



**日本農芸化学会関西支部
第490回講演会・ミニシンポジウム**



講演要旨集

**平成27年7月4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)

(株)三ツワフロンテック

サントリーホールディングス(株)

安井器械(株)

住友化学(株)

大和酵素(株)

(株)第一化成

理研化学工業(株)

大日本除虫菊(株)

和研薬(株)

宝酒造(株)

和光純薬工業(株)

プログラム

- ミニシンポジウム (13:00~15:05)
『植物代謝を自在に操る ~物質生産から防除まで~』
 - 1 「発芽種子中の代謝経路の理解による根寄生雑草防除への挑戦」 4
岡澤 敦司 (大阪府大院・生命環境)
 - 2 「植物免疫の化学的制御による病害防除法の開発」 6
能年 義輝 (岡山大院・環境生命)
 - 3 「有毒グリコアルカロイドから有用ステロイドサポニンへの植物代謝工学」 8
水谷 正治 (神戸大院・農)
- 一般講演 (15:20~16:35)
 - *1 S-エクオールによる膵 β 細胞の維持・増加作用とそのメカニズムの解明 14
○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)
 - *2 β -Caryophyllene による CB2 レセプターを介した肝細胞の脂肪蓄積抑制作用の解明 15
○上久保 綾祐¹, 甲斐 建次¹, 内藤 健太郎², 赤川 貢¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²(株)ディーエイチシー)
 - *3 キノキサリン誘導体の合成と香気評価 16
○今西 望愛¹, 園田 素啓¹, 谷森 紳治¹, 宮里 博成², 杉本 圭一郎²
(¹大阪府大院・生命環境, ²長岡香料・技開研)
 - *4 ユーグレナワックスエステル生産制御に向けた3-ケトアシルCoAチオラーゼの機能解明 17
○小山 啓一郎¹, 中澤 昌美^{1,2}, 安藤 博子¹, 渡辺 嘉³, 中井 猛夫³, 上田 光宏¹,
阪本 龍司¹, 乾 博⁴, 中野 長久^{1,5}, 宮武 和孝^{1,6} (¹大阪府大院・生命環境, ²JST CREST,
³大阪市工研, ⁴大阪府大院・総リハ, ⁵大阪女短大, ⁶帝塚山学院大・人間科)
 - *5 *Aspergillus aculeatus* 由来 β -glucosidase 1 のセロビオースに対する反応性の向上 18
○馬場 祐太郎, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司 (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)
農芸化学奨励賞受賞講演
『植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構に関する研究』 19
土反 伸和 (神戸薬科大)
- 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 2,000 円 (学生無料)

MEMO

13:00~15:05 多目的ホール

植物代謝を自在に操る ～物質生産から防除まで～

「発芽種子中の代謝経路の理解による根寄生雑草防除への挑戦」

岡澤 敦司（大阪府大院・生命環境）

「植物免疫の化学的制御による病害防除法の開発」

能年 義輝（岡山大院・環境生命）

「有毒グリコアルカロイドから有用ステロイドサポニンへの植物代謝工学」

水谷 正治（神戸大院・農）

発芽種子中の代謝経路の理解による根寄生雑草防除への挑戦

岡澤 敦司（大阪府大院・生命環境）

【目的】幸いなことに国内では被害がないため、あまり知られていないが、根寄生雑草による農業への被害は甚大である。依然、飢餓問題が解消されていないアフリカにおいて特にその被害が大きく、人道的かつ経済的な見地からその早急な解決が求められている。農業に被害を与えている根寄生雑草はハマウツボ科に属し、宿主に寄生しなければ生活環を全う出来ない絶対寄生植物である。これらの根寄生雑草は、発芽の際に外部からの発芽刺激物質を必要とするなど、寄生能に関連する特徴的な生育様式を持つ。その防除については、既存の除草剤を用いる方法や、宿主となる作物を植える前に、発芽刺激物質である合成ストリゴラクトンを農地に投与し、強制的に根寄生雑草の発芽を誘導することによって、根寄生雑草を枯死させる自殺発芽誘導などが試みられ、一定の成果を上げている。しかし、除草剤の使用では宿主の作物に対する葉害や、寄生の現場である土壌中での効率的な処理が難しいといった問題が指摘されており、自殺発芽誘導においても、近年ストリゴラクトンが、宿主と菌根菌間のシグナル物質であることや、植物の枝分かれや根系の発達を制御する植物ホルモンであることがわかったため、合成ストリゴラクトンの使用の際、生態系に与える影響を十分考慮に入れる必要があることが実用化の障壁となると予想される。そこで、本研究では根寄生雑草の発芽過程に着目し、選択的な防除法の確立のための標的となる代謝経路を見出すことを目的とした。

【方法】国内で入手可能な帰化植物であるヤセウツボ (*Orobanche minor*) を用いた。定法に従って、ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) を用いたメタボロミクスを行うことで、ヤセウツボの発芽過程で含有量に変化する代謝物に関する情報を得た。着目した代謝物で構造未知のものについて、単離精製した後、構造決定を行った。決定した構造をもとに代謝阻害剤を検討し、ヤセウツボの発芽を抑制するものを選抜した。この阻害剤を用い、着目する代謝物の代謝経路を生化学的に決定した。また、選抜した代謝阻害剤がヤセウツボ以外の植物種の生育に及ぼす影響を解析することで、この阻害剤の根寄生雑草に対する選択性について考察した。さらに、次世代シーケンサーを用いた *de novo* トランスクリプトーム解析によって、発芽に関わる遺伝子群について知見を得た。

【結果】ヤセウツボ種子中の親水性代謝物プロファイルの発芽過程における経時変化を解析し、含有量に変化する代謝物に関する情報を得た。その結果、構造未知の三糖が発芽の進行と共に減少していることが明らかとなった。ヤセウツボの乾燥種子よりこの三糖を単離精製し、構造決定を行うことで、これをプランテオース (α -D-ガラクトピラノシル-(1 \rightarrow 6)- β -D-フルクトフラノシル-(2 \rightarrow 1)- α -D-グルコピラノシド) と決定した。次に、いくつかの糖質加水分解酵素阻害を合成ストリゴラクトン GR24 と同時に投与したところ、ノジリマイシン (NJ) によってヤセウツボの発芽が顕著に阻害されることを見出した。また、NJ 投与時の種子中では、プランテオースが減少している一方で、スクロースが蓄積し、グルコースやフルクトースが減少していることが示された。さらに、GR24 と NJ の同時投与時にグルコースを加えると、ヤセウツボの発芽率が回復することが明らかとなった。これらの結果より、プランテオースの代謝経路を図のように予測した。この経路のうち、スクロースをグルコースとフルクトースに加水分解する酵素はインベルターゼとして知られている。そこで、発芽刺激処理後の種子より粗酵素を抽出し、そのインベルターゼ活性に対する NJ の影響を評価したところ、その活性は NJ によって阻害されなかった。一方、NJ で処理した種子中では、未処理の発芽種子において観察されるインベルターゼの活性化が起こっていないことが明らかとなった。即ち、NJ はインベルターゼの活性を直接阻害している訳ではなく、発芽種子中のインベルターゼの転写、翻訳、あるいは、翻訳後の活性化のいずれかの段階を阻害していると示唆された (図)。また、NJ の選択性についても評価を行い、その効果はハマウツボ科の根寄生雑草に特に顕著に表れることが確認出来た。発表では NJ の処理による遺伝子発現の変動についてトランスクリプトーム解析によって得られた知見に関する報告も報告する。

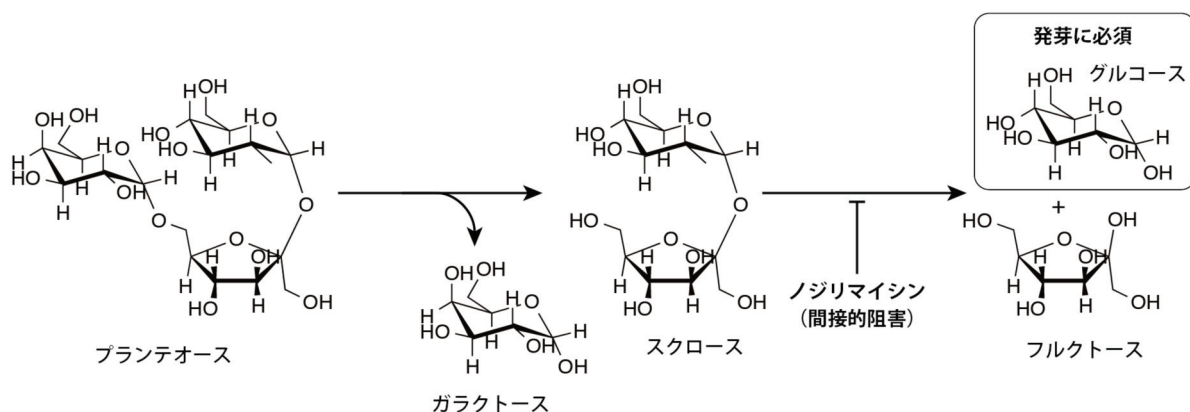


図. ヤセウツボ種子中のプランテオース代謝経路とノジリマイシンの作用

植物免疫の化学的制御による病害防除法の開発

能年 義輝（岡山大学院・環境生命）

【目的】植物病原体は宿主の自然免疫を抑制するためにエフェクターと呼ばれるタンパク質群を宿主細胞に放出する。植物はこれを抵抗性タンパク質によって感知し、耐病性を発揮する。この反応では植物免疫を司るホルモンであるサリチル酸 (SA) が合成される。そして感染細胞は過敏感細胞死を起こして病原体を封じ込めると共に、周辺では抗菌物質を蓄積して二次的感染に備える (図 1) (能年ら, 蛋白質核酸酵素 (2006) 51:408-18)。これは耐病性品種の育種に利用されてきた農業上の重要形質だが、その分子機構には未解明な点も多い。そこで我々は新たなアプローチとしてケミカルバイオロジーを導入した。これは解析対象となる生命現象をかく乱する生理活性物質やケミカルツールを用いることで、関連する遺伝子やタンパク質を同定する研究手法である。濃度やタイミングを変えて薬剤を作用させることで致死遺伝子の影響を解析でき、また同じ働きを持つタンパク質群の機能を同時にかく乱することにより機能重複性の遺伝子群を炙り出せる。つまり分子遺伝学的手法で見つかっていない新規遺伝子の発見に迫れる点や、得られた薬剤を他の生物種の研究や生物機能の人為的制御へと応用できる点が特徴である。

【方法】植物免疫をかく乱する薬剤を網羅的に探索できる系として、シロイヌナズナの培養細胞とその病原細菌（非親和性の斑葉細菌病菌）を 96 穴プレート上で感染させ、植物細胞が誘導する細胞死を指標として薬剤の影響を定量判定できる細胞ベースのハイスループットスクリーニング法を開発した (能年, 岡山大学農学部学術報告 (2014) 103:31-6)。薬剤のみを添加した反応を並行することにより、細胞死阻害剤、誘導剤、プライミング剤（感染時の細胞死を増強）を区別して同定できる点が特徴である。そして複数の化合物ライブラリーを探索し、多くの免疫かく乱剤を同定した。植物免疫を活性化する薬剤はプラントアクチベーターと呼ばれ、病害防除剤として実用されている。そこで免疫プライミング剤の特徴付けを行った。また、一部の薬剤の標的分子として SA 配糖化酵素 (SAGT) を見出したことから、酵素ベースのハイスループットスクリーニング系を新たに開発し、化合物ライブラリーの探索を行った。

【結果】多様性低分子有機化合物ライブラリー10,000 個の探索（終濃度 100 μ M）から

7 個の免疫プライミング剤が得られ、インプリマチンと名付けた。防御遺伝子発現誘導活性から、それらの作用点は SA の上流と下流に分類された (図 1)。薬剤の作用機序として SA 代謝阻害を予測し、既報の SAGT (UGT74F1) に対する影響から、A 群、B 群がこれを標的とすることを見出した (Noutoshi et al., PlantCell, 2012, 24, 3795-804; Noutoshi et al., Plant Sig.Behav., 2012, 7, 1526-8)。これらの SAGT 阻害剤はシロイヌナズナ培養細胞の病原細菌誘導性の細胞死を濃度依存的に活性化した。また、水耕栽培シロイヌナズナの根から投与すると非病原性の斑葉細菌病菌に加え、病原性菌に対する病害抵抗性誘導活性を示した。感染植物の SA と SA 配糖体の定量解析により、薬剤処理によって SA 配糖体の産生が抑制されることを確認した。我々は新たな SAGT として UGT76B1 を同定し、薬剤が両 SAGT を共に阻害することを確認した。また、反応速度論解析からこれらの薬剤は基質である SA と拮抗することがわかった。さらに、SAGT 欠損シロイヌナズナ変異体は病害抵抗性が向上し、薬剤作用を模倣する表現型を示したことから、本剤の作用機序が支持された。以上の研究から、病害感染時に働く SA 代謝酵素が同定され、その免疫応答における重要性が明らかになった。また、SA 代謝阻害が免疫プライミング作用の発現に有効であることが示された。

次にさらに強力な SAGT 阻害剤の単離を目指し、標的ベース探索法を確立した (谷川ら, 平成 26 年度日本植物病理学会関西支部会)。配糖化反応で生成する UDP を蛍光物質に変換して間接的に酵素活性を定量検出する手法を用いた (Kumagai et al., AnalBiochem, 2014, 447, 146-55)。大腸菌で発現精製した UGT76B1 を用い、384 プレートでの酵素反応における S/B 比、CV 値、Z'値が基準をクリアするよう反応条件を最適化した。そして東京大学創薬機構のコアライブラリー9,600 個 (終濃度 10 μ M) の探索から 63 個の 1 次ヒットを得た。次に HPLC を用いた 2 次スクリーニングを行い、SAGT 活性を 40%以上阻害する 3 つの薬剤を同定した。これらの二次ヒットはシロイヌナズナの両 SAGT の活性を阻害したが、細胞ベースアッセイでは 2 つの薬剤のみが濃度依存的な細胞死の活性化を示した。これらをミナトカモジグサ-紋枯病感染系で評価したところ 1 つの薬剤が抵抗性誘導活性を示した (能年ら, 日本ケミカルバイオロジー学会第 10 回年会)。

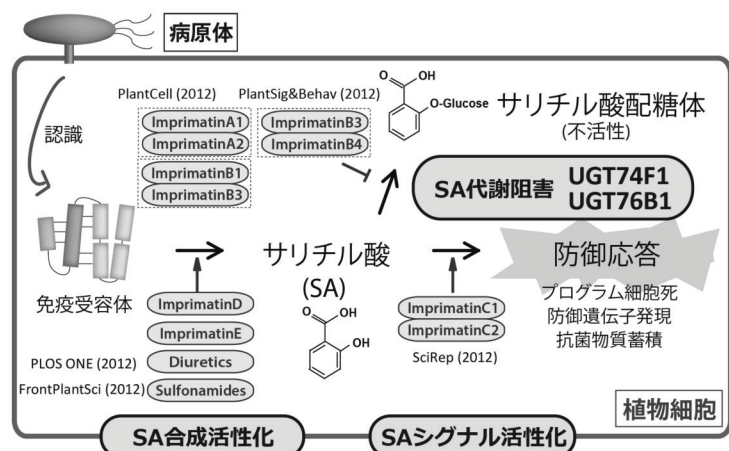


図 1. 植物の免疫応答と植物免疫プライミング剤の作用点

有毒グリコアルカロイドから有用ステロイドサポニンへの 植物代謝工学

水谷 正治 (神戸大院・応用生命化学)

植物は膨大な数の生物活性物質を生合成する能力を有しており、植物由来の生物活性物質は医薬や漢方およびその原料として多数利用されている。それらの多くは希少な植物種にしか存在せず含有量も少ないため、様々な研究グループが生合成遺伝子群の解明と微生物発現系を利用した微生物代謝工学を進めている。例えば、抗がん剤であるタキソールの大腸菌発現系による大量生産の試みや抗マラリヤ剤であるアルテミシニンの酵母発現系による大量生産系の確立などの成功例が報告されている。一方、植物個体あるいは植物組織培養を利用した植物代謝工学による有用物質生産の最大の利点は、必要となる生合成マシナリー（生合成酵素や輸送蓄積系）のほとんどは既に植物細胞内に整っている点である。さらに、植物発現系は太陽エネルギーと CO₂ を利用して物質生産を行う光合成機能をそのまま有用化合物の生産に結びつけることができる点で非常に優れている。しかし、植物を有用物質生産の場とする植物代謝工学の実用化は未だ発展途上である。本講演では、ナス科植物であるジャガイモを「有用物質生産の場」として利用する植物代謝工学に関する我々の取り組みを紹介する。ジャガイモには有毒ステロイドグリコアルカロイドである α -ソラニンが蓄積している。一方、ヤマノイモ属のヤマイモには医薬用ステロイドの合成原料となる有用ステロイドサポニンであるジオシンが蓄積している。そこで、ジャガイモの α -ソラニン生合成能を有用サポニン生合成能へ「代謝スイッチング」させる植物代謝工学について、これまでの研究経過を以下に紹介する。

ステロイドの3位水酸基に複数の糖が結合したステロイドサポニンは界面活性作用を有し、様々な生物活性を示す天然生理活性物質である。単子葉ヤマノイモ属 (*Dioscorea*) のヤマイモはサポゲニン (アグリコン) としてジオスゲニンを持つジオシンを多量に蓄積しており、医薬用ステロイド合成中間体の供給源として利用されている。一方、双子葉ナス属 (*Solanum*) のトマトやジャガイモは毒性を示すステロイドグリコアルカロイドである α -トマチンや α -ソラニンをそれぞれ多量に蓄積している。同位体標識化合物による研究から、これらサポニンは植物体内生のコレステロールに由来し、C-16, 22, 26 位への酸素添加、その過程での E 環 F 環形成、C-3 位水酸基

への糖転移などの反応を経て生合成されると推定されている。しかし、生合成経路および生合成に関わる酵素遺伝子についての詳細は不明である。本発表では、ヤマノイモ属およびナス属のステロイドサポニン生合成に関わる酸素添加酵素としてシトクロム P450 および 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (2OGD) の同定と機能解析の研究成果を解説する。さらに、ジャガイモのソラニン生合成遺伝子を RNA 干渉法により発現抑制した結果、有毒グリコアルカロイドを有用ステロイドサポニンへ「代謝スイッチング」することに成功した。現在、ジャガイモやトマトを利用して有用ステロイドサポニン生合成能をさらに増強する植物代謝工学を進めている。

本講演の研究成果は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業（シーズ創出ステージおよび発展融合ステージ）の「作物における有用サポニン産生制御技術の開発」の助成によるものであり、阪大院工・村中俊哉教授、キリン・梅基直行博士（現・理研）、東工大・大山清助教（現・JT）、千葉大薬・斉藤和希教授の各研究グループとの共同研究の成果である。

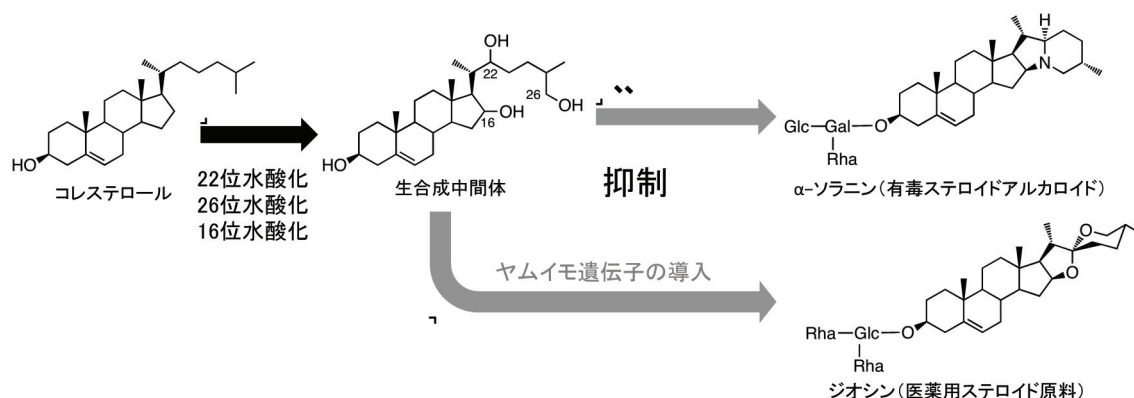


図 ジャガイモにおける有毒ステロイドから有用ステロイドへの代謝スイッチング

● 演者プロフィール

名前：岡澤 敦司 (Atsushi Okazawa)

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: okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp

略歴：

1993年3月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業

1995年3月 京都大学大学院 農学研究科 修士課程修了

1997年5月 京都大学大学院 農学研究科 博士課程中退

1997年6月 大阪大学 工学部 助手

1998年11月 博士（農学）取得 [京都大学]

2012年4月 大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 准教授

現在に至る

主な研究テーマ：代謝分析に基づく新しい寄生雑草防除法の開発，植物工場での物質生産を視野に入れたリグナン類の代謝工学

今後の展望：これまでに明らかにした寄生雑草選択的な発芽阻害の分子機構を明らかにし，実用化研究を展開したい。

名前：能年 義輝 (Yoshiteru Noutoshi)

連絡先：〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 1-1-1

岡山大学 大学院環境生命科学研究科 農生命科学専攻

E-mail address: noutoshi@okayama-u.ac.jp

略歴：

1995年3月 広島大学 工学部 第3類(化学系) 発酵工学課程 卒業

1997年3月 広島大学 大学院工学研究科 工業化学専攻 博士前期課程 修了

1997年4月 日本学術振興会 特別研究員 DC1 (山田隆教授)

1999年3月 広島大学 大学院工学研究科 工業化学専攻 博士後期課程 修了

1999年3月 博士（工学）取得 [広島大学]

1999年4月 日本学術振興会 特別研究員 PD (山田隆教授)

2000年4月 理化学研究所 基礎科学特別研究員 (篠崎一雄主任研究員)

2003年4月 理化学研究所 協力研究員（篠崎一雄主任研究員）
2005年1月 The Sainsbury Laboratory, Research Scientist (Dr. Ken Shirasu Lab.)
2006年4月 理化学研究所 植物科学研究センター 研究員（白須賢 GD）
2009年1月 岡山大学 異分野融合先端研究コア 助教(特任)
2013年4月 岡山大学 大学院環境生命科学研究科 准教授
現在に至る

主な研究テーマ：ケミカルバイオロジーによる植物免疫機構の解明と病害防除への
応用展開

今後の展望：植物免疫の基礎と応用を研究し、防除技術のシーズ発掘と社会実装を
目指す。また、それらの研究活動を通じ、現場で活躍できる人材を養成
したい。

名前：水谷 正治 (Masaharu Mizutani)

連絡先：〒657-8501 神戸市灘区六甲台町1-1

神戸大学大学院農学研究科生命機能科学専攻 植物機能化学教育研究分野

E-mail address: mizutani@gold.kobe-u.ac.jp

略歴：

1989年3月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業
1991年3月 京都大学大学院 農学研究科 修士課程修了
1991年4月 日本チバガイギー株式会社 国際科学研究所 研究員
1996年4月 ノバルティスファーマ株式会社 宝塚研究所 研究員
1997年9月 博士（農学）取得 [京都大学]
1998年9月 京都大学化学研究所生体触媒化学研究室 助手
2009年1月 神戸大学大学院農学研究科 准教授
現在に至る

主な研究テーマ：① 植物生理活性物質の生合成系の解明
② 植物の酸素添加酵素（P450 および 20GD）の解析と応用
③ 植物代謝工学による有用物質生産系の構築

今後の展望：① 植物における生理活性物質の構造および生理機能の多様性を、
生合成酵素の分子進化から考察する。
② 植物由来有用酵素を用いた代謝工学、特に、植物を有用物質生産
の場とする植物代謝工学の実用化を目指す。

MEMO

●●● 一般講演 ●●●

15:20~16:35 多目的ホール

(講演時間 11 分、質疑応答 3 分)

- *1 S-エクオールによる膵β細胞の維持・増加作用とそのメカニズムの解明
○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)
- *2 β-Caryophyllene による CB2 レセプターを介した肝細胞の脂肪蓄積抑制作用の解明
○上久保 綾祐¹, 甲斐 建次¹, 内藤 健太郎², 赤川 貢¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²(株)ディーエイチシー)
- *3 キノキサリン誘導体の合成と香気評価
○今西 望愛¹, 園田 素啓¹, 谷森 紳治¹, 宮里 博成², 杉本 圭一郎²
(¹大阪府大院・生命環境, ²長岡香料・技開研)
- *4 ユーグレナワックスエステル生産制御に向けた3-ケトアシルCoAチオラーゼの機能解明
○小山 啓一郎¹, 中澤 昌美^{1,2}, 安藤 博子¹, 渡辺 嘉³, 中井 猛夫³, 上田 光宏¹, 阪本 龍司¹, 乾 博⁴, 中野 長久^{1,5}, 宮武 和孝^{1,6}
(¹大阪府大院・生命環境, ²JST CREST, ³大阪市工研, ⁴大阪府大院・総リハ, ⁵大阪女短大, ⁶帝塚山学院大・人間科)
- *5 *Aspergillus aculeatus* 由来 β-glucosidase 1 のセロビオースに対する反応性の向上
○馬場 祐太郎, 炭谷 順一, 谷 修治, 川口 剛司 (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

S-エクオールによる膵β細胞の維持・増加作用とそのメカニズムの 解明

○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・生命環境・応用生命，²大阪府大・地域連携，³大阪府大・総リハ)

【目的】膵β細胞量やインスリン分泌能の低下は、インスリン分泌不全を引き起こし、2型糖尿病の発症や進行の原因となる。膵β細胞において、cyclic AMP/protein kinase A (cAMP/PKA) シグナルの活性化は細胞量の維持・促進に寄与し、グルコース応答性インスリン分泌を亢進する。我々はこれまでに、大豆イソフラボンであるダイゼインの腸内細菌代謝物 S-エクオールが cAMP/PKA シグナルを活性化して、膵β細胞においてグルコース応答性のインスリン分泌を促進することを報告した。本研究では、膵β細胞の細胞死および増殖に及ぼす S-エクオールの作用と S-エクオールによる cAMP/PKA シグナルの活性化機構について検討を行った。

【方法・結果】ラット膵β細胞由来 INS-1 細胞において、S-エクオールはエナンチオ選択的かつ濃度依存的に細胞増殖を促進し、アロキサンによる酸化ストレス誘導性の細胞死を減少させた。これらの作用は前駆体のダイゼインより強力であり、PKA 阻害剤である H89 によって抑制された。S-エクオールの cAMP/PKA シグナルの活性化機構を検討するために、INS-1 細胞の細胞膜画分およびサイトゾル画分での cAMP 産生量を測定した結果、細胞膜画分において S-エクオール (10 μM) は cAMP の産生を促進したが、サイトゾル画分ではその作用は見られなかった。S-エクオールの cAMP 応答配列 (CRE) を介した転写活性の上昇は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼの阻害剤によって抑制された。一方で、細胞膜画分において 10 μM の S-エクオールはホスホジエステラーゼの活性に影響を与えず、高濃度 (100 μM) ではホスホジエステラーゼ活性を阻害したものの、その作用は R-エクオールと同程度であった。さらに、三量体 G タンパク質の Gas サブユニットに結合し、その GTPase 活性を阻害することで恒常的に Gas を活性化させるコレラ毒素を用いて CRE レポーターアッセイを行った。その結果、アデニル酸シクラーゼを直接活性化するフォルスコリンとコレラ毒素存在下では、CRE を介した転写活性は相加的に上昇したが、S-エクオールとコレラ毒素存在下では、CRE を介した転写活性は相乗的に増加した。以上の結果から、S-エクオールは細胞膜に局在する G タンパク質共役受容体に作用して cAMP/PKA シグナルを活性化することで、膵β細胞量の維持・増加作用を示すと推測された。

β-Caryophyllene による CB2 レセプターを介した肝細胞の脂肪蓄積抑制作用の解明

○ 上久保 綾祐¹, 甲斐 建次¹, 内藤 健太郎², 赤川 貢¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²(株) ディーエイチシー)

【目的】生活習慣病患者数の増加にともない、非アルコール性脂肪肝疾患 (NAFLD) と呼ばれるアルコール常飲歴のない脂肪肝患者が世界的に急増している。NAFLD は非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) や肝硬変、肝臓へと悪化する可能性があるにもかかわらず、有効な治療法は見出されていない。そこで本研究では、古くから薬草や生薬としても用いられてきた香辛料に着目し、肝細胞の脂肪蓄積を抑制し、NAFLD の予防・改善に繋がるような成分の探索を行った。また、同定された活性成分の作用機構の解明を試みた。

【方法】香辛料 DMSO 抽出液を添加したパルミチン酸含有培地でヒト肝由来 HepG2 細胞を培養後、蓄積した脂肪を Oil Red O で染色し、その定量を行った。また、肝細胞内で脂質代謝を司るタンパク質である AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化レベル、及び AMPK によるリン酸化で不活性化される脂肪酸合成の律速酵素である acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1) のリン酸化レベルをウェスタンブロット法により評価した。さらに、リパーゼの発現を促進する転写因子 FoxO1 と脂質合成を促進する SREBP-1c の細胞内局在を免疫蛍光染色法によって観察した。

【結果】香辛料抽出液をスクリーニングした結果、インドネシア原産でフトモモ科のクローブ (*Syzygium aromaticum*) 抽出液において、顕著な脂肪蓄積量の減少と、AMPK 及び ACC1 のリン酸化が確認された。そこで、活性成分の特定を試みた結果、GC/MS 及び ¹H-NMR 解析によって、主活性成分はカンナビノイドの一種である β-caryophyllene であると同定された。β-Caryophyllene は、濃度依存的に脂肪蓄積を抑制し、AMPK 及び ACC1 のリン酸化を促進した。さらに、活性化された AMPK が下流の転写因子をリン酸化することによって FoxO1 の核内移行を促進し、SREBP-1c の核内移行を阻害した。また、その作用機構として β-caryophyllene が HepG2 細胞の cannabinoid type 2 (CB2) レセプターに結合し、AMPK キナーゼである Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase kinase β (CaMKKβ) の活性化を誘導する経路が推定された。以上の結果から、クローブ及び β-caryophyllene は、NAFLD の予防・改善に有効である可能性が示された。

キノキサリン誘導体の合成と香気評価

○今西望愛¹, 園田素啓¹, 谷森紳治¹, 宮里博成², 杉本圭一郎²
(¹大阪府大院・生命環境, ²長岡香料・技開研)

【目的】キノキサリン誘導体は医薬品や農薬、香料等の開発において、きわめて重要な化合物群の一つである。例えば、5-メチルキノキサリン (Figure 1) は、コーヒーやローストアーモンド等に含まれるナッツ様ロースト香をもち、香料として多用されている。しかし、その誘導体の香気特性についての報告は見当たらない。そこで本研究では、様々な置換基を有するキノキサリン誘導体を合成してライブラリー構築を行うと共に、それらの香気特性を調べ、機能性香料をはじめとした様々な分野への応用研究に繋げることを目的とした。

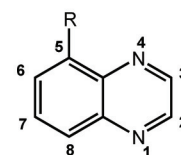
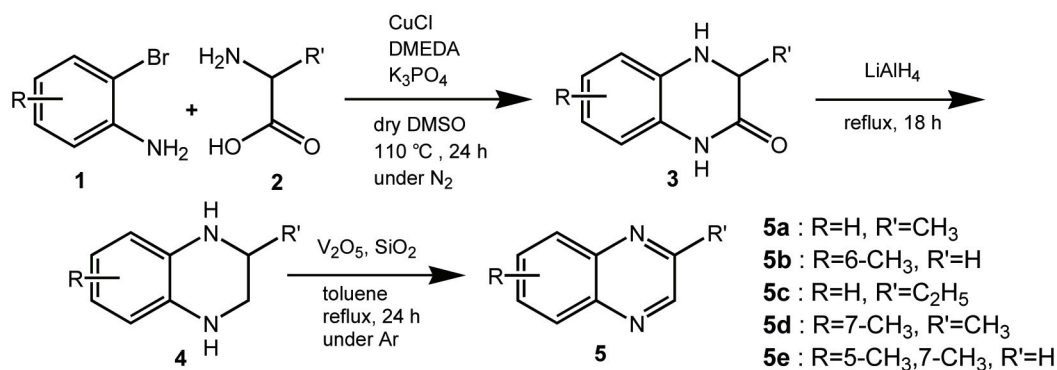


Figure 1.
R = H : キノキサリン
R = CH₃ : 5-メチルキノキサリン

【方法・結果】キノキサリン誘導体の合成にあたり、銅触媒を利用した2-ブロモアニリン **1** とアミノ酸 **2** とのカップリングによるキノキサリノン **3** の生成、**3** のカルボニル基の水素化アルミニウムリチウム還元によるテトラヒドロキノキサリン **4** への変換、および五酸化バナジウムによる脱水素、の三段階による簡便な方法を開発した。この方法により、置換基の種類、および置換基の位置の異なるキノキサリン誘導体 (**5a~5e**) を良好な収率で合成することができた。



また、香気特性については、**5a** はナッツやエビ、コーヒー、醤油のような香り、**5b** はクッキーやヘーゼルナッツ、杏仁豆腐のような香り、**5c** は冷涼感のある香り、**5d** は煙、肉、脂肪のような香り、**5e** は煙、薬品様の香りがあると評価された。これらの結果から、**5a** や **5b** のようなメチル基を導入したキノキサリン誘導体が食品香料としてより望ましい香気特性を示すものと考えられた。

ユーグレナワックスエステル生産制御に向けた 3-ケトアシル CoA チオラーゼの機能解明

○小山啓一郎¹、中澤昌美^{1,2}、安藤博子¹、渡辺 嘉³、中井猛夫³、上田光宏¹、
阪本龍司¹、乾 博⁴、中野長久^{1,5}、宮武和孝^{1,6}
(¹ 阪府大院・生命、² JST CREST、³ 阪市工研、⁴ 阪府大院・総リハ、
⁵ 大阪女短大、⁶ 帝塚山学院大・人間科)

【目的】ユーグレナは、低酸素下でミトコンドリア脂肪酸 β 酸化の逆行経路を経由してワックスエステル (WE) を産生し、細胞内に貯蔵する。WEは脂肪酸 (FA) と脂肪アルコール (FA1c) から構成されており、WE由来バイオディーゼル燃料は車輛用燃料やジェット燃料としての利用が期待されている。実用化に向けた研究開発が進められる中で、WE生産能力の増強や、用途に合った性質を持つWEの生産が望まれている。本研究では、未解明な点が多いユーグレナのWE代謝を解析し、代謝制御することによって、人為的にWE生産を改変するための研究に取り組んだ。

【方法・結果】ユーグレナミトコンドリア脂肪酸合成系の中で、脂肪酸伸長反応を触媒する3-ケトアシルCoAチオラーゼ (KAT) に着目した。まず、ESTデータベース解析を行い、6種類のKATアイソザイム (KAT1~6) を見出した。次に、RNA干渉による各KAT遺伝子の発現抑制を行った。KAT3の発現を抑制すると、ユーグレナが産生するWE量がコントロールと比べ約25%にまで低下した。このことから、KAT3が触媒する反応がWE合成における律速反応の1つである可能性が示された。一方、KAT1もしくはKAT2の発現を抑制すると、産生するWE総量は変化しなかったが、WE組成が低分子化した。KAT1発現抑制細胞が産生するWE組成を詳細に調べた結果、通常ユーグレナ由来WEが炭素長14のFA・FA1cを主成分とすることに対して、炭素長12~13のFA・FA1cが占める割合が大きく増加していた。最後に、低分子化WE由来バイオディーゼル燃料の熱特性を調べた。KAT1発現抑制細胞におけるWE組成に基づいて、FA1cとFAメチルエステルを混合したモデル燃料を調製し、示差走査熱量計 (DSC) により測定した。その結果、通常ユーグレナでの組成に基づいて調製したものと比較して、凝固点が8°C低下して13°Cに、融点が12°C低下して-38°Cになっており、低温での流動性が向上した。

【まとめと展望】本研究では、WE合成過程において機能するKATを特定すると同時に、その機能を制御することによって、世界で初めてWEの組成を人為的に改変することに成功した。今後さらにWE合成機構の解析を進め、適切にWE合成を制御することにより、目的に応じた特性のバイオ燃料を生産する技術につながることを期待できる。

Aspergillus aculeatus 由来 β -glucosidase 1 のセロビオースに対する反応性の向上

○馬場祐太郎, 炭谷順一, 谷修治, 川口剛司 (大阪府大院・生命環境)

【目的】*A. aculeatus* 由来 GH3 β -glucosidase 1 (AaBGL1) はセロオリゴ糖に対する加水分解活性が高く, 糖転移産物も蓄積しないことから *Trichoderma reesei* のセロビオハイドrolラーゼの主要な分解産物であるセロビオース (C2) によるセルラーゼの生成物阻害を緩和するために重要な酵素である。しかし AaBGL1 の触媒効率は C2 < ゲンチオビオース (G2) < ラミナリビオース (L2) の順で高くなり, 目的とする C2 よりも G2 や L2 に対する k_{cat}/K_m が更に高いことが明らかとなっている。そこで本研究ではセルロース性バイオマスの更なる糖化効率改善に貢献するために AaBGL1 の基質特異性を改変し, C2 に対する k_{cat}/K_m を更に向上させることを目的とした。

【方法と結果】種々の β -グルコオリゴ糖に対して加水分解活性を有する AaBGL1 において C2 の認識に関与しているのは, 非還元末端側から 2 糖目が結合する +1 サブサイトであることが予測された。そこで既に決定された立体構造情報を元にして +1 サブサイトを構成すると予想された 9 アミノ酸それぞれに対して site-saturation mutagenesis により変異を導入し, *S. cerevisiae* を宿主として変異ライブラリを作製した。形質転換体の培養上清を用いて野生型 AaBGL1 (WT) よりも C2 に対する活性が上昇したものを候補酵素として選抜した。合計 4860 株をスクリーニングした結果, 4 つの候補酵素を得た。置換後のアミノ酸を同定した結果, 全ての変異酵素が Q201E の変異を有していた。*A. oryzae* を宿主としたタンパク質生産系を用いて精製した Q201E は C2 に対する k_{cat}/K_m が 2.7 倍上昇していた。 β -グルコオリゴ糖に対するカイネティクス解析と C2 加水分解の pH プロファイルの解析結果から, Q201E は G2 や L2 に対する k_{cat} を低下させる代わりにセロオリゴ糖に対する k_{cat} を増加させる変異であることを明らかにし, そのような k_{cat} の変化には E201 の解離していないカルボキシ基が関与していることが示唆された。また 9 種類の Q201 変異酵素の C2, G2, L2 に対する反応性を調べた結果, C2 に対する反応性を増加させたのは Q201E のみであった。他の変異酵素は C2, G2, L2 の全ての基質に対しておよそ同等の割合で k_{cat} を低下させたことから, Q201 は触媒反応に関与するアミノ酸残基であることが示唆された。現在は Q201E のセルロース性バイオマスの酵素糖化における添加効果を解析している。

●●● 特別講演 ●●●

16:50~17:20 多目的ホール

農芸化学奨励賞受賞講演

『植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構
に関する研究』

士反 伸和 (神戸薬科大)

植物二次代謝生産における自己耐性と輸送の分子機構に関する研究

士反 伸和 (神戸薬科大学・生薬化学)

【目的】植物は環境に応答するため、さまざまな二次代謝産物を生産し、その数は20万種類を超える。それらの多くは高い生理活性を有し、化粧品や医薬品原料としても用いられてきた。そこで、その安定かつ大量な供給を目的に、生合成酵素や遺伝子の研究が数多くされてきたが、大量生産に成功した例は多くはない。演者は、植物における安定生産には生合成のみならず、生産産物の生理活性への自己耐性、細胞質からの輸送体による隔離、の2つが協調することが重要であるとの視点を持ち、薬用植物を中心に研究を進めた。実際に、耐性に関わる分子を同定するとともに、内在性アルカロイド輸送体を初めて同定し輸送蓄積機構を解明するなど、二次代謝産物の生産機構を解明してきた。各研究成果の概略を、以下に記す。

【結果】

1. 自らが生産する二次代謝産物に対する自己耐性機構

植物は自らが生産する二次代謝産物の高い生理活性に対し、独自の耐性機構を有している。耐性に関わる分子の同定を目的とした機能スクリーニングとして、マメ科植物クララのcDNAライブラリーを出芽酵母に導入し、クララの主要プレニル化フラボノイドであるソフォラフラバノンG (SFG) を含有する培地で生育してくる菌から耐性付与遺伝子を単離した。得られた遺伝子 *SfRPT2* はプロテアソーム構成因子であり、本タンパク質が SFG に耐性を付与することを明らかとした。アミノ酸相同性の高いシロイヌナズナ *AtRPT2* では SFG 耐性を付与しないことから、*SfRPT2* による耐性はクララが独自に獲得してきたことが示唆された。またキンポウゲ科オウレンも、自ら生産するベルベリンアルカロイドに耐性を示すが、同様の機能スクリーニングにより、ガラクチノール合成酵素 (*CjGolS*) が耐性を付与することを明らかとした。これら研究は、自ら生産する生理活性物質への耐性に関わる分子実体を同定できたものであり、またプロテアソームに二次代謝産物への耐性付与という新たな機能があるという知見を提供した。

2. 植物二次代謝産物の輸送機構の解析

植物は二次代謝産物を生産後、最終的に薬用部位など蓄積器官の細胞の液胞などに蓄積するか、細胞外 (土壤中など) に排出する。この膜輸送による二次代謝産物の隔離または排出は、生産した化合物の細胞毒性から自らの身を守る毒性回避機構の一つ

であり、また、虫や微生物などへの防御など環境適応に重要な役割を果たす。演者は、生化学的ならびに分子細胞生物学的にその輸送機構の解明に取り組んだ。

第一に、薬用植物オウレンにおけるベルベリン輸送を解析した。オウレン培養細胞は、ベルベリンを生産して液胞に蓄積するとともに、培地に添加したベルベリンも積極的に細胞内に吸収するが、この細胞膜での取り込みに ABCB1/MDR (multidrug resistance) 型の ABC (ATP-binding cassette) 輸送体が働くことを明らかとした。さらに、オウレンの ABCB1/MDR 輸送体遺伝子 *Cjabcb1/Cjmdr1*、*Cjabcb2* を単離し、アフリカツメガエルの卵母細胞や出芽酵母を用いた機能解析により、ベルベリン取り込み活性を証明した。両分子は、オウレン植物体のベルベリン蓄積部位である根茎の道管付近の細胞に発現していた。以上の結果を総合して、オウレンにおいてベルベリンが根から根茎へと転流される際、根茎の道管付近の細胞の細胞膜上で発現する CjABCB1 および 2 がベルベリンを積極的に細胞内に取り込むことで、根茎へのベルベリン高蓄積に働いていると考えられた。以上の結果は、植物における二次代謝産物の転流に対する輸送体の関与を明らかとするとともに、その分子実体を初めて同定したものであり、二次代謝産物の輸送蓄積機構に関する基礎的知見の発展に大きく貢献できたと考えている。

第二に、虫害耐性に関わる輸送体の解析を行った。タバコにおいてニコチンは、根において生合成され、その後、道管を介して地上部へと転流され、最終的に葉の液胞に高濃度で蓄積される。ニコチンは昆虫などに対して神経毒として働くため、その蓄積は虫害耐性などにおいて重要な役割を果たす。そこで、ニコチンの転流や蓄積に関わる輸送体の探索を行った。タバコ培養細胞のトランスクリプトーム解析からニコチン輸送体候補として複数の MATE (multidrug and toxic compound extrusion) 型輸送体を同定し解析したところ、JAT1 (jasmonate-inducible alkaloid transporter1) と名付けた MATE の 1 種は根・茎・葉において、JAT2 は葉に特異的に発現し、これらが根から転流されてきたニコチンを葉の液胞内に輸送することでニコチン転流および液胞への高蓄積に関わることを明らかとした (図 1)。さらに、出芽酵母を用いた輸送解析から、根で発現する MATE1/2 が液胞内にニコチンを輸送すること、根の細胞膜で発現する PUP (purine uptake permease) 型輸送体 NUP1 がニコチン取り込み活性を有することも明らかとした。これらは、発現する組織や細胞内局在の異なる複数の輸送体が協調して単一分子の輸送転流に働くことで、植物の虫害耐性に関わることを示した初めての報告であり、輸送体を介した植物の環境応答の理解に大きく貢献することができた。

おわりに

これら一連の研究から、二次代謝の安定生産に不可欠な「耐性」と「輸送」のメカニズムについて、多くの基礎的知見が得られた。近年では、これら成果を一つの礎として、二次代謝産物の輸送研究もさらに進められており、二次代謝生産の研究領域の拡大にも繋がっている。またこれら耐性や輸送の研究成果は、合成生物学において微生物に生合成酵素とともに耐性・輸送体の分子実体を導入し、耐性や細胞外への排出などを付与することで、効率的な安定生産という応用的側面へと繋がることも期待される。今後さらに実用的な物質生産を目指し研究を進めることで、基礎から応用に渡る農芸化学の研究分野に貢献していきたい。

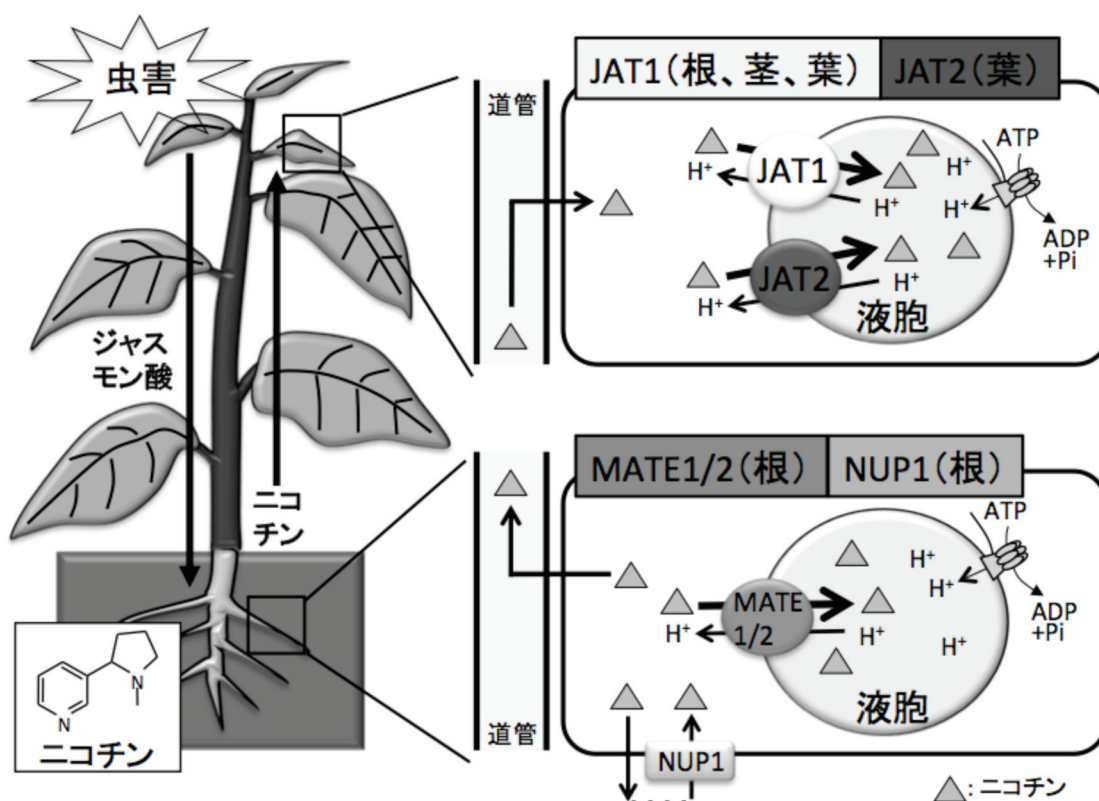


図1 タバコにおけるニコチン転流と虫害耐性モデル

タバコ植物は根でニコチンを生合成し、地上部へと転流させ、葉に蓄積させて昆虫への防御に用いる。その過程では様々な輸送体が組織発現や膜局在を別にしながら機能しており、根においては MATE1/2 が液胞への蓄積、NUP1 が細胞膜での取り込みに働く。一方、道管を介して地上部へと運ばれたニコチンは、JAT1、JAT2 の2分子が葉の液胞中に輸送させることで、葉での高蓄積と虫害応答に働いている。

● プロフィール

名前：土反 伸和 (Nobukazu Shitan)

連絡先：〒658-8558 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1

神戸薬科大学 生薬化学研究室

E-mail address: shitan@kobepharma-u.ac.jp

略歴：

1998年3月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業
2000年3月 京都大学大学院 農学研究科 修士課程修了
2003年3月 京都大学大学院 農学研究科 博士課程修了 博士（農学）
2003年4月 京都大学 木質科学研究所 研究支援推進員
2004年4月 京都大学 生存圏研究所（日本学術振興会 特別研究員）
2007年4月 京都大学 生存圏研究所 特任助教（産学連携研究員）
2009年4月 神戸薬科大学 生薬化学研究室 助教
2012年4月 神戸薬科大学 生薬化学研究室 講師
2014年4月 神戸薬科大学 生薬化学研究室 准教授
現在に至る

主な研究テーマ：植物が二次代謝産物を生産する際の耐性と輸送機構の解析

今後の展望：植物における二次代謝産物の輸送体を数多く単離解析し、輸送方向や基質認識のメカニズムを解明することで、微生物などを用いた有用物質生産へと繋げていきたい。

MEMO

MEMO

次回のお知らせ

2015 年度日本農芸化学会中部支部・関西支部合同大会 (第 491 回講演会)

日時：平成 27 年 9 月 19 日（土）～ 20 日（日）

会場：富山県立大学

プログラム（予定）

第 1 日目

- ・ 支部参加会（11:30 – 13:00）
- ・ シンポジウム（13:05 – 15:10）
- ・ 特別講演（15:25 – 17:00）
- ・ 懇親会（17:30 – 19:30）

第 2 日目

- ・ 一般講演（9:00 – 16:30）

講演申込締切：8 月 19 日（水）午後 5 時まで

講演要旨締切：8 月 21 日（金）午後 5 時まで

問合せ先：日本農芸化学会中部支部 庶務幹事 中崎 敦夫
(名古屋大学大学院生命農学研究科)
E-mail: nakazaki@agr.nagoya-u.ac.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内

庶務幹事：橋本 涉

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

TEL: 0774-38-3756、FAX: 0774-38-3767

会計幹事：安部 真人

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

TEL: 075-753-6405、FAX: 075-753-6408

発行日 平成27年7月3日