



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 180 回例会

講演要旨集

ミニシンポジウム
『植物の発生可塑性』

環境・共生・進化を規定する生物間相互作用の包括的理解

および

一般ポスター発表

平成 29 年 10 月 7 日（土）
名古屋大学豊田講堂（シンポジオンおよびアトリウム）

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 180 回例会

平成 29 年 10 月 7 日（土）
名古屋大学豊田講堂（シンポジオンおよびアトリウム）

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

（1F/2F ロビーにて）

9:30-12:50 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

（1F シンポジオンにて）

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『植物の発生可塑性』

13:15-14:00 「植物が窒素固定細菌と共生をはじめた日」

川口正代司（基礎生物学研究所）

14:00-14:45 「ハマウツボ科寄生植物の寄生器官の発生と形づくり」

吉田 聡子（奈良先端科学技術大学院大学）

14:45-15:00 休憩

（1F アトリウムにて）

15:00-16:30 一般ポスター発表

（1F シンポジオンにて）

16:45-17:00 奨励賞（優秀ポスター発表者）の表彰

（2F ユニバーサルグランドにて）

17:10-19:00 懇親会

ミニシンポジウム

『植物の発生可塑性』 環境・共生・進化を規定する生物間 相互作用の包括的理解に向けて (S01, S02)

- S01 「植物が窒素固定細菌と共生をはじめた日」
川口正代司 (基礎生物学研究所)
- S02 「ハマウツボ科寄生植物の寄生器官の発生と形づくり」
吉田 聡子 (奈良先端科学技術大学院大学)

植物が窒素固定細菌と共生をはじめた日

川口 正代司（基礎生物学研究所・共生システム研究部門、総合研究大学院大学）

基生研が、天文台、核融合、分子研、生理研よりなる自然科学研究機構に所属していること、また兼任している総研大が、大統合自然史など、宇宙のはじまりから生命の誕生、現在のカルチャーに至るまで扱う広い大学院大学であることがおそらく影響して、最近共生研究を広く研究を考えるようになりました。

太陽系の惑星と大気組成

窒素はすべての生物に必須の分子です。生命を構成し維持する DNA や RNA などの核酸そしてタンパク質を構成するアミノ酸、さらには生命エネルギーの源である ATP 等には窒素が含まれています。不思議なことに、私たちが棲むこの地球は窒素 N_2 が多い惑星であり、私の知る限りこのような星は存在しません。太陽系の惑星の大気組成とも大きくことになります。例えば、火星や金星の大気の約 95% は CO_2 です。それに対して、 N_2 はそれぞれ 2.7%、3.5% と少ない。ホルストの「惑星」で有名な木星はどうでしょうか？木星の大気中の 93% は H_2 であり、あとヘリウムが 7%、メタンが 0.3% と続き、窒素はほとんどないといって良い。つまり、木星はわれわれが想像できる生命は存在しえない過酷な環境なのです。地球の大気中になぜ窒素が多いかについては、次の説が唱えられています。

初期地球の火山で放出される水蒸気が液体となり、大気中に多く含まれていた CO_2 が原始の海に吸収された。さらに光合成生物の出現によって使われた、そのために 3 番目に多かった窒素が残ったと。

ハーバー・ボッシュ法

地球に存在する 78% の窒素を真核生物は直接利用することができません。 N_2 を生物が使える分子に変換できるのは原核生物の窒素固定細菌のみです。大気中の窒素分子を窒素化合物に変換することを世界で最初に実現したのはノルウェー人のビルケランドとアイデであり、1905 年に高電圧放電法により行いました。しかしこの方法は雷と同様の空中放電を伴い、電力消費が極めて大きいのが問題でした。ドイツカールスルーエ工科大学のハーバーは、1909 年 7 月 2 日にオスミウム触媒を用いて 175 気圧、550℃ で窒素と水素から直接アンモニアを合成することに成功しました。その後ボッシュが 1913 年工業化に成功し、ハーバー・ボッシュ法、あるいはハーバープロセスとして広く知られています。ハーバー・ボッシュ法は今日もアンモニア合成の主要な手法ですが、高温高压を必要とするため多くの温室ガスを排出することなどが問題となっています。

植物と窒素固定細菌の共生のはじまり

大気中の窒素をアンモニアに変換する新生細菌やメタン細菌が誕生して窒素固定をいつ始めたかについては手がかりがありません。ただ重要なのは窒素固定が常温常圧で行われるだということです。また最近私は、「植物が窒素固定細菌と共生をはじめた日」のことをあれこれ想像します。実際のところ分からないことだらけですが、植物と窒素固定細菌との共生による共生窒素固定は約1億年前に素因（predisposition）が作られたという仮説が提唱されています(Soltis et al. 1995; Werner et al. 2014)。単一起源説です。マメ科植物の起源は約6000万年前と言われているので、それより4000年も前のことです。いったいその当時どのような植物がいたでしょうか？素因は何で、どのように共生窒素固定は誕生したのでしょうか？素因の形成からマメ科植物が出現するまでに4000万年かかりましたが、その間共生と崩壊が繰り返されたのでしょうか？もしそうだとしたら根粒共生系はどのように安定化されてきたのでしょうか？

今後の展望 カスミヒメハギ

これまでマメ科のモデルミヤコグサを用いて分子遺伝学的研究を進めてきて、根粒形成の制御系（オートレギュレーション）はシロイヌナズナやイネの茎頂メリステムの制御系と良く似ていることを見つけてきましたが、共生進化問題の一端を解明したいと考えて、この数年、マメ科植物に近縁で根粒共生をしない新たな植物を探してきました。その結果、マメ目に属するヒメハギ科のカスミヒメハギ *Polygala paniculata*（パラオ諸島由来）が実験的に使える材料であることが見えてきました。今後全ゲノム解読や窒素固定細菌との相互作用実験を通じて、共生窒素固定という一大イノベーションの一端を明らかにできればと思っています。

略歴

川口 正代司（かわぐち まさよし）

静岡市生まれ。1987年3月静岡大学理学部生物学科卒業、1992年3月東京大学大学院理学系研究科相関理化学専攻博士課程修了、博士（理学）取得。1992年4月日本学術振興会特別研究員、1993年10月東京大学教養学部助手、2001年新潟大学理学部自然環境科学科助教授、2003年東京大学大学院理学系研究科生物学専攻助教授。2009年4月より基礎生物学研究所・共生システム研究部門及び総合研究大学院大学・生命科学研究所教授。

ハマウツボ科寄生植物の寄生器官の発生と形づくり

吉田 聡子（奈良先端大・バイオサイエンス）

通常、高等植物は葉に太陽光を浴びて光合成をすることで自身の成長に必要な有機栄養を作り出し、地下に根を張って土壌から水分と無機栄養を吸収する。しかし、これらの養分を他から得ることができるのであれば、葉も根も必要がなくなる。寄生植物は、他の高等植物に寄生し、水分や養分を奪って暮らす植物である。寄生植物は、全被子植物の約 1%にあたる 4000 種ほどが知られているが、中にはラフレシアやヒドノラのように奇妙な形の花だけを咲かせる植物もある。寄生植物の中には寄生の程度の異なるものがあり、独立栄養でも生育できる条件的寄生植物と宿主植物なしでは生活環を全うできない絶対寄生植物がある。また、絶対寄生植物の中でも光合成能を維持しているものを半寄生植物、光合成能を失ったものを全寄生植物と呼ぶ。ハマウツボ科には、これらの寄生の程度が異なる植物種が含まれており、寄生植物の進化を知る上では恰好の材料である。また、ハマウツボ科絶対寄生植物の中には、病害雑草として農業被害をもたらしているものがある。ストライガやオロバンキは、イネやトウモロコシなどの穀物、トマトやニンジンなどの野菜類にそれぞれ寄生してその収量を落とすため、世界各地で大きな問題となっている。ハマウツボ科寄生植物の寄生機構を解明することは、寄生雑草による農業被害を防ぐ方法を見つける一助となると考えられる。

ハマウツボ科寄生植物は宿主の根に寄生する根寄生植物で、自身の根に寄生器官である「吸器」を作って宿主に侵入し寄生を成立させる。吸器形成のシグナルとして、宿主細胞壁成分由来と考えられる 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone(DMBQ)が知られている。シグナルを受けて、根の一部の細胞の分裂と伸長が活発化され、コブ状の吸器が形成される。ハマウツボ科絶対寄生植物は主根の根端に吸器を形成し、条件的寄生植物は、根の側面に吸器を形成する。吸器は、宿主への到達、付着、組織内への侵入そして道管をつなげることによる養分の吸収という根とは異なる新たな機能を有する。吸器の形成は独立栄養から従属栄養への転換の鍵となる重要なイベントであるが、その形成の分子機構はあまりよくわかっていない。その理由の一つとして、従来、寄生植物には分子生物学的な解析に適した植物材料がなく、解析が困難であった点が挙げられる。私たちは、ハマウツボ科寄生植物の吸器形成の仕組みを明らかにするために、条件的寄生植物コシオガマを用いた遺伝学的解析の系を立ち上げた。コシオガマは世代時間が比較的短く、2 倍体、自家受粉であるなど、遺伝学的解析に適した性質を持っている。また、コシオガマの毛状根根質転換法を確立したことにより、遺伝子機能解析が可能になった。本講演では、コシオガマを用いた解析により明らかになった吸器の発生の調節機構について紹介したい。

吸器形成とオーキシシン

私たちは、コシオガマの遺伝子発現解析から、吸器の形成初期に植物ホルモンオーキシシン合成酵素である *YUCCA* 遺伝子が発現上昇することを見出した。*YUCCA* 遺伝子は吸器の先端部の表皮細胞付近で得意的に発現しており、*YUCCA* 遺伝子を RNAi によりロックダウンすることで吸器の形成率が下がることがわかった。さらに、表皮細胞で誘導的に *YUCCA* 遺伝子を発現させると、吸器状の形態の形成が観察された。実際に吸器が形成されるとオーキシシンが蓄積することが明らかになり、吸器先端部でのオーキシシン合成酵素の発現によるオーキシシンの蓄積が吸器の形成の鍵となっていることが示された。

吸器の形とエチレン

コシオガマに変異原処理をした種子プールを作成し、吸器の形態に異常が出る変異体のスクリーニングを行った。その中で、薬剤処理により誘導された吸器が状に長くなる変異体を 2 ライン単離した。ゲノムシーケンスにより原因遺伝子を同定したところ、2 ラインともエチレンのシグナル伝達に関わる遺伝子であることが明らかになった。宿主への寄生を成立させるためには、寄生植物の吸器は宿主の組織に到達する必要がある。寄生植物は宿主の存在を察知して、エチレンのシグナル伝達系を抑制することにより、宿主への到達を可能にしているのではないか、と考えられた。また、この変異体では、宿主への侵入にも異常が生じることがわかっており、宿主への侵入にもエチレンシグナルが重要な役割を果たすことが示唆された。

これらの結果から、寄生植物は他の植物から分泌される根圏シグナル物質を認識して、内在の植物ホルモンを活性化することで吸器という新しい器官を作り出していると考えられる。寄生植物が進化の過程でどのようにこの性質を獲得したのか、宿主由来根圏シグナルにどのようなものがあるのか、今後の研究により明らかにしていきたい。

略歴

吉田 聡子（よしだ さとこ）

広島県広島市生まれ、東京都小平市育ち。1996 年 3 月東京大学理学部生物学科卒業、2001 年 3 月東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻博士課程修了、理学博士。2001 年 6 月英国ジョーネスセンターセンズベリー研究所・博士研究員、2004 年 9 月よりドイツ共和国ミュンヘン大学。大学スタッフ、2006 年 8 月 理化学研究所・植物科学研究センター・研究員、同環境資源科学研究センター・上級研究員を経て、2016 年より奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 特任准教授。

一般ポスター発表 (P01～P75)

P01

ウェルシュ菌 ϵ 毒素遺伝子の新規 Bent DNA の役割
○野寺 菜美子、矢野 智奈美、宮田 茂（中部大・応用生物）

【目的】

ウェルシュ菌 B 型菌と D 型菌が産生する ϵ 毒素は、LD₅₀ が 1 ng/mouse とボツリヌス毒素、破傷風毒素に次ぐ強い毒素活性を有し、家畜に致死率 100%の腸性毒素血症を引き起こす。毒素前駆体として産生され、C-末端領域がプロセッシングされることにより活性化される pore-forming toxin である。本菌を 37℃、嫌気条件下で培養することにより、高い毒素発現量を示すことから、本研究では ϵ 毒素遺伝子 (*etx*) の発現制御を明らかにすることを目的としてプロモーター解析をおこなった。

【方法・結果】

ϵ 毒素の発現量及び *etx* の mRNA 量を、それぞれ ELISA 及び northern blot で調べた結果、感染時に相当する 37℃のほうが環境中に相当する 25℃より 10 倍以上高い値を示した。プロモーター領域を調べるために、primer extension により転写開始部位を決定したところ、明確なプロモーター配列や -15/-14 の TG モチーフが存在せず、プロモーター領域に overlap するように 3 つの phased A-tracts と翻訳開始コドン下流に 2 つの phased A-tracts が存在することが明らかとなった。コンピューター解析と PAGE による解析から、これらの phased A-tracts によりこの DNA 領域は折れ曲がり構造 (Bent DNA) を形成していることが示された。

次に、この Bent DNA が *etx* の転写に与える影響について検討した。新規に構築した NanH シアリダーゼをレポーターとして用いたレポーターアッセイ系に、この Bent DNA 領域やその欠失 DNA 断片をクローニングし、ウェルシュ菌 13 株を形質転換した。これらを用いてレポーター活性を指標に転写増強効果のある領域を調べた結果、翻訳開始コドン下流の 2 つの Phased A-tracts の欠失により、レポーター活性が低下することが明らかとなった。*etx* の Bent DNA はプロモーター活性を増強している可能性が考えられたため、前述した 5 つの A-tract を順次置換し、Bending を軽減または消失させたプロモーター領域を有するレポーター・プラスミドを構築し、現在、詳細に解析している。

P02

各種デヒドロゲナーゼ遺伝子欠失がウェルシュ菌の水素生産に及ぼす影響
○中村 圭那、森山 龍一、宮田 茂（中部大・応用生物）

【目的】

C. perfringens は、現在知られている細菌のなかで最も速い増殖速度を示し、増殖時に $H_2 : CO_2 = 1 : 1$ からなるガスを産生する。また、ヒドロゲナーゼの発現量の増大は水素ガスの産生に影響を与えないことから、水素増産のためには、基質となるフェレドキシン (Fdx) への電子供給が重要であると考えられた。本研究では、高い水素生産性をもつ株を構築するために、*C. perfringens* 13 株の保有遺伝子から代謝を推測し、NADH を酸化する各種デヒドロゲナーゼ遺伝子を選出し、それらの遺伝子欠失が水素生産に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】

欠失させたい各種デヒドロゲナーゼ遺伝子の 5'-上流と 3'-下流を含む in-frame gene を pXM のマルチプル・クローニング・サイトに挿入して各遺伝子の欠失用プラスミドを構築した。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 (Cm^r) を指標にプラスミドが染色体に挿入された株をスクリーニングした。これらのプラスミドは、*C. perfringens* 13 株では複製できない suicide vector なので、得られた Cm^r クローンは、標的遺伝子の 5'-側または 3'-側領域で相同組換えを起こし、プラスミドが染色体に挿入された株だと考えられた。これらのクローンを、0.5% キシロースを含む GAM 培地でカウンターセクションを行うことにより、プラスミドのループアウトを誘導した。最終的に colony PCR により各種欠失株をスクリーニングした。親株である 13 株及びこれらの欠失株を培養し、産生したガスのガス分析を行った結果、L-乳酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*ldhL*) 欠失株や *ldhL* を含む多重欠失株は *C. perfringens* 13 株と比較して水素産生量が増加した。*ldhL* を欠失したことにより L-乳酸発酵の際に酸化されるはずだった細胞内の NADH が増加し、それに伴い還元型 Fdx が増加し、redox balance 維持のため水素産生量が増加したと考えられた。

P03

ウェルシュ菌による clostridial cellulosome 構成酵素の発現
○鳥谷 采加, 澤入 駿哉, 宮田 茂 (中部大・応用生物)

【目的】

Clostridium 属の一部の細菌は、低利用バイオマスである植物細胞壁を効率的に分解するセルラーゼ複合体であるセルロソームを生産する。しかし、偏性嫌気性菌であるため培養が難しく、またその遺伝子が極端に AT-rich であるため、異種発現も困難である。一方で、*Clostridium* 属のウェルシュ菌は、偏性嫌気性菌であるが嫌気要求度が低いため、嫌気チャンバー等培養のための特殊な設備は必要ない。加えて、最適条件下では現在知られている細菌のなかで最も速い増殖速度を示す菌のうちの 1 種であり、*Clostridium* 属の AT-rich 遺伝子発現のためのホストとして、当研究室で毒素遺伝子の欠失のためのゲノム編集ベクターや発現ベクターの開発が進められてきた。今回、ウェルシュ菌による物質生産のために、セルロソーム構成酵素を発現させ発現量が高く比活性の高い酵素の選別を試みた。選別した酵素はウェルシュ菌の染色体上の毒素遺伝子と置換し、安定的に発現させることを検討した。

【方法・結果】

C. acetobutylicum 由来のエンドグルカナーゼ遺伝子 *eglA* を、大腸菌・ウェルシュ菌シャトルベクターである pCC13 の T7 プロモーター下流に挿入し、発現プラスミド pCC13-*eglA* を構築した。キシロースにより T7 RNA ポリメラーゼの発現が誘導されるウェルシュ菌 mT7II 株をこのプラスミドで形質転換した。発現誘導後、SDS-PAGE で培養上清中の EglA を解析するとともに、培養上清中の CMC 分解活性を調べたところ、高い比活性を示すことが明らかとなった。次に、ゲノム編集プラスミド pXM を用いて θ 毒素遺伝子と *eglA* を置換したところ、 θ 毒素遺伝子プロモーター下で安定的に発現させることができた。現在、*C. cellulolyticum* のセルロソーム構成酵素遺伝子について、同様に発現量及び酵素活性の検討を行っている。

P04

E. coli ビタミン B6 結合タンパク質 YggS の機能解明 : *glyA* との合成致死性の解析
○堀蘭, 伊藤智和, 邊見久, 吉村徹 (名大院生命農)

【目的】

Escherichia coli 由来 YggS はピリドキサル 5' リン酸 (PLP) を結合した機能未知のタンパク質であり、バクテリアからヒト、植物、酵母に至る様々な生物で高度に保存されている。この高度な保存性から、YggS が生体内において何らかの重要な機能を有していることが示唆される。現在までの研究で、*E. coli* *yggS* 欠損株が 2-aminobutyrate (2-AB)、2-ketobutyrate (2-KB)、そして、オフタルミン酸 (γ -Glu-2-AB-Gly) を蓄積することが示されている。また、PLP の前駆体であるピリドキシン 5' リン酸 (PNP) を蓄積し、ピリドキシン (PN) に対して感受性であることが報告されている。また、*yggS* ヒトホモログである *PROSC* 遺伝子が PN 依存性癲癇の原因遺伝子として同定された。別の研究では、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ (*glyA*) 遺伝子と *yggS* 遺伝子が致死性ペアであることが示唆された。このように、*yggS* 欠損のフェノタイプについては多くの報告があるが、現在のところ、YggS やそのホモログタンパク質の機能は同定されていない。本研究では *glyA* と *yggS* の合成致死性の要因解明を目指した。

【方法・結果】

glyAyggS 二重欠損株の作製を試みたところ、同株は取得可能であり、二重欠損株の生育が顕著に遅いことが明らかとなった。生体内において GlyA は Ser と tetrahydrofolate (THF) から Gly と 5,10-methylene-tetrahydrofolate (5,10-mTHF) を生成する相互変換を触媒する。*glyAyggS* 二重欠損株の生育は、その生合成に 5,10-mTHF を要求する化合物群 (チミジン、パントテン酸、Met、イノシン) の培地への添加によって回復した。*glyA* 欠損時には、5,10-mTHF はグリシン開裂系 (GCV) によって供給されていると予想され、YggS と GCV の関連性が示唆された。そこで、3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ (*serA*) 欠損株では 5,10-mTHF の供給が GCV に依存することを利用して、GCV と YggS の関連を検証した。*serAyggS* 二重欠損株では Gly 存在下での生育が顕著に遅延し、チミジン、パントテン酸、Met、イノシンの添加によって回復した。以上の結果から、YggS が GCV の反応に関与している可能性が示唆された。

P05

土壌細菌由来 β -1,3-グルカンホスホリラーゼ
○牛谷健作, 川島大地, 寺田真衣, 磯野直人 (三重大院生物資源)

【目的】

β -1,3-グルカンホスホリラーゼ[BGP; β -1,3-(Glc)_n + α -G1P $\rightleftharpoons$ β -1,3-(Glc)_{n+1} + Pi] (EC 2.4.1.97) は黄金色藻の *Ochromonas danica* や *Poterioochromonas malhamensis* から発見された酵素であり、 β -1,3-グルカンや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。我々は *O. danica* 由来 BGP (OdBGP) の構造と機能の解析や本酵素を用いた β -1,3-グルカンの合成法の開発を行ってきた。本研究では数種類の土壌細菌にも BGP が存在することを見出し、その特性を調べた。

【方法・結果】

OdBGP と約 50 % のアミノ酸配列類似性を示す機能未知タンパク質のうち、*Paenibacillus polymyxa* NBRC 15309 株や *Paenibacillus glucanolyticus* NBRC 15330 株など 5 種類の土壌細菌由来タンパク質を組換え大腸菌で発現・精製したところ、4 種類のタンパク質が BGP の活性を示した。これらの土壌細菌由来 BGP の基質特異性は OdBGP と類似していた。至適温度は由来によって異なったが (30-50 °C)、至適 pH はいずれも 8.0 前後であった (OdBGP は 30 °C, pH 5.0)。 *P. polymyxa* 由来 BGP は熱安定性に劣る酵素であったが、 α -グルコース-1 リン酸 (α -G1P) の共存により熱安定性が大幅に向上した。一方、*P. glucanolyticus* 由来 BGP は α -G1P の非存在下でも安定な酵素であった。また、土壌細菌由来 BGP を用いて α -G1P とラミナリビオースを基質とした反応を行ったところ、OdBGP と同様に β -1,3-グルカンが合成された。

P06

Ruminiclostridium josui の分子育種のための基盤技術の開発に関する研究

○汪 亜運, 奥川 慶, 国武 絵美, 栗冠 真紀子, 木村 哲哉, 栗冠 和郎 (三重大院生資)

【目的】

中温性のセルロース分解性嫌気性菌 *Ruminiclostridium josui* (*Clostridium josui*) を、統合バイオプロセス (consolidated bioprocessing, CBP) により、セルロース系バイオマスからの有用物質生産に利用するためには本菌の形質転換系を確立する必要がある。本研究では、*R. josui* の制限酵素 *RjoI* の性質を明らかにし、本菌の効率的な遺伝子導入系を確立することを目的とする。

【方法・結果】

R. josui の無細胞抽出液から HiTrap Heparin HP 及び HiTrap Q HP カラムクロマトグラフィーにより *RjoI* を精製し、その性質を調べた。その結果、*RjoI* の認識配列は A がメチル化された G^{met}ATC であり、切断部位は A と T の間 (G^{met}A↓TC) であること、すなわち *RjoI* は *DpnI* のイソシゾマーであることが分かった。大腸菌と *Clostridium perfringens* 間のシャトルプラスミド pJIR751 をもとに発現ベクター pKKM801 を構築した。大腸菌 *dam*-株から調製したプラスミド pKKM801 DNA を用いて、エレクトロポレーション法の条件検討を行った結果、*R. josui* へのプラスミドの導入に成功した。さらに、セルロソーム形成に関与するドックリンドメイン領域を除いた *R. josui cel48A* 遺伝子を pKKM801 にクローニングし、*R. josui* へ導入したところ、RjCel48A Δ doc は培養上清のみで発現していることが分かった。以上の結果より、*R. josui* の制限/修飾システムの解析に基づいて、効率的な遺伝子導入系を確立し、*R. josui* の分子育種のための基盤技術を確認したと判断した。

P07

Ruminiclostridium josui 由来のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A の
CBM6 の吸着特性解析

○間宮愛, 田中 晶善, 國武絵美, 栗冠真紀子, 木村哲哉, 栗冠和郎 (三重大院生資)

【目的】

Ruminiclostridium josui のフェルラ酸エステラーゼ Fae1A は, 糖質エステラーゼファミリーCE1の触媒モジュール, 糖質結合モジュール(CBM6)およびドックリンモジュールから成るモジュラー酵素である. 今回は, CBM6 を発現・精製し, その吸着特性を明らかにした.

【方法・結果】

大腸菌を用いて発現させた CBM6 の吸着性を ITC で調べたところ, CBM6 はキシロース ($K_D=1.4\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) やキシロビオース ($K_D=3.2\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$), pNP-キシロース ($K_D=2.4\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) に結合したことから, キシロオリゴ糖の非還元末端のキシロース残基に結合すると予想された. また, 非還元末端のキシロース残基の 2 の位置にアラビノースが結合したキシロトリオースには強い吸着性 ($K_D=1.9\times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$) を示したが, 非還元末端の 3 の位置にアラビノースが結合したキシロビオースには吸着しなかった. アラビノースやアラビノオリゴ糖に対しては全く吸着性を示さなかった. 一方, CBM6 の可溶性多糖に対する結合性を Native affinity PAGE で調べたところ, アラビノースで置換されていないバーチウッドキシランに対する吸着性が最も低く, 次いでライアラビノキシラン, 最も高い吸着性が確認されたのが可溶性小麦アラビノキシランであった. この結果は, ITC で得られた糖鎖の非還元末端のキシロース残基に結合するという結果と矛盾する. また, 今回使用したライアラビノキシランと小麦アラビノキシランに構造的な違いがあることが示唆された.

P08

アミラーゼプロモーターを用いた *Clostridium beijerinckii* におけるタンパク質発現系の構築
○須江夏希, 三宅英雄 (三重大院・生資)

【目的】

Clostridium beijerinckii はアミラーゼを分泌することでデンプンを加水分解し、アセトン、ブタノール、エタノールを生産する。これまで *C. beijerinckii* を宿主とした異種タンパク質発現についていくつか報告はあるが、いずれも発現量が少なく、目的遺伝子によって発現量も異なるためプロモーターの選択は重要である。本研究では *C. beijerinckii* が増殖時にアミラーゼを大量発現していることに注目し、*C. beijerinckii* を宿主としたアミラーゼのプロモーターを用いたタンパク質発現系を構築することを目的とした。

【方法・結果】

C. beijerinckii 由来のアミラーゼ (Cbei_0664) のプロモーター領域をゲノム DNA からクローニングした。プロモーターの下流にレポーター遺伝子として *C. cellulovorans* 由来のセルラーゼである *engO* を連結し、*E. coli-Clostridium* のシャトルベクターである pMTL500E に導入することで *engO* 発現プラスミドを構築した。このプラスミドを嫌気条件下において、エレクトロポレーション法を用いて *C. beijerinckii* に形質転換し、抗生物質耐性マーカーによるコロニーの選別を行うことで形質転換体を得た。

得られた形質転換体を 1%CMC を含む寒天培地に植菌し、嫌気条件下で培養した。その後、このプレートについてコンゴーレッド染色を行った結果、セルラーゼ活性が観測された。このことから *C. beijerinckii* 由来アミラーゼプロモーターを用いた *C. beijerinckii* タンパク質発現系を構築することができた。

P09

Clostridium cellulovorans 由来エンドグルカナーゼ E の基質阻害の解析

○幸崎涼, 三宅英雄 (三重大院・生資)

【目的】

エンドグルカナーゼ E (EngE) は嫌気性細菌 *Clostridium cellulovorans* が生産する糖質分解酵素である。この酵素は触媒ドメイン、糖質結合モジュール、ドックリンドメイン、そして 3 つの Surface layer homology ドメインと多くのドメインから構成されており、糖質分解酵素の中でもユニークな酵素の 1 つである。そこで本研究では、EngE の組換え体を作製し、その基質特異性の評価と反応速度論的解析を行った。

【方法・結果】

組換え体 EngE を作製し、様々な多糖と反応させ、その生成物を TLC により分析した。その結果、CMC と PASC を基質とした場合では主に 2 糖と 3 糖を生成したが、Avicel では生成物が検出されなかった。これより、EngE は結晶度の低いセルロースを好んで分解するセルラーゼであると分かった。また、glucomannan や lichenan、 β -glucan を基質とした場合でも生成物を検出した一方で、xylan では検出されなかった。lichenan、glucomannan、 β -glucan の主鎖にはセルロースと同じグルコース残基が含まれるため、EngE はそれらの β -1,4 グリコシド結合を加水分解したと考えられる。次いで、CMC を基質として反応速度論的解析を行った。その結果、基質濃度が 3 mg/mL 以上になるとミカエリスメンテンモデルから逸脱し、反応初速度が低下する現象が見られた。そこで、得られたデータにいくつかの基質阻害モデルを充て、解析したところ、酵素に基質が 2 つ結合した ESS 複合体からも生成物を生産するモデルに適合した。従って、EngE は基質阻害を示し、ESS 複合体からも生成物を生産することが示唆された。

P10

Clostridium cellulovorans が生産する新規エンドグルカナーゼ GH44A の酵素化学的研究

○矢田百絵, 三宅英雄 (三重大院生資)

【目的】

Clostridium cellulovorans のゲノム解析から新規エンドグルカナーゼ遺伝子 (*engGH44A*) が見つかった。その配列情報から N 末端側に GH44 ファミリーに属する糖質分解酵素の触媒ドメインと C 末端側にセルロソームを形成するのに必要なドックリンドメインを有している。また、プロテオーム解析から炭素源に稲わらなどのセルロース系バイオマスで培養すると発現していることが明らかになった。そこで本研究では EngGH44A の組換え体を作製し、酵素化学的な諸性質を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

構築したプラスミドを大腸菌に形質転換させ培養および精製を行った。しかしながら、時間の経過とともにドックリンドメインは切断されたが、触媒ドメインを含む単一の酵素を得られたのでこれを精製酵素として用いた。基質として CMC、Avicel、PASC、xylan を用いて酵素反応を行い、薄層クロマトグラフィーでそれらの生成物を評価した。その結果、Avicel や PASC を基質とした時には生成物は検出されなかったが、可溶性セルロースである CMC を基質とした時、3 糖と 4 糖を生成した。また xylan を基質とした時、4 糖より大きなオリゴ糖を生成した。従って、EngGH44A はセルラーゼとキシラナーゼの活性を示すエンドグルカナーゼであることが分かった。さらに基質として CMC を用いたとき至適温度は 50 度であり、至適 pH が 5 であることが分かった。

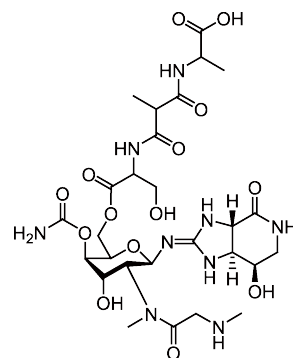
P11

streptothricin 類縁化合物における *O*-acylpeptide 構造生合成遺伝子クラスターの
同定および機能解析

○坂上 莉奈¹, 丸山 千登勢¹, 橋本 絢子², 新家 一男³, 濱野 吉十¹
(¹ 福井県大院・生物資源, ²JBIC, ³産総研)

【目的】

抗生物質 streptothricin (ST) 類縁化合物、SF-2111B は、Ser、methyl malonate、Ala からなる特徴的な *O*-acylpeptide 構造を有しており、この構造が抗真菌活性に重要であることが知られている。これまでに我々は、SF-2111B 生合成遺伝子クラスターの全長を含む BAC クローンを取得しており、各遺伝子の予想される機能と組換え酵素を用いた酵素反応の結果から、*O*-acylpeptide の生合成には、非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS) をコードする *orf* 1197 遺伝子及び *orf* 1198 遺伝子が関与していることを見出した。本発表では、これら NRPS 遺伝子の近傍に存在する *orf* 1195 遺伝子及び *orf* 1196 遺伝子に着目し、*O*-acylpeptide 生合成に関与するか、遺伝子破壊実験による検証を行った。



SF-2111B

【方法・結果】

BLAST 検索の結果から、Orf 1195 と Orf 1196 はそれぞれ、S-adenosyl-L-methionine hydroxide adenosyltransferase と asparagine synthase に相同性を示すことが示唆されたが、*O*-acylpeptide 生合成のどのステップに関与しているかは不明であった。そこでそれぞれの遺伝子を BAC クローン上で破壊し、破壊 BAC クローン導入株の培養上清を LCMS にて分析した。その結果、*orf* 1195 遺伝子破壊株の SF-2111B 生産性が完全に消失し、*O*-acylpeptide がない生合成中間体を生産蓄積することが判明した。このことから Orf 1195 が *O*-acylpeptide 生合成に関与していることが明らかになった。さらに現在、*orf* 1196 遺伝子についても破壊実験を進めており、その詳細な結果について紹介する。

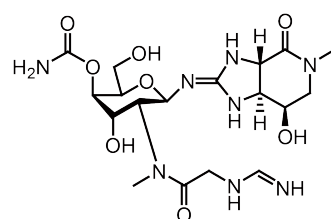
P12

streptothricin 類縁生合成遺伝子群に見出した aminoacyl-tRNA 依存型ペプチド合成酵素における
基質認識機構の解析

○松田 貫暉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】

streptothricin (ST) 類縁化合物である抗生物質 BD-12 の生合成において、アミノ糖と glycine のペプチド結合形成は、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 (C. Maruyama *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 82, 3640-3648, 2016)。当研究室はこれまでに、Orf11 ホモログ酵素として、BD-12 類縁生合成遺伝子群 (*sba* 遺伝子群) から、Sba18 を同定している。Sba18 組換え酵素を用い、本酵素の基質特異性を調べたところ、放線菌由来の aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) においては、Gly-tRNA^{Gly} に高い基質特異性を示した。興味深いことに、大腸菌由来の aa-tRNA を用いた反応においては、Gly-tRNA^{Gly} だけでなく、Ala-tRNA^{Ala}、Ser-tRNA^{Ser} を基質として認識した。この結果から、Sba18 は aa-tRNA^{aa} 上のアミノ酸だけでなく、tRNA の塩基配列や化学修飾も認識していることが示唆された。そこで本研究では、Sba18 の tRNA^{aa} に対する基質認識機構の解明を試みた。



BD-12

【方法・結果】

E. coli は、3 種類の tRNA^{Gly} 遺伝子と 2 種類の tRNA^{Ala} 遺伝子を有し、放線菌 *S. lividans* は、tRNA^{Gly} 遺伝子を 4 種類有しているが、これら 9 種類の aa-tRNA 分子全てが Sba18 の基質となるのかは不明であった。そこで、Sba18 がこれらのうち、どの tRNA を基質として認識するか検証するために、*in vitro* 転写反応にて各 tRNA 分子を合成し、これらを基質とした Sba18 の酵素反応を行った。本発表では、その結果について報告する。

P13

GH134 に属する β -1,4-マンナナーゼ変異株の機能解析と食品への応用

○木本 紗蘭¹, 酒井 杏匠¹, 新沢 祐大¹, 鈴木 健吾¹, 神藤 定生², 前林 正弘¹, 志水 元亨¹,
加藤 雅士¹ (¹名城大・農, ²名城大・理工, ³名大院・生命農)

【目的】

これまでに我々は、既知の β -マンナナーゼ (Glycoside Hydrolase family 5 (GH5) および GH26 に属する) とは相同性を有さない新規 β -マンナナーゼ (Man134A) を見出し、GH134 family を新設した (Shimizu et al. *J. Biol. Chem.* 2015). 本酵素は、既知の糖質加水分解酵素とも全く相同性を有していないために、Man134A の立体構造および活性部位残基を推定できなかった. 本研究では、GH134 で高度に保存されているアミノ酸残基を選抜して部位特異的変異を導入することで、Man134A の活性に必要なアミノ酸残基を探索した. また、Man134A の活性部位アミノ酸残基を変異させた β -マンナナーゼ活性を有さない Man134A 変異体 (Man134A-E61A) の機能を解析した.

【方法・結果】

新規 GH134 に属する β -マンナナーゼ Man134A および対照として GH5 に属する β -マンナナーゼ Man5C を酵母 *Pichia pastoris* にて異種発現させ、それらの基質特異性、熱安定性および pH 安定性など酵素学的性質を比較した. Man134A は、既知の Man5C と同様に、 β -マンナンを加水分解することで β -マンナン溶液の粘度を低下させた. また、部位特異的変異により、Man134A のアミノ酸変異体 9 種類を作製・解析したところ、変異体 Man134A-E61A の β -マンナナーゼ活性が消失したことから、E61 (アミノ酸配列中の 61 番目のグルタミン酸) が活性残基の 1 つであることが判明した. さらに興味深いことに、Man134A-E61A は β -マンナンを加水分解できないが、 β -マンナン溶液の粘度を減少させた. また、Man134A-E61A はマンナングル表面の弾力を減少させ、ゲルのテクスチャーを変化させることも発見した. 以上の結果より、Man134A とその変異体は、第二世代のバイオ燃料生産への利用はもとより、 β -マンナン含有食品のテクスチャー (食感) の改善など様々な食品産業への応用も見込まれると考えられる.

P14

Fusarium graminearum のトリコテセン生合成制御に関する研究

○塩原拓也、中嶋佑一、赤坂まな美、前田一行、鬼頭良幸、金丸京子、
小林哲夫、木村 真
(名大農・院生命農学)

【目的】

Fusarium graminearum は生育環境を感知してトリコテセン系毒素の産生を制御する。窒素代謝に必要な遺伝子群の転写を制御する AreAp の結合コンセンサス配列が毒素生合成遺伝子のプロモーター上に多数存在することから、資化に AreAp の機能を必要とするアミノ酸 (AreAp 依存性アミノ酸) を単一窒素源として代謝させると、毒素産生は活性化されると予想される。そこで AreAp 依存性アミノ酸を代謝する際の毒素産生量について調査した。

【方法・結果】

F. graminearum JCM 9873 株、HP1 を欠損させた Δ hep1 株、Tri6 遺伝子上流に TEF プロモーターを配した Tef6 株、クラスターコア領域の距離を伸張させた Ext 株を使用した。この株をスクロースと単一アミノ酸を含む培地に植菌した。培地の pH を 3.5 一定に保つために 2-3 時間おきに pH を調節し続け、36 時間培養後に全菌体を新しい培地に移し替えて窒素源の枯渇を防いだ。さらに 36 時間 pH を合わせながら培養 (鬼頭・塩原法) した後、36 時間目の毒素産生量と 72 時間目の毒素産生量を HPLC により求め、総毒素量を算出した。野生株を AreAp 依存性アミノ酸 L-Thr、L-Phe を用いて培養し、AreAp 非依存性アミノ酸 L-Gln を用いて培養した場合と毒素量を比較したところ、L-Gln、L-Phe では毒素産生量が増加したのに対し、L-Thr では逆に毒素産生が有意に抑制された。一方、Tef6 株、Ext 株、および Δ hep1 株では L-Thr による毒素産生の抑制はみられなかった。

F. graminearum におけるトリコテセン C-4 位水酸化酵素の基質特異性

○田中佑弥¹⁾、杉浦涼介¹⁾、田中彰²⁾、前田一行¹⁾、新海航輝²⁾、松井宏介²⁾、中嶋佑一¹⁾、
吉成知也³⁾、金丸京子¹⁾、小林哲夫¹⁾、安藤直子²⁾、木村真¹⁾
1) 名大院・生命農学、2) 東洋大工研・理工研、3) 国立衛研

【目的】

Fusarium graminearum は穀類に感染し、ニバレノール (NIV) 等の C-7 位が水酸化されたタイプ B トリコテセン系かび毒を生産して食の安全を脅かす。これまでの研究から NIV 生産菌は C-8 位にケトンをもたない *F. sporotrichioides* などのタイプ A トリコテセン生産菌を祖先型とし、C-4 位水酸化酵素をコードする *Tri13* や C-8 位水酸化酵素をコードする *Tri1* の機能が変化することによって生じたことが知られている。本研究では *F. graminearum* の FgTRI13 の基質特異性を明らかにし、NIV 生産菌がどのようにに生合成経路を進化させてきたのかを明らかにする。

【方法・結果】

トリコテセン生合成の初発反応を進める *Tri5* および C-7, C-8 位の水酸化を進める *FgTri1* を二重破壊した *F. graminearum* 変異株を用いた feeding 実験によって、C-4 位水酸化酵素 FgTRI13 の機能を検証した。C-7 位が水酸化され C-8 位がケトンとなったトリコテセンの C-4 位は直ちに水酸化されたが、C-7 位もしくは C-8 位のどちらか一方のみが水酸化されたトリコテセンの C-4 位水酸化は限定的で、反応は非効率的であった。さらに、*F. sporotrichioides* の *FsTri13* を *FgTri13* にスワッピングし C-8 位アシル化酵素をコードする *Tri16* を破壊した株を用いて feeding 実験を行ったが、C-7 位と C-8 位がともに水酸化されたトリコテセンの C-4 位水酸化は非効率的にしか進まなかった。これらの結果より、FgTRI13 の基質特異性は FsTRI13 に比較して極めて高く、C-7 位が水酸化されかつ C-8 位がケトンのトリコテセンでないと速やかに反応が進まないことが示された。C-4 位が水酸化されたトリコテセンは FgTRI1 の基質にはなりにくいことから、NIV 生産菌は C-7 位、C-8 位の修飾が完了するまで C-4 位の水酸化が進まないように進化したと考えられた。

ムギ赤かび病菌 *Fusarium graminearum* の固体培養時におけるアミノ酸代謝とトリコテセン生産の関係

○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、西内巧³、木村真¹ (¹ 名大院生命農、
² 明治大院農、³ 金沢大学際科学)

【目的】

Fusarium graminearum はトリコテセン系かび毒を生産し穀類を汚染する。我々はこれまでに *F. graminearum* の玄米粉固体培養時にトレオニン (Thr) などのアミノ酸を添加することでトリコテセンの生産が抑制されることを見出している。さらに、この Thr 添加によってトリコテセン生合成遺伝子群が転写レベルで抑制されることを確認したが、詳しい機構は不明であった。本研究では上記現象の分子機構を明らかにすることを目的に、遺伝子発現解析や遺伝子破壊実験解析を行った。

【方法・結果】

本菌の固体培養時における Thr 添加区において発現が変化する遺伝子群を定量的 RT-PCR によって調査した結果、培養初期過程特異的にトレオニナルドラーゼやグリシンデカルボキシラーゼ P サブユニットをコードする遺伝子の顕著な発現上昇が認められた。*F. graminearum* はゲノム上に 3 種類のトレオニナルドラーゼ遺伝子を有するが、Thr 添加によって発現上昇したのは 1 種類のみであった。そこでまずこのトレオニナルドラーゼの破壊株を作出したところ、Thr の資化能が大幅に低下していた。さらに本株の固体培養時に Thr を添加したところ、野生株と比較してトリコテセン生産が抑制されにくくなったことからこのトレオニナルドラーゼを介した Thr 代謝がトリコテセン生産抑制効果を生み出していることが示唆された。現在、Thr 添加により発現上昇が認められたグリシンデカルボキシラーゼ P サブユニットの破壊株を作出し、同様の解析を進めている。

P17

糸状菌 *Aspergillus nidulans* 由来の新規 poly (ADP-ribose) glycohydrolase の発見とその働き
○ワイズ里沙¹, 尾下彩音¹, 宮地雄大¹, 酒井杏匠¹, 志水元亨¹, 加藤雅士¹ (¹名城大農)

【目的】

タンパク質のポリ (ADP-リボース) (PAR) 化は, 真核生物に特異的な可逆的翻訳後修飾である. この反応には, PAR を合成する poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) と分解する poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) が関与することが知られている. PARP は, 酵母を除く全ての真核生物に保存され, DNA 修復, 転写調節, 細胞死, 中心体の分裂制御に関与していると考えられている糸状菌 *Aspergillus nidulans* のゲノム中にも *parp* の ortholog が 1 つ存在するが, 酵母および *A. nidulans* を含む糸状菌のゲノムの中には既知の *parg* の ortholog は見出されない. 本研究では, 糸状菌の *parg* 遺伝子を特定し, その生理学的役割を明らかにすることを目的とする.

【方法・結果】

A. nidulans のゲノム中から *parg* 候補遺伝子を 7 種選抜し, リコンビナントタンパク質を調製した. これらの PARG 活性を測定したところ, 1 種のみ Mg^{2+} 依存的に PAR を分解した. PAR の分解産物を LC-MS/MS にて解析したところ, ADP-リボースが検出された. これらのことから, このタンパク質を fungal PARG (fPARG) と名付けた.

次に $\Delta fparg$ 株を作製し DNA 損傷剤に対する影響を検討したところ, 野生株に比べて DNA 損傷剤に対して感受性を示した. また, 細胞内局在を解析したところ fPARG は主に核に局在していた. 以上のことから, 糸状菌では fPARG が PARG として機能していることが示唆された.

P18

担子菌 *Coprinopsis cinerea* の子実体形成初期に誘導的に発現する機能未知遺伝子が
子実体形成に及ぼす影響

○武内花菜子¹, 酒井杏匠¹, 村口元², 吉田誠³, 志水元亨¹, 加藤雅士¹
(¹名城大農, ²秋田県立大生物資源, ³東京農工大農)

【目的】

担子菌は, 光や温度など環境変化に応じて菌糸体から子実体へ形態を変化する. このため, 細胞分化および形態形成機構を解明するにあたり, 担子菌は極めて興味深い研究対象になると考えられる. しかしながら, 担子菌の子実体形成機構については完全に解明されていない. 担子菌 *Coprinopsis cinerea* は, ゲノム情報が解読されていること, 短期間で子実体が形成されることから, 担子菌類のモデル生物として用いられている. 本研究では, プロテオーム解析で見出した *C. cinerea* の子実体で特異的に発現した機能未知タンパク質 (HP) が子実体形成に与える影響について解析した.

【方法・結果】

子実体形成初期に特異的に発現していた HP をコードする遺伝子のノックダウン株を作製したところ, 白い菌傘の子実体が形成された. *C. cinerea* 野生株の菌傘にはメラニンが含まれているため黒色を呈することが知られている. このことから, 子実体特異的に発現した HP は, 子実体の成熟やメラニンの生合成に関与していることが考えられた.

さらに, HP のリコンビナントタンパク質を調製し, 赤血球に対する溶血活性を測定したところ, HP は溶血作用を有していた. また, その作用は GlcNAc によって阻害された. さらに, 真菌の細胞壁の主成分であり GlcNAc から構成されるキチンと特異的に結合した. これらのことから, HP は担子菌の細胞壁中に含まれるキチンと結合して子実体形成初期に何らかの機能を果たしていることが示唆された.

P19

His-Asp リン酸リレー情報伝達機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節

○金丸京子, 木村真, 小林哲夫 (名大院生命農)

【目的】

真核生物にとってミトコンドリアは、ATP やヘム、脂肪酸などの合成や代謝に関わる重要なオルガネラである。そのため、生育環境の変化によるミトコンドリアの機能低下は最終的に生育停止や細胞死を引き起こす。一方、わが国の醗酵醸造産業において、糸状菌の生育を継続、維持することが生産性の向上に重要だが、ミトコンドリア機能がもたらす有効性についてほとんど検討されていない。近年、われわれは、環境応答システムを利用した糸状菌の生育促進を目的に、関連制御因子の網羅的解析を行い、その過程で、His-Asp リン酸リレー情報伝達機構のヒスチジンキナーゼ HysA がミトコンドリアの機能維持に重要であることを見出した。本研究では HysA 欠損株の機能変化を解析し、環境変化に応答したミトコンドリア機能調節が糸状菌の正常な生育に重要であることを明らかにする。

【方法・結果】

昨年度の本例会で、Mito Tracker Red プローブを用いたミトコンドリア膜電位レベルの観察や ATP 量の測定から、HysA 欠損株ではミトコンドリア機能が低下していることを示した。ミトコンドリアの機能低下と活性酸素種 (ROS) 発生の関連性について理解するために、ミトコンドリアで発生した ROS を検出する Mito Sox Red プローブを用いて顕微鏡観察したところ、欠損株の菌糸、分生子柄で ROS の発生を確認した。電子伝達系は多くのタンパク質因子で構成されているが、それらの発現量の変化は電子の正常な流れに影響する。HysA 欠損株では、複合体 I の Alternative factors である AifA, NdeA の発現量が上昇することを定量 PCR 解析で明らかにした。すなわち、ユビキノンへの過剰な電子の伝達が ROS 発生を引き起こしたと考える。HysA の情報伝達変異株の解析とあわせ、His-Asp リン酸リレー機構を介した糸状菌ミトコンドリアの機能調節の重要性について考察する。

P20

Aspergillus oryzae 由来転写因子 XlnR 制御遺伝子の網羅的同定

○岡 大椰¹、児島 孝明¹、井原 邦夫²、小林 哲夫³、中野 秀雄¹ (¹名大院・生命農・生命技術、²名大・遺伝子実験施設、³名大院・生命農・生物機構)

【目的】

転写因子は、標的 DNA 配列に特異的に結合し、遺伝子の発現を制御する。Genomic SELEX-Seq(gSELEX-Seq)は、転写因子に対して結合性を有する領域をゲノミクライブラリーから in vitro で濃縮選択した配列情報を高感度に出力できる手法である。本研究では、この gSELEX-Seq 法を用いて麹菌由来のキシラン代謝制御転写因子 XlnR の結合部位をゲノムワイドで解析し、XlnR によるキシラン代謝制御機構の解明を目的とした。

【方法・結果】

麹菌ゲノミクライブラリーを調製し、このライブラリーに対して XlnR を用いた gSELEX を 3 ラウンド実施した。高速 DNA シークエンサーによって各選択プールの配列を大量に取得し、得られた配列データの解析を行ったところ、XlnR の既知の結合モチーフである GGCT(A/G)A が抽出された。また、XlnR 結合活性を示すプロモーター配列を保有する遺伝子が多数検出された。この候補制御遺伝子リストとマイクロアレイによって同定された発現変動遺伝子 (DEGs) 75 種類と照合したところ、51 遺伝子で重複が確認された。プロモーター領域に結合部位を有し、かつ発現変動を受けるこれらの遺伝子は XlnR によって直接的に発現制御される遺伝子であると推定される。また、XlnR 結合が認められる一部の配列に対して BLI 法を用いた結合活性測定を行い、転写因子 XlnR 結合の詳細な解析を行った。

P21

微生物分泌性膜小胞を介した細菌細胞間の物質輸送システムの機構解析
○高木航太郎, 長谷川雄将, 二又裕之, 田代陽介 (静大院・総合科技)

【目的】

微生物は、自身の細胞膜から分泌するリポソーム様構造体 Membrane vesicles (MVs)を利用して他の微生物細胞と相互作用している。情報伝達物質を高濃度に含有した MVs を利用することにより、離れた微生物細胞に効率よく物質が伝達される。これまでに、微生物細胞からの MV 分泌機構においては数多く報告例があるものの、微生物が MVs を取り込む機構に関しては未知な部分が多い。本研究では、MV 生産能が高いグラム陰性菌 *Buttiauxella agerstis* CUETM77-167 株をモデル微生物とし、微生物細胞による MV 取り込み現象の因子の探索を目的とした。

【方法・結果】

B. agrestis CUETM77-167 株より抽出した MVs を蛍光色素 FM4-64 を用いて標識し、受容菌と 30℃ で 30 分間反応させた。上清中の未反応の MVs を取り除いたのち、受容菌体懸濁液の蛍光強度を測定しこれを MV 取り込み能として評価した。また CUETM77-167 株の細胞表層の構成に関与する遺伝子の欠損株を作製し、これらを MV 供与菌、受容菌として同様の実験を行った。その結果、ペリプラズム空間に局在するタンパク質 TolB の遺伝子欠損株を受容菌とした場合に、野生株に比べて MV 取り込み能が約 1.7 倍向上した。一方で *tolB* 欠損株由来の MV を用いた実験系においては、*tolB* 欠損株を MV 受容菌とした場合野生株に比べて約 3.7 倍の取り込み能を示した。以上の結果より取り込みには MVs 中ならびに受容細胞中双方の TolB が複合的に関与している可能性が示唆された。TolB は細胞中で外膜と内膜を架橋していることから、*tolB* 欠損株では膜間の架橋が失われることで外膜に歪みが生じ、その結果細胞表面が MVs を取り込みやすい状態になったと考えられる。さらなる詳細な解析により、細菌細胞による MVs 取り込み機構の解明が期待される。

P22

好気・微好気・嫌気条件下におけるプラスミドの接合伝達性と宿主域の解析

○越智健太郎², 柳谷洸輔¹, 井上謙吾³, 水口千穂⁴, 野尻秀昭⁴, 大熊盛也⁵, 金原和秀^{1,2}, 新谷政己^{1,2,5}, (¹静大院・総合科技, ²静大・工, ³宮崎大・農, ⁴東大・生物工学セ, ⁵理研・BRC-JCM)

【目的】

遺伝子組み換えツールとして用いられるプラスミドは、好気条件下の接合伝達性について詳細に研究が進められてきた。一方、土壌中および動物体内といった実環境中で想定される、微好気・嫌気的条件下の接合伝達性および宿主域についてはほとんど研究がなされていない。従って、微好気・嫌気条件のプラスミドの接合伝達性頻度や宿主域は、既知のものとは異なる可能性がある。本研究では、酸素濃度の違いにより、それらが変化するかどうか検証することを目的とした。

【方法・結果】

供与菌には絶対好気性菌 *Pseudomonas putida* KT2440 株の派生株である SMDBS 株、または通性嫌気性菌 *P. stutzeri* を用い、プラスミドには pBP136::gfp と pCAR1::gfp を用いた。受容菌には通性嫌気性を示す菌株を用いて接合伝達実験を行い、得られた接合完了体数を供与菌と受容菌の積で除したものを伝達頻度として算出し、各条件下で比較をした。その結果、微好気・嫌気条件の接合伝達頻度は、好気条件よりも 10¹~10⁴ 低下し、その低下度合いは供与菌と受容菌の組み合わせによって異なることが示唆された。また、*P. putida* SMDBS(pBP136::gfp)を供与菌とし、牛糞やメタン発酵槽内のグラニューール中の微生物群集を受容菌候補として好気・微好気条件で接合実験を行い、蛍光を指標にして、接合完了体を固体栄養培地上にフローサイトメトリーを用いてソーティングした。形成したコロニーについてプラスミドの有無を確認後、16S rRNA 遺伝子を増幅して配列を解読し、属レベルの同定を行った。その結果、好気・微好気条件でプラスミドの宿主域が変化し、酸素濃度の違いがプラスミドの宿主域に影響を及ぼすことが示唆された。

プラスミドが宿主の fitness を変化させる原因因子の同定

ファム・チー・キム・ユン¹, レー・ティエ・タン・トゥー¹, 金原和秀¹, 新谷政己^{1,2}

(¹ 静大院・総合科技, ² 静大・工, 静大グリーン研)

【目的】

プラスミドは分子生物学の必須のツールとして用いられているのに対し、多くの環境条件下では、プラスミドを保持することは宿主にとって負荷となり、プラスミドの宿主の fitness (適応度) が低下する。我々の先行研究で、IncP-1 群プラスミド pBP136::gfp と、IncP-7 群プラスミド pCAR1::gfp について、それぞれを有する *Pseudomonas putida* KT2440 株と、その派生株である PpY101 株とでは、宿主の fitness の変化が異なる現象を見出している。2つの菌株についてゲノム配列を比較したところ、PpY101 株では、prophage1 と推定される領域と、kguKE 遺伝子を含む領域が欠落していることが判明した。本研究は、これらの領域を欠失した KT2440 株を作出し、プラスミドをもつことで、その fitness がどのように変化するかを検証することを目的として行った。

【方法・結果】

KT2440 株と PpY101 株を宿主とし、pBP136::gfp と pCAR1::gfp それぞれについて、プラスミド保持株と非保持株の競合試験を行った。各菌株を同量になるように LB 液体培地に混合し、植え継ぎを繰り返した。植え継ぐ際に、プラスミド保持株と非保持株の割合を調べ、その割合の変化を competitive index (CI) として、宿主の fitness を評価した。その結果、KT2440 株を宿主とした場合、fitness は低下ないし拮抗を示したのに対し、PpY101 株では増加した。そこで、KT2440 ΔP1 株 (推定 prophage1 欠損株)、KT2440 ΔkguKE 株、KT2440 ΔP1 ΔkguKE 株 (二重欠損株) の3つの欠損株を作出し、これらの欠損株について、pBP136::gfp と pCAR1::gfp のプラスミドを持つ場合の fitness 変化を競合試験で評価した。その結果、pBP136::gfp の場合、3つの欠損株とも fitness が変化しなかった。それに対し、pCAR1::gfp の場合、KT2440 株と比べ、KT2440 ΔP1 株と KT2440 ΔkguKE 株の fitness が増加したが、KT2440 ΔP1 ΔkguKE 株では fitness の変化は似た傾向を示した。従って、prophage1 と kguKE 領域上には、pCAR1::gfp の宿主の fitness 変化をもたらす原因因子が存在する可能性が示唆された。

モデル土壌スラリーにおける分解プラスミドの動態解析

○孕石明¹, 中澤駿介¹, 金原和秀¹, 新谷政己¹ (¹ 静大院・総合科技)

【目的】

接合伝達性プラスミドは、微生物どうしの接合を通して、異なる微生物間を伝達可能な遺伝因子である。また、難分解性有機化合物の分解遺伝子はプラスミド上から多く見出されている。これまで、モデル環境水における分解プラスミドの接合伝達性とその宿主の分解性の変化は評価されていたが、モデル土壌中における挙動は十分な評価がなされておらず、その動態予測ができないのが現状である。そこで本研究では、モデル土壌スラリーを作製し、分解プラスミドとその宿主の動態解析を試みた。

【方法・結果】

プラスミドとしてカルバゾール(CAR)分解プラスミド pCAR1::rfp (Km 耐性) を使用し、供与菌として *Pseudomonas putida* SM1443, 受容菌として *P. putida* KT2440 を用いた。ねじ付試験管にモデル土 1.0 g を入れ、液体無機培地 1.0 mL 加えた。終濃度 250 mg/L となるように CAR を加え、菌体液を 10⁶ CFU/mL となるように加えた。それらの試験管を、静置条件と、回転条件(10 rpm)とで 48 h, 30°C でインキュベートした。48 h 後の残存 CAR 濃度を GC-FID で測定し、接合完了体数を MPN 法で測定した。その結果、静置条件では CAR 濃度が約 40% にまで減少し、供与菌×受容菌あたり 10⁻¹² の頻度で接合完了体が検出された。回転条件では CAR は検出できず、供与菌×受容菌あたり 10⁻¹² の頻度で接合完了体が検出された。静置条件と回転条件の接合完了体数に有意差はなかった。このことから、回転による接合伝達の変化は見られなかったが、回転による CAR 分解の促進が示唆された。

P25

回転型スラリーバイオリアクタを用いた低温条件下における油汚染土壌浄化の高速化
○三好佑奈¹, 浦田智宇², 新谷政己², 金原和秀² (¹ 静大・工, ² 静大院・総合科技)

【目的】

油類の流出による土壌汚染は、世界で重大な問題として取り上げられており、その解決方法のひとつとして、予め油分解能が確認されている微生物をバイオ製剤として汚染土壌に投入するバイオオーグメンテーションがある。これは低コスト・低環境負荷である一方、環境条件に左右されやすいことや浄化期間が予測できないということから確実性が低いという問題点がある。我々は *Rhodococcus erythropolis* に属する 2 種類の油分解菌を用いて、15℃の低温静置条件下でモデル汚染土壌の A 重油の分解を確認した。本研究では、この A 重油の分解効率を回転型のリアクタを利用することにより向上させることを目的として行った。

【方法・結果】

赤玉土 300 g, 芝目砂 200 g, 無機塩培地の W 培地 332 ml を混合したモデルスラリーを調製し、15℃で 1 日攪拌し混合操作を行った後、*Rhodococcus erythropolis* の 2 株の濃縮菌液をそれぞれ 1.0×10^8 cells/g-soil になるように接種し、A 重油を 2500 mg/kg 加えた。15℃の温度条件で 6 日間分解試験を行い、一定期間ごとに A 重油残存濃度および菌数の測定を行った。A 重油残存量はヘキサン抽出し、GC-FID を用いて分析・定量した。菌数の計測は、抽出した菌液を 1/3 に希釈した LB 寒天培地上に塗布し、生じたコロニー数を計測した。その結果、A 重油濃度は 6 日目までに 96% 以上が減少した。静置条件では 12 日間かかる分解期間が、回転型リアクタを用いることで短縮可能であることが示唆された。また菌数は、初期の菌数から油分解が行われている期間に増加し、分解が終了すると減少するという結果が得られた。

P26

樹皮糖化産物のメタン発酵特性に与える影響の解析

○横田忠顕¹, 大塚祐一郎², 中村雅哉², 中島田豊³, 加藤純一³, 新谷政己¹, 金原和秀¹
(¹ 静大・工, ² 森林総研, ³ 広大院・先端)

【目的】

現在、未利用木質バイオマスの減容化とエネルギー変換を目的としたバイオプロセスが注目されている。しかし、樹皮にはタンニンと呼ばれる芳香族化合物が含まれており、酵素阻害作用および殺菌効果を持つと報告されていることから、生物学的処理への応用は困難であるとされてきた。本研究では、木質バイオマスのエネルギー利用を目指し、スギ樹皮の糖化産物を原料としてメタン発酵することで、樹皮成分がメタン発酵にどのような影響を与えるか調べた。

【方法・結果】

本研究では、上向流嫌気性汚泥床(UASB)メタン発酵とバイアル瓶を用いた回分実験を行った。UASB メタン発酵では、スギ心材糖化液でグラニュールを馴養した後、樹皮糖化液の量を徐々に上昇させ、発酵特性への影響を調べた。樹皮糖化液を投入後、メタン発酵により生成したガスの組成は CH₄ 60~70%, CO₂ 9~17% で安定化した。ガス生成量は樹皮糖化液を 100% にした後も差異は認められなかった。バイアル瓶を用いた回分メタン発酵では、スギ心材糖化産物と樹皮糖化産物の割合を変えてメタン発酵を行った。木質バイオマス糖化液に馴化した汚泥と未馴化した汚泥を用い、汚泥の種類による発酵特性の違いと糖化産物中の樹皮成分の量の違いが発酵に及ぼす影響を調べた。未馴化した汚泥を使用した場合、メタンガスの生成量は心材糖化産物の割合が大きいほど優位性が認められた。木質バイオマス糖化液に馴化した汚泥を使用した場合、窒素源の投入の有無によりガス生成量に違いが認められ、投入無しでは樹皮糖化液の割合が大きいほど優位性が認められた。

和歌山県日高地方の紀州なれずしの発酵過程における菌叢の変遷

○土井遼平¹, 奥村真衣², 藤田知佳子², 水野洸介², 上原葵², 野村泉¹, 稲葉（長谷川）桂子¹,
 稲垣瑞穂¹, 島田昌也¹, 鈴木徹¹, 早川享志¹, 中川智行¹
 (¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜大・応生)

【目的】

和歌山県を代表する郷土料理の一つに紀州なれずしがある。紀州なれずしは、1ヶ月以上塩漬けにしたサバを1度塩抜きして塩飯の上に乗せ、アセの葉で包み、隙間なく木桶に敷き詰め、重しをして数週間ほどつけ込み、自然発酵させる伝統的な発酵食品であり、今なお祭事の際などには欠かせないものとして親しまれている。これまで、日本の様々ななれずしの発酵過程における菌叢などが解析されてきたが、和歌山県日高地方の紀州なれずしに関する詳細な報告例はほとんどない。

そこで、本研究では和歌山県日高地方の紀州なれずしの発酵過程における菌叢変遷を中心に解析を行った。

【結果・考察】

紀州なれずしの発酵過程における菌叢の変遷を解析するため、発酵開始から0, 2, 5日目のサンプルを入手し、それぞれの菌叢変遷を追跡した。紀州なれずし中の生菌数は、MRS培地において0日目では 5.8×10^7 cfu/gであり、5日目には 2.6×10^8 cfu/gに増加した。また、その際の菌叢の変遷を16S rRNAメタゲノム解析を用いて観察したところ、発酵開始前の0日においては*Staphylococcus*属が全体の約40%を占める優占種であるが、発酵が進むにつれて*Lactococcus*属などの乳酸菌が支配的になり、5日目の時点では全体の約90%が乳酸菌で占められた。また、発酵5日目には*Lactobacillus*属が顕著に増加した。以上のことから、なれずし中の菌叢は5日目には完全に乳酸菌が優先種となることが確認され、発酵が進むにつれ*Lactococcus*属から*Lactobacillus*属に変遷することが推察される。

「岐阜らしさ」を醸す新奇「岐阜大酵母」の開発とその発酵特性

○奥村真衣¹, 平井菜未¹, 内田みなみ¹, 吉村明浩², 澤井美伯², 正木和夫², 二神泰基³, 玉置尚徳³,
 向田潤⁴, 三井亮司⁴, 稲垣瑞穂¹, 島田昌也¹, 早川享志¹, 中川智行¹
 (¹岐阜大応生, ²岐阜県産業技術センター, ³鹿児島大農, ⁴岡山理大理)

【目的】

清酒の「個性」は酵母の持つ様々な能力によって決定づけられる。例えば、清酒の甘辛や濃淡は酵母が醸すアルコールと酸の濃度により決定づけられ、またその風味は酵母が醸す香味成分により左右される。つまり、一般的なきょうかい酵母とは異なる特徴的な発酵特性を持つ新奇な清酒酵母を開発し、その能力を最大限に活用することで、より個性的で魅力的な清酒の開発が可能になる。

私たちの研究グループでは、岐阜の魅力を発信するための地域ブランドの確立を目指し、「岐阜らしさ」を醸せる「岐阜大酵母」の開発に向け、岐阜県各地から新奇な清酒酵母のスクリーニングを試みている。本研究では、これまで単離した「岐阜大酵母」の遺伝学的特徴さらには醸造特性について解析を行い、「岐阜大酵母」の清酒酵母としての「個性」を評価した。

【方法・結果】

岐阜県各地の600以上のサンプルから22株の*Saccharomyces cerevisiae*を獲得し、その中から発酵力および発酵香を指標に4株を岐阜大酵母の候補株として1次選抜した。これら4株の遺伝学的特性を、ゲノムレベルの系統関係を反映する*THI7*, *ZAP1*, *PXL1*, *GLG1*, *YRR1*を指標に系統解析を行ったところ、GY-115株がきょうかい酵母に最も近縁であった。またGY-115株は清酒のオフフレーバーである4-ビニルグアイヤコール(4-VG)を生成しなかった。これらを踏まえ、今回、GY-115株を選抜し、総米10kgにて試験醸造を行った。その結果、GY-115株は独特な酸組成を持つ清酒を醸し、低温(最高10.2°C)にて発酵させることで甘口で爽やかな酸味の清酒(アルコール度14.9, 酸度2.27)を醸造することができた。

P29

野沢菜漬けの発酵に伴う菌叢の変化と免疫調節作用への影響

○濱島知里¹, 山本佳奈¹, 高橋楓香¹, 渡辺純², Bayanjargal Sandagdorj², 田中沙智¹

(¹信大院総合理工, ²農研機構・食総研)

【目的】

当研究室では信州の伝統野菜である野沢菜が IFN- γ および IL-10 を産生誘導し、長期発酵させた野沢菜漬けで IFN- γ 産生量が増加することを明らかにしてきた。乳酸菌は漬け物の発酵過程で増加し、サイトカイン産生誘導を含む多くの免疫調節作用が報告されていることから、野沢菜漬けにおけるサイトカイン産生量の増加に乳酸菌が関与することが予想される。そこで本研究では、発酵過程におけるサイトカイン産生と細菌叢の相関解析を行うことで、サイトカイン産生に関与する野沢菜漬け由来乳酸菌種の推定を試みた。

【方法・結果】

野沢菜原料を塩水漬けし、原料と漬け込み後 3, 7, 14, 21, 28 日目に各野沢菜サンプルを回収した。各サンプルについて pH メーターを用いて pH を測定し、平板培養法にて乳酸菌生菌数を測定したところ、漬け込みにより pH の低下と乳酸菌数の増加が示されたことから、乳酸菌による乳酸発酵が起こったことが推察された。また、滅菌リン酸緩衝生理食塩水で懸濁した各サンプルの懸濁液を試料原液とし、細菌の 16S rRNA 遺伝子配列を MiSeq で解析したところ、発酵に伴って *L. curvatus* と *L. plantarum* が優勢となることが示された。さらに、遠心分離で得た試料原液のペレット画分をマウス脾臓細胞に添加し、IFN- γ および IL-10 産生量を測定したところ、原料でも IFN- γ および IL-10 の産生が確認できたが、漬け込みによって各サイトカイン産生量が増加した。加えて、菌種特異的プライマーを用いた qPCR による細菌の絶対定量を行い、各サイトカイン産生量と乳酸菌の絶対数の相関を解析したところ、野沢菜のサイトカイン産生に主に寄与する菌種は *L. curvatus* ではなく、*L. plantarum* と *L. brevis* であることが示唆された。

P30

Isolation and Identification of Indigenous Yeast Fermenting Ethanol from Vegetable and Fruit Wastes

○Fannisa Putri^{1,2}, Makiko Sakka¹, Naoto Isono¹, Emi Kunitake¹, Tetsuya Kimura¹, Kazuo Sakka¹, Sunardi² and Yuli Astuti Hidayat² (¹Grad Sch Bioresources, Mie Univ, ²Dept Environ Sci, Postgrad Sch Univ Padjadjaran, Indonesia)

The acceptance of vegetables and fruits each day in Bandung City, Indonesia, from various regions reaches hundreds of tons and produces a lot of organic wastes. In addition to the approach of waste product, recycling of vegetable and fruit wastes can be pursued through the concept of waste to energy. Vegetable and fruit wastes have the biological and chemical potential to produce bioethanol. Biological potency owned by indigenous microorganisms was examined for fermentation of the vegetable and fruit wastes. Among 8 yeast strains isolated from the wastes, 2 indigenous yeast strains S1.2 and S2.2 showed an excellent ability of ethanol fermentation while 6 other yeasts did not show a good result on this experiment. Strains S1.2 and S2.2 could ferment glucose in the medium consisting of 20% glucose, 1% peptone and 0.5% yeast extract to accumulate ethanol about 9.5 to 10% in the medium, indicating high ethanol recovery close to theoretical value. They grow best on 25-30 °C in pH 3-6 and are capable of fermenting various monosaccharides such as glucose, xylose, mannose, galactose, fructose, and arabinose to produce ethanol. Physiological properties and PCR-based 18S rRNA gene sequences showed that strain S1.2 was closely related to *Hanseniaspora opuntiae* and strain S2.2, *Pichia fermentans*.

P31

高圧によって引き起こされる細胞小器官損傷及び圧力耐性の GFP 酵母を用いた観察

○宇野諒（岐阜大学院自然科学技術研究科生命科学・化学専攻）

【目的】

高圧は微生物に生理的な影響や、損傷を与え、生育阻害や細胞死を起こす。また、細胞膜に影響を与え、細胞オルガネラに損傷が生じることがこれまでに推定されている。そこで本研究では細胞オルガネラに局在する、GFP を融合させたタンパク質を指標として、高圧下における細胞オルガネラの損傷及び圧力耐性を評価した。

【方法・結果】

本研究は *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 株、および各遺伝子に GFP 遺伝子を挿入した Yeast GFP Clone Collection (ThermoFisherScience) を利用した。各酵母は液体 YPD 培地で本培養し、対数増殖期細胞、定常期細胞、対数増殖期細胞のヒートショック処理細胞を用いた。GFP 遺伝子の被融合遺伝子としては、核では *ROX3* (YBL093C)、核膜では *NIC96* (YFR002W)、小胞体では *PHO86* (YJL117W)、ゴルジ体では *SEC7* (YDR170C) を利用した。酵母の高圧下での各細胞小器官の損傷を調べるために、氷中で 50 MPa、100 MPa、150 MPa、200 MPa ・ 30 分の条件で酵母を処理し、常圧に戻した後に蛍光顕微鏡で観察を行った。同時に生菌数を測定し、高圧下での酵母の生菌数の変化も評価した。

その結果 50 MPa では細胞内の細胞小器官の構造にまでは影響は観察されなかった。100 MPa では、核、核膜に損傷が観察された。150MPa ゴルジ体に損傷が確認された。200 MPa ではほぼすべての細胞小器官の構造に影響が認められた。また対数増殖期細胞、定常期細胞、対数増殖期細胞にヒートショックをあたえたものの全てが 100MPa で核膜に損傷が観察された。圧力処理後の生菌数は、対数増殖期細胞に比べ定常期細胞、ヒートショック処理細胞で高いことを確認した。

P32

酵母を用いた持続的な熱ストレスに対する液胞構造の変化の解析

○石井彩音, 川井理仁, 野田遥香, 竹田航平, 木村洋子（静岡大院・農）

【目的】

出芽酵母においては、短時間ではあるが致死的な温度(例 50℃, 10-20 分)の熱ストレスを与えられた場合と、長時間、持続的に亜致死的な温度(例 40-41℃, 数時間)の熱ストレスを与えられた場合では、防御機構が異なることが考えられる。後者の持続的な熱ストレスに対しては十分な量のユビキチンが必要であることが報告されているが、未知の部分が多い。今回、この熱ストレスの細胞応答機構を解明するため、細胞内の変化を観察した。

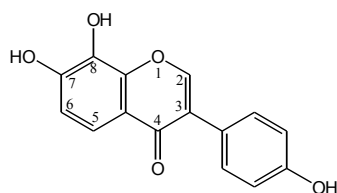
【方法・結果】

熱ストレス後、液胞の形態変化が著しく、凸凹の液胞膜や陥入が観察された。この陥入構造は、オートファジーの遺伝子欠損変異株でも起きていたが、ESCRT 系の分子の変異株では、見られなかった。電子顕微鏡解析により、野生株では、液胞内に小胞が数珠状に繋がっている陥入構造があることが明らかになった。熱ストレス時には液胞膜とエンドソーム膜の融合が頻繁に生じることが予想され、このような液胞の形態変化は、液胞表面積の急激な増加に対応している可能性が示された。

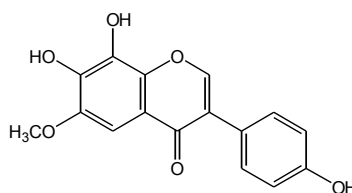
高純度 8-ヒドロキシイソフラボン類試薬の開発

○牧岡富広¹, 松本恵実¹, 中塚宏志¹, 平松直人², 岡田利孝², 中塚進一^{1*}(¹ 長良サイエンス株式会社, ² 株式会社東洋発酵)

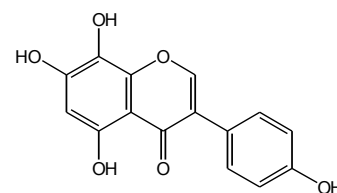
発酵大豆中にはイソフラボン骨格の 8 位が水酸基で酸化された 8-Hydroxydaidzein (1)¹⁾、8-Hydroxyglycitein (2)²⁾、8-Hydroxygenistein (3)¹⁾等の抗酸化成分がある。近年、これらの化合物が、Genistein や Daidzein よりも強力な抗酸化作用、抗変異原活性、細胞増殖抑制作用を示し、大豆発酵食品の機能性の化学的根拠として注目されている。そこで本研究では、発酵大豆から **1,2,3** を HPLC 等により単離精製を行ったところ、TLC 分析、HPLC 分析、¹H-NMR により 99% 以上の高純度で、グラム単位の生産が可能となり、生理活性の解明や定量等の研究のための高純度試薬の開発に成功したので報告する。



8-Hydroxydaidzein (1)



8-Hydroxyglycitein (2)



8-Hydroxygenistein (3)

1) Hideo Esaki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**(4), 740-746 (1998).Akira Hirota *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(6), 1372-1374 (2004).

高純度飽和脂肪酸試薬の開発

○藤野和孝、宮田健吾、松本恵実、中塚宏志、中塚進一（長良サイエンス株式会社）

飽和脂肪酸は植物や動物に幅広く存在し、種によって脂肪酸の炭素数の種類や存在比などが異なっている。さらに脂肪酸は添加剤として食品、塗料、医薬品や化粧品などに広く利用されており、その他にも潤滑剤、可塑剤、乳化剤など様々な用途に利用されている。

また、脂肪酸は生体内で重要な役割を果たしている化合物群の部分構造を形成しており、例えば細胞のシグナル伝達の調節などを行っているガングリオシド、細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質、細胞膜で脂質膜を形成するとともにシグナル伝達物質として様々な作用を担うセラミドなどがある。これらの化合物を合成し医薬品などに利用するには純度の高いものが必要であり、高純度脂肪酸が求められている。

脂肪酸は多くの種類が市販されているが、その大半は数%単位の炭素数の異なる不純物等を含んでいるので、さらなる高純度化を達成すべく脂肪酸の精製を行った。

純度測定は TLC、HPLC 及び NMR で分析した。HPLC 分析において飽和脂肪酸には強い UV 吸収が無く検出しにくいとため、紫外線エンド吸収法*を用いて分析を行った。その結果、偶数脂肪酸とともに奇数脂肪酸を含めた C10:0 から C30:0 までの飽和脂肪酸をそれぞれ純度 99.5% 以上の精製に成功した。また、大量化も可能になり kg 単位での生産が可能になったので報告する。

* 松本恵実, 中塚進一, *FOOD Style* **21**, **17**(3), 87-89(2013).

松本恵実, 藤野和孝, 牧岡富広, 中塚進一, セラミド研究会 第 7 回学術集会(H26.10.30).

P35

赤アズキ種皮に含まれる紫色色素の単離と構造

○永井伸和¹, 市川由樹¹, 数馬恒平², 尾山公一³, 古賀和司⁴, 近藤忠雄², 吉田久美²

(¹名大・情報科学、²名大・情報学、³名大・物産学、⁴名大・生命農学)

【目的】

我々は赤アズキ種皮に含まれる紫色色素の単離及び構造決定を目的として研究を行っている。2017年度の日本農芸化学会大会(京都)において、紫色色素の光分解物の構造を明らかにし、これに基づいてカテキノピラノシアニジン A(**1**)の構造を決定した。カテキンとシアニジンが縮合した新規骨格を持っていることが明らかになった。今回、微量色素カテキノピラノシアニジン B(**2**)とその光分解物の構造解析を行った。

【方法・結果】

赤アズキ(*Vigna angularis*, 品種:エリモショウズ)を温水で洗浄後、酢酸エチルで色素を抽出した。これを Toyopearl HW-40C および ODS カラムクロマトグラフィーによって精製し、24 kg の乾燥種子から 4.6 mg の **1** を、2.4 mg の **2** を得た。NMR 解析および CD スペクトルから **2** は **1** と同じ発色団を持ち、**1** のジアステレオマーであることが分かった。さらに、**1** を様々な pH の 50% メタノール-緩衝液に溶解させ、UV/Vis スペクトルを測定した。通常のアントシアニンと異なり、pH 5 の条件下で 5 日後も約 80%の色を保っていた。現在、紫色発色機構や色素の安定性の解明のため、発色団を含むモデル化合物の合成を行っている。

P36

Study on the color and stability of 3-*O*-substitution of cyanidin

○Asmaa B. El-Meligy,^{1,2} Takehiro Ishihara,¹ Kin-ichi Oyama,³ Ahmed M. El-Nahas,² Ahmed H. Mangood,² and Kumi Yoshida¹

(¹ Graduate School of Informatics, Nagoya University, ² Faculty of Science, El-Menoufia University, Egypt,

³ Research Institute for Materials Science, Nagoya University)

The purpose:

Anthocyanin natural dyes are important pigment that can be used as a food colorant, as well as a dye for dye sensitized solar cell. The main drawback is their instability; they are highly reactive by degrading under normal condition of storage. 3-*O*-glycosilation of anthocyanidin is considered to increase stability. To clarify this, we compared the stability of cyanidin (**1**) with 3-*O*-glucosylcyanidin (**2**) and 3-*O*-methylcyanidin (**3**). We also analyzed the effect of presence of co-pigments on the color and stability of pigment.

Method and Result:

2 was isolated from black soy bean (*Glycine max*). **1** was obtained by acidic hydrolysis of **2**. **3** was synthesized from rutin (**4**). After tetra-benzoylation of **4**, sugar moiety was hydrolyzed, then 3-OH was methylated with CH₃I. After removal of Bn-protection group, our transformation method using Zn-reduction followed with air oxidation to be obtained **3**. **1-3** were dissolved in aq. buffer solution of pH 1 and the stability of the solutions were investigated by recording UV-Vis Spectra. The results reveal that the 3-*O*-glycoside substitution of anthocyanin is the most stable followed by 3-methylation while the 3-hydroxyl is the least stable. Thus, 3-*O*-substitution plays a role in retarding decomposition of anthocyanin. Addition of co-pigment, flavocommelin (**5**, 1-10 eq. to each pigment) gave increase in stability with bathochromic effect even in strong acidic condition.

フグ毒テトロドトキシンの推定生合成中間体の化学合成研究

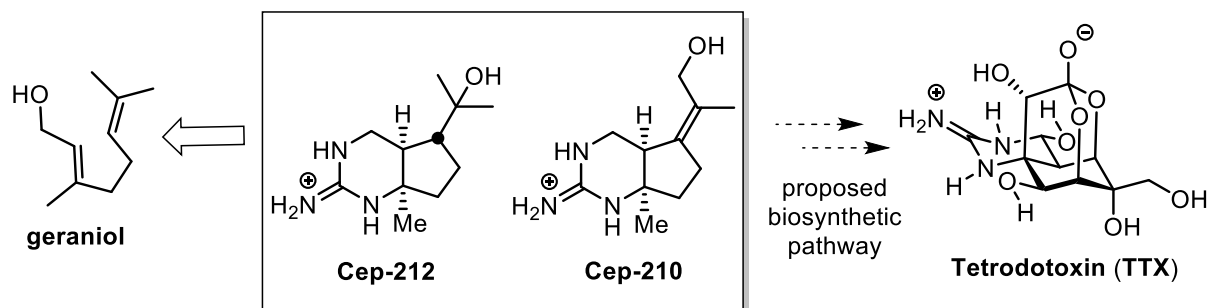
○宮坂忠親, 安立昌篤, 西川俊夫 (名大院生命農)

【目的】

テトロドトキシン(TTX)は、電位依存性 Na^+ チャネルに対する強力な阻害剤であり、フグやイモリ、タコなどの生物が保有している。一方、TTX の生合成研究は多数行われているにも関わらず、現在もその生合成経路は未解明である。近年、東北大学の山下らは、オキナワシリケンイモリ (*Cynops ensicauda popei*) から Cep-212 および Cep-210 を単離した。その特徴的な構造から、これら二つの天然物は、TTX の生合成中間体の可能性が指摘されている。しかし、単離された Cep 類の量は極僅かであり、また絶対立体配置が未決定である。そこで本研究では、化学合成による量的供給および絶対立体配置の決定を目的として、これらの合成を検討した。

【方法・結果】

ゲラニオールを出発原料として、三連続不斉中心の立体選択的構築とグアニジン化を経て、Cep-212 の不斉全合成を達成した。現在、合成品を用いて絶対立体配置の決定および無毒イモリへの投与実験を共同研究で行っている。また、合成中間体から Cep-210 の合成も検討中である。



バンレイシ科アセトゲニン (+)-muconin の合成研究

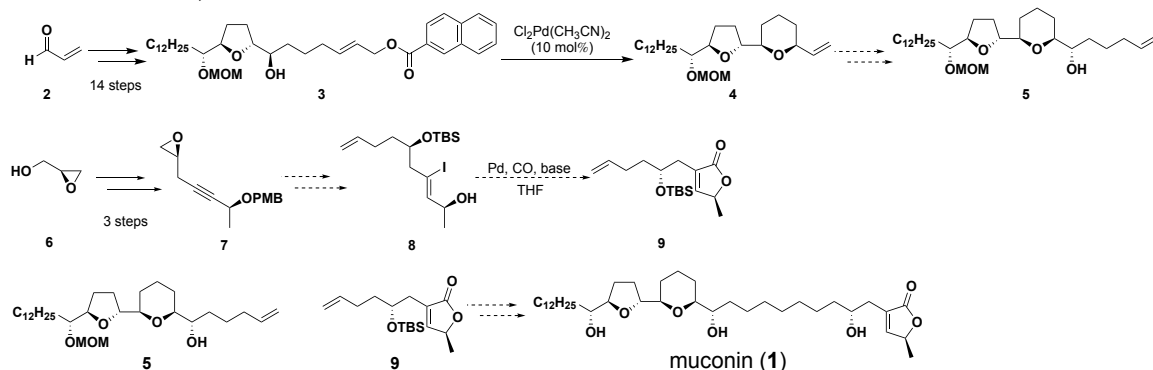
○納所早弥華¹, 彦坂源¹, 服部恭尚², 真壁秀文¹(信大院総合理工¹, 京都薬科大 共同利用機器センター²)

【目的】

(+)-Muconin (1)はバンレイシ科植物 *Rullinia mucosa* から単離されたアセトゲニンであり、 α,β -不飽和 γ -ラクトン環及び直結する THF·THP 環、そして六つの連続する不斉点を有している。本研究は、鍵反応として立体選択的オキシパラデーションを用い、1 の効率的な合成を行うこと、及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】

Acrolein (2)を出発物質として、Sharpless 不斉エポキシ化及び Sharpless 不斉ジヒドロキシル化を含む 14 段階の反応により環化前駆体 3 を合成した。続いて、2 価の Pd 触媒を用いた立体選択的オキシパラデーションにより環化付加体 4 を合成した。また (S)-(-)-glycidol (6)を出発物質として 3 段階の反応によりエポキシド 7 を合成した。今後 THF·THP 環ユニット 5 及び γ -ラクトン環ユニット 9 の合成を完了し、両ユニットのクロスメタセシスにより(+)-muconin (1) の合成を行う予定である。

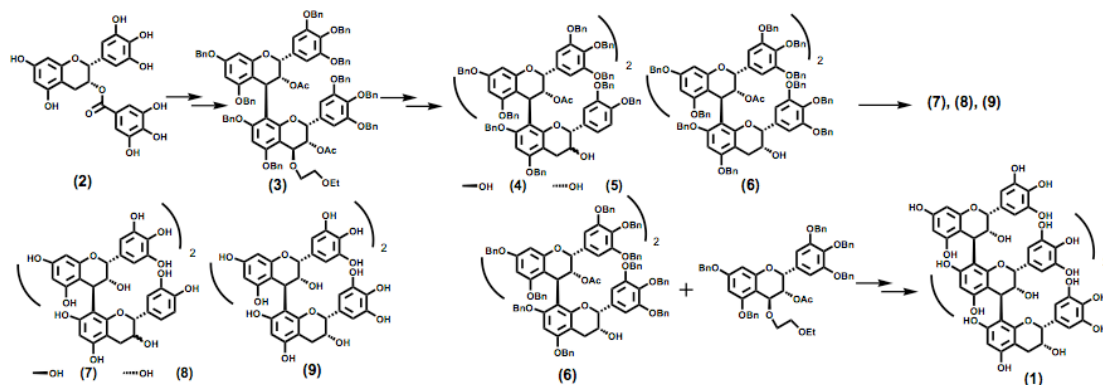


(一) Epigallocatechin 重合体の合成と生理活性評価

○山本慎也¹, 市川幹広¹, 石原知里¹, 梅澤公二^{1,2}, 藤井博^{1,2}, 眞壁秀文^{1,2}(¹ 信州大院総合理工・農学専攻, ² 信州大先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所)

【目的】 当研究室では単離が困難な *proanthocyanidin* 類を有機合成によって全合成し、その抗腫瘍活性を評価してきた。先行研究により *epigallocatechin oligomer* はその類似体に比べ高い抗腫瘍活性を示し、またその重合度が大きくなるにつれて活性が高まることが分かった。それらを踏まえ本研究では 3 量体化合物の全合成によるピロガロール基の存在の有無と抗腫瘍活性の相関の評価、及び全合成報告がない *epigallocatechin tetramer* (1) の全合成を試みた。

【方法・結果】 市販品 2 を出発物として 4 ステップで共通前駆体 3 を合成した。3 を種々の求核剤とLewis酸存在下縮合させ、続く脱保護により目的の 3 量体化合物 7, 8, 9 を得た。また 6 に単量体求電子を用いて同様の反応を行い *epigallocatechin tetramer* (1) を得た。7, 8, 9 の抗腫瘍活性試験から活性が末端ユニットの水酸基の存在の有無と相関していることが明らかになった。今後 (1) の抗腫瘍活性試験を行う予定である。



Quinocidin の母核化合物に対する求核剤の付加反応解析

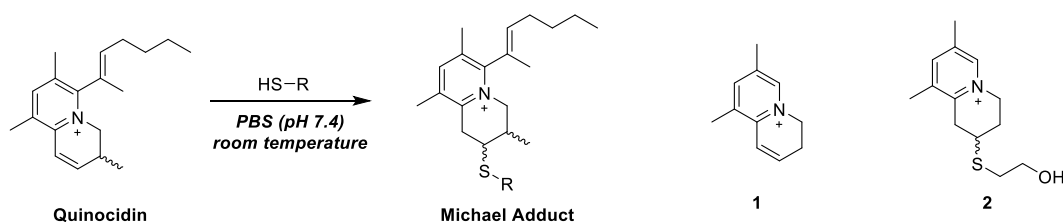
○澤木裕紀, 中川 優, 戸村友彦, 小鹿 一 (名大院生命農)

【目的】

Quinocidin は、放線菌 *Actinomyces* sp. TP-A0019 株が生産する細胞毒性物質であり、天然物では極めて稀な 3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有している。我々は、Quinocidin が中性水溶液中、室温で 2-mercaptoethanol および *N*-acetyl-L-cysteine と Michael 付加体を形成することを見出した。本知見は、Quinocidin を利用して新たな cysteine 捕捉剤を開発できる可能性を示唆するものである。そこで本研究では、Quinocidin の母核化合物である 1 を合成し、その反応性を調べることを目的とした。

【方法・結果】

母核化合物 1 は、3,5-lutidine を出発原料として 5 段階で合成した。まず、1 を PBS (pH 7.4) 中室温で 10 等量の 2-mercaptoethanol と混合してその反応液を HPLC によって分析したところ、2 時間で 1 が完全に消失し、新たな生成物を与えることが確認された。各種機器分析から、生成物は 2 と決定され、1 は Quinocidin と同様に Michael 付加反応によってチオールを捕捉することが示唆された。現在、cysteine を含む各種アミノ酸と 1 との付加反応についても調べており、その結果も合わせて報告する。



プラディミシンと高マンノース型糖鎖の分岐型オリゴ糖モチーフとの結合解析

○渡邊泰典¹, 中川 優^{1,2}, 山地史哉¹, 伊藤幸成², 五十嵐康弘³, 小鹿 一¹

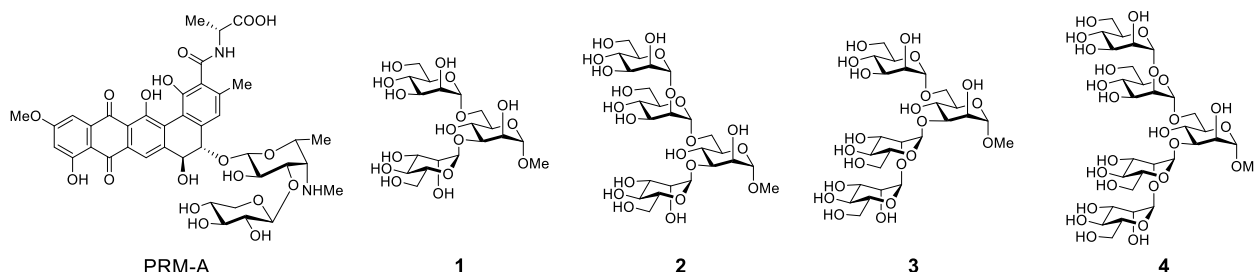
¹名大院・生命農, ²理研, ³富山県大・生工

【目的】

プラディミシン A (PRM-A) は, ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の表層に存在する高マンノース型糖鎖に結合することで抗 HIV 活性を示す. PRM-A は糖鎖を標的とする前例のない抗 HIV 薬リードとして注目されているが, PRM-A と高マンノース型糖鎖の結合様式は明らかになっていない. 近年, 我々は PRM-A が直鎖型よりも分岐型マンノオリゴ糖に強く結合することを見出した. そこで本研究では, 高マンノース型糖鎖の三〜五糖からなる分岐型マンノオリゴ糖モチーフと PRM-A とのアフィニティを評価し, PRM-A と高マンノース型糖鎖との結合様式に関する知見を得ることを目的とした.

【方法・結果】

高マンノース型糖鎖の分岐型オリゴ糖モチーフ (**1-3**) を合成し, PRM-A との結合活性を評価した. その結果, PRM-A は三糖 **1** よりも四糖 **2, 3** に強く結合し, 非還元末端マンノース残基の空間的距離が重要である可能性が示唆された. 現在五糖 **4** の合成を進めており, その結合試験の結果も合わせて報告する.



プラディミシンと真菌マンナン分岐型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

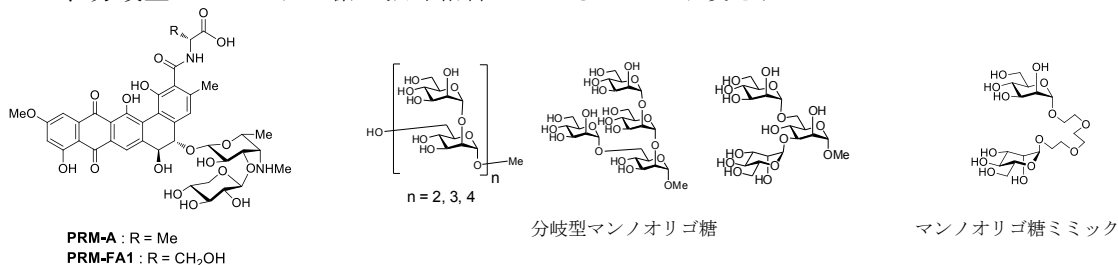
¹名大院・生命農, ²理研, ³富山県大・生工

【目的】

プラディミシン類 (PRMs) は, 真菌の細胞壁マンナンに結合して抗真菌活性を示すユニークな抗生物質群である. 我々は最近, PRMs は細胞壁マンナンのマンノース (Man) 残基にランダムに結合するのではなく, 分岐型マンノオリゴ糖部分に選択的に結合することを見出している. そこで本研究では, 真菌マンナン由来の分岐型マンノオリゴ糖を系統的に化学合成し, PRMs に対するアフィニティを評価することで, PRMs のオリゴ糖認識メカニズムに関する知見を得ることを目的とした.

【方法・結果】

Candida albicans の細胞壁マンナンの構造から分岐型マンノオリゴ糖モチーフを抽出して化学合成した. 各オリゴ糖の PRMs に対するアフィニティを評価した結果, 非還元末端 Man 残基の数が多いオリゴ糖ほど PRMs と強く結合することが明らかとなった. さらに, トリエチレングリコールの両端に Man を連結したマンノオリゴ糖ミミックが二分岐型マンノオリゴ糖と同等のアフィニティを示すことも確認された. 以上の結果より, PRMs は複数の非還元末端 Man 残基と同時に相互作用することで, 分岐型マンノオリゴ糖と強く結合していることが示唆された.



Bis(*p*-nitrophenyl) Phosphorazidate を求電子剤かつアジド源として利用した
Pummerer 型転位の開発

○石原稿太郎, 塩入孝之, 松儀真人 (名城大農)

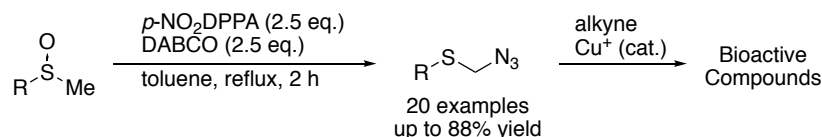
【目的】

Pummerer 転位はスルホキシドに求電子剤を作用させることで α 置換スルフィドへと変換する反応である。様々な求核剤を用いることで異なる官能基を導入することができるが、本 Pummerer 転位によりアジド基を導入した報告はこれまでに 2 例しかない。¹⁾

一般に、 α -アジドスルフィドは α -ハロスルフィドと爆発性を有するアジド化剤との置換反応によって合成される。一方、*p*-NO₂DPPA はリン原子の作用により安定化されたアジド化剤であり、本試薬由来のアジド基を求核剤として用いた Pummerer 転位が進行すれば、安全かつ簡便に α -アジドスルフィドが合成できる。そこで、*p*-NO₂DPPA を求電子剤かつアジド源として利用した Pummerer 転位による α -アジドスルフィドの合成を試みた。

【方法・結果】

種々検討した結果、*p*-NO₂DPPA の存在下、塩基として DABCO を用いることで Pummerer 転位が進行し、目的生成物が収率良く得られることがわかった。様々なスルホキシドを基質として反応を試みたところ、メチルスルホキシドを用いた際に目的生成物が収率良く得られた。メチルスルホキシドに基質を絞り、基質の適用範囲を調べたところ、芳香族・脂肪族スルホキシドともに反応は首尾良く進行し、メチル基のみで選択的にアジド化が進行することが明らかになった。次に、合成した α -アジドスルフィドを用いて Click 反応を行い、生物活性物質を合成した。



References 1) (a) Shimada, K. *et al. Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 4637. (b) Jiao, N. *et al. Org. Lett.* **2015**, 17, 6186.

米糠タンパク質はコレステロール代謝改善作用を発揮する

○王 吉力特, 長岡 利 (岐阜大・応用生物科学部)

【目的】

米糠タンパク質 (RBP) のコレステロール (CHOL) 代謝に対する影響についての報告は少ない。本研究では、*in vivo* 及び *in vitro* 実験により RBP の CHOL 代謝改善作用機構を解明することを目的とする。

【方法・結果】

<実験 1> Wistar 系雄ラットに RBP を添加した高 CHOL 食を与え、血清脂質、糞中ステロイド排出量を定量した。また、RBP の *in vitro* の CHOL ミセル溶解性及び胆汁酸結合能に対する影響を評価した。<実験 2> RBP を胆汁酸結合カラムにより、アフィニティークロマトグラフィーを行い、活性タンパク質を同定した。<実験 3> RBP を HiLoad 26/60 Superdex 200 pg カラムでゲルろ過クロマトグラフィーを行い、RBP1~RBP6 の CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。また、RBP3 を SOURCE 5RPC ST 4.6/150 カラムによる逆相クロマトグラフィーを行い、三つの画分に分け、CHOL ミセル溶解性に対する影響を評価した。その結果、<実験 1> RBP は血清総 CHOL を有意に低下させ、糞中ステロイド排出量を有意に増加させ、CHOL ミセル溶解性を有意に低下させ、胆汁酸結合能を持つことを明らかにした。<実験 2> RBP 由来する胆汁酸結合タンパク質が得られ、Hypothetical protein OsJ_13801 (NCBI accession no. EAZ29742, 54.5KDa) と同定した。<実験 3> RBP3 は他の画分と比較して CHOL ミセル溶解性を有意に低下させた。RBP3A または、RBP3B と比較して RBP3C は CHOL ミセル溶解性を有意に低下させ、Non-specific lipid-transfer protein 1 (LTP1) (NCBI accession No.A2ZHF1, 11.3KDa) と Lectin (NCBI accession No.Q01MB6, 22.7KDa) を含むことを明らかにした。

本研究により、RBP は *in vivo* では、糞中ステロイド排出量を増加させることで血清 CHOL が低下すること、*in vitro* では、胆汁酸と結合して CHOL ミセル溶解性を低下させることを明らかにし、新規胆汁酸結合タンパク質として Hypothetical protein OsJ_13801、新規 CHOL ミセル溶解性阻害性タンパク質として LTP1 及び Lectin を初めて同定した。本研究で、RBP に含まれる CHOL 代謝改善作用を発揮する有効成分を含む作用機構を解明した。

P45

乳酸菌オリゴ DNA と生薬分子の複合体による骨格筋分化誘導

○進士彩華¹, 梅澤公二^{1,2}, 下里剛士³, 高谷智英^{1,2}

(¹信州大農, ²信州大バイオメディカル研, ³信州大菌類・微生物セ)

【目的】

超高齢化社会では加齢性筋萎縮を伴うロコモティブ症候群が急増している。筋力や筋量を維持するには、日々の食事を介した予防が重要である。骨格筋組織は、筋芽細胞と呼ばれる先駆細胞の増殖と分化によって恒常性が保たれている。そこで我々は、多彩な生理作用を示すオリゴ DNA (ODN) に着目し、筋芽細胞に作用する ODN 配列の探索と解析を行った。

【方法・結果】

マウス筋組織から採取・培養した筋芽細胞を試験に用いた。スクリーニングには、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来する ODN を供した。96 穴プレートに播種した筋芽細胞に ODN を投与し、48 時間後に骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) の免疫染色を行った。その結果、MHC 陽性筋細胞の割合を著しく増加させる ODN 群を見出し、myoDN (myogenic ODN) と命名した。

myoDN は熱変性で失活することから、その活性は立体構造に依存することが示唆された。分子シミュレーションの結果、myoDN は G スタッキングを有する特徴的な立体構造を取ることが示された。さらに、植物性生薬に含まれるアルカロイドの一種が、myoDN の作用を顕著に増強することを見出した。アルカロイド単体には筋分化促進作用は認めないことから、このアルカロイドは myoDN と結合し、その構造を安定化させることで myoDN の作用を増強すると考えられる。また、一部の塩基を欠失または置換した変異 myoDN の検討を行い、活性に必須の塩基や、アルカロイドに対する反応性に不可欠な塩基を同定した。

myoDN-アルカロイド複合体は、細胞の筋分化を促進する全く新しい機能性分子として、ロコモティブ症候群の予防、食肉の増産、横紋筋肉腫の増殖抑制などへの適用が期待される。

P46

乳酸菌オリゴ DNA による筋分化誘導を活用した鶏肉増産法の開発

○二橋佑磨¹, 進士彩華², 小野珠乙², 鏡味裕², 梅澤公二^{2,3}, 下里剛士⁴, 高谷智英^{1,2,3}

(¹信州大院農, ²信州大農, ³信州大バイオメディカル研, ⁴信州大菌類・微生物セ)

【目的】

筋組織は筋芽細胞の増殖と分化によって形成される。我々はこれまで、卵用鶏と比べて肉用鶏では筋芽細胞の増殖・分化が速いこと、骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン遺伝子の発現が高いことを見出してきた。肉用鶏の筋形成を担う筋芽細胞の分化をさらに促進できれば、食肉の増産につながることを期待される。我々は最近、乳酸菌 *Lactobacillus rhamnosus* GG のゲノム配列に由来するオリゴ DNA (myoDN) が、マウス筋芽細胞の分化を強力に促進することを見出した。本研究では、myoDN の筋分化作用がニワトリ筋芽細胞でも認められるかを検討した。

【方法・結果】

肉用鶏の 10 日胚の脚部筋組織から骨格筋幹細胞を採取し、初代培養して得た筋芽細胞を実験に用いた。筋芽細胞に myoDN を投与し、細胞数を経時的に計測した結果、myoDN 投与後 48 時間には顕著な細胞増殖の抑制を認めた。次に、増殖中の未分化な筋芽細胞に myoDN を投与し、48 時間後にミオシン重鎖の免疫染色を行った。myoDN 投与群では、ミオシン重鎖陽性の筋細胞の割合が有意に増加していた。myoDN 依存的な遺伝子発現の変化を qPCR で調べた結果、myoDN 投与群では、骨格筋のマスター因子 *MYOD1* の発現量が 3.3 倍、筋分化を誘導する転写因子 *MYOG* が 2.8 倍、速筋型ミオシン重鎖 *MYH1* が 2.7 倍、筋細胞融合に必須の膜タンパク質 *TMEM8C* が 3.2 倍に増加していた。以上の結果から、myoDN は哺乳類だけでなく鳥類の筋芽細胞の分化も亢進することが示された。さらに我々は最近、myoDN の作用を増強する植物性分子を発見したので報告する。myoDN には、家禽の筋発生・筋形成を促進し、食肉の増産につながる飼料配合物としての可能性が期待される。

P47

経口摂取アセチルコリンは迷走神経を介して高血圧自然発症ラットの血圧を下げる

○山口翔平², 松本健督², 渡辺旭², 野尻恵資², 中村浩蔵^{1,2}

(¹信州大農, ²信州大院農)

【目的】

我々は経口摂取アセチルコリン (ACh、 10^{-8} mol/kg) が高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧上昇および腎交感神経活動を抑制することを、テレメトリー法を用いて明らかにした。本研究では経口摂取 ACh の降圧メカニズムを、ACh 受容体阻害試験および迷走神経 (消化器につながる副交感神経) 切断試験および ACh 反復経口投与試験後の生体成分濃度変化で検討した。

【方法】

- 1、ACh 受容体阻害試験： 雄性 11 週齢 SHR に ACh (ACh 投与群) または M3 受容体アンタゴニスト・1,1-Dimethyl-4-diphenylacetoxypiperidinium (4-DAMP) およびその両者 (ACh+4-DAMP) を、それぞれ 10^{-8} mol/kg となるように単回経口投与し、血圧測定を行った。
- 2、迷走神経切断試験： 麻酔下で雄性 15 週齢 SHR を開腹後、手術群では迷走神経を横隔膜と胃の噴門部の間で切断した。偽手術群 (対照) では開腹手術のみを行った。手術後 1 週間の回復期間を設け、 10^{-8} mol/kg 用量の ACh を両群に単回経口投与し、血圧測定を行った。
- 3、反復経口投与試験： SHR を代謝ケージで飼育、ACh 10^{-8} mol/kg を 30 日間反復経口投与して血圧と生体成分を測定し、対照群 (水投与) と比較した。

【結果】

迷走神経切断した手術群の血圧は、経口摂取 ACh による影響を受けず、収縮期血圧が偽手術群と比較して有意な高値を示した。また、4-DAMP 処理によって ACh の降圧作用が大きく減弱した。反復経口投与試験では、血圧低下に伴い血圧などに関与する生体成分濃度が、対照群に比べて有意に変化した。以上の結果から経口摂取 ACh は消化管上の M3 受容体へ作用し、副交感神経 (迷走神経) を亢進させ、降圧作用を示すことが示唆され、その結果、生体成分濃度が変化したと推察された。

P48

ナスのアセチルコリン含量と抗高血圧作用

○松本健督², 山口翔平², 早崎大輔², 中村浩蔵^{1,2}(¹信州大農, ²信州大院農)

【目的】 我々は、神経伝達物質として知られているアセチルコリン (AcCh) が、高血圧自然発症ラット (SHR) において、極低用量の経口投与で抗高血圧作用をもたらすことを明らかにし、AcCh は新たな食品機能性成分として期待できることを示した。生鮮農産物を対象に AcCh 含量調査を行ったところ、AcCh は全ての農産物に含まれており、特にナスがその他の農産物の 1,000 倍以上含有していた。本研究では、AcCh 高含有農産物・ナスの抗高血圧作用を、SHR を用いた血管等尺性張力試験および単回経口投与試験、反復経口投与試験によって評価した。

【方法】 大阪府阪南市産・泉州水ナスまたは高知県産・土佐鷹ナスの凍結乾燥粉末を純水に懸濁させて以降の試験に用いた。ナス中の AcCh 含量は、凍結乾燥粉末の振とう抽出溶液を陽イオン交換カートリッジで固相抽出した後、溶出液を 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。血管等尺性張力試験：フェニレフリン収縮させた雄性 14 週齢 SHR 由来胸部大動脈血管リング標本に、ナス凍結乾燥物を累積添加し、張力変化を記録した。単回経口投与試験：絶食後の雄性 14 週齢 SHR に、ナス凍結乾燥物または純水を単回経口投与 (n=6) し、収縮期・拡張期血圧をテイルカフ法で経時的に測定した。反復経口投与試験：雄性 10 週齢 SHR を 4 週間代謝ケージで飼育し、毎日、ナス凍結乾燥物または純水を経口投与し (n=6)、投与開始 1 週間毎にテイルカフ法で血圧測定を行った。

【結果】 試験に用いたナス凍結乾燥粉末中のアセチルコリン含量は泉州水ナスが 2.25 mg/g、土佐鷹ナスが 1.78 mg/g であった。血管等尺性張力試験では、ナス凍結乾燥物は AcCh 標準品と同レベルの血管拡張作用を示し、血管拡張パターンも標準品と同様であった。単回経口投与試験、反復経口投与試験では、ナス凍結乾燥物投与群の収縮期血圧が対照群と比較して有意な低値を示した。食経験豊富で身近な野菜であるナスは、今後高血圧予防を目的とした機能性食品素材としての応用が期待できる。

P49

プロシアニジン B2 ガレートによる T 細胞機能制御メカニズムの解明

○古屋花暖¹, 山本佳奈², 山田和輝¹, 真壁秀文¹, 田中沙智¹ (¹信大院総合理工)

【目的】

ポリフェノール的一种であるプロシアニジン B2 (PCB2) はマクロファージの炎症性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で様々な炎症性疾患の改善効果を示すことが期待されている. 一方で, 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ることが予想されるが, T 細胞の機能制御への関与については未だ解明されていない. そこで本研究では, PCB2 ガレートによる T 細胞機能に対する影響を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

PCB2, PCB2 3'-OG, PCB2 3''-OG, PCB2 3,3''-di-OG を 25 μ M でマウス脾臓細胞に添加し, 抗 CD3 抗体刺激したところ, 培養上清中の IFN- γ と IL-17 産生量は, PCB2 3,3''-di-OG の添加により抗 CD3 抗体単独刺激と比較して有意に減少したが, IL-10 産生量は変化しなかった. また, 単離した CD4 陽性 T 細胞においても, PCB2 3,3''-di-OG の添加で IFN- γ と IL-17 産生量は有意に低下したが, IL-10 産生に有意な影響はみられなかった. そこで, 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 の発現を解析したところ, T-bet と ROR γ t の発現は PCB2 3,3''-di-OG の添加により有意に低下した. 以上の結果から, PCB2 3,3''-di-OG は T 細胞に直接作用して T-bet および ROR γ t の発現を抑制し, 炎症性サイトカインである IFN- γ と IL-17 の産生を特異的に制御することで, T 細胞関連疾患の改善作用をもつ可能性が示唆された.

P50

DNA 低メチル化に伴う DNA 損傷機構の解明: ゲノム編集技術による遺伝子欠損細胞の作製と解析

○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】

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疾患との関連性が近年注目されている. 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 のメチル化は維持メチル化反応により, 安定に継承されている. DNA 複製直後, 二本鎖 DNA の鋳型鎖のみがメチル化されたヘミメチル化 DNA が生じたことを UHRF1 が認識し, 維持メチル化酵素 DNA methyltransferase 1 (DNMT1) がリクルートされ, 新生鎖にメチル化を付与する. 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 DNMT1 の発現低下により, ヘミメチル化 DNA に UHRF1 が結合したまま次の DNA 複製期を迎えると 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 メチル化酵素が欠損し, ゲノム DNA に全くメチル化がない ES 細胞(TKO)や UHRF1 を欠損させた TKO を作製し, これらを用いて 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】

まず, TKO の複製中の DNA 鎖にメチル化 dCTP を取り込ませ, ゲノム DNA 上にヘミメチル化部位を生じさせた. 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)の局在数をカウントし, DNA 損傷レベルを解析した. その結果, 局在数は次の DNA 複製期以降に有意に増加していた. すなわち, ヘミメチル化部位に UHRF1 が結合したまま次の DNA 複製期を迎えると複製装置が衝突し, DNA 二本鎖切断が引き起こされるモデルの妥当性を示せた.

次に, UHRF1 と複製装置の衝突が DNA 損傷の原因であることをより明確にするために, ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを利用して *Uhrf1* を欠損させた TKO を作製した. 現在, 欠損させたことを遺伝子およびタンパクレベルで確認・解析している. このモデルの解明は, 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を支持する.

P51

生きた麴菌を用いた新規プロバイオティクスのよる宿主の腸内代謝物及び細菌叢の変化
○都築 翔¹, 山田 和広¹, 高田 真由香¹, 村田 俊輔¹, 酒井 杏匠¹, 丸井 萌子¹, 長澤 麻央¹,
片山 琢也², 丸山 潤一², 兒島 孝明³, 中野 秀雄³, 林 利哉¹, 志水 元亨¹, 加藤 雅士¹
(¹名城大・農, ²東大院・農, ³名大院・農)

【目的】

わが国では古くから味噌、醤油などの発酵食品を活用した独自の食文化を形成してきた。これらの伝統製法の発酵食品中では麴菌が生存している場合があり、それらを食すことで日本人は麴菌を生きたまま摂取していたことが考えられる。また、麴菌および近縁の *A. nidulans* は低酸素条件下でも生存し、アミノ酸や有機酸を発酵生産することが明らかになっている。これらのことは麴菌が比較的低酸素条件下である腸内においても活動できることを示唆している。

本研究では、マウスに生きた麴菌を摂取させることにより、麴菌が生きたまま腸内に届くのか、比較的低酸素である腸内環境で麴菌は活動できるのか、その場合、腸内の代謝物の変化や細菌叢への影響はどのようなものかを明らかにすることを目的にした。

【方法・結果】

人工胃液を調製し、麴菌が生存できるのか評価したところ、麴菌は pH1 の胃酸に 3 時間暴露されても、50 % 以上生存していた。このことから、麴菌は高い胃酸耐性を有することがわかった。生理食塩水のみ（コントロール）、または生理食塩水に懸濁した生きた麴菌の孢子 5.0×10^2 , 10^3 , 10^4 個をそれぞれ 30 日間毎日マウスに経口投与し、糞便を回収した。GC-MS による糞便中の代謝物の解析から、麴菌を与えたものでは Ala, Val, およびコハク酸などが増加していた。また、糞便中の細菌叢をメタゲノム解析したところ、生きた麴菌を与えたものでは *Bacteroides* 門に属する細菌が増加していた。これらのことから、麴菌が腸内で活動し腸内環境に影響を与えることが示唆された。

P52

D-Asp が腸内細菌叢に与える影響と腸内細菌が生体内 D-Asp に与える影響の解析
○山本佳奈, 伊藤智和, 邊見久, 吉村徹（名大院生命農）

【目的】

近年哺乳類の体内に存在する D-アミノ酸が、多様な生理機能を担っていることが明らかになってきた。D-Ser は *N*-メチル-D-アスパラギン酸（NMDA）受容体のコアゴニストとして働くことで、記憶や学習に関与している。D-Asp はホルモンの合成・分泌を制御し、神経伝達物質として機能している。また腸内細菌により産生される D-アミノ酸が、小腸上皮の D-アミノ酸オキシダーゼ（DAO）を介し一部の腸内細菌の制御に関与することが報告された。本研究では、D-Asp の経口投与により腸内細菌叢がどのような影響を受けるかを解析した。また未だ生体内 D-Asp の合成機構が不分明であることから、生体内 D-Asp レベルに腸内細菌が影響を与えるかを検証した。

【方法・結果】

C57BL/6 マウスに D-Asp または L-Asp を 4 週間経口投与した。経時的に血清中の D-Asp および L-Asp 濃度を測定するとともに、糞便中 DNA の解析により腸内細菌叢の変化を解析した。D-Asp 投与群では Control 群（Asp 非投与）や L-Asp 投与群と比べ血中 D-Asp 濃度は約 2 倍上昇した。D-Asp 摂取による腸内細菌叢の顕著な変化は認められなかった一方で、L-Asp 投与群で *Prevotella* 属の増加抑制が認められた。本研究ではまた、抗生物質を経口投与し腸内細菌を除去した C57BL/6 マウスの、血清、精巣、大脳、小脳中の D-Asp 濃度を解析した。腸内細菌除去群と Control 群間の、D-Asp 濃度に有意差は認められなかった。したがって腸内細菌は生体内 D-Asp の主要な供給源ではない可能性が示唆された。

D-セリンデヒドラターゼの基質となるヒト尿中未知アミノ酸の同定
 ○戸野真由香, 伊藤智和, 邊見久, 吉村徹 (名大院生命農)

【目的】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 D-セリンデヒドラターゼ (Dsd1p) は、ピリドキサーールリン酸 (PLP) 及び Zn^{2+} 依存的に D-セリンの脱アミノ化反応を触媒する。Dsd1p をヒト尿サンプルに作用させ、アミノ酸分析に供したところ、ヒト尿中に Dsd1p の基質となる D-セリン以外の未知のアミノ酸が存在することが明らかとなった。このアミノ酸はヒト尿中にタンパク質性アミノ酸と同程度か、それ以上の濃度で存在していた。本研究では、この未知アミノ酸の同定、及び哺乳類の各組織における当該アミノ酸の分布についての検討を目的としている。

【方法・結果】

ヒト尿より部分精製したこの未知アミノ酸に対して、様々な D-アミノ酸と反応性を示す D-アミノ酸オキシダーゼや D-アミノ酸トランスアミナーゼを作用させたところ、当該アミノ酸はこれら酵素により異化されなかった。このことから、当該アミノ酸は Dsd1p の基質になるにもかかわらず D-アミノ酸ではない可能性が考えられた。検討の結果、(a) 当該アミノ酸の 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxy-succinimidyl carbamate (AQC) 誘導体化物の ESI-MS 解析から、この質量電荷比が 319 であること、(b) 当該アミノ酸の Dsd1p 処理によって生じるケト酸が、アスパラギンの脱アミノ化反応によって生じるケト酸と同一であること、(c) 当該アミノ酸が大腸菌由来アスパラギナーゼ 1 (ansA) の基質となり、反応後に L-エリスロ-β-ヒドロキシアスパラギン酸を生じること、などが明らかとなった。以上の結果、当該アミノ酸が L-エリスロ-β-ヒドロキシアスパラギンであると結論づけられた。また、ラットとマウス的大脑、小脳、精巣、血漿、尿における当該アミノ酸の分布を検討したところ、尿においては当該アミノ酸が著量存在していたが、その他の組織では検出されなかった。

表皮形成におけるタンパク質架橋化酵素の機能解析
 ○田辺勇輝¹、加藤まなみ¹、山根美樹¹、高間寛之²、辰川英樹¹、秋山真志²、人見清隆¹
 (1 名大院・創薬科学、2 名大院・医)

【目的】

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) はカルシウムイオン依存的にタンパク質同士をグルタミン残基とリジン残基間で架橋化する酵素であり、血液凝固、表皮形成などの多彩な生命現象に関与している。皮膚表皮では TG1 と TG3 が協調的に働き、表皮の形成やバリア機能に貢献しているが、その詳細については未だ不明な点が数多く存在する。本研究ではヒト表皮形成を再現できる三次元培養系を用いた表皮特異的な TGase の機能解析を目的とする。

【方法・結果】

ヒト新生児由来の表皮角化細胞は単層初代培養で増殖させた後、三次元培養を行うことで人工的に表皮角化層が作製できる。作製表皮の完成度は HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色による形態観察で評価した。表皮中の TG1、TG3 の発現レベルを解析したところ、表皮形成に伴った各 TG の発現パターンが明らかになった。また表皮中における TG1、TG3 の活性に関して、これらを特異的に検出する基質ペプチドを用いて解析した結果、それぞれの活性が観察された領域は異なっていた。また、siRNA を用いてノックダウンを行い、TG1 及び TG3 の発現抑制下での表皮を作製した。HE 染色及び電子顕微鏡による形態観察を行った結果、TGase の発現抑制が通常とは異なる表皮形態をもたらすことが明らかになった。

メダカの組織型タンパク質架橋化酵素の遺伝子欠損変異体作製と解析
 奥谷冬穂¹、渡邊優子¹、木下政人²、辰川英樹¹、橋本寿史²、〇人見清隆¹
 (1 名大院・創薬科学、2 京大院・農、3 名大・生物機能開発利用研究セ)

【目的】

タンパク質架橋化酵素はタンパク質間に不可逆的な架橋形成を触媒する酵素ファミリーで、これを構成するそれぞれのアイソザイムが血液凝固や表皮形成、細胞死などに関与する。ヒトでは8種類の酵素群が存在し、中でも全ての組織に存在する組織型(TG2)については、転写調節、細胞死、神経活動など多彩な生命現象に関わるアイソザイムである。近年モデル生物として取り扱われている、メダカ(*Oryzias latipes*)にもTG2に相当するアイソザイム(オルソログ)が存在し、我々はこれまで組換えタンパク質を作製して酵素活性など生化学的性質を明らかにしてきた。本研究では発現分布を免疫組織学的に調べるとともに、2種類のゲノム編集による変異体の作製を試みその解析を目的とした。

【方法・結果】

精製した組換えタンパク質を抗原としてポリクローナル抗体を得て、メダカ組織切片を解析し、あわせて組織抽出物のイムノブロッティングを行った。その結果、ヒトTG2は全組織に発現しているが、メダカでは脊髄をはじめとする特異的な組織発現を示した。さらにTALENおよびCRISPR/Cas9法により異なる様式での変異体を作製した。ホモ変異体はいずれも外見上の変化はなかったが、遊泳行動が野生型と異なる傾向を見出した。そこで5分間の遊泳行動を追跡しその距離を定量化解析することで、変異体が野生型よりも遊泳距離が短く運動機能に影響を及ぼしていることを示した。この傾向はオスのメダカでより顕著であり、今後そのメカニズムを発現組織の知見と合わせて解析する。

カルシウムシグナルによる分泌経路の新規制御メカニズム解析
 〇新居裕美香¹、井上国子¹、高原照直¹、柴田秀樹¹、牧正敏¹(¹名大院生命農)

【目的】

生体内で、分泌経路はコラーゲンなどの分泌タンパク質にとって重要な役割を果たしている。近年、小胞体(ER)からゴルジ体の初期分泌経路において、カルシウムシグナルを介した制御が明らかとなってきた。カルシウム結合タンパク質ALG-2は、初期分泌経路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、MAP1Bを見出した。MISSLは機能未知のタンパク質であったが、MISSLの発現抑制により、ERからの出芽部位(ERES)やERGIC、ゴルジ体の局在が変化することが明らかとなった。また、微小管の動態に関与するMAP1Bが、カルシウム依存的にALG-2とMISSLに結合することを見出してきた。本研究では、ALG-2が分泌経路に関与することから、ALG-2、MISSL、MAP1Bの分泌経路における機能解明を目的とした。

【方法・結果】

ALG-2、MISSLの初期分泌経路への関与を調べるために、正常ヒト線維芽細胞(IMR-90)を用いてコラーゲンの輸送をモニターした。ALG-2、MISSLを発現抑制すると、コントロールに比べてコラーゲンのゴルジ体への輸送が遅れた。

また、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り、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、MAP1Bの発現抑制も組み合わせてSEAPの分泌割合を測定したところ、MISSL、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した。これらの結果から、ALG-2、MISSL、MAP1Bのカルシウム依存的な結合により、コラーゲンなどの分泌タンパク質の輸送が制御される新たな仕組みを見出した。

P57

アネキシン A11 とその ALS 関連変異体の過剰発現がもたらすカルシウムホメオスタシスへの影響

○林本 敬大, 柴田 秀樹, 高原 照直, 牧 正敏 (名大院・生命農)

【目的】アネキシン A11 (AnxA11)は、カルボキシ末端側領域にアネキシファミリーに共通の繰り返し配列であるアネキシンリピートを持ち、それによってカルシウム依存的にリン脂質に結合するタンパク質である。また、家族性及び孤発性筋委縮性側索硬化症(ALS)患者に、6つの AnxA11 遺伝子の変異(G38R, D40G, G175R, G189E, R235Q, R346C)が同定されており、今回の研究では、その変異体と Ca^{2+} 濃度の関連について、野生型との違いを解析した。

【方法】HeLa 細胞に緑色蛍光タンパク質 SGFP2 を誘導させた AnxA11 (AnxA11-SGFP2)と Ca^{2+} 濃度を感知するセンサータンパク質 R-GECO1 を発現させ、カルシウムイオノフォアである ionomycin の刺激前後の、AnxA11-SGFP2 の局在と細胞内の遊離 Ca^{2+} 濃度の変化の様式を解析した。

【結果】AnxA11-SGFP2 を発現させていない細胞では、ionomycin によって上昇した Ca^{2+} 濃度がその後速やかに減衰していった。一方、AnxA11-SGFP2 を発現させた細胞では、上昇した Ca^{2+} 濃度が高いまま維持され、その後、AnxA11-SGFP2 の局在が、時間をおいて細胞質から細胞膜、次に、核質から核膜へと変化した。 Ca^{2+} 濃度の上昇と AnxA11-SGFP2 の局在変化には一定のタイムラグがあったことから、この間に何らかの機構が働いていたことが考えられる。

AnxA11 の変異体においては、野生型と同様、上昇した Ca^{2+} 濃度が高いまま維持されたもの(G38R, D40G, G189E)と、上昇した $[\text{Ca}^{2+}]$ が徐々に緩やかに減衰していくもの(G175R, R235Q, R346C)が見られた。一方、局在変化については、R235Q 以外の変異体において、 Ca^{2+} 濃度の上昇後に野生型と同様の局在変化を示した。このことから、AnxA11 遺伝子のいくつかの変異において、細胞内カルシウムホメオスタシスに影響を与える可能性が示された。カルシウムホメオスタシスの異常が ALS の発症に関わっているかもしれない。

P58

微小管結合タンパク質 MAP1B 内の Ca^{2+} を介した新規機能領域の同定と解析

○河野雄太¹, 新居裕美香¹, 高原照直¹, 柴田秀樹¹, 牧正敏¹ (¹名大院生命農)

【目的】

微小管結合タンパク質 MAP1B は神経系において微小管の動態制御や、シグナル伝達タンパク質としての機能など様々な機能を有することが明らかになっている。我々はこれまでにカルシウム結合タンパク質 ALG-2 と MAP1B が結合することを見出した。ALG-2 は細胞内カルシウムセンサーとして働きカルシウム依存的に様々なタンパク質と相互作用することから、ALG-2 と MAP1B との結合はカルシウムシグナルに応答した微小管動態制御の新しい分子基盤であると推測される。これまで ALG-2 結合モチーフとして ABM-1 と ABM-2 の 2 つが判明しているが、MAP1B にはこれらのモチーフが存在しない。本研究では、MAP1B 内の新規 ALG-2 結合モチーフの同定を行うことにより、MAP1B と ALG-2 との結合様式を詳細に解析することを目的とした。

【方法・結果】

MAP1B における ALG-2 の結合領域を絞り込むために、MAP1B 全長や種々の MAP1B 断片と ALG-2 との結合能を免疫沈降実験により解析した。その結果、ALG-2 の結合最小領域として MAP1B の 1813-1848 に相当する 36 アミノ酸残基を同定した。さらにこの領域においてアミノ酸置換を行った MAP1B 変異体を複数作製し ALG-2 との結合解析を行った。その結果、ALG-2 との結合に必要なアミノ酸残基を同定した。さらに Far-Western blotting 解析により MAP1B と ALG-2 とが直接的に結合することが分かった。これらのことから MAP1B の新規機能領域として ALG-2 結合領域を同定した。

さらに既知 ALG-2 変異体と MAP1B の結合能を免疫沈降実験により解析した。野生型 ALG-2 では MAP1B 断片との結合が確認されたが変異体では Pocket 2 が変異した Δ GF 変異体のみが結合した。この結果からも MAP1B との結合様式は ALG-2 の既知結合タンパク質のものとは異なることが示唆された。

P59

ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC 7942 由来脂肪酸生産株の明暗周期条件での生育は
培地からの遊離脂肪酸除去により改善する

○吉田和裕, 松浦美祥, 鶴瀬和秀, 加藤明宏, 高谷信之, 前田真一, 小俣達男 (名大院生命農)

【目的】

ラン藻の acyl-ACP 合成酵素(Aas)を欠損させて大腸菌由来の thioesterase(TesA)を導入すると, バイオ燃料の原料となる遊離脂肪酸(FFA)を細胞外へ放出する. しかし, *Synechococcus elongatus* PCC 7942 からこのようにして作製した FFA 生産株 dAS1T は, 12L/12D や 8L/16D の明暗周期条件では生育が著しく阻害され, FFA もほとんど放出しなかった. これは, 将来的に屋外の下での持続可能なバイオ燃料生産を行う上では解決しなければならない問題である. 本研究の目的は, dAS1T の明暗周期条件での生育を改善することである.

【方法・結果】

ラン藻の細胞内に FFA が蓄積すると光化学系 II (PSII) が不安定化される. 連続光条件下でも培養後期になると FFA が高蓄積して dAS1T の生育は阻害されるが, この生育阻害は, 培養液にミリスチン酸イソプロピル(IM)を重層し, 培地中の FFA を IM 層に吸収させ, FFA の細胞外への受動拡散を促進させることにより緩和された¹⁾. 本研究では, IM を重層した状態で dAS1T の明暗周期条件での生育を調べ, 著しい生育阻害を引き起こす 8L/16D 条件でも二相培養によって dAS1T の生育が大幅に改善されることを明らかにした. このことから明暗周期下の生育阻害についても, 細胞内 FFA の蓄積が主原因であることが分かった. また, 明暗条件での PSII の量子収率を測定した結果, 暗期から明期に移行する際に dAS1T では WT に比べて著しく F_v/F_m が低下し, IM の重層によりその低下が緩和された. つまり, dAS1T では, 蓄積した FFA によって暗期に PSII が不安定化され, 明期の開始時に光阻害を受ける可能性が考えられた.

1) Kato *et al.* Biotechnol. Biofuels. 10: 141. 2017.

P60

ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 におけるクロロフィルの脱フィトール化

○上之園誠, 高谷信之, 藤田祐一, 小俣達男 (名大院生命農)

【目的】 クロロフィルはクロロフィリドにフィトールがエステル結合した構造をしているが, ラン藻ではフィトールの脱離と再結合が常に行われており, 強光条件でこのターンオーバーが促進されることが報告されている. しかし, ラン藻における脱フィトール酵素は未だ同定されておらず, クロロフィルのターンオーバーの生理学的意義は不明である. 最近, シロイヌナズナにおいて新規クロロフィル脱フィトール酵素 CLD1 が発見された. 本研究の目的は, ラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 における CLD1 ホモログである Synpcc7942_1028 の脱フィトール活性を調べ, 生理学的役割を明らかにすることである.

【方法・結果】 His-tag を付加した Synpcc7942_1028 の組換えタンパク質 (His₆-1028) を *in vitro* でクロロフィルと反応させた結果, His₆-1028 を加えた反応液では加えない反応液より多くのクロロフィリドの生成が確認された. このことから His₆-1028 が脱フィトール活性を持つことが明らかとなった. 次に His₆-1028 を *S. elongatus* PCC7942 で過剰発現させた株 (1028OX 株) を作製し, 生育への影響を調べた. 弱光条件では対照株 (VC 株) と 1028OX 株との生育の差は見られなかったが, 強光条件では VC 株に比べ 1028OX 株の生育が著しく低下し, クロロフィル含量が VC 株の 60%に低下していた. 今後, 欠損株を作製し, 生理学的役割を解明していく予定である.

P61

窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* における
トランスポゾンタギング変異導入系の確立

○戸松千映¹, 上坂一馬², 井原邦夫², 土屋徹^{3,4}, 藤田祐一¹

(¹名大院生命農, ²名大遺伝子, ³京大院地球環境, ⁴京大院人間環境)

【目的】

シアノバクテリアは酸素発生型光合成を行う原核生物であり、その約半数種が窒素固定能を有する。窒素固定反応を触媒するニトロゲナーゼは酸素に非常に脆弱な酵素であることから、酸素を発生する光合成と酸素に弱い窒素固定の両立という“酸素パラドクス”を何らかの分子機構で統御して窒素固定的生育を可能としている。しかしヘテロシスト非形成型シアノバクテリアにおける知見はほとんど得られていない。本研究では、ヘテロシスト非形成型シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* においてトランスポゾンタギング変異導入系を確立し、窒素固定的生育に異常が生じた変異株の単離とその原因遺伝子の探索を行った。

【方法・結果】

高活性トランスポゼースを有する mini-Tn5 ベクター-pKUT-Tn5-Sm/Sp を *Escherichia coli* から *L. boryana* に接合伝達により導入し、ストレプトマイシンで選抜した。その結果、ストレプトマイシン耐性 (Sm^R) を示す変異株を多数単離し、このうち 13 株についてゲノムリシーケンスによって Sm^R カートリッジの挿入部位の同定を行った。その結果、いずれもゲノムの様々な部位に Sm^R カートリッジが挿入されていることが確認できた。この方法がトランスポゾンタギング変異導入系として有効であると考え、さらに変異株ライブラリー約 2,000 株から窒素固定条件での生育を指標にスクリーニングを行い、同条件で生育不良もしくは生育促進を示す変異株を単離した。これらの変異株について原因遺伝子の同定・解析を行ったので報告する。

P62

ヒメツリガネゴケ PPR 編集因子の RNA 認識機構の解析

○松田拓也¹, 杉田護¹, 一瀬瑞穂^{1,2} (¹名大・遺伝子, ²名大・WPI-ITbM)

【目的】

Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質は PPR モチーフと呼ばれる繰り返し構造をもつ配列特異的な RNA 結合タンパク質で、植物オルガネラにおいて RNA 編集を含む様々な転写後制御に関与している。近年、*in silico* 解析により PPR モチーフ内の特定のアミノ酸ペアが RNA 塩基の認識に寄与していることが示唆されたが、その実験的な検証はいまだ不十分である。本研究では、ヒメツリガネゴケの RNA 編集に関与する PPR タンパク質を用いて RNA 塩基認識の基本原則を明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

RNA 編集因子 PpPPR_56 はミトコンドリアの *nad3* と *nad4* RNA を標的とするが、*nad3* RNA 配列を特異的に認識するように複数の PPR モチーフを改変した PpPPR_56 をデザインした。野生型と改変型 PpPPR_56 の組み換えタンパク質を用いて *in vitro* RNA 結合実験を行なった結果、どちらのタンパク質も *nad3*、*nad4* RNA の両方に結合したが、改変型は野生型よりもやや強く *nad3* RNA に結合していた。しかし、これらのタンパク質を *nad3* 部位と *nad4* 部位の RNA 編集が欠損した PpPPR_56 遺伝子破壊株で発現させたところ、野生型 PpPPR_56 は RNA 編集欠損を完全に相補したが、改変型 PpPPR_56 は予想に反して *nad3*、*nad4* RNA とともに RNA 編集活性が観察されなかった。この原因を調べた結果、改変した複数の PPR モチーフのうち、C 末端側の PPR モチーフ内のアミノ酸置換が RNA 編集に影響することが明らかになった。

P63

配列特異的な RNA 結合モチーフを利用したオルガネラ遺伝子のノックダウン系の確立
○石丸愛理¹、一瀬瑞穂^{1,2}、杉田護¹ (¹名大・遺伝子、²名大・WPI-ITbM)

【目的】

植物オルガネラである葉緑体とミトコンドリアは核とは別に独自のゲノムを持つが、これらのオルガネラ DNA を改変することは非常に困難である。本研究では、任意の RNA 配列を認識する RNA 結合タンパク質をベースにオルガネラ移行配列と RNase ドメインを搭載した「人工 RNA 制限酵素」を創製し、オルガネラ遺伝子の発現を RNA レベルで制御するノックダウン系の確立を目指した。

【方法・結果】

人工 RNA 制限酵素に用いる RNA 結合タンパク質として、RNA 塩基と配列特異的に結合し、近年その塩基認識の基本原則が明らかになってきた Pentatricopeptide repeat (PPR) タンパク質を選択した。次に、RNase ドメインを探索した。組み換えタンパク質を用いた *in vitro* RNA 分解実験を行った結果、NYN ドメインが 1 本鎖 RNA を非特異的に切断するエンドヌクレアーゼであることを確認できた。そこで、任意の RNA 配列を認識するようにカスタムした PPR タンパク質と NYN ドメインを用いて、オルガネラ遺伝子をターゲットとした人工 RNA 制限酵素を作製した。現在、生体内で人工 RNA 制限酵素が有効に作用するかを検証するために、複数の人工 RNA 制限酵素を植物体内で発現させ、ターゲット RNA の蓄積量が変化するか調べている。

P64

ヒメツリガネゴケの茎葉体形成を抑制する二成分制御系の研究

○龍昌志¹、野本友司²、後藤友規¹、一瀬瑞穂^{3,4}、佐藤健介⁵、杉田護³、山篠貴史²、青木撰之^{1,5} (¹名大院情科、²名大院生命農、³名大遺伝子、⁴名大 ITbM、⁵名大院情報)

【目的】

二成分制御系は、広く保存された環境応答・細胞内情報のシグナル伝達機構である。この機構において、シグナルはリン酸基の転移を介してヒスチジンキナーゼ (HK) からレスポンスレギュレーターに伝達される。コケ植物ヒメツリガネゴケは植物で最も多様な HK をもつが、それらの機能はあまりわかっていない。私たちは PAS (Period-Arnt-Sim) ドメインをもつ 2 つの HK (PpHK3a と PpHK3b とする) の機能解析を目的とした。

【方法・結果】

PpHK3a と PpHK3b のアミノ酸配列を用いて、分子系統解析を行った。PAS ドメインを持つ HK は、コケ植物とシダ植物以外の植物からは見つからなかった。また、これらの PAS ドメインは、植物では未発見の PAS ドメインであることが示唆された。PpHK3a と PpHK3b の機能を調べるため、相同組換えを用いて、それぞれの単独・二重変異株を作出した。変異株を明暗条件下で生育させたところ、茎葉体発生の早期化が観察された。そこで、茎葉体に分化するカウロネマ細胞の分岐を調べたところ、変異株のカウロネマ細胞の分岐形成率が高くなっていた。定量 PCR の結果、変異株では茎葉体頂端分裂細胞のマスター制御因子 *APB* 遺伝子群の発現が低下していた。したがって、PpHK3a と PpHK3b は、APB 遺伝子群とは異なる経路によって、茎葉体発生を制御していることが明らかになった。

P65

高等植物シロイヌナズナにおける概日時計因子 PRR7 のレシーバー様ドメインの機能解析

○高田祐輔, 嶺野雄登, 加藤翔子, 今村美友, 野本友司, 山篠貴史 (名大院・生命農)

【目的】 多くの生物は 24 時間周期で変動する外界の環境変化に適応するために、概日リズムを生成する機構を獲得・進化させてきた。シロイヌナズナにおいて、PRR(Pseudo Response Regulator)は概日時計システムを構成する主要な振動体として働くことが知られている。PRR の持つレシーバー様ドメイン(RLD)は典型的な RR(Response Regulator)に存在するレシーバードメイン(RD)と一次配列の相同性は高いが、リン酸基転移による修飾を受けることができない。すなわち、RLD は本来の RD としての機能を失っているが、RLD を保持する PRR タンパク質は緑色植物系統に広く保存されていることが知られている。このことから、RLD は PRR の生理活性に重要な役割を果たしていることが推定されるが、その機能については全くわかっていない。そこで、本研究ではこの PRR に保存された RLD の生理的機能を解明することを目的とした。

【方法・結果】 材料として PRR7 の cDNA 全長と HA タグをコードする融合遺伝子 *intact PRR7-HA* と、その RLD をコードする塩基配列を欠損させた *PRR7ΔRLD-HA* をそれぞれ PRR7 プロモーター支配下で制御するコンストラクトを *prp9prp7prp5* 三重変異体に導入した形質転換体を作製した。Flowering Time、胚軸長、概日リズムを測定した結果、*intact PRR7* 導入株では *prp9prp5* 二重変異体と同様の表現型を示し PRR7 の機能を回復することができたが、*PRR7ΔRLD* 導入株では PRR7 の機能を相補することができず、親株である *prp9prp7prp5* 三重変異体と同様な表現型を示した。以上から RLD は PRR7 の中心振動体としての機能に必要であることがわかった。転写抑制因子としての PRR の機能における RLD の関与を調べるため、ヒストン H3 アセチル化抗体を用いて PRR のターゲット遺伝子プロモーター近傍で ChIP 実験を行った結果、*intact PRR7* 導入株や野生株ではアセチル化状態は時間特異的に変動していたが、*PRR7ΔRLD* 導入株では常にアセチル化レベルが高い状態であった。以上の解析から、RLD はヒストン修飾に関与し、ターゲット遺伝子の転写制御に必要なドメインであることが示唆された。

P66

サイトカニン情報伝達によるシロイヌナズナ軸性器官における細胞分裂活性の制御機構

○今村 美友、島田 由里菜、古川 博規、山篠 貴史(名大院生命農)

【目的】

シロイヌナズナを含む多くの種子植物では、根や茎などの軸性器官において伸長成長(一次成長)とともに肥厚成長(二次成長)が観察される。二次成長は、軸性器官内部の維管束形成層、及び内鞘細胞に由来する細胞が起点となり、分裂・分化が続くことにより引き起こされる。植物ホルモンの一つであるサイトカニンは、細胞の分裂活性調節・維持に関与することにより、二次成長を活性化することが知られているが、その作用機序の詳細は明らかとなっていない。そこで本研究では二次成長をサイトカニンの生理活性を *in vivo* で評価するためのモデル系として捉え、細胞の分裂活性制御を支える分子基盤を理解することを目的とした。解析にあたっては、サイトカニン情報伝達を担う B 型 ARR 転写因子の下流で機能する遺伝子に着目し、二次成長を誘導する遺伝子の探索を行うこととした。

【方法・結果】

trans-zeatin 処理 3 時間後のシロイヌナズナ根におけるトランスクリプトームデータに基づいてサイトカニン応答性を示す転写制御因子を複数同定した。このうち最もサイトカニンに対する感受性の高かった遺伝子 *LBD3* について、そのホモログである *LBD4* とともに機能解析を行った。レポーターアッセイ並びにトランジェントアッセイにより、*LBD3*、*LBD4* 遺伝子は根の中心柱内部で発現すること、*LBD3*、*LBD4* タンパク質は核局在を示すことが明らかになった。またこれらの遺伝子の機能欠損変異体では根の肥大成長が抑制されるとともに、分裂期に入っている細胞の割合の減少、及び分化運命にあると推定される細胞の割合の増加がみられた。さらにこの変異体では、*CYCD3;1*、*WOX4*、*AINTEGUMENTA (ANT)* といった、既知の二次成長関連遺伝子の発現量が低下していることも、qRT-PCR 解析により明らかになった。以上の結果から、*LBD3*、*LBD4* は根の中心柱におけるサイトカニン情報伝達経路下流で機能する転写因子として細胞分裂の活性制御に関与することが示唆された。

phy シグナルが制御する SA 応答性防御応答

東井周¹, ○堀尾宗正¹, 野元美佳¹, 板谷知健¹, 塚越啓央^{2,3}, 松下智直^{2,4}, 多田安臣^{1,5}(¹名大院理生命, ²JST さきがけ, ³名城大院農, ⁴九大院農, ⁵名大遺伝子)

【目的】

野生の植物にとって、病原菌の感染に対する防御応答は無論のこと、日照不足や高温といった環境刺激への応答も同様に重要であり、これらの応答にはそれぞれ独立した機構の関与が確認されている。一方、自然環境下では生存を脅かす複数の要因が同時に発生することがあり、限られたリソースを各応答に対してどのように振り分けるのかという点も重要であると考えられる。そのため、各応答機構の間には未知の協調的制御機構が存在し、情報を統合することで最適な応答を行っているのではないかと予想される。寄生菌の感染に応答して生じるサリチル酸 (SA) 応答性免疫機構が遠赤色光下で抑制されることから、その誘導には赤色光シグナルの関与が示唆されている。そこで、我々は赤色光受容体フィトクロム (phy) に着目し、SA シグナルへの影響及びそのメカニズムの解明を目的とする。

【方法・結果】

phy の二重欠損変異体 *phyAphyB* に SA 処理を行ったところ、野生型植物と比較して NPR1 が顕著に蓄積した。植物は寄生菌の感染に応答して SA を生成し、転写補助因子である NPR1 の細胞質での一時的な蓄積及びその後の核内移行を促すことで SA 応答性遺伝子群を発現する。このことから、NPR1 の高蓄積は SA 応答性の免疫を高めると考えられたが、*phyAphyB* は病原菌 *Pseudomonas syringae* に対する抵抗性及び、SA 応答性遺伝子群の発現の減少を示した。また、タバコを用いた BiFC 解析では phyB と NPR1 の結合が細胞質で確認された。以上の結果から、phy は細胞質で NPR1 と相互作用し、NPR1 の核内移行を促すことで SA 応答性防御応答を活性化すると考えている。

シロイヌナズナにおける機械刺激誘導性の植物免疫系に関する解析

○松村護¹, 野元美佳¹, 板谷知健¹, 鈴木孝征², 多田安臣^{1,3}(¹名大院理生命, ²中部大応生, ³名大遺伝子)

【目的】

植物は、降雨や病原体の侵入により生じる機械刺激に曝されている。雨の中には多数の病原体が含まれ、植物は雨による機械刺激を認識し疾病防御応答を活性化する機構を持っていることが予想される。さらに、植物が機械刺激を認識する機構として、動物が体毛を介して機械刺激を認識するのと類似して、葉面のトライコームが関与している可能性が考えられる。本研究は、植物が機械刺激を認識し疾病防御応答を活性化するか、また、機械刺激認識にトライコームが関与するかについて調査することを目的とする。

【方法・結果】

植物が降雨による機械刺激を認識し、疾病防御応答を活性化することができるか検討するため、シロイヌナズナの野生型 Col-0 植物に対し、人工的な雨による処理を行い、RT-qPCR による遺伝子発現解析に供試した。その結果、雨による機械刺激によって疾病防御関連遺伝子の発現が有意に上昇することが確認された。

また、機械刺激の認識に葉面のトライコームが関与するかを調査すると同時に、降雨処理に含まれる温度低下や湿度条件等の要因を除き、葉面への機械刺激の影響のみを検討するため、Col-0 植物とトライコームを持たない Col(*gll*)植物の葉面に対し、ブラシによる機械刺激処理を行い、RNA-seq 解析によって遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、Col-0 植物では疾病防御に関与する多数の遺伝子の発現が上昇し、Col(*gll*)植物ではその上昇度が顕著に低下することが確認された。そこで、機械刺激が実際に病害抵抗性を誘導するか検討するため、Col-0 植物と Col (*gll*) 植物に対して *Psm* ES4326 を接種後、一定の時間間隔で機械刺激処理を行った結果、Col-0 植物のみで有意に病害抵抗性が誘導されることが示された。

P69

Auxin and Rho-of-plant direct actin-mediated polar nuclear migration in Arabidopsis root epidermal hair cells

○Moritaka Nakamura¹, Andrea R. Claes¹, Tobias Grebe¹, Rebecca Hermkes², Corrado Viotti¹, Yoshihisa Ikeda² and Markus Grebe^{1, 2} (¹University of Potsdam, Germany, ²Umeå Plant Science Centre, Sweden)

【目的】

Polar nuclear movement at the subcellular level is crucial during multiple events in eukaryotic development. In most cases, components and regulators of the cytoskeleton as well as nuclear envelope proteins are major components involved, as demonstrated by severe developmental disorders in respective mutants. In the Arabidopsis root epidermis, the nucleus initially assumes a position at the inner lateral membrane during cell elongation and moves towards the root hair after hair bulging. Except for its actin-dependence demonstrated by pharmacological studies, little is known about dynamic hallmarks and regulatory mechanisms underlying this polar nuclear migration.

【方法・結果】

Here, we report that nuclear auxin signaling and Rho-of-Plant (ROP) signaling direct actin-dependent polar nuclear migration towards the root hair bulge. Time-lapse imaging reveals that the nucleus located at the inner lateral membrane starts its actin-associated movement towards the outgrowing root hair in an ACTIN7 (ACT7)-dependent manner. Loss of ACT7 function as well as reduced or enhanced activation of ROP signaling alter polar nuclear migration. High auxin concentration or reduced CTR1 kinase function induce nuclear mis-positioning that is suppressed by ARF7 ARF19 loss of function, revealing that nuclear auxin signaling regulates nuclear migration. Our findings establish a mechanistic framework of auxin- and ROP-signaling-directed, ACT7-dependent polar nuclear migration in the Arabidopsis root epidermis.

P70

根毛と種子を護る細胞壁タンパク質 SRPP の発見と解析

○鶴野裕¹, 田中-高田奈月^{1, 2}, 佐藤良介¹, 前島正義¹

(¹名大院生命農, ²Department of Plant Sciences, University of Oxford)

【目的】

根毛は先端成長し、細胞表面の大部分を外環境に露出する特色ある細胞である。根毛機能の解明を、新規な無根毛株 NR23 を試料として進めてきた。その過程で、リン酸欠乏時に根毛細胞で顕著に発現する新規タンパク質 SRPP が同定された。遺伝子欠損株 *srpp* を観察したところ、リン酸欠乏時に根毛が短く壊死しやすく、種子は萎縮し発芽率の低下を示した。このため、SRPP は根毛と種子を護る働きをすると推定した。本研究では、SRPP の分子機能を解明する一環として、根毛での関連遺伝子を含めた発現変動の特徴および、相補株における種子の表現型・発芽率の回復について解析した。

【方法・結果】

野生株を通常条件からリン酸欠乏条件に植え替えると、根毛が顕著に伸長する 5 日目から SRPP の有意な発現上昇が見られた。また、公開データにおいて SRPP との共発現が示唆された根毛特異性の高い 2 種のペクチンメチルエステラーゼも同様に、根毛伸長に伴った SRPP の発現と同じタイミングで発現した。種子については、*srpp* 株に SRPP を胚・種皮・鞘で特異的に発現させた相補株において、表現型・発芽率の顕著な回復が見られた。また、WT に SRPP を部位特異的に導入した過剰発現株では、熱処理を行った際の種子の発芽率が向上した。*srpp* 株では細胞壁構造に異常が見られることから、SRPP は細胞壁を強化することで、環境ストレスから根毛・種子を護る機能があると推測した。

P71

ピロリン酸蓄積が引き起こすシロイヌナズナの形態変化と窒素源の関連

○福田 茉由¹, 瀬上 紹嗣¹, Ali Ferjani², 前島 正義¹ (¹名大院・生命農, ²東京学芸大・教育・生命)

【目的】

植物の液胞膜に局在する H^+ -pyrophosphatase (H^+ -PPase) は、ピロリン酸 (PPi) の加水分解と H^+ ポンプの2つの機能を合わせもつ。PPiは核酸やタンパク質、多糖などの合成反応の副産物であり、細胞内に過剰に蓄積すると、これらの高分子合成の反応を化学平衡論的理由により抑制する。したがって、その適切な濃度の維持は細胞にとって必須である。 H^+ -PPase 遺伝子を欠損したシロイヌナズナ (*fugu5*) では、ショ糖無添加培地における子葉の形態変化と、発芽以降のステージにおけるわずかな生育の遅延が知られているが(Plant Cell 2011, Frontiers Plant Sci. 2016)、さらに、硝酸イオンを単一の窒素源とする MGRL 培地で生育した *fugu5* は、PPi 蓄積を原因とした強い生育不全を示すことを発見した。そこで本研究は PPi と植物の窒素代謝の関係の解明を大きな目的とした。

【方法・結果】

走査型電子顕微鏡による観察とトリパンブルー染色により、MGRL 培地で生育させた *fugu5* では本葉の分裂組織細胞が壊死し、これによって本葉が正常に展開しなくなることが分かった。また、本葉の表皮細胞の構造にも異常が生じており、さらに葉の表面のクチクラ層も部分的に欠損していた。これらの一連の現象は、アンモニウムイオン (NH_4^+) を含む培地では起こらず、野生株と同様の生育を示した。そこで窒素の代謝経路に注目し、PPiに関連する反応の代謝生産物を培地に添加して生育試験を行った。その結果、幾つかの代謝産物にも NH_4^+ と同等の表現型抑制効果があることを見出した。MGRL 培地における *fugu5* の一連の現象は、 NH_4^+ を素材とする代謝経路の PPi による阻害、または窒素代謝経路から過剰生産された PPi を H^+ -PPase 欠損下では処理しきれなくなったためであると予想している。

P72

モモ葉のホウ素再転流機構解明

○服部 桃子¹、佐藤 亜沙子¹、Reuscher Stefan^{1,2}、森 仁志¹、白武 勝裕¹、前島 正義¹、河内 美樹^{*1,3} (¹名大・生命農、²名大・生物機能セ、³名大・高等研)

【目的】

長年同じ場所で生育する木本植物にとって栄養素の再転流機構は重要な生存戦略である。一方で、微量必須元素であるホウ素の植物体内における移動度は低く、若い葉や肥大組織を中心にホウ素欠乏症がしばしば観察される。ホウ素の役割は主に細胞壁の構造安定化であり、欠乏すると成長障害や不稔など重篤な被害がもたらされる。複数種の果樹を対象とした葉内元素の経月解析の結果、バラ科の植物であるモモ (*Prunus persica*) が落葉前にホウ素を再転流している可能性が示された。そこでモモにおける輸送体を介したホウ素の積極的な再転流の可能性を調べるため、シロイヌナズナのホウ素輸送体(BORs, NIPs)のモモのホモログ遺伝子を同定し、発現の季節変化を解析した。

【方法・結果】

ホウ素輸送体候補遺伝子の毎月の発現解析の結果、*PpeBOR4* が落葉前に顕著に増加しており、落葉期のモモ葉内ホウ素量減少との相関が示された。そこで、*PpeBOR4* の機能を調べるために、*PpeBOR4* を酵母に発現させたところ、細胞膜に局在し、ホウ素排出輸送体として機能することが明らかとなった。また、葉内の不溶性ホウ素と可溶性ホウ素の含量を調べたところ、落葉期には不溶性ホウ素が減少することも明らかとなった。さらに、落葉期にペクチン分解酵素 PME の発現が増加すること、グリコシダーゼなど細胞壁分解に関わると推測される酵素が発現していることがリアルタイム PCR、プロテオミクス解析からそれぞれ明らかとなった。これらより、成長期にホウ素を再利用するために落葉に先立って葉内の細胞壁ホウ素が可溶化され、*PpeBOR4* を介して積極的に樹体へと再転流されている可能性が示された。

P73

植物色素アントシアニンの色と関連する膜輸送体の研究

○永縄万由子¹, 木村ゆり¹, 武村みどり¹, 佐古建志¹, 前島正義¹, 中西洋一¹ (¹名大院生命農)

【目的・背景】

植物の液胞は、細胞の約 90%を占め、栄養塩や色素、タンパク質などを貯蔵する役割を持つ。この過程で液胞膜上の様々な膜輸送体が機能し、イオンや有機酸などの輸送を行っている。植物色素の一種であるアントシアニンも液胞に蓄積して赤や紫、青色を示すが、その色みは水素イオンや金属イオン、助色素など液胞内の物質の作用によっても変化する。この特徴を利用して新規の液胞膜輸送体を発見することを目的として、アントシアニンを蓄積し赤紫色を示すシロイヌナズナの変異株 *pap1-D* に膜輸送体遺伝子コレクション Amethyst を形質転換したライブラリのスクリーニングにより、色みの変化した株が 19 系統得られている。

【方法・結果】

本研究では、色み形質の責任輸送体を同定するため、候補遺伝子を個別に形質転換した株を用いて色みと葉の吸収スペクトルを解析した。その結果、再作出した形質転換株は吸収スペクトルのピークが長波長側へ移動し、見た目でも青紫の色みが再現したため、シロイヌナズナでは 6 種類の遺伝子 (110, 212, 301, 304, 310, 311) の過剰発現が *pap1-D* の色みを青くする機能を持つことが確認された。また、赤レタスプロトプラストを用いた一過的過剰発現解析より、6 種類の遺伝子 (212, 225, 301, 304, 305, 310) がアントシアニンの青みに関わることを示した。さらに、候補輸送体の細胞内局在解析のため膜輸送体と GFP との融合タンパク質の蛍光観察を行い、212 番の輸送体が液胞膜に局在することが明らかとなった。

P74

Analysis of flavonoid content in *Oenothera*'s flower during senescence

OTEPABUT Yada¹, OYAMA Kin-ichi², KONDO Tadao¹, YOSHIDA Kumi¹

(¹Graduated School of Informatics, ²Research Institute for Materials Science, Nagoya University)

【Purpose】

Flower of tsukimisou (*Oenothera tetraptera*) begins to bloom around 20:00 and fades in the morning. The full-blooming flower is white, and then the color is changed to red during senescence. Other *Oenothera* flowers, such as komasuyoigusa (*O. laciniata*) and matsuyoigusa (*O. stricta*) also change the color from yellow to orange during senescence. Our research group is interested in this phenomenon of coloration, so the analysis of pigments in *O. tetraptera*'s petals was done.

【Methods and Results】

Petals of were collected at 0, 4, 7 and 12 hours after blooming and extracted with acidic condition (3% TFA in 50% acetonitrile). The extract was analyzed using 3D-detected HPLC with Develosil RPAQUEOUS-AR-3 reverse phase column. In the white petal extract, flavonol derivative was detected. In the red petal extract, a peak of anthocyanin was observed with the flavonol. Using LC-MS analysis with authentic samples clarified that the flavonol was quercitrin with $m/z = 449 [M+H]^+$, and anthocyanin was cyanidin 3-glucoside (Cy3G) with $m/z = 449 [M]^+$. During senescence, the content of Cy3G increased, whereas the content of quercitrin was not changed. The same experiments were carried out using *O. laciniata* and *O. stricta*. In both flowers Cy3G was detected. The color change was clarified to be the *de novo* biosynthesis of Cy3G.

植物の気孔密度を制御するペプチドホルモン stomagen のミミックペプチドの設計

○植田健太, 近藤竜彦, 小鹿一 (名大院・生命農)

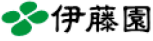
【目的】

気孔は光合成や呼吸、蒸散といった植物の生長に必須な活動を調節する器官である。植物は、気孔の密度を調節することによって、これらの生体現象の効率を制御していることが明らかになってきている。我々は、シロイヌナズナの気孔密度を上昇させる 45 残基のペプチドホルモン stomagen を同定した。さらに、構造活性相関研究を行った結果、stomagen のループ構造の中央部分に存在する 6 残基が、活性発現に重要であることを明らかにした。本発表では、stomagen のループ中央部分の立体構造に着目し、stomagen の気孔密度上昇活性をミミックできる短鎖ペプチドを得ることを目的とした。

【方法・結果】

本研究では、stomagen と同一のファミリーに属し、stomagen と競合的に受容体に結合することが報告されている EPF2 に着目した。両者のアミノ酸配列を比較すると、EPF2 にのみループ中央部にジスルフィド結合が存在する。stomagen において対応する残基をシステインに置換し、ジスルフィド結合を導入したペプチド stomagen-CC は、stomagen とほぼ同等の活性を示した。この結果は、stomagen のループ部分の活性型立体構造が、EPF2 のようにジスルフィド結合で固定された立体構造と近いものであることを示唆している。そこで、stomagen-CC を元に、安定配座解析を行った。得られた安定配座を元に、空間的に近接した残基ペアを置換して、ジスルフィド結合を導入した一連の短鎖ペプチドを設計および合成し、活性を調べた結果、有意な気孔密度上昇活性を示すペプチドが得られた。この結果は、stomagen のループ中央部の立体構造を模した小ペプチドによって、stomagen の気孔密度上昇活性をミミックできることを示唆している。

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(株) 敦賀バイオ研究所
アステラスファーマテック(株)	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) 品質保証室	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 29 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 29 年 9 月 16 日現在 敬称略, 括弧内は本部役職)

支部長 (支部担当理事)

吉村 徹 名古屋大学大学院生命農学 (理事)

副支部長

人見清隆 名古屋大学大学院創薬科学

山口庄太郎 天野エンザイム(株)

庶務幹事

木村 真 名古屋大学大学院生命農学

山篠貴史 名古屋大学大学院生命農学
(男女共同参画委員)

会計幹事

大島健司 名古屋大学大学院生命農学

北浦靖之 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

伊藤貴文 福井県立大学生物資源学部

上野義仁 岐阜大学応用生物科学部

小関 誠 太陽化学(株)ニュートリション
事業部

勝崎裕隆 三重大学大学院生物資源学

近藤竜彦 名古屋大学大学院生命農学

堀尾文彦 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)

西村直道 静岡大学農学部 (英文誌編集委員)

林 利哉 名城大学農学部

鮒 信学 静岡県立大学食品栄養科学部

真壁秀文 信州大学大学院総合理工学
(代議員)

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, 監事)

飯島信司 名古屋大学大学院工学

池田正人 信州大学大学院総合理工学

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

岩橋 均 岐阜大学応用生物科学部

岩本悟志 岐阜大学応用生物科学部

氏田 稔

梅川逸人

榎本俊樹

遠藤克秋

大口健司

大澤俊彦

太田明德

大塚正盛

大西利幸

岡戸信夫

岡本徳隆

奥村克純

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

木村哲也

熊澤茂則

倉根隆一郎

堤坂裕子

坂井田和裕

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

千 菊夫

鈴木英生

鈴木大資

鈴木 徹

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)

椋山女学園大学生生活科学部

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

新日本化学工業(株) 研究部

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

三重大学大学院生物資源学

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 (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

三重大学大学院生物資源学 (英文誌
編集委員)

静岡県立大学食品栄養科学部

中部大学応用生物学部

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)

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

科研製薬(株) 生産技術研究所

信州大学農学部

敷島スターチ(株) 生産技術部技術課

名糖産業(株) 食品開発部

岐阜大学応用生物科学部

高田正保	日本食品化工(株) 研究所	日野真吾	静岡大学農学部
種部 勝	東洋紡(株)敦賀バイオ研究所	平井浩文	静岡大学農学部
田村廣人	名城大学農学部 (代議員)	福井敏夫	中日本冰糖(株)
築地輝夫	キリンビール(株)名古屋工場	藤田智之	信州大学大学院総合理工学
徳山真治	静岡大学農学部	保坂 毅	信州大学大学院総合理工学
長岡 利	岐阜大学応用生物科学部	星野一宏	富山大学大学院理工学研究部
中川 寅	岐阜大学応用生物科学部 (代議員)	本多裕之	名古屋大学大学院工学
中川智行	岐阜大学応用生物科学部	前島正義	名古屋大学大学院生命農学
中野秀雄	名古屋大学大学院生命農学 (学術活動強化委員会幹事, 英文誌編集委員)	牧 正敏	名古屋大学大学院生命農学 (代議員, 倫理委員, フェロー)
中村浩蔵	信州大学大学院総合理工学	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学 (理事, 財務委員)
中村宗一郎	信州大学大学院総合理工学		
中村圭伸	物産フードサイエンス (株)	松見 繁	養命酒製造(株) 商品開発センター
中山俊裕	(株)岐阜セラック製造所品質保証部	松本裕子	ヤマモリ(株) 開発研究所
中山幸晴	(株)三和化学研究所	三沢典彦	石川県立大学生物資源工学研究所
南条文雄	三井農林(株)食品総合研究所	三澤博之	アサヒビール(株) 名古屋工場
西川俊夫	名古屋大学大学院生命農学	村上 茂	福井県立大学生物資源学
西田洋巳	富山県立大学生物工学研究センター (代議員)	村澤久司	旭松食品(株)食品研究所
西村篤寿	イチビキ(株) 技術開発部	森上 敦	名城大学農学部
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)	森山龍一	中部大学応用生物学部
濱野吉十	福井県立大学生物資源学部 (学術活動強化委員, 広報委員)	山口秀明	名城大学農学部
原 正和	静岡大学農学部	山田康弘	カネハツ食品 (株) 技術部
		横越英彦	中部大学応用生物科学部
		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 180 回例会
講演要旨集

平成 29 年 10 月 7 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