

日本農芸化学会関西支部
第 504 回講演会・ミニシンポジウム

講演要旨集

平成 30 年 7 月 14 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

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 第 504 回講演会・ミニシンポジウム

プログラム

◆ 開会の辞 12:30 ~ 12:35

◆ ミニシンポジウム 12:35 ~ 14:35

『ポストゲノム時代におけるゲノム研究の新展開』

1. 植物における micro RNA の機能発現機構
岩田 雄二 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)
2. 人工核酸 BNA とその利活用方法のご紹介
折田 文子 (株式会社 BNA 研究開発部)
3. Functional Genomics for Mammalian Upstream ORFs
相澤 康則 (東京工業大学生命理工学院)

◆ 一般講演 (講演 9 分, 質疑応答 2 分 30 秒) 14:50 ~ 16:14

(*農芸化学会関西支部若手優秀発表賞対象講演)

- *1. 青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralstonin 類の構造決定と生物活性
○村井勇太¹, 森祥子², 今野博行³, 曳地康史⁴, 甲斐建次¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² サントリー, ³ 山形大院・工, ⁴ 高知大・農)
- *2. ピリドキサミンによるリポフスチン形成阻害を介した網膜色素上皮細胞保護効果の解明
○山下知佳¹, 井出涼子¹, 甲斐建次¹, 須山享三², 赤川貢¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 東北大院・医)
- *3. シロイヌナズナを用いた光酸化ストレス防御機構における Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase の重要性
○門田かなえ¹, 嶋川銀河¹, Guy Hanke², 三宅親弘¹
(¹ 神戸大院・農, ² Sch. Biol. Chem. Sci., Queen Mary Univ.)
- *4. P700 酸化システムの温度・光環境に対する生理応答解析
○居原太陽, 三宅親弘 (神戸大院・農)
- *5. Heterologous production of antimalarial precursor amorpha-4,11-diene in *Artemisia absinthium* L. calli
○Agus Setiawan, Paskorn Muangphrom, Ery Odette Fukushima, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
6. シロイヌナズナにおけるフェレドキシン (Fd) の酸化還元メカニズムに関する研究
○松方貴寛, 三宅親弘 (神戸大院・農)

7. 薬用植物カンゾウ由来 UGT73F サブファミリー酵素の機能解析及び組換え酵母を用いたトリテルペノイドサポニン生産への応用
○チョンスヨン¹, 野村勇太¹, 金澤光司¹, 辻恵里花¹, 林宏明², 關光¹,
村中俊哉¹ (¹阪大院・工, ²岩手医大・薬)

◆ 受賞講演

16:30 ~ 18:00

農芸化学奨励賞

1. イオンチャネル内蔵型受容体の高選択的リガンド認識と機能調節に関わる生物有機化学研究
伊原 誠 (近畿大学農学部)
2. 生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の相互作用に関する研究
原田 直樹 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

農芸化学女性研究者賞

1. 有機合成を基軸としたフラバン-3-オール誘導体の機能性解明研究と栽培現場への貢献を目指した研究展開
齊藤 安貴子 (大阪電気通信大学工学部)

◆ 優秀発表賞表彰式・懇親会

18:10 ~ 19:10

ミニシンポジウム (12:35 ～ 14:35)

ポストゲノム時代におけるゲノム研究の新展開

1. 植物における micro RNA の機能発現機構

岩田 雄二 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

2. 人工核酸 BNA とその利活用方法のご紹介

折田 文子 (株式会社 BNA 研究開発部)

3. Functional Genomics for Mammalian Upstream

ORFs

相澤 康則 (東京工業大学生命理工学院)

植物における microRNA の機能発現機構

岩田 雄二（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

【目的】近年のゲノム解析の進展により、ゲノム DNA 中にはタンパク質をコードする mRNA 以外に多様な種類の non-coding RNA (ncRNA) がコードされていることが明らかとなっている。一般的に、生物種が高等になるほど多くの ncRNA を持っており、より複雑な高次機能を担っていると推測されている。真核生物において 20–24 塩基からなる microRNA (miRNA) は ncRNA の代表的なもので、塩基配列依存的に mRNA に結合し、mRNA 分解や翻訳抑制を引き起こすことで遺伝子発現を制御する。ヒトにおいて全 mRNA の 60%以上が miRNA により発現調節されていると推定されており、様々な生物学的プロセスや疾患の発症・進行などとも関係する。植物においても miRNA は発達・分化の制御、環境ストレス応答、病害応答、栄養応答など多岐にわたる生命現象を制御している他、農業上有用な形質とも関係することが明らかになっており、また人工 miRNA を用いた特定の遺伝子の機能抑制にも応用されてきている。miRNA はゲノム DNA から一本鎖の前駆体 RNA として転写された後、RNA 分解酵素である Dicer により切断されることで生成し、Argonaute タンパク質と複合体を形成し機能発現することが知られている。植物における Dicer は Dicer-Like1 (DCL1) であることが明らかにされているが、その機能には不明な点が多く残る。そこで、本研究では miRNA 前駆体の二次構造と DCL1 に着目し、植物における miRNA 生成機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】昆虫細胞／バキュロウイルス発現系を用いてシロイヌナズナ miRNA 関連タンパク質を、T7 RNA Polymerase による in vitro 転写系を用いて miRNA 前駆体をそれぞれ調製した。これらタンパク質と RNA を用いた試験管内再構成系により miRNA 生成反応を行うと共に、各種アッセイ系による分子間相互作用解析を行い、miRNA 生成反応の特徴づけを行った。また、RNA 二次構造を変化させた変異型 miRNA 前駆体を同様に調製し特徴づけを行い、効率的な miRNA 生成に必要な miRNA 前駆体の二次構造について知見を得た。更に、DCL1 の相互作用パートナータンパク質である SERRATE (SE) を欠損するシロイヌナズナ変異体・形質転換植物を作製し、生育や形態の異常、miRNA や標的 mRNA の発現レベルを調査することで、miRNA 生成における SE の機能を推察した。

【結果】miRNA 前駆体はステムループ構造を持つ一本鎖 RNA であるが、ステム領域には塩基対を形成しない部分（ここでは以降バルジと呼ぶ）が散在しているという特徴を持つ。モデル miRNA 前駆体として pri-miR167a を選定し、塩基置換によりステム領域のバルジをそれぞれ閉じた変異型 pri-miR167a を複数調製した。昆虫細胞発現系により調製した精製 DCL1 を用いて RNA 切断反応を行った結果、別々のバルジを閉じた変異型 pri-miR167a の切断様式はいずれも野生型とは異なっており、変異型間でも様々に異なっていた。詳細な解析の結果、ステム上に存在する複数のバルジは、DCL1 による切断効率や切断位置の決定においてそれぞれ異なる役割を担っており、これらのバルジが協調して miRNA の高効率かつ正確な切り出しに寄与していることが分かった。同様のことが他の miRNA 前駆体でもみられたことから、この領域に存在するバルジの DCL1 による切断位置決定における役割は植物の miRNA 前駆体全般に当てはまる特徴であることが考えられた。

また、SE タンパク質が DCL1 の miRNA 前駆体切断活性に重要であることを見出した。具体的には、DCL1 は単独で miRNA 前駆体を認識し結合できるが、RNA 切断活性は SE の存在下で発揮されることを明らかにした。発表では、精製タンパク質を用いた *in vitro* アッセイ系や、変異型 SE を発現するトランスジェニック植物を用いた解析によって得られた知見を紹介したい。

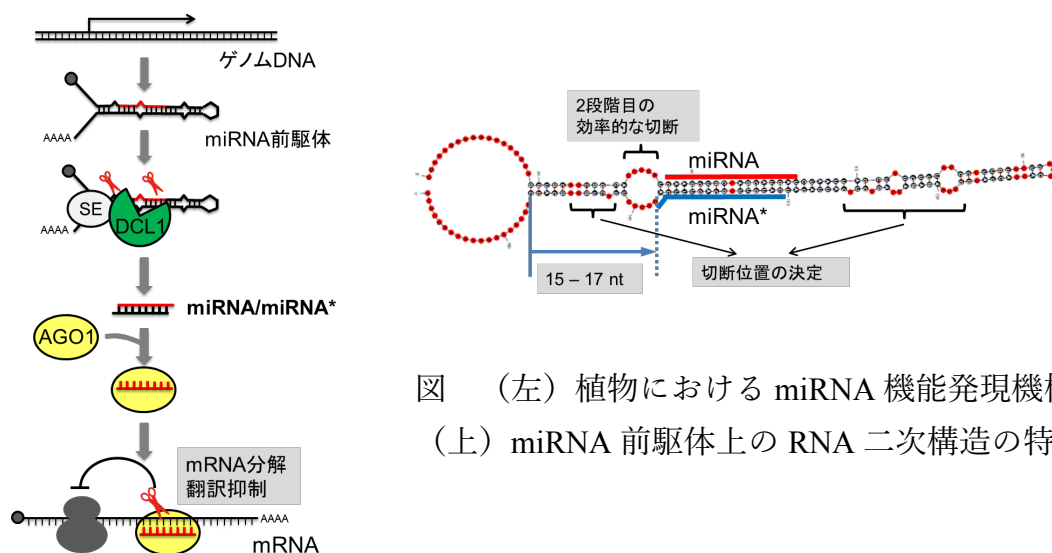


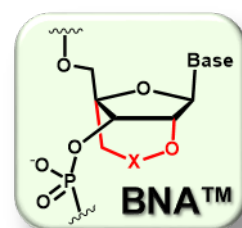
図 （左）植物における miRNA 機能発現機構。
（上）miRNA 前駆体上の RNA 二次構造の特徴。

人工核酸 BNA™とその利活用方法のご紹介

折田 文子（株式会社BNA 研究開発部）

【事業内容】

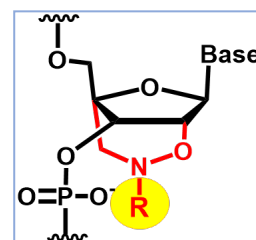
株式会社BNAは、遺伝子検査・核酸医薬品の創製を目指した「大阪大学発の研究開発型バイオベンチャー」です。2008年に設立し、独自開発の架橋型人工核酸「BNA : Bridged Nucleic Acid」の製造販売およびライセンスを主な事業内容としております。2014年12月より理研ジェネシスより100%出資を受け、増資および商用展開のための経営体制を強化いたしました。基礎研究はもとより、診断用途や核酸医薬への応用など、人工核酸 BNA™を幅広く使っていただくことを目指し、「グローバルな視点」で「スピーディかつオープンな事業展開」を進めていきます。



【BNA™の特長】

BNA™を組込んだオリゴヌクレオチドは、結合親和性 (T_m 値) が大幅に向上し、高い核酸分解酵素の耐性能を獲得します。(J. Am. Chem. Soc., 2008, 130(14), 4886-4897)

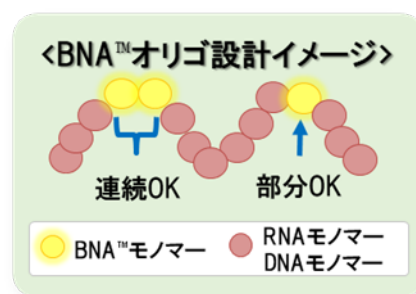
- ・ DNA、RNA に強固に結合します。
 - T_m 値を調整できるため、もう配列で悩まされません。
(BNA™アミダイト修飾1塩基当たり約 6°C の T_m 値が上昇します。)
- ・ 優れた配列特異性があります。
 - 一塩基の違いを見逃しません。
- ・ 核酸分解酵素に強い耐性があります。
 - 生体内で分解されにくいことから、少量の投与での薬効が期待できます。
- ・ 多様な機能性を『R』に付与できます。
 - オリゴヌクレオチドに様々な機能を付加できます。
例えば蛍光基 → 検出感度の向上が期待
例えばペプチド → DDS の向上が期待



【BNA™の使用手法】

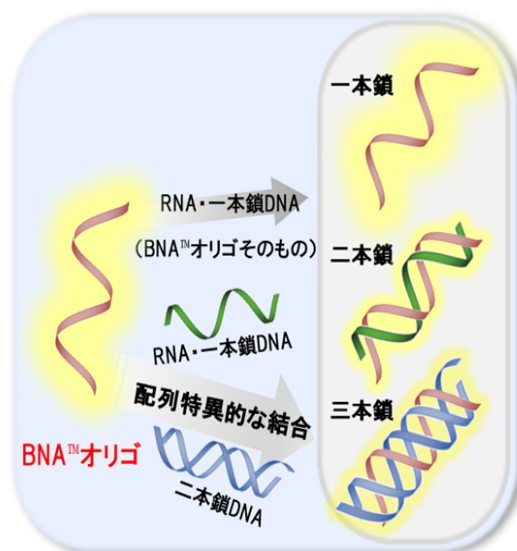
オリゴヌクレオチド合成の際に BNA™を組み込むだけで高機能な「BNA™オリゴ」をご利用いただけます。

- ・ 1 個から複数個組み込めます。
- ・ 連続しても組み込めます。



【BNA™オリゴを使用したアプリケーションの例】

BNA™オリゴは、標的となる一本鎖の RNA や DNA に強く結合し、安定な二重鎖を形成します。また、フーグスティーン型結合だけでなくワトソン・クリック型結合でも二本鎖 DNA にも強く結合し、安定な三重鎖を形成することができます。もちろん、BNA™オリゴそのまの一本鎖でも高機能性を発揮します。現在、これらの特長を生かし、下記のアプリケーションにお使いいただいております。(数社から製品化しております)



BNA™オリゴは豊富なアプリケーションにご利用いただけます

ゲノム編集

PCR primer & probe

siRNA

アンチセンス

アプタマー

デコイ

【BNA™オリゴに関するお問い合わせ先】

BNA™オリゴは、以下よりお問い合わせいただけます。



株式会社 B N A

住所 大阪府茨木市彩都あさぎ7-7-20 彩都バイオイノベーションセンター内

URL <http://www.bna.jp/>

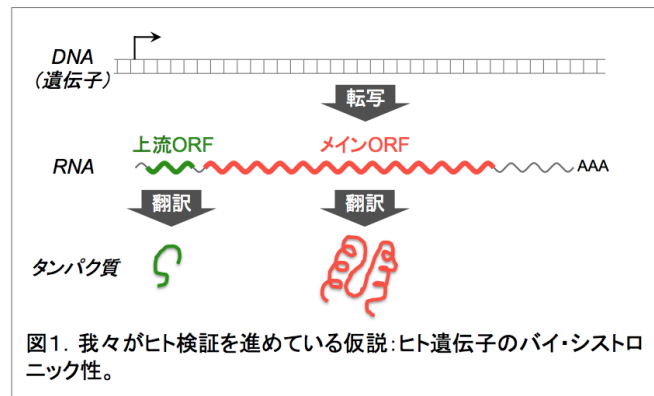
TEL 072-646-7037 / E-mail : bna@bna.jp

Functional Genomics for Mammalian Upstream ORFs

相澤 康則（東京工業大学生命理工学院）

【目的】上流 ORF とは、真核生物の mRNA 上の 5'非翻訳領域に存在する ORFである。これまでの多くの遺伝子における上流 ORF への変異体解析で、上流ORFを欠損させるとその下流に位置するメイン ORF からの翻訳量が変化することが明らかになっていることから、「上流 ORF = 翻訳制御するシスエレメント」として広く認知されている。近年、リボゾームプロファイリング法によって、数千もの哺乳類遺伝子の上流 ORF が翻訳されていることが示唆され、上流 ORF からの翻訳がもつ役割が注目されている。

一方、我々を含め複数のグループからこれまでに、長鎖非コード RNA 上に存在する小さい ORF から機能性タンパク質が翻訳される例が報告され始めている。これら長鎖非コード RNA におけるケースから、我々は上流 ORF にも機能性タンパク質をコードするものが存在すると仮説（図1）を立て、その実例を見つけることを目的としている。



【方法】本研究では、これまでのプロテアソーム研究から、質量分析によって翻訳されることが明らかになっている MIEF1 遺伝子の上流 ORF にコードされているタンパク質（MIEF1_uORFp）の機能解析を進めた。次ページの図2に示しているように、MIEF1_uORFp は既知のペプチドモチーフ「Complex I family LYR」をもつ。このモチーフをもつタンパク質はヒトにおいては少なくとも8種

類がすでに知られており，これらタンパク質は LYR ファミリーとして知られている．これら LYR タンパク質の多くはすでに、ミトコンドリアに局在し，呼吸鎖複合体の形成や機能に関与していることが明らかになっている．そこで我々は, MIEF1_uORFp のミトコンドリア機能に対する影響を細胞生物学的に検証することとした．



図2. MIEF1のmRNA上のメインORF(青矢印)と上流ORF(赤矢印)および上流ORFにコードされているアミノ酸配列。「Complex I family LYR」というモチーフに相当するアミノ酸を赤字表記してある。

【結果】本研究は論文未発表であるため詳細は控えるが，MIEF1_uORFp のアラニンスキャニング変異体を作成し，ヒト培養細胞株において過剰発現ののちに，ミトコンドリア機能の変化を解析したところ，MIEF1_uORFp 上でミトコンドリア機能の調節に関わる可能性の高いアミノ酸部位を特定することができた．そのアミノ酸部位は，既知の LYR モチーフではなかった．

この一連の変異体解析の結果から，MIEF1 の上流 ORF には機能性タンパク質がコードされていること強く示唆され，ヒト遺伝子のなかにはバイ・シストロニックな遺伝子が含まれることが高まった．

○演者プロフィール

名前：岩田 雄二 (Yuji Iwata)

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: yuji.iwata@plant.osakafu-u.ac.jp

略歴：

2000 年 3 月 東京工業大学 工学部 化学工学科 卒業

2002 年 3 月 東京工業大学大学院 理工学研究科 博士前期課程修了

2005 年 3 月 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科
博士後期課程 研究指導認定

2005 年 4 月 奈良先端科学技術大学院大学 COE 研究員

2005 年 6 月 博士（バイオサイエンス）取得 [奈良先端科学技術大学院大学]

2007 年 5 月 ペンシルバニア州立大学 博士研究員

2011 年 2 月 アブドゥラ国王科学技術大学 博士研究員

2013 年 3 月 大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 助教

2018 年 3 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：高等植物における RNA を介した遺伝子発現制御機構の解明

今後の展望：RNA 分解を切り口に植物の高次生命現象を理解し、植物分子育種に向けた基礎的知見を得たい。

名前：折田 文子 (Ayako Orita)

連絡先：〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ 7-7-20

彩都バイオイノベーションセンター 206

株式会社BNA 研究開発部

E-mail address: orita@bna.jp

略歴：

学歴

1993 年 3 月 神戸大学医療技術短期大学部 衛生技術学科 卒業

1993 年 5 月 臨床検査技師免許取得

1998 年 8 月 学士（保健衛生学）取得[学位授与機構]

2001 年 3 月 神戸大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 修士課程修了 (保健学)

2007 年 3 月 神戸大学大学院 医学系研究科 保健学専攻 博士課程修了 (保健学)

職歴

1993 年 4 月 大阪府立成人病センター 中央検査部 臨床検査技師

1994 年 3 月 株式会社三和銀行本店健康管理センター 臨床検査技師

2005 年 4 月 大阪大学大学院 薬学研究科 生物有機化学分野 特任研究員

2008 年 3 月 株式会社シーエーシー 薬事コンサルタント

2010 年 8 月 株式会社 B N A 臨床開発部 部長

現在に至る

主な研究テーマ：人工核酸 BNA™を用いた遺伝子解析技術および核酸医薬の開発

今後の展望：遺伝子解析技術、医薬品、ゲノム編集などへ人工核酸 BNA™の応用展開を拡大してまいります。

名前：相澤 康則 (Yasunori Aizawa)

連絡先：〒226-8501 横浜市緑区長津田町 4259 B1-501

東京工業大学 生命理工学院

E-mail address: yaizawa@bio.titech.ac.jp

略歴：

1994 年 3 月 京都大学薬学部 製薬化学科 卒業

1996 年 3 月 京都大学薬学研究科 薬品作用制御システム専攻 修士課程修了

1999 年 3 月 京都大学薬学研究科 薬品作用制御システム専攻 修士課程修了
博士 (薬学) 取得 [京都大学]

1999 年 4 月 京都大学エネルギー理工学研究所 研究員

1999 年 7 月 コロンビア大学 博士研究員

2002 年 8 月 ジョンズホプキンス大学 博士研究員

2005 年 7 月 東京工業大学 バイオ研究基盤支援総合センター 講師

2017 年 10 月 東京工業大学 生命理工学院 准教授

現在に至る

主な研究テーマ：ヒトゲノム配列の生物学的意義の解明

今後の展望：ゲノムサイズを極力小さくしたヒト細胞を作りたい。

一般講演 (14:50 ～ 16:14)

(講演 9 分, 質疑応答 2 分 30 秒)

- *1. 青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralstonin 類の構造決定と生物活性
○村井勇太¹, 森祥子², 今野博行³, 曳地康史⁴, 甲斐建次¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² サントリー, ³ 山形大院・工, ⁴ 高知大・農)
- *2. ピリドキサミンによるリポフスチン形成阻害を介した網膜色素上皮細胞保護効果の解明
○山下知佳¹, 井出涼子¹, 甲斐建次¹, 須山享三², 赤川貢¹
(¹ 阪府大院・生命環境, ² 東北大院・医)
- *3. シロイヌナズナを用いた光酸化ストレス防御機構における Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase の重要性
○門田かなえ¹, 嶋川銀河¹, Guy Hanke², 三宅親弘¹
(¹ 神戸大院・農, ² Sch. Biol. Chem. Sci., Queen Mary Univ.)
- *4. P700 酸化システムの温度・光環境に対する生理応答解析
○居原太陽, 三宅親弘 (神戸大院・農)
- *5. Heterologous production of antimalarial precursor amorpho-4,11-diene in *Artemisia absinthium* L. calli
○Agus Setiawan, Paskorn Muangphrom, Ery Odette Fukushima, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka (Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)
- 6. シロイヌナズナにおけるフェレドキシン (Fd) の酸化還元メカニズムに関する研究
○松方貴寛, 三宅親弘 (神戸大院・農)
- 7. 薬用植物カンゾウ由来 UGT73F サブファミリー酵素の機能解析及び組換え酵母を用いたトリテルペノイドサポニン生産への応用
○チョンスヨン¹, 野村勇太¹, 金澤光司¹, 辻恵里花¹, 林宏明², 關光¹, 村中俊哉¹ (¹ 阪大院・工, ² 岩手医大・薬)

* 農芸化学会関西支部若手優秀発表賞対象講演

*1 青枯病菌においてクオラムセンシング制御下にある PKS-NRPS が産生するリポペプチド ralstonin 類の 構造決定と生物活性

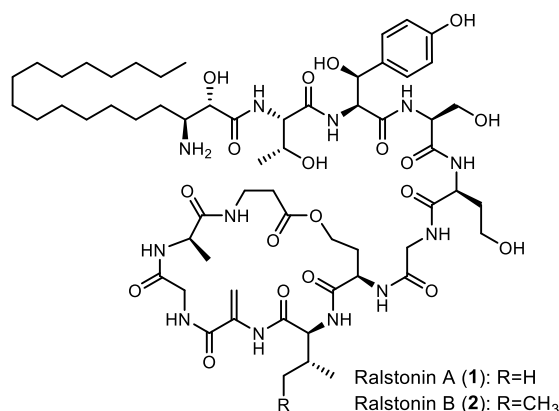
○村井勇太¹, 森祥子², 今野博行³, 曳地康史⁴, 甲斐建次¹

(¹ 阪府大院・生命環境, ² サントリー, ³ 山形大院・工, ⁴ 高知大・農)

【目的】青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科植物を中心とした 200 種以上の植物に萎凋病を引き起こす植物病原細菌である。本菌の病原力因子の産生は、菌密度依存の遺伝子発現機構であるクオラムセンシング (QS) によって制御されている。QS 制御下にある未知リポペプチドが、真菌の厚壁孢子誘導と真菌細胞内への侵入・感染に関与する可能性が報告された¹⁾。しかし、本リポペプチドの化学構造は不明であり、精製した化合物に本当にそのような生物活性があるのかどうかを検証する必要がある。そこで本研究では、青枯病菌が産生するリポペプチド ralstonin 類を単離・構造決定し、それらの生物活性を明らかにすることにした。

【方法・結果】*R. solanacearum* OE1-1 株

の BG 寒天培地培養物のアセトン抽出物から、逆相 HPLC を用いて ralstonin A (1) と B (2) を単離した。各種 NMR 解析より、 β -hydroxytyrosine や dehydroalanine を含む 11 種のアミノ酸と、新規アミノ脂肪酸 3-amino-2-hydroxyoctadecanoic acid で構成された ralstonin 類の平面構造を明らかにした。各アミノ酸残基の立体配



置は、マーフィー法によって決定した。酸に弱い β -hydroxytyrosine の立体配置は、ralstonin 類の Pronase 分解物にマーフィー法を適用することで決定した。脂肪酸部分の立体配置決定には、予想された 2 種エナンチオマーの合成とそれらの HPLC 保持時間の比較を使った。以上の結果から、ralstonin 類はユニークな環状リポペプチドであることが判明した(右上図)²⁾。

単離した ralstonin 類は、真菌 *Fusarium oxysporum* の厚壁孢子を誘導した。合成酵素遺伝子変異株は ralstonin 類産生能を消失しているとともに、*F. oxysporum* の厚壁孢子誘導能を示さなかった。さらに、ralstonin 類をタバコ葉に摂取したところ、濃度依存的に壊死斑が形成され、ralstonin 類は植物毒素活性も有することが分かった。以上の結果より、QS 制御下にある ralstonin 類は、青枯病菌が異なる宿主種に感染する上で重要な分子であることが示唆された。

1) Keller *et al.*, *ISME J.*, **2016**, 10, 2317-2330

2) Murai *et al.*, *Org. Lett.*, **2017**, 19, 4175-4178

*2 ピリドキサミンによるリポフスチン形成阻害を介した 網膜色素上皮細胞保護効果の解明

○山下知佳¹, 井出涼子¹, 甲斐建次¹, 須山享三², 赤川貢¹

(¹ 阪府大院・生命環境, ² 東北大院・医)

【目的】

加齢黄斑変性は、加齢に伴い網膜中心部の黄斑に障害が生じることで視力低下を引き起こす難治性疾患である。欧米では失明原因の第1位であり、我が国でも高齢化社会の到来とともに患者数が急増している。主発症要因として、加齢に伴う *all-trans-retinal* 代謝の衰弱・遅延によって網膜色素上皮細胞内の *retinal* が過剰となり、細胞成分とアミノカルボニル反応することによりリポフスチン（蛍光性加齢色素）が形成されて沈着することで、アポトーシスが惹起される機構が推定されている。我々は、リポフスチンの新規な候補構造体として、2 分子の *retinal* が Lys 残基の ε-アミノ基に付加した蛍光性 4 級ピリジニウム化合物 A2L を同定している。一方、ビタミン B₆ 化合物であるピリドキサミンは、脂質過酸化やアミノカルボニル反応の過程で生じるカルボニル化合物を自身のアミノ基を介して捕捉することにより、糖尿病合併症の発症を予防し得ることが報告されている。このような背景から、本研究はピリドキサミンによるリポフスチンの形成阻害および網膜色素上皮細胞保護効果を検証することを目的とした。

【方法・結果】

本研究では、リポフスチンの形成を評価するにあたり、抗 A2L 抗体の作製を試みた。*Retinal* 修飾タンパク質をマウスに免疫し、抗 A2L 抗体産生ハイブリドーマを作製し、競合 ELISA によって選別した。BSA と *retinal* を反応させ、作製した抗 A2L 抗体を使用してウェスタンブロットにより解析した結果、*retinal* 濃度依存的な A2L の生成が確認され、付随的な BSA の蛍光化も観察された。また、ピリドキサミンが濃度依存的に *retinal* による BSA の蛍光化と A2L の形成を阻害することを見出した。次に、*retinal* 曝露したヒト由来網膜色素上皮細胞 ARPE-19 に対するピリドキサミンの効果を検証した。蛍光顕微鏡を使用して ARPE-19 細胞内の A2L および蛍光性凝集タンパク質の蓄積を評価したところ、ピリドキサミン濃度依存的な減少が観察された。また、ピリドキサミンの添加が、*retinal* 曝露による ARPE-19 細胞死を有意に抑制することを明らかにした。さらに、アポトーシスシグナル因子をウェスタンブロットにより解析した結果、ピリドキサミン処理がアポトーシスシグナルを減弱させることを見出した。以上の結果から、ピリドキサミンは *retinal* 由来のリポフスチン形成を阻害し、アポトーシスを抑制することによって、網膜色素上皮細胞保護効果を発揮することが示唆された。

*3 シロイヌナズナを用いた光酸化ストレス防御機構における Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase の重要性

○門田かなえ¹, 嶋川銀河¹, Guy T. Hanke², 三宅親弘¹

(¹ 神戸大院・農, ²Sch. Biol. Chem. Sci., Queen Mary Univ.)

【目的】

植物は太陽光により常に強力な光エネルギーに晒されており、光合成に用いられなかったエネルギーは酸素へと伝達されることで活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を生成する。ROS は光合成器官に傷害を与え、最終的には枯死へと至らせる危険性がある。近年、三宅グループは、ROS の主要な生成部位である光化学系I (PSI) 反応中心クロロフィル P700 が酸化されると ROS 生成を抑制する「P700 酸化システム」の重要性を明らかにしてきた (Sejima et al., 2014)。

光合成電子伝達反応 (Linear electron flow: LEF) では、Ferredoxin (Fd) が P700 により還元され、Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreductase (FNR) を介して、その電子を NADP⁺ へと伝達し、NADPH を生成する。近年、Fd から電子を受け取る proton gradient regulation 5 (PGR5) において、P700 酸化への貢献を支持することを明らかにした (Takagi & Miyake, 2018)。しかし PGR5 同様に Fd から電子を受け取る FNR においては、P700 酸化との関連性は未だ明らかになっていない。我々は葉緑体内にアイソザイムをもつ FNR は、それぞれ役割を持ち存在していると考えている。そこで本研究においては、FNR と P700 酸化との関係に注目し、解析を行った。

【方法・結果】

Arabidopsis thaliana の葉内において、FNR は 2 種類存在する。野生株 (WT) とそのうちの 1 つを欠損させた変異体 (*fnr1*) を用いて、分光学的に生葉中の P700 量をリアルタイムで定量することで、FNR と P700 酸化の関係を明らかにした。FNR は LEF の末端において作用する。そこで電子を LEF の末端まで飽和させるため、強光条件において P700 の酸化還元状態を測定した。すると、WT に比べて *fnr1* では P700 の酸化状態を維持することができなくなっていることを明らかにした。またその際に、FNR へ電子を伝達する Fd の酸化還元状態も同時に測定したところ、WT に比べて *fnr1* においては Fd が還元されていることを明らかにした。このことから、欠損株においては FNR による Fd から NADP⁺ への電子伝達が抑制されることにより P700 酸化を行うことができなくなっていることを明らかにした。以上の結果から、P700 酸化においては FNR が重要であることを明らかにした。

【参考文献】

Sejima T, et al. (2014) Plant Cell Physiol.

Takagi D & Miyake C. (2018). Physiologia plantarum.

*4 P700 酸化システムの温度・光環境に対する生理応答解析

○居原太陽, 三宅親弘

(神戸大院・農)

【目的】

光合成では光を吸収し、電子伝達を行うことで、ATP や NADPH を生産し、炭酸固定や光呼吸で消費する。しかし、環境ストレスが原因で電子が過剰になった場合、光化学系 I (PSI) で細胞の破壊や、光合成活性の低下を起こす活性酸素種 (Reactive oxygen species, 以下 ROS) が発生する危険性がある。しかし、反応中心クロロフィル P700 を酸化することで PSI が保護されることが知られている (Sejima et al. 2014)。

P700 を酸化させるために、P700 から放出される電子量を増やすシステム (アクセプター側制御) と流入する電子量を制限するシステム (ドナー側制御) が存在する。

植物に短く強力な光 (pulse) を断続的に当てる rsp 処理 (Repetitive Short-Pulse Light) では、光合成が駆動しない条件下で PSI での ROS によるダメージの度合いを知ることができる。今回、他の被子植物とは異なり、モミジは低温で PSI がほとんどダメージを受けないことを発見した。また、rsp 処理後の pulse 照射で P700 は他の植物とは異なり、常温よりも低温のほうが大幅に酸化された。このことから、モミジにおいて、独自の P700 酸化メカニズムが働いていると考え、その解明を目的にこの研究を行った。

【方法・結果】

モミジとコムギにおいて常温 (25度) と低温 (10度) で rsp 処理時のクロロフィル蛍光、P700 酸化の割合、 ΔpH 、Cytb563 と Cyt f の酸化還元状態を測定した。

結果、モミジでアクセプター側制御が働きにくい O₂ 2% 条件でも P700 が酸化されていたことから、低温でアクセプター側の制御は働いていないとわかる。また、P700 に流入する電子量が低温で減っていたことから、ドナー側制御が強く働いているとわかる。このとき、 ΔpH が小さいことから ΔpH によるドナー側制御は弱いと考えられる。

モミジは Q サイクルの回転が温度問わず遅くなっていた。さらに Cytb563 と Cyt f は共に低温で電子流入量が少なかった。このことから、モミジは Q サイクルと、低温での Cyt との電子伝達の制限を 2 重でかけることで P700 を酸化すると考えられる。

また、低温でモミジの Fd 還元量が低下していたことから、P700 酸化は Fd への電子供給を減らすことで、Fd での ROS 生成を抑制する役割が存在することも発見した。

【参考文献】

Sejima, T., Takagi, D., Fukuyama, H., Makino, A. and Miyake, C. (2014) Repetitive short-pulse light mainly inactivate photosystem I in sunflower leaves. *Plant Cell Physiol.* 55, 1184-1193.

*5

Heterologous production of antimalarial precursor amorpha-4,11-diene in *Artemisia absinthium* L. calli

OAgus Setiawan, Paskorn Muangphrom, Ery Odette Fukushima, Hikaru Seki, Toshiya Muranaka

(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ.)

Objective: Artemisinin, the most effective antimalarial compound, is produced only in *Artemisia annua* L. plants. Previous studies in our laboratory showed that functional artemisinin biosynthetic enzymes are present in *A. absinthium* with the exception of amorpha-4,11-diene synthase (ADS), the first committed enzyme in artemisinin biosynthesis, suggesting ADS might be a limiting factor for the production of artemisinin *in planta*. Hence, the objective of this research is a heterologous expression of ADS in *A. absinthium* to produce amorpha-4,11-diene and other artemisinin precursors.

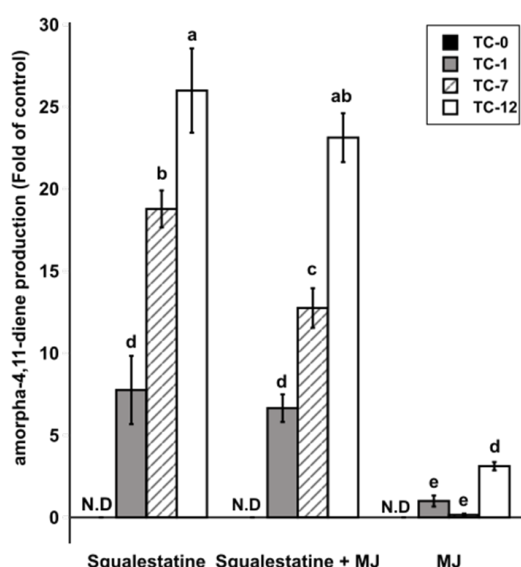


Fig 1. Amorpha-4,11-diene production increased in transformed calli (TC) treated with squalestatin

Methods and Results: We heterologously expressed *A. annua* ADS in *A. absinthium* callus via *Agrobacterium*-mediated transformation. Hence, we successfully obtained transformed calli (TC) lines that accumulated amorpha-4,11-diene. Moreover, competitive pathway inhibition with squalestatin (15 μ M) on TC-1, TC-7 and TC-12 enhanced its production up to 7, 18 and 25-fold, respectively (Fig. 1). However, subsequent precursors of artemisinin such as artemisinic alcohol could not be detected, possibly due to the

low expression levels of *abCYP71AV1* in the transformed undifferentiated tissues. Furthermore, other factors beyond *ADS* and *abCYP71AV1* expression might be necessary for the production of artemisinin in alternative plant hosts as plant-artemisinin combination therapy (pACT) sources.

6 シロイヌナズナにおけるフェレドキシン(Fd)の酸化還元メカニズムに関する研究

○松方貴寛, 三宅親弘

(神戸大院・農)

【目的】

植物は光エネルギーを用いて光合成電子伝達を行ない、CO₂ 固定に必要な NADPH と ATP を生成する。しかし、強光や乾燥などの環境ストレス下では光合成が制限され、NADPH と ATP の消費速度が生成速度を下回る。すると光合成電子伝達系は過還元状態となり、光化学系 I (PSI) で過剰な電子が O₂ に渡り、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が生成される。ROS は植物に酸化障害を与え、最悪の場合、枯死に至らしめる。植物は PSI の反応中心である P700 の酸化型の割合を高く保つことで、ROS 生成を抑制していることが明らかにされた (Sejima et al. 2014; Shimakawa et al. 2016; Takagi et al. 2016)。これを P700 酸化システムと呼ぶ (Shimakawa et al. 2016, 2017; Takagi et al. 2017)。

ROS は PSI においてだけでなく、還元型フェレドキシン (Fd) が酸素に電子を伝達することによっても生成されうる (Badger 1985)。これまで P700 酸化と ROS 生成についての研究はなされてきたが、P700 酸化が Fd の酸化還元に与える影響に言及したものはなかった。そこで今回は、光合成反応中の P700 と Fd の酸化還元レベルを同時測定することによって、P700 酸化システムが Fd での ROS 生成抑制に寄与しているかどうかを調査することを目的とした。

【方法・結果】

シロイヌナズナの野生型 (Col-0) および PGR5 欠損変異体 (*pgr5*) を用いて、P700 酸化を誘導するため光合成抑制条件 (CO₂ 濃度: 100 ppm、光強度: 1000 μmol/m²s、気温 25°C、湿度 60%) において、P700 と Fd の酸化還元レベルを調査した。*pgr5* は PSI から電子シンクへの電子伝達効率を調節できず (Takagi et al. 2017)、P700 酸化システムが機能しない。その結果、野生型と比較して *pgr5* の方が還元型 P700 の割合が高く、このとき還元型 Fd の割合も野生型より高いことが明らかとなった。このことから P700 酸化は Fd 酸化を誘導し、Fd における ROS 生成も抑制していることが示唆された。

7 薬用植物カンゾウ由来 UGT73F サブファミリー酵素の機能解析及び組換え酵母を用いたトリテルペノイドサポニン生産への応用

○チョン スヨン¹, 野村勇太¹, 金澤光司¹, 辻恵里花¹, 林宏明²,
關光¹, 村中俊哉¹

(¹阪大院・工, ²岩手医大・薬)

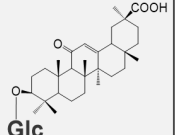
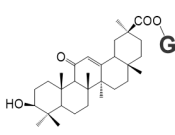
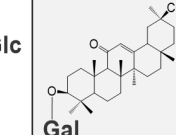
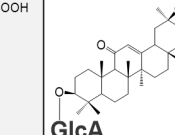
【目的】

マメ科植物においてトリテルペノイドサポニン生合成に関わることが知られている UGT73F サブファミリー酵素を薬用植物カンゾウから同定し、それらの機能解析を行うとともに、組換え酵母をホストとしたグリチルリチン等のサポニン生産系の確立を目的とした。

【方法・結果】

マメ科の薬用植物カンゾウは天然甘味成分として知られるトリテルペノイドサポニンのグリチルリチンを生産する。グリチルリチン生合成に関わる UGT の候補として、トリテルペノイドへの糖転移反応を触媒するダイズの UGT73F4 とのアミノ酸配列相同性が高い 4 種の UGT を同定し、グリチルレチン酸と 3 種の糖供与体 (UDP-グルコース、UDP-ガラクトース、UDP-グルクロン酸) を基質とした *in vitro* 酵素活性試験を行った。その結果、全 4 種の UGT がグリチルレチン酸への糖転移活性を示し、それぞれ異なる糖選択性と位置特異性を持つことが判明した (表 1、酵素反応生成物の構造を示す)。

また、3 位選択的なグルコース転移活性を示した GuUGT_01 と一緒に、2 糖目の糖転移反応を触媒することが判明している 2 種の UGT (GuUGT_05、GmUGT73P2) をグリチルレチン酸生産酵母に導入した。その結果、2 つの糖が結合したと推定される 4 種の化合物が生成した。糖を 2 つ以上保有するサポニンの組換え酵母での生成は未だに報告されておらず、複雑な配糖化パターンを持つサポニンの組換え酵母での生産の実行可能性を示す初めての研究例である。

				
GuUGT_01	○	—	△	—
GuUGT_02	○	—	○	△
GuUGT_03	—	○	—	—
GuUGT_04	△	—	—	—

Glc: グルコース、Gal: ガラクトース、GlcA: グルクロン酸
○: 強、△: 弱、—: 検出限界以下

表1. カンゾウ候補 UGT の機能解析結果

受賞講演 (16:30 ～ 18:00)

農芸化学奨励賞

1. イオンチャネル内蔵型受容体の高選択的リガンド

認識と機能調節に関わる生物有機化学研究

伊原 誠 (近畿大学農学部)

2. 生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の

相互作用に関する研究

原田 直樹 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

農芸化学女性研究者賞

1. 有機合成を基軸としたフラバン-3-オール誘導体の

機能性解明研究と栽培現場への貢献を目指した研究

展開

齊藤 安貴子 (大阪電気通信大学工学部)

イオンチャネル内蔵型受容体の高選択的リガンド認識と機能調節に関する生物有機化学研究

伊原 誠（近畿大学農学部）

【はじめに】イオンチャネル内蔵型受容体は、神経伝達物質受容体としてのみならず環境応答センサーとしても重要な働きをしている。それゆえ、その機能調節機構の理解は基本的生命現象の解明だけでなく、生物制御剤の開発を初めとする様々な応用への可能性を秘めている。演者はイオンチャネル内蔵型受容体の機能制御の分子機構に興味を抱き、それらのリガンド認識と機能制御の解明をめざした研究を展開してきた。講演では、本奨励賞に関わる研究推進に大きく寄与することとなった技術開発研究、タンパク質の新規非変性電気泳動法と昆虫神経細胞に対するパッチクランプ法、そして真菌の TRP チャネルが有するマルチモーダルな活性化制御の分子機構の分子構造基盤およびネオニコチノイドの昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体に対する高選択的相互作用の分子機構について紹介する。

【技術開発研究-非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 FN-PAGE の開発と昆虫神経細胞に適応可能なパッチクランプ条件の確立】 構造生物学的アプローチによりイオンチャネルの機能-構造相関研究を行うためには、解析に必要なイオンチャネルの異種発現コンストラクト設計を迅速に進める必要がある。研究開始当時、GFP 融合技術と液体クロマトグラフィーを組み合わせた蛍光検出ゲルろ過クロマトグラフィー（FSEC）が開発され普及し始めていたが、逐次分析のため解析できる試料数に限界があった。そこで、解析のハイスループット化が期待される Native-PAGE 法に着目し、その条件を探索した。その結果、スルホコハク酸系陰イオン界面活性剤の一種をチャージキャリアとして用いることで、膜タンパク質の構造を保ちながらも、明瞭な電気泳動バンドを与える条件を見だし FN-PAGE と命名した。本手法は、膜タンパク質の性状解析を迅速かつ簡便に行う事を可能にした。

一方で昆虫神経細胞のイオンチャネル内蔵型受容体と各種リガンド間相互作用の分子機構解析には、長時間にわたり安定した測定を必要としたが、研究開始当初数十分にわたり安定に昆虫の初代培養神経細胞の細胞膜電流を記録する方法が確立されていなかった。そこで、電気生理学的実験手法であるパッチクランプ測定に使用する電極内溶液組成を精査しリガンド処理により誘起されるイオン電流を長時間にわたり記録可能なパッチクランプ条件を確立した。

【真菌 TRP チャネルのマルチモーダルな活性化制御の分子基盤研究】 Transient

receptor potential (TRP) チャネルは、ヒトや昆虫を含む多くの真核生物において、温度や浸透圧、ケミカルリガンドなどの様々な細胞外情報受容体として、また細胞内情報伝達物質受容体としてはたらいっている。TRP チャネルの興味深い特性のひとつに、ひとつのチャネルが異なったメカニズムにより活性化されるという制御機構があげられる。代表的な例として、辛み成分カプサイシン受容体 TRPV1 は 42°C 以上の温度にも応答を示し、メントール受容体 TRPM8 は冷温にも応答を示すことが上げられる。しかし、どの様なしくみで TRP チャネルが多様な情報に応答できるのか不明であった。そこで、構造生物学的アプローチによってその分子機構にアプローチすべく、GFP 融合技術を活用して構造生物学的研究に適用可能な真菌 TRP チャネルを探索し、赤カビ病菌 (*Gibberella zeae*) から [1] 浸透圧変化, [2] 温度上昇, [3] H₂O₂ による酸化ストレス, [4] 細胞質 Ca²⁺ および [5] 膜電位の変化を感知してチャネルを開口する TRP チャネル (TRPGz) を見いだした。

TRPGz が様々な外部刺激に対して応答できる機能制御には、細胞内ドメイン (CTD) が関与すると推測し、その構造特性を分析超遠心法や NMR により解析した。その結果、CTD は単量体・二量体・四量体の平衡状態にあり、浸透圧や温度刺激によるイオンチャネルの開口には CTD の会合が重要な役割を果たす一方で、Ca²⁺ や膜電位変化に対する応答には CTD が関与しないことが明らかになった。つぎに、CTD の多量体化が生じる機構と CTD に動的な構造変化が伴う理由についてさらに検討したところ、CTD に存在する、強いねじれをもつヘリックスバンドル構造が関与することが明らかになった。さらに、TRPGz のカルボニル末端近傍に存在する塩基性アミノ酸クラスターの機能を調べたところ、当該塩基性アミノ酸クラスターがイノシトールリン脂質 (PIPs) に対する親和性を示すとともに、それらは浸透圧や温度変化に伴う液胞膜上の TRPGz チャネルの開口抑制に関与することを見出した。

これらの研究を通じて、浸透圧や温度変化により TRPGz が液胞からのカルシウムイオンの放出を連鎖的に引き起こして細胞内シグナルカスケードのスイッチを入れる一方、カルシウムイオン濃度の上昇により誘起される液胞膜中の PIP₂ 濃度上昇を検知してチャネル機能が制御されること、そして本 TRP チャネルの機能制御ドメインは天然変性タンパク質という、フレキシブルで離合集散可能な弱い相互作用で会合するという性質をもつことで、浸透圧や膜電位、イノシトールリン脂質など様々な形態の刺激によって制御されるというマルチモーダルな機能制御を可能にしていることを構造生物・生理学的アプローチから明らかにした。

【昆虫制御物質の活性発現と選択性の分子機構の解明】 多くの動物に共通する神経シナプス伝達のうち、昆虫の神経伝達機構を選択的に制御・調節すること

は、安全性に優れたな昆虫制御剤を開発するうえで重要である。そこで、ネオニコチノイド系生物制御剤の活性発現と昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に対する選択的結合機構の解明に取り組んだ。まず、電気生理学的手法を用いた解析によって、ネオニコチノイド化合物によって、アンタゴニストとして作用する場合からアセチルコリン以上の応答を誘起するスーパーアゴニストとして作用する場合までバラエティに富むことを見出した。

次に、構造生物学的アプローチによってネオニコチノイドの nAChR に多様な生理活性と、昆虫の nAChR に対する選択毒性の発現メカニズムの解明を目指した。nAChR のアゴニスト結合ドメインに相同な構造をもつタンパク質、アセチルコリン結合タンパク質 (AChBP) をモデルタンパクとして用い、ネオニコチノイドと AChBP の複合体結晶の X 線結晶構造を明らかにした。そして、その立体構造に基づいて、nAChR の non- α サブユニットの loop D 領域にて広く保存されている塩基性アミノ酸との相互作用によってネオニコチノイドが昆虫の nAChR に対する選択性を示す事を提唱するとともに、昆虫の nAChR サブユニットタンパク質で見られた一アミノ酸多型がネオニコチノイドのアゴニスト活性に顕著に影響を及ぼすことを発見した。さらに、Loop D に塩基性アミノ酸導入した変異型 AChBP とネオニコチノイド複合体結晶の X 線結晶構造を解析することにより結晶構造中でネオニコチノイドが loop G 領域の塩基性アミノ酸とも相互作用することを見いだした。この発見から、昆虫の nAChR では、 α サブユニット同士が隣接した受容体が形成されること、そして昆虫の nAChR α サブユニットでは、LoopD-E-G 領域のアミノ酸残基が協調して、ネオニコチノイドの昆虫 nAChR に対する選択性をいっそう高めていることを見いだした。本研究で得られた知見は、同受容体を標的とする生物制御剤開発のみならず、将来発生する可能性のある薬剤耐性昆虫の予測とその対策への知見として、さらに現在社会問題化しつつある農薬の非標的生物に対する薬害発生防止への基盤情報を与えるものであると考えている。

【おわりに】 以上の研究成果は、真菌や昆虫の生体機能の高選択的化学調節機構における基盤概念を提供し、基本的生命現象の理解を深めることに貢献したことから、広範な応用研究へと発展する可能性を秘めている。今後もイオンチャネルの動作原理の解明をすすめていくとともに、イオンチャネルが関与する生命現象を追求し、環境に調和した生物制御剤の開発を見据えた農芸化学研究に貢献していきたい。

○受賞者プロフィール

名前：伊原 誠 (Makoto Ihara)

連絡先：〒631-8505 奈良県奈良市中町 3327-204

近畿大学 農学部 応用生命化学科

E-mail address: makoto_i@nara.kindai.ac.jp

略歴：

2000年3月 近畿大学 農学部 農芸化学科 卒業

2002年3月 近畿大学大学院 農学研究科 博士前期課程修了

2005年3月 近畿大学大学院農学研究科 博士後期課程修了

博士（農学）取得

2005年4月 近畿大学 農学部 研究員

2006年10月 独立行政法人理化学研究所 応射光科学総合研究所 研究員

2012年12月 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科（薬学系）特任助教

2013年4月 近畿大学 農学部 応用生命化学科 講師

2018年4月 近畿大学 農学部 応用生命化学科 准教授

現在に至る

主な研究テーマ：リガンド開口イオンチャネルの開口制御の解析およびその生物制御剤への応用

今後の展望：無脊椎生物の機能未知イオンチャネルとネイティブリガンドを探索するとともに、生物制御剤への応用を模索していきたい

生体制御におけるアンドロゲンシグナリングと食の相互作用に関する研究

原田 直樹（大阪府立大学大学院生命環境科学研究科）

【はじめに】

食事は、がんやメタボリックシンドロームなどの生活習慣病の発症と密接に関連し、疾患の発症を正にも負にも調節する作用を持つ。生活習慣病の発症機構解明とその予防を目指し、食事の影響を受けて発症する疾患に関わる細胞内シグナリングとしてアンドロゲン（男性ホルモン）シグナリングを捉え、生化学・分子生物学・生理学・栄養学的見地から研究を行なってきた。これまでの研究成果は、前立腺がんやメタボリックシンドロームにおけるアンドロゲンシグナリングの役割やその作用機構の一端を明らかにするとともに、これらの疾患の発症や予防におけるアンドロゲンシグナルリングと食事・食品因子のクロストークに関する知見を広げており、以下に紹介する。

【アンドロゲン受容体（AR）転写活性化機構の解明】

ARは、男性ホルモン依存的な転写因子として機能する。ARの転写活性化機構の全容を解明するために、転写共役因子と呼ばれるARと複合体を形成するタンパク質の同定とその作用機構の解明に取り組み、解糖系酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（GAPDH）、Ran結合タンパク質10（RanBP10）、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素10（PRMT10）がARの転写を調節する因子として作用することを見出した。さらに、転写共役因子として既に同定されていたARA24/Ranについてもその作用機構を同定した。

【前立腺がんの進行におけるAR機能の解析と食品因子による抑制作用】

前立腺がんの発症は食習慣と関係し、食習慣の欧米化が進む日本では罹患率が飛躍的に増加している。ARを介した男性ホルモンの作用は、男性の生殖器官である前立腺の発達と密接に関係しており、がん化した前立腺上皮細胞の増殖にも強い影響を持つ。初期前立腺がんに対し、外科的・内科的にARシグナルを抑制するホルモン治療を行った後に再発した去勢抵抗性前立腺がん（castration-resistant prostate cancer: CRPC）は、予後不良であり、有効な治療方法がない。CRPCの発症メカニズムを明らかにするために、CRPCの発症モデル細胞株を樹立して解析した結果、C末端領域が欠損したAR（AR-NH1: the N-terminal fragment of AR cleaved in the neighborhood of helix 1 of the ligand-binding domain）が産生されることを見出した。AR-NH1はホルモン療法に類似した状態でのみプロテオリシスによって産生され、その特徴からリガンド非依存的に転写活性化すると推察された。つまり、ホルモン療法後にAR-NH1が産生されてリガンド非依存的に機能することがCRPCの発症に繋がるというメカニズムを提唱するに至った（図

1). 一方で, CRPC の発症を予防するために, ホルモン療法後に摂取すべき食品因子の同定を目的として, AR 機能抑制を指標にスクリーニングした結果, ブドウに含まれるポリフェノールのレスベラトロールを見出した. レスベラトロールは, 野生型 AR だけでなく, C 末端領域を欠損した AR の転写活性を抑制したことから, AR-NH1 の機能も抑制すると考えられた. 以上より, CRPC の発症予防に対する食品因子の有効性について, そのメカニズムとともに提示した (図 2).

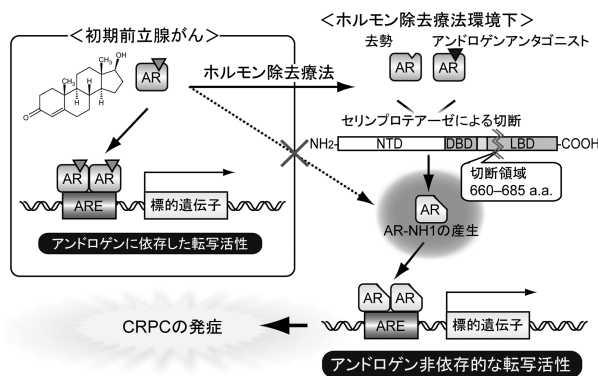


図 1. CRPC 発症機構の解明. リガンド非存在下またはアンタゴニスト存在下においてプロテオリシスにより切断された AR (AR-NH1) が CRPC 発症に関与するメカニズムを示す.

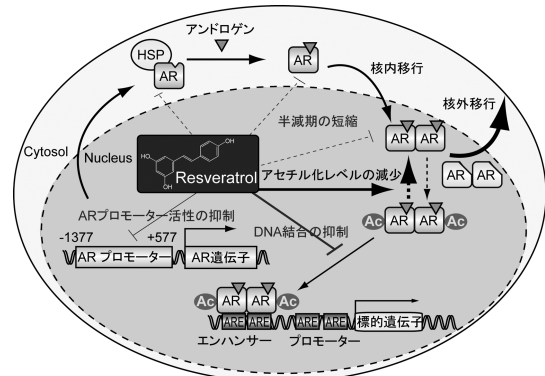


図 2. 食品因子による AR 転写抑制機構. レスベラトロールが AR の転写活性を抑制するメカニズムを示す.

【メタボリックシンドロームの発症における男性ホルモンの作用に関する研究】

男性における血中テストステロンの低下は, メタボリックシンドロームの発症を介して心疾患や脳血管疾患といった生活習慣病のリスクを高めて寿命を短縮させることが明らかとなってきた. しかし, これら一連のメカニズムについては十分には理解されていない. そこで, テストステロンの低下から肥満や 2 型糖尿病が発症する機構を明らかにすることを目的に動物モデルの構築を行った.

去勢ラットを用いて膵臓 β 細胞における男性ホルモンシグナリングについて検討した結果, 去勢により血中テストステロンレベルを低下させると β 細胞量がコントロールの 3 割程度にまで減少して耐糖能不全を生じることが判明した. この β 細胞の減少と耐糖能不全は, テストステロンの補充により回避された. テストステロンは直接 β 細胞の AR に作用して増殖を制御することが示唆された. さらに, β 細胞の AR はグルコース濃度の上昇によりユビキチンプロテアソーム系により分解され, 高グルコース条件下ではテストステロンによる細胞増殖促進作用が消失することが明らかになった. また, 性成熟期以降のみならず, 胎児期において雄への性分化を誘導するアンドロゲンシグナリングが, 雄の β 細胞の発達に関与することを見出した.

去勢マウスでは、男性ホルモンの減少によって高脂肪食を摂取させた時にのみ食餌効率（体重増加／摂取エネルギー）が増加することで内臓肥満や脂肪肝、血糖値の上昇を発症し、このとき、糞便の減少、腸内細菌叢の変化が起きることを見出した（図 3）。さらに、抗生物質により腸内細菌叢を攪乱すると、去勢により生じた現象がすべて消失した。さらに、AR ノックアウトマウスでも同様の結果を確認し、AR ノックアウトマウスでは寿命が短縮することを見出した。現在、AR を介した男性ホルモン作用の低下に起因して腸内細菌叢が変化する機序について解析を行っている。

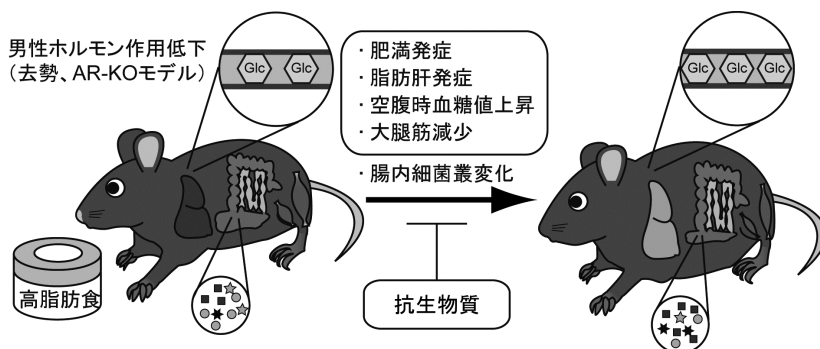


図 3. 男性ホルモン低下によるメタボリックシンドローム発症メカニズムの解明。去勢や AR-KO によるメタボリックシンドロームの発症における腸内細菌叢の関与を示す。

【おわりに】

アンドロゲンシグナリングの活性化機構の詳細と生理的役割の解明に取り組み、さらに、食事・食品成分とのクロストークについて分子レベルから個体レベルで解析してきた。これまでの研究成果によって、従来知られているアンドロゲンシグナリングの標的組織への直接作用に加え、腸内細菌叢を介した間接作用という新しい作用形態の存在が明確になってきた。今後、食事とアンドロゲンシグナリングのクロストークがどのように腸内細菌叢に影響するかについて明らかにすることで、エネルギー代謝における食と内分泌系のクロストークに関する新たな研究フィールドを切り拓きたい。

【謝辞】本研究は、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食品代謝栄養学グループで行われたものです。研究者としての道に導いて頂いた大阪府立大学名誉教授 中野長久先生、自由に研究を行う機会を与えて頂いた大阪府立大学教授 乾博先生、研究の基礎をご教授頂いた大阪府立大学教授 山地亮一先生には、学生時代より今日まで終始ご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。また、長年にわたり激励とご助言を頂いた近畿大学教授 重岡成先生、本研究の遂行にご協力を頂いた足達哲也先生（金蘭千里大学）、桑村充先生（大阪府立大学）、井澤武史先生（大阪府立大学）に深謝いたします。共同研究者として多大な協力を頂いた東村泰希博士（石川県立大学）、三谷壘一博士（信州大学）、小川真弘博士、堀内寛子博士、北風智也博士をはじめ、本研究の遂行に関わり支えてくれた院修了生、卒業生、ならびに現院生、学部学生諸氏に深く感謝申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関西支部長の河田照雄先生ならびにご支援を賜りました諸先生方に厚く御礼を申し上げます。

○受賞者プロフィール

名前：原田 直樹 (Naoki Harada)

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: harada@biochem.osakafu-u.ac.jp

略歴：2002 年 3 月 大阪府立大学農学部応用生物化学科卒業

2007 年 4 月 日本学術振興会特別研究員

2007 年 9 月 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科修了, 博士 (農学)

2008 年 10 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科助教

2015 年 4 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科講師

現在に至る

主な研究テーマ：代謝制御における食と性ホルモンの作用およびそのクロストーク

今後の展望：膵臓 β 細胞機能維持へのアプローチおよび内臓脂肪減少を志向した腸内細菌叢へのアプローチ

有機合成を基軸としたフラバン-3-オール誘導体の機能性解明研究と栽培現場への貢献を目指した研究展開

齊藤 安貴子（大阪電気通信大学工学部環境科学科）

【はじめに】フラバン-3-オールの構造を図1に示した。フラバン-3-オールは、フラボノイドの一種で、2位にフェニル基を有するクロマン骨格の3位が水酸基で置換された化合物群である。一般的には「カテキン類」と呼ばれ認知度が高く、緑茶カテキンなど機能性化合物

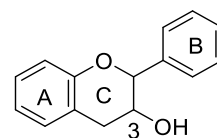


図1. フラバン-3-オールの基本構造

として積極的に摂取されているものも多い。最近では多くの有機合成化学者がフラバン-3-オール誘導体の合成研究を進めているが、一昔前は、天然に多量に存在し抽出操作によって確保できるようなこの化合物群を、「わざわざ」合成しようとするメリットがないと考える傾向にあった。私が本化合物に注目したのは、博士号を取得し自分自身のライフワークとしての研究分野を立ち上げようと考えていた時、フラバン-3-オールが化合物群としては天然に多量に存在するが、多数の類似の誘導体の混合物として得られることが多く、簡単に、かつ、大量に単離できる化合物群の機能性は詳細に検討されていたが、それ以外の化合物については機能性評価の例が少ないことを知ったところからである。修士まで有機合成、博士は分子生物学を学び、博士研究員は幸運にも自分のテーマで研究を立ち上げることが許される環境にあったことから本研究を始めることができた（これは本当に幸運なことである）。

【フラバン-3-オール誘導体】フラバン-3-オールの構造を見ると、一定の脂溶性と平面性を持つ骨格が水酸基で置換され、その置換位置によって多くの類縁体を持つことに加え、2位、3位の立体により全体の3次元構造が決まる。一方で、そのコンフォメーションは相手側（タンパク質等）によって比較的フレキシブルに動くことができる。この化合物群の構造について考えれば考えるほど、「ポリフェノール化合物は何にでも偽陽性を示す」「何にでも活性を示す」のではないのではないかと思えてきた。さらに多くの機能性が抽出液・混合物で測定されていることも気になった。例えば、10倍高い活性の化合物が10分の1量含まれていて活性を示している場合、それは「総ポリフェノール量」などとは相関がないだろう。それゆえ、ざっくりと「フラバン-3-オール誘導体混合物の活性」ではなく、「この立体のこの化合物の活性・・・」といった議論をしたいと考え

た. しかし市販で入手できる化合物の種類には限界があり, 植物から抽出できる化合物も単離するのが困難なものが多いうえ, 植物種によって構造が異なるため効率が悪い. これこそが「有機合成」が活躍できる場だと考えた.

有機合成研究の詳細は省略するが, 図 2 に示したように, 天然から入手することが難しい化合物群や, 非天然型の化合物群を合成し構造-活性相関研究を行った. その結果, 微細な構造の違いが活性に大きく影響することが確認された¹.

この研究により, 類似の構造を持つが活性に大きく差がある化合物のラインナップを揃えることができ, プローブ化をはじめとする化学生物学研究を進めている.

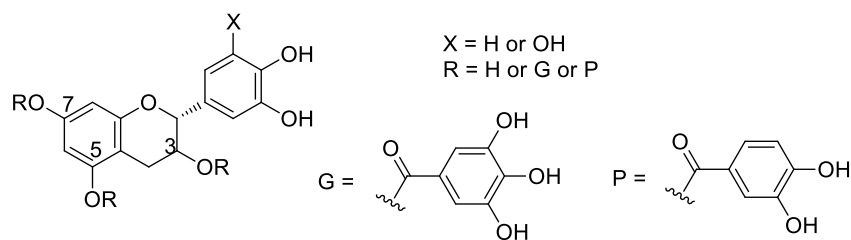


図 2. 天然から単離が難しい誘導体の合成

【フラバン-3-オール重合体：プロアントシアニジン】フラバン-3-オール誘導体が重合した化合物群をプロアントシアニジンと呼び, リンゴポリフェノール, ワインポリフェノール, カカオポリフェノールなども, このプロアントシアニジンが主成分である. 代表的な構造は図 3 に示したが, 水酸基の数やオリゴマーの長さ, さらには様々な官能基や分子団による修飾により, 多くの類似の構造を持つ化合物の混合物として存在し, それぞれの化合物を単離・構造決定が難しい化合物として知られる. そのため, 生物活性評価に十分な純粋な化合物を確保すること, また, 適した対照化合物を同時に入手することが困難であることから, 構造-活性相関研究が進みにくい化合物群である. この化合物群についても合成研究を行い, 合成法の開発²や構造-活性相関研究³を進めた. 最近, B 型肝炎ウイルスに対する活性発現メカニズムの解明⁴など, プローブ化研究でも少しずつであるが成果が出始めている (国立感染症研究所との共同研究).

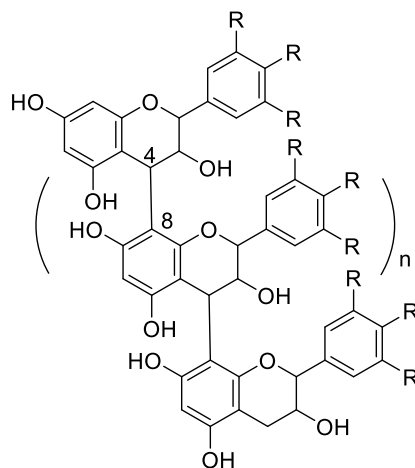


図 3. プロアントシアニジンの構造

【栽培現場への貢献を目指して】

やはり農芸化学分野としては研究の成果を応用していくことが重要だと考え、作物中のフラバン-3-オール誘導体に関する研究を開始した。より機能性が高い構造を持つフラバン-3-オール誘導体を増加させるにはどうしたら良いか、有機化学の視点とアプローチで切り込みたい。作物の中でどのような有機化学反応が起こって化合物が生産されているのか、生合成系の研究者を巻き込んで進めているところである。

【おわりに】今回女性研究者賞をいただくことができたが、性別について私自身は「もしかして女性だったかもしれない」と時々思い出す程度である。もちろん現在も小学生の子供を抱え育児に仕事に奮闘する日々だが、基本的にサイエンスや研究をやりたいことに性別は関係ないと考えている。ときどき「女性特有の視点では・・・？」と質問されることもあるが、今でも質問の意味自体が理解できないので笑ってごまかしている。子育て中で時間に限りがあるため「今できること」と「今はできないこと」を整理して、優先順位をつけて行動することで色々な場面を乗り越えられた気もするし、色々な苦労があったのだと思うが実は自分でもあまり覚えていない。私が最も幸運だったのは、理解してくれる周囲の環境があったこと、それが農芸化学という分野に出会えたことである。今後もサイエンスに真面目に実直に向き合い、農芸化学という分野に貢献できるような成果を出すことで恩返しをしていきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Hojima, T., *et al.*, and Saito, A., *Nat. Prod. Chem. Res.*, **5**, 250 (2017).
- 2) Higashino, Y., *et al.*, and Saito, A., *Molecules*, **23**, 205 (2018).
- 3) Hamada, *et al.*, and Saito, A., *Molecules*, **20**, 18870-18885 (2015).
- 4) Tsukuda, S., *et al.*, *Hepatology*, **65**, 1104-1116 (2017).

【謝辞】本研究は富山県立大学で立ち上げたのち細々と継続し本年で17年目になりました。これまで温かいご指導ご鞭撻を賜りました多くの先生方に心より感謝申し上げます。ここで述べた研究は、大阪電気通信大学の学生たちの気づきと努力によって実現し現在も着実に成果を出しつつあるものです。彼ら・彼女らの努力がなければ実現しませんでした。学生達に心から感謝しています。また、本女性研究者賞を作るためにご尽力くださった先生方、本賞にご推薦くださいました岡山大学大学院環境生命科学研究科 清田洋正先生、ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

○受賞者プロフィール

名前：齊藤 安貴子 (Akiko Saito)

連絡先：〒572-8530 大阪府寝屋川市初町 18-8

大阪電気通信大学 工学部 環境科学科

齊藤化学生物学研究室

E-mail address: a-saito@ osakac.ac.jp

略歴：1995 年 3 月 東北大学農学部農芸化学科卒業，学士(農学)

1997 年 3 月 東北大学大学院農学研究科環境修復生物工学
博士前期課程修了，修士(農学)

2000 年 3 月 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻
博士後期課程修了，博士(学術)

2000 年 4 月 富山県立大学，富山県バイオテクノロジーセンター勤務
科学技術振興事業団科学技術特別研究員
学術振興会特別研究員

2005 年 4 月 理化学研究所中央研究所長田抗生物質研究室
理化学研究所基幹研究所ケミカルバイオロジー研究領域
基礎科学特別研究員，協力研究員

2010 年 4 月 大阪電気通信大学 工学部・応用化学科 講師
(2011 年 4 月より学科再編により環境科学科)

2012 年 4 月 大阪電気通信大学 工学部 環境科学科 准教授

2017 年 4 月 大阪電気通信大学 工学部 環境科学科 教授
現在に至る

主な研究テーマ：有機合成化学を軸足としたケミカルバイオロジー研究。特に、食品・植物に含まれ、天然からの単離が困難な化合物について、「立体選択的に合成する手法の開発、プローブ化等「有機合成でしかできないこと」にこだわり、合成した化合物を用いてケミカルバイオロジー研究を進めている。特に最近気になっているのは、生物活性評価や機能性解明研究における「ネガティブ・コントロール化合物」。ある機能性評価系において、「その化合物自体は活性を持たないが、活性が高い化合物と構造的に極めて近い化合物」を見出すと嬉しくなる。しかし、学生にとっては論文にならないネガティブデータの山となることから、現在、学生との価値観の違いが表面化し難しい状態にある。

今後の展望：有機合成でしか得られない化合物・ツールの開発にこだわりつつ、それを有効に活用して新たな事象を化学的に解明する研究を進めていきたい。

日本農芸化学会関西支部第 504 回講演会・ミニシンポジウム

幹事校 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

代表：片岡 道彦

庶務：岡澤 敦司

ミニシンポジウム企画：

石橋 宰

園田 素啓

原田 直樹

○次回予定

2018 年度日本農芸化学会関西支部大会（第 505 回講演会）

日時：2018年9月14日（金）～15日（土）

会場：京都工芸繊維大学

講演申込締切：8月10日（金）

講演要旨締切：8月17日（金）

連絡先：〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町

京都工芸繊維大学応用生物化学系

2018年度支部大会実行委員会

E-mail: kit2018@kit.ac.jp

実行委員長：鈴木秀之

Tel: 075-724-7763

庶務：北島佐紀人

Tel: 075-724-7763

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 7 月 14 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/

