



2024 年度日本農芸化学会
関西支部大会（第 532 回講演会）

農芸化学会創立 100 周年・関西支部創立 90 周年記念大会

講演要旨集

令和 6 年 9 月 28 日（土）・29 日（日）

京都先端科学大学 太秦キャンパス

公益社団法人 日本農芸化学会 関西支部

2024年度 日本農芸化学会 関西支部大会（第532回講演会）
農芸化学会創立100周年・関西支部創立90周年記念大会

第1日目 9月28日（土）

10:20- 受付

--

10:30-11:00 執行部会（W303）

11:00-12:00 幹事会（W303）

12:00-13:00 参与会（W302）

--

13:00-13:15 祝賀挨拶（みらいホール）

13:15-14:00 特別講演（みらいホール）

14:00-17:20 招待講演（みらいホール）

17:20-17:30 閉会の挨拶（みらいホール）

--

17:45~19:30 懇親会（The Commons G レストラン）

第2日目 9月29日（日）

9:00- 受付

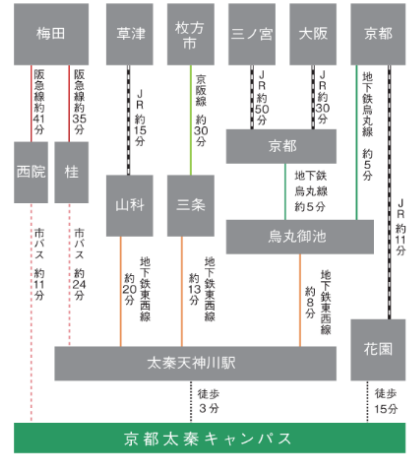
--

10:00-12:10 一般講演（A~D会場）

--

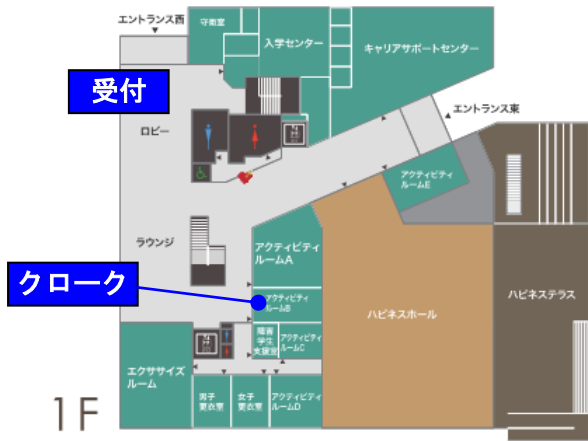
13:20-15:15 ミニシンポジウム（C会場）

京都先端科学大学 太秦キャンパスへのアクセス

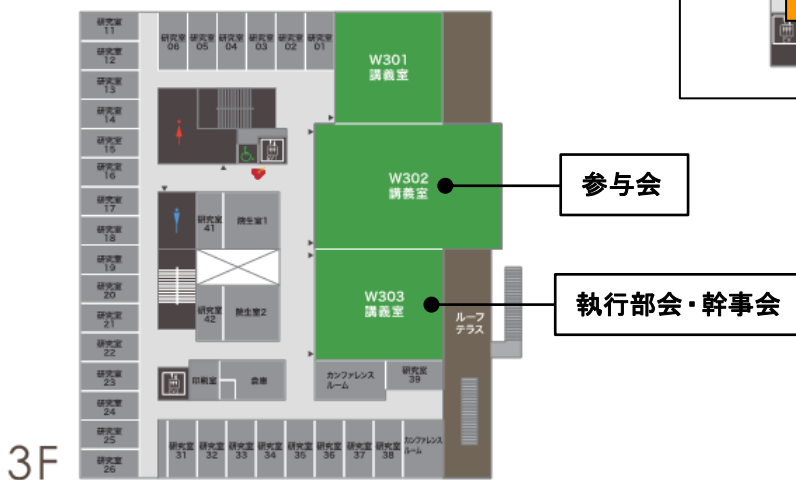


京都先端科学大学 太秦キャンパス 会場案内図

西館 (受付、一般講演、ミニシンポジウム)



北館 (特別講演、招待講演、懇親会)



お知らせとお願い

<大会参加の皆様へ>

- この要旨集は PDF のみの配布となります。
- みらいホールでは飲食が禁止となっています。昼食は3F 休憩室（北館）、2F 休憩室、1F ハピネスホール、2F ラウンジ（いずれも西館）でとっていただくことが可能です。
- 大学内の食堂は営業しておりません。大学周辺にはローソン、モスバーガー、白くまベーカーリー、志津屋本店等がありますのでご利用ください。

<一般講演される方へ>

- 講演の当日に C 会場前の「講演者・座長受付」で来場していることを教えてください。
- 講演は各自で用意した PC を用い、会場の液晶プロジェクターで投影して行っていただきます。プロジェクターへの接続は HDMI ケーブル（タイプ A）で行います。下記の<PC・プロジェクターに関する注意点>も確認してください。スクリーンのサイズはアスペクト比 16:9 が推奨です。
- 各演題の発表前に「接続確認時間」を設けています。持参された PC を用いて正常にスライドが映写できるか確認してください。
- 持参された PC で正常に映写できない場合は、実行委員会の PC を用いて発表を行っていただきます。発表に使用する「PowerPoint ファイル」および「PDF に変換したファイル」を保存した USB メモリ（ただし、タイプ C は不可）を必ず持参してください。
- 前演者の発表中は次演者席で待機してください。次演者の質疑終了後にすぐにプロジェクターに接続できるように準備をしておいてください。
- 講演時間は 12 分（発表 9 分、質疑 2 分、交代時間 1 分）です。円滑な進行のために時間厳守をお願いします。時間経過は下記の通り、ベルにてお知らせいたします。
 - 1 鈴：発表終了 2 分前（7 分経過時）
 - 2 鈴：発表終了・質疑開始（9 分経過時）
 - 3 鈴：質疑終了（11 分経過時）

<PC・プロジェクターに関する注意点>

- スクリーンセーバー、省電力設定、自動ウイルスチェック、バックアップ機能等は一時的に解除してください。発表用のソフトウェア（PowerPoint 等）以外は終了しておいてください。
- バッテリー切れに備え、電源アダプターも持参してください。
- HDMI ケーブルを通じた音声出力が可能です。
- スマートフォンやタブレット端末を用いた映写については確認しておりませんので、使用はご遠慮ください。

<座長の皆様へ>

- 座長の担当日に C 会場前の「講演者・座長受付」で来場を教えてください。

プログラム

特別講演および招待講演（9月28日）（みらいホール）

13:00-13:15 祝賀挨拶 日本農芸化学会会長 西山 真

特別講演

13:15-14:00 「ユニークな微生物機能の探索・開発と産業利用
－微生物による“モノづくり”の100年」
清水 昌（京都大学名誉教授）
座長：小川 順（京都大）

招待講演

14:00-14:30 「独自に単離した菌株からの研究－スクリーニングの重要性－」
渡部 邦彦（京都府立大学名誉教授、立命館大学）
座長：増村 威宏（京都府立大）

14:30-15:00 「根圏情報物質ストリゴラクトンの生合成経路の解明と応用」
杉本 幸裕（神戸大学名誉教授）
座長：水谷 正治（神戸大）

15:00-15:30 「アミロイド β の毒性配座に対する特異抗体の開発と
アルツハイマー病の早期診断への応用」
入江 一浩（京都大学名誉教授、同志社大学）
座長：塚野 千尋（京都大）

15:30-15:50 休憩

15:50-16:20 「腸管上皮細胞を介した藻類由来多糖類の生理機能」
水野 雅史（神戸大学名誉教授、大阪青山大学）
座長：福田 伊津子（神戸大）

16:20-16:50 「有用酵素の探索と組換え微生物を利用した物質生産」
片岡 道彦（大阪公立大学大学院農学研究科）
座長：秋山 康紀（大阪公立大）

16:50-17:20 「ポリヒドロキシアルカノエート実用化への100年」
佐藤 俊輔（株式会社カネカ CO₂ Innovation Laboratory）
座長：吉田 健一（神戸大）

17:20-17:30 閉会の挨拶 日本農芸化学会関西支部支部長 森 直樹

一般講演 (9月29日)

講演時間：12分（発表9分，質疑2分，交代時間1分）

A会場 有機化学 (W201教室)

A01～A05 発表者の接続確認時間 9:45～10:00 座長：甲斐建次（大阪公立大）

- 10:00 A01 非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンのイネジャポニカ品種に特徴的な分布の遺伝的背景および野生イネにおけるひろがり
○阪本駿太¹、吉川貴徳²、佐藤豊²、森直樹¹
(¹京大院・農、²遺伝研・ゲノム・進化)
- 10:12 A02 イネがもつ非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンの水田雑草アオウキクサに対する成長抑制作用
○弘中智諒¹、阪本駿太¹、伊藤照悟²、小山時隆²、森直樹¹
(¹京大院・農、²京大院・理)
- 10:24 A03 ササラダニ類における防御物質マンデロニトリル誘導体の分解機構の解析
○森山太介、高原千尋、清水伸泰（京都先端大・バイオ環境）
- 10:36 A04 水中下三成分連結反応による1,4-ジヒドロピリジンならびに3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンのグリーン合成
藤岡あん、高橋亮太、○谷森紳治（阪公大院・農）
- 10:48 A05 海浜性ハネカクシの分泌する(7*R*)-actinidineと生合成経路について
○高谷佑生、大畑勇統、森直樹（京大院・農）

A06～A09 発表者の接続確認時間 11:00～11:10 座長：谷森紳治（大阪公立大）

- 11:10 A06 青枯病菌におけるQS阻害剤の開発と受容体に関する研究
○田中あゆむ、福井万里子、甲斐建次（阪公大院・農）
- 11:22 A07 Ralstonin生合成に関与するTyr β -水酸化酵素の同定と真菌寄生への寄与について
○野林亜由未、斉藤悠晟、横山みなみ、田淵光昭、甲斐建次
(大阪公立大学大学院・農学研究科)
- 11:34 A08 醸成ビール中の微量有機化合物の合成研究とアルツハイマー病予防を志向した構造活性相関
○木下智貴¹、古賀野泰志¹、入江由美¹、入江一浩^{1,2}、塚野千尋¹
(¹京大院・農、²同志社大)

- 11:46 A09 α -1,3-グルカンとそのカルボキシメチル誘導体からなる生分解性架橋
ハイドロゲルの機能性
○木下陽花¹、大垣内誠²、武田陽一¹、豊竹洋佑¹、若山守¹
(¹立命大院・生命、²島津製作所)

B 会場 動物、酵素 (W202 教室)

B01~B05 発表者の接続確認時間 9:45~10:00 座長：横川拓海（京大）

- 10:00 B01 小胞体ストレスを抑制する HO1 の作用機序
○杉田真穂、寶関 淳（京都先端大院・バイオ環境）
- 10:12 B02 ヒト培養細胞を用いたヒト膜タンパク質生産の効率化
○木村泰久、森伊吹、木岡紀幸（京大院・農・応用生命）
- 10:24 B03 メカノセンサータンパク質ピンキュリンに依存した間葉系幹細胞の分化制御
に関わるヒストン修飾
○小川陽久、藤原萌衣、木村泰久、木岡紀幸、黒田美都（京大院・農）
- 10:36 B04 転写共役因子 PGC1 α の骨格筋における標的遺伝子の探索
○木村徳士¹、杉本拓海¹、酒巻千広¹、江口貴大²、三浦進司³、
亀井康富¹
(¹京府大院・生命環境、²国立長寿研・中枢性老化、³静岡県大院・食品栄養)
- 10:48 B05 ハマダラカに対するネオニコチノイドの毒性発現機構
○伊藤稜¹、神谷昌輝¹、高山浩一¹、森澄海人¹、小嶋尚憲¹、
武林真由花¹、伊原誠¹、Gareth Lycett²、David B. Sattelle³、松田一彦¹
(¹近大院・農、²LSTM、³UCL)

B06~B10 発表者の接続確認時間 11:00~11:10 座長：木村泰久（京大）

- 11:10 B06 パルミトイル化修飾に着目した亜鉛エクスポーターZNT1 の発現制御に
関する研究
○中喜多和孝、山本奈央、神戸大朋（京大院・生命科学）
- 11:22 B07 ピレスリン生合成に関わる GDSL リパーゼの酵母での発現
○竹本圭佑¹、岸田千夏²、伊原誠¹、松田一彦¹ (¹近大院・農 ²近大・農)
- 11:34 B08 ヒト DNA ポリメラーゼ δ の Leu606 のデオキシリボヌクレオチドと
リボヌクレオチドの識別における役割
上野凜¹、石橋周佑¹、神田橋眞子¹、深田健太郎²、滝田禎亮^{1,2}、
○保川清^{1,2} (¹京大院・農、²京大・農)

- 11:46 B09 運動による脳機能調節に対する骨格筋 AMP キナーゼの寄与
○澤田廣大¹、横川拓海¹、岡崎郁憲¹、江川達郎²、三浦進司³、
井上和生¹、林達也² (1京大院・農、2京大院・人環、3静県大・食品栄養)
- 11:58 B10 学習・情動制御におけるシナプス接着分子 Arcadlin の役割
○岡崎郁憲、横川拓海、澤田廣大、井上和生 (京大院・農)

C 会場 微生物 (W203 教室)

C01~C05 発表者の接続確認時間 9:45~10:00 座長：白石晃将 (京大)

- 10:00 C01 γ -アミノ酪酸産生乳酸菌の探索
○櫻間晴子¹、田中舞¹、中柴実祐¹、松田柚稀¹、坂本文夫^{1,2}、
藤田裕之¹、萩下大郎¹
(1京都先端大・バイオ環境、2京都ニホンミツバチ研究所)
- 10:12 C02 葉面細菌 *Methylobacterium* のバクテリオクロフィルの ATP 産生機能
○井口博之¹、谷明生² (1京都先端大・バイオ環境、2岡山大・植物研)
- 10:24 C03 タウリンを合成する能力を有する微生物の探索
○萩下大郎¹、原田恋夏¹、櫻間晴子¹、西川正信²
(1京都先端大・バイオ環境、2岡山生物研)
- 10:36 C04 *Bacillus subtilis* の細胞空洞化に関与するペプチドグリカン分解酵素 CwlO
○中根摩耶、中本博、南部優子、高瀬隆一、小倉康平、橋本涉
(京大院・農)
- 10:48 C05 酸素制限による枯草菌細胞内のニコチンアミドジヌクレオチド量の増加
○池田魁哉、石川周、吉田健一 (神戸大学大学院・科学技術イノベーション研究科)

C06~C10 発表者の接続確認時間 11:00~11:10 座長：櫻間晴子 (京都先端科学大)

- 11:10 C06 腸内細菌由来酵素の阻害による phenol 生成の抑制
○上野僚¹、及川大樹¹、片山高嶺¹、中山亨²
(1京大院・生命科学、2東北大院・工学)
- 11:22 C07 メタノール酵母の Processing body における mRNA の時空間制御と生理的意義
○関岡風花、白石晃将、赤木美穂、幅田亜香莉、由里本博也、阪井康能
(京大院・農)

- 11:34 C08 酵母 *Komagataella phaffii* のミクロベキソファジーにおける液胞膜変形を駆動する ESCRT 分子の解析
○光部雅俊¹、石垣颯斗²、齋藤敬¹、奥公秀³、白石晃将²、阪井康能²
(¹京大院・総合生存学、²京大院・農、³京都先端科学大・バイオ環境)
- 11:46 C09 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミクロリポファジーは Rsp5 によるユビキチン化により促進される
○中辻拓実¹、白石晃将¹、奥公秀²、阪井康能¹
(¹京大院・農、²京都先端科学大・バイオ環境)
- 11:58 C10 酵母ステロール合成経路を制御する脂肪滴タンパク質の解析
○奥公秀¹、萱原彰吾¹、古川美琴¹、轟嘉良²、阪井康能²
(¹京都先端科学大・バイオ環境、²京都大院・農)

D 会場 食品・栄養、植物 (W204 教室)

D01~D05 発表者の接続確認時間 9:45~10:00 座長：森田重人 (京都府立大)

- 10:00 D01 食品由来脂肪細胞分化誘導抑制物質の探索
○付琳、矢野善久、藤田裕之 (京都先端大・バイオ環境)
- 10:12 D02 豆煮汁酵素消化物におけるアンジオテンシン変換酵素阻害物質に関する研究
○山中滉斗¹、矢野善久¹、木村万里子²、藤田裕之¹
(¹京都先端科学大・バイオ環境、²神戸女子大・家政)
- 10:24 D03 カヌカエキスの長期経口摂取による抗肥満作用に関する研究
○山口紗那花¹、矢野善久¹、野崎勉²、藤田裕之¹
(¹京都先端大・バイオ環境、²ビーエイチエヌ(株))
- 10:36 D04 苦味嗜好のメカニズムに対する脳内報酬系の寄与
○大石愛華、井上和生 (京大院・農)
- 10:48 D05 メタロチオネインに着目した亜鉛のフェロトーシス抑制
○我妻拓実、神戸大朋 (京大院・生命)

D06~D10 発表者の接続確認時間 11:00~11:10 座長：藤田裕之 (京都先端科学大)

- 11:10 D06 野生イネにおける種子貯蔵タンパク質の解析
松本啓輔¹、増村威宏^{1,2}、○森田重人^{1,2}
(¹京都府大院・生命環境、²京都府農技生資セ)
- 11:22 D07 オジギソウにおける活動電位の発生・伝播と刺激応答メカニズム
児玉創太郎、袁雨聡、宋和慶盛、北隅優希、○白井理 (京大院・農)

- 11:34 D08 マルミノヤマゴボウとヨウシュヤマゴボウのトランスクリプトームの比較によるベタレイン色素生合成遺伝子の探索
○深山友紀子、小川拓水、岡澤敦司（阪公大院・農）
- 11:46 D09 Effects of Endophytic Bacteria on Growth Metrics and Asarone Content in *Acorus calamus* L.
○Oyundari Ganbat¹, Nagomi Kashimoto¹, Ikumi Oyama¹, Bolortuya Ulziibat², Motoaki Tojo¹, Takumi Ogawa¹, Atsushi Okazawa¹ (¹Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ, ²Dept. Res. Monitor., Mongolian Acad. Sci.)
- 11:58 D10 ナス褐病菌の菌糸成長を抑制する葉面微生物の同定
富田昂希、小原怜哉、奥田和加那、プリエト ラファエル、關谷次郎、
○高瀬尚文（京都先端大・バイオ環境）

ミニシンポジウム (9月29日) (C会場: W203)

座長: 高瀬 尚文 (京都先端科学大)、藤田 裕之 (京都先端科学大)

- 13:20 開会挨拶
- 13:20-13:45 SY1 「環境応答における植物細胞壁の新規機能:
XYLANASE1 発現制御を介した乾燥耐性調節」
遠藤 暁詩 (京都先端科学大学バイオ環境学部)
- 13:45-14:10 SY2 「直接電子移動型酵素の機能解明と生体模倣」
宋和 慶盛 (京都大学大学院農学研究科応用生命化学専攻)
- 14:10-14:20 休憩
- 14:20-14:45 SY3 「分子動力学法による蛋白質-低分子の結合解析を応用した蛋白質の
機能解明」
林 大輝 (神戸大学大学院農学研究科応用生命化学講座)
- 14:45-15:10 SY4 「ミラーイメージの活性中心をもつ人工金属酵素の構築」
森田 能次 (大阪公立大学大学院農学研究科生命機能化学専攻)
- 15:10-15:15 閉会挨拶 大会実行委員長 寶関 淳

特別講演・招待講演

講演要旨

ユニークな微生物機能の探索・開発と産業利用 —微生物による“モノづくり”の100年—

清水 昌(京都大学名誉教授)

日本は、資源に乏しい国といわれているが、微生物に関しては世界に冠たる資源大国である。日本は周囲が海で、寒冷地から亜熱帯まで細長い国土をもち、地形も変化に富んでいる。排他的経済水域も含めると、「国土？」は広大である。要するに、変化に富んだ自然があり、生息する微生物も多種多様で、それらは四季の変化に応じて刻々と変化する。これを砂漠の土と比較すれば、同じ1グラム中に同じ数の微生物がいると仮定しても、その豊かさが全くちがうことは容易に理解できる。数と種類の多さは、周到で熱心な探索(スクリーニング)を行えば、優れた能力や未知の能力を有する微生物と出会う可能性も高いことを意味している。微生物との共存を可能にするこのような日本特有の環境は、私たちに、微生物に対する高い親和性をうえつけ、これを基盤にして多くの生産物がたくみに作り出されてきた。現在、日本が微生物バイオの分野では最先進国のひとつであり、化学工業・食品産業などがいわゆるバイオプロセスを取り入れた生産を活発に展開しているのも、このようなところにそのルーツがある。

自明のことであるが、バイオの主役は“生き物”(ここでは微生物)である。これは、わかっているようでわかっていない部分が多々あるブラックボックスのようなもので、一株の微生物ですらわれわれの思う通りには働いてくれない。一方で、例外的なスーパーな微生物に出会うこともある。それは、子育てのように、永く(時間がかかる)、不確かで、多様性と意外性を秘めている。したがって、解釈より観察に基づく実証が優先する場合も多く、既存のデータや新しい技術を融合させてデザイン化し展開する思考法が通用しない部分が多々ある。また、永いが故の長期的な視座も必要となる。そういうことが分かっていると、ついつい、バイオ技術の展開による将来の見通しやストーリーを述べるときに、躊躇してしまうのは私だけだろうか？私の経験も含めて言うと、バイオの成功例の多くは意図したものではなく、自らそうなったとしか説明できないところに面白みがあるように思う。このようなバイオ特有の「あいまいさ」は、それを克服するというよりは、むしろ、その特徴を生かして進める方向もあるかと思っている。

以前、トヨタ産業技術記念館で、長大なパネルに100年前のバイオの巨人、高峰譲吉(1854-1922)、池田菊苗(1864-1936)、鈴木梅太郎(1874-1943)が並んで紹介されているのを見て、驚いたことがある。彼らを並べたパネル製作者の意図はどこにあるのだろうか？本講演では、私の解釈も含めて「微生物によるモノづくり」の話と結びつけて展開してみたい。

独自に単離した菌株からの研究―スクリーニングの重要性―

渡部 邦彦 (京都府大名誉教授, 立命館大学)

農芸化学の分野において微生物関連が占める割合は大きく、他の学会ではカバーできない内容も数多く含む。ここでは、独自に単離して来た細菌株3株(膜小胞に関する強力プロテアーゼを生産する *Meiothermus ruber* H328 株、学生実験から出て来た低温耐性細菌 *Exiguobacterium undae* Su-1 株、新属、新種として登録できた *Caenibacillus caldisapo-nilyticus* B157 株)を紹介し、農芸化学分野の武器であるスクリーニングの重要性を再認識したい。

これまで、難分解性の動物タンパク質分解に寄与する強力なプロテアーゼを追いかけて来た。その中の1つ、分解し難いエラスチンタンパク質の分解を指標に、H328 株を有馬温泉泉源から単離していたが、廃棄に困っているトリ羽毛を分解しようと地鶏業者からトリ羽毛を仕入れ培地を模索していた。残念な結果が続く中、CaCO₃ を添加した時、突然分解が進むことが分かり、その本体のプロテアーゼを単離しようとした。ところが様々な生化学的手法を駆使してもうまく行かず、当時別途、タンパク質結晶を扱っていたこともあり動的光散乱(Dynamic Light Scattering)装置で分子量を測定してみた。するとラフな標品にでも、分子量 1 億にも達する超高分子量を持つことが判り、この事実からプロテアーゼ特定のために、プロテオームとゲノム解析そして電顕解析を組合せて行くことにした。しかし得られた情報から、この局在性は、膜小胞(membrane vesicle)という細菌では考えのつかない代物で、ここに行き着くとは考えてもいなかった。膜小胞の詳細は省くが、その発見は 50 年以上前に遡り、本大会のシンポジウムでも膜小胞のテーマで取り扱って貰った。

次に、学生実験で単離される菌株に目を向け、形にできたのが Su-1 株である。毎年学生実験で単離される相当数の菌株の中で1株だけ、違った挙動をする菌株が目にとまった。この株を持ち帰り、解析を進めていくと、コリネ型の細胞形態のみならず低温耐性細菌に属する *Exiguobacterium undae* である上に、Ca²⁺イオンでプロテアーゼの転写・活性化が判り、他分野と共同研究により明らかになった研究を報告する。

最後に紹介する B157 株は、東北大名誉教授西野徳三先生が開発された大洗水族館に設置されたアシドロコンポストから単離された。当時、経産省の産総研に所属していた茂里氏から菌源としての話があったものの、ホスホリパーゼに焦点を絞るには手間が掛かった。しかし、単離した株が新属新種だと判り、当該株の性質を調べ上げ、論文発表にまで辿り着いた例を紹介する。

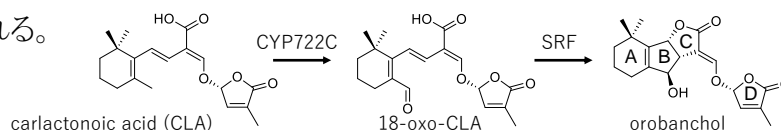
根圏情報物質ストリゴラクトンの生合成経路の解明と応用

杉本幸裕（神戸大学名誉教授）

ストリゴラクトン (Strigolactone; SL) は根寄生雑草の種子発芽刺激物質として同定された一群の化合物である。後に、アーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐誘導因子として同定され、さらに、植物の枝分かれ抑制機能を有することが発見されて以来、植物科学分野で最も注目を集める化合物群の一つである。六員環 (A 環)、五員環 (B 環) およびラクトン (C 環) からなる三環性の母核にメチルブテノライド (D 環) がエノールエーテルを介して結合した基本骨格を有する典型的 SL は、根圏で他の生物とのコミュニケーションを担っていると考えられている。C 環の立体配置は生理活性に大きく影響し、 α 配置、 β 配置の SL は、それぞれ orobanchol 型、strigol 型と分類される。SL 生合成経路の解明は枝分かれ過剰変異体の解析を通して飛躍的に進展した。D27 によって all-trans- β -carotene が 9-cis- β -carotene に異性化し、CCD7 と CCD8 による連続的な酸化開裂により carlactone (CL) が生成すること、CYP711A により CL が、SL の共通生合成中間体と考えられる carlactonoic acid (CLA) に変換されることが明らかにされた。

我々は、CLA 下流の SL 生合成経路を解析し、立体選択的な BC 環形成反応および環形成後の構造多様化を、新規な SL の同定を含めて、分子レベルで明らかにしてきた。一例として orobanchol 生合成について、ササゲ (*Vigna unguiculata*) の根の RNA-seq データを用いた遺伝子共発現解析から見出した VuCYP722C が CLA を 18-oxo-CLA に変換することを明らかにした。トマト (*Solanum lycopersicum*) においても SICYP722C が同じ活性を示すことを確認した。さらに、18-oxo-CLA を立体選択的に環化して orobanchol を生成する VuSRF および SISRF を見出した。SICYP722C をノックアウトしたトマトでは orobanchol および下流の SL の生成が抑えられ、根分泌物の根寄生雑草種子に対する発芽刺激活性が有意に低下した。一方、SISRF をノックアウトしたトマトでは 18-oxo-CLA の自発的環化により、orobanchol だけでなく、C 環が β 配置の ent-2'-epi-orobanchol もほぼ等量生成した。

近年、SL の新たな機能に関心が寄せられており、根からの SL 分泌が異なる植物を用いて根圏微生物の網羅的解析が進められている。生合成の知見に基づいて定性的、定量的に SL 生産を変化させた植物を利用することで、より高精度に SL の機能が解明されていくと期待される。



参考文献

Wakabayashi et al., *Sci. Adv.*, 5, eaax9067 (2019)

Homma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 121, e2313683121 (2024)

アミロイド β の毒性配座に対する特異抗体の開発と アルツハイマー病の早期診断への応用

入江 一浩 (京都大名誉教授, 同志社大)

アルツハイマー病 (AD) は, アミロイド β タンパク質 ($A\beta$) の蓄積 (老人斑の形成), タウタンパク質のリン酸化 (神経原線維変化), 神経細胞の脱落の順序で進行するとされる. これより, 毒性を示す $A\beta$ 凝集体 (オリゴマー) を減らすことにより AD の発症を抑制 (予防) できるのではないかと考えられている (アミロイド仮説).

抗 $A\beta$ 抗体は AD モデルマウスにおいて, 老人斑を効率よく除去できることから, 抗体医薬としての開発が約 25 年前から世界中で鎬を削って行われてきている. ごく最近まで, 抗 $A\beta$ 抗体は医薬品としての使用には至らなかったが, 2021 年, エーザイが開発したアデュカヌマブが世界で初めての $A\beta$ 凝集体を標的とした AD 治療薬として米国で承認された. その後, 同様の抗 $A\beta$ 抗体であるレカネマブ, ドナネマブが相次いで日本国内での使用が認められた. しかしながら, これらの抗体医薬が認識する $A\beta$ の領域ならびに立体構造は不明であり, 有効性の改善や副作用の低減が求められている.

AD 診断薬・治療薬としての抗 $A\beta$ 抗体を合理的に開発する方法の一つとして, 毒性を示す $A\beta$ の立体配座を明らかにし, それに対する立体構造特異抗体を作製することが考えられる. これまで, 固体の NMR 法やクライオ電顕法によって, 不溶性の $A\beta$ フィブリルの立体構造が明らかにされているが, 毒性と密接に関わる $A\beta$ の立体構造に関する知見はほとんどなかった. 筆者らは, 毒性の高い 42 残基の $A\beta$ ($A\beta_{42}$) に対して, 系統的なプロリン置換法, 電子スピン共鳴法, 固体の NMR 法を駆使して, 「 $A\beta_{42}$ の Glu22 および Asp23 でのターン (毒性ターン) 形成が引き金となり, Met35 の酸化を経て毒性オリゴマーを形成する」という毒性配座理論を提唱した¹⁾. 次に, この毒性ターンを模倣したプロリン置換ペプチドを抗原としてマウスに免疫することにより, E22P- $A\beta$ に特異的に結合するモノクローナル抗体・24B3 を得て, 本抗体と市販の N 末端抗体・82E1 とのサンドイッチ ELISA が, ヒト脳脊髄液を用いた AD 診断に有効であることを示した²⁾. さらに, 24B3 抗体は AD モデルマウスに連続投与することにより, 認知機能の改善が認められたため, AD 治療薬としての応用も期待される³⁾.

しかしながら, 24B3 抗体は生体に存在しない E22P- $A\beta$ に対する抗体であることから, プロリン置換ではなく分子内ジスルフィド架橋により, 野生型の配列で毒性ターン構造を固定した $A\beta_{42}$ 誘導体の開発を試みた. その結果, 野生型 $A\beta_{42}$ よりもはるかに高い凝集能ならびに細胞毒性を示す分子内 SS 架橋体・L17C,K28C-SS- $A\beta_{42}$ を同定し^{4,5)}, それに対する特異抗体・TxCo-1 の開発に成功した⁶⁾. TxCo-1 は, AD 患者の剖検脳中の老人斑を顕著に染色するとともに, TxCo-1 とその抗原ペプチドとの共結晶の X 線構造解析によって, $A\beta_{42}$ の毒性ターン構造 (毒性コンホマー) を認識する初めての抗体であることが明らかになった. 今後, 様々な AD 剖検脳を TxCo-1 で免疫染色することにより, AD の進行に対する毒性コンホマーの寄与に関する情報が得られるものと期待される. さらに, 各種毒性 2 量体モデルの構造-機能解析の結果についても述べる^{7,8)}.

- 1) Irie, K., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2020**, *84*, 1–16.
- 2) Murakami, K. *et al.*, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29038.
- 3) Izuo, N. *et al.*, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11811.
- 4) Matsushima, Y. *et al.*, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 4118–4121.
- 5) Matsushima, Y. *et al.*, *ChemBioChem* **2022**, *23*, e202200029.
- 6) Kageyama, Y. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12*, 3418–3432.
- 7) Chikugo, A. *et al.*, *ACS Chem. Neurosci.* **2022**, *13*, 2913–2923.
- 8) 入江一浩, *医学のあゆみ* **2023**, *287*, 685–691.

腸管上皮細胞を介した藻類由来多糖類の生理機能

水野雅史（大阪青山大学）

食物繊維とは、トロウエルが「人間の消化酵素の作用を受けない植物細胞の構造残渣」として定義した¹⁾。すなわち、人の消化酵素によって消化されにくい食物中の難消化性成分の総称であり、化学的には炭水化物のうちの多糖類であることが多い。この食物繊維に関して栄養学では「消化されず役に立たないもの」とされていたが、1970年代になると生活習慣病予防の効果が明らかにされ、最近では腸内細菌叢によって資化され短鎖脂肪酸の産生を促し、腸管免疫能の増強をもたらす重要な成分として注目されている。今回は、このような間接的な腸内細菌叢への作用ではなく、日本人の5人に一人が罹患すると言われている花粉症をはじめとするI型アレルギーに対する藻類由来多糖による直接腸上皮細胞を介した抑制機構について解説したい。

真昆布 (*Saccharina japonica*) に含まれるフコイダンは、フコースが α -1, 3 結合した主鎖に α -1, 2 結合したフコース(硫酸基含)が側鎖として存在する高分子多糖である。このフコイダンは、経口投与によってのみ能動型および受動型皮膚アナフィラキシーを抑制する。その作用機序は、ガラクトース認識レクチンであり、IgE 高親和性のガレクチン 9 を血中に分泌することで、肥満細胞の感作状態を緩和し脱顆粒を抑制する²⁾。したがって、既にアレルギーが発症したような場合でもフコイダンを経口摂取すればアレルギーは抑制できる可能性を含んでいる³⁾。

日常的に食べている海苔スサビノリ (*Pyropia yezoensis* f. *narawaensis*) 由来多糖のうち、主鎖にガラクトースをもち側鎖にグルコースが存在する多糖類には、フコイダと同様 I 型アレルギーを抑制する効果が認められた。またこの効果は、経口投与した場合のみで確認できた。しかしながら血中のガレクチン 9 量には影響していなかった。作用機序に関しては、重要な因子が 2 つ存在していることが明らかとなった。その一つは、IL-10 であった⁴⁾。しかしながら IL-10 だけでは抗アレルギー効果は発揮されず、過酸化水素の存在がもう一つの因子であることも明らかになった。この過酸化水素産生には、NADPH オキシダーゼが関与していることも明らかとなった。

1) Trowell, *Atherosclerosis*, 16, 138-140 (1972).

2) Tanino et al., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 59(1), 25-30 (2016).

3) Mizuno et al., *Biomolecules*, 10(2), 258 (2020).

4) Yonekura et al., *Food Sci. Technol. Res.*, 26(6), 847-854 (2020).

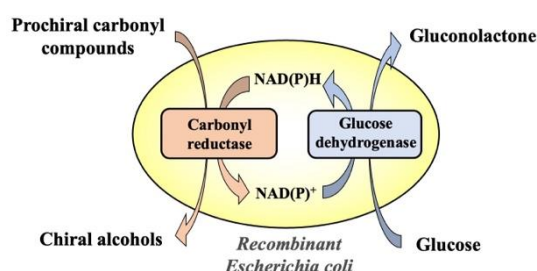
有用酵素の探索と組換え微生物を利用した物質生産

片岡道彦（阪大院農）

自然界に存在する微生物(酵素)を利用した物質生産は古くから行われてきており、我々の生活に必要不可欠なものとなっている。さらに、近年では遺伝子組換え技術が普及し、大腸菌を代表とする宿主細胞内で異種遺伝子を大量発現させることが可能となってきた。本講演では、組換え大腸菌を用いた有用物質生産に関する研究を紹介する。

1. バイオ還元システムの構築

酵素は、様々な特異性や選択性を有しているが、立体選択的な反応を触媒する性質を利用した有用キラル化合物の生産プロセスの研究開発が行われてきた。その中で、カルボニル還元酵素が触媒する不斉還元反応を利用したキラルアルコール類の合成が試みられてきたが、還元型補酵素である NAD(P)H が基質と等量供給される必要があることや光学純度を高めるためには必要とするエナンチオマーのみを与える酵素が選択的に作用する必要があることから、工業的なレベルでの微生物変換プロセスの構築は進まなかった。そこで、遺伝子組換え技術を利用し、大腸菌内にカルボニル還元酵素と NAD(P)H 再生系酵素の両遺伝子を発現させ、この菌体を触媒として反応させることで、著量のキラルアルコール類が生産できることを証明した(右図)。



2. 旧黄色酵素の新規触媒能の発見

旧黄色酵素は、フラビン含有酵素として初めて見出された酵素であり、構造や反応機構に関する多くの研究が行われてきた。不斉還元酵素の研究を行う過程で、旧黄色酵素が C=C 結合を不斉水素化する反応を触媒することを見出した。さらに結晶構造解析データを基にしたタンパク質工学的的手法により、基質特異性等を変えることにも成功している。

3. 人工生合成経路構築による 1-プロパノール生産大腸菌の分子育種

汎用ポリマーであるポリプロピレンをバイオマス(糖類)から生産することを目的として、その前駆体となる 1-プロパノールの発酵生産を試みた。設計した 1-プロパノール生合成経路を担う酵素遺伝子を大腸菌に導入し、酸化還元バランスを維持しながら生育させることで、1-プロパノール発酵生産を行った。

ポリヒドロキシアルカノエート実用化への 100 年

佐藤 俊輔 (株式会社カネカ CO₂ Innovation Laboratory)

ポリヒドロキシアルカノエート(PHAs)の存在が初めて報告された論文は 1888 年に公開されている。論文では未だ PHAs とは特定されておらず、細胞内に Lipid が蓄積されていると記載されているのみであった。その後 1925 年に初めてその Lipid が PHAs の一種である Poly-3-hydroxybutyrate であることが明らかになっている。

化石資源から生産される汎用プラスチックの発明は 1900 年代以降であることから、PHAs はプラスチックが発明される以前からその存在が知られている古の物質である。

それどころか、微生物が生産するエネルギーと炭素の貯蔵物質である PHAs は地球に生命が誕生して以来、炭素循環サイクルの中で循環し続けている天然物質である。

本学会 100 年の歴史と同じく、我々人類はこの PHAs をポリマー材料として使えないかと 100 年間研究し続けている。

本講演では、株式会社カネカにおける PHAs の一種である PHBH(Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate))の開発、社会実装について紹介する。

カネカでは 1980 年代から PHAs の材料化に向けた研究を開始し、世界で初めて PHBH 生産微生物を自社工場の土壌より単離することに成功した。その後 30 年間、産学官の連携による実用化研究を続けている。遺伝子工学が未発達であった 1990 年代からバイオ生産研究を開始し、生産微生物の育種、培養、精製プロセス検討、樹脂加工研究を進展させ、2011 年に年間 1,000 トン規模の大型実証プラントを稼働させた。

本年にはその生産能力を 20,000 トン/年まで向上させ、社会実装を加速させている。PHBH はバイオマスから生産されるのみならず、天然物であるが故に微生物が生育可能なあらゆる環境で生分解する特徴を有する。我々は PHBH でプラスチックを代替し、近年問題となっている海洋プラスチックゴミ問題に対するソリューションを提供し、ポリマー産業を循環型に変革することで地球環境を守り、次の 100 年にタスキを繋ぐことを志している。



PHBH の成形加工例

ミニシンポジウム

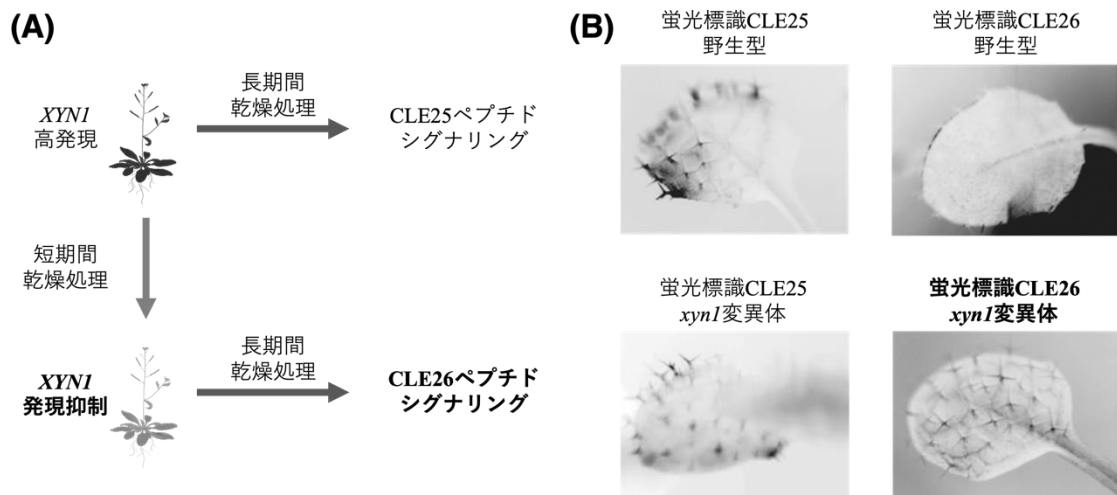
講演要旨

環境応答における植物細胞壁の新規機能： *XYLANASE1* 発現制御を介した乾燥耐性調節

遠藤 暁詩(京都先端科学大学・バイオ環境)

日々変化する周囲の環境に対し、それを回避するよりも適応するよう進化した植物は、複雑な細胞外マトリックスである植物細胞壁を有する。その細胞壁構築に関わる遺伝子群の発現が環境に応じて多様に変化することは知られているが、環境応答における細胞壁構造変化の実態やその役割についてはよくわかっていない。

私達は、シロイヌナズナ変異体を用いた解析から、木部細胞壁成分キシランの修飾酵素をコードする *XYLANASE1* (*XYNI*) が、短期間の乾燥処理に応じて発現が抑制されることで、後の長期の乾燥処理における乾燥ストレス耐性の増強に関与することを見出した。それ以前の研究において、*XYNI* 発現を改変すると植物体におけるトレーサーの輸送パターンが変化することを観察していたことから、乾燥に応じた *XYNI* の発現変動が何らかの輸送に影響することで乾燥ストレス耐性を誘導したのではないかと予想した。そこで乾燥応答を担う細胞間シグナルである CLV3/ESR-related 25 (CLE25) ペプチドとの関わりを調べたところ、CLE25 ペプチドではなく、1 アミノ酸だけ異なる CLE26 ペプチドが *XYNI* に依存した乾燥応答において働いていることがわかった (CLE25, RKVPNGPDPIHN; CLE26, RKVPRGPDPIHN)。さらに、輸送レベルでの *XYNI* による CLE26 ペプチドシグナリング制御を示唆する実験結果を加え、植物細胞壁が環境応答において物質輸送を調節する可能性について議論する。



(A) *XYNI* 発現が予め短期間の乾燥処理で抑制されていた場合、長期の乾燥処理において CLE26 ペプチドシグナリングがストレス耐性を誘導する。

(B) *XYNI* を欠損した変異体(*xyn1*)では、蛍光標識した CLE26 ペプチドが CLE25 の様に葉の表面まで移動して蓄積される。

代謝、呼吸、発酵、光合成などの電子移動反応は、すべての生命で中心的役割を果たしており、地球上の元素サイクルを支えている。これらの反応は、酸化還元酵素によって触媒されており、本酵素は、全酵素種の約 1/4 を占める巨大ファミリーを形成している。酵素反応と電極反応を共役させた酵素電極反応は、平衡論的パラメータである電位を制御した条件で、速度論的パラメータである電流（＝酵素活性に相当）を観測できる。本反応を活用することで、酵素特性を定量的に評価し、生物電気化学的視点から、電子移動経路の特定や酵素の機能解明が可能となる。また、電極を電子受容体（あるいは供与体）として基質認識できる酵素を“直接電子移動 (DET) 型酵素”と呼称する。本酵素を電極に修飾し、酵素機能を電極に付与することで、第三世代型バイオセンサやバイオ電池、バイオリアクタなどの生体模倣技術に応用展開できる。

酢酸菌由来の膜結合酵素であるフルクトース脱水素酵素 (FDH) は、強力な DET 型活性を持つモデル酵素として長年研究されてきた。しかし、膜結合タンパク質という特性上、約 30 年間その立体構造は解明できず、反応機構の詳細は不明であった。そこで、クライオ電子顕微鏡観察及び単粒子像解析技術を活用し、FDH の立体構造を世界で初めて解明した。立体構造に基づき、FDH の電子移動経路を平衡論と速度論の観点から考察し、酵素工学も取り入れることで、芳香族アミノ酸によって酵素－電極間の電子移動加速効果を発見した[1]。また、構造生物学と電気化学によって、FDH の基質特異性の理解や改変にも取り組んだ[2]。さらに、同じく酢酸菌由来の膜結合酵素であるアルコール脱水素酵素 (ADH) やアルデヒド脱水素 (ALDH) についても、その立体構造の解明に成功し、その反応機構を考察した[3]。

メタノール資化性菌由来のギ酸脱水素酵素 (FoDH1) は、 CO_2 /ギ酸と NAD^+/NADH 対の相互変換を触媒するため、 CO_2 バイオ資源化や補酵素再生リアクタへ応用できる。本酵素に関しても、その立体構造を解明し、酵素内電子移動経路を特定した[4]。さらに、酵素工学による小型変異体を作製し、DET 型反応の効率化に成功した[5]。

当日は、上記の基礎研究成果をコア技術とする社会実装活動についても紹介する。

[1] K. Sowa*, et al., *ACS Catalysis*, **13**, 13828 (2023)

[2] K. Sowa*, et al., *Electrochim. Acta*, **490**, 144271 (2024)

[3] K. Sowa*, et al., *ACS Catalysis*, **13**, 7955 (2023)

[4] K. Sowa*, et al., *Chem. Commun.*, **58**, 6478 (2022)

[5] K. Sowa*, et al., *Electrochim. Acta*, **465**, 142954 (2023)

SY3 分子動力学法による蛋白質-低分子の結合解析を応用した 蛋白質の機能説明

林 大輝 (神戸大学 大学院農学研究科 応用生命化学講座 生物化学研究室)

分子動力学 (MD) シミュレーションは、原子及び分子の動的な変化を、古典力学に基づいて計算し、予測することのできる手法である。MD シミュレーションは、受容体-リガンドや、酵素-基質の結合解析に有用な研究手法である。本講演では、これまでの研究で得られた以下 2 つの成果について発表する。

1. ビタミン E 受容体の同定

これまでに発表者らは、齧歯類におけるビタミン E (α -Toc) の糖尿病性腎症改善効果のメカニズムの検討から、ラミニンや茶カテキンの受容体として知られる 67 kDa laminin receptor (67LR あるいは RPSA) が α -Toc の新規受容体である可能性を見出した。しかし、RPSA と α -Toc がどのように相互作用しているのかは不明であったため、MD シミュレーションによりその結合の可視化を試みた。RPSA 及び α -Toc を、脂質ラフトを模した組成の脂質二重膜内に配置し、全原子 MD シミュレーションを実施したところ、 α -Toc が 67LR の疎水領域に結合する様子を可視化することに成功した。実際に、シミュレーションで示唆された、結合に関わるアミノ酸残基に変異を導入したところ、 α -Toc の RPSA を介した機能が減弱あるいは消失した。これらのことから RPSA が新規の α -Toc 受容体として機能することを明らかにすることができた。

2. ホスホリパーゼ A₂ の過酸化リン脂質分解メカニズムと特異性改変による機能説明

ホスホリパーゼ A₂ (PLA₂) は、グリセロリン脂質を代謝する酵素である。中でも、Group VIA calcium-independent PLA₂ (GVIA iPLA₂) は、過酸化リン脂質の蓄積を抑制することで、フェロトーシスと呼ばれる細胞死を抑制することが知られている。しかし、過酸化脂質の蓄積を抑制する詳細な分子メカニズムは不明であった。過酸化リン脂質と GVIA iPLA₂ の結合を MD シミュレーションにより解析したところ、チロシン残基のフェノール性水酸基が過酸化リン脂質との結合に重要であることが示唆された。そこで、GVIA iPLA₂ の過酸化リン脂質に対する活性を特異的に消失させる変異体として、チロシンをフェニルアラニンに置換した変異体 (Y555F) を作成し、種々の検討を行った。その結果、Y555F 変異体は、非酸化リン脂質に対する活性を野生型の 6 割以上維持しているにもかかわらず、フェロトーシス抑制効果を完全に消失した。これらのことから GVIA iPLA₂ が過酸化リン脂質を直接分解することでフェロトーシスを抑制すること、非酸化リン脂質に対する活性はフェロトーシスに寄与しないことが明らかとなった。換言すると、MD シミュレーションを応用し、GVIA iPLA₂ の基質特異性を改変することで、その機能の詳細を明らかにすることに成功した。

SY4 ミラーイメージの活性中心をもつ人工金属酵素の構築

森田 能次 (阪公立大院・農)

人工金属酵素は金属錯体とタンパク質を組み合わせた生体触媒であり、タンパク質が提供する不斉環境により、立体選択的な反応が可能となる¹⁾。これまでに我々は、4つの His からなる金属結合モチーフを有するクピタンパク質(TM1459)を用いた人工金属酵素の開発を行ってきた^{2,3)}。特に、H52A 変異体は、*S*-エナンチオ選択的なマイケル付加反応を触媒する。ミラーイメージの活性中心を構築できれば、エナンチオ選択性を反転させることができるが、*d*-アミノ酸からなる鏡像タンパク質の調製は未だ困難である。そのため、安定なタンパク質足場を基に目的の反応性を示す活性中心の合理的な設計とその構築が求められている。そこで本研究では、エナンチオ選択性を反転させるため、TM1459 変異体の活性部位近傍に化学修飾することで、ミラーイメージの活性中心を構築し、エナンチオ選択性が反転することを明らかにした (Fig. 1)⁴⁾。化学修飾のために、結合した基質の *Si* 面側のアミノ酸を Cys に置換し、4,4'-dithiodipyridine (4-PDS) と反応させた。得られた Cu-I49C-4py/H52A/C106D は *R*-エナンチオ選択性を示した ($ee = 71\% (R)$)。さらに、*Re*-面側に H54A 変異を導入することで、*R*-エナンチオ選択性が向上した ($ee = 88\% (R)$)。X 線結晶構造解析から、修飾したチオピリジンが Cu に配位したミラーイメージの配位構造であることが明らかとなった。このように、化学修飾反応を用いることで、設計した配位構造を構築することができ、望みの選択性を示すことが明らかとなった。化学修飾に基づく本システムは、人工金属酵素が触媒するさまざまな反応への応用が期待される。

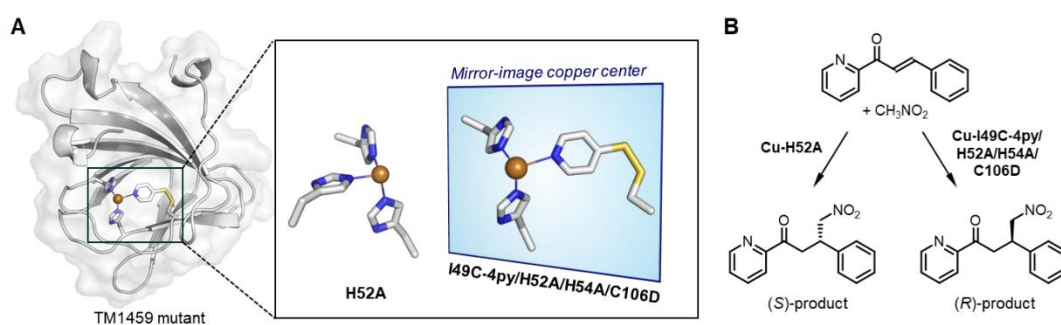


Fig. 1 (A) Thiopyridine-bound mirror-image copper center for reversal of enantioselectivity. (B) Enantioselective Michael addition

【参考文献】

- 1) F. Schwizer, T. R. Ward, *et al.*, *Chem. Rev.*, **118**, 142 (2018).
- 2) N. Fujieda, S. Itoh, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **59**, 7717 (2020).
- 3) R. Matsumoto, Y. Morita, N. Fujieda, *et al.*, *Chem. Sci.*, **14**, 3932 (2023).
- 4) Y. Morita, H. Kubo, N. Fujieda *et al.*, *J. Inorg. Biochem.*, **260**, 112694 (2024).

一般講演

講演要旨

A01 非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンのイネジャポニカ品種に特徴的な分布の遺伝的背景および野生イネにおけるひろがり

○阪本駿太¹, 吉川貴徳², 佐藤豊², 森直樹¹

(¹京大院・農、²遺伝研・ゲノム・進化)

【目的】

アジアイネ (*Oryza sativa* L., *O. sativa*) がもつ非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンおよびその生合成酵素 OsTAM1 は、ジャポニカ品種に特徴的であり、インディカ品種ではほとんどみられない。 β -チロシンはイネのアレロパシーに関与する可能性があり、その種内多様性の遺伝的背景を明らかにすることは、イネがもつ防御の進化史への理解を深めると期待される。そこで本研究では、*O. sativa*の祖先にあたる遺伝的・地理的に多様なイネ属 4 種 140 系統の TAM1 および β -チロシンの有無を調査し、上述の遺伝的背景を解明した上で、野生イネにおける TAM1・ β -チロシンの広がりを明らかにした。

【方法・結果】

はじめに、*O. sativa*の直接祖先である野生イネ *O. rufipogon* の遺伝的・地理的に多様な110 系統の TAM1 および β -チロシンの有無を PCR および LC/MS 分析により調査した。その結果、TAM1 はジャポニカ品種の祖先亜集団 Or-IIIa に局在し(保有率 71.4%)、他の亜集団 Or-I にはまったく存在しなかった(保有率 0%)。また、LC/MS分析から、 β -チロシンの蓄積も Or-IIIa に特徴的であるとわかった。インディカ品種は、Or-IIIa に由来する祖先ジャポニカ種がOr-I と交雑して誕生したと考えられている。すなわち、TAM1・ β -チロシンは Or-IIIa に特徴的な形質であり、これがジャポニカ品種に受け継がれた一方、TAM1 をもたない Or-I との交雑により、インディカ品種には受け継がれなかった可能性が高いと考えられた。

野生イネにおける TAM1・ β -チロシンのひろがりを明らかにするため、アジア以外に分布する野生イネ *O. barthii* (アフリカ)、*O. glumaepatula* (南米)、*O. meridionalis* (オーストラリア)各 10 系統における TAM1・ β -チロシンの有無を調べた。その結果、*O. barthii* は TAM1 をもち(保有率 86%, 6/7 系統) β -チロシンを蓄積する(10 系統平均値 11.3 $\mu\text{g/g}$ seed)、*O. glumaepatula* は TAM1 をもたず(保有率 0%) β -チロシンをほとんど蓄積しない(同 1.5 $\mu\text{g/g}$)、*O. meridionalis* は TAM1 をもつが(保有率 80%)、 β -チロシンの蓄積量は少ない(同 2.6 $\mu\text{g/g}$)、とわかった。すなわち、TAM1・ β -チロシンは、これまで明らかになっていたアジアイネに加えて、世界の野生イネにも広くみられるが、その分布や蓄積量には種間差(=地域差)があった。今後、アレロパシーを念頭にした適応的な観点から、種内および種間多様性の意義解明をめざす。

A02 イネがもつ非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンの水田雑草アオウキクサに対する成長抑制作用

○弘中智諒¹、阪本駿太¹、伊藤照悟²、小山時隆²、森直樹¹
(¹京大院・農、²京大院・理)

【目的】

ジャポニカ品種のイネ (*Oryza sativa* L.) は、非タンパク質性アミノ酸 β -チロシンを合成し、根から分泌する。ゆえに β -チロシンは、イネのアレロパシーに関与する可能性があるが、その生態学的役割はいまだ不明瞭である。本研究では、水田雑草であるアオウキクサ (*Lemna aequinoctialis* 5636) をモデルとして用いて、 β -チロシンのアレロパシー活性について検証を行った。

【方法・結果】

ラセミ体の β -チロシンを添加した液体培地でアオウキクサを培養し、総葉面積を測定した。その結果、 $0.3 \mu\text{M}$ で本種の増殖が 50 % 抑制 (EC_{50}) され、 $0.6 \mu\text{M}$ 以上ではコロニーの分離に異常が起きた。続いて、 β -チロシンの水酸基の位置異性体である *o*- β -チロシン、*m*- β -チロシンを化学合成して構造活性相関を行ったところ、どちらもアオウキクサに対する強い増殖阻害活性はみられなかった。さらに、イネが *R*体の β -チロシンを高い光学純度 (94% e.e.) で産生することから、光学異性体ごとに培養試験に供したところ、*R*体はより強い増殖抑制活性を示した。以上より、*R*体で水酸基が*p*-位に配位する、すなわちイネが分泌する (*R*)- β -チロシンのみがアオウキクサに対する強い増殖阻害活性をもつとわかった。

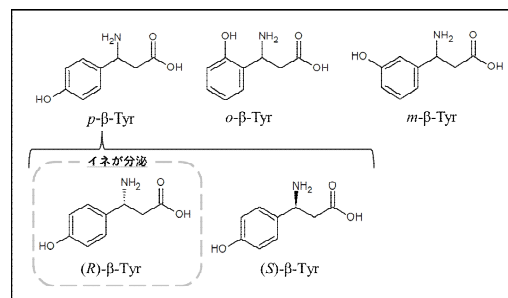


Fig. 1 β -チロシンと類縁体の構造

次に、 β -チロシンの作用機序の理解に向けて、*L*-チロシンによるレスキュー効果を検証した。その結果、*L*-チロシンの添加で、 β -チロシンによるアオウキクサの増殖抑制作用が消失した。このことから、両者が植物体内への取り込み時または作用点への結合のどちらかで競合している可能性が考えられた。今後は、 β -チロシンの作用機構に着目し、増殖抑制および分裂阻害機序の解明を目指す。

A03 ササラダニ類における防御物質マンデロニトリル誘導体の分解機構の解析

○森山太介、高原千尋、清水伸泰

(京都先端大・バイオ環境)

【背景と目的】節足動物の多くは外敵から身を守るために独特の防御機構を備えている。ササラダニ類の防御物質として、オトヒメダニ科ではヤドクガエルアルカロイド、タテイレコダニ科ではchrysomelidial、コイタダニ科ではマンデロニトリル誘導体であるmandelonitrile hexanoateが知られている。我々は特にダニ類の化学防御に着目し、防御物質の探索を行ってきた。ケヤキの樹皮に集団を形成しているササラダニ亜目コイタダニ科に属するセンダンササラダニ*Phauloppia adjectra*の油腺分泌物からセスキテルペン類のほかにmandelonitrile octanoateを検出した。シアン化合物を分解しシアン化水素を防御物質として利用する節足動物はオビヤスデ目ヤスデのほか、ごく一部のムカデ類とガ類の幼虫に限られる。

ヤスデにおけるシアン化合物分解機構はヒドロキシニトリルリアーゼなどの酵素的な分解あるいは加水分解やショッテンバウマン反応による非酵素的な反応によって引き起こされる。一方、ササラダニからシアン化合物は検出されたものの、実際にシアン化水素が生成するかは不明である。そこで我々はササラダニ亜目コイタダニ科に属するセンダンササラダニ由来のシアン化合物を用いて、シアン化水素への分解機構の検証を行った。

【方法と結果】センダンササラダニ成虫および若虫はケヤキの樹皮裏から採集した。ダニの油腺分泌物は成虫および若虫をヘキサミンに浸漬することで抽出し、その抽出液をGC-MSで分析した。その結果、成虫からmandelonitrile octanoateが検出された一方で、本化合物は若虫からは検出されず成虫特異的な成分であることが明らかとなった。さらに成虫をすり潰すことによってシアン化水素が生成することをピクリン酸試験紙法で確認したことから、シアン化水素の生成には酵素の関与が示唆された。現在は非酵素的な分解の可能性としてmandelonitrile octanoateの各pHによる加水分解の検証に加えて、酵素的な分解を検証するため成虫を緩衝液中ですり潰し、粗酵素液を調製したのちにmandelonitrile octanoateを基質とした酵素反応によりシアン化水素が生成するかの検討を行っている。

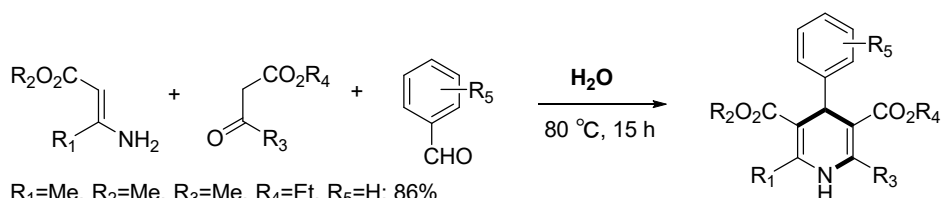
A04 水中下三成分連結反応による1,4-ジヒドロピリジンならびに3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンのグリーン合成

藤岡あん、高橋亮太、○谷森紳治

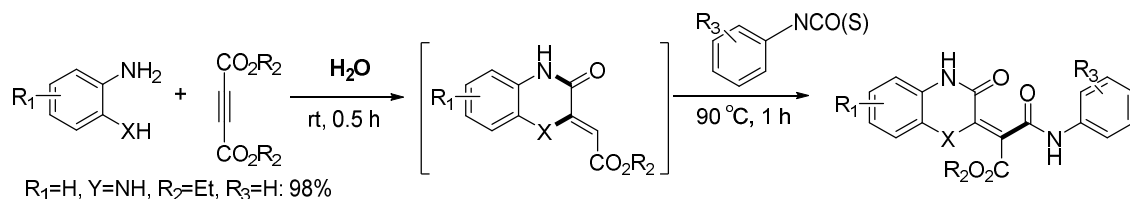
(阪公大院・農)

【目的】 グリーンサステイナブルケミストリーの観点から、有機合成化学分野においてもエネルギーの有効利用、廃棄物の低減、経済的な出発原料の選択など環境調和性に配慮した合成法の開発が求められている。このため、水中での反応、無溶媒反応、マイクロ波や超音波照射下の反応などが試みられている。本研究では、安価で低毒性、かつ安全なグリーン溶媒である水を用いて、医薬品の原料として重要な複素環化合物である1,4-ジヒドロピリジンならびに3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンを簡便に合成することが出来たので報告する。

【方法・結果】 1,4-ジヒドロピリジンや3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンの合成は従来、塩化メチレンやエタノールなどの有機溶媒中で行われていた。有機溶媒は化石資源であり、かつ安全性、廃棄の際の二酸化炭素の放出などの問題がある。そこで水を溶媒に用いて、2-アミノクロトン酸メチル、アセト酢酸エチル、ならびにベンズアルデヒドを80°Cで一晩反応させたところ、目的とした1,4-ジヒドロピリジン誘導体が86%の収率で得られた。同様な条件下、様々な置換誘導体が59%~98%の収率で得られたため、本反応は一般性があることが分かった。



また、*o*-フェニレンジアミン、ジエチルアセチレンジカルボキシラート、ならびにフェニルイソシアナートの三成分連結反応による3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンの水中での合成を検討した。まず*o*-フェニレンジアミンとジエチルアセチレンジカルボキシラートを室温にて30分反応させて中間体を得たのち1.5当量のフェニルイソシアナートを加え90°Cにて1時間反応させたところ、目的とした3-オキソ-3,4-ジヒドロキノキサリノンの98%の収率で得られた。同様な条件下、様々な置換基を持った原料を用いて反応を行ったところ、生成物が42%~99%の収率で得られた。



A05 海浜性ハネカクシの分泌する (7R)-actinidine と 生合成経路について

○高谷佑生¹、大畑勇統¹、森直樹¹

(¹京大院・農)

【目的】

「ハネカクシ」とは甲虫目ハネカクシ科に属する昆虫で、世界におよそ8万種が記載される動物界最大の分類群である。また、多様な二次代謝物質を産生することでも知られる。

一部のハネカクシは actinidine を産生し、演者らは その絶対配置が R 体であることを明らかにした。本研究では オオアバタウミベハネカクシ *Cafius vestitus* を対象に、安定同位体を用いたトレーサー実験を行った。

【方法・結果】

300 頭のアバタウミベハネカクシを酢酸エチル 50 mL に一晩浸し、分泌物を抽出した。濾過・濃縮乾固の後、粗抽出物 67.2 mg を得た。ヘキサン・酢酸エチルを展開溶媒とし、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製を行った。酢酸エチル 30 % 画分から黄色油状物質 5.2 mg を得た。これを NMR と GCMS 分析に供した。また、キラルカラムを用い、化合物の絶対立体配置を決定した。

NMRのスペクトルデータ、MSのフラグメントパターンおよびキラルカラムでの保持時間から、分泌物質の主要成分として (7R)-actinidine を同定した。天然物からのR体報告は演者らの報告が初である (Takatani *et al.*, 2023)。

安定同位体である glucose-1-¹³C と mevalonic acid-2-¹³C を用いたトレーサー実験を行い、actinidine の生合成経路を調べた。

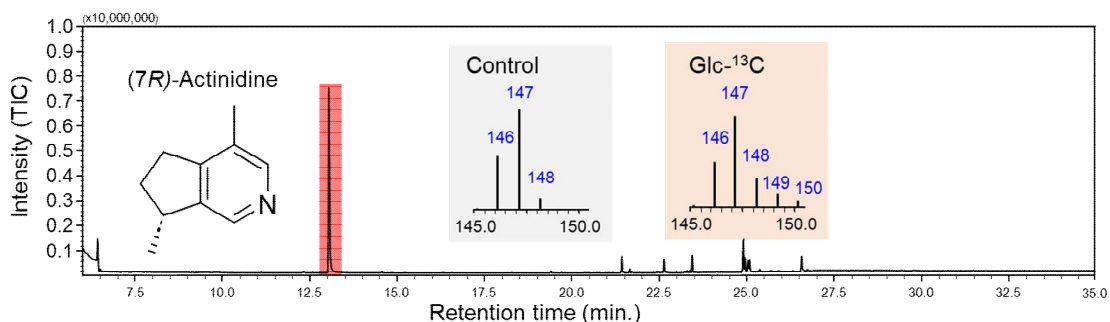


図1. Glucose-1-¹³C 給餌後ハネカクシのジクロロメタン粗抽出物の GCMS クロマトグラムと MSスペクトル

A06 青枯病菌における QS 阻害剤の開発と受容体に関する研究

○田中あゆむ、福井万里子、甲斐建次

(阪公大院・農)

【目的】 青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* は、ナス科植物を宿主とする植物病原細菌である。本菌は根の傷口から植物体内に侵入し、維管束内で爆発的に増殖・大量の細胞外多糖 (EPS) を産生する。その結果、植物は導管が機能不全となり萎凋症状を呈する。EPS を含む病原力因子の発現は、クオラムセンシング (QS) より制御されている。青枯病菌 OE1-1 株では、methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME) が QS シグナル分子として機能し、6 回膜貫通ヒスチジinkinナーゼ PhcS に受容される。QS シグナル分子の構造を模倣して開発された阻害剤 PQI 類は、青枯病菌の病原力発現のみを抑制するため、薬剤耐性菌を出現させ難いことが期待される。本研究では、新規 PQI 類の主要病原力因子の産生阻害と、植物体を用いた病徴抑制効果を検証した。また、QS シグナルである 3-OH MAME がどのように PhcS によって受容されるのか、各ドメインの機能解析を進めたので報告する。

【方法・結果】 PQI-5 のベンゼン環部をチオフェン環とフラン環に置換した PQI-6 と QPI-7 の主要病原力因子の産生阻害活性を評価した。EPS I 産生量は、CPG 寒天培地上で青枯病菌を 20 時間培養し、産生された EPS I を ELISA 法により分析した。その結果、(S)-PQI-6 は 1 μ M、(S)-PQI-7 は 10 μ M で QS 欠損株と同程度にまで EPS I 産生を抑制した。また、二次代謝産物の産生量は、PS 培地で青枯病菌を 24 時間振盪培養し、産生された二次代謝産物を LC/MS で分析した。その結果、(S)-PQI-6 と (S)-PQI-7 の両化合物が 10 μ M で完全に阻害した。続いて、PQI 類が感染植物体の発病を阻害するかどうか検証した。播種後 3 週目のトマト植物体に本菌を感染させた後、(S)-PQI-6 を含む水耕液で 10 日間培養した。無処理区のトマト植物体は接種後 9 日目には完全に枯死したが、(S)-PQI-6 を処理した植物体では濃度依存的に萎凋症状が緩和された。その際、(S)-PQI-6 が水耕液中で加水分解されることが観察されたため、何らかの対策が必要であると考えられた。

次に、PhcS の機能解析を進めるために、PhcS のセンサー、ダイマー化、ATPase、膜貫通のドメインをそれぞれ欠損した株を作製した。次に、EPS I と二次代謝産物の産生量を指標として、これらの欠損株の QS 制御下の表現型を評価した。それらの結果、センサードメイン欠損株と膜貫通ドメイン欠損株は、QS 機能が消失した表現型を示した。各ドメインの機能について詳細に評価するために、欠失する領域を変化させた欠損株の作製を進めている。

A07 Ralstonin 生合成に関与する Tyr β -水酸化酵素の同定と真菌寄生への寄与について

○野林亜由未、斉藤悠晟、横山みなみ、田淵光昭、甲斐建次
(大阪公立大学大学院・農学研究科)

【目的】

リポペプチドにおいてよく見られるアミノ酸の β -水酸化は、それらの生物活性の発現に重要な修飾機構である。例えば、クロラムフェニコールの生合成には前駆体L-*p*-アミノフェニルアラニンの β -水酸化反応が必要である。青枯病菌が産生するralstonin類は、PKS-NRPS遺伝子*rmyAB*から生合成されるリポペプチドである。Ralstonin類に含まれるTyr残基は β 位が水酸化された構造を有する。また、ralstoninは植物に対して毒素として機能し、真菌に対しては厚膜胞子を誘導することで寄生に必須な因子として働く。しかし、ralstoninのTyr β -水酸化酵素はいまだ同定されておらず、生物活性の発現への寄与についても明らかにされていない。そこで本研究では、ralstonin類Tyr β -水酸化酵素を同定し、本変換反応の生物学的意義の解明を目指した。

【方法・結果】

遺伝子解析から、*rmy*遺伝子クラスター内の二鉄モノオキシゲナーゼをコードする遺伝子*RSp0639*がralstonin分子中のTyr β -水酸化に関わっている可能性が高いと考えられた。また、ralstoninと類似構造をもつralstoamideやralstopeptinを産生する菌株が持つ45830、40460遺伝子は、*RSp0639*のホモログであり、これらの遺伝子もTyr β -水酸化に関わっていると予想された。そこで、これらの遺伝子を欠損させた株を作製し、ralstonin、ralstoamide、ralstopeptinのdeoxy体が産生されると予想し、それらの化合物の単離・構造決定を行った。*R. solanacearum* OE1-1株由来の*RSp0639*遺伝子欠損株をBG寒天培地にて培養し、培養抽出物をカラムクロマトグラフィーで分画しHPLCで精製した後、NMRによる構造解析を行った。その結果、Tyrの β 位にOH基が存在しないdeoxyralstoninが得られた。また、45830、40460遺伝子の欠損株においても同様に、deoxy体が得られることを確認した。以上より、これらの遺伝子がTyr β -水酸化に関与していることが強く示唆された。

次に、Tyr β -水酸化がralstonin類の生物活性に影響を及ぼすのかを調べるため、野生株OE1-1と*Rsp0639*欠損株の真菌*Fusarium oxysporum*への感染実験を行った。その結果、OE1-1株では厚膜胞子が誘導され、それらに対する寄生が観察されたが、*Rsp0639*欠損株では厚膜胞子誘導と真菌寄生のいずれも認められなかった。以上のことから、ralstonin生合成におけるTyr β -水酸化は厚膜胞子誘導に必須であり、本遺伝子の有無は青枯病菌の真菌寄生能に大きな影響を与えることが分かった。

A08 醸成ビール中の微量有機化合物の合成研究と アルツハイマー病予防を志向した構造活性相関

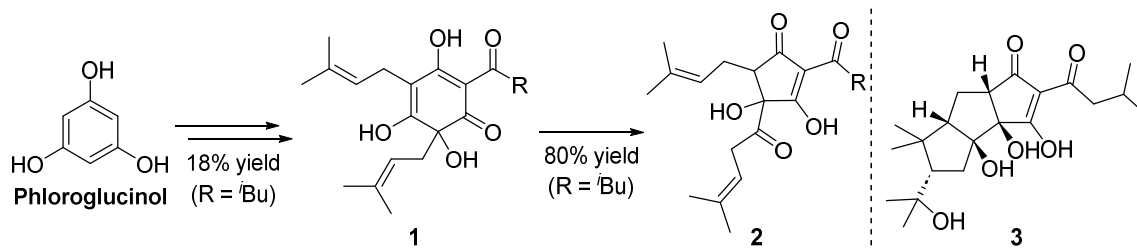
○ 木下智貴¹、古賀野泰志¹、入江由美¹、入江一浩^{1,2}、塚野千尋¹
(¹京大院・農、²同志社大)

【目的】

ビールは 7000 年以上にわたって人類の食生活の一部として親しまれてきた飲料である。原材料のホップからは α 酸 (1) などの有機化合物が単離されており、醸造過程で生じるイソ α 酸 (2) などの有機化合物には、生活習慣病改善効果やアミロイド β (A β) の産生低下に伴う記憶機能の改善など様々な健康増進作用が報告されている^{1,2}。2009 年にはビールの醸成に伴って生じる tricyclohumol (3) 等の多環性化合物が単離・構造決定されたが³、これらの化合物の有機合成化学的手法による供給経路の確立や、苦味以外の生物活性に関する研究はなされていない。そこで本研究では、イソ α 酸 (2) や関連化合物および多環性化合物の合成経路を確立するとともに、アルツハイマー型認知症の原因物質の一つである A β の凝集阻害能を指標としてこれらの化合物を評価し、構造活性相関研究へと展開することを目的とした。

【方法・結果】

まず、イソ α 酸 (2) の合成から開始した。フロログルシノールを出発原料とした 3 段階の反応により、 α 酸 (1) を得た。その後、 α 酸 (1) を水-メタノール混合溶媒中、塩化マグネシウム六水和物存在下で異性化することにより、イソ α 酸 (2) を得た。続いてイソ α 酸 (2) の合成経路を基盤として、Friedel-Crafts アシル化を用いて導入する側鎖の構造を変えることにより、 α 酸 (1) およびイソ α 酸 (2) の類縁体を合成した。また、5-メトキシレソルシノールを出発原料とした反応により、中間体の類縁体を合成した。合成した α 酸 (1) やイソ α 酸 (2) およびその類縁体について、蛍光試薬チオフラビン T を用いて A β 42 の凝集阻害能を評価した。その結果、 α 酸 (1) を含む複数の化合物について A β 42 の凝集阻害作用がみられた。本発表では、これらの合成と生物活性の評価について報告する。



【文献】 1) H. Yajima, *et al. J. Biol. Chem.* **2005**, 279, 33456–33462. 2) Y. Ano, *et al. J. Biol. Chem.* **2017**, 292, 3720–3728. 3) D. Intelmann, *et al. Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 13047–13058.

A09 α -1,3-グルカンとそのカルボキシメチル誘導体からなる生分解性架橋ハイドロゲルの機能性

木下陽花¹、大垣内誠²、武田陽一¹、豊竹洋佑¹、若山守¹

(¹立命大院・生命、²島津製作所)

【目的】

近年の環境問題やバイオセーフティの観点から、生体適合性が高く、かつ最終的にCO₂とH₂Oに分解される生分解性を有する天然高分子を素材とするハイドロゲルへの関心が高まっている。吸水性を示さない多糖類に対しては、カルボキシメチル (CM) 化することで、溶解性の向上、生物学的活性の改善、さらに水の吸収量の大幅な増加が明らかになっている。そのため、多糖類の特性を活かしたハイドロゲル開発が期待されている。多糖類の1つである α -1,3-グルカンは不溶性であり、*Streptococcus*属由来の糖転移酵素 (GTF-I) によって生産される。生産プロセスは環境にやさしく、安価であり、有機溶媒を使用せず沈殿によって容易に精製することができることから、有望な低コストバイオベース新素材であると期待されている。本研究では、報告例の少ない α -1,3-グルカンのCM誘導体を用いたハイドロゲルを作製し、機能性評価を行うことを目的とした。

【方法・結果】

イソプロパノールを溶媒とし、モノクロロ酢酸と α -1,3-グルカンを70°Cで8時間反応させることでCM誘導体を合成し、合成したCM誘導体の特性評価 (FT-IR、TGA) を行った。その結果、CM化によって熱安定性の向上が示唆された。

続いて、Poly (ethylene glycol) diglycidyl ether (PEGDGE) 22、400を用いて架橋ハイドロゲルを作製した。以下①～③を調べることでその機能性を評価し、架橋剤の違いがこれらの機能性に及ぼす影響を調べた。

- ① 吸水力 (pH感受性): CM誘導体の添加、その割合の増加によって、増加した。また、PEGDGE400で作製したゲルはPEGDGE22で作製したゲルより高い吸水力を示したと同時に、pH7の時、最も高い吸水性が得られた。
- ② タンパク吸着能力: CM誘導体の添加、その割合の増加によって、増加した。また、PEGDGE400で作製したゲルはPEGDGE22で作製したゲルより吸着量が多かった。
- ③ 色素吸着能力: CM誘導体の添加、その割合の増加によって、増加した (約20.0%)。また、PEGDGE400で作製したゲルはPEGDGE22で作製したゲルより高い色素除去率が得られ、最大で98.2%の色素除去率が得られた。

B01 小胞体ストレスを抑制する HO1 の作用機序

○杉田真穂、寶関 淳

(京都先端大院・バイオ環境)

【目的】

小胞体は細胞内で合成されるタンパク質の約3割を担っており、そのため厳格なタンパク質品質管理機構を有している。小胞体はこのような厳格な品質管理機構を有しているにもかかわらず、生活習慣によるストレスや老化などに伴い、小胞体内にミスフォールドタンパク質が蓄積した、小胞体ストレス状態が生じることがある。小胞体ストレスが起こると小胞体は恒常性を維持するため、翻訳抑制、フォールディング促進やミスフォールディング分解の促進などからなる小胞体ストレス応答を活性化する。それでも小胞体ストレスが改善せず、この状態が継続すると、アポトーシスが引き起こされる。このような小胞体ストレスによる細胞死は神経変性疾患や糖尿病などをはじめとする様々な疾患の発症原因になると考えられている。

ヘムオキシゲナーゼ(HO1)はヘムを分解する酵素であり、酸素を利用して、ヘムをビリベルジン、遊離鉄と一酸化炭素に分解する。HO1はC末端の1回膜貫通ドメインを介して小胞体膜にアンカーし、活性部位を含む N 末端側部分はサイトゾルに局在している。HO1は小胞体内腔に局在していないのにも関わらず小胞体ストレスを抑制することが報告されているが、その機序は不明なままである。本研究では、HO1が小胞体ストレスを抑制する機序を明らかにすることを目的として行った。

【方法・結果】

ヒトヘムオキシゲナーゼ(hHO1)の発現プラスミドを作製し、これを HeLa 細胞に過剰発現させた際の小胞体ストレス抑制効果を解析した。小胞体ストレス抑制の指標として、real-time PCRにより小胞体ストレス応答において誘導される遺伝子の転写量及びXBP1 splicing assayを解析した。その結果、hHO1はその酵素活性依存的に小胞体ストレスに対する抑制することを明らかにした。さらに、hHO1が小胞体ストレス時の小胞体レドックスに対して与える影響を解析している。

B02

ヒト培養細胞を用いたヒト膜タンパク質生産の効率化

○木村泰久¹、森伊吹¹、木岡紀幸¹

(¹京大院・農・応用生命)

【目的】

膜タンパク質はヒト遺伝子のおよそ30%をしめ、生命活動維持に重要な役割を果たしている。また、既存の市販薬の多くが膜タンパク質をターゲットとすることから、創薬対象としても着目されている。我々は膜タンパク質の一種である、ABCタンパク質を哺乳類細胞を用いて発現・精製し、生化学、酵素化学的解析によってその機能を明らかにする研究を展開してきた。一方、既存の発現系では十分なタンパク質を生産できず、解析が実施できないことも多かった。そこで、発現系および精製系の効率化を目的として検討を行った。

【方法・結果】

浮遊培養に順化されたヒト由来培養細胞(FreeStyle 293)を用いてタンパク質の発現を行った。従来用いていた専用培地では細胞到達密度が 2.0×10^6 /ml程度であった。そこで培地を検討したところ、細胞密度を 8.0×10^6 /mlまで増加させることに成功した。また、導入したタンパク質の発現量をGFPによって評価したところ、従来法に比べておよそ4倍の発現量が得られることが分った。次いで、ヒト由来のABCタンパク質を2種類(ABCA1、ABCB1)発現させたところ、ABCA1では従来法と同程度の発現量が得られたが、ABCB1については発現量が低下した。このことから、新たに開発した方法は発現を大きく増加させるポテンシャルがあるものの、タンパク質によってその効果が大きく異なることが明らかになった。現在、汎用性を高めるため、複数の膜輸送体タンパク質を用いて発現条件の検討を行っている。

タンパク質の精製は機能解析に向けた生化学研究の第一歩である。我々はこれまでに抗FLAG抗体ビーズを使った高純度精製を報告してきた。本手法は1ステップで高純度の標品を取得できることから、汎用性の高い手法であるが、抗FLAG抗体ビーズにかかるコストがネックとなっていた。そこで様々な抗FLAG抗体ビーズを検討し、手法の最適化と低コスト化を実施した。

B03 メカノセンサータンパク質ビンキュリンに依存した間葉系幹細胞の分化制御に関わるヒストン修飾

○小川陽久¹、藤原萌衣¹、木村泰久¹、木岡紀幸¹、黒田美都¹

(¹京大院・農)

【目的】

間葉系幹細胞は、細胞外基質の硬さなど物理的な外部刺激を感知し、自身の分化を制御する。この過程において間葉系幹細胞は”硬さ”の刺激を記憶することが明らかとなっているが、その具体的な分子メカニズムは未解明である。近年、分化制御機構の一つとしてエピジェネティクス、特にクロマチン修飾が注目されている。そこで本研究では、硬さの刺激記憶に応じた分化制御機構の解明を目指し、「間葉系幹細胞は細胞外基質の硬さを感知し、ヒストン修飾を介して細胞分化を制御する」という仮説を立て、本仮説を検証することとした。

【方法・結果】

細胞外環境を”軟らかい”と感知しているモデル細胞として物理的的刺激感知分子(メカノセンサータンパク質)ビンキュリンを発現抑制したST2細胞を用い、ChIP-qPCR法により分化制御遺伝子領域のヒストン修飾を解析した。その結果、ビンキュリンの発現抑制細胞では、コントロール細胞に比べ、脂肪細胞分化マスターレギュレーター遺伝子 *Ppar γ* の転写開始点近傍領域のH3K4 me3修飾と、骨芽細胞分化を負に制御するとされる *Meflin* 遺伝子の転写開始点近傍領域のH3K4 me3修飾が増加していた。また、ビンキュリンと複合体を形成して細胞外基質の硬さ感知に関わるとされるSorbs1(CAP)の発現抑制細胞においても、同様に *Ppar γ* 遺伝子転写開始点近傍領域のH3K4 me3修飾と、*Meflin* 遺伝子転写開始点近傍領域のH3K4 me3修飾の増加が見られた。以上の結果から、細胞外環境を軟らかいと感知している細胞では、分化制御遺伝子の転写開始点近傍領域のヒストン修飾が変化していることが示唆された。当該修飾変化が軟らかい基板上での脂肪細胞分化促進に寄与している可能性がある。今後は、実際の軟らかい基盤上培養でも同様の修飾変化が起こるか、さらに当該修飾変化が時間依存的であるかを解析する予定である。

B04 転写共役因子 PGC1 α の骨格筋における標的遺伝子の探索

○木村徳士¹、杉本拓海¹、酒巻千広¹、江口貴大²、
三浦進司³、亀井康富¹

(¹京府大院・生命環境、²国立長寿研・中枢性老化、
³静岡県大院・食品栄養)

【目的】

骨格筋はヒトの体重の約40%を占める人体最大の組織であり、運動やエネルギー代謝、糖取り込みなどにおいて重要である。適度な運動は骨格筋の機能を維持し、肥満や糖尿病などの生活習慣病を防ぐ観点から重要である。転写共役因子PGC1 α は運動によって骨格筋で発現が増加し、ミトコンドリアの生合成、筋線維の赤筋化、脂肪酸酸化といった運動に関連する代謝を促進する。PGC1 α は核内受容体であるERR α などを活性化し、標的遺伝子の発現を制御する。PGC1 α の標的遺伝子の同定はPGC1 α によって制御される運動への適応やエネルギー代謝の分子メカニズムを解明することにつながる。

本研究では、運動によって骨格筋で発現が増加するPGC1 α の新規標的遺伝子を探索し、骨格筋におけるPGC1 α の役割を解明することを目的とした。

【方法・結果】

骨格筋特異的にPGC1 α を欠損した(PGC1 α -mKO)マウスの腓腹筋で網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、神経筋接合部の形成に必須であるDok-7の発現が減少していた。骨格筋特異的にPGC1 α を過剰発現させた(PGC1 α -mTG)マウスの腓腹筋において、Dok-7の発現が増加した。また、神経筋接合部の構造を解析したところ、野生型マウスと比較して、PGC1 α -mTGマウスの方が大きくなっており、神経伝達が円滑になっていると考えられた。運動させたマウス(生理的にPGC1 α が増加する条件)の腓腹筋においてもDok-7の発現は増加した。このことから、これまで不明であった、運動が神経筋接合部の形成を亢進する経路として、PGC1 α がDok-7の発現を正に制御することを明らかにした(Sugimoto, Sakamaki, Kimura et al. 2024)。

PGC1 α -mKOマウスの腓腹筋の網羅的遺伝子発現解析により、Dok-7と同様に発現が減少した遺伝子が複数個抽出された。それらの遺伝子について、PGC1 α 遺伝子改変(PGC1 α -mTG、PGC1 α -mKO)マウスや運動させたマウスの腓腹筋における遺伝子発現解析を行うと、いくつかの遺伝子がPGC1 α によって正に制御されることが示唆された。

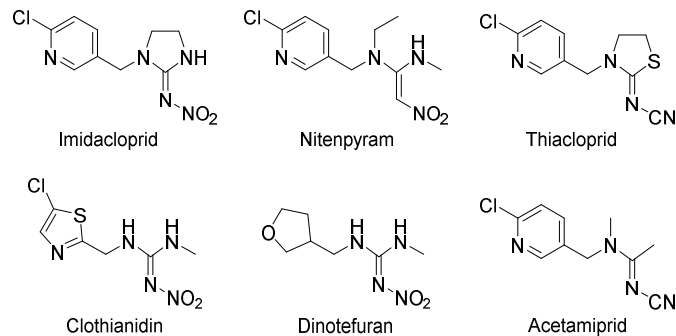
B05

ハマダラカに対するネオニコチノイドの毒性発現機構

○伊藤稜¹、神谷昌輝¹、高山浩一¹、森澄海人¹、小嶋尚憲¹、
武林真由花¹、伊原誠¹、Gareth Lycett²、David B. Sattelle³、松田一彦¹
(¹近大院・農、²LSTM、³UCL)

【目的】

マラリアに毎年約2億人以上が感染、60万人以上が死亡している。このマラリアを媒介するガンビエハマダラカ(*Anopheles gambiae*)を防除するためピレスロイド系殺虫剤が使用されてきたが、標的部位、代謝亢進による抵抗性の発達が報告されている。そのため、ピレスロイドとは異なる作用機構をもつネオニコチノイド系殺虫剤の使用が検討されている。ネオニコチノイド系殺虫剤は昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に対して選択的に作用する。本研究では、ハマダラカの5種のサブユニットから成るnAChRの機能的発現を試み、それらに対する6種のネオニコチノイド系殺虫剤のアゴニスト活性を測定した。さらに、本活性に対する各サブユニットの寄与を解明するとともに、ハマダラカの雌成虫に対するノックダウン効果の進行速度を支配するnAChRと化合物の物理化学的性質を明らかにしたので報告する。



【方法・結果】

アフリカツメガエル卵母細胞に5種のサブユニットと3つの補助因子のcRNAをインジェクションし、一定期間インキュベートした後、二電極膜電位固定法を用いて試験した。その結果、13種のnAChRサブタイプの機能的発現が確認された。それらに対する6種のネオニコチノイドのアゴニスト活性を測定し、本活性に対するサブユニットの寄与を多変量解析したところ、Aga2サブユニットはネオニコチノイドの親和性を低下させるのに対して、逆にAga3サブユニットはネオニコチノイドの親和性を高めることが明らかとなった。受容体レベルで得られたネオニコチノイドの活性とハマダラカの雌成虫に対するノックダウン速度との関係を重回帰分析したところ、化合物の疎水性とAga1/Aga2/Aga8/Agβ1 nAChRに対するネオニコチノイドの活性がノックダウン活性を支配していることが示唆された。

B06 パルミトイル化修飾に着目した亜鉛エクスポーターZNT1の発現制御に関する研究

○中喜多和孝、山本奈央、神戸大朋

(京大院・生命科学)

【目的】

亜鉛はタンパク質の構造因子、酵素の補因子、シグナル伝達因子として働く生命活動に欠くことのできない必須微量栄養素である。そのため、亜鉛ホメオスタシスの維持は生命にとって重要である。細胞外から細胞質への亜鉛取り込みには多数のZIP亜鉛トランスポーターが働く一方で、細胞質から細胞外への亜鉛の排出には唯一亜鉛トランスポーターZNT1が働くことが知られる。したがって、ZNT1には重要な役割があると考えられてきたが、その詳細に関しては依然、多くの不明な点が残されている。近年、ZNT1発現量が肝がんの悪性度と相関することや、ZNT1の体細胞変異が高血圧を引き起こすことが報告され、ZNT1の生理機能には大きな注目が集まっている。本研究は、ZNT1の発現制御に関する詳細を明らかにする目的で行った。

【方法・結果】

ZNT1の発現制御については亜鉛応答性転写因子MTF-1を介した転写制御がよく知られているが、最近、当研究グループではZNT1がタンパク質レベルにおいても発現制御されていることを見出した。この制御においてZNT1が何らかのタンパク質と相互作用する必要があると予想し、ZNT1近傍分子をBio-ID法を用いて探索したところ、S-パルミトイル化修飾酵素、脱S-パルミトイル化修飾酵素と相互作用している可能性を示唆する結果を得た。Acyl-PEGyl Gel Shift Assay (APEGS法) およびAcyl-Biotinyl Exchange Assay (ABE法) を用いてZNT1が実際にS-パルミトイル化修飾されるかどうか解析した結果、分子内の少なくとも3ヶ所でS-パルミトイル化修飾を受けることを確かめた。加えて、細胞内および膜貫通領域内に位置するすべてのCysについてSerに置換した変異体を作製し、S-パルミトイル化修飾を受けるCysを特定した。現在、特定した3ヶ所のCysをすべてSerに置換した変異体について、細胞膜での局在、亜鉛輸送活性、および安定性の変化などについてWTと比較し、S-パルミトイル化修飾がZNT1の発現調節に寄与している可能性を検討している。3つのCysは結晶構造において空間的に近いことから、S-パルミトイル化修飾が協調的なZNT1発現制御に関わる可能性が大きく期待できる。

B07 ピレスリン生合成に関わる GDSL リパーゼの酵母での発現

○竹本圭佑¹、岸田千夏²、伊原誠¹、松田一彦¹

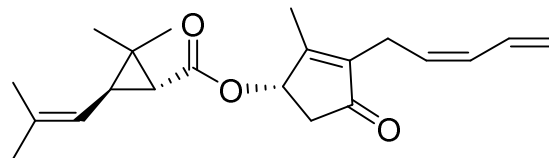
(¹近大院・農 ²近大・農)

【目的】

除虫菊 (*Tanacetum cinerariifolium*) は天然殺虫剤ピレスリンを生合成する。GDSL エステラーゼ・リパーゼ (TcGLIP) はピレスリン生合成の最終ステップを担い、ピレスリンのエステル結合形成反応を触媒することを先駆けて見出した。

われわれはTcGLIPの立体構造をX線結晶構造解析によって求め、その基質認識機構を明らかにすることを目的として、本酵素の異種発現系の構築を試みた。

大腸菌でHis-tagを付してTcGLIPを発現させたときには不溶性となったが、マルトース結合タンパク質との融合タンパク質として発現させた場合には、可溶性タンパク質として発現した。本組換えTcGLIPはピレスリン合成活性を示し、基質の立体構造を厳密に認識した。しかし、このようにして発現させたTcGLIPはSDS-PAGEでは均一のように見えてもゲルろ過では複数のピークを示し、純度の面で問題が認められた。これは、おそらくジスルフィド結合の形成が不完全なものが混在したためと推定された。そこで酵母 *Pichia pastoris* を用いてTcGLIPの発現と精製を試みたので報告する。



Pyrethrin I

【方法・結果】

His-tagを付したTcGLIPのcDNAを染色体に挿入した *Pichia pastoris* をBMGY培地で培養した。回収した菌体をBMMY培地に懸濁し、振とうしながらメタノールを培地に添加し、TcGLIPの発現を誘導した。培養液をアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて精製した。このようにして精製したタンパク質はSDS-PAGEで単一のバンドを示し、ゲルろ過分析で単量体であることが示唆された。 *P. pastoris* で発現させたTcGLIPはピレスリン合成活性を示し、触媒効率は *E. coli* で発現させたものに比べて高いことが明らかになった。

B08 ヒト DNA ポリメラーゼ δ の Leu606 のデオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドの識別における役割

上野凜¹、石橋周侑¹、神田橋眞子¹、深田健太郎²、滝田禎亮^{1,2}、○保川清^{1,2}
(¹京大院・農、²京大・農)

【目的】

DNAポリメラーゼ (Pol) は数千塩基対に1塩基の割合で誤ってリボヌクレオチドを取り込む。Polの活性部位にはモチーフAとよばれる保存配列(DXXXLYPS)が存在し、ヌクレオチド選択に関与することが知られているが、詳細は不明である。Pol δ はゲノムDNAのラギング鎖を複製する酵素で、ヒトでは4つのサブユニット(p125、p66、p50、p12)から成り、触媒部位はp125に存在する。酵母では、Pol δ のLeu612(ヒトPol δ のLeu606に相当)に変異を導入すると、変異がF、G、I、K、M、N、T、Vであるものは生育したが、他の11種類は生育しなかったことが報告されている¹⁾。本研究では、Pol δ のLeu606がF、G、I、K、M、N、T、Vに置換された8種類の単変異体を作製し、ヌクレオチド取込み活性を解析することで、Leu606の本識別における役割を調べた。

【方法】

1. 発現と精製: 既報²⁾ に従い、大腸菌BL21(DE3)に、p125とp12、p66とp50のそれぞれのポリシストロニック発現プラスミドを導入して発現させ、菌体からPol δ を精製した。

2. ヌクレオチド取込み活性の測定: 34塩基のDNAとこれの3'側に相補的な20塩基のDNAをアニールさせたものを鋳型プライマーとし、dNTPあるいはrNTP存在下、37°Cで反応を行った。反応物を12%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけて解析した。

【結果】

変異体のデオキシリボヌクレオチド取込み活性(A)は野生型酵素(WT)の40%~180%であり、変異体間で大きな差はなかった。変異体のリボヌクレオチド取込み活性(B)はWTの6.1%~690%であり、変異体間で大きく異なった。WTのB/Aを100%とした場合の変異体のB/Aは16%~820%であり、高い順にL606G(820%)、L606F(670%)、L606M(570%)であった。これらのことから、Leu606は、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドを識別する役割を担っていることが示唆された³⁾。

【文献】

- 1) Venkatesan et al. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 4486-4894
- 2) Masuda et al. (2007) *Nucleic Acids Res.* **35**, 6904-6916
- 3) Ueno et al. (2024) *J. Biol. Macromol.* in press

B09 運動による脳機能調節に対する骨格筋 AMP キナーゼの寄与

○澤田廣大¹、横川拓海¹、岡崎郁憲¹、江川達郎²、三浦進司³、
井上和生¹、林達也²

(¹京大院・農、²京大院・人環、³静岡県大・食品栄養)

【目的】

運動は身体機能・全身代謝のみでなく、脳機能を亢進させることが示されているが、その詳細な機序は未だ明らかでない。運動により活性化される骨格筋 AMP キナーゼ (AMPK) は、細胞内代謝経路の調節因子であるとともに、骨格筋由来の生理活性物質 (マイオカイン) の制御にも関与していることが示唆されている。従って、骨格筋-中枢連関による脳機能制御において、骨格筋 AMPK が主要な役割を果たしている可能性があるが、その直接的なエビデンスは存在しない。以上より本研究では、脳機能調節における骨格筋 AMPK の関与を検証するとともに、その詳細な分子機序を探索することを目的とした。

【方法】

本研究では、骨格筋特異的に AMPK を不活性化する AMPK α ドミナントネガティブ変異体強制発現 (AMPK-DN) マウスを用いた。野生型ならびに AMPK-DN マウスをランニングホイールあり・なしの各条件にて 3 週間飼育した後、自発行動・情動・学習に関わる行動解析を実施した。また、行動解析後に、情動や学習に関わる脳領域である海馬をサンプリングし、遺伝子発現解析を実施した。

【結果・考察】

オープンフィールド試験において、AMPK-DN マウスでのみ運動により自発行動量が有意に増加した。また、高架式十字迷路試験において、野生型マウスでのみ運動による抗不安効果が見られた。Y 迷路試験においては、空間作業記憶の指標である自発的交替行動に 4 群間で顕著な差は観察されなかった。バーンズ迷路試験では、AMPK-DN マウスにおいて空間学習能力の低下が示された。加えて、運動による学習能力の亢進が AMPK-DN マウスにて抑制されている傾向が見られたが、統計学的に有意な差は見られなかった。

遺伝子解析において、野生型マウスでは運動により、脳由来神経栄養因子をコードする *Bdnf* の遺伝子発現量が有意に上昇していた一方、AMPK-DN マウスでは運動による *Bdnf* 発現量の上昇が消失していた。

以上の結果から、骨格筋 AMPK が海馬における脳由来成長因子の発現を制御していることが示されたとともに、自発行動・不安様行動・学習能力の調節に関与していることが示唆された。

B10 学習・情動制御におけるシナプス接着分子 Arcadlin の役割

○岡崎郁憲¹、横川拓海¹、澤田廣大¹、井上和生¹

(¹京大院・農)

【目的】

摂食行動や運動といった生理的因子によって脳機能が変化することが知られているが、その分子機序については十分に明らかになっていない。当研究室において絶食や運動に応答する分子としてシナプス接着分子Arcadlinを同定した。Arcadlinは神経活動により迅速に誘導される最初期遺伝子であるとともに、シナプス接着分子として興奮性シナプスの数的制御に関与している。したがって、Arcadlinがシナプス可塑性を介して、脳機能の調節に関与している可能性が考えられる。しかしながら、生体における Arcadlinの行動学的な機能ならびに、その分子機序に関してはいまだに明らかでない。そこで本研究では、Arcadlinの欠損が学習・情動に与える影響を明らかにするとともに、その分子基盤を探索することを目的とした。

【方法】

同腹のArcadlin knockout (KO)マウスおよび野生型マウスを用いて行動解析を行ったのち、海馬や前頭前皮質、視床下部の生化学的解析を行った。

【結果・考察】

野生型マウスを用いて、Arcadlinの遺伝子発現解析を実施したところ、Arcadlinが脳で選択的に発現し、特に海馬と視床下部、前頭前皮質、線条体で高発現することが明らかとなった。生体におけるArcadlinの機能評価のために行動解析を実施したところ、Arcadlin KO マウスはオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験において不安様行動を示した。またY迷路試験においては、Arcadlin KOマウスの空間作業記憶の亢進が示された。Arcadlin欠損が脳の基本的な構造に与える影響を確認するために、海馬において各種細胞マーカーのウエスタンブロットティングおよび免疫染色を実施したところ、神経細胞やグリア細胞の量および構造的な形態に顕著な差は確認されなかった。Arcadlin欠損がシナプスに与える影響を確認するために、シナプス分子のタンパク質発現解析および遺伝子発現解析を実施したところ、Arcadlinの結合標的であるneural cadherin (N-cadherin) に関しては、遺伝子発現の変動なしにタンパク質発現量が増加していることが確認された。また興奮性シナプス分子に関しても、タンパク質発現量の包括的な増加が確認された。一方で、Arcadlin欠損は視床下部において不安関連ニューロペプチドの遺伝子発現には顕著な影響を与えなかった。以上より、Arcadlinは海馬興奮性シナプスの調整に関与するとともに、学習や情動を制御することが示唆された。

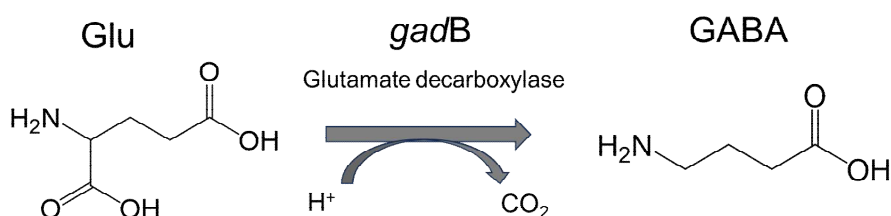
C01 γ -アミノ酪酸産生乳酸菌の探索

○櫻間晴子¹、田中舞¹、中柴実祐¹、松田柚稀¹、坂本文夫^{1,2}
藤田裕之¹、萩下大郎¹

(¹京都先端大・バイオ環境、²京都二ホンミツバチ研究所)

【目的】 乳酸菌はその保健効果から広くプロバイオティクスとして利用されており、益々、その需要が高まっている。これまでに、我々は、発酵食品や植物、蜂蜜などから乳酸菌を単離し、200株以上の乳酸菌ライブラリーを構築してきた。本研究では、機能性成分として、ストレスの緩和や高めの血圧を下げる機能があるとされている γ -アミノ酪酸(GABA)に着目し、GABA生産能を有する乳酸菌の探索を行った。

【方法】 サンプルを生理食塩水に懸濁し、炭酸カルシウム含有MRS培地などを用いて乳酸菌を単離した。単離した乳酸菌を、1% グルタミン酸含有MRS培地などで4~7日嫌気条件下で培養し、GABA生産反応を行った。反応産物は薄層クロマトグラフィー(TLC)にて分析した。GABAが検出された菌株については、反応産物を高速液体クロマトグラフィー分析することで詳細に解析した。GABAを検出した反応液をTCA処理したのち、D-FDLDAで誘導体化し、340nmで検出した。さらに、反応産物は、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC-MS)で分析することで、GABAとグルタミン酸を同定した。また、生産量が多い菌株は、NucleoSpin tissue kitを使ってゲノムを抽出し、次世代シーケンスにてゲノム解析した。



【結果】 乳酸菌274株のうち、GABA生産乳酸菌を10株得た。そのうち、4日培養液をD-FDLDAで誘導体化してLCまたはLC-MS分析した結果、蜂蜜由来の菌株のみ、グルタミン酸をすべてGABAに変換したことが示された。さらに、本菌株をゲノム解析した結果、ユニークなGABA合成遺伝子群を有していることが示された。

C02 葉面細菌 *Methylobacterium* のバクテリオクロロフィルの ATP 産生機能

○井口博之¹、谷明生²

(¹ 京都先端大・バイオ環境、² 岡山大・植物研)

【目的】 *Methylobacterium* 属 (再分類により新属に移行した *Methylorubrum* 属を含む) は葉面に多数生息する植物共生メチロトロフ細菌である。葉面は太陽光を受けて熱や紫外線、乾燥といったストレスを生じ、また葉面で利用可能な栄養物質も限られるなど、生息する微生物にとっては厳しい環境である。本属細菌にはバクテリオクロロフィル (BChl) 生合成遺伝子が分布しているが、光合成細菌とは認識されておらず BChl の機能も不明である。そこで本研究では *Methylobacterium* における BChl の光合成 (エネルギー産生) 機能と、葉面での生育生存に果たす役割を明らかにすることを目的とした。我々はまず、BChl の生産および生産条件を調べ、*Methylobacterium* の各種基準株が BChl を生産すること、菌によって明条件あるいは暗条件で生産されることを報告した (2024 年度日本農芸化学会年次大会)。本発表では、*Methylobacterium* の BChl がエネルギー (ATP) 産生に係る機能を有しているか調べたので報告する。

【方法・結果】 BChl 生産条件の異なる 2 菌株を使用した。 *M. extorquens* AM1 は 1,2-propanediol という特殊な炭素源、明暗サイクル条件で BChl を生産し、 *M. phyllosphaerae* CBMB27 は、メタノールを炭素源、暗条件で生産する。それぞれの菌株で BChl 生合成経路の 1 遺伝子を破壊したところ、BChl の生産が見られなくなったことから、これを BChl 欠損株とした。次に、野生株と欠損株を BChl 生産条件で培養し、細胞内の ATP 量を定量した。 *M. phyllosphaerae* CBMB27 は、暗期には野生株と欠損株とで ATP 量は同等だったのに対し、明期には野生株で ATP 量が高くなっていたことから、本菌の BChl は ATP 産生に関与していることが示唆された。一方で、 *M. extorquens* AM1 の ATP 量は、明期の方が暗期よりも高かったが、野生株と欠損株の差異は見られなかった。このことから、 *M. extorquens* AM1 では想定している BChl 以外にも、光を利用して ATP 産生に関わる (光に応答して ATP 産生を高める) 機能分子が存在する可能性が示唆された。

C03

タウリンを合成する能力を有する微生物の探索

○萩下大郎¹、原田恋夏¹、櫻間晴子¹、西川正信²

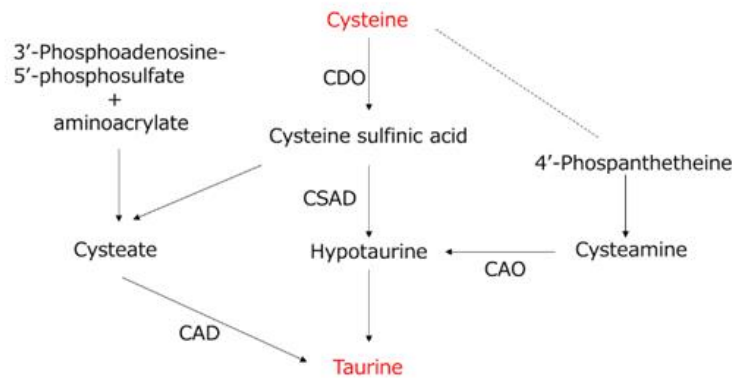
(¹ 京都先端大・バイオ環境、² 岡山生物研)

【目的】

タウリンは分子内にアミノ基とカルボキシル基の代わりにスルホキシ基を持つ含硫アミノ酸様化合物であり、幅広い疾患の予防に有効であることが報告されている。タウリンは生体内でメチオニンやシステインなどの含硫アミノ酸から合成される他、魚介類を摂取することで補給されている。タウリンは生体内で遊離した状態で存在しており、浸透圧調節物質として恒常性を維持するうえで重要な役割を果たしている。化学合成されたタウリンは医薬品に分類され、日本では食品の原料として合成タウリンを使用することはできない。そこで本研究では環境負荷が低く、安全で効率的にタウリンを生産することを目的として、タウリンを合成する能力を有する微生物のスクリーニングを行った。また、タウリン代謝に関わる化合物の分析方法を検討した。

【方法・結果】

枯草菌の芽胞形成期にタウリンが存在する報告があることから、枯草菌をターゲットにスクリーニングを行った。タウリンの生合成経路(下図)としてシステインスルフィン酸経路、システイン酸経路、システアミン経路の三つの経路が知られている。



そこでタウリン合成能を有する微生物のスクリーニングにはシステインを基質とする菌体反応を行った。タウリンおよび中間代謝化合物は薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した。主に土壌から単離した微生物290株の菌体反応を行い、TLC分析でタウリンならびに中間代謝化合物と同じ位置にスポットが確認された菌株を53株得た。明瞭なスポットが得られた10株について、反応条件を検討した。

DL-アミノ酸ラベル化キット(ナカライ株式会社製)を応用して、システインおよびタウリン代謝に関わる中間代謝化合物のHPLC分析方法の構築を行った。

C04 *Bacillus subtilis* の細胞空洞化に関するペプチドグリカン分解酵素 CwIO

○中根 摩耶、中本 博、南部 優子、高瀬 隆一、小倉 康平、橋本 渉
(京大院・農)

【目的】グラム陽性細菌のモデル生物*Bacillus subtilis*は土壌・大気や動物・植物に広く存在し、納豆製造に用いられる納豆菌もその一種である。当研究室では、納豆菌を蒸大豆上で長期間培養した際、一部の菌体に巨大な穴が開き細胞内容物が漏出する細胞空洞化の現象を見いだしている⁽¹⁾。本現象は*B. subtilis* 実験室株(168株)でも観察され、空洞形成位置が細胞極付近に偏っている点で一般の溶菌と異なる新規なものであると考えられるが、その生理的意義は明らかにされていない。これまでに、芽胞形成のレギュレーターであるSpo0Aの遺伝子欠失が細胞空洞化を抑制し、生菌数を低下させることを明らかにしている。さらに、*B. subtilis*がもつ複数のペプチドグリカン分解酵素の中で、CwIOが空洞化に関与することが示された。本研究では、細胞空洞化におけるCwIOの機能解明を目的として、野生株とCwIO遺伝子欠損株($\Delta cwIO$ 株)の性状を比較した。

【方法・結果】蒸大豆上で*B. subtilis* 168株を培養し、走査型電子顕微鏡解析により空洞化細胞の全細胞に占める割合(空洞化率)を経時的に算出した。野生株の空洞化率は、培養2日後から4日後(いずれも定常期)の間に大きく上昇し、10%ほどに達した後、一定に保たれていた。一方、 $\Delta cwIO$ 株の空洞化率は上昇せず(1%以下)、野生株と比較して有意に低かった。このことから、CwIOが直接的あるいは間接的に細胞空洞化を誘導することが明らかになった。次に、野生株あるいは $\Delta cwIO$ 株を蒸大豆上で培養した後に生理食塩水を加え、ボルテックスミキサーにより菌体を回収し、その生菌数(Colony-Forming Unit, CFU)を測定した。その結果、いずれの培養時間においても、野生株と $\Delta cwIO$ 株との間で生菌数に差はみられなかった。一方で、菌体を7日間および16日間培養した蒸大豆をそれぞれ生理食塩水回収処理後にLB液体培地へ移し、波長600 nmにおける光学密度の変化を測定したところ、両日ともに野生株と比較して $\Delta cwIO$ 株では濁度上昇に遅滞がみられた。

【考察】以上の結果から、野生株との相違点として、空洞化が抑制される $\Delta cwIO$ 株では大豆(固体)表面に残存する生菌数が少ないことが示唆された。この差異は野生株の空洞化率が低い培養1日後にはみられないことから、空洞化が接着性に寄与している可能性が示された。固体表面への安定した接着は菌体にとって栄養源へのアクセスを容易にするものであり、生育に不可欠である。今回の結果から、*B. subtilis*の細胞空洞化は、周りの細胞の接着性を向上させることで生育を助け、細胞集団全体の生菌数を維持する意義をもつことが考えられた。

(1) Sugiura *et al.* (2020) *Sci. Rep.* 10: 18691.

C05 酸素制限による枯草菌細胞内のニコチンアミドジヌクレオチド量の増加

○池田魁哉¹、石川周²、吉田健一³

(¹神戸大学 大学院・科学技術イノベーション研究科)

【目的】

枯草菌では安定に解糖系でエネルギーを得るためにも一定以上のニコチンアミドジヌクレオチド(NAD)量が維持されていると考えられる。しかし、それが如何に調節されているのか、その機構の詳細は未だに理解されていない。本研究はその解明を目指し、特に酸素供給量に呼応して細胞内NAD量が制御されている可能性を検討し、NAD合成を自在に操作する方法論を開発することを究極的な目的とする。

【方法・結果】

枯草菌野生株を培養する際に、攪拌回転数を増減する、あるいは容器内に封入する培地の量を増減することによって、酸素供給量に差を設定する検討を行った。細胞内のNAD量を測定した結果、低回転数攪拌にした場合と培地量を増やした場合、いずれも酸素が制限されている条件でNAD量は増加する傾向を示した。また、酸素供給の低下が著しい時点においてはNADHの蓄積も観察された。すなわち、低酸素時には呼吸鎖が滞り、NADHを酸化してNAD⁺に戻せなくなる。すると、細胞内はNAD⁺不足に陥る。このままでは解糖系が維持できなくなるため、不足を補うためのNAD⁺をde novo合成する機構が存在する可能性が示唆された。そこで、NAD⁺のde novo合成遺伝子の調節因子であるNiaRの欠損株においても同様に検討したところ、依然としてNAD量は低酸素時に増加する傾向を示した。この結果は、酸素供給に呼応してNAD⁺のde novo合成を制御するNiaRではない未知の調節因子(機構)が存在する可能性を示唆した。NAD⁺のde novo合成の初発であるアスパラギン酸の量はTCAサイクルからのオギザロ酢酸の分岐量に依存すると考えられる。現在、細胞内のアスパラギン酸量と酸素供給の相関、そしてNAD量の変化を解析して考察を進めている。

C06 腸内細菌由来酵素の阻害による phenol 生成の抑制

○上野僚¹、及川大樹¹、片山高嶺¹、中山亨²

(¹京大院・生命科学、²東北大院・工学)

【目的】

慢性腎臓病には有効な治療法がないため、症状が進行すると人工透析が必要となる。本疾患は尿毒素として知られるphenyl sulfateの蓄積が一因となって進行するが、その前駆体であるphenolは食餌由来のtyrosineが腸内細菌によって代謝されることで生じる。腸内におけるphenol生成酵素としては、これまでtyrosine phenol-lyaseが注目されてきたが、近年、tyrosineが段階的に代謝されて生じる化合物で、食餌成分にも含まれることが知られる *p*-hydroxybenzoate (PHB) から hydroxyarylic acid decarboxylase (HAD) の脱炭酸反応によって生じることが明らかとなった。本研究では、腸内細菌によるPHBからのphenol生成を低減させることを目的として、HAD活性を阻害する化合物を探索した。

【方法・結果】

HAD 阻害剤の探索には、基質であるPHBと構造類似性を有し、ヒトへの有用な生理機能が報告されている植物性ポリフェノール化合物ライブラリーを用いた。各化合物をPHBと共に *had* ホモログを有する細菌を含む反応液に添加して phenol 産生量を比較したところ、リンゴ果皮に含まれる phloretin と漆に含まれる sulfuretin において高い phenol 生成抑制効果が確認され、またその抑制効果は同化合物の投与量依存的であった。さらに両化合物をヒト糞便懸濁液に添加して phenol 蓄積に対する抑制効果を検証したところ、やはり投与量依存的に phenol 生成が有意に減少した。両化合物による PHB からの phenol 生成抑制は、*had* ホモログを有する細菌の粗酵素液を反応液に添加した際にも観察されたことから、その作用は HAD 阻害であることが強く示唆された。両化合物あるいはその誘導体の腸内における phenol 生成抑制効果が期待される。

C07 メタノール酵母の Processing body における mRNA の時空間制御と生理的意義

○関岡風花、白石晃将、赤木美穂、幅田亜香莉、由里本博也、阪井康能

(¹京大院・農)

*Candida boidinii*をメタノール培地で培養すると、ペルオキシソームに局在するジヒドロキシアセトンシンターゼ (DAS) や細胞質に局在するホルムアルデヒドデヒドロゲナーゼなどのメタノール代謝関連酵素が顕著に発現誘導される。我々はこれまでに、これら酵素の mRNA (methanol-inducible mRNA: mimRNA) がメタノール培養時に細胞質で顆粒を形成することを見出している。そこで、*DAS1* mRNA を対象に mimRNA 顆粒の時空間制御とその生理的意義について調べた。

DAS1 mRNA の顆粒は Processing body (P-body) のマーカータンパク質である Edc3 と部分的に共局在し、*edc3* Δ (P-body 形成不全) 株では野生株と比較し *DAS1* mRNA の転写量と顆粒数が減少した。さらに過酸化水素による酸化ストレス条件では、*DAS1* mRNA と Edc3 の共局在率が大きく上昇し、*edc3* Δ 株の生育は野生株よりも低かった。これらより、P-body による mimRNA の隔離はメタノール代謝関連遺伝子の発現量の調節、およびストレス下での生育に寄与することが示唆された。加えて我々は、*C. boidinii* が葉面でメタノールを利用して増殖する¹際の P-body の役割を調べた。

¹K. Kawaguchi, H. Yurimoto, M. Oku, and Y. Sakai. Yeast methylo-trophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS ONE*, 6, e25257 (2011).

C08 酵母 *Komagataella phaffii* のマイクロペキソファジーにおける液胞膜変形を駆動する ESCRT 分子の解析

○光部雅俊¹、石垣颯斗²、齋藤敬¹、奥公秀³、白石晃将²、阪井康能²
(¹京大院・総合生存学、²京大院・農、³京都先端科学大・バイオ環境)

【目的】

細胞内分解機構であるオートファジーには、液胞膜の形態変化を伴わないマクロオートファジーと液胞膜の形態変化を伴うマイクロオートファジーが存在する。遺伝学的階層性、活性制御機構、基質認識機構などの理解が進んでいるマクロオートファジーに対し、マイクロオートファジーについては統一的な分子機構の見解は得られていない。これまでに当研究室により、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の脂肪滴選択的なマイクロオートファジーに ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport complex) 分子群が関与することが明らかになった。そこで本研究では、メタノール資化性酵母 *Komagataella phaffii* (旧名 *Pichia pastoris*) のペルオキシソーム選択的なマイクロオートファジー、通称マイクロペキソファジーを対象に、マイクロオートファジーにおける ESCRT 分子群の機能解析を進めた。

【方法・結果】

K. phaffii の ESCRT 分子群に属するタンパク質をコードする遺伝子のうち、*vps27*、*snf7*、*vps4* それぞれの破壊株を作製し、マイクロペキソファジー誘導時の液胞膜形態変化を調べた。その結果、これらの遺伝子欠損株では野生型で見られる液胞膜形態変化が起こらないことを見出した。一方で、これらの遺伝子破壊株においてマクロペキソファジーは野生株と同様に進行したことから、ESCRT 分子群がマイクロペキソファジーに特異的な因子であることが示唆された。さらに、マイクロペキソファジーにおける ESCRT 分子群の役割を調べるため、ESCRT 分子群の一つである Vps27 を蛍光標識し、局在解析を行った。その結果、マイクロペキソファジー誘導時、Vps27 が液胞-ペルオキシソームコンタクトサイト (VPC: Vacuole-Peroxisome Contact site) に局在することを見出した。これらことから、ESCRT 分子群がマイクロペキソファジー誘導初期におけるペルオキシソームの認識と液胞膜の形態変化を駆動していることが示唆された。

C09 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のマイクロリポファジーは Rsp5 によるユビキチン化により促進される

○中辻拓実¹、白石晃将¹、奥公秀²、阪井康能¹

(¹京大院・農、²京都先端科学大・バイオ環境)

【目的】

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、ダイオキシックシフトに伴い、脂肪滴を液胞に取り込み分解するマイクロリポファジーが誘導される。本研究では、マイクロリポファジー誘導時の脂肪滴認識機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

近年我々は、ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 分子群の一つである Vps27 がマイクロリポファジー誘導時に液胞近傍に局在を変えることを報告した (Oku et al. 2017)。Vps27 の局在変化および K63 ユビキチン鎖との高い親和性から、我々はマイクロリポファジー誘導時に脂肪滴がユビキチン化され、その認識に Vps27 が機能していると推察した。

そこで、ユビキチン転移 (E3) 酵素の候補である Rsp5 を変異発現する (*rsp5-1*) 株を作成したところ、*rsp5-1* 株では脂肪滴の分解が起こらなかった。また、マイクロリポファジー誘導時、*rsp5-1* 株では野生株と比較して、脂肪滴と液胞の接触が低減していた。これらより、マイクロリポファジー誘導時には Rsp5 を介した脂肪滴タンパク質のユビキチン化が起こることが示唆された。

これらのことから、出芽酵母 *S. cerevisiae* ではダイオキシックシフトに伴い、Rsp5 依存的に脂肪滴局在タンパク質のユビキチン化が起こり、そのユビキチン鎖を Vps27 が認識することでマイクロリポファジーが誘導されることが示された。

現在、マイクロリポファジーの誘導に伴いユビキチン化される脂肪滴局在タンパク質の探索を行っている。

Oku M, Maeda Y, Kagohashi Y, Kondo T, Yamada M, Fujimoto T, Sakai Y. Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J Cell Biol.* 2017 2;216(10):3263-3274.

C10 酵母ステロール合成経路を制御する脂肪滴タンパク質の解析

○奥公秀¹、萱原彰吾¹、古川美琴¹、轟嘉良²、阪井康能²

(¹京都先端科学大・バイオ環境、²京都大院・農)

【目的】

酵母のステロール合成経路は抗菌剤のターゲットとなる重要な反応経路であり、これまでその制御に関する多くの研究が行われてきた。本経路の中ではスクアレンからラノステロールへ変換される過程が律速段階の1つであり、スクアレンエポキシダーゼであるErg1が鍵酵素となっている。これまでErg1の活性調節機構として、小胞体関連分解(ERAD)による本酵素の分解が報告されているが、不明な点も多い。

本発表者らはこれまで、脂肪滴に局在する機能未知タンパク質の解析に従事してきたが、その過程で偶然にも、ある脂肪滴局在タンパク質がErg1の細胞内動態制御に機能することを見いだした。この脂肪滴局在タンパク質に対しては、複数の相互作用タンパク質が同定されていることから、それらも含めた機能解析を行い、Erg1活性制御の新たな分子機構を明らかにすることを本研究の目的とした。

【方法・結果】

本発表者らの研究する脂肪滴局在タンパク質を欠損させた出芽酵母(欠損株)を親株(野生株)とともにグルコース培地で定常期まで培養し、脂肪滴をNile Redで染色して蛍光顕微鏡観察に供した。その結果、欠損株では脂肪滴が野生株よりも凝集した形態をとることが分かった。

この欠損株と類似の脂肪滴形態がErg1の変異株において報告されていたことから[Ta *et al.*, *FEBS J.*, **279**:p. 4231, (2012)], Erg1と蛍光タンパク質EGFPとの融合タンパク質を野生株、欠損株でどちらもERG1プロモーター制御下で発現させ、その細胞内局在を蛍光顕微鏡観察で調べるとともに、EGFPに対するイミュノブロット解析で発現量を野生株と欠損株とで比較した。結果、野生株では主として小胞体に観察されるErg1-EGFPが、欠損株では脂肪滴により多く分布する様子が観察された。またErg1-EGFPの発現量は欠損株で低下していた。

欠損株における上記のErg1の細胞内局在、発現量の異常が酵母のステロール合成に及ぼす影響を調べるため、野生株・欠損株からFolch法で脂質抽出し、ステロール合成経路中間体の量を、LC-MSを用いて比較した。結果、欠損株ではErg1の基質であるスクアレンの蓄積が見られることが分かった。現在、この脂肪滴局在タンパク質と相互作用するタンパク質群の欠損株についても同様の解析を進めている。

D01 食品由来脂肪細胞分化誘導抑制物質の探索

○付琳、矢野善久、藤田裕之

(京都先端大・バイオ環境)

【目的】

中高年以降の加体重が増加しており、これに伴う生活習慣病発症のリスクも増加していることから、肥満の治療と予防は国民健康の重要な課題になってきている。一方、脂肪細胞の分化や肥大化、増殖を抑制することができれば、肥満を抑制でき、生活習慣病の予防することができると思われる。そこで、脂肪前駆細胞を用い、これの分化や肥大化を抑制することができる食品成分の探索をおこなった。

【方法・結果】

肥満細胞には、3T3-L1前駆脂肪細胞をモデルとして使い、10%FBS、2.5 mMデキサメサゾン、0.5 mM IBMX、10 mMインスリンを含むD-MEM培地に交換することで脂肪細胞への分化誘導を行った。また、脂肪滴の蓄積の評価には、2%パラホルムアルデヒドで固定後、Oil-Red-O染色し、492 nmの吸光度を測定することで評価した。食品抽出物には、当研究室で保管している熱水抽出物61種、70%エタノール抽出物67種を用い、各種サンプルを無菌的に培地に添加して検討した。また、活性成分の精製には、逆相系分取HPLCにより、0.1%ギ酸を含むアセトニトリルでグラジエント溶出し分取して評価した。その結果・・・であることが明らかとなった。

試験した食品サンプルのうち、無添加のものと比較して30%以上脂肪蓄積を抑制したサンプルは、熱水抽出物2種と70%エタノール抽出物4種であった。これらのうち、特に安定した一番高い蓄積抑制を示したキャッツクローの70%エタノール抽出物について着目して、活性成分の構造解析を行うこととした。ODSカラムを用いたHPLCで分取した結果、30本のピークが得られ、これらのうちアセトニトリル28%の濃度で溶出される画分に活性が認められた。現在、さらにカラムを変えて活性成分の単離を進めているところである。

D02 豆煮汁酵素消化物におけるアンギオテンシン変換酵素阻害物質に関する研究

○山中滉斗¹、矢野善久¹、木村万里子²、藤田裕之¹

(¹京都先端科学大・バイオ環境、²神戸女子大・家政)

【目的】

血圧調節に関与するメカニズムに1つにレニン-アンギオテンシン-アルドステロン系(RA系)があるが、この中で、アンギオテンシン変換酵素(ACE)は、アンギオテンシン I を血圧上昇作用を有するアンギオテンシン II に変えることから、ACEを阻害することで、血圧上昇を抑えることができると考えられた。一方、豆の餡を製造する際に大量に廃棄されている豆煮汁中には、可溶性タンパク質が豊富に含まれていることからこれの有効活用が考えられている。

そこで、本研究では、各豆煮汁酵素消化物のACE阻害活性を測定するとともにACE阻害ペプチドを得ることを目的とした。

【方法】

豆煮汁には、大豆、エンドウ豆、手亡豆、ひよこ豆、小豆、レンズ豆の6種を用いた。プロテアーゼは、食品添加物用の26製剤を使用し、それぞれの至適pHに調整後、37℃、3時間酵素消化をした。

ACE阻害活性は、Cushmanらの変法により分析し、Hippryl-His-Leuから遊離した馬尿酸をHPLCにより定量して解析した。また、豆煮汁酵素消化物からの活性成分の分離には、分取逆相HPLCにより行った。

【結果・考察】

6種類の豆煮汁を26製剤で酵素処理した豆煮汁酵素消化物についてACE阻害活性を調査した。その結果、手亡豆のプロテアーゼHF「アマノ」150SD、およびエンドウ豆のニューラーゼF3G消化物が強力なACE阻害活性(IC₅₀:29.8 μg/mL, 33.5 μg/mL)を示すことが明らかとなった。

このことから手亡豆のプロテアーゼHF「アマノ」150SD、およびエンドウ豆のニューラーゼF3G消化物に、ACE阻害活性物質が含まれていることが示唆された。

現在、ACE阻害活性成分の分画を進め、構造決定を進めているところである。

D03 カヌカエキスの長期経口摂取による抗肥満作用に関する研究

○山口紗那花¹, 矢野善久¹, 野崎勉², 藤田裕之¹

(¹京都先端大・バイオ環境, ²ビーエイチエヌ(株))

【目的】

胆汁酸は、食餌性の脂肪やコレステロールを胆汁酸ミセルとしてミセル化し、腸管での脂質の消化・吸収を促進するが、この胆汁酸ミセルを崩壊させ、腸肝循環を阻害すれば、食餌由来の脂肪やコレステロールの吸収を抑制し、血中コレステロールの低下や抗肥満作用が期待できる。そこで種々の食品を検討した結果、カヌカ(*Kunzea ericoides*)の熱水抽出物が強力な崩壊活性を示し、さらにこれに含まれる活性成分の単離・同定を行った結果、Isotricitinin、Strictinin、Kunzeachromon F、Kunzeachromon D、Myricitrinを活性成分として推定した。そこで、このカヌカエキスの経口投与による安全性および抗肥満作用について検討することを目的とした。

【方法】

安全性試験については、C57BL/6J系の雄性マウスを用い、AIN93-Mをコントロール餌とし、AIN93-Mにカヌカエキスを0.75%添加した餌(AIK0.75)、AIN93-Mにカヌカエキスを1.5%添加した餌(AIK1.5)を調製し、9週間の投与試験を行った。一方、抗肥満作用の予備試験には、C57BL/6J系の雄性マウスを用い、AIN93-Mをコントロール餌とし、HFD-60(摂取エネルギーとして脂質を60%含有)を高脂肪食餌(HFD)として負荷した群に対し、高脂肪食にカヌカエキスを1.0%添加した餌(HFK1.0)を調製し、12週間の投与試験を行った。投与試験中に体重増加量や摂餌量を測定し、試験終了後には、各臓器重量や血液検査、肝臓脂肪量などを測定した。

【結果・考察】

安全性試験では、体重、摂餌量、各種臓器重量、血液検査項目について分析した結果、コントロール群と比較して、AIK0.75、AIK1.5群にほとんど変化は認められず、1.5%混餌による影響は認められなかったことから、カヌカエキスは安全性に問題はないと考えられた。一方、抗肥満作用の予備試験については、体重増加量では、HFK1.0群がHFD群に対し、有意差はなかったものの低値を示した。また、脂肪組織重量では、HFK1.0群はHFD群と比べ有意に低下しており、さらに血中トリグリセリド量もHFK1.0群が明らかに低下していた。肝臓中の脂肪重量においてもHFK1.0群が有意に低下しており、脂肪肝を抑制する可能性も示唆された。以上のことから、カヌカエキスは普通食においては影響を与えず、高脂肪食での投与でのみ、抗肥満作用に影響を与えることが示唆された。現在、高脂肪食におけるカヌカエキスの濃度用量依存性(HFK0.75%、HFK1.5%)について検討中である。

D04 苦味嗜好のメカニズムに対する脳内報酬系の寄与

○大石愛華、井上和生

(京大院・農)

【目的】

動物は生来、毒性を示すシグナルである苦味を忌避する。しかし、人間は成長するにつれてコーヒーやビールなど苦味を伴う飲食物を好むようになる現象がみられる。このように本来嫌悪される苦味に対して嗜好が形成されるメカニズムはあまりわかっていない。そのメカニズムには脳内での何らかの変化が関係していると考えられたため、快感や意欲を司り、食べ物の嗜好に大きくかかわる脳内報酬系という部位に着目した。そして苦味の摂取時に、食品成分や報酬性を伴う経験などによって報酬系が活性化されることで、嫌悪される苦味に対する嗜好が形成されるという仮説を立てた。そこで本研究では、苦味を好むようになるメカニズムと脳内報酬系の関係性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

報酬系の中でも中脳辺縁系ドーパミン経路と μ オピオイド受容体にそれぞれアプローチする実験を行った。前者については、野生型マウスに対してドーパミン再取り込み阻害剤のノミフェンシンを用いて、体内ドーパミンの濃度を上げることで苦味嗜好に影響があるかどうかを検証した(実験 I)。後者については、光照射によって特定の神経を活性化するオプトジェネティクスを用いて、POMC/ChR2 マウスの脳内に光照射を行い、 μ オピオイド受容体の内因性アゴニストである β エンドルフィンを増加させることによる苦味嗜好への影響を調べた(実験 II)。実験 I ではマウスを 2 群に分け、ノミフェンシン又は生理食塩水の腹腔内投与から 15 分後に苦味溶液(0.2 mM キニーネ塩酸塩水溶液)を摂取させる条件付けを 3 日間行った。そしてその条件付けの前後に苦味溶液と水の二瓶選択実験を行った。実験 II ではまず POMC/ChR2 マウスに手術を行い、報酬系において重要な部位である側坐核へ光ファイバーカニューレを挿入した。次に光照射 off 状態で苦味溶液と水の二瓶選択実験を行い、その結果を元来の苦味嗜好とした。そしてその後 5 日間は苦味溶液摂取時の光照射を on にして二瓶選択実験を行った。

【結果・考察】

実験 I の結果、まずノミフェンシン投与によって条件付け前より条件付け後の苦味溶液摂取比率が増加した。そして条件付け期間に生理食塩水を投与したコントロール群と比べ、ノミフェンシン投与群は条件付け後の苦味溶液摂取比率が高かった。よって、ドーパミンによる報酬効果が苦味の嗜好性を高めると考えられた。実験 II の結果、光照射 off 時と比べて光照射 on から 5 日目の苦味溶液摂取比率が増加した傾向がみられた。このことから側坐核の μ オピオイド受容体への報酬効果が苦味嗜好の増加に寄与すると示唆された。今後はドーパミンによる側坐核での報酬効果が苦味嗜好に及ぼす影響や、その μ オピオイド受容体との関連性について検証していく。

D05 メタロチオネインに着目した亜鉛のフェロトーシス抑制

○我妻拓実¹、神戸大朋¹

(¹京大院・生命)

【目的】

フェロトーシスは細胞内遊離Fe²⁺を起点とし、過酸化脂質の蓄積に終結する鉄依存性細胞死である。フェロトーシスはがん治療、神経変性疾患の観点から多くの解析が行われてきたが、鉄以外の必須微量金属との関係は不明な点が多い。本研究では、鉄に次いで生体内含量が豊富な亜鉛とフェロトーシスの関係について解析を行った。

【方法・結果】

ヒト慢性骨髄性白血病由来HAP1細胞を用い、鉄ホメオスタシスのレギュレーターFBXL5をCRISPR/Cas9によりノックアウトした。本欠損株では細胞内の遊離Fe²⁺が恒常的に増加し、鉄添加のみでフェロトーシスを惹起可能となる。FBXL5欠損株に対して亜鉛濃度を変動させることで亜鉛とフェロトーシスの関係を解析した。

はじめにFBXL5欠損株に鉄添加を行うと、鉄取り込みを担うトランスフェリン受容体の高発現維持、および細胞内鉄の貯蔵を担うフェリチンの低発現維持が確認された。また、Fe²⁺プローブFerroOrangeの蛍光が増大し、細胞内遊離Fe²⁺の蓄積が認められた。また、72h後には過酸化脂質の蓄積に伴い約40%の細胞が死滅し、フェロトーシスが惹起された。そこで、亜鉛欠乏培地を用いて鉄添加を行うと24hで細胞は完全に死滅し、フェロトーシスの促進が確認された。一方、亜鉛欠乏培地への亜鉛の再添加により促進は緩和され、亜鉛がフェロトーシスを抑制する可能性が示唆された。

作用機序を解析するため、亜鉛欠乏で発現が変動する因子のうち、メタロチオネイン(MT)に着目した。MTの発現は細胞内亜鉛濃度に鋭敏に応答し、亜鉛欠乏下では速やかに分解される。そこで、FBXL5とMTの多重欠損株を作製し、同様の解析を行った。結果、鉄添加24hで細胞は完全に死滅した一方で、亜鉛添加による抑制が確認されなかった。この結果より、亜鉛のフェロトーシス抑制はMTが作用点であると示唆された。

【結論】

本研究の解析より、MTを介した亜鉛のフェロトーシス抑制機能が示唆された。今後はヒトMTに存在する11種のアリソフォームについての機能比較や、より詳細なMTの作用機序について解析を実施予定である。

D06

野生イネにおける種子貯蔵タンパク質の解析

松本啓輔¹、増村威宏^{1,2}、○森田重人^{1,2}

(¹ 京都府大院・生命環境、² 京都府農技セ生資セ)

【目的】 植物の種子には、次世代の窒素源として貯蔵タンパク質が蓄積している。イネ種子貯蔵タンパク質はプロラミンとグルテリンの2種類に大別され、プロラミンはヒトの消化管では難消化性であり、栄養として利用度が低い。プロラミンは多重遺伝子ファミリーにコードされているため、これまで低プロラミン含量の変異体は見つかっていない。野生イネ(*Oryza*属イネ近縁種)は栽培イネ(*Oryza sativa*)にない有用形質を持つ系統が多数存在するため、イネ育種の重要な遺伝資源である。本研究の目的は野生イネの種子貯蔵タンパク質の解析を行い、プロラミン含量が低く、消化性の良いタンパク質含量の高い野生イネを探索することである。

【方法・結果】 栽培イネの標準品種である日本晴と、野生イネ7種(栽培イネの祖先種である*O. rufipogon* (perennial)、*O. nivara*、*O. barthii*、およびそれよりも遠縁の*O. punctata*、*O. officinalis*、*O. australiensis*、*O. brachyantha*)を実験材料に、種子タンパク質のSDS-PAGEを行った。さらに、貯蔵タンパク質各種に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。グルテリン酸性サブユニットは、最も近縁の*O. rufipogon* (perennial)では日本晴と類似したバンドパターンであったが、これよりも遠縁になるとバンドサイズが多数異なっていた。また、10kDaプロラミン、および16kDaプロラミンは、*O. rufipogon* (perennial)においても日本晴とバンドサイズが異なっていた。

また日本晴の貯蔵タンパク質遺伝子の配列を用い、野生イネに対してBLASTサーチを行った。その結果、近縁の野生イネの貯蔵タンパク質は、日本晴と高い相同性が見られた。一方で、13bプロラミンの遺伝子数は、*O. rufipogon* (perennial)とそれより遠縁の種では2~6個であるのに対し、日本晴では15個であった。よって13bプロラミンは*O. rufipogon*から栽培イネへの進化の過程で数が激増したことが明らかとなった。

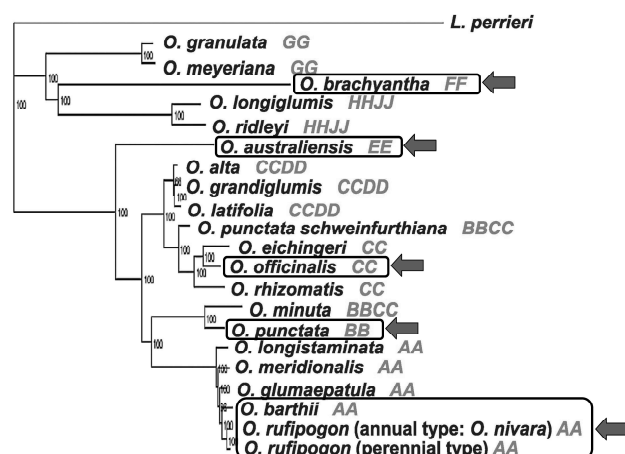


図1. 野生イネの系統図 (Sato et al., 2021 より引用、改変)。矢印で示した7種を解析対象とした。

D07 オジギソウにおける活動電位の発生・伝播と刺激応答メカニズム

児玉創太郎¹、袁 雨聡¹、宋和慶盛¹、北隅優希¹、○白井 理¹

(¹京大院・農)

【目的】

オジギソウ(学名: *Mimosa Pudica* L.)は葉枝部分に外部刺激を受けると刺激部位に近い葉枕が屈曲運動をし、その運動はより遠くへ伝播する。オジギソウの信号伝達は古くから関心の対象となり、多くの研究が行われたきた。電気生理学実験により、オジギソウの信号伝達には伝達速度が異なる三種類の信号(活動電位、変動電位、未知の高速信号)が存在することがこれまでに知られていた。活動電位は一般的に観察される信号であり、傷害刺激と非傷害刺激(温度、圧力変化、電気、薬物)の両方で発生し、葉枕まで伝達される。因みに、Ca²⁺ や Cl⁻ の細胞内外での濃度変化が活動電位の発生および伝播に関わっていることが知られている。変動電位は傷害刺激によって生じ、導管内の物質移動を介して伝達され、活動電位と加算されて葉枕・茎を通して他の葉に到達する。また、未知高速信号は切断刺激によって生じる非電氣的信号と考えられているが、詳細は未解明であり、活動電位発現機構や伝播機構も明らかにされていない。

本研究ではオジギソウの一つの葉柄に注目し、葉柄上の一点に氷水を付着させて冷刺激を与えて葉柄中の四ヶ所の電位について経時変化を記録し、電気信号の時空間的な伝達挙動を解析した。

【方法・結果】

オジギソウの葉柄内において等間隔で四ヶ所に電極を挿入し、土壌中に挿入した基準電極との間の電位差をそれぞれ同時に測定した。葉柄内の一点に冷刺激を与えて各電位差の時間変化を解析し、電気信号の伝播挙動を解明した。活動電位および刺激時や活動電位が葉枕に到達したときに発生する高速電気信号を確認した。冷刺激を行った箇所から活動電位が発生し、活動電位が葉柄に沿って両側に伝播することを明らかになった。また、活動電位の伝達速度は葉柄中でほぼ一定であり、葉の先端に向かう信号は $9 \pm 3 \text{ mm s}^{-1}$ であり、茎の方向に向かう信号は $6 \pm 2 \text{ mm s}^{-1}$ であった。なお、膜電位変化の発現は温度変化によるネルンスト応答の変化と局所的な環電流の発生で説明できた。さらに、他の外部刺激(高温、圧力変化、電気、薬物)による膜電位変化(活動電位等)の発生および伝播メカニズムについても議論する。

D08 マルミノヤマゴボウとヨウシュヤマゴボウのトランスクリプトームの比較によるベタレイン色素生合成遺伝子の探索

○深山友紀子、小川拓水、岡澤敦司

(阪公大院・農)

【目的】

ヤマゴボウ属植物における植物色素ベタレイン生合成経路およびベタレイン生合成酵素遺伝子については完全に解明されていない。ヤマゴボウ属のマルミノヤマゴボウ (*Phytolacca japonica* M.) とヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana* L.) を栽培したところ、実生の段階で、ヨウシュヤマゴボウの胚軸にはベタレインが蓄積していたが、マルミノヤマゴボウの胚軸にはベタレイン色素が蓄積されていなかった。さらに異なる組織でのベタレイン色素の遺伝子発現の違いを調べるために、両植物の胚軸をカルス誘導した結果、カルスにおいてもヨウシュヤマゴボウはベタレインが蓄積していたが、マルミノヤマゴボウには蓄積されていなかった。そこで、本研究ではマルミノヤマゴボウとヨウシュヤマゴボウの胚軸およびカルスのトランスクリプトームの比較を行い、ヨウシュヤマゴボウで高発現していると予想されるベタレイン色素生合成遺伝子に関する知見を得ることを目的とした。

【方法・結果】

マルミノヤマゴボウとヨウシュヤマゴボウの胚軸およびカルスからトータル RNA を抽出後、RNA-seq を行なった。de novo アセンブリによってそれぞれの植物種のトランスクリプトームデータを得た。アミノ酸配列を取得後、既存のベタレイン生合成酵素遺伝子のアミノ酸配列を query にし、BLASTp にてヤマゴボウ属植物におけるベタレイン生合成酵素遺伝子 *arogenate dehydrogenase (ADH)*、*cytochrome P450 76AD (CYP76AD)*、*L-DOPA 4,5-dioxygenase (DODA)*、*cyclo-DOPA 5-O-glucosyltransferase (cDOPA5GT)*、*betanidin 5-O-glucosyltransferase (Bet5GT)*、*betanidin 6-O-glucosyltransferase (Bet6GT)* および *amaranthin synthetase (AMASY1)* の絞り込みを行った。候補遺伝子の選抜後、MEGA11 を用いて分子系統樹解析を行った。その結果、マルミノヤマゴボウとヨウシュヤマゴボウのベタレイン生合成酵素遺伝子である *ADH*、*CYP76AD*、*DODA*、*cDOPA5GT*、*Bet5GT* および *Bet6GT* について、それぞれ 1 つ以上のオルソログを確認した。それらの transcripts per million (TPM) 値を算出し、発現量を比較した結果、ヨウシュヤマゴボウで高発現をしているいくつかのベタレイン生合成酵素候補遺伝子が明らかになった。今後は、それらの候補遺伝子の機能解析を行い、ヤマゴボウ属植物のベタレイン生合成に関する知見を獲得する。

D09

Effects of Endophytic Bacteria on Growth Metrics and Asarone Content in *Acorus calamus* L.

Oyundari Ganbat¹, Nagomi Kashimoto¹, Ikumi Oyama¹, Bolortuya Ulziibat², Motoaki Tojo¹,
Takumi Ogawa¹, Atsushi Okazawa¹

¹Grad. Sch. Agric., Osaka Met. Univ, ²Dept. Res. Monitor., Mongolian Acad. Sci.

【Objective】

This study investigates the medicinal plant *Acorus calamus* L. and its associated endophytic bacteria, with the primary objective of evaluating the potential of these bacteria to enhance plant growth and the biosynthesis of asarones, major bioactive compounds. By exploring the symbiotic relationships between these endophytic bacteria and *A. calamus*, we aim to contribute to the understanding of their interactions and the roles they play in plant growth and the contents of asarones.

【Method and Results】

In this study, four strains of endophytic bacteria, which may have the potential to induce root growth, were isolated from aseptic, *in vitro*-grown rooting plants of *A. calamus*, collected from the Medicinal Botanical Garden of Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari, Hokkaido, Japan.

We assessed their indole-3-acetic acid (IAA) production using Salkowski's reagent test. Results indicated that No.2 and No.4 strains produced IAA, suggesting that strains No.2 and No.4 effectively induce root growth in *A. calamus* through IAA production. In contrast, strains No.1 and No.3 may promote root growth without IAA production.

Co-cultivation was performed with one-month-old, endophyte-free *A. calamus* explants dipped in strain No.1. Subsequently, the explants were placed on solid shoot proliferation 1/2 MS medium with some combination of auxin and cytokinin and observed for 2 months. The results showed that co-cultivation of the *A. calamus* with the endophytic bacterium No.1 not only enhances plant growth through increased root and shoot development but also increases the accumulation of asarones.

D10

ナス褐病菌の菌糸成長を抑制する葉面微生物の同定

富田昂希、小原怜哉、奥田和加那、プリエト ラファエル、關谷次郎、
○高瀬尚文

(京都先端大・バイオ環境)

【目的】

ナス褐紋病は、糸状菌であるナス褐紋病菌 (*Phomopsis vexans* Harter) が引き起こす病気であり、葉、茎、果実に発生し、苗の枯死や、質の低下、収穫量の減少を引き起こす。本病は、輸送中や市場で発生するポストハーベスト病害も問題となっている。本研究では、ナス褐紋病に対する生物的病除への応用を念頭に、ナス果皮を分離源としてナス褐病菌に対する拮抗微生物を探索した。

【方法・結果】

ナス褐紋病菌は、学内に設けたナス連作圃場で路地栽培した加茂ナス果実の罹病組織から分離した株を用いた。ナス褐紋病菌に対する拮抗微生物の探索は、同ナス連作圃場で路地栽培した加茂ナスの中から1個の健全果実を選抜し、分離源として行った。まず、健全果実から切り出した果皮と滅菌水を混合した菌懸濁液をジャガイモデキストロース寒天 (PDA) プレートに塗布し、プレート中央部にナス褐紋病菌の菌叢片を置床した。28°Cで3~4日間培養し、ナス褐紋病菌の菌糸の成長を抑制する拮抗作用が観察されたコロニーから拮抗微生物として5株 (OW11, OW21, OW22, OW41, OW42) を分離した。また、分離した5株について光学顕微鏡による形態観察と、28S rDNAのD1/D2領域およびrDNAのITS領域の塩基配列による分子系統解析を行った。

分離した5株は、光学顕微鏡により出芽による増殖が観察され、酵母の形態的特徴を有していた。また、分子系統解析は、OW11株は *Moesziomyces antarcticus* と同一の分子系統学的位置を示し、OW22株は *Sporobolomyces carnicolor* と同一の分子系統学的位置を示した。またOW21株、OW41株、OW42株の3株は、いずれも *Moesziomyces aphidis* と同一の分子系統学的位置を示した。

このことからナス褐紋病菌に対する拮抗作用を有する複数種の酵母が、健全なナス果実の果皮に生息していること可能性が示唆された。

本研究の一部は、京都ニホンミツバチ研究所の研究助成を受けて実施した。この場を借りて深く御礼申し上げます。

2024年度 日本農芸化学会関西支部 賛助企業（五十音順）

アース製薬（株）	ナカライテスク（株）
植田製油（株）	日世（株）
江崎グリコ（株）	（株）日本医化器械製作所
（株）カネカ	Noster 株式会社
菊正宗酒造（株）	ハウスウェルネスフーズ（株）
黄桜（株）	ヒガシマル醤油（株）
月桂冠（株）	不二製油（株）
甲陽ケミカル（株）	松谷化学工業（株）
三栄源エフ・エフ・アイ（株）	三井化学クロップ&ライフソリューション(株)
サントリーホールディングス（株）	(株)三ツワフロンテック
住友化学（株）	大和酵素（株）
宝酒造（株）	理研化学工業（株）
（株）第一化成	（株）ロッテ
築野食品工業（株）	和研薬（株）
東洋紡（株）	

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

📷 @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。



○ 次回支部例会（第 533 回講演会）予定

開催日：2024 年 12 月 6 日（金）

同日開催：第 10 回もっと知ろう賛助企業

開催校：神戸大学

講演申込締切：2024 年 11 月 22 日（金）

講演要旨締切：2024 年 11 月 29 日（金）

（問い合わせ先）

幹事校庶務幹事 福田 伊津子（神戸大学大学院 農学研究科）

TEL: 078-803-5873 E-mail: itsuko@silver.kobe-u.ac.jp

2024 年度 日本農芸化学会関西支部大会（第 532 回講演会）

農芸化学会創立 100 周年・関西支部創立 90 周年記念大会 実行委員会

〒621-8555 京都府亀岡市曾我部町南条大谷 1-1 京都先端科学大学バイオ環境学部内

(<https://www.kuas.ac.jp/>)

実行委員長：寶関 淳

庶務：清水 伸泰

会計：奥 公秀

プログラム：井口 博之、高瀬 尚文、藤田 裕之、櫻間 晴子

会場：藤田 裕之、櫻間 晴子

受付：藤井 康代

懇親会：奥 公秀、萩下 大郎、遠藤 暁詩

顧問：三村 徹郎

日本農芸化学会関西支部 事務局 (<http://kansai.jsbba.or.jp/>)

〒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)

庶務幹事：岸野 重信 (TEL: 075-753-6122, FAX: 075-753-6113)

会計幹事：安居 佑季子 (TEL: 075-753-6390, FAX: 075-753-6127)

庶務幹事(補)：川本 純 (TEL: 0774-38-4711, FAX: 0774-38-3248)

公益社団法人 日本農芸化学会 関西支部

2024 年度 日本農芸化学会関西支部大会

講演要旨集

発行者：寶関 淳（2024 年度 日本農芸化学会関西支部大会 実行委員長）

京都府亀岡市曾我部町南条大谷 1-1 京都先端科学大学バイオ環境学部

発行日：令和 6 年 9 月 21 日