

日本農芸化学会関西支部
第 534 回講演会

講演要旨集

令和 7 年(2025 年)2 月 8 日(土)
京都大学(百周年時計台記念館・国際交流ホール)

日本農芸化学会関西支部



第 534 回講演会プログラム

● 開会の辞 (13:00~13:05)

関西支部長 森 直樹(京大院・農)

● 一般講演 (13:05~17:19) [講演 8 分、質疑 2 分、交代 1 分]

(*印は若手優秀発表賞対象講演)

座長: 高橋春弥(京大院・農)、小倉康平(京大院・農)、松宮健太郎(京大院・農)

- *1. シロイヌナズナ種子ネオリグナンの立体化学制御に關与するディリジェントプロテイン AtDIR12 の機能解析
○高江洲 広司 (京都大学 生存圏研究所)
- *2. 酸化型緑茶カテキンと凝集性タンパク質との相互作用機構の解明
○山口 黎士 (京都大学 大学院農学研究科)
- *3. 合成ユビキノン類を用いた出芽酵母におけるユビキノン取り込みの分子機構研究
○桜井 直也 (京都大学 大学院農学研究科)
- *4. 非解離型有機酸による酵母の[*GAR*⁺]化
○細谷 瑞 (龍谷大学 農学部)
- *5. 腸内善玉菌における新規葉酸生合成遺伝子の同定
○森本 聖志 (京都大学 大学院工学研究科)
- *6. *Geobacter sulfurreducens* における硫黄に対する転写応答とポリスルフィド代謝遺伝子
○藤田 大樹 (立命館大学 大学院生命科学研究科)
- *7. 葉面における *Methylobacterium* sp. OR01 株の細胞内レドックス動態の可視化解析
○荒巻 佳穂 (京都大学 大学院農学研究科)
- *8. トリプトファンの摂取による腸内環境への影響
○織井 悠樹 (神戸大学 大学院農学研究科)
- *9. 骨格筋における DNA メチル化酵素 Dnmt3a の役割
○川口 留奈 (京都府立大学大学院 生命環境科学研究科)
- *10. ヒト DNA ポリメラーゼ δ の Leu606 への変異導入がリボヌクレオチド取り込み活性に及ぼす影響
○上野 凜 (京都大学 大学院農学研究科)
- *11. 塩味感覚における塩化物イオンの寄与
○中貝 美玖 (京都女子大学 家政学部)
- *12. 唾液腺の除去が味嗜好性に及ぼす影響
○松原 由伎乃 (京都女子大学 家政学部)
- *13. Ergothioneine 含有ヒラタケ *Pleurotus* sp. は老化促進モデルマウスの運動機能障害を改善する
○村松 大二郎 (大阪公立大学 大学院農学研究科)

休憩 (15:28~15:40)

座長: 小野 肇(京大院・農)、由里本 博也(京大院・農)

- 14. 油脂由来の新規バイオ樹脂開発
○今井 岳志 (兵庫県立工業技術センター 食品・バイオグループ)

15. 玄米由来酵母 *Solicoccozyma zizaniae* のイネとの共生と性状
○中谷 優花 (京都大学 大学院農学研究科)
16. 主要な貯蔵タンパク質を欠失した大豆の加工機能性に関する研究
○五十嵐 眞子 (京都大学 大学院農学研究科)
17. メタンからの異種タンパク質直接生産のためのメタン酸化菌・メタノール資化性酵母共培養系の開発
○岸本 貫志 (京都大学 大学院農学研究科)
18. 野生酵母からのオルニチン高含有株の構築とクラフトビール醸造への応用
○山田 康矢 (奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科)
- 19.メラニン合成酵素チロシナーゼの活性化機構の解析
○宮崎 聖 (京都大学 大学院生命科学研究所)
20. 黄体ホルモン・プロゲステロンの植物受容体候補 AmPR に対する結合活性の生化学的解析
○石神 世捺 (京都大学 大学院生命科学研究所)
21. DGK α KO マウスにおけるジガラクトシルジアシルグリセロールの抗アレルギー性鼻炎効果の検討
○神吉 玲奈 (神戸大学 大学院農学研究科)
22. DGK/PKC に着目した記憶及び感情障害を改善させる機能性食品の開発に向けて
○横田 夕佳里 (神戸大学 大学院農学研究科)

優秀発表賞の投票・集計 (兼 休憩) (17:19~17:30)

● 2022 年度農芸化学中小企業産学・産官連携研究助成 成果報告 (17:30~17:45)

座長: 吉田 健一 (神戸大院・科学技術イノベ)

「D-アミノ酸の酵素定量法の開発」

○若山 守 (立命館大学 生命科学部)、黒野 剛 (Dアミノ酸ラボ株式会社)

● 2024 年度支部技術賞 授賞式及び受賞記念講演 (17:45~18:30)

座長: 谷 史人 (京大院・農)

「ロコモティブシンドローム対策を目指したロコモアの開発研究」

○出雲 貴幸¹、大塚 祐多¹、永井 研迅¹、長谷部 杏子¹

(¹サントリーウエルネス株式会社)

「通気性培養容器による曝気を行わない好気性微生物の培養法」

○吉田 健一¹、四ツ谷 昌人²、佐藤 亮介²

(1 神戸大学 大学院科学技術イノベーション研究科、2 株式会社潤工社)

● 若手優秀発表賞表彰式 (18:30~18:35)

● 次回関西支部例会のアナウンスおよび閉会の辞 (18:35~18:40)

関西副支部長 八十原 良彦 (株式会社カネカ)

● 懇親会 (18:50~)

京都大学百周年時計台記念館 2 階 国際交流ホール II にて

一般講演

1* シロイヌナズナ種子ネオリグナンの立体化学制御に関するディリジェントプロテイン AtDIR12 の機能解析

○高江洲広司¹、巽奏¹、榊原圭子²、小埜栄一郎³、高野俊幸⁴、
斉藤和季²、梅澤俊明¹、飛松裕基¹

(¹京大生存研、²理研 CSRS、³サントリーグローバル
イノベーションセンター(株)、⁴京大院農)

【目的】

リグナンとネオリグナンは、ともにフェニルプロパノイド類の酸化的ラジカルカップリングで生成するフェニルプロパノイドダイマーであり、前者はC8-C8'カップリング、後者はC8-C8'カップリング以外で二量化した化合物群である。天然から単離されたリグナンとネオリグナンは通常光学活性を示し、いずれもフェニルプロパノイドモノマーのエナンチオ選択的ラジカルカップリングにより生成すると考えられている。¹⁾ 1997年、リグナン生成のエナンチオ選択性を制御するディリジェントプロテイン(DIR)が初めて同定された。²⁾ その後、リグナン生成に関わるDIRについて多くの研究が蓄積されてきた一方で、ネオリグナン生成に関わるDIRについては、その存在は推定されていたものの、実態は不明であった。近年、シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)変異体の代謝物解析から、種皮に蓄積するネオリグナン*erythro*-SC(4-O-8)Gの生成に関与するDIR (AtDIR12)が初めて同定された。³⁾ しかし、*erythro*-SC(4-O-8)G生成におけるAtDIR12の寄与の詳細、特にラジカルカップリングにおける位置選択性制御及び立体化学制御への寄与については未解明である。本研究では、AtDIR12のさらなる機能解明を目的とし、シロイヌナズナ種子から単離した*erythro*-SC(4-O-8)Gのエナンチオ組成の解析及び組換えAtDIR12の調製と機能解析を進めた。

【方法・結果】

シロイヌナズナ(Col-0株)種子の水/メタノール混合溶媒(4:1, v/v)抽出物から、陽イオン交換カラム及びC18カラムによる精製を経て、*erythro*-SC(4-O-8)Gを単離した。単離した*erythro*-SC(4-O-8)Gについて、キラルHPLC分析を用いたエナンチオ組成の解析を行ったところ、(-)-体過剰(エナンチオマー過剰率 70%)であることが示唆された。次に、大腸菌[BL21(DE3)株]における組換えAtDIR12の発現を行った。粗組換えAtDIR12(ライセート)を、カワラタケ由来ラッカーゼ(TvLAC)及び基質(シナポイルコリン及びコニフェリルアルコール)と混合し、反応生成物をLCMS分析によって解析した。その結果、粗組換えAtDIR12を加えない条件と比較して、*erythro*-SC(4-O-8)G及び*threo*-SC(4-O-8)Gの収率がともに増加し、さらに、*threo*-SC(4-O-8)Gに対する*erythro*-SC(4-O-8)Gの割合も増加することも認められた。これにより、AtDIR12が、シナポイルコリン及びコニフェリルアルコールのラジカルカップリングにおける*erythro*-SC(4-O-8)Gの立体選択的な生成を促進する可能性が示唆された。現在、生成した*erythro*-SC(4-O-8)Gのエナンチオ組成の解析を進めている。

引用文献:1) Umezawa, *Phytochem Rev* 2:371-390 (2003); 2) Davin et al., *Science*, 275:362-366 (1997); 3) Yonekura-Sakakibara et al., *Plant Cell*, 33:129-152 (2020).

2*

酸化型緑茶カテキンと凝集性タンパク質との相互作用機構の解明

○山口黎士¹、内田啓太²、阪本駿太¹、森本大智²、宗正智¹、小野肇¹、古川亜矢子¹、菅瀬謙治¹

(¹京大院・農、²京大院・工)

【目的】

本研究では、 α -シヌクレインと酸化型 EGCG の間に働く相互作用の詳細を解明するために、蛍光測定や NMR を中心に、酸化型 EGCG による α -シヌクレインの線維化阻害機構に関する原子分解能での相互作用を解析した。

【方法・結果】

蛍光測定による酸化型 EGCG のアミロイド線維化抑制効果の検証

チオフラビン T アッセイにより非酸化型 EGCG と酸化型 EGCG のアミロイド線維形成抑制効果を調べた(図1)。その結果、酸化型 EGCG が最も強いアミロイド線維形成抑制効果を示した。一方、EGCG 溶液はアミロイド線維形成に対して中程度の阻害効果を示し、還元剤である DTT を添加した非酸化型 EGCG はアミロイド線維形成に対して最も弱い阻害効果を示した(図1)。これらの結果は、EGCG が酸化されることによって線維化阻害効果が発揮されることを示す。

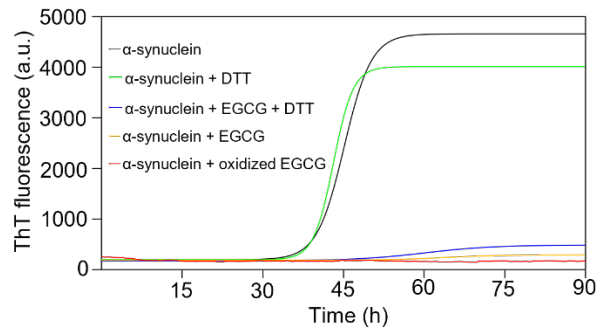


図1 酸化型 EGCG によるアミロイド線維化の抑制

NMR による α -シヌクレインと酸化型 EGCG の相互作用解析

酸化型EGCGの添加により α -シヌクレイン全体に化学シフト変化(CSD)が観測されたものの、その変化量は小さく、酸化型EGCGが α -シヌクレインと弱く相互作用することが分かった。一方で、とくにN末端領域の化学シフト変化が比較的大きく観測された。N末端領域は膜結合や凝集に重要な役割を果たすことが知られており、酸化型EGCGは α -シヌクレインのN末端領域と相互作用することで凝集抑制に関与することが示唆される。また、アミノ酸残基ごとの化学シフト変化の解析結果より、酸化型EGCGが α -シヌクレインの疎水性アミノ酸残基と相対的に強く相互作用することが分かった(図2)。

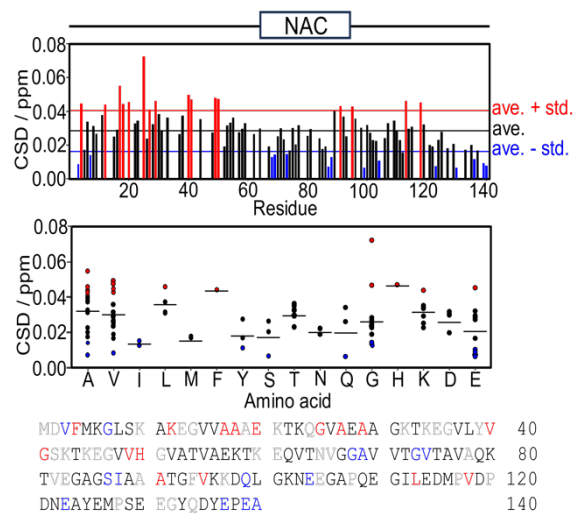


図2 酸化型 EGCG と α -シヌクレインの相互作用

3*

合成ユビキノン類を用いた出芽酵母におけるユビキノン取り込みの分子機構研究

○桜井直也¹、水谷みらい¹、奥公秀²、三芳秀人¹、村井正俊¹

(¹京大院・農、²京都先端大・バイオ環境)

【目的】 “コエンザイムQ”の名称で広く知られているユビキノン (UQ、**図1**) は、ミトコンドリアにおける酸化リン酸化 (ATP合成) に必須の脂溶性分子である。近年の研究では、ミトコンドリアで生合成されたUQは細胞内各所へ、細胞外から取り込まれたUQはミトコンドリアへ能動輸送されることが示されたが、輸送経路を含むその全体像は不明である。これまでに当研究室では、独自に分子設計したUQプローブ (pUQ₅、**図1**) を活用し、出芽酵母UQ生合成欠損株 ($\Delta coq2$) から、細胞外UQ取り込みに関与するタンパク質の候補を複数同定している。本研究では、ミトコンドリア内膜に存在するUQ結合タンパク質のひとつとして同定し

たCoq10に注目し、出芽酵母の細胞外UQの取り込みにおけるこのタンパク質の役割を解明することを目指した。

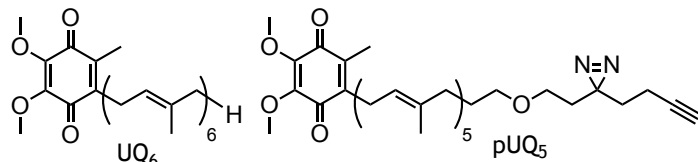


図1. 天然 UQ (UQ₆) と光反応性 UQ (pUQ₅) の構造

【方法・結果】 Coq10は、疎水性分子の細胞内輸送に関与するSTARTドメインスーパーファミリーに属するタンパク質であり、ミトコンドリア内膜で生合成されたUQに対して“シャペロンの”に作用し、円滑な電子伝達をサポートしていると考えられている。*COQ10*遺伝子そのものは、出芽酵母の呼吸系(グリセロール)培地での生育に必ずしも必須でないが、UQ生合成の必須遺伝子である*COQ2*との二重欠損株 ($\Delta coq2/\Delta coq10$) を作成したところ、細胞外UQによるグリセロール培地での生育相補が完全に消失することを偶然見出した。この実験結果は、ミトコンドリア内膜に存在するCoq10タンパク質が細胞外UQ依存的な生育(すなわち細胞外UQのミトコンドリアへの取り込み)に関与する可能性を示唆するものである。

細胞外 UQ のミトコンドリアへの取り込み量の変化を、Coq2 単独欠損株 ($\Delta coq2$) と Coq10との二重欠損株 ($\Delta coq2/\Delta coq10$) で比較する目的で、乳酸人工培地に人工UQである pUQ₅を添加し、それぞれの UQ 欠損株を培養してミトコンドリアを単離した。単離したミトコンドリアを光親和性標識し、ミトコンドリア内に取り込まれた pUQ₅ を可視化したところ、タンパク質の標識量は二重欠損株由来のミトコンドリアで圧倒的に低下することがわかった。以上の実験結果は、二重欠損株では細胞外 UQ がミトコンドリアに到達できないことを示しており、Coq10 が細胞外 UQ のミトコンドリア内膜への能動輸送に重要な役割を担っていることを強く示唆するものである。

4*

非解離型有機酸による酵母の[*GAR*⁺]化

○細谷 瑞¹、中田惇彦¹、田邊公一^{1,2}、島 純^{1,2}

(¹龍谷大・農、²龍谷大・発酵醸造セ)

【目的】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、複数種の炭素源が環境中に存在すると、グルコースを優先的に資化し、効果的にエネルギーを獲得する(グルコース抑制)。酵母において、プリオン様タンパク質が形成された状態([*GAR*⁺]と呼ぶ)では、グルコース抑制が回避され、グルコース以外の炭素源を資化できるようになる。先行研究において、乳酸が[*GAR*⁺]出現率を大幅に増加させることが示されているが、そのメカニズムは完全には解明されていない。本研究では、ピルビン酸および酢酸が[*GAR*⁺]の出現頻度に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】

酵母株として、実験室株X2180、清酒酵母協会701号(K701)、および滋賀県内酒造から分離されたU44株を用いた。X2180、K701は約 10^{-5} の[*GAR*⁺]出現頻度を示すのに対して、U44株は、[*GAR*⁺]出現頻度が 10^{-2} と高値を示す。これらの株をYPD液体培地中で対数増殖期まで培養し、[*GAR*⁺]細胞の選択培地であるGGM寒天培地に塗布し、[*GAR*⁺]出現頻度を調べた。またピルビン酸、乳酸、酢酸を含むGGM培地を用いて、有機酸が[*GAR*⁺]出現頻度に及ぼす影響を調べた。

いずれの有機酸も、すべての *S. cerevisiae* 株において[*GAR*⁺]出現頻度を濃度依存的に上昇させたが、[*GAR*⁺]の出現誘導効果は株間で異なっていた。また、有機酸による[*GAR*⁺]誘導能力は、それらの酸解離定数(pKa)を超えるpHで減弱した。以上の結果より、非解離型の有機酸が[*GAR*⁺]の出現を促進する可能性が示唆された。また、いずれの有機酸においても、[*GAR*⁺]誘導能に顕著な相違が見られなかったことから、取り込まれた有機酸による[*GAR*⁺]誘導は、乳酸特異的ではないことを明らかにした。

5* 腸内善玉菌における新規葉酸生合成遺伝子の同定

○森本聖志¹、佐藤喬章^{1,2}、跡見晴幸^{1,2}

(¹京大院・工、²京大・エネ研)

【目的】

腸内細菌は宿主の腸内で細菌叢を形成しており、宿主にとっては難分解性の化合物の分解や、宿主が生合成できない化合物の生合成などを行い、宿主に利益をもたらしている。葉酸は核酸やアミノ酸の生合成で機能する重要な補酵素の前駆体であるが、ヒトは葉酸を生合成できず腸内細菌が葉酸の一部を供給していることが知られている。しかし、一部の腸内細菌において葉酸生合成経路の全容は解明されていない。具体的には、葉酸の前駆体である7,8-ジヒドロネオプテリン三リン酸(DHNTP)からピロリン酸基を脱離する酵素をコードする遺伝子が同定されていない。先行研究において、乳酸菌 *Lactococcus lactis* および大腸菌 *Escherichia coli* において、本反応を触媒する酵素が同定されていた。さらに当研究室において、乳酸菌 *Limosilactobacillus reuteri* における酵素も同定されたが、それぞれのアミノ酸配列の相同性は低く、同じ反応を触媒する酵素が3種存在している。本研究では、いずれの相同遺伝子も有していない腸内善玉菌において、4つ目となる新規DHNTP脱ピロリン酸化酵素の同定を目的とした。

【方法・結果】

研究対象とした腸内善玉菌の無細胞抽出液から酵素活性を指標に標的タンパク質を探索した。腸内善玉菌を培養し、得られた菌体を超音波破碎、遠心した後、上清を無細胞抽出液とした。カラムクロマトグラフィーなどを用いて無細胞抽出液中のタンパク質を分画することで、目的の活性を有するタンパク質が含まれる画分の精製を進めた。活性値の大きさとSDS-PAGE解析におけるバンドの濃さが相関しているバンドを切り出し、LC-MS解析を行い、目的の活性を有するタンパク質の同定を試みた。その結果、3つのタンパク質が候補として得られた。そのうちの1つのタンパク質をコードする遺伝子にHisタグ配列を付加した遺伝子を腸内善玉菌のゲノムから増幅し、発現ベクターを作製した。本遺伝子を大腸菌内で発現させ、発現産物をカラムクロマトグラフィーでほぼ単一となるまで精製した。得られた組換え型タンパク質を用いて、DHNTPを基質とした活性解析を行ったところ、ピロリン酸基が脱離された反応産物を検出できた。この酵素は既知の脱ピロリン酸化酵素と高い相同性を示さなかったため、4つ目となる新規DHNTP脱ピロリン酸化酵素を同定できたことが示唆された。

6* *Geobacter sulfurreducens* における硫黄に対する転写応答とポリスルフィド代謝遺伝子

○藤田大樹¹、伊豆由記子¹、井上真男^{1,2}、青野陸¹、越智杏奈¹、三原久明¹
(¹立命大院・生命、²R-GIRO)

【目的】

元素状硫黄は環境中に豊富に存在する硫黄種の1つである。硫黄還元細菌 *Geobacter sulfurreducens* PCA は、元素状硫黄を電子受容体とした硫黄呼吸を行うことが知られている。これまでに本菌において、元素状硫黄と鉄が存在する環境では鉄還元に関わる遺伝子の転写が促進されることが報告されている。しかし、硫黄に対して本菌がどのように遺伝子発現を変化させるかは不明である。そこで本研究は、硫黄が本菌の遺伝子発現に及ぼす影響について調べることを目的とし、硫黄存在下または非存在下におけるトランスクリプトーム解析を行った。また、硫黄呼吸に関わることが示唆されたポリスルフィド代謝遺伝子群に着目し、遺伝学的解析を行った。

【方法・結果】

G. sulfurreducens PCA を硫黄添加条件下で培養したところ、生育に伴いスルフィドが生成し、硫黄還元が行われていることが示された。そこで、硫黄添加または無添加の両条件下で RNA-Seq 解析を行ったところ、硫黄の存在下でエネルギー保存に関与する酸化還元タンパク質、マルチヘム *c* 型シトクロムをコードする多くの遺伝子や硫黄・セレン・窒素代謝、タンパク質酸化還元ホメオスタシス、DNA 修復、細胞運動性に関わる遺伝子について有意な転写物の増減が見られた。特に、ポリスルフィド代謝遺伝子群 (*ext* オペロン) にコードされるロダネーゼ様タンパク質 ExtH、外膜ポーリンタンパク質 ExtI、硫黄キャリア ExtJ およびペリプラズム局在ポリスルフィド還元酵素 ExtK_L の遺伝子転写量が、硫黄存在下で約4倍増加し、各タンパク質の発現量も増加していた。そこで、ExtH、ExtI、ExtJ に着目し、各遺伝子欠失株および補完株を作製し、硫黄還元に関与する影響を調べた。ExtH、ExtI、ExtJ はそれぞれ保存された Cys 残基を有しているため、各 Cys 残基を異なるアミノ酸に置換した変異体も作製した。硫黄を含む寒天培地上で野生株を生育させたところ、透明なハロの形成が認められた。ハロは、菌体外に放出されたスルフィドにより不溶性の元素状硫黄が水溶性のポリスルフィドに還元されたため形成されることが考えられる。一方、遺伝子欠損株およびシステイン変異体による相補株ではハロが小さくなった。これらの結果から、ExtH、ExtI、ExtJ は *G. sulfurreducens* の硫黄還元において重要であり、AlphaFold 予測構造の解析と合わせて、細胞外膜外の硫黄を保存された Cys 残基を介した硫黄リレーによって、ペリプラズムに取り込む役割を担う可能性が示唆された。

7* 葉面における *Methylobacterium* sp. OR01 株の細胞内レドックス動態の可視化解析

○荒巻佳穂¹、白石晃將¹、竇関淳²、由里本博也¹、阪井康能¹

(¹京大院・農、²京都先端大・バイオ環境)

【目的】

近年、植物-微生物間相互作用における酸化還元(レドックス)動態が着目されている。微生物の植物への定着や植物免疫応答の制御において、活性酸素種(ROS)や酸化還元酵素がシグナル伝達を担い、病原菌によるレドックス制御がその感染過程に関与し、共生微生物によるレドックス制御が植物の生長促進やストレス耐性向上に寄与することが明らかになりつつある。しかし、植物-微生物間相互作用において微生物のレドックス動態をリアルタイムに追跡する系は確立されていない。そこで本研究では、葉面で優占化するメタノール資化性細菌 *Methylobacterium* sp. OR01 株の細胞内レドックス動態を可視化解析するための菌株を構築し、シロイヌナズナ葉面に接種した際の細胞内レドックス動態を追跡した。

【方法・結果】

当研究室の先行研究により、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を用いて酵母および哺乳類細胞内のレドックス動態を可視化する Redoxfluor が開発された¹。Redoxfluor は細胞内が還元的になると FRET 効率が増加し、酸化になると FRET 効率が低下する。本研究では Redoxfluor のダイナミックレンジを向上させた変異型 Redoxfluor である Redoxfluor 2²を OR01 株に発現させた。酸化剤 H₂O₂で細胞を処理すると FRET 効率が減少する一方で、還元剤 DTT で処理すると増加したことから、細胞内レドックス状態を可視化できる Redoxfluor 2-OR01 株を作製できたと結論付けた。Redoxfluor 2-OR01 株を日周性明暗サイクル環境下で栽培したシロイヌナズナ葉面に接種し、同株の細胞内レドックス動態を追跡したところ、細胞内が明期において還元的に、暗期において酸化的に日周変動した。続いて、シロイヌナズナ葉面のメタノール濃度は明期に低く、暗期に高くなり日周変動する³ことから、Redoxfluor 2-OR01 株の細胞内レドックスとメタノール濃度の関連性を調べた。その結果、Redoxfluor 2-OR01 株の細胞内レドックスは、高濃度メタノール寒天培地上では酸化的に、低濃度メタノール寒天培地上では還元的に変化した。以上より、Redoxfluor 2-OR01 株の細胞内レドックスは葉面のメタノール濃度に伴い変化すると考えられた。

¹Oku M, Sakai Y. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(7):698-704.

²Shiraishi K, Kitamura B, Aramaki K, Sakai Y, Hoseki J. 投稿中

³Kawaguchi K, Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. *PLoS One*. 2011;6(9):e25257.

8*

トリプトファンの摂取による腸内環境への影響

○織井 悠樹、福田 伊津子、橋本 堂史、榊原 啓之、藍原 祥子

(神大院・農)

【目的】

腸内細菌は栄養素の産生や病原菌の排除を通じて宿主の健康維持に重要な役割を果たしている。腸内細菌叢は腸管から分泌される免疫グロブリンA (IgA)によって宿主に制御されると同時に、腸内細菌やその代謝物がIgAの分泌を調節するという双方向の関係にある。特にトリプトファン (Trp)が腸内細菌により代謝されて産生されるインドール類は、芳香族炭化水素受容体 (AhR)を介して腸管からの粘液分泌の促進や上皮バリア機能を増強することが知られている。本研究では、TrpおよびTrp由来インドール類が腸内環境へ及ぼす影響を明らかにするため、IgA分泌への関与を検討した。

【方法】

実験1：C57BL/6Nマウスに蒸留水または10 mg/匹のTrpを2週間経口投与した。糞便中のIgA量をELISAで測定し、回腸のIgA関連遺伝子発現をqPCRで解析した。また、糞便中DNAのメタ16S rRNA遺伝子解析により腸内細菌叢を評価した。

実験2：C57BL/6Nマウスを4群 [対照群、0.5% Trp添加飼料群、TrpおよびAhRアンタゴニスト添加飼料群、抗生物質混合水およびTrp添加飼料群]に分け、2週間飼育した。抗生物質 (アンピシリン、ネオマイシン、バンコマイシン)は飼料切り替えの5日前から飲水投与した。実験1と同様に糞便中IgA量と回腸の遺伝子発現を解析し、AhR活性化の指標としてCYP1A1発現をウエスタンブロッティングにより評価した。

【結果】

Trpの投与により、糞便中IgA量は対照群と比較して約2倍に増加し、回腸のIgA関連遺伝子 (*Baff*, *April*)の発現も有意に上昇した。メタ16S解析において、炎症性腸疾患と関連する硫酸還元菌である*Desulfovibrio*属の有意な減少が認められた。実験2において、これらのTrpによる効果はAhRアンタゴニストや抗生物質の投与により抑制され、回腸におけるCYP1A1発現解析からも同様の変化が確認された。これらの結果から、Trpが腸内細菌によりインドール類に代謝され、AhR依存的にIgA産生を促進することが示唆された。本研究は、食事性Trpが腸管からのIgA産生の促進および腸内環境の調節に関与することを初めて示し、食事成分によるIgA制御機構の解明に新たな知見を提供した。

9* 骨格筋における DNA メチル化酵素 Dnmt3a の役割

○川口留奈¹、大藪葵¹、亀井康富¹

(¹ 京都府大院・生命環境)

【目的】

骨格筋は人体最大の組織で、運動やエネルギー代謝・糖取り込みに重要である。老化に伴い骨格筋量が低下することで、筋力や筋機能の低下をもたらすことをサルコペニアという。サルコペニアの表現型の一つとして、健常者の骨格筋と比べ萎縮しにくく、萎縮からの回復もしにくい、すなわち萎縮応答性の低下が挙げられる。DNAメチル化はエピジェネティック修飾の一つで、DNAメチル化酵素(Dnmt)によって制御される。その中でDnmt3aは骨格筋で比較的多く発現している。先行研究では、サルコペニアになると、骨格筋におけるDNAメチル化が増加することが知られている。しかしながら、骨格筋でのDNAメチル化の増加が萎縮応答にどのような影響を与えるかは明らかではない。そこで本研究では骨格筋特異的にDnmt3aを過剰発現させることで、骨格筋においてDNAメチル化が増加したマウス(Dnmt3a-Tgマウス)を作製した。Tgマウスの筋萎縮後の回復能を評価することで、DNAメチル化の増加が萎縮応答性に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】

3カ月齢のTgマウスを48時間絶食させた後に、24時間の再摂食を行った。絶食にて野生型で見られた腓腹筋重量の低下や筋萎縮関連遺伝子の発現増加が、Tgマウスでは抑制された。しかし、再摂食による筋萎縮からの回復は野生型マウスと比べて低下していた。また、3カ月齢のTgマウスの下肢を11日間不動化させ、その後30日間の再活動を行った。絶食後の再摂食時と同様に、Tgマウスは不動化による筋萎縮が生じにくい、再活動による筋萎縮からの回復もしにくいという結果が示された。以上より、骨格筋でのDnmt3a過剰発現によるDNAメチル化の増加は、萎縮応答性の低下(サルコペニア様の表現型)をもたらすことが示唆された(Oyabu, Kawaguchi et al., *iScience* 2025)。

10* ヒト DNA ポリメラーゼ δ の Leu606 への変異導入がリボヌクレオチド取り込み活性に及ぼす影響

○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)は数千塩基対に一塩基の割合で誤ってリボヌクレオチド(R)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)が存在するが、R取り込み活性に及ぼす影響は不明点が多い。Pol δ はゲノムDNAのラギング鎖を複製し、ヒトでは4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 ではLeu606)に、変異F、G、I、K、M、N、T、Vを導入しても生育したが、他の11種類では生育しなかった¹⁾。本研究では、ヒトPol δ のLeu606への変異導入がR取り込み活性に及ぼす影響を調べた。

【方法・結果】

1. 大腸菌でのPol δ の発現と性状解析: 大腸菌BL21(DE3)に、p125(野生型(WT)およびL606F、G、I、K、M、N、T、V)とp12、およびp66とp50をポリシストロニックに発現するプラスミド2種を導入して発現させ、菌体からPol δ を精製した。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、デオキシリボヌクレオチド(D)あるいはR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。変異体のD取り込み活性(A)は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R取り込み活性(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、特にL606F、L606G、L606Mで高かった²⁾。

2. 動物細胞でのPol δ の発現と性状解析: p125(WT、L606G、L606F、L606M)発現プラスミドをヒト胎児腎細胞株HEK293に一過性に発現させた。2日後に細胞を回収し、RNA、細胞抽出液、ゲノムDNAを調製した。導入遺伝子に特異的な配列を標的としたリアルタイムRT-PCRにより、導入したp125のmRNAの発現を確認した。抗p125抗体を用いたウエスタンブロットにより、導入したp125のタンパク質発現を確認した。ゲノムDNAをアルカリ処理して電気泳動に供すると、L606M発現細胞のゲノムDNAは、WT発現細胞と比較して若干低分子側に移動する傾向が見られ、ゲノムDNAに多くのRが蓄積している可能性が示された。以上のことから、Leu606はヌクレオチドの識別において重要な役割を担っていることが示唆された。

【文献】 1) Venkatesan et al. (2006) J. Biol. Chem. 281, 4486-4894

2) Ueno et al. (2025) J. Biol. Macromol. 25, 3-13

11* 塩味感覚における塩化物イオンの寄与

○中貝美玖¹、村田百²、成川真隆^{1,2}

(¹京女大・食、²京女大院・家政)

【目的】代表的な塩味物質としてNaClが知られている。塩味の発生にはNa⁺が重要であると考えられており、これまでの塩味研究ではNa⁺受容に焦点が当てられてきた。しかし、Na塩の中には塩味が弱いものや塩味以外の味を呈すものがある。一方で、Na⁺を持たないCl塩にも塩味を示すものが確認されている。これらの知見は、塩味の発生にNa⁺だけでなくCl⁻も重要である可能性を示唆する。しかし、塩味感覚におけるCl⁻の役割については議論が分かれている。本研究では、ヒトの塩味感覚におけるCl⁻の役割に関する知見を得るため、様々な塩の呈味特性を官能評価法により調査した。他方、塩味の受容メカニズムについては未解明な点が多いが、少なくとも上皮性Na⁺チャネルENaCが関与することが知られている。そこで、塩溶液にENaC阻害剤アミロライドを添加し、その塩味強度への影響についても検討した。

【方法】京都女子大学に所属する健康な成人女性を被験者とした。試験は全口腔法で実施した。被験物質として、NaClに加え、Cl塩であるKCl、NH₄ClとMgCl₂、Na塩であるリンゴ酸Na、グルコン酸Naとグルタミン酸Naを用いた。これら溶液に対し、味強度、嗜好度、および味質を評価した。味強度はVASスケールを用いた絶対評価、嗜好度は「とても好き」から「とても嫌い」の7段階の評点法で評価した。味質の評価では、塩味、酸味、苦味、甘味、うま味、無味、その他の選択肢から最もあてはまるものを1つ回答させ、その割合を算出した。アミロライドの添加効果は、VASスケールと二点比較法で評価した。二点比較法では、アミロライドを添加した溶液と添加していない溶液を比較し、より強く塩味を感じる溶液を選択させた。

【結果・考察】Na塩に加え、Cl塩でも塩味を呈することを確認した。特にKClとNH₄Clが強い塩味を引き起こすことがわかった。Na塩も塩味を呈したが、その塩味強度は同じ濃度のNaClに比べ弱かった。これらの塩溶液にアミロライドを添加した結果、Na塩の塩味強度は低下したが、NaClを含むCl塩では塩味強度の低下は観察されなかった。ENaCの阻害後も被験者が塩味を感じたことから、ヒトが食品を味わう際、ENaCを介した塩味の寄与度は予想よりも小さいと考えられた。

以上の結果は、ヒトの塩味感覚において、Cl⁻を介した塩味が重要な役割を果たしていることを示唆する。

12* 唾液腺の除去が味嗜好性に及ぼす影響

○松原由伎乃¹、馬野玲実¹、村田百²、成川真隆^{1,2}

(¹京女大・食、²京女大院・家政)

【目的】唾液は消化において重要な役割を果たし、咀嚼、嚥下や食塊の形成を助ける。また、唾液は食物を溶解し、味物質と味覚受容体の相互作用を促すことで、味認識にも寄与する。そのため、疾患や加齢により唾液分泌能が低下すると、味認識にも影響が及ぶと考えられる。しかし、唾液分泌能低下が具体的にどの程度味認識に影響を与えるのか、またそのメカニズムについては十分に解明されていない。唾液は主に3つの大唾液腺、耳下腺、顎下腺、舌下腺から分泌される。本研究では、それら唾液腺を除去したマウスモデルを用い、唾液分泌能の低下による味嗜好性の変化とその要因について検討した。

【方法】実験にはC57BL/6J系統雄マウスを用いた。唾液腺をそれぞれ除去した耳下腺、顎下腺、舌下腺除去群と、偽手術を施したSham群の4群を設けた。唾液腺除去手術は6週齢で行い、回復期間を経て8週齢から味嗜好性試験を実施した。味嗜好性は48時間二瓶選択試験により測定し、味刺激として基本五味(苦味、酸味、塩味、甘味、旨味)を用いた。嗜好性試験終了後、唾液を採取し、その分泌量とタンパク質濃度を測定した。さらに、SDS-PAGEでタンパク質組成を比較した。また、唾液腺除去が味蕾の味関連分子の発現に与える影響を調べるために、味細胞マーカー抗体を用いた免疫組織染色を行った。

【結果・考察】Sham群と比較して、耳下腺及び舌下腺除去群では各基本味に対する嗜好性に有意な差は認められなかった。一方、顎下腺除去マウスにおいて、苦味に対する忌避性の有意な低下が認められた。このとき、味蕾におけるPLC β 2やCAR4などの味覚関連分子の発現に明確な差は認められなかった。唾液たんぱく質濃度と組成を比較した際、たんぱく質濃度に有意な変化はみられなかったが、顎下腺除去によってその組成が大幅に変化していることが分かった。これらの結果は、唾液たんぱく質組成の変化が顎下腺除去による苦味に対する忌避性低下の要因のひとつとなる可能性を示唆する。

13* Ergothioneine 含有ヒラタケ *Pleurotus* sp.は老化促進モデルマウスの運動機能障害を改善する

○村松大二郎¹, 菅原菜々子², 花山幹², 北風智也¹, 原田直樹¹,
山地亮一^{1,3}

(¹大阪公大院・農, ²ホクト株式会社, ³大阪公大・生資センター)

【目的】

骨格筋は運動機能を担う組織である。しかし加齢に伴い骨格筋では量的・質的な低下が起こり、転倒リスクの上昇、運動能力の低下をもたらす、日常生活動作や生活の質の低下を招く。したがって加齢に伴う運動機能の低下を抑制するために、食品成分の機能を活用することに期待が寄せられている。

エルゴチオネイン (EGT) は天然由来のチオール誘導体でありヒトを含む動物では生合成できないが、食事から体内へと取り込まれる。ヒトを対象にした研究では身体能力の指標の一つである歩行速度の維持または改善に関連する体内代謝物の一つとしてEGTがあげられているが、その因果関係は未だ不明である。そこで本研究では、EGTを含有するヒラタケ *Pleurotus* sp. またはEGTが加齢に伴う運動機能の低下にどのような影響を及ぼすのか老化促進モデルマウス(SAMP1)を用いて検証した。

【方法・結果】

20週齢のSAMP1雄性マウスを3群(SAMP-cont群; SAMP-ヒラタケ群; SAMP-EGT群)に分け、それぞれに通常食(AIN-93M), ヒラタケ含有AIN-93M, EGT含有AIN-93Mを35週齢まで与えた。正常老化を示すマウスには通常食を与えた(SAMR群)。35週齢時に運動機能の指標である後肢伸展反射能を評価したところ、後肢の非伸展時間がSAMR群に比べてSAMP-cont群では有意に増加し、運動機能障害がみられた。一方で、SAMP-ヒラタケ群とSAMP-EGT群ではSAMP-cont群と比べて非伸展時間が有意に低下した。血漿中のEGT濃度は、SAMR群とSAMP-cont群では定量下限値以下(約0.5 μM)であり、SAMP-ヒラタケ群とSAMP-EGT群ではそれぞれ約25 μMと28 μMであった。各群のマウスの腓腹筋における神経筋接合部(NMJ)の形成と機能に関わる因子の発現レベルを測定したところ、神経栄養因子である*NT-4/5*のmRNA発現は、SAMP-cont群に比べてSAMP-ヒラタケ群とSAMP-EGT群で有意に増加した。NMJの主要構成因子である*agrin*, *Lrp4*, *Dok-7*のmRNA発現は、SAMP-cont群に比べてSAMP-EGT群で増加した。アセチルコリン分解酵素の*AChE*のmRNA発現はSAMP-cont群に比べてSAMP-EGT群で増加したが、アセチルコリン受容体のサブユニットである*Chrna1*と*Chrne*のmRNA発現はヒラタケまたはEGTによって影響を受けなかった。これらの結果から、EGTあるいはEGTを含むヒラタケの摂取はNMJの形成と機能を改善し、老化に伴う運動機能の低下を抑制することが示唆された。

14 油脂由来の新規バイオ樹脂開発

○今井岳志¹、阿知良浩人¹三原久明²

(¹兵庫工技センター、²立命・生命科学)

【目的】

我々は細菌における酸化ストレス適応に関する基礎的な研究を展開する中で偶然、電解質化したカルボン酸を持つ不飽和脂肪酸の酸化重合物がユニークな性質を有していることを見出した。植物油脂由来の脂肪酸を原料として作製した当該樹脂は高い強度を示し、セッケンと同様に両親媒性であることから、様々な材料とよく馴染むことが予想された。そこで我々は、当該バイオ樹脂をfatty acid-derived polyelectrolyte (FADP)と名付け、様々な材料との複合化に向け、まずはパルプなどの親水性フィラーとの複合化および強度測定を実施した。

【方法・結果】

パルプと複合化した場合の曲げ強度および弾性率を、FADPの電解質化の比率を変化させつつ評価した。まず、リノール酸にラジカル開始剤としてFeCl₃を加え、内容物を攪拌することで空気中の酸素を混ぜ込みながら、280℃に加熱し、各約1時間30分反応させることで、低～中分子量の酸化重合物を得た。これにそれぞれ0～20% (w/w)の水酸化ナトリウムを加え、引き続き1時間加熱し、ポリスチレン換算分子量で10³～10⁸の重合物を含む、FADPを調製した。得られた高分子電解質に35% (w/w)のパルプを加えて板状に成形し、成形体を140℃にて1時間さらに160℃にて16時間加熱し、硬化を完了させた。JISK7171を参考に成形体の3点曲げ試験を行った結果、表1のような結果となり、パルプにおいてFADP中のカルボン酸アニオン基が13%で最も曲げ強さが高く、親和性が高いことが示唆された。

表1 FADPの電解質化の比率とパルプ複合材の機械的物性

使用した高分子電解質中のNaOH濃度 (%)	カルボン酸アニオン基の含有率 (%)	曲げ強さ (MPa)	曲げ弾性率 (MPa)
0(対照)	0	1.5	5
0.2	1.3	2.8	325
0.5	3.2	13.6	105
1.0	6.4	30.6	1750
2.0	13	39.1	1100
15	96	4.4	510
20	100 (飽和)	0.4	35

15 玄米由来酵母 *Solicoccozyma zizaniae* のイネとの共生と性状

○中谷 優花、高瀬 隆一、小倉 康平、橋本 渉

(京大院・農)

【背景・目的】 植物には様々な微生物が定着しており、一部の微生物は共生による生長促進(=正の効果)あるいは感染による枯死(=負の効果)を誘導する。イネにおける植物-微生物間や微生物同士の相互作用の理解は、農業における微生物を用いた増産や病害予防に役立つ。当研究室では、これまでに大豆と枯草菌との関係について解析してきた¹⁾。酵母*Solicoccozyma zizaniae*はイネ科植物周辺環境から単離報告されているが²⁾、酵母全般が宿主植物や微生物叢に与える影響については細菌や糸状菌と比べて研究が遅れており、植物における酵母の性状については不明点が多い。本研究では、玄米由来酵母*S. zizaniae*のイネへの定着と微生物叢形成における役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】 玄米およびイネの常在微生物を探索したところ、出芽酵母*S. zizaniae*が玄米より高頻度で単離された。本酵母のイネへの定着性を明らかにするため、表面殺菌した玄米に*S. zizaniae*を接種して無菌的に発芽・生育した後、イネの各部位から真核微生物を検出した。その結果、*S. zizaniae*が根周辺から多く検出され、植物体内にも存在していた。本酵母と他のイネ由来微生物との相互作用について、酵母または細菌の培養上清を用いた際の生育を評価した。その結果、*S. zizaniae*の培養上清添加により、*Microbacterium*属細菌や*Curtobacterium*属細菌といったイネから高頻度で単離された細菌の生育が増強されるなど、*S. zizaniae*が一部の細菌と相互作用し、生育増強または抑制の関係にあることが示唆された。糖質資化性試験では、*S. zizaniae*がペクチンをはじめとした幅広いイネ含有多糖を単一炭素源として生育できることがわかった。さらに、本酵母の特徴として、ペクチンを単一炭素源とした培地でも良好に生育し、培養14日後に乾燥菌体重量当たり5.9%の油脂を蓄積することが判明した。その脂肪酸組成は主にオレイン酸、パルミチン酸、リノール酸で構成されていた。

【考察】 ペクチンは植物細胞壁成分であり、生長する際に細胞外へ分泌され、特に根圏環境に豊富に存在することが知られている³⁾。本研究の結果から、*S. zizaniae*はペクチンを含むイネの根分泌物を利用して生育し、イネに定着している細菌の生育に様々な影響を与え、微生物叢の形成に関与することが示唆された。また、*S. zizaniae*はペクチンを炭素源として油脂を生産することが明らかになり、油脂生産がイネの生長や微生物叢に影響を与えることが考えられた。

¹⁾ Sugiura, H. *et al.*, *Sci. Rep.* **10**, 18691 (2020). ²⁾ Yurkov, A. M., & Kurtzman, C. P., *FEMS Yeast Res.* **19**(2) (2019). ³⁾ Oades, J. M., *J. Soil Sci.* **29**, 1–16 (1978).

16

主要な貯蔵タンパク質を欠失した大豆の加工機能性に関する研究

○五十嵐眞子¹、石井統也²、松村康生³、大木信彦⁴、谷史人¹、
松宮健太郎¹ (¹京大院農、²香川大農、³京大生存研、⁴農研機構)

【目的】単離精製された大豆のオイルボディ(OB)は高度な乳化特性を有するが、貯蔵タンパク質を除去するためには複雑な工程を経る必要がある。本研究では、主要な貯蔵タンパク質を遺伝的に欠失し、OBの濃度が相対的に高い系統「QF2」を供試し、さらに種々の濃縮操作を組み合わせることで、加工機能性に優れた植物性素材の開発を試みた。また、ユニークな加工機能性を発現するメカニズムを、豆乳中のOBや塩基性7Sグロブリンなどに着目して解析した。

【方法】QF2(Q)と‘Fukuyutaka’ (F) (主要貯蔵タンパク質を含む品種)の種子を水で浸漬した後、水または30% (w/w) EtOHを加えて絞ることにより、生豆乳を得た。これらの豆乳を50℃または60℃で減圧濃縮することにより濃縮豆乳を得た後、これらQ豆乳とF豆乳の加工機能性を以下のように評価した。すなわち、油分を65wt%含むマヨネーズ様乳化物を調製し、降伏応力および乳化活性を測定した。N₂Oガスとともに射出し、起泡性および泡沫安定性を測定した。濃縮豆乳を加熱・冷却することにより、ゲル化能の有無を検討した。

【結果】生豆乳を重量比で15%になるまで減圧濃縮すると、タンパク質濃度は12~20%になった。エタノール添加溶媒で減圧濃縮した後の豆乳は、Q豆乳とF豆乳も水の場合と比較して流動性が乏しかった。Q豆乳とF豆乳はマヨネーズ様乳化物を作製できる能力を有していたが、特にQ豆乳で調製した乳化物には、通常のマヨネーズと同等の降伏応力があり、また凍結融解処理に対しても安定であった。乳化物の油滴の粒子径はQ、Fともにエタノール添加濃縮の場合の方が大きかった。これは乳化作用を示すOBがエタノールによって構造変化を起こしたことに起因する可能性がある。泡沫はQ、F豆乳ともに水を添加溶媒として濃縮した場合にのみ安定的に作製することができた。濃縮豆乳は未濃縮豆乳と比較して起泡性に劣るものの、泡沫安定性に優れていることが明らかになった。これは濃縮による界面活性成分の有効濃度または豆乳の粘度の増加によるものと考えられた。貯蔵タンパク質を欠失したQ豆乳のみでゲル化性を検討したところ、水を添加溶媒として濃縮した場合に、豆乳がゲルを形成した。ゲル化に関与するタンパク質を同定するために濃縮豆乳を超遠心分離し、上清を回収して加熱すると、同様にゲルを形成した。この上清について、電気泳動法および質量分析を実施し、貯蔵タンパク質以外にゲル化するタンパク質の同定を行った。

17

メタンからの異種タンパク質直接生産のためのメタン酸化菌・メタノール資化性酵母共培養系の開発

○岸本貫志、木田航平、竹谷友之、阪井康能、由里本博也

(京大院・農)

【目的】

常温常圧下でメタンからメタノールへの酸化反応を触媒するメタン酸化酵素 (メタンモノオキシゲナーゼ: MMO) を有するメタン資化性細菌は、自然環境ではメタノール資化性細菌と共に単離されることが多い。メタンを炭素源とするこのような共生系をフラスコ内で再構成することができれば、メタノールからの有用タンパク質生産が確立されているメタノール資化性酵母(C1酵母)と、メタン資化性細菌との共培養系によるメタンからのワンポットタンパク質生産が期待できる。しかし、メタン資化性細菌の多くは偏性メタン資化性であり、メタン酸化により生じたメタノールを自らの増殖のために消費してしまう。一方、我々は、プロパン資化性細菌 *Mycolicibacterium* sp. TY-6株が非メタン資化性でありながらメタン酸化活性をもつことを報告しており¹⁾、本研究では、TY-6株をメタン酸化細胞触媒として用い、C1酵母 *Komagataella phaffii* との共培養系における、メタンからの異種タンパク質直接生産能評価系構築と共培養条件の最適化を行った。

【方法・結果】

共培養系に用いるC1酵母には、我々が *K. phaffii* を用いて開発したメタノール誘導性遺伝子 (*DAS2*) プロモーター支配下に蛍光タンパク質 Venus を発現するメタノールセンサー酵母を用いた²⁾。メタノールセンサー酵母には蛍光タンパク質 mCherry を恒常的に発現させており、その蛍光を基に共培養液中のセンサー酵母細胞数を計測できる。TY-6株とメタノールセンサー酵母を、窒素あるいはメタンを封入した密閉容器内の培地中で共培養を行い、培養液についてフローサイトメトリー (FCM) 解析により蛍光タンパク質 Venus の生産と酵母の増殖を評価した。菌体濃度や培地条件を最適化した結果、メタン封入条件下でのメタノールセンサー酵母の Venus の蛍光強度の上昇と細胞数の増加が認められ、TY-6株のメタン酸化で生じたメタノールによるメタノールセンサー酵母の蛍光タンパク質生産と細胞増殖が示唆された。

1) Oktayら、日本農芸化学会2024年度大会講演要旨集, 3E5a11.

Takeya et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 102: 7017-7027 (2018).

18

野生酵母からのオルニチン高含有株の構築とクラフトビール醸造への応用

○山田康矢¹、西村明²、高木博史²

(¹ 奈良先端大・バイオ、² 奈良先端大・研究推進機構)

【目的】

現在、日本国内では800を超えるクラフトビールの醸造所が存在しており、競合他社と差別化できるクラフトビールの開発が求められている。本研究では、野生酵母を利用して地域独自性の高いクラフトビールのブランド化を目指した。また、更なる付加価値として肝機能の促進の効果が知られているオルニチンに注目し、オルニチン高含有株の構築および、その高含有メカニズムの検討を行った。

【方法・結果】

まず、本学キャンパス内で自生している植物から試料を採取し、集積培養を行った。次に富栄養培地に塗布し、得られた出芽酵母様の菌体について26S rDNAの塩基配列から*Saccharomyces cerevisiae*を5株単離した。これらの株について発酵能を測定し、市販のエールビール酵母と近い発酵能を示す1株を選抜した(ADH837と命名)。ADH837を用いて醸造したクラフトビールを分析した結果、必須アミノ酸であるリジンや健康機能性成分(リラックス効果、血圧低下作用、睡眠の質向上が期待される)のγ-アミノ酪酸(GABA)が多く含まれることが判明した。以上より、ADH837を使用することで、健康志向を訴求できる新たなクラフトビールの開発に成功した。

さらなる健康系イメージを付与するために、オルニチン高含有株の育種を行った。ADH837をメタンサルホン酸エチルで変異処理した後、アルギニンアナログであるカナバニンの耐性株を140株取得した。これらの株の細胞内オルニチン含量を測定した結果、親株に比べてオルニチン含量が約10倍高い変異株を1株選抜した(ADHorn49と命名)。麦汁培地を使用した簡易的な発酵試験を実施したところ、ADHorn49は親株と同等の発酵能を有し、さらに細胞内のみでなく発酵液上清中のオルニチン含量も親株と比較して増加することが判明した。ADHorn49の全ゲノムDNAシーケンス解析を実施したところ、ミトコンドリア内のオルニチン生合成に関する*N*-アセチルグルタミン酸キナーゼをコードする*ARG6*にアミノ酸置換(Gly351Asp)を伴う変異を見出した。Arg6の立体構造から、Gly351はフィードバック阻害剤であるアルギニンの結合部位付近であることが考えられた。さらにいくつかの醸造酵母株に*ARG6*^{Gly351Asp}遺伝子を導入したところ、全ての株でオルニチン含量が増加することが判明した。現在、Arg6のGly351が果たす具体的な機能の解明を進めており、オルニチン代謝制御機構の新たな知見を得られることが期待される。

19 メラニン合成酵素チロシナーゼの活性化機構の解析

○宮崎聖¹、高橋諒全²、古川良明²、神戸大朋¹

(¹京大院・生命科学、²慶應大・理工)

【目的】

メラニンは、チロシンを出発物質とする多段階の酵素反応を経て合成される。この反応にはチロシナーゼ(TYR)、チロシナーゼ関連タンパク質1, 2(TYRP1、TYRP2)の3つの酵素が関与する。このうちTYRは、活性中心に2つの銅イオン配位し、メラニン合成の初発の反応を担う律速酵素として知られている。TYRに変異があるとアルビノとなり、ヒトでは先天性の色素異常症である眼皮膚白皮症1(OCA1)を発症する。また、コウジ菌やマッシュルームのTYRの活性化機構の解析は進展している一方で、ヒトTYRに関しては不明な点が数多く残されている。TYRP1は、TYRと同様にメラノソーム内腔に1回膜貫通型で局在し、アミノ酸配列の40%以上が一致しており、構造的に非常に類似しているが、金属要求性などに大きな相違がある。そこで本研究では、TYRとTYRP1のアミノ酸配列において比較的相同性が低いC末端領域(リンカー領域、膜貫通領域、細胞質領域で構成)に着目し、両者のアミノ酸配列を入れ替えたドメイン交換変異体を用いることで、ヒトTYRの活性化に必要な配列を特定することを目的とした。

【方法・結果】

野生型TYRおよびドメイン交換を行なった変異型TYRを、ヒトメラノーマSK-MEL2細胞に一過的に過剰発現させた。Western Blottingによってタンパク質の発現を解析し、L-DOPA酸化反応を利用した方法でTYRの酵素活性を測定した。

C末端領域の変異体を解析した結果、膜貫通領域、細胞質領域の交換体ではTYRの活性に影響が認められなかった一方、リンカー領域での交換体は活性が消失することが明らかになった。さらに、眼皮膚白皮症1(OCA1)の患者の変異が、リンカー領域内でいくつか報告されており、これらの変異を導入したTYR変異体を解析したところ、酵素活性が著しく低下することがわかった。以上の結果から、リンカー領域内にTYRの活性化に重要な配列が存在することが示唆された。そこでドメイン交換の領域をさらに狭めた変異型TYRを作製し、リンカー領域におけるTYRの活性化に必須のアミノ酸配列を特定した。次に、これらの配列の機能を調べるため、配列の特性に着目した解析を行なった。その結果、このリンカー領域は2本のヘリックスからなり、チロシンをはじめとした疎水性アミノ酸が同一方向に集まっている構造が予測された。実際にチロシンを変異させると、酵素活性が減少することがわかった。これらの結果から、この配列がTYRの金属獲得や未知の分子との相互作用に関与することが示唆された。今後はこのメカニズムを詳細に解析する予定である。

20 黄体ホルモン・プロゲステロンの植物受容体候補 AmPR に対する結合活性の生化学的解析

○石神世捺¹、衣笠有夏¹、山上あゆみ¹、宮川拓也¹、中野雄司¹

(¹京大院・生命)

【目的】

哺乳類の黄体ホルモンとして知られるプロゲステロン(PG)は、多様な植物種にも存在し、PGが植物の環境ストレス耐性の向上といった生理活性をもつことが我々の先行研究により明らかとなった。動物のPG受容体には核内受容体と7回膜貫通型受容体mPR(membrane Progesterone Receptor)が知られているが、我々はモデル植物のシロイヌナズナにおいて5つのmPR相同性遺伝子の存在を見出し、Arabidopsis mPR(AmPR)と命名した。本研究では、AmPRが植物においてPGの受容体として機能することを生化学的に検証することを目的とした。

【方法・結果】

AmPRとPGの結合解析のために、コムギ無細胞タンパク質合成系を利用したAmPRの合成を試みた。AmPRは膜貫通型タンパク質であることから、脂質二重膜に埋め込まれた状態で調製するため、ナノディスクと呼ばれる人工脂質二重膜を採用した。ナノディスクは、membrane scaffold protein(MSP)という両親媒性タンパク質がリン脂質二重層の疎水性尾部を取り囲んだディスク状のナノ粒子であり、合成されたAmPRはリポソームに取り込まれナノディスクへと再構成される。この方法により、5種類全てのAmPRの合成に成功し、AmPRに融合したアフィニティ精製タグにより、ナノディスクに組み込まれた状態で精製可能であることが確認された。

5種類のAmPRのうち、十分な収量が得られたAmPR3とAmPR5について、PGの結合解析を実施した。結合解析には、グレーティング結合干渉法(Grating-coupled interferometry, GCI)を利用し、ナノディスクを構成するMSPに融合したヒスチジンタグを用いて、AmPRを再構成したナノディスクと空のナノディスクをセンサーチップに固定し、PGの添加に伴うセンサーグラムの変化を比較評価した。その結果、AmPR3とAmPR5のセンサーグラムの強度はPGの添加時間依存的に上昇して飽和し、PGの特異的な結合を示唆するパターンが観測された。今後は、高濃度のPGにおける凝集性の課題などを改善し、AmPR3とAmPR5に対するPGの結合親和性を定量評価するとともに、他のAmPRについても解析を行う予定である。これにより、本研究で検討したAmPRのナノディスク再構成と相互作用解析を基盤に、PG受容体としてのAmPRの機能解明を目指す。

21

DGK α KO マウスにおけるジガラクトシルジアシルグリセロールの抗アレルギー性鼻炎効果の検討

神吉玲奈、赤澤葉月、長谷川直也、上田修司、福田伊津子、白井康仁
(神戸大学院・農・応用生命化学)

【目的】

ジガラクトシルジアシルグリセロール(DGDG)は、植物のチラコイド膜に含まれるグリセロ糖脂質の一種であり、グリセロ糖脂質には抗腫瘍作用や抗炎症作用があることが報告されている。当研究室ではDGDGがTh1/Th2バランスの改善を介してマウスのアレルギー性鼻炎を抑制する効果を持つことを明らかにしており、この抗アレルギー作用に腸内での酪酸産生菌の増加による制御性T細胞の誘導が関与している可能性を見出している。T細胞受容体(TCR)シグナルを媒介するジアシルグリセロール(DG)をホスファチジン酸(PA)に変換する脂質キナーゼであるジアシルグリセロール(DGK)は、TCRシグナルを阻害することでT細胞の活性化を制御している。本研究ではDGKのT細胞主要アイソフォームであるDGK α に着目し、DGDGがアレルギー性鼻炎を誘導したDGK α KOマウスに与える影響を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

アレルギー性鼻炎を誘導したC57BL/6マウスの野生型とDGK α KO型を用いてDGDGの経口投与による抗アレルギー作用を調べた。その結果、DGK α KOマウスにおいてもDGDG投与により、アレルギー症状であるくしゃみ回数が野生型マウスとの同様に減少する傾向にあった。しかし、Th1/Th2バランスを確認するため、脾臓におけるT細胞関連サイトカイン遺伝子のmRNA発現量に与える影響を調べたところ、野生型ではアレルギーで優位に働くTh2細胞産生サイトカインであるIL-13が、アレルギー誘導により有意に増加し、DGDGによって抑制される傾向にあったのに対し、DGK α KOマウスではDGDGによるIL-13の抑制は見られなかった。さらに、Th1細胞産生サイトカインであるIFN- γ はアレルギー誘導により有意に減少し、野生型マウスではDGDGによって回復する傾向にあったが、DGK α KOマウスではその回復は見られなかった。以上のことから、DGK α KOマウスにおけるDGDGの抗アレルギー作用にはTh1/Th2バランスの改善は関与しておらず、その他の抑制経路があることが示唆された。現在、その詳細について検討中である。

22 DGK/PKC に着目した記憶及び感情障害を改善させる機能性食品の開発に向けて

○横田夕佳里、中尾天亮、上田修司、福田伊津子、白井康仁
(神戸大学院・農・応用生命化学)

【目的】

ジアシルグリセロールキナーゼはジアシルグリセロール (DG) をホスファチジン酸 (PA) へと変換する脂質キナーゼである。DGはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化することが知られており、DGKをKOするとDGが増加し、PKCが異常な活性を示す。これまでに当研究室では、DGK β あるいはDGK γ をKOしたマウスが記憶及び感情障害を示すが、神経保護効果が報告されているフラボノイドAを100 mg/kgで10日間経口投与することで、海馬や大脳皮質のPKC γ の異常な活性が抑制され、記憶及び感情障害を改善することを見出した。しかし、フラボノイドAは高価であるため、現実的な機能性食品には不向きであった。そこで本研究では、記憶や感情障害を改善させる機能性食品の開発に向けて、より安価で、且つ低濃度で効果を発揮する類似フラボノイドの効果を検討した。

【方法・結果】

まず、PKC γ -GFPを導入したCos7細胞を用いて、フラボノイドA及びその類似物であるフラボノイドB, C, DのPKC γ 活性阻害効果及びその適正濃度を調べた結果、フラボノイドBを50 μ Mの濃度で処置した際に、最も活性阻害が認められた。そこで、フラボノイドBに着目し、in vivoでの実験を行った。DGK β KOマウスにフラボノイドBを、各量10日間経口投与し、不安様行動、を調べる明暗箱試験、及び記憶を調べるY-MAZE試験を行ったところ、KOマウスの記憶及び感情障害が50 mg/kgの濃度で最も改善している傾向が確認された。また、DGK γ KOマウスにおいても同様の実験を行った結果、50 mg/kgの濃度で同様の結果が得られた。ついで、PKC γ の異常な活性に対する効果について、組織を摘出、ライセート化し自己リン酸化を指標にWestern blottingを用いて調べた。その結果、DGK β KOマウスの海馬において、濃度依存的に異常な活性が抑制される傾向が確認され、DGK γ KOマウスの海馬においても、同様の実験で、50 mg/kgの濃度で、KOにおけるPKC γ の異常な活性が抑制される傾向が確認された。

以上の結果、フラボノイドBは50 mg/kgの濃度で記憶・感情障害に対して有効である可能性が示唆された。今後は、より低濃度での効果を期待して、長期投与などを行っていく予定である。

2022 年度 農芸化学
中小企業産学・
産官連携研究助成
成果報告

D-アミノ酸酵素定量法の開発

若山 守¹、黒野 剛²

¹立命館大学生命科学部

²D アミノ酸ラボ株式会社

1. はじめに

D-アミノ酸が重要な生理機能を担うとともに、様々な疾患の検出・診断マーカーになり得ることが明らかとなってきた。D-アミノ酸による診断技術の開発は将来性が高いものと考えられるが、現在 D-アミノ酸の検出は二次元 HPLC や LC/MS など高感度ではあるが高価な分析機器でしか行えないことから、D-アミノ酸測定の汎用化は進んでいない。ヒト用途のための開発には多額の資金が必要であることや、分析コストが高額であることなどから、一定規模の市場が予想されるにもかかわらず、D-アミノ酸測定による診断技術の社会実装は進んでいない。

最近、尿中の D-アミノ酸濃度がネコの慢性腎疾患の検出のマーカーとして有効であることが報告された (1)。腎不全は腎臓の機能が長い年月をかけて徐々に低下していくことで起こり、高齢の猫の死因の第 1 位にあげられ、猫の宿命ともいえる病気である。15 歳以上の猫は 81% が慢性腎臓病に罹患しているとの報告もあり、病態の進行を防ぐためには早期発見が何よりも肝要とされる。一方で、腎不全は腎機能の 3 分の 2 程度が失われてようやく症状が現れるという早期発見が難しい病気である。腎機能の評価は、主として動物病院における血液検査、すなわち血中クレアチニン濃度・血中尿素態素 (BUN) ・対称性ジメチルアルギニン (SDMA) などの測定によって行われてきた。これらの測定は、採血を要することから在宅をベースとした検査は困難である。

そこで我々は多様な D-アミノ酸を基質とする D-アミノ酸 N-アセチルトランスフェラーゼ (HPA3) を用いた、ネコ尿中 D-アミノ酸の簡便な測定法の確立を図るとともに、本法が猫の腎疾患の検出に有効であることを検証した。

図 1 に示すように、出芽酵母に見出された HPA3 は酸性アミノ酸を除く D-アミノ酸のアミノ基にアセチル

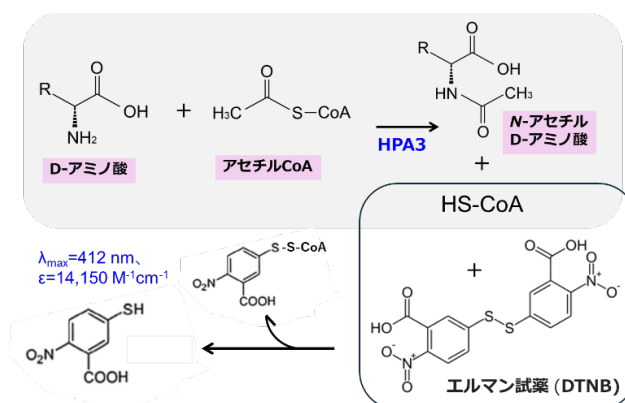


図 1 HPA3 の反応

CoA からアセチル基を転移する酵素であり、その結果生成する CoA の SH 基をエルマン試薬で定量することによって、基質 D-アミノ酸を容易にアッセイできる (2)。HPA3 は同じく GNAT ファミリーに属する出芽酵母のヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HPA2) と 49%の配列相同性と 81%の類似性を有するもののヒストンには作用せず、HPA2 も D-アミノ酸を基質にしない。HPA3 の構造機能相関は酵素化学的に興味深い、構造に基づく基質特異性の改変ができれば、応用面からも有効である。そのため本研究では HPA3 のネコ尿中 D-アミノ酸測定法への応用とともに、立体構造モデルの構築ならびに X 線結晶構造解析により同酵素の立体構造へのアプローチを行った。

2. HPA3 の立体構造

すでに結晶構造が決定されている HPA2 の立体構造をもとに、AlphaFold2 を用いて HPA3 の構造モデルを構築した (図2)。HPA2 のアセチル CoA 結合部位近傍の Y33 が、HPA3 では Q38 に置き換わっていることがわかった。HPA3 の Q38Y ならびに HPA3 の Y33Q の変異酵素の D-アミノ酸を基質にしたアセチル CoA からのアセチル基の転移活性を調べた結果、Q38Y では活性の低下、Y33Q では活性の増加が見られたことから HPA3 の Q38 と HPA3 の Y33 が、それぞれ基質の認識に関与していることが示唆された。HPA3 の結晶構造を解析するために、自動結晶化装置 mosquito を用いて結晶の作製を試みた。その結果、CoA と D-Met の存在下で HPA3 の結晶が得られた (図3)。現在、X 線構造解析を行なっている。



図2 HPA3 の立体構造モデル

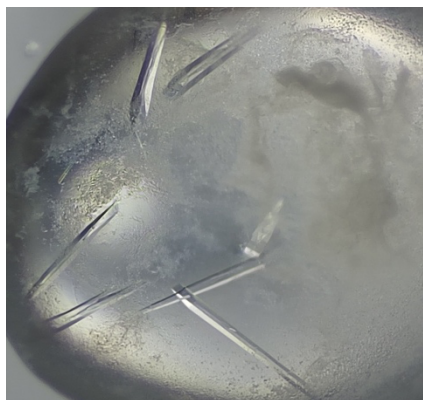


図3 HPA3 の結晶

3. HPA3 による D-アミノ酸の定量

図4に示したように HPA3 は酸性アミノ酸を除く、多様なアミノ酸に作用する。従って同酵素を用いることにより、酸性アミノ酸を除く全 D-アミノ酸の定量が可能となる。本研究の目的である HPA3 による D-アミノ酸定量法の社会実装を考えた場合、反応のスケールを小さくすることにより測定コストを軽減することが望ましい。そこで反応条件を検討した

結果、100 mM HEPES Buffer (pH 8.0)、0.5 mM アセチル CoA、2 mM DTNB、10 μg HPA3 を含む 100 μL の反応液を用いて標品 D-アミノ酸の定量が可能となった。図 5 に一例として D-セリンを測定した場合の結果を示した。

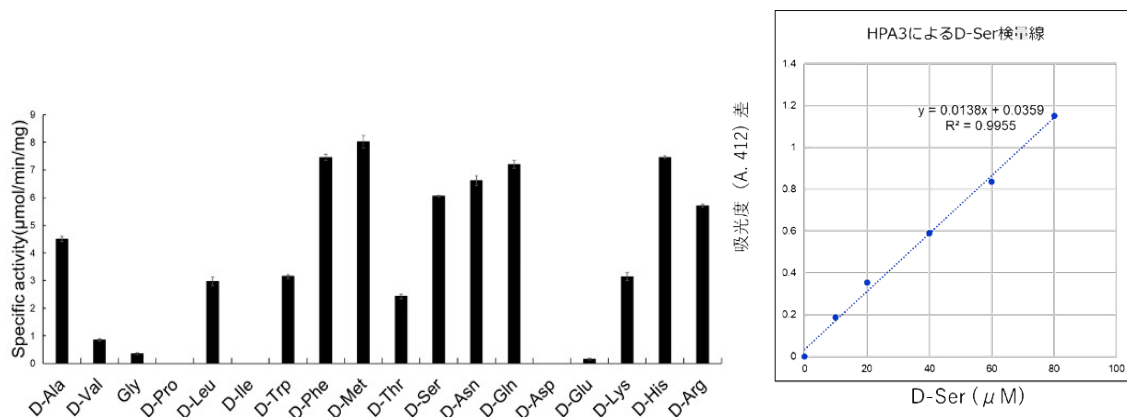


図 4 HPA3 の基質特異性

図 5 D-セリンの検量線

4. HPA3 法を用いた猫尿中 D-アミノ酸の測定および尿中 D-アミノ酸濃度と腎疾患の関連

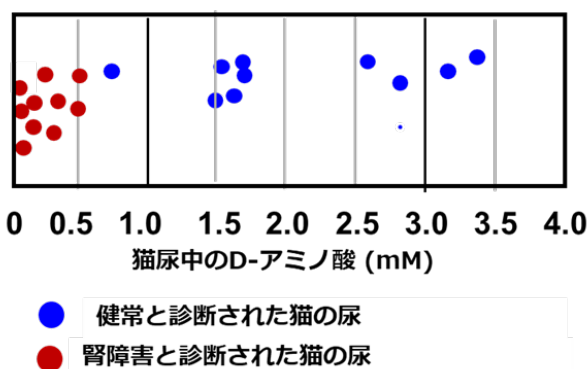


図 6 健常及び腎疾患の猫尿中 D-アミノ酸濃度

獣医師により健常および腎疾患と診断された猫の尿、20 サンプルの提供を受けた。猫尿を卓遠心機で遠心後、上清 20 μL を上記の反応系に供した。図 6 に示したように、1 例を除いて健常と診断された猫尿中の D-アミノ酸濃度は 1.0 mM 以上であったのに対して、腎疾患と診断された猫では 0.6 mM 以下であり、顕著な差が見られた。

5. まとめ/今後の展開

本研究の結果、HPA3 による D-アミノ酸定量法によって得た猫尿中 D-アミノ酸濃度が猫の腎疾患マーカーとして機能するものと予想された。血中クレアチニンや BUN の測定といった現行の猫腎疾患の診断法はいずれも採血を要するものであるため、動物病院でなければ実行困難である。これに対して HPA3 を用いる本法は、家庭で猫尿を採取しこれを郵便等で検査会社へ送ることによって腎疾患の簡易検査を行うという事業への展開が期待できる。このようなビジネスモデルを想定した研究が、NEDO の「2024 年度 研究開発型スタートアップの起業・経営人材確保等支援事業/ディープテック分野での人材発掘・起業家育成事業 (NEP) / 躍進コース、課題名 D-アミノ酸をバイオマーカーとする動物用腎機能検査技術の開発」に D アミノ酸ラボ株式会社と立命館大学若山研究室の共同研究として採択され、現在進行中である。

6. 謝辞

本研究に助成をいただきました公益社団法人日本農芸化学会と、猫尿の提供をいただきました愛知県春日井市の平成動物病院（平島康博 院長）に心より御礼申し上げます。X線結晶構造解析にあたっては、立命館大学生命科学部生物工学科の松村浩由教授ならびに上原了助教にご指導いただき、厚く御礼申し上げます。

【参考文献】

- (1) Kimura R, Ueda R, Tsujimura H, Ban T, Tanaka A (2024) Urinary D-amino acid profiles in cats with chronic kidney disease. *J Vet Med Sci* 86, 855–859.
- (2) Yow, G-Y, Uo T, Yoshimura T, Esaki N (2004) D-Amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch Microbiol*, 182, 396-403.

2023 年度支部技術賞 受賞記念講演

ロコモティブシンドローム対策を目指したロコモアの開発研究

出雲 貴幸、大塚 祐多、永井 研迅、長谷部 杏子

サントリーウエルネス株式会社 生命科学研究所

1. はじめに

超高齢社会の日本では、要介護や要支援の割合が増加しており、要介護の要因は、高齢による衰弱、骨折・転倒、および関節疾患といった運動器疾患が全体の約 1/3 を占める。運動器疾患の予防は、生活の質（Quality of life; QOL）の維持や健康寿命の延伸に重要であり、その対策として適度な運動とバランスの取れた食事や栄養摂取が推奨されている。

サントリーにおける運動器の健康に向けた食品の研究開発は 1990 年代から始まり、我々はまず初めに膝関節の健康に着目した。膝痛に対して有効なグルコサミン塩酸塩、コンドロイチン硫酸およびケルセチン配糖体を独自配合した 3 成分の組合せが、膝痛による QOL の低下を改善することを見出し、2001 年にグルコサミン&コンドロイチン™を発売した。また、運動器疾患を対象とする日本最大のコホート研究である ROAD スタディとの共同研究により、2005 年と 2015 年の膝関節の病態を比較したところ、いずれにおいても加齢に伴い膝関節裂隙が減少することが確認された¹⁾。一方で、2005 年と 2015 年の同世代間の比較では 2015 年の方が膝関節裂隙の幅が大きかった¹⁾。この結果は、年齢と共に擦り減り続ける膝関節の構造的機能低下に対して、食や運動などの生活習慣の改善が膝関節の健康維持に寄与した結果と考えられた。2007 年には日本整形外科学会より、運動器の障害のために立ったり歩いたりするための身体能力（移動機能）が低下した状態と定義されたロコモティブシンドローム（ロコモ）が提唱され、膝関節だけではなく、運動器全体の包括的な診断と予防が重要視されるようになった。ロコモの主な原因の一つとして、加齢による筋肉量の減少および筋力の低下を意味するサルコペニアが注目を集めている。そこで我々は、従来の膝関節に加えて筋機能も含めた包括的なロコモ対策商品の開発を目指した。

2. ヒト骨格筋細胞におけるケルセチンの作用

最初に我々は、抗炎症作用を始めとして多くの生理作用を有するケルセチンに着目をして、骨格筋細胞を用いた *in vitro* での有効性を探索した。*in vitro* での筋機能評価には、平面培養のげっ歯類由来細胞を用いた実験が一般的であるが、ヒトとげっ歯類ではミオシン重鎖アイソフォームの発現パターンや化合物に対する反応性が異なることや、平面培養では骨格筋の重要な表現型である筋力や筋持久力を測定することは困難であることが課題であった。そこで我々は、名古屋大学との共同研究により独自のマイクロデバイスを用いた三次元ヒト骨格筋組織培養系を構築して、ケルセチンの作用を検討した。その結果、ケルセチンは遅筋線維への分化を促進し、筋持久力を増加させることを明らかにした²⁾。

さらに骨格筋において筋衛星細胞とは異なり脂肪や線維組織に分化可能な間葉系前駆細胞に着目し、ヒト初代骨格筋細胞から間葉系前駆細胞を単離する技術を確立した。本評価系

においてケルセチンは、TGF- β 経路を介した筋肉の線維化、および CREB 経路を介した筋肉の脂肪化を抑制することを見出した³⁾。加齢による筋力の低下は、筋肉の量だけでは説明できず、筋細胞外での線維組織や脂肪滴の増加など筋肉の質が寄与することが報告されていることから、ケルセチンには加齢に伴う筋肉の質の低下を改善する可能性が考えられた。

3. ケルセチン配糖体と運動による筋肉の柔軟性の改善効果

筋肉の線維化を評価する超音波エラストグラフィを用いた中高齢者での検討において、膝完全屈曲時の大腿部筋スティフネスが加齢に伴い増加することを確認した⁴⁾。この結果は加齢に伴って筋肉が硬くなる、すなわち筋肉の柔軟性が低下することを意味している。筋肉の柔軟性は関節可動域や筋機能と関連があり、ストレッチなどの運動により一過的に改善することが知られているが、食品成分による有効性研究はこれまで報告されていない。そこで、軽度な運動と併用時のケルセチン配糖体による筋肉の柔軟性に対する有効性を評価した。その結果、低強度のレジスタンス運動とケルセチン配糖体摂取の組合せにより、運動とプラセボ食品と比較して、筋肉の柔軟性が有意に改善することを見出した⁵⁾。以上の結果から、ケルセチン配糖体は、筋肉の質の一部である筋肉の線維化を改善して、筋機能の維持に寄与している可能性が示された。

4. ロコモア™による歩行速度の増加効果

これまでの研究において筋機能に対して様々な効能を示すケルセチン配糖体に加えて、筋力増加作用を示すイミダゾールペプチドのアンセリン⁶⁾、膝関節の健康に寄与するグルコサミン塩酸塩およびコンドロイチン硫酸の4つの成分を独自配合したロコモア™を開発した。

ロコモア™を評価する移動機能の中で最も重要な指標の一つとして歩行速度に着目して、ロコモア™の有効性を検討した。歩行速度は、要介護リスクや平均寿命と関連することが報告されており、移動機能の簡便な評価指標として広く用いられている。また歩行速度の維持には、膝関節のみならず筋機能が重要であることから、運動器全体を評価する包括的な指標と考えられる。ランダム化二重盲検プラセボ対照並行群間比較試験の結果、4成分の組合せの16週間摂取により、プラセボと比較して通常歩行速度が有意に増加した⁷⁾。また8週目では、4成分の摂取により膝伸展筋力の増加が見られ、膝関節機能を評価する日本版膝関節症機能評価尺度スコアの有意な改善が確認された⁷⁾。さらに単群オープン試験において、4成分の摂取は歩行速度や膝痛改善に加えて、歩容指標の一部である歩幅および足底角度の延長が確認された⁸⁾。以上の結果より、4成分の組合せは膝関節の違和感軽減および下肢筋力の増加により、地面に対する脚の蹴り出しが強くなることで歩行の推進力が高まり、歩幅や歩行速度が増加すると考えられた。

5. おわりに

ロコモア™は、膝関節や筋肉に悩みを持つ多くの消費者から支持される商品となり、2013年の発売以降販売数を拡大し続け、現在では脚対策サプリメントでシェア No.1 の商品である。さらに2024年10月から、国内で初めて「軽い運動との併用で、加齢により衰える筋肉の柔軟性（ひざ関節を完全に曲げた状態での筋肉の柔らかさ）の向上」を表示する機能性表示食品としてリニューアルした。今もなお高齢化が進む日本において、運動器に対して多面

的な効果を発揮するロコモア™が今後も多くの方々の健康の維持・増進に寄与することを期待したい。

【参考文献】

- 1) Kitamura B, Iidaka T, Horii C, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T, Otsuka Y, Izumo T, Tanaka T, Rogi T, Shibata H, Tanaka S, Yoshimura N. Ten-year trends in values of joint space width and osteophyte area of knee joints: Comparison of the baseline and fourth ROAD study surveys, *Osteoarthr. Cartil. Open*, 6, 100454 (2024).
- 2) Nagai A, Kaneda Y, Izumo T, Nakao Y, Honda H, Shimizu K. Quercetin induces a slow myofiber phenotype in engineered human skeletal muscle tissues, *FASEB J.*, 38, e70009 (2024).
- 3) Ohmae S, Akazawa S, Takahashi T, Izumo T, Rogi T, Nakai M. Quercetin attenuates adipogenesis and fibrosis in human skeletal muscle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 615, 24–30 (2022).
- 4) Maeda A, Yamagishi M, Otsuka Y, Izumo T, Rogi T, Shibata H, Fukuda M, Arimitsu T, Yamada Y, Miyamoto N, Hashimoto T. Characteristics of the passive muscle stiffness of the vastus lateralis: a feasibility study to assess muscle fibrosis, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18, 8947 (2021).
- 5) Otsuka Y, Miyamoto N, Nagai A, Izumo T, Nakai M, Fukuda M, Arimitsu T, Yamada Y, Hashimoto, T. Effects of quercetin glycoside supplementation combined with low-intensity resistance training on muscle quantity and stiffness: a randomized, controlled trial, *Front. Nutr.*, 9, 912217 (2022)
- 6) Nagai A, Ida M, Izumo T, Nakai M, Honda H, Shimizu K. l-Anserine increases muscle differentiation and muscle contractility in human skeletal muscle cells, *J. Agric. Food Chem.*, 71, 8952–8958 (2023).
- 7) Kanzaki N, Ono Y, Shibata H, Moritani T. Glucosamine-containing supplement improves locomotor functions in subjects with knee pain: a randomized, double-blind, placebo-controlled study, *Clin. Interv. Aging*, 10, 1743–1753 (2015).
- 8) Kanzaki N, Otsuka Y, Izumo T, Shibata H, Nagao H, Ogawara K, Yamada H, Miyazaki S, Nakamura Y. Glucosamine-containing supplement improves locomotor functions in subjects with knee pain - a pilot study of gait analysis, *Clin. Interv. Aging*, 11, 835–841 (2016).

【講演者略歴】

出雲 貴幸 (いづも たかゆき ; 博士 (薬学))

サントリーウエルネス株式会社 生命科学研究所 部長

2003年11月 サントリー株式会社 入社

2011年05月 薬学博士取得

2011年08月-2013年7月 アイルランド Teagasc 研究所

2013年09月 サントリー健康科学研究所 研究主幹

2022年04月 サントリー生命科学研究所 部長

現在に至る

専門分野：食品素材の有効性・安全性評価

通気性培養容器による曝気を行わない好気性微生物の培養法

吉田 健一¹、四ツ谷 昌人²、佐藤 亮介²

¹神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科、²株式会社潤工社

1. 開発目的

大容量の液体培養で好気性微生物に十分な酸素供給を保証するには、一般にスパージャーによる高圧曝気が必要である。しかし、スパージャーによる曝気は、培養液の泡立ちやオーバーフローを引き起こすため、消泡剤の添加などの対策が必要となる。また、コンプレッサーの運転に必要な電力は高価であり、エネルギー消費も大きく、培養装置の複雑化もあって経済的にも環境的にも大きな負担となっている。

グラム陽性菌である枯草菌は、酵素をはじめとする異種タンパク質、食品添加物、ビタミン、抗生物質、アミノ酸、殺虫剤などを生産する細胞工場として高く評価されている。一般的には偏性好気性細菌と考えられている。すなわち、枯草菌を標準的な栄養条件下で培養するには、激しい振盪やスパージャー曝気により効率的に酸素を供給する必要がある。そこで本研究では、枯草菌をはじめとする通性好気性微生物の培養を、より費用対効果に優れ、かつ持続可能なものとするために、枯草菌をモデル微生物として、スパージャー曝気を用いない新たな培養法の開発を目指した。

2. 技術内容

新しい培養法は、液体は透過させないが気体は透過させる材料である ePTFE (フッ素樹脂 PTFE から特殊な成形工程を経て製造される材料で、ナノ多孔質構造により優れた通気性・不透水性、柔軟性、軽量性、撥水性、耐熱性、耐薬品性、耐紫外線性を発揮する) を用いて製造した培養容器に基づいている。この ePTFE 培養容器内で培養液を攪拌すると、容器の壁を通過する酸素により微生物が呼吸できる。しかし、通常の攪拌では酸素供給が不十分であるため、下方水流を容器中央に発生するスクリューにより強制的対流を付加して、曝気条件に優るとも劣らない酸素供給を達成することができるよう工夫した。本研究では、アルツハイマー病の予防効果が報告されている *scyllo*-inositol を生産する枯草菌の細胞工場株 KU303 の増殖と *scyllo*-inositol の産生量を検討することで、我々が開発した新しい培養法の性能を調べた。

3. 開発成果

KU303 株を 1.5L の培地に接種し、800rpm で対流攪拌しながら 37°C で 48 時間増殖させた。細胞増殖の指標となる 600nm の細胞密度、培地の pH、溶存酸素濃度、生成した *scyllo*-inositol 濃度を経時的に測定した。細胞密度は典型的な細菌増殖曲線を示し、対数増殖期は培養後 4~10 時間に相当し、その後 10~12 時間が遷移期、12 時間以降が定常期であった。培地の pH は対数増殖の終わりに一旦低下したが、その後上昇に転じた。この結果は、対数

増殖の後半に酸が生成され、その後、定常期への移行期にアミノ酸が分解されてアンモニアが出現したことを示している。興味深いことに、対数増殖期の終わりりと定常期の前半の2回、溶存酸素濃度がほぼゼロになるにつれて酸素消費量が増加する時期が現れた。前者は細胞増殖期と一致しているように見えた。後者は、 29.3 ± 1.0 g/L までの *scyllo*-inositol の生産が増加する時期と一致し、これは細胞増殖ではなく物質変換に伴う酸素消費が別途生じることを示していた。重要なことは、この *scyllo*-inositol の収量が以前振とうフラスコで得られた 27.6 g/L の最大収量に匹敵したことである。新しい培養法は従来の培養法に優るとも劣らぬ性能を発揮し、少なくともスパージャー曝気のために電力を消費するコンプレッサーを作動させる必要もなく、培養装置自体を簡素化できるので大幅なコスト削減が見込まれる。

4. 社会実装及び波及効果

以上より、曝気を行わない好気性微生物の新たな培養法の実現可能性が示された。この培養法は農芸化学分野のバイオ法による化学品生産や廃棄物処理など様々な分野に適応可能な技術である。また、エネルギー消費についても、環境負担についても「優しい」グリーンテクノロジーとなる。すなわち、本培養法によって好気性微生物の利用が促進されて一層活発に社会実装されれば、その波及効果が SDGs の達成に大きく貢献することが期待される。

【参考文献】

Ken-ichi Yoshida, Kyosuke Yokoyama, Ayşegül Öktem, Shu Ishikawa, Jan Maarten van Dijk, Masato Yotsuya, and Ryosuke Sato (2024) *Bacillus subtilis* grown in a “breathing” vessel without sparger aeration. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 88(11):1389-1393.

【講演者略歴】

吉田 健一（よしだ けんいち；京都大学博士（農学））
神戸大学大学院科学技術イノベーション研究科教授

1990年4月 福山大学工学部助手、1996～7年 フランス国立農業研究所博士研究員
2003年4月 福山大学生命工学部助教授
2004年4月 神戸大学農学部助教授
2005～7年 文科省学術調査官、2009年12月 神戸大学農学研究科教授
2016年4月 現職。現在に至る。

専門分野：応用微生物学、ゲノム微生物学、代謝生化学

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	日清オイリオグループ株式会社
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	Noster 株式会社
黄桜株式会社	ハウスウェルネスフーズ株式会社
月桂冠株式会社	ヒガシマル醤油株式会社
甲陽ケミカル株式会社	不二製油株式会社
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社	松谷化学工業株式会社
サントリーホールディングス株式会社	三井化学クロップ&ライフソリューション株式会社
住友化学株式会社	株式会社三ツワフロンテック
宝酒造株式会社	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
築野食品工業株式会社	株式会社ロッテ
東洋紡株式会社	和研薬株式会社

(50音順 敬称略)

○次回支部例会(第 535 回講演会)予定

開催日:2025 年 5 月 23 日(金)

開催校:京都府立大学

会場:京都府立京都学・歴彩館

(京都府立大学下鴨キャンパスに隣接)

講演申込締切:2025 年 5 月 2 日(金)

講演要旨締切:2025 年 5 月 9 日(金)

講演会参加登録締切:2025 年 5 月 16 日(金)

〒606-8522

京都市左京区下鴨半木町 1-5

辻本 善之(開催校庶務幹事)

Tel:075-703-5669

E-mail: yoshi_t@kpu.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 2025 年 1 月 31 日 (金)

日本農芸化学会関西支部ホームページ: <http://kansai.jsbba.or.jp/>