

**日本農芸化学会関西支部
第485回講演会・ミニシンポジウム**

講演要旨集

**平成26年7月12日(土)
大阪府立大学 学術交流会館**

日本農芸化学会関西支部

支部賛助企業 (50 音順)

関西支部の活動は下記の支部賛助企業様からのご支援により支えられています

アース製薬(株)

東洋紡(株)

植田製油(株)

ナカライテスク(株)

(株)ウォーターエージェンシー

(株)日本医化器械製作所

江崎グリコ(株)

日本盛(株)

(株)カネカ

日本新薬(株)

菊正宗酒造(株)

ヒガシマル醤油(株)

黄桜 (株)

不二製油(株)

月桂冠 (株)

松谷化学工業(株)

三栄源エフ・エフ・アイ (株)

三井化学アグロ(株)

サントリーホールディングス(株)

理研化学工業(株)

住友化学(株)

和研薬(株)

(株)第一化成

和光純薬工業(株)

大日本除虫菊(株)

プログラム

- ミニシンポジウム (13:00~14:50)

『細胞・生物情報ネットワークを紐とく』

 - 1 「接合菌の内生細菌におけるクオラムセンシング」 4
甲斐 建次 (大阪府大院・生命環境)
 - 2 「疫病菌交配ホルモンの生物有機化学」 6
矢島 新 (東農大・応生科)
 - 3 「ROSによる植物の根の成長を制御する細胞機能転換転写ネットワーク」 8
塚越 啓央 (名大院・生命農、JST さきがけ)
- 一般講演 (15:05~16:41)
 - *1 マイクロアレイ解析によるカイコ休眠制御遺伝子の網羅的検索 14
○江木 雄一, 秋友 紫苑, 坂本 克彦 (神戸大院・農)
 - *2 S-Equol のインスリン分泌促進作用について 15
○白井 理絵¹, 堀内 寛子¹, 原田 直樹¹, 中野 長久², 乾 博³, 山地 亮一¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪女子短大, ³大阪府大院・栄養)
 - *3 マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成 16
○掃部 正浩¹, 松岡 智里², 西村 重徳¹, 谷 修治¹, 炭谷 順一¹, 多田 俊治³, 川口 剛司¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大・生命環境, ³大阪府大院・理)
 - *4 フラボノイド誘導体の酵素合成と機能性評価 17
○服部 裕美¹, 津々木 博康², 甲斐 建次¹, 中澤 昌美¹, 上田 光宏¹, 居原 秀², 阪本 龍司¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大院・理学)
 - *5 キイロショウジョウバエのエクジソン受容体発現酵母の高感度化と有用性の評価 18
○松浦 麻衣¹, 原島 小夜子¹, 川西 優喜¹, 中川 好秋², 八木 孝司¹
(¹大阪府大院・理, ²京大院・農)
 - 6 FOXO1 遺伝子改変マウスにおける筋分化能と遺伝子発現解析 19
○山下 敦史¹, 畑澤 幸乃¹, 三浦 進司², 小野 悠介³, 亀井 康富¹
(¹京都府大・生命環境, ²静岡県大・食品栄養, ³長崎大・医歯薬)
 - 7 コムギ登熟種子ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの開花期窒素供給への応答と 20
遺伝子発現
○山本 直樹^{1,2,3}, 高野 知之³, 木下 由貴¹, 佐生 愛¹, 矢野 健太郎³, 杉本 敏男², 増村 威宏^{1,4}
(¹京都府大院・生命環境, ²神戸大院・農, ³明治大・農, ⁴京都府農技セ・生資セ)
 - 8 マウス細胞におけるヘテロクロマチンタンパク質 α の細胞周期を通じた局在の可視化と 21
ヘテロクロマチンドットの周期的な明滅
○中川 千雅, 川喜 多愛, 深田 尚, 杉本 憲治 (大阪府大院・生命環境)

* 「農芸化学会関西支部若手優秀発表賞・賛助企業特別賞」対象講演
- 特別講演 (16:50~17:20)

日本農学賞受賞講演

『環境保全型の高選択的生物制御物質に関する先駆的研究』 24
林 英雄 (大阪府大名誉教授)
- 若手優秀発表賞・支部賛助企業特別賞表彰式 (17:20~17:30)
- 懇親会 (17:40~18:40) 会費 3,000 円 (学生無料)

MEMO

13:00~14:50 多目的ホール

細胞・生物情報ネットワークを 紐とく

「接合菌の内生細菌におけるクオラムセンシング」

甲斐 建次（大阪府大院・生命環境）

「疫病菌交配ホルモンの生物有機化学」

矢島 新（東農大・応生科）

「ROSによる植物の根の成長を制御する細胞機能

転換転写ネットワーク」

塚越 啓央（名大院・生命農、JST さきがけ）

接合菌の内生細菌におけるクオラムセンシング

甲斐 建次（大阪府大院・生命環境）

【目的・背景】細菌はシグナル物質を使って自分と同種の菌密度をモニターし、その変化に応じて様々な遺伝子の発現を調節している。この機構はクオラムセンシング（QS）と呼ばれ、アシルホモセリナクトン（AHL）はグラム陰性細菌において最も一般的な QS シグナル物質である。我々は、土壌分離糸状菌に AHL シグナリングを制御しうる物質を求めスクリーニングを行い、接合菌 *Mortierella alpina* A-178 株の培養抽出物から AHL 類を見出した。詳細な解析を進めた結果、*M. alpina* にはエンドバクテリアと呼ばれる内生細菌が存在し、AHL 類を産生していることが分かった。さらにエンドバクテリア除去株と保有株の比較から、エンドバクテリアの宿主への寄与についても調べたので紹介する。

【方法・結果】QS は細菌が宿主へと侵入・感染する過程で必須な因子（細胞外酵素、細胞外多糖など）の発現調節に係わっていることから、AHL のアゴニスト・アンタゴニストは新しい抗病原薬のリードになることが期待されている。そこで、約 3000 株の糸状菌培養抽出物を AHL 応答性レポーター遺伝子を組込んだ *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 株を用いたアッセイに供し、AHL アゴニスト・アンタゴニスト生産菌を探索した。その結果、接合菌 *M. alpina* と同定された A-178 株に強いアゴニスト活性が見つかった。そこで本菌の産生する活性物質の精製を進め、約 140 L の菌培養物から 2 種の活性物質を得た。単離した活性物質が微量であったため、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ と EI-MS のスペクトル情報しか得られなかったが、AHL 類に特徴的な ^1H シグナルと EI フラグメンテーションが認められた。合成標品とスペクトルデータの比較を行うことで、活性物質を $\text{C}_8\text{-HSL}$ および $\text{C}_7\text{-HSL}$ と同定した（図 1）。精製過程で認められたマイナーな活性成分は、GC/MS により $\text{C}_6\text{-}$ 、 $\text{C}_9\text{-}$ および $\text{C}_{10}\text{-HSL}$ であることが分かった。さらに、 $\text{C}_{10}\text{-HSL}$ よりも分子量が 2 小さく、アシル鎖部分に二重結合を 1 つ有する新規 AHL、 $(4Z)\text{-en-C}_{10}\text{-HSL}$ を見出した。

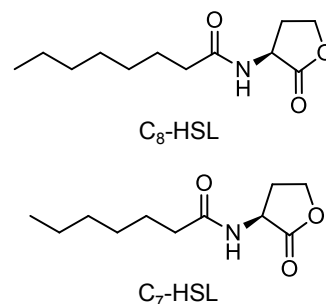


図 1 *M. alpina* から単離した AHL 類

ここまでの状況証拠から、*M. alpina* にはグラム陰性細菌が共生していることが予想

された。細菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析によって、*M. alpina* 菌糸には β -プロテオバクテリア *Castellaniella defragrans* と放線菌 *Cryobacterium* sp. に高い類似性を示す細菌が存在することが分かった。細菌 16S rRNA に対する FISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）と菌糸の TEM（透過型電子顕微鏡）観察により、細菌が *M. alpina* 内に共生していることを明らかにした（図 2）。

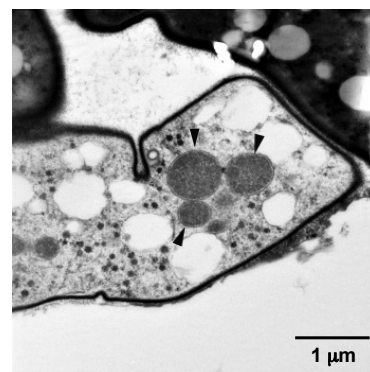


図 2 *M. alpina* 菌糸体の TEM 観察

次に、エンドバクテリアが本当に AHL 類を産生しているかどうかを検証した。エンドバクテリアの単離・純粋培養は成功しなかった。そこで、*M. alpina* 孢子に抗生物質を処理し、バクテリア除去株を作製した。レポーターアッセイでエンドバクテリア除去株培養物の AHL 活性を調べたところ、活性が検出されなかった。さらに、細菌 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR においても、除去株からは増幅産物が確認されなかった。したがって、AHL 類はエンドバクテリアによって産生されることが分かった。

AHL は自身の生合成遺伝子の発現を活性化する作用（オートレギュレーション）を示す。*M. alpina* 培養物中の AHL 類を定量したところ、オートレギュレーションの存在が強く示唆された。合成 AHL アンタゴニストを *M. alpina* に処理したところ、いくつかの AHL 類の産生量が低下することが観察されたものの、エンドバクテリア量や *M. alpina* の目立った形態変化は認められなかった。

M. alpina にとって、エンドバクテリアは有益なのであろうか。それを調べるために、バクテリア除去株と A-178 株の生育を観察した。それぞれの孢子を培地上に播種し、1 日後の様子を観察したところ、エンドバクテリア除去株では明らかな生育遅延が見られた。さらに 1 週間後にコロニー形状を比較したところ、除去株では *M. alpina* に特徴的なバラ花卉様の模様がなくなり、コロニー径が有意に小さくなった。これらの結果から、エンドバクテリアはホストの生育を促進していることが予想された。

【結論】当初の目的とは異なって研究は進み、ユニークな共生系とそこで機能することが予想される QS 系を見出した。接合菌細胞内は競合相手がおらず（少なく）、比較的栄養に恵まれているため、より小さな細菌にとっては良い生育環境であるのかもしれない。事実、*Mortierella* 属の接合菌には広くエンドバクテリアが分布していることが分かってきた。接合菌とエンドバクテリアのミクロな共生系において QS がどのような役割を担うのかを明らかにすることが今後の大きな課題であろう。

疫病菌交配ホルモンの生物有機化学

矢島 新（東農大・応生科）

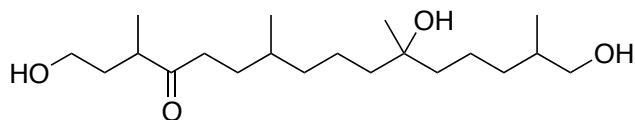
疫病菌(*Phytophthora*)はジャガイモやトマトなど様々な農作物に被害を及ぼす植物病原菌である。1840 年代中頃に 100 万人以上もの餓死者を出したといわれるアイルランド飢饉の原因となったことで知られており、現代でも農作物に甚大な被害を与え続けている。当然のことながら農薬（殺菌剤）による防除が行われてきてはいるが、近年では耐性菌が出現し、特に北米大陸ではコナラなどの樹木を枯死させる sudden oak death の原因となっており、被害が急速に広がりつつあることから、疫病菌対策は急務であると言える。

さて、疫病菌の生活環に着目してみると、菌糸の有糸分裂によって、もしくは孢子を形成することによって増殖するなどの特徴から、菌類の一種とみなされていたが、近年ではエキビョウキン属を含む卵菌類は菌類とは別系統、すなわちクロミスタ界に分類されるようになった。疫病菌の中でも特に植物への病原性が高い種の中には、有性生殖によって卵孢子を形成し次世代を生み出すものがある。有性生殖を行う疫病菌には A1、A2 の二種類の株が存在し、共に雌雄同体であるとみなすことができる。有性生殖の際、A1 株が放出して A2 株に卵孢子形成を促進するホルモン用物質 $\alpha 1$ と、逆に A2 株が放出して A1 株に卵孢子形成を促進するホルモン $\alpha 2$ の存在が 1920 年代には既に報告されていた。しかし、このホルモン様物質の探索は困難を極め、同定されたのはこの 10 年のことである。本講演では疫病菌の卵孢子形成を誘導するホルモン様物質を交配ホルモンと称し、その発見の歴史的経緯から生合成の解明にいたるまでの生物有機化学的な知見などについて紹介する。尚、本講演は筆者の単名となっているが、講演内容の一部分の研究は名古屋大学大学院生命農学研究科の故坂神洋次教授、小鹿一教授のグループによって行われたものである。

①疫病菌交配ホルモンの発見から同定まで

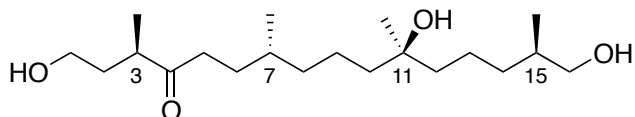
疫病菌交配ホルモン $\alpha 1$ および $\alpha 2$ は 1929 年にその存在が提唱された。そこから実際の単離・平面構造の決定までは 70 年以上の歳月が費やされている。ホルモンと呼んでいることから推察することができるかもしれないが、その含有量は極めて僅かである。

② $\alpha 1$ の平面構造の決定からラセミジアステレオマー混合物の合成まで



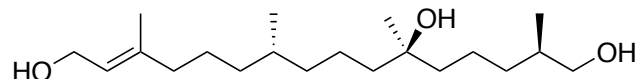
2005 年に小鹿らによって平面構造が提唱されたことを受けて、まずラセミジアステレオマー混合物を合成し、生物検定試験をおこなった。合成品は天然物の 5～10 分の 1 程度の活性を示したことから、いずれかの立体化学が活性発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。

③ $\alpha 1$ 光学活性体の立体選択的合成から絶対立体配置の決定まで



天然の $\alpha 1$ において分子両端に存在するヒドロキシ基を対応する MTPA エステルとして分析することにより、3 位および 15 位の立体化学がともに *R* であることが明らかとなった。残る 7 位、11 位に関する四種の立体異性体を合成し、合成品の生物検定を行ったところ、(7*R*,11*R*)-体のみが活性を示した。よって天然物の絶対立体配置を決定することができた。

④ $\alpha 2$ の単離同定から合成、絶対立体配置の決定まで



続いて $\alpha 2$ も単離され、平面構造が決定されたので、 $\alpha 1$ と同様の方法論により天然物の絶対立体配置を決定した。

⑤交配ホルモンの生合成

疫病菌交配ホルモンの構造を眺めると $\alpha 1$ と $\alpha 2$ は非常によく似ていることに気付かされる。また、このような構造で真っ先に思いつくのは植物体内には普遍的に存在する phytol である。疫病菌が植物の病原菌であることから、その生活様式に植物が密接に関係していることは想像に難くない。そこで交配ホルモンの生合成について検討したところ、A2 株は外部から phytol を取り込んで $\alpha 2$ を産生し、放出された $\alpha 2$ を受け取った A1 株が $\alpha 2$ を $\alpha 1$ へと代謝、放出することで、互いの株に卵孢子形成を促しているという興味深い現象を明らかにすることができた。

⑥交配ホルモンの構造活性相関からケミカルバイオロジーへの展開

交配ホルモンの受容体探索などを指向した構造活性相関の知見などについても紹介したい。

ROSによる植物の根の成長を制御する細胞機能転換転写ネットワーク

塚越啓央 (名大院・生命農、JST さきがけ)

【目的】 地球環境の劇的な変化や世界人口の増加に伴う食料やエネルギー問題を解決する為には、植物バイオマスの効率的な生産技術の確立が重要となっている。植物バイオマスの増産に関連するこれまでの基盤研究から、植物の大きさを決定する要因、特に植物ホルモンの重要性が明らかにされている。植物の成長は植物が生育している周りの環境に強く影響され、環境に応答した植物体内の長期的、短期的なシグナル伝達で制御されている。特に根のサイズ決定には根端における細胞の分裂から分化への機能転換の制御が鍵となっている。根は長軸方向にメリステム領域、伸長領域、成熟領域の大きく三つの領域に分類される。メリステム領域の細胞サイズはほぼ一定に保たれ、細胞分裂活性が高い。伸長領域の細胞は分裂活性が低下し、急激な伸長を示す。成熟領域の細胞は分裂活性も伸長活性もほぼ失い、細胞の分化を始める。一度これらのバランスが崩れることで正常な根の伸長のみならず個体全体の成長が異常となる。この細胞の分裂から分化への機能転換制御機構を解明することで植物の大きさや環境適応能力を人為的に変化させることが可能になると考えられる。本研究ではこの細胞機能転換を支配する新奇転写ネットワークを解明することを目的とした。

【方法】 根の細胞機能転換を制御する転写因子を逆遺伝学的に検索した。その為に植物の根を長軸方向に12の部位に切り分け、それぞれの部位における遺伝子発現をマイクロアレイによって解析した大規模データベース“RootMap”を用いた。RootMapからメリステム領域と伸長領域の境界で顕著な発現変動を示す転写因子を約100個選抜し、それらの破壊株を解析した。このスクリーニングから得られた原因遺伝子の発現様式をレポーターにより追跡し、この転写因子により直接発現を制御される標的因子をマイクロアレイやクロマチン免疫沈降法により網羅的な解析を行った。

【結果】 RootMAP を利用した逆遺伝学的解析から、一つの遺伝子破壊株で野生型株よりも根が長くなるという表現型を見だし、その原因遺伝子を UPBEAT1 (UPB1) と名付けた。UPB1 の遺伝子破壊株(*upb1-1*)はメリステム領域が増加し、その結果根全体が長くなり、一方で過剰発現株では根が短くなった。UPB1 は根端の最外層の根冠細胞で、かつメリステム領域と伸長領域の境界領域という極めて局所的な部位で特異的に発現していた。一方で、UPB1 と GFP の融合タンパク質は根冠細胞での蛍光は観察されず、伸長領域の全ての細胞種の核で蛍光が観察された。この結果から UPB1 は

細胞非自立的に機能を持つと考えられた。

upb1-1 と *UPB1* 過剰発現株を用いたマイクロアレイ解析から、*UPB1* は顕著にペルオキシダーゼ遺伝子群を抑制していることがわかった。さらにクロマチン免疫沈降とゲノムアレイを組み合わせた ChIP-chip 法により *UPB1* が少なくとも 3 つのペルオキシダーゼ遺伝子プロモーター領域に直接結合することがわかった。

UPB1 標的ペルオキシダーゼの過剰発現株ではメリステムサイズが大きくなり、***UPB1* はペルオキシダーゼ群の発現を直接制御することで、根のサイズ決定の鍵となっていると示唆された。**

ROS の一種である H_2O_2 処理によってメリステムは小さくなり、 H_2O_2 のスカベンジャーであるヨウ化カリウム(KI)処理ではメリステムが大きくなる。また、ペルオキシダーゼの活性阻害剤でもメリステムが小さくなることから、**ペルオキシダーゼの活性やそれに伴う ROS レベルの変動が根端のメリステムサイズを規定していると考えられた。**根では H_2O_2 は根冠を除くメリステム領域にはほとんど蓄積せず、細胞伸長領域に蓄積している。*UPB1* によって発現抑制を受けるペルオキシダーゼはメリステムと伸長領域の境界領域で発現しており、これらペルオキシダーゼが H_2O_2 の量を境界領域で調節していると考えられた。

H_2O_2 とともに超酸化化物(O_2^-)も根の発達に重要な役割を果たしている。*NADPH* オキシダーゼ活性阻害剤がメリステムを小さくすることから、 O_2^- もメリステムサイズ決定に関与している。 O_2^- はメリステム領域に多く蓄積し、*upb1-1* 変異株では O_2^- のレベルが増加し、メリステムが大きくなり、一方、過剰発現株では H_2O_2 のレベルが伸長領域で増加していた。これらの結果から、**少なくとも H_2O_2 と O_2^- といった 2 種の ROS の根端における空間的な分布が細胞の分裂から伸長への機能転換とそれに続くメリステムサイズの決定に重要と考えられる。**動物細胞でも O_2^- が細胞分裂を促進し、 H_2O_2 が細胞を静止状態に保つことが知られているが、これは植物根端の結果と相補的であり、ROS を介した細胞の分裂から分化への機能転換は植物と動物とでよく保存されている。

ROS は *UPB1* 遺伝子の発現を誘導し、ROS と *UPB1* の分子機能の間にはフィードバックループが存在している。すなわち、高濃度では細胞に有害と考えられる ROS の量を適切に保つ為のホメオスタシス機構が *UPB1* を介した遺伝子発現制御に働いていると考えられる。よって *UPB1* は ROS の空間的・濃度的分布を適切に保つことで根端における細胞機能転換を調節する転写制御因子であると結論される。

● 演者プロフィール

名前：甲斐 建次 (Kenji Kai)

連絡先：〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 応用生命科学専攻

E-mail address: kai@biochem.osakafu-u.ac.jp

略歴：2002 年 3 月 大阪府立大学農学部応用生物化学科卒業

2007 年 5 月 京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了，博士(農学)

2007 年 6 月 静岡大学農学部産学官連携研究員

2008 年 1 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助教

現在に至る

主な研究テーマ：菌類内生細菌と植物病原細菌のクオラムセンシング。クオラムセンシング制御物質の開発。

今後の目標：菌類や植物の懷に潜り込むために、細菌たちが“ひそひそ話（ケミカルコミュニケーション）”でどんなことを喋っているのかを知りたい。悪いことを企んでいるようであれば、「うるさいよ、そこ！」と注意できるようにになりたい。

名前：矢島 新 (Arata Yajima)

連絡先：〒156-8502 東京都世田谷区桜丘 1-1-1

東京農業大学応用生物科学部醸造科学科

E-mail address: ayaji@nodai.ac.jp

略歴：2000 年 3 月 東京理科大学理学研究科博士課程修了，博士(理学)

2000 年 4 月 東京農業大学応用生物科学部助手

2003 年 4 月 東京農業大学応用生物科学部講師

2009 年 10 月 東京農業大学応用生物科学部准教授

現在に至る

主な研究テーマ：天然物合成化学・微生物のケミカルバイオロジー

今後の展望：有機合成化学を使って微生物の言語を理解する

名前：塚越 啓央 (Hironaka Tsukagoshi)

連絡先：〒464-8601 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科 生物化学研究室

E-mail address: upbhiro@agr.nagoya-u.ac.jp

略歴:2006 年 7 月 名古屋大学大学院生命農学研究科生物機構機能科学選考 博士後
期課程修了, 博士(農学)

2006 年 8 月 日本学術振興会特別研究員

2007 年 4 月 Duke University(USA), ポストドクトラルフェロー

2010 年 4 月 日本学術振興会 海外特別研究員 (Duke Univeristy)

2011 年 4 月 名古屋大学高等研究院 特任助教/生命農学研究科 特任助教
兼任

2012 年 10 月 独立行政法人科学技術振興機構 さきがけ研究員 兼務

2012 年 12 月 名古屋大学 PhD 登龍門推進室 特任講師/生命農学研究科 特
任講師 兼任
現在に至る

主な研究テーマ：植物の活性酸素種による根の伸長制御

今後の展望： 活性酸素が支配する新奇な植物成長制御に関わる因子群を同定して
行きたい。

MEMO

●●● 一般講演 ●●●

15:05~16:41 多目的ホール

(講演時間9分、質疑応答3分)

- *1 マイクロアレイ解析によるカイコ休眠制御遺伝子の網羅的検索
○江木 雄一, 秋友 紫苑, 坂本 克彦 (神戸大院・農)
- *2 S-Equol のインスリン分泌促進作用について
○白井 理絵¹, 堀内 寛子¹, 原田 直樹¹, 中野 長久², 乾 博³, 山地 亮一¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪女子短大, ³大阪府大院・栄養)
- *3 マルトトリオース生成アミラーゼを用いたマルトトリオシル配糖体の合成
○掃部 正浩¹, 松岡 智里², 西村 重徳¹, 谷 修治¹, 炭谷 順一¹, 多田 俊治³,
川口 剛司¹ (¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大・生命環境, ³大阪府大院・理)
- *4 フラボノイド誘導体の酵素合成と機能性評価
○服部 裕美¹, 津々木 博康², 甲斐 建次¹, 中澤 昌美¹, 上田 光宏¹, 居原 秀²,
阪本 龍司¹ (¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大院・理学)
- *5 キイロショウジョウバエのエクジソン受容体発現酵母の高感度化と有用性の評価
○松浦 麻衣¹, 原島 小夜子¹, 川西 優喜¹, 中川 好秋², 八木 孝司¹
(¹大阪府大院・理, ²京大院・農)
- 6 FOXO1 遺伝子改変マウスにおける筋分化能と遺伝子発現解析
○山下 敦史¹, 畑澤 幸乃¹, 三浦 進司², 小野 悠介³, 亀井 康富¹
(¹京都府大・生命環境, ²静岡県大・食品栄養, ³長崎大・医歯薬)
- 7 コムギ登熟種子ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの開花期窒素供給への
応答と遺伝子発現
○山本 直樹^{1,2,3}, 高野 知之³, 木下 由貴¹, 佐生 愛¹, 矢野 健太郎³,
杉本 敏男², 増村 威宏^{1,4}
(¹京都府大院・生命環境, ²神戸大院・農, ³明治大・農, ⁴京都府農技セ・生資セ)
- 8 マウス細胞におけるヘテロクロマチンタンパク質1 α の細胞周期を通じた局在の
可視化とヘテロクロマチンドットの周期的な明滅
○中川 千雅, 川喜 多愛, 深田 尚, 杉本 憲治 (大阪府大院・生命環境)

*「農芸化学会関西支部若手優秀発表賞・賛助企業特別賞」対象講演

マイクロアレイ解析によるカイコ休眠情報伝達遺伝子の網羅的検索

○江木雄一，秋友紫苑，坂本克彦（神戸大院・農）

【目的】

カイコガ (*Bombyx mori*) の 2 化性品種では、卵期と幼虫期に経験した日長、気温などの環境情報が次世代卵の休眠決定に影響を与える。休眠が決定されると、蛹期に休眠ホルモンが放出され、卵巣内で発達中の卵の休眠が誘導される。卵期・幼虫期に決定された休眠もしくは非休眠の情報は、幼虫期の脳に保存されることは分かっているが、この情報がどのようにして蛹期にまで伝達されるかについては、分子レベルではまだ明らかにされていない。そこで本研究では、カイコの休眠情報の伝達に関与する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析によって検索した。

【方法】

卵期の温度及び卵期の明暗によって休眠制御可能な 2 化性品種 p50 を実験に用いた。5 齢期の雌幼虫の脳から抽出した RNA を対象としてマイクロアレイ解析を行い、休眠卵産下群と非休眠卵産下群の間で脳内における遺伝子発現プロファイルを比較した。両群の間で 1.5 倍以上の発現差異を示した遺伝子を休眠情報伝達遺伝子候補とした。

【結果】

卵期の温度で休眠を制御したグループと卵期の明暗で休眠を制御したグループのいずれにおいても有意に発現差異のあった遺伝子は、*cytochromeP450 18a1* (*Cyp18a1*) と *Krüppel homolog1* (*Kr-h1*) であった。これら 2 つの遺伝子は休眠卵産下群において発現が増加していた。*Cyp18a1* は 20-ヒドロキシエクダイソンを代謝、不活性化する酵素をコードする遺伝子であった。また、*Kr-h1* は幼若ホルモンの変態抑制シグナルを伝達する働きをもつ転写因子であった。これらの候補遺伝子と休眠情報伝達の関係について議論する。

S-Equol のインスリン分泌促進作用について

○白井理絵¹, 堀内寛子¹, 原田直樹¹, 中野長久², 乾博³, 山地亮一¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪女子短大, ³大阪府大院・栄養)

【背景・目的】2型糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島β細胞でのインスリン分泌不全や末梢組織でのインスリン作用不全によって発症する。日本人を含むアジア人では健常時でもインスリン分泌が欧米人の半分程度と低い上に、糖尿病発症早期からインスリン分泌のさらなる低下が観察される。そのため、アジア人型の2型糖尿病の発症予防や治療にはインスリン分泌能の改善が特に重要となる。S-Equol は大豆イソフラボンである Daidzein から腸内細菌によって産生され、女性ホルモン (エストロゲン) 様作用を示す物質である。我々は、S-Equol が膵β細胞の生存亢進作用をもつことを、培養細胞を用いて明らかにしてきた。本研究では、インスリン分泌に及ぼす S-Equol の影響について、一過적および長期的な作用を検討した。

【方法・結果】8週令のオス ICR マウスから単離したランゲルハンス島を用いて、インスリン分泌に及ぼす S-Equol の一過적作用を検討した。その結果、S-Equol は高グルコース (16.7 mM) によって刺激されたインスリン分泌を促進した。このインスリン分泌促進作用は R-Equol には観察されず、S 体に特異的であった。高グルコース条件下における S 体特異的な一過적インスリン分泌促進作用は、膵β細胞株である INS-1 細胞と HIT-T15 細胞においても観察され、INS-1 細胞においては 1 μM 以上で有意なインスリン分泌促進作用が認められた。女性ホルモンである 17β-Estradiol (10 nM) と S-Equol (10 μM) はエストロゲン受容体の転写活性を同程度まで促進させたが、17β-Estradiol はインスリン分泌を促進しなかった。S-Equol 存在下で INS-1 細胞を継代培養すると、グルコースに応答したインスリン分泌能が増強されることが明らかになった。細胞内 cAMP レベルの上昇は、膵β細胞の一過적グルコース応答や長期培養によるグルコース応答の亢進に関与する。そこで、細胞内 cAMP レベルに及ぼす S-Equol の影響を検討した結果、S-Equol は鏡像立体異性選択的に cAMP 濃度を上昇させ、cAMP 応答配列を介した転写を活性化した。これらの結果から、S-Equol は鏡像立体異性選択的にグルコース刺激によるインスリン分泌を一過的に促進させること、また長期的に細胞に作用してインスリン分泌能を亢進することが明らかになった。これらの作用は、細胞内 cAMP レベルを上昇させることで発揮すると推察される。

マルトトリオース生成アミラーゼを用いた マルトトリオシル配糖体の合成

○掃部正浩¹，松岡智里²，西村重徳¹，谷修治¹，炭谷順一¹，多田俊治³，川口剛司¹
(¹大阪府大院・生命環境，²大阪府大・生命環境，³大阪府大院・理)

【目的】化合物の水溶性や安定性を改善する方法のひとつとして配糖体化があり，食品，化粧品，医療品などの分野で利用されている。配糖体を合成する酵素のほとんどは単糖を転移する酵素であり，特定のオリゴ糖を転移する転移酵素はあまり知られていない。*Kitasatospora* sp. MK-1785 株が生産するマルトトリオース生成アミラーゼ (G3Amy) は水酸基を有する各種化合物に対してマルトトリオース (G3) を転移する活性も有し，マルトトリオシル配糖体合成酵素としての応用が期待される。しかしながら，産業的に利用するためにはさらに加水分解活性を抑え，転移活性を向上させることが望まれる。以前，我々はアクセプター部位に存在すると考えられるアミノ酸に対して部位特異的変異導入を行い，グルコースをアクセプター基質としたときの G3 転移活性が向上した変異酵素の取得に成功している。本研究では，アクセプター基質としてアルコールおよびフェノール系化合物を用い，取得した野生型酵素と変異酵素のこれらの基質に対する配糖化活性の比較を行った。

【方法と結果】グルコースに対する転移活性が向上した 10 種の変異酵素 (L191R, R223K, F258H, L277T, L277Q, F279V, F279L, D323R, D323H, D323W) および野生型酵素をアクセプター基質存在下で可溶性澱粉と反応させ，反応産物を TLC によって確認した。アクセプター基質として，グリセロール，フェルラ酸，カフェ酸，アスコルビン酸を使用した。その結果，グリセロールでは，L191R, D323R, D323H において配糖化活性の向上が確認され，一方，R223K では配糖化活性が激減した。フェルラ酸，カフェ酸では，R223K, L277T, L277Q, F279V, F279L において配糖化活性の向上が確認された。アスコルビン酸に関しては，L191R, F258H において配糖化活性の向上が確認され，さらに驚くことに F258H によって合成したアスコルビン酸配糖体の Rf 値は野生型酵素，L191R のものとは異なり，転移反応における位置選択性の改変も確認された。今後は他のアクセプター基質に関しても同様に実験を進めるとともに，変異部位を組み合わせることで，さらに配糖体活性の向上した変異酵素の取得を行っていく予定である。

フラボノイド誘導体の酵素合成と機能性評価

○服部裕美¹, 津々木博康², 甲斐建次¹, 中澤昌美¹, 上田光宏¹, 居原秀², 阪本龍司¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大院・理学)

【目的】ナリンジン (Nar) などのフラボノイドは柑橘果皮などに含まれるポリフェノールであり, 抗菌, 抗酸化, 抗炎症性などの機能をもつことから, 食品添加物, 化粧品および医薬品への利用が期待されている. 一方, 酵素を利用したエステル転移反応や糖転移反応による構造改変技術は, 優れた生理機能や物性をもつ新規有用物質の創製に利用することができる. 本研究では新規機能性物質を獲得することを目的として, Nar および糖転移 Nar (α GNar) を基質として酵素化学的手法により種々の Nar 誘導体を合成し, それらの抗菌活性および抗炎症活性を評価した.

【方法・結果】アセトンに Nar, 各種脂肪酸ビニル, モレキュラーシーブス, 固定化リパーゼを加えて, 50°C で攪拌しながらエステル転移反応を行った. 未反応の脂肪酸ビニルおよび Nar をヘキサンおよび 30%メタノールを用いて除去することで, C2~C18 の飽和脂肪酸を Nar に結合させた 9 種のモノ脂肪酸エステル (Nar-C2~C18) を精製した. NMR 解析の結果, 各エステル体は Nar 中のグルコース残基 6 位に各脂肪酸が結合した構造を持つことが確認できた.

抗菌性評価について, *Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* を用いて, 1~100 μ M の範囲で測定した結果, Nar-C8~C12 において, *B. subtilis* に対する活性が認められた. 最大活性を示した Nar-C10 および -C12 の MIC 値 (菌の生育を抑制する最少のサンプル濃度) は 12.5 μ M であり, ソルビン酸 (MIC 値 8 mM) やパラベン (MIC 値 1.25 mM) などの防腐剤をはるかに上回るものであった. なお, Nar には抗菌活性は認められなかった.

次に抗炎症作用について, マクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いて LPS 誘導性 NO 産出を指標として評価した. まず MTT アッセイにより細胞に対する毒性を検討したところ, Nar-C2~C12 では毒性を示さなかったが, Nar-C14~C18 において 25~50 μ M で毒性が認められた. そこで Nar-C2~C12 の各種エステル体 (25, 50 μ M) で RAW 264.7 を処理した後, LPS で炎症を誘発し, 産生される NO 量をグリースアッセイにより測定した. その結果, Nar-C6~C12 において NO 産出抑制効果が認められ, 脂肪酸の炭素鎖が長くなるにつれて効果が高まることが確認された. Nar-C12 においては, 高い抗炎症作用をもつことが知られているノビレチンを上回るものであった. 以上の結果より, Nar-C12 について焦点を当て, 分子メカニズムに関する解析を行った. ウェスタンブロット解析による誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) の発現抑制の検討を行った結果, Nar のラウロイル化による抑制効果の向上が見られた. iNOS の発現抑制メカニズムについては現在検討中である.

また, α GNar についても Nar と同様の操作でエステル転移反応を行い, α GNar-C12 を獲得した. α GNar-C12 は Nar-C12 と同程度の抗菌および抗炎症作用を示し, さらに水溶性は Nar-C12 の約 500 倍に向上した.

キイロショウジョウバエのエクジソン受容体発現酵母の 高感度化と有用性の評価

○松浦麻衣¹，原島小夜子¹，川西優喜¹，中川好秋²，八木孝司¹
(¹大阪府大院・理，²京大院・農)

【目的】近年、昆虫特有の脱皮・変態過程を制御する核内受容体であるエクジソン受容体 (ecdysone receptor ; EcR) を介して作用する人工化合物が新たな殺虫剤として開発されている。この化合物は昆虫の分類学上の「目 (order)」特異的に作用し、化合物ごとに害虫特異的に殺虫効果をもたらすことができる。当研究室では、すでにヒトの核内受容体を発現するレポーターアッセイ酵母株を樹立し、環境サンプル中からリガンド物質を検出してきた。そこで、同様の手法で異なる目に属する昆虫の EcR を用いて酵母レポーターアッセイ系を確立することは、EcR 特異的なリガンド活性検出のための一次スクリーニング系として有用であると考えられる。本研究では、まずモデル生物であるキイロショウジョウバエ(双翅目)の EcR を発現するレポーターアッセイ酵母株を樹立し、さらにレポーターアッセイを高感度化するため、薬剤排出ポンプ遺伝子 *PDR5*、*PDR10*、および細胞壁マンナンタンパク遺伝子 *CWP1*、*CWP2* を単独および、二重に欠失させた変異酵母株を宿主に用いた EcR 発現酵母を作製し、既知リガンドに対する応答性を野生酵母株と比較した。

【方法】キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster* : Dm)の EcR とそのヘテロダイマーパートナーをコードする USP cDNA を、無細胞系発現プラスミドから PCR 法によって増幅し、酵母での EcR-USP 発現プラスミドを作製した。またキイロショウジョウバエの mRNA から RT-PCR 法で転写共役因子 DmTai cDNA をクローニングして酵母発現ベクターに組み込み、応答配列をもつ *lacZ* レポータープラスミドとともに、酢酸リチウム法により野生酵母株 W303a に導入して、アッセイ酵母株を作製した。次に、昆虫の脱皮ホルモン 20-hydroxyecdysone (20E) を 96 穴マイクロプレートに添加し、アッセイ酵母菌液と培地を加えて 18 時間培養した。新しいプレートに ONPG を含む発色溶液とリガンド曝露した酵母菌液を混合して 37℃でインキュベートし、発色 OD₄₀₅ と酵母濁度 OD₅₉₅ を測定した後、β-ガラクトシダーゼ活性を算出した。レポーター活性の高い酵母株を選抜し、既知リガンドとして 20E の前駆体；α-ecdysone、植物由来エクジステロイドのボナステロン A を用いてアッセイを行った。双翅目のヒトスジシマカ (*Aedes aldopictus* ; Aa) の EcR と結合する人工化合物 Tetrahydroquinolin (THQ) 系化合物や、主に鱗翅目に対する殺虫剤として商品化されている Dibenzoylhydrazine (DBH) 系化合物に対する応答性も調べた。また、エクジステロイドと同様にステロイド骨格を有する脊椎動物のステロイドホルモンに対する交差性を調べた。さらに、変異株酵母 4 種類 (*pdr5* Δ、*pdr5* Δ*pdr10* Δ、*cwp1* Δ*pdr5* Δ、*cwp1* Δ*cwp2* Δ) それぞれを宿主としたアッセイ酵母株を作製して既知リガンドに対する応答性を調べるとともに、環境試料からリガンド活性の検出に用いた。

【結果】作製した酵母株は DmTai を導入した場合のみ 20E に対して濃度依存的な応答性を示したことから、酵母での DmEcR-USP を介した転写活性には DmTai が必要であることがわかった。変異酵母株を用いた環境試料のアッセイでは野生酵母株と比べて応答性が増大してレポーター活性が高かった。以上のことから新たに樹立した高感度化 DmEcR-USP 酵母は環境サンプルなど様々な試料に含まれる微量なりガンド活性が検出可能であり、リガンド物質同定のための一次スクリーニング系として有用であると期待できる。

FOXO1 遺伝子改変マウスにおける筋分化能と遺伝子発現解析

○山下敦史¹、畑澤幸乃¹、三浦進司²、小野悠介³、亀井康富¹
(¹京府大・生命環境, ²静岡県大・食品栄養, ³長崎大・医歯薬)

【目的】 Forkhead box protein-O1 (FOXO1) はフォークヘッド型の転写因子であり、生体代謝の同化ホルモンであるインスリンと拮抗することが知られている。エネルギー欠乏状態の骨格筋において FOXO1 の遺伝子発現は著しく増加し、筋萎縮を誘導する。本研究では FOXO1 の機能をより詳細に調べるために FOXO1 遺伝子改変マウス由来の骨格筋と筋サテライト細胞を実験に用いた。筋サテライト細胞は骨格筋に存在する筋原性幹細胞であり、骨格筋形成において重要な役割を担っていると考えられている。細胞株である C2C12 筋芽細胞では FOXO1 の過剰発現により筋管形成が抑制されることが報告されているが、初代培養の筋サテライト細胞で同様の現象が起こるか否かは不明であり、FOXO1 が筋サテライト細胞の分化に及ぼす影響を検討した。並行して骨格筋のマイクロアレイ解析を行うことで FOXO1 によって発現が変動し、筋分化に関与する遺伝子の探索を試みた。

【方法と結果】 頸椎脱臼により屠殺した FOXO1 遺伝子改変マウスの長趾伸筋(EDL)を両脚から採取し、0.2% collagenase 溶液中で約 2 時間インキュベートして単一の筋線維まで分解した。不純物を取り除き、過収縮を起こしていない筋線維のみを精製した(単一筋線維法)。精製した筋線維をトリプシン/EDTA で 10 分間処理後、増殖培地で懸濁しマトリゲルコーティングしたプレートで培養した。培養 6 日目に細胞を同密度で再播種し、培養 10 日目に分化マーカーの RNA を抽出することで遺伝子の発現量を測定し、同時に FOXO1 と分化マーカーであるミオシン重鎖の免疫染色を行うことで分化への影響を解析中である。また、骨格筋特異的 FOXO1 過剰発現マウス(FOXO1-Tg マウス)と WT マウスの EDL 及びヒラメ筋(Sol)から抽出した total RNA をマイクロアレイ解析に供じた。WT マウスに比べて FOXO1-Tg マウスの骨格筋で 2 倍以上増加していた遺伝子に着目したところ、FOXO1-EDL では 692 個、FOXO1-Sol では 528 個、その中で同時に増加していた遺伝子は 172 個であった。現在それらの個々の遺伝子について詳細な情報検索を行い、筋サテライト細胞の分化に影響がある可能性のある遺伝子の解析を行っている。

コムギ登熟種子ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼの 開花期窒素供給への応答と遺伝子発現

○山本直樹^{1,2,3}, 高野知之³, 木下由貴¹, 佐生愛¹, 矢野健太郎³, 杉本敏男², 増村威宏^{1,4}

(¹京都府大院・生命環境, ²神戸大院・農, ³明治大・農, ⁴京都府農技セ・生資セ)

【目的】ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (PEPC) は植物に広く存在する、多機能性の有機酸代謝酵素である。PEPC は C4 型、CAM 型植物において光合成の炭酸固定の役割を果たす一方、植物種子で一般に高活性が見られ、アミノ酸、脂肪酸といった物質合成および呼吸の基質供給の役割を担うと推定されている。植物 PEPC は多重遺伝子ファミリーを形成し、その一次構造から、Plant-type と Bacterial-type に大別される。Plant-type には植物に広く存在する C3 型、酵素活性阻害因子であるリンゴ酸への感受性が弱い C4 型、Chloroplast 型等が含まれる。Bacterial-type の PEPC は Plant-type PEPC とヘテロ複合体を形成するとの報告がある。近年、種子における窒素集積と PEPC の関連性を裏付ける根拠が蓄積してきている。ダイズでは、完熟種子中の PEPC 活性は種子全窒素含量と品種間で正の相関を示した。イネでは、登熟種子中の PEPC 活性は開花期の窒素供給に対して正に応答し、その活性応答は完熟種子のタンパク質含量応答と品種間で正に相関していた。これらの観察は、種子 PEPC のアミノ酸合成への関与を示唆する。しかし、開花期の窒素供給に対する種子 PEPC 活性応答の分子機構については明らかではない。本研究では、コムギ登熟種子の窒素供給に対する PEPC 活性応答性およびその分子機構を解明することを目的とした。

【方法】開花期のコムギ (品種：シロガネコムギ) に硝酸アンモニウム (5g/ポット) を表層施用し、窒素供給に対する登熟種子 PEPC 活性の応答を調べた。PEPC の活性とタンパク質蓄積量の関係をウェスタン解析によって調べた。PEPC 遺伝子の発現を調べるため、コムギ cDNA およびゲノム配列データから PEPC 遺伝子配列を検索し、各遺伝子の発現量を Sequence Read Archive より取得した登熟種子 RNA-seq データより算出した。窒素供給に対する遺伝子発現応答を半定量 RT-PCR によって解析した。

【結果と考察】コムギ登熟種子 PEPC 活性は窒素供給により、開花後 11、16、21 日にそれぞれ 6、9、9 割の増加を示した。PEPC 活性と PEPC タンパク質蓄積量の間には同調的変動が見られ、窒素供給に対する活性応答はタンパク質蓄積量の増加によって説明できた。計算科学的に同定したコムギ PEPC アイソジーン (4 種の Plant-type と 1 種の Bacterial-type) の分子系統関係はイネ科植物の間で高度な保存が見られ、3 種の Plant-type アイソジーン (*Tappc1*, *Tappc2*, *Tappc3*) の登熟種子における遺伝子発現量は他の 2 種に比べて高かった。*Tappc2*, *Tappc3* は窒素供給により、それぞれ開花後 11、21 日に遺伝子発現量の増加を示した。現在進行中の組織別発現解析により、各アイソジーンの生理学的機能の理解が深まると期待する。

マウス細胞におけるヘテロクロマチンタンパク質 1 α の細胞周期を通じた局在の可視化とヘテロクロマチンドットの周期的な明滅

○中川千雅, 川喜多愛, 深田尚, 杉本憲治
(大阪府大院・生命環境)

【目的・方法】ヘテロクロマチンは、細胞周期の間期(G1 期、S 期、G2 期)においても染色体のクロマチン構造が凝縮しており、転写が不活性な領域である。ヘテロクロマチンタンパク質 1 α (HP1 α)はヘテロクロマチンに局在し、G1 期には核でドット状に局在することが知られている。さらに、我々はこれまでに、HP1 α が G2 期に核質で拡散していることを報告している[1]。このように、HP1 α は間期に局在が変化するので、生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できるかも知れないと考えた。そこで、細胞周期を通じた HP1 α の分子動態を解明するために、赤色蛍光タンパク質 DsRed に融合した HP1 α を安定発現するマウス C3H10T1/2 細胞を作製し、2 回の連続した細胞分裂間のライブイメージングを行った[2]。

【結果】HP1 α の局在変化を指標とすると、間期を 4 つのフェーズに分割することができた。細胞分裂後、HP1 α は核でドットが形成され維持された(フェーズ 1)。次に、HP1 α が核質で拡散し始め、HP1 α のドットの蛍光強度が周期的に明滅変化した。(フェーズ 2)。それから、HP1 α の拡散が核周縁まで進行し、ドットが識別できなくなった(フェーズ 3)。そして、核全体が一様の局在を示し(フェーズ 4)、2 回目の細胞分裂が開始した。HP1 α が拡散し始める正確な時期の決定は今後の課題であるが、フェーズ 2 は間期の中間に位置していた。この時期に HP1 α のドットが周期的な明滅を開始し、局在が動的に変化することから、フェーズ 2 は S 期と重なっているのではないかとと思われる。マウス細胞のライブイメージングでは、HP1 α のドットの明滅は容易に観察されるので、明滅をフェーズ 2 の視覚的な指標にすることができる。以上のことから、HP1 α は生細胞での細胞周期進行マーカーとして使用できる可能性があることが分かった。

[1] Sugimoto, K. *et al.*, *Cell Struct. Funct.* (2001) **26**, 705-718.

[2] Nakagawa, C. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2014) in press.

MEMO



16:50~17:20 多目的ホール

日本農学賞受賞講演

『環境保全型の高選択的生物制御物質に関する
先駆的研究』

林 英雄（大阪府大名誉教授）

環境保全型の高選択的生物制御物質に関する先駆的研究

林 英雄（大阪府立大学名誉教授）

〔はじめに〕 人類の生存にとって食糧確保のための生物生産は必須であり、持続可能な農業すなわち環境保全型農業の確立は今なお重要な課題である。農作物を脅かすものとして害虫や植物病原菌、植物ウイルス、さらに寄生雑草の攻撃などがある。また同時に、土壌の貧栄養化あるいはアルカリ化など克服すべき課題も残る。筆者はこれらの課題を解決するために有用な生物由来の生理活性物質に関する研究を行い、いくつかの知見を得た。それらの中で、特に昆虫生理活性物質および菌根菌宿主認識シグナル物質、クオラムセンシングにおけるシグナル物質に関する研究成果を概説する。

〔昆虫に対する生理活性物質〕 害虫防除に有効な薬剤にはピレスリンやスピノサイド、ミルベメクチンなどがあるのみであることから、簡便な生物検定法を用いて新規活性物質生産菌を検索した。その結果、昆虫に対して殺虫性や麻痺性、痙攣性を示す菌株の分離に成功し、新規骨格を有する okaramine など 41 の新規物質を含む 56 の化合物ライブラリーを構築した(表 1、1)。それらの活性物質の作用様式を検討した結果、殺虫性物質 okaramine は神経細胞における抑制性グルタミン酸のチャネルオープナーであり、麻痺性物質 asperparaline (2) は昆虫選択的にニコチン性アセチルコリン受容体の応答を阻害し (3)、痙攣作用増強物質 dehydroaustin はゴキブリ神経細胞においてニコチン性アセチルコリン受容体のアゴニストとして作用することを明らかにした (4)。これらの物質はいずれも昆虫特異的な作用様式であった。また、dehydroaustinol が diorcinol 共存下 *Aspergillus nidulans* の孢子形成を誘導することを見出し (5)、austin 類が真菌の孢子形成を制御していることが明らかとなった。

表1 分離菌株と生理活性物質

分離菌株	生理活性物質	作用
<i>Penicillium simplicissimum</i> AK-40	Okaramines A, B, D, E, F, G, J, K, L, M, N, O, P, Q, R	殺虫性
	Penitrem A, 6-Bromopenitrem E	痙攣性
<i>P. simplicissimum</i> MF-24	Okaramines A, B, C	殺虫性
	Verruculogen	痙攣性
<i>Aspergillus aculeatus</i> KF-428	Okaramines H, I	殺虫性
<i>P. brasilianum</i> MG-11	Austin, Dehydroaustin, Austinol, Dehydroaustinol, Acetoxydehydroaustin, Neoaustin	痙攣性増強
<i>A. japonicus</i> JV-23	Asperparalines A, B, C	麻痺性
<i>P. brasilianum</i> JV-379	Brasiliamides A, B, C, D, E	痙攣性
<i>P. expansum</i> MY-57	Communesins A, B, D, E, F	殺虫性
Unidentified ascomycete OK-128	PF1171A, PF1171C, PF1171F, PF1171G	麻痺性
<i>Taralomyces</i> sp. YO-2	Chrodriamans A, B, C, D, E, F, G, H	殺虫性
<i>P. griseofulvum</i> OK-17	Cyclopiamines A, B, C, D	麻痺性

本研究で明らかにした物質群の構造が注目された結果、okaramine C, J, M, N および communesin F の全合成が国内外の研究者により成し遂げられた。また、特異な bicyclo[2,2,2]diazaoctane 骨格を有する asperparaline 類も脚光を浴び、生合成研究および合成研究の対象となっている。

【アーバスキュラー菌根菌宿主認識シグナル物質】アーバスキュラー菌根菌（AM 菌）は植物に感染・共生し、リンを宿主植物に供給するとともに病原菌に対する耐性付与、収量の向上、生長促進などの良好な形質を植物に与える有用微生物であり、農業資材として利用されている。AM 菌は 80% 以上の陸上植物と共生しているように、菌根が地球上で最も普遍的な共生であるにもかかわらず、AM 菌が絶対共生菌であるため菌根形成過程に関する分子機構は不明であった。今回、筆者らは AM 菌の培養技術や生物検定法などを独自に開発し、菌糸分岐誘導活性を指標として用いることにより宿主認識シグナル物質として 5-deoxystigol を世界に先駆けて同定することに成功した (6, 7)。根寄生雑草種子発芽刺激物質として既に報告されていた strigol などのストリゴラクトン (SL) 類には強弱はあるものの AM 菌に対する菌糸分岐誘導活性が認められた。さらに、AM 菌が感染できないアブラナ科のナタネでは SL の分泌量がごく微量であること、また、マメ科のシロルーピンでは著量の SL が分泌されると同時に菌糸の生育および分岐を阻害するイソフラボンが分泌されていることを突き止めた (8)。

世界的な農業生産の阻害因子の一つにストライガ類をはじめとする根寄生雑草があり、SL 類は AM 菌に対する菌糸分岐誘導活性のみならず、本根寄生雑草の種子発芽刺激活性をも有する。これら両活性と構造との相関を 44 SL 類について精査した結果、AM 菌と根寄生雑草では構造要求性が異なり、SL の合成誘導体 GR24 の還元体 GR24-H₂ が AM 菌に対する活性のみを具えていることを明らかにした (9)。

【クオラムセンシングにおけるシグナル物質】細菌はシグナル物質を用いることにより自己と同種の菌密度をモニターし、その変化に応じて遺伝子発現を制御する。このクオラムセンシング (QS) 機構により、細菌は生存に適した環境をつくるために病原性を発現したり、バイオフィルムを形成したりする。アシルホモセリンラクトン (AHL) 応答性レポーター遺伝子を組込んだ *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 株の検定系を用いてグラム陰性細菌の QS シグナル物質である AHL のアゴニストあるいはアンタゴニスト生産菌を検索し、アゴニスト生産菌である接合菌 *Mortierella alpina* A-179 株を見出した。この株の生産する活性物質を C₈-HSL および C₇-HSL と同定するとともに、新規物質である C₁₀en-HSL を明らかにした (10)。これらの物質の真の生産者を明らかにするために A-179 株の菌体内に共生菌が存在するか否かを精査した。その結果、これらの物質が A-179 株自身ではなく、共生細菌によって生合成されていることを解明するとともに、AHL を生産する共生細菌が *Mortierella*-属の接合菌に広く分布していることを明らかにした (11)。

QS 機構を阻害するために AHL 合成酵素阻害剤の創製を試みた。その結果、AHL 合成酵素阻害剤として AHL 生合成中間体の構造類似体を見出した。これらの成果は内生菌の QS 機構における機能など、新たな研究領域発展への端緒を開いたものである。

【おわりに】筆者は環境保全型生物生産を実現するために生物由来の生理活性物質に関する研究を行った。この研究で得られた昆虫生理活性物質は哺乳類には作用せず、昆虫特異的な物質群であるため害虫防除に今後利用されるものと思われる。菌根共生における AM 菌菌糸分岐活性および根寄生雑草の種子発芽刺激活性を併せ持つ SL 類の中から、両活性を分離可能な物質を見出した。

本物質は貧栄養状態改善や収量増進などのために菌根共生を活用する方途となるものである。さらに、QS シグナル物質 AHL 類の生合成酵素阻害剤の創製に成功した。植物病原菌に対し殺菌作用を示さず、病原性発現やバイオフィーム形成などを阻害できる物質はより安全な細菌制御物質となるものと期待される。すなわち本研究で得られた物質群はいずれも独自に見出された高選択的生物制御物質であり、環境保全型の生物生産に大いに寄与するものと期待される。また、本研究で得られた成果は生物共生に関する今後の研究発展の契機となることが期待される。

[論文等、主な関連研究業績]

- (1) Bioactive fungal metabolites. Hayashi, H., Studies in Natural Products Chemistry Vol. 32, Bioactive Natural Products (Part L), pp. 549-609, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, 2005.
- (2) Hayashi, H., Nishimoto, Y., Akiyama, K., and Nozaki, H. (2000) New paralytic alkaloids, asperparalines A, B and C, from *Aspergillus japonicus* JV-23. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 111-115.
- (3) Hirata, K., Kataoka, S., Furutani, S., Hayashi, H., and Matsuda, K. (2011) A fungal metabolite asperparaline A strongly and selectively blocks insect nicotinic acetylcholine receptors: The first report on the mode of action. *PLoS ONE* **6**: e18354.
- (4) Kataoka, S., Furutani, S., Hirata, K., Hayashi, H., and Matsuda, K. (2011) Three austin family compounds from *Penicillium brasilianum* exhibit selective blocking action on cockroach nicotinic acetylcholine receptor. *Neurotoxicology* **32**: 123-129.
- (5) Rodríguez-Urra, A.B., Jiménez, C., Nieto, M.I., Rodríguez, J., Hayashi, H., and Ugalde, U. (2012) Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem. Biol.* **7**: 599-606.
- (6) Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435**: 824-827.
- (7) Akiyama, K. and Hayashi, H. (2006) Strigolactones: Chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Annals of Botany* **97**: 925-931.
- (8) Akiyama, K., Tanigawa, F., Kashiwara, T., and Hayashi, H. (2010) Lupin pyranoisoflavones inhibiting hyphal development in arbuscular mycorrhizal fungi. *Phytochemistry* **71**: 1865-1871.
- (9) Akiyama, K., Ogasawara, S., Ito, S., and Hayashi, H. (2010) Structural requirements of strigolactones for hyphal branching in AM fungi. *Plant and Cell Physiol.* **51**: 1104-1117
- (10) Kai K., Kasamatsu K., and Hayashi, H. (2012) (Z)-N-(4-Decenoyl)homoserine lactone, a new quorum-sensing molecule, produced by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178. *Tetrahedron Lett.* **53**: 5441-5444.
- (11) Kai, K., Furuyabu, K., Tani, A., and Hayashi, H. (2012) Production of the quorum-sensing molecules N-acylhomoserine lactones by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178. *ChemBioChem.* **13**: 1776-1784.

(平成 26 年度日本農学賞受賞論文要旨から転載)

● プロフィール

名前：林 英雄 (Hideo Hayashi)

連絡先：〒619-0224 京都府木津川市兜台 6-11-4

E-mail address: hhayashi6114@tea.ocn.ne.jp

略歴：

1972 年 3 月 京都大学 農学部 食品工学科 卒業
1974 年 3 月 京都大学大学院 農学研究科 修士課程修了
1977 年 3 月 京都大学大学院 農学研究科 博士課程単位修得退学
1979 年 10 月 大阪府立大学 農学部 助手
1979 年 11 月 農学博士取得 京都大学
1992 年 4 月 大阪府立大学 農学部 講師
1994 年 1 月 大阪府立大学 農学部 助教授
1996 年 2 月 大阪府立大学 農学部 教授
2000 年 4 月 大阪府立大学 大学院 農学生命科学研究科 教授
2005 年 4 月 大阪府立大学 大学院 生命環境科学研究科 教授
2013 年 3 月 定年退職
2013 年 4 月 大阪府立大学名誉教授

現在 (株) ファーマフーズ技術顧問、(株) 三香堂技術顧問

受賞 1989 年 4 月 農芸化学奨励賞

2012 年 2 月 第 3 回リサーチフロントアワード (トムソンロイター)

2014 年 4 月 日本農学賞、読売農学賞

主な研究テーマ：微生物の生産する生理活性物質、生物共生を制御する物質

MEMO

MEMO

次回のお知らせ

2014 年度日本農芸化学会関西支部大会(第 486 回講演会) 日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年 記念大会

日時：平成 26 年 9 月 19 日（金）

シンポジウム（特別講演・学会賞受賞講演を含む）、懇親会

会場：東大寺総合文化センター

日時：平成 26 年 9 月 20 日（土）

一般講演、受賞講演（功績賞 2 題）、支部参与会

会場：奈良先端科学技術大学院大学

講演申込締切：8 月 11 日（月）

講演要旨締切：8 月 18 日（月）

問合せ先：〒630-0192

奈良県生駒市高山町 8916 番地の 5

奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

高木 博史

E-mail: jsbba-kansai@bs.naist.jp

詳細についてはホームページをご覧ください。

<http://kansai-jsbba.jp>

お 知 ら せ

- 支部参与会は、12:00 より学術交流会館小ホールにて開催します。
 - 懇親会を 17:40 より同会館サロンにて開催します。
- 奮ってご参加ください。

日本農芸化学会関西支部

<http://kansai-jsbba.jp/>

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院農学研究科

庶務幹事：由里本 博也

E-mail: yury@kais.kyoto-u.ac.jp

TEL: 075-753-6387、FAX: 075-753-6454

会計幹事：松尾 道憲

E-mail: matsuomi@kyoto-wu.ac.jp

TEL: 075-531-7129、FAX: 075-531-7170

発行日 平成26年7月5日