

一般講演プログラム 1 演題 15 分、発表 12 分・討論 3 分（演者交代含む）

11 月 2 日(金)

(座長:ゴトウ・デレック )

15:00(1) 幌延深部地下環境由来の微生物集積培養物がフミン酸分子に与える影響  
(<sup>1</sup> 幌延地圏環境研究所、<sup>2</sup> 広島大院・生物圏科学、<sup>3</sup> 北大院・工) ○上野 晃生<sup>1</sup>、清水 了<sup>1</sup>、  
玉村 修司<sup>1</sup>、高田 迪彦<sup>1</sup>、遠藤 亮<sup>1</sup>、長沼 毅<sup>2</sup>、大味 泰<sup>1</sup>、金子 勝比古<sup>1,3</sup>

15:15(2) Effects of herbicides and other organic compounds on N<sub>2</sub>O emission  
(北大院農) ○Li Li, 波多野隆介, 橋床泰之

(座長:加藤英介、重富顕吾)

15:30(3) イネの傷害時の SAG を donor とした TA に対する糖転移反応  
(北大農<sup>\*</sup>、北大院農) ○竹松知紀<sup>\*</sup>、宮澤吉郎、瀬戸義哉、和久田真司、佐分利亘、  
鍋田憲助、松井博和、松浦英幸

15:45(4) Theobroxide 処理による植物応答機構の解明  
(北大院農) ○山下雄大、葵新、吉原照彦、鍋田憲介、松浦英幸

16:00(5) 傷害応答時におけるツベロン酸の生理活性  
(北大院農) ○武石翔平、相川健亮、鍋田憲助、松浦英幸

16:15(6) 1-deoxynojirimycin (DNJ) - 疎水基複合体の合成と $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性  
(<sup>1</sup> 北大農、<sup>2</sup> 北大院農) ○近久史明<sup>1</sup>、加藤英介<sup>1,2</sup>、川端潤<sup>1,2</sup>

16:30(7) オニシモツケ由来のリパーゼ阻害剤の構造活性相関研究  
(北大院農) ○米本龍太、加藤英介、川端潤

16:45(8) 効率的クロスリンクを目指したビスジアジリン含有フェニルアラニンの立体選択的合成  
(北大院農) ○村井勇太、橋床泰之、橋本 誠

17:00(9) ミコフェノール酸 6' 位誘導体化による新規 HDAC 阻害剤開発の検討  
(北大院農) ○春原和宏、重富顕吾、三橋進也、生方 信

17:15(10) モリノカレバタケ属種菌糸体培養物からのオートファジー誘導物質探索  
(北大院農) ○新藤 千波耶、三橋 進也、宮本 敏澄、生方 信

11月3日(土・祝)

(座長:曾根輝雄)

9:30(11) 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるホエーパーミエート・糖質混合原料からのエタノール生成

(<sup>1</sup>帯畜大、<sup>2</sup>雪印メグミルク) ○藤井秀峰<sup>1</sup>、伊藤光太郎<sup>2</sup>、吉岡孝一郎<sup>2</sup>、折笠善丈<sup>1</sup>、小田有二<sup>1</sup>

9:45(12) 糸状菌 *Phomopsis amygdali* が持つインドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの解析 (北大院工<sup>a</sup>、北大院理<sup>b</sup>) ○劉 成偉<sup>a</sup>、野池基義<sup>a</sup>、田上紘一<sup>b</sup>、南 篤志<sup>b</sup>、及川英秋<sup>b</sup>、大利 徹<sup>a</sup>

10:00(13) Laminin Binding Proteins Isolated from *Lactobacillus rhamnosus* FSMM22 (Obihiro Univ, Udayana Univ) ○Ni Putu Desy Aryantini<sup>1</sup>, I Nengah Sujaya<sup>2</sup>, Tadasu Urashima<sup>1</sup>, and Kenji Fukuda<sup>1</sup>

10:15(14) *Bifidobacterium longum* 105-A におけるシステイン/メチオニン代謝の解析 (北大院農) ○鈴木 梓、吹谷 智、横田 篤、和田 大

(座長:比良 徹)

13:00(15) フィチン酸およびミオイノシトール摂取が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢に及ぼす影響 (藤女子大人間生活, 生活栄養学研究所) ○岡崎由佳子<sup>1</sup>、片山徹之<sup>2</sup>

13:15(16) 日常的にナガイモを摂取している高齢者の腸内細菌叢の分析 (帯畜大・食品科学<sup>1</sup>、帯広大谷短大<sup>2</sup>、(株)ファスマック<sup>3</sup>、帯広臨検センター<sup>4</sup>) ○<sup>1</sup>古田土 麗、<sup>2</sup>山崎民子、<sup>3</sup>原口浩幸、<sup>3</sup>高崎一人、<sup>3</sup>布藤 聡、<sup>4</sup>池田徳明、<sup>1</sup>得字圭彦、<sup>1</sup>木下幹朗、<sup>1</sup>大和田琢二、<sup>1</sup>大西正男

(座長:和田 大、佐分利 亘、吹谷 智)

13:30(17) シイタケ栽培廃液上面水に含まれる酵素の解析 (北見工大・バイオ環境化学<sup>\*1</sup>、財)岩手生工研<sup>\*2</sup>、(株)北研<sup>\*3</sup>) ○北原慎一<sup>\*1</sup>、外館隆<sup>\*1</sup>、澤田雄太<sup>\*1</sup>、廣長泰輔<sup>\*1</sup>、永井勝<sup>\*2</sup>、鮎澤登夫<sup>\*3</sup>、枝 克昌<sup>\*3</sup>、山内隆弘<sup>\*3</sup>、青木貴行<sup>\*3</sup>、佐藤利次<sup>\*1,\*2</sup>

13:45(18) シイタケ・グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータによるシイタケ・ラッカーゼ遺伝子 *lcc1* の発現 (\*<sup>1</sup>北見工大・バイオ環境化学、\*<sup>2</sup>財)岩手生工研) ○内藤真良<sup>\*1</sup>、南愛香<sup>\*1</sup>、鈴木直之<sup>\*1</sup>、八重樫香<sup>\*2</sup>、河田真樹<sup>\*2</sup>、平野達也<sup>\*2</sup>、佐藤利次<sup>\*1,2</sup>

14:00(19) ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ (*Lentinula edodes*) REMI mutant の解析-第2報- (\*<sup>1</sup>北見工大・バイオ環境化学、\*<sup>2</sup>財)岩手生工研) ○沢目洋史<sup>\*1</sup>、山形明史<sup>\*1</sup>、鈴木直之<sup>\*1</sup>、永井勝<sup>\*2</sup>、渡邊久敬<sup>\*2</sup>、八重樫香<sup>\*2</sup>、平野達也<sup>\*2</sup>、佐藤利次<sup>\*1,2</sup>

14:15(20) 組換えツペロン酸グルコシドグルコシダーゼの酵素化学的諸性質の解析 (北大院・農<sup>1</sup>、農研機構・北海道農研<sup>2</sup>) ○武田遼介<sup>1</sup>、姫野奈美<sup>1</sup>、佐分利亘<sup>1</sup>、和久田真司<sup>1</sup>、森春英<sup>1</sup>、松浦英幸<sup>1</sup>、鍋田憲助<sup>1</sup>、今井亮三<sup>2</sup>、松井博和<sup>1</sup>

- 14:30(21) ツペロン酸グルコシド加水分解酵素の基質認識機構の解明  
(北大院・農<sup>1</sup>, 農研機構・北海道農研<sup>2</sup>) ○姫野奈美<sup>1</sup>, 和久田真司<sup>1</sup>, 武田遼介<sup>1</sup>, 佐分利亘<sup>1</sup>, 森春英<sup>1</sup>, 松浦英幸<sup>1</sup>, 鍋田憲助<sup>1</sup>, 今井亮三<sup>2</sup>, 松井博和<sup>1</sup>
- 14:45-15:00 休憩
- 15:00(22) *Bacillus* sp. AAH-31 株由来耐熱性アルカリ $\alpha$ -アミラーゼの高機能化に関する研究  
(<sup>1</sup>北大院農、<sup>2</sup>株式会社 ADEKA) ○玉村尚也<sup>1</sup>, 向井惇<sup>1</sup>, 森本奈保喜<sup>2</sup>, 竹花稔彦<sup>2</sup>, 佐分利亘<sup>1</sup>, 森春英<sup>1</sup>, 小池誠治<sup>2</sup>, 松井博和<sup>1</sup>
- 15:15(23) *Aspergillus niger* 由来 $\alpha$ -glucosidase の基質特異性に関与するアミノ残基の解析  
(北大院農) ○佐藤恵美, 田上貴祥, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫
- 15:30(24) 可変領域への変異導入とその組み合わせによる抗菌ペプチド「アピデシン」の抗菌スペクトル改変  
(北大院工、<sup>1</sup>東理大・基礎工) ○三宅 政裕、岩村 雄太、松本 謙一郎、橋本茂樹<sup>1</sup>、大井 俊彦、田口 精一
- 15:45(25) セルロース系糖質バイオマス为原料とした高乳酸分率ポリマーの効率的生産  
(北大院工) ○佐々木 勝平、John Masani Nduko、松本 謙一郎、大井 俊彦、田口 精一
- 16:00(26) *Ralstonia eutropha* 由来ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の改変による Class I 乳酸重合酵素の創出  
(北大院工、<sup>1</sup>東工大・総理工) ○越智 杏奈、大場 貴史、坂井 浩平、松本 謙一郎、柘植 丈治<sup>1</sup>、田口 精一
- 16:15(27) 進化工学的改変による高活性 PhaB の速度論的解析と PHB 生産性の向上  
(北大院工) ○渡辺 剛志、宋 育陽、松本 謙一郎、大井 俊彦、田口 精一
- 16:30(28) 大腸菌を用いた高光学純度(*R*)-3-ヒドロキシブタン酸の効率的生産  
(北大院工) ○本間 以祝、松本 一郎、大慶 岳洋、大井 俊彦、田口 精一

1

幌延深部地下環境由来の微生物集積培養物がフミン酸分子に与える影響

(<sup>1</sup> 幌延地圏環境研究所、<sup>2</sup> 広島大院・生物圏科学、<sup>3</sup> 北大院・工) ○上野 晃生<sup>1</sup>、清水 了<sup>1</sup>、玉村 修司<sup>1</sup>、高田 迪彦<sup>1</sup>、遠藤 亮<sup>1</sup>、長沼 毅<sup>2</sup>、大味 泰<sup>1</sup>、金子 勝比古<sup>1,3</sup>

**【研究背景】**地圏環境有機物の主要分画を成す腐植物質は、環境中では非常に安定した物質であるため、一般的には微生物の炭素源としての利用性はほとんど無いと考えられている。しかしながら、腐植物質分解微生物に関する報告により<sup>1,2)</sup>、腐植物質は微生物作用を通じ、地圏環境中の炭素循環に重要な役割を果たしている可能性がある。本研究では、幌延地下環境由来の集積培養物を用い、同地下環境に含まれる腐植物質の利用性を調べた。

**【方法】**日本原子力研究開発機構・幌延深地層研究施設より採取した地下水を接種源とし、Aldrich フミン酸(Aldrich HA)を唯一の炭素源とする好気培養にて集積培養物を得た(H-URL250)。Aldrich HA および声間層由来 HA(K-HA)を含む培養液にて H-URL250 の培養を行った後、HA を抽出した。HPSEC と FTIR 解析を行い、微生物を加えない対照実験群と H-URL250 培養群の HA 分子量分布および分子構造の違いを比較した。

**【結果及び考察】**HPSEC にて HA を分析したところ、対照実験では見られない、高分子側に新たなピークが確認された。FTIR 解析を行ったところ、対照実験群と H-URL250 培養群では FTIR スペクトルのパターンが異なり、特に Aldrich HA では 3420 と 1710  $\text{cm}^{-1}$  付近の、K-HA ではさらに 1035  $\text{cm}^{-1}$  付近の吸収が H-URL250 培養群では消失していた。以上の結果から、H-URL250 内の微生物の増殖に伴い、HA 分子の利用と構造変化が生じている可能性が示唆された。

**【参考文献】**<sup>1)</sup> Dari *et al.*, (1995) FEMS Microbiol. Ecol. 16: 115-122.; <sup>2)</sup> Grinhut *et al.*, (2011) Environ. Sci. Technol. 45: 2748-2754.

2

Effects of herbicides and other organic compounds on N<sub>2</sub>O emission

(北大院農) ○Li Li, 波多野隆介, 橋床泰之

**Background)** Nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) is an active greenhouse gas contributing more than 7% of global warming. Our focus is to search chemical compounds that accelerate or repress nitrous oxide (N<sub>2</sub>O) emission of hyperactive or moderate N<sub>2</sub>O emitters from farmland soils. As we have established reproducible N<sub>2</sub>O emission assay system, many N<sub>2</sub>O emitting eubacteria were successfully isolated from soils of Andisol corn farmland in Hokkaido. Using these isolates, effects of some herbicides and other related compounds, including methyl viologen *n*-hydrate and amitrol (3-amino-1,2,4-triazole), on N<sub>2</sub>O emission were investigated.

**Methods)** Some commercial herbicides and other related chemicals were examined at concentrations of 2 and 10  $\mu\text{M}$ . A loop of bacterial colony of N<sub>2</sub>O emitters pre-cultured on modified MW plates for 2-4 days were inoculated to the medium prepared for N<sub>2</sub>O emission assay (10 ml; 0.5 mg ml<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> as the substrate; sugarless or 0.05% sucrose; pH 5.0). After 4-7 days of incubation at 20°C, headspace gas of the culture vial (headspace volume, 22.6 ml) was sampled and subjected to an ECD-gas-chromatographic analysis.

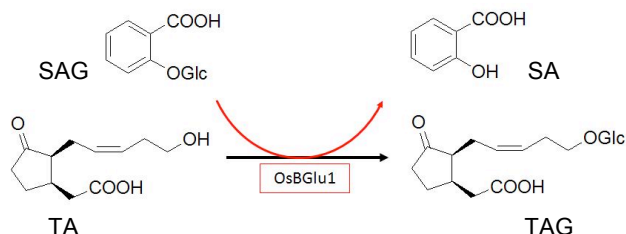
**Results and discussion:** We have found that methyl viologen at 10  $\mu\text{M}$  significantly repressed N<sub>2</sub>O emission of two active eubacteria, *Pseudomonas chlororaphis* and *P. umsongensis*. The selected herbicides, simazine, trifluralin, and amitrol, together with isoprothiolane accelerated N<sub>2</sub>O emission of test bacteria at concentration of 2  $\mu\text{M}$ . Particularly, *P. chlororaphis* under an exposure to 2  $\mu\text{M}$  amitrol showed 15 fold higher N<sub>2</sub>O emission than the control. Therefore some herbicides, including amitrol and other triazole-type chemicals, have potentials to enhance N<sub>2</sub>O emission from farming soils. Some herbicides are thus not safe in global environment in this point of view. Next generation of herbicides and other agrochemicals should have a by-effect to reduce N<sub>2</sub>O emission.

### 3

イネの傷害時の SAG を donor とした TA に対する糖転移反応  
 (北大農\*)、北大院農) ○竹松知紀\*)、宮澤吉郎、瀬戸義哉、和久田真司、佐分利亘、鍋田憲助、松井博和、松浦英幸

**研究背景** ジャスモン酸(JA)の代謝産物については多く知られているが、JA の代謝産物であるツベロン酸(TA)またはツベロン酸グルコシド(TAG)の代謝や機能については不明な点が多い。当研究室により、イネ培養細胞由来の粗酵素液中における TA の代謝、特に配糖体化における donor と基質選択性を有する糖転移酵素の探索が行われた。その結果、TA の配糖体化の donor としてサリチル酸グルコシド(SAG)が、糖転移酵素として OsBGlul(イネ  $\beta$ -グルコシダーゼ)が特定された。傷害時の *OsBGlul* 遺伝子の経時的な発現量を解析したところ、SAG の内生量の減少に併せて、*OsBGlul* 遺伝子の発現量が増えることも確認している。本研究では、Glc の 6 位が重水素ラベル化された SAG $d_2$  と TAG $d_2$  を合成し、イネ体内での SAG を donor とする TA の配糖体化について解析した。

**方法・結果及び考察** イネの葉を約 1 cm 幅で鋭く裁断することで傷害処理した後、裁断されたイネを 1 mM SAG $d_2$  溶液で満たされたシャーレに浮かべた。人工気象器にて 24 h 静置し、十分に SAG $d_2$  溶液をイネ体内に吸収させた。その後、裁断されたイネの抽出液を UPLC MS/MS により分析したところ、TAG $d_2$  のピークが抽出液から検出された。また、UPLC TOF MS により、TAG $d_2$  のピークを示した化合物の精密分子量を求めたところ、理論値と近接した値が与えられた。この結果により、検出された化合物は TAG $d_2$  であると断定し、イネ体内での SAG を donor とした TA への糖転移反応が確認された。

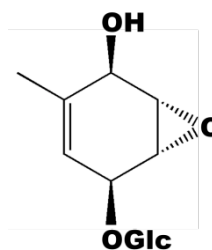


### 4

Theobroxide 処理による植物応答機構の解明  
 (北大院農) ○山下雄大、葵新、吉原照彦、鍋田憲介、松浦英幸

**【研究背景】** 糸状菌、*Lasiodiplodia theobromae* は様々な興味ある生理活性物質を生合成し、本菌は特に、植物ホルモンであるジャスモン酸を生合成することで有名である。当研究室において本菌培ち液中より、バレイショ塊茎形成誘導活性、アサガオ花芽誘導促進活性など様々な興味深い生物活性を示す化合物として Theobroxide が単離された。更には Theobroxide による効果が長期的に持続しないという研究結果から、代謝機構の存在も示唆されている。しかしながら、Theobroxide が植物に影響を及ぼす際のメカニズム、及び代謝機構については未解明である。そこで本研究では、これらを解明する為の足掛かりを得るために、植物への Theobroxide 処理により特異的に蓄積する化合物の探索を行った。

**【方法・結果及び考察】** 代謝産物の探索は UPLC TOF MS のデータを指標に行った。Theobroxide 処理サンプルを UPLC TOF MS に供し多変数解析を行った結果、Theobroxide 処理サンプルにおいて特異的なピークが検出された。この化合物の単離及び構造決定を行った結果、これは Theobroxide の 3 位の水酸基にグルコースが結合した化合物(A)であることが決定された。植物において配糖体化は、代表的な代謝機構の一つとして知られている。本研究ではさらに、A 及びその類縁化合物の合成を行い、A の構造の再確認並びに生物活性を検討する。



化合物 A

## 5

傷害応答時におけるツベロン酸の生理活性  
(北大院農) ○武石翔平、相川健亮、鍋田憲助、松浦英幸

**研究背景** 植物の重要なストレス応答物質の一つとして働くジャスモン酸(JA)は様々な類縁体を持つ。当研究室でバレイショ塊茎形成誘導物質として最初に単離されたJA類縁体の一つであるツベロン酸(12-水酸化ジャスモン酸、TA)は、植物傷害応答時にJAの蓄積に付随して植物体に蓄積することは確認されているが、その詳細な機能については不明であった。しかしTAについての知見の一つとして2007年、Wasternackらの研究グループにより「TAはJA応答のスイッチオフに働く」という報告がされた。だがこの実験系にはTAの蓄積量に関して生物学的に許容できない点があり、TAの植物体内での生理活性や機能を再検討することを目的として研究を行った。

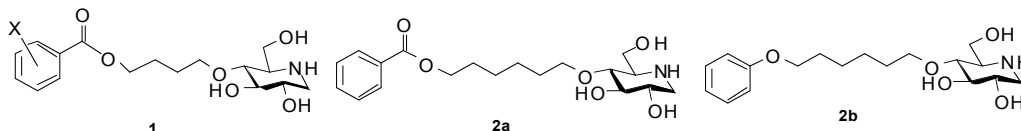
**方法・結果及び考察** トマト(*Solanum lycopersicum*, castlemart)を用い、トマト葉をピンセットで挟むことで傷害を与え、葉におけるJA類の蓄積を経時変化を追って分析した。結果、JA及びその類縁体の蓄積が観察され、傷害により植物体に蓄積し得る量が示された。また、Wasternackらの実験を参考にトマト葉を水、TA溶液のいずれかに浸漬し、葉におけるTA蓄積量を分析した。同時にトマト葉からRNAを抽出してcDNAを作製し、これらを定量リアルタイムPCRに供して傷害応答遺伝子発現量解析を行った。高濃度のTA溶液に浸漬した場合、葉に蓄積するTA量は生物学的に起こりえない濃度となり、一方で低濃度の場合にはトマト傷害応答遺伝子の発現量が有意に増加した。以上より、TAが生物学的に起こりえない濃度では傷害応答を正に誘導することは難しいが、生物学的に起こり得る濃度ならば傷害応答を正に誘導し得ることが示唆された。

## 6

1-deoxynojirimycin(DNJ)－疎水基複合体の合成と $\alpha$ -アミラーゼ阻害活性  
(<sup>1</sup>北大農、<sup>2</sup>北大院農) ○近久史明<sup>1</sup>、加藤英介<sup>1,2</sup>、川端潤<sup>1,2</sup>

**背景** 本研究室では近年世界規模で増加しているII型糖尿病の病態改善に有用と考えられる $\alpha$ -アミラーゼ阻害剤の分子設計及び合成を行っている。これまでの研究で1-deoxynojirimycin(DNJ)の4位水酸基に疎水性側鎖を結合させた化合物の合成及び活性評価により、疎水性相互作用が阻害活性に寄与することが分かった。そこでさらに置換基を末端にもつ化合物1を合成したが、その阻害活性は予想に反して低かった。そこで本研究ではさらにリンカー部を長くした化合物2a,2bを合成し活性について検討した。

**方法・結果** 2a,bはDNJの4位水酸基にC6のリンカーを結合させ、さらに疎水基を結合させて段階的に合成した。化合物2a,bをアミラーゼ阻害活性試験に供した結果5mMで2aが26%、2bが10%の阻害活性を示し、エステル結合で疎水基を結合させたものの方が阻害活性が高いことが分かった。また2aは1よりも阻害活性が高かった。このことから現在はエステル結合を介して他の疎水基を結合させた化合物を合成し、疎水基の違いによるアミラーゼ阻害活性への影響について調べている。



## 7

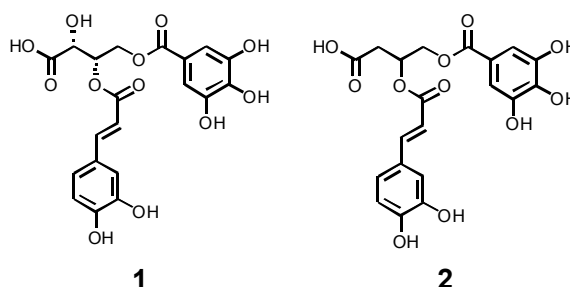
### オニシモツケ由来のリパーゼ阻害剤の構造活性相関研究

(北大院農) ○米本龍太、加藤英介、川端潤

**背景・目的)** 膵臓リパーゼは脂質の大半を占めるトリグリセリドを加水分解する酵素である。この酵素を阻害することは、近年懸念されている高脂肪食による肥満の予防につながる。植物由来のリパーゼ阻害剤の探索の結果、オニシモツケ (*Filipendula kamtschatica*) より高いリパーゼ阻害活性を示すトレオン酸誘導体 **1** が見出された。これまでの構造活性相関研究により、**1** のカルボキシル基の存在が阻害活性に重要であることがわかっている。そこで、本研究ではトレオン酸の2位水酸基の有無による阻害活性の変化を調べることにした。

**方法・結果)** **1** の構造の簡略化を図り、トレオン酸2位の水酸基をなくした化合物 **2** および没食子酸、コーヒー酸の置換位置の異なる類縁体を合成して阻害活性を評価、フェノールカルボン酸の組み合わせが阻害活性に影響をもたらすのか調べることにした。

3-ブテン酸を酸化してジオールとし、選択的なエステル化反応によって **2** および類縁体の保護体を得た。現在脱保護条件の検討および生成物のリパーゼ阻害活性評価を行っている。



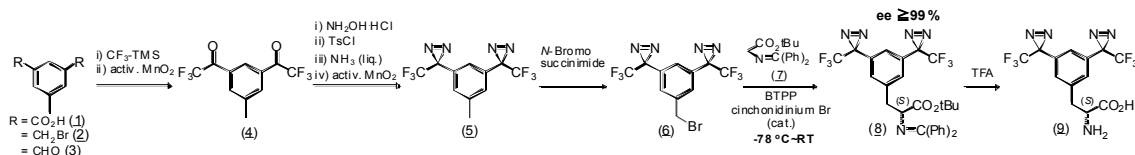
## 8

### 効率的クロスリンクを目指したビスジアジリン含有フェニルアラニンの立体選択的合成

(北大院農) ○村井勇太、橋床泰之、橋本 誠

**研究背景)** 光アフィニティーラベル法は低分子生理活性物質と生体分子の相互作用を研究する有用な手法の一つであるが、しばしばそのラベル効率の問題等により目的ラベルした分子の低回収率が問題となることがある。効率的なクロスリンク形成を目的に、光反応性基の中でも特に反応に優れたトリフルオロメチルジアジリル基を分子内に二つ備えたフェニルアラニン誘導体の合成を検討した。

**方法・結果及び考察)** 5-メチルイソフタル酸(**1**)もしくは3,5-ビス(ブロモメチル)トルエン(**2**)を用いてビスアルデヒド(**3**)を調製し、これを  $\text{CF}_3\text{-TMS}$  によるトリフルオロメチル基の導入、次に活性二酸化マンガンによる酸化によってビストリフルオロアセチル化合物(**4**)を得た。これを従来法によりビスジアジリン誘導体(**5**)へと変換した。続いて *N*-ブロモスクシニミドによってベンジル位のモノブロモ化(**6**)を行い、次にシンコニジウムブロミド触媒存在下、BTTPP 塩基及びグリシン誘導体(**7**)を  $-78^\circ\text{C}$  にて添加後、室温条件において不斉合成を行なったところ ee 99% 以上で *L*-ビスジアジリルフェニルアラニン誘導体(**8**)を合成することに成功した。さらに保護基を TFA で脱保護し *L*-ビスジアジリルフェニルアラニン(**9**)を得た。現在、*L*-ビスジアジリルフェニルアラニンの光分解性について検討を行っている。

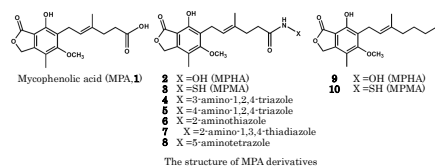


## 9

ミコフェノール酸 6' 位誘導体化による新規 HDAC 阻害剤開発の検討  
(北大院農) ○春原和宏、重富顕吾、三橋進也、生方 信

**【研究背景】**ミコフェノール酸(Mycophenolic acid, MPA, 1)は *Penicillium* sp.から単離構造決定された生理活性物質である。MPA はイノシンーリン酸脱水素酵素(IMPDH)を阻害することで免疫抑制剤として用いられている。当研究室の研究により MPA の 6' 位をヒドロキサム酸に誘導体化したミコフェノールヒドロキサム酸(MPHA, 2)がヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)を阻害することが見いだされた。しかし MPHA の HDAC 阻害活性は代表的な HDAC 阻害剤に比べ弱い。従って本研究では活性中心の亜鉛イオンとの親和性に着目し、HSAB 則や他の亜鉛イオンを含む酵素阻害剤の構造を基に硫黄原子や窒素、硫黄を含むヘテロ環を導入した亜鉛配位子官能基を持つミコフェノールメルカプタム酸(MPMA, 3)および各種ヘテロ環化合物(4-8)の合成を行った。また合成した化合物を用いてヒト慢性骨髄性白血病細胞株(K562) に対する増殖抑制および分化誘導活性を評価した。

**【方法・結果及び考察】**右図に示す各 MPA 誘導体は MPAの 6' 位をクロロ炭酸エチル、CDI、オキサリルジクロリドを用いて活性化した後アミノ基含有化合物を付加させることで 3 以外の MPA 誘導体(4-10)の合成を達成した。K562 増殖抑制試験は細胞懸濁液に SAHA 0.5 μM (ポジティブコントロール)、各種 MPA 誘導体の DMSO 溶液(最終濃度 0.1%)を任意の濃度になるように添加して 3 日間培養し細胞増殖率を求めた。結果 3-amino-1,2,4-triazole 誘導体(4)が高い細胞増殖抑制活性を示した。各誘導体の分化誘導活性は現在検討中である。



## 10

モリノカレバタケ属種菌糸体培養物からのオートファジー誘導物質探索  
(北大院農) ○新藤 千波耶、三橋 進也、宮本 敏澄、生方 信

**緒言:**細胞内タンパク質分解機構の一つであるオートファジー(AP)は、飢餓対応や細胞内環境維持のほか、ガンや神経疾患などに関わりのある重要な生理機能であり、AP 誘導物質は細胞機能の解明及び薬剤への応用が期待出来る。そこで北海道の野生キノコ株の培養菌糸体から AP 誘導剤を探索することを目的として、採取したキノコの培養菌糸体抽出物における誘導活性を調べ、活性がみられたモリノカレバタケ属の一種(*Gymnopus* sp.)培養菌糸体からの AP 誘導物質の単離を行った。

**方法・結果:**キノコを採取後、菌糸体を分離培養し、DNA シークエンスにより種を推定した。培養菌糸体をアセトン抽出し濃縮除去後、酢酸エチルで分液抽出した。マウス NIH3T3 細胞に各菌糸体の抽出物を最終濃度 100 μg/ml で加え、4 時間処理した後回収し、ウェスタンブロット法により AP の誘導を検出した。16 菌株の抽出物のうち強い AP 誘導活性を示したモリノカレバタケ属の一種(菌株 A)について、活性物質の単離を行った。4.8 L の培養物を最終濃度 70%(v/v)のアセトンで処理し濃縮除去後、酢酸エチルで分液抽出し、2.9 g の粗抽出物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(Silica Gel 60N)を行い、粗抽出物を 6 つに分画した。次に細胞活性試験として、 $1.0 \times 10^4$  cells/well の NIH3T3 細胞を 96 穴プレートに播種し、各分画の一部をそれぞれ DMSO に溶解し、最終濃度 50 μg/ml で細胞を処理した。そして、Cell Counting Kit-8 で生細胞数を、ウェスタンブロット法により AP 誘導を検出した。コントロールは DMSO のみで処理したのものを用いた。活性が最も強いと考えられた画分について、HPLC 分取を行い、主要ピークを濃縮乾固し、細胞活性試験を行っている。今後、活性本体の構造決定を行う予定である。



**11** 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* によるホエーパーミエート・糖質混合原料からのエタノール生成  
 (<sup>1</sup>帯畜大、<sup>2</sup>雪印メグミルク) ○藤井秀峰<sup>1</sup>、伊藤光太郎<sup>2</sup>、吉岡孝一郎<sup>2</sup>、折笠善丈<sup>1</sup>、小田有二<sup>1</sup>

**目的**)チーズ製造の副産物であるホエーを限外ろ過によって濃縮したパーミエートの主成分は約 12%ラクトースであるが、効率的エタノール生産のためには濃度が不十分である。そこで、ホエーパーミエート以外の原料と混合して糖濃度を上げたときのエタノール生成について調べた。

**方法**)ホエーパーミエートは低温殺菌(63°C、30 分間)後、ラクターゼで 30°C、48 時間処理した。小麦粉およびバレイショデンプンは、それぞれ温水に懸濁し、 $\alpha$ -アミラーゼで液化後、グルコアミラーゼと植物組織崩壊酵素でデンプンをグルコースにまで加水分解した。ラクターゼ処理したホエーパーミエートと小麦粉糖化液、バレイショデンプン糖化液またはテンサイ糖蜜を混合することにより、全糖濃度を 20%に調整して発酵用培地とした。酵母は *Saccharomyces cerevisiae* NBRC 10515 および対照株 NBRC 0224 をそれぞれ YPD 培地で 24 時間振盪培養後、菌体を回収して培養液の 2 倍容量の発酵用培地に接種した。これを通気制限下で振盪培養し、上清中のエタノールおよび糖を分析した。

**結果**)NBRC 10515 は NBRC 0224 ほど強いカタボライトリプレッションを受けないため、ラクトース濃度が 5%の生チーズホエーと糖化した小麦粉の混合原料からのエタノール生成に優れている\*。ホエーパーミエート+糖化小麦粉およびホエーパーミエート+糖化バレイショデンプンのいずれの培地においても、NBRC 10515 は NBRC 0224 よりも速やかにガラクトースを消費し、60~72 時間で発酵は完了した。一方、ホエーパーミエート+テンサイ糖蜜の培地においては、いずれの菌株も 96 時間経過後もガラクトースが残存した。\*藤井ら、日本農芸化学会 2012 年度大会

**12** 糸状菌 *Phomopsis amygdali* が持つインドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの解析  
 (北大院工<sup>a</sup>、北大院理<sup>b</sup>) ○劉 成偉<sup>a</sup>、野池基義<sup>a</sup>、田上紘一<sup>b</sup>、南 篤志<sup>b</sup>、及川英秋<sup>b</sup>、大利 徹<sup>a</sup>

**(研究背景)**

これまでに我々は、糸状菌 *Phomopsis amygdali* のドラフトゲノム解析を行い、本菌が生産するジテルペン化合物、フシコクシン A の生合成遺伝子クラスターを同定し詳細な解析を行ってきた<sup>1-6</sup>。ドラフトゲノムを精査した結果、*Penicillium paxilli* で同定、機能解析がなされている<sup>7</sup>、パキシリン生合成遺伝子群のオーソログを持つクラスターを見出した。これまでパキシリンに代表されるインドールジテルペンの生合成に関しては、基本骨格生成後については報告例があるものの前半部分に関しては不明であることから、見出した遺伝子を用いて機能解析を行った。

**(方法・結果及び考察)**

**(1) インドールジテルペン生合成遺伝子クラスターの取得**

ジテルペン化合物は全てゲラニルゲラニル 2 リン酸(GGDP)を出発原料に生合成される。その生合成酵素は、基質 GGDP の結合部位を中心に高い相同性を有することから、フシコクシン A の生合成に関与する GGDP 生合成酵素を query にパラログをゲノムに探索した。その結果、上述したように、1 つのパラログがパキシリン生合成様遺伝子群とクラスターを成していた。本クラスターには、GGDP 生合成様遺伝子に加え、さらに 2 つのプレニル転移酵素様遺伝子が存在した。

**(2) プレニル転移酵素様遺伝子の機能解析**

見出した 3 つの遺伝子の cDNA の取得を試みたが、*P. amygdali* では発現量が低かったため、異種宿主である麹菌で強制的に発現させ cDNA を調製後、組換え酵素を用いて機能解析した。その結果、1 つは予想通り GGDP 生合成活性を示した。もう 1 つは、パキシリンにジメチルアリル 2 リン酸を 2 分子転移する活性を有していた。現在、残る 1 つの酵素遺伝子について機能解析を行っている。

**References**

- <sup>1</sup>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, **104**, No. 9, 3084 (2007), <sup>2</sup>Bioorg. Med. Chem. Lett., **19**, 870 (2009), <sup>3</sup>Bioorg. Med. Chem. Lett., **19**, 5640 (2009), <sup>4</sup>J. Am. Chem. Soc., **133**, 2548 (2011), <sup>5</sup>ChemBioChem., **13**, 566 (2012), <sup>6</sup>PLoS ONE, **7**, e42090 (2012), <sup>7</sup>Mol. Microbiol. **39**, 754, (2001)

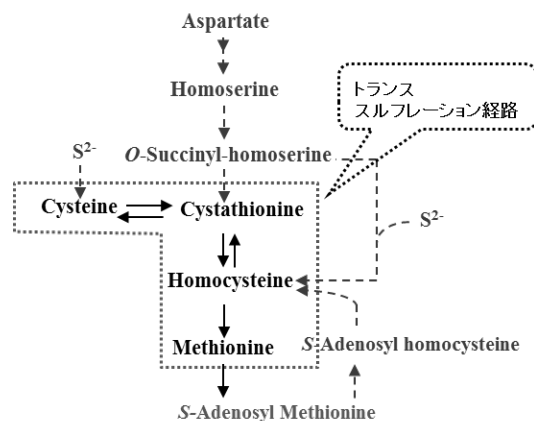
**13** Laminin Binding Proteins Isolated from *Lactobacillus rhamnosus* FSMM22  
(<sup>1</sup>Obihiro Univ, <sup>2</sup>Udayana Univ) ○Ni Putu Desy Aryantini<sup>1</sup>, I Nengah Sujaya<sup>2</sup>, Tadasu Urashima<sup>1</sup>, and Kenji Fukuda<sup>1</sup>

**[Background]** *L. rhamnosus* FSMM22 was isolated from fermented mare milk as a potential probiotic with high adhesive ability against laminin (Shi et al. Biosci Biotechnol Biochem, in press). This ability may be possible solution to prevent pathogenic bacterial invasion to the host, since such infection mostly initiates by binding of pathogens to extracellular matrix proteins, e.g., laminin, of the host cells. However, knowledge about probiotics capable of binding laminin is very scarce. The aim of this study is to identify laminin binding proteins of FSMM22. **[Methods]** Cell surface proteins of FSMM22 were extracted with six extraction buffers: PBS (pH 7.4), 1 M LiCl, 0.2 M glycine (pH 3.0), 2 mg/ml lysozyme, 2 M GndCl, and 2 mg/ml lysozyme/1 M LiCl. Each extract was subjected to inhibition ELISA; in brief, each extract was added to laminin-coated ELISA plate prior to addition of primary antibody against laminin. Presence of laminin binding proteins were evaluated by lowering titer compared with control. Under the same conditions, proteins bound to laminin were directly trypsinized and subjected to peptide mass fingerprinting. **[Results]** Only fraction extracted with 2 mg/ml lysozyme/1 M LiCl showed significantly lower titer on ELISA. Because the in-plate tryptic digestion was unsuccessful, in-gel tryptic digestion after separation of the laminin binding proteins on SDS-PAGE is ongoing.

**14** *Bifidobacterium longum* 105-A におけるシステイン/メチオニン代謝の解析  
(北大院農) ○鈴木 梓、吹谷 智、横田 篤、和田 大

**研究背景)** ビフィズス菌はヒトを含む宿主との相互作用により健康増進効果を示すことが知られている。ビフィズス菌の生理機能については研究が進んでいるが、そのアミノ酸代謝系については理解が不十分である。本研究では、ビフィズス菌の必須アミノ酸であるシステインの代謝系に注目した。これまでビフィズス菌はシスタチオニンとホモシステインを中間体とするトランススルフェーション経路によりシステイン/メチオニン代謝を行なうと考えられてきた。しかし、近年のゲノム解析の進展によりトランススルフェーション経路以外の代謝経路の存在が示唆された。本研究ではシステイン/メチオニン代謝系の全容を解明することを目指し、まずこれらの代謝経路が実際に存在するか確認した。

**方法・結果)** システイン/メチオニン代謝経路の存在を確認するために、*Bifidobacterium longum* 105-A を各種の含硫アミノ酸を単一硫黄源とする最小培地で培養し、生育可能であるか検討した。その結果、システイン、シスタチオニン、ホモシステインを単一硫黄源として生育可能であった。このことから、*B. longum* 105-A においてトランススルフェーション経路が存在することが明らかになった。さらに、シスタチオニンからシステインを合成する酵素と、ホモシステインからシスタチオニンを合成する酵素の存在が明らかになった。また、メチオニンを単一硫黄源として生育可能であった。この結果から、*B. longum* 105-A 株はメチオニンからシステインの代謝が可能であることが明らかになった。



## 15 フィチン酸およびミオイノシトール摂取が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢に及ぼす影響 (<sup>1</sup>藤女子大人間生活, <sup>2</sup>生活栄養学研究所) ○岡崎由佳子<sup>1</sup>, 片山徹之<sup>2</sup>

**研究背景)** フィチン酸は、ビタミン様物質のミオイノシトールに 6 個のリン酸基が結合した構造をしており、穀類、豆類、油糧種子類といった主要三大栄養源となる食品に 1~3%含まれている。また、これらの食品を精製する過程で副産物としても産出されている。フィチン酸はリン酸基に起因するキレート作用により、亜鉛やカルシウム等の無機質の吸収を抑制することが古くから知られている。しかし、これをフィチン酸の側から見てみると、食物繊維やオリゴ糖のように難消化性物質となることを意味しており、腸内環境に何らかの影響を与える可能性が考えられる。本研究では、フィチン酸が高脂肪食摂取ラットの腸内細菌叢をはじめとする腸内環境因子に及ぼす影響について、ミオイノシトールの影響と併せて検討を加えた。

**方法及び結果)** 実験動物として 4 週齢の SD 系雄ラットを用いた。高脂肪食(30%牛脂)を基本食とし、飼育期間を 21 日間とした。実験 1 では、1.02%フィチン酸ナトリウム添加食の腸内細菌叢への影響を検討した。実験 2 では 1.02%フィチン酸ナトリウムならびに等モルの 0.2%ミオイノシトール添加食の盲腸内容物有機酸含量と腸内細菌叢への影響を検討した。盲腸内容物中の細菌叢と有機酸は T-RFLP 法と HPLC 法により分析した。その結果、実験 1 ではフィチン酸添加食群において、盲腸内容物重量と内容物中の *Bifidobacterium* および *Lactobacillales* が有意に増加した。実験 2 においても、フィチン酸添加食群において盲腸内容物中の *Lactobacillales* が有意に増加した。一方、ミオイノシトール添加食による腸内細菌叢への影響は認められなかった。また、盲腸内容物中の有機酸含量について検討したところ、フィチン酸添加食群において酪酸含量が有意に増加することが認められた。

## 16 日常的にナガイモを摂取している高齢者の腸内細菌叢の分析 (帯畜大・食品科学<sup>1</sup>, 帯広大谷短大<sup>2</sup>, (株)ファスマック<sup>3</sup>, 帯広臨検センター<sup>4</sup>) ○<sup>1</sup>古田土 麗, <sup>2</sup>山崎民子, <sup>3</sup>原口浩幸, <sup>3</sup>高崎一人, <sup>3</sup>布藤 聡, <sup>4</sup>池田徳明, <sup>1</sup>得字圭彦, <sup>1</sup>木下幹朗, <sup>1</sup>大和田琢二, <sup>1</sup>大西正男

**目的:** 演者らは、十勝地方で生産されているブランド品「十勝川西長いも」の高付加価値化を図る一環として、その成分組成、アミラーゼカ価およびスーパーオキシドアニオン消去活性を分析するとともに、ナガイモ(*Dioscorea opposita* Thumb., ヤムイモの一種)が大腸腺腫発症抑制効果、免疫賦活作用、異物代謝促進作用などの食品機能を有することを報告している。一方、粘質物や難消化性成分が比較的多く含むヤムイモ類の摂取は、腸内細菌叢に影響を及ぼし、大腸機能に有益な作用を示すことが動物実験から明らかになっている。そこで、我々は介護施設に入居されている高齢者を対象としてナガイモ摂取の排便や腸内細菌叢に及ぼす影響を検討しているが、今回は腸内細菌叢の特徴を分析した結果について報告する。

**方法:** 介護施設入所の高齢者 7 名(男 4 名, 女 3 名, 平均年齢 81 歳)を対象とした。対象者は、ナガイモを含まない通常食を 1 週間喫食した後、朝食時に十勝産ナガイモ 40g を「とろろ」として 4 週間、毎日摂取した。その後、ナガイモを含まない通常食を喫食した。菌叢分析は、通常食期後、ナガイモ摂取(試験食)期後およびナガイモ摂取中止 2 週間後の便サンプルを用いて培養法によって行った。また、DGGE 法および次世代シーケンサーを用いて遺伝子レベルの解析も行った。

**結果:** 試験期間中の喫食率は高く(平均 94%)、また、ナガイモ料理は全対象者が全量を摂取した。糞便内総嫌気性菌数は、通常食期と比べて、試験食期において高かった。培養法で分析した 6 種の菌種の中で善玉菌(*Lactobacillus* と *Bifidobacterium*) の占める割合は試験食期で増加傾向が見られ、摂取中止期との比較では有意に減少した。一方、悪玉菌(*Clostridium perfringens* と *Enterobacteriaceae*) の割合は試験食期において減少した。なお、次世代シーケンサーによる分析結果については、現在、解析中である。

17 シイタケ栽培廃液(上面水)に含まれる酵素の解析  
 (北見工大・バイオ環境化学<sup>\*1</sup>、財団法人岩手生工研<sup>\*2</sup>、株北研<sup>\*3</sup>)○北原慎一<sup>\*1</sup>、外館隆<sup>\*1</sup>、澤田雄太<sup>\*1</sup>、廣長泰輔<sup>\*1</sup>、永井勝<sup>\*2</sup>、鮎澤澄夫<sup>\*3</sup>、枝克昌<sup>\*3</sup>、山内隆弘<sup>\*3</sup>、青木貴行<sup>\*3</sup>、佐藤利次<sup>\*1,\*2</sup>

**研究背景)** シイタケは担子菌に属する木材腐朽菌の1種で、リグニン分解酵素や多糖分解酵素などを分泌することにより木材を分解して栄養源を獲得している。シイタケはリグニン分解酵素として主にラッカーゼを分泌しているが、ラッカーゼは環境汚染物質の除去等への利用が期待される有用酵素である。また、セルラーゼやキシラナーゼ等の多糖分解酵素は、非食用植物バイオマスからのバイオエタノール製造等において重要な酵素である。本研究では、シイタケ菌床栽培の上面栽培に注目し、その廃液(上面水)中に溶出している酵素の解析を行った。

**方法・結果及び考察)** 上面水は、(株)北研馬頭工場で栽培された上面栽培物から回収し、分子量10kDa以上の物質を濃縮できる限外ろ過膜で100以上に濃縮した(濃縮上面水)。濃縮上面水中のラッカーゼ活性、セルラーゼ活性及びキシラナーゼ活性を測定したところ、それぞれ9U/ml、21U/ml、39U/mlを示した。次に濃縮上面水に関して陰イオンカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、ラッカーゼ、セルラーゼ及びキシラナーゼは、それぞれ2つ以上のピークとして溶出され、それぞれの酵素に関して2種類以上のアイソザイムが存在することが示唆された。一方、濃縮上面水は、濃縮過程で褐色化しており、カラムクロマトグラフィーでは褐色物質は除去できなかった。そこで、褐色物質に関して、硫酸プロタミン処理による除去の検討を行った。その結果、0.8%硫酸プロタミン処理により、褐色物質の約92%を沈殿として除去できた。また、この処理により、褐変物質と共にタンパク質が約95%除去され、ラッカーゼ活性は約61%残存することが明らかとなった。これに対して、キシラナーゼとセルラーゼの活性残存率は、約36%と約41%であった。現在、硫酸プロタミン処理上清に含まれるこれらの酵素についてさらに解析している。

18 シイタケ・グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ  
 によるシイタケ・ラッカーゼ遺伝子 *lcc1* の発現  
 (\*<sup>1</sup>北見工大・バイオ環境化学、\*<sup>2</sup>財) 岩手生工研)○内藤真良<sup>\*1</sup>、南愛香<sup>\*1</sup>、鈴木直之<sup>\*1</sup>、  
 八重樫香<sup>\*2</sup>、河田真樹<sup>\*2</sup>、平野達也<sup>\*2</sup>、佐藤利次<sup>\*1,2</sup>

**研究背景)** シイタケは木材腐朽菌に属し、木材のリグニンを分解することで栄養源を獲得して成長する。シイタケは、リグニン分解酵素としてラッカーゼ(Lcc)を菌糸から分泌している。シイタケが分泌するLccの中で、Lcc1は最もよく特徴づけられており、液体培養液中に分泌されることが明らかになっている。またLcc1は、染料の脱色やフェノール性内分泌攪乱物質の分解に有効であることが明らかになっていることから、その産業利用が期待されている。Lccを大量に生産するための方法の1つとして、宿主-ベクター系による高発現がある。我々はこれまでに、シイタケの発現ベクターとして、シイタケの解糖系の酵素であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子(*gpd*)プロモータで外来遺伝子を発現できるベクターpChGベクターを開発した。本研究では、このpChGベクターによるシイタケ*lcc1*遺伝子発現に関して解析を行った。

**方法・結果及び考察)** pChGベクターにシイタケ*lcc1*遺伝子cDNAを挿入したベクター、pChG-cL1sを構築し、シイタケSR-1株にREMI法により導入した。得られた組換え体40株に関して、24穴プレートでの液体培養によるラッカーゼ活性変動について検討した。Lccの基質として、0.1mM ABTSを含むMYPG液体培地2mlを24穴マイクロプレートの1穴あたりに添加し、寒天培養菌糸を接種した後、静置培養した。その結果、培養24時間後、親株よりも明らかにラッカーゼ活性の高い株として、5-2株と5-7株が選抜された。次に、100mlのMYPG液体培地を含む三角フラスコに、寒天培養菌糸を接種し、静置培養と振とう培養を行い、培養ろ液のラッカーゼ活性の経時変化をみた。その結果、5-2株では、静置培養27日目に、親株よりも約2倍高いラッカーゼ活性が検出された。

**19** ラッカーゼ発現に変異の生じたシイタケ (*Lentinula edodes*) REMI mutant の解析-第2報-  
 (\*<sup>1</sup> 北見工大・バイオ環境化学、\*<sup>2</sup> 財)岩手生工研)○沢目洋史\*<sup>1</sup>、山形明史\*<sup>1</sup>、鈴木直之\*<sup>1</sup>、  
 永井勝\*<sup>2</sup>、渡邊久敬\*<sup>2</sup>、八重樫香\*<sup>2</sup>、平野達也\*<sup>2</sup>、佐藤利次\*<sup>1,2</sup>

**研究背景** シイタケ (*Lentinula edodes*) は、産業上有用な酵素であるラッカーゼ (Lcc) を複数有していることが報告されているが、その発現メカニズムに関しては不明である。その中の分泌型 Lcc の1つである Lcc1 は、液体培養時にのみ分泌されることが報告されている。昨年、本大会において、シイタケ薬剤耐性遺伝子発現ベクターを REMI 法によって導入したシイタケ組換え株の中に、Lcc 発現パターンが宿主株と異なる株が1株 (#590) 得られたことを報告した。また、その胞子株についても同様の性質を示す株を数株選抜した。その特徴は、宿主株より早い時期に Lcc 活性が検出されることである。本研究では、シイタケ組換え株 #590 株とその胞子株が分泌する Lcc に関して解析を行ったので報告する。**方法・結果** 宿主株 SR-1、組換え株 #590 株、およびその胞子株について液体振とう培養を行い、培養液を経時的に回収して Lcc 活性の変化をみたところ、#590 株および胞子株は親株よりも培養初期から Lcc 活性が検出されることが確認できた。また、液体振とう培養時の Lcc 発現パターンは、#590 株および胞子株では、親株とは異なる Lcc 活性変動を示し、2回のピーク(1次および2次ピーク)を示した。それぞれのピークについてウエスタン解析を行ったところ、宿主株の液体振とう培養では Lcc1 のみが検出されるが、組換え株では Lcc1 とは異なる Lcc UKs が検出された。現在、組換え株が分泌する LccUKs について、精製を試みている。

**20** 組換えツベロン酸グルコシドグルコシダーゼの酵素化学的諸性質の解析  
 (北大院・農<sup>1</sup> 農研機構・北海道農研<sup>2</sup>)  
 ○武田遼介<sup>1</sup>、姫野奈美<sup>1</sup>、佐分利亘<sup>1</sup>、和久田真司<sup>1</sup>、森春英<sup>1</sup>、松浦英幸<sup>1</sup>、鍋田憲助<sup>1</sup>、  
 今井亮三<sup>2</sup>、松井博和<sup>1</sup>

**研究背景** 植物ホルモンの配糖体は一般的に不活性体かつ貯蔵体として存在しており、必要時に加水分解され活性体となる。病傷害ストレスへの応答等に関与する植物ホルモンであるジャスモン酸 (JA) の 12 位炭素が水酸化されたツベロン酸 (TA) およびその配糖体の TA グルコシド (TAG) は植物に普遍的に存在している。TA ではバレイショの塊茎誘導作用や JA 生合成遺伝子の転写抑制作用が報告されており、植物内で TAG は TA の貯蔵体として働くと考えられる。我々はイネから TAG の加水分解活性を持つ2種類の酵素 (OsTAGG1, OsTAGG2) を単離精製したが低収量により生化学的機能の解析は充分ではない。本研究では組換え OsTAGG1 を生産し、諸性質を解析した。

**方法・結果及び考察** イネの cDNA を鋳型として OsTAGG1 遺伝子をクローニングし、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて C 末端ヒスチジンタグタンパク質として組換え酵素を生産した。粗酵素液から硫酸沈殿、Ni キレートイオン交換クロマトグラフィーおよび Resource S カラムクロマトグラフィーにより組換え OsTAGG1 を精製した。本酵素は *p*-ニトロフェニルβ-D-グルコシド (pNPG) に対し pH 5.0、温度 55°C で最も高い加水分解活性を示し、pH 4.2-9.9、温度 55°C 以下で安定であった。各種配糖体およびオリゴ糖を用いて基質特異性を解析した。本酵素は TAG だけではなくサリチル酸グルコシド (SAG)、*m*-SAG、*p*-SAG、サリシン、ヘリシン、GA<sub>4</sub>-Glc、pNPG、pNP-ガラクトシド、pNP-セロビオシド、セロオリゴ糖、ソホロースおよびラミナリビオースに対し加水分解活性を示したが、TAG に対する  $K_m$  値が最も低かった。本酵素は OsTAGG2 とは異なり、TAG を最良の基質とし、さらにオリゴ糖も加水分解することが明らかとなった。

## 21 ツベロン酸グルコシド加水分解酵素の基質認識機構の解明

(北大院・農<sup>1</sup>, 農研機構・北海道農研<sup>2</sup>)

○姫野奈美<sup>1</sup>, 和久田真司<sup>1</sup>, 武田遼介<sup>1</sup>, 佐分利亘<sup>1</sup>, 森春英<sup>1</sup>, 松浦英幸<sup>1</sup>, 鍋田憲助<sup>1</sup>, 今井亮三<sup>2</sup>, 松井博和<sup>1</sup>

**研究背景** ツベロン酸 (TA) およびツベロン酸グルコシド (TAG) は、パイレイシヨの塊茎形成誘導因子として知られているが、塊茎を形成しない植物にも存在する。我々はイネより TAG 加水分解活性を指標として 2 種類の TAG 加水分解酵素を同定した (OsTAGG1 および OsTAGG2)。これらの酵素はアミノ酸配列が 85% 同一でありながら基質特異性は大きく異なる。OsTAGG2 はサリチル酸グルコシド (SAG) に対して TAG の約 4 倍の加水分解活性を示すがオリゴ糖にはほとんど作用しない。一方、OsTAGG1 は TAG に対して高い特異性を示し、オリゴ糖ではソホロースとラミナリビオースを加水分解する。本研究では OsTAGG2 を用いてアグリコン特異性を決定付けるアミノ酸残基の特定を目指した。

**方法・結果及び考察** OsTAGG2 の立体構造から 6 アミノ酸 (W181, T182, N186, F193, V250 および H252) がアグリコン結合部位の形成に関わると推測した。このうち W181, N186 および H252 は OsTAGG1 との間で保存されていない。イネおよびイロイヌナズナの 83 種類の  $\beta$ -グルコシダーゼの配列を比較した結果、H252 に相当する残基の多様性が最も高かった。このため H252 を OsTAGG1 型に改変した H252N をメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて生産し諸性質を解析した。H252N の *p*-ニトロフェニル  $\beta$ -D-グルコシドおよび TAG に対する  $k_{cat}/K_m$  はそれぞれ野生型の 105% と 89% とほぼ同程度であったのに対し、SAG に対する  $k_{cat}/K_m$  は野生型の 28% まで低下した。同様に SAG の類似化合物である *p*-SAG, *m*-SAG, ヘリシンやサリシンに対する  $k_{cat}/K_m$  も野生型の 23% から 64% 低下した。これらの結果より OsTAGG2 のアグリコン結合部位において SA 基の認識には H252 が重要であることが示唆された。

*Bacillus* sp. AAH-31 株由来耐熱性アルカリ  $\alpha$ -アミラーゼの高機能化に関する研究

## 22

(<sup>1</sup>北大院農、<sup>2</sup>株式会社 ADEKA) ○玉村尚也<sup>1</sup>, 向井惇<sup>1</sup>, 森本奈保喜<sup>2</sup>, 竹花稔彦<sup>2</sup>, 佐分利亘<sup>1</sup>, 森春英<sup>1</sup>, 小池誠治<sup>2</sup>, 松井博和<sup>1</sup>

**研究背景** アルカリアミラーゼは、澱粉汚れの除去を目的に洗剤用酵素として利用されてきた。しかし、近年、自動食器洗浄機の普及に伴い、耐熱性と耐アルカリ性を兼ね備えた酵素が求められている。我々はこれまでに好熱性・好アルカリ性アミラーゼ生産能を指標として土壌から *Bacillus* sp. AAH-31 株を取得し、本菌株が生産する  $\alpha$ -アミラーゼ (AmyL) がアルカリ pH で最適に作用し、優れた耐熱性、キレート剤耐性を有する酵素であることを明らかにしている。しかし、AmyL の比活性が低く、現状では実用化が難しい。そこで、本研究では AmyL を改変し、比活性を向上させた変異酵素を開発した。

**方法・結果及び考察** AmyL と高い配列類似性を示す *Thermoactinomyces vulgaris* 由来  $\alpha$ -アミラーゼ (TVAI) の立体構造を鋳型として、AmyL の構造を推測した。変異の導入による活性の減少を避けるため、サブサイト-1 および +1 以外に位置する 24 アミノ酸残基を選択した。選択したアミノ酸残基をアラニンに置換した変異酵素を作製した。変異酵素の可溶性澱粉に対する比活性がそれぞれ野生型の 245%、266%、184%、163% に向上した Y398A、H403A、I481A、K521A が得られた。野生型と比較して比活性が最も向上した H403 へのランダム変異ライブラリーから 96 クローンを選択し、無細胞抽出液での活性が向上した 20 クローンを選抜した。これらをそれぞれ精製し、比活性を測定した。上位 6 番目以内の変異酵素における変異導入部位の配列を決定した結果、2 個が Ala、3 個が Gly、1 個が Cys への置換であった。H403A の比活性は野生型酵素の 260%、H403G は 197%、H403C は 189% であった。以上のことから、H403 位のアミノ酸は Ala が最適であると考えられた。現在、アラニン変異導入によって大きく活性の上昇した他の 3 つのアミノ酸残基について、アミノ酸の最適化を行っている。

## 23 *Aspergillus niger* 由来 $\alpha$ -glucosidase の基質特異性に関するアミノ酸残基の解析 (北大院農)

○佐藤恵美, 田上貴祥, 奥山正幸, 森春英, 木村淳夫

**研究背景)** *Aspergillus niger* 由来 $\alpha$ -glucosidase (ANG) はマルトオリゴ糖を加水分解し、 $\alpha$ -グルコースを遊離する。また、糖転移反応も触媒し、イソマルトオリゴ糖合成の産業用酵素として利用されている。本研究では、ANG の基質特異性の改変を目的とし、サブサイト+1 に保存される Phe693 および隣接する Asn694 に着目した。これらのアミノ酸残基を置換した変異体 (F693V, N694A/F) を作製し、加水分解の基質特異性ならびに糖転移反応を解析した。

**方法・結果及び考察)** 野生型、変異体とも *Pichia pastoris* を宿主として組換え酵素を生産した。各酵素のグルコニ糖類およびマルトオリゴ糖に対する速度パラメーターを算出した。グルコニ糖類に対する変異体の  $k_{cat}/K_m$  値は、野生型同様マルトースに対して最も高かった。マルトオリゴ糖では、変異体の  $k_{cat}/K_m$  値はマルトースおよびマルトトリオースにおいて野生型よりも減少した。次に、100 mM マルトースを基質とした反応初期生成物の生成速度から糖転移率を求めた。各酵素の糖転移率は、WT (80%), N694A (70%), N694F (72%) および F693V/N694F (79%) であり、変異体では糖転移率が減少した。N694F および F693V/N694F 変異体では野生型と比較して糖転移反応における $\alpha$ -1,4 転移の割合が20-30%程度増加した。

## 24 可変領域への変異導入とその組み合わせによる抗菌ペプチド「アピデシン」の抗菌スペクトル改変

(北大院工・生機高、<sup>1</sup>東理大・基礎工) ○三宅 政裕、岩村 雄太、松本 謙一郎、橋本 茂樹<sup>1</sup>、大井 俊彦、田口 精一

**研究背景)** 抗菌ペプチドは生物が持つ自然免疫を担う分子の一種であり、新しい抗菌物質として注目されている。「アピデシン」はミツバチ由来の抗菌ペプチドであり、グラム陰性菌に対して静菌的に作用する。アピデシンは 18 アミノ酸残基から構成され、N 末端から 1~3 残基および 6~8 残基は、アピデシンのホモログとの間での保存性が低く、可変領域と考えられている。これまでの研究で、可変領域の一部である N 末端 3 残基に変異を導入し、大腸菌に対して約 10 倍の抗菌活性を有する RVR 変異体を取得することに成功している<sup>(1)</sup>。本研究では、もう一つの可変領域である 6~8 番目の残基のうち、アピデシンホモログとの間で最も保存性の低い 7 残基目のチロシン残基に着目した。本部位に変異を導入し、アピデシンの抗菌活性に与える影響を調査した。

**方法および結果)** アピデシンの 7 残基目を、側鎖構造の異なる 10 種のアミノ酸残基に置換した変異ペプチドを固相法により合成し、グラム陰性、陽性の種々の細菌に対する抗菌スペクトルを調べた。抗菌活性は最小発育阻止濃度(MIC)により評価した。その結果、ヒスチジン残基置換体は、グラム陰性菌に対する抗菌活性の向上が見られた。興味深い事に、システインに置換した変異体は、グラム陰性菌に対する抗菌活性が低下する一方、野生型が活性を示さないグラム陽性菌に対して活性を示した。このことから、アミノ酸 1 残基置換によって抗菌スペクトルの逆転が起きることを発見した。次に、RVR 変異と 7 残基目の変異を組み合わせ、各種細菌への抗菌活性を調べたところ、変異の組み合わせにより抗菌スペクトルが大きく変化することが分かった。

(1) S. Taguchi *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(5), 1460-1464 (2009)

## 25 セルロース系糖質バイオマス为原料とした高乳酸分率ポリマーの効率的生産 (北大院工) ○佐々木 勝平、John Masani Nduko、松本 謙一郎、大井 俊彦、田口 精一

**研究背景** 種々の細菌により産生されるポリヒドロキシアルカン酸(PHA)は、典型的には 3-ヒドロキシシアシル CoA が PHA 合成酵素により重合されて合成される。我々の研究グループでは、ある特殊な PHA 合成酵素の変異体が、乳酸をモノユニットとして含むポリマーを合成できることを見出し、乳酸重合酵素と命名した。乳酸重合酵素を発現する組換え大腸菌を用いると、グルコースを単一の炭素源として、乳酸と 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)の共重合ポリエステルが合成される。本研究では、セルロース系糖質バイオマスの主成分の一つとして知られる、キシロースを炭素源とした乳酸ポリマー合成を検討した。その結果、既存の研究においては、キシロースを炭素源とした PHA 生産はグルコースよりも生産性が低いことが報告されていたが、興味深い事に、乳酸ポリマーの生産においては、キシロースがグルコースと同等以上の生産性を示す事が分かった。さらに、キシロースからポリマーその他の代謝産物への変換を経時的に分析し、その原因を解析した。

**方法・結果及び考察** Keio collection の乳酸高生産変異株である大腸菌 JW0885 株に、乳酸重合酵素遺伝子、ラクチル CoA を合成するための CoA 転移酵素遺伝子、3HB-CoA を供給するための酵素遺伝子を導入し、組換え株を作成した。得られた組換え株の培養液を経時的にサンプリングして、菌体内のポリマー組成および培養上清中の糖・有機酸の濃度を測定した。その結果、培養開始後 14 時間後から、培地中に乳酸、酢酸が分泌されるのと同時に乳酸ポリマーが合成される事が分かった。これらの有機酸のほとんどは、培養後期に資化された。キシロースは 3HB モノマーに変換される効率がグルコースよりも低く、より多くの炭素源が乳酸合成に利用される事が分かった。

## 26 *Ralstonia eutropha* 由来ポリヒドロキシアルカン酸重合酵素の改変による Class I 乳酸重合酵素の創出

(北大院・工・生機高・<sup>1</sup>東工大・総理工) ○越智 杏奈、大場 貴史、坂井 浩平、松本 謙一郎、柘植 丈治<sup>1</sup>、田口 精一

**研究背景** ポリ乳酸(PLA)は、石油由来樹脂の代替材料として最も実用化が進んでいるバイオプラスチックである。現在 PLA は、微生物発酵により生産された乳酸を原料として、主に重金属触媒を用いた化学重合により生産されているが、医療や食品などの用途への利用を考えると、有害な重金属触媒の残留の可能性のない合成方法が望ましい。最近、当研究室では、乳酸を重合可能なポリヒドロキシアルカン酸(PHA)重合酵素(乳酸重合酵素)を世界で初めて発見し、乳酸ポリマーの完全生合成系を構築した。PHA 重合酵素は、その基質特異性に基づき 4 つの Class に分類されるが、最初に発見された LPE は、Class II に属する *Pseudomonas* sp. 61-3 由来の PHA 重合酵素(PhaC<sub>1ps</sub>)の高活性変異体(S325T/Q481K)であった。これまでの研究より、乳酸重合酵素の重合能力が乳酸ポリマーの生産に大きく影響することが分かっている。そこで、本研究では、高い活性を持つことが知られている *Ralstonia eutropha* 由来 Class I PHA 重合酵素(PhaC<sub>Re</sub>)に着目し、本酵素を改変することで新規乳酸重合酵素の創出を目指した。

**方法・結果** 初代乳酸重合酵素である PhaC<sub>1ps</sub>において、Q481K 変異が乳酸重合活性に必要であることが分かっていた。そこで、Q481 位に該当する PhaC<sub>Re</sub> 中の A510 位を K に置換した変異型酵素遺伝子を作製した。本遺伝子をモノマー供給系遺伝子と共に大腸菌に導入し、ポリマー蓄積条件で培養した。得られたポリマーを解析した結果、乳酸ポリマーの合成が確認できたことから、Class I の乳酸重合酵素を創出することに初めて成功した。

A. Ochi *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s00253-012-4231-9



## 27 進化工学的改変による高活性 PhaB の速度論的解析と PHB 生産性の向上 (北大院工) ○渡辺 剛志、宋 育陽、松本 謙一郎、大井 俊彦、田口 精一

**研究目的** *Ralstonia eutropha* 由来のポリヒドロキシブタン酸(PHB)生合成系遺伝子群(phaA, phaB, phaC)の中で、phaB がコードするアセトアセチル CoA(AcAcCoA)レダクターゼ(PhaB)は、PHB のモノマー供給酵素であり、NADPHを補酵素として AcAcCoA を 3-ヒドロキシブチル CoA (3 HB-CoA)へと還元する反応を触媒する。この酵素反応が、PHB 生合成の律速段階であると考えられていたことから、PHB 生産性向上を目的として PhaB の進化工学的改変を行い、高活性優良変異体を取得した<sup>1)</sup>。本研究では、PhaB 高活性変異酵素の NADPH と AcAc-CoA の両基質に対する酵素動力学的解析を行った。加えて得られた PhaB 高活性変異酵素を用いて、アミノ酸生産菌として工業的に広く利用され安全性の高い *Corynebacterium glutamicum* に導入し、PHB 生産性の向上について検討した。

**結果** His-tag 精製した PhaB 変異酵素の AcAc-CoA に対する  $k_{cat}/K_m$  は、 $2.65 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、野生型よりも高かった。一方、NADPH に対する  $k_{cat}/K_m$  は、 $5.85 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であり、野生型と比べて低下したことから、PhaB 変異酵素の高活性化の要因は AcAc-CoA に対する反応性の向上であると考えられた。次に、この PhaB 変異酵素遺伝子を *C. glutamicum* に他の PHB 生合成系遺伝子(phaA, phaC)と共に導入したところ、高活性 PhaB 変異酵素遺伝子を導入した *C. glutamicum* の組換え株は、野生型酵素遺伝子導入株に比べて約 2 倍の PHB 蓄積率を示したことから、PhaB 変異酵素は PHB 合成の向上に寄与することが確認できた。

1) T. Watanabe et.al., 15<sup>th</sup> International Biotechnology Symposium and Exhibition, Korea (2012).

## 28 大腸菌を用いた高光学純度(R)-3-ヒドロキシブタン酸の効率的生産 (北大院工・生機高) ○本間 以祝、松本 一郎、大慶 岳洋、大井 俊彦、田口 精一

**研究背景** バイオポリエステルであるポリヒドロキシ酪酸[P(3HB)]の構成成分である 3-ヒドロキシ酪酸(3HB)は光学活性を有しており、抗生物質や生理活性物質などのキラル合成の出発材料として工業的にも注目されている有用な化合物である。微生物発酵による 3HB 生産の利点は、キラル選択性の高い酵素反応による高光学純度の 3HB を合成できる点である。グルコースを炭素源とした 3HB 合成には、(1)微生物合成された P(3HB)を P(3HB)分解酵素により加水分解する方法、(2)P(3HB)合成中間体である 3HB-CoA をチオラーゼにより直接加水分解する方法などが知られている。我々はプロピオニル CoA 転移酵素(PCT)を用いることで、CoA 転移反応により 3HB-CoA から 3HB を合成すると共に、酢酸からアセチル CoA が再生され 3HB 合成経路に利用される設計である 3HB 生産経路を構築した。さらに 3HB 合成に関与するアセトアセチル CoA リダクターゼ(PhaB)の改変酵素を用いることで、3HB の生産向上についても検討した。

**方法・結果** P(3HB)生合成関連遺伝子(phaA, phaB)および PCT 遺伝子を導入した大腸菌を、グルコースを含む LB 培地を用いて培養した場合、3HB は 1g/L 生産された。また、酢酸をグルコースと共に添加することで、3HB は最大で 5.2g/L まで上昇した。生産された 3HB の光学純度をキラルカラムにより分析したところ、非常に光学純度の高い(R)-3HB であることが分かった。加えて、PhaB 改変遺伝子を大腸菌に導入し、酢酸とグルコースを添加して培養した結果、野生型の PhaB 遺伝子の場合と比べて 3HB 生産性が上昇した。