

日本農芸化学会関西支部
第 530 回講演会

講演要旨集

令和 6 年（2024 年）5 月 31 日（金）

京都府立京都学・歴彩館

日本農芸化学会関西支部



第530回講演会プログラム

■ 開会の辞 亀井 康富 開催校幹事代表 (13:00～13:05)

■ 一般講演 (13:05～15:53) [発表 10分：質疑応答 3分：演者交代 1分]

*印は優秀発表賞（支部長推薦および賛助企業推薦）対象講演

座長：長井 薫（京府大院・生命環境）

*01. 加齢が味細胞タイプの割合に及ぼす影響 (13:05～13:18)

○村田 百¹、岡 ほのみ²、成川 真隆^{1, 2} (¹京女大院・家政、²京女大・食)

*02. カカオポリフェノールによる求心性迷走神経活性化と耐糖能向上作用への連関 (13:19～13:32)

○石原 寛隆、大林 健人、岩崎 有作（京府大院・生命環境）

*03. 紅茶ポリフェノールの＜腸・脳・代謝臓器＞連関による体熱産生作用 (13:33～13:46)

○池田 倭子、大林 健人、岩崎 有作（京府大院・生命環境）

*04. 筋老化制御における DNA メチル化の役割の解析 (13:47～14:00)

○大藪 葵、大平 悠人、藤田 真理子、川口 留奈、畑澤 幸乃、亀井 康富（京府大院・生命環境）

座長：辻本 善之（京府大院・生命環境）

*05. NO ストレスからの Neuro2a 細胞保護作用のリン脂質構造特異性と保護作用の解明 (14:01～14:14)

○後藤 理奈、田代 有里、佐々木 梓沙、長井 薫（京府大院・生命環境）

<14:14～14:30 休憩>

*06. 非保存部位特異的な人工結合タンパク質による ABC transporter の基質排出能阻害 (14:30～14:43)

○岡本 恵祐¹、神谷 友華¹、雨坂 心人¹、松村 浩由²、高野 和文¹、田中 俊一¹ (¹京府立大院・生命環境、²立命館大院・生命科学)

*07. 筋萎縮性側索硬化症に関連する単量体 Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼに特異的なモノポディの開発 (14:44～14:57)

○雨坂 心人¹、原 瑞穂¹、堺 優貴¹、新谷 敦子²、須恵 香里²、山中 智行³、田中 俊一¹、古川 良明² (¹京府大院・生命環境、²慶應大・理工、新潟大・脳研究所)

***08. 大腸菌バイオフィルムの形態形成及び遺伝子発現動態を捉える低コストイメージングシステムの開発** (14:58~15:11)

○酒井 隆之介、趙 一帆、Robert Martin (京大院・薬)

座長：田中 俊一 (京府大院・生命環境)

09. *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T株のホスホリパーゼ A の成熟化機構と機能解析 (15:12~15:25)

○永野 晏那、中川 玲央奈、辻本 善之 (京府大院・生命環境)

10. *Thermotoga maritima* ピルビン酸キナーゼ使用によるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法凍結乾燥試薬の保存安定性の向上 (15:26~15:39)

Kevin Maafu Juma¹、村上雄人²、森本健太¹、滝田禎亮¹、兒島憲二³、鈴木孝一郎⁴、柳原格⁵、生田宗一郎²、藤原伸介²、○保川清¹ (¹京大院・農、²関学・生命環境、³姫路獨大・薬、⁴微研、⁵大阪母子医療セ)

***11. 新規ブラシノステロイドシグナル伝達因子 BIL7 による植物成長促進機構の解明** (15:40~15:53)

○西田快世¹、仲村友介¹、宮地朋子¹、山上あゆみ¹、宮川拓也¹、浅見 忠男²、松井南³、中野雄司¹ (¹京大院・生命、²東大院・農、³理研・CSRS)

<15:53~16:10 休憩>

■ **産学交流講演会** (16:10~16:50)

座長：亀井 康富 (京府大院・生命環境)

合成生物学を用いた希少天然化合物の大量生産

○新谷 隆史 (ファーマランタ株式会社)

■ **優秀発表賞 (支部長推薦ならびに賛助企業推薦) 表彰式** (16:55~17:05)

■ **次回支部例会アナウンス** (17:05~17:10)

■ **閉会の辞 森 直樹 日本農芸化学会関西支部 支部長** (17:10~17:15)

■ **懇親会** (17:30~)

京都府立大学稲盛記念会館 1階 レストランたまご

一般講演

*01 加齢が味細胞タイプの割合に及ぼす影響

○村田 百¹、岡ほのみ²、成川真隆^{1,2}

(¹京女大院・家政、²京女大・食)

【目的】加齢に伴い、食事摂取量の低下や摂取品目の偏りなど、食事の質の低下が懸念される。食事の質の低下は体力低下を招き、次いで食欲の減退を招くという悪循環に陥る。したがって、食事の質を保つことは健康を維持する上で鍵になり得る。では、なぜ加齢に伴い食事の質が低下してしまうのか？その原因のひとつとして、加齢による味感受性の低下があげられる。しかし、加齢によって味感受性が低下するそのメカニズムには不明な点が多い。

食物の味は味物質が口腔内に存在する味蕾によって受容されることで生じる。味蕾は数十個の味細胞から構成され、味細胞は形態や発現する分子種の違いからI～IV型に分類される。このうち、II型とIII型が味の受容で重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、加齢に伴う味感受性の変化が味細胞タイプの割合の変化に起因するのではないかと仮説を立てた。この仮説を検証するために、若齢と高齢マウスの味蕾におけるII型とIII型味細胞マーカーの発現パターンを比較した。

【方法】実験群として、若齢(11～24週齢)と高齢マウス群(108～121週齢)の2群を設けた(いずれもC57BL/6J系統雄マウス)。加齢表現型を確認するために、苦味溶液(安息香酸デナトニウム)に対する感受性を確認した。その後解剖を行い、有郭乳頭を含む舌上皮をサンプリングした。薄切切片を作製し、代表的なII型、III型味細胞マーカーに対する抗体を用いて、免疫組織染色を行った(II型マーカー:Gustducin、PLCβ2、SEMA3A;III型マーカー:CAR4)。得られた染色像において、それぞれのマーカーを発現する細胞数をカウントし、味蕾における各細胞タイプの割合を求めた。

【結果】まず、苦味溶液に対する感受性を調べたところ、高齢マウスの苦味溶液に対する忌避性が若齢マウスに比べ有意に低下していることを確認した。加齢による味感受性の変化が認められたため、次に有郭乳頭を対象として免疫染色を行った。味蕾におけるII型、III型味細胞の割合は若齢と高齢マウスでほぼ同程度であった(II型細胞:若齢マウス $30.3 \pm 1.5\%$ vs. 高齢マウス $29.1 \pm 0.8\%$;III型細胞:若齢マウス $20.7 \pm 1.3\%$ vs. 高齢マウス $21.1 \pm 1.2\%$)。この結果は、加齢は味細胞タイプの割合に影響を及ぼさないことを意味する。したがって、味細胞タイプの割合変化が加齢による味感受性の変化の要因ではないと考えられた。

*02 カカオポリフェノールによる求心性迷走神経活性化と耐糖能向上作用への連関

○石原寛隆¹、大林健人¹、岩崎有作¹ (¹京都府大院・生命環境)

【背景と目的】 世界規模で糖尿病罹患者数は増加しており、糖尿病の予防と改善に有効な方法の確立は喫緊の課題である。食後高血糖は、2型糖尿病の初期症状であり、2型糖尿病を悪化させる原因でもある。近年、カカオを原料とするチョコレートは食後血糖上昇能が低い「低 GI (glycemic index) 食品」として注目されている。カカオが低GIとなる機序については、procyanidinを中心としたカカオポリフェノールが腸ホルモン glucagon-like-peptide-1 (GLP-1) の分泌を促進し、インスリン分泌を促進させて、耐糖能を改善することが報告されている。他方、当研究室では、GLP-1分泌促進は、内臓感覚神経の求心性迷走神経の活性化を介して脳へ作用し、インスリン感受性を亢進させて耐糖能を向上させることを見出している。インスリン感受性を亢進させることは、インスリン抵抗性の改善に貢献するだけでなく、インスリン分泌を節約できるため膵保護作用が期待される。そこで本研究では、カカオポリフェノール(発酵カカオ由来 cacao liquor procyanidin; CLPr)の求心性迷走神経活性化を介したインスリン感受性亢進による耐糖能向上作用を検証した。

【方法と結果】 C57BL/6JマウスにCLPr 水溶液を単回胃内投与すると、求心性迷走神経細胞における神経活性化マーカーpERK1/2を発現する神経数が有意に増加した。CLPrの単回胃内投与は投与後30分をピークに血中GLP-1濃度を上昇させた。GLP-1分泌がピークとなるCLPr投与30分後に腹腔内糖負荷試験をすると、グルコース誘導性インスリン分泌が促進され、耐糖能が向上した。一方、GLP-1分泌亢進が終盤となるCLPr投与60分後に腹腔内糖負荷試験をすると、インスリン感受性が亢進し、耐糖能が向上した。そして、CLPrの前投与は、インスリン分泌促進剤(スルホニルウレア剤)による血糖低下作用を増強させた。これらCLPr のインスリン感受性亢進による耐糖能向上作用は、GLP-1受容体欠損マウスと迷走神経共通肝臓枝の求心路障害マウスにおいて完全に消失した。

【結語】 本研究では、カカオポリフェノール(CLPr)がマウスの求心性迷走神経を活性化すること、この活性化の機序に腸 GLP-1 分泌促進と GLP-1 受容体シグナリングが関与することを明らかにした。そして、CLPr による求心性迷走神経活性化は耐糖能を向上させた。さらに興味深いことに、CLPr の投与タイミングの違いが、グルコース誘導性インスリン分泌促進の増強、または、インスリン作用の増強と異なる糖代謝システムを駆動させることを発見した。

*03 紅茶ポリフェノールの＜腸・脳・代謝臓器＞連関による 体熱産生作用

○池田倭子¹、大林健人¹、岩崎有作¹（¹京府大院・生命環境）

【目的】

紅茶は体を温めて冷えに効果があるとして経験的に利用されているが、その効果と作用機序は不明な点が多い。紅茶に含まれる紅茶ポリフェノール(BTP)には様々な生理機能が報告されている。しかし、BTPの小腸の吸収率は0.001%と乏しく、そのままの構造では殆ど生体に吸収されないため消化管への作用を介して生理機能を発揮するルミナコイドとして注目されている。しかし、BTPがどのような機構を介して生理機能を発揮しているのかについては不明な点が多い。他方、食物刺激によって分泌される腸ホルモンGlucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、求心性迷走神経の活性化を介した脳への作用によって、脳→副腎交感神経→副腎髄質由来アドレナリン分泌→体熱産生を誘導することを、当研究室は見出してきた。

本研究では、BTPの体熱産生作用と、その機序におけるGLP-1、自律神経、アドレナリンの関与を検討した。

【方法・結果】

実験動物を用いて紅茶ポリフェノール(BTP)による体熱産生作用を検討した。C57BL/6JマウスにBTPを単回胃内投与すると、投与後1時間と2時間の直腸温が有意に上昇した。次に、BTPの体熱産生作用における、GLP-1分泌促進、求心性迷走神経、アドレナリン分泌促進、アドレナリン受容体の関与を検証した。C57BL/6JマウスにBTPを単回胃内投与すると、血中GLP-1濃度とアドレナリン濃度が有意に上昇した。BTPによる直腸温上昇作用は、GLP-1受容体阻害剤Exendin(9-39)、または、アドレナリンβ受容体阻害剤propranololの前投与によって完全に消失した。さらに、腸GLP-1を受容する求心性迷走神経の関与を検証するために、横隔膜下の迷走神経を切断すると、BTPによる直腸温上昇は完全に消失した。

【結語】

本研究は、紅茶ポリフェノール(BTP)が体熱産生作用を有することを、マウスを用いた動物実験にて、初めて明らかにした。この作用機序は、BTPが腸GLP-1の分泌を促進させることで腸周辺を支配する求心性迷走神経を活性化し、この感覚神経入力が脳と出力系の交感神経系を活性化し、副腎からのアドレナリン分泌を促進させ、末梢代謝臓器へのアドレナリンβ受容体作用にて体熱産生が誘導されるものと示唆された。本研究は経験的に冷えに効果があると知られている紅茶に科学的根拠を付与するための重要な基礎研究である。

*04

筋老化制御における DNA メチル化の役割の解析

○大藪葵、大平悠人、藤田真理子、川口留奈、畑澤幸乃、亀井康富
(京都府大院・生命環境)

【目的】超高齢社会を迎えた我が国において、寝たきりや要介護、医療費の増大などにつながるサルコペニア(加齢に伴う骨格筋の量と機能の低下)は社会的課題として認識されている。しかしながら、サルコペニアの発症機序には不明な点が多い。我々は、老化したマウス骨格筋において、グローバルDNAメチル化が増加することを観察した。そこで本研究では、グローバルDNAメチル化を蓄積させたエピゲノム改変マウスを作製し、エピゲノム情報の破綻が骨格筋老化に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】DNAメチル化の増加が骨格筋の老化に及ぼす影響を調べるために、骨格筋特異的にDNAメチル化酵素(Dnmt3a)を過剰発現したマウス(Dnmt3a-Tgマウス)を作製した。メチローム解析とトランスクリプトーム解析の結果、Dnmt3a-Tgマウスの骨格筋では、グローバルDNAメチル化の増加と遺伝子発現の劇的な変化を伴って、速筋特異的な筋萎縮(サルコペニアの特徴)が生じることを明らかにした(結果①)。さらに、Dnmt3a-Tgマウスの骨格筋では、Myh7⁺(Type I)筋線維の割合の増加(結果②)、筋恒常性破綻の特徴である中心核陽性筋線維数の増加、細胞老化関連分泌形質(SASP)因子を含む炎症・老化シグネチャーの増強、さらにはミトコンドリアタンパク質発現の低下など、さまざまな骨格筋の加齢様変容が惹起されていることを明らかにした(結果③)。

トレッドミル試験による運動機能解析と筋重量測定の結果、加齢に伴う骨格筋の量と機能の低下は、老齢のDnmt3a-Tgマウスでは加速していることが判明した。興味深いことに、骨格筋での慢性炎症が、老化とDNAメチル化の蓄積によって相乗的に増強されていた(結果④)。最後に、骨格筋の代謝弾性(Metabolic elasticity、Cell Metab, 2023、筋萎縮からの回復能)を評価するために、絶食と再摂食による筋重量の変動を調べたところ、Dnmt3a-Tgマウスでは、絶食による筋萎縮が起きにくだけでなく、再摂食による筋萎縮からの回復能が低下していた(結果⑤)。したがって、エピゲノム情報の破綻によって、骨格筋の代謝弾性は低下することが示唆された。

以上より、DNAメチル化の蓄積によるエピゲノム情報の破綻が骨格筋の加齢様変容をもたらすことが示唆された(Oyabu et al., *iScience*. in revision)。DNAメチル化によるエピゲノム情報は、生物学的年齢の指標とされている(「エピジェネティック・クロック」)。本研究成果は、筋老化の新知見を提供するとともに、骨格筋のエピゲノム情報の破綻がサルコペニアの発症と密接に関わっていることを示唆するものである。

*05

NO ストレスからの Neuro2a 細胞保護作用の リン脂質構造特異性と保護作用の解明

○後藤理奈、田代有里、佐々木梓沙、長井薫

(京府大院・生命環境)

【目的】

アルツハイマー病など多くの神経変性疾患は、ミクログリアによって産生された過剰なNOによるストレスなどが原因で神経細胞死が起こることによって発症する。従って、NOストレスからの神経細胞の保護は、神経変性疾患予防法の探索において重要な標的となる。本研究では、神経細胞をNOストレスから保護する作用を持つ可能性のある食品成分として、大豆や卵黄に多く含まれるリン脂質に着目した。本研究は、リン脂質が神経細胞保護作用により神経変性疾患を予防する可能性とその分子機構について明らかにすることを目的としている。

【方法・結果】

神経細胞モデルとしてマウス神経芽腫細胞Neuro2a細胞を、NOストレスモデルとしてNOドナーであるニトロプルシッドナトリウム(SNP)を用いた。まず、様々な構造を有するリン脂質を用い、NOストレス誘導細胞死に対する細胞保護作用の構造機能相関について検討した。細胞をリン脂質で前処理後、SNP処理を行い、MTT法による細胞生存率解析を行った。その結果、1,2-dilinoleoyl-phosphatidylcholine (DLPC)、1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylcholine (PLPC)、1-palmitoyl-2-oleoyl-phosphatidylcholine (POPC)によって、細胞生存率の有意な上昇が観察された。その他の構造をもつリン脂質には保護作用が観察されなかった。従って、特定のリン酸エステル部分や脂肪酸エステルの数と構造が、細胞保護作用において重要であると考えられた。次に、細胞内シグナル阻害剤を用い、細胞保護作用の分子機構を検討した。プロテインキナーゼC(PKC) α 、 β 、 γ の阻害剤GF109203X、PKC α 、 β の阻害剤Go6976、PKC β の阻害剤LY333531でそれぞれリン脂質と同時に前処理を行い、細胞保護作用に対する影響の解析を行った。その結果、DLPC、PLPC、POPCの細胞保護作用は、GF109203X前処理により大幅に抑制され、Go6976前処理によってやや抑制された。一方、LY333531前処理による影響はほとんど観察されなかった。このことから、PKC γ の活性化が保護作用に重要であると考えられた。さらに、PKCの下流シグナルの検討を阻害剤を用いて解析を行った。その結果、これら3種のリン脂質の細胞保護作用は、Akt阻害剤前処理により抑制された。従って、これら3種のリン脂質の細胞保護作用にはPKC、主に γ サブタイプが関与しており、その下流シグナルとしてAktが関与していると考えられた。

*06 非保存部位特異的な人工結合タンパク質による ABC transporter の基質排出能阻害

○岡本 恵祐¹、神谷 友華¹、雨坂 心人¹、松村 浩由²、高野 和文¹、
田中 俊一¹

(¹京府立大院・生命環境、²立命館大院・生命科学)

【目的】

ATP-Binding Cassette (ABC) transporterはATPを駆動力として様々な基質を輸送する膜タンパク質である。ABC transporterは細菌からヒトまで幅広い生物種で保存されており、生命活動において重要である。その一方で、ABC transporterは疾患との関連性も示唆されており、一例として、ヒトにある48種類のABC transporterの1つであるABCB1がある。ABCB1は、がん細胞で過剰発現して抗がん剤を排出することで、がん細胞に薬剤耐性を与えることが報告されている。そのため、ABC transporterによる基質排出に焦点が当てられ、基質排出を阻害する低分子薬の開発がなされてきた。しかし、既存薬の標的は、基質結合部位やATP結合部位といったABC transporter間で高度に保存されている部位であるため、特異性に欠け、深刻な副作用を引き起こすことが問題となっている。

そこで本研究では、ABC transporter間で配列・構造的に保存度の低い部位に結合する阻害剤を創出し、その阻害機序を解明することで、新たな阻害形式の提案に繋げることを目的とした。

【方法・結果】

ABC transporterのモデルタンパク質は、本研究室において知見が蓄積されており、基質であるタンパク質LipAを分泌する、*Serratia marcescens*由来のLipBのNucleotide Binding Domain (LipB-NBD) を選択した。本研究では、LipB-NBD のATPase活性部位が阻害剤の標的とならないように、ATPを介した二量体を保持する変異体LipB-NBD (NBD^{Dimer}) を用いた。阻害剤のモデルとして、本研究室において*in vitro*での迅速なスクリーニングが可能であり、容易に結合部位をマッピングできる人工結合タンパク質、Monobody (Mb) を選択した。まず、ファージディスプレイ法・酵母表層ディスプレイ法を用いてNBD^{Dimer}特異的に結合するMb01、Mb02を獲得した。これらのMbは、*in vivo*においてLipBの基質輸送能を阻害した。続いて、より優れた阻害能を示したMb02を選択し、NBD^{Dimer}との結合様式を解明すべくX線結晶構造解析を行った。その結果、2.04 Å分解能での立体構造の決定に成功した。これらの成果をもとに、本アプローチの有効性について議論する。

*07 筋萎縮性側索硬化症に関連する単量体 Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼに特異的なモノボディの開発

○雨坂心人¹、原瑞穂¹、塚優貴¹、新谷敦子²、須恵香里²、山中智行³、田中俊一¹、古川良明²

(¹京都府大院・生命環境、²慶應大・理工、新潟大・脳研究所)

【背景・目的】スーパーオキシドジスムターゼ(SOD1)は、細胞内で活性酸素の分解を担う酸化還元酵素である。ホモ二量体からなり、各サブユニットに銅イオンと亜鉛イオンが結合することで高い構造安定性を有している。しかしながら、家族性筋萎縮性側索硬化症(ALS)患者の一部では、ミスフォールドしたSOD1の脊髄運動ニューロンへの蓄積が報告されている。その原因は未解明な部分が多いが、金属イオンの解離や病原性変異による不安定化によって、凝集し易い単量体への構造変化が促進されることでALSが発症する説が有力視されている。このような背景から、ALSの病態解明への貢献ならびに診断用ツールへの応用を期待し、単量体SOD1を特異的に認識するプローブの開発が望まれている。現在、SOD1 exposed dimer interface(SEDI)抗体を用いた単量体SOD1の検出は可能であるが、ポリクローナル抗体であるため再現性が課題となっている。更に、抗体は構造形成にS-S結合を必須とするため、還元環境下である細胞内で安定的にフォールディングして機能することができない。そこで我々は、人工結合タンパク質Monobody(Mb)に着目した。Mbはモノクローン化された分子であり、単一エピトープを認識するため再現性が高い。また、骨格構造にS-S結合を持たないため、in-cell解析への利用も期待できる。本研究では、単量体SOD1に特異的に結合するMbを創出し、生体試料中の単量体SOD1が検出可能かを検証した。

【方法・結果】ファージディスプレイと酵母表層ディスプレイを用いて、変異導入により単量体化させたSOD1(MM)に対するMbのスクリーニングを行い、Mb(S4)を獲得した。続いてバイオレイヤー干渉法(BLItz)を用いた結合能解析から、Mb(S4)は二量体SOD1(WT)には結合せず、単量体SOD1(MM)に対して特異的に結合することが確認できた。一方で、SOD1(MM)とMb(S4)の親和性が低い($K_d = 5.0 \times 10^{-6} \text{M}$)という課題が明らかとなった。そこで、近接分子を特異的に架橋するタンパク質クロスリンク法の併用を試みた。in vitro 試料として精製されたSOD1、ex vivo 試料としてSOD1を発現させたマウス由来神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a、*S. cerevisiae*、*E. coli*のライセートを用意し、それぞれに対してMb(S4)を添加後、架橋剤処理を施した。架橋後の試料をSDS-PAGEとウェスタンブロットニングで解析した結果、Mb(S4)はin vitro と ex vivo の両条件において単量体SOD1を特異的に検出できることを確認した。以上の結果より、Mb(S4)は単量体SOD1の特異的プローブとして有用であることが示された。

*08 バイオフィルムの形態形成及び遺伝子発現動態を捉える 低コストイメージングシステムの開発

○酒井隆之介¹、趙一帆¹、Robert Martin¹

(¹京大院・薬)

【目的】

生命科学において、ライブイメージングは発生過程の遺伝子動態を理解するための重要な技術である。そのため、経時的観察には撮影行程を完全に自動化した市販の機器が使用されるが(Choong et al. 2021; Eckert et al. 2022)、すべての研究室がそのような機器を購入できるほど経済的に余裕があるわけではない。加えて、研究室によって撮影機器に求める機能は異なり、ニーズに合わせてその機能を調整できるカスタマイズ性の高い機器が望まれる。これらの背景から、ユーザー独自のイメージング環境やシステムを構築する動きが勢いを増している(Pi et al. 2022)。この動きを支えている主な要因は Raspberry pi などのマイクロコンピュータや 3D プリンターを安価に利用できるようになったことである (Baden et al. 2015)。

また、当研究室ではバイオフィルムの遺伝子発現の時空間的な分布の変化から集団的な細胞の振る舞いを巨視的に解析することを目的としているが、当研究室で稼働している撮影環境は一視野で複数のサンプルにおける単色の蛍光を観察することしか出来ない。これらの背景から、我々の研究対象であるバイオフィルムの観察を前提として、その立体構造、光学密度や複数の蛍光など複数のモードでバイオフィルムを観察できる自動化された機器を低コストで開発することを本研究の目的とした。

【方法・結果】

3Dプリンターによる印刷物を骨格とし、Raspberry pi からLED光源のON/OFF、LED光源、光学フィルター、ウエルの移動とカメラを制御することによって、9つのペトリ皿において二種類の明視野画像、緑色及び赤色蛍光画像を撮影可能な機器を開発した。ベンチマークテストでは、観察対象の各撮影時間における位置のずれは観察されなかったことから、ウエルの位置制御が正確であることが示された。そして、LED光源と対応する光学フィルターの適合性評価ではGfpmut2とmCherryの蛍光は区別・検出された。最後に、構成的に二種類の蛍光タンパク質を発現する大腸菌バイオフィルムを同時に9つ培養、解析した結果、光学密度の増加とともに蛍光タンパク質に起因する蛍光が増加し、観察対象の位置ずれもなく5日間の観察が遂行された。

これらの結果から、我々の低コストで開発した撮影機器は複数のサンプルを自動的、経時的、マルチモードで観察できることが示された。今後は開発された撮影機器を改良しながら、バイオフィルムにおける細胞集団の振る舞いと時空間的な遺伝子発現との繋がりを明らかにしていきたい。

09

Caenibacillus caldisaponilyticus B157^T 株のホスホリパーゼ A の成熟化機構と機能解析

○永野晏那、中川玲央奈、辻本善之

(京都府大 院・生命環境科学)

【目的】ホスホリパーゼA(PLA)は、リン脂質をリゾリン脂質と遊離脂肪酸に加水分解する酵素であり、広く産業利用されている。しかし、既存PLAには様々な問題があるため代替酵素が求められている。本研究室では新規PLA(PlaA)を細胞外産生する好熱性細菌 *Caenibacillus caldisaponilyticus* B157^T株を単離した。PlaAはC末端側にpro配列を持つ不活性型(PlaA-Cpro)として分泌され、細胞外で活性型(PlaA)へと成熟化する。大腸菌では成熟型PlaAは封入体として発現した。しかし、Cproを含む不活性型PlaA-Cproを大腸菌で発現させ、*in vitro*プロセッシングすることで活性型組換えPlaA(rPlaA)が得られた。従って、CproはPlaA-Cproのフォールディングに参与するシャペロンの機能とPlaAの活性を阻害する機能を併せ持つことが示唆された。また、rPlaAは加水分解活性に加えトランスアシラーゼ活性(アシルCoA非依存的アシル基転位活性)を持つ可能性がある。本研究では、PlaAの成熟化機構におけるCproの機能解析、rPlaAの諸性質解析及びrPlaAを用いたリン脂質の改変を試みた。

【方法・結果】

成熟化機構: PlaA-Cproの大腸菌での細胞内発現でフォールディングに不可欠な領域を特定するため、3次元構造予測等に基づき、3種類のCpro欠失体を作製した。PlaA-Cproでは封入体をほぼ形成しなかったが、成熟型PlaAとCpro欠失体の全てにおいて封入体が形成された。従って、フォールディングにはCproのほとんどの領域が不可欠であることが判った。次に、封入体のリフォールディングへのCproの寄与を調査した結果、より短いCpro鎖長でもリフォールディングが可能であった。

機能解析: rPlaAは、広域のpH・温度で安定(pH 3.0-12.0、0-65°C)かつ高活性(pH 6.0-11.0、60-70°C)であった。以下の実験は基質に卵黄phosphatidylcholine(PC)、界面活性剤にタウロコール酸Naを用い、60°C、pH 7で行った。次に、反応生成物に基質のsn-1位に多く存在する飽和脂肪酸が98%含まれたことから、rPlaAはsn-1位選択性が高いことが明らかとなった。rPlaAは、PCの他にcardiolipin、phosphatidylglycerol、phosphatidylethanolamineを加水分解した。さらに、rPlaAはリン脂質や脂肪酸の種類ではなく、基質や界面活性剤の会合状態(ミセル)を認識して活性化することが判った。次に、脂肪酸組成の異なる3種類の植物油(オリーブ油、ココナッツ油、アマニ油)を用いて卵黄PCの脂肪酸置換を行った結果、全ての植物油で置換が確認できた。さらに、ヒドロキシ脂肪酸を多く含むヒマシ油を用いた場合でも、反応後の改変PCの脂肪酸組成はヒドロキシ脂肪酸が改変前のPCより48%増加した。

10

Thermotoga maritima ピルビン酸キナーゼ使用によるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法凍結乾燥試薬の保存安定性の向上

Kevin Maafu Juma¹、村上雄人²、森本健太¹、滝田禎亮¹、兒島憲二³、鈴木孝一郎⁴、柳原格⁵、生田宗一郎²、藤原伸介²、○保川清¹
 (¹京大院農、²関学生命環境、³姫路獨大薬、⁴微研、⁵大阪母子医療セ)

【目的】リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法 (RPA法) は、リコンビナーゼ (Rec)、1本鎖DNA結合タンパク質 (SSB)、鎖置換型DNAポリメラーゼ (Pol)、ATP再生酵素 (ARE) により標的DNAを約41℃の一定温度で増幅させる (図1)。RPA法を現場での核酸検査に普及させるために、試薬の常温保存が求められている。従来、ウサギクレアチンキナーゼがAREとして使われてきた。我々は近年、ヒト由来ピルビン酸キナーゼ (hPK) がAREに応用できることを報告した¹⁾。本研究では、*T. maritima* 由来の耐熱性ピルビン酸キナーゼ (TmPK) のAREへの応用を検討した。

【方法・結果】 1. 発現と精製: N末端に(His)₆が付加されたTmPK遺伝子が挿入されたpET-28aを大腸菌BL21(DE3)に導入した。250 mLの培養液から5 mg のTmPK が精製された。 2. 活性測定: ADP、ホスフォエノールピルビン酸 (PEP) を基質とし、NADH、乳酸脱水素酵素存在下、pH 7.5、25℃で反応させ、340 nmの吸光度の減少を測定した。TmPKの比活性は、hPKの20%であった。 3. 耐熱性: PKを52~92℃で10分間熱処理後、活性測定を行った。hPKは64℃で活性が50%に低下したが、TmPKは92℃でも低下しなかった。

4. RPA: ウレアプラズマのUreB DNAを標的とし、41℃で反応を行い、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で解析した。TmPKとPEPの最適濃度は20 ng/μL、5 mMであった。TmPKを用いたRPAでは、標的DNAが6,000分子以上存在するとき、30分間で増幅された。 5. 凍結乾燥試薬: Rec、SSB、Pol、TmPKまたはhPK、dNTPを混合後トレハロースを加え、EYELA-FD1000 (東京理科器械) を用いて-50℃、50 Paで16時間凍結乾燥を行った。その後、20℃で0~28日保存後、水に溶解し、RPA反応を行った。TmPKを含む試薬はhPKを含む試薬よりも高い性能を示した。

【考察】 TmPKはRPA凍結乾燥試薬への応用に適している。このことから、耐熱酵素は中温酵素よりも、凍結乾燥試薬への応用に広く適していることが示唆された。

【文献】 1) Kojima *et al.* (2023) *J. Biosci. Bioeng.* **136**, 341–346

2) Juma *et al.* (2024) *J. Biosci. Bioeng.* in press

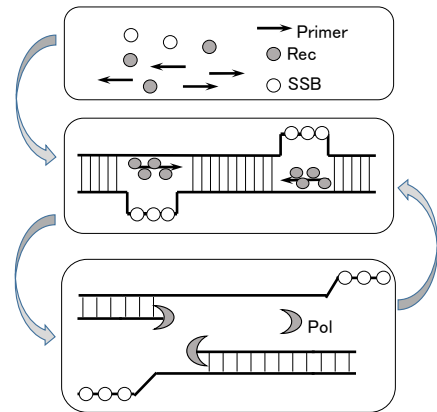


図1. RPA法の増幅原理

*11

新規ブラシノステロイドシグナル伝達因子 BIL7 による植物成長促進機構の解明

○西田快世¹, 仲村友介¹, 宮地朋子¹, 山上あゆみ¹, 宮川拓也¹, 浅見忠男², 松井南³, 中野雄司¹

(¹京大院・生命, ²東大院・農, ³理研・CSRS)

【目的】

植物ホルモン・ブラシノステロイド(BR)は植物の成長促進において重要な役割を担っており、その生理作用から様々な作物における農業利用も試みられている。未解明部分が多く残る細胞膜から核にかけてのBRシグナル伝達機構の解明を目指し、BR生合成阻害剤Brzに耐性を示す変異体の選抜を行った結果、新規BRシグナル伝達促進因子BIL7が単離された。BIL7は細胞膜と核に局在し、核においてBRシグナル伝達のマスター転写因子BIL1と相互作用することが明らかとなり、BRシグナル伝達において重要な役割を担うことが期待される。さらに、*BIL7* 高発現イネは種子収量が野生型と比較して150%上昇することが明らかとなっているが、*BIL7*タンパク質に既知の機能領域が認められず、具体的な分子機能の解析が待たれている。本研究では、BRによる植物成長促進機構の全貌解明を目指し、*BIL7*によるBRシグナル伝達のマスター転写因子BIL1制御の分子機構を解析した。

【方法・結果】

*BIL7*は基本的に細胞膜に局在するが、限定的な細胞において核局在が観察されている。*BIL7pro::BIL7-GFP* 形質転換体の観察を行った結果、*BIL7* は発芽初期や根端の細胞において核局在することが明らかとなり、*BIL7*は細胞伸長が活発な時期・組織において機能すると考察された。核内における*BIL7*の転写因子BIL1を介した遺伝子発現制御機構を解析するため、*BIL7*とBIL1の機能獲得型変異体を用いてRNA-seqを行った。*BIL7*がBIL1の転写制御に与える直接的な影響を調べるため、転写因子標的遺伝子を解析するChIP-seqの公開データを考慮した解析を行った。その結果、*BIL1*が標的とし、かつ*BIL1*と*BIL7*の両方において発現活性化される遺伝子数は、*BIL1*のみで発現活性化される遺伝子数に比べて約6倍であった。一方、同条件下で*BIL1*-*BIL7*両方による発現抑制遺伝子数は、*BIL1*単独の約1.6倍と大きく変わらなかった。この結果は、*BIL1*が持つ転写の活性化と抑制化という両面の遺伝子発現制御機能の中で、特に発現活性化時に*BIL7*はコアクチベーターとして機能していると考察された。さらに *BIL7*の*BIL1*に対する作用機序を解析するため、プロトプラスト一過性発現系によるCo-IP法を用いて、*BIL7*と *BIL1*のドメイン別相互作用解析を行った。その結果、*BIL7* は種間で保存された領域において*BIL1*のDNA結合領域以外の領域と相互作用することが明らかとなり、*BIL7*の機能における *BIL1*との相互作用の重要性が考察された。

以上のことから*BIL7*は、細胞伸長が活発な時期・組織においてBRシグナルの活性化により細胞膜から核に移行し、核内においてBRシグナル伝達のマスター転写因子BIL1による促進的な転写を活性化することによってBRシグナル伝達を促進していると考えられた。今後*BIL7*によるBIL1制御の詳細な分子機構の解析を進めることにより、*BIL7*の機能解明が進むことが期待される。

産学交流講演会

合成生物学を用いた希少天然化合物の大量生産

○新谷隆史

(ファーマランタ株式会社)

人類はこれまで、健康増進や医薬品開発のために天然化合物を有効利用してきた。その中でも植物由来の有用成分は、生理機能が多種多様で、医薬品・化粧品・機能性食品等の原料として幅広く利用されている。しかし、その多くは複雑な構造を有しており、化学合成による実用生産が困難である。一方、従来農業による植物の栽培は特定地域の年単位の不安定な栽培に依存し、さらに複雑な抽出法によって僅かな含有成分を抽出しなければならないため、安定して必要量を確保する上で大きな障壁が存在している。その結果、化学合成物に比べて天然物は非常に高価になるなど、その利用は限定的なものになってしまっている。このような中で近年、微生物を用いた有用成分の生産に注目が集まっている。微生物は生育が早く、省スペースでの培養も容易であり、時間的・空間的コストを抑えることができる。さらに、微生物発酵を通じた有用物質生産は化学合成法に比べて環境負荷が少なく、化学工業に代わる持続可能な産業変革に向けた解決策として期待が寄せられている。

ファーマランタ株式会社では、植物由来の希少成分をはじめとする有用化合物を、大腸菌を用いて効率的に発酵生産する技術の確立を目指して研究開発を進めている。我々が主なターゲットとするアルカロイド・フラボノイド・テルペノイド・カンナビノイドなどの植物の二次代謝産物は、化学合成法による代替生産が難しい複雑な化学構造を持つ。また、そもそも植物と同じ生産能を保有する微生物は存在しないため、宿主に多くの遺伝子を導入して植物と似たような目的物質の生合成経路を構築する必要がある。そのために、前例に無い 20 種以上の外来遺伝子を 1 菌体に導入し、適切に発現させる必要がある。このような技術を用いて、グルコース等の簡素な糖源から複雑な構造を持つ有用成分を発酵生産させることができれば、気候や栽培地域に依存せず、スケールアップ可能な生産及び供給が可能になると考えられる。

本講演では、弊社の創業の経緯や弊社が有する技術、現在開発中の諸化合物などについて紹介したい。また、アカデミア出身の講演者が体験した、アカデミアとベンチャー企業の相違点についてもお話しできればと考えている。

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

東洋紡株式会社

植田製油株式会社

ナカライテスク株式会社

江崎グリコ株式会社

日世株式会社

株式会社カネカ

株式会社日本医化器械製作所

菊正宗酒造株式会社

ハウスウェルネスフーズ株式会社

黄桜株式会社

ヒガシマル醤油株式会社

月桂冠株式会社

不二製油株式会社

甲陽ケミカル株式会社

松谷化学工業株式会社

三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社

三井化学アグロ株式会社

サントリーホールディングス株式会社

株式会社三ツワフロンテック

住友化学株式会社

大和酵素株式会社

株式会社第一化成

理研化学工業株式会社

宝酒造株式会社

株式会社ロッテ

築野食品工業株式会社

和研薬株式会社

(50音順 敬称略)

- 日本農芸化学会関西支部 第 530 回講演会
幹事校 京都府立大学
幹事校代表 亀井 康富 (京都府立大学大学院 生命環境科学研究科)
(問い合わせ先)
幹事校庶務幹事 森田 重人 (京都府立大学大学院 生命環境科学研究科)
Tel/Fax: 0774-93-3526/3261 E-mail : s_morita@kpu.ac.jp
- 次回支部例会 (第 531 回講演会) 予定
開催日 : 2024 年 7 月 12 日 (金)
同日開催 : ミニシンポジウム「カロテノイドから拓く農芸化学の新局面」、
北風 智也 (阪公大院・農)、藤井 律子 (阪公大・人工光合成研究センター)、
三沢 典彦 (石川県大・生資工/CaroProTech)
若手女性研究者賞 受賞記念講演 (奥田 綾・京都大学複合原子力科学研究所)
開催校 : 大阪公立大学 (中百舌鳥キャンパス)
講演申込締切 : 2024 年 6 月 21 日 (金)
講演要旨締切 : 2024 年 6 月 28 日 (金)
(問い合わせ先)
幹事校庶務幹事 原田 直樹 (大阪公立大学大学院 農学研究科)
Tel&Fax : 072-254-9454 E-mail : naoki.harada@omu.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 2024 年 5 月 28 日 (火)
日本農芸化学会関西支部ホームページ : <http://kansai.jsbba.or.jp/>