

日本農芸化学会関西支部 第 503 回講演会

講演要旨集

平成30年5月19日（土）

京都府立大学
稲森記念会館

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

日本農芸化学会関西支部例会(第 503 回講演会)

日時：2018 年 5 月 19 日（土）

会場：京都府立大学 稲盛記念会館 104 講義室（京都市左京区下鴨半木町）

◇開会の辞（12:30～12:35）

◇一般講演（12:35～15:20）

◇受賞講演（15:30～17:00）

農芸化学奨励賞 受賞講演

- ・藻類での有用脂質生産と脂質蓄積制御因子の同定
○梶川昌孝氏〈京都大学〉
- ・エネルギー代謝を制御する食品成分とその作用機構に関する研究
○後藤剛氏〈京都大学〉

農芸化学若手女性研究者賞

- ・微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用
○梅川碧里氏〈京都大学、現 三重大学〉

◇産学交流会講演会（17:00～17:40）

- ・糖脂質型バイオサーファクタント“ソホロリピッド®”の工業的生産と洗浄剤への応用
○平田善彦氏〈サラヤ株式会社〉

◇優秀発表賞（支部長推薦）優秀発表賞（賛助企業推薦）表彰式（17:40-17:50）

◇懇親会（18:00～20:00）

会場：京都府立大学 稲盛記念会館 Deli Cafe たまご 京都北山

主催：公益社団法人日本農芸化学会関西支部

第 503 回講演会

開催校代表：高野 和文（京都府立大学 大学院 生命環境科学研究科）

開催校庶務：辻本 善之（京都府立大学 大学院 生命環境科学研究科）

日本農芸化学会関西支部 第 503 回講演会

プログラム

◇開会の辞(12:30~12:35)

◇一般講演(12:35~15:20) 【発表：15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 D-リジン異化代謝オペロン制御因子に対するエフェクターおよび DNA の結合解析

○黒石和樹, 佐藤大起, 戸部隆太, 三原久明 (立命館大・生命科学)

2 *Geobacillus stearothermophilus* 由来トランスグルタミナーゼに関する研究: 発現精製および変異体の性状解析

○京逸如, 保川清, 滝田禎亮 (京大院・農)

* 3 新規ホスホリパーゼ A₁ の成熟型とプロ型の性質比較 -高効率なリン脂質の改変を目指して-

○田中秀典¹, 大道大², 齋藤遼¹, 古谷洋人¹, 辻本善之^{1,2}, 茂里康³, 渡部邦彦^{1,2}

(¹京府大院・生命環境, ²京府大・生命環境, ³産総研)

* 4 乳酸菌由来脂肪酸の動脈硬化抑制効果の検証

○伊佐奈津実¹, 小倉正恒², 岸野重信³, 小川順³, 斯波真理子², 松尾道憲¹

(¹京女大院・家政, ²国循・研, ³京大院・農)

* 5 骨格筋で PGC1 α/β を活性化させる化合物の探索系の確立

○松田凜太郎, 内富蘭, 中井志帆, 大西拓己, 畑澤幸乃, 亀井康富

(京府大院・生命環境)

* 6 食品成分による ABC タンパク質の活性化効果

○高岡志帆, 松尾道憲 (京女大院・家政)

* 7 ヒ素輸送体 ArsB とオルガネラターゲティング技術を利用したヒ素耐性植物の作製

○出呂町祐典¹, 西村浩二², 清野正子³, 浦口晋平³, 佐藤雅彦¹, 平野朋子¹

(¹京府大院・生命環境科学, ²島根大院・生物資源科学, ³北里大・薬)

8 リボヌクレアーゼ H2 を欠損した NIH3T3 細胞株の樹立とその性状解析

月足元希, 馬場美聡, ○児島憲二, 滝田禎亮, 保川清 (京大院・農)

◇受賞講演（15:30～17:00）

農芸化学奨励賞 受賞講演

- ・藻類での有用脂質生産と脂質蓄積制御因子の同定

○梶川昌孝氏〈京都大学〉

- ・エネルギー代謝を制御する食品成分とその作用機構に関する研究

○後藤剛氏〈京都大学〉

農芸化学若手女性研究者賞

- ・微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用

○梅川碧里氏〈京都大学、現 三重大学〉

◇産学交流会講演会（17:00～17:40）

- ・糖脂質型バイオサーファクタント“ソホロリピッド®”の工業的生産と洗剤への応用

○平田善彦氏〈サラヤ株式会社〉

◇優秀発表賞（支部長推薦）優秀発表賞（賛助企業推薦）表彰式（17:40-17:50）

◇懇親会（18:00～20:00）

会場：京都府立大学 稲盛記念会館 Deli Cafe たまご 京都北山

参加費：オンライン決済 一般 3,500 円、学生 500 円

当日支払い：一般 4,000 円、学生 1,000 円

（口頭発表する学生は無料）

D-リジン異化代謝オペロン制御因子に対するエフェクターおよび DNA の結合解析

* 1

○黒石和樹、佐藤大起、戸部隆太、三原久明

(立命館大・生命科学)

【目的】 *Pseudomonas putida* KT2440 は、D-リジン異化代謝系を有しており、D-リジンを唯一の C 源・N 源とする培地で良好に生育できる。本菌における D-リジン異化代謝酵素である D-リジンデヒドロゲナーゼ (AmaD) は、D-リジンから Δ^1 -ピペリدين-2-カルボン酸への変換を触媒する。amaD は、隣接する 5つの遺伝子 (dlcR、dlcA、dlcB、dlcC、dlcE) とオペロン (dlc オペロン) を構成している。我々は、これまでの研究により、dlcA-dlcC、dlcE が塩基性 D-アミノ酸特異的なインポーターをコードすることを明らかにしてきた。本オペロンの最上流に位置する dlcR 遺伝子は、RpiR ファミリーに属する転写制御因子をコードする。dlcR 遺伝子欠損株を用いた解析により、DlcR が dlc オペロンのリプレッサーとして機能すること、また、dlc オペロンの発現抑制は D-リジンまたは L-リジンの存在下で解除されることが示唆されている。そこで本研究では、DlcR に対する塩基性アミノ酸および DNA の結合特性を解析することにより、DlcR を介する dlc オペロンの転写制御の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 *P. putida* KT2440 株由来の dlcR 遺伝子をクローニングし、大腸菌を宿主とする dlcR 高発現株を構築した。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。DlcR が結合する DNA 領域を特定するために、ゲルシフトアッセイを行った。その結果、DlcR は本遺伝子上流部に位置する推定パリンドロームを含む DNA 断片に特異的に結合することが示された。また、DlcR の DNA への結合は、D-リジンおよび D-アルギニン、D-オルニチン存在下で解除され、L-体を含む他のアミノ酸では解除されないことを見出した。D-リジンおよび D-アルギニン、D-オルニチンに対する DlcR の親和性を明らかにするため、本精製タンパク質を用いたトリプトファン蛍光法により、それぞれの解離定数 (K_D) を算出した。その結果、D-リジンおよび D-オルニチン、D-アルギニンの順に親和性が高いことが明らかになった。以上の結果から、DlcR は、D-リジン、D-アルギニン、D-オルニチンをインデューサー分子として機能する dlc オペロンのリプレッサーであることが示唆された。

【目的】

トランスグルタミナーゼ(TG)は、タンパク質のグルタミン側鎖とリシン側鎖の架橋反応を触媒し、食肉等の弾力性を改善するために用いられる。現在、*Streptomyces mobaraensis*由来のTGが商品化されている。最近、*Bacillus subtilis*由来のTG(BsTgl)の結晶構造と性質が報告された¹⁾。BsTglは、これまでに報告された最小のTGであり、*S. mobaraensis*由来のTGに対し類似性を示さない。本研究では、耐熱性に優れていると考えられる*Geobacillus stearothermophilus*由来のTG(GsTgl)について、様々な発現系を構築し、精製条件および活性測定法を検討し、15種の変異体の活性を調べた。GsTglは、BsTglにないC末端伸長配列(Ex:27残基)を有する。

【方法・結果】

8種類の発現系を構築した：タグなし(GsTgl)；N末端にHisタグ(H₆GsTgl)；C末端にHisタグ(GsTglH₆)；C末端に(GlySer)₄リンカーとHisタグ(GsTgl(GS)₄H₆)；C末端に(GlySer)₅リンカーとHisタグ(GsTgl(GS)₅H₆)；C末端に(AspSer)₅リンカーとHisタグ(GsTgl(DS)₅H₆)；Exを欠失(GsTglΔEx)；Exを欠失しHisタグ(GsTglΔExH₆)。20°Cで培養菌体の可溶性画分をSDS-PAGEに供すると、いずれの発現系においても目的バンドが確認された。抗Hisタグ抗体を用いたウェスタンブロット解析をおこなうと、全てのHisタグ付加GsTglについて目的バンドが確認された。しかし、Ni²⁺アフィニティー担体に結合したのは、GsTgl(DS)₅H₆とGsTglΔExH₆のみであり、その他のGsTglではHisタグが溶媒に露出していないと考えられた。アシル供与体(Z-DQMD-AFC：下線はアミノ酸残基)、アシル受容体(K-MCA、KA-MCA、Boc-VLK-MCA、Boc-EKK-MCA)、および精製酵素(GsTgl、GsTgl(DS)₅H₆、GsTglΔExH₆)を37°Cで反応させると、いずれの場合も、励起波長325 nmで、蛍光ピーク波長が390 nmから443 nmに移動した。443 nmの蛍光強度の増加は時間に対し直線を示し、この傾きから初速度を算出すると、いずれのアシル受容体を用いた場合も、GsTgl(DS)₅H₆の活性が最も高かった。GsTglΔExH₆の活性部位の8残基(F69、E115、C116、W149、Y171、E187、N188、H200)を置換した15種の一重変異体を発現精製した。これらの活性を、KA-MCAとZ-DQMD-AFCを用い、上記の方法で比較すると、9種の変異体で活性上昇し、4種の変異体(F70W、W150A、W150F、E189A)では10倍以上活性が上昇した。

【文献】

1. Fernandes, C. G. et al. *Biochemistry*, 54, 5723-5734 (2015)

新規ホスホリパーゼ A₁ の成熟型とプロ型の性質比較 -高効率なリン脂質の改変を目指して-

* 3

○田中 秀典¹、大道 大²、齋藤 遼¹、古谷 洋人¹、辻本 善之^{1,2}、茂里康³、渡部 邦彦^{1,2} (¹京府大院・生命環境、²京府大・生命環境、³産総研)

【背景・目的】 リン脂質を加水分解するホスホリパーゼ (PL) は油脂の精製や、機能性リン脂質や乳化性に優れたリゾリン脂質の製造等の脂質改変に利用されている。しかし、宗教や病原性の問題、そしてPLが細胞膜を破壊することによる異種発現系での大量調製の困難さのため、産業利用可能な酵素は限られている。そのため、安定性に優れ高い位置選択性を有する安価で大量調製可能な代替酵素が求められている。そこで、我々は好熱性細菌に注目し、アシドロコンポストより *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T株を単離した*。B157^T株はリン脂質の *sn*-1位に選択性の高いホスホリパーゼA₁ (PLA₁) を細胞外に分泌する。このPLA₁はシグナル配列等が切れ、C末端側にpro domain (23.6 kDa) を持つ活性のほとんど無いプロ型酵素 (PlaA-C-pro, 52.5 kDa) として分泌された後、細胞外でプロセッシングされ、成熟型酵素 (PlaA, 28.9 kDa) へと活性化される。また、我々は組換えPlaA-C-proをSDSで処理するとプロセッシング無しに活性を持つ酵素 (activated PlaA-C-pro) になることを明らかにした。そこで、PlaAとactivated PlaA-C-proの性質を比較することとした。

【方法・結果】 B157^T株由来のPlaA-C-proをコードする遺伝子を大腸菌で発現し、組換えPlaA-C-proを精製した。次に、pro domainをproteinase Kで分解・切断し、CM-celluloseを用いてPlaAを精製した。ホスファチジルコリン (PC) を基質としてPL活性を測定すると、PlaA-C-proの活性は極めて低かったが、2% SDS処理したactivated PlaA-C-proは顕著な活性を示した (PlaAの20%程度)。PlaAはPCを分解後、Lyso PC (LPC) も分解したが、activated PlaA-C-proはPCを分解するものの、LPCを分解しなかった。しかし、基質として1-acyl-LPCを用いると、LPCを分解した。PlaAはPCの *sn*-1位を選択的に分解し、その後2-acyl-LPCをも分解するが、activated PlaA-C-proはPCとLPCどちらに対しても *sn*-1位のみを分解することが明らかとなった。次に、基質として *p*-nitrophenyl palmitateを用いてエステラーゼ活性を測定すると、PlaAとactivated PlaA-C-proは同程度の活性を示した。これらの結果は、PlaAとactivated PlaA-C-proが異なる基質特異性を有することを示唆している。今後、その他の性質も明らかにし、性質比較を行う予定である。また、PlaAがPCとMeOHから脂肪酸メチルエステルを生成したことより、エステル交換活性を有することが判ったため、リン脂質と機能性脂肪酸から機能性リン脂質を生成することを試みる。

* *Int J Syst Evol Microbiol*, **66**, 2684-2690 (2016)

乳酸菌由来脂肪酸の動脈硬化抑制効果の検証

＊ 4 ○伊佐奈津実¹、小倉正恒²、岸野重信³、小川順³、斯波真理子²、
松尾道憲¹

(¹京女大院・家政、²国循・研、³京大院・農)

【目的】

近年、腸内細菌とヒトの健康との関連について研究が進んでいる。我々はいくつかの乳酸菌による脂肪酸代謝物(乳酸菌由来脂肪酸)が細胞からのABCトランスポータータンパク質(ABCA1及びABCG1)によるコレステロール搬出を促進することを蛍光法で確認してきた。このことから、乳酸菌由来脂肪酸がHDLを介した動脈硬化予防効果または退縮効果を有する可能性がある。乳酸菌由来脂肪酸のうち、 γ KetoCおよびKetoCのコレステロール搬出促進作用を放射性コレステロール法で確認するとともに、上記脂肪酸投与マウスの血漿から調製したHDL分画の搬出反応に及ぼす影響を検討することを本研究の目的とした。

【方法・結果】

³Hコレステロールで標識したマウスマクロファージRAW264.7細胞に脂肪酸各100 μ MとアポA-I(HDLの担体タンパク) 10 μ g/mLまたはHDL 50 μ g/mLを添加し、24時間後のコレステロール搬出率を測定した。その結果、 γ KetoCはアポA-Iを介したABCA1によるコレステロール搬出を約1.8倍、HDLを介したABCG1によるコレステロール搬出を約1.2倍に増強した。また、KetoCはアポA-Iを介したコレステロール搬出を約2.4倍、HDLを介したコレステロール搬出を約1.8倍に増強した。次にウェスタンブロット法によりコレステロール搬出に関わるABCタンパク発現を確認した。その結果、ABCG1タンパク発現を γ KetoCは約2.6倍、KetoCは約5.3倍増加させた。さらに、マウスに上記脂肪酸 8 mg/匹を経口投与し、30分後および24時間後に得られた血漿から13%ポリエチレングリコール沈殿法によりHDL分画を調製し、コレステロール搬出率を測定した。その結果、脂肪酸を単回投与したマウスから調製したHDL分画は、コーンオイルを単回投与したコントロールと比較してコレステロール搬出を促進させなかった。以上の結果より、乳酸菌由来脂肪酸である γ KetoCとKetoCはマクロファージのABCG1タンパク発現を増強し、コレステロール搬出を促進する可能性が示唆された。一方、*in vivo*実験で上記脂肪酸がHDL分画に効果がなかった原因としては、脂肪酸がマウスの腸管で吸収された後、別の物質に代謝されている可能性が考えられる。また、脂肪酸がHDL粒子ではなく細胞膜ABCタンパクにのみ作用する可能性や単回投与では不十分であった可能性も考えられる。今後は脂肪酸の用量依存性や体内での代謝経路を検討するとともに、マウスへの反復投与でもHDL分画への影響を検討する予定である。

骨格筋で PGC1 α / β を活性化させる化合物の探索系の確立

* 5

松田凜太郎、内富蘭、中井志帆、大西拓己、畑澤幸乃、亀井康富

(京都府立大・生命環境)

【目的】

骨格筋は人体最大の組織であり、運動、エネルギー代謝、糖取り込みなどの重要な役割を果たしている。適度な運動は肥満予防、糖尿病予防、高血圧の改善など身体にとって良い効果があり、骨格筋機能の維持は健康増進に重要である。転写共役因子PGC1 α は運動により骨格筋で発現増加し、ミトコンドリアの生合成、筋線維タイプの赤筋化、脂肪酸酸化促進などエネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化する。またPGC1 β はPGC1 α と相同性が高いタンパク質としてクローニングされ、骨格筋で高い発現が見られ、エネルギー代謝に関わる遺伝子を制御する。PGC1 α とPGC1 β は運動時の代謝を活性化させることから、これらを活性化させる化合物を探索することは高齢者や寝たきりの人の運動模倣食品の開発につながると考え、本研究ではPGC1 α とPGC1 β の転写活性を促進させる化合物を探索するためのレポーターアッセイの確立を試みた。

【方法・結果・考察】

PGC1 α およびPGC1 β にGAL4 DNA領域を付加し、GAL4-PGC1 α / β 融合タンパク質を発現するプラスミドを作成した。GAL4認識配列(UAS)をプロモーター領域に付加したルシフェラーゼをレポーターとした。これらのプラスミドをHEK293T細胞に導入すると、ルシフェラーゼ活性が観察され、PGC1 α / β の転写活性の評価系となりうると考えられた。このレポーターアッセイの有用性を検証するために、PGC1を活性化させる可能性がある11種類の化合物において転写活性化能を評価した。その結果、FucoxanthinとResveratrolによってPGC1 α およびPGC1 β の顕著な転写活性化が観察された。これらのことから、培養細胞でPGC1 α およびPGC1 β の機能を促進するための化合物の評価系を確立したと考えている。さらにC2C12筋細胞にFucoxanthinとResveratrolを添加しPGC1 α / β の標的遺伝子の発現変動を検証中である。今後、食品成分560種類について、本評価系でスクリーニングを行う。

食品成分による ABC タンパク質の活性化効果

* 6 ○高岡志帆、松尾道憲

(京女大・家政)

【目的】

末梢細胞にコレステロールが過剰に蓄積すると、動脈硬化が進行し狭心症や心筋梗塞に罹るリスクも高まる。動脈硬化を抑制するには、コレステロールの体外排出を促進することが必要である。そこで体内のコレステロール輸送に関与するABCトランスポータータンパク質のABCA1、ABCG1、ABCG4、ABCG5/ABCG8に着目した。ABCA1とABCG1は末梢細胞の細胞膜に局在し、過剰のコレステロールを排出することで高密度リポタンパク質(HDL)形成に関わる。このHDL形成だけが末梢細胞に蓄積したコレステロールを除去するための唯一の経路である。ABCG4は細胞のコレステロール量を調節することによって巨核球の増殖を制御している。巨核球は動脈硬化の悪化因子である血小板の増殖に関わっている。ABCG5とABCG8はヘテロ二量体で肝細胞と小腸上皮細胞の細胞膜に局在し、コレステロールの体外排出に関わる。

これらのABCタンパク質を活性化することによってコレステロール排出を促進し、動脈硬化を防ぐことができるような食品成分を発見することを本研究の目的とした。

【方法・結果】

ABCA1、ABCG1、ABCG4、ABCG5/ABCG8をそれぞれ誘導発現させたBHK細胞に食品成分を添加してコレステロール排出量を蛍光法と比色法で測定した。その後、コレステロール排出を促進した機序を調べるために、タンパク質の発現量をウエスタンブロッティング分析で調べた。蛍光法と比色法で豆腐のエタノール抽出物、豆腐のアセトン抽出物がABCG5/ABCG8を、リコピンがABCA1によるコレステロール排出を活性化させることが分かった。また豆腐のエタノール抽出物、豆腐のアセトン抽出物についてABCG5/ABCG8のタンパク量への影響を調べるためウエスタンブロッティング分析を行った。豆腐のエタノール抽出物はABCG8のタンパク質量を上げたが、豆腐のアセトン抽出物はコントロールと変わらなかった。豆腐のエタノール抽出物はABCG8のタンパク質量を増加させることでコレステロール排出を促進させたと考えられる。

ヒ素輸送体 ArsB とオルガネラターゲティング技術を利用したヒ素耐性植物の作製

* 7

○出呂町祐典¹、西村浩二²、清野正子³、浦口晋平³、佐藤雅彦¹、平野朋子¹

(¹京府大院・生命環境科学、²島根大院・生物資源科学、³北里大・薬)

【目的】

新しいヒ素高蓄積植物の開発を目指して、重金属トランスポーターの導入により植物体のヒ素輸送能力を上昇させる点、植物体においてリザーバー能力の大きい液胞にヒ素を隔離させるという2点を重要視して研究を行った。

【方法・結果】

所属研究室の先行研究によって、小胞輸送に関与するシロイヌナズナ SNARE 分子を輸送タグとして用いるオルガネラターゲティング技術が開発された。これは、目的の膜タンパク質に SNARE 分子を付加することで、細胞膜や液胞膜といった様々なオルガネラへと局在させる技術である。我々は、オルガネラターゲティング技術によって、バクテリアのヒ素輸送体 ArsB を液胞膜に局在させることで、ヒ素を液胞内に蓄積するヒ素蓄積植物の作製によってファイトレメディエーションが可能となると考えた。そこで、ArsB を液胞膜に局在させるために、ArsB に液胞膜 SNARE タンパク質 VAMP711 を融合させたタンパク質を発現するシロイヌナズナ形質転換体の作出を試みた。その結果、ArsB の N 末端側に VAMP711 を融合させた VAMP711-ArsB-GFP (VBG)を発現する植物では、VBG が液胞膜に局在し、ヒ素に対して感受性を示した。一方、ArsB の C 末端に VAMP711 を融合させた GFP-ArsB-VAMP711 (GBV) を発現する植物では、GBV が細胞膜に局在し、ヒ素に対する耐性を示した。これらの結果から、VBG 形質転換植物は、液胞膜に局在した ArsB が液胞内に許容量を超えたヒ素を蓄積させたため、ヒ素感受性を示し、GBV 形質転換植物は、細胞膜に局在した ArsB によってヒ素が細胞外に排出され、根でヒ素耐性を示したと考えられる。

リボヌクレアーゼ H2 を欠損した NIH3T3 細胞株の樹立とその性状解析

月足元希、馬場美聡、○児島憲二、滝田禎亮、保川 清

(京大院・農)

【目的】リボヌクレアーゼH (RNase H) は、RNA/DNAハイブリッド (R/D) のRNAを加水分解する酵素であり、アミノ酸配列と基質特異性に基づき、I型のRNase H1およびII型のRNase H2 (RH2) に分類される。真核生物のRH2は、活性部位があるAサブユニットとBおよびCサブユニットから成るヘテロ三量体である。RH2は、二本鎖DNAに1個だけ埋め込まれたリボヌクレオチド (R) の5'側を切断する活性と、R/Dの連続するRを切断する活性を有する。近年、DNA複製時にDNAポリメラーゼによりゲノムにRが取り込まれること、そしてRH2がそれを除去しゲノム安定性維持に寄与していることが明らかになった¹⁾。また、転写時に生じるRループのプロセシングの異常はゲノムの不安定化につながると考えられ、RH2がこれを解消していることが明らかになった。本研究では、CRISPR/Cas9システムを用いて、RH2を欠損したマウス胎児由来NIH3T3細胞株を樹立し、その性質を検討した。

【方法・結果】RH2のAサブユニットをコードする遺伝子 (*Rnaseh2a*) のエキソン2を標的としたガイドRNAを設計し、それを発現させるためのオリゴDNAをpGuide-it-ZsGreen1ベクター (Clontech) に導入した。得られたベクターをNIH3T3細胞にトランスフェクションし、限界希釈法により単一クローンを得た。4個のクローンについて標的配列をPCRにより増幅し、増幅産物の塩基配列を解析したところ、16塩基が欠失しフレームシフト変異を起こしていると考えられる1クローン (KO株) が得られた。野生株およびKO株の細胞溶解液について、RH2のAサブユニットに対する抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、KO株ではAサブユニットが発現していないことを確認した。また、1個のRを含む12 bpの二本鎖DNAを基質として、細胞溶解液におけるRH2の酵素活性を測定したところ、KO株では活性が検出されなかったことからRH2が発現していないことを確認した。次に、野生株およびKO株のゲノム中のRの含量を比較するため、両株から抽出したゲノムDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動に供した。野生株に比べて、KO株のゲノムDNAはより低分子側に移動したことから、RH2の欠損によりゲノムにRが蓄積されていることが示唆された。MTT法により両株の細胞増殖速度を比較したところ、対数増殖期における倍加時間は野生株が18時間、KO株が29時間であり、RH2の欠損により細胞増殖速度が低下した。

1) Reijns, M.A. et al. *Cell* **149**, 1008-1022 (2012)

2018 年度 農芸化学奨励賞

受賞講演 藻類での有用脂質生産と脂質蓄積制御因子の同定
○梶川昌孝(京都大学大学院生命研究科)

はじめに

多くの藻類は窒素欠乏に応答して脂質・デンプンを高蓄積するが、栄養欠乏は藻類の生育を停止させる。良好な生育と高い生産性を両立させるために脂質・デンプン蓄積の分子機構を理解し制御する必要がある。しかし脂質・デンプン蓄積誘導の分子機構の全体像の解明には至っていない。筆者はモデル緑藻のクラミドモナスを用いて脂質蓄積異常変異体の探索と原因遺伝子の解析によりその分子機構の解明を進めた。また藻類はその高い光合成能や増殖能を活用した有用物質生産の場としても注目されている。そこで脂質蓄積制御因子の研究と並行し、藻類での代謝工学による有用物質生産の可能性を探るため、実用珪藻ツノケイソウを用いた有用脂肪酸リシノール酸の生産を行った。以下に各研究の概略を記す。

1. 緑藻の窒素欠乏時の脂質蓄積制御因子 TAR1 の解析

緑藻クラミドモナスの脂質蓄積異常変異体を解析し、栄養欠乏応答の鍵となる制御因子 TAR1 を見出した¹⁾。TAR1 遺伝子は DYRK ファミリーの Yak1 サブファミリーに属するタンパク質リン酸化酵素をコードしており、光混合栄養条件において窒素や硫黄の欠乏に応答してクロロフィル分解と光合成活性を低下させ、培地中の酢酸からの脂質の生合成と蓄積を正に制御する因子であった。Yak1 サブファミリーは植物・藻類・菌類に広く保存されているが、実験開始当時、酵母 Yak1 以外の機能は不明であった。次世代シーケンスを用いた RNAseq による網羅的遺伝子発現解析から、葉緑体タンパク質の品質管理に関わる VIPP1 遺伝子やクロロフィル生合成に関与する複数の遺伝子発現が変異体で上昇していることが示された。これは藻類の栄養欠乏応答と遺伝子発現制御にタンパク質リン酸化酵素が重要な役割を担うことを示した最初の事例であるとともに、他の藻類においても TAR1 オーソログ遺伝子が脂質蓄積量を増大するための育種ターゲットとなる可能性を示唆する。

2. 分子育種による藻類をプラットフォームとした有用脂質生産 —ツノケイソウでのリシノール酸生産

水酸化脂肪酸のリシノール酸は鎮痛剤や抗炎症剤といった医薬品や携帯電話等に使われる機能性プラスチック、ならびに自動車エンジンの潤滑油の原料として利用されている。現在、リシノール酸はトウゴマの種子油から精製されているが、原料のトウゴマの種子は毒性物質をもつ点、海外からの種子の供給量が低下していること等の

問題があり、他生物を用いた代替生産方法の確立が求められている。リシノール酸の代替生産を行う候補としてツノケイソウに着目した。ツノケイソウは牡蠣やウニの養殖で餌として利用されており中性脂質を高蓄積する性質をもつ。筆者らの共同研究グループにより、高効率な外来遺伝子の導入が可能となった。そこで、麦角菌由来のリシノール酸生合成酵素(脂肪酸水酸化酵素)遺伝子 *CpFAH* を導入した形質転換体を作成し、ツノケイソウでのリシノール酸生産を試みた²⁾。*CpFAH* 発現株の中で最もリシノール酸を生産した Cp4 株を用いて、生育可能な 15°C から 25°C までの範囲で蓄積量が最大となる温度を調べた結果、最も低温の 15°C で培養 7 日目に細胞あたり 2.2 pg 蓄積した。これは全ての脂質を構成する脂肪酸の 8.8%に相当する。リシノール酸は内在性の脂肪酸であるオレイン酸(炭素鎖 18)から生合成されるが、ツノケイソウの脂質はオレイン酸よりも鎖長の短いパルミチン酸(炭素鎖 16)をより多く含む。そこでパルミチン酸を炭素鎖 18 の脂肪酸に変換してオレイン酸の供給量を増やすために、糸状菌由来のパルミチン酸特異的な鎖長延長酵素遺伝子 *MALCE1* を Cp4 株に導入した。その結果、リシノール酸の含有量は 1.5 倍多くなり細胞あたり 3.3 pg、全脂質の 12%にまで増加した。一方パルミチン酸は 60%減少し、脂肪酸代謝のフラックスを変えることに成功した。Cp4 株はどの生育温度においても野生型と同様に生育する。一方、酵母に *CpFAH*を発現させた先行研究では細胞内のリシノール酸は細胞増殖を顕著に阻害し、分子内の水酸基に細胞毒性があることが示唆された。ツノケイソウではこの毒性を回避する仕組みがあると予想し、Cp4 株のリシノール酸を含む脂質の構造を決定した結果、細胞内のリシノール酸の約 70%が分子内の水酸基に他の脂肪酸が新たに 1 分子結合したエストライド構造をもつ脂質として蓄積することが判明した(図 1)。また培地中にリシノール酸メチルを添加して野生型ツノケイソウを生育させた場合にも、細胞内に取り込まれたリシノール酸は速やかにエストライドに変換されて蓄積することがわかった。以上の結果からツノケイソウは水酸基を持つリシノール酸をエストライドに変換する仕組みを持ち、分子内の水酸基を他の脂肪酸でマスクすることで細胞毒性を回避していることが示唆された。

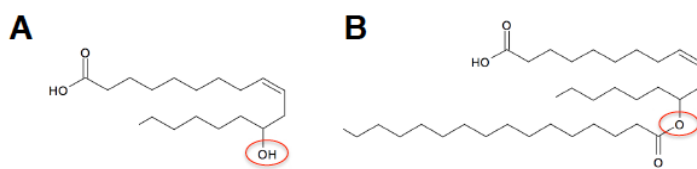


図 1. リシノール酸とエストライド
リシノール酸(A)の水酸基に他の脂肪酸のカルボキシル基がエステル結合することでエストライド(B)となる。

おわりに

本研究により、藻類の栄養欠乏下での光合成活性と代謝変動にタンパク質リン酸化酵素が重要な働きをすることが明らかになった。現在、TAR1 によってリン酸化制御を受けることが予想される新奇因子について変異体解析に基づく機能解析を進めており、TAR1 を起点としたタンパク質リン酸化の制御機構の全容解明につながると期待される。またツノケイソウのリシノール酸生産株の解析から、ツノケイソウがリシノール酸をエステル TAG へ変換する代謝経路を持つことを明らかにした。この変換反応を担う酵素を同定できれば、ツノケイソウでの生産性の強化に加えて、酵母など他の微生物での RA の細胞毒性を回避したエステル TAG の生産につながると期待される。今後も藻類の栄養欠乏への応答機構と藻類での有用物質生産という基礎と応用の両面に貢献する研究を進めていきたい。

(引用文献)

- 1) M. Kajikawa, Y. Sawaragi, H. Shinkawa, T. Yamano, A. Ando, M. Kato, M. Hirono, N. Sato & H. Fukuzawa: *Plant Physiol.*, 168, 752–764 (2015)
- 2) M. Kajikawa, T. Abe, K. Ifuku, K. Furutani, D. Yan, T. Okuda, A. Ando, S. Kishino, J. Ogawa & H. Fukuzawa: *Sci. Rep.*, 6, 36809 (2016)

謝 辞 本研究は、京都大学大学院生命科学研究科微生物細胞機構学分野において実施されたものです。この研究の機会を与えていただくとともに、日々ご指導、ご支援を賜りました福澤秀哉教授に心より御礼申し上げます。京都大学大学院農学研究科教授・小川順先生、お茶の水女子大学基幹研究院教授・加藤美砂子先生、京都大学大学院生命科学研究科助教・伊福健太郎先生、東京大学大学院総合文化研究科教授・佐藤直樹先生、法政大学生命科学部教授・廣野雅文先生との共同研究によって本課題が推進されましたことに御礼申し上げます。また本研究を支えてくださいました研究室のスタッフならびに共に研究を行ってきた在学生の皆様、修了生の皆様に感謝いたします。大学院在籍時よりご指導、多くのご助言を賜りました京都大学名誉教授・故大山莞爾先生ならびに京都大学大学院生命科学研究科教授・河内孝之先生に感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦いただきました日本農芸化学会関西支部長・河田照雄先生(京都大学大学院農学研究科教授)ならびにご支援くださいました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

2018 年度 農芸化学奨励賞

受賞講演

エネルギー代謝を制御する食品成分とその作用機構に関する研究

○後藤 剛（京都大学大学院農学研究科）

はじめに

肥満は脂肪組織の過剰蓄積と定義され、肥満状態では脂肪組織の肥大化が起こるとともに、肝臓や骨格筋といった非脂肪組織における脂肪蓄積量も増大化する。過剰な脂肪蓄積は、脂肪組織や肝臓、骨格筋などの組織においてインスリンに対する感受性が低下した状態である「インスリン抵抗性」を惹起する。インスリン抵抗性は種々の生活習慣病の発症基盤となるとともに、動脈硬化症の危険因子となるため、肥満の蔓延に対する新たな予防・治療法の創出は急務の課題である。

本研究では、肥満や肥満に伴う代謝異常症の予防・改善に有用な食品由来成分および腸内細菌代謝産物について探索・機能解析を行うとともに、脂肪酸をはじめ種々の食品由来成分の受容体として機能し、生体のエネルギー代謝調節に重要な核内受容体、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体(PPARs)の生体内活性調節因子や機能について検討を行った。

1. エネルギー代謝制御に関わる食品成分および内因性因子の探索と機能解析

リガンドによって活性化される核内受容体型転写因子PPARsは、 α 、 γ 、 δ の3種のサブタイプにより構成され、生体のエネルギー代謝を制御している。PPAR α は肝臓や骨格筋において高発現し、活性化によって脂肪酸酸化を惹起する。PPAR γ は主に脂肪組織において発現し、活性化により脂肪細胞分化を促進させ、インスリン感受性が良好な小型の脂肪細胞の数を増やすことが示されている。

上記のようなPPARsの性質に着目し、食事を介した代謝異常症の予防・改善を目指し、食品および天然物由来の新規PPARsリガンドの探索を行った。リガンド候補物質として、食品を含む天然物中に幅広く存在するイソプレノイド関連物質を中心にPPARsリガンドの探索を行ったところ、いくつかのPPARs活性化化合物が得られた。これらの化合物について、肥満モデル動物を用いて有用性の評価を行ったところ、肥満によって惹起される、インスリン抵抗性、耐糖能障害、高血糖、脂肪肝をはじめとする種々の代謝異常が、得られたPPARsリガンド候補物質の摂取によって改善することが明らかになった。これらの実験動物の肝臓においては、PPAR α の標的遺伝子の発現増加が認められていたこと、またPPAR α 欠損マウスでは、いくつかの代謝異常の改善効果が認められなかったことから、その作用の少なくとも一部には肝臓でのPPAR α の活性化作用が寄与しているものと考えられた。これらの結果から、リガンド候補物質が生体に

においてもPPARsリガンドとして機能し、肥満に伴う代謝異常症改善作用を有することを示した。

次に、機能的な内因性リガンドが不明なPPAR γ の内因性リガンドについて検討し、コレステロール生合成経路の中間代謝物であるファルネシルピロリン酸(FPP)が脂肪細胞におけるPPAR γ の内因性リガンドとして機能していることを見出した。FPP添加は脂肪細胞分化を促進し、その効果はPPAR γ アンタゴニスト存在下で減弱した。また、コレステロール生合成経路上の代謝酵素阻害剤を用いて脂肪細胞内のFPP量を変動させたところ、FPP量の増減に応じて脂肪細胞分化マーカーが増減した。以上より、FPPが脂肪細胞において内因性のPPAR γ リガンドとして機能していることが示唆された。

2. 食餌脂肪酸の腸内細菌代謝産物による宿主代謝調節機構

近年、腸内細菌叢と肥満や肥満に伴う代謝異常症との関連が注目されているが、腸内細菌叢による宿主の代謝調節機構については未解明な部分が多い。本研究項目では、京都大学大学院・農学研究科の小川順教授らのグループによって明らかにされた、食餌脂肪酸を基質として腸内細菌によって特異的に産生される修飾脂肪酸の宿主代謝調節機能について検討を行った。具体的には、これらの修飾脂肪酸中に核内受容体PPARsの活性調節を介した細胞機能調節作用やマクロファージにおける分化調節・抗炎症作用を有するものが存在することを主に細胞レベルで明らかにした。実験動物レベルでも、オキソ型の修飾脂肪酸10-oxo-12(Z)-octadecenoic acid (KetoA)は、消化管において陽イオンチャネル、transient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)を活性化し、求心性迷走神経を介して脂肪組織の交感神経活動を活性化させることにより、脂肪組織でのエネルギー消費を高めることで、抗肥満作用を発揮していることを見出した。本研究成果は食餌脂肪酸腸内細菌代謝産物の機能に着目した、プレ、プロ、ポスト・バイオティクスの肥満に伴う代謝異常症の新たな予防・治療法開発の基盤的研究となりうるものであり、将来の発展性が期待される知見である。

3. 核内受容体型転写因子PPAR α 活性化時の代謝改善作用機構の解明

PPAR α は肝臓や骨格筋などに多く発現し、脂肪酸酸化を制御している。肥満動物に対するPPAR α アゴニスト、fenofibrate (Feno)の投与は高中性脂肪血症の改善作用に加え、抗肥満・抗糖尿病作用を発揮する。その代謝改善作用について詳細に検討を行ったところ、脂肪萎縮症モデルマウスに対するFeno投与は高中性脂肪血症の改善作用は示したが、抗糖尿病作用は大きく減弱することを見出し、Fenoによる代謝改善作用において、脂肪組織が重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、PPAR α 活性化時に増加し、脂肪組織に作用する代謝改善ホルモン、線維芽細胞増殖因子21 (FGF21)の役割について検討した。Feno投与は肝臓においてFGF21の発現を

誘導し、血中FGF21量を増加させた。高脂肪食負荷時に野生型マウスで認められたFeno投与による抗肥満・抗糖尿病作用は、FGF21欠損マウスでは大きく減弱しており、Feno投与による抗肥満・抗糖尿病作用には肝臓でのFGF21産生促進が重要であることを示した。また、白色脂肪細胞においてPPAR α が比較的多く発現していたことから、白色脂肪細胞におけるPPAR α 活性化の機能について検討した。脂肪細胞においてPPAR α の活性化は脂肪細胞分化と脂肪酸酸化を同時に誘導し、良好なインスリン感受性を呈する小型の脂肪細胞数を増加させることが示唆された。さらに、活性化型ヒトPPAR α を脂肪組織特異的に強制発現させた遺伝子改変（Tg）マウスを作成したところ、Tgマウスでは高脂肪食負荷時にも脂肪細胞の肥大化が抑制されており、良好なインスリン感受性を呈することが明らかとなった。以上の結果は、脂肪酸をはじめとする種々の食品成分受容体としても機能するPPAR α による代謝異常改善作用機構の一端を示したものである。

おわりに

本研究では、エネルギー代謝を制御する食品成分とその作用機構について検討を行ってきた。これらの研究成果は、食品成分による肥満・肥満に伴う生活習慣病の予防・改善の可能性を示したものであり、今後これらの知見を礎とした肥満症に対する新たな予防・治療法の確立が期待される。

謝 辞

本研究は、主に京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻食品分子機能学分野および栄養化学分野、京都大学学際融合教育研究推進センター生理化学研究ユニット、ならびに岐阜大学・応用生物科学部・食品分子機能学分野において行われたものです。特に、京都大学 河田照雄教授には卒業研究当初から現在に至るまで研究指導を頂き、心より御礼申し上げます。また、京都大学 伏木亨名誉教授（現 龍谷大学教授）には、研究を始めるきっかけと多くのご指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。岐阜大学 長岡利教授には岐阜大学での研究において非常に丁寧にご指導を頂き、大変感謝しております。また、上記の研究分野において本研究をご指導・ご支援頂きました先生方、スタッフの皆様ならびに卒業生、在学生の皆さまに感謝いたします。さらに、本研究は、さまざまな研究機関に所属される非常に多くの共同研究者の方々のご指導・ご助力のもとに成り立っております。心より御礼申し上げたいと存じます。最後に、本賞にご推薦頂きました日本農芸化学会関西支部長・河田照雄先生ならびにご支援を賜りました関西支部の諸先生方に深く御礼申し上げます。

2018 年度 農芸化学若手女性研究者賞

受賞講演 微生物を活用した N 型糖鎖代謝酵素の機能解明とその応用
○梅川 碧里(京都大学、現 三重大学)

糖質は、細胞がATPを産生する源となるとともに、タンパク質や膜上において、多糖が連結した「糖鎖」として存在し、細胞の構造維持や生体分子の機能に重要な役割を持つ。筆者は、「糖鎖の代謝分解」に関わる種々の酵素の機能について、微生物を活用して、分子・細胞レベルで明らかにするとともに、有用物質生産に向けた応用展開を目指して研究に取り組んできた。本研究においては、特に、タンパク質のアスパラギン残基に結合するN-結合型(N型)糖鎖の代謝分解に関わる微生物酵素の活性と機能に着目して解析を行った。

1. 微生物由来のエンドグリコシダーゼを用いた新規糖タンパク質調整法の開発

生体内のタンパク質の多くは「糖鎖」の付加した糖タンパク質として存在しており、糖鎖の有無や構造の違いによりタンパク質の機能や生理活性は大きく異なる。とりわけ、ヒトのN型糖鎖末端のシアル酸は、多くのサイトカインの生理活性に重要である。抗貧血薬として用いられる糖タンパク質であるエリスロポエチンは、末端にシアル酸が付加した3本のN型糖鎖が欠如すると血中半減期が減少し、生理活性を示さない。そのため、特定の糖鎖を有する均一な糖タンパク質を効率的に調製する手法が必要となる。本研究で着目する、糸状菌由来のエンドグリコシダーゼ(Endo-M)は、ヒト型のシアロ複合型糖鎖を含むN型糖鎖に幅広く作用してオリゴ糖を切り出し、ペプチドに転移付加する特異的な糖転移活性を有する。しかし、本酵素を糖鎖付加のツールとして活用する際のボトルネックは、生成した糖転移生成物がEndo-Mの基質となり加水分解されるため、ごく僅かしか得られないことであった。

筆者は先ず、Endo-Mを遺伝子操作の容易な大腸菌で生産させる系を構築し、Endo-Mの部位特異的変異体を効率的に作製することを可能にした。当時、ホモログ間で構造解析は報告されていなかったため、保存されたアミノ酸残基の部位特異的変異体を網羅的に作製し、酵素学的解析を行った。その結果、糖転移活性の初速度が野生型Endo-Mの2倍程度まで上昇した変異体酵素Y217Fを選抜し、目的の糖転移生成物の最大収量を大幅に向上させることが出来た¹⁾。また筆者は、Endo-Mが反応中間体としてオキサゾリン誘導体を形成するユニークな反応機構を有することに着目し、糖転移生成物を加水分解することなく蓄積できる変異体を創製することとした。まず、触媒残基近傍に保存された非酸性アミノ酸残基であるアスパラギン残基(Asn-175)がオキサゾリン中間体形成の鍵残基であることを同定した¹⁾。そして、本鍵

残基を破壊した変異体酵素が、化学合成した糖オキサゾリン誘導体を基質として反応させることによって、糖転移生成物を加水分解することなく蓄積できることを見出した^{1), 2)}。糖転移付加機能を著しく高められたAsn-175の変異体(N175Q)と糖オキサゾリン誘導体を活用することによって、均一なシアロN型糖鎖を有する目的タンパク質が約80%の高収率で得られた³⁾。また、本手法を用いて、数種類の生理活性ペプチドにシアロN型糖鎖を付加することにより、生理活性を損うことなくプロテアーゼ抵抗性を付与することが出来た⁴⁾。

上述したEndo-Mの部位特異的変異体N175Q及びY217Fは、現在、東京化成工業において市販されており、タンパク質にN型糖鎖を付加するツールとして利用されている。また、本研究で新たに開発した「エンドグリコシダーゼのアスパラギン変異体と糖オキサゾリン誘導体を用いて糖転移産物を蓄積させる」という手法は、いくつかのホモログ酵素にも適用され、同様の変異体が創出されている。本研究において、エンドグリコシダーゼを活用してタンパク質にN型糖鎖を効率的に付加する技術を確立することができたと考えている。

2. 酵母を用いた細胞内N型糖鎖代謝制御と栄養応答の機構解明

生体内における細胞内代謝分解の機能はさまざまな環境変化に応じて厳密に調節制御される。細胞内代謝の代表的な機構の一つが、真核生物に保存された大規模分解経路「オートファジー」である。オートファジーは、不要なタンパク質やオルガネラなどのさまざまな細胞質成分を液胞(又はリソソーム)に膜輸送し分解するシステムである。オートファジーは、栄養飢餓時に自己タンパク質を分解してアミノ酸を再利用する生理的意義を持つと考えられているが、「オートファジーを介したリサイクル」に関する知見は乏しい。オートファジーの終着点である液胞には、タンパク質のほか、種々の糖鎖も輸送され分解されるが、実際にその栄養飢餓時における重要性を示した報告は殆どない。本研究では、未解明な「オートファジーを介したリサイクル」の意義について、糖質代謝の視点から明らかにすることを目的として、細胞外環境に応じて運命決定する真核モデル生物である出芽酵母を用いて解析を行った。

まず、オートファジーが強く誘導される栄養飢餓条件下で、細胞内糖代謝分解が誘導されるのかを明らかにするため、酵母の細胞内に豊富に存在する高マンノース型のN型糖鎖の代謝分解を担う α -マンノシダーゼ(Ams1)の細胞内活性の変化に着目した。それまで、Ams1は恒常的に細胞質遊離糖鎖を代謝すると考えられてきたが、筆者らは、Ams1の細胞内活性は富栄養条件下では非常に微弱であり、アミノ酸やグルコースなどの栄養飢餓時に著しく上昇することを明らかにした⁵⁾。Ams1は栄養応答に重要なTORC1キナーゼ及びProteinkinaseAにより下方制御され、飢餓に応じてストレス応答性転写因子Msn2/4により転写誘導されることを明らかにした。加えて、オートファ

ジーにより液胞に輸送されプロテアーゼ依存的プロセッシングを受けることで翻訳後レベルでも活性化されることを明らかにした。これらの結果から、Ams1を介した細胞内マノシド糖鎖の代謝は、オートファジーと連動して栄養飢餓時に重要な生理的意義を持つことが考えられる。

また筆者らは、Ams1の細胞内活性が栄養シグナルに応じて変動することを利用して、細胞外からの栄養伝達に関わる新規の膜機能分子Ecm33を同定している⁶⁾。Ecm33の欠損株では、富栄養条件下においても細胞内が飢餓状態にシフトしており、TORC1が不活化することで、オートファジーが亢進した。Ecm33は、細胞表層において、細胞外グルコースの効率的な取り込みに関与し、栄養増殖時における活発なATP生産と細胞増殖を促す生理機能を担うことが示唆された。

本研究によって、細胞外炭素源の飢餓に端を発し、最終的に細胞内糖鎖の代謝分解に至るまでのシグナル伝達経路に関わる新たな分子および分子機構の解明に貢献出来たと考えている。今後は、糖タンパク質糖鎖の「分解経路」の重要性と新たな意義を明らかにしていきたい。また、同定した細胞外糖質の資化代謝に関わる遺伝子を改変し、細胞外糖質から効率的にエタノール生産できる酵母の創製にも応用展開したい。

(引用文献)

- 1) Umekawa M, Huang W, Li B, Fujita K, Ashida H, Wang LX, Yamamoto K “Mutants of *Mucor hiemalis* endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase show enhanced transglycosylation and glycosynthase-like activities.” *J Biol Chem*, Vol.283, p4469-4479 (2008)
- 2) Umekawa M, Li C, Higashiyama T, Huang W, Ashida H, Yamamoto K, Wang LX “Efficient glycosynthase mutant derived from *Mucor hiemalis* endo-beta-*N*-acetylglucosaminidase capable of transferring oligosaccharide from both sugar oxazoline and natural N-glycan.” *J Biol Chem*, Vol.285, p511-521 (2010)
- 3) Umekawa M, Higashiyama T, Koga Y, Tanaka T, Noguchi M, Kobayashi A, Shoda S, Huang W, Wang LX, Ashida H, Yamamoto K “Efficient transfer of sialo-oligosaccharide onto proteins by combined use of a glycosynthase-like mutant of *Mucor hiemalis* endoglycosidase and synthetic sialo-complex-type sugar oxazoline.” *Biochim Biophys Acta*, Vol.1800, p1203-1209 (2010)
- 4) Higashiyama T, Umekawa M, Nagao M, Katoh T, Ashida H, Yamamoto K “Chemo-enzymatic synthesis of the glucagon containing *N*-linked oligosaccharide and its characterization.” *Carbohydr Res*, Vol. 455, p92-96 (2018)
- 5) Umekawa M, Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M

“The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of α -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*.” *Biochim Biophys Acta*, Vol.1860, p1192-1201 (2016)

6) Umekawa M, Ujihara M, Nakai D, Takematsu H, Wakayama M “Ecm33 is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast.” *FEBS Lett*, Vol.591, p3721-3729 (2017)

謝 辞 本研究は、京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子応答機構学分野、および立命館大学生命科学部生物工学科にて実施したものです。カビ由来エンドグリコシダーゼに関する研究を行う機会を与えてくださり、ご指導いただいた山本憲二先生(現 石川県立大学特任教授)ならびに芦田久先生(現 近畿大学教授)に心より御礼申し上げます。本研究は、メリーランド大学のLai-Xi Wang先生ならびに東北大学の正田晋一郎先生のグループ、鹿児島大学の藤田清貴先生との共同研究による成果です。酵母を用いた糖代謝制御に関する研究を実施するにあたっては、酵母を扱う細胞生物学の基礎をご指導いただき、多くのリソースをご提供いただいたミシガン大学のDaniel Klionsky先生、自由に研究を行う機会と環境を与えていただいた立命館大学の若山守先生、共同研究を行わせていただいた京都大学の竹松弘先生に深く感謝致します。私が今日まで研究を続けることが出来たのは、ご支援くださった多くの先生方、当該研究に貢献してくれた学生の皆様、そして家事育児に協力してくれた家族・両親のお陰であり、心より感謝致します。最後になりましたが、日ごろから研究に関するご助言をくださり、本賞にご推薦くださいました京都大学の片山高嶺先生に深く御礼申し上げます。

産学交流会 講演会
糖脂質型バイオサーファクタント“ソホロリピッド®”の工業的生
産と洗浄剤への応用
○平田善彦(サラヤ株式会社バイオケミカル研究所)

1. はじめに

酵母が洗剤（界面活性物質）をつくるのをご存知だろうか。界面活性剤というと洗浄や殺菌など衛生的な生活を送るために必要不可欠な化成品というイメージが強く、生物にとってはむしろ有害な物質のように感じる。しかし、体内で食物油脂の分解・吸収に重要な役割を果たしている胆汁酸は極めて優秀な界面活性物質である。すなわち、生物と界面活性物質はとても身近な関係にある。このような生物由来の界面活性剤物質を総称してバイオサーファクタント（Biosurfactant, BS）と呼ぶ。狭義には酵母を含む微生物が菌体外に分泌生産し、かつ界面活性の高い物質を指す¹⁾。本講演では、子囊菌酵母である *Starmerella bombicola* が生産する糖脂質型 BS である Sophorolipid (SL、図1) の実用化例として、洗浄剤への応用を中心に紹介する。

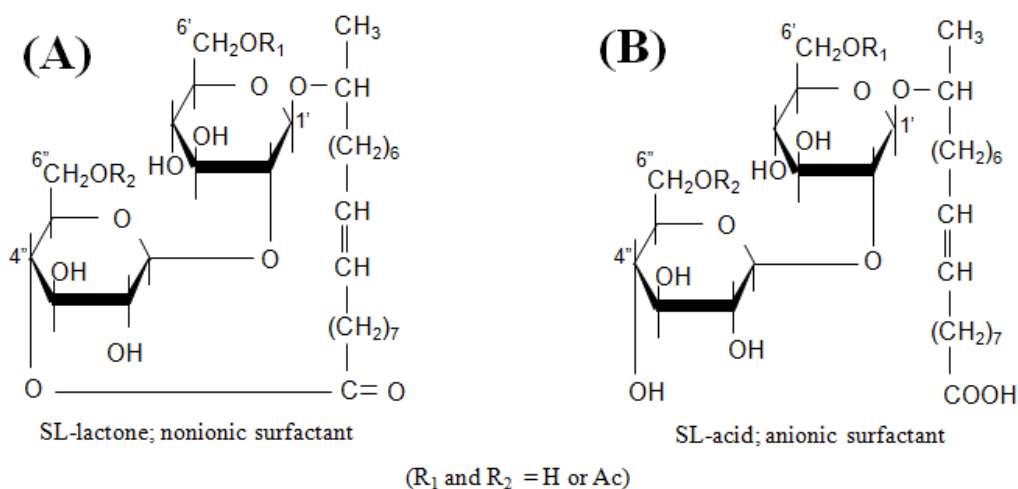


図1 Sophorolipid の構造

2. Sophorolipid の高生産：混合疎水性基質の利用

SLは親水基であるソホロースと疎水基である脂肪酸を構成成分とし、耐浸透圧性酵母 *Starmerella bombicola* によって生産される。最初の報告は1961年（Gorinら）と古く、他のBSと比較して顕著に生産性が高いことから、発酵条件の最適化に関して盛んに研究された。しかし、産業利用はこれまで皆無であり、バイオ素材の実用化がいかに困難かを示している。これまで、炭素源とし

て、SL の構成成分であるグルコースと脂肪酸の混合炭素源の使用が SL 高生産に有効とされているが、疎水性基質を二成分混合系にした SL 生産に関する報告はなかった。そこで、植物油（パームオレイン, POL）と脂肪酸（オレイン酸, OL）からなる混合疎水性基質(Mixed Lipophilic Substrates: MLS)を用いて、SL 発酵生産実験を行った。培養開始 2 日目から、SL 生合成が盛んになり、5 日目には培養液中に約 120 g/L の SL を蓄積した（図 2）。さらに特筆すべきこととして、培養時間が短く（植物油単独の 1/3 弱）なり、培養 6 日後には、疎水性基質が検出限界にまで消費された。今回開発された MLS 発酵法では、投入した炭素源を高効率で SL に変換でき、SL 収量も多く短時間で培養が完了するので、製造にかかる使用エネルギーも少なくて済む。さらに、培養終了液に油脂が残留しないので、SL 精製に有機溶剤（酢酸エチルやヘキサンなど）を使用する必要もない（NOS 精製法：Non-Organic Solvent Process）。また、培養終了液の BOD も低いので、その処理やバイオリアクターの洗浄も容易である。SL は「化学プロセス」を利用しない「オールバイオプロセス」によって生産され、ダウンストリーム工程も含め、全工程で環境に配慮した SL 製造を可能にするものである。

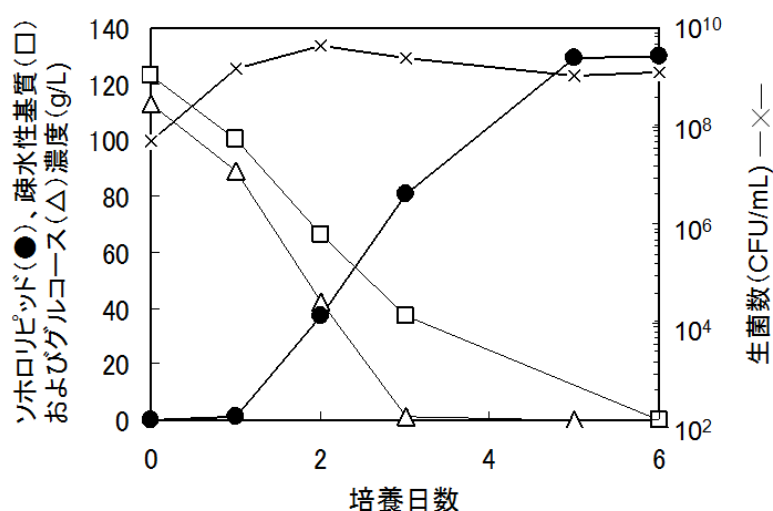


図 2 Sophorolipid の培養挙動

3. 界面化学的特性

SL は親水基として非常に嵩高い二糖類であるソホロースと脂肪酸からなる糖脂質である（図 1）。ほかの BS には見られない SL の構造的特徴は、非イオン性界面活性剤であるラクトン型 SL(図 1A)とアニオン性界面活性剤である酸型 SL(図 1B)の混合物として、酵母から生産されることである。この構造的特徴に

着目し洗浄剤としての応用可能性について検討した。

まず、SL の起泡性を Ross-Miles 法で測定したところ、石けんおよびドデシル硫酸ナトリウムと比較して極めて低い起泡性（およそ 1/10）を示すことが判った²⁾。その低起泡性は、産業利用されている低起泡性のブロックポリマー型非イオン界面活性剤に同等であった（図 3）。次に、水の硬度 100 ppm で同様の試験を行ったところ、酸型 SL のみが起泡力が顕著に低下したが、ラクトン含有率が 17%以上では、起泡力は硬度の影響を受けないことが判った³⁾。界面活性剤としては非常に特殊な低起泡性を示す SL は、水生生物（ヒメダカ、オオミジンコおよび淡水藻類）に対する毒性が極めて低く、良好な生分解性を有し、さらに優れた洗浄性も兼ね備えており、理想的な低起泡性界面活性剤であった⁴⁾。

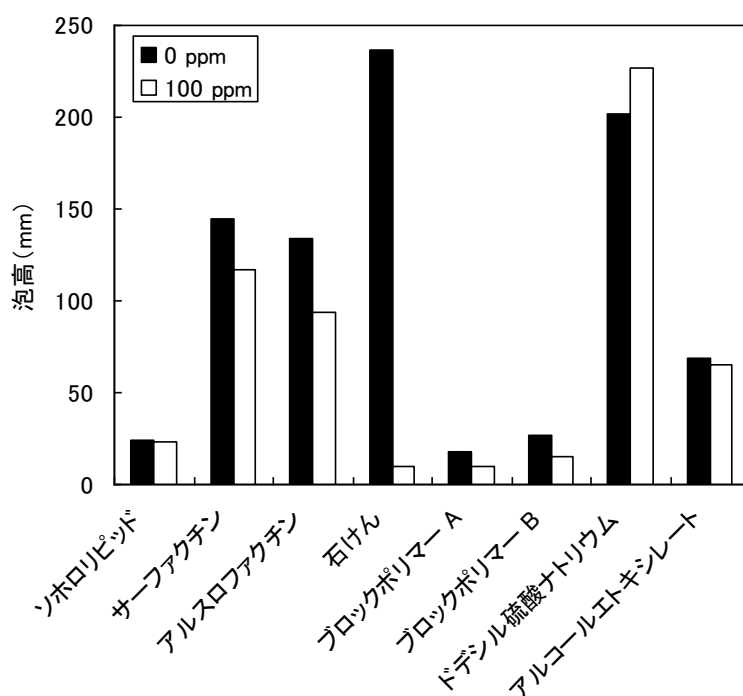


図 3 Sophorolipid の低起泡性

4. 自動食器洗浄機用洗剤への応用

SL の界面化学的特性に適した洗浄剤としてジェット噴射型の自動食器洗浄機用洗剤を開発した。炭酸塩、酸素系漂白剤および酵素をベース処方とする SL 配合洗浄剤を作製し、その洗浄力を電機工業会が公開している標準法で調べた。その結果、SL 配合洗浄剤が化学合成界面活性剤配合の洗浄剤に同様に優れた洗浄力を有していることが確認された。さらに、SL 未配合洗浄剤の洗浄力が著しく低下したことから、SL はジェット水压の物理力を弱めることなく、再汚染防

止などの優れた洗浄特性を発揮していることが確認された。開発した SL 配合洗剤は、優れた洗浄力と良好な生分解性を併せもつ新しい環境対応型の食洗機洗浄剤となった^{5,6)}。

5. おわりに

SL は再生可能原料からバイオプロセスのみで製造される。その性能は石油由来化学合成界面活性剤に匹敵する高い洗浄性、そして環境および生体適合性にも優れており、多機能性のバイオ洗浄成分である。当社では SL の製剤化にも成功し、主に低起泡性洗浄剤として、多くの洗浄現場に導入実績がある。最近、原料販売への展開も始め、すでに、環境洗浄剤として利用されている。今後も“自然派のサラヤ”として、生物多様性にも配慮した“ものづくり”を継続するため、バイオ洗浄剤「SOFORO」を通じ、世界の環境・衛生・健康の向上に貢献したい。

文献

- 1) Tulloch, A. P. Hill, A. and Spencer, A. F. T. (1968) *Can. J. Chem.*, **46**, 3337-3351.
- 2) Hirata, Y., Ryu, M., Oda, Y., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., and Sugiura, M. (2009) *J. Biosci. Bioeng.* **108**, 142-146.
- 3) Hirata, Y., Ryu, M., Igarashi, K., Nagatsuka, A., Furuta, T., Kanaya, S., and Sugiura, M. (2009) *J. Oleo. Sci.*, **58**, 565-572.
- 4) 平田善彦, 荒木道陽, 古田太郎 (2010) 日本油化学第 49 回年会 講演要旨集, p.307.
- 5) Hirata, Y., (2003) International Network for Information of Technology Newsletter, (7), 30.
- 6) 高本一夫, 五十嵐敬祐, 平田善彦 (2005) ジャパンフードサイエンス, **44**, 6, 30-35.

以上

○次回の予定

日本農芸化学会 関西支部 支部例会（第 504 回講演会）

開催日：2018 年 7 月 14 日（土）

場所：大阪府立大学

講演申込締切：2018 年 6 月 15 日（金）

講演要旨締切：2018 年 6 月 22 日（金）

連絡先：岡澤敦司

(Tel & Fax: 072-254-7341, E-mail: okazawa@plant.osakafu-u.ac.jp)

公益社団法人 日本農芸化学会 関西支部 事務局

〒 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 5 月 19 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



日本農芸化学会関西支部ホームページ： <http://kansai.jsbba.or.jp/>