



日本農芸化学会 関東支部 2018年度 第2回 支部例会

トピックス賞受賞講演

講演要旨集

2018年 9月 8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 2018年度 第2回 支部例会

プログラム

<2018年度トピックス賞受賞講演>

12:30 開会

12:35 安永 元樹 (曾田香料株式会社)

DAS™ (Drinking Aroma Simulator)とリアルタイム質量分析計を用いたレモン飲料のフレーバーリリース分析

12:50 坂井 克行 (北里大学)

薬剤感受性出芽酵母を用いた抗真菌薬シード化合物の探索

13:05 大津 厳生 (筑波大学)

システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産

13:20 今井 亮三 (農研機構)

コムギにおける*in planta*ゲノム編集技術の開発

13:35 佐々木 崇 (東京大学)

胆汁酸受容体TGR5は骨格筋を肥大化し筋力の増大を誘導する

13:50 阿野 泰久 (キリン株式会社)

ビール苦味成分イソ α 酸の海馬ドーパミンを介した記憶学習機能改善作用

14:05-14:35 休憩

14:35 河村 達郎 (理化学研究所)

がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物のスクリーニング

14:50 西山 千春 (東京理科大学)

吉草酸-GPR109a経路はエイコサノイド生産を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する

15:05 原 精一 (キッコーマン株式会社)

形質転換麹菌でのエルゴチオネインとセレノネインの生産

15:20 松本 健 (理化学研究所)

ゲノムワイドshRNAライブラリースクリーニングによるアポトーシス誘導物質JBIR-140の標的経路の解析

15:35 小林 洋大 (森永乳業株)

Bifidobacterium breve A1によるアルツハイマー病モデルマウスの認知障害に対する改善作用

15:50 水野 翼 (東京大学)

常温個体型エチレン様活性物質による農業被害低減効果の追究

16:05-16:35 休憩

16:35 飯野 隆夫 (理化学研究所)

微生物腐食対策のための金属腐食性*Prolixibacter*属細菌検出系の構築

16:50 熊木 峻佑 (東京農業大学)

新規霊長類消化管オルガノイド構築と機能解析

17:05 永久保利紀 (筑波大学)

ヘモグロビンの新規フラボノイド変換活性の発見

17:20 佐藤 聡子 (ライオン株式会社)

新規*in vitro*運動モデルの確立及び β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸 (HMB) の作用メカニズム解析への応用

17:35 浅水 俊平 (東京大学)

新規labionen構造の形成に關与するlanthipeptide合成酵素の解析

17:55 閉会

<懇親会>

18:20 アブルボア (事前振込制)

講演番号：2B09p03

講演日時：3月16日 14:22～ 共通講義棟南 B09 会場

DAS™ (Drinking Aroma Simulator) とリアルタイム質量分析計を用いたレモン飲料のフレーバーリリース分析

Flavor release of lemon beverages with DAS™ (Drinking Aroma Simulator) and PTR-TOF

○安永 元樹、葛西 賢造、服部 祥治、高垣 仁志 (曾田香料株式会社)

○Motoki YASUNAGA, Kenzo KASAI, Shoji HATTORI, Hitoshi TAKAGAKI (SODA AROMATIC Co.,Ltd.)

【目的】

香気は鼻から直接香るオルトネーザルアロマと喉から鼻に抜けるレトロネーザルアロマの2種類に区別される。いずれもフレーバー開発において重要であるが、なかでも飲料をゴクリと飲み込んだ際に呼気によって運ばれ鼻に抜けるレトロネーザルアロマは、飲料の美味しさを感じるうえで欠かすことのできない要素の1つとなっている。本研究では、飲料を飲み込んだ際の鼻に抜ける香気を再現可能なレトロネーザルアロマ再現装置「DAS™ (Drinking Aroma Simulator)」を開発し、形態の異なるレモン飲料（糖酸飲料、炭酸飲料、炭酸アルコール飲料）のフレーバーリリース特性を確認した。また、DAS™とPTR-TOF（プロトン移動反応TOF質量分析計）を組み合わせ、レトロネーザルアロマの経時変化も観察した。

【方法】

実際の飲用時のように、飲料と唾液の混合液が咽頭部を通過する状態を再現したDAS™を開発した。DAS™を用いたレトロネーザルアロマの捕集は、口腔および咽頭部を再現した装置内へあらかじめ人工唾液を混合させたレモン飲料を流した後、装置下部から上部へ窒素ガスを流入してTenaxTAに吸着させて行った。捕集した各香気成分は加熱脱着装置を用いてGC/MSに導入した。経時変化の観察には、IONICON社製のPTR-TOFを用い、DAS™から得られた香気の実時間分析を行った。また、レモン香気寄与成分の探索にはAROMATCH®を用い、寄与が確認された香気成分について各レモン飲料中でのフレーバーリリース特性を確認した。

【結果】

今回開発したDAS™を用いて捕集した香気と実際の呼気香気の実時間分析結果を比較すると、香気成分バランスに加え、経時変化においても近似した結果となっており、DAS™によってレトロネーザルアロマの再現が可能となった。各レモン飲料においてもそれぞれのフレーバーリリース特性が明確となり、様々な飲料形態にも対応可能であることが示された。さらに、AROMATCH®で選択された香気寄与成分を原料とし、DAS™で得られたフレーバーバランスの知見を合わせることで、炭酸飲料、チューハイなど様々な飲料形態に最適化したフレーバーの開発が可能になることが示唆された。

flavor release, retronasal, lemon

発表責任者：高垣 仁志 (Hitoshi_Takagaki@soda.toray.co.jp)

講演番号：3A18a09

講演日時：3月17日 10:38～ 共通講義棟北 A18 会場

薬剤感受性出芽酵母を用いた抗真菌薬シード化合物の探索

Search for antifungal seed compounds using a multi-drug sensitive budding yeast

○坂井 克行¹、廣瀬 友靖^{1,2}、岩月 正人^{1,2}、知念 拓実³、木村 徹¹、須賀 拓弥^{1,2}、野中 健一^{1,2}、中島 琢自^{1,2}、砂塚 敏明^{1,2}、臼井 健郎³、浅見 行弘^{1,2}、大村 智²、塩見 和朗^{1,2} (1北里大院感染制御、²北里大生命研、³筑波大生命環境科学)

○Katsuyuki SAKAI¹, Tomoyasu HIROSE^{1,2}, Masato IWATSUKI^{1,2}, Takumi CHINEN³, Toru KIMURA¹, Takuya SUGA^{1,2}, Kenichi NONAKA^{1,2}, Takuji NAKASHIMA^{1,2}, Toshiaki SUNAZUKA^{1,2}, Takeo USUI³, Yukihiko ASAMI^{1,2}, Satoshi OMURA², Kazuro SHIOMI^{1,2} (1Kitasato Univ. graduate school of infection control sciences, ²Kitasato Univ. kitasato institute for life sciences, ³Tsukuba Univ. graduate school of life and environmental sciences)

【背景と目的】 出芽酵母である *Saccharomyces cerevisiae* は薬剤のスクリーニング、ターゲットの同定や生物活性物質の評価を含むケミカルバイオロジー研究で広く使用されている。しかしながら、*S. cerevisiae* は低い薬剤透過性、及び細胞膜に局在する薬剤排出ポンプの亢進により高い薬剤耐性を示し、化合物の探索や解析を困難にしている。したがって、薬剤感受性を有した *S. cerevisiae* を利用すればこれまでにスクリーニングされてこなかった化合物を探索することが可能になると考えられる。そこで、薬剤排出ポンプである ATP binding cassette (ABC) transporter の発現に関わる 12 個の遺伝子を破壊し、さらに薬剤膜透過性に関わる ergosterol 合成遺伝子を誘導発現型にした薬剤超感受性の *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6¹ を利用して、微生物二次代謝産物から新しい抗真菌薬シード化合物を探索することを目的に研究を行った。

【方法】 ABC transporter に関わる遺伝子を 4 個破壊した *S. cerevisiae* BY25929 (4 遺伝子破壊株) と 12 個破壊した *S. cerevisiae* 12geneΔ0HSR-iERG6 (12 遺伝子破壊株) を利用しペーパーディスク法により微生物培養液からスクリーニングを行った。12 遺伝子破壊株にのみ阻止円を形成するサンプルを選抜し、選抜したサンプルについて生産菌の培養及び精製、単離、構造解析を行った。

【結果と考察】 上記の方法で糸状菌及び放線菌培養液計 4,656 サンプルのスクリーニングを行い、スクリーニング通過サンプルを 2 サンプル見出した。スクリーニング通過サンプルの糸状菌 *Pestalotiopsis humus* FKI-7473 株培養物より新規化合物の pestynol (Fig. 1) を 33 mg 取得した。Pestynol の平面構造は高分解能 ESI-MS 及び各種 NMR により決定した。続いて、pestynol のシクロヘキセン環内の絶対立体配置を改良モッシャー法によりすべて R 体であると決定した。Pestynol の抗菌活性評価はペーパーディスク法で行い、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマ、酵母及び糸状菌に対して行った。Pestynol は複数のグラム陽性菌及び 12 遺伝子破壊株、ムコールに対して抗菌活性を示した。また、12 遺伝子破壊株の親株である *S. cerevisiae* BY4741 株に対して抗菌活性を示さなかったことより、薬剤排出機構を破壊した出芽酵母である 12 遺伝子破壊株を用いることで初めて取得することができた。

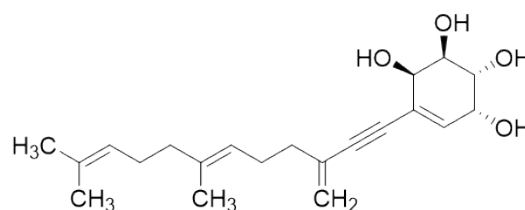


Fig. 1 Pestynolの化学構造

配置を改良モッシャー法によりすべて R 体であると決定した。Pestynol の抗菌活性評価はペーパーディスク法で行い、グラム陽性菌、グラム陰性菌、マイコプラズマ、酵母及び糸状菌に対して行った。Pestynol は複数のグラム陽性菌及び 12 遺伝子破壊株、ムコールに対して抗菌活性を示した。また、12 遺伝子破壊株の親株である *S. cerevisiae* BY4741 株に対して抗菌活性を示さなかったことより、薬剤排出機構を破壊した出芽酵母である 12 遺伝子破壊株を用いることで初めて取得することができた。

1) Chinen, T., Nagumo, Y. & Usui, T. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**, 160–162 (2014)

farnesylcyclohexenetetraol, ATP-binding cassette transporter, multi-drug sensitive budding yeast

講演番号：3A09a08

講演日時：3月17日 10:27～ 共通講義棟北 A09 会場

システイン生産大腸菌によるエルゴチオネインの発酵生産

Fermentative overproduction of ergothioneine in cysteine-producing *Escherichia coli*

○河野 祐介¹、田中 尚志¹、城山 真恵加¹、大城 聡¹、佐藤 康治²、大川 徹²、大津 巖生¹ (1筑波大・高細精医、²北大院・工)

○Yusuke Kawano¹, Naoyuki Tanaka¹, Maeka Shiroyama¹, Satoshi Oshiro¹, Yasuharu Satoh², Tohru Dairi², Iwao Ohtsu¹ (1Innov. Med. Res. Inst., Univ. of Tsukuba, ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【背景・目的】

エルゴチオネイン (ERG) は、含硫黄アミノ酸の一種であり、高い抗酸化能を有する機能性分子として、近年、産学界の注目を集めている。その生合成は、一部のバクテリアやキノコ類で行われているが、ヒトや植物はその生合成系を有していない。しかしながら、ヒトは、食事から ERG を摂取・吸収し、これを自身の細胞・生体の健全な活動維持に重要な「抗酸化システム」として有効活用している。このような ERG の有用性の一方で、その安価な生産法については、未だ発展途上の段階にあり、現状では非常に高価であるという課題が残されている。よって、本研究では、ERG 生合成能はないが遺伝子工学的基盤が整っている大腸菌を用いて、合成生物学および代謝工学的なアプローチにより、発酵生産による安価な ERG 高生産系を確立することを目的とした。

【結果・考察】

ERG の高生産には、分子骨格となるヒスチジン、そのアミノ基のトリメチル化に要する *S*-アデノシルメチオニン、そのイミダゾール環へのチオン基導入に要する γ -グルタミルシステイン (システインとグルタミン酸から生成) の供給強化が鍵となる。各反応の触媒酵素は、*Mycobacterium* 属細菌で生合成遺伝子クラスター (*egtABCDE*) にコードされていることが知られている。我々は、これらの遺伝子群を、オペロン型として、IPTG で誘導可能な発現プラスミドを構築し、大腸菌に導入することで ERG の合成生物学的な発酵生産を実現した。更なる ERG 生産性の改善のためには、(1) γ -グルタミルシステイン供給能の強化の目的では、その基質となるシステイン生合成の強化育種を行った。また、(2) *S*-アデノシルメチオニンの供給能の強化の目的では、葉酸回路およびメチオニン生合成系の遺伝子群の発現を負に一括制御している転写因子遺伝子の破壊育種も実施した。また、上記の基質類の添加等の培地成分の条件検討も行い ERG 生産への効果を検証した。最終的には、ジャーファーマンターを用いた発酵生産培養系を適用することにより、菌体濃度を高めつつ、基質類のフィード条件を最適化することで、1 g/L を越える ERG 生産に成功した。本発表では、当研究開発の成果について報告・議論し、更なる生産性改良を志向した育種状況・戦略についても紹介する。なお、本研究は、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (26027AB) の支援を受けて行った。

ergothioneine, cysteine, *Escherichia coli*

発表責任者：大津 巖生 (ohtsu.iwao.fm@u.tsukuba.ac.jp)

講演番号：3A28a12

講演日時：3月17日 11:21～ 共通講義棟北 A28 会場

コムギにおける *in planta* ゲノム編集技術の開発

Development of *in planta* genome editing technology in wheat

濱田 晴康²、LIU Yuelin¹、LINGHU Qianyan¹、柳楽 洋三²、三木 隆二²、田岡 直明²、○今井 亮三¹ (1農研機構生物部門、²(株)カネカ)

Haruyasu HAMADA², Yuelin LIU¹, Qianyan LINGHU¹, Yozo NAGIRA², Ryuji MIKI², Naoaki TAOKA², ○Ryozo IMAI¹ (¹NIAS, NARO, ²Kaneka Co)

作物の形質転換やゲノム編集は通常カルス培養や組織培養を必要としており、培養特性や再分化効率等の優れた特定の品種に実施範囲が限定されるのが大きな問題である。コムギにおいても、一部の外国品種のみが形質転換可能あり、国産主要品種における形質転換成功例は殆どない。一方、組織培養を経ず、植物体の状態で形質転換を行う、いわゆる *in planta* 法がシロイヌナズナで確立されているが、作物における成功例は極めて少ない。我々は、コムギを材料に、国産実用品種にも適用可能な再現性の高い形質転換法 (*in planta* particle bombardment (iPB)法)を開発した (Hamada et al. *Sci Rep* 2017)。そこで、本研究では、iPB法をゲノム編集に適用したコムギ *in planta* ゲノム編集技術の確立することを目的とした。

iPB法は吸水後のコムギ種子を供試し、実体顕微鏡下で胚より鞘葉および葉原基を取り除き、茎頂分裂組織を露出させる。切り取った胚をプレート上に並べ、DNAを付着させた金粒子を茎頂L2層に存在する生殖系列細胞をターゲットにパーティクルガンで導入する。撃ち込み後の胚より植物体を成長させ、PCRによる遺伝子導入個体の選抜後、次世代に遺伝する種子を選抜する。iPB法は、形質転換体作製以外にも、一過的発現系としても利用できることに着目し、CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集を試みた。変異導入遺伝子としては千粒重に関わる *TaGASR7* を選択し、これに対してデザインされた gRNA 及び Cas9 遺伝子を導入マーカー (GFP) 遺伝子と共に金粒子にコートしてパーティクルガンを用いて種子胚茎頂に導入した。ボンバードした210個の胚から生育させた植物個体のうち、11個体 (5.2%) で目的部位に変異が検出され、3個体 (1.4%) で変異の次世代への遺伝が観察された。遺伝分離後の T1 世代において、A, B, D ゲノムの全 *TaGASR7* 遺伝子に変異し、完全にノックアウトされた個体が複数得られた。また、得られた変異体について、Cas9, gRNA 遺伝子断片の挿入は検出されなかった。以上の結果から、種子胚茎頂の L2 細胞において、導入した CRISPR-Cas9 遺伝子の一過的発現による変異が誘導され、花粉等生殖細胞を経て、次世代に変異が遺伝することが明らかとなった。

iPB法はコムギに以外にも多様な作物品種に適用可能であり、RNP やタンパク質の導入も可能であることから、次世代作物ゲノム編集技術として有望である。

genome editing, wheat, particle bombardment

発表責任者：今井亮三 (rzi@affrc.go.jp)

講演番号：2A23p06

講演日時：3月16日 15:05～ 共通講義棟北 A23 会場

胆汁酸受容体 TGR5 は骨格筋を肥大化し筋力の増大を誘導する

Bile acid receptor TGR5 induces muscle hypertrophy and increases muscle strength

○佐々木 崇、久保山 文音、村田 翔太朗、清水 誠、井上 順、佐藤 隆一郎（東大院・農生科・応生化）

○Takashi SASAKI, Ayane KUBOYAMA, Shotaro MURATA, Makoto SHIMIZU, Jun INOUE, Ryuichiro SATO (Dept. of Appl. Biol. Chem., Grad. Sch. of Agr. and Life Sci., Univ. of Tokyo)

【研究の背景と目的】肝臓で合成された胆汁酸は摂食に応じて消化管に分泌され、脂溶性の食品成分やビタミン類の消化吸收を助けるばかりでなく、それ自体がシグナル分子として働くことで様々な代謝変動を引き起こすことが知られている。特に血中胆汁酸濃度は食後に大きく上昇することから、摂食シグナルを伝達する因子と考えられる。胆汁酸受容体 TGR5 は様々な組織に発現が認められ、その活性化により抗肥満効果や糖代謝改善効果を発揮する。これらの作用は褐色脂肪組織における熱産生亢進や小腸における GLP-1 分泌亢進などにより説明されているが、TGR5 の機能に関する理解は未だ限定的である。特に、骨格筋は摂食に応じて最もダイナミックな代謝変動を生じる臓器のひとつであるにも関わらず、胆汁酸シグナルが骨格筋機能に及ぼす影響は明らかにされていなかった。そこで本研究では、TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響の解明を試みた。

【方法と結果】全身性 TGR5 ノックアウトマウスおよび骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニック (Tg) マウスを用い TGR5 が骨格筋機能に及ぼす影響を解析したところ、TGR5 が骨格筋の肥大化、ならびに筋力の増大を誘導することが明らかとなった。Tg マウスは同腹仔の野生型マウスと比較して骨格筋重量が 10%程度増加しており、さらに若齢期から高齢期に至るまで有意な筋力の増大が確認された。Tg マウス骨格筋への胆汁酸投与により、骨格筋の成長を促進する IGF1 の発現上昇や筋萎縮関連遺伝子の発現低下が確認され、これらが TGR5 による筋量増大効果の一部を説明するものと考えられた。またヒト初代培養骨格筋細胞においても、TGR5 活性化により同様の遺伝子発現変動を示した。続いて我々は骨格筋における TGR5 発現調節機構の解析を行った。興味深いことに、TGR5 mRNA 発現量は運動後のマウス骨格筋で転写因子 ATF6 α 依存的に上昇することが示された。

【考察】遺伝子改変マウスを用いた一連の実験より、胆汁酸受容体 TGR5 が新たな筋肥大誘導因子であることが示され、更に TGR5 発現量は運動後の骨格筋で上昇することが明らかとなった。これらの結果は、TGR5 を軸とし、運動と摂食が相乗的に筋肥大を誘導するシステムの存在を示唆している。超高齢社会を迎えた我が国では、加齢に伴う筋量の低下 (サルコペニア) が深刻な問題となっており、高齢者の QOL 低下や医療費の増大を招いている。本研究結果より、骨格筋 TGR5 が新たな筋機能改善ターゲット分子として、これらの問題解決に貢献する可能性が示された。

bile acid, skeletal muscle, tgr5

講演番号：3B07p08

講演日時：3月17日 15:27～ 共通講義棟南 B07 会場

ビール苦味成分イソ α 酸の海馬ドーパミンを介した記憶学習機能改善作用

Memory improvement of iso- α -acids, bitter components in beer, via hippocampal dopamine

○阿野 泰久¹、星 朱香²、内田 真一³、山田 浩司³、近藤 恵二¹ (¹キリン(株)健康研、²キリン(株)基盤研、³協和発酵キリン(株)中枢神経研)

○Yasuhisa ANO¹, Ayaka HOSHI², Shinichi UCHIDA³, Koji YAMADA³, Keiji KONDO¹ (¹Kirin Co. Ltd., Lab for Health Sci., ²Kirin Co. Ltd., Central Lab. for Key Tech., ³Kyowa Hakko Kirin Co. Ltd. CNS Lab.)

【背景・目的】ビールの原料であるホップは古来より薬用植物として知られ、我々はこれまでホップ由来のビール苦味成分であるイソ α 酸が、脳内炎症の抑制により認知症予防効果を示すことを報告してきた(引用1)。また、イソ α 酸摂取によるヒト脳活動改善の可能性が内閣府革新的研究開発推進プログラム ImPACT での実証トライアルによるMRI測定によって示唆されている(引用2)。本研究では、イソ α 酸が脳内炎症以外で認知機能、特に記憶学習機能に及ぼす影響を探索することを目的とした。

【実験方法】A β オリゴマーの脳室内投与で認知機能を低下させたICRマウス(雄性、6週齢)にイソ α 酸(0.02-2 mg/kg)を経口投与し、投与1時間後にY字迷路試験および新奇物体認識試験を実施した。また、スコポラミンによる健忘惹起マウスを用いて同様の行動薬理試験を実施した。続いて、イソ α 酸投与の海馬での神経伝達物質放出への影響を評価するため、SDラット(雄性、6週齢)にイソ α 酸(0.5, 1 mg/kg)単回投与後の海馬で放出されたモノアミン量をマイクロダイアリシス法により測定した。更にドーパミンの関与を評価するため、マウスにイソ α 酸投与後にドーパミンD1受容体阻害薬SCH23390を腹腔内投与し、Y字迷路にて評価した。また、作用機序探索のため、マウスにイソ α 酸単回および7日間投与後の海馬のマイクロアレイ解析を実施した。

【結果】Y字迷路試験および新奇物体認識試験の結果、A β 脳室内投与およびスコポラミン健忘モデルのいずれでも、イソ α 酸の単回投与は濃度依存的にY字迷路での自発的交替行動率および新奇物体への探索時間を有意に増加した。また、イソ α 酸の主要な化合物であるシスおよびトランスイソフムロン等の単一成分で同様の作用を確認した。マイクロダイアリシスの結果、イソ α 酸の単回投与で海馬からのドーパミン放出量が有意に増加した。また、DR1阻害薬の投与によりイソ α 酸の記憶改善作用が消失したことより、イソ α 酸はドーパミン放出を促すことで記憶力を改善することが示唆された。更にマイクロアレイ解析の結果、イソ α 酸投与により海馬におけるドーパミン産生、神経新生、神経可塑性に関わる遺伝子群の発現上昇が確認され、これらのシグナル経路の増強を確認した。

【結論】イソ α 酸の短期的な摂取は海馬におけるドーパミン放出を促し、記憶学習機能を増強することを明らかにした。イソ α 酸は風味付けや保存性向上の目的でビール醸造に長く利用されてきたが、我々の研究により、脳機能に対する生理作用が次第に明らかとなってきた。今後、イソ α 酸がドーパミン産生を促す機序や記憶学習機能への苦味受容体の関与など、より詳細な解析が待たれる。

引用1 Ano et al, J. Biol. Chem., 2017、引用2 内閣府 ImPACT 2016年3月1日リリース

dopamine, memory, hippocampus

発表責任者：阿野泰久 (Yasuhisa_Ano@kirin.co.jp)

講演番号：3A14a11

講演日時：3月17日 11:10～ 共通講義棟北 A14 会場

がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物のスクリーニング

Screening for small-molecule inducers of reactive oxygen species

○河村 達郎^{1,2}、WILKE Julian^{1,2}、渡辺 信元^{1,3}、ZIEGLER Slava²、WALDMANN Herbert²、長田 裕之^{1,4} (1理研 CSRS・理研-マックスプランク連携、2マックス・プランク分子生理学研究所、3理研 CSRS・生理活性物質探索、4理研 CSRS・ケミカルバイオロジー)

○Tatsuro KAWAMURA^{1,2}、Julian WILKE^{1,2}、Nobumoto WATANABE^{1,3}、Slava ZIEGLER²、Herbert WALDMANN²、Hiroyuki OSADA^{1,4} (1RIKEN-MPI Joint, RIKEN CSRS, 2MPI Mol. Physiol., 3Bio-Active Comp. Discov., RIKEN CSRS, 4Chem. Biol., RIKEN CSRS)

【背景・目的】がん細胞では正常な細胞と比べて活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)の基礎レベルが高いため、さらなる酸化ストレスの誘導による細胞死誘導が1つのがん治療戦略として注目されてきた。一方、ROSは量・種類・局在に応じて細胞増殖や細胞死など様々な細胞応答を引き起こすため、細胞のレドックス制御機構やROSの役割については未解明な点も多い。そこで本研究では、がん細胞のレドックス制御系のさらなる理解と制御を目的とし、がん細胞にROS産生を誘導する化合物のスクリーニングを行った。

【結果】ROS検出試薬としてCM-H₂DCFDAを用い、ヒト骨肉腫U-2 OS細胞のROSレベルを測定するハイスループットなアッセイ系を構築した。そしてこのアッセイ系を用いることにより、ドイツ・マックスプランク分子生理学研究所の186,117化合物のスクリーニングを行った結果、704化合物に強いROS産生誘導活性を見出した。ヒットした704化合物が細胞内の主要な抗酸化物質であるグルタチオンのレベルに与える影響を解析したところ、一部の化合物はグルタチオン枯渇誘導活性を示し、強いグルタチオン枯渇誘導活性を有する化合物のいくつかは4,5-dihalo-2-methylpyridazin-3-one (DHMP)あるいは2,3,4,5(6)-tetrachloro-6(5)-methylpyridine (TCMP)を共通部分構造として有していた。これらDHMP, TCMP含有化合物は細胞のグルタチオン枯渇、ROS産生の誘導のみでなく、同濃度域で細胞毒性を示した。さらに、DHMPやTCMPを含む化合物は*in vitro*で酵素非存在下において還元型グルタチオンのチオール基と共有結合することを見出した。DHMPの一種である4,5-dichloro-2-methylpyridazin-3-oneやTCMPに関連した2,3,4,5-tetrachloropyridineを含む化合物の細胞毒性の報告はあったもののその作用機序は不明であったが、本研究によりDHMP, TCMP含有化合物が還元型グルタチオンと直接結合し、グルタチオン枯渇、ROS産生を伴う細胞死を誘導することを明らかにした。本研究で見出したDHMPあるいはTCMP含有化合物が細胞機能解析のためのツールとなることが期待される。

reactive oxygen species, glutathione, cancer

講演番号：2B05a07

講演日時：3月16日 10:16～ 共通講義棟南 B05 会場

吉草酸-GPR109a 経路はエイコサノイドの産生を介してマスト細胞依存性アレルギー炎症を抑制する
Valerate-Gpr109a axis suppresses mast cell-mediated allergic responses by upregulating
eicosanoid production.

○藤垣 泉¹、笠倉 和巳¹、久保 允人²、八代 拓也¹、西山 千春¹ (¹東理大基工、²東理大生命研)

○Izumi FUJIGAKI¹, Kazumi KASAKURA¹, Masato KUBO², Takuya YASHIRO¹, Chiharu NISHIYAMA¹ (¹Dept. of Biol. Sci. Technol., Tokyo Univ. of Sci., ²Research Institute for Biomedical Science, Tokyo Univ. of Sci.)

[目的] 腸内細菌は食物繊維を代謝し、分解する際に短鎖脂肪酸 (Short-chain fatty acid; SCFA)を産生する。この SCFAs は、モノカルボン酸トランスポーターや G タンパク共役型受容体 (GPCR)を介して免疫担当細胞に作用し、免疫寛容に働く制御性 T 細胞の分化を誘導するなど、腸管免疫系の恒常性維持に寄与することが報告されている。一方、腸管をはじめ全身の粘膜や結合組織に分布し食物アレルギーなど I 型アレルギー炎症誘導の責任細胞であるマスト細胞について、SCFAs の作用は未だ不明である。本研究では、マスト細胞活性化反応を抑制する SCFAs を特定し、その作用機序の解明を目指した。[方法・結果] マウス骨髄由来培養マスト細胞 (BMMC)に各種 SCFAs を添加し IgE 受容体を介した活性化反応を誘導したところ、特に吉草酸と酪酸に顕著な抑制効果が認められ、これら SCFAs の受容体が GPCR である可能性を昨年度の本大会で報告した。今回、受容体を特定するためマスト細胞で発現レベルの高い GPR109a に対し siRNA を導入したところ、酪酸による抑制が低減し吉草酸による抑制効果は完全に消失した。*Il10*^{-/-}マウス由来の BMMC では、酪酸、吉草酸処理による脱顆粒応答の抑制レベルが減弱し、COX 阻害効果をもつアスピリンを BMMC 培養液に添加すると吉草酸による抑制効果が消失したことから、マスト細胞の産生する抗炎症性サイトカイン IL-10 やエイコサノイド類が本抑制効果に関与すると考えられた。GPR109a はナイアシンの受容体でもあることからナイアシンについても検討した結果、脱顆粒反応が抑制され、この作用は SCFAs と同様にアスピリン処理により減弱した。マスト細胞が吉草酸添加時に PGE2 を産生すること、PGE2 存在下で脱顆粒反応が抑制されたことから、吉草酸によるマスト細胞活性化反応の抑制機構に PGE2 の関与が示唆された。吉草酸をマウスに経口投与したのち、IgE 誘導性全身性アナフィラキシーを観察したところ、抗原投与後に引き起こされる急激な体温低下が、吉草酸投与により緩和されることが判明した。この吉草酸による抑制効果は、アスピリンを飲水投与したマウスでは減弱していた。さらに、IgE 誘導性受動皮膚アナフィラキシーでは、抗原投与後に引き起こされる浮腫の肥大が、吉草酸投与により抑制されることを見出した。[まとめ] GPR109a を介した刺激がマスト細胞活性化抑制に効果的であり、吉草酸がそのリガンドとして生理的に意義のある効果を発揮することが明らかとなった。吉草酸による抑制機構には、マスト細胞自身が産生する PGE2 や IL-10 の関与が示唆された。本研究の結果から、食物繊維や短鎖脂肪酸、ビタミンといった食品成分がアレルギーの病態に関わる分子機構の一端が明らかになると共に、I 型アレルギー反応の予防・治療に GPR109a が有効な標的であることが示された。

Allergy, short-chain fatty acid, mast cell

発表責任者：西山千春 (chinishi@rs.tus.ac.jp)

講演番号：2A07p02

講演日時：3月16日 14:11～ 共通講義棟北 A07 会場

形質転換麹菌でのエルゴチオネインとセレノネインの生産

Production of ergothioneine and selenoneine in transformed koji molds

○原 精一、市川 恵一、篠原 靖智、五味 恵子 (キッコーマン)

○Seiichi HARA, Keiichi ICHIKAWA, Yasutomo SHINOHARA, Keiko GOMI (Kikkoman Corp.)

【背景・目的】 エルゴチオネインはヒスチジンベタイン構造を持つ含硫アミノ酸の一種で、この物質が持つ抗酸化能に基づく様々な生理活性が報告されている。エルゴチオネインは植物やヒトを含めた動物にも保持されているが、これを生合成できるのは一部の細菌や真菌のみである。このうち、タモギタケやササクレヒトヨタケなどの担子菌から抽出したものが産業利用されている。

セレノネインはエルゴチオネインの硫黄がセレンに置き換わった構造の物質で、これまでにマグロなどの魚類から抽出・分離され、エルゴチオネインよりさらに強い抗酸化活性が報告されている。セレノネインは市販されていない。

麹菌においてもエルゴチオネインの生合成遺伝子が予測されており、これら遺伝子を強制発現させることにより、エルゴチオネイン、さらにセレノネインの麹菌での効率的な生産を試みた。

【方法・結果】 真菌のエルゴチオネイン生合成経路では、まず、ヒスチジンがトリメチル化されてヘルシニンになり、次いで、ヘルシニンとシステインからヘルシニルシステインスルホキシドが生成する。麹菌 *Aspergillus sojae* において、この2段階の反応を担う2種の酵素の融合タンパク質をコードすると予測される遺伝子を *egtA* とした。次の段階でヘルシニルシステインスルホキシドからエルゴチオネインが生成するが、この反応を担うシステインデスルフラゼの候補遺伝子として2個を選び、*egtB*、*egtC* とした。*A. sojae* においてこれら3個の遺伝子を *tef* プロモーターを用いて個別に強制発現させて液体培養を行ったところ、*egtA* の強制発現においてエルゴチオネインの生産量が顕著に増えたのに対し、*egtB* または *egtC* の強制発現では増えなかった。これらの結果から、*A. sojae* では *egtA* の産物が担う反応が律速になっている可能性が考えられる。同様に、*A. oryzae* の *egtA* を *A. oryzae* で強制発現させたところ、エルゴチオネインの生産量が顕著に増えた。

次に、セレン源として亜セレン酸やセレノシスチンを添加して *A. sojae* や *A. oryzae* の *egtA* 強制発現株を液体培養したところ、いずれもセレノネインの生産が確認された。

麹菌の大量培養は容易であることから、今回の知見により、エルゴチオネインやセレノネインの安定かつ高効率な工業生産が期待される。

ergothioneine, selenoneine, *Aspergillus sojae*

講演番号：3A15a15

講演日時：3月17日 11:54～ 共通講義棟北 A15 会場

ゲノムワイド shRNA ライブラリースクリーニングによるアポトーシス誘導物質 JBIR-140 の標的経路の解析

Target pathway analysis of an apoptosis inducer JBIR-140 using genome-wide shRNA library screening

○高瀬 翔平^{1,2}、近藤 恭光^{3,4}、鈴木 健裕⁵、堂前 直⁵、新家 一男⁶、長田 裕之^{3,4}、久城 哲夫²、松本 健^{1,7,8}、吉田 稔^{1,7,8} (1理研 CSRS・ケミカルゲノミクス、2明治大院・農、3理研 CSRS・ケミカルバイオロジー、4理研 CSRS・創薬ケミカルバンク、5理研 CSRS・生命分子解析、6産総研・創薬基盤、7理研・化学遺伝学、8理研 CSRS・創薬シード)

○Shohei Takase^{1,2}, Yasumitsu Kondoh^{3,4}, Takehiro Suzuki⁵, Naoshi Dohmae⁵, Kazuo Shin-ya⁶, Hiroyuki Osada^{3,4}, Tetsuo Kushiro², Ken Matsumoto^{1,7,8}, Minoru Yoshida^{1,7,8} (1Chem. Genomics Res. Gr., RIKEN CSRS, 2Grad. Sch. of Agri., Meiji Univ., 3Chem. Biol. Res. Gr., RIKEN CSRS, 4Chem. Bank Unit Drug Discov., RIKEN CSRS, 5Biomol. Charact. Unit., RIKEN CSRS, 6Biotech. Res. Inst. Drug Discov., AIST, 7Chem. Genet. Lab., RIKEN, 8Seed Cpds Explor. Unit Drug Discov., RIKEN CSRS)

植物、微生物が生産する天然有機化合物にはユニークな構造を持ち、特徴的で強力な生理活性を有するものが多い。そのような生理活性物質の標的を同定することによって、これらの化合物をバイオプローブとして活用でき、基礎研究の発展に貢献する上で重要である。そこで本研究は、プール型 shRNA ライブラリーと次世代シーケンサーを駆使してゲノムワイドな RNAi スクリーニングを行い、生理活性物質による細胞増殖抑制に関わる遺伝子を特定することを目的とした。このバイアスのない網羅的解析技術は、生理活性物質の作用機構解析に対して強力な手法の1つであり、新規の生物学的知見を得られる可能性がある。

本研究で解析した JBIR-140 は放線菌 *Streptomyces olivoviridis* より単離された Thioviridamide の構造類縁体である。Thioviridamide は、ラット線維芽細胞 3Y1 にアデノウイルス E1A を発現させた細胞において顕著に細胞増殖阻害を引き起こすチオアミド結合を複数有したペプチドで、その増殖阻害活性はアポトーシスによるものであることがわかっている。また、幾つかのヒト腫瘍細胞において JBIR-140 が Thioviridamide よりも強力な増殖阻害活性を有することが示されている。しかし、JBIR-140 の作用機序は未だ解明されていない。そこで、本研究ではまず JBIR-140 の細胞増殖抑制に関わる遺伝子を同定するため、ヒト HeLa S3 細胞での shRNA ライブラリースクリーニングを行った。その結果、ミトコンドリアタンパク質や翻訳関連因子の遺伝子をノックダウンしたとき、見かけ上細胞の JBIR-140 感受性が低くなることが明らかとなり、これらが標的経路に関わると示唆された。また、トランスクリプトームやメタボローム解析、化合物ビーズを用いた結合タンパク質の同定等の手法を組み合わせ、JBIR-140 の標的を探索した。結果として JBIR-140 はミトコンドリア呼吸鎖 complex V を阻害することで統合ストレス応答の1つである GCN2 のリン酸化を介した ATF4 の発現上昇を引き起こすことが明らかとなり、E1A の発現がこの作用機構に何らかの影響を与えていることが示唆された。また、JBIR-140 処理によりミトコンドリア形態の変化も観察された。以上のことより、JBIR-140 はミトコンドリアに作用することによって細胞死を誘導していることが示唆された。

shRNA library screening, target identification

講演番号：3B07a06

講演日時：3月17日 10:05～ 共通講義棟南 B07 会場

Bifidobacterium breve A1によるアルツハイマー病モデルマウスの認知障害に対する改善作用 Therapeutic potential of *Bifidobacterium breve* A1 for preventing cognitive impairment in Alzheimer's disease

○小林 洋大¹、嶋田 耕育²、密山 恵梨¹、久原 徹哉¹、安岡 顕人²、近藤 隆^{2,3}、阿部 啓子^{2,4}、清水 金忠¹ (¹森永乳業株式会社 研究本部 基礎研究所、²地方独立行政法人神奈川県立産業技術総合研究所食品機能性評価グループ、³国立研究開発法人 理化学研究所 統合生命医科学研究センター、⁴東京大学大学院 農学生命科学研究科)

○Yodai Kobayashi¹, Kousuke Shimada², Eri Mitsuyama¹, Tetsuya Kuhara¹, Akihito Yasuoka², Takashi Kondo^{2,3}, Abe Keiko^{2,4}, Jin-zhong Xiao¹ (¹Morinaga Milk Industry Co., Ltd. Next Generation Science Institute, ²Group for Food Functionality Assessment, Kanagawa Institute of Industrial Science and Technology, ³RIKEN-IMS Laboratory for Developmental Genetics, ⁴Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

【目的】

アルツハイマー病をはじめとした認知症は全世界的に増加しており、今後も爆発的に増加することが危惧されている。アルツハイマー病は発症すると症状を改善させることが困難であり、根本的な治療法がない現在では、発症予防や進行抑制を目的とした生活習慣への介入や、機能性食品による日常生活の中での対策が求められている。近年、腸内細菌叢による脳機能への影響が注目されており、脳と腸の機能連関を意味する「脳腸相関」が脚光を浴びている。ビフィズス菌は腸内細菌叢の主要構成菌であり、その生理作用は整腸作用を中心に広範囲にわたり報告されているが、ビフィズス菌を含むプロバイオティクス摂取によって抗不安作用が報告されるなど、脳機能への好影響が期待されている。本研究では、乳児から取得した *Bifidobacterium breve* A1 (以下 *B. breve* A1) にアルツハイマー病モデルマウスの認知機能を改善する可能性を見出したことを報告する。

【方法】

アルツハイマー病の原因物質と考えられているアミロイド β をマウスの脳内に投与し、アルツハイマー病のモデルとしたマウスに *B. breve* A1 (1×10^9 cfu) を10日間にわたり経口投与し、Y迷路試験と受動回避試験を用いて自発的交代行動率および反応潜時を評価した。さらに、*B. breve* A1 摂取による海馬での遺伝子発現への作用を検討するため、海馬の遺伝子発現を次世代シーケンサーによるRNA-seqによって網羅的に解析した。

【結果・考察】

ビフィズス菌投与群は、媒体対照群と比較してY迷路試験による自発行動交替率に有意な改善が認められた。また、受動回避試験による反応潜時においても、有意な改善が認められた。加熱死菌体の *B. breve* A1 やビフィズス菌の主要代謝産物である酢酸の摂取によっても一部認知機能改善の作用が観察されたが、生きた *B. breve* A1 が最も改善作用が強く、その効果は陽性対照として用いたドネペジルと同程度であり、*B. breve* A1 による認知障害への改善作用が認められた。また、RNA-seqによる網羅的遺伝子解析では、モデルマウスの海馬にて誘起された過剰な免疫反応や脳内炎症が、*B. breve* A1 の摂取により抑制されることが認められた。以上の結果から、*B. breve* A1 はその抗炎症作用により $A\beta$ の毒性を和らげ、アルツハイマー病の発症リスクを低下させる可能性が示唆された。

Alzheimer's disease, probiotics, Brain-gut microbiota axis

発表責任者：小林洋大 (youd-kobayashi@morinagamilk.co.jp)

講演番号：2A28a07

講演日時：3月16日 10:16～ 共通講義棟北 A28 会場

常温固体型エチレン様活性物質による農業被害低減効果の追究

Damage control of crop production using solid ethylene mimic compounds

○水野 翼¹、財前 穂波¹、鈴木 優志¹、北畑 信隆²、浅見 忠男¹ (¹東大院・農生科、²東理大・理)

○Tsubasa Mizuno¹, Honami Zaizen¹, Masashi Suzuki¹, Nobutaka Kitahata², Tadao Asami¹
(¹Univ. Tokyo, ²Tokyo Univ. Science)

【背景と目的】

Striga hermonthica (ストライガ)は「魔女の雑草」とも呼ばれる根寄生雑草で、サブサハラアフリカを中心に農作物生産に多大な被害を及ぼしている。本研究では、ストライガ防除を目的として、ストライガ種子の自殺発芽誘導活性をもつエチレンに着目した。ストライガ種子を温暖湿潤な条件下に1,2週間さらすコンディショニングという処理を行った後、合成ストリゴラクトンアナログであるGR24を処理すると、エチレン生合成が活性化し、発芽へと向かうことが知られている。アメリカ合衆国では、エチレンを土壤中に注入することで自殺発芽を誘導する手法を用いてストライガ防除に成功しているが、設備が高価であるため、ストライガ被害の中心地であるアフリカでこの手法を適用することは現実的ではない。我々は、シロイヌナズナにおいてエチレン特有の応答であるトリプルレスポンスを引き起こすKUT15を報告している。KUT15は白色粉末状の化合物であり、エチレンガスと比較すると扱いが容易である。そこでこのストライガ種子の発芽誘導活性に焦点を当てた追究を行った。KUT15は予想通りストライガ種子の発芽誘導活性を示す化合物であったため、この化合物をリード化合物として構造展開を行い、ストライガにおける発芽誘導活性を評価することで実用可能性のある化合物の探索を試みた。また、GR24とKUT15を共処理し、エチレンおよびストリゴラクトンの両シグナル経路を同時に活性化することによる発芽誘導活性への効果や、エチレン生合成遺伝子の発現量への影響についても解析した。

【方法と結果】

KUT15は3つの置換基をもつトリアゾール誘導體である。今回、KUT15をリード化合物として2つの置換基を改変し、合成した化合物のシロイヌナズナにおけるエチレン様活性と、ストライガ種子発芽誘導活性を調べた。その結果、合成化合物中にエチレン生合成中間体であるACCと同程度のストライガ種子発芽誘導活性をもつ化合物を見出した。また、ストリゴラクトンによるストライガ種子発芽には通常はコンディショニングが必要であるが、GR24およびKUT15の共処理では、コンディショニングを行わない場合でも、それぞれの化合物単独処理時と比較して発芽誘導活性が高くなる傾向が見られた。これらの結果から、エチレンおよびストリゴラクトンシグナルを活性化する化合物の併用が農業利用という観点から有望であることが示唆された。

Ethylene, *Striga hermonthica*, Strigolactone

講演番号：2A01a10

講演日時：3月16日 10:49～ 共通講義棟北 A01 会場

微生物腐食対策のための金属腐食性 *Prolixibacter* 属細菌検出系の構築

Evaluation of PCR primers of 16S rRNA gene for the detection of iron-corroding *Prolixibacter*.

○飯野 隆夫¹、伊藤 公夫²、大熊 盛也¹ (¹理研 BRC-JCM、²新日鐵住金)

○Takao Iino¹, Ito Kimio², Ohkuma Moriya¹ (¹RIKEN BRC-JCM, ²Nippon Steel and Sumitomo Metal Corp.)

【目的】微生物作用により金属材料が腐食する微生物腐食は、予測が困難な上、急速かつ局所的に腐食が生じるため、金属腐食問題の中でも特に問題が深刻化しており、原因菌の特定や効果的な防食対策が喫緊に求められている。この問題に対して、我々は未知種であった *Prolixibacter denitrificans* MIC1-1 株が既存のメカニズムとは異なり、硝酸還元を介して金属腐食を引き起こすことを明らかにした¹⁾。微生物腐食を未然に防ぐためには、原因菌の種多様性の把握や検出技術の構築が必須であるが、*Prolixibacter* 属細菌は 2 種 2 株しか存在せず知見が皆無である。本研究は、新たな金属腐食性 *Prolixibacter* 属細菌の分離・培養と PCR による *Prolixibacter* 属細菌検出系の構築を目的とした。

【方法】日本各地の原油などを収集し、*Prolixibacter* 属細菌の純粋分離を行った。金属鉄 (Fe⁰) を含む人工海水培地に供試菌株を接種し、25°C にて 30 日間培養を行なった。培養後、試験液中の溶出鉄量を定量し、鉄腐食能の有無を解析した。続いて、分離株を含む *Prolixibacter* 属細菌 6 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列のアライメントを行い、*Prolixibacter* 属細菌に特異的なプライマーを作製した。分離株と工場用水から染色体 DNA を抽出し、作製したプライマーを用いて PCR を行った。

【結果および考察】4 株の *Prolixibacter* 属細菌を新たに純粋分離した。16S rRNA 遺伝子塩基配列解析を行った結果、3 株 (AT004 株, KGS048 株, NT017 株) は *P. denitrificans* と 99.8-99.2% の高い相同性を得た。残る 1 株 (SD074 株) は既知の 2 種と 95.8-97.0% の相同性しかなく、*Prolixibacter* 属第 3 の種と考えられる。これら分離株のうち、NT017 株を除く 3 株が硝酸塩存在下で金属鉄を腐食した。このことから、*Prolixibacter* 属細菌の金属腐食能は株固有の能力でありながら、種間横断的に保有されることが明らかとなった。*Prolixibacter* 属細菌特異的プライマーを用いて、培養株の DNA を鋳型に PCR を行った結果、*Prolixibacter* 属細菌 6 株全てから単一の遺伝子断片の増幅が確認され、近縁種である *Mangrovibacterium diazotrophicum* JCM 19152[†] などからは増幅がなかった。よって、作製したプライマーは *Prolixibacter* 属に特異性が高いことを確認した。工場用水由来の染色体 DNA を鋳型に PCR を行った結果、目的とする単一の遺伝子断片の増幅が確認され、供試した工場用水に *Prolixibacter* 属細菌が存在することが明らかとなった。現在、作製したプライマーセットを利用した定量化に向けた準備を整えている。安価かつ迅速な解析方法である PCR/定量 PCR 解析は原因菌検出および腐食リスク評価を可能にする実現場での定期予防診断技術として期待できる。

1) Iino, T. *et al.* (2015) *Appl. Environ. Microbiol.*, 81, 1839.

microbiologically influenced corrosion, iron corrosion, nitrate reduction

発表責任者：飯野隆夫 (iino@riken.jp)

講演番号：3B07p01

講演日時：3月17日 14:00～ 共通講義棟南 B07 会場

新規霊長類消化管オルガノイド構築と機能解析

Generation and characterization of new intestinal organoids from primates

○熊木 竣佑¹、稲葉 明彦²、木下 和弥²、齊藤 万佐子²、中村 倫果²、今井 啓雄³、栗飯原 永太郎⁴、山根 拓実^{1,2}、大石 祐一^{1,2}、岩槻 健^{1,2} (1東農大院農、²東農大応生、³京大霊長研ゲノム進化、⁴シンシナティ大医)

○Shunsuke KUMAKI¹, Akihiko INABA², Kazuya KINOSHITA², Masako SAITO², Michika NAKAMURA², Hiroo IMAI³, Eitaro AIHARA⁴, Takumi YAMANE^{1,2}, Yuichi OISHI^{1,2}, Ken IWATSUKI^{1,2} (1Graduate School of Tokyo Univ. of Agriculture, ²Tokyo Univ. of Agriculture, ³Kyoto Univ., ⁴Univ. of Cincinnati)

【目的】消化管上皮には食事中の栄養素に応答してホルモンを分泌する内分泌細胞と、寄生虫感染時に2型自然免疫系を惹起する Tuft 細胞という二種類の味細胞様細胞が存在する。いずれも口腔内の味細胞が発現する味覚受容関連分子を発現し、齧歯類の消化管内腔におけるケモセンサーだと推測されている。しかしながら、味細胞様細胞は消化管上皮において1%前後と少なく、リガンドや細胞内シグナル伝達物質などの知見は乏しい。ましてや、霊長類での味細胞様細胞に関わる研究は進んでいない。そこで我々は、味細胞様細胞に特異的な受容体および伝達物質を探索し、霊長類特有の味細胞様細胞機能の解明するために、霊長類の消化管オルガノイド作製と味細胞様細胞の解析系構築を目指した。

【方法】我々はまず、これまで作製例のない旧世界ザルの消化管からオルガノイドを作製し、霊長類の味細胞様細胞に関する新たな知見を得ようと試みた。旧世界ザルの十二指腸・空腸・回腸・盲腸・大腸それぞれを採取後、2% sorbitol, 1% sucrose, 1% BSA, 2 mM EDTA / PBS において15分間インキュベートした。ピンセットを用いて上皮細胞層を剥離させ、セルストレイナーでクリプトを単離した。得られたクリプトの沈殿をマトリゲルに包埋し、Wnt3a, R-spondin, Noggin, hEGF, A-83-01, Nicotinamide 等を添加した培地を用いて培養した。この時、Dibenzazepine (DBZ: Notch シグナル阻害剤) や IL-4 といったサイトカインを用いた味細胞様細胞への分化誘導を試みた。味細胞様細胞の性質と機能解析には IHC (免疫組織化学染色)、RT-PCR、Ca アッセイ等を用いた。

【結果および考察】培養を開始して6時間後にはクリプトは球体構造を取り増殖を開始し、2日後には、直径約100 μmの大きさに成長した。遺伝子・タンパクレベルでの DCLK1、CHGA (共に味細胞様細胞マーカー) の発現および Ca アッセイによる味物質への応答確認より、サル消化管オルガノイドは *in vivo* を反映していることが明らかとなった。また、DBZにより味細胞様細胞へ、IL-4により Tuft 細胞へそれぞれ分化誘導できることを確認した。以上のことから、我々は世界に先駆けてサル消化管よりオルガノイド作製に成功したと判断した。最近になり、齧歯類と霊長類では味覚感受性に多くの差異があることが報告されているため、本霊長類オルガノイドはヒト研究への橋渡しとして最適なツールであると考えられる。今後、本培養系を用いたヒトの消化管ホルモン分泌や免疫系を制御する食品機能性成分の探索が進み、齧歯類中心の研究から脱却した“ヒトを対象とした新しい食の科学”へのパラダイムシフトが期待される。

Organoids, Primates, Taste like cells

発表責任者：岩槻健 (ki204886@nodai.ac.jp)

講演番号：2A25p03

講演日時：3月16日 14:22～ 共通講義棟北 A25 会場

ヘモグロビンの新規フラボノイド変換活性の発見

Discovery of a novel flavonoid-converting activity of hemoglobin

○永久保 利紀、熊野 匠人、橋本 義輝、小林 達彦 (筑波大院 生命環境)

○Toshiki NAGAKUBO, Takuto KUMANO, Yoshiteru HASHIMOTO, Michihiko KOBAYASHI (Grad. School of Life and Environ. Sci., Univ. of Tsukuba)

【背景・目的】

がんや心疾患などの慢性疾患の増加は、世界規模の健康問題である。疫学的な調査結果は、これらの慢性疾患に対するフラボノイドの予防効果を裏付けており、その効果がフラボノイドの抗酸化作用や種々の酵素に対する阻害作用に起因することも明らかにされてきている。しかし、ヒト体内におけるフラボノイドの代謝経路は、十分に理解されているとはいいがたい。一方で、フラボノイド代謝産物が独自の生理活性を発揮し、フラボノイドの生理活性の一部を担っていることも報告されている。したがって、ヒト体内における未知のフラボノイド代謝産物や代謝酵素の同定は、フラボノイドの有用な生理活性を理解する上で必要不可欠である。

【結果】

本研究では、ヒトのモデル動物であるブタを用いて、フラボノイドを変換する新規酵素の探索を試みた。具体的には、ブタ臓器由来無細胞抽出液とフラボノイドを含む反応液をインキュベートし、高速液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) により、フラボノイドに由来する反応産物の検出を試みた。その結果、ブタ肝臓由来の無細胞抽出液が、CoA の存在下で 7,8-dihydroxyflavone (7,8-DHF) を新規化合物に変換する活性を有することを見出した。この変換反応を触媒する酵素を高純度に精製し、アミノ酸配列の同定を行ったところ、本酵素がヘモグロビン (Hb) であることが分かった。次に、質量分析や核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いた構造解析、基質特異性の検討等により、Hb が、(i) CoA を pantetheine と 3'-phospho-ADP に加水分解し、(ii) CoA の分解産物である pantetheine (あるいは glutathione や cysteine 等のチオール) を-SH 基を介してフラボノイドに付加する、前例の無い2段階反応を触媒することを明らかにした。Hb の補因子ヘムを一酸化炭素で不活性化することで反応②のみが阻害されたことから、反応①が Hb のポリペプチド鎖部位において触媒されることも明らかにした。また、この2段階反応を触媒する活性はヒト由来 Hb にも存在した。

Hb は普遍的に存在する酸素運搬タンパク質だが、上記のフラボノイド変換酵素としての活性に関する報告はこれまでに一切無い。以上の結果は、Hb の新たな生理学的役割の発見につながる可能性がある。

Flavonoid, Hemoglobin, CoA

講演番号：3A13a01

講演日時：3月17日 09:00～ 共通講義棟北 A13 会場

新規 *in vitro* 運動モデルの確立及び β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸 (HMB) の作用メカニズム解析への応用

establishment of a new *in vitro* exercise model and its application to analyze the mechanism of beta-hydroxy-beta-methylbutylate (HMB) on the contraction-induced protein synthesis

○佐藤 聡子¹、高村 裕介¹、山名 一綱¹、野村 充¹、内山 章¹、古市 泰郎²、眞鍋 康子²、藤井 宣晴² (¹ライオン株式会社 研究開発本部、²首都大学東京 人間健康科学研究科)

○Satoko SATO¹, Yusuke TAKAMURA¹, Ikko YAMANA¹, Mitsuru NOMURA¹, Akira UCHIYAMA¹, Yasuro FURUICHI², Yasuko MANABE², Nobuharu FUJII² (¹Research and Development Headquarters, Lion Corporation, ²Graduate School of Human Health Sciences, Tokyo Metropolitan University)

【背景と目的】レジスタンス運動（筋力トレーニング）による筋収縮は筋タンパク質合成を向上させるため、筋力増強及び筋力低下予防に効果的である。近年、運動による筋タンパク質合成をさらに促進する食品素材が複数報告されている。しかし、筋収縮による筋タンパク質合成能を簡便に評価できる培養細胞モデルはなく、これまで食品素材の評価はヒトや動物で実施されていた。本研究では、培養骨格筋細胞を用いて筋収縮によるタンパク質合成能をより簡便に評価できる新たな *in vitro* 運動モデルの構築を目指した。さらに、本モデルを食品素材によるタンパク質合成の評価に応用し、ロイシンの代謝物であり、ヒトにおいて運動との併用効果が報告されている β -ヒドロキシ- β -メチル酪酸 (HMB) を筋収縮と併用したときの筋力向上メカニズム解析を実施した。

【方法】1) *in vitro* 運動モデルの構築：ラット骨格筋由来の筋芽細胞 (L6 細胞) を筋管細胞に分化させた後、電気刺激 (100 Hz, 50 V, 10 分) を負荷した。電気刺激負荷 3 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法により骨格筋合成シグナルである mTORC1 経路及び Erk 経路の各因子のリン酸化レベルを評価した。

2) HMB の併用効果：1) と同様に細胞培養及び電気刺激負荷を行った。電気刺激負荷 2.5 時間後に HMB を添加して、添加 30 分後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法により mTORC1 経路及び Erk 経路の各因子のリン酸化レベルを評価した。

【結果】1) 電気刺激を負荷した細胞の Akt (Thr308), p70S6K (Thr389) 及び Erk1/2 (Thr202/Tyr204) のリン酸化レベルは、刺激を与えなかった細胞と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

2) 電気刺激と HMB を併用した細胞の p70S6K 及び Erk1/2 のリン酸化レベルは電気刺激のみの細胞のそれと比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

【結論と考察】L6 細胞に高周波数 (100 Hz, 10 分) の電気刺激を負荷することで、レジスタンス運動負荷時に活性化されるタンパク質合成シグナルの mTORC1 経路及び Erk 経路が活性化した。低周波数 (1 Hz, 60 分) の電気刺激では C2C12 細胞において p70S6K の活性化は報告されていないことから、今回用いた条件が、筋タンパク質合成能の評価に適したモデルであると考えられる。さらに、本モデルの活用により HMB は筋収縮による mTORC1 経路及び Erk 経路をより顕著に活性化させることで、筋タンパク質合成を促進することが示された。

muscle protein synthesis, contraction, beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB)

講演番号：2A17p20

講演日時：3月16日 17:59～ 共通講義棟北 A17 会場

新規 labionen 構造の形成に関与する lanthipeptide 合成酵素の解析

Analysis of lanthipeptide biosynthetic enzymes responsible for formation of novel labionen structure

○菅井 佳宣¹、江畑 一真¹、浅水 俊平¹、後藤 佑樹²、菅 裕明²、尾仲 宏康¹ (¹東大院農、²東大院理)

○Yoshinori SUGAI¹, Kazuma Ebata¹, Shumpei Asamizu¹, Yuki Goto², Hiroaki Suga², Hiroyasu Onaka¹ (¹Univ. of Tokyo (Agri. life Sci.), ²Univ. of Tokyo (Sci.))

【背景・目的】リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド (RiPPs) は広範な構造多様性を持つ巨大な天然化合物群の一つである。この中には強力な生理活性を示すものも多く含まれ、有用な医薬探索源とされている。*Streptomyces* sp. TP-A0584 のゲノム中には RiPPs の一種である lanthipeptide の生合成酵素遺伝子 (*lbeKC*) がコードされており、塩基配列情報から labionin 環 (Lab) 構造を形成する修飾反応に関与することが予想された。その近傍には aminovinyl-cysteine (AviCys) の生合成に関与する酸化脱炭酸酵素遺伝子 (*lbeD*) が存在していた。これまでにこのような酸化脱炭酸酵素と単環性の lanthionin (Lan) 合成酵素との組み合わせで生合成される化合物は知られていたが、二環性の Lab 合成酵素との組み合わせは報告が無いため、これら酵素の機能に興味を持たれた。本研究ではこの新規ペプチド化合物の生合成経路を解析し、特異な分子構造の生合成機構の解明を目的とした。

【方法】既に確立していた目的生合成遺伝子クラスターの異種発現系を用いて化合物の生産を行った。培養抽出物から目的ペプチドを単離、精製し各種機器分析により構造の決定を行った。RiPPs の修飾反応に関与すると予想された2つの遺伝子はそれぞれ大腸菌を用いて組換え酵素として調製した。*In vitro* 翻訳系を用いて前駆体ペプチドやアミノ酸残基を置換したアナログペプチドを調製し、これを基質に酵素反応を行なった。反応生成物は MALDI-TOF-MS で解析し、脱水、酸化脱炭酸反応の進行を確認した。また、脱水反応によって形成される dehydroalanine 残基の二重結合は環化反応により消失するため、これを誘導体化して検出することで環化反応の進行を確認した。

【結果・考察】異種発現系を用いて生産したペプチド化合物を機器分析したところ、8 アミノ酸残基からなる環状ペプチドであった。さらに Lab 構造内の Lan が AviCys となった新規構造であることが示されたため、この構造を labionen (Lbe) と命名した。組換え酵素を用いた解析から、LbeD の反応により酸化脱炭酸反応が進行し、そこに LbeKC を加えることにより3回の脱水反応が進行したことが示された。この反応生成物の環化状態を解析したところ、二環性の構造 (Lbe) が形成されていた。一方で、前駆体ペプチドに LbeKC のみを反応させたところ3回の脱水反応は進行したが、生成物は単環性の Lan 構造だった。前駆体ペプチドのアミノ酸配列から、Lan 構造は大きな環と小さな環を形成する可能性があったため、アミノ酸残基を置換したアナログペプチドを用いて解析した。その結果、いずれのサイズの Lan 構造も形成されうる事が示された。以上の結果から、LbeD との連続反応により LbeKC の酵素反応が単環性の Lan 形成から二環性の Lab 形成様へとスイッチすることが示された。

RiPPs, Lanthipeptide, Biosynthesis

発表責任者：尾仲宏康 (aonaka@mail.ecc.u-tokyo.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
2018年 9月 8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応用生命化学専攻

浅見 忠男