

日本農芸化学会関西支部会  
第 487 回 講演会

講演要旨集

日時：平成 26 年 12 月 6 日(土)  
会場：神戸大学大学院農学研究科

# 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)

日本新薬(株)

(株)カネカ

ヒガシマル醤油(株)

菊正宗酒造(株)

不二製油(株)

黄桜(株)

松谷化学工業(株)

月桂冠(株)

三井化学アグロ(株)

三栄源エフ・エフ・アイ(株)

安井器械(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

- 開会の辞 (13: 00-13: 05) 水野雅史 (神戸大院・農、幹事校代表)
- 一般講演 (13: 05 ~ 15: 35) [講演 9 分、質疑応答 3 分]  
(\* 印は若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞対象講演)
  - 1. (13: 05 ~ 13: 17)  
6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネートの細胞周期開始抑制機序に関する研究  
○小寺裕貴<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、石村麻耶<sup>1</sup>、藍原祥子<sup>1</sup>、  
金沢和樹<sup>1</sup>、三宅秀芳<sup>1</sup>、吉田 優<sup>2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大院・医)
  - \*2. (13: 17 ~ 13: 29)  
チョウ目昆虫幼虫の農薬感受性リズム制御機構の解明  
○江木雄一、坂本克彦  
(神戸大院・農)
  - \*3. (13: 29 ~ 13: 41)  
抗マイコバクテリア活性を示す Ramariolide A の化学合成  
○八田雅士、久世雅樹、滝川浩郷  
(神戸大院・農)
  - \*4. (13: 41 ~ 13: 53)  
ヒトのミトコンドリア NAD キナーゼのリン酸化修飾による活性制御  
○川畑 豊<sup>1</sup>、阪井裕貴<sup>1</sup>、村田幸作<sup>2</sup>、河井重幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京都大院・農、<sup>2</sup>摂南大・理工)
  - \*5. (13: 53 ~ 14: 05)  
*Lactobacillus delbrueckii* が産生する菌体外多糖類の免疫賦活性に関する研究  
○岸本真奈<sup>1</sup>、野本竜平<sup>2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>、大澤朗<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大学自然科学系)
  - \*6. (14: 05 ~ 14: 17)  
LysM ドメインの構造と機能：Receptor 型 LysM と Carbohydrate-Binding Module 型 LysM との比較  
○北奥喜仁<sup>1</sup>、平東紀<sup>2</sup>、沼田倫征<sup>3</sup>、深溝慶<sup>1</sup>、大沼貴之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・農、<sup>2</sup>琉大農・亜熱生資、<sup>3</sup>産総研・バイオメディカル)
- 休憩 18 分 (14: 17 ~ 14: 35)
- \*7. (14: 35 ~ 14: 47)  
大腸菌における新規チオ硫酸イオン輸送体 YeeED の機能解析とシステイン発酵生産への応用  
○城山真恵加、河野祐介、大津巖生、高木博史  
(奈良先端大・バイオ)
- \*8. (14: 47 ~ 14: 59)  
酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な NO 合成とその制御機構  
○吉川雄樹、那須野亮、渡辺大輔、高木博史  
(奈良先端大・バイオ)

\*9. (14:59 ~ 15:11)

脂質結合ドメインを用いた新規ホスファチジン酸可視化プローブの開発  
○沖本航、中井寛子、上田修司、山之上稔、白井康仁  
(神戸大院・農)

\*10. (15:11 ~ 15:23)

傷害によって誘導される(3Z):(2E)-ヘキセナールイソメラーゼの同定と酵素学的性質の解明  
○國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕  
(神戸大院・農)

\*11. (15:23 ~ 15:35)

アルファルファ根粒菌に見出されたイノシトール合成系に関する研究  
○本窪田章博<sup>1</sup>、田中耕生<sup>2</sup>、竹中慎治<sup>1</sup>、Laurent Sauviac<sup>3</sup>、  
Claude Bruand<sup>3</sup>、吉田健一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大学自科、<sup>3</sup>LIPM, INRA Toulouse, France)

休憩 15分 (15:35 ~ 15:50)

● 2014年度日本農芸化学会功績賞受賞講演 (15:50 ~ 16:35)

食品製造における速度過程が関与する現象の工学的解析  
○安達修二 (京都大院・農)

● 特別講演 (16:35 ~ 17:20)

ヘリコバクターピロリ感染と胃がん  
○東 健 (神戸大院・医)

● 若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞表彰・閉会の辞

(17:20 ~ 17:30)

内海龍太郎 (近畿大院・農、日本農芸化学会関西支部長)

● 懇親会 (17:50 ~ 20:00、神戸大学アカデミア館3階「さくら」)

神戸の夜景を眺めながら、学生、教員、研究者、産業人を交えて  
熱い忘年会を！

参加費：一般 3,000 円 / 学生無料

## 01. 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネートの 細胞周期開始抑制機序に関する研究

○ 小寺裕貴<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、石村麻耶<sup>1</sup>、藍原祥子<sup>1</sup>、金沢和樹<sup>1</sup>、三宅秀芳<sup>1</sup>、  
吉田 優<sup>2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大院・医)

【目的】 本わさびに含まれる 6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアネート (6-MSITC) は、がん予防効果が報告されている。我々は 6-MSITC が細胞周期休止期 ( $G_0/G_1$  期) のマウス正常表皮由来 JB6 細胞に対して S 期への進行に必要なタンパク質の発現を抑制し、細胞周期開始阻害を引き起こすことを明らかにしてきた。本研究では、細胞周期開始阻害に関わる 6-MSITC の標的タンパク質の解明を行った。

【方法】  $G_0$  期に細胞周期を同調させた JB6 細胞の細胞溶解液を調製した。6-MSITC を固定した磁性ビーズを用いて細胞溶解液中の 6-MSITC と結合するタンパク質を回収し、nano LC-MS/MS により解析を行った。一方、構造が類似しながら阻害効果を示さない 6-メチルチオヘキシルイソチオシアネート (6-MTITC) についても同様の解析を行い、これらの結果を比較することで、細胞周期開始阻害に関わると考えられるタンパク質の候補を選定した。また、このタンパク質の分析は、免疫沈降法及びウェスタンブロッティング法で行った。

【結果および考察】 6-MTITC と比較し、6-MSITC と強く結合するタンパク質としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を同定した。一般に S 期進行に必要なタンパク質の発現は、Rb タンパク質が転写因子 E2F から解離することで誘導される。この両タンパク質について測定した結果、GAPDH は  $G_0/G_1$  期において Rb および E2F と複合体を形成していた。上皮細胞増殖因子を添加すると、GAPDH は Rb から解離したが、E2F とは複合体を形成したままであった。このことから GAPDH は E2F の転写活性を促進させるが、6-MSITC はこの促進作用を阻害するのではないかと考えた。最後に GAPDH の酵素活性におよぼす 6-MSITC の影響を *in vitro* にて調べたが、6-MSITC は GAPDH 活性に影響をおよぼすことはなかった。以上のことから、6-MSITC は、GAPDH に結合することで E2F の転写活性を阻害していると考えられるが、これは GAPDH の酵素活性を阻害することによるものではないと考えた。

## \*02. チョウ目昆虫幼虫の農薬感受性リズム制御機構の解明

○江木雄一、坂本克彦  
(神戸大院・農)

### 【目的】

いくつかの昆虫において、農薬感受性に日周性リズムがあることが知られている。農薬の効率的な使用のためには、害虫の農薬感受性リズムを考慮することは重要である。チョウ目昆虫の幼虫は主要な農業害虫であるが、その農薬感受性リズムに関する報告はこれまでない。そこで本研究では、チョウ目昆虫のモデル動物であるカイコ (*Bombyx mori*) を実験対象として農薬感受性リズムの解析を行い、その制御機構を調べることを目的とした。将来的なチョウ目農業害虫防除への応用を目指している。

### 【方法】

#### 1. 農薬感受性リズムの観察

雌雄鑑別が容易な限性品種 p63 のオス幼虫を実験に用いた。5 齢期 2 日目と 3 日目において農薬感受性リズムを観察した。まず、明暗サイクル下において、明期の中央時刻で薬剤の LD50 (半数致死量) を決定した。そして、この LD50 に対する生存率を、1 日の 4 つの異なる時刻で測定した。また、作用機序の異なる薬剤間で、感受性リズムのパターンを比較した。

#### 2. 農薬代謝酵素 P450 の遺伝子発現パターンの解析

ピレスロイド系殺虫剤のペルメトリンの代謝に関与すると考えられている P450 遺伝子群の発現パターンを調べた。5 齢期 2 日目に、1 日の 4 つの異なる時刻での脂肪体と中腸における mRNA 発現量をリアルタイム PCR で測定した。

### 【結果】

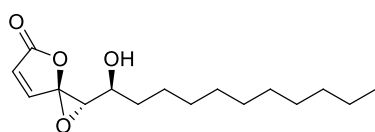
カイコ幼虫では、農薬に対する感受性リズムがあった。また、農薬の作用機序の違いによって、感受性リズムのパターンが異なることが分かった。

脂肪体と中腸において、ペルメトリンを代謝すると考えられる P450 遺伝子の発現に日周性リズムがあった。

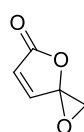
### \*03. 抗マイコバクテリア活性を示す Ramariolide A の化学合成

○八田雅士、久世雅樹、滝川浩郷  
(神戸大院・農)

【目的】 Ramariolide A はホウキタケ属きのこ (*Ramaria cystidiophora*) から単離された天然物であり、結核菌などのマイコバクテリアに対する抗菌活性を示す。<sup>1</sup>また、天然物としては珍しい spirooxyrane butenolide 骨格を特徴としており、新規抗マイコバクテリア薬のリード化合物として期待されている。本研究では ramariolide A の化学合成を目的とした。

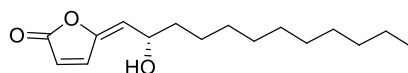


Ramariolide A



Spirooxyrane butenolide 骨格  
格

【方法】 Ramariolide A の spirooxyrane butenolide 骨格は、最終段階におけるエポキシ化反応によって構築することにした。この前駆体となる butenolide 化合物は実際に天然から単離されており、この butenolide 化合物を当面の合成目標として設定することにした。



butenolide 化合物

【結果】 市販の 1,2-ドデカンジオールを出発原料とし、3 段階で  $\alpha$ -ヒドロキシドデカナルを得た。向山アルドール反応によってフラン環を導入した後、脱水反応およびヒドロキシ基の脱保護により butenolide 化合物を得た。この butenolide 化合物には幾何異性体が含まれていたが、天然型の幾何異性体は分離精製が可能であり、そのスペクトルデータは報告値と一致した。

文献 1 : Centko R, et al., *J. Nat. Prod.*, **75**, 2178-2182, (2012).



#### \*04. ヒトのミトコンドリア NAD キナーゼのリン酸化修飾による活性制御

○川畑 豊<sup>1</sup>、阪井 裕貴<sup>1</sup>、村田 幸作<sup>2</sup>、河井 重幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>摂南大・理工)

【背景】 NAD キナーゼ (NADK) は、NAD<sup>+</sup>のリン酸化による NADP<sup>+</sup>の合成反応を触媒する唯一の酵素である。ヒトには細胞質局在性 NADK (cytNADK) とミトコンドリア局在性 NADK (mitNADK) が存在する。ミトコンドリアにおける NADP(H)の重要性にも拘わらず、組換え精製 mitNADK の比活性は組換え精製 cytNADK の比活性の約 1/200 と非常に弱い<sup>1)</sup>。近年、ヒト、マウス、およびラットの cytNADK と mitNADK の Ser、Thr、Tyr 各残基のリン酸化がフォスホプロテオミクス解析により明らかにされている。しかし、これらの部位のリン酸化修飾の生理的な役割、すなわちリン酸化修飾が各 NADK の活性や安定性に及ぼす影響などの詳細は不明である。

【方法】 ヒト cytNADK のリン酸化部位 [Ser-381、Thr-127 (Ser-381 のリン酸化がフォスホプロテオミクス解析によりヒト cytNADK で検出)] とヒト mitNADK のリン酸化部位 [7 箇所の Ser 残基、2 箇所の Thr 残基 (Ser-188、Ser-345、Ser-367、Thr-183 のリン酸化が同様にヒト mitNADK で検出)] を Asp 残基に置換した組換え模倣リン酸化 NADK を作製ならびに精製し、各模倣リン酸化修飾の NADK 活性への影響を *in vitro* で調べた。また、抗リン酸化 Ser 抗体や抗リン酸化 Thr 抗体を用いた、ヒト HEK293A 細胞 (*in vivo*) における各 NADK のリン酸化の検出も試みた。

【結果】 模倣リン酸化 cytNADK では NADK 活性に大きな変化は見られなかった。一方、cytNADK と比較して活性が非常に弱い mitNADK ではリン酸化による NADK 活性の上昇が期待されたが、各模倣リン酸化 mitNADK (mitNADK T183D、S188D、S289D、S289E、S294D、T357D、および S376D) の活性は低下した (同 S345D、S363D、および S367D の活性は変動しなかった)。特に、mitNADK S188D の活性は完全に消失した。さらに、*in vivo* における mitNADK の Ser 残基のリン酸化も検出された。ヒト mitNADK Ser-188 のリン酸化は、複数のフォスホプロテオミクス解析で検出されている。さらに Ser-188 は mitNADK のホモログ間に高度に保存されており、かつ同ホモログに特有な Motif 2 に存在するため、Ser-188 のリン酸化は重要な役割を有する可能性があるかと推察された。現在、酸化ストレスの有無など様々な培養条件が Ser-188 や他の残基のリン酸化修飾に及ぼす影響、ならびに各 NADK の安定性へのリン酸化修飾の寄与などを調べている。

1) Ohashi et al. Nat. Commun. 3:1248 (2012) doi:10.1038/ncomms2262

## \*05. *Lactobacillus delbrueckii* が産生する菌体外多糖類の免疫賦活性

○岸本真奈<sup>1</sup>、野本竜平<sup>2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>、大澤朗<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院農、<sup>2</sup>神戸大学自然科学系)

**[目的]** 細菌が産生する菌体外多糖 (Exopolysaccharides: EPS) は種属間のみならず株間においても構造・機能などが多様であることが知られている。そのうちある種の乳酸菌が産生する EPS は *in vitro* 実験におけるマクロファージ活性化作用や *in vivo* 実験における NK 細胞活性化といった免疫賦活作用に加え、炎症状態の細胞に対しての抗炎症作用も報告されている。しかし、一般的に EPS は高分子体であり、胃腸粘膜を通過して生体内でマクロファージや NK 細胞に直接作用するかどうかは疑問であり、その作用機序は不明な点が多く、腸管細胞を介した EPS の応答性に関する報告は少ない。そこで本研究では、腸管共培養モデルを用いて、*Lactobacillus delbrueckii* の各株が産生する EPS の腸管細胞を介した間接的な宿主の免疫システムへの影響を検証し、その作用機序について新たな知見を得ることを目的とした。

**[方法・結果・考察]** 乳酸菌を使用した食品検体から、粘性のあるコロニーを単離し、*L. delbrueckii* と同定後 10 株を EPS 産生株として供試した。上層に小腸上皮様 Caco-2 細胞、下層にマクロファージ様 RAW264.7 細胞を配した腸管共培養モデルを用いた EPS の免疫賦活性試験において、異なる菌株由来の EPS による刺激で応答するサイトカインの発現は多様であった。ある一株の EPS 処理区では RAW264.7 細胞が活性化し、Th1 型のサイトカインの産生が確認され EPS の免疫賦活性が示された。この実験により、高分子体である EPS は Caco-2 細胞を介したシグナル伝達経路により RAW264.7 細胞を活性化させる事が示唆された。次に、*in vitro* 腸管炎症モデルを用い腸管炎症状態における EPS の抗炎症作用を検証した。その結果、いずれの EPS も炎症状態においては各サイトカインの発現量に影響を与えなかった。各 EPS の糖の構成比を HPLC により調査した結果、免疫学的応答の傾向との相関性は見られなかったことから、EPS の立体構造や修飾等が免疫刺激に関連する可能性が考えられた。

## \*06. LysMドメインの構造と機能:

### Receptor型 LysMと Carbohydrate-Binding Module型 LysMとの比較

○北奥喜仁<sup>1</sup>、平良東紀<sup>2</sup>、沼田倫征<sup>3</sup>、深溝慶<sup>1</sup>、大沼貴之<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・農、<sup>2</sup>琉大農・亜熱生資、<sup>3</sup>産総研・バイオメディカル)

【目的】 Lysin-Motif (LysM)は多くの植物において、キチンおよびその関連糖質を介した植物-微生物間相互作用に関わる膜タンパク質の細胞外レセプタードメインとして存在することが知られている(Receptor型 LysM)。一方、Tairaらは植物キチナーゼにおいて、その触媒反応を補助する糖質結合モジュール(Carbohydrate-Binding Module)として機能する LysM (CBM型 LysM)を見出した(*Glycobiology*, 2008, 18, 414-423)。本研究では、シダやスギナに見出される CBM型 LysMの結晶構造とキチン結合特性を調べ、異なる役割を担う Receptor型 LysMとの共通性および相違点を明らかにすることを目的とした。

【方法】シダ (*Pteris ryukyuensis*) およびスギナ (*Equisetum arvense*) 由来キチナーゼ (PrChiA および EaChiA) に含まれる CBM型 LysM (PrChiA-LysM および EaChiA-LysM) を精製し、結晶化後、分子置換法によって立体構造を決定した。また、キチンオリゴ糖との結合様式を明らかにするために安定同位体でラベルされた LysM を調製し、NMRを用いたキチンオリゴ糖滴定実験を行った。オリゴ糖滴定に伴う NMRシグナルの変化に基づいて、結合部位を推定した。オリゴ糖結合に関わるアミノ酸残基として PrChiA-LysMの Tyr残基に注目し、この部位に変異を導入した後、結合力への影響を調べた。

【結果】X線結晶構造解析の結果、PrChiAとEaChiAのLysMの立体構造を、それぞれ1.8 Åと2.5 Åの分解能で決定した。両CBM型LysMの立体構造は、すでに決定されているReceptor型LysMドメインのものとよく類似していたが、CBM型LysMだけにみられる特徴的な構造として、二つのジスルフィド結合を見出した。得られたCBM型LysMの立体構造の分子表面に、NMR滴定実験より推定された結合に関わると思われるアミノ酸残基をマッピングしたところ、CBM型LysM分子表面のクレフト末端に存在するTyr残基の重要性が示唆された。そこで、PrChiAがもつこのTyr残基に変異を導入し、キチンオリゴ糖との結合性を等温滴定型熱量計によって調べた。その結果、この変異によってキチンオリゴ糖に対する親和性は有意に減少し、Tyr残基のオリゴ糖結合に対する寄与が明らかとなった。

## \*07. 大腸菌における新規チオ硫酸イオン輸送体 YeeE の機能解析とシステイン発酵生産への応用

○ 城山真恵加、河野祐介、大津巖生、高木博史  
(奈良先端大・バイオ)

【目的】大腸菌は無機性の硫黄化合物である硫酸塩やチオ硫酸塩を同化する2つの経路を有し、生育に必須な有機性の硫黄化合物であるシステイン(Cys)を合成する。チオ硫酸経路では、細胞内に取り込まれたチオ硫酸イオンとO-アセチルセリンからO-アセチルセリンスルヒドラーゼB(CysM)によりスルホシステインを合成し、チオレドキシンの還元反応によりCysが生成する。cysM破壊( $\Delta$ cysM)株はチオ硫酸塩を単一硫黄源として生育できないはずであるが、実際には僅かに生育が観察される。このことから、CysM非依存的なチオ硫酸イオン同化経路の存在が示唆された。本研究では、その機能を担う因子の同定と代謝経路の解析を行った。

【方法・結果】ゲノムデータベースを用いてチオ硫酸硫黄転移酵素を探索し、10個の候補遺伝子を同定した。これら候補遺伝子を $\Delta$ cysM株に導入し、チオ硫酸塩を単一硫黄源とした最少培地で生育を野生株並みに回復させる遺伝子(*glpE*, *pspE*, *yeeD*, *sseA*, *yceA*)を見出した。中でも機能未知である*yeeD*は9回膜貫通型の推定トランスポーターをコードする*yeeE*とオペロンを形成していることが判明した。そこで、 $\Delta$ cysA株(チオ硫酸イオンと硫酸イオンの取込み能を欠く)、 $\Delta$ yeeE株、 $\Delta$ yeeD株、 $\Delta$ cysA $\Delta$ yeeE株、 $\Delta$ cysA $\Delta$ yeeD株をチオ硫酸塩が単一硫黄源の培地で培養したところ、 $\Delta$ cysA株は良好に生育するものの、二重欠損株はいずれも生育しなかった。以上の結果から、YeeEは新規なチオ硫酸イオン輸送体であると示唆され、大腸菌におけるチオ硫酸イオンの取込み系は、CysPTWAとYeeEの2つのみであることが判明した。さらに、*yeeD*、*yeeE*のどちらか一方が欠損すると生育できないことから、YeeEの機能にはチオ硫酸硫黄転移酵素YeeDが必須であると考えられた。最後に、YeeDを介した新しい硫黄同化経路が大腸菌のCys生産性に及ぼす効果を評価した。その結果、従来のCys生産株はチオ硫酸を含む培地で約1 g/LのCysを生産したが、YeeDを過剰発現させることでCys生産量が2.3倍に増加した。このことから、YeeDの過剰発現がCys生産性の向上に有用であることが実証できた(本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて実施した)。

## \*08. 酵母に見出したフラボタンパク質 Tah18 依存的な NO 合成とその制御機構

○吉川雄樹、那須野亮、渡辺大輔、高木博史  
(奈良先端大・バイオ)

### 【目的】

当研究室では、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、高温ストレスに  
応答してアルギニン依存的に一酸化窒素 (NO) が合成され、細胞のスト  
レス耐性に寄与すること、この NO 合成酵素 (NOS) 活性にフラボタンパク質  
の Tah18 が関与することを明らかにした。しかし、Tah18 には NOS 活性に  
必須のオキシゲナーゼドメインが欠落しており、NO 合成の詳細な機構は不  
明である。最近、Tah18 との相互作用が知られている Dre2 タンパク質が酵  
母の NOS 活性を阻害する可能性を見出した。

本研究では、これまでの知見から「非ストレス下では Dre2 は Tah18 と相  
互作用することで Tah18 依存的な NOS 活性を抑制しているが、ストレスに  
応答した Tah18-Dre2 複合体の解離によって遊離した Tah18 が NOS 活性に寄  
与する」という仮説を立て、酵母の新規ストレス応答的な NO 合成とその制  
御機構の解析を行った。

### 【方法・結果】

上記モデルの検証のため、Tah18 と Dre2 それぞれにタグを融合した共過  
剰発現株を作製し、プルダウン後のウェスタン解析により、高温や過酸化水  
素処理後の Tah18-Dre2 複合体の割合を非ストレス下のものと比較した。興  
味深いことに、高温や過酸化水素処理後 5 分で Tah18-Dre2 複合体の割合が  
低下した。また、過酸化水素処理 1 時間でその割合はさらに減少し、上記モ  
デルを支持する結果となった。

次に、TAH18 と DRE2 各遺伝子のノックダウン (KD) 株を作製し、表現  
型を解析した。その結果、両 KD 株は野生型株に比べ、顕著な生育遅延を示  
したが、DRE2 の KD 株においてのみ NOS 阻害剤 (NAME) の添加によって  
生育速度が回復した。現在、Tah18-Dre2 複合体の形成・解離を介した NOS  
活性の制御モデルを提唱しており、今回の結果から、ストレス下では遊離し  
た Tah18 依存的に細胞保護に必要なレベルの NO が合成されるが、非スト  
レス下では Dre2 が Tah18 に依存した NOS 活性を抑制することで、NO が過剰  
に合成されないよう制御していると考えられる。

## \*09. 脂質結合ドメインを用いた新規ホスファチジン酸可視化プローブの開発

○沖本航<sup>1</sup>、中井寛子<sup>1</sup>、伊藤俊樹<sup>2</sup>、上田修司<sup>1</sup>、山之上稔<sup>1</sup>、白井康仁<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大・バイオ)

【目的】 三大栄養素のひとつである脂質は膜の構成成分であるだけでなく、様々な酵素を活性化する脂質シグナルとして働くことが明らかになっている。この脂質シグナルは細胞内の様々なオルガネラ膜で産生され代謝されているため、その細胞内動態を可視化するため、脂質結合ドメインを用いた様々なプローブが近年開発されてきている。一方、ホスファチジン酸(PA)も mTOR や Raf-1 kinase などを活性化する重要な脂質シグナルと考えられるが、未だ PA を簡便に可視化するプローブは存在していない。そこで我々は局所的な PA 産生を可視化する新規プローブの開発を試みた。

【方法】 PA 可視化プローブとして PA 結合ペプチドである tapas に着目した。これを 1 連あるいは 3 連につなげ、N 末端側に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合させたプラスミドを作製した(GFP-tapas, GFP-tapas×3)。次に、細胞内での PA 応答性を確認するため、PA を産生する酵素である DGK $\alpha$  に赤色蛍光タンパク質(mCherry)を融合させたプラスミドと GFP-tapas あるいは GFP-tapas×3 を DDT1-MF2 細胞に共発現させ、DGK $\alpha$  を活性化するビタミン E 刺激でのライブイメージングを行った。さらに、DGK 阻害剤である R59949 を処置して同様の実験を行った。

【結果】 刺激前には GFP-tapas×3、mCherry-DGK $\alpha$  とともに細胞質に認められたが、DGK $\alpha$  がビタミン E 刺激によって活性化し細胞質から細胞質膜へとトランスロケーションするのに伴い、GFP-tapas×3 も細胞質膜へとトランスロケーションした。しかし、tapas が 1 連である GFP-tapas は膜へのトランスロケーションを示さなかった。DGK 阻害剤を処置すると GFP-tapas×3 のトランスロケーションは見られなくなった。このことから膜移行は DGK $\alpha$  による細胞質膜での PA 産生を反映しており、tapas を 3 連にすることで PA 応答性が上がったものと考えられた。また、GFP-tapas×3 のみを発現させた細胞においても、ビタミン E 刺激による細胞質膜へのトランスロケーションが弱いながら認められ、DGK 阻害剤の処置で阻害された。

以上のことから、GFP-tapas×3 は内在性の PA 産生を検出する可視化プローブとして有用であると期待される。

## \*10. 傷害によって誘導される(3Z):(2E)-ヘキセナールイソメラーゼの同定と 酵素学的性質の解明

○國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕  
(神戸大院・農)

【目的】 3-ヘキセナールと 2-ヘキセナールに代表される C6 化合物群は傷害を受けた植物において生成量が増加するオキシリピンであり、防御応答遺伝子の発現を誘導することが報告されている。3-ヘキセナールは、リノレン酸から酵素的に変換されることによって生じる。一方、分子内に  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基を持つため高い反応性を示す 2-ヘキセナールは、3-ヘキセナールの異性化によって生合成されると考えられているが、その詳細は未解明である。本研究は、2-ヘキセナールの生合成に関わるヘキセナールイソメラーゼの同定とその酵素学的性質の解明を目的としている。

【方法と結果】 さまざまな植物のヘキセナールイソメラーゼ活性を調べ、最も高い活性を示したパプリカ果実を材料として選抜した。パプリカ果実より活性を指標に酵素を精製し、分子量 38 kDa の単一のバンドを得た。キネティクス解析の結果、3-ヘキセナールに対する  $K_m$  値は 0.73 mM であった。部分アミノ酸配列を得て、それに基づいて酵素遺伝子を同定した。系統樹を作製し、相同性を示した遺伝子について組換え酵素を作製し活性を測定した結果、ナス科のトマトとジャガイモ由来の遺伝子も活性を有する酵素をコードしていることが明らかとなった。点変異を導入した組換え酵素を作製し酵素活性の評価を行った結果、54 番目のヒスチジンが重要であることが分かった。反応機構の解明のために、重水中で酵素反応を行い、得られた 2-ヘキセナールの  $^1\text{H-NMR}$  を測定した結果、4 位に重水素の導入が確認された。このことから、3-ヘキセナールへの水の付加と脱離によって、二重結合が移動していることが考えられた。ナス科のモデル植物であるトマトに対して傷害ストレスを与えることでヘキセナールイソメラーゼ遺伝子の発現量の増加が認められたことから、本酵素が傷害ストレスに対する防御応答に関与していることが支持された。

## \*11. アルファルファ根粒菌に見出されたイノシトール合成系に関する研究

○ 本窪田章博<sup>1</sup>、田中耕生<sup>2</sup>、竹中慎治<sup>1</sup>、Laurent Sauviac<sup>3</sup>、Claude Bruand<sup>3</sup>、  
吉田健一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大自科、<sup>3</sup>LIPM, INRA Toulouse, France)

【目的】 *Sinorhizobium meliloti* は、アルファルファに感染して窒素固定を行う根粒菌であり、植物-微生物共生窒素固定のモデル微生物として幅広く研究されている。我々は *S. meliloti* のゲノムにイノシトール-1-リン酸合成酵素をコードする *ino1* 遺伝子を見出し、また当該酵素がイノシトールモノフォスファターゼと共にイノシトール合成系を構成し得ることを明らかにした。そして、*ino1* 遺伝子が塩ストレス下において誘導されることが判明したため、本研究では *S. meliloti* におけるイノシトール合成系の生理的意義について浸透圧ストレス耐性への関与を検討した。

【方法】 *S. meliloti* の主要な浸透圧調整物質は trehalose、glycine betaine、および N-acetylglutaminylglutamine amide である。そこで、それぞれの合成に関わる *otsA* 遺伝子、*betB* 遺伝子、*ngg* 遺伝子と *ino1* 遺伝子を組み合わせ、破壊した変異株シリーズを作製し、浸透圧耐性を比較検討した。さらに上記の変異株シリーズにイノシトールの分解に関する *idhA* 遺伝子の破壊を加えることで、イノシトールが高度に蓄積し得る条件を人為的に作り出して検討した。また、これら一連の変異株についてアルファルファへの感染実験を行い、共生窒素固定に関して *ino1* 遺伝子が何らかの機能を果たすか否か可能性を調査した。

【結果】 上述のとおり作成した変異株シリーズには浸透圧耐性の低下が観察され、*ino1* 欠失の影響は他の3つの浸透圧調整物質が失われた時に最も顕著になった。また、イノシトール分解に関する *idhA* 遺伝子の破壊を加えると、イノシトール存在下で浸透圧耐性が向上する傾向が見られた。従って、イノシトール自体が浸透圧調整物質として機能している可能性と、このためにイノシトール合成系が機能を果たしている可能性が示唆された。一方驚いたことに、他の浸透圧調整物質の合成が不全になった場合に *ino1* 遺伝子のみが機能すると共生窒素固定に悪影響が観察されたので、その詳細についても検討を加えている。



# 2014 年度日本農芸化学会功績賞受賞講演

食品製造における速度過程が関与する現象の工学的解析

安達修二(京都大院・農)

# 食品製造における速度過程が関与する現象の工学的解析

安達修二  
(京都大院・農)

1. はじめに 着目する対象に対して有効な多くの手段を用いて、その理解の深化を図る研究手法が多い農芸化学分野の研究にあって、演者は物質や熱などの移動速度過程に関する移動現象論と化学反応の速度過程を定量的に扱う反応工学の考え方を、食品製造プロセスの効率化や製造過程で起こる現象の解明に適用する手法で、食品を安価で合理的に製造するための基礎的な研究を行ってきた。主な研究課題は、1) 連続クロマトグラフ装置の設計法の確立とバイオリクターとの融合による効率化、2) 亜臨界水の食品加工への利用に関する基礎的並びに応用的検討、3) 粉末化による脂質の酸化抑制機構の解明、4) パスタの乾燥および茹で過程における水の移動機構の解明、に大別できる。ここでは、1) と4) の課題について概説する。

2. 連続クロマトグラフ装置の設計法の確立と効率化 2成分を連続的に分離する擬似移動層型連続クロマトグラフ分離装置内における溶質濃度の分布を推算する二つのモデル(連続移動層モデルと間歇移動層モデル)を提案した。前者のモデルに基づいて、良好な分離が達成できるように各ゾーンの流速の範囲を合理的に決定する方法および各ゾーンの小カラムの寸法と本数を決定する方法(装置の設計法)を確立した。また、擬似移動層操作を採用する高果糖異性化糖の製造装置の一部に固定化グルコースイソメラーゼ反応器を組み込むことにより、分離工程で使用する溶離液の量を大幅に低減して溶質濃度の低下を抑えるとともに、目的成分であるフルクトースの回収率を高めて、濃縮工程の負担を軽減する省エネルギーなプロセスを提案した。

3. パスタ内における水の移動機構 生パスタを短時間に乾燥する条件の決定や茹でパスタの食感の制御には、パスタ内の水の移動機構を知ることが不可欠である。安価なデジタルカメラを用いて、パスタ内の水分分布を精確に求める方法を開発した。茹で過程におけるパスタ内の水分分布は、単純な水の拡散現象と捉える従来の考え方では説明できないことを示し、水分分布を合理的に説明する水の移動機構を提案した。

4. おわりに 課題解決型の研究スタイルであるが、工学的な手法を適用することにより、課題ごとに、新規な方法の開発や機構の解明につながる知見が得られ、ささやかながら大学に所属する研究者としての使命の一端が果たせたと各位に感謝する。食品科学を志望する若手研究者の皆様に、このような分野の面白さを感じていただければ幸いである。

謝辞 学生の頃から今日に至るまでご指導とご鞭撻いただきました松野隆一先生並びに中西一弘先生，工学分野に奉職する機会を与えていただきました橋本健治先生，演者が勤務した京都大学工学部化学工学科，新居浜工業高等専門学校工業化学科，静岡県立大学食品栄養科学部食品学科および京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻で研究をともにしたスタッフや卒業生並びに企業の皆さまに感謝いたします．また，多大なご支援をいただきました日本農芸化学会関西支部の皆さまに厚く御礼を申し上げます．

## 特別講演

ヘリコバクターピロリ感染と胃がん

東 健（神戸大院・医）

## ヘリコバクターピロリ感染と胃がん

○東 健<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・医)

1982年にヘリコバクターピロリが発見され、1994年にWHOより1群の発がん因子に認定され、現在では、胃がんは子宮頸がんと同じく感染症であることが明らかにされてきた。これまでに、ピロリ菌感染による分子メカニズムとして、ピロリ菌が胃粘膜上皮細胞に接着すると、ピロリ菌の4型分泌装置を介してがん蛋白と考えられているCagAがピロリ菌から上皮細胞内へと注入されることが明らかになった。そして、上皮内に注入されたCagAは、胃粘膜上皮細胞内でチロシンリン酸化を受け、細胞の分化や増殖に重要な役割を担う細胞質内脱リン酸化酵素SHP2と特異的に結合し、細胞の異常増殖に作用することが認められた。また、CagAのSHP2結合配列は東アジア株のCagAと欧米株のCagA間で異なり、東アジア株のCagAは欧米株のCagAに比べSHP2とより強く結合し、細胞内シグナル伝達系をより強く変化させることになり、東アジア型のCagAを有するピロリ菌の感染と胃がんとの間に有意な相関関係が認められた。したがって、CagAのリン酸化及び引き続いて生じるCagAとSHP2との結合によって生じる胃粘膜上皮細胞内でのシグナル伝達系の変化が胃発がん重要な役割を担っていると考えられる。

胃がんが感染症であるのであれば、胃がんは予防可能ながんと考えられる。これまでに、ヒトにおける介入試験について、エビデンスが次々と報告されてきている。日本からの報告では、胃潰瘍患者の除菌後8.6年の経過を観察したところ、5年後の胃がん発症のリスクは除菌成功群で2.00%、除菌不成功群の6.41%に比べ有意に胃がんの発症が抑制された。また、除菌による、早期胃がんの内視鏡的治療後の異時性二次発がんの抑制効果も認められた。以上の結果をもとに、我が国では、2013年2月に、ピロリ菌感染胃炎に対する除菌治療が保険適用になり、ほぼ全てのピロリ菌感染者が除菌対象となった。今後、胃がん撲滅を進める上に、ピロリ菌除菌を積極的に実施していくことが重要である。



## <お知らせ>

- 第 487 回支部参与会は、2014 年 12 月 6 日(土)12:00 より  
神戸大学大学院農学研究科 A 棟 3 階大会議室 にて開催いたします。
  - 懇親会を 17 :50 より神戸大学アカデミア館 3 階「さくら」にて  
開催します。奮ってご参加ください。一般:3000 円、学生:無料
  - 次回例会(488 回)予定  
日時:2015 年 1 月 31 日(土)  
会場:京都大学楽友会館  
講演申込締切:2015 年 1 月 6 日(火)  
講演要旨締切:2015 年 1 月 13 日(火)正午  
問い合わせ先:〒605-8502 京都市左京区北白川追分町  
京都大学大学院農学研究科  
由里本 博也  
Tel: 075-753-6387  
E-mail: yury@kais.kyoto-u.ac.jp
- 

日本農芸化学会関西支部

支部ホームページ <http://www.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内

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

2014 年 12 月 1 日 発行