



日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第2回 支部例会

トピックス賞受賞講演

講演要旨集

2017年10月21日(土)

東京大学農学部

主催 公益社団法人 日本農芸化学会 関東支部

日本農芸化学会 関東支部 2017年度 第2回 支部例会

プログラム

13:00 開会

<2017年度トピックス賞受賞講演>

13:05 平野 伸一 ((一財)電力中央研究所 環境科学研究所)
電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産

13:25 杉山 圭一 (国立医薬品食品衛生研究所)
酵母凝集反応を利用した新規エピジェネティック変異原検出法の開発

13:45 片山 琢也 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)
**麹菌実用株における CRISPR/Cas9 システムを用いた
効率的な多重変異株取得法の確立**

14:05 伊藤 慎一郎 (高砂香料工業 株式会社)
**リアルタイム香気分析装置を利用した
「喉越し感」に寄与する香りバランス変化に関する考察**

14:25 谷川 篤史 (サッポロビール 株式会社)
日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の特徴香について

14:45 休憩

15:10 森 美穂子 (北里生命科学研究所)
**糸状菌代謝産物 ovalicin は
赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す**

15:30 永井 研迅 (宇都宮大学 農学部)
コラーゲン由来抗うつペプチドの同定およびその脳脊髄液への移行

15:50 物井 則幸 (ライオン 株式会社)
睡眠の質改善素材：清酒酵母による肌質改善作用とそのメカニズム解析

16:10 岩槻 健 (東京農業大学 応用生物科学部)
霊長類味蕾オルガノイド培養系の確立

16:30 戸澤 謙 (埼玉大学大学院 理工学研究科)
日本型イネ由来の新規除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* の機能解析

16:50 閉会

<懇親会>

17:10 アブルボア ※事前申込制

講演番号：3J27p10

講演日時：3月19日 16:25～ J校舎 27会場

電気を還元力とした鉄酸化細菌による二酸化炭素からの有用物質生産
Electrochemical conversion of CO₂ by *Acidithiobacillus ferrooxidans*
○平野 伸一、長岡 亨、松本 伯夫 (電中研)
○Shin-ichi HIRANO, Toru NAGAOKA, Norio Matsumoto (CRIEPI)

【背景及び目的】

産業活動によって排出される CO₂ は温暖化効果ガスとして気候変動を引き起こす要因となるため、その削減が重要な課題となっている。近年、CO₂ を原料とした化学原料やアルコールなど有価物に変換する様々な技術の開発が低炭素・循環型社会の構築に向けて進められている。CO₂ を高分子の有価物に変換するためには外部からエネルギー(還元力) の投入が必須である。これまで、CO₂ 変換反応の還元力として光や水素を用いた研究が多くなされている(化学触媒、微細藻類など)が、光利用には膨大な受光面積の確保、日内・季節間変動の問題、水素利用には保存・輸送の問題が存在する。一方、これまでに、我々の研究グループでは電気化学的に電子を還元力として供給しながら培養する電気培養法を開発を進めており、独立栄養生物である鉄酸化細菌に本法を適用することにより、電気で増殖をサポートし、通常の培養法に比べ最終菌体密度を 10-100 倍程度向上可能であることを明らかにしている。そこで、本研究では、鉄酸化細菌の遺伝子組換えにより有価物生産能を付与・強化することにより、電気を還元力とする CO₂ 変換技術の構築を目的とした。

【方法及び結果】

鉄酸化細菌 *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859 を本研究の対象とし、遺伝子組換えにより乳酸生産能を強化することを試みた。*A. ferrooxidans* に対してコドン最適化した *Lactococcus lactis* 由来の lactate dehydrogenase 遺伝子を大腸菌を介した接合伝達により *A. ferrooxidans* に導入した。導入遺伝子の確認後、三極式の電気培養槽 (200 ml 容) を用いて遺伝子組換え *A. ferrooxidans* および野生株の電気培養を実施した。培地としては電子メディエーターである硫酸鉄を含む 9K 培地 (pH2.0) を使用し、空気をバブリングしながら培養を開始し、約 24 時間後、対数増殖期に還元電位 (+0V vs Ag/AgCl) を作用電極に印加した。培養期間中は -2.0 mA/cm² 程度の電流が検出され、作用極から *A. ferrooxidans* に電子が供給されていることが確認された。電位印加後、培養を 1 週間継続し、定期的に *A. ferrooxidans* の菌体密度と菌体内ならびに培養液中の代謝産物分析を行った。その結果、野生株、遺伝子組換え株ともに、通電時において非通電時と比べて最終到達菌体密度は約 10 倍向上し、遺伝子組換え株では野生株では見られない乳酸とその他数種の代謝産物の蓄積が検出された。本発表では投入した還元力・産物のバランスを踏まえ CO₂ 変換技術としての本法の有用性を議論したい。本研究は科研費 挑戦的萌芽研究「電気駆動型新規二酸化炭素変換プロセスの構築」の一部として実施された。

CO₂, Chemolithotrophic, Electrochemical cultivation

発表責任者：平野 伸一 (s-hirano@criepi.denken.or.jp)

講演番号：3C17p05

講演日時：3月19日 15:00～ C校舎17会場

酵母凝集反応を利用した新規エピジェネティック変異原検出法の開発

Epigenetic mutagen can be detected by using the yeast flocculation as indicator

○杉山 圭一、古沢 博子、グルーズ ピーター、本間 正充 (国立衛研・変異遺伝部)

○Kei-ichi SUGIYAMA, Hiroko FURUSAWA, Petr GRUZ, Masamitsu HONMA (Nat. Inst. Health Sci.)

【背景】近年、プロモーションなどの発がん機序にエピジェネティック制御のかく乱が指摘されるなか、エピジェネティック変異原 (エピ変異原) 検出系の早期の開発が求められているが、現時点では衆目の一致するところのエピ変異原短期スクリーニング系はない。一方、真核微生物の出芽酵母においては、DNA methyltransferase (*DNMT*) 遺伝子は未同定であるが、既に我々はヒト *DNMT* 遺伝子形質転換酵母 (ヒト *DNMT* 酵母) が凝集性を獲得し、凝集関連遺伝子の1つ *FLO1* 遺伝子の mRNA レベルが亢進していることを明らかにしている¹⁾。さらに、この凝集性は *DNMT* 阻害剤とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) に可逆的に応答することも報告している^{1,2)}。

【目的】本研究では、酵母凝集性を指標にエピ変異原の同定を試みた。被検物質として、元既存添加物であるアカネ色素含有成分のアリザリンを用いた。アントラセン誘導体のアリザリンはプロモーション作用が指摘され、同色素はげっ歯類を用いた発がん試験で発がん性が認められている。

【方法】凝集レベルは画像より半定量化し、*FLO1* 遺伝子の転写レベルは RT-PCR により解析した。Western blot によりヒストン H3 量を、また DAPI を用いた核染色像の観察によりクロマチン構造に対する影響を検討した。GFP を用いた *FLO1* レポーターアッセイ系を構築し、アリザリンが同活性に示す作用も検証した。なお、ヒト *DNMT* 酵母には、DNA 維持メチル化酵素 *DNMT1* と新規メチル化酵素 *DNMT3B* 遺伝子発現プラスミドを出芽酵母に形質転換した株を使用した。

【結果および考察】ヒト *DNMT* 酵母およびコントロール株において、アリザリン濃度 (0 - 4.0 μM) 依存的な凝集と、*FLO1* mRNA レベルの上昇が確認された。一方、アントラセン処理では同様の作用は認められなかった。HDACi のトリコスタチン A もアリザリンと同様の効果を示すことから、コアヒストンに対するアリザリンの作用を検討したところ、ヒストン H3 量の減少と DAPI による核染色像の異常が観察された。また、凝集誘発作用をより高感度に検出できるコントロール株において、アリザリンによる *FLO1* レポーター活性の上昇も確認された。以上の結果は、アリザリンがエピ変異原であること、また酵母凝集性を指標にエピ変異原が検出できることを示唆している。

1) Sugiyama, K., et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **456**, 689-694 (2015).

2) Sugiyama, K., et al., *Mutagenesis* **31**, 687-693 (2016).

yeast, flocculation, epigenetic mutagen

発表責任者：杉山圭一 (sugiyama@nihs.go.jp)

講演番号：2C18p06

講演日時：3月18日 15:25～ C校舎18会場

麹菌実用株における CRISPR/Cas9 システムを用いた効率的な多重変異株取得法の確立
Efficient mutagenesis of multiple genes by the CRISPR/Cas9 system in *Aspergillus oryzae* industrial strains

○片山 琢也¹、藤井 渉²、丸山 潤一¹ (¹東大院・農生科・応生工、²東大院・農生科・応動)

○Takuya KATAYAMA¹, Wataru FUJII², Jun-ichi MARUYAMA¹ (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²Dept. of Animal Res. Sci., The Univ. of Tokyo)

【背景】麹菌 *Aspergillus oryzae* は食品醸造や酵素・タンパク質の生産に用いられる産業的に重要な糸状菌であり、このような様々な用途で数多くの *A. oryzae* 実用株が使用されている。これまでに野生株である RIB40 株に由来する株では非相同末端結合に関わる *ku70* や *ligD* の欠損株が取得され、効率的な遺伝子改変が可能となっている。一方、ほとんどの実用株ではこれらの欠損株は取得されておらず、遺伝子改変に多大な労力と時間を要する。近年、効率的な遺伝子改変の方法として複数のゲノム編集技術が確立されている。そのうちの一つである CRISPR/Cas9 システムは、ヌクレアーゼ Cas9 とそれを標的部位に誘導するガイド RNA (gRNA) の 2 つからなる簡便な方法である。これまでに我々は CRISPR/Cas9 システムを *A. oryzae* の遺伝子改変技術として確立している¹⁾。しかし、ゲノム編集用プラスミドの導入のために *niaD* 欠損株の作製が必要であること、変異株の取得効率が 10~20% と比較的低いことが課題であった。そこで、本研究ではゲノム編集用プラスミドを改良し、変異株取得効率の向上とプラスミドリサイクルによる多重変異株の作製を試みた。

【結果】まず、*niaD* に代わる選択マーカーとして、ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* をゲノム編集用プラスミドに挿入した。さらに、プラスミドの自立複製を可能とするとされる *Aspergillus nidulans* 由来の DNA 断片 AMA1 の半分にあたる領域を挿入した。作製したプラスミドを用いて変異導入を試みた結果、RIB40 株および日本酒製造用 RIB128 株、醤油製造用 RIB915 株において 50~100% の割合で変異株が取得できた。

次に、導入したゲノム編集用プラスミドを変異株から脱落させるため、*amyB* プロモーター制御下で *Aoace2* を発現する断片をプラスミドに挿入した。*Aoace2* は分化に関わる転写因子をコードし、これまでに過剰発現によって生育が著しく低下することを示している²⁾。このプラスミドを用いて RIB128 株の標的遺伝子に変異を導入した後、*amyB* プロモーターの誘導条件で培養することでプラスミドを脱落した標的遺伝子の変異株を単離することができた。さらに、その株に別の遺伝子を標的とするゲノム編集用プラスミドを導入することによって、二重変異株の取得に成功した。以上の結果から、本研究で作製したプラスミドを用いることで、実用株において効率的に多重変異株を作製できることが示された。

1) Katayama *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 38, 637-642, 2016

2) 中村ら、第 67 回日本生物工学会大会要旨集 p.89, 2015

Aspergillus oryzae, Genome editing, CRISPR/Cas9

発表責任者：丸山潤一 (amarujun@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

講演番号：4A03a11

講演日時：3月20日 12:00～ A校舎 03会場

リアルタイム香気分析装置を利用した「喉越し感」に寄与する香りバランス変化に関する考察
Real-time percept flavor balance derived from retronasal threshold and in vivo measurements of retronasal aroma release with PTR-MS

○伊藤 慎一郎、大森 憲、宮崎 秀基、武田 寿弘、星野 邦秀（高砂香料工業株式会社 研究開発本部）

○Shinichiro ITO, Ken OHMORI, Hideki MIYAZAKI, Toshihiro TAKEDA, Kunihide HOSHINO
(Takasago International Corporation Corporate Research & Development Division)

【背景・目的】

飲食物を喫食時に口腔内から鼻腔に入る香り（レトロネーザル香気：喉越し香）は、嗜好性に対する重要な要素の1つであり、鼻孔から入る香り（オルソネーザル香気：鼻先香）とは識別されている。Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) や Odor Activity Value (OAV) は香気貢献度を示す手法としてよく知られているが、喫食時に経時的に変化するレトロネーザル香気の影響を示すことはできない。一方、リアルタイム計測機器を用いて鼻呼吸中の香気成分を計測する研究は幾つも報告されているが、レトロネーザル香気の影響について言及している例は殆んどない。そこで本研究では、レトロネーザル香気貢献度をリアルタイム計測結果に基づいて評価し、鼻腔中の香りバランスとその経時変化を予測する手法の開発を目的とした。

【方法】

被験者が 2-Methylbutanal や 2,3-Dimethylpyrazine、Methyl cyclopentenolone などの香気成分を添加したモデル飲料水を喫飲し、鼻呼吸中の香気成分をリアルタイム香気分析装置である Proton Transfer Reaction-Mass Spectrometry (PTR-MS) で計測した。各香気成分の濃度変化を呼吸ごとに積算（濃度積算値）し、その時間変化プロファイルを得た。次に、各香気成分を添加した飲料水を飲んだ時の認知閾値を同被験者で評価し、PTR-MS の計測結果から推測される認知閾値時の鼻呼吸中の濃度積算値をレトロネーザル閾値とし、香気成分ごとに求めた。そして、各香気成分における任意の呼吸数時の濃度積算値をレトロネーザル閾値で除算した比率をレトロネーザル香気貢献度とし、飲料喫飲時における各香気成分の貢献度を評価した。

【結果】

モデルコーヒーフレーバーを 0.1%賦香した飲料水（モデルコーヒー）を喫飲した場合を想定し、1呼吸目及び10呼吸目の各香気成分の貢献度を水への添加量に応じて算出した。そして、各呼吸数の貢献度の割合から香りバランスを予測した。また、専門パネルが選定したコーヒーの香りを表現するワードを用いて、モデルコーヒーを喫飲直後及び約30秒後の官能評価を行った。その結果、官能評価と香りバランスの予測は良好な関係性であった。従って、本研究の手法を用いることで、喫食時に知覚する香りの貢献度の算出と香りバランスの経時変化を予測できるということが示唆された。

retronasal, flavor, drink

（注記： オリジナルの講演要旨から加筆修正されたものです。2017年8月10日担当受領）

講演番号：3A04a09

講演日時：3月19日 11:30～ A校舎04会場

日本生まれのフレーバーホップ「ソラチエース」の特徴香について

Identification and characterization of unique flavor compounds contributing to the specific flavor of Japanese hop 'SORACHI ACE'

○谷川 篤史¹、實方 綾子²、蛸井 潔¹、松本 一郎¹、中山 康行¹ (1サッポロビール株式会社、²サッポロホールディング株式会社)

○Atsushi Tanigawa¹, Ayako Sanekata², kiyoshi Takoi¹, Ichiro Matsumoto¹, Yasuyuki Nakayama¹ (1SAPPORO BREWERIES LTD., 2SAPPORO HOLDINGS LTD.)

【目的】

ビールの市場はピルスナータイプと呼ばれるビールが主流であるが、2000年代に北米を発端としたクラフトビールブームによって、様々なタイプのビールが醸造されるようになった。ホップはビールの香りを変化させる重要な原料であり、品種によりその香りの特性が異なる。特にフレーバーホップと呼ばれるホップ品種群が特徴的な香りを作り出す品種として重要視されている。その中でも北米のクラフトビールシーンを中心に、サッポロビールが30年以上前に育種した「ソラチエース」がユニークな香りを作り出す品種として脚光を浴びている。ソラチエースで醸造したビールの香りは、松、森林、ディルハーブ、レモンなどと表現されているが、その香りの成分は特定できていなかった。そこで、ソラチエースに含まれている香りの成分の解明を行った。

【方法・結果】

通常のアロマホップ、ソラチエースの2種類のホップで醸造したビールを2次元GC-0、SPME-GC-MSを用い比較分析を行った。その結果、ソラチエースに特異的に多く含まれている成分がゲラン酸であることを特定した。更にゲラン酸そのものは閾値が高い成分であるものの、他のホップの香り成分と相互作用することでソラチエース特有のレモン様の香りを形成することを官能評価によって明らかにした。また、ホップの添加時期が異なったビールを醸造したところ、ゲラン酸の含有量は変化しないが、その他のホップの成分が変化するため、発酵中にホップを添加するドライホッピング法がレモン様の特徴を出すために適した方法であると考えられた。

craft beer, flavor hop, geranic acid

発表責任者：谷川篤史 (atsushi.tanigawa@sapporobeer.co.jp)

講演番号：3C15a08

講演日時：3月19日 11:15～ C校舎15会場

糸状菌代謝産物 ovalicin は赤痢アメーバ症肝膿瘍モデルハムスターに対して治療効果を示す
Ovalicin, a fungal metabolite, is effective against a hamster amoebic liver abscess model.

○森 美穂子^{1,2}、中野 由美子³、柘植 聡志^{1,2}、大村 智²、塩見 和朗^{1,2}、野崎 智義^{3,4} (1北里大院感染制御、²北里生命研、³感染研、⁴筑波大院生命環境)

○Mihoko MORI^{1,2}, Yumiko NAKANO³, Satoshi TSUGE^{1,2}, Satoshi OMURA², Kazuro SHIOMI^{1,2}, Tomoyoshi NOZAKI^{3,4} (1Kitasato Univ., ²Kitasato Institute for Life Sciences, ³NIID, ⁴Tsukuba Univ.)

【背景・目的】赤痢アメーバ症は単細胞の寄生虫（原虫）である赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) が腸管に寄生して起こる下痢症である。赤痢アメーバが肝臓、肺、脳へ移行して膿瘍を形成し、重症化するケースもある。発展途上国を中心に罹患者は 5,000 万人、死者は原虫症の中ではマラリアに次いで多く、年 10 万人と推定されている。日本でも感染症法により届出が必要な寄生虫症であり、近年報告数が増加している。赤痢アメーバ症の治療には抗菌・抗原虫薬であるメトロニダゾールが用いられているが、耐性を持つ赤痢アメーバの出現、催奇形性などの副作用があること、感染に関与するシスト状態の赤痢アメーバには効果がないこと等のため、新しい治療薬が求められている。

我々は新たな赤痢アメーバ症治療薬のシーズ化合物を微生物二次代謝産物より探索している。約 7,000 種の放線菌培養液および糸状菌培養液から、赤痢アメーバ原虫に対し殺原虫活性を示した *Penicillium* 属糸状菌培養液と *Metarhizium* 属糸状菌培養液を選択し、前者から血管新生阻害活性を持つことで知られる fumagillin、後者からその類縁化合物 ovalicin を殺原虫化合物として単離した（2016 年度大会で報告）。Fumagillin は抗微孢子虫症治療薬として使用されており、抗赤痢アメーバ活性も既に報告されているが、ovalicin の抗赤痢アメーバ活性は初の知見であった。

我々の測定結果では、*in vitro* において ovalicin の方がより低濃度で抗赤痢アメーバ活性を示し、ヒト正常細胞に対する細胞毒性との選択性が見られたため、ovalicin は創薬シーズとして大きな可能性を持つ化合物だと考えられた。そのため肝膿瘍モデルハムスターを用い、ovalicin の *in vivo* での活性を調べた。

【方法】Fumagillin は市販のものを購入し使用した。Ovalicin は *Metarhizium* 属糸状菌 FKI-6809 株を培養し、培養液を酢酸エチル抽出後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、分取 HPLC で精製して得た。それぞれ DMSO で溶解し、ハムスターに皮下または経口により投与した。ハムスターは赤痢アメーバの栄養型を注射して感染させ、感染 24 時間後から化合物を投与し、感染 6 日後に肝膿瘍の状態を確認した。

【結果】Fumagillin は 5 mg/kg で皮下投与、経口投与のいずれでも治療効果は見られなかった。Ovalicin は経口投与では治療効果は全く見られなかったが、皮下投与では既存薬メトロニダゾール 10 mg/kg（経口投与）に匹敵する治療効果を 1 mg/kg で示した。この結果から ovalicin は赤痢アメーバ症治療薬シーズとして展開する価値のある化合物であると考えられた。

Entamoeba histolytica, ovalicin, amoebic liver abscess

講演番号：3A06a03

講演日時：3月19日 09:50～ A校舎06会場

コラーゲン由来抗うつペプチドの同定およびその脳脊髄液への移行

Identification of antidepressant collagen peptide and the penetration into cerebrospinal fluid

○永井 研迅、東 奈央、水重 貴文、蕪山 由己人 (宇都宮大農)

○Akitoshi NAGAI, Nao AZUMA, Takafumi MIZUSHIGE, Yukihiro KABUYAMA (Utsunomiya Univ.)

【背景・目的】

これまで我々は、コラーゲン加水分解物に抗うつ作用が認められることを見出した。しかしながら、その活性成分は明らかになっていない。また、コラーゲン加水分解物を摂取した際、Pro-Hyp (P0) や Hyp-Gly (OG) などのジペプチドが血中に移行していることが明らかになっている。本研究では、コラーゲン加水分解物の抗うつ作用の活性成分の同定およびその脳脊髄液中での検出を目的とした。

【方法】

マウスに、P0、OG、P、O、およびそれらアミノ酸の混合物 (P+O) を3日間連続で経口投与した。3日目に、6分間の強制水泳試験を実施した。その間の無動時間を測定し、抗うつ活性を評価した。また、うつとの関連が指摘されている脳海馬の神経新生を調べるため、P0を3日間経口投与し、増殖細胞マーカーであるKi67を免疫染色した。脳海馬歯状回のKi67陽性細胞数を計測した。同様に、3日間強制水泳ストレスを負荷した場合でも検討した。ラットに、コラーゲン加水分解物を経口投与した後、経時的に脳脊髄液を採取し、LC/MSでP0およびOGを定量した。

【結果】

P0は、無動時間を用量依存的に減少させた。OG、P、O、P+Oによる無動時間の変化は見られなかった。P0によるKi67陽性細胞数の変化は見られなかった。強制水泳ストレス負荷によりKi67陽性細胞数は減少し、P0はその減少を改善した。コラーゲン加水分解物を経口投与したラットにおいて、脳脊髄液中にP0が検出された。その濃度は、投与60分後で最も高濃度であり、その後180分まで維持された。脳脊髄液中のOGの濃度は、P0の濃度より低濃度であった。

【結論】

P0は、経口投与で有効な抗うつ作用を示すことが明らかになった。また、P0は、ストレス負荷による海馬神経新生の減少を改善した。経口摂取後に脳脊髄液でP0が存在し、脳で直接作用する可能性が示された。

講演番号：3A06a10

講演日時：3月19日 11:45～ A校舎06会場

睡眠の質改善素材：清酒酵母による肌質改善作用とそのメカニズム解析

The Effect of Sake Yeast on Skin Condition

○永盛 友樹¹、岡 謙吾¹、物井 則幸¹、岩本 拓¹、尾林 裕子¹、翠川 辰行¹、村越 倫明^{1,2}、内山 章¹、裏出 良博³ (¹ライオン(株)、²京都府立医科大、³筑波大 WPI-IHIS)

○Yuki Nagamori¹, Kengo Oka¹, Noriyuki Monoi¹, Taku Iwamoto¹, Yuko Obayashi¹, Tatsuyuki Midorikawa¹, Michiaki Murakoshi^{1,2}, Akira Uchiyama¹, Yoshihiro Urade³ (¹Lion Corporation, ²Kyoto Pref. Univ. of Medicine, ³WPI-IHIS, Univ. of Tsukuba)

【背景および目的】

我々は、清酒酵母に睡眠の質向上機能（深睡眠の指標：デルタ波パワー値の増加、成長ホルモン（GH）分泌量の増加、起床時の眠気の低下）を確認している（Monoi *et al*, J Sleep Res. 2016）。睡眠の質と肌質には正の相関が、GHにはヒトの肌のコラーゲン量を増加させることが報告されている。これらの背景から、本研究では、清酒酵母を摂取することで、肌質が改善されるかどうかをヒト試験にて検討し、さらに、メカニズム解析としてGHが肌質関連因子に与える影響を *in vitro* 試験で検証した。

【方法】

①ヒト試験：睡眠に一定の不満を抱える健常成人計20名（男性14名、女性6名、平均年齢：34.5±9.1）を対象に、被験食品（清酒酵母粉末500mg/日）、または対照食品を就寝1時間前に5週間摂取させる二重盲検並行群間試験を実施した。評価は試験食摂取前、摂取5週間後に実施し、その差を統計解析に用いた。主評価項目として、吸収法により頬の弾力性を示す回復率（R2）、瞬間的回復率（R7）、超音波画像解析法により頬のコラーゲン密度を評価した。副次評価として、経皮膚水分蒸散量やOSA睡眠調査票による睡眠感の評価も行った。

② *in vitro* 試験：播種24時間後の培養ヒト皮膚線維芽細胞に、GHまたはその下流で分泌されるインスリン様成長因子（IGF-1）を（各々0.5, 5, 50 ng/mL）を添加した。添加24時間後にtotal RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCR法により肌質関連因子の遺伝子発現変動を解析した。

【結果】

①ヒト試験：試験食摂取前、摂取5週間後の変化量を対照食品群と比較した結果、清酒酵母群では頬の弾力性を示す回復率（ $p < 0.01$ ）、瞬間的回復率（ $p < 0.01$ ）およびコラーゲン密度（ $p < 0.05$ ）が有意に増加した。また、清酒酵母摂取により経皮水分蒸散量（ $p < 0.1$ ）、睡眠感（ $p < 0.05$ ）にも改善がみられた。

② *in vitro* 試験：GHおよびIGF-1の添加によりヒアルロン酸合成酵素、IGF-1の添加によりコラーゲン前駆物質の発現量が用量依存的かつ有意に増加することが認められた（ $p < 0.05$ ）。

【結論】

清酒酵母は、睡眠の質を向上させることに加えて、肌質（弾力性、コラーゲン密度）を改善させることが明らかとなった。さらに、深睡眠時に分泌されるGH、およびGH下流のIGF-1によりコラーゲンなどの肌質関連因子の発現が上昇することを見出した。

sleep, skin, sake yeast

講演番号：3A02p14

講演日時：3月19日 17:35～ A校舎02会場

霊長類味蕾オルガノイド培養系の確立

Generation of taste organoid from primates

○岩槻 健¹、難波 みつき¹、熊木 竣佑¹、大木 淳子¹、今井 啓雄²、山根 拓実¹、大石 祐一¹ (1東農大応生、²京大霊長研)

○Ken IWATSUKI¹, Mitsuki NAMBA¹, Shunsuke KUMAKI¹, Junko OHKI¹, Hiroo IMAI², Takumi YAMANE¹, Yuichi OISHI¹ (¹Tokyo Univ. Agri., ²Kyoto Univ.)

【背景・目的】味細胞は10～14日で再生を繰り返す細胞であり、新たに生ずる細胞は常に味蕾周辺の味幹細胞から生じ、最終的に5種類の味質（甘味、うま味、苦味、塩味、酸味）に反応する味細胞へ分化する。味細胞研究の多くは、げっ歯類をモデル動物とし、呈味物質と受容体との相互作用の研究や行動学などの研究が進んできた。しかし、近年のゲノム情報の開示により、ヒトやサルなどの霊長類とげっ歯類との間には、味覚受容体の数や構造にかなりの違いがある事が分かってきた。すなわち、呈味物質のそれぞれの受容体に対する反応特性は霊長類とげっ歯類では異なる事が多く、ヒトをはじめとする霊長類の味覚を研究するならば、霊長類由来の味細胞を用いたアッセイ系の確立が望まれている。そこで、本研究ではこれまでに存在しなかった霊長類の味蕾細胞培養系を作製し、霊長類独特の味覚について解析できる系を構築する事を目的とした。

【方法】我々はこれまでげっ歯類において、Lgr5陽性細胞より味蕾の三次元幹細胞培養系である味蕾オルガノイドを作製してきた（参考文献）。今回、京都大学霊長類研究所の協力のもと、ニホンザルの舌より有郭乳頭を含む上皮および真皮を採取しサンプルとした。同サンプルをTrypsin-EDTAにて消化後、マトリジェルに包埋し、報告されているヒト消化管オルガノイド作製用の培地を参考に、Wnt活性の高い培養液を重層し、細胞の成長の様子と味細胞や増殖マーカーの発現について調べた。

【結果・考察】培養5日目には増殖する細胞塊が観察され、継代を繰り返しながら少なくとも3ヶ月間は同様の状態で細胞は維持されている。味細胞マーカーのPLCbeta2、増殖マーカーのKi67に対する免疫染色では、オルガノイドの外側にKi67が、内側にPLCbeta2の発現が観察され両者の共発現は見られなかった。形態学的PLCbeta2陽性細胞は味蕾内に存在する味細胞と酷似していた。呈味物質を用いたCaイメージングでは、うま味、苦味、甘味に反応する事が分かった。

本研究は、霊長類において味蕾オルガノイド作製に成功した世界初の例である。同オルガノイドは、味細胞の形態を示す味細胞マーカー分子を発現する事、呈味物質に反応する事、継代しながら3ヶ月以上に及ぶ培養が可能であった事などから、味蕾幹細胞と味細胞に分化した細胞の集団であると結論づけた。本味蕾オルガノイドは食品の安全性や評価、そして再生医療の基盤研究にも貢献すると考えられ、今後、我々霊長類の味覚を研究する上で有用なツールとなると期待される。

参考文献：Ren W *et al.* PNAS, 111, 16401-16406 (2014)

taste cell, stem cell, primate

発表責任者：岩槻 健 (ki204886@nodai.ac.jp)

講演番号：2J30a06

講演日時：3月18日 10:45～ J校舎 30会場

日本型イネ由来の新規除草剤抵抗性遺伝子 *HIS1* の機能解析

Characterization of a novel herbicide resistance gene, *HIS1*, derived from japonica rice

○戸澤 譲¹、泉 厚志²、武井 里美¹、山崎 明彦³、関野 景介³、山田 祐司³、村田 和優⁴、前田 英郎⁵、廣瀬 咲子⁶、川岸 万紀子⁶、谷口 洋二郎⁶、川田 元滋⁶、吉田 均⁶、大島 正弘⁶、加藤 浩⁷(¹埼玉大院理工、²富山県大、³株) エス・ディー・エス バイオテック、⁴富山県・農林水産総合技術センター、⁵農研機構・中央研、⁶農研機構・生物機能部門、⁷農研機構・作物開発センター)

○Yuzuru TOZAWA¹, Atsushi IZUMI², Satomi TAKEI¹, Akihiko YAMAZAKI³, Keisuke SEKINO³, Yuji YAMADA³, Kazumasa MURATA⁴, Hideo MAEDA⁵, Sakiko HIROSE⁶, Makiko KAWAGISHI-KOBAYASHI⁶, Yojiro TANIGUCHI⁶, Motoshige KAWATA⁶, Hitoshi YOSHIDA⁶, Masahiro OHSHIMA⁶, Hiroshi KATO⁷ (¹Saitama Univ., ²Toyama Pref. Univ., ³SDS Biotech K.K., ⁴Toyama Pref. AFFRC, ⁵NARO CARC, ⁶NARO NIAS, ⁷NARO NICS)

【目的】 *HIS1* は 4-HPPD 阻害型除草剤への抵抗性原因遺伝子として日本型イネに見出され、既知の除草剤抵抗性遺伝子との類似性がないイネ科植物に固有のタンパク質をコードしている。本研究では *HIS1* の機能を明らかにするため、遺伝子組換え植物を作出し、水稲用除草剤ベンゾビシクロン (BBC) を含むトリケトン系 4-HPPD 阻害型除草剤に対する *HIS1* の作用を解析するとともに、試験管内翻訳系を利用して *HIS1* タンパク質の機能解明を進めた。

【材料及び方法】 *HIS1* を BBC 感受性のイネおよびシロイヌナズナに導入した組換え体を作成し、BBC ならびに BBC と同一作用機作で化学構造の異なる 4-HPPD 阻害型除草剤に対する感受性検定を実施した。並行して、*HIS1* タンパク質をコムギ胚芽試験管内翻訳系により調製し、BBC の活性本体である加水分解体 (BBC-OH) を基質とした代謝解析を行い、*HIS1* の基本的な酵素機能を明らかにした。

【結果及び考察】 *HIS1* 発現個体は、イネおよびシロイヌナズナともに感受性原品種が完全白化する BBC 濃度でも抵抗性を示し正常に生育した。BBC と化学構造の異なる 4-HPPD 阻害型除草剤に対しても同様の抵抗性を示し、*HIS1* の抵抗性付与効果はビシクロオクタンジオン (BOD) 系薬剤だけではなく、シクロヘキサジオン (CHD) 系薬剤に対しても同様に確認された。

HIS1 タンパク質のアミノ酸配列には、鉄配位および 2-オキシグルタル酸 (2OG) 結合部位を含む酸化還元ドメインの存在が予想されたことから、合成 *HIS1* タンパク質を二価鉄イオンおよび 2OG の存在下で BBC-OH と反応させ、反応液を HPLC で解析した。合成 GFP を用いた対照区では BBC-OH の残存が観察されたのに対し、*HIS1* 反応液では BBC-OH ピークの消失が確認された。代わりに出現した BBC-OH 代謝物の構造解析を進めた結果、*HIS1* タンパク質は BBC-OH の酸化修飾を触媒する Fe(II)/2OG オキシゲナーゼとして機能することで、その 4-HPPD 阻害活性を不活化し、イネに BBC 抵抗性を付与するものと推論した。さらに、*HIS1* の対象化合物は BBC に限定されず、CHD 骨格を有する既存 4-HPPD 阻害型除草剤も同様に不活化されることを HPLC 解析により確認した。

我々は、以上の結果より、イネ品種間の交配による *HIS1* 遺伝子座の導入のみならず、遺伝子組換え法でも *HIS1* 遺伝子による感受性作物への除草剤抵抗性の付与が可能であることを示し、かつ水田・畑地を問わずに利用可能な除草剤の選択肢が複数あることを明らかにした。これは、イネ由来の *HIS1* 遺伝子が、新たな除草剤抵抗性遺伝子のツールとして、イネ以外の主要作物においても広く利用可能であることを示している。

rice, herbicide resistance gene, oxygenase

発表責任者：戸澤譲 (tozawa@mail.saitama-u.ac.jp)

JSBBA KANTO

日本農芸化学会関東支部2017年度第2回支部例会 講演要旨集
2017年10月21日 発行
発行者 公益社団法人 日本農芸化学会関東支部

連絡先

〒113-8657

東京都文京区弥生1-1-1

東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター

小林 彰子