

日本農芸化学会関西支部
第 528 回講演会

講演要旨集

令和 5 年(2023 年)12 月 2 日(土)
神戸大学大学院農学研究科(C101 講義室)

日本農芸化学会関西支部



第 528 回講演会プログラム

●開会の辞(13:00~13:05)

久世 雅樹 開催校幹事代表

●一般講演(13:05~16:15)[講演 10 分、質疑 3 分]

(*印は若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞対象講演)

座長: 林大輝(神大院・農)、水谷正治(神大院・農)

1. ワイン酵母におけるプロリン資化抑制機構
○大井 智樹(奈良先端大・バイオ)
- *2. *Gordonibacter urolithinifaciens* DSM 27213 由来ウロリチン 4 位脱水酸化酵素の解析
○片所 杏野(京都大学大学院農学研究科)
- *3. 大豆発酵過程で *Bacillus subtilis* から産生されるベタインの合成とそれに伴う凝集体の形成
○加古 有宜子(京大院・農)
- *4. バクテリオファージ由来の転写系を利用した酵母遺伝子スイッチの構築
○堀 智彦(神戸大院・科技イノベ)
- *5. リンゴ果実に常在する酵母によるアルコール自然発酵
○敦賀 和輝(京大院・農)
- *6. バイオプラスチック発酵生産中に発見したメンブレンベシクル創発現象
○高 相昊(神戸大院・イノベ)
- *7. ウシグソヒトヨタケがもつ光受容体の分光特性
○伏見 圭司(神戸大・イノベ)

休憩(14:36~14:55)

座長: 藍原祥子(神大院・農)、金丸研吾(神大院・農)

- *8. トマトにおけるノルトロパンアルカロイド生合成の解析
○中江 亜理紗(神大院・農)
- *9. マウス TMC4 はクロライド味の検出に関与する
○眞砂 文(京女大・食)
- *10. 緑藻スジアオノリ由来メラニン形成抑制成分の単離・同定及びメラニン形成抑制メカニズムの解析
○下村 東瑚(大阪公大院・農)
- *11. 加齢による嗅覚関連遺伝子の発現量変化
○星山 佳代(京女大・食)
12. 芳香族炭化水素受容体を介した時計遺伝子の変調は脂肪細胞の脂質代謝に影響を及ぼす
○伊木 日菜子(神戸大院・農)
- *13. 転写因子 FOXO1 活性の抑制を介した筋萎縮抑制効果を持つ食品・植物由来成分の探索
○山本 有紗(京都府大院・生命環境)

優秀発表賞の投票・集計/休憩(16:13~16:30)

●特別講演 農芸化学奨励賞受賞講演(16:30~17:15)

座長:久世 雅樹

酵母におけるアミノ酸の新しい生理機能と代謝調節機構

西村 明(奈良先端大・バイオ/研究推進機構)

●若手優秀発表賞・支部賛助企業特別賞表彰式(17:30~17:45)

●次回関西支部例会アナウンスおよび閉会の辞(17:45~17:50)

森 直樹 日本農芸化学会関西支部 支部長

●懇親会(18:00~) 当日参加費:一般 4,000 円 学生 500 円

学生、教員、研究者、産業人を交えて熱い忘年会を。

農学研究科 A301にて

一般講演

1 ワイン酵母におけるプロリン資化抑制機構

○大井智樹¹、西村 明^{1,2}、高木博史²

(¹ 奈良先端大・バイオ、² 奈良先端大・研究推進機構)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は酒類の醸造において重要な役割を担い、原料中の窒素化合物を資化(取り込み+代謝)することで多種多様な香味成分を生合成する。アミノ酸のプロリンは、ワインの原料であるブドウ中に最も豊富に含まれる窒素源であるが、発酵中の酵母はプロリンをほとんど利用することができず、発酵後も多量に残存することが知られている。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こす。さらに、ブドウ含有窒素源が少ない場合は発酵中の窒素源枯渇を防ぐために、人工窒素源の添加が必要となる。この添加物は、ワインの品質に影響を与えるだけでなく、製造コストの増加要因にもなっている。そのため、プロリン高資化性酵母を育種することで、付加価値の高いワインを作り出すことができる。本研究では、ワイン酵母を用いて、プロリン資化抑制に関与する遺伝子群の探索・解析を行うことで、プロリン資化抑制機構の解明および、プロリン高資化性酵母の構築を目指した。

【方法・結果】

まず、発酵環境下においてプロリン資化の抑制に関与している遺伝子群を探索するために、ワイン酵母のプロリン要求性株を構築した。プロリン要求性株は、ワイン発酵モデル培地である白ブドウ培地でプロリンを資化できず、生育できない。このプロリン要求性株を親株として、白ブドウ培地でもプロリンを資化できる株のスクリーニングを行った。スクリーニングの結果、白ブドウ培地でも生育可能な自然突然変異株が得られ、P1 株と名付けた。P1 株の生育評価を行ったところ、P1 株は白ブドウ培地ではプロリンを資化可能であることが判明した。

次に、プロリン資化抑制の原因遺伝子を同定するために、P1 株の全ゲノム DNA シーケンス解析を行った。その結果、広範なアミノ酸の取り込み活性を有するパーミアーゼ Gnp1 をコードする *GNP1* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う新規なヘテロ変異(570G>A、Met190Ile)を見出した。興味深いことに、変異型 Gnp1 のプロリン取込み活性は野生株と同様であった。また、*GNP1* 変異はワイン酵母においてプロリン資化抑制を解除することがわかったが、実験室酵母のプロリン資化抑制を解除しないことが判明した。以上より、Gnp1 はワイン酵母に特異的なプロリン資化制御因子であり、プロリン取り込み活性以外でプロリン資化抑制を制御している可能性が考えられた。今後は、変異型 Gnp1 の機能解析を行う予定である。

*2 *Gordonibacter urolithinifaciens* DSM 27213 由来ウロリチン 4 位脱水酸化酵素の解析

○片所 杏野¹、渡邊 寛子¹、中島 賢則²、山本 浩明²、
岸野 重信¹、小川 順¹

(¹ 京都大学大学院農学研究科、² ダイセル・事業創出センター)

【目的】

ウロリチンはポリフェノール的一种であり、ザクロなどのベリー類、クルミなどのナッツ類に含まれているエラジタンニンに由来する化合物群である。また、腸内細菌によりエラジタンニンがエラグ酸、さらにウロリチンへと代謝されることが報告されている。ウロリチン類の中でもウロリチン A と B は抗酸化・抗炎症作用を、ウロリチン A はオートファジー活性化作用を示すことから健康増進への寄与が期待されている。

ヒト糞便由来腸内細菌 *Gordonibacter urolithinifaciens* DSM 27213 は、エラグ酸をウロリチン M5 へと変換し、さらにウロリチン M5 を M6、M6 を C へと脱水酸化することが報告されている。これまでの研究で、我々は本菌におけるエラグ酸代謝の初発反応を触媒するエラグ酸ラクトナーゼ UroH を特定した。しかし、次いで起こるウロリチンの脱水酸化に関わる酵素は未解明であった。本研究では、本菌のウロリチン 4 位脱水酸化反応を触媒する酵素群 UroA12 を特定した。

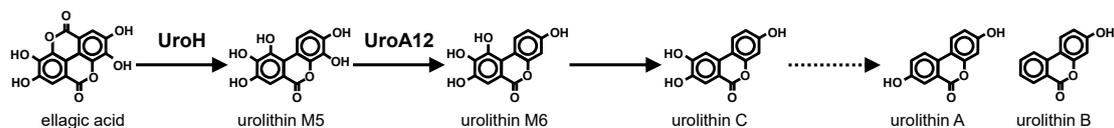


Fig.1 腸内細菌におけるエラグ酸・ウロリチン類の代謝

【方法・結果】

本菌を、エラグ酸添加あるいは非添加培地にて培養し、各条件で得られた菌体のエラグ酸変換活性を比較した。その結果、エラグ酸添加培地で培養した菌体のみによりエラグ酸変換活性を見いだした。これより、本菌のエラグ酸変換酵素はエラグ酸により誘導されることが明らかとなった。次に、プロテオーム解析により誘導菌体と非誘導菌体でのタンパク質の発現を比較したところ、誘導菌体で高発現しているモリブドプテリン含有酵素および鉄硫黄クラスター含有酵素からなるタンパク質群 (UroA12) を見出した。続いて、大腸菌を宿主とする UroA12 の異種タンパク質発現を試みたが、活性は得られなかった。そこで、宿主として放線菌を用い、uroA12 発現形質転換株を作成し休止菌体による活性評価を行った。その結果、ウロリチン M5 からの M6 の産生が観察され、UroA12 がウロリチン 4 位脱水酸化反応に関与することが示された。

*3 大豆発酵過程で *Bacillus subtilis* から産生されるベタインの合成とそれに伴う凝集体の形成

○加古 有宜子、高瀬 隆一、老木 紗予子、小倉 康平、橋本 渉
(京大院・農)

【背景・目的】*Bacillus subtilis* の一種である納豆菌は、その発酵作用により蒸大豆から納豆を生成する。これまでに、*B. subtilis* のバイオフィーム依存的生存様式について報告されている¹⁾。当研究室では納豆菌の大豆上での挙動について解析し、納豆菌のペクチン資化機構などを提唱している²⁾。発酵前後でのメタボローム解析ならびに対数増殖期での納豆菌のトランスクリプトーム解析を実施したところ、発酵に伴うトリメチルグリシン(ベタイン)の蓄積ならびにコリン輸送関連遺伝子群の発現上昇が見られた。そこで本研究では、アミノ酸の一種であるベタインに着目し、納豆菌の大豆発酵におけるベタイン合成経路と、ベタイン産生の生理学的意義の解明を目指した。

【方法・結果】納豆菌を植菌した蒸大豆に含まれるコリンとベタインを、LC-MS/MS(京大北部キャンパス機器分析拠点設備)を用いて経時的に定量した。その結果、納豆菌は対数増殖期後にコリンを消費しベタインを蓄積していた。以降の解析は、一遺伝子破壊株が利用可能な *B. subtilis* 168 株(γ -ポリグルタミン酸(γ -PGA)非産生)を用いた。コリンからベタインアルデヒドを介したベタイン産生を担う酵素 GbsA と GbsB をコードする各遺伝子破壊株を蒸大豆に植菌した際は、コリン消費とベタイン産生が見られなかったことから、大豆発酵過程で生じるベタインはコリンから合成されることが明らかになった。ベタインは菌体内で浸透圧ストレスを低減させると報告されているが³⁾、大豆上での両破壊株の生育菌数は野生株と同等であったため、ベタイン合成は大豆上での生育には必須ではないことが示された。一方で、野生株植菌時のみ、豆表面で凝集体が観察された点に相違が見られた。*gbsB* 破壊株植菌と同時にベタインを外的に添加すると、凝集体形成が復帰した。また、納豆菌植菌時においても、ベタインが菌体外に蓄積していた。以上の結果から、大豆発酵における *B. subtilis* のベタイン依存的な凝集体形成が示唆された。

【結論】本研究により、大豆発酵過程で納豆菌は GbsA と GbsB によりコリンからベタインを合成することを明らかにした。また、ベタインは枯草菌の凝集性を高め、形成された凝集体は大豆上でバイオフィームとして機能する可能性を見いだした。今後、凝集体のベタインや枯草菌バイオフィーム成分の含有量、さらには納豆菌バイオフィームとして既に知られている γ -PGA・レバンとベタインとの関係について解析を進める。

1) Arnaouteli *et al.*, *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 600-614 (2021)

2) Sugiura *et al.*, *Sci. Rep.* 10, 18691 (2020)

3) Nau-Wagner *et al.*, *J. Bacteriol.* 194, 2703-2714 (2012)

*4 ○バクテリオファージ由来の転写系を利用した酵母遺伝子スイッチの構築

○堀 智彦¹、富永将大^{1,2}、梶 亘佑¹、近藤 昭彦^{1,2,3,4}、石井純^{1,2}
(¹神戸大院・科技イノベ、²神戸大・先端バイオ工研セ、³神戸大院・工、⁴理研・環境資源)

【目的】

新規な微生物機能の創出を目指す合成生物学では、細胞内外のシグナル(分子, 熱, 光など)に応答し遺伝子発現を制御する, 人工の制御系(遺伝子スイッチ)が必要不可欠である。しかし, 真核微生物である酵母での遺伝子スイッチの工学研究は, 原核微生物である大腸菌でのそれと比較して遅れている。これは遺伝子スイッチの構成要素である人工プロモータを構築する上で, 転写因子ごとに結合配列の数や位置を調節する必要があり, 合理的な設計が困難なためである。そこで本研究では, 酵母内在の因子と相互作用しないファージ由来の転写系を利用した, 簡便な酵母遺伝子スイッチの作出法の確立を目的とした。

【方法・結果】

1. 研究用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるシンプルな設計の遺伝子スイッチの構築: *Bacteriophage* T7 由来の RNA ポリメラーゼ(T7 RNAP)とそのプロモータ(P_{T7})を導入した酵母遺伝子発現系を利用する。*Pseudomonas protegens* 由来の転写因子(PhIF)は, その結合配列(*phlO*)に結合し下流遺伝子の転写を阻害するが, 誘導物質 2,4-diacetylphloroglucinol(DAPG)が結合すると *phlO* から解離して転写を誘導する。そこで, *phlO* を P_{T7} の下流に配置した人工プロモータ(P_{T7phlO})を T7 RNAP を発現する酵母株に導入した。このプロモータによって発現される緑色蛍光タンパク質(GFP)は, DAPG 非添加時には PhIF により抑制され, DAPG を添加すると最大で 35 倍にまで亢進された。このように, ファージ由来の転写系を利用して, 酵母遺伝子スイッチが容易に作出可能であることを実証できた。さらに, 転写因子とその結合配列, 誘導物質のセットを交換することで, 5 種類の酵母遺伝子スイッチの構築に成功した。

2. メタノール資化酵母における遺伝子スイッチ構築: 上記で構築した遺伝子スイッチを高いタンパク生産能から産業利用が期待される *Komagataella phaffii* へ移植可能か検証した。まず, T7 RNAP と転写因子 rPhIF を発現する *K. phaffii* 株を構築した。この株に *S. cerevisiae* と同様の設計の人工プロモータ P_{T7phlO} をそのまま移植すると, このプロモータによって発現される GFP 蛍光は DAPG 濃度に応答し, ON/OFF 比は最大で 17 倍に達した。このように, 研究用酵母で構築したシンプルな設計の遺伝子スイッチが, Non-conventional な酵母に応用可能であることを実証した。

*5 リンゴ果実に常在する酵母によるアルコール自然発酵

○敦賀 和輝、老木 紗予子、小倉 康平、橋本 渉

(京大院・農)

【目的】果実の自然発酵による酒類の生産は、果実に常在する細菌・酵母・糸状菌の単離・保存が困難であった時代から用いられてきた手法である。その過程では、アルコール発酵により酵母が優占となり、腐敗に関連する微生物の増殖が抑制されると考えられるが¹⁾、その学術的研究は少なく、自然発酵プロセスに関与する常在微生物の動態には不明な点が多い。当研究室はこれまでに、*Saccharomyces cerevisiae* の干しブドウ常在性について報告してきた²⁾。本研究では、果実常在微生物による自然発酵プロセスと同プロセスに関与する微生物間相互作用機構の解明、ならびに発酵制御に関する知見の獲得を目指し、果実自然発酵における微生物の動態を解析した。入手しやすく自然発酵シードル生産の歴史があるリンゴを対象とした。

【方法・結果】リンゴ3品種(ふじ・王林・ジョナゴールド)を購入し、細菌 16S rRNA 遺伝子あるいは真菌 ITS 領域の配列から常在微生物を同定した。その結果、果皮表面から *Staphylococcus* 属細菌や *Priestia* 属細菌などが、果肉・種子からは *Bacillus* 属細菌、*Curtobacterium* 属細菌などが3品種で共通して単離されたが、抗生物質添加培地には糸状菌のみが生育し、酵母のコロニーは観察されなかった。次に、リンゴ(3サンプル/品種)を破碎し水に浸漬した発酵試験を行った。ふじ品種以外の2品種では早期に糸状菌が優占となりサンプル中のエタノール濃度は1%前後あるいはそれ以下であった。一方、ふじ品種2サンプルでは約1週間後からエタノール濃度が上昇し、1ヶ月後までに最大約3%以上に達した。サンプルをガスクロマトグラフィー分析に供したところ、エタノールから酢酸への変換はみられなかった。浸水44日後の細菌については、*Priestia* 属細菌のみが共通して検出され、細菌数はアルコール発酵が微量なサンプルでは $10^5 \sim 10^6$ CFU/mLと増加していたが、アルコール発酵が進んだふじ品種2サンプルでは 10^3 CFU/mL以下であった。一方で真菌については、*Meyerozyma caribbica* や *Candida tropicalis* といったアルコール発酵性酵母が全サンプルから単離された。

【結論】リンゴ果実には購入時には単離できないレベルでのアルコール発酵性酵母が常在しており、微生物間相互作用に伴うアルコール自然発酵の可能性が提示された。一方で、自然発酵進行のためには、アルコール発酵性酵母が迅速に優占となる菌叢が形成されている必要がある。今後は、アルコール発酵が1品種でのみ進んだ要因を明らかにすべく、リンゴ品種の特性や単離された酵母の性状について解析する。

【参考文献】¹⁾Swain *et al*, *Biotechnology Research International* 2014:250424 (2014). ²⁾Watanabe and Hashimoto, *Scientific Reports* 13(1):9279 (2023).

*6 バイオプラスチック発酵生産中に発見したメンブレンベシクル創発現象

○高相昊¹、豊福雅典²、野村暢彦²、田口精一¹

(¹神戸大院・イノベ、²筑波大・生命環境系)

自然界で多くの細菌は、自身の細胞膜からなるメンブレンベシクル (membrane vesicle, MV) を細胞外に分泌している。MV は、脂質二重膜が自己会合してできた中空ナノカプセルであるため、核酸・蛋白質・シグナル伝達物質などの情報を“包んで”、ほかの細胞へ“届ける”ためのコミュニケーション媒体としての役割を果たす。こうした多彩な機能を活かして、ドラッグデリバリーなど医療分野において脚光を集めている。一方、自然界の“気まぐれな”MV 発生イベントに対して、その形成メカニズムに関する知見は乏しく、MV の工学的応用において大きな障壁となっている。

これまで我々は、全く意図せず、生分解性プラスチック (ポリヒドロキシ酪酸, PHB) を生産する大腸菌において、MV が発生する現象「MV 創発現象」を発見した^{1,2)}。これまで多くの研究者が見逃してきたポリマー生産培養時に発生する“泡の正体”を追求した成果である。本原理の巧妙な点は、グルコースの添加量に応じた細胞内 PHB 合成量によって、MV 発生量を精密に制御生産可能などところにある。

さらに、最近では、外膜からなる単層の single-layered MV (s-MV) と、内膜と外膜からなる多層ラメラ状の multi-layered MV (m-MV) が同時発生し、グルコース量を閾値として s-MV と m-MV が選択的に作り分けられていることがわかった (図 1)³⁾。この成果は、独自に構築した緑色蛍光タンパク質 GFP を MV に内包誘導するトレーサー実験⁴⁾ によって明らかにした。従って、本 MV 発生原理は、量的制御にのみならず、単層/多層の形態制御に

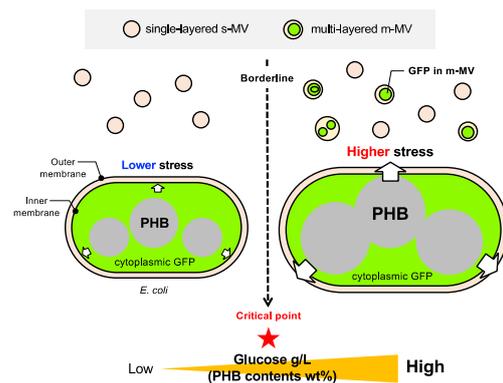


図 1 PIA-MVP の発生原理³⁾

優れた MV 生産プラットフォームとしての有効性が示された。これらを踏まえ、PHB の細胞内合成蓄積が“引き金”となって誘発される MV 発生制御モデル PIA-MVP (Polymer Intracellular Accumulation-triggered system for MV Production) を、我々は新たに提案している。本講演では、従来の MV 発生機構と対比しながら、本現象の仕組みについて紹介する。

1. S. Koh *et al.*, Controllable secretion of multilayer vesicles driven by microbial polymer accumulation. *Sci. Rep.*, 12, 3393 (2022).

2. 高ら, メンブレンベシクル創発の新原理~バイオプラスチック合成が“引き金”~. *化学と生物*, 61(5), 217-219 (2023).

3. S. Koh *et al.*, Population dynamics in the biogenesis of single-/multi-layered membrane vesicles revealed by encapsulated GFP-monitoring analysis. *Appl. Microbiol.*, 3(3), 1027-1036 (2023).

4. 特願 2023-030519, メンブレンベシクルの生産方法及びメンブレンベシクルを利用した物質生産方法.

*7 ウシグソヒトヨタケがもつ光受容体の分光特性

○伏見圭司¹、深澤茉愛²、星野宏季²、村口元³、坂本裕一⁴、
成川礼²

(¹神戸大・イノベ、²都立大・理学、³秋田県大・生物資源、
⁴岩手生工研・生物資源)

【目的】

キノコは孢子、菌糸体、子実体(いわゆるキノコと呼ばれる生殖器官)の形態を繰り返す生活環をもち、子実体の形成には光が必須とされている。多くの生物は光受容体の働きによって光の色(波長)や量(強度)を感知することができる。この光感知が生命現象を制御する分子機構の引き金となる。

キノコには短波長光感知型光受容体と長波長光感知型光受容体が存在し、遺伝学的研究によって短波長光(青色光)が子実体の形成に重要であることが知られている。しかし、キノコに保存されている光受容体の分子機能は確認されておらず、決定的な分化誘導制御分子は未だ特定されていない。本研究では、モデルキノコのウシグソヒトヨタケ・一核性子実体形成株(*Coprinopsis cinerea* strain A43mut B43mut pab1-1 #326)を対象にキノコの光受容体の特性を明らかにし、子実体の形成の謎を紐解くための糸口を掴むことを目的とした。

【方法・結果】

#326 株の短波長光感知型光受容体(CcDst1(CcWC-1)、CcDst2、CcWC-2)および長波長光感知型光受容体(CcFphA)の配列情報を取得し、各々の構造と機能について検討した。

CcDst2 は光感知に重要なドメイン(FAD binding 4 domain)が分割しているにも関わらず、モデリング分子は色素を結合し得る立体構造を示した。分光特性を解析した結果、紫外光-青色光(360 - 460 nm)を感知することが確認された。CcFphA は光感知に重要なドメイン(PAS / GAF / PHY domains) が保存されており、モデリング分子も色素を結合し得る立体構造を示した。分光特性を解析した結果、赤色光-遠赤色光(700 - 760 nm)を感知することが確認された。今回、キノコに由来する光受容体の特性を解析することによって、これらが生体内でも機能する可能性が示された。特に、長波長光(赤色光)は子実体の形成には必要ないとされていたが、長波長光の光感知も重要な役割があることが示唆された。また、#326 株の各生育段階の遺伝子発現量(Muraguchi, Hajime *et al.*, *PLOS ONE*, 10(10), e0141586, 2015)から各光受容体の動態について考察した。

*8 トマトにおけるノルトロパンアルカロイド生合成の解析

○中江亜理紗¹、秋山遼太¹、加藤敦²、杉本幸裕¹、水谷正治¹
(¹神大院・農、²富大・病院薬)

【目的】

キャリステジン(calystegine)は、ヒルガオ属(*Calystegia sepium*)から単離・同定され、ナス科など一部の植物種が生成するノルトロパンアルカロイドである。キャリステジンの中には、 β -グルコシダーゼ及び α -ガラクトシダーゼの阻害活性や、糖タンパク質糖鎖の生合成を阻害する活性があり、治療薬のシーズとして注目されている。生合成経路については、オルニチンを出発物質としてシュードトロピンに至る生合成酵素は同定されているため、本研究ではそれ以降の反応に関わる生合成酵素遺伝子を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

当研究室の先行研究において、候補遺伝子のゲノム編集毛状根の解析からシュードトロピン生成後に N 脱メチル化および水酸化反応に関わるシトクロム P450 および 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ遺伝子が同定されたが、想定基質を用いた in vitro 酵素アッセイでは触媒反応を同定することができなかった。他のグループの研究から新たにアシル化シュードトロピンが生合成中間体として報告された。そこで本研究では、化学合成したアシル化シュードトロピンを基質として、これら生合成遺伝子群をタバコ一過的発現系により in planta で反応させた。その結果、アシル化されたノルトロパンアルカロイド類の生産を確認することができた。このことから、キャリステジン類は、アシル化シュードトロピンを生合成中間体として生成される可能性が示唆された。現在、各酵素反応の詳細を明らかにする実験に取り組んでいる。

*9 マウス TMC4 はクロライド味の検出に関与する

○眞砂文¹、村田百¹、齊藤芳和^{2,3}、笠原洋一²、阿部啓子²、朝倉富子^{2,4}、成川真隆¹

(¹京女大・食、²東大院・農、³東洋食品研究所、⁴放送大)

【目的】代表的な塩味物質として NaCl が知られている。塩味の発生には Na⁺ が重要であると信じられているが、Cl⁻が他のアニオンに置き換えられたナトリウム塩では、同じ濃度の NaCl よりも塩味が弱くなるように、塩味の発生には Na⁺ と Cl⁻の両者が必要だといえる。

塩味の受容はアミロライドに対する感受性の違いから、アミロライド感受性 (AS) とアミロライド非感受性 (AI) 受容に分けられる。このうち、AS 受容には上皮性ナトリウムチャンネルが関与する一方で、AI 受容を担う分子は長年不明であった。最近、我々は膜タンパク質 Transmembrane-like channel 4 (TMC4) が AI 受容に関与する電位依存性クロライドチャンネルであることを見出した。このことは、AS と AI 受容の主体がそれぞれ Na⁺ と Cl⁻である可能性を示唆する。

過去の検討から、Na⁺受容に関する知見は集積している一方で、Cl⁻受容に関する検討は十分ではない。本研究では、Cl⁻受容における TMC4 の役割についてさらなる知見を得るために、*Tmc4* KO マウスを使用して、様々な塩 (NaCl、KCl、NH₄Cl、グルコン酸 Na (NaG)) に対する味行動を観察することを目的とした。

【方法】実験には *Tmc4* KO マウス (オス、15-22 週齢) および C57BL/6J マウス (オス、10-13 週齢) を用いた。味行動としてリックテストを実施した。リックテストは提示した味溶液を舐める回数をカウントすることで、溶液に対する感受性を求める方法である。絶水下のマウスに異なる濃度の味溶液を 5 秒間提示し、その間の舐め回数をリックメーターで計測した。味溶液として、4 種類の塩溶液 (30-1000 mM NaCl、30-1000 mM KCl、30-1000 mM NH₄Cl、30-1500 mM NaG) を用いた。

【結果】*Tmc4* KO マウスでは、ナトリウム塩である NaG に対する感受性の有意な低下は観察されなかった一方で、NaCl、KCl、NH₄Cl などのクロライド塩に対する感受性の有意な低下が観察された。この結果は、TMC4 がクロライド味の検出に関与している可能性を示唆する。

*10 緑藻スジアオノリ由来メラニン形成抑制成分の単離・同定及びメラニン形成抑制メカニズムの解析

○下村東瑚¹、萩原志保¹、中澤昌美¹、上田光宏¹、秋田もなみ²、橋爪雄志³、タンジャマハマド³、飯田聡史³、甲斐建次¹、阪本龍司¹
(¹大阪公大院・農、²高知県海洋深層水研究所、³東洋精糖(株))

【目的】

海藻は地球上に約 25,000 種存在し、光合成色素の違いから紅藻類、褐藻類、緑藻類に分類される。炭水化物やタンパク質、脂質、ミネラルに加えて、ポリフェノールやカロテノイド、ステロールなどの生理活性物質の含有量も多く、栄養補助食品や医薬品、化粧品利用を目指した新奇な化合物の供給源として注目されている。また、海藻は陸生植物では生成されない多種多様な代謝化合物を生成することが報告されている。このような海藻由来生理活性物質の研究は褐藻類や紅藻類が主であり、緑藻類に関する報告は少ないのが現状である。そこで本研究では、高知県海洋深層水研究所で培養可能である海藻 6 種から緑藻スジアオノリ (*Ulva prolifera*) に着目し、エタノール抽出物からメラニン形成抑制成分の単離及び構造決定、メラニン形成に及ぼす影響を評価した。

【方法・結果】

海洋表層水培養および深層水培養のスジアオノリ、ミル、ナガミル、ヒラミル、テングサの 6 種類の海藻を凍結乾燥・粉碎後、95%エタノールに浸漬することでエタノール抽出物を獲得した。これらを用いてマウスメラノーマ細胞株 B16F10 における、メラノサイト刺激ホルモン (α -MSH) 誘導性メラニン形成に及ぼす影響を評価すると、海洋表層水培養スジアオノリ、ナガミル、ヒラミル、テングサ由来の抽出物にメラニン形成抑制傾向が見られ、中でも表層水培養スジアオノリエタノール抽出物 (S-UPE) は強い抑制効果を示した。まず、B16F10 由来チロシナーゼに対する S-UPE の阻害活性を検討したが、本活性は認められなかった。一方、S-UPE のメラニン形成抑制メカニズムについてウェスタンブロットティングにより評価すると、メラニン形成の律速酵素であるチロシナーゼのタンパク質発現抑制が認められた。次に S-UPE から生理活性物質の単離を試みた。S-UPE をヘキサン、酢酸エチル、n-ブタノールで順次水に対して分液し、抑制効果の高いヘキサン画分より、シリカゲルカラム、ODS カラムを用いた HPLC による分取を経て目的物質を単離した。LC-ESI-MS による分子量決定および NMR 解析により、1-ヘキサデカテトラエノイルグリセロール (1-HTG) と同定した。25 μ g/mL で 1-HTG とヘキサデカテトラエン酸によるメラニン形成抑制効果を検討した結果、1-HTG のみ抑制効果を示し、グリセロールとのエステル結合が重要であることが示唆された。今後は S-UPE および 1-HTG による抑制メカニズムの解析を進める予定である。

*11 加齢による嗅覚関連遺伝子の発現量変化

○星山佳代、村山ちひろ、西田梨子、森優子、成川真隆

(京女大・食)

【目的】食事をおいしく味わう上で、においは重要な要素となる。食事から感じるにおいによって摂食意欲が刺激され、においを感じながら食べることでおいしさが増す。また、においによって食べ物の好き嫌いが分かれてしまうほど、においは食の嗜好性に大きな影響を与える。

超高齢社会に突入した現代、高齢者の健康維持は社会的に重大な関心事である。年を取ると食が細くなってしまう。この原因の一つとして、加齢による嗅覚機能の変化があげられる。そのため、嗅覚機能の維持は健康的な生活を送る上で重要になる。しかし、どのようなメカニズムで加齢により嗅覚機能が変わってしまうのか、その詳細には不明な点が残っている。本研究では、におい受容に関わる嗅上皮を対象とし、嗅覚関連遺伝子の加齢による発現量変化を検討した。

【方法】C57BL/6J系統雄マウスを実験対象とした。若齢群として13~15週齢、高齢群として120~121週齢を用いた。まず、2-メチル酪酸とバニラエッセンスに対するにおい行動試験を実施し、加齢による嗅覚感受性の変化を評価した。におい試験終了後に解剖を行い、嗅上皮をサンプリングした。嗅上皮サンプルからtotal RNAを抽出し、cDNAを合成した。これを鋳型に定量PCRを行った。代表的な嗅覚関連遺伝子(嗅覚受容体: *Olf15*, *Olf42*, *Olf544*; 細胞内シグナル伝達: *Golf*, *Cnga2*, *Cnga4*, *Cngb1*, *Tmem16B*; 嗅覚マーカータンパク質: *Omp*)を解析対象とした。

【結果】2-メチル酪酸に対するにおい行動に両群間で差はなかったが、バニラエッセンスに対する高齢マウスのにおい行動が若齢マウスに比べて有意に増加していた。加齢によってにおい行動の変化が認められたため、次いで嗅上皮における嗅覚関連遺伝子のmRNA発現量の変化を測定した。その結果、高齢マウスの嗅上皮において一部遺伝子のmRNA発現量が低下していた。この結果は、加齢に伴い嗅覚関連遺伝子の発現量が変わる可能性を示唆する。

12 芳香族炭化水素受容体を介した時計遺伝子の変調は脂肪細胞の脂質代謝に影響を及ぼす

○伊木日菜子¹、北風智也²、芦田均¹

(¹神戸大院・農、²大阪公立大院・農)

【目的】

生体の概日リズムは時計遺伝子の発現の振動によって制御されており、時計遺伝子の発現の異常は概日リズムの乱れにつながる。また、芳香族炭化水素受容体 (AhR) はベンゾピレン (B[a]P) などの環境汚染物質をリガンドとする転写因子であり、AhR の活性化が疾患誘発に関連していることが報告されている。これまでに肝細胞では、AhR の活性化が概日リズムを乱すことで β 酸化の低下および脂肪酸取り込みの増加を引き起こし、その結果、肝細胞への脂質の蓄積が増加した。そこで本研究では、脂肪細胞に着目し、AhR の活性化と時計遺伝子の変調が脂質代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】

分化した 3T3-L1 脂肪細胞にデキサメタゾンを用いて概日リズムを同調させ、その後 B[a]P を 60 時間細胞に処理した。mRNA およびタンパク質の発現レベルは、それぞれ qPCR およびウエスタンブロットティングにより測定した。脂質蓄積は Oil Red O 染色で観察した。

【結果】

B[a]P の作用により、Reverb α の核内蓄積量が増加し、時計遺伝子である Brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1) の発現量が低下した。また、B[a]P の作用により脂肪細胞への脂質蓄積が減少し、脂肪酸合成に関与するアセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) や脂肪酸合成酵素 (FAS) の mRNA およびタンパク質の発現量が低下した。これらの現象は AhR および BMAL1 をノックダウンするとみられなかった。したがって、B[a]P による AhR の活性化は Reverb α の核内蓄積量を増加させ、核内における BMAL1 の転写抑制を引き起こし、結果として生じる BMAL1 の発現量の低下を介して、脂肪酸合成能を低下させることで脂質蓄積の減少が誘発されることが示唆された。以上のことから、B[a]P などの AhR アゴニストによる消耗性症候群の発症には、時計遺伝子の乱れが関与することが判った。

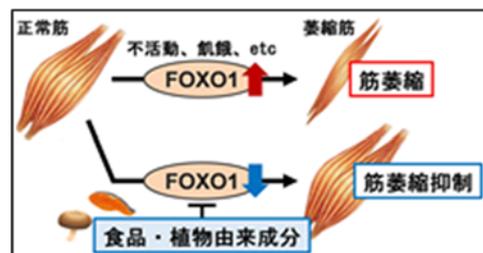
*13 転写因子 FOXO1 活性の抑制を介した筋萎縮抑制効果を持つ食品・植物由来成分の探索

○山本有紗、大西拓己、水谷彩子、内富蘭、大藪葵、亀井康富
(京都府大院・生命環境)

【背景・目的】 骨格筋は人体最大の組織であり、運動やエネルギー代謝、糖取り込みなど多岐にわたり重要な役割を果たしている。加齢や不活動、病的な疾患時に骨格筋は小さくなり(筋萎縮)、健康寿命の短縮や生活の質(QOL)の低下を引き起こす。本研究室では、転写因子 FOXO1 を骨格筋特異的に過剰発現した際に、顕著な筋萎縮が生じること、逆に、FOXO ファミリーを骨格筋で欠損させると筋萎縮が抑制されることを観察しており、FOXO1 が筋萎縮を引き起こす重要な因子であることを示した。加えて既知の報告より、様々な筋萎縮条件下で FOXO1 が活性化することからも FOXO1 が筋萎縮時のカギであることが示唆される。本研究では、筋萎縮を引き起こす「FOXO1」の活性抑制を指標とし、筋萎縮を抑制する化合物を探索することを目的とした。

【方法・結果】 FOXO1 の転写活性を評価できるレポーターアッセイ系を確立し、520 種類の食品・植物由来化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。加えて、FOXO ファミリーの一つである、FOXO3a の転写活性を評価できるレポーターアッセイ系を確立し、二次スクリーニングを行った。その結果、FOXO1 や FOXO3a の転写活性を抑制する化合物として、活性型ビタミン D3 である 1,25(OH) 2D3 やウコン由来のクルクミンを含む 8 種類の化合物が見つかった。次に、これらの化合物が筋萎縮を抑制するかについて調べた。マウス骨格筋由来の細胞である C2C12 筋芽細胞と、それを分化させ、より骨格筋に近い状態である C2C12 筋管細胞に、デキサメタゾンを追加した。(筋萎縮状態を模倣)。この時、化合物を追加すると、筋萎縮時に活性化する筋萎縮関連遺伝子の発現増加を抑制した。

【考察】 これらの化合物は FOXO1 の転写活性を抑制することで、FOXO1 下流の筋萎縮関連遺伝子の発現増加を抑制し、筋萎縮を抑制すると考えられる。これまで、筋萎縮を改善する方法は「運動」とされてきたが、筋萎縮患者が運動を実施することは困難である場合が多い。本研究で見出した化合物は、運動以外の筋萎縮へのアプローチとして、筋萎縮のリスク軽減効果を持つ機能性食品や、筋萎縮改善を目的とした医薬品の開発に利用されることが期待される。



2023 年度農芸化学奨励賞 受賞記念講演

酵母におけるアミノ酸の新しい生理機能と代謝調節機構

西村 明

(奈良先端大・バイオ/研究推進機構)

はじめに

アミノ酸はこれまで、タンパク質の構成成分としての認識が強く、遊離状態のものは単なる窒素源の貯蔵体や代謝産物の前駆体として考えられてきた。しかし、最近では遊離状態のアミノ酸が生体の恒常性維持に必須であることが理解され始め、アミノ酸の重要性が注目されている。私たちはこれまでに出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における遊離アミノ酸の新規な代謝制御機構と生理機能を解析してきた。

1. 発酵環境におけるプロリン資化抑制機構

酵母はワインなどの醸造に用いられ、酵母による原料の資化(細胞内への取込み、分解)が酒類の味・風味を決める大きな要因となっている。プロリン(Pro)はワインやビールの原料であるブドウや麦芽中に最も豊富に含まれるアミノ酸であるが、発酵中の酵母はプロリンをほとんど資化することができず、発酵後も多量に残存する。残存したプロリンは苦味の増加や酸味の減少を引き起こし、最終製品であるワインやビールの酒質を低下させる。さらに、豊富に存在するプロリンを窒素源として資化できないため、発酵中に窒素源の枯渇がしばしば起こり、人工窒素源(アンモニウム塩)の添加が必要となる。この添加物は、ワインやビールの品質に影響を与えるだけでなく、製造コストの増加要因にもなっている。このため、プロリンは「最も無駄で厄介な窒素源」として 30 年以上前から認識されている。

私たちは Pro 要求性株を利用した独自のスクリーニング系から、アルギニン(Arg)が Pro を細胞内に取込むトランスポーター Put4 を細胞膜から除去することで、Pro 消費を強く阻害することを発見した^{1),2)}。この機構を詳細に解析した結果、Arg のトランスポーター Can1 がトランスポーターとして働くのではなく、細胞外 Arg のレセプター(受容体)として機能することにより、Pro 資化を抑制することを見出した³⁾(図 1)。このようなレセプター様の機能を併せ持つトランスポーターは「トランスセプター」と呼ばれ、炭素源応答の主要制御因子である Protein kinase A(PKA)を cAMP 非依存的に活性化することが知られている。しかし、トランスセプターがどのように PKA を活性化し、栄養源の資化選択性を生み出すのか、その分子機構については全く明らかになっていない。今後、このメカニズムを解明することで、細胞の環境応答機構における新たなパラダイムとして「トランスセプターを介したアミノ酸代謝と環境因子のクロストーク」が提唱できると考えている。

さらに、私たちは大規模な野生酵母コレクション(Phaff Yeast Culture Collection、カリフォルニア大学デービス校)からワインやビールの発酵モデル培地上でプロリンを有意に消費する酵母(プロリン資化性酵母)を約 20 株取得した⁴⁾。これらのプロリン資化性酵母について簡易的なビール発酵試験を行った結果、2 株は比較的高いアルコール生産性(約 3%)を示し、ビール製造に適していることが判明した。

本研究を通して、プロリン高資化性酵母を構築することで、プロリン含量の低下したワインやビールを生み出すことが可能となる。その結果、「①スッキリ」・「②豊かな香り」・「③オーガニック」をキーワードとした高品質かつ個性的な発酵飲料の創出に繋がり、ワインやビールの高付加価値化と差別化が期待できる。

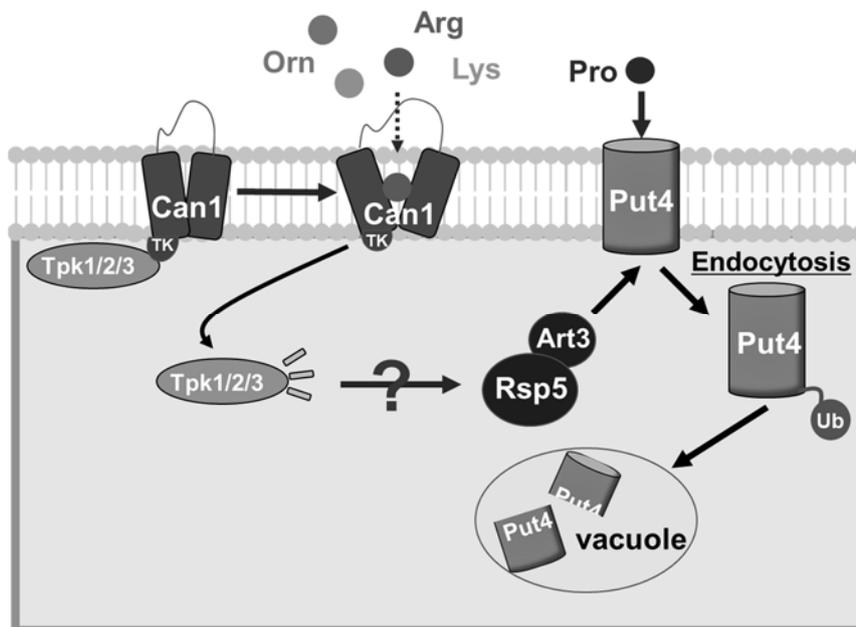


図1 プロリン資化抑制機構(仮説)

2. システインパーサルフィドの生合成経路と寿命制御機構

システインパーサルフィド(CysSSH)は、システインのチオール基に複数のイオウ原子が付加したポリサルフィド構造を有しているアミノ酸誘導体である。CysSSHは細胞内に多量に存在することが知られているが(システインの量に対して 20-30%)、CysSSHの合成経路や生理機能はほとんど判明していない。私たちは古細菌以外の生物において、システニル tRNA 合成酵素(cysteinyI-tRNA synthetase: CARS)が主要な CysSSH 合成系であることを報告した⁵⁾。また、酵母の CARS 遺伝子を同定し(CRS1と命名)、CRS1は1つの遺伝子から2つのタンパク質(サイトゾル型とミトコンドリア型)を発現していることを見出した⁶⁾。この機構はミトコンドリアのエネルギー代謝の変化に依存して起こり、このような調節機構は私たちが初めて提唱したユニークなものである。さらに、CysSSHはミトコンドリアのエネルギー代謝や小胞体内タンパク質の恒常性維持に関与し、寿命の制御因子として働いていることを発見した(論文投稿中)。現在、Crs1のCysSSH合成活性に対する阻害剤を探索中であり、抗真菌剤の開発に貢献できると考えている。

3. アルギニンによるバイオフィーム抑制機構

バイオフィームは、固体表面上に付着する微生物とそれらが産生する細胞外マトリックスによって構成される高次構造体であり、医療面では慢性感染を、工業面では配管の目詰まりや金属腐食などをそれぞれ引き起こすため問題視されている。このため、生体や環境に対する適合性が高い物質を活用したバイオフィームの制御

が期待されている。私たちはこれまでに Arg が Can1 のエンドサイトーシス誘導を通して、接着因子 *FLO11* の転写を抑制し、バイオフィーム形成を阻害していることを見出した⁷⁾。また、Arg は黒カビや病原性真菌 *Candida glabrata* を含む多くの真菌のバイオフィーム形成を抑制することが判明し、幅広い汎用性を示すことができた。現在、Arg を配合した素材(シリコンなど)におけるバイオフィーム抑制効果を検討しており、今後はこれら素材の産業利用が期待できる。

4. アミノ酸代謝制御による発酵産物の差別化・高機能化

私たちはこれまでにエールビール酵母や清酒酵母のアミノ酸代謝を改変した変異株を育種し、商品開発に大きく貢献している(図 2)。特に、エールビール酵母において、プロリン含量を増加させビール発酵初期に生じる浸透圧ストレスに耐性を付与した変異株を育種し、発酵期間の短縮とそれに伴うまろやかで軽い口当たりを実現したクラフトビールの開発に貢献した。また、フェニルアラニン含量を増加させることで、バラ様の香气成分である β -フェネチルアルコール(フェニルアラニン代謝物)含量が約 15 倍増加(閾値以上)した変異株を育種し、独自性の高いクラフトビールの開発に成功した。

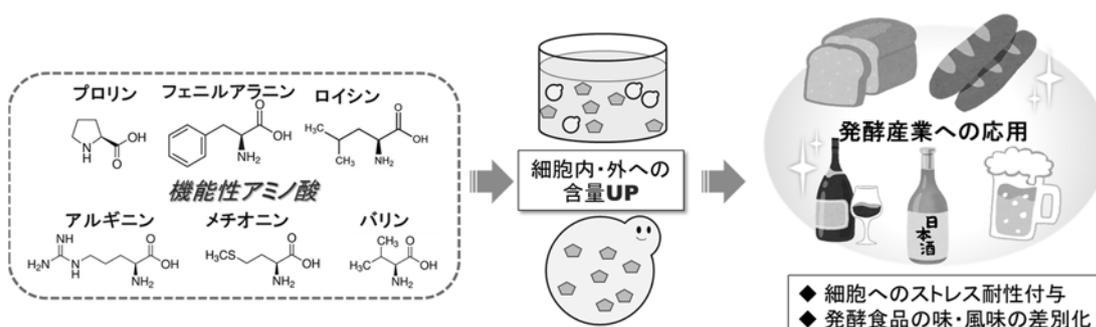


図 2 アミノ酸研究の社会実装

おわりに

アミノ酸の研究はアスパラギン酸の発見(1806年)を皮切りに200年以上の歴史があり、古臭い研究に思われるかもしれない。しかし、我々の研究をはじめとしてアミノ酸には未知の生理機能や制御機構がまだまだ存在しており、興味が尽きない。アミノ酸は誰もが知っているように生命に必須な分子であるため、これらからもアミノ酸研究に終わりがくるとはないだろう。今後も古くて新しいアミノ酸研究の楽しさを世間に伝えていきたい。また、このような研究を通して、酵母の魅力や機能を高める手助けになればと考えている。

引用文献

1) Nishimura A et al., Inhibitory effect of arginine on proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 37: 531-540, 2020

- 2) Nishimura A et al., The yeast α -arrestin Art3 is a key regulator for arginine-induced endocytosis of the high-affinity proline transporter Put4. *Biochem Biophys Res Commun*, 531: 416-421, 2020
- 3) Tanahashi R et al., The arginine transporter Can1 acts as a transceptor for regulation of proline utilization in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 40: 333-348, 2023.
- 4) Tanahashi R et al., Large-scale screening of yeast strains that can utilize proline. *Biosci Biotechnol Biochem*, 87: 358-362, 2022
- 5) Akaike T et al., Cysteinyl-tRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat Commun*, 27: 1177, 2017
- 6) Nishimura A et al., Expression of mitochondrial cysteinyl-tRNA synthetase via alternative transcriptional initiation as regulated by cell energy metabolism in yeasts. *J Biol Chem*, 294: 13781-13788, 2019
- 7) Nishimura A et al., Arginine inhibits *Saccharomyces cerevisiae* biofilm formation by inducing endocytosis of the arginine transporter Can1. *Biosci Biotechnol Biochem*, 86: 1300-1307, 2022

謝辞

本研究は、奈良先端大・バイオサイエンス領域と東北大・医学研究科において実施されました。酵母研究の楽しさと厳しさを教えて頂き、本奨励賞にご推薦下さいました奈良先端大・名誉教授 高木博史先生に心より感謝申し上げます。また、緻密な実験計画とデータ取得、タイムリーな論文発表の重要性を厳しく教えて頂いた東北大・教授 赤池孝章先生に深く感謝いたします。さらに、本研究に携わり多大なるご指導・ご助力を賜りましたスタッフや学生、共同研究者の皆様方に対してこの場を借りて感謝申し上げます。

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

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

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

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)

○次回例会(第 529 回)予定
開催日:2024 年 2 月 10 日(土)
開催校:京都大学
会場:京都大学百周年時計台記念館 2 階 国際交流ホール
講演申込締切:2024 年 1 月 12 日(金)
講演要旨締切:2024 年 1 月 19 日(金)
講演会参加登録締切:2024 年 2 月 2 日(金)

問い合わせ先:
〒611-0011
京都府宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 森林代謝機能化学分野
飛松 裕基 Tel: 0774-38-3626
E-mail: ytobimatsu@rish.kyoto-u.ac.jp

公益社団法人 日本農芸化学会関西支部 事務局
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町
京都大学大学院農学研究科内



支部長: 森 直樹
Tel: 075-753-6307, Fax: 075-753-6312
E-mail : mori.naoki.8a@kyoto-u.ac.jp

庶務幹事: 岸野 重信
Tel: 075-753-6122, Fax: 075-753-6113
E-mail : kishino.shigenobu.3e@kyoto-u.ac.jp

会計幹事: 安居 佑季子
Tel: 075-753-6390, Fax: 075-753-6127
E-mail : yasui.yukiko.7a@kyoto-u.ac.jp

庶務幹事(補): 川本 純
Tel: 0774-38-4711, Fax: 0774-38-3248
E-mail : kawamoto.jun.4s@kyoto-u.ac.jp

発行日 2023 年 11 月 27 日(月)
日本農芸化学会関西支部ホームページ: <http://kansai.jsbba.or.jp/>