



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 177 回例会

講演要旨集

ミニシンポジウム
触媒機能の活用に向けた微生物研究の新展開
および
一般ポスター発表

平成 28 年 9 月 24 日 (土)
名古屋大学野依記念学術交流館

主催：日本農芸化学会中部支部
共催：名古屋大学大学院生命農学研究科

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 177 回例会

平成 28 年 9 月 24 日（土）
名古屋大学野依記念学術交流館

主催：日本農芸化学会中部支部
共催：名古屋大学大学院生命農学研究科

（名古屋大学農学部講義棟にて）

9:30-12:00 農芸化学関連企業に就職を考えている学生のための賛助・協力企業展

（名古屋大学野依記念学術交流館にて）

13:00-13:15 開会の挨拶・支部功労者表彰

13:15-14:45 ミニシンポジウム「触媒機能の活用に向けた微生物研究の新展開」

13:15-14:00 バイオ燃料電池に適した触媒微生物の開発の現状

東 雅之（大阪市立大学・工学研究科）

14:00-14:45 細菌におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望

古園 さおり（東京大学・生物生産工学研究センター）

14:45-15:00 休憩

15:00-17:00 一般ポスター発表・奨励賞（優秀発表賞）

（名古屋大学グリーンサロン東山 レストラン花の木にて）

17:10-19:00 懇親会

ミニシンポジウム
触媒機能の活用に向けた
微生物研究の新展開
(S01, S02)

S01 バイオ燃料電池に適した触媒微生物の開発の現状

東 雅之 (大阪市立大学・工学研究科)

S02 細菌におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望

古園 さおり (東京大学・生物生産工学研究センター)

バイオ燃料電池に適した触媒微生物の開発の現状

東 雅之（大阪市立大学・工学研究科）

化石燃料の枯渇や地球温暖化など資源・エネルギー・環境に関わる諸問題の解決が求められている。安全で持続可能なエネルギー開発、なかでもバイオマスの有効活用は、循環型クリーンエネルギーを創出する上で欠かせないテーマである。ここでは、バイオマス由来の有機物が持つ化学エネルギーを、電気エネルギーに変換するバイオ燃料電池に焦点を当てる。バイオマス由来のエネルギー開発は、バイオエタノール生産を中心に研究が進められている。今後、これらに加えてさまざまなエネルギー形態での利用について検討する必要がある。微生物を活用してバイオマスから電気エネルギーを回収する微生物燃料電池（Microbial Fuel Cell）は、まだその出力レベルは低い。しかし、直接利用可能な電気が得られ蒸留工程を必要としない利点もあり、さらに、有機物を二酸化炭素と水まで酸化しそのエネルギーの多くを回収できれば、有機物からのエネルギー回収率は代謝中間産物のバイオエタノール生産より高くなる。近年著しく進歩した細胞改変技術と電気化学的な技術の組み合わせにより現状の低出力を改善できれば、補完的なエネルギー源やインフラが未整備な地域での発電などへの応用が期待される。

下水などの有機性の廃水や廃棄物からの MFC による発電は、エネルギーの獲得だけでなく有機廃棄物量の減容にも繋がり、環境にも優しいエネルギー開発になる。そのため、バイオ燃料電池の応用に向けた一つの方向として、国内でもその検討が進められている。一方、木質系バイオマスはバイオマスの中で最も潜在量が多く、都市部においてもオフィスで発生する古紙や建築廃材・剪定枝などを含めると、地産地消のエネルギー源として十分量存在する。木質系バイオマスの単純な利用方法として、固形燃料にして燃やしてエネルギー（電力）を得る方法がある。しかし、それでは木質系バイオマスに含まれる有用な物質も全て失う。有用成分から新たな付加価値を生み出しながら、エネルギーを得ることができれば有益な方法となる。我々は、木質系バイオマスに含まれるセルロース系成分からの発電を念頭に置き、MFC による糖からの発電に関してその基盤となる研究を進めている。

電池の性能は、それを構成する電極や溶媒などの各要素の改善の積み重ねにより向上する。これまでに、触媒をパン酵母とした mL スケールの 2 槽型の MFC を用いて、その構成要素の最適化を検討した。その結果、MFC の中では比較的高い最高出力（負極溶液量当たり約 800 ワット/m³）を得ている。触媒能力のさらなる改善が電池性能の向上に繋がると考え、モデル生物である酵母と大腸菌を用いて、糖代謝や電子伝達経路などの改変から、総出力と燃費に相当するクーロン効率の改善を進めている。例えば、パン酵母の場合解糖系から TCA サイクルに繋がる中央代謝経路から分岐する代謝としてエタノール発酵やグリセロール発酵がある。メディエーターとして用いているキノン系化合物（HNQ）は電子伝達系から電子を奪うと考えており、これらの分岐への代謝を抑制すると電子伝達経路へ多くの電子を流すことができ出力の改善が期待された。グリセロール生産に繋がる酵素の欠損株

(*gpd1Δ*)とエタノール生産に繋がる酵素の欠損株(*pdh1Δ*)を用い出力を測定した結果、これら遺伝子欠損により平均出力が向上する傾向が見られた。TCA サイクルの方向へ代謝を傾けることで出力が向上することが示された。酵母エキスの生産に使用されているトルラ酵母(*Candida utilis*)は、酵母種の中で呼吸活性が高いと言われ増殖能も非常に高いことから、新たな微生物触媒として期待された。*C. utilis* NBRC0998 株を用いて出力評価を行った結果、微生物触媒としてパン酵母と同等かそれ以上の高い能力を持つことがわかった。現在、酵母の利用と並行して、微生物触媒として有益となる機能を大腸菌の染色体上に集約する育種を進めており、これまでに得られた成果についても紹介する。

略歴

東 雅之（あずま まさゆき）

兵庫県尼崎市生まれ。1985 年 3 月大阪大学工学部醗酵工学科卒業、1987 年 3 月大阪大学大学院工学研究科醗酵工学専攻博士課程修了。1987 年 4 月住友林業（株）に入社、1996 年 3 月退社。1996 年 4 月より大阪市立大学工学部助手、助教授を経て、2007 年 4 月より同大学工学研究科教授、現在に至る。この間、1987 年から 1991 年東京大学大学院農学系研究科研究生、1993 年に博士（農学）を取得。2000 年から 2001 年カナダ McGill 大学理学部客員研究員。

細菌におけるタンパク質アシル化修飾研究の現状と展望

古園 さおり（東京大学・生物生産工学研究センター）

タンパク質アセチル化は、代表的な翻訳後修飾の1つであり、真核生物ではヒストンアセチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が良く知られている。近年の質量分析技術を利用したアセチル化タンパク質のプロテオミクス解析（アセチローム解析）により、アセチル化は多くの細菌タンパク質にも見出され、リン酸化と並び生物に普遍的な翻訳後修飾として知られるようになった。アセチル化は従来、アセチル化酵素（KAT）と脱アセチル化酵素（KDAC）により可逆的に制御されると考えられてきたが、最近ではアセチルリン酸やアセチル CoA による非酵素的なメカニズムも報告されている。また、スクシニル化などの新たな修飾が次々と発見され、アセチル化を含めて「アシル化修飾（Protein acylation）」と総称されている。アシル化修飾はアシル CoA という代謝鍵物質を利用することから、代謝や栄養シグナル応答との関連が指摘されている。本発表では、アシル化修飾に着目した代謝酵素調節に関する研究の現状と展望についてお話したい。

グルタミン酸生産とアシル化修飾変化

グルタミン酸生産菌として知られるコリネバクテリウム菌（以下、コリネ菌）は、ビオチン制限や Tween 40 添加等の刺激によりグルタミン酸を過剰生産する。これらの刺激はグルタミン酸排出チャネルを開口させるとともに、グルコースからグルタミン酸生成へ向かって代謝フラックスを大きく変化させる。一方、対応する代謝酵素の発現量は不変もしくは低下することが知られており、代謝フラックスと遺伝子発現量のギャップが指摘されていた。私たちはアシル化修飾による酵素の質的制御の可能性を考え、グルタミン酸生産条件での半定量アシローム解析を行った。その結果、グルタミン酸生産に関連する中央代謝経路酵素の多くでグルタミン酸生産に伴うアシル化修飾変化を見いだした。全体として、非生産条件ではアセチル化が優位であり、グルタミン酸生産条件ではスクシニル化が誘導される傾向が見られた。

補充経路酵素の（脱）アセチル化とグルタミン酸生産

グルタミン酸生産に関連する中央代謝経路酵素のうち、オキサロ酢酸供給の補充経路酵素に着目した。コリネ菌にはホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPC）とピルビン酸カルボキシラーゼ（PC）の2つの補充経路酵素があり、遺伝子破壊実験の結果、グルタミン酸生産には PEPC が必須であった。グルタミン酸生産に必須なアセチル化部位 PEPC-K653 を見出した。アセチル化模倣変異である K653Q 変異株ではグルタミン酸生産が著しく低下したのに対し、非アシル化模倣の K653R 変異株ではグルタミン酸生産を維持していたことから、K653 のアセチル化が負に作用することが示唆された。組換え変異タンパク質および *in vitro* でアセチルリジンを導入した PEPC タンパク質を用いた解析から、K653 のアセチル化が PEPC 活性を抑制することを明らかにした。

K653 アセチル化が PEPC 活性を抑制することは、その脱アセチル化は PEPC を活性化することを意味する。グルタミン酸生産条件では、PEPC タンパク質発現レベルは低下するが、全タンパク質あたりの PEPC 活性は維持されている。また、K653 のアセチル化レベルはグルタミン酸生産条件で低いと

いう結果が得られており、K653 脱アセチル化は、グルタミン酸生産条件での PEPC フラックスの維持に寄与している可能性が考えられる。

今後の展望

非酵素的なアシル化修飾は 1 種のカーボンストレスだと言う主張もあり、PEPC-K653 アセチル化もその例に当てはまるかもしれない。非アシル化模倣変異の導入によりアシル化の負の効果を回避する育種方法も考えられる。近年、代謝フラックス制御において翻訳後修飾やアロステリック制御など酵素の質的制御の重要性が指摘されている。アシル化修飾による代謝調節の仕組みを理解し、代謝フラックスの改変や増強につなげることができればと期待している。

略歴

古園 さおり（こその さおり）

大阪市生まれ。1991 年 3 月大阪大学工学部醗酵工学科卒業、1996 年 3 月大阪大学大学院工学研究科醗酵工学専攻博士課程修了、博士（工学）取得。1996 年 4 月理化学研究所に基礎科学特別研究員として入所、1997 年 10 月理化学研究所・研究員を経て、2005 年 4 月同専任研究員。2012 年 4 月より東京大学生物生産工学研究センター・微生物機能代謝工学寄付部門・特任准教授。

一般ポスター発表 (P01～P79)

P01

Arthrobacter sp. S58-1 の DFA I オリゴ糖合成酵素の特性

○原口和朋¹ (¹農研機構・食品研究部門)

【目的】

チョコリなどの植物に貯蔵多糖類の一種であるイヌリンが含まれている。このイヌリンから新しい食品素材となる有用オリゴ糖を生産することを目的として研究を行っている。イヌリンに特定の微生物酵素を作用させると、果糖 2 分子が二ヶ所で結合した還元性の無いオリゴ糖 DFA I (ディーエフイー・ワン) が生産される。DFA I オリゴ糖は砂糖の 50%程度の甘味を有し、ダイエット甘味料などとしての利用が期待される。茨城県下妻市で採取した土壌試料から DFA I オリゴ糖合成酵素を生産する菌株(細菌: S58-1 株)を分離することができた。本菌株が生産する DFA I オリゴ糖合成酵素(Inulin fructotransferase (DFA I-producing))の精製を行い、本酵素の酵素化学的、蛋白化学的な特性を解明することを目的として検討を行った。

【方法・結果】

得られた菌株(S58-1 株)について、顕微鏡観察、生物化学的な特性の解明、16S リボソーム DNA の塩基配列の決定など分類学的検討を行った。その結果本菌株は *Arthrobacter* sp. S58-1 と分類・同定された。本菌株の DFA I オリゴ糖合成酵素は菌株の培養上清中に作られる。そこで、培養上清を Tris-HCl 緩衝液で透析した後、イオン交換クロマト(DEAE-トヨパール)、疎水クロマト(Butyl-トヨパール)を行うことにより精製を進めた。その結果 16.8%の収率で、電気泳動的に均一な酵素を得ることができた。精製の過程で比活性は約 8.8 倍に上昇した。本酵素の反応至適 pH は 5.5、反応至適温度は 45℃であった。本酵素の耐熱性について検討すると、本酵素は 85℃、30 min まで安定であることが示された。本酵素の耐熱性はこれまでに報告された DFA I オリゴ糖合成酵素のなかで最強であることが示された。SDS-電気泳動によって分子量の推定を行うと、42 kDa という値が得られた。

P02

発芽玄米酒粕中のポリフェノール簡易検索方法の検討

○小木曾加奈¹, 古田一匡² (¹長野県短大生活科学, ²富士通(株))

【目的】

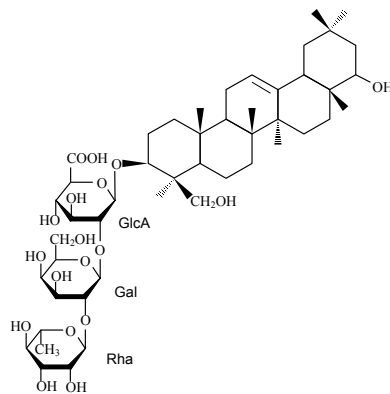
近年、付加価値の高い新規食品に対する需要の拡大から、付加価値である「機能性」を持つ成分をできるだけすばやく、確実に見いだすことが喫緊の重要課題となっている。一方、食品中の機能性を探索するには、試料を粉碎・抽出した後、濃縮後に精製、測定し、未知の成分、既知の成分を分取し同定と作業が必要になる。発芽玄米酒粕は発芽玄米を発酵させて清酒を作った絞りかすであり、これまでほとんど研究はなされてこなかった。今回はできるだけ簡便な方法で機能性成分を探索するため、発芽玄米酒粕中の各種ポリフェノールについて簡易検索方法を確立することを目的とする。

【方法・結果】

発芽玄米酒粕を 10 倍容に懸濁したのち、遠心分離で下層を取り除いた。その上澄み液をフィルターで濾したのち、LC-MS (Waters Xevo QT) 分析を行った。発芽玄米酒粕の LC-MS データを ACD/MS Workbook Suite の IntelliTarget 機能により、各種文献から酒粕中に存在すると考えられるポリフェノール類(フェルラ酸、γ-オリザノール、イノシトール、イノシトール 6 リン酸)に該当する分子イオンピークを持つピークを判別した。これらの方法を用いることで、LC/MS データのみから興味ある成分の存在を推定し、更に詳細な解析、研究へ進めるための指標を得られることがわかった。なお、本研究は科研費(26750033)の助成を受けたものである。

大豆粗精製サポニンおよび大豆粉末からのソヤサポニン Bb の単離精製
○野場翔太, 平 修, 高橋正和, 片野肇 (福井県大院生物資源)

ソヤサポニンは抗炎症作用や抗癌作用, コレステロール低下作用など多様な作用を示す機能性成分として注目され, 中でもグループ B に属するものはこれらの活性が高いことが知られる。このうち, ソヤサポニン Bb(右図)は亜鉛トランスポータの発現を促進するなど, 特に注目される。従来, ソヤサポニン Bb はカラム精製により得られてきたが, ソヤサポニン Bb を 10wt%程度含む粗精製サポニンを出発試料としても長時間を要し, また, 収率も乏しい。我々は, ①粗精製サポニンを 3:7(v/v)アセトン-水で洗浄すると, 主としてソヤサポニン Bb および Ba を含む沈殿が得られること, ②この沈殿を所定の体積の 1:1 アセトン-水に接触させるとソヤサポニン Bb が同溶媒に溶解すること, ③この溶液に大量の水を加えると, ソヤサポニン Bb が再沈殿すること, をこれまでに見出した。すなわち, 溶液操作のみで簡易迅速に粗精製サポニンからソヤサポニン Bb を単離精製できることを示した (*Anal. Sci.*, **2015**, *31*, 85)。



さらに本研究では, 低コストでソヤサポニン類を得るとともに, 将来的には品種ごとにソヤサポニン類の収率を評価し, 農作物の付加価値に新たな視点を与える目的から, 大豆粉末より直接ソヤサポニン Bb を単離する溶液操作法を検討した。現在までのところ, ①大豆粉末から MeOH 抽出物を調製し, ②ホウ砂水溶液と接触させソヤサポニン Bb を溶解させた後, 上澄みに酸を添加して再沈殿させ, ③最後に同沈殿を 1-オクタノールで洗浄することで, ソヤサポニン Bb 以外にはひとつの化合物しか含まない標品の単離に成功した。質量分析($m/z = 767$)から, この化合物はソヤサポニン Bb の糖鎖がグルクロン酸-アラビノースになったソヤサポニン Bc' と推定された。以上の検討結果について発表する。

フラーレンを内包するリポソームのヒトメラノーマ細胞に対する放射線増感効果

○加藤信哉¹, 吉村哲郎^{2,3}, 三羽信比古^{4,5} (¹三重大 RI 医, ²三重大院工, ³(株)リポソーム工学研究所, ⁴県立広島大名誉教授, ⁵NPO 法人 日本老化防御医科学センター)

【目的】

我々はフラーレンの水溶性誘導体 Polyhydroxy small gap fullerenes (SGFs: $C_{120}O_{30}(OH)_{30} \cdot 30H_2O \cdot 25Na^+$) を DOPC/DOPS 多重層リポソーム (Lpsm) に内包させ (LpsmSGFs), ヒトメラノーマ細胞に投与して放射線増感効果を調べた。

【方法・結果】

X 線照射後の細胞増殖度を WST-8 法により測定し, ミトコンドリア膜電位の変化を Rhodamine123 により評価した。細胞内活性酸素を Dihydroethidium の蛍光により検出し, DNA 酸化損傷を 8-OHdG 免疫染色により観察した。その結果, LpsmSGFs 投与後の X 線照射により, ヒトメラノーマ細胞の細胞増殖度は投与量依存的に低下し, Lpsm 単独投与ならびに遊離 SGFs を有意に下回った。ミトコンドリア膜電位は, X 線照射なしでは LpsmSGFs 投与と無投与でほぼ同じであったが, X 線照射後には LpsmSGFs 投与で蛍光強度が上がり, 一方, 無投与では低下した, また LpsmSGFs 投与では, X 線照射後の細胞内活性酸素が増加し, また DNA 酸化損傷も検出された。また SGFs 水溶液に X 線照射を行った場合, 8 Gy まで酸化還元電位は上昇した。以上より, リポソームに内包することで高濃度のフラーレンを細胞内に送達することが可能となり, LpsmSGFs の放射線増感効果は, 多数の-OH が結合した水酸化フラーレンで-OH の一部がラジカル化するなどフラーレンが介在する酸化ストレスが寄与している可能性が示唆される。

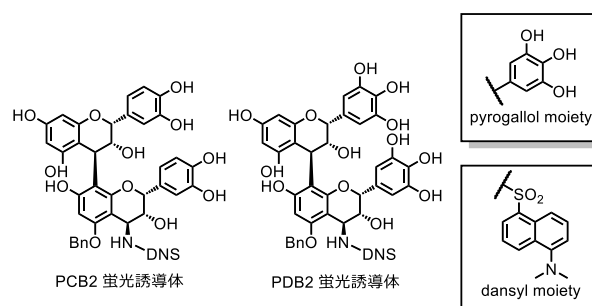
Proanthocyanidin 類蛍光誘導体の合成研究

○木下翔¹, 石原知里¹, 藤井博², 眞壁秀文^{1,3}(¹信大院総合理工, ²信大先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所, ³信大院農)

【目的】 Proanthocyanidin 類は, 様々な食品中に含有されるポリフェノール化合物の一群である. 多様な生理活性が報告されており, 機能性成分として応用が期待されている. 当研究室では, これまでに proanthocyanidin 類の合成研究を行い, ヒト前立腺ガン細胞株 (PC-3) に対する抗腫瘍活性試験に供してきた. その結果, (-)-epicatechin の二量体 procyanidin B2 (PCB2) では活性が見られなかった. 一方で, (-)-epigallocatechin の二量体 prodelphinidin B2 (PDB2) は, 顕著な抗腫瘍活性を示した. これら化合物の違いは, pyrogallol 基の有無だけであり, pyrogallol 基と抗腫瘍活性の関連が示唆された. 今回, pyrogallol 基の有無による細胞内動態の差異を解明するために, 分子内に蛍光発色団を導入した蛍光誘導体の合成を目的とした.

【方法・結果】 蛍光発色団は, dansyl 基 (DNS 基) を用いた. そして, DNS 基を結合させるために NH₂ 基を 4" 位に導入することとした.

PCB2 蛍光誘導体の合成は, 二量体に DNS 基を導入する方法と単量体に DNS 基を導入後に縮合させる方法を用いて行った. その結果, DNS 基を導入した単量体を縮合させる方法が収率の面で良好であった. そのため, PDB2 蛍光誘導体を同様の方法で合成した. また, 合成した PCB2 および PDB2 蛍光誘導体は, PC-3 に対する抗腫瘍活性に変化がないことを確認した.



エピガロカテキンガラート (EGCG) はスタチンによる動脈硬化促進因子 PCSK9 の増加を抑制する

○岡田 雄大, 北村 幸平, 長岡 利 (岐阜大・応用生物科学部)

【目的】 現在, 高コレステロール血症の治療薬として一般にスタチンが使用されている. スタチンは LDL 受容体 (LDLR) レベルを増加させると同時に, その分解促進因子である PCSK9 レベルを増加させることが知られている. 本研究では, PCSK9 のタンパク質レベルを減少させるエピガロカテキンガラート (EGCG) とスタチンをヒト培養肝臓細胞 HepG2 に同時添加することで, EGCG がスタチンの効果を強める可能性をもつかを検討した. また, 近年 Annexin A2 (ANXA2) が PCSK9 の持つ細胞表面 LDLR の分解活性を阻害する内因性のタンパク質として同定され, EGCG による LDLR 上昇作用及び PCSK9 低下作用に ANXA2 が関与している可能性が考えられた. そこで ANXA2 を siRNA でノックダウンし, LDLR と PCSK9 に与える影響を検討した. 【方法・結果】 <実験 1> Control 群, EGCG 群, Lovastatin 群, EGCG 群+Lovastatin 群の 4 群を用いて実験を行った. 各群を HepG2 細胞に処理した後, 【A】 RT-PCR によって LDLR・PCSK9 mRNA レベルを, 【B】 ウェスタンブロットによって LDLR・PCSK9 タンパク質レベルを, 【C】 ELISA によって PCSK9 タンパク質レベルを測定した. <実験 2> Control siRNA 群, EGCG+ Control siRNA 群, ANXA2 siRNA 群, EGCG+ ANXA2 siRNA 群の 4 群を用いて実験を行った. 各群を HepG2 細胞に処理した後, 【A】 RT-PCR によって LDLR・PCSK9 mRNA レベルを, 【B】 ウェスタンブロットによって LDLR・PCSK9 タンパク質レベルを, 【C】 ELISA によって PCSK9 タンパク質レベルを測定した. その結果, <実験 1> EGCG と Lovastatin の併用利用で LDLR mRNA・タンパク質レベルは有意に増加した. EGCG はスタチンによる PCSK9 の増加を抑制した. <実験 2> ANXA2 ノックダウンによって LDLR の mRNA・タンパク質発現の基礎レベルが有意に減少した. 成熟型の PCSK9 タンパク質レベルは EGCG+ ANXA2 siRNA 群で有意に減少した. また mRNA レベルも有意に減少した. よって, ANXA2 は PCSK9 を減少させる従来の作用だけではなく, LDLR の発現に必須であることを発見した.

P07

コレステロールの分解を促進する卵白タンパク質由来新規ペプチド SRLY の発見
○内山裕香, 坪井俊樹, 島田昌也, 長岡利 (岐阜大学)

【目的】 卵は良質なタンパク質源であり、栄養的に最も優れた食品の一つである。一方で、コレステロールを多く含むため、脂質異常症、冠動脈心疾患などのリスク上昇が懸念され、敬遠されている。しかし、ヒトや動物において、卵白タンパク質の摂取は血清コレステロールを減少させることが報告されている。また、当研究室の実験で、ラットにおいて卵白タンパク質の酵素分解物 (EP-1) の摂取により血清コレステロールと肝臓総脂質が減少し、糞中総ステロイド排泄量が増加した。さらに、コレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール 7 α -水酸化酵素 (CYP7A1) の mRNA レベルが増加傾向を示したことから、この現象のメカニズムには CYP7A1 によるコレステロールの分解促進が関与すると考えられる。しかし、この効果をもたらすペプチドの本体は不明である。そこで本研究は、ヒト培養肝臓細胞 HepG2 を用いて、CYP7A1 の mRNA レベルを評価基準とし、EP-1 の可溶性ペプチド混合物 (EP-1S) からコレステロールの分解を促進するペプチドの本体を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】 EP-1S のスクリーニングは逆相クロマトグラフィーを用いて行った。得られた画分をヒト培養肝臓細胞 HepG2 に添加し 24 時間後に総 RNA を回収、CYP7A1 の mRNA レベルを測定した。得られた画分のうち Fraction 4 が CYP7A1 の mRNA レベルを増加させた。この Fraction 4 を同手法でさらにスクリーニングを行い、得られた画分のうち Fraction 42 が最も CYP7A1 mRNA レベルを増加させた。続いて MALDI-TOF-MS/MS により Fraction 42 に含まれるペプチドの解析を行い、オボアルブミン由来のアミノ酸配列である Ser-Arg-Leu-Tyr (SRLY) を同定した。SRLY を HepG2 細胞に添加したところ CYP7A1 の mRNA レベルを増加させることを明らかにした。以上の結果から、我々はコレステロールの分解を促進する卵白タンパク質由来新規ペプチド SRLY を発見した。

P08

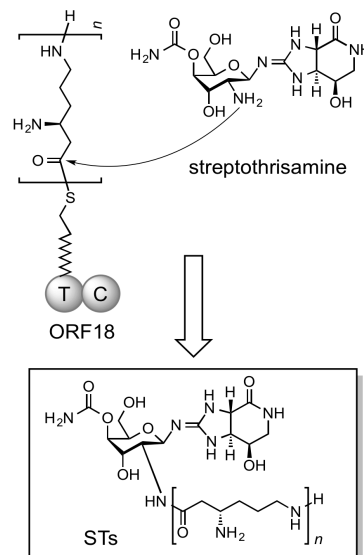
ポリカチオン性ポリマー β -lysine oligopeptide 生産放線菌の分子育種
○川崎春香¹, 丸山千登勢¹, 牛丸和乗¹, 濱野吉十¹ (¹ 福井県立大・生物資源)

【目的】

放線菌 *Streptomyces rochei* NBRC12908 が生産する抗生物質 streptothricin (ST) は、その構造に 1~4 残基からなる β -lysine oligopeptide [oligo(β -Lys)] を有している。これまでの研究において、生合成酵素を用いた *in vitro* の反応で oligo(β -Lys) のみの構造を創出し、得られた 6 残基の oligo(β -Lys) が枯草菌特異的な抗菌活性を示すことを見出している (*Nat. Chem. Biol.*, 8, 791-797, 2012)。そこで本研究では、oligo(β -Lys) の微生物生産を目的とした oligo(β -Lys) 生産菌の分子育種を試みた。

【方法・結果】

ST は、ORF18 の T domain 上に結合した oligo(β -Lys) と、生合成中間体である streptothrisamine との縮合により生合成される。そこで、微生物による oligo(β -Lys) 生産を目的に、streptothrisamine 生合成遺伝子を破壊した遺伝子クラスターをプラスミドにて異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株に導入したところ、ほぼ全ての導入株 (約 80 株) において oligo(β -Lys) の菌体外生産を確認できなかったが、1 株が菌体外に oligo(β -Lys) を生産することを見出した。本導入株は、細胞内で生合成された oligo(β -Lys) を細胞外に排出する能力が向上した自然突然変異株であると考えられたことから、本変異株からプラスミドをクローニングし、再度、プラスミドを導入した。その結果、全ての形質転換体で oligo(β -Lys) の菌体外生産を確認することができた。



P09

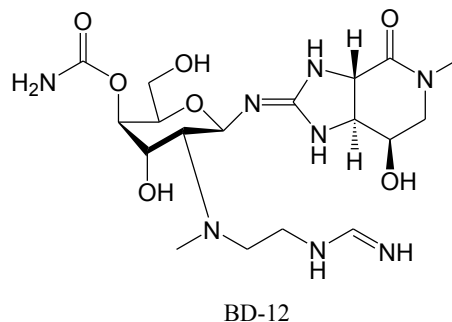
ストレプトスリシン類縁生合成遺伝子群に見出した Ala-tRNA^{Ala} 依存型ペプチド合成酵素の機能解析

○松田 貴暉¹, 丸山 千登勢¹, 橋本 絢子², 新家 一男³, 濱野 吉十¹

(¹ 福井県大・生物資源, ²JBIC, ³産総研)

【目的】

抗生物質 streptothricin (ST) 類縁化合物の 1 つである BD-12 は、側鎖に glycine 誘導体を有しており、これまでの研究で、アミノ糖と glycine 側鎖のペプチド結合が FemAB family に相同性を示す Orf11 によって Gly-tRNA^{Gly} 依存的に触媒されることを見出した (C. Maruyama et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016)。従って Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索は、glycine 以外のアミノ酸を側鎖に有する新規 ST 類縁化合物の創製に有用であると予想し、放線菌ドラフトゲノムデータベースより Orf11 ホモログ酵素遺伝子の探索を行った。



【方法・結果】

データベース検索の結果、新たな ST 類縁生合成遺伝子群 (*sba* 遺伝子群) を見出し、Orf11 ホモログ酵素遺伝子である *sba18* 遺伝子を同定した。そこで Sba18 組換え酵素を構築し、本酵素の基質特異性を調べたところ、Ala-tRNA^{Ala} を基質として認識することが判明した。これまでに、alanine を側鎖に有する ST 類縁化合物は報告されておらず、その生理活性は大変興味深い。そこで酵素合成にて得られた alanine を側鎖に有する ST 類縁化合物の生理活性評価を行った。また本化合物の微生物生産を目的に、ST 生合成遺伝子群と *sba18* 遺伝子の共発現を行っており、その詳細についても紹介する。

P10

セルロース系バイオマス分解細菌 *Clostridium thermocellum* σ 因子発現株の解析

○山下恭平¹ 市川俊輔² 荻田修一³

¹三重大学生物資源学部 ²三重大学教育学部 ³三重大学大学院生物資源学研究科

【目的】

再生可能で環境負荷が小さい資源であるセルロース系バイオマスを分解し利用することで、プラスチック原料やバイオ燃料を得ることが出来る。セルロース系バイオマスを分解するには大量の分解酵素を添加する必要がある点が課題となっている。

本研究では、細菌 *Clostridium thermocellum* を培養するだけで、セルロース系バイオマスを分解できる技術に着目している (Prawitwong et al. *Biotechnol. Biofuels.* 6: 184. 2013.)。 *C. thermocellum* は σ 因子を介して複数の分解酵素遺伝子の発現を誘導している (Nataf et al. *PNAS.* 107: 18646. 2010.)。したがって、 σ 因子を発現させることで複数の分解酵素の分泌を促進させ、*C. thermocellum* のセルロース系バイオマス分解活性を向上させられるのではないかと仮説を立てた。

【方法・結果】

C. thermocellum は 9 つの σ 因子遺伝子 (*sig11* ~ *sig18*, *sig24C*) を持っている。これら遺伝子を *C. thermocellum* に導入することで、 σ 因子発現株を作成した。 σ 因子発現株の細胞内には σ 因子が存在することを確認した。9 つの σ 因子発現株のうち、*sig14* 発現株と *sig17* 発現株の培養液中には、多量のセルラーゼが分泌されていた。以上の結果より、*C. thermocellum* において、 σ 因子を発現させることで複数のセルラーゼの分泌を促進できることを明らかにした。

P11

ホップ (*Humulus lupulus*) 中に含まれるポリフェノールの成分組成と機能性評価
○奥村小春¹, 乾隆子^{1,2}, 細谷孝博¹, 熊澤茂則¹ (¹静岡県大院・食品栄養, ²サントリービール(株))

【目的】

ホップ (*Humulus lupulus*) は、アサ科の宿根性多年生植物であり、ビールの主原料のひとつである。ビールに香りや苦味を与える他、抗菌剤や不眠、骨粗鬆の改善などの健康機能を有することが報告されている。今回、ホップの機能特性に寄与する成分としてポリフェノールに着目し、ホップ中に含まれるポリフェノールの成分組成および機能性との関連を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

チェコ・ザーツ産のホップを溶媒抽出後、固相抽出したものを試料とした。LC-MSを用いて、ホップ中に含まれる主なポリフェノール 23 種の定性・定量分析を行い、成分組成を明らかにした。また、ホップ抽出物を用いて、DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 法による抗酸化活性、マウスマクロファージ様細胞 J77.1 による抗炎症活性、マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いた脂肪細胞分化抑制活性について評価した。ホップ抽出物は、いずれの評価法においても活性を示した。更に、主要ポリフェノール 23 種についても同様に評価を行い、ホップ中の成分組成との関連性を調べた。また、主要ポリフェノール成分 23 種以外にも活性に寄与する成分が存在すると考えられ、現在、これら化合物の構造決定を進めている。

P12

ワサビ葉成分が脂肪細胞分化に及ぼす影響
○三澤尚己¹, 細谷孝博¹, 熊澤茂則¹ (¹静岡県大院・食品栄養)

【目的】

ワサビ (*Wasabia japonica* Matsumura) は、アブラナ科ワサビ属に分類される多年生植物で、静岡県での栽培が盛んである。ワサビの利用部位は、その根茎であり、葉や茎は廃棄されることが多い。そこで当研究室では、未利用資源であるワサビ葉に機能性を見出し有効利用へとつなげるために、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を用いて、ワサビ葉成分が脂肪細胞分化に及ぼす影響について調べた。本研究では、ワサビ葉に含まれる脂肪細胞分化抑制成分の同定および作用機序の解明を目的とした。

【方法・結果】

ワサビ葉をメタノールにて抽出後、3T3-L1 細胞を用いたアッセイ結果を指標としたクロマトグラフィーを行い、複数の脂肪細胞分化抑制成分を単離し、LC-MS, NMR を用いてそれらの構造を決定した。その結果、ワサビ葉に含まれる脂肪細胞分化抑制成分として 5-Hydroxy ferulic acid methyl ester (5-HFA ester), Sinapic acid methyl ester, all-*trans*-Lutein を同定した。ワサビ葉には、フェニルプロパノイド類が複数含まれており、中でもワサビ葉に特異的に含まれている 5-HFA ester が優れた脂肪細胞分化抑制能を示したことから、5-HFA ester およびその類縁体を化学合成し、構造活性相関を調べた。その結果、ケイ皮酸骨格の 4 位および 5 位の置換基、またメチルエステル構造が脂肪細胞分化抑制に寄与していることが示唆された。次に、5-HFA ester の作用機序を調べるために、脂肪細胞分化および脂肪蓄積に関わる遺伝子の mRNA 発現量とタンパク質発現量をリアルタイム RT-PCR および Western blotting 法により調べた。5-HFA ester は、脂肪細胞分化に重要な PPAR γ および C/EBP α , そして脂肪蓄積に関わる遺伝子群の mRNA 発現量を有意に抑制していた。さらに、PPAR γ のタンパク質発現量についても抑制していることが明らかとなった。

P13

線維芽細胞増殖因子 FGF18 の発現を抑制する化合物の探索
○吉村一輝¹, 藤浪未沙¹, 細谷孝博¹, 熊澤茂則¹ (¹静岡県大院・食品栄養)

【目的】

FGF18 (Fibroblast Growth Factor 18) は線維芽細胞増殖因子の一つで、生体内における細胞の増殖および分化を制御する分子群である。しかし FGF18 について、毛周期において休止期を維持するといった報告や、癌細胞において異常な発現が見られるといった報告がなされている。このことから、FGF18 は抗癌剤や発毛剤の開発に向けた新たな分子標的になり得ると考えられるが、FGF18 を標的とした天然成分はいまだ報告されていない。そこで本研究では、天然物から FGF18 の発現を抑制する化合物を単離・同定し、得られた化合物に対して FGF18 発現抑制活性の評価を行うとともに、その活性メカニズムの解明を行うことを目的とした。

【方法・結果】

当研究室の先行研究によって構築された FGF18 プロモーター領域を標的としたレポーターアッセイ系 (SW480-FGF18prom-luc) を用い、沖縄産植物試料 141 種に対してスクリーニングを行った。スクリーニングの結果選択されたトウダイグサ科オオバギ (*Macaranga tanarius*) に対して、活性化化合物の単離・同定を行った。同定された化合物について、リアルタイム RT-PCR および Western blotting 法を用いた FGF18 発現抑制活性の評価とその活性メカニズムの解明を試みた。その結果、オオバギの葉からプレニルフラボノイドである Nymphaeol-C が単離され、リアルタイム RT-PCR および Western blotting 法の結果、この化合物は FGF18 の発現を抑制することが確認された。

P14

オニヒトデ由来ステロイド配糖体の神経細胞分化誘導活性
○長島志菜, 笹山裕美, 小鹿一 (名大院生命農)

【目的】

NGF (神経成長因子) は神経細胞の分化・生存に必須の因子であり、アルツハイマー病治療への応用が期待されているが、投与が困難であるという課題を持つ。そこで当研究室では、神経モデル細胞である PC12 細胞に対して NGF と同様の作用、または NGF の作用を増強する物質を探索している。この中で沖縄産オニヒトデ *Acanthaster planci* より acanthasteroside B3 が単離され、マウスに対する記憶改善効果が示された。オニヒトデからはこれまでに多くの類縁体が発見されていたので、本研究ではこれら acanthasteroside 類の NGF 増強活性を調べ、構造活性相関を行うことを目的とした。

【方法・結果】

PC12 細胞を 24 well マイクロプレートにまき、血清培地中で 24 時間インキュベートした後に、サンプルと 0.5 ng/mL NGF を含む無血清培地に培地交換をした。活性は 4 日間培養後の突起伸長率、すなわち細胞の長径より長い突起を持つ細胞の割合で評価した。

その結果、acanthasteroside A1 に、acanthasteroside B3 を上回る NGF 増強活性が見られた。Acanthasteroside 類は糖の結合様式から A~D の 4 つのグループに分かれており、A グループはステロイド核 3 位に 1 つの糖が、B グループはステロイド核 3 位および側鎖分岐鎖に 1 つずつ糖が結合している。また、ステロイド核 3 位と側鎖 26 位に 1 つずつ糖が結合した D グループでは、今回試験した acanthasteroside D1~D4 全てにおいて活性が見られなかった。その他のグループでは同グループ内でも活性に大きな差が見られたことから、糖の結合様式以外に活性に関与する因子の存在が示唆された。現在、さらなる類縁体についての活性試験を進めている。

P15

ペクチンが好塩基球と抗原提示細胞に及ぼす影響の解析

○前田絢香, 津田明里, 岩城佳那, 矢部富雄, 北口公司 (岐阜大院・応生科・応用生命)

【目的】

水溶性食物繊維の一種であるシトラスペクチンを食物アレルギーモデルマウスに摂取させると、アレルギー特異的 IgG1 の抗体価が減少し、アレルギー性の下痢を緩和できる可能性が示唆された。しかしながら、ペクチンの作用点ならびにその詳細な作用機序については不明である。本研究では、アレルギー応答のエフェクター細胞である好塩基球ならびにアレルギーの感作相で重要な役割を担う抗原提示細胞にペクチンが及ぼす影響を調査した。

【方法・結果】

ラット好塩基球細胞株 RBL-2H3 へペクチンを添加した後、イオノマイシンならびに IgE 架橋刺激により脱顆粒を誘導した結果、顆粒放出率やサイトカイン発現量にペクチンの添加は影響を及ぼさなかった。さらに、ペクチンを経口投与した Balb/c マウスに受動性アナフィラキシーを誘導したところ、直腸温の低下は対照群と同程度であった。したがって、I 型アレルギーの主要なエフェクター細胞であるマスト細胞や好塩基球には、ペクチンは影響を及ぼさない可能性が示唆された。次いで、抗原提示細胞にペクチンが及ぼす影響を調査した。ヒト単球由来細胞株 THP-1 を PMA 刺激でマクロファージ様の抗原提示細胞へ分化させ、ペクチンと 24 時間共培養した。共培養後に LPS で 6 時間刺激し、抗原提示に関わる共刺激分子の遺伝子発現量を qPCR 法で測定した結果、ペクチン添加群において、活性化共刺激分子である CD40 および CD80 の発現量が有意に上昇した。一方で、IgE/IgG1 へのクラススイッチに関与する ICOSL の発現量がペクチン添加により有意に抑制された。以上の結果より、ペクチンは、アレルギー感作相において抗原提示細胞の共刺激分子発現量を調節し、アレルギー応答を調節している可能性が示唆された。

P16

閉経後骨粗鬆症モデルマウスに対する小豆煮汁抽出物の効果

○江崎将梧¹, 西尾昌洋¹, 近藤 修司², 中村昌弘², 伊藤宏規², 梅川逸人¹

(¹三重大院・生物資源, ²井村屋株式会社)

【目的】 高齢化社会において、骨粗鬆症の予防と治療は大きな問題となっている。骨代謝は骨芽細胞と破骨細胞によって調節されているが、両者の作用がアンバランスになると骨粗鬆症が発症する。小豆は和菓子の原料として古くから用いられており、その煮汁には利尿作用など種々の薬理作用があることが知られている。そこで今回、小豆煮汁の 40%エタノール抽出画分を閉経後骨粗鬆症モデルマウスに投与し、骨密度および血清アルカリホスファターゼ (ALP) や酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 等に対する影響を検討した。

【方法・結果】 小豆煮汁を 10 倍に濃縮した後、遠心分離して得た上清 (AZ) をダイアイオン HP20-カラムに供し、20%エタノールで洗浄した後、40%エタノールで溶出した。得られた溶出物を凍結乾燥し、40%エタノール抽出物 (AE) とした。動物実験は雌性 C57BL/6 系マウス (12 週齢) を用いて行った。標準試験飼料 (AIN-93 改変飼料) でマウスを 1 週間予備飼育した後、骨粗鬆症を誘発させるため卵巣摘出手術 (OVX) を行った。OVX モデル作成後、標準試験飼料のみを与えた群を CNT 群、標準試験飼料に 1% AE を含む飼料を与えた群を AE 群、1% AZ (凍結乾燥物) を含む飼料を与えた群を AZ 群とした。また、疑似手術を施し標準試験飼料のみを与えた群を Sham 群とした。OVX 処理後 4 週間飼育し、マイクロ CT で骨解析を行った後、血清を分離して ALP および TRAP 活性を測定した。CT 解析の結果、AE 群の骨密度 (BV/TV) は CNT 群に比べ有意に高く、Sham 群とほぼ同じレベルであった。AE 群の血清 ALP 活性は、CNT 群より高い傾向にあり、TRAP 活性は低い傾向にあった。以上のことから、小豆煮汁抽出物は閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨吸収と骨形成のアンバランスを改善することにより骨密度の低下を抑制したと考えられた。

P17

メタロチオネイン遺伝子を導入した *Mentha aquatica* 形質転換体の作出と解析

○小野里真志, 栗田将平, 田淵晃 (信州大・応用生命)

【目的】

ファイトレメディエーションは、植物の生理機構を利用して、環境浄化を図る技術である。最近では、遺伝子組換え植物を用いることで、ファイトレメディエーションの効率を向上させる試みが行われている。本研究では、ファイトレメディエーション効率の向上を目指し、*Mentha aquatica* (ウォーターミント) に、金属結合性タンパク質であるヒトメタロチオネインの遺伝子 (MT 遺伝子) を導入し、高濃度に重金属を蓄積する形質転換体の作出を試みた。作出した形質転換体について、重金属の一種である銅を用いて、銅耐性および銅蓄積能の調査を行った。

【方法・結果】

形質転換体の作出は、次のように行った。*Agrobacterium rhizogenes* 野生株およびプラスミド pBI121 または *GUS* 遺伝子を MT 遺伝子に置換したプラスミド pBI121-*MTL1* を保有する *A. rhizogenes* をそれぞれウォーターミント茎切片に感染させ、毛状根を誘導し、植物体へ再生させた。形質転換体の銅耐性および銅蓄積能の調査は次のように行った。GamborgB5 (B5) 固体培地で 2 週間の前培養を行った後、葉を 4 枚含むように切り取った植物体を、銅の終濃度が 0, 10, 30 mg/L になるように硫酸銅を添加した B5 固体培地に移植した。26℃, 16 時間明期で 4 週間培養し、茎頂の伸長と葉の様子を観察した。4 週間培養した植物体を培地から取り出し、80℃で 2 日間乾燥した後、電気炉を用いて灰化した。塩酸を用いて灰化植物体から銅を抽出し、原子吸光分析により銅濃度を測定した。その結果、MT 遺伝子による銅耐性および銅蓄積能の向上は認められなかった。しかし、ウォーターミント野生株と比較して、形質転換体においては銅含有量が増加する傾向が見られた。このことから、*A. rhizogenes* による形質転換によって、植物体に何らかの変化が生じ、重金属の蓄積能が向上したことが示唆された。

P18

Candida antarctica lipase A の大腸菌発現系の構築

○服部菜月, 中野秀雄, 岩崎雄吾 (名大院生命農)

【目的】

酵母 *Candida antarctica* は二種のリパーゼ A 及び B を産生するが、そのうちリパーゼ A (*Candida antarctica* lipase A, CALA) は油脂の *sn*-2 位に弱い位置選択性を示す。

本研究の最終目標は CALA を蛋白質工学的に改変して厳密な 2 位特異性を付与することである。この目的のため、野生型 CALA およびその変異体を簡便に調製できる発現系が必須である。CALA の大腸菌での発現に関しては菌体内で活性型 CALA を発現させた例がある。目的蛋白質を菌体外に分泌させることが可能になれば、発現後の回収、精製が容易になる。そこで本研究では CALA の大腸菌での細胞外分泌発現系の構築を目的とした。

【方法・結果】

大腸菌用にコドン最適化した人工 CALA 遺伝子上流に *pelB* シグナル配列を付加した CALA 発現プラスミドを構築した。このプラスミドを保持した *E. coli* BL21(DE3)を用いて発現実験を行ったところ、CALA は培養上清中に検出された。培養条件を最適化した後、培養上清から CALA の精製を行ったところ、200 mL の培養上清から 2.8mg の精製 CALA を得る事ができた。精製 CALA の N 末端配列を調べ、*pelB* シグナル配列が正しく除去されていることを確認した。また、精製 CALA を用いてトリアシルグリセロール分解反応を行い、生成するジアシルグリセロールの異性体組成を分析したところ、組換え CALA は 2 位選択性を有することを再検証した。さらに、高速多検体スクリーニングに対応するため、96 穴プレートでのオートインダクションを利用したシングルコロニーからの CALA 発現を検討したところ、十分な発現量が得られる事が確認できた。

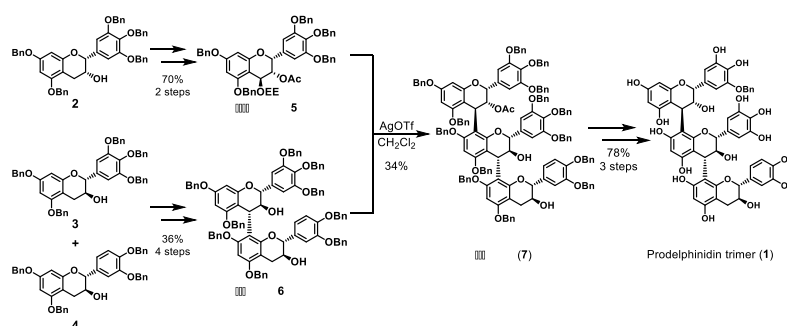
Prodelphinidin trimer の合成と抗腫瘍活性

○森雅貴¹, 松本桐子², 石原知里², 川口耕一郎³, 河原誠一^{3,4}, 服部恭尚⁵, 藤井博^{2,3,6}, 真壁秀文^{1,2,3}
 (¹ 信大院農, ² 信大農, ³ 信大院総合工学系, ⁴ 株式会社サンクゼール, ⁵ 京都薬科大
 共同利用機器センター, ⁶ 信大先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所)

【目的】 Prodelphinidin 類は穀物などに多く含まれるポリフェノールの一種で、様々な生理活性が報告されており、特に抗腫瘍活性について注目されている。しかし、prodelphinidin 類は自然界では微量にしか存在せず、自然界から純粋な試料を多量に得ることは不可能である。よって、活性試験などの応用研究を行うためには合成による試料の供給が必要となる。本研究ではハンニチバナ科植物 *Cistus albidus* から単離されたエピガロカテキン、ガロカテキン、カテキンユニットを持つ prodelphinidin trimer (1) の最初の合成を達成し、さらに抗腫瘍活性試験に向け、安定的に試料を供給することを目的とした。

【方法・結果】 Prodelphinidin trimer (1) の 3 つのユニットであるエピガロカテキンユニット(2)、ガロカテキンユニット(3)、カテキンユニット (4) を合成し、その後、求電子剤 (5) と求核剤 (6) をそれぞれ得た。得られた求電子剤 (5) と求核剤 (6) を等量用いたルイス酸による縮合反応を行い、ルイス酸として AgOTf を用いた条件において、収率 34% で三量体 (7) を合成した。その後、保護基の脱保護を行い、

prodelphinidin trimer (1) の最初の合成を達成した。また、合成した化合物を用いて、ヒト前立腺癌細胞株 (PC-3) に対する抗腫瘍活性試験を行ったところ、すでに活性が知られている prodelphinidin B3 (PDB3) と同程度の抗腫瘍活性を持つことが判明した。



嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* の乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子の解析とバイオ
 水素ガス生産向上への応用

○吉田稜¹, 関兵馬¹, 三縄由希子¹, 大島健志朗², 服部正平², 栗冠真紀子¹, 木村哲哉¹, 栗冠和郎¹
 (¹ 三重大院生資, ² 東大院新領域)

【目的】

次世代クリーンエネルギーとして注目されている水素ガスをバイオマスから微生物によって直接生産することを究極の目的として、キャンパス土壌から単離した嫌気性細菌 *Clostridium paraputrificum* M21 を中心としたシステムの構築をめざしている。嫌気性細菌が糖を代謝する経路として解糖系でピルビン酸生産までは好気性菌と同じ一般的な代謝経路を経る。しかし、ピルビン酸からは乳酸を生産する経路とアセチル CoA を経て酢酸や酪酸を生産する嫌気性菌特有の代謝が行われる。この過程で生じた還元力の一部は水素ガスの生産に用いられる。そこで、乳酸生成に働く乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を破壊することで、水素ガス生産が向上する方向へ代謝を変化させることを目的とした。

【方法・結果】

C. paraputrificum M21 のゲノム配列から乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*ldh*)は 2 つ存在する可能性が示された。遺伝子発現解析の結果より、1 つの遺伝子が主に発現していることが分かった。そこで高発現している方の *ldh* 遺伝子を破壊することにした。遺伝子破壊には GroupII イントロンを応用した ClosTron システムを利用した。ClosTron ベクターに PCR 法で合成した *ldh* 破壊用遺伝子を連結し、*C. paraputrificum* へ形質転換を行い *ldh* 遺伝子の破壊を行った。GS 改変培地で嫌気瓶を用いて培養したところ、遺伝子破壊株は野生株に比べて水素ガス生産量が 2.5~3 倍になった。

P21

微生物燃料電池の細胞外電子伝達を強化する新規化合物の特性解析
○鈴木溪¹, 久保田博子², 由井嵐士², 小暮敏博⁴, 田代陽介², 二又裕之^{1,3}
(¹ 静大院・創造, ² 静大院・工, ³ 静大・グリーン研, ⁴ 東大院・理)

【目的】

微生物燃料電池(Microbial Fuel Cells ; MFC)は有機性廃棄物の処理とエネルギー生産を同時に行える次世代型の装置であるが、発電力が低く実用化には至っていない。我々はその MFC の発電力を著しく増加させるのみならず、蓄電能力を持つ微生物由来の新規化合物を獲得した。本研究ではその新規化合物の物質科学的特性と関連微生物群の解析を目的とした。

【方法・結果】

乳酸を電子供与体とし、汽水湖底泥を接種源とする複合系微生物群を用いた MFC において高発電が観察された。そこで電極上の微生物群集を嫌氣的に回収し培養した結果、ある微生物群は蓄放電能力を有する黒色沈殿物質を生成した。興味深いことに、サイクリックボルタンメトリー解析の結果、本物質は酸化還元特性を示した上に、蓄放電特性を持つことが示された。エネルギー分散型 X 線(XRD)解析の結果、黒色沈殿物質の主成分はリン、チタン、鉄およびカルシウムであることが示された。本物質を MFC 負電極へ添加したところ、未添加の MFC と比較し運転初期の発電力が約 100 倍増加した。この沈殿物質生成微生物を特定するため複合微生物群から分離を実施したところ、黒色および白色の沈殿物質を生成する HB 株および KW 株を獲得した。培養液中の鉄および硫酸イオン濃度を測定したところ、HB 株では鉄および硫酸イオンの還元が引き起こされたのに対し、KW 株では確認されなかった。XRD 解析の結果、HB および KW 株は鉄、硫黄およびリン、チタンをそれぞれ主成分とすることが示され、HB 株生成物質の方が優れた蓄放電性能を示した。以上の結果は、HB 株由来の黒色沈殿物質は蓄放電能力を有するだけでなく、MFC の電気生産能力を向上させ、これは黒色沈殿物質が細胞外電子伝達を強化した事を示唆した。

P22

植物共生細菌 *Methylobacterium zatmanii* の重希土類元素および Ca に対する生育特性と
メタノール脱水素酵素の性質

○王 倫¹, 菅沼 宗矢¹, 谷 明生², 早川 享志¹, 中川 智行¹ (¹ 岐阜大院・応生, ² 岡山大・植物研)

【目的】

メタノールを唯一の炭素源として生育できる *Methylobacterium* 属細菌は植物共生細菌である。近年、*Methylobacterium* 属細菌が軽希土類に依存したメタノール生育能力を持つことが見いだされ、その鍵酵素メタノール脱水素酵素 (MDH) が軽希土類を補因子とする新規な MDH (XoxF) であることが明らかとなった。また、軽希土類と Ca が共存すると *xoxF* 遺伝子が支配的に発現され、重希土類と Ca では *mxoFI* 遺伝子が優先的に発現されることが報告されている。しかし、重希土類や低 Ca 環境で誘導される MDH がどのような性質を持つか、これまで報告がない。私たちは、重希土類でもメタノール生育が可能な *M. zatmanii* GM41 株をスクリーニングし、そのメタノール生育の特徴を観察してきた。今回、様々な条件で生育した GM41 株から MDH を精製し、それぞれの酵素科学的諸性質を明らかにした。

【方法・結果】

M. zatmanii GM41 株は、*M. extorquens* が生育できないような重希土類 Lu や低 Ca 環境でも十分なメタノール生育を示す。低 Ca 環境で生育した GM41 株から、硫酸沈殿 (70%)、Butyl TOYOPEARL 650S および Hitrap SP カラムクロマトグラフィーにより MDH を精製した。精製酵素は、SDS-PAGE および PMF 解析から、60 kDa の α サブユニットと 10 kDa の β サブユニットから成る MxaFI であることが分かった。また、本酵素の酵素科学的諸性質を 30 μ M Ca のメタノール生育細胞から精製した Ca-MDH と比較したところ、最適温度は 50°C と同等であったのに対し、メタノールに対する K_m は 1.60 μ M (Ca-MDH : 0.11 μ M), V_{max} は 3.77 μ mol/min $\cdot$ mg (Ca-MDH : 17.8 μ mol/min $\cdot$ mg) であった。

細菌ラミナリデキストリンホスホリラーゼの機能解析とラミナリオリゴ/メガロ糖合成
 森晴彦, 伊藤僚哉, 十万真奈, 磯野直人(三重大院生物資源)

【目的】

ラミナリデキストリンホスホリラーゼ[LDP; β -1,3-(Glc)_n + α -G1P $\rightleftharpoons$ β -1,3-(Glc)_{n+1} + Pi] (EC 2.4.1.30) はラミナリオリゴ糖の加リン酸分解とその逆反応(合成反応)を触媒する酵素であり、 β -1,3-グルカンホスホリラーゼ(BGP, EC 2.4.1.97)やラミナリビオースホスホリラーゼ(EC 2.4.1.31)とは基質特異性(鎖長特異性)が異なる。LDP はミドリムシから発見された酵素であるが、ミドリムシ LDP の構造は報告されていない。本研究では細菌由来の LDP を見出し、組換え酵素の特性を調べることを目的とした。また、本酵素を利用してラミナリオリゴ糖やラミナリメガロ糖の合成を行った。

【方法・結果】

細菌 *Psychromonas ingrahamii* や *Melioribacter roseus* をはじめとする 5 種類の細菌のゲノム DNA に LDP がコードされていることを見出した。細菌 LDP は *Ochromonas danica* 由来 BGP と約 30% のアミノ酸配列類似性を示した。細菌 LDP の配列中には既知の保存領域は認められなかったが、二次構造や触媒残基の周辺配列が GH94 ファミリーのホスホリラーゼと類似していた。細菌 LDP の基質特異性は互いに類似していた。至適温度は由来によって異なり 25–55°C であった。 α -G1P とグルコースを基質として LDP の反応を行ったところ、ラミナリオリゴ糖やラミナリメガロ糖(重合度 10 以上)が合成された。 α -G1P/グルコース比の値が大きくなるにつれて、反応産物の平均鎖長が増加した。また、グルコースとスクロースを基質とした LDP とスクロースホスホリラーゼの同時反応によっても、ラミナリオリゴ/メガロ糖が得られた。

分岐型 β -1,3-グルカンの酵素合成
 ○伊藤僚哉, 磯野直人(三重大院生物資源)

【目的】

β -1,3-グルカンには直鎖型と β -1,6-グルコシド結合を有する分岐型の二種類が存在する。後者は主に菌類が生産する水溶性の β -1,3-グルカンであり、スエヒロタケやシイタケから高度に精製された分岐型 β -1,3-グルカンは抗腫瘍剤としても利用されているが高価である。分岐型 β -1,3-グルカンでは分岐鎖の存在が機能性や水溶性に重要な役割を果たしていると考えられている。

β -1,3-グルカンホスホリラーゼ(BGP)は β -1,3-グルカンの加リン酸分解とその逆反応(合成反応)を触媒する。我々は黄金色藻 *Ochromonas danica* 由来 BGP (OdBGP) を用いた直鎖型 β -1,3-グルカンの合成法の開発を行ってきた。また最近、グラム陰性菌 *Azotobacter vinelandii* から β -glucosyltransferase (AvBGT) が発見された。AvBGT はラミナリオリゴ糖の β -1,3-結合を切断し、生じた糖鎖を別のラミナリオリゴ糖に β -1,6-結合で転移させる反応を触媒する。本研究では、これらの二種類の酵素を用いて分岐型 β -1,3-グルカンを簡便に合成することを目的とした。

【方法・結果】

ヒスチジンタグが付加された OdBGP と AvBGT を大腸菌を用いてそれぞれ生産し、ニッケルカラムで精製した。 α -グルコース 1-リン酸とラミナリビオースを基質として、OdBGP の反応を行うと、水に不溶な直鎖型 β -1,3-グルカンが生成する。この系に AvBGT を加えて反応を行ったところ、AvBGT の添加量が多くなるにつれて、沈殿物の量が減少した。サイズ排除 HPLC で分析したところ、反応産物の上清には水溶性の多糖が存在することが明らかとなった。また、メチル化分析等の結果から、この水溶性多糖は β -1,3-グルコシド結合と β -1,6-グルコシド結合を含む分岐型 β -1,3-グルカンであることが確認された。

P25

シングル B 細胞由来ウサギモノクローナル抗体迅速取得法の開発

○森下しおみ¹, 加藤晃代¹, 児島孝明¹, 中野秀雄¹ (1 名大院生命農・生命技術科学)

【目的】

我々のグループでは、動物の末梢血から B 細胞を単離し、1 細胞逆転写反応と PCR により得られた抗体 L 鎖と H 鎖の DNA フラグメントを無細胞タンパク質合成系にて Fab(fragment of antigen binding)として発現させ評価する迅速なモノクローナル抗体取得法 (SICREX[single-cell RT-PCR linked in vitro expression]法)を開発し、様々な抗体の取得に取り組んでいる。本研究では、抗体の抗原決定部位のバリエーションが豊富であり、かつ免疫化や採血がマウスに比べ容易なウサギを用いた SICREX を実施し Shigatoxin2 に対する抗体取得を目的とした。

【方法・結果】

まずはじめに、Shigatoxin2 の無毒変異体(E167Q)を大腸菌により組換え生産・精製した。これを抗原としてウサギ (New Zealand White rabbit) に免疫後、ウサギ末梢血より血清を得た。免疫経過 1 ~7 日間において抗原結合能を有する末梢血中リンパ球の存在率をフローサイトメーターを用いて継続的に測定したところ、1 日後の割合が最も高く、Shigatoxin2 に対する抗体産生 B 細胞が血中に多く存在していることが示唆された。さらに、抗原特異的な抗体産生細胞を効率良く回収するために、1 細胞に単離する段階で、蛍光標識した抗原と小胞体染色試薬により二重染色し、セルソーターによる単離を試みた。これらの細胞から SICREX を行ったところ、PCR により遺伝子の増幅が見られ、これらの遺伝子を解析すると新規の相補性決定領域を持つことが分かった。これらの遺伝子から無細胞タンパク質合成系にて Fab を発現させ ELISA により評価した結果、Shigatoxin2 に対する高い結合活性を有することが分かった。

P26

セリ科生薬由来 Anomalin の肝細胞への脂肪蓄積抑制作用

○小野 鮎子¹, 川崎 安都紗¹, 古矢 康久¹, 松原 竜之典¹, 高橋 正和¹,
谷口 雅彦², 馬場きみ江², 村上 茂¹ (1 福井県立大生物資源, 2 大阪薬科大薬)

【目的】

近年、肥満者の増加にともない、非アルコール性脂肪性肝疾患 NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease) が急激に増加している。NAFLD は、過剰なエネルギー摂取と運動不足による肝細胞への脂肪蓄積に炎症や酸化ストレスが加わることにより発症・進展し、最終的に肝硬変や肝ガンに至る疾患である。本研究では、ヒト肝ガン由来細胞株 (HepG2) およびマクロファージ様細胞 (RAW264) を用い、セリ科生薬から単離されたクマリン誘導体 Anomalin の肝細胞への脂肪蓄積抑制作用、および作用メカニズムについて検討を行った。

【方法・結果】

肝細胞への脂肪蓄積は、HepG2 細胞を脂肪酸と 24 時間培養することにより誘導し、Anomalin は脂肪酸添加前に 0.1~30 μM の濃度で培地に添加した。細胞への脂肪蓄積は、Oil red O 染色および中性脂肪の定量により評価し、さらに細胞内の活性酸素種 (ROS) 産生を、蛍光試薬 DCFH-DA (2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate) を用いて測定した。また、RAW264 細胞を用いて Griess 法により NO 産生を、MTT 法により細胞毒性を評価した。その結果、Anomalin は 0.1~30 μM で濃度依存的な肝細胞への脂肪蓄積抑制作用を示すと同時に、ROS 産生を抑制した。さらに RAW264 細胞の NO 産生も $\text{IC}_{50}=6.7 \mu\text{M}$ にて濃度依存的に抑制した。これらの結果より、Anomalin は抗酸化および抗炎症作用を有し、これらの作用が NAFLD の in vitro モデルにおける肝細胞への脂肪蓄積抑制と関連している可能性が示唆された。

P27

清酒酵母と花から分離した天然酵母による清酒の醸造特性およびメタボローム解析

○大原礼仁¹、望月麻衣¹、船越吾郎²、三井俊²、伊藤彰敏²、志水元亨¹、加藤雅士¹

(¹名城大農、²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)

【目的】

和食がユネスコの無形文化遺産に登録されたことで、日本酒が国内外でさらに注目されている。しかし、日本酒の国内での消費量は減少傾向にあり、多様化したアルコール飲料へのニーズに対応することがこれからの日本酒には求められている。そこで、従来の清酒にない新たな特徴を付与した清酒の醸造が必要である。我々はキャンパス内の花（カーネーション）から酵母を分離し、清酒の醸造に用いることで、これまでの清酒とは異なる香りを持つ極めて甘口の名城大学ブランド日本酒『華名城(はなのしろ)』を開発した。

本研究では、カーネーション酵母（MC9-3）および一般的な清酒製造に用いる酵母（協会酵母 9 号：K901）を用いて製造した清酒の成分を比較することで、花酵母を用いて醸造した清酒に特徴的な成分を見出すこと目指した。

【方法・結果】

愛知県の付属農場のカーネーションから *Saccharomyces cerevisiae* (MC9-3) の単離に成功した。MC9-3 の醸造特性を明らかにするために、MC9-3 を用いて清酒の小仕込み試験を行ない、LC-MS/MS、GC-MS など各分析法を用いて清酒中の成分を解析した。また対照には K901 を用いた。

K901 を用いて醸造した清酒に比べて、MC9-3 を用いて製造した清酒ではアルコール度と日本酒度が低く、酸度が高いことが分かった。有機酸を分析したところ、K901 と比較して、MC9-3 を用いて醸造した清酒では酢酸が 1.9 倍多かったことから、MC9-3 で醸造した清酒の酸度は、酢酸によるものであることが示唆された。さらに、MC9-3 で醸造した清酒には K901 で醸造した清酒の 25 倍のイソマルトースが含まれていた。また、LC-MS の分析の結果 MC9-3 を用いた清酒には K901 を用いた清酒に比べてジペプチドなどのいくつかの物質が多く含まれていることが分かった。

P28

海洋性粘液細菌由来の新規二次代謝産物の構造と生理活性

○樫山大貴¹、孫雨偉¹、山崎達志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))

【目的】

粘液細菌は、原核生物でありながら多細胞性の子実体を形成するなど、複雑な生活環をもつ微生物であり、その多くは難培養性であるためにあまり注目されてこなかった。しかし近年、新種が徐々に分離され、そこから新規な化学構造や多様な生理活性を持つ化合物が発見されていることから、真菌や放線菌に代わる、新たな抗生物質の探索源として注目されている。

我々は、難培養性の海洋性粘液細菌 *Haliangium ochraceum* から抗疫病菌物質 *haliangicin* を発見しているが、ゲノム解析により、*haliangicin* 以外のポリケチド生合成に関与する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、*H. ochraceum* から、ゲノム情報に基づき予想される新規生理活性物質を単離することを目的とした。

【方法・結果】

H. ochraceum を、三角フラスコ中でカジトンの基本成分とし、吸着樹脂を含む液体培地で 2 週間浸透培養した。菌体と吸着樹脂をアセトンで抽出し、酢酸エチルで分配することで抽出物を得た。得られた抽出物をカラムクロマトグラフィーや逆相 HPLC 等を用いて精製した。

HeLa 細胞に対する細胞毒性を指標に分離したところ、既知の *aurafuron* B とともに、化合物 A, B が単離された。NMR 等を用いた構造解析の結果、両者は *H. ochraceum* のポリケチド生合成遺伝子クラスターの 1 つとして予想される *aurafuron* 類の類縁体であることが分かった。化合物 A, B は共に新規化合物であり、HeLa 細胞に対し、 $IC_{50} = 39, 13 \mu M$ の毒性活性が見られた。

植物疫病菌の交配ホルモン感受性の多様性

○山田麻衣子, 戸村友彦, 大西裕貴, 小鹿一 (名大院生命農)

【目的】

疫病菌 (*Phytophthora* 属糸状菌) はジャガイモやトマト等の重要農作物に感染し, 世界中で甚大な被害を及ぼしている. 疫病菌は有性生殖によって遺伝的多様性を獲得することで急速な変異 (過酷な環境への対応や薬剤耐性) に繋がると考えられる. 有性生殖には交配ホルモン (A1 交配型が分泌する $\alpha 1$ と A2 交配型が分泌する $\alpha 2$) が関与していることが当研究室で明らかになったが, 受容体に関する知見は全くない. そこで交配ホルモンに対する感受性が最も高くなる時期を調べることで, 交配ホルモン受容体の発現パターンを探ることを目的とする.

【方法・結果】

異なる交配型を含む 13 の疫病菌株 (*P. capsici* 5 株および *P. nitotianae* 8 株) を 10 %V8 ジュース培地上, 25 °C で培養し, コロニーの中心から 15 mm の位置に交配ホルモン (A1 交配型に対し $\alpha 2$, A2 交配型に対し $\alpha 1$) をそれぞれ 10, 30 ng/disk 投与した. 3~4 日間インキュベートした後, 形成した有性胞子 (卵胞子) の数を調べた. その結果, 卵胞子を形成しない株が 5 株見られた. 卵胞子を形成する 8 株については, 交配型の間に大きな違いはなかった. *P. nicotianae* 38606 および 33193 について, 接種した点 (シャーレ中央) からの距離の違いで, 菌糸のホルモン応答がどう変化するか調べたところ, 中心に近いより古い菌糸ほど高い応答を示した. そこでより詳しく応答性の経時変化を調べたところ, ホルモン応答の時期が菌株ごとに大きく異なった. 例えば *P. nicotianae* 33193 および 38607 は培養日数が長いほど卵胞子数は上昇し, それぞれ 10 日で 2,739 個および 9 日で 1,430 個に達した. 一方, *P. nicotianae* 31425 は 4 日で最大値 (612 個) になりその後, 減少した. また, *P. capsici* 30697 は 3 日で最大値 (1,571 個) になりその後, 一定になった. 以上のように, 疫病菌は菌株ごとに交配ホルモンに対する感受性に多様性が見られ, この結果は今後, 交配ホルモン受容体の探索において重要な知見となるであろう.

セミノール果皮抽出物の生理機能性の研究

○齋藤愛^{1,2}, 伊藤克¹, 矢野竹男², 奥村克純³, 西村訓弘², 籠谷和弘¹ (¹辻製油 (株), ²三重大院地域イノベーション, ³三重大院生物資源)

【目的】

セミノールは三重県で栽培が盛んな柑橘類で, 生鮮のほかに種々の加工品が流通している. その中でも流通量の多い果汁は, 搾汁時に果皮部を中心とする加工副産物が生じるが, その有効な利用価値は見出されていない. そこで我々は, 当該未利用資源の有効活用を目的として, 果皮部に精油成分を含む油胞が存在することに着目し, 有機溶媒による抽出物の調製検討を行った. 得られたセミノール果皮抽出物 (SPE) は, 柑橘類特有の機能性成分であるポリメトキシフラボン (PMF) 類を含有していることが, HPLC 分析により明らかとなった. そこで, PMF 類が有する機能性を, SPE が保持しているか否かを確認するために, 破骨細胞の分化成熟抑制効果の検証を行った.

【方法・結果】

機能性の評価は, マウスマクロファージ由来細胞 RAW264.7 を用いて実施した. 試験実施に先立ち, 細胞増殖に影響を与えない処理濃度の範囲を MTT 試験により確認し, 本試験での SPE の処理濃度は 1, 10, 50 $\mu\text{g/mL}$ とした. 細胞播種 24 時間後より SPE 処理を開始し, さらにその 24 時間後より, 分化誘導剤である RANKL 処理を開始した. 両存在下で 6 日間培養後, 破骨細胞を特異的に染色する TRAP 染色を行い, 高度に成熟した破骨細胞 (本試験では有核数 21 個以上とした) の数を計測した. 試験の結果, SPE で処理した細胞群で対照群と比較して, 高度に成熟した破骨細胞数が減少しており, その活性は処理濃度依存的であった. このことから, SPE は PMF 類由来の機能性を保持している事が確認された. 本研究結果は, 加工副産物を原料とする SPE が機能性食品素材として有効活用できることを示唆している.

Clostridium perfringens T7 発現系の改良と誘導条件の検討

○澤入 駿哉, 鳥谷 采加, 野寺 菜美子, 中根 一恵, 森山 龍一, 宮田 茂 (中部大・応用生物)

【目的】*Clostridium* 属細菌は多種の有用なタンパク質を生産するが、遺伝子が極端な AT-rich であるため、大腸菌などの発現系では特に高分子量タンパク質の発現が困難である。我々は今までに、致死毒素である α 毒素と θ 毒素の遺伝子を欠失させ、キシロース添加により T7 RNA polymerase を発現する *C. perfringens* T7II 株を作製し、各種 Clostridial protein の発現に成功してきた。今回、AT-rich コドンに改変した T7 RNA polymerase 遺伝子(mT7 *rpo*)を染色体上の α 毒素遺伝子座と置換し、誘導条件を検討することによりさらなる発現量の向上を目指した。

【方法・結果】*yplC* 遺伝子の上流域及び α 毒素遺伝子 (*plc*) 下流域のそれぞれ約 1 kb を pCM-GALK2 にクローニングし、染色体上の *yplC-plc* 領域の欠失・置換用ベクター pAE-YP を構築した。更に、mT7 *rpo* を *C. difficile* のキシロース誘導プロモーター (P_{xyIB})、キシロース利用オペロンのレプレッサー遺伝子(*xylR*)とともに pAE-YP にクローニングし、pAE-YP-mT7 を構築した。同様に θ 毒素欠失用に pAE-pfoA を構築した。これらのプラスミドで *C. perfringens* P13 株を形質転換し、染色体上の *pfoA* が欠失し、*yplC-plc* 領域が *xylR-P_{xyIB}-mT7 rpo* に置換した *C. perfringens* mT7II 株を得た。なお、各毒素遺伝子の欠失や置換は PCR により、各毒素の発現は SDS-PAGE により調べた。

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、その下流に各種組換えタンパク質遺伝子をクローニングした発現プラスミドを構築した。これらのプラスミドで、T7II 株及び mT7II 株を形質転換し、各種誘導条件下での発現量を SDS-PAGE や酵素活性で調べた結果、mT7II 株では発現量が大幅に増加していた。これらの結果から、本研究で開発した新規発現系が *Clostridium* 属細菌の AT-rich 遺伝子の誘導発現に適していることが示唆された。

現在、mT7II 株から更に、培養上清中の主要なタンパク質を含む 4 種類の遺伝子を欠失させた新規発現宿主 mT7VI 株を作成中である。

ウェルシュ菌の新規ゲノム編集法の開発

○藤田 雄也¹, 成谷 宏文², 澤入 駿哉¹, 中村 圭那¹, 中根 一恵¹, 森山 龍一¹, 宮田 茂¹
(¹中部大・応用生物, ²香川大・医)

【目的】我々のグループは以前、galactokinase 遺伝子 (*galK*) をカウンターセレクション・マーカーとして利用したウェルシュ菌のゲノム編集方法を報告した。この方法を用いれば、ゲノム上の任意の領域の特異的欠失や外来遺伝子との置換が可能だが、予め染色体上の *galKT* オペロンをノックアウトした株を用いなければならなかった。そのため、ガラクトース利用能が消失し、各種欠失・置換株の表現型解析や利用の際に問題となることがあった。この問題を克服するために、大腸菌の RNA interferase 遺伝子 (*mazF*) をカウンターセレクション・マーカーとして利用した新規ゲノム編集法の開発を試みた。【方法・結果】キシロース誘導可能な発現ベクターである pXCH の *xylR-xylO-P_{xyIB}* 領域を PCR で増幅し、その P_{xyIB} 下流に大腸菌染色体から増幅した *mazF* をオーバーラップ PCR により連結した。この DNA 断片を pCM-GALK2 の *galK* と置換することにより、新規ゲノム編集プラスミド pXM を構築した。pXM によるゲノム編集が可能かどうか調べるために、 θ 毒素遺伝子 (*pfoA*) の欠失・置換ベクターの構築を行った。*pfoA* 構造遺伝子の 5'-上流領域及び 3'-下流領域のそれぞれ約 1 kb を PCR で増幅し、pXM のマルチプル・クローニング・サイトに挿入して pXM-pfoA を構築した。このプラスミドで *C. perfringens* 13 株を形質転換し、クロラムフェニコール耐性株を分離した後、さらにキシロース含有 GAM 培地でカウンターセレクションした。得られたクローンの染色体及び表現型を調べた結果、*pfoA* の欠失に成功したことが明らかとなった。次に、pXM-pfoA の P_{pfoA} 下流に *C. acetobutylicum* の endoglucanase 遺伝子 (*eglA*) を挿入して pXM-pfoA-eglA を構築した。同様に、*C. perfringens* 13 株を形質転換し、*pfoA* 遺伝子座の *eglA* への置換を試みた。その結果、 θ 毒素の欠失とともに endoglucanase の発現が観察された。さらに α 毒素遺伝子の欠失でも同様な結果が得られた。以上のことから、今回開発した方法により自由にゲノム編集が可能であることが示唆された。

P33

Agaro-oligosaccharide enhances tight junction of Caco-2 intestine epithelial cells
○Bai Jun¹, 市川七海², 唐澤幸司³, 白井郁也³, 酒井武彦³, 三谷壘一^{1,4}, 片山茂^{1,4}, 中村宗一郎¹
(¹信州大院農, ²信州大農, ³(株)伊那食品工業, ⁴信州大バイオメディカル研究所)

【Objective】

The human intestinal epithelium is formed by a single layer of epithelial cells that separates the intestinal lumen from the underlying lamina propriety. The space between these cells is sealed by tight junctions (TJ) which regulate the permeability of the intestinal barrier. In this study, we investigated the effect of agaro-oligosaccharide (AG) on the tight junction in small intestine using Caco-2 cell monolayers.

【Methods & Results】

To develop a tight cell monolayers, Caco-2 cells were cultured in Transwell for 21 days to achieve a trans-epithelial electrol resistance (TEER) value of $800\Omega \cdot \text{cm}^2$, which is desirable for small intestinal tight junction model. TEER value was measured in AG-treated Caco-2 cells every 30 min for a period of 2 h. TEER value rapidly was increased after the addition of AG samples in Caco-2 cells monolayers. Moreover, tight junction-related genes such as Claudin-4, Claudin-7, and ZO-1 were upregulated by AG treatment as well as the protein expression for Claudin-4. Immunofluorescence microscopy showed that Claudin-4 was interspersed in the cytoplasm in the absence of AG, whereas Claudin-4 was localized in cytomembrane in the presence of AG in Caco-2 cells. Our results indicated that AG enhances the tight junction of Caco-2 cell monolayers. AG might be used as a therapeutic agent for intestinal inflammation and diseases.

P34

多様なアミロイド形成のモニターを可能にする新規量子ドットプローブの創製
○中林昌基¹, 片山茂¹, 三谷壘一¹, 徳楽清孝², 橋友理香¹, 中村宗一郎¹
(¹信州大院農, ²室蘭工大院工)

【目的】

アミロイドーシスは、タンパク質が線維化し沈着することにより生じる重篤な疾患群の総称である。アミロイド線維量の評価には、蛍光物質であるチオフラビン T を用いた方法や透過型電子顕微鏡で観察する方法などが用いられているが、これらの方法では長期的な生体内動態の観察が難しいことから、新規評価法の開発が求められている。そのような中で近年、従来の有機色素よりも優れた特徴を持つ蛍光物質である量子ドット (Qdot) を用いた生体内イメージング法が数多く開発されており、アミロイドタンパク質の動態観察への応用が期待されている。そこで本研究では、生体内におけるあらゆる種のアミロイドタンパク質の観察に応用可能な新規量子ドットプローブ (QDP) の創製を試みたので報告する。

【方法・結果】

プローブ候補ペプチドには、アミロイド凝集性を示すことが知られている 6 種のペプチド (KLFFFAE, LVFFA, GNNQQNY, STVIE, VTVTVT, LIVAGD) を用いた。これらのペプチドと Qdot とを結合させ、6 種類の QDP を作製した。QDP と A β とを 1536 well プレート内で 24 時間、37°C でインキュベーションし共凝集させた。その後、蛍光顕微鏡にて観察画像を撮影し、ImageJ を用いて画像解析を行った。一方、アミロイド凝集性を示すことで知られるインスリン、リゾチームのアミロイド線維体観察への応用の可能性についても検討した。その結果、LIVAGD (LD6) を結合させた QDP は、A β のみならずインスリン及びリゾチームのアミロイド凝集についても効果的に観察できることが明らかにされた。次に LD6 と A β との結合領域について検討した。その結果、[LIV] の 3 残基が重要な役割を有していることが示された。

P35

ヒトモノクローナル抗体の新規取得法に関する研究
○内田由乃, 加藤晃代, 中野秀雄 (名大院生命農)

【目的】

モノクローナル抗体 (mAbs) は病気の治療や診断に必須であり、近年その用途はますます拡大している。しかしハイブリドーマ法やファージディスプレイ法等の従来法では新規 mAbs の取得に長い時間を要する。一方、我々の研究グループは、動物の末梢血から得られる B 細胞から、一細胞逆転写反応と PCR により抗体遺伝子を増幅し連続的に大腸菌無細胞タンパク質合成系で抗体合成・評価することが可能な高速 mAbs スクリーニング法 SICREX (single cell RT-PCR-linked *in vitro* expression) 法を開発してきた。そこで本研究では抗体医薬のスクリーニング源として有望なヒト B 細胞からの SICREX 法確立を目的とし、市販の不死化ヒト B 細胞からのヒト抗体取得条件を検討した。

【方法・結果】

まず、理研細胞バンクより入手した不死化ヒト B 細胞群から、乳酸菌 *Lactobacillus bulgaricus* に対し、結合能を有する細胞を選択した。まず *L. bulgaricus* 死菌体をコートした磁気ビーズにより細胞を濃縮後、小胞体染色試薬 ER トラッカーにより染色し、セルソーターを用いて、約 1% の細胞を 96well プレートに 1cell/well になるように分注した。その後抗体遺伝子特異的プライマーによる逆転写反応および 2 段階の PCR を行ったところ、いくつかの遺伝子の増幅がみられ、いずれも新規 CDR を含む遺伝子であることがわかった。また、再構成系無細胞タンパク質合成系 (PUREsystem) において抗体を合成し SDS-PAGE 解析したところ目的サイズのタンパク質発現を確認した。今後は ELISA により得られた抗体遺伝子の性能を評価する。

P36

高血圧自然発症ラットへのアセチルコリン反復経口投与による血圧上昇抑制作用

○渡辺旭¹, 高橋佑介², 小山正浩², 中村蔵浩^{1, 2}
(¹信州大院農, ²信州大農)

【目的】

近年、我々は、ソバスプラウト乳酸発酵物の抗高血圧成分としてコリンエステル類を同定した。本研究では、代表的なコリンエステルであるアセチルコリン (AcCh) を高血圧自然発症ラット (SHR) へ反復経口投与し、テレメトリー法を用いて動脈圧および腎交感神経電位を同時に無拘束・無麻酔下で連続記録することにより、血圧上昇抑制作用を評価した。

【方法・結果】

血圧、腎交感神経活動測定には、Millar 社製のテレメトリーセンサを用いた。まず、麻酔下で SHR (雄性 10 週齢) の腹部を切開し、血圧センサを腹部大動脈に挿入、生体用接着剤で固定・止血後、腎交感神経を剥離し、神経電位センサを取り付け、シリコン接着剤で固定し SHR へのテレメトリーセンサの埋め込み手術を行った。術後 1 週間を回復期間とした後、AcCh 投与群に AcCh 10^{-8} mol/kg を、コントロール群に純水を毎日経口投与し、動脈圧および腎交感神経電位を連続記録した。そして、動脈圧波形から収縮期血圧、拡張期血圧を求め、AcCh 経口投与による血圧上昇抑制作用を評価した。また、一定の閾値を超えた腎交感神経電位をカウントすることによって、AcCh 経口投与による血圧上昇抑制作用と腎交感神経活動の関連性を評価した。その結果、AcCh 投与群では、収縮期血圧値および拡張期血圧値において、コントロール群と比較して有意な血圧上昇抑制作用が確認され、AcCh 投与群の腎交感神経活動低下が確認された。本研究の結果から、AcCh 経口投与が腎交感神経活動を抑制し血圧上昇抑制を抑制することが明らかとなった。

P37

標準添加法による新規食品機能性成分コリンエステル類同時定量法の開発

○山口翔平¹, 森田恵梨², 三輪優莉絵¹, 野尻恵資², 小山正浩¹, 猪狩直樹³, 中村浩蔵^{1, 2}

(¹信州大農, ²信州大院農, ³大和薬品(株))

【目的】当研究室では、優れた降圧作用を有するソバスプラウト乳酸発酵食品（FBS）から、新規な食品機能性成分として期待されるコリンエステル類（アセチルコリン：AcCh, ブチリルコリン：BuCh, ラクトイルコリン：LaCh, プロピオニルコリン：PrCh）を発見した。そこでこれらのコリンエステル類およびコリン（Ch）を同時定量する方法を開発し、発酵食品（FBS, 食酢, 酒類, 味噌）および生鮮食品（野菜類）中のこれらのコリン化合物含量を定量した。

【方法】コリン化合物の定量は、凍結乾燥物の振とう抽出液を陽イオン交換カートリッジで固相抽出した後、LC/MS/MS 多重反応モニタリング（MRM）モードで分析し標準添加法を用いて行った。分析条件を以下に示す。LC/MS/MS システム：ACQUITY UPLC, Waters Quattro micro API, カラム：疎水性カラム（4.6×250 mm）、カラム温度：40℃、移動相：0.010%ギ酸-33%メタノール含有水、流速：0.50 mL/min、イオン化方法：ESI（+）、Cone：AcCh, BuCh, LaCh, PrCh 20 V, Ch 30 V, Collision：AcCh, PrCh 10 eV, BuCh, Ch, LaCh 15 eV。

【結果】標準添加法と MRM モードの使用により、定量対象以外の夾雑物質およびその影響を効果的に除去でき、検出限界が 2 pmol の高感度な定量法となった。FBS 100 g 新鮮重量（FW）中に含まれる AcCh, BuCh, Ch, LaCh, PrCh の量は、それぞれ 1.19 mg, 2.24×10^{-4} mg, 13.6 mg, 2.79 mg, 0.128 mg であった。その他の発酵食品中には、AcCh と Ch がそれぞれ 10~50 μ g/100 gFW, 10 μ g~100 mg/100 gFW 含まれていたが、一部のものにしか AcCh 以外のコリンエステル類は含まれていなかった。一方で野菜には全て複数のコリンエステル類が含まれており、種によって含量が大きく変動した。特に含量が高かった野菜については、品種によるコリンエステル類含量の違いを検討した。

P38

Refolding of antigen-binding fragments with the leucine zipper domain
from *Escherichia coli* inclusion bodies

ORitthisan Panwad, Teruyo Ojima-Kato, Satomi Nagai, Takaaki Kojima, and Hideo Nakano
(Dept. Bioeng., Grad. Sch. Agric., Nagoya Univ.)

Fragment antigen-binding (Fab) are the most widely used in several applications and produced by recombinant processes. However, overexpression of recombinant proteins in *E. coli* often resulted in the accumulation of protein aggregation as inclusion bodies, which limits the application for Fab production using *E. coli* expression system.

Leucine zipper (LZ) is a protein-protein interaction domain consisting of heptad repeat of leucine residues at every seven position and forming alpha-helical conformation. The fusion of which peptides to Fab enhanced correct pairing of heavy chain (Hc) and light chain (Lc), leading to more efficient formation of active Fab in *E. coli* expression systems. The new Fab format is named as 'Zipbody' (1).

In this study, we examined various conditions of the protein refolding for Zipbody to obtain highly efficient refolding procedures from inclusion bodies. Leucine zipper, ACID-p1 (LZA) and BASE-p1 (LZB) were fused into mouse Fab which binds to *E. coli* O157, from the inclusion bodies expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and we could isolate highly purified inclusion bodies of m6FabLZ. Next, we compared 5 protocols for solubilization, and the m6FabLZ protein was most efficiently solubilized in 3 M Urea using freeze-thawing method. The solubilized proteins were refolded by three different protocols using step-wise dialysis. The estimated yield of purified m6FabLZ was 0.25 g —from 1 L culture. The refolded showed a high affinity and specificity toward *E. coli* O157 in ELISA. These results demonstrate that the refolding method can be utilized for high-yield production of Fab from *E. coli* inclusion bodies.

(1) Ojima-Kato, T. et al., Protein Eng. Des. Sel., 2016

X=H : Cholesterol

Desmosterol

Lathosterol

X=RCO : Acyl cholesterol

酵母発現系を用いたソバ主要アレルゲンの調製とリン酸化によるアレルギー改善

○山口大樹¹, 片山茂^{1,2}, 三谷壘一^{1,2}, 中村宗一郎¹ (¹信州大院農, ²信州大バイオメディカル研究所)

【目的】

ソバは健康食品として注目を集めているが、重篤なアレルギー症状を惹起しやすいことが問題となっている。ソバ主要アレルゲンとしてグロブリン系である **Fag e 1 (Fe1)** とアルブミン系である **Fag e 2 (Fe2)** が既に報告されている。Fe1 はソバタンパク質中の含有量が非常に高く、Fe2 は消化抵抗性を有し、強いアレルゲン性を示すことが知られている。そこで本研究では、酵母発現系による Fe1, Fe2 の分泌生産を確立するとともに、リン酸化によるアレルギー改善効果について検討した。

【方法・結果】

酵母発現用ベクター (pGAPZ α A, pPICZ α C) のマルチクローニングサイトにそれぞれ Fe1, Fe2 の cDNA 配列を挿入し、得られたベクターを用いて *Pichia Pastoris* X-33 を形質転換した。形質転換体は、YNB 培地で培養後、得られた上清をサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。精製した Fe1, Fe2 は、ピロリン酸塩存在下で 85°C, 5 日間乾燥加熱することで、リン酸化 Fe1, Fe2 (pFe1, pFe2) とした。In vivo におけるアレルギー改善効果の評価は、Fe1, Fe2 感作 BALB/c マウスに対し、pFe1 または pFe2 を 0.05% 含有している飼料を 6 週間自由摂取させることによって行った。その結果、pFe1, pFe2 摂取群では、血清中 total IgE 価の減少と total IgA 価の増加が確認された。次に、脾臓及びパイエル板細胞を Fe1, Fe2 存在下で培養し、培養上清中 IL-4, IFN- γ 量を測定したところ、IL-4 産生量の減少が確認された。またフローサイトメトリーにより細胞表面マーカーの解析の結果、pFe1, pFe2 摂取により、濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞の集団割合の増加が確認された。Tfh 細胞は、B 細胞の腸管 IgA 抗体産生に関与することから、リン酸化アレルゲン摂取によるアレルギー改善効果には、Tfh 細胞が関与していることが示唆された。

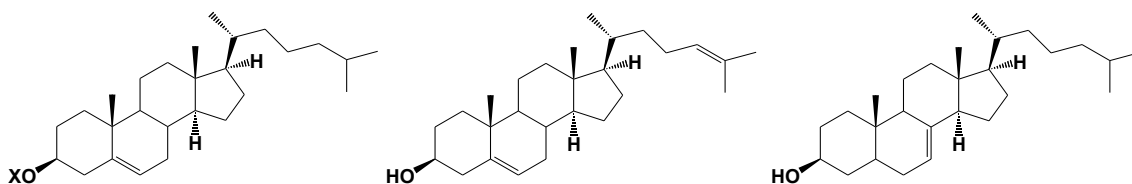
P40

コレステロールとそのアシル体及び関連ステロイド類の高純度化

石野暢好, 中塚宏志, ○中塚進一 (長良サイエンス株式会社)

【目的】コレステロールとそのアシル体は生体の生命現象において重要な役割を担う分子であるとともに、その物性を利用して液晶材料としても利用されるなど広い分野で注目されている。また、類似物質であるデスモステロールやラトステロールも同様の薬理活性などを持つことが期待されている。しかし、これらの化合物は構造が近いこと分離精製が困難である。現在販売されている標準品は 90% 程度の純度であり正確にその薬理活性を解明するためにはより高純度の試薬が求められている。そこで本研究ではコレステロール及び関連ステロイド類の高純度化を検討した。

【方法・結果】オープンカラム、HPLC 等のクロマト分離と溶媒抽出、結晶化法などの組み合わせにより、ラノリン(羊脂)からコレステロール、デスモステロール、ラトステロールを単離した。精製した化合物の純度は HPLC 及び¹H-NMR により 99.5%以上であることを確認し、これらステロイド類 3 種の高純度化に成功した。また、この高純度コレステロールをアシル化することにより、アセチル体(C2)、ブチリル体(C4)、ノナニル体(C9)、ステアリル体(C18)の 4 種類を純度 99.5%以上、数百グラム単位で生産できた。本研究の成果はコレステロールとそのアシル体及び関連ステロイド類の薬理活性の解明に貢献できると考えている。



P41

Lanosterol

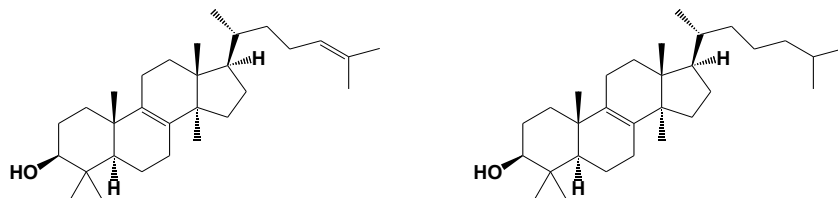
Dihydrolanosterol

ラノステロール及びジヒドロラノステロールの高純度試薬の開発

○田村敦裕, 石野暢好, 牧岡富広, 中塚宏志, 中塚進一 (長良サイエンス株式会社)

【目的】 ラノステロールは生体に含まれるステロイドで、コレステロールなどの前駆体として重要な化合物で、2015 年にラノステロールを含む点眼薬が白内障に有効である可能性が示された*。しかしながら、ラノステロールの市販品は純度が低く、正確な薬理活性を解明するには十分ではない。そこで、本研究ではラノステロールの高純度試薬の製法を検討した。

【方法・結果】 ラノリン(羊脂)からラノステロールを分離精製する場合、構造の近いジヒドロラノステロールの分離が困難であり、市販試薬の純度が悪い一因となっている。そこで我々は分離精製に用いる順相、逆相の各種シリカゲル系担体を独自の方法で精密に分級(粒ぞろえ)し、分離性能を上げることにより、精密な分離精製を可能にした。分級した各種シリカゲル系担体を用いたオープンカラム、HPLC、誘導化法、結晶化法などを組み合わせてラノリンを分離精製した結果、ラノステロール及びジヒドロラノステロールを 99.5%以上の高純度にでき、高純度試薬を世界で初めて 10g 単位で量産できるようになった。本研究の成果はラノステロール及びジヒドロラノステロールの薬理活性の解明並びに白内障の新たな治療法の開発に貢献できると考えている。 *Zhang, K. *et al.*, *Nature* **2015**, *523*, 607-611.



P42

Geobacillus sp. NTS46 株由来ペーパースラッジ糖化酵素の精製とその性質○鈴木裕貴¹, 見原翔子¹, 栗原健人¹, 小笠原渉², 志田洋介², 竹口昌之¹, (¹沼津高専, ²長岡技科大)

【目的】 静岡県富士市の製紙工場では、再生紙の製造工程で年間 100 万トンのペーパースラッジ(以下 PS)が排出されており、その処理方法が問題となっている。本研究では、PS 中のセルロースおよびヘミセルロースを中性、高温条件で酵素糖化により単糖を生産することを目的に、高温、中性 pH の条件で PS の糖化反応を触媒する微生物の探索を行なった。また、得られた微生物より PS 糖化酵素を単離し、その性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 炭素源としてカルボキシメチルセルロース(以下 CMC)および PS を含む平板寒天培地を用いて土壌サンプルより PS の糖化反応を触媒する微生物のスクリーニングを行なった。培養は温度 60°C, pH 8.0 の条件で行なった。その結果、PS 糖化活性を有するグラム陽性桿菌の *Geobacillus* sp. NTS46 を分離した。各種炭素源にて *Geobacillus* sp. NTS46 の培養を行ない、得られた上清の CMCase 活性およびキシラナーゼ活性を測定した。その結果、検討したすべての炭素源で CMCase 活性が観測され、特に炭素源としてキシランを用いた場合において最も高いキシラナーゼ活性が観測された。また、二次元電気泳動を用いた活性染色の結果から、CMC とキシランは同じ酵素によって糖化される可能性が示唆された。*Geobacillus* sp. NTS46 の全ゲノム解析を行なったところ、3 種類のキシラナーゼ遺伝子を有しており、そのうち 1 つが細胞外分泌型のキシラナーゼであることがわかった。固相抽出と陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて *Geobacillus* sp. NTS46 の培養上清からキシラナーゼの精製を行ない、Endo-1,4-β-D-xylan-xylanohydrolase (E.C. 3.2.1.8)を単離した。本酵素は pH 6 において至適温度 70°C, 反応温度 80°C において pH5.5 から 8.5 に 80%以上のキシラナーゼ活性を有することがわかった。

信州大学繊維学部農場から単離・培養した超微小細菌に関する研究

○堀内希恵¹, 山中茂², 志田敏夫¹ (¹信大大学院 応生, ²信大)

【目的】

さまざまな研究から、微生物の種類はおよそ 10^9 種以上ではないかと言われている。現在、分離培養されて、さらに形態や諸性質が調べられている細菌は 1%にも満たない。今までに単離や培養ができていない細菌は、必ずしも培養が不可能というわけではなく、何らかの方法を工夫することで単離や培養が可能になるものも存在すると考えられている。このような細菌を培養できるようになれば、新たな遺伝子資源を得られるだけでなく、新規抗生物質などの有用な物質が得られる可能性がある。本研究では細胞サイズの小さい超微小細菌を得るために、土壌懸濁液を滅菌用フィルターに通し、ろ液を液体培地で培養した。単離された 2 菌体について形態を観察し、生理・生化学的性状を調べた。

【方法・結果】

信州大学繊維学部農場の土壌を採取し、生理食塩水に懸濁させ、土壌懸濁液を作製した。上清を $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターでろ過した。ろ液を液体培地に植菌し、150 rpm, 30°C で約 1 か月間、連続集積培養した。得られた培養液を寒天培地に塗布した。出現したコロニーを再度フィルターでろ過し、培養した。確実にフィルターを 5 回通過したものを目的の微生物サンプルとした。その結果、2 菌体 (D 株、R 株) の微生物を取得した。この 2 菌体について、微生物同定のための 16S rRNA シーケンズを行い、得られた DNA 配列をもとに系統樹を作製した。得られた超微小細菌の特徴 (SEM による形態観察、生育条件、グラム染色性、遊走性、分泌酵素、含有キノン・脂肪酸など) を調べた。大きさは D 株が $0.38 \pm 0.05 \times 1.27 \pm 0.26 \mu\text{m}$ 、R 株が $0.40 \pm 0.05 \times 1.03 \pm 0.15 \mu\text{m}$ である。菌体の体積を大腸菌と比較すると、ともに約 5 分の 1 であることが分かった。

トロパンアルカロイドの骨格形成酵素の探索

○長谷部文人, 谷美生夏, 大石和敬, 川嶋智佳, 相沢光輝, 金 承榮, 鮎 信学 (静岡県大院・食栄)

【目的】

トロパンアルカロイドはナス科やコカノキ科の植物が生産するアルカロイドの一種であり、コカインなど複雑な生理活性を有するものが多い。トロパンアルカロイドは、点眼剤などの局所麻酔薬や、ハーブティーなどの伝統的嗜好品として利用されてきた。トロパンアルカロイドの構造上の最大の特徴は、オルニチン由来の含窒素 5 員環と 3 つの炭素からなる架橋構造であり、この骨格はトロピノン骨格と呼ばれている。トロピノンの全合成は、Sir Robert Robinson によって 1917 年に達成されたが、その生合成酵素は不明である。

【方法・結果】

Erythroxylum coca における取り込み実験の結果、含窒素 5 員環の前駆体は *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium であると予想されている¹。架橋構造の前駆体には複数の可能性があるが、*N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium に対して、malonyl-CoA が二回に分けて縮合する可能性¹と acetone dicarboxylic acid が反応する可能性²が提唱されている。我々は、malonyl-CoA が 2 分子縮合した diketidyl-CoA または acetone dicarboxylic acid と *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium が反応する可能性を試験した。基質とヒヨス *Hyoscyamus niger* L. の根の粗酵素抽出液を混合し、反応液を HPLC に供した。その結果、基質の減少または新たな化合物の出現は観察されなかった。以上より、diketidyl-CoA と *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium、acetone dicarboxylic acid と *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium を基質とする Mannich 反応が、トロピノン骨格形成に関与しない可能性が高まった。

¹Leete, E. and Kim, S.-H. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2976-2978 (1988)²Humphrey, A.J. and O'Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 494-502 (2001)

細胞のアミノ酸感知メカニズムにおけるカルシウムの役割
○中村奈央¹, 高原照直¹, 柴田秀樹¹, 牧正敏¹ (¹名大院生命農)

【目的】アミノ酸は細胞内において必須の栄養素であり、シグナル因子としても重要である。アミノ酸応答の主要なシグナル伝達経路として mTORC1 経路がある。mTORC1 はアミノ酸をシグナルとして下流の p70 S6 kinase (S6K) などリン酸化する。これまでの研究で、アミノ酸枯渇した細胞にアミノ酸溶液を与えると、細胞内カルシウム濃度が上昇することがわかっている。しかしながら、その具体的な分子機構や mTORC1 経路への意義はよく分かっていない。そこで本研究では、mTORC1 経路に対するカルシウムの寄与について検討した。

【方法・結果】mTORC1 経路へのカルシウム上昇の影響を調べた結果、カルシウムキレート剤 EGTA の培地中への添加や、カルシウムチャネル阻害剤 Amiloride の存在下で、アミノ酸依存的な S6K のリン酸化が低下した。よって、カルシウムチャネルを介した細胞外からのカルシウム流入が mTORC1 活性化に必要であると示唆された。次に、mTORC1 経路におけるカルシウムの作用機構を解析した。アミノ酸による mTORC1 活性化機構として、低分子量 GTPase である Rag により mTOR がリソソームへ移動した後、別の低分子量 GTPase である Rheb との結合により活性化されると考えられている。また、Rag や Rheb の過剰発現により、アミノ酸飢餓条件でも mTORC1 の活性が維持されることが報告されている。そこで、Rag と Rheb の恒常的活性化型を過剰発現させた条件下で、細胞内カルシウムキレート剤 BAPTA-AM の影響を調べたところ、BAPTA-AM 処理によって Rag 過剰発現による mTORC1 活性は低下したが、Rheb 過剰発現では維持された。よって、Rheb による制御の上流でカルシウムが作用すると考えられる。さらに、mTOR の局在変化を調べた結果からも、EGTA 前処理によるアミノ酸依存的な mTOR のリソソーム局在化の阻害はみられなかった。これらのことから、カルシウムは mTORC1 のリソソーム局在後から Rheb による活性化に至るいずれかのステップに関与すると考えられる。mTOR と Rheb は直接結合すると報告されていることから、現在 mTOR と Rheb との結合へのカルシウムの意義を検討中である。

プラディミシンと真菌マンナンオリゴ糖モチーフとの結合解析
○山地史哉¹, 中川 優^{1, 2}, 渡邊泰典¹, 五十嵐康弘³, 伊藤幸成², 小鹿 一¹
¹名大院・生命農、²理研、³富山県大・生工

【目的】

プラディミシン類 (PRM) は、真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示す類稀な抗生物質群である。PRM のマンナンに対する結合活性は D-マンノースと比べて数百倍高いことから、PRM はマンナン中のオリゴ糖モチーフを強く認識していると考えられるが、その標的モチーフは明らかになっていない。そこで本研究では、*Candida albicans* の細胞壁マンナンの部分構造に対応するマンノオリゴ糖を化学合成し、PRM が最も高い結合親和性を示すモチーフを同定することを目的とした。

【方法・結果】

Candida albicans の細胞壁マンナンは、D-マンノースが α -1,6 結合で連結した主鎖に、 α -1,2, α -1,3, α -1,6, および β -1,2 結合を有するマンノオリゴ糖が側鎖として付加した櫛形構造を基本骨格としている。そこで、マンナンの主鎖および側鎖構造に対応するマンノピオース 3 種、マンノトリオース 4 種およびリン酸含有マンノピオースをそれぞれ合成し、抗真菌試験、共沈殿試験、および等温滴定カロリメトリー (ITC) 試験により、PRM に対する結合親和性を評価した。その結果、いずれの試験においても、methyl 6-O- α -D-mannopyranosyl-3-O- α -D-mannopyranosyl- α -D-mannopyranoside が最も高い結合親和性を示すことが明らかとなった。本結果は、PRM が真菌の細胞壁マンナンの側鎖に存在する分岐型マンノトリオースモチーフに選択的に結合することを示唆している。

プラディミシン A と分岐型マンノトリオースとの結合解析

○渡邊泰典¹, 中川 優^{1,2}, 土井崇嗣³, 竹腰清乃理³, 五十嵐康弘⁴, 伊藤幸成², 小鹿 一¹

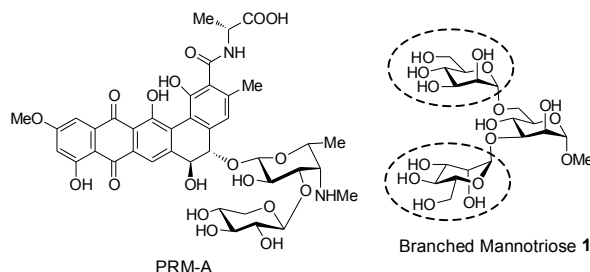
¹名大院・生命農, ²理研, ³京大院・理, ⁴富山県大・生工

【目的】

プラディミシン A (PRM-A) は, D-mannose (Man) を含む糖鎖に結合するユニークな抗生物質である. PRM-A は直鎖のオリゴマンノースよりも分岐構造を有するマンノトリオース (**1**) に極めて強く結合することが指摘されているが, その要因は明らかになっていない. そこで本研究では, PRM-A と **1** との結合様式の解明を目指し, **1** の非還元末端 Man 残基 A, B に対する PRM-A の結合選択性を調べることを目的とした.

【方法・結果】

我々の研究グループは近年, PRM-A/Man 複合体を凝集体として単離し, その複合体構造を固体 NMR で解析することに成功している. そこで, 本解析戦略を PRM-A と **1** との相互作用解析にも適用することとした. 三糖 **1** の Man 残基 A, B を別々に ¹³C 標識した二種の ¹³C 標識体を合成し, ¹³C 標識 PRM-A との複合体を凝集体として調製した. 本固体サンプルを用いて, 固体 NMR の dipolar-assisted rotational resonance (DARR) 法により, PRM-A が Man 残基 A, B と近接していることを示すシグナル強度を比較した結果, PRM-A が Man 残基 A よりも B に選択的に結合している可能性が示唆された. 本可能性を検証するため, 現在 **1** の Man 残基 A, B をそれぞれ D-glucose に置換したオリゴ糖との結合試験を行っており, その結果についても報告する.



プラディミシン A を利用した糖鎖の蛍光染色

○都築麗江¹, 中川 優^{1,2}, 戸村彦彦¹, 五十嵐康弘³, 伊藤幸成², 小鹿 一¹

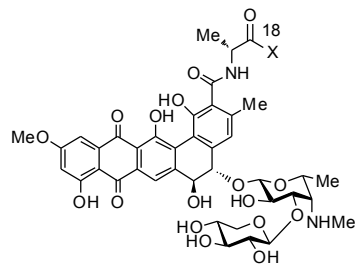
(¹名大院・生命農, ²理研, ³富山県大・生工)

【目的】

Pradimicin A (PRM-A) は, D-mannose (Man) 認識能を有する抗真菌性天然物である. 近年, 我々は「PRM-A の 18 位カルボキシル基は Man 結合活性に必須である」という従来の仮説を覆し, 本カルボキシル基をアミド化した誘導体 (**1**) が Man と結合して抗真菌活性を示すことを見いだした. そこで本研究では, PRM-A の 18 位カルボキシル基にアミド結合を介して蛍光基を導入し, 糖鎖を蛍光染色する手法を確立することを試みた.

【結果】

任意の蛍光基をクリック反応で導入することを視野に入れ, PRM-A の 18 位カルボキシル基にスペーサーを介してアジド基を導入した誘導体 (**2**) を合成した. 等温滴定カロリーメトリー試験および抗真菌試験の結果, **2** は Man 結合活性および抗真菌活性を保持していることが確認された. さらに, Man あるいはマンナン存在下で蛍光基を有するアルキンと **2** とのクリック反応を行なったところ, **2** と糖が結合した状態においてもクリック反応は容易に進行することが明らかとなった. そこで, 細胞壁にマンナンを有する *Candida rugosa* 存在下で **2** と蛍光基のクリック反応を試みたところ, 細胞表面が蛍光染色されることが観察できた. 本結果は, **2** が蛍光染色による糖鎖検出用ツール分子として利用できることを示唆するものである.



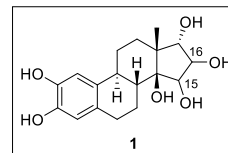
PRM-A : X = OH
1 : X = NHCH₂CH₂OH
2 : X = NH(CH₂CH₂O)₃CH₂CH₂N₃

Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) の合成化学的研究:

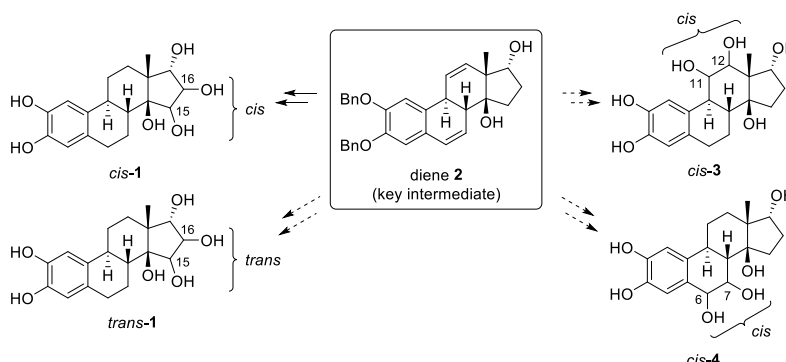
ジエンを鍵中間体とした多様な候補物質の合成

○橋本圭古, 池田 藍, 西川俊夫, 中崎敦夫(名大院生命農)

【目的】 Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) は Vanderbilt 大学の稲上・田村らによってウシの副腎より単離された物質であるが、得られた量の少なさのため詳細な化学構造は明らかになっていない。その後、推定構造(1)が提唱されたが、15,16位の水酸基の実際の位置や立体化学は不明のままである。そこで我々は、推定構造(1)をもとに様々な候補物質を合成し活性評価を行うことにより、Inagami-Tamura EDLF の真の構造を明らかにすることを目的として研究を開始した。



【方法・結果】 我々はすでに、様々な候補物質へと変換可能な鍵中間体であるジエン 2 を得ることに成功し、*cis*-1 の合成を達成している。そこで今回は、ジエン 2 を用いて *trans*-1、*cis*-3 及び *cis*-4 の合成の検討を行ったので報告する。



カルシウムシグナルを介した細胞内分泌経路制御の解析

○新居裕美香¹, 井上国子¹, 高原照直¹, 柴田秀樹¹, 牧正敏¹ (名大院生命農)

【目的】 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 は COPII 被覆小胞の外殻を担う Sec31A と相互作用し、小胞体(ER)からゴルジ体への輸送である初期分泌経路に関与することが分かっている。ALG-2 はこの過程のカルシウムセンサーとして機能すると考えられるが、その詳細な機構はよく分かっていない。

我々は、ALG-2 の新規相互作用因子として MISSL を見出した。MISSL は機能未知のタンパク質であったが、これまでの解析から、GFP 融合 MISSL は ALG-2、Sec31A と共局在することや、MISSL の発現抑制により、ER からの出芽部位 (ERES) や ERGIC、Golgi 体の局在が変化することが明らかとなっており、MISSL が ALG-2 と同様に分泌経路に関与する可能性が考えられる。そこで本研究では MISSL と ALG-2 の分泌経路における機能解明を目的とした。

【方法・結果】 MISSL の分泌経路への関与を調べるために、恒常的分泌タンパク質である SEAP (分泌型アルカリホスファターゼ) を安定的に発現する HeLa 細胞を用いて細胞外への分泌割合を測定した。MISSL、ALG-2 をそれぞれ発現抑制すると、コントロールに対し SEAP の分泌割合が 7~8 割ほどに低下した。両者を同時に発現抑制した場合も単独の発現抑制の場合と同程度であったことから、MISSL は ALG-2 と共同して分泌経路に関わっていると考えられた。

さらに、GFP 融合 MISSL を恒常的に発現する HeLa 細胞を用いて、MISSL の新規相互作用因子に微小管の動態に関与する MAP1B を見出した。結合解析を行ったところ、カルシウム依存的に MAP1B と ALG-2 が強く結合し、MISSL もわずかに結合していた。さらに SEAP の分泌割合を測定したところ、MISSL や ALG-2 単独の発現抑制で見られた分泌割合の低下が MAP1B の発現抑制により、回復することが分かった。

これらの結果から、MISSL と ALG-2 がカルシウム依存的に MAP1B と結合し、微小管の動態制御を介して、細胞内輸送に関わっている可能性が示唆された。

P51

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株のアルデヒド代謝関連酵素の解析

○松岡友洋¹, 矢野嵩典², 新谷政己³, 金原和秀³, 吉田信行³ (¹ 静大工, ² 山梨大生命環境, ³ 静大院)

【目的】

超低栄養性細菌とは炭素源およびエネルギー源無添加の無機固体培地 (BM 培地) で良好に生育する微生物群であり, 多くは大気中の CO₂ を要求する. *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は私たちが単離した超低栄養性細菌の中で最も良い生育を示すものであり, さらに窒素・硫黄源を除いた BM 培地においても生育するというユニークな特性を持っている. 網羅的な遺伝子解析により, アルデヒドデヒドロゲナーゼ, アルデヒドデヒドロゲナーゼ, アセチル-CoA シンテターゼ, アセチル-CoA カルボキシラーゼとアノテーションされる遺伝子 (*mnoA*, *aldA*, *acs* および *acc*) が低栄養生育時に高発現していることが判明している. このことから, 本菌の超低栄養生育にはアセトアルデヒドから脂質合成に至るまでの経路が重要であることが示唆された. 本研究では, 以上に挙げた 4 種の酵素活性を測定し, アルデヒド代謝について生化学的な解析を行った.

【方法・結果】

通常, 低栄養条件での培養には炭素源無添加で窒素源を NaNO₃ とした BM 培地, 富栄養条件での培養には LB 培地を用いている. まず BM および LB 固体培地で生育させた菌体を集菌し, バッファーに再懸濁後, ジルコニアビーズにより菌体を破碎することによって得られた無細胞抽出液を用いて各種酵素活性の測定を行った. 酵素活性の測定は主に分光光学的な方法により, 各酵素反応における基質または生成物の増減を経時的に測定した. その結果, 上記 4 種のアルデヒド代謝関連酵素のうち Acc を除く 3 種の酵素で, 富栄養生育時に比べ低栄養生育時の比活性が高いことが確認できた. 特に, *MnoA* と *AldA* は低栄養生育時には富栄養生育時の 10 倍程度の比活性となった. 以上の結果は, これまでの結果と一致し, 本菌の超低栄養性においてアルデヒド代謝が重要な役割を果たすという仮説を支持する結果となった.

P52

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株の低栄養条件応答性プロモーターの探索

○池ヶ谷凌士², 小林亮太¹, 松岡友洋², 金原和秀^{1,2}, 福田雅夫³, 新谷政己^{1,2}, 吉田信行^{1,2}

(¹ 静大院・総合科技研, ² 静大・工, ³ 長岡技科大・生物)

【目的】 備蓄原油中から単離された *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株は, 炭素源・エネルギー源無添加の無機培地 (BM 培地) に良好に生育し, 大気中の CO₂ を要求する超低栄養性細菌である. また, これまでの研究で, N9T-4 株は, 低栄養条件下で誘導的にアルデヒドデヒドロゲナーゼと推定される酵素 *AldA* を大量に発現することが判明している. そこで本研究では, N9T-4 株の低栄養条件応答システムの解明を目的とし, *aldA* の上流に存在すると想定される低栄養条件応答性プロモーターの探索を行った.

【方法・結果】 *aldA* 上流より低栄養条件応答性のプロモーターを探索するため, *aldA* と上流 1000 bp を含む断片を PCR で増幅し, ショットルベクターに挿入したプラスミド pALDA1000 を構築した. 本プラスミドで, 低栄養性を失った N9T-4 株の *aldA* 欠損株を形質転換したところ, 形質転換体の低栄養性が回復した. 従って, *aldA* 上流 1000 bp に低栄養条件応答性のプロモーターが存在することが示唆された. この結果を受け, 上流 1000 bp をさらに切り縮めた断片 (800 bp, 600 bp, ...) を PCR で増幅し, ルシフェラーゼをコードする遺伝子 *luxAB* 上流部分に組み込んだレポータープラスミドを構築した. これらのプラスミドによって N9T-4 株を形質転換し, それぞれ LB プレート (高栄養条件), BM プレート (低栄養条件) に塗抹し, 30℃で静置培養を行った. その後, 菌体をバッファーに懸濁し, 菌体量を, OD を指標に揃えた後, 96 well プレートに加えた. 各ウェルにルシフェラーゼ反応の基質となる 1-デカナールの希釈液を添加し, 発光強度の測定を行った. その結果, 上流 1000 bp の断片を含むレポータープラスミドを用いた場合, 低栄養条件では, 高栄養条件に比べて数十倍の発光強度が認められた. 現在までに, 少なくとも *aldA* 上流 200 bp の領域に低栄養条件応答性プロモーターが存在することが示唆され, 現在, さらに塩基配列を絞り込んでいる.

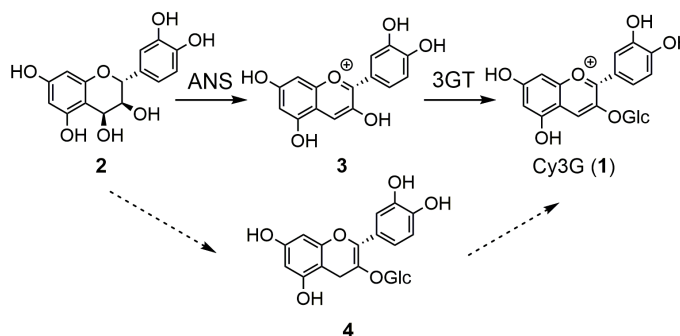
黒大豆種皮色素シアニジン 3-グルコシドの生合成経路に関する研究
 ○中根悠輔 YadaTeppabut 林英美 近藤忠雄 吉田久美 (名大院情報科学)

【目的】

黒大豆 (*Glycine max*) の種皮色素はシアニジン 3-グルコシド(Cy3G,**1**)である。**1** の生合成は、シスロイコ体(**2**)がアントシアニン合成酵素 (ANS) により酸化されシアニジン(**3**)となった後配糖化を受け、液胞へ運ばれると考えられてきた。緑色の未熟種子を莢から出すと数時間で黒化し **1** が生成する。一方、深見らは未熟種皮に配糖化フラベノール(**4**)が含まれることを報告した¹⁾。我々も独自に未熟種皮に **4** の存在を認め、酸性条件下で容易に **1** へと変換されることを明らかにした²⁾。これらは **1** が **2** ではなく **4** を経由して生合成されることを示唆する。この解明を目的に研究を行った。

【方法と結果】

未熟種子を色により薄緑色 (ステージ 1)、淡赤色 (ステージ 2)、紫色 (ステージ 3) に分類し、各ステージの成分を HPLC で分析した。**4** はステージ 2, 3 で検出され、空気暴露による黒化もステージ 2, 3 のみで観察された。さらに黒化に伴う **4** の減少を確認した。未熟種皮より ANS 遺伝子を取得できたので、今後その酵素活性と基質選択性を調べる予定である。



1) Fukami, H., et al., *J. Oleo Sci.* **2013**, 62, 623. 2) 林英美他、日本農芸化学会 2015 年度大会要旨集。

Pichia methanolica グルコース抑制解除株を用いた AOD アイソザイムの発現制御機構に関する研究
 ○土井遼平, 蓮實涼子, 早川享志, 中川智行 (岐阜大応生・応用生命)

【目的】 メチロトロフ酵母は強力なメタノール誘導性遺伝子を持つことから、その遺伝子プロモータを活用した異種遺伝子発現系として利用されている。特に、*P. methanolica* は一般的なメタノール誘導性遺伝子であるメタノール酸化酵素 (AOD) 遺伝子を *MOD1* と *MOD2* の 2 コピー持ち、両プロモータの特性を生かした新奇な異種遺伝子発現系が構築されている。一方、*MOD1* と *MOD2* はグルコース存在下ではその発現誘導が完全に抑制される。これまで AOD 発現は主にメタノール応答により制御されていると考えられてきたが、キシロースやグリセロールなどメタノール以外の炭素源でも AOD 発現が認められることから、AOD アイソザイムの発現制御機構を知るには、グルコースによるカタボライト抑制や他の炭素源による発現誘導も詳細に解析する必要がある。そこで、本研究では *P. methanolica* のグルコース抑制解除株を獲得し、その AOD アイソザイムの発現応答の詳細を解析することにした。

【方法・結果】 *P. methanolica* グルコース抑制解除株を、グルコースのアナログ 2-DG 耐性により選抜し、RH3 株と命名した。RH3 株をグルコース+メタノール培地に生育させたところ、メタノール生育時と同等の AOD 活性が誘導された。よって、RH3 株は AOD のグルコース抑制が解除されていることが証明された。一方、私たちは、これまで AOD の発現は「メタノール誘導」と「グルコース抑制の解除」の 2 通りで制御されていると考えてきたが、グルコース生育した RH3 株は AOD 活性をほとんど示さなかった。このことは *P. methanolica* 野生株が、キシロースやグリセロールによる AOD 誘導は、「グルコース抑制の解除」によるものではなく、キシロースやグリセロールにより直接誘導されることが推測される。つまり、AOD アイソザイムの発現誘導は「メタノール誘導」と「グルコース抑制の解除」以外にも様々な要因により精密に制御されている可能性を示した。

P55

腸管上皮細胞由来フィブロネクチンと相互作用するペクチンの部分構造の解明

○中智美¹, 宮本茉由², 山根菜摘¹, 北口公司^{1,2}, 矢部富雄^{1,2}

(¹岐阜大・応生科・応用生命, ²岐阜大院・応生科・応用生命)

【目的】

ポリガラクトuron酸から成る主鎖と中性糖から成る側鎖で構成されている水溶性食物繊維のペクチンを摂取すると、小腸絨毛の形態変化が生じることが報告されているが、その生理的意義は未だ明らかとなっていない。我々はこれまでに、ヒト腸管上皮細胞由来の細胞外マトリクス構成タンパク質であるフィブロネクチン (FN) が、ペクチン構造を認識することを報告している。そこで、小腸絨毛形態変化の意義解明への第一歩として、FN と結合するペクチン分子中の部分構造を解明することを本研究の目的とする。

【方法・結果】

ブルーネ (*Prunus domestica* L.) よりアルコール不溶性画分を調製したのち、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーによりブルーネペクチンを精製した。得られたペクチンに対し、主鎖のみを分解するペクチナーゼと、側鎖のみを分解する endo 型・exo 型のアラビナンおよびガラクトタン分解酵素を、単独あるいは組み合わせて作用させた。得られた試料と FN との分子間相互作用を、表面プラズモン共鳴法 (SPR) により測定した。その結果、ペクチナーゼ処理ペクチンが強い結合を示したことから、側鎖構造が結合に関与していると考えられた。また、アラビナンおよびガラクトタンと FN との相互作用解析から、ガラクトタン側鎖が結合に重要であることが示唆された。さらに、endo 型および exo 型のガラクトタン分解酵素を作用させたペクチンは、FN と強い結合を示すものの解離定数に大きな差はなかった。ガラクトースのみでは FN との相互作用を示さず、 β -galactosidase 処理ペクチンでは FN との結合をほとんど示さなくなることから、ペクチンの FN との結合にはガラクトースが複数結合したガラクトタン側鎖が重要であることが明らかとなった。

P56

硫黄欠乏は Ecl1 ファミリー依存的にリボソームを低下させ経時寿命を延長させる

○島崎嵩史, 滝浪奨洋, 大塚北斗, 饗場浩文 (名大院・創薬)

【目的】

分裂酵母は栄養豊富な条件下で細胞分裂によって対数的に増殖し、栄養源の枯渇等によりやがて分裂が停止する。この分裂が停止した時期を定常期と呼び、定常期の細胞が生存する期間を経時寿命と呼ぶ。分裂酵母 Ecl1 は、高発現すると経時寿命を延ばす因子として同定され、その発現は対数増殖期から定常期へ入る時期に一過的に上昇する。分裂酵母には Ecl1 と構造・機能が類似する Ecl2, Ecl3 が存在し、これらを合わせて Ecl1 ファミリーと呼んでいる。本研究は Ecl1 の発現誘導シグナルの探索から始まり、Ecl1 を介した具体的な寿命制御メカニズムの解明を目的としている。

【方法・結果】

ecl1⁺の発現誘導シグナルを探索した結果、硫黄欠乏がシグナルであることが明らかになった。また、その誘導に転写因子 Zip1 が関わっていることを見出した。そこで、硫黄欠乏が分裂酵母に与える影響を解析したところ、経時寿命の延長に加え、リボソーム遺伝子の発現低下、胞子形成などが Ecl1 ファミリー依存的に起こることを見出した。さらに、リボソーム活性を阻害する薬剤処理や、リボソーム変異株では経時寿命が延長した。なお、グルコースや窒素源を制限した場合にも、経時寿命の延長とリボソームの低下が認められた。以上の結果から、硫黄欠乏は、Ecl1 を介してリボソームを抑制することで経時寿命を延ばす新規な寿命制御シグナルだと考えている。

P57

高輝度発光酵素 (NanoLuc ルシフェラーゼ) 融合タンパク質を用いた結合解析による ALG-2 の新規相互作用タンパク質の探索

○松尾里奈, 張維, 高原照直, 柴田秀樹, 牧正敏 (名大院生命農)

【目的】

ALG-2 は, アポトーシス関連因子として発見されたタンパク質で, Ca^{2+} 依存的に様々なタンパク質と相互作用することにより, 細胞死, がん発生, シグナル伝達, 小胞輸送などに関与することが知られている. 当研究室では, ALG-2 が 2 種類の結合モチーフを認識することを明らかにした. 本研究は, X 線結晶構造解析および変異体結合解析の結果から新たに定義した 7 残基からなる 2 型モチーフに基づいて, 新規相互作用タンパク質を同定することを目的とした.

【方法・結果】

ヒトのタンパク質データベースを検索し, 2 型モチーフをもつ配列を抽出した. このうち, スコアの高い十数種のタンパク質を選び, 部分断片あるいは全長の GFP 融合タンパク質の発現プラスミドを作製した. HEK293T 細胞にプラスミド DNA をトランスフェクションし, 細胞溶解液を用いて抗 GFP 抗体による免疫沈降を行い, その産物の SDS-PAGE 分離後, 高輝度発光酵素 (NanoLuc ルシフェラーゼ) 融合 ALG-2 (Nluc-ALG-2) をプローブとして用いて Ca^{2+} 存在下で Far Western 解析を行った. また, 同じ免疫沈降産物に Nluc-ALG-2 を加えて Ca^{2+} 存在下でインキュベートし, 結合した Nluc-ALG-2 の量を発光測定により調べた. その結果, SARAF において最も強い結合が見られた. さらに, HEK293T 細胞溶解液を用いて抗 SARAF 抗体による免疫沈降を行い, 抗 ALG-2 抗体を用いた Western Blotting 解析を行ったところ, Ca^{2+} 依存的に内在性 ALG-2 が共沈降された.

P58

ジアステレオ選択的なアザパラデーションを用いた (+)-Monomorine の合成に関する研究

○武本タ貴子¹, 出口綾香¹, 服部恭尚³, 真壁秀文^{1,2}

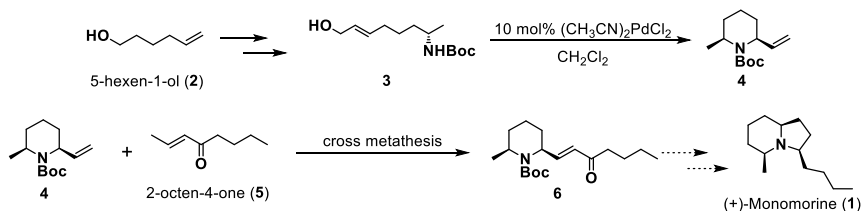
(信大院農¹, 信大院総合理工², 京都薬科大 共同利用機器センター³)

【目的】

2, 6-ジアルキル置換型ピペリジン環は自然界の多様なアルカロイド中に見られ, 中には神経系に作用して顕著な生理活性を示すものがある. (+)-Monomorine (1) は, 1973 年にイエヒメアリより道するベフェロモンとして単離された 3, 5-二置換型のインドリジジンアルカロイドである. その構造的特徴として, 2, 6-*cis*-ジアルキル置換型ピペリジン環を有することがあげられる. 本研究は, 2 価 Pd 触媒を用いたジアステレオ選択的なアザパラデーションを鍵反応として, 1 の効率的な合成を行うことおよびその生理活性の発現メカニズムの解明研究に応用することを目的とする.

【方法・結果】

5-Hexen-1-ol (2) を出発物質として, Jacobsen 加水分解速度論的分割および光延反応を含む 10 段階の反応により, 望む立体化学の環化前駆体 3 を総収率 30% で合成した. 続いて, 2 価 Pd 触媒を用いた立体選択的な環化反応により 2, 6-*cis*-ピペリジン環ユニット 4 を構築した. 2-Octen-4-one (5) と 4 の交差メタセシスにより 6 を合成した. 今後二重結合の還元およびアミンの脱保護, 環化を経て (+)-monomorine の合成を行う予定である.



P59

根粒菌 *Bradyrhizobium diazoefficiens* は新奇なレアアース依存的メタノール代謝系をもつ

○菅沼宗矢¹, 王倫¹, 日比野歩美¹, 三井亮司², 谷明生³, 海老原章郎¹, 早川享志¹, 中川智行¹

(¹岐阜大・応生, ²岡山理大・理, ³岡山大・植物研)

【目的】 根粒菌は、マメ科植物の根圏において窒素固定を行う植物共生細菌である。近年、ゲノム情報から *Bradyrhizobium* などの根粒菌がメタノール代謝の鍵酵素メタノール脱水素酵素 (MDH) のオーソログ遺伝子を持つことが明らかとなった。しかし、根粒菌はメタノール生育を示さないことから、その MDH 遺伝子は偽遺伝子とされていた。一方、我々のグループはメタノール細菌 *Methylobacterium* 属がレアアース (REE) 依存的な新奇メタノール代謝系を持ち、本代謝では REE 依存型 MDH がメタノール酸化を担っていることを示している。さらに *Bradyrhizobium* sp. も Ce 誘導型 MDH を持つことから、根粒菌も REE 依存的にメタノール生育を示すことが想像でき、本代謝系は自然界における根粒菌の植物共生の重要なツールであると考えられる。本研究では、*B. diazoefficiens* USDA110 株の REE によるメタノール生育の詳細と MDH の機能から、根粒菌のメタノール代謝について解析することにした。

【方法・結果】 USDA110 株は過去の報告通り、Ca ではメタノール生育を全く示さなかったが、La から Nd までの 4 種類の REE に依存的なメタノール生育を示した。生育が良好であったメタノール/Ce 培地に生育した USDA110 株から Ce 依存型 MDH (Ce-MDH) を SDS-PAGE にて単一になるまで精製した。Ce-MDH は 64 kDa のサブユニットの単量体で、補因子として Ce を保持していた。Ce-MDH の最適温度は 35°C であり、メタノールに対する K_m 値は 67.2 μ M、 V_{max} は 12.9 U/mg であった。この結果は *M. extorquens* 由来の Nd-MDH とほとんど変わらない性質であり、メタノール代謝を担う十分な機能を持ち合わせていた。根圏には REE と植物が放散するメタノールが十分量存在することから、根粒菌は根圏において REE 依存的なメタノール代謝を行っており、本代謝が植物共生に何らかの役割を持つものと推測できる。

P60

新規 GH134 ファミリーに属する β -1,4-マンナーゼの機能解析

○酒井 杏匠、新沢 祐大、嶺澤 美帆、木本紗蘭、志水 元亨、加藤 雅士 (名城大農)

【目的】 我々は、 β -マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 *Aspergillus nidulans* を生育させた際に細胞外に分泌される新規の β -1,4-マンナーゼ (Man134A) を発見し、現存する糖質加水分解酵素ファミリーのいずれにも Man134A が属さないことを示した (Shimizu *et al.* 2015)。このことから、Man134A が新規の GH family であることを提唱した。次に、GH134 ファミリーの分子系統樹を作成したところ、GH134 に属するタンパク質は植物病原菌を含む糸状菌および放線菌の一部にのみ分布しており、*A. nidulans* と同じ *Aspergillus* 属である *A. niger* のゲノムには GH134 に属する遺伝子はコードされていなかった。一方、*A. nidulans* のゲノムには Man134A と相同性を有する遺伝子が Man134A の他に 3 種類存在していた。本研究では、Man134A の 3 種類のパラログおよび他の菌類が有する GH134 に属するタンパク質の機能を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 Man134A 以外の GH134 ファミリーに属するタンパク質すべてが β -マンナーゼ活性を有するか、他の多糖類に対する加水分解活性を有するかは不明である。そこで、いくつかのオルソログおよびパラログのリコンビナントタンパク質をメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* にて異種発現させ、調製した。 β -マンナンおよび他の多糖類と反応後、TLC および HPLC にて反応生成物を分析することで、基質特異性を解析した。その結果、*A. nidulans* のパラログのうち 2 種類 (Man134B, Man134C; Man134A との identity 71%, 54%) および *A. oryzae* のもの (Man134A と identity 70%)、放線菌 *Streptomyces* 属のもの (Man134A と identity 61%) においては、すべて β -マンナーゼ活性が見られたが、それらのリコンビナント酵素の β -マンナンやオリゴ糖に対する酵素学的パラメーターおよび分解産物の生成パターンに違いが見られた。現在、*A. nidulans* のゲノム中にある Man134A のパラログである Man134B, Man134C, Man134D の生理学的役割についても解析を行なっている。

P61

Pd 触媒による一酸化炭素挿入反応を用いたイソクマリン化合物 legioliulin の合成研究

○浅井将貴¹, 服部恭尚², 真壁秀文^{1,3}

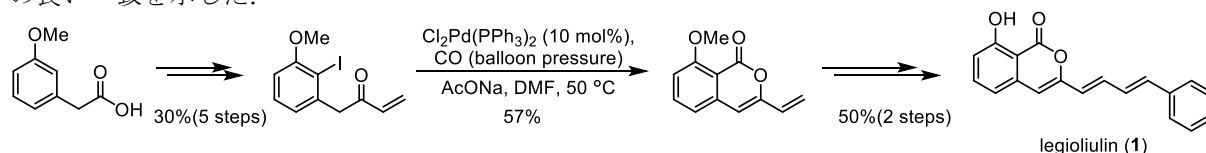
(¹信大院総合理工, 京都薬科大 共同利用機器センター², 信大院農³)

【目的】

Pd 触媒は, 有機合成に用いられる普遍的な触媒である. この Pd 触媒を用いて, 一酸化炭素雰囲気下で反応を行うと, 分子内にカルボニル基を挿入することができ, 有毒な一酸化炭素を分子資源として活用することができる. この一酸化炭素挿入反応に続く環化反応を用いて, イソクマリン化合物の効率的な合成法を開発することを目的とし, 肺炎の一種の原因菌である *Legionera dumoffii* より単離された化合物 legioliulin を合成の目的化合物として設定した.

【方法・結果】

3-Methoxyphenylacetic acid を出発物質として, LAH 還元, オルトリチオ化によるヨウ素化, Dess-Martin 酸化, Grignard アルキル化反応, Dess-Martin 酸化によって環化前駆体を合成した. これに対し, 一酸化炭素挿入反応の検討を行い, イソクマリン骨格を構築した. その後, Heck 反応により側鎖を伸長し, BBr₃ によって脱メチル化を行い legioliulin (1) を合成した. 各種スペクトルは文献値との良い一致を示した.



P62

小胞体ストレス関連因子 CDIP1 とその相互作用因子の役割

○鈴木千尋¹, 犬飼隆太¹, 京卓志¹, 高原照直¹, 牧正敏¹, 柴田秀樹¹ (¹名大院生命農)

【目的】

小胞体に異常な構造のタンパク質が蓄積するとタンパク質合成の抑制や小胞体内腔で機能する分子シャペロンの発現誘導が起こる. 小胞体ストレスが持続する場合にはアポトーシスが引き起こされるが, その分子メカニズムの詳細は不明である. CDIP1 (Cell death-inducing p53-target protein 1) は小胞体ストレスにより発現が誘導され, Caspase-8 の活性化を介しミトコンドリア経路のアポトーシスを促進する. 本研究では CDIP1 とその相互作用因子に着目することで, 小胞体ストレスにより誘導されるアポトーシスの分子メカニズムの解明を試みた.

【方法・結果】

CDIP1 はアミノ末端のプロリンに富んだ領域中に, カルシウム結合タンパク質である ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) との結合が予想されるモチーフ (ABM-2: ALG-2-binding motif 2) を持つ. 免疫沈降実験により両者の結合を解析すると, その結合はカルシウム依存的であり CDIP1 の ABM-2 が重要であることが明らかとなった. つづいて ALG-2 の発現抑制細胞に Brefeldin A を添加し, 小胞体ストレスを誘導したところ, ALG-2 を発現抑制した場合には Caspase-8 の切断・活性化が抑えられた. また, 既知の ALG-2 相互作用タンパク質から CDIP1 の相互作用タンパク質を探索したところ, CDIP1 は 1 回膜貫通領域を持った SHISA family タンパク質 SHISA4, Scotin と結合した. その結合様式について解析すると, SHISA4, Scotin は CDIP1 のシステインに富んだ領域を含むカルボキシ末端領域と結合することが明らかとなった. 蛍光タンパク質を融合させた Scotin は小胞体様の局在を示した. さらに CDIP1 も膜貫通領域を持たないにもかかわらず小胞体様の局在を示したことから Scotin が CDIP1 を小胞体上にリクルートし, 小胞体膜上での CDIP1 を核とした複合体が小胞体ストレス誘導性アポトーシスの制御に関与する可能性を考えている.

糸状菌の鉄恒常性維持に関与する転写因子 HapX の C-末端領域ドメインの機能解析

○村田俊輔, 小森誠也, 志水元亨, 加藤雅士 (名城大・農)

【背景と目的】

HapX は、我々の研究グループが初めて見出した CCAAT-box 結合因子 (HapB/C/E 複合体) と相互作用する真菌類に特有の転写因子である。HapX は鉄欠乏時に鉄を含むタンパク質の転写を抑制することから、鉄の恒常性維持機構の中心的な役割を果たしている。我々はすでに、HapB/C/E 複合体存在下での HapX の DNA 結合様式について詳細に研究を進めてきた。その結果、HapX の N-末端側に存在するアミノ酸モチーフが HapX と HapB/C/E 複合体との相互作用に関与していることを明らかにした。一方、C-末端側ドメインにはオルソログ間で保存されたシステイン残基が連続する 4 つのモチーフ (cysteine-rich region A-D; Crr A-D) が存在しているが、その機能については不明である。そこで本研究では、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の HapX の C-末端側ドメインの機能解明を目的とした。

【方法・結果】

A. nidulans 由来の HapX の C-末端側ドメイン中に存在するシステイン残基が連続する 4 つのモチーフ CrrA-D に対してそれぞれ欠失変異を導入した変異型 HapX を 4 種 (HapX^{CrrA}, HapX^{CrrB}, HapX^{CrrC}, HapX^{CrrD}) 調製し、紫外可視吸収スペクトルを解析した。野生型のリコンビナント HapX (HapX^{WT}) の紫外可視吸収スペクトルを測定したところ、波長 420 nm 付近に鉄硫黄クラスターに特有のピークが検出された。このことから、HapX^{WT} は鉄硫黄クラスターを保持していることが示唆された。さらに、HapX の C-末端側ドメイン中に存在する CrrA, B, C, D を欠損させた 4 種の変異型 HapX (HapX^{CrrA}, HapX^{CrrB}, HapX^{CrrC}, HapX^{CrrD}) の吸収スペクトルを測定したところ、HapX^{CrrA} および HapX^{CrrB} では吸収強度が HapX^{WT} に比べてそれぞれ 30% まで低下したことから、鉄硫黄クラスターの保持には CrrA および CrrB が重要であると示唆された。

Rhodococcus jostii RHA1 由来ムコノラクトンイソメラーゼ CatC の反応山梨智也¹, 〇戸塚直希¹, 長谷部文人¹, 原啓文², 鮎信学¹(¹ 静岡県大食栄, ² マレーシア工科大マ日国際工科環境)

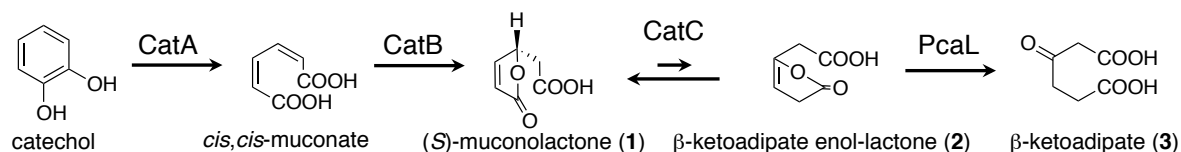
【目的】

土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 はβ-ケトアジピン酸経路により芳香族化合物を異化し、acetyl-CoA、succinyl-CoA に分解する。本研究では、β-ケトアジピン酸経路中の catechol を起点とする catechol branch の酵素、ムコノラクトンイソメラーゼ CatC の反応を精査した。

【方法・結果】

ムコノラクトンイソメラーゼ CatC は、(S)-muconolactone (1) をβ-ketoadipate enol-lactone (2) に異性化する酵素である。*in vitro* 反応において、CatC は、1 を 2 に変換する正反応よりも、その逆反応を速やかに触媒することが明らかになった。これまで、1→2→β-ketoadipate (3) の順に異化されると考えられていた。そこで、2→3 を触媒する PcaL と、CatC、1 を混合したところ、予想通り、速やかに 3 へと変換されることを確認した。

in vivo において、CatC の逆反応が進行するかどうかを確かめるために、RHA1 株とΔpcaL 株において catechol 異化能の差異を検討した。RHA1 株は、catechol を速やかに異化した。一方、ΔpcaL 株では HPLC 上、蓄積物が見られ、その構造は 2 ではなく 1 であった。さらに、蓄積した 1 が培養経過とともに減少した。以上より、*in vivo* において、CatC の逆反応が優勢である可能性が示唆された。また、*R. jostii* RHA1 株において、1 を異化する CatC→PcaL 以外の未知経路の存在が示唆された。



微好気・嫌気環境下におけるプラスミドの宿主域の解析
 ○柳谷洸輔¹, 片岡大亮², 金原和秀^{1,2}, 大熊盛也³, 新谷政己^{1,2,3}
 (¹ 静大・工, ² 静大院・総合科技, ³ 理研・BRC-JCM)

【目的】 プラスミドは、微生物間における遺伝子の「運び手」であり、その伝達現象は微生物の急速な進化・適応能の原動力と考えられている。そのため、プラスミドがどのような種類の微生物に伝播するのかという宿主域の情報は非常に重要である。これまでは、好気条件下で行われた接合伝達実験の結果に基づいてプラスミドの宿主域が決められてきた。しかし、実際にプラスミドが伝播すると考えられる土壌、堆肥、動物体内などの実環境の多くは、微好気・嫌気条件下にある。そこで、本研究では微好気・嫌気条件下でプラスミドが伝達するかを検証し、プラスミドのいわば「真」の宿主域の決定を行うことを目的とした。まず pBP136::gfp をモデルプラスミドとし、本プラスミドが微好気条件下で伝達するかを検証した。

【方法・結果】 12種類の通性嫌気細菌を受容菌候補株とし、リファンピシン (Rif) に対する自然耐性株を取得後、ミニトランスポゾンを利用してゲンタマイシン (Gm) 耐性を付与した。供与菌には、pBP136::gfp {接合伝達時のみ GFP が発現する。カナマイシン (Km) 耐性遺伝子をもつ} をもつ土壌に生息する微生物の一種である *Pseudomonas putida* KT2440 株の派生株を用いた。微好気条件下での接合実験は以下のように行った。好気条件下で培養した供与菌と受容菌を混合し、LB 平板培地上に置いた孔径 0.45 μm メンブレンフィルター上に載せ、嫌気チャンバー内で 30°C, 24 h 静置後、チャンバー内で菌体を LB 培地に懸濁し、選択培地 (LB+Rif+Gm+Km) にて接合完了体を選抜した。その結果、*Proteobacteria* 5 株, *Deinococcus-Thermus* 1 株, *Firmicutes* 2 株, *Actinobacteria* 2 株に対して pBP136::gfp が微好気条件下で伝達することが示唆された。しかし、*Pseudomonas* に属する 3 株の内、2 株については接合完了体を検出できなかった。また、*Corynebacterium* 1 株については、微好気条件下では、好気条件下と比較して伝達頻度が低下することが示唆された。現在、前培養時から嫌気条件にした場合についても実験を行っている。

異なる側鎖構造を示すトリコテセン生合成酵素オルソログの機能解析
 ○杉浦涼介¹, 田中佑弥¹, 田中彰², 中嶋佑一¹, 前田一行¹, 金丸京子¹, 小林哲夫¹, 安藤直子², 木村真¹ (¹ 名大院生命農, ² 東洋大理工)

【目的】

Fusarium 属菌は穀物に感染し赤かび病を引き起こすだけでなく、トリコテセン系かび毒を生産して食の安全を脅かす。これまで T-2 toxin 生産菌 *Fusarium sporotrichioides* をモデルとして生合成遺伝子の機能解析が行われたが、側鎖構造の異なるニバレノールを生産する *Fusarium graminearum* の生合成経路は明らかにされていない。本研究では側鎖修飾のパターンが異なる多様なトリコテセン系かび毒を生産するように進化してきた *Fusarium* のトリコテセン経路遺伝子の機能を検証する。

【方法・結果】

ニバレノール生合成初発反応を担う *Tri5* および C-7 / C-8 位水酸化に関わる *Tri1* の二重遺伝子破壊株を用いた feeding 実験によって *F. graminearum* のトリコテセン骨格 C-4 位水酸化酵素 FgTRI13p の機能を検証した。その結果、FgTRI13p は A-ring の C-7 が水酸化され C-8 がケトとなった DON の C-4 を効率的に水酸化し、A-ring が未修飾のトリコテセン基質に対しては極めて非効率的にしか水酸化しないことを見出した。一方、*F. sporotrichioides* の *FsTri13* を始めとする各種破壊株を用いた実験から、FsTRI13p は A-ring が未修飾のトリコテセン基質の C-4 を効率的に水酸化することが明らかになった。また、新たなシャント経路へ入ることを見出した。

以上のことより、トリコテセン骨格の同じ位置に同一の置換基を付加する生合成酵素でも、側鎖構造の多様性を生み出すために、基質特異性の変化を伴って進化してきたことが明らかとなった。

トリコテセン生合成に必須の転写因子をコードする *Tri6* の発現制御に関する研究
 ○中嶋佑一¹, 塩原拓也¹, 前田一行², 金丸京子¹, 小林哲夫¹, 木村真¹ (¹名大院生命農, ²明治大院)

【目的】

植物病原菌 *Fusarium graminearum* はデオキシニバレノールやニバレノール等のトリコテセン系かび毒を生産する。トリコテセン生合成は、生合成遺伝子クラスター内の転写因子遺伝子 *Tri6* によって正の発現制御を受ける。*F. graminearum* では培地中にスクロース等の特定の糖がないと *FgTri6* 発現が活性化されないが、トリコテセンクラスターを有し T-2 toxin を生産する *Fusarium sporotrichioides* ではスクロースを必要としない。本研究では両種の *Tri6* 転写活性化機構の違いを手掛かりに、トリコテセン生産制御機構を明らかにする。

【方法・結果】

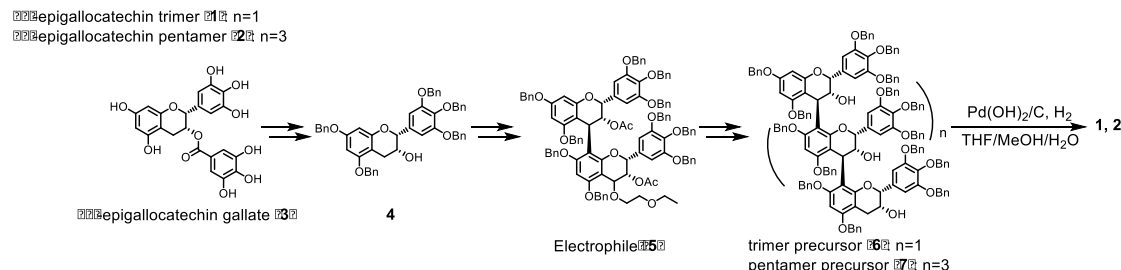
F. sporotrichioides の *FsTri6* ORF または *FsTri6* プロモーターを、それぞれ *F. graminearum* の対応する領域、すなわち *FgTri6* ORF または *FgTri6* プロモーターへ置換した株を作出した。さらにそれぞれの *Tri6* ORF 上流に Tef プロモーター配列を挿入することで構成的高発現株を作出した。これらの株を用いて様々な条件でトリコテセン生産やクラスターの転写状況を調べたところ、両種のトリコテセン生産制御の違いは *Tri6* の転写活性化制御ではなく、翻訳後の TRI6p の活性化機構の違いに起因することが示された。つまり *F. graminearum* は培地中のスクロースに応答して初めて TRI6p を機能化された状態に活性化するという、より繊細な制御機構を備えていることが明らかとなった。

(-)-Epigallocatechin oligomer の合成研究

○市川幹広¹, 石原知里², 藤井博³, 真壁秀文^{1,2,3} (¹信大院農, ²信大院総合理工, ³信大先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所)

【目的】 ポリフェノール化合物は多種多様な植物に含まれ、その抗酸化活性から生体調節機能を高めるとして脚光を浴びている。ポリフェノール化合物の中でも縮合型タンニンと呼ばれる化合物群は、構成単位 (flavan-3-ols) や分子間の結合様式の多様さ、また重合度の広い分布により、複雑な混合物として天然に存在する。そのため縮合型タンニン類の構造活性相関研究を推進するためには系統的な合成法の確立が望まれる。本研究では、(-)-epigallocatechin 重合体の合成を行い、ヒト前立腺ガン細胞株 PC-3 に対する細胞増殖抑制活性を評価することを目的とする。

【方法・結果】 (-)-Epigallocatechin gallate (3) を出発物質として、(-)-epigallocatechin のベンジル保護体 4 を得た。続いて求電子剤と求核剤を調製し、Friedel-Crafts アルキル化反応による分子間結合の形成を繰り返すことで(-)-epigallocatechin 重合体 1, 2 を合成した。今後、1 と 2 をヒト前立腺ガン細胞株 PC-3 に対する細胞増殖抑制活性試験に供し、他の縮合型タンニン類との活性の比較を行う予定である。



前駆脂肪細胞分化前におこる DNA 複製の意義

○大河内七海¹, 竹林慎一郎², 緒方正人², 緒方進¹, 奥村克純¹ (¹三重大院生資, ²三重大院医)

【目的】

前駆脂肪細胞分化前に行われる 1-2 回の特異的な DNA 複製を mitotic clonal expansion : MCE と呼ぶ。MCE は脂肪細胞の分化に必要不可欠であると考えられているが、そのメカニズムについては未だ理解が乏しい。我々は、前駆脂肪細胞には「増殖のための複製」と「分化のための情報の書き換えが行われる複製」の 2 種類の DNA 複製が存在するという仮説を立てている。本研究は MCE 中の DNA 複製回数が脂肪細胞の分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、検討を行った。

【方法・結果】

MCE 中の 1 回目、2 回目の DNA 複製をそれぞれヌクレオシド類似体で標識し、分化誘導後 8 日目に免疫蛍光染色法により視覚的に検出した。次に標識した細胞の脂肪滴を染色することで、分化した細胞の割合と脂肪滴の大きさを測定した。その結果、分化した細胞のうち 2 回複製した細胞の割合が非常に高かった。一方で、脂肪滴の大きさに関しては複製の回数に関係なくほぼ一定であった。これらの結果は MCE 中の DNA 複製回数が分化開始を主に制御していることを示唆している。DNA 複製の際はクロマチン成分も同時に倍化し、この時にエピゲノム修飾が変化することで、遺伝子発現に影響することが知られている。脂肪細胞への分化においても、MCE 中の DNA 複製依存的に変化したエピゲノム修飾が「増殖」から「分化」へのスイッチを制御している可能性が考えられる。現在 MCE 中の DNA 複製依存的に変化するエピゲノム修飾が存在するのかについて研究を進めており、今後 MCE 中の DNA 複製依存的に働く、重要な因子を明らかにすることで新規の肥満予防・治療法開発につながると考えられる。

糸状菌転写因子 AmyR の誘導物質依存的リン酸化に関する解析

○楠見有惟、森本翔太、大崎陽央、金丸京子、木村真、小林哲夫（名大院生命農学・生物機構）

Aspergillus 属に普遍的に存在する AmyR は真菌類に特異的な Zn(II)₂Cys₆ 型の DNA 結合モチーフを持つ転写因子であり、アミラーゼ遺伝子群の転写を正に制御する。AmyR は生理的誘導物質である isomaltose (IM) に応答して細胞質から核へ移行し、転写を活性化することが明らかにされている。さらに、IM 誘導による核移行の後、AmyR はリン酸化修飾を受けることが示されており、そのリン酸化が引き金となって AmyR が不安定化し分解されることなどが示唆されている。本研究では、この IM 依存的なリン酸化の生理学的意義の解明を目的に、AmyR の真のリン酸化部位を明らかにするために AmyR の変異体を用いて解析を行った。

AmyR の推定リン酸化部位 8 ヶ所を Ala および Glu 置換した GFP-AmyR の発現株を用いてアミラーゼ活性測定を行った結果、T424A, S436A, S445A において、変異を導入していない GFP-AmyR と比べ著しくアミラーゼ生産能が低下し、S492A, S532A ではやや上昇傾向となった。細胞内の AmyR の安定性を調べたところ、T424A, S436A, S445A においては著しく不安定化していた。また、これら 3 ヶ所の Glu 置換株を用いてリン酸化レベルの解析を行ったところ、T424E は、IM 誘導時においてもリン酸化 AmyR は検出されず、S445E は、野生型と同等のバンドパターンを示した。S436E においては、リン酸化レベルの低下を示した。しかし、これらの変異によって、核移行能を持たないなど間接的にリン酸化に影響を与えた可能性も示唆されるため真のリン酸化部位とは決定しがたい。今後、アミラーゼ生産に影響のあった S492A や S532A などに関してリン酸化レベルの解析や転写レベルでの解析を進めることでリン酸化部位を明らかにする予定である。

P71

マウスマクロファージにおけるシアル酸認識レクチン発現調節
○立山博之¹, 樋口廣士¹, 村瀬佑介¹, 西島謙一¹, 飯島信司¹ (¹名大院工)

【目的】 動物細胞表面を覆う糖鎖の末端はシアル酸である。シグレックは主に免疫系の細胞表面に発現しているレクチンで、シアル酸含有糖鎖を特異的に認識する。その多くは細胞内ドメインに Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれる抑制性のチロシンモチーフをもち、免疫系を制御する活性が報告されている。

マクロファージは、ホメオスタシス維持に重要な役割を果たしており、炎症反応により外来微生物を除去する一方で、炎症抑制・組織修復においても中心的な役割を果たしている。我々はマクロファージとシグレックの関係に注目し研究を進めており、これまで好酸球や肺胞マクロファージでの発現のみ着目されてきたシグレック-F が、骨髄由来マクロファージで発現していることを見出したため、その機能解析を試みた。

【方法・結果】 C57BL/6 骨髄細胞を、M-CSF あるいは L929 培養上清を加えた培地で一週間培養することで骨髄由来マクロファージへと分化させた。マウスマクロファージのシグレック発現量は、全般にヒトよりも低かった。そこで、種々の刺激によるシグレックの発現変化を定量 RT-PCR 調べたところ、炎症時に産生される GM-CSF によりシグレック-F の発現量が顕著に増加した。この際、マクロファージの炎症活性を抑制するシグレック-E の発現量は、ほとんど変化しなかった。マクロファージにおける機能を調べるため、シグレック-F を siRNA によりノックダウンしたところ、IL-4 刺激によって誘導されるアルギナーゼ 1 の発現量が減少した。このとき、IL-4 シグナルで重要な STAT6 のリン酸化が低下しており、アルギナーゼ 1 発現量減少の一因と考えられた。

これらの結果から、シグレック-F はマクロファージの GM-CSF 刺激によって発現量が増加し、遺伝子発現を調節している可能性が示唆された。

P72

糸状菌における新規炭素源抑制機構の解明
○李怡, 国武絵美, 内田遼太, 野原健弘, 金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農)

【目的】

糸状菌は、植物遺体や植物細胞壁の資化を目的に多種多様な酵素を生産する。セルロースやヘミセルロースなどを含んだ培地で生育させると、完全分解に必要な組成の分解酵素群を分泌する。しかし、多くの生物では、より資化しやすい炭素源が存在する場合、より資化しにくい炭素源の資化が抑制される。このような現象はカーボンカタボライト抑制 (CCR; Carbon Catabolite Repression) と呼ばれ、*Aspergillus* 属では CreA が CCR を担う主要な転写抑制因子として知られている。しかし、本研究室でのプロテインキナーゼ破壊株を対象としたスクリーニングにより、CreA 非依存的で PkaA (cAMP 依存的プロテインキナーゼ) 依存的な CCR が見いだされた。本研究では、この CreA 非依存的な CCR についてさらに解析を行うとともに、PkaA の上流因子の同定を行った。

【方法・結果】

プレートアッセイにより *A. nidulans* におけるセルラーゼ生産抑制を様々な炭素源について検討したところ、グルコースとマンノースによる抑制が PkaA 破壊株で解除されていた。また、主要セルラーゼの発現抑制について解析したところ、CreA と PkaA のいずれも関与しており、PkaA 依存的抑制は CreA 依存的なものより低濃度のグルコースで引き起こされることが明らかとなった。従って、*A. nidulans* におけるセルラーゼ遺伝子の発現制御においては CreA 依存的な抑制と CreA 非依存的な抑制の両方が機能しており、その寄与の程度は抑制炭素源の種類によって異なると考えられた。

cAMP/PKA 経路の上流に存在すると考えられる、三量体 G タンパク質複合体の α サブユニットに着目し、CCR との関係解析した。その結果、*A. nidulans* における CCR には GanB が主として関わることを発見した。また、GanB 破壊株では PkaA 破壊株よりも多様な炭素源において抑制解除が観察された。これは、GanB の下流に PkaA を介した経路と、PkaA を介さない経路が存在することを示唆している。

P73

栄養成分の欠乏はゲノム DNA の損傷を引き起こす～葉酸と DNA～

○赤廣匠¹, 緒方進¹, 奥村克純¹ (¹三重大院生物資源)

【目的】

葉酸は水溶性のビタミン B の一種であり、核酸の合成や様々なメチル化の基質となる *S*-アデノシルメチオニン (SAM) の合成に必要な栄養素である。したがって、葉酸はエピジェネティクスの一つである DNA のメチル化にも深く関係している。葉酸の不足は貧血や胎児の発育不全、免疫疾患などの様々な病気を引き起こすが、詳しいメカニズムについては十分に解明されていない。当研究室では、葉酸の不足が DNA のメチル化異常を誘導し、結果として DNA の損傷や様々な病気を引き起こすと推測している。本研究では葉酸欠乏で培養した細胞を用いて、葉酸の不足と DNA の損傷及びメチル化との関係性について検証した。

【方法】

DNA の損傷解析には免疫蛍光染色法、DNA メチル化解析にはバイサルファイトシーケンシング法を用いた。DNA の損傷は、DNA 二本鎖切断のマーカータンパク質を蛍光検出して顕微鏡イメージングを行い、その蛍光量から解析した。DNA メチル化解析は、メチルされていない特定の塩基を別の塩基に化学変換させ、シーケンス解析後に元の配列と比較することで解析した。

【結果及び考察】

通常に比べ、葉酸欠乏で培養した細胞では DNA 損傷の増加が見られた。また、全体の DNA メチル化レベルが低下していることがわかり、葉酸の不足によって DNA の損傷とメチル化異常が引き起こされることを確認した。今回このような結果が得られた一つの要因として、葉酸の不足による細胞内の SAM の低下が DNA の損傷やメチル化異常に影響したと推測している。今後は葉酸不足による細胞内の SAM の変化と DNA のメチル化レベルの変化を解析し、遺伝子の分子生物学的な制御機構のより詳しい解明や医療分野への応用に役立てていきたいと考えている。

P74

COPII 被覆構成タンパク質 Sec31A の相互作用因子の探索

○伊藤仰喜¹, 京卓志¹, 桑田啓子², 高原照直¹, 牧正敏¹, 柴田秀樹¹

(¹名大院生命農, ²名大 WPI-ITbM)

【目的】 COPII 被覆小胞は小胞体からゴルジ体への順行輸送を担う輸送小胞である。Sec31A は 1220 アミノ酸からなり、Sec13 とヘテロ四量体を形成し、細胞質から小胞体の COPII 小胞の出芽領域に動員され、COPII の外被覆を形成する。COPII 被覆小胞の形成メカニズムについては研究が進められているが、小胞の大きさや出芽のタイミングなどの制御機構の多くは解明されていない。私たちは、Sec31A の C 末端のプロリンに富んだ領域 (PRR, Pro-rich region) にカルシウム結合タンパク質 ALG-2 が相互作用することで小胞体からの輸送が制御されていることを報告した。Sec31A のアミノ末端領域は COPII ケージを構成するが、PRR を含む C 末端領域は COPII ケージに含まれないことから、Sec31A の C 末端領域に ALG-2 を含む複数のタンパク質が相互作用し、COPII の外被覆の形成を制御している可能性が考えられる。本研究では、そのような新規制御因子の探索と制御機構の解明を目的とした。

【方法・結果】 Sec31A の C 末端領域 (790-1220 a.a.) の N 末端に緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を融合したタンパク質 (SGFP2-Sec31A Ct) を恒常的に発現する HEK293 細胞と HeLa 細胞を樹立し、これらの細胞溶解液から GFP-Trap を用いて免疫沈降を行った。得られた免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開後に銀染色し、SGFP2 恒常発現細胞 (コントロール) にはないバンドを切り出して LC-MS/MS による解析を行った。しかし SGFP2-Sec31A Ct の分解物由来と考えられるバンドが多く検出され、特異性の判断が困難であった。そこで同様の方法で調製した免疫沈降産物を SDS-PAGE で展開し、ゲル全体を切り出して LC-MS/MS による解析を行った。この手法では免疫沈降産物中のタンパク質を網羅的に解析することができ、結果として 3 つのタンパク質が相互作用因子候補として挙げられた。現在はこれらのタンパク質の Sec31A との結合と局在様式について、免疫沈降や免疫染色による解析を行っている。

糸状菌の環境応答におけるミトコンドリアの機能的役割

○金丸京子、林早紀、小島憲介、平川卓実、木村真、小林哲夫（名大院生命農）

【目的】

発酵食品や医薬品の生産における糸状菌の高度利用には、糸状菌の生育環境に対する応答システムを理解することが不可欠である。研究対象の *Aspergillus nidulans* では、赤色光や低栄養条件下での有性生殖誘導や、浸透圧あるいは酸化剤や抗真菌剤などの各種ストレスに対する応答に、環境センサータンパク質（生物に広く存在する His-Asp リン酸リレー情報伝達機構のヒスチジンキナーゼ）が重要な役割を担う。近年、われわれは、HysA と名付けたヒスチジンキナーゼによるミトコンドリア機能変化が *A. nidulans* の形態形成に影響することを見いだした。本研究では、ストレス条件下での HysA の機能を検討し、糸状菌の環境応答におけるミトコンドリアの重要性について考察する。

【方法・結果】

各種ストレス条件（NaCl, Sorbitol, H₂O₂, EtOH, 低酸素）で野生株を培養し、膜電位を発生したミトコンドリアを検出する Mito Tracker Red で染色後、顕微鏡下で分生子柄や菌糸のミトコンドリアを観察した。上記どの条件でもミトコンドリア膜電位レベルが部分的に低下することを確認した。HysA 欠損株では、ストレスの存在しない条件でもミトコンドリア膜電位が同様に低下することから、上記の条件では HysA 機能が低下した結果と推定された。ミトコンドリアの膜電位の変化は ATP 合成に影響するため、野生株、HysA 欠損株の ATP 量を測定したところ、欠損株では野生株の 1/2 以下に低下していた。1% EtOH を含むストレス条件では、野生株の ATP 合成量も欠損株レベルまで低下したのに対して、欠損株では EtOH が存在しても ATP 量の顕著な低下が認められなかった。以上の結果は、HysA が環境ストレス下、ミトコンドリア機能を低下させ *A. nidulans* の生育に影響することを示唆した。

NSY マウスの 2 型糖尿病感受性遺伝子座 (*NiddInsy*) のコンジェニックマウスでの解析○村木紀之¹、小林美里¹、大野民生²、村井篤嗣¹、堀尾文彦¹(¹名古屋大院・生命農・応用生命、²名古屋大院・医学系)

【目的】

2 型糖尿病の発症にはインスリン分泌不全とインスリン抵抗性が関与しており、それらは遺伝因子と環境因子の両方の影響を受けている。NSY マウスは加齢に伴って軽度の肥満と 2 型糖尿病を自然発症するヒトの病態に類似した 2 型糖尿病モデルマウスである。遺伝解析により、NSY マウスの 2 型糖尿病形質をコントロールする QTL (*NiddInsy*) が第 11 番染色体 (Chr. 11) に同定されている。さらに、正常系統である C3H マウスに NSY マウスの Chr. 11 を置換したコンソミックマウスにおいて、糖尿病遺伝子の存在が証明されている。そこで本研究では 2 種のコンジェニックマウスの表現型解析により、*NiddInsy* の責任遺伝子の存在領域の限局を行った。

【方法】

対照系統である C3H に NSY の Chr. 11 を部分的に導入した 2 種のコンジェニックマウス R2 (セントロメア～72 Mb) と R2B (48～72 Mb) を C3H マウス、NSY マウスとともに高脂肪食で 4 週齢から 11 週間飼育した。8 週目以降に耐糖能試験、インスリン負荷試験、インスリン分泌能試験を行い、11 週目に解剖した。

【結果および考察】

NSY では C3H に比べて有意な高血糖、耐糖能低下、インスリン抵抗性が見られ、インスリン分泌不全の傾向が観察された。R2 では C3H に比べて有意な耐糖能低下が見られ、インスリン抵抗性とインスリン分泌不全の傾向も観察された。R2B ではこれらの表現型において C3H との有意な差は見られなかった。このことから、*NiddInsy* の少なくとも 1 つの責任遺伝子は、R2 領域の R2B と重複しない領域 (セントロメア～48 Mb) に存在することが示唆された。今後、その領域を断片化したコンジェニックマウスの作製を進めて、責任遺伝子の存在領域のさらなる限局を行う予定である。

DNA の低メチル化によって起こる DNA 損傷メカニズムに関する研究

○服部楓¹, 竹林慎一郎², 柴田隆豊¹, 緒方進¹, 緒方正人², 奥村克純¹ (¹三重大院生資, ²三重大院医)

【目的】 近年, 栄養成分の欠乏等によるエピジェネティクス異常と生活習慣病などの様々な疾患との関連性が注目されている. 我々はエピジェネティック修飾の一つであるゲノム DNA のメチル化が低下すると DNA 二本鎖切断が起こることを見出し, その分子機構モデルを提案している. DNA のメチル化は CG 配列の C に二本鎖両方に生じ, そのゲノム上のパターンは, DNA 複製時の維持メチル化反応により, 安定に維持されている. 栄養成分の欠乏によって, 細胞内のメチル化基質の供給不足や維持メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1) の発現低下により, 維持メチル化反応ができないと片方の DNA 鎖のみメチル化されたヘミメチル化 DNA が生じ, これに特異的に結合する UHRF1 が関与して DNA 損傷が起こるというモデルである. 本研究では, 三種の DNA メチル化酵素がノックアウトされたゲノム DNA が全くメチル化されていない ES 細胞(TKO)を用い, 人工的に細胞内にヘミメチル化部位を生じさせ, DNA 損傷誘導モデルを検証することを目的とした.

【方法・結果】 DNA メチル化酵素ノックアウト ES 細胞(TKO)の複製中の DNA 鎖に 2'-deoxy-5-methylcytidine 5'-triphosphate (5me-dCTP)を取り込ませることで, ゲノム DNA 上にヘミメチル化部位を人工的に生じさせ, 0, 9, 12, 15 時間後に回収した細胞に対し, 免疫蛍光染色法により細胞核内に形成される γ -H2AX (DNA 二本鎖切断マーカータンパク質)の局在の数をカウントすることにより DNA 損傷レベルを解析した. その結果, 局在の形成数は次の DNA 複製期を迎える 12 時間後以降に増加しており, DNA 複製依存的な DNA 二本鎖切断が誘導されていることがわかった. すなわち, 次の DNA 複製期を迎えると, ヘミメチル化部位に結合したままとなっている UHRF1 に複製装置が衝突し, DNA 二本鎖切断が引き起こされているというモデルを強く支持する結果となった. 栄養成分等の欠乏等によって起こるエピジェネティクス異常が生活習慣病等の疾患を導く可能性の一端を示すものである.

標準 RNA を用いた RNA のクオリティコントロール

○長谷川丈真¹, 高橋淳子², 岩橋均¹ (¹岐阜大学院応生, ²(独)産総研)

【目的】

細胞の生理学的状態を観察するとき, リアルタイム PCR やマイクロアレイ解析, RNAseq など, mRNA に着目した方法が広く用いられている. またこれらの実験手法の感度はますます向上している. 現在, 抽出 RNA の評価方法として, rRNA に着目した RIN 値の測定や, 吸光度による純度測定 (A260/A230, A260/A280)などが広く行われているが, これらは mRNA を直接評価しているわけではない. そこで本研究では, mRNA を直接評価できる, 外部標準 RNA(以下標準 RNA)を用いた新しい RNA の評価方法を確立することを目的とする.

【方法・結果】

本研究では RNA のクオリティに関する, 収率, ポリメラーゼ等への酵素反応阻害, RNA の分解の 3 つの観点に着目して, 標準 RNA を用いた RNA の評価方法の可能性を検討した. モデル実験として, 酵母または大腸菌から Hot Phenol 法で RNA を抽出した. 収率は, RNA 抽出実験の最初または各工程において標準 RNA を添加し, 得られた抽出 RNA 中の標準 RNA 量を定量することで評価した. 酵素反応阻害は, RNA 定量実験を行うとき, RNA テンプレートに標準 RNA を添加し, 定量結果に添加した標準 RNA の反映量を評価した. RNA の分解に関しては, 酵母または大腸菌の粗抽出液により標準 RNA を分解させ, 標準 RNA 上の各領域に対して RT-qPCR を行った. その結果, 3 つの観点において, 酵母と大腸菌で異なることが分かり, RNA の評価方法に標準 RNA が利用できる可能性を示した.

シロイヌナズナ小胞体局在アクアポリン SIPs の分子細胞生物学的研究
○佐藤良介¹, 榊原理恵¹, 宮本恭輔¹, 前島正義¹ (¹ 名大院生命農)

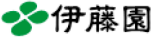
【目的】

植物アクアポリンは水や尿素、二酸化炭素などの分子を組織へ輸送する役割を担っており、この輸送を通じて細胞の分化や細胞伸長、生育に関与している。植物アクアポリンは主に構造や細胞内局在から PIPs、TIPs、NIPs、XIPs そして SIPs の 5 つのサブグループに分類される。このサブグループの中の small and basic intrinsic protein (SIP) の生理的役割が不明となっている。そこで 3 種 (SIP1;1, SIP1;2, SIP2;2) の SIP に注目し、分子細胞生物学的視点での機能解明を目的とする。

【方法・結果】

各 SIP における遺伝子欠損変異体を用いて解析を行ったところ、通常生育において各 *sip* 変異体の新鮮重は野生型と違いはなかったが、*sip2;1* 変異体ではアントシアニンの顕著な蓄積が観察された。また、植物に小胞体(ER)ストレス処理を施したところ、*sip2;1* 変異体において、ER ストレス応答の指標となる *BiP3* の発現上昇が観察された。つまり *sip2;1* 変異体は ER ストレスに対する感受性が高くなっている。これらのことから、SIP2;1 が小胞体において ER ストレス応答に関与していることが示唆された。一方、*sip1;1*、*sip1;2* の欠損変異体ではアントシアニンの蓄積や *BiP3* の発現上昇は確認されなかった。ここから、両遺伝子は ER ストレスには関わらないと推定され、SIP1;1 と SIP1;2 は他の機能を有している可能性が示唆された。

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

	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/
	伊那食品工業(株)	http://www.kantenpp.co.jp/
	加藤化学(株) 技術部	http://www.katokagaku.co.jp/
	(株)岐阜セラック製造所 品質保証部	http://www.gifushellac.co.jp/
	キリンビール(株) 名古屋工場	http://www.kirin.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/
	新日本化学工業(株) 研究部	
	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/
	中日本冰糖(株)	http://www.nakahyo.co.jp/
	(株)ニッポンジーン	http://www.nippongene.com/
	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/
	ヤマモリ(株) 桑名工場	http://www.yamamori.co.jp/
	養命酒製造(株) 商品開発センター	http://www.yomeishu.co.jp/

協力企業（五十音順）

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

平成 28 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 28 年 9 月 1 日現在 敬称略, 括弧内は本部役職)

支部長 (支部担当理事)

堀尾文彦 名古屋大学大学院生命農学 (理事)

副支部長

山口庄太郎 天野エンザイム(株)
(授賞選考委員)

吉村 徹 名古屋大学大学院生命農学

庶務幹事

木村 真 名古屋大学大学院生命農学

柴田秀樹 名古屋大学大学院生命農学

会計幹事

北浦靖之 名古屋大学大学院生命農学

児島孝明 名古屋大学大学院生命農学

支部幹事

生城真一 富山県立大学工学部

上野義仁 岐阜大学応用生物科学部

大久保勉 太陽化学(株) ニュートリション事
業部 (学術活動強化委員)

小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学
岸 幹也 (株) Mizkan Holdings
(和文誌編集委員)

木村哲哉 三重大学大学院生物資源学
(英文誌編集委員)

高橋正和 福井県立大学生物資源学部

林 利哉 名城大学農学部

平井浩文 静岡大学農学部

真壁秀文 信州大学大学院農学 (代議員)

増田修一 静岡県立大学食品栄養科学部
(JABEE 担当委員)

南 博道 石川県立大学生物資源工学研究所

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 (フェロー)

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

石島寿也 キリンビール(株) 名古屋工場

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学部

岩橋 均

岩本悟志

氏田 稔

梅川逸人

榎本俊樹

遠藤克秋

大澤俊彦

太田明徳

大塚正盛

大西利幸

奥村克純

小川浩一

小倉光雄

籠谷和弘

片山新太

加藤雅士

加藤康夫

苅田修一

金政 真

神田宗和

北島 健

木下徹也

熊澤茂則

倉根隆一郎

黒川洋一

児島雅博

堤坂裕子

坂井田和裕

栗冠和郎

里村武範

佐野元昭

塩谷茂信

下位香代子

下坂 誠

下村吉治

関根 章

岐阜大学応用生物科学部

岐阜大学応用生物科学部

名城大農学部

三重大学大学院生物資源学

石川県立大学生物資源環境学部

竹本油脂(株)

愛知学院大学心身科学部

中部大学応用生物学部 (相談役)

サンエイ糖化(株)

静岡大学農学部

三重大学大学院生物資源学

日本食品化工(株) 研究所

東海大学海洋研究所

辻製油 (株) 第一研究所

名古屋大学エコトピア科学研究所

名城大学農学部 (英文誌編集委員,
学術活動強化委員会幹事, 産学官学
術交流委員)

富山県立大学工学部

三重大学大学院生物資源学
(代議員)

中部大学応用生物学部

アステラスファーマテック (株) 富
山技術センター

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

伊藤園(株) 中央研究所

ポッカサッポロフード&ビバレッ
ジ (株) 調達部 (代議員)

三重大学大学院生物資源学

福井大学大学院工学

金沢工業大学ゲノム生物工学研究
所

東海物産(株) 食品研究所

静岡県立大学食品栄養科学部

信州大学繊維学部

名古屋大学大学院生命農学

科研製菓(株) 生産技術研究所

千 菊夫 信州大学農学部
鈴木英生 敷島スターチ(株)生産技術部技術課
鈴木大資 名糖産業(株)食品開発部
種部 勝 東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所
田村廣人 名城大学農学部(代議員)
近松 豪 新日本化学工業(株) 研究部
徳山真治 静岡大学農学部
長岡 利 岐阜大学応用生物科学部
中川 寅 岐阜大学応用生物科学部(代議員)
中川智行 岐阜大学応用生物科学部
中野秀雄 名古屋大学大学院生命農学
中村浩蔵 信州大学農学部
中村宗一郎 信州大学大学院農学
中村圭伸 物産フードサイエンス(株)
中山俊裕 (株)岐阜セラック製造所品質保証部
中山幸晴 (株)三和化学研究所
南条文雄 三井農林(株)食品総合研究所
西川俊夫 名古屋大学大学院生命農学
西田洋巳 富山県立大学生物工学研究センター(代議員)
西村篤寿 イチビキ(株)技術開発部
朴 龍洙 静岡大学グリーン科学技術研究所
(英文誌編集委員)
早川享志 岐阜大学応用生物科学部
原 正和 静岡大学農学部

人見清隆 名古屋大学大学院創薬科学
(和文誌編集委員)
日野真吾 静岡大学農学部
福井敏夫 中日本冰糖(株)
藤田智之 信州大学大学院農学
保坂 毅 信州大学農学部
星野一宏 富山大学大学院理工学研究部
本多裕之 名古屋大学大学院工学
前島正義 名古屋大学大学院生命農学
牧 正敏 名古屋大学大学院生命農学
(代議員, 倫理委員)
間瀬民生 相山女学園大学生生活科学部
松田 幹 名古屋大学大学院生命農学
松見 繁 養命酒製造(株)商品開発センター
松本裕子 ヤマモリ(株)開発研究所
三沢典彦 石川県立大学生物資源工学研究所
三澤博之 アサヒビール(株)名古屋工場
村澤久司 旭松食品(株)食品研究所
森上 敦 名城大学農学部
森田達也 静岡大学農学部(英文誌編集委員)
森山龍一 中部大学応用生物学部
山口秀明 名城大学農学部
山田康弘 カネハツ食品(株)技術部
米田祐康 (株)ニッポンジーン
和田 正 フジ日本精糖(株)研究開発室
(代議員)

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
日本農芸化学会中部支部第 177 回例会
講演要旨集

平成 28 年 9 月 24 日 発行

編集発行人: 日本農芸化学会中部支部 支部長 堀尾 文彦

名古屋市千種区不老町 名古屋大学 東山キャンパス内