

# 2018 年度日本農芸化学会関西支部大会

第 505 回講演会

講演要旨集

2018 年 9 月 14 日（金）・15 日（土）

国立大学法人 京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス





# 2018 年度日本農芸化学会関西支部大会

第 505 回講演会

講演要旨集

2018 年 9 月 14 日（金）・15 日（土）

国立大学法人 京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス





## 2018年度日本農芸化学会関西支部大会(第505回講演会)

公益社団法人 日本農芸化学会 関西支部

国立大学法人 京都工芸繊維大学 (共催)

日程：2018年9月14日(金)・15日(土)

会場：国立大学法人 京都工芸繊維大学 松ヶ崎キャンパス

### 第1日目 9月14日(金)

開会挨拶	センターホール	13:00～
講演会	センターホール	13:05～
支部技術賞表彰式	センターホール	15:00～
受賞講演	センターホール	15:05～
一般講演	東3号館(ノートルダム館)	16:30～
懇親会	60周年記念館2階 大セミナー室	18:00～

### 支部幹事会など

執行部会	60周年記念館2階 小セミナー室	10:00～
幹事会	60周年記念館2階 大セミナー室	11:00～
参与会	60周年記念館1階 講義室	12:00～

### 第2日目 9月15日(土)

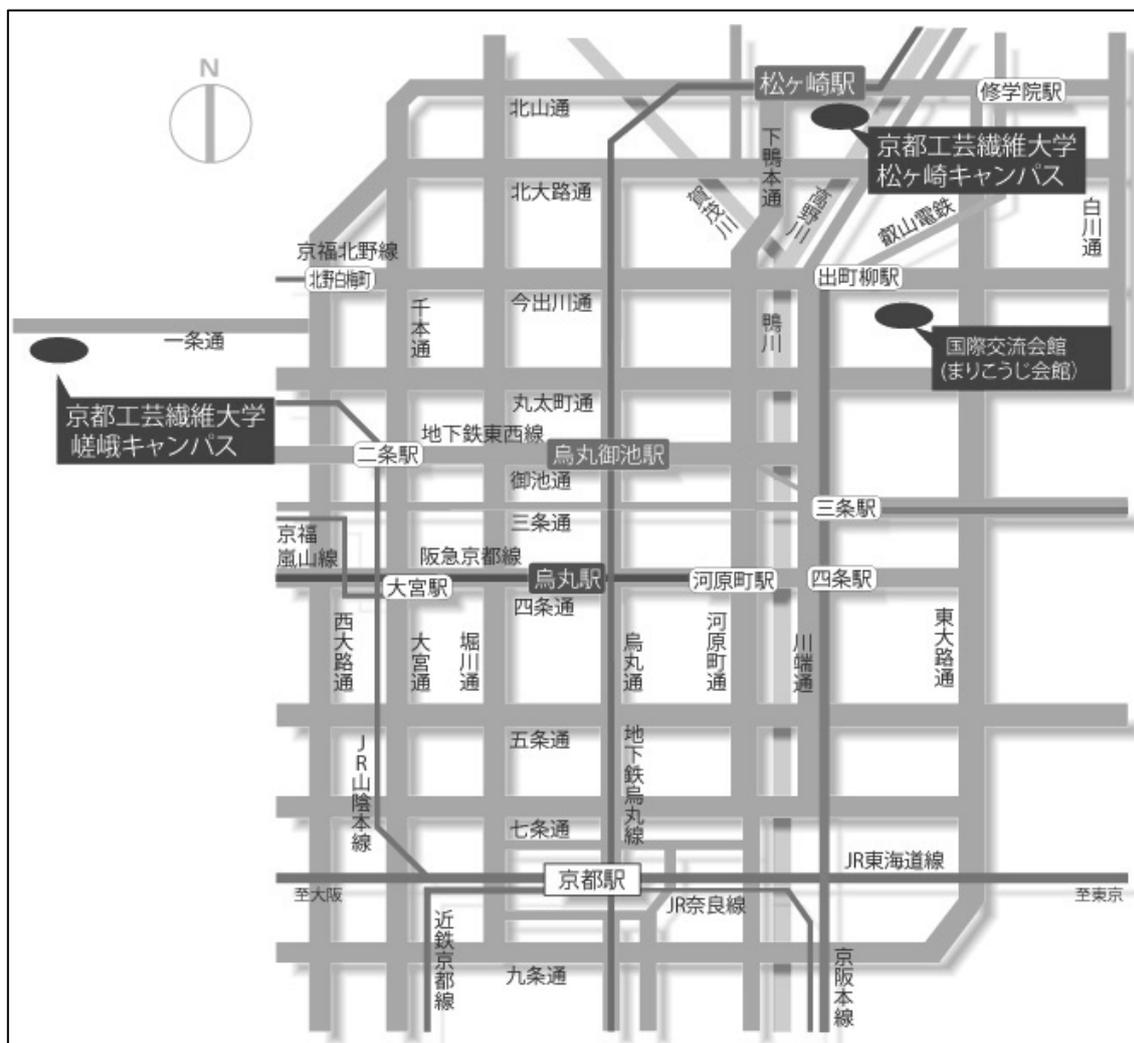
一般講演	東3号館(ノートルダム館)	10:00～
------	---------------	--------

大会参加費： 一般2,000円、学生無料(学生証をお持ちください)

懇親会参加費： 一般4,000円、学生1,000円



## 京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパスへのアクセス



京都駅より

市営地下鉄烏丸線「国際会館」行きに乗車(約18分)「松ヶ崎駅」下車、徒歩約8分

京阪三条駅より

市営地下鉄東西線「太秦天神川」行きに乗車、「烏丸御池駅」で地下鉄烏丸線・国際交流会館行きに乗り換え、「松ヶ崎駅」下車、徒歩約8分

## 市営地下鉄松ヶ崎駅からキャンパスまで



市営地下鉄烏丸線「松ヶ崎駅」出口1を出て、北山通を東へ  
 4つめの信号を南へ  
 「松ヶ崎駅」から徒歩約8分

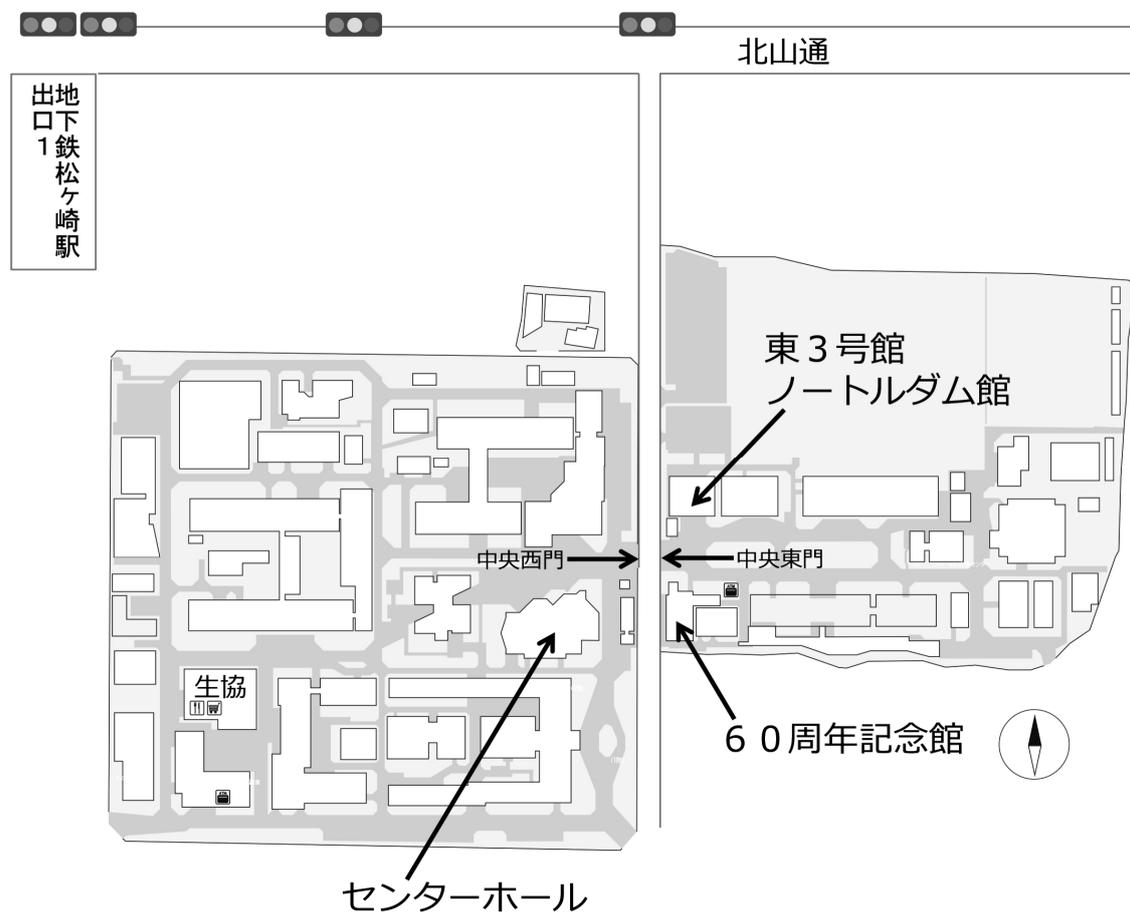
烏丸線  松ヶ崎駅 1 京都・竹田・近鉄奈良方面										
Karasuma Line Matsugasaki Sta. for Kyoto, Takeda, Kintetsu Nara										
平日 Weekdays						土曜・休日 Saturdays, Sundays & Holidays				
5				20				42		57
6				12 <sup>分</sup>	25		37		47	55 <sup>分</sup>
7	4		11 <sup>分</sup>	19 <sup>分</sup>	26		33		40 45	50 54 59 <sup>分</sup>
8	3 8		13 17	21 25	30 33 37		41 45 49		53	57 <sup>分</sup>
9	1 5 10 14 19		23 27	31 <sup>分</sup>	35 39		44 49		54	59 <sup>分</sup>
10	5		11 17	22 <sup>分</sup>	27		32 37		41 <sup>分</sup>	45 49 55 <sup>分</sup>
11	2 9		17 <sup>分</sup>	24		32 39 <sup>分</sup>		47		54 <sup>分</sup>
12	2 9		17 <sup>分</sup>	24		32 39 <sup>分</sup>		47		54 <sup>分</sup>
13	2 9		17 <sup>分</sup>	24		32 39 <sup>分</sup>		47		54 <sup>分</sup>
14	2 9		17 <sup>分</sup>	24		32 39 <sup>分</sup>		47		54 <sup>分</sup>
15	2 9		17	24 <sup>分</sup>		32 39		46		52 58 <sup>分</sup>
16	4		10 <sup>分</sup>	16	21 26		31 36		41 46	51 56 <sup>分</sup>
17	1 6		11 <sup>分</sup>	16	21 26 <sup>分</sup>		31 36		41 46	51 56 <sup>分</sup>
18	1 6		11 <sup>分</sup>	16	21 26 <sup>分</sup>		31 36		41 46	51 56 <sup>分</sup>
19	2 8		14	20 26 <sup>分</sup>		32 38		44		50 57 <sup>分</sup>
20	4		12 19	27 <sup>分</sup>		34		42		50
21	0 <sup>分</sup>	9	19	29		39 <sup>分</sup>		49		59
22	9		19 <sup>分</sup>	29		39		49		59
23			11	21		33		41		
24			★11							
5								20		42 57
6								12 <sup>分</sup>	26	36 <sup>分</sup> 46 55
7								5 <sup>分</sup>	14	23 33 41 <sup>分</sup> 49 56
8								3	10 <sup>分</sup>	16 22 28 34 40 46 52 58 <sup>分</sup>
9								4	10 <sup>分</sup>	16 22 <sup>分</sup> 29 <sup>分</sup> 35 42 <sup>分</sup> 48 55
10								2 <sup>分</sup>	9	17 24 <sup>分</sup> 32 39 <sup>分</sup> 47 54 <sup>分</sup>
11								2	9	17 <sup>分</sup> 24 32 39 <sup>分</sup> 47 54 <sup>分</sup>
12								2	9	17 <sup>分</sup> 24 32 39 <sup>分</sup> 47 54 <sup>分</sup>
13								2	9	17 <sup>分</sup> 24 32 39 <sup>分</sup> 47 54 <sup>分</sup>
14								2	9	17 <sup>分</sup> 24 32 39 <sup>分</sup> 47 54 <sup>分</sup>
15								2	9 <sup>分</sup>	16 24 31 <sup>分</sup> 39 46 54 <sup>分</sup>
16								2	9	17 24 <sup>分</sup> 32 39 47 54 <sup>分</sup>
17								2	8	14 20 26 <sup>分</sup> 32 38 44 <sup>分</sup> 50 56 <sup>分</sup>
18								2	8	14 20 26 <sup>分</sup> 34 41 49 57 <sup>分</sup>
19								4	12 19	27 <sup>分</sup> 34 42 49 57 <sup>分</sup>
20								4	12 19	27 <sup>分</sup> 34 42 50
21								0	9 <sup>分</sup>	19 29 39 <sup>分</sup> 49 59
22								9	19 <sup>分</sup>	29 39 49 59
23									11	21 33 41
24									★11	

備考 は急行 近鉄奈良行 (竹田駅まで各駅停車) は普通 新田辺行 その他は竹田行  
 は烏丸御池駅で東西線との接続待ちをします  
 ★は金曜日のみ運行します (年末年始とお盆期間を除く。)

平成30年03月17日実施

許可を得て京都市交通局のHPから転載

## キャンパスマップ

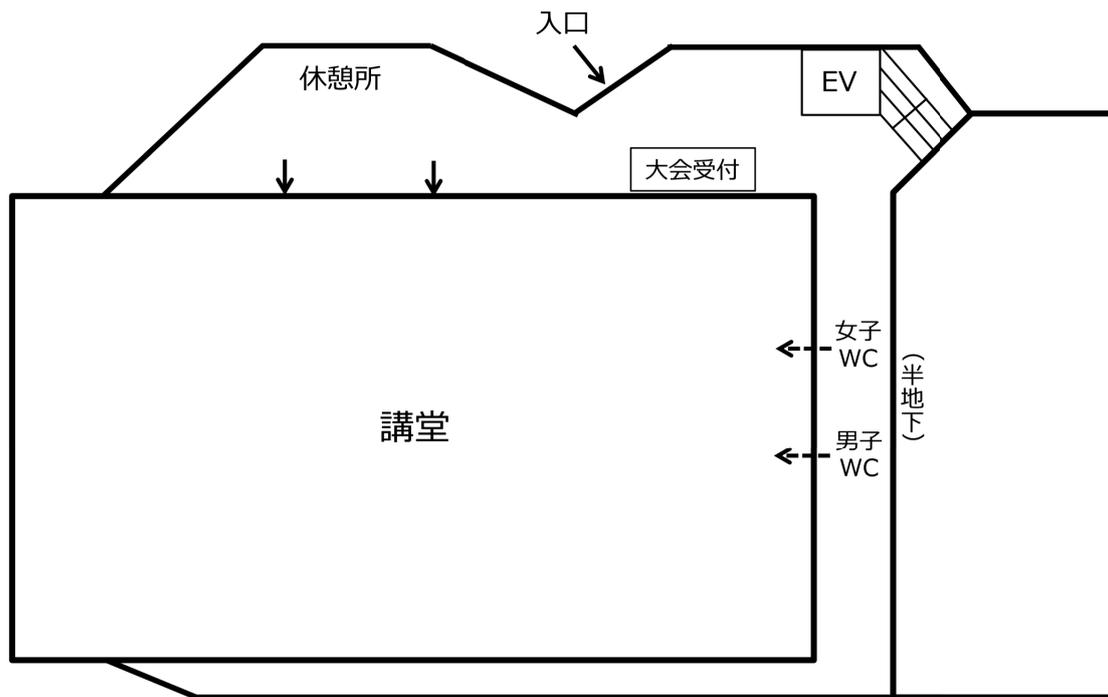


北西門からキャンパスに入ることも可能ですが、多くの方が構内で迷われます。  
地下鉄松ヶ崎駅出口1を出て、北山通を東へ。4つめの信号を南に下がり、中央門からキャンパスに入られることを強くお勧めします。

## 会場案内図

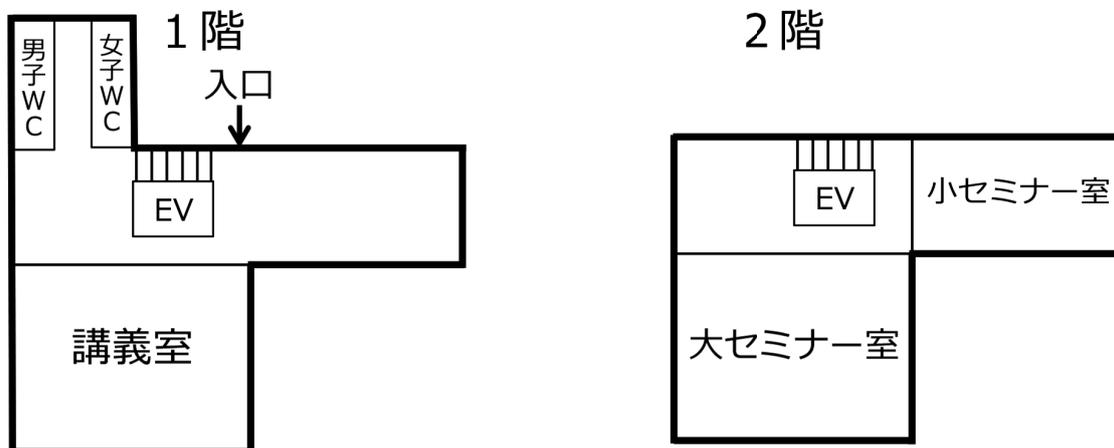
### センターホール

講演会、支部技術賞授賞式、受賞講演 会場



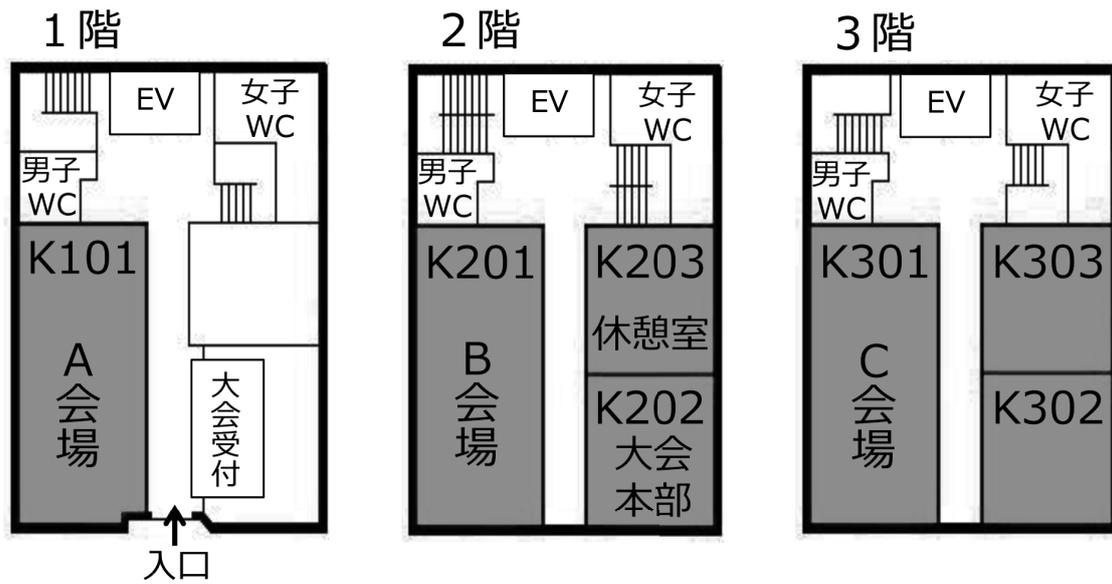
### 60周年記念館

懇親会、支部執行部会、支部幹事会、支部参与会 会場



# 東3号館（ノートルダム館）

一般講演 会場



## 大会参加者へのご案内

### 1. 参加受付

受付（1日目：16:00までセンターホール1F、16:00以降および2日目：A会場前）にて、講演要旨集と名札をお受け取りください。事前決済がお済みでない方は受付にてお支払いください。名札には所属、氏名を記入し、会場内でご着用ください。

大会参加費：一般2,000円、学生無料（学生証をお持ちください）

懇親会参加費：一般4,000円、学生1,000円

### 2. 支部参与会（1日目 12:00～13:00）

支部参与会に御出席される先生は、12:00までに支部参与会会場（60周年記念館1階講義室）にお集まりください。

### 3. 懇親会

懇親会は1日目18:00から、大学内の60周年記念館2階大セミナー室にて開催します。事前に懇親会への参加登録をしていない場合は、当日、受付にてお申込みください。

### 4. 遺失物・拾得物

お忘れ物、落とし物等がある場合は、受付へお越してください。また、会場内での忘れ物、落とし物等を拾得された方は、受付までお届けください。

### 5. 飲食

講演会場内では飲食禁止です。休憩室としてK203室(B会場向かい)をご利用ください。

### 6. 昼食

1日目は大学の学生食堂を利用できます。2日目の学生食堂はお休みです。最寄りのコンビニエンスストア（ローソン）は地下鉄「松ヶ崎駅」の「出口1」の向

かいにあります。北山通に飲食店が多数あります。

#### 7. 喫煙

大学構内は、指定された場所を除いて禁煙です。60周年記念館東側に喫煙所があります。

#### 8. その他

- 大学構内には十分な駐車スペースがありませんので、公共交通機関でお越しください。
- 無許可で講演を写真撮影、録画・録音等を行うことはお断りします。
- クロークはございません。

## 一般講演発表者の方へ

### 1. 発表形式

一般講演にはご自身の PC をお使いいただきます。電源ケーブルを必ずご準備ください。プロジェクターへの映像出力端子はミニ D-Sub15pin 端子のみ使用できます。それ以外の形状のものや Mac の場合は変換アダプターが必要ですので、必ずご持参ください。

### 2. 講演時間

講演時間は 15 分（発表 12 分、質疑応答 3 分、パソコン繋ぎ換えの時間を含む）です。時間厳守をお願いいたします。

### 3. 発表用データ

講演当日の PC の不具合に備え、発表用ファイル（オリジナルファイルと PDF 等汎用形式）をコピーした USB メモリをご持参ください。

### 4. その他

- 演者は講演開始 10 分前までにパワーポイントを開いた状態で「次演者席」にて待機し、前演者の講演終了後直ちにディスプレイケーブルを PC に接続してください。
- 演者は講演終了後、直ちにディスプレイケーブルを PC から外し、次演者にお渡しください。

## 一般講演座長一覧

日時	会場	担当演題番号	座長名 (所属)
9月14日	A	A41~A43	森田重人 (京府大院・生命環境)
9月14日	A	A44~A45	田茂井政宏 (近畿大院・農)
9月15日	A	A51~A54	神戸大朋 (京大院・生命)
9月15日	A	A55~A58	芦田均 (神戸大院・農)
9月14日	B	B41~B45	亀井康富 (京都府立大・生命環境)
9月15日	B	B51~B54	森直樹 (京大院・農)
9月15日	B	B55~B60	秋野順治 (京工織大・応用生物)
9月14日	C	C41~C45	片岡道彦 (阪府大・生命環境)
9月15日	C	C51~C54	澤山茂樹 (京大院・農)
9月15日	C	C55~C60	橋本渉 (京大院・農)



プログラム



**第1日目 9月14日(金)**

**センターホール**

13:00~13:05 開会の挨拶

13:05~ 講演会

13:05~13:50 「おいしさの構造」

演者：伏木 亨（龍谷大学）

座長：鈴木秀之（京都工芸繊維大学）

13:50~14:20 「モンシロチョウ由来サイトトキシンによる生体組織の  
機能不全化とその応用」

演者：小谷英治（京都工芸繊維大学）

座長：北島佐紀人（京都工芸繊維大学）

14:20~14:50 「微生物遺伝資源を利用するキラル化合物合成法の開発」

演者：八十原良彦（株式会社カネカ）

座長：鈴木秀之（京都工芸繊維大学）

14:50~15:00 休憩

15:00~15:05 支部技術賞表彰式

「酒粕の機能性に関する研究 ～甘酒、にごり酒への応用～」

月桂冠株式会社

大浦 新、堤 浩子、入江元子、大澤麻水

15:05～ 受賞講演  
15:05～15:35 2018年度 農芸化学技術賞  
「GABAの生産技術の確立と高機能食品の市場開発」  
演者：山津敦史（株式会社ファーマフーズ）  
座長：水野雅史（神戸大学）

15:35～16:05 2018年度 日本農芸化学会功績賞  
「タンパク質の新機能性開発に関する多面的基盤研究」  
演者：裏出令子（京都大学）  
座長：水野雅史（神戸大学）

16:05～16:30 休憩

### 東3号館（ノートルダム館）

#### A会場（K101教室）

- 16:30 A41 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子(*APXII*)の選択的スプライシング制御因子の解析  
○大原農亜<sup>1</sup>, 田部記章<sup>2</sup>, 吉村和也<sup>3</sup>, 田茂井政宏<sup>1</sup>, 重岡成<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ, <sup>2</sup>NAIST, <sup>3</sup>中部大・応生・食栄
- 16:45 A42 Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein (PLATZ) 転写因子ファミリーの機能解析  
○瀬古友梨恵<sup>1</sup>, 田部記章<sup>2</sup>, 田茂井政宏<sup>1</sup>, 重岡成<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ, <sup>2</sup>NAIST
- 17:00 A43 シロイヌナズナにおける bHLH11 転写因子を介した鉄取り込み機構の解析  
○野澤昂太郎<sup>1</sup>, 田部記章<sup>2</sup>, 野志昌弘<sup>3</sup>, 田茂井政宏<sup>1</sup>, 重岡成<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ, <sup>2</sup>NAIST, <sup>3</sup>和歌山信愛・生活・食栄

- 17:15 A44 漆における過酸化水素の生成とその影響  
○池永誠<sup>1</sup>, 橘洋一<sup>1</sup>, 北島佐紀人<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>京都市産技研, <sup>2</sup>京工織大・応用生物
- 17:30 A45 イネエチレンレセプターOsERS1の発芽と初期生長における機能解析  
○森田重人<sup>1,2</sup>, 谷柚希<sup>1</sup>, 中村淳一<sup>1</sup>, 増村威宏<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>京府大院・生命環境, <sup>2</sup>京都農技セ生資セ

### B会場 (K201 教室)

- 16:30 B41 ハナショウガ抽出液の暑熱ストレス耐性向上効果  
○小林永和, 上田修司, 加藤良毅, ユンサンスン, 津曲涼介,  
山之上稔, 白井康仁  
神戸大・農
- 16:45 B42 ヒト Bcl-2 ファミリー Bcl-rambo と VDAC はショウジョウバエにおいて遺伝学的相互作用を示し、ヒト培養細胞株において協調的にカスパーゼの活性化を促進する  
○田中嶺士, 松原久典, 立石竜也, 吉田英樹, 山口政光, 片岡孝夫  
京工織大院・応用生物
- 17:00 B43 長期的な運動による老化促進モデルマウス (SAMP8) の筋機能低下の改善効果  
○瀧川花穂, 松田凜太郎, 内富蘭, 大西拓己, 畑澤幸乃, 亀井康富  
京都府立大・生命環境
- 17:15 B44 胎児期の抗アンドロゲン剤暴露による膵臓β細胞の発達と血糖値への影響  
○四元優佑<sup>1</sup>, 甲木孝弘<sup>1</sup>, 與田安紘<sup>1</sup>, 乾博<sup>2</sup>, 原田直樹<sup>1</sup>,  
山地亮一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>大阪府大院・応用生命, <sup>2</sup>大阪府大・栄養
- 17:30 B45 ヒト浮遊培養細胞への遺伝子導入手法の検討  
○木村泰久<sup>1</sup>, 松尾道憲<sup>1</sup>, 木岡紀幸<sup>1</sup>, 植田和光<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農・応用生命, <sup>2</sup>京大・iCeMS

## C会場 (K301 教室)

- 16:30 C41 ピーマン果実の苦味惹起成分  
○森本正則<sup>1</sup>, 段上輝之<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>近畿大・応生化, <sup>2</sup>ナント種苗
- 16:45 C42 (R)-3-キヌクリジノールの高効率生産に関する研究  
○岡田圭以子, 李曉彤, 品田雅, 松原充, 片岡道彦  
阪府大院・生命環境
- 17:00 C43 全アミノ酸スクヤ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<sup>1</sup>, 片野裕太<sup>1</sup>, 兒島憲二<sup>1</sup>, 滝田禎亮<sup>1</sup>, 八波利恵<sup>2</sup>,  
中村聡<sup>2</sup>, 保川清<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>東工大・生命理工
- 17:15 C44 全アミノ酸スクヤニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を  
用いた MMLV 逆転写酵素の耐熱化  
片野裕太<sup>1</sup>, ○李瞳陽<sup>1</sup>, 馬場美聡<sup>1</sup>, 中村実世<sup>1</sup>, 伊東昌章<sup>2</sup>,  
滝田禎亮<sup>1</sup>, 保川清<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>沖縄高専
- 17:30 C45 エカルディーグティエール症候群 (AGS) の患者で同定された変  
異が導入された組換えヒト RNase H2 の性状解析  
○西村拓人, 馬場美聡, 兒島憲二, 滝田禎亮, 保川清  
京大院・農

第2日目 9月15日(土)

東3号館(ノートルダム館)

A会場(K101教室)

- 10:00 A51 ピペリンはTRPV1を介してAMPKを活性化し、グルコース取り込みを促進する  
○前田歩海<sup>1</sup>, 白鞘大志<sup>1</sup>, 吉岡泰淳<sup>2</sup>, 山下陽子<sup>1</sup>, 芦田均<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・農, <sup>2</sup>神戸大院・科技イノベ
- 10:15 A52 生理的濃度域のルテオリンによるNrf2/ARE経路を介した薬物代謝酵素の発現調節機構  
○牧山敦志<sup>1</sup>, 北風智也<sup>2</sup>, 山下陽子<sup>1</sup>, 芦田均<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・農, <sup>2</sup>神戸大院・科技イノベ
- 10:30 A53 黒大豆ポリフェノールの吸収、代謝、分布と排泄および血管機能に及ぼす影響に関する研究  
○王柳青<sup>1</sup>, 山下陽子<sup>1</sup>, 仲村明日賀<sup>1</sup>, 中川純一<sup>2</sup>, 難波文男<sup>3</sup>, 齋藤静<sup>3</sup>, 戸田登志也<sup>3</sup>, 芦田均<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>神戸大院・農・生命機能科学, <sup>2</sup>三圭会・中川医院, <sup>3</sup>フジッコ(株)
- 10:45 A54 Proteins accumulated in *Ficus carica* latexes play defensive role against pests.  
○Eric Hymmeva Savadogo<sup>1</sup>, Wataru Aoki<sup>2</sup>, Kazufumi Yazaki<sup>2</sup>, Ryosuke Munakata<sup>3</sup>, Toki Taira<sup>4</sup>, Shunsuke Aburaya<sup>2</sup>, Susumu Hibino<sup>1</sup>, Haruna Yano<sup>1</sup>, Masamitsu Yamaguchi<sup>1</sup>, Hideki Yoshida<sup>1</sup>, Takanari Umegawachi<sup>1</sup>, Ryo Tanaka<sup>1</sup>, Dan Ngoc Anh Suong<sup>1</sup>, Sakihito Kitajima<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Kyoto Institute of Technology, <sup>2</sup>Kyoto University, <sup>3</sup>Universite de Lorraine, <sup>4</sup>University of the Ryukyus
- 11:00 A55 ジャバラ果皮由来ポリメトキシフラボノイドの抗肥満活性  
○奥野祥治<sup>1</sup>, 大田時帆<sup>1</sup>, 宇都宮洋才<sup>2</sup>, 河野良平<sup>2</sup>, 野村幸子<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>和高専・生化, <sup>2</sup>和歌山医大

- 11:15 A56 大豆・ヒヨコ豆イソフラボンによる THP-1 細胞からのインターロイキン-12 産生誘導  
○高橋佑治<sup>1</sup>, 中谷優太<sup>1</sup>, 西野勝俊<sup>1</sup>, Riadh Ksouri<sup>2</sup>, 増田誠司<sup>1</sup>, 神戸大朋<sup>1</sup>, 磯田博子<sup>3</sup>, 永尾雅哉<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院・生命, <sup>2</sup>CBBC・Tunisia, <sup>3</sup>筑波大院・生命環境・地中海・北アフリカ研究センター
- 11:30 A57 白ナタマメより粗抽出したゲル化物質の物理化学的特性  
○西澤果穂, 高橋美咲, 西浦彩夏, 田添英里, 松浦志帆, 有井康博  
武庫川女子大
- 11:45 A58 京野菜のポリアミン  
○藤原有希, 鈴木秀之  
京工繊大・応用生物

#### B 会場 (K201 教室)

- 10:00 B51 トビイロシワアリの道しるベフェロモン：6-メチルサリチル酸メチルの同定  
○中村哲朗, 原田恭子, 秋野順治  
京工繊大・応用生物
- 10:15 B52 シルクで体臭を抑えられるか？  
○一田（高濱）昌利, 谷口慧, 宮地遥, 秋野順治  
京工繊大・応用生物
- 10:30 B53 カイコガ精子成熟誘発因子であるセリンプロテアーゼの基質精液タンパク質探索  
○長岡純治, 忞田紗希, 高村智子, 土居梓  
京工繊大・応用生物

- 10:45 B54 Kujigamberol およびその類縁体は炎症性サイトカイン誘導性の細胞接着因子の発現と糖鎖修飾に作用する  
○谷垣里穂<sup>1</sup>, 福原早友里<sup>1</sup>, 木村賢一<sup>2</sup>, 片岡孝夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京工繊大院・応用生物, <sup>2</sup>岩手大・農
- 11:00 B55 NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路とその標的遺伝子 ICAM-1 の発現に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序の解析  
○馬場康輔<sup>1</sup>, 平松令子<sup>1</sup>, Benjamart Suradej<sup>1</sup>, 谷垣里穂<sup>1</sup>, 小枝清花<sup>2</sup>, 和久友則<sup>2</sup>, 片岡孝夫<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京工繊大院・応用生物, <sup>2</sup>京工繊大院・分子化学
- 11:15 B56 リンゴ果実における傷害応答性トリテルペン類の生理活性  
○大畑勇統<sup>1</sup>, 森田沙代<sup>1</sup>, 吉永直子<sup>1</sup>, 石栗陽一<sup>2</sup>, 森直樹<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大農, <sup>2</sup>青森産技セ りんご研
- 11:30 B57 糖類による青枯病菌二次代謝の活性化  
○村井勇太<sup>1</sup>, 石川陽子<sup>1</sup>, 坂田恵<sup>1</sup>, 曳地康史<sup>2</sup>, 甲斐建次<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>阪府大院・生命環境, <sup>2</sup>高知大・農
- 11:45 B58 植物の光形態形成反応の制御を目的としたアゾ-ヒドラゾン系ホウ素錯体の合成  
○塩見飛翔, 種将太郎, 園田素啓, 谷森紳治  
阪府大院・生命環境
- 12:00 B59 水中の重金属イオンの固定化が可能なジチオカルボン酸誘導体の合成と除去能評価  
○山口浩明, 尾崎紀哉, 野元昭宏, 小川昭弥  
阪府大院・工
- 12:15 B60 最少培地における枯草菌による $\gamma$ PGA 生産  
Chumsakul Onuma<sup>1</sup>, 増田健太<sup>2</sup>, 森本拓也<sup>2</sup>, 影山泰<sup>2</sup>, 尾崎克也<sup>2</sup>, 萩原浩<sup>2</sup>, 吉田健一<sup>3</sup>, ○石川周<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>奈良先端大, <sup>2</sup>花王, <sup>3</sup>神戸大学・イノベーション

## C会場 (K301 教室)

- 10:00 C51 焼酎粕は大腸菌の良好な培地である  
○西田和生<sup>1</sup>, 玉置尚徳<sup>2</sup>, 鈴木秀之<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京工繊大院・応生, <sup>2</sup>鹿大・農
- 10:15 C52 デンプンを炭素源として利用できる大腸菌の育種  
○西村真波, 鈴木秀之  
京工繊大・応用生物
- 10:30 C53 窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* による「廃グリセロール」からの有用ポリマー生産  
○吉田暢広<sup>1</sup>, 菅原良実<sup>2</sup>, 南部優子<sup>1</sup>, 村田幸作<sup>3</sup>, 橋本渉<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京都市・環境政策局, <sup>3</sup>摂南大・理工
- 10:45 C54 ヒト細胞外マトリックス由来断片化ヒアルロン酸を取り込む連鎖球菌ホスホトランスフェラーゼ系  
○老木紗予子<sup>1</sup>, 村田幸作<sup>2</sup>, 橋本渉<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>摂南大・理工
- 11:00 C55 クロレラ転写因子過剰発現による脂質合成能向上  
○徳永早紀<sup>1</sup>, 三田将平<sup>1</sup>, 浦口裕介<sup>1</sup>, 久保裕生<sup>2</sup>, 城井真衣<sup>2</sup>, 中川聡<sup>1,2</sup>, 澤山茂樹<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大・農
- 11:15 C56 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のリンゴ酸酵素遺伝子過剰発現による脂質合成能向上  
○三田将平<sup>1</sup>, 浦口裕介<sup>1</sup>, 徳永早紀<sup>1</sup>, 久保裕生<sup>2</sup>, 城井真衣<sup>2</sup>, 中川聡<sup>1,2</sup>, 澤山茂樹<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大・農
- 11:30 C57 Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発  
○佐野芽生<sup>1</sup>, 黒田ひかり<sup>1</sup>, 小原仁実<sup>1</sup>, 安藤寛<sup>2</sup>, 松本圭司<sup>2</sup>, 麻生祐司<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京工繊大・バイオベース, <sup>2</sup>(株)カネカ・R&D 企画部

- 11:45 C58 Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発  
○矢田棕己<sup>1</sup>, 佐野芽生<sup>1</sup>, 小原仁実<sup>1</sup>, 安藤寛<sup>2</sup>, 松本圭司<sup>2</sup>,  
麻生祐司<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>京工織大・バイオベース, <sup>2</sup>(株)カネカ・R&D 企画部
- 12:00 C59 酵母プリオン様因子[*GAR*<sup>+</sup>]を介した清酒酵母-生醗乳酸菌間の相  
互作用  
○熊野舞香<sup>1</sup>, 渡辺大輔<sup>1</sup>, 杉本幸子<sup>1</sup>, 砂田啓輔<sup>2</sup>, 高橋俊成<sup>2</sup>,  
山田翼<sup>2</sup>, 高木博史<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ, <sup>2</sup>菊正宗酒造株式会社
- 12:15 C60 酵母非遺伝的因子[*GAR*<sup>+</sup>]がアルコール発酵と遺伝子発現に及ぼ  
す効果  
○渡辺大輔, 熊野舞香, 杉本幸子, 高木博史  
奈良先端大・バイオ



# 講演会要旨



## おいしさの構造

伏木 亨

龍谷大学農学部食品栄養学科  
龍谷大学食の嗜好研究センター

おいしさは卑近でありながら最も曖昧な感覚であると言える。しかしながら、このような多様で曖昧に見える「おいしさ」が、すべての料理や食の開発の根底に横たわっており、食に関わる現場の困惑をもたらしてきた。今でも、「その道のプロの舌」に依存するしかない。いわゆるビッグデータ解析の発達で、設定された条件に対して最適解を割り出せる可能性が見えてきたものの、おいしさの何をゴールとすべきかは明らかではない。また、応用につながる原理を明らかにするには至っていない。

本発表では、食のおいしさが食品の分析だけでは理解できないこと、おいしさには必ずどこかに人間の判断が必要なことを述べ、おいしさに対して人間が判断を下すための基本的な要素を探る重要性を解説する。

食嗜好の構造を明らかにすることによって、科学になじまないとわれてきたおいしさをいくつかの要素に分解することで定量的なアプローチを可能にする。さらに、その解析方法の研究の現状に関して、チーズや日常的な食品などへのおいしさ評価の実施例を紹介するとともに、日本酒と料理の相性といった物質的な実態が希薄な感覚への応用例を紹介する。また、おいしさの評価が将来的にどのような形で達成されるかの展望についても触れたい。

現状では、当該の食品のおいしさを主観的に評価するとともに、評価に影響している主要因が、報酬、文化、情報、生理のいずれに基づいているのかを明らかにすることが可能になっている。

おいしさの評価を進めることが、人間の生活の質を高め、幸福に寄与できる食の展開が容易になると期待している。さらに主観的なおいしさの判断の内容を客観的に把握できる可能性が高まり、おいしさの評価に新たな情報が加わることで期待できると思われる。

## モンシロチョウ由来サイトトキシンによる生体組織の 機能不全化とその応用

小谷 英治

京都工芸繊維大学応用生物学系

近年、RNA 干渉やゲノム編集技術により、特定遺伝子をノックダウンあるいはノックアウトすることが可能となり、特定の機能を失ったモデル生物が作り出されている。しかし、これらの技術はすべての生物で一律の効果を発揮するものではなく、また、一度の実験では特定の一つの遺伝子についてしか操作できない。多様な技術を取り入れ、より簡便に特定組織の機能不全化を実現させることができれば、モデル生物の作出は迅速化すると考えられる。そこで演者らは、細胞障害性タンパク質の人為的発現を利用し、カイコの特定組織の機能不全化について調べてきた。

モンシロチョウ血液由来のサイトトキシンであるピエリシン-1 は、NAD を基質として DNA を ADP-リボシル化する酵素であり、多くのほ乳類細胞にアポトーシスを誘導することが知られる。細胞内の DNA 損傷修復のためには、DNA ADP-リボシル化酵素の機能制御が必要であるが、ピエリシンファミリーはこの過程を攪乱する働きのあることが予想される。これまでに、その強い細胞障害性のために、ピエリシン-1 の遺伝子発現を利用した機能不全化組織を持つモデル動物の作出は行われてこなかった。本研究では、ピエリシン-1 と相同性を持ち、弱い DNA ADP-リボシル化活性を持つモンシロチョウのピエリシン-1A (P1A) を後部絹糸腺で発現する遺伝子組換えカイコを作出し、その特性について検討した。

培養細胞を用いた一過性発現実験から、P1A の N 末端領域は、ヨトウガ由来 Sf21 細胞でアポトーシスを誘導するものの、カイコ由来 BM-N 細胞ではアポトーシスの誘導が見られず、特定のタンパク質発現を抑制する働きを持つことがわかった。この P1A 活性部位を FibH プロモーターにより発現する遺伝子組換えカイコを作出したところ、このカイコの後部絹糸腺ではアポトーシスによる消失は起らず、形態の異常が示された。また、このカイコの後部絹糸腺において、野生型に比べ、吐糸期の FibH および FibL の mRNA 量が著しく減少した。このカイコはフィブロインをほとんど含まないセリシン繭を作ることとも判明した。セリシン繭から未変性のセリシンを含む水溶液を調製することができ、セリシン水溶液をもとにして水溶性ゲルを作ることができた。さらに、培養実験において、LIF 存在下にマウス ES 細胞が本ゲル上で増殖することもわかった。

こうした結果は、LIF がセリシゲル内で安定に保たれ、ゲルから放出されてゲル上の細胞の増殖を促進したことを示している。したがって、P1A はタンパク質発現能が不全化した組織を持つモデル動物の作出に利用可能であること、また、作られるセリシゲルは生体内外での細胞増殖制御に有効であることが示唆される。

P1A 発現の人為的な導入と制御により、様々な有益な性質のあるモデル生物を作り出すことも可能である。本講演では、生物体内での P1A 利用の可能性についても言及する。



## 微生物遺伝資源を利用するキラル化合物合成法の開発

八十原 良彦

株式会社カネカ バイオテクノロジー研究所

分子内に不斉炭素を有し互いに鏡像関係にある一対の立体の化合物は光学活性体と呼ばれる。生物を構成する化合物の多くは光学活性体であり、対掌体間で生物活性に差がある場合が多い。過去には合成医薬品のほとんどが光学活性体の等量混合物であるラセミ体であったが、対掌体による副作用など光学活性への理解が進み、合成医薬品の多くは光学活性体になった。光学活性化合物の経済的な合成法や HPLC による光学純度分析技術など合成化学の一連の業際領域は、20 世紀末にはキラルテクノロジーと呼ばれ、日本はそのリーダー的存在となった。

酵素や微生物は立体識別能が高いため、精密有機合成における不斉点導入に有用な触媒となり得る。さらに位置選択性も高く、高収率での化学変換が可能である。また、水を溶媒とし、常温、常圧で作用する。こうしたバイオプロセスは、キラル合成のような価値付与目的のみならず、欧米や中国においては持続可能社会をめざすバイオエコノミー戦略下での貢献がのぞまれている。

触媒となる微生物や酵素は、その多様性に期待するスクリーニング実験によってさまざまなユニークな機能をもつものが発見され、数多くのイノベーションを引き起こしてきた。さらに遺伝子組換え技術の普及によって微量の酵素活性が増幅可能になり、蛋白質工学による優秀な触媒の創製も容易となった。経済性に劣り結果が読み切れないと言われてきたバイオプロセスが、確度高く実用化を見通せるテクノロジーに至ったと言えるだろう。さらに次世代シーケンサーの登場で遺伝子解析能力は指数関数的に向上し、遺伝資源イコール情報という新たなステージへの進階は周知のところである。

さて、立体選択的な還元反応は、プロキラルな基質であるケトンを経過してキラルなアルコールに変換できる有用かつ歴史の長い化学反応である。高温高圧下で行なう不斉金属触媒による水素添加反応と比して、酵素還元反応はマイルドな環境で実施可能である。しかし、反応に必要な還元型の補酵素の効率的な再生が必須となる。本講演では、補酵素再生と触媒力不足を同時に克服した遺伝子組換え微生物プロセスによる種々のキラル化合物の合成法を題材に、上述した技術の変遷を辿りつつ、課題や将来像について議論したい。



# 受賞講演要旨



## GABA の生産技術の確立と高機能食品の市場開発

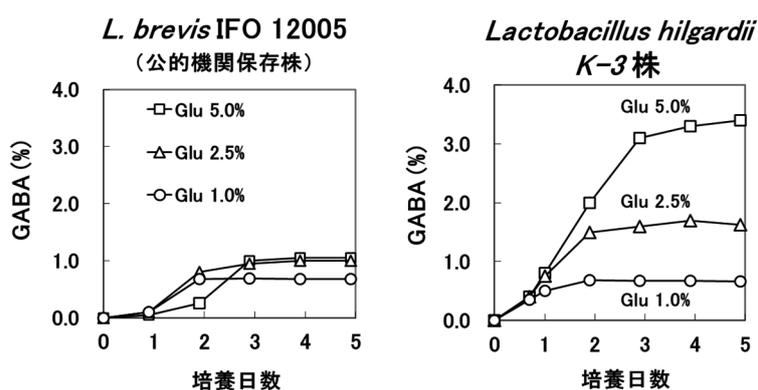
山津 敦史, 堀江 健二, 渡部 和哉, 坂下 真耶  
株式会社ファーマフーズ

### はじめに

GABA (gamma-aminobutyric acid) は、抑制系の神経伝達物質としてヒト体内において極めて重要な役割を果たしている生体内アミノ酸の一つである。日本において GABA は近年まで頭部外傷後遺症に対する脳代謝促進用の医薬品として使用されており、化学合成法で作られていた。2001 年に厚生労働省による食薬区分の変更がなされ、GABA が一般食品として使用できるようになってからは、GABA 高含有の発芽玄米やお茶などの食品が注目されるようになった。しかし、一般的に食品で摂取できる GABA は 1 食あたり数 mg 程度と少なく、機能性食品として普及するには、合成ではなく天然由来の安全かつ高純度な GABA の開発が望まれていた。本講演では、我々が取り組んだ 3 つの実用化研究 (技術開発) について、その概要を紹介させていただきたい。

### 1. 食品としての高濃度 GABA の大量生産技術の研究

我々は様々な食品を調べる中で、伝統的な発酵漬物であるキムチに GABA が極めて多く含まれる事を見出した。キムチは乳酸菌発酵により作られる食品であるが、キムチ中の乳酸菌のスクリーニングを進める中で、低 pH 環境下で非常に高い GAD (glutamate decarboxylase) 活性を示し、また高濃度のグルタミン酸塩存在下でも増殖する極めて特殊な乳酸菌を見出した (図 1) 16S rRNA 系統解析による同定の結果、本菌は *Lactobacillus hilgardii* K-3 株と命名された (京都府中小企業技術センター共同研究)。



(図 1) *Lactobacillus hilgardii* K-3 株の GABA 変換効率

一方、大量生産の発酵過程では pH が急激に上昇し菌の生育を阻害するなど、多くの解決すべき問題が発生した。これらの問題点を解決するべく pH の連続的コントロー

ルや発泡の抑制に関する技術を確立し、高濃度の GABA を含有する粉末状食品素材「ファーマギャバ (PharmaGABA®)」を作り出す事に成功した。なお製造に用いた乳酸菌 K-3 株は食経験豊富な漬物から発見されたこと、また、「ファーマギャバ (PharmaGABA®)」に関して各種安全性試験を行い安全性に全く問題のなかったことから、本製品の食品としての安全性を担保している。現在では、過飽和結晶法を用いた精製工程を設けることにより、純度約 99% の GABA 粉末の大量生産方法も確立している。

## 2. 高濃度 GABA 摂取による新規生理機能の研究

GABA の機能としては、経口摂取による血圧抑制効果が以前から知られていたが、その他の機能に関してはほとんど注目されていなかった。我々は GABA が抑制系の神経伝達物質であることに着目し、GABA の経口摂取による抗ストレス効果を初めて見出した。抗ストレス効果の検証試験の一つとして、日本一怖い吊り橋と言われる谷瀬の吊り橋（奈良県、全長 300 m、高さ 54 m）を高所が苦手な被験者が渡り、被験者にかかるストレスを計測するという斬新な試験を静岡県立大学、京都女子大学と共同で実施した（図 2）。ストレスマーカーとしては唾液中のコルチゾール、IgA などに加え、唾液中クロモグラニン A (CgA) に着目し、その有用性を見出した。本手法を取り入れる事により、GABA を配合した食品のヒトでの効果を客観的に、かつ身近な方法で検証出来るようになり、GABA の抗ストレス効果は幅広く認知されるようになった。また、更なる GABA の機能として睡眠改善効果も見出した。小型脳波計を用いて GABA の摂取が入眠潜時やノンレム睡眠に与える影響を検証し、睡眠の質の改善に寄与することを示した。近年ではホエイプロテインと同時摂取した際の筋肉肥大効果について米国で発表を行うなど、常に新しい機能性を探索している。



(図 2) 吊り橋によるストレス負荷試験

## 3. アプリケーション技術研究と市場の拡大

2006 年の GABA 配合チョコレートの上市を契機に、GABA 配合商品が数多く販売されるようになった。配合商品形態による効果の検証を多数実施し、最終製品への応用

技術を確立した。2015 年 4 月からスタートした機能性表示食品制度においては、GABA を配合し、精神的ストレスの緩和効果を表示した食品が日本で初めて届出された。本件をきっかけに GABA を配合した機能性表示食品の届出件数が急速に増え、現在では機能性表示食品全体の 1 割以上にあたる 160 件(2018 年 7 月 9 日現在)となっている。届出されているヘルスクレームは、大別して 4 種類あり(ストレス緩和、疲労感の緩和、睡眠の質の改善、高めの血圧を下げる)、それぞれの機能を表示した機能性表示食品が多数届出されている。我々の生理機能研究ならびにアプリケーション技術研究により、GABA はサプリメントから菓子、飲料、そして米、麺、ハム等広く一般食品へ拡がり、日本において大きな機能性食品市場を形成することとなった。また、GABA は日本国内だけでなく海外においても拡がっている。米国、台湾、中国、タイなどにおいて当局の許認可を受け、GABA を配合した飲料、サプリメント、一般食品等が数多く販売されている。

**謝 辞** 本賞に支部推薦頂きました日本農芸化学会関西支部・支部役員の先生方に深く感謝致します。また、GABA の機能性研究の推進にあたり、ご助言、ご指導を賜りました元静岡県立大学・横越英彦教授、近畿大学・米谷俊教授、松下記念病院・山根哲郎病院長ならびに乳酸菌の分離・実用化に関しご協力賜りました元京都府中小企業技術センター・早川潔研究開発課長、京都府中小企業技術センター・上野義栄主任研究員に深く感謝申し上げます。また本技術の基礎、応用研究ならびに国内外の市場開拓にご尽力頂きました関係者の皆様に深く感謝申し上げます。



## タンパク質の新機能性開発に関する多面的基盤研究

裏出 令子

京都大学 複合原子力科学研究所

### はじめに

真核細胞で合成される膜タンパク質や分泌タンパク質は、小胞体で合成される。また、人類の食料タンパク質源として最も重要な主要穀類の種子貯蔵タンパク質も小胞体で合成され蓄積される。これらのタンパク質がその生理的役割を果たすためには小胞体での立体構造形成（フォールディング）が必須である。私は、植物及び動物の小胞体でのフォールディング機構のさらなる理解とそれに基づいたタンパク質の高度利用を目標に基盤的研究を行うとともに、食品タンパク質の凝集体構造と機能との関係を追求してきた。本講演では、それらの概略を紹介させていただく。

### 1. 動物細胞小胞体の酸化的フォールディング酵素 ER-60 の多面的機能

小胞体で合成される新生タンパク質の 90%以上が分子内ジスルフィド結合の形成を伴ってフォールディング（酸化的フォールディング）する。そのため、小胞体には高度に発達した酸化的フォールディングシステムが備わっている。小胞体における酸化的フォールディングを担う酵素としては protein disulfide isomerase (PDI) が 1970 年代から知られていたが、その反応機構や他のタンパク質との機能的な相互作用などは不明であった。1992 年に私は PDI に次ぐ量で存在する PDI ファミリー ER-60/ERp57 (以下 ER-60) を見だし、ER-60 が小胞体で複数の分子シャペロン (BiP, calnexin, calreticulin, RAP) 及び PDI と複合体を形成し、糖タンパク質の酸化的フォールディングに重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに、血清中性脂肪値の決定因子である VLDL 構成タンパク質 apolipoprotein B100 の肝細胞内での調節的分解に ER-60 が作用していることを明らかにした。現在、ER-60 は哺乳動物細胞にとって重要且つ普遍的な PDI ファミリーと認知され、酸化的フォールディングのみならず抗原提示やアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症・進展にも関わる多機能性タンパク質として注目されている。

### 2. 植物小胞体における酸化的フォールディングの分子機構

穀類の種子は、発芽の際に必要なエネルギーとアミノ酸を賄うために種子貯蔵タンパク質を蓄積する。とくにダイズ種子は際だって高いタンパク質蓄積能を有するため、医薬用などの有用タンパク質の生産への利用が期待されているが、それを実現するためには小胞体における酸化的フォールディングの分子機構の解明が重要となる。そこで、ダイズを研究対象として植物小胞体の酸化的フォールディング機構の解明を目指した。まず、チオレドキシニンモチーフを有する 7 種類のダイズ PDI ファミリーを同定し、酸化的フォールディング活性を有する 5 種類の PDI ファミリーが主要なダイズ種子貯蔵タンパク質（グリシニン及びβ-コングリシニン）の構造形成に関わっていることを明らか

にした。これらの PDI ファミリーにはジスルフィド結合の導入（酸化）が得意なものと組み替え（異性化）が得意なものがあり、小胞体内で複数の組み合わせで会合した PDI ファミリー分子の活性中心間及び同一分子内の活性中心間で電子リレーを行うことで協同的かつ効率的に酸化的フォールディングを成し遂げていることを明らかにした。これにより、小胞体に複数種類の PDI ファミリーが存在する意義は多様な基質への対応に加えて酸化的フォールディング速度を速めることにあるというモデルを提示した。さらに、PDI ファミリーに酸化力を提供する小胞体膜酵素 ER oxidoreductin 1 (ERO1) を同定し、ERO1 により 4 種類の PDI ファミリーの活性中心が酸化され新生タンパク質にジスルフィド結合が導入されるシステムの存在を証明するとともに、ERO1 の活性が還元型 PDI ファミリーによって必要に応じて活性化される分子機構を明らかにした。また、小胞体内にアンフォールドしたタンパク質が蓄積する小胞体ストレス下で惹起される unfolded protein response (UPR) により制御されるシロイヌナズナ及びダイズの UPR 遺伝子のリストを完成させ、酸化的フォールディングの中心メンバーである 5 種類の PDI ファミリー、ERO1 及び QSOX の発現も UPR により制御されていることを明らかにした。

以上のように、植物小胞体における酸化的フォールディング反応の全容を明らかにするとともに、真核細胞において小胞体に複数の PDI ファミリーが存在する生理的意義について新しい概念を提唱した。

### 3. 種子貯蔵タンパク質の構造と食品機能特性

食品タンパク質は食品加工のほとんどの場面で、分子間相互作用のもとで形成された凝集体として食品機能特性を発揮する。たとえば、さまざまな食品に加工され消費されている小麦粉生地の優れた物性に主に寄与しているのはタンパク質凝集体グルテンである。グルテンは 270 年前に最初に発見されたタンパク質で、グルテンの主要成分の 1 つであるグリアジンはアルコール水に溶解するが水には溶解しないと考えられてきた。私は、小麦粉生地から天然構造を維持したまま純水で抽出する方法を開発し、グリアジンが純水に高濃度で溶解するタンパク質であることを見いだした。そして、X 線や中性子を用いた粒子ビーム小角散乱解析を食品タンパク質凝集体の実験手法として取り入れ、グリアジンが桿状の比較的大きく広がった分子であり、濃度に依存して分子集合することを明らかにした。また、グルテンのような濃厚な状態では十数ナノメートルの基本凝集体を形成し、これらが集合してメゾスケールの二次凝集体を形成すること、凝集体間の距離は塩などによって大きく変化し、この距離と物性との間に相関関係があることを明らかにした。その他、小麦粉生地作製時のグルテニンの脱重合化反応にたいする内在性コムギ PDI ファミリーの役割や、ダイズ子葉細胞内での  $\beta$ -コングリシニンとグリシニンのジスルフィド結合依存性の新奇な分子会合の存在とタンパク質貯蔵液胞への効率的な輸送及び工業的なダイズタンパク質の良好な分離に還元剤の添加が必要とされる理由との関係を明らかにするなどの研究を行った。

謝 辞 京都大学食糧科学研究所にて研究者へと教え導いていただいた京都大学名誉

## 2018 年度日本農芸化学会功績賞

教授 鬼頭誠先生に深く感謝申し上げます。また、恩師である大阪府立大学名誉教授故北岡正三郎先生に感謝申し上げます。本研究は、共同研究者である多数の国内外の先生方、大学院生、企業研究者のご助力のもとで続けることができました。これらの方々に心より感謝申し上げます。



# 一般講演要旨



## A41 アスコルビン酸ペルオキシダーゼ遺伝子(APXII)の選択的スプライシング制御因子の解析

○大原 農<sup>1</sup>、田部 記章<sup>2</sup>、吉村 和也<sup>3</sup>、田茂井 政宏<sup>1</sup>、重岡 成<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ、<sup>2</sup>NAIST、<sup>3</sup>中部大・応生・食栄)

### 【目的】

アスコルビン酸ペルオキシダーゼ(APX)は、アスコルビン酸を電子供与体として過酸化水素を消去する酵素である。APXII遺伝子からは選択的スプライシング(AS)により2種類のAPXアイソザイムが生成される。このAS機構はAPXII遺伝子のイントロン12に存在するスプライシング制御配列(SRE)によって制御され、SREに結合する核タンパク質の存在が示唆されたが、未だ同定には至っていない。また、2種類のAPXをASにより生成しない生物種にAPXII遺伝子を導入した場合でも正確にASされたことから、このSREを介したAS制御機構は植物間で広く保存されていることが示唆された。本研究では、シロイヌナズナを用いてAPXII遺伝子のASを制御するトランス因子の同定を試みた。

### 【方法・結果】

APXII遺伝子のASに必須な領域を、分断させたルシフェラーゼ(Fluc)遺伝子の間に挿入したキメラ遺伝子をシロイヌナズナに導入し、APXII遺伝子が正確にASされた場合のみFluc発光がみられる形質転換体を作成した。この形質転換体の種子にEMSを用いて変異導入し、発光が変化する変異株のスクリーニングを行ったところ、1株のFluc発光消失株を単離した。この変異株におけるAPXII遺伝子のAS効率をRT-PCRにより確認したところ、ASが抑制されていた。そこで、この変異株を *APXII alternative splicing inhibition 1 (asi1)* とした。次に、*asi1* とコントロール株を交配し、F2世代のFluc発光消失株からゲノムDNAを抽出して次世代シーケンス解析により変異箇所の同定を行った。その結果、RNA結合タンパク質(RBP)をコードしている遺伝子に1塩基の変異を検出した。この変異は、RBPのエキソン1の3'側の CAG (Glu) が TAG(終止コード)へと変異したナンセンス変異であった。次に、このRBPの変異が *asi1* のAS抑制に関与していることを確認するために、変異型および野生型のRBP遺伝子をそれぞれ *asi1* 株へ導入した。その結果、変異型遺伝子導入株ではFluc発光は消失したままであるのに対し、野生型遺伝子導入株ではFluc発光が回復した。さらに、それぞれの形質転換株のAS効率をRT-PCRを用いて確認したところ、変異型遺伝子導入株ではAPXII遺伝子のASは抑制されたままであるのに対して、野生型遺伝子導入株ではASは回復していた。現在、RBPがSREを特異的に認識することをゲルシフトアッセイにより解析している。

## A42 Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein (PLATZ) 転写因子ファミリーの機能解析

○瀬古友梨恵<sup>1</sup>、田部記章<sup>2</sup>、田茂井政宏<sup>1</sup>、重岡成<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ、<sup>2</sup>NAIST)

### 【目的】

サツマイモの塊根形成機構を明らかにする過程で、不定根原基で特異的に発現する遺伝子として *Plant AT-rich sequence and zinc-binding protein (IbPLATZ)* を同定した (Tanabe et al., *Plant Root* 2018)。*PLATZ* 遺伝子はエンドウマメで初めて単離され、転写因子であることが予想されたが、生理機能についてはほとんど明らかにされていない。そこで、*IbPLATZ* の機能を解析するためにシロイヌナズナ野生株に恒常的に発現させたところ、*IbPLATZ* 恒常発現株は正常な形態形成が阻害された。また、*IbPLATZ* のC末端側に転写抑制ドメインであるSRDXを融合させたタンパク質を恒常的に発現させたシロイヌナズナは、*IbPLATZ* 恒常発現株と同様に正常な生育が阻害された。このことは、*IbPLATZ* が植物の形態形成に関わる転写抑制因子であることを支持した。一方、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノムにも12種類の *PLATZ* 遺伝子 (*AtPLATZ1~12*) がコードされているが、生理機能についての報告はほとんどない。そこで、*AtPLATZ* 転写因子ファミリーの機能解析を試みた。

### 【方法・結果】

シロイヌナズナの葉および根における *AtPLATZ1~12* の発現を半定量的RT-PCRにより解析した。その結果、*AtPLATZ7* の発現は根特異的であり、*AtPLATZ8* の発現も葉と比較して根で強かった。一方、*AtPLATZ1, 2, 3, 11*、および *12* の発現は葉と根において恒常的であった。また、*AtPLATZ4, 5, 6, 9*、および *10* の発現は、いずれの組織においても低かった。次に、*AtPLATZ1~12* をそれぞれ恒常的に発現させた形質転換シロイヌナズナ ( $T_3$ ) を作出した。*AtPLATZ7* および *8* の恒常発現株は *IbPLATZ* 恒常発現株と同様に正常な生育が阻害されたことから、これらは植物の形態形成に関わることを示唆された。そこで、T-DNA挿入およびCRISPR/CAS9システムを用いて *AtPLATZ7* 破壊株および *AtPLATZ8* 破壊株を作出したが、それぞれの単独遺伝子破壊株は野生株との間に表現型の差は認められなかった。これらの結果より、*AtPLATZ7* および *8* は機能相補していると考えられることから、現在 *AtPLATZ7* および *AtPLATZ8* の二重破壊株を作出している。さらに、*AtPLATZ1~12* の転写因子としての機能を解析するために、各遺伝子のC末端側にSRDXを融合させたタンパク質を恒常的に発現させたシロイヌナズナの作出および解析を試みている。

## A43

### シロイヌナズナにおける bHLH11 転写因子を介した鉄取り込み機構の解析

○野澤昂太郎<sup>1</sup>、田部記章<sup>2</sup>、野志昌弘<sup>3</sup>、田茂井政宏<sup>1</sup>、重岡成<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>近畿大院・農・バイオ、<sup>2</sup>NAIST、<sup>3</sup>和歌山信愛・生活・食栄)

#### 【目的】

鉄は植物の生育に必須な必須微量元素であるが、土壤中に存在する鉄の多くは難溶解性を示し、植物は直接細胞内に取り込むことができない。そのため、シロイヌナズナなどの双子葉植物は、鉄還元酵素およびトランスポーターを介した鉄取り込み機構を発達させてきた。鉄欠乏時には、FITと呼ばれる転写因子を中心とした多数のbasic helix-loop helix (bHLH) 型転写因子により、鉄還元酵素およびトランスポーター遺伝子の発現が正に制御することが報告されている。一方で、細胞内への過剰な鉄の取り込みは活性酸素種を生じさせるなど植物に負の影響を与えることから、植物の鉄取り込みは厳密に制御される必要がある。しかしながら、これまでにFIT依存的な鉄取り込み機構を負に制御する転写因子についてはほとんど明らかにされていない。我々は、clade IVbに属するbHLH11の発現が鉄十分条件で増加すること、bHLH11の恒常的発現株 (*35S-bHLH11*) および優性抑制発現株 (*DN-bHLH11*) は低鉄濃度条件において矮性/子葉黄化を示すことを見いだした。そこで本研究では、これらの株における鉄取り込み能力を解析し、鉄恒常性の維持におけるbHLH11の機能について考察した。

#### 【方法・結果】

低鉄濃度条件における*35S-bHLH11*および*DN-bHLH11*では、*FIT*の発現および鉄取り込み活性も、野生株と比較して抑制されていた。一方、bHLH11のC末端に転写活性化ドメインVP16を融合して恒常的に発現させたシロイヌナズナ(*bHLH11-VP16*)では、低鉄濃度条件の*35S-bHLH11*および*DN-bHLH11*で見られた矮性/子葉黄化や*FIT*の発現抑制および鉄取り込み活性の低下は見られず、野生株と同程度であった。これらの結果から、bHLH11はFIT依存的な鉄取り込み機構を抑制する転写因子であることが示された。通常、bHLHタンパク質は複合体を形成して目的遺伝子配列に結合することが知られている。そこで、bHLH11の相互作用因子を酵母two-hybrid法により探索した。その結果、bHLH11は鉄取り込み制御に関与するclade IVc bHLH転写因子と相互作用していることが示唆された。現在、*FIT*の転写制御に及ぼすclade IVc bHLHsとbHLH11間の相互作用の影響を、シロイヌナズナプロトプラストへの一過性発現系により解析している。

## A44 漆における過酸化水素の生成とその影響

○池永誠<sup>1</sup>、橘洋一<sup>1</sup>、北島佐紀人<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>京都市産技研、<sup>2</sup>京工織大・応用生物)

### 【目的】

漆は、ウルシノキより採取され、日本で伝統的に用いられてきた天然塗料である。漆の反応は、主成分であるフェノール類のウルシオールが、微量に含まれるラッカーゼによって酸化されることで重合が進行し、最終的に強固な漆塗膜を得る。植物より採取され、酵素により硬化する漆は、持続可能なグリーン材料といえる。そのため、漆についての理解を深めることは、漆の改良、および漆を模した塗料の開発につながり、地球環境への負荷の低減が期待される。

これまでにフェノール類を加えた水溶液から、過酸化水素が生成することが報告されてきた[1]。そこで、本研究では、ウルシオールを用いて過酸化水素の生成について検討を行った。また、生成した過酸化水素が漆に与える影響について調査を行った。

### 【方法・結果】

初めに、ウルシオールから生成する過酸化水素について検討を行った。種々条件のウルシオール水溶液にカタラーゼを加え、生成した過酸化水素を酸素と水に分解した。発生した酸素を酸素電極によって測定することで過酸化水素の定量を行った。時間、濃度およびpHを変化させて測定を行ったところ、過酸化水素の生成量は、時間と濃度に依存しており、pHが酸性から塩基性になるにしたがって、増大するという結果が得られた。

次に、漆における過酸化水素の影響について調査した。漆または漆から抽出したラッカーゼに過酸化水素を添加し、漆の硬化時間とラッカーゼの酸化活性について調べた。漆の硬化時間は、温度 20 °C、相対湿度 80%の恒温恒湿槽にて、塗料乾燥時間測定器を用いて測定した。また、ラッカーゼの酸化活性は、グアヤコールおよびカタコールを基質として、酸素電極による酸素の減少速度の測定から算出した。その結果、過酸化水素を添加することで、漆の硬化時間が遅くなり、漆ラッカーゼの活性が低下することが示された。

[1] Mitsugu Akagawa, et al., Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67, 12, 2632-2640.

## A45 イネエチレンレセプターOsERS1の発芽と初期生長における機能解析

○森田重人<sup>1,2</sup>、谷柚希<sup>1</sup>、中村淳一<sup>1</sup>、増村威宏<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>京府大・院生命環境、<sup>2</sup>京都農技セ生資セ)

### 【目的】

植物の種子形成の過程では休眠が誘導されるため、完熟直後の種子は発芽が抑制されている。穀類の種子形成時に休眠誘導が弱いと、穂発芽が起こり、収量や品質低下が引き起こされる。また発芽は芽生えの生長と直結しており、発芽と初期生長の遅れは、栽培期間全体にわたって生育に悪影響を与える。このように種子の休眠・発芽は、農業上重要な問題である。

植物の種子休眠と発芽は、アブシジン酸(ABA)やエチレンなどの植物ホルモンにより調節されている。エチレンは多くの植物種で休眠解除と発芽促進に機能しているが、イネの発芽におけるエチレンの役割については未解明である。そこで本研究では、イネ種子の休眠・発芽調節におけるエチレンの役割を明らかにすることを目的として、エチレンレセプター*OsERS1*の発芽における機能について解析を行った。またエチレンは、イネ芽生えにおいてシュートの伸長促進に働いている。そこで、発芽後の初期生長における*OsERS1*の役割についても検討した。

### 【方法・結果】

CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集により、*OsERS1*のコード領域の5'-末端付近に変異を導入した形質転換体イネを作出した。*OsERS1*がノックアウトされたホモ変異体(T<sub>1</sub>個体)を育成し、得られたT<sub>2</sub>種子を用いて、休眠、発芽や初期生長に影響が見られるかどうかを調査した。

*OsERS1*変異体系統とコントロール系統から、開花後42日目の休眠種子を採取して発芽試験を行い、休眠性を調査した。その結果、3つの変異体系統のうちN41系統では、発芽率が低かったことから、休眠が強いことが明らかとなった。しかし他の変異体系統はコントロール系統と差が見られなかったため、N41系統における休眠性の上昇は*OsERS1*の変異とは関連していない可能性が考えられる。

また完熟種子を用いて発芽試験を行った結果、コントロール系統と変異体系統で、発芽率に差は見られなかった。一方、*OsERS1*変異体系統ではコントロール系統に比べ、シュートが伸長しており、初期生長が促進されていることが明らかとなった。このことから*OsERS1*は、初期生長の抑制に働いていることが示唆された。

## A51

### ピペリンは TRPV1 を介して AMPK を活性化し、グルコース取り込みを促進する

○前田歩海<sup>1</sup>、白翰大志<sup>1</sup>、吉岡泰淳<sup>2</sup>、山下陽子<sup>1</sup>、芦田均<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大院・科技イノベ)

#### 【目的】

生体内の血糖調節において重要な組織は筋肉であり、インスリン応答によるグルコースの取り込みの約75%は筋肉が担っている。インスリンがインスリン受容体に結合するとprotein kinase B/AKT等の下流のシグナル分子が活性化され、細胞内小胞に存在するグルコース輸送体4 (GLUT4) が細胞膜へ移行することでグルコースの取り込みが促進される。GLUT4は、インスリン非依存的に運動や筋収縮による5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性化によっても細胞膜へ移行する。本研究では、これまでにL6筋管細胞においてグルコース取り込みを促進することが認められたペッパーの辛味成分であるピペリンに着目し、その作用機序を解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

L6筋管細胞にピペリンを作用させたところ、グルコースの取り込みおよびGLUT4の細胞膜移行が誘導された。その作用機序を検討したところ、ピペリンは、インスリンシグナル経路ではなく、AMPKシグナル経路を介してグルコース取り込みを促進することが判った。さらに、その上流因子について検証を行ったところ、ピペリンは細胞質内Ca<sup>2+</sup>の上昇によって活性化されるCalcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase (CAMKK) を介してAMPKを活性化させることが示唆された。ピペリンを作用させた筋管細胞において細胞質内Ca<sup>2+</sup>の上昇が観察されたため、その要因がROS産生によるものであると仮定し測定したところ、ピペリンを作用させた筋管細胞においてROSの産生が認められた。また、ピペリンによるAMPKのリン酸化および細胞質内Ca<sup>2+</sup>の上昇は、抗酸化物質であるN-acetylcysteineによって阻害された。ピペリンはTransient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) を活性化することが知られているため、TRPV1をノックダウンした筋管細胞にピペリンを作用させ検討を行ったところ、ピペリンによるグルコース取り込み、GLUT4の膜移行およびAMPKのリン酸化はTRPV1のノックダウンによってキャンセルされた。さらに、ラットにピペリン(0.01、0.1 mg/kg BW)を経口投与し、グルコース負荷試験を行ったところ、いずれの濃度においても有意な血糖上昇抑制効果が認められた。このとき、筋肉組織においてGLUT4の膜移行、AMPKのリン酸化、CAMKK β のリン酸化およびROS産生の上昇が認められた。以上の結果より、ピペリンはTRPV1を介してROSの産生および細胞質内Ca<sup>2+</sup>の上昇を引き起こし、CAMKK/AMPK経路を活性化することで血糖調節に寄与することが示唆された。

## A52

### 生理的濃度域のルテオリンによる Nrf2/ARE 経路を介した薬物代謝酵素の発現調節機構

○牧山敦志<sup>1</sup>、北風智也<sup>2</sup>、山下陽子<sup>1</sup>、芦田均<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>神戸大院・科技イノベ)

#### 【目的】

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) は、薬物代謝系第Ⅱ相酵素の発現を介し、酸化ストレスなどに対する防御機構を担う転写因子である。これまでに、ポリフェノールの一種であるルテオリンが肝臓における Nrf2 の活性化を誘導することが報告されている。しかし、検討されているルテオリンの濃度は我々が日常的に食事を摂取した際の血中濃度 (100 nM 以下) よりも高い。また、ルテオリンによる Nrf2 の活性化機構については十分に解明されていない。そこで本研究では、生理的な濃度域のルテオリンが肝臓での薬物代謝酵素の発現に与える影響とその調節機構について検討した。

#### 【方法・結果】

ICRマウスに 0.01–10 mg/kg B.W. のルテオリンを 7 日間経口投与し、肝臓における薬物代謝系第Ⅱ相酵素のタンパク質発現量と Nrf2 の核内移行について検討した。また、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に 10 pM–1 μM のルテオリンを作用させ、薬物代謝系第Ⅱ相酵素のタンパク質発現量を検討した。Nrf2 のリン酸化に関わる extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 のリン酸化と Nrf2 のユビキチン化、核内移行、リン酸化、ならびに antioxidant response element (ARE) との結合にルテオリンが与える影響についても評価した。

その結果、ルテオリンは動物レベルにおいて肝臓中の薬物代謝系第Ⅱ相酵素の発現量と Nrf2 の核内移行量を増加させた。HepG2 細胞においても、生理的濃度域のルテオリンは薬物代謝系第Ⅱ相酵素のタンパク質発現量を増加させ、ERK1/2 と Nrf2 のリン酸化、Nrf2 の核内移行、ならびに Nrf2 と ARE の結合を促進させた。さらに、ルテオリンは Nrf2 のユビキチン-プロテアソーム系による分解を抑制させた。

以上の結果から、生理的濃度域のルテオリンが動物・細胞レベル共に肝臓における薬物代謝系第Ⅱ相酵素の発現量を増加させることが示された。また、ルテオリンは Nrf2 の分解抑制とリン酸化の促進により、Nrf2 の核内移行量を増加させ、下流の薬物代謝系第Ⅱ相酵素の発現量を増加させることが明らかとなった。

本研究は文部科学省科研費 17H00818 の助成を受けたものです。

## A53

### 黒大豆ポリフェノールの吸収、代謝、分布と排泄および血管機能に及ぼす影響に関する研究

○王柳青<sup>1</sup>、山下陽子<sup>1</sup>、仲村明日賀<sup>1</sup>、中川純一<sup>2</sup>、難波文男<sup>3</sup>、齋藤静<sup>3</sup>、戸田登志也<sup>3</sup>、芦田均<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>神戸大院・農・生命機能科学、<sup>2</sup>三圭会・中川医院、<sup>3</sup>フジッコ(株))

【目的】黒大豆 (*Glycine max*) は栄養豊富な食材であり、その種皮には anthocyanidin と flavan-3-ol が多く含まれ、子葉には isoflavone が含まれている。これらのポリフェノールは血管機能の向上に寄与することが報告されているが、ヒトでの有効性は十分に明らかとなっていない。分子レベルで、黒大豆ポリフェノールの作用機構が解明されつつあるが、「細胞試験で機能性が実証されている濃度域」と「動物試験で報告されている生理的濃度」が矛盾している等の問題点で、黒大豆中の flavan-3-ol の体内動態まだ十分に解明されていなく、ヒトでの有効性検証の障壁となっている。そこで、本研究は動物試験で黒大豆 flavan-3-ol の体内動態について調べるとともに、ヒト介入試験で黒大豆の摂取が血管機能に及ぼす影響を検証し、黒大豆ポリフェノール中の有効成分を見出すことを目的とした。

【方法・結果】まず、HPLC を用いて、cyanidin-3-O-glucoside, (-)-epicatechin, procyanidin B2, procyanidin C1, cinnamtannin A2, daidzein, daidzin, glycitein, glycitin, genistein, genistin と equol を含む 12 種類の黒大豆ポリフェノールの測定に適している分析系を構築した。次に、この分析系を用いて、黒大豆 flavan-3-ol の吸収、代謝、分布と排泄について調べた。ICR マウスに黒大豆種皮抽出物 (Black soybean seed coat extract: BE) を 250 mg/kg 体重で経口投与した 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h 後に血液、小腸と肝臓などの組織および糞を回収し、flavan-3-ol の定量分析に供した。その結果、flavan-3-ol の一部は、経口投与後に小腸から吸収され、血漿中では主に抱合体として存在し、組織では主にアグリコンとして広く分布していたことが判った。分子量が比較的高い procyanidin C1 と cinnamannin A2 も体内に吸収されることが明らかになった。健常なヒトを対象としたヒト介入試験を行った。対象者に煎り黒大豆を 30 g/日を 8 週間摂取させ、摂取開始前、摂取 4 週目および 8 週目に検査日を設け、対象者の血管機能、酸化ストレスおよび血中と尿中ポリフェノール濃度を測定した。加速度脈波を用いて、対象者の血管機能を測定したところ、44 人の対象者のうち、33 人の血管機能が煎り黒大豆の摂取により改善された。血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) を測定したところ、尿中 NO が有意に増加し、煎り黒大豆の摂取により血管拡張の改善が示唆された。また、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン、ヘキサノイルリジンとミエロペルオキシダーゼを測定したところ、これらのマーカーが尿中と血中で減少し、体内酸化ストレスが軽減したことが示唆された。尿中および血中のポリフェノール濃度も増加し、各バイオマーカーとの相関性を算出したところ、黒大豆ポリフェノールは血管機能と酸化ストレスの改善に寄与し、特に種皮含まれる flavan-3-ol が強く関与していることが示唆された。以上の結果から、黒大豆ポリフェノールは体内に吸収され、ヒトの血管機能の改善に寄与することが明らかになった。

本研究は、文部科学省科研費 17H00818 の助成を受けたものです。

## A54 Proteins accumulated in *Ficus carica* latexes play defensive role against pests.

○Eric Hyrmeya Savadogo<sup>1</sup>, Wataru Aoki<sup>2</sup>, Kazufumi Yazaki<sup>2</sup>, Ryosuke Munakata<sup>3</sup>, Toki Taira<sup>4</sup>, Shunsuke Aburaya<sup>2</sup>, Susumu Hibino<sup>1</sup>, Haruna Yano<sup>1</sup>, Masamitsu Yamaguchi<sup>1</sup>, Hideki Yoshida<sup>1</sup>, Takanari Umegawachi<sup>1</sup>, Ryo Tanaka<sup>1</sup>, Dan Ngoc Anh Suong<sup>1</sup>, Sakihito Kitajima<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Kyoto Institute of Technology, <sup>2</sup>Kyoto University, <sup>3</sup>Universite de Lorraine, <sup>4</sup>University of the Ryukyus)

### **【Purpose】**

Laticifer cell of plants is unique in shape, development, and function. The cytoplasm is a sticky white fluid called latex, which is exuded when the plant is wounded. Laticifer contains various toxic compound and therefore supposed to play a defensive role against pest in plants. However latex constituent is highly variable among species and even among organs in a single species. The purpose of this study is to identify in *Ficus carica* different organs latexes proteins highly accumulated and playing a defensive role against pest.

### **【Method and results】**

To gain insight in the defensive role of proteins in *F. carica* latexes, we conducted an RNA-seq analysis of latex exuded from immature fruit, petiole, and trunk, and we compared the expression levels of the unigenes in the three organs' latexes. The expression level of some unigenes related to biotic stresses were significantly increased in trunk and petiole latexes, compared with in fruit latex, suggesting that petiole and trunk latexes play a major role in the defense system of *F. carica*. To check the protein's toxicity, cDNA of some unigenes highly expressed were reverse-transcribed, cloned into a vector and expressed in *Drosophila melanogaster* S2 cells. The class V chitinase (FcVch), pathogenesis-related protein 4 (FcPR4) and the Elicitor-inducible protein (FcEI) have shown a toxicity to cultured S2 cells. These results suggest that FcPR4, FcVch, and FcEI are major proteins playing a key role in the defense system of *F. carica* against pest. To confirm the idea, we introduced the FcEI cDNA in *D. melanogaster* to express in eye imaginal disk using GMR-GAL/UAS system. Analysis of its toxic effect is undergoing.

# A55

## ジャバラ果皮由来ポリメトキシフラボノイドの抗肥満活性

○奥野祥治<sup>1</sup>、大田時帆<sup>1</sup>、宇都宮洋才<sup>2</sup>、河野良平<sup>2</sup>、野村幸子<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 和高専・生化、<sup>2</sup> 和歌山医大)

### 【目的】

肥満は、高血圧、動脈硬化、糖尿病といったメタボリックシンドロームの最大の要因である言われている。近年、生活習慣の欧米化に伴い、日本人の肥満の有病者数は予備軍を含めると、2000万人を突破したといわれ、肥満の予防・改善法が大きな課題となっている。その手段の1つとして、天然物由来抗肥満活性物質の研究が盛んに行われている。

ジャバラ (*Citrus jabara*) は和歌山県北山村原産の香酸柑橘である。ジャバラの化学成分として、ポリメトキシフラボノイドについて報告されているが、機能性に関する報告はほとんどされていない。これまでに我々の研究室では、ジャバラ果皮からアポトーシス誘導物質を単離し、その機能性について明らかにした。本研究では、ジャバラ果皮水抽出物が3T3-L1細胞に対して脂肪滴蓄積抑制効果を示したことから、ジャバラ果皮に含まれる抗肥満活性物質の探索およびその作用機構の解明を目的とした。

### 【方法・結果】

分化刺激を与え、分化させた3T3-L1脂肪細胞にジャバラ果皮水抽出物を添加し、2日間培養したのち、サンプル無添加の培養培地に入れ替え、6日間培養したのち、蓄積された脂肪滴をOil red Oにより染色した。その結果、ジャバラ果皮水抽出物は、未処理の細胞と比較して、脂肪滴の蓄積を優位に抑制した。そこで、この水抽出部を、脂肪滴蓄積抑制効果を指標として、各種クロマトグラフィーを用いて分画を繰り返し、3種の活性成分**1-3**を単離し、構造決定した(Fig. 1)。

化合物 **1-3**の3T3-L1脂肪細胞に対する脂肪滴蓄積抑制効果について検討したところ、それぞれ200 μMで脂肪の蓄積を抑制した。また、GPDH誘導活性に対する効果について検討した結果、**1-3**は、200 μMでGPDHの誘導活性を抑制した。さらに、これらの化合物は、過剰蓄積された脂肪に対する分解効果も示した。このことから**1-3**は脂肪の蓄積を抑制することだけでなく脂肪を分解することも明らかとなった。

現在、抗肥満効果の作用機構の解明を目的として、RT-PCRを用いた脂肪蓄積における遺伝子の発現解析を行っている。

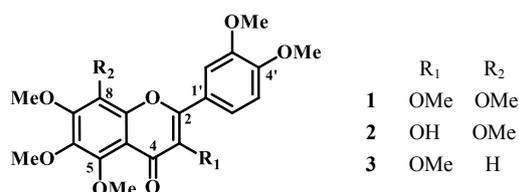


Fig. 1. Structure of active compounds

## A56

### 大豆・ヒヨコ豆イソフラボンによる THP-1 細胞からの インターロイキン-12 産生誘導

○高橋佑治<sup>1</sup>、中谷優太<sup>1</sup>、西野勝俊<sup>1</sup>、Riadh Ksouri<sup>2</sup>、増田誠司<sup>1</sup>、  
神戸大朋<sup>1</sup>、磯田博子<sup>3</sup>、永尾雅哉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・生命、<sup>2</sup>CBBC・Tunisia、

<sup>3</sup>筑波大院・生命環境・地中海・北アフリカ研究センター)

【目的】大豆を発酵させてつくられた無塩味噌粉末の経口投与によって、ナチュラルキラー(NK)細胞活性化因子であるインターロイキン-12(IL-12)陽性の細胞がマウス脾臓中で増加することが近年報告された。一方、大豆に多く含まれるイソフラボンとしてゲニステインやダイゼインがあるが、ゲニステインの経口投与によって、マウス脾臓中のNK細胞の細胞傷害性が活性化されると報告されている。しかし、我々が行なった実験では、ダイゼインやゲニステインによってNK細胞株の細胞傷害性を直接的に活性化させることができなかった。以上の結果から、大豆イソフラボンが免疫細胞からのIL-12産生を誘導し、間接的にNK細胞を活性化している可能性が考えられた。そこで本研究では、大豆・ヒヨコ豆の4種のイソフラボン(ダイゼイン、ゲニステイン、フォルモノネチン、バイオカニンA)によって、ヒト単球由来細胞株THP-1、またはTHP-1細胞を樹状細胞様に分化させた細胞からのIL-12産生が誘導されるかについて検討した。

【方法・結果】単球様、または樹状細胞様に分化させたTHP-1細胞を各イソフラボン存在下で3日間培養し、その培養上清中のIL-12を定量したところ、どちらの細胞に対してもダイゼインとフォルモノネチンのみに用量依存的なIL-12産生誘導効果が確認された。ダイゼインはエストロゲンレセプター(ER)や芳香族炭化水素受容体(AhR)のリガンドでもあるため、ダイゼインによるIL-12産生誘導がERやAhRを介している可能性が考えられた。そこで、ER、AhRそれぞれのアンタゴニストであるフルベストラントやCH-223,191による阻害効果を調べたが、ダイゼインおよびフォルモノネチンのTHP-1細胞からのIL-12産生誘導効果は抑制されなかった。ダイゼインやフォルモノネチンによって酵素活性が強められることが知られる転写制御因子SIRT1は、ヒストンを脱アセチル化することでIL-12の転写抑制に寄与する可能性が示唆されているが、これはダイゼインやフォルモノネチンによってIL-12産生が誘導された事実と相反している。この点に着目し、SIRT1阻害がダイゼインやフォルモノネチンのIL-12産生誘導効果に影響するか調べたが、SIRT1阻害剤EX527ではイソフラボンによるIL-12産生誘導効果に影響を与えなかった。なお、イソフラボン類のIL-12産生誘導能に関する構造活性相関については、5位の水酸基の有無が重要で、この位置に水酸基がないダイゼインとフォルモノネチンにIL-12産生誘導能が認められた。

【謝辞】本研究はJST/JICAの地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム(SATREPS)の支援と、中央味噌研究所の助成により実施しました。

## A57

### 白ナタマメより粗抽出したゲル化物質の物理化学的特性

○西澤果穂、高橋美咲、西浦彩夏、田添英里、松浦志帆、有井康博  
(武庫川女子大)

【目的】ナタマメ(*Canavalia gladiata*)はタンパク質を約26%、脂質を約3%、炭水化物を約62%含む。我々はその組成から、ナタマメを食品として利用できると考えている。これまでに白ナタマメからタンパク質を豊富に含む粗抽出液を調製し<sup>1)</sup>、ナタマメ主要タンパク質の可溶性が塩濃度依存的に変化する特性を明らかにしている<sup>2)</sup>。その研究過程において、ある粗抽出液を冷却することによってゲル化する現象も発見している。本研究では、新規食品素材の発掘を目的とし、白ナタマメからゲル化物質を粗抽出する方法およびゲル化物質の物理化学的特性について検討した。

【方法・結果】水で浸漬した白ナタマメを氷上でハンドブレンダーにより破碎した。破碎液を100°C、105°Cで加熱あるいは煮沸することで、ゲル化物質の抽出に適した加熱方法を調べた。加熱液あるいは煮沸液を濾過し、濾液を抽出液として4°Cおよび20°Cで静置した。また、抽出時における破碎豆の有無がゲル化に与える影響を調べるために、破碎液および破碎豆を除いた液から調製した抽出液についても4°Cおよび20°Cで静置した。静置後に生じた沈殿湿重量を測定し、抽出液に対する沈殿率を算出することで、ゲル化現象を数値化した。破碎液を煮沸後に濾過した抽出液のみ、ゲル化することが明らかとなった。次に、抽出液がゲル化する最適条件を調べるために、抽出液の静置温度および静置日数による沈殿率の変化を比較した。抽出液は10°C以下でゲル化し、生じたゲルは65°C以上で融解することが明らかとなった<sup>3)</sup>。さらに、各調製法により調製した抽出液中の物質について、SDS-PAGEおよびヨウ素デンプン反応により検討した。SDS-PAGEではゲル化の有無に関わらず、各抽出液中のタンパク質バンドはほとんど検出されなかった<sup>3)</sup>。一方、ヨウ素デンプン反応ではゲル化する抽出液のみがやや呈色したが、ゲル化に十分な量に対する発色ではなかった<sup>3)</sup>。加えて、フェノール-硫酸法により全糖量、ソモギー-ネルソン法により還元糖量を測定したところ、抽出液中には多糖類が多く含まれていることが明らかとなった。

1) Nishizawa *et al.* (2016). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 1623.

2) Nishizawa and Arai. (2016). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80, 2459.

3) Nishizawa and Arai. (2018). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82, 120.

## A58 京野菜のポリアミン

○藤原有希、鈴木秀之

(京工織大・応用生物)

### 【目的】

ポリアミンとはアミノ基を2つ以上もつ脂肪族炭水化物であり、バクテリアから高等動物に存在する。ポリアミンは細胞の増殖、成長、発達やタンパク質合成にも関与し、生命活動に欠くことのできない物質である。従って、生現機能を維持するためには体内のポリアミン濃度を最適なレベルに保つことが重要である。最も一般的なポリアミンは、ジアミンであるプトレッシン、トリアミンであるカダベリンとスペルミジン、テトラアミンであるスペルミンである。近年ポリアミンは健康寿命の伸張に有効であることが報告されている。ポリアミンの生合成量は加齢に伴って減少することが知られているが、ポリアミンは食品から摂取することが可能である。

本研究では京野菜や漬け物に含まれるポリアミン量を測定し、ポリアミン含量の高い食品を見出すことを目的としている。

### 【方法・結果】

万願寺トウガラシ、山科トウガラシ、伏見トウガラシ、ピーマン(京みどり)、柘野ササゲ、聖護院キュウリ、賀茂ナス、枝豆(夏取り紫ずきん)の9種類の京野菜と、菜の花漬、柴漬などの漬け物とその原材料のポリアミン含量を測定した。万願寺トウガラシにおいては調理法によって、枝豆については茹でる前後でポリアミン量がどのように変化するか調べた。検体はディープフリーザーで冷凍した後、検体1gに対して5mlの割合で5%TCAを加え、フードプロセッサーでホモジネイトしてポリアミンを抽出した。抽出液をポアサイズ0.45 $\mu$ mのフィルターを通した後、TSKgel polyaminepak(4.6 $\times$ 50mm)を装着したHPLCにより分析した。

京野菜を分析した結果、品種によってポリアミン含量がことなり、トウガラシやピーマンにはプトレッシンが多く含まれていることが分かった。また、枝豆においては収穫時期の違いによりポリアミン含量が変化することも示唆された。万願寺トウガラシの調理法の違いや枝豆の茹でる前後でポリアミン含量に大きな違いは見られなかった。漬け物の分析結果では、漬け物の原材料には検出できなかった未知物質が検出され、全体のポリアミン量も原材料と比較すると増加していた。このことから、漬け物では微生物発酵によってポリアミンが蓄積していると考えられ、解析を進めている。

### 【謝辞】

本研究で使用した京野菜は京都府農林センター、菜の花漬は河村様、柴漬とその材料は志ば久様の御好意により分与頂いたものです。

## B41

### ハナショウガ抽出液の暑熱ストレス耐性向上効果

○小林永和、上田修司、加藤良毅、ユンサンスン、津曲涼介、  
山之上稔、白井康仁

(神戸大・農)

【目的】暑熱ストレスはヒトへの健康被害や家畜などの経済動物の生産性低下を引き起こす。このため暑熱ストレス耐性の獲得機構について広く研究されてきており、分子シャペロンである熱ショックタンパク質(HSP)と暑熱耐性向上の関係性が示唆されている。このHSPは熱ストレスだけでなく、フィトケミカルによる化学な刺激においても発現が誘導される。実際、ハナショウガに含まれるゼルンボン(HSP70誘導因子)はHSP発現誘導効果が報告されているが、個体レベルでの暑熱ストレスに対する作用は報告されていない。そこで、本研究ではハナショウガ抽出液のHSP発現誘導作用をマウスの培養細胞及び個体で確認するとともに、その暑熱ストレス耐性向上効果をマウス個体を用いて検証することを目的とした。

【方法】ハナショウガ根茎の乾燥粉末からエタノールにより抽出し、ハナショウガエキスとした。このエキスを添加した培地でHepa1c1c7細胞(マウス肝臓由来)を刺激し、その後の各種HSP発現についてウェスタンブロット法により評価を行った。次いで、マウス(C57BL6)を用いて、暑熱耐性評価系を構築し、ハナショウガエキスの暑熱耐性向上効果を評価した。マウスをエキス添加飼料と対照飼料で1週間飼育後、1日1時間40℃環境下に暴露する暑熱ストレスを5日間与えた。暑熱ストレス前後の体重を測定し、増体率で評価を行った。また、試験後にマウスを屠殺して肝臓を採材してウェスタンブロット法によりHSPの発現を確認した。

【結果】ハナショウガエキス(ゼルンボンとして50  $\mu$  M相当)の添加によりHepa1c1c7細胞においてHSP40、HSP70、HSP90の有意な発現増加が認められた。また構築した暑熱耐性評価系において、暑熱ストレス(HS)区では室温対照(RT)区(と比較して増体率の鈍化が認められたが、暑熱ストレス処理前からエキス添加飼料を給餌した区(HS+ZER区)では増体率の鈍化が有意に改善した。ただし、室温条件でエキス添加飼料を給餌した区(RT+ZER区)はRT区と増体重に差は認められなかった。またこれらの被験マウスの肝臓におけるHSP70の発現を調査したところ、RT区と比較してその他の区でHSP70の発現が増加していた。

【結論】ハナショウガエキスの飼料への添加により、暑熱ストレスによる増体率の低下が軽減されることが明らかになった。肝臓においてHSP70の発現が増加していることも確認されており、特に暑熱ストレスとエキス添加飼料を与えたマウスで最も発現増加が認められた。これらの結果からゼルンボンがHSP70の発現誘導を介して暑熱耐性向上効果をもたらしていることが示唆された。

## B42

### ヒト Bcl-2 ファミリーBcl-rambo と VDAC はショウジョウバエにおいて遺伝学的相互作用を示し、ヒト培養細胞株において協調的にカスパーゼの活性化を促進する

○田中嶺士、松原久典、立石竜也、吉田英樹、山口政光、片岡孝夫  
(京工繊大院・応用生物)

#### 【目的】

Bcl-2ファミリーBcl-rambo (BCL2L13)は、N末端側に4つのBcl-2 homology (BH)ドメイン、中央部にユニークなNo BH motif (BHNo)ドメイン、C末端に膜貫通ドメインを有するタンパク質である。ヒトBcl-ramboはヒト胎児腎由来293T細胞において過剰発現させるとアポトーシスを誘導した<sup>1)</sup>。さらに、ヒトBcl-ramboをショウジョウバエの複眼に異所的に発現させると、色素の消失を伴うrough eye表現型が誘導された<sup>2)</sup>。この複眼の色素の消失はadenine nucleotide translocase (ANT)をコードする*sesB*の変異系統と交配させることによって抑制された<sup>2)</sup>。本研究では、ヒトBcl-ramboを発現させたショウジョウバエ系統、ヒトBcl-ramboをトランスフェクションしたヒト培養細胞株、ヒトBcl-ramboとグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を用いてBcl-ramboの生理機能を解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

ヒト肺がん由来A549細胞にBcl-rambo、もしくはLC3-interacting region (LIR)モチーフ変異体(W276A/I279A)を過剰発現すると、ミトコンドリアの断片化が誘導され、核周辺部にBcl-ramboと断片化したミトコンドリアが集積することが観察された。これらの結果から、ヒトBcl-ramboによるミトコンドリアの断片化がLC3との結合に依存しないことが確認された。Bcl-ramboをショウジョウバエの複眼に発現させたショウジョウバエ系統を用いた遺伝学的スクリーニングを行ったところ、voltage-dependent anion channel (VDAC)として知られる*porin*の変異系統と交配することで、Bcl-ramboにより誘導される複眼の色素の消失が抑制された。GST-Bcl-rambo融合タンパク質は、ANT1とANT2と相互作用したが、これらの相互作用と比較して、VDAC1の相互作用は非常に弱くVDAC2との相互作用は検出できなかった。一方、293T細胞にBcl-rambo、VDAC1、VDAC2をトランスフェクションすると、Bcl-ramboはVDAC1、もしくはVDAC2と協調的にカスパーゼの活性化を促進した。以上の結果から、ヒトBcl-ramboとVDACはショウジョウバエにおいて遺伝学的相互作用を示し、ヒト培養細胞株において協調的にカスパーゼの活性を促進することが明らかになった。

[1] Kataoka, T. *et al.*, J.Biol. Chem., 276, 19548-19554 (2001)

[2] Nakazawa, M. *et al.*, PLoS One, 11, e0157823 (2016)

## B43 長期的な運動による老化促進モデルマウス(SAMP8)の筋機能低下の改善効果

○瀧川花穂、松田凜太郎、内富蘭、大西拓己、畑澤幸乃、亀井康富  
(京都府立大・生命環境)

### 【目的】

高齢者の筋機能低下(サルコペニア)の予防・改善は超高齢社会で重要な問題である。サルコペニアに長期間の継続的な運動がどのような影響を及ぼすか調べるために老化促進モデル(senescence accelerated mouse) SAMP8マウスを用いて実験を行った。

### 【方法・結果】

SAMP8マウス(雄性、7週齢、8匹)を25週間、回転カゴに入れて、自発的に運動させた。比較のために回転カゴに入れない群(雄性、7週齢、8匹)も作成した。23週後、トレッドミルにより持続走行能力を測定した。その後、解剖に供し、筋重量と脂肪重量を測定するとともに骨格筋での遺伝子発現変化を解析した。

回転カゴによる自発的運動は、1日1万回転以上観察されたが、実験開始後17週間後以降は回転数が減少した。体重は、回転カゴに入れない群で徐々に増加したが、回転カゴ群では体重は定常レベルを保った。トレッドミル試験においては、回転カゴ群で走行時間が顕著に増加した。これは老齢による筋機能低下が、長期の持続的運動によって回復したことを示唆する。解剖時、骨格筋重量(ヒラメ筋、前脛骨筋)は回転カゴにより筋重量が有意に増加した。また脂肪重量は顕著に低下した。マイクロアレイにより骨格筋の網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、回転カゴで発現増加した遺伝子群にリボソームタンパク質、インスリンシグナルの下流キナーゼAkt、ユビキチンリガーゼであるAtrogin1などタンパク質の合成・分解の遺伝子が複数認められ、筋タンパク質の代謝回転が活発になっていることが示唆された。これらのことから、回転カゴによる長期の運動は肥満を改善するとともに、加齢による筋機能低下を回復させていることが示唆された。

Takigawa et al. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry 論文投稿中

## B44

# 胎児期の抗アンドロゲン剤暴露による膵臓β細胞の発達と血糖値への影響

○四元優佑<sup>1</sup>、甲木孝弘<sup>1</sup>、與田安紘<sup>1</sup>、乾博<sup>2</sup>、原田直樹<sup>1</sup>、山地亮一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・応用生命, <sup>2</sup>大阪府大・栄養)

### 【目的】

近年、胎児期の環境が生育後の健康に影響を及ぼすという生活習慣病胎児期発症起源説 (Developmental Origins of Health and Disease 説) が注目されている。雄の胎児期における男性ホルモンは男性への性分化に関与しているが、正常範囲を超える高アンドロゲン状態は性成熟後の耐糖能異常や膵臓β細胞量の減少の原因となる。しかし、胎児期の低アンドロゲン状態での影響は不明である。そこで、本研究では胎児期に抗アンドロゲン剤暴露により男性ホルモン作用を阻害した雄ラットにおける膵臓β細胞の発達と性成熟後の耐糖能に与える影響を解明することを目的とした。

### 【方法・結果】

Wistar母ラットに抗アンドロゲン剤であるFlutamide (50 mg/kg) を妊娠16.5日目から出産まで毎日経口投与した。出生ラットはY染色体に存在するSry遺伝子の有無で雌雄判定を行い、雄性仔ラットはFlutamide暴露によるアンドロゲン作用の抑制を肛門尿道間距離の伸長阻害作用により確認した。出生直後、Control群と比べてFlutamide群で膵臓β細胞量は雄特異的に減少し、Ki67(細胞増殖マーカー)陽性β細胞の割合は低下し、TUNEL(細胞死マーカー)陽性β細胞の割合は変化しなかった。出生後、離乳までControl群の母ラットに育てさせた後、性成熟前後となる6週齢および12週齢時の膵臓β細胞量はControl群と比べてFlutamide群で約70%と約50%まで減少した。これらの時期のKi67陽性β細胞の割合とTUNEL陽性β細胞の割合は2群間に差はなかった。6週齢および12週齢時に腹腔内糖負荷試験とインスリン負荷試験を行い、耐糖能への影響を検討した結果、6週齢時では各試験結果において影響はなかった。12週齢時の腹腔内糖負荷試験ではControl群と比べてFlutamide群で耐糖能が改善する傾向が観察されたが、インスリン負荷試験においては影響がなかった。膵臓β細胞のストレス耐性を検討するために、12週齢時に膵臓β細胞特異的に酸化ストレスを与えるStreptozotocin (STZ; 45 mg/kg) を腹腔内投与し、13週齢時に腹腔内糖負荷試験を行った。その結果、STZにより生じた耐糖能の低下がFlutamide群で抑制された。以上の結果から、胎児期における男性ホルモン作用阻害は雄仔特異的に出生前後の膵臓β細胞の細胞増殖能を低下させて膵臓β細胞量を減少させるが、膵臓β細胞の抗酸化能が亢進することで耐糖能の悪化を起こさないことが示唆された。

## B45

### ヒト由来浮遊培養細胞への遺伝子導入手法の検討

○木村泰久<sup>1</sup>、松尾道憲<sup>1</sup>、木岡紀幸<sup>1</sup>、植田和光<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農・応用生命、<sup>2</sup>京大・iCeMS)

#### 【目的】

哺乳類由来のタンパク質は高度な翻訳後修飾を受けるものが多く、タンパク質生産には哺乳類の細胞が必要となる場合が多い。ヒト由来のタンパク質を本来の機能を保った形で発現させ、機能解析を行うにはヒト培養細胞を用いるのが最適であると考えられる。しかし、ヒト培養細胞は大容量での培養が困難であり、遺伝子の導入には高価な遺伝子導入試薬が必要となることから、タンパク質の大規模生産に用いることは困難であった。本研究では浮遊培養が可能なヒト胎児腎細胞293(FreeStyle293F細胞)に、様々な陽イオン性リポソーム、および陽イオン性ポリマーを用いて遺伝子を導入し、タンパク質発現効率の最適化を行った。さらに培養容器の形状についても検討を行った。

#### 【方法・結果】

FreeStyle293F細胞を三角フラスコ、バツフル付三角フラスコ、角型ボトルを用いて培養し、増殖速度を評価した。その結果、バツフル付三角フラスコで最も高い増殖効率を示すが、三角フラスコや角型ボトルでもほぼ同様の増殖を示すことが明らかとなった。次いで遺伝子導入剤の検討を行った。本研究ではカチオン性脂質を混合したリポソームおよびカチオン性のポリマーを緑色蛍光タンパク質(GFP)発現用プラスミドと混合し、対数増殖期のFreeStyle293F細胞でのタンパク質発現を蛍光によって評価した。いずれの導入剤においても遺伝子導入率は導入剤の濃度依存的に向上したが、高い濃度では低下が見られた。発現が低下する濃度では細胞由来のタンパク質が減少していたことから、遺伝子導入剤の細胞毒性によって細胞が障害を受けた結果、発現量が低下したと推定される。比較した中ではカチオン性ポリマー(polyethyleneimine; PEI)2種が最も高い遺伝子導入効率を示したことから、用いるDNA量と導入剤の割合を細かく調査し、最適化を行った。GFP発現用プラスミドと導入剤を様々な量比で混合し、FreeStyle293F細胞に一過的に発現させたところ、GFPの発現量はプラスミドと導入剤の量比が1:2となる量比周辺で最も高くなるシャープなピーク形状を示した。FreeStyle293F細胞を用いて目的とするタンパク質を最大収量で得るためには、遺伝子導入剤と発現用プラスミドの量比の最適化が重要であると考えられる。

## B51

### トビイロシワアリの道しるべフェロモン：6-メチルサリチル酸メチルの同定

○中村哲朗、原田恭子、秋野順治

(京工織大・応用生物)

#### 【目的】

近年北米に侵入して問題化しているトビイロシワアリ *Tetramorium tsushimae* は、日本国内でも農作物に被害をもたらす農業害虫として問題視されている。本研究では、その防除を目指した行動制御法開発の一環として、本種の道しるべフェロモン同定を試みた。

#### 【方法・結果】

道しるべ定位活性の検証には、10 cm長の直線上に、1 cmあたり  $1 \times 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^0$  アリ頭当量 (WE) の検定試料を塗布し、それぞれに対して各40頭の働きアリによる反応を比較するI字検定法を用いた。トビイロシワアリ働きアリ20,000頭を40 mLのジエチルエーテルに1時間浸漬して得られた全身粗抽出液を、1N塩酸および1N水酸化ナトリウム水溶液による液液分配法で酸性・中性・塩基性物質の3つの画分に分画した。その結果、酸性物質含有画分にのみ定位活性が認められたため、同画分をヘキサン・ジエチルエーテル混合溶媒によるシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより5つの画分に分画した。1%エーテル/ヘキサン (E/H) 溶出画分に定位活性が局在したため、同画分を分取ガスクロマトグラフ法により5分毎に分画し、極性カラム DB-WAXで4画分、無極性カラム HP-1で8画分をそれぞれ得た。Kovátsの保持指標値 (RI) が極性カラムによる分取では1917-2089に相当する画分に、無極性カラムによる分取では1153-1381に相当する画分に、それぞれ定位活性が局在化した。同活性画分を極性カラム DB-WAXによるGC-MS分析に供した結果、 $m/z$  77, 106, 134, 166 [M<sup>+</sup>]に特徴的なフラグメントイオンを示す化合物 (RI=1961) を候補物質として検出した。NISTライブラリ検索により6-メチルサリチル酸メチル (M6MS) と推定されたことから、有機合成したM6MSのスペクトルデータを測定して比較したところ、保持指標値とマススペクトルが候補物質と一致した。一定量の*n*-トリデカンを添加する内部標準法によりとして腹部粗抽出液に含まれるM6MS量を定量した結果、働きアリ1頭の保有量を約0.9 ngと推定した。この結果を基に合成品のM6MSの希釈系列を調製し、その定位活性を腹部粗抽出液と1%E/H画分の希釈系列と比較したところ、粗抽出液では  $10^{-4}$  WE/cmから、1%E/H溶出画分と合成M6MSでは  $10^{-3}$  WE/cmから定位活性が認められた。これらの検証結果から、本種トビイロシワアリの道しるべフェロモンを、6-メチルサリチル酸メチルと同定した。

## B52 シルクで体臭を抑えられるか？

○一田(高濱)昌利、谷口慧、宮地遥、秋野順治

(京工織大・応用生物)

### 【目的】

近年、日本では臭いに対する人々の関心が高く、体臭や口臭などの臭いによる被害を指すスメルハラスメントという言葉がメディアで取り上げられるほどである。一方、演者らは絹を着用した場合に、他の繊維製品と比較して臭くならないということに経験的に気づいていた。さらに、絹に関わっている色々な方に話を聞くと、多くの方から絹は汗臭くならない、あるいはいやな臭いが残らないといった話をお聞きした。そこで、シルクには体臭の発生抑制機能があるのではないかと考えた。さらに、蚕の品種と生産物である繭糸の抗酸化能力の関係を調べた結果、品種によってかなり違うことを明らかにしてきたことと合わせ、繭糸には体臭発生抑制効果があり、品種の違いが体臭発生抑制効果に大きく影響するのではないかと考え、繭層抽出物の加齢臭発生抑制効果を中心に検討を加えた。

### 【方法・結果】

乾燥繭を煮繭後繰糸した生糸あるいは高濃度塩溶液に2年間浸漬したのち脱塩し、低温繰糸した生糸からの抽出物には、繭層抽出物と同程度の加齢臭(2-ノネナール)発生抑制効果が認められた。

繰糸後の生糸から加齢臭発生抑制効果物質が得られたことは、生産物である繭の価値を高めるだけでなく、抽出が容易になることを意味している。

次に脱脂綿の代わりに絹布あるいは綿布を用いた場合、絹布では加齢臭発生抑制効果のある生糸からの抽出物を塗布しなくてもかなり強い加齢臭発生抑制効果が認められた。一方、綿布では加齢臭発生抑制効果はほとんど認められなかったが、生糸からの抽出物を塗布すると十分な加齢臭発生抑制効果が認められた。

以上の結果から、蚕の品種の違いは加齢臭発生抑制効果に大きな影響を及ぼさず、同等の効果があることを認めた。さらに、加齢臭発生抑制効果物質はセリシン部だけではなく、シルクの本体であるフィブロインにも存在することが明らかになるとともに、綿布に生糸からの抽出物を塗布することで加齢臭発生抑制効果を持たせることから、繊維加工剤としての応用が考えられた。

## B53

### カイコガ精子成熟誘発因子であるセリンプロテアーゼの基質 精液タンパク質探索

○長岡純治、忝田紗希、高村智子、土居梓

(京工織大・応用生物)

#### 【目的】

カイコガオス生殖腺末端部の前立腺で特異的に合成・分泌されるinitiatorinは、未交尾オスに貯えられた未成熟な精子に運動能と受精能を獲得させる一連の反応を開始させる精子成熟誘発因子として機能するセリンエンドペプチダーゼである。本研究では、最終的にinitiatorinによって引き起こされる精子成熟反応の全容を明らかにすることを目指し、まずに、一連の精子成熟反応が貯精のうから生殖腺分泌物と共に取り出した未成熟精子にinitiatorinを含む前立腺磨砕液を作用させることで*in vitro*で再現出来ること(精子成熟再現系)を利用することで、initiatorinの基質候補タンパク質の同定を試みた。

#### 【方法・結果】

精子成熟再現系に含まれるタンパク質、特に、塩基性タンパク質 (*pI* 6以上)を、二次元電気泳動により分離し、成熟反応の進行に伴い、出現してくるスポットの探索を行なった。この結果見出された複数個のスポットのうち、2種類について、エドマン法によりN末端配列を決定し、さらに、その配列を利用して、RT-PCR法で遺伝子の単離を行なった。推定アミノ酸配列中には、複数の連続した2つのArg配列が散在しており、二次元電気泳動スポットから得られたN末端配列の直前に存在していた。これらは、①精子成熟再現系において、initiatorinを含む前立腺磨砕液の代わりにtrypsinやEndopeptidase Arg-Cは利用できるものの、Endopeptidase Lys-Cでは、不可能なことや、②initiatorinは、Argが2つ連続した蛍光人工基質に対して高い反応特異性を持つといった知見から想像すると、initiatorinの基質タンパク質として好適な候補であると言える。また、これらの遺伝子は、同一染色体上にタンデムに存在する機能未知タンパク質をコードしているが、その一部分には高い相同性を持っており、この相同配列部分を用いてカイコガゲノム中を探索すると、さらに、隣接して、2つの連続したArg配列が予想配列中に4-7箇所散在する点でも類似する2遺伝子の存在が明らかとなった。そこで、以上の4遺伝子の発現ならびにタンパク質動態を調査したところ、すべて貯精のうで部位特異的に合成・分泌され、射精に伴い、メスへと移行し、その体内で精子成熟が進んでいくと、恐らく連続したArg配列が選択的に切断されたことによる段階的な分解が確認された。

現在、これらタンパク質の機能を明らかにするために、TALENによるノックアウト系統の作出を行なっている。

## B54 Kujigamberol およびその類縁体は炎症性サイトカイン誘導性の細胞接着因子の発現と糖鎖修飾に作用する

○谷垣里穂<sup>1</sup>、福原早友里<sup>1</sup>、木村賢一<sup>2</sup>、片岡孝夫<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京工繊大院・応用生物、<sup>2</sup>岩手大・農)

### 【目的】

Kujigamberolは、岩手県久慈産琥珀から単離された化合物である<sup>1)</sup>。最近、kujigamberolが*in vitro*及び*in vivo*において抗アレルギー活性をもつことを報告した<sup>2)</sup>。本研究では、kujigamberol及びその類縁体であるkujiol Aとkujigamberol Bの抗炎症活性を解明することを目的とした。その結果、ヒト臍帯静脈内皮細胞human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)における炎症性サイトカインが誘導する細胞接着因子の発現や糖鎖修飾に対するkujigamberol、kujigamberol B、kujiol Aの作用機序を明らかにした<sup>3)</sup>。

### 【方法・結果】

Kujigamberolは、interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )やtumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )によって誘導されるintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)のmRNA量とタンパク質量にほとんど影響しない濃度で、ICAM-1の分子量を低下させたことから、ICAM-1の糖鎖修飾に選択的に作用することが明らかになった。一方、kujigamberolは、IL-1 $\alpha$ やTNF- $\alpha$ によって誘導されるvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)とE-selectinのmRNA量とタンパク質量を減少させた。Kujigamberolは、IL-1 $\alpha$ やTNF- $\alpha$ によって誘導されるnuclear factor  $\kappa$  B(NF- $\kappa$  B)サブユニットRelAの核移行に作用しなかった。以上の結果から、kujigamberolは、細胞接着因子の種類によって異なる作用を示すことが明らかになった。ICAM-1に対するkujigamberol類縁体の作用を検討したところ、細胞生存率に影響しない濃度で、kujigamberol BはICAM-1の分子量を低下させたが、kujiol AはICAM-1の分子量を低下させなかった。HUVEC以外の細胞においてICAM-1の発現と糖鎖修飾に対するkujigamberolの作用を検討するために、ヒト肺がん由来A549細胞、ヒト乳がん由来MCF-7細胞、ヒト繊維肉腫HT-1080細胞を用いた。Kujigamberolは、細胞生存率に影響しない濃度で、A549細胞においてICAM-1の発現量の減少と分子量の低下を誘導し、MCF-7細胞とHT-1080細胞ではICAM-1の発現量の減少のみを誘導した。以上の結果から、kujigamberolのICAM-1に対する作用は細胞の種類によって異なることが明らかになった。

[1] Kimura, K. *et al.*, *Fitoterapia* 83, 907-912 (2012)

[2] Maruyama, M. *et al.*, *Fitoterapia* 127, 263-279 (2018)

[3] Fukuhara, S. *et al.*, *Int. Immunopharmacol.* 62, 313-325 (2018)

NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路とその標的遺伝子 ICAM-1 の発現  
に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序の解析○馬場康輔<sup>1</sup>、平松令子<sup>1</sup>、Benjamart Suradej<sup>1</sup>、谷垣里穂<sup>1</sup>、小枝清花<sup>2</sup>、  
和久友則<sup>2</sup>、片岡孝夫<sup>1</sup>( <sup>1</sup>京工織大院・応用生物、<sup>2</sup>京工織大院・分子化学)

## 【目的】

五環性トリテルペノイド類は、抗がん活性や抗炎症活性などの様々な生理活性を有する化合物であり、多くの植物に含まれている。我々は、炎症性サイトカインの一つであるinterleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )によって誘導される細胞接着因子の発現に対する五環性トリテルペノイド類の作用機序を解析してきた。これまでに、ウルソール酸(ursolic acid)がintercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)の細胞内輸送や糖鎖修飾に作用すること、及びオレアノール酸(oleanolic acid)とベツリン酸(betulinic acid)がICAM-1の糖鎖修飾に作用することを報告してきた<sup>1,2)</sup>。本研究では、3種類の五環性トリテルペノイド類として、アシアチン酸(asiatic acid)、マスリン酸(maslinic acid)、コロソール酸(corosolic acid)を用いて、nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)シグナル伝達経路とその標的遺伝子ICAM-1の発現に対する作用機序を解析した。

## 【方法・結果】

Cell ELISAとフローサイトメトリーを用いて細胞表面ICAM-1の発現量を測定したところ、コロソール酸とマスリン酸は、IL-1 $\alpha$ で誘導される細胞表面ICAM-1の発現を阻害したが、アシアチン酸は細胞表面ICAM-1の発現をほとんど阻害しなかった。さらに、ウェスタンブロッティングを用いてICAM-1のタンパク質量と糖鎖修飾に対する影響を検討したところ、コロソール酸はICAM-1のタンパク質量を抑制したが、アシアチン酸とマスリン酸は、ICAM-1のタンパク質量を増加させた。また、これらの五環性トリテルペノイド類はいずれもICAM-1の低分子量化を誘導し、糖鎖修飾に作用することがわかった。次に、ICAM-1の転写量に対する影響を検討したところ、コロソール酸はICAM-1 mRNA量を若干減少させ、アシアチン酸はICAM-1 mRNA量を若干増加させた。また、マスリン酸はICAM-1 mRNA量を大きく増加させた。さらに、NF- $\kappa$ Bシグナル伝達経路に対する作用機序の解析として、IL-1 $\alpha$ で誘導されるRelAの細胞質から核への移行に対する影響を検討したところ、アシアチン酸、コロソール酸、マスリン酸は、RelAの核移行にほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、アシアチン酸、コロソール酸、マスリン酸は、分子構造が類似しているが、ICAM-1の発現に対して異なる作用機序を有することが明らかになった。

[1] Mitsuda, S. *et al.*, FEBS Open Bio, 4, 229-239 (2014)[2] Hiramatsu, R. *et al.*, Eur. J. Pharmacol., 767, 126-134 (2015)

## B56

### リンゴ果実における傷害応答性トリテルペン類の生理活性

○大畑勇統<sup>1</sup>、森田沙代<sup>1</sup>、吉永直子<sup>1</sup>、石栗陽一<sup>2</sup>、森直樹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大農, <sup>2</sup>青森産技セ リンゴ研)

#### 【目的】

リンゴ果実はモモシクイガ幼虫の食害を受ける。2015年度と2017年度の農芸化学会で、食害部の近傍でトリテルペン 3 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (3-Oxo-TA) と2 $\beta$ ,3 $\beta$ -3,25-epoxy-2,3,19-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (Pomaceic acid) が誘導され、これらは異なる誘導量の経時変化を示すことを報告した<sup>1), 2)</sup>。植物は二次代謝産物を生合成して様々なストレスへの防御応答を行うので、傷害により誘導されるトリテルペンがリンゴ果実内で何らかの生理的な役割を担っていると考えられる。そこでリンゴ害虫への生理活性を調べ、傷害応答性トリテルペンが誘導される生態学的意義を解明することを目的とした。

#### 【方法・結果】

リンゴ幼果傷害部のMeOH抽出液から3-Oxo-TA を精製し、これを含む寒天飼料を作成した。これをリンゴ果実の害虫であるモモシクイガ *Carposina sasakii* 2齢幼虫と広食性害虫のハスモンヨトウ *Spodoptera litura* 3齢幼虫とに摂食させ、体重変化と摂食量を測定した。その結果、ハスモンヨトウ幼虫には摂食阻害活性があったが、モモシクイガ幼虫に対して活性は確認できなかった。また、ハスモンヨトウ終齢幼虫に3-Oxo-TA を直接投与したところ、幼虫の体重変化や蛹の重量に影響はなかった。以上のことから、3-Oxo-TA にはリンゴ果実を食害するモモシクイガの摂食行動には影響せず、リンゴ果実を食害しないハスモンヨトウには摂食阻害活性があるが、生育に影響するような毒性はないと示唆された。

さらに、ほかのリンゴ害虫に対する傷害応答性トリテルペン類の生理活性を調べるため、モモシクイガと同様に果実を食害するナシヒメシクイ *Grapholita molesta* と葉を食害するリンゴコカクモンハマキ *Adoxophyes orana fasciata* に対する生理活性について検討した。これらの結果からリンゴ果実における傷害応答性トリテルペンの生態学的意義について報告する。

- 1) 森田ら, 2015 年度日本農芸化学会要旨集, 2016
- 2) 大畑ら, 2017 年度日本農芸化学会要旨集, 2018

## B57

### 糖類による青枯病菌二次代謝の活性化

○村井勇太<sup>1</sup>、石川陽子<sup>1</sup>、坂田恵<sup>1</sup>、曳地康史<sup>2</sup>、甲斐建次<sup>1</sup>

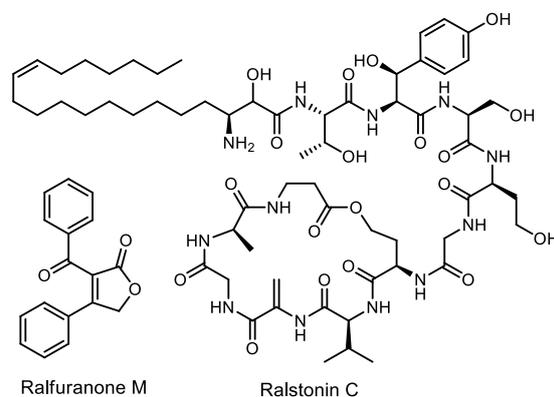
(<sup>1</sup> 阪府大院・生命環境、<sup>2</sup> 高知大・農)

#### 【目的】

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科を中心とした200種以上の植物に感染し枯死を引き起こす植物病原細菌である。我々はクオラムセンシング制御下にある二次代謝産物として ralfuranone 類と ralstonin 類を見出し、それらがバイオフィーム形成の制御因子や植物毒素として病原力に寄与する可能性を報告している<sup>1,2</sup>。青枯病菌は人工培地を使って生育させたときよりも、トマト植物体内でより多くの二次代謝産物を産生する。植物組織中に存在する何らかの成分が、青枯病菌の二次代謝物を活性化させる可能性が考えられた。さらに、青枯病菌のバイオフィーム形成が宿主由来の糖類によって促進されることが報告されている<sup>3</sup>。そこで本研究では、植物細胞間隙中に存在する糖類存在下で青枯病菌を培養した時、ralfuranone 類と ralstonin 類の産生量とプロファイルにどのような変化があるのかを詳細に調べた。

#### 【方法・結果】

植物水耕栽培用培地であるPS培地に0.1%の glucose、mannose、fructose、galactose をそれぞれ加え、野生株である OE1-1 株を培養した。これらの培養物の酢酸エチル抽出物を HPLC と LC/MS で分析したところ、糖類未添加のコントロールに比べ、ralfuranone 類と ralstonin 類の産生量の増加が認められた。特に、



galactose 添加時に著しく増加しており、新規類縁体ピーク (ralfuranone M と ralstonin C と名付けた) が見出された。各種 NMR 解析を中心に、ralfuranone M と ralstonin C の化学構造を右上図のように決定した。Ralfuranone 生合成欠損株と ralstonin 生合成遺伝子変異株の病原力を、トマト芽生えの接種実験によって調べた。その結果、野生株に比べて有意に病原力の低下が認められた。以上の結果より、宿主細胞間隙に高濃度に存在する糖類によって、ralfuranone/ralstonin 類の産生が活性化され、青枯病菌の病原力に寄与する可能性が示唆された。

1) Kai *et al.*, *ChemBioChem*, 15, 2590 (2014).

2) Murai *et al.*, *Organic Letters*, 19, 4175 (2017).

3) Mori *et al.*, *Molecular Plant Pathology*, 17, 890 (2016).

# B58

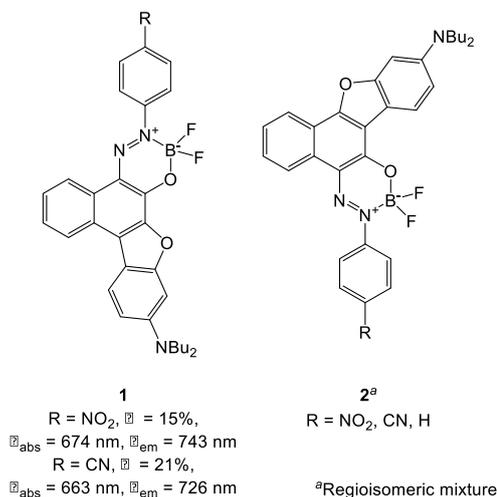
## 植物の光形態形成反応の制御を目的としたアゾ-ヒドラゾン系 ホウ素錯体の合成

○塩見飛翔、種将太郎、園田素啓、谷森紳治

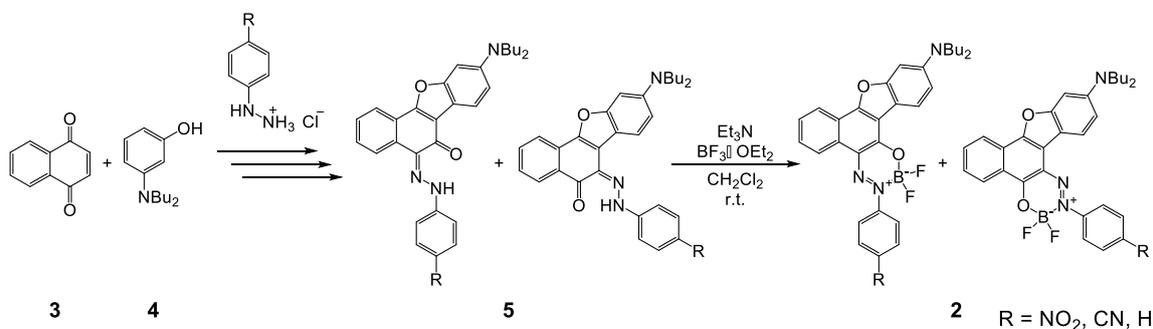
(阪府大院・生命環境)

【目的】 植物中に存在するフィトクロムと呼ばれる光受容体は、660 nm付近(赤色光)と730 nm付近(遠赤色)の波長の光を吸収することによって、発芽や花芽形成といった様々な光形態形成反応が誘起され、植物の生長に影響を与えることが知られている。そこで、蛍光色素を含んだ波長変換フィルムを植物に被覆することで光形態形成反応をコントロールし、植物の生育制御ができれば、作物の高品質化や栽培の低コスト化に応用できるのではないかと期待されている。フ

イトクロムの吸収帯に対応する蛍光色素として、吉田らは1,2-ナフトキノンから5段階で合成したアゾ-ヒドラゾン系ホウ素錯体**1**を報告した。最近、当研究グループにおいて、置換基Rをクロロ基などに変えることで蛍光量子収率が向上した。本研究では、**1**の構造異性体として1,4-ナフトキノンから誘導できる錯体**2**の合成を検討した。



【方法・結果】 1,4-ナフトキノン**3**とN,N-ジブチル-3-アミノフェノール**4**を出発物質とし、共役付加、水酸基の導入、脱水環化反応によりジケトン誘導体を合成した。次に、各種ヒドラジンを用いて、脱水縮合により各種ヒドラゾン体**5**を位置異性体混合物として得られた。各異性体の分離を試みたが困難であったため、混合物のまま三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体と反応させてホウ素錯体**2**を得た。現在、位置異性体の分離方法および、クロロ基など他の置換基Rの導入を検討している。



## B59 水中の重金属イオンの固定化が可能なジチオカルボン酸誘導体の合成と除去能評価

○山口浩明、尾崎紀哉、野元昭宏、小川昭弥

(阪府大院・工)

### 【目的】

近年、人間の社会活動は劇的に多様化し周辺環境に対する影響も大きく変化している。大気汚染・水質汚濁・大気汚染などは一定の改善法が確立されているものの、これらの問題は環境だけでなく、生物に対しても悪影響を及ぼす。したがって、社会活動から排出される様々な物質に対する無害化処理や清浄化には、より一層の改善・改良が強く求められている。

当研究室では、工業廃水に含まれる重金属類による水質汚濁に着目し、その固定化および除去を目指し、より高効率なキレート剤の工業的製法の開発を行っている。わが国では、過去にイタイタイ病や水俣病などの公害が発生し、それぞれカドミウムおよび有機水銀化合物が原因物質であるとされている。現在では改善されているが、重金属を含む工業廃水を多量に排出しているのが現状であり、多種の重金属が環境水中に放出される前に固定化することは、従来よりもその必要性が増している。

現在、固定化剤としてジチオカルバメート誘導体が一般的に用いられている。しかしながら、本化合物は酸または熱により分解することが知られており、重金属を環境中に再放出するだけでなく、可燃性で有毒な二硫化炭素を再発生するという問題点を有している。そこで当研究室では、より安定と考えられるジチオカルボン酸誘導体の合成法開発に着目している。

### 【方法・結果】

まず始めに、有機溶媒を用いない環境低負荷な手法を用いて、シクロペンタノンおよびシクロヘキサノン为原料とするジチオカルボン酸誘導体の合成を行った。これらを蒸留水に溶解させることで、一定濃度の固定化剤水溶液の調製を行った。

続いて、重金属（カドミウム、銅、鉄、鉛、亜鉛）の塩化物を蒸留水に溶解させることで、一定濃度の重金属水溶液を調製した。

重金属水溶液に固定化剤水溶液を一定量加えて攪拌することで生じた沈殿を濾過により除去した後、水溶液中の残存重金属イオン濃度を誘導結合プラズマ原子吸光分析法により測定した。その結果、水溶液中に重金属イオンはほとんど残存しておらず、本ジチオカルボン酸誘導体は優れた金属固定化能を有することが明らかとなった。また、酸や熱を加えても分解が確認されなかったことから、酸および熱に対する耐性を有することも明らかとなった。

## B60

### 最少培地における枯草菌による $\gamma$ PGA生産

Chumsakul Onuma<sup>1</sup>、増田健太<sup>2</sup>、森本拓也<sup>2</sup>、影山泰<sup>2</sup>、尾崎克也<sup>2</sup>、  
萩原浩<sup>2</sup>、吉田健一<sup>3</sup>、○石川周<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>奈良先端大、<sup>2</sup>花王、<sup>3</sup>神戸大学・イノベーション)

#### 【目的】

ポリ- $\gamma$ -グルタミン酸( $\gamma$ PGA)は、日本の伝統的な発酵食品である納豆のネバネバ物質であり、枯草菌により生産される。また、食品添加物、化粧品材料、凝集剤、ドラッグデリバリーのキャリア分子、プラスチックの材料に利用されている有用物質である。しかし、生産コストは高く、社会でより広く普及させるためには安価な材料を原料とした効率的な生産方法の開発が必要である。そこで、原材料費を抑えるために、グルコースを唯一の炭素源、塩化アンモニウムを唯一の窒素源とした最少培地で、 $\gamma$ PGAを高生産する株を作成することを目的とした。

#### 【方法・結果】

高い物質生産性を有するゲノム縮小株を使用した。 $\gamma$ PGA合成遺伝子、および、 $\gamma$ PGA分解酵素遺伝子を(高濃度 $\gamma$ PGAによる粘性を低下させるため)、構成的に高レベルで転写するプロモーターの制御下に置いた株を基本株とした。安定な物質生産には細胞分化の抑制が効果的だと考え、細胞分化に関わる遺伝子を抑制するグローバル転写抑制因子AbrBを常に発現し続ける変異株を作成した。また、効率的な物質生産にはグルコースから $\gamma$ PGAへの効率的な変換が必要であると考え、主要な副産物合成経路であるアセトイン合成系を破壊した株を作成した。

基本株では $\gamma$ PGAを0.5 g/L/hで合成することができた。構成的AbrB発現株では、合成速度が親株の2倍以上に上昇した(1.2 g/L/h)。しかし、これらの株では定常期に入ると生産は停止した。一方、アセトイン合成遺伝子欠損株では合成速度には変化が無かったが、定常期に入っても生産を続けることができた。面白いことに、両方の変異を有する株は、基本株と比べ、合成速度が2倍以上、かつ、定常期でも $\gamma$ PGAを生産することができた。このように、グルコースを唯一の炭素源、塩化アンモニウムを唯一の窒素源とした最少培地で、増殖期・定常期において1.0 g/L/hで $\gamma$ PGAを生産する株を作成することに成功した。

## C41 ピーマン果実の苦味惹起成分

○森本正則<sup>1</sup>、段上輝之<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>近畿大・応生化、<sup>2</sup>ナント種苗)

### 【目的】

野菜などの食品材料において、色や食感などとともに香りや味は消費者に対して重要な性質のひとつである。世界中で様々な野菜が食用とされる中、ナス科野菜のひとつであるピーマンの可食部である果実部を食すると、独特の苦味が惹起されることが多く、これがピーマン果実の味を特徴づけている。しかし、この苦味惹起という性質が時として子どもなどが嗜好について苦手意識を持ってしまう要因ともなっている。これまでもピーマン果実の苦味惹起成分が数種報告されているが、本研究では、新たにピーマン果実中の苦味惹起成分の同定とピーマン栽培品種ごとの成分含有量と苦味惹起程度との関係を明らかにし、これらの情報をピーマン栽培品種改良時に利用することを目的とした。

### 【方法・結果】

ピーマン果実を乾燥後粉碎物をメタノールを用いて抽出し、ピーマン果実メタノール抽出物を調製した。苦味惹起活性は、被験液をろ紙にしみこませた後、常温常圧で溶媒を完全に蒸発させた。植物成分が保持したろ紙を検定者が口に含み、その味覚を確認した。ピーマン果実メタノール抽出物について、苦味惹起活性の存在を確認した後、これを酢酸エチルと水で分液すると、その苦味成分は、水層に移動した。この水層を凍結乾燥し、さらにクロロホルムとメタノールを移動相とするシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーを用いて、苦味惹起活性を指標として活性成分を精製した。その結果、苦味惹起成分はTLC上で同様な発色パターンを示す化合物群中に存在し、その中の数種の化合物を精製することに成功した。これらの化合物について、各種機器分析を実施したところ、NMR分析の結果よりグリセロ脂質に糖が結合した化合物であると推察した。そこで、構成する脂肪酸部分についてアルカリ加水分解の後、遊離した脂肪酸を三フッ化ホウ素メタノール錯体を用いてメチル化後、GCMSによって同定を試みた。その結果、これらを構成する主な脂肪酸は、リノレン酸であった。同様なTLCパターンを示すこれらの化合物群は、脂肪酸と糖の種類と数がグリセロールへの結合が異なる化合物群であることが示唆された。逆相HPLCを用いて、苦味程度の異なるピーマン果実メタノール抽出物中の糖脂質の定量を行ったところ、これらの糖脂質の含有量と苦味惹起活性の程度に相関性を見いだすことが出来た。この様なことから、ピーマン果実中の苦味惹起活性に、これらの糖脂質が関与していることが示唆された。

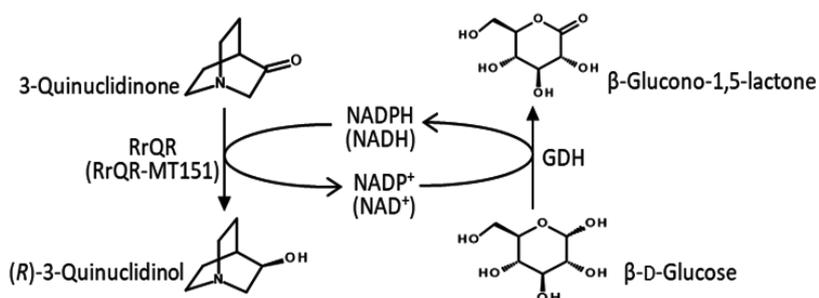
## C42

## (R)-3-キノクリジノールの高効率生産に関する研究

○岡田圭以子、李曉彤、品田雅、松原充、片岡道彦

(阪府大院・生命環境)

【目的】 (R)-3-キノクリジノールは、抗認知症薬や気管支拡張剤などの合成中間体として利用されている。 *Rhodotorula rubra* 由来のNADPH依存性キノクリジノン還元酵素 (RrQR) は3-キノクリジノンを経還元し、(R)-3-キノクリジノールに変換する酵素である。 RrQRによって消費されるNADPHをグルコース脱水素酵素 (GDH) で再生供給することで、効率よく (R)-3-キノクリジノールを生成することができる。



先行研究により、野生型RrQRに対して変異を導入することで、NADH依存性変異型酵素RrQR-MT151を得た。また、大腸菌にRrQR-MT151およびGDHを導入することで、共発現菌株が得られた。本研究では、この共発現菌株を用いて、(R)-3-キノクリジノールの生産性向上のため、種々の検討を試みた。

【方法・結果】 200 mM基質と休止菌体反応を行ったところ、(S)体の生成が認められたことから、菌体の熱処理条件を検討したところ、45°Cの熱処理によって(S)体の生成のみを抑えることに成功した。次に、反応の最適pHを検討し、pH 8.0において最も高い反応速度と(R)体過剰率を得た。また、基質濃度の検討では、800 mMにおいて収率が著しく低下したが、菌体量を増加させると収率の低下は改善された。そこで、酵素の発現量や活性について調べた結果、熱処理によってGDHの活性が著しく低下していたため、熱処理を行わない菌体を用いた。その結果、800 mMにおいても定量的に反応が進行し、高い収率、(R)体過剰率を得ることができた。初期の検討では、熱処理によって(R)体過剰率を高めていたが、基質濃度を上げることで、熱処理を行わずとも(R)体の選択率を向上させることができた。また、反応に必要な補酵素NAD+添加量の削減を目的として、NAD+の添加濃度を検討した結果、0.1 mMにおいて収率が著しく低下したが、菌体量を増加させることで収率の低下は改善し、最少でNAD+濃度0.05 mMにおいて、反応が進むことが確認できた。

以上より、熱処理なしの菌体40 mg/mLを用いた、pH 8.0、基質濃度800 mM、補酵素濃度0.05 mMの条件で、最も高効率な生産に成功した。

## C43 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<sup>1</sup>, 片野裕太<sup>1</sup>, 児島憲二<sup>1</sup>, 滝田禎亮<sup>1</sup>, 八波利恵<sup>2</sup>, 中村聡<sup>2</sup>, 保川清<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>東工大・生命理工)

### 【目的】

キシラナーゼは第二世代バイオエタノール生産への応用が期待されており、反応効率向上のため、更なる耐アルカリ化および耐熱化が望まれている。我々は、全アミノ酸スクランニング変異導入法を用いて糖質加水分解酵素ファミリー (GH) 10 に属する *Bacillus* sp. TAR-1 株由来キシラナーゼ (XynR) の耐熱型変異体 S92E を取得した<sup>1)</sup>。本研究では、GH11 に属する *Bacillus* sp. 41M-1 株由来キシラナーゼ (XynJ) の耐熱型変異体の取得を試みた。

### 【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 領域とその一次構造上の近傍の 118 アミノ酸残基 (D11-T102、S167-N192) のうちの 1 残基のコドン进行他の 19 種類のコドンに置換し、大腸菌 BL21(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. 耐熱型変異体の選抜：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、残存活性 (熱処理前に対する熱処理後の活性の相対値) を求めた。4. 酵素の精製：菌体の可溶性画分から陰イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。5. 速度論的解析：反応は精製酵素 (0.1 μM) を用いて Beechwood xylan を基質として pH 7.8、37°C で行った。経時的に反応液を採取し、還元末端を 3,5-ジニトロサリチル酸によって定量し、 $K_m$  と  $V_{max}$  を求めた。

### 【結果】

野生型酵素 (WT) の残存活性は 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 種類のアミノ酸残基に置換したところ、残存活性は、G では 75%、F、Y、W、K、R、H、E、D、N では 5% 未満、それ以外は 6~25% であった。このことから、82 位に位置するアミノ酸残基が酵素の耐熱性に深く関与している可能性が示唆された。WT および T82A の、65°C の熱処理で活性が 50% に低下する時間はそれぞれ 2.5 分と 38 分であった。WT および T82A の  $K_m$  値はそれぞれ 16.4、13.2 mg/mL、 $V_{max}$  値はそれぞれ 13.1、11.3 μM/s で、いずれも同程度であった。XynR に続いて XynJ でも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。

1) K. Nakatani et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press, doi: 10.1080/09168451.2018.1495550

## C44 全アミノ酸スクランニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いた MMLV 逆転写酵素の耐熱化

片野裕太<sup>1</sup>, ○李瞳陽<sup>1</sup>, 馬場美聡<sup>1</sup>, 中村実世<sup>1</sup>, 伊東昌章<sup>2</sup>,  
滝田禎亮<sup>1</sup>, 保川清<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院農, <sup>2</sup>沖縄高専)

### 【目的】

逆転写酵素 (RT) は分子生物学的研究や臨床診断で必要不可欠な酵素である。今日、モロニーマウス白血病ウイルス (MMLV) RT が使用されているが、RNA の二次構造をなくし、反応効率を向上させるために耐熱化が求められている。我々は部位特異的変異により、耐熱性が向上した MMLV RT である MM4 (E286R/E302K/L435R/D524A) を作製した<sup>1)</sup>。しかし、その耐熱性は耐熱型 DNA ポリメラーゼと比較すると著しく低い。近年、我々は無細胞タンパク質合成系により MMLV RT を発現させ、その性状が大腸菌で発現させたものと同様であることを報告した<sup>2)</sup>。本研究では、全アミノ酸スクランニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系を用いて MMLV RT の耐熱化を試みた。

### 【方法・結果】

1. 全アミノ酸スクランニング変異導入法によるライブラリーの作製: C 末端に (His)<sub>6</sub> を付加した MMLV RT (Thr24–Leu671) をコードする遺伝子を pET22b(+) の NdeI サイトと EcoRI サイトに挿入された発現プラスミドを鋳型として、QuikChange HT Protein Engineering System (アジレントテクノロジー) により、Ala70 から Arg469 までの 400 アミノ酸残基の各々のアミノ酸残基のコドンに他の 19 種類のアミノ酸残基のコドンに置換した。これを大腸菌 BL21 (DE3) に導入した。任意の 73 クローンの塩基配列を解析した結果、27 クローン (37%) で目的の変異が確認された。2. MMLV RT の発現: 個々の形質転換菌を 96 穴プレートで培養後、8 クローンの培養液を混合し、プラスミドを抽出し、無細胞タンパク質合成キット (ジーンフロンティア) により、MMLV RT を発現させた。3. 耐熱性の評価: 無細胞タンパク質合成の反応液を 55°C または 56°C で一定時間熱処理後、モデル RNA を用いた RT-PCR (cDNA 合成は 45°C) を行った。768 クローンをスクリーニングした結果、最終的に耐熱型酵素 D200C を取得した。大腸菌で発現させ菌体から精製した D200C を用いた cDNA 合成反応で cDNA が合成された最高温度は 57°C であり、野生型酵素より 4°C 高かった。以上の結果は、全アミノ酸スクランニング変異導入法と無細胞タンパク質合成系がタンパク質工学に有効であることを示唆する<sup>3)</sup>。

- 【文献】 1. K. Yasukawa, M. Mizuno et al. (2010) *J. Biotechnol.* **150**, 299–306  
2. Y. Katano, T. Hisayoshi et al. (2016) *Biotechnol. Lett.* **38**, 1203–1211  
3. Y. Katano, T. Li et al. (2017) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **81**, 2339–2345

## C45

### エカルディーグティエール症候群 (AGS) の患者で同定された変異が導入された組換えヒト RNase H2 の性状解析

○西村拓人、馬場美聡、兒島憲二、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 ハイブリッドの RNA を加水分解する。RNase H のうち RNase H2 は二本鎖 DNA に 1 塩基だけ埋め込まれたリボヌクレオチド (R) の 5'側を切断するが、RNase H1 はこれを切断しない。RNase H2 は細胞内の DNA に埋め込まれた R の除去に関与する。また、AGS 患者でヒト RNase H2 の遺伝性変異が同定された。ヒト RNase H2 はサブユニット A、B、C から成るヘテロ 3 量体である。我々は、野生型ヒト RNase H2 (WT) を大腸菌で発現させ、活性と安定性に対する塩の影響を解析した<sup>1)</sup>。本研究では、AGS 患者で同定された変異 (サブユニット A の G37S、N212I、R291H; B の A177T、V185G; C の R69W) が導入された 6 種類の単変異体を作製し、性状を解析した。

#### 【方法と結果】

1. 変異体の調製: 変異導入には QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) を用いた。(His)<sub>6</sub> を各 N 末端に付加したサブユニット A、B、C を大腸菌でポリシストロニックに発現させ、菌体内可溶性画分から酵素を精製した。2. 活性測定: 3' 末端 FITC 標識 RNA (5'-gaucugagccugggagcu-3') と相補的な 5'-Dabcyl 修飾 DNA から成る二本鎖 (18R)、あるいは 1 塩基の R (a と表記) を含む 3'-FITC 修飾 DNA (5'-GATCTGAGCCTGGGaGCT-3') と相補的な 5'-Dabcyl 修飾 DNA から成る二本鎖 (1R) を基質とした。pH 8、25°C で反応させ、490 nm 励起時の 515 nm の蛍光を連続測定した。18R、1R を基質としたときの G37S の活性はそれぞれ、WT の 0.2、1% であり、著しく低下した。一方、他の変異体の活性は WT の 50~120% で、WT と同程度であった。塩の活性に対する影響は全変異体と WT で差がなかった。3. CD: Jasco J-820 (日本分光) を用いた。200-250 nm のスペクトルは全変異体と WT で差がなかったことから、変異導入による二次構造の変化はないと考えられた。4. ゲルろ過: カラムは COSMOSIL Packed Column 5Diol-300-II (7.5 nm I.D. × 600 mm) (ナカライテスク) を、溶離液は 0.5 M L-Arg、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を用いた。全変異体が WT と同じパターンを示したことから、変異導入による三量体形成への影響はないと考えられた。

【文献】1. M. Baba et al. (2017) *J. Biochem.* **162**, 211-219

## C51

### 焼酎粕は大腸菌の良好な培地である

○西田和生<sup>1</sup>、玉置尚徳<sup>2</sup>、鈴木秀之<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京工織大院・応生、<sup>2</sup>鹿大・農)

#### 【目的】

焼酎粕は、焼酎製造後に残る産業廃棄物であり、水分が多いため焼却に多大なエネルギーが必要である。現在、飼料・肥料、バイオガス化による電気・熱のエネルギー源あるいはモロミ酢の製造など、再利用法がいくつか開発されているが、十分とは言えない。私たちは、大腸菌が焼酎粕中で非常に高密度にまで生育することを見出した。そこで、焼酎粕が大腸菌の良好な培地として使用できるかを様々な点から評価することにした。

#### 【方法・結果】

麦あるいは芋焼酎粕から固形物を取り除き、pHを7に調整後、大腸菌の培養液として使用した。多くの研究室で大腸菌を使用する際に問題となる菌の生育、プラスミド・タンパク質の生産について、大腸菌培養に一般的に使用されているLB Miller培地、緩衝能を持ち栄養素含量の多いTerrific brothで培養した場合と比較した。(1)大腸菌野生株を培養し、倍加時間および最終到達濁度を調べた。結果、焼酎粕培地での大腸菌の倍加時間はLB培地およびTerrific brothでの倍加時間よりも1.3～1.6倍長いことがわかった。しかし、麦および芋焼酎粕培地における大腸菌の最終到達濁度は、それぞれLB培地の2倍および3倍高い値であり、芋焼酎粕培地での最終到達濁度はTerrific brothで得られたものと同等であった。したがって、芋焼酎粕培地は大腸菌の増殖を支持する優れた培地である。(2)pBR322をもつ大腸菌を培養し、培養液1mlからプラスミドを精製して、産生量を調べた。結果、芋焼酎粕培地で培養した菌体から単離したプラスミド量は、Terrific brothで培養したものに匹敵した。麦焼酎粕培地から単離したプラスミド量は、芋焼酎粕培地から得られたプラスミドの量の約80%であり、これは、LB培地から得られたプラスミドの約2倍であった。したがって、両方の焼酎粕培地は、実験室条件下でのプラスミド単離においてLB培地より優れた培地である。(3) *tpl* プロモーター下でβ-ガラクトシダーゼを高発現する菌株を培養し、β-ガラクトシダーゼ活性を比較した。芋焼酎粕培地で培養した菌体のβ-ガラクトシダーゼ活性は、Terrific brothで培養した菌体の約70%であったが、LB培地よりも約2倍高かった。Miller Unitは、菌密度によって正規化された酵素活性を示す。したがって、芋焼酎粕培地中で、大腸菌がLB培地よりも約3倍増殖することを考えると、芋焼酎粕培地は酵素産生においてLB培地よりもはるかに優れた培地といえる。

## C52 デンプンを炭素源として利用できる大腸菌の育種

○西村真波、鈴木秀之

(京工織大・応用生物)

### 【目的】

日本では、年間約646万トン(2015年度)の食品ロスを排出している。それは、世界の食糧援助量、約320万トン(2015年)よりもはるかに多い。2001年に施行された食品リサイクル法により食品廃棄物の再生利用が促進されるようになったが、再生率は71%(2015年度)である。また、年間に排出される食品ロスのうち、約15%が焼却処分されており、それによって二酸化炭素排出量が増加し、環境に大きな影響を与えている。このような現状から食品ロスの中でも特に、廃棄されたお米に注目した。廃棄されたお米を炭素源として大腸菌を培養し、培養した大腸菌から化成品などを発酵生産する方法を開発することによって、食品ロスを有効活用し、かつ二酸化炭素排出量を削減できないか検討した。しかし、大腸菌はマルトペントースより小さいマルトデキストリンしか菌体内に取り込めず、お米の主成分であるデンプンはそれよりもはるかに大きいため、炭素源として利用できない。そこで、菌体表層にデンプン分解酵素を提示(固定)することでデンプンを分解し、炭素源として利用できる大腸菌の育種を目指した。

### 【方法・結果】

アンカータンパク質PgsAまたはYiaTR<sup>232</sup>の下流に*Bacillus subtilis* 168の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子*amyE*、プルラナーゼ遺伝子*amyX*、および*B. megaterium*の $\beta$ -アミラーゼ遺伝子*bamM*をそれぞれ導入したプラスミドを作製し、作製したプラスミドを組み合わせてもつ大腸菌株を作製した。作製した大腸菌株をデンプン寒天培地上に生育させ、ヨウ素デンプン反応により、 $\alpha$ -アミラーゼが細胞表層に提示されているかを確認した結果、アンカータンパク質PgsAの下流に $\alpha$ -アミラーゼを導入したプラスミドを持つ大腸菌株が生育した周辺のデンプン寒天培地では、ヨウ素デンプン反応による青紫色に呈色しなかった。この結果から、アンカータンパク質PgsAは細胞表層に $\alpha$ -アミラーゼを活性型で提示していることが考えられた。また作製した大腸菌株を、実際にごはんを唯一の炭素源として培養した結果、デンプン分解酵素を菌体表層に提示した大腸菌株では、ごはんを分解した。このことから、作製した大腸菌株は、ごはんを炭素源として利用できる有能な大腸菌株であると考えられる。

### 【結論】

ごはんの主成分であるデンプンを炭素源として利用できる大腸菌株を作製することができた。

## C53

### 窒素固定細菌 *Azotobacter vinelandii* による「廃グリセロール」からの有用ポリマー生産

○吉田暢広<sup>1</sup>、菅原良実<sup>2</sup>、南部優子<sup>1</sup>、村田幸作<sup>3</sup>、橋本渉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京都市・環境政策局、<sup>3</sup>摂南大・理工)

【目的】循環型社会の構築のため、欧州を始めとして植物油からバイオディーゼル燃料（BDF）が生産されている。日本では、廃食油を原料にBDFが生産されており、その生産量は年々増加している。しかし、BDF製造の際に副生する「廃グリセロール」は、アルカリ性で油分やメタノールなどの不純物を含むため、利活用法の探索が急務となっている。当研究室では、グリセロール資化性かつ好アルカリ性の窒素固定細菌*Azotobacter vinelandii*を用いて、「廃グリセロール」を単一炭素源、「大気窒素」を単一窒素源とする省エネ・省コスト型発酵により、アルギン酸（増粘剤）やポリヒドロキシ酪酸（PHB：生分解性プラスチック素材）などの有用ポリマーの生産を目指している。これまでに、水で希釈した「廃グリセロール」に微量のミネラルを添加したWG-MB培地（約0.2%グリセロール）で本菌が良好に生育し、アルギン酸を生産することを見出した。本研究では、WG-MB培地でのPHB生産性を評価するとともに、新たな有用物質探索の一環として細胞外へのアミノ酸分泌性を調べた。

【方法・結果】「廃グリセロール」は、京都市廃食油燃料化施設由来のものを使用した（グリセロール45%、メタノール15%、油分25%、pH 10~11）。PHB生産性は、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた細胞切片観察、及び分解物のガスクロマトグラフィーにより評価した。WG-MB培地で培養した*A. vinelandii*野生株（ATCC12837）をTEM解析に供したところ、定常期（92時間）細胞で多くのPHB顆粒が観察された。同様に培養した野生株とそのアルギン酸合成欠損株（ $\Delta algD$ ）の乾燥菌体を酸性条件下で熱処理し、PHB分解物を定量した。その結果、培養開始48時間以降から両株ともPHBの生産が認められ、培養液あたりの生産量は野生株と比較して $\Delta algD$ 株の方が高かった。一方、細胞外画分のアミノ酸分析を行った。野生株を「純品グリセロール」を単一炭素源とするG-MB培地で培養した。フィルター処理した培養液を薄層クロマトグラフィーに供した結果、ニンヒドリンと反応する物質の存在が認められた。そこで、この細胞外画分をアミノ酸組成分析したところ、本菌はセリン（リン酸化）、ロイシン、イソロイシンなどのアミノ酸や、エタノールアミンを分泌していることがわかった。

【結論・考察】本研究により、*A. vinelandii*が「廃グリセロール」を単一炭素源としてPHBを生産できることが明らかとなった。また、本菌はアミノ酸分泌能をもつことが示唆された。

## C54

### ヒト細胞外マトリックス由来断片化ヒアルロン酸を取り込む連鎖球菌ホスホトランスフェラーゼ系

○老木紗予子<sup>1</sup>、村田幸作<sup>2</sup>、橋本渉<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>摂南大・理工)

**【目的】** ある種の細菌は、動物細胞と相互作用する際、宿主細胞外マトリックスの構成要素である多糖グリコサミノグリカン (GAG) を定着や分解のための標的とする。ヒトの腸管、咽頭、膣などに常在する日和見病原性のグラム陽性連鎖球菌は、細胞表層の多糖リアーゼにより、GAGの一種であるヒアルロン酸を不飽和二糖に断片化し、細胞内の不飽和グルクロニルヒドロラーゼにより断片化二糖を単糖へ分解する。これらの酵素およびホスホトランスフェラーゼ系(PTS)をコードする遺伝子群がゲノム上で集約して一つの遺伝子クラスターを形成する。PTSは、ホスホエノールピルビン酸からリン酸基を基質へ転移し、細胞内にリン酸化基質を輸送する。本研究では、連鎖球菌 (*Streptococcus agalactiae*) のヒアルロン酸取り込み機構を明らかにすることを目的とする。

**【方法・結果】** PTSによる断片化ヒアルロン酸 (不飽和二糖) の取り込みを調べるため、連鎖球菌の細胞をトルエンで処理し、PTSによる基質取り込みに伴ってホスホエノールピルビン酸から生じるピルビン酸を定量することにより、PTS輸送活性を測定した。その結果、トルエン処理細胞は、断片化ヒアルロン酸存在下でPTS輸送活性を示した。そこで、断片化ヒアルロン酸が、本菌のゲノム上にコードされる多数のPTSのうち、GAG遺伝子クラスターにコードされるPTSによって取り込まれることを実証するため、カナマイシン耐性遺伝子の挿入による本PTS遺伝子の破壊株を育種した。破壊株のトルエン処理細胞では、断片化ヒアルロン酸存在下でPTS輸送活性が認められなかった。さらに、断片化ヒアルロン酸の取り込みに加え、破壊株によるヒアルロン酸への作用を解析した。GAGの断片化を評価するハロー検出を行ったところ、破壊株は野生株と同様にヒアルロン酸を断片化した。また、ヒアルロン酸最少培地で生育を調べた結果、野生株は良好な生育を示す一方、破壊株では生育が認められず、ヒアルロン酸を資化しなかった。

**【考察】** GAG遺伝子クラスターにコードされるPTSの遺伝子破壊株は、断片化ヒアルロン酸を基質として細胞内に取り込むことができず、結果としてヒアルロン酸を資化できないことが判明した。以上のことから、断片化ヒアルロン酸を取り込む連鎖球菌PTSの実体を明らかにすることができた。ヒアルロン酸への作用が連鎖球菌感染症の発症に重要であることが指摘されているため、本PTSをターゲットとした治療法の開発が期待される。

## C55

### クロレラ転写因子過剰発現による脂質合成能向上

○徳永早紀<sup>1</sup>、三田将平<sup>1</sup>、浦口裕介<sup>1</sup>、久保裕生<sup>2</sup>、城井真衣<sup>2</sup>、  
中川聡<sup>1,2</sup>、澤山茂樹<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京大・農 )

#### 【目的】

トレボウクシア藻 *Chlorella vulgaris* は、カロテノイドや脂肪酸などの有用機能性物質の供給源として期待されている。これまでに様々な形質転換系に関する研究が行われてきたが、未だ安定した形質転換系の確立には至っていない。そこで我々は *C. vulgaris* 高タンパク質発現用ベクターを人工合成し、*C. vulgaris* 形質転換系の確立を目的に研究を行った。また、ターゲット遺伝子としてDOF転写因子群に着目し、*DOF* を *C. vulgaris* で過剰発現させることで脂質蓄積量の多い形質転換体の獲得を試みた。

#### 【方法・結果】

*HSP70A-RBCS2* デュアルプロモーター配列と、マーカー遺伝子 *Ble* を含む *C. vulgaris* 高タンパク質発現用ベクター pCvHRB を人工合成した。このベクターは *Ble* と MCS との間に自己開裂ペプチドがコードされているので、*Ble* とターゲット遺伝子の共発現が可能である。また、同定されていない *C. vulgaris* の *DOF* 塩基配列は、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の *DOF* アミノ酸配列から推定した。pCvHRB を用いて *DOF* 候補遺伝子を *C. vulgaris* 内に導入し、フレオマイシン添加寒天培地に播種することで形質転換体を選抜した。生じた形質転換体74株のうち3株でターゲット配列の挿入を確認したので、それらについて評価を行った。脂質を定量したところ、形質転換体 CvDOF#3 の細胞当たりの脂質含量は野生株の1.6倍であった。また、ヒスタグをもつ *DOF* タンパク質を精製・定量した結果、CvDOF#3 は *DOF* タンパク質を過剰発現していることが推定された。これらの結果から、導入した *DOF* 候補遺伝子が *C. vulgaris* の *DOF* であることが示唆された。また、今回用いたベクター pCvHRB は、ターゲット遺伝子を長期間安定して発現させることが期待でき、*C. vulgaris* における外来タンパク質高発現に適していると考えられる。

## C56 緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* のリンゴ酸酵素遺伝子過剰発現による脂質合成能向上

○三田将平<sup>1</sup>、浦口裕介<sup>1</sup>、徳永早紀<sup>1</sup>、久保裕生<sup>2</sup>、城井真衣<sup>2</sup>、  
中川聡<sup>1,2</sup>、澤山茂樹<sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京大・農 )

### 【目的】

リンゴ酸酵素(Malic enzyme)は、リンゴ酸を脱炭酸してピルビン酸を生成する反応を触媒する酵素である。リンゴ酸酵素にはこの反応の電子受容体にNAD<sup>+</sup>を用いるタイプとNADP<sup>+</sup>を用いるタイプの二種類が存在し、それぞれが反応の結果NADHあるいはNADPHを生産する。これらの還元力は脂肪酸の生合成に必要なものである。微細藻類はバイオ燃料に用いる脂質の生産源として近年注目を浴びており、リンゴ酸酵素過剰発現の報告がなされている種もあるが、二種類の酵素を同じ微細藻類で過剰発現させた報告はなされていない。そこで本研究では、微細藻類のモデル生物である*C. reinhardtii*においてNAD<sup>+</sup>依存性のリンゴ酸酵素遺伝子*MME1*、あるいはNADP<sup>+</sup>依存性のリンゴ酸酵素遺伝子*MME6*のそれぞれを過剰発現させることで、どちらがより脂質生産性を向上させるかを比較検討した。

### 【方法・結果】

*C. reinhardtii*用タンパク質発現ベクターpChlamy\_4に、クローニングした*CrMME1*、*CrMME6*をインフュージョン法で挿入し、ベクターpC4MME1、pC4MME6を作成した。得られたベクターを用い、ガラスビーズ法で*C. reinhardtii*を形質転換した。ゼオシン耐性で選抜した両形質転換体の脂質含量を測定したところ、*MME6*形質転換体で野生株と比べて1細胞当たりの脂質含量が有意に増加している株が得られた。*MME1*と*MME6*両形質転換体の脂質含量を比較すると、1細胞あたり、培養液1 mlあたり共に*MME6*過剰発現形質転換体の方がそれぞれ多いという傾向であった。これらのことから、*C. reinhardtii*の脂質合成能向上のためには、NADHよりもNADPHの量を増やす方がより効果的であることが示唆された。

## C57

### Thiol-ene 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

○佐野 芽生<sup>1</sup>、黒田 ひかり<sup>1</sup>、小原 仁実<sup>1</sup>、安藤 寛<sup>2</sup>、松本 圭司<sup>2</sup>、麻生 祐司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京工織大・バイオベース、<sup>2</sup>(株)カネカ・R&D 企画部)

#### 【目的】

微生物はイタコン酸(IA)などのビニル化合物を生産する。これらは再生可能なポリビニル原料として有用であるが、自然界からビニル化合物生産菌を選択的に分離する方法はない。そこで本研究では、チオールアルケンへの付加反応であるThiol-ene反応に基づく生産菌分離技術の開発を行った。原理は次の通りである。まず、抗菌性を示す $\alpha$ -チオグリセロール(TG)とラジカル開始剤VA-044(VA)を含む寒天培地に生産菌を含む分離源を塗布する。培養中に生産菌由来のビニル化合物がTGと反応しTGの濃度が低下することで生産菌はコロニーを優先的に形成することができる。

#### 【方法・結果】

5 mM VA、50 mM TG、100 mM IAを窒素下で30°C、120 h、Thiol-ene反応に供し、Ellman試薬を用いて残存TG濃度を測定した結果、反応率は約40%であった。また、LC-MS解析よりTGとIAの反応物が確認されたことから、Thiol-ene反応の進行が確認された。また、種々の微生物に対するTGおよびTGとIAの反応物の最小生育阻止濃度を調べたところ、それぞれTGでは12.5-100 mM、反応物では200 mM以上であった。よって、Thiol-ene反応によりTGの抗菌性失活が確認された。次に、VAとTGを含むポテトデキストロース寒天培地にて*Aspergillus terreus* NBRC 6123(IA生産菌)、*Aspergillus niger* NBRC 33023、*Aspergillus oryzae* NBRC 30113(両株ともIA非生産菌)を培養した結果、NBRC 6123は優先的にコロニーを形成した。さらに、同寒天培地にてNBRC 6123の孢子を含む土壌を塗布培養し同株の再分離を試みたところ、約100%の効率で土壌から再分離できた。よって、本手法はビニル化合物生産菌の分離に有効であることが示唆された。

## C58

### Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発

○矢田椋己<sup>1</sup>、佐野芽生<sup>1</sup>、小原仁実<sup>1</sup>、安藤寛<sup>2</sup>、松本圭司<sup>2</sup>、麻生祐司<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京工織大・バイオベース、<sup>2</sup>(株)カネカ・R&D 企画部)

#### 【目的】

ある種の微生物はビニル化合物を生産する。それらは炭素-炭素二重結合を持ち容易にポリマー化する。よって、新たなビニル化合物生産菌が分離できればバイオプラスチック開発に有用である。しかし、ビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するための手法はなく、これまでに報告されているビニル化合物は *Aspergillus terreus* によって生産されるイタコン酸など数種類にとどまる。そこで本研究では、イタコン酸をビニル化合物のモデルとして利用し、アルケンとハロゲン化アルキルの付加反応である Heck 反応を用いたビニル化合物生産菌の分離技術の開発を行うとともに、土壌からイタコン酸生産菌の分離を試みた。

#### 【方法・結果】

イタコン酸水溶液に Pd(OAc)<sub>2</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、ヨードベンゼンを加えて 80℃ で 1 h 攪拌し Heck 反応を行った。HPLC 解析によりイタコン酸とヨードベンゼンの付加反応物の生成を確認した。反応液に濃 HCl を添加し反応を停止させた後、亜硝酸ナトリウム水溶液と可溶性デンプン水溶液を加えた。Heck 反応により生じたヨウ素イオンをヨウ素デンプン反応により検出することで Heck 反応の進行を確認することができた。次に、グルコース無機塩培地を用いて土壌より分離した 500 株を培養し培養液を用いて同条件で Heck 反応を行った。その結果、ビニル化合物を生産すると思われる 1 株を得た。LC-MS 解析の結果、反応物の分子量は 206.058、化学式は C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> であった。これらはイタコン酸とヨードベンゼンの付加反応物であるベンジリデンコハク酸のそれらと一致した。よって、分離株はイタコン酸生産菌であることが示された。以上の結果から、本手法はビニル化合物生産菌を自然界からハイスループットで選択的に分離するために有効な手法であることが示された。

## C59

### 酵母プリオン様因子[*GAR*]を介した 清酒酵母-生醗乳酸菌間の相互作用

○熊野舞香<sup>1</sup>、渡辺大輔<sup>1</sup>、杉本幸子<sup>1</sup>、砂田啓輔<sup>2</sup>、高橋俊成<sup>2</sup>、  
山田 翼<sup>2</sup>、高木博史<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup> 菊正宗酒造株式会社)

#### 【目的】

清酒醸造における伝統的手法である生醗造りは、酵母と乳酸菌の共存過程を含む。乳酸菌の共存意義としては、他の微生物の混入防止効果や、清酒の風味への効果が報告されているが、酵母への影響については不明な点が多い。一方、近年の研究により、細菌との共存によって[*GAR*] (glucose-associated repression) と呼ばれる酵母プリオン様因子の誘導が促進され、酵母の炭素代謝が変化することが明らかになった。本研究では、[*GAR*]を介した清酒酵母と生醗乳酸菌との相互作用を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法・結果】

酵母における[*GAR*]の誘導は、炭素源を改変した培地 (YPGly+GlcN) での生育により検出することが可能である。一般的な清酒酵母である K701 株および生醗から単離された Km67 株を乳酸菌の非存在下で YPGly+GlcN 培地に塗布したところ、実験室酵母と比較して高頻度に、かつ自発的に[*GAR*]を誘導することが明らかとなった。次に、生醗乳酸菌として知られる *Leuconostoc mesenteroides* および *Lactobacillus sakei* を YPGly+GlcN 培地上で酵母と共存させた結果、これらの生醗乳酸菌が[*GAR*]の誘導を促進し、中でも生醗酵母に対する効果が最も顕著であることを見出した。以上の結果から、清酒酵母と生醗乳酸菌が[*GAR*]を介して相互作用を行い、生醗造りにおいても何らかの影響を与えている可能性が示された。さらに、この生醗乳酸菌による[*GAR*]の誘導促進は、培養上清のみや、加熱殺菌した乳酸菌懸濁液を用いた場合には観察されなかったことから、生菌同士の直接的な相互作用が[*GAR*]の誘導に必要ではないかと推測された。

[*GAR*]の誘導が酵母の生理状態に及ぼす影響についても解析を行った。実験室酵母や清酒酵母 K701 株においては[*GAR*]の誘導によりアルコール発酵力が低下したが、生醗酵母 Km67 株では低下の程度が抑えられた。また、[*GAR*]の誘導により酵母のエタノール耐性が高くなることも示された。したがって、生醗造りにおける[*GAR*]の誘導は、酵母によるアルコール発酵を抑制することで乳酸菌の死滅を防ぐと共に、酵母自身のエタノール耐性を高め、両者の共存に有利に働くことが示唆された。

## C60 酵母非遺伝的因子[*GAR*<sup>+</sup>]が アルコール発酵と遺伝子発現に及ぼす効果

○渡辺大輔、熊野舞香、杉本幸子、高木博史

(奈良先端大・バイオ)

### 【目的】

酵母とバクテリアの共培養により、プリオン様非遺伝的因子[*GAR*<sup>+</sup>]の酵母内での形成が促進され、アルコール発酵の抑制につながることが報告されている。我々は以前、伝統的な清酒醸造法である生酏造りに用いられる乳酸菌 *Leuconostoc mesenteroides* や *Lactobacillus sakei* が、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における[*GAR*<sup>+</sup>]形成促進能を有することを明らかにした(Watanabe *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* in press)。本研究では、[*GAR*<sup>+</sup>]の形成が、アルコール発酵と遺伝子発現に及ぼす効果について、実験室酵母を用いて解析を行った。

### 【方法・結果】

実験室酵母の元株([*gar*<sup>-</sup>]株)および[*GAR*<sup>+</sup>]形成株を用いた発酵試験を実施したところ、グルコースのみを炭素源としたYPD20培地では[*GAR*<sup>+</sup>]により発酵速度が顕著に低下したのに対し、グルコースとスクロースを混合した場合(YPD10+Suc10)には[*GAR*<sup>+</sup>]による影響が抑圧された。この結果から、[*GAR*<sup>+</sup>]の形成により、スクロースの資化能が上昇することが示唆された。次に、グルコースによる遺伝子発現の変化に対して[*GAR*<sup>+</sup>]が及ぼす影響を明らかにするために、グルコースアナログであるグルコサミン添加前後の酵母を用いてRNA-seq解析を実施した。その結果、まず、スクロースの資化に必要なインベルターゼをコードする*SUC2*遺伝子の発現量が[*GAR*<sup>+</sup>]株において高いことを見出した。*SUC2*遺伝子の発現はグルコース抑制を受けることから、[*GAR*<sup>+</sup>]株ではグルコース抑制が解除されており、グルコースとスクロースの両方を含む環境でのアルコール発酵に有利となる可能性が示唆された。この点は、上述の発酵試験において得られた知見と良く合致するものであった。また、[*GAR*<sup>+</sup>]株では、高浸透圧ストレス応答において中心的な役割を果たすHOGシグナル伝達経路の標的遺伝子の発現が恒常的に低いことも見出され、アルコール発酵の抑制と関連していることが推測された。以上の結果を考え合わせると、バクテリアの存在により酵母において形成が促進される[*GAR*<sup>+</sup>]は、酵母による急激なグルコース消費を抑えると共に、グルコース以外の炭素源の資化を誘導することで、酵母とバクテリアが共存しやすい環境の維持に貢献しているのかもしれない。



---

# 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

---

2018 年度日本農芸化学会関西支部大会の開催にあたり、下記の企業様には飲料協賛をいただいております。篤く御礼申し上げます。

サントリー食品インターナショナル株式会社

ハウスウェルネスフーズ株式会社

50 音順 敬称略

---

---

## 2018 年度日本農芸化学会関西支部大会実行委員会

### 実行委員長

鈴木 秀之

### 庶務

北島 佐紀人

### 実行委員

秋野 順治

片岡 孝夫

麻生 祐司

長岡 純治

### 連絡先

〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎橋上町 1

国立大学法人 京都工芸繊維大学応用生物学系

E-mail: [kit2018@kit.ac.jp](mailto:kit2018@kit.ac.jp)

Tel: 075-724-7763 (鈴木) または 075-724-7791 (北島)

---

○次回例会（第 506 回）予定

日時：2018 年 12 月 1 日(土)

会場：神戸大学

講演申込締切：2018 年 11 月 2 日（金）

講演要旨締切：2018 年 11 月 9 日（金）

問い合わせ先：〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1

神戸大学大学院農学研究科

山内 靖雄

E-mail: yamauchi@kobe-u.ac.jp

Tel & Fax: 078-803-5886

---

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：2018 年 9 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/