーズ上に提示させ、酵素活性を指標としたハイスループットスクリーニング系の構築を目的とした。

【方法・結果】

MnP 発現用に改良した大腸菌無細胞タンパク質合成系により、MnP を scCro との融合タンパク質として発現させ、scCro の DNA 結合領域である ORC を固定したマイクロビーズに結合させた。その後、フローサイトメトリーを用いてビーズ上における MnP の提示量の評価を行った結果、MnP をビーズ上に提示できることが示された。さらに、MnP の基質としてビオチン化チラミドと蛍光標識したアビジンを用いてビーズ上に固定された MnP の活性測定を、フローサイトメトリーによる計測を試みたところ、MnP を提示しているビーズは、そうでないビーズに比べて有意に高い蛍光シグナルを示した。現在本手法を用いて、活性を指標とした MnP のスクリーニングを行っている。

ウェルシュ菌によるセルラーゼ遺伝子の発現

○東 正人, 朝日 航, 森山龍一, 宮田 茂 (中部大院応用生物)

【目的】 微生物の有機物分解能や光合成を利用したバイオエタノールやメタンガス、水素ガス等の生産は微生物関連の再生可能エネルギーとして、近年急速に進歩し一部実用化されている。このうちセルロース系バイオマスを対象とする方法はだいに期待されているが、次代の要請にだえるべく、低コスト化、効率化などの技術革新が求められている。

グラム陽性嫌気性細菌である *Clostridium perfringens* は、土壤中やヒトを含む動物の腸管内に存在しており、旺盛な有機物分解能を有し、「stormy fermentation」にふさわしい大量の水素ガスを産生する。水素ガスは、単位重量あたり石油の3倍もの潜在エネルギーをもち、次世代のクリーンなエネルギー源と期待されていることから、種々のセルラーゼ遺伝子を持ち、炭素源としてセルロースを利用することが可能な *C. perfringens* 株の開発を目標として、*C. acetobutylicum* の endoglucanase 遺伝子 *eglA*、*celF*、スキヤフォールディン遺伝子 *cipA* を *C. perfringens* に導入し発現を試みるとともに、その酵素活性と安定性を調べた。

【方法・結果】 *C. acetobutylicum* の染色体 DNA を鋳型にして PCR により *eglA*、*celF* を増幅し、当研究室で開発したキシロース誘導性発現ベクターである pXCH の *NdeI*-*XhoI* サイトに挿入して pCelF、pEglA を構築した。塩基配列を確認後 *C. perfringens* 13 株を形質転換した。形質転換株を培養しキシロースの添加によって発現を誘導した。培養上清を SDS-PAGE で解析するとともに、カルボキシメチルセルロース (CMC) を基質として CMC 分解活性を半定量的に調べた。その結果、*eglA* 形質転換株では誘導 1 時間後には約 80 kDa の EglA に相当するバンドが観察され、CMC 分解活性も同様に観察された。またこれらはともに 19 時間経過後も維持していた。一方で、*celF* 形質転換株では *celF* の発現と CMC 分解活性は観察されなかった。そこで、現在 *celF* の上流に存在するスキヤフォールディン遺伝子 *cipA* 及び *cipA* と *celF* の両方を組み込んだ発現ベクターの構築を行っている。

各種 β -グルコシダーゼの酵素活性に及ぼす加圧の効果

○林 秀太, 神野 沢弥, 藤田 智之 (信州大院農)

【目的】

100 MPa 以下の加圧条件下における市販セルラーゼの酵素活性への圧力効果を調査したところ、複数の酵素で加圧下での還元糖生成量が常圧下に比べて増加することを見出した。各種基質を用いて Celluclast 1.5L を作用させた結果、本酵素の圧力感受性は β -グルコシダーゼ活性の昂進であることが示された¹⁾。今回は、Celluclast 1.5L を用いて、加圧下での反応温度と pH の影響について検討した。また、同じ微生物由来の酵素としてセルラーゼ“オノヅカ”3S、植物由来の酵素として almond 由来及び脱穀したソバ種子中の β -グルコシダーゼ活性の変化についてもそれぞれ調査した。

【方法・結果】

酵素はセルラーゼ Celluclast 1.5L、セルラーゼ“オノヅカ”3S、almond 由来 β -グルコシダーゼ及びソバ粉から調製した粗酵素液²⁾を用いた。基質には 4-nitrophenyl β -D-glucopyranoside (pNPG) を用いた。チャック付き袋に 0.1 M 酢酸緩衝液 1.0 ml、1 mg/ml 基質 0.5 ml、酵素溶液 0.5 ml を添加し、シーラーで密封後、常圧 (0.1 MPa) または中高压 (100 MPa) 下、25~70℃及び pH 3.5~6.0 にて反応を行った。反応終了後、0.2 M 炭酸ナトリウム水溶液を 2.0 ml 加え、反応液の吸光度 (400 nm) を測定した。

Celluclast 1.5L 中の β -グルコシダーゼ活性を測定した結果、反応温度の高い条件ほど、常圧下と比べて加圧下での pNP 生成量が増加した。反応 3 時間後の pNP 生成量は、温度 65℃のときが最も多く、常圧下と比べて 1.9 倍となった。植物由来の酵素では、ソバ粉粗酵素液中の β -グルコシダーゼ活性も加圧下で上昇し、反応 2 時間後の pNP 生成量は常圧下と比べて 1.4 倍となった。一方、almond 由来 β -グルコシダーゼ活性を測定した結果、ソバ粉の場合とは異なり、常圧下と比べて加圧下で活性は著しく低下した。以上の結果から、酵素の起源の違いによって圧力感受性が異なることが示唆された。

1) 日本農芸化学会 2014 年度 (平成 26 年度) 大会講演要旨集, P. 89 (2014)

2) 日本食品科学工学会第 61 回大会講演集, p.160 (2014)

天然物化学研究成果の事業化による社会貢献と大学の活性化
○中塚進一＊（長良サイエンス株式会社、＊岐阜大学名誉教授）

【目的】

大学の研究で得られた最先端科学技術やその研究成果を活用して大学発ベンチャーを創業し、広く社会の発展に貢献すると共に出身母体をも活性化することを目的として事業を進めた。

【方法・結果】

筆者は岐阜大学において生理活性天然物の全合成、新規天然物の単離、構造決定、活性発現機構等を研究してきた。これらの研究は合成反応、分離精製、構造解析などの独自の技術を開発しながら進めることが多く、その新技術を当該研究室のみならず、広く一般社会にも貢献できると共に、大学自身をも活性化できると考えた。

1990年のバブル崩壊後に、大学の技術を日本社会の活性化に生かすべく大学発ベンチャーへの期待が高まった。筆者は1999年に岐阜大学発ベンチャーを創業した。翌年の2000年、筆者は国立大学教官初の会社社長としての兼業が文科省、人事院より認められて現在まで弊社社長を務めている。長良サイエンス（株）では、茶カテキン類、大豆イソフラボン類をはじめとした食品、健康食品、漢方薬等の生理活性成分約300種類の試薬を販売しているが、その大半は世界初商品で、世界の研究発展に貢献している。この間に、複雑な天然物を簡便に分析、分離精製する独自の技術を開発して新規試薬の開発や、受託精製の業務にも用いている。また出身大学の研究発展にも貢献して高学歴社員の雇用を創出して高度な研究の場を提供して、社員の大半が博士、修士の学位取得者として活躍している。

なお、弊社の業績は各社の新聞、雑誌に取り上げられると共に表彰された（平成17年度安藤百福賞ベンチャー部門優秀賞、平成19年度東海地区信用金庫協会ビジネス大賞最優秀賞）。

紫外線エンド吸収と分取セルを利用した HPLC 分析法の開発と標準品試薬製造への応用
○松本恵実、藤野和孝、牧岡富広、石野暢好、中塚進一（長良サイエンス株式会社）

【目的】

グルコシルセラミド等の脂質、イヌリン等の糖質は、生体内や植物内において様々な役割を担っているが、その生理活性発現機構の解明や応用研究にはそれら化合物の分析法の確立や高純度品が必要である。HPLC 分析は有機化合物の主要な分析法の一つであり、化合物の検出は UV 検出器を用いて各化合物に特徴的な UV 吸収波長で測定することが多い。しかし、グルコシルセラミドやイヌリンのように特徴的な UV 吸収のない化合物の検出は極めて困難である。このような化合物を分析する場合、ELSD 等、他の検出器の利用や誘導体化して検出する方法がとられるが、再現性や分取への応用が困難等の問題点がある。そこで我々は簡便でかつ分取への応用が可能な分析法を検討した。

【方法・結果】

グルコシルセラミド及びイヌリンは UV_{200nm} 付近にエンド吸収を持つためこれを利用した。この波長の分析は、溶媒自身や溶媒中の不純物による吸収のため困難であるが、検出器のセルを分析用セル（セル長 10mm）から分取用セル（セル長 1mm）に替えたところ、溶媒由来の吸収が 1/10 に減少し、UV_{200nm} での分析が可能になった¹⁾。本法を用いてグルコシルセラミドの検量線を作成できた。さらに UV_{200nm} では、安価な一級グレードのメタノールでも分析が可能で、本法は分取へも応用が可能であるため安価な分取法を開発できた。本法を用いてグルコシルセラミド混合物を分離精製し、米、蒟蒻、舞茸、たもぎ茸由来グルコシルセラミド構成成分をそれぞれ 6, 9, 5, 4 種類、純度 99%以上、3mg~1.4g 得た。また本法を用いてイヌリンオリゴ糖混合物を分離精製し、GF₄~GF₁₉ の 16 種類を純度 95~100%、13mg~116mg 得た。本法は脂質、糖質等、特徴的な UV 吸収がない化合物の分析及び分取を可能にし、標準品試薬製造に応用できた。1) 松本恵実, 中塚進一, FOOD Style 21, 17(3), 87-89 (2013)。

自己縮合法を用いた epicatechin 二量体の選択的合成と procyanidin C1 の合成への応用

○須田真人¹, 藤井 渉¹, 高梨光希¹, 服部恭尚², 真壁秀文¹(¹ 信州大学大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻, ² 京都薬科大学 創薬科学系)

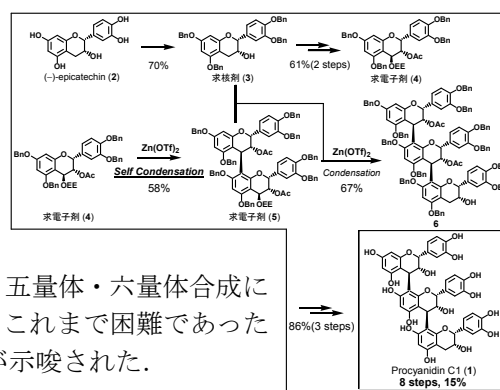
【目的】

Procyanidin 類は自然界において数多くの植物, 取り分けブドウや茶葉等に豊富に含有されるポリフェノールの一類であり, 抗酸化活性を筆頭に多様な生理活性が報告されている. しかし天然中においては微量かつ複雑な混合物として存在し, それらの単離・精製並びに精密な活性試験は困難を極める. 故に, 効率的な有機合成法の開発は, procyanidin 類の応用開発に繋がる重要な課題であると言える.

本研究においては, 温和な条件で縮合剤に $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ を用い, epicatechin 単量体を自己縮合させることで選択的に epicatechin 二量体を得る手法を開発し, procyanidin 類合成経路の更なる効率化へと導くことを目的とした.

【方法・結果】

(-)-Epicatechin (2) を出発物質として, 求核剤(3)及び求電子剤(4)を合成し, 得られた求電子剤(4)を $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ を用いた自己縮合反応¹⁾に供し, 収率 58%で二量体求電子剤(5)を得た. 求電子剤(5)を更に $\text{Zn}(\text{OTf})_2$ を用いた求核剤(3)との縮合反応に供し, 収率 67%で三量体(6)を得た. その後, 脱保護を経て, 8 段階, 総収率 15%で procyanidin C1 (1)を得た.



本手法は右図に示した三量体合成のみならず, 四量体・五量体・六量体合成においても応用可能であることが確認された. したがって, これまで困難であった高次重合体合成における合成経路の大幅な改善の可能性が示唆された.

1) Suda, M., Fujii, W., Takanashi, K., Hattori, Y., Makabe, H. *Synthesis*. **2014**, 46, in press.

出芽酵母のアセトアルデヒドストレス耐性機構における NADPH 供給系の機能と役割

松山明加¹, ○高木哲史¹, 佐藤優太¹, 早瀬未来¹, 早川享志¹, 河井重幸², 村田幸作³, 奥公秀², 由里本博也², 阪井康能², 中川智行¹ (¹ 岐阜大応生, ² 京都大院農, ³ 摂南大理工)

【目的】

アルコール発酵の代謝中間体であるアセトアルデヒド (AA) は, 様々な生体物質と付加体を形成し, 生体機能を阻害する毒性化学物質である. つまり, アルコール発酵において AA は代謝抑制因子であり, 今後, AA 耐性能の強化が出芽酵母の分子育種の重要課題と考えられる. 一方, 我々はグルタチオン還元系, 脂肪酸合成系など, NADPH を要求する代謝系が AA 耐性機構において重要であることを報告してきた. しかし, これらに NADPH を供給する代謝系の AA 耐性機構における機能については明らかでない. そこで, 本研究では AA 耐性機構における NADPH 供給系の役割の解明を目的とした.

【方法・結果】

NADPH の供給には (1) NADP^+ の還元と (2) NAD^+/NADH のリン酸化が必要不可欠である. 出芽酵母では, NADP^+ 還元系としてペントースリン酸経路 (PPP) と AA 脱水素酵素 Ald6 が報告されている¹⁾. PPP 遺伝子群の欠損はグルコースを炭素源としたとき強い AA 感受性を示したが, グリセロールを炭素源としたとき PPP よりも *ald6Δ* 株の方が強い AA 感受性を示した. さらには, AA ストレスにより細胞内 NADPH のみならず NADP^+ 量も顕著に増加したことから, NADP^+ 還元系だけでなく NAD^+/NADH リン酸化系も重要であることが分かった. また, NAD^+/NADH リン酸化酵素遺伝子のうち *pos5Δ* 株のみが強い AA 感受性を示した. 以上より, 出芽酵母の AA 耐性では Pos5 が NADPH を生産し, PPP と Ald6 が NADP^+ 還元系として機能することで細胞内 NADPH の増強を図っていると考えられる.

¹⁾ Grabowska and Chelstowska (2003) *J. Biol. Chem.* 278: 13984-13988.

出芽酵母のアセトアルデヒドストレス耐性におけるグルタチオン代謝系の役割

○佐藤 優太, 尾形 泰子, 光永 徹, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大応生)

【目的】

アセトアルデヒド (AA) はアルコール発酵における重要な代謝中間体であるが、タンパク質などの生体因子と付加体を形成する毒性物質である。つまり、出芽酵母は発酵の際、AA の毒性に曝されており、それに対する何らかの耐性機構を保持していると推察できる。我々は、これまでにグルタチオン (GSH) 生合成系の欠損が強い AA 感受性を示すことを明らかにしてきたが、それだけでは AA 耐性機構を十分に説明できず、GSH 代謝経路の AA 耐性機構への新たな関与が推察された。そこで、本研究では GSH 代謝系に関与する DUG 経路の AA 耐性機構における役割について解析した。

【方法・結果】

GSH の分解系は、近年、液胞内局在 Ecm38 に加えて、GSH を Cys-Gly に分解する Dug2/Dug3 と Cys-Gly を Cys に分解する Dug1 で構成される細胞質局在型 DUG 経路の存在が報告された¹⁾。これらの遺伝子破壊株のうち、*ecm38Δ*、*dug3Δ* は AA 感受性を示さず、*dug2Δ* は強い AA 感受性を示し、*dug1Δ* は AA 耐性能が向上した。一方、*DUG2* および *DUG3* は AA により発現量が有意に増加した。さらに、*met4Δ* 株では、*DUG2* および *DUG3* の AA 応答が観察されなかったことから、Met4 が *DUG2*、*DUG3* の AA に対する遺伝子発現を制御している可能性が示唆された。また、GSH の分解物である Cys-Gly は GSH よりも短時間で AA と結合する能力を有していたことから、GSH による AA 毒性回避のみならず、Cys-Gly による AA 回避システムの重要性が示された。しかし、酵母に AA ストレスを与えても生体内における Cys-Gly と AA が結合した物質の挙動に変化が見られなかった。つまり、Cys-Gly は AA 耐性機構に関与しているが、主として働いている別の機構の存在が示唆された。

¹⁾ Baudouin-Cornu *et al.*, 2012. *J. Biol. Chem.* 287: 4552.

メチロトロフ酵母 *Pichia methanolica* の炭素源による生育特性と AOD アイソザイムの発現誘導

○若山 敬嗣, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大応生)

【目的】

メチロトロフ酵母は、強力なメタノール誘導性プロモータを有し、それらを用いた異種遺伝子発現系が広く利用されている。特に *P. methanolica* は 2 種のアルコールオキシダーゼ (AOD) 遺伝子 MOD1 と MOD2 を持ち、両遺伝子産物からアイソザイムを形成する。両 AOD 遺伝子は、炭素源が存在しない場合には Mod1p のみが誘導され、ここにメタノールを添加することで Mod2p が発現するというように発現誘導がそれぞれ異なる。私たちは *P. methanolica* のこのような MOD1/2 プロモータの発現誘導の違いを利用した新規な異種遺伝子発現系の構築が可能であると考えている。このような背景から、本研究では種々の炭素源培養下における *P. methanolica* AOD アイソザイムの発現特性の詳細を解析し、また生育が良好であり、かつ AOD 遺伝子の発現誘導を阻害しない炭素源の選抜を目的とした。

【方法・結果】

P. methanolica の生育特性、さらには AOD アイソザイムの発現を阻害しない炭素源の選抜を目的に、様々な炭素源に 1%メタノールを添加した培地を作成し、その生育と AOD アイソザイムの発現特性を観察した。その結果、メタノールでの生育と比べ、グリセロール以外の炭素源培養時には菌体収量が上昇した。またこれらの AOD アイソザイムの発現を観察したところ、炭素源単独での培養時は主に Mod1p の発現が見られ、1%メタノールを添加した培養では Mod1p、Mod2p 両方の発現が見られた。この発現パターンは、グリセロール、ガラクトース、キシロースにおいて顕著に見られた。これらのことから、ガラクトース、キシロースを炭素源として利用することで高効率な有用タンパク質生産が期待され、2 つの AOD プロモータを活用した新規異種遺伝子発現系への応用も期待できると推測される。

P41

Pichia pastoris のペントースリン酸経路を介したキシロース 5-リン酸供給系の機能と役割の解明
○福岳 寛隆, 早川 享志, 中川 智行 (岐阜大応生)

【目的】

メチロトロフ酵母はメタノール代謝の際、ペルオキシソーム内でメタノールを酸化し、代謝中間体のホルムアルデヒドをキシロース 5-リン酸 (Xu5P) に固定することで、メタノール由来炭素を細胞構成成分に導いている。この Xu5P は代謝中間体をフルクトース-1,6-ビスリン酸アルドラーゼ (FBA) により、ペントースリン酸経路へ導くことで供給している。そのため、FBA およびペントースリン酸経路酵素がメタノール代謝においても、非常に重要であると考えられる。しかし、これまでにこれらのメタノール代謝における重要性に関する詳細な報告はほとんどない。そこで、本研究では *P. pastoris* のメタノール代謝における Xu5P 供給系の重要性について解析を行った。

【方法・結果】

P. pastoris において Xu5P 供給系の遺伝子情報をゲノムデータベースにて探索したところ、FBA とトランスアルドラーゼ (TAL) をコードする ORF は 2 コピーずつ (*PpFBA1*, *PpFBA2* および *PpTAL1*, *PpTAL2*) 存在し、フルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBP) およびトランスケトラーゼ (TKT) は 1 コピー存在した。FBA および TAL の 4 遺伝子の発現応答を観察したところ、*PpFBA1* および *PpTAL1* は構成的発現を示したが、*PpTAL2* はメタノールにおいて強い誘導、*PpFBA2* はメタノールに特異的な誘導が見られた。また、FBA 活性の細胞内局在を観察したところ、その局在は細胞質であった。これらのことから、構成的発現を示す PpFba1p, PpTal1p と 1 コピーしか持たない FBP, TKT は一般的に知られている解糖系およびペントースリン酸経路の酵素として機能し、PpFba2p と PpTal2p はメタノール代謝に特異的な誘導酵素であると考えられる。

P42

大腸菌における生体内 malonyl-CoA 量に寄与する因子のスクリーニング
○山本 聡、山梨智也、鮎 信学 (静岡県大院・食栄)

【目的】

malonyl-CoA は脂肪酸合成経路の重要な中間体である。また、大腸菌生体内では malonyl-CoA 量は厳密に制御されており、その濃度は低く抑えられている。ポリケタイドは malonyl-CoA を前駆物質とする二次代謝産物である。そのため、大腸菌を宿主としたポリケタイドの微生物生産において malonyl-CoA 量はボトルネックになっている。我々は大腸菌 *E. coli* K-12 BW25113 の 3,985 種の非必須遺伝子の単一欠損株コレクションである Keio collection を用い、malonyl-CoA の生体内量に寄与する遺伝子のスクリーニングを行った。

【方法・結果】

Ⅲ型ポリケタイド合成酵素 RppA は、5 分子の malonyl-CoA から THN の合成を触媒する。THN は容易に赤色色素 flaviolin に酸化される。大腸菌発現用ベクター pQE2 に *rppA* をクローニングし、pQE2-rppA を作製した。大腸菌 *E. coli* K-12 BW25113 株および Keio collection 株に pQE2-rppA を形質転換した。LB 培地培養液の flaviolin 生産を定量することにより、個々の形質転換株の malonyl-CoA 量を評価した。その結果、63 種の株が親株よりも高い flaviolin 生産能を示した。flaviolin の生産量が増加した原因としては、第一に代謝流量が改変されたことによる malonyl-CoA 量の増加、第二に細胞内 ATP 量の増加、第三に発現プラスミドのコピー数の増加が考えられる。そこで、63 種の高 flaviolin 生産株に対し、malonyl-CoA の定量を LC-MS により、ATP 量をルシフェラーゼアッセイによって定量した。

P43

Pd 触媒によるカルボニレーションを用いた α , β -不飽和- γ -ラクトン環を有する天然物の合成
○彦坂源¹, 服部恭尚², 真壁秀文¹(¹信州大学大学院農学研究科 機能性食料開発学専攻, ²京都薬科大学 創薬科学系)

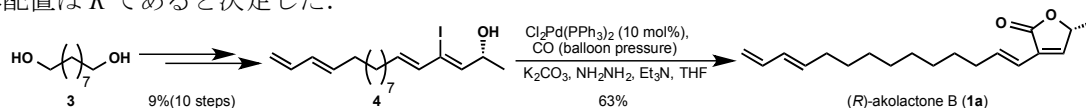
【目的】

分子内に α , β -不飽和- γ -ラクトン環を有する化合物は, 細胞毒性のような生理活性を示すものが多い. 本研究の目的化合物である akolactone B (**1**) はクスノキ科ハマビワ属の *Litsea akoensis* から単離され, C-4 位の絶対立体配置は未決定である. また (+)-ancepsenolide (**2**) はサンゴの一種である *Pterogorgia anceps* から単離, 構造決定されたが, その生理活性は未だ報告されていない. そこで, akolactone B (**1**) における C-4 位の絶対立体配置の決定と両目的化合物の効率的な合成法の確立を目的とした.

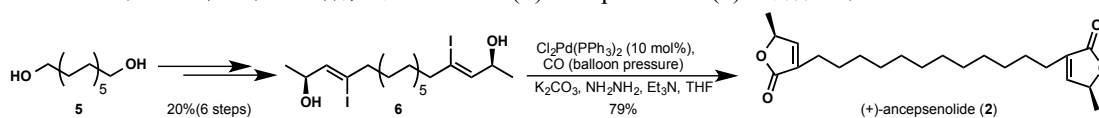
【方法・結果】

(R)-Akolactone B (**1a**) 及び (S)-akolactone B (**1b**) の合成

1,9-Nonanediol を出発物質として, (R)-(-)-3-butyn-2-ol または (S)-(-)-3-butyn-2-ol との菌頭クロスカップリング反応により望む立体化学を導入と, Pd 触媒を用いたカルボニレーションを含む 12 段階, 収率 7% 及び 2% で両エナンチオマーを合成した. また, 得られた比旋光度の値から C-4 位の絶対立体配置は R であると決定した.

(+) -Ancepsenolide (**2**) の合成

1,12-Dodecanediol を出発物質とし, Pd 触媒を用いたカルボニレーションにより 2 つの γ -ラクトン環構造を一挙に構築し, 7 段階, 収率 16% で (+)-ancepsenolide (**2**) の合成を完了した.



P44

Aspergillus nidulans が細胞外に分泌する β -マンナン分解に関与する新規タンパク質の機能解析

石原紗彩耶¹, 金子優平¹, 望月麻衣¹, 山本竜也¹, 前林正弘¹, 大場正春¹, 小林哲夫², 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)

【目的】

β -マンナンは針葉樹木, グァーガムやコーヒー豆など様々な植物に含まれる難分解性多糖で, 環境中に存在する未利用バイオマスの一つであるため, バイオエタノールの原料などとして注目を集めている. 我々は, β -マンナンのみを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に, *endo*-1,4- β -マンナーゼと共に細胞外に多量に生産される機能未知タンパク質 (HP) を同定した. HP は, 機能が分かっている既知のタンパク質と全く相同性を有しておらず, 推定される機能ドメインも含んでいなかった. 本研究では, 糸状菌による β -マンナン分解における HP の役割を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

hp 遺伝子破壊株 (Δ HP 株) を作製し, β -マンナンを唯一の炭素源とした培地で生育させたところ, 野生株と比較して生育が抑制された. グルコース, セルロースなどを唯一の炭素源とした場合, 野生株と同様に生育したことから, HP は β -マンナンの分解に関与すると考えられた. また, 精製したリコンビナントおよびネイティブの HP を用いて解析したところ, HP はゲル化した β -マンナンの主鎖を加水分解せずに β -マンナン溶液の粘度を大きく低下させた. さらに, HP と *endo*-1,4- β -マンナーゼを混合すると, β -マンナーゼによる β -マンナンの分解が促進された. これらのことから, HP は β -マンナン分子に作用し三次元構造を緩めることで, *endo*-1,4- β -マンナーゼによる β -マンナンの分解が促進されたことが考えられた.

本研究の一部は生研センター「イノベーション創出基礎的研究推進事業」の支援を受けて行われた.

ヒドロキシアーキオールコア脂質の生合成に関する研究
○森健, 磯部圭祐, 吉村徹, 邊見久 (名大院生命農)

【目的】

アーキアの膜脂質はそのグリセロール部分にイソプレノイド鎖がエーテル結合しているなど、他の生物群の膜脂質では観察されない特徴を有している。さらにイソプレノイド鎖はアーキア種によって様々な構造をもち、一部のメタン生成アーキアでは完全還元したイソプレノイド鎖に水酸基が付加したヒドロキシアーキオールをコア構造とする、特徴的な膜脂質が生合成されている。しかし、その生合成経路の詳細は明らかになっていない。当研究室ではアーキア由来の膜脂質生合成酵素遺伝子を複数クローニングし大腸菌に導入することにより、大腸菌内にアーキア膜脂質前駆体の生合成経路を構築することに成功している。本研究ではこの系を用いてヒドロキシアーキオール生合成酵素の探索を行った。

【方法・結果】

常温性メタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* よりフィトエンデサチュラーゼのホモログ遺伝子をクローニングし、上記のアーキア膜脂質前駆体を生合成する大腸菌に導入した。このカロテノイド合成酵素のホモログは、カロテノイドを生合成しない同菌においては、同じくイソプレノイド化合物であるアーキア膜脂質を基質として酵素活性を示すのではないかと期待された。同大腸菌株から抽出された脂質を LC/MS で分析した結果、アーキア膜脂質前駆体に水酸基が付加したと考えられる質量電荷比のイオンが検出された。この結果より、同酵素がヒドロキシアーキオールコア脂質の前駆体の生合成に関わることが予想された。そこで大腸菌株にメバロン酸経路を導入して同化合物の生産量を増加させ、抽出後、タンデム質量分析により詳細な分析を行った。

ヘムと結合したデハイドリンの酵素活性発現に関する研究
○天野翔乃¹, 原正和^{1, 2} (¹ 静大院農, ² 静大グリーン科技研)

【目的】

デハイドリンは、種子が胚形成を終了し、乾燥休眠に入る段階で大量に蓄積される LEA (late embryogenesis abundant) タンパク質の一種である。また、デハイドリンは、非生物学的ストレスを受けた植物でも発現するため、植物のストレス耐性向上に関係すると考えられている。デハイドリンは、特定の二次構造を取らない天然変性タンパク質であるため、機能を予測することが難しく、どのように植物のストレス耐性機構に関係しているかは現在のところ研究途上である。デハイドリンは、無機分子（水、カルシウム、重金属）や高分子（タンパク質、核酸）と結合することがわかっており、他の分子と結合することによって機能を発揮すると考えられる。しかし、デハイドリンと有機低分子との相互作用についての報告はなかった。本研究では、デハイドリンの重金属親和性に着目し、鉄イオンを配位するヘムとの結合を示すと共に、それに伴う酵素活性の発現について調査した。

【方法・結果】

シロイヌナズナの KS 型デハイドリン AtHIRD11 (At1g54410) は大腸菌発現系で調製した。AtHIRD11 の His 含有率を変化させた変異タンパク質も用意した。デハイドリンとの結合試験には、ヘミンを用いた。ヘミン結合はヘミンアガロース担体のアフィニティークロマトグラフィーで調べた。ペルオキシダーゼ活性は、タンパク質を転写した PVDF 膜にペルオキシダーゼの化学発光試薬を作用させて検出した。その結果、AtHIRD11 はヘミンアガロースと結合した。その結合は 1M NaCl では解除されなかった。また、PVDF 膜上でヘミンと結合しペルオキシダーゼ活性を示した。しかし、この 2 つの結果は His 残基を全て Ala に置換した変異タンパク質ではみられなかった。以上の結果、AtHIRD11 のヘム結合には His 残基が不可欠であることが示された。AtHIRD11 とヘムとの結合に関する生理的な意義について考察する。

P47

ホスホリパーゼDのタンパク質工学による位置特異的ホスファチジルイノシトール合成の最適化

○黒岩千智、石田健、田中秀俊、中野秀雄、岩崎雄吾（名大院・生命農・生命技術）

【目的】ホスファチジルイノシトール(PI)は脂質代謝改善作用などが認められる機能性リン脂質である。本研究では、元来PI合成活性を持たない放線菌由来ホスホリパーゼD(PLD)をタンパク工学的に改変することで、同活性を付与する事に成功した。しかし、改変型PLDによるPIの合成反応では、酵素の*myo*-イノシトールに対する位置特異性が完全ではないため天然型の1-PIに加えて、その位置異性体である3-PIも合成されてしまうという問題があった。そこで本研究では、1-PIの高純度合成を目的として、PI合成型PLDを改変することでさらなる位置特異性の向上を試みた。

【方法・結果】現有する改変型 PLD のうち、NYR(W187N/Y191Y/Y385R)変異体は 1-PI を優先的に生成し、その 1-PI/3-PI 比は約 76/24 である。NYR のイノシトール結合ポケットを構成する G186 から D190 の 5 残基からなるループ構造に着目し、それぞれの残基を他の 19 アミノ酸に置換した変異 *pld* 遺伝子を作製した。作製した変異遺伝子を大腸菌で発現させ、得られた粗 PLD を用いて PI 合成反応を行い、生成する PI の異性体組成を分析した。その結果、G186 への変異が選択性向上に有効であり、特に G186T と G186L 変異体では 1-PI/3-PI 比が約 90/10 程度に向上した。現在、これらの変異体にさらなる変異を導入し、PI の収率の評価を行っている。

P48

マナマコ由来ガングリオシド SJG-2 の全合成研究

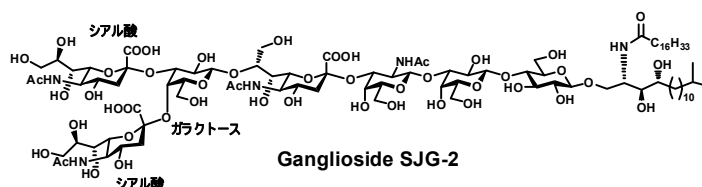
○大山龍太郎¹、坂本紘一¹、安藤弘宗^{1,2}、今村彰宏¹、石田秀治¹、木曾 真^{1,2}（¹岐阜大・応用生物、²京都大・iCeMS）

【目的】

ガングリオシドは、分子内にシアル酸を含有しているスフィンゴ糖脂質のことであり、生体内に広く分布している。その中でも棘皮動物ガングリオシドは、哺乳類ガングリオシドとは異なる特異な構造を持つことが報告されており、また、神経細胞のモデルである PC12 に対して強力な神経突起伸展活性を示すことが明らかとなり、各種神経疾患に対する治療薬の素材として期待されている。本研究では、これまでに最も強い神経突起伸展活性が報告されたマナマコ(*Stichopus japonicus*)由来のガングリオシド SJG-2¹⁾に着目し、構造活性相関研究の足掛かりとして、SJG-2 の全合成を目指した。

【方法・結果】

ガングリオシド SJG-2 は、七糖からなる糖鎖部分とセラミドで構成される。特に、内部シアル酸の 8 位水酸基から伸びるガラクトース残基には、3, 4 位水酸基の双方にシアル酸が結合し、他に類を見ない特異な分岐構造を形成している。本研究ではまず、合成困難と予想されるこのユニークな分岐構造の構築を目指した。ガラクトース 4 位水酸基の低反応性を補うために、当研究室で開発した *N*-Troc シアリルガラクトースから誘導した種々の糖受容体を合成し、ガラクトース 4 位へのシアル酸残基の導入を検討した。その結果、*N*-Troc シアリルガラクトースから誘導した 1,5-ラクタム型シアリルガラクトースにおいて、 α 優先的に 3,4-ジシアリルガラクトースを合成することに初めて成功し、非還元末端三糖の合成法を確立した。さらに、七糖部分の構築を目指し、得られた末端三糖の糖供与体への変換を検討した。



1) M. Kaneko, F. Kisa, K. Yamada, T. Miyamoto, R. Higuchi, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1004-1008.

コブヒトデ由来ガングリオシド PNG-2A の全合成研究

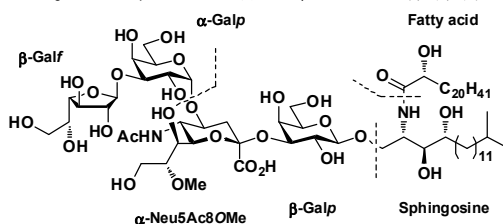
○後藤健太¹, 鈴木達哉^{1,2}, 安藤弘宗^{1,2}, 今村彰宏¹, 石田秀治¹, 木曾真^{1,2}(¹ 岐阜大・応用生物, ² 京都大・iCeMS)

【目的】

当研究室では、これまでにシアル酸 (Neu5Ac) を含む酸性スフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの化学合成を行ってきた。今回我々は、コブヒトデから単離されたガングリオシド PNG-2A の奇異な構造、すなわちシアル酸 4 位が α -ガラクトピラノシル化を受け 8 位がメチル化された構造に興味をもち、この PNG-2A の全合成を行うこととした。

【方法・結果】

本研究では、PNG-2A を、ガラクトフラノシルガラクトピラノース、シアリルガラクトース、アジドスフィンゴシン、脂肪酸の各ユニットに分け、収斂的に合成することとした。シアリルガラクトースユニットは、大量調製が可能なシアリルガラクトース誘導体を出発物質として 5 段階の反応の後、シアル酸 8 位水酸基のメチル化を行うことで効率的に合成した。また、シアル酸 4 位への二糖縮合においては、当研究室で開発された 4,6-DTBS-ガラクトース供与体¹を用いることにより高収率で α -グリコシド結合を選択的に構築した。得られた四糖は供与体へと変換した後、収率 79% にてアジドスフィンゴシンとのグリコシル化を行った。現在、PNG-2A の骨格構築に向けて脂肪酸導入の検討を行っている。

¹ A. Imamura *et al. Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6725-6728.

脂質ラフト分子の 1 分子観察に向けた脂質変換型蛍光 GM3 プロープの合成

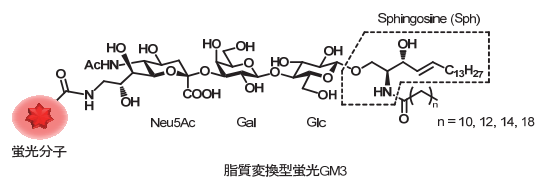
○山崎彩乃¹, 河村奈緒子^{1,2}, 鈴木健一², 安藤弘宗^{1,2}, 今村彰宏¹, 石田秀治¹, 楠見明弘², 木曾真^{1,2}(¹ 岐阜大・応用生物, ² 京都大・iCeMS)

【目的】

脂質ラフトは、メソスケールの機能性細胞膜ドメインであり、シグナル伝達や膜輸送において重要な役割を担っている。我々は、1 分子観察によりラフト分子の離合集散を直接観察することで、ラフトの形成機構および機能解明を目指している。この目的を達成するために、シグナル分子受容体と協奏的に機能するガングリオシドのプロープが必要となる。我々はこれまでに C18 の脂肪酸を有する GM3 プロープを合成し、その機能評価を行ってきた。本研究では、脂質ラフトに存在する他の主要な GM3 脂質類縁体を標的とし、種々の長さの脂肪酸を導入した脂質変換型蛍光 GM3 プロープの合成を行うこととした。

【方法・結果】

本研究において、共通の鍵中間体として GM3 構造から脂肪酸を除いたアミノ体 (lyso-GM3 保護体) を設定し、この分子に種々の脂肪酸の導入を行うことで、脂質変換型 GM3 の効率的かつ系統的な合成を目指した。まず、lyso-GM3 保護体の構築に向け、還元末端ユニットとして、N₃-Sph をアグリコンに有する Glc-Sph 受容体を合成した。この受容体と Neu-Gal 供与体の縮合、N₃ 基の還元を経て、lyso-GM3 保護体の構築後、炭素鎖長の異なる種々の脂肪酸を導入した。そして得られたそれぞれの GM3 骨格の保護基の除去後、アミド化により Neu9 位アミノ基への蛍光標識の導入を行い、目的化合物の合成を達成した。



P51

糖供与体の反応性に及ぼす遠隔置換基効果に関する研究

○堀綾香¹、松本佳央梨¹、小西美紅^{1,2}、今村彰宏¹、安藤弘宗^{1,2}、石田秀治¹、木曾真^{1,2}

(¹岐阜大・応用生物、²京都大・iCeMS)

【目的】

グリコシル化反応は糖鎖合成の成否を左右する鍵反応であり、反応に影響を与える要因は数多く存在する。特に、保護基の電子的特性は糖供与体 (求電子剤) 及び糖受容体 (求核剤) の反応性を大きく左右することが知られており、これまでに糖供与体の反応性において、アノマー位に隣接する置換基の影響がよく研究されている。その一方で、遠隔位の置換基の影響に関する知見は乏しい。そこで本研究では、遠隔位の水酸基保護基が供与体の反応性に及ぼす影響を系統的に調べ、遠隔置換基効果の作用機構の理解を目指すこととした。

【方法・結果】

電子供与性及び電子求引性の種々の保護基を遠隔位の 4 位及び 6 位水酸基に導入したグルコース供与体 11 種類、ガラクトース供与体 8 種類をそれぞれ合成し、それら供与体と受容体をグリコシル化反応に供することで、各供与体の反応性を検証した。その結果、グルコース・ガラクトース供与体共に、電子供与性保護基を有する方が供与体の反応性が向上することが分かった。また、2 種類の供与体を用いた競合グリコシル化反応により、グルコース・ガラクトース供与体の相対的な反応性の差を検証することとした。その結果、保護基が供与体の反応性に及ぼす影響は、グルコース・ガラクトースで異なることが明らかとなった。これらの結果の詳細と反応性差についての考察を報告する。

P52

タンパク質架橋化酵素の組織分布解析

○阿部奈都美、大橋慎太郎、辰川英樹、人見清隆 (名大院創薬科学)

【目的】

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) はタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基間を架橋化する酵素である。哺乳類では 8 種類のアイソザイム (FXIII、TG1-TG7) が存在し、様々な組織で特異的に発現することにより血液凝固や皮膚形成といった生理的役割を果たしている。しかしながら、各アイソザイムの詳細な組織分布については未だ解析が不十分であるため、マウスの全組織を用いて TGase 各アイソザイムの局在を網羅的に検出し、基礎的なデータを集めることを目的とした。

【方法・結果】

マウス主要組織を用いた RT-PCR により、TGase の各アイソザイムの局在を特異的に検出した。また、マウス新生児の全組織切片を用いて *In situ* Hybridization を行うことにより、TG1、TG2 の mRNA レベルの局在分布を可視化した。その結果、TG1 は脾臓、胸腺、皮膚、肝臓において発現が見られ、TG2 はこれらの部位に加えて脊椎、胃、腎臓においても発現が認められた。さらに同組織切片を用いて免疫染色を行い、TGase の主要なアイソザイムである TG1、TG2、TG3 のタンパク質レベルでの局在分布を可視化した。TG1、TG3 は皮膚 (表皮、毛包)、口、食道、前胃に強く発現が見られ、TG3 については角質層に特徴的な発現が見られた。TG2 は全身に幅広く分布し、特に筋肉または脳、脊髄などの神経系外膜に発現していた。TG1、TG2 は腎臓や眼にも発現が見られた。今後は FXIII など他アイソザイムについても局在解析を進め、アイソザイム間での発現組織分布の違いを特定し、生理的意義や作用機序の解明に役立てたいと考えている。

P53

ラクタスタチンは HNF-3 α を介してコレステロール分解系を活性化する

○古田真優, 磯貝渚, 井辰かおる, 世古聖士, 島田昌也, 長岡利 (岐阜大学, 応用生物科学部)

【目的】

コレステロール 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) はコレステロールの分解に関与しており、CYP7A1 遺伝子の発現調節は、脂質異常症や動脈硬化症を予防改善するための重要な戦略である。牛乳乳清 B-ラクトグロブリン由来の血清コレステロール低減化ペプチドであるラクタスタチン (IIAEK) は、ヒト培養肝細胞 HepG2 において CYP7A1 mRNA レベルを誘導し、CYP7A1 遺伝子転写を活性化する¹⁾。また、DNA マイクロアレイにおいて、CYP7A1 転写活性化因子の一つである HNF-3 α の mRNA の有意な上昇を観察した。そこで本研究では、CYP7A1 遺伝子プロモーター上の HNF-3 α 結合領域に注目し IIAEK の CYP7A1 遺伝子転写活性化機構を解明すると共に、DNA マイクロアレイを用いて CYP7A1 遺伝子活性化を媒介するシグナル経路を特定することを目的とする。

【方法・結果】

HepG2 細胞に、CYP7A1 遺伝子プロモーター部を連結させた luciferase プラスミド (野生型-371 ~+24) 及びその変異体を一過性に導入し、1mM IIAEK が CYP7A1 遺伝子転写活性に与える影響をルシフェラーゼアッセイにより検討した。また、1mM IIAEK を 6 時間処理した HepG2 細胞における遺伝子変化について DNA マイクロアレイを用いて評価すると共に、得られたデータを用いて IPA 解析を行った。その結果、CYP7A1 遺伝子プロモーターの-299~-289 領域 (HNF-3 コンセンサス配列と類似した領域) を欠損させた変異体を用いた試験では、IIAEK による CYP7A1 遺伝子の転写活性化が消失した。また、HepG2 細胞への IIAEK の添加により、カルシウムシグナルに関与する多くの遺伝子変動した。以上より、ラクタスタチンによる CYP7A1 遺伝子転写活性化には CYP7A1 遺伝子プロモーターの-299~-289 領域に結合する HNF-3 α が関与し、この作用はカルシウムシグナルが媒介することを発見した。

1) Biochem. Biophys. Res. Commun., 352, 697-702 (2007)

P54

シアノバクテリア由来の 2 成分制御系を用いた光応答性大腸菌の構築

○岡 駿佑, 堀 慎佑子, 杉江 よしみ, 大塚 北斗, 饗場 浩文
(名大院創薬科学)

【目的】

本研究では、合成生物学の展開に向けた基盤技術を開発するために、大腸菌に遺伝子発現を容易に制御することが可能な ON/OFF スイッチの導入を試みた。そこで、環境シグナルに応答するシステムである 2 成分制御系に着目した。その中でも、緑と赤の光波長変化に応答して集光色素タンパク質遺伝子の発現制御を行う、シアノバクテリア "*Nostoc punctiforme*" の CcaS (ヒスチジンキナーゼ)-CcaR (レスポンスレギュレーター) を利用した。我々は、大腸菌内に (1) *ccaS-ccaR*, (2) 発色団フィコシアノビリンの生合成系遺伝子、(3) CcaR の結合配列を持ったレポーター遺伝子 (*lacZ*) を導入し、光応答的遺伝子発現システムを獲得した新規大腸菌の構築を目的とした。

【方法・結果】

ccaS-ccaR を再構築した大腸菌において、*lacZ* 遺伝子の発現が緑色光波長下では活性化、赤色光波長下では抑制されることが明らかになった。さらに、光の波長を切り替えることにより、遺伝子発現の ON/OFF を可逆的に調節することにも成功した。非侵襲性の光波長によって遺伝子発現の ON/OFF が可能なシステムを構築できたことから、新たな代謝経路などを組み合わせることによって有用物質の合目的生産などが可能になると期待される。今後は、大腸菌由来の 2 成分制御系に光波長応答性を付与することで、大腸菌固有の各種レギュロンが発現が光波長によって制御可能な実験系を開発していく予定である。以上の結果を基に 2 成分制御系を利用した合成生物学の展開を議論する。

海洋性粘液細菌から得られた新規二次代謝産物の構造と生理活性

○ 佐藤潤一¹, 孫雨偉¹, 不藤亮介², 飯塚俊², 小鹿一¹(¹名大院生命農, ²味の素(株)イノベーション研究所)

【目的】粘液細菌とは、難培養性の微生物で、環境中に普遍的に存在しているが、その培養の難しさからあまり注目されてこなかった。しかし近年その二次代謝産物の多くは、新規骨格を形成し、抗真菌性・抗菌・細胞毒性などの生理活性を示すことから、医薬品シードの探索源として注目されている。

我々は海洋性粘液細菌の最初の例である *Haliangium ochraceum* から抗真菌性物質 *haliangicin* を発見しているが、ゲノム情報から *haliangicin* 生合成遺伝子クラスター以外のポリケチド生合成遺伝子クラスターが複数存在することが示唆された。そこで様々な条件で、*H. ochraceum* を培養した結果、新規化合物の単離に成功した。

【方法・結果】10 cm デッシュにて VY2/SWS 寒天培地で2週間培養した *H. ochraceum* を、三角フラスコ中カジトンの基本成分とした液体培地で振盪培養した。培養4日後に吸着樹脂を加え、計2週間培養した。培養物を濾過し、菌体と吸着樹脂を集めてメタノールで抽出し、得られたメタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相 HPLC 等を用いて精製した。

各種生理活性検定を試み、活性画分をさらに分離したところ、*haliangicin* とともに化合物 A が単離された。NMR を中心とした構造解析の結果、ポリケチド-ペプチド混合型二次代謝産物であることがわかった。この構造から予想される生合成遺伝子クラスターを探索したところ、1つが見つかった。この生合成遺伝子クラスターでは、モジュールはスターターを認識することより始まり、1つの NRPS によりアミド構造、4つの PKS により炭素骨格が形成されると予想されたが、化合物 A はこのモジュールと対応する構造を有していた。この化合物 A の生理活性および立体配置は現在、検討中である。

分裂酵母における経時寿命延長因子 Ec11 ファミリータンパク質の解析

○島崎嵩史, 大塚北斗, 石田麻衣子, 内藤知佳子, 饗場浩文(名大院創薬科学)

【目的】

Ec11 ファミリー遺伝子 (*ec11⁺*, *ec12⁺*, *ec13⁺*) は、細胞内に高発現することによって分裂酵母の経時寿命を延長する遺伝子として当研究室で発見された。これらの遺伝子は逆に欠損することで経時寿命が短くなる。Ec11 ファミリータンパク質は互いに相同性の高い80アミノ酸程度の小さなタンパク質であるが、これらが経時寿命を延長する具体的なメカニズムは不明である。

Ec11 ファミリータンパク質には、共通して保存された4つのシステインが存在する。我々はこれらのシステインがEc11 ファミリータンパク質の機能に重要であると予測し、解析を行った。また、昨年度にEc11 ファミリータンパク質が、微量金属の欠乏に応答する新規な有性生殖過程において重要な働きを担っていることを報告した。この結果をうけて、Ec11 ファミリータンパク質の寿命制御と金属との関係性を解析し、さらに生育環境中の金属量が分裂酵母の経時寿命に与える影響を調べた。

【方法・結果】

Ec11 ファミリータンパク質に保存された4つのシステインのいずれかをセリンに置換した変異型 Ec11 タンパク質の高発現株では、いずれも寿命の延長が見られなくなった。またこれらの変異型 Ec11 タンパク質は、Ec11 ファミリー遺伝子欠損変異株が示す微量金属の欠乏による性分化誘導の機能不全を回復しなかった。以上の結果から、これら4つのシステインすべてがEc11 ファミリータンパク質の機能において重要な役割を担っていることが示唆された。

次に、Ec11 ファミリータンパク質の寿命制御と金属との関係性を解析した結果、Ec11 ファミリータンパク質の高発現による寿命延長効果は、生育環境中の金属量を増加することで著しく抑制された。さらに生育環境中の金属量が経時寿命に与える影響を解析した結果、分裂酵母の経時寿命は生育環境中の金属、特に亜鉛を枯渇させることで大きく延長した。以上、本研究によって亜鉛と寿命制御の関連性を初めて示すことができた。

新規コレステロール吸収抑制ペプチド VVFLASVS の作用の分子機構解析
 ○久松賢太郎, 秋江祐希, 島田昌也, 岩本悟志, 長岡利 (岐阜大学応用生物科学部)

【目的】

大豆由来ペプチド VVFLASVS は、動物実験でコレステロール吸収を強力に抑制するとともに、医薬品コレスチラミンよりも強力にコレステロール溶解性を低下させる。コレステロールの溶解には胆汁酸のミセル形成が不可欠であり、コレスチラミンは胆汁酸を吸着することでミセル形成を阻害する。一方で、VVFLASVS には強力な胆汁酸結合能がなく、コレスチラミンとは異なる機構でコレステロール溶解性を低下させていることが考えられる。そこで、本研究では VVFLASVS がミセル構成成分に与える影響、微粒子の分散安定性の指標であるゼータ電位や粒径に与える影響などに注目し、VVFLASVS の持つ強力なコレステロール溶解性低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ミセルの構成成分である胆汁酸とリン脂質を VVFLASVS 添加時と非添加時で定量した。その結果、VVFLASVS 添加は、胆汁酸とリン脂質の濃度を低下させた。しかし、定量した胆汁酸濃度は臨界ミセル濃度以上であったことから VVFLASVS 添加後も胆汁酸はミセルを形成していることが示唆された。次に、混合ミセルの粒径(nm)・ゼータ電位(mV)、VVFLASVS のゼータ電位について測定した。その結果、混合ミセルの粒径は約 5nm、ゼータ電位は負電荷に分布した。VVFLASVS のゼータ電位は正電荷を示した。このことから、VVFLASVS と混合ミセルとの間に静電的相互作用があることが示唆された。さらに、混合ミセルに VVFLASVS を添加した場合の粒径・ゼータ電位を測定し、ゼータ電位は通常の混合ミセルと比較して顕著な変化はないが、粒径は約 1nm となり粒径が小さくなることを明らかにした。したがって、ミセル形成を阻害することでコレステロール溶解性を低下させるコレスチラミンとは異なり、VVFLASVS は静電的相互作用を介して、ミセルを残存させたまま、ミセルに溶解化しているコレステロールを不溶化する新規の作用機構であることを発見した。

2,3-環状保護糖供与体を用いた立体選択的グリコシル化の検討

○八神 なほ子¹、小西 美紅^{1,2}、玉井 秀樹^{1,2}、植木 章晴^{1,2}、安藤 弘宗^{1,2}、今村 彰宏¹、石田 秀治¹、木曾 真^{1,2} (¹岐阜大・応用生物、²京都大・iCeMS)

【背景・目的】

糖鎖合成化学において、立体選択的なグリコシル化反応の開発は非常に重要な課題である。現在、立体制御には、アノマー効果や隣接基効果、溶媒効果が一般的に用いられている。しかし、これらの効果は一定の立体選択性を発揮するものの、完全な立体選択性が得られることは稀であり、反応基質の構造、脱離基と活性化剤の組み合わせなどにより影響されることが散見される。また、選択性を発現させる条件下では、基質の溶解性の低下、使用できる保護基が制限される等の問題がしばしば生じる。これらの実情を踏まえると、効率的かつ実用的な糖鎖の合成戦略を立案する上では、立体制御法の拡充が必要である。近年、環状保護基を用いた立体制御法が報告されており、環状保護基が立体制御に有効に働くという知見が得られている。そこで、本研究では、2,3 位に環状保護基を導入した糖供与体を用いてグリコシル化反応を行い、立体選択性を検証することとした。

【方法・結果】

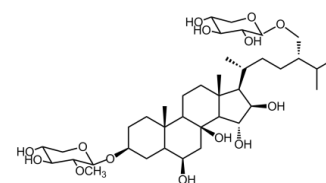
環状保護基を糖供与体のアノマー位近傍に配置させることで、立体選択性を得ようと着想し、グルコピラノースの 2,3 位水酸基に環状保護基(TIPDS、 σ -Xylylene)を導入した糖供与体を種々合成した。得られた糖供与体をグリコシル化反応に供し、立体選択性を検証した結果、TIPDS 体、 σ -Xylylene 体において、優位な β 選択性を得た。さらにガラクトピラノースにおいても同様に検証を行ったところ、低温にて優位な β 選択性を得た。本発表では、これらの詳細について報告する。

オニヒトデ由来の生理活性物質に関する研究
○原田翔太、山田理紗、長島志栞、小鹿 一（名大院生命農）

【目的】

近年の高齢化に伴いアルツハイマー型認知症の患者数は大きく増加しているが、その根本的治療法は確立されていない。NGF（神経成長因子）は神経細胞の分化・生存に必須の因子として神経変性疾患治療薬として期待されたが、投与の困難さに課題が残る。当研究室において神経モデル細胞であるPC12細胞を用いてNGF様物質の探索を行った結果、沖縄産オニヒトデ *Acanthaster planci* より acanthasteroside B3 が単離された。この物質はマウスに対する記憶改善効果が示されている。オニヒトデは、サンゴに被害をもたらすことから沖縄で大量に駆除・廃棄されており、材料確保・廃棄物有効活用の面からも生理活性物質の探索源として有用である。

本研究では、オニヒトデより新たな神経突起伸長活性物質の探索、またPC12細胞に対して細胞毒性を示す物質の単離・同定を目的とする。



acanthasteroside B3

【方法・結果】

オニヒトデ湿重量 9.6 kg をメタノール抽出し、ODS カラムによって4画分に分離した。このうち acanthasteroside B3 を含む画分（80% MeOH 溶出）をシリカゲルカラムによって分離し、神経突起伸長活性を示す2つの画分 Fr. 2-2、Fr. 2-6 を得た。このうち Fr. 2-6 から acanthasteroside B3 (70 mg) を単離し、Fr. 2-2 より得た神経突起伸長活性物質は、収量が微量であったため、量上げを行った。また精製過程においてPC12細胞に対して強い毒性を示した画分について、MTT アッセイを用いて毒性物質の同定を行った。

担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成初期に誘導的に発現する機能未知遺伝子ノックダウン株の作製と子実体形成への影響

○酒井杏匠¹、相島奈央¹、山田知佳¹、金子優平²、角健太²、村口元³、吉田誠⁴、志水元亨^{1,2}、加藤雅士^{1,2}
（¹名城大農、²名城大院農、³秋田県立大生物資源、⁴東京農工大農）

【目的】

担子菌は、光や温度など環境変化に応じて菌糸体から子実体への形態変化を行う。このため、細胞分化および形態形成機構を解明するにあたり、担子菌は極めて興味深いターゲットとなると考えられる。しかしながら、担子菌の子実体形成機構については完全に解明されていない。担子菌 *Coprinopsis cinerea* は、ゲノムプロジェクトが完了していることや短期間で子実体が形成されることから、担子菌類のモデル生物として用いられている。本研究では、プロテオーム解析で *C. cinerea* の子実体に特異的に発現するタンパク質を探索し、それらをコードする遺伝子のノックダウン株や高発現株を作製することで、子実体形成に与える影響を解析した。

【方法・結果】

C. cinerea を Malt Yeast Glucose 培地に接種して3日間（30℃）暗所下にて培養した。既報に従い4日目からは12時間の明暗サイクルで培養し子実体形成を誘導した。子実体と菌糸体からそれぞれタンパク質を抽出し、二次元電気泳動を行なったところ、それぞれ300を超えるスポットが検出された。それらの中で菌糸体に特異的に発現するものを30スポット、子実体に特異的に発現するものを40スポット見出した。これらのスポットを切り出しトリプシン処理後、MALDI-TOF/TOF-MSによって解析することで得られた質量スペクトルから、MASCOT サーチを行ない、菌糸体と子実体で発現するタンパク質を同定した。現在、同定された200を超えるスポットのうち、菌糸体では18種、子実体では11種同定されている。この中には、子実体に特異的に発現することが既知のセブチンやガレクチンも含まれていた。さらに、子実体に特異的に発現していた機能未知タンパク質をコードする遺伝子のノックダウン株を作製したところ、白い菌傘の子実体が形成された。*C. cinerea* 野生株の菌傘にはメラニンが含まれているため黒色を呈することが知られていることから、子実体特異的に発現したこの機能未知タンパク質は、子実体の成熟やメラニンの生合成に関与していると考えられた。

P61

ペクチンによる抗炎症作用機構の解析

○石其慧太¹, 北口公司^{1,2}, 矢部富雄^{1,2} (¹岐阜大院・応生科・応用生命, ²岐阜大・応生科・応用生命)

【目的】

ペクチンは、ポリガラクトuron酸を主成分とする主鎖に複数の中性糖からなる側鎖が付加した構造をとる複合多糖類である。食物繊維としてペクチンを摂取すると、便通改善、血中コレステロール低減、血糖上昇抑制作用などの生体調節作用を示すことが報告されている。また、ペクチンが炎症の起点となるマクロファージに作用し、炎症応答を制御することも示唆されているが、その作用機序は不明である。そこで本研究では、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生にペクチンが及ぼす影響を調査し、炎症応答の調節に関与するペクチンの分子構造を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 にリンゴおよび柑橘由来のペクチンを添加し、24 時間培養した後、lipopolysaccharide (LPS)刺激で誘導される炎症性サイトカイン発現量をリアルタイム PCR 法と ELISA 法により測定した。その結果、ペクチン非添加群に比べて、ペクチン添加群で有意に Interleukin-6 (IL-6)の mRNA 発現量とタンパク質産生量が低下した。次いで、炎症性サイトカインの産生抑制活性を有するペクチンの分子構造を明らかにするため、ペクチナーゼを用いて主鎖構造を分解したペクチンを調製した。この主鎖分解ペクチンを RAW264.7 に添加したところ、ポリガラクトuron酸添加群に比べて、有意に LPS 誘導性 IL-6 産生が抑制された。以上の結果から、マクロファージにおける炎症性サイトカインの産生抑制には、ペクチンの側鎖構造が重要であると考えられた。

P62

ロイシンジッパー付加による Fab 抗体発現の効率化

○福井貫介¹ 山本広晃¹ 橋村大¹ 加藤晃代^{1,2} 児島孝明¹ 中野秀雄¹

(¹ 名大院・生命農、² 公益財団法人科学技術交流財団)

【背景・目的】 現在モノクローナル抗体は、動物細胞や酵母などの真核生物細胞や、大腸菌をはじめとする細菌を用いて生産され、スクリーニングされるのが一般的である。しかしながら、これらの方法は、クローニングや培養のプロセスが煩雑であることや、迅速性に欠けることなどの課題があった。

無細胞蛋白質合成系は、煩雑なクローニングを必要とせず、短時間で蛋白質を生産することができるため、新たなハイスループット抗体スクリーニング法として注目を集めている。これまで、無細胞蛋白質合成系を用いた scFv や Fab(antigen-binding fragment)の合成例が報告されてきた。しかしながら Fab は、その分子ごとに H 鎖、L 鎖間のジスルフィド結合形成効率が異なり、多くの場合、活性型 Fab の収量が低いことが課題となっていた。そこで、Fab の H 鎖と L 鎖にそれぞれ互いに強く結合し、ヘテロダイマーを形成するロイシンジッパー-LZA と LZB を付加することにより、Fab 合成の効率化を目指した。

【方法・結果】 抗大腸菌 O157 マウス Fab の L 鎖と H 鎖の C 末端側に、それぞれ LZA、LZB を overlapping PCR により付加し、Fab-LZ 複合体として無細胞蛋白質合成系を用いて発現させた。その結果、ロイシンジッパーを付加していない Fab と比較すると、Fab-LZ 複合体では Fab 形成効率が向上し、大腸菌 O157 を抗原とした ELISA のシグナルも顕著に増大した。

また抗リステリアウサギ Fab においても LZA、LZB を付加したところ、同様に Fab 形成効率が向上し、リステリア菌を抗原とした ELISA のシグナルも顕著に増大した。

以上より、無細胞蛋白質合成系において Fab を活性型として形成するために、ロイシンジッパーの付加が効果的であることが示された。

Clostridium perfringens の T7 発現系の開発

○朝日 航, 澤入 駿哉, 森山 龍一, 宮田 茂 (中部大院応用生物)

【目的】

Clostridium 属は、多種の有用なタンパク質を産生する一方で、大腸菌と比較して分子生物学的アプローチからの研究は限定的である。その理由として、分子生物学的ツールが不足しており、特に機能解析や応用のために遺伝子発現を行う場合、遺伝子が極端に AT-rich であるため、大腸菌など通常の組換え発現系ではその遺伝子発現が困難である点が挙げられる。本研究では、大腸菌と *C. perfringens* のどちらでも誘導的に遺伝子発現が可能な宿主 - ベクター系の開発を目的とし、今回、AT-rich 遺伝子発現用宿主として T7 プロモーター下で制御可能な *C. perfringens* 誘導株 (T7 株) を作製した。

【方法・結果】

T7 株は、当研究室で開発された in-frame gene deletion 法を応用して、*C. perfringens* 13 株染色体上の *yplC-plc* (α 毒素) 遺伝子座を、*C. difficile* のキシロース利用オペロンのレプレッサー遺伝子と T7 RNA polymerase 遺伝子に置換することにより作製した。さらに同様な方法で致死毒素である θ 毒素遺伝子を欠失させた T7 II 株を作製した。各毒素遺伝子の欠失は PCR により確認した。各毒素の発現を SDS-PAGE 及び溶血活性により調べた結果、対応するバンド及び溶血活性は観察されなかった。次に、大腸菌-*C. perfringens* のシャトル・ベクターに T7 プロモーターを挿入し、その下流にレポーターとして *nanH* 及び 180 kDa 分泌タンパク質である *NagH* の遺伝子をクローニングし、pCET7-*nanH* 及び pEH23 の構築を行った。これらのプラスミドで、T7 株または T7II 株を形質転換し、キシロースの添加により染色体上の T7 RNA polymerase の発現を誘導し、その結果転写される *nanH* と *nagH* の発現量を SDS-PAGE により半定量的に調べた。その結果、キシロースによる誘導後に発現量が大幅に亢進していた。今後、さらなるホストの改良として主要な菌体外プロテアーゼを欠失させる予定である。

バクテリオファージ ϕ X174 スパイク G タンパク質に存在する 塩基性アミノ酸残基の 5 量体形成およびリポ多糖認識に与える影響

○清水 陽介、伊藤 静香、稲垣 穰 (三重大院生資)

【目的】バクテリオファージ ϕ X174 のスパイク突起を構成する G タンパク質は、大腸菌表層のレセプター分子であるリポ多糖 (LPS) の認識とファージ DNA を菌体へ挿入するために重要と考えられている。G タンパク質にある塩基性アミノ酸は、LPS にある負電荷を持つ糖やリン酸残基などを認識する上で重要と考えられる。そこで本研究では、それらの塩基性アミノ酸残基に変異を加えたタンパク質を調製し、それらの変異体と LPS の相互作用を測定することで、変異導入による影響を調べた。また、G タンパク質が溶液中で自発的に 5 量体を形成するかを調べることによって、変異させたアミノ酸残基の 5 量体形成に及ぼす影響も同時に調べた。

【方法・結果】コドンの変異を含むプライマーを用いた PCR (Quick Change 法) により、プラスミドにコードされたタンパク質上の目的のアミノ酸残基に変異を導入した。C 末端にヒスチジンタグを有する G タンパク質 (cHisG) の ¹⁷Lys, ³⁶Lys, ⁵⁸His, ¹³⁴Arg, ¹⁵⁴Lys, ¹⁵⁶Arg, ¹⁶⁶Lys, ¹⁷⁵Lys を Ser 残基に置換した変異体を調製することができた。そこでまず、もとの G タンパク質 (cHisG) および各変異体について、SDS-PAGE を用いて 5 量体形成の様子を比較・分析した。その結果、K17S, K36S, H58Q, K134S, K154S の 5 種類の変異体において、5 量体の熱安定性が低下することを確認し、R156Q では、5 量体が形成できないことを確認した。つぎに、表面プラズモン共鳴により、cHisG および各変異体について、LPS に対する解離定数 K_D を評価した。その結果、5 量体を形成しない R156Q の K_D 値は、cHisG の K_D 値と比べ約 7 倍大きくなったため、5 量体形成と LPS の認識は互いに影響を及ぼし合うと判断した。また、K154S の K_D 値は 5 量体を形成するにもかかわらず、cHisG の K_D 値と比べ約 6 倍大きくなったことから、¹⁵⁴Lys は LPS の認識に重要な残基であることが判った。

イリドイド類の合成研究

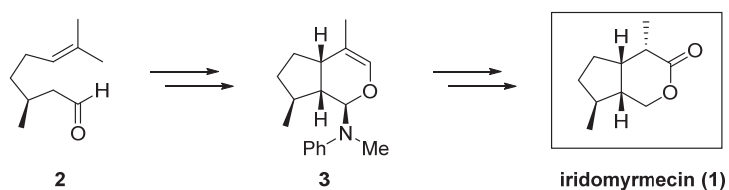
○宮澤 悠¹, 安立 昌篤¹, 室岡 孝信², 宮崎 雅雄², 西川 俊夫¹ (¹名大院生命農, ²岩手大農)

【目的】

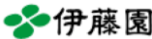
イリドミルメシン(**1**)をはじめとするイリドイド類は、イソプレンより生合成されるモノテルペノイドである。これらはこれまでにアリやブラムシといった昆虫からフェロモンとして単離されたほか、マタタビやイヌハッカなど植物からも単離されており、ネコ科の動物に対し異常な興奮作用を示すことが報告されている。本研究では、イリドイド類の生理活性の詳細と未だ不明な作用機序の解明を目的として、イリドミルメシン(**1**)およびその類縁体の合成を検討した。

【方法・結果】

S(-)-シトロネラル (**2**)を出発原料として、アリル酸化と環化によって二環性化合物 **3** を得た。さらに、数段階の反応を経てイリドミルメシン(**1**)を含む 7 種類の類縁体の合成に成功した。現在、これら類縁体の生物活性評価を行っている。



日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

	アサヒビール(株) 名古屋工場	http://www.asahibeer.co.jp/
	天野エンザイム(株) 岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/
	イチビキ(株) 研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	(株)伊藤園 生産本部	http://www.itoen.co.jp/
	加藤化学(株) 技術部	http://www.katokagaku.co.jp/
	(株)岐阜セラツク製造所 品質保証部	http://www.gifushellac.co.jp/
	金印(株) 研究開発部	http://www.kinjirushi.co.jp/
	(株)三和化学研究所 三重研究所	http://www.skk-net.com/
	敷島製パン (株) 研究部	http://www.pasconet.co.jp/
	(株)真誠	http://www.shinsei-ip.ne.jp/
	太陽化学(株) ニュートリション事業部	http://www.taiyokagaku.com/
	辻製油(株)	http://www.tsuji-seiyu.co.jp/
	東海物産(株) 食品研究所	http://www.tokaibsn.co.jp/
	中日本氷糖(株)	http://www.nakahyo.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) 研究開発室	http://www.fnsugar.co.jp/
	物産フードサイエンス(株) 研究開発センター	http://www.bfsci.co.jp/
	ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株) 中央研究所	http://www.pokkasapporo-fb.jp/



(株)Mizkan-Holdings 中央研究所

<http://www.mizkan.co.jp/company/>



名糖産業(株) 食品開発部

<http://www5.mediagalaxy.co.jp/meito/>



ヤマモリ(株) 桑名工場

<http://www.yamamori.co.jp/>



養命酒製造(株) 中央研究所

<http://www.yomeishu.co.jp/>

協力企業（五十音順）

旭松食品(株) 食品研究所	サンエイ糖化(株) 素材開発部	東海漬物(株) 漬物機能研究所
アステラス製薬(株) CSR 部	サンジルス醸造(株) 生産本部	(株)東洋発酵
伊藤忠製糖(株) 品筆保証室	敷島スターチ(株) 技術開発室	東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所
伊那食品工業(株)	新日本化学工業(株) 研究部	名古屋製酪(株) 中央研究所
科研製薬(株) 生産技術研究所	大和製罐（株） 総合研究所	三井農林(株) 食品総合研究所
カネハツ食品(株) 技術部	竹本油脂（株） 情報調査室	盛田(株) 小鈴谷工場
キリンビール(株) 名古屋工場	デザイナーフーズ(株)	

平成 26 年度 日本農芸化学会中部支部 支部役員および支部参与
(平成 26 年 9 月 30 日現在 敬称略, 括弧内は本部役職)

支部長 (支部担当理事)

小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学 (理事)

副支部長

堀尾文彦 名古屋大学大学院生命農学
(役員候補者等選考委員)

山口庄太郎 天野エンザイム(株)
(代議員, 和文誌編集委員)

庶務幹事

中崎敦夫 名古屋大学大学院生命農学

邊見 久 名古屋大学大学院生命農学

会計幹事

大場裕一 名古屋大学大学院生命農学

近藤竜彦 名古屋大学大学院生命農学

支部幹事

岩本悟志 岐阜大学応用生物科学部

氏田 稔 名城大農学部

大久保勉 太陽化学(株)ニュートリション事業部
(代議員, 役員候補者等選考委員)

荻田修一 三重大学大学院地域イノベーション
(英文誌編集委員)

河原崎泰昌 静岡県立大学食品栄養科学部

米田英伸 富山県立大学工学部

高橋正和 福井県立大学生物資源学部

原 正和 静岡大学農学部

藤田智之 信州大学大学院農学研究科

牧 正敏 名古屋大学大学院生命農学
(代議員, 役員候補者等選考委員)

南 博道 石川県立大学生物資源工学研究所

山上圭吾 (株) Mizkan Holdings

支部参与 (50 音順)

浅野泰久 富山県立大学生物工学研究センター

飯島信司 名古屋大学大学院工学

池田正人 信州大学農学部

石田秀治 岐阜大学応用生物科学部 (代議員)

井上俊逸 敷島製パン(株) 研究開発部

岩崎行玄 福井県立大学生物資源

岩橋 均 岐阜大学応用生物科学部

上野義仁 岐阜大学応用生物科学部

内田浩二 名古屋大学大学院生命農学
(英文誌編集委員)

内田博之 福井大学大学院工学

梅川逸人 三重大学大学院生物資源

榎本俊樹 石川県立大学

遠藤克秋 竹本油脂(株)

大澤俊彦 愛知学院大学心身科学部

太田明德 中部大学応用生物学部

大塚正盛 サンエイ糖化(株)

大西利幸 静岡大学農学部

奥村克純 三重大学大学院生物資源
(代議員, 倫理委員)

小川浩一 日本食品化工(株) 研究所

小倉光雄 東海大学海洋研究所

岡戸信夫 新日本化学工業(株) 研究部

籠谷和弘

片山新太

片山高嶺

加藤和美

加藤康夫

金政 真

菊池 洋

北島 健

木下徹也

熊澤茂則

倉根隆一郎

黒川洋一

堤坂裕子

坂井田和裕

栗冠和郎

佐野元昭

下位香代子

下坂 誠

下村吉治

関根 章

千 菊夫

田中晶善

玉置真司

田村廣人

築地輝夫

徳山真治

長岡 利

中川 寅

中川智行

中野秀雄

中村宗一郎

中山俊裕

南条文雄

西川俊夫

西田洋巳

西村篤寿

芳賀聖一

朴 龍洙

服部静夫

早川享志

原 脩

日野真吾

日野資弘

平井浩文

廣田 満

星野一宏

本多裕之

前島正義

松見 繁

真壁秀文

辻製油(株)

名古屋大学エコトピア科学研究所

石川県立大学

あいち産業科学技術総合センター

食品工業技術センター

富山県立大学

中部大学応用生物学部

豊橋技術科学大学

名古屋大学大学院生命農学

加藤化学(株) 技術部

静岡県立大学食品栄養科学部

中部大学応用生物学部

福井県立大学生物資源

伊藤園(株) 生産本部

ポッカサッポロフード&ビバレッジ

(株) 中央研究所

三重大学大学院生物資源

金沢工業大学ゲノム生物工学研究所

静岡県立大学環境科学研究所

信州大学繊維学部

名古屋大学大学院生命農学

科研製薬(株) 生産技術研究所

信州大学農学部

三重大学理事・副学長

敷島スターチ(株) 技術開発室

名城大学農学部

キリンビール(株) 名古屋工場

静岡大学農学部

岐阜大学応用生物科学部

岐阜大学応用生物科学部

岐阜大学応用生物科学部

名古屋大学大学院生命農学

信州大学農学部 (代議員)

(株) 岐阜セラック製造所技術部

(代議員)

三井農林(株) 食品総合研究所

名古屋大学大学院生命農学

富山県立大学生物工学研究センター

イチビキ(株) 技術開発部

名城大学農学部

静岡大学グリーン科学技術研究所

(英文誌編集委員)

東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所

岐阜大学応用生物科学部

名城大学薬学部

静岡大学農学部

アステラス製薬(株) 生物工学研究所

静岡大学農学部

信州大学農学部

富山大学大学院理工学研究部

名古屋大学大学院工学

名古屋大学大学院生命農学

養命酒製造(株) 商品開発センター

信州大学大学院農学研究科

間瀬民生	梶山女学園大学生生活科学部	山田永人	名糖産業(株) 食品開発部
松田 幹	名古屋大学大学院生命農学	山田康弘	カネハツ食品 (株) 技術部
松本裕子	ヤマモリ (株)	横越英彦	中部大学応用生物科学部
三澤博之	アサヒビール(株) 名古屋工場	吉村 徹	名古屋大学大学院生命農学
水野 猛	名古屋大学大学院生命農学		(代議員, 広報委員, 被災地理科教育
村澤久司	旭松食品(株)		支援特別委員)
森上 敦	名城大学農学部	米田祐康	(株)ニッポンジーン
森田達也	静岡大学農学部	和田 正	フジ日本精糖 (株) 研究開発室
森山龍一	中部大学応用生物学部	渡邊重夫	物産フードサイエンス (株)

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
日本農芸化学会創立 90 周年・中部支部創立 60 周年記念 第 171 回例会
講演要旨集

平成 26 年 10 月 11 日 発行

編集発行人: 日本農芸化学会中部支部 支部長 小鹿 一

名古屋市千種区不老町 名古屋大学 東山キャンパス内