



日本農芸化学会 関東支部 2018年度 支部大会

講演要旨集

2018年10月13日(土)

東京理科大学野田キャンパス

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 支部大会

プログラム

10:30 開会の辞 浅見 忠男 支部長 (東京大学)

<一般講演>

10:35 ポスター発表 (カナル会館 3階 大会議室)

10:35-11:30 奇数演題の発表

11:30-12:25 偶数演題の発表

12:25 昼休み

13:40 口頭発表前半 (カナル会館 3階 大会議室)

O-1 Phorbacin H およびI の合成研究

○高橋 健輔^{1,2}, 森 直紀¹, 久世 雅樹², 滝川 浩郷¹

(¹東大院・農生科・応生化, ²神大院・農・生機科)

O-2 L-酒石酸還元金ナノ粒子を用いたアミノ酸の選択的検知と不斉識別

○新森 英之, 酒井 皓大

(山梨大院・生命環境)

O-3 新規共有結合性PPAR γ アゴニストの構造活性相関及び推定結合様式の解析

○宇津木 優樹¹, 小淵 裕菜², 河村 幸雄², Ahmed Salahelden Aboelhamd Atito³,
永尾 雅哉⁴, 磯田 博子⁵, 宮前 友策^{4,5}

(¹筑波大・生物資源, ²京都女子大・食物栄養, ³筑波大院・グローバル教育院,
⁴京都大院・生命科学, ⁵筑波大院・生命環境)

O-4 ソホロオリゴ糖と配糖体を基質とする新規糖転移酵素の機能と構造

○小林 海渡¹, 清水 久佳¹, 中島 将博¹, 中井 博之², 宮永 顕正³, 田口 速男¹

(¹東理大院・理工, ²新潟大・農, ³東工大・理学)

O-5 Structure and Function of Carbazole 1,9a-Dioxygenase in Dioxygenation Catalysis

○Yixia Wang¹, Jun Matsuzawa¹, Joydeep Chakraborty¹, Zui Fujimoto²,

Chiho Suzuki-Minakuchi^{1,3}, Kazunori Okada¹, Hideaki Nojiri^{1,3}

(¹BRC, UTokyo, ²Advanced Analysis Center, NARO, ³CRIM, UTokyo)

O-6 内因性酸化ステロールがコレステロール代謝制御機構に及ぼす影響

○齋藤 穂高¹, 山内 祥生¹, 佐藤 隆一郎¹

(¹東大院・農生科・応生化)

O-7 カルボリン誘導体の小胞体グルコシダーゼII阻害による抗ウイルス活性

○恩田 桃子¹, 石渡 明弘², 袴田 航¹, 平野 貴子¹, 伊藤 幸成², 遠矢 幸伸³,
西尾 俊幸¹

(¹日大院・生資科, ²理研・細胞制御化学, ³日大生資科・獣医)

O-8 オピオイド受容体 δ アゴニストによる腸炎病態改善効果

○長田 和樹¹, 三浦 亮介¹, 長瀬 博², 八代 拓也¹, 西山 千春¹

(¹理科大・院基・生工, ²筑波大・国際統合睡眠医科学研究機構)

15:20 休憩

15:40 口頭発表後半 (カナル会館 3階 大会議室)

- O-9 マウス摘出腸管における糖吸収に及ぼす酢酸投与のタイミングについて
○杉山 沙依美¹, 寺島 和哉², 石原 智³, 唐木 晋一郎⁴, 本間 知夫^{1,2}
(¹前橋工大・生物学, ²前橋工大院・生物学, ³群馬県農技セ, ⁴静岡県大・食品栄養)
- O-10 標準BMIアスリートの腸内細菌叢解析
○鈴木 基生¹, 中谷 浩崇², 上田 麻実¹, 富士川 凜太郎¹, 横田 真人^{1,2}, 世良 泰³,
鈴木 啓太¹
(¹AuB, ²TWOLAPS, ³慶應大・スポーツ医学総合センター)
- O-11 A novel gelsolin-like protein regulates growth and septum formation
in filamentous fungi
○Md. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2}
(¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIM, The Univ. of Tokyo)
- O-12 植物特異的なBZR転写因子ファミリーのDNA結合特異性の構造基盤
○野崎 翔平¹, 宮川 拓也¹, 徐 玉群¹, 中村 顕¹, 平林 佳¹, 浅見 忠男¹,
中野 雄司², 田之倉 優¹
(¹東大院・農生科・応生化, ²理研CSRS)
- O-13 CRISPR/Cas9を用いた低アミロースジャガイモの作出と交配による
後代植物取得の検討
○朝日 貴大¹, 大沼 万里子¹, 浅野 賢治², 野田 高弘², 草野 博彰³, 寺村 浩¹,
島田浩章¹
(¹東理大院・生物工, ²農研機構北海道農業研究センター, ³現京都大・生存研)
- O-14 植物由来カフェ酸誘導体による神経細胞保護作用
○繁森 英幸¹, 宮前 友策¹, 栗栖 真奈美², 木立 恵利², 谷野 伸吾³, 松浦 大輔³,
金谷裕敏³
(¹筑波大院・生命環境, ²筑波大院・生命環境, ³(株)バスクリン)
- O-15 活性酸素-Ca²⁺シグナルネットワークによる植物の発生・プログラム細胞死・
ストレス応答の制御
○朽津 和幸, 橋本 研志, 賀屋 秀隆, 花俣 繁, 来須 孝光, 北畑 信隆
(東京理科大理工)

17:05 閉会の辞 倉持 幸司 支部大会担当幹事 (東京理科大学)

<懇親会> (カナル会館 1階 カナル食堂)

17:20 懇親会および優秀発表賞授与式

一般講演

口頭発表要旨

O-1	<p>Phorbasin H および I の合成研究 ○高橋 健輔^{1,2}, 森 直紀¹, 久世 雅樹², 滝川 浩郷¹ (¹東大院・農生科・応生化, ²神大院・農・生機科)</p>
<p>【目的】<i>Phorbas</i> sp.から単離された phorbasin H および I はシクロヘキサンカルボン酸の4位に側鎖が置換しているジテルペンである。シクロヘキサンが結合している側鎖上には、複数のトランス二重結合が存在しており、これらを Julia-Kocienski カップリング等を用いて導入できると考え合成計画を立てた。</p> <p>【結果】 Phorbasin H の合成では、シクロヘキサン部分に相当するスルホンフラグメントは <i>trans</i>-1,4-cyclohexanedimethanol を出発原料とし、5段階の反応を経て合成した。側鎖部分に相当するアルデヒドフラグメントは、(<i>S</i>)-citronellal を原料とし、2段階の変換の後に合成した。合成したそれぞれのフラグメントを Julia-kocienski カップリングに用いて、目的化合物である phorbasin H の骨格を持つ化合物が、<i>E:Z</i> = 2:1 で得られた。この幾何異性体はこの時点で分離不可能であったため、脱保護と酸化反応を行うことで目的化合物である phorbasin H へと変換した後に、幾何異性体の分離に成功した。得られた phorbasin H の比旋光度は天然物のものと符号が一致し、未定であった天然物の絶対立体配置は <i>S</i> であると決定することができた。</p>	

O-2	<p>L-酒石酸還元金ナノ粒子を用いたアミノ酸の選択的検知と不斉識別 ○新森 英之, 酒井 皓大 (山梨大院・生命環境)</p>
<p>【目的】 金ナノ粒子は可視光領域に特異な光学特性を有するため、バイオセンサやバイオイメージング等への応用が期待されているナノ材料である。これらライフサイエンス分野への展開においては、金ナノ粒子とバイオ物質との選択的相互作用が鍵となり、その相互作用に伴った金ナノ粒子界面の物性変化や金ナノ粒子自体の分散-凝集平衡の偏りによる変色等が活用されている。一方、生体はキラルな物質の塊であり、タンパク質や酵素のユニットとなって生命活動を支えている化合物にアミノ酸がある。そこで本研究では、アミノ酸を選択的に認識・検知できるキラルな金ナノ粒子の構築を目的とした。ここでキラル金ナノ粒子を創出する際に、天然に豊富に存在する（特にブドウやワイン）有機ヒドロキシ酸である L-酒石酸を基体とした。</p> <p>【方法・結果】 使用する金ナノ粒子は金イオンを L-酒石酸ナトリウム共存下で加熱還元することで合成した。得られた L-酒石酸還元金ナノ粒子コロイド分散水溶液に8種類のアミノ酸（アスパラギン酸、グルタミン酸、システイン、フェニルアラニン、トレオニン、ヒスチジン、リシン、アルギニン）を一定濃度で添加後、それぞれの経時変化を吸収スペクトルにより測定したところ、システインとリシンの場合に極大吸収波長の減少と長波長域での新たな吸収帯の出現が観測された。そこで、この2種のアミノ酸において不斉識別を様々な濃度領域で検討した結果、その変化に差異が見られた。従って、L-酒石酸還元金ナノ粒子はアミノ酸の選択的な検知能と不斉識別能を併せ持つことが明らかとなった。</p>	

O-3	<p>新規共有結合性 PPARγ アゴニストの構造活性相関及び推定結合様式の解析 ○宇津木 優樹¹, 小淵 裕菜², 河村 幸雄², Ahmed Salahelden Aboelhamd Atito³, 永尾 雅哉⁴, 磯田 博子⁵, 宮前 友策^{4,5} (¹筑波大・生物資源, ²京都女子大・食物栄養, ³筑波大院・グローバル教育院, ⁴京都大院・生命科学, ⁵筑波大院・生命環境)</p>
<p>【目的】核内受容体 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ)は、低分子リガンドにより活性化される転写因子であり、糖や脂質代謝の主要制御因子である。本グループは、以前、PPARγリガンド結合ポケットの特徴を利用した新規リガンド開発法を考案し、不可逆的アンタゴニスト GW9662 及び食品由来ケイヒ酸誘導体 (CA) の両者を融合させた構造を有する新規共有結合性アゴニストを創出した¹⁾。本研究では、両構造ユニットの接続様式が異なる類縁化合物を用いて構造活性相関の解析を行った。</p> <p>【方法・結果】GAL4-PPARγ融合タンパク質及び pUAS-Luc プラスミドを用いたレポーター遺伝子アッセイにより各化合物の PPARγ の転写活性化能を評価した結果、以下のことを明らかにした。1) GW9662 のアニリン環に対する CA の接続位置が活性に重要である。2) CA の二重結合の有無は活性に影響を与えない。3) GW9662 の塩素原子は活性に必要である。FT-LC-MS 及び recombinant PPARγ ligand-binding domain (LBD)を用いたローダミンマレイミドアッセイにより各化合物の Cys285 残基への共有結合形成能を評価した結果、塩素原子を有する全化合物は PPARγ LBD の Cys285 残基との共有結合を形成することが示された。さらに、Molegro Virtual Docker 6.0.1 を用いてドッキングシミュレーションによるアゴニスト型・非アゴニスト型化合物の推定結合様式を比較したところ、アゴニスト活性には PPARγ LBD の Ω ループ領域付近との相互作用が重要であることが示唆された。これらの推定結合様式は内在性リガンドの結合様式と類似した。^{1)Ohtera A. et al., ACS Chem. Biol. 2015, 10, 2794-2804.}</p>	

O-4	<p>ソホロオリゴ糖と配糖体を基質とする新規糖転移酵素の機能と構造 ○小林海渡¹, 清水久佳¹, 中島将博¹, 中井博之², 宮永顕正³, 田口速男¹ (¹東理大院・理工,²新潟大・農,³東工大・理学)</p>
<p>【目的】細菌由来 β-1,2-グルカナーゼ(SGL)が近年同定され、新たに Glycoside hydrolase (GH) family 144 が創設された。多くの SGL ホモログ遺伝子は遺伝子クラスターを形成するが、構成遺伝子には機能未同定の推定糖加水分解酵素が多くある。本研究では、その中から GH35 に属する酵素の機能・構造解析を行った。</p> <p>【方法・結果】<i>Ignavibacterium album</i>, <i>Chloroflexus</i> sp. Y-400-fl 由来の 2 種の GH35 酵素(IaSGT, ChSGT)を大腸菌内で発現させ、精製した。様々な糖鎖を用いて基質の探索を行ったところ、IaSGT と ChSGT は特異的にソホロ (β-1,2-グルコ) オリゴ糖(Sop_ns, n は重合度)に作用し、グルコース単位を転移する新規活性を示した。しかし、Sop_ns に対して両酵素とも反応速度論量の解析において高い K_m 値を示したことから、Sop_ns はドナーあるいはアクセプターとしては親和性が低いと考えられた。X 線結晶構造解析により IaSGT の Sop₂ 複合体構造を決定したところ、Sop₂ はサブサイト-1 から+1 へ結合していたため、Sop₂ は真のドナーと考えられた。そこで、各種グルコシド配糖体をアクセプターとして活性を調べたところ、IaSGT ではグリコンが Aryl 基や Alkyl 基をもつ α アノマーの配糖体に高い親和性を示した。一方で、ChSGT では配糖体に対しての親和性は低かった。また、IaSGT と配糖体の複合体構造ではアグリコン部分が疎水性残基に囲まれていた。以上から IaSGT において、ドナーは Sop_ns であり、Aryl 基や Alkyl 基をもつ α アノマーのグルコシド配糖体が真のアクセプターと考えられた。</p>	

O-5	<p>Structure and Function of Carbazole 1,9a-Dioxygenase in Dioxygenation Catalysis ○Yixia Wang¹, Jun Matsuzawa¹, Joydeep Chakraborty¹, Zui Fujimoto², Chiho Suzuki-Minakuchi^{1,3}, Kazunori Okada¹, Hideaki Nojiri^{1,3} (¹ BRC, UTokyo, ² Advanced Analysis Center, NARO, ³ CRIIM, UTokyo)</p>
<p>Objective Carbazole 1,9a-dioxygenase (designated as CARDO) are three-component Rieske non-heme iron oxygenase, consisting of ferredoxin reductase, ferredoxin and terminal oxygenase (Oxy). CARDO catalyzes the angular dioxygenation of aromatic compounds such as carbazole (CAR) which is predominant in coal tar creosote with toxicity and mutagenicity, by incorporating two oxygen atoms from dioxygen into an angular position to yield 2'-aminobiphenyl-2,3-diol (ABP-diol). To illustrate the catalytic cycle of the homo-trimeric Oxy, two pathways have been proposed according to the binding sequence of substrate and dioxygen. The present study aims towards revealing the mode of substrate binding, product formation and release during the catalytic cycle of CARDO.</p> <p>Results To date, we have solved the crystal structures of the reduced CAR-bound, the O₂-bound as well as the CAR plus O₂-bound Oxy at 2.2 Å resolution. Reduced CAR-bound structure showed that substrate bound to the active site caused closure of catalytic pocket by the shift of F204 and I231. O₂-bound structure displayed that even though dioxygen bound skewed side-on to the non-heme iron, no significant conformational changes were observed between the overall structures with/without dioxygen. The CAR plus O₂-bound structure indicated that in subunit A, a presumed alkylperoxo intermediate was first trapped at the active site; while in subunits B and C, the substrate was converted to the product (ABP-diol), and both F204 and I231 had returned back to open the pocket through which the product was ready to be released after protonation and reduction of the non-heme iron.</p>	

O-6	<p>内因性酸化ステロールがコレステロール代謝制御機構に及ぼす影響 ○齋藤 穂高¹, 山内 祥生¹, 佐藤 隆一郎¹ (¹ 東大院・農生科・応生化)</p>
<p>転写因子 SREBP-2 は小胞体にて SCAP と複合体を形成し、小胞体コレステロール含量依存的にコレステロール合成酵素群の発現を制御する。一方、小胞体に局在する Insig は SCAP と結合し、SREBP-2/SCAP 複合体を小胞体へ係留することで、SREBP-2 抑制因子として働く。さらに、コレステロール代謝産物である酸化ステロールは、Insig と結合し、SREBP-2/SCAP/Insig 三者複合体形成を促進することで、SREBP-2 の活性化を抑制する。これまでのほとんどの研究では、培地中に添加した“外因性”酸化ステロールが用いられており、コレステロール水酸化によって細胞内で産生された“内因性”酸化ステロールがコレステロール代謝へ及ぼす影響についての知見は乏しい。本研究では、酸化ステロール産生酵素として 25-Hydroxycholesterol (25-HC)を産生する CH25H と 7α-Hydroxycholesterol (7α-HC)を産生する CYP7A1 の発現がコレステロール代謝制御に及ぼす影響について検討した。まず、SREBP-2 標的遺伝子の HMG-CoA 合成酵素(HMGCS)のプロモータ領域を用いた Luc-assay を実施し、これらの酵素が HMGCS プロモータ活性に及ぼす影響を検討した。CH25H 過剰発現はそのプロモータ活性を約 50%抑制したが、CYP7A1 過剰発現ではその抑制はわずかであった。さらに、CH25H 過剰発現は SREBP-2 活性とその標的遺伝子の発現を顕著に抑制した他、Insig1 を安定化した。CYP7A1 過剰発現は SREBP-2 活性を抑制しなかった。以上の結果から、内因性 25-HC は Insig の安定化を介して SREBP-2 活性を抑制するが、CYP7A1 により産生される 7α-HC はコレステロール代謝制御に大きな影響を及ぼさないことが示された。</p>	

O-7	<p>カルボリン誘導体の小胞体グルコシダーゼ II 阻害による抗ウイルス活性 ○恩田 桃子¹, 石渡 明弘², 袴田 航¹, 平野 貴子¹, 伊藤 幸成², 遠矢 幸伸³, 西尾 俊幸¹ (¹日大院・生資科, ²理研・細胞制御化学, ³日大生資科・獣医)</p>
<p>【目的】ウイルス糖タンパク質の N-結合型糖鎖修飾の阻害は、ウイルスの感染・増殖を抑制する。我々は、本糖鎖修飾に関与する小胞体グルコシダーゼ II (GII) を標的酵素とし、天然化合物ライブラリから GII 阻害剤の探索を行い、非糖ミミックな構造を有するカルボリン誘導体を GII 阻害剤として見出した。得られたカルボリン誘導体の合成法を確立し、細胞毒性・GII 阻害活性について評価を行なった結果、多くの化合物が細胞レベルで GII 阻害活性を示し、その細胞毒性は総じて低毒性であった。そこで GII 阻害活性と抗ウイルス活性の関係を明らかとするため、カルボリン誘導体の GII 阻害時の N-結合型糖鎖プロセッシング経路の解明と、その抗ウイルス活性について評価を行った。</p> <p>【方法・結果】ヒト培養細胞にカルボリン誘導体を投与し、全糖鎖を回収・精製・ラベル化後、MALDI-TOF/MS により網羅的な N-結合型糖鎖解析を行った。その結果、GII 阻害によって生じる糖鎖 (Glc2Man9GlcNAc2) および阻害時に起こる糖鎖修飾によって生じる糖鎖、かつ GII 阻害による不良タンパク質の蓄積に基づく小胞体関連分解によって生じる遊離糖鎖を確認することができた。この結果はカルボリン誘導体がヒト細胞内で GII 阻害活性を有していることを示している。また、ネコ腎臓由来株化細胞を宿主としたネコヘルペスウイルス感染系における、カルボリン誘導体の抗ウイルス活性を測定した。その結果、カルボリン誘導体は既知 GII 阻害剤と比べて、1/10 の作用濃度で 5 倍の感染阻止効果を示し、抗ウイルス剤として高いポテンシャルを有していることが明らかとなった。</p>	

O-8	<p>オピオイド受容体 δ アゴニストによる腸炎病態改善効果 ○長田 和樹¹, 三浦 亮介¹, 長瀬 博², 八代 拓也¹, 西山 千春¹ (¹理科大・院基・生工, ²筑波大・国際統合睡眠医科学研究機構)</p>
<p>【目的】オピオイドとはモルヒネ様の麻薬性鎮痛薬に類似した機能を持つ物質の総称であり、麻薬や鎮痛薬、神経伝達物質を含む。この受容体は μ、δ、κ の 3 タイプ存在し、主に中枢神経系に発現している。近年 μ を受容体とするモルヒネが免疫細胞の機能を調節することが明らかになってきたが、δ や κ 受容体を介したシグナルが免疫応答に及ぼす影響についてはほとんど不明なままである。そこで本研究では免疫細胞に対するオピオイドの作用を選択的アゴニストを用いて明らかにすることを旨とした。</p> <p>【方法・結果】マウス DSS 誘導性大腸炎モデルにおいてオピオイド δ 受容体の作動薬である KNT-127 を投与すると体重減少や下痢など大腸炎の症状が改善された。拮抗薬 NTI を事前に投与すると症状改善が認められないことから、KNT-127 の効果がオピオイド δ 受容体を介したものであることが明らかになった。脳血液関門を通過しない末梢性の δ アゴニスト YNT-2715 を投与したマウスでも症状改善の傾向が認められ、オピオイドが末梢の細胞に影響を及ぼすことにより大腸炎の症状を改善する可能性が示された。マウスの腸管膜リンパ節から mRNA を抽出し、遺伝子発現を調べた結果、KNT-127 を投与した個体で <i>Il6</i>、<i>Tnfα</i>、<i>Il17a</i> など炎症性サイトカインの発現が上昇する傾向が認められた。培養マクロファージを用いた実験から KNT-127 が直接細胞に作用しサイトカイン産生を増幅していることも示唆されている。これらのことから、δ オピオイドによる大腸炎症状改善には、未知の因子が関わりと予想され、今後は症状改善の要因同定を進めるとともに、異なるマウスモデルを用いて KNT-127 の効果を検証していく。</p>	

O-9	<p>マウス摘出腸管における糖吸収に及ぼす酢酸投与のタイミングについて ○杉山 沙依美¹, 寺島 和哉², 石原 智³, 唐木 晋一郎⁴, 本間 知夫^{1,2} (¹前橋工大・生物工学, ²前橋工大院・生物工学, ³群馬県農技セ, ⁴静岡県大・食品栄養)</p>
<p>【目的】我々はキャベツ酢がマウス摘出腸管において、酸度依存的にグルコース吸収を抑制し、それは主成分である酢酸で起こることを報告してきた。酢酸によるグルコース吸収抑制機構を明らかにすべく、本研究では酢酸投与のタイミングがグルコース吸収に及ぼす影響を調べることを目的として実施した。</p> <p>【方法】4.5%酢酸溶液(pH3程度)はpH7.4に調製したものをサンプルとして使用した。マウス摘出小腸の上部2/3を6等分し、各部位の反転腸管標本(漿膜側にグルコースを含まないリンガー液(Glucose-free Ringer)を入れた)をそれぞれ作製した。各標本は、Glucose-free Ringerあるいは0.7%酢酸溶液を含むGlucose-free Ringer(酢酸Ringer)に入れ、37°C・混合ガス(95%O₂-5%CO₂)通気下、5分後にグルコース(作用濃度10mM)を添加した。添加20分後あるいは40分後に標本を取り出し、粘膜側及び漿膜側の各液のグルコース濃度を測定した。また、グルコース添加20分後に酢酸溶液(作用濃度0.7%)を標本が入った液中に添加し、さらにそれから20分後に標本を取り出し、同様に各液のグルコース濃度を測定した。</p> <p>【結果】これまでの実験では、酢酸とグルコースを初めから含むリンガー液に腸管標本を入れていた。今回はグルコースを含まず、酢酸を含むリンガー液に腸管標本を入れた後にグルコースを投与した。酢酸が無いとグルコース吸収量は時間と共に増えたが、酢酸存在下ではグルコース吸収は抑制された。さらにグルコース吸収を20分間起こさせた状態のところ酢酸を投与した場合、その後のグルコース吸収が抑制されたことから、酢酸によるグルコース吸収抑制はすぐに起こることが示唆された。</p>	

O-10	<p>標準BMIアスリートの腸内細菌叢解析 ○鈴木 基生¹, 中谷 浩崇², 上田 麻実¹, 富士川 凜太郎¹, 横田 真人^{1,2}, 世良 泰³, 鈴木 啓太¹ (¹AuB, ²TWOLAPS, ³慶應大・スポーツ医学総合センター,)</p>
<p>【背景・目的】腸内細菌叢の組成と日常の行動はお互いに影響を及ぼし合うことが明らかになっており、腸内細菌叢の機能が着目されている。我々はアスリートのパフォーマンスの向上、コンディションの維持をサポートすることを目標に、アスリートの腸内細菌叢を研究し、アスリートの腸内細菌叢は平均から外れているものが多いことを見出し、総会において発表した。しかし、アスリートは相撲やマラソンなど競技の特性による被験者のBMIの範囲が一般人よりも広く、見出した特徴は被験者のBMIによるものである可能性も示唆された。今回の解析は、標準BMIのアスリートを対象とし、BMIによる影響を除外することにより、アスリートの腸内細菌叢の一般人との違いを明らかにできるか検討することを目的とした。</p> <p>【方法・結果】これまでサンプルを採集したアスリート、一般人からBMIが20-25の男性被験者を選定し、アスリート72名、一般人54名での比較解析を行った。さらに、年齢による影響を除外するため、アスリート29名、一般人40名での比較解析も行った。腸内細菌叢は次世代シーケンサーによって16S rRNA遺伝子の配列情報から細菌組成データを得て解析した。既報では、ラットを用いた実験において、運動により短鎖脂肪酸を産生する菌が増加することが報告されている(1)。今回の解析により、この傾向がヒトにおいても示される結果を得た。</p> <p>1. Queipo-Ortuño MI et al. 2013 PLoS One. 28;8(5):e65465</p>	

O-11	<p>A novel gelsolin-like protein regulates growth and septum formation in filamentous fungi ○ Md. Abdulla Al Mamun¹, Takuya Katayama^{1,2}, Jun-ichi Maruyama^{1,2} (¹Dept. of Biotechnol., The Univ. of Tokyo, ²CRIIM, The Univ. of Tokyo)</p>
<p>Actin cytoskeleton plays a vital role for organisms by giving respective morphologies. In filamentous fungi, polarized hyphal growth and septum formation are major morphological features, which is regulated by actin dynamics. Hence, a unique machinery of actin dynamics directing at the hyphal tip and septum would be present in filamentous fungi. However, the specific components regulating actin dynamics have been insufficiently characterized to understand the unique morphological features in filamentous fungi.</p> <p>Here, by BLAST search in the filamentous fungus <i>Aspergillus oryzae</i>, we found an uncharacterized gelsolin-like protein (AO090005001233) that is conserved in other filamentous fungi but not in yeast. Gelsolin is generally known as an actin-modulating protein with severing activity. The <i>A. oryzae</i> gelsolin-like protein with 1,837 aa contains three gelsolin domains and a domain of unknown function (Pfam: DUF4045). The protein was localized at the hyphal tip, a site of ongoing septation, and the septal pore upon hyphal wounding. The gene deletion strain showed moderate growth defect, abnormally larger interval of septa, and inability to prevent excessive cytoplasmic loss at the septal pore upon hyphal wounding. In the fluorescence microscopy observation with actin marker Lifeact-GFP, the gene deletion caused overaccumulation of actin at the hyphal tip and failure to properly form the contractile actin ring typically seen during septation. Therefore, the present study indicated that the novel gelsolin-like protein regulates the growth/septum formation and maintains actin dynamics in filamentous fungi. Truncation analysis of individual domain in the gelsolin-like protein for function and localization is being performed.</p>	

O-12	<p>植物特異的な BZR 転写因子ファミリーの DNA 結合特異性の構造基盤 ○野崎 翔平¹, 宮川 拓也¹, 徐 玉群¹, 中村 顕¹, 平林 佳¹, 浅見 忠男¹, 中野 雄司², 田之倉 優¹ (¹東大院・農生科・応生化, ²理研 CSRS)</p>
<p>ブラシノステロイドは生長・発達および環境シグナル応答を制御する植物ホルモンである。ブラシノステロイドの情報はマスター転写因子 BIL1/BZR1 に伝達され、活性化した BIL1/BZR1 は数千の BR 応答遺伝子を直接制御する。BIL1/BZR1 は非典型的な basic helix-loop-helix (bHLH) ファミリー様の DNA 結合ドメインをもち、植物特異的な BZR ファミリーに分類される。BZR ファミリーは典型的な bHLH ファミリーと同様に、ゲノム上に点在する G-box 配列 (CACGTG) を認識するが、C₁A₂ 塩基に対する認識の厳密さが緩いという点で bHLH ファミリーとは異なる塩基配列認識の特異性をもつ。しかし、この 2 つのファミリー間における特異性の違いを説明する理由はこれまでわかっていなかった。そこで本研究では、BZR ファミリーに特徴的な塩基認識の仕組みを構造生物学的手法で解析した。シロイヌナズナ由来 BIL1/BZR1 の DNA 結合ドメインと G-box 配列を含む DNA との複合体の結晶を作製し、X 線結晶構造解析により立体構造を決定した。BIL1/BZR1 の C 末端領域は既知の bHLH ファミリーとは異なる構造をとることで、これまでに例のない二量体構造が形成されていることがわかった。興味深いことに、この二量体形成様式の違いに伴い、DNA に対する BIL1/BZR1 の塩基認識残基を含む α ヘリックスの配向が既知の bHLH ファミリーの配向と比べて大きく傾いていた。さらに、この α ヘリックスの配向変化に伴う DNA の構造制限と BIL1/BZR1-DNA 内で形成される特徴的な塩橋・水素結合ネットワークによって、C₁A₂ 塩基認識に係わる残基の配向が微調整され、C₁A₂ 塩基の認識を緩めていることがわかった。</p>	

O-13	<p>CRISPR/Cas9 を用いた低アミロースジャガイモの作出と交配による後代植物取得の検討 ○朝日貴大¹,大沼万里子¹,浅野賢治²,野田高弘²,草野博彰³,寺村浩¹,島田浩章¹ (¹東理大院・生物工,²農研機構北海道農業研究センター,³現京都大・生存研)</p>
<p>ジャガイモ塊茎のデンプンは25%のアミロースと75%のアミロペクチンから構成される。<i>GBSS I</i> 遺伝子を標的とする CRISPR/Cas9 を導入して、ゲノム編集の手法による低アミロースジャガイモの作出を試みた。この組換え体はジャガイモゲノムに含まれる4つのアレルの <i>GBSS I</i> 遺伝子のすべてに変異が生じており、この遺伝子の機能に変化が生じていると考えられた。これらの植物に生じた塊茎は低アミロースの形質を示したため、これらは低アミロース変異体であることがわかった。この変異体にはゲノム編集に用いた外来の <i>CRISPR/Cas9</i> 遺伝子が含まれているため、交配によりこの遺伝子を取り除き、Null-segregant 植物の取得を試みた。変異体作製に用いたジャガイモ品種「さやか」は、栄養生殖性が強く稔実率が低いいため、組換え体の安定的な開花条件と交配方法を検討した。その結果、25℃以下の室温で十分な光の下で栽培することで安定的に開花することがわかった。そこで、これらの条件で交配を行った。その結果、3個の果実が得られた。これらの果実から得られた種子のうち12個を播種したところ、6個体の T₁ 個体が発芽した。これらのうちの4個体について PCR を行い、<i>CRISPR/Cas9</i> 遺伝子が含まれているかどうかを検定したところ、1個体では <i>CRISPR/Cas9</i> が検出されなかった。このことから、この後代植物は <i>CRISPR/Cas9</i> が脱落した Null-segregant であることが示唆された。また、この方法で後代の Null-segregant 植物の取得が可能であることがわかった。(本研究の一部は内閣府イノベーション創造プログラム(SIP)「次世代農林水産業創造技術」(生研センター)によって実施された。)</p>	

O-14	<p>植物由来カフェ酸誘導体による神経細胞保護作用 ○繁森英幸¹, 宮前友策¹, 栗栖真奈美², 木立恵利², 谷野伸吾³, 松浦大輔³, 金谷裕敏³ (¹筑波大院・生命環境, ²筑波大院・生命環境, ³(株)バスクリン)</p>
<p>【目的】アルツハイマー型認知症 (AD) は、アミロイドβ (Aβ) が中枢神経系に蓄積することで強い神経細胞毒性が引き起こされ発症する。したがって、Aβ凝集を阻害することによって神経細胞が保護され、発症が抑制されると考えられている。一方で、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor ; HGF) は、神経炎症を抑制することで神経細胞保護作用を示すことが知られている。そこで本研究では、植物由来カフェ酸誘導体による上記の作用機序を介した神経細胞保護作用の解明を目的とした。</p> <p>【方法および結果】寄生植物アメリカネナシカズラやヤセウツボの抽出物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに逆相 HPLC を用いて 3,5-di-<i>O</i>-caffeoylquinic acid 等のカフェオイルキナ酸 (CQA) ならびに acteoside 等のフェニルエタノイド配糖体 (PHEG) を単離し、NMR および MS により構造同定した。これらのカフェ酸誘導体について、Aβ凝集阻害活性試験 (Th-T アッセイ、透過型電子顕微鏡による凝集形態観察) ならびに HGF 産生促進活性試験を行った。それぞれの活性試験について構造活性相関を調べた結果、いずれの活性発現にもカテコール構造の存在および数が重要であることが示唆された。以上の結果により、CQA 類や PHEG 類等のカフェ酸誘導体が、Aβ凝集阻害活性ならびに HGF 産生促進活性を有することで神経細胞保護作用を示すことを明らかにした。また、これらのカフェ酸誘導体は、サツマイモ、コーヒー、オリーブやゴマといった食品中にも含まれるため、AD 予防を目的とした機能性食品等への応用が期待される。</p>	

O-15	<p>活性酸素-Ca²⁺シグナルネットワークによる植物の発生・プログラム細胞死・ストレス応答の制御 ○朽津 和幸, 橋本 研志, 賀屋 秀隆, 花俣 繁, 来須 孝光, 北畑 信隆 (東京理科大理工)</p>
<p>植物は各細胞の自立的な応答性に基づく分散型の情報処理により個体全体を統御するシステムを進化させて来た。植物免疫, 環境ストレス応答, 先端成長・発生など植物の高次機能の基盤となる細胞内・細胞間シグナル伝達系, 細胞表層における情報統御系の根幹に, 活性酸素種(ROS)の積極的生成系と Ca²⁺濃度変化とが重要な役割を担っており, 積極的な ROS の生成を担う NADPH oxidase (NOX)はそのクロストークポイントに位置づけられる[1-3]。陸上植物の NOX/Rboh は, N 末端側細胞質領域に二つの Ca²⁺結合性 EF-hand を含む高度に保存された活性制御ドメインを持ち, Ca²⁺結合と種々のプロテインキナーゼを介したリン酸化により相乗的に活性化される[3-10]。Rboh を介した ROS の積極的生成のパターンは, 植物免疫の良い指標となる[11,12]ことから, それを利用してハイスループットスクリーニング系を構築し, 植物免疫活性化(抵抗性誘導)剤候補化合物(齊藤ら, 佐藤ら, 中野ら 本大会発表)や, 抑制化合物(北畑ら 本大会発表)の探索と作用機構の解析を進めている。シロイヌナズナの 10 種の Rboh のうち, RbohC, RbohH/J はそれぞれ根毛, 花粉に局在し, 両者が Ca²⁺により活性化され細胞壁空間(apoplast)に ROS を生成することが, 先端成長に重要な役割を果たす[5,10,13]。最近見出したゼニゴケの 2 種の欠損変異体の表現型にも触れながら, 制御された ROS 生成の調節機構, 生理的意義, 及びその進化について議論したい。</p> <p>[1] Kurusu <i>et al.</i> (2013) <i>Trends in Plant Sci</i> 18: 227-233; [2] Kärkönen and Kuchitsu (2015) <i>Phytochem</i> 112: 22-32 [3] Kurusu T <i>et al.</i> (2015) <i>Front Plant Sci</i> 6: 427; [4] Ogasawara Y <i>et al.</i> (2008) <i>J Biol Chem</i> 283: 8885-8892; [5] Takeda S <i>et al.</i> (2008) <i>Science</i> 319: 1241-1244; [6] Kimura S <i>et al.</i> (2012) <i>BBA</i> 1823: 398-405; [7] Kimura S <i>et al.</i> (2013) <i>J Biochem</i> 153: 191-195; [8] Drerup M <i>et al.</i> (2013) <i>Mol Plant</i> 6: 559-569; [9] Kawarazaki T <i>et al.</i> (2013) <i>BBA</i> 1833: 2775-2780; [10] Kaya H <i>et al.</i> (2014) <i>Plant Cell</i> 26: 1069-1080; [11] Kadota <i>et al.</i> (2005) <i>Plant Cell Physiol</i> 46: 156-165; [12] Kadota <i>et al.</i> (2006) <i>Plant Cell Physiol</i> 47: 1337-1342; [13] Kaya H <i>et al.</i> (2015) <i>Plant Signal Behav.</i> 10: e989050</p>	

一般講演

ポスター発表要旨

P-1	<p>フェナジノン天然物群の簡便合成法の開発 ○古波津 春希¹, 加茂 翔伍^{1,2}, 友重 秀介¹, 倉持 幸司¹ (¹東理大・理工, ²京府大院・生命環境)</p>
<p>【目的】 フェナジノン類は青色の天然色素であり、フェナジンの窒素原子がアルキル化された構造を有する。最も単純な化合物である Pyocyanin に加え、Lavanducyanin や Phenazinomycin、Marinocyanin など窒素原子上にテルペンやプレニル基が置換した天然物が単離されている。またこれら天然物群は、がん細胞に対する細胞毒性や抗菌活性など様々な生物活性を示すため、医農薬開発のリード化合物としても興味深い。しかしながら、Pyocyanin 以外のフェナジノン類の合成例は少ない。北原らが唯一 Lavanducyanin と Phenazinomycin の合成を達成しているが、フェナジンの窒素原子のアルキル化は進行しにくく、高圧条件等を用いても低収率であった。そこで我々は従来法とは異なるアプローチで、フェナジノン類の簡便で効率的な合成を目指した。</p> <p>【手法・結果】 我々は、モノアルキル化した <i>o</i>-フェニレンジアミン誘導体を、酸化剤存在下でピロガロールと縮合させることで様々なフェナジノン誘導体を一挙に合成できると考えた。まず、メチル基を導入した <i>o</i>-フェニレンジアミン誘導体から Pyocyanin を合成した。縮合反応において酸化剤や溶媒の検討を行った結果、酸素雰囲気下に 2-propanol を溶媒とする条件が最適であった。また同様の手法で Marinocyanin B の初の全合成に成功した。現在 Lavanducyanin 等の類縁体の合成に着手しており、合成品を用いた生物活性・物性評価への応用を目指す。</p>	

P-2	<p>Lycoperdic acid 両鏡像異性体の合成 ○西山 慧¹, 石内 隆太郎¹, 國澤 実希子¹, 勝田 亮², 矢島 新², 石神 健², 額田 恭郎² (¹東農大院・農, ²東農大・生命)</p>
<p>【目的】 天然には特徴的な生物活性を有する非タンパク質性アミノ酸が多く存在する。本研究では担子菌 <i>Lycoperdon perlatum</i> より単離された lycoperdic acid に注目した。本化合物はグルタミン酸の γ 位にブチロラクトンがスピロ結合した構造を有する。本化合物の生物活性は未解明であるが、強力な甘味を呈する monatin や神経毒性を持つ dysiherbaine に代表されるようなグルタミン酸類縁体と同様に顕著な生物活性を示すことが期待される。この事から我々は本化合物の生物活性の解明を目的として、両鏡像異性体の合成を試みた。合成に際しては導入する官能基を適宜選択することで monatin をはじめとするグルタミン酸類縁体にも応用可能な合成経路の確立を目指した。</p> <p>【方法・結果】 合成にあたり、両鏡像異性体が容易に入手可能なカンファースルタムを不斉補助基としたジアステレオ選択的 Diels-Alder 反応により三環性アミンを合成した。これを 3 段階でアミノシクロペンテノンとしたのち、求核付加反応と続くラクトンの形成により γ 位の置換基を構築した。二重結合の酸化開裂と二酸への酸化を経て lycoperdic acid の両鏡像異性体をそれぞれ 15 工程 2.9-3.7%の総収率で合成することに成功した。</p>	

P-3	<p>イオン性液体中でのキノン二量化反応による有用化合物の効率的合成 ○大貫真依¹, 太田元博², 加茂翔伍^{1,2}, 友重秀介¹, 椿一典², 倉持幸司¹ (¹東理大・理工, ²京府大院・生命環境)</p>
<p>【目的】イオン性液体は液体で存在する塩(えん)であり、一般的に蒸気圧がほとんど無く、不揮発性で難燃性または不燃性という特徴を持つ。さらに、回収することで再利用が可能ことから環境調和型反応溶媒としての利用が期待される。また、イオン対を組み合わせることで極性の制御が可能で、反応の選択性の向上も見込まれることから、これまでに無い新たな反応が進行する可能性を秘めている。私は、2-ブロモ-3-メチル-1,4-ナフトキノンと 2-メチル-1,4-ナフトキノンのイオン性液体中での二量化を検討したところ、一般的な有機溶媒中では全く進行しない新規二量化反応を開発したため、今回発表する。</p> <p>【方法・結果】まず 2-ブロモ-3-メチル-1,4-ナフトキノンを tetrabutylammonium bromide (TBAB) 中で加温したところ、5,7,12,14-ペンタセンテトロンを合成することに成功した。これは有機半導体であるペンタセン誘導体の前駆体として汎用性が高い。一方、2-メチル-1,4-ナフトキノンを同様の条件で反応させたところ、驚くべきことに五員環ジキノイド構造を有する 1-methylKuQuinone (KuQMe) が得られた。この化合物は医薬品や機能性色素としての利用が期待されている有用化合物である。また本反応はこれまでに報告が無い、メチル基の転位を伴った新規二量化反応であったことから反応機構の解明に取り組むことにした。さらに反応中間体の特定を行い、¹³C 標識化合物を用いて NMR 解析を行った結果、本反応は基質の二量化後に、酸臭化物を経由して KuQMe へ変換されるという機構で進行していることが強く示唆された。</p>	

P-4	<p>Paecilonic acid A の合成研究 ○的場 充弘, 森 直紀, 渡邊 秀典, 滝川 浩郷 (東大院・農生科・応生化)</p>
<p>【目的】 Paecilonic acid A は 2016 年に真菌 <i>Paecilomyces variotii</i> より単離、構造決定された脂肪酸化合物であり、その生物活性は明らかにされていない。本化合物の骨格的特徴として 4 つの不斉点を有するジオキサビシクロ[3.2.1]オクタン(以下 DOBCO)が挙げられる。抗 HIV 活性やガン細胞への細胞毒性などの有用な活性を示す DOBCO 化合物が報告されているため、本化合物の活性にも興味を持たれる。以上の背景より、我々は paecilonic acid A の効率的合成法の確立を目的として本研究に着手した。</p> <p>【方法・結果】 本研究における重要課題である DOBCO の構築は、プロリンを触媒とした分子内アルキル化によって行うものとした。まず、容易に調製可能なジオールと 10-ウンデセナールから得られるケトンとのアセタール化、および数段階の変換を経て、鍵反応の前駆体となるアルデヒドの合成を行った。続いて鍵反応であるプロリンによる分子内アルキル化の条件に附することで DOBCO の構築に成功した。現在は得られた DOBCO 化合物の目的物への変換を検討中である。</p>	

P-5	<p>1,4-ナフトキノンの新規骨格変換を利用した天然物合成 ○石井 優之介¹, 太田 元博², 友重 秀介¹, 椿 一典², 倉持 幸司¹ (¹東理大・理工, ²京府大院・生命環境)</p>
<p>【目的】 Methyl 2,3,7-trihydroxy-2-methyl-1-indanone-3-carboxylate はディオノン科の被子植物 <i>Triphyophyllum peltatum</i> の根から単離された天然物である。この化合物は単離が報告されているだけで、活性については報告されていない。この天然物の構造は Hooker 酸化の中間体と類似しているが、この中間体は不安定であり、通常の Hooker 酸化の条件では得られない。しかし、この中間体を確実に得られる条件さえ見出せば、天然物やインダノン化合物を簡便に合成できると考えた。そこで本研究では、ビタミン K₃ やプルンバギンから種々の基質を合成し、これら化合物から Hooker 酸化中間体を合成する骨格転位反応を検討することとした。そして、この反応を利用して天然物などの種々のインダノン化合物を合成し、合成化合物の中から有用な生物活性を有する化合物を見出すことを目標に設定した。</p> <p>【方法・結果】 本研究では、「酸素を用いた骨格転位反応」と「過酸化水素を用いた骨格転位反応」の2つの経路で骨格転位反応を検討した。前者では、低収率ではあるが、合計4種のインダノン化合物の合成に成功した。後者では、良好な収率で、所望のインダノン化合物の合成に成功した。さらに、本研究にて合成した Methyl 2,3,4-trihydroxy-2-methyl-1-indanone-3-carboxylate の ¹H NMR および ¹³C NMR は <i>Triphyophyllum peltatum</i> の根から単離された天然物とほぼ完全に一致した。このことから報告された天然物の提唱構造はベンゼン環上の水酸基の位置が異なっていることが示唆された。</p>	

P-6	<p>Pleurospiroketal 類の合成研究 ○帯津陽一, 木村真菜, 渡邊秀典, 滝川浩郷 (東大院・農生科)</p>
<p>【目的】 Pleurospiroketal 類は食用キノコのシロノタモギタケモドキより単離されたセスキテルペノイドであり、マクロファージで活性化された一酸化窒素の産生阻害活性を有している。我々は、この化合物の特徴的な構造および有用な生物活性に興味を持ち、合成に着手した。</p> <p>【結果】 Diels-Alder 反応を用いて容易に調製可能な既知化合物より Stille クロスカップリングなどを用いて鍵中間体を合成した。鍵中間体に対して酸化を行うことで、望みのスピロ環を構築することに成功した。現在は目的化合物への変換および、各工程の最適化条件の検討を行っている。</p>	

P-7	新規神経細胞保護物質 pestalotioquinol の作用機構解析 ○鶴川 幸音, 菅野 和紀, 鈴木 優華, 村上 裕信, 竹田 志郎, 紙透 伸治 (麻布大獣医)
<p>活性窒素は細胞に酸化ストレスを与え、細胞傷害を引き起こす。活性窒素による細胞傷害はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、炎症などとの関連が示唆されている。そこで、活性窒素である peroxynitrite (ONOO⁻) による細胞傷害から神経細胞を保護する化合物の探索を行なった。その結果、<i>Pestalotiopsis microspora</i> から新規神経細胞保護物質 pestalotioquinol を得た。この化合物は、神経様細胞に分化したラット副腎褐色細胞腫 (PC12) に前処理を行うことで、ONOO⁻ 供与体である 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) による細胞傷害から細胞を保護することを見出した。そこで本研究では、pestalotioquinol の作用機構解析を行った。</p> <p>まず、pestalotioquinol の神経細胞保護活性が SIN-1 による細胞傷害特異的であるか検討した。その結果、NO 供与体である NOR-3 による細胞傷害に対しては神経細胞保護活性を示したが、活性酸素産生を誘発する 2-methyl-1,4-naphthoquinone (menadione), rotenone や過酸化水素による細胞傷害に対しては神経細胞保護活性を示さなかった。この結果より、pestalotioquinol の神経細胞保護活性は活性窒素種特異的であることが示唆された。</p>	

P-8	ショウガオールが骨格筋細胞に与える影響 ○栗山恵弥 ¹ , 田中光 ² , 田中直子 ¹ (¹ 大妻女子大・食物, ² 東邦大・薬)
<p>【目的】ショウガの辛味成分にはジンゲロール、ショウガオール、ジンゲロンがある。その中でも主要辛味成分であるジンゲロールは熱に不安定な化合物で、加熱により簡単に脱水反応を起こしショウガオールに変わることがわかっている。ショウガ辛味成分には、代謝促進、血糖降下作用、抗炎症作用があることが報告されているが、骨格筋に対する代謝促進効果の結果、運動機能にどのような影響があるか調べた研究は少ない。本研究ではショウガ辛味成分の摂取が筋肉の機能や運動能力に与える影響に着目することとし、今回はショウガオールが与える影響を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】マウス由来筋芽細胞株 C2C12 細胞を分化誘導培地中で 7 日間培養後、0~50 nM のショウガオールを含む培地に交換し、電気刺激装置 C-Dish (IonOptix 社) を用いて 24 時間 16.7V/25 mm の電気刺激を与えた細胞と与えない細胞とについて、筋分化に関わるタンパク質、ミオシン重鎖 (Myh2)、さらにエネルギー代謝、炎症に関わるタンパク質の mRNA 発現を、RealTimePCR (SYBR 法) を用いて定量した。</p> <p>【結果および考察】ショウガオールは電気刺激を与えない C2C12 筋管細胞に対し、筋分化を促進して筋タンパク質の発現を増加させ、また糖の取り込みおよび代謝に関わるタンパク質の mRNA 発現量も増加させた。一方、電気刺激下では筋原線維への分化が若干抑えられ、および糖代謝に関わるタンパク質の発現も抑制される傾向がみられた。ショウガオールは、主に運動刺激のかからない状態で筋分化を促進する効果があることが示された。</p>	

P-9	<p><i>Pestalotiopsis microspora</i> が生産する神経細胞保護活性物質の単離と構造決定 ○菅野 和紀¹, 鶴川 幸音¹, 柴崎 久宣¹, 村上 裕信¹, 内山 淳平¹, 倉持 幸司², 紙透 伸治¹ (¹麻布大・獣医, ²東理大・理工)</p>
<p>微生物の二次代謝産物は様々な生理活性を有しており、医薬品や農薬などの開発を目的に研究されている。真菌の二次代謝産物からは、有用な生理活性を有する物質が数多く報告されている。真菌の二次代謝産物から単離された抗生物質の代表例としてペニシリンやシクロスポリンなどが挙げられる。そこで我々は真菌の二次代謝産物から天然有機化合物ライブラリーを作製し、様々な生理活性試験を行うことで新規生理活性物質を探索している。今回、<i>Pestalotiopsis microspora</i> の培養液中から神経細胞保護活性を有する新規キノールを単離、構造決定したので報告する。</p> <p>日本各地の海洋や土壌で動植物を採取し、付着している真菌を単離し、液体培地で約3週間培養した。培養液を有機溶媒で抽出し、粗抽出物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで分画し、神経細胞保護活性やがん細胞増殖抑制活性試験など様々な活性試験を行った。その結果、神奈川県で採取した葉より分離した <i>P.microspora</i> が生産する化合物が神経細胞保護活性を持つことが示唆された。そこでこの菌を PDB 培地で 21 日間静置培養し、培養液をジクロロメタンで抽出した。得られた粗抽出物をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物を単離した。化合物を MS や NMR を用いて解析し、構造を決定した。この化合物はキノールを有する新規化合物であり、<i>pestalotioquinol</i> と名付けた。</p>	

P-10	<p>オレフィンのイメージング質量分析：Ag⁺アダクトによる検出感度の向上 赤羽宏之, 小宮桂太郎, 権田貴大, 渡部春香, 山根久和, 榎元廣文 (帝京大・理工・バイオ)</p>
<p>【目的】オレフィンとはC=C結合をもつ炭化水素化合物である。近年、脱離エレクトロスプレーイオン化を用いたイメージング質量分析(IMS)において、オレフィンをAg⁺のアダクトにすることで、検出感度が向上することが報告されている。そこで本研究では、IMSに用いられる主なイオン化法の一つであるマトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)-IMSにおける、オレフィンの検出感度に及ぼすAg⁺アダクトの影響を調べた。</p> <p>【方法・結果】オレフィンとして、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、および植物におけるリノレン酸の代謝物である12-オキソ-フィトジエン酸の標準品を用いた。各標準品のメタノール溶液を、2,5-ジヒドロキシ安息香酸(DHB)および硝酸銀を添加したDHBと混合し、ポジティブイオンモードでMALDI-IMSを行った。その結果、DHBのみではどの標準品の[M+H]⁺イオンもほとんど検出されなかったが、硝酸銀の添加によって全ての標準品で[M+Ag]⁺イオンが検出された。次に、1,5-ジアミノナフタレン、9-アミノアクリジン、α-シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸およびDHBに硝酸銀を添加し、各標準品のMALDI-IMSを行ったところ、DHBが最も検出感度が高かった。最後に、硝酸銀を添加したDHBを用いてインゲンマメ未熟種子のメタノール抽出液を測定したところ、オレイン酸、リノール酸、およびリノレン酸の[M+Ag]⁺イオンが検出された。以上の結果より、MALDI-IMSにおいても、Ag⁺のアダクトを形成させることでオレフィンの検出感度が向上することが示唆された。</p>	

P-11	Vibsanin A 誘導体の生物活性評価および標的分子の同定 ○三浦 一輝, 松木 渉, 高尾 賢一, 清水 史郎 (慶應大・理工)
<p>【目的】 Vibsanin (Vib) は <i>Viburnum odoratissimum</i> (サンゴジュ) から単離されたジテルペンであり、11 員環炭素骨格を有する Vib A, B および F、7 員環炭素骨格の Vib C, D および E の計 6 種類の類縁体が天然より単離されている。これら Vib 類縁体のなかでも、Vib A には魚毒活性、プロテインキナーゼ C の活性化を介した白血病細胞分化誘導活性など多様な生物活性を有することが報告されており、Vib A が他にも新規生物活性を有する可能性が考えられる。そこで本研究では、がん細胞に対する増殖抑制活性を指標とし、これまでの Vib A の構造活性相関研究で得られた Vib A analog A - D (VAA - VAD) の生物活性評価を行い、さらに細胞増殖抑制活性が確認された場合は標的分子の同定を研究目的とした。</p> <p>【方法・結果】 まず初めに Vib A および VAA - VAD について、がん細胞増殖抑制活性を有するかを確認するため、10 種類のヒト由来がん細胞に対して化合物を処理し、MTT Assay により生物活性評価および 50%効果濃度 (EC₅₀) を算出した。その結果、Vib A 誘導体のなかでも VAC が全てのがん細胞に対して数 μM 程度の濃度で強いがん細胞増殖抑制活性を示した。VAC が強いがん細胞増殖抑制活性を示したため、次に VAC の標的分子の同定を行うこととし、ヒト培養細胞に VAC を処理した際に変化するシグナル伝達経路を解析することで VAC の標的分子の同定を試みた。その結果、AKT (T308) および p70S6K (T389) のリン酸化が抑制され、VAC は細胞増殖に関与するシグナル伝達経路を阻害することでがん細胞増殖抑制活性を示すことが示唆された。現在はより詳細な解析を行い VAC の標的分子の同定を試みている。</p>	

P-12	トポロジー解析による DPY19L1 の C-mannosyltransferase 活性中心の探索 ○横山典弘, 柳原凌太郎, 三浦一輝, 丹羽祐貴, 清水史郎 (慶應大・理工)
<p>【目的】 C-mannosylation はタンパク質翻訳後修飾の 1 つであり、小胞体 (ER) 内腔において Trp のインドール環 2 位の炭素に α-mannose が C-mannosyltransferase によって付加する反応である。これまで当研究室において DPY19L3 が R-spondin1 の C-mannosyltransferase であることを報告し、近年ヒト DPY19L3 のファミリーである DPY19L1 も C-mannosyltransferase としての活性を有していることが明らかになった。そこで我々は膜貫通タンパク質である DPY19L1 の膜貫通領域 (TMD) を識別し、非膜貫通領域に局在しているアミノ酸鎖 (loop) の配向の同定を行い、すでに当研究室で決定している DPY19L3 のトポロジーとの比較を行うことによる C-mannosyltransferase の活性中心および基質特異性を示すアミノ酸配列の同定を目的とした。</p> <p>【方法・結果】 <i>In silico</i> 解析により DPY19L1 の TMD が 13 個存在していることが予測された。その予測に基づいて ER 内腔と細胞質の酸化還元状態の違いを用いた解析法である redox-sensitive luciferase assay を行うことによって、非膜貫通領域の loop 配向を解析した。その結果、DPY19L1 の N 末端領域は ER 内腔に存在していた。また TMD 間における loop の局在を現在までに 10 カ所同定した。以上の結果と DPY19L3 の既知のトポロジー解析結果を比較することによって、DPY19L1 と DPY19L3 の N 末端側のトポロジーが大きく異なることが示唆された。</p>	

P-13	<p>放線菌由来シトクロム P450 の基質特異性の解明 ○樋澤 芽依¹, 瀬瀬 健人², 庄村 康人¹ (¹茨城大・院理工, ²協和発酵バイオ)</p>
<p>【目的】シトクロム P450 は活性部位にヘムを持つモノオキシゲナーゼであり、多様な化合物を水酸化する機能を持つことから、基質特異性の改変による産業利用への展開が期待されている。我々は今回、ステロイド骨格をもつ化合物を基質とする <i>Stackebrandtia nassauensis</i> 由来のシトクロム P450(P450_{Sn}) 及び <i>Actinopolymorpha alba</i> 由来の P450(P450_{Aa}) を研究対象とし、これらの X 線結晶構造解析により基質認識機構を原子レベルで明らかにし、基質特異性の改変に向けた構造基盤を確立することを目的とした。</p> <p>【方法・結果】目的タンパク質は大腸菌による大量発現系を用いて産生し、その後アフィニティーカラム、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラムにより精製を行い、結晶化標品とした。P450_{Sn} は結晶化の際にイミダゾールを添加することで良質な結晶が得られ、イミダゾールを含まない溶液に浸漬したものをアポ型結晶とした。P450_{Aa} では結晶化の際にステロイド骨格を持つ化合物である、デオキシコール酸を基質として添加した条件から基質結合型とアポ型の結晶が得られ、それぞれ最高分解能 2.0 Å、2.4 Å で構造を決定した。P450_{Aa} のデオキシコール酸結合型と P450_{Aa} アポ型の構造比較では全体的に大きな変化は見られなかった。しかし P450_{Aa} と P450_{Sn} のアポ型同士の構造比較では基質結合部位周辺に構造の多様性が確認され、特に B-ヘリックスを中心としたループに顕著な違いが見られた。本発表では P450_{Aa} デオキシコール酸結合型とアポ型の構造比較、及び P450_{Sn} と P450_{Aa} のアポ型同士の詳細な基質結合部位の構造比較を、分光学的解析の結果と合わせて報告する。</p>	

P-14	<p>ヒト C 型糖転移酵素 DPY19L3 のプロモーター解析 ○吉本 哲, 三浦 一輝, 清水 史郎 (慶應大・理工)</p>
<p>【目的】タンパク質の糖修飾の一つである C-mannosylation は、W-X-X-W/C(X:任意のアミノ酸)というコンセンサス配列内の N 末端側のトリプトファン残基に α-マンノースを付加する報告例の少ない糖付加反応である。C-mannosylation は、酵素活性、タンパク質分泌、細胞内シグナル伝達に影響を及ぼすことが報告されている。DPY19L3 は、分泌型タンパク質 R-spondin1 の C 型糖転移酵素の一つである。しかし、DPY19L3 の遺伝子発現制御機構は、未だ明らかになっていない。本研究では、DPY19L3 の遺伝子発現制御機構を明らかにすることで、C-mannosylation の機能解明を研究目的とした。</p> <p>【方法・結果】ヒト DPY19L3 遺伝子のプロモーター領域を決定するため、転写開始点から上流 2050 塩基、1868 塩基、1655 塩基、1500 塩基の配列の下流にルシフェラーゼを組み込んだプラスミドを HEK293T 細胞にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、-1655 から-1501 の間の 155bp が、転写活性に重要な領域であることを明らかにした。次に領域内に結合する転写因子を明らかにするため、オンラインソフトウェアである TF bind を用い転写因子の予測を行った。その結果、数種の転写因子が予測されたため、これら予測された候補転写因子の結合配列に変異を加え、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、結合配列に変異を加えたいくつかの転写因子において、発光量の有意な減少が見られた。以上より、ヒト DPY19L3 の遺伝子発現を制御する領域を決定し、その発現制御に関与している転写因子の候補を絞り込んだ。</p>	

P-15	<p>L-アミノ酸リガーゼを用いた生理活性ペプチドの <i>in vivo</i> 合成系の確立 ○清野 里々花¹, 矢ヶ崎 誠², 庄村 康人¹ (¹茨城大・院理工, ²協和発酵バイオ(株))</p>
<p>【目的】アミノ酸は重合してジペプチドを形成し、アミノ酸単体にはない生理活性を示すことがある。L-アミノ酸リガーゼ (LAL) は ATP 依存的に L-アミノ酸の脱水縮合を触媒する。L-アミノ酸に保護基の導入を必要とせず、反応が水系でかつ温和な条件で進行することから、環境への負荷が少ない生産プロセスへの応用が期待されている。本研究では天然に存在する LAL の基質特異性の改変を目的とし、部位特異的変異体の調製および大腸菌によるジペプチド合成系の開発を進めた。</p> <p>【方法・結果】LAL が本来基質としない L-アミノ酸を取り込むような変異体を X 線結晶構造をもとに設計・調製し、変異体発現ベクターで大腸菌を形質転換した。枯草菌由来 LAL (BacD) に対しては、酸性アミノ酸を取り込ませることを目的とした。アミノ酸依存的な ATPase 活性が見られたものについて、酸性アミノ酸および L-フェニルアラニンの存在下で 24 時間培養し、培地成分の上清を高速液体クロマトグラフィーにより分析した。BacD 変異体は酸性アミノ酸を含むジペプチドを合成していなかったが、野生体とは異なるジペプチド産生を行っていることがわかった。生理学的な基質は明らかにされていないが幅広い L-アミノ酸を基質とする青枯病菌由来 LAL (RSp1486a) に対しては、抗不安薬として利用可能な Tyr-Leu を合成させることを目的とした。RSp1486a 変異体のアミノ酸依存的な ATPase 活性をもとに有望な変異体の探索を進めている。有望な変異体については BacD と同様に <i>in vivo</i> でのジペプチド産生を目指す。</p>	

P-16	<p>R-spondin1 におけるリン酸化の機能解析 ○西谷 拓海¹, 鈴木 健裕², 丹羽 祐貴¹, 三浦 一輝¹, 堂前 直², 清水 史郎¹ (¹慶應大・理工, ²理研・CSRS)</p>
<p>【目的】R-spondin1 (Rspo1) は性別決定や卵巣の発達、幹細胞分裂の促進など多岐にわたる細胞機能に影響を与える分泌型タンパク質である。Rspo1 は細胞外に分泌後、Wnt/β-catenin signaling のアゴニストとして機能するため、がんの悪性化に関与することが報告されている。それゆえ、Rspo1 について調べることでがん化と Rspo1 の関係を解明することが可能となる。そこで本研究では、Rspo1 の翻訳後修飾に着目し、機能に影響を及ぼすか否か解析をした。</p> <p>【方法・結果】Rspo1 のリン酸化の有無を明らかにするため、野生型 Rspo1 の安定過剰発現細胞株を樹立後、リコンビナントタンパク質を粗精製し、LC-MS 解析を行った。その結果、Rspo1 の Ser33 のみがリン酸化されていることを初めて見出した。次に、リン酸化されない変異型 (S33A) やリン酸基の負電荷を模倣した変異型 (S33D, S33E) の安定過剰発現細胞株を樹立後、野生型との比較実験によって、リン酸化が Rspo1 の機能に与える影響を評価した。その結果、野生型と比較して各変異型の細胞内局在は変化していなかった。一方で、細胞外分泌量及び Wnt/β-catenin signaling 促進効果は変化していた。これらのことから、Rspo1 の Ser33 におけるリン酸化は Rspo1 の機能を制御していることが明らかになった。現在、リン酸化を触媒する酵素の同定を行っている。</p>	

P-17	<p>翻訳エンハンサーと誘導型プロモーターによる植物用 TALEN system の高度化 ○小野寺 瞳¹, 新宮 沙絵子¹, 大沼 万里子¹, 堀江 峻晃¹, 紀平 望帆², 草野 博彰³, 寺村 浩¹, 島田 浩章¹ (¹東京理科大・生物工, ²奈良先端大・バイオサイエンス, ³京大・生存圏研)</p>
<p>【目的】 TALEN は標的配列を特異的に認識し, DNA 二本鎖切断を引き起こすことで変異を誘発させる人工ヌクレアーゼである。配列特異性が高いため, オフターゲットがほとんど誘発されないという特徴を有する。我々は, これまでに Gateway システムを利用した植物用 TALEN ベクターの簡便な構築システム: Emerald Gateway TALEN system を開発している。本研究では, このシステムの性能向上を目指した。</p> <p>【方法・結果】 イネの dMac3 は ORF 下流の翻訳効率を高める翻訳エンハンサーである。我々は, TALEN 遺伝子の上流に dMac3 を組み込んだ (Emerald Gateway dxTALEN system)。これにより, TALEN の産生量の増大による変異効率の向上に成功した。次に, グルココルチコイド処理により一過的に強い発現をもたらす薬剤誘導型プロモーターをこのシステムに組み込んだ。この条件発現システムでは, グルココルチコイド処理時に変異効率が高まることを期待した。これらのシステムを用いてイネのプロテアーゼ遺伝子を標的とする TALEN 遺伝子を構築し, イネ培養細胞に導入した。形質転換細胞からゲノム DNA を抽出し, CAPS 解析により標的部位での変異を調べたところ, 高い頻度で変異が検出されることが分かった。これらの結果から, 翻訳エンハンサー: dMac3 と誘導型プロモーターの利用が, TALEN によるゲノム編集システムの高度化に有益であることが示唆された。</p>	

P-18	<p><i>Paracoccus</i> sp. 由来 <i>scyllo</i>-inositol dehydrogenase の構造と基質特異性に関する解析 ○鈴木 麻佑¹, 伊藤 晋作², 佐々木 康幸², 中村 顕³, 矢嶋 俊介² (¹東農大院・バイオ, ²東農大・生命バイオ, ³筑波大・生命環境)</p>
<p>【目的】 D-グルコースは生命の主要なエネルギー源であるが, その鏡像異性体である L-グルコースは, 天然にはほとんど存在しないためこれを資化する生物はいないと考えられていた。しかし近年, L-グルコースを資化する微生物, <i>Paracoccus laeviglucoosivorans</i> が単離され, NAD⁺依存的に L-グルコースを酸化する活性を有する <i>scyllo</i>-inositol dehydrogenase (PI-sIDH)が発見された。生物が栄養源とすることが無いとされていた L-グルコースを基質とすることから, その基質認識, 触媒機構を解明することで, 糖と酵素の反応における新たな知見が得られると考えられた。我々は, 既に PI-sIDH と NAD⁺との複合体構造を報告している。今回は, NAD⁺と結合していない, apo 型の PI-sIDH の立体構造解析を行った。また基質となることが既に明らかとなっている <i>scyllo</i>/<i>myo</i>-inositol, L-glucose 以外の D-glucose, D/L-xylose, D/L-arabinose, D/L-fucose について活性測定を試みた。</p> <p>【方法・結果】 <i>P. laeviglucoosivorans</i> 株由来の <i>lgdA</i> 遺伝子に C 末端に 6 x His-tag をつけた遺伝子を pET21a(+)に組み込み, BL21(DE3)に導入した株を用いた。精製タンパクを濃縮し, ハンギング・ドロップ蒸気拡散法により 20 °Cで結晶を得た。分子置換法により初期構造を決定, 精密化を行い, 最終的に 2.2 Å 分解能で構造を得ることに成功した。また活性測定では, 10 mM NAD⁺を加えた基質溶液に 200µl/ml の酵素溶液を加え, 波長 340 nm の吸光値を測定した。その結果, 活性を示す基質に共通の構造があると考えられた。</p>	

P-19	<p>Predominant Contribution of Lysine derived Advanced Glycation End Products (AGEs) in BSA binding to Receptor for AGEs ○Ganesh Deepak^{1,2}, Kyoto Torigoe², Miyuki Kumano-Kuramochi², Sachiko Machida², Toshiro Kobori^{1,2} (¹筑波大院・生命環境, ²農研機構)</p>
<p>【目的】 Advanced Glycation End Products (AGEs) are formed by a reaction of sugars or di-carbonyl compounds with free amines/amino group of proteins. AGEs are produced endogenously and can also be acquired from dietary sources. It is known that some AGEs bind to receptor of AGE (RAGE) inducing signal transduction linked with diabetic complications. AGEs are formed on lysine (Carboxyethyl lysine) and arginine (methylglyoxal hydroimidazolone) residues on a protein, whereas pentosidine is formed as a crosslinking between them. Although elucidating a molecular mechanism of AGEs-RAGE binding grabs attention, contribution of lysine- and arginine-derived AGEs on a protein binding to RAGE is still in void.</p> <p>【方法・結果】In this study, native BSA and lysine-methylated BSA (Me-BSA) were modified with MGO to clarify an effect of lysine-derived AGEs on RAGE binding. Binding assay using purified RAGE clearly shows that lysine methylation in BSA resulted in loss of binding ability to RAGE, even after its modification with MGO. This also indicates that AGEs formed on arginine from high concentration of MGO may not have significant impact on RAGE binding. The modification of lysine and arginine in BSA was assessed through fluorometric quantification and LCMS/MS analysis, suggesting that arginine-derived AGEs were produced in methylglyoxal-modified BSA and Me-BSA. From these results we would discuss predominant contribution of lysine-derived AGEs contribution in binding of AGEs to RAGE produced on BSA by MGO.</p>	

P-20	<p>Extraction of enzymatic inhibitors from unused parts of brown seaweed <i>Undaria pinnatifida</i> ○Shipeng Yin, Mario Shibata, Tomoaki Hagiwara (Tokyo University of Marine Science and Technology; TUMSAT)</p>
<p>【Introduction】</p> <p>The stems of some seaweeds have not been utilized because they are too hard to be masticated. In this study, the extraction of enzymatic inhibitors (α-amylase and glucoamylase) by using various solvents from the stem of the brown seaweed <i>Undaria pinnatifida</i> were carried out. In addition, the amounts of epicatechin, fucoxanthin, total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) in the extracts were also measured.</p> <p>【Materials and Method・Results】</p> <p>Freeze-dried and pulverized stem of <i>Undaria pinnatifida</i> was used as an extraction material. Six different types of solvents water, acetone, methanol, ethanol, a mixture of methanol and acetone, and supercritical carbon dioxide (SC-CO₂; 40 °C, 3000 psi), were used as an extraction medium. In case of SC-CO₂ extraction, ethanol was mixed with the pulverized stem of <i>Undaria pinnatifida</i> as a co-solvent before extraction. The inhibitory activities of α-amylase and glucoamylase were measured based on Michaelis-Menten equation. The measurement of epicatechin, fucoxanthin, TPC and TFC contents were carried out by HPLC. Among the six different solvents, SC-CO₂ showed relative high levels of the inhibitory activities, epicatechin, fucoxanthin TPC and TFC. This suggested that SC-CO₂ extraction with ethanol as a co-solvent is a potentially promising method for efficient utilization of unused part of seaweeds.</p>	

P-21	<p>サクランボ中の糖類および有機酸類のイメージング質量分析法による可視化 ○清水ほのか, 小川陽暉, 海士紗希, 瀧弘貴, 山根久和, 榎元廣文 (帝京大・理工・バイオ)</p>
<p>【目的】甘味成分である糖類, および酸味成分である有機酸類は, 果物の美味しさにおいて重要な成分である。しかし, その分布はほとんど明らかになっていない。イメージング質量分析法 (IMS) は, 組織切片上を二次元的に質量分析することで生体分子を可視化する手法である。これまでの研究で, 私たちは IMS を用いてイチゴ中の糖類および有機酸類を可視化し, その分布を明らかにした¹⁾。そこで本研究では, サクランボ中の糖類および有機酸類の IMS による可視化を試みた。</p> <p>【方法・結果】始めに, サクランボの切片化条件の検討を行った。凍結固定のみで, クライオスタットを用いて厚さ 100μm 以下で, 本来の構造を保った切片を作成することができた。この切片を, 酸化インジウムスズ (ITO) をコートされたスライドガラスに接着させる際, 常温の ITO コートスライドガラスを用いることで, 本来の構造を保ったまま接着させることができた。続いて, マトリックスに 2,5-ジヒドロキシ安息香酸を塗布し, 飛行時間型 (TOF) /TOF タイプの質量分析計を用いて, ポジティブイオンモードで測定を行った。その結果, サクランボ切片上より, 主要な糖類であるヘキソースとスクロース, および有機酸類であるクエン酸が [M+K]⁺イオンとして検出された。これらのイオンを画像化したところ, サクランボ中において, これらの成分が特徴的な分布をしていることが明らかとなった。以上の結果より, IMS はサクランボ中の糖類および有機酸類の分布可視化に有効な手法であることが示唆された。</p> <p>1) Enomoto et al., <i>J Agric Food Chem</i>, 66, 4958-4965, 2018.</p>	

P-22	<p>糖化ソバアルブミンの食後血糖値上昇抑制作用 ○萩尾 泰成¹, 茂木 崇¹, 濱田 彩¹, 二宮 和美², 山口 勇将¹, 赤尾 真¹, 熊谷 仁², 熊谷 日登美¹ (¹日大・生資科, ²共立女子・家政)</p>
<p>【目的】糖尿病の予防と治療には, 食後の血糖値上昇を穏やかにする食品の摂取が有効である。我々は, ソバ粉中のアルブミン (BWA) とデンプンをラットに同時摂取させた際に, α-アミラーゼを阻害することにより食後血糖値上昇が抑制されることを明らかにしている。一方, 多糖には, 難消化性で様々な物質を吸着し, その吸収を阻害する作用を持つものがある。そのような多糖で BWA を修飾し, α-アミラーゼ阻害作用と糖吸着作用の両方を併せ持った化合物を作製することができれば, 単糖を摂取した際にも食後血糖値上昇抑制作用が期待できる。そこで本研究では, メイラード反応により BWA に多糖を修飾した糖化 BWA を作製し, これをデンプンまたはグルコースと共にラットに投与し, 糖化 BWA の食後血糖値上昇抑制作用について検討した。</p> <p>【方法】メイラード反応により BWA と種々の多糖 (Dextran, Locust bean gum, Guar gum, Xanthan gum) を結合し, TNP 法によるアミノ基の定量および SDS-PAGE により糖修飾を確認した。さらに, 糖化 BWA を用いて経口デンプン負荷試験 (OSTT) および経口グルコース負荷試験 (OGTT) を行った。</p> <p>【結果】BWA の糖修飾はローカストビーンガムのみで確認でき, α-アミラーゼ阻害活性も保持されていた。OSTT においては糖化 BWA 投与により, 血糖値と血中インスリン濃度の上昇が抑制された。OGTT においては, 糖化 BWA 投与により血糖値のピークが未投与群よりも 15 分遅延した。ローカストビーンガムを修飾した WBA は, 糖尿病予防のためのより優れた機能性食品素材としての利用が期待できる。</p>	

P-23	穀類に含まれるオリザノール様成分の抗酸化特性 ○都築 和香子, 今場 司朗, 小竹 英一 (農研機構・食品研究部門)
<p>【目的】米ぬかのγオリザノールは、フェルラ酸に各種の植物ステロールあるいはトリテルペンアルコールがエステル結合した脂溶性機能成分であり、食品添加物や神経作動薬として利用されている。近年、このγオリザノールと同様の化合物（オリザノール様成分）が、米以外の穀類、小麦、ライ麦、コーン等にも存在し、オリザノール様成分の植物ステロール部分の組成が種特異的であることもわかってきている（Biosci. Biotechnol. Biochem. 81.573-580, 2017）。オリザノール様成分の生理機能性は、各成分の分子構造に依存して異なることが知られている。本研究においては、各穀類のオリザノール様成分の利用拡大を目的として、穀類より抽出したオリザノール様成分の抗酸化特性について調べた。</p> <p>【方法・結果】定法に従って玄米、玄麦および玄アワよりオリザノール様成分を抽出し、固相カラムで精製した。オリザノール様成分は HPLC-UV 法で分析、定量した。精製した各穀類オリザノール様成分の抗酸化能について、PAO-SO 法（還元力）、DPPH 法（電子供与）、DPPP 法（脂質ラジカルに対する抗酸化能）キレート能評価法で評価した。また、標準品シクロアルテニルフェルレイト（市販品）、標準品γオリザノール（市販品）、フェルラ酸（市販品）、αトコフェロールの各抗酸化能と比較した。特に、DPPP 法による脂質ラジカルに対する各成分の抗酸化能については、各種の不飽和脂肪酸についての詳細な検討を行った。その結果、オリザノール様成分の植物ステロール部分の構造が、抗酸化能の反応特性に影響することがわかった。</p>	

P-24	スルフォラフェン高含有ダイコンスプラウトの栽培とその抽出物の第二相解毒酵素誘導活性 ○小川 一樹, 古崎 華央, 清水 元海, 山口 勇将, 伊藤 紘子, 赤尾 真, 野口 章, 長谷川 功, 熊谷日登美 (日大・生資科)
<p>【目的】ブロッコリーに含有されているスルフォラフェン (SFA) が、第二相解毒酵素を誘導し、抗がん作用を発揮することが知られているが、当研究室では、SFA と構造が類似したスルフォラフェン (SFE) がダイコンスプラウト中に、ブロッコリースプラウト中の SFA の約 25 倍相当量存在することを見出している。また、SFE が SFA とほぼ同等の第二相解毒酵素誘導活性を示すことも明らかにしている。日々の食品摂取による疾病予防において重要なことは、少量の摂取により効果が得られることである。そこで本研究では、SFE を高含有するダイコンスプラウトの栽培条件を検討し、その条件下で栽培したスプラウトから抽出物を作製し、これをマウスに経口投与した際に、第二相解毒酵素を誘導するか否かについて検討した。</p> <p>【方法】ダイコン種子を種々の組成の水耕液、あるいは明暗条件を変化させて 7 日間栽培し、得られたスプラウト中の SFE 含量を HPLC により定量した。SFE を高含有する条件下で栽培したスプラウトから抽出物を作製し、これをマウスに 5 日間経口胃内投与した。5 日目に肝臓を摘出し、第二相解毒酵素であるグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) の活性を測定した。</p> <p>【結果】硝酸塩濃度の増加につれて SFE 含量は減少し、アンモニウム塩存在下では、窒素フリーの時に比べ、SFE 含量が増加した。ダイコンスプラウトは明条件よりも暗条件下において SFE 含量が多くなった。スプラウト抽出物をマウスに経口胃内投与することにより、GST の活性が誘導された。</p>	

P-25	<p>シイタケ臭気前駆体による血中アルコール濃度上昇抑制 ○坂口 智哉¹, 櫻井 彩夏¹, 山口 勇将¹, 近藤 春美¹, 赤尾 真¹, 齊藤 武², 熊谷 日登美¹ (¹日大・生資科, ²アセラ食品理化セ)</p>
<p>【目的】食品による血中アルコール濃度の上昇抑制はアルコール性肝障害に起因した疾患の予防に有効である。当研究室では、ニンニクの臭気前駆体である <i>S</i>-allyl-L-cysteine sulfoxide (ACSO) をエタノールとともにラットに経口胃内投与した際に、血漿エタノール濃度の上昇が抑制されることを見出している。一方、シイタケの臭気前駆体であるレンチニン酸は、その構造や、<i>C-S</i> リアーゼによって臭気成分に変換されることなどがニンニクの ACSO と類似していることから、同様に血中アルコール濃度上昇抑制効果を示すことが期待される。本研究では、レンチニン酸含有シイタケ抽出物を用いて、レンチニン酸が血中エタノール上昇を抑制するか <i>in vivo</i> にて検討した。</p> <p>【方法】シイタケをメタノールに浸して酵素を失活させ後にホモジナイズすることにより、レンチニン酸含有シイタケ抽出物を調製した。一方、レンチニン酸未含有シイタケ抽出物は、シイタケを 37°C の恒温槽でホモジナイズし、レンチニン酸を酵素で臭気成分に変換することにより調製した。ラットを一晩絶食させた後、20%エタノールと共に各抽出物を経口投与した。対照群では、20%のエタノールのみを投与した。その後、経時的に尾静脈から血液を採取し、血中エタノール濃度を測定した。</p> <p>【結果】血中エタノール濃度は、対照群では著しく上昇したのに対し、各シイタケ抽出物の経口投与は血中エタノール上昇を有意に抑制した。また、レンチニン酸を含有するシイタケ抽出物の抑制効果は、レンチニン酸を含まないシイタケ抽出物よりも強いことが明らかとなった。</p>	

P-26	<p>外因性酸化コレステロールの脳への移行性及び蓄積性の検討 ○中堀 紘花, 古和口 智絵, 加藤 慧士, 長田 恭一 (明治大・農)</p>
<p>【目的】近年、高コレステロール血症と認知症発症との間に関連性があるのではないかと示唆されており、コレステロールが酸化されて生成する酸化コレステロール(Oxc)が、その発症に関与していると考えられている。生体内で検出される Oxc は、内因性と外因性のものがあり、外因性 Oxc が脳に到達するのかどうかは明らかになっていない。本研究ではラットに Oxc を与え、Oxc の各組織への蓄積特異性の中でも、特に脳組織への移行性を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法・結果】6週齢 Wistar 系雄性ラットを、AIN-76 純化基礎飼料を摂取させた Control 群、基礎飼料に Oxc を 0.25%含む食餌を与えた Oxc 群の 2 群に分け、2 週間飼育し 12 時間の絶食後麻酔を施して解剖した。血漿、肝臓、及び脳を採取し、脳については各部位に分けた。各臓器の種々の Oxc レベルは脂質抽出後、GC-MS に供して解析した。</p> <p>外因性 Oxc は、コレステロールと同様に小腸から吸収されることが知られている。本研究の結果からも、肝臓での主要な外因性 Oxc 分子種のレベルが Oxc を投与した群で有意に高くなったことから、食事から摂取した Oxc が吸収されたと考えられる。さらに、大脳での主要な外因性 Oxc 分子種のレベルを測定したところ、エポキシ基を有する分子種以外の Oxc のレベルが高くなった。このことから、Oxc 分子種の中でもエポキシ基を有する分子種は脳へは移行せず、その他の主要な外因性 Oxc 分子種は血液脳関門を通過し、脳内へ流入する可能性が示唆された。</p>	

P-27	<p>水溶性小麦グリアジンのイオン交換樹脂による脱アミド化と機能特性 ○杉本 千晶¹, 中村 華恵¹, 殿島 利奈¹, 阿部 竜典¹, 山口 勇将¹, 赤尾 真¹, 熊谷 仁², 熊谷 日登美¹ (¹日大・生資科, ²共立女子・家政)</p>
<p>【目的】我々は陽イオン交換樹脂を用いて、ペプチド結合の加水分解を起こさずタンパク質を脱アミド化する方法を開発し、大豆グロブリンや小麦グリアジンの機能性の向上を行ってきた。しかし、小麦グリアジンは通常、60%エタノールで抽出されるものの溶解度は低く、60%エタノール中で陽イオン交換樹脂と混合した場合には、脱アミド化度は28%であった。近年、裏出らは食塩含有小麦粉ドウから、純水に高濃度で溶解するグリアジンの純水抽出法を見出した。純水抽出のグリアジンはエタノール抽出のグリアジンよりも開いた構造であると報告されており、樹脂表面での接触機会が増えると予想されることから脱アミド化が効率よく行えると考えられる。また、表面特性も異なると考えられるため、純水抽出とエタノール抽出ではグリアジンは異なった機能性を示すと考えられる。そこで本研究では、水溶性小麦グリアジンを用い、陽イオン交換樹脂による脱アミド化の最適条件検討と機能性評価を行った。</p> <p>【方法】水溶性小麦グリアジン溶液とカルボキシレートタイプ陽イオン交換樹脂を混合攪拌することで脱アミド化を行った。脱アミド化率は、脱アミド化により除去されたアミド中の窒素量に対する未処理グリアジン中のグルタミンとアスパラギン側鎖中の窒素量の割合として算出した。</p> <p>【結果】水溶性小麦グリアジンの脱アミド化最適条件は、陽イオン交換樹脂量：1.0 g/mL, 処理時間：24 h, 処理温度：室温となり、この脱アミド化率は約43%であった。機能特性の詳細については当日報告する。</p>	

P-28	<p>大腸炎発症モデルマウスにおける炎症反応及び胆汁酸排泄に対するライチ由来低分子プロシアニジン“Oligonol[®]”の影響 ○依田 浩樹¹, 林 洪太¹, 高成 準², 北館 健太郎², 長田 恭一¹ (¹明治大院・農, ²株式会社アミノアップ化学)</p>
<p>【目的】大腸炎発症モデルマウスを用いた、Oligonol[®]の大腸炎発症予防効果の検証を目的とした。</p> <p>【方法】4週齢の雄性ICRマウスを7日間予備飼育し、AIN93G基準食及び水道水を摂取させるC群、AIN93G基準食及び2.5%デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)含有水を摂取させるD群、0.1%Oligonol[®]食及び2.5%DSS含有水を摂取させるL群、0.5%Oligonol[®]食及び2.5%DSS含有水を摂取させるH群の4群に分けた。21日間の本飼育期間の内、最初の7日間は食餌のみを試験食に置き換え、残りの14日間で2.5%DSS含有水の投与により大腸炎を誘発させ、臨床学的評価を行った。本飼育終了後に解剖し、得られた試料を種々の分析に供し、Oligonol[®]の抗大腸炎作用を評価した。</p> <p>【結果・考察】D群ではC群に対して体重及び摂食量が減少し、Oligonol[®]を摂取させたL群及びH群ではより顕著な減少が観察された。また、DSSを投与した群では大腸炎が誘発されたことによる大腸の短縮や軟便、血便及びDAIの上昇が観察されたが、いずれの大腸炎症状に関してもD群に対してL群及びH群の方が顕著であった。大腸における炎症性サイトカインのmRNA発現量に関しても同様の傾向となった。したがって、本研究ではDSSの投与により大腸炎が誘発され、その症状がOligonol[®]の摂取によって促進された可能性が考えられた。この原因の一つとしてOligonol[®]摂取による胆汁排泄量の増加によって大腸内の酸化ストレスレベルが上昇していた可能性が考えられた。現在、糞中の中性ステロイド及び胆汁酸濃度を分析している。</p>	

P-29	<p>亜麻仁アルブミンによるウシ膵臓由来トリプシンの阻害 ○小林 隼斗, 池ヶ谷 紫苑, 山口 勇将, 赤尾 真, 熊谷 日登美 (日大・生資科)</p>
<p>【目的】 亜麻仁油には心血管疾患のリスクを低下させるなどの生理機能が報告されているが、亜麻仁油を抽出したあとに残る残渣からはヒトに対して有用な価値が見出せておらず廃棄されているのが現状である。この残渣にはタンパク質が豊富に含まれており、一般に、穀類や豆類のタンパク質には、様々な機能性があることが知られているため、亜麻仁タンパク質も類似の機能性を有する可能性がある。小麦アルブミンはα-アミラーゼ阻害活性、大豆グロブリンはトリプシン阻害活性を有することが知られていることから、本研究では、食品に利用可能な抽出法である水及び食塩水での抽出により亜麻仁粉末からタンパク質画分を回収し、これらがα-アミラーゼおよびトリプシン阻害活性を有するか検討した。</p> <p>【方法】 亜麻仁粉末を脱脂したのち、水および食塩水を用いてアルブミン画分とグロブリン画分を抽出し、これらを凍結乾燥することにより亜麻仁アルブミンおよびグロブリンを得た。これらのタンパク質の分子質量を SDS-PAGE により測定した後、酵素阻害活性を、ミールワーム由来α-アミラーゼおよびウシ膵臓由来トリプシンを用いて評価した。</p> <p>【結果】 亜麻仁アルブミン画分は 14.3 kDa 付近に、グロブリン画分は 20.1~29 kDa 付近に主なバンドが観察された。アルブミン、グロブリン共に、ミールワーム由来α-アミラーゼに対する阻害活性は確認されなかった。しかし、アルブミンは、ウシ膵臓由来トリプシンの活性を阻害した。現在、この亜麻仁アルブミンが、食品へ利用する上で重要な熱および冷凍耐性を有するか検討している。</p>	

P-30	<p>食事性フロリジンの吸収と体内動態 ○石田 瑞穂¹, 依田 浩樹², 三田村 真里¹, 長田 恭一¹ (¹ 明治大・農, ² 明治大院・農)</p>
<p>【目的】 フロリジンは糖尿病予防作用を示すと考えられている。しかし、その吸収動態は不明である。本研究ではフロリジンの小腸からの吸収と体内動態を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】 3 週齢の Wistar 系雄性ラットに AIN76 基準食を与えた対照群と基準食に 0.25%フロリジンを添加した飼料を与えた P 群に分けて 3 週間飼育した。12 時間の絶食後に解剖し、血漿、尿、肝臓、盲腸及び糞を採取した。各試料よりフロリジン代謝産物を抽出して LC-MS に供して代謝産物を解析した。</p> <p>【結果・考察】 対照群の試料では認められなかったが、P 群の血漿ではフロリジン、フロレチンとフロレチンの硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体あるいはグルクロン酸・硫酸抱合体が検出され、中でもフロレチン硫酸抱合体が 33.9%と最も高くなった。尿では血漿と同様の代謝産物に加え、一部検体にヒドロキシフロレチン硫酸抱合体やヒドロキシメチル硫酸抱合体が検出された。なお、主たる代謝産物はグルクロン酸抱合体で 48.5%と最も高くなった。肝臓ではフロレチン、フロレチンの硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体が検出され、中でもフロレチン硫酸抱合体が 64.2%と最も高くなった。盲腸ではフロレチンの硫酸抱合体とグルクロン酸抱合体が検出され、硫酸抱合体が 59.0%と最も高くなった。以上の結果から、食事性フロリジンは 12 時間の絶食を経た場合でもフロリジン及びフロレチン抱合体が検出され、体内での残留性は高いと考えられた。これはフロリジンの疎水性が比較的高いことが原因であると考えられ、このことが血糖値上昇抑制作用に関連していると考えられた。</p>	

P-31	<p><i>Aspergillus oryzae</i> 001 を用いたアワビ内臓発酵物のアンジオテンシン変換酵素阻害物質の単離・精製および阻害様式の解明 ○川上 瑞規¹, 志村 茉莉子², 濱田 奈保子¹ (¹東京海洋大院・食品流通安全管理, ²ブルドックソース株式会社)</p>
<p>【目的】水産加工残渣であるアワビの内臓を有効利用するため、食用微生物を用いて発酵させることにより付加価値を高め、新しい機能性食品としての利用を目指すことを目的とした。</p> <p>【方法・結果】供試菌としては、当研究室保有株である <i>Aspergillus oryzae</i> 001 を用いた。オーストラリア産アワビの内臓を凍結乾燥し、粉碎後、蒸留水に終濃度 1% (w/v) になるように添加し、本培養培地を作製した。PDB 培地で前培養した <i>A. oryzae</i> 001 を本培養培地に植菌し、28℃, 160 rpm で 6 日間培養した。培養上清を回収し、50℃で 60 分間抽出した後、減圧乾固し、蒸留水に溶解して ACE 阻害活性を測定した。<i>A. oryzae</i> 001 を用いて発酵したアワビ内臓は ACE 阻害活性が有意に上昇した。ddY マウスを用いた単回投与試験において、発酵物投与群は未発酵物投与群に比べて血圧上昇が 90%程度抑制された。発酵物および未発酵物を限外濾過に供し、最も高い ACE 阻害活性を有する 3 kDa 以下の画分を逆相高速液体クロマトグラフィーで分離したところ、発酵物に特有の高い ACE 阻害活性を有するピークが分離された。そのピークを回収し、エドマン分解および質量分析を行った結果、当該ピークはチロシンであることが明らかとなった。チロシンおよびその異性体の ACE 阻害活性を測定したところ、L-<i>m</i>-チロシンが分離ピークと同等の ACE 阻害活性を有していた。さらに、ラインウィーバー・バークプロットから算出した結果、L-<i>m</i>-チロシンの阻害様式は非競合阻害であり、K_i は 47.7 μM であった。以上から、アワビ内臓を <i>A. oryzae</i> 001 で発酵させることで、血圧上昇を抑制する機能性食品として利用できることが示唆された。</p>	

P-32	<p>pCAR1 由来芳香族化合物分解遺伝子群の一細胞での発現解析 ○山本 夏実¹, 高比良 早紀¹, 水口 千穂^{1,2}, 岡田 憲典¹, 野尻 秀昭^{1,2} (¹東大・生物工学セ, ²東大・微生物連携機構)</p>
<p>【背景・目的】プラスミドは様々な新規形質を宿主に付与するが、その遺伝子の発現は宿主ごとに異なる。また同一遺伝子の発現が一細胞ごとに異なる例が存在することから、宿主の違いに加え、細胞ごとの発現の揺らぎが集団を特徴付ける可能性が考えられる。本研究では <i>Pseudomonas</i> 属細菌を宿主として pCAR1 上のカルバゾール (CAR) 分解遺伝子群の発現を一細胞レベルで解析し、宿主ごとに比較することを目的とした。CAR 分解遺伝子群は、CAR と中間代謝産物であるアントラニル酸 (AN) の代謝に関与する <i>car</i> オペロン、<i>ant</i> オペロンから成り、これらの発現を制御する転写制御因子 <i>antR</i> も pCAR1 上に存在する。このうち <i>ant</i>、<i>car</i> 両オペロンの転写を誘導するプロモーターP_{ant}に着目し解析を行った。</p> <p>【方法・結果】P_{ant}の下流に <i>gfp</i> が結合した遺伝子カセットを <i>P. putida</i> KT2440(pCAR1)株、<i>P. fluorescens</i> Pf0-1(pCAR1)株、及び本来の pCAR1 保持株である <i>P. resinovorans</i> CA10 株の染色体上に挿入した菌株を作製した。P_{ant}の誘導条件下で培養時の蛍光強度を測定した結果、3 株間で誘導のかかり方に差が見られた。CA10 株ではばらつきが小さく明瞭に誘導されるのに対し、KT2440(pCAR1)株と Pf0-1(pCAR1)株では 10%程度の細胞が低い蛍光を示し、P_{ant}からの発現が弱い細胞の存在が示唆された。蛍光強度の低い Pf0-1(pCAR1)株においては、相同組換えによる pCAR1 上の <i>antR</i> の欠失が示された。一方 KT2440(pCAR1)株については遺伝的変異は生じておらず、<i>antR</i> の発現量の揺らぎや AN の取り込み量の揺らぎなど、Pf0-1(pCAR1)株とは異なる要因で発現が弱い細胞が生じていると考えられた。</p>	

P-33	ストロンチウム蓄積細菌の探索 The search of strontium accumulation bacteria ○吉岡 潤一 ¹ , 林 秀謙 ^{1,2} (¹ 前工大院・工・生物工, ² 前工大・工・生物工)
<p>【背景及び目的】 2011年3月、福島第一原発事故が発生し、放射性核種が放出された。ストロンチウム90(Sr90)は半減期が約28年と長く、長期間に渡り環境中に存在することから、早急な対応が必要とされている。一方で、乳酸菌をはじめとした複数の細菌でストロンチウムの蓄積が報告されている。しかしながら、依然として実用化の方法は確立されていない。そこで、本研究はストロンチウム蓄積能の高い菌株を選抜し、その蓄積能の増強及びバイオレメディエーションへの応用を目的としている。</p> <p>【方法】 NBRCより提供を受けたスクリーニング株(RD株)を1mM SrCl₂を含む液体培地で培養を行った。菌体を回収し、乾燥重量を測定後、濃硝酸を用いて加熱溶菌処理を行った。その後、各サンプルの希釈系列を作成し、原子吸光光度計を用いて、菌体内ストロンチウム蓄積量を算出した。また、ストロンチウム蓄積能の高かった菌株は16S rRNA遺伝子シーケンスによる系統解析を実施した。</p> <p>【結果及び考察】 購入したRD株の内、放線菌95株、乳酸菌39株の計134株のストロンチウム蓄積能を測定した。測定の結果、ストロンチウム蓄積量の高い株を4株獲得し、放線菌でストロンチウム蓄積が比較的高い傾向が見られた。特に <i>Brevibacterium</i> sp. RD012516 が最も高い 29.4 μmol/g[dry weight]を示した。今後はストロンチウム蓄積を示した菌株を中心に新規ストロンチウム蓄積株の探索及び高蓄積細菌の蓄積能の向上を行う予定である。</p>	

P-34	メチオニン代謝と共役したGTP生合成の新規な制御機構の解析 ○大坂 夏木(東京農大院・バイオ)
<p>細菌の栄養状態に応じた代謝変化には、細胞内のGTP量が深く関わっており、特にアミノ酸飢餓条件において細胞内のGTP量を低下させることが生存に必須であることが知られている。細菌一般においてGTP量を制御する主要な因子として、知られている (p)ppGpp は特にアミノ酸飢餓時に顕著に合成・蓄積される。(p)ppGpp はDNA複製、翻訳といった、あらゆる生体反応に関わる因子に多面的に働き、生体分子の無駄な消費を抑制することが知られているが、グラム陽性細菌における主たる標的は、GTP生合成経路の酵素であることが明らかとなっている。このように(p)ppGppによるGTPの制御については古くから研究が進められてきているが、制御されるGTPの生合成が、他の細胞内のどのような代謝と共役して変化し、アミノ酸飢餓時の生存性に関与しているのかは、あまり理解されていない。枯草菌において(p)ppGppの合成酵素を全て欠失させた株(ppGpp⁰株)は、アミノ酸飢餓条件では生育が阻害されるものの、生育回復する抑圧変異株が出現する。ppGpp⁰株の最少培地での生育阻害を抑圧する変異株を複数取得し、変異点の同定を行ったところ、(p)ppGppの標的であるGTP生合成に直接関与しない遺伝子に多数の変異を同定した。これらの抑圧変異株のアミノ酸飢餓条件における生育回復効果を阻害する因子を探索した結果、メチオニンが抑圧変異株のアミノ酸飢餓条件での生育を阻害することが分かった。さらに、このメチオニンによる抑圧阻害効果は、GTP生合成の抑制によって解消されることが分かった。以上の結果から、メチオニン代謝がアミノ酸飢餓への適応に関わる細胞内GTPの量的制御に関与していることが示唆された。</p>	

P-35	<p>有用油脂生産パラクロレラ藻 AMI5 株の特徴付け ○高木 明香莉, 佐々木 美月, 朝山 宗彦 (茨城大・農)</p>
<p>【目的】 微細藻類は、有用な油脂や多糖、色素などを生産することが昔から知られている。微細藻類バイオリファイナリーに資する基盤研究を行うことを目的とし、地元水域より新奇微細藻類を単離・純化した。取得株の分類および細胞内に生産・蓄積させた油脂の組成や生産能について特徴付けを行った。</p> <p>【方法・結果】 地元茨城県阿見町の水域より採集した微細藻を BG11 液体培地で一旦増殖させた後、混積重層法により BG11 寒天培地上で幾つかの藻コロニーを単離した。純化した微細藻一種の細胞ゲノム上 18S rDNA ならびに ITS1_5.8S rDNA ITS2 領域 約 2,38 kbp の塩基配列を解読し、それをデータベースと照らし合わせたところ、緑藻 <i>Parachlorella kessleri</i> FR865655 株の 18S rDNA のそれと最も相同性が高く 99.7%であったが、18S rDNA 内やその周辺領域の塩基配列数カ所に差が認められ、本株が <i>Parachlorella</i> の新種であることが明らかとなった。ゆえに本株を <i>Parachlorella</i> sp. AMI5 と暫定的に命名し、以後の解析に使用した。AMI5 株を種々の BG11 培地で培養した後、細胞を Nile red で染色して、時間の経過とともに蛍光顕微鏡観察を行い、細胞の形態変化とあわせて細胞内に油脂を蓄積していることを確認した。さらにそれら細胞から全脂質を抽出し、メチルエステル化後、全脂肪酸メチルエステル (FAMES) の組成を水素炎イオン化検出器 (FID) により分析した。その結果、バイオ燃料や飲食品向けの良質な油脂を豊富に含んでいることが明らかとなった。以上を踏まえ、AMI5 株の藻バイオリファイナリーへの利用の可能性について考察する。</p>	

P-36	<p>放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)における内在性 NO による抗生物質生産制御機構の解明 ○本間 颯太、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 (東農大・バイオ)</p>
<p>【目的】 放線菌は主に土壤中に生息するグラム陽性細菌であり、抗生物質などの多種多様な二次代謝産物を生産する。我々は放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)において硝酸→亜硝酸→一酸化窒素 (NO)→硝酸を循環する窒素酸化物代謝サイクルを見いだした。本菌において NO は二次代謝産物生産のシグナル分子の役割を担っている事が示唆されているが、その制御メカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。一方、本菌において NO を感知するセンサーキナーゼ及びそのレスポンスレギュレーターから成る二成分制御系の存在を明らかとしている。そこで我々は本菌における内在性 NO による二成分制御系を介した抗生物質生産制御機構の解明を目的とした。</p> <p>【方法・結果】 二成分制御系と抗生物質生産の関連性を検証するために、センサーキナーゼ欠損株及びレスポンスレギュレーター欠損株における抗生物質生産量を定量した。また、NO 発生剤として亜硝酸 (NO₂⁻)を菌体に短時間曝露した時における、抗生物質生合成の調節因子の発現量を検証した。加えて、ChIP-qPCR によりレスポンスレギュレーターと抗生物質生合成調節因子の直接的な相互作用と NO 濃度依存的な相互作用の変化を検証した。</p> <p>センサーキナーゼ欠損株及びレスポンスレギュレーター欠損株における抗生物質生産量はコントロール比べて有意に減少した。また、NO₂⁻を短時間曝露した時、親株の抗生物質生合成調節因子の発現量は減少し、NO 低生産株では発現量が増大した。しかし、レスポンスレギュレーター欠損株において、NO₂⁻曝露した時で発現量に有意な変化はなかった。さらに、ChIP-qPCR によりレスポンスレギュレーターと抗生物質生合成調節因子の直接的な相互作用を検証した結果、レスポンスレギュレーターが抗生物質生合成調節因子をコードする遺伝子のプロモーター領域に結合していることが明らかとなった。また、短時間の NO₂⁻の曝露により、この相互作用は低濃度 NO₂⁻曝露時に増大し、高濃度 NO₂⁻曝露時に減少することが明らかとなった。</p>	

P-37	<p>電極プレート培養法を用いた水田発電由来の <i>Geobacter</i> 属発電菌の単離 ○上岡 永佳, 高妻 篤史, 渡邊 一哉 (東薬大院・生命科学)</p>
<p>【目的】近年、微生物と外界の電気化学的相互作用が注目を集めている。我々は微生物が有機物を酸化分解して電流生成を行う微生物燃料電池の開発を行っているが、発電菌の単離は難しく、その多様性や生態などに関する知見は未だに十分とは言えない。そこで本研究では、発電菌を単離するための電極プレート培養 (EPC) 法を開発し、水田から未知発電菌を単離することでその有用性を実証した。</p> <p>【方法・結果】EPC は培地プレート上に電極を設置し、電極を電子受容体または電子供与体としてコロニーを形成させる手法である。菌液をプレートの表面に塗布後作用極 (FTO 電極) をその上に被せると、その下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成がおこる。本研究では、約 4 か月運転した水田発電のアノードを作用極として酢酸を基質とした定電位培養を行い、発電菌のさらなる集積を行った。その後、アノード付着微生物を懸濁し、EPC に植菌した。その結果、FTO 作用極下にコロニーが出現し、生育に伴う電流生成も確認された。得られたコロニーは発電菌として知られる <i>Citrobacter</i> の近縁種であったが、これは先行研究における水田発電電極付着菌叢の解析ではマイナーなものであった。この原因としては作業途中の酸素曝露が考えられたので、EPC への塗布など全工程を嫌気条件下で行ったところ、<i>Sulfurospirillum</i> や <i>Geobacter</i> を含む複数の菌種からなるコロニーが得られた。そこでコロニー由来の培養物から EPC による単離、純粋を行ったところ、水田発電ではメジャーな <i>Geobacter</i> 属細菌の単離に成功した。今後は EPC を利用して様々な環境から新奇発電菌の単離を行っていきたい。</p>	

P-38	<p>セスバニア根粒菌における宿主殺傷能とアンピシリン耐性能は転写因子 AmpR を介して温度により制御される ○平川 智基¹, 松岡 淳一², 日高 真誠^{3,4}, 諸橋 賢吾¹, 青野 俊裕^{2,4} (1東理大院・理工, 2東大・生セ, 3東大院・農, 4東大・微生物連携機構)</p>
<p>R-body とは、<i>reb</i> 遺伝子群がコードする低分子タンパク質群の重合体であり、一部の細菌が生産する。特にゾウリムシ絶対内生菌の R-body は宿主ゾウリムシの殺傷能に関与することで知られる。マメ科植物セスバニアの根粒菌 <i>Azorhizobium caulinodans</i> は、共生菌でありながらも <i>reb</i> 遺伝子群をオペロンとして保持しており、本菌が R-body を生産すると宿主植物細胞は殺傷される。<i>reb</i> オペロンの発現は、転写抑制因子 PraR や Lon プロテアーゼにより通常は抑制されているが、2-オキシグルタル酸 (2OG) 存在下で低温になると誘導される。2OG は <i>reb</i> プロモーターに対する PraR の結合を阻害するが、温度による制御は全く未解明である。本研究ではその温度制御機構の一端を解明することとした。</p> <p>$\Delta praR$ 株、Δlon 株、$\Delta praR \Delta lon$ 株を高温・低温で培養し、SDS-PAGE 解析等を行ったところ、β-ラクタム系抗生物質分解酵素 AmpC の発現パターンが <i>reb</i> オペロンとは相反することが判明した。<i>ampC</i> の転写促進因子 AmpR に着目し、<i>ampR</i> 破壊株群の <i>reb</i> オペロンの発現量を比較したところ、$\Delta praR \Delta ampR$ 株では $\Delta praR$ 株よりも高い発現量を示した。このことから、AmpR は高温時に <i>reb</i> オペロンの発現を抑制することが示唆された。また、<i>ampC</i> の発現を温度別に調べた結果、35°C から 38°C の間で高温であるほど発現量が上昇することが判明した。アンピシリン耐性を 25°C と 38°C で比較した結果、38°C では耐性が上昇した。<i>ampR</i> 破壊株、<i>ampC</i> 破壊株では耐性がなかった。これらの結果から AmpR が温度依存的に <i>ampC</i> の発現、及びアンピシリン耐性を制御していることも明らかになった。</p>	

P-39	<p><i>Acidithiobacillus ferridurans</i> を用いたアンモニア生産に関する分子機構の解明 ○宮内 友子, 高妻 篤史, 渡邊 一哉 (東薬大院・生命科学)</p>
<p>【目的】 現在、省エネルギー型アンモニア生産法の確立が望まれており、窒素固定細菌を用いた生物学的方法が注目を集めている。本研究では、鉄酸化細菌 <i>Acidithiobacillus ferridurans</i> を用いたアンモニア生産法の検討を行い、関連する分子機構を解明するために本菌のゲノム解析を行った。</p> <p>【方法・結果】 <i>Acidithiobacillus</i> 属細菌は鉄以外にも水素を電子供与体として用いることが知られている。水素を酸化する場合、鉄よりも多くのエネルギーが得られることから、水素はアンモニア生産のエネルギー源として適していると考えられる。そこで本研究では、水素酸化能が高い <i>Acidithiobacillus ferridurans</i> を選定し、まず本細菌の培養法を検討した。異なる電子供与体が増殖に与える影響を調べた結果、水素を用いることで鉄培養よりも高い菌体密度が得られることが確認され、また水素培養においてアンモニウムイオンを培地中に蓄積させることに成功した。これらの結果は、本菌株によって水素と窒素からアンモニアが生産できることを示している。次に、本細菌のゲノム解析を行い、完全なゲノム配列 (約 2.9 Mb) を得た。現在、水素酸化や窒素還元に関与する遺伝子を同定することを目的に、電子供与体の違いや窒素源の有無が本細菌のトランスクリプトームに与える影響を解析している。今後、高効率なアンモニア生産が可能な遺伝子改変株の作出を試みる予定である。</p>	

P-40	<p>セスバニア根粒菌の非マメ科植物に対する組織感染と細胞内感染 ○糊澤 啓吾¹, 石綱 史子², 日高 真誠^{3,5}, 諸橋 賢吾¹, 青野 俊裕^{4,5} (¹東理大院・理工, ²家政学院・現生, ³東大院・農, ⁴東大・生七, ⁵東大・微生物連携機構)</p>
<p><i>Azorhizobium caulinodans</i> ORS571 は、マメ科植物セスバニアに窒素固定器官である茎粒と根粒を形成させる根粒菌である。また、本菌はイネ・コムギ・トマト・シロイヌナズナなどの非マメ科植物のエンドファイトでもある。本研究では、シロイヌナズナに対する本菌の感染を窒素十分条件下と欠乏条件下で比較し、本菌のエンドファイトとしての特性を解明することとした。</p> <p>まず、窒素十分条件下で本菌を接種すると、根以外にも葉にも感染することが判明した。このとき、主茎の伸長は接種により抑制されたことから、本菌の接種は宿主の生育に負担をかけると推測された。</p> <p>一方、窒素欠乏条件下で本菌を接種すると、主茎の伸長が本菌の接種により促進された。ただし、子葉が黄化していることから、生育促進とは考えられず、一種のストレス応答ではないかと推測される。変異株群を用いた試験により、Nod ファクター合成能、窒素固定能、IAA 生産能は主茎伸長には関与しないことが明らかになった。次に、野生型株による感染を詳細に観察した。その結果、根のみならず葉や花にも本菌が感染することが明らかになった。更に、これらの感染部位を電子顕微鏡で観察すると、細胞間隙のみならず、細胞内にも本菌が感染していることが判明した。</p> <p>以上のことから、シロイヌナズナに対しては積極的な生育促進は示さず、広範囲領域に感染するので、本菌は弱い病原菌として感染している可能性が考えられる。</p>	

P-41	<p>発電バイオフィーム形成における c-di-GMP の関与 ○松元 陽歩¹, 古賀 亮太², Kanaly Robert³, 高妻 篤史¹, 渡邊 一哉¹ (¹東葉大・生命科学, ²東葉大院・生命科学, ³横浜市大院・生命ナノシステム)</p>
<p>【背景・目的】微生物燃料電池における電流生成では、電気化学活性微生物（EAB）が電極上にバイオフィームを形成することが重要となる。我々はEABによる電極バイオフィームの形成機構を明らかにするため、電気化学フローセル（EFC）を開発し、モデルEABである <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 株の電極バイオフィームの形態観察を行った（Kitayama <i>et al.</i>, 2017 AEM 83:166）。その結果、MR-1 株のバイオフィーム形態が培地の流動によって変化することを発見した。非流水条件と流水条件における遺伝子発現を DNA マイクロアレイ解析により比較したところ、c-di-GMP 合成酵素をコードすると考えられる遺伝子 SO_1646 が流水条件で顕著に発現上昇することがわかった。しかし、発電バイオフィーム形成における c-di-GMP の役割は未解明である。そこで本研究では SO_1646 の機能を解析し、発電バイオフィーム形成と c-di-GMP の関連を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法・結果】SO_1646 破壊株を作製し、細胞内 c-di-GMP の定量を行った結果、野生株と比べ c-di-GMP の細胞内濃度が著しく低下することが示された。この結果は、SO_1646 が MR-1 株において主要な c-di-GMP 合成酵素として働くことを示唆している。また EFC を用いて野生株と SO_1646 破壊株の流水条件下でのバイオフィーム形態と電流生成を調べた結果、SO_1646 破壊株ではバイオフィーム形成が抑制され、電流生成量も低下していた。これらのことから、MR-1 株において SO_1646 が電極バイオフィームの形成と電流生成に重要な役割を示すことが示された。</p>	

P-42	<p>植物の免疫を亢進する植物内生菌の探索 ○黒川 摩利, 中野 正貴, 北畑 信隆, 朽津 和幸, 古屋 俊樹 (東京理科大・理工・応生)</p>
<p>【目的】近年、環境保全型農業の実現に向けて、植物免疫を活性化する微生物農薬に関心が寄せられている。しかしながら、植物免疫活性化剤としての微生物農薬の実用化例は限られている。要因の一つとして、微生物は環境の変化の影響を受けやすく根圏に定着しにくいことが挙げられる。また、植物体に微生物を作用させる従来の探索手法は、多くの時間がかかることも要因と考えられる。そこで本研究では、植物内に安定に定着する植物内生菌を微生物探索の対象とした。さらに、微生物の植物免疫亢進活性の評価に植物細胞を利用し、探索手法の効率化を図るとともに、植物の免疫力を亢進する内生菌の取得を試みた。</p> <p>【方法・結果】有機農法により栽培された小松菜から 31 株の内生菌を単離し、16S rRNA 遺伝子配列をもとに属種同定を行った。解析が完了した 25 株は <i>Proteobacteria</i> 門、<i>Actinobacteria</i> 門、<i>Firmicutes</i> 門に分類された。3 株は既報の微生物との相同性が 96%以下であり、属レベルで新規な微生物であることが示唆された。つぎに、植物細胞の活性酸素種（ROS）の生成量と防御応答の強さに相関があることに着目し、タバコ BY-2 細胞の ROS 生成を指標として微生物を評価した。その結果、いくつかの取得株は、BY-2 細胞とともにインキュベーションすることにより、クリプトゲイン（エリシター）誘導性の ROS 生成を亢進した。陽性を示した内生菌について、現在、植物体を利用して病原菌に対する耐病性試験を行っているところである。</p>	

P-43	<p>光センサークラス III LitR を保有する <i>Burkholderia multivorans</i> の光依存的な転写調節に関する解析 ○角 悟、高野(白鳥) 初美、上田 賢志、高野 英晃 (日大・生資科・生命研)</p>
<p>【目的】前大会で我々は、土壌細菌 <i>Burkholderia multivorans</i> における光依存的な葉酸合成の促進が、光センサー型転写調節蛋白質クラス III LitR によって制御されること、ならびにその光感知ドメインの形成と DNA 結合能に 3 つの Cys 残基が必須の役割を担うことを報告した。本大会では、<i>B. multivorans</i> が有する光誘導性遺伝子のプロモーター構造に関する解析結果を中心に発表する。</p> <p>【方法・結果】はじめに、Modified 5'-RACE 法によって本菌が有する光誘導性遺伝子群の 5 つの転写開始点を決定した。そのうちの 2 つのプロモーター領域は、大腸菌の生育に必須なシグマ因子 σ^{70} の認識配列に似ていることから、対応する σ 因子である σ^{RpoD} によって認識されることが推測された。残りの 3 つのプロモーター領域は σ^{70} の認識配列に類似していないが、保存されている -10 と -35 配列が σ^{LitS} によって認識されることが示唆された。そこで、One-Hybrid system 法によってそれらのプロモーター領域と σ^{LitS} の相互作用を解析したところ、両者間で特異的な相互作用を示した。次に、LitR の結合領域をゲルシフトアッセイによって調査したところ、σ^{RpoD} 依存性プロモーターの転写開始点から -30~-50 の位置に結合配列が存在することが示唆された。また、光照射後に光誘導性遺伝子の転写が開始されるまでの時間を半定量 RT-PCR で調べたところ、σ^{RpoD} 依存性遺伝子の転写は 10 分の間に、σ^{LitS} 依存性遺伝子は 20 分で上昇した。これらのことから、<i>B. multivorans</i> の光依存的な転写調節は、3 つの転写調節蛋白質によって 2 段階的に制御されることが推測された。</p>	

P-44	<p>リンゴカビ毒パツリンを分解する微生物の探索 ○三田 芽実¹、中川 博之²、古屋 俊樹¹ (¹東京理科大・理工・応生、²農研機構)</p>
<p>【目的】カビが産生する化合物のうち、多くの生物に悪影響を及ぼすものはカビ毒と呼ばれる。中でも、リンゴ果実に着生する <i>Penicillium expansum</i> が産生するパツリンは、毒性の強さから国際的に規制されており、除去技術の開発が望まれている。微生物機能を利用した方法は有効な手段の一つで、これまでにパツリンをデソキシパツリン酸やアスクラジオールに変換する微生物が報告されている。本研究では、新規パツリン分解微生物の取得を目的として、探索を実施した。</p> <p>【方法・結果】パツリンを炭素源として含む液体培地に土壌サンプルを接種し、培養液の濁度の増加を微生物の生育の指標としてパツリン分解菌の探索を行った。生育が確認されたサンプルについては、高速液体クロマトグラフィーで培養液内のパツリン含有量を測定した。その結果、510 の土壌サンプルから再現よく培養後にパツリンが減少する微生物集積系を 2 つ取得した。これらの集積系から TUS-MM1、TUS-MM2 と命名した 2 株が単離され、ITS1 領域のシーケンス解析により、それぞれ <i>Acremonium</i> 属、<i>Fusarium</i> 属の糸状菌と推定された。本研究では、TUS-MM1 株の分解活性を詳細に評価した。TUS-MM1 株の孢子懸濁液にパツリンを添加して振とうしたところ、パツリンの大幅な減少が確認された。滅菌処理した孢子懸濁液にパツリンを添加したサンプルでは、その減少が見られなかった。これより、生きた TUS-MM1 株の持つ酵素活性によりパツリンが減少していると考えられ、TUS-MM1 株はパツリン分解活性を有していることが示唆された。現在、さらなる検証実験を進めているところである。</p>	

P-45	<p>低アンモニウム条件における分裂酵母の侵入成長を誘導するシグナルの解析 ○川口 彩季¹, 池島 あい², 相澤 朋子^{1,3}, 光澤 浩^{1,3} (¹日大院生資料, ²日大生資料・生命化, ³日大生資料・くらし)</p>
<p>【目的】 分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> は、低アンモニウム (NH_4^+) 培地において通常とは異なり寒天培地の内部に侵入する。この侵入成長には、アンモニウムトランスポーター Amt1 が必要であることが明らかとなっている。NH_4^+濃度を上げると <i>amt1Δ</i> 株の侵入成長が回復することから、取り込まれた NH_4^+あるいはその代謝産物がシグナルとなっていることが示唆された。その実体を解明するため、アンモニア代謝に関わる酵素 (NADP 依存性グルタミン酸脱水素酵素, NAD 依存性グルタミン酸脱水素酵素, グルタミン合成酵素, グルタミン酸合成酵素) の遺伝子破壊株 (それぞれ <i>gdh1Δ</i>, <i>gdh2Δ</i>, <i>gln1Δ</i>, <i>glt1Δ</i> 株) が既に作製されている。本研究の目的は、侵入成長の程度と代謝産物濃度の関係を明らかにすることである。</p> <p>【方法・結果】 3 種類の二重破壊株 (<i>gdh1Δ gdh2Δ</i>, <i>gdh1Δ glt1Δ</i>, <i>gdh2Δ glt1Δ</i> 株) を作製した。単独破壊株と野生型株を含めた計 8 株を用いて、各種窒素源培地 (10 mM NH_4^+, 10 mM Gln, 10 mM Glu) での生育を調べた。<i>gdh1Δ</i> 株と <i>gdh1Δ gdh2Δ</i> 株は NH_4^+での生育が野生型株よりも遅かった。グルタミン酸を合成する酵素を欠く <i>gdh1Δ glt1Δ</i> 株は予想に反し Gln でも生育を示した。この理由としてグルタミンナーゼの関与が考えられた。また、0.76 mM NH_4^+を含む LNB 培地で 30°C, 14 日間培養を行った後、培地表面の細胞を水で洗い流すことで侵入成長の程度を調べた。興味深いことに、<i>glt1Δ</i> 株は野生型株と培地表面での生育に差がないにもかかわらず、野生型株よりも侵入成長の程度が低かった。侵入成長の程度と代謝経路産物濃度の相関を調べるため、GC-MS と LC を用いて α-ketoglutaric acid, NH_4^+, Gln, Glu の測定を行っている。</p>	

P-46	<p>日光文化財に発生する真菌を光触媒殺菌で防除するために必要な真菌叢の網羅的解析および防除のための事前試験 ○小笠原 麻衣¹, 三浦 菜摘¹, 藤嶋 昭², 鈴木 智順^{1,2} (¹東理大・応生, ²東理大・総研)</p>
<p>【目的】 日光社寺文化財の表面には変色している部分が見られ、その原因は真菌の発生によるものだと考えられている。しかし、原因となる真菌の正確な同定はされておらず、真菌発生の予防法についての研究も進んでいないため、修復作業以外に解決策がない。そこで本研究では、文化財表面に発生している真菌叢の解析と、光触媒の殺菌効果を利用して真菌の発生を防ぐことを目的とした。</p> <p>【方法・結果】 培養法により、文化財および日光自然環境由来真菌 34 株が分離されている。これらを同定するために 18S rRNA および ITS 遺伝子を用いた系統解析を行った。また、第三世代シーケンサーを用いた非培養法的真菌叢解析を行い、文化財に発生する真菌の網羅的解析も試みた。さらに、事前試験として、膠および桐油彩色漆木片に分離株を接種し、発生する真菌の様子を経時的に観察した。</p> <p>培養法の結果、文化財由来株は <i>Penicillium</i> 属と <i>Cladosporium</i> 属に近縁な真菌が主であり、日光自然環境由来株は <i>Pestalotia</i> 属等であった。従って、文化財由来真菌は一般的な建築物に発生する真菌である可能性が示唆された。また、非培養法では、文化財には <i>Baudoinia</i> 属と <i>Penicillium</i> 属に近縁な種が主で、日光自然環境には <i>Aspergillus</i> 属と <i>Penicillium</i> 属に近縁な種が主に存在していることが判明した。これらの結果は培養法によっては得られず、真菌叢の網羅的解析を補完するものであった。</p> <p>本発表に際しては、残りの分離株の系統解析および非培養サンプルの真菌叢解析結果も報告するとともに、防除のための事前試験結果についても報告する予定である。</p>	

P-47	<p>ヒト腸内細菌によるスクロースアナログ二糖の資化性調査 ○保坂浩貴, 平野貴子, 袴田航, 西尾俊幸 (日大院生資料)</p>
<p>【目的】当研究室では、スクロースのグルコース残基が様々な単糖へと置き換わったスクロース類似構造を有するオリゴ糖の合成と、それらのプレバイオティクス機能の評価を行っている。我々はこれまでに、<i>Aspergillus oryzae</i> や <i>Microbacterium saccharophilum</i> が生産するβ-フルクトフラノシダーゼの糖転移作用を利用して、スクロースのグルコース残基がグルコサミン、N-アセチルグルコサミン、グルクロン酸、およびグルクロン酸アミドに置き換わったスクロサミン、N-アセチルスクロサミン、スクロン酸、およびスクロン酸アミドの合成に成功した。現在、これら4種類のスクロースアナログ二糖の腸内細菌に対する増殖効果を評価している。本発表では、これまでに得られた結果について報告する。</p> <p>【方法・結果】ヒト腸内由来の各種の <i>Bifidobacterium</i> 属および <i>Lactobacillus</i> 属の細菌を培養後、96 ウェルプレートを用い、各オリゴ糖の終濃度が 30 mM になるように調節した MRS 培地にこれら菌を添加し培養を行った。菌体の増殖は、マルチプレートリーダーを用いて OD₆₅₅ における培養液の濁度を測定し評価した。その結果、<i>Bifidobacterium</i> 属と <i>Lactobacillus</i> 属細菌は、全般的に各オリゴ糖に対する資化性はスクロースと比較して低かった。しかし、<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> では、合成した全てのスクロースアナログ二糖を良く資化できることが確認できた。このことから、オリゴ糖の資化には種による特異性があることが示唆された。</p>	

P-48	<p>細菌のペプチドグリカン層が TiO₂ 光触媒殺菌に与える影響の検討 ○高尾 綾乃¹, 大嶋 佑治¹, 岡本 歩未¹, 藤嶋 昭², 鈴木 智順^{1,2} ¹東理大・応生, ²東理大・総研</p>
<p>【目的】光触媒反応による殺菌効果は、TiO₂に紫外線を照射することで産生する活性酸素種の強い酸化力によるものである。しかし、殺菌メカニズムの詳細は未だ完全に解明されておらず、ペプチドグリカン層に対する光触媒反応には、互いに相反する報告が存在しているのが現状である。そこで本研究では、芽胞を形成せず、ペプチドグリカン層が厚いグラム陽性桿菌である <i>Lactobacillus plantarum</i> JCM1149^T と、そのプロトプラスト細胞、そして細胞壁を持たない <i>Mesoplasma florum</i> NBRC100688^T に対して光触媒反応を行った後、BacLight 蛍光試薬による細胞膜損傷率評価を行い、それぞれの死滅速度の違いに着目することで、ペプチドグリカン層が光触媒反応に与える影響について明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法・結果】各細胞懸濁液 100 μL に対して BacLight 蛍光試薬 0.3 μL 加え、暗所で 15 分間静置した。その後、日本工業規格 (JIS) の JIS R-1702 に準じた実験評価系を構築し、各細胞に対して光触媒反応を行った。光触媒反応後、細胞膜非損傷率すなわち生存率を算出した。その結果、ペプチドグリカン層のある未処理細胞の方が死滅しやすいことが分かった。また、プロトプラスト細胞を作製する際に添加する細胞壁融解酵素が光触媒反応を抑制する可能性を評価したところ、細胞壁融解酵素の添加がプロトプラスト細胞の生存率低下抑制の原因ではないことが分かった。さらに、<i>M. florum</i> NBRC100688^T の死滅率とプロトプラスト細胞の生滅率に有意差はみられなかった。以上の結果から、ペプチドグリカン層が存在することで、光触媒による殺菌効果は促進されることが示唆された。</p>	

P-49	<p><i>Kaistia</i> sp. 32K 株の培養上清中での <i>Methylobacterium</i> sp. ME121 株のバイオフィルム形成に与える影響</p> <p>○薄井 祥明¹, 若林 佑¹, 清水 哲², 中村 顕², 伊藤 政博¹ (¹東洋大院・生命科学, ²筑波大・生命環境系)</p>
<p>【目的】 自然界では多くの細菌同士が互いに影響し合い生息していることが考えられる。このことから、近年、異なる種間の細菌同士を意図的に混合し培養する共培養の研究報告が増加している。本研究では、同一土壌サンプルから分離された <i>Methylobacterium</i> sp. ME121 株 (運動性あり, ME121 株) と <i>Kaistia</i> sp. 32K 株 (運動性なし, 32K 株) を使用した。これまで、32K 株を合成培地で培養して取得した 32K 株培養上清において ME121 株の遊泳速度向上が観察された。ME121 株の運動性向上には、32K 株の菌体外多糖類が関係していると推定された。菌体外多糖類はバイオフィルム形成の主成分であることから、本研究で 32K 株培養上清を使用して ME121 株のバイオフィルム形成への影響を調査することを目的とした。</p> <p>【方法・結果】 バイオフィルム形成量はクリスタルバイオレット染色法を用いて評価した。合成培地において、ME121 株はバイオフィルムを形成しないが、32K 株はバイオフィルムを形成することが明らかとなった。ME121 株と 32K 株の共培養時と 32K 株の単独培養時と比較すると、共培養時の方が有意なバイオフィルム形成量の増加が観察された。次に合成培地ではなく、32K 株の培養上清を用いてバイオフィルム形成量の定量を行った。32K 株培養上清において、ME121 株がバイオフィルムを形成することが明らかとなった。これらの結果から、32K 株が生産する物質によって ME121 株がバイオフィルムを形成し、共培養時にはより多量のバイオフィルムを形成し合うことが推察された。今後は ME121 株と 32K 株の共培養時におけるバイオフィルム形成と運動性向上の関係を明らかにする予定である。</p>	

P-50	<p>循環型汚水浄化槽における代謝産物要求細菌が必要とする物質の特定</p> <p>○山本 晃裕, 島田 紘帆, 鈴木 智順 (東理大・応生)</p>
<p>【目的】 当研究室で運転している循環型汚水浄化槽から、他の細菌（ヘルパー細菌）が生産する物質を必要とする代謝産物要求細菌が分離されている。しかし、その代謝産物がどのような物質なのかは、まだ解明されていない。また、生物にとって鉄は必要不可欠な元素であるが、環境中に生物が利用できる遊離鉄は限られている。しかし、微生物は鉄獲得因子であるシデロフォアを放出し、それを他の微生物が生育に用いていることが明らかとなっている。そこで本研究では、生育因子である代謝産物の性質・構造を明らかにし、さらには代謝産物要求細菌の生育と鉄との関連性を見出すことを目的とした。</p> <p>【手法・結果】 本研究では、ヘルパー細菌 JS5h 株と代謝産物要求細菌 3Cr 株を供試した。JS5h 株を人工汚水液体培地で培養後、菌体を除去し、JS5h 株培養濾液を得た。そして、分液、濃縮を行い、逆相シリカゲルクロマトグラフィーで分画後、得られたフラクションを乾固し、人工汚水で再溶解した。これらの溶液に 3Cr 株を植菌し、生育を確認することで、生育因子である代謝産物が含まれているフラクションを特定し、NMR 測定を行った。また、人工汚水培地と、塩化鉄(III)を加えた人工汚水培地で JS5h 株培養濾液を作製し、それぞれに 3Cr 株を植菌、培養した。その結果、生育因子である代謝産物はペプチドである可能性が示唆された。また、JS5h 株の鉄添加培養濾液は無添加培養濾液と比べ、3Cr 株の生育が促進された。JS5h 株の無添加培養濾液に鉄を添加しても 3Cr 株の生育に影響は及ぼさなかった。このことから鉄は 3Cr 株に直接影響を及ぼさず、JS5h 株の代謝に影響を与えていると考えられる。</p>	

P-51	<p>マイクロ流路を用いた二重層マイクロカプセルによる細菌分布の制御 ○¹高橋 晃平, ²豊福 雅典, ²小川 和義, ²野村 暢彦, ²Andrew S. Utada (¹筑波大・生命環境学群, ²筑波大・生命環境系)</p>
------	---

【目的】細菌は細胞外多糖類を放出することで菌体が凝集し、集団を形成する。このような凝集体の例として、水処理に用いられるグラニュールなどが知られている。グラニュールの内側と外側には異なる細菌種が局在しており、その局在性によって活性が高まっていると考えられる。しかしながら、細菌の局在がどのように凝集体の活性に影響を与えるかの詳細なメカニズムと時空間的な解析はなされていない。本研究では、凝集体の細菌局在の制御とその活性の関係を明らかにするために、細菌を包括する二重層のカプセルをマイクロ流路で形成した。

【方法・結果】マイクロカプセルはマイクロ流路中で、陰イオンであるアルギン酸溶液をオイルと流すことで乳化（エマルジョン）させ、陽イオンである塩化カルシウム溶液槽に加えることで作成した。流路の潤辺の小さいマイクロ流路で作成したマイクロカプセルを、より潤辺の大きなマイクロ流路でアルギン酸に再包括することで二重層のマイクロカプセルを作成した。また、アルギン酸溶液に菌体を混合しておくことで、マイクロカプセルへの細菌の包括も可能であった。本マイクロカプセルは顕微鏡下での観察が経時的に行えるという特徴を持つ。今後は、異なるカプセル層に細菌を局在させ、局在と活性の関係を解析していく。

P-52	<p>循環型汚水浄化槽内における他の細菌からの代謝産物により生育が可能な細菌の系統解析 ○鈴木 遥菜, 島田 紘帆, 鈴木 智順 (東理大・応生)</p>
------	---

【目的】細菌を系統解析することは、その細菌の進化上の位置づけを行うことであり、同時に種多様性の解明に繋がると期待されている。当研究室では、循環型汚水浄化槽を構築し、人工汚水を1週間、循環させて処理している。先行研究において、人工汚水培地では生育せず、処理水を用いた培地でのみ生育する代謝産物要求細菌3株が分離され、これらは16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析で相同値が99%以下であり、新種ではないかと考えられた。本研究では、循環型汚水浄化槽由来の代謝産物要求細菌3株(3Cr株, 5Fr株, HS3株)を用いて表現形を網羅的に解析すると共に、ほぼ全ての16S rRNA 遺伝子塩基配列を用いた分子系統解析を行い、これら3株の新属新種の提唱を行うことを目的とした。

【方法・結果】分離株の16S rRNA 遺伝子の全塩基配列を決定した。さらに、先行研究で解析途中であったHS3株の分子系統解析を行った。形態学的解析はコロニー観察、グラム染色、走査型電子顕微鏡を用いた細胞形態の観察により行った。生理生化学的性状はAPI ZYM (bioMérieux) を用いて各種酵素活性の有無を判定し、さらには生育温度の測定も行った。その結果、HS3株の16S rRNA 遺伝子塩基配列は*Pseudomonas caeni* HY-14^Tと相同値が97.3%となり、新属の可能性が示唆された。分離株3株は共にグラム陰性の桿菌で、コロニーはクリーム色で1~3 mmの大きさであった。生育可能温度は3株共に10~37℃で、生育至適温度は3Cr株と5Fr株では20℃、HS3株では25℃であった。なお、具体的な3株の生理生化学的性状については発表当日に報告する予定である。

P-53	<p>バイオマスを原料としたチロシン誘導体の微生物生産 ○嵯峨 知沙, 佐々倉 有麻, 梶尾 俊介, 川崎 志慧, 高谷 直樹 (筑波大・生命環境)</p>
<p>【目的】 チロシン誘導体には、医薬品や化粧品、香料などの原料に幅広く利用される産業上重要な化合物が多いが、その大量生産は化学合成に依存している。特に、クマル酸は様々なチロシン誘導体を生産する際の出発物質として、チラミンはカテコールアミン製剤などとして利用される重要なチロシン誘導体である。これら化合物の持続的生産のための代替法として、環境負荷の軽減が期待できる発酵生産技術の確立は重要である。本研究では、グルコースを原料とした組換え大腸菌によるチロシン誘導体の発酵生産を目的とした。</p> <p>【方法・結果】 <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)の代謝改変を行うことによりチロシン高生産菌を作製した。フィードバック阻害の解除をすることでシキミ酸経路を強化し、プレフェン酸脱水素酵素をコードする <i>tyrA</i> を高発現させたところ、72時間の培養でグルコースを基質として1.4 g/Lのチロシンを生産した(対糖収率 5.1%(w/v))。このチロシン生産菌に様々な異種酵素を導入することによって、チロシン誘導体の生産を行った。<i>Rhodotorula glutinis</i> 由来の脱アンモニア酵素をチロシン生産菌に導入することによって、48時間の培養で0.29 g/Lのクマル酸を生産した。また、トマト由来の脱炭酸酵素をチロシン生産菌に導入することによって、24時間の培養で0.20 g/Lのチラミンの生産が確認できた。</p>	

P-54	<p>イネいもち病菌における核数制御因子の探索 ○齋藤 翔太, 菊澤 佑斗, 荒添 貴之, 鎌倉 高志 (東京理大・応用生物)</p>
<p>【目的】 イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌 (<i>Pyricularia oryzae</i>) は感染特異的器官である付着器の形成から成熟までの細胞分化時を除き、1つの核が隔壁に仕切られた単核細胞で構成される。近縁であるアカパンカビ (<i>Neurospora crassa</i>) などの多核細胞で構成される糸状菌も複数存在するが、核数制御機構に着目した研究は少なく未解明な点が多い。本研究は単核細胞で構成されるイネいもち病菌の核数制御因子の探索とその機能解析を行うことで、核数制御機構とその生物学的意義の一端を明らかにすることを目的とする。</p> <p>【方法・結果】 我々はイネいもち病菌のヒストン H3 を GFP で可視化した H3::GFP 株を作出し、アグロバクテリウム法を用いたランダム遺伝子破壊による核数制御因子の探索を行った。得られた 994 の推定形質転換株の蛍光観察により、栄養菌糸において核数異常を示す 8 株を単離した。これら異常株のうち 7 株では分生子において隔壁の消失や過剰形成、核数の増減を示したことから、隔壁形成や核の局在、それらを制御する細胞周期などが本研究に関与することが推測された。残りの 1 株では、分生子形成過程を経ることで栄養菌糸時に観察されたヒストン H3 の GFP 蛍光の消失が見られた。DAPI 染色においては正常な核の染色が認められたことから、細胞分化時特異的な染色体構成の異常によるものと考えられた。</p>	

P-55	芳香族アミンの発酵生産システムの構築 ○皆川 一, 榎尾 俊介, 高谷 直樹 (筑波大・生命環境)
<p>【背景】芳香族アミンの一種である芳香族ジアミンは、種々のカルボン酸類と反応させることで高耐熱及び有機溶剤可溶性に優れたアラミド樹脂が得られる。我々はこれまでに、新規アラミド樹脂の原料として利用可能な新規芳香族ジアミンの発酵生産に成功している。本研究は、ジャーファーマンターを用いた大量培養によってこの芳香族ジアミンを大量に発酵生産するシステムを構築することを目的とする。</p> <p>【方法・結果】<i>Pseudomonas fluorescence</i> 由来の遺伝子を高発現させた大腸菌を用いた。ジャーファーマンターを用い、グルコースを炭素源とした培地の最適な培地成分を検討したところ 0.075 g/L の芳香族ジアミンを生産できた。次に、培養のスケールアップのために、3 条件の KLa の下での生産を検討し、5 L スケールの培養においても同等の芳香族ジアミンを生産することに成功した。さらに、最適 KLa 条件下で 600 L スケールで培養したところ、培養上清中に 21.6 g の当該芳香族ジアミンを生産できた。これを陽イオン交換樹脂に吸着・溶出させた後、エバポレーターを用いて溶出液を濃縮した。このジエチルエーテル抽出物を乾燥させて得られた沈殿をイソプロパノールに溶解・析出させることによって 4.4 g の芳香族ジアミンを得た（純度 89%、収率 20%）。以上の結果から、芳香族アミンの大量培養・発酵生産システムが構築できた。本研究によって高純度の芳香族ジアミンをグラムスケールで得られたことから、樹脂合成に新たな原料の提供が可能となった。</p>	

P-56	イネいもち病菌を利用した 抗生物質 Roxithromycin と標的候補タンパク質 Cdc27 の <i>in vivo</i> 解析 ○鈴木 優花, 林 真優子, 石井 晶, 荒添 貴之, 鎌倉 高志 (東理大院・理工・応生科)
<p>【目的】我々は「ドラッグリポジショニング」の概念に基づいて、植物病原糸状菌であるイネいもち病菌 (<i>Pyricularia oryzae</i>) の形質を利用し、既存薬剤の新規作用点の解明を行っている。先行研究において、本菌の感染時特異的器官である付着器の形成を指標とした既存薬剤の新規作用点の探索が行われ、14 員環マクロライド系抗生物質である Roxithromycin (RXM) がイネいもち病菌の Cdc27 (<i>Pyricularia oryzae</i> cell division cycle 27 : PoCdc27) に結合することで付着器形成を特異的に阻害することが示された (Ishii <i>et al.</i>, 2015)。そこで、本研究では RXM と Cdc27 の相互作用の解明を目的として研究を進めることにした。</p> <p>【方法・結果】<i>PoCDC27</i> の TPR (Tetratricopeptide Repeat) ドメインに点変異を導入した株を作出したところ、分生子形成ならびに付着器形成能の著しい低下がみられた。また、本変異株に <i>PoCDC27</i> を過剰発現させると発芽能や付着器形成能の回復がみられたが、ヒトの <i>CDC27</i> (<i>hCDC27</i>) を過剰発現させると回復がみられなかった。このことから、<i>hCdc27</i> は <i>PoCdc27</i> の機能を相補しないことが示唆された。一方で、野生株に <i>PoCDC27</i> や <i>hCDC27</i> を過剰発現させると、RXM への感受性が上昇する傾向がみられた。以上より、RXM によるイネいもち病菌の付着器形成の阻害は <i>Cdc27</i> の機能阻害によるものではなく、RXM と <i>Cdc27</i> との複合体形成に起因することが示唆された。</p>	

P-57	Evolution of hydrocarbon degradation pathway in <i>Thermus oshimai</i> JL-2. OJoydeep CHAKRABORTY ¹ , Chiho SUZUKI-MINAKUCHI ^{1,2} , Kazunori OKADA ¹ , Hideaki NOJIRI ^{1,2} (¹ BRC, UTokyo, ² CRIIM, UTokyo)
<p><i>Thermus oshimai</i> JL-2, an aerobic thermophile isolated as a nitrate reducer from the United States Great Basin hot springs, bears a unique cluster of oxidoreductase genes located within a 0.27 Mb megaplasmid, pTHEOS01. Comparative genomics have indicated that the cluster is quite conserved only among few Thermales but does not show any resemblance with any known catabolic gene cluster in other bacteria. Based on gene sequence homology and synteny, the cluster has been hypothesized as a newly assembled set of genes (acquired by lateral transfer from taxonomically diverse members) divided into two putative operons, and responsible for degradation of carboxylated aromatic hydrocarbons. Degradation studies and spectrophotometric analyses of enzyme activities have revealed that <i>p</i>-hydroxybenzoate (PHB) is an inducer of the catabolic operon and that, the strain degrades PHB via protocatechuate and catechol, following a novel degradation pathway involving thermostable enzymes. The strain is thus a model for studying evolution of catabolic pathway(s) by vertical expansion in thermophiles. Gene disruption experiments and qRT-PCR analyses are underway to understand the involvement of individual genes in catalytic steps and regulation of the pathway, respectively.</p>	

P-58	異種間のショウジョウバエにおける糖に対する反応性の遺伝学的解析 ○阿部真生子 ¹ 、渡辺佳織 ² 、服部佑佳子 ² 、上村匡 ^{2, 4} 、丹羽隆介 ^{3, 4} 1) 筑波大学 生物学類、2) 京都大学院 生命科学、3) 筑波大学院 生命環境系、 4) AMED-CREST, AMED
<p>[目的] 交配可能な近縁種であるキイロショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i> (<i>D. mel</i>) とセイシェルショウジョウバエ <i>Drosophila sechellia</i> (<i>D. sec</i>) は、食餌中の糖に対する反応性が大きく異なる。すなわち、<i>D. sec</i> の高糖条件における寿命は <i>D. mel</i> に比較して著しく低く、またこの際の体液中グルコース濃度は <i>D. sec</i> の方が顕著に高い。一方で、<i>D. mel</i> と <i>D. sec</i> の F₁ 雑種成虫を高糖エサ条件下に置くと、寿命と体液中グルコース濃度は、<i>D. mel</i> のそれに似ることが明らかになった。この結果を受け、糖に対する反応性の種間差を決定付けている顕性（優性）遺伝子は <i>D. mel</i> 側に存在すると考察した。そこで本研究は、<i>D. mel</i> のどの染色体座位が糖に対する反応性を決定付けているのかを解明することを目的とした。生命現象を制御する遺伝的メカニズムの多くがショウジョウバエとヒトで共通していることから、同定された遺伝子がヒトにも保存されていれば、将来的にはヒトにおける糖に対する反応性への理解向上にもつながると期待できる。</p> <p>【方法と結果】 染色体の一部が欠失している <i>D. mel</i> 系統（Df 系統）を用いて、<i>D. sec</i> との F₁ 雑種の寿命測定と体液中グルコース濃度の測定を行った。この結果、複数の Df 系統と <i>D. sec</i> の F₁ 雑種の高糖条件下での寿命は、野生型同士の交配による F₁ 雑種に比べて有意に低下し、一方で体液グルコース濃度は有意に低くなった。現在、Df 系統の中で欠いている染色体領域に存在する遺伝子を精査しており、本発表ではそれも合わせて報告する。</p>	

P-59	<p>ムラサキイモ濃縮エキスがマウス摘出腸管におけるアルコール吸収に及ぼす影響</p> <p>○鍛治 諒太郎¹, 鈴木 優香², 古我 匠², 本間 知夫¹ (¹前橋工大院・生物工学, ²日農化学工業(株))</p>
<p>【目的】ムラサキイモ濃縮エキス(Purple Sweet Potato Extracts, 以下 PSPE と表記, 日農化学工業(株)製)を飲酒前に服用すると, 呼気中アルコール濃度のピーク値低下や低下速度促進などが確認され, PSPE が飲酒時に作用を示すことが示唆されたが, その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では, PSPE が腸管レベルでアルコール吸収を抑制するかどうかを調べることを目的として実施した。</p> <p>【方法】PSPE をリンガー液で重量比 250 倍希釈と 100 倍希釈になるよう調製したものをサンプルとして使用した。マウス摘出小腸を 3 等分し, そのまま片側を結紮して腸管内部にサンプル(あるいはコントロールとしてリンガー液のみ)100 μL を入れた腸管標本を, 37°C・混合ガス(95%O₂-5%CO₂)通気下のリンガー液に 2 分間浸した後, 一度腸管標本を取り出して腸管内部にさらに 5%エタノールを含むリンガー液を 100~1200 μL 入れ(個体・腸管部位により異なる), 再びリンガー液内に 15 分間浸した。その後腸管標本内部の液を回収し, エタノール濃度を F-キット エタノール(JK インターナショナル)で測定した。</p> <p>【結果】腸管で吸収されるエタノール量は腸管の長さにより異なるため, 腸管 1 g あたりの吸収量に換算した。そして各腸管標本部位で得られたエタノール吸収量を合計し, 全腸管標本重量で割ることで腸管全体におけるエタノール吸収量を求めた。コントロール, 250 倍希釈サンプル投与, 100 倍希釈サンプル投与におけるエタノール吸収量は, それぞれ 43.54±5.32(n=3), 34.52±3.41(n=5), 31.65±1.91(n=3)(mg/g-intestine)となり, PSPE 存在下ではアルコール吸収が腸管レベルで抑制されることが示唆された。</p>	

P-60	<p>クランウェルツノガエルにおけるビタミン E 同族体の選択的体内保持</p> <p>○矢竹 真, 松岡 佐紀, 石井 萌香, 竹中 麻子 (明治大農・農化)</p>
<p>【目的】自然界には, α-, β-, γ-, δ-トコフェロール(Toc)とトコトリエノールの 8 種類のビタミン E 同族体が存在する。哺乳類や鳥類, 魚類の体内では α-Toc の体内濃度が他の同族体より高く, これは α-Toc 輸送タンパク質により α-Toc が選択的に肝臓から血中に輸送され, 体内に保持されるためと考えられている。一方, 他の多くの生物において α-Toc が選択的に体内に保持されるかどうかは検討されていない。そこで本研究では両生類を用いてビタミン E 同族体の選択的体内保持について検討した。</p> <p>【方法】クランウェルツノガエルの幼生(生後 17 日)および成体(生後 44 日)を用い, 体内ビタミン E 濃度を低下させる目的でビタミン E 欠乏食を 1 週間与え, 24 時間絶食後に一部を凍結した(con 群)。幼生は全身を凍結し, 成体は肝臓とそれ以外の部位に分けて凍結した。残りの個体には, α-Toc, δ-Toc, α-及び δ-Toc をそれぞれ 0.05 g/100 g 添加した食餌を 5 日間与え(α 群, δ 群, αδ 群), 24 時間絶食後, con 群と同様に凍結した。凍結時の体重を測定し, 凍結サンプルの α-, β-, γ-, δ-トコフェロール濃度を HPLC により測定した。</p> <p>【結果】幼体, 成体どちらにおいても, 実験食は体重に影響を与えなかった。また, αδ 群の体内の α-Toc 濃度の増加は, δ-Toc 濃度の増加よりも大きかった。よって, 両生類であるクランウェルツノガエルにおいても, α-Toc を選択的に体内に保持することを明らかにした。</p>	

P-61	<p>マウス摘出腸管における糖吸収に及ぼす梅抽出液の影響</p> <p>○廣瀬 仁志, 本間 知夫 (前橋工大院・生物学)</p>
<p>【目的】青梅果実をホワイトリカー(以下 WL と表記)に浸して得られた抽出液(梅リカー抽出液, 以下 UL と表記)の美白効果に関する研究を進めているが, UL 摂取による生体機能性についても調べようと考えた。本研究ではマウス摘出腸管における糖吸収に対する UL の作用を調べることを目的とした。</p> <p>【方法】群馬県産青梅果実を WL に3ヶ月間漬けて得られた液(酸性)を pH 7.0 に調製したもの(UL)をサンプルとした。マウス摘出小腸の上部 2/3 を6等分し, 各部腸管を反転させて漿膜側に Krebs 液を入れて反転腸管標本とした。37°C, 混合ガス(95%O₂-5%CO₂)通気下の Krebs 液に反転腸管標本を浸し, 粘膜側を基準(マイナス極)として漿膜側の電位(プラス極)を測定し, 粘膜側にグルコース(作用濃度 5 mM, 以下 Glu と表記)を投与して発生する Glu 輸送電位をレコーダーに記録した。UL あるいは WL を粘膜側に投与(作用濃度は共に 1%あるいは 5%)して Glu 輸送電位に及ぼす影響を調べた。なお Glu 輸送電位は繰り返し得られるが, 1回目と2回目以降では電位の大きさが異なるため, 2回目以降に各試験を実施した。</p> <p>【結果】2回目の Glu 輸送電位の大きさを 100%とし, UL あるいは WL 存在下の Glu 輸送電位, 腸管洗浄後の Glu 輸送電位の大きさを相対的に表し, UL あるいは WL の影響を調べた。UL1%投与では小腸上部で, UL5%投与では小腸中部にて Glu 輸送電位の減少がみられ, UL により Glu 吸収が抑制されることが示された。ただし WL5%投与でも Glu 輸送電位は減少したことから, 含まれるアルコールの影響と思われる。現在, アルコールを含まない水による梅抽出液の作用についても調べている。</p>	

P-62	<p>皮膚の適応免疫応答における核内受容体型転写因子 NR4A3 の寄与</p> <p>○中野 詩織, 八代 拓也, 西山 千春 (東理大院・基礎工)</p>
<p>【目的】これまでに私たちは核内受容体型転写調節因子 NR4A3 が樹状細胞に強く発現していることを見出し, NR4A3 が樹状細胞の分化や活性化を制御することを報告している (Nagaoka, Yashiro, et al. <i>J. Immunol.</i> 2017)。一方, 生体の免疫応答における NR4A3 の役割はほとんど不明であったことから, 本研究では, 皮膚免疫システムにおける NR4A3 の寄与を明らかにすることを目指した。</p> <p>【方法・結果】<i>Nr4a3</i>^{+/+} (以下 WT)及び <i>Nr4a3</i>^{-/-} (以下 KO)マウスから皮膚リンパ節 (cLN)細胞を調製し, フローサイトメトリーを用いて解析した結果, KO では遊走性樹状細胞 (migDC)の割合が減少していた。炎症状態における NR4A3 の機能を解析するため, FITC, oxazolone, DNFB の3種類のハプテンを用いて接触過敏反応 (CHS)を誘導した。その結果, FITC や低濃度 DNFB を用いた CHS では耳介腫脹が KO で減弱していた一方で, oxazolone と高濃度 DNFB を用いた際には WT と KO 間で耳介の腫れに有意な差が認められなかった。FITC 感作1日後の WT の cLN には FITC⁺ migDC が多数遊走していたのに対し, KO では FITC⁺ DC がほとんど検出されなかった。また, FITC 感作5日後には WT の cLN において, メモリー CD4⁺ T 細胞, メモリー CD8⁺ T 細胞, エフェクター CD8⁺ T 細胞の割合が増加していたが, KO ではこれらの細胞の割合は変動していなかった。FITC 処理した WT マウスの骨髄由来培養 DC を KO マウスに移入して惹起を行った結果, 耳介の腫れは WT と同程度に回復した。以上の結果から, 弱いハプテンでの感作時, NR4A3 は皮膚 DC の抗原輸送能を制御することで獲得免疫の成立に関与することが示唆された。</p>	

P-63	<p>胆汁酸受容体 TGR5 による骨格筋肥大効果の解明とその機能発揮に関わる新規遺伝子の探索 ○久保山 文音, 佐々木 崇, 清水 誠, 佐藤 隆一郎 (東大院・農生科・応生化)</p>
<p>【目的】胆汁酸受容体 TGR5 は全身で幅広く発現する G タンパク質共役受容体である。これまでに、TGR5 は小腸における GLP-1 分泌促進や褐色脂肪組織における熱産生亢進を介して糖代謝改善効果や抗肥満効果を発揮することが報告され、代謝との深い関連が示されてきた。しかし、主要な代謝器官である骨格筋での TGR5 の機能は不明であった。本研究では、遺伝子改変マウスを用いて骨格筋 TGR5 の機能解析に取り組み、さらにその機能発揮に際して重要な役割を果たす新たな遺伝子の探索とその解析を試みた。</p> <p>【方法・結果】まず骨格筋特異的 TGR5 トランスジェニック (Tg) マウスを作出し、同腹仔野生型 (WT) マウスと表現型を比較した結果、Tg マウスでは筋重量の増加と筋線維の肥大化および筋力の上昇が認められた。続いて、Tg マウスの骨格筋をマイクロアレイに供したところ、WT マウスに比べ Tmem100 遺伝子の発現が上昇しており、さらに全身性 TGR5 ノックアウトマウスの骨格筋では反対に Tmem100 の発現低下が確認された。2 回膜貫通型タンパク質である Tmem100 は、神経細胞において Ca²⁺チャネル TRPA1・TRPV1 との相互作用により痛覚伝達を担うことが知られている。一方で骨格筋 TRPV1 の活性化が mTOR を介した筋肥大に寄与するという過去の報告があること、そして Tmem100 が筋肥大効果を有する TGR5 と発現相関することから、筋量制御に関与する新規遺伝子として Tmem100 に着目した。発現制御機構解析の結果、Ca²⁺シグナルが Tmem100 の発現を制御することが明らかとなったため、今後 TGR5 と Ca²⁺シグナルの結びつきを検討することで筋量調節に関わる新たな知見が得られるものと期待される。</p>	

P-64	<p>N-型糖鎖におけるゴルジ体 β-ガラクトシダーゼによる逆行修飾酵素としての可能性 ○小野寺 千尋, 三浦 一輝, 袴田 航, 平野 貴子, 西尾 俊幸 (日大院・生資科)</p>
<p>【目的】我々はヒト培養細胞のゴルジ体に新規な β-ガラクトシダーゼ (β-Gal) 活性を報告し (<i>Bioorg. Med. Chem.</i>, 2016) し、その活性本体と機能解明を目的に研究を行っている。ヒト細胞内に存在する β-Gal 遺伝子は <i>GLB1</i> 遺伝子のみであり、この <i>GLB1</i> はリソソーム β-Gal をコードしていることが知られている。そこで我々は、リソソーム β-Gal の前駆体タンパク質である precursor GLB1 (pGLB1) がゴルジ体で β-Gal として機能しているのではないかと仮定し、2 つの酵素源 (Recombinant human pGLB1 (rhGLB1) およびヒト培養細胞) および 2 つの蛍光基質 (ゴルジ体 β-Gal 基質 (G β-Gal)・リソソーム β-Gal 基質 (SA β-Gal)) を用いて、<i>in vitro</i> およびヒト培養細胞において、活性局在・至適 pH 等の基質特異性を中心とした pGLB1 の諸性質の解明を行った。</p> <p>【方法・結果】<i>In vitro</i> において、rhGLB1 はリソソームの pH (3.5) でリソソーム β-Gal の基質を分解することのみ報告されている。そこで、G β-Gal および SA β-Gal を用いてゴルジ体の pH (6.5) およびリソソームの pH における β-Gal 活性の比較を行った。その結果、両基質においてリソソームの pH に比べ、ゴルジ体の pH で非常に高い酵素活性が認められた。Cell-based では、G β-Gal がゴルジ体、SA β-Gal がリソソームにおいて分解されそれぞれの存在するオルガネラを特異的に染色することが認められた。これらの結果から、pGLB1 はゴルジ体において C 末端のプロセッシングを受け、基質特異性・至適 pH が変化しリソソーム β-Gal に成熟すると考えられ、その変化を得られた結果と pGLB1 の立体構造より考察した。</p>	

P-65	<p>広域病害抵抗性を示す <i>BSR1</i> 過剰発現イネでは MAMPs 応答性オキシダティブバーストが亢進する ○神田 恭和^{1,2}, 西澤 洋子¹, 鎌倉 高志², 森 昌樹^{1,2} (¹農研機構生物機能利用研究部門, ²東理大院・理工・応生)</p>
<p>【目的】<i>BSR1</i> (<i>Broad-spectrum resistance1</i>) は、受容体様細胞質キナーゼ (RLCK) サブファミリーVII に属するイネ遺伝子である。<i>BSR1</i> を過剰発現させたイネやシロイヌナズナは細菌病と糸状菌病の両方に対して顕著な抵抗性を示す。同サブファミリーの知見より、MAMP-triggered immunity (MTI) におけるリン酸化シグナリング経路への関与が予想された。しかし、実験的裏付けは乏しく、また過剰発現がどのようにして抵抗性を賦与するかは明らかになっていなかった。</p> <p>【方法・結果】初めに、本来の MTI への <i>BSR1</i> の寄与を検証するために、典型的な MAMP エリシター (キチン, ペプチドグリカン, LPS) 処理下での <i>BSR1</i> ノックアウト培養細胞の防御応答を定量した。<i>BSR1</i> ノックアウトは MAMP エリシターに応答した H₂O₂ 産生 (オキシダティブバースト) と防御関連遺伝子の発現上昇を抑制した。この結果から、<i>BSR1</i> が本来の機能として MTI シグナリング経路で働くことが強く示唆された。次に、<i>BSR1</i> 過剰発現が MAMPs 応答に与える影響を解析した。その結果、タグ化 <i>BSR1</i> を過剰発現する培養細胞が MAMP エリシター存在下で野生型を大きく上回る濃度の H₂O₂ を産生することが明らかになった。一方で、防御関連遺伝子の発現量は過剰発現によって必ずしも上昇するわけではなかった。これらの結果は、病原体の感染に対して <i>BSR1</i> 過剰発現イネがより強いオキシダティブバーストを起こすことを示している。オキシダティブバーストに伴う大量の H₂O₂ による病原体の傷害や ROS シグナリングの増幅が、<i>BSR1</i> 過剰発現体における病害抵抗性の原因であることが示唆された。</p>	

P-66	<p>Study on the Chemical Content of Secretory Idioblasts in <i>Egeria densa</i> Leaves ○Aisya Syahmina, Akane Yamagishi, Mai Shinozuka, Mikako Kanazawa, Koki Munakata, Shingo Onda, Toyonobu Usuki, and Makoto Fujiwara (Faculty of Science and Technology, Sophia University)</p>
<p>[Background] <i>Egeria densa</i> (Hydrocharitaceae) is a waterweed whose leaf idioblasts lack chlorophylls. Under UV light irradiation, these idioblasts emit light blue fluorescence and are easily distinguished from the surrounding epidermal cells which emit red autofluorescence from chlorophylls. There were conflicting data on the chemical nature of the idioblast content. However, the exact compound(s) has not been reported. The chemical characterization of the contents may help us understand the development and function of these idioblasts. Here, we report our current results of the cell staining and chemical extraction experiments.</p> <p>[Methods and Results] The cell staining experiments were conducted using several classical histochemical reagents. Among the reagents that were employed, only Nile Blue A, an indicator for acidic lipids, stained the idioblasts. This confirmed a previous study that the idioblast content is lipophilic and acidic. For the organic solvent extraction, the fluorescent idioblast content was observed through fluorescence microscopy to determine its successful extraction. Methanol extracted the idioblast content, along with the extraction of the chlorophylls. Meanwhile, ethanol extracted only the chlorophylls, while idioblast fluorescence became red-shifted. Based on these, we plan to analyze both the methanol and the two-step ethanol followed by methanol extracts for blue and red-purple fluorescent compounds. The candidates which show lipophilicity and acidity may point to the target idioblast content.</p>	

P-67	<p>突発的防御応答と計画的発生プログラムを結ぶ”生きた”遺伝子制御ネットワーク ○荒井 萌伽¹, 安江 啓人², 根岸 洸平², Erich Grotewold³, 諸橋 賢吾^{1,2} (¹東京理科大・応用生物科学, ²東京理科大院・応用生物科学, ³ミシガン州立大学)</p>
<p>【目的】 植物は外敵となる草食昆虫や真菌などから身を守るために、様々な防御応答機構を発達させてきた。その一つに植物体表面に存在する毛状様器官トライコームがある。トライコームは、特に草食昆虫に対する防御応答の役割を担うことが知られており、草食昆虫の食害によって形成が誘導される。一方で、トライコーム形態形成は発生において計画的にプログラムされており、その遺伝子制御ネットワーク (GRN) が研究されてきた。しかしながら、突発的な防御応答によるトライコーム形成と、計画的発生プログラムに依存したトライコーム形成という異なる経路を、植物がどのように制御しているのか、特に包括的な GRN はよくわかっていない。私たちはシロイヌナズナのトライコーム形成において、防御応答誘導と発生プログラムを一つのシステムとして捉え、GRN を明らかにすることを試みた。</p> <p>【方法・結果】 トライコーム形成に必要な十分なマスター転写因子である GL3 の機能を人為的に誘導可能な組み換えシロイヌナズナを用い、経時的なゲノムワイドな遺伝子発現データ (RNA-seq) を取得した。誘導時間ごとの遺伝子発現変動データの相関係数を基にした GRN を構築し、各誘導時間において中心となる転写因子群に着目した。その結果、食害が引き起されていないにも関わらず、防御応答関連遺伝子群の発現も誘導されていることがわかった。この結果は、発生プログラムと防御応答の GRN が進化的に起源をひとつにしている可能性を示唆している。今後は、トライコーム形成における防御応答誘導と発生プログラムのより詳細な関係性を探り、包括的トライコーム GRN の構築を目指す。</p>	

P-68	<p>シロイヌナズナ葉緑体分裂異常変異体 <i>arc5</i> と <i>arc6</i> の葉表皮色素体の形態解析 ○藤原 誠^{1,2}, 安澤 愛¹, 湖城 恵¹, 丹羽 康夫³, 阿部 知子², 吉田 茂男², 中野 雄司^{2,4}, 伊藤 竜一⁵ (¹上智大・理工, ²理研, ³静岡県大・生活健康科学, ⁴JST, ⁵琉球大・理)</p>
<p>【目的】 葉緑体は対称二分裂によって増殖する。葉緑体分裂装置 (分裂リング) はストロマ, 内包膜, 外包膜, 細胞質に局在する多様な分裂因子群からなる。シロイヌナズナの <i>ARC5</i> と <i>ARC6</i> はそれぞれ分裂装置を構成する細胞質のダイナミン様タンパク質と内包膜の膜貫通タンパク質をコードする。<i>arc5</i> 変異体の葉肉細胞では狭窄が途中で停止した葉緑体が形成され、<i>arc6</i> の葉肉細胞では一細胞あたり 1~数個の巨大葉緑体が形成される。今回、私たちは <i>arc5</i> と <i>arc6</i> の葉表皮細胞と孔辺細胞の色素体を解析した。</p> <p>【方法】 シロイヌナズナストックセンターから入手した <i>arc5</i>, <i>arc6</i> 変異体を、ストロマ局在性蛍光タンパク質を構成的に発現する形質転換系統と交配した。野生型と葉緑体分裂阻害変異体 <i>atminE1</i> をコントロールとして用い、本葉葉柄部の表皮色素体を共焦点レーザー顕微鏡及び蛍光顕微鏡を用いて観察した。</p> <p>【結果】 <i>arc5</i> の表皮色素体は稀に巨大化を示したものの、多くは形態・分裂共に正常であった。<i>arc6</i> の表皮色素体は、巨大葉緑体からミニ色素体に至る多型を示し、ストロミュールの異常昂進、ブドウ様の色素体集団の形成、さらに高い増殖活性という多面的な異常を示した。興味深いことに、<i>arc5</i> では稀に、<i>arc6</i> では頻繁に葉緑体を欠失した孔辺細胞が現れ、それらの内部にはそれぞれ過去に報告のない異常形態の色素体が存在した。以上より、葉表皮の色素体 (葉緑体) は <i>arc5</i> でも分裂可能であること、さらに 1 枚の葉の中でも葉緑体分裂異常表現型は組織または細胞タイプによって異なることが示された。</p>	

P-69	<p>新規植物免疫活性化剤を用いた動的な遺伝子制御ネットワーク解析により植物免疫システムの制御機構を解き明かす ○安江 啓人, 中野 正貴, 北畑 信隆, 朽津 和幸, 諸橋 賢吾 (東理大・理工)</p>
<p>【目的】植物は病害菌を認識すると、サリチル酸(SA)とジャスモン酸(JA)等の植物ホルモンを始めとするさまざまなシグナル伝達物質が関与する複雑な植物免疫システムを介して抵抗応答を示す。これらの植物ホルモンは、拮抗的あるいは協調的にはたらくことが知られているが、制御機構の全貌は未解明の点が多い。最近北畑らは、植物免疫システムを活性化し、シロイヌナズナの耐病性を亢進する新規植物免疫活性化剤群を同定した(斉藤ら 本大会)。本研究では、化合物処理による、経時的な遺伝子発現変動をトランスクリプトーム解析し、遺伝子間の関わり合い、ネットワークの経時的な変化に着目することで、複雑な植物免疫システムの制御機構の解明を試みた。</p> <p>【手法・結果】時系列トランスクリプトームデータを取得し、動的な遺伝子制御ネットワーク(tGRNs)を作成し、ネットワーク解析による植物免疫システムの制御機構解明を目指した。シロイヌナズナ芽生えに対し、3種のCY化合物(CY15, CY16, CY20)を別々に処理し、1, 3, 12, 24時間後の植物体を回収しRNA-Seqを行った。その結果、4,688の発現変動遺伝子群(DEGs)を同定した。これらDEGs間における遺伝子発現の相関をピアソンの相関係数(PCC)で評価し、各CY化合物ごとのDEGsをもとに、誘導時間に依存したtGRNsを構築した。遺伝子発現の相関が高い遺伝子を多く含む転写因子クラスターに着目した結果、例えば、CY16処理後1時間では、エピジェネティクスに関わる遺伝子群が多く含まれているクラスターを見出した。各化合物の固有のtGRNを見出すことによって、新たな制御関係の解析を進めている。</p>	

P-70	<p>環境ストレスに応答した青シソ二次代謝関連遺伝子の発現変動 ○平安山 昌史¹, 井口 広也¹, 加川 夏子², 華岡 光正¹ (¹千葉大院・園芸・応用生命化学, ²千葉大・環境健康フィールド科学センター)</p>
<p>【背景・目的】植物が生産する代謝産物は、生命活動を維持するための一次代謝産物と、ストレス応答や繁殖などに利用される二次代謝産物に分けられる。二次代謝産物の中には強い薬理作用を持つものもあり、医薬分野への応用も期待されている。しかし、通常時に植物が生産する二次代謝産物量は僅かであるため、産業利用に向けたスケールアップが望まれている。本研究で用いた青シソは、生育や繁殖が容易であり、また二次代謝産物としてロスマリン酸などのフェニルプロパノイドやフラボノイド・テルペノイド類を多く合成する植物種である。本研究では、青シソの葉における二次代謝と様々なストレス因子との関係性を二次代謝関連遺伝子の発現量に着目することで調査し、二次代謝産物の合成量を促進させるストレス条件の確立を目指した。</p> <p>【方法・結果】10週間以上生育した青シソの葉を茎から切り離し、傷害や低温といった様々なストレス処理を行い、各葉位での二次代謝関連遺伝子の発現量変化をノーザンプロット解析により調べた。また、有意に発現の増加が見られた条件に関しては、HPLCを用いた成分定量解析を行うことで二次代謝産物の含有量変化も調べた。その結果、葉を1cm四方に断片化する傷害ストレス条件において、フェニルプロパノイド合成に関与する遺伝子のmRNA量や、二次代謝産物であるロスマリン酸などの含量が増加することが見いだされ、ストレス応答による二次代謝変動の一側面を確認することができた。本発表では、傷害に加えて他のストレスに対する応答についてもあわせて報告する。</p>	

P-71	<p>イネ花粉成熟過程の葯タペート細胞のプログラム細胞死におけるオートファジー・活性酸素種(ROS)生成酵素の役割と制御機構 ○小川 和准¹, 澤田 隼平¹, 福永 任吾¹, 北畑 信隆¹, 花俣 繁^{1,2}, 小野 聖二郎³, 野々村 賢一³, 来須 孝光^{1,4}, 朽津 和幸¹ (¹東京理科大理工, ²新潟・農, ³国立遺伝研, ⁴公立諏訪東京理科大工)</p>
<p>植物の花粉成熟過程において、葯の最内層のタペート細胞にプログラム細胞死(PCD)が誘導され、花粉に表面構造の材料や栄養が供給される。我々は、イネのオートファジー欠損変異体では、タペート細胞のPCDが遅延し、花粉成熟不良による重篤な雄性不稔性を示すこと、一核期のタペート細胞でオートファジーが誘導されPCD制御に重要であることを見出した(Kurusu <i>et al. Autophagy</i> 2014; Hanamata <i>et al. Front Plant Sci</i> 2014; Kurusu & Kuchitsu <i>J Plant Res</i> 2017; 来須 <i>et al. BSJ Review</i> 2018)。タペート細胞のオートファジー動態の可視化系を構築し、透過電子顕微鏡解析を併用して解析した結果、野生型ではstage 10で急激にオートファジーが誘導されるが、タペート細胞のPCDを制御する転写因子EAT1の変異体ではオートファジー誘導が抑制されることが明らかになった。一方、PCD制御に活性酸素種(ROS)生成が関与する可能性を検証するため、ROSを積極的に生成する酵素NADPH oxidase/Rboh(朽津ら 本大会発表参照)を探索したところ、葯特異的に発現する<i>OsRbohF</i>を見出した。ゲノム編集により<i>OsRbohF</i>欠損変異体を単離し、表現型を解析したところ、オートファジー欠損変異体と同様に、タペート分解不全、花粉形成の不良を伴う雄性不稔性を示すことが明らかとなった。タペート細胞のPCD制御におけるオートファジー、ROS蓄積の意義と、転写因子EAT1を介した制御機構について議論する。</p>	

P-72	<p>シロイヌナズナにおける微生物資材の作用機作に関する研究 ○内山 優里恵¹, 李 克², 西片 百合¹, 長谷川 雄大², 藤原 徹², 安保 充¹ (¹明大農, ²東大院農)</p>
<p>【目的】 本研究では微生物資材の効果を植物体への作用機作の観点から解明することを目的とした。本研究で用いた微生物資材では、チシャにおいて地上部湿重量の増加と地上部中Mo量の顕著な増加が確認されている¹⁾。今回はシロイヌナズナにおいて同様の効果が示されるか確認し、微生物資材の無機成分吸収への作用に着目して実験を行った。</p> <p>【方法・結果】 微生物資材として、紅色非硫黄細菌を主体とする光合成肥料であるバクテリアン(ワタナベ産業)を用いた。植物サンプルとして、シロイヌナズナCol-0株を用いた。生育は、人工気象器内で温度20℃、湿度60%に設定し、1/10MS寒天培地で10日間生育させた後、生育条件の異なる培地に株を移植し、さらに10日間生育した。生育条件は、Control(資材なし)、B(資材あり)に設定した。地上部、根の湿重量により増収効果の評価を行った。その後、ICP-MS(Perkin Elmer, NexION[®] 300D)による地上部、根中のMo量の測定を行った。また、Mo量増加にモリブデントランスポーターが関与していると仮定し、MOT1, MOT2のmRNA発現量をQuantitative RT-PCRにより測定した。結果として、地上部湿重量の増加、地上部、根中Mo量増加が示されたが、BでのMOT1, MOT2のmRNA発現量増加は見られなかった。</p> <p>1) 西片ら：日本農芸化学会2017年度大会要旨集P1886</p>	

P-73	<p>トマト班葉細菌病菌に対するシロイヌナズナの耐病性の簡便な新規定量的評価法の開発と新規植物免疫活性化剤候補化合物の評価 ○中野 正貴¹・北畑 信隆¹・石賀 貴子²・石賀 康博²・朽津 和幸¹ (¹東理大・理工・²筑波大・生命環境)</p>
<p>【背景・目的】我々は、タバコ BY-2 細胞と卵菌由来のタンパク質 cryptogein を用いたハイスループットスクリーニング系(特許第 5885268 号)により、11,000 化合物から ROS の生成と過敏感細胞死を活性化する植物免疫活性化剤候補化合物群を同定した。また、これまで化合物群を処理したシロイヌナズナにおけるフラジェリン由来ペプチド flg22 添加による ROS 生成をはじめとした諸性質を明らかにしてきた。しかしながら、化合物の数が多く、これらの耐病性への影響の評価は十分に行われていなかった。そこで、化合物処理によるシロイヌナズナの耐病性の変化をハイスループットに評価できる方法を開発することを目的として本研究を行った。</p> <p>【方法・結果】シロイヌナズナのマイクロタイタープレート液体培養系と蛍光タンパク質を発現したトマト班葉細菌病菌(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000, <i>Pto</i> DC3000)を用いて、シロイヌナズナの耐病性や、植物免疫活性化剤候補化合物の効果をハイスループットに評価できる新たな手法を開発した。この方法は、従来法と比べて、少量の化合物で耐病性に対する影響を短時間に定量解析可能である。この方法について報告するとともに、この手法を用いて植物免疫活性化剤候補化合物がシロイヌナズナの耐病性に与える影響の評価を行ったので、その結果を報告する。</p>	

P-74	<p>カリキン受容体阻害剤の探索 ○酒井 寿彦, 姜 凱, 喜久里 貢, 高橋 郁夫, 徐 玉群, 宮川 拓也, 田之倉 優, 中村 英光, 浅見 忠男 (東大院・農生科・応生化)</p>
<p>【背景・目的】Karrikin (KARs) は植物が燃焼すると生じる煙中の成分である。KAI2 は KARs を受容することによって種子の発芽を促進するための情報伝達因子であり、焼け野原となった大地に再び植物を繁茂させるといった、重要な役割を果たしていると考えられている。また、KAI2 は胚軸伸長を抑制するなど、光形態形成などにも関わっていることが知られている。しかし、植物内在性の KAI2 タンパク質のリガンドは未だ明らかになっていない。KAI2 受容体阻害剤の創製と応用により、未解明な多様な植物における KAI2 機能の追究が可能になると期待できる。そこで KAI2 阻害剤の探索を行った。</p> <p>【方法・結果】KAI2 はストリゴラクトン (SL) 受容体である D14 と同様に α/β 加水分解酵素ファミリーに属し、リガンドの受容機構やシグナル伝達機構に多くの共通点を有していることから、D14 のアンタゴニストとして働く化合物中に KAI2 アンタゴニスト活性を有する化合物が含まれている可能性が期待できる。そこで当研究室で開発された SL アンタゴニスト探索のために構築された化合物ライブラリーを対象として KAI2 アンタゴニストのスクリーニングを行った。シロイヌナズナの胚軸伸長抑制の阻害を指標とした結果、KAI2 阻害剤候補化合物として 2 種類の化合物を選抜した。さらに、等温滴定カロリメトリーを用いた KAI2 タンパク質と化合物の親和性の測定では、2 つの候補化合物のうち 1 つの化合物について、KAR1 よりも高い親和性を観察することができた。現在、さらなる生化学的な解析によるこれらの化合物の KAI2 阻害剤としての特性の評価を行っている。</p>	

P-75	<p>植物の感染防御応答を亢進する新規抵抗性誘導剤候補化合物の探索 ○佐藤 静香¹, 北畑 信隆^{1,2}, 中野 正貴¹, 石賀 康博³, 来須 孝光^{2,4}, 浅見 忠男⁵, 朽津 和幸^{1,2} (¹東京理科大院理工, ²東京理科大・イメージングフロンティアセンター, ³筑波大・生命環境, ⁴公立諏訪東京理科大・工, ⁵東京大院農学生命)</p>
<p>【目的】植物の免疫反応を活性化させる薬剤(抵抗性誘導剤)は、直接的な抗菌活性なしに病害を防除できるため、環境負荷の少ない新たな農薬として注目されている。一方で、現在農薬として防除範囲の限られた数種類の抵抗性誘導剤が登録されるのみである。本研究では、新規抵抗性誘導剤候補化合物の同定を目指して、タバコ培養細胞 BY-2 の cryptogein 誘導性活性酸素種(ROS)生成パターンを指標としたハイスループットスクリーニング系(特許第 5885268 号)を用いて、理化学研究所の NPDepo 化合物ライブラリーを対象に新たな抵抗性誘導剤の探索を行った。</p> <p>【方法・結果】397 種の化合物を対象としてスクリーニングを行い、cryptogein 誘導性の持続的 ROS 生成の亢進効果が高かった 9 種の化合物を選抜した。この 9 種の化合物はいずれも cryptogein 誘導性の過敏感反応様プログラム細胞死(PCD)を亢進した。新規に開発した簡便な耐病性検定法(中野ら 本大会)を用いて、トマト斑葉細菌病菌(<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000)に対するシロイヌナズナの耐病性に対する化合物の影響を評価したところ、5 種類の化合物で耐病性の亢進効果が見られた。微生物分子パターン(microbe-associated molecular pattern; MAMP)の一種である細菌鞭毛タンパク質由来のペプチド flg22 により誘導される感染防御応答に対するこれらの化合物の影響を調べたところ、耐病性の亢進効果を示した 5 種のうち 4 種で flg22 誘導性 ROS 生成の亢進効果が見られた。これらの化合物は MAMP 誘導性免疫の亢進により耐病性を高める可能性が考えられ、作用点や構造活性相関の解析を進めている。</p>	

P-76	<p>植物ホルモンによる光形態形成制御における PIF と <i>STH7</i> の関係の解析 ○岡本 光紗¹, Jutiporn Thussagunpanit¹, 永井 優子¹, 中野 雄司², 中村 英光¹, 浅見 忠男¹ (¹東大農・農生科・応生化, ²理研・CSRS)</p>
<p>植物が光照射を受けると胚軸伸長の抑制など光形態形成が促進される。光形態形成は多くの因子によって制御されるが、暗形態形成に働く因子 PIF は光形態形成を抑制する。そのため <i>pif</i> 変異体は光照射により野生型よりも胚軸が短くなる。一方、光形態形成は植物ホルモンによっても制御されている。ストリゴラクトン (SL) は胚軸伸長を抑制するが、ブラシノステロイド (BR) は反対に促進することが知られている。この 2 つのホルモンは B-box タンパク質である <i>STH7</i> を介して胚軸長を制御していることが我々を含めた先行研究にて解明されている。BR は、BR に正に制御される転写因子 BIL1/BZR を介して <i>STH7</i> の発現を抑制している。また BIL1 が光形態形成に関与する PIF と相互作用し下流の発現制御を行うことも知られており、本研究では BIL1 は PIF と相互作用したのち <i>STH7</i> を制御し光形態形成を抑制するという作業仮説を立て、シロイヌナズナ <i>pif</i> 欠損変異体 <i>pif1</i>, <i>pif3</i>, <i>pif4</i>, <i>pif5</i>, <i>pifq</i> (<i>pif1</i>, <i>pif3</i>, <i>pif4</i>, <i>pif5</i> 四重変異体) を使用してその検証を行った。合成 SL アゴニストである GR24、活性型 BR であるブラシノライド (BL)、BR 生合成阻害剤 Brz を加えた培地上で <i>pif</i> 変異体を 4 日間育てて胚軸長を観察し、その後 qRT-PCR で <i>STH7</i> の発現量を測った。その結果、<i>pif</i> 変異体では GR24、BL、Brz の有無に関係なく胚軸長が短くなっており、<i>STH7</i> の発現量の上昇も見られた。また GR24、BL、Brz の効果は <i>pifq</i> 変異体でも見られた。これらの結果から、SL や BR による光形態形成制御は PIF を介さない経路が存在することが示唆された。</p>	

P-77	<p>新規植物免疫活性化剤候補化合物の活性評価と作用機構の解析 ○齊藤 優歩¹, 北畑 信隆^{1,2}, 中野 正貴¹, 石賀 康博³, 来須 孝光⁴, 浅見 忠男⁵, 朽津 和幸^{1,2} (¹東京理科大院理工, ²東京理科大イメージングフロンティアセンター, ³筑波大生命環境, ⁴公立諏訪東京理科大工, ⁵東京大院農学生命)</p>
<p>【目的】植物本来の免疫力を高める植物免疫活性化剤(抵抗性誘導剤)は、殺菌剤とは異なり、幅広い病原菌種に効果があり耐性菌が出現しにくい等の利点を持つ。しかし、現在農薬登録されている植物免疫活性化剤は、いずれもサリチル酸 (SA) 経路を活性化してイネのいもち病菌に対する耐病性を高める薬剤であり、対象や作用点が限定的である。我々は、新規作用点を持つ化合物の探索を目指して、培養細胞の活性酸素種(ROS)生成パターンを指標としたスクリーニングにより、化合物ライブラリーから新規植物免疫活性化剤候補化合物を 56 種選抜した。ジャスモン酸 (JA) 経路に作用する化合物や、既存剤とは異なる作用を持つ化合物を探索・同定するため、候補化合物の活性評価と作用機構の推定を進めている。</p> <p>【方法・結果】56 種のうち、CY2, CY15, CY22, CY55 はシロイヌナズナにおいて、抗菌活性を示さずにトマト斑点細菌病菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 (<i>Pst</i> DC3000) に対する耐病性を向上させた。4 つの化合物の、Col-0 における flg22 誘導性 ROS 生成量・SA 内生量・PR1 発現量, 及び <i>npr1</i> (SA シグナル伝達欠損変異体) における flg22 誘導性 ROS 生成量に対する影響を調べ、作用点を推定した。CY2 は flg22 誘導性 PR1 発現量・SA 内生量の双方を、既存剤 probenazole よりも早く増強したことから、SA 生合成経路を活性化する可能性がある。一方、CY15, CY22, CY55 は化合物単独で効果はないが、flg22 誘導性の防御応答を亢進した。また、<i>npr1</i> においても flg22 誘導性 ROS 生成を亢進したことから、既存剤とは異なる作用機構で、微生物分子パターン誘導性免疫経路を活性化する可能性が示唆された。</p>	

P-78	<p>ストリゴラクトン受容体の過剰発現による病害抵抗性誘導機構の解明 ○伊藤瑛子¹, 山野博之¹, 前田哲², 森昌樹², 中村英光¹, 浅見忠男¹ (¹東大院・農生科・応生化, ²農研機構・生物機能利用研究部門)</p>
<p>【背景・目的】 今回、我々は、イネのストリゴラクトン(SL)受容体 D14 の過剰発現体(<i>OsD14ox</i>)が葉身に疑似病斑を形成すること、さらにいもち病への抵抗性が向上していることを見出した。本研究では、植物病害抵抗性と SL シグナル伝達との関係性を明らかにすることを目的とする。</p> <p>【方法・結果】 トウモロコシ <i>Ubg</i> プロモーターの下流でイネ D14 遺伝子を高発現させるプラスミドを野生型イネ (シオカリ) に導入し、<i>OsD14ox</i> イネを作成した。<i>OsD14ox</i> イネは疑似病斑を形成していたことから、続いていもち病抵抗性試験を行ったところ、野生型イネと比較して高い病害抵抗性を示すことが明らかとなった。さらに、<i>d14</i> 変異体は野生型イネとよりも有意にいもち病菌に対して高感受性を示し、病害抵抗性における <i>D14</i> の関与が示唆された。一方、野生型イネに合成 SL である GR24 を処理しても病害抵抗性が誘導されず、SL シグナルが病害抵抗性を誘導したのではないことが示唆された。また、<i>AtD14ox</i> シロイヌナズナにおいて、炭疽病菌抵抗性試験を行ったところ、その抵抗性は野生株と変わらなかった。今後はイネ D14 の SL 加水分解に関する変異体の作出、病原菌やエリシター処理時における <i>OsD14ox</i> の遺伝子発現解析などを行っていく予定である。</p>	

P-79	<p>植物の感染防御応答・MAMP 誘導性免疫を抑制する新規化合物の作用機構の解析 ○北畑 信隆^{1,2}, 末次 真悠¹, 斉藤 優歩^{1,3}, 来須 孝光^{2,4}, 浅見 忠男⁵, 朽津 和幸^{1,2,3} (¹東京理科大・理工、²東京理科大・イメージングフロンティアセンター、³東京理科大・農理工学際連携、⁴公立諏訪東京理科大・工、⁵東大院・農生科)</p>
<p>【目的】 植物は微生物分子パターン(MAMP)等を通して病原体を認識し、防御応答機構を活性化させることで、病害抵抗性を誘導する。感染防御応答機構の解明のために、遺伝学的手法を中心としてこれまでに多くの研究が行われているが、複雑な感染防御応答機構の全容の理解には至っていない。我々はその解明を目指し、MAMP 誘導性免疫経路を特異的に阻害する新規化合物の探索と作用点の同定を行っている。</p> <p>【方法・結果】 活性酸素種(ROS)生成を指標として植物免疫を抑制する化合物のスクリーニング系を構築し、約 11,000 化合物の中から、エリシター誘導性の ROS 生成を強く抑制する 26 種の候補化合物を選抜した。選抜した化合物の一つ CY66 はシロイヌナズナで MAMP の一種であるペプチド f1g22 誘導性の一過的 ROS 生成を濃度依存的に最も強く抑制した。f1g22 誘導性 ROS 生成は f1g22 誘導性のカロース蓄積や気孔閉鎖に必要である。そこで、f1g22 誘導性カロース蓄積や気孔閉鎖に対する CY66 の効果を解析したところ、CY66 は f1g22 誘導性のカロース蓄積と気孔閉鎖を濃度依存的に阻害した。一方、f1g22 誘導性防御応答遺伝子の発現は ROS 生成経路と独立と考えられているが、f1g22 誘導性防御応答遺伝子の発現に対する CY66 の効果をリアルタイム PCR 法により調べた結果、CY66 はこれらの遺伝子発現を抑制しなかった。これらの結果から、CY66 は ROS を介する感染防御応答経路を抑制する新規の化合物であり、MAMP 受容体から ROS 生成酵素 Nox/Rboh の活性化による ROS 生成までの感染防御応答初期過程に機能するシグナル伝達因子を阻害する可能性が示唆された。</p>	

会場マップ

会 場：東京理科大学 野田キャンパス カナル会館

東武野田線（東武アーバンパークライン）運河駅下車、徒歩5分
（JR・柏駅、つくばエクスプレス・流山おおたかの森駅、JR・船橋駅、あるいはJR・大宮駅などからお乗り継ぎください。）



JSBBA KANTO

日本農芸化学会関東支部2018年度支部大会 講演要旨集
2018年10月13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

〒278-8510

千葉県野田市山崎2641

東京理科大学工学部応用生物科学科

倉持 幸司