

2021 年度 日本農芸化学会北海道支部

第 2 回学術講演会

講演要旨

日時：2021 年 12 月 11 日(土), 12 日(日)

プログラム

12月11日(土) 北海道大学農学部大講堂 (Zoom 同時配信)

- 13:00~13:05 開会の挨拶 北海道支部 支部長 松浦英幸 (北大院農)
13:05~13:20 日本農芸化学会北海道支部 奨励賞・学生奨励賞授賞式

日本農芸化学会北海道支部 奨励賞・学生奨励賞受賞講演

- 13:25~13:55 日本農芸化学会北海道支部奨励賞
重富 顕吾 (北大院農)
「構造活性相関による天然生理活性物質の機能解明」
座長: 松浦 英幸 (北大院農)
- 13:55~14:35 日本農芸化学会北海道支部学生奨励賞
堀越 秀 (北大院農)
「植物 GH1 β -グルコシダーゼの機能構造相関に関する研究」
座長: 佐分利 亘 (北大院農)
- 瀧野 純矢 (北大院総化)
「糸状菌天然物における骨格構築酵素の機能解析」
座長: 及川 英秋 (北大院理)

特別講演

- 14:50~15:30 「複雑で驚異的生物活性を持つ天然物の酵素合成を夢見て」
及川 英秋 (北大院理)
座長: 南 篤志 (北大院理)
- 15:30~16:10 「フェアリー化合物の科学とその応用展開」
河岸 洋和 (静大グリーン科学研究所)
座長: 脇本 敏幸 (北大院薬)
- 16:20~17:00 「メガロ糖とは? : 課題・生産・機能・展望」
木村 淳夫 (北大院農)
座長: 奥山 正幸 (北大院農)

12月12日(日) オンライン (Zoom) 開催

発表 10分, 質疑応答 3分, 交代時間 2分

演題番号の*印: 学生優秀発表賞エントリー

A 会場

9:00~9:45 座長 三上 奈々 (帯畜大)

- A1* 国産カカオ発酵中のマイクロバイオータ及びメタボローム解析
○西村 洋哉¹, 志波 優^{2,3}, 富田 理⁴, 遠藤 明仁¹
¹東農大生物産業, ²東農大ゲノム解析センター, ³東農大分子微生物学科, ⁴農研機構 食品研究部門

- A2* ヒト腸内酪酸産生菌 *Faecalibacterium prausnitzii* の多様性と特異的プライマーの評価
○丹野広貴, 遠藤明仁
東農大院・生物産業

- A3* 酪酸産生菌 *Anaerostipes* spp. の芽胞形成に関する研究
○門脇 廉、丹野 広貴、遠藤 明仁
東農大生物産業

9:45~10:45 座長 遠藤 明仁 (東農大)

- A4* 高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内脂肪酸プロファイルの変化が腸内細菌叢構成に与える影響
○川上 憲太郎¹, B. Gowda Siddabasave Gowda², Zhen Chen², 吹谷 智¹,
Chongsheng Liang², Han Hai², 石塚 敏¹, 小椋 義俊³, 後藤 恭宏⁴, 前田 智也¹, 林 哲也⁴, 千葉 仁志⁵, 恵 淑萍², 横田 篤¹
¹北大院・農, ²北大院・保健, ³久留米大・医, ⁴九大院・医, ⁵札幌保医大・栄

- A5* Insertion Sequencing 解析により網羅的に同定されたビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価
○井上 太貴, 前田 智也, 横田 篤, 吹谷 智
北大院農

- A6* 牛尿発酵液の微細藻類培養への利用
○加藤勇太^{1,2}, 邱泰瑛¹, 小西正朗¹
¹北見工大院, ²環境大善株式会社

- A7* 牛尿発酵液からのインドール-3-酢酸生産菌のスクリーニング
○Pei-Yu TAN¹, 石田奨¹, 加藤勇太^{1,2}, 邱泰瑛¹, 小西正朗¹
¹北見工大院, ²環境大善株式会社

10 : 45~11 : 30 座長 前田 智也 (北大院農)

- A8 Effects of culture condition and strain dependence on the productivity of *Monascus* secondary metabolite, monascin
○Qingyun Huang, Nodoka Miyaki, Zongfei Li, Toru Hayakawa, Jun-ichi Wakamatsu, and Haruto Kumura
Grad. Sch. Agri., Hokkaido Univ.

- A9 紅麹菌 *Monascus ruber* NBRC 32318 のモナシン産生に及ぼす培地成分の影響
○宮木 温香, 黄 卿雲, 早川 徹, 若松 純一, 玖村 朗人
北大院農

- A10* ドライ熟成肉に生育する真菌類のプロテアーゼやリパーゼの生産性に関する検討
○細野未紗¹, 豊留孝仁^{2,3,4}, 栗田虎之介¹, 島田謙一郎¹, 田村健一⁵, 三上奈々¹
¹帯畜大・畜産, ²帯畜大・獣医, ³帯畜大・動物・食品検診セ, ⁴千葉大・真菌医研セ, ⁵北一ミート (株)

B 会場

9 : 00~10 : 00 座長 加藤 英介 (北大院農)

- B1* コール酸摂取によるラット肝脂質蓄積に伴う鉄代謝の経時的な変動
○久保田 夏希¹, 伊藤 隼大², 堀 将太², 石塚 敏²
¹北大農, ²北大院農

- B2* ラットにおける食後門脈・体循環血漿でのアミノ酸動態と肝臓アミノ酸組成との関係
○荒川 唯¹, 坂口 文菜², 石塚 敏²
¹北大農, ²北大院農

- B3 老化モデルマウスに対する真珠層抽出液の抗老化作用
○下村七海, 大浦一馬, 長谷川靖
室工大院

B4* 植物内生菌 *Phialocephala fortinii* 由来の生物活性物質の探索

○坂東慧¹, 櫛部遼河², 北岡直樹², 松浦英幸²

¹北大農, ²北大院農

10:00~11:00 座長 佐分利 亘 (北大院農)

B5* 空気伝搬させた methyl jasmonate がゼニゴケの植物ホルモン内生量に与える影響の解明

○都築玄武¹, 井上史郎², 北岡直樹², 松浦英幸²

¹北大農, ²北大院農

B6* 三員環構造を有するペプチド抗生物質ペラクトシンとホルマオマイシンの生合成研究

○島谷 諒¹, 大利 徹², 小笠原 泰志²

¹北大院総化, ²北大院工

B7 微細藻類由来 DHA 合成酵素の dehydratase ドメインの機能解析

○小林 飛悠¹, 佐藤 康治², 小笠原 泰志², 大利 徹²

¹北大院総化, ²北大院工

B8* Linaridin natural products containing D-amino acids

○Wanlu Xiao¹, Yasushi Ogasawara², and Tohru Dairi²

¹Grad. Sch. Chem. Sci. Eng. and ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.

11:00~12:00 座長 佐藤 康治 (北大院工)

B9 クアシノイド類による 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解促進機構解析

○木下雄太, 岩田稜平, 加藤英介

北大院農

B10* グルコース 1-リン酸をリン酸基供与体とした ATP 再生反応とそれを利用したオリゴ糖合成

○泉しずく¹, 佐分利亘², 森 春英²

¹北大院農学院, ²北大院農学研究院

B11 組み換え大腸菌による 4-ヒドロキシアルカン酸を含むブロック共重合体 PHA の生合成

○磯部 凧, 富田宏矢, 松本謙一郎

北大院総化

B12 Engineering of polyhydroxyalkanoate synthase for reinforcing activity toward 3-hydroxyhexanoyl-CoA

○Phan Thi Hien¹, Hiroya Tomita², and Ken'ichiro Matsumoto²

¹北大院総化, ²北大院工

構造活性相関による天然生理活性物質の機能解明

重富 顕吾

北海道大学大学院農学研究院

構造活性相関 (Structure-Activity Relationship: SAR) は、ある生物活性物質の部分構造を改変した類縁体 (analog) の調製とそれらの活性評価によって、その生物活性についての情報を引き出す研究手法である。SAR は元の生物活性物質の構造必要性を検証することがその目的だと考えられがちだが、時に標的分子に関するヒントを与えたり、こちらが全く予期していなかった情報が得られたりすることもある。本発表では SAR を用いたいくつかの天然生理活性物質の機能解明の成果について発表させて頂く。

6-Tuliposide B はチューリップの葯に特異的に存在する抗細菌活性の糖エステルである。その標的や分子機構が明らかにされていなかったことから、本化合物の全合成と類縁体の合成、SAR を検討した。その結果、6-tuliposide B は抗菌活性においてあくまでプロドラッグであり、側鎖のラクトン化物である (+)-tulipalin B の形成が活性の鍵であることが明らかになった。また、その標的が細菌の細胞壁合成酵素のひとつである MurA であると推定し、組み換え MurA や過剰発現株を用いたアッセイにより、これを立証した。

北方産きのこ培養物のスクリーニングにより、新たなオートファジー誘導物質として (+)-epogymnolactam を発見した。本化合物の全合成と類縁体合成を経て SAR を検討した結果、オキシラン環自体やその立体、ラクタムの形成のいずれもが活性に重要であることを見出した。さらに側鎖の影響について検証したところ、C4 であった側鎖は C6 とすることでより明確な誘導活性を示す一方、C8 以上に伸長した際にはオートファジー阻害様の活性と、高い細胞毒性を示すことが明らかとなった。活性への寄与を予期していなかった脂肪鎖の、わずか炭素数 2 つの差が明確な違いをもたらしたことに大きな驚きを覚えた。作用機序についてはまだ明確ではないが、脂肪酸合成機構との関連を予想している。

木材のうち、樹皮は高度な利用法が確立されていない材のひとつである。それらの抽出成分量の豊富さと、多様さに注目して生理活性物質の探索を行った。これまでシラカンバ外樹皮から AGEs 形成阻害剤、トドマツ外樹皮から寄生性原虫 *Trypanosoma congolense* に対する増殖阻害剤、ミズナラ外樹皮から抗 *Toxoplasma gondii* 活性物質を発見した。特にミズナラから単離した化合物については、既報では曖昧であった構造を合成化学的手法により 29-norlupan-3, 20-dione であると同定し、さらに構造活性相関についても検討した。その結果、3 位について疎水性官能基であることが選択毒性を高め、E 環においてはカルボキシ基を有することが活性自体を高めることを明らかにした。その他、同様に SAR に基づき、微生物間生育因子の作用機序解明や、新たなタイプの IMPDH 阻害剤ならびに HDAC 阻害剤の開発を達成したのでこれらについても報告したい。

植物 GH1 β -グルコシダーゼの機能構造相関に関する研究

堀越 秀

北海道大学大学院農学院

β -グルコシダーゼは基質の非還元末端の β -グルコシド結合を加水分解する。植物は糖質加水分解酵素群 GH1 に属す多数の β -グルコシダーゼを持つ。これら酵素の基質となる β -グルコシドも、生理活性物質等の配糖体やオリゴ糖など多様性に富む。GH1 β -グルコシダーゼは特定の時期に特定の器官・組織において特定の基質に作用して、幅広い生物学的プロセスに寄与するとされる。ただし、個々の酵素の基質特異性は広く、他酵素との機能が重複するため、逆遺伝学的手法による酵素機能の解明は容易ではない。構造に基づく酵素機能の推定に向けて、GH1 酵素の構造機能相関研究が必要とされる。本研究では、アグリコン特異性に関わるアグリコン結合部位、および高度に保存されながらも多様なグリコン特異性を示すグリコン結合部位に関して、以下の3点を明らかにした。

1. アグリコン特異性の分子基盤：シロイヌナズナ由来 AtBGlu42 は逆遺伝学的手法によってスコポリンを加水分解し、鉄吸収および根圏菌叢改善を誘起するスコポレチンを生成する鍵酵素とされる。大腸菌組換え AtBGlu42 はスコポリンへの高い触媒効率を示した。結晶構造解析と結合予測に基づき、Phe197 と Trp360 がスコポリンのアグリコン結合に重要と推定された。本酵素のセロオリゴ糖三糖への特異性に関し、Arg342 がサブサイト+3 で立体障害となると推定された。Arg342 を長鎖セロオリゴ糖特異的酵素の対応残基 Tyr に置換することで特異性が長鎖側へ改変され、Arg342 相当残基が鎖長特異性制御に重要であると判断された。

2. グリコン(β -グルコシド, β -マンノシド)特異性の分子基盤：シロイヌナズナ AtBGlu44 は高い β -マンノシド特異性を示す一方、イネ Os3BGlu7 は高い β -グルコシド特異性を示し、特異性が明確に異なる。しかし、両酵素間のグリコン結合部位の保存性は高い。詳細な構造比較により、同結合部位のセカンドシェルに3残基が、グリコシル基3位 OH と相互作用する His および求核触媒 Glu のわずかな位置の違いに影響すると推定した。これらの相互変換により、AtBGlu44 は β -グルコシド特異性に変換された。これら残基が特異性決定の一因であることを示した。

3. グリコン(β -グルコシド, β -フコシド)特異性の分子基盤：イネ GH1 酵素 TAGG1 および TAGG2 はメチル配糖体ではいずれもグルコシド特異性を、pNP 配糖体ではそれぞれグルコシドおよびフコシド特異性を示し、基質アグリコンによりグリコン特異性が変化することを見出した。アグリコン結合部位の両酵素間で異なる8残基が寄与すると予想した。TAGG1 のこれら8残基の置換体は pNP フコシド特異性を示した。このことから、グルコシドとフコシドの特異性に、アグリコンの結合様式が関与することを明らかにした。

糸状菌天然物における骨格構築酵素の機能解析

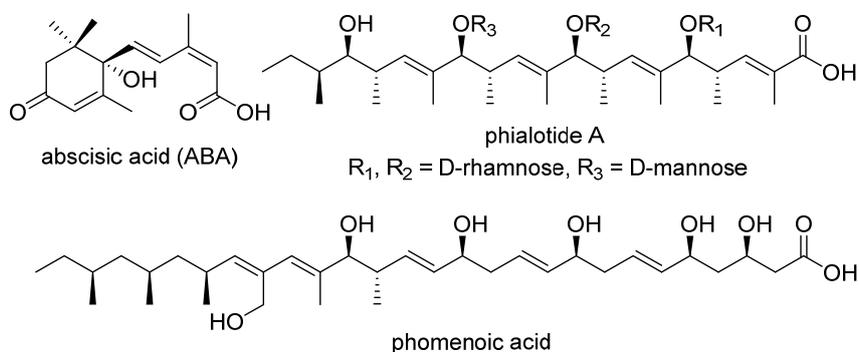
瀧野純矢

北海道大学 大学院総合化学院

糸状菌は、天然有機化合物の宝庫であり、優れた生物活性や複雑な構造を有する興味深い天然物を数多く生産している。本研究では、天然物生合成初期にはたらく骨格構築酵素に着目し、麹菌異種発現系と組み換えタンパク質を用いた実験によって、1)植物ホルモンアブシジン酸(ABA)生合成における新奇テルペン環化酵素の機能解析、2)糸状菌ポリケタイド合成酵素(HR-PKS)における汎用的立体化学制御則の提唱を行った。

1) ABA は、植物が乾燥などの環境ストレスに応答して生産する植物ホルモンであるが、植物に感染する病原性糸状菌においても生産される。糸状菌における ABA の生合成は長年研究されてきたが、鍵酵素である骨格構築酵素は同定されていなかった。本研究では、候補遺伝子を麹菌で異種発現し、ABA 異種生産を達成することで、機能未知遺伝子 *bcABA3* が ABA 生合成における骨格構築酵素であることを明らかにした。また、*BcABA3* は従来のテルペン環化酵素とは似ていない新奇テルペン環化酵素であったため、組み換えタンパク質・標識前駆体を用いた *in vitro* での解析、および、新規解析手法の開発による推定中間体の取り込み実験によって、特徴的な反応機構を解明した^{[1][2]}。

2) HR-PKS は、脂肪酸合成酵素(FAS)と類似したドメインで構成される巨大酵素である。FAS とは異なり、HR-PKS では置換基が残った PK 鎖が生合成される。導入された置換基の立体配置は、各ドメインの立体選択性によって決まるが、その詳細は不明である。主な原因は、①PK 鎖が酵素に連結したまま伸長するため、反応中間体が観測できないこと、②不斉合成などから絶対立体配置が報告されている PK は不斉中心が少ないことがある。本研究では、不斉中心が数多く存在する *phialotide*、*phomenoic acid* について、PK 鎖の絶対立体配置を決定し、立体化学制御則を提唱した。また、HR-PKS の分子系統樹を作製し、近縁の酵素から段階的に適用範囲を検証した結果、提唱した制御則が糸状菌 HR-PKS に汎用的に適用できることが示された^[3]。



[1] J. Takino, et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12392.

[2] J. Takino, et al. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2019**, *83*, 1642.

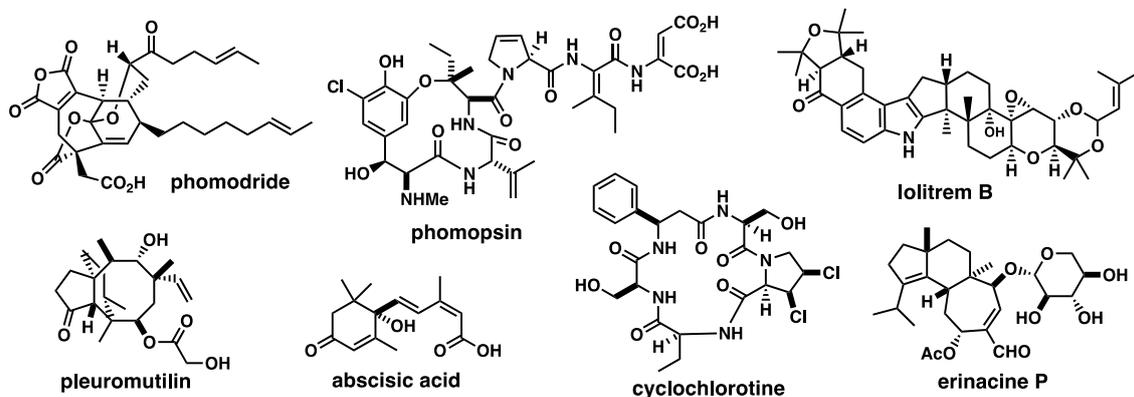
[3] J. Takino, et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23403.

複雑で驚異的生物活性を持つ天然物の酵素合成を夢見て 及川 英秋

北海道大学大学院理学研究院化学部門

細胞中のごくありふれた物質から生合成される天然物は、生物が長い年月をかけて作り上げた機能性分子である。一般にストリキニーネやバンコマイシンのように複雑で多様な構造を持ち、驚異的な生理活性を有することから、人類は医薬などのソースとして利用してきた。一株の微生物には天然物の生合成酵素遺伝子がクラスター（天然物の設計図）として多数ゲノム上に存在することが明らかになり、2010年代に入ると著者らの貢献もあり、入手容易になった設計図情報を使った天然物の合成研究が推進され、次第に一般化しつつある。この状況に至った経緯を振り返ってみたい。

大学4年の時、植物病原菌の代謝毒素を研究対象にする研究室を選び、ナフトキノ系抗生物質の全合成研究という課題を頂いたが、研究を深くやりたいという気持ちとは裏腹に成果が出ない時期が続いた。そうした中、天然物の生合成という分野があることを知った。これは生物がいかなる反応を使って分子を作り上げるか調べる分野で、その延長線上に biomimetic 合成（生物模倣合成）がある。この合成は天然物の構造から有機合成的感性で生物の合成戦略を予想し、それを実現するものである。大変合理的であり、将来性があるように思われた。当時は遺伝子工学が花開いた時代で、何らかの手法で遺伝子を手に入れば生合成酵素を使った天然物合成もできることが脳裏をかすめた。思えばこれが研究生活の最初の転機だった。博士課程進学とともに植物病原菌代謝毒素の研究にテーマを替えて頂き、興味深い毒素を見つけ、生合成研究を行い学位取得となった。2年間のポスドク修行後、出身研究室に戻り研究を続けることが許された。いきなり世界の最先端研究に挑むことはできず、生合成でその存在が予想されても証明がない Diels-Alder 反応を触媒する酵素の研究を手がけた。未踏の研究で、苦心もあったが10年以上かかって実証に成功することができた。この間に遺伝子工学を駆使した天然物生合成経路の解明はさらに進み、2000年頃にヒトゲノムが解析されると、一挙にポストゲノム研究が進行した。有機化学が専門の著者も遺伝子を使いこなして天然物を生産できそうな状況が生まれた。これが2番目の転機である。この後冒頭に述べた成果へと繋がっているが、その詳細にも触れたい。



フェアリー化合物の科学とその応用展開

河岸洋和

静岡大学グリーン科学技術研究所

芝が輪状に周囲より色濃く繁茂し時には輪状に成長が抑制され、後にキノコが発生する現象は、フェアリーリング (fairy rings, 妖精の輪) と呼ばれ、西洋の伝説では、妖精が輪を作りその中で踊るとされている。1675年のフェアリーリングに関する最初の科学的論文が1884年のNature誌に紹介されて以来、その妖精の正体 (芝の繁茂・枯死の原因) は謎のままであった。

我々は、その妖精の正体を明らかにした¹⁻⁷⁾。フェアリーリングを起こすコムラサキシメジ (*Lepista sordida*) からシバ成長促進物質 2-azahypoxanthine (AHX) と成長抑制物質 imidazole-4-carboxamide (ICA) を得た (図1)。さらに、AHXの植物中の代謝産物 2-aza8-oxohypoxanthine (AOH) を発見した (図1)。これら3つの化合物 (フェアリー化合物, fairy chemicals と総称, FCs と略称) はあらゆる植物の成長を制御し、植物に普遍的に内生している。さらに、FCsは、農作物の収量を大幅に増加させた。実用化に向けての研究が我々自身や民間企業で行われている。私は、これまでの実験結果から「フェアリー化合物は新しい植物ホルモンである」と考え、それを証明するための種々の検討を行っている。

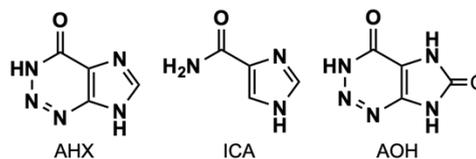


図1 フェアリー化合物の化学構造

本講演では、この研究の歴史と最新の成果を紹介する。また、AOHが化粧品原料として今年中に上市される。その開発経緯も紹介する。

- 1) 河岸洋和, “フェアリーリング”の化学と“フェアリー化合物”の植物成長調節剤としての可能性, **化学と生物**, 52(10), 665-670 (2014)
- 2) 河岸洋和, フェアリーリングの妖精の正体解明とその後の展開, **現代化学**, No. 531, 6月号, 31(2015)
- 3) 河岸洋和, フェアリー化合物を追って —新たな植物成長促進物質の発見と応用への期待, **化学**, 71(6), 12-15 (2016)
- 4) 河岸洋和, フェアリー化合物は植物ホルモンか?, **植物の生長調節**, 52(2), 78-84 (2017)
- 5) Kawagishi, H., Fairy chemicals – a candidate for a new family of plant hormones and possibility of practical use in agriculture –, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 82(5), 752–758 (2018).
- 6) Kawagishi, H., Are fairy chemicals a new family of plant hormones?, **Proc. Jpn. Acad., Ser. B**, 95(1), 29-38 (2019). DOI: 10.2183/pjab.95.003 (無料ダウンロード)

メガロ糖とは？： 課題・生産・機能・展望

木村 淳夫

北海道大学 大学院農学研究院

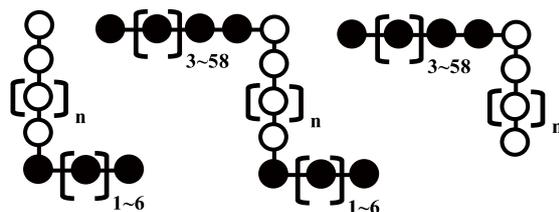
メガロ糖は、糖質の鎖長（重合度; DP と略）に基づいた分類で「DP が 10 以上で多糖まで」をカバーする科学用語として約 60 年前に唱えられた。この分類によると、オリゴ糖の DP は 2～9 となる。多糖の DP は不明であるが、DP が 100 (or 200) 以上でその機能が発揮できると考えると、メガロ糖の DP サイズは「10～100 (or ～200)」となる。一方この分類には曖昧な点がある。特にメガロ糖の機能が明確ではなく、構造と機能の関連が不明瞭であった。メガロ糖の定義がなされても、機能による裏打ちが必要である。

我々は、イソマルトメガロ糖と称する糖質を酵素的に合成した。その構造は、非還元末端側に α -1,6 グルコシド糖鎖 (1,6GC) を、還元末端側に α -1,4 グルコシド糖鎖 (1,4GC) を有している (図左)。すなわち "イソマルト/マルト/メガロ糖" なる「キメラ糖質」である。そのキメラ構造から 1,6GC は親水性を、1,4GC は疎水性を示し、二機能な (bifunctional) 性質を持つ。この二機能性から難溶性化合物が水溶化され、環境汚染物質であるアゾ色素化合物の酵素的分解やフラボノイドの小腸吸収を促進した。最近、小腸上皮細胞のカベオラ経路のシグナルでバリア機能の惹起が観察された (タイトジャンクション閉塞)。二機能性に着目すると、1,4GC の長鎖化がメガロ糖機能の向上に繋がる。しかし還元末端側の長鎖化は困難であり、非還元末端に注目し、環状デキストリン合成酵素の転移反応で作製に成功した (図中央)。難溶性のフラボノイドや薬剤の水溶化がさらに促進された。また短鎖の 1,6GC (小型デキストランなど) に転移酵素を作用させ、非還元末端に 1,4GC を導入したメガロ糖 (図右) は同様な機能を与えた。一段階の酵素反応で得られる点に魅力がある。

BCS (Biopharmaceutics Classification System) により薬剤などの化合物は、水溶性と膜透過性により 4 クラスに分類される。BCS クラス 2 化合物 (BCS-2; 低水溶・高膜透過) には、重要な薬剤や食品素材が含まれ、上述したアゾ色素、フラボノイドや薬剤は BCS-2 のメンバーであった。BCS-2 の水溶化は、それらの投与量や含有量の削減に繋がり、低コスト化が実現できる。さらに SDGs への貢献も可能になった。

以上は、単一種の単糖から成る「ホモ型メガロ糖」であるが、複数の単糖種から成る「ヘテロ型メガロ糖」も想定できる。食品多糖に注目し、その低分子化からヘテロメガロ糖を構築した。前述のメガロ糖 (ホモグルコメガロ糖) が可溶化できないフラボノイドに優れた作用を示した。

メガロ糖の構造的特徴である構成単糖や鎖長サイズの多様性を考慮すると開発の余地が大きい研究対象と判断できる。また食品多糖からのヘテロメガロ糖は消化管で発生すると推察され、その機能も興味深い。



A1* 国産カカオ発酵中のマイクロバイオータ及びメタボローム解析

○西村 洋哉¹, 志波 優^{2,3}, 富田 理⁴, 遠藤 明仁¹(東農大生物産業¹, 東農大ゲノム解析センター², 東農大分子微生物学科³, 農研機構 食品研究部門⁴)

【背景・目的】 カカオの樹木は主に熱帯地域で栽培され、その果実中の種子は発酵させる事でチョコレートの主原料となる。カカオ発酵のマイクロバイオータは酵母、乳酸菌、酢酸菌等で構成されることが報告されているが、屋外の開放的な環境（木の箱やバナナの葉に堆積）で発酵させるため、外部の環境に大きく依存する事が知られる。また、これらの発酵微生物により蓄積される代謝産物はチョコレートの味や香りに大きな影響を与える。一方で、国産カカオの樹木は亜熱帯の小笠原諸島で栽培され、衛生環境の整った首都圏の工場内で発酵させるために海外産カカオとは環境が大きく異なる。そこで本研究では国産カカオ発酵中のマイクロバイオータを明らかにすることで、国産カカオ製造を評価することを目的とした。

【方法・結果】 2020年7月、10月、11月の3つの異なる時期に製造された国産カカオ種子の発酵物を経時的にサンプリングし、培養法およびショットガンメタゲノム解析を用いてマイクロバイオータを解析した。培養法では、7月のカカオは発酵1日後から酵母、乳酸菌が多く分離され、発酵4日後に酢酸菌が多く分離されるといった海外産カカオと概ね類似した微生物叢の変遷がみられた。また、菌種レベルでの解析においても、海外のカカオ発酵で報告されている菌種が優勢菌として分離された。その一方で、10月、11月のカカオではこれらの発酵微生物の生育が全体的に遅く、特に酢酸菌がほとんど分離されないという大きく異なる特徴がみられた。ショットガンメタゲノム解析の結果はおおむね培養法の結果と一致し、海外産カカオで優勢と報告されている微生物が国産カカオでも同様に検出された一方で、3つの発酵時期によって大きく異なるマイクロバイオータが形成されていた。メタボローム解析では発酵1日後では類似した成分組成がみられたが、発酵4日後以降は7月のカカオと10月、11月のカカオでは大きく異なっており、特にクエン酸代謝や酢酸、マンニトールの蓄積等の面で大きな違いがみられた。以上の結果から国産カカオは十分に安定的な発酵が行われていない事が明らかとなり、スターター微生物の必要性が示唆された。

A2* ヒト腸内酪酸産生菌 *Faecalibacterium prausnitzii* の多様性と特異的プライマーの評価○丹野広貴¹, 遠藤明仁¹(東農大院・生物産業¹)

【背景・目的】 *Faecalibacterium prausnitzii* は健康成人の腸内に5-15%程度の割合で存在する最優勢の酪酸産生菌であり、クローン病などの炎症性腸疾患患者の腸内で顕著な減少が報告されている。近年、*F. prausnitzii* はゲノムレベルの相同性を基に、種レベルで異なるいくつかの系統群の存在が示唆されている。しかし、これまで *F. prausnitzii* の研究は限られた菌株のみで行われておらず、また定量的PCRにおいても多様な系統群が一群として報告されている。そのため、それらの系統群ごとの生理学的特性やヒトの健康への影響が明らかになっていない。本研究では、各系統群に属する *F. prausnitzii* をゲノムレベルで比較を行うとともに、これまでに *F. prausnitzii* の定量で用いられてきたプライマーがどの系統群を検出していたのかを評価することで、それぞれの系統群の腸内における意義を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果・考察】 NCBI に2019年12月31日時点で公開されていた103菌株の *F. prausnitzii* のゲノムデータのうち、ゲノムサイズが2.5Mbp以上の86菌株を対象とした。まず Average Nucleotide Identity (ANI) を用いてゲノムレベルでの相同性を比較したところ、86株は菌種レベルで異なる8つの系統群に分かれた。次に、Pubmed を用いて特定のキーワードで論文の検索を行い、ヒットした論文の中から特に多くの研究で用いられているプライマーを抽出し、NCBI の Primer-BLAST を用いて各系統群への特異性の確認を行った。その結果、プライマーごとに大きく異なる特異性を示し、全ての系統群を検出可能なプライマーが確認された一方で、いくつかのプライマーは特定の系統群を全く検出できない可能性が考えられた。そのため、プライマーの種類によっては特定の系統群の検出ができておらず、*F. prausnitzii* の存在量を正確に定量できていない可能性が考えられた。以上の結果より、これまでに蓄積された *F. prausnitzii* の研究データの一部はバイアスのある手法により得られたデータであることが示唆された。

A3* 酪酸産生菌 *Anaerostipes* spp. の芽胞形成に関する研究

○門脇 廉、丹野 広貴、遠藤 明仁

(東農大生物産業)

【背景・目的】

酪酸産生菌が産生する酪酸は腸管上皮細胞の主要な栄養源となる他、上皮細胞に対する抗炎症作用や大腸がん細胞のアポトーシス誘導などの有益な効果をもたらすことが報告されている。それらの効果から酪酸産生菌は次世代のプロバイオティクスとして期待が寄せられているが、酸素感受性が非常に高く、生菌での食品利用は困難なことが課題となっている。そこで本研究では酸素耐性向上効果が見込まれる芽胞に着目し、研究を行った。現在の芽胞に関する研究は *Bacillus* 属細菌や一部の病原性細菌に偏っており、class *Clostridia* に主に分類されるヒト腸内酪酸産生菌での芽胞形成に関する研究は殆ど行われていない。本研究ではヒト腸内で主要な酪酸産生菌であり、芽胞を形成しないと報告されている *Anaerostipes* spp. の芽胞形成について *in vitro* および *in silico* で検討を行った。

【方法・結果】

まず、先行研究を参考に熱や貧栄養などの様々なストレスを *Anaerostipes* spp. に与え、顕微鏡下による芽胞様構造物観察およびエタノール処理による芽胞形成の確認を行った。その結果、これまで芽胞を形成しないと報告されていた *Anaerostipes caccae* で芽胞形成が確認され、*Anaerostipes hadrus* においても芽胞様構造物が観察された。*In silico* 解析では class *Clostridia* に分類される 89 菌種を含む 207 菌種 208 菌株のゲノムを用い、芽胞形成菌に特徴的にみられると報告のある 72 の遺伝子保持率を確認した。その結果、遺伝子保持率を基に試験菌は 2 群に分けられ、保持率が高い群を Potential spore-forming bacteria と分類した。この Potential spore-forming bacteria には *Anaerostipes* spp. の他にも様々な酪酸産生菌が含まれており、多くの酪酸産生菌は芽胞を形成する可能性があると考えられた。また、この Potential spore-forming bacteria に特徴的な、芽胞形成に直接関与する 26 個の遺伝子を見出した。

A4* 高脂肪食摂取ラットにおける盲腸内脂肪酸プロファイルの変化が腸内細菌叢構成に与える影響

○川上 憲太郎¹、B. Gowda Siddabasave Gowda²、Zhen Chen²、吹谷 智¹、Chongsheng Liang²、Han Hai²、石塚 敏¹、小椋 義俊³、後藤 恭宏⁴、前田 智也¹、林 哲也⁴、千葉 仁志⁵、恵 淑萍²、横田 篤¹

(北大院・農¹、北大院・保健²、久留米大・医³、九大院・医⁴、札幌医大・栄⁵)

【背景・目的】 脂質を過剰に含む高脂肪食の摂取は、肥満や代謝関連疾患の発症のみならず、腸内細菌叢の特異的な変化を引き起こす。我々はこれまでに、高脂肪食の摂取に伴う盲腸内総胆汁酸濃度の増加が菌叢変化に与える影響を明らかにしてきたが、存在量が変化した全ての腸内細菌種が胆汁酸の影響を受けたわけではない。このことから我々は、胆汁酸以外の腸内細菌叢に影響を与える因子として、高脂肪食に多量に存在し、胆汁酸と同様に抗菌活性を示すとされる遊離脂肪酸に着目した。遊離脂肪酸が腸内細菌叢に与える影響についてはこれまで十分に理解されていない。そのため本研究では、高脂肪食摂取時に盲腸内容物に含まれる遊離脂肪酸が腸内細菌叢に与える影響を解明することを目的とした。

【方法】 3 週齢の WKAH/Hkm Slc 雄性ラットを 2 週間の予備飼育後、AIN-93G 準拠飼料を与える Control 食群 (C 群)、23% ラード含有高脂肪食群 (HL 群) の 2 群に分類し、8 週間の本飼育試験を行った (各群 $n=6$)。解剖時に採取した盲腸内容物を用いて、HPLC-LTQ-Orbitrap MS による遊離脂肪酸分析、UPLC-ESI/MS による胆汁酸分析および Illumina MiSeq によるメタ 16S 菌叢解析に供した。得られた配列データから、97%配列類似度に従って OTU (Operational Taxonomic Unit) に分類し、脂肪酸濃度、胆汁酸濃度と各 OTU の存在比との相関解析を行った。

【結果】 遊離脂肪酸分析の結果、HL 群において総脂肪酸濃度の有意な増加が確認された。また相関解析の結果、総脂肪酸濃度と相関する菌は菌叢中の 50.5% を占めており、その内総胆汁酸濃度と総脂肪酸濃度の両方と相関を示した菌は 24.9% であった。このことから、総脂肪酸濃度と有意に相関した細菌種のうち、約半分近くの 25.6% が胆汁酸ではなく脂肪酸のみの影響を受けたと考えられた。現在、遊離脂肪酸が高脂肪食摂取時の菌叢変化に関与していることを検証すべく、HL 群において有意に増加した 5 種類の遊離脂肪酸をラットに与えた飼育試験を行い、盲腸内容物サンプルの分析を進めている。

A5* Insertion Sequencing 解析により網羅的に同定されたビフィズス菌遺伝子の通常飼育マウス腸内における定着と生存への寄与の評価

○井上 太貴¹, 前田 智也¹, 横田 篤¹, 吹谷 智¹

(北大院・農¹)

【背景・目的】ビフィズス菌はヒトに整腸作用や感染症予防といった健康効果を与える腸内細菌であるが、ビフィズス菌の腸内での定着・生存機構には、未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、ヒト由来ビフィズス菌 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 105-A 株 (105-A 株) を用いて、トランスポゾン変異株集団を用いた Insertion-Sequencing 解析により、無菌マウス腸内での定着と生存に寄与するビフィズス菌遺伝子を網羅的に同定した。しかしながら、通常ヒトやマウスには腸内細菌叢が存在するため、これらの遺伝子が、腸内細菌叢を持つ通常飼育マウスにおいても定着と生存に重要であるかを評価する必要がある。そこで本研究では、網羅的に同定された遺伝子のうち、Tight adherence pilus ATPase (*tadA*), Chololate efflux transporter (*ctr*), Sortase (*srt*), diamminopimelate decarboxylase (*lysA*), transcriptional regulator ArgR (*argR*) の5 遺伝子に着目して、通常飼育マウス腸内での定着と生存における重要性を評価した。

【方法】各遺伝子の腸内における重要性を評価するために、目的遺伝子を欠損させた Δ 株と、遺伝子を欠損させていない比較株を作製し、マウスに両菌株を等量投与後、6%ラフィノース含有食を与えて定着させた。そして、経日的に採取した糞便の懸濁液を塗抹し、培地に形成されたコロニー数を計測することで、マウス腸内における各菌株の生菌数を評価した。糞便中の Δ 株と比較株を特異的に検出するため、それぞれに異なる薬剤耐性遺伝子を導入し、対応する抗生物質をビフィズス菌選択培地に添加した。比較株と比べて生菌数が Δ 株で減少した場合、当該遺伝子は腸内での定着と生存に重要と考えられる。

【結果】比較株と比べて、 $\Delta tadA$ 株は腸内における生菌数が有意に上昇した一方で、 Δctr 株と Δsrt 株は有意に減少した。これらの結果から、*ctr* と *srt* は腸内細菌叢存在下での腸内における定着と生存に重要な遺伝子であることが明らかになった。また $\Delta lysA$ 株と $\Delta argR$ 株については、現在投与試験を行い、腸内での生菌数の解析を進めている。

A6* 牛尿発酵液の微細藻類培養への利用

○加藤勇太^{1,2}, 邱泰瑛¹, 小西正朗¹

(北見工大院¹, 環境大善株式会社²)

【背景・目的】微細藻類は二酸化炭素から目的の製品を生産でき、陸上生物に比べ耕作地を必要としないことから次世代のバイオ製品のための有望な原料として考えられている。しかし、微細藻類の商業化事例は少なく多くの課題が残っているのが現状である。そのため、より効率的な培養方法を確立しバイオマス収量を向上させることが求められている¹⁾。そこで、当研究グループによって既に植物成長促進効果を持つことが判っている牛の尿を微生物処理した液体「牛尿発酵液」(Fermented Cattle Urine:FCU)が応用可能であると考えた。本研究では牛尿発酵液を微細藻類培養の培地添加材として用いた際の影響について調査することを目的とした。

【方法・結果】FCU と同等の窒素、リン、カリウムを含む模擬牛尿発酵液(Simulated-FCU:S-FCU)を調製した。BG-11 培地を基礎培地とし、10-50%(v/v)の FCU および S-FCU がラン藻 *Synechococcus elongatus* PCC7942 の増殖に与える影響を調査した。培養温度 30°C, 光量子束密度 115-120 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ の LED 照明下で、濁度(OD₇₃₀)を測定しながら7日間培養した。培養終了後、乾燥菌体重量、クロロフィル量、グリコーゲン量を測定した。さらに、フローサイトメリーにより細胞数・細胞毎のクロロフィル量を測定し、イオンクロマトグラフにより、培養液中の窒素・リン・カリウムを測定した。その結果、FCU および S-FCU を 50%(v/v)加えた場合、BG-11 と比較して 10-15%程度細胞数の減少が見られた。しかし、FCU を 50%加えた場合、濁度、乾燥菌体重量で約 1.5 倍、クロロフィル量、グリコーゲン量は約 2 倍に増加した。同時に培地中の窒素、リンの消費量が増えた。フローサイトメリー分析の結果から細胞毎のクロロフィル量の増加、細胞形状の変化が支持されたため、顕微鏡で細胞形態を観察したところ FCU により細胞の肥大化が確認された。これにより FCU は細胞中のクロロフィル量を増大させ、光合成を活性化させることで細胞の同化作用を亢進する可能性が示唆された。一方で、細胞の増殖速度には影響が少なく、細胞当たりのバイオマス量の増加させる作用があることがわかった。1) Toyama, T. et al. *Biotechnol. Biofuels* 11, 1-12 (2018)

A7* 牛尿発酵液からのインドール-3-酢酸生産菌のスクリーニング

OPei-Yu TAN¹, 石田奨¹, 加藤勇太^{1,2}, 邱泰瑛¹, 小西正朗¹

(北見工大院¹, 環境大善株式会社²)

【背景・目的】牛の尿から長期の好気性微生物処理によって作られる牛尿発酵液 (Fermented Cattle Urine, FCU) は、単体の窒素・リン・カリウムの供給とは異なった作用によって植物の成長を促進する。また当研究グループでは、FCU 存在下で栽培したシロイヌナズナの RNA-seq 解析により、オーキシン関連遺伝子がアップレギュレートされることを見出した。これらのことから、我々は FCU にオーキシン様物質が含まれていると推測した。それらが処理中の微生物により生産されている可能性を検証するため、FCU から微生物を分離し、オーキシンの中でも代表的なインドール-3-酢酸 (Indole-3-acetic acid, IAA) について、分離菌の生産能を評価した。

【方法・結果】FCU から好氣的に3種類の寒天培地でシングルコロニーを採取し、計145株を単離した。IAA 生合成における出発物質であるトリプトファンを含む栄養培地を用い、96 ディープウェルにて分離株を培養した。その後 Salkowski 法により IAA 生産量を評価した¹⁾。各菌株の培養上清を Salkowski 試薬と混合し呈色させ、535 nm における吸光度を測定し上清の IAA 濃度を推定した。IAA 生産菌の陽性対照株として *Pseudomonas simiae* OLiT を用いた。その結果、145 株すべてで IAA の生産 ($0.3 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$ - $76.8 \pm 11.4 \mu\text{g/mL}$) を確認した。さらに、145 株中 87 株は、陽性対照株の $5.1 \pm 2.3 \mu\text{g/mL}$ よりも高い生産量を示した。また、測定された値は最大で $76.8 \pm 11.4 \mu\text{g/mL}$ であり、陽性対照株の約 15 倍であった。rRNA の V3/V4 領域のシーケンスに基づく同定によれば、生産量の上位 20 株について、*Bacillus*²⁾、*Pseudomonas*²⁾、*Aeromonas*²⁾、*Streptomyces*²⁾ および *Acinetobacter*³⁾ 属であることを確認した。上記の属に含まれる細菌は、植物成長促進細菌として過去の文献に報告があり、これらの細菌が生産する IAA が FCU の植物の生育促進に貢献していると考えられた。1) Bharucha, U. et al., Agric Res, 2(3):215-221 (2013). 2) W. Ramakrishna, et al., Applied Soil Ecology, 138, 10-1812 (2019). 3) Suzuki, W. et al., JBB, 118(1) (2014).

A8 Effects of culture condition and strain dependence on the productivity of *Monascus* secondary metabolite, monascin

OQingyun Huang, Nodoka Miyaki, Zongfei Li, Toru Hayakawa, Jun-ichi Wakamatsu, and Haruto Kumura (Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

【Background & purpose】*Monascus* sp. synthesizes diverse secondary metabolites including yellow pigment of nephrotoxic citrinin and monascin which exerts health benefit such as anticancer, antidiabetic and antiobesitic effects. We have prepared culture products of *M. ruber* NBRC 32318 and *M. purpureus* AHU 9085 for cheese adjuncts using whey solid substrates. Under this condition, both strains produced no monascin while strain AHU 9085 produced citrinin. Takahashi et al. (2004) found the strain AHU 9085 produced monascin under the liquid culture containing rice powder. However, no information was available concerning monascin productivity of citrinin-negative-strain NBRC 32318. In this study, the influence of the culture condition on the monascin production of these strains was investigated. Then, monascin productivity using other *Monascus* sp. strains under a favorable substrate was compared.

【Methods & results】Liquid medium containing either rice or whey powder and its mixture was used as the substrate. Ten days culture products were recovered and freeze-dried to extract secondary metabolites with 80% ethanol. Then monascin was measured with HPLC. As the results, monascin productivity was highly depending on the strain and *M. ruber* NBRC 32318 was found to possess high potential for its production, in particular, with rice and whey mixed culture.

Takahashi et al. (2004) Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 51 67-71.

A9

紅麴菌 *Monascus ruber* NBRC 32318 のモノシン産生に及ぼす培地成分の影響

○宮木 温香, 黄 卿雲, 早川 徹, 若松 純一, 玖村 朗人 (北海道大学大学院農学院)

【背景・目的】*Monascus* 属に分類される紅麴菌は様々な二次代謝産物を産生する。この中でモノシンは、抗肥満、抗炎症、抗がん作用など多様な機能性を有する黄色色素である。当研究室では、紅麴菌のモノシン産生は菌株や培養条件にも大きく依存すること、*M. ruber* NBRC 32318 株はモノシンを多量に産生することを明らかにしてきた。しかし、その産生に栄養因子等の諸条件は未解明であることから、本研究では、窒素源及び炭素源の観点から *M. ruber* NBRC 32318 のモノシン産生効率を比較し、重要な栄養因子の特定を試みた。

【方法・結果】基本培地には Czapek-Dox (pH 4.0) を用いた。窒素源によるモノシン産生への影響を検討する際には、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、ホエイタンパク質 (WPI) とそのプロテイナーゼ K 分解物を用いた。一方、炭素源の検討にはグルコース、ガラクトース、フルクトース、マルトース、ラクトース、スクロース、可溶性澱粉、コーンスターチ、片栗粉の9種類を対象とした。*M. ruber* NBRC 32318 を 1.3×10^4 spores 接種し、25°Cで10日間培養後、菌体と上清に分離した。菌体を洗浄後、湿重量を測定し、その後、80%エタノールでモノシンを抽出した。一方、上清は凍結乾燥後に同様の抽出を行なった。これらの抽出物を TSKgel ODS-100Z カラムを用いた HPLC に供し、324nm における吸光度からモノシンを定量した。炭素源をグルコースに固定し、低分子の窒素化合物を用いた場合のモノシン産生量は少なく、尿素を用いた場合には菌の発育すら認められなかった。これに対してペプトンは発育とモノシン産生において最も優れていたが、同じタンパク質の分解物でも WPI のプロテイナーゼ K 分解物ではモノシン産生が認められなかった。一方、未分解の WPI を用いた場合にはバイオマス当たりのモノシン産生量はペプトン使用時の約 1/5 程度であった。これらの違いの原因と他の炭素源を用いた培養の効果については現在検討中である。

A10*

ドライ熟成肉に生育する真菌類のプロテアーゼやリパーゼの生産性に関する検討

○細野未紗¹, 豊留孝仁^{2,3,4}, 栗田虎之介¹, 島田謙一郎¹, 田村健一⁵, 三上奈々¹(帯畜大・畜産¹, 帯畜大・獣医², 帯畜大・動物・食品検診セ³, 千葉大・真菌医研セ⁴, 北一ミート(株)⁵)

【背景・目的】ドライ熟成肉 (DAB) は、温度・湿度が制御された熟成庫内で一定期間、空気に晒して一定期間貯蔵された食肉製品である。以前演者らは北一ミート(株)の熟成庫で製造された DAB の表面から *Mucor flavus*, *Helicostylum pulchrum* (ケカビ) や *Penicillium series Camembertiourum* (アオカビ) といった真菌類を分離・同定した (Mikami et al, 2021, Food Res. Int.)。また、これらの真菌類を接種した DAB では、熟成期間が長くなるにつれ肉中の遊離アミノ酸の増加 (栗田ら、2021 年、第 62 回日本食肉研究会要旨集) や熟成香の増強が見出された。これらのことから、分離した真菌類によって肉に主に含まれるタンパク質や脂質が分解され、DAB を特徴づける多くの代謝物を産生している可能性が考えられた。しかし、これらの菌株におけるプロテアーゼやリパーゼに関する知見はなく、詳細は不明である。本研究ではこれらを明らかにする第一段階として、DAB から分離した3種類の真菌がタンパク質や脂質に対して分解活性を有するか検討することを目的とした。

【方法・結果】タンパク質 (スキムミルク 3%) 又は脂質 (トリオレイン 3% 又は トリパルミチン 3%) をそれぞれ添加したグルコース寒天平板培地の中心に、*M. flavus*, *H. pulchrum*, *P. series Camembertiourum* を白金線で植菌し、4°C と 25°C (*P. series Camembertiourum* のみ) で 0~21 日間培養した。形成されたコロニーとクリアゾーンの直径をノギスで経時的に測定し、菌の生育状況とタンパク質や脂質に対する分解能を評価した。その結果、スキムミルク添加培地においては、無添加培地よりも3種の菌のコロニーが大きくなり、クリアゾーンも形成されたため、プロテアーゼを産生している可能性が示唆された。一方で、トリオレインやトリパルミチン添加培地においては無添加培地と比べ、3種の菌で生育が促進されることはほとんどなく、明確なクリアゾーンも認められなかった。そのため本研究の条件下において、分離した3種の真菌はトリグリセリドの分解には直接的には関わっていない可能性が考えられた。これらの結果より、DAB の熟成過程において肉由来の酵素のみならず、真菌類由来の酵素も協働している可能性が示唆された。

B1* コール酸摂取によるラット肝脂質蓄積に伴う鉄代謝の経時的な変動

○久保田 夏希¹, 伊藤 隼大², 堀 将太², 石塚 敏²

(北大農¹, 北大院農²)

【背景・目的】非アルコール性脂肪性肝疾患は、アルコール非依存的に生じる肝脂質蓄積を特徴とする肝疾患であり、現在世界中で約10億人が患っているとされる。肝臓での脂質蓄積は糖尿病や心血管疾患等の非感染性疾患の危険因子と考えられており、肝脂質蓄積の予防は健康寿命の延伸に重要と考えられる。先行研究において、体内での12 α 水酸化胆汁酸の増加が肝脂質蓄積に関与することを見出し、我々はこれまでの研究で、12 α 水酸化胆汁酸に含まれる一次胆汁酸であるコール酸(CA)を添加した餌をラットに摂取させることで、炎症や線維化を伴わない肝脂質蓄積が誘導されることを明らかにした。この時、肝臓の鉄濃度が減少することを見出したので、肝脂質蓄積と鉄代謝の関係を検討した。

【方法・結果及び考察】WKAH/Hkms1c 雄性ラット(3または5週齢)をAIN-93G 準拠の飼料を与えたコントロール群、CAを0.5 g/kg 添加した群の2群に分け、それぞれ2または13週間の飼育を実施した。肝臓中のトリグリセリド(TG)を測定したほか、肝臓および糞中鉄量の原子吸光光度計での測定による鉄出納の評価、リアルタイムPCRによる肝臓での各種遺伝子発現の解析を行った。いずれの試験においてもCA摂取による肝臓でのTG蓄積が確認され、13週間のCA摂取では肝臓において特異的な鉄の減少が観察され、2週においてもその傾向がみられた。鉄出納に注目すると、13週間では鉄収支に群間差はなかった一方で、2週間ではCA摂取において糞中鉄排出量の増加が観察された。鉄がフェントン反応を介して脂質の酸化に寄与することを踏まえると、CA摂取によって引き起こされる12 α 水酸化胆汁酸の増加と肝臓での脂質蓄積の初期の段階において、脂質の酸化因子である鉄を排泄しようとする可能性が考えられた。さらに、13週飼育で肝臓におけるlipocalin 2(LCN2)の発現が顕著に増加するという結果が得られた。LCN2はシデロフォアをリガンドとして鉄と結合することから、脂質蓄積が誘導された肝臓での脂質酸化を回避するために鉄を運び出す可能性が推察された。

B2* ラットにおける食後門脈・体循環血漿でのアミノ酸動態と肝臓アミノ酸組成との関係

○荒川 唯¹, 坂口 文菜², 石塚 敏²

(北大農¹, 北大院農²)

【背景・目的】食事由来のアミノ酸は消化管上皮で吸収され、門脈血で肝臓を経由した後に体循環血に至る。消化管における吸収やアミノ酸代謝は肝臓や他臓器での代謝に影響を及ぼすと考えられる。体循環血におけるアミノ酸濃度は疾患にも関わることが知られている。しかし、摂食後の門脈におけるアミノ酸動態や代謝中枢である肝臓におけるアミノ酸代謝に関する情報は少ない。そこで本研究では、ラットを用いて、食事摂取後の体循環血漿だけでなく、門脈血漿中のアミノ酸組成を経時的に評価するとともに、それを肝臓におけるアミノ酸組成と比較することで食後アミノ酸の動態を検証した。

【方法】実験1: Wister/ST(♂)7週齢のラットにAIN-93Gを2週間与え、16時間の絶食の後に1時間自由摂食時間を設けた。摂食開始から1時間毎に3時間後まで経時的に門脈血と大動脈血を採取した。血漿中のアミノ酸をフェニルイソチオシアネート誘導体としてHPLCで測定した。実験2: WKAH/Hkms1c(♂)4週齢のラットを10週間飼育した後、2週間暗期・明期を反転させ、暗期のみを摂食可能とした。食事摂取開始3時間後に解剖し、門脈・大動脈血、肝臓を採取した。これらの血漿及び肝臓組織におけるアミノ酸濃度を前述の方法でHPLCにより測定した。

【結果・考察】実験1では、門脈血漿・大動脈血漿ともにAlaが食後3時間まで経時的に著しい増加を示した。門脈血-大動脈血(P-A)差を算出すると、Alaが著増した。飼料に用いたタンパク源は主にカゼインであり、そのアミノ酸組成ではAla含量が多くないことを考慮すると、食後の消化管上皮においてAlaが優先的に合成される可能性が考えられた。実験2の血漿アミノ酸濃度解析では、AlaのP-A差が極めて高い値となり、実験1での再現性を確認できた。一方、肝臓アミノ酸組成では、Ala以外にGlu、Tau、Metも高い値を示した。これらのことから、食後に消化管で合成されたAlaが門脈経由で肝臓に流入した可能性が高い一方で、肝臓ではGlu、Tau、Metが合成された可能性が考えられる。今後さまざまな食事条件で、食後の肝臓におけるアミノ酸の代謝調節について検討する予定である。

B3 老化モデルマウスに対する真珠層抽出液の抗老化作用

○下村七海, 大浦一馬, 長谷川靖

(室蘭工業大学大学院)

【背景・目的】

古くから中国で漢方薬として使用されてきた真珠は、現在化粧品としても利用されているが、その作用機構や作用物質については明らかになっていない。本研究では、真珠と同じ組成をもつアコヤガイ貝殻から作製した真珠層抽出液がD-Galactoseを腹腔内投与し誘発された老化モデルマウスの記憶障害を真珠層抽出液が改善するかどうか行動薬理試験やリアルタイムPCRを用いて評価した。さらに遺伝的に老化が促進される SAMP8 マウスにおいても老化に伴う記憶障害改善作用があるかどうか検討を行った。

【方法・結果】

アコヤガイの表面にある真珠層を可溶化除去後、透析、濃縮、凍結乾燥し、真珠層抽出液として使用した。

- (1) マウスに対し D-Galactose 溶液を 80 あるいは 500mg/kg、真珠層抽出液を 40 及び 80mg/kg で 7 週間毎日腹腔内投与した。記憶障害を改善しているか、Y 字迷路試験等の行動薬理試験によって記憶能力の評価、さらに mRNA 発現量変化についてリアルタイム PCR 等で測定を行った。— D-Galactose 投与群で短期記憶能力が低下し、真珠層抽出液投与群で有意に改善していることがわかった。さらに、抗酸化に関わる mRNA 発現量が真珠層抽出液の投与で増加していることがわかった。
- (2) SAMP8 マウスに、真珠層を 125 及び 250mg/kg 含んだエサを毎日、3 ヶ月間与え、Y 字迷路試験、新奇物体認識試験によって記憶障害の改善がみられるか検討した。— SAMP8 マウスで Y 字迷路試験等において記憶能力が低下したが、真珠層を含んだエサを与えた群において記憶障害が改善していることがわかった。

外見上老化の指標となる D-Galactose 誘発老化モデルマウス、SAMP8 マウスの毛羽立ちも真珠層抽出液の投与は抑制した。現在、老化を抑制する作用機序についてさらに検討を行っている。

B4* 植物内生菌 *Phialocephala fortinii* 由来の生物活性物質の探索

○坂東慧¹, 榎部遼河², 北岡直樹², 松浦英幸²

(北大・農¹, 北大院・農²)

【背景・目的】植物体内で共生する微生物はエンドファイトと呼ばれ、その中でも、暗色で隔壁のある菌糸を持ち植物の根で共生するエンドファイトはDSE (dark-septate endophytic fungi) と呼称される。DSE は、宿主植物の成長を促進するのみではなく、宿主植物に環境ストレス耐性、土壌病害耐性や害虫に対する耐性を付与することが報告されている。しかし、その詳細な作用機構が明らかにされた例は、ほとんどない。これら背景より、DSE が植物の成長促進やストレス耐性付与の鍵となる低分子有機化合物を生合成していると仮説を立て、本研究では、DSE の 1 種である *Phialocephala fortinii* の菌体抽出液より代謝産物を単離・精製し、得られた代謝産物が有する植物の生育に対する生物活性を評価した。

【方法・結果】*P. fortinii* を浜田培地 (液体培地、1.5 L) で培養し、その菌体を酢酸エチルで抽出した。菌体の粗抽出液を、酢酸エチル：ヘキサン (=30% : 70%) でシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。得られた粗精製物を、さらに同条件でシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、254 nm において UV 吸収を示す化合物 1 を 6.4 mg 単離した。単離した化合物 1 を各種分光学的手法による構造解析に供し、その化学構造を 8-hydroxy-6-methoxy-3,7-dimethyl-1H-2-benzopyran-1-one と決定した。化合物 1 は新規化合物であり、その植物に対する活性は未報告であった。生物活性試験に供するために十分な量を得るために、本菌を大スケール (60 L) で培養し、その菌体抽出液より化合物 1 を 25.7 mg 単離した。終濃度 10 μM・100 μM・200 μM の化合物 1 を含む 1/2MS 培地で、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を長日条件で 7 日間生育し、根長を測定した。その結果、コントロール処理区と比較し、終濃度 100 μM と 200 μM の化合物を含む培地で育成した植物で、根の長さが有意に短く、化合物 1 による伸長阻害活性が確認された。現在、他の生物活性について検討を進めている。

B5*

空気伝搬させた methyl jasmonate がゼニゴケの植物ホルモン内生量に与える影響の解明

○都築玄武¹, 井上史郎², 北岡直樹², 松浦英幸²

(北大・農¹, 北大院・農²)

【背景・目的】植物ホルモンのジャスモン酸 (JA) 類の一種である methyl jasmonate (MeJA) は、空気を介して近隣の植物に伝搬され、受け取った植物において防御応答を引き起こす。JA 類の受容体として COI1 と JAZ という 2 種のタンパク質が明らかとなっているが、種子植物と苔類に属するゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) では、それら受容体に認識されるリガンドが、それぞれ、jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) と、2,3-dinor-12-oxo-phytodienoic acid (dn-OPDA) と異なる。種子植物において空気伝搬した MeJA は COI1-JAZ 受容体のリガンドである JA-Ile に変換されるが¹、ゼニゴケにおける MeJA の代謝経路や生理作用は未だ明らかとなっていない。これら背景より、本研究では、空気伝搬の MeJA が、ゼニゴケの JA 類をはじめとする植物ホルモンの内生量に与える影響を調べた。

【方法・結果】MeJA (1.5 μ mol) を染み込ませたペーパーディスクをおいた半密閉容器内に 5 週齢のゼニゴケを入れ、MeJA-d3 を空気中より取り込ませた。処理後、0、24、48、および 72 時間後に植物体をサンプリングし、UPLC-MS/MS を用いた植物ホルモンの内生量分析に供した。尚、dn-OPDA の分析には、市販の MeJA から 10 段階で合成した化合物を標品として用いた。その結果、JA の重水素標識体が検出され、植物体内での MeJA の加水分解が確認された。また、JA の非標識体、*cis*-OPDA、dn-OPDA の有意な増加が観察された一方で、処理の有無に関わらず JA-Ile は検出限界以下であった。さらに、JA 類以外の植物ホルモンの内生量を分析したところ、abscisic acid (ABA) の内生量の有意な減少が観察された。以上の結果より、空気伝搬の MeJA もしくはその代謝物はゼニゴケに受容され、正のフィードバックにより JA の生合成を誘導するとともに、ABA の生合成を負に制御することが明らかとなった。

[1] K. Oki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2019, 83, 1709-1712.

B6*

三員環構造を有するペプチド抗生物質ベラクトシンとホルマオマイシンの生合成研究

○鳥谷 諒¹, 大川 徹², 小笠原 泰志²

(¹北大院総化、²北大院工)

【背景・目的】ベラクトシンおよびホルマオマイシンは、それぞれ *Streptomyces* sp. KY11780 と *Streptomyces griseoflavus* W-384 から単離されたペプチド天然物で、いずれもシクロプロピルアラニン構造を有する。その生合成について、標識化合物の投与実験からシクロプロピルアラニン部は L-リジンを経由して前駆体とすること、また、ベラクトシン (*bel*) とホルマオマイシン (*hml*) の生合成遺伝子クラスターの同定も報告されていた。しかし、シクロプロピルアラニン部の生合成機構については報告がないため、その解明を目的とした。

【方法・結果】両者の生合成遺伝子クラスターの比較から、*belK/hml* (Fe 依存酸化酵素) と *belL/hmlJ* (α -ケトグルタル酸-Fe 依存酸化酵素) の 2 つの機能未知遺伝子が共通して見出されたため、これらがシクロプロピルアラニン部の生合成に関与すると予想された。そこで各遺伝子を大腸菌 BL21(DE3) で発現させ、静止菌体を用いた *in vivo* 反応を LC-MS で解析した結果、*belK* または *hml* を発現した場合に、6-ニトロノルロイシンが検出された。また、組換え酵素を用いた *in vitro* 実験で、*BelK/Hml* が L-リジンから 6-ニトロノルロイシンへの酸化反応を触媒することが確認された。さらに、*BelL/HmlJ* が 6-ニトロノルロイシンからニトロシクロプロピルアラニンへの環化反応を触媒することも分かった。本反応は、 α -ケトグルタル酸-Fe 依存酸化酵素によるシクロプロパン化の初の例である。

B7

微細藻類由来 DHA 合成酵素の dehydratase ドメインの機能解析

○小林 飛悠¹、佐藤 康治²、小笠原 泰志²、大川 徹²(¹北大院総合化学、²北大院工)

【背景・目的】ドコサヘキサエン酸 (DHA; C22:6 ω3) やアラキドン酸 (ARA; C22:5 ω6) に代表される多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は、心血管系疾患の予防等の生理活性が報告されており、その需要は年々増加している。従来の供給源は魚油などの海洋資源であるが、海洋資源の保護や安定供給の観点から、新規供給源として微生物による発酵生産が期待されている。ある種の海洋性微細藻類や細菌は、ポリケチド合成酵素様のマルチドメインから構成される巨大酵素複合体 (PUFA 合成酵素) により PUFA を生合成することが知られている。それらは類似のドメイン構造を有しているにも関わらず、炭素鎖長や二重結合の位置が異なる PUFA を正確に作り分ける。これまでに当研究室で、海洋性細菌由来の PUFA 合成酵素の *in vitro* 解析により、異なるタイプの dehydratase (DH_{FabA} と DH_{PKS}) ドメインの基質特異性の差が ω3 と ω6 PUFA を作り分けることを明らかにしている。しかし、海洋性細菌由来の酵素と相同性を有さない微細藻類由来の酵素については未解明であるため、本研究ではその解明を目的とした。

【方法・結果】微細藻類 *Schizochytrium* 由来 DHA 合成酵素には、DH_{PKS} と 2 つの DH_{FabA} (DH1_{FabA} と DH2_{FabA}) ドメインが存在する。各ドメインを不活性化した変異遺伝子を大腸菌で異種宿主発現させ生産物を解析した結果、全ての DH ドメインが PUFA 生合成に必須であることが分かった。次に各 DH ドメインの機能を明らかにするため、それぞれの組換え酵素を調製し、炭素鎖長 4 の crotonyl-acyl carrier protein (ACP) と炭素鎖長 6 の 2-*trans*-hexenoyl-ACP を基質に用い、逆反応である加水反応で解析した結果、DH_{PKS} および DH2_{FabA} が両基質に活性を示した。したがって、炭素鎖長 6 までの基質については DH_{PKS} と DH2_{FabA} が触媒することが判明し、DH1_{FabA} ドメインは炭素鎖の長い基質に作用する可能性が示唆された。

B8*

Linarinidin natural products containing D-amino acids

○Wanlu Xiao¹, Yasushi Ogasawara², and Tohru Dairi²(¹Grad. Sch. Chem. Sci. Eng. and ²Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

【Introduction】Salinipeptin is linarinidin peptide natural product containing multiple D-amino acids. Analysis of the biosynthetic gene clusters (*sal*) revealed that salinipeptin is a ribosomal peptide and that epimerization of a precursor peptide (SalA) is required for its biosynthesis. Although *sal* cluster did not contained any candidate genes of epimerases, a gene with unknown function (*salL*) was found near *salA* gene. Interestingly, bioinformatics analysis showed that gene clusters with similar gene organization were widely distributed in many different bacterial strains, mainly in actinobacteria, and that the biosynthetic gene clusters of other two linarinidin peptides, grisemyacin and cypemyacin, also contained *salL* homologs. Thus, we proposed that SalL is responsible for the epimerization and that grisemyacin and cypemyacin also contained D-amino acids.

【Results and Discussion】To prove above hypothesis, the biosynthetic gene clusters of grisemyacin (*gm*) and cypemyacin (*cyp*) along with *sal* were individually cloned into pWHM3 and expressed in *Streptomyces lividans* TK23. LC-MS analysis of the culture broth revealed the production specific metabolites which *m/z* are consistent with corresponding linarinidin peptides. In addition, chiral analysis confirmed that grisemyacin and cypemyacin contained multiple D-amino acid residues in the similar manner to salinipeptin. We also showed that SalL homolog was indispensable for grisemyacin production by gene knockout experiments. Taken together, these results suggested that SalL is a novel peptide epimerase responsible for salinipeptin class linarinidin natural products.

B9

クアシノイド類による 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解促進機構解析

○木下雄太, 岩田稜平, 加藤英介

(北大院農)

【背景・目的】脂肪細胞に蓄積された脂肪は、細胞内リパーゼにより脂肪酸とグリセロールに分解された後、体の各部位へ運ばれて代謝される。したがって、細胞内リパーゼによる脂肪分解経路の活性化は、蓄積された脂肪の利用につながり、肥満改善に役立つと考えられている。我々は、クアシノイド類が 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪分解を促進することを見出し、かつ、その作用が cAMP 濃度の上昇を伴わず、アドレナリン受容体などを介した脂肪分解経路の活性化とは異なることを見出している。一方、クアシノイド類はタンパク質合成阻害活性を有することが知られている。本研究では、細胞内タンパク質量の変化が脂肪分解促進活性に関わっていると考え、タンパク質合成阻害活性と脂肪分解促進活性との関連について解析した。

【方法・結果】タンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシイミド (CHX) を、3T3-L1 脂肪細胞に投与したところ脂肪分解の促進が見られた。また、クアシノイド類と CHX を、ペプチダーゼ阻害剤であるロイペプチン、MG132 と共投与したところ、MG132 の共投与により脂肪分解促進活性は抑制された。さらに、タンパク質の合成を阻害する種々の抗生物質で 3T3-L1 脂肪細胞を刺激したところ、1つを除いて脂肪分解の促進が見られた。これらより、クアシノイド類はタンパク質合成阻害により脂肪分解を促進していることが示唆された。

次に、クアシノイド類及び CHX で 3T3-L1 脂肪細胞を刺激し、脂肪分解経路に関わるタンパク質量の変化を解析した。その結果、クアシノイド類と CHX 両者において perilipin-1 量の減少が見られた。したがって、クアシノイド類は、タンパク質の合成を阻害することで perilipin-1 の減少を誘導し、細胞内リパーゼが脂肪滴に作用しやすくすることで脂肪分解を促進していると考えられる。

B10*

グルコース 1-リン酸をリン酸基供与体とした ATP 再生反応とそれを利用したオリゴ糖合成

○泉しずく¹, 佐分利亘², 森春英²

(北海道大学大学院農学院¹, 北海道大学大学院農学研究院²)

【背景・目的】ATP は、各種化合物の合成に使用される。in vitro の ATP を用いた合成では、ADP から ATP への再生反応を含むワンポット合成が行われ、リン酸基供与体としてホスホエノールピルビン酸、ポリリン酸等が頻用される。本研究では、これらに代えグルコース 1-リン酸 (Glc1P) を用いる ATP 再生反応を行った。酵素には *N*-アセチルヘキソサミン 1-キナーゼ (NahK; EC 2.7.1.162) を用いた。NahK 等の糖 1-キナーゼは、ATP を用いて糖の 1 位水酸基をリン酸化し、ホスホリラーゼ等の糖合成反応各種において出発材料となる糖 1-リン酸を生成する。中でもビフィズス菌由来の NahK は、GlcNAc 等に加え Glc, Man 等も基質とし、糖 1-リン酸を生成する。本研究では、Glc1P がスクロース (Suc) やアミロースの加リン酸分解により合成されることに注目し、Glc1P をリン酸供与体とした NahK の逆反応による ATP 再生反応を行った。また、この ATP 再生反応を利用して、Man1P の合成とマンノシルグルコースホスホリラーゼ (MGP) による Man1P と Glc からの Man β 1-4Glc 合成をワンポットで行った。

【方法・結果】NahK, スクロースホスホリラーゼ (SP) および MGP には大腸菌組換え酵素を用いた。NahK 反応において、Glc1P と ADP (各 2 mM) から生成する Glc 濃度は、反応 24 時間で 0.25 mM (基質の 12.5%が変換) であった。SP と NahK を含む反応では、基質を 100 mM Suc, 100 mM Pi および 5 mM ADP とした。生成する ATP 濃度は、反応 18 時間でほぼ最大値 (1 mM, 基質 ADP の 20%が変換) に達し、低濃度ながら蓄積が確認された。Glc1P を用いた ATP 再生反応, NahK による Man1P 合成ならびに MGP による Man β 1-4Glc 合成の 3 反応を組み合わせたワンポット反応を行った。基質を 50 mM Glc1P, 5 mM ADP および 50 mM Man とした。Man β 1-4Glc の濃度は反応の進行に伴い増加し、反応 7 日で 11 mM となった。これは初期 ADP 濃度よりも明らかに高く、ATP の再生を伴ったオリゴ糖合成反応の進行が確認された。

B11

組み換え大腸菌による4-ヒドロキシアルカン酸を含むブロック共重合体 PHA の生合成

○磯部 凧^{1*}, 富田宏矢¹, 松本謙一郎¹

(1 北大総合化学院)

ポリヒドロキシアルカン酸 (PHA) は微生物が生産する生分解性ポリエステルである。一般的に、複数のモノマーを用いて PHA を合成すると基質が無秩序に重合したランダム配列となる。しかし、当研究室では改変型重合酵素 PhaC_{AR} を用いると、2-ヒドロキシ酪酸 (2HB) と 3-ヒドロキシ酪酸 (3HB) のホモポリマーが共有結合したブロック共重合体が得られることを見出した。

本研究では、PhaC_{AR} の基質特異性の探索及びブロック配列が生じる規則性を分析するため、4-ヒドロキシ-2-メチル酪酸 (4H2MB) を含む新規 PHA の合成を試みた。GC 分析より 4H2MB を 5 mol% 程度含む PHA の合成が確認された。また NMR 分析より 3HB と組み合わせるとランダム配列、2HB、3HB と組み合わせるとブロック配列を形成することが分かった。さらにポリマー中の 4H2MB 組成を高める手がかりを得るため培養液中の基質残存量やグルコース消費量を HPLC により分析した。

B12

Engineering of polyhydroxyalkanoate synthase for reinforcing activity toward 3-hydroxyhexanoyl-CoA

○Phan Thi Hien¹, Hiroya Tomita², and Ken'ichiro Matsumoto²(北大院・総合化¹、北大院・工²)

[Background/Purpose]

Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a biodegradable polyester produced by microorganisms. To reduce the environmental plastic wastes, synthesis and use of various PHAs are expected. However, the key enzyme PHA synthase (PhaC) generally show strict substrate specificity, thus expanding the capacity of PhaC to accept a wide range of substrates is required. In our study, the target enzyme PhaC_{AR} shows preference to 3-hydroxybutyrate (3HB)-CoA to produce poly(3-hydroxybutyrate), P(3HB), and shows little activity with 3-hydroxyhexanoate (3HHx). We aimed at incorporating another monomer 3HHx into the polymer and evolve PhaC_{AR} to synthesize various PHAs. To this end, protein engineering was carried out to create mutant PhaC_{AR} proteins which can incorporate more 3HHx-CoA compared to the parent PhaC_{AR}.

[Methods/Results]

As the structural information of PhaC is limited, random mutagenesis of *phaC_{AR}* was performed by error-prone PCR. The mutant library was introduced into *Escherichia coli* JM109, and the highly polymer-producing cells were selected by the screening using a fluorescent dye staining which can semi-quantitatively visualize intracellular PHA accumulation. Since PhaC_{AR} cannot synthesize P(3HHx) homopolymer, P(3HB-co-3HHx) was synthesized as an indicator polymer to select positive mutant candidates. As a result, we selected potent candidates producing the polymer with greater 3HHx fraction and identified some beneficial mutation sites. The selected mutant exhibited higher enzymatic activity toward 3HHx-CoA. Our results provided substantial opportunity to expand the substrate specificity further of PhaC_{AR} and therefore the type of biopolymer utilizing this enzyme.