

**日本農芸化学会関西支部
第 531 回講演会**

講演要旨集

令和 6 年（2024 年）7 月 12 日（金）

大阪公立大学（中百舌鳥キャンパス・学術交流会館）

日本農芸化学会関西支部



第531回講演会プログラム

■ 開会の辞 (13:00～13:05)

秋山 康紀 開催校幹事代表

■ ミニシンポジウム (13:05～15:10)

カロテノイドから拓く農芸化学の新局面 [発表時間 35分：質疑応答 5分]

ミニシンポジウム趣旨説明

世話人代表 三浦 夏子 (阪公大院・農)

1. カロテノイドによる骨格筋の調節
北風 智也 (阪公大院・農)
2. 海洋緑藻ミルにおける青緑光によるシフォナキサンチン生合成の制御
藤井 律子 (阪公大・人工光合成研究センター)
3. カロテノイド遺伝子を切口とした学際研究
三沢 典彦 (石川県大・生資工/CaroProTech/北陸学院大・健康科学)

■ 休憩 (15:10～15:25)

■ 一般講演 (15:25～16:35)

[発表時間 10分：質疑応答 3分：交代 1分] *印は優秀発表賞対象講演

- *1. 去勢による男性ホルモン低下とフルクトース摂取による腸内細菌叢－内臓脂肪量－脂肪肝への影響
○高橋 央樹¹、速水 陽平²、原田 直樹^{1,2}、Erdenetsogt Dungubat³、中澤 昌美^{1,2}、北風 智也^{1,2}、杉本 圭一郎^{4,5}、乾 博^{1,6}、高橋 芳久³、山地 亮一^{1,2,5}
(¹阪公大院・農、²阪府大・生命環境、³東京医科大・分子病理、⁴長岡香料、⁵阪公大・生資センター、⁶大手前大・健康栄養)
- *2. 糸状菌における糖の種類に応じた糖質加水分解酵素遺伝子群の選択的遺伝子発現制御機構の解明
○志賀 結衣¹、菊矢 咲季²、川口 剛司^{1,2}、谷 修治^{1,2}
(¹阪公大院・農、²阪府大・生命環境)
- *3. 低酸素条件下で形成される酵素集合体G-bodyの単離・精製に向けた基礎検討

○森川 穂香、赤井 美咲、三浦 夏子、片岡 道彦
(阪公大院・農)

*4. ピキア酵母を宿主としたヒト血清アルブミン分泌発現系の構築と融合タンパク質への応用

○小森 美月、藤枝 伸宇、森田 能次
(阪公大院・農)

*5. 組換えヒト α -グルコシダーゼのHEK293細胞への発現

○西本 創¹、Anais Debarbat¹、池田 祐輝¹、有川 慧美¹、小田垣 祐生¹、
矢野 晴菜¹、喬 穎¹、伊東 昌章²、木村 俊之³、滝田 禎亮¹、保川 清¹
(¹京大院・農、²沖縄高専・生物資源、³農研機構・高度分析研究センター)

■ 優秀発表賞の投票・集計 (兼 休憩) (16:35~16:50)

■ 2024年度農芸化学若手女性研究者賞 受賞記念講演 (16:50~17:20)
小胞体における酸化的フォールディング酵素の機能・構造相関解析
奥田 綾 (京大・複合研)

■ 優秀発表賞表彰式 (17:20~17:25)

■ JSBBA KANSAI Student Committee からの案内 (17:25~17:30)
光部 雅俊

■ 関西支部創立90周年記念支部大会 (第532回講演会) のアナウンス (17:30
~17:35)

■ 閉会の辞 (17:35~17:40)
森 直樹 日本農芸化学会関西支部 支部長

■ 懇親会 (17:45~18:45)

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

カロテノイドによる骨格筋の調節

北風 智也（阪公大院・農）

【はじめに】骨格筋は、身体を動かす物理的な運動器としての機能以外に、糖や脂質を代謝する機能も担う。さらに骨格筋はオートクライン的に骨格筋自体、あるいはパラクライン/エンドクライン的に他の組織の生理作用を調節するマイオカインと呼ばれる分泌因子を産生する機能も有する。骨格筋量は運動などにより負荷がかかることによって増加する一方、加齢や運動不足、栄養不良によって減少する。骨格筋量の減少による活動量の低下は QOL の低下を招き、また肥満や糖尿病のような代謝疾患に罹患するリスクを高める。したがって骨格筋量の維持・増加に寄与する食品成分とその食品成分による調節機構を理解することは、骨格筋量の減少による身体的不利益を予防・改善するために重要な課題である。本講演では、骨格筋の健康増進に寄与する食品成分としてカロテノイドが骨格筋を量的・質的に調節する分子機構に関する研究成果を紹介する（図 1）。

【カロテノイドの筋萎縮抑制作用】大規模な疫学調査 (Invecchiare in Chianti Study, イタリア; Women's Health and Aging Study, アメリカ) から高齢者における筋力と歩行速度に関してヒトの血中に存在する主要なカロテノイド (α -カロテン、 β -カロテン、 β -クリプトキサンチン、ルテイン、ゼアキサンチン、リコピン) が有益性をもつことが示唆されている。カロテノイドは脂溶性の色素化合物であり、多数の共役二重結合を持ち、高い抗酸化作用を有する。一方で、 β -カロテンや β -クリプトキサンチンは生体内で特異的な酸化酵素によって 2 分子あるいは 1 分子のレチナールとなり、その後レチノイン酸 (ATRA) へと代謝される。ビタミン A 欠乏は骨格筋におけるタンパク質分解を増加することから、 β -カロテンや β -クリプトキサンチンは抗酸化剤として機能する以外に、代謝されてビタミン A として骨格筋の量的・質的な維持・増加に寄与する可能性を持つ。そこで我々は、 β -カロテンと β -クリプトキサンチンに着目して骨格筋量と筋力に与える影響を検討した。骨格筋量が低下する寝たきりモデルのマウスに β -カロテンを摂取させた結果、 β -カロテンは速筋である腓腹筋重量には影響せず、遅筋であるヒラメ筋重量の減少を抑制した¹⁾。一方で、老化モデルのマウスに β -クリプトキサンチンを摂取させた結果、筋力の指標であるグリップ力が増加した²⁾。また、 β -クリプトキサンチン摂取は遅筋であるヒラメ筋重量において低下した選択的オートファジーを亢進し、ヒラメ筋量を増加させた。

【カロテノイドの筋肥大促進効果】 健常なマウスに β -カロテンを摂取させたところ速筋である腓腹筋重量には影響せず、一方でヒラメ筋ではタンパク質合成が促進し、筋肥大をともなった筋量の増加と筋力の上昇が認められた³⁾。 β -カロテンによるヒラメ筋重量増加の分子機構として、レチノイン酸受容体 γ に依存して発現の増加するトランスグルタミナーゼ 2 が分泌タンパク質として骨格筋細胞の細胞表面に存在する G タンパク質共役受容体である GPR56 を介してタンパク質合成を促進し、筋肥大を誘発することを明らかにした⁴⁾。 β -カロテンの骨格筋に及ぼす有効性が、遅筋であるヒラメ筋においてのみ起こる理由を明らかにするため、骨格筋におけるカロテノイドトランスポーターの発現量に着目した。CD36、SR-B1、NPC1L1 の 3 つカロテノイドトランスポーターの発現量を遅筋と速筋で比較した結果、遅筋における CD36 の発現量が速筋と比べて顕著に高いことを見出した⁵⁾。 β -カロテンによるヒラメ筋重量の増加は CD36 のノックダウンによって消失したことから、遅筋特異的に β -カロテンが CD36 を介して骨格筋に取り込まれることが示唆された。さらに、 β -カロテンをレチナールに代謝する BCO1 のノックアウトマウスでは β -カロテンによる筋重量の増加がみられず、骨格筋に取り込まれた β -カロテンがビタミン A に代謝され RAR γ を活性化することが骨格筋量の増加に必要なことを示唆する結果を得た。

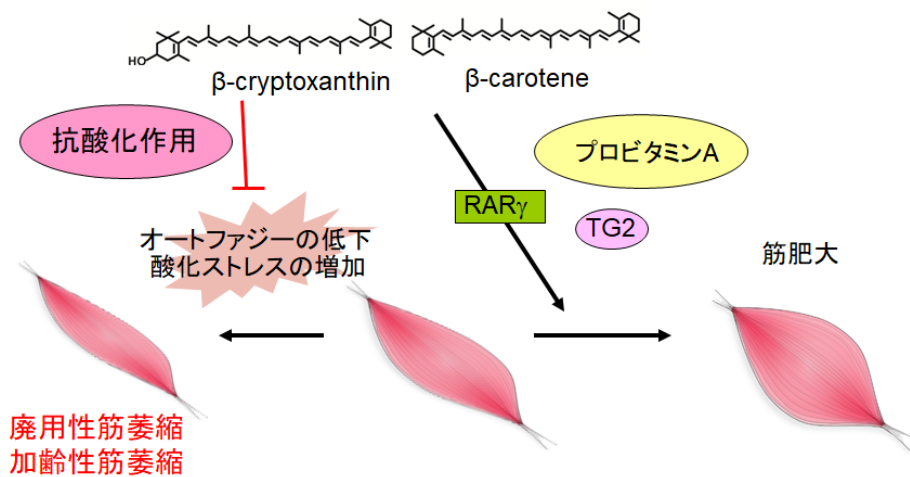


図1 プロビタミン A カロテノイド骨格筋量調節機構

参考文献

1. Ogawa M. et al. Br. J. Nutr. 109 (8):1349-1358 (2013)
2. Noguchi M. et al. Nutrients. 12(8):2180 (2020)
3. Kitakaze T. et al. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 61 (6):481-7 (2015)
4. Kitakaze T. et al. Biochem. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res. 1867(2):118563 (2020)
5. Kitakaze T. et al. J. Clin. Biochem. Nutr. 71(2):112-121 (2022)

海洋緑藻ミルにおける青緑光によるシフォナキサンチン生合成の制御

藤井 律子 (阪公大・人工光合成研セ)

カロテノイドの一次生産は光合成生物による。太陽光をエネルギー源として活用するには、必要な光を捉える集光だけでなく、強すぎる光を安全に逃す消光を必要に応じて駆動する調節機構が必要である。この調節機構を主に担うのが光合成アンテナと呼ばれる色素結合型タンパク質である。これに結合したカロテノイドは、集光と消光の両方に寄与している。

緑藻ミル (*Codium fragile*) は、渋い深緑色を呈する日本原産の食用海藻であるが、近年、世界中の港で繁茂し、侵略的外来種となっている。ミルが生育する潮間帯は、潮汐による水深の変化で、光環境が青緑色の弱光から白色の強光まで大きく変動する。鮮やかな緑色を呈する緑藻や高等植物はルテイン (Lu) を持つところ、ミルは独特のカロテノイド、シフォナキサンチン (Sx) を持つ。Sx は光合成アンテナ LHCII に結合すると緑色の光を吸収し、光合成に役立てることができるので、ミルは水深の深い場所では有利となる。しかしながらミルは、強すぎる光から生体を防御する代表的な仕組みであるキサントフィルサイクル (Xc) を持たない。Xc は、強光に応答して、デオキササンチンのエポキシ基脱離反応を促進し、共役二重結合数が多いゼアキササンチンの蓄積を誘導する現象である。では、ミルはどのようにして干潮時の強い白色光に適応するのだろうか。ミルと近種のイワズタ (*Caulerpa racemosa*) については、生育時の光強度に応じて蓄積している Sx/L の量比が変化した調査結果に基づき、Xc に類似のメカニズムで、Sx と Lu の光強度に応じた可逆的な構造変化が光保護機能と関連づけられるのではないかという Sx-Lu サイクルが提案されている [1]。同様の光に応答した色素組成変化がミルでもみられるのだろうか。

我々は、実験室内で培養したミル (KU-0654、神戸大学海藻類系統株コレクション) 系状体を用いて、照射光の波長や強度による蓄積色素の時間変化を詳細に調べたところ、青緑色光で、顕著な Sx の減少とそれに伴う未同定のカロテノイドが蓄積することを発見した。このカロテノイドの絶対化学構造を決定し、これが Lu から Sx への生合成中間体であるデオキシシフォナキサンチン (dS) であること、また青色強光で生育した場合、dS や Lu が光合成アンテナ LHCII に結合し

ていることを明らかにした[2]。では光合成アンテナ LHCII 内で Sx が入れ替わることがあり得るのだろうか。我々は、ミルの光合成アンテナ LHCII の高分解能構造の取得に初めて成功し、Sx の結合サイトのたんぱく質が、Lu を結合するハウレンソウの場合とほぼ同一であることを明らかにした[3]。この結果は、強い青緑色光で生育した場合、Sx が Lu や dS に入れ替わった光合成アンテナが生成している可能性を裏付けるものであった。

この色素置換による消光メカニズムを明らかにすることは、今後の課題である。一方、生合成中間体 dS の構造と物性が明らかになったことで、Sx の生合成の光環境応答の観測例が増えると期待できる。また遺伝子情報と合わせることで、今後 Sx の生合成酵素を明らかにしていく糸口が得られたのではないかと考えている。

[1] Raniello, R., et al., *Mar. Ecol.* 27:20–30 (2006).

[2] Seki, S., et al., *FEBS Lett.* 596(120):1544-1555 (2022). DOI: 10.1002/1873-3468.14357

[3] Seki, S., et al., *BBA Adv.* 2:100064 (2022). DOI: 10.1016/j.bbadv.2022.100064.

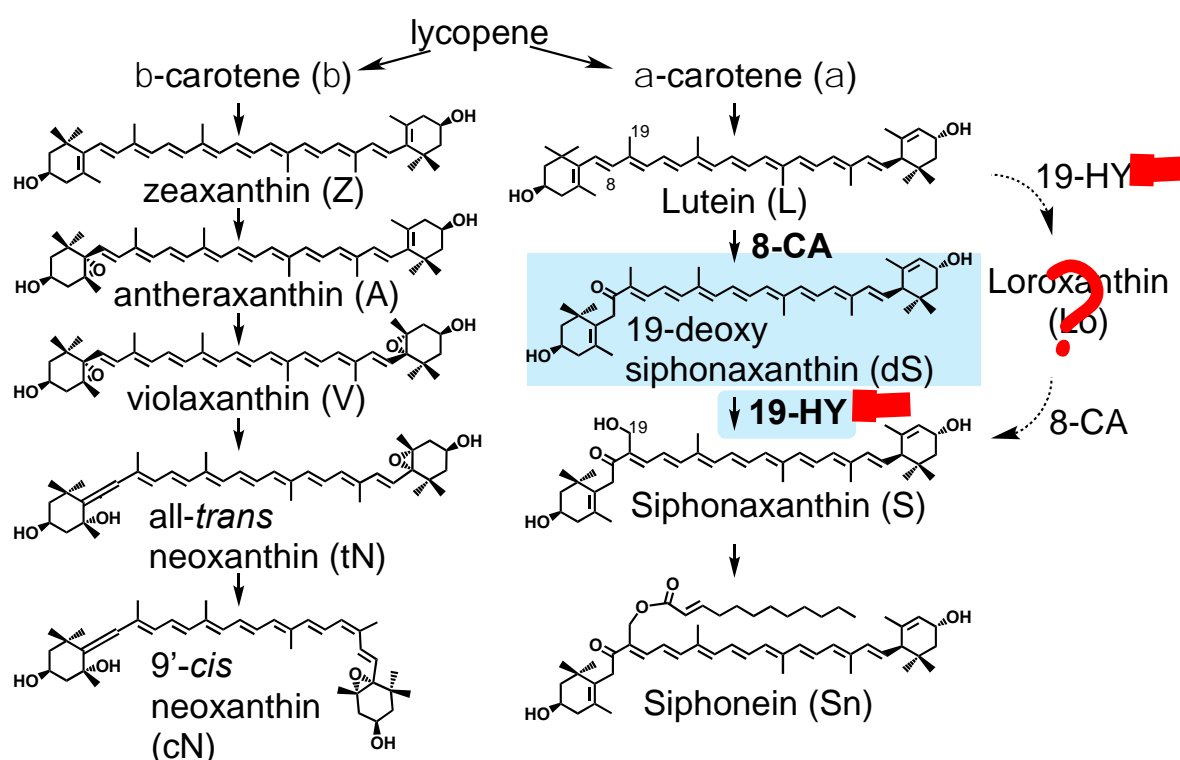


図 1: 緑藻ミルのカロテノイド生合成経路。赤で指示した酵素は青緑色光で阻害されると考えられる。従来提示されていた点線の経路の存在を示すロロキサントンの蓄積挙動は観測できなかった。

カロテノイド遺伝子を切口とした学際研究

三沢 典彦（石川県大・生資研／CaroProTech／北陸学院大・健康科学）

1. カロテノイドの多様性

現在までに、750 種以上のカロテノイド色素が自然界に存在することが確認されており、基本骨格が炭素数 40 (C40) の典型的なカロテノイドに加えて、基本骨格が炭素数 30 (C30) や炭素数 20 (C20) のカロテノイドが存在する¹⁾。シアノバクテリア、藻類、コケ類、高等植物を含む全ての光合成生物は C40 カロテノイド (β -Carotene、Zeaxanthin 等) を生合成する。合成されたカロテノイドは、光エネルギーの吸収、クロロフィルへの伝達、過剰な光エネルギーの放散 (熱エネルギーに変換)、及び、光エネルギーにより発生した一重項酸素をはじめ活性酸素種の消去 (光酸化の抑制) 等の機能を担うと考えられる。また、一部の高等植物の特定器官には、水溶性の C20 カロテノイド (Crocins 等) が蓄積するが、それらは C40 カロテノイドから dioxygenase の働きにより作られたものである²⁾。なお、光合成を行わない細菌、アーキア、カビの一部もカロテノイドを生合成できるが、それらも C40 カロテノイドであり、光酸化の抑制やその他の環境ストレスへの耐性等の機能を担うと考えられている。一方、Firmicutes 門に属する細菌 (グラム陽性細菌) の中にもカロテノイド生産菌が存在する。しかし、それらのカロテノイドは全て、直鎖状の C30 カロテノイドであり、最終産物として片端に、グルコース等の糖が付加した構造をしており (Staphyloxanthin 等)、非光合成細菌における C40 カロテノイドと同様の機能性を持つと考えられる。なお、ヒトをはじめ動物はカロテノイドを生合成できないので、健康を維持するために、C40 カロテノイドを食事から摂取する必要がある。このように、カロテノイドは構造や生理機能において多様であるが、その多様なカロテノイドを作る遺伝子はかなり解明されてきている³⁾。本講演では、これらカロテノイド遺伝子を切口とした学際研究について、我々の最近の知見を中心に紹介したい (本要旨では、2 に 1 例のみ記載)。

2. カロテノイド遺伝子を切口とした節足動物の食物連鎖研究

動物界の中で、アブラムシやハダニ等の節足動物は、例外的にカロテノイド (C40) を生合成できる^{4,5)}。我々は、アブラムシにおけるカロテノイド生合成遺伝子配列の中で、4 つの遺伝子が機能発現すること、その内の 1 つは独自に進化し、特殊なカロテノイド色素 (β,γ -Carotene や γ,γ -Carotene ; 図 1) を生合成することを見出した⁶⁾。



図 1. アキアカネの生育ステージとアブラムシ由来のカロテノイドの寄与率

次に、各生育ステージの赤とんぼ (アキアカネ; *Sympetrum frequens*) や、その他アブラムシを捕食すると考えられる節足動物からカロテノイドを抽出し、その特殊な色素を指標に、アブラムシ由来のカロテノイドの比率を調べた。その結果、アブラムシから赤とんぼ (図 1)、その他の節足動物に連なる食物連鎖の一端が解明された⁶⁾。

参考文献

- 1) G. Britton et al, Carotenoids Handbook, Basel, Boston, Berlin: Birkhäuser Verlag, 2004.
- 2) K. Shindo et al (2022) *Frontiers in Nutrition* **9**, 885412.
- 3) N. Misawa (ed), Carotenoids: Biosynthetic and Biofunctional Approaches, Springer, 2021.
- 4) N. A. Moran & T. Jarvik (2010) *Science* **328**, 624-627.
- 5) M. Grbić et al (2011) *Nature* **479**, 487-492.
- 6) M. Takemura et al (2021) *BMC Zoology* **6**, 19.

○ 演者プロフィール

名前：北風 智也 (**Tomoya Kitakaze**)

連絡先：〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻

E-mail address: kitakaze@omu.ac.jp

略歴：

- 2012年3月 大阪府立大学生命環境科学部生命機能化学科卒業
- 2014年3月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科博士前期課程修了
- 2017年3月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科博士後期課程修了、
博士（応用生命科学）
- 2017年4月 神戸大学大学院科学イノベーション研究科学術研究員
- 2019年4月 神戸大学大学院農学研究科学術研究員
- 2020年3月 神戸大学大学院農学研究科助手
- 2021年4月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科テニュアトラック助教
- 2022年4月 大阪公立大学大学院農学研究科テニュアトラック助教
現在に至る

主な研究テーマ：骨格筋における食品成分の機能性に関する研究。

今後の展望：食品成分の細胞内局在や代謝動態にも着目して機能性を明らかにしていきたい。

名前：藤井 律子 (**Ritsuko Fujii**)

連絡先：〒588-8585 大阪府大阪市住吉区杉本 3-3-138

大阪公立大学人工光合成研究センター/大学院理学研究科化学専攻

E-mail address: ritsuko@omu.ac.jp

略歴：

- 1994年3月 関西学院大学理学部化学科卒業
- 1996年3月 関西学院大学大学院理学研究科化学専攻 博士課程前期課程
修了
- 1999年4月 日本学術振興会特別研究員（DC2）
- 2001年3月 関西学院大学大学院理学研究科化学専攻 博士課程後期課程
修了
- 2001年3月 博士（理学）取得
- 2001年4月 日本学術振興会特別研究員（PD）

2002年4月 光エネルギー変換研究センター 博士研究員
2004年1月 大阪市新産業創生センター 博士研究員
2006年4月 大阪市立大学 博士研究員
2010年10月 大阪市立大学複合先端研究機構 特任准教授
2011年10月 JST さきがけ「光エネルギーと物質変換」領域研究員
(兼任)
2013年4月 大阪市立大学複合先端研究機構/大学院理学研究科物質分子
専攻 (兼任) 准教授
2020年4月 大阪市立大学人工光合成研究センター/大学院理学研究科
物質分子専攻 (兼任) 准教授
2022年4月 大阪公立大学人工光合成研究センター/理学部化学科、
大学院理学研究科化学専攻 (兼任) 准教授
2024年4月 大阪公立大学人工光合成研究センター/理学部化学科、
大学院理学研究科化学専攻 (兼任) 研究教授
現在に至る

主な研究テーマ：光合成の集光機構の解明と人工光合成への展開

今後の展望：海藻における仕組みの解明と太陽光利用効率の向上を目指した蛋白質改変への展開

名前：三沢 典彦 (Norihiko Misawa)

連絡先：〒920-1396 石川県金沢市三小牛町イ 11 番地
北陸学院大学 健康科学部 栄養学科

E-mail address: n-misawa@hokurikugakuin.ac.jp; n-misawa@ishikawa-pu.ac.jp

略歴：

1981年3月 京都大学 農学部 農芸化学科 卒業

1983年3月 京都大学大学院 農学研究科 農芸化学専攻 修士課程修了

1983年4月 麒麟麦酒 (株) 開発科学研究所・研究員 (研究所を歴任)

1989年11月 京都大学 農学博士 取得

[1991年2月-1992年5月 Konstanz 大学 (Peter Böger 研究室)・客員研究員]

1995年3月 麒麟麦酒 (株) 基盤技術研究所・主任研究員

2000年1月 麒麟麦酒 (株) 医薬事業本部 企画部創薬企画担当・
部長代理

2001年10月 (株) 海洋バイオテクノロジー研究所・分子設計領域長
2008年4月 キリンホールディングス (株) フロンティア技術研究所・
主任研究員
2010年4月 石川県立大学 生物資源工学研究所・教授
2014年7月 株式会社カロテノイド生産技術研究所 (CaroProTech) 設立
2023年4月 石川県立大学・客員教授・名誉教授、日本女子大学・
客員研究員
2024年4月 北陸学院大学 健康科学部 栄養学科・教授
現在に至る

主な研究テーマ：カロテノイド生合成遺伝子を利用した合成生物学

今後の展望：花卉植物の花弁色素の構造、機能性、及び生合成遺伝子の解明

一般講演

* 1

去勢による男性ホルモン低下とフルクトース摂取による腸内細菌叢-内臓脂肪量-脂肪肝への影響

○高橋 央樹¹、速水 陽平²、原田 直樹^{1,2}、Erdenetsogt Dungubat³、
中澤 昌美^{1,2}、北風 智也^{1,2}、杉本 圭一郎^{4,5}、乾 博^{1,6}、
高橋 芳久³、山地 亮一^{1,2,5}

(¹ 阪公大院・農、² 阪府大・生命環境、³ 東京医科大・分子病理、
⁴ 長岡香料、⁵ 阪公大・生資センター、⁶ 大手前大・健康栄養)

【目的】フルクトースを含む飲料は腸内細菌叢の変化を伴って、代謝関連性脂肪性肝疾患 (MASLD) のリスクを高める。加齢による男性ホルモンレベルの低下も腸内細菌叢の変化を伴い、MASLDなどの代謝疾患の一因となるが、男性ホルモン低下とフルクトース摂取の2つの要因とMASLDとの関係は不明である。本研究では去勢マウスを用い、男性ホルモン低下とフルクトース摂取との組み合わせによる腸内細菌叢、内臓脂肪、脂肪肝への影響を明らかにし、さらに抗生物質を用いて腸内環境を攪乱することで腸内細菌の変化との因果関係を検証することを目的とした。

【方法・結果】ICR雄性マウス(8週齢)に去勢あるいは疑似手術を行い、水道水、10%フルクトース水、10%フルクトース+抗生物質水を摂取させる計6群を設け、16週齢まで飼育した。体重は疑似手術群において抗生物質摂取により増加し、去勢によって減少した。摂水量はフルクトースによって増加したが、去勢による影響は認められなかった。皮下脂肪(鼠径部)は水道水群と比較して去勢+フルクトース群において増加し、内臓脂肪(腸間膜)は水道水群と比較して去勢群、去勢+フルクトース群において増加したが、抗生物質摂取下では有意な増加は認められなかった。肝臓中のトリグリセリド量と総コレステロール量はともに去勢+フルクトース群において疑似手術+フルクトース水群、去勢+水道水群と比較して有意に増加し、トリグリセリドについては抗生物質摂取によって増加が軽減した。肝臓で脂肪酸合成に関与する*Acc1*、*Fasn*、*Srebp-1c*、*Chrebp*、*Elovl6*の発現量は水道水群と比較して、去勢+フルクトース水群において増加し、脂肪酸取り込みを行う*Cd36*、糖取り込みを行う*Glut2*の発現量は去勢により増加した。腸内細菌叢のβ多様性は抗生物質を摂取させた2群を除いた4群の全ての組み合わせで有意な差が認められたが、α多様性に差は認められなかった。盲腸内の有機酸を解析した結果、ピルビン酸濃度が去勢とフルクトース摂取の組み合わせによって増加した。以上の結果から去勢による男性ホルモン低下とフルクトース摂取は、内臓脂肪を増加させ、相乗的に脂肪肝を発症させることを見出した。これには腸内細菌叢の構成の変化による盲腸内のピルビン酸濃度の上昇、肝臓での脂肪酸生合成あるいは脂肪酸や糖の取り込みに関与する遺伝子の発現量の増加が関与すると考えられる。

*2

糸状菌における糖の種類に応じた糖質加水分解酵素遺伝子群の選択的遺伝子発現制御機構の解明

○志賀 結衣¹、菊矢 咲季²、川口 剛司^{1,2}、谷 修治^{1,2}

(¹ 阪公大院・農、² 阪府大・生命環境)

【目的】

糸状菌 *Aspergillus aculeatus* におけるマンノビオースまたはセロビオースに応答した糖質加水分解酵素遺伝子の発現は、転写因子 ManR を介して誘導される。しかし、ManR が異なる糖に応答して選択的に糖質加水分解酵素遺伝子の発現を制御する分子機構は未解明である。当研究グループでは、UDP-glucose 4-epimerase (Uge5) が、マンノビオースに応答した遺伝子発現誘導に必須であること、隔壁形成因子 SepM がセロビオースに応答した遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした。また、分裂酵母の SepM オルソログは、隔壁形成に関わるキナーゼ (Sid1p) の活性を正に調節することから、*A. aculeatus* SepM の相互作用因子を探索し、SepM が Sid1p の *A. aculeatus* オルソログ (SepL) と相互作用することを見出した。そこで本研究では、ManR を介した選択的遺伝子発現制御において SepL と SepM が関与する情報伝達経路を解明することを目的とした。

【方法・結果】

A. aculeatus *sepL* 破壊株 ($\Delta sepL$) および *sepL* 相補株 (*CsepL*) を作出し、SepL の機能を遺伝学的に解析した。 $\Delta sepL$ は、隔壁形成能が約1/10に低下し、細胞壁形成を阻害する Congo red に対して感受性になった。また、ManR 制御下の糖質加水分解酵素遺伝子の発現は、 $\Delta sepL$ においてセロビオースに応答した遺伝子発現誘導能が消失する一方で、マンノビオースに応答した遺伝子発現量は減少するのみであることを見出した。隔壁は細胞壁と同じ多糖から構成されていることから、細胞壁の恒常性維持に関わる cell wall integrity (CWI) 経路が隔壁形成因子を介した情報伝達経路に関与しているか解析した。CWI 経路の情報伝達を担う Map kinase により活性化され CWI 関連遺伝子の発現を制御する転写因子の遺伝子 *rlmA* の破壊株 ($\Delta rlmA$) と *sepM* と *rlmA* の二重破壊株 ($\Delta sepM\Delta rlmA$) を作出した。 $\Delta rlmA$ の影響は観察されなかったものの、 $\Delta sepM\Delta rlmA$ においてセロビオースに応答した酵素遺伝子発現誘導能が消失した。一方で、マンノビオースに応答した遺伝子発現量は減少するのみであった。*uge5*破壊株も Congo red 感受性になるものの、セロビオースとマンノビオースに応答した遺伝子発現制御における CWI 経路の役割は異なることが示唆された。以上の結果より、ManR を介したセロビオースに応答する選択的な遺伝子発現は、隔壁形成因子を介した経路と CWI 経路によって制御されていることが遺伝学的に示された。

*3

出芽酵母で低酸素下で形成される解糖系酵素等の集合体 G-body の単離・精製に向けた基礎研究

○森川 穂香、赤井 美咲、三浦 夏子、片岡 道彦

(阪公大院・農)

【目的】

G-bodyとはGlycolytic bodyの略称であり、酵母*Saccharomyces cerevisiae*を低酸素条件下で培養した際に、解糖系酵素エノラーゼ (Eno2p) 等の代謝酵素が代謝経路を調節するために形成する、タンパク質集合体である。先行研究において、様々なスケールでの低酸素培養によりG-body形成が確認されており、低酸素下で分子凝縮体を形成する酵素は順番に集合することが示唆されている。そこで本研究ではG-bodyの内容物を解明し、まだ明らかになっていないG-body形成のしくみを明らかにするため、G-bodyの単離・精製に向けて、第一段階として大量培養が可能なジャーファーマンターを用いた培養においても、各酵素の集合体形成率の経時的変化が同様に観察できるか確認することを目的とした。第二段階としてG-bodyの精製方法を検討した。

【方法・結果】

使用した株は、酵母のエノラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼの集合をGFPの蛍光によって確認できるGFP株である。新たに検討した300 mL容ミニジャーファーマンター（サンキ精機社製）による培養法を用いて、2時間ごとにサンプリングを行い、サンプルを用いて顕微鏡観察を行った。撮影した顕微鏡写真からG-body形成率を算出した。先行研究の1ウェルあたり1 mL容量の24ウェル培養法を用いた場合と比較した結果、先行研究と同様のG-bodyの経時的変化を確認できた。このことから培養器のスケールによらず、G-body形成率の変化は同様であると示唆された。この培養法を用いて、G-bodyの単離・精製を行うこととした。G-bodyの精製方法として、フローサイトメーターを用いたG-bodyの精製を試みたところ、G-bodyと思われる粒子を確認することができた。今後は、新たなG-body精製方法の検討や、G-bodyの解析、RNAの抽出などを行い、G-bodyの形成メカニズムについての調査を進める。

*4

ピキア酵母を宿主としたヒト血清アルブミン分泌発現系の構築と融合タンパク質への応用

○小森 美月、藤枝 伸宇、森田 能次

(阪公大院・農)

【目的】

ピキア酵母は真核微生物の中でも強力な異種タンパク質発現系の宿主として知られている。また、分泌シグナルを利用することで目的タンパク質を細胞外に分泌発現することが可能である。しかし、高い発現量を得るには分泌シグナルの最適化が必要である。一方、ヒト血清アルブミン(HSA)は血中半減期が長く、多くの生物学的役割を担うため、医療分野において需要が高い生体材料である。さらに、機能性タンパク質に安定性の高い HSA を融合することで、免疫学的安全性や体内安定性の向上が期待できるため、HSA 融合タンパク質はバイオ医薬品として注目されている。そこで本研究は、ピキア酵母を宿主とした α 因子分泌シグナルを用いた HSA の分泌発現系を構築し、分泌シグナルへの変異導入と HSA 発現量の関係性の明らかにすることを目的とする。さらに、様々な検出法で利用されている西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)と HSA の融合タンパク質(HSA-HRP)の分泌発現系も構築する。

【方法・結果】

α 因子分泌シグナルとHSAをコードするプラスミドDNAを調製し、ピキア酵母の形質転換を行った。次に、グリセロールを含むBMGY培地で得られたピキア酵母を培養し、その後メタノールを含むBMMY培地に培養液を置換することで、HSAの分泌発現を誘導した。培養液上清のSDS-PAGEを行い、HSAの分泌発現を確認した。アフィニティークロマトグラフィーを用いて、HSAの精製を行った。得られた組換えHSAと天然由来のHSAのCDスペクトルを計測し、組換えHSAが天然由来のHSAと同様の二次構造を持つことを明らかにした。

次に、分泌シグナルへの変異導入とHSAの発現量の相関解析を行った。 α 因子分泌シグナルの一部を欠失させた3種類の変異型分泌シグナル($\Delta 57-70$ 、 $\Delta 57-60$ 、 $\Delta 61-70$)を作製し、Bradford法によるタンパク質量により、それぞれのHSA分泌発現量を明らかにした。天然型および3種類の変異型の分泌シグナルでは、HSAの分泌量に大きな差が見られないことがわかった。つまり、HSA発現系では、 α 因子分泌シグナルの57-70番目の領域は分泌発現量に影響せず、欠失可能であることが示された。さらに、HSA-HRP融合タンパク質についても同様に、4種類の分泌シグナルを用いた発現系を構築した。以上のように、本研究ではピキア酵母を宿主とするHSA分泌発現系を構築し、シグナル配列への変異導入と分泌発現量との相関を明らかとした。

*5

組換えヒト α -グルコシダーゼの HEK293 細胞への発現

○西本 創¹、Anaïs Debarbat¹、池田 祐輝¹、有川 慧美¹、
小田垣 祐生¹、矢野 晴菜¹、喬 穎¹、伊東 昌章²、木村 俊之³、
滝田 禎亮¹、保川 清¹

(¹京大院・農, ²沖縄高専・生物資源, ³農研機構・高度分析研究センター)

【目的】 食事で摂取された糖質は、 α -アミラーゼと α -グルコシダーゼ (AG) により単糖に分解される。AGは哺乳動物ではマルターゼ (M)・グルコアミラーゼ (G) 複合体 (MG) (1857アミノ酸残基) およびスクラーゼ (S)・イソマルターゼ (I) 複合体 (SI) (1827アミノ酸残基) として存在する。AG阻害物質は食後高血糖の抑制効果が期待されている。AG阻害物質の評価では、従来、ラット腸管アセトンパウダー (R) 抽出液が酵素源として使われてきたが、ヒトへの効果の推察にはヒト酵素が好ましい。我々¹⁾と他のグループは、ヒト結腸癌細胞株 Caco-2 の有用性を報告した¹⁾。本研究では、ヒト MG と SI をヒト胎児腎細胞株 HEK293 に発現させ、細胞抽出液の酵素源としての有用性を検討した。

【方法】 1. MGとSIの発現: N末端に (His)₆ をもつ MG または SI 遺伝子が挿入されたプラスミド pCMV_FLAG を HEK293 に導入し、2 日後に細胞を回収した。 2. 抽出液の調製: MG または SI 発現細胞、Caco-2、R を細胞溶解緩衝液で懸濁し、超音波処理を行った。得られた可溶性画分を抽出液とした。 3. M、S、I 活性: 各基質、抽出液存在下、pH 6.0、37°C (または 25~85°C) で反応させた。生成したグルコースをムタロターゼ・GOD 法で定量した。 4. G 活性: 糖化力分別定量キット (キッコーマン) を用いた。

【結果】 1. 活性: MG 発現細胞は M、G、I 活性を有し、S 活性を欠いた。SI 発現細胞と Caco-2 は M、S、I 活性を有し、G 活性を欠いた。R は全活性を有した。 2. 速度パラメータ: M、S、I 活性について検討した。MG 発現細胞の M 活性の K_m は 1.71 mM であり、SI 発現細胞の M、S、I 活性の K_m (9.09、6.69、11.9 mM) よりも低かった。タンパク質濃度 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ における MG および SI 発現細胞の M 活性の V_{max} は 0.301、0.307 mM/min であり、MG 発現細胞の I 活性 (0.017 mM/min)、SI 発現細胞の S、I 活性 (0.030、0.128 mM/min) よりも高かった。これらから、AG の各活性のうち、MG の M 活性が最も高いと考えられた。 3. 活性の温度依存性: MG 発現細胞の M、I 活性の最適温度は 55~70°C で、SI 発現細胞の M、S、I 活性のそれ (50~55°C) よりも高く、MG は SI よりも熱安定性が高いことが示された。 4. 阻害物質の効果: イミノ糖である 1-デオキシノジリマイシンは MG 発現細胞、SI 発現細胞、Caco-2、R の全活性を阻害した。

【考察】 MG あるいは SI 発現 HEK293 抽出液の酵素源としての有用性が示唆された。今後は、持続的に発現する細胞を樹立し、MG および SI を精製し、さらに詳細な解析を行う。

【文献】 1. Ikeda Y, Nishimoto S et al. (2024) *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **127**, 107508

2024 年度農芸化学若手女性研究者賞

受賞記念講演

小胞体における酸化的フォールディング酵素の機能・構造相関解析

奥田 綾 (京大・複合研)

はじめに

真核細胞の膜タンパク質や分泌タンパク質は小胞体で生合成され、小胞体内腔で折りたたまれて立体構造が形成される (フォールディング)。その大部分は、立体構造を安定化する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、全ての真核生物の小胞体には酸化的フォールディングを担う酵素群 Protein Disulfide Isomerase (PDI) ファミリーに属するタンパク質が存在し、ヒトでは 20 種類、高等植物では 10 種類の PDI ファミリータンパク質が存在している。PDI ファミリータンパク質による酸化的フォールディングは、基質タンパク質に一過的なジスルフィド結合を形成する酸化反応の後、正しいジスルフィド結合へ架け替える異性化反応が進行する。本研究では複数の PDI ファミリータンパク質による酸化的フォールディングの作用機構の解明を目指した。

1. ダイズ小胞体における新規 PDI ファミリータンパク質の同定と機能解析

高等植物ダイズが持つ PDI ファミリータンパク質 (図 1)のうち、未同定であった 2 種類(GmPDIL7 [1] GmPDIL6 [2]) の cDNA をクローニングするとともに、これらと他のダイズ PDI ファミリータンパク質に対し、酵素学的性質の解析を進めた。その結果、ダイズ PDI ファミリータンパク質は、

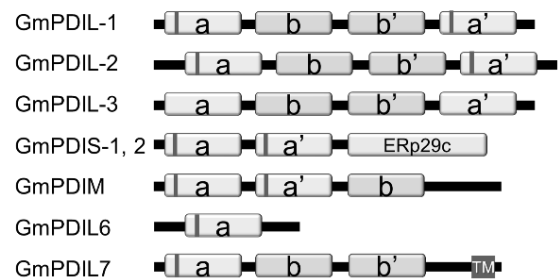


図 1. ダイズ PDI ファミリータンパク質

酸化活性のみを持つグループ、酸化と異性化の両活性を持つが酸化速度に比較して異性化速度が速いグループと遅いグループに分類できることを見出した [3]。このことから、酸化的フォールディングにおいてダイズ PDI ファミリータンパク質は、その酵素学的性質によって役割分担を行っていると考えられた。

一方、酸化的フォールディング反応の一段階目では、酸化酵素 ERO1 が PDI ファミリータンパク質にジスルフィド結合を供給する。ダイズの PDI ファミリータンパク質酸化酵素 ERO1 が様々な PDI ファミリータンパク質にジスルフィド結合を供給し、その活性化が還元型 PDI ファミリータンパク質によるジスルフィド結合の還元によって引き起こされることを見いだした [3, 4]。更に、ERO1

活性化能は PDI ファミリータンパク質によって異なり、ERO1 と PDI ファミリータンパク質の間には合理的で精緻なフィードバック制御システムが存在することも明らかにした。

2. ダイズ小胞体における複数の酵素による協働的なフォールディング機構の解明

小胞体内でのタンパク質酸化的フォールディングにおいて、PDI ファミリータンパク質が持つ酵素学的特性にしたがって役割分担を行っているとの仮説を立てた。そこで、共免疫沈降実験により小胞体内での PDI ファミリータンパク質の会合状態を明らかにし、会合状態にあるものの共存下で酸化的フォールディング実験を行った。その結果、基質である種子貯蔵タンパク質と複数種類の PDI ファミリータンパク質が一過的に会合していること、また特定の PDI ファミリータンパク質同士も会合していることを明らかにした [1-4]。更にこれらの結果は「小胞体では複数の PDI ファミリータンパク質が協働的に一つの基質の酸化的フォールディングを行っている」ことを強く示唆していた。そこで、小胞体内で会合している PDI ファミリータンパク質を組み合わせると、酸化的フォールディング速度が相乗的に高まることが明らかとなった (図 2A)。即ち、生体内では複数の PDI ファミリータンパク質が互いの機能を補完しあって酸化的フォールディングを効率的に行うことが示唆された。一方、生体内の存在量比から逸脱した比率で PDI ファミリータンパク質と ERO1 を作用させると酸化的フォールディングが阻害される場合ことも明らかとなった(図 2B)。このことから、生体内は効率的な酸化的フォールディングが行われる酵素濃度と酸化還元バランスに維持していることが示唆され、PDI ファミリータンパク質と ERO1 の量的バランスが小胞体におけるタンパク質フォールディングを制御するという新たな概念を提唱するに至った。

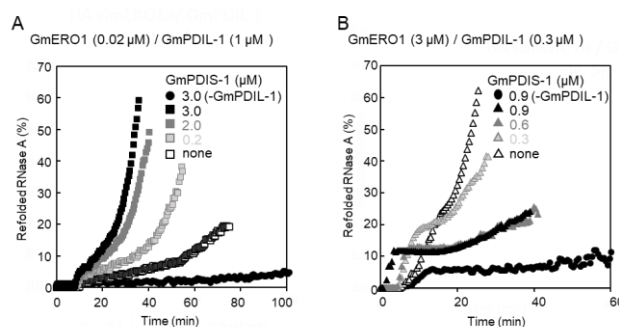


図 2. 会合体を形成するダイズ PDI ファミリータンパク質共存下の酸化的フォールディング

3. ヒト酸化的フォールディング酵素 ER-60 の機能・構造相関解析

小胞体内は酸化的フォールディングに適した環境に制御されていることから、PDI ファミリータンパク質による酸化的フォールディング等の生命機能の理解には生理的条件下、つまり溶液中での構造観察が非常に重要である。そこで溶液中の構造観察が可能な溶液散乱法を用いて、機能に相関した構造の観察を行う

こととした。酸化的小角散乱(SAXS)測定を行った。それにより、ER-60 は活性中心システインペアの状態が酸化型と還元型で慣性半径 (R_g) およびコンフォメーションが異なることを世界で初めて観測した (図 3) [5]。この結果は、酸化的小角散乱における酵素の機能と構造の関係性を強く示唆している。

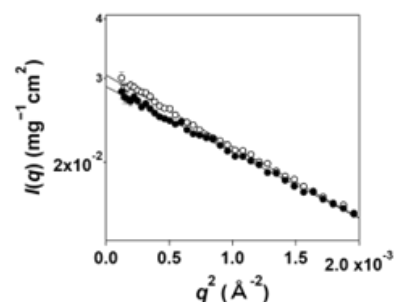


図 3. ER-60 の SAXS プロファイルから得られた Guinier プロット

おわりに

機能と構造の相関をさらに詳細に明らかにするには SAXS による全体構造の観察に留まらず、機能を持つ特定の構造に着目した構造解析が必須である。今後は中性子小角散乱(SANS)法による特定構造に着目した構造解析を目指すとともに、本法に必要なタンパク質重水素化技術とタンパク質ライゲーション技術の開発を進めている。さらに、ヒト ER-60 に留まらず、他のヒト PDI ファミリーやダイズ PDI ファミリー、それらの会合体についても構造と機能の相関解析を視野に入れている。

(引用文献)

- 1) Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Urade R. Identification and characterization of GmPDIL7, a soybean ER membrane-bound protein disulfide isomerase family protein. *FEBS J.* **284**, 414-428 (2017)
- 2) Okuda A, Matsusaki M, Masuda T, Morishima K, Sato N, Inoue R, Sugiyama M, Urade R. A novel soybean protein disulfide isomerase family protein possesses dithiol oxidation activity: Identification and characterization of GmPDIL6. *J Biochem.* **168**, 393-405 (2020)
- 3) Matsusaki M, Okuda A, Matsuo K, Gekko K, Masuda T, Naruo Y, Hirose A, Kono K, Tsuchi Y, Urade R. Regulation of Plant ER Oxidoreductin 1 (ERO1) Activity for Efficient Oxidative Protein Folding. *J Biol Chem.* **294**, 18820-18835 (2019)
- 4) Matsusaki M, Okuda A, Masuda T, Koishihara K, Mita R, Iwasaki K, Hara K, Naruo Y, Hirose A, Tsuchi Y, Urade R. Cooperative protein folding by two protein thiol disulfide oxidoreductases and ERO1 in soybean. *Plant Physiol.* **170**, 774-789 (2016)
- 5) Okuda A, Shimizu M, Morishima K, Inoue R, Sato N, Urade R, Sugiyama M. Solution structure of multi-domain protein ER-60 studied by aggregation-free SAXS and coarse-grained-MD simulation. *Scientific Reports.* **11**, 5655 (2021)

謝辞

本研究の生化学的解析は京都大学農学研究科農学専攻 品質設計開発学分野において裏出令子先生のご指導の下、行われました。また、構造学的解析については京都大学複合原子力科学研究所 粒子線基礎物性研究部門にて杉山正明先生のご指導の下、行われました。両先生には心からの御礼を申し上げます。また、両研究室の皆様からも多大なるご支援とご協力をいただきましたこと、深く感謝と御礼を申し上げます。

○ 受賞者プロフィール

名前：奥田 綾 (Aya Okuda)

連絡先：〒590-0494 大阪府泉南郡熊取町朝代西 2-1010

京都大学複合原子力科学研究所

E-mail address: okuda.aya.5r@kyoto-u.ac.jp

略歴：

- 2012年3月 京都大学農学部資源生物科学科 卒業
- 2014年3月 京都大学大学院農学研究科 修士課程 農学専攻 修了
- 2016年4月 京都大学大学院農学研究科 日本学術振興会 特別研究員
- 2017年3月 京都大学大学院農学研究科 博士後期課程 農学専攻 修了
- 2017年3月 博士（農学）取得
- 2018年4月 京都大学大学院農学研究科 特定助教
- 2019年4月 京都大学複合原子力科学研究所 研究員
- 2021年2月 京都大学複合原子力科学研究所 助教
- 2023年10月 京都大学複合原子力科学研究所 准教授
現在に至る

主な研究テーマ：酸化的フォールディング酵素の機能・構造および作用機構の解析

今後の展望：小胞体における酸化的フォールディング機構の俯瞰的な解明を進めるとともに、関連手法の開発と普及にも努めていきたい。

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	ナカライテスク株式会社
植田製油株式会社	日世株式会社
江崎グリコ株式会社	株式会社日本医化器械製作所
株式会社カネカ	Noster株式会社
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	三井化学クロップ&ライフソリューション株式会社
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
東洋紡株式会社	(50音順 敬称略)

JSBBA KANSAI 11th Student Forum

2024.10.27 (SAT)

英語のみで行う農芸化学に関するミニ学会

会場:神戸大学 六甲台第2キャンパス
瀧川記念学術交流会館

プログラム

- ・ポスター発表
- ・口頭発表
(ポスター発表、口頭発表共に
優秀者には表彰を行います)
- ・特別公演
- ・懇親会
(懇親会の参加は別途費用がかかります)

参加登録方法

参加費：無料 (懇親会を除く)

締切：発表者は9月下旬
参加者は10月上旬

右QRコードからサイトにアクセスし、
必要事項の記入をお願いします！

参加登録フォーム

・公式SNS

✕ @JsbbaKansai Instagram @jsbbakansai



プログラムの詳細は参加登録フォームをご確認ください、
最新の情報はSNSで随時更新します！
お問い合わせはjsbba.kansai.stu.com@gmail.comまで

特別公演



宮寄 絢子 博士 東京農工大 助教

2020年 東京農工大学大学院
生物システム応用科学府
食料エネルギーシステム科学専攻
5年一貫博士課程 修了
在学中に国連食糧農業機関 (FAO)
にてインターン

2020年 外務省

~2023年

2024年~ 東京農工大学 西東京三大学共同
サステナビリティ国際社会実装
研究センター 特任助教

専門は農業経済学。特にアフリカ農村社会における女性のエンパワメント
に関心が高く、学術と実務の架け橋となることを目指す。

「Follow Your Heart」

学生時代の研究活動や
キャリア、育児を通じて
学んできた経験を紹介、
自分自身の心の声を
大切に作る生き方とは

JSBBA KANSAI 11TH STUDENT FORUMは公益財団法人日本農芸化学会 関西支部の下部組織JSBBA KANSAI Student Committeeが主催する学生向けイベントです。本フォーラムは学生の国際的なコミュニケーション能力と発表力の向上を目指しており、フォーラムの進行と発表はすべて「英語」で行います！
大学、国籍、英語の能力、データの有無は問いません。皆さんの積極的な参加をお待ちしております。



- 日本農芸化学会関西支部 第 531 回講演会
幹事校 大阪公立大学
幹事校代表 秋山 康紀 (大阪公立大学大学院 農学研究科)
(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
(ミニシンポジウム)
世話人代表 三浦 夏子 (大阪公立大学大学院 農学研究科)
- 次回 関西支部創立 90 周年記念支部大会 (第 532 回講演会)
日時： 令和 6 年 (2024 年) 9 月 28 日 (土)、29 日 (日)
開催校： 京都先端科学大学
会場： 京都先端科学大学太秦キャンパス
講演申込締切： 令和 6 年 8 月 26 日 (月)
講演要旨締切： 令和 6 年 9 月 2 日 (月)
問い合わせ先 清水 伸泰
Tel : 0771-29-3588
E-mail : shimizu.nobuhiro@kuas.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 7 月 9 日 (火)
日本農芸化学会関西支部ホームページ： <http://kansai.jsbba.or.jp/>

