

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部 関西支部

2015 年度 日本農芸化学会中部·関西支部合同大会

(中部支部第 174 回例会)(関西支部第 491 回講演会)

講演要旨集

平成 27 年 9 月 19 日(土)·20 日(日) 会場:富山県立大学

主催: 公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部および関西支部シンポジウム共催: JST-ERATO 浅野酵素活性分子プロジェクト

後援: 公益財団法人 富山県ひとづくり財団

2015 年度日本農芸化学会中部・関西支部合同大会 (中部支部第 174 回例会)(関西支部第 491 回講演会)

第1日目 9月19日(土)

13:00-17:25 シンポジウムおよび受賞講演 会場: 2 階 大講義室

13:00-13:10 開会の挨拶

13:10-15:25 シンポジウム『酵素活性分子研究の新展開-タンパク質のフォールディ

ング研究と酵素機能の利用-』

基調講演 「蛋白質凝集の原理的理解をめざして」

後藤 祐児(大阪大学蛋白質研究所)

「分子シャペロンはいかにしてタンパク質をフォールディングするのか?」

元島 史尋(富山県立大学、JST, ERATO)

「Development of Multi-Step Syntheses of Industrial Chemicals with Integrated Biocatalytic Key Steps」

Harald Gröger (Bielefeld University)

From Mechanisms to Applications of Two-component

Flavin-Dependent monooxygenases J

Pimchai Chaiyen (Mahidol University)

15:25-15:40 休憩

15:40-17:25 受賞講演

農芸化学技術賞「交流高電界殺菌法を利用した果汁製品の製造」

ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社

農芸化学技術賞「ビール泡品質向上への一貫した取組み」

サッポロビール株式会社

日本農芸化学会賞 「細胞表層活用の基盤開拓とその展開」

植田充美(京都大学大学院農学研究科)

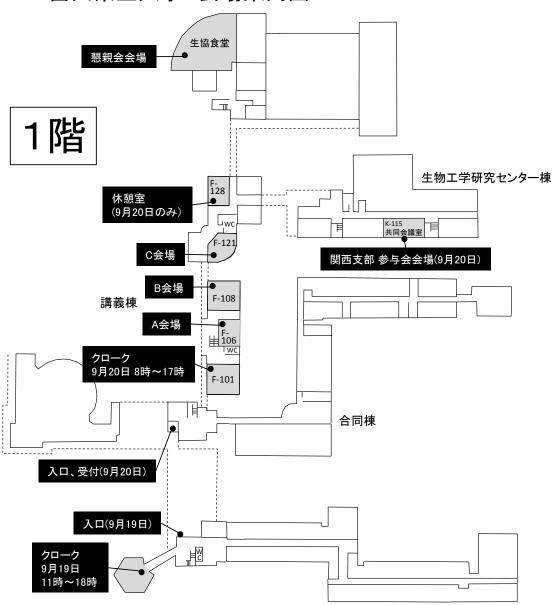
17:50-19:50 懇親会 会場: 生協食堂

第2日目 9月20日(日)

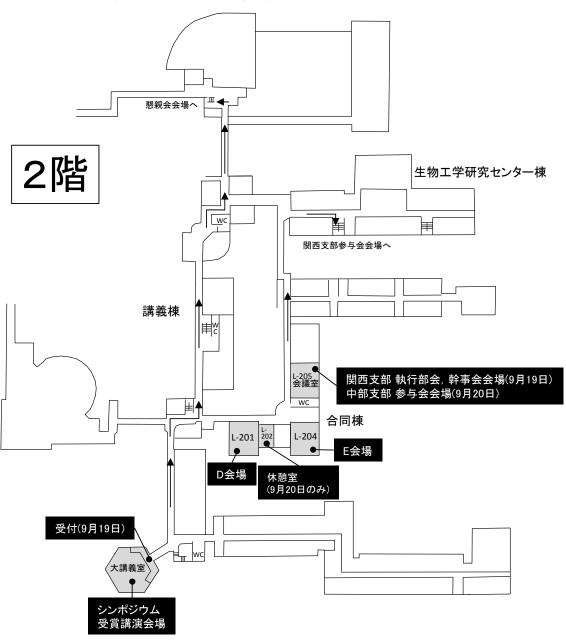
| 9:00-11:56 | 一般講演(口頭発表) | 会場: 講義棟1階および |
|-------------|------------|------------------------------------|
| | | 合同棟2階の各講義室 |
| 12:00-13:00 | 中部支部参与会 | 会場: 合同棟2階 L-205 会議室 |
| 12:00-13:00 | 関西支部参与会 | 会場: 生物工学研究センター棟 1 階 K-115 共同会議室 |
| 13:30-15:40 | 一般講演(口頭発表) | 会場: 講義棟 1 階および 合同棟 2 階の各講義室 |



富山県立大学 会場案内図



富山県立大学 会場案内図



富山県立大学周辺 ランチマップ



富山県立大学生協は9月19日、20日は営業しておりません。あらかじめ昼食をご用意されるか、周辺のコンビニや飲食店をご利用ください。

一般講演発表者の方へのお願い

- ・大会実行委員会で Windows ノート PC(Windows 7; PowerPoint 2010)を用意します(**自身のノート** PC でのご発表はできませんので、ご注意ください)。 ご発表に使用される PowerPoint ファイルは USB メモリーに保存してご持参ください。 また、予備として PDF に変換したファイルも作成し、同じ USB メモリーに保存してください。
- ・一般講演発表は、ノート PC 上の「Microsoft PowerPoint」のスライドを液晶プロジェクターによって 投影して行います。
- ・発表当日に、受付横の「講演者・座長デスク」にて受付をお済ませください。
- ・講演時間は12分(発表9分、討論2分30秒、交代時間30秒)です。円滑な進行のために時間厳守でお願いします。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、討論開始 (9 分経過時)、3 鈴: 討論終了 (11 分 30 秒経過時)
- ・以下の手順でノート PC の USB ハブに発表ファイルを含む USB メモリーを接続してください。
 - (1) 自身の発表の前(10 分間の接続時間内)に、各会場前方の「PC 接続席」にお越しください。
 - (2) PC に接続された USB ハブに、発表ファイルを含む USB メモリーを接続してください。
 - (3) PowerPoint ファイルを開いて正しく映写されるかを確認してください。
 - (4) 使用しているフォントなどから PowerPoint ファイルに問題があった場合は、PDFファイルを開いて確認してください。その場合の発表は PDF ファイルで行ってください。
- ・スライド操作は発表者が行ってください。
- ・音声出力や動画には対応しておりません。

プログラム

シンポジウムおよび受賞講演(第1日目、13:00-17:25)会場:2階 大講義室

13:00-13:10 開会の挨拶

シンポジウム『酵素活性分子研究の新展開-タンパク質のフォールディング研究と酵素機能の利用-』(13:10-15:25)

座長 浅野泰久(富山県立大学)

13:10-13:55 **PL01** 「蛋白質凝集の原理的理解をめざして」 後藤 祐児(大阪大学蛋白質研究所)

座長 松井大亮 (富山県立大学、JST, ERATO)

13:55-14:25 **IL01** 「分子シャペロンはいかにしてタンパク質をフォールディングするのか?」

元島 史尋(富山県立大学、JST, ERATO)

14:25-14:55 IL02 Development of Multi-Step Syntheses of Industrial Chemicals with

Integrated Biocatalytic Key Steps J Harald Gröger (Bielefeld University)

14:55-15:25 **IL03** From Mechanisms to Applications of Two-component

Flavin-Dependent monooxygenases J Pimchai Chaiyen (Mahidol University)

15:25-15:40 休憩

受賞講演(15:40-17:25)

農芸化学技術賞

座長 堀尾文彦 (名古屋大学)

15:40-16:10 **AW01** 「交流高電界殺菌法を利用した果汁製品の製造」 ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社

座長 山口庄太郎 (天野エンザイム(株))

16:10-16:40 **AW02** 「ビール泡品質向上への一貫した取組み」 サッポロビール株式会社

日本農芸化学会賞

座長 安達修二(京都大学)

16:40-17:25 **AW03** 「細胞表層活用の基盤開拓とその展開」 植田充美(京都大学大学院農学研究科)

懇親会(第1日目、17:50-19:50) 会場: 生協食堂

一般講演(第2日目、9:00-11:56, 13:30-15:40) 会場:講義棟1階および 講演時間: 12分(発表9分、討論2分30秒、交代時間30秒) 合同棟2階の各講義室

A 会場 有機化学・天然物化学 (講義棟 1 階、F-106 講義室)

A-a02, A-a03, A-a04, A-a05 発表者の接続時間 9:02~9:12

| 9:12 | A-a02 | 基質ペプチド配列に基づくアザ−デカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の 合成と阻害活性評価 |
|-------|-----------|--|
| | | 〇服部恭尚¹、嶋本康広¹、小林数也¹、照屋健太²、三城明³、中川敦史⁴、 山下栄樹⁴、赤路健一¹ |
| 0.04 | A−a03 | ¹京都薬科大学、²東北大学医、³(株)プロテインウェーブ、⁴大阪大学蛋白研 エンドファイトが産生するペラミンの合成研究 |
| 9:24 | A-aus | 〇山本雄太、西川俊夫 |
| 0.26 | A−a04 | 名大院生命農 レスベラトロール誘導体の合成とそのラジカル捕捉活性ならびに放射線防護 |
| 9:36 | A-au4 | レスペットロール誘導体の合成とてのプシカル捕捉冶性ならいに放射線的設 活性評価 |
| | | 〇卯津羅早織¹、園田素啓¹、谷森紳治¹、関根絵美子²、中西郁夫²¹阪府大院生命環境、²放医研 |
| 9:48 | A−a05 | プラディミシン A はマンノースの環内酸素原子を認識する |
| | | 〇渡邉泰典¹、中川 優¹.²、五十嵐康弘³、伊藤幸成²、小鹿 一¹ ¹名大院·生命農、²理研、³富山県大·生工 |
| | | |
| | A-a06, A- | a07, A-a08, A-a09, A-a10 発表者の接続時間 10:00~10:10 |
| 10:10 | A−a06 | 抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析 |
| | | ○新倉 春香¹、丸山 千登勢¹、泉川 美穂²、石川 淳³、池田 治生⁴、 ※富、田⁵、窓駅 末 1 1 |
| | | 新家 一男 ⁵ 、濱野 吉十 ¹ 「福井県大・生物資源、2 JBIC、3国立感染研、4 北里大・北里生命研、5産総研 |
| 10:22 | A-a07 | エゾムラサキツツジが生産する天然物ダウリクロメン酸の生合成研究 |
| | | 〇飯島未宇¹、田浦太志¹、兼目裕充²、高橋宏暢²、豊田正夫²、李貞範¹、 黒崎文也¹、浅川義範² |
| | | 「富大院薬、 ² 徳島文理大薬 |
| 10:34 | A-a08 | セレン含有フコース誘導体の合成およびフコース結合蛋白質のX線結晶構造 |
| | | 解析への応用 〇島袋隼平 ^{1,2} 、牧尾尚能 ³ 、鈴木達哉 ^{1,2} 、安藤弘宗 ^{1,2} 、今村彰宏 ¹ ,石田秀治 ¹ 、 |
| | | 加藤龍一 3, 木曽真 1.2 |
| 10.46 | A00 | ¹岐阜大・応用生物、²京都大・iCeMS、³高エネ機構・放射光 ワックス組成から見たヘルヘフフジヤスデと近縁同所種の種間関係 |
| 10:46 | A−a09 | ○ 京の 日本 「 |
| | | 「富山県大工 ERATO、2熊本大・教育 |
| 10:58 | A-a10 | Chemical study on antifungal substances produced by endophytic fungi O Enkhee PUREV, Hitomi ISOBE, Daigo TAKEMOTO, Kazuhito KAWAKITA, |
| | | and Makoto OJIKA |
| | | Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University |

| 11:20 | A−a11 | Streptomyces が生産する anthracimycin の生合成に関する研究 〇春成円十朗 ¹、小牧久幸 ²、五十嵐康弘¹ ¹富山県大工、²NBRC |
|-------|-------|---|
| 11:32 | A−a12 | Pseudorobillarda 属糸状菌の生産する二次代謝産物の構造研究 〇下山猛夫 ¹、三由美都季 ¹、Olivier Laurence²、五十嵐康弘 ¹ |
| 11:44 | A-a13 | ¹ 富山県立大、 ² Mycosphere サソリ毒素ペプチド LaIT2 のジスルフィド架橋様式の決定 |

11:44 A-a13 サソリ毒素ペプチド LaIT2 のジスルフィド架橋様式の決定 安藤亮、○宮下正弘、中川好秋、宮川恒 京大院農

A-p01, A-p02, A-p03, A-p04, A-p05 発表者の接続時間 13:20~13:30

| 13:30 | A-p01 | Darzens 反応を利用した天然ラクタム化合物群の全合成 〇水谷将馬¹、谷口 透²、小森健太¹、門出健次²、倉持幸司¹、椿 一典¹ ¹京府大院生命環境、²北大院先端生命 |
|-------|-------|--|
| 13:42 | A-p02 | Inagami-Tamura EDLF(Endogenous Digitalis-Like Factor)の合成化学的 研究 |
| | | 〇橋本圭古、池田 藍、西川俊夫、中崎敦夫 名大院生命農 |
| 13:54 | A-p03 | SOFAT-HMQC NMR を用いた非カテコール型フラボノイドによるアミロイド β |
| | | の凝集阻害機構の解析 ○花木瑞穂¹、村上一馬¹、赤木謙一²、入江一浩¹ ¹京大院農、²医薬基盤研 |
| 14:06 | A-p04 | ^{京入院長、} |
| | | 〇山田優作¹、土屋諒²、廣住操俊¹、佐藤浩平¹、鳴海哲夫¹、戸田三津夫¹、 大西利幸²³、間瀬暢之¹³、渡辺修治¹⁴ |
| | | 静岡大·1工、2農、3グリーン研、4創造科技院 |
| 14:18 | A-p05 | 7-Oxoorobanchol の光学活性体合成に関する研究 |
| | | 新子大樹、田中政志、久世雅樹、〇滝川浩郷 神戸大院農 |

A-p06, A-p07, A-p08 発表者の接続時間 14:30~14:40

| 14:40 | A−p06 | Juglomycin 類の糸統的合成法の開発 |
|-------|-------|---|
| | | 〇吉岡快、加茂翔伍、倉持幸司、椿一典 |
| | | 京府大院生命環境 |
| 14:52 | A-p07 | 立体選択的 oxypalladation を用いた decytospolide A, B および 3-epi 体の |
| | | 合成研究 |
| | | 〇黒米 雄次 ¹ 、服部恭尚 ² 、真壁秀文 ^{1,3} |
| | | ¹信大院総合工、²京薬大創薬化、³信大院農 |
| 15:04 | A-p08 | 大豆イソフラボン代謝産物 equol のエナンチオ選択的合成研究 |
| | | 〇木下麻美、齋藤雄輔、園田素啓、谷森紳治 |
| | | 阪府大院生命環境 |
| | | |

B 会場 酵素・タンパク質 (講義棟 1 階、F-108 講義室)

| | B−a01, B- | -a02, B-a03, B-a04, B-a05 発表者の接続時間 8:50~9:00 |
|-------|--------------|---|
| 9:00 | B-a01 | 放線菌由来 CYP105A1 の三重変異体(R73A/R84A/M239X)の大腸菌での 発現とビタミン D2 と 7-メトキシクマリンに対する酵素活性 |
| | | 光境とにアミン D2 と 7 -アドイング 3 グロスタ の 日本 2 、 3 で の た久間 3 、 4 で の たん の に の に の に の に の に の に の に の に の に の |
| | | 真野寛生 ² 、太田美穂 ⁴ 、生城真一 ² 、保川清 ¹ 、榊利之 ² |
| | | 1.京大院·農、².富山県大·工、³.理研播磨、⁴.相愛大·人間 |
| 9:12 | B-a02 | 活性型ビタミン D や医薬品代謝物を生産する CYP105A1 の機能解析 |
| | | 〇余語祐哉 ¹、安田佳織 ¹、滝田禎亮 ²、杉本宏 ³、城宜嗣 ³、真野寛生 ¹、 |
| | | 林恵子¹、鎌倉昌樹¹、太田美穂⁴、生城真一¹、保川清²、榊利之¹ |
| | | ¹富山県大·工、²京大院·農、³理研播磨、⁴相愛大·人間発達 |
| 9:24 | B-a03 | Expression of soluble manganese peroxidase in chaperons over-expressing <i>E.</i> |
| | | coli and in vitro maturation by ATP-dependent chaperons releasing OAlfi Almasul, Bo Zhu, Jasmina Damnjanovic, Takaaki Kojima, Yugo Iwasaki, |
| | | OAm Almasul, во Znu, Jasmina Damnjanovic, Такаакі Којіта, тugo Iwasaki, Hideo Nakano |
| | | 名大院生命農 |
| 9:36 | B-a04 | Substrate specificity of L-amino acid oxidase/monooxygenase from |
| | | Pseudomonas sp. AIU 813 |
| | | ODuangthip Trisrivirat ¹ , Daisuke Matsui ² , Yasuhisa Asano ² |
| | | and Pimchai Chaiyen ¹ |
| | | ¹ Mahidol University, ² Toyama Prefectural University |
| 9:48 | B-a05 | L-アミノ酸オキシダーゼ/モノオキシゲナーゼの変異導入による機能改変 |
| | | 〇松井大亮 ^{1,2} 、林到炫 ³ 、伏信進矢 ³ 、礒部公安 ^{1,2} 、浅野泰久 ^{1,2} 「富山県大工・生工研セ、 ² JST ERATO、 ³ 東大院農 |
| | | 由山东八工 工工研记、UOT LINATO、宋八机辰 |
| | B−a06, B- | -a07, B-a08, B-a09, B-a10 発表者の接続時間 10:00~10:10 |
| | | |
| 10:10 | B−a06 | 金属要求性酵素の金属置換による触媒機能の改変検討 |
| | | 日比 慎、〇間中千尋、小園祥子、高橋里美、小川 順 京大院農 |
| 10:22 | B-a07 | ホス内成版 Biochemical characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase |
| 10.22 | D 40, | (SSADH) from <i>Acinetobacter baumannii</i> |
| | | OJittima Phonbuppha ¹ , Ruchanok Tinikul ² , Somchart Maenpuen ³ , |
| | | Kittisak Thotsaporn ⁴ , and Pimchai Chaiyen ¹ |
| | | ¹ Mahidol University, ² Mahidol University, ³ Burapha University, |
| | | ⁴ Chulalongkorn University |
| 10:34 | B−a08 | Purification and Characterization of Xylitol Dehydrogenase with Broad |
| | | Substrate Specificity from Newly Isolated Pentose Fermenting Yeast Meyerozyma caribbica |
| | | OWiphat Sukpipat ¹ , Poonsuk Prasertsan ¹ , Hidenobu Komeda ² |
| | | and Yasuhisa Asano ² |
| | | 1 |

〇日比野佑哉、河井翔太、北隅優希、白井理、加納健司

¹Prince of Songkla University, ²Toyama Prefectural University

フルクトース脱水素酵素の電子移動経路に関する

タンパク質工学/電気化学的研究

京大院農

10:46

B-a09

10:58 B-a10 テトラデカノイルCoAからテトラデカナールを生成する アシルCoAデヒドロゲナーゼに関する研究

> 〇藤井 宏祐¹、中谷 友樹¹、伊藤 正和²、村松 正善²、岸野 重信¹、 小川 順¹

¹京大院農・応用生命、²トヨタ自動車

B-a11, B-a12, B-a13 発表者の接続時間 11:10~11:20

11:20 B-a11 糸状菌 *Pythium sulcatum* 由来ω3 不飽和化酵素遺伝子の機能解析および 油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 における過剰発現

〇浅井大貴 1、中辻諒平 1、安藤晃規 1.3、櫻谷英治 2、小川順 1.3

1京大院農、2徳島大院ソシオ、3京大生理化学ユニット

11:32 B-a12 Flavobacterium psychrophilum 由来コラゲナーゼの大腸菌での発現と 性状解析

> 〇森真璃子¹、中山仁志²、田中啓友³、服部俊治³、滝田禎亮¹、⁴、保川清¹、⁴ 京大農、²和歌山県水産試験場、³株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所、 ⁴京大院農

11:44 B-a13 好熱性放線菌由来クチナーゼの表面アミノ酸残基の選択的改変による 高活性変異体の取得

> 〇亀谷貴仁, 大門結花, 伊藤貴文, 日ビ隆雄 福井県立大学·生物資源学部

B-p01, B-p02, B-p03, B-p04, B-p05 発表者の接続時間 13:20~13:30

13:30 B-p01 アシドロコンポストから単離した新規好熱性細菌 B157 株が産生する ホスホリパーゼに関する研究

〇古谷洋人¹、石原大祐¹、辻本善之¹、鶴岡直樹²、茂里康²、渡部邦彦¹ 京府大院生命環境²産総研

13:42 B-p02 医療用消化酵素製剤の性質比較に関する研究

〇黒田学¹、山口庄太郎¹、洪繁²

1天野エンザイム(株)岐阜研究所、2慶應義塾大学医

13:54 B-p03 糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH family に属する β-マンナナーゼ Man134A の発見とその生理学的役割の解明

〇酒井 杏匠 ¹, 望月 麻衣 ¹, 山田 みゆき ¹, 金子 優平 ¹, 石原 紗彩耶 ¹, 新沢 祐大 ¹, 嶺澤 美帆 ¹, 木本 紗蘭 ¹, 神藤 定生 ², 志水 元亨 ¹, 小林 哲夫 ³, 加藤 雅士 ¹

1 名城大•農, 2 名城大•理工, 3 名大院•生命農

14:06 B-p04 Directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol

OJasmina Damnjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Michiko Muraki, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagova University

14:18 B-p05 分岐型プレニルニリン酸を与えるメタン生成古細菌由来酵素の研究 〇邊見 久、小川拓哉、江見晃一、吉村 徹 名大院生命農

| B-p06, B-p07, B-p08, B-p09, B-p10 発表者 | の接続時間 14:30~ | 14:40 |
|---------------------------------------|--------------|-------|
|---------------------------------------|--------------|-------|

| 14:40 | B-p06 | 合成アルドキシムを基質とするアルドキシム脱水酵素反応の エナンチオ選択性の解明 〇大池敬子 ¹ 、Richard Metzner ^{1,2} 、Harald Gröger* ³ 、浅野泰久* ^{1,2} ¹ 富山県大工・生工研セ、 ² JST ERATO、 ³ Bielefeld University |
|-------|-------|---|
| 14:52 | B-p07 | 1-ホスファチジル-β-D-グルコースの酵素合成 〇井上ありさ、安立昌篤、中野秀雄、Jasmina Damnjanovic、岩崎雄吾 名大院生命農 |
| 15:04 | B-p08 | ビフィズス菌由来 1,2-α-L-fucosidase の高効率フコシンターゼ化-ヒトミルクオリゴ糖の酵素合成への応用- 〇杉山友太 ¹、加藤紀彦 ¹、後藤愛那 ¹、本多裕司 ¹、吉田永吏奈 ¹、栗原新 ¹、北岡本光 ²、山本憲二 ¹、片山高嶺 ¹.3 ¹ 石川県大、² 農研機構・食総研、3 京大院生命 |
| 15:16 | B-p09 | 遺伝子改変酵母を用いたビタミン E 代謝物のグルクロン酸抱合化反応の解析 〇高平梨可、岩本明日夏、西川美宇、安田佳織、鎌倉昌樹、榊利之、 生城真一 富山県大・エ・生物工 |
| 15:28 | B-p10 | グリコサミノグリカン輸送に関わる連鎖桿菌由来基質結合タンパク質の X線結晶構造解析 〇老木紗予子¹、丸山如江²、三上文三¹、村田幸作²、橋本 渉¹ ¹京大院・農、²摂大・理工 |

C会場 食品·植物 (講義棟1階、F-121講義室)

| C-a02, C-a03, C-a04, C-a05 | 発表者の接続時間 | 9:02~9:12 |
|----------------------------|----------|-----------|
| | | |

| 9:12 | C-a02 | 植物根に由来する土壌微生物増殖刺激物質に関する研究 〇樋口侑夏, 西川博崇, 小川舞, 村瀬潤, 近藤竜彦, 小鹿一 名大院生命農 |
|------|-------|---|
| 9:24 | C-a03 | Brevibacillus を用いた植物ペプチドホルモンの効率的生産 〇能瀬遥、根岸佑香里、近藤竜彦、小鹿一 名大院生命農 |
| 9:36 | C-a04 | イネの種子発芽におけるグルタレドキシン OsGRXC2;2 の機能解析 〇中村淳一¹、足立聖佳¹、増村威宏¹²、佐藤茂¹³、森田重人¹² ¹京府大生命環境、²京都農技セ生資セ、³龍谷大農 |
| 9:48 | C-a05 | 2-ヘキセナールの生成に関わる酵素遺伝子の同定とトマトの香気成分の 改変 〇國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕 神大院農 |

C-a06, C-a07, C-a08, C-a09, C-a10 発表者の接続時間 10:00~10:10

| 10:10 | C-a06 | タケ懸濁培養細胞におけるヒドロキシ桂皮酸プトレッシンアミド合成酵素の |
|-------|-------|------------------------------------|
| | | 解析 |
| | | 〇青島和音 1、野村泰治 1、荻田信二郎 1.2、加藤康夫 1 |
| | | 1富山県大・生工研セ、2県立広島大・生命科学 |
| 10:22 | C-a07 | イネにおける新規インドール-3-酪酸代謝物の探索および定量 |

| | | 〇西野雄人、「宮下正弘」、宮川恒「 |
|-------|-----------|---|
| 10:34 | C−a08 | 「京大院農 ジベレリン代謝酵素の多量体構造形成と酵素活性との相関 |
| 10.04 | O 400 | ○ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ |
| | | 1名大·生物機能セ、²京大院・農 |
| 10:46 | C-a09 | グリシドール脂肪酸エステル関連化学物質の暴露摂取源の解明 |
| | | 〇稲垣僚, 平井央子, 島村裕子, 増田修一 |
| 10.50 | 0 10 | 静岡県大院・食栄環院 |
| 10:58 | C-a10 | 冷凍過程におけるマヨネーズの不安定化要因に関する一考察 ○宮川弥生、中川究也、安達修二 |
| | | 京大院農 |
| | | |
| | C-a11, C- | -a12, C-a13 発表者の接続時間 11:10~11:20 |
| 11:20 | C-a11 | 食品 O/W エマルションの水相の凍結状態の評価 |
| | | 〇香月和敬, 宮川弥生, 中川究也, 安達修二 |
| | | 京大院農 |
| 11:32 | C−a12 | 加工デンプンの添加が小麦粉麺内部の水分分布に及ぼす影響 |
| | | 〇福澤聡真、中川究也、安達修二 京大院農 |
| 11:44 | C-a13 | ボスが展 食中毒菌の食肉内部への侵入や病原性因子発現に影響を与える因子の |
| | | 解明 |
| | | 〇江川瑞規 ',島村裕子 ',土屋祐介 ',篠田和代 ²,青野博志 ²,増田修一 ' |
| | | 「静岡県大・食品栄養科学, ² アオノフレッシュミート(株) |
| | C-p01, C- | -p02, C-p03 発表者の接続時間 13:20~13:30 |
| | | |
| 13:30 | C−p01 | 血清アルブミンに自然抗体リガンド機能を付与するポリフェノールの探索 |
| | | 〇古橋麻衣¹、畑佐行紀¹、近澤未歩¹、柴田貴広¹、赤川貢²、内田浩二¹ ¹名大院生命農、²大阪府立大生命環境 |
| 13:42 | C-p02 | カテキンのリジルオキシダーゼ活性による自然抗体リガンド生成に関する |
| 10.12 | 0 pu2 | 研究 |
| | | 〇畑佐行紀 ¹、古橋麻衣 ¹、近澤未歩 ¹、柴田貴広 ¹、赤川貢 ²、立花宏文 ³、 |
| | | 内田浩二 1 |
| | | 1名大院生命農、 ² 大阪府大院生命環境、 ³ 九大院農 |
| 13:54 | C-p03 | 紅茶、ウーロン茶製造工程における配糖体の量的変動とその安定性 ○松尾哲明¹、水谷健太²、崔継来³6、大西利幸⁴5、佐藤浩平¹、間瀬暢之¹5、 |
| | | ○松尾召明、小谷健众、崔極木 、人四利辛 、佐藤后平 、间积畅之 、 鳴海哲夫 ¹ 、戸田三津夫 ¹ 、竹本裕之 ⁵ 、渡辺修治 ^{1,6} |
| | | 1静岡大学院工、 ² 静岡大学工、 ³ 西南大学茶学、 ⁴ 静岡大学院農、 |
| | | 5グリーン科学技術研究所、6創造科学技術大学院 |
| | | |

D 会場 微生物·環境科学·生物化学工学 (合同棟 2 階、L-201 講義室)

| D A | 9) | ,从光行于 上1916于上于 (日间14.2 阳、C 201 研我主) |
|-------|-----------|---|
| | D-a03, D- | -a04, D-a05 発表者の接続時間 9:14~9:24 |
| | | |
| 9:24 | D-a03 | 白色腐朽菌の木材分解における芳香環代謝酵素系の役割 |
| | | 〇松田裕大 ¹、小山元規 ¹、森智夫 ¹、河岸洋和 ¹.².3 、平井浩文 ¹.² ¹静大院・農、²静大・グリーン研、³静大創造院 |
| 9:36 | D-a04 | 一一時へに・長、神人・グリーン研、神人創垣に 古生子嚢菌類 Saitoella complicata の RNA マップ解析およびヌクレオソーム |
| 3.00 | D 404 | ロエー製品類 GaitGella Complicata Of NNA マップ解析 |
| | | 山内健太 ¹、近藤伸二 ²、浜本牧子 ³、鈴木穣 ⁴、〇西田洋巳 ¹ |
| | | 「富山県大、 ² 極地研、 ³ 明治大、 ⁴ 東京大 |
| 9:48 | D−a05 | 未培養好熱性アーキア Caldiarchaeum subterraneum で発見された |
| | | ユビキチン様タンパク質の機能解明 |
| | | 〇橘高瑞奈¹、金井 保²、藤本理夏子²、徳原将弘²、安枝裕貴²、清中茂樹²、 |
| | | 石野良純 ⁴ 、高木善弘 ³ 、高見英人 ³ 、浜地格 ² 、高井 研 ³ 、森 泰生 ^{1,2} 、 |
| | | 布浦拓郎³、跡見晴幸² ¹京大院地球環境.²京大院工、³海洋研究開発機構.⁴九大院農 |
| | | 宋人院地环境境,宋人院工、 海洋研九朋先候件, 九人院辰 |
| | D-a06 D- | -a07, D-a08, D-a09, D-a10 発表者の接続時間 10:00~10:10 |
| | D 400, D | 207, 10 200, 10 200, 10 210 元弘 日の [文明] 10.00 10.10 |
| 10:10 | D-a06 | ヒト腸内細菌最優勢種のポリアミン輸送能・合成能の網羅的解析 |
| | | 〇栗原 新¹, 奈良 未沙希¹, 白石 友香¹, 杉山 友太¹, 片山 高嶺 ¹² |
| | | 「石川県大・腸内細菌、 ² 京都大院・生命・統合生命 |
| 10:22 | D-a07 | 大腸菌発現系を用いた組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲンの生産: |
| | | 通気培養槽と自動発現誘導による高収量化 |
| | | 〇柴田直哉 ¹、山下晋司 ²、朴明宣 ³、大野敏 ³、横川隆志 ³、西川一八 ³、 |
| | | 鈴木文昭 ⁴ 、中川寅 ⁴ 、海老原章郎 ⁴ |
| 10:34 | D-a08 | ¹ 岐阜大院応生、 ² 岐阜大連合農学、 ³ 岐阜大院工, ⁴ 岐阜大応生 Shewanella—電極接合系の電子伝達経路に関する研究 |
| 10.34 | D-a00 | ○竹内良輔、北隅優希、白井 理、日比 慎、小川 順、加納健司 |
| | | 京大院農 |
| 10:46 | D-a09 | 磁性細菌に特異的な細胞骨格蛋白質 MamK によるマグネトソーム細胞内 |
| | | 配置調節 |
| | | 〇田岡 東 ^{1,2} 、清河 文子 ³ 、上杉 知佳 ³ 、福森 義宏 ¹ |
| | | 1金沢大理工自然システム、2金沢大理工バイオ AFM、3金沢大院自然研 |
| 10:58 | D-a10 | 撹拌槽内における機能遺伝子伝播条件の最適化 |
| | | 〇中澤駿介¹、福田洸平²、金原和秀¹²新谷政己¹² |
| | | ¹ 静岡大院工 ² 静岡大創造科技大院 |
| | D-a11 D | -a12, D-a13 発表者の接続時間 11:10~11:20 |
| | D-all, D | -a12, D-a13 光衣有の接続時间 11:10~11:20 |
| 11:20 | D-a11 | 青枯病菌のクオラムセンシングシグナル分子は |
| | | (<i>R</i>)-methyl 3-hydroxymyristate である |
| | | 〇甲斐建次 ¹、大西秀幸 ¹、嶋谷美香 ¹、石川詩歩 ²、森 友花 ²、木場章範 ²、 |
| | | 大西浩平 3、 |

- 14 -

青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子の構造活性相関とプローブ化の

¹阪府大院生命環境、²高知大農、³高知大総研セ

11:32 **D-a12**

検討

〇嶋谷美香、大西秀幸、甲斐建次 阪府大院生命環境

11:44 D-a13 DMoR 法による単糖の比色分析と酵素のプレートアッセイへの応用

〇高桑正寛, 伊藤貴文, 日竎隆雄, 片野肇 福井県大院生物資源

E 会場 動物 (合同棟 2 階、L-204 講義室)

E-a01, E-a02, E-a03, E-a04, E-a05 発表者の接続時間 8:50~9:00

9:00 モデル生物としてメダカのタンパク質架橋化酵素ファミリーとその機能に E-a01 関する解析 高田佑紀 1、奥谷冬穂 1、木下政人 2、橋本寿史 3、辰川英樹 1、〇人見清隆 1 1名大院創薬科学、2京大院農、3名大生物機能セ 9:12 表皮型タンパク質架橋化酵素に対する高反応性基質ペプチドの活用法 E-a02 〇山根美樹、椙村佳代子、川崎寛子、辰川英樹、人見清隆 名大院創薬科学 腎臓の線維化進行に伴うタンパク質架橋化修飾の役割 9:24 E-a03 〇大津里紗、谷優治、脇田峻資、辰川英樹、人見清隆 名大院創薬科学 骨格筋のエネルギー代謝制御因子 PGC-1 α 9:36 E-a04 〇亀井康富¹、三浦進司² 1京都府立大生命環境、2静岡県立大食品栄養 9:48 E-a05 HepG2 細胞におけるアントシアニンの LDL 受容体活性化 〇岡田 雄大, 三島 周平, 島田 昌也, 長岡 利

E-a06, E-a07, E-a08, E-a09, E-a10 発表者の接続時間 10:00~10:10

岐阜大学, 応用生物科学部

HDL(善玉コレステロール)産生における ABCA1 の C 末端領域の機能解析 10:10 E-a06 〇岡本雄介 1、永田紅 2、笠井倫志 3、楠見明弘 23、植田和光 1.2 ¹京大院農、²京大 iCeMS、³京大再生研 10:22 E-a07 NPC1L1 に対する新規化合物 fomiroid A の構造特異的な結合による コレステロール取込み阻害作用 〇千場 智尋 1.2、櫻田 剛史 1、渡邊 理恵 1、山口 宏二 1、木村 泰久 3、 木岡 紀幸 3、河岸 洋和 4.5.6、松尾 道憲 7、植田和光 2.3 ¹ファンケル総研、²京大・iCeMS、³京大院・農、⁴静大院・創造、 5静大・グリーン研、6静大・農、7京女大・家政 10:34 福井県産エゴマ油および α-リノレン酸の肝細胞脂肪蓄積抑制作用の検討 E-a08 〇高橋正和 1、古矢康久 1、久保義人 2、小林恭一 2、村上 茂 1 1福井県大生物資源、2福井県食品加工研 Alu 配列の一部がエクソン化されたタンパク質と ALG-2 の相互作用解析 10:46 E-a09 〇小島亨介、松尾里奈、張維、鮑宣白、高橋健、高原照直、柴田秀樹、 牧正敏 名大院生命農 E-a10 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 と相互作用する MISSL の初期小胞輸送に 10.58

おける機能解析

〇井上国子、新居裕美香、高原照直、柴田秀樹、牧正敏 名大院生命農

| | E-a11, E- | a12, E-a13 発表者の接続時間 11:10~11:20 |
|-------|-----------|---|
| 11:20 | E-a11 | カルシウム結合蛋白質 ALG-2 による NFAT1 の転写活性制御 〇張維、鮑宣伯、高原照直、柴田秀樹、牧正敏 |
| 11:32 | E-a12 | 名大院生命農・応用分子生命科 小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける ALG−2 標的タンパク質の 複合体形成 |
| | - 40 | 〇犬飼隆太、鈴木千尋、京卓志、高原照直、牧正敏、柴田秀樹 名大院生命農・応用分子生命科 |
| 11:44 | E−a13 | ローヤルゼリー由来ペプチドが誘導するアポトーシスと金属イオンの関係 〇竹内まい子¹,大島和也¹,松岡拓磨²,川島拓司²,中村正²,北口公司¹, 矢部富雄¹ |
| | | 1岐阜大院・応生科・応用生命,2(株)秋田屋本店 |
| | E-p01, E- | p02, E-p03, E-p04, E-p05 発表者の接続時間 13:20~13:30 |
| 13:30 | E−p01 | 強い骨密度上昇作用を有するビタミンD誘導体の代謝および作用メカニズム の解明 |
| | | 〇遠山枝李¹、安田佳織¹、高野真史²、橘高敦史²、鎌倉昌樹¹、生城真一¹、 榊利之¹ ¹富山県大工、²帝京大薬 |
| 13:42 | E-p02 | CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用に関する研究 |
| | | 〇青木健悟¹、西川美宇¹、高松将士¹、田中一丸¹、安田佳織¹、中川公恵²、 津川尚子³、岡野登志夫²、生城真一¹、榊利之¹ ¹富山県大·工、²神戸薬大·薬、³樟蔭女子大·健康 |
| 13:54 | E-p03 | 網羅的解析によるマウスの食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の探索 〇鈴木京 ¹ 、小林美里 ¹ 、大野民生 ² 、村井篤嗣 ¹ 、堀尾文彦 ¹ |
| 14:06 | E-p04 | 「名大院生命農、 ² 名大院医学系 マウスの体重増加に及ぼす去勢と高脂肪食摂取のクロストーク ○花岡諒 「、原田直樹 「、乾博 ² 、山地亮一 「 |
| 14:18 | E-p05 | 「大阪府大院・生命環境、 ² 大阪府大院・栄養 唾液タンパク質の性差とテストステロンの影響について ○橋本未来「、原田直樹」、乾博 ² 、山地亮一「 |
| | | ○橋本未未 、原田直樹 、乾厚 、田地元一 「大阪府大院・生命環境、 ² 大阪府大・栄養 |
| | E-p06, E- | p07, E-p08, E-p09, E-p10 発表者の接続時間 14:30~14:40 |
| 14:40 | E-p06 | 脱ユビキチン化酵素 USP 19 による筋形成抑制作用について 〇北野剛大、原田直樹、山地亮一 |
| 14:52 | E-p07 | 大阪府大院・生命環境 単一細胞レベルでの哺乳類染色体複製ドメイン構造の網羅的解析 〇柴田 隆豊¹、緒方 進¹、緒方 正人²、奥村 克純¹、竹林 慎一郎² |
| 15.04 | F 00 | 「三重大院生物資源、2三重大院医 |

15:04 E-p08 大豆イソフラボンの DNA ポリメラーゼ, DNA トポイソメラーゼ阻害活性と

ヒトがん細胞増殖抑制活性

〇平林正大 1, 片山 茂 1, 中村宗一郎 1, 水品善之 1, 2

¹信州大院農,²神戸学院大 LSC

15:16 E-p09 コラーゲンが上皮細胞の嚢胞と管腔形成に及ぼす影響

〇今井まり子 1、市川(長里)彩花 1、植田和光 1, 2、木岡紀幸 1

¹京大院農、²京大 iCeMS

15:28 E-p10 ペクチンによる食物アレルギー調節機構の解析

〇岩城佳那, 矢部富雄, 北口公司

岐阜大院•応生科•応用生命

シンポジウム

酵素活性分子研究の新展開 -タンパク質のフォールディング研究と 酵素機能の利用-

講演要旨

PL01

Toward Understanding the Unified Mechanism of Protein Aggregation

Yuji Goto (Institute for Protein Research, Osaka University)

Although aggregation is one of the most important properties of proteins, aggregation has often been an obstacle to studying the structure, function, and physical properties of proteins. However, a large number of amyloid fibrils associated with over 30 amyloidoses including Alzheimer's disease and dialysis-related amyloidosis promoted the challenge of studying protein misfolding and aggregation in comparison with protein folding (Fig. 1). Amyloid fibrils and amorphous aggregates are two types of aggregates formed by denatured proteins. Nevertheless, the mechanism of amyloid fibrillation and, moreover, the relationship between amyloid fibrils and amorphous aggregates remains elusive.

To study amyloid fibrils, we developed several types of unique techniques. First, to visualize amyloid fibrils, we combined total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) with amyloid-specific thioflavin T (ThT) fluorescence (1). With this approach, we succeeded in observing the growth of amyloid fibrils in real-time at a

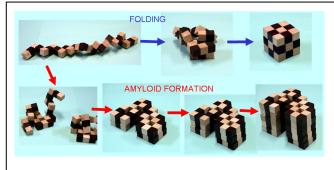
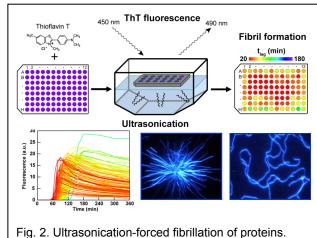


Fig. 1. Models of protein folding and misfolding.

single fibrillar level for various amyloidogenic proteins including $\beta 2$ microglobulin, a protein responsible for dialysis-related amyloidosis, and A β peptide associated with Alzheimer's disease.

Second, we showed that ultrasonication is one of the best means of accelerating amyloid nucleation and thus the formation of fibrils (Fig. 2) (2, 3). By combining a water bath-type ultrasonicator and a microplate reader, we constructed a HANdai Amyloid Burst Inducer (HANABI), which enables a high-throughput analysis of ultrasonication-forced amyloid formation of proteins (4).

Third, calorimetry, one of the most powerful methods used to study the thermodynamic properties of globular proteins, has not played a significant role in understanding protein aggregation. We succeeded with 82-microglobulin in direct heat measurements of the formation of amyloid fibrils using isothermal titration calorimeter (5). The spontaneous fibrillation after a lag phase was accompanied by



– 18 –

exothermic heat. The results indicate that isothermal titration calorimeter will become a promising approach for clarifying comprehensively the thermodynamics of protein folding and misfolding.

Our results with various unique approaches indicate that the solutions of denatured proteins are often supersaturated above the solubility limit and ultrasonic agitations release the supersaturation effectively, excluding solvated monomers to form fibrils. We suggest that amyloid fibrils and amorphous aggregates are similar to the crystals and glasses of solutes, respectively,

and supersaturation is required to form crystal-like amyloid fibrils. We propose a general view of how the structures of protein and peptide precipitates vary dramatically from single crystals to amyloid fibrils and amorphous aggregates, in which "solubility" and "supersaturation" play critical roles (Fig. 3) (3, 6).

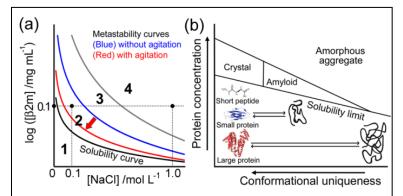


Fig. 3. (a) Phase diagrams of β 2-m at pH 2.5 depending on the NaCl and β 2-m concentrations. (b) General phase diagram of the conformational states of peptides and proteins.

References

- Ban, T., Yamaguchi, K.,
 and Goto, Y. (2006) Acc Chem Res 39, 663-670
- 2. Ohhashi, Y., Kihara, M., Naiki, H., and Goto, Y. (2005) J Biol Chem 280, 32843-32848
- Yoshimura, Y., Lin, Y., Yagi, H., Lee, Y.-H., Kitayama, H., Sakurai, K., So, M., Ogi, H.,
 Naiki, H., and Goto, Y. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109, 14446-14451
- 4. Umemoto, A., Yagi, H., So, M., and Goto, Y. (2014) J. Biol. Chem. 289, 27290-27299
- Ikenoue, T., Lee, Y. H., Kardos, J., Yagi, H., Ikegami, T., Naiki, H., and Goto, Y. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111, 6654-6659
- Adachi, M., So, M., Sakurai, K., Kardos, J., and Goto, Y. (2015) J Biol Chem 290, 18134-18145

Yuji Goto

1982: D. Sci., Osaka Univ., Graduate School of Science.

1982 - 1984: Research Assistant, Inst. for Enzyme Research, Medical School, Tokushima University

1984-1989: Research Assistant, Faculty of Science, Department of Biology, Osaka University

1986-1988: Research Fellow, University of California, Santa Cruz

1989-1998: Associate Professor, Faculty of Science, Department of Biology, Osaka University 1998-present: Professor, Institute for Protein Research, Osaka University,

IL01

How Chaperonins Fold Protein

Fumihiro Motojima, JST-ERATO Asano Active Enzyme Project

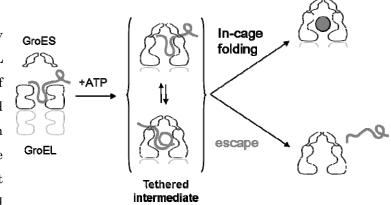
Although protein structures are coded in their amino acid sequence, many proteins cannot fold spontaneously. In cells, the various types of molecular chaperones contribute to assist protein folding. Chaperonin GroEL/GroES from *E.coli* is an essential molecular chaperone and one of the most studied molecular chaperones. Chaperonin GroEL binds various denatured proteins to prevent aggregate formation and assists their folding in an ATP-dependent manner (Fig. 1). GroEL binds denatured proteins at the hydrophobic apical end of the central cavity. By subsequent binding of ATP and GroES to one ring of GroEL, denatured protein is encapsulated into the cage capped with GroES and folding reaction occurs.

To explain the efficient folding function of chaperonin, a number of mechanistic models have been proposed so far. In these models, denatured protein is assumed to fold freely in the chaperonin cage lined with many hydrophilic residues. One of popular models, confinement model, assumes that the conformational restrictions of denatured protein in the limited space of chaperonin cage increase the energy of denatured state and accelerate protein folding. However, we found that denatured proteins in the chaperonin cage interact with the hydrophobic interfaces between chaperonin subunits^{1,2}. The finding that fractions of denatured protein escape out of the cage suggests that denatured proteins are loosely tethered at the hydrophobic interface (tethering model).

To know the function of hydrophobic residues, we performed complehensive mutation analysis and revealed that hydrophobic residues at the interface of subunits and at the upper half of the chaperonin cage are important for both folding acceleration and the retension of denatured protein in the cage. However, important residues are different for substrate proteins. The analysis of conformation of denatured protein by fluorescence resonance energy transfer (FRET) show that denatured protein is extended in the chaperonin cage and is not largely extended in the cage of less-hydrophobic mutant. We assume that weak hydrophobic interactions between denatured protein and the chaperonin cage wall destabilize non-native hydrophobic interaction and enable to form native interactions. It is known that some proteins initially form non-native hydrophobic interactions and their spontaneous folding is trapped (hydrophobic collapse). This model can explain many experimental results and seems to be reasonable.

Fig. 1. Tethering model

Denatured protein (thick grey curves) bound on one ring of GroEL is encapsulated upon binding of ATP and GroES. Denatured proteins in the cage interact with hydrophobic residues of the cage and is expanded transiently at different positions (tethered



intermediate). This intermediate proceeds to the folding in the cage (in-cage folding) or the escape as denatured protein (escape).

References

- 1. Motojima, F. and Yoshida, M. Polypeptide in the chaperonin cage partly protrudes out and then folds inside or escapes outside. *EMBO J.* **29**, 4008-4019 (2010)
- 2. Motojima, F., Motojima-Miyazaki, Y. & Yoshida, M. Revisiting the contribution of negative charges on the chaperonin cage wall to the acceleration of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 15740–15745 (2012).

Fumihiro Motojima, Ph. D.

I studied on X-ray crystallographic analysis of antitumor antibiotic protein C-1027 and gained B.S. and M.S. I shifted to biochemical field and studied on the molecular mechanism of chaperonin GroEL/GroES from *E. coli* for Ph. D. I have been studied chaperonin for about 20 years as postroctral researcher and assistant professor. As a researcher of JST-ERATO Asano project, I am now studying on the crystallographic analysis and bioengineering of hydroxynitrile lyase and the improvement of protein expression by mutated molecular chaperone.

| 2000 | Ph.D. in Biological Science, Tokyo Institute of Technology |
|--------------|---|
| 2000-2001 | Postdoctoral researcher, Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of |
| | Technology |
| 2001-2003 | Postdoctoral associate, Howard Hughes Medical Institute, Yale University, USA |
| 2003-2010 | Assistant professor, Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of |
| | Technology |
| 2010-2014 | Assistant professor, Kyoto Sangyo University |
| 2015-present | Researcher, JST-ERATO Asano Active Enzyme Project |

IL₀₂

Development of Multi-Step Syntheses of Industrial Chemicals with Integrated Biocatalytic Key Steps

Harald Gröger

Faculty of Chemistry, Bielefeld University P.O. Box 100131, D-33501 Bielefeld, Germany; E-mail: harald.groeger@uni-bielefeld.de

Multi-step one-pot processes represent an attractive synthetic concept for the improvement of overall process efficiency by decreasing the required number of work up and purification steps. By avoiding such time-, capacity- and solvent-intensive process steps, multi-step one-pot syntheses contribute to a significantly improved process economy as well as to more sustainable synthetic routes. A key criterion for multi-step one-pot processes is the compatibility of the individual reaction steps with each other. In organic synthesis multi-step one-pot processes are typically based on metal- or organocatalytic reaction sequences. However, also organic multi-step one-pot processes based on the combined use of different enzymes or the combined use of enzymes and chemocatalysts offer interesting synthetic perspectives. In this contribution, strategies and synthetic examples for the combination of different enzymes or the combined use of chemo- and biocatalysts towards the development of multi-step one-pot processes in aqueous reaction media are presented.

In the field of combination of enzymes in organic-synthetic multi-step reaction processes we developed a one-pot transformation of the readily available starting material cyclohexanol into the bulk chemical ε -caprolactone. This process technology is based on the combined use of an alcohol dehydrogenase and a Baeyer-Villiger monooxygenase and only requires molecular oxygen as a co-substrate. It is noteworthy that the cofactor required in the first step (NADPH for oxidation of cyclohexanol) is regenerated *in situ* in the second reaction step, namely the Baeyer-Villiger oxidation of cyclohexanone into ε -caprolactone.[1]

In the research area of the combined use of chemo- and biocatalysts for one-pot processes, we were interested, e.g., in the investigation of the compatibility of palladium-catalyzed reactions and enzymatic reductions in water. As an example for such a one-pot process the synthesis of chiral biaryl-containing alcohols *via* Suzuki-cross-coupling reaction and subsequent asymmetric enzymatic reduction is shown.[2] Another example for the combination of palladium catalysis and a biotransformation is a one-pot process comprising a Wacker oxidation and subsequent enzymatic reduction.[3] A further research focus is on the combination of enzyme-compatible organocatalytic reactions with biotransformations towards multi-step one-pot syntheses. It turned out that a reaction mixture resulting from an asymmetric organocatalytic aldol reaction is compatible with a

direct subsequent enzymatic reduction without the need for a work-up step of the aldol reaction. [4,5] In addition, an organocatalytic nitroalkene synthesis has been successfully combined with its subsequent ene reductase-catalyzed asymmetric reduction, leading to the corresponding nitroalkane with high enantioselectivity. [6]

- (1) S. Staudt, U. T. Bornscheuer, U. Menyes, W. Hummel, H. Gröger, *Enzyme Microb. Technol.* **53**, 288-292 (2013).
- (2) E. Burda, W. Hummel, and H. Gröger, Angew. Chem. 120, 9693-9696 (2008); Angew. Chem. Int. Ed. 47, 9551-9554 (2008).
- (3) H. Sato, W. Hummel, and H. Gröger, Angew. Chem. 127, 4570-4574 (2015); Angew. Chem. Int. Ed. 54, 4488-4492 (2015).
- (4) K. Baer, M. Kraußer, E. Burda, W. Hummel, A. Berkessel, and H. Gröger, Angew. Chem. 121, 9519-9522 (2009); Angew. Chem. Int. Ed. 48, 9355-9358 (2009).
- (5) G. Rulli, N. Duangdee, K. Baer, W. Hummel, A. Berkessel, and H. Gröger, Angew. Chem. 123, 8092-8095 (2011); Angew. Chem. Int. Ed. 50, 7944-7947 (2011).
- (6) E. Burda, T. Ress, T. Winkler, C. Giese, X. Kostrov, T. Huber, W. Hummel, and H. Gröger, Angew. Chem. 125, 9493-9496 (2013); Angew. Chem. Int. Ed. 52, 9323-9326 (2013).

Short CV:

Harald Gröger studied Chemistry at the Universities of Erlangen-Nürnberg and Oldenburg and received his diploma degree in Chemistry from the University of Oldenburg in 1994. He carried out his doctoral thesis at the University of Oldenburg under the supervision of Prof. Dr. Martens. After receiving his doctoral degree in 1997, he stayed as a postdoctoral fellow at the University of Tokyo in the group of Prof. Dr. Shibasaki from 1997 to 1998. In 1998 he joined the research department Chemische Forschung of SKW Trostberg AG. After the merger with Degussa-Hüls AG to Degussa AG in 2001, he became Project Manager in the Project House Biotechnology of Degussa AG. From 2004 to 2006 he worked as a Senior Project Manager at the research unit Service Center Biocatalysis of Degussa AG. From 2006 to 2011 he was W2-Professor (Associate Professor) of Organic Chemistry at the University of Erlangen-Nürnberg and since April 2011 he is W3-Professor (Full Professor) of Organic Chemistry at Bielefeld University. Harald Gröger and his teams were awarded the Degussa Innovation Award 2003 (category: new products) and the Degussa Innovation Award 2005 (category: new or improved processes). In addition, he was awarded the Carl-Duisberg-Memorial-Prize 2008 of the German Chemical Society (GDCh), the Otto Roelen Medal 2014 of the DECHEMA and the German Catalysis Society (GeCatS) and a Visiting Professorship of Osaka University in 2014. His main research areas center on the use of bio- and chemocatalysts in organic synthesis and the development of sustainable and industrially feasible production technologies.

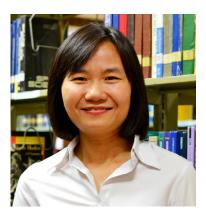
IL₀3

From Mechanisms to Applications of Two-component Flavin-Dependent Monooxygenases Pimchai Chaiyen

Department of Biochemistry and Center of Excellence in Protein Structure and Function, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Flavin-dependent enzymes are among the most versatile redox catalysts found in nature. To catalyze monooxygenation and other additional reactions, flavin-dependent enzyme employs a reactive intermediate, C4a-hydroperoxyflavin, as a key agent to incorporate an oxygen atom into substrates. We used combined approach of quantum mechanical and pre-steady state kinetics to elucidate the mechanism of oxygen activation to form C4a-hydroperoxyflavin in p-hydroxyphenylacetate (4-HPA) 3-hydroxylase (HPAH) that is a two-component flavin-dependent monooxygenase consisting of reductase (C1) and oxygenase (C2) components. Results show that the first step of oxygen activation is the proton-coupled with electron transfer and the process to form C4a-hydroperoxyflavin is almost barrierless.

HPAH is an attractive enzyme to be developed as a biocatalyst because it can convert several phenolic and catecholic acids into bioactive 3,4,5-trihydroxyphenolic acids products. However, the bioconversion of p-coumaric acid into 3,4,5-trihydroxycinnamic acid by the wild-type C2 is not very efficient. We therefore engineered the active site of C2 and found that the Y398S variant is more efficient than the wild-type enzyme in the synthesis of 3,4,5-trihydroxy cinnamic acid. Pre-steady state kinetic study showed that the Y398S mutant binds to p-coumaric acid better than does the wild-type enzyme; with the same concentration of substrate, the reaction proceeds more into the productive hydroxylation path instead of wasteful flavin oxidation.



Website: http://www.sc.mahidol.ac.th/chaiyen_p

Dr. Pimchai Chaiyen is Professor of Biochemistry and Deputy Dean for Research at Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand. Her research interests are in the broad areas of enzyme catalysis, engineering and application. Her group studies flavin-dependent, PLP-dependent, redox and aldolase enzymes. They have contributed significantly to the understanding of many fundamental aspects of these systems, including mechanisms of oxygen activation by flavoenzymes, reduced flavin transfer between proteins, hydroxylation and oxidation by flavin-dependent enzymes. The group utilizes kinetics (transient, steady-state, isotope effect), spectroscopic, computational and structural approaches to investigate enzyme catalysis. Their research also includes enzyme applications in biocatalysis, biorefinery, bioreporter and drug design.

Dr. Chaiyen received her Ph.D. in Biological Chemistry from University of Michigan, Ann Arbor, USA. She has received numerous awards including the L'oreal-Unesco Fellowship for Woman in Science in Thailand (2003), Young Scientist Award (2005) and Young Biochemist and Molecular Biologist Award from The Science Society of Thailand (2008), Taguchi Prize for Outstanding Research Achievement in Biotechnology (2010), TRF-CHE-Scopus Researcher Award from The Thailand Research Fund (2010), Outstanding Researcher Award (Chemical Science and Pharmacy) from the National Research Council of Thailand (2012) and recently Outstanding Scientist of Thailand (2015). She serves as an editorial board member and referee for many high profile international journals, and also as a reviewer in many national and international granting agencies. She was the chairperson of the organizing committee of IUBMB 18th International Symposium on Flavins and Flavoproteins (2014).

受賞講演

講演要旨

AW01

交流高電界殺菌法を利用した果汁製品の製造

(ポッカサッポロフード&ビバレッジ株式会社)井上 孝司

はじめに

果汁等の飲料は、食品衛生法により清涼飲料水と定義され、製品の pH や保存温度によって加熱殺菌の基準が定められている食品である。さらに、近年においては、果汁の様な低 pH(pH4.0 未満)状態で生育し高い耐熱性を有する好酸性耐熱性菌(TAB)や耐熱性力ビなどが発見され、pH4.0 未満の果汁の殺菌においても100°C以上で数十秒間といった超高温短時間殺菌を行い、商業的無菌の観点から耐熱性胞子を死滅させる必要が製造上必要になっている。この商業的無菌が達成できる加熱殺菌条件は、もちろん食品衛生法に定められた基準よりも非常に高い加熱条件で処理する必要があり、食品の品質を大きく損なう要因になっている。一方、お客様の果汁飲料に対する嗜好は、天然に近い搾りたての品質を求める傾向にある。

そこで,当社は,食品衛生法の基準に適合し,耐熱性芽胞等を効率的に殺菌可能な技術開発を 2003 年より(独)農研機構 食品総合研究所と共同で電気エネルギーを利用した食品自身を自己発熱させる交流高電界殺菌法の開発を開始し、業界で初めて本技術を利用した果汁製造ラインを 2013 年に構築し, 2014 年 2 月より本ラインで生産された果汁製品の発売を行っている.

1. 交流高電界殺菌法とは

電気抵抗を持つ食品に一対の金属の電極を介して、その電極間に交流電源で電圧を印加すると食品内部を流れる電流とそれに逆らう電気抵抗により食品自身が自己発熱することを利用したジュール加熱と高電界の印加によって微生物細胞内外の電位差でクーロン力が生じることを利用した電気穿孔(エレクトロポーレーション)などによる微生物損傷の相乗効果によって、液状食品中の微生物を 1 秒以内の極短時間で殺菌できる技術である。ジュール加熱とは材料の両端に電圧(V)を印加した場合に材料内部に生じた電気勾配を小さくしようとする力に従って電気を運ぶキャリアーの移動がおこる。このときに食品では、キャリアーが+、ーイオンであることや食品に含まれる成分の構造や不純物などにより電気抵抗が(R)が生じる。この電気抵抗により運動エネルギーが熱エネルギー(P)に変換され、材料に流れる電流(I)と R、V から下記により計算される法則である。 $P=I^2R=V^2/R$

また、細胞の電気穿孔とは、細胞の種類や大きさにかかわらず、細胞一個当たり 1V 以上の電位差が与えられた場合、細胞膜の絶縁破壊が生じ、細胞膜に局所的な電気機械的な不安定性のために穴が開く現象であり、自己修復できないレベルまで損傷すると細胞が死滅する.

2. 交流高電界殺菌法の特性 1,2)

交流高電界殺菌法の有芽包細菌の殺菌特性を飲料中で問題なる中温性耐熱性菌や高温性耐熱性菌および TAB を用いて明らかにした. 交流高電界殺菌法は, 印加電界の強度に比例して殺菌効果が向上し, 流れる電流には殺菌効果が依存しないことを明らかにした. また, 各種耐熱性芽胞の殺菌が開始する温度は, 各微生物胞子が有する耐熱性(F値)から推定されることが分かり, その時の向上率は, D値の減少として表され, D値が大きい胞子(高い温度で処理しないと殺菌できない胞子)ほど, その効果が大きくなることを明らかにした. また, 果汁で問題となる TAB は, 従来の加熱のみの処理に比べ殺菌速度として約30倍速いことも明らかにした.

3. 交流高電界殺菌法の電極設計とスケールアップ

1) 電極設計と耐久性

交流高電界殺菌法の殺菌効果および電極の耐久性や安定性を確保する上で重要な要因となるのは、電極の構造である。ただし、交流高電界殺菌法は、電極の通過時間が 1 秒以内と極短時間である点と用いられる電極間には数百~数千 V/cm の電界が生じているため、そこに熱電対等のセンサーを挿入して直接材料の温度を測定することは不可能である。そこで、我々は、流れる食品に電界を印加したときに材料にどのような電界が印加されて、加熱されるのかをコンピューターシミュレーション(Computer Fluid Dynamics)による解析結果を元にした電極設計を行った。具体的には、電極内部の流速分布、温度分布、電界分布を明 3)らかにし、最終的な実生産機には、流速、温度の分布の偏差が最も小さくなる様に設計することができた。

また、設計した電極の耐久性として長時間食品の通液処理後の殺菌効果や電極の表面粗さおよびオージェ分析によるチタニウム製電極の元素分析を行い、食品を長時間処理しても殺菌効果に変化が認められない

ことや電極表面に腐食等の発生が無く、電極の平滑性が損なわれないことを明らかにした. さらに、電極表面には酸化膜が均一に形成され、酸化チタンとして安定化していることも分かり⁴、食品を殺菌する装置としての安定性や耐久性が問題無いことを明らかに出来た.

2) 交流高電界殺菌装置のスケールアップ

清涼飲料の製造ラインは、一般的に時間あたり数千 L~数万 L 処理する能力が求められる. 当社は、処理能力として時間 60 L の処理装置で各種微生物胞子の殺菌特性や電極の耐久性およびコーヒー、茶、果汁などの各種飲料に応用できる装置に改良した. その後、装置能力を 500 L/hr にスケールアップを行い、更に 2,000 L/hr の装置を製作し液状食品を殺菌できる装置によって、実際の生産現場の実証試験機として殺菌試験、製品の品質検査、製品の保存試験を行い、食品製造に問題無いことを確認した. さらに、食品を数千時間処理しても電極の平滑性が損なわれず腐食等が発生しないことも確認し、飲料の実ライン製造設備として問題無いこと実証した.

3) 実用化した飲料の製造ラインの特徴とその効果

2013 年 12 月に弊社 名古屋第 3 工場に、毎時 5,000 L の処理能力を有する工場を竣工した。本生産ラインの特徴としては、食品の品質劣化させる要因である酸化・熱劣化を低減・抑制したライン構成になっている。酸化劣化を防止するために、原料水および製造工程中のタンクや配管中の酸素を可能な限り除去した調合工程と殺菌工程に交流高電界殺菌法を利用して熱劣化を防止することで、お客様の要望であるフレッシュで搾りたての高品質な商品をお届けすることができるライン構成である。

本ラインで製造したポッカレモンの商品としては、従来の加熱殺菌のみによる殺菌法に比べて、熱による変色を約2/5に抑制し、加熱臭の発生を約1/8、ビタミンCの減少を約1/10などに抑えられ、レモンの特徴的な香気成分を多く残存させ、逆に、劣化臭の成分の発生を低減できた。

本効果は、当社官能評価パネラーの試験によっても、爽やかなレモンの風味やレモンの果皮の風味などの項目で有意に向上し、逆に、焦げた風味やイモ臭などの項目で有意に抑制される等、成分分析の結果を裏付ける高品質な製品を製造することが出来ている。実際に本ラインで製造している商品群を図 1 に示す。最後に、本製造ラインにより生産される商品の品質として、よりフレッシュで搾りたての品質を再現できる様になったことから、お客様の満足度が向上できたと考えている。

謝辞 交流高電界殺菌技術の開発にあたり、(独)農研機構・食品総合研究所 植村邦彦ユニット長、日本大学 五十部誠一郎教授、筑波大学 中嶋光敏教授にご指導、ご尽力頂き、ここに深く感謝の意を表します。



図 1 交流高電界殺菌法を利用した商品

(引用文献)

- 1) 井上孝司,河原(青山)優美子,池田成一郎,土方祥一,五十部誠一郎,植村邦彦 交流高電界による各種微生物胞子の殺菌.日本食品工学会誌, Vol.8, 3, p123-130, (2007)
- 2) K. Uemura, I. Kobayashi, T. Inoue Inactivating of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in Orange Juice by high electric field alternating current. Food Sci. Technol. Res., 15 (3), p211-216 (2009)
- 3) 植村邦彦, 小林 功, 井上孝司, 中嶋光敏 交流高電界処理における電極内部の温度分布の解析. 食総研報, 71, p21-32, (2007)
- 4) サイエンスフォーラム フレッシュ食品の高品質殺菌技術 p359-366, IBN978-4-916164-93-3

略歴

井上孝司(いのうえ たかし)

1993年 岐阜大学農学研究科卒業/同年 ㈱ポッカコーポレーション 中央研究所入社/2007年 筑波大学大学院生命環境科学研究科博士後期課程修了,博士(農学)/2008年 ㈱ポッカコーポレーション中央研究所 マネジャー/2013年 ポッカサッポロフード&ビバレッジ㈱ 中央研究所(経営統合による社名変更)/2014年 名古屋工業大学大学院 産業戦略工学専攻卒業(MOT取得) 現在に至る。

AW02

ビール泡品質向上への一貫した取組み サッポロビール株式会社

黄金の液色に白い泡、その2色のコントラストがビールならではの美しさを演出する。泡はビールの酸化やガスの揮散を防ぐだけでなく、その白くきめ細やかな性状はビールのおいしさを視覚から伝える重要な手段である。泡に関する研究は国内外のビール会社にとって古くから、そして今もなお盛んに取組まれている分野である。

ビール泡の構成因子としては大麦由来の蛋白質、ホップ苦味成分、ビール中の炭酸ガスなどであり、 逆に脂肪酸、脂質、酵母から排出される蛋白質分解酵素などが阻害物質として知られている。また、 ビールが飲まれるその瞬間までを考えると容器・グラスの形状、流通過程での取扱い、飲食店向け商 品では注出サーバーの性能も重要である。

当社はビールの泡品質に関する研究について長年広範囲に取組んできた。今回はその中でも、醸造工程でのビール泡品質向上策、泡持ちに優れたビール大麦の開発、飲食店での付加価値提供を実現する生ビールサーバーの開発、この3点について紹介する。

1. 醸造工程でのビール泡品質向上策

大麦は発芽することによって自らの酵素で澱粉、蛋白質を糖やアミノ酸へ分解し酵母の栄養源として供給するだけでなく、ビールの香りや味、そして泡にも大きく関与している。ビールの泡にとって 大麦の蛋白質がプラス成分、脂質がマイナス成分と言える。

ビール大麦は重量比で $2\sim3\%$ と脂質を比較的多く含み、その構成脂肪酸の大半はリノール酸とオレイン酸である。脂肪酸は発芽工程やビール工場での仕込工程で酸化され泡持ちの悪化や香味の老化を引起こす。特に泡持ちの場合、リノール酸が複数の過程を経て 9,12,13-トリヒドロキシオクタデセン酸(THOD)となり泡持ちを悪化させることが知られている。我々は小スケールでの試験を重ね、脂質酸化を触媒する酵素リポキシゲナーゼ(以下 LOX と表記)の活性を抑える仕込条件を確立しビール工場へ展開した。

泡プラス成分の蛋白質は発芽の過程で徐々に分解される。酵母の発酵性やその他最終製品の品質を考えると蛋白質分解の程度は重要な管理指標である。当社では、複数の大麦品種を用い発芽条件を変えた試験で、ある大麦品種で発芽による蛋白質分解が進んでも泡持ちが影響を受けにくい、言い換えれば泡安定性の高い品種があることを見出し、採用することとした。

また泡持ちにプラスとなる蛋白質は熱凝固性も高いため、熱エネルギー管理のためにカロリー制御を導入し、醸造工程で最も熱負荷の高い煮沸工程の熱エネルギーを適正化した。

我が国を代表するビール製造技術の一つである生ビールでは、非熱処理のため酵母由来の蛋白質分解酵素が製品中でも失活されず経時的にビールの泡持ちを悪化させる。この酵素は Proteinase A(以下 PrA と表記)と呼ばれ酵母の弱化や自己消化の際に細胞外へ漏出されると言われていた。使用する酵母株や、発酵・貯酒中の栄養条件やその温度、期間によって最終製品の PrA 活性は大きく変化する。実際のビール製造において PrA 排出の低い酵母株の確認・選定や酵母の弱化を起こしにくい管理を発酵および貯酒工程で導入し、製品中の PrA 活性低減を実現した。

2. 泡持ちに優れたビール大麦の開発

前述の通り大麦の脂質酸化は泡持ちを悪化させるだけでなく、香味の老化を引起す原因でもある。 当社は岡山大学と共同で、泡持ちと香味耐久性の向上を目的として在来大麦遺伝資源から脂質酸化を 触媒する酵素リポキシゲナーゼー1 (以下 LOX-1 と表記) のない LOX-1 レス変異を探索した。数千 系統のスクリーニングから LOX-1 の活性を欠く自然変異を発見し、この形質を導入した大麦を醸造試 験に用いると、大麦そのものでも、発芽させた麦芽においても泡持ちが向上することを確認した(図 1)。 2001年より、この LOX-1 レス形質を栽培性や他の品質面でビール醸造に適したビール大麦に導入するためカナダのサスカチュワン大学との共同で戻し交雑育種法による LOX-1 レス大麦の開発を開始した。ビール泡持ちの高い性質をもつ「CDC Kendall」との5回連続戻し交雑により「CDC Kendall」の遺伝的背景を持ち、かつ LOX-1 レス形質を示す系統の育成に成功した。その後この系統はカナダでの品種認定試験に合格し北米初の LOX-1 レス品種「CDC PolarStar」として 2008年に品種登録を出願した。以後、本品種の普及を進め開発スタートから 10年以上を経た 2013年には約 17,000 ヘクタールという大規模な栽培実績に到達した。

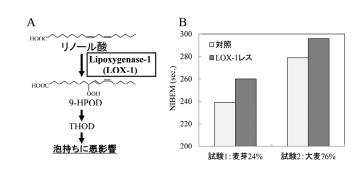


図1 泡持ちとLOX-1の関係(A)およびLOX-1レス麦芽・大麦による醸造試験の泡持ち(B) 9-HPOD: 9-hydroperoxy-10, 12-octadecadienoic acid

THOD: 9,12,13-trihydroxy octadecanoic acid 試験1:麦芽での比較(麦芽24%発泡酒仕様) 試験2:大麦での比較(大麦76%発泡酒仕様)

3. 生ビールサーバーの開発

飲食店で提供する生ビールはビールの泡が実感できる格別なシーンである。最終的な提供品質を維持・向上させるために生ビールを樽から注出するサーバーの性能は重要である。サーバーの衛生状態が清潔に保たれていないとビールの泡品質はもちろん香りや味にも悪影響を及ぼす。常に良好な状態でのする必要がある。当社では 2002 年より、構造上複雑なサーバーの冷却部分を定期的に交換し自社の洗浄施設で分解洗浄し、サーバーの良好な状態を維持する独自の生ビール品質管理システム「サッポロセパレシステム」を導入した。

近年このサーバーを改良し泡付け機能を進化させたものを開発した。これまで泡付けのノズルはビールに対して垂直方向であったが、角度を 90 度変えることでグラス壁面接線方向へ泡付けするよう改

良した(図2左)。これにより、泡付け時のビール液面の"もまれ"がなくなり、ガスの揮散を防ぎ、粒径の細かい泡をより長く維持させることが可能となった(図2右)。さらに飲むごとに泡が再生し最後の一杯まで泡持ちの良いビールが楽しめるようになった。当サーバーは専用グラスや液温管理とともに「パーフェクト樽生ビール」として2014年春より飲食店へ導入している。

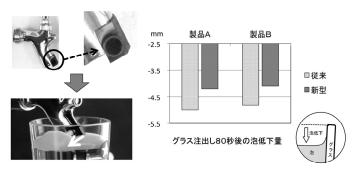


図2 新型サーバーによる泡持ち向上効果

略歴

中村 剛(なかむら たけし)

1987年 京都大学農学部食品工学科卒業

同年 サッポロビール株式会社入社

1995年から96年にかけてビール醸造技術習得のためドイツベルリンに留学

2014年3月よりサッポロビール価値創造フロンティア研究所にて勤務

AW03

細胞表層活用の基盤開拓とその展開

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻植田充美

1. はじめに

生命情報処理技術を基盤としてそれをゲノム研究と結びつけて、タンパク質の細胞表層への輸送機構の情報の集積解析を行ったところ、酵母などをはじめとする全生物に普遍的に存在する「細胞表層輸送システムのゲノム情報」が見つかり、「細胞表層工学(Cell Surface Engineering)」を提唱した. Chemical Engineering News で新しいバイオテクノロジー研究領域「細胞表層工学の開発」の確立として評され、アメリカの学会から「アーミング(Arming)技術」という「千手観音(Arming Buddha)」を模した名を命名された. 現在、原核生物から、酵母を始め、植物・動物などの真核生物も材料にした「細胞表層工学」は、基礎的にも応用的にも世界で活用されてきている.

2. 細胞表層タンパク質のもつ基本情報の発見と活用へ

細胞表層へのタンパク質の輸送機構は、パン酵母を材料として、細胞同士が、接合の時に誘導発現す る性凝集細胞間接着分子であるアグルチニンタンパク質をモデルにして明らかにした. α接合型細胞 で発現するαーアグルチニンとα接合型細胞で発現するαーアグルチニンがあり,ともに細胞壁に結 合して活性部位が細胞の最外層から突き出ており、この2つの分子を介して細胞間接着が起こる.それ ぞれのコア部分は共に、GPI(グリコシルフォスファチジルイノシトール)アンカー付着シグナルと 推定される疎水性領域をC末端に有しており、また、セリンとスレオニンに富む糖鎖修飾部位と接着に かかわる活性部位がその直ぐN末端側に有り,全体のN末端には疎水性の分泌シグナルを持つ分子構 造からなる. 細胞膜へのアンカーリングに必要なGPIアンカーは, 原生動物, 粘菌, 酵母, 昆虫から哺 乳類にいたるまで様々な真核生物に見いだされており、疎水性の性質以外にあまり共通性が見られな いが、その基本骨格はよく保存されている、哺乳類のGPIアンカー付加タンパク質は、細胞膜外に露 出されて保持されるが、細胞壁をもつ酵母などの場合は、さらに細胞表層で PI-PLC (ホスファチジル イノシトール特異的ホスホリパーゼ C)によりさらに切断をうけて細胞壁の最外層に移行する.これら の一連のプロセスの中で,細胞内でのタンパク質の品質管理によるフォールディングの管理と分泌小 胞を介したエキソサトーシスによる膜融合は巨大なネイティブタンパク質分子の細胞外への排出シス テムとして応用していくのは有用である. 分泌シグナル・機能ドメインを操作することによって. 種々 の酵素タンパク質やタンパク質ドメインなどを細胞表層に提示することが可能となるのである. タン パク質の発現において、もっとも厄介であったフォールディングは真核細胞のナチュラルな戦略に委 ねられ,また,アグルチニンの場合は通常時には機能しないうえに,その発現の潜在スペース(10⁶分 子の余地)を細胞表層に保持している.しかもその活性部分を細胞外に理想的に配向していると考えら れる.

3. 新しい細胞触媒の構築

上述の手法により、デンプンやセルロースなど細胞が直接資化できない高分子を分解する酵素を、酵母の細胞表層に提示して、細胞表層で低分子にまで分解して、直接エタノールを生産できる細胞生体触媒を開発してきた。また、リパーゼを細胞表層提示した触媒を用いて、環境汚染で問題のアルカリ法に替わる、廃油から新しいバイオディーゼルの製法を確立し、ベンチャー「バイオエナジー」を立ち上げ、商標ロゴにアーミング図案が採用された。また、細胞表層に、水圏環境汚染の凶である銅、カドミウムやヒ素などのイオンを捕捉できるタンパク質ドメインなどを提示することにより、水圏からこれらの汚染源重金属イオンを除去回収できる選択的吸着体触媒の開発を行い、水圏の重金属汚染の浄化と水質改善に貢献しつつある。レアメタルやレアアース選択的捕捉細胞は、都市鉱山として存在する金属廃棄物からのリサイクル回収システム技術の確立に貢献し、環境浄化だけでなく、資源回収の新しいバイオテクノロジー基盤研究へと拡大展開している。

4. 新しいタンパク質「考」学への挑戦

導入した DNA から生まれてきたタンパク質を細胞の表層にディスプレイする手法「コンビナトリア ル・バイオエンジニアリング」へも展開してきた.多くの既知や未知の遺伝子に由来するペプチドやタ ンパク質を網羅的に、かつハイスループットに選択して機能解析することができ、導入した個々の DNA から生まれてきた個々のタンパク質が個々の細胞の表層の上に安定な形でディスプレイされ、細胞を 一つの支持体として、タンパク質を遺伝子の形で保持でき、いつも生きたまま、必要ならいつでも表層 にタンパク質で発現増幅でき,切り出すことも可能になった. さらに,アミノ酸配列分析なしで, PCR 法 の併用により、タンパク質のアミノ酸配列が即座に決定できるというメリットも創出される.このよう に、情報分子を機能分子に変換し、多くの組み合わせの分子ライブラリーから適合するものをシステ マティックに選択できる特徴を生かして,未知の新しい機能分子や細胞を,「自然界から探す」という 方向からナノテクノロジーも導入して「情報分子集団(ライブラリー)から創る」という方向への研 究も進めている.この手法は、タンパク質の変異体の網羅的ライブラリーの作成をもとにしたタンパク 質の構造と機能相関研究やゲノムにコードされていない新しいペプチドやタンパク質の創製などにも 新しい視点を提供してきており、網羅的ライブラリーの作製を基盤とするタンパク質工学の新たな展 開―タンパク質「考」学―を展開してきている.機能を増強した多くの変異体酵素や膜タンパク質の作 製や抗体・抗体酵素の創製を容易にするとともに,変異に対応した新たなリガンド, 阻害剤のスクリー ニングの高速化や高機能経口ワクチンの製造にも展開している.

参考文献: K. Kuroda, M. Ueda, Biomolecules, 3, 632-650 (2013)

略歴:植田 充美(うえだ みつよし)1955年生まれ/1984年 京都大学大学院工学研究科工業化学 専攻博士課程修了、工学博士/2010年日本バイオインダストリー賞受賞、2015年日本農芸化学賞受賞、 現在 京都大学大学院農学研究科・教授、京都バイオ計測センター(KISTIC)・代表

一般講演

講演要旨

基質ペプチド配列に基づくアザーデカリン型 SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤の合成と阻害活性評価 ('京都薬科大学、2東北大学医、3(株)プロテインウェーブ、4大阪大学蛋白研)〇服部恭尚 '、嶋本康広 '、 小林数也 '、照屋健太 2、三城明 3、中川敦史 4、山下栄樹 4、赤路健一 '

【目的】

重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS) は、21 世紀初の新興感染症であり新種のコロナウィルス (SARS CoV) が発症の原因である。SARS は8,000 を超える症例と約800人の死者を出したウィルス疾患であるが、いまだ有効な治療薬やワクチンは開発されていない。

SARS CoV の増殖には、SARS 3CL プロテアーゼ (SARS 3CL pro) が必須であり、SARS 3CL pro 阻害剤は有望な抗 SARS 薬の標的となりうる。我々はこれまでの研究で、基質配列と異なるアミノ酸配列を持つペプチドアルデヒド型阻害剤の開発とその SARS 3CL pro 複合体の X 線結晶構造解析に成功した。今回我々は、このペプチド型阻害剤と SARS 3CL pro との相互作用解析の結果をもとに、 P_2 サイトでの疎水性相互作用に着目した新たな非ペプチド型阻害剤の合成と阻害活性評価を行ったので報告する。

【方法・結果】

エステル 2 を出発物質とし、Diels-Alder 反応と加水分解、光学分割により光学活性なカルボン酸 3 を得た。その後の構造変換で環化前駆体 4 とした。鍵となる環化反応にはこれまでにピペリジンアルカロイドの合成で有用性を明らかにしたパラジウム触媒による環化反応を応用し、環化生成物 5 を単一のジアステレオマーとして得た。その後、4 工程で目的化合物 1 を得ることに成功した。得られた化合物の SARS 3CL PTO 阻害活性評価も行ったので合わせて報告する。

A-a03

エンドファイトが産生するペラミンの合成研究 (名大院生命農)〇山本雄太、西川俊夫

【目的】

エンドファイトとは、植物に共生する微生物であり、牧草の一種であるホソムギに共生する Neotyphodium 属糸状菌などが知られている。この糸状菌が産生するペラミン(1)は、牧草の害虫の摂食阻害及び産卵抑制を引き起こすとされる。しかし、その詳細は全く研究されていない。我々は、ペラミンの生物活性の詳細とその作用機構を解明すべく、ペラミンの合成研究を開始した。

【方法・結果】

ペラミンの特徴的なピロロピラジン環をピロールアミド**2**及びブロモアセチレン**3**を用いた直接環化によって、合成する計画を立てた。条件検討の結果、触媒として銅塩を使うと、ピロロピラジン環をもつ化合物**4**を一挙に得ることに成功している。現在、脱シリル化とグアニジンの導入によるペラミンの合成を検討中である。

レスベラトロール誘導体の合成とそのラジカル捕捉活性ならびに放射線防護活性評価

(¹阪府大院生命環境、²放医研)〇卯津羅早織¹、園田素啓¹、谷森紳治¹、関根絵美子²、中西郁夫²

【目的】

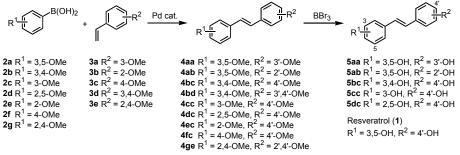
レスベラトロール (Res) (1) は、ブドウの果皮等に含まれるスチルベンを骨格とするポリフェノールであり、抗酸化、抗癌、認知症予防など様々な効果が報告されている。このため、Res 及びその誘導体は機能性食品や化粧品、医薬品などへの応用が期待されている。本研究では、以前報告したボロン酸とスチレンを用いた酸化的 Heck 反応による Res 合成法を利用し¹⁾、新たな Res 誘導体の合成とライブラリー構築を行い、ラジカル捕捉活性ならびに放射線防護活性評価を行った。

【方法・結果】

ボロン酸(2) とスチレン(3) をビスアセトニトリルジクロロパラジウム(Π)存在下、無水 DMF 中で反応させ、カップリング体 4 を得た。続いて、その一部について無水ジクロロメタン中、三臭化ホウ素により脱保護を行い、Res 誘導体(5) を得た。また、DPPH ラジカルを用いて Res (1) と Res 誘導体 5 のラジカル捕捉活性評価を行った。その結果、2', 3, 5-(0H) $_3$ 体 (5ab) と

3,4,4' $-(OH)_3$ 体(5bc)が Res よりも高い活性を示すことが明らかになった。さらに、放射線防護活

性についても評価を行ったので報告する。 1)卯津羅早織、諫山篤、 園田素啓、谷森紳治, 2014年度日本農芸化 学会関西支部大会要旨 集, P. 60.



A-a05

プラディミシン A はマンノースの環内酸素原子を認識する

('名大院·生命農、'理研、'富山県大·生工)〇渡邉泰典'、中川 優¹,2、五十嵐康弘3、伊藤幸成2、小鹿 一¹

【目的】

プラディミシン A (PRM-A) はマンノース (Man) に結合するユニークな天然低分子化合物である. PRM-A は Man の 2, 3, 4 位水酸基を認識する一方で、1 位および 6 位水酸基を認識しないことが報告されているが、環内酸素原子の寄与は明らかになっていない。そこで本研究では methyl α -D-mannopyranoside (Man-OMe) の環内酸素原子を、水素結合能が低い硫黄原子に置換した 1 との結合試験を行ない、PRM-A との結合における環内酸素原子の役割を明らかにすることを目的とした.

【方法・結果】

PRM-A は Ca^{2+} 存在下で凝集し、この凝集体が Man を特異的に取り込む. 取り込まれた Man 量は凝集体を酸処理して分解後、 ^1H-NMR における積分値から算出することができる. この共沈殿試験を

1に対して行ったところ、PRM-Aは1と結合して 凝集体中に取り込むことが確認された。しかしな がら、Man-OMe 共存下では、PRM-Aは1より も Man-OMe を優先的に取り込むことが明らかと なった。本結果は、PRM-Aが1よりも Man-OMe に対して強く結合することを示すものであり、 Manの環内酸素原子はPRM-Aとの結合に関与し ていることを示唆するものである。

抗生物質 BD-12 生合成遺伝子の機能解析

 $(^1$ 福井県大·生物資源、 2 JBIC、 3 国立感染研、 4 北里大·北里生命研、 5 産総研) 〇新倉 春香 1 、丸山 千登勢 1 、泉川 美穂 2 、石川 淳 3 、池田 治生 4 、新家 一男 5 、濱野 吉十 1

【目的】

BD-12 は streptothricin (ST) 類抗生物質の 1 つであり、放線菌 Streptomyces luteocolor NBRC 13826 によって生産される。その化学構造の特徴は、N-formimidoyl-glycine とアミノ糖がアミド結合している点であり、FemAB family のペプチド合成酵素に相同性を示す ORF12がその生合成に関与していると予想された。また、N-formimidoyl 基は、N-formimidoyl 基転移酵素に相同性を示す ORF2 によって生合成されると考えられ、本研究では、これら酵素の反応機構の解明を行った。【方法・結果】

FemAB family の酵素は、aminoacyl-tRNA を基質としてペプチド合成を触媒する。よって ORF12 は、glycyl-tRNA を基質として BD-12 のアミノ糖と glycine のアミド結合形成を触媒すると予想し、組換え ORF12 を用いて酵素反応を行った。その結果、アミノ糖と glycine が縮合した分子量 431 を示す化合物の生産を観察し、ORF12 のペプチド合成活性を検出することが出来た。さらに反応液に RNase を添加した場合、本反応産物は検出されなかったことから、ORF12 は tRNA 依存

ダウリクロメン酸

streptothricin (ST)

的にペプチド合成を触媒することも明らかにした。この反応産物は、ORF2 がコードする N-formimidoyl 基転移酵素の基質であると予想された事から、現在、本酵素を用いた *in vitro* 解析を行っており、その研究成果についても報告する。

A-a07

エゾムラサキツツジが生産する天然物ダウリクロメン酸の生合成研究

(1富大院薬、2徳島文理大薬)

〇飯島未字¹、田浦太志¹、兼目裕充²、高橋宏暢²、豊田正夫²、李貞範¹、黒崎文也¹、浅川義範²

【目的】

北海道に自生するエゾムラサキツツジ(Rhododendron dauricum)は強力な抗 HIV 活性を示すダウリクロメン酸を生産する。本化合物はグリフォリン酸のテルペン部分が酸化閉環することにより生成すると考えられているが、生合成酵素に関する研究は報告されていない。天然物のテルペン部を酸化閉環する酵素として詳細な研究が行われたものは、現在のところ大麻成分カンナビノイドの合成酵素のみである。本研究ではダウリクロメン酸生合成研究のファースト のH ステップとして、生合成酵素の遺伝子クローニングを検討した。

【方法・結果】

エゾムラサキツツジ若葉より RNA を抽出し、所定の操作により断片化 cDNA ライブラリーを調整した後、次世代シークエンサーGenome Analyzer (イルミナ) を用いた配列解析に基づき EST データベースを構築した。次いで、カンナビノイド合成酵素など FAD 結合型オキシダーゼとホモロジーを示す配列をスクリーニングし3種の候補遺伝子を得た。各候補遺伝子を酵母 (Pichia pastoris) に導入し、組み換え酵素の活性を検討した結果、1種が DCA 生合成酵素をコードすることを確認した。現在、組み換え酵素の精製およびキャラクタリゼーションについて各種検討を行っている。

セレン含有フコース誘導体の合成およびフコース結合蛋白質のX線結晶構造解析への応用 ('岐阜大・応用生物、'京都大・iCeMS、'高エネ機構・放射光)〇島袋隼平 ^{1,2}, 牧尾尚能 ³, 鈴木達哉 ^{1,2}, 安藤 弘宗 ^{1,2}, 今村彰宏 「石田秀治」加藤龍一 ³, 木曽真 ^{1,2}

【目的】

糖鎖は細胞間の接着や細胞内での蛋白質の分子機構発現に必須であるが、その際糖鎖とそれを認識する蛋白質との相互作用が重要である。その分子機構を詳細に解明するためには、糖鎖・蛋白質複合体の立体構造情報の取得が重要となる。当研究室では、セレンの持つ X線に対する波長依存性の特殊応答を位相決定に利用する多波長および単波長異常分散法(MAD/SAD法)に着目し、セレン含有糖をリガンドかつ位相決定分子として利用した糖鎖・蛋白質複合体の X線結晶構造解析を行っている。そのためにセレン含有糖の開発を行ってきたが、セレン原子の導入位置に依存して蛋白質との結合能が低下する場合があるという知見を得ており、糖鎖との結合親和性に関する知見の無い蛋白質への応用には問題がある。この問題を解決するために、糖分子内に存在する水酸基をそれぞれセレン原子に置換した化合物群の利用が有効であると考え、本研究ではモデルとして選択したフコースの誘導体化および、立体構造が未解明であったフコース結合蛋白質 AOL との共結晶化、立体構造解析を通してその有用性を検証した。

【方法・結果】

AOLの糖鎖認識機構が未解明であったためセレン原子導入位置の異なる5つのセレン含有フコース 誘導体の合成を行った。続いてセレン含有誘導体とAOLとの共結晶を作製し、MAD法を適用したと ころ、十分な異常分散効果が得られAOLの立体構造を明らかとした。このとき、5つのフコース結合 部位にセレン含有誘導体が取り込まれていることが確認された。以上より、糖鎖認識機構が未解明で ある蛋白質に対するセレン含有糖ライブラリーの有用性を見出した。

A-a09

ワックス組成から見たヘルヘフフジヤスデと近縁同所種の種間関係 (「富山県大工 ERATO、2熊本大・教育)〇桑原保正「、田辺 力2、浅野泰久」

【目的】

ヘルヘフフジヤスデ Anaulaciulus simplex.(Verhoeff, 1936, Julida: Julidae)の防御分泌物は一般的なベンゾキノン類以外に、n-hexyl laurate を主成分とする特徴的なエステル混合物で構成される (Shimizu N et al, 2012, J. Chem. Ecol.)。この混合物組成は採集時期や個体の成長過程で変化しないことを経験的に認識しているが、採集場所ごとにより大きく変化する事に気付いた。種内での地理的変異なのか、種の違いに基づく現象なのか、その解明を目的とする

【方法・結果】

フジヤスデ Anaulaciulus sp.は春に成虫が出現し産卵、夏には微小な若虫で見つかり(採集困難ではあるが)、秋には成虫として採集できる。熊本からサツマフジヤスデ Anaulaciulus kiusiensis (Verhoeff, 1941)を、大学周辺の公園などからヘルヘフフジヤスデ及び同所種を適宜収集し、1 頭ごとにヘキサンで 3 分間抽出し、GC/MS 分析{(5975 Inert XL; Agilent, at 70 eV), HP-5MS capillary column (0.25 mm x 30 m, 膜厚 0.25 μ m), He; 1.00 ml/min, 温度 60-290°C, 10°C/min}した。その結果、アルコール部分が共通の 1-hexanol で脂肪酸部分がそれぞれ lauric acid, myristic acid, palmitic acid と変化する 3 類型(C_6 - C_{12} , C_6 - C_{14} ,および C_6 - C_{16} と略)及び 1-octanol と lauric acid とがエステル化した C_8 - C_{12} とに分類できた。個体群の類型は常識的には採集場所ごとに異なると思わるが、太閤山公園の個体群では意外にも同じ場所で C_6 - C_{12} (n=19)と C_6 - C_{14} (n=20),の個体が混ざって採集でき、この 2 類型の個体間には、形態的相違を認め得なかった。個体数が少なく結論できないがサツマフジヤスデに C_6 - C_{16} (n=5)と C_6 - C_{12} (n=1)、立山個体群には C_6 - C_{14} (n=1)と 2 類型 (C_6 - C_{12} + C_8 - C_{12})にまたがる個体(n=1)もあり、全体的に種内変異の多い個体群と思われる。

Chemical study on antifungal substances produced by endophytic fungi

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) OEnkhee PUREV, Hitomi ISOBE, Daigo TAKEMOTO, Kazuhito KAWAKITA, and Makoto OJIKA

[Aim]

Epichloë endophyte is a microorganism that resides internal tissues of the temperate grasses of the subfamily *Pooideae* and provides the host plants with fastness against insect and pest damages. The main aim of this study is to isolate antifungal substances produced by the endophytic fungus *Epichloë festucae* 437 (wild and a *vibA* gene-overexpressed strains) and to determine their structures and mode of action.

[Methods and Results]

The endophyte strains were cultured in a liquid medium for seven days. The culture filtrate was freeze-dried and washed with methanol. The methanol-insoluble fraction was separated by ODS HPLC to give a partially purified substance that inhibited the spore germination of the important plant pathogen *Dreschlera erythrospila*. The major part of the structure was obtained by NMR analysis. To complete the purification of the active substance and determine the molecular formula by MS, we are now examining the HPLC conditions using a number of columns, which are appropriate for polar compounds

A-a11

Streptomyces が生産する anthracimycin の生合成に関する研究 (「富山県大工、2NBRC) ○春成円十朗」、小牧久幸2、五十嵐康弘1

【目的】

グラム陽性菌 Streptomyces 属放線菌が生産するマクロライド系ポリケタイドである anthracimycin はグラム陰性菌 Sorangium 属の粘液細菌が生産する chlorotonil A と 3、4、8位の置 換基を除くと鏡像異性体の関係にある。我々の知る限り分類学的に大きく異なる生物が鏡像異性体を 生産する例は無く、その生合成に興味がもたれた。本研究では、anthracimycin の生合成前駆体の安 定同位体標識化合物の取り込みを調べることにより、生合成起源を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

はじめにポリケタイド骨格を決定するため、 $[1,2^{-13}C_2]$ 酢酸を培養開始 48 時間から 24 時間ごとに 4 回添加することで目的化合物に取り込ませた。培養液中の anthracimycin はブタノールにより抽出し、シリカゲルクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーおよび逆相系 HPLC により精製した。標識された anthracimycin の 13 C NMR により骨格は全て酢酸由来であることが明らかとなり、マクロライド骨格に一般的なプロピオン酸由来ではないことが示された。以上より、残る 3 つのメチル基はメチオニン由来であると推測されたため、 $[メチル-^{13}C]$ メチオニンの添加を行ったところ、いずれのメチル基も 13 C シグナルの増強が観察されたことから、メチオニン由来であることが証明された。

Pseudorobillarda 属糸状菌の生産する二次代謝産物の構造研究

('富山県立大、'Mycosphere)〇下山猛夫'、三由美都季'、Olivier Laurence'、五十嵐康弘'

【目的】

Fleming による penicillin の発見以来、微生物は医薬探索源として活発に研究がなされてきた。しかし近年、*Penicilliumや Aspergillus* などの糸状菌からは、既知化合物を単離する頻度が高くなり、新規化合物の発見が難しくなってきている。一方で、二次代謝物の研究が進んでいない微生物も未だ多く残されており、微生物の生合成能力については、検討の余地がある。本研究では、二次代謝産物報告例のない *Pseudorobillarda* 属糸状菌からの新規化合物の発見を目的に、培養条件の検討と生産物の構造解析を行った。

【方法・結果】

Pseudorobillarda texana MS 9788 をさまざまな培地で培養したところ、液体培地に 0.4%の寒天を加えた半固体培地にて良好な物質生産が認められた。25 °Cで 30 日間培養後、培養菌体をブタノール抽出し、その濃縮物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーにより分画した。その後、HPLC 分取により精製し、3 種の化合物を得た。各種二次元 NMR スペクトル及び HR-ESI-MS 解析により、1 つは既知物質 monascuspyrone と同定されたが、残り 2 つは新規化合物であったことから、robillafurane、robillapyrone、と命名した。これらのうちピロン化合物であるmonascuspyrone と robillapyrone はいずれもマウス前駆脂肪細胞 ST-13 の脂肪細胞への分化を誘導した。

A-a13

サソリ毒素ペプチド LaIT2 のジスルフィド架橋様式の決定

(京大院農)安藤亮、〇宮下正弘、中川好秋、宮川恒

【目的】

LaIT2 はヤエヤマサソリの毒液より単離された 59 残基のペプチドであり、殺虫活性ならびに抗菌活性を示す。LaIT2 は 2 つの構造ドメインによって構成されており、N 末端領域は α -ヘリックス構造を形成し、C 末端領域は 3 つのジスルフィド結合によって折りたたまれた構造を持っている。このような構造を持つペプチドは他のサソリ毒液からも多数見いだされているが、3 つのジスルフィド結合の架橋様式について実験的に決定された例はない。そこで本研究では、質量分析計を用いて LaIT2 のジスルフィド架橋様式の決定をおこなった。

【方法・結果】

LaIT2 のジスルフィド結合を保ったまま、CNBr、トリプシン、Asp-N によって順次処理し、Cys 残基間の配列を特異的に切断した。得られた消化断片を LC/MS によって分析し、1 組の架橋様式を決定した。この分析では、2 つのペプチド(CEDHCR と DCVCS)が 2 組のジスルフィド結合により架橋された断片も検出された。この断片のさらなる消化は困難であると考え、異なる架橋様式を持つ 2 種類の標品化合物をそれぞれ化学合成し、MS/MS 分析によるフラグメンテーションパターンを比較することで架橋様式の決定を試みた。架橋様式の異なる 2 種類のペプチドの合成には、選択的なジスルフィド結合の形成が必要となるが、これを達成するために異なる条件で除去できる Cys 側鎖保護基を用いた。標品と消化物の MS/MS フラグメンテーションを比較した結果、この断片に含まれる 2 組の架橋様式が判明し、LaIT2 のすべてのジスルフィド架橋様式を決定することができた。

AKKPFVQRVKNAASKAYNKLKGLAMQSQYGCPIISNMCEDHCRRKKMEGQCDLLDCVCS

Darzens 反応を利用した天然ラクタム化合物群の全合成

('京府大院生命環境、'北大院先端生命)〇水谷将馬'、谷口 透'、小森健太'、門出健次'、倉持幸司'、椿 一典'

【目的】 Rubrobramide は不完全菌類の一種である Cladobotryum rubrobrunnescens の培養液から単離され、マウスのリンパ球性白血病 L-1210 に対する細胞毒性を有する。また、Flavipucine は同菌や Aspergillus flavipes から単離されており、グラム陽性菌およびグラム陰性菌に対する抗菌活性をもつ。 我々はこれまでに α -ブロモ- β -ケトアミドとグリオキサールとの Darzens 反応を利用した新規 γ -ラクタム形成反応を開発している。今回、本反応を利用することで、 α -ブロモ- β -ケトアミド 1 および 3 から Rubrobramide と Flavipucine をそれぞれ合成することを計画した。

【方法・結果】 まず、 α -ブロモ- β -ケトアミド 1 とイソブチルグリオキサールとを γ -ラクタム形成 反応に付し、 γ -ラクタム 2 を合成した。続いて、得られた 2 を p-トルエンスルホン酸で処理したところ、ケタールの脱保護とともに 3 つの縮環構造が一挙に形成され、Rubrobramide を合成することに成功した。さらに、合成したラセミ体を光学分割した後、VCD 励起子キラリティー法により両エナンチオマーの絶対立体配置を決定することができた。一方、アミドを Boc 基で保護した基質 3

とイソブチルグリオキサールと の反応を行うと、Darzens 反応 のみが進行し、エポキシイミド 4 が得られた。PdCl₂(CH₃CN)₂ を用いて化合物 4 のケタール と Boc 基を順次脱保護すると、6 環化の様式が一転し Flavipucine を合成できた。

A-p02

Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor)の合成化学的研究 (名大院生命農)〇橋本圭古、池田 藍、西川俊夫、中崎敦夫

【目的】

Inagami-Tamura EDLF (Endogenous Digitalis-Like Factor) は稲上・田村らによってウシの副腎より単離された物質であるが、得られた量の少なさのため未だ構造は明らかになっていない。その後榊原らが推定構造(1)を提唱したが、15,16 位の水酸基の実際の位置や立体化学は不明のままである。そこで我々は、榊原らによって提唱された構造(1)をもとに様々な候補物質を合成し活性評価を行うことにより、Inagami-Tamura EDLF の真の構造を明らかにすることを目的として研究を開始した。

【方法・結果】

ソルビン酸エチルから容易に合成可能なヒドロキシラクトン 2 (ラセミ体) を用いた分子間 Heck 反応によって、8,9-trans-ラクトン 3 を得た。続く Friedel-Crafts 型アルキル化反応により B 環構築を行い、さらに 7 段階の反応を経て 15,16-cis-ジオールを有する候補物質 4 及び 5 を得た。

SOFAT-HMQC NMR を用いた非カテコール型フラボノイドによるアミロイド β の凝集阻害機構の解析 (1京大院農、2 医薬基盤研) 〇花木瑞穂 1、村上一馬 1、赤木謙一 2、入江一浩 1

【目的】アルツハイマー病(AD)の原因物質と考えられている 42 残基のアミロイド β タンパク質 (A β 42) は、凝集する過程で神経細胞毒性を示す。本研究グループは最近、カテコール構造を有するフラボノイドであるタキシフォリンが自動酸化されて σ キノン体を形成し、A β 42 の Lys16 あるいは Lys28 とマイケル付加体を形成することにより、凝集を抑制することを明らかにした(Sato, M. et al., J. Biol. Chem. 2013、288、23212). 一方で、カテコール構造をもたないフラボノイド(モリン、ダチセチン、ケンフェロール)も A β 42 の凝集を抑制したが、その凝集抑制機構の詳細は不明なままであった。本研究では、これらの非カテコール型フラボノイドにおいて、B 環の水酸基の位置および数の A β 42 凝集抑制能への影響を系統的に解析した.

【方法・結果】B 環の 2' あるいは 4' 位に水酸基をもつモリン,ダチセチン,ケンフェロールが作用する $A\beta42$ のアミノ酸残基を,SOFAST HMQC NMR を用いて解析した.その結果,モリンならびにダチセチンは, $A\beta42$ の凝集において重要な His13,14 および Phe19,20 などと相互作用することが示唆された.一方で,ケンフェロールにおいては $A\beta42$ との相互作用がほとんど認められなかった.ケンフェロールはインキュベーション中に一部酸化分解していたことから,酸化分解物と $A\beta42$ の相互作用を同様に調べたが,その相互作用もほとんど認められなかった.

次に、これらのフラボノイドが $A\beta42$ の 2 つの凝集過程(核形成および線維伸長過程)のどの段階に作用するかを調べた。その結果、B 環の 2' 位水酸基をもつモリンおよびダチセチンは、分子内水素結合に起因する平面性を介して、 $A\beta42$ の分子間 β シート形成領域と相互作用することによって、両過程を阻害することが示唆された。一方、2' 位に水酸基をもたないケンフェロールとその酸化分解物は、線維伸長過程のみを抑制していることが示唆された。以上より、B 環の複数の水酸基の位置の違いによって、 $A\beta42$ の凝集抑制機構が異なることが初めて示された。

A-p04

花芽誘導物質 LDS1 および構造改変体の合成

(静岡大・¹工、²農、³グリーン研、⁴創造科技院)〇山田優作¹、土屋諒²、廣住操俊¹、佐藤浩平¹、鳴海哲夫¹、 戸田三津夫 ¹、大西利幸^{2,3}、間瀬暢之^{1,3}、渡辺修治^{1,4}

【目的】

低分子花芽誘導物質の合成は農産物の開花調節への応用面だけでなく、植物生理学的研究でも期待されている。本研究室では、アオウキクサ($Lemna\ paucicostata$)の乾燥処理によって生成する花芽誘導分子(11E,15 $\emph{Ø}$ -9,13-dihydroxy-10-oxooctadeca-11,15-dienoic acid (1, LDS1) を発見した。LDS1

は 10 nM という低濃度でアオウキクサに対して花芽誘導を示す。LDS1の構造要求性に関する知見を得るために、LDS1構造改変体、および、LDS1の合成に着手した(Fig. 1)。

【方法・結果】

LDS1 の 13 位水酸基欠損体 2 は、oleic acid 2 (cis)-hept-4-enal を出発物質として全 7 steps で合成を完了した。化合物 2 の 10 位のカルボニルを還元しアルコール 3 に変換した。得られた E olefine のアリル位選択的酸化反応により、13 位への水酸基導入を検討した。また、3 のメチルエステルを 10 位選択的に酸化することにより、LDS1 のメチルエステル体及び LDS1 の合成を目指している。LDS1 は 6 種類の官能基と炭素直鎖の長さが花芽誘導活性に関与していると考え、LDS1 における構造要求性を解明するために、13 位水酸基、11 位、15 位二重結合のそれぞれの欠損体、炭素鎖短縮体、および、13 位水酸基位置異性体等の構造改変体の合成に着手した。現在までに LDS1 の合成は達成していないが、複数の構造改変体では、花芽誘導活性が著しく低下するなど、構造要求性に関する新たな知見を得ることができた。

7-Oxoorobanchol の光学活性体合成に関する研究 (神戸大院農)新子大樹、田中政志、久世雅樹、〇滝川浩郷

【目的】

Striga や Orobanche などの根寄生雑草の種子は、宿主から分泌される発芽刺激物質を感知して発芽することが知られている。それら発芽刺激物質として単離された化合物群はストリゴラクトンと総称されており、近年、新たな植物ホルモンとしても大いに注目されている。2009年、既報の天然ストリゴラクトンであるorobancholの7位が酸化された7-oxoorobancholの単離が報告された。本研究では、7-oxoorobancholの光学活性体合成を目的としている。

【方法・結果】

我々は、既に 7-oxoorobanchol の 4 位水酸基を除去したモデル化合物である 7-oxo-5-DS のラセミ・ジアステレオマー混合物の合成を達成している。その基本的な合成経路を踏襲しながら、合成中間体の光学分割を試みた。その結果、合成中間体のジアステレオマー法による光学分割が可能であることを見出し、7-oxoorobanchol の光学活性体合成法を確立した。

A-p06

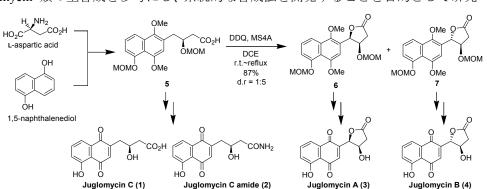
Juglomycin 類の系統的合成法の開発 (京府大院生命環境)〇吉岡快、加茂翔伍、倉持幸司、椿一典

【目的】

Juglomycin 類 (1~4) は放線菌 Streptomyces sp. より単離された 1,4-ナフトキノン天然物であり、枯草菌 (Bacillus subtilis) や大腸菌 (Escherichia coli) などに対する抗菌活性性を有することが知られている (Scheme 1)。これらの天然物は生産菌内で共通の生合成経路に従い、順次生産されると考えられている。今回は Juglomycin 類の生合成を参考にし、系統的な合成法を開発することを目的として研究を行なった。

【方法・結果】

L-アスパラギン酸と1,5-ナフタレンジオールから合成したカルボン酸 5より、Juglomycin類(1~4)の合成を行なった(Scheme 1)。まずカルボン酸



5 に脱保護と官能 Scheme 1. Synthesis of Juglomycins (1~4)

基変換を施し、Juglomycin C (1) と Juglomycin C amide (2) を合成した。一方、カルボン酸 $\mathbf{5}$ に対し DDQ を作用させると分子内酸化的ラクトン形成反応が進行し、化合物 $\mathbf{6}$, $\mathbf{7}$ が得られることを見出した。そして化合物 $\mathbf{6}$, $\mathbf{7}$ の保護基の除去と酸化を行ない、Juglomycin \mathbf{A} (3)、Juglomycin \mathbf{B} (4) の合成を達成した。

立体選択的 oxypalladation を用いた decytospolide A, B および 3-epi 体の合成研究 (1信大院総合工、2京薬大創薬化、3信大院農) 〇黒米 雄次 1、服部恭尚 2、真壁秀文 1.3

【目的】 THP 環は生理活性を有する種々の天然物に含まれる骨格で、天然物合成研究においては、様々な立体化学の制御方法が報告されている。我々は、バンレイシ科アセトゲニン類の合成研究の過程で、 2 価 Pd 触媒とアリールアリルエステルによるジアステレオ選択的な THP 環の構築法を見出し、ミトコンドリア complex I を強力に阻害する pyranicin の全合成を達成した。環化反応の収率及び立体選択性について現在までに更なる最適条件を見いだした事から、2,6-cis-二置換 THP 環の構築のターゲットとして多くのグループが合成を行ってきた decytospolide A (1), B (2)の合成に応用する事とした。

【方法・結果】(S)-グリシドールを出発物質として、位置選択的な Grignard アルキル化反応、水酸基の保護基の変換と Dess-Matin 酸化、続くジアステレオ選択的な Grignard アルキル化反応とクロスメタセシス反応によるアリールアリルエステルの導入により環化前駆体を合成した。オキシパラデーションによる環化体はヒドロホウ素化を含む数段階の反応を経た後、最終工程での水酸基の光延反転を試みたが反応は進まなかった。そこで、環化前に立体反転を行い、同様の工程を経て decytospolide A (1)、B(2)の全合成を完了した。各種スペクトルは文献値との良い一致を示した。

A-p08

大豆イソフラボン代謝産物 equol のエナンチオ選択的合成研究 (阪府大院生命環境)〇木下麻美、齋藤雄輔、園田素啓、谷森紳治

【目的】

Equol は、大豆イソフラボンであるダイゼインの腸内代謝によって産生されるフラボノイドであり、前立腺がんや乳がん、更年期症状などの予防と改善効果との関連が報告されている。そこで本研究では、equol の合成法を検討し、構造活性相関などの応用研究につなげたいと考えた。

【方法・結果】

まず、ラセミ体エクオールの合成を行った。2,4・ジメトキシベンズアルデヒドと4・メトキシフェニル酢酸を出発物質とし、Perkin 反応、還元、水酸基の臭素化、脱メチル化、および環化の五段階によりラセミ体エクオールを良好な収率で合成した。この結果をもとに、次に光学活性 equol の合成について検討した。その結果、アリールプロピオンアルデヒド2 を出発物質とし、アリール化剤としてジアリールヨードニウム塩3 を、有機分子触媒として1・フェニルグリシンから導いた1 MacMillan 触媒1 を用いて不斉アリール化反応を行い、アルデヒド1 を得た。続いてラセミ体エクオールの場合と同様に、還元、臭素化、脱メチル化、および環化反応を行うことにより、エナンチオ選択的に1 を合成することに成功した。

放線菌由来 CYP105A1 の三重変異体(R73A/R84A/M239X)の大腸菌での発現とビタミン D2 と 7-メトキシクマリンに対する酵素活性

(¹.京大院·農、².富山県大·工、³.理研播磨、⁴.相愛大·人間)〇佐久間宙 ¹、余語祐哉 ²、滝田禎亮 ¹、 安田佳織 ²、杉本宏 ³、城宜嗣 ³、真野寛生 ²、太田美穂 ⁴、生城真一 ²、保川清 ¹、榊利之 ²

【目的】我々は、放線菌 Streptomyces griseolus 由来 CYP105A1 が、ビタミン D3(VD3)の 25 位と 1α 位を水酸化し、活性型ビタミン D である 1α ,25-ジヒドロキシビタミン D3(1α ,25D3)を生成することを明らかにした。さらに、活性部位に変異を導入し、高活性な二重変異体 R73A/R84A を得た。本酵素によるビタミン D2(VD2)の 1α 位水酸化活性は、25 位水酸化活性に比べ極めて低く、その原因としてMet239 による立体障害が示唆された。本研究では、高い VD2→ 1α ,25D2 変換活性をもつ酵素を得るため、R73A/R84A の Met239 を置換した多様な変異体を用意し、その発現条件を検討し、25 D2 の 1α 位水酸化活性を測定した。また、7-メトキシクマリン(7-MC)に対する 0-脱メチル化活性も調べた。

B-a02

活性型ビタミン D や医薬品代謝物を生産する CYP105A1 の機能解析

('富山県大·工、'京大院·農、'理研播磨、'相愛大·人間発達)〇余語祐哉'、安田佳織'、滝田禎亮'、杉本宏'、城宜嗣'、真野寛生'、林恵子'、鎌倉昌樹'、太田美穂'、生城真一'、保川清'、榊利之'

ビタミン D_3 (VD3)、ビタミン D_2 (VD2)の 1α 位および 25 位が水酸化された $1\alpha,25$ -ヒドロキシビタミン D_2 および D_3 ($1\alpha,25D2$ および $1\alpha,25D3$)はさまざまな生理作用を有することが知られており、骨粗鬆症や乾癬の治療薬として使用されている。

放線菌 $Streptomyces\ griseolus$ 由来 CYP105A1 は VD3 の 25 位と 1α 位を水酸化し、 1α ,25D3 を生成する。我々は X 線結晶構造解析から得られた CYP105A1 の立体構造を基に二重変異体 R73A/R84A を作製し、25 位および 1α 位水酸化活性をそれぞれ 400 倍および 100 倍上昇させることに成功した[1]。一方、25-ヒドロキシビタミン D_2 (25D2)に対する 1α 位水酸化能は、きわめて低く、R73A/R84A と 25D2 のドッキングモデルから、Met239 の側鎖が 1α 位水酸化活性を阻害していると推測された。 R73A/R84A の Met239 をさまざまなアミノ酸に置換した三重変異体を作製し、25D2 に対する 1α 位水酸化活性を調べた。その結果、R73A/R84A/M239A は R73A/R84A の約 20 倍高い活性を示した。

CYP105A1 を用いた有用物質生産の可能性を探るため、種々の基質に対する活性を調べたところ、非ステロイド系抗炎症薬(ジクロフェナク、メフェナム酸、フルフェナム酸等)に対して高い活性を示すことがわかった。この場合は Arg73 が基質の結合にきわめて重要な役割を果たしており、ビタミン D水酸化反応の場合と真逆であった。また、CYP105A1 はスタチン系高脂血症薬(メバスタチン、ロバスタチン)に対しても水酸化活性を示し、変異導入により活性を著しく上昇させることに成功した。

このように、CYP105A1 は構造の異なるさまざまな基質に対して活性を示す。その中には実用性の高い反応が含まれており、立体構造に基づく変異導入により産業応用が可能になると思われる。

1) Hayashi et al.(2008) *Biochemistry*, 47, 11964-11972

Expression of soluble manganese peroxidase in chaperons over-expressing *E. coli* and *in vitro* maturation by ATP-dependent chaperons releasing

(名大院生命農) OAlfi Almasul, Bo Zhu, Jasmina Damnjanovic, Takaaki Kojima, Yugo Iwasaki, Hideo Nakano

Manganese peroxidase (MnP) is able to catalyze a redox reaction, even for bulky compounds. Therefore, MnP is highly used in paper industries, biodegradation of synthetic polymers, and bioremediation of environmental pollutants. However, MnP is mostly expressed as insoluble form in *E. coli*. The objective of this study was to improve the solubility and the ratio of holoenzyme of MnP (holo-MnP) from *P. chrysosporium* expressed in *E. coli*.

Our previous study showed that disulfide bond isomerase DsbC improved the solubility of *in vitro* synthesized MnP (1). Hence, *E. coli* strain SHuffle T7 Express was chosen as the host for *in vivo* expression, because it overexpresses the DsbC in cytoplasm. The MnP was also co-expressed with various other chaperone combinations including dnaK, dnaJ, grpE, groES, groEL, and trigger factor (tig). The solubility of MnP was improved by co-expression with DsbC-tig and DsbC-dnaK-dnaJ-grpE. After the purification of Mnp, the chaperones were found to be co-purified, and native PAGE indicated that the chaperones-MnP complex was formed. To disassociate the MnP-chaperon complex, the cell lysate or the semi-purified MnP-chaperon was incubated with additional hemin, ATP and ATP-regeneration system. This *in vitro*-maturation step led to the production of holo-MnP with comparable specific activity of commercial glycosylated MnP form *P. chrysosporium*.

(1) Ninomiya and Zhu et al., J Biosci Bioeng, 117, 652-657, 2014.

B-a04

Substrate specificity of L-amino acid oxidase/monooxygenase from Pseudomonas sp. AIU 813

(¹Mahidol University, ²Toyama Prefectural University) ODuangthip Trisrivirat¹, Daisuke Matsui², Yasuhisa Asano² and Pimchai Chaiyen¹

L-Lysine oxidase/monooxygenase (L-AAO/MOG) from *Pseudomonas* sp. AIU 813 is an FAD-bound enzyme. The enzyme catalyzes both oxidative decarboxylation and oxidative deamination of L-amino acid. Oxygen is utilized as a co-substrate. The reaction yields α -keto acid, hydrogen peroxide and ammonia as products for oxidase activity while amide and carbon dioxide is resulted from monooxygenase activity. L-AAO/MOG is useful as a diagnostic enzyme for detection of single amino acid concentrations in blood as biomarkers for disease diagnosis.

L-AAO/MOG gene from *Pseudomonas* sp. AIU 813 was subcloned into pET11a vector containing *BamH*I and *Nde*I cutting site by ampicillin selection, and overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) using auto-induction system. The enzyme was purified by ammonium precipitation, dialysis, anion-exchange and phenyl sepharose chromatography. Substrate specificity of the enzyme in a reductive half-reaction was observed in an anaerobic condition by spectrophotometer. Results show that L-Lysine and L-arginine are best substrates to reduce the enzyme bound-FAD during the reductive half-reaction.

L-アミノ酸オキシダーゼ/モノオキシゲナーゼの変異導入による機能改変 (¹富山県大工・生工研セ、²JST ERATO、³東大院農) 〇松井大亮 ¹²、林到炫 ³、伏信進矢 ³、礒部公安 ^{1,2}、浅野泰久 ^{1,2}

【目的】

我々は、血中アミノ酸による疾病検出を安価且つ簡易的に行うため、酵素を用いた定量法の開発を進めてきた。Pseudomonas sp. AIU 813 由来 L-アミノ酸 α -オキシダーゼ/モノオキシゲナーゼは、塩基性 L-アミノ酸の酸化的脱アミノ反応と酸化的脱炭酸反応を触媒する二機能性のフラビン酵素である。本実験では、本酵素のアミノ酸定量用酵素への利用を目指して、変異導入による機能の改変を行った。

【方法・結果】

スルフヒドリル試薬であるp-クロロ水銀安息香酸(p-CMB)の添加により、モノオキシゲナーゼ活性が減少し、オキシダーゼ活性が上昇することから、本酵素中の5つのシステイン残基に飽和変異を導入し、オキシダーゼ活性を指標としてスクリーニングを行った。得られた変異型酵素C254Iは、野生型酵素よりもオキシダーゼの比活性が上昇し、C254Iにより活性の低下が見られないことから、酸化的脱炭酸反応にはC2554が関与していることが明らかとなった。

さらに基質認識部位を明らかにするために、本酵素の基質ポケットに位置する残基(Arg102、Trp235、Asp238、Gln258、Tyr416)に飽和変異を導入した。その結果、得られた変異型酵素 D238F は、塩基性 L-アミノ酸に対するオキシダーゼ活性が減少し、L-ロイシンや L-フェニルアラニンなどの疎水性アミノ酸に対してオキシダーゼ活性を示したことから、Asp238 が基質認識に関与していることが推定された。Asp238 を Glu に置換することで、L-リシンに対する基質特異性が上昇し、より選択的に L-リシンを定量することが可能となった。

B-a06

金属要求性酵素の金属置換による触媒機能の改変検討

(京大院農)日比 慎、〇間中千尋、小園祥子、高橋里美、小川 順

【目的】

金属要求性酵素類は金属イオンを補因子として含有しており、その結合が酵素の触媒機能の完全な発揮のために必要である事が多い. ある金属要求性酵素の機能に影響を及ぼす金属イオンの種類は必ずしも1つではなく、ある程度柔軟に種々の金属イオンを受容し得る. 本研究ではこの性質を活かし、様々な金属イオンを人為的に結合させた金属要求性酵素を作製する事で、新たな機能性を持たせた酵素触媒の開発を実施する.

【方法・結果】

本研究では Fe(II)/α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属するアミノ酸水酸化酵素類を対象として金属イオン種の置換を実施した.本酵素の活性中心を形成する錯体に含まれる Fe(II) イオンは EDTA などのキレート剤処理により容易に脱離して不活性型のアポ酵素となる. またアポ酵素に Fe(II)イオンを添加することで活性型のホロ酵素に速やかに変化する。このような柔軟な金属イオン結合能を活かし、アポ酵素に対して様々な金属イオンを添加することで、非天然型の金属が結合した新規酵素触媒の創出を目指した. 各酵素触媒に関して比活性や基質特異性の変化を解析した結果に関して報告する.

Biochemical characterization of succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) from *Acinetobacter baumannii*

(¹Mahidol University, ²Mahidol University, ³Burapha University, ⁴Chulalongkorn University)○Jittima Phonbuppha¹, Ruchanok Tinikul², Somchart Maenpuen³, Kittisak Thotsaporn⁴, and Pimchai Chaiyen¹

Succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) is an enzyme that catalyzes the oxidation of succinic semialdehyde to succinic acid using NAD(P)⁺ as an electron acceptor. Succinic acid, the product of SSADH reaction is widely used in the chemical industry as a precursor for synthesizing commodity chemicals, such as biodegradable plastics. Therefore, SSADH has a potential to be used in biocatalysis or the biorefinery process to produce succinic acid. The knowledge of enzymatic and kinetic properties of SSADH will pave the way for its biocatalytic application.

The AbSSADH gene is a part of p-hydroxyphenylacetate (4-HPA) degradation pathway but it shares the highest sequence identity with SSADH encoded by gabD gene in $E.\ coli$, a member of γ -aminobutyrate (GABA) degradation pathway. AbSSADH and gabD from $E.\ coli$ also share similar catalytic properties such as preference to use NADP⁺ as an electron accepter, number of cysteine residues at the active site (catalytic and neighboring cysteine) and formation of disulfide bond under oxidized state. We found that the pK_a value of the group in AbSSADH that has to be deprotonated in order to achieve the higher activity is 7.5 ± 0.1 and the neighboring cysteine (Cys291) is not associated with the ionization properties of the group participating in the enzyme catalysis. The enzyme also show reasonable thermostability at 40°C and relatively stable at 30 and 35°C. The AbSSADH reaction proceeds via a ternary complex mechanism with $K_m^{SSA} = 189\pm31\ \mu\text{M}$; $K_m^{NADP+} = 113\pm18\ \mu\text{M}$; $V_{max} = 5\pm0.3\ \mu\text{M/sec}$ and k_{cat} $137\pm9\ \text{sec}^{-1}$. The step generating NADPH is not the rate-limiting step, while the steps after hydride transfer to NADP⁺ is slow and control the overall catalytic turnover of SSADH reaction.

B-a08

Purification and Characterization of Xylitol Dehydrogenase with Broad Substrate Specificity from Newly Isolated Pentose Fermenting Yeast *Meyerozyma caribbica*

(¹Prince of Songkla University, ²Toyama Prefectural University) OWiphat Sukpipat¹, Poonsuk Prasertsan¹, Hidenobu Komeda² and Yasuhisa Asano²

[Purpose] Meyerozyma caribbica strain 5XY2, a new pentose fermenting strain was isolated from Thai starter. Thai starter or "Loog-pang" is a rice-alcoholic fermentation starter from Thailand. M. caribbica could utilize hexose and pentose sugars to ethanol and sugar alcohols. In this study, xylitol dehydrogenase involved in the pentose metabolism was purified from M. caribbica and characterized. The gene for the enzyme was also isolated.

[Methods and results] A NAD⁺-dependent XDH (McXDH) was purified from M. caribbica. The enzyme exhibited broad substrate specificity toward sugar alcohols such as xylitol, D-sorbitol, ribitol and L-arabitol. Xylitol was the preferred substrate with a K_m = 16.1 mM and k_{cat}/K_m = 68.9 min⁻¹mM⁻¹. The enzyme had an optimum pH and temperature at 9.5 and 40 °C, respectively. Enzyme activity exclusively depends on NAD⁺ as a cofactor. The gene for McXDH includes a coding sequence of 1,086 bp encoding a putative 362 amino acid protein of 38.9 kDa. The McXDH was found to be a member of the zinc-containing alcohol dehydrogenase family and to have homology to xylitol dehydrogenases from other yeasts.

フルクトース脱水素酵素の電子移動経路に関するタンパク質工学/電気化学的研究 (京大院農)〇日比野佑哉、河井翔太、北隅優希、白井理、加納健司

【目的】

酸化還元酵素反応と電極反応を共役させたバイオエレクトロカタリシスは、様々な生物電気化学デバイスに応用できる. とりわけ電極を一方の基質とみなす直接電子移動(DET)型反応は世界的に注目されているが、その詳細なメカニズムは不明である.

酢酸菌由来の膜結合型酵素であるフルクトース脱水素酵素(FDH)は DET 型反応を行い、その触媒電流密度が非常に高い。 FDH は触媒活性中心である FAD に加え 3 つのへム C を有している。 我々のグループの先行研究で、 へム C サブユニット部分で電極と直接電子移動すること、また DET 型触媒反応サイクル過程では、3 つのうち 1 つのへム C が DET 型反応に関与しないと結論した 1 しかし、電子移動経路の詳細は未だ不明のままである。

本研究では、FDH をモデルとした DET 型反応のメカニズムの解明を最終目標として、タンパク質工学的にヘム C の軸配位子を置換することにより、電子移動特性がどのような影響をうけるか観察することを目的とした.

【方法・結果】

FDH の 3 つのうち 2 つのへム C の第六軸配位子である Met を Ala, Gln, および Leu に置換した変異体を作成した。アミノ酸配列上で N 末端に近いへム C を改変した変異体には,FDH との顕著な差異はみられなかった。これはそのへム C が DET 型反応に関与していないという先の結論を支持する D. 一方で,真ん中のへム D 軸配位子を Gln に改変した場合,触媒電流の観測可能な電位が負側にシフトした。この電位のシフトは応用面での有用性が極めて高い。同様の効果は Ala と Leu による変異でも観測できた。このことは,このへム D は電極と直接電子移動を行う可能性を示すが,他のアミノ酸残基の配位も考えられる。

1) S. Kawai, et al. *Electrochem. Commun.*, 2014, **38**, 28.

B-a10

テトラデカノイルCoAからテトラデカナールを生成するアシルCoAデヒドロゲナーゼに関する研究 (¹京大院農・応用生命、²トヨタ自動車)

〇藤井 宏祐 1、中谷 友樹 1、伊藤 正和 2、村松 正善 2、岸野 重信 1、小川 順 1

【目的】

ガソリンや軽油の主成分であるn-アルカンの生合成に関しては、脂肪酸がアルデヒドを経てn-アルカンへと変換されることが報告されている。本研究では微生物によるn-アルカン生産を確立すべく、脂肪酸をアルデヒドに還元する微生物を探索し、アルデヒド生産に関与する酵素ならびにその遺伝子の単離を試みた。

【方法・結果】

研究室保存菌および自然界からの単離菌を対象に、テトラデカン酸を還元する菌株の探索を行った。テトラデカナールを生成する菌株は取得できなかったが、1-テトラデカノールを生成する微生物を 121 株取得した。1-テトラデカノール生産能が高かった Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae NBRC3321 株を用いて、本反応に関与する酵素の精製を試みた。本菌の cell-free extracts (CFE) を調製し反応に供したところ、テトラデカン酸を基質とする還元活性は観察されなかったが、テトラデカノイル CoA を基質とした場合に 1-テトラデカノールの生成が認められた。 CFE を各種カラムクロマトグラフィーに供し、テトラデカノイル CoA を 1-テトラデカノールへと変換する酵素を精製していく過程で、テトラデカナールを特異的に生産するフラクションを取得した。本フラクションより、反応に関与する酵素を同定し、N 末端アミノ酸配列を決定した。本配列情報をもとに本菌のゲノムより本酵素遺伝子をクローニングし、形質転換大腸菌を作製した。本遺伝子産物の機能解析から、本酵素がテトラデカノイル CoA をテトラデカナールへと変換することを確認した。

糸状菌 *Pythium sulcatum* 由来ω3 不飽和化酵素遺伝子の機能解析および 油糧微生物 *Mortierella alpina* 1S-4 における過剰発現

(¹京大院農、²徳島大院ソシオ、³京大生理化学ユニット) 〇浅井大貴¹、中辻諒平¹、安藤晃規^{1,3}、櫻谷英治²、 小川順^{1,3}

【目的】

エイコサペンタエン酸(EPA)は、生活習慣病の予防など多様な生理機能が報告され需要が高まっている。しかし現在その供給は魚油に依存しており、安価で安定した代替供給源が求められている。本研究では EPA 生産の鍵である、 $\omega 3$ 不飽和化酵素遺伝子を糸状菌 $Pythium\ salcatum$ より単離し、酵母 $Saccharomyces\ cerevisiae$ の発現系を用いて機能解析を行った。さらに EPA の前駆体であるアラキドン酸(ARA)を高生産する油糧微生物 $Mortierella\ alpina\ 1S-4$ に導入し EPA 発酵生産を試みた。

【方法・結果】

EPA 生産性糸状菌 P. salcatum より,縮重 PCR 及び Inverse PCR を行い,既知の ω 3 不飽和化酵素と相同性を示すホモログ遺伝子(Psul ω 3 遺伝子)をクローニングした.酵母 S. cerevisiae で本酵素遺伝子の発現解析を行った結果,炭素数 18 及び炭素数 20 の ω 6 脂肪酸を対応する ω 3 脂肪酸へと変換することが確認された.一方コドン使用頻度を、M. alpina 1S-4 様に改変した Psul ω 3 遺伝子を高発現プロモーターにて制御するベクターを構築し,アグロバクテリウム法にて M. alpina 1S-4 に導入した.結果,Psul ω 3 遺伝子の発現による ω 3 系脂肪酸の蓄積が確認でき,28°C,7 日間培養において,総脂肪酸中約 30%,約 0.5 mg/mL ω 0 EPA 生産を確認した.

B-a12

Flavobacterium psychrophilum 由来コラゲナーゼの大腸菌での発現と性状解析 (「京大農、2和歌山県水産試験場、3株式会社ニッピ・バイオマトリックス研究所、4京大院農) 〇森真璃子「、中山仁志 2、田中啓友 3、服部俊治 3、滝田禎亮 1、4、保川清 1、4

【目的】

Flavobacterium psychrophilum はアユ冷水病の原因菌である。近年、本菌が産生するコラゲナーゼがアユ冷水病の原因毒素であることが示唆された。「)本コラゲナーゼは毒性が強いために形質転換菌の作製や培養が困難である。本研究では、本酵素の大腸菌での発現系を構築し、その性状解析を試みた。

【方法・結果】pUC18 にプロモーター配列を含む F. psychrophilum コラゲナーゼ遺伝子を挿入した。これを氷上で大腸菌 JM109 に加え、培養を 18° でで行い導入した。形質転換菌を LB 培地に植菌し、10、19、28、37 $^{\circ}$ の各温度で 14 日間培養して経時的に培養液を採取した。培養液の OD_{600} は、10、19、28 $^{\circ}$ の場合、4-8 日目に 5-6 に達した後、ほぼ一定であった。一方 37° Cの場合、5 日目に約 4 に達した後、減少した。培養上清の FITC-コラーゲン分解活性は、 19° Cの場合で最も高く、 37° Cの場合で最も低かった。本活性は 37° Cの場合のみ、6 日目以降減少した。培養上清の MOCAc-KPLGL(Dpa)AR 分解活性は、 37° Cの場合のみ、7-11 日目に上昇し、12 日目以降、減少に転じた。培養上清のゼラチンザイモグラフィーでは、成熟前、成熟後および部分消化を受けたと思われるコラゲナーゼのバンドが、 10° Cと 19° C では全期間で、 28° Cと 37° Cでは 1-5 日にみられた。 37° Cのみ、6 日目以降、部分消化を受けたと思われるコラゲナーゼのバンドが非常に濃く観察された。培養上清および菌体の総タンパク質の SDS-PAGEでは、10、19、 28° Cでは全期間でバンドが見られたが、 37° Cでは、6 日目以降、大腸菌由来の夾雑タンパク質のバンドが消失した。以上から、本酵素は 37° Cで部分消化あるいは何らかの修飾を受けることによりコラゲナーゼ分解活性が低下する一方、ゼラチン分解活性および広い基質特異性を示すプロテアーゼ活性が上昇することが示唆された。この変換は、本酵素の毒性に関連していると思われる。

1. Nakayama, H. et al. (2015) Biosci. Bioechnol. Biochem. in press

好熱性放線菌由来クチナーゼの表面アミノ酸残基の選択的改変による高活性変異体の取得 (福井県立大学・生物資源学部)〇亀谷貴仁,大門結花,伊藤貴文,日ビ隆雄

【目的】

植物の葉の表面は、クチンを主要な構成成分とするクチクラ層で覆われている。クチンは常温で固体の長鎖脂肪酸エステル化合物であるが、葉の表面に存在する一部の微生物は、エステル結合を加水分解するクチナーゼを産生し、このクチンを分解し侵入する。一方、脂肪酸由来の生分解性プラスチックは微生物によって分解される環境負荷の少ない資材とされているが、環境中では分解速度が遅いため十分に分解されず、期待通りのリサイクルは行われていない。強力な分解能力をもったクチナーゼを創出することができれば、生分解性プラスチックのさらなる普及につながることが予想される。

そこで、本研究では、基質との親和性の最適化や活性化エネルギーの減少を伴う高活性化を期待し、 酵素の柔軟性を増大させるよう立体構造表面に存在するアミノ酸残基を他の残基に置換した変異体を 取得し、その活性を評価した。

【方法・結果】

好熱性放線菌 Thermobifida fusca JCM3263 由来クチナーゼの N 末端にヒスチジンタグ (His-tag) が付加されるように発現プラスミドを調製した。変異候補として、構造既知の立体構造モデル(PDB: 3VIS)とホモロジーモデリングを利用し、活性部位から離れているループ中の根元のヒンジ部分に位置するアミノ酸残基を選択した。調製したプラスミドを鋳型として部位特異的な飽和変異を行い、大腸菌BL21Gold(DE3)を形質転換することで、変異体ライブラリーを作製した。それらをディープウエルプレートを用いて培養し、タンパク質を抽出後、4-nitrophenyl butyrate を基質として活性の高い変異体を選抜した(一次スクリーニング)。次に、一次スクリーニングで選抜した変異体の精製を行い、比活性を求めた(二次スクリーニング)。現在、野生型の約1.3倍の比活性を持つ変異体が取得されている。

B-p01

アシドロコンポストから単離した新規好熱性細菌 B157 株が産生するホスホリパーゼに関する研究 (「京府大院生命環境²産総研)〇古谷洋人「、石原大祐」、辻本善之「、鶴岡直樹²、茂里康²、渡部邦彦」

【目的】

アシドロコンポストは、酸性・高温条件下で分解された生ごみ堆肥である。そこに生育する微生物は、上記条件を反映しながら、生ごみを分解・資化していることが期待される。そこで、脂質分解酵素に着目し、その中でも報告が少ないホスホリパーゼ A (PLA) に焦点を当てた。PLA は、リン脂質の脂肪酸エステル結合を加水分解する酵素であり、油脂の精製等に応用される。本研究では、酸性・高温条件下で安定な PLA を産生する細菌のスクリーニングから新規好熱性細菌 B157 株を単離し、これが産生する PLA の性質決定、酵素精製および遺伝子クローニングを試みた。

【方法・結果】

茨城県大洗水族館のアシドロコンポストを菌源とし、レシチン (主にホスファチジルコリン (PC) を含む)分解を指標にしたスクリーニングを行った。その結果、好熱性細菌 B157 株が単離され、分類学的解析により新属新種が強く示唆された。次に、酵素精製の条件検討を行った。B157 株の培養上清をPEG 20,000 を用いて濃縮し、20%飽和 (w/v) 硫安沈殿除去、50% (v/v) アセトン沈殿を行った。各種カラムクロマトグラフィーによる精製は効果的でなかったため、アセトン沈殿後のサンプルを部分精製標品として以後の実験に用いた。卵黄 PC を用いた酵素反応で生じた遊離脂肪酸をガスクロマトグラフィーで解析した結果、本酵素は sm-1 位選択性が高い PLA₁であった。一方、B157 株の全ゲノム配列情報からは、PLA₁をコードすると予測された遺伝子は見いだせなかった。そこで、SDS-PAGE 後に活性染色を行い、活性バンドからの酵素タンパク質の抽出・同定を試みた。その結果、単一なタンパク質バンドとその N 末端配列解析から、(Q/G) ESX (V/N) X (V/N) HETP のアミノ酸配列が得られ、ゲノム情報と照合したところ、57 kDa の機能未知タンパク質がヒットした。当該遺伝子の大腸菌発現系を構築した結果、可溶性画分において PLA₁ 活性が検出され、現在遺伝子産物の解析等を行っている。

医療用消化酵素製剤の性質比較に関する研究

(1天野エンザイム(株)岐阜研究所、2慶應義塾大学医、)〇黒田学1、山口庄太郎1、洪繁2

【目的】国内の医療現場において、多種の酵素が消化酵素製剤として医薬に利用されている. 国産製剤の多くは、豚由来膵酵素であるパンクレアチンと複数の微生物由来酵素の複合製剤であり、海外製剤のパンクレリパーゼは高力価パンクレアチンの単一製剤である. これらの消化力は前者が日本薬局方(日局法)で、後者は海外の測定法である FIP 法で規定されているが、これまでにこれら消化酵素製剤の消化力を in vitro で正確に比較された知見はない. そこで今回、日局法と FIP 法で消化力を評価し、製剤間の性質の差異を検証することとした. また、消化管を模した消化管モデルでの消化力比較も行った.

【方法】たん白消化力,脂肪消化力,でんぷん糖化力は日局法および FIP 法に準じて測定し、せんい素糖化力は厚生省薬務局審査課長通知に準じて測定した.消化酵素製剤は、国産製剤としてエクセラーゼ、オーネス N,タフマック E,日局パンクレアチン、フェルターゼ、ベリチーム、ポリトーゼを、海外製剤としてパンクレリパーゼを対象とした.酵素は乳鉢で粉砕しながら溶解し、単位重量あたりの消化力で表した.

【結果】たん白消化力(pH3.0)では酸性プロテアーゼが配合されているポリトーゼ,エクセラーゼが他より高い消化力を示し、同(pH8.0)ではパンクレリパーゼ,オーネスNが高かった。中性から弱アルカリ性に至適pHがあるパンクレアチンの単一製剤であるパンクレリパーゼは,でんぷん糖化力(pH6.8)、脂肪消化力(pH7.0)でも最も高い消化力を示した。せんい素糖化力は、セルラーゼが配合されていない日局パンクレアチンとパンクレリパーゼ以外の全てにおいて検出された。さらに、in vitro 消化管モデルにおける消化挙動においても予想通りの結果であった。今回の検討により、医療用消化酵素製剤間の消化酵素活性の違いが明らかとなった。

B-p03

糸状菌 *Aspergillus nidulans* が分泌する新規 GH family に属する β-マンナナーゼ Man134A の発見とその生理学的役割の解明

(' 名城大・農 , ² 名城大・理工 , ³ 名大院・生命農) 〇酒井 杏匠 ¹, 望月 麻衣 ¹, 山田 みゆき ¹, 金子 優 平 ¹, 石原 紗彩耶 ¹, 新沢 祐大 ¹, 嶺澤 美帆 ¹, 木本 紗蘭 ¹, 神藤 定生 ², 志水 元亨 ¹, 小林 哲夫 ³, 加藤 雅士 ¹

【目的】

我々は、6-マンナンを唯一の炭素源として糸状菌 $Aspergillus\ nidulans\$ を生育させた際に細胞外に分泌される、既知の 6-マンナナーゼが属する glycoside hydrolase family 5 (GH5) および GH26 とは相同性を有さない新規 6-マンナナーゼ (Man134A) を見出し、新規の GH family であることを提唱した。既知の 6-マンナナーゼ (Man5C) と機能を比較したところ、酵素学的特徴も大きく異なることが明らかになった。本研究では、Man134A の生理学的な役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

Man134A と Man5C のリコンビナントタンパク質を調製し、6-マンナンを基質にして反応させたところ、生成する分解産物に違いがあることがわかった。また、Man5C の至適 pH が 4.0 であるのに対して Man134A は 6.0 であった。次に、man134A の遺伝子破壊株 ($\Delta man134A$ 株) を作製し、種々の多糖を唯一の炭素源として生育させたところ、 $\Delta man134A$ 株の生育が著しく低下した。 さらに、 $\Delta man134A$ 株の生育が著しく低下した。 さらに、 $\Delta man134A$ 株の生育が著しく低下した。 さらに、 $\Delta man134A$ と $\Delta man134A$ 株の生育が著しく低下した。 さらに、 $\Delta man134A$ と $\Delta man134A$ は特に中性付近における $\Delta man134A$ において高い相乗効果を示した。以上の結果より、 $\Delta man134A$ は特に中性付近における $\Delta man134A$ は対は $\Delta man134A$ は特に中性付近における $\Delta man134A$ は対は $\Delta man134A$ は $\Delta man134A$ は対は $\Delta man134A$ は対は $\Delta man134A$ は $\Delta man134$

Directing positional specificity in phospholipase D-catalyzed synthesis of 1-phosphatidylinositol

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) OJasmina Damnjanovic, Chisato Kuroiwa, Ken Ishida, Hidetoshi Tanaka, Michiko Muraki, Hideo Nakano, Yugo Iwasaki

[Background and purpose of the study]

Phosphatidylinositol (PI) could become an important dietary supplement due to its effects on regulation of lipid metabolism in humans. Due to its limited availability in nature, enzymatic reaction between phosphatidylcholine (PC) and *myo*-inositol catalyzed by phospholipase D (PLD) could be a sustainable and cost-effective alternative for PI production. Our previous study used *Streptomyces* PLD as a template for generation of PI-synthesizing variants by saturation mutagenesis targeting inositol-accommodating residues, W187, Y191 and Y385. Since the variants generated PI as a mixture of positional isomers among which only 1-PI exists in nature, the current study aimed to create 1-PI specific PLD starting from W187N/Y191Y/Y385R PLD (NYR) which generates PI as a mixture of 1-PI and 3-PI in the ratio of 76/24.

[Methods and result]

Four residues of NYR's inositol-binding site were subjected to mutagenesis and screening for improved specificity. NYR-186T and NYR-186L emerged as the most improved, achieving 1-/3-PI ratio of 93/7 and 87/13 respectively, at 37°C. Structure model analyses pointed at G186T and G186L mutations to increase rigidity of the binding site, thus restricting the orientations of inositol. Further structure rigidification at low temperatures increased the specificity of both variants to 1-/3-PI > 97/3 at 20°C, with no change in PI yield. PI synthesis at a range of temperatures and subsequent analysis of the thermodynamic parameters revealed different mechanisms of inositol binding and its temperature dependency in 1-PI and 3-PI specific enzymes.

B-p05

分岐型プレニルニリン酸を与えるメタン生成古細菌由来酵素の研究 (名大院生命農)〇邊見 久、小川拓哉、江見晃一、吉村 徹

【目的】

E,Z 混合型ポリプレニル二リン酸合成酵素は一般に、ファルネシル二リン酸(FPP)に代表される 短鎖の全 E型プレニル二リン酸をプライマー基質とし、これに対してイソペンテニル二リン酸(IPP)を重合的に縮合させてウンデカプレニル二リン酸などの糖キャリア脂質前駆体を合成する.しかし、メタン生成古細菌 $Methanosarcina\ acetivorans$ 由来の同酵素 Ma1831 は、通常の反応に加えて、FPP とジメチルアリル二リン酸(DMAPP)間の縮合反応も触媒する二機能性酵素である.そこで Ma1831 の生成物の構造解析を進め、生理的機能を推定することを目的とした.

【方法・結果】

大腸菌で発現させた組換え酵素を用い、FPP と DMAPP を基質とした縮合反応を行った. 得られた生成物を LC-MS で解析、もしくはホスファターゼ処理した後に HPLC で精製して NMR 解析に供した. その結果、同生成物はラバンジュリル構造を含む新奇な C_{20} 分岐型プレニルニリン酸と同定され、ゲラニルラバンジュリルニリン酸と命名された. しかしながら同化合物が前駆体だと推定される化合物はこれまで M. acetivorans から見出されておらず、この縮合反応は生理的な意義を持たない可能性が高い. 一方で、短鎖全 E型プレニルニリン酸とE14CE1PP を基質として反応を行い、ホスファターゼ処理後に TLC による生成物分析を行った結果、E20を中心とした様々な鎖長のポリプレニルニリン酸の合成が示された. ところが、E20を中心とした様々な鎖長のポリプレニルニリン酸の合成が示された. ところが、E30を中心とした様々な鎖長のポリプレニルニリン酸の合成が示された. ところが、E30を中心とした様々な鎖長のポリプレニルニリン酸の合成が示された. ところが、E31の合成を中心とした様々な鎖長を LC-MS を用いて調べたところ、大腸菌などと同様に E35が中心であり、E41の生成物分布とは大きく食い違った結果となった. E41の本では、E55が中心であり、E51の本では、E

合成アルドキシムを基質とするアルドキシム脱水酵素反応のエナンチオ選択性の解明

(「富山県大工・生工研セ、²JST ERATO、³Bielefeld University) 〇大池敬子 「Richard Metzner^{1,2}、Harald Gröger*³、浅野泰久*^{1,2}

【目的】

ニトリル化合物は、ナイロン、アクリル繊維、殺虫剤等の工業的生産における重要な中間体である.自然界では、アルドキシムーニトリル経路を持つ微生物が存在し、アルドキシムはアルドキシム脱水酵素(Oxd)により、ニトリルを経てカルボン酸に代謝される.これまでに、Bacillus sp. strain OxB-1由来アルドキシム脱水酵素(OxdB)は、E(RS)-2-phenylpropionaldoxime(2-PPOx)に対し、S立体選択的に脱水反応を触媒することが明らかになっている 1) が、現段階では一例しかない.本研究では、様々なアルドキシム分解菌由来の Oxd を用いてアルドキシムのエナンチオ選択性の検討を行った.

【方法・結果】

Oxd を有する細菌ライブラリー2)より、十数株の Oxd 遺伝子を発現する大腸菌形質転換株を作成した。それらを用いて、HPLC にて 2-PPOx に対するエナンチオ選択性を検討したところ、全て OxdB と同様の結果である S選択性を示した。また、2-(thiophen-2-yl)-propionaldoxime (TPOx) および cyclohexyl-2-phenylacetaldoxime (CPOx) を合成し、OxdB を用いてエナンチオ選択的反応を行った。その結果、TPOx の場合では、2-PPOx の場合と同様に、4 つのジアステレオマーのうち、3 つはニトリルへ変換されたが、残り 1 つのジアステレオマーは変換されなかった。現在、(R)-および(S)-ニトリルの同定を行っている。それとは対照的に、CPOx のニトリルへの変換は確認できなかった。おそらく、CPOx のシクロヘキシル置換基がかさ高いため、OxdB の活性部位に合致できず、ニトリルへの変換が行われなかったと考えられる。

- 1) Metzner R., Okazaki S., Asano Y., and Gröger H., ChemCatChem., 6, 3105-3109 (2014)
- 2) Kato Y., Ooi R., and Asano Y., Appl. Environ. Microbiol., 66, 2290-2296 (2000)

B-p07

1-ホスファチジル-β-D-グルコースの酵素合成

(名大院生命農)〇井上ありさ、安立昌篤、中野秀雄、Jasmina Damnjanovic、岩崎雄吾

【背景・目的】

当研究室では、放線菌由来ホスホリパーゼ D (PLD) を蛋白工学的に改変し、ホスファチジルイノシトール (PI) 合成活性を有する変異 PLD の作出に成功した。この PI 合成反応では、ホスファチジルコリン (PC) およびイノシトールを利用しているが、同様に PC とグルコースとの間で PLD を作用させると、ホスファチジルグルコース (PGlc) が合成された。一方、1-ホスファチジル・ β -D-グルコース (1-PGlc) は、2001年にヒト臍帯血の赤血球膜から初めて単離・同定され(Nagatsuka et al., 2001)、その生理機能に興味が持たれるものの、簡便な調製法がないため未だ詳しい解析は進んでいない。そこで、変異 PLD による酵素合成により、1-PGlc を簡便に調製する方法を確立することとした。

【方法・結果】

PI 合成型変異 PLD を用いた PGlc 合成反応では、異なる複数の PGlc 異性体の生成が認められた。そこで、本研究室の保有する多様な位置特異性を有する変異 PLD (約 150 種)を調べたところ、PLD(W187K/Y191W/Y385Y)変異体が 1-PGlc を最も優先的に合成した。さらに、反応産物に含まれる 1-PGlc 以外の PGlc 異性体を還元アミノ化により変性することで、1-PGlc の単離が可能となった。現在は、大スケールにおける 1-PGlc 合成の反応条件を検討している。

ビフィズス菌由来 1,2-α-L-fucosidase の高効率フコシンターゼ化-ヒトミルクオリゴ糖の酵素合成への応用-('石川県大、²農研機構・食総研、³京大院生命) 〇杉山友太 ¹、加藤紀彦 ¹、後藤愛那 ¹、本多裕司 ¹、 吉田永吏奈 ¹、栗原新 ¹、北岡本光 ²、山本憲二 ¹、片山高嶺 ^{1,3}

【目的】

ヒトミルクオリゴ糖(HMOs)は母乳に含まれる重合度 3 以上のオリゴ糖の総称である。HMOs は病原性細菌の感染防御などの生理活性を有しており、乳児の健全な発育に重要な成分である。そのため、食品への応用を見据えた HMOs の大量合成法の確立が望まれている。しかし、HMOs 主成分に見られる Fuca1-2Gal 構造は化学法および酵素法のいずれにおいても立体・位置選択的な高効率合成が困難であり、HMOs の大量合成法の確立を妨げる障壁となっている。実際に我々がこれまでに試みてきた Bifidobacterium bifidum 由来の 1,2- α -L-fucosidase(AfcA)のグリコシンターゼ化においても、フッ化フコース(β -FucF)とラクトース(Lac)から 2-フコシルラクトース(2-FL)のみを選択的に合成することに成功しているものの、その収率は β -FucF に対して 6%と低い。そこで、上記の研究結果に鑑みて、本研究では AfcA の高効率フコシンターゼ化を試みた。

【方法・結果】

高効率フコシンターゼ化の作出のため、AfcA の活性残基を様々なアミノ酸に置換した変異型酵素を 35 種作製した。各酵素のフコース転移活性は β -FucF と Lac から生成される 2'-FL の量を HPLC で測定することで評価した。その結果、N423H および N423D/D766N の 2 種が β -FucF に対して 80%を超える収率で 2'-FL を生成した。さらに、N423H の糖受容体特異性を解析した結果、本酵素は Lac のみならず種々のオリゴ糖に対しても高いフコース転移活性を示した。これらの結果より、N423H が 2'-FL に限らず種々のフコシル化ヒトミルクオリゴ糖の合成に有用な高効率フコシンターゼであることが示唆された。

B-p09

遺伝子改変酵母を用いたビタミン E 代謝物のグルクロン酸抱合化反応の解析 (富山県大・エ・生物工)

〇高平梨可、岩本明日夏、西川美宇、安田佳織、鎌倉昌樹、榊利之、生城真一

【目的】

【方法・結果】

ヒト肝臓及び小腸ミクロソームを用いてグルクロン酸抱合解析を行ったところ、ビタミン E 同族体由来代謝物である γ 、 δ -CEHC ではクロマン環水酸基(6 位)及び側鎖カルボキシル基が抱合化を受けるのに対し、 α 体では側鎖カルボキシル基のみ抱合化された。UGT 発現酵母を用いた代謝実験より、肝臓発現分子種では UGT1A9、腸管発現分子種では UGT1A8、10 が 6 位抱合化に関与することが示された。また、側鎖カルボキシル基の抱合化では UGT2B7 も寄与することが示された。更に、発現 UGT分子種を選択することにより、ビタミン E 同族体について部位特異的なグルクロン酸抱合体を調製することに成功した。このことから、UGT 分子種を発現させた出芽酵母抱合体調製系を用いるにより CEHC の体内動態及びその機能性解析に貢献できるものと考えられる。

グリコサミノグリカン輸送に関わる連鎖桿菌由来基質結合タンパク質の X 線結晶構造解析 ('京大院・農、²摂大・理工)〇老木紗予子 '、丸山如江 ²、三上文三 '、村田幸作 ²、橋本 渉 ¹

【目的】

グリコサミノグリカン(GAG)は動物細胞外マトリックスの主要な構成要素の一つであり、ウロン酸とアミノ糖の二糖の反復配列からなる酸性多糖である。ある種の細菌は、GAGを定着や分解の標的とする。病原性連鎖球菌(Streptococcus)は、多糖リアーゼと不飽和グルクロニルヒドロラーゼの協働作用により GAG を分解し、動物細胞内へ侵入する。これらの酵素と共にゲノム上で一つの遺伝子クラスターにコードされるフォスフォトランスフェラーゼ系は、断片化された GAG 不飽和二糖を細胞内へ輸送することが示唆される。一方、新たに見出した連鎖桿菌(Streptobacillus)の遺伝子クラスターには、基質結合タンパク質 Smon0123 依存 ABC トランスポーターがコードされている。本発表では、Smon0123 の GAG 不飽和二糖との結合に関わる構造要因を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

Smon0123 と GAG 不飽和二糖との結合レベルを解析するため、結合に伴う Smon0123 のトリプトファン蛍光変化を分光蛍光光度計で測定した。その結果、Smon0123 はコンドロイチン不飽和二糖 (C Δ 0S) と最も高い親和性を示し、その解離定数は $0.6~\mu$ M だった。そこで、Smon0123 と C Δ 0S との複合体の X 線結晶構造解析を行った。分解能 1.78~Åの X 線回折データを収集し、分子置換法により複合体の立体構造を決定した。Smon0123 は 2 つのドメインからなり、各ドメインでは 5 本の β 鎖が平行・逆平行の混合型で 1 枚の大きな β -シートを形成し、その周りを α -ヘリックスが取り囲んでいた。両ドメインの間に存在するクレフトに C Δ 0S が結合していた。C Δ 0S の不飽和ウロン酸とアミノ糖がファンデルワールス力及び水素結合によって強く認識されており、特にアミノ糖のアセトアミド基には複数の塩基性残基及び Δ 1、Tyr-128 が直接水素結合していた。したがって、これらの相互作用が Δ 3 不飽和二糖の輸送に重要であることが示唆される。

植物根に由来する土壌微生物増殖刺激物質に関する研究

(名大院生命農)〇樋口侑夏, 西川博崇, 小川舞, 村瀬潤, 近藤竜彦, 小鹿一

【目的】

ネコブセンチュウは、約 700 種以上の植物に感染する内部定着性の植物寄生性線虫の一種であり、 感染による農業被害は非常に深刻な問題となっている。

ネコブセンチュウは植物由来の誘引物質を感知し根に接近すると考えられている。この誘引物質について研究する過程で、我々はある土壌細菌がネコブセンチュウに対する誘引物質を生産することを発見した。また植物根から調製した浸出液には、この細菌に対して有意に増殖活性を示す活性物質が含まれていることを明らかにした。これらの結果は、宿主根から分泌される活性物質により細菌が根の周囲で増殖し、増殖した細菌が生産する誘引物質を線虫が感知する、という新しい線虫誘引モデルの存在を示唆している。本研究では、この植物根由来の細菌増殖刺激物質(Root-Exudates-derived Microbe-growth stimulating Substance, REMS)の化学的本体を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

細菌の増殖刺激活性については、細菌培養液に検定試料を加えた際の濁度の上昇で評価することにした。この生物検定を指標とした予備的な精製実験の結果、活性物質は非常に高極性の化合物であることが示唆された。そこで、HILICカラムを用いた HPLCによる分画を行い、各画分の細菌増殖刺激活性を調べたところ、複数の画分に活性が観察されたことから、根の浸出液中には複数の REMS が含まれていることが示唆された。現在までに HILICカラムの組み合わせによる精製と NMR を用いた構造解析の結果から複数の REMS を同定している。未同定の REMS に関しても精製を進めているため、その結果についても合わせて報告する予定である。

C-a03

Brevibacillus を用いた植物ペプチドホルモンの効率的生産 (名大院生命農)〇能瀬遥、根岸佑香里、近藤竜彦、小鹿一

【目的】

植物は陸上に進出する際に、体表面からの水分消失を防ぎ、ガス交換や蒸散を効率よく行うために気孔を発達させた。その機能は植物の生存に必須であり、気孔は適切な密度と位置に形成されるよう、精密に制御されている。近年のシロイヌナズナを用いた研究から、気孔分化を正に制御する分泌型ペプチドホルモンとして stomagen が同定された。生理活性をもつ成熟型 stomagen の構造は、3 対のジスルフィド結合を有するアミノ酸 45 残基であることが明らかになっている。本研究では、大量のタンパク質を菌体外に分泌する *Brevibacillus* 発現システムを用いることで、stomagen の効率的な生産を行うとともに、生産された stomagen の生産量、ジスルフィド結合様式、生理活性を明らかにすることを目的とする。

【方法・結果】

STOMAGEN 遺伝子を挿入した発現用プラスミドを用いて Brevibacillus を形質転換し、推奨されている培地を用いて培養を行った。培養上清を直接 MALDI-TOF MS で分析した結果、stomagen の理論値と合致する分子量を示すシグナルを確認することができた。また、培養上清に還元剤を添加して MALDI-TOF MS を測定したところ、stomagen より 6 Da 大きいシグナルが検出されたことから、生産されたペプチドは分子内に3対のジスルフィド結合を形成していることが強く示唆された。次に、培養条件を検討するため、Brevibacillus を 4 種類の培地で培養した。LC-MS を用いて培養上清中に含まれる stomagen の定量を行った結果、アミノ酸カクテルを添加した化学合成培地で 72 時間培養した時に、最も stomagen の生産量が多いことが明らかになった。Brevibacillus で生産した stomagen の構造と、その生理活性については、現在検討中であり、合わせて発表する予定である。

イネの種子発芽におけるグルタレドキシン OsGRXC2:2 の機能解析

(¹京府大生命環境、²京都農技セ生資セ、³龍谷大農) 〇中村淳一 ¹、足立聖佳 ¹、増村威宏 ^{1, 2}、佐藤茂 ^{1, 3}、森田重人 ^{1, 2}

【目的】

グルタレドキシン (GRX) は、グルタチオンの還元力を用いてタンパク質のジスルフィド結合を還元する酸化還元酵素であり、抗酸化防御や標的タンパク質のレドックス調節に関わっている。当研究室では、イネ種子で主に発現しているグルタレドキシン OsGRXC2;2 に着目して研究を行ってきた。OsGRXC2;2 は、登熟種子と完熟種子の胚、アリューロン層で高蓄積している。また、発芽時には吸水開始3日目以降、蓄積が急速に減少する。OsGRXC2;2 過剰発現イネの解析により発芽の抑制および初期生長の遅延が見られている。以上のことから、OsGRXC2;2 が種子発芽の調節に関与している可能性が考えられるため、本研究ではその調節機構を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

CaMV 35S プロモーター制御下で OsGRXC2;2 を過剰発現させた形質転換イネ系統を用いた. 活性酸素は発芽調節に関与しており、発芽を促進する. 一方、OsGRXC2;2 は活性酸素消去に働いていると考えられることから、活性酸素の一種である過酸化水素の吸水種子中の含量を測定した. その結果、過剰発現系統とコントロール系統の間で過酸化水素含量に差は見られなかった.

また、吸水種子において発芽促進に関与するジベレリン(GA)応答遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCR を用いて調査した。その結果、コントロール系統に比べて過剰発現系統では GA 応答性転写因子 OsGAMYB の発現は高いが、その下流で働く OsAmy1A の発現は低いという傾向が見られた。さらに、吸水種子に GA 処理を行ったところ、過剰発現系統では GA による発芽促進効果が弱かった。

以上の結果から、OsGRXC2:2 は吸水種子において GA シグナル伝達経路の OsGAMYB より下流に影響を与えることで、発芽を抑制していると考えられる.

C-a05

2-ヘキセナールの生成に関わる酵素遺伝子の同定とトマトの香気成分の改変 (神大院農)〇國嶋幹子、山内靖雄、水谷正治、杉本幸裕

【目的】植物普遍的に存在する揮発性成分として、テルペン類や6つの炭素鎖からなる緑葉揮発性成分(green leaf volatiles, GLVs)がある。食用作物におけるこれらの香りは、商品価値を左右する要素の一つである。GLVs の1つである(3Z) -ヘキセナールは青臭い香りを有するのに対して、(2E)-ヘキセナールは果実様の香りとして知られる。これらの揮発性成分は、リノレン酸から酵素的に変換されることによって生じる。(2E)-ヘキセナールは(3Z) -ヘキセナールの異性化によって生合成されることが示唆されてきた。したがって、この変換は食用作物の商品価値に影響を与えていると予想されるが、その詳細は未解明であった。本研究では(2E)-ヘキセナール生合成に関わるヘキセナールイソメラーゼを同定し、遺伝子組換えによりトマトの香気成分の改変を試みた。

【方法・結果】2-ヘキセナールは果実の成熟に伴って増加することが報告されていたので、様々な果実のヘキセナールイソメラーゼ(HI)活性を調べた。その結果、最も高い活性を有したパプリカ果実より酵素精製を行い、分子量 35 kDa の単一のバンドを得た。キネティクス解析の結果、3-ヘキセナールに対する K_m 値は 0.73 mM で k_{cat} 値は 760 であった。NMR 解析を行い、酵素変換された 2-ヘキセナールは trans 体であることを確認した。部分アミノ酸配列を得て、それに基づいて酵素遺伝子を同定した。系統樹を作製し、相同性を示した遺伝子について組換え酵素を作製し活性を測定した結果、ナス科とマメ科、ウリ科、イネ科由来の遺伝子が活性を有する酵素をコードしていることが明らかとなった。アグロバクテリウム法により 35S プロモータを用いてパプリカ由来 HI 過剰発現形質転換トマトを作製した。葉の GLVs を GC-MS 分析により解析した結果、野生株では GLVs の 98.8%を(32)-ヘキセナールが占めたのに対し、形質転換株では(2E)-ヘキセナールが 87.1%を占めていた。現在、果実の GLVs について解析を進めており、果実での香気成分組成の変化も確認する予定である。

タケ懸濁培養細胞におけるヒドロキシ桂皮酸プトレッシンアミド合成酵素の解析

(¹富山県大·生工研セ、²県立広島大·生命科学)〇青島和音¹、野村泰治¹、荻田信二郎¹²、加藤康夫¹【目的】

当研究室で樹立されたタケ (Phyllostachys nigra, ハチク) の懸濁培養細胞 (Pn 細胞) は、培養条件を改変することで、増殖の促進あるいは木化の促進といった人為的な培養フェーズの制御が可能である。木化を促進する条件で培養された Pn 細胞は、主要二次代謝産物として feruloylputrescine (FP) を高蓄積することから、FP 生合成と木化との関連性が示唆されている。FP のようなヒドロキシ桂皮酸アミド類の合成酵素は多くの植物種において同定されているが、FP 生合成経路の直接的な証明はこれまでなされていない。本研究では、Pn 細胞から FP 合成酵素を精製し、その性状を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

Feruloyl-CoA (F-CoA) と putrescine を基質として、木化促進条件で培養した Pn 細胞の粗酵素を用いた酵素活性の探索を行ったところ、酵素依存的な FP の生成が認められ、また抽出および各種酵素反応条件を最適化することで、極めて微弱であった FP 生成活性を当初の約 20 倍程度まで向上させることができた。さらに、粗酵素を用いて基質特異性を検討した結果、本酵素はアシル供与体として F-CoAを、アシル受容体として putrescine を良い基質とした縮合反応を触媒することが確認され、Pn 細胞において FP は、F-CoA と putrescine から直接生合成されていることが強く示唆された。Pn 細胞の培養過程における FP 合成酵素活性の経時分析の結果、木化条件下での培養 4-10 日目にかけて最も高い活性が検出されたことから、同条件の培養 7 日目の細胞から FP 合成酵素の精製を試みた。硫安分画および各種カラムクロマトグラフィーを経て、FP 合成酵素を精製倍率約 1600 倍まで部分精製したが、完全精製には至らなかった。そこで、FP 合成酵素が F-CoA に対して高い親和性を示すことに着目し、セファロース支持体上に feruloyl 基をリガンドとして導入したアフィニティーカラムを作成し、精製に用いることとした。現在、同検討を行っており、その結果についても併せて報告する予定である。

C-a07

イネにおける新規インドール-3-酪酸代謝物の探索および定量

(1京大院農)〇西野雄人、1宮下正弘1、宮川恒1

【目的】

オーキシンは植物の成長や発達に必要な植物ホルモンであり、主要なものとしてインドール・3・酢酸(IAA)が知られている。インドール・3・酪酸(IBA)はオーキシンの一種であるが、IAA と相互変換することから IAA の貯蔵形態とも考えられている。植物中で IAA 濃度を調節する機構には生合成や輸送とともに代謝があることが分かっている。IAA は酸化、アミノ酸抱合、糖抱合といった様々な代謝を受けることが知られている。一方、IBA の代謝に関しては知見が少ない。そこで本研究では質量分析計を用いてイネにおける IBA の新規代謝物の探索および定量を行った。

【方法・結果】

発芽後 2 週のイネを液体窒素中で破砕し、80%アセトン水溶液で抽出した。この抽出液を固相カートリッジで部分精製し、LC-ESI-MS/MS 分析に供した。IBA 代謝物の探索は、IBA に特有のフラグメントイオンの質量を基準にしたプレカーサーイオンスキャンにより行った。その結果、酸化体である OxIBA と考えられるピークが検出された。次に IBA をイネに終濃度 $100~\mu M$ となるように投与し同様に分析したところ、IBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp、OxIBA-Asp および OxIBA-Asp があると考えられる。

ジベレリン代謝酵素の多量体構造形成と酵素活性との相関

('名大·生物機能セ、'京大院·農)〇竹原 清日'、三上 文三'、樫尾 徹'、松岡 信'、上口(田中) 美弥子'

【目的】

植物ホルモンのひとつであるジベレリン(GA)は、草丈の伸長促進や発芽促進、花芽形成促進などさまざまな生理作用をもつ。 ジベレリン生合成経路の後半段階においては GA20-oxidase (GA20ox)および GA3-oxidase (GA3ox)が、代謝経路では GA2-oxidase (GA2ox)が働いており、いずれも 2-オキソグルタル酸要求性酸化酵素に属する酵素である。 我々は、これら酵素の構造解析に取り組み、イネの GA不活化酵素である GA2ox3 の構造を明らかにした。 全体構造は、S-S 結合で結合したダイマー同士が相互作用した 4 量体を形成しており、基質である GA_4 が活性中心以外にもダイマー分子の間に結合して 4 量体を形成していることが明らかとなった。 そこで本研究は、この多量体構造の形成と酵素活性との関係を明らかにすることを目的とした。また、これら酵素の機能解析も合わせて行った。

【方法・結果】

GA2ox3 の溶液中での分子状態を調べるため、多量体形成に必要と考えられる GA_4 存在化でゲル濾過を行った。 その結果、溶液中でも 4 量体構造をとることが明らかとなり、4 量体および単量体の単離にも成功した。 そこで、得られた各分子の酵素活性を調べたところ、4 量体が単量体に比べ酵素反応速度がはるかに速いことが分かった。 また、 GA_4 の有無により可逆的に 4 量体を形成することも明らかになった。 さらに、植物細胞内における多量体形成能および細胞内での局在場所を調べるため、イネのプロトプラストを用いた BiFC 解析を行った。 その結果、 $in\ vitro\$ と同様に $in\ planta\$ でも多量体構造をとっており、その多量体形成は細胞質で行われることも分かった。

以上の結果から、GA2ox3 は以前から知られているような遺伝子発現調節だけでなく、GA4濃度が上昇すると多量体構造を形成して活性を上げ、GA代謝を促進するといった、タンパク質レベルでの調節も行うことが示唆された。

C-a09

グリシドール脂肪酸エステル関連化学物質の暴露摂取源の解明 (静岡県大院・食栄環院)〇稲垣僚,平井央子,島村裕子,増田修一

【目的】

グリシドール脂肪酸エステル (GEs) は、ジアシルグリセロール (DAG) 油等の食用油の製造工程で生成し、生体内に摂取されると、リパーゼの作用により発がん物質グリシドールが生成すると考えられており、現在、高濃度の GEs を含む DAG 油は販売中止となっている。しかし最近、DAG 油を摂取していないヒト血液中においても、グリシドール由来のヘモグロビン付加体が検出されたことが報告されている。そこで本研究では、DAG 油等食用油以外の GEs の暴露摂取源を明らかにするために、各種食肉および魚肉を様々な加熱条件下で処理し、GEs が生成するか検討した。また、GEs 関連化学物質である 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) 脂肪酸エステルについても同様に検討した。

【方法・結果】

3種類の食肉(豚、牛、鶏肉)、また 5種類の魚肉(サケ、サンマ、ブリ等)を、ガス加熱または直炭火 (BBQ) で加熱処理した後、抽出および前処理を行い、LC/MS を用いて加熱試料中の各 GEs および 3-MCPD 脂肪酸エステル量を測定した。また、非加熱食肉および魚肉中の脂肪酸量を GC/FID を用いて測定した。その結果、強火ガス加熱(約 250° C)で処理された豚肉及び牛肉中において、各 GEs が生成することを確認した。また、直炭火加熱(300° C \sim 600 $^{\circ}$ C)で処理された豚肉、牛肉、鶏肉においては、ガス加熱に比べて 10 倍以上の GEs が生成した。ガス加熱された魚肉においても、各 GEs が生成し、さらに食肉中で検出されなかった 3-MCPD 脂肪酸エステルの生成も確認された。また、生成した GEs および 3-MCPD 脂肪酸量と食肉およびブリ魚肉中の脂肪酸組成との間に相関性が認められた。以上の結果より、我々は日常的に食事を通して、これら GEs 関連化学物質を摂取している可能性が示唆された。

冷凍過程におけるマヨネーズの不安定化要因に関する一考察

(京大院農)〇宮川弥生、中川究也、安達修二

【目的】 マヨネーズは保存性などの点から冷凍され、喫食時に解凍されることがある.このとき油水が分離する不安定化が生じると、品質が低下するため、その抑制が求められる.不安定化の機構が提案されているが〔1〕、未だ確定的な要因は明らかでない.一般に、結晶化に伴い、水の体積は増加し、油の体積は減少する.また、油が結晶化すると溶存していた空気が溶出する.これらの物理的変化が冷凍過程におけるマヨネーズの不安定化に及ぼす影響を考察することを目的とする.

【方法・結果】 圧力センサーおよび熱電対を取り付けた耐圧容器に菜種油を入れ,-20°C で冷凍保持し、その際の試料の温度およびヘッドスペースの圧力を連続的に測定した. Timms [2] に従い、冷凍過程の菜種油の体積を算出した. また、この値に基づきヘッドスペースの体積を算出した. さらに、気体の状態方程式を適用して、結晶化に伴い溶出した空気量を算出した. 溶出した空気の量は空気の油への飽和溶解量と比較して妥当な値が得られた. また、マヨネーズを想定した系について、冷凍に伴う体積、油滴径および油滴間の距離の変化を算出した. 結晶化したときの水の体積の膨張量に比べ、油の体積の減少量の方が大きいため、水相と油滴の間には空隙が生じると仮定した. 溶出した空気はこの空隙を満たすのに十分な量であり、マヨネーズの冷凍時に油が結晶化すると、油ー空気界面および空気ー氷界面が新たに生じると推察された. 新たな界面の形成は系のエネルギーレベルを高めるため、水および油の体積変化、ならびに油の結晶化に伴う空気の溶出は、冷凍過程におけるマヨネーズの不安定化に対して少なからぬ影響を及ぼすと思われる.

【謝辞】 本研究は、京都大学・岐阜大学・日清製粉グループによる共同研究の一部として実施した.

【文献】 1) D. Rousseau: Food Res. Int., 33, 3–14 (2000). 2) R. E. Timms: JAOCS, 62, 241–249 (1985).

C-a11

食品 O/W エマルションの水相の凍結状態の評価 (京大院農)○香月和敬, 宮川弥生, 中川究也, 安達修二

【目的】

食品は冷凍により保存性を高めることが少なくない.しかし,乳化食品などは冷解凍により不安定化し,品質が低下することがある. O/W エマルションの冷解凍に伴う不安定化を引き起こす要因の一つとして,水相の結晶化に伴う凍結濃縮などが考えられる.これらの現象が不安定化に及ぼす影響を定量的に評価するには,水相の凍結状態の正確な把握が必要であるが,基礎的な知見が不足している.本研究では,代表的な食品エマルションの水相の成分として塩化ナトリウム,酢酸を想定し,これらの成分が水相の凍結状態に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした.

【方法】

塩化ナトリウム,酢酸および水を種々の割合で混合し,2 mg を DSC 分析に供した.温度プログラムは, 30° C から -120° C まで 5° C/min で降温した後,直ちに -120° C から 30° C まで 5° C/min で昇温し,融解時のピーク温度を求めた.

【結果】

水、水と塩化ナトリウムの 2 成分の共晶および水、塩化ナトリウムと酢酸の 3 成分の共晶に由来すると思われる 3 つの融解ピークが、 $0\sim-30^{\circ}$ C、 $-20\sim-30^{\circ}$ C、 -35° C に観察された. これらから作成した状態図より、一般的な食品の冷凍温度である -20° C では、水のみが凍結しており、共晶は生成していないことが示された.

【謝辞】

本研究は「京都大学・岐阜大学・日清製粉グループ共同研究」の一部として実施した.

加エデンプンの添加が小麦粉麺内部の水分分布に及ぼす影響

(京大院農)〇福澤聡真、中川究也、安達修二

【目的】小麦粉を原料とする麺の品質には、吸水により生じる麺内部の水分分布が大きな影響を及ぼす.一方、冷凍うどんなどの冷凍麺には、食感改良や老化耐性付与を目的として加工デンプンが添加されることが多い.しかし、加工デンプンの添加が麺内部の水分分布に及ぼす影響については十分な知見がない.そこで本研究では、加工デンプンの添加が小麦粉麺内部の水分分布に及ぼす影響を、デジタル画像プロファイル法[1]により評価することを目的とした.

【方法】小麦粉(日清製粉),加工デンプン(ヒドロキシプロピル化タピオカデンプン)および水をミキサーで混捏し,パスタマシン(Magica, Bottene)を用いて小麦粉麺(直径 2.5 mm,長さ 80 mm)を作製した.小麦粉麺を 98°C の湯浴で吸水させた後,試料断面をデジタルカメラ(EOS-40D,キヤノン)により撮影し,断面画像より試料内部の水分分布を測定した.また,各試料についてクリープメータ(Re2-33005S,山電)を用いてくさび形プランジャ(No.6,山電)による破断試験を行った.【結果】加工デンプンの添加により,小麦粉麺の外縁領域の含水率が上昇した.これは,加工デンプンの糊化温度が小麦デンプンと比べ低温であることによる吸水挙動の変化を反映していると考えられる.また,破断試験の結果から算出した小麦粉麺のヤング率は,加工デンプンの添加により含水率に依らず顕著に低下した.これらの結果より,加工デンプンの添加は,小麦粉麺内部の水分分布およびタンパク質のネットワーク構造の双方に影響を及ぼし,品質変化に寄与していると考えられる.

【謝辞】本研究は、「京都大学・岐阜大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した。

【引用文献】

[1] T. Ogawa, S. Adachi: Food Bioprocess Technol., 7, 1465-1471 (2014)

C-a13

食中毒菌の食肉内部への侵入や病原性因子発現に影響を与える因子の解明

(¹静岡県大・食品栄養科学,²アオノフレッシュミート(株))〇江川瑞規¹,島村裕子¹,土屋祐介¹, 篠田和代²,青野博志²,増田修一¹

【目的】

食中毒菌の食肉内部への侵入や病原性因子発現に影響を与える因子を明らかにすることは、食肉の食中毒菌に対する汚染防御を考える上で重要である。そこで、本研究では、食肉の効果的な殺菌方法を見出すための基礎的な知見を得るために、種類や部位等の異なる様々な食肉を用いて、食中毒菌の内部への侵入や毒素遺伝子等の病原性因子発現を調べ、食肉の微生物学的安全性の維持に関与する各種因子について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

縦3cmx 横3cmx 高さ6cmにカットした各種食肉に食中毒菌を付着させ、食肉の構造、付着部位、保存時間の違いにおける食肉内部への菌の侵入程度について検討した。また、食肉の結合組織の構成成分である細胞外マトリックス(ECM)タンパク質(コラーゲンI、コラーゲンIV、フィブロネクチン、ラミニン)への食中毒菌の付着特性について、クリスタルバイオレット染色法を用いて調べた。さらに、ECMタンパク質が食中毒菌の毒素遺伝子発現やバイオフィルム形成等に及ぼす影響について、リアルタイムRTPCRを用いて調べた。その結果、食肉の食中毒菌汚染面の線維方向が垂直の鶏むね肉、また薄皮なしのレバーでは、食中毒菌は内部に侵入しやすいことを明らかにした。さらに、食中毒菌の食肉への付着機構を解明するために、食中毒菌とECMタンパク質との付着性を調べたところ、食中毒菌の細胞壁構造の違いにより、食肉の各種ECMタンパク質への付着特性が異なることを明らかにした。また、ECMタンパク質に付着した食中毒菌は、毒素遺伝子およびバイオフィルム形成関連遺伝子等の病原性因子の発現量が有意に増加した。これらの結果より、食中毒菌のECMタンパク質への付着を抑制することで、食中毒菌の付着・侵入を抑制できる可能性が示唆された。

C-p01

血清アルブミンに自然抗体リガンド機能を付与するポリフェノールの探索

(¹名大院生命農、²大阪府立大生命環境)〇古橋麻衣 ¹、畑佐行紀 ¹、近澤未歩 ¹、柴田貴広 ¹、赤川貢 ²、内田 浩二 ¹

【目的】

自然抗体は内因性・外因性抗原の共通の特徴を幅広く認識することにより異物の排除や生体の恒常性維持に寄与していると考えられている。ポリフェノールは果物や野菜など多くの食品に含まれ、高い抗酸化能を有することから、食品の機能性への関与が示唆されている。本研究では自然抗体とポリフェノールに着目し、ポリフェノールを血中アルブミンと反応させ自然抗体との相互作用を解析することにより、ポリフェノールによる自然免疫活性化機構について検討することを目的とする。

【方法・結果】

25 種のポリフェノールと血清アルブミンを 37℃, 24 時間インキュベートして作製したポリフェノール処理アルブミンと、マウス血清やモノクローナル IgM 自然抗体との交差性を ELISA 法により検討した。その結果、ブドウやラズベリーなどの赤色液果類に多く含まれる Cyanidin や Delphinidin、赤ワインに含まれる Piceatannol、イチゴ中の主なポリフェノールである Ellagic acid など種々のポリフェノールにより処理したアルブミンが自然抗体に認識されることを見出した。また、これらのポリフェノール処理アルブミンでは修飾に伴いタンパク質の表面陰性電荷が増加することを確認した。さらにこれらのタンパク質は代表的な自己免疫疾患である関節リウマチ患者において有意に増加している抗シトルリンタンパク質抗体に対しても同様に交差性を示すことが明らかとなった。以上からポリフェノールはアルブミンに自然抗体リガンド機能を付与し自然免疫系の発動や活性化に関与している可能性が示唆された。

C-p02

カテキンのリジルオキシダーゼ活性による自然抗体リガンド生成に関する研究

(¹名大院生命農、²大阪府大院生命環境、³九大院農) 〇畑佐行紀¹、古橋麻衣¹、近澤未歩¹、柴田貴広¹、 赤川貢²、立花宏文³、内田浩二¹、

【目的】自然抗体による抗原認識に伴う自然免疫系の適度な活性化は疾病予防に寄与する。本研究では、緑茶成分等に含まれるカテキンによる自然免疫系の活性化について検討し、主要な血中タンパク質であり種々の物質の輸送に関わる血清アルブミンが、種々の食品成分の中でも特に、主要な茶カテキンである Epigallocatechin gallate (EGCG) と反応することで自然抗体リガンド機能を持ち、自然抗体に認識されることを見出した。さらに、EGCG によるタンパク質の化学修飾について、EGCG のリジルオキシダーゼ様活性による酸化及び共有結合修飾に着目し検討した。その結果、EGCG 修飾アルブミン中でリジン残基に由来するタンパク質カルボニルの生成が進行し、加えて EGCG とアルブミンが結合していること見出した。そこで今回は抗原認識メカニズムについてさらなる検討を行った。

【方法・結果】EGCG/HSA におけるリガンド機能獲得に関し、抗原性の付与やカルボニル形成への EGCG 酸化の関与や、抗原認識に直接関わるアルブミンの構造変化について検討した。EGCG 酸化を 抑制するアスコルビン酸を加えた検討を行ったところ、交差性やカルボニル形成が有意に抑制された。 また、カルボニル基の還元や、NaCl により電荷を打ち消した結果、抗体認識に対する、リジン残基末 端のアミノ基の消失に伴うタンパク質表面電荷の陰性化の関与が示唆された。さらに、EGCG/HSA の 陰性電荷が関与すると考えられる特定の血清タンパク質との相互作用についても示唆されたことから、現在検討を進めている。

以上の結果から、EGCG 修飾アルブミンは、表面電荷が変化することにより IgM 自然抗体によって認識され、自然免疫系を活性化していると考えられ、緑茶の摂取による恒常性の維持・健康増進の一因となっていると予想される。現在、カルボニル化されるリジン残基部位の同定やマウスを用いた in vivoでの検討など、より詳細なメカニズムについて研究を進めている。

C-p03

紅茶、ウーロン茶製造工程における配糖体の量的変動とその安定性

(¹ 静岡大学院工、² 静岡大学工、³ 西南大学茶学、⁴ 静岡大学院農、⁵ グリーン科学技術研究所、⁶ 創造科学技術大学院) 〇松尾哲明¹、水谷健太²、崔継来^{3,6}、大西利幸^{4,5}、佐藤浩平¹、間瀬暢之^{1,5}、鳴海哲夫¹、戸田三津夫¹、竹本裕之⁵、渡辺修治^{1,6}

【目的】

チャ葉にはアルコール系香気成分配糖体として β D-glucopyranoside (Glc), β primeveroside (Prim)が蓄積され、その一部は、チャ葉の加工時にアグリコンであるアルコール香気成分を遊離するといわれている。本研究では LC-MS, LC-MS/MS を用い、紅茶、ウーロン茶製造工程における配糖体の量的変動を解析した。ウーロン茶製造段階の内、加熱段階での配糖体の増加の原因として化学的に不安定な配糖体であるマロニル化配糖体の存在を示唆した。本研究では予備検討として、チャ葉におけるマロニル化配糖体の同定を試みた。またマロニル化配糖体のモデル化合物として非天然化合物 phenyl 6'-Omalonyl- β -D-glucopyranoside (PhGlcMal)を合成し、その熱安定性等と、チャ抽出液中での安定性を検討した。

【方法・結果】

紅茶製造過程で Prim は柔捻段階で著しく減少し、ウーロン茶の場合は加熱工程で Prim, Glc が著しく増加した。後者での加熱による増加には、化学的に不安定な配糖体例であるマロニル化配糖体の寄与を想定した。LC-HRMS 分析の結果、benzyl, 2-phenylethyl 6'-O-malonyl- β -D-glucopyranosides がウーロン茶製造時のチャ葉に存在することを確認した。モデル化合物として合成した PhMalGlc は水溶液中、90 °C,1 時間の処理で 98%が PhGlc に変換すると共に、マロニル基の位置異性体の存在も確認した。またチャ葉 MeOH, acetone 抽出液中では PhMalGlc は比較的安定であった。

白色腐朽菌の木材分解における芳香環代謝酵素系の役割

(¹静大院・農、²静大・グリーン研、³静大創造院) 〇松田裕大 ¹、小山元規 ¹、森智夫 ¹、河岸洋和 ^{1,2,3}、平井浩文 ^{1,2}

【目的】

白色腐朽菌はリグニンを高度に分解できる唯一の微生物であり、リグニン分解性ペルオキシダーゼを菌体外に分泌し高分子リグニンを解重合した後、低分子リグニンを菌体に取り込み、最終的に水と二酸化炭素にまで分解する。しかし、低分子リグニン代謝と高分子リグニン解重合の関係は不明のままである。そこで本研究では、低分子リグニンの代謝に関与しているとされる 1,4-benzoquinone reductase(BQR)及び homogentisate 1,2-dioxygenase(DOG)遺伝子を高活性リグニン分解菌 *Phanerochaete sordida* YK-624 株内で高発現させることで、高分子リグニンの分解に与える影響を検討した。

【実験方法及び結果】

DOG 遺伝子もしくは BQR 遺伝子を導入した B 株及び D 株のリグニン分解特性を調査したところ、B 株及び D 株においてリグニン分解選択性が向上するという結果が得られた。リグニン分解選択性が向上した原因を探求すべく、選抜した遺伝子導入株(B4 株、D14 株)によるバニリンの代謝実験を行った結果、両株ともにバニリン代謝能の向上が認められた。さらに、木粉にバニリンを添加して、リグニン分解特性に与える影響について調査した。その結果、コントロール株ではバニリンの添加によりリグニン分解率は変化しなかったもののリグニン分解選択性が大幅に低下したのに対して、B4 株及び D14 株ではバニリン添加の有無でリグニン分解特性に差異がないことが示された。これらの結果から、芳香環代謝能の向上によって低分子リグニンフラグメントの代謝が促進され、Fenton 反応を抑制することでリグニン分解選択性が向上することが示唆された。

D-a04

古生子嚢菌類 Saitoella complicata の RNA マップ解析およびヌクレオソームマップ解析 (「富山県大、²極地研、³明治大、⁴東京大)山内健太「、近藤伸二²、浜本牧子³、鈴木穣⁴、〇西田洋巳「

【目的】

子嚢菌出芽酵母 Saitoella complicata は、分裂酵母 Schizosaccharomyces 属菌種などが属している古生子嚢菌類(Archiascomycetes, Taphrinomycotina)の一種である。古生子嚢菌類は子嚢菌類の進化において、最も初期に共通祖先より分岐した系統群である。これまでのゲノム比較により、Saitoella complicata が糸状子嚢菌類(Euascomycetes, Pezizomycotia)に似ていることがわかった。我々はゲノム塩基配列を決め、104 コンティグ、6933 のタンパク質コード領域を決めた(Yamauchi et al. 2015、Genome Announc 3、e00220-15)。今回、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A(TSA)を用いて、RNA マップ解析およびヌクレオソームマップ解析を行った。

【方法・結果】

TSA を培地に 1μ g/ml, 2μ g/ml, 3μ g/ml の濃度で添加した際の発現 RNA マップの作成,TSA 無添加および 3μ g/ml 添加の際のヌクレオソームマップの作成を行った。RNA 発現レベルが TSA 濃度依存的に各 25%以上に増加した 154 遺伝子,各 25%以上に減少した 131 遺伝子を同定し, Schizosaccharomyces pombe の遺伝子との類似アミノ酸配列検索を行った。その結果,増加したものの 53 遺伝子(34.4%),減少したものの 107 遺伝子(81.7%)が類似配列をもっており,減少した遺伝子の方に保存性が高いものが多く含まれていた。次に TSA の影響で遺伝子プロモータ領域におけるヌクレオソーム位置プロファイルが変化したものを抽出した。大きく位置が変化した(相関係数 <0.4)遺伝子数は,発現が増加したものの 20((13.0%),減少したものの 22((16.8%))であった。他方,位置が高く保存されていた(相関係数 <0.8)の遺伝子数は発現が増加したものの 59 (38.3%),減少したものの 58 (44.3%) であった。

未培養好熱性アーキア Caldiarchaeum subterraneum で発見された ユビキチン様タンパク質の機能解明

(¹京大院地球環境,²京大院工、³海洋研究開発機構,⁴九大院農)〇橋高瑞奈¹、金井 保²、藤本理夏子²、 徳原将弘²、安枝裕貴²、清中茂樹²、石野良純⁴、高木善弘³、

高見英人³、浜地格²、高井 研³、森 泰生¹²、布浦拓郎³、跡見晴幸²

【目的】

ユビキチン (Ub) は真核生物に普遍的に存在し、標的タンパク質と選択的に結合すること(Ub 化)で 細胞内の様々な生命活動に関与する。メタゲノム解析により明らかにされた、未培養好熱性アーキア Caldiarchaeum subterraneum のゲノム上には、原核生物には例のない真核生物型 Ub 様遺伝子 (Ubl) が 存在する。本 Ubl は、一連の Ub 化反応に関与する Ub 活性化酵素(E1)、Ub 結合酵素(E2)、Ub リガーゼ(E3)のホモログと共に、原核生物特有のオペロン構造を形成していた。本 Ubl システムは、真核生物が起源と考えらえてきた Ub システムの発生と進化を理解する上で、大変興味深い存在である。本研究ではこの Ubl システムの機能検証を目的として、in vitro でのタンパク質修飾反応系の再構築を行った。

【方法・結果】

本菌の Ubl、Ubl の C 末端付近の GlyGly モチーフ以降を除いた成熟型 Ubl(mUbl)、E1、E2 の各組換え タンパク質を調製し、これらを用いた複合体形成実験を行った。その結果、ATP 依存的な mUbl-E1 複合体の形成、および mUbl-E1 複合体生成に依存した mUbl-E2 複合体の形成、をそれぞれ確認した。また本菌の E3 を調製し、mUbl・E1・E2 と共に混合した再構成系を用いて、基質となる本菌由来タンパク質を探索した。その結果、本菌の DNA 複製に関与するヘリカーゼの一つが、本系により Ubl 化されることを見出した。このことから、本菌の Ubl システムが真核生物の Ub システムと同様に、タンパク質の修飾に関与することが強く示唆された。Ubl 化タンパク質の LC-MS/MS 解析により、本 Ubl が特定のリジン残基に結合していることを明らかにした。

D-a06

ヒト腸内細菌最優勢種のポリアミン輸送能・合成能の網羅的解析 (¹石川県大・腸内細菌、²京都大院・生命・統合生命)

〇栗原 新 ', 奈良 未沙希 ', 白石 友香 ', 杉山 友太 ', 片山 高嶺 ^{1,2}

【目的】

ヒト腸管内腔には様々な腸内細菌が生育し、複雑な腸内細菌叢を形成している。腸内細菌の菌体は厚い粘膜層や免疫機構に阻まれてその多くが腸管上皮まで到達出来ないが、腸内細菌により生産され放出される代謝産物は、大腸を通じて体内に取り込まれ直接的に生体に影響を与えることから、腸内細菌由来の代謝産物研究は非常に重要である。近年、寿命伸長や知能向上に有効であることが報告されているポリアミンは、腸内細菌が産生する主要な代謝産物であり、その腸管内濃度は数 $100~\mu M$ に達する。本研究はヒト腸内細菌最優勢種のポリアミン輸送能・合成能を解析することを目的とする。

【方法・結果】

ヒト腸内細菌最優勢 30 種 (*Nature*, 464:59-65 (2010)) のうち入手・培養が可能な 24 種類について GAM 培地を用いて培養を行い、培養上清および菌体内のポリアミン(プトレッシン、カダベリン、スペルミジン、アグマチン、スペルミン) 濃度を測定した。また、実験を行った菌株における既知のポリアミン輸送・合成系タンパクホモログの有無を Protein BLAST により検索した。この結果、腸内常在菌優占上位 30 種のうち 4 種で培地中のプトレッシン濃度が 20-30 μM 減少し、7 種でスペルミジン濃度が 10-20 μM 減少、3 種でアグマチン濃度が 40 μM 程度減少した。この中には、対応する既知ポリアミン輸送系ホモログを持たないものが存在した。このことは、ヒト腸内細菌最優勢種が新規ポリアミン輸送系を持つことを示唆している。実験に用いた多くの腸内細菌の菌体内で、いくつかのポリアミンが検出された。このうち、既知ポリアミン合成・輸送系ホモログを持たない上に、培養上清においてポリアミン濃度が変動しないにも関わらず、細胞内にポリアミンが検出されるものが存在した。このことから、ヒト腸内細菌最優勢種に新規なポリアミン代謝系が存在することが考えられた。

大腸菌発現系を用いた組換え型ヒツジアンジオテンシノーゲンの生産: 通気培養槽と自動発現誘導による高収量化

(1岐阜大院応生、2岐阜大連合農学、3岐阜大院工,4岐阜大応生)

〇柴田直哉¹、山下晋司²、朴明宣³、大野敏³、横川隆志³、西川一八³、鈴木文昭⁴、中川寅⁴、海老原章郎⁴

【目的】

アンジオテンシノーゲン (ANG) は、昇圧ペプチド・アンジオテンシンの前駆体タンパク質である。アンジオテンシン生産経路の起点は、酵素レニンによる基質 ANG の特異的な切断反応である。私たちは、立体構造に基づく反応機構解明のため、ヒトレニンに対し高い親和性を持つヒツジ ANG に着目し、大腸菌発現系(LB 培地, $15~\rm L$)から約 $2~\rm mg$ の精製ヒツジ ANG を得た。本研究では、さらなる高収量化を目的とし、培養法の改良、構造機能解析による性質決定を行った。

【方法・結果】

大腸菌発現系によるヒツジ ANG の生産は、通気培養槽と自動発現培地による培養、3 段階の精製で行った。培養法の改良により、培地 1 L 当たりのヒツジ ANG 精製標品の収量は約 15 倍向上した。次に大腸菌と動物細胞で生産したヒツジ ANG 標品の構造と機能の比較を行った。円偏光二色性スペクトル、動的光散乱、 $K_{\rm m}$ 、 $k_{\rm cat}$ では両標品とも同等の性質を示した。しかし熱安定性を評価する示差走査 蛍光定量では、大腸菌で生産したヒツジ ANG の変性中点温度が約 2° C低かった。以上の結果より、両標品の熱安定性に差はあるものの、二次構造、水和半径、 $K_{\rm m}$ 、 $k_{\rm cat}$ がそれぞれ同等の性質を示したことから、今回の培養法が有用であると考えられる。

D-a08

Shewanella—電極接合系の電子伝達経路に関する研究

(京大院農)〇竹内良輔、北隅優希、白井 理、日比 慎、小川 順、加納健司

【目的】

Shewanella 属は、多様な細胞外電子受容体を選択できるため、バクテリアリーチングや微生物電池を志向した応用研究が多数行われている。 Shewanella 属は膜表在型デカヘムシトクロム c の MtrC を有し、かつ菌体外にフラビンモノヌクレオチド(FMN)を分泌還元するため、 MtrC から FMN へと電子移動する機構が主に提唱されている。 ただし、本モデルは熱力学的に不利な過程を経ており、速度論的な観点からは妥当性に欠けると考えた。 本研究では、FMN 還元反応における MtrC の役割について、電気化学的・分光学的手法により評価し、電子伝達経路を再考察することを目的とする。

【方法・結果】

本菌体の懸濁液に乳酸と FMN を添加すると、乳酸の酸化反応を電極にて間接的に観測できた.これは FMN を電子移動仲介物質とする菌体触媒反応(嫌気的細胞外電子移動)だと考えられる.本反応を利用して,嫌気的細胞外電子移動速度を電気化学的に測定した.また,酸素消費速度(好気的電子移動速度)を酸素電極にて評価した.一般にヘムタンパク質は CN⁻の配位により不活性化するため,MtrCをもつ本菌体に KCN を添加し,嫌気的・好気的反応速度に対する CN⁻の影響を評価した.その結果,

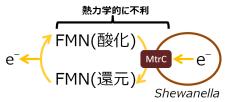


図. 提唱されている細胞外電子伝達機構

好気的電子移動速度は低下したが、嫌気的電子移動速度は微増した.一方で、菌懸濁液の紫外可視吸収スペクトル測定を KCN 添加条件で行ったところ、CN の配位と同時に、ヘムの還元が観察された.へムの還元は、菌懸濁液中の残存電子ドナーによる還元反応と、呼吸阻害によると判断できる.これらの結果を説明できる電子移動モデルとして、MtrC を介さずに FMN 還元する電子伝達経路を提案する.

磁性細菌に特異的な細胞骨格蛋白質 MamK によるマグネトソーム細胞内配置調節 (1金沢大理工自然システム、2金沢大理エバイオ AFM、3金沢大院自然研)

〇田岡 東 1,2、清河 文子 3、上杉 知佳 3、福森 義宏 1

【目的】磁性細菌は、磁気センサーとしてはたらく「マグネトソーム」とよばれる原核細胞オルガネラをもつ。マグネトソームは、約50 nm の磁鉄鉱結晶(磁石)を含む膜小胞であり、細胞の中央に直鎖状に配置される。この細胞内配置はアクチン様蛋白質 MamK からなる細胞骨格とマグネトソームとの相互作用により保たれていると考えられている。しかし、これまでの知見は電子顕微鏡観察により得られており、生きた細胞内でマグネトソームがどのように振舞い、また MamK 細胞骨格がどのようにマグネトソームの配置を調節しているか明らかにされていない。本研究では、生細胞蛍光イメージング法を用いて MamK 細胞骨格のマグネトソーム細胞内配置における役割を調べた。

【方法・結果】磁性細菌 Magnetospirillum magneticum AMB-1に、マグネトソームに特異的に局在する膜蛋白質 MamC と GFP の融合蛋白質をプラスミドより発現させ、マグネトソームを蛍光標識した。GFP 融合蛋白質を発現させた細胞を液体培地中で培養しつつ、24 時間以上にわたりマグネトソーム動態をタイムラプス観察した。その結果、野生株ではマグネトソームは、細胞長軸方向に沿った直鎖状に配置され、細胞が成長し伸長しても細胞の長軸に沿って安定に保持され、細胞分裂時には娘細胞へ安定に分配される様子が観察された。一方、mamK欠損株では、蛍光シグナルは細胞内をランダムに移動または凝集体を形成しており、細胞分裂の際には娘細胞に不均等に受け渡されていた。mamK欠損株にプラスミドから MamK (野生型)を発現させたレスキュー株では、マグネトソームは安定な直鎖状構造を回復した。一方、アクチン様蛋白質に保存された ATPase 活性部位に変異をもつ MamKを発現させた細胞では、直鎖状構造は回復しなかった。以上の結果から、MamK 細胞骨格は、マグネトソームを細胞周期を通して安定な直鎖状構造に保持し、細胞内での分散や凝集を防ぎ、効率的な磁気センサーとしての機能を支えていることが明らかになった。

D-a10

撹拌槽内における機能遺伝子伝播条件の最適化

(1静岡大院工2静岡大創造科技大院)〇中澤駿介1、福田洸平2、金原和秀12新谷政己12

【目的】

プラスミドは、微生物どうしの接触を通して伝達可能で、細菌の進化・適応能を担う重要な遺伝因子である。さらに、プラスミドは河川や湖沼など、動的な動きのある水環境中でも微生物間を伝播する可動性遺伝因子として知られており、このことから液体の動きはプラスミドの伝達にとって重要な環境因子であることが考えられる。しかし、流体の動きがプラスミドの伝播に与える影響というものはいまだに明らかにされていない。そこで当研究室では動的な水の動きを、撹拌槽内における撹拌速度で表し、プラスミドの伝達効率を詳細に比較することで、その伝播特性の解明を試みた。

【方法・結果】

モデルプラスミドとして、接合伝達性の pBP136(rigid タイプ)および pCAR1(flexible タイプ)を使用し、モデル供与菌・受容菌として Pseudomonas putida KT2440 由来の菌株を用いた。撹拌槽としては $125 \, \text{mL}$ 容のスピナーフラスコを用いた。1/3 に希釈した LB 液体培地 $100 \, \text{mL}$ を入れたフラスコに、供与菌と受容菌を異なる密度で接種し、静置条件と、様々な撹拌速度にした場合における接合伝達頻度を比較した。実験開始から 0 分,45 分後に混合液を採取し、接合完了体のみが生育する 1/3LB 液体培地に添加して、生育した接合完了体数を最確数(MPN)法によって推算した。MPN 法は、 $96 \, \text{穴プレートを用いて}$,2 倍(または 1/2 倍)ずつの段階希釈系列を作製し、統計学的に推計した。その結果、菌体密度に応じて、接合伝達頻度を高効率化する撹拌条件は異なり、flexible タイプの性線毛をもつプラスミドは rigid タイプの性線毛をもつプラスミドよりもせん断応力に対して高い抵抗力を持つ可能性が示された。今後は他のプラスミドについても検証を試みる予定である。

青枯病菌のクオラムセンシングシグナル分子は (R)-methyl 3-hydroxymyristate である

(1阪府大院生命環境、2高知大農、3高知大総研セ)

〇甲斐建次¹、大西秀幸¹、嶋谷美香¹、石川詩歩²、森 友花²、木場章範²、大西浩平³、曵地康史²

【目的】

青枯病菌 Ralstonia solanacearum は、200 以上の植物種に感染し萎凋を引き起こす。本菌は農作物に甚大な被害を及ぼすことから、病原性制御機構の解明と防除法開発が切望されている。本菌は維管束内で爆発的に増殖し、大量の細胞外多糖(EPS)を産生する。その EPS が維管束の通水が阻害するため、植物は萎凋する。EPS などの病原力因子はレギュレータータンパク質 PhcA によって制御され、PhcA 活性はクオラムセンシング(QS)によって調節される。QS シグナル分子として AW1 株培養物からmethyl 3-hydroxypalmitate(3-OH PAME)が報告されている。しかし、3-OH PAME を産生しない株が多くあることから、これらの株では別のシグナル分子が機能していることが強く示唆された。そこで本研究では、未知 QS シグナル分子、その合成酵素および受容体の同定を試みた。

【方法・結果】

QS シグナル分子の推定合成酵素をコードする phcB 遺伝子の欠損株 ($\Delta phcB$ 株)を用い、EPS 産生誘導を指標にして、野生株 (OE1-1 株)の培養物からシグナル分子を精製した。NMR、MS および合成標品との比較により、QS シグナル分子を (R)-methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME)と同定した。 3-OH MAME は、EPS だけでなく、二次代謝産物と細胞壁分解酵素の産生を誘導した。phcB 遺伝子の相補実験と異種発現実験から、PhcB が 3-OH MAME 合成酵素であることを確認した。同様の実験から、ヒスチジンキナーゼ PhcS が受容体であることが強く示唆された。様々な野生株の PhcB と PhcS から分子系統樹を作成したところ、系統樹はシグナル分子のタイプ (3-OH MAME か 3-OH PAME)と一致して 2 つのグループに分かれ、Phc タンパク質のユニークな分子進化が明らかになった。

D-a12

青枯病菌クオラムセンシングシグナル分子の構造活性相関とプローブ化の検討 (阪府大院生命環境)○嶋谷美香、大西秀幸、甲斐建次

【目的】

青枯病菌 Ralstonia solanacearum は、200 以上の植物種に感染するグラム陰性細菌である。本菌は植物の維管束内で大量の細胞外多糖 (EPS) を産生し、維管束の通水を阻害することで植物を萎凋させる。 EPS などの病原力因子の産生は、クオラムセンシング(QS)によって制御されている。我々は、本 QS系を制御するシグナル分子が(R)-methyl 3-hydroxymyristate((R)-3-OH MAME)であることを明らかにした。変異株の解析から、3-OH MAME は 6 回膜貫通ヒスチジンキナーゼ PhcS によって受容されることが強く示唆されている。しかし、それらの結合を直接的に証明するデータはない。そこで本研究では、3-OH MAME の構造活性相関研究を行い、3-OH MAME と PhcS 受容体の結合を化学的に証明するためのプローブ合成を試みた。

【方法・結果】

各種 3-OH MAME アナログの QS シグナル活性評価には 3-OH MAME 合成酵素欠損株($\Delta phcB$ 株)を用い、EPS 産生が誘導される最小有効処理量で評価した。天然リガンドである (R)-3-OH MAME の最小有効処理量は 0.04 nmol であった。S 体は 0.4 nmol であり、活性は 10 倍低下した。3 位ヒドロキシ基除去体は 6 nmol であり、活性はさらに大きく低下した。カルボキシ体と C12 化合物は不活性であった。これらの結果から、受容体による QS シグナルの認識には、3 位ヒドロキシ基、メチルエステル構造および C14 以上の鎖長が重要であることが明らかになった。これらの知見に基づき、3-OH MAME に光親和性ジアジリン基とクリックケミストリーで検出するためのアルキンを導入したプローブをデザインし、その合成を進めた。現在、最終反応の 1 ステップ前まで完成している。その反応が完了次第、QS シグナル活性を調べる予定である。

DMoR 法による単糖の比色分析と酵素のプレートアッセイへの応用 (福井県大院生物資源)〇高桑正寛, 伊藤貴文, 日竎降雄, 片野肇

糖の比色分析法はいくつか知られているが、反応液を煮沸するなどの操作が含まれ、プラスチック製のマイクロタイタープレートを使用したアッセイ法に向くものは少ない。また、大規模のスクリーニングにおいては長時間の発色の安定性も問題となる。我々は、Si(IV)-Mo(VI)溶液中で、還元糖が直接Mo(VI)種を還元して青色のモリブドケイ酸を生じ、この反応がオリゴ糖や多糖と比べて単糖では顕著に速いことを見出し、単糖の比色分析法 (direct molybdate reduction:DMoR 法) を確立してきた。DMoR 法は試験液に対し数倍体積のSi(IV)-Mo(VI)溶液を加え、所定の時間数十度で反応させるだけで安定した発色を与えることから、単糖の生成を触媒する酵素のアッセイ法として期待できる。今回は、DMoR 法による α -グルコシダーゼおよびグルコースイソメラーゼのプレートアッセイ法について報告する。

従来, α -グルコシダーゼのアッセイは p-ニトロフェニル- α -D-グルコピラノシドを基質として用い,生成する p-ニトロフェノラートの吸光測定が利用される。今回, $\mathrm{Si}(\mathrm{IV})$ -Mo(VI)溶液に $20\%(\mathrm{V/V})$ の DMSO を加えることで,過剰のマルトース(二糖)存在下でもグルコースの定量が可能となり,マルトースやスクロースを基質として用いたグルコシダーゼのアッセイ系を確立する事が出来た。またこの方法は,同酵素の阻害剤のスクリーニングにも応用可能であることが示された。

次に、単糖の間の感度差を利用することで、グルコースイソメラーゼの活性測定方法を確立した. DMoR 法ではフルクトースやキシルロースなどのケトースがグルコースやキシロースなどのアルドースに比べて格段に高い感度を与える傾向を示す.pH=4.5 の Si(IV)-Mo(VI)溶液を用いたところ、数百 mM のグルコース溶液中に含まれる数 mM のフルクトースを定量することが出来た.本法はケトースの比色分析法として知られる phenol-acetone-borate 法よりも簡易迅速であり、高い再現性を与えたことから、グルコースイソメラーゼのアッセイに応用が可能である.以上の実験結果について報告する.

モデル生物としてメダカのタンパク質架橋化酵素ファミリーとその機能に関する解析

(¹名大院創薬科学、²京大院農、³名大生物機能セ) 高田佑紀¹、奥谷冬穂¹、木下政人²、橋本寿史³、辰川 英樹¹、〇人見清隆¹

【目的】タンパク質架橋化酵素(トランスグルタミナーゼ:以下 TGase)は、翻訳後修飾としてのタンパク質間の架橋や一級アミンの付加反応を担っている。ヒト等の哺乳類では8つのアイソザイムが存在して酵素ファミリーを構成し、多様な組織分布のもとで各々が多彩な機能を有しているが、尚それらの生理的役割については不明な点が多い。ニホンメダカ(Oryzias latipes)は、ゼブラフィッシュと同様に、近年創薬スクリーニングを始めモデル生物として用いられている。これは飼育や遺伝子変異個体の取得が容易であるためである。我々は未だ知見のないメダカの TGase を対象として、ヒトで主要なアイソザイムである組織型 TGase(TG2)に相当するメダカ酵素の検索ならびに生化学的な解析と、その遺伝子欠失変異体の作製・表現型解析を目的とした。

【方法・結果】データベース解析から、メダカにはヒトの TGase に相当する類似遺伝子群7つが存在した。このうち、ヒトでは広範な組織に発現し、機能的に多様である TG2 の類似遺伝子 (01TGT) を対象にまず組換えタンパク質の作製を試みた。定法によって大腸菌において発現させたところ、低温で培養した場合に可溶性画分に回収されたので、大量培養を行ない単一に精製した。この精製標品を用いて、酵素活性の測定並びに抗体作製を行なった。抗体による組織発現解析の結果、脊髄、網膜、浮袋に特に強い発現が見られた。一連の生化学的な解析と並行して、ゲノム編集技術である TALEN 法を用いて 01TGT 遺伝子を欠失させた個体を作製した。この個体群は発生過程や外見に異常な変化はなかったが、時間あたりの行動範囲に関して解析を行ったところ、野生型に比して有為に遊泳範囲が狭くなることを見出した。

E-a02

表皮型タンパク質架橋化酵素に対する高反応性基質ペプチドの活用法 (名大院創薬科学)〇山根美樹、椙村佳代子、川崎寛子、辰川英樹、人見清隆

【目的】

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ(TGase)は、カルシウムイオン依存的にタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基との間にイソペプチド結合を形成する反応を触媒する酵素ファミリーである。皮膚表皮においては、複数の TGase が協調的に異なった架橋様式で働くことにより、数種の構造タンパク質群が架橋結合され、表皮のバリア機能に寄与する構造物が形成される。しかし、表皮形成時に架橋されるタンパク質群に関する詳細な情報や、表皮細胞の培養系で表皮の完成度を評価する方法は未だ途上である。本研究では、我々がこれまでに取得してきた各 TGase に対する高反応性基質ペプチドの活用法を検討し、本酵素の関わる皮膚形成機構の解明に貢献することを目的とした。【方法・結果】

表皮型 TGase と高い反応性を示す基質ペプチド(K5)の活用法として、まず、培養したヒトの表皮細胞における TGase の基質探索を行った。表皮細胞の抽出液にビオチン標識したペプチド(Bio-K5)を加えて反応させると、TGase 特異的に抽出液中のタンパク質と Bio-K5 が架橋される。反応産物をビオチンと親和性のあるアビジンゲルを固定化したカラムに通すことで、Bio-K5 と架橋したタンパク質のみを取得した。取得したタンパク質を質量分析で解析した結果、表皮でバリア機能に関わる既知のタンパク質以外にも、架橋化されうる 4 つの基質タンパク質群を新規に同定することが出来た。

次に、表皮の完成度を評価しうる可能性を考え、表皮細胞の立体培養系での活用を試みた。TGase は表皮形成時の分化マーカーとしても知られており、発現量だけでなく、その活性を検出することが 出来れば有益な情報となる。蛍光標識したペプチド(FITC-K5)を立体培養細胞から得た切片に添加し、TGase の活性検出を試みた結果、活性を有する領域を蛍光シグナルとして検出することが出来た。

腎臓の線維化進行に伴うタンパク質架橋化修飾の役割

(名大院創薬科学)〇大津里紗、谷優治、脇田峻資、辰川英樹、人見清隆

【目的】線維症とはコラーゲンなどの線維性タンパク質が組織に過剰に蓄積し、組織構造が壊れ、柔軟な組織が硬化して恒常的な機能が失われる疾患である。タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) は、線維形成の主要因である細胞外マトリクスを架橋し、その安定化や蓄積を促進することで線維症発症へ寄与することが示唆されている。しかしながら、病態発症に関連する詳細な病態分子メカニズムは未だ不明瞭な点が多い。本研究では、腎線維症のモデルマウスを用いて、病態進行に伴う TGase の役割を解明し、腎疾患の新たな治療や予防に繋げることを目的とした。

【方法・結果】8週齡のICR 雄マウスに片側尿管閉塞(UUO)を行い、腎線維症を誘導した。解析には未処理のもの、処理後3、7、14日間が経過したマウスの腎臓を使用した。線維化の進行程度について評価するため、組織形態学的解析およびマーカー遺伝子・タンパク質の発現量の変化を確認した結果、UUO 処理後の日数に応じて上昇が確認された。TGase アイソザイムのうち、腎組織に比較的多量に存在する TG1、TG2 について、mRNA・タンパク質発現量を確認したところ、線維症が進行するにつれて mRNA 量の上昇は見られるものの、タンパク質発現量は減少した。TG1、TG2 により特異的に架橋されるグルタミン残基を含む基質ペプチドを用いて腎組織中の架橋活性を測定したところ、線維症の初期段階で TG1、TG2 の活性が上昇し、その後に活性の低下が見られた。一方、蛍光標識した基質ペプチドを用いた活性染色においては、TG1 は尿細管上皮、TG2 は間質領域において顕著な活性の上昇が観察された。また、TGase により架橋されるグルタミン受容基質タンパク質を同定するため、TG1 及び TG2 の基質ペプチドを取り込んだタンパク質の同定を行ったので報告する。

E-a04

骨格筋のエネルギー代謝制御因子 PGC-1 α

(1京都府立大生命環境、2静岡県立大食品栄養)〇亀井康富1、三浦進司2

【目的】

骨格筋は、運動や栄養素代謝のみならずヒトの健康に重要な組織である。転写共役因子である PGC-1 α は、運動トレーニングによって骨格筋での発現量が増加する。演者らは、これまでに PGC-1 α を骨格筋特異的に過剰発現させた PGC-1 α -Tg マウスにおいて、骨格筋の遅筋化と持久力の向上を確認している。本研究では、PGC-1 α -Tg マウスの骨格筋の代謝変化を、遺伝子発現および代謝産物の網羅的変化の観察により明らかにすることを試みた。

【方法・結果】

マイクロアレイ法により、 $PGC1\alpha$ -Tg マウスの骨格筋において分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝が亢進していることが示唆された。さらに、 $PGC1\alpha$ -Tg マウスの骨格筋において BCAA 代謝酵素の遺伝子発現及びタンパク質発現が増加したことを確認した。また骨格筋及び血中において BCAA 量が減少していた。これらの結果は、骨格筋における $PGC1\alpha$ が BCAA 代謝を促進し、持久運動能力向上に寄与している可能性を示唆している(PLOS ONE 2014)。

さらにメタボローム解析により、遅筋化に伴う骨格筋中の低分子代謝物、特に水溶性代謝物の変動を検討した。TCA 回路、BCAA や β -アラニンを含むアミノ酸代謝、そしてプリンヌクレオチド回路とアスパラギン酸ーリンゴ酸シャトルの代謝産物のレベルが変化した。これらの結果から、PGC1 α がアミノ酸を含む様々な基質を利用して TCA 回路を活性化し、運動時のエネルギー源としている可能性が示唆された(PLOS ONE 2015)。

HepG2 細胞におけるアントシアニンの LDL 受容体活性化

(岐阜大学, 応用生物科学部) 〇岡田 雄大, 三島 周平, 島田 昌也, 長岡 利

【目的】

高い血漿低密度リポタンパク質(LDL)レベルは動脈硬化症等のリスクを増大させることが知られている. LDL レベルは主に肝臓で発現している LDL 受容体(LDLR)により調節される. 近年,LDLR タンパク質の分解を促進する因子として Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9)が同定され,血漿 LDL レベルに影響を与える新たな因子として注目を集めている. そこで LDLR を活性化させ,PCSK9 を低下させる因子を探索し,その作用機構を解明することは動脈硬化症の予防に対する新たな方策発見につながる. ある種のポリフェノールは血中 LDL レベルの上昇を抑制し、抗動脈硬化作用を示すことが知られている. 私はポリフェノールであるアントシアニンに注目し, LDLR や PCSK9 に与える影響について,ヒト培養肝臓細胞 HepG2 を用いて解析することを目的とした.

【方法・結果】

HepG2 細胞を各濃度の塩化シアニジンで 24 時間処理した後,WST-1 法により細胞生存率を評価した結果,各濃度で細胞生存率に影響はなかった.HepG2 細胞を各濃度のシアニジン-3,5-ジグルコシド,塩化シアニジンで 24 時間処理した後,LDLR mRNA レベルに与える影響をリアルタイム定量 PCR 法により測定した.また同条件で塩化シアニジンを添加し,LDLR タンパク質レベルに与える影響をウェスタンブロット法により測定した.結果として LDLR mRNA・タンパク質レベルは塩化シアニジンの濃度依存的に有意に増加したが,シアニジン-3,5-ジグルコシド添加では変化しなかった.またHepG2 細胞を各濃度の塩化シアニジンで 24 時間処理した後,PCSK9 mRNA レベルに与える影響をリアルタイム定量 PCR 法で,PCSK9 の細胞外タンパク質レベルに与える影響を ELISA 法によって測定した結果, mRNA レベルは有意に変化しなかったが,タンパク質レベルは有意に減少した.

E-a06

HDL(善玉コレステロール)産生における ABCA1 の C 末端領域の機能解析

(¹京大院農、²京大 ¡CeMS、³京大再生研)〇岡本雄介¹、永田紅²、笠井倫志³、楠見明弘²³、植田和光¹²

【目的】

ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)は、善玉コレステロール(HDL)の産生に必須の膜タンパク質である。ABCA1 は細胞内の過剰なコレステロールを脂質受容体であるアポリポプロテイン A-I(apoA-I)に受け渡すことで HDL の産生を仲介し、末梢組織から肝臓へのコレステロール逆輸送系において重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、ABCA1 が HDL 形成時に一時的にダイマー化し細胞膜上で静止すること、機能を失った変異体は細胞膜上で単量体のまま自由拡散することを明らかにした。ABCA サブファミリーは、他の ABC サブファミリーには見られない特徴的な長い C 末端領域を持つ。そこで本研究では、この長い C 末端領域に着目し、ABCA1 のダイマー化や機能において、ABCA1 の C 末端領域がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

ABCA1の C 末端領域を、他の ABCA サブファミリーの C 末端領域と入れ替えたキメラタンパク質を作製した。これらのキメラタンパク質を HEK293 細胞に一過的に発現させ、細胞膜に局在することをフローサイトメトリーによって確かめた。また、蛍光標識した apoA-I との結合活性や、apoA-I に対する脂質排出活性を解析することで、機能が保持されているかを検討した。その結果、ABCA1 との相同性が最も高い ABCA7 とのキメラタンパク質は機能を失ったのに対し、ABCA4 および ABCA13 とのキメラタンパク質は機能を保持していた。さらに、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた一分子解析によって細胞膜上での拡散係数を解析したところ、機能を保持していた ABCA4 とのキメラタンパク質が細胞膜上で静止する傾向にあったのに対し、機能を失った ABCA7 とのキメラタンパク質は膜上で自由拡散する傾向にあった。これらの結果から、ABCA1 の C 末端領域は膜上での静止と機能に重要であり、一部の ABCA サブファミリーの C 末端領域はその役割を代替できることが明らかになった。

NPC1L1 に対する新規化合物 fomiroid A の構造特異的な結合によるコレステロール取込み阻害作用 ('ファンケル総研、²京大・iCeMS、³京大院・農、⁴静大院・創造、⁵静大・グリーン研、⁶静大・農、⁷京女大・家政) 〇千場 智尋 ¹²、櫻田 剛史 ¹、渡邊 理恵 ¹、山口 宏二 ¹、木村 泰久 ³、 木岡 紀幸 ³、河岸 洋和 ^{4,56}、松尾 道憲 ⁷、植田和光 ^{2,3}

【目的】

食事および胆汁由来コレステロールの小腸からの吸収を担う Neimann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) は、高コレステロール血症改善剤である ezetimibe の標的タンパク質である。これまでに我々は、キノコの一種であるクロサルノコシカケより単離した新規化合物 fomiroid A が NPC1L1 に対する ezetimibe の結合を阻害することを見出し、NPC1L1 依存的なコレステロール取込みを阻害することを明らかにした。しかし、fomiroid A と平面構造が類似する化合物群に同様の活性を認めるのかは不明であった。そこで本研究では、fomiroid A の類縁化合物を用いて、NPC1L1 に対する結合活性を検討することとした。

【方法・結果】

Ezetimibe の代謝物を標識した[3 H]ezetimibe-glucuronide([3 H]EZG)と NPC1L1 発現細胞の膜画分を用いて、類縁化合物の結合阻害活性を検討した。その結果、いずれの化合物も EZG 結合には影響が認められず、fomiroid A の構造特異性が示唆された。次に、NPC1L1 に対する fomiroid A の直接結合を支持するため、NPC1L1変異体を用いたファーマコロジカルシャペロン活性を検討した。Fomiroid A は、立体構造の異常から小胞体に留まる NPC1L1 変異体に対して、その局在を小胞体から細胞膜へと救済するファーマコロジカルシャペロン作用を示した。一方、この変異体に対し ezetimibe は同様の効果を示さなかった。この結果より、fomiroid A は ezetimibe とは異なる結合様式にて NPC1L1 と直接結合することが示唆された。現在、NPC1L1 のコレステロール結合部位である N 末端ドメインを部分精製し、fomiroid A が N 末端ドメインと結合するのか検討中である。

E-a08

福井県産エゴマ油および α-リノレン酸の肝細胞脂肪蓄積抑制作用の検討

('福井県大生物資源、'福井県食品加工研)〇高橋正和'、古矢康久'、久保義人'、小林恭一'、村上 茂'

【目的】

近年,非アルコール性脂肪肝障害(non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD)の報告例が増加している。NAFLD は肥満による肝臓への脂肪蓄積により発症し,その約9割は単純脂肪肝であるが,約1割は酸化ストレス・炎症反応などによって非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を引き起こし,さらには肝硬変・肝臓がんへと進行する。そこで現在,肝臓への脂肪蓄積抑制効果を示す食成分が注目されている。本研究では α -リノレン酸が豊富な福井県産エゴマ油の肝細胞蓄積抑制効果などを検討した。【方法・結果】

ヒト肝がん細胞株 HepG2 を脂肪酸添加培地で 24 時間培養したところ、オイルレッド O 染色法により脂肪蓄積の誘導が確認された。そこで本培養系に各種濃度のクルクミンまたはルテオリンを添加し、翌日オイルレッド O 染色細胞を 2-プロパノール抽出に供して 510nm の吸光度を比較した。その結果、クルクミンとルテオリンはいずれも用量依存的に脂肪蓄積抑制効果を示すことが確認された。福井県産エゴマ油から FAME を調製して構成脂肪酸比率をガスクロマトグラフィーにて調べたところ、その約 63%が α -リノレン酸であることが確認された。そこで次に α -リノレン酸の効果をこのモデル評価系で検討したところ、やはり用量依存的な脂肪蓄積抑制効果を示すことが確認された。さらに α -リノレン酸は、RAW264 マクロファージ細胞株においてリポ多糖(LPS) 刺激で誘導される一酸化窒素 (NO) 産生に対しても抑制作用を示したことから、NAFLD 発症モデルにおける炎症応答抑制効果が期待された。最後に (NO) を2 週間自由摂食させたところ、エゴマ油添加食群はコーン油 (NO) を2 週間自由摂食させたところ、エゴマ油添加食群はコーン油添加食群に比べて脂肪肝抑制傾向を示した。

Alu 配列の一部がエクソン化されたタンパク質と ALG-2 の相互作用解析

(名大院生命農)○小島亨介、松尾里奈、張維、鮑宣白、高橋健、高原照直、柴田秀樹、牧正敏

【背景と目的】Ca2+結合タンパク質 ALG-2 は、アポトーシス関連因子として発見され、Ca2+依存的に様々なタンパク質と相互作用することで、細胞死、がん、シグナル伝達、小胞輸送などの生理機能に関与している。 我々は ALG-2 が一般に Pro に富む領域に存在する2種類の結合配列モチーフを認識することを突き止め、それぞれのモチーフを持つ ALIX、および、Sec31A ペプチドと ALG-2 複合体の共結晶化にも成功した。X線結晶構造より明らかとなった Sec31A の ALG-2 結合部位の各種変異体解析によって最適結合モチーフを定義した。このモチーフ(PPPPGF)を持つタンパク質群に、Alu 配列の一部がエクソン化されたタンパク質 PPIL3a と MAGI3 が新たに見つかった。 Alu 配列はレトロトランスポゾン SINE に属し、エクソン化は様々なアイソフォームを生み出すが、一般に機能不活性に作用している。 PPIL3 は a と b の2つのアイソフォームを持つが、a のみが ALG-2 結合モチーフを持つ。 Alu 配列のエクソン化が PPIL3 の機能にどのように関わるのかは不明であり、選択的スプライシングによって ALG-2 と相互作用するものが生じた場合、新規機能賦与に繋がる可能性がある。 そこで本研究では、 PPIL3a および MAGI3 と ALG-2 の相互作用解析を行った。

【方法と結果】GFP 融合の PPIL3a、MAGI3 をそれぞれ作製し、HEK293 細胞内で発現させ、共免疫沈降実験によりALG-2 との結合解析を行った。MAGI3 は ALG-2 との結合が確認されたが、PPIL3 では結合が見られなかった。双方はモチーフならびにその前後で保存性の高い配列を持つが、結合能に違いが見られた。その原因を探るため、GST 融合の PPIL3a を大腸菌で発現させ、精製し、モチーフ付近の柔軟性と ALG-2 との結合能の関係を調べた。モチーフ直後にストップコドンを入れることで、恣意的にモチーフ付近の柔軟性を高めたペプチドを作製、精製した。柔軟性の高いペプチドではより強い結合が検出されたため、タンパク質の立体構造によるモチーフ付近の柔軟性の低下が結合に負の影響を及ぼすことが示唆された。

E-a10

カルシウム結合タンパク質 ALG-2 と相互作用する MISSL の初期小胞輸送における機能解析 (名大院生命農)〇井上国子、新居裕美香、高原照直、柴田秀樹、牧正敏

【目的】

ALG-2(apoptosis linked gene-2)は連続した 5 つの EF ハンドモチーフを持つカルシウム結合タンパク質である。ALG-2 はカルシウムを介して様々なタンパク質と相互作用し、初期小胞輸送の制御に関わることが解っている。より詳細な役割を解明すべく、ALG-2 の相互作用因子を探索したところ、新たに機能未知タンパク質 MISSL が見つかった。本研究では ALG-2 による初期小胞輸送の制御における MISSL の役割を明らかにすることを目指した。

【方法・結果】

まず、MISSL と ALG-2 との結合を確認するために、抗 MISSL 抗体を用いて免疫沈降実験を行ったところ、カルシウム条件下でのみ内在性の ALG-2 が共沈降された。このことから、内在性の MISSL と内在性の ALG-2 とはカルシウム依存的に結合することが分かった。

次に、HeLa 細胞に GFP 融合 MISSL (GFP-MISSL)を発現させ、細胞内のカルシウム濃度を上昇させると、GFP-MISSL はドット状に変化し、ALG-2 および Sec31A (ER exit site マーカー) と共局在した。また、ALG-2 を発現抑制した場合には、このような局在変化は見られなかった。このことから、ALG-2 のカルシウム結合に依存して、GFP-MISSL は ER exit site に集積することが分かった。

さらに、MISSL を発現抑制すると、ER-ゴルジ間のマーカーである ERGIC-53 の局在が変化した。 このことから、MISSL は ALG-2 と共に小胞輸送の初期段階に関わることが示唆された。

そこで、MISSLの小胞輸送への関与を検証するために、分泌型アルカリフォスファターゼを用いて、細胞外への輸送をモニターしたところ、MISSLおよびALG-2を発現抑制した際に分泌量が低下した。また両者を同時に発現抑制させると、片方を発現抑制した時と同程度の低下が見られた。これらのことから、MISSLはALG-2と共同して小胞輸送の制御に関わっていることが示唆された。

カルシウム結合蛋白質 ALG-2 による NFAT1 の転写活性制御

(名大院生命農·応用分子生命科)〇張維、鮑宣伯、高原照直、柴田秀樹、牧正敏

【目的】

NFAT1(Nuclear factor of activated T cells 1)は、多くの細胞においてサイトカインの遺伝子発現に重要な転写因子として作用する。未刺激条件下では、NFAT1 は細胞質に局在し、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させると、NFAT1 は calcineurin により脱リン酸化され、細胞質から核内に移行する。その後、サイトカイン遺伝子転写調節領域の特異的認識配列に結合し、それらの転写活性化を誘導する。当研究室では、 Ca^{2+} 結合蛋白質 ALG-2 の相互作用蛋白質を探索したところ、NFAT1 が相互作用候補として挙げられた。ALG-2 は NFAT1 と相互作用することで、NFAT1 の核移行や、 Ca^{2+} シグナル応答遺伝子発現を制御している可能性がある。本研究では、NFAT1 と ALG-2 の相互作用及びその生理的機能を明らかにすることを目的に実験を行った。

【方法・結果】

HEK293T 細胞に SGFP2 融合 NFAT1(NFAT1-SGFP2)を発現させ、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降実験を行ったところ、内在性の ALG-2 が Ca²+依存的に共免疫沈降する結果が得られた。また、HEK293T 細胞などに NFAT1-SGFP2 を発現させ、抗 ALG-2 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、細胞質の Ca²+濃度上昇刺激により、ALG-2 は NFAT1-SGFP2 とともに核内に集積した。さらに、ALG-2 の転写調節に対する効果を調べるため、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行った。HEK293 細胞と ALG-2 knockdown HEK293 細胞に、NFAT1、Nanoluc-NFAT response element を発現させ、細胞刺激をしたところ、ALG-2 knockdown HEK293 細胞の方が、より高い Nanoluc の発光量が得られた。以上より、ALG-2 が NFAT1 と相互作用して、NFAT1 の転写活性を制御する可能性が示唆された。

E-a12

小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおける ALG-2 標的タンパク質の複合体形成 (名大院生命農・応用分子生命科)○犬飼隆太、鈴木千尋、京卓志、高原照直、牧正敏、柴田秀樹

【目的】

ALG-2 (apoptosis-linked gene 2) は、カルシウム結合モチーフである EF-hand を 5 つ連続して持ち、カルシウム依存的に様々なタンパク質と結合することでカルシウム応答性アダプターとして機能する。我々は、複数の ALG-2 標的タンパク質の ALG-2 結合領域を同定し、2 つの ALG-2 結合モチーフを明らかにした。更なる標的タンパク質探索のため、データベース上で 2 型 ALG-2 結合モチーフ (ABM-2) を持つタンパク質を検索したところ、CDIP1 が挙げられた。CDIP1 は小胞体ストレス時に発現が誘導され、caspase-8 を介したアポトーシスを促進する。本研究では、CDIP1 と ALG-2 の結合が小胞体ストレス誘導性アポトーシスを制御する可能性を検証することを目的とした。

【方法・結果】

GFP を融合させた CDIP1 の野生型または ABM-2 領域を欠損させた変異体を HEK293 細胞に発現させ、抗 GFP 抗体による免疫沈降実験により ALG-2 との結合を解析した。その結果、CDIP1 はカルシウム依存的に ALG-2 と結合し、その結合には ABM-2 領域が重要であることが明らかになった。次に、ALG-2 の発現抑制がアポトーシスに与える影響を検証した。ALG-2 を発現抑制した HeLa 細胞に小胞体ストレス誘導試薬 Brefeldin A を処理すると、発現抑制していない場合と比較して細胞死が抑制され、アポトーシス経路の上流にある caspase-8 の切断も抑制された。さらに、mCherry 融合 CDIP1 と GFP を融合させた ALG-2 標的タンパク質を共発現させ、抗 mCherry 抗体による免疫沈降実験により CDIP1 と結合する ALG-2 標的タンパク質を探索した。CDIP1 どうしの結合とともに、膜貫通ドメインを持った SHISA4 と Scotin との結合が検出された。これらの結果より、小胞体膜上での ALG-2 標的タンパク質の複合体形成が caspase-8 の活性化を制御する可能性があると考えている。

ローヤルゼリー由来ペプチドが誘導するアポトーシスと金属イオンの関係

('岐阜大院・応生科・応用生命,²(株)秋田屋本店) 〇竹内まい子¹,大島和也¹,松岡拓磨²,川島拓司²,中村正²,北口公司¹,矢部富雄¹

【目的】

ミツバチ(Apis mellifera)の働き蜂が分泌するローヤルゼリー(RJ)は、幼虫を女王蜂に分化させる成分を含むなど、様々な生理機能をもつ物質である。私たちは、RJ主要タンパク質の幼虫由来消化酵素処理画分から機能性ペプチド YPDWSFA を同定し、配列内のトリプトファン残基が酸化されていることを発見した。酸化型トリプトファン残基と RJ の生理機能との相関関係を検討するため、これまでに、鉄イオンと過酸化水素によるフェントン反応を用いて人工的に酸化型トリプトファン残基を含むペプチドを作成した。このペプチドをラット小腸上皮細胞(IEC-6)に添加するとアポトーシスが誘導された。本研究では、フェントン反応に用いた鉄イオンがペプチドによる IEC-6 細胞のアポトーシス誘導にどのように影響するかを検討するため、銅イオンを用いて作成したペプチドと比較した。

【方法・結果】

過酸化水素と鉄イオンまたは銅イオンによりペプチド配列内のトリプトファン残基を酸化し、酸化型ペプチドを作成した。金属イオンは、陽イオン交換樹脂とキレート剤を用いて取り除いた。ペプチド配列内のトリプトファン残基の酸化は、MALDI-TOF-MS分析により確認した。作成した酸化型ペプチドをIEC-6細胞に添加し、24時間培養後にWST-8試薬を用いた吸光度測定により細胞生存率を算出した。その結果、鉄イオンにより作成した酸化型ペプチドの添加とは異なり、銅イオンにより作成した酸化型ペプチドの添加ではアポトーシスはほとんど誘導されず、銅イオン除去によりアポトーシスが促進された。また、鉄イオン除去後に再度鉄イオン、銅イオン除去後に再度銅イオンを加えたペプチドのIEC-6細胞への添加では、いずれも陽イオン除去前と大きな変化はなかった。細胞に与える挙動が異なることから鉄イオンと銅イオンによる酸化では生成物が異なることが示唆された。

E-p01

強い骨密度上昇作用を有するビタミンD誘導体の代謝および作用メカニズムの解明

(¹富山県大工、²帝京大薬)〇遠山枝李¹、安田佳織¹、高野真史²、橘高敦史²、鎌倉昌樹¹、生城真一¹、 榊利之¹

【目的】

骨粗鬆症や癌治療薬への応用を目指し、様々な活性型ビタミン D_3 (1,25 D_3)誘導体が研究されている。これまで我々は 2 位に置換基を有するビタミン D 誘導体が、天然型である $1,25D_3$ と比べて高い VDR (ビタミン D 受容体) 結合能をもち、ビタミン D 24 位水酸化酵素 (CYP24A1) による不活性化を受けにくいことを明らかにしてきた。また、近年、 2α 位にアゾール基を有する誘導体 2α -[2-(tetrazol-2-yl)ethyl]-1,25 D_3 (AH-1)を合成・評価し、AH-1 が骨粗鬆症モデルラットに対し血中カルシウム濃度を上げずに骨密度を上昇させることを明らかにした[1]。AH-1 は副作用の少ない骨粗鬆症治療薬として期待できることから、ビタミン D 誘導体に重要な CYP24A1 による代謝を調べた。 【方法・結果】

ラット由来 CYP24A1 発現大腸菌の膜画分を用いて、AH-1 と 1,25D3 の代謝を比較した。速度パラメーターを比較したところ、 k_{cal}/K_m 値は 1,25D3 の 1/4 程度であり、AH-1 は 1,25D3 に比べるとやや CYP24A1 による代謝を受けにくいことがわかった。さらに 1,25D3 は CYP24A1 による多段階的な水酸化反応を受けて種々の代謝物へと変換されたのに対し、AH-1 は 2 段階目以降の代謝を極めて受けにくく、その主要代謝物である 24 位水酸化体は、AH-1 や 1,25D3 と同様、高い VDR 結合能を有していた。1,25D3 は CYP24A1 による代謝を連続的に受け、不活性化されることが知られているが、AH-1 は CYP24A1 の代謝を受けても、高い生理活性を有していることが明らかになり、このことが骨粗鬆症モデルラットにおける骨粗鬆症治療効果をもたらした可能性が高い。ヒト由来 CYP24A1 を用いた代謝実験も行っており、ラットとヒトの種差についても論じる。

[1] Matsuo et al., ACS Med Chem Lett. 4, 671-674 (2013)

CYP27B1 ノックアウトマウスを用いた 25-ヒドロキシビタミン D3 の生理作用に関する研究 (「富山県大・工、2神戸薬大・薬、3樟蔭女子大・健康) 〇青木健悟」、西川美宇「、高松将士」、田中一丸」、安田佳織「、中川公恵 2、津川尚子 3、岡野登志夫 2、生城真一」、榊利之「

【目的】

【方法・結果】

生体内のビタミン D_3 は 2 段階の水酸化を経て 1α ,25・ジヒドロキシビタミン D_3 (1,25 D_3)となり、生理活性を示す。従来、1,25 D_3 が活性型ビタミン D_3 であり、25・ヒドロキシビタミン D_3 (25 D_3)はプロホルモンであると考えられてきたが、近年、25 D_3 自身がホルモン作用を示す可能性が示されている。我々はこれまでに、25 D_3 がビタミン D 受容体(VDR)のリガンドとして直接作用してヒト前立腺由来細胞 PZ-HPV-7 の細胞増殖を抑制すること示してきた[1]。そこで、本研究では 25 D_3 を 1,25 D_3 に変換する酵素 CYP27 D_3 1 の遺伝子欠損マウス(KO マウス)を用いて、25 D_3 3 の直接作用を検討した。

KO マウスの血中には 1,25D3 が検出されず、骨形成不全、子宮形成不全などが見られることから、これらの表現型には 1,25D3 が重要な役割を果たすことがあわかる。離乳直後の KO マウスに $0\sim250\mu g/k g/day$ も 25D3 を連日投与し、表現型や生化学的知見に及ぼす影響を検証した。KO マウスにおける離乳後の発育不全は 25D3 投与により顕著に改善された。生後 $10\sim12$ 週齢における骨密度を測定したところ、25D3 投与により KO マウスの骨密度は著しく上昇したが、血中カルシウム及びリン濃度の有意な上昇は認められなかった。また、25D3 投与により、腎臓における CYP24A1 遺伝子の顕著な転写誘導が見られ、血中に 24,25D3 など CYP24A1 による代謝物が高濃度で検出された。ビタミン D の標的臓器において 25D3 が VDR に結合し、CYP24A1 の発現を誘導した結果と推測できる。また、25D3 投与により KO マウス同士の交配に成功した。これらの結果により、25D3 は高カルシウム血症などの副作用を示さずに骨密度を上昇させ、生殖機能を回復させる可能性が示唆された。

[1]Munetsuna et al., Mol.Cell.Endocrinol.381,960-970(2014)

E-p03

網羅的解析によるマウスの食餌誘導性脂肪肝感受性遺伝子の探索

('名大院生命農、'名大院医学系)〇鈴木京 '、小林美里 '、大野民生 '、村井篤嗣 '、堀尾文彦 '

【目的】

脂肪肝は食事因子と複数の遺伝因子の相互作用により発症する多因子疾患であり、様々な発症メカニズムが存在する。我々は、高脂肪食の摂取により著明な脂肪肝を呈する SMXA-5 マウス(A/J マウスと SM/J マウスを両親系統とする組み換え近交系統)の第 12 番染色体に、脂肪肝感受性遺伝子座 Fl1sa(A/J アレルが脂肪肝増悪)を同定した(J Lipid Res. 48;2039, 2007)。本研究では、網羅的な解析手法により Fl1sa の候補遺伝子を選抜することを目的とした。

【方法・結果】

①脂肪肝感受性遺伝子の存在領域を絞り込むために、第 12 番染色体部分置換(コンジェニック)マウスを複数系統作出した。6 週齢・雄性の A/J マウス(脂肪肝易発性)、第 12 番染色体置換マウス(コンソミック:脂肪肝抵抗性)、コンジェニックマウスについて、7 週間の高脂肪食摂取条件下で表現型解析を行った。その結果、R2、R3 コンジェニックマウスの肝臓脂質が A/J と比較して有意な低値を示した。ゆえに、FIIsa の脂肪肝感受性遺伝子は、第 12 番染色体のセントロメア~29.8Mb(R2 領域)と 29.8Mb~47.8Mb(R3 領域)にそれぞれ 1 つ以上存在することが分かった。②①で限局した領域内に存在する脂肪肝感受性遺伝子を網羅的に探索するために、DNA マイクロアレイ解析とエクソーム解析を行った。DNA マイクロアレイ解析には 7 週間高脂肪食を摂取させた A/J マウスと第 12 番染色体置換マウスの肝臓と精巣上体脂肪組織を用い、エクソーム解析には A/J マウスと SM/J マウスの尾から抽出した DNA を用いた。そして、DNA マイクロアレイ解析とエクソーム解析で共通して検出された IahI 遺伝子を、脂肪肝感受性遺伝子の有力な候補として選抜した。今後は、IahI 遺伝子の発現制御機構と、IahI の生体内での機能の解析を進める。

マウスの体重増加に及ぼす去勢と高脂肪食摂取のクロストーク

(¹大阪府大院·生命環境、²大阪府大院·栄養)〇花岡諒¹、原田直樹¹、乾博²、山地亮一¹

【背景・目的】前立腺がん患者に去勢などの男性ホルモン除去療法を行うと、肥満を生じて心疾患や脳血管疾患のリスクが上昇する。健常人でも、男性ホルモンレベルはおよそ 25 歳から年間 2-3%ずつ減少するため、加齢による男性ホルモンの生理作用の低下は、肥満を発症させ動脈硬化症のリスクを増加させる一因になると考えられる。しかし、げっ歯類では、去勢による男性ホルモン低下に起因する肥満を発生するモデルはこれまでに確立されていなかった。本研究では、去勢による男性ホルモン低下に起因した肥満を発症するモデルの構築とその発症要因の解析を目的とし、マウスに与える食餌組成に着目して研究を行った。

【方法・結果】性成熟後の C57BL/6J 雄マウス (8 週齢) に去勢または疑似手術を行い、標準食または高脂肪食を与えて 16 週間飼育した。食餌の種類に関わらず、去勢により摂食量が減少したが、高脂肪食摂取時では体重増加量が去勢によって上昇した。高脂肪食摂取時の去勢による体重増加量の約 85%は、内臓脂肪と鼠蹊部皮下脂肪の増加に起因した。食餌効率(体重増加量/摂取カロリー)は高脂肪食摂取時にのみ去勢で有意な上昇が認められた。また、摂食量当たりの乾燥糞重量が高脂肪食摂取時にのみ去勢により減少した。そこで、高脂肪食摂取マウスに抗生物質を経口投与して飼育すると、去勢による体重と内臓脂肪(腸間膜脂肪)の増加や、摂食量当たりの乾燥糞重量の減少は観察されなくなった。一方で、鼠蹊部皮下脂肪は抗生物質を投与しても去勢により増加した。これらの結果から、高脂肪食摂取時に男性ホルモン低下によって腸内環境が変化し、内臓脂肪型肥満の発症につながったと考えられる。

E-p05

唾液タンパク質の性差とテストステロンの影響について

(¹大阪府大院·生命環境、²大阪府大·栄養)〇橋本未来¹、原田直樹¹、乾博²、山地亮一¹

【目的】

唾液は、主に顎下腺、舌下腺、耳下腺の3大唾液腺から口腔に分泌される分泌液であり、ムチンなどの糖タンパク質を豊富に含む。顎下腺の顆粒性迂曲部(GCT)が雄マウスの性成熟期に著しく発達して性差を生じるため、顎下腺はテストステロン(男性ホルモン)の標的器官であると考えられている。本研究では、3大唾液腺の発達と性ホルモン受容体の発現、および唾液量や唾液タンパク質における性差とテストステロンの影響について検討した。

【方法・結果】

8週齢の C57BL/6J 雌雄マウスの顎下腺,舌下腺,耳下腺におけるアンドロゲン受容体 (AR) の発現を検討したところ,AR は 3 大唾液腺で雌雄ともに高いレベルで発現することが判明した.唾液とテストステロンの関係について検討するために,8 週齢の C57BL/6J マウスを①雄対照群,②雄去勢群,③去勢後テストステロンを投与した群(雄去勢+テストステロン群),④雌対照群に分け,ピロカルピン刺激によって分泌された唾液を解析した.顎下腺の重量と比例して,GCT が去勢により雌対照群と同程度まで縮小するのに対して,去勢後テストステロンを投与した雄マウスでは雄対照群と同程度まで大きさが回復した.舌下腺,耳下腺の重量に関しては群間で差はなかった。体重あたりの唾液量に関しては群間で明瞭な差は認められなかった.一方で,SDS-PAGE 後 PAS 染色によって解析した唾液糖タンパク質では,雄対照群では~130 kDa,~34 kDa の糖タンパク質が観察され、雌対照群では~117 kDa,~39 kDa の糖タンパク質が観察された。雄去勢群では雌対照群と同様のパターン,さらに雄去勢+テストステロン群では雄対照群と同様のパターンの糖タンパク質が出現した.本研究により,唾液糖タンパク質において性差による違いが明らかになり,この現象にはテストステロンが寄与することが判明した.

脱ユビキチン化酵素 USP 19 による筋形成抑制作用について (大阪府大院・生命環境)〇北野剛大、原田直樹、山地亮一

【目的】

骨格筋は運動器としての機能以外に、糖や脂質の代謝を担う生体内で最大の組織である。骨格筋は 損傷を受けると、静止状態のサテライト細胞が活性化し、筋芽細胞へと分化し、さらに筋芽細胞同士 が融合した筋管細胞への分化過程を経て筋線維を再生する。ubiquitin-specific peptidase 19 (USP19) は筋 萎縮時に発現が増加する脱ユビキチン化酵素であり、骨格筋における筋タンパク質分解に寄与する。 一方で、筋分化時における USP19 の生理作用は不明であるので、本研究では、筋分化における USP19 の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を分化培地で培養したところ、筋分化にともなって USP19 の発現量が増加した。一方、USP19 siRNA によって USP19 の発現を抑制すると筋分化が促進し、USP19 を高発現させると筋分化は抑制された。さらに USP19 の機能ドメインを検討するため、USP19N 末端領域 (USP19N) と脱ユビキチン化活性部位を含む C 末端領域 (USP19C) の発現ベクターを作製した。C2C12 細胞内で発現させたところ、USP19C は野生型 USP19 と同様に細胞質に局在し、筋分化を抑制した。そこで USP19 の基質を同定するために、glutathione S-transferase (GST) を融合した GST-USP19C を作製した。GST-USP19C は人工基質に対して脱ユビキチン化活性を示した。GST-USP19C を C2C12 細胞破砕液と混合し、USP19C と結合するタンパク質を探索した。その結果、蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオミクスによって USP19C と結合する基質タンパク質を解析したところ、USP19C と特異的に結合する基質タンパク質の候補を複数検出した。現在、これらの候補タンパク質について解析を行っている。

E-p07

単一細胞レベルでの哺乳類染色体複製ドメイン構造の網羅的解析

(1三重大院生物資源、2三重大院医)〇柴田 隆豊1、緒方 進1、緒方 正人2、奥村 克純1、竹林 慎一郎2

【目的】

近年、遺伝的に同じ細胞であっても、個々の細胞間ではクロマチン構造に大きなバリエーションがあることがわかってきている。これはクロマチン構造が動的で確率論的なメカニズムにより決定されることを示唆しているが、その詳細は未だ不明な部分が多い。DNA複製は、DNAを倍加するという細胞増殖にとって根元的なプロセスである。この時、同時にクロマチン成分の倍加も行われるため、エピジェネティックな修飾の変化や維持にとっても重要なプロセスである。哺乳類のDNA複製は、複製ドメインと呼ばれる複製開始やフォークの進行が協調して制御される染色体機能ユニットで行われており、これにより巨大なゲノムを効率的に倍加している。複製ドメイン構造の染色体分布は、発生段階でダイナミックに変化し、ゲノム上のトポロジカルドメインやラミン結合ドメインなどの高次クロマチン構造の分布とも高い相関があることが分かっている。

個々の細胞レベルにおける複製ドメイン制御の特性を明らかにするために、単一細胞で、なおかつ ゲノムワイドに複製ドメイン構造を解析できる新手法の確立を目指した。

【方法・結果】

DNA 複製期初期の単一細胞 (ヒト培養細胞) をマイクロマニピュレーターにより単離し、Multiple displacement amplification 法で、1 細胞中に含まれる DNA を増幅した。増幅した DNA を次世代シークエンサーIon Proton を用いて解析し、コピー数変化を指標に複製ドメイン構造の検出を試みた。その結果、単一細胞レベルで網羅的に DNA 複製ドメイン構造を検出することに成功した。現在、この手法を用いて、個々の細胞レベルにおける複製ドメイン構造のバリエーションと遺伝子発現制御との関連を調べている。

大豆イソフラボンの DNA ポリメラーゼ, DNA トポイソメラーゼ阻害活性とヒトがん細胞増殖抑制活性 (1信州大院農、2神戸学院大 LSC)〇平林正大1、片山 茂1、中村宗一郎1、水品善之1、2

【目的】

近年、大豆の健康機能性が注目されている.本研究では、大豆イソフラボンの哺乳類の DNA 合成酵素 (DNA ポリメラーゼ、Pol) と DNA のねじれを巻き戻す DNA トポイソメラーゼ (Topo) の阻害活性に基づいた抗がん機能性を検討した.

【方法・結果】

大豆イソフラボンは,ゲニステイン,ダイゼイン,グリシテインの3種類(図1)と,それぞれの配糖体であるゲニスチン,ダイジン,グリシチンの6物質について,市販試薬を使用した.哺乳類 Pol は精製酵素を準備して,*in vitro* における活性測定を実施した.Topo は市販酵素を用いて pBR322 スーパーコイル DNA を基質として nicking/catalytic 活性を測定した.ヒト子宮がん細胞(HeLa cells)増殖抑制活性は,WST-1 法で測定した.

大豆イソフラボン 6 物質のうち、 200μ M の濃度でヒト Topo II を阻害したものは、ゲニステインだけであった(IC_{50} =37.5 μ M). ゲニステインの哺乳類の Pol 群やヒト Topo I の阻害活性は弱かった.二本鎖 DNA の熱変性解析により、ゲニステインは基質である二本鎖 DNA に結合(インターカレート)しなかったことから、酵素タンパク質に結合することで阻害活性を示すと考えられる.ゲニステインだけがヒト子宮がん細胞増殖抑制活性を示し、細胞周期を G_2/M 期で停止して、アポトーシスを誘導した.ゲニステインは Topo II 阻害活性に基づいたヒトがん細胞増殖抑制が示唆され、抗がん作用が期待できる.

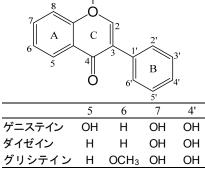


図1:大豆イソフラボン

E-p09

コラーゲンが上皮細胞の嚢胞と管腔形成に及ぼす影響

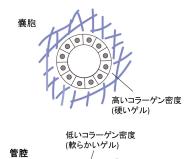
(¹京大院農、²京大 iCeMS) 〇今井まり子 ¹、市川(長里)彩花 ¹、植田和光 ^{1,2}、木岡紀幸 ¹

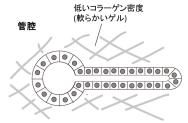
【目的】

上皮細胞は生体内で球状の嚢胞やチューブ状の管腔を形成し機能している。嚢胞から管腔への転換はがんの転移と関連することから注目を集めている。この嚢胞管腔形成は wnt3 や上皮細胞増殖因子などの液性因子によって制御されているほか、コラーゲンやラミニンのような細胞外マトリックス(ECM)の構成分子の種類によっても制御されている。これらに加えて ECM の硬さなどの物理的要因も嚢胞管腔形成に影響を与えることが報告されつつあるが、その詳細な効果は不明である。本研究ではコラーゲンゲルの濃度(硬さ)が上皮細胞の嚢胞管腔形成に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】

ブタ腱由来のコラーゲン I (新田ゼラチン社)のゲルの濃度を変えることで軟らかいゲル(1.0mg/ml)、硬いゲル(2.4mg/ml)を作製し、そのゲルの中にヒト乳腺上皮細胞を埋め込んで 3 日から 2 週間三次元培養を行った。培養後 3 日でゲルの硬さによらず細胞集塊が形成されはじめ、その後培養を続けると一週間で硬いゲル内では嚢胞様構造が、軟らかいゲル内では管腔様の構造が形成された。一方、ゲルを液体培地内で浮遊させた状態で細胞を培養するとゲルの硬さに関わらず嚢胞様構造が形成された。また、軟らかいゲル内で培養し管腔様構造を形成させた後、ゲルを液体培地中に浮遊させると、管腔様構造が嚢胞様の構造に変化した。以上の結果からコラーゲンの物理的な要因が乳腺上皮細胞の嚢胞管腔形成を制御していることが明らかとなった。





ペクチンによる食物アレルギー調節機構の解析

(岐阜大院・応生科・応用生命)〇岩城佳那, 矢部富雄, 北口公司

【目的】

水溶性食物繊維であるペクチンはポリガラクツロン酸を主構造とする複合多糖類であり、様々な生体調節作用を有することが報告されている。また、ペクチンがアレルギー応答を調節する食品成分であることも示唆されているが、その詳細な作用機序は不明である。そこで本研究では、食物アレルギーモデルマウスに柑橘由来のペクチンを摂取させ、アレルギー病態に及ぼす影響について調査することを目的とした。

【方法】

7週齢の雄性 Balb/c マウスに柑橘由来ペクチンを脱イオン水(10 mg/mL)に溶解した水溶液を 21日間自由摂水させた。ペクチンの飲水投与開始から8日目に水酸化アルミニウムゲルアジュバントとともに卵白オボアルブミン(OVA)を腹腔内投与し,血清を継時的に採取した。ペクチンの投与終了後に OVA の追加免疫を行った後,ゾンデを用いて OVA を 13日間強制経口投与(50 mg/day)し,下痢を誘導した。さらに,OVA 経口投与終了後に,OVA を腹腔投与し,アナフィラキシーを誘導した。

【結果】

ペクチン摂取群では、対照群に比べて OVA の経口投与で誘導される下痢症状が緩和されていた。一方、アナフィラキシーショックによる体温の低下は、ペクチン摂取群でも軽減されなかった。ペクチン摂取群の IgE 濃度は対照群と同程度であったが、追加免疫後の IgG_1 濃度が減少していたことから、ペクチンは IgG_1 産生を調節することでアレルギー性の炎症を抑制している可能性が示唆された。

日本農芸化学会中部支部 賛助企業・協力企業 一覧

支部活動には、以下団体からのご援助いただきました。 関係者一同より御礼申し上げます。

賛助企業

天野エンザイム(株) 岐阜研究所 イチビキ(株) 研究開発部 (株)伊藤園 生産本部 伊那食品工業(株) 加藤化学(株) 技術部 (株)岐阜セラツク製造所 (株)三和化学研究所 三重研究所 敷島製パン(株) 研究部 (株)真誠 新日本化学工業(株) 研究部

太陽化学㈱ニュートリション事業部

辻製油(株)
東海物産(株) 食品研究所
中日本氷糖(株)
(株)ニッポンジーン
フジ日本精糖(株) 研究開発室
物産フードサイエンス(株) 研究開発センター
ポッカサッポロフード&ビバレッジ(株) 中央研究所
(株)Mizkan-Holdings 中央研究所
ヤマモリ(株) 桑名工場
養命酒製造(株) 中央研究所

協力企業

アサヒビール(株)名古屋工場 旭松食品(株)食品研究所 アステラス製薬(株) CSR 部 伊藤忠製糖(株)品質保証室 科研製薬(株)生産技術研究所 カネハツ食品(株)技術部 キリンビール(株)名古屋工場 金印(株)研究開発部 サンエイ糖化(株) サンジルシ醸造(株)生産本部 敷島スターチ(株)技術開発室

竹本油脂(株) 情報調査室 デザイナーフーズ(株) 東海漬物(株) 漬物機能研究所 (株)東洋醗酵 東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所 名古屋製酪(株) 中央研究所 日本食品化工(株) 研究所 三井農林(株) 食品総合研究所 三井農林(株) 食品総合研究所 名糖産業(株) 食品開発部 盛田(株) 小鈴谷工場

大和製罐(株)総合研究所

50 音順 敬称略

日本農芸化学会関西支部 賛助会員 一覧

支部活動には、以下団体からのご援助いただきました。 関係者一同より御礼申し上げます。

アース製薬株式会社

植田製油株式会社

株式会社ウォーターエージェンシー

江崎グリコ株式会社

株式会社カネカ

菊正宗酒造株式会社

黄桜株式会社

月桂冠株式会社

甲陽ケミカル株式会社

三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社

サントリーホールディングス株式会社

住友化学株式会社

株式会社第一化成

大日本除虫菊株式会社

宝酒造株式会社

築野食品工業株式会社

東洋紡株式会社

ナカライテスク株式会社

株式会社日本医化器械製作所

日本新薬株式会社

ヒガシマル醤油株式会社

不二製油株式会社

松谷化学工業株式会社

三井化学アグロ株式会社

株式会社三ツワフロンテック

安井器械株式会社

大和酵素株式会社

理研化学工業株式会社

和研薬株式会社

和光純薬株式会社

50 音順 敬称略

公益社団法人 日本農芸化学会 中部支部 関西支部 2015 年度日本農芸化学会中部·関西支部合同大会 講演要旨集

発行者: 浅野 泰久(2015年度日本農芸化学会中部·関西支部合同大会 世話人) 富山県射水市黒河 5180 富山県立大学工学部生物工学科

発行日: 平成 27 年 9 月 19 日

電子版公開日: 平成 27 年 9 月 24 日

印刷所: 名古屋大学消費生活協同組合印刷部

名古屋市千種区不老町