

日本農芸化学会関西支部 第 502 回 講演会

講演要旨集

日時：平成 30 年 2 月 3 日（土）

会場：京都大学百周年時計台記念館

日本農芸化学会関西支部

日本農芸化学会関西支部

支部賛助企業

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

アース製薬株式会社
植田製油株式会社
株式会社ウォーターエージェンシー
江崎グリコ株式会社
株式会社カネカ
菊正宗酒造株式会社
黄桜株式会社
月桂冠株式会社
甲陽ケミカル株式会社
三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社
サントリーホールディングス株式会社
住友化学株式会社
株式会社第一化成
宝酒造株式会社
築野食品工業株式会社
東洋紡株式会社

ナカライテスク株式会社
日世株式会社
株式会社日本医化器械製作所
日本新薬株式会社
ハウスウェルネスフーズ株式会社
ヒガシマル醤油株式会社
不二製油株式会社
松谷化学工業株式会社
三井化学アグロ株式会社
株式会社三ツワフロンテック
安井器械株式会社
大和酵素株式会社
理研化学工業株式会社
株式会社ロッテ
和研薬株式会社

プログラム

開会の辞(12:35～12:40)

一般講演(12:40～17:00)[講演 8 分:質疑応答 3 分]

(* 印は優秀発表賞(支部長推薦)および優秀発表賞(賛助企業推薦)対象講演)

***1 シロイヌナズナの病害抵抗性を誘導する 3-ヘキセニルアセテートの作用機構の解明**

○松田 彩、山内靖雅、松岡大介、土佐幸雄、水谷正治、杉本幸裕 (神戸大院・農)

***2 果物・野菜アレルゲンコンポーネント解析へのリアルタイム PCR の導入**

○河合菜月¹、岡崎史子²、村上友貴絵³、谷内昇一郎⁴、西野昌光⁵、犬尾千聡⁶、近藤康人⁷、松本晋也¹、
成田宏史¹ (¹京女大食物、²龍谷大食物、³京都栄医専、⁴愛仁会高槻病院、⁵愛仁会千船病院、
⁶聖マリアンナ医大、⁷藤田保健衛生医大)

***3 パイナップル果実由来グルコシルセラミドのアレルギー抑制効果と LMIR3 の関与**

○竹村有裕美¹、大戸信明²、栗原浩誠²、水野雅史¹ (¹神大院・農、²丸善製菓(株))

***4 ZIP4 の発現量を増加させる新規亜鉛吸収促進因子の探索**

○有本紗也加、神戸大朋 (京大院・生命)

***5 亜鉛要求性酵素 TNAP の活性化における亜鉛トランスポーターの役割**

○小川凡乃、福江和久、神戸大朋 (京大院・生命)

***6 全アミノ酸スクランニング変異導入法による *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼの耐熱化**

○中谷滉太¹、片野裕太¹、児島憲二¹、滝田禎亮¹、八波利恵²、中村 聡²、保川 清¹
(¹京大院・農、²東工大・生命理工)

***7 オートファジーはマクロファージにおいて炎症シグナル伝達系を制御する**

○米野雅大、白木琢磨、芦田 久 (近畿大院・生物理工)

***8 *Penicillium chrysogenum* 由来キシロガラクトクロナン分解酵素の機能解析**

○桐原昇汰¹、山本真海¹、小谷口美也子²、北村進一¹、中澤昌美¹、上田光宏¹、阪本龍司¹
(¹大阪府大院・生命、²(有) IPE)

***9 黒酢醪由来 D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* KTCC12 の D-セリンデヒドラターゼの機能解析**

○岩田音々¹、山中一也^{1,2,3}、老川典夫^{1,2,3}

(¹ 関大・院・理工学研究科、² 関大・化学生命工、³ 関大・先端機構)

***10 *Pseudomonas putida* における D-リジン異化代謝系遺伝子転写制御因子 DlcR の機能解析**

○佐藤大起、黒石和樹、戸部隆太、三原久明 (立命館大・生命)

***11 代謝改変酵母によるアルギン酸由来モノウロン酸 DEH の代謝の機構と転写コリプレッサー Tup1-Cyc8 との関連**

○松岡史也¹、柏原貴幸¹、中田翔太²、村田幸作³、橋本 渉^{1,2}、河井重幸^{1,2}

(¹ 京大院・農、² 京大・農、³ 摂南大・理工)

***12 *Methylobacterium* 属細菌の植物定着能評価法の確立**

○福永啓太、吉田裕介、由里本博也、阪井康能 (京大院・農)

<14:50-15:05 休憩>

13 超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における C1 供与機構に関する研究

○井崎力久、下坂天洋、跡見晴幸 (京大院・工)

14 超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素に見出した新奇な補酵素結合様式

○林 順司¹、米田一成²、大島敏久³、櫻庭春彦⁴

(¹ 立命大・生命、² 東海大・農、³ 大阪工大・工、⁴ 香川大・農)

15 ヘパリンの分解と代謝に関わる乳酸菌酵素系の構造・機能解析

○岩瀬久夢¹、山田章文²、河合桂吾¹、老木紗予子¹、三上文三^{1,2}、村田幸作³、橋本 渉^{1,2}

(¹ 京大院・農、² 京大・農、³ 摂大・理工)

16 γアミノ酪酸(GABA)の摂取がマウスの運動パフォーマンスに及ぼす影響

○前川 慶¹、松田凜太郎¹、瀧川花穂¹、山田裕晃²、斉藤憲二²、坂下真耶²、畑澤幸乃¹、亀井康富¹

(¹ 京都府大、² ファーマフーズ開発部)

17 植物発酵エキスがラットの脂肪蓄積に及ぼす影響

○本多奈保子¹、原田愛子¹、山本美菜¹、村上允唯²、中川泰輔²、渡辺敏郎¹

(¹ 園田学園女大・食栄、² 機能性食品開発研究所)

18 X線結晶構造解析と部位特異的変異に基づくプロテイングルタミナーゼの機能解明

○田中智紀¹、高橋延行¹、水谷公彦¹、山口庄太郎²、三上文三¹

(¹京大院・農、²天野エンザイム株式会社)

19 逆転写活性を有する耐熱型 DNA ポリメラーゼによる高感度な one-step RT-PCR

○岡野啓志¹、馬場美聡¹、川戸克展²、秀瀬涼太²、柳原 格³、兒島憲二¹、滝田禎亮¹、藤原伸介²、

保川 清¹ (¹京大院・農、²関西学院大、³大阪母子医療センター)

20 超好熱性アーキアにおけるタンパク質の糖鎖修飾酵素の機能解析

○諏訪貴士、佐藤喬章、跡見晴幸 (京大院・工)

21 L-アミノ酸エステラーゼによる血管拡張作用ペプチド(Trp-His)の酵素合成に関する研究

○牧 慶子¹、田中貴大¹、高木一好²、林 順司¹、若山 守¹

(¹立命館大院・生命科学・生工、²立命館大・生命科学・応化)

22 光反応性リン脂質プローブの合成研究

○安部真人、折田雄一郎、真鍋佑梨、三芳秀人 (京大院・農)

特別講演 (17:10～18:10)

日本農芸化学会関西支部技術賞 受賞講演

・グリコーゲンの酵素的製造方法の開発と応用研究

○古屋敷 隆、角谷 亮、梶浦英樹、高田洋樹 (江崎グリコ株式会社)

・新たな乳酸菌コーティング技術の開発と食品への応用展開

○久 景子¹、宇佐美クランク陽子²、岸野重信³、小川 順³

(¹日東薬品工業株式会社、²株式会社ロッテ、³京都大学大学院農学研究科)

農芸化学女性企業研究者賞 受賞講演

・ポリフェノールの機能解明に関する研究とその応用開発

○小野佳子 (サントリーウエルネス株式会社)

優秀発表賞(支部長推薦)、優秀発表賞(賛助企業推薦) 表彰式 (18:10-18:20)

懇親会(18:30～20:00) 京都大学百周年時計台記念館 2階 国際交流ホール III

一般 3,000 円 学生 1,000 円

*1

シロイヌナズナの病害抵抗性を誘導する 3-ヘキセニルアセートの作用機構の解明

○松田彩、山内靖雅、松岡大介、土佐幸雄、水谷正治、杉本幸裕

(神戸大院・農)

【目的】

植物は周囲の環境からストレスを受けると、香気成分である緑葉揮発性化合物 (Green Leaf Volatiles : GLVs) を生産する。GLVsはC6の化合物群であり、ストレスに対する防御応答に関与することが知られている。GLVsの一種3-ヘキセニルアセート (3-HAC) は、コムギにおいて病原菌防御応答に関与すること、および、トマトにおいて細胞内のCa²⁺濃度の変動を誘導することなどが判明しており、シグナル作用を有することが示唆されているが、その詳細な作用機構は明らかになっていない。そこで、本研究ではシロイヌナズナを用いて、3-HACの作用を検証し、そのシグナル伝達経路の探索を行うことを目的とした。

【方法・結果】

3-HACを暴露したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) をマイクロアレイ解析に供したところ、*PR*遺伝子などの病原菌応答遺伝子群が誘導されていた。リアルタイムPCRによる解析においても、これらの遺伝子の発現量は3-HAC処理で増加することが確認されたため、3-HACが病原菌防御応答を誘導すると考えられた。そこで、3-HACを暴露した植物体に病原菌を接種し、病徴を観察した。植物の病原菌応答は、サリチル酸またはジャスモン酸により制御されており、2つの経路は拮抗的に作用すると考えられている。それぞれの経路が応答する病原菌を接種して3-HACの効果を検証したところ、サリチル酸経路が応答する病原菌への抵抗性が向上した。よって、3-HACは *PR*遺伝子などのサリチル酸経路の遺伝子を誘導することにより、病害抵抗性を向上させることが示唆された。

続いて、3-HACが誘導する病原菌応答のシグナル伝達経路の探索を行った。3-HAC処理により細胞内のcAMPおよびCa²⁺濃度の上昇が認められた。また、病原菌応答への関与が報告されているGαタンパク質およびカルシウムチャネルについて、遺伝子欠損株を用いた逆遺伝学的解析を行ったところ、一部の系統がシグナル伝達経路に関与することが判明した。さらに、サリチル酸経路の上流に存在し、病原菌応答の初期に作用するMAPキナーゼ経路もシグナル伝達に関与することが判明した。

以上の結果から、シロイヌナズナにおいて、3-HACは動物における嗅覚受容と類似したメカニズムで受容され、そのシグナルがサリチル酸経路に伝達されることで、病害抵抗性が誘導されると推定された。

*2

果物・野菜アレルゲンコンポーネント解析へのリアルタイム PCR の導入

○河合菜月¹、岡崎史子²、村上友貴絵³、谷内昇一郎⁴、西野昌光⁵、
犬尾千聡⁶、近藤康人⁷、松本晋也¹、成田宏史¹

(¹ 京女大食物、² 龍谷大食物、³ 京都栄医専、⁴ 愛仁会高槻病院、

⁵ 愛仁会千船病院、⁶ 聖マリアンナ医大、⁷ 藤田保健衛生医大)

【目的】

卵・乳アレルギーは乳幼児に発症し寛解に至る場合が多いが、果物・野菜アレルギーは幼児期以降での発症が多く、治り難い特徴が有る。通常は果物・野菜の摂取で口腔粘膜にかゆみ等を呈する口腔アレルギー症候群 (OAS) で軽症であるが、近年花粉症との関連やアナフィラキシー発症例も報告されていることから、抗原 (コンポーネント) の特定が急がれている。我々は植物アレルゲンの代表と考えられていた Lipid Transfer Protein (LTP) の研究に、そのコンタミタンパク質である Gibberellin-Regulated Protein (GRP) が LTP より強力なコンポーネントである事を発見・報告して来た。今回は GRP が他の果物・野菜アレルギーにも関与している可能性を考え、以下の解析を行なった。

【方法・結果】

OAS、トマトによる食物依存性運動誘発アナフィラキシーを併発する重症患者血清を用い、当研究室で純化したモモ、トマト GRP に対する IgE 測定を行った。その結果、OAS 患者血清 24 例中に、トマト GRP と反応したものはなかったが、重症患者では 3 例中 3 例ともトマト GRP に反応を示した。このうち 1 例はモモ GRP に対する反応性は同程度であるにも拘らず、モモは食べただけでアナフィラキシーを起こした履歴が有った。症状の理解にはコンポーネントに対する反応性以外の因子の関与が想定されたため、それが抗原量ではないかと考え、リアルタイム PCR を導入して発現量の解析を行なった。

リアルタイム PCR の結果、トマトは GRP 発現量がモモと比べて非常に低いことが判明した。したがって、GRP に感作されていても GRP 含量の少ないトマトを摂取しただけでは軽症ですむが、運動などの補助因子が加わることで重症化する可能性が示唆された。モモ・リンゴにおける GRP の発現は実で、LTP の発現は皮で高く、皮をむいて食べる日本においては GRP 感作が、皮のまま食べるヨーロッパでは LTP 感作が高いことと一致した。またアレルゲン登録されているウメ GRP の塩基配列にはモモとアミノ酸配列が 100% 一致する配列と一部異なる配列が報告されている。PCR 解析の結果、花ウメでは両方が、実ウメ (南高梅、古城梅) ではモモと同じ配列だけが発現されており、実ウメが食を目的としてモモに近づくように品種改良されて来ていることが示された。

*3

パイナップル果実由来グルコシルセラミドのアレルギー抑制効果と LMIR3 の関与

○竹村有裕美¹、大戸信明²、桑原浩誠²、水野雅史¹

(¹ 神大院・農、² 丸善製薬(株))

【目的】

植物由来のグルコシルセラミド(GlcCer)は、皮膚の保湿効果や、アトピー性皮膚炎や大腸炎に対する抗炎症効果を有する食品素材として近年注目されているが、I型アレルギーに対する効果は報告されていない。そこで本研究では、パイナップル果実由来グルコシルセラミド(P-GlcCer)のアレルギー抑制効果を検証した。

【方法】

BALB/cマウス(雌、5週齢)に、P-GlcCer(4 mg/匹)を4日間毎日経口投与した。その後TNP-IgEを尾静脈投与し、感作させた30分後、耳介に抗原としてピクリクロリドを塗布することで、受動皮膚アナフィラキシー(PCA)反応を誘導した。PCA反応の指標として、抗原塗布前と後の耳介厚の差から浮腫の程度を測定した。GlcCerそのものが関与しているかを調べるため、白血球単一免疫グロブリン様受容体(LMIR3)-Fcを、経口投与の開始2日目から1 µg/匹で毎日尾静脈投与した。また、小腸上皮様Caco-2細胞をトランズウェルの管腔側に、肥満細胞様RBL-2H3細胞を基底膜側に配置した共培養系において、管腔側にP-GlcCer(40, 80 µg/mL)を添加した。6時間後、基底膜側に抗DNP-IgEを添加し、感作させた後に抗原としてDNP-BSAを添加し、脱顆粒を誘引した。その際、RBL-2H3細胞から放出されるβ-hexosaminidase活性を指標として、脱顆粒反応を測定した。

【結果】

PCA反応試験において、P-GlcCerの経口投与により浮腫が54%抑制された。また、共培養系においても、P-GlcCerの添加により濃度依存的に脱顆粒が抑制された。GlcCerは小腸において、そのままあるいはグルコースやセラミド、さらにスフィンゴイド塩基や脂肪酸などに酵素的に加水分解され、体内に取り込まれる。そこで、セラミドをリガンドとするLMIR3-Fcを投与した結果、P-GlcCerによる浮腫の抑制効果が打ち消された。よってP-GlcCerそのものではなく、その代謝物の関与が示唆された。また肥満細胞に発現しているLMIR3はセラミドとの結合により、肥満細胞の活性化を抑制することが報告されている。つまり、P-GlcCerの代謝物であるセラミドが、LMIR3を介して肥満細胞の活性化を抑制し、アレルギー反応を緩和している可能性が考えられた。現在はP-GlcCerの代謝物とLMIR3の相互作用が起こっているかを確認するため、LMIR3中のITIMおよびITSMに脱リン酸化酵素SHP-1が会合しているかを検討中である。

*4

ZIP4 の発現量を増加させる新規亜鉛吸収促進因子の探索

○有本紗也加、神戸大朋

(京大院・生命)

【目的】

亜鉛は、タンパク質の構造や酵素活性、種々のシグナル調節の重要因子として機能する必須微量元素である。その為、亜鉛の不足は味覚障害や皮膚炎、成長遅延等種々の症状を引き起こす。近年、途上国のみならず、先進国においても女性や高齢者を中心に亜鉛欠乏者が認められることが報告されており、亜鉛は欠乏しやすい微量栄養素として大きな注目を集めている。日本においても国民の2～3割が潜在的な亜鉛欠乏にあると試算されており、日々の食生活を通して亜鉛を充足させることが極めて重要となっている。消化管からの亜鉛吸収には先天性亜鉛欠乏症(腸性肢端皮膚炎)の原因遺伝子として同定された亜鉛トランスポーターZIP4が必須の役割を果たす。亜鉛欠乏時、ZIP4は分解されず小腸上皮細胞管腔側膜に局在し亜鉛の取り込みに機能する。消化管からの亜鉛吸収効率は30%前後とされており、効率的に亜鉛欠乏を予防するためには、多量の亜鉛を摂取するだけでなく、消化管での亜鉛吸収量を増加させることが、亜鉛吸収効率を増強し亜鉛欠乏症の予防に貢献することが出来ると考えられる。本研究は、亜鉛欠乏予防効果をもつ食品を創成するための基盤確立を目的として、ZIP4の発現を促進する食品由来因子の探索、精製を実施した。

【方法・結果】

食品サンプルの調製には、対象とする抽出サンプルを50%メタノール溶解し、用事調整で使用した。次に、小腸上皮細胞と同様に亜鉛欠乏時のみにZIP4の発現を増加させる性質を持つマウスHepa細胞を培養し、培養上清に調整した食品抽出物を加え24時間培養した。細胞膜画分抽出液を調製し、Western blot法とビオチン化アッセイによりZIP4の発現変化に及ぼす影響を解析した。さらに、ヒトのZIP4に対する効果については、ヒトASPC1細胞においてマウスHepa細胞と同様の解析を実施した。

今回、これまでに見出していた大豆サポニン画分と同様に、ブドウ種子や茶の木抽出物等に含まれるアントシアニン類やカテキン類といったフラバン骨格を有する成分を含むサンプルに、再現性よく、かつ濃度依存的にZIP4の発現を増加させる結果を得た。従って、フラバン骨格を有する食品由来因子にはZIP4の発現量を増加させる機能を有することが示唆される。今後、それぞれの活性因子の同定と詳細な作用機序の解明を進めていく予定である。

*5

亜鉛要求性酵素 TNAP の活性化における 亜鉛トランスポーターの役割

○小川凡乃、福江和久、神戸大朋

(京大院・生命科学)

【目的】

亜鉛は生体内に2-3 g存在する必須微量元素であり、細胞質内の亜鉛ホメオスタシスは、亜鉛トランスポーターによって厳密に制御されている。当研究室はこれまでに、小胞体およびゴルジ体からなる早期分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターZNT5、ZNT6、ZNT7が、亜鉛要求性酵素の活性化に寄与することを報告してきた。しかし、これらのトランスポーターと局在を同じくするZIPトランスポーターに関する解析は未だ行われていない。そこで本研究は、初期分泌経路に局在するZIPトランスポーターZIP9およびZIP13が亜鉛要求性酵素の活性化に与える影響について詳細に解析することを目的として実施した。

【方法・結果】

相同組換え効率が高いニワトリ B リンパ球系細胞である DT40 細胞を用いて多重欠損細胞を作成した。作成した欠損細胞にヒトの亜鉛トランスポーターオーソログを発現させ、亜鉛要求性酵素の一つである TNAP (Tissue non-specific alkaline phosphatase) の活性を測定し、TNAP 活性化における亜鉛トランスポーターの寄与について評価した。ZIP9 と ZIP13 を単独欠損させた細胞株 ($\Delta 9$, $\Delta 13$) および両トランスポーターを同時に欠損させた細胞株 ($\Delta 9 \Delta 13$) を作成して TNAP 活性を測定したところ、野生型 (WT) と同程度の活性を保持していた。さらに $\Delta 9 \Delta 13$ に、ZIP9 および ZIP13 と相同の機能を有すると考えられる ZIP7 を過剰発現させた細胞株を作成したが、 $\Delta 9 \Delta 13$ と比べて TNAP 活性を大きく変化させなかった。また、 $\Delta 9 \Delta 13$ における TNAP 活性は、細胞質の亜鉛ホメオスタシスの調節に機能するメタロチオネインを欠損させた場合においても変化しなかった。

ZNT5、ZNT6、ZNT7 を同時に欠損させた細胞株 (Triple Knock Out cell : TKO) においては、TNAP 活性が顕著に低下する。この TKO においてさらに ZIP9 と ZIP13 を欠損させた五重欠損株 (TKO $\Delta 9 \Delta 13$) を作成し、TNAP 活性の測定を行った。その結果、TKO $\Delta 9 \Delta 13$ においては、TKO と同様に TNAP 活性が顕著に低下していたが、ZNT5 と ZNT6、ZNT7 をそれぞれ過剰発現させると、TNAP の活性は有意に回復した。以上より、TNAP の活性化には、ZNT5、ZNT6、ZNT7 が不可欠であり、ZIP9 および ZIP13 の発現の有無に影響されないことが確認された。

以上の結果から、初期分泌経路に局在する ZIP9 および ZIP13 が輸送する亜鉛は、亜鉛要求性酵素 TNAP の活性化に対して影響を与えないこと、また、TNAP の活性化には、ZNT5、ZNT6、ZNT7 が支配的に働くことが明示された。

*6 全アミノ酸スクランニング変異導入法による *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼの耐熱化

○中谷滉太¹, 片野裕太¹, 児島憲二¹, 滝田禎亮¹, 八波利恵², 中村聡², 保川清¹

(¹京大院・農, ²東工大・生命理工)

【目的】

キシラナーゼは植物の細胞壁を構成する主成分の一つであるキシランを加水分解する酵素で、カビや酵母、原生動物に広く存在している。環境に優しいパルプ漂白法やフルーツジュースの清澄化などに利用されており、近年では第二世代バイオエタノール生産への応用も期待されている。反応効率向上のためキシラナーゼの耐アルカリ化および耐熱化が望まれている。好アルカリ性菌 *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼ (XynJ) は糖質分解酵素ファミリー11 に属し、 β シート構造によって高度に折りたたまれた Finger 領域をもつ¹⁾。本研究では近年開発された全アミノ酸スクランニング変異導入法を用いて XynJ の耐熱化を試みた。

【方法】

1. ライブラリーの作製 : XynJ 遺伝子が挿入された pET-21b(+) を鋳型として QuikChange HT Protein Engineering System (アジレントテクノロジー) により、Finger 領域と一次構造上の近傍 (Y13-R104、G169-Y194) の 118 アミノ酸残基のうちの 1 残基のコドン进行を他の 19 種類のコドンに置換し、大腸菌 LB21(DE3) に導入した。2. 発現 : 形質転換菌を 37°C で培養し、IPTG で誘導した。3. 耐熱性の評価 : 超音波処理した菌体の可溶性画分を 65°C 15 分間の熱処理後、RBB-xylan を基質として、pH 7.8、37°C で 15 分間反応させ、上清の 540 nm の吸光度を測定した。

【結果と考察】

野生型酵素 (WT) の残存活性 (熱処理前の活性に対する熱処理後の活性の相対値) は 5% であった。576 クローンのうち T82A の残存活性 (90%) が最も高かった。T82 を他の 19 種類のアミノ酸に置換した T82X の残存活性は、X が A、G、C では高かった (75-100%) が、F、Y、W、M、K、R、H、D、N では 0% であった。このことから、82 位のアミノ酸残基の側鎖のかさ高さが基質認識や耐熱性に関与している可能性が示唆された。今回、耐熱型変異体が得られたことから、全アミノ酸スクランニング変異導入法の有効性が示唆された。今後、WT および耐熱型変異体について速度論的解析や結晶構造解析を行い、より詳細な耐熱化機構を明らかにしていく予定である。

1) H. Umemoto et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73(4), 965-967, 2009

*7

オートファジーはマクロファージにおいて炎症シグナル伝達系を制御する

○米野雅大、白木琢磨、芦田 久

(近畿大院・生物理工)

オートファジーは細胞内の非選択的なバルク分解のみならず、選択的な分解にも関与している。機能不全ミトコンドリア、細胞侵入性細菌、凝集タンパク質などは、ユビキチンで標識され、アダプタータンパク質である p62 によってオートファゴソームに選択的に輸送されることが分かっている。しかし、細胞内シグナル伝達タンパク質の選択的分解についてはまだ解明されていない点が多い。免疫系のシグナル伝達においては多くのタンパク質が関与し、その速やかな発現と分解が要求される。そこで我々は選択的オートファジーが炎症反応においてどのように関与するのか検討した。

マウス由来マクロファージ細胞株でオートファゴソーム形成に関与する Atg 遺伝子をノックダウンしたところ、LPS (Lypopolysaccharide)除去後の炎症性サイトカインの産生終結が遅延した。逆にアミノ酸飢餓によりオートファジーを活性化させたところ、産生量が早期に減少した。このことからオートファジー関連タンパク質は、炎症シグナル伝達タンパク質と相互作用し、炎症反応をコントロールしていることが示唆された。そこで我々は、その制御の分子機構の解析を行った。TLR4 (Toll like receptor 4)シグナル伝達経路のうち、MyD88 依存的経路においては TRAF6 (TNF receptor associated factor 6)複合体が重要な役割を果たす。TRAF6 は炎症時にポリユビキチン化され、p62 と相互作用することが報告されている。実際に p62 と TRAF6 の相互作用を免疫沈降で確認したところ、炎症反応のどの時期においても結合していた。そこで他にこのようなタンパク質が存在しないか検討したところ、同じくオートファジーの基質認識に関わるタンパク質である NBR1 が TRAF6 と相互作用することが判明した。さらに NBR1-TRAF6 は、p62-TRAF6 とは異なり、炎症回復時間によりその存在量が変わることが明らかになった。以上の結果から、NBR1-TRAF6 複合体は、オートファジーが関与する炎症回復-終結に関わることを示唆される。

*8

Penicillium chrysogenum 由来キシログラクチュロナン分解酵素の機能解析

○桐原昇汰¹、山本真海¹、小谷口美也子²、北村進一¹、中澤昌美¹、上田光宏¹、阪本龍司¹

(¹ 大阪府大院・生命、²(有) IPE)

【目的】ペクチンは植物組織中において一次細胞壁および中葉に存在するヘテロ分岐多糖であり、主にラムノガラクチュロナン-I (RG-I) 領域とホモガラクチュロナン (HG) 領域、キシログラクチュロナン (XGA) 領域から構成される。RG-I 領域は主鎖としてガラクチュロン酸 (GalA) とラムノース (Rha) の繰返し構造を有し、Rha 残基には種々の中性糖側鎖が結合した複雑な構造を持つ。HG領域はGalAのみから構成されているが、GalA残基の 3 位に高頻度でキシロース (Xyl) 側鎖が結合した領域はXGAと呼ばれる。ペクチンを構成する糖鎖の中でも、XGAについての研究例は非常に少なく、詳細な構造解析は行われておらず、本領域を特異的に分解できる酵素は未だ 1 種しか報告されていない。本研究では *P. chrysogenum* 由来の 2 種のXGA分解活性を有する酵素 (PGX3,PGX4) を *Aspergillus oryzae* を宿主として発現させ、組換え酵素を用いて詳細な反応特性解析を行った。

【方法・結果】トラガカントガムをNaOHでけん化後、トリフルオロ酢酸で処理し、RG領域の中性糖側鎖を除去した。さらにポリガラクチュロナーゼ (PGase) 処理でHG領域を除去し、XGAを得た。PGX3 はHGに対して活性を示さないが、XGA分解活性を有し、高性能陰イオン交換クロマトグラフィー (HPAEC) 分析により様々なオリゴ糖が検出されたことから、XGA特異的なエンド型キシログラクチュロナンハイドrolラーゼ (XGH) であることが判明した。一方、PGX4 はHGを分解し、反応産物としてGalAのみを生成した。また、XGAに対しては主生成物としてGalAとGalA-Xyl を蓄積したことから、本酵素はXyl 側鎖をバイパスすることができるエキソ型のPGaseであることが判明した。次にPGX3 の切断様式を詳細に解析するため、本酵素によるXGAの反応産物をHPLC-CAD-MS/MSに供したところ、約10種のオリゴ糖が検出された。主生成物はGalAとGalA-Xyl であったが、四糖以上のほとんどのオリゴ糖 (GalA₂-Xyl-Fuc, GalA₂-Xyl₂-Fuc など) にはFuc が含まれることが推定された。一方、GalA-Xyl-Fuc は微量しか検出されなかった。これらの結果より、PGX3 はFuc が側鎖末端に存在する場合にはその付近を分解できないことが示唆された。また、GalAを多量に蓄積したことから、本酵素は切断部位の -1 あるいは +1 サブサイトのどちらかが未修飾のGalAでも切断可能であることが判明した。現在、上記オリゴ糖の詳細な構造解析およびXGA分解におけるPGX3 とPGX4 の相乗作用を検討している。

*9

黒酢醪由来 D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* KTCC12 の D-セリンデヒドラターゼの機能解析岩田音々¹、山中一也^{1,2,3}、老川典夫^{1,2,3}(¹ 関大・院・理工学研究科、² 関大・化学生命工、³ 関大・先端機構)

【目的】

先にわれわれは、鹿児島県福山黒酢株式会社製の黒酢中に、他社の黒酢及び食品に比較して高濃度の D-アミノ酸(D-Ala, D-Asp, D-Glu, D-Ser)が含まれていることを明らかにし、本黒酢の醪から D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* KTCC12 を単離した。本菌は優れた黒酢醸造特性を持ち、食品の旨みや総合評価を高める D-アミノ酸(D-Ala, D-Asp, D-Glu)を菌体外に著量生産する。本菌は、一般に微生物の増殖を阻害する D-Ser を含む黒酢中でも生育可能なことから、本菌の D-Ser 代謝の解明は、本菌の基礎及び応用の両面から大きな意義を持つ。そこで本研究では、*P. pentosaceus* KTCC12 の D-Ser 代謝を中心的に担うと考えられる D-セリンデヒドラターゼの機能を解析することを目的とした。

【方法・結果】

P. pentosaceus KTCC12 のゲノムは未解読であるため、*P. pentosaceus* の基準株である ATCC 25745 のゲノム情報に基づきプライマーを設計し、本菌の D-セリンデヒドラターゼ(*Pp-Dsd*)ホモログ遺伝子(*Pp-dsd*)をポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で増幅後、大腸菌で発現した。得られた形質転換体 *Escherichia coli* Rosetta(DE3)/pET19b-*Pp-dsd* をカルベニシリンを含む LB 培地で培養後、無細胞抽出液から *Pp-Dsd* を Ni-NTA カラムで精製した。Dsd 活性(1 U)は、D-Ser を基質とし 37℃で1分間あたり1 μ mol のピルビン酸を生成する酵素量とした。また大腸菌の *dsd* 破壊株 *Escherichia coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$ を λ -Red システムと pCP20 を用いて構築後、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$ /pET19b-*Pp-dsd* を得た。

Pp-Dsd の酵素科学的性質を検討した結果、本酵素はサブユニットの分子質量約 48 kDa のホモテトラマー酵素であり、Ser の両エナンチオマーに特異的に作用し、D-Ser 及び L-Ser に対する k_{cat}/K_m はそれぞれ 0.80、0.45 min⁻¹ であり、D-Ser に対して約 2 倍高い触媒効率を示すことが明らかとなった。一方、D-Ser を含む M9 最少培地を用いて *E. coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$, *E. coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$ /pET19b, *E. coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$ /pET19b-*Pp-dsd* の生育を比較したところ、*E. coli* BL21(DE3) $\Delta Ec-dsd$ /pET19b-*Pp-dsd* のみが D-Ser 存在下で生育し、D-Ser 濃度の増加に伴い生育量が増加することが明らかとなった。

以上の結果から、*Pp-Dsd* は、*P. pentosaceus* KTCC12 の D-Ser の異化と耐性に関与することが示唆された。

*10 *Pseudomonas putida* における D-リジン異化代謝系遺伝子 転写制御因子 DlcR の機能解析

○佐藤大起、黒石和樹、戸部隆太、三原久明

(立命館大・生命)

【目的】 *Pseudomonas putida* KT2440 は、D-リジンを C 源・N 源とする最少培地（D-リジン最少培地）にて良好に生育する。これは本菌が、D-リジン脱水素酵素（AmaD、PP_3596）をはじめとする D-リジン異化代謝系を有することに起因する。当研究室では、*amaD* と共にオペロン（*dlc* オペロン）を形成する遺伝子群（PP_3593-PP_3595、PP_3597）の産物が、D-ヒスチジンを除く塩基性 D-アミノ酸特異的な ABC インポーターとして機能していることを明らかにしてきた。一方で、本オペロンの最上流に位置する PP_3592（*dlcR*）遺伝子の産物は、タンパク質の一次構造から転写制御因子であると考えられるが、その詳細は未だ明らかにされていない。本研究では、精製 DlcR タンパク質を用いた *in vitro* DNA 結合解析、および *dlcR* 遺伝子欠損株（*dlcR*⁻ 株）を用いた *in vivo* 解析により、DlcR を介する D-リジン異化代謝系の発現制御機構の解明を試みた。

【方法・結果】 *P. putida* KT2440 株のゲノム DNA を鋳型にして *dlcR* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主とする *dlcR* 高発現系を構築した。本発現系を用いて、His-tag 融合タンパク質として DlcR を精製した。精製 DlcR を用いてゲルシフトアッセイを行った結果、DlcR は本遺伝子上流に位置する推定パリンドローーム配列を含む DNA 領域に特異的に結合することが明らかとなった。また、DlcR の 本DNA領域断片への結合は、D-リジン、D-アルギニン、および D-オルニチンの存在下で解除されるが、L 体を含む他のアミノ酸の添加では結合が解除されないことから、DlcR は *dlc* オペロンの発現を抑制するリプレッサーとして機能すると考えられた。一方、D-リジン最少培地において、野生株と *dlcR*⁻ 株との生育には差がないことが予想されたが、野生株に比べ、*dlcR*⁻ 株の生育は著しく遅延していた。D-リジン最少培地で培養した野生株と *dlcR*⁻ 株における細胞内アミノ酸の蓄積量を解析した結果、*dlcR*⁻ 株の菌体内に、D-リジン異化代謝経路の中間体である L-ピペコリン酸が蓄積されていることが示唆された。このことから、DlcR は、*dlc* オペロンの制御に加えて、D-リジン異化代謝経路で L-ピペコリン酸を Δ¹-ピペリデイン-6-カルボン酸に変換する L-ピペコリン酸酸化酵素の制御にも関与している可能性が示唆された。

*11

代謝改変酵母によるアルギン酸由来モノウロン酸 DEH の代謝の機構と転写コリプレッサーTup1-Cyc8 との関連

○松岡史也¹、柏原貴幸¹、中田翔太²、村田幸作³、橋本 渉^{1,2}、河井重幸^{1,2}

(¹京大院・農、²京大・農、³摂南大・理工)

【背景】

大型褐藻 (コンブやワカメなど) は再生可能なバイオマスとして有望であり、これらの主要糖質であるアルギン酸やマンニトール (Mtl) からのエタノールを始めとした有用化合物の生産技術の確立は重要である。出芽酵母 (パン酵母) は有用化合物生産の宿主として優れているが、アルギン酸およびMtlを資化しない。当研究室ではこれまでに、出芽酵母BY4742株およびD452-2株にDEH (アルギン酸をアルギン酸リアーゼにより分解することで得られるモノウロン酸) およびMtlの資化能を付与し、2 株のDEH+株を構築している¹⁾。さらに、両DEH+株をDEH培地において適応進化させることによりDEH資化能の向上した代謝改変酵母株 (DEH++株) を育種している¹⁾が、代謝改変酵母のDEH代謝機構はほとんど何も分かっていない。

出芽酵母へのMtl資化能の付与には、Mtl資化遺伝子を強制発現させる方法²⁾と、転写コリプレッサーTup1-Cyc8遺伝子の自然変異による方法 (当研究室で明らかにした方法)³⁾がある。既報¹⁾において、DEH+株の構築には種々の理由により前者を用いたが、後者には遺伝子組換えによらずにMtl資化能を付与できるという長所がある。一方、代謝改変酵母におけるDEHの代謝とTup1-Cyc8の関連は明らかとなっていない。

【方法と結果】

BY4742株由来のDEH++株をDEH培地およびグルコース培地でそれぞれ培養した際の遺伝子の発現量をCAGE (Cap Analysis of Gene Expression) 解析により網羅的に定量して比較したところ、DEH培地では糖新生やC2化合物代謝などに関わる遺伝子の発現量が上昇していた。さらに、グルコサミンによるDEH培地での生育阻害も併せて、DEH代謝はグルコース抑制による制御を受けると考えられた。

BY4742株およびD452-2株にDEH資化能のみを付与した株 (Mtlを資化しない) をMtl培地で長期間培養することにより、Mtl資化能を獲得した株を育種した。これらの株のTUP1およびCYC8の変異部位を特定するとともに、DEH培地における生育性を調べた。

【参考文献】

- 1) Matsuoka *et al. Sci. Rep.* 2017. 7(1), 4206.
- 2) Enquist-Newman *et al. Nature.* 2014. 505(7482), 239-243.
- 3) Chujo *et al. Appl. Environ. Microbiol.* 2015. 81(1), 9-16.

*12

Methylobacterium 属細菌の植物定着能評価法の確立

○福永啓太、吉田裕介、由里本博也、阪井康能

(京大院・農)

【目的】

メタノールを単一の炭素源、エネルギー源として生育することができる *Methylobacterium* 属細菌は、pink-pigment facultative methylotroph (PPFM) と呼ばれ、植物葉上微生物の優占種である。また、植物に対して生長促進効果を持つ菌株も報告されており、当該細菌属と植物間の共生メカニズムを解明することは、新規農業技術の開発、植物－微生物間の共生関係のさらなる理解につながると期待される。我々はこれまでに、当研究室で植物試料から単離したPPFMにおいて、植物への生長促進効果や植物定着能に関して、当該細菌属の種レベルでの特異性が植物種との間にあることを明らかにした^{1,2)}。また、菌株によってビタミン要求性が異なることも明らかにした³⁾。本研究では、*Methylobacterium* 属細菌の植物定着、生長促進メカニズム解明のために、菌株間における増殖特性、植物定着能の違いを簡便に評価する手法の確立を目的とした。

【方法・結果】

Methylobacterium 属細菌は、葉上ではメタノールだけでなく他の化合物も炭素源として利用しており、菌株間の各種炭素源資化能力の違いが葉上定着能に影響すると考えられる。そこで2菌株の競合培養時の増殖能を比較するために、半透膜で仕切られた二層式フラスコ(別府フラスコ)を用いて、各PPFMのメタノールあるいはコハク酸を炭素源とした培地での生育を調べた。アカシソに高度に優占化する *Methylobacterium* sp.OR01株と、モデル菌株である *M. extorquens* AM1株を比較した場合、単独培養時には同等の生育を示すが、競合培養時には、メタノールを炭素源とした時にはOR01株が、コハク酸を炭素源とした時にはAM1株が、それぞれ高い増殖能を示した。このことから、葉上での優占化には、メタノール資化能が影響していることが示唆された。

次に、OR01株とAM1株を用い、植物定着能の簡便な評価法の確立を行った。OR01株及びAM1株において、異なる蛍光タンパク質(CFPとGFP)をそれぞれ恒常的に発現する株を構築し、シロイヌナズナ種子に単独あるいは混合接種した。2週間栽培後の葉をリン酸緩衝生理食塩水に懸濁して葉面微生物細胞を回収し、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定したところ、単独接種の場合にはそれぞれの蛍光を示す細胞が検出されたのに対し、混合接種した場合にはOR01株のCFP蛍光を示す細胞のみが検出された。以上の結果より、植物上での *Methylobacterium* 属細菌の生育動態をフローサイトメトリーを用いて追跡し、植物定着能を簡便に評価する手法の確立に成功した。

1) Mizuno M *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 76, 578-580 (2012)

2) Mizuno M *et al.*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 77, 1533-1538 (2013)

3) 吉田ら、日本農芸化学会2016年度大会、2F034

【目的】

メチル基やヒドロキシメチル基などのC1基を付加する反応は、プリン・CoA等の重要な生体分子の生合成に関わる反応である。大腸菌のC1供与機構では、葉酸がグリシンやセリンからC1を受け取り、このC1が様々な化合物に供給されてプリン・CoA等が生合成される。本研究では、いまだ明らかにされていない超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* におけるC1供与に關与する酵素の同定を目的とした。

【方法・結果】

大腸菌においては、グリシンは4種のタンパク質 (H、P、T、L) によって分解され、その際に生ずるC1がC1供与機構に利用される。*T. kodakarensis*のゲノム上にはLを除くH、P、Tの遺伝子ホモログが存在する。そこで本菌においてもグリシンがC1供与体として利用されると予想し、遺伝学的検証を進めた。まず、Hタンパク質をコードする遺伝子 (TK0150) の欠損株 (H破壊株) を作製した。次に、主要な炭素源として20種のアミノ酸のみを含む合成培地、セリンを除いた19種のアミノ酸を含む培地におけるH破壊株および宿主株の増殖特性を解析した (Fig. 1)。その結果、セリン非添加培地において、宿主株の増殖と比べてH破壊株のそれは著しく低下した。これにより、本培地における増殖ではHを介したグリシンからのC1の供給、もしくはセリンからのC1基の供給の何れかが必要である可能性が示唆された。C1基を供給し得る他の代謝中間体を探索するため、我々はketopantoate (Kp) hydroxymethyltransferase反応に注目し、KpによりC1の供給が行われ、H破壊株のセリン要求性を解消する可能性があると考えた。実際にKpを加えたセリン非添加アミノ酸培地で培養した結果、H破壊株の増殖がやや回復した。一方、他の候補物質のイノシン、dTMP、ギ酸、メチルセリンの添加によりH破壊株のセリン要求性は解消されなかった。これらの結果より、*T. kodakarensis*のC1基供与機構において、グリシン、セリン、KpがC1基供与体であることが示唆された。

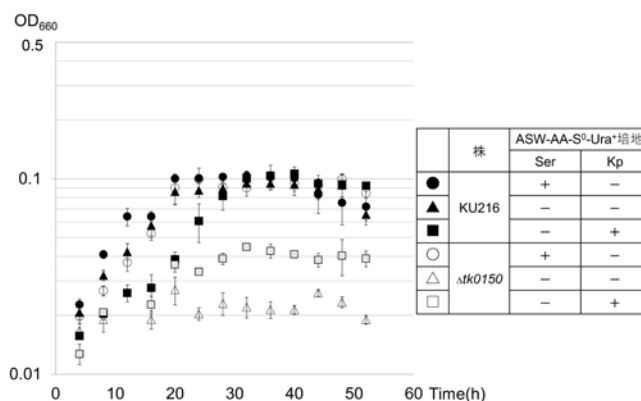


Fig. 1. 宿主株・H破壊株の増殖特性

超好熱アーキア由来ホモセリン脱水素酵素に見出した新奇な補酵素結合様式

○林 順司¹、米田一成²、大島敏久³、櫻庭春彦⁴

(¹立命大・生命、²東海大・農、³大阪工大・工、⁴香川大・農)

【目的】

必須アミノ酸であるスレオニン、メチオニン、イソロイシンは微生物や植物にのみ存在するアスパラギン酸経路によってアスパラギン酸から生合成される。ホモセリン脱水素酵素(HseDH)は本経路において、スレオニン、メチオニン、イソロイシン共通の前駆体であるホモセリンを合成する酵素である。HseDHはスレオニンによるフィードバック阻害を受け、本経路の調節機能を担う鍵酵素として重要な役割を持つ。またHseDHはヒトには存在しないため、新規抗菌剤設計のための分子標的としても注目されている。これまで本経路に関する研究は常温微生物において詳細に研究がなされているが、超好熱アーキアにおける本経路の関連酵素の研究は少なく、特にHseDHに関する研究報告は一切無かった。我々のグループは、超好熱アーキア *Pyrococcus horikoshii*由来HseDHの酵素化学的諸性質の解明およびX線結晶構造解析に成功し、既知のNAD(P)依存性脱水素酵素には認められない新奇な補酵素結合様式を見出した。

【方法・結果】

目的遺伝子の大腸菌における発現系を構築し、精製酵素を用いて諸性質解析・結晶化を行った。構造解析とMass解析の結果、結晶作製中に補酵素を添加していないにもかかわらず、その構造中にNADPHの存在が確認された。しかしながら、NADPHが結合しているにもかかわらず、本酵素はNADPを補酵素とした活性を全く示さず、逆にNAD依存性のホモセリン酸化反応がNADPによって強力に阻害($K_i=5$ nM)されることが判明した。本酵素の補酵素結合部位は、従来のNADP依存性酵素によく見られる特徴を備えており、NADPHのアデニンリボースC2リン酸基と酵素間に複数の相互作用の存在が確認された。これら相互作用するアミノ酸残基の内、Lys57をアラニンに変異させたK57AはNADPを補酵素とした活性を新たに獲得した。また、K57Aの構造解析の結果から、野生型酵素に認められたNADPHのアデニンリボースC2リン酸基周辺の水素結合が減少していることを確認した。これらの結果から、野生型酵素のNADPによる強力な阻害はNADPのアデニンリボースC2リン酸基が非常に強力に保持されているためであることが示唆された。本研究により、脱水素酵素の補酵素決定メカニズムには従来のものとは異なるバリエーションが存在することが示唆された。

ヘパリンの分解と代謝に関わる乳酸菌酵素系の構造・機能解析

○岩瀬 久夢¹、山田 章文²、河合 桂吾¹、老木 紗予子¹、
三上 文三^{1,2}、村田 幸作³、橋本 渉^{1,2}

(¹京大院・農、²京大・農、³摂大・理工)

【目的】グリコサミノグリカン(GAG)は、アミノ糖とウロン酸からなる二糖の繰り返しによって構成される多糖である。構成糖の種類、糖結合の様式、及び硫酸化レベルにより、GAG はヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などに分類される。GAG は動物において細胞外マトリックスを構成する要素となるため、病原性細菌や腸内細菌が GAG を接着や分解の標的とする。当研究室では、乳酸桿菌(*Lactobacillus*)がヘパリンを分解することを初めて見出したが、その分解や代謝に関わる酵素には不明な点が多い。本研究では、乳酸桿菌のゲノム上にコードされるヘパリンの分解と代謝に関わる酵素系の立体構造と機能との相関を明らかにすることを目指した。

【方法と結果】ヘパリン分解能を示す *Lactobacillus rhamnosus* のゲノムにコードされるヘパリナーゼIIIホモログ(LhepC)について、その発現系を大腸菌において構築し、GAG 分解活性を測定した。その結果、酵素反応液の235nmにおける吸光度が上昇したことから、LhepC は β -脱離(リアーゼ)反応によりヘパリンを分解することが示唆された。LhepC の立体構造をホモロジーモデリングにより構築した。モデル上では、ヘパリナーゼIIIファミリーにおける活性中心の空間的配置が LhepC においても高度に保存されていた。新たにヘパリン分解性が見出された *L. harbinensis* のゲノムにも LhepC ホモログがコードされていた。一方、ヘパリンの代謝酵素である *L. rhamnosus* 由来イソメラーゼ KduI の立体構造をX線結晶構造解析によって決定した。この分子表面に、KduI ファミリーによく保存されている残基が集結したクレフトを見出した。これらの残基が KduI の酵素活性に重要であると考えられるため、変異体の発現と精製系を構築し、それらの酵素活性を測定した。その結果、野生型酵素と比較すると、変異体 R163A と H200A では活性が顕著に低下した。

【考察】LhepC においてヘパリン分解活性が確認できたこと、及び構築した立体構造に活性中心が空間的に保存されていたことから、LhepC が本菌によるヘパリン分解に機能すると考えられた。また、*L. rhamnosus* に限らず、*L. casei* や *L. harbinensis* もゲノムにも LhepC ホモログがコードされていた。これらの乳酸桿菌においても、LhepC ホモログがヘパリン分解性に機能していると推測できる。ヘパリンの代謝に関わる KduI の立体構造と変異体の活性測定から、Arg163 と His200 が KduI の活性発現に寄与する残基であると示唆された。

γアミノ酪酸(GABA)の摂取がマウスの運動パフォーマンスに及ぼす影響

○前川慶¹、松田凜太郎¹、瀧川花穂¹、山田裕晃²、斉藤憲二²、坂下真耶²、畑澤幸乃¹、亀井康富¹(¹京都府大、²ファーマフーズ開発部)

【目的】健康寿命を延伸するためには要介護や寝たきりにならないように身体活動および運動能力を維持することが必要不可欠である。健康長寿を実現するためには運動と毎日の食事改善などに取り組む対策が必要であると考えられる。転写調節因子PGC1 α は骨格筋などにおいて運動により増加し、エネルギー代謝や脂肪酸酸化を促進する。我々は以前、PGC1 α を過剰発現させたマウスの骨格筋における代謝産物としてγアミノ酪酸(GABA、ギャバ)が顕著に増加することを観察した。PGC1 α を過剰発現させたマウスは持久運動能力が向上していることから、PGC1 α 活性化による運動能力の向上にGABAが関与している可能性を考えた。本研究では、身体活動及び運動能力を向上させる機能性食品素材を開発することを目指し、GABA摂取が運動パフォーマンスに及ぼす影響を、マウスを用いて検討した。

【方法・結果】8週齢雄性のマウス(C57BL6/J)を、コントロール餌群(AIN93G食摂取)とGABA群(0.5%(w/w)GABA含有AIN93G食摂取)に群わけし、半数を6日/1週間強制水泳運動をさせながら1カ月間飼育した。残りの半数は水泳をさせずに同期間飼育した(計4群:コントロール餌水泳群、コントロール餌非水泳群、GABA水泳群、GABA非水泳群)。摂取開始3週間後に蒸留水またはGABA(200 mg/kg)を強制経口投与し、1時間後にトレッドミルによる走行試験を行い、疲労困憊までの時間を測定した。強制水泳運動により、コントロール餌水泳群およびGABA水泳群の両方でトレッドミル走行時間が顕著に増加し、水泳により持久運動能力が向上することが観察された。コントロール餌水泳群とGABA水泳群の間では差は認められなかった。GABA非水泳群に比べてGABA水泳群では、有意にトレッドミルの走行時間が増加した。今後、GABAが骨格筋に及ぼす影響についてさらに解析を進める予定である。

植物発酵エキ스가ラットの脂肪蓄積に及ぼす影響

○本多奈保子¹、原田愛子¹、山本美菜¹、村上允唯²、中川泰輔²、
渡辺敏郎¹

(¹園田学園女大・食栄、²機能性食品開発研究所)

【目的】

近年、緑茶成分をはじめとする多くの植物素材には脂肪蓄積抑制効果があることが報告されている。植物発酵エキスは、多種類の野菜や果実を漬け込み抽出したエキスをキノコ類の煎じ液、穀類、海藻などを加えて長期間熟成・発酵させた植物発酵食品であるため、脂肪蓄積抑制効果を有することが考えられた。そこで、本研究では植物発酵エキ스가ラットの脂肪蓄積に及ぼす影響について調べた。

【方法】

植物発酵エキスは、(株)機能性食品開発研究所(岡山県)より提供された製品「陽命源GOLD」を用いた。5週齢の雄性SDラットを低脂肪食対照(LSD)群、低脂肪食植物発酵エキス(LF)群、高脂肪食対照(HSD)群、高脂肪食植物発酵エキス(HF)群の4群(n=6)に分け、個別ケージにより30日間、飼育した。試験期間中は、飼料摂取量および体重を毎日測定し、試験終了時にイソフルランにて麻酔後、腹部大動脈採血により屠殺した。内臓脂肪は、腹部脂肪、腎臓周囲脂肪、睪丸周囲脂肪を摘出し、それらの重量を合算することで総脂肪量とした。また筋肉量は左足腓腹筋重量を測定することで表した。盲腸内容物を摘出し、T-RFLPにより腸内フローラを解析した。血清総コレステロール量(TC)およびトリグリセライド量(TG)の分析は、和光純薬工業のキットにより定量した。群間での有意差は統計ソフト「IBM SPSS Statistics 20」を用いてt-検定をおこない、 $p < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

【結果】

試験終了時の体重はLSD群と比べるとLF群で低値を示したが、HSD群とHF群の間には違いが認められなかった。総脂肪量は、植物発酵エキスを摂取したLF群とHF群で減少する傾向がみられ、逆に筋肉量(左足腓腹筋)はLF群とHF群で増加する傾向がみられた。血清脂質分析では、TGがHSD群に比べHF群は有意に減少した。腸内フローラ解析では、植物発酵エキスを摂取させたLF群およびHF群で*Bacteroides*が増加した。

○田中智紀¹、高橋延行¹、水谷公彦¹、山口庄太郎²、三上文三¹
(¹京大院・農、²天野エンザイム株式会社)

【目的】

プロテイングルタミナーゼ (protein-glutaminase; PG) はタンパク質中のグルタミン残基をグルタミン酸残基に変換する酵素である。PG は遊離グルタミンを基質とせず、ジペプチド以上のペプチド及びタンパク質に含まれるグルタミン残基を基質とする。PG は 114 残基のプロ領域、185 残基の成熟体領域からなる酵素であり、初め非活性型のプロ酵素として発現した後、プロテアーゼにより切断されて成熟体酵素となり、活性を示す。先行の研究では、X 線結晶構造解析により、PG の立体構造が決定し、反応機構が解明されたほか、プロ体の Ala47 を Gln47 及び Glu47 に変異させた変異体の立体構造から、反応が中間体の状態で止まり、アンモニウムイオンの存在によって反応が逆行することが示唆された。そこで、本研究では PG の特異な酵素機能の解明を目的として、部位特異的変異導入を用いて、その変異体の酵素活性と結晶構造の解析を行った。

【方法・結果】

PGの触媒残基の他に反応機構に深く関わっていると考えられるArg159、加えてPGの触媒ポケット入口で基質認識に関わっていると考えられるAsp154及びSer195をそれぞれ別の残基に置換した。組み換え大腸菌を用いた発現系でこれらの変異体を発現・精製し、プロ体の結晶を作製した。大型放射光施設SPring-8にて回折実験を行い、各変異体のプロ体の結晶構造を解析したところ、Arg159変異体では野生型及び各変異体でそれぞれ異なる水分子との水素結合様式が見られた。PGのプロ体をトリプシンによりプロセッシングし、再度精製することで得られたPGの成熟体を用いて酵素活性を調べた。基質としてN末端保護ジペプチドCbz-Gln-Glyを使用しpH7で測定を行ったところ、Asp154変異体では作製した全変異体において活性の著しい低下が見られた。Asp154変異体のプロ体の結晶構造では大きな構造変化はなく、側鎖の長さが同じであるD154N変異体でも k_{cat}/K_m が30%まで低下した。このことから、Asp154が単に基質認識に関わっているだけでなく、Asp154の負電荷がPGの反応を進める上で重要な役割を果たしていることが示唆された。また、Arg159変異体においても活性の低下が見られ、基質であるグルタミン残基と触媒ポケット内の水分子の距離が活性に影響を与えていると推定された。

逆転写活性を有する耐熱型 DNA ポリメラーゼによる高感度な one-step RT-PCR

○岡野啓志¹、馬場美聡¹、川戸克展²、秀瀬涼太²、柳原格³、兒島憲二¹、滝田禎亮¹、藤原伸介²、保川清¹

(¹ 京大院・農、² 関西学院大、³ 大阪母子医療センター)

【目的】

One-step RT-PCRはRNAを迅速に解析する手法であり、two-step RT-PCRと比較してDNAのコンタミリスクが低いという長所を持つ。しかし、この手法で利用されている既存のDNAポリメラーゼは、通常の逆転写酵素と比較してcDNA合成活性が弱い。これまでに新規の耐熱型逆転写酵素として、Leu329をAlaに置換することによりRT活性を獲得した好熱性細菌*Thermotoga petrophila* K4株由来ファミリーA DNAポリメラーゼ変異体(K4pol_{L329A})¹⁾、16アミノ酸残基への変異導入によりRT活性を獲得した超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*由来ファミリーB DNAポリメラーゼ変異体(RTX)²⁾が構築された。そこで本研究では、K4pol_{L329A}あるいはRTXを用いたcDNA合成反応条件とPCR条件の最適化を通して、高感度one-step RT-PCRの開発を試みた。

【方法・結果】

K4pol_{L329A}あるいはRTX、*E. coli* RNA、MgCl₂、Mn(OCOCH₃)₂の濃度を変化させ、モデルRNAを用いたcDNA合成反応、PCRおよびone-step RT-PCRの感度に与える影響を調べた。RNA検出感度の測定はリアルタイムPCRにより行った。

K4pol_{L329A}とRTXの至適濃度は、それぞれ500 nM、5 nMであった。*E. coli* RNAの添加により、K4pol_{L329A}のcDNA合成活性、K4pol_{L329A}あるいはRTXのPCR活性は増加した。K4pol_{L329A}のcDNA合成活性の至適条件は、1–3 mM Mn(OCOCH₃)₂、0–1 mM MgCl₂を含む条件であり、Mg²⁺よりもMn²⁺のほうがこの反応には適していると示唆された。一方RTXを用いたcDNA合成においては、このような偏りは見られなかった。K4pol_{L329A}あるいはRTXを用いたPCRにおいても同様の偏りは見られなかったが、高濃度のMg²⁺やMn²⁺を含む条件では、cDNA合成と比較して反応は強く阻害された。続いて、one-step RT-PCRの最適条件は、K4pol_{L329A}を用いた場合は0.5 mM MgCl₂と3 mM Mn(OCOCH₃)₂であり、RTXを用いた場合は1 mM MgCl₂と1 mM Mn(OCOCH₃)₂であった。いずれの条件でも、300 copies/μlのモデルRNAの検出を達成した。K4pol_{L329A}やRTXは高温で強い活性を有することから、GC含量が高く、二次構造を形成しやすいRNAを鋳型としたone-step RT-PCRへの利用が期待される。

1) Sano *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 315-321 (2012)

2) Ellefson *et al.*, *Science*, **352**, 1590-1593 (2016)

20 超好熱性アーキアにおけるタンパク質の糖鎖修飾酵素の機能解析

○諏訪貴士、佐藤喬章、跡見晴幸（京大院・工）

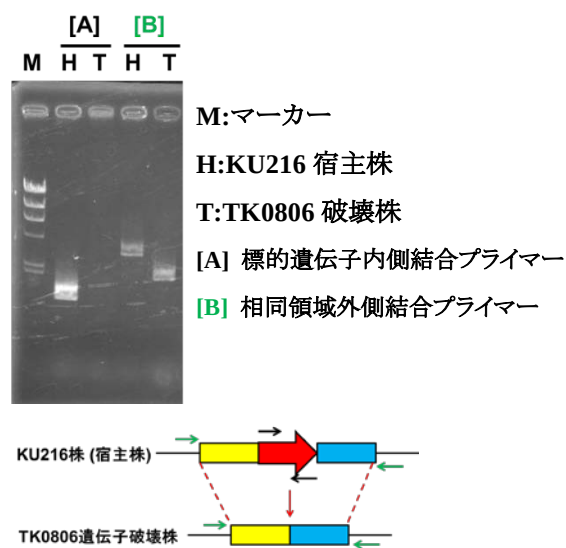
【目的】

糖鎖修飾は生体内でおこるタンパク質の翻訳後修飾の一つであり、タンパク質の機能に大きな影響を与える。しかし、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* における糖鎖修飾機構やそれに関わる酵素は明らかになっていない。ゲノム情報を調べた結果、糖鎖修飾関連酵素をいくつか見出すことができたが、その中で *T. kodakarensis* のゲノム上には dolichylphosphate 上のマンノースをタンパク質に転移させ糖タンパク質を形成する dolichyl-phosphate-mannose protein mannosyltransferase (DPMPMT) と annotate される遺伝子が二つ存在することが明らかとなった (TK0806 および TK1293)。本研究では、両遺伝子の機能を解析し、*T. kodakarensis* の糖鎖修飾機構の解明を目指す。現在はまず、一方の TK0806 遺伝子について解析を進めている。

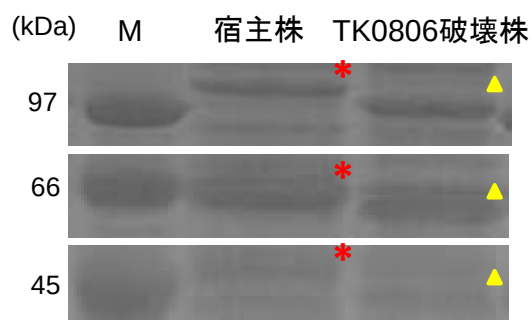
【方法・結果】

まず、orotidine-5'-monophosphate decarboxylase gene (*pyrF*) を選択マーカーとした TK0806 破壊ベクターを作製し、pop-in/pop-out 法により、TK0806 遺伝子破壊株を作製した。PCR 解析により、作製した形質転換体が目的の破壊株であることを確認した (Fig. 1)。

次に、破壊株の菌体から膜タンパク質を抽出し、SDS-PAGE でそれらの分子量の比較を行った。Fig. 2 に示すように、宿主株で見られた 48、66、100 kDa 付近のタンパク質の分子量が減少し、TK0806 遺伝子破壊株では糖修飾されていないと考えられるタンパク質のバンドが観察された。現在はこのタンパク質をゲルから抽出し、LC-MS 解析による同定を試みている。今後は同定を進めると共に、どのような糖が修飾されているのか、糖鎖修飾により本タンパク質の機能がどのように変化するのかなどを明らかにしていく予定である。



(Fig. 1) TK0806 遺伝子破壊株の PCR 解析



(Fig. 2) 各株の膜タンパク質の SDS-PAGE 解析

○牧慶子¹、田中貴大¹、高木一好²、林順司¹、若山守¹(¹ 立命館大院・生命科学・生工、² 立命館大・生命科学・応化)

【目的】

Trp-Hisは細胞内のCa²⁺濃度を調節するCa²⁺チャネルブロッカーであり、唯一の血管拡張作用ジペプチドとして、アテローム性動脈硬化の発症を防止する。一般的な治療に用いられるCa²⁺チャネル拮抗薬は心臓疾患を併発する患者への投与が忌避されてきたが、Trp-Hisは使用可能である。しかし、Trp-Hisが高価であることから、利用が進みにくいのが現状である。そこで本研究ではL-アミノ酸エステラーゼにより、Trp-OMeおよびHisからTrp-Hisを効率的に合成する方法を確立することを目的とした。我々はこれまでに土壌微生物のスクリーニングを行い、*Pseudomonas* sp. KM1由来L-アミノ酸エステラーゼ (KM1LAE) が高いTrp-His合成能を持つことを見出し、本酵素の大腸菌での高生産系を構築した。その後KM1LAEの精製を行い、Trp-His合成を行った。今回はTrp-HisおよびTrp-OMeの加水分解活性を抑制し、更なる高収率を目指すため有機溶媒耐性菌と報告されており、本酵素と相溶性の高い*Pseudomonas aeruginosa* PAO1由来 S9_PA1のクローニングおよび諸性質の解明を進め、KM1LAEとの比較を行ったことを報告する。

【方法・結果】

Pseudomonas sp. KM1由来L-アミノ酸エステラーゼ (KM1LAE) 遺伝子が導入されたpCold TEV由来の発現プラスミドで、大腸菌BL21 (DE3) 株を形質転換した。さらに、アフィニティー精製、陰イオン交換、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、酵素の精製を行った。最終精製酵素は、精製倍率17.26倍、比活性22.15 μ mol/min/mg (50 mM トリプトファンメチルエステル、300 mM ヒスチジン、45°C、pH 9.0、30分反応)を示した。本酵素の至適pHは9.5、至適温度は45°C、安定温度は30°C~45°C、安定pHは7.0~9.0であり、N末端基質として疎水性アミノ酸メチルエステルを好むことが分かった。最適な条件でKM1LAEによるTrp-Hisの酵素合成を行ったところ、50 mM トリプトファンメチルエステル、300 mM ヒスチジンを基質として12.3 mMのTrp-Hisが生成した。また、S9_PA1に関してもKM1LAEと同様に遺伝子をクローニングし、pCold TEV由来プラスミドで形質転換した大腸菌BL21 (DE3) 株から精製を行った。結果としてS9_PA1はTrp-His合成能を有し、N末端基質特異性がKM1LAEと類似していた。その上、20%DMSOの存在下において90%以上の残存活性を示したことから、今後、加水分解反応を低減したTrp-His合成への応用が可能と考えられる。

【背景】

生体膜を構成する膜脂質の化学構造や構成比率は、生体膜の物理化学的な性質を支配するだけでなく、種々の膜タンパク質の機能や構造の制御に関わり、生理学的に重要な要素である。

リン脂質ホスファチジルグリセロール (PG、Fig. 1左) は、チラコイド膜に存在する唯一の陰性リン脂質であり、光化学系 I および光化学系 II の構

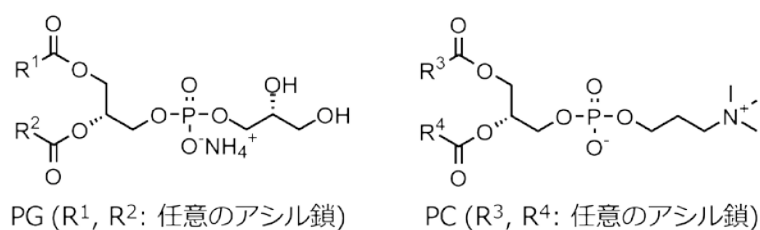


Fig. 1 PG および PC の化学構造

造維持に必須である。しかし、PGの具体的な機能はほとんどわかっていない。また、リン脂質ホスファチジルコリン (PC、Fig. 1右) は、細胞膜やミトコンドリア膜を構成する主要な中性リン脂質であり、種々のタンパク質との相互作用が指摘されている。特に、PCのオルガネラ間輸送や脂肪酸部の代謝は、膜脂質の組成変化を介した様々な生理活性に影響することが知られている。

【目的】

膜脂質の機能解析では、目的に応じた人工膜脂質をデザイン・合成して用いることが有効である。そこで本研究では、リン脂質を用いた光親和性標識実験を可能とする光反応性プローブの効率的合成方法を確立することを目的とした。

【方法・結果】

Fig. 2に示す光反応性リン脂質プローブを合成した。リン酸基の導入では、ホスホロアミダイト法の条件検討を行うことで、収率と再現性が大幅に向上した。この方法によれば、多様な光反応性リン脂質を合成することが可能であり、リン脂質の機能解析における幅広い活用が期待できる。

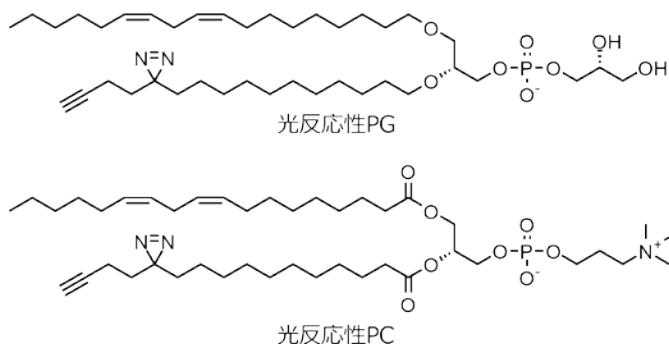


Fig. 2 本研究で合成したプローブ

特別講演 日本農芸化学会関西支部技術賞 受賞講演

グリコーゲンの酵素的製造方法の開発と応用研究

古屋敷 隆¹、角谷 亮¹、梶浦 英樹²、高田 洋樹³

¹江崎グリコ(株)健康研、²グリコ栄養食品(株)開発研、³グリコ栄養食品(株)品保部

グリコグループはグリコーゲンから生まれた。創業者の江崎利一が「食品による国民の体位向上」という理念のもと、牡蠣の煮汁に含まれていたグリコーゲンをキャラメルに配合し、栄養菓子「グリコ」を発売したのが始まりである。

グリコーゲンはグルコースのポリマーで、 α -1,4 および α -1,6 結合からなる樹状の分岐構造をもった動物の貯蔵多糖として知られている。古くから滋養強壮や栄養強化などに利用されており、「体に良い」と信じられてきたが、グリコーゲンの健康増進効果を科学的に示すデータはほとんど存在しなかった。そこで、我々は、グリコーゲンの健康増進効果の解明と産業利用拡大を目的として、高純度かつ工業レベルで製造可能なグリコーゲンの合成方法の開発に取り組んだ。江崎グリコ(株)生物化学研究所（現健康科学研究所）で長年培ってきた糖質加工技術を駆使し、数々の試作を繰り返した結果、植物デンプンからグリコーゲンを合成する技術の開発に成功した。具体的には、イソアミラーゼにより α -1,6 結合を完全に切断した後、ブランチングエンザイム（BE）とアミロマルターゼ（MalQ）による枝付けおよび不均化反応を同時に行うことで、効率よくグリコーゲンを合成できることを見出した（1）。本製法で得られるグリコーゲンは、分子内の鎖長や分岐度、電子顕微鏡による形状観察、固有粘度など種々の物理化学的性質において、天然のグリコーゲンと同等の構造および性質を有することが明らかになった（2）。独自に開発した BE と MalQ は、食品添加物として使用する認可を受け、食品素材として応用できるグリコーゲンを工業生産することが可能になった。

本グリコーゲンをを用いて機能性の解析を進めた結果、これまでに、以下の効果を確認した。①免疫賦活効果：グリコーゲンをマウスに経口投与すると、全身の免疫力が高まることを明らかにした。そのメカニズムとして、グリコーゲンが免疫細胞の Toll 様受容体に認識され、細胞内シグナルを伝達することを見出した（3-5）。②抗肥満効果：グリコーゲンを経口摂取すると、一部が食物繊維として腸内細菌に資化されることで短鎖脂肪酸へと変換され、腸内のビフィズス菌を増やすことが分かった。同時に、脂肪の吸収を抑制して、体脂肪の蓄積を抑制することを明らかにした（6、7）。③認知機能向上効果：ヒトを対象とした試験の結果、グリコーゲンを 5g/日で 1 カ月間摂取することで、記憶力や認識力が高まることを明らかにした。④表皮細胞活性化効果：ヒト表皮細胞をグリコーゲンで刺激すると、ATP やヒアルロン酸、セラミドの産生を促進することを明らかにした。表皮細胞に対する効果を、ヒトの試験で検証したところ、グリコーゲン

を1カ月間塗布することで、角層の水分量、毛穴の面積、乾燥による小じわが改善することを確認した。上述のように、健康増進効果や肌への有効性が明らかになり、現在では化粧品原料、食品原料として産業利用を進めている。肌への効果を活用し、2012年に自社化粧品ブランドを立ち上げ、販売を開始した。グリコーゲンの機能を活かした製品開発を継続しており、現在は7品目を展開中である。

1. H. Kajiura, R. Kakutani, T. Akiyama, H. Takata and T. Kuriki. *Biocatal. Biotransform.* (2008) **26**: 133–140
2. Kajiura H, Takata H, Kuriki T, Kitamura S. *Carbohydr Res.* (2010) **345**: 817-24.
3. Kakutani R, Adachi Y, Kajiura H, Takata H, Kuriki T, Ohno N. *Carbohydr Res.* (2007) **342**: 2371-9.
4. Kakutani R, Adachi Y, Takata H, Kuriki T, Ohno N. *Glycobiology.* (2012) **22**: 146-59
5. Kakutani R, Adachi Y, Kajiura H, Takata H, Kuriki T, Ohno N. *Int Immunopharmacol.* (2012) **12**: 80-7.
6. Furuyashiki T, Takata H, Kojima I, Kuriki T, Fukuda I, Ashida H. *Food Funct.* (2011) **2**: 183-9.
7. Furuyashiki T, Ogawa R, Nakayama Y, Honda K, Kamisoyama H, Takata H, Yasuda M, Kuriki T, Ashida H. *Nutr Res.* (2013) **33**: 743-52.

特別講演 日本農芸化学会関西支部技術賞 受賞講演

新たな乳酸菌コーティング技術の開発と食品への応用展開

久 景子¹、宇佐美クラック 陽子²、岸野 重信³、小川 順³

¹日東薬品工業株式会社、²株式会社ロッテ、³京都大学農学研究科・応用生命科学専攻

近年、乳酸菌の機能性に関して、整腸作用に留まらず、免疫賦活作用や内臓脂肪蓄積抑制作用など、多種多様な研究成果が報告されている。それに伴い、乳酸菌のニーズは年々高まりをみせ、機能性食品市場の拡大を牽引している。しかしながら、生菌として乳酸菌が配合される食品は、常温で長期保存することが難しいため、一般的には冷蔵で保管されており、賞味期限も短い。それゆえ限られた製品でしか摂ることができなかった。

これら乳酸菌の弱点をカバーし、さらに利点を最大限に発揮するため、乳酸菌を「生きたまま」「おいしく」「いつでもどこでも」摂れることをコンセプトとする新たなプロバイオティクス製品を開発することを目指した。

製品開発にあたっては、医薬品の製剤化技術の一つで、吸湿防止、接触回避、耐酸性向上が可能となる油脂コーティング技術の適用を着想し、お菓子として長年愛され、また油脂素材としてカカオ油脂を豊富に含むチョコレートに応用する研究を展開し、乳酸菌をチョコレートで包む方法を確立した¹⁾。さらにチョコレートの平均粒子径を限られた大きさに均一化する最適条件を見出したことで防湿効果が高まり、水分に弱い乳酸菌の安定性を格段に向上させることにも成功した（特許査定）²⁾。その結果、本乳酸菌含有チョコレートは常温保存でも乳酸菌の生菌数がほとんど低下せず、長期保存が可能となった。

乳酸菌がチョコレートに包まれることによる防湿効果の向上は、胃酸への暴露防止においても有効であった³⁾。さらに、ヒト臨床試験においても、*Lactobacillus brevis* NTT001（乳酸菌ブレビス T001 株）含有チョコレートを摂取すると生きて腸まで届くことが確認された⁴⁾。

この新技術により、腸における乳酸菌のプロバイオティクス効果を向上させる可能性を見出せた。本技術を適用した乳酸菌ブレビス T001 株は約 170 菌株の中から選抜した高いプリンヌクレオシダーゼ活性を有する乳酸菌である⁵⁾。食品由来の主要なプリン体であるプリンヌクレオシドは、腸内細菌による代謝を受け、経腸吸収されにくいプリン塩基となる。乳酸菌ブレビス T001 株の持つ高い酵素活性によってプリン体を経腸吸収されにくい形に変換することで、尿酸

値の上昇を抑えられると考えられる。この酵素活性を指標に、模擬人工胃液暴露後の乳酸菌ブレビス T001 株のプリンヌクレオシダーゼ活性を測定したところ、チョコレートに配合することで、酵素活性の失活が抑制された。本結果より、チョコレートコーティングによる乳酸菌の胃酸耐性向上が酵素活性保持の観点からも有効である可能性が示された^{3,6)}。

乳酸菌の新たな加工技術として、油脂コーティング技術を基盤としたチョコレートコーティング技術を開発することで生菌の長期保存を可能とし、また“乳酸菌を生きたまま腸まで届ける”ことによるプロバイオティクス効果の顕在化に成功した。本技術の確立によって実現した乳酸菌含有チョコレートの大ヒットをきっかけに乳酸菌への関心がより一層高まり、各方面から高い評価を得ている。

- 1)特願 2016-543748 乳酸菌含有油脂組成物およびその製造方法
- 2)特願 2016-158335 乳酸菌含有チョコレートおよびその製造方法
- 3)Y. Yonejima, K. Hisa, M. Kawaguchi, H. Ashitani, T. Koyama, Y. Usamikrank, N. Kishida, S. Kishino, J. Ogawa. *Biocatal Agric Biotechnol*, 4(4), 773-777 (2015).
- 4)樋口 裕明、吉田 圭司郎、西村 聡、米島 靖記、久 景子、鈴木 聡、大澤 謙二
薬理と治療 45(6),967-973(2017)
- 5)岸田 奈弓、岸野 重信、雑賀 あずさ、米島 靖記、小川 順
高いプリン体代謝活性を有する乳酸菌の探索 日本農芸化学会 2016 年度大会 4F166
- 6)米島 靖記、久 景子、松原 由以子
化学と生物 56(1), 47-51 (2018)

特別講演 農芸化学女性企業研究者賞 受賞講演

ポリフェノールの機能解明に関する研究とその応用開発

小野 佳子

サントリーウエルネス株式会社 健康科学研究所

植物は様々な外敵やストレスから自分自身の身を守るためポリフェノールをその体内に合成する能力を有している。我々は、古くから健康に良いとされる食品に含まれる機能性成分、特に植物に含まれるポリフェノールに着目し、その効能とメカニズムに関する研究を長年にわたり続けている。ポリフェノールは反応性の高い水酸基を持ち、ベーシックな機能として抗酸化作用を有する点は共通しているが、化合物によって、吸収・分布・代謝・排泄（ADME）などが異なり、それぞれに固有の特性を有している。ADME を理解した上で効能特性をとらえることで、より効果的に健康維持に役立つ商品を開発することができた。筆者らが行ってきたポリフェノールなどに関する研究をいくつか紹介する。

1. セサミン^{1,4)}

セサミンはアラキドン酸の発酵生産研究の過程で、 $\Delta 5$ 不飽和化酵素阻害作用を持つ物質としてゴマの中から同定された。これまでに、多くの研究者により様々な効能が明らかにされている。日常的に疲労を感じる健常男女にセサミン含有サプリメントを8週間摂取させることで、LDL 酸化耐性の向上と睡眠の質や美容に関する主観的状态が改善することを確認した。1993年にサプリメントとして上市し、今年で発売25年目を迎える。研究の過程で、新たに発見した効能や他成分との組み合わせについて特許を取得するとともに、商品リニューアルへとつなげ、現在は「セサミン EX」として発売し、機能性表示食品としても受理されている。

2. ウーロン茶重合ポリフェノール (OTPP)⁵⁾

特保ウーロン茶の開発をめざし、ウーロン茶ポリフェノールの中でも、茶葉を半発酵させる過程でカテキン類が重合したウーロン茶特有の成分・ウーロン茶重合ポリフェノール(OTPP)が *in vitro* で強いリパーゼ阻害作用を持つこと、脂肪摂取後の血中中性脂肪の上昇を抑制することを確認した。2006年に「食後の血中中性脂肪の上昇を抑える」という特定保健用食品のヘルスクレームを取得し、「黒烏龍茶」として上市されている。

3. ケルセチン配糖体⁶⁾

ケルセチン配糖体はエンジュから抽出したルチンを原料に酵素処理して得られた素材である。水溶性に優れ、生体利用率が非常に高いことが期待された。ヒトにおいてケルセチン配糖体 45mg の摂取で血中 ORAC 活性が上昇することを確認し、その抗酸化・

抗炎症作用を期待して「グルコサミンアクティブ」に配合して販売している。さらに、ケルセチン配糖体含有サプリメントでのヒト臨床試験を実施し、4 か月間の継続摂取により通常歩行速度が向上することを明らかにして、「ロコモア」の上市を実現した。

4. オリーブとブドウのポリフェノール⁷⁾

地中海式食事法は地中海地域で日常的に摂取されている食習慣であり、**quality of life** の維持に役立つ理想的な食事法として知られている。そこで地中海地域で好んで食されているオリーブとブドウのポリフェノールに着目し、ヒト臨床試験において、オリーブとブドウのポリフェノールの 4 週間の摂取が、血管内皮機能の指標である **Flow-mediated vasodilation (FMD)** を有意に改善すること、尿中 8-OHdG 排泄量を低下させることを確認した。これらを含むサプリメントは「サンオレア」として上市されている。

入社以来、植物に含まれるポリフェノールを中心に効能評価を続けてきた。植物に含まれる成分は多種多様で、それぞれに特徴的な成分が含まれることは興味深い。研究を通じてこれらの作用を科学的に明らかにでき、少しでも皆様の健康維持のお役に立つことができれば幸いである。

(引用文献)

- 1) Nakano D, Kwak CJ, Fujii K, Ikemura K, Satake A, Ohkita M, Takaoka M, Ono Y, Nakai M, Tomimori N, Kiso Y, Matsu-mura Y, *J Pharmacol Exp Ther.*, 318(1), 328-335, (2006)
- 2) Tada M, Ono Y, Nakai M, Harada M, Shibata H, Kiso Y, Ogata T, *Anal. Sci.*, 29(1), 89-94, (2013)
- 3) Takada S, Kinugawa S, Matsushima S, Takemoto D, Furi-hata T, Mizushima W, Fukushima A, Yokota T, Ono Y, Shi-bata H, Okita K, Tsutsui H, *Exp Physiol.*, 100(11), 1319-1330, (2015)
- 4) Tomimori N, Rogi T, Shibata H, *Mol Nutr Food Res.*, Dec 19, (2016)
- 5) Toyoda-Ono Y, Yoshimura M, Nakai M, Fukui Y, Asami S, Shibata H, Kiso Y, Ikeda I, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71(4), 971-976, (2007)
- 6) Kanzaki N, Ono Y, Shibata H, Moritani T. *Clin Interv Aging.* 10, 1743-1753, (2015)
- 7) 小南優, 安武瑤子, 小野佳子, 坂野克久, 海老原淑子, 柴田浩志, 薬理と治療, 43(8), 1181-1191, (2015)

(略歴)

1986 年 3 月	神戸大学農学部農芸化学科卒業	農学士
1986 年 4 月	サントリー株式会社入社	応用微生物研究所配属
1987 年 9 月	同	基礎研究所配属
2001 年 3 月	同	健康科学研究所配属
2005 年 3 月	博士取得 (理学、大阪市立大学)	
2007 年 7 月	主任研究員	
2009 年 4 月	サントリーウエルネス株式会社に社名変更	
2011 年 4 月	同	課長
2013 年 1 月	同	研究主幹

MEMO

<お知らせ>

○支部参与会は、11:45 から京都大学時計台記念館 2 階 国際交流ホール II にて開催いたします。

○次回例会(第 503 回講演会)予定

日時:平成 30 年 5 月 19 日(土) 会場:京都府立大学

講演申込締切:平成 30 年 4 月 20 日(金)

講演要旨締切:平成 30 年 4 月 27 日(金)

問い合わせ先: 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

京都府立大学大学院生命環境科学研究科

辻本 善之

(E-mail : yoshi_t@kpu.ac.jp、Tel & Fax: 075-703-5669)

公益社団法人日本農芸化学会関西支部

〒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

発行日:平成 30 年 2 月 3 日

庶務幹事:神戸 大朋

E-mail : kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp

Tel: 075-753-6273

Fax: 075-753-6274

会計幹事:岸野 重信

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

Tel: 075-753-6122

FAX: 075-753-6113

支部ホームページ <http://kansai.jsbba.or.jp/>

