



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 179 回例会

講演要旨集

受賞講演

平成29年度農芸化学女性若手研究者賞，農芸化学女性研究者賞，農芸化学奨励賞

および

ミニシンポジウム

化学と生物の接点～ケミカルバイオロジーの
最前線

平成 29 年 6 月 24 日 (土)

信州大学伊那キャンパスF棟30番講義室

主催：日本農芸化学会中部支部

共催：信州大学大学院総合理工学研究科 農学専攻

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部

第 179 回例会

平成 29 年 6 月 24 日 (土)

信州大学伊那キャンパスF棟30番講義室

主催：日本農芸化学会中部支部

共催：信州大学大学院総合理工学研究科 農学専攻

(信州大学農学部講義棟12, 13, 14, 15番講義室にて)

11:00-12:30 農芸化学関連企業に就職を考えている学生のための企業展

(信州大学伊那キャンパス F 棟 30 番講義室にて)

13:00-13:10 開会の挨拶

受賞講演 平成 29 年度農芸化学若手女性研究者賞

13:10-13:40 「食品由来機能性成分による免疫調節作用メカニズムに関する研究」

田中沙智 (信州大学大学院総合理工学研究科 農学専攻)

13:40-14:10 「有用タンパク質の微生物生産とその産業利用に関する研究」

加藤 晃代 (名城大学農学部)

受賞講演 平成 29 年度農芸化学女性研究者賞

14:10-14:40 「酸性糖鎖ポロアシル酸の新機能の発見とその応用展開」

佐藤 ちひろ (名古屋大学生物機能開発利用研究センター)

受賞講演 平成 29 年度農芸化学奨励賞

14:40-15:10 「菌類が産生する機能性物質に関する研究」

崔 宰熏 静岡大学大学院農学領域 (静岡大学大学院農学領域)

15:10-15:30 休憩

ミニシンポジウム 化学と生物の接点～ケミカルバイオロジーの最前線

15:30-16:10 「次世代型抗インフルエンザ薬を指向したシアリダーゼ阻害剤の設計」

清田 洋正 (岡山大学大学院環境生命科学研究科)

16:10-16:50 「細胞内信号伝達系の調節を指向した中分子戦略」

大神田 淳子 (信州大学大学院総合理工学研究科 農学専攻)

17:00 懇親会 (信州大学農学部生協)

食品由来機能性成分による免疫調節作用メカニズムに関する研究

田中 沙智（信州大学大学院総合理工学研究科農学専攻）

免疫系が正常に作用するためには、正確かつ迅速な自己・非自己の異物認識、それに続く免疫細胞の活性化や過剰な免疫反応の抑制など、免疫系のバランスを維持することが重要である。しかしながら、食生活の乱れやストレスなどの体内環境を悪化させる様々な要因により免疫バランスを適切に制御できない「免疫バランスの破綻」が起こると、がんやアレルギー、自己免疫疾患、感染症などの発症につながる事が示唆されている。免疫バランスを維持するためには、免疫機能を調節する食材を毎日の生活の中で摂取することが簡便、且つ効果的であると考える、私はこれまでに、黒豆の一種である「黒千石」、キク科の野菜「春菊」、および信州の伝統野菜の一種である「野沢菜」に免疫機能調節作用があることを明らかにしている。本講演の前半部分では野沢菜による免疫賦活作用とそのメカニズムについて、後半ではポリフェノールの一種であるプロシアニジン B2 ガレートによる T 細胞の機能制御について報告する。

野沢菜による免疫賦活作用とそのメカニズム

信州の伝統野菜の一つである「野沢菜」に着目し、野沢菜の熱水抽出物不溶性画分（HIS）を調製し、マウス脾臓細胞に添加して 48 時間の培養を行ったところ、IFN- γ 産生が強く誘導されることを見出した。次に、野沢菜の樹状細胞に対する影響を骨髄由来樹状細胞（BMDC）を用いて検討したところ、細胞表面抗原（MHC クラス I およびクラス II、CD86、CD40）の発現が増加し、IL-12 産生レベルが有意に増加した。さらに、野沢菜の HIS の刺激で IFN- γ を産生する細胞を同定したところ、IFN- γ 産生細胞は NK1.1 陽性細胞であることが確認されたことから、野沢菜は樹状細胞からの IL-12 産生を促し、NK 細胞からの IFN- γ 産生を誘導することが示された。加えて、野沢菜の活性成分の認識機構について、レセプターの中和抗体や阻害剤などを用いて検証したところ、Toll-like receptor（TLR）2 や TLR4、カルシウム依存性にレセプターと結合する C 型レクチンレセプターなどが関与することが示された（図 1）。野沢菜のマウス生体内での免疫機能制御について評価するために、調製した野沢菜の HIS をマウスに経口投与したところ、脾臓細胞での NK 活性が有意に増加し、IL-2+IL-12 で刺激したときの IFN- γ 産生が有意に増加した。加えて、腸内細菌への影響を検証するために、マウスに野沢菜の HIS を経口摂取させ、結腸および盲腸の消化管内容物を採取し、腸内細菌叢の構成比の変動を解析したところ、日和見菌の一種で酢酸を生成するバクテロイデテスが低下し、酪酸濃度が増加した。

このときのマウス脾臓の免疫担当細胞について調べたところ、制御性 T 細胞の割合が増加する傾向にあった (1)。以上のことから、野沢菜の摂取により、腸内細菌叢が変動して酪酸濃度が増加し、免疫状態が変化することが示された。今後は、野沢菜の活性成分の同定と野沢菜漬けによる免疫機能制御についても詳細に検討したいと考えている。

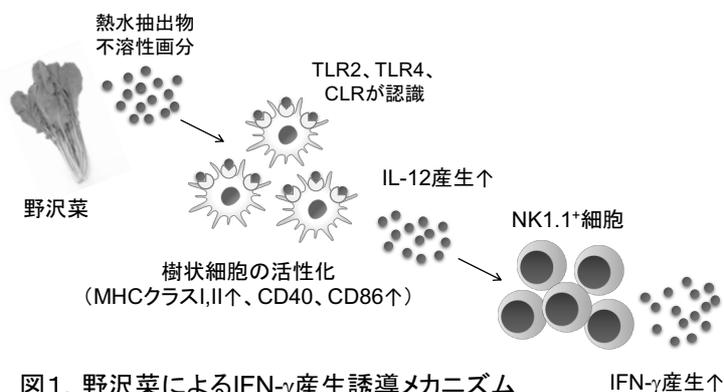


図 1. 野沢菜による IFN- γ 産生誘導メカニズム

プロシアニジン B2 ガレートによる T 細胞の機能制御

ポリフェノール的一种であり多くの植物に含まれるプロシアニジン B2 (PCB2) は、マクロファージからのサイトカイン産生を抑制し、過剰な炎症応答を制御することが報告されている。ガレート基を有する PCB2 は、水酸基を豊富にもつことから機能的であり、T 細胞の機能制御にも関与する可能性が考えられる。そこで、PCB2 とそのガレート (PCB2 3-OG、PCB2 3"-OG、PCB2 3,3"-di-OG) をマウス脾臓細胞に添加し、抗 CD3 抗体刺激で T 細胞から産生されるサイトカインに対する影響を調べた結果、PCB2 3,3"-di-OG の添加により脾臓細胞からの IFN- γ および IL-17 産生が有意に低下した。また、PCB2 ガレートが作用する細胞を同定した結果、T 細胞での IFN- γ 産生が抑制されることが示された。加えて PCB2 3,3"-di-OG は、単離した CD4 および CD8 陽性 T 細胞からの IFN- γ 産生も有意に抑制した。さらに IFN- γ の転写因子である T-bet、および IL-17 の転写因子である ROR γ t 発現への影響を調べたところ、PCB2 3,3"-di-OG の添加によって T-bet および ROR γ t 発現は有意に減少した (図 2)。以上のことから、PCB2 ガレートは T 細胞に直接作用し、T-bet および ROR γ t 発現を抑制することで IFN- γ および IL-17 産生を制御することが明らかとなった (2)。今後は、T 細胞関連自己免疫疾患モデルマウスを用いて、PCB2 ガレートの生体内での効果について評価していきたい。

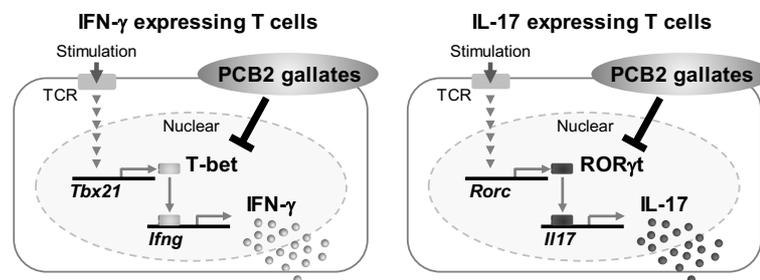


図2. プロシアニジンB2ガレートによるT細胞のサイトカイン産生制御

引用文献

1. Tanaka S, et al. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 82, 2693-2699, 2016.
2. Tanaka S, et al. International Immunopharmacology, Vol. 44, 87-96, 2017.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御助言と御指導を賜りました信州大学農学部の中村宗一郎教授、藤井博教授、真壁秀文教授、米倉真一准教授、上野豊助教、東北大学大学院農学研究科の麻生久教授、北澤春樹准教授、北海道大学遺伝子病制御研究所の北村秀光准教授に深謝申し上げます。また、本研究に関わる実験にご協力いただいた学生諸氏に深く感謝いたします。

略歴

田中 沙智 (たなか さち)

2009年 3月 東北大学大学院農学研究科博士課程後期修了 博士 (農学) 取得

2009年 4月 北海道大学遺伝子病制御研究所免疫制御分野 日本学術振興会特別研究員 (PD)

2012年 4月 帯広畜産大学原虫病研究センター生体防御学分野 特任研究員

2013年 10月 信州大学農学部近未来農林総合科学教育研究センター 助教 (テニュアトラック)

現在に至る

有用タンパク質の微生物生産とその産業利用に関する研究

加藤 晃代（名城大学農学部）

はじめに

有用タンパク質の探索・微生物生産は研究のみならず産業においても重要性が高い。著者は、主に食品産業分野での微生物・タンパク質利用およびそれらによる技術開発を目指し、有用糖質合成酵素、質量分析を用いた微生物同定技術、モノクローナル抗体取得技術、およびタンパク質の大量生産法などに関する研究開発を展開してきた。本講演では下記について発表する。

1. 糖転移酵素 α -グルコシダーゼ(AG)

AG は、マルトオリゴ糖の加水分解および糖転移活性を有する酵素であり、食品産業においては主に糸状菌由来酵素が分岐オリゴ糖や配糖体の合成に使用されている。

著者らは、糖転移活性が高く、かつ副産物が少ない AG による配糖体合成法の確立を目指し、自然界から AG を探索した。その結果、好塩性の *Halomonas* sp. H11 株より、糖転移効率が高く、様々なアルカリ金属塩に活性化される興味深い特性を有する新規 AG を見出した。

本 AG は、マルトースを糖供与体、グリセロール、エタノールなどのアルコール性 OH 基を有する物質を糖受容体としたときに配糖体を高効率で合成可能であり、三糖以上の副産物を殆ど生成しないという特徴を有していた。また、他起源酵素では配糖化が困難であったショウガ成分 6-ジンゲロールに対する糖転移活性も高く、約 60%の変換効率でジンゲロール配糖体を合成できることが分かった。本配糖体は水に可溶で熱に安定であることから、食品・化成品素材として有用と考えられた。

2. 異性化酵素セロビオース 2-エピメラーゼ(CE)

CE をラクトースに作用させると、還元末端のガラクトースがマンノースに異性化した希少糖エピラクトースを生成することができる。本糖は、プレバイオティクス効果やミネラル吸収促進効果などの機能が見出されている。著者らは、工業利用に必要な 60℃以上の耐熱性と反応性能を有する海洋性微生物 *Rhodothermus marinus* 由来 CE を見出し、酵素工学的諸性質を明らかにすると同時に本酵素による高純度エピラクトース生産プロセスを開発した。

3. 質量分析計 MALDI-TOF MS による食中毒菌の迅速識別

マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS) による微生物同定法は、その利便性および迅速性から、臨床微生物検査分野を中心に急速に拡大している。しかし、従来のフィンガープリント法においては、種以上の詳細な識別が困難な場合があった。

著者らは、ゲノミクスとプロテオミクスを融合したプロテオタイピング法の一つで名城大学田村らのグループにより開発された、*S10*-GERMS 法 (*S10*-*spc*-*alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) を基とし、食中毒細菌の血清型レベルでの識別法および高精度細菌識別ソフトウェア Strain Solution (現在、島津製作所より販売) を開発した。これにより、大腸菌 O157 に代表される腸管出血性大腸菌やリステリア菌などの食中毒細菌の血清型を MALDI-TOF MS にて迅速に識別することが可能となった。

4. モノクローナル抗体(mAbs)の迅速取得法

mAbs は医薬・診断に汎用されているが、一般的に用いられているハイブリドーマ法による抗体取得や動物細胞による抗体生産には多大な時間と労力が必要である。

一方、筆者らのグループでは、B細胞1細胞からのPCRと無細胞タンパク質合成系を組み合わせた、迅速 mAbs 抗体取得法を開発してきた。本手法では、mAbs を Fragment of antigen binding (Fab)として *in vitro* で発現・評価するため、動物細胞発現系を用いた系と比較し迅速化が容易である。しかし、同じ動物種から得られた mAb 遺伝子であっても、クローンによって Fab の形成効率および生産量そのものが低いことが課題であった。そこで、まず Fab 形成効率を改善するために抗体重鎖と軽鎖の末端に互いに接着するロイシンジッパーペプチド付加した「Zipbody」を開発し大腸菌の無細胞タンパク質合成系で活性型の Fab を生産することを可能とした。さらに、タンパク質生産量を改善するために、後述する「N 末端 SKIK ペプチドタグ」を考案し、抗体を大腸菌発現系において大量生産可能とする技術を開発した。Zipbody と SKIK タグの組み合わせにより、様々な食中毒菌に対するウサギ mAbs の創出と大腸菌による大量生産系を確立し、動物の B 細胞 1 個から 2 日間の操作で抗体遺伝子を取得・評価することが可能となった。

5. タンパク質の大量生産を可能とする N 末端ペプチドタグ

遺伝子によって大腸菌におけるタンパク質発現量が異なることは、タンパク質の評価ならび実用化において最大の課題となる場合がある。通常、そのような「難発現タンパク質」の発現量を増大させるためには、コドン・培地・誘導条件の最適化、可溶性タンパク質と融合発現、さらには宿主-ベクター系の見直し等の手間と時間のかかる検討を要する。

著者らは、本課題を簡便に解決する手段を模索するために、大腸菌で元来高発現なタンパク質の N 末端アミノ酸配列傾向を報告する一本の論文から着想を得、難発現タンパク質の N 末端に Ser-Lys-Ile-Lys から成る 4 アミノ酸のペプチドタグ (SKIK タグ) を付加し発現するのみで、大腸菌におけるタンパク質発現量を数十～百倍に増大可能であることを見出した。本現象のメカニズムは謎であるが、SKIK タグの付加により細胞内 mRNA コピー数当たりの翻訳効率が 100 倍以上にも効率化することでタンパク質生産量が增大している可能性を明らかにした。

略歴

加藤 晃代 (かとう てるよ) 2008 年名古屋大学生命農学研究科博士課程前期修了・同年日本食品化工株式会社入社／2013 年博士 (農学) 取得／2012 年～2016 年知の拠点あいち重点研究プロジェクト「食の安全・安心技術開発プロジェクト」研究員・名古屋大学生命農学研究科研究員／2016 年名城大学総合研究所研究員／現在名城大学農学部・日本学術振興会特別研究員

酸性糖鎖ポリシアル酸の新機能の発見とその応用展開 佐藤ちひろ（名古屋大学生物機能開発利用研究センター）

糖鎖はタンパク質、核酸に次ぐ第3の生命鎖といわれており、その構造と機能を解明することは生命を理解する上で必須な課題である。特に細胞表面では、細胞膜や細胞外に存在するタンパク質のほぼ全てが糖鎖修飾を受けており、その結果100-200nm程度の厚いGlycocalyx（糖衣）により覆われている。従って糖鎖は細胞の顔として細胞外とのコミュニケーションに深く関わる重要な生体高分子と位置づけられている。このような外界に向かって最先端に存在する糖鎖の最末端構造(非還元末端)は、糖の中でも特に特徴的な酸性9炭糖、シアル酸によりキャップされている。このシアル酸は外界からの変化を最先端で鋭敏に受けとり変化させることができる機能性糖残基であり古くから注目されて研究されてきている。これまでに受精・発生・分化・免疫・脳機能・疾患など多岐にわたる生物学的現象において重要な役割を担っていることが明らかにされている。また、ウイルスが細胞に進入する際の足場としても用いられており、細胞表面のシアル酸を制御することは医薬・食品開発において重要な課題であり、ターゲット分子として注目されている。シアル酸は通常、1残基が1本の糖鎖の最外部(非還元末端)に結合したモノシアル酸として存在するが、まれにその末端シアル酸残基の上にさらにシアル酸の直鎖ポリマーが結合するポリシアル酸 (polySia, PSA) 構造として存在する場合がある。polySiaはその発見のほとんどが胎児脳および癌細胞であったことから、癌胎児性抗原として古くから注目され、特にpolySia修飾をうけた神経細胞接着分子(NCAM) (polySia-NCAM)を中心に世界的に研究が進んでいる。これまでにNCAM上のpolySia構造は、そのほとんどが胎児脳に一過的な発現をすること、成体脳では神経の可塑性が保たれている領域、海馬や嗅球などに偏在していること、その巨大な排除体積によって接着分子の接着能を負に制御し、細胞間相互作用を抑えるような反発性の空間を提示することにより、脳の正常な発達を促し、学習・記憶、行動、体内時計の正常な維持に関わると考えられて来た。しかし、以下の我々自身の4つの研究成果から、シアル酸重合体(di/oligo/polySia)構造の超多様性と新機能が明らかになりつつあり、polySia鎖が及ぼす機能の底流となる分子メカニズムを再度検証する必要性に迫られている。またその新機能に基づく応用研究も展開中である。

私はこれまでにポリシアル酸鎖の構造多様性の発見し(1-3)、シアル酸重合体の検出法の開発をもとにしたdi/oligo/polySia鎖の普遍的存在証明(2-8)を行い、「シアル酸の重合度が精緻に制御されることによって糖タンパク質の機能が制御される」という糖タンパク質の機能調節メカニズムの提唱に至っている(9)。またこれまで反接着作用しか考えられていなかったpolySia鎖が、脳由来神経栄養因子(BDNF)をはじめとするニューロトロフィン類(11-15)、増殖因子(FGF-2)(13-16)、カテコールアミン系神経伝達物質(ドーパミン(DA))(13)などのいずれも脳機能に深く関わる液性因子を保持し制御する新機能を明らかにしてきた。これらの液性因子とpolySia-NCAM上のpolySia鎖の分子間力を表面プラズモン共鳴法(SPR)やフロンタルアフィニティークロマトグラフィーなどの手法を用いて解析する技術を開発し(3, 15, 17)、それらの方法によってこれらの因子はpolySiaの重合度特異的に結合していること、polySia鎖は親和的な空間を形成しており、神経作用因子とその受容体との相互作用が関わるシグナル伝達を、既知のヘパラン硫酸鎖のようなグリコサミノグリカン鎖とは異なる機構で制御していることを示した(3)。さらにpolySia鎖からの分子の放出メカニズムに関して、エキソソーム上のシアリダーゼによるpolySia鎖の分解によるBDNFの放出機構を明らかにしたほか(10)、

FGF2 の場合は、FGFR に受け渡す前にヘパラン硫酸に受け渡す機構があること(16)、インタクトな FGF2 の構造特異的に結合することでプロテアーゼからの保護機構があることを明らかにした(15)。一連の研究により polySia 構造が神経系細胞表面にあって様々な神経作用因子を保持する微小糖鎖空間を作り出すこと、その空間は脳内環境の変化によって形成・消失し、その変化に応じた神経作用因子の提示が実現されるという「Retain and Release 仮説」を提唱するに至った (3)。さらに polySia 鎖における retain and release 機能を鑑み、この polySia 鎖が醸し出す空間はきわめて厳密に制御され、この空間の不全が疾患を導くという仮説を立て (3,18)、その仮説を証明するために精神疾患に着目した研究も行ってきている。近年、ゲノムワイドな研究からポリシアル酸を生合成する酵素 ST8SIA2 遺伝子の一塩基多型(SNPs)が精神疾患、特に統合失調症、双極性障害と関連性があることが示唆されている(3,18,19)。しかしこれまでの研究は、ゲノム配列と疾患の統計学的な関連性の報告しかなく、生化学的な解析は全く手つかずであった。そこで、統合失調症患者で見つかったアミノ酸置換を伴う変異(cSNP)と伴わない変異(sSNP) (13-15)、双極性障害患者および自閉症での関連性が示唆されるイントロン領域の変異(iSNP) (20)、日本人と中国人の統合失調症患者で示唆される制御領域の rSNP に着目して、その酵素発現および反応産物の構造及び分子結合性に対する機能解析を詳細に行ってきた。その結果、いずれの疾患に関わる SNPs も、酵素の発現量および反応産物の機能が損われる事が明らかになり、polySia 鎖の破綻が疾患の原因の一端を担う可能性を示すことができた。現在は環境要因における polySia 鎖の変動のメカニズムの解析を行うと共に、応用的な観点からシアル酸を中心とした医薬品の開発を進めている。

(引用文献)

(1) Sato C, et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 23675-23684. (2) Sato C, et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 15422-15431. (3) Sato C, and Kitajima K. (2013) J. Biochem. 154, 115-136. (4) Sato C, et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 2575-2582. (5) Sato C, et al. (1999) Anal. Biochem. 267, 102-109. (6) Sato C, et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 18923-18928. (7) Sato C, et al. (1998) J. Biol. Chem. 273, 2575-2582. (8) Inoko E, et al. and Sato C. (2010) Glycobiology 20, 916-928. (9) Sato C. (2004) Trends Glycosci. Glycotech. 16, 331-344. (10) Sumida M, et al. and Sato C. (2015) J. Biol. Chem. 290, 13202-13214. (11) Kanato Y, Kitajima K and Sato C. (2008) Glycobiology 12, 1044-1053. (12) Kanato Y, et al. and Sato C. (2009) Biosci. Biotech. Biochem. 73, 2735-2741. (13) Isomura R, et al. and Sato C. (2011) J. Biol. Chem. 286, 21535-21545. (14) Hane M, et al. and Sato C. (2012) Pure Appl. Chem. 84, 1895-1906. (15) Hane M, et al. and Sato C. (2015) Glycobiology 10, 1112-1124. (16) Ono S, et al. and Sato C. (2012) J. Biol. Chem. 287, 3710-3722. (17) Sato C et al. (2010) Methods in Enzymology (Minoru Fukuda ed. in glycomics) Elsevier science, 478, pp219-232. (18) Sato C and Kitajima K. (2013) Front. Cell. Neurosci. 7, 61 (1-11). (19) Sato C, Hane M and Kitajima, K. (2016) Biochim. Biophys. Acta. 1860, 1739-1752. (20) Hane M., Kitajima K and Sato C. (2016) Biochem. Biophys. Res. Commun. 478, 1123-1129.

略歴

佐藤ちひろ (さとうちひろ)

1992年 東京大学理学部生物化学科卒業

1994年 東京大学大学院理学系研究科修士課程修了

1997年 東京大学大学院理学系研究科博士課程修了

1997年 理学(博士)取得

1996-1998 日本学術振興会 特別研究員(DC2/PD)

1998-2001 日本学術振興会 特別研究員(PD)

2001-2001 名古屋大学生物分子応答研究センター 研究機関研究員

2001-2005 名古屋大学大学院生命農学研究科応用分子生命化学専攻応用生命化学講座助教

2005-現在 名古屋大学生物機能開発利用研究センター 准教授

菌類が産生する機能性物質に関する研究

崔 幸熏（静岡大学大学院農学領域応用生物化学系列）

はじめに

菌類とは、一般にキノコ・カビ・酵母と呼ばれる生物の総称であり、菌界に属する生物を指す。外部の有機物を利用する従属栄養生物である。その中のキノコを対象とした小分子である機能性物質や薬理活性物質の天然物化学的研究は他の生物種のそれに比較して多いとは言えない。筆者らは菌類（主にキノコ）が産生する植物成長調節物質、小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制物質、破骨細胞形成阻害物質について現在に至るまで研究してきた。以下に研究成果の概要を紹介する。

1. 植物成長調節物質

本研究に関する最新の成果は Nature 誌（505 巻 298 頁 2014 年）やアメリカ化学会 Chemical & Engineering News（92（4）2014 年 1 月 27 日発行）などに紹介されている。それらの内容と現在研究している内容を紹介する。芝が大きな曲線を描いて周りに比較して色濃く繁茂し、時には成長が抑制され、後にキノコが発生するフェアリーリングという現象が知られている。「妖精が輪を作ってその中で踊る」と伝えられてきたこの現象について、最初の科学論文が報告されたのは 1675 年のことである。この論文が Nature 誌（29 巻 384 頁 1884 年）に紹介されて以降 330 年間、妖精の正体（芝を繁茂させる原因）は謎のままであったが、筆者らが微生物と植物が織りなすこの神秘の謎に初めて化学のメスを入れ、遂にその妖精の正体を明らかにした。実際に静岡大学キャンパスでコムラサキシメジ（*Lepista sordida*）によるフェアリーリングが現れたことから、その菌類を用い研究開始のきっかけになった。シバ生長促進物質 2-アザヒポキサンチン（AHX）とシバ成長抑制物質イミダゾール-4-カルボキシアミド（ICA）の単離・同定に成功した。さらに AHX は植物体内で 2-アザ-8-オキソヒポキサンチン（AOH）に代謝されることを見出した。これら 3 つ化合物を、Nature 誌がこの研究を紹介した記事の見出し“fairy chemicals”から“フェアリー化合物（FCs）”と命名した。イネやコムギなど調べた全ての植物の成長をその属する科に関わらず調節し、植物に普遍的に内生していることを明らかにした。さらに、イネの cDNA マイクロアレイや RT-PCR の検討によって、FCs は既知の植物ホルモンとは全く異なる挙動を示すこと、GST, BBI, OsTIP2;1 の発現量が大きく増大された。それらの遺伝子発現促進により、温度や塩など非生物学的ストレスに対する耐性をイネに与えること、そしてアンモニア態窒素と全窒素のイネへの吸収を大幅に高めて成長を促進することを明らかにした。FCs は 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA) から化学的に合成される。AICA はあらゆる生物に存在しているが、その化合物の代謝については全く不明であったため、筆者らは、化学合成経路と同じく AICA が AHX に代謝される経路が植物に存在すると仮定して研究を行い、新規プリン代謝経路を発見した。さらに、AICA リボチド(AICAR)から AHX リボチド(AHXR)と AOH リボチド(AOHR)を経て AHX と AOH に代謝されるのは hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT)が触媒することを考えた。その HGPRT を大腸菌に形質転換し、HX と IMP の可逆的な変換活性を持つタンパク質が得られ、その酵素で AHX と AOH が触媒することが明らかになった。また FCs を処理したイネに新たな代謝産物が産生することを明らかになり、それらの代謝産物の精製と構造決定に成功した。L. *sordida* における AHX 及び ICA の生合成に L-Arg が関与していること、nitric oxide synthase (NOS) によって L-Arg から生成する NO が関与している。また、コムラサキシメジゲノムからタンパク質同

定に利用可能な LC-MS/MS 解析用のデータベースの構築も行った。さらに、活性を有するタンパク質同定用の FCs を結合させたプローブ分子の合成と FCs の実験室における簡易大量合成法も成功しそれらを用い他の代謝産物と生合成・代謝に関わるタンパク質についても、研究が進行中である。以上の知見から、筆者らは「FCs は新たな植物ホルモンである」可能性が高いと考えている。このように、本研究は FCs を新規植物ホルモンとして位置づけ、植物のストレス生理学あるいは新規植物成長調節物質の開発研究に新たな切り口を提供すると期待される。

2. 小胞体ストレス誘導神経細胞死抑制物質

認知症の発症のメカニズムは多岐にわたり、未解明な部分も多い。アルツハイマー病などの一因とされる小胞体ストレス誘導細胞死を抑制する物質の探索研究を行い、ブナハリタケ、アカヤマドリ、オオシロアリタケから活性物質を単離に成功した。

3. 破骨細胞形成阻害物質

骨粗鬆症の予防及び治療には破骨細胞による骨吸収を抑制することが有効と考えられ、菌類抽出物の破骨細胞形成阻害スクリーニングの結果をもとに研究を行い、マコモタケ、アンニンコウ、アカヤマドリ、チャジュタケから活性物質の単離に成功した。

おわりに

本研究では様々な菌類から生物活性を持つ化合物のスクリーニングを行い、菌類が生産する天然物は興味ある化合物を多数報告している。このような新規リード化合物の探索することで、フェアリーリングの研究のように大きな研究につながった。多くの生物の全ゲノム情報が判明しているが、生命現象を直接制御しているのは小分子であり、このことが天然物化学研究の重要性を示している。特にキノコと生物間の共存・共生下の現象に興味があり、挑戦している。

謝 辞

本研究のすべては、静岡大学農学部において行われてものです。本研究を行う機会を与えていただき、特に博士課程時代からこれまで終始一貫してご指導とご激励で興味深い分野に飛び込んでいく機会をいただきました静岡大学・河岸洋和先生に心より深く感謝を申し上げます。また、ご指導を賜った静岡大学農学部の諸先生方にも深謝申し上げます。最後に、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会中部支部長・堀尾文彦先生（名古屋大学教授）に厚く御礼申し上げます。

略 歴

崔 宰熏（ちえ じえふん）

2003年2月 建国大学 Animal Product Science 卒業（韓国ソウル）

2005年2月 建国大学 大学院 Animal Product Science 修士課程修了（韓国ソウル）

2009年3月 静岡大学 創造科学技術大学院 バイオサイエンス専攻 博士課程修了

2009年4月 静岡大学 農学部 学術研究員

2012年4月 静岡大学 創造科学技術大学院 特任助教

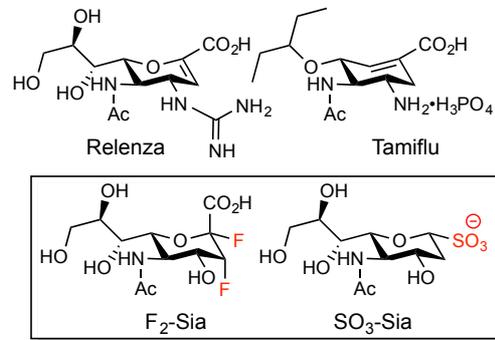
2014年3月 静岡大学 大学院 農学研究科 助教

2015年4月 静岡大学 学術院 農学領域 助教（現在に至る）

次世代型抗インフルエンザ薬を指向したシアリダーゼ阻害剤の設計

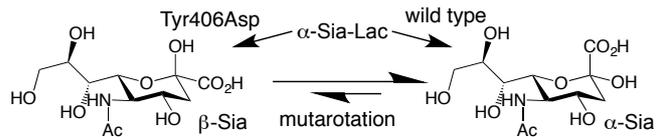
清田 洋正 (岡山大学 大学院環境生命科学研究科)

新規なインフルエンザ治療薬の開発は、パンデミックに備えるために重要な課題である。ウィルス
の出芽段階で機能するシアリダーゼを標的とした創薬が展開され、推定遷移状態アナログである
Relenza、Tamiflu、Inavir、Rapiacta が上市されたが、頭痛、めまい、異常行動などの副作用や抵抗性株の出現が問題
となっている。これ迄、詳細な酵素反応機構が未確定であったことが、新規な作用機序をもつ薬剤の開発を阻ん
できた。私は、インフルエンザ・シアリダーゼの機構を Tyr406 残基が関与する二重反転（保持）機構であること
を明らかにし、不可逆的阻害剤 F₂-Sia 及び次世代型阻害剤 SO₃-Sia の開発に成功した。



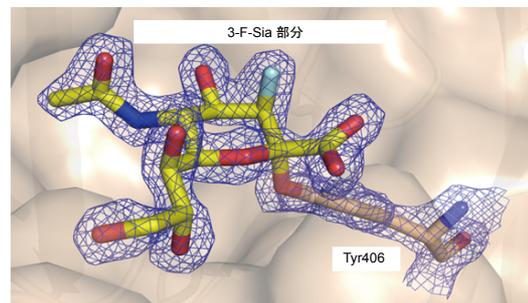
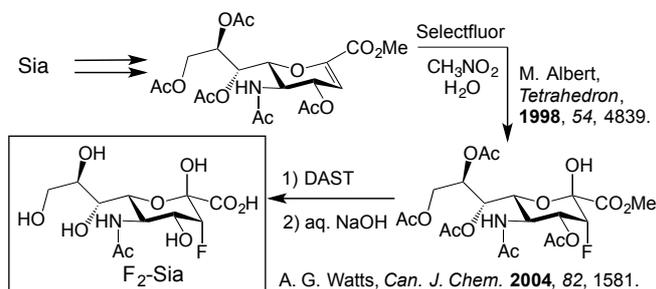
1. インフルエンザ・シアリダーゼの酵素触媒機構の解明 (Tyr406)

アジアインフルエンザ (A/H2N2 亜型) シアリダーゼの変異体 Tyr406Asp では、酵素の K_{cat} は 1/100
に、 K_m は 1/2 に低下した。また、3'-sialyllactose を加水分解すると、野生株酵素では立体配置保持の
 α -sialic acid (Sia) が、変異体では β -Sia が生
成した。即ち、加水分解反応は Tyr406 の基
質シアル酸残基 2 位への求核攻撃を含む二重
反転機構であることが示唆された [1]。



2. 共有結合型（不可逆的）阻害剤の開発 (Difluorosialic Acid, F₂-Sia)

Tyr406 の OH 基を標的とする共有結合阻害剤として 2 α ,3 α -difluorosialic acid (F₂-Sia) に着目した。2
位 F 基は Tyr406 との反応性の向上、3 位 F 基は Tyr406 とのシアロシド結合の安定化に働くと考え、大
類らの報告 [2] を元に改良合成を行った。Sia から既知物質を経て、Selectfluor、DAST を用いて順
次 F 基を導入し、F₂-Sia を合成した。酵素との共結晶の X 線解析で Tyr406 残基と F₂-Sia との間にグ
リコシド結合が確認され、上記加水分解の機構が明らかになった [1]。



F₂-Sia は、B 型ウィルス、タミフル耐性
株のシアリダーゼに阻害活性を示した [1]。
立体異性体 ($\beta\beta$ -F₂-Sia) は不活性であった。

	インフルエンザ・シアリダーゼ阻害活性 IC ₅₀ (μ M)			
	Relenza	Tamiflu	F ₂ -Sia	$\beta\beta$ -F ₂ -Sia
パンデミック H1N1 (2009)	1	10	1000	10 ⁷
低病原性カモ H5N1	1	10	1000	10 ⁷
タミフル耐性株 H1N1	10	10 ⁵	100	10 ⁷
A ソ連型 H1N1	1	10	10	10 ⁷
A 香港型 H3N2	100	1	100	10 ⁷
B 型	10	10	10	10 ⁷

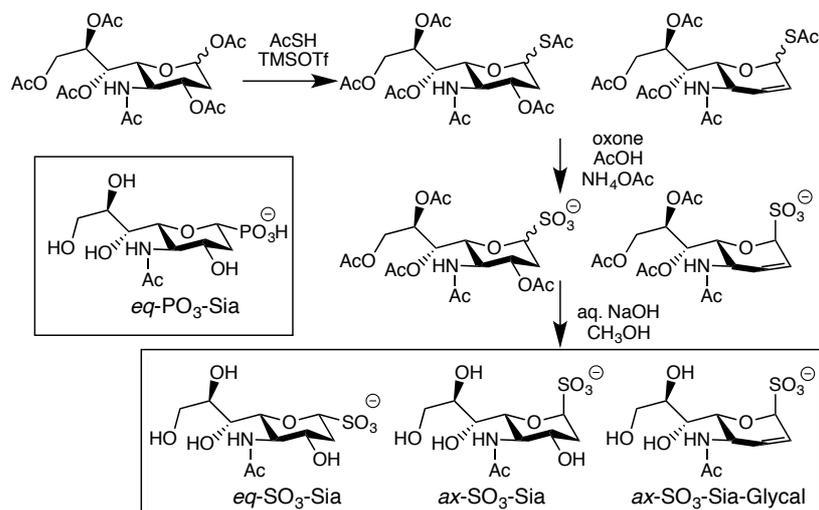
3. 次世代型阻害剤の開発 (Sulfosialic Acid, SO₃-Sia)

より強固な結合能を求めて、全てのシアリダーゼ活性中心にある三つの Arg 残基と結合する、アノマー位 COOH 基の代替を検討した。既にホスホノ体 (eq-PO₃-Sia) が有望との報告があり[3,4]、我々は更に電子吸引性の強いスルホ体 (eq-SO₃-Sia) の作製を試みた。

Sia の脱炭酸型誘導体 [4] のアノマー位を SAc 基で置換し O,S-アセタール及びそのグリカールに導いた。各々 Oxone [5] で酸化してスルホン酸アンモニウム塩に導き、脱保護により SO₃-Sia 類を得た [6]。

インフルエンザ (H2N2)、ウェルシュ菌および連鎖球菌のシアリダーゼ阻害活性試験を行った結果を表に示す。

eq-SO₃-Sia は H2N2 に対して eq-PO₃-Sia より 40 倍強力であり、ax-SO₃-Sia と ax-SO₃-Sia-Glycal も強い活性を示した。eq-SO₃-Sia はウェルシュ菌と連鎖球菌にも効果があった [6]。



シアリダーゼ阻害活性 IC₅₀ (μM)

	eq-PO ₃ -Sia	eq-SO ₃ -Sia	ax-SO ₃ -Sia	ax-SO ₃ -Sia-Glycal
influenza H2N2 (1957)	8.9	120	320	370
<i>Clostridium perfringens</i> NanJ	38	>1000	>1000	320
<i>Streptococcus</i> 6646K	3.7	-	-	-

スルホ基は、アノマー位官能基として最強の活性を示すことが分かった。スルホシアル酸を基盤とする次世代型不可逆的阻害剤の開発を進めている。

[1] C. J. Vavricka, Y. Liu, H. Kiyota *et al.*, *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1491. [2] T. Nakajima, H. Hori, H. Ohru, H. Meguro, T. Ido, *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52*, 1209. [3] K. Wallimann & A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1990**, *73*, 1359. [4] J. J. Shie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17959. [5] A. Lipták *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 839. [6] C. J. Vavricka & H. Kiyota, JP Pat. Appl. **2016**, 162979.

略歴

清田 洋正 (きよた ひろまさ)

1966・1月 仙台市生まれ 聖光学院高等学校 (21期・横浜)

1989 東京大学 農学部農芸化学科 卒業 (土壌学・和田秀徳教授)

1991 東京大学 大学院農学系研究科農芸化学専攻 修士課程修了 (有機化学・森謙治教授)

東京大学 農学部 助手 (有機化学・森謙治教授)

1999 東北大学 農学部 助手 (生物制御化学・折谷隆之教授)

2001~2002 英国 Cambridge 大学 文部科学省在外研究員 (Steven V. Ley 教授)

2002 東北大学 大学院農学研究科 助教授 (生物制御化学・桑原重文教授)

1995 博士 (農学)「光学活性昆虫フェロモンの合成研究」 (東京大学・北原武教授)

2003 日本農芸化学会農芸化学奨励賞

細胞内信号伝達系の調節を指向した中分子戦略

大神田 淳子（信州大学大学院総合理工学研究科農学専攻）

たんぱく質間相互作用(protein-protein interactions: PPIs)は細胞内信号伝達系において主要な役割を担っており、ポストゲノム時代の新薬標的として広く注目されている[1]。細胞内 PPIs を自在に調節する有機合成分子には、医薬・化学生物学研究に有用なリード化合物または分子ツールとしての役割が期待されるが、PPIs の作用面は広く平坦なだけでなく、柔軟で非構造領域を含む場合が知られており、drug-like な低分子リガンドの設計は常に難しい課題とされてきた(図 1)。最近、分子量 600~10,000 の中分子が、PPI 創薬における新たな潮流を生み出している。druglikeness から逸脱した分子サイズゆえに伝統的な創薬ではむしろ敬遠されてきた中分子だが、広い PPI 作用面を認識するのに必要な多点相互作用を導入できるため、未開拓のケミカルスペースとして期待が高まっている。しかし低い細胞透過性など大きな分子量ゆえの課題があり、今後中分子創薬を推進するうえでは抜本的な分子戦略の改変が必要である。

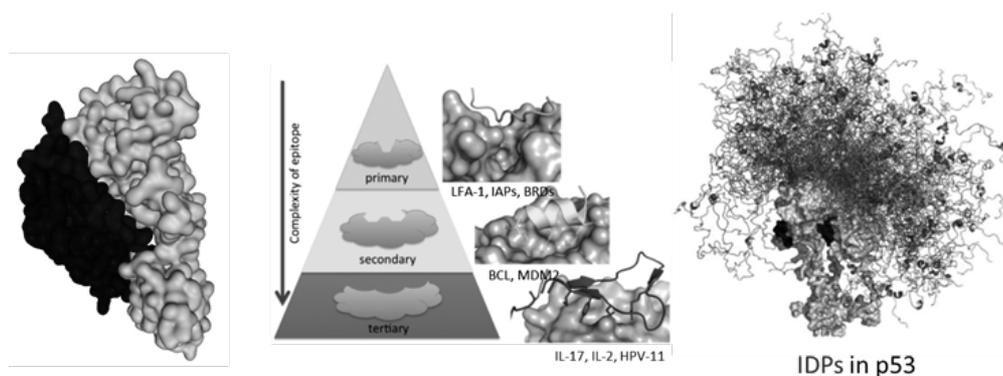


図 1 : たんぱく質間相互作用(PPIs)作用面の構造多様性

中分子が抱える細胞透過性の確保と構造多様性の導入に関する課題に対し、これまでに私たちは部品の集積法による中分子設計を着想し検討してきた[2]。この戦略は、種々の官能基を導入した低分子「部品」を種々の方法で集積し、標的 PPI 作用面を多点認識する中分子を構築するものである(図 2)。

1 例として、細胞内の部品集積による 14-3-3 たんぱく質阻害剤の合成を検討した結果を述べる。14-3-3 は真核細胞に普遍的に発現する制御たんぱく質で、リン酸化信号伝達系の PPIs を制御する。ジテルペン配糖体フシコキシニン-A (FC)は、植物 14-3-3 と H^+ -ATPase の C 末端 14-3-3 結合モチーフ QSYpTV ペプチド (pT:リン酸化トレオニン)と安定な 3 者会合体を形成することが知られており、FC の構造の一部を改変した FC 誘導体は哺乳類細胞中の 14-3-3 に作用して顕著な生物活性を誘導することを明らかにしている[3]。我々は、FC と QSYpTV に適切な反応点を導入したフラグメントを設計できれば、両者の反応によって 14-3-3 中分子阻害剤を細胞内に発生させ、リン酸化信号系を制御できると予想した。試行錯誤の結果、FC の 12 位水酸基に *o*-ホルミルベンジル基を、QSYpTV ペプチドの C 末端カルボキシル基と pT 残基をそれぞれアミノオキシ基と D 残基に変換した化合物によるオキシムライゲーションが、14-3-3 たんぱく質を鋳型として速やかに進行し、対応するオキシム誘導体を高収率で与えることを見出した。本反応は細胞内でも進行し、生じた誘導体が 14-3-3PPIs 阻害剤として作用し、顕著な細胞増殖阻害を誘導することを明らかにした[4]。以上の結果から、部品集積による中分子構築法

が、PPI 阻害剤の構造多様性の拡張と細胞内デリバリーを可能にする方法論として有用であると考えられる。本講演では分子の合理設計、分子間相互作用、ならびに生物活性の詳細について述べたい。

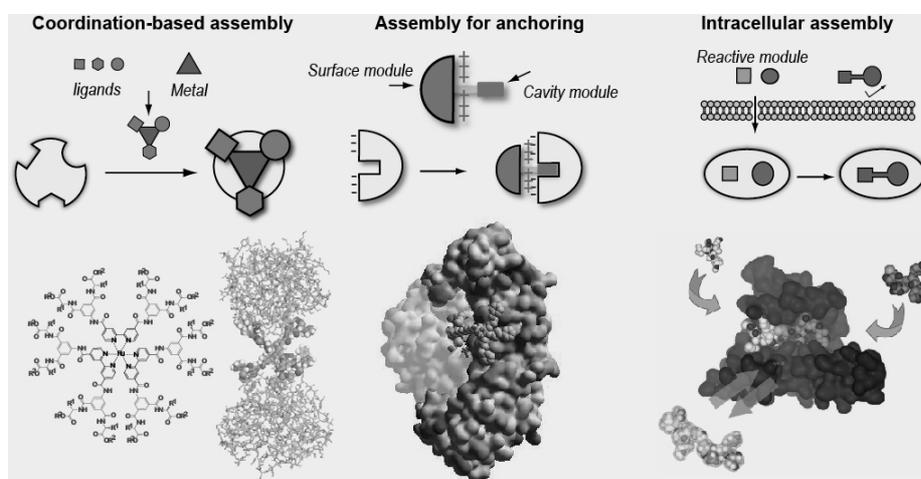


図 2：部品集積法による中分子 PPI 阻害剤の設計戦略

文献

- [1] D. E. Scott, A. R. Bayly, C. Abell, J. Skidmore, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2016**, *15*, 533.
 [2] J. Ohkanda, *Chem. Rec.* **2013**, *13*, 561.
 [3] M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 509.
 [4] P. Parvatkar, N. Kato, M. Uesugi, S. Sato, J. Ohkanda, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15624.

略歴

大神田 淳子（おおかんだじゅんこ）

1990 年 お茶の水女子大学大学院理学研究科化学専攻博士前期課程修了

1990 年（株）リコー中央研究所

1991 年 成蹊大学助手

1996 年 博士（工学）（東京大学、西郷和彦教授）

1998 年 Yale 大学化学科博士研究員（Prof. A. D. Hamilton）

2003 年 Achillion Pharmaceuticals, Inc. 創薬部門研究員（Connecticut, USA）

2004 年 東京学芸大学講師

2005 年 大阪大学産業科学研究所准教授

2013 年 京都大学化学研究所准教授

2016 年 10 月より現職

受賞歴等

2017 年 長瀬研究振興賞

2016 年 第 21 回日本女性科学者の会奨励賞

2010 年 第 1 回日本学術振興会科学研究費補助金第 1 段審査員表彰

専門分野

生物有機化学、ケミカルバイオロジー、医薬品化学

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

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 179 回例会
講演要旨集

平成 29 年 6 月 24 日 発行

編集発行人: 日本農芸化学会中部支部 支部長 吉村 徹

名古屋市千種区不老町 名古屋大学 東山キャンパス内