日本農芸化学会関西支部
第 506 回講演会

講演要旨集

日時：２０１８年１２月１日（土）

会場：神戸大学農学部 C101 講義室

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

50 音順　敬称略

プログラム

●開会の辞（13：25 ～ 13：30）

●一般講演（13：30 ～ 15：50）

1.　（13：30 ～ 13：43）

ゲノム編集技術を用いた *16DOX* 遺伝子の破壊による有用形質ジャガイモの作出

○藤本大輝[1]，中安大[2]，安本周平[1]，澤井学[1]，李榮宰[1,2]，水谷正治[2]，刑部祐里子[3]，刑部敬史[3]，梅基直行[4]，斉藤和季[4]，村中俊哉[1]

（[1]阪大院・工，[2]神戸大院・農，[3]徳島大院・生物資源，[4]理研・CSRS）

2.　（13：43 ～ 13：56）

セミの抜け殻が植物の生育に及ぼす影響

○梅澤高徳，坂本克彦

（神戸大院・生命機能）

3.　（13：56 ～ 14：09）

昆虫における P450 遺伝子の発現に及ぼす摂食の影響

○　岩井酉樹，坂本克彦

（神戸大院・生命機能）

*4.　（14：09 ～ 14：22）

摘果柿に含まれる AGEs 生成阻害物質の探索

○大西夏実，飯田彰，澤邊昭義

（近畿大院・農）

*5.　（14：22 ～ 14：35）

Aβ42 毒性オリゴマーの細胞内標的タンパク質と作用機序

○片岡翔太郎[1]，村上一馬[1]，徳田真樹[1]，泉俊輔[2]，入江一浩[1]

（[1]京大院・農，[2]広大院・理）

休憩 10 分（14：35～ 14：45）

*6.　（14：45 ～ 14：58）

ジュンサイ抽出液からのヒト免疫不全ウイルス 1 型逆転写酵素阻害物質の精製

○石塚啓子[1]，　角江亮太[1]，　馬場美聡[1]，　西村耕作[1,2]，　畠恵司[3]，　高橋砂織[3]，作田庄平[4]，　兒島憲二[1]，　滝田禎亮[1]，　保川清[1]

（[1]京大院・農，　[2]公財・東洋食品研，　[3]秋田総合食品研セ，　[4]帝京大・理工）

*7.　(14：58 ～ 15：11)

毛状根培養系を利用したジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の探索

○清水宏祐[1]，増田裕貴[1]，李榮宰[1]、秋山遼太[1]，坂田至[2]，串田篤彦[2]，奈良部孝[2]，谷野圭持[3]，松木田聖士[4]，井上勉[4]，杉本幸裕[1]，水谷正治[1]

([1]神戸大院・農，[2]農研機構・北農研，[3]北大院・理，[4]日本曹達)

*8.　(15：11 ～ 15：24)

褐藻主要炭素源アルギン酸のモノマー化戦略

○中田翔太[1]，平山　誠[1]，村田幸作[2]，橋本　渉[1]，河井重幸[1,3]

([1]京大院・農，[2]摂南大・理工，[3]現石川県立大)

*9.　(15：24 ～ 15：37)

***Aspergillus glaucus* MA0196 由来ハイマンノース型アスパルティックプロテアーゼの糖鎖の生理学的意義**

○林理希[1]，仙波弘雅[1]，木村行宏[1]，横田仁子[2]，土居幹治[2]，吉田健一[3]，竹中慎治[1]

([1]神戸大院・農，[2]マルトモ（株），[3]神戸大院・イノベ)

*10.　(15：37 ～ 15：50)

酸化ストレス応答に関わる 2-hexenal 受容体のスクリーニング

○宮本亜夜[1]，山内靖雄[2]，水谷正治[2]，杉本幸裕[2]

([1]神戸大・農，[2]神戸大院・農)

（＊印は農芸化学会関西支部若手優秀発表賞対象講演）

休憩 15 分（15：50～ 16：05）

●特別講演（16：05 ～ 17：15）

◇農芸化学奨励賞受賞講演

極限環境微生物のエネルギー変換に関する生化学および熱力学的解析

若井 暁（神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科）

◇農芸化学女性企業研究者賞受賞講演

清酒副産物の機能性ペプチドに関する研究

堤 浩子（月桂冠）

●優秀発表賞（支部長推薦）および優秀発表賞（賛助企業推薦）表彰式（17：15 ～ 17：25）

●懇親会（17：50 ～ 20：00）

会場：神戸大学アカデミア館 3 階「さくら」

一般講演

1 ゲノム編集技術を用いた *16DOX* 遺伝子の破壊による有用形質ジャガイモの作出

○藤本大輝[1]、秋山遼太[2]、中安大[2]、安本周平[1]、澤井学[1]、李滎宰[1,2]、刑部祐里子[3]、刑部敬史[3]、梅基直行[4]、斉藤和季[4]、水谷正治[2]、村中俊哉[1]
（[1]阪大院・工、[2]神大院・農、[3]徳大院・社会産業理工、[4]理研・CSRS）

【目的】

ジャガイモは、不適切な保管下において、ソラニンやチャコニンといったステロイドグリコアルカロイド（SGAs）と呼ばれる特化（二次）代謝産物を蓄積する。この SGAs は毒性があり、誤って多量に摂取してしまうと、えぐ味の原因となるだけでなく、食中毒を引き起こす。そのため、ジャガイモの SGAs を低減させる研究がなされてきた。私たちは、SGAs の前駆体であるコレステロールの合成にかかわる酵素遺伝子 *SSR2* を TALEN を用いて破壊することにより、SGAs が大幅に減少したゲノム編集植物の作出に成功している（Sawai, Ohyama et al. 2014）。また、RNAi による遺伝子抑制実験において、SGAs 生合成遺伝子 *16DOX* の発現量を抑制したところ、SGAs の低減とともに萌芽抑制という興味深い表現型が観察された（Nakayasu et al. 2017）。萌芽抑制は塊茎の保存期間を大きく伸ばすことができるため、ジャガイモ産業において、非常に有用な形質である。このような萌芽抑制が、*16DOX* 遺伝子の発現量低下により誘発されているのか、あるいは特定の品種でのみ観察されることであるのか、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では、RNAi で見られた有用な形質（低 SGAs 含量、萌芽抑制）が、ゲノム編集技術を用いて *16DOX* 遺伝子を破壊することによっても起こるのか、また、品種依存的であるかどうかの確認を目指した。ゲノム編集植物においても、有用な表現型が観察される場合、自殖等によりゲノム編集カセットを脱落させた、遺伝子組み換え植物に相当しない有用なジャガイモの作出につながると考えている。

【方法・結果】

16DOX 遺伝子を破壊するゲノム編集ツールとして、本研究では TALEN と CRISPR/Cas9 を用いた。それぞれのゲノム編集ツール発現ベクターを構築し、アグロバクテリウム法にて、ジャガイモ植物体の形質転換を行い、得られた再分化個体の解析を行った。まず、先行研究と同じ品種（サッシー）において、TALEN を用いてジャガイモ形質転換を行った。その結果、1 ラインのゲノム編集植物が得られた。さらに、日本において広く栽培・利用されている品種（さやか）を用いてジャガイモ形質転換を行った。その結果、CRISPR/Cas9 を用いることにより、複数ラインのゲノム編集植物が得られた。これらのゲノム編集植物の SGAs 含量を LC-MS にて測定したところ、非形質転換植物に比べて大幅な SGAs 含量の低下を示す個体が確認された。現在、萌芽抑制試験のために必要となる塊茎の生育を進めている。本研究の一部は内閣府戦略的イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」（管理法人：生研支援センター）によって実施された。

2　セミの抜け殻が植物の生育に及ぼす影響

○梅澤高徳、坂本克彦
（神大院・農）

【目的】

昆虫の死体が栄養となることで植物の生長に寄与することが知られている。例えば、高密度で現れたセミ成虫の死体は、窒素源として植物に利用されることで、窒素循環の一端を担っていると言われている。しかし、昆虫が脱皮した際に残す抜け殻による作用についてはあまり調べられていない。本研究では、セミの抜け殻が植物の生育に及ぼす影響とその作用機構を調べることを目的とする。

【方法・結果】

セミの抜け殻の粉末を加えた土壌で3週間生育させたコマツナの地上部乾燥重量を測定することによって、抜け殻が植物の生育に及ぼす影響を調べた。まず、抜け殻の投与量に依存して、コマツナの生長促進が起こることが分かった。生長促進に抜け殻の生物的要因が関わっているかを調べるために、滅菌した抜け殻を加えた土壌でコマツナの生育をおこなった。滅菌した抜け殻でも効果は変わらなかったことから、生長促進は抜け殻の構成成分に起因すると考えられる。そこで、肥料元素の中で昆虫に高い割合で含まれることが知られる窒素に着目して、セミの抜け殻の窒素含有率を測定すると、7.5％であった。セミの抜け殻の窒素成分が植物の吸収できる形態にまで分解されているかを調べるために、土壌中の無機態窒素量を経時的に測定した。抜け殻を加えた土壌では、生育開始から2週間目の時点で無機態窒素量が増加していたことから、抜け殻の窒素成分の分解が進んでいることが示唆された。セミの抜け殻由来の窒素が吸収されているかを調べるために、コマツナと抜け殻において、^{15}Nと^{14}Nの存在比である窒素安定同位体比（δ^{15}N値）を測定した。コマツナのδ^{15}N値は、抜け殻を加えていない方が6.139‰だったのに対して、加えた方は0.054‰と低かった。また、抜け殻のδ^{15}N値は1.965‰だった。^{15}Nに比べて^{14}Nは分解速度が速いため、土壌中の抜け殻から先に無機化された窒素は^{14}Nの割合が多くなり、結果的に抜け殻自体よりもδ^{15}N値が低くなると考えられる。抜け殻を加えたコマツナはこの抜け殻由来の無機態窒素を吸収したために、δ^{15}N値が低くなったと推測される。このことから、コマツナは抜け殻由来の窒素を吸収していることが示唆された。

以上の結果から、セミの抜け殻に含まれる窒素により、植物の生長が促進することが示唆された。セミの抜け殻に関わらず、昆虫の抜け殻は自然界で多く排出されていると考えられる。そのため、生態系では昆虫の死体だけではなく、抜け殻も窒素源として利用され、窒素循環に重要な役割を果たしていることが推測される。

3　昆虫における P450 遺伝子の発現に及ぼす摂食の影響

○岩井酉樹、坂本克彦
（神大院・農）

【目的】

昆虫を含むほぼすべての生物に存在するP450遺伝子は、体内で解毒代謝を担っている。摂食行動は毒素が体内に侵入する機会であり、代謝を誘導する重要な行動であると考えられる。昆虫は農業被害を引き起こすなど経済的に重要である。しかし、昆虫における農薬等の解毒代謝と摂食行動の関係は調べられていない。そこで、チョウ目昆虫のモデル生物であるカイコを用いてP450遺伝子の発現と摂食の関係を調べた。

【方法・結果】

カイコを絶食群（18 時間絶食）と自由摂食群に分けて中腸を取り出し、ペルメトリン代謝に作用すると示唆されている *Cyp18a1*、*Cyp6b29*、*Cyp4g25*、*Cyp302a1* の4遺伝子について PCR で発現量を定量した。*Cyp18a1*、*Cyp6b29* は絶食群で有意に発現量が下がったが、*Cyp4g25*、*Cyp302a1* は絶食の影響を受けなかった。また、変化があった2遺伝子について詳細な実験を行った結果、絶食開始後 6 時間で低い発現量で安定し、12 時間絶食した後に餌を与えた場合は、6 時間で自由摂食群と同程度の発現量に戻ることがわかった。次に脂肪体、マルピーギ管、絹糸腺、精巣といった中腸以外の組織においての摂食群と絶食群（18 時間絶食）の発現量を比較した。その結果、絶食によって *Cyp18a1* は脂肪体や精巣でも発現が下がり、*Cyp6b29* は脂肪体では逆に発現が上がっていることがわかった。農薬塗布実験を行ったところ、自由摂食群と絶食群（12 時間絶食）で感受性の差はなかった。発現変化のメカニズムに脳からのシグナルが関与しているかを確かめるため、断頭個体を用いて実験を行った。*Cyp18a1* の中腸での発現減少は絶食個体と同様に起こったが、*Cyp6b29*の脂肪体での発現増加は断頭個体では起こらないことがわかった。これらの結果から脳からのシグナルが脂肪体での *Cyp6b29*の発現変化に関与していることが示唆された。これまでの実験で摂食により発現が増加する遺伝子や発現が減少する遺伝子があり、一部の変化が脳により制御されている可能性があることがわかったが、その詳細はまだ分からない部分も多い。今後は摂食のどの要素（咀嚼行動、腸内膨圧など）が P450 遺伝子の発現変化を引き起こすのかを調べていく。

*4 摘果柿に含まれる AGEs 生成阻害物質の探索

○大西夏実，飯田彰，澤邊昭義
（近畿大院・農）

【目的】

本研究では柿（*Diospyros kaki* ）の栽培工程の1つである摘果によって切り落とされる果実（ここでは摘果柿とする）を使用した．摘果柿は切り落とされたらそのまま地面に放置されてしまうので，本来は廃棄される未利用資源である摘果柿を有効利用することを本研究の目的としている．

そこで本研究では，抗糖化に着目し，疾病および老化の進行を防ぐことを目的とし摘果柿に含まれる成分のAGEs生成阻害活性について検討したので報告する．

【方法・結果】

渋柿は刀根早生(6.33kg)，甘柿は富有(6.50kg)の摘果柿を使用した．刀根柿の抽出物の分離を進め，3種の成分を単離した．NMR，MSの各スペクトルの結果から，4-(2-*O*-glucopyranosyl ethyl)phenol [**1**],Gallic acid [**2**], Betulinic acid [**3**]の3つの化合物が同定された．

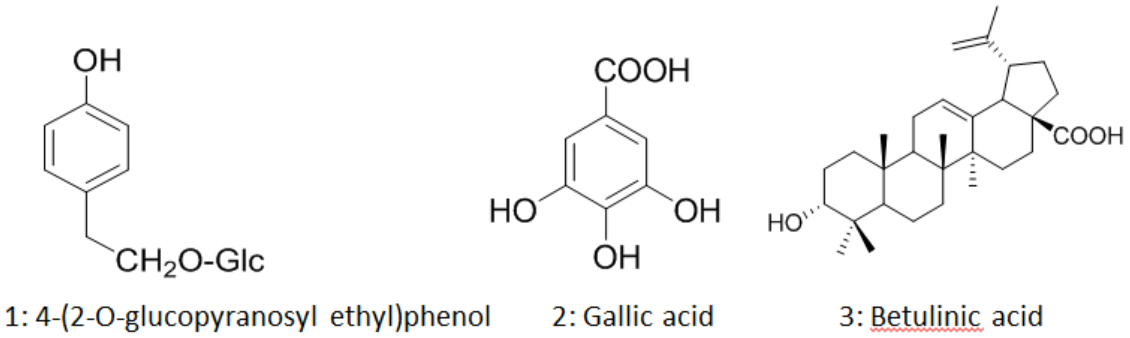


Fig. 1 Structures of isolated compounds

単離した化合物においてAGEs生成阻害活性試験(Table 1）を測定した結果，ポジティブコントロールのaminoguanidineと比較して，化合物**3**は非常に高い阻害活性を示した．

Table 1 IC_{50} value of AGE inhibitory activity

Compound	IC50 (mM)
aminoguanidine (positive)	0.21
1: 4-(2-O-glucopyranosyl ethyl)phenol	0.48
2: Gallic acid	0.39
3: Betulinic acid	0.17

*5 Aβ42 毒性オリゴマーの細胞内標的タンパク質と作用機序

○片岡翔太郎[1], 村上一馬[1], 徳田真樹[1], 泉 俊輔[2], 入江一浩[1]
([1]京大院・農, [2]広大院・理)

【目的】 アルツハイマー病の原因物質の一つである 42 残基のアミロイド β タンパク質(Aβ42)は, 凝集(オリゴマー化)することによって神経細胞毒性を示す. 本研究グループの入江らは, Aβ42 の 22, 23 番目のアミノ酸残基付近におけるターン構造を特徴とした「毒性コンホマー」の存在を明らかにし, 本コンホマーがオリゴマー化しやすいことを提唱した(毒性配座理論).[1] これまでに Aβ42 の毒性オリゴマーは細胞内に蓄積しやすいことを報告したが,[2] 先行研究で報告されている Aβ42 の標的分子は細胞膜上に存在するものが多く, 細胞内における標的タンパク質およびその作用機序については不明な点が多い. そこで本研究では, 毒性オリゴマーを形成しやすい Aβ42 の 2 量体モデル[3] を用いて, ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) の細胞質抽出液から標的タンパク質の探索を行うとともに, その作用機序を系統的な siRNA 実験によって調べた.

【方法・結果】 毒性コンホマーを形成しやすい E22P-Aβ42 について, オリゴマー形成に重要な C 末端コア内の Val40 において, L,L-2,6-diaminopimelic acid (DAP) で架橋した 2 量体モデル[3] をビオチン標識することにより, 毒性オリゴマーの最小構成単位を模した分子プローブとした(下図). 本プローブを 24 時間インキュベーションしてオリゴマー化(6 量体以上)させたものを, SH-SY5Y 細胞の細胞質抽出液と反応させた後, アビジン修飾した磁性ビーズを用いて結合タンパク質を回収した. 結合タンパク質を電気泳動で分離し, バンドを MS/MS 解析したところ, 毒性オリゴマーに結合する複数の標的タンパク質候補を得た. これらのタンパク質 5 種に関する siRNA を用いて, それぞれ系統的にノックダウンした SH-SY5Y および SK-N-SH 細胞を用いて MTT 試験を行ったところ, RNA 結合タンパク質である HuC/D のノックダウン細胞を使った時のみ Aβ42 による神経細胞毒性が有意に緩和された. さらに, SH-SY5Y 細胞を Aβ42 で処理すると, HuC/D の発現量が有意に増加していることが判明した. 以上の結果より, Aβ42 オリゴマーは HuC/D に結合, 安定化させることによって, 神経細胞毒性を誘発していることが示唆された.

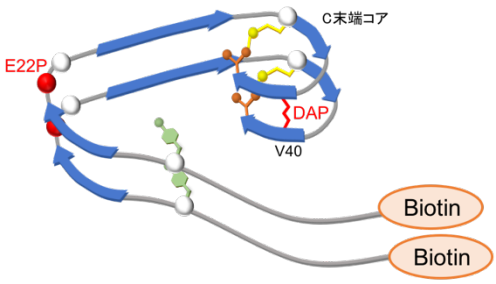


図. Aβ42 の毒性ダイマープローブ

1) Masuda, Y. *et al*., ***ChemBioChem*** 10: 287-295, 2009.
2) Murakami, K. *et al*., ***ACS Chem. Neurosci.*** 1: 747-756, 2010.
3) Murakami, K. *et al.*, ***Sci. Rep.*** 6: 29038, 2016.

*6 ジュンサイ抽出液からのヒト免疫不全ウイルス 1 型逆転写酵素阻害物質の精製

○石塚啓子[1]、角江亮太[1]、馬場美聡[1]、西村耕作[1,2]、畠恵司[3]、
高橋砂織[3]、作田庄平[4]、兒島憲二[1]、滝田禎亮[1]、保川清[1]
([1]京大院・農、[2]公財・東洋食品研、[3]秋田総合食品研セ、[4]帝京大・理工)

【目的】

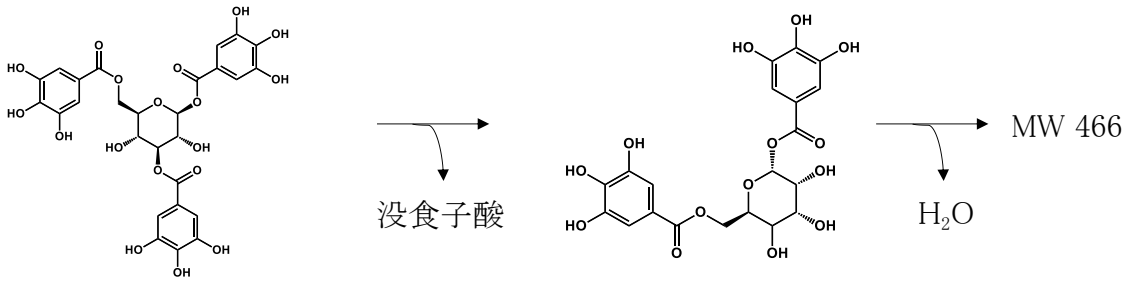
ヒト免疫不全ウイルス 1 型逆転写酵素(HIV-1 RT)は AIDS 薬剤治療の主要な標的である。薬剤耐性を有する変異型 HIV-1 株の出現が治療を困難にしており、新たな阻害剤が求められている。我々は 25 種類の野菜や果物の抽出液について、HIV-1 RT に対する阻害効果を調べ、ジュンサイ抽出液が高い阻害活性を有することを報告した[1,2)]。本研究の目的は、本阻害活性成分を精製し、同定することである。

【方法・結果】

1. HIV-1 RTの調製:大腸菌BL21(DE3)にHIV-1 RT p51発現プラスミドとp66発現プラスミドをそれぞれ導入し、発現後、菌体破砕物を混合し、p51/p66を精製した。

2. 阻害成分の精製:ジュンサイ熱水抽出液を逆相クロマトグラフィー (Sep-Pak C-18 (Waters) および Capcell-Pak C18 (資生堂)) にかけた。各フラクションのHIV-1 RTによるpoly(rA)-p$(dT)_{15}$への[^{3}H]標識dTTPの取り込みに対する阻害活性を測定し、阻害成分を精製した。

3. LC-Q-Tof/MS分析:LC-20A (島津製作所) とmicrOTOF-QⅡ (Burker Japan) を用いた。5種類の化合物が阻害活性の高い画分にのみ検出された。この5種類の化合物の構造をCompass Data Analysis (Bruker Japan) を用いて解析した結果、3種類の化合物について下図に示す関係が示唆された。



【文献】 1. Hisayoshi et al. (2014) *J. Biol. Macromol.* 14, 59-65
2. Hisayoshi et al. (2015) *J. Nat. Med.* 69, 432-440

*7 毛状根培養系を利用したジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の探索

○清水宏祐[1]、増田裕貴[1]、李榮宰[1]、秋山遼太[1]、坂田至[2]、串田篤彦[2]、奈良部孝[2]、谷野圭持[3]、松木田聖士[4]、井上勉[4]、杉本幸裕[1]、水谷正治[1]
（[1]神戸大院・農、[2]農研機構・北農研、[3]北大院・理、[4]日本曹達）

【目的】

ジャガイモシストセンチュウ（yellow potato cyst nematode（*Globodera rostchiensis*）、以下、Gr）はジャガイモやトマトの根に寄生し大幅な減収を引き起こす重大害虫である。Gr雌成虫は自身の体内に産卵し数百の卵を抱えた包嚢（シスト）となり土壌中に定着する。シストは10 年以上も休眠状態で長期生存可能であり、シスト内の卵は寄主作物から分泌される孵化促進物質に対して特異的に反応して孵化する。これまでに、寄主植物に特異的な孵化促進物質としてジャガイモ水耕液からソラノエクレピンA が単離同定されているが、分析化学的に検出した報告例はない。一方、ナス科植物はステロイドグリコアルカロイド（SGA）を多量に生合成し茎葉や果実に蓄積しているが、根から土壌や水耕液中に一部排出されることが知られている。そこで、本研究では毛状根培養系を利用して、(1)ソラノエクレピンAの探索と、(2)SGAのGr卵への孵化促進活性の解析を行った。

【方法・結果】

(1)ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）およびトマト（*S. lycopersicum*）の無菌毛状根培養液について、Gr卵を用いたバイオアッセイ法により孵化促進活性を評価した結果、両培養液は高い活性を示した。次に、培養液を固相カラムに供して分画した結果、主な活性は、SEA標品が検出される画分とは異なる画分に検出されたため、ソラノエクレピンAとは異なる新規な孵化促進物質の存在が示唆された。

(2)各毛状根の培養液についてLC-MSによりSGAを分析した結果、ジャガイモ毛状根培養液中にはα－ソラニンとα－チャコニン、トマト毛状根培養液中にはα－トマチンを検出した。そこで、Gr卵に対して各SGA標品を供試したところ、有意な孵化促進活性を示すことが明らかとなった。次に、各SGAのアグリコンであるソラニジンとトマチジンを供試したところ、これらのアグリコンは孵化促進活性を全く示さなかった。以上の結果から、ステロイド骨格の3位水酸基に結合する糖鎖部分が孵化促進活性に大きな影響を与えていることが示唆された。一方、各培養液は、SGA含量から推定されるよりも非常に高い孵化促進活性を示すことから、毛状根培養液中にはSGA以外の高活性物質が存在することが示唆された。

本研究は農研機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業（うち先導プロジェクト）」の支援を受けて行った。

*8 褐藻主要炭素源アルギン酸のモノマー化戦略

○中田翔太[1]、平山　誠[1]、村田幸作[2]、橋本　渉[1]、河井重幸[1,3]
([1]京大院・農、[2]摂南大・理工、[3]現石川県立大)

【背景と目的】

長大な海岸線を有する日本では、褐藻などの海洋バイオマスを原料とした有用化合物の生産技術の開発が重要である。当研究室では、高い発酵能を有する出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*を用いて、褐藻の主要炭素源である多糖アルギン酸から有用化合物を生産することを目指している。高分子アルギン酸をエキソ型アルギン酸リアーゼにより分解するとモノマー化し、モノウロン酸である4-deoxy-L-*erythro*-5-hexoseulose uronate (DEH) が生成する。これまでに、DEHの反応特性の解明[1)]とDEH資化能を付与した出芽酵母の作出[2)]に成功しており、本酵母をDEHまたはアルギン酸を炭素源とするバイオリファイナリーに利用しようと試みている。

DEH資化能を付与した出芽酵母を用いてアルギン酸から有用化合物を生産するためには、高分子のアルギン酸をモノマー化する必要がある。この時、①「精製酵素を用いて予めアルギン酸をモノマー化する」、または②「DEH資化能を付与した出芽酵母に自らアルギン酸をモノマー化させる」という戦略が考えられる。本研究では、①精製エキソ型アルギン酸リアーゼAtu3025を用いるDEH調製 (アルギン酸モノマー化)の高効率化、及び②アルギン酸を自らモノマー化し生育できる出芽酵母の育種を目指した。

【方法と結果】

① MOPS緩衝液 (pH 7.0) を反応液に添加すると、非添加の時と比較してAtu3025が多くのアルギン酸をモノマー化してDEHを生成することを見いだした。さらに、MOPS緩衝液 (pH 8.0) 及びMES緩衝液 (pH 7.0) によってもAtu3025によるアルギン酸のモノマー化は同様に促進された。また、Atu3025と共に精製エンド型アルギン酸リアーゼA1-Iを作用させると、さらに多くのアルギン酸がモノマー化され、アルギン酸のモノマー化効率が従来法よりも約2.3倍向上した。

② DEH資化能を付与した出芽酵母に細胞外でAtu3025を分泌発現させることによって、アルギン酸を自らモノマー化して生育できる出芽酵母の育種を試みた。そのため、シグナル配列(*Rhizopus oryzae*由来グルコアミラーゼのシグナル配列)をAtu3025のN末端に付加したが、細胞外でのAtu3025の発現は確認できなかった。他方、シグナル配列だけでなく糖鎖付加領域なども含めたフュージョンパートナーを目的タンパク質のN末端に付加することにより、出芽酵母の細胞外への分泌が促進されることがBaeらにより報告された[3)]。本法を適用したところ、アルギン酸を資化できないが、オリゴアルギン酸を資化できる出芽酵母が得られた。さらに、本酵母を改変し、細胞外でエンド型アルギン酸リアーゼA1-Iも発現させたところ、アルギン酸を単一炭素源とする培地で生育できるようになった。すなわち、アルギン酸を自らモノマー化し資化できる出芽酵母の育種に成功した。

【参考文献】

1) 中田ら. (2018) . 日本農芸化学会2018年度大会. 講演番号 2A10a14.
2) F. Matsuoka *et al*. (2017). *Sci. Rep.* 7, 4206, DOI:10.1038/s41598-017-04481-3.
3) J. H. Bae *et al*. (2015). *Sci. Rep.* 5, 12229, DOI: 10.1038/srep12229.

*9 *Aspergillus glaucus* MA0196 由来ハイマンノース型アスパルティックプロテアーゼの糖鎖の生理学的意義

○林理希[1]、仙波弘雅[1]、木村行宏[1]、横田仁子[2]、土居幹治[2]、吉田健一[3]、竹中慎治[1]
([1]神戸大院・農、[2]マルトモ(株)、[3]神戸大院・イノベ)

【目的】

我々は、かつお節かび付けに伴う色相変化の機構を明らかにすることを目的とし、かび付けに用いられる*Aspergillus*属糸状菌の生成する脱色因子の特性解析を行い、アスパルティックプロテアーゼが脱色に関与していることを明らかにした[1, 2]。分離株の中で*A. glaucus* MA0196株は、MY20培地で培養するとハイマンノース型の糖鎖を有するアスパルティックプロテアーゼ (PepA_MA0196) を分泌することがわかっているが[3]、同酵素の一次構造の詳細や糖鎖の生理学的意義は明らかではない。そこで、遺伝子クローニングと*Pichia pastoris*による組換え酵素および変異酵素の異種発現を行い、糖鎖の有無を変化させた酵素の特性解析を行ったので報告する。

【方法・結果】

酵素遺伝子のORFは1,367 bpで、4つのエキソンと3つのイントロンから構成されていた。cDNAから推測されるPepA_MA0196のアミノ酸配列は、20アミノ酸残基からなるシグナル配列を含む396アミノ酸残基からなると推定した。また、推定アミノ酸配列中にはN結合型糖鎖の付加に必要とされているコンセンサス配列 (Asn-X-Ser/Thr) が2カ所見られた。つづいて、親株酵素と、コンセンサス配列中のAsnをGlnに置換した一重および二重変異酵素を*P. pastoris*-pPICZαA発現系にて分泌生産させ、いずれもN型糖鎖修飾された活性体を得ることができた。精製酵素をPNGase FおよびEndo Hで処理して糖鎖を切断し、SDS-PAGEに供すると、約40 kDaのバンドが見られた。PepA_MA0196は変異酵素と比較すると、幅広いpH条件下(pH 2.5～5.5)で活性を維持していた。また、PepA_MA0196は熱に対してより高い安定性(～55℃)を示し、40℃で1週間放置しても50%以上の残存活性があった。さらに、反応系にグリセロールを加えた低水分活性下(～58% (w/v) ≒ Aw=0.815)においても、PepA_MA0196は二重変異酵素と比較してより高い活性を示した。PepA_MA0196にとり糖鎖の付加は、様々な環境因子に対する安定性や耐性能に寄与していると考えられる。

1) J. Sci. Food Agric. 93:1349-1355, 2013; 2) J. Sci. Food Agric. 97:95-101, 2017; 3) J. Sci. Food Agric. 2018 (https://doi.org/10.1002/jsfa.9339)

*10 酸化ストレス応答に関わる2-hexenal受容体のスクリーニング

○宮本亜夜[1]、山内靖雄[2]、杉本幸裕[2]、水谷正治[2]
（[1]神戸大・農、[2]神戸大院・農）

【目的】

植物は日々様々なストレスを受けている。その中でも、高温、強光、乾燥といった環境ストレスを受けると葉緑体内で活性酸素種(ROS)が発生し、酸化ストレスが併発する。ROS は反応性が高く、近傍に存在するチラコイド膜の構成成分である多価不飽和脂肪酸を攻撃し、低分子化合物を生成する。生成した化合物のうち 2-hexenal を始めとする短鎖 α,β-不飽和カルボニル化合物は反応性短鎖緑葉揮発化合物(RSLV)と呼ばれ、高温、酸化ストレス応答遺伝子群の発現を誘導することが知られている。本研究室では酸化ストレス応答に着目し、RSLV が揮発性物質であることから、哺乳類における嗅覚受容機構を参考に、2-hexenal 受容から酸化ストレス応答遺伝子発現誘導までの情報伝達経路の探索を行ってきた。その結果、シロイヌナズナにおいても 2-hexenal の情報伝達経路に、哺乳類の嗅覚伝達経路と同様の、アデニル酸シクラーゼ、cAMP、細胞質内[Ca^{2+}]の一過的上昇の関与が示唆されてきた。このことから、本研究では 2-hexenal の受容体においても哺乳類の嗅覚受容体と類似した 7 回膜貫通(7TM)タンパク質が関与していると仮定し、シロイヌナズナにおいて 2-hexenal 受容に関わる 7TM タンパク質のスクリーニングを行うことを目的とした。

【方法・結果】

2-hexenal受容体のスクリーニングのために、シロイヌナズナ7TMタンパク質のT-DNA挿入による欠損変異株全33系統に対し2-hexenal処理を行い、酸化ストレス応答遺伝子(*ZAT10*)発現の誘導を確認する実験をRT-PCRを用いて行った。その結果、Cand8と呼ばれるタンパク質の欠損変異株において、2-hexenal処理後の*ZAT10*誘導能が野生株に対して有意に低くなっていることが明らかとなった。Cand8はGタンパク質と相互作用する7TMタンパク質である。そこで、Cand8が細胞内へシグナルを伝達する2-hexenal受容体であることを確認するため、昆虫細胞膜上でCand8と、それと相互作用すると考えられるGタンパク質であるGPA1の融合タンパク質を発現させた。これに対し2-hexenal処理によるGDPとGTPの交換反応を、[^{35}S]GTPγSを用いて解析した結果、2-hexenal濃度依存的にGTP交換活性が増加した。これにより、Cand8がシロイヌナズナの2-hexenal情報伝達経路において受容体として機能していることが示唆された。

特別講演

特別講演 2018 年度 農芸化学奨励賞

極限環境微生物のエネルギー変換に関する生化学および熱力学的解析

若井 暁 （神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科）

地球上には温度、塩濃度、pH、圧力など、かなり厳しい物理化学条件に曝される環境が存在し、そのような環境に生育する微生物は極限環境微生物と呼ばれる。どのような過酷な環境に細胞が置かれようとも、そこで生命が活動しているのであれば、生命の定義の一つであるエネルギー獲得は必ず行われている。私は、生物のエネルギー獲得（変換）の限界を知ることは、生命の限界を知ることでもあると考えており、極限環境微生物がその種々の過酷な環境で行っているエネルギー獲得に興味を持っている。本発表ではこれまで携わってきた各種極限環境微生物（高度好塩性菌、好酸性菌、好熱菌、好冷菌など）に関する研究と、現在進めている難変換エネルギーを利用する微生物についての研究、極限環境微生物由来酵素をベースとした酵素改変について一部を紹介する。

1. 高度好塩性菌のエネルギー変換に関する熱力学的解析

生体内のエネルギー変換において、ATP はエネルギー通貨とも呼ばれ、外部から獲得したエネルギーはATPに変換され、様々な生体内の反応にATPが使用されていることは多くの方が知っているはずである。一方で、この ATP は高エネルギーリン酸化合物の一つであるが、ATP のもつ高エネルギーリン酸結合の開裂が、なぜ大きな自由エネルギー変化につながるのかを説明できる人は少ないように思う。その加水分解エネルギーの起源については、教科書にも書かれてあるのでそのおさらいと、高塩環境で高エネルギーリン酸化合物を加水分解した時のエンタルピー変化（反応熱）について、高度好塩性菌由来の酵素反応を等温滴定マイクロカロリメータ（ITC）により測定した研究を通して紹介する。

2. 難変換エネルギーを利用する微生物

次に、珍しいエネルギー獲得系として、通常の微生物がエネルギー源として利用できない固体金属をエネルギー源として使用する微生物について紹介する。固体金属から電子を抜き取ると金属イオンが遊離するため、実環境では金属が腐食するという現象に繋がる。金属が微生物によって腐食する問題は、ヒトが微生物に感染して発症する微生物感染症とよく似ており、金属が罹る微生物感染症として独自のアプローチで研究を展開している。近年明らかになってきた腐食原因菌の反応メカニズムと電子移動の速度について紹介すると共に、このような細胞外の固体基質から直接電子を受け取るエネルギー獲得系と生物界における第三のエネルギー獲得機構の可能性について紹介する。

3. 極限環境微生物由来酵素と計算科学に基づく酵素改変

上記の研究以外にも、好熱菌由来や深海微生物由来酵素研究を実施しており、酵素の適応戦略についてそれなりの知識を得てきた。この知識を応用研究に生かす方法として、現在、

酵素の機能改変にそれらの情報を使うと共に、*in-silico* 解析を上手に組み合わせることができないかと画策している。今年、酵素工学分野でノーベル化学賞の受賞もあったので、この機会に現在の自身の研究進捗について紹介する。

最後に、私の研究は、多岐に渡り分散しがちであるが、どこかで繋がっている部分がある。本発表ではその全てを紹介することは難しいが、*Biosci. Biotechnol. Biochem.*誌に Award review としてまとめているので、ご興味があればご一読頂きたい。今後も、微生物を基軸として、基礎から応用まで多岐に渡り少し変わった視点から研究を進めていきたいと考えている。

（参考文献）

1） Wakai S et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2519‐2528, 2004

2） Wakai S et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2735-2742, 2007

3） Wakai S et al., *J. Biol. Chem*., 288, 29247‐29251, 2013

4） Wakai S et al., *Environ. Microbiol. Rep.*, 5, 235‐242, 2013

5） Wakai S et al., *Microb. Ecol.*, 68, 519‐527, 2014

6） Wakai S et al., *Mater. Technol.*, 30(B1), 38‐43, 2015

7） 若井暁、化学と生物、53（8）, 515‐520, 2015

8） Wakai S et al., *Extremophiles*, 21, 471‐477, 2017

9） Kuribayashi T et al., *Extremophiles*, 21, 357‐368, 2017

10） Tsurumaru H et al., *Sci. Rep.*, 8, 15149, 2018

名前：若井暁（WAKAI Satoshi）

連絡先：〒657-8501　兵庫県神戸市灘区六甲台町 1-1

神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科バイオ生産工学研究室

e-mail：wakaists@pegasus.kobe-u.ac.jp

略歴：2000 年 3 月　岡山大学農学部総合農業科学科卒業

2005 年 9 月　岡山大学大学院自然科学研究科エネルギー転換科学専攻博士後期課程修了

2005 年 10 月　（独）製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部研究職員

2009 年 4 月　広島大学大学院生物圏科学研究科　研究員

2013 年 1 月　神戸大学自然科学系先端融合研究環　特命助教

2016 年 4 月　神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科　特命准教授

現在に至る

主な研究テーマ：麹菌による物質生産、酵素改変技術の開発、金属の微生物腐食

特別講演 2018 年度 農芸化学女性企業研究者賞
清酒副産物の機能性ペプチドに関する研究

堤 浩子（月桂冠株式会社 総合研究所）

日本酒は，米を原料とし主に清酒酵母と麹菌の2つの微生物の複雑な代謝を経て得られる発酵産物であり，多くの物質が含まれていることが言われている．発酵が終了し，清酒を絞った後に得られる酒粕は，機能性素材として期待される成分が多く含まれている．酒粕に多く含まれるタンパク質に対し，酵素を用いて分解し酒粕ペプチドの製造方法を検討した．最初に，アンギオテンシン変換酵素（ACE）阻害[1)]に着目し，ACE 阻害活性を有するペプチド粉末として酒粕ペプチドを製造し， ACE 阻害ペプチドの同定を行った[2)]．酒粕ペプチドの ACE 阻害活性以外の機能性（活性）を探索した結果，抗酸化，肝臓保護効果等を有していた．

1）抗酸化ペプチド

酒粕ペプチドの抗酸化活性を 3 種類の方法（リノール酸自動酸化抑制，SOD 様，DPPH 消去能）で測定した結果，2 種類の活性測定（リノール酸自動酸化抑制，SOD 様活性）では，酒粕ペプチドはグルタチオンとほぼ同等の活性を有していた．グルタチオンは抗酸化活性があり，医薬品や機能性食品として知られている．どのようなペプチドが機能を持つのかを調べた結果，酒粕ペプチド中には多種類の抗酸化ペプチドが少しずつ含まれていた．新規ペプチド Ile-Gln-Pro は，ACE 阻害活性および抗酸化活性を有する機能性ペプチドとして見出した[3)]．

2） 酒粕ペプチドの非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）に対する効果[4)]

非アルコール性脂肪肝疾患（NAFLD）は，慢性肝疾患の主要な原因の 1 つとして世界中で増加傾向にある．高脂肪食（HFD）摂食マウスを使用し，酒粕ペプチドの NAFLD 抑制効果を調べた．マウスを用いた試験では，高脂肪食で4週間飼育し，その後「高脂肪食」「高脂肪食に酒粕ペプチドを含む餌」を比較し肝臓の脂肪蓄積を比較した．その結果，酒粕ペプチドを含む餌のグループでは，肝臓の脂質蓄積が抑えられ，インスリン抵抗性および肝臓炎症は，酒粕ペプチドの投与により改善が認められた．よって，酒粕ペプチドにはNAFLD 発症のリスクを低下させることが示された．

2）マウス試験による酒粕ペプチドの肝臓保護効果

酒粕ペプチドの肝臓保護効果をマウス試験により検証した．Balb/c マウス雄 8 周齢を 1 週間予備飼育し，「普通餌（コントロール）」，「コントロール+酒粕ペプチドを含む餌」，「コントロール+酒粕を含む餌」の 3 種類を用いてガラクトサミンによる肝障害誘導し，酒粕の肝機能保護効果を調べた．ガラクトサミンは，肝機能障害を引き起こす化学物質としてすでに知られている．それぞれの肝機能評価については，血清分析し GOT 値，GPT 値を指標とした．その結果，摂取 4 週間，6 週間では酒粕ペプチドを摂取した群では顕著に GOT,GPT 値が低減した（図 4）．また酒粕を含む餌のグループでは，酒粕ペプチドにはガラクトサミン誘導した肝機能障害を保護し，

酒粕そのものにも肝機能保護効果があることを初めて見出した[5].

日本酒中に含まれる成分は 700 種類以上とも言われ，醸造微生物である麹菌と酵母の代謝により，多くの物質が醸造により生成されている結果であろう．醸造食品の機能性の最大の利点は，長い食経験に裏付けられた「安全性」であり，酒粕も長い食経験を有する日本酒の副産物である．これまでに，酒粕にさらなる機能性を見出すため，ペプチドからの探索を行ったが，ペプチドのみならず，酒粕中にはまだまだ，新たな機能の可能性を有するものと考えている．酒粕（醸造食品）が「安心」「安全」「健康」がそろった食品となるには，長い歴史の間に創り上げられた醸造微生物の賜物といえる．今後，発酵という利点を生かすことで，豊かな食生活や健康に寄与できると考えられる．

（参考文献）

1） Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. and Imayasu, S., Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. Biosci. Biotech. Biochem., 58（10）, 1767-1771（1994）

2） 堤　浩子，水本真紀子，大浦　新，アンギオテンシン変換酵素阻害ペプチド．特許第 512893 号．

3） 堤　浩子，大浦　新，秦　洋二，安部泰久，酒粕ペプチドに含まれる抗酸化ペプチドの同定．日本農芸学化学会 2010 年度大会講演要旨集，134（2010）

4） Kubo, H., Hoshi M., Matsumoto T., Irie M., Oura S., Tsutsumi H., Hata Y., Yamamoto Y., Saito K., Sake lees extract improves hepatic lipid accumulation in high fat diet-fed mice. Lipids Health Dis., 16, 106. doi: 10.1186/s12944-017-0501-y.（2017）

5） 堤　浩子，水本真紀子，大浦　新，抗酸化剤及び肝機能障害抑制剤．特許第 5474369 号．

名前：堤　浩子（TSUTSUMI Hiroko）

連絡先：京都市伏見区下鳥羽小柳町101番地

月桂冠株式会社　総合研究所

e-mail：h_tsutsumi@gekkeikan.co.jp

略歴：　1989 年　広島大学工学部　第 III 類（化学系）卒業

1991 年　広島大学大学院　工学研究科　工業化学専攻　修了

1991 年　月桂冠株式会社　総合研究所　研究員

1998 年　同上　副主任研究員

2001 年 4 月　～　2003 年 3 月　独立行政法人　酒類総合研究所　出向（共同研究員）

2003 年 4 月　月桂冠株式会社　総合研究所　副主任研究員

2011 年　同上　主任研究員　　現在に至る

主な研究テーマ：発酵産物の機能性、微生物による物質生産、清酒酵母育種・代謝解析

日本農芸化学会関西支部第 506 回講演会

幹事校　神戸大学大学院農学研究科
代表：　竹中　慎治
庶務：　山内　靖雄

＜お知らせ＞
〇支部参与会は、12:00 から神戸大学農学部 3 階大会議室（A304)にて開催いたします。

〇次回例会（第 507 回）予定
日時：2019 年 2 月 2 日（土）
会場：京都大学
講演申込締切：2018 年 12 月 28 日（金）
講演要旨締切：2019 年　1 月 7 日（月）
問い合わせ先：〒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
木村泰久
E-mail: ykimura@kais.kyoto-u.ac.jp
Tel: 075-753-6469、Fax: 075-753-6104

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 12 月 1 日
庶務幹事：神戸 大朋
E-mail ： kambe1@kais.kyoto-u.ac.jp
Tel: 075-753-6273　Fax: 075-753-6274

会計幹事：岸野 重信
E-mail ： kishino@kais.kyoto-u.ac.jp
Tel: 075-753-6122　FAX: 075-753-6113

支部ホームページ　http://kansai.jsbba.or.jp/