



公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部
第 183 回例会

講演要旨集

ミニシンポジウム
『タンパク質の糖修飾とその意義』

および

一般ポスター発表

平成 30 年 9 月 15 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 183 回例会

平成 30 年 9 月 15 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)

9:00-12:50 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『タンパク質の糖修飾とその意義』

13:15-14:00 「C-mannosylation—基質と酵素の探索」

清水 史郎 (慶応義塾大学)

座長：北島 健 (名古屋大学)

14:00-14:45 「糖タンパク質の精密化学合成を利用する糖鎖機能解明」

梶原 康宏 (大阪大学)

座長：安藤弘宗 (岐阜大学)

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

(グリーンサロン東山 レストラン花の木にて)

17:30-19:30 懇親会

ミニシンポジウム

『タンパク質の糖修飾とその意義』

(S01, S02)

- S01 「C-mannosylation—基質と酵素の探索」
清水 史郎 (慶応義塾大学)
座長：北島 健 (名古屋大学)
- S02 「糖タンパク質の精密化学合成を利用する糖鎖機能解明」
梶原 康宏 (大阪大学)
座長：安藤 弘宗 (岐阜大学)

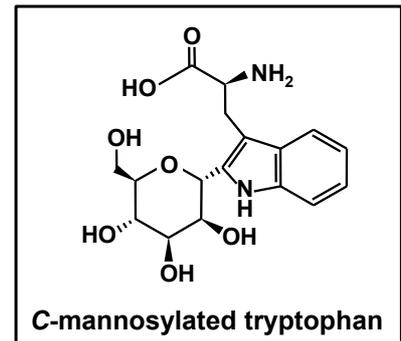
C-mannosylation—基質と酵素の探索

清水 史郎

(慶應義塾大学 理工学部 応用化学科)

分泌タンパク質の多くは翻訳後修飾として様々なタイプの糖鎖修飾を受ける。中でもアスパラギン残基に多糖が付加される *N* 型の糖鎖修飾が代表的であり、生合成・分解に関する経路や異状と疾病の関連が盛んに研究されている。一方、その他のタンパク質の糖鎖修飾にはトリプトファン残基に単糖のマンノースが修飾される *C*-mannosylation がある (右図)。

タンパク質の *C*-mannosylation はヒト尿中より精製された RNase 2 で初めて報告され [1]、現在までに約 30 のタンパク質で確認されている。分泌タンパク質の中でも、特に Trp-Xaa-Xaa-Trp/Cys 配列中の *N* 末端側のトリプトファンが酵素的にマンノース付加される [2]。上記コンセンサス配列が、トロンボスポンジン 1 型リピート (TSR1) 領域にあるタンパク質群と Trp-Ser-Xaa-Trp-Ser モチーフを含む I 型サイトカイン受容体ファミリーにおいて最もよく *C*-mannosylation が報告されている。*C*-mannosylation に関する論文は、最初の報告から 20 年は一年間におおよそ一報ほどであり、その内容も「*C*-mannosylation されていた」という限定的なものが多かった。しかし 2013 年に線虫における



C-mannosylation 責任酵素として dpy-19 が同定された [3]。これは *C*-mannosylation が Dol-P-Man を用いて ER 内にて行われることと、*N* 型糖鎖修飾がドリコールニリン酸オリゴ糖 (Dol-PP-oligosaccharide) を用いて ER 内にて行われることの類似性に着目し、*C*-mannosylation 責任酵素が *N* 型糖鎖転移酵素 STT3 と構造的に類似しているとの予測の基、ホモロジーサーチにより同定された。引き続き、哺乳類でも DPY19L1 と DPY19L3 に *C*-mannosylation 触媒活性があることが報告され、今後も責任酵素に関する研究がより一層進むことが期待されている [4, 5]。

さらに、*C*-mannosylation の基質と酵素候補の異状と疾病の関連が示唆され始めており、急速に研究が進むことが期待されている。例えば、ADAMTS-like 1 の Trp42 は *C*-mannosylation されており、Trp42 を Arg に変異した W42R 変異体は細胞外への分泌が阻害されることが報告されていた [6]。昨年、先天性緑内障や近視などの目の異常、甲状腺機能低下症、難聴、生歯遅延などの症状が複合的に高頻度で現れている家系において、全エクソンシーケンスが行われた結果、ADAMTS-like 1 において共通するヘテロなミスセンス変異 c.124T>C, p.(Trp42Arg) が同定された [7]。この研究成果は疾患に関連するバリエーションが *C*-mannosylation に影響を与える初めての報告であり、ADAMTS-like 1 の *C*-mannosylation 異常による分泌抑制機構と上記の複合的症狀との関連の解明が待たれる。さらに *C*-mannosylation 責任酵素 DPY19 ファミリーと疾患の関連も示唆されている。DPY19L2 は精巣特異的な発現が報告されているタンパク質であるが、DPY19L2 の欠損や変異が巨大頭部精子症の原因の 1 つであることが報告されており、DPY19L2 のノックアウトマウスは巨大頭部精子症の表現型を示す [8]。これらのことから、DPY19L2 による *C*-mannosylation と巨大頭部精子症の関連が示唆されるが、DPY19L2 が *C*-mannosylation 酵素活性を有しているかは報告されておらず、これらの関係の解析が望まれる。

このような背景の中、我々の研究室では *C*-mannosylation される基質の同定と責任酵素の探索を行ってきた。その結果、これまでに 7 種類の新たな基質タンパク質の同定 [4, 9-14] とヒトで初めての責任酵素の同定に成功し、そのトポロジーも明らかにした [4, 15]。本講演では、これまでの成果を紹介するとともに、最近得られた新たな *C*-mannosylation に関する知見を紹介する。

参考文献

- [1] Hofsteenge J, *et al.*, & Vliegthart JF. *Biochemistry*, **33**, 13524-30 (1994)
- [2] Krieg J, *et al.*, & Hofsteenge J. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 301-9 (1998)
- [3] Buettner FF, *et al.*, & Bakker H. *Mol. Cell*, **50**, 295-302 (2013)
- [4] Niwa Y, *et al.*, & Simizu S. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 744-56 (2016)
- [5] Shcherbakova A, *et al.*, & Bakker H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2574-9 (2017)
- [6] Wang LW, *et al.*, & Apte SS. *J. Biol. Chem.*, **284**, 30004-15 (2009)
- [7] Hendee K, *et al.*, & Semina EV. *Hum. Mutat.*, **38**, 1485-90 (2017)
- [8] Pierre V, *et al.*, & Arnoult C. *Development*, **139**, 2955-65 (2012)
- [9] Goto Y, *et al.*, & Simizu S. *Int. J. Oncol.*, **45**, 344-50 (2014)
- [10] Sasazawa Y, *et al.*, & Simizu S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **468**, 262-8 (2015)
- [11] Fujiwara M, *et al.*, & Simizu S. *FEBS Lett.*, **590**, 2639-49 (2016)
- [12] Okamoto S, *et al.*, & Simizu S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **486**, 558-63 (2017)
- [13] Morishita S, *et al.*, & Simizu S. *Oncol. Lett.*, **14**, 2537-44 (2017)
- [14] Otani K, *et al.*, & Simizu S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **498**, 466-72 (2018)
- [15] Niwa Y, *et al.*, & Simizu S. *FEBS J.*, **285**, 1162-74 (2018)

略歴

清水 史郎 (しみず しろう)

千葉市生まれ。1993年3月慶應義塾大学工学部応用化学科卒業、1998年3月慶應義塾大学大学院理工学研究科生体医工学専攻博士課程修了、博士(工学)取得。1998年4月理化学研究所基礎科学特別研究員、2000年4月理化学研究所研究員、2007年4月理化学研究所専任研究員、2010年4月慶應義塾大学工学部応用化学科専任講師、2012年4月慶應義塾大学工学部応用化学科准教授を経て、2017年4月より慶應義塾大学工学部応用化学科教授。

S02

糖タンパク質の精密化学合成を利用する糖鎖機能解明

梶原康宏

(大阪大学大学院理学研究科)

糖タンパク質の生合成は、小胞体で開始される。リボソームから生産されるペプチドにグルコースが3つ結合したハイマンノース型糖鎖が付加 (Figure A:1) し、そしてこの糖鎖が多数の酵素、シャペロンにより構成される糖タンパク質品質管理機構のタグ (Figure A:3, 4) として利用されることで、タンパク質部分が正しくフォールディングする (5)。

この過程で、正しくフォールディングした糖タンパク質 5 は、ゴルジ体へ送られ、ハイマンノース型糖鎖 (Figure B:8) のプロセッシングおよびシアリル複合型糖鎖 (Figure B 10, 11) への再構築を経て完成品 7 となり、細胞膜や細胞外へと分泌されていく。特に、糖タンパク質が、酸性のシアリル糖鎖 (Figure B 10, 11) を持つことで、血中に分泌された後、その水溶性の向上や、糖タンパク質の凝集の防止、血中寿命、抗原性が制御される。

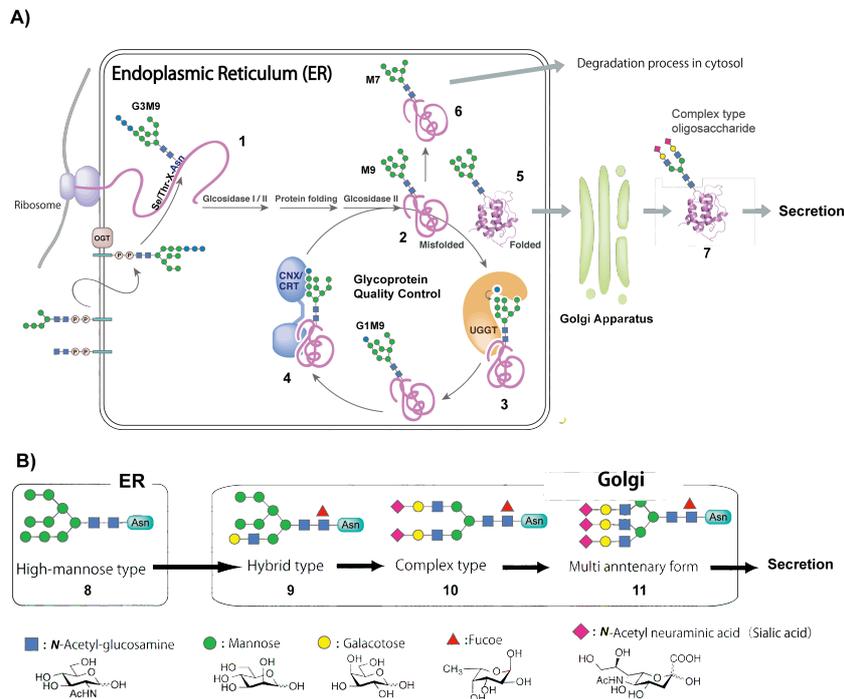


Figure A: 糖タンパク質の生合成経路. リボソームから生成したペプチドに G3M9 ハイマンノース型糖鎖が付加し 1、続いてタンパク質部位のフォールディングが実施される。この間でフォールディングセンサー酵素 UDP-Glucose glycoprotein glucosyltransferase (UGGT) がタンパク質の構造を調べ 3、ミスフォールドであればシャペロンであるカルネキシン/カルレチクリン (CNX/CRT) がタンパク質部位の構造を整える 4。完成した糖タンパク質 5 は、ゴルジ装置へ運ばれ、シアリル糖鎖へと変換され (7) 細胞外へ分泌される。

Figure B: 小胞体内からゴルジを経由する糖タンパク質の糖鎖構造の変化

しかしながら、糖鎖の機能は未だ明確には理解されておらず、糖鎖構造が、糖タンパク質の合成経路ならびに生理活性発現に与える影響を化学的視点で緻密に調べることは困難であった。これは、糖タンパク質分子がバイオテクノロジー法でしか調製できなかったことと、その際、糖鎖構造を自在に制御して、任意の糖鎖を持つ糖タンパク質を得ることができなかったことが原因である。

そこで、我々は、高純度糖鎖をもつ糖タンパク質の精密化学合成を検討してきた。これまで、ヒト型糖鎖をもつ小型サイトカイン（アミノ酸が72-76残基）¹⁻³、さらには、アミノ酸166残基からなるエリスロポエチン^{4,5}、インターフェロンβ⁶の精密化学合成に成功した。これら糖タンパク質の合成では、まず、鶏卵より単離したヒト型ハイマンノース型あるいはシアリル複合型糖鎖アスパラギンを用いた糖ペプチドの合成、そしてこれら糖ペプチド、ペプチドを native chemical ligation 法を利用して連結し、糖タンパク質の全長に相当する糖ポリペプチドを得る。そして、フォールディング操作をおこなうことで天然型の3次構造をもつ糖タンパク質を合成することができる。また、糖タンパク質がもつ分子内ジスルフィド結合の組み合わせを変えて、故意にミスフォールド型糖タンパク質も合成した²。我々は、これら手法を用いてハイマンノース型糖鎖が小胞体での糖タンパク質の品質管理機構においてどのように利用されているのか調べた⁷⁻⁹。

その結果、小胞体内では、生じたハイマンノース型糖鎖をもつミスフォールド糖タンパク質を効率よく UGGT が認識しグルコシル化後、GNT/CRT のシャペロン作用によりリフォールディングが促進されていることが LCMS により追跡することができた。また、このリフォールディング作用は、わずかなグルコシル化を繰り返しながら促進する触媒機構であることを確認することができた。本講演では、これら成果の詳細について述べる。

(1) Yamamoto, N.; Tanabe, Y.; Okamoto, R.; Dawson, P. E.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 501. (2) Izumi, M.; Makimura, Y.; Dedola, S.; Seko, A.; Kanamori, A.; Sakono, M.; Ito, Y.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7238. (3) Kajihara, Y.; Tanabe, Y.; Sasaoka, S.; Okamoto, R. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 5944. (4) Murakami, M.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3567. (5) Murakami, M.; Kiuchi, T.; Nishihara, M.; Tezuka, K.; Okamoto, R.; Izumi, M.; Kajihara, Y. *Science Advances* **2016**, *2*, e1500678. (6) Sakamoto, I.; Tezuka, K.; Fukae, K.; Ishii, K.; Taduru, K.; Maeda, M.; Ouchi, M.; Yoshida, K.; Nambu, Y.; Igarashi, J.; Hayashi, N.; Tsuji, T.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5428. (7) Dedola, S.; Izumi, M.; Makimura, Y.; Seko, A.; Kanamori, A.; Sakono, M.; Ito, Y.; Kajihara, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 2883. (8) Izumi, M.; Oka, Y.; Okamoto, R.; Seko, A.; Takeda, Y.; Ito, Y.; Kajihara, Y. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3968. (9) Izumi, M.; Kuruma, R.; Okamoto, R.; Seko, A.; Ito, Y.; Kajihara, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11421.

略歴

梶原 康宏（かじはら やすひろ）

山口県柳井市生まれ。1988年3月 神奈川大学工学部応用化学科卒業;1990年3月 神奈川大学大学院工学研究科応用化学修了;1993年3月 東京工業大学大学院総合理工学研究科博士後期課程生命化学専攻修了;1993年4月 日本たばこ産業株式会社生命科学研究科 博士研究員;1995年6月 横浜市立大学理学部 助手;2001年4月 横浜市立大学総合理学研究科 助教授;2007年4月 横浜市立大学国際総合科学部 教授;2009年4月 大阪大学大学院理学研究科 教授

一般ポスター発表
(P01～P72)

P01

Deinococcus grandis スフェロプラスト巨大化の機構解明

○西野弘起¹, 森田裕介¹, 高橋沙和子¹, 鳴海一成², 大島拓¹, 西田洋巳¹ (¹富山県大, ²東洋大)

【目的】

放射線抵抗性細菌 *Deinococcus* には、球菌だけではなく、桿菌も含まれる。*D. grandis* は桿菌であり、リゾチーム処理によってスフェロプラストにできる。このスフェロプラストをペニシリン存在下で培養することによって、細胞は分裂することなく、巨大化する。われわれの研究室では、様々な細菌細胞を上記の方法によって巨大化しているが、*D. grandis* は、直径が 400 μm になる超巨大化細胞が現れるなど、ほかの細菌とは異なる特徴を有した。そこで、その巨大化機構を解明することを目的とする。

【方法・結果】

通常、*Deinococcus* の培養は、TGY が用いられるが、スフェロプラストの巨大化には適しておらず、マリン培地が適している。そこで、培地成分における金属塩の影響を調べた結果、マグネシウムイオンとカルシウムイオンのどちらの存在が、細胞巨大化において必要であることがわかった。細胞の外膜の安定性にこれらの金属イオンが関与している可能性が考えられたため、巨大化の過程にある細胞を継時的にサンプリングし、DNA は DAPI、細胞膜は FM4-64 でそれぞれ染色することによって蛍光顕微鏡観察を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、(1) *D. grandis* スフェロプラストの巨大化は外膜の合成によって生じ、その伸張に比べると内膜伸張は抑制され、巨大なペリプラズム空間を持つこと、(2) 低濃度の 2 価イオンだけでは、内膜が破壊され、内部に存在していた DNA が外膜で囲まれる領域に分散していること、しかし、(3) ナトリウムイオンなどの添加によって、内膜の崩壊を防ぐことができ、その際には外膜の伸張が生じ巨大化することがわかった。以上の結果より、*D. grandis* のスフェロプラストの巨大化には、マグネシウムイオンあるいはカルシウムイオンによる外膜の構造的安定および浸透圧による内膜の安定の 2 つの条件を満たすことが必要であることを明らかにした。

P02

nif 遺伝子群を有する非窒素固定性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 における ニトロゲナーゼ活性とその向上

横溝 この実¹、山本 治樹¹、山川 壽伯¹、藤田 祐一¹

¹名古屋大学大学院生命農学研究科

【目的】

窒素固定能を植物に移入することを最終目標として、非窒素固定性シアノバクテリアへの窒素固定能を付与するモデル実験を進めている。これまでの研究で、*Synechocystis* sp. PCC 6803 に *nif* および *nif* 関連遺伝子 26 個を導入した形質転換体 CN1 を単離し、有意なニトロゲナーゼ活性を検出した。CN1 のニトロゲナーゼ活性の特性を調べると共にさらに遺伝子を導入することによる活性の向上を試みた。

【方法・結果】

窒素固定性シアノバクテリア *Leptolyngbya boryana* の窒素固定遺伝子クラスター (20.8-kb) (*nif* クラスター) を非窒素固定性シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 に導入した形質転換体 CN1 は有意なニトロゲナーゼ活性 (*L. boryana* の約 0.3%) を示した。この活性は、窒素枯渇および嫌気条件でのみ検出されたことから、CnfR を介した *L. boryana* での発現制御が *Synechocystis* sp. PCC 6803 でも同様に作動することが確認された。CN1 から、O₂ や活性酸素除去に関わる遺伝子群やシトクロム *c* オキシダーゼ遺伝子を *trc* プロモーターで発現させる形質転換体を新たに単離した。これらの多くは CN1 より高い活性を示し、最大で約 5 倍の活性が得られた。本報告ではニトロゲナーゼ活性向上の詳細を報告する。

P03

Rhodococcus jostii RHA1 におけるβ-ケトアジピン酸経路から分岐する新規異化経路

○増田恵実¹, 戸塚直希¹, 山梨智也¹, 長谷部文人¹, 原啓文², 鮎信学¹

(¹静岡県大院食品栄養, ²マレーシア工科大マ日国際工科環境)

【目的】

土壌放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 はβ-ケトアジピン酸経路により芳香族化合物を異化し、acetyl-CoA、succinyl-CoA に分解する。そのため、*R. jostii* RHA1 は、芳香族化合物を唯一の炭素源として生育することができる。CatABC はβ-ケトアジピン酸経路の酵素であり、CatA は catechol を muconate (1) に、CatB は 1 を (S)-muconolactone (2) に、CatC は 2 を β-ketoadipate enol-lactone (3) にそれぞれ変換する。2→3 が遮断されているため、Δ*catC* 株は 2 を蓄積するが、Δ*catC* 株は一度蓄積した 2 を消費する、という現象を我々は見出した。本研究では、2 から分岐する新規異化経路の発見、また、それを担う酵素遺伝子を探索した。

【方法・結果】

R. jostii RHA1 親株およびΔ*catC* 株、Δ*catB* 株を、炭素源に benzoate (benzoate→catechol→1→2→3 の順に異化される) を用いた最小培地にて培養した。その結果、親株は培養 2 日目から生育が確認されたが、Δ*catB* 株は 1→2 が遮断されているため、生育しなかった。一方、驚くべきことに、Δ*catC* 株は培養 8 日目に生育が確認できた。また、Δ*catC* 株の培養上清を LC-MS で分析した結果、培養 7 日まで上清に存在していた 2 が、8 日目以降に減少することが判明した。以上より、2 から分岐する新規異化経路が存在し、Δ*catC* 株においてその経路が誘導されたことが示唆された。

我々は、分岐経路の初発反応は、2 の加水分解であると予想し、その候補遺伝子を探索した。その結果、候補遺伝子 A の強制発現株はΔ*catC* 株の生育を回復することが判明した。そこで、候補遺伝子 A とΔ*catC* との二重破壊株を作製し、同様に生育試験を行った。その結果、二重破壊株はΔ*catC* 株と比べて生育が遅れることが分かった。本実験結果より、候補遺伝子 A がコードする酵素が新規異化経路に関与すると予想している。

P04

低栄養環境下における *Methylobacterium* 属細菌のランタノイド応答に関する研究

○水野洸介, 原田雄斗, 岩本悟志, 稲垣瑞穂, 島田昌也, 早川享志, 中川智行

(岐阜大院・自然科学)

【目的】

通性メタノール資化性細菌 *Methylobacterium* 属は植物葉上や水道水中など、自然界に普遍的に生息する細菌である。私たちは、*Methylobacterium* 属細菌が生育環境下のランタノイドを認識し、メタノール代謝の鍵酵素メタノール脱水素酵素の補因子として La, Ce, Pr, Nd を利用することを証明してきた。一方、私たちはメタノール代謝以外に、*Methylobacterium* 属細菌が低栄養環境下でランタノイドの一種 Sm に応答し、コロニー径を増大させるという現象を見いだした。Sm に対する細胞応答はこれまで報告されておらず、その分子メカニズムも全く不明である。そこで本研究では、*Methylobacterium* 属細菌の低栄養環境下におけるランタノイド応答の分子メカニズムを解明することを目的とする。

【方法・結果】

メタノール資化性細菌 75 株について、普通栄養培地を 1/100 に希釈した貧栄養培地に 30 μM Sm を添加し、コロニーの形態を観察したところ、75 株のうち 15 株のコロニー径が増大した。15 株のうち最も大きな応答を示した *M. zatmanii* GM97 株を選抜し、以降の実験に用いた。Sm によりコロニー径が増大する理由として、細胞体積が増大する、細胞増殖が活性化する等が考えられる。そこで Sm 生育細胞のモルフォロジー解析を行ったところ、Sm の有無に関わらず細胞の形態に差は見られず、1 コロニー当たりの細胞数が Sm 添加により約 20 倍に上昇していた。このことから、Sm は GM97 株の増殖を活性化していることが示された。また、GM97 株に対するランタノイド特異性を観察したところ、メタノール生育に利用されるランタノイドではコロニー径が増大せず、Sm よりも原子番号が大きい Eu, Gd, Tb などが GM97 株の生育促進能を示した。これらのことから GM97 株はメタノール生育と低栄養生育では応答するランタノイド種を使い分けていることが示唆された。

P05

分裂酵母における硫黄枯渇と細胞応答

○筒井優, 服部允起, 島崎嵩史, 大塚北斗, 饗場浩文 (名大院創薬科学)

【目的】

当研究室では、高発現すると分裂酵母において経時寿命(増殖を停止した細胞の生存可能期間)を延長する Ecl1 ファミリータンパク質が発見されており、その mRNA 量及びタンパク質量は、硫黄を枯渇させると上昇する。また、硫黄枯渇は経時寿命を延長させることも判明した。他方、硫黄枯渇は細胞形態にも影響を与え、Ecl1 ファミリー遺伝子依存的に小型化することが明らかになった。本研究は、このような Ecl1 ファミリー遺伝子を中心とした分裂酵母の硫黄枯渇応答の分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

まず、3400 の非必須遺伝子が 1 つずつ欠失した欠損株セットを用いて、硫黄枯渇に関与する遺伝子の探索を行った。硫黄枯渇下で細胞の形態をそれぞれ確認し、野生株で認められる細胞の小型化がおこらない欠損株をスクリーニングした。その結果、203 の欠損株を取得した。次に、この 203 の欠損遺伝子の中から Ecl1 の下流で機能すると予想される遺伝子を探索するため、各欠損株に Ecl1 を高発現するプラスミドを導入し、細胞の形態を確認した。現在までに 90 の欠失株については解析が終了している。

これまでの解析から、硫黄枯渇に関与する Ecl1 の下流因子として細胞周期の制御に関与する遺伝子が複数取得された。そのため Ecl1 ファミリー遺伝子と細胞周期が密接に関係している可能性が高く、現段階では硫黄枯渇により Ecl1 の発現が上昇し、これらの因子による細胞周期制御を介して細胞形態の変化が起こると考えている。さらに、Ecl1 ファミリー遺伝子は経時寿命を延長する機能をもつことから、Ecl1 ファミリー遺伝子が寿命制御と細胞周期制御をつなぐ重要な役割をしていると想定される。これらの可能性を踏まえつつ、まずは現在までの結果を基に、硫黄枯渇下での細胞の小型化に焦点を当てて議論する。

P06

Fusarium graminearum のグリシン開裂系がトリコテセン生合成に及ぼす影響の解析

○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明大・農, ³金沢大・学際科学)

【目的】

植物病原性糸状菌 *Fusarium graminearum* はトリコテセン系かび毒を産生し、主要穀類の種子を汚染することが知られている。発表者らはこれまでに窒素源としてのアミノ酸の代謝が毒素産生へ及ぼす影響を調査する過程で、グリシン開裂系を介したトレオニンの代謝が毒素産生を抑制することを見出している。本研究では、メチル基供与体の C1 単位を供給するグリシン開裂系がヒストンタンパクの修飾を介して毒素産生へどのような影響を与えるかを解析する。

【方法・結果】

トリコテセン系かび毒 15-acetyldeoxynivalenol (15-ADON) 生産菌 *F. graminearum* JCM 9873 株のグリシンデカルボキシラーゼ P サブユニット (GCV3) 遺伝子 (FGSG_08352) の破壊株を作出した。本遺伝子破壊株は Gly を唯一窒素源とする培地で生育できなかった。本破壊株を過剰の Gly を添加した毒素産生培地 (酵母エキス含有培地) で培養し、かび毒量を調べたところ、Gly 添加区において 15-ADON 産生の大幅な上昇が認められた。現在、上記培養条件におけるヒストン H3 のグローバルなメチル化状況をウェスタンブロットティングによって調べている。

【謝辞】

本研究の一部は「イノベーション創出強化研究推進事業」の支援を受けた。

P07

Rare Earth Elements Induce Production of Rhamnan in *Bradyrhizobium* sp. strain Ce-3
Viagian Pastawan¹, Soya Suganuma², Kosuke Mizuno², Mizuho Inagaki^{1,2}, Masaya Shimada^{1,2},
Takashi Hayakawa^{1,2}, Nanung Agus Fitriyanto³ and Tomoyuki Nakagawa^{1,2}

(¹The United Grad. Sch. Agric. Sci., Gifu Univ.; ²Grad. Sch. Appl. Biol. Sci., Gifu Univ.,
³Fac Animal Sci, Univ Gadjah Mada)

【Objective】

Cerium (Ce³⁺), one of light rare earth elements (REEs), is an important element in the methanol metabolism of *Bradyrhizobium* strains because Ce³⁺ is a cofactor of XoxF, which is REE dependent methanol dehydrogenase. Moreover, we had already reported that Ce³⁺ induced production of exopolysaccharides (EPS), Rhamnan, in *Bradyrhizobium* sp. Ce-3. However, there is no information about a synthetic pathway for Rhamnan in strain Ce-3, and its physiological function. In this study, we aimed to show the induction pattern of Rhamnan by all REEs and to identify the EPS synthetic genes cluster in strain Ce-3.

【Methods and Results】

Strain Ce-3 produced EPS on the poor-nutritional medium with La³⁺, Ce³⁺, Pr³⁺ and Nd³⁺ at 28°C for 7 to 10 days, although the strain did not produce EPS with heavy REEs. From this result, EPS production of strain Ce-3 was induced by only light REEs. Next, we searched Rhamnan synthetic genes on the draft genome sequence of the strain. As a result, strain Ce-3 has the putative gene cluster for Rhamnan synthetic pathway, including *rmIC*, *rmID*, *tgdA* and *gtfA* genes. However, expression of these genes did not significantly upregulate by Ce³⁺. Based on these results, it seems that strain Ce-3 produces EPS, Rhamnan, induced by light REEs, although expression of putative Rhamnan synthetic pathway was not upregulated by Ce³⁺.

P08

野生酵母における 4-VG 非生成株の分布と清酒酵母育種に向けた選抜方法の開発

○奥村真衣¹, 平井菜未², 吉村明浩³, 澤井美伯³, 正木和夫³, 向田潤⁴,
三井亮司⁴, 稲垣瑞穂^{1,2}, 島田昌也^{1,2}, 早川享志^{1,2}, 中川智行^{1,2}

(¹岐阜大院自然科学, ²岐阜大応生, ³岐阜県産業技術センター, ⁴岡山理大理)

【目的】 4-ビニルグアイヤコール (4-VG) は、煙様・スパイス様の香りを持つことから、清酒のオフフレーバーの一つに数えられ、その混入は清酒の品質を著しく低下させる。一般に、4-VG は植物細胞壁の構成成分であるフェルラ酸の脱炭酸反応で生成されるが、本反応は主に出芽酵母が持つ Pad1p および Fdc1p により触媒される。きょうかい酵母は *FDC1* にナンセンス突然変異が生じているため 4-VG 生成能を持たないが、自然界からスクリーニングした野生酵母を用いた清酒醸造ではしばしば 4-VG 生成がみられ、その品質を著しく低下させている。つまり 4-VG 生成能は野生酵母の清酒酵母としての能力を左右する最重要因子の一つである。しかし、自然界における野生酵母の 4-VG 生成能の分布、その遺伝系統、さらには 4-VG 生成能の簡易的な判別方法など、野生酵母における 4-VG 生成能に関する知見はほとんどないのが現状である。そこで、本研究では野生酵母における 4-VG 生成能の分布と 4-VG 生成能の簡易的な判別方法の開発を目指した。

【方法・結果】 野生酵母における 4-VG 生成能の分布を示すため、岐阜県内でスクリーニングされた *Saccharomyces cerevisiae* 31 株を用いて 4-VG 生成能を観察した。その結果、31 株中 28 株が 4-VG 生成能を持ち、非生産株はわずかに 3 株であった。これら 4-VG 非生成株が遺伝系統的に近縁であるかどうか、現在、解析中である。以上のことから、自然界では大多数の出芽酵母が 4-VG 生成能を持つことが示され、自然界から清酒酵母をスクリーニングする際には、なんらかの方法で 4-VG 非生成株を的確に選抜する必要がある。そこで、4-VG 生成能を簡易的に判別する方法の開発を行った。Pad1p/Fdc1p はフェルラ酸同様、桂皮酸の脱炭酸反応を触媒することが知られており、桂皮酸の毒性回避の鍵酵素でもある。そこで 4-VG 生成株および非生成株の桂皮酸に対する感受性を観察したところ、4-VG 生成株は桂皮酸に対して高い耐性を持つものの、非生産株は桂皮酸存在下ではプチコロニーを形成した。よって本法を用いることで簡便に 4-VG 非生産株を選抜することは可能であると結論づけた。

P09

エゴマおよびエゴマ発酵産物中成分によるコラーゲン産生促進メカニズムの解析

○竹内萌恵¹, 加島隆洋², 鈴木寿², 北口公司³, 矢部富雄^{3, 4}

(¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜県産業技術センター, ³岐阜大・応生, ⁴生命の鎖統合研究センター)

【目的】

エゴマ (*Perilla frutescens* var. *frutescens*) は油糧作物の一種であり, 種子から得られる油は健康増進に対する効果で注目されている. 一方で, 搾油後の残渣の多くは廃棄されているため, その利用方法の一つとして発酵技術に注目した. また, 本研究では健康長寿を目指す上で重要なコラーゲンに着目し, 老化に伴い減少するコラーゲン量の維持に作用する食品素材としてエゴマを検討した. これまでに我々は, エゴマ残渣がマウス線維芽細胞(L-M 細胞)のコラーゲン産生を促進する作用を報告しているが, 発酵したエゴマ残渣でも同様の作用があるのかは確認されていない. そこで本研究では, エゴマ残渣発酵産物にもコラーゲン産生促進作用が存在するのかを調査した後, そのメカニズムの解明を目的とした.

【方法・結果】

各エゴマ搾油後残渣(未発酵エゴマ, 麦麴発酵エゴマ, 泡盛麴発酵エゴマ)から熱水抽出物を得た. WST 法によって求めた細胞毒性の無い濃度の各試料を L-M 細胞に添加して培養後の上清を回収し, SCA 法によりコラーゲン量を測定した. 全てのエゴマにコラーゲン産生促進作用が確認され, 未発酵エゴマ残渣が最も高いコラーゲン量を示した. さらに, コラーゲンを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の活性の測定や, real-time RT-PCR によるコラーゲン合成促進に関わる各種遺伝子発現の調査を行った. その結果, 全てのエゴマにおいて MMP 阻害活性とコラーゲン産生に関わる TGF- β 1 の発現を上昇させることが確認されたが, コラーゲン遺伝子の発現増加は認められなかった. 以上より, エゴマ残渣には発酵後もコラーゲン産生促進作用が残存し, その作用にはコラーゲンの合成促進よりも, 分解抑制に与える影響が大きいことが明らかとなった.

P10

米タンパク質分解物がグルテンフリー米粉パン生地の動的粘弾性と製パン性に与える影響

○井上七海¹, 本多裕司¹ (¹石川県大院生資環)

【目的】

グルテンを添加せずに米粉だけで焼成したパンは, 小麦粉で焼成したパンよりも比容積が増大せず, 食感も大きく劣る傾向にある. 最近, 我々は焼成したグルテンフリー米粉パンの比容積増大に 35 °C における米粉生地の動的粘弾性が大きな影響を与えることを見出した.*

本研究では, プロテアーゼ処理した米タンパク質がグルテンフリー米粉パンの製パン性や 35 °C における米粉パン生地の動的粘弾性に与える影響について分析した.

【方法・結果】

米粉(パウダーライス D, 新潟製粉)から 0.2 % NaOH 溶液で米タンパク質を抽出した. 米タンパク質に様々なプロテアーゼを作用させた後, 凍結乾燥することで米タンパク質分解物を得た. 続いて米澱粉(ファインスノウ, 上越スターチ)に水, 米タンパク質分解物, 塩, 砂糖, およびオリーブオイルを入れて混捏し, グルテンフリー米粉パン生地を調製した. また対照として, プロテアーゼ処理していない米タンパク質を添加したグルテンフリー米粉パン生地も同様に調製した. 各米粉パン生地の 35 °C における動的粘弾性を測定してみると, プロテアーゼ処理した米タンパク質を添加した米粉パン生地は, 対照の米粉パン生地と比較して $\tan \delta$ が大幅に減少した.

次に, 調製したグルテンフリー米粉パン生地にドライイーストを入れて混捏した後, その生地を 300 mL トールビーカーに分注した. 分注したパン生地を 35 °C で 30 分間発酵させた後, 200 °C で 30 分焼成した. 焼成したグルテンフリー米粉パンの比容積を比較してみると, プロテアーゼ処理した米粉パンの比容積は対照の米粉パンと比べて増大した.

* Y. Honda, N. Inoue, R. Sugimoto, K. Matsumoto, T. Koda, A. Nishioka, *Biosci. Biotech. Biochem.* **82**, pp.484-488(2018)

P11

温室メロン中の GABA による機能性表示受理を目指した季節変動および果実内の部位間差異の評価

○豊泉友康¹, 大場聖司¹, 藤井杏丞², 松浦英之¹, 池ヶ谷 篤^{1,3}, 中嶋輝子¹

(¹静岡農林技研, ²静岡農林大, ³静岡県大院)

【目的】

静岡県の特産品である温室メロンには、血圧上昇抑制や抗ストレス効果が期待される γ -aminobutyric acid (GABA) が多く含まれる。一方で、平成 27 年度の機能性表示食品制度の導入により、生鮮品で機能性表示が可能となったため、表示の受理がメロン生産現場から強く望まれている。そこで、本研究は、温室メロンにおける血圧上昇抑制および抗ストレス効果での機能性表示取得の可能性を明らかにするため、夏、秋、冬および春作のアルースフェボリット系のメロンの GABA 濃度の季節変動および同一果実内の部位間差異を評価した。

【方法・結果】

本研究では、静岡県内のメロン生産組合（温室組合）にて栽培された夏および秋作（2015 年）のメロンをそれぞれ 6 玉と、冬および春作（2016）のものそれぞれ 10 玉を供した。各作のメロンは、果実の胎座部を除き 15 区に分けた後に、それぞれを搾汁した。搾汁液は濾過後に、AccQ・Tag 法で蛍光誘導体化し、蛍光検出器を接続した高速液体クロマトグラフで定量した。その結果、GABA 濃度の平均値は、夏、秋、春、冬の順に高値だった。また、同一サンプル内では、胎座部に近い部位ほど濃度が高く、果皮に近いほど低かった。更に、全サンプルの分析値をメロン一切れ分（1/8：約 100 g）に換算した場合の平均値は、96 mg/100 g F.W. であり、血圧上昇抑制（参考値：12.3 mg）および抗ストレス効果（参考値：28 mg）での表示取得に必要な含量を満たした。

P12

Epigallocatechin gallate (EGCG) の LDL 受容体活性化作用には 67 kDa ラミニン受容体を媒介しない新規経路が関与する

○残華久美子, 川口勇矢, 岡田雄大, 長岡利（岐阜大院・自然科学技術研究科）

【目的】

当研究室では、緑茶に含まれる主要なカテキンである Epigallocatechin gallate (EGCG) が低密度リポタンパク質受容体 (LDLR) を活性化することで抗動脈効果作用を発揮することを報告した¹⁾。しかし、その詳細な作用機構は未だ明らかになっていない。また、近年 EGCG の受容体として 67 kDa Laminin Receptor (67LR) が発見された。そこで本研究では、EGCG の LDLR 活性化機構の解明の一環として、67LR を媒介する経路の関与の有無を検討した。

【方法・結果】

<実験 1> 抗 67LR 抗体で前処理したヒト培養肝臓細胞 HepG2 に EGCG を添加した。その後、RT-PCR を用いて LDLR mRNA レベルを測定した。<実験 2> 67LR siRNA をトランスフェクションした HepG2 細胞に EGCG を添加した後、【A】 RT-PCR を用いて EGCG の抗ガン作用および抗アレルギー作用関連因子レベルを、【B】 RT-PCR によって LDLR を含むコレステロール代謝関連因子の mRNA レベルを、ウェスタンブロットによって LDLR タンパク質レベルを、それぞれ測定した。その結果、<実験 1> 抗 67LR 抗体処理の有無に関わらず、EGCG は LDLR mRNA レベルを有意に増加させた。<実験 2> 【A】 67LR ノックダウンにより EGCG による MYLK mRNA レベルおよび MRLC リン酸化レベルの低下が有意に抑制された。【B】 67LR ノックダウンの有無に関わらず、EGCG は LDLR mRNA および成熟体タンパク質レベルを有意に増加させた。以上より、EGCG の LDLR 活性化作用には 67LR を媒介しない新規経路が関与する可能性が示唆された。

1) *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 1600836 (2017)

P13

難消化性デンプンに着目した調理加工後の金時豆の機能性
○田中美玖¹, 本多裕司¹, 松本健司¹ (¹石川県大・食品科学)

【目的】

金時豆には消化酵素では消化されにくい難消化性デンプン (RS) が 30%程度含まれている。RS には糖・脂質代謝改善への機能性が報告されていることから、金時豆にも RS の機能性が期待できる。金時豆を摂食するには加熱調理が必要で、一般的には煮て食べられるが、煮ることによって金時豆の RS 含量は 1/10 程度に減少するため、煮豆による RS の機能性に関する効果は期待できない。我々はこれまでの研究で金時豆を粉碎後に焙煎処理をすると RS 含量を維持することを見出した。そこで本研究では焙煎した金時豆と煮た金時豆の機能性を比較し、RS に着目した金時豆の健康への効果を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

金時豆粉を 180 度で 10 分間焙煎した焙煎金時豆 (RS 含量 24%) と、金時豆を 50 分間煮た煮金時豆 (RS 含量 3%) をサンプルとして用いた。C57BL/6N マウス (6 週齢、雄) を用いて、高脂肪食に 10%の豆粉を加えた餌を与えたマウスと、各豆粉の PFC 比と食物繊維量を同じにしたモデルサンプルを高脂肪食に 10%加えた餌を与えたコントロールマウス、健常コントロールである普通食を与えたマウスを 12 週間飼育し、機能性の比較を行った。焙煎金時豆を与えたマウスでは血中悪玉コレステロールの低下、肝臓中コレステロールの低下、肝機能障害抑制、糞の排泄量増加、糞への脂質排泄量増加、および腸内 IgA を増加させる効果がみられた。煮金時豆を与えたマウスでは、耐糖能異常改善効果、肝機能障害抑制、および盲腸内酪酸量を増加させる効果がみられた。以上の結果から、金時豆中の RS はコレステロール代謝改善、脂質吸収抑制、腸内免疫を高める作用を有することが示唆された。一方、煮金時豆は糖代謝の悪化を予防する作用を有することが示唆された。

P14

腸管上皮細胞が分泌するエクソソームによる炎症制御

○長谷川加奈¹, 桑田啓子², 吉武淳³, 内田浩二⁴, 柴田貴広¹ (¹名大院生命農, ²名大 ITbM, ³名大未来社会, ⁴東大院農生)

【目的】

細胞から分泌される細胞外小胞の一種であるエクソソームは様々な物質を内包し、標的細胞にその内容物を運ぶことで遺伝子発現等を制御している。近年、腸管由来エクソソームは免疫抑制的に働くことで腸管の免疫寛容を保っていることが明らかになっている (Jiang et al., (2016), Nat. Com.)。

腸管は様々な食品成分に暴露されるため、腸管由来エクソソームの機能は食品成分によって何らかの影響を受けているものと考えられるが、そのような解析はほとんどなされていない。こうした背景から、腸管由来エクソソームを介した食品成分の新たな機能性を解析することを目的とした。

【方法・結果】

腸管上皮細胞のモデルとして、ヒト結腸癌由来の培養細胞である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞に 10 種類の食品成分を投与し、24 時間後の培養上清から超遠心分離およびホスファチジルセリンアフィニティービーズを用いてエクソソームを回収した。その後、各食品成分処理エクソソームの免疫細胞に対する抗炎症活性を評価するため、それぞれのエクソソームをマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 に投与し、Lipopolysaccharide によって炎症を誘導した。RAW264.7 細胞から放出された炎症性サイトカインについて、ELISA 法を用いて定量した結果、処理したエクソソームの種類によって炎症性サイトカイン TNF- α の放出量が異なることが明らかとなった。このことから、腸管上皮細胞が分泌するエクソソームは食品成分の影響を受ける可能性が示唆された。現在、最も抗炎症活性を示した Caco-2 細胞由来エクソソームに含まれる成分について、質量分析装置などを用いて詳細に解析している。

P15

ビタミンB₁の酸化生成物に関する研究

○笹月仁詞¹、吉武淳²、内田浩二³、柴田貴広¹
(¹名大院生命農、²名大未来社会、³東大院農生科)

【目的】

代謝において重要な働きをするビタミンは、生体内で合成することができない必須な栄養素である。最初に同定されたビタミンであるチアミン（ビタミン B₁）はサイトゾルで主にチアミンピロリン酸（TPP）に変換され、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体やトランスケトラーゼなどの補酵素として働くことが知られている。また、チアミンは一重項酸素（¹O₂）のスカベンジャーとしての機能や脂質酸化抑制効果など、抗酸化作用を有することが報告されている。しかしながら、活性酸素種（ROS）によるチアミンの酸化生成物に関しては、thiochrome や thiamine disulfide, oxodihydrothiochrome が報告されているのみで、その他のチアミン由来の酸化生成物に関する報告は未だなされていない。そこで本研究では、ROS によって形成されるチアミンの酸化生成物の検出と構造解析を行った。

【方法・結果】

リン酸緩衝液（pH 7.4）中でチアミンと各種 ROS および ROS 発生試薬を 24 時間反応させた後、LC-MS に供して酸化生成物を検出した結果、複数の生成物が確認された。そこで HPLC により反応生成物を単離精製し、NMR による構造解析を行ったところ、formylaminopyrimidine (FAP)、thiamine sulfinic ester (TSE) および thiamine sulfone acid (TSA) の 3 つを同定した。また、これらは経時的なチアミンの減少に伴って増加し、特に非ラジカル性 ROS においても同様に生成が確認された。これまでに FAP の細菌における非酵素的な生成、また TSE や TSA の有機合成研究について報告されているものの、ROS による酸化過程で生成されることはまだ知られていない。現在、これらチアミン酸化生成物の反応機構の解析と生体サンプルからの検出を試みている。

P16

ペプチドアレイを活用した米α-グロブリン由来新規胆汁酸結合ペプチドの網羅解析 ○MAIHEMUTI MIJITI, 王吉力特, 長岡利 (岐阜大院・自然科学技術研究科)

【目的】

米α-グロブリンは、in vivo 実験において血清コレステロール(CHOL)を低下することが報告されている。しかしながら、活性ペプチドは不明である。本研究では、数百種類のペプチドを同時にアッセイ可能なペプチドアレイを活用し、米α-グロブリンから新規胆汁酸結合ペプチドを網羅的に探索することを目的とする。さらに、発見した胆汁酸結合ペプチドの in vitro での胆汁酸結合能、CHOL ミセル溶解性評価及び in vivo での CHOL 吸収に対する影響評価を行うことを目的とする。

【方法・結果】

<実験 1>米由来α-グロブリンを網羅したペプチドアレイを作成し、胆汁酸ハイブリッドアッセイにより結合能を評価した。<実験 2>実験 1 で見出した胆汁酸結合能を有するペプチドを[¹⁴C]-タウロコール酸を含むタウロコール酸溶液に添加し、in vitro における胆汁酸結合能を評価した。<実験 3>実験 1 で見出した胆汁酸結合能を有するペプチドを[¹⁴C]-CHOL を含むミセル溶液に添加し、in vitro でのコレステロールミセル溶解性に対する影響を評価した。<実験 4>実験 2, 3 において活性が高いペプチド MRFRDR と[³H]-CHOL を含むエマルジョン溶液を調製し、ラットに経口投与し、1 時間後に解剖し、in vivo における CHOL 吸収に及ぼす影響を評価した。その結果、<実験 1>ペプチドアレイにより、米α-グロブリンペプチドには胆汁酸結合能を有するアミノ酸配列が存在することを明らかにした。<実験 2>実験 1 で選抜したペプチドの評価により、RLTRAR と MRFRDR は、カゼインペプチド (CTH) や GGGGGG に比べて、有意に高い胆汁酸結合能を示した。<実験 3>RLTRAR と MRFRDR は、CTH や GGGGGG と比べてミセル溶解性を有意に低下させた。<実験 4>in vivo 実験により、MRFRDR 投与群はコントロール群と比較して小腸での CHOL 吸収を有意に抑制することを発明した。

P17

中高圧加工による玄米中の成分移行性の評価

○田中慎太郎¹, 佐藤 翼¹, 森下雄太², 筒井 歩^{1,2}, 藤田智之^{1,2} (¹信州大院総合理工農, ²信州大農)

【目的】

米には様々な機能性成分が豊富に含まれているものの、その多くが米糠（種皮および胚芽）の部分に存在している。当研究室では、玄米に中高圧下で加水、加温などの加工処理を施すことで、米糠の成分が胚乳に浸透移行し、精白米中のポリフェノール成分が増加することを明らかにしている。玄米に含まれるフェノール酸類のほとんどは糖や脂肪酸などと結合したエステル型で存在していることからエステル型のフェノール酸誘導体が胚乳に移行したことが示唆されている。そこで、本研究では中高圧加工処理により移行する成分の挙動を明らかにすることを目的として、米糠中にエステル型で存在するフェノール酸誘導体を検索した。

【方法・結果】

平成 29 年度産コシヒカリの米糠 400 g に 80%エタノール溶液 2.0 L を加えて攪拌後、暗所にて室温で 24 時間浸漬した。抽出液を吸引濾過し、減圧濃縮後、凍結乾燥して抽出物を得た。抽出物をダイアイオン HP20 を用いたカラムクロマトグラフィー（水/アセトン, 20% stepwise）で分画した。各画分の一部を採取し、アルカリ加水分解後、遊離のフェノール酸を抽出した。

高速液体クロマトグラフィー分析の結果、米糠 80%エタノール抽出物の画分（Fr.1~6）のうち、40%アセトン溶出画分（Fr.3）にエステル型のフェルラ酸が含まれていることを確認した。ほか、複数のエステル型フェノール酸誘導体の存在を確認した。このうち Fr.3 を Wakogel 50C18 を担体とし、水/アセトニトリルで溶出して Fr.3-1~6 に分画した。さらに、20%アセトニトリル溶出画分（Fr.3-2）をシリカゲル 60 を用いてクロロホルム/メタノールで溶出し、35%メタノール溶出画分（Fr.3-2-8）に 6'-*O*-feruloylsucrose の存在を確認した。

P18

野沢菜によるマクロファージの活性化機構の解明

○高橋楓香, 田中沙智（信大院総合理工）

【目的】

マクロファージは、侵入してきた病原体に反応してサイトカインや一酸化窒素（NO）を産生することで免疫系を活性化し、病原体を死滅させることから、感染防御において重要な役割をもつ。当研究室では、これまでに長野県の伝統野菜である野沢菜（*Brassica rapa* L.）の熱水抽出物不溶性画分（IF）が樹状細胞からのサイトカイン産生を誘導することを明らかにしてきた。しかしながら、野沢菜のマクロファージに対するサイトカインおよび NO 産生誘導能や、野沢菜の活性成分を認識するレセプターについては明らかになっていない。そこで本研究では、マクロファージにおける野沢菜の免疫賦活効果とそのメカニズムの解明を目的とした。

【方法・結果】

マクロファージの細胞株である RAW264 細胞に IF を添加して 24 時間培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を ELISA で測定したところ、IL-6 と TNF- α のサイトカイン産生が有意に増加した。また、Griess 試薬を用いて、同様に刺激した RAW264 細胞の培養上清に含まれる NO 産生量を定量したところ、無刺激に比べて IF 刺激で有意に NO 産生が増加した。続いて、チオグリコレートを腹腔内投与した C57BL/6 マウスを 4 日間飼育した後に、腹腔マクロファージ（pM）を採取し、RAW264 細胞と同様に IF で刺激したところ、サイトカインおよび NO 産生が無刺激に比べて有意に増加した。さらに、IF を認識するレセプターを探索するため、WT、TLR2^{-/-}および TLR4^{-/-}マウスから上記と同様の手順で pM を回収し、IF で刺激した後、培養上清に含まれるサイトカイン産生量を測定したところ、IL-6 および TNF- α 産生は WT に比べて TLR2^{-/-} および TLR4^{-/-} pM で有意に低下した。以上のことから、野沢菜は TLR2 と TLR4 を介してマクロファージを活性化することが示された。

P19

野沢菜漬けの発酵過程における菌叢の変遷および免疫調節作用への影響
○濱島知里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】

当研究室において、信州の伝統野菜である野沢菜は発酵に伴い、サイトカイン産生誘導能を増強させることを明らかにしてきた。一方、漬け物の菌叢は発酵過程で変化し、乳酸菌が増加することが知られているが、これまでに野沢菜漬けの菌叢の詳細に関する報告例は少ない。そこで本研究では、野沢菜の発酵過程における菌叢とサイトカイン産生誘導能について解析した。また、発酵させた野沢菜漬けから分離した乳酸菌株のサイトカイン産生誘導能を評価した。

【方法・結果】

塩水漬けした野沢菜原料を 10℃で発酵させ、原料と発酵開始から 3, 7, 14, 21, 28 日目に各サンプルを回収し、16S rRNA メタゲノム解析を実施した。その結果、発酵に伴って *Lactobacillales* の占有率が有意に増加し、菌叢の多様性指数が有意に減少した。次に、各サンプルをマウス脾臓細胞に添加したときのサイトカイン産生量を測定したところ、発酵によって IFN- γ および IL-10 産生量が増加した。続いて、菌種特異的プライマーを用いた qPCR により乳酸菌の絶対定量を行い、乳酸菌数とサイトカイン産生量の相関を解析したところ、*Lactobacillus curvatus*, *L. plantarum*, *L. brevis* が IFN- γ 産生量と正の相関を示し、*L. curvatus* は IL-10 産生量においても正の相関を示した。発酵 28 日目のサンプルから分離した乳酸菌 48 株のうち多数の株が *L. plantarum* であり、一部は *L. curvatus*, *L. brevis* と同定された。IFN- γ および IL-10 の産生誘導能は、菌株ごとに異なる産生パターンを示した。今後は、サイトカイン産生誘導能の高い乳酸菌株をスターターとして用いた野沢菜漬けの解析を進めることで、機能性食品の開発につなげていきたいと考えている。

P20

小豆煮汁抽出物の骨代謝に対する影響
○細川遥香¹, 西尾昌洋¹, 江崎将梧¹, 近藤修司², 園淳平², 中村昌弘², 濱口昭弘², 栗谷健志¹, 梅川逸人¹ (¹三重大学・生物資源, ²井村屋(株))

【目的】

小豆煮汁には、カテキンやルチン等のポリフェノールをはじめとする種々の有効成分が豊富に含まれている。しかし、小豆煮汁のほとんどは廃棄されているため、これを保健機能食品等に有効活用することを目指している。我々は、ダイアイオン HP20 カラムに供した小豆煮汁の 20-40%エタノール画分(凍結乾燥物)が骨粗鬆症モデルマウスに対して骨密度低下抑制効果を有することをすでに報告した¹。本研究では、有効成分の調製を容易化するため、回収するエタノール画分を 0-40%とした上で、乾燥操作を凍結乾燥から真空乾燥に変更し、得られたサンプルにおける破骨細胞・骨芽細胞への分化と、卵巣摘出術により骨粗鬆症を誘発したラット骨代謝に対する影響を検討した。

【方法・結果】

小豆煮汁を遠心分離して得た上清画分(AZ)をバッチ法にて HP20 に吸着し、40%エタノールで溶出した画分の真空乾燥物(AE)を、細胞試験および動物試験に用いた。細胞試験では、破骨前駆細胞(RAW264.7)から破骨細胞、骨芽前駆細胞(MC3T3-E1)から骨芽細胞への分化誘導を行い、それぞれ TRAP 染色、アリザリンレッド染色にて検定した。動物試験では、雌性 Wister 系ラットを 1 週間順化させた後に卵巣摘出し、試験餌で 4 週間飼育した後 CT 解析により骨密度等を測定した。

細胞試験の結果、破骨細胞分化はコントロール(PC)群と比較して AE 群で有意に抑制され、AZ 群では抑制傾向が見られた。骨芽細胞分化は AE 群で有意に促進していたが、AZ 群では変化は見られなかった。動物試験の結果、AE 群および AZ 群で骨密度の有意な低下抑制が認められた。現在、AE および AZ 群に含まれる種々の有効成分を分析中である。

1.日本農芸化学会中部支部第 177 回例会

P21

ヤマトタチバナ未利用資源の有効活用に関する研究

○山田由佳¹, 中山寛子¹, 島田康人², 三島隆³

(¹三重大学大学院地域イノベーション学研究所, ²三重大学大学院医学系研究所,
³三重大学大学院生物資源学研究所)

【目的】

ヤマトタチバナはミカン科ミカン属の日本固有種の柑橘である。日本書紀では永遠に香る果実と表現されており、花・葉・果皮それぞれに特徴のある芳香を有する。果皮の香気成分はリモネンが主成分であるが、リナロールなど他の香気成分がグリーンで果汁感のある香気に寄与している。ヤマトタチバナは三重県鳥羽市に自生し、市の木にも選定されている。鳥羽市では地域資源としての活用として、2003年に農工商連携による商品開発を始めた。

現在、ヤマトタチバナの果汁は加工食品として利用されるようになったが、果皮・じょうのう膜・種子は利活用されていない。これらの重量は全体の約60%を占める。本研究では、多くの割合を占めるヤマトタチバナの未利用資源に着目し、栄養特性解析およびゼブラフィッシュを用いた生理活性に関する一次スクリーニングを行った。

【方法・結果】

ヤマトタチバナの5栄養成分について、常法を用いて測定した。

ヒトの肥満と共通する病態経路を有するゼブラフィッシュをヒトモデルとしてスクリーニングに用いた。試料を混ぜた餌を2週間ゼブラフィッシュに与えたのち、脂肪含量の高いアルテミアを1週間大量に投与することで肥満誘導を行った。身体測定及びアルテミア摂取量測定により体質の変化を観察した。Control群のアルテミア摂取率が約40%であったのに対し、ヤマトタチバナの果皮・じょうのう膜を混ぜた餌を2週間与えたゼブラフィッシュの摂取率は90~100%となり、ヤマトタチバナによる食欲増進が示された。

P22

ミオイノシトールによる肝臓中性脂肪蓄積の抑制機構に関する研究

○市古雄太郎, 稲垣瑞穂, 中川智行, 早川享志, 島田昌也 (岐阜大院・自然科学技術)

【目的】

柑橘類等に遊離の形として多く含まれるミオイノシトール(MI)は、古くから抗脂肪肝作用をもつことが知られている。我々は、ラットに高フルクトース食を摂取させることで誘導した非アルコール性脂肪肝(NAFL)に対しても、MIが抗脂肪肝作用を発揮すること、特に肝臓の中性脂肪(TG)量を著しく減少させることを報告してきた。本研究では、高フルクトース食誘導性NAFLに対するMIのTG蓄積抑制機構を検討することを目的とした。

【方法・結果】

糖質源を65%グルコースとした食餌(グルコース食)を陰性対照とし、グルコースをフルクトースに置き換えた食餌(フルクトース食)、あるいはフルクトース食にMIを添加(0.05%あるいは0.25%)した食餌を、それぞれラット(Wistar系, 4週齢, 雄)に14日間摂取させた。グルコース食と比較しフルクトース食を摂取させたラットでは、肝臓TG量は顕著に増加したが、この増加はMIの添加により有意に抑制された。また、リアルタイムPCR法およびウエスタンブロット法により、フルクトース食によって誘導された脂肪酸合成系酵素(FASN, ME1など)の発現量の増加は、MI添加により抑制されることを明らかにした。さらに、クロマチン免疫沈降法により、フルクトース食によって誘導されたFASN遺伝子上への転写因子ChREBPの結合量は、MI添加により抑制されることを明らかにした。以上の結果より、MIによる肝臓TG蓄積の抑制は、FASN遺伝子上への転写因子ChREBPの結合低下が一因であることが示唆された。

P23

乳児腸管におけるラクトフェリンの分解吸収機構の解析

○石川千尋, 宮田真路, 灘野大太, 松田幹, 大島健司 (名古屋大学大学院 生命農学研究科)

【目的】

ラクトフェリン (LF) は、哺乳動物の乳汁中に含まれる生理活性を持つ糖タンパク質であり、受容体に結合し細胞へシグナルを伝達するだけでなく、消化酵素により分解され抗菌活性を持つラクトフェリシンやピフィズ菌増殖ペプチドなど複数の機能性ペプチドを生成する。しかしながら乳児の消化能力は弱く、また LF は消化酵素への抵抗性があるため、このような機能性ペプチドが生成するかを含め、乳児消化管での LF 分解の全貌は明らかとなっていない。本研究では乳児腸管における LF の分解や局在の解明を目的とする。

【方法・結果】

2 日齢の ICR マウスに精製ウシ LF (bLF) を胃内投与し、0~300 分の範囲で経時的に腸管を摘出した。小腸を 3 等分し、ウェスタンブロットおよび免疫染色により LF を検出した。また、3, 6, 30 日齢の ICR マウスから腸管を摘出し、小腸管腔内容物と組織の抽出液を調製した。この抽出液を用いて、LF の *in vitro* 消化を行った。

bLF 投与群において投与から 30 分以降に小腸上部から中部にかけて 55 kDa、45 kDa、32 kDa の bLF 分解断片と思われるバンドが検出されたが、より小さな分解断片は見られなかった。このうち最も主要に見られた 45 kDa の分解断片は、トリプシンによる消化では生成されなかった。乳児特異的 bLF 断片の生成がどの酵素によるものか解析するため *in vitro* 消化を行ったところ、45 kDa 断片は小腸上部の組織抽出液によって生成された。免疫染色により、bLF は投与 60 分後の小腸上部の絨毛内部や絨毛基部に観察された。

これらの結果から、乳児腸管において LF は小腸上部の細胞によって取り込まれ、細胞内プロテアーゼによって複数の比較的大きな分解断片として速やかに体腔側に移行することが示された。

P24

胆汁酸吸着能を有する柿タンニンの肥満モデルマウスにおける糖代謝への影響

○西田紗希¹, 勝見尚也¹, 松本健司¹ [¹石川県大]

【目的】

柿の未成熟果実から調製した柿タンニンには胆汁酸吸着能があり、これまでに血中コレステロール低下作用が明らかになっている。一方、胆汁酸吸着剤は高コレステロール血症に加え、2 型糖尿病に対する追加承認を 2008 年に FDA で得ており、胆汁酸吸着能を有する物質には糖代謝への有効性が期待できる。本研究では胆汁酸吸着能を有する柿タンニンの糖代謝への影響について肥満モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

未成熟平核無柿粉末から抽出した柿タンニンをサンプルとした。リサーチダイエット社の高脂肪食にセルロース、柿タンニン、コレステラミンをそれぞれ 2% 添加した試験飼料(コントロール群、柿タンニン群、コレステラミン群とする)を C57BL/6J マウスに 12 週間摂取させ、インスリン抵抗性や耐糖能など、糖代謝への影響について検討した。その結果、飼育期間中の餌摂取量はコレステラミン群で有意に多く、体重は 3 群間に有意差がみられ、柿タンニン群、コレステラミン群がコントロール群に比べて有意に低い値となった。14 時間絶食血糖値についても柿タンニン群とコレステラミン群がコントロール群に比べて有意に低い値を示した。また、インスリン抵抗性試験ではコントロール群と差がなかったが、腹腔内グルコース負荷試験において柿タンニン群がコントロール群に比べて血糖値上昇が有意に低かった。これらの結果から柿タンニンは血糖値低下作用を有することが明らかとなった。一方、タンニンには鉄の吸収阻害効果が知られていることから柿タンニン摂取による鉄欠乏症が危惧される。そこで糞中の鉄含有量を測定したところ、3 群間で有意差はみられなかった。よって柿タンニンの摂取による鉄の吸収阻害効果はないと考えられる。

Pd 触媒による CO 挿入反応を用いた styryl lactone 類の合成研究

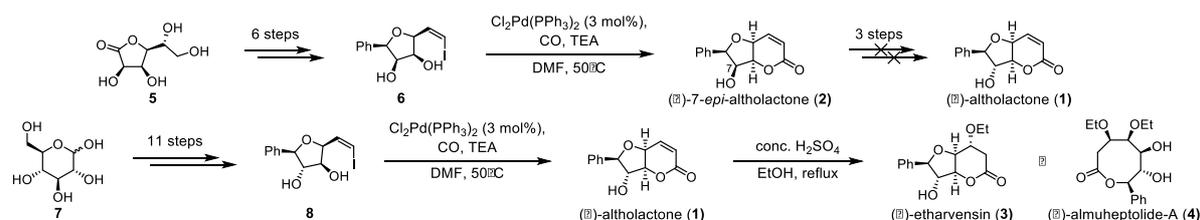
○宮澤雄希¹, 服部恭尚², 眞壁秀文¹(¹信大院総合理工, ²京都薬科大 共同利用機器センター)

【目的】

バンレイシ科 *goniothalamus* 属は、熱帯アジアに見られる植物であり、その樹皮より多種多様な化合物が単離・構造決定されている。中でも styryl lactone 類は顕著な抗腫瘍活性を有することが明らかとなっている。そこで本研究では Pd 触媒を用いた CO 挿入反応を鍵反応として styryl lactone 類を合成することと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】

D-Gulonolactone (5) を出発物質とし 6 段階の反応を経て環化前駆体 6 を得た後、鍵反応である CO 挿入反応を行い、(+)-7-*epi*-altholactone (2) を得た。その後、既に報告されている方法に従って、(+)-altholactone (1) の合成を試みたが目的物を得ることはできなかったため、出発物質を D-Glucose (7) に変更し全合成を試みた。7 から 11 段階の反応を経て環化前駆体 8 を得た後、鍵反応として CO 挿入反応を行い (+)-altholactone (1) の全合成を 12 段階、総収率 15.3% で達成した。また、合成した 1 を用いて、(-)-etharvensin (3), (+)-almuheptolide-A (4) の合成も達成した。



生理活性ペプチド Stylissatin A の構造活性相関研究およびケミカルプローブの合成

○Yiting Sun¹, 砂場大輝², 張夢華³, 木越英夫², 北将樹¹(¹名大院生命農, ²筑波大院数理工学, ³筑波大グローバル教育院)

【目的】

Stylissatin A はパプアニューギニア産の海綿 *Stylissa massa* から単離された 4 種類の L-アミノ酸から構成される環状ヘプタペプチドである (図 1)。本化合物はリポ多糖で刺激したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に対して、炎症反応のメディエーターの一つである一酸化窒素の生産を抑制することから、抗炎症剤のリード化合物として期待される。本研究では、stylissatin A の構造活性相関研究により、天然物リガンドを起点とした、新たな抗炎症活性メカニズムを解明するツールの開発を目指した。

【方法・結果】

これまでの本化合物の構造活性相関研究により、Tyr¹ 残基のフェノール性ヒドロキシ基を *tert*-Bu 基で保護した誘導体が、天然物よりも約 6 倍強い NO 産生抑制活性を示すことを見出した。そこでこのヒドロキシ基を種々の官能基で保護した誘導体、および D-アミノ酸を 1 つもしくは 2 つ導入したアナログを固相法で合成し、天然物よりも強い NO 産生阻害活性および低い細胞毒性を示す、活性選択性に優れた誘導体を見出した。また、作用機序の解明を目指して、stylissatin A のビオチン誘導体も高効率で合成した。

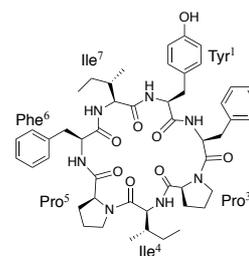


図 1 Stylissatin A

P27

Stylissatin A の抗炎症および抗肥満活性に関する研究

○張夢華¹, 砂場大輝², Yiting Sun³, 柴田貴広³, 佐々木一憲^{2,4}, 磯田博子^{4,5}, 木越英夫², 北将樹³
(¹筑波大グローバル教育院, ²筑波大院数理物質, ³名大院生命農, ⁴産総研, ⁵筑波大院生命環境)

【目的】

近年、環状ペプチドは有機小分子と生体高分子のギャップを補完する「中分子創薬」の候補として注目されている。環状ペプチドは鎖状化合物に比べてコンフォメーションが制限されるため、特定の標的分子に対してより強く相互作用し、強力な薬理活性を発現することが多い。我々は海洋生物由来の抗炎症活性を示す環状ペプチド stylissatin A に注目し、本研究ではケミカルプローブを用いた標的分子の同定、および新たな抗炎症活性の作用メカニズムの解明を目指した。

【方法・結果】

一般に炎症反応と肥満は密接に関係していることから、脂肪蓄積阻害活性を評価したところ、stylissatin A 誘導体の一つがマウス線維芽細胞 (3T3-L1) の脂肪細胞への分化と脂肪滴の蓄積を顕著に阻害し、マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に対する抗炎症活性と高い相関があることがわかった。ついで stylissatin A にビオチン基を導入した誘導体を用いたアフィニティー精製により、標的分子の同定を行った。その結果、上記の RAW264.7 細胞と 3T3-L1 細胞の両方から、脂肪酸の β 酸化に関わる同一の酵素を標的タンパク質として同定した。本発表ではラット肝臓抽出液を用いた酵素活性阻害試験、および stylissatin A 誘導体による DNA microarray 解析についても報告する。本化合物のさらなる作用機序の解明により、抗炎症と抗肥満作用に共通する新たなシグナル伝達系の理解に繋がると期待される。

P28

リガンド解離型ピレンプローブを用いた標的分子における結合位置解析

○荒井厚志¹, 服部篤紀¹, 渡邊礼², 胡□萍², 飯尾啓太², 米田耕三², 木越英夫², 北将樹^{1,3}
(¹名大院生命農, ²筑波大院数理物質, ³JST さきがけ)

【目的】

生理活性物質 (リガンド) に反応基と検出基を導入した誘導体 (ケミカルプローブ) は、標的分子の同定や、結合位置の解析に用いられる。我々は、アミドピレン基を持つケミカルプローブとマトリックス不要のレーザー脱離イオン化質量分析法 (LA-LDI MS) を用いて、ラベル化ペプチドを選択的に検出し、標的タンパク質とリガンドの結合位置を高精細に解析する手法の開発を目指している。これまでに、リガンドに反応性官能基とアミドピレン基を導入したケミカルプローブを用いて、標的分子の位置選択的なラベル化と修飾ペプチド断片の検出に成功している。一方、上記のプローブを用いると、LA-LDI MS 系内においてリガンドとアミドピレン基をつなぐリンカー構造が開裂し、ラベル化ペプチドの検出感度が低下するという問題があった。そこで本研究では、新たにリガンド解離型ピレンプローブを開発し、標的分子におけるリガンドの詳細な結合位置解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】

リガンドにはビオチンを選び、アミドピレン基との間に NHS 基を挿入したリガンド解離型プローブを合成した。標的タンパク質アビジンのラベル化は特異的に進行し、分子モデリング計算により得られたリガンドの結合位置は、複合体の結晶構造のものとはほぼ完全に一致した。さらに、末端にアジド基を持つリガンドと、ジベンジルアザシクロオクチン (DBCO) 基を持つアミドピレン基間の歪み Click 反応により、分子内に電荷を持つなど高極性のリガンドであっても、アミドピレン基のリガンド解離型プローブを簡便に合成できる手法を開発した。検出基であるピレン基の改良によるさらなる高感度化、およびラベル化ペプチドの選択的な脱塩・検出法の試みについても合わせて発表する。

キューバ産植物由来の抗炎症物質の探索研究

○蛭川美奈子¹, Lázaro M. Echenique-Díaz², 溝田浩二², 大舘智志³, Gerardo Begué-Quiala⁴, Jorge L. Delgado Labañino⁴, Jorgelino Gámez Díez⁴, 北将樹¹ (¹名大院生命農, ²宮城教育大教員キャリア研究機構, ³北大低温研, ⁴キューバ共和国アレハンドロ・デ・フンボルト国立公園)

【目的】

カリブ海の亜熱帯・熱帯地域の島嶼国は生物多様性が高く、未知の生物活性物質の発見が期待される。発表者らは、キューバ共和国において世界で2種しかいない絶滅危惧種の有毒哺乳類ソレノドンや民間伝承の薬用植物など、カリブ海の固有・希少な野生生物に関する生態化学的調査を2012年より継続して実施しており、有効成分の化学分析と生態学、進化系統解析を組み合わせることで、生物進化と生物多様性の謎に迫ることを目指している。今回、中米に固有の生物種からユニークな新物質の発見を目指して、有用物質の探索研究を行なった。

【方法・結果】

キューバ共和国グアンタナモ州に位置する、アレハンドロ・デ・フンボルト国立公園の高原地帯にて採取した固有種の植物23種について、抗炎症活性および腫瘍細胞に対する細胞毒性を評価した。その結果、ノウゼンカズラ科とジャケツイバラ科の植物に、リポ多糖で刺激したマウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に対して、炎症反応のメディエーターの一つである一酸化窒素の生産を抑制する抗炎症作用が見られた。この活性を指標に、アルコールで抽出したエキスを液-液分配と各種カラムクロマトグラフィーで分離・精製し、活性物質として環状ジエノン構造を持つ化合物2種を単離した。ともに既知化合物であったが、これらが抗炎症活性を示すことは今回初めて明らかとなった。単離・構造解析および誘導反応について発表する。

海洋天然物アプリロニン A の標的分子における結合位置解析および作用機序の解明

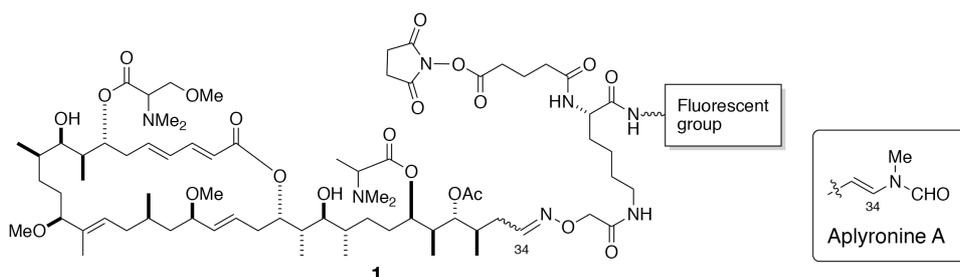
○井熊純也¹, 瀬口由宇², 山岸航大², 中根玄貴², 臼井健郎³, 木越英夫², 北将樹^{1,4}
(¹名大院生命農, ²筑波大院数理物質, ³筑波大院生命環境, ⁴JST さきがけ)

【目的】

アプリロニン A は、海洋軟体動物アメフラシから単離された24員環マクロリドであり、強力な抗腫瘍活性およびアクチン脱重合活性を有する。また本化合物はアクチンと複合体を形成した後、微小管を構成するチューブリンとも相互作用し、ごく低濃度でがん細胞の有糸分裂を阻害する。本研究では、ケミカルプローブを用いてアプリロニン A のチューブリンにおける結合位置を解明し、本化合物が誘導する特異なタンパク質間相互作用を解明することを目指した。

【方法・結果】

これまでの構造活性相関研究をもとに、アプリロニン A の C34 位エナミド基から L-Lys リンカーを伸長して、反応性官能基にスクシニル基、および検出基に TAMRA など蛍光基を持つケミカルプローブ **1** を合成した。アクチンのラベル化を検討した結果、アプリロニン A が強固に結合するアクチンの疎水性クレフトに近い Lys113 残基の特異的なラベル化がみられた。アクチン、チューブリンの共在下で行ったラベル化についても合わせて発表する。



P31

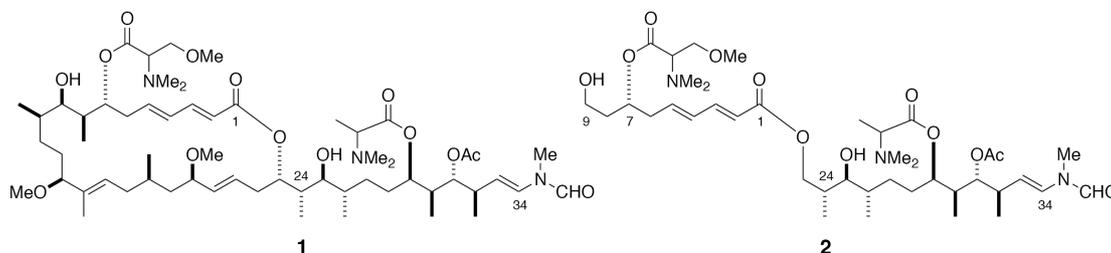
海洋天然物アプリロニン A の構造簡略化を指向した人工類縁体の設計と合成

○藤枝あかり¹, 高橋桃子², 二木健太郎², 木越英夫², 北将樹^{1,3}

(¹名大院生命農, ²筑波大院数理物質, ³JST さきがけ)

【目的】 アプリロニン A (**1**) は, がん細胞に対する強力な細胞増殖抑制活性および顕著な抗腫瘍活性を示す海洋産マクロリドである. 本化合物は細胞骨格タンパク質であるアクチンとチューブリンの相互作用を誘導し, ごく低濃度でがん細胞の有糸分裂を阻害することから, 新規な作用機序を持つ抗がん剤リード化合物として期待される. 本研究では, アプリロニン A の生物活性を保持しつつ, 構造を簡略化した人工類縁体を創出し, その作用機序の解明や, 細胞骨格タンパク質を精製する新規ツールの開発を目指した.

【方法・結果】 これまでの構造活性相関研究の知見をもとに, アクチンとの結合に重要な C24-C34 側鎖部と, 細胞増殖阻害活性に重要なマクロラクトン部の C1-C9 位を結合した **2** など, 数種の人工類縁体を合成した. 超遠心法により, 細胞骨格タンパク質への効果を *in vitro* で評価した結果, いずれの誘導体も, アクチン脱重合活性は天然物の活性をほぼ保持していたが, チューブリンへの作用はみられなかった. またヒト子宮頸がん細胞 (HeLa S3) に対する細胞増殖阻害活性も大幅に低下した. 分子モデリング計算による, 人工類縁体のアクチンとの相互作用の解析についても合わせて発表する.



P32

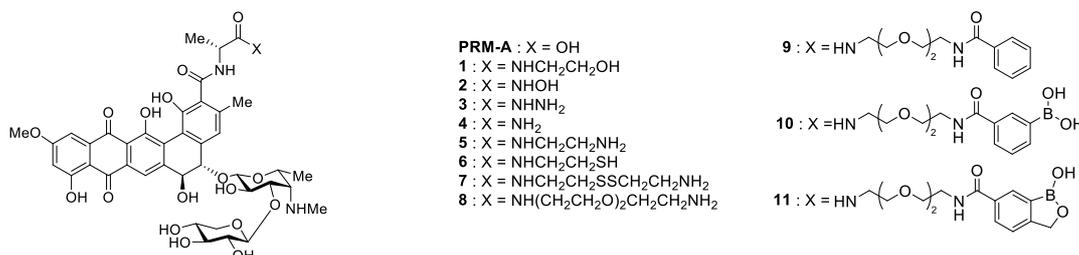
Pradimicin A のアミド誘導体の系統的合成と活性評価

○宮西 航¹, 中川 優^{1,2}, 五十嵐康弘³, 伊藤幸成², 小鹿 一¹

¹名大院・生命農, ²理研, ³富山県大・生工

【目的】 Pradimicin A (PRM-A) は, 真菌マンナンのマンノース (Man) 残基に結合して抗真菌活性を示す抗生物質である. PRM-A は糖鎖を標的としたユニークな抗真菌薬リードとして注目されているが, 水溶液中で高い凝集性を示すことが大きな問題となっている. 我々は近年, PRM-A のカルボキシ基に 2-aminoethanol をアミド縮合した誘導体 (**1**) が Man 結合活性を保持し, さらに水溶液中でほとんど凝集しないことを見出した. そこで本研究では, PRM-A のアミド誘導体を系統的に合成し, それらの抗真菌活性, Man 結合活性, および凝集性を評価することで, 創薬リードとしての資質を高めた誘導体を見出すことを目的とした.

【方法・結果】 PRM-A のメチルエステル化とエステル/アミド交換反応により, 10 種のアミド誘導体 (**2-11**) を合成した. まず, *Candida rugosa* に対する抗真菌活性を評価したところ, 長い置換基を有するアミド誘導体 (**7-11**) はいずれもほぼ不活性であったのに対して, 比較的短い置換基を有する誘導体 (**2-4**) は顕著な抗真菌活性 (MIC = 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を示すことが明らかになった. さらに, **2-4** は水溶液中でほとんど凝集しないことが確認された. 現在, 等温滴定カロリーメトリーによる Man 結合試験を行なっているところであり, その結果も合わせて報告する.



ベルベリン類縁体による筋分化誘導型オリゴ DNA の作用増強

○進士彩華¹, 梅澤公二^{1,2}, 下里剛士³, 高谷智英^{1,2}

(1信州大院総合理工, 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】

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 ライブラリを用い、マウス骨格筋芽細胞への作用をスクリーニングした結果、筋分化を強力に促進するオリゴ DNA として myoDN を同定した。また、生薬キハダに含まれるアルカロイド分子ベルベリンが、myoDN と結合し、その筋分化誘導作用を増強することを見出した。本研究では、myoDN 変異体およびベルベリン類縁体を用い、myoDN とベルベリンの相互作用を調べた。

【方法・結果】

myoDN とベルベリン類縁体 (ベルベリン、コプチシン、パルマチン、ジャトロリジン) の混合物をアガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロマイド染色に供した。紫外線照射でベルベリン誘導体が発する黄色蛍光を指標に、myoDN との結合を検定した。また、これらのベルベリン類縁体が、myoDN の筋分化促進作用を増強するか検討した。ベルベリンとコプチシンは myoDN に強く結合し、その活性を高めた。パルマチンは myoDN に弱く結合したが、ジャトロリジンは結合しなかった。myoDN とベルベリンの複合体形成における陽イオンの役割を調べるため、myoDN とベルベリンを、HCl、NaCl、MgCl₂、KCl、CaCl₂、MnCl₂、FeSO₄、CuSO₄ または ZnSO₄ 溶液中で混合した。myoDN-ベルベリン複合体は CaCl₂ 中で強く、MgCl₂ 中で弱く検出されたが、他の溶液中では検出されなかった。また、一部の塩基を欠失または置換させた変異 myoDN の検討から、ベルベリンとの結合に不可欠な myoDN の塩基を同定した。これらの結果から、myoDN-ベルベリン複合体の形成および筋分化誘導活性に必須となる分子構造の一端が明らかになった。

糖濃度依存的な骨格筋分化抑制に対する筋分化誘導型オリゴ DNA の作用

○中村駿一¹, 米倉 真一^{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】

血糖値スパイクは、血糖値が食後急上昇し、その後急降下する現象である。近年、血糖値スパイクが糖尿病や心筋梗塞などの危険因子であることが明らかになりつつある。しかし、血糖値スパイクが筋芽細胞に及ぼす影響についての報告はまだない。筋芽細胞は、骨格筋組織の恒常性維持に中心的な役割を果たす筋前駆細胞である。筋芽細胞の増殖・分化能の低下は、筋力や筋量の減少を伴うサルコペニアの一因となる。筋芽細胞の機能は血糖異常を伴う肥満や糖尿病で障害されるため、本研究では、血糖値スパイクを模した条件で筋芽細胞を培養し、増殖や分化が変化するかを調べた。

【方法・結果】

マウス筋芽細胞株 C2C12 を以下の増殖培地で培養した。通常グルコース濃度 (normal glucose; NG、5.6 mM)、高濃度グルコース (high glucose; HG、25 mM)、NG と HG を 24 時間ごとに交換 (oscillated high glucose; OG)。培養 4 日目には、NG 群と比較して OG 群と HG 群の細胞数が有意に減少した。次に、上記条件で培養した C2C12 を播種し、分化培地 (differentiation medium; DM) で筋分化を誘導した。NG 群は DM-NG に、HG 群は DM-HG に交換し、OG 群では DM-NG と DM-HG を 24 時間ごとに交換した。分化誘導 4 日後に骨格筋マーカーであるミオシン重鎖 (MHC) を免疫染色した結果、OG 群と HG 群では MHC 陽性細胞率が有意に低下していた。以上の結果から、断続的な高濃度グルコースへの曝露は、筋芽細胞の増殖・分化を低下させることが明らかになった。本演題では、我々が見出した筋分化誘導型オリゴ DNA が、糖濃度異常により減弱した筋分化を改善するかを報告する。

P35

筋分化誘導型オリゴ DNA による多能性幹細胞の分化誘導

○石岡美奈¹, 二橋佑磨², 鏡味裕^{1,2}, 下里剛士³, 高谷智英^{1,2,4}

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

【目的】

我々は最近、筋芽細胞（骨格筋前駆細胞）の分化を著名に亢進する新規核酸分子として、18塩基の1本鎖オリゴ DNA である myoDN を同定した。しかし myoDN が、胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞などの多能性幹細胞の分化に及ぼす影響は不明であった。本研究では、myoDN がマウス多能性幹細胞の筋分化を促進するかを検討した。

【方法・結果】

マウス iPS 細胞 20D17 株の分化誘導を行い、分化誘導 5 日目に myoDN を添加した。9 日目には、myoDN 投与群でのみ心筋様に拍動するコロニーを認めた。10 日目以降には対照群でも自発的に分化した心筋様のコロニーが出現したが、その直径は最大でも 300 μm 程度であり、myoDN 投与群で観察された直径 1 mm 以上のコロニーと比較して小さかった。13 日目にコロニーの拍動数を計測すると、対照群の約 130 回/分に対し、myoDN 投与群では 200 回/分以上の拍動を記録した。

次に、心筋特異的転写因子 *Nkx2-5* の遺伝子座に GFP をノックインしたマウス ES 細胞 hCGp7 株を分化誘導した。分化誘導 5 日目から myoDN を投与すると、8 日目には myoDN 投与群でのみ GFP 陽性の拍動するコロニーが確認された。一方、対照群では GFP の発現および拍動するコロニーは認めなかった。興味深いことに、分化誘導 3 日目から myoDN を投与した群では、8 日目以降 15 日目に至るまで、拍動するコロニーは全く観察されなかった。以上の結果から、多能性幹細胞の分化誘導において、myoDN は心筋分化を誘導する効果を持つが、その効果は投与時期によって異なることが示された。今後、さらに条件を検討することで、myoDN による効率的な心筋分化誘導法を確立できれば、心臓再生医療などへの応用が期待される。

P36

トガリネズミ由来の麻痺性神経毒ペプチドの構造と生物活性

○武仲敏子¹, 別所学¹, Andres D. Maturana¹, 木越英夫², 大館智志³, 上村大輔⁴, 北将樹^{1,2,5}

(¹名大院生命農, ²筑波大院数理解物質, ³北大低温研, ⁴神奈川大理, ⁵JST さきがけ)

【目的】

トガリネズミは唾液中に毒を持ち、ミミズなど獲物を麻痺させて捕まえる珍しい哺乳類である。特に、北米に棲息するブラリナトガリネズミ *Blarina brevicauda* が持つ毒は強力であり、カエルやネズミなど脊椎動物も餌としてしまう。演者らはこれまでに、この種の顎下腺から脊椎動物に対して麻痺と痙攣を引き起こす致死性プロテアーゼ毒、ブラリナトキシンを発見した。一方で、ブラリナトキシンを獲物に注入してから毒性を示すまで数時間以上かかること、およびトガリネズミが主な餌とするミミズや昆虫など無脊椎動物にはこの毒は効かないことから、この動物の唾液成分にはタンパク毒素とは異なる麻痺物質が含まれると予想し、特異な麻痺性神経毒の発見を目指すこととした。

【方法・結果】

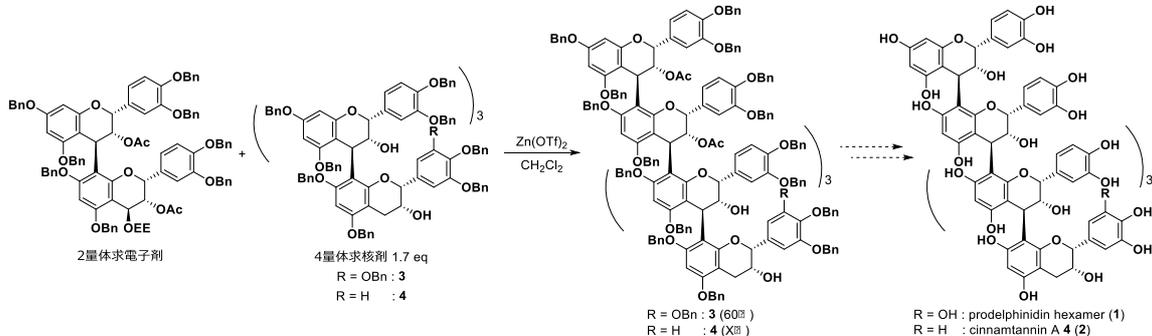
ブラリナトガリネズミの顎下腺を生理食塩水で抽出し、ミールワームに対する麻痺作用を指標に分離精製した結果、低分子を主に含む画分に活性が見られた。この主成分を精製して分子量約 5 kDa の新規ペプチド 2 種を単離し、Blarina Paralytic Peptides (BPP) 1, 2 と命名した。溶液内酵素消化および詳細な MS/MS 解析により、BPP 類のアミノ酸一次配列を解析した結果、BPP 類はヒトのオピオイドペプチド前駆体に相当するシンエンケファリンの部分構造に類似しており、3 つのジスルフィド結合をもつ一本鎖のペプチドであることが判明した。また電気生理学的解析により、BPP2 類は Ca チャネルを発現誘導したヒト神経芽腫細胞 (IMR-32) に対する Ca チャネル開口活性を示した。BPP 類の構造と機能を確認するため、現在、ブレババチルス発現系を用いたリコンビナントペプチドの合成を検討している。

ブドウ梗に含まれる proanthocyanidin 類の合成

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

【目的】 Proanthocyanidin 類は、ブドウやリンゴ、大豆など様々な食品に存在し、抗酸化作用や動脈硬化抑制作用等の生理活性を有する。特に、ブドウ梗に含まれる prodelfphinidin octamer はヒト前立腺癌細胞株 (PC-3) に対し顕著な抗腫瘍活性を示す。しかし、天然には微量に存在することから活性試験への試料供給が困難であり、構造活性相関が明らかになっていない。本研究では prodelfphinidin octamer のモデル化合物を合成し、構造活性相関解明に向けた試料供給を目的とした。

【方法・結果】 Prodelfphinidin octamer のモデル化合物として、ピロガロール基を 1 つもつ prodelfphinidin hexamer (1), さらにネガティブコントロールとしてピロガロール基をもたない cinnamtannin A4 (2) を目的化合物とした。エピカテキン、エピガロカテキンガレートより 10 段階の反応を経て 4 量体求核剤 (3 または 4) を合成した後、2 量体求電子剤との縮合反応に供し 6 量体化合物 (5 または 6) を得た。最後に、保護基の脱保護を行い prodelfphinidin hexamer (1) 及び cinnamtannin A4 (2) の合成を完了し、活性試験に供する予定である。

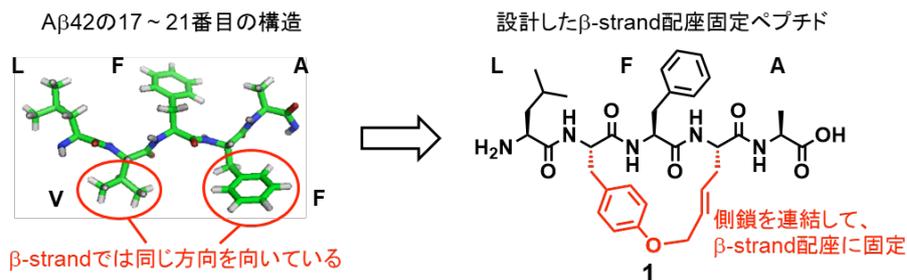


アミロイドβの凝集を阻害するβ-ストランド配座固定ペプチドの設計と合成

○田中 郁也¹, 柴田 果奈¹, 増田 裕一¹ (¹三重大院生物資源)

【目的】 アルツハイマー病因ペプチドである 42 残基のアミロイドβ (Aβ42) は、分子間β-シートを形成して凝集し、神経細胞毒性を示す。Aβ42 の分子間β-シートに結合し、その伸長を阻害する短鎖ペプチドはβ-シートブレイカーペプチド (BSBp) と呼ばれ、アルツハイマー病治療薬の候補として期待されている。本研究では、BSBp の立体配座をβ-ストランドに固定することにより、Aβ42 の分子間β-シートへの結合能および凝集阻害活性を向上させた新規 BSBp を設計・合成することを目的とした。

【方法・結果】 Aβ42 凝集体の 17 ~ 21 番目のアミノ酸残基 (LVFFA) は、分子間β-シートを形成しており、凝集において重要な役割を果たしている。そこで、本部位のアミノ酸配列とβ-ストランド配座 (図・左) を模倣して、同じ方向を向いている側鎖どうしを適切な長さで連結することにより、β-ストランド配座に固定したペプチド 1 (図・右) を設計・合成した。チオフラビン-T 法を用いた Aβ42 凝集阻害活性試験を行ったところ、1 は Aβ42 の凝集を強く阻害することが明らかとなった。現在、Aβ42 による細胞毒性に対する 1 の抑制効果を評価している。



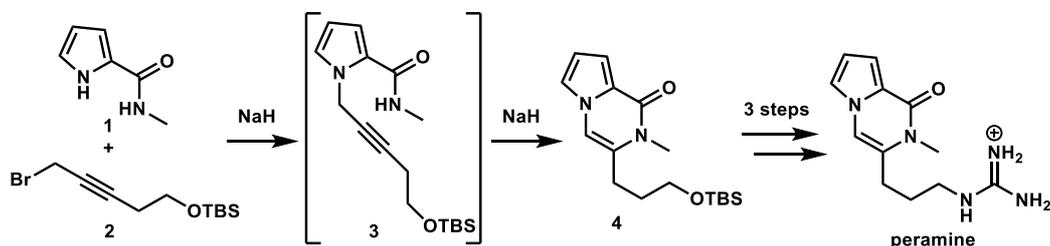
ペラミンの効率的合成法の開発
 ○伊藤晋作, 山本雄太, 西川俊夫 (名大院生命農)

【目的】

ペラミン(peramine)は、カビ *Neotyphodium lolii* に感染したイネ科植物 *Perennial ryegrass* から単離されたアルカロイドである。ペラミンは、昆虫に対する忌避作用を示す。しかし、天然からの供給量が少ないためその分子機構は明らかにされていない。そこでペラミンを供給するために、2017 年当研究室でペラミンのピロロピラジノン骨格の構築法が開発された。^{*} しかしこの方法では大量化が困難であったため、ピロールアミド **1** とプロパルギルブロミド **2** を用いた one-pot ピロロピラジノンの構築法を新たに開発し、ペラミンを合成したので報告する。

【方法・結果】

ピロールアミド **1** とプロパルギルブロミド **2** に NaH を段階的に加え、ピロロピラジノン **4** をグラムスケールで得ることに成功した。その後グアニジンを導入して、4 段階 34% でペラミンの全合成を達成した。



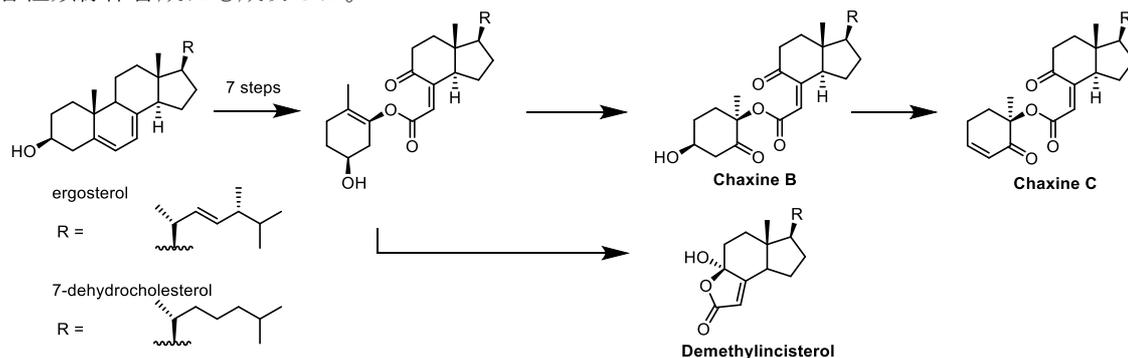
* Yamamoto Y, Nakazaki A, Nishikawa T. *Tetrahedron* **2017**; *73*: 3443-3451.

Chaxine 類とその類縁体の合成研究

○二木美咲¹, 平田裕嗣¹, 中崎敦夫¹, 河岸洋和^{2,3,4}, 西川俊夫¹
 (¹名大院生命農、²静大農・応生科、³静大・グリーン研、⁴静大院・創造)

【目的】 Chaxine 類は、中国産食用キノコである茶樹茸から単離されたステロイド骨格を持つ天然物である。ステロイドの A 環部分と C 環部分がエステル結合によって連結した非常にユニークな構造を有している。当研究室では、2017 年に ergosterol を出発原料とした Chaxine 類の合成を報告した。これら合成化合物のキノコに対する活性試験を行ったところ、その中の一つがマツタケの菌糸の成長を促進させる効果があることがわかった。そこで本研究では、Chaxine 類のさらなる供給のために合成法を改良し、構造活性相関研究を目的として Chaxine 類縁体を合成した。

【方法・結果】 各工程を大量合成に適したものへと改良し、従来の 10 倍以上のスケールでの Chaxine 類の合成に成功した。天然に存在する Demethylcisterol も得た。また側鎖部分の構造活性相関を調べるため、ergosterol 類縁体で入手可能な 7-dehydrocholesterol を出発原料として 17-nor-Chaxine D 等の各種類縁体合成にも成功した。



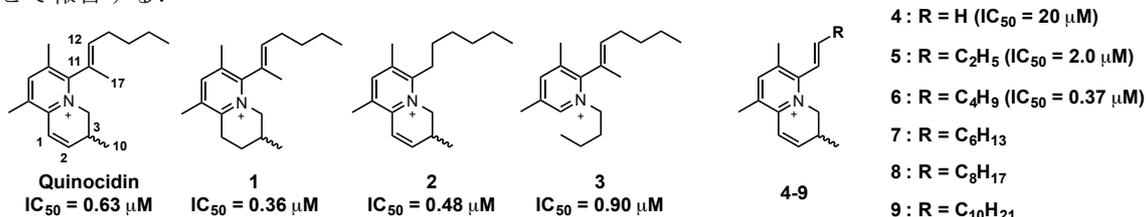
細胞毒性物質 quinocidin の構造活性相関
○澤木裕紀, 中川 優, 小鹿 一 (名大院生命農)

【目的】

放線菌由来の quinocidin は, 3,4-dihydroquinolizinium 骨格を有するユニークな天然物であり, HeLa-S3 細胞に対して毒性を示す ($IC_{50} = 0.63 \mu M$)¹⁾. 我々は, 本天然物の 3 位の立体配置が細胞毒性に影響を与えないことを確認したが, 詳細な構造活性相関は不明である. そこで本研究では, quinocidin のアナログ合成と細胞毒性評価を行い, 本天然物の構造活性相関に関する知見を得ることを目的とした.

【方法・結果】

3,5-Lutidine を出発原料としてアナログ (1~6) を合成し, HeLa-S3 細胞に対する毒性を評価した. その結果, 1, 2 位あるいは 11, 12 位二重結合を飽和したアナログ (1, 2) と 3,4-dihydroquinolizinium 骨格をもたないアナログ (3) が quinocidin とほぼ同等の細胞毒性を示したことから, 1, 2 位および 11, 12 位二重結合と 3,4-dihydroquinolizinium 環は quinocidin の細胞毒性に必須ではないことが明らかとなった. また, アルケン側鎖の長さが異なるアナログ (4~6) に関しては, 側鎖の炭素数が多いほど細胞毒性が強かったことから, quinocidin の細胞毒性がアルケン側鎖の疎水性に依存していることが示唆された. 現在, 側鎖をさらに伸長したアナログ (7~9) の合成も進めており, それらの細胞毒性の結果についても併せて報告する.



1) Nakagawa, Y. *et al. Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 17894.

チューリップシド変換酵素の基質認識におけるアルコール部位の影響
○二永貴¹, 野村泰治², 北岡直樹², 加藤康夫² (¹富山県大院・工, ²富山県大・生工研セ)

【目的】

チューリップ組織中に著量含まれるグルコースエステル, tuliposide (Pos) 類 (PosA, PosB) はチューリップの主要二次代謝産物であり, これらはチューリップ組織内在の PosA 変換酵素 (tuliposide A-converting enzyme; TCEA) および PosB 変換酵素 (TCEB) によって, 抗菌活性物質であるアグリコンのラクトン化体, tulipalin (Pa) A および PaB へとそれぞれ変換される. TCE は, 一次構造上はカルボキシルエステラーゼファミリーに属するが, Pos 類の加水分解反応ではなく, 分子内エステル転移によるラクトン形成反応のみを触媒するユニークな酵素である. しかしながら, TCE の基質認識機構についてはこれまで全く分かっていない. そこで本研究では, Pos 類エステル部分のアルコールの構造を改変した合成基質類縁体を用いて, アルコール部位の構造が本酵素の基質認識に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

PosA, PosB のアシル側鎖部分はそれぞれ 1,4-butanediol から 4 段階, solketal から 6 段階で合成した. Pos 類アルコール部分は glucose を模倣した cyclohexane methanol, tetrahydropyran-2-methanol, 1,2,3-trideoxyglucose, 1,2-dideoxyglucose および α -または β -1-O-methylglucose を用い, 先に合成したアシル側鎖部分との縮合を経てそれぞれ基質類縁体へと誘導した. これらを基質として, 大腸菌で発現させた組換え TCE (TgTCEA1, TgTCEB1) を用いて酵素活性を測定した. その結果, 本来の基質である Pos 類と比較して, cyclohexylmethyl 型をはじめとする 6 種の基質類縁体に対する活性値は 1/100-1/10 程度であったのに対し, 1,2-dideoxy-および α -または β -1-O-methylglucose 型基質に対しては良好な活性値を示した. さらに, 反応速度論解析の結果, TCE の基質認識にはアルコール部位の glucose 様構造および水酸基の位置や数が重要であることが示唆された. 良好な基質となった類縁体の安定性を検討した結果についても併せて報告する.

P43

オルニチン由来アルカロイド生合成中間体の安定的微生物生産

○室田健来¹、大石和敬¹、川嶋智佳¹、谷美生夏¹、相沢光輝¹、長谷部文人²、鮎信学²

¹静岡県立大学 大学院薬食生命科学総合学府 ²静岡県立大学 大学院食品栄養環境科学研究所

【目的】

アルカロイドは植物や動物、微生物などが生産する含窒素有機化合物であり、その構造は多様である。このうち植物由来のアルカロイドは強い生理活性を示し、医薬・創薬などを通じて人類に多大な恩恵を与えている。植物に特異なオルニチン由来アルカロイドであるトロパンアルカロイドやニコチンは、微生物による安価大量生産は実現されていない。これらは putrescine から PMT, MPO により生合成される 1-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cation (1-mpyr, **1**) が共通の中間体と考えられている。そこで本研究ではオルニチン由来アルカロイドの微生物生産を達成するために、まず **1** の安定生産を目指した。

【方法・結果】

植物において MPO は、1-methylputrescine から 4-methylaminobutanal への変換を担うが、副産物としてアンモニアを生成する。これは最終的にグルタミン酸に取り込まれるが、アンモニアの同化にはエネルギー(ATP と NAD(P)H)が必要である。そこで、MPO の代替酵素を探索し、アンモニアを放出せずに直接グルタミン酸に変換できる aminotransferase (YgjG)を見出した。*E. coli* BL21 (DE3) を宿主とし、PMT と YgjG を共発現させた菌株の培養液を HPLC に供した結果、**1** の生産が確認された。また、**1** の生産量が増加する条件を検討した結果、1%グルコースを添加することで **1** の生産量は増加し、約 38 mg/L の生産が確認された。さらに、大腸菌において **1** を代謝し得る 2 種の酵素を同定し、これら両遺伝子破壊株を作製して **1** の生産量を経時的に測定した。その結果、長時間培養で親株において観察された **1** の減少が、破壊株においては継時的な蓄積が観察され、**1** の安定的微生物生産を達成した。

P44

デハイドリン COR47 の非 K セグメント領域の酵素凍結保護活性に関する研究

○大久保智博¹、神谷慶太¹、亀山阿由子¹、原正和^{1,2} (¹静岡大・農, ²静岡大グリーン研)

【目的】 デハイドリンは、植物における代表的な LEA (late embryogenesis abundant) 蛋白質であり、種子の成熟後期や、低温・乾燥ストレスを受けた時に発現する天然変性蛋白質である。デハイドリンの主な機能として、高い酵素凍結保護活性が知られている。最近、われわれは、本活性が、デハイドリンの保存配列 K セグメント (リジンを含む 15 アミノ酸配列 EKKGIMEKIKEKLP) の疎水性アミノ酸に依拠することを示した。しかし、非 K セグメント領域の酵素凍結保護活性を調査した例はほとんどない。本研究では、シロイヌナズナの 10 デハイドリンのうち、アミノ酸配列が最も長く、多様な非 K セグメント領域をもつ COR47 に着目し、非 K セグメント配列の酵素凍結保護活性を測定した。さらに、活性部位の配列特性を調査した。

【方法・結果】 COR47 の K セグメント以外の領域 (220 アミノ酸) を、15 アミノ酸ずつに切り分け、14 カ所の非 K セグメント、つまり Non-K セグメント (以下 NK とする) を設計した (NK1~NK14)。低温に敏感な乳酸脱水素酵素 (LDH) の凍結保護活性を調査したところ、NK3 に最も高い活性が見られた。NK3 の配列は K セグメントと相同性はないが、活性は K セグメントと同程度であった。次に、NK3 の疎水性アミノ酸全てを、親水性の非電荷アミノ酸 (スレオニン) に置換したところ、LDH 凍結保護活性は完全に失われた。一方、NK3 の塩基性アミノ酸、又は酸性アミノ酸を、それぞれスレオニンに置換した場合、活性は維持された。さらに、NK3 の疎水性アミノ酸を保持し、それ以外の配列をグリシンに置換したペプチドは活性を示したが、塩基性アミノ酸や酸性アミノ酸を保持し、それ以外の配列をグリシンに置換したペプチドには活性はなかった。

以上の結果から、COR47 には、K セグメントのみならず、非 K セグメントにおいても、LDH 凍結保護活性を示す配列が存在し、その活性発現には疎水性アミノ酸が不可欠であることが判明した。よって、デハイドリンの酵素凍結保護活性には、疎水性相互作用が関与する可能性が高まった。

3 種の水溶性難消化性グルカンの機能性比較

○堀之内歩¹, 松本健司² (¹石川県大)

【目的】

水溶性難消化性グルカン(Water-soluble indigestible glucan :WSIG)は小腸ではほとんど消化吸収されないグルコースを単位とする多糖であり、食物繊維様作用に加え、腸管免疫の活性化などの生理活性が報告されている。ドリンク類に添加することにより手軽に摂取できることから、難消化性デキストリンを中心に様々な WSIG が上市されている。本研究は構造の異なる 3 種類の WSIG の生理活性の違いについて、マウスを用いた動物実験で明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

α 1-4、 α 1-6 結合からなる難消化性デキストリン(ID)、難消化性デキストリンに水素添加した還元型難消化性デキストリン(HID)、 α , β のいずれのグルコシド結合も含み、1-2、1-3、1-4、1-6 結合を有する多分岐多糖である難消化性グルカン(IG)をサンプルとして用いた。各 WSIG サンプルまたはコーンスターチ(コントロール群)を同じ原材料で作られた通常試料(脂質 4.3%)と高脂肪試料(脂質 24%)に 5%(w/w)添加し実験飼料とした。マウスは C57BL/6N 系統を用い 4 週間各サンプルを摂取させた。飼育期間中に食餌重量、体重、血糖値測定を行い、4 週間後に非絶食の状態で行った。盲腸内短鎖脂肪酸量、糞重量、糞中 IgA、糞への脂質排泄について分析を行い、各試料の生理活性の違いを検討した。その結果、それぞれの生理活性において有意差がみられた。全体的には ID、HID は同様な傾向が見られ、IG は ID、HID とは異なる傾向がみられた。また餌の違いにより同一の WSIG においても異なる結果が得られた。これらの結果から構造の違いによって WSIG の生理活性が異なること、またその生理活性は食事に影響を受けることが明らかになった。

ウニ生殖巣における新奇ポリシアル酸合成酵素の発見

○吉村淳^{1,2}, 萩原尚文^{1,2}, 宮田真路¹, 佐藤ちひろ^{1,2}, 北島健^{1,2} (¹名大院生命農; ²名大生物機能セ)

【目的】

シアル酸は酸性 9 炭糖で、通常は糖タンパク質や糖脂質の非還元末端に 1 残基のみ存在する。しかし、まれにシアル酸同士がホモポリマーを形成したポリシアル酸として存在する。ポリシアル酸はシアル酸の結合様式 (α 2,8、 α 2,9、 α 2,5 $O_{glycolyl}$ など) によって構造多様性を示す。哺乳類脳において、 α 2,8 結合ポリシアル酸は神経細胞接着分子 NCAM に存在し、神経活動に関わることが知られている。また、他の脊椎動物においても α 2,8 結合ポリシアル酸に限られた担体分子を修飾している。一方で、無脊椎動物ウニの配偶子においては、 α 2,5 $O_{glycolyl}$ 結合、 α 2,8 結合および α 2,9 結合ポリシアル酸の存在が確認されている。ウニは単一種内で 3 種類のポリシアル酸が発現する唯一の例であり、ポリシアル酸の構造多様性の意義を探索するのに適した生物である。そこで本研究では、ウニにおいて新奇のポリシアル酸転移酵素の探索と同定を目的とした。

【方法・結果】

まず、ウニのポリシアル酸転移酵素は既知の α 2,8-シアル酸転移酵素に相同性があると考え、北米ムラサキウニのデータベースを検索し、候補となる 33 の機能未知遺伝子を見出した。次に、日本産バフンウニの生殖巣を用いて RT-PCR 解析を行い、発現が確認された 11 遺伝子について定量的 PCR によって卵巣および精巣での発現量を比較した。また、全長クローニングに成功した cDNA クローンを哺乳類細胞発現用ベクターに組み込み、哺乳類細胞に対してトランスフェクションを行った。遺伝子導入細胞をフローサイトメトリーで、界面活性剤により可溶化したタンパク質をウェスタンブロットで解析したところ、候補遺伝子の 1 つ spu5 を導入した細胞において α 2,8 結合ポリシアル酸の存在が確認された。spu5 は脊椎動物既知ポリシアル酸合成酵素とは異なる遺伝子を祖先にもち、新奇ポリシアル酸合成酵素であると考えられる。

P47

ヒト CD69 の外因性リガンドの探索

○伊藤誌小里, 山内陽介, 木落信郎, 由良裕城, 奥村裕紀, 氏田 稔 (名城大院農)

【目的】

CD69 はマクロファージやリンパ球などの表面で発現しており, これらの細胞の増殖や活性化などにおける初期の免疫応答の情報伝達に関与することが知られている. ヒト CD69 は 4 つのドメインから成り, 細胞外領域に C 型レクチン様ドメインを有する II 型膜タンパク質である. また, ジスルフィド結合により二量体を形成し, それぞれの糖鎖認識領域には 1 か所ずつ N 結合型オリゴ糖鎖が付加される. しかしながら, 外因性リガンドは同定されていない. CD69 は β -グルカン受容体である Dectin-1 とアミノ酸配列類似性を示すことからヒト CD69 も β -グルカン結合能を有する可能性がある. よって, 本研究では組換えヒト CD69 を作製し, 結合特異性を解析することで, ヒト CD69 の外因性リガンドを探索することを目的とする.

【方法・結果】

カイコーバキュロウイルス発現系を用いて作製した組換えヒト CD69 細胞外領域 (N-His-hCD69-ECD) の糖結合特異性をインビトロ結合アッセイにより解析した. また, 結合活性を定量的に解析するためにヒト CD69 の細胞外領域の N 末端側に GFP を融合した発現コンストラクトを作製した. 各種不溶性糖鎖ゲルとの相互作用解析を行った結果, N-His-hCD69-ECD は不溶性 β -グルカンと特異的に結合し, 可溶性 β -グルカンによって結合が阻害されたため, ヒト CD69 は β -グルカン受容体として機能する可能性があることが示唆された.

P48

ニワトリ CD69 の糖結合特異性

○佐々木理恵, 武藤愛里, 安藤 郷, 奥村裕紀, 氏田 稔 (名城大院農)

【目的】

ニワトリは卵や肉の生産において最も重要な家禽である. 2015 年度における鶏肉消費量は豚肉を抜いており, 今後も消費が見込まれるため鶏肉の安価で安定的な供給が望まれる. そのためにもニワトリの疾病予防は不可欠であり, 多剤耐性菌問題の影響を受けて抗生物質の使用を控えた飼育法が研究されている. しかしながら, 抗生物質を用いないことによって起こり得る様々な疾病への対策が課題となっている. 本研究ではその打開策の 1 つとして β -グルカン受容体を介したニワトリの免疫力向上に注目した. これまでに β -グルカンを含んだ飼料をニワトリに与えると免疫力の向上が見られたとの報告があり, ニワトリの β -グルカン受容体の機能を解明できれば様々な疾病予防に利用できると考えられるが, ニワトリには β -グルカン受容体である Dectin-1 が存在しないことも明らかとなっている. 本研究ではニワトリにおける β -グルカン受容体候補分子の機能解析を行った.

【方法・結果】

β -グルカン受容体として知られるヒト Dectin-1 とアミノ酸配列類似性を有するニワトリ CD69 (cCD69) の細胞外領域の組換えタンパク質をカイコーバキュロウイルス発現系で作製し, その糖結合特異性をインビトロ結合アッセイにより解析した. その結果, cCD69 は β -1,3-結合をもつグルカンと主に結合することが明らかとなり, 本分子がニワトリにおける β -グルカン受容体である可能性が示唆された.

Dectin-1 と LOX-1 の糖結合活性の比較

○原田悠宇, 武藤愛里, 福村 藍, 安藤 郷, 木落信郎, 奥村裕紀, 氏田 稔 (名城大院農)

【目的】

酸化 LDL 受容体として知られている LOX-1 は血管内皮細胞, 平滑筋細胞, マクロファージなどの表面に発現し, 血中の酸化 LDL を取り込むことで動脈硬化症の発症と進行に関与していると考えられている. また, Dectin-1 はマクロファージなどに発現する β -グルカン受容体の一種であり, ヒトの免疫系に関与していることが知られている. 両受容体は分子内に C 型レクチン様ドメインを有し, アミノ酸配列においてそれらは高い類似性を有することが知られているが, LOX-1 の糖結合活性の詳細は明らかとなっていない. 本研究では LOX-1 と Dectin-1 の糖結合活性を比較することで両受容体の機能的類似性を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

ヒト Dectin-1 (hDectin-1) とヒト LOX-1 (hLOX-1) の細胞外領域の N 末端側に緑色蛍光タンパク質 (AcGFP1) を融合させた組換え hDectin-1 と組換え hLOX-1 を作製した. 各種不溶性糖鎖ゲルに対する両組換えタンパク質の結合活性を AcGFP1 の蛍光を測定することにより解析した. その結果, 複数の β -グルカンに対する結合が確認された. その中でも, リケナンなどの一部の糖鎖に対する両組換え受容体の強い結合が確認された. また, 可溶性糖鎖の添加によって不溶性糖鎖ゲルと両組換え受容体との結合が阻害されるかどうかを調べることにより両受容体が認識する糖鎖構造の詳細な解析を行った.

機能性低分子の ϵ -poly-L-lysine 修飾による生体膜透過性・水溶性の一挙改善○武内大和¹, 牛丸和乗², 加藤康夫³, 丸山千登勢¹, 濱野吉十¹(¹ 福井県大院・生物資源, ² AIST, ³ 富山県大院・生工研セ)

【目的】化合物の生体膜透過性を改善するための一般的な戦略は、化合物の疎水化である。しかし、その反面生じる水溶性の低下は予期しない副作用の出現や製剤調製の複雑化など新たな問題を生む。実際に、上市されている医薬品の約 40%、候補化合物に至っては約 70%が難水溶性である現状において、いかにして薬剤の水溶性を確保するかが創薬技術開発の重要なファクターとなっている。したがって、生体膜透過性と水溶性を一挙に改善させる化学修飾技術を開発できれば、現在の創薬スピードを加速させることができる。そこで我々は、放線菌 *Streptomyces albulus* が生産するポリカチオン性化合物 ϵ -poly-L-lysine (ϵ -PL) の持つ超水溶性・生体膜透過性に着目し、化合物の ϵ -PL 修飾を行った。

【方法・結果】*S. albulus* の ϵ -PL 生産培養において、培地にアルコールを添加して培養すると生産される ϵ -PL のカルボキシ末端にエステル結合でアルコールが導入される⁽¹⁾。このエステル合成副反応は、 ϵ -PL 合成酵素⁽²⁾によるものであり、この反応を応用利用することで、 ϵ -PL のカルボキシル基に PEG リンカーを介してアジド基を簡便に導入することができる。そこで、生体膜を透過しない難水溶性の蛍光色素である FAM をモデル化合物として、アジド基を利用した Click Chemistry によって ϵ -PL 修飾を行なった。得られた ϵ -PL-PEG-N₃/DBCO-FAM は、高い水溶性を示すにも関わらず、高い生体膜透過性を示したことから、 ϵ -PL 修飾が化合物の生体膜透過性と水溶性を一挙に改善する修飾法として優れていることを実証した。本発表ではさらに、 ϵ -PL 修飾法を実際の医薬品に適用した例を報告するとともに、高分子化合物であるタンパク質にも本法が適用できるか考察する。

【文献】(1) Nishikawa, M. & Ogawa, K. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 2306-2312 (2006). (2) Yamanaka, K. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 4, 766-72 (2008).

P51

近接ラベリング手法を用いたコラーゲン分泌制御因子の網羅的探索

○松下明理¹, 柴田秀樹¹, 桑田啓子², 高原照直¹, 牧正敏¹ (¹名大院生命農, ²名大 ITbm)

【目的】コラーゲンはヒトの乾燥重量の約 25%を占め、様々な組織形成に必須の構造蛋白質である。小胞体で合成されたコラーゲン前駆体は、小胞体の限局された領域 (endoplasmic reticulum exit site、ERES) から輸送小胞 COP II に積み込まれ、ゴルジ体へ輸送される。当研究室では、小胞体からの積荷蛋白質の搬出が、5つの EF-hand をもつ Ca²⁺結合蛋白質 ALG-2 によって調節されていることを報告してきた。通常、COP II 小胞の直径は 60~90 nm であるのに対して、線維性コラーゲンの三本鎖らせん構造は約 300 nm に及ぶ。近年、COP II 小胞の直径よりも長いコラーゲン前駆体の輸送に ALG-2 を含む様々な因子が機能することが明らかにされつつあるが、未だその全容は明らかでない。そこで本研究では、ERES に存在する蛋白質を近接ラベリング手法により網羅的に探索することで、コラーゲン分泌における新規制御因子の同定を目指した。

【方法・結果】遺伝子改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼである APEX2 は、ビオチンフェノールを基質、過酸化水素を電子供与体として近傍蛋白質のチロシン残基をビオチン標識する。まず ERES に局在する既知の蛋白質の N 末端および C 末端に V5 タグと APEX2 を融合させた蛋白質を恒常的に発現する細胞を樹立した。そして抗 V5 抗体を用いて融合蛋白質の発現を確認し、またストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼを用いてビオチン標識された蛋白質を検出した。その結果、融合蛋白質の発現量とビオチン標識蛋白質量は必ずしも相関はなく、APEX2 が適切に配位されることが重要であると考えられた。次に、効率よくビオチン標識反応が進行した APEX2 融合蛋白質の恒常発現細胞から、ストレプトアビジンビーズによりビオチン標識蛋白質を精製した。既知の ERES 局在蛋白質に対する抗体を用いて解析したところ、精製産物には ERES 局在蛋白質が特異的に含まれていることが判明した。さらに質量分析により精製産物に含まれる蛋白質の同定を進めた結果、多くの候補蛋白質が得られた。

P52

肝線維症において架橋される新規基質タンパク質の解析

○中川晴加, 辰川英樹, 人見清隆 (名大院創薬科学)

【目的】

線維症とは、コラーゲンなどの線維性タンパク質が過剰に蓄積することで柔軟な組織が硬化し、恒常的な機能を失う疾患である。タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) が線維症の病態形成に寄与することが報告されているが、病態発症に関連する詳細な分子機構は未だ明らかではない。これまでに胆管結紮による肝線維症モデルマウスを用いた解析において、TGase アイソザイムである TG1 及び TG2 が特異的に発現上昇及び活性化することを明らかにし、肝線維症に伴う TGase の基質候補タンパク質としてサイトケラチン 18 及びサイトケラチン 8 (K18, K8) を同定した (Tatsukawa H. *et al. Sci. Rep.* 2017)。本研究では、K18, K8 の架橋修飾を介した TGase の肝線維症との関連性を検証し、肝疾患の新たな治療や予防法に繋げることを目的とする。

【方法・結果】

K18, K8 の組換えタンパク質を作製し、TGase による架橋反応性を評価したところ、TG1, TG2 の基質となることが示された。胆管結紮により誘導した肝線維化の *in vitro* モデルとして、胆汁酸の主成分であるグリコケノデオキシコール酸 (GCDCA) を処理したヒト肝癌細胞株 HepG2 を用いて解析を行った。細胞障害の程度は、Caspase 3 の活性化および生細胞数測定により評価した。GCDCA 処理した HepG2 において、TGase の発現量に差はないものの、細胞障害の程度は TG1, TG2 の発現抑制により緩和された。TGase アイソザイムに対して特異的に反応する基質ペプチド及び一級アミンを用いて、TG1, TG2 の架橋活性評価を行った結果、GCDCA の処理濃度に依存して一部のタンパク質への基質の特異的な取り込みが認められた。また、同細胞では K18, K8 の架橋体の形成が見られ、免疫染色により GCDCA 処理依存的に K18 は核の周辺部位、K8 は核内に局在することが分かった。現在、K18, K8 と架橋されるタンパク質の同定及び K18, K8 の局在変化と肝細胞障害との関係性について検討を進めている。

可溶性(プロ)レニン受容体生成と V-ATPase 複合体の形成・機能発現との関連

○松井咲豊子¹, 中川千春², 海老原章郎², 鈴木文昭², 中川寅² (¹岐大院自然科学, ²岐大応生)

【目的】

(プロ)レニン受容体[(P)RR]は、リソソームの酸性化を担う液胞型 H⁺-ATPase (V-ATPase)複合体の形成と機能維持に必要なアクセサリタンパク質 ATP6AP2 として知られる。(P)RR は一回膜貫通型タンパク質で、一部はプロセシング酵素に切断されて可溶性(P)RR [s(P)RR]として存在している。s(P)RR の血中濃度が慢性腎臓病、妊娠糖尿病、膵臓癌などの疾病で上昇すること報告されているが、そのメカニズムは明らかにされていない。私たちはこれまでに、細胞内のエネルギー代謝を阻害すると s(P)RR が増加することを見出ししている。そこで本研究では、エネルギー代謝阻害で見られた s(P)RR 増加のメカニズムを、V-ATPase の複合体の形成・機能発現との関係に着目して検討した。

【方法・結果】

HeLa 細胞を解糖系阻害剤 2-deoxy-D-glucose (2DG)と電子伝達系の脱共役剤 carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP)で処理し、s(P)RR をイムノブロットで、また、リソソームの酸性化状態を LysoTracker 染色で解析した。その結果、2DG 処理、および 2DG と CCCP を両方処理した時に細胞内 s(P)RR の増加とリソソーム酸性化の抑制が見られた。また HeLa 細胞を、リソソーム pH を上昇させる薬剤であるクロロキンと塩化アンモニウムでそれぞれ処理し、イムノブロットと LysoTracker を用いて解析した結果、リソソームの酸性化が抑えられ、細胞内 s(P)RR が増加した。さらに V-ATPase 複合体のサブユニットの 1 つである VoC を、siRNA を用いてノックダウンした結果、細胞内(P)RR が減少した。これらの結果より、細胞内 s(P)RR の生成は V-ATPase 複合体の形成・機能発現に伴って起きる可能性が示唆された。

マウス脳の老化に伴う細胞外マトリクスプロテオグリカンの変動解析

○杉谷慶, 大島健司, 灘野大太, 松田幹, 宮田真路 (名大院・生命農)

【目的】

脳の抑制性神経細胞の一つであるパルブアルブミン陽性細胞 (PV 細胞) の周囲にはペリニューロナルネット (PNN) と呼ばれる特徴的な細胞外マトリクス構造が存在する。PNN は PV 細胞を酸化ストレスから防御することが提唱されており、老化に伴う脳機能の低下に関与する可能性がある。アグリカンは主要な PNN の構成成分であり、豊富なコンドロイチン硫酸鎖をもつコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。PNN が老化に伴い変化すると報告されているが、その詳細は不明である。本研究では、アグリカンに着目し、老化に伴い起こる変化とその原因の解明を目的とした。

【方法・結果】

成体および老齢マウスの脳に存在するアグリカンを、抗アグリカン抗体、及びアグリカン上のコンドロイチン硫酸鎖を認識する抗体を用いてウエスタンブロット法により検出した。老齢マウスでは全長のアグリカンに加え、より分子量の小さいアグリカンの分解断片が検出された。さらに、アグリカンコアタンパク質の総量は、老化に伴い 4 倍程度に増加していた。一方で、コンドロイチン硫酸鎖の量は老化に伴って変化しておらず、アグリカン 1 分子当たりのコンドロイチン硫酸鎖は減少すると考えられた。次に、アグリカンの分解に関わる Adamts (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs)、および MMP (matrix metalloproteinase) 遺伝子の発現変動を定量的 RT-PCR により解析した。Adamts ファミリーの発現量は老化に伴いやや減少するが、MMP3, 13 は発現量が 2 倍以上増加していた。以上より老化に伴い脳内では、アグリカンのコアタンパク質が増加し、分解断片が蓄積することが明らかとなった。分解断片の産生には MMP3, 13 の増加と、コンドロイチン硫酸鎖の減少が寄与する可能性がある。現在、LC-MS/MS を用いて、アグリカンの分解機構、及びアグリカン上のコンドロイチン硫酸鎖を解析している。

アミノ酸枯渇による寿命延長と分裂酵母の経時寿命延長因子 Ecl1 Family の解析

○佐藤哲平, 加藤敬典, 島崎嵩史, 大塚北斗, 饗場浩文 (名大院創薬)

【目的】

我が国は世界有数の長寿国だが、いまだ平均寿命と健康寿命の間に大きな差が存在しており、生活の質の向上のためにも健康寿命の増大が求められている。ヒトの個体寿命を理解するためには、まず細胞レベルでの寿命の理解が必須であると考え、我々は分裂酵母をモデルとして細胞レベルでの寿命制御機構の解析を行っている。特に、分化を終え分裂を停止した細胞の生存期間と定義される経時寿命を解析することで、ヒト神経細胞の寿命維持などに貢献したいと考えている。当研究室で発見された Ecl1 Family 遺伝子(*ecl1⁺*, *ecl2⁺*, *ecl3⁺*)は高発現することで分裂酵母の経時寿命を延長するが、その機構の詳細は不明である。本研究では、寿命延長経路の活性化を引き起こすアミノ酸枯渇条件下において、Ecl1 Family 遺伝子がどのように関与するのかに焦点を絞り解明を試みた。

【方法・結果】

ロイシン枯渇と Ecl1 Family 遺伝子の関連を調査するため、RT-PCR を用いて通常状態とロイシン枯渇状態での Ecl1 Family 遺伝子の発現量を調べた。その結果、ロイシン枯渇状態で *ecl1⁺* の爆発的(約 200 倍)な発現上昇が確認された。また、ロイシン過剰状態で培養した株では、通常、対数増殖期から定常期への遷移時に確認される *ecl1⁺* の発現誘導が抑制された。これらの結果からロイシン枯渇により *ecl1⁺* の発現誘導が起きることが判明した。また、転写因子 *fil1⁺* を欠損した株においてはロイシン枯渇条件下での *ecl1⁺* の発現上昇が見られなかったことから、ロイシン枯渇による *ecl1⁺* 発現誘導は Fil1 依存的に起こることが判明した。加えて、野生型ではロイシン枯渇状態にすることで経時寿命の延長が見られたが、Ecl1 Family 欠損株ではロイシン枯渇による寿命延長が見られなかった。このことから、ロイシン枯渇による寿命延長は Ecl1 Family 遺伝子を介して行われることが判明した。以上の結果を基に、ロイシン枯渇と寿命延長機構について議論する。

炎症制御を目指したシアル酸認識レクチン Siglec の機能解析

○稲坂唯¹, 立山博之¹, 樋口廣士¹, 村瀬佑介¹, 金岡英徳¹, 飯島信司¹, 西島謙一¹ (¹名大院・工)

【目的】

病原生物の危険から身を守っている免疫は適切に調節されることが重要である。AIDS などの免疫不全は感染症にかかりやすくなる一方、過剰な免疫応答により生じる慢性炎症は、自己免疫疾患やさらにはがんや生活習慣病と密接に関わっていることが知られている。シアル酸はヒトを含む高等生物の糖鎖末端に付加し、様々な生理機能に関与することが知られており、免疫応答においても重要な役割を持つと考えられている。我々は、シアル酸を認識するレクチンとして発見された Siglec の炎症制御作用に注目して研究を行っており、これまでにヒト Siglec-9 がマクロファージの炎症応答を抑制する一方で、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を促進することを報告している。本研究では、これまで好酸球や肺胞マクロファージにおいてのみ発現が報告されていたマウス Siglec-F の末梢マクロファージにおける機能解明を目的とした。

【方法・結果】

8 週齢マウス(C57BL/6)の大腿骨、脛骨より調製した骨髄細胞を M-CSF により 7 日間培養しマクロファージに分化させ実験に使用した。各種刺激時における Siglec の発現量を定量 RT-PCR によって解析したところ、炎症時に産生される GM-CSF により Siglec-F の発現量が増加することが分かった。GM-CSF により活性化される STAT5、MAPK、PI3K のシグナルをそれぞれ特異的阻害剤で抑制したところ、STAT5 のリン酸化が Siglec-F 発現に重要であることが示唆された。このことは STAT5 のノックダウン実験によっても確認された。次に、マクロファージにおける生理的意義を解明するために、Siglec-F のノックダウン実験を行った。その結果、Siglec-F が GM-CSF シグナル伝達経路を抑制的に制御していることが示唆され、細胞増殖に関与している可能性が示された。今後は、この抑制機能について更なる解析を進める予定である。

P57

誰でも簡単に特別な装置なしで抗体を保存する：プルランフィルムに関する研究

○由井翠¹, 寺本好邦², 中川寅², 海老原章郎² (¹岐阜大院・自然科学, ²岐阜大・応用生物)

抗体は、分子生物学をはじめとする研究において、欠かせないツールである。実験室から医薬品まで広く利用される抗体は、輸送や保存法による失活が問題となる。プルランは、食品加工に用いられる水溶性の多糖類である。タンパク質をプルランで包埋、乾燥させることで、室温で数カ月間その活性を保持できることが報告されている (Jahanshahi-Anbuh *et al.*, 2014)。本研究では、抗体に対してプルランフィルムを適用し、フリーザーなどの特別な装置なしに抗体の安定保存が可能かどうかを検討した。

1. 熱加速試験 プルランを PBS に溶解し、抗体を加えた (Pullulan Solution, PS)。これを OHP フィルムへ滴下し、室温で一晩置いて風乾した (Pullulan Film, PF)。両サンプルを PCR チューブに入れ、95°C、30 分加熱した。Direct ELISA を用いて抗原との結合を確認したところ、PF では高温に対して活性が保持されており、4°C 保存した PS と同程度であった。

2. フィルム形成・溶解試験 1. で調製した PF を純水で溶解、さらにフィルム形成と溶解を計 3 回繰り返したサンプルにおいても、PS と同程度の活性が確認された。

3. 熱安定性試験 1. で調製した PS, PF を 95°C、30 分加熱後、示差走査蛍光定量により評価した。対照区の未処理の抗体を測定すると、変性中点温度 (T_m) は 74°C であった。PF では T_m が 71°C であった一方で、PS では未変性から変性への二状態転移は観察されなかった。

以上より抗体をフィルム化することで、高温下で安定であることを、活性と構造の両面から明らかにした。さらに凍結融解を繰り返すことによる活性低下に対する解決策となりうる。

P58

酵素合成 β -1, 3-グルカンの抗喘息作用機構の解明

○川崎悠矢¹, 西尾昌洋¹, 中川奈美¹, 河野光生², 磯野直人¹, 栗谷健志¹, 梅川逸人¹

(¹三重大院・生物資源, ²三重大院・医)

【目的】 β -1,3-グルカンはグルコースが β -1,3 結合した多糖類で、抗炎症作用を持つことが知られている。 β -1,3-グルカンは、 β グルカンホスホリラーゼを用いて *in vitro* で合成が可能で、最近我々は、種々の重合度の酵素合成 β -1,3 グルカンのうち、重合グルコース数 70 (DP70) のものが最も強い抗喘息作用を有することを報告した¹。今回、DP70 の持つ抗喘息作用の作用機構の解明を目的として実験を行った。

【方法・結果】 雄性 BALB/c マウス (7 週齢) にオボアルブミン (OVA) を腹腔内投与し、気管支喘息を誘発した。ネブライザで DP70 を吸入投与し、肺切片における iNOS の発現量を蛍光免疫染色により検討した。RAW264.7 細胞は大腸菌由来のリポ多糖 (LPS) で、KU812 はカルシウムイオノフォア (A23187) で炎症を誘導し、DP70 を添加した。RT-PCR により炎症性 mRNA の発現量、グリース試薬により NO 量、ウェスタンブロッティングにより MAPK のリン酸化をそれぞれ検出した。

マウスの細気管支における iNOS 量は、DP70 投与により有意に抑制された。RAW264.7 は DP70 添加により NO 産生量は有意に抑制され、iNOS 発現量は抑制傾向にあった。また、KU812 における IL-8 発現量は DP70 添加により有意に抑制された。さらに DP70 は ERK1/2 のリン酸化を抑制し、p38 のリン酸化を促進する傾向がみられた。

以上より、DP70 は MAPK 経路に関与し、iNOS 等の炎症性物質の生産を抑制することで抗喘息作用を示す可能性が示唆された。

1. 日本農芸化学会大会 2014

III 型ポリケタイド合成酵素の環化反応に関与するアミノ酸残基の探索

○佐々木允人¹, 安間満彦¹, 中村修人¹, 曾根祐輔³, 長谷部文人², 鮎信学²(静岡県立大学¹大学院薬食生命科学総合学府、²食品栄養科学部、³東京大学生物工学研究センター)

【目的】

III 型ポリケタイド合成酵素 (PKS) は単独で伸長反応及び環化反応を触媒し、芳香族ポリケタイドを生成する。放線菌由来の III 型 PKS、RppA (THNS) は malonyl-CoA を縮合し、1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) を生成する¹⁾。一方、*Streptomyces* sp. NRRL S-340 の III 型 PKS *IG64_RS22470* (70) は RppA と高い相同性を示すにも関わらず、伸長反応のみを触媒し、ポリケタイド生合成経路の鎖状中間体を放出する。我々は 70 と THNS のキメラ酵素を作製することで、III 型 PKS の環化反応に関与する領域やアミノ酸残基の特定を行った。

【方法・結果】

THNS と 70 遺伝子には 5'-末端から 327 bp 及び 806 bp (THNS の位置) に共通の制限酵素サイト (*Bsp*HI, *Apa*LI) が存在する。そこで両遺伝子を *Bsp*HI、*Apa*LI で切断し、N 末端領域、中央領域、C 末端領域を相互に組み合わせた 6 種類のキメラ酵素を作製した。これらの酵素を *S.lividans* *TK21* 株にて異種発現した結果、可溶性蛋白質として chimera 2 (N 末 70 型中央 THNS 型 C 末 THNS 型) chimera 4 (N 末 70 型中央 70 型 C 末 THNS 型) を取得できた。取得したキメラ酵素を基質 malonyl-CoA と共に *in vitro* 反応を行い、HPLC 分析した。その結果、両酵素の反応液中に THN の生産が確認され、chimera 2、chimera 4 は THNS 活性を有することが判明した。全配列中の大半が 70 型である chimera 4 において THNS 活性が見られたことは非常に興味深い。この結果から、III 型 PKS における環化反応に関与するアミノ酸残基が THNS 配列の C 末端領域に存在することが示唆された。今後、部位特異的変異導入を行い III 型 PKS の閉環反応に関与するアミノ酸残基の特定を目指す。

【文献】1) Funa N *et al.* *Nature* 400, 897-899 (1999)*Aspergillus nidulans* のセクレトーム解析から見出された新規 rhamnogalacturonan lyase○鈴木裕満¹, 酒井杏匠¹, 鈴木健吾¹, 山口愛彩¹, 高須賀太一², 堀千明³, 志水元亨¹, 加藤雅士¹
(¹名城大・農, ²北大・農, ³北大・工)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus nidulans* は starch, cellulose, hemicellulose, pectin などの分解能を有していることから、多糖の分解に関わる細胞外酵素の機能およびそれらの転写制御について盛んに研究が行われている。本研究では、最も複雑なグリカンとして知られている rhamnogalacturonan (RG) のみを炭素源として *A. nidulans* を生育させ、細胞外に分泌されたタンパク質のセクレトーム解析を行った。その結果、機能既知のどのタンパク質とも、アミノ酸配列の相同性が全く無い機能未知タンパク質 (HP) が多数生産されていることを見出した。そこで、*Pichia pastoris* にて異種生産させた HP を調製し、その機能を明らかにすることを試みた。

【方法・結果】

RG のみを炭素源にして培養した *A. nidulans* の培養ろ液から TCA/アセトン沈殿により細胞外タンパク質を回収しセクレトーム解析した。同定されたタンパク質から HP を 3 種選抜し、リコンビナントタンパク質 HP1, HP2, HP3 を調製した。これらをそれぞれ RGI と反応させたところ、HP1 のみ還元糖の生成が見られた。RGI の主鎖である polygalacturonic acid および polyrhamnosyl galacturonan, RGI の側鎖である α -1,5-arabinan, β -1,3-galactan, β -1,4-galactan を基質として反応させたところ、polyrhamnosyl galacturonan のみを基質とした。また、HP1 の反応産物を MALDI-TOF-MS にて分析したところ、不飽和結合を含む rhamnosyl galacturonan オリゴ糖が検出された。これらのことから、HP1 は現存するいずれの Polysaccharide Lyase (PL) ファミリーに属さない、新規の rhamnogalacturonan lyase であることが判明した。現在、HP1 の詳細な反応機構および生理学的役割について解析している。

P61

養菌性キクイムシと共生するセルロース資化性糸状菌の単離ならびに
同菌が生産するセルラーゼの同定と機能解析

○堤星太郎¹, 酒井杏匠¹, 都築翔¹, 河合祐斗¹, 鈴木啓仁², 梶村恒², 小林哲夫², 志水元亨¹,
加藤雅士¹ (¹名城大・農, ²名大院・生命農)

【目的】

アイノキクイムシ *Euwallacea interjectus* は菌類と共生関係を築いている。すなわち、樹木に穿孔して坑道を形成する際に、マイカンギアと呼ばれる孢子貯蔵器官内に貯蔵している菌類を坑道に接種し、生育した菌類を摂食する。養菌性キクイムシが形成する坑道内の微生物叢を網羅的に解析した例はほとんどなく、共存する微生物のそれぞれの役割は未解明のままである。本研究では、アイノキクイムシが穿入したイチジク坑道内の菌叢を網羅的に解析し、その中からセルロース資化性菌の単離および、同菌が生産するセルラーゼを同定し機能を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

我々は、DGGE 解析によりアイノキクイムシが穿入したイチジク坑道内から 15 種類の細菌と 2 種の真菌を見出した。また、アイノキクイムシを破砕後、セルロースを唯一の炭素源にした培地にて共生する菌を集積培養することで、セルロース資化性菌 *Fusarium oxysporum* EI 株を単離した。この EI 株は DGGE 解析で同定された真菌と同一であった。EI 株が生産する主要なセルラーゼを同定するため、セルロースを唯一の炭素源とする培地で培養し、培養液中のセルラーゼを活性染色にて検出した。25 kDa 付近に高いセルラーゼ活性を持つバンドが検出され、このバンドを MALDI-TOF-MS にて解析したところ、Glycoside Hydrolase 12 ファミリーに属する酵素であった。この酵素を *Pichia pastoris* にて異種発現させ、その機能を解析したところ、キシログルカンに対して高い加水分解活性を有していたため、この xyloglucanase を FoXEG12A と命名した。現在、詳細な酵素学・生理学的解析を進めている。

P62

Nicotine の骨格形成反応を担う酵素の探索

○川嶋智佳, 長谷部文人, 鮎信学 (静岡県大院食栄)

【目的】

Nicotine はナス科タバコ (*Nicotiana tabacum*) が生産するアルカロイドである。Nicotine はその構造内にピロリジン環とピリジン環を有しており、それぞれ 1-Methyl- Δ^1 -pyrrolinium (1-Mpyr) と Nicotinic acid に由来すると考えられている。しかし、これら 2 つの環を縮合する反応、および酵素は未同定である。*N. tabacum* 由来である酸化還元酵素 A622 は Nicotine の生合成に関与すると考えられている。A622 の発現量抑制は、Nicotine の生産量低下を導くと共に Nicotinic acid *N*-glycoside (NaG) の生産量上昇を導く¹⁾。そこで、我々は A622 が担う未解明な酵素反応の解明を目指した。

【方法・結果】

Nicotinic acid は Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) cycle 中に存在することから、NAD cycle 中の化合物およびその類縁体を A622 の基質候補と想定した。基質候補のうち、1-Mpyr と NaG は有機合成により調製した。また、A622 は大腸菌用にコドン最適化した合成遺伝子を用いて組換えタンパク質を精製した。組換え A622 は、1-Mpyr と基質候補と、補酵素候補 (NAD(P)H) と共に 30 °C でインキュベートした。反応溶液を HPLC で分析した結果、反応による新規ピークの出現や基質の減少は見出せなかった。以上の結果から、A622 は NaG および NAD cycle 周辺の化合物を基質としないことが示唆された。現在、Nicotinic acid の類縁体として 3 種の Hydroxy nicotinic acid も基質候補として A622 の反応を検討中であり、本大会ではこれらの結果についても報告する予定である。

【文献】

1) M. Kajikawa *et al Plant Mol Biol* **69**, 287-298 (2009)

P63

暗所作動型プロトクロロフィリド還元酵素のアセンブリにおける NB-クラスターの役割
○守本好希¹、山本正典²、山川壽伯¹、藤田祐一¹ (¹名大院生命農、²名大農)

【目的】

暗所作動型プロトクロロフィリド (Pchl_{id}) 還元酵素 (DPOR) は、クロロフィルやバクテリオクロロフィル生合成系の最終段階で Pchl_{id} の還元反応を触媒する。DPOR は、L-タンパク質 (BchL 二量体) と NB-タンパク質 (BchN-BchB ヘテロ 4 量体) から構成される。NB-タンパク質は、L-タンパク質からの電子を BchN-BchB 界面に保持される [4Fe-4S] クラスター (NB-クラスター) を介して基質 Pchl_{id} に伝達し、C17=C18 二重結合を還元しクロロフィリド a を生成する。NB-タンパク質は、BchN と BchB との複合体形成と NB-クラスターの形成を経て活性型となるが、その過程については全く明らかにされていない。本研究では、単独タンパク質として *E. coli* で発現させた BchN と BchB から活性のある NB-タンパク質を再構成する系の確立を試みた。

【方法・結果】

光合成細菌 *Rhodobacter capsulatus* の BchN と BchB を、異なるアフィニティータグとの融合タンパク質 (各々 3xFLAG-BchN と Strep-BchB) として *E. coli* で単独発現させ、3xFLAG-BchN を結合した FLAG 抗体樹脂に Strep-BchB を含む粗抽出液を添加することで NB-タンパク質の再構成を試みた。その結果、Strep-BchB が 3xFLAG-BchN と共精製され、その画分に Pchl_{id} 還元活性が検出された。さらに、この再構成系に NB-クラスター保持に関わる Cys 残基の Ala 変異体を供することで、NB-タンパク質のアセンブリにおける NB-クラスターの役割を検討したので報告する。

P64

放線菌由来 1-aminocyclopropanecarboxylic acid synthase の機能解析
○茅根千湖¹、丸山千登勢¹、橋本絢子²、小曾根郁子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】放線菌によって生産される Q6402 は 6 残基のアミノ酸からなる環状オリゴペプチド構造を有し、抗炎症作用を持つ生理活性物質である。本化合物は特徴的な 2-methyl-1-aminocyclopropanecarboxylic acid (methyl-ACC) 構造を有しており、その生合成機構には大変興味を持たれた。ACC は植物ホルモンの 1 種である ethylene の生合成前駆体であり、S-adenosylmethionine (SAM) から PLP 依存型 ACC synthase の触媒によって生合成される¹。しかしこの酵素や既に報告されているシクロプロパン環の形成に関与する酵素に相同性を示す酵素遺伝子は Q6402 生合成遺伝子群には存在せず、新規 ACC 合成酵素遺伝子の存在が予想された。そこで本研究では、Q6402 生合成に関わる遺伝子群の機能解析による生合成経路の解明を目的とした。

【方法・結果】Q6402 異種生産菌の [1-¹³C]-L-methionine 及び [methyl-¹³C]-L-methionine 添加培養の結果から、methyl-ACC 構造が SAM 由来の炭素骨格を有することが示唆された。そこで PLP や SAM の結合ドメインを有する酵素遺伝子を探索したところ、*orf2399* と *orf2400* がそれぞれ、ラジカル SAM 結合ドメインを有する酵素と PLP 依存型 aminotransferase に相同性を示すことを見出した。実際にそれぞれの酵素遺伝子を in-frame で破壊したところ、両破壊株において Q6402 生産性が完全に消失した。このことから、先に methyl-ACC が生合成され、環状オリゴペプチド構造に取り込まれる生合成経路が示唆された。現在、*orf2399*、*orf2400* の組換え酵素を構築しており、その結果について報告する。

P65

ムラサキのアシル基転移酵素 LeOAT はシコニンのアセチル化反応を触媒する

○押切春佳¹, 山本浩文², 矢崎一史³, 高梨功次郎^{1,4}

(¹信州大院・総合理工, ²東洋大・生命科学, ³京都大・生存研, ⁴信州大・理)

【目的】

薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) は根の表皮に紅色を呈するナフトキノン誘導体であるシコニンを生産する。シコニン類縁体のほとんどはアシル化修飾を受けアポプラストに輸送されるが、その生合成および輸送機構は未だ全容解明に至っていない。本研究ではシコニン生合成時に発現が上昇する BAHD アシル基転移酵素 LeOAT がシコニン類縁体の形成に寄与すると推測し、LeOAT の機能解析を行うことでアシル化シコニンの生合成反応を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ムラサキ植物体の根もしくはシコニン生産条件の培養細胞から調製した cDNA を鋳型として BAHD アシル基転移酵素 2 分子 (*LeOAT2,3*) をクローニングした。*LeOAT2* のコドンで大腸菌発現に至適化し、コールドショック発現系の利用およびシャペロンとの共発現を行うことで *LeOAT2* の大腸菌発現に成功した。*LeOAT2* 発現大腸菌の粗酵素画分を用いた酵素活性測定を行ったところ、シコニンおよびアセチル CoA を基質とした際にアセチルシコニンが生成された。酵素の特性をより詳細に調べるため、現在 *LeOAT2* の精製を進めている。*LeOAT2* は N 末に葉緑体への Transit peptide (TP) を有すると推測されたが、タバコを用いた細胞内局在解析において *LeOAT2* は細胞質に局在した。さらに、推定 TP を除いた *LeOAT2* はアセチルシコニン生成活性を有していなかった。現在 *LeOAT3* のタバコを用いた機能解析および細胞内局在解析も行っており、本発表ではこれらの結果も併せて報告する。

P66

ランタノイド依存型メタノール脱水素酵素 XoxF1 の酵素活性と安定性はランタノイド種に依存する

○王 倫¹, 菅沼宗矢², 日比野歩美², 谷明生³, 三井亮司⁴, 海老原章郎^{1,2},
岩本悟志^{1,2}, 稲垣瑞穂^{1,2}, 島田昌也^{1,2}, 早川享志^{1,2}, 中川智行²

(¹岐阜大学院・連農, ²岐阜大学院・応生, ³岡山大・植物研, ⁴岡山理大・理)

【目的】

XoxF1 はランタノイドを補因子とする新規メタノール脱水素酵素 (MDH) であり、植物共生菌 *Methylobacterium* 属や根粒菌に広く分布する。また、植物葉上には一定量のランタノイドが存在し、XoxF1 が葉上の主要な細菌由来タンパク質であること、XoxF1 がランタノイドのうち、La, Ce, Pr, Nd で強く誘導されることから、XoxF1 がこれら細菌群の植物共生の鍵因子の一つと考えられる。しかし、これまでにランタノイド種の違い、さらには、複数のランタノイドが共存する場合の XoxF1 活性への影響についての解析はない。本研究では、*M. extorquens* AM1 株を用いて、La と Nd が共存する環境下での AM1 株の細胞応答、さらには La-XoxF1 と Nd-XoxF1 の酵素科学的性質について観察した。

【方法・結果】

AM1 株は、Nd のみでは La に比べてメタノール生育と MDH 活性がともに低いのに対し、そこに La を添加すると La : Nd 比にかかわらず、La のみと同等の良好なメタノール生育および高い MDH 活性を示した。一方、La-XoxF1 と Nd-XoxF1 を精製したところ、メタノールに対する K_m 値および V_{max} 値は、La-XoxF1 が 67.4 μM と 29.3 U/mg, Nd-XoxF1 が 76.7 μM と 11.0 U/mg と異なっていた。さらに、両酵素の熱安定性は、La-XoxF1 の方が高く、変性中点温度は 64°C であったのに対し、Nd-XoxF1 は 45°C と 58°C 付近の 2 箇所を示した。さらに、La と Nd が共存する条件で生育した細胞の XoxF1 は La のみを保持していた。これらのことから AM1 株は Nd よりも La を優先的に利用し、より安定な La-XoxF1 を主要 MDH とすることで安定的なメタノール生育を行なっていることが分かった。

P67

バイオ医薬品高生産に向けた遺伝子組換えニワトリの樹立
○加藤万貴¹, 藤原亜衣¹, 金岡英徳¹, 西島謙一¹, 飯島信司^{1,2}
(¹名大院工生命分子, ²愛工大応用科学)

【目的】

現在バイオ医薬品は CHO 細胞により主に生産されているが、高い生産コストが問題視されている。その解決策として動物を利用した医薬品生産が長年検討されており、その中でも我々は遺伝子組換えニワトリに着目している。特に、鶏卵の卵白中に約 2g と最も多く含まれるタンパク質であるオボアルブミン (OVA) を医薬品タンパク質に置き換えることにより、安価かつ大量に医薬品を生産する系の実現を目指す。

【方法・結果】

始原生殖細胞 (PGC : Primordial germ cell) は胚に存在する細胞であり、将来精子や卵子に分化しその遺伝情報を子孫に伝えることができる。これまで不可能であった PGC の長期培養法が確立され、より多くの PGC を遺伝子組換えに用いることが可能となり、我々も従来よりも高い効率で組換え個体の取得に成功している。今回は CRISPR/Cas9 によるゲノム編集により PGC の OVA ローカスに医薬品モデルタンパク質としてヒトエリスロポエチンを挿入したクローンを取得し、レシピエント胚への移植を行った。その結果、クローンは PGC として重要な機能である生殖腺への定着能を維持しており、成長した雄個体 (G0) において精子に分化していることが確認された。将来的には、医薬品タンパク質生産ニワトリと糖鎖改変ニワトリとを掛け合わせることでより安定したタンパク質生産が可能な個体作製を目指している。

P68

想起誘導モデルを用いた記憶障害のバイオマーカーの探索
○丸井萌子¹, 長澤麻央^{1,2}, 足立華織¹, 高木悠花², 市毛拓海², 林利哉^{1,2} (¹名城大院農, ²名城大農)

【目的】

近年、世界的な問題として取り上げられる認知症は、2050年には罹患者数が1億人を超えることが危惧されている。この認知症の中核症状である記憶障害は、「生活の質」の低下を招くことから、治療法や予防法の確立が急務であり、有用なバイオマーカーが必要とされている。そこで、本研究では記憶の過程のうち認知症で障害される「想起」(思い出す過程)に着目し、想起誘導モデルの確立と、バイオマーカーと成り得るような脳内変化を特定することを目的とした。

【方法・結果】

実験には ICR マウス (8 週齢、雄) を用いた。装置内に 2 つの同じ物体 (既存物体) を設置し、これらを記憶させるため、装置内を探索させる試験を連続で 3 日間行った。4 日目においては、対照群には同じ物体を、想起誘導群には一方の物体を異なる物体 (新奇物体) に置き換えて探索させた。マウスが新しいものに興味を示す習性があることから、4 日目における 2 つの物体の総探索時間に対する新奇物体の探索時間の割合を新奇物体探索割合とし、既存物体を記憶しているかの指標とした。その後、マウスの海馬を単離し、海馬中のタンパク質の発現動態並びに最初期遺伝子の発現量の比較を行った。想起誘導群における新奇物体探索割合は 80%程度の値となり、想起が誘導されたことが示された。また、対照群と比較して想起誘導群においてタンパク質の発現動態が変化した。最初期遺伝子においては、想起誘導群でグルタミン酸受容体を介する神経伝達への関与が示唆されている Egr1 が増加する傾向がみられた。以上より、想起を誘導したことにより変化したタンパク質並びに最初期遺伝子は想起のメカニズムの一端を担うと推測され、記憶障害におけるバイオマーカーと成り得る可能性が示された。

Arabidopsis thaliana でのニトロゲナーゼ遺伝子 *nifH* の発現
○山本治樹, 山篠貴史, 藤田祐一 (名大院生命農)

【目的】

私たちは、一部の原核生物のみが保持する窒素固定酵素ニトロゲナーゼを高等植物で機能発現させ、窒素固定能を有する高等植物を創出することを目的として研究を展開している。ニトロゲナーゼは酸素に対し不安定な性質をもつため、酸素発生型光合成を行う高等植物ではその発現環境を慎重に検討する必要がある。本研究では、ニトロゲナーゼ発現に適した植物細胞内環境を探索するため、窒素固定性シアノバクテリアのニトロゲナーゼの還元コンポーネント遺伝子 *nifH* をモデル植物 *Arabidopsis thaliana* で発現させ、NifH が葉緑体、ミトコンドリア、細胞質に局在する形質転換体を作成した。各形質転換体での NifH 含量の比較から各環境における NifH の安定性の検討を行った。

【方法・結果】

NifH を *A. thaliana* 細胞の各細胞内環境に局在させるため、N 末端に葉緑体もしくはミトコンドリア移行のシグナル配列を融合させた NifH および、細胞質局在のためシグナル配列なしの NifH を発現する一連のプラスミドを構築した。まず、*A. thaliana* のプロトプラストを用いた一過的発現系を利用し GFP 融合タンパク質として発現させた各 NifH の細胞内局在性を確認した。次に、35S プロモーターに上記 3 種類の *nifH* 遺伝子を連結させた発現プラスミドを、アグロバクテリウムを介した形質転換により *A. thaliana* の核ゲノムに導入した。各形質転換体の T1 株における NifH の発現量を葉組織と根組織に分けて Western blot で比較し、根組織の細胞質の NifH 含量が最も高いことを見出した。この結果は、根組織の細胞質がニトロゲナーゼ発現の局在場所として有望であることを示唆している。

シロイヌナズナ軸性器官でのサイトカイニンによる細胞分裂活性の制御に関する転写因子の分子機能

○今村 美友、島田 由里菜、古川 博規、馬場 真里、山篠 貴史(名大院生命農)

【目的】

多くの種子植物の根や胚軸、花茎(軸性器官)では、伸長成長(一次成長)にともなって肥厚成長(二次成長)が観察される。二次成長は、軸性器官内部で維管束形成層、および内鞘に分化した細胞が分裂活性を維持し、これらを起点に細胞分裂と維管束分化が続くことで引き起こされる。植物ホルモンの一つであるサイトカイニンは、細胞の分裂活性調節・維持に関与することにより、二次成長を誘導することが知られているが、その作用機序の詳細は不明である。昨年度の例会で、サイトカイニン情報伝達を担う B-type ARR (Arabidopsis Response Regulator) の下流で機能する転写因子 LBD3、LBD4 が、根の中心柱で細胞分裂の活性制御に関与することを発表した。本発表では前回の発表内容を基盤に、LBD3、LBD4 に保存された機能ドメインの役割を理解すること、二次成長を支える細胞分裂活性の誘導を細胞周期の進行と関連付けて組織学的に明らかにすることを目的とした研究成果を報告する。

【方法・結果】

LBD3 と LBD4 は、植物に特異的な、LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN (LBD) 転写因子ファミリーに属する。このファミリーのタンパク質は、N 末端に共通して Zn フィンガー様ドメインとロイシンジッパー様ドメインからなる LOB ドメインを有している。従って、LBD3、LBD4 の N 末端は DNA 結合(DB)に、C 末端は転写活性に関与する機能をもつと推定された。そこで LOB ドメインを含む N 末端領域とそれ以降の C 末端側領域に分けて、蛍光タンパク質や Gal4-DB との融合体を発現するコンストラクトを作製し、葉肉細胞由来プロトプラストでの一過性発現系を用いて細胞内局在部位の解析およびルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、LBD3、LBD4 の N 末端側は核移行ドメインとして、C 末端側は転写活性化ドメインとしての役割を担うことが示された。またチミジンアナログ EdU を取り込ませた植物体の軸性器官を観察した結果、LBD3、LBD4 に依存して細胞周期が進行している細胞は確かに維管束メリステムと内鞘由来の細胞であることが示された。

P71

コケ植物の PAS ヒスチジンキナーゼの機能解析

○佐藤健介¹, 山篠貴史², 龍昌志³, 山川壽伯², 藤田祐一², 青木撰之^{1,3} (1名大院情報学, 2名大院生命農, 3名大院情報科学)

【目的】

二成分制御系 (Two-Component System ; TCS) は, 環境適応において多様で重要な役割を果たすシグナル伝達系である。植物の TCS については, 一部のモデル被子植物を用いた植物ホルモン関連の機能解析が進む一方で, 基部植物での研究は始まったばかりである。モデル基部植物ヒメツリガネゴケの2つのヒスチジンキナーゼ (HK), PAS-Histidine kinase 1 (PHK1) とそのパラログ PHK2 は, 多様な環境応答機能の知られる PAS (Per-Arnt-Sim) ドメインを N 末端に持ち, また高等植物にホモログが存在しない点でユニークである。これら HK のコード遺伝子 *PHK1* と *PHK2* の破壊株を用いて機能解析を行い, さらに PHK1 と PHK2 の下流シグナル因子を探索することを目的とする。

【方法・結果】

PHK1 と *PHK2* の破壊株を作出し, 野生型との間で生育・発生を比較した。その結果, 好気条件においては, 破壊株では茎葉体の形成が早まり, またカウロネマの分枝が促進された。さらに破壊株では, 沈水条件あるいは低酸素条件においては茎葉体形成が抑制された。このことから, PHK1 と PHK2 は, i) 好気条件では, カウロネマの分枝の誘導を抑制して茎葉体形成を遅らせる働きがあり, また, ii) 沈水条件では, 低酸素濃度を検知し, 好気条件とは逆に茎葉体形成を促進すると考えられた。酵母 2 ハイブリッドシステムを用いた実験により, PHK1 も PHK2 も, コケのゲノムにコードされる3つのヒスチジン含有リン酸伝達因子 (HPt1, HPt2, HPt3) のうち, HPt2 と特異的に結合することがわかった。現在, HPt2 と結合するレスポンスレギュレーターの同定を試みている。

P72

植物時計の中心振動体 PRR に保存されたレシーバー様ドメインの機能解析

○高田祐輔, 古川博規, 今村美友, 嶺野雄登, 野本友司, 山篠貴史 (名大院生命農)

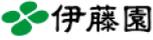
【目的】

多くの生物は地球の自転により生じる昼夜の環境変化に適応可能な約 24 時間周期で自律的に時を刻む体内時計を獲得・進化させてきた。緑色植物系統に保存されている Pseudo Response Regulator (PRR) family は植物の概日時計システムを構成する中心振動体として機能していることが知られている。PRR family の N 末端には共通して機能未知の特徴的なドメインを有している。このドメインは His kinase からの情報を受容する二成分系の Response Regulator が保持しているレシーバードメイン (RD) との相同性が極めて高いことから, レシーバー様ドメイン (RLD) と名付けられている。RLD は RD から分子進化したと考えられるが, リン酸化に必須の Asp 残基が保存されていないため, もはや二成分系の情報伝達を担うドメインではなく, 植物時計の振動機構を支える新規機能を獲得していると推定された。そこで, 本研究ではシロイヌナズナを対象に PRR family 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】

Y2H法を用いた解析から RLD は PRR に存在する唯一の二量体形成ドメインであることが示唆された。葉肉細胞由来のプロトプラストを用いた Sprit YFP 解析から PRR7 は生理的条件下で RLD に依存して二量体を形成していることが判明した。PRR7-HA 融合体を発現する形質転換体を用いた western blotting 解析から RLD は時間特異的に発現する PRR7 の半減期を規定する役割を担っていることが判明した。さらに, ヒストン H3 アセチル化, メチル化抗体を用いたクロマチン免疫沈降実験よりシロイヌナズナの PRR7 は RLD に依存してターゲットプロモーター近傍のヒストン脱アセチル化に関与していることが明らかになった。このことから, RLD は PRR の活性に必須の機能ドメインであり, 植物時計の強健な振動特性を支える背景には PRR によるエピゲノム修飾を介した日周性のクロマチンダイナミズム制御が重要な役割を果たしていることが考えられた。

日本農芸化学会中部支部 賛助企業（五十音順）

	天野エンザイム(株) 岐阜研究所	http://www.amano-enzyme.co.jp/jp/
	イチビキ(株) 研究開発部	http://www.ichibiki.co.jp/
	(株)伊藤園 生産本部	http://www.itoen.co.jp/
	伊那食品工業(株)	http://www.kantenpp.co.jp/
	加藤化学(株) 技術部	http://www.katokagaku.co.jp/
	(株)岐阜セラック製造所 品質保証部	http://www.gifushellac.co.jp/
	キリンビール(株) 名古屋工場	http://www.kirin.co.jp/
	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) R&D グループ
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30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30年8月15日現在 敬称略)

支部長

吉村 徹 名古屋大学大学院生命農学

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

山篠貴史 名古屋大学大学院生命農学

中川 優 名古屋大学大学院生命農学

会計幹事

大島健司 名古屋大学大学院生命農学

小林美里 名古屋大学大学院生命農学

企業展担当幹事

近藤竜彦 名古屋大学大学院生命農学

支部幹事

堀尾文彦 名古屋大学大学院生命農学

岸 幹也 (株) Mizkan Holdings

勝崎裕隆 三重大学大学院生物資源学

中川智行 岐阜大学応用生物科学部

真壁秀文 信州大学大学院農学

西村直道 静岡大学農学部

鮒 信学 静岡県立大学食品栄養科学部

林 利哉 名城大学農学部

南 博道 石川県立大学生物資源工学研究所

野村泰治 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

小関 誠 太陽化学(株)ニュートリション事業部

支部参与 (50音順) 【89名】

浅野泰久 富山県立大学生物工学研究センター

飯島信司 名古屋大学大学院工学

池田正人 信州大学大学院総合理工学

石田秀治 岐阜大学応用生物科学部

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

上野義仁 岐阜大学応用生物科学部

氏田 稔 名城大学農学部

梅川逸人 三重大学大学院生物資源学

榎本俊樹 石川県立大学生物資源環境学部

遠藤克秋 竹本油脂(株)

大口健司 椋山女学園大学生生活科学部

大澤俊彦 愛知学院大学心身科学部

太田明德 中部大学応用生物学部

大塚正盛 サンエイ糖化(株)

大西利幸 静岡大学農学部

近松 豪 新日本化学工業(株) 研究部

岡本徳隆 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

奥村克純 三重大学大学院生物資源学

小倉光雄 東海大学海洋研究所

小鹿 一 名古屋大学大学院生命農学

籠谷和弘 辻製油(株)第一研究所

片山新太 名古屋大学エコトピア科学研究所

加藤雅士 名城大学農学部

加藤康夫 富山県立大学工学部

苅田修一 三重大学大学院生物資源学

金政 真 中部大学応用生物学部

神田宗和 アステラスファーマテック(株) 富

山技術センター

北島 健 名古屋大学大学院生命農学

木下徹也 加藤化学(株) 技術部

木村哲也 三重大学大学院生物資源学

熊澤茂則 静岡県立大学食品栄養科学部

倉根隆一郎 中部大学応用生物学部

提坂裕子 伊藤園(株) 中央研究所

坂井田和裕 ポッカサッポロフード&ビバレッ

ジ(株) 調達部

里村武範 福井大学大学院工学

佐野元昭 金沢工業大学ゲノム生物工学研究

所

塩谷茂信 東海物産(株) 食品研究所

下位香代子 静岡県立大学食品栄養科学部

下村吉治 名古屋大学大学院生命農学

関根 章 科研製薬(株) 生産技術研究所

鈴木英生 敷島スターチ(株) 生産技術部技術

課

鈴木大資 名糖産業(株) 食品開発部

鈴木 徹 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

田口悟朗 信州大学大学院総合理工学

竹野誠記 信州大学大学院総合理工学

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
石島寿也	キリンビール(株)名古屋工場	福井敏夫	中日本冰糖(株)
徳山真治	静岡大学農学部	藤田智之	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	保坂 毅	信州大学大学院総合理工学
中川 寅	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
中野秀雄	名古屋大学大学院生命農学	本多裕之	名古屋大学大学院工学
中村浩蔵	信州大学大学院総合理工学	前島正義	名古屋大学大学院生命農学
中村宗一郎	信州大学大学院総合理工学	牧 正敏	名古屋大学大学院生命農学
中村圭伸	物産フードサイエンス(株)	松田 幹	名古屋大学大学院生命農学
中山俊裕	(株)岐阜セラック製造所品質保証部	松見 繁	養命酒製造(株)商品開発センター
		松本裕子	ヤマモリ(株)開発研究所
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
和泉原啓二	三井農林(株)R&Dグループ	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	村澤久司	旭松食品(株)食品研究所
		森上 敦	名城大学農学部
西村篤寿	イチビキ(株)技術開発部	森山龍一	中部大学応用生物学部
朴 龍洙	静岡大学グリーン科学技術研究所	山口秀明	名城大学農学部
濱野吉十	福井県立大学生物資源学部	山田康弘	カネハツ食品(株)技術部
原 正和	静岡大学農学部	米田祐康	(株)ニッポンジーン
日野真吾	静岡大学農学部	和田 正	フジ日本精糖(株)研究開発室

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 183 回例会
講演要旨集

平成 30 年 9 月 15 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