

目次

■ 動物細胞工学研究室	1
■ 遺伝子発現制御学研究室	5
■ 生物機能化学研究室	11
■ 植物細胞工学研究室	15
■ 環境工学研究室	21
■ 環境有機化学研究室	27
■ 応用微生物学研究室	31
■ 食品分析学研究室	37
■ 栄養生化学研究室	41
■ 食品・発酵工学研究室	47
■ 食品安全学研究室	55
■ 応用糖質化学研究室	61
■ 化学研究室	67

動物細胞工学研究室

Laboratory of Animal Cell Engineering

■ 教授 市川 進一 Prof. Shinichi ICHIKAWA, Ph.D.

■ 助教 伊藤 美千代 Assist. Prof. Michiyo ITO, Ph.D.



- 1) スフィンゴ脂質生理機能の解明
- 2) 細胞死抑制遺伝子の解析
- 3) 脂肪肝予防法の開発



・グルコシルセラミド ・がん ・酸化ストレス ・細胞死 ・脂肪肝

研究概要

1) スフィンゴ糖脂質生理機能の解明

スフィンゴ脂質は、膜上に存在する脂質の1つで、様々な生理作用があると考えられているが、その詳細は明らかではない。本研究ではスフィンゴ脂質代謝酵素であるグルコシルセラミド合成酵素とスフィンゴミエリン合成酵素に焦点を合わせてその生理機能を解析する。

2) 細胞死抑制遺伝子の解析

活性酸素種は、酸化ストレスシグナル伝達経路を通して細胞死を引き起こすことにより様々な疾患の原因になっている。本研究では、既に本研究室で同定している、活性酸素による細胞死を抑制する遺伝子の機能解析を行う。最終的には活性酸素種が引き起こす様々な疾患の予防と治療法の開発を目指す。

3) 脂肪肝予防法の開発

脂肪肝は、過食などにより肝臓に中性脂質が蓄積する生活習慣病である。脂肪肝は悪化すると、肝炎を経て肝硬変へと移行し、最終的にがんを発症することがある。本研究では、脂肪肝抑制作用のある食品、植物、生薬、および化合物の探索を

培養細胞脂肪肝モデルで行い、さらに動物実験モデルで検証する。最終的には脂肪肝を治療または予防する方法の開発を目指す。

2013年度の研究成果

1) 新規低分子量グルコシルセラミド合成酵素阻害剤の同定とその性質

グルコシルセラミド合成酵素(EC.2.4.1.80)は、スフィンゴ糖脂質合成の第一段階の反応を触媒する酵素である。この酵素の過剰発現は、がん細胞の多剤耐性の原因の一つになっている。昨年度本研究室では、Bcl-2阻害剤の一つであるHA14-1が、この酵素を阻害することを見出した。今年度はさらに、2種類の低分子有機化合物がグルコシルセラミド合成酵素活性を阻害することを明らかにした。この内1種類は、転写因子の阻害剤として報告されている化合物であり、もう1種類は生物活性が報告されていない化合物だった。どちらもグルコシルセラミド合成酵素阻害剤としては新規の構造であり、細胞内の酵素を阻害する活性を有していた。転写因子を阻害する活性のある化合物は、その作用により、がん細胞死を起こすことが報告されている。そのため、この化合物は多剤耐性がんに対するがん治療のためのユニークなリード

化合物になると考えられる。

2) TCTPによる酸化ストレス誘導細胞死の阻害機構

我々はこれまでに発現クローニング法を用いて、酸化ストレス誘導細胞死を阻害するタンパク質を同定してきた。そのうちの1つであるTCTPはミトコンドリア経路のアポトーシスを抑制することが報告されている。我々は以前TCTPが、酸化ストレスによる細胞死を抑制することを報告している。今年度は、TCTPがミトコンドリア経路以外に作用して、酸化ストレスによる細胞死を抑えているという予備的な結果を得ることができた。

3) 脂肪肝を予防する植物抽出液と化合物

脂肪肝は肝細胞に脂肪滴が蓄積した状態である。脂肪肝は炎症の原因になり最終的にはがんを引き起こすことがある。我々は、肝細胞の脂肪滴形成を抑制する作用を持つ植物と食品抽出液の探索を行ってきた。実験では、マウス肝臓がん細胞株を高濃度のオレイン酸と、試験を行う植物又は食品抽出液を添加した培地で1晩培養した。翌日、細胞を固定し、形成された脂肪滴をOil RedOで染色して可視化した。今年度は植物及び食品抽出液、合計130種類でスクリーニングを行った。その結果、1種類のキノコ抽出液で強い脂肪滴形成に対する抑制効果が認められた。脂肪滴抑制の詳細な機構については、現在解析中である。

Research projects and annual reports

1) Identification of novel ceramide glucosyltransferase inhibitors.

Ceramide glucosyltransferase (EC.2.4.1.80) is the enzyme that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid (GSL) synthesis. Ceramide glucosyltransferase-overexpression is one of the causes of multi-drug resistance of various cancer cells. The last year, we showed that HA14-1, widely used Bcl-2 inhibitor, had ability to inhibit this enzyme. In this year,

we identified two novel ceramide glucosyltransferase transferase inhibitors. These compounds had no structural similarities with previously known ceramide glucosyltransferase inhibitors. One compound had been known as a transcription factor STAT3 inhibitor. This compound could induce apoptosis on cancer cells by inhibiting STAT3. No bioactivity had been reported on the other compound. Both compounds could inhibit the enzyme activity in cells. The compound with STAT3 inhibitor activity could be a unique lead compound for cancer treatment, since the compound could induces cell death to multi-drug resistant cancer cells.

2) The Inhibition mechanism of TCTP on oxidative stress-induced cell death

We have previously identified proteins that inhibit oxidative stress-induced cell death. One of the proteins, TCTP has been reported to inhibit mitochondrial pathways of apoptosis. In this year, we obtained preliminary results suggesting that TCTP could inhibit oxidative stress-induced cell death without affecting mitochondrial pathway.

3) Plant and food extracts that prevent fatty liver

Fatty liver is a condition where lipid droplets accumulate in liver cells. Fatty liver induces inflammation and may finally cause cancer.

We screened plant and food extracts for inhibitory effect on the lipid droplet formation in cultured liver cells. A mouse hepatoma cells were cultured overnight in the medium with high concentration of oleic acid, and plant and food extracts to be tested. The next day, the cells were fixed and lipid droplets formed were visualized by Oil Red O staining. In this year, we screened 130 extracts in total. Among them, a mushroom extract showed strong inhibitory activity. Detailed mechanisms are now under examination.

発表論文

ダンス出張講義) 2013年6月19日

Niino, S., Nakamura, Y., Hirabayashi, Y., Nagano-Ito, M.
and Ichikawa, S. “A small molecule inhibitor of Bcl-2,
HA14-1, also inhibits ceramide glucosyltransferase”,
Biochemical and Biophysical Research Communications
(2013)433(2), 170-174.

学会発表

国内学会

新野 聡美, 中村 豊, 平林 義雄, 長野一伊
藤美千代, 市川 進一

「Bcl-2阻害剤HA14-1はグルコシルセラミド合成
酵素を阻害する」

第36回日本分子生物学会年会, 神戸, 2013年12月
3日～6日

その他特記事項

1) 外部資金

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開
発基盤の確立と, その医療・健康指導への応用の
ための実践拠点形成(研究分担者) 研究課題「脂
質代謝異常による疾患の予防法の研究」市川 進
一, 伊藤美千代(研究代表者:小西 徹也)

受託/共同研究(民間)

市川 進一: 1件

2) 学外活動

学会活動

市川 進一: 日本生化学会, 日本分子生物学会

伊藤美千代: 日本薬学会, 日本生化学会, 日本分
子生物学会

学外活動(その他)

伊藤美千代: 新潟市立万代高等学校(高校内ガイ

遺伝子発現制御学研究室

Laboratory for Gene Regulation Study

■ 教授 梨 本 正 之 Prof. Masayuki NASHIMOTO, Ph.D.

■ 助教 川 野 光 興 Assist. Prof. Mitsuoki KAWANO, Ph.D.



多発性骨髄腫治療用sgRNA薬の開発およびアンチセンスRNAによる遺伝子発現制御に関する研究



・ TRUE gene silencing ・ Multiple myeloma ・ 小分子機能性アンチセンスRNA
・ 遺伝子発現制御 ・ 大腸菌

研究概要

1. 多発性骨髄腫治療用sgRNA薬の開発

遺伝子発現抑制法TRUE gene silencingを基盤とした、多発性骨髄腫治療用のsmall guide RNA (sgRNA) 薬の開発を行う。

2. 大腸菌の毒素・抗毒素遺伝子の機能解析

大腸菌で発見されたType I Toxin-Antitoxin (TA) システムである、*ldrD*/*rdlD*遺伝子および*symER*遺伝子の発現制御機構についての研究を行う。

3. 大腸菌におけるアンチセンスRNAによる遺伝子発現制御システムの開発

プラスミドに二種類以上の人工アンチセンスRNA遺伝子断片を導入してオペロンのように転写させ、複数の標的遺伝子の発現制御を同時に簡便に効率よく行うことのできる実験系の開発を行う。

4. マウス精子特異的機能性小分子RNAの解析

精子に特異的に存在している小分子RNAの生理機能を解明する。その小分子RNAが受精の際に精子を介して卵に伝達されているか調べる。

5. ヒト脳に存在するマイクロRNA前駆体中に生じるRNA編集部位の解析

次世代シーケンシング解析により、ヒト脳サンプル由来のマイクロRNA（前駆体）中に生じるRNA編集部位を同定する。そのRNA編集により、マイクロRNA生合成が制御されているかを解析する。

2013年度の研究成果

1. 多発性骨髄腫治療用sgRNA薬の開発

我々は、4種類の高効率heptamer型sgRNA H11247, H15540, H1560, H15860のカクテルが*in vivo*においてヒト骨髄腫細胞KMM-1の増殖を如何に抑制するかを調べるために、マウスゼノグラフト実験を行った。KMM-1細胞をSCID/NODマウスの皮下に生着させ、その後、sgRNAカクテルを2日に1回ずつ合計で3回局所投与した。Kaplan-Meier生存曲線において、生存期間の中間値はsgRNA投与群の方が、対照群である生理食塩水投与群よりも11日間長かった。このことは、このsgRNAカクテルが*in vivo*においても、それなりに有効であることを示唆している。

2. 大腸菌の毒素・抗毒素遺伝子の機能解析

ldrD 遺伝子領域をアラビノース誘導プロモーター保有プラスミド (pAZ3) に組み込み, pAZ3-*ldrD* と名付けた。この *ldrD* 遺伝子領域に部位特異的変異導入法を用いて様々な変異を導入した。これらのプラスミドを用いて遺伝学的な解析を行ったところ, *ldrD* の上流に存在する *ldrDX* の翻訳が *ldrD* 毒素遺伝子の発現に重要であることがわかった。

3. 大腸菌におけるアンチセンスRNAによる遺伝子発現制御システムの開発

標的遺伝子の開始コドン基準に, 上流側の24塩基と相補的な配列を持つ人工アンチセンスRNA 遺伝子断片を用いて, *lacZ* と *phoA* の遺伝子発現を同時に発現抑制できるプラスミドを構築することができた。また, この遺伝子発現制御には Hfq タンパク質は関与していないことがわかった。この, 誘導型遺伝子ノックダウン実験系は, ノックアウト実験を行うことのできない生育必死遺伝子の機能解析に用いることができる。

4. マウス精子特異的機能性小分子RNAの解析

次世代シーケンシング技術を用いて, 精子から miRNA や piRNA など様々な機能性RNAを同定した。その中にテロメアRNA由来の新規小分子RNAを発見した。これらの小分子RNAは初期発生の際に重要な働きをしていることがわかった。

5. ヒト脳に存在するマイクロRNA前駆体中に生じるRNA編集部位の解析

次世代シーケンサーを使用して, ヒト脳細胞(胎児, 成人を各一人ずつ) の全RNAサンプルを用いて miRNA の前駆体である pre-miRNA の塩基配列を網羅的に決定した。

生命情報科学的手法を用いて, pre-miRNA 上に生じた A-to-I RNA 編集部位を複数同定することができた。

Research projects and annual reports

1. Development of therapeutic sgRNA for multiple myeloma

We performed mouse xenograft experiments to examine how a cocktail of the highly efficacious heptamer-type sgRNAs H11247, H15540, H15603, and H15860 can reduce the growth of human myeloma KMM-1 cells *in vivo*. KMM-1 cells were implanted subcutaneously into SCID/NOD mice, and the sgRNA cocktail was subsequently administered locally once every 2 days in a total of 3 times. Median survival periods of the sgRNA cohorts in the Kaplan-Meier curves were greater than those of the saline control cohorts by 11 days. This observation suggests that the sgRNA cocktail works *in vivo*, albeit moderately.

2. Analysis of type I toxin-antitoxin modules in *E. coli*

We constructed a pAZ3-*ldrD* plasmid which includes *ldrD* gene region under arabinose promoter in *E. coli*. Using the plasmid as a template we made various mutations by site-directed mutagenesis to investigate *ldrD* gene expression regulation. It was revealed that *ldrDX* which locates upstream of *ldrD* was important for expression of *ldrD* toxin.

3. Development of gene silencing system by using antisense RNAs in *E. coli*

We developed a novel gene silencing system that 24-nt antisense RNAs was induced from an arabinose-controlled plasmid for regulating *lacZ* and *phoA* genes simultaneously. We showed that the silencing was not dependent on Hfq RNA chaperon protein. This inducible knockdown system can be used for functional study of bacterial essential genes, which are not possible with knockout analyses.

4. Analysis of mouse sperm-enriched small RNAs

By next generation sequencing, we identified several

small noncoding RNAs including miRNA, piRNAs and sRNAs derived from telomeric repeat RNAs in mature sperm. We analyzed their physiological functions and found possibly important roles for gamete-specific small RNAs in early embryogenesis.

5. Identification of RNA editing sites in (pre-) miRNA in human brain

We were able to obtain much more sequencing reads corresponding to pre-miRNAs using DNA/LNA oligos in RT reaction. Many A-to-I RNA editing sites on human brain pre-miRNAs and snoRNAs were identified by deep sequencing and bioinformatics analyses.

発表論文

1. Masayuki Takahashi, Reyad A. Elbarbary, Norihiro Watanabe, Atsushi Goto, Daichi Kamiya, Yoshihiro Watabe, Takayoshi Uchiyama, Miwako Narita, Masuhiro Takahashi, Yoshiaki Takahashi, Noriko Ishihara, Tatsuya Miyazawa, Tetsuo Yoshida, Mitsuoki Kawano, Masato Tamura, Masayuki Nashimoto. (2014) Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. *Leukemia Research* 38, 808–815.
2. Norihiro Watanabe, Miwako Narita, Akie Yamahira, Tomoyo Taniguchi, Tatsuo Furukawa, Tetsuo Yoshida, Tatsuya Miyazawa, Masayuki Nashimoto, Masuhiro Takahashi. (2013) Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. *Leukemia Research* 37, 580–585.
3. Kawaji H, Lizio M, Itoh M, Kanamori-Katayama M, Kaiho A, Nishiyori-Sueki H, Shin JW, Kojima-Ishiyama M, Kawano M, Murata M, Ninomiya-Fukuda N, Ishikawa-Kato S, Nagao-Sato S, Noma S, Hayashizaki Y, Forrest AR, Carninci P; FANTOM Consortium.

Comparison of CAGE and RNA-seq transcriptome profiling using clonally amplified and single-molecule next-generation sequencing.

Genome Research. Epub 2014 Mar 27. (4):708-17

4. Kouno T, de Hoon M, Mar JC, Tomaru Y, Kawano M, Carninci P, Suzuki H, Hayashizaki Y, Shin JW. Temporal dynamics and transcriptional control using single-cell gene expression analysis. *Genome Biology*. 2013;14(10):R118

学会発表

国際学会

1. Masayuki Takahashi, Norihiro Watanabe, Miwako Narita, Masuhiro Takahashi, Mitsuoki Kawano, Masato Tamura, Masayuki Nashimoto 「Development of a Therapeutic sgRNA for Multiple Myeloma Based on TRUE Gene Silencing」 2013年4月, 第14回 International Myeloma Workshop, 京都
2. 川野 光興 「Towards RNA editing study of pre-miRNA and repetitive sequences by deep sequencing in human brain」 BRI International Conference 2013: RNA World in Brain at Niigata University, Center for Integrated Human Brain Science, 新潟大学脳研究所, 2013年7月27日

国内学会

1. Satoshi Iizuka, Nobuhiko Oridate, Masayuki Nashimoto, Satoshi Fukuda, Masato Tamura 「Growth inhibition of head and neck squamous carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing」 2013年10月, 第72回日本癌学会学術総会, 横浜
2. 川野 光興, 藤田 翔太, 井本 和宏, 小柳佳奈 「大腸菌リボソームタンパク質オペロン部位から転写されるアンチセンスRNAの解析」 第15回日本RNA学会年会, 松山市ひめぎんホー

ル，2013年7月24-26日

3. 川野 光興, Maxwell Burroughs 「Pre-miRNA deep sequencing」 NGS現場の会，神戸国際会議場，2013年9月4日-5日

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (B)

課題名：多発性骨髄腫治療用sgRNA薬の開発

研究代表者：梨本 正之

研究分担者：川野 光興

基盤研究 (C)

課題名：TRUE gene silencing法による頭頸部癌増殖抑制の試み

研究代表者：横浜市立大学・医学研究科・教授 折舘 伸彦

研究分担者：梨本 正之

挑戦的萌芽研究

課題名：検査診断の新規バイオマーカーの開発を目指した血液中の低分子RNAの探索

研究代表者：新潟大学・医歯学系・教授 高橋 由明

研究分担者：梨本 正之

基盤研究 (B)

課題名：Wntシグナルを介した骨と造血幹細胞制御の組織間ネットワークの分子機構

研究代表者：北海道大学・歯学研究科・教授 田村 正人

研究分担者：梨本 正之

若手研究 (B)

課題名：マイクロRNA前駆体の効率的な塩基配列決定手法の開発と配列解析

研究代表者：川野 光興

挑戦的萌芽研究

課題名：ユビキチン-プロテアソーム系制御を介した骨形成の新規分子機構の解明と骨形成誘導法

研究代表者：北海道大学・歯学研究科・教授 田村 正人

研究分担者：川野 光興

2) その他研究費

日本私立学校振興・共済事業団 平成25年度学術研究振興資金

課題名：TRUE silencing法を基盤とした血液がん治療薬の開発

研究代表者：梨本 正之

研究分担者：皆川 信子，川野 光興，安藤 昌幸，酒井 聡

3) 学外活動

学会活動

梨本 正之：日本癌学会，日本生化学会，日本分子生物学会，日本RNA学会

川野 光興：日本RNA学会

学外活動 (その他)

梨本 正之：新潟県立新潟東高等学校の講師，新潟県立新潟南高等学校SSH運営指導員，SSH全国大会の審査員，新潟県立新潟南高等学校SSEI臨地研修の指導員，Gene誌の論文審査員

川野 光興：新潟医療福祉大学非常勤講師

大学出張講義 (柏崎常磐高校)，障害学生支援セミナー (福岡リーセントホテル)

4) その他

梨本 正之：JST特許出願支援制度 採択

発明の名称：ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸 PCT/JP2012/071503, WO/2013/031704

Bio tech 2013 アカデミックフォーラム

「TRUE gene silencing法を基盤とした血液がん治療に効果的なsgRNAの探索」

(口頭発表30分間およびポスター発表)

平成25年5月8日～10日 東京ビッグサイト

生物機能化学研究室

Laboratory of Chemical Biology

■ 教授 石 黒 正 路

Prof. Masaji ISHIGURO, Ph.D.

■ 助教 田 宮 実

Assist. Prof. Minoru TAMIYA, Ph.D.



コンピュータシミュレーションと有機化学の手法を用いた多様な生物機能の解析



・コンピュータシミュレーション

・有機合成化学

・タンパク質構造解析

研究概要

生物機能化学研究室では、「小さな分子を用いて、タンパク質の機能をとらえる」ことを研究の目的とし、コンピュータシミュレーションと有機合成化学を手段として研究を進めている。

1) 新規核酸ペプチド (NAP) の機能とその応用

核酸を模倣したペプチド、いわゆる人工核酸ペプチドをデザインし、その機能をコンピュータシミュレーションにより予測し有機合成化学により、核酸とダブルヘリックスを形成し得る核酸ペプチドを合成してその新機能を応用する。

2) ブラジキニンB1受容体の機能解析

降圧、平滑筋収縮、発痛、血管透過性亢進など強力かつ多彩な生理活性を仲介するブラジキニン受容体(B1R)は、Gタンパク質共役型受容体(GPCR)の一つで、この受容体に作用するステロイド誘導体を用いてコンピュータシミュレーションと有機合成化学をベースにした機能構造解析を行う。

3) プロテインキナーゼATRの分子認識機構

五味子の実から単離されたリグナン類のなか

で、ゴミシンNがATRを阻害することが明らかにされている。そこで、ゴミシンNの合成経路を開発し、標的タンパク質を明らかにするとともに、結合ドメインを放射線ラベル体を用いて明らかにしタンパク質との結合様式をコンピュータシミュレーションおよび結晶構造解析などにより明らかにする。また、ゴミシンN誘導体の合成を通し新規阻害剤の開発を目指す。

4) ミラクリンの甘味増強作用の機構解析

キンバイザサ科の植物とアカテツ科の植物からそれぞれ単離されたタンパク質、ネオクリンとミラクリンは、酸性において甘味を呈する甘味修飾タンパク質であることが知られている。コンピュータシミュレーションにより、pHの違いによる両タンパク質の構造変化を予測し、甘味修飾機構を解明するとともに新機能を有する甘味タンパク質を創成する。

2013年度の研究成果

1) 核酸ペプチド (NAP) の合成研究

アミノ酸側鎖のβ位に核酸塩基を有するアラニン誘導体とグリシンのジペプチドが核酸1ユニットに対応することから、グリシンを他のアミノ酸

(AlaまたはTrp) に交換したジペプチドユニットからなる核酸ペプチド (NAP) をデザインし、コンピュータシミュレーションによりDNAまたはRNAとの二重ラセン構造を予測し、その応用としてGGGGGGGGの配列を有する新規NAPのデザインと合成を行った。

2) ブラジキニンB1受容体の機能解析

セコステロイドの一種であるvelutinol Aが非ペプチド性の天然物としてB1Rに対する拮抗作用があることが知られており、既にこのvelutinol Aおよびその構造類縁体であるargeloside aglyconの初の合成に成功している。この合成経路を利用して関連するセコステロイドillustrolおよびその配糖体の合成に成功し、B1Rの機能解析のツールがさらに広がった。また、薬学部生化学研究室との共同研究により、B1Rのアンタゴニスト活性を測定する系の確立を試みた。

3) プロテインキナーゼATRの分子認識機構解析

既に開発したATR阻害剤であるGomisin Nの不斉合成法を放射活性を有するゴミシンNの合成法へと展開し、¹⁴Cラベルをメチル基として導入したゴミシンNの合成法を確立した。今後、ラベル化ゴミシンNの合成とタンパク質結合の解析へと進める。

4) ミラクリンの甘味増強作用の機構

分子動力学法を用いたネオクリンの二量体の解離状態解析法をDOI合成酵素 (DOIS) の高活性変異体の構造解析に応用し、DOISの二量体の解離がその高活性の重要なファクターであることを示した。特に、温度上昇による活性の上昇は、特異的部位の変異による活性上昇と対応することを示し、DOISの高活性変異体デザインへの重要な知見を得た。

Research projects and annual reports

1) *Design and Synthesis of Nucleic Acid Peptide*

Along with the results of computational simulations on NAP-DNA/RNA double helical complexes, we have developed a synthetic method of the artificial nucleic acid peptide (NAP) unit, having amino acid residues other than glycine and applied to the design of the magnetic sensitive devise.

2) *Synthesis of Steroidal Bradykinin Receptor Ligands*

D-ring secosteroids such as vertinol, illustrol and argeloside have unique oxygenated cage-like structure. The synthetic route of velutinol A and argeloside aglycon that we have developed previously were successfully applied to the synthesis of illustrol and its glycoside. Biological activity of the argeloside aglycone and illustrol are now under investigation.

3) *Mechanistic Study on the Molecular Recognition of ATR*

The extracts from the lignan-rich fruit of *Schizandra chinensis* have been used in Chinese and Japanese traditional medicine as an antitussive and a tonic and nearly forty dibenzocyclooctadiene lignans were isolated from the plant. Among those, Gomisin N was found to be a specific inhibitor of the ATR, a member of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase). However, the binding site of this lignan at the enzyme is not known since the enzyme constitutes kinase domain as well as DNA-binding domain. Thus, we have been developing the synthetic methods for the preparation of radio-labeled Gomisin N. Unfortunately, the previous methods for the synthesis of Gomisin N inevitably produce the useless diastereomer. Thus, more stereoselective methods have been investigated and we finally developed the stereoselective synthetic route for Gomisin N. Synthesis of radio-labeled Gomisin N is now under investigation.

4) *The Sweet modification Mechanism of Sweet-modifying Protein, Neoculin and Miraculin.*

The molecular dynamics (MD) method which

we have developed in the analysis of the mechanism of sweet taste modification by neoculin and miraculin was applied to the analysis of the mechanism of the enhancement of the enzymatic activity of DOI synthetase mutants. The dissociation of the two units of DOIS to single unit which should be active entity of this enzyme occurs at a higher temperature or specific point mutations in the MD calculations. This dissociation can explain the results of kinetic experiments on the native enzyme and the mutants.

発表論文

1. Ikekawa N, Fujimoto Y, Ishiguro M. Reminiscences of research on the chemistry and biology of natural sterols in insects, plants and humans.
Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2013, 89 349-69.
2. Takeuchi M, Hirasawa A, Hara T, Kimura I, Hirano T, Suzuki T, Miyata N, Awaji T, Ishiguro M, Tsujimoto G. FFA1-selective agonistic activity based on docking simulation using FFA1 and GPR120 homology models.
Br J Pharmacol. 2013, 168 1570-83.
3. Tamiya, M.; Isaka, N.; Kitazawa, T.; Ishiguro, M.; Synthesis of the aglycone of the argelosides, anti-proliferative 14,15-seco-pregnaneglycosides, *Asian. J. Org. Chem.* 2014, 3, 264-268.

著書および総説

1. 「膜タンパク質構造研究」25章受容体とリガンドのモデリングp214-221, 石黒 正路 分担執筆, 岩田 想編 (化学同人)
2. Comprehensive Organic Synthesis II (Second Edition), 3.11 Pinacol Coupling Reactions, Pages 580-620, K. Suzuki, M. Tamiya

学会発表

国内学会

1. 井坂 修久, 池田 舞由, 北澤 貴明, 田宮 実, 石黒 正路
Illustrol の合成研究 (口頭発表)
第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟薬科大学, 平成25年5月18日)
2. 大久保崇之, 佐藤 雅人, 田宮 実, 高久 洋暁, 岩澤 裕喜, 石黒 正路
DOI合成酵素変異体における変異と活性の相関解析 (口頭発表)
第41回構造活性相関シンポジウム (関西学院, 平成25年11月7-8日)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (B)

課題名: ATR阻害剤ゴミシンNの作用機作の解明とがん治療増感剤への応用

研究代表者: 石黒 正路

研究分担者: 西田 浩志, 高久 洋暁, 田宮 実, 山崎 晴丈

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開発基盤の確立と、その医療・健康指導への応用のための実践拠点形成 (研究分担者) 研究課題「健康増進を目的とした非糖系甘味剤の開発研究」石黒 正路, 田宮 実 (研究代表者: 小西 徹也)

受託/共同研究 (民間)

石黒 正路: 2件

2) 学外活動

学会活動

石黒 正路: 日本薬学会医薬化学部会役員および

構造活性相関部会常任幹事

田宮 実：有機合成化学協会（編集協力委員），
日本薬学会構造活性相関部会（幹事）

学外活動（公的機関）

石黒 正路：JST専門委員，農研機構審査員，長野県飯山北高SSH運営委員，新潟市食の新潟国際賞財団理事，新潟市食と花の世界フォーラム組織委員会委員，文部科学省科学技術政策研究所科学技術動向研究センター専門調査員

学外活動（その他）

石黒 正路：出張講義：燕大学，燕市中央公民館

植物細胞工学研究室

Laboratory of Plant Biotechnology

■ 教授 田 中 宥 司 Prof. Hiroshi TANAKA, Ph.D.

■ 助教 相 井 城太郎 Assist. Prof. Jotaro AII, Ph.D.



植物の重要農業形質の機能解明による高効率育種法の開発と実践



・ リン代謝 ・ 越冬性機構 ・ デンプン代謝 ・ 半矮性 ・ 自家不和合性

研究概要

植物細胞工学研究室では、イネ科植物、薬用植物やソバ属植物等を研究材料として、農業上有用な表現形質の探索とその形質が現れるメカニズムを分子レベルで解明し、品種改良に役立てようとする研究を進めている。

イネでは、食料としての不良成分であるフィチン酸含量を低下させ、無機リンの含量が高まった作物を作成するために、分子生物学的手法と逆遺伝学的手法を用いて、種子中におけるリン代謝に関する知見獲得を目指している。オオムギでは、北陸地域等の寒冷地・多雪地向けの新規需要のある品種育成を目指し、凍霜害回避に有用な秋播性（低温要求性）遺伝子、収量低減の一因であるうどんこ病や縞萎縮病に対する抵抗性遺伝子などの遺伝子診断を行い、有望系統の育成をしている。薬用植物では、安定した生産システムの構築を目指し、五味子の効率的な組織培養系を開発している。また、ソバでは、新規デンプン形質を有する健康・機能性を強化した食品素材開発を目指すと共に、生産性に大きく関わる生殖や草型の形質を順遺伝学的手法による分子レベルの研究に取り組んでいる。

1) イネのリン代謝に関する研究

穀物の種子に含まれるリンの7～8割はフィチン酸として貯蔵されるが、非反芻家畜はフィチン酸を消化することができず多量のリンが排出され、湖沼の主な汚染源ともなっている。またフィチン酸は、様々な金属に強いキレート作用を示すため、食べると体内のミネラルの吸収を阻害することでも知られる。そこで、(独)農研機構 中央農研北陸研究センターとの共同研究で、無機リンの増加を指標として単離されたイネ低フィチン酸突然変異体を用い、種子中におけるリン代謝に関する新知見の獲得を目指している。さらに、得られた成果を応用することによる低環境負荷ならびに高機能性植物を作出するための技術基盤構築を目指している。

2) オオムギの越冬性に関する研究

越冬性機構については、イネ科牧草やコムギなどで多くの研究事例があり、茎葉に蓄積する非構造性炭水化物であるフルクタンの量が重要であることが指摘されている。そこで、寒冷地向けオオムギ育種に必要なDNAマーカーの開発を目指し、越冬性と茎葉蓄積性非構造性炭水化物であるフルクタン量との関連に注目し、その合成に関わる遺伝子6-SFT, 1-SST, 1-FFTの品種間多型解析を行っ

ている。

3) 薬用植物の産地形成に向けた研究

漢方製剤・生薬の原料となる薬用植物は、8割以上を中国からの輸入に依存している。今後、薬用植物は国内需要の拡大が見込まれるため、安定した生産システムを構築することが急務となっている。そこで、五味子等薬草の種子・種苗の安定供給体制の確立を目指し、効率的な組織培養技術を開発している。

4) ソバの有用形質に関する研究

国際的な穀物需給の逼迫と価格の高騰、輸入食品による食の安全を脅かす問題の発生をうけ、安心感が高い国産農産物を軸とした食と農の結びつき、いわゆる「地産地消」の強化が求められている。このような社会的要請をうけ、伝統的な健康食品として広く認識され、特に高齢者の嗜好に合致することからその需要が増加しているソバをモデルとして、有用性質に関わる遺伝子の機能解析とその応用により、健康・機能性を強化した食品素材開発を目指している。さらに、草型および生殖機構に関する知見を獲得することで、安定多収品種育種体系の構築を目指している。

5) ソバ属の生殖機構に関する研究

多くの植物は、受粉時に自己の花粉と非自己の花粉を識別し、自己の花粉との受精を抑制する自他識別システムを有している。この自他識別システムは自家不和合性とも呼ばれ、花の形態が複数型あり、異なる型の花に由来する配偶子間で受精が行なわれる異型花型自家不和合性と花の形態には多型のない同型花型自家不和合性がある。C. Darwinの著書「Different forms of flowers」に掲載されているように、多くの植物において花の形態多型と自家不和合性が密接に関係した異形花型自家不和合性が見られる。しかしながら、その分子遺伝学的な機構は全く解明されていない。本研究の目的は、いまだに謎の多い異形花型自家不和合性の分子機構と進化を解明し、その成果を自殖性

ソバ作出へ応用することにある。

2013年度の研究成果

1) イネのリン代謝に関する研究

イネにおけるリン代謝に関する知見獲得を目的に、フィチン酸含量が低下し、無機リンの含量が高まったイネ突然変異体の原因遺伝子の解明を順遺伝学的手法により行なっている。本年度は、(独)農研機構 中央農研北陸研究センターにおいて育成された「どんとこい」を原品種とする無機リン含量が高まった低フィチン酸変異体とカサラスとのF₂集団を用いてフィチン酸低含有化の原因遺伝子の高精度マッピングを行った。その結果、本変異体の原因遺伝子は、第12染色体長腕上の35kbの領域に座上することを明らかにした。当該領域には、1つの遺伝子が存在することが予測されており、近傍組換え体を用いて候補遺伝子としての妥当性を検証している。

2) オオムギの越冬性に関する研究

越冬性が優れるオオムギ品種の効率的な育成に向けての基礎的知見として、フルクタン合成系酵素遺伝子のうち6-SFT遺伝子に注目し、越冬性に違いのあるオオムギ日本品種・系統を材料として、その品種・系統間の差異を解析した。6-SFT遺伝子内の560bpの塩基配列を比較した結果、7つのSNPsと2つのINDELsが見出され、変異の組み合わせによって4つのタイプに分類することができた。越冬性の優れる寒冷地品種5品種・系統は同じ「ミユキオオムギ型」に分類された。

品種・系統名	育成場所	条性	播性	越冬性	6-SFTA領域シーケンスタイプ
北陸皮49号	北陸セ	六条	秋播性	強	ミユキオオムギ型
北陸皮50号	北陸セ	六条	秋播性	強	ミユキオオムギ型
ミユキオオムギ	東北農研	六条	秋播性	強	ミユキオオムギ型
東北皮41号	東北農研	六条	秋播性	強	ミユキオオムギ型
小春二条	東北農研	二条	春播性	中	小春二条型
東山皮種109号	長野農試	六条	春播性	強	ミユキオオムギ型
シュンライ	長野農試	六条	春播性	中	ミユキオオムギ型
シルキースノウ	長野農試	六条	秋播性	中	シルキースノウ型
関東皮96号	作物研	六条	秋播性	中	関東皮96号型
関東二条43号	栃木農試	二条	秋播性	弱	関東皮96号型

播性、越冬性は北陸研究センターでの育種データによる

3) ソバの有用形質に関する研究

ソバはタンパク質、脂質および糖質をバランスよく有し、動脈硬化の予防に有効なルチンを多量

に含むことが明らかにされている。したがって、伝統的な食品を見直す機運が高まっているなか、バランスよく栄養素を摂取でき、メタボリック症候群といった現代病の予防に適したソバの価値は高く、新形質を有するソバ育種の価値は非常に大きいと考えられる。本年度は、安定多収性品種を開発するに重要な草型制御に関する研究を行った。安定多収性に寄与する形質としては、矮性形質が知られる。自殖性フツウソバに見出された極矮性変異体は、ブラシノステロイドの生合成欠損変異体であることを明らかにした。さらに、その責任遺伝子は、活性型ブラシノステロイドであるカステステロンとブラシノライドを合成する遺伝子CYP85Aであることを明らかにした。

4) ソバ属の生殖機構に関する研究

普通ソバの生殖は、異形花型自家不和合性に基づき行われる。異形花型自家不和合性は、他の植物でも見られる虫媒による他殖性強化のための巧妙な機構であり、ソバにおいては花型と自家不和合性を制御する遺伝子複合体がS座に集約されて機能していると考えられている。本年度は、その分子の実体解明を目指し、花器官における網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、雌ずい特異的に発現する遺伝子を見出すに至った。それらのうち、配偶体型自家不和合性の雌ずい側因子として知られるRNaseについて詳細な解析を行った。

Research projects and annual reports

Using rice and buckwheat as the main experimental materials, we are investigating the molecular mechanism of important agronomic characteristics, such as environmental stress, plant reproduction system and plant structure. Research activities also cover the improvement of agronomic and physiological characteristics and the development of crops adapted to low-input management and high-quality crops.

1) Genetic characterization of a low phytic acid mutant in rice

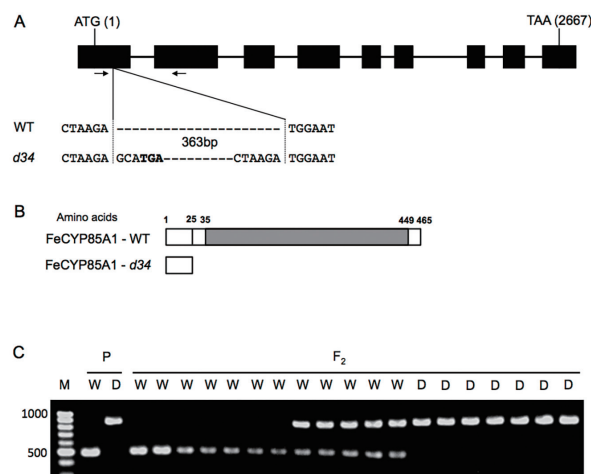
Phytic acid is the most abundant form of phosphorus (P) in cereal grains. In addition to being essential for normal seedling growth and development, phytic acid plays an important role in human and animal nutrition. Previously, low phytic acid rice mutants were isolated by using a forward genetics approach. Those mutants are caused by single gene, recessive non-lethal mutations. DNA marker analysis revealed that one mutant was likely to be mapped in chromosome 12 as a novel locus in phytic acid metabolism.

2) Allelic variations of 6-SFT among Japanese barley cultivars

Allelic variations of 6-SFT were investigated for ten Japanese barley cultivars. By the combinations of four SNPs and two INDELs in ca. 560bp partial sequence of 6-SFT gene, the cultivars were classified into four types. All the five cultivars having superior wintering ability belong to 'Miyuki-oomugi type'.

3) Molecular characterization of a dwarf mutant in buckwheat

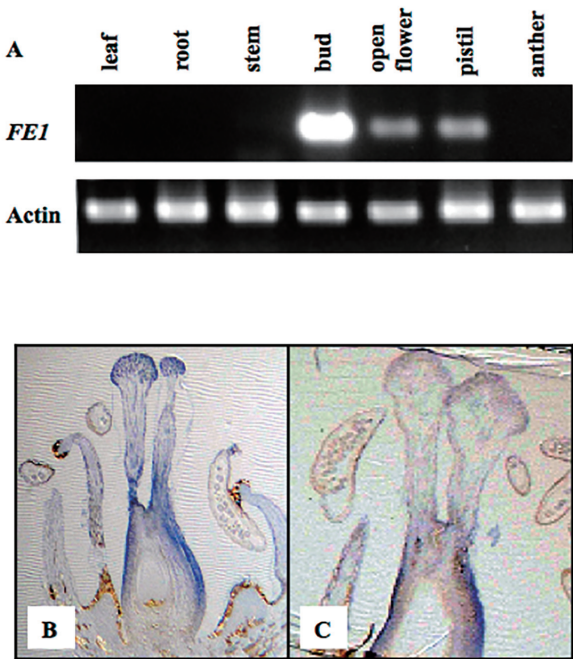
Brassinosteroids (BRs) are steroidal plant hormones that are essential for growth and development. In common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), more than 40 dwarf mutants have been described, but little is known about the role of BRs, except for the identification of BRs from pollen. A spontaneous dwarf mutant, *d34*,



was isolated from self-pollinating buckwheat breeding lines. Plants of *d34* show strong dwarfism with dark green rugose leaves. The phenotype was rescued by the application of brassinolide, a bioactive BR, indicating that *d34* was a BR deficient mutant. The accumulation profile of BR compounds in the *d34* suggested that this mutant might be deficient in the activity of BR C-6 oxidase. We cloned a *D34* gene that encodes cytochrome P450 classified in CYP85A. The *d34* plants exhibited a 363-bp insertion sequence in first exon resulted in the creation of a stop codon, and *d34* phenotype co-segregated with its insertion sequence. These results indicate that *d34* is caused by a loss of function of a C-6 oxidase in BR biosynthesis. On the basis of these findings, we also discuss the BR biosynthesis pathway in buckwheat.

4) Characterization of T2/S-RNase genes in buckwheat

Self-incompatibility (SI) is a genetic mechanism to prevent self-fertilization to keep variability of the genome. In genus *Fagopyrum*, of which self-incompatibility mechanism is sporophytic but different from the typical one and thought to be RNase regulated from its self-pollen rejection behavior, ironically the major crop *F. esculentum* is self-incompatible and dimorphic, while a wild species *F. homotropicum* is self-compatible and homomorphic. To understand of the molecular basis of the dimorphic sporophytic self-incompatibility (SSI), three T2/S-RNases, *FE1*, *FE2* and *FH* were cloned and characterized from the self-incompatible and self-compatible species in genus *Fagopyrum*, respectively. The deduced amino acid sequences of them shows highly similarity, 70~63%, to acidic plant S-like RNase that previously reported as involved in plant defense mechanism. The expression patterns of the *FE1* reveal that expressed specifically in the flower organs, especially in the stigma of the pistil. Comparison of deduced amino acid sequences, *FE1*, *FE2* and *FH*, showed significant polymorphism that located



hypervariable region (RHV) which might be concerned to allele-specific pollen rejection in S-RNase mediated SI system. Although the *FE1*, *FE2* and *FH* were not linked to the S-locus, reveals that they do not have direct role in self-pollen rejection. In this study, we describe the potential importance of these genes for the understanding of the dimorphic SSI system on its unique expression pattern and the significant polymorphism of their amino acid sequences.

発表論文

長嶺 敬, 関 昌子, 相井城太郎, 田中 宥司「オオムギのフルクタン合成系酵素sucrose: fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) 遺伝子の品種間変異」北陸作物学会報 49: 48 – 50 (2014)

学会発表

国際学会

Yasuo Yasui, Masashi Mori, Jotaro Aii, Shingo Sato, Ohmi Ohnishi, Tomoko Abe, Yoriko Hayashi, Daiki Matsumoto and Tatsuya Ota. Intact *S-ELF3* is exclusive to heteromorphic SI species in *Fagopyrum*. The 12th international symposium on buckwheat, Slovenia,

国内学会

1. 相井城太郎, 佐藤 真吾, 佐藤 祐也, 中野 絢菜, 田中 宥司

新規な自家不和合性機構解明への挑戦 4) ソバの異形花型自家不和合性機構第124回 日本育種学会 鹿児島 2013年10月12日~13日

2. 中野 絢菜, 小森 美佳, 中村 勇輝, 森下 敏和, 鈴木 達郎, 清水 明美, 相井城太郎, 田中 宥司 ダッタンソバ半矮性変異体*sda*の分子遺伝学的解析
第124回 日本育種学会 鹿児島 2013年10月12日~13日

3. 佐藤 真吾, 安井 康夫, 森 正之, 相井城太郎, 阿部 知子, 松本 大生, 林 依子, 大西 近江, 大田 竜也, 田中 宥司
ソバ属植物 (*Fagopyrum*) に見出された二花柱性関連遺伝子S-LOCUS EARLY FLOWERIN3の同定
第3回 上信越植物育種セミナー 長野 2013年11月2日

4. 中野 絢菜, 小森 美佳, 中村 勇輝, 森下 敏和, 鈴木 達郎, 清水 明美, 相井城太郎, 田中 宥司
ダッタンソバ半矮性変異体*sda*の分子遺伝学的解析 第3回 上信越植物育種セミナー 長野 2013年11月2日

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (C)

課題名: ソバにおける自家不和合性の雄性因子の同定

研究代表者: 相井城太郎

研究分担者: 森 正之 (石川県立大学), 大田 竜也 (総合研究大学院大学)

挑戦的萌芽研究

課題名: ゲノムワイド突然変異遺伝子スクリーニング法の開発

研究代表者: 京都大学・農学研究科・助教 安井 康夫

研究分担者: 相井城太郎

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開発基盤の確立と, その医療・健康指導への応用のための実践拠点形成 (研究分担者) 研究課題「アグリインフォマティクスによるマルチ高付加価値ソバの開発」田中 宥司, 相井城太郎

(研究代表者: 小西 徹也)

その他研究費

1. 東経連ビジネスセンター 新事業開発・アライアンス助成事業「六条大麦生産の再生と地域ブランド焼酎の開発」
研究代表者: 田中 宥司
研究分担者: 高久 洋暁

2. 応用生命科学部学部内共同研究奨励費
研究プロジェクト名「超高压糖化醸造によるブランド焼酎の開発を利用した地域活性化と六条オオムギ作の再生」

2) 社会的活動

学会活動

田中 宥司: 日本育種学会, 日本農芸化学会

相井城太郎: 日本育種学会, 日本遺伝学会, 植物生理学会, 世界ソバ学会

学外活動 (公的機関)

田中 宥司:

1. 文部科学省 遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の申請に対する学識経験者からの意見聴

取会合

2. 農林水産省 委託プロジェクト「GMOリスク分析」 アドバイザリー委員
3. 新潟県 農業総合研究所遺伝子組換え実験安全委員会
4. 新潟県立加茂農林高校評議員会委員

学外活動（その他）

田中 宥司：

1. 新潟市農業活性化総合センター 薬草研究委員会委員
2. 日本技術士会生物工学部会会委員
3. 上信越育種セミナー世話役
4. 新津ロータリークラブ会員，定例会講師
5. 高校教員免許更新講義講師等

相井城太郎：

1. 出前講義 糸魚川高校
2. 第124回 日本育種学会 シンポジウム講演
3. 上信越育種セミナー世話人
4. シンポジウム「新潟における植物バイオの現状と将来」講演 演題「ゲノム情報を利用した新しい植物育種法の展開」
一般社団法人・健康ビジネス協議会，2013年
4月15日

環境工学研究室

Laboratory of Environmental Engineering

■ 教授 川 田 邦 明 Prof. Kuniaki KAWATA, Ph.D.

■ 助教 小 瀬 知 洋 Assist. Prof. Tomohiro KOSE, Ph.D.



化学と工学を基礎として化学物質の安全な管理法を通じた環境の改善と保全のための研究



・ 化学物質 ・ 処理方法 ・ リスク ・ 起源解析 ・ 環境動態 ・ 再資源化

研究概要

I. 鉄触媒を用いたペルフルオロオクタン酸の光分解の機構の検討

有機フッ素化合物は撥水・撥油性を有するという物性から消火剤、衣類、ワックスなど様々な用途に用いられている。しかし、その難分解性から環境中において幅広く検出され、水環境汚染への関心が高まっている。中でもペルフルオロオクタン酸（PFOA）は水溶性の高い残留性有機化合物であり、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）の一般化学物質（旧第二種監視化学物質）に指定されている。近年、PFOAのより効率的な分解除去法として紫外線と鉄(III)を用いた複合処理が報告されている。しかしながら、この反応の分解機構は解明されておらず、反応速度の影響因子が明らかで無い。そこで、本研究ではPFOA分解機構とその速度に及ぼす鉄濃度の影響についての検討を行った。加えて活性炭に触媒鉄を担持した新水処理材料の開発を行い、その性能評価を行った。

II. 縮合リン酸エステル類難燃剤の分解生成物の放散挙動とリスク評価

テレビ、パソコンなどの電気製品の難燃化には、

多くの場合高い難燃化効果を持つ臭素系難燃剤（BFR）が使用されてきた。しかしながらRoHS指令によるポリ臭素化ジフェニルエーテルの規制に加え、ヘキサシクロブROMODECANもPOPs条約における審議対象物質となっている。これらの規制により臭素などのハロゲンを用いない難燃剤への代替が進んでいる。従来より一部樹脂の難燃化に用いられてきた有機リン酸トリエステル類（OPEs）は、難燃化作用に加えて可塑化作用を有するため添加樹脂の機械特性が低下する。またOPEsはSVOCに準ずる揮発性を有するため長期的な難燃効果の維持に不安が残るほか、室内空気の汚染源となることも懸念される。

近年これらの点を改良した有機リン系の難燃剤である縮合リン酸エステル類難燃剤（CPFR）の使用量が増加している。CPFRはリン酸トリエステルのエステル基部分に架橋構造を導入し、オリゴマー化した高分子量の難燃剤であり、分子量が大きいため揮発性が低く、樹脂を可塑化しない。しかしながら加水分解性を有することで知られるOPEsと同様のリン酸エステル結合を有するため、難燃化製品の使用時を想定した条件下においても同様の加水分解反応が起こることが確認されている。分解生成物にはフェノール類などのVOCに準ずる揮発性をもつ化合物も含まれていることか

ら、難燃化製品使用時、廃棄リサイクル時に汚染源となることが懸念される。そこで本研究では製品使用過程及び廃棄過程用いてビスフェノールAビス-ジフェニルホスフェート（BDP）及びその分解生成物の生成、放散挙動を解明し、リスク評価を行うことを目的とした。

III. 水田に散布された農薬の挙動

多種多様の農薬が生産、販売されており、病虫害の駆除や除草等の目的で、主に農耕地で散布されている。特に水田に散布された農薬は、一部が排水とともに河川に流入する可能性があるため、河川の生態系への影響とともに、浄水処理における農薬対策などの問題が生じている。水田に散布された農薬は、水田土壌に移行するとともに、生物学的分解や化学的分解を受けて減少して行くと考えられるが、その挙動については十分解明されていない。また、分解過程で生ずる分解生成物の挙動についても不明な点が多い。そこで、水田に散布された農薬やその分解生成物を対象として、田面水と水田土壌における減衰挙動を明らかにし、排水に伴って河川に流出する農薬の割合を評価するとともに、河川における農薬の挙動についても明らかにした。

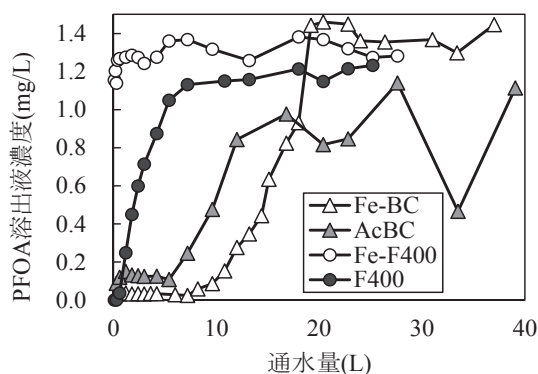
IV. 東日本大震災における津波堆積物の起源と再資源化に関する研究

東日本大震災における津波により生じた津波堆積物は、土砂や汚泥に加えて海水由来の塩分や周辺の汚染を含んでいる為、従来の処理法で処理できず、再生利用も困難である。このことから、本研究では宮城県石巻市周辺域において津波堆積物を採取し、その物理化学特性および金属含有量の検討を行った。得られた金属含有量から津波堆積物の有害性を検討し、堆積物の再生利用の可能性を評価した。また金属組成と物理化学特性の相関を解析し、再生資源としての特性と有害性を判断しうる簡便な指標を模索した。加えて金属組成の解析から津波堆積物の起源の推定を試みた。

2013年度の研究成果

I. 鉄触媒を用いたペルフルオロオクタン酸の光分解の機構の検討

2種の鉄固定化処理剤、すなわち、K-OH賦活した竹炭（AcBC）に鉄を担持したものの（Fe-BC）及び市販の石炭系活性炭Filtersorb F400に鉄を担持したものの（Fe-F400）、を作成し、X線回折により鉄の形態を明らかにした。作成した鉄固定化処理剤を触媒としてペルフルオロオクタン酸（PFOA）の吸着・光分解の連続処理を行ったところ、PFOAに対する吸着能は比表面積及び全細孔面積の傾向と一致すること、鉄の形態によって触媒作用に差が生じることが示唆された。



II. 縮合リン酸エステル類難燃剤の分解生成物の放散挙動とリスク評価

使用済み自動車内装材及び車内ダスト中の難燃剤のうち有機リン系難燃剤及び可塑剤（PFRPs）に注目し、これらの含有量を明らかにした。また、内装材に含まれる難燃剤の一部はリサイクル原料に使用されていた可能性があることがわかった。

III. 水田に散布された農薬の挙動

水田に空中散布された殺虫剤ジノテフランの水田中における減衰と水田からの流出挙動を明らかにするとともに、河川における消長を検討した。ジノテフランの水田からの流出率と水田におけるジノテフランの半減期を算出できた。

IV. 東日本大震災における津波堆積物の起源と再資源化に関する研究

宮城県石巻湾に面する2地域で採取した津波堆積物について特性及びその起源の推定を試みた。このうち、1地点では津波堆積物は海底質を由来とすると考えられたが、他の地域では津波堆積物は陸土に由来するものと海底質に由来するものが存在すると考えられた。堆積物の起源の推定においてMoが重要な項目であると考えられた。

Research projects and annual reports

I. Study on Photochemical Decomposition of Perfluorooctanoic Acid (PFOA) by Iron Catalyst

Two iron immobilized carbonaceous materials Fe-BC and Fe-F400 were produced with ferric iron using a bamboo porous carbon activated by KOH (AcBC) and a coal-based activated carbon Filtersorb F400, respectively. The Fe compounds in the carbonaceous material were identified from the XRD pattern. The performances of the carbonaceous materials were examined for adsorption and photochemical decomposition of PFOA in aqueous solution. The adsorption of PFOA on the carbonaceous materials increased as the increases in surface area and the total pore volume of the materials. Moreover, the chemical structures of Fe compounds can affect the decomposition of PFOA.

II. Study on emission behavior and risk assessment for breakdown products of condensed phosphoric ester flame retardants

Content ratios of 17 phosphate flame retardant plasticizers (PFRPs) in the interior parts and cabin dusts of end-of-life vehicles were determined. Some PFRPs in the vehicle interior materials could be derived from recycled raw materials.

III. Behavior of pesticides applied to paddy fields

Behavior of the insecticide dinotefuran in waters and soils from two paddy fields after aerial application to paddy fields was investigated as well as in river water.

The runoff ratios of dinotefuran from the paddy fields and the mean half-lives of dinotefuran in the paddy water and soil were calculated.

IV. Study on origin and recycling capability of Tsunami deposit from Great East Japan Earthquake

Characteristic distributions of metals, ignition loss and silt content were investigated in the tsunami deposits from the Great East Japan Earthquake sampled at two areas bordering the Ishinomaki bay, Miyagi Prefecture. The tsunami deposits in one of the investigated area appears to originate from the sea sediment, whereas those in the other area from both the sea sediment and the land soil. Among the investigated metals, Mo could be an important index for the origin estimation of tsunami deposits.

発表論文

1. Hidetoshi Matsukami, Tomohiro Kose, Mahumi Watanabe and Hidetaka Takigami: Destruction behavior of organophosphorus flame retardants during incineration of solid wastes, *Organohalogen Compounds*, 75, 928-931 (2013)
2. Masaki Ohno, Masataka Ito, Ryouichi Ohkura, Esteban R. Mino A, Tomohiro Kose, Tetsuji Okuda, Satoshi Nakai, Kuniaki Kawata and Wataru Nishijima: Photochemical decomposition of perfluorooctanoic acid mediated by iron in strongly acidic conditions, *Journal of Hazardous Materials*, 268, 150-155 (2014).

著書および総説

1. Behavior of Herbicides in Paddy Water and Soil after Application, K. Kawata and T. Kose, in “Handbook on Herbicides: Biological Activity, Classification and Health & Environmental Implications”, D. Kobayashi and E. Watanabe (ed.),

pp277-290, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, USA (2013) .

学会発表

国内学会

1. 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 川田 邦明, 梶原 夏子, 鈴木 剛, 滝上 英孝, 酒井 伸一: 使用済み自動車部材および車内ダスト中の難燃剤等の (第2報), 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
2. 小瀬 知洋, 戸舘 侑孝, 川田 邦明, 滝上 英孝: 古紙廃プラ固形燃料製造工程における樹脂添加剤の分解挙動, 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
3. 梶原 夏子, 滝上 英孝, 小瀬 知洋, 鈴木 剛, 酒井 伸一: 3 使用済み自動車部材および車内ダスト中の難燃剤等の調査 (第3報), 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
4. 伊藤 雅隆, 大野 正貴, Esteban R Mino A, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 奥田 哲士, 中井 智司, 西嶋 渉, 川田 邦明: 鉄触媒によるペルフルオロオクタン酸 (PFOA) の紫外線処理におよぼす Fe^{3+} 濃度の影響, 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
5. 田村 沙貴, 伊藤 雅隆, 戸舘 侑孝, 大野 正貴, 小瀬 知洋, 奥田 哲士, 浅田 隆志, 中井 智司, 西嶋 渉, 川田 邦明: 鉄固定化触媒によるPFOAの連続紫外線分解処理の検討, 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
6. 大野 正貴, 今泉 圭隆, 白石不二雄, 芹澤 滋子, 小瀬 知洋, 川田 邦明: 能代川における表流水中の水田農薬の濃度変動とその実態調査, 第22回環境化学討論会, 東京 (2013).
7. 田村 沙貴, 伊藤 雅隆, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 浅田 隆志, 大野 正貴, 奥田 哲士, 中井 智司, 西嶋 渉, 川田 邦明: 鉄固定化触媒によるPFOAの光分解能へ及ぼす鉄の保持形態の影響, 第14回エコカーボン研究会, 福島 (2013).
8. 脇坂 勇伍, 川田 邦明, 浅田 隆志: ボールミル処理により鉄を複合した木質バイオマスの炭素化における生成物の特性, 第14回エコカーボン研究会, 福島 (2013).
9. 鈴木まゆみ, 小瀬 知洋, 玉置 仁, 川田 邦明: 東日本大震災津波堆積物の起源推定と再利用に関する検討, 廃棄物資源循環学会第24回研究発表会, 北海道 (2013).
10. 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 川田 邦明, 玉置 仁, 高崎みつる: 沿岸域への栄養塩類供給源としての源流域研究, 第16回日本水環境学会シンポジウム, 沖縄 (2013).
11. 鈴木まゆみ, 小瀬 知洋, 玉置 仁, 川田 邦明: 東日本大震災における津波堆積物の特性および起源の分布に関する検討, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).
12. 石井恵美子, 小瀬 知洋, 西嶋 渉, 川田 邦明: 釧路川流域における溶存有機物の起源推定, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).
13. 田村 沙貴, 浅田 隆志, 西嶋 渉, 川田 邦明: 鉄固定化処理剤によるPFOA 吸着分解複合処理能の検討, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).
14. 金子翔一郎, 小瀬 知洋, 西嶋 渉, 川田 邦明: 釧路川水道原水中の溶存有機物への家畜由来肥料の影響, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).

15. 鈴木まゆみ, 横山沙也子, 小瀬 知洋, 川田 邦明: 信濃川水系, 新津川における金属の分布と起源に関する検討, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).

16. 横山沙也子, 小瀬 知洋, 戸舘 侑孝, 川田 邦明: 水田に空中散布されたジノテフランの水田内および周辺河川への負荷挙動に関する研究, 第48回日本水環境学会年会, 宮城 (2013).

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

若手研究 (B)

課題名: 室内環境におけるリン系新規難燃剤の放散・暴露リスク評価に関する研究

研究代表者: 小瀬 知洋

その他研究費

1. 応用生命科学部学部内共同研究奨励費

課題名: 飲用される清水の「安全」と「おいしさ」の科学的評価

代表研究者: 川田 邦明

2. 環境省 環境研究総合推進費補助金

課題名: 製品に含まれる化成品及び不純物に由来する有害廃棄物対策と循環方策構築に向けた研究

研究代表者: 独立行政法人国立環境研究所 資源循環・廃棄物研究センター ライフサイクル物質管理研究室 室長 滝上 英孝

研究分担者: 小瀬 知洋

3. 公益財団法人河川財団 河川整備基金助成事業

課題名: 釧路市の水道水源に流入する容存有機物質の起源と流入経路・流入機構の研究

研究代表者: 小瀬 知洋

4. 公益財団法人内田エネルギー科学振興財団試験研究費

「水田に施用されるネオニコチノイド系農薬および製剤添加物の河川水中への負荷挙動」

研究代表者: 小瀬 知洋

2) 学外活動

学会活動

川田 邦明: 日本環境化学会 (評議員, 編集委員), 日本分析化学会 (関東支部新潟地区部会幹事)

小瀬 知洋: 日本水環境学会 (関東支部幹事), 日本分析化学会 (関東支部新潟地区部会幹事)

学外活動 (公的機関)

川田 邦明:

1. 環境省 (事務局: 国立環境研究所) 化学物質暴露評価委員会 検討委員

2. 環境省 (事務局: 日本エヌ・ユー・エス) 内分泌かく乱作用に係る生態影響評価検討班委員

3. 国土交通省北陸地方整備局北陸技術事務所ダイオキシン類精度管理委員会 座長

4. 新潟県 都市計画審議会 委員長

5. 新潟県 環境リーダー育成協議会 委員

小瀬 知洋:

1. 国土交通省北陸地方整備局北陸技術事務所ダイオキシン類精度管理委員会委員

2. 新潟市亀田清掃センター運営協議会委員

学外活動 (その他)

川田 邦明:

1. (社)日本環境測定分析協会 環境測定分析士等試験・認定委員会委員

2. 新津第二小学校新津川水質調査への協力（5年生）

3. 論文査読（英文論文3件，和文論文2件）

小瀬 知洋：新津第二小学校新津川水質調査への協力（5年生）

環境有機化学研究室

Laboratory of Environmental Organic Chemistry

■ 教授 中 村 豊 Prof. Yutaka NAKAMURA, Ph.D.

■ 助教 小 島 勝 Assist. Prof. Masaru KOJIMA, Ph.D.



環境にやさしい有機合成化学によるものづくり



- ・フルオラス化学
- ・フェイスタグ法
- ・環境調和型有機合成反応
- ・再生可能資源
- ・不斉触媒

研究概要

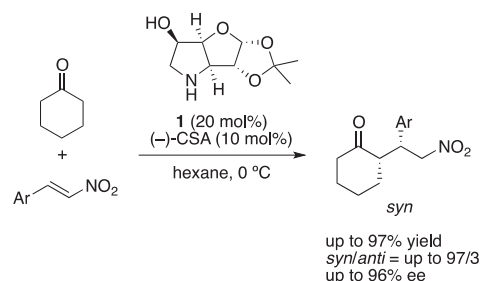
これまでの有機合成は、原料と反応溶媒は枯渇資源の石油由来であるばかりでなく、反応で生じる目的物と副生成物を分離する際に膨大なエネルギーを必要とし、かつ大量の廃棄物が発生していた。しかしながら、持続可能な社会を構築するためには環境に調和した有機合成技術の開発は必須である。このような観点から環境有機化学研究室では、再生可能資源として糖もしくは天然から容易に入手可能なアミノ酸を原料にして、医薬品のリード化合物となる天然物などの有用物質の合成および、これまでに培ってきたフルオラスケミストリーの技術の他、新しい反応場や反応媒体さらには触媒化学の技術を取り込むことによって環境にやさしい（環境調和型）有機合成反応の開発を行っている。

2013年度の研究成果

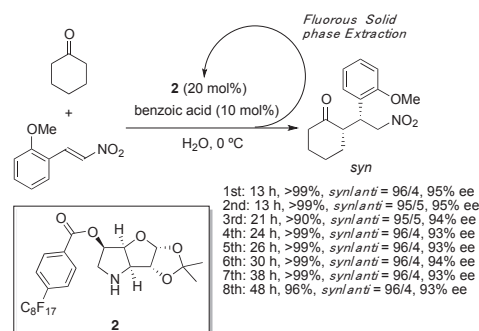
1) D-グルコースを出発原料とする環境調和型不斉有機触媒の開発

再生可能資源であるD-グルコースからこれまでに不斉有機触媒として使用例のない3,6-ジデオキシ-3,6-イミノフラノシド誘導体を合成し、シク

ロヘキサノンと種々のニトロオレフィンとの不斉マイケル付加反応の触媒としての評価を検討した。その結果、最適条件下、3,6-ジデオキシ-3,6-イミノグルコフラノース誘導体 **1** は高収率、高ジアステレオ選択的かつ高エナント選択的に対応するマイケル付加体を与えた。



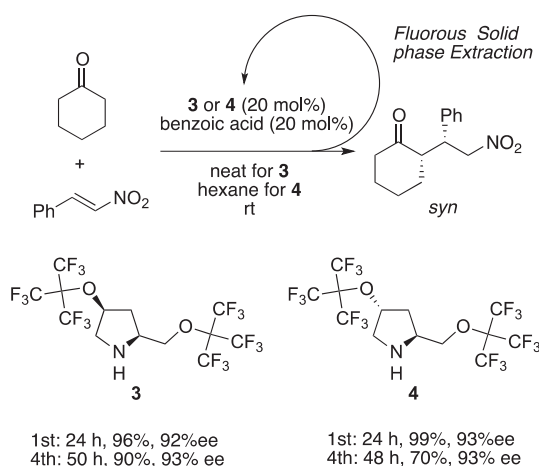
さらに **1** の5-O-フルオラスベンゾイル誘導体 **2** は、水中でマイケル反応を触媒し、高収率かつ高エナント選択的に *syn* 付加体へ導いた。フルオラス触媒 **2** はフルオラス固相抽出で簡便に回収され、触媒活性の顕著な失活なしで7回まで再使用できた。



2) リサイクル型フルオラス不斉有機触媒反応の開発

新規なリサイクル型のフルオラス触媒として 2,4-ビス(パーフルオロ *tert*-ブトキシメチル)ピロリジン 3 と 4 を合成し、シクロヘキサノンとニトロオレフィン類の不斉マイケル付加反応を検討した。フルオラスピロリジンはマイケル付加反応の高効率な触媒であり、高収率、高ジアステレオ選択的、高エナンチオ選択性で *syn*-付加体を与えた。

2つのフルオラス触媒はフルオラス固相抽出によって簡単に分離・回収され、最低でも4回まで触媒活性とエナンチオ選択性を失うことなく再使用できた。



Research projects and annual reports

1) Development of environmentally friendly chiral organocatalyst starting from D-glucose.

3,6-dideoxy-3,6-iminohexafuranoses derived from D-glucose have been developed as organocatalyst for the asymmetric Michael addition reaction of cyclohexanone to nitroolefins. Under the optimal conditions, 3,6-dideoxy-3,6-glucofuranose 1 leads to Michael adducts in high yields (up to 97%) with high excellent diastereoselectivities (up to 97:3 *syn*/*anti*) and excellent enantio-selectivities (up to 96% ee).

In addition, 3,6-dideoxy-3,6-glucofuranose 5-O-fluorous benzoate 2 catalyzes the Michael addition reaction in water, leading to the synthesis of

corresponding *syn*-adducts in high yield with up to 95% ee. The fluororous catalyst is easily recovered by fluororous solid phase extraction and can be reused up to seven times without significant loss of the catalytic activity.

2) Development of recyclable fluororous organocatalytic reactions.

2,4-Bis(perfluoro *tert*-butoxymethyl)-pyrrolidine as a novel recyclable fluororous catalysts 3 and 4 were synthesized and employed for in enantioselective Michael addition reaction of cyclohexanone to nitroolefins. The fluororous pyrrolidine catalysts were a highly efficient catalyst for the Michael addition reaction, leading to *syn*-adducts with high yields, diastereoselectivities, and enantioselectivities.

Both the fluororous catalysts were simply separated and recovered by fluororous solid phase extraction, and reused repeatedly at least four cycles without significant loss of activity and enantioselectivity.

発表論文

1. "A small molecule inhibitor of Bcl-2, HA14-1, also inhibits ceramide glucosyltransferase" Satomi Niino, Yutaka Nakamura, Yoshio Hirabayashi, Michiyo Nagano-Ito, Shinichi Ichikawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013, 433(2), 170-174.
2. "A Concise Total Synthesis of (+)-Pancratistatin from D-Glucose Featuring the Henry Reaction" Shoji Akai, Masaru Kojima, Sunsuke Yamauchi, Takahiro Kohji, Yutaka Nakamura, Ken-ichi Sato, *Asian J. Org. Chem.* 2013, 2, 299-302.

学会発表

国内学会

1. "クネーフェナーゲル縮合を鍵反応とするカルセオラリオシドAおよびBの全合成" 小島 勝,

- 藤井 俊佑, 武内 征司, 中村 豊, 第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム), C16 (平成25年5月18日, 新潟薬科大学)
2. “フルオラスイミノ糖を有機触媒とした不斉マイケル付加反応 - 触媒の回収・再利用の検討 - “ 安野 喜明, 小島 勝, 渡邊亜華音, 武内 征司, 中村 豊, 第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム), B08 (平成25年5月18日, 新潟薬科大学)
3. “パーフルオロtert-ブトキシ基を2本導入したピロリジン誘導体を有機触媒とする不斉マイケル付加反応 “ 牛腸 明子, 小島 勝, 武内 征司, 中村 豊, 第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム), B07 (平成25年5月18日, 新潟薬科大学)
4. “フルオラスタグ法による 2-(3,4-ジヒドロキシフェニル)エチル 4-O-(カルボキシアセチル)- β -D-グルコピラノシド誘導体の迅速合成 “ 小島 勝, 藤井 俊佑, 武内 征司, 中村 豊, フルオラス科学研究会第6回シンポジウム, P-15 (平成25年11月1日, 岡山国際交流センター)
5. “フルオラス N-フェニルカルバモイル基を用いたククルビトシド C の合成研究 “ 長谷川貴章, 小島 勝, 武内 征司, 中村 豊, フルオラス科学研究会第6回シンポジウム, P-14 (平成25年11月1日, 岡山国際交流センター)
6. “糖を出発原料とする環境低負荷型有機触媒の開発 - フルオラスイミノヘキサフラノースの合成とその触媒活性評価 - “ 安野 喜明, 小島 勝, 渡邊亜華音, 武内 征司, 中村 豊, フルオラス科学研究会第6回シンポジウム, P-13 (平成25年11月1日, 岡山国際交流センター)

7. パーフルオロ tert-ブトキシ基をフルオラスタグとする環境調和型ピロリジン触媒を用いた不斉マイケル付加反応 “ 牛腸 明子, 渡辺 未希, 小島 勝, 武内 征司, 中村 豊, フルオラス科学研究会第6回シンポジウム, P-12 (平成25年11月1日, 岡山国際交流センター)
8. “ $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$ 錯体を用いたアリルエステル還元を鍵反応とするククルビトシドCの合成研究 “ 長谷川貴章, 小島 勝, 武内 征司, 中村 豊, 第66回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (東工大シンポジウム), D19 (平成25年11月30日, 東京工業大学大岡山キャンパス)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (C)

課題名: 海洋シアノバクテリア由来環状デブシペプチドグラッシィペプトリド類の全合成研究
研究代表者: 中村 豊

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開発基盤の確立と、その医療・健康指導への応用のための実践拠点形成 (研究分担者) 研究課題「フルオラス科学を基盤とする機能性食品成分の迅速合成およびプローブ分子の創製」中村 豊, 小島勝 (研究代表者: 小西 徹也)

2) 学外活動

学会活動

中村 豊: 日本化学会, アメリカ化学会, 有機合成化学協会 (関東支部幹事), 国際複素環化学会, フルオラス科学研究会

小島 勝: 日本化学会, 有機合成化学協会, 日本糖質学会

学外活動（公的機関）

中村 豊：新潟県立新津工業高校学校評議員

学外活動（その他）

中村 豊：

1. 応用生命科学講座（8/4）新潟薬科大学
2. オープンキャンパスミニ講義（8/18）新潟薬科大学
3. 教員免許状更新講習講師（8/21）新潟薬科大学
4. 新潟県高等学校自然科学系クラブ活動報告・研究発表会審査員（11/18）新潟大学

応用微生物学研究室

Laboratory of Applied Microbiology

■ 教授 高 久 洋 暁 Prof. Hiroaki TAKAKU, Ph.D.

■ 助教 山 崎 晴 丈 Assist. Prof. Harutake YAMAZAKI, Ph.D.



- ・植物ディフェンシン蛋白質の作用メカニズム解析
- ・地域食品・醸造残さからの油脂酵母による食用油脂生産システムの開発



- ・ *Candida albicans*
- ・ antifungal peptide
- ・ oleaginous yeast
- ・ lipid droplet

研究概要

1) 植物ディフェンシン蛋白質の作用メカニズム解析

稲いもち病菌 *Magnaporthe grisea*, カンジダ症原因菌 *Candida albicans* に抗菌作用を示す新規抗菌剤として付加価値の高いカラシナ由来ディフェンシン蛋白質の作用メカニズムの解析を行う。

2) 地域食品・醸造残さからの油脂酵母による食用油脂生産システムの開発

食品・醸造業などの地域産業活性化のためには、より付加価値の高い産物を新たに生み出すプロセス開発およびそのための要素技術開発が必要である。そこで食品産業からの排出される未利用残渣を出発原料として、油脂酵母を利用して、高付加価値の油脂を製造する技術基盤を構築すること本研究の目的とする。食用油脂の地域生産、さらにその国内流通によって、地域活性化、および国民の健康促進につながる。

2013年度の研究成果

1) 植物ディフェンシン蛋白質の作用メカニズム解析

植物ディフェンシンは、細菌及び真菌に抗菌活性を示す小さく、塩基性で、システインに富むペプチドである。植物ディフェンシンは、植物の自然免疫系の一部であり、真菌や細菌への防御機能を担っている。昨年までに、我々は、カラシナ由来のディフェンシンAFP1の精製と特徴解析を行ってきた。我々は、酵母 *Pichia apstoris* を利用して組換えAFPを産生させ、精製し、酵母 *Kluyveromyces lactis*, ヒト病原菌 *Candida albicans* に対して生育を阻害することを明らかにしている。また、AFP1は、高い耐熱性とpH耐性の特性をもつ抗菌蛋白質である。

AFP1との相同性が94%と高い *Raphanus sativus* 由来植物ディフェンシンRsAFP2は、標的微生物の細胞壁及び細胞膜上に局在する糖脂質 Glucosylceramide (GlcCer) と相互作用し、さらに細胞膜脱分極化および活性酸素種 (ROS) 蓄積を誘導することが報告されている。

本研究の対象物質であるAFP1においても同様の作用機序を示す可能性が高いと考えられ、まず、*C. albicans* における GlcCer 合成酵素欠損株 (Δgcs) を取得した。AFP1感受性を検証した結果、 Δgcs 株は野生株よりもAFP1低感受性を示した。また、AFP1を作用させた時、野生株では細胞膜脱分極化および菌体内におけるROS蓄積が生じ、それに

伴い生菌率が減少していたが、 Δgcs 株においては観察されなかった。このことは、AFP1が細胞膜脱分極化およびROS蓄積を誘導し、結果として*C. albicans*における細胞死を誘導することを示唆する。これら結果より、GlcCerの存在がAFP1感受性を決定する重要な因子の1つであると考えられる。

次に我々はGlcCer構造に注目した。GlcCerは、ある種の真菌、ヒト細胞も有しており、特にヒト細胞では、恒常性の維持に関与する重要な因子として知られている。さらにヒト細胞もGlcCerを持つがAFP1非感受性を示すことが分かっている。AFP1感受性真菌とヒト細胞のGlcCer構造の相違点に注目し、比較した結果、AFP1感受性真菌の有するGlcCerは、ヒト細胞の有するGlcCerと次の2点で異なることが判明した。①長鎖塩基側鎖の9番目の炭素にメチル基を有する。②長鎖塩基側鎖の8,9番目の炭素間に二重結合を有する。そこで我々は、AFP1感受性真菌*C. albicans*を利用して、メチル基・二重結合を欠失したGlcCer構造を有する*C. albicans*変異株($\Delta sld1$)とメチル基を欠失したGlcCer構造を有する*C. albicans*変異株($\Delta mts1$)を作製した。これらの変異株は、野生株と比較してGlcCer含有量が低下していた。そこで、GlcCer合成酵素遺伝子を過剰発現させ、細胞あたりのGlcCer含有量が増加した変異株に対し、AFP1抗菌活性強度の検討を行った。その結果、 $\Delta sld1$ 株、 $\Delta mts1$ 株は、共に野生株と比較してAFP1低感受性を示した。特にメチル基・二重結合欠失GlcCer構造を有する $\Delta sld1$ 株の低感受性の程度は大きかった。すなわち、AFP1の抗菌活性強度には、GlcCer分子構造上のメチル基、二重結合部位の認識が大きく関与していることが示唆され、また、AFP1の抗菌作用は、特異性が高いことが予想された。

2) 地域食品・醸造残さからの油脂酵母による食用油脂生産システムの開発

現在、石油資源の枯渇や環境問題を克服するため油糧植物を原料としたバイオ燃料の生産が注目

されているが、原料のほとんどが可食バイオマスであるため、食料との競合による原料の価格高騰の面から利用を続けるのは難しい。また食用油脂は我々の健康と密接に関わっているため、輸入に依存しない安定した油脂自給システムの構築は、油脂自給率の低い我が国の課題である。これらの解決策として、油脂酵母*Lipomyces starkeyi*を利用した油脂生産に注目している。この酵母は細胞内に脂肪球を形成し、油脂（トリアシルグリセロール（TAG））を高蓄積できる。脂肪球は、小胞体膜に中性脂質が蓄積し、次第に増加する場合、細胞質側に向かって膨らみ、細胞膜側のリン脂質層に覆われた状態として存在すると考えられている。この油脂酵母の油脂蓄積能を産業利用できれば上記問題の解決に貢献できると考えられるが、この酵母が生産できる油脂量や脂肪酸組成の種類には限界があるため、育種や遺伝子改変技術の導入による形質の改善が求められる。それらに向け、本研究では遺伝子発現解析を行い各遺伝子が脂質代謝にどう関与しているかの基礎的な知見を得ることを目的としている。

定量PCRを利用して、油脂生産関連遺伝子の発現解析を実施した。ジアシルグリセロールからTAGを合成する酵素の遺伝子発現量は炭素源が枯渇するまではほぼ一定だったが、炭素源枯渇後は減少した。アセチルCoAや脂肪酸合成に関与する遺伝子発現量は対数増殖期初期に一過的に著しく上昇したものの、それ以降は時間の経過と共に低下した。遊離脂肪酸をアシルCoAに変換する酵素の遺伝子の中には炭素源枯渇後に著しく発現が上昇したものもあった。TAG分解遺伝子の発現量は培養を通して大きな変化は見られなかったため、油脂分解は定常的に起こっており、炭素源枯渇後の油脂量の減少は分解ではなく合成量が低下することに起因すると考えられる。また油脂量が減少する時期では、脂肪酸をエネルギーに変換する経路が高発現していた。以上のことから、アセチルCoAや脂肪酸を合成する経路の遺伝子を恒常的に高発現できれば、油脂量の増加に繋がるのではないかと推察している。

Research projects and annual reports

1) Analysis of molecular mechanism of the plant defending AFP1

Plant defensins, which possess antifungal and/or antibacterial activity, are small (45 to 54 amino acids), basic, and cysteine-rich peptides. Plant defensins are part of the innate immune system of plants, and they function in the protection of plants against fungal and bacterial pathogens. By last year, we purified and characterized AFP1, a plant defensin from *Brassica juncea*. We produced the functional recombinant AFP1 (rAFP1) using the yeast *Pichia pastoris* heterologous expression system and purified. Recombinant AFP1 (rAFP1) inhibited the growth of yeast species *Kluyveromyces lactis*, human fungal pathogen *Candida albicans*. The biological function of rAFP1 was found highly stable in extremes pH (range from 3 to 11) and temperature (upto 100 °C) conditions.

Only a limited number of defensins have been studied in detail. RsAFP2 of *Raphanus sativus* interacted with glucosylceramide (GlcCer) on target fungal membranes and cell walls, and induces membrane permeabilization and ROS production. Since AFP1 shares 94% amino-acid sequence identity with RsAFP2, it is probable that AFP1 also interacts with the GlcCer of the target fungi and induces membrane permeabilization and ROS production.

We constructed the *C. albicans* GlcCer synthase gene (*HSX11*) disruption mutant (Δgcs). The Δgcs cells showed the low AFP1 sensitivity, compared to wild-type cells. We also observed rAFP1-induced membrane permeabilization and ROS production, which correlated with the growth inhibition, in *C. albicans* cells, but did not in the Δgcs cells. These results demonstrated that the presence of GlcCer on target pathogens is an important factor in rAFP1 sensitivity in fungi.

We have notably focused the structure of GlcCers that interact with AFP1. AFP1 is non-toxic to human cells containing GlcCer. A methyl residue and a double

bond exists at the 9th carbon and $\Delta 8$ region of the sphingolipid base moiety of GlcCer, respectively, in fungal cells but not in human cells. To determine the functional role of these structures, we constructed *C. albicans* mutants containing a methyl residue and/or a double bond-defect. However, the amount of GlcCer in the $\Delta mts1$ and $\Delta sld1$ cells was significantly lower than that in the wild-type cells. Therefore, we constructed $\Delta mts1$, $\Delta sld1$, and the corresponding wild-type cells, which overexpress the *HSX11* gene. The amount of GlcCer in these mutant cells was almost same as that of the wild-type cells. We were able to compare the effects of the structural differences in GlcCer on rAFP1 sensitivity without considering the amount of GlcCer. The concentrations of *HSX11* overexpressed cells treated with rAFP1 were significantly higher than those of the wild-type cells. We observed that the $\Delta sld1$ cells, which lack the 9th methyl residue and trans- $\Delta 8$ double bond of the GlcCer sphingoid base moiety, exhibited rAFP1 resistance, but the extent of rAFP1 resistance of the $\Delta sld1$ cells was the same or slightly lower than that of the $\Delta mts1$ cells, which lacks only the 9th methyl residue of the GlcCer sphingoid base moiety; however, the reason for this phenomenon remains unknown. Considering together, these results demonstrate that the 9th methyl residue, but not the double bond at the $\Delta 8$ region, of the sphingolipid base moiety of GlcCer is important to AFP1 sensitivity in *C. albicans*.

2) Development of the edible oil production system using oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* from food and shochu residues

We are in the face with the exhaustion of fossil fuel resources and environmental problem. Some plants, such as oil palm and rape, have been used for production of biodiesel but it is difficult to use these plants continuously due to competition with human food requirement. Moreover, we also suffer from the scarcity of edible oil from plants. To overcome these problems, we have focused on using an oleaginous yeast, *Lipomyces*

starkeyi, to produce triacylglycerol (TAG) from nonedible biomasses.

Lipid droplets (LDs) are spherical organelles that consist of neutral lipids, mainly TAG and sterol ester (StE), covered with a phospholipid monolayer. Neutral lipids start to accumulate between phospholipid bilayers of endoplasmic reticulum and bud to the cytoplasm later with the phospholipid monolayer. Recent studies for LDs formation in mammalian adipocyte and yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* have uncovered many factors important for LDs formation. However, how and when LDs are formed are still largely unknown. We addressed the detailed expression pattern of genes responsible for LDs formation in *L. starkeyi*. *DGA1* and *LRO1* encoding enzymes that catalyze diacylglycerol to TAG are highly expressed in early to late log phase. Genes responsible for acetyl CoA and fatty acid synthesis, *ACL1*, *ACC1*, *FAS1* and *FAS2* are highly expressed transiently in early log phase but not in late log phase. *TGL3* and *TGL4* encoding enzymes that degrade TAG to DAG and free-fatty acids are continuously expressed in log and stationary phases, suggesting that the amount of TAG is controlled by TAG synthesis but not by TAG degradation. From these results the constitutive expression of acetyl CoA and fatty acid synthesis gene is expected to lead to efficient accumulation of TAG in yeast cells.

発表論文

1. 「Antifungal activity of plant defensin AFP1 in *Brassica juncea* involves the recognition of the methyl residue in glucosylceramide of target pathogen *Candida albicans*」 Oguero Y, Yamazaki H, Takagi M, Takaku H *Curr. Genet.* 60:89-97 (2014)
2. 「アブラナ科植物由来ディフェンシン蛋白質 AFP1の大腸菌生産と抗菌活性再生方法」 提箸 祥幸, 栃原 孝志, 川田 元滋, 高久 洋暁,

矢頭治 中央農研研究報告 19: 1-13 (2013)

招待講演, シンポジウム等

高久 洋暁 「組換え大腸菌を利用した糖からの芳香族化合物前駆体の発酵生産」第51回関西バイオポリマー研究会 産総研バイオ材料コンソーシアム, 京都工芸繊維大学創造連携センター 2013年7月 (招待講演)

学会発表

国内学会

1. 「バイオプロセスによる脱リグニン処理を目指したマイタケ廃菌床保管処理中における網羅的遺伝子発現応答解析」小島 慧吾, 古川隆紀, 志田 洋介, 倉橋 敦, 下田 隆史, 西堀 耕三, 山崎 晴丈, 高久 洋暁, 小笠原 渉 第65回日本生物工学会大会, 広島, 9月18日, 2013年
2. 「DOI 合成酵素変異体における変異と活性の相関解析」大久保崇之, 佐藤 雅人, 田宮 実, 高久 洋暁, 岩澤 裕喜, 石黒 正路 第41回構造活性相関シンポジウム, 西宮, 11月7日, 2013年
3. 「*Candida albicans*における植物ディフェンシンAFP1の作用機序解析」小黒 芳史, 山崎 晴丈, 高木 正道, 高久 洋暁 日本農芸化学会2014年度大会, 生田, 3月29日, 2014年
4. 「抗菌性蛋白質AFP1のイネ植物体表面処理によるイネいもち病菌の感染抑制効果の検証」提箸 祥幸, 芦澤 武人, 高久 洋暁, 矢頭 治 日本農芸化学会2014年度大会, 生田, 3月30日, 2014年 (日本農芸化学会トピックス賞)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

若手研究 (B)

課題名: 増殖停止細胞のテロメア維持機構の解析

研究代表者: 山崎 晴丈

基盤研究 (B)

課題名: ATR阻害剤ゴミシンNの作用機作の解明
とがん治療増感剤への応用

研究代表者: 石黒 正路

研究分担者: 西田 浩志, 高久 洋暁, 田宮 実,
山崎 晴丈

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品
開発基盤の確立と, その医療・健康指導への応用
のための実践拠点形成(研究分担者) 研究課題
「ファインケミカル原料の微生物生産」高久 洋
暁, 山崎 晴丈(研究代表者: 小西 徹也)

受託/共同研究(民間)

高久 洋暁: 1 件

その他研究費

1. 農林水産省 農林水産業・食品産業科学

技術研究推進事業(シーズ創出ステージ)

課題名: 地域食品・醸造残さからの高品質・
高機能油脂生産に向けた基盤研究

研究代表者: 高久 洋暁

研究分担者(新潟薬科大学): 山崎 晴丈

2. NEDO委託事業 非可食性植物由来化学品製

造プロセス技術開発, 「木質バイオマスからの
各種化学品原料の一貫製造プロセスの開発」

研究分担者(新潟薬科大学): 高久 洋暁, 宮
崎 達雄, 山崎 晴丈

3. 環境省 環境研究総合推進費補助金

課題名: 「微生物を利用した地域バイオマスキ
ノコ廃菌床からの化学工業原料生産システムの
開発」

研究代表者: 高久 洋暁

研究分担者: 山崎 晴丈

4. JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援

プログラム(A-STEP) フィージビリティスタ
ディ【FS】ステージ

研究課題: 「低炭素社会を目指した大腸菌によ
る糖からの芳香族アミン前駆体の発酵生産」

研究代表者: 高久 洋暁

研究分担者: 山崎 晴丈

5. 東経連ビジネスセンター 新事業開発・アライ

アンス助成事業「六条大麦生産の再生と地域ブ
ランド焼酎の開発」

研究代表者: 田中 宥司

研究分担者: 高久 洋暁

2) 学外活動

学会活動

日本農芸化学会, 日本生物工学会, 酵母遺伝学
フォーラム, 細胞研究会, 新産業酵母研究会(運
営委員, 会計), バイオマス利活用研究会(幹事)

山崎 晴丈: 日本農芸化学会, 日本生物工学会,
酵母遺伝学フォーラム, 酵母細胞研究会, 新産業
酵母研究会

学外活動(公的機関)

農林水産省競争的資金 1 次(書面) 審査専門評
価委員(農林水産・食品産業技術振興協会)

学外活動(その他)

高久 洋暁:

1. 博士学位論文審査委員(長岡技術科学大学)

2. SSH課題講師(新潟南高校)

3. 免許状更新講習「遺伝子組換え技術の進展と将来展望」, 2013年11月30日, 新潟薬科大学

4. 出張講義 (7月22日, 新発田高校)

5. 出張講義 (7月25日, 柏崎翔洋中等教育学校)

山崎 晴丈:

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistryの査読3件

食品分析学研究室

Laboratory of Functional and Analytical Food Sciences

■ 教授 佐藤 眞 治 Prof. Shinji SATO, Ph.D.

■ 助教 能見 祐 理 Assist. Prof. Yuri NOMI, Ph.D.



生活習慣病予防効果を有する機能性食品開発と
メイラード反応生成物の構造と動態解析



・抗肥満作用 ・血糖値上昇抑制作用 ・血圧上昇抑制作用
・グリセミックインデックス ・メイラード反応



研究概要

1. メタボリック症候群予防・改善機能を持つ食品素材、因子の研究

糖尿病、高血圧、高脂血症などのメタボリック症候群（生活習慣病）を予防するためには、内臓脂肪蓄積型の「肥満症」の発症を予防し、インスリン抵抗性の惹起を阻止することが非常に重要である。本研究では血糖値調整および脂質代謝異常改善に作用する食品因子、素材の動物、細胞レベルの機能評価を通してメタボリック症候群予防機能食品の開発に繋げる。インスリン抵抗性は高血糖状態が長期間持続することによって惹起されるため、食後の血糖値の変動をより厳密に管理することが必要となる。摂食後の急激な血糖値の上昇を抑制し、インスリン抵抗性の惹起を阻止する食品の開発を企業連携で進め、機能評価を行うと共に、セカンドミール効果など食育にも資する現象の機構解明を進める。

2. 食品由来メイラード反応生成物の構造と動態解析

食品の加工・調理時に起こる成分間反応のひとつに、アミノ基とカルボニル基との間に起こるメイラード反応がある。この反応は非酵素的な褐変

反応であり、食品の見た目や風味形成、美味しさなど、食品の品質に大きく関与することが知られている。

メイラード反応は反応条件（pH, 温度, 酸素など）により生成物が低分子～高分子まで多種多様に変化する非常に複雑な反応であり、生成物の化学構造が明らかになったものは少ない。本研究ではメイラード反応機構の解明を目指して、食品のモデル反応や実際の食品を用いて、生成されるメイラード反応生成物の化学構造やその動態、性状を明らかにしていく。

2013年度の研究成果

1. ラットにおけるイソマルチュロースの満腹感持続作用

スクロースの構造異性体であるイソマルチュロースは、小腸でゆっくりと消化される糖質として知られている。摂食行動には様々な要因が関わっているが、食品中の栄養成分の消化速度と摂食調節との関連性については明らかになっていない。そこで、ラットの摂食行動に及ぼすイソマルチュロースの影響について検討を行った。その結果、イソマルチュロース投与後24時間の摂餌量及び総エネルギー摂取量は、コントロール群に比

べ有意に減少することが明らかとなった。また、胃内容物排出速度はコントロール群に比べ低下する傾向にあり、血糖値と血漿中インスリン濃度の上昇はスクロース群に比べ有意に抑制された。以上の結果は、消化速度の遅いイソマルチュロースが満腹感を持続させる作用を有することを示しており、食欲コントロールに有用である可能性が示唆された。

Research projects and annual reports

1. Sustained effect of isomaltulose on a feeling of satiety in rats

Isomaltulose, which is a structural isomer of sucrose, is digested slowly in the small intestine. Although various factors are concerned with feeding behavior, the relationship between the digestion rate of the nutrients in food and feeding regulation is unknown. We examined the effect of isomaltulose on feeding behavior in rats. The food and total energy intakes were measured during the light (7:00-19:00) and dark (19:00-7:00) periods after the administration of test sugar at 7:00 and 19:00. The results showed that the food and total energy intakes during 24 hours were significantly decreased in isomaltulose group compared with control group. We also measured gastric emptying rate and blood components after the administration of test sugar. Gastric emptying rate in isomaltulose group had a tendency to be slower than that in control group. Isomaltulose group was significantly lower plasma glucose and insulin levels than sucrose group. From these results, it was suggested that isomaltulose had the prolonged effect of the satiety and would be likely to be beneficial for appetite control.

発表論文

ラットにおけるイソマルチュロースの満腹感持続作用, 笹川 克己, 峰尾 茂, 平山 匡男, 佐藤 眞治, 日本栄養・食糧学会誌, 第66巻, 第6号,

301-307, (2013)

学会発表

国内学会

1. 週齢の異なるラットにおけるアスコルビン酸の体内動態について, 井坂亜友美, 田口 麻里, 北村 香織, 曾根 保子, 佐藤 眞治, 山王丸 靖子, 三宅 紀子, 倉田 忠男, 鈴木恵美子, 第67回日本栄養・食糧学会大会, 平成25年5月24~26日, 名古屋大学, 名古屋
2. ^{13}C グルコースを用いたイソマルチュロースの糖取り込み促進作用に関する検討, 石川 修平, 笹川 克己, 峰尾 茂, 佐藤 眞治, 西田 浩志, 平山 匡男, 第67回日本栄養・食糧学会大会, 平成25年5月24~26日, 名古屋大学, 名古屋
3. イソマルチュロースが肝臓・骨格筋のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響—運動能力を向上させる可能性の検討—, 笹川 克己, 石川 修平, 峰尾 茂, 越中 敬一, 西田 浩志, 佐藤 眞治, 平山 匡男, 第67回日本栄養・食糧学会大会, 平成25年5月24~26日, 名古屋大学, 名古屋
4. 自然発症高血圧ラットにおける花糰の血圧上昇抑制効果とインスリン抵抗性改善効果, 佐藤 優太郎, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, 第60回日本食品科学工学会, 平成25年8月29~31日, 実践女子大学, 東京
5. 米菓中のアクリルアミドの低減に関する研究, 小林 篤, 村山 里子, 山崎 彬, 佐藤 眞治, 小西 徹也, 第60回日本食品科学工学会, 平成25年8月29~31日, 実践女子大学, 東京
6. 摂食後の血糖値上昇に及ぼすダチョウ肉の影響, 竹内 康浩, 青木 敏弘, 宮地 登三, 櫻

井 美仁, 佐藤 眞治, 第43回新潟糖尿病談話会, 平成26年2月15日, 朱鷺メッセ, 新潟

7. 高脂肪高ショ糖給餌ラットにおけるトマトの抗肥満効果, 小林 真也, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, (公社)日本食品科学工学会平成26年度関東支部大会, 平成26年3月1日, 東京農業大学, 東京

8. 高脂肪高ショ糖給餌ラットにおける越後茸の抗肥満効果, 関 和也, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, (公社)日本食品科学工学会平成26年度関東支部大会, 平成26年3月1日, 東京農業大学, 東京

9. 高脂肪高ショ糖給餌ラットにおける米穀の抗肥満効果, 大竹 健, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, (公社)日本食品科学工学会平成26年度関東支部大会, 平成26年3月1日, 東京農業大学, 東京

10. 短梗五加葉抽出物による脂肪細胞分化および骨格筋細胞のAMPK活性化作用, 西田 美也子, 平山 匡男, 金崎 桃子, 伊藤 大貴, 永塚 貴弘, 小西 徹也, 佐藤 眞治, 西田 浩志, 日本農芸化学会大会, 平成26年3月28~30日, 明治大学, 東京

11. 自然発症高血圧ラットにおける米糈の血圧上昇抑制効果と抗肥満効果, 佐藤優太郎, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, 日本農芸化学会大会, 平成26年3月28~30日, 明治大学, 東京

12. 高脂肪高ショ糖給餌ラットにおける米穀由来バイオエタノール発酵残渣の抗肥満効果, 櫻井 美仁, 内海 竜也, 佐藤 眞治, 日本農芸化学会大会, 平成26年3月28~30日, 明治大学, 東京

13. 食後血糖値に及ぼすダチョウ肉成分の影響,

竹内 康浩, 宮地 登三, 青木 敏弘, 佐藤 優太郎, 櫻井 美仁, 佐藤 眞治, 日本薬学会第134年会, 平成26年3月27~30日, 熊本大学, 熊本

その他特記事項

1) 外部資金

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開発基盤の確立と, その医療・健康指導への応用のための実践拠点形成(研究分担者)研究課題「イソマルチュロースがグリコーゲン蓄積に及ぼす影響」佐藤 眞治(研究代表者:小西 徹也)

受託/共同研究(民間)

佐藤 眞治: 5件

その他研究費

公益財団法人内田エネルギー科学振興財団試験研究費

「マイナスイオンナノミストサウナの還元特性の実証」

研究代表者: 佐藤 眞治

2) 特許出願

発明者: 佐藤 眞治ほか

出願人: 学校法人新潟科学技術学園新潟薬科大学, 民間企業「血糖値上昇抑制剤」

特願2013-15222

3) 学外活動

学会活動

日本薬学会, 日本栄養・食糧学会, 日本食品科学工学会, 日本食物繊維学会, 日本農芸化学会, 日本体力医学会, 日本分析化学会(関東支部新潟地区部会の幹事)

学外活動(公的機関)

日本GI研究会, 新潟県食品技術研究会(副会長),

公私立大学実験動物施設協議会（代議員）

学外活動（その他）

学術的な講演・講義・講習の講師

1. 新潟市秋葉区農業委員会講演会，秋葉区区役所401会議室，平成25年7月31日
2. イノベーション・ジャパン2013 -大学見本市，東京ビッグサイト，平成25年8月29日
3. アグリビジネス創出フェア2013，東京ビッグサイト，平成25年10月23日
4. 新潟県立図書館公開講演会，新潟県立生涯学習推進センター大研修室，平成25年10月26日
5. 加工性食品機能性研究事業，新潟日報メディアシップ，平成26年3月13日

栄養生化学研究室

Laboratory of Nutritional Biochemistry

■ 教授 西 田 浩 志 Prof. Hiroshi NISHIDA, Ph.D.

■ 助教 永 塚 貴 弘 Assist. Prof. Takahiro EITSUKA, Ph.D.



健康維持および病態改善に貢献できる食品成分の探索とその生化学的メカニズムの解析



・ 抗腫瘍 ・ 抗酸化 ・ 脂質代謝 ・ 免疫制御 ・ アンチエイジング

研究概要

人の健康における“食”の役割は大きい。なかでも栄養については、その重要性が極めて大きく、これまで生体内で生合成できない化合物をいかに効率よく摂るかというクラシックな観点で研究が進められてきた。しかし近年では、食品およびその成分の新たな「機能性」を見出し健康維持や疾病予防に寄与するという新しい観点に移行して来ていることは周知である。本研究室では、既知および未知の食品成分による生理作用を生化学的解析や遺伝子発現解析を応用することで、人の健康維持および疾病予防につなげ、健康寿命の延伸に貢献するための情報集積や健康戦略の構築に寄与することを目的とする研究を行っている。また、脂質・糖質・タンパク質代謝制御に加えて、機能成分による抗酸化、抗ガン作用、抗高血圧作用、免疫制御作用などについても幅広く栄養生化学的見地から研究を行っている。

2013年度の研究成果

1. 重粒子癌治療における柿葉フラボノールの治療効率化

柿葉は古くから生体調節を基本とした中医薬お

よび漢方薬に用いられてきた。我々は柿葉の抽出物から2”位にガロイル基をもつフラボノール(PLF)を抽出した。ガロイル基をもつフラボノールは抗酸化などの生理機能の増強が期待できるが、癌治療に応用できるか否か調べられた例は見当たらない。本研究では細胞のDNA損傷チェックポイントに着目してPLEの抗がん剤の増感作用を調べた。PLFは炭素イオンビームを用いた重粒子照射によって誘導したA549肺ガン細胞の致死効果を顕著に増感した。SMC1, Chk1, p53などのチェックポイント分子とその上流のATMのリン酸化を抑制した。さらに、PLFがG2/Mチェックポイントを無効にしていることもわかった。この結果は、PLFがATM依存のチェックポイントシグナルを破綻させることにより、抗ガン剤の増感作用を示すことを示している。

2. SchBステレオアイソマーによるATR阻害活性の差異

我々は生薬五味子の主要リグナンであるSchBが2つのステレオアイソマーである γ Schisandrin(γ Sch)およびGomisinN(GN)の2つから成ることを突き止めた。これまでSchBはDNA損傷応答反応の重要因子として機能しているPI3キナーゼの一つであるATR(Ataxia telangiectasia-mutated

and Rad3 related) の特異的阻害剤であることを報告しているが、本研究では上記のアイソマーのいずれが阻害活性をもたらしているかを調べた。紫外線照射後のDNA応答反応において、GNは γ Schと比べてチェックポイント分子であるp53, SMC1, Chk1のリン酸化を阻害することが分かった。同時にM期チェックポイントの指標であるヒストンH3のリン酸化も抑制した。試験管内にて直接的なキナーゼ活性の阻害試験を行ったところ、GNはIC50として7.25 μ Mという特異的な阻害活性を示した。SchBによるATRの阻害を介したDNA損傷増感作用はGNによるものであったことが証明された。

3. チャガ由来の低分子フェノール性化合物によるDNAポリメラーゼ活性と細胞増殖の阻害

癌細胞は無限の増殖を繰り返し、宿主を死に至らしめる。我々はこれまで様々な天然物の機能性を調べてきたなかで、癌細胞の増殖に関わるDNAポリメラーゼの阻害活性を示す天然物の探索を行ってきた。チャガは古くからロシアで癌治療に応用されており、本研究ではそこから抽出された化合物が実際に癌細胞の増殖を抑制するかどうかを検討した。チャガ由来のカフェー酸 (CA) と3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL) は癌細胞のDNAトポイソメラーゼIIを有意に阻害し、細胞増殖を抑制した。チャガに含まれる制ガン作用を示す化合物はCAとDBLであることが示された。

Research projects and annual reports

1. Persimmon Leaf Flavonols Enhance the Anti-Cancer Effect of Heavy Ion Radiotherapy on Murine Xenograft Tumors.

The cell cycle checkpoint system play a pivotal role in the cellular DNA damage response, and the discovery of check-point inhibitors is expected to sensitize current cancer therapies. Checkpoint signaling cascades are critically modulated by ATM (Ataxia telangiectasia-mutated) and its related molecules. Generally, ATM

primarily responds to ionizing irradiation-induced DNA double-strand breaks. Heavy ions from an accelerated carbon ion beam have been used to cure cancer because they are more effective than ionizing irradiation such as X-ray and γ -radiation in terms of biological damage. In a previous study, we demonstrated that a persimmon leaf flavonol (PLF) promoted the cytotoxic effect of chemotherapeutic agents on cancer cells through inhibition of checkpoint activities, especially in the ATM dependent pathway. The present study investigated whether PLF inhibits checkpoint activity during the DNA damage response induced by heavy ion irradiation. Treatment with PLF significantly increased the cytotoxicity of heavy ion irradiation in A549 adenocarcinoma cells. The phosphorylation of checkpoint proteins such as p53, SMC1, and Chk1 was increased by heavy ions. PLF reduced the phosphorylation of checkpoint proteins. Pre-treatment with PLF significantly prevented the decrease of mitotic cells in heavy ion-exposed cells. We further evaluated tumor volume in SCID mice inoculated with human lung adenocarcinoma A549 cells. The combination treatment of PLF and heavy ion resulted in a decrease of tumor volume compared with controls, although PLF itself did not exhibit any effect. These results indicate that PLF inhibits tumor growth through modulation of the DNA damage response. PLF may be useful for clinical application in combination with heavy ion radiotherapy.

2. Differential effect of Schisandrin B stereoisomers on ATR-mediated DNA damage checkpoint signaling.

We have previously reported that schisandrin B (SchB) is a specific inhibitor of ATR (ataxia telangiectasia and Rad-3-related) protein kinase. Since SchB consists of a mixture of its diastereomers gomisins N (GN) and γ -schisandrin (γ -Sch), the inhibitory action of SchB might result from a stereospecific interaction between one of the stereoisomers of SchB and ATR.

Therefore, here we investigated the effect of GN and γ -Sch on UV (UVC at 254 nm)-induced activation of DNA damage checkpoint signaling in A549 cells. UV-induced cell death (25–75 J/m²) was amplified by the presence of the diastereomers, especially GN. At the same time, GN, but not γ -Sch inhibited the phosphorylation of checkpoint proteins such as p53, structural maintenance of chromosomes 1 (SMC1) and checkpoint kinase 1 (Chk1) in UV-irradiated cells. Moreover, GN inhibited the G2/M checkpoint during UV-induced DNA damage. The in vitro kinase activity of immunoaffinity-purified ATR was dose-dependently inhibited by GN (IC₅₀: 7.28 μ M) but not by γ -Sch. These results indicate that GN is the active component of SchB and suggest that GN inhibits the DNA damage checkpoint signaling by stereospecifically interacting with ATR.

3. Inhibitory effects of low molecular weight polyphenolics from *Inonotus obliquus* on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation.

Low molecular weight (LMW) polyphenolics containing a polyhydroxylated benzyl moiety are abundant in medicinal plants. In the present study, we report on the activities of seven LMW polyphenolics isolated from *Inonotus obliquus*, a medicinal mushroom. The isolated compounds included caffeic acid (CA), 3,4-dihydroxybenzalacetone (DBL), gallic acid, syringic acid, protocatechuic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde and 2,5-dihydroxyterephthalic acid. We analyzed their inhibitory effects on DNA polymerase (pol) and DNA topoisomerase (topo), and their effects on human cancer cell growth. All isolated compounds inhibited human topo II activity; the most potent were DBL and CA, which contain a catechol propanoid moiety. CA other compounds had no effect. No compound modulated the activities of 11 mammalian pol species or other DNA metabolic enzymes, including T7 RNA polymerase, mouse IMP

dehydrogenase (type II), T4 polynucleotide kinase and bovine deoxyribonuclease I. CA and DBL markedly suppressed the proliferation of human colon HCT116 carcinoma cells with an LD₅₀ of 70.0 and 49.4 μ M, respectively, and halted the cell cycle in the G2/M phase. The suppressive effect of these compounds on cancer cell growth correlated with their ability to inhibit topo II. These results suggest that CA- and DBL-dependent decreases in cell proliferation are due to the inhibition of cellular topo II. The mechanism of action of these catechol propanoid compounds and the implication for their use as anticancer agents are discussed

発表論文

1. Tanaka Y, Tsunemi Y, Kawashima M, Tatewaki N, Nishida H. Treatment of Skin Laxity Using Multisource, Phase-controlled Radiofrequency in Asians: Visualized Three-dimensional Skin Tightening Results and Increase in Elastin Density Shown through Histological Investigation. *Dermatologic Surgery*, 40, 756-762, 2014
2. Matsushima A, Furuuchi R, Shirai M, Nagai S, Yokoyama T, Nishida H, Hirayama M. Effects of acute and chronic Boysenberry intake on blood pressure and endothelial function in spontaneous hypertensive rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 60, 43-51, 2014
3. Kawakami K, Nishida H^{*}, Tatewaki N, Eguchi-Kasai K, Anzai K, Eitsuka T, Konishi T, Hirayama M. Persimmon leaf flavonols enhanced anti-cancer effect of heavy ion radiotherapy on murine xenograft tumors. *J. Cancer Ther.*, 4, 1150-1157, 2013

4. Tatewaki N, Nishida H, Yoshida M, Ando H, Kondo S, Sakamaki T, Konishi T.
Differential effect of Schisandrin B stereoisomers on ATR-mediated DNA damage checkpoint signaling.
J. Pharmacol Sci, 122, 138-148, 2013
5. Tanaka Y, Tsunemi Y, Kawashima M, Nishida H.
The impact of near-infrared in plastic surgery.
Plastic Surgery: An International Journal, 2013
(Article ID 973073, 13 pages)
6. Matsushima A, Furuuchi R, Sakaguchi Y, Goto H, Yokoyama T, Nishida H, Hirayama M.
Acute and chronic flow-mediated dilation and blood pressure responses to daily intake of boysenberry juice: a preliminary study.
J. Int. Food Sci. Nutr., 64, 988-992, 2013
7. Tanaka Y, Tsunemi Y, Kawashima M, Tatewaki N, Nishida H.
Objective assessment of skin tightening using water-filtered near-infrared (1000-1800 nm) device with a contact cooling and freezer stored gel in Asians.
Clin. Cosm. Invest. Dermat., 6, 167-176, 2013
8. Kuriyama I, Nakajima Y, Nishida H, Konishi T, Takeuchi T, Sugawara F, Yoshida H, Mizushima Y.
Inhibitory effects of low-molecular-weight polyphenolics from Chaga on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation.
Mol Med Rep, 8, 535-542, 2013
9. Donai K, Kiyono T, Eitsuka T, Guo Y, Kuroda K, Sone H, Isogai E, Fukuda T. Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase.
J. Biotechnol. 176: 50-57 (2014)

著書および総説

永塚 貴弘, 第5章 ビタミン様物質, 2. ピロロキノリンキノン, ビタミンK2 (メナキノン-4), トコトリエノール「食品機能性成分の吸収・代謝機構」シーエムシー出版, 宮澤陽夫 監修 (2013)

学会発表

国際学会

1. Eitsuka T, Nakagawa K, Nishida H, Miyazawa T
Up-regulation of cellular telomerase activity by Amadori-glycated phosphatidylethanolamine: A link between diabetes and cancer. 7th Diet and Optimum Health conference (May 15-18, 2013 @ Corvallis, OR, USA)
2. Tatewaki N, Eitsuka T, Konishi T, Nishida H
Squalene inhibits DNA damage response through the induction of Wip1 phosphatase in A549 adenocarcinoma cells. American Society for Cell Biology Annual Meeting 2013 (Dec. 14-18, 2013 @ New Orleans, LA, USA)
3. Saito M, Nishida M, Kokubo M, Eitsuka T, Nishida H
Strawberry polyphenols attenuate the production of inflammatory mediators in U937 cells. American Society for Cell Biology Annual Meeting 2013 (Dec. 14-18, 2013 @ New Orleans, LA, USA)

国内学会

1. 西田美也子, 平山 匡男, 金崎 桃子, 伊藤大貴, 永塚 貴弘, 小西 徹也, 佐藤 眞治, 西田 浩志
短梗五加葉抽出物による脂肪細胞分化および骨格筋細胞のAMPK活性化作用, 第67回日本農芸化学会大会, (2014年3月27日~30日 @ 明治大学)
2. 齋藤 哲男, 西田美也子, 永塚 貴弘, 西田

浩志

五加の実がマウス脂質代謝に及ぼす影響，第67回日本農芸化学会大会，（2014年3月27日～30日@明治大学）

3. 永塚 貴弘，舘脇 直人，西田 浩志，仲川 清隆，宮澤 陽夫

トコトリエノールによる癌細胞増殖抑制とフェルラ酸の相乗効果，第67回日本農芸化学会大会，（2014年3月27日～30日@明治大学）

4. 笹川 克己，石川 修平，峰尾 茂，越中 敬一，西田 浩志，佐藤 眞治，平山 匡男
イソマルチュロースが持久的運動時のグリコーゲン蓄積に及ぼす影響，第67回日本栄養・食糧学会大会，（2013年5月24日～26日@名古屋大学）

5. 石川 修平，笹川 克己，峰尾 茂，佐藤 眞治，西田 浩志，平山 匡男
¹³Cグルコースを用いたイソマルチュロースの糖取り込み促進作用に関する検討，第67回日本栄養・食糧学会大会，（2013年5月24日～26日@名古屋大学）

6. 松嶋 全人，古内 亮，滝澤佐季子，横山 忠幸，佐々木克典，西田 浩志，平山 匡男
ボイセンベリー果汁および果実酢の単回投与および長期摂取における高血圧自然発症ラットの抗高血圧作用の解析，第67回日本栄養・食糧学会大会，（2013年5月24日～26日@名古屋大学）

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究（C）

課題名：食品成分によるDNA損傷応答反応の制御に関する研究

研究代表者：西田 浩志

基盤研究（C）

課題名：糖化脂質によるテロメラーゼ活性化の基盤的研究：糖尿病と癌の関わり

研究代表者：永塚 貴弘

基盤研究（B）

課題名：ATR阻害剤ゴミシンNの作用機作の解明とがん治療増感剤への応用

研究代表者：石黒 正路

研究分担者：西田 浩志，高久 洋暁，田宮 実，山崎 晴丈

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品開発基盤の確立と，その医療・健康指導への応用のための実践拠点形成(研究分担者) 研究課題「食品素材によるガン治療増感剤の探索」西田浩志，永塚貴弘（研究代表者：小西 徹也）

受託／共同研究（民間等）

西田 浩志：6 件

その他研究費

1. 応用生命科学部学部内共同研究奨励費

研究プロジェクト名「食品に含まれる微量栄養素情報データベースの構築と活用に関する研究」
研究代表者：西田 浩志

2. 永塚 貴弘：飯島藤十郎記念食品科学振興財団 学術研究助成金「米ぬか成分によるテロメア短縮抑制を介した細胞老化の防止」

3. 永塚 貴弘：栄養・食糧学学術基金 国際交流助成

3) 学外活動

学会活動

1. 西田 浩志：米国癌学会，日本生化学会，日

本農芸化学会，日本栄養・食糧学会，日本食品
免疫学会，日本畜産学会，日本メイラード学会
(評議員)，日本フードファクター学会

2. 永塚 貴弘：日本農芸化学会，日本栄養・食
糧学会，日本ビタミン学会，日本メイラード学
会，日本過酸化脂質・抗酸化物質学会，日本脂
質生化学会，日本油化学会

学外活動（公的機関）

西田 浩志：日本メイラード学会 評議員，日本
畜産学会第117回大会 実行委員，日本家禽学会
2013年秋季大会 実行委員

学外活動（その他）

西田 浩志：

1. 平成25年 9 月13日 一般社団法人健康ビジ
ネス協議会 新潟県機能性食品開発会議 特別
講演

2. 平成25年12月 6 日 新潟県立大学人間生活
学部健康栄養学科 特別講義

3. 平成25年12月26日 新潟県立新発田高校
スーパーサイエンスハイスクール 講義・実習

4. 平成25年12月 5 日 NASA invited seminar,
National Aeronautics and Space Administration,
Johnson Space Center, Houston, TX, USA

永塚 貴弘：

1. 出前講義（新津南高等学校，5/24）

2. SSH（高田高等学校，12/23-24）

食品・発酵工学研究室

Laboratory of Food and Fermentation Technologies

■ 教授 重 松 亨 Prof. Toru SHIGEMATSU, Ph.D.

■ 助教 井 口 晃 徳 Assist. Prof. Akinori IGUCHI, Ph.D.



超高压技術・発酵技術を利用したグリーンプロセスの開発



・超高压技術 ・微生物 ・食品加工 ・メタン発酵 ・難培養性微生物

研究概要

本研究室では、超高压（静水压）技術および発酵技術を2つの軸として、新しい食品製造技術をはじめとする様々な“地球に優しい”グリーンプロセスの開発を目指して研究を行っている。

圧力の利用：100 MPa以上の超高压を食品素材に施すことで、細胞構造や生体成分の変化が生じる。こうした現象を解明し利用することで、機能性成分の富化を伴う、省エネルギー型の新しい食品製造技術の開発を進めている。

発酵の利用：発酵は微生物の機能を利用した省エネルギー型の食品製造技術と位置付けられる。発酵制御のための微生物の圧力死滅機構に関する研究、微生物間相互作用に関する研究、さらに未知の微生物の探索等を通じて、知られざる微生物の機能を引き出し、食品製造技術にとどまらず様々なフィールドへの応用を目指す。

2013年度の研究成果

2013年度の主な研究成果は以下の通りである。

1) 超高压技術を用いた食品加工

超高压技術を用いた食品加工を目的として以下の研究を行った。大麦澱粉の糊化に有効な圧力処

理条件として600 MPa（室温）2時間を見出し、非加熱で糊化処理を行った大麦を用いた新規焼酎醸造プロセスの構築に成功した。ル・レクチエの酵素依存的褐変反応を進めるポリフェノールオキシダーゼの活性が50℃以上の温度における300 MPa以上の圧力処理により抑制されることを明らかにした。

2) 圧力による発酵制御・殺菌技術の開発

圧力による微生物死滅効果を応用し、非加熱で発酵制御を行う技術の開発を目的として、以下の研究を行った。圧力感受性変異株*Saccharomyces cerevisiae* a924E1の温度・圧力不活性化挙動、およびエネルギー代謝関連のメタボロームを解析した。変異株は好気呼吸機能の低下により、親株に比べて温度・圧力に対する感受性が増大したと考えた。この成果を応用し耐塩性酵母*Zygosaccharomyces rouxii*の圧力感受性変異株の取得に成功した。

また、できるだけ温和な圧力・温度条件で枯草菌の孢子を不活性化させる条件を探索した結果、200 MPa（65℃）の圧力処理を360分間施すことにより7-log不活性化させることに成功した。

3) メタン発酵技術に関する研究

新規なメタン発酵技術の開発と、メタン発酵プロセスに生息する未培養微生物の探索・解析を目的とし、以下の研究を行った。

生分解性プラスチックを使ったごみ袋を開発し、生ごみごとメタン発酵による処理プロセスを構築する目的で、Poly (3- hydroxyl-butyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) を分解・無機化する発酵プロセスを構築し、プロセス内の微生物群集構造を明らかにした。

下水を処理するUASB式メタン発酵プロセスに高頻度に検出される未培養微生物 (Candidate division OP5) の機能推定を目的に、実験室規模のUASBプロセスを構築し、槽内のグラニュール汚泥に対してリアルタイムPCR法によりOP5に属する細菌の検出と存在量を定量した。この細菌の生理機能を推定するために、各種基質を用いたグラニュール汚泥の回分培養とrRNA定量実験を行い、増殖に寄与する基質をいくつか探索することに成功した。

4) 未培養微生物の分離技術の開発

未培養微生物の分離技術開発を目的に、ファージディスプレイ法を用いた特定微生物分離技術のハイスループット化を検討した。その結果、有価資源であるパラジウム蓄積細菌 *Shewanella algae* ATCC 51181株に対する特異的ペプチドのハイスループットスクリーニング技術を確立した。

Research projects and annual reports

In our laboratory, we have carried out research projects for the novel uses of high hydrostatic pressure over 100 MPa on food processing and fermentation control technologies. Moreover, we have investigated on detection, separation and analysis of the uncultured microorganisms related to methane fermentation processes. The summarized result of each project was as follows:

1) Food processing technologies using high hydrostatic pressure

In order to develop food processing technologies using high hydrostatic pressure (HP), the following studies were carried out. Barely starch could be efficiently gelatinized by a HP treatment at 600 MPa (at ambient temperature) for 2 h. Using this treatment, a novel shochu- brewing process without heat treatment for gelatinization was successfully established. The activity of polyphenol oxidase (PPO), which causes brown discoloration, in pear fruits “Le Lectier” could be suppressed by HP treatments over 300 MPa (over 50°C).

2) Microbial inactivation using high hydrostatic pressure

For the novel use of pressure on fermentation control, pressure inactivation behavior of the pressure-sensitive and resistant mutants of budding yeast *S. cerevisiae* was analyzed. The analyses on inactivation kinetics against temperature-pressure, as well as metabolites, revealed that the mutant strain was deficient in the metabolic functions for aerobic respiration and therefore showed sensitive against high temperature and pressure. Using the relationship between aerobic respiration deficiency and pressure sensitivity, a pressure sensitive mutant of a halophilic yeast *Z. rouxii* was screened. Moreover, by screening of HP treatment for efficient inactivation of spores of *B. subtilis*, HP condition at 200 MPa (65°C) for 6 h could achieve 7-log inactivation.

3) Researches related to methane fermentation processes

To develop a novel methane fermentation process and to investigate microbes in methane fermentation processes, the following studies were carried out. To develop a treatment process for municipal solid waste (or kitchen garbage) together with bags made of biodegradable plastics, a methane fermentation process degrading a biodegradable plastic Poly (3- hydroxyl-

butyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBH) was constructed. The microbial community structures were analyzed.

Uncultured bacterial species belonging to candidate division OP5 is frequently detected in UASB processes treating domestic wastewater. A laboratory scale UASB process was constructed and operated. Using real time PCR method targeting the 16S rRNA gene of bacterial species of OP5, the species belonging to OP5 was successfully detected and quantified in the process. Using batchwise cultivation and OP5 rRNA quantification experiments, some substrates that facilitate the growth the species were detected.

4) Development of separation and isolation techniques for uncultured microorganisms

A phage display technique was applied for development of separation and isolation for uncultured microorganisms. A high throughput screening of specific peptides targeting a palladium accumulating bacterium *Shewanella algae* strain ATCC 51181 was successfully established.

発表論文

1. Kinji Kobori, Yuto Maruta, Shigeru Mineo, Toru Shigematsu and Masao Hirayama “Polyphenol-retaining decaffeinated cocoa powder obtained by supercritical carbon dioxide extraction and its antioxidant activity” *Foods* 2013, 2(4), 462-477 (Dec. 2013)
2. Wakako Kiriya, Kei Honma, Tomoaki Hiratsuka, Itsuka Takahashi, Takahiro Nomizu, Yuta Takashima, Masataka Ohtsuka, Daiki Takahashi, Kazuya Moriyama, Sayoko Mori, Shiho Nishiyama, Masahiro Fukuhara, Tatsunosuke Nakamura, Toru Shigematsu and Toshio Yamaguchi “Diversities and similarities in pH-dependency among bacterial NhaB-like Na⁺/H⁺ antiporters” *Microbiology*, 159

(Pt 10), 2191-2199, (Oct. 2013)

3. Shigeaki Ueno, Takumi Katayama, Takae Watanabe, Kanako Nakajima, Mayumi Hayashi, Toru Shigematsu, Tomoyuki Fujii “Enzymatic production of γ -aminobutyric acid in soybeans using high hydrostatic pressure and precursor feeding” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(4), 706-713 (Apr. 2013).
4. Masaru Nanba, Kazuki Nomura, Yusuke Nasuhara, Manabu Hayashi, Miyuki Kido, Mayumi Hayashi, Akinori Iguchi, Toru Shigematsu, Masao Hirayama, Shigeaki Ueno, Tomoyuki Fujii “Importance of cell-damage causing growth delay for high-pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*” *High Pressure Research*, 33(2), 299-307 (Aug. 2013).
5. Miyuki Kido, Kaneto Kobayashi, Shuji Chino, Toshikazu Nishiwaki, Noriyuki Homma, Mayumi Hayashi, Kazutaka Yamamoto, Toru Shigematsu “Super-fine rice flour production by enzymatic treatment with high hydrostatic pressure processing” *High Pressure Research*, 33(2), 237-244 (Aug. 2013).
6. Toshimi Hasegawa, Takuya Nakamura, Mayumi Hayashi, Miyuki Kido, Masao Hirayama; Toshio Yamaguchi, Akinori Iguchi, Shigeaki Ueno, Toru Shigematsu, Tomoyuki Fujii “Influence of osmotic and cationic stresses on high-pressure inactivation of *Escherichia coli*” *High Pressure Research*, 33(2), 292-298 (Aug. 2013).
7. Kengo Kubota, Mikio Hayashi, Kengo Matsunaga, Akinori Iguchi, Akiyoshi Ohashi, Yu-You Li, Takashi Yamaguchi, Hideki Harada. “Microbial community composition of a down-flow hanging sponge (DHS) reactor combined with an up-flow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor for the treatment of municipal

sewage.」Bioresource Technology, Pages 144-150, Volume 151, January 2014.

8. 井口 晃徳, 大久保 努, 立花 真, 永井 寛之, 上村 繁樹, 山口 隆司, 久保田健吾, 原田 秀樹. 実証規模UASB-DHSシステムにおける後段DHSリアクターの微生物群集構造解析と脱窒細菌群の定量. 土木学会論文集G(環境). Vol.69, No.7, pp.III_539-III_546, 2013.

著書および総説

1. 重松 亨, 西海理之監修「進化する食品高圧加工技術—基礎から最新の応用事例まで—」ISBN 978-4-86469-069-0 pp. 11-16. エヌ・ティー・エス, 東京 (2013年6月10日)
2. 重松 亨「超高圧プロセスを利用した超微細米粉の開発」産官学連携ジャーナル 9 (7), 12-13 (2013年7月)
3. 重松 亨「高圧処理による食品の成分変換」冷凍88(1026), 280-284(2013年4月)

学会発表

国際学会

1. Kazuki Nomura, Hitoshi Iwahashi, Akinori Iguchi and Toru Shigematsu “Analysis of barosensitive mechanisms in yeast for pressure regulated fermentation” APS-SCCM & AIRAPT-24 Joint Conference, The Westin Seattle Hotel, Seattle (8 Jul., 2013)
2. Akinori IGUCHI, Tsutomu Okubo, Masanobu Takahashi, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Shigeki Uemura, Kengo Kubota and Hideki Harada. Microbial community structure of practical-scale Down-flow Hanging Sponge reactor treating municipal wastewater in India. The 1st International

Forum On Asian Water Environment Technology, Dec. 12~18, 2013 (Delhi).

国内学会

1. 野村 一樹, 岩橋 均, 井口 晃徳, 重松 亨「酵母*Saccharomyces cerevisiae*への圧力感受性付与におけるProline代謝の影響」日本農芸化学会2014年度大会, 明治大学生田キャンパス (2014. 3. 27-30)
2. 重松 亨, 南波 優, 野村 一樹, 長谷川敏美, 井口 晃徳「高圧力発酵制御を目的とした酵母*Saccharomyces cerevisiae*の圧力耐性・感受性変異株の解析」日本高圧力学会第54回高圧討論会, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (2013. 11. 16)
3. 野村 一樹, 岩橋 均, 井口 晃徳, 重松 亨「呼吸阻害剤による酵母*Saccharomyces cerevisiae*の圧力感受性への影響」日本高圧力学会第54回高圧討論会, 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (2013. 11. 16)
4. 井口 晃徳, 千葉 有紀, 林 真由美, 山口隆司, 原田 秀樹, 重松 亨「下水処理UASBプロセスのグラニュール汚泥内に存在する主要未培養微生物の空間分布と機能推定」第29回日本微生物生態学会大会, 鹿児島, 2013年11月
5. 井口 晃徳, 南波 優, 野村 一樹, 齋木 朋恵, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 重松 亨「*Saccharomyces cerevisiae* UV変異株の損傷からの回復を考慮した圧力死滅挙動解析」第18回生物関連高圧研究会シンポジウム, 岐阜大学サテライトキャンパス, (2013年9月5日)
6. 長谷川敏美, 中村 拓哉, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳, 山口 利男, 重松 亨「NaCl共存下の*Escherichia coli*の圧力耐性に及

ばす浸透圧・イオンストレス応答タンパク質の重要性」第18回生物関連高圧研究会シンポジウム，岐阜大学サテライトキャンパス，（2013年9月6日）

7. 小堀 欣司,丸田 優人,峰尾 茂,重松 亨,平山 匡男「ココアパウダーのポリフェノール組成と抗酸化活性に関する検討」日本食品科学工学会第60回記念大会，実践女子大学（2013年8月29日～31日）

8. 大久保 努,上村 繁樹,荒木 信夫,多川 正,井口 晃徳,高橋 優信,久保田健吾,原田 秀樹.「エジプト乾燥地における汚水灌漑の実態調査」土木学会平成25年度 全国区大会 第68回年次学術講演会，千葉，2013年9月

9. 野村 一樹,岩橋 均,井口 晃徳,重松 亨「*Saccharomyces cerevisiae* における呼吸欠損が圧力感受性へ与える影響」第18回生物関連高圧研究会シンポジウム，岐阜，2013年9月

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究（C）

課題名：難培養性微生物を標的としたハイスルー
プット分離・培養・代謝機能解析システムの開発
研究代表者：重松 亨
研究分担者：井口 晃徳

若手研究（B）

課題名：下水処理嫌気性プロセスに存在する未知
微生物群の機能解析と最適運転条件の提案
研究代表者：井口 晃徳

基盤研究（B）

課題名：バクテリアのコロニーを作らない変異株
を用いたコロニー形成の機構解析

研究代表者：東京大学・農学生命科学研究科・教授 正木 春彦
研究分担者：重松 亨

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品
開発基盤の確立と，その医療・健康指導への応用
のための実践拠点形成（研究分担者）研究課題「食
品機能増強のための高圧処理・発酵技術の開発」
重松 亨（研究代表者：小西 徹也）

受託／共同研究（民間等）

重松 亨：5件

その他研究費

1. 社会システム改革と研究開発の一体的推進
先導的創造科学技術開発費補助金(文部科学省)
途上国におけるイノベーションを促進する国際
協力の戦略的推進 「乾燥地域における灌漑再
利用のための革新的下水処理技術開発の国際研
究拠点形成」
代表機関：国立大学法人東北大学
（共同研究者：井口 晃徳）

2. JST-JICA地球規模課題対応国際科学技術協力
プログラム（SATREPS）
研究課題：エネルギー最小消費型の下水処理技
術の開発
研究題目「処理メカニズムの解明と重要微生物
の検出・定量・モニタリング技術の開発，DHS
技術の新展開」
代表機関：国立大学法人東北大学
（研究分担者：井口 晃徳）

3. 公益財団法人内田エネルギー科学振興財団試
験研究費
「下水処理メタン発酵プロセスにおいて高頻度
に検出される未知微生物群の機能解析」
研究代表者：井口 晃徳

4. 応用生命科学部学部共同研究奨励費(分担)
「自噴する新津石油の微生物改質による有効成分の生産に関する研究」研究代表者 田宮 実

5. 応用生命科学部学部共同研究奨励費(分担)
「食品に含まれる微量栄養素情報データベースの構築と活用に関する研究」研究代表者 西田 浩志

6. 応用生命科学部学部共同研究奨励費(分担)
「六条大麦を用いた新潟薬科大学ブランド焼酎の開発」研究代表者 田中 宥司

2) 特許出願

1. 特願2014-02649「ポリヒドロキシアルカン酸の分解方法、並びに微生物製剤」(2014年2月14日)
発明者: 重松 亨, 井口 晃徳 ほか
出願人: 学校法人新潟科学技術学園新潟薬科大学, 民間企業

2. 特許第5326147号「米粉の製造方法並びに米粉並びに米粉加工品」(2013年8月2日)
発明者: 本間 紀之, 西脇 俊和, 小林 兼人, 木戸みゆ紀, 山本 和貴, 重松 亨, 鈴木 敦士
特許権者: 新潟県, 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構, 学校法人新潟科学技術学園新潟薬科大学

3) 学外活動

学会活動

重松 亨: 日本農芸化学会, 日本生物工学会, 日本水環境学会, 日本微生物生態学会(編集委員), 土木学会, 日本高圧力学会

井口 晃徳: 日本水環境学会会員, 日本微生物生態学会会員, 社団法人土木学会会員

学外活動(公的機関)

重松 亨:

1. 放送大学 主任講師「暮らしに役立つバイオサイエンス」担当

2. H・P未来産業創造研究会 顧問

3. 新潟県中小企業団体中央会 「地域中小企業の人材確保・定着支援事業」運営委員会委員

4. 国立大学法人 長岡技術科学大学 博士学位論文の審査委員

5. 国立大学法人 東京大学 非常勤講師

6. 県立教育センター 「平成25年度先端科学技術体験講座(中学校理科)」に伴う講師

井口 晃徳:

放送大学 講師「暮らしに役立つバイオサイエンス」担当

学外活動(その他)

重松 亨:

1. 平成25年5月15~17日 ifia JAPAN 2013 出展

2. 平成25年6月18~19日 Gustavo V. Barbosa-Cánovas 教授(ワシントン州立大学)訪問 研究紹介・案内

3. 平成25年8月4日 新潟薬科大学 生命科学講座 講師

4. 平成25年8月7日 イルクーツク国立大学 ザバイカル農業学部訪問 研究紹介・案内

5. 平成25年8月8日 新潟薬科大学 高校教員セミナー 就職支援体制の紹介

6. 平成25年8月16日 夏休みふむふむパーク(新潟日報メディアシップ) 講師

7. 平成25年10月23～25日 アグリビジネス創
出フェア 出展
8. 平成25年10月28日 ニューヨーク州立大学
フレドニア校訪問（大学連携協定調印式）
9. 平成25年11月7日 産業科学システムズセ
ミナー 講師
10. 平成25年11月9日 平成25年度秋葉区産官
学連携地域交流講座 講師
11. 平成25年11月23～24日 平成25年度「青
少年のための科学の祭典」新潟県・上越大会
講師
12. 平成26年3月13日 新潟地域農産物の機能
性研究成果発表会 発表

井口 晃徳：

1. メディアシップ 夏休みふむふむパーク 新
潟薬科大学講座（2013年8月16日）
2. 新潟南高校 SSH「SSEI臨地研修」講師（2013
年10月12日）
3. 高田高校 高大連携実習講座 講師（2013
年12月23-24日）

食品安全学研究室

Laboratory of Food Safety

■ 教授 浦 上 弘 Prof. Hiroshi URAKAMI, Ph.D.

■ 助教 小長谷 幸 史 Assist. Prof. Yukifumi KONAGAYA, Ph.D



食品の安全のための微生物制御方法に関する研究



・微生物 ・食中毒 ・ノロウイルス ・孢子形成菌 ・HACCP

研究概要

食の安全・安心という標語をよく見かけるが、安心は心理的なものであるのに対して安全は客観的、科学的なものである。食品の安全を脅かす最大の脅威は、一般に恐れられているような残留農薬でも放射性物質でもましてや食品添加物ではなく、微生物である。私たちは食品安全の最大の脅威である有害な微生物から食品を守ることを目標に研究を行っている。

1) 孢子形成菌の制御

細菌の中には、栄養がなくなると孢子と呼ばれる種のような耐久型の細胞をつくるものがある。その中でもっとも恐れられているのが、食品中で猛毒をつくるボツリヌス菌であり、その殺滅には調理加熱では不十分で、120℃で数分の加熱を要する。私たちは、このような細菌孢子の熱耐性を下げる成分をいくつかの食品中で見つけた。例えば、ボツリヌス菌の孢子を炊飯中に加えると、水の中で加熱するよりも1000倍も速く死滅する。米に含まれる成分の探索とその作用のメカニズムがひとつの研究テーマである。

また、ある条件下で数千気圧の圧力をかけると、孢子が発芽する。発芽して増殖を始めた細胞は孢

子と違って熱に弱く、70～80℃で殺すことができる。おそらく、孢子は環境に栄養があると勘違いしたのだろう。どのような条件を揃えれば、孢子をだまして発芽を促せるか。その条件が食品加工に利用できれば、缶詰のように120℃まで加熱することなく、おいしさを保ったまま安全性を確保できる。これまでに、食品に含まれている栄養素などが発芽の促進に有効であることを明らかにすることができた。



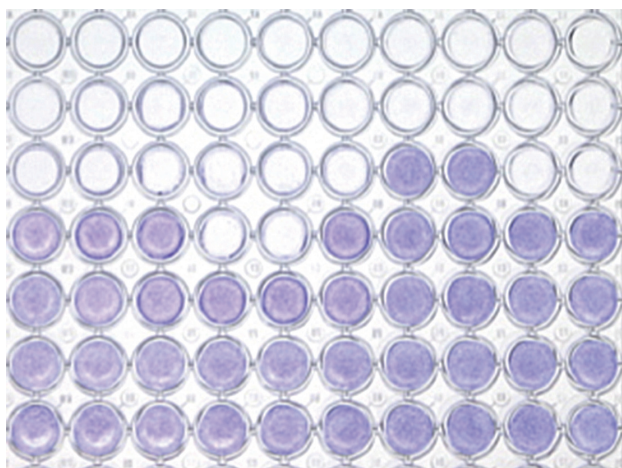
ボツリヌス菌の孢子

2) ウイルスに有効な消毒剤の開発

日本で最も多い食中毒はノロウイルスによるものである。年間370万人もの日本人が感染する理

由のひとつに、よい消毒剤がないことが挙げられる。ノロウイルスは構造が単純なだけ、消毒剤の標的が少ないのである。かつてノロウイルスを殺すには、数100ppmの次亜塩素酸（ハイター）が必要とされていた。私たちは、視点を変えて実験をやり直すことで、数ppmで十分であることを明らかにした。

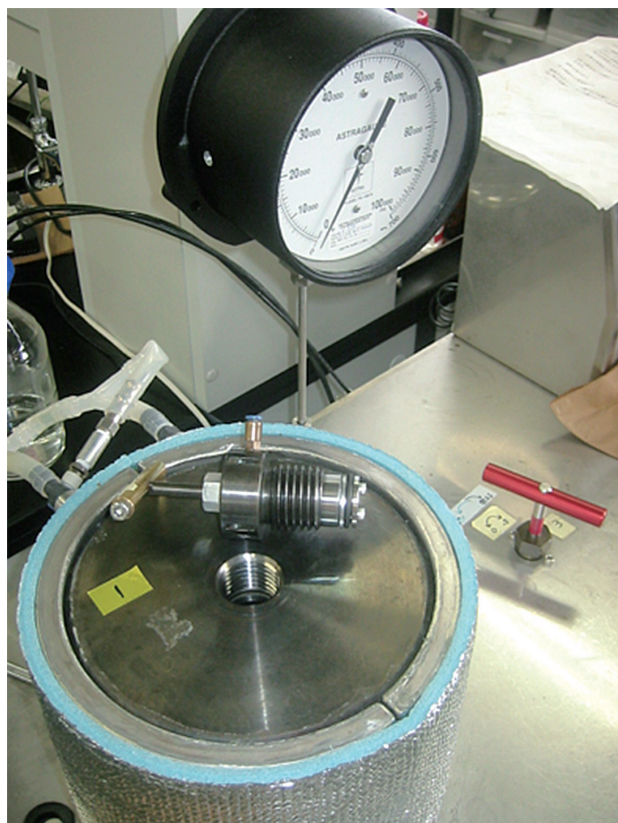
現在は消毒剤メーカーと協同で、様々な消毒成分を配合することで、ノロウイルスに有効な消毒剤の開発を行っている。キッチンでも安心して使える組成であること、皮膚に使えること、それに加えて一般の細菌にも有効であることが目標である。



培養細胞を使った消毒力の測定
生き残った細胞が紫に染まっている

3) 高圧技術の安全性の検証

高圧技術の食品加工への応用を目標にした新潟県のプロジェクトに、新潟薬科大学から我々を含む3研究室が参画している。1)で述べた高圧による発芽促進もその一環であるが、もうひとつの大きな研究課題は、高圧加工の安全性の検証である。高圧をかけることにより発癌物質のようなものが新たに生成される可能性はほとんどない、というのが世界的な認識である。しかし一般消費者の「安心」への疑念に応える必要がある。そこで、製品化を予定している高圧加工食品をマウスに食べさせ、細菌や動物細胞に与えてその安全性を検証している。



超高压装置 円筒の中心の空間を6000気圧まで
加圧することができる

4) HACCPの研究と普及

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point, 危害要因分析と必須管理点) は、食品を安全に製造する手法である。近年、国際的な食品安全への関心の高まりから義務化する国が増え、様々な国際機関が認証を行っている。それに伴い、HACCP自体が変容してきている。我々はその動向を注視するとともに、遅れている日本での普及を促進したいと考えている。

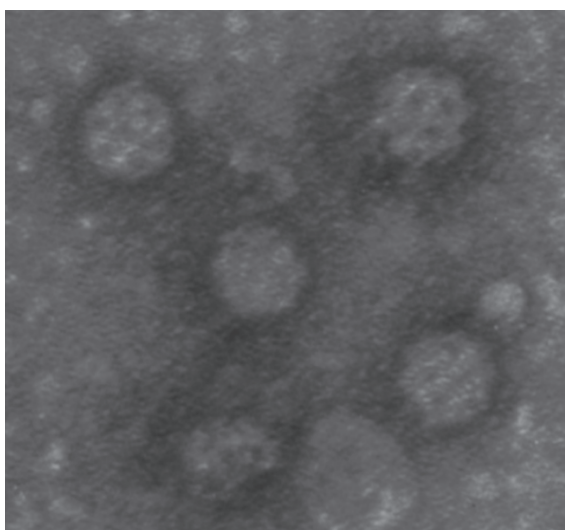
2013年の研究成果

1) 米に含まれる孢子形成菌の制御因子

有効成分は複数あり、ひとつはオリゴ糖であると推定された。もうひとつの成分についても検討中である。この成分は培地だけでなく、食品に加えても抗菌力を発揮することが示され、食品添加物として用いる可能性が開けた。

2) ウイルスに有効な消毒剤の開発

ノロウイルスは培養できないため、近縁のネコカリシウイルス (FCV) がその代替として、広く用いられてきた。近年、ヒトノロウイルスにより近縁なネズミノロウイルス (MNV) が発見された。我々もこれら2種のウイルスを使い消毒剤耐性の比較を行っている。ノロウイルスへの有効性を謳っている市販の消毒剤を比較したところ、主張通りの効能があるものだけでなく、有効性が疑わしいものも見出された。FCVには有効だが、MNVには有効性の低いものもあり、これは消毒剤が酸性であるためと考えられた。なぜなら、FCVは気道感染するウイルスであるが、MNVはヒトノロウイルスと同様に胃を通過して感染するため、酸性環境に耐性があると考えられるからである。また、MNVは感染させる宿主細胞の細胞密度など培養条件で見かけに感染価が変化するという扱い難さがあることが判明した。



ネコカリシウイルス

3) 高圧技術の安全性の検証

高圧技術で生産された製品に微細な米粉がある。この米粉を汚染していることが懸念されるいくつかの食中毒細菌を、高圧により不活化できる条件を見出した。

高圧による発芽誘発での孢子形成細菌の制御を試みた結果、高圧処理を行うときにアミノ酸を添加することで、より効率よく孢子を発芽せること

が可能になった。そしてアミノ酸の種類により効果に大きな差があることも分かった。また、発酵食品にも発芽誘発があることを認め、そこに含まれるアミノ酸だけでは、効果の強さが説明できず、他にも発芽誘発作用を持つものがあることが示唆された。

4) HACCPの研究と普及

HACCPは全米食品微生物諮問委員会と国連機関のCodexがガイドラインを定めているが、実際の運用には様々な方法がある。その中で影響力の大きい米国での実施方法が変化し始めている。これは米国が想定しているHACCPの国際化とそれに伴う米国内での全食品への義務化に合わせたものである。このような変化も踏まえて、食品企業への啓蒙活動を行い、企業へのコンサルティングも行った。

HACCPは大規模な食品工業を想定して作られたシステムであり、飲食業や惣菜・弁当製造に適用するには、改変が必要である。これまでもいくつかの改変が提案されてきたが、それらを比較し新たな方法を提案すべく研究を行っている。

Research projects and annual reports

The most serious threat in food safety is not pesticide residue, radioactive substances nor food additives, but pathogenic microorganisms. Our studies therefore focus on protection of foods from the microorganisms.

1) Controlling the heat-resistance of bacterial spores.

Some bacteria produce a resistant form of the cells called “spores.” The spores are highly resistant to heat. *Clostridium botulinum* produces toxins in foods, one gram of which kills millions of humans and their spores are the most heat-resistant among the pathogenic bacteria. Temperature as high as 120°C is needed to kill the spores. We, however, found some factors in foods to reduce the heat-resistance. The spores are

killed 1,000 times faster when cooked with rice than when heated in water. We are seeking the factor(s) in rice to know the mechanism reducing the heat-resistance.

The spores germinate when pressurized at several hundred mega Pascals in some conditions. The germinated spores lose their heat-resistance and are easily killed at cooking temperature. We found that nutrient conditions are important for germination under the pressure. Controlling the germination of the spores, we could prepare long shelf life foods without harsh heating.

2) Development of sanitizers effective against norovirus.

Approximately one out of 40 Japanese are infected with norovirus every year. One of the reasons for this serious number of infections is a lack of effective sanitizers. We already found the effectiveness of sodium hypochlorite at a concentration lower than 5 ppm. It used to be thought that hypochlorite was effective only when the concentrations are higher than 100 ppm.

We are developing effective sanitizers by dispensing several ingredients in a cooperative study with a company. Our goal is sanitizers that can be used in safety in a kitchen and used for human skins.

Because Human norovirus cannot be cultivated in vitro, feline calicivirus (FCV) and murine norovirus (MNV) are widely used as surrogates. We examined commercially available sanitizers that claim effectiveness on human norovirus. Some were effective enough to inactivate FCV and MNV, but some were not. One sanitizer showed significant difference between the effectiveness against two viruses provably because of its acidic pH. MNV is more resistant in acidic environment than FCV, because MNV infects through stomach, but FCV through the respiratory tract. This suggested that MNV is a better surrogate for human norovirus that also infect through the digestive tract. However MCV changed its apparent infectivity depending on the

condition of host cells, such as cultivation density.

3) Validation of safety of high pressure treatment of foods.

We are involved in a grant-in-aid project for utilization of the high pressure technology of food industries. Our participation is a validation of safety of pressurized foods. Though toxic substances such as carcinogens are not likely to occur if foods are pressurized, it will be required to confirm the safety when the pressurized foods will be on the market. We are feeding the foods to mice and cultivating bacteria and animal cells with extracts of the foods.

4) Research and education of HACCP

HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) is known as the most useful tool to produce safe foods. The number of the countries is increasing that mandate food industries to adopt HACCP, and several international organizations require safety control by HACCP for international food trade. We keep a research of HACCP that appears to change.

HACCP was originally developed for food industries. It is therefore required some changes to be adopted to food services, such as restaurants and catering. FDA published a modification of HACCP system to the food service settings, however it is still difficult for small scale food services to utilize HACCP. We compare modified HACCP systems proposed by the others than FDA, and are trying to propose another modification of HACCP system.

発表論文

1. Transovarial transmission rates of *Orientia tsutsugamushi* in naturally infected *Leptotrombidium* colonies by immunofluorescent microscopy. H. URAKAMI, K. OKUBO, H. MISUMI, M. FUKUHARA and M. TAKAHASHI. Med. Entomol. Zool. 64(1): 43-46, 2013.

2. Prevalence of *Orientia tsutsugamushi* in trombiculid mites (Acari: Trombiculidae) in the endemic area of tsutsugamushi disease in Japan, with the determination of vector mites. Misumi, H., H. Urakami, S. Nakajima, S. Yamamoto, K. Takahashi, and M. Takahashi Ann. Rep. Ohara Hosp. (大原総合病院年報) .52: 35-59. 2013.

著書および総説

1. 石森 崇晃, 浦上 弘, 2013/6月, 重松 亨, 西海理之監修「進化する食品高圧加工技術—基礎から最新の応用事例まで—」第2章・第1節「超高圧殺菌に影響を及ぼす因子」, pp197-212, (株)エヌ・ティー・エス刊.
2. 浦上 弘 (監修) 2013/7月, 「惣菜工場のHACCP管理」, (社)日本惣菜協会刊.
3. 浦上 弘 (監修) 2013/7月, 「惣菜工場の衛生管理」, (社)日本惣菜協会刊.
4. 小長谷幸史, 「温度管理と微生物～食中毒予防のために～」月刊HACCP 2014年1月号
5. 藤井 建夫 編著, 小長谷幸史, 「食品微生物学の基礎」(13章 微生物の実験 分担) (講談社サイエンティフィック栄養士テキストシリーズ)

招待講演, シンポジウム等

小長谷幸史: 飯島藤十郎記念食品科学振興財団学術講演会, 招待講演「米のペプチドによるボツリヌス菌の制御」(11月22日)

その他特記事項

1) 外部資金

受託/共同研究 (民間)

浦上 弘: 3件

その他研究費

小長谷幸史: 一般財団法人東和食品研究振興会
研究助成金「添加物あるいは照射による包装米飯中のボツリヌス菌胞子の制御」

2) 特許出願

特願2014-047452号「二枚貝におけるウイルス不活化方法」発明者: 浦上 弘 他
出願人: 学校法人新潟科学技術学園新潟薬科大学, 民間企業

3) 学外活動

学外活動 (公的機関)

浦上 弘:

1. 新潟市「食の安全基本方針見直し検討委員会」(議長)
2. 新潟県「にいがた食の安全安心審議会」(委員)

小長谷幸史:

1. 日本HACCPトレーニングセンター 理事

学外活動 (その他)

浦上 弘:

1. 放送大学学園・面接授業「食品安全の基礎」, 2013/6/1-2 (新潟)
2. 新潟バイオリサーチパーク(株)「品質管理業務実務者講習会」講師, 2013/6/28, 8/30 (新潟)
3. 新潟薬科大学・高大連携・生命科学講座, 2013/8/25
4. 日本HACCPトレーニングセンター主催・第30回HACCPコーディネーター・ワークショップ 講師, 2013/9/11-13, 発明学会ビル (東京)
5. 日本HACCPトレーニングセンター主催・第14回Train-the-trainer/HACCP Course 副講師, 2013/11/13-15, HOTEL ゆうぽうと (東京)

6. 日本HACCPトレーニングセンター主催・第
6回HACCP Verification and Validation Course 講
師, 2014/2/19-21, HOTEL ゆうほうと (東京)

7. 日本HACCPトレーニングセンター主催・第
31回HACCPコーディネーター・ワークショッ
プ 講師, 2014/3/12-14, 発明学会ビル (東京)

8. 日本HACCPトレーニングセンター (理事長)

9. 新潟県総合生活協同組合「組合員の声反映に
向けた有識者会議」(議長)

10. 日本惣菜協会「惣菜管理士試験」(委員)

11. 新潟バイオリサーチパーク(株)・食品安全
サービス事業部 (顧問)

12. H・P未来産業創造研究会 (顧問)

小長谷幸史：

1. 新潟県立高田高校バイオ実習(12月23～24日)

2. 上越地区高校訪問 (7月4日・12月5日)

3. 新潟県立巻総合高校出張講義 (4月5日)

4. ノロウイルス対策講座 (補助) (2月9日)

応用糖質化学研究室

Laboratory of Applied Glycochemistry

■ 教授 鰐 坂 勝 美 Prof. Katsumi AJISAKA, Ph.D.

■ 助教 宮 崎 達 雄 Assist. Prof. Tatsuo MIYAZAKI, Ph.D.



有機化学と酵素化学の技術を駆使して、糖質を合成し、その機能研究を行う。



・ 糖ペプチド ・ ミルクオリゴ糖 ・ 抗酸化活性 ・ 擬似糖 ・ シアル酸転移酵素

研究概要

生体内には、単糖を構成単位として鎖のように繋がった「糖鎖」と呼ばれる物質が、タンパク質や脂質に結合して存在しており、ヒト細胞の表面はその糖鎖で覆われている。そして、これら糖鎖は、細胞が細胞同士もしくは細胞外物質とコミュニケーションを図るときにリガンドとして機能し、ウイルスの感染、癌の転移、炎症、発生、分化、老化などのさまざまな生命現象に関わっていることが知られている。当研究室では、この「糖」をキーワードとして、酵素や微生物などの生物学的手段、あるいは有機化学的な変換や改造といった工学的手段を利用し、ヒトに役立つ物質を創る研究に取り組んでいる。

1. 糖質の機能解析および利用を目指した研究

糖質にはいろいろな生理機能が知られており、その代表的なものの一つに、抗感染機能がある。また最近注目されている機能として抗酸化機能がある。そこで本研究室では、これらの機能解析を行い実用化することを目的として、抗感染機能に関してはウシ初乳中のオリゴ糖を用いて研究を行っている。また抗酸化活性に関する研究材料としては、硫酸基を有する多糖であるコンドロイチ

ン硫酸を用いて研究を行っている。

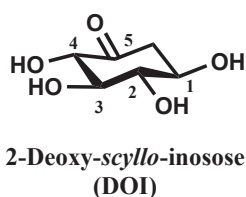
2. 海洋性細菌由来のシアル酸転移酵素の基質特異性の解明研究

シアル酸を有する糖鎖（シアロシド）は、インフルエンザウイルスの感染、コレラ毒素の細胞内侵入などさまざまな生命現象に関わる分子である。そのため、これまでに天然型・非天然型を問わずさまざまな種類のシアロシドが合成されてきた。それらの合成法のうち、最も簡単なものがシアル酸転移酵素を利用した手法であるが、本手法は酵素の基質特異性が厳密であるため合成可能なシアロシドが天然型に限られるという欠点を有していた。そこで我々は、近年、海洋性細菌から発見された幅広い基質特異性を有することが期待されていたシアル酸転移酵素に注目し、その基質特異性の解明研究に着手した。

3. 2-デオキシ-scyllo-イノソース（DOI）を原料としたカルバ糖の系統的合成法の開発

カルバ糖とは天然型の単糖の環酸素原子がメチレン基に置換された化合物であり、この擬似単糖は、ピラノース環に比べて化学的に強固なシクロヘキサン環をもつため酵素的な糖代謝反応の基質とはならず、またメイラード反応に代表される非

酵素的糖化反応も起こさないで、*in vivo*において非常に優れた安定性を有するミミック分子である。そのため、糖関連酵素の機能を解明する上での分子ツールと成りえる化合物である。しかしながら、効率的にグラムスケールにて合成可能なカルバ糖は数例しか報告されていない。そのため当研究室では、組換え大腸菌により数百グラムスケールでの合成が可能となったDOIを前駆体として、系統的なカルバ糖およびカルバ二糖の合成研究を展開している。



2013年度の研究成果

1) ミルクオリゴ糖の感染阻害研究

ウシ初乳中からオリゴ糖を分離して、それを中性糖画分と酸性糖画分に分けて、それらのオリゴ糖画分の抗感染活性について調べるために、浦上教授と共同研究を行った。その結果、両画分ともにサルモネラ菌の腸管内皮細胞への付着を抑えることを確認した。

2) コンドロイチン硫酸の抗酸化活性に関する研究

コンドロイチン硫酸の抗酸化活性が、硫酸基のカウンターイオンを変化させることによって大きく変化することを再確認することができた。

3) 海洋性細菌由来の α 2,3-シアル酸転移酵素のユニークな基質特異性の解明

一般的に、 α 2,3-シアル酸転移酵素は受容体に対して厳密な基質認識を有しているため、合成できるシアロシドが限定される欠点を有している。しかしながら、我々が用いている海洋性細菌 (*Photobacterium* sp.) 由来の α 2,3-シアル酸転移酵素は非常にユニークな基質特異性を有しており、これまでに、マンノース残基やイノシトール

類を受容体基質として認識し、シアリルマンノースやシアリルイノシトールが合成できることを見出してきた。そこで、本年度は、典型的な受容体であるガラクトース残基の3位と4位のヒドロキシ基の立体配置に相当する1,2-*cis*-ジオール構造を有する3種類のカルバ糖 (カルバ- β -D-Gal, カルバ- β -D-Man, カルバ- α -D-Glc) に対するシアル酸転移反応を検討した。その結果、これら全てが基質として認識されることが判明し、シアリル- α 2,3-カルバ- β -D-Gal, アリル- α 2,1 β -カルバ- β -D-Man, シアリル- α 2,2-カルバ- β -D-Glcの合成を達成した。

4) 6-O-アセチル-カルバ- β -D-グルコースのランダムピバロイル化反応によるカルバ糖の合成研究

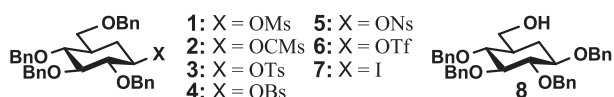
近年、代謝工学的改変を施した組換え大腸菌を用いることにより、2-デオキシ-scyllo-イノソース (DOI)が大量生産可能となった。DOIは、4つのヒドロキシ基を有するシクロヘキサノン誘導体であり、カルバ糖の合成前駆体として最適な化合物である。本年度は、DOIから高収率にて合成できる6-O-Ac-カルバ- β -D-Glcをランダムピバロイル化することで一挙に数種類の部分保護体を合成し、その後、種々のカルバ糖へ導く合成法を検討した。6-O-Ac-カルバ- β -D-Glcを原料としてランダムピバロイル化反応の条件を種々検討した結果、ピリジン中、80℃で10当量のPivClを作用させると、一挙に3種類のtri-O-Piv体 (1,2,3-tri-O-Piv体, 1,2,4-tri-O-Piv体, 1,3,4-tri-O-Piv体) が合成できることがわかった。これらの部分保護体を鍵化合物として、カルバ- β -D-Gal, カルバ- β -D-All, カルバ- β -D-Manの合成を達成した。

5) 高濃度条件下におけるカルバグルコース同士のカップリング反応を用いたジカルバ- β -D-イソマルトースの合成

アセタールやヘミアセタール構造をもたないジカルバグルコビオースは、グルコシダーゼによる加水分解反応やメイラード反応を起こさないた

め、優れた安定性をもつ新規糖鎖リガンドである。それゆえ、これらの擬似二糖は、*in vivo*において糖鎖の機能を解明するための分子ツールとしての利用が期待されている。優れた安定性をもつ新規糖鎖リガンドとして期待されている。しかしながら、これまでにカルバ糖同士を繋ぐ効率的な反応は見出されていない。そこで、カルバ- β -D-グルコース同士が繋がったジカルバ- β -D-イソマルトースをターゲットとして、カップリング反応を検討した。

カルバ- β -D-グルコースを原料として、カルバグルコース供与体1～7とカルバグルコース受容体8を合成した。その後、得られた化合物に対してクラウンエーテル存在下、NaHを作用させカップリング反応を試みた。種々検討した結果、トリフレート体6と受容体8を高濃度条件下、0℃にて反応させることにより、ジカルバ- β -D-イソマルトース保護体を得ることに成功した(47%)。その後、脱保護することでジカルバ- β -D-イソマルトースの合成を達成した。



Research projects and annual reports

1. Study of milk oligosaccharide for use as anti-infection materials.

Oligosaccharides isolated from bovine colostrum were separated to neutral and acidic oligosaccharide fractions. Both fractions of neutral and acidic oligosaccharide were confirmed to inhibit the *Salmonella* to attach to Caco-2 cells *in vitro*.

2. Antioxidant activity of chondroitin sulfates.

The antioxidant activity of chondroitin sulfate was reconfirmed to vary with the difference of its counter ion on the sulfate group.

3. Elucidation of unique substrate specificity of the marine bacterial α 2,3-sialyltransferase

Generally, the α 2,3-sialyltransferase has strict substrate specificity toward an acceptor. Therefore, the sialosides could be synthesized in enzymatic method were natural type in most cases. However, the marine bacterial α 2,3-sialyltransferase from *Photobacterium* sp. JT-ISH-224 that we utilize has had very unique substrate specificity. For instance, it recognized a mannose residue and several inositols as an acceptor substrate and the sialyl mannose and several sialyl inositols were synthesized.

Therefore, in this year, we examined α 2,3-sialyltransferase reaction toward three kinds of carbasugar (carba- β -D-Gal, carba- β -D-Man, carba- α -D-Glc), which had 1,2-cis-diol structure corresponding to the 3- and 4-position of the galactose residue that is a typical acceptor. As a result, all of carbasugars were recognized by α 2,3-sialyltransferase. The synthesis of sialyl- α 2,3-carba- β -D-Gal, sialyl- α 2,1- β -carba- β -D-Man and sialyl- α 2,2-carba- β -D-Glc were achieved.

4. Synthetic study on carbasugars by utilizing the random pivaloylation of 6-O-acetyl-carba- β -D-glucose

Recently, the production of 2-deoxy-*scyllo*-inosose (DOI) in practical scale was accomplished by the bioconversion using metabolically engineered *E. coli*. DOI which is cyclohexanone derivative having four OH groups is suitable as a precursor of carbasugars. In this year, we attempted to the synthesis of carbasugars featuring the random pivaloylation of 6-O-Ac-carba- β -D-Glc, by which partially protected products are obtained at a time.

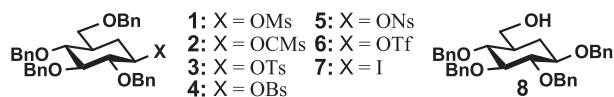
As a result that reaction conditions of random pivaloylation of 6-O-Ac-carba- β -D-Glc, which was easily synthesized from DOI in practical scale, were optimized, three kinds of tri-O-Piv derivatives (1,2,3-tri-O-Piv, 1,2,4-tri-O-Piv, 1,3,4-tri-O-Piv)

were obtained at a time under these condition that used 10 equiv. of PivCl in pyridine at 80°C. Then, we achieved synthesis of carba- β -D-Gal, carba- β -D-All, and carba- β -D-Man from these three partial protected compounds.

5. Study of the synthesis of dicarba- β -D-isomaltose by using a coupling reaction between two carba- β -D-glucoses under high concentration condition

Dicarbaglucobioses, having no acetal and hemiacetal structures are very stable compounds under both hydrolysis and glycation conditions. Therefore these disaccharide mimics are expected to utilize as molecular tools to elucidate the function of oligosaccharides *in vivo*. However the reported coupling reaction between two carbasugars are inefficient. Therefore, we attempted to the optimization of the reaction conditions for coupling between carbaglucose donor and acceptor, and the synthesis of dicarba- β -D-isomaltose.

First, carbaglucose donors 1-7 and carbaglucose acceptor 8 were synthesized from carba- β -D-glucose as a starting material. Next, the coupling reaction between carbaglucose donors and acceptor were attempted by using NaH and 15-crown-5 ether. As a result, we found that the coupling reaction between triflate 6 and acceptor 8 under high-concentration condition at 0°C is gave the coupling product at 47% yield. By deprotection of benzyl groups of dicarbaglucobiose derivative, we achieved synthesis of the carba- β -D-isomaltose.



学会発表

国内学会

- 分子間カップリング反応による5a,5a'-ジカルバ- β -D-グルコビオースの合成研究：館田

尚家, 宮崎 達雄, 鰐坂 勝美：第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム（新潟）2013年5月18日

- エンド型酵素を利用したO-結合型糖ペプチド合成における新規糖供与体：鰐坂 勝美, 五十嵐和也, 釜田 崇志, 関川 雄基, 宮崎 達雄, 川崎 寿, 夏目 亮, 中松 亘：第32回日本糖質学会年会（大阪）2013年8月5日～7日

- カルバグルコースを構成糖とする擬似二糖の合成研究：宮崎 達雄, 館田 尚家, 鰐坂 勝美：第7回東北糖鎖研究会（新潟）2013年9月27日～28日

- コンドロイチン硫酸のカウンターイオンの違いによる抗酸化活性の変化：鈴木 康弘, 鰐坂 勝美, 宮崎 達雄：第7回東北糖鎖研究会（新潟）2013年9月27日～28日

- エンド型糖加水分解酵素を利用したO-結合が多糖ペプチド合成反応における新規二糖供与体：五十嵐和也, 関川 雄基, 鰐坂 勝美, 釜田 崇志, 宮崎 達雄, 川崎 寿, 夏目 亮, 中松 亘：第7回東北糖鎖研究会（新潟）2013年9月27日～28日

- 高濃度条件下での分子間カップリング反応によるジカルバグルコビオースの合成：館田 尚家, 宮崎 達雄, 鰐坂 勝美：日本農芸化学会2014年度大会（東京）2014年3月27日～30日

- Carba- β -D-glucoseの乳がん細胞に対する抗腫瘍効果についての研究：酒巻 利行, 酒井 哉, 五十嵐 優, 中島 志帆, 佐藤 浩二, 鰐坂 勝美, 宮崎 達雄：日本薬学会第134年会（熊本）2014年3月27日～30日

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

若手研究 (B)

課題名：カルバ糖を基盤としたヒト型擬似糖鎖の
系統的合成法の開発

研究代表者：宮崎 達雄

私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(文部科学省)

「薬」「食」融合研究による次世代型機能性食品
開発基盤の確立と、その医療・健康指導への応用
のための実践拠点形成(研究分担者) 研究課題「擬
似糖質を基盤とした感染症治療薬の開発」 鯉坂
勝美, 宮崎 達雄 (研究代表者：小西 徹也)

その他研究費

1. JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援
プログラム (A-STEP) フィージビリティスタ
ディ【FS】ステージ

研究課題：「病原菌と結合するオリゴ糖結合
ビーズの研究基材および生活用品への利用」

研究代表者：鯉坂 勝美

2. NEDO委託事業 非可食性植物由来化学品製
造プロセス技術開発「木質バイオマスからの各
種化学品原料の一貫製造プロセスの開発」

研究分担者 (新潟薬科大学)：高久 洋暁, 宮
崎 達雄, 山崎 晴丈

2) 学外活動

学会活動

鯉坂 勝美：日本農芸化学会 (関東支部参与),
日本糖質学会, 日本応用糖質科学会, 日本食糧栄
養学会, キチン・キトサン学会

宮崎 達雄：日本糖質学会, 日本農芸化学会, 有
機合成化学協会, FCCA (Forum of Carbohydrate
Coming of Age), 第65回有機合成化学協会関東支
部シンポジウムの世話人, 第7回東北糖鎖研究会

の世話人

3) その他

2013年度「生命科学」講座「紅茶から生理活性
成分『カフェイン』を取り出そう！」

化学研究室

Laboratory of Chemistry

■ 教授 新井 祥生 Prof. Yoshifusa ARAI, Ph.D.



アルキルコバロキシム錯体の固相反応の研究及び天然物化学に関する研究



・アルキルコバロキシム錯体 ・固相反応 ・X線結晶構造解析
・天然物化学 ・生理活性

研究概要

1) アルキルコバロキシム錯体の固相反応の研究

嵩高い平面配位子を有するアルキルコバロキシム錯体の結晶に空气中で可視光を照射すると空气中の酸素と反応して酸素挿入錯体が生成する。平面配位子や反応基上の置換基を変えることでその反応性を制御し、酸素以外の気体状小分子と反応させて固相－気相反応で炭素－炭素結合形成反応を開発することを当面の目標としている。

2) 天然物化学

ダチョウの脂肪や葛より抗菌活性及び抗酸化活性を指標として新規生理活性物質の単離を目的とする。

2013年度の研究成果

1) アルキルコバロキシム錯体の固相反応の研究

平面配位子に4-フルオロフェニルグリオキシムを有する錯体を合成した。その中で、反応基としてナフチルエチル基を有する錯体では固相で可視光を照射したところ、空气中の酸素と反応した酸素挿入錯体を高収率で得た。

2) 天然物化学

ダチョウ脂の抽出物において、脂肪酸トリグリセリドよりやや高極性分画に抗菌活性を有する分画を得たが、活性本体を単離することはできなかった。

Research projects and annual reports

1) Solid-state reaction of alkylcobaloxime complexes

Alkylcobaloxime complexes coordinated with di (4-fluorophenyl) glyoximes reacted with oxygen in solid-state and oxygen insertion products were obtained.

2) Bioactive natural products

The antimicrobial activity was found from the extract of fat of ostrich.

学会発表

国内学会

アルキルコバロキシム錯体と気体状小分子の固相－気相反応，高橋 麻実，笠原えれな，山口 晃弘，川本 美咲，新井 祥生，大胡 恵明，第65回有機合成化学協会関東支部シンポジウム（新潟シンポジウム），要旨集p.48-49（新潟，2013年5月）

その他特記事項

1) 外部資金

受託／共同研究（民間）

新井 祥生：1 件

その他研究費

公益財団法人内田エネルギー科学振興財団 試験研究費助成（課題名「アルキルコバロキシム錯体と気体状小分子の固相-気相反応」）

2) 社会的活動

学会活動

日本化学会，同 有機結晶部会，日本結晶学会，有機合成化学協会，日本農芸化学会

学外活動（公的機関）

新潟県立新津高等学校学校評議員

学外活動（その他）

教員免許更新講習講師，北信越工業化学教育研究大会第46回大会講演講師，新潟県立新潟南高等学校SSH「SSI臨地研修」事前指導講師，新潟県立新潟南高等学校SSH「SSI臨地研修」講師，新潟県立新津工業高校インターンシップ（デュアルシステム）受け入れ指導，新潟県立長岡農業高校本学見学時の説明