

Niigata University of
Pharmacy and Applied Life Sciences
Faculty of Applied Life Sciences
Annual Research report 2014

新潟薬科大学
応用生命科学部

研究年報 2014

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	9
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	39
栄養生化学研究室	43
食品・発酵工学研究室	49
食品安全学研究室	59
食品酵素学研究室	65
化学研究室	69

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.

■ 准教授 伊藤 美千代 Associate 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) 非アルコール性脂肪肝予防法の研究



・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。特に酸化ストレスによる細胞死を抑制するタンパク質として知られているTCTPの作用機構を調べる。

3) 非アルコール性脂肪肝予防法の研究

非アルコール性脂肪肝は、過食などにより肝臓にトリグリセリド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。

2014年度の研究成果

1) スフィンゴ糖脂質生理機能の解明

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。私たちは昨年度2種類のグルコシルセラミド合成酵素阻害物質を見出している。この内1種類は、転写因子STAT3の阻害剤として報告されている化合物であり、グルコシルセラミド合成酵素の阻害剤としては、新規の構造を有していた。そこで、この化合物を中心に分析を行った。この化合物のグルコシルセラミド合成酵素活性に対する IC_{50} 値は $7.3 \mu M$ だった。B16細胞を、この化合物で1時間処理した後、細胞内脂質を分析した結果、グルコシルセラミド量は減少しなかったが、セラミド量が増加した。これらの結果は、この化合物が、細胞内のグルコシルセラミド合成酵素に対しても阻害作用を持つことを示している。この化合物は、セラミドを増加させて細胞死を誘導する可能性があるの

で、多剤耐性がん細胞のユニークなリード化合物になる可能性がある。

2) 細胞死抑制遺伝子の解析

私たちは以前、細胞死抑制タンパク質である TCTP が、過酸化水素による細胞死を抑制することを明らかにしている。TCTP が細胞死を抑制する仕組みは、既に幾つか報告されている。しかしながら私たちは、未だ明らかにされていない仕組みがあるという予備的な実験結果を得ている。そこで、今年度は、HEK293T 細胞で TCTP を高発現させ、シグナル分子のリン酸化のレベルが変化するかどうかを調べた。実際の実験では、動物細胞発現ベクターに組み込んだ TCTP cDNA を HEK293T 細胞にトランスフェクションして、一過性発現させた後、細胞を回収して Western blot 法で解析した。その結果、幾つかのシグナル分子で、リン酸化のレベルが変化することが明らかになった。現在、TCTP がどのようにこれらのタンパク質のリン酸化を制御しているか調べている。

3) 非アルコール性脂肪肝予防法の研究

非アルコール性脂肪肝は肝臓細胞に脂肪滴が過剰に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、食品及び化合物の探索を行ってきた。実験では、マウス肝臓がん細胞株 Hepa1-6 を高濃度のオレイン酸存在下で 1 晩培養することにより、非アルコール性脂肪肝と類似の脂肪滴を形成させた。この時、評価を行う植物、食品抽出液または化合物を添加し、脂肪滴形成が抑制されるかどうかで評価を行った。形成された脂肪滴は、細胞を固定した後、Oil Red O で染色して可視化した。今年度は、脂肪滴形成を抑制する化合物を中心に研究を行った。以前の研究で既に脂肪滴形成抑制能を持つことが知られている 4 種類の化合物について分析を行った。その結果、3 種類の化合物は細胞内の脂肪滴を減少させるだけでなく、トリグリセリドの量も減少させた。これらの化合物は全てリン酸化酵素の阻害

剤であり、リン酸化酵素が脂肪滴形成に関係している可能性が示唆された。

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 in glycosphingolipid (GSL) synthesis. The overexpression of ceramide glucosyltransferase is one of the causes of multi-drug resistance of various cancer cell types. In the last year, we identified two novel ceramide glucosyltransferase inhibitors. One of the inhibitor had been known as a transcription factor STAT3 inhibitor. This inhibitor had a novel structure as a ceramide glucosyltransferase inhibitor. Thus, we focused on this inhibitor and analyzed its properties. The IC_{50} value of this inhibitor against ceramide glucosyltransferase was $7.3 \mu M$. B16 cells treated with the inhibitor for 1h did not reduce the glucosylceramide content. In contrast, an increase in ceramide content was observed. These results indicate that the inhibitor has ability to inhibit ceramide glucosyltransferase activity in the cells. Thus, derivatives of this inhibitor could provide unique lead compound for cancer treatment, because this inhibitor might elevate ceramide levels and induce death in multi-drug resistant cancer cells.

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

We have previously found that TCTP known as a protein that suppresses cell-death could also inhibit hydrogen peroxide-induced cell death. Although several mechanisms of TCTP's anti-cell death activities have been reported so far, our preliminary results suggest the presence of novel mechanisms that have not been studied previously. Thus, in this year, we over-expressed TCTP in HEK293T cells and examined phosphorylation labels of signal proteins. The TCTP

cDNA in a mammalian expression vector was transfected into HEK293T cells and TCTP was expressed transiently. The transfected HEK293T cells were harvested and subjected to Western blot analyses. The analyses detected alteration of phosphorylation levels of several signal proteins. The mechanism how TCTP control phosphorylation states of each signal protein is now under examination.

3) Studies for preventing nonalcoholic fatty liver disease

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

We have tested plant and food extracts, and chemical compounds for inhibitory effect on the lipid droplet formation in cultured liver cells. A mouse hepatoma cell Hepa1-6 cells were cultured overnight in the medium with high concentration of oleic acid and a sample (a plant or food extract, or a chemical compound) 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 focused on chemical compounds that can prevent the lipid droplet formation. Four compounds tested positive for inhibition of lipid droplet formation induced by oleic acid. In addition, three out of four compounds reduced triglyceride contents in the cells. Most of these compounds have been known as their inhibitory activity against phosphokinases. This fact suggests that phosphokinases are involved in lipid droplet formation.

学会発表

国際学会

1. Tomohiro Takahashi, Yuya Takiguchi, Kento Takizawa Wataru Sugawara, Tatsuya Nagashima, Asari Okonogi, Naoto Kawaguchi, Takanori Tsutsumi, Michiyo Nagano-Ito and Shinichi

Ichikawa, Characterization of plant and food extracts that inhibit fatty liver. International Conference on Food for Health in Niigata 2014, 10月30日, 朱鷺メッセ, 新潟
(発表者: 市川 進一)

国内学会

1. Hikaru Katano, Kousuke Sato, Ryo Imai, Satomi Niino, Yoshio Hirabayashi, Michiyo Nagano-Ito, Shinichi Ichikawa, STAT3 inhibitor WP1066 also inhibits ceramide glucosyltransferase
第37回日本分子生物学会年会
演題番号: 【2P-0087】 11月26日, パシフィコ横浜 (発表者: 市川 進一)

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: 西田 浩志)

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)

市川 進一:

新発田高校SSH運営指導委員

秋葉区産官学連携地域交流講座「食べ物から考える肝臓の健康」

伊藤美千代：

秋葉区まちなか活性化事業委員

新潟県立高田高等学校高大連携事業・バイオテクノロジー実習講座「遺伝子機能の可視化と遺伝子産物の抽出～形質転換による大腸菌のGFP産生とその抽出～」

遺伝子発現制御学研究室

Laboratory for Gene Regulation Study

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

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



アンチセンスRNAを用いて細菌の遺伝子発現を制御する方法の開発やその応用に関する研究



・ 小分子機能性アンチセンスRNA ・ 遺伝子発現制御 ・ トキシン-アンチトキシン
・ 大腸菌 ・ 次世代シーケンシング

研究概要

1. 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*遺伝子ユニットおよび*symER*遺伝子ユニットの発現制御機構についての研究を行う。また, トキシンタンパク質の機能解析を行う。

2. 大腸菌を用いた, 人工アンチセンス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やその応用について研究を行う。

3. 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。

4. 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。さらに, 年齢の異なるヒト脳において発現している小分子RNAのプロファイルを生物情報学的解析により調べる。

2014年度の研究成果

1. 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。さらに, アンチセンスRNAである*RdlD* RNAは*ldrD* mRNAと結合し*ldrDX*の翻訳を抑制していることを明らかにした。

2. 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を基準に, 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。今回構築したプラスミドを用いて、バイオフィーム形成や遺伝子修復に関与する遺伝子の発現抑制を試みた。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。

3. 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。さらに、精子特異的に存在する小分子RNAを発見し、これらは初期胚の細胞核の中で安定に存在することがわかった。

4. 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。その内の1つであるmiR-664a上に生じた編集は、ACA36 snoRNAと成熟miR-664aの生合成経路を変化させる可能性があることを示した。

Research projects and annual reports

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

We constructed a pAZ3-*ldrD* plasmid carrying *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 is revealed that *ldrDX* which locates upstream of *ldrD* is important for expression of *ldrD* toxin. We also indicate that RdID RNA represses the translation of *ldrDX* through base-pairing.

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

We developed a novel gene silencing system that 24-nt antisense RNAs induced from an arabinose-inducing promoter plasmid for regulating *lacZ* and *phoA* genes simultaneously. We showed that the silencing was not dependent on Hfq RNA chaperon protein. We carried out gene silencing assay by using the plasmid to repress translation of genes which involved in biofilm formation and replication repair. This inducible knockdown system can be used for functional study of bacterial essential genes, which are not possible with knockout analyses.

3. 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. Two of them were highly enriched in sperm and detectable exclusively in germ cells. Designated 'spR-12 and -13' for 'sperm RNAs', they are encoded in a piRNA locus on chromosome 17. After fertilization, they were maintained in low copy numbers in the egg and the dividing blastomeres. A strict nuclear localization was evidenced by microinjection of fluorescence-tagged RNAs into the male pronucleus of one-cell embryos. While, under these conditions, other small RNAs such as microRNAs were immediately excluded from the nucleus and disappeared within the first hour after microinjection, spR-12 and spR-13 were partitioned between the male and the female pronuclei. Stably maintained during the

preimplantation period, they were equally distributed between blastomeres at cell division, remaining strictly localized in the nucleus until the blastocyst stage at which they were not detectable.

4. 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.

The adult brain library does not appear to hold any strong editing sites in the pre-miRNA hairpin, while the infant brain library holds at least three miRNAs (let-7b, mir-664a, and mir-421). We suspect the potential editing sites from fpRNA and ppiRNA may represent vestiges of editing events in pri-miRNA transcripts; suggesting some small fraction of edited pri-miRNA transcripts may be still be processed by the RNAi machinery. The vestige presence of U-tailing in some mature miRNAs might represent an analogue, as it is clear that at least a small number of U-tailed premiRNAs are processed by DICER.

発表論文

1. Ninomiya S*, Kawano M*, Abe T*, Ishikawa T*, Takahashi M, Tamura M, Takahashi Y, Nashimoto M. Potential small guide RNAs for tRNase ZL from human plasma, peripheral blood mononuclear cells, and cultured cell lines. PLoS One. 2015 Mar 2;10(3):e0118631. doi: 10.1371/journal.pone.0118631. eCollection 2015. PubMed PMID:25730316; PubMed Central PMCID: PMC4346264.

*These authors contributed equally to this work.

2. Takahashi M, Elbarbary RA, Watanabe N, Goto A, Kamiya D, Watabe Y, Uchiyama T, Narita M,

Takahashi M, Takahashi Y, Ishihara N, Miyazawa T, Yoshida T, Kawano M, Tamura M, Nashimoto M. Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. Leuk Res. 2014 Jul;38(7):808-15. doi: 10.1016/j.leukres.2014.03.021. Epub 2014 Apr 5. PubMed PMID: 24768135.

学会発表

国際学会

1. Kawano M, Type I toxin-antitoxin systems in *Escherichia coli*
OMICS Group Conferences, 2nd International Congress on Bacteriology and Infectious Diseases
DoubleTree by Hilton Hotel, Chicago-North Shore, USA, 2014年11月18日 (招待講演)

国内学会

1. 川野 光興, 藤田 翔太, 石本 巧, 津森 豊
オペロン型小分子アンチセンスRNAを用いた
遺伝子発現制御法の開発
第37回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜,
2014年11月27日 (ポスター発表)
2. 川野 光興, 石本 巧, 水吉 智彦, 橋本 兼吾
toxin-antitoxin遺伝子システムldr/rdlにおける遺
伝子発現制御機構
日本農芸化学会2015年度大会, 岡山大学,
2015年3月28日 (口頭発表)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (C)

課題名: マイクロRNA前駆体におけるRNA編集
部位の解析

研究代表者：川野 光興

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

2）学外活動

学会活動

川野 光興：日本生物工学会, 日本分子生物学会,
日本農芸化学会

学外活動（その他）

川野 光興：出張講義 村上中等教育学校

公開シンポジウム「Structured ncRNA 研究への前
哨」親子をつなぐRNAの秘密

千葉工業大学（習志野）

大阪市立大学肝臓研究セミナー「次世代シーケ
ンス解析による新規機能性小分子RNAの探索」大
阪市立大学医学部（阿倍野）

生物機能化学研究室

Laboratory of Chemical Biology

■ 教授 石 黒 正 路

Prof. Masaji ISHIGURO, Ph.D.

■ 准教授 宮 崎 達 雄

Associate Prof. Tatsuo MIYAZAKI 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 ・ 糖質化学

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用い研究を進めている。

1) 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) の一つである。本研究は、1) この受容体に作用するステロイド誘導体 (ベルチノール A) および、構造類縁体 (アルゲロサイドアグリコン、イラストロール、ペンタリノサイドアグリコン) それぞれの合成、2) 合成した化合物の B1R に対する活性試験、3) 活性試験をもとにしたコンピュータシミュレーション、を行い、機能構造解析を行うことを目的とする。

2) 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。本研究は、1) ゴミシンNの合成経路の開発、2) 標的タンパク質の解明、3) 放射線ラベル化されたゴミシンNを用いた結合ドメインの解明、4) コンピュータシミュレーションおよび結晶構造解析によるゴミシンNとタンパク質との結合様式の解明、を目的とする。さらに、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。

3) ミラクリンの甘味修飾作用の機構解析

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。本研究は、1) コンピュータシミュレーションを用いたpHの違いによる両タンパク質の構造変化の予測および甘味修飾機構の解明、2) 新機能を有する甘味タンパク質の創成、を目的とする。

4) カルバ糖を有する糖鎖ミミック分子による生物活性制御

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、相当する天然

型の単糖と非常に近い立体構造を有する。また、カルバ糖は、天然型単糖のピラノース環部分が、より化学的に強固なシクロヘキサン環に置き換わっているため、酵素による糖代謝分解反応やメイラード反応に代表される非酵素的糖化反応を起こさない特徴をもつ。そのため、カルバ糖は生体内において優れた安定性を有する糖ミミック分子として機能する。本研究は、これら特異な性質をもつカルバ糖の系統的な合成法を開発するとともに、その特徴を応用し、1) カルバ糖による近視の薬物治療法の開発、2) カルバ糖鎖を利用したヒト型糖鎖抗体生産法の開発、3) カルバ糖による癌細胞増殖抑制効果の検討などを目的とする。

2014年度の研究成果

1) ブラジキニンB1受容体の機能解析

昨年までに、ベルチノールAおよび、その類縁体である、アルゲロシドアグリコン、イラストロールAの合成に成功している。本年度は、残された類縁体であるペンタリノサイドアグリコンの合成に着手した。その結果、ベルチノールAを合成する際に開発した合成経路を利用することで効率的に合成できることを見出し、標的化合物全ての合成を完了した。

2) プロティンキナーゼATRの分子認識機構

ゴミシンNの不斉合成に関しては、昨年度までに完了していたため、本年度は、開発したゴミシンNの合成経路を利用し、放射線ラベル化されたゴミシンNの合成を検討した。具体的には、14位のメチルオキシ基がフェノール性水酸基に置き換わっているゴミシンN前駆体に対し、 ^{14}C ラベル化されたヨウ化メチルを水素化ナトリウムの存在下作用させ、放射活性ゴミシンNの合成に成功した。

3) ミラクリンの甘味修飾作用の機構解析

ネオクリンWTのMD計算を行った結果、構造変化の大きい部位は、甘味受容体と相互作用する

と考えられる酸性サブユニット(NAS)のPro103, Leu106および塩基性サブユニット(NBS)のAsn44を含む領域を構成するループ部位であった。結晶構造から、この領域はもう一つのネオクリンのPro103, Leu106およびAsn44を含む領域と接しており、この“PLNインターフェース”を介したネオクリン分子の会合が甘味受容体との結合領域をブロックする構造となっていると推測した。そこで、結晶構造を構成するネオクリン四量体について10nsのMD計算を行った結果、酸性においてNBSのHis11を含むインターフェースでの解離が生じ、続いてPLNインターフェースの構造変化が生じ、PLNインターフェースでの解離が促進され単量体となることが示された。これによって受容体結合に重要とされるPro103, Leu106およびAsn44が露出し、甘味受容体との結合が可能となり、甘味物質として機能するのではないかと結論付けた。

4) カルバ糖を有する糖鎖ミミック分子による生物活性制御

カルバ糖の種類と癌細胞増殖抑制効果の相関を検討するために、各種カルバ糖を合成した。当研究室で確立した手法により、2-デオキシ-scyllo-イノソース(DOI)から7工程で得られる6-O-アセチル-カルバ- β -D-グルコースを原料として、ランダムピバロイル化反応を試みた。その結果、一挙に三種類のtri-O-Piv体を良好な収率にて得ることができた。[1,2,3-tri-O-Piv体(36%), 1,2,4-tri-O-Piv体(24%), 1,3,4-tri-O-Piv体(24%)]。次いで、1,2,3-tri-O-Piv体の4位OH基をトリフレート化し、さらに*in situ*にて3位Piv基を分子内で求核攻撃させることにより、ガラクト型の1,2,4-tri-O-Piv体を合成することに成功した(84%)。その後、脱保護することで、カルバ- β -D-ガラクトースへ導いた(11工程, 14%)。さらに、得られたガラクト型の1,2,4-tri-O-Piv体の3位OH基にトリフレート基を導入後、ギ酸セシウムによる反転反応、脱保護することで、カルバ- β -D-グルコースを合成した(11工程, 10%)。また、上記と同様の合成ルートにより、1,2,4-O-tri-

Piv体と1,3,4-tri-O-Piv体の1対1混合物を原料として、カルバ-β-D-アロース(12工程, 4.2%)とカルバ-β-D-マンノース(12工程, 3.8%)をそれぞれ合成することができた。

Research projects and annual reports

1) *Synthesis of Steroidal Bradykinin Receptor Ligands*

We completed the syntheses of bradykinin B1 receptor(B1R) antagonist velutinol A, a *seco*-pregnane with a cage-like framing in DEF rings, argeloside aglycon, and illustrol, the analogs of velutinol A, last year. Thus, we have been focusing on the synthesis of pentalinonside aglycon, the remaining *seco*-pregnane congener to be synthesized, since last year. After the unfruitful investigations, we realized that utilization of the 14,15,16-triol derivative, the intermediate for the synthesis of velutinol A, enables us to access pentalinonside aglycon effectively. Evaluation of the biological activity of the argeloside aglycon, illustrol, and pentalinonside aglycon is now under investigation.

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

Since enantio-selective total synthesis of gomisin N, dibenzocyclooctadiene type lignin, was accomplished last year, we investigated the preparation of radio (¹⁴C)-labeled gomisin N for elucidating the binding domain of gomisin N in ATR in this year. Thus, after 14-O-demethyl gomisin N, the precursor of radio (¹⁴C)-labeled gomisin N, was synthesized by utilizing the synthetic route to gomisin N, the precursor was treated with ¹⁴C-labeled MeI in the presence of NaH to afford ¹⁴C-labeled gomisin N. Determination of the gomisin N-binding domain of ATR is now under investigation.

3) *Structural Basis of pH Dependence of Neoculin, a Sweet Taste-Modifying Protein*

We have been investigating the molecular mechanism

of the pH dependent sweetness of neoculin by molecular dynamics(MD) calculations. The MD calculations for the dimeric structures of neoculin and His11 mutants showed no significant structural changes for each monomer at neutral and acidic pH levels. However, the dimeric structure of neoculin dissociated to form isolated monomers under acidic conditions while it was maintained at neutral pH. On the other hand, the dimeric structure of the His11Ala mutant, sweet at both neutral and acidic pH, dissociated at both pH 3 and 7. The His11 residue is located in close proximity to the Asp91 residue of the other monomer of the dimer. The MD calculations for the dimeric structures of His11Phe and His11Tyr mutants demonstrated that the dimeric structures was maintained at neutral pH and dissociated to the isolated monomers. The dissociation of the dimer caused a flexible backbone at another dimeric surface. The MD calculations on the tetrameric structure of neoculin found in the crystal structure suggested that the dissociation of the dimer affect the further dissociation at the other dimeric interface under acidic conditions. These results suggest that His11 plays an important role in the formation of oligomeric structures at pH 7 and that the isolated monomer of neoculin at acidic pH is responsible for its sweetness.

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

Recently, we examine a cancer cell increase suppressant effect of the carbasugars, in which the ring oxygen atom of the parent sugar has been replaced by a methylene. Therefore, in this year, we attempted to synthesize the various carbasugars featuring the random pivaloylation of 6-O-Ac-carba-β-D-Glc, which is easily synthesized from 2-deoxy-scylo-inosose(DOI) over 7 steps. As a result that reaction conditions of random pivaloylation of 6-O-Ac-carba-β-D-Glc were optimized, three kinds of tri-O-Piv derivative were obtained at a time in good yield

[1,2,3-tri-O-Piv (36%), 1,2,4-tri-O-Piv (24%), 1,3,4-tri-O-Piv (24%)]. After triflation of 1,2,3-tri-O-Piv derivative, the protected carba- β -D-Gal was obtained via intramolecular nucleophilic attack of 3-O-Piv group to the C-4 atom with triflate group. By the removal of the protective groups, the synthesis of the carba- β -D-Gal was accomplished in the 14% yield over 11 steps from DOI. Additionally, 1,2,4-tri-O-Piv-Gal derivative, which was synthetic intermediate of carba- β -D-Gal, was triflated, followed by inversion at C-3 with Cesium formate to give the carba- β -D-Gul derivative. After deprotection, the carba- β -D-Gul was obtained in the 10% yield over 11 steps. Furthermore, the synthesis of carba- β -D-All and carba- β -D-Man were achieved from mixture of 1,2,4-tri-O-Piv derivative and 1,3,4-tri-O-Piv derivative (1/1) in similar to synthetic route of carba- β -D-Gal described above (4.2% over 12 steps, 3.8% over 12 steps, respectively).

発表論文

1. A. Noguchi, M. Horikawa, J. Murata, M. Tera, Y. Kawai, M. Ishiguro, T. Umezawa, M. Mizutani, E. Ono; Mode-of-action and evolution of methylenedioxy bridge forming P450s in plant specialized metabolism. *Plant Biotechnology*, 31, 2014, 493-503
2. M. Tamiya, N. Isaka, K. Ishizawa, M. Ikeda, M. Ishiguro; Total Synthesis of 2,6-Dideoxy-3-methylpyranosyllustrol, a Seco-norpregnaneglycoside from *Mandevilla illustris*, *Chemistry Letters*, 43, 2014, 1704-1706

学会発表

国際学会

1. Tatsuo Miyazaki, Ban Kanami, Toshiki Mine, Hitomi Kajiwar, Katsumi Ajisaka and Takeshi Yamamoto; Enzymatic Synthesis of a Novel Sialoside Analogues for Prevention of Viral Infection; 6th International Conference on Food for Health in

Niigata 2014, October 30-31, 2014

国内学会

1. 井坂 修久, 田宮 実, 北澤 貴明, 石澤 和也, 長谷川篤志, 池田 舞由, 石黒 正路
Velutinol A及び関連天然物の合成研究
日本薬学会第135年会 2015年3月25日-28日
(神戸学院大学)
2. 大久保崇之, 中嶋健一郎, 伊藤 啓祐, 三坂 巧, 阿部 啓子, 田宮 実, 石黒 正路
味覚修飾タンパク質の酸による甘味発現機構の解析 第42回構造活性相関シンポジウム
2014年11月14日 (くまもと森都心プラザ)
3. 井坂 修久, 田宮 実, 石澤 和也, 池田 舞由, 石黒 正路
2,6-Dideoxy-3-O-methylpyranosyllustrolの全合成 有機合成化学協会関東支部 新潟シンポジウム 2014年11月29日 (新潟大学)
4. 田宮 実, 眞柄 良平, 近 恵, 土屋 裕徳, 熊倉 美佳, 五十嵐久未, 中川 悠貴, 石黒 正路
ATR阻害剤ゴミシンNの全合成 有機合成化学協会関東支部 新潟シンポジウム 2014年11月29日 (新潟大学)
5. 吉田 侃史, 坂口 雄樹, 前田 悠貴, 伊藤 祐介, 鰐坂 勝美, 宮崎 達雄
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; 第33回 日本糖質学会年会, 名古屋, 2014年8月10日~12日
6. 館田 尚家, 鰐坂 勝美, 宮崎 達雄
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グルコビオースの合成研究; 第33回 日本糖質学会年会, 名古屋, 2014年8月10日~12日

7. 宮崎 達雄, 吉田 侃史, 坂口 雄樹, 前田 悠貴, 鰐坂 勝美
カルバ-β-D-グルコースを原料としたカルバ糖類の合成; 第8回東北糖鎖研究会, 岩手, 2014年10月10日~11日

8. 館田 尚家, 鰐坂 勝美, 宮崎 達雄
カルバグルコース同士のカップリング反応における供与体保護基の影響; 日本農芸化学会2015年度大会(岡山) 2015年3月26日~29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: 田宮 実

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, 「擬似糖質を基盤とした感染症治療薬の開発」宮崎 達雄(研究代表者: 西田 浩志)

その他研究費

新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO), 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」(再委託先)
研究分担者: 宮崎 達雄

2) 学外活動

学会活動

石黒 正路: 日本薬学会構造活性相関部会常任幹

事, 日本薬学会医薬化学部会世話人

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

学外活動(その他)

石黒 正路:

1. 公益財団法人食の新潟国際賞財団理事
2. 新潟市国家戦略特区推進協議会委員
3. 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 審査専門評価委員
4. 国立研究開発法人科学技術振興機構(JST) A-STEP専門委員
5. 文部科学省 科学技術・学術政策研究所科学技術動向研究センター調査委員

宮崎 達雄:

1. 2014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!」
2. 「農学・バイオ系」分野の説明会(日本文理高校)

田宮 実:

1. 上智大学 COEセミナーでの講演

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、植物に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、有望系統の育成支援を行っている。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、国立研究開発法人農研機構 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) オオムギの重要農業形質に関する研究

オオムギは六条オオムギと二条オオムギに大別され、国内では六条オオムギは主に精麦用・麦茶用・味噌用等に、二条オオムギはビール用・焼酎用等に利用される。本研究ではこのうち六条オオムギについて、その主産地である北陸地域等の寒冷地・多雪地向けに、実需者から新規需要のある新需要オオムギ品種及び高品質精麦用オオムギ品種を2品種以上育成し、広域普及させることを目

的とし、越冬性や病害抵抗性といった重要農業形質のDNAマーカー選抜による新需要オオムギ品種育成支援を行っている。

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、安定多収品種育成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型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型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。

2014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。これまでに、国立研究開発法人 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により、本変異体の原因となる候補遺伝子の絞り込みに至っている。

2) オオムギの越冬性に関する研究

長野県および北陸研究センターで育成された有望系統（合計252系統）について、DNAマーカーを用いた秋播性遺伝子 *Vrn-H2*、うどんこ病抵抗性遺伝子 *mlo* 及び *Mla*、縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* の選抜支援を行った。秋播性遺伝子 *Vrn-H2* に関するDNAマーカーを用いた解析から、長野県農試育成系統144系統のうち105系統及び北陸研究センター育成系統108系統のうち44系統が秋播性として判定された。うどんこ病抵抗性遺伝子 *mlo* については、評価したすべての系統が罹病性型として判定された。うどんこ病抵抗性遺伝子 *Mla* については、長野県農試育成系統48系統及び北陸研究センター育成系統56系統が抵抗性型として判定された。縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* については、長野県農試育成系統22系統及び北陸研究センター育成系統48系統が抵抗性を示す *rym5* 型として判定された。長野県農試育成系統6系統及び北陸研究センター育成系統2系統は、秋播性でうどんこ病と縞萎縮病の抵抗性型遺伝子を併せ持っていた。

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みな機構であり、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、自家不和合性変異体(TPIB)の分子遺伝学的解析を行い、変異の原因が雄性側に働く遺伝子の変異に起因することを明らかにした。

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) DNA marker-assisted selection of important agronomic traits in barley

Marker-assisted selection (MAS) provides opportunities for enhancing the response from selection because molecular markers can be applied at the seedling stage, with high precision and reductions in cost. This study leverages the breeding data of 252 barley breeding lines evaluated in 2 field trials for marker-assisted selection of major disease resistance and chilling requirement genes.

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.

4) A dimorphic self-compatible mutant in *Fagopyrum esculentum* that could be mediated by breakdown of dominance relationships between self-incompatibility pollen part alleles

Self-incompatibility (SI) is an important reproductive system that prevents self-pollination in numerous flowering plants. In buckwheat (*Fagopyrum esculentum*), dimorphic flowers, (short-styled and long-styled flowers) are associated with a type of SI named heteromorphic SI, and two alleles (S and s alleles) at *SELF-INCOMPATIBILITY* complex locus (S locus) are thought to regulate the dimorphic flower morphs and intra-morph SI response. A spontaneous self-compatible mutant, *TPIB*, was isolated from common buckwheat breeding lines. A spontaneous SC mutant, *TPIB*, was able to be self-pollinated in only thrum flower morphology that shows heterozygous for the S locus (Ss) even though unable to be in pin (ss) morph. To maintain the *TPIB*, self-pollination was performed, showed a pollination response and seed set comparable to those normally observed in compatible crosses between dimorphic SI plants. Because of thrum shows heterozygous for the S locus (Ss), two selfed progeny lines, *TPIB1* and *TPIB2* were used for further analyses to investigate the mode of inheritance of the SC trait and the flower morphology. In *TPIB1* total 19 selfed progeny plants were segregated 13 thrum plants and 6 pin plants. Studies on self-compatibility showed that all thrum plants were self-compatible but all pin plants were self-incompatible. Tested against an expected ratio of 3 : 1, $\chi^2 = 0.158, P < 0.750$ and to ratio of 2 : 1, to a 2 : 1 ratio, $\chi^2 = 0.007, 0.900 < P$. In *TPIB2* total 31 plants were showed 20 thrum plants and 11 pin plants, identically to *TPIB1* all

20 thrum plants were self-compatible but 11 pin plants were self-incompatible. The segregation corresponds to a 3 : 1 ratio, $\chi^2 = 1.301, P < 0.500$ and to a 2 : 1 ratio, $\chi^2 = 0.005, 0.900 < P$. In order to clarify whether SC of thrum plants in *TPIB* was caused by loss of S function in pollen or style, or recombination in the S allele, reciprocal and cross-pollination test were performed between *TPIB2* (thrum and pin) and the SI c. v. Koto (thrum and pin). When the SI c. v. Koto pollens were used for as paternal, all the legitimate cross, thrum $\times$ pin or pin $\times$ thrum, were cross-compatible but cross-incompatible in illegitimate cross. By contrast, when the SC *TPIB2* thrum pollens using as paternal all cross pollination were compatible, but the pollens from pin of *TPIB* were showed same manner as SI c. v. Koto as described in above. These results indicate that *TPIB* is caused by a loss of function of pollen part of gene.

発表論文

1. 「A dwarf mutant, *d34*, of buckwheat is caused by a loss of function of a C-6 oxidase in brassinosteroid biosynthesis」 Taketo Funaki, Jotaro Aii, Kaoru Yamamoto, Mamiko Sakai, Kenta Nishi, Mio Nagano, Clayton Campbell, Suguru Takatsuto, Ichiro Honda, Noboru Hiraoka, Hiroshi Tanaka
Fagopyrum Vol. 32, (2015)
2. 「新規な自家不和合性機構解明への挑戦」 掛田 克行, 佐々 英徳, 土屋 亨, 相井城太郎
育種学研究 16: 53-60 (2014)

学会発表

国内学会

1. 「RNA-seq解析によるソバ異形花型自家不和合性の雄性因子の探索」 相井城太郎, 佐藤 真吾, 田巻 茜, 長野 美緒, キャンベル クレイトン, 安井 康夫, 森 正之, 大田 竜也, 田中 宥司 第126回日本育種学会, 宮崎, 9

月26・27日，2014年

2. 「*de novo*アセンブリ配列を用いたダッタンソバ半矮性変異体*sda*の原因遺伝子候補の探索」

中野 絢菜，森下 敏和，鈴木 達郎，清水 明美，相井城太郎，田中 宥司 第126回日本育種学会，宮崎，9月26・27日，2014年

3. 「イオンビーム照射由来ダッタンソバ半矮性変異体*sdb*の次世代シーケンサーを用いた変異解析」

小森 美佳，中野 絢菜，橋本 瑛司，船木 武人，森下 敏和，鈴木 達郎，清水 明美，相井城太郎，田中 宥司 第126回日本育種学会，宮崎，9月26・27日，2014年

4. 「低フィチン酸イネ突然変異体の特性と遺伝学的解析」

中村 勇輝，東 みく，山際 由夏，矢頭 治，相井城太郎，田中 宥司 第126回日本育種学会，宮崎，9月26・27日，2014年

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

研費基盤 (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

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

グリインフォー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：西田 浩志)

受託／共同研究(民間等)

田中 宥司：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

課題名：新たな実需ニーズに応える寒冷地・多雪地向け新需要大麦品種等の育成と普及

共同研究者：相井城太郎

2. 応用生命科学部共同研究奨励費

課題名：超高圧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

研究代表者：田中 宥司

3. 応用生命科学部共同研究奨励費

課題名：科学的根拠に基づく薬草の栽培管理技術の開発

研究代表者：相井城太郎

4. 総合研究大学院大学研究費特別支援

課題名：タデ科ギシギシ属植物における性決定の分子機構

研究分担者：相井城太郎

2) 社会的活動

学会活動

田中 宥司：日本農芸化学会会員，日本育種学会会員，日本技術士会会員

相井城太郎：日本育種学会，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. 高校教員免許更新講義講師
5. 新潟県立加茂農林高校評議員会委員
6. 新潟市農業活性化総合センター 薬草研究委員会委員
7. 日本技術士会生物工学部会会委員
8. 上信越育種セミナー世話役
9. 新津ロータリークラブ会員，定例会講師
10. 秋葉区町中活性化部会委員

相井城太郎：

1. 上信越育種セミナー世話人
2. 日本育種学会第128回講演会組織委員
3. 食と花の世界フォーラム案内人
4. Breeding Science 英文査読（1報）
5. Fagopyrum 英文査読（1報）
6. Euphytica 英文査読（1報）

7. 新潟県民FM「hiro&hiroの新潟ステキ☆プロダクション」ラジオ出演

8. 新津ロータリークラブ定例会講師

環境工学研究室

Laboratory of Environmental Engineering

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

■ 准教授 小 瀬 知 洋 Associate 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 ・ リスク ・ 起源解析 ・ 環境動態 ・ 再資源化

研究概要

I. 自動車内装部材中の難燃剤の分布とその曝露評価

自動車の内装部材には道路運送車両法により難燃性材料の使用が義務付けられており、シート布地やシートウレタンなどの一部内装部材においてジエチレングリコールビスジ2-クロロイソプロピルホスフェートなどの難燃剤による防炎加工が施されている。一部の有機臭素系難燃剤が家電製品からダストへ移行し、ダストを経由して人に曝露されることが知られており、車内環境において同様に難燃剤の移行及び曝露が考えられる。

そこで車内環境における有機リン系難燃剤の曝露を評価するために、使用済み自動車の乗用部分に面する内装部材、座面のダスト及び床面のダストを採取し、PFRsの内装部材における難燃剤成分の分布とそこからダストへの移行を検討した。

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、ヘキサシクロブロモドデカンも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、分子量が大きいと揮発性が低く、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，病害虫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。

2014年度の研究成果

Ⅰ．自動車内装部材中の難燃剤の分布とその曝露評価

自動車内装材及び車内ダストの採取を実施し，内装部材のXRF分析および各種難燃剤の定量分析を行った。この結果，有機臭素系難燃剤および有機リン系難燃剤の含有傾向が明らかとなり，リン系では特に含塩素有機リン系難燃剤が主体であることが確認された。加えて含塩素縮合リン酸エステル類難燃剤であるDEG-BDCIPPが複数の部材から%オーダーで含有されており，難燃化目的での使用が明らかとなった。

車内ダスト中からいくつかの難燃剤の含有が確認された。特に含塩素リン酸トリエステル類においては内装部材中濃度とダスト中濃度に相関が見られ，内装部材からダストへの移行が確認された。

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

廃プラスチック中に含まれる難燃剤成分が，古紙廃プラ固形燃料（RPF）の製造工程などのリサイクル工程において加水分解する事が確認された。加水分解の結果，有害性の高いフェノール類の生成が確認されたほか，リン酸エステル結合が部分的に加水分解した中間生成物の生成が確認された。

Ⅲ．水田に散布された農薬の挙動

水田に空中散布された除草剤ピラクロニル，プロピリスルフロン，及びメタゾスルフロン，殺虫剤ジノテフラン，並びに殺菌剤チオファネートメチルについて，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。これらの農薬の水田からの流出率と水田における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 . Distribution and behavior of organophosphorus flame retardants from in vehicles interior.

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 interior materials could be derived from recycled raw materials through material recycle process. Some low molecular weight PFRPs transfer from interior materials to cabin dusts

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

Hydrolysis of condensed phosphoric ester flame retardants (CPFRs) in waste plastic was observed during recycle process such as RPF production process. As a result of the hydrolysis, preparation of phenols and intermediates was observed.

III . Behavior of pesticides applied to paddy fields

Behavior of herbicides pyraclonil, propyrisulfuron, and metazosulfuron, an insecticide dinotefuran, and a fungicide thiophanate-methyl 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 from the paddy fields and the mean half-lives of the target pesticides 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 . Sayako Yokoyama, Masataka Ito, Shunsuke Nagasawa, Masayuki Morohashi, Masaki Ohno, Yukitaka Todate, Tomohiro Kose and Kuniaki Kawata*: Runoff and Degradation of Aerially Applied Dinotefuran in Paddy Fields and River. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 94,796-800 (2015).
- 2 . Hidenori MATSUKAMI, Tomohiro KOSE, Mafumi WATANABE, Hidetaka TAKIGAMI: Pilot-scale incineration of wastes with high content of chlorinated and non-halogenated organophosphorus flame retardants used as alternatives for PBDEs, Science of The Total Environment, 493, 672-681 (2014).

学会発表

国際学会

- 1 . Natsuko KAJIWARA, Hidetaka TAKIGAMI, Tomohiro KOSE, Go SUZUKI, Shin-ichi SAKAI: Bominated flame retardants and related substances in the interior materials and cabin dusts of end-of-life vehicles collected in Japan, 34th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants, Madrid, Spain (2014).

国内学会

1. 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 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縮合リン酸エステル類難燃剤の分解挙動, 第23回環境化学討論会, 3A-15, 京都 (2014)
2. 鈴木まゆみ, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 大野 正貴, 奥田 哲士, 中井 智司, 西嶋 渉, 川田 邦明: 釧路川流域における溶存有機物質の挙動, 第23回環境化学討論会, 1E-10, 京都 (2014)
3. 鈴木まゆみ, 永井 千尋, 小瀬 知洋, 川田 邦明: 信濃川水系, 新津川の底質中における金属の分布, 第23回環境化学討論会, P-185, 京都 (2014)
4. 鈴木まゆみ, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 梶原 夏子, 鈴木 剛, 滝上 英孝, 酒井 伸一, 川田 邦明: 自動車内装部材に含まれる有機リン系難燃剤の分布特性, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 広島 (2014)
5. 田村 沙貴, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 滝上 英孝, 川田 邦明: RPF 製造工程における縮合リン酸エステル類難燃剤の加水分解挙動, 第25回廃棄物資源循環学会研究発表会, 広島 (2014)
6. 横山沙也子, 高橋 明訓, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 川田 邦明: 水田地域を流域とする河川水中の農薬濃度の変動, 日本陸水学会甲信越支部第40回研究発表会, 長野 (2014)
7. 鈴木まゆみ, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 大野 正貴, 奥田 哲士, 中井 智司, 西嶋 渉, 川田 邦明: EEM 法を用いた糞便由来汚染指標の開発と河川水への適用, 日本陸水学会甲信越支部第40回研究発表会, 長野 (2014)
8. 横山沙也子, 戸舘 侑孝, 小瀬 知洋, 川田 邦明: 水田に散布された農薬の挙動及び河川水に対する影響, 第49回日本水環境学会年会, 石川 (2015)
9. 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起源とその指標に関する検討, 第49回日本水環境学会年会, 石川 (2015)
10. 田村 沙貴, 小瀬 知洋, 滝上 英孝, 川田 邦明: RPF 加熱冷却処理における縮合リン酸エステル類難燃剤の加水分解生成物の検討, 第49回日本水環境学会年会, 石川 (2015)
11. 松縄 泰天, 小瀬 知洋, 滝上 英孝, 酒井 伸一, 川田 邦明: 車内環境における内装部材からダストへの有機リン系難燃剤の移行, 第49回日本水環境学会年会, 石川 (2015)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

若手研究 (B)

課題名: 自動車内装材に含まれる難燃剤成分の車内挙動及び循環時リスクの評価

研究代表者: 小瀬 知洋

その他研究費

1. 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: 国立研究開発法人国立環境研究所
滝上 英孝

研究分担者: 小瀬 知洋

2. 公益財団法人内田エネルギー財団 試験研究費助成

課題名：新規水稻除草剤プロピリスルフロン・
ピラクロニル施用時の環境負荷挙動

研究代表者：小瀬 知洋

3. 一般財団法人佐々木エネルギー財団 試験研究費助成

課題名：RPF製造工程における原料プラ添加剤由来の環境負荷とその低減

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),
日本水環境学会(第18回シンポジウム実行委員),
日本分析化学会 (関東支部新潟地区部会幹事)

学外活動 (その他)

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：環境計画研究所)水質環境基
準(健康項目)等検討委員会 委員

3. 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

4. 環境省(事務局：化学物質評価研究機構) 化
学物質複合影響評価手法検討調査生態影響評価
分科会 委員

5. 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

6. 新潟県都市計画審議会 委員長

7. 新潟県環境リーダー育成協議会 委員

8. 一般社団法人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

9. 新津第二小学校新津川水質調査への協力 (5
年生)

10. 論文査読 5 編 (英文 1 編, 和文 4 編)

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

3. 新潟青陵大学 非常勤講師 (人の暮らしと環
境)

4. 新津第二小学校新津川水質調査への協力 (5
年生)

5. 新津第二小学校セミナー講師

その他

Natsuko KAJIWARA, Hidetaka TAKIGAMI, Tomohiro
KOSE, Go SUZUKI, Shin-ichi SAKAI: Bominated
flame retardants and related substances in the interior
materials and cabin dusts of end-of-life vehicles
collected in Japan, Organohalogen Compounds 76,
1022-1025(2014)

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 ・フェイズタグ法 ・環境調和型有機合成反応
・再生可能資源 ・天然物合成

研究概要

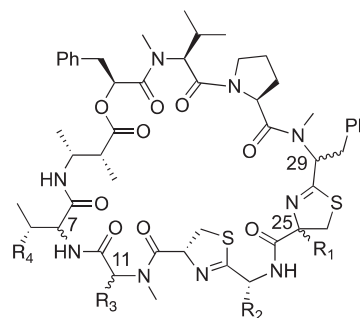
これまでの有機合成は、原料と反応溶媒は枯渇資源の石油由来であるばかりでなく、反応で生じる目的物と副生成物を分離する際に膨大なエネルギーを必要とし、かつ大量の廃棄物が発生していた。しかしながら、持続可能な社会を構築するためには環境に調和した有機合成技術の開発は必須である。このような観点から環境有機化学研究室では、再生可能資源として糖もしくは天然から容易に入手可能なアミノ酸を原料にして、医薬品のリード化合物となる天然物などの有用物質の合成および、これまでに培ってきたフルオラスケミストリーの技術の他、新しい反応場や反応媒体さらには触媒化学の技術を取り込むことによって環境にやさしい（環境調和型）有機合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

2014年度の研究成果

1) 疎水性タグ法を用いるグラッシィペプチド類の合成研究

グラッシィペプチド類（図1）は海洋シアノバクテリアが産生する環状デプシペプチドであり、幾つかのがん細胞に対して抗がん作用を有す

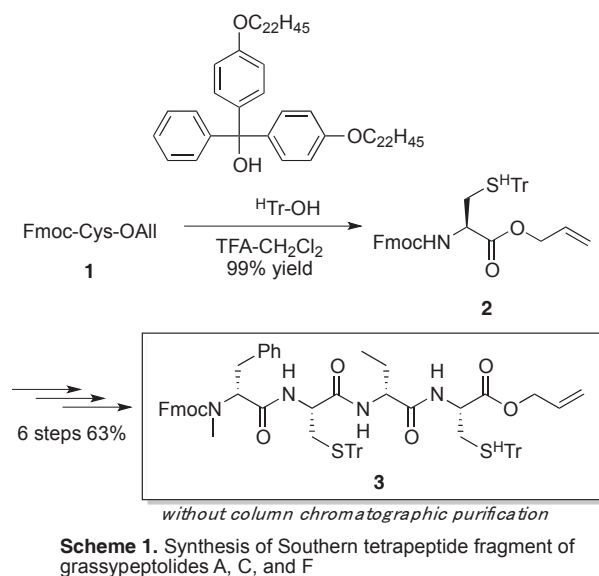
る。我々はグラッシィペプチド類の構造と生物活性に興味を持ち、その全合成を新規な疎水性チオール保護基である4,4'-ビス（ドコシルオキシ）トリチル（^HTr）基を用いて検討した。



grassypeptolide A: 7R,11R,25R,29R, R₁=H, R₂=Et, R₃=*i*-Bu, R₄=OH
grassypeptolide B: 7R,11R,25R,29R, R₁=H, R₂=Me, R₃=*i*-Bu, R₄=OH
grassypeptolide C: 7R,11R,25R,29S, R₁=H, R₂=Et, R₃=*i*-Bu, R₄=OH
grassypeptolide D: 7R,11R,25S,29S, R₁=Me, R₂=Et, R₃=*i*-Bu, R₄=OH
grassypeptolide E: 7S,11S,25S,29S, R₁=Me, R₂=Et, R₃=*i*-Bu, R₄=OH
grassypeptolide F: 7R,11R,25R,29R, R₁=H, R₂=Et, R₃=Bn, R₄=Me
grassypeptolide G: 7R,11R,25R,29R, R₁=H, R₂=Me, R₃=Bn, R₄=Me

Figure 1. Structures of grassypeptolides A-G

Fmoc-Cys-OAll(1)にTFA存在下、4,4'-ビス（ドコシルオキシ）トリチルアルコール（^HTr-OH）を作用させて得られたFmoc-Cys(^HTr)-OAll(2) からグラッシィペプチド類の南半球テトラペプチド(3)の合成を達成した（スキーム1）。^HTr保護合成中間体はアセトニトリルのような極性溶媒により沈殿させて簡単に単離することができた。標的となるテトラペプチド(3)はカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことなく、Fmoc-Cys(^HTr)-OAll(2)から6工程収率63%、純度よく得られた。



2) フェニルエタノイド配糖体アクテオシドの全合成

アクテオシドは、ゴマハノグサ科の植物などから見いだされているフェニルエタノイド配糖体の一種で、アミロイドβタンパク質の凝集を阻害する作用があることが明らかにされ、アルツハイマー病の予防薬として注目されている(図2)。そこで、アクテオシド全合成の検討を結果、2,6-O-メトキシベンジリデン-β-D-グルコピラノシド受容体とL-ラムノピラノース供与体の位置選択的グルコシル化とアクテオシドのケイ皮酸エステル部分の構築のためのクネーフェナーゲル縮合を鍵反応として、その実用的な全合成を達成した(スキーム2)。

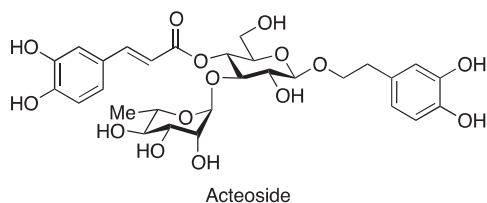
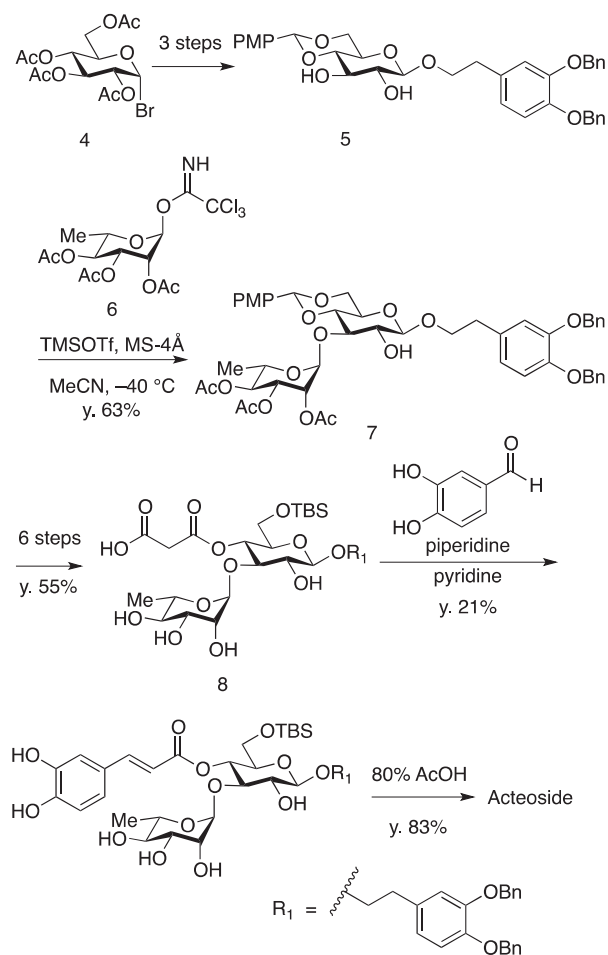


Figure 2. Structure of acteoside



Research projects and annual reports

1) Synthetic studies on grassypeptolides using hydrophobic tag method

A synthesis of a southern tetrapeptide fragment towards the total synthesis of grassypeptolides has been achieved using a new hydrophobic thiol protecting group, 4,4'-bis(dococyloxy)trityl group (^HTr). The synthetic ^HTr protected intermediates were easily isolated by precipitation with polar solvent such as acetonitrile. The target tetrapeptide was obtained in 63 % overall yield and high purity from Fmoc-Cys(^HTr)-OAll (6steps) without column chromatographic purification.

2) Total synthesis of acteoside, a phenylethanoid glycoside

A practical total synthesis of phenylethanoid glycoside, acteoside has been developed. Key reactions are regioselective glycosylation of 4,6-*O*-methoxybenzylidene- β -D-glucopyranoside acceptor with L-rhamnopyranose donor, and a Knoevenagel condensation for constructing of a cinnamic ester moiety of acteoside.

発表論文

1. 3,4-dihydroxybenzalacetone protects against Parkinson's disease-related neurotoxin 6-OHDA through Akt/Nrf2/glutathione pathway, Kei Gunjima, Ryoichi Tomiyama, Ken Takakura, Takashi Yamada, Koji Hashida, Yutaka Nakamura, Tetsuya Konishi, Seiichi Matsugo, Osamu Hori, J. Cell. Biochem. 2014, 115, 151-160.
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

国際学会

1. “Synthetic study of phenylethanoid glycosides using Knoevenagel condensation as a key reaction” Yutaka Nakamura, Masaru Kojima, International Conference on Food for Health in Niigata 2014 (ICFHN2014), P-28, October 30-31, 2014, Niigata, JAPAN

国内学会

1. アクテオシドの全合成, 小島 勝, 中村 豊, 第67回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (横浜シンポジウム), (平成26年 5月17日, 慶應義塾大学矢上キャンパス)

2. クネーフェナーゲル縮合を鍵反応とするフェニルエタノイド配糖体の合成研究, 小島 勝, 中村 豊, 第33回日本糖質学会年会, (平成26年 8月10日~12日, 名古屋大学)
3. 三級および四級不斉炭素を持つ万能型キラルビルディングブロックの合成研究, 林 拓哉, 小笠原 功, 村松 義浩, 赤井 昭二, 小島 勝, 中村 豊, 佐藤 憲一, 第33回日本糖質学会年会, (平成26年 8月10日~12日, 名古屋大学)
4. 疎水性タグ法を用いるGrassypeptolide類の合成研究, 中村 豊, 斎藤 立樹, 石田 京夏, 風間 瑞月, 小島 勝, 第68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), (平成26年11月29日, 30日, 新潟大学五十嵐キャンパス)
5. 糖を原料とする三級および四級不斉炭素を持つ万能型キラルビルディングブロックの合成研究, 林 拓哉, 小笠原 功, 村松 義浩, 赤井 昭二, 小島 勝, 中村 豊, 佐藤 憲一, 第68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), (平成26年11月29日, 30日, 新潟大学五十嵐キャンパス)

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プシペプチドグラッシ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

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（研究代表者：西田 浩志）

2) 特許出願

赤井 昭二, 西田 浩志, 小島 勝, 永塚 貴弘,
佐藤 眞治, 佐藤 憲一, 青島 啓太
抗癌剤
特願：2014-142432, 2014年7月

3) 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（その他）

中村 豊：

1. 新潟県立新津工業高校学校評議員
2. 応用生命科学講座
3. 新潟薬科大学教員免許状更新講習講師(8/20)
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（11/8）長岡技術科学大学

小島 勝：

1. 出張講義（大学講義体験）県立村上高等学校

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.



- ・組換え大腸菌による2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) の高発酵生産
- ・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



- ・ 2-deoxy-scyllo-inosose
- ・ genetic engineering
- ・ oleaginous yeast
- ・ lipid droplet

研究概要

1) 組換え大腸菌による2-deoxy-scyllo-inosose (DOI)の高発酵生産

2-deoxy-scyllo-inosose (DOI) は、*Bacillus circulans* 由来の DOI 合成酵素(*btrC*)により、グルコース-6-リン酸 (G6P) から合成される炭素六員環構造を有する芳香族化合物前駆体である。DOI は、医薬品、化粧品、酸化抑制剤等の原料である 2 価フェノール (ハイドロキノンやカテコール) へ容易に化学変換できるため、化学品の合成に重要な中間原料である。本研究室では、G6P 代謝経路に関与する 3 遺伝子を破壊した大腸菌 GI724Δ*pzp* に *btrC* 遺伝子を導入した株で、フラスコスケールで 30 g/L のグルコースから 29.5 g/L の DOI を 60 時間で発酵生産することに成功している(変換効率およそ 99%)。しかし、実用化へ向け、さらなるDOIの高効率生産が必要であり、①DOI 合成酵素の機能向上、②DOI 生産宿主大腸菌の育種、③培養工学的手法による DOI 生産性の向上による技術強化が必須である。

1) - 1 進化工学的改変による高活性型DOI合成酵素の取得・利用

構築した変異型DOI合成酵素遺伝子ライブラ

リーを導入した形質転換体1107株について、1 次スクリーニング、2 次スクリーニングを実施し、DOI生産性向上に関与する部位を 6 カ所 (E23, L143, L214, S230, W293, M346) 同定した。特にDOI生産性への効果が大きかったW293Rについて調査した結果、総合的に酵素の能力を示す Kcat/Km値が、変異型DOI合成酵素W293R の方が野生型DOI合成酵素よりも 1.56 倍程度大きな値を示した。次に、DOI生産性の上昇が大きかった 2 つの変異型DOI合成酵素L214M, W293R, さらには、2 つの単独の変異を組み合わせた L214M/W293Rをコードする遺伝子を、グルコース-6-リン酸高蓄積株Δ*pzp*株に導入して 3 次スクリーニングを行った。Δ*pzp*/L214M株, Δ*pzp*/W293R株, Δ*pzp*/L214M/W293R株のDOI生産性は、Δ*pzp*/WT株よりもそれぞれ約1.1倍、約1.2倍、約1.3倍と高くなった。次に*in vitro* DOI合成酵素活性測定法を利用して、高DOI生産性を示す変異型DOI合成酵素の比較検討を行った。野生型(WT) 及び 変 異 型DOI合 成 酵 素L214M, W293R, L214M/W293Rの酵素は、Hisタグが付加した組換え蛋白質として生産・精製した。*in vitro* DOI合成酵素活性測定の結果、WTと比較して、L214M は約1.3倍、W293RとL214M/W293R は約1.5倍のDOI合成酵素活性を示した。これらの酵素が有

するDOI合成酵素活性の上昇が、上記したDOI生産性の上昇に繋がっていることが考えられる。

1) - 2 DOI耐性（低感受性）DOI生産宿主の取得・利用

組換え大腸菌によるDOI発酵生産の実用化を考慮すると、5%以上、さらには10%のDOI含有培養液の生産への必要性が考えられる。しかしながら、本研究で利用しているDOI生産宿主の大腸菌GI724ΔPZPは、2% DOIを含む培地において、その生育が半分程度阻害され、また、4% DOIを含む培地においては生育が完全に阻害された。培養液中に高濃度のDOIを生産・蓄積させるためには、DOI耐性株、少なくともDOI低感受性株の開発が必要であった。大腸菌の全遺伝子破壊株コレクションを利用し、DOI耐性・感受性関連遺伝子の探索を行った。大腸菌遺伝子破壊株（3,823株）の6%DOI含有培地におけるDOI感受性試験（1次スクリーニング）を実施した。破壊株コレクションの野生株BW25113のDOI非含有培地の増殖を指標（100%）とし、①6% DOI含有培地の増殖が80%以上の株、及びDOI非含有と6%DOI含有培地の増殖差が10%以下の株をDOI耐性候補株として3株選出し、②6% DOI含有培地の増殖が20%以下の株、及びDOI非含有と6%DOI含有培地の増殖差が90%以上の株をDOI感受性候補株として6株選出した（BW25113の6% DOI含有培地の増殖は50%）。各条件で選出した株の2次スクリーニングを実施した結果、DOI耐性候補株としてΔ*argO*株、DOI感受性候補株としてΔ*rffC*株、Δ*gor*株を見出した。また、各遺伝子の機能確認のため、*argO*遺伝子欠失株を作製し、評価培養を行ったところ、DOI耐性を示したことから、*argO*遺伝子は、DOI耐性（低感受性）に関連する遺伝子であると同定した。また、*rffC*遺伝子及び*gor*遺伝子においても得られた破壊株の遺伝子上をPCRで、該当遺伝子が欠失していることを確認したことから、*rffC*遺伝子及び*gor*遺伝子は、DOI感受性に関与する遺伝子であると同定した。

1) - 3 培養工学的DOI発酵生産

DOIを生産する大腸菌の生育可能範囲における詳細なDOI安定性について調べた。温度4, 20, 35, 50℃、pH 3.0, 5.0, 7.0, 9.0の条件下でDOIの安定性を評価した結果、大腸菌の生育温度（20, 35℃）では、培養液中のDOI安定性を考慮すると、pH 5.0条件付近のDOI発酵生産が適していると考えられた。次に、上記結果を考慮し、培養温度（27, 30, 33, 37℃）及びpH（pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0）条件を維持しながら、フラスコレベルでDOI生産性を検討した結果、温度27, 30, 33℃、pH 5.5, 6.0条件時のDOI生産性が至適であった（36時間で培地中の3% グルコースを全てDOIに変換）。フラスコ培養の結果を考慮し、ジャーフェーマンターで温度、pHだけでなく攪拌速度、通気量なども検討した結果、33℃、pH 6.0、450 rpm、5 L/min、生育炭素源マンニトール、初期グルコース濃度3%条件が至適DOI生産培養条件であった（効率はフラスコ培養時と同様）。次にジャーフェーマンターで初期グルコース濃度を5%まで増加させたときの至適DOI生産培養条件を検討した結果、30℃、pH 6.0、1000 rpm、5 L/min、HNS培地、生育炭素源マンニトール、初期グルコース濃度5%の条件において、41.5 g/L/36 hを達成し、これまでに我々が報告していた29.5 g/L/60 hのDOI発酵生産効率（DOI生産量、発酵生産時間）を大幅に改善することができた。さらに、流加培養法によりDOI発酵生産を検討した結果、116.0 g/L/60 hのDOI発酵生産効率を達成することができた。

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

人類が抱える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に注目が集まっているが、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困難である。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。

L. starkeyi の脂質代謝を明らかにするためには、油脂合成・分解経路に特化した *L. starkeyi* のリアルタイムPCRによる遺伝子発現様式解析システムが必要であると考え、野生株を経時培養した際の油脂合成・分解に関与する遺伝子の発現様式について、リアルタイムPCRを用いて検討した。油脂酵母に特異的に存在して、一般的な酵母には存在しない *ACL1* は、TCA回路由来のクエン酸からアセチルCoAを合成するのに機能しており、油脂酵母がトリアシルグリセロールを生産するのに非常に重要な酵素をコードしていると考えられる。この *ACL1* を含め、アセチルCoAや脂肪酸合成に関与する *ACC1*, *FAS1*, *FAS2* の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することが明らかとなった。しかし、リンゴ酸からピルビン酸を合成する酵素である *Mae1* は、その過程で *FAS1*, *FAS2* に必須な補酵素であるNADPHを生産するため、トリアシルグリセロール合成に重要な酵素であるが、*MAE1* の発現量は培養を通じて大きな変化は見られなかった。また、ホスファチジン酸からジアシルグリセロールを合成する酵素をコードする遺伝子である *PAH1* や、ジアシルグリセロールからトリアシルグリセロールを合成する酵素を

コードする遺伝子である *DGA1*, *LRO1* は、油脂を蓄積する培養7日目までは発現量が高かったが、培地のグルコースが枯渇し、トリアシルグリセロールの分解が始まる培養8日目以降は発現量が低下した。一方、トリアシルグリセロールを分解する酵素をコードする遺伝子である *TGL3*, *TGL4* は、培養を通じて発現量に大きな変化は認められなかった。これらのことから、細胞内のトリアシルグリセロール量は、分解ではなく合成ステップで制御されていると考えられる。

Research projects and annual reports

1) High efficient production of 2-deoxy-scylo-inosose in recombinant *Escherichia coli*

2-deoxy-scylo-inosose (DOI) is a six-membered carbocycle formed by the multi-step direct cyclization of glucose-6-phosphate catalyzed by 2-deoxy-scylo-inosose synthase (DOIS), a key enzyme in the biosynthesis of aminocyclitol antibiotics in *Bacillus circulans* and is valuable as a direct precursor for the aromatic compounds. DOI can be conveniently converted by rather simple chemical reactions into benzenediols such as catechol and hydroquinone which are important industrial chemicals used as antioxidants and starting materials for fragrances, and into medical and agricultural agents, and other useful compounds. We constructed a metabolically engineered *Escherichia coli* strain by introducing a DOIS gene (*btrC*) and by disrupting genes for phosphoglucose isomerase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and phosphoglucomutase (*pgi*, *zwf* and *pgm*, respectively), which relate to the glucose-6-phosphate metabolism. The small scale fermentation of DOI by recombinant *E. coli* mutant $\Delta pgi \Delta zwf \Delta pgm / btrC$ was done using 500 ml baffled flasks. We were able to obtain DOI at 29.5 g/L from glucose 30 g/L under the optimum conditions (almost 99% yield) .

To conduct a practical application of DOI (DOI productivity; 100 g/L/day), there are some tasks that we must resolve.

1. Improvement in the function of DOIS
2. Molecular breeding of DOI producing recombinant *E. coli*
3. Improvement of DOI productivity by fermentation technological method

1) – 1 improvement in the function of DOI synthase

In the screening for DOI synthase mutants with high activity, we obtained three mutants (L214M, W293R, L214M/W293R). These mutants have the DOI synthase with high activity, which enhance the DOI productivity. These mutant enzymes may contribute enhance the DOI productivity because of shortening the culture time and acceleration of DOI production.

1) – 2 molecular breeding of DOI producing recombinant *E. coli*

To conduct a practical application of DOI (DOI productivity; 100 g/L and over), DOI-resistant *E. coli* mutant is required for the high DOI accumulation in culture medium because of the sensitivity of *E. coli* against DOI. The Keio mutant collection (3,823 mutant strains) was screened for DOI-resistant and -sensitive strains in the 6% DOI containing medium. We obtained $\Delta argO$ as the DOI-resistant mutant strain and $\Delta rffC$, Δgor as the DOI-sensitive candidate mutant strain. The DOI-resistant mutant strain, $\Delta argO$, may contribute to accumulate the high concentration of DOI in the culture medium, which leads to enhance the DOI productivity.

1) – 3 improvement of DOI productivity by fermentation technological method.

To improve the DOI productivity by the control of temperature, pH, aeration and agitation in a jar fermentor, we firstly examined the effects of temperature (0, 20, 35, 50°C) and pH (3.0, 5.0, 7.0, 9.0) on the DOI stability. DOI is stable under low temperature and acidic conditions. Next, Considering the growth

temperature conditions of DOI producing recombinant *E. coli* and the chemical property of DOI, the examination of optimal condition of DOI productivity should perform on the basis of this condition (35°C, pH 5.0). We investigated the effects of temperature (27, 30, 33, 37°C) and pH (5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0) on the DOI productivity of DOI producing recombinant *E. coli* using 500 ml baffled flasks. We were able to obtain DOI at 27 g/L under the optimum conditions (30 or 33°C, pH 6.0, almost 100% yield). Finally, We examined the DOI productivity by the control of temperature, pH, aeration and agitation in a jar fermentor. We determined the optimal batch culture condition (temperature, 30°C; pH, 6.0; agitation speed, 1,000 rpm; aeration, 5 L/min; growth carbon, mannitol; initial glucose concentration, 5%) and fed-batch culture condition [temperature, 35°C to 28°C; pH, 6.0; agitation speed, 450 rpm; aeration, 10 L/min; feeding medium (250 g Glucose, 250 g Glycerol, 30 g Yeast extract, 470 g H₂O), 0.3 g/min]. Those condition cultures indicate 41.5 g/L/36 h and 116.0 g/L/60 h of DOI productivity, respectively. Especially, fed-batch culture method may be an important contribution because the DOI productivity is over 100 g/L.

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 are also facing the serious problem of self-sufficiency rate for edible oil. To overcome these problems, we have focused on using oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*, which is a good producer of triacylglycerol (TAG) from non-edible 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 accumulate between phospholipid bilayers of endoplasmic reticulum and bud to the cytoplasm later with the phospholipid monolayer.

Genetic and metabolic engineering approaches to *L. starkeyi* are used as cell factories for storing and producing huge amounts of lipid. However, methods for molecular breeding have not been established for *L. starkeyi*. Therefore, gene expression patterns of lipid accumulation, biosynthesis and degradation response of the oleaginous yeast *L. starkeyi* are still unknown.

In this study, we addressed the detailed expression pattern of genes responsible for lipid accumulation, biosynthesis and degradation in *L. starkeyi*. ATP citrate lyase (ACL) that catalyzes the conversion of citrate to acetyl CoA and oxal acetate is present in oleaginous yeasts, but not in non-oleaginous yeast. Genes responsible for fatty acid synthesis, *ACL1*, *ACCI*, *FAS1* and *FAS2* are highly expressed transiently in early log phase but not in late log phase. However, the expression of *MAE1* encoding for malic enzyme as the provider of NADPH for fatty acid synthesis did not alter during culture period. *DGA1* and *LRO1* encoding enzymes that catalyze diacylglycerol to TAG are highly expressed in early to late log phase but not after carbon starvation. The expression pattern of *PAH1* encoding phosphatidate phosphatase also resembles those of *DGA1* and *LRO1*. *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. Taken together, these results suggest that the constitutive expression of acetyl CoA and fatty acid synthesis gene leads to efficient accumulation of TAG in yeast cells.

発表論文

Oguro Y, Yamazaki H, Shida Y, Ogasawara W, Takagi

M, Takaku H “Multicopy integration and expression of heterologous genes in the oleaginous yeast, *Lipomyces starkeyi*” Biosci Biotechnol Biochem 79(3):512-5 (2015)

著書および総説

山崎 晴丈, 石川 冬木

“DNA損傷認識機構を巧みに利用したテロメア維持戦略” 生化学. 86(6): 812-6, 2014.(総説・査読無・招待有)

学会発表

国内学会

1. 山崎 晴丈, 坂井 真人, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「油脂酵母*Lipomyces starkeyi*の油脂蓄積関連遺伝子の発現解析」第47回酵母遺伝学フォーラム, 東京, 2014, 9月
2. 山崎 晴丈, 坂井 真人, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「油脂酵母*Lipomyces starkeyi*の油脂蓄積に關与する遺伝子の発現解析」第66回日本生物工学会大会, 札幌, 2014, 9月
3. 小黒 芳史, 山崎 晴丈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「油脂酵母*Lipomyces starkeyi*における形質転換系の開発」第66回日本生物工学会大会, 札幌, 2014, 9月
4. 宮田 淳史, 通野 和人, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和夫, 森 一樹, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉「油脂酵母*Rhodospiridium toruloides*の油脂生産機構の解明」第66回日本生物工学会大会, 札幌, 2014, 9月
5. 通野 和人, 宮田 淳史, 志田 洋介, 山崎 晴丈, 正木 和夫, 森 一樹, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉「油脂酵母*Lipomyces starkeyi*における油脂酵母高生産株の開発」第66回

日本生物工学会大会, 札幌, 2014, 9月

6. 志田 洋介, 宮田 淳史, 通野 和人, 山崎 晴丈, 正木 和夫, 森 一樹, 久原 哲, 高久 洋暁, 小笠原 渉 「油脂酵母 *Rhodospiridium toruloides* の油脂生産機構の解析」 第9回ゲノム微生物学会年会, 神戸, 2015, 3月

7. 山崎 晴丈, 坂井 真人, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* の油脂蓄積関連遺伝子の発現解析」日本農芸化学会2015年度大会, 岡山, 2015, 3月

8. 小黒 雅智, 山崎 晴丈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における油脂低蓄積変異株の取得とその油脂生産関連遺伝子の発現解析」 日本農芸化学会2015年度大会, 岡山, 2015, 3月

9. 小黒 芳史, 山崎 晴丈, 志田 洋介, 小笠原 渉, 高久 洋暁「産業油脂酵母 *Lipomyces starkeyi* における遺伝子破壊システムの開発とその利用」日本農芸化学会2015年度大会, 岡山, 2015, 3月

10. 木戸 みゆ紀, 内藤 広賢, 五十嵐 友, 神保 真優香, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨, 高久 洋暁, 田中 宥司「焼酎開発を目的とした圧力処理による大麦澱粉の糊化・糖化」 日本農芸化学会2015年度大会, 岡山, 2015, 3月

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: 高久 洋暁

若手研究 (B)

課題名: G0細胞におけるテロメア維持機構の解析

研究代表者: 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: 西田 浩志)

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: 山崎 晴丈

2. NEDO 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: 高久 洋暁

研究分担者: 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. 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

5. 平成26年度地神芳文記念研究助成

センター（招待講演）

課題名：分裂酵母G0細胞のテロメア維持機構の解析

研究代表者：山崎 晴丈

2) 学外活動

学会活動

高久 洋暁：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（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（その他）

高久 洋暁：

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

2. SSH課題講師（新潟南高校）

3. 教員免許状更新講習「遺伝子組換え技術の進展と将来展望」

4. 出張講義（万代高校）

5. 基調講演「地域資源を活用した高付加価値生産物の開発」（飯山北高校）

山崎 晴丈：

1. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry
査読4件

3) その他

高久 洋暁，小黑 芳史，山崎 晴丈，高木 正道 「酵母による植物由来抗菌蛋白質AFP1の生産とその作用メカニズム」第8回新産業酵母研究会講演会，新産業酵母研究会，産総研：臨海副都心

食品分析学研究室

Laboratory of Food Analysis

■ 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
食品の加工調理中に起こる成分変化の解析



・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、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。

今年度はモデル反応として、アミノ基を有するビタミンと五炭糖であるキシロース由来のメイラード反応生成物について解析を行った。

2014年度の研究成果

1. 米菓中のアクリルアミドの低減に関する研究

アクリルアミドはジャガイモのような炭水化物を多く含む食材を120℃以上の高温で調理した食品に生成する物質であり、発がん性が疑われる化合物である。日本では、せんべい等の米加工品に含有することが報告されており、焼成や乾燥等の製造過程においてアクリルアミドが生成すると考えられている。そこで、米菓中のアクリルアミド

の生成要因の解明とアクリルアミドの低減方法を開発することを目的として本研究を行った。更に、アクリルアミドが含有している食品や副材料からアクリルアミドを低減する方法についても検討を行った。

市販のウルチ米菓、モチ米菓、味付け前の素焼き米菓、副材料、その他食品からアクリルアミドを水抽出し、固相抽出カラムによる精製を行った。アクリルアミドの定量分析にはLC-MSを用いた。アクリルアミドの低減方法として、120℃以下の比較的穏やかな加熱条件を用いた。アクリルアミドとアミノ酸の混合物を加熱反応させ、遊離のアクリルアミド含量の変動とアクリルアミドとアミノ酸の反応生成物の変動を測定した。

分析を行った米菓11製品中の7製品中のアクリルアミド含量は100 $\mu\text{g/kg}$ 以下であることが判明した。副材料として黒糖を用いた製品の一部から高いアクリルアミド含量が確認された。この結果は、米菓中のアクリルアミドの含有率は主に副材料素材に由来していることを示している。また、アクリルアミドとリジンやシステインなどのアミノ酸を添加した場合、120℃よりも低い温度においてアクリルアミドの含量を低減できることが判明した。これらの結果は、適切なアミノ酸との穏やかな加熱処理によってアクリルアミドを低減させることが可能であることを示している。

2. ピリドキサミン由来メイラード反応生成物の生成機構の解析

メイラード反応の抑制にチアミンやピリドキサミンなどのアミノ基を有するビタミンが有効である。これらビタミンはカルボニル化合物と反応することが予想されるが、形成されるメイラード反応生成物についての報告は少ない。

ビタミン由来メイラード反応生成物の探索を行ったところ、ピリドキサミンとキシロースとの反応で生成するメイラード反応生成物 (XP-1) を見出し、その化学構造を明らかにした。今年度は、XP-1のLC/MS/MSによる定量方法の開発、及びXP-1生成条件の検討を行った。

XP-1標品を調製後、MSによるMRM最適化によって高感度に検出できるパラメータを設定し、LC/MS/MSによる定量メソッドを構築した。本定量メソッドを用いてXP-1生成におけるpHの影響を検討した結果、XP-1は弱酸性・中性条件下で生成するが、アルカリ条件下では生成されることが明らかとなった。また、50℃以上の高温条件で顕著に生成したことから、XP-1は生体内では生成する可能性は低く、食品中での高温短時間の加熱調理によって生成する可能性が示唆された。また、キレート剤の添加によりXP-1の生成量が増加したことから、XP-1は重金属存在下では分解する可能性が考えられた。さらに、五炭糖だけでなく六炭糖からも生成することが確認された。

Research projects and annual reports

1. Elimination of Acrylamide by Moderate Heat Treatment below 120℃ with Lysine and Cysteine

Acrylamide is a toxic compound generated in processed foods prepared at high temperatures. To explore means by which food processing can reduce the acrylamide content in foods, we studied the reaction of acrylamide with lysine and cysteine, which carry nucleophilic functional groups, at temperatures below the initiation of acrylamide generation. The amino acid-mediated reduction of acrylamide content followed first-order reaction kinetics in aqueous solution below 120℃. The profile of acrylamide decrease correlated well with the formation of a 1:1 adduct of acrylamide with the respective amino acid, indicating that these amino acids reacted directly with acrylamide. The reactivity of acrylamide toward both amino acids was pH-dependent. In particular, the reactivity of cysteine toward acrylamide was remarkably enhanced by an increase of pH. These findings suggested the possibility of reducing acrylamide levels during food processing by treating foods with the appropriate amino acid(s) at moderate temperatures below 120℃.

2. Analysis of the formation mechanism for the Maillard reaction product derived from pyridoxamine and xylose

Vitamins containing amino group, such as thiamin and pyridoxamine, is effective in inhibiting the progress of the Maillard reaction. Although these vitamins are expected to react with carbonyl compounds, the structural data on the Maillard reaction products formed from these vitamins has been very few.

As a result of the search for the Maillard reaction products derived from vitamins and carbonyl compounds, the major reaction product derived from pyridoxamine and xylose, named XP-1, was identified. In this year, we developed a determination method for XP-1 using LC/MS/MS, and clarified the factors affecting the formation of XP-1.

After the preparation of standard XP-1, the MS/MS parameters were optimized with standard XP-1 under positive ion electrospray ionization, and then determination method for XP-1 was developed using LC-MS/MS with MRM mode. Using this method, we investigate the effect of pH, temperature, DTPA and kinds of sugars on the formation of XP-1. We observed that XP-1 was formed under weakly acidic and neutral conditions and that XP-1 production was markedly increased when heated at the temperature above 50°C. These findings suggested that XP-1 was likely to be produced in food processed at the high temperature. In addition, it was suggested that XP-1 could be degraded in the presence of metal ion, because the addition of DTPA, a strong metal chelator, resulted in the increase of XP-1 production. Moreover, we confirmed that XP-1 was formed from not only pentose but also hexose.

発表論文

1. Atsushi Kobayashi, Satoko Gomikawa, Akira Yamazaki, Shinji Sato and Tetsuya Konish, 「Elimination of acrylamide by moderate heat treatment below 120 °C with lysine and cysteine」,

Food Science and Technology Research, 20, 979–985, (2014) 査読有

著書および総説

1. 編著 宇田 靖, 大石 祐一, 著 佐藤 眞治, 他6名「わかりやすい 食品の基礎と機能性分析法」, アイ・ケイ コーポレーション, 初版発行2015年3月30日
2. 佐藤 眞治「焼きマイタケをおかずにごはんをしっかりと食べると食後血糖値の上昇が抑えられる。次の食後も効果を維持」, 健康, 第40巻2号, 28–29, 2014年12月27日

学会発表

国際学会

1. Shinji Sato, Misato Sakurai, Yuri Nomi, Shuhei Ishikawa, Katsumi Sasagawa and Shigeru Mineo, Effect of isomaltulose on liver function maintenance in high fat high sugar fed rats. International Conference on Food for Health in Niigata 2014, October 30-31, 2014, Toki Messe, Niigata

国内学会

1. 佐藤 眞治, 櫻井 美仁, 能見 祐理, 丸田 優人, 笹川 克己, 「高脂肪高ショ糖給餌ラットにおけるカカオの抗肥満効果」日本薬学会第135年会, 平成27年3月25~28日, 神戸学院大学, 兵庫
2. 石川 修平, 笹川 克己, 櫻井 美仁, 峰尾 茂, 佐藤 眞治, 「高脂肪高糖質食給餌ラットにおけるイソマルチュロースの肝機能維持効果」, 第68回日本栄養・食糧学会大会, 平成26年5月30~6月1日, 酪農学園大学, 札幌
3. 能見 祐理, 佐藤 眞治, 大塚 譲「ピリドキサミン由来新規メイラード反応生成物の同定と生成機構の解析」平成26年度食品分析研究

会学術集会（平成26年9月5日）

4. 松井 芳光, 中西 康博, 山本 祐司, 保坂 好江, 猪子 諒, 能見 祐理, 大塚 譲, 本間 清一「モデルメラノイジン分解微生物の探索と分解生成物の性質」日本農芸化学会2015年度大会（平成27年3月27日, 岡山大学津島キャンパス）

5. 大塚 譲, 中村 愛, 保坂 好江, 石井美佳子, 橋本 侑子, 重森 美里, 能見 祐理, 中島 敬子, 鈴木恵美子, 松井 芳光, 山本 祐司, 本間 清一「LC-MS/MSによる食品中のメラノイジン反応産物の分析」日本農芸化学会2015年度大会（平成27年3月28日, 岡山大学津島キャンパス）

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

若手研究 (B)

課題名: メイラード反応がビタミンの動態に与える影響の網羅的解析

研究代表者: 能見 祐理

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「低GI食品の開発と機能評価」佐藤 眞治 (研究代表者: 西田 浩志)

受託/共同研究(民間等)

佐藤 眞治: 4件

その他研究費

1. 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
研究代表者: 佐藤 眞治

2. 応用生命科学部共同研究奨励費「ピリドキサミン由来新規メイラード反応生成物の食品中の動態解析および遺伝子発現解析」

研究代表者: 佐藤 眞治

研究分担者: 能見 祐理

2) 特許出願

赤井 昭二, 西田 浩志, 小島 勝, 永塚 貴弘, 佐藤 眞治, 佐藤 憲一, 青島 啓太
抗癌剤

特願: 2014-142432, 2014年7月

3) 学外活動

学会活動

佐藤 眞治: 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, 日本食品分析学会(委員), 日本分析化学会(関東支部新潟地区部会の幹事)

能見 祐理: 日本農芸化学会, 日本家政学会

学外活動(その他)

佐藤 眞治:

公私立大学実験動物施設協議会(代議員)

新潟県食品技術研究会(副会長)

新潟県新たな米産業創出技術研究会(会長代行, 企画委員会委員)

日本GI研究会

産学連携イベント出展「ifia Japan 2014」,

「イノベーション・ジャパン2014 - 大学見本市」,

「アグリビジネス創出フェア2014」

能見 祐理: 長野東高等学校での出張講義

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の見地から研究を行っている。

2014年度の研究成果

1. トコトリエノールによる癌細胞増殖阻害に対するフェルラ酸の相乗作用

米ぬかにはトコトリエノール (T3)、フェルラ

酸 (FA)、セラミドなどの食品成分が多含まれ、近年これらの機能性が数多く見出されている。T3は抗腫瘍などの多様な生理作用を有し、4種のT3異性体の中でも δ -T3が最も高い効果を発揮することが知られている。一方、FAにも抗酸化、認知症予防、発癌抑制などの機能性が認められ、近年注目を集めている。以上のことから、米ぬか成分の積極的活用は健康維持に繋がると考えられるが、これらを組み合わせてその影響を検証した例は過去にない。そこで δ -T3とFAに着目し、癌細胞の増殖に対するこれら機能性成分の相乗的阻害効果を検討した。 δ -T3の単独処理によって各種癌細胞の増殖が濃度依存的に阻害されたが、FA単独では細胞の増殖に何ら影響を与えなかった。しかし、 δ -T3とFAを同時に添加することで、 δ -T3による増殖阻害活性がFAの濃度に依存して飛躍的に高まることが明らかになった。フローサイトメトリー解析の結果、細胞周期に対するFAの効果は認められなかったが、 δ -T3処理によってG1期停止を誘導し、FAの同時添加でその作用がさらに高まった。ウエスタンブロット法によってG1期停止に関与するp21の発現を調べたところ、 δ -T3+FA処理でp21の発現レベルが顕著に増加していた。FAによる相乗効果の作用機序を明らかにするために、細胞から δ -T3を抽出してHPLCで分

析した。FAを同時処理することで有意に細胞内の δ -T3量が増大しており、FAによる相乗作用は δ -T3の細胞内濃度に起因すると考えられた。以上のことから、 δ -T3による細胞増殖抑制にFAが相乗効果を発揮することが明らかになった。

2. ヒト肝癌細胞における過酸化リン脂質PCOOHの代謝と作用

動脈硬化発症に関与する酸化LDLの形成では、LDL表面のホスファチジルコリン(PC)の酸化で、PCヒドロペルオキシド(PCOOH)が生じることが知られており、そのPCOOHの病態生理学的作用が注目されている。ヒト肝癌細胞(HepG2)の実験では、細胞内でPCOOHがPCヒドロキシド(PCOH)へ還元される可能性が指摘されており、PCOOHの生理作用がそれ自体によるか、PCOHなど代謝物に起因するのか不明である。そこで、PCOOHをHepG2に処理し、取り込みと代謝を評価することで病態生理学的作用との関係を明らかにしようとした。培地に加えたPCOOHの一部がHepG2へ取り込まれ、ほとんどが細胞内でPCOHへと還元されることを明らかにした。PCOOHとPCOHの作用を比較した結果、PCOOHは顕著な細胞死を誘導するが、PCOHや未酸化PCでは細胞死は生じなかった。すなわち、PCOOHの作用は還元物PCOHではなく、PCOOH自体の作用と考えられた。さらに、阻害剤でグルタチオン量を下げた細胞へPCOOHを処理するとより顕著な細胞死が観察され、この細胞死はトコフェロールにより緩和されたため、酸化ストレスが関わる細胞死と示唆された。さらに、この細胞死の詳細を調べた結果、ミトコンドリア膜電位の低下やP38タンパクの発現から、アポトーシスと考えられた。ただし、p53タンパクは不活性化し、細胞周期はG2M期に集積することも判明し、PCOOHは従来のアポトーシスとは幾分違う細胞死を引き起こす可能性が新たに示唆された。

Research projects and annual reports

1. Synergistic inhibition of cancer cell proliferation with a combination of δ -tocotrienol and ferulic acid.

Rice bran consists of many functional compounds including tocotrienol (T3), ferulic acid (FA) and ceramide, and thus much attention has been focused on the health benefits of its components. We previously demonstrated that T3 has potent anti-tumor activity, and that δ -T3 has the most potent anti-cancer activity of the four T3 isomers. FA is receiving widespread attention owing to its therapeutic effects against cancer and neurodegenerative disorders. Here, we investigated the synergistic inhibitory effects of its components, particularly δ -T3 and FA, against the proliferation of an array of cancer cells, including DU-145 (prostate cancer), MCF-7 (breast cancer), and PANC-1 (pancreatic cancer) cells. The combination of δ -T3 and FA markedly reduced cell proliferation relative to δ -T3 alone, and FA had no effect when used alone. Although δ -T3 induced G1 arrest by up-regulating p21 in PANC-1 cells, more cells accumulated in G1 phase with the combination of δ -T3 and FA. This synergistic effect was attributed to an increase in the cellular concentration of δ -T3 by FA. Our results suggest that the combination of δ -T3 and FA may present a new strategy for cancer prevention and therapy.

2. Metabolism and cytotoxic effects of phosphatidylcholine hydroperoxide in human hepatoma HepG2 cells.

Oxidized low density lipoprotein (LDL) contains predominantly oxidized phosphatidylcholine (PC), which is hypothesized to play a role in the promotion of atherosclerosis. During the course of LDL oxidation, PC is primarily oxidized to PC hydroperoxide (PCOOH), while further modification of PCOOH yields various secondary products such as PC hydroxide

(PCOH). Among these oxidatively modified PCs, PCOOH was thought to be the most causative agent in terms of atherosclerosis, but which oxidized PCs show cytotoxic, apoptotic and atherogenic effects remain unclear. In this study, we investigated cellular uptake and metabolism of PCOOH in human hepatoma HepG2 cells by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and then evaluated whether PCOOH or its metabolites cause pathophysiological effects such as cytotoxicity and apoptosis. In HepG2 cells, PCOOH is actually taken up and metabolized to PCOH, rather than other oxidized PCs. PCOOH significantly reduced cell viability, whereas no decrease was observed for PCOH-treated HepG2 cells. The viability was markedly decreased in PCOOH + BSO (an inhibitor of glutathione production)-treated cells, and the cytotoxicity was attenuated by α -tocopherol (an antioxidant) treatment. Therefore, although most PCOOH was converted to PCOH in HepG2 cells, the remaining PCOOH would be a particularly biologically active molecule, and PCOOH-induced cell death could be closely related to changes in cellular oxidative stress levels. Hallmarks of apoptosis (e.g., lower mitochondrial membrane potential and higher level of phosphorylated p38) were observed especially in PCOOH + BSO-treated cells. However, decreased expression of p53 and accumulation of cells in the G2/M phase were detected. These results suggest that PCOOH induces cell death via an unusual apoptosis pathway.

発表論文

1. Synergistic inhibition of cancer cell proliferation with a combination of δ -tocotrienol and ferulic acid. Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, Kurata T, Nakagawa K, Miyazawa T. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct 24; 453(3):606-11.

2. Metabolism and cytotoxic effects of phosphatidylcholine hydroperoxide in human hepatoma HepG2 cells. Suzuki Y, Nakagawa K, Kato S, Tatewaki N, Mizuochi S, Ito J, Eitsuka T, Nishida H, Miyazawa T. Biochem Biophys Res Commun. 2015 Mar 20; 458(4):920-7.
3. Establishment of cell lines derived from the genus Macaca through controlled expression of cell cycle regulators. Kuroda K, Kiyono T, Eitsuka T, Isogai H, Takahashi K, Donai K, Isogai E, Fukuda T. J. Cell Biochem. 2015 Feb; 116(2): 205-211

著書および総説

永塚 貴弘：味・お国自慢「米粉の先進地・新潟」JAFS News Letter, p21 (2015)

学会発表

国際学会

1. N. Tatewaki, T. Eitsuka, H. Nishida Squalene inhibits inflammation in tumor transplanted mice through the suppression of PGE2 production. Society for Free Radical Biology and Medicine, 21st Annual Meeting, Seattle, USA, 2014
2. N. Tatewaki, C. Washio, M Nishida, T. Eitsuka, H. Nishida The effect of Rice bran extract on DNA damage response. The 2nd International Conference on Pharma and Food (ICPF), Shizuoka, Japan, 2014
3. R. Furuuchi, D. Maejima, T. Yokoyama, H. Nishida, M. Hirayama Evaluation of in vitro vasorelaxant activity of

proanthocyanidins in boysenberry

International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, Japan, 2014

4. N. Tatewaki, M. Tamiya, M. Ishiguro, T. Eitsuka, T. Konishi, H. Nishida

Elucidation of ATR kinase inhibition mechanism by Gomisin N.

International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, Japan, 2014

5. Synergistic inhibition of cancer cell growth by combination treatment of δ -tocotrienol and ferulic acid. Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, Nakagawa K, Miyazawa T. International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Niigata, Japan, Oct 30-31 (2014)

国内学会

1. 古内 亮, 松嶋 全人, 横山 忠幸, 西田 浩志, 平山 匡男, In vitro血管弛緩作用におけるボイセンベリープロアントシアニジン中の主要活性成分の同定, 第68回日本栄養食糧学会, 札幌, 2014.

2. 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阻害に対するフェルラ酸の相乗作用」 日本ビタミン学会, 兵庫, 2014年6月13日

3. 永塚 貴弘, 舘脇 直人, 西田 浩志, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫「ビタミンEによる細胞老化の抑制効果」 日本過酸化脂質・抗酸化物質学会, 宮城, 2014年8月9日

4. 永塚 貴弘, 舘脇 直人, 西田 浩志, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫「ビタミンEによるテロメア短縮抑制作用」 ビタミンE研究会, 東京, 2015年1月9日

5. 永塚 貴弘, 舘脇 直人, 西田 浩志, 仲川 清隆, 宮澤 陽夫「トコトリエノールの抗癌作用に対するフェルラ酸の相乗効果」 日本農芸化学会, 岡山, 2015年3月29日

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 (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

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

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(研究代表者) 研究課題「次世代型機能性食品デザインと評価」, 「食品素材によるガン治療増感剤の探索」研究代表者 西田 浩志

受託/共同研究(民間等)

西田 浩志: 3件

永塚 貴弘: 2件

その他研究費

西田 浩志: 新潟薬科大学応用生命科学部共同研究奨励費「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」

2) 特許出願

赤井 昭二, 西田 浩志, 小島 勝, 永塚 貴弘,
佐藤 眞治, 佐藤 憲一, 青島 啓太
抗癌剤

特願: 2014-142432, 2014年7月

3) 学外活動

学会活動

西田 浩志: American Association of Cancer Research (AACR), American Society of Cell Biology (ASCB), Free Radical Biology and Medicine (FRBM), 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, 日本フードファクター学会, 日本食品分析学会, 日本香辛料研究会

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, 日本食品分析学会

学外活動(その他)

西田 浩志:

1. 新潟市食品機能性表示制度運用検討委員会
運用検討委員
2. 新潟県田上町食育ワーキング会 食育ワーキング委員
3. 食と花の世界フォーラムにいがた2014年
健康と食品に関する新潟国際会議 大会実行委員長
4. 新潟県健康管理協会 幼児期の食育と健康教育を考える[全3回シリーズ]
5. 青少年のための科学の祭典 新潟県大会
大会実行委員

6. 健康げんき倶楽部& 4大メディアキャンパス
合同講座 シニア世代の健康げんき講座

7. 新潟バイオリサーチパーク(株) 食品ヒト試験審査委員会 食品ヒト試験評価委員

8. 新潟健康ビジネス協議会 機能性食品の科学と制度に関するメディア懇談会

9. NPO法人 健康寿命・リヴィング-ウィル
“創ろう健康文化”「健康寿命をとことん考える」

10. 高等学校理科クラブ支援事業報告会

11. 県立新発田高校SSH生命科学実験講師

12. 県立新発田高校SSH海外研修発表会

13. 静岡大学大学院農学研究科特別講義

永塚 貴弘:

1. International Conference on Food for Health in Niigata 2014 実行委員
2. 新潟県立大学人間生活学部第5回学術講演会
教育講演「トコトリエノール(ビタミンE同族体)の優れた機能性ー健康増進・疾病予防への応用ー」
3. 出前講義(新潟青陵高等学校)
4. SSH(高田高等学校)

4) その他

西田 浩志: 依頼執筆 特集: 食と健康を結ぶ先端研究「新野菜プチヴェールの機能性」日本冷凍空調学会誌: 冷凍, 2014年, 特集89巻(第1041号), 469-474

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 ・メタン発酵 ・微生物 ・食品加工 ・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。

(1) 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。

(2) 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。

2014年度の研究成果

2014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

バナナ (*Musa spp.*) 果実の抗酸化活性およびフェノール化合物に及ぼす高压処理の影響を解析した。その結果、室温で500 MPaの高压処理を10 min施したバナナの抗酸化活性（ORAC値）が除圧後室温1日保存後2.5倍に増加することを明らかにした。高压処理によるフェノール化合物濃度の増加が抗酸化活性の増加を引き起こした可能性を示した。

サツマイモ (*Ipomoea batatas*) 澱粉の高压処理による糊化と内在酵素反応による糖化を解析した。その結果、70℃で500 MPaの高压処理を10 min施したサツマイモの還元糖濃度は、80℃常圧条件で10 min加熱したサツマイモと同等の値を示した。低温条件において高压処理によってサツマイモ澱粉の糊化および内在酵素反応による糖化が生じる可能性を示した。

大麦焼酎の醸造プロセス構築のため、高压処理を利用した大麦澱粉の糊化・糖化プロセスを検討した。大麦（ゆきみ六条）を水浸漬した後、室温で600 MPaの高压処理を120 min施し、米麴をアミラーゼ源として添加することで、非熱的な糖化プロセスを構築した。この糖化プロセスとエタノール発酵プロセスを連結した焼酎醸造プロセスを構築した結果、良好にエタノールが生産されることを示した。続いて、アミラーゼ源として、大

麦を発芽させて調製した「緑麦芽」を用いることで、非熱的かつ米麴無添加の糖化プロセスを構築した。

2) 圧力による発酵制御・殺菌技術の開発

常温流通可能な生味噌の製造を目的として、加熱処理に代わり高压処理による殺菌工程を組込んだ味噌醸造プロセスの構築を進めている。味噌用酵母*Zygosaccharomyces rouxii* S-96株の呼吸機能が低減した変異株の中から、非凝集性のRE4-23Ft株を取得した。本株の圧力死滅挙動を解析した結果、室温で200~300 MPaの圧力条件で、親株S-96の1.3~1.6倍の死滅速度定数を示し、圧力感受性変異株であることが判明した。本株の取得は、より低い圧力条件での発酵制御技術の実現に重要な足掛かりを提供するものである。

本研究室では出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae* KA31a株から圧力感受性変異株および圧力耐性変異株を取得してきた。その中で、処理圧力により圧力耐性・感受性が変化するa1210H12株について、4~40℃での175~250 MPaの高压処理における死滅挙動を解析した。温度と圧力に対する死滅速度定数を等高線として表したところ、本株の死滅速度定数は、30℃、175 MPaの条件で最小値を示し、円弧を描く形で増加する結果を得た。本株の圧力死滅反応における活性化体積は親株KA31aよりも大きく、死滅機構が親株と異なる可能性を示した。酵母の圧力感受性機構の解明に向けての重要な知見を得た。

細菌孢子（芽胞）の、より低温条件での殺菌技術は食品製造技術の大きな課題である。温度と圧力の組合せによる枯草菌孢子的殺菌を検討した。室温で200~600 MPaの高压処理を10 min施したところ、200 MPaの処理後60 min保温することで、80℃の温度処理における温度耐性が最も低く、全工程で約2桁生菌数が減少した。一方、高压処理時の温度を上昇させたところ、65℃で500 MPaの高压処理を行うことで、温度耐性が顕著に減少し、全工程で約5桁の生菌数の減少を認めた。高压処理時の温度が孢子の損傷ならびに温度耐性に

異なる影響を及ぼすことを明らかにした。

3) 発酵食品関連の研究

山崎糀屋および本学産官学連携推進センターとの共同で、糀（米麴）の機能性の解析を進めている。糀の抗酸化活性を解析した結果、糀の水抽出物に、米に比べて高い抗酸化活性および総フェノール量、総フラボノイド量が認められた。HPLC-UV/VIS分析の結果、280 nmの光を吸収する成分の存在が複数認められた。その内の1つを分取し、質量分析計にて分析したところ、パラチノースを含む化合物である可能性を示した。

4) メタン発酵技術・未培養微生物の分離技術に関する研究

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定量実験を行った。その結果、本微生物は酢酸やプロピオン酸などの揮発性脂肪酸を添加することで活性が増加する傾向を示した。これらの基質を利用したバイアル瓶による本微生物の分離培養を試みた結果、本微生物を継代的に培養できることが示された。

新津川の自噴原油の生物学的処理を目的に、実験室規模のCSTRプロセスを構築し、自噴原油の主成分であるオクタデカンを分解する微生物群集の集積と石油分解微生物の分離培養を試みた。結果、構築したプロセスにおいて良好なオクタデカンの分解を確認することができた。またプロセス内に生息する未培養微生物系統に属する微生物を純粋分離することに成功した。

酢酸を唯一の炭素源として供給するメタン発酵プロセスの槽内液にマイクロプレート分離培養法を適用し、槽内液中に生息する酢酸酸化細菌と水素資化性メタン生成古細菌の微生物共生系の検出を行った。*Methanomicrobiales*目の水素資化性メタン生成古細菌の16S rRNA遺伝子の特異的に増幅するPCRプライマーを検討し、検出を行った結果、

水素資化性メタン生成古細菌が分離されていることが示され、マイクロプレート分離培養法により、微生物共生系の分離が可能であることを示した。

近年、固体培地上にコロニーを形成しない種類・状態の微生物の存在が示唆されており、微生物学の進展を阻んでいる。コロニー形成機構の解明に向けて、固化剤の種類・濃度とコロニー形成率の関係を解析した。大腸菌*Escherichia coli* BW25113株の生菌数を、液体培養法および固体培地上でのコロニーカウント法でそれぞれ測定し、コロニー形成率を求めた。寒天および精製寒天を用いた場合、濃度の低下に伴ってコロニー形成率が増加する傾向が認められた。一方、ゲランガムを用いた場合には、濃度によるコロニー形成率の顕著な変動は認められなかった。本株のコロニー形成に最適な固化剤は0.5%寒天あるいは0.5%精製寒天であり、60~80%のコロニー形成率を示した。一方、ゲランガムは固化剤として不適であることを示した。

PMA (Propidium monoazide) とPCR法を組み合わせた、感染能を有するウイルスのみを特異的に検出する技術 (PMA-PCR) の構築と最適化を行った。モデルウイルスにはM13バクテリオファージを使用し、人為的に感染能を調節したM13ファージに対してqPCRおよび、PMA-qPCRによるファージDNA数の相関性を調査した。結果、PCRの標的遺伝子配列を短く設定した場合においてはPMA-qPCRとファージ感染能には相関が見られなかったが、増幅断片を長く設定することで、両者に高い相関を見出すことができた。

Research projects and annual reports

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 mainly related to methane fermentation processes. The summarized results of our projects were described as

follows:

1) Food processing technologies using high hydrostatic pressure (HP)

Effect of HP on antioxidant activity and phenolic compounds in banana (*Musa spp.*) fruit was analyzed. The antioxidant activity (as evaluated by ORAC value) increased in 2.5-fold by 1-day incubation after HP treatment at 500 MPa (ambient temperature) for 10 min. HP treatment was demonstrated to increase antioxidant activity as well as phenolic compounds concentration.

Effect of HP on sweet potato (*Ipomoea batatas*) starch and subsequent saccharification by internal enzymes were analyzed. The reducing sugar concentration of sweet potato, after HP treatment at 500 MPa (70°C) for 10 min, was roughly comparable with that after thermal treatment at 80°C (atmospheric pressure) for 10 min. HP treatment was demonstrated to cause gelatinization of starch and subsequent saccharification by internal enzymes in sweet potato.

To develop a barley *shochu* brewing, gelatinization and saccharification processes of barley starch were developed. Water-soaked barley grains (*Hordeum vulgare* L. cv. Yukimi-rokujo) were subjected to HP treatment at 600 MPa (ambient temperature) for 120 min. After HP treatment, rice *koji* was added as an amylase source. As a result, non-thermal gelatinization and saccharification process of barley starch was developed. By combination of this process with ethanol fermentation, ethanol production from barley grains was successfully observed. Moreover, malt made from Yukimi-rokujo was applied as the amylase source. Thus, the alternative non-thermal saccharification process without rice *koji* was developed.

2) Microbial inactivation using high hydrostatic pressure

To manufacture a raw *miso*, which could be distributed at ambient temperature, a novel process

with non-thermal fermentation control technique by HP treatment was investigated. A non-flocculation mutant strain RE4-23Ft was obtained by aerobic respiration deficient mutants of *Zygosaccharomyces rouxii* strain S-96, which is used as a standard strain for *miso* manufacturing. The HP inactivation behavior of strain RE4-23Ft showed 1.3 to 1.6 fold larger inactivation rate constants under HP at 200 to 300 MPa (ambient temperature), indicating this strain was a pressure sensitive (piezo-sensitive) mutant. Obtain of this mutant strain would lead us to develop a fermentation control technology by HP at lower pressure levels.

We have obtained piezo-sensitive and resistant mutants from *Saccharomyces cerevisiae* strain KA31a. Strain a1210H12 showed piezo-resistant and piezo-sensitive behaviors depending on the pressure levels. The inactivation behavior was analyzed under HP treatment at 175 to 250 MPa with 4 to 40°C. The inactivation rate constant in relation to temperature and pressure, summarized in a temperature-pressure diagram, showed the temperature dependence of pressure inactivation as contour lines. The inactivation rate constant of the strain showed the minimum value at 30°C at 175 MPa and increased with elliptical curves. The activation volumes of the strain during inactivation reactions showed larger than those of parent strain KA31a, suggesting the inactivation mechanism of strain a1210H12 was different from that of KA31a.

Sterilization technique of bacterial spores under lower temperature is one of subjects in food manufacturing with great concerns. Thus, inactivation of *Bacillus subtilis* spores by combination of HP and thermal treatments was investigated. At ambient temperature, HP at 200 to 600 MPa for 10 min was applied on the spores. As a result, the thermotolerance of spores at 80°C demonstrated to be significantly decreased after 60 min incubation after HP at 200 MPa, resulting in approximately 2-Log loss in viability

during the total process. In contrast, when the temperature during HP treatment was increased, HP treatment at 500 MPa (65°C) showed significant decrease of thermotolerance of spores, resulting in approximately 5-Log loss in viability during the total process. The temperature during HP treatment was demonstrated to remarkably effect on the damage and thermotolerance of spores.

3) Research related to fermented foods

By the collaboration with Yamazaki koujiya and the Liaison center for R&D promotion, the function in rice *koji* was investigated. The water extract of rice *koji* showed a high antioxidant activity (as evaluated by ORAC value), as well as high phenolic compounds and flavonoids concentrations. By HPLC-UV/VIS analysis, several compounds, which absorb UV with 280 nm. One of the compounds was separated and subjected to MS/MS analysis, suggesting that the compound contains a palatinose-like structure.

4) Researches related to methane fermentation processes and analysis on uncultured microorganisms

Uncultured bacterial species belonging to candidate division OP5 is frequently detected in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) processes treating domestic wastewater. To investigate functions of the uncultured OP5 species, batchwise cultivation and OP5-rRNA quantification experiments using a quantitative RT-PCR were conducted. To attempt isolation of OP5 species, successive cultivation of OP5 species has become possible by using defined substrate.

In order to biologically remediate the petroleum pollution flowing to Niitsu river, A laboratory scale Completely Starred Tank Reactor (CSTR) process feeding Octadecane, a key ingredient of petroleum pollution in Niitsu river, was constructed and operated. The CSTR process successfully treated Octadecane in anaerobic condition. Also we could isolate a novel

microorganism belonging to uncultured clade from the constructed CSTR process.

An anaerobic cultivation and method using microplates was applied for separation of microorganisms with syntrophic association between acetate oxidizing bacteria and hydrogenotrophic methanogens from and acetate-fed methane fermentation process. A PCR primer set targeting the 16S rRNA genes of hydrogenotrophic methanogens, belonging to the order *Methanomicrobiales*, was designed and used for detection of hydrogenotrophic methanogens in the culture broth in microplate wells after cultivation. As a result, hydrogenotrophic methanogens were detected in several wells, indicating that the microplate anaerobic cultivation and separation method was available for separation of microorganisms with the syntrophic association.

Recently, certain microorganisms cannot reportedly form colonies on solid media under specific physiological conditions. The existence of such viable but non-culturable (VNC) microorganisms inhibits the development in microbiology. Towards elucidation of colony-forming mechanism of microorganisms, the relationship between colony-forming ability of *Escherichia coli* and the kind and concentration of the gelatinizing reagents in the solid medium was investigated. The viable cell numbers of *E. coli* strain BW25113, counted by liquid cultivation and colony counting, respectively, was used for calculation of colony-forming ratios. Using agar and purified agar (Agar Noble) as the gelatinizing reagents, the colony-forming ratio increased with decrease in their concentrations. In contrast, using gellan gum, no apparent decrease as well as increase in colony-forming ratio was observed with decrease in the concentration. As a result, the optimal gelatinizing reagent for colony formation of strain BW25113 was demonstrated to be agar or purified agar at 0.5% in concentration, with 60 to 80% colony forming ratios. Gellan gum would not be suitable for colony formation of this strain.

Construction and optimization of PCR based detection of active-infectious-viruses method combined with Propidium monoazide (PMA) was conducted. M13 bacteriophage, model infectious virus, was used and correlation of active M13 phage (pfu) with quantitative DNA copies number calculated with qPCR or PMA-qPCR was investigated. Initially we could not find the correlation between active M13 phage number and PMA-qPCR based phage number in conventional PMA-qPCR condition. Finally, we can optimize the PMA-qPCR condition by an adjustment of PCR fragment length.

発表論文

1. Kazuki Nomura, Hitoshi Iwahashi, Akinori Iguchi and Toru Shigematsu “Depletion of arginine in yeast cells decreases the resistance to hydrostatic pressure” High Pressure Research, (published online 27 April 2015; accepted on 23 March 2015)
2. Kazuki Nomura, Hitoshi Iwahashi, Akinori Iguchi and Toru Shigematsu “Barosensitivity in *Saccharomyces cerevisiae* is closely associated with a deletion of the COX1 gene” Journal of Food Science, 80 (5), M1051-M1059 (published on line on 11 May 2015; accepted on 12 March 2015)
3. 重松 亨 「酵母の高圧環境における振る舞いと酵素化学反応」 生物工学93(4), 204-207 (2015年4月)
4. Yue-Qin Tang, Toru Shigematsu, Shigeru Morimura and Kenji Kida “Dynamics of the microbial community during continuous methane fermentation in continuously stirred tank reactors.” Journal of Bioscience and Bioengineering, 119(4), 375-383 (published April, 2015; Available online 16 October 2014)
5. 大久保 努, 井口 晃徳, 久保田健吾, 山口

隆司, 上村 繁樹, 原田 秀樹.「実証規模DHSリアクターの処理性能と硝化細菌群に及ぼすポンジ担体の影響」下水道協会誌, 51(623) 121-128 (2014年9月)

6. 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*, 151, 144-150, (January 2014)

著書および総説

1. Toru Shigematsu “13. Applications of High Pressure as a Nonthermal Fermentation Control Technique.” Özlem Tokuşoğlu and Barry G. Swanson eds. *Improving Food Quality with Novel Food Processing Technologies*, ISBN 9781466507241, pp. 299-317, CRC Press, London (Dec. 2014)
2. 岩橋 均, 重松 亨「暮らしに役立つバイオサイエンス」ISBN978-4-595-31581-7 放送大学教育振興会, 東京 (2015年3月20日)
3. 重松 亨「12. 圧力で微生物を制御する」日本微生物生態学会編「環境と微生物の事典」ISBN978-4-254-17158-7 C3545 p. 29. 朝倉書店, 東京 (2014年7月15日)
4. 井口 晃徳 暮らしに役立つバイオサイエンス (放送大学教材) 単行本: 177ページ
出版社: 放送大学教育振興会 (2015/03) ISBN-13: 978-4595315817 発売日: 2015/03

学会発表

国際学会

1. Shigeaki Ueno, Mayumi Hayashi, Toshimi Hasegawa, Akinori Iguchi and Toru Shigematsu “Inactivation of *Escherichia coli* in liquid whole egg by high hydrostatic pressure” International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Abstracts and Synopsis p. 68, Niigata Convention Center (Toki Messe) (October 30-31, 2014) ポスター発表
2. Toru Shigematsu, Yuki Kuwabara, Yuta Kaneko, Hiroyuki Takahashi, Kanako Nakajima, Miyuki Kido, Mayumi Hayashi and Akinori Iguchi “Temperature-pressure inactivation profile of a barosensitive mutant strain generated from *Saccharomyces cerevisiae*” International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Abstracts and Synopsis p. 71, Niigata Convention Center (Toki Messe) (October 30-31, 2014) ポスター発表
3. Kyoko Ishiguro, Hisae Oku, Yuka Nakahara, Aya Satomi and Toru Shigematsu “Effect of high hydrostatic pressure treatment on medical resources—*Swertia japonica* (Senburi)—” International Conference on Food for Health in Niigata 2014, Abstracts and Synopsis p. 93, Niigata Convention Center (Toki Messe) (October 30-31, 2014) ポスター発表
4. Yuki Chiba, Akinori Iguchi, Toru Shigematsu, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi, Masanobu Takahashi, Kengo Kubota and Hideki Harada “In situ ecophysiological analysis of uncultured *Caldiseirica* phylotype reside in UASB sludge granules treating sewage” International workshop on “UASB-DHS integrated system—a sustainable sewage treatment technology,” New Delhi & Agra, India (October 16-17, 2014) ポスター

5. Toru Shigematsu, Kenta Nakahara, Hiroki Kobayashi, Miyuki Kido, Kanako Nakajima, Mayumi Hayashi and Akinori Iguchi “Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by moderate hydrostatic pressure below 600 MPa with temperature below 100°C” 8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2014), Book of abstracts p. 70, ONIRIS, Nantes, France (July 15th – 18th 2014)
6. Kazuki Nomura, Hitoshi Iwahashi, Akinori Iguchi and Toru Shigematsu “The Key factor for Pressure Regulated Fermentation technology” 8th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology (HPBB2014), Book of abstracts p. 103, ONIRIS, Nantes, France (July 15th – 18th 2014) ポスター発表
7. Kengo Kubota, Tadashi Tagawa, Yuta Seto, Akihiro Nagamachi, Akinori Iguchi, Shigeki Uemura, Tsutomu Okubo, Masanobu Takahashi, and Hideki Harada, Application of DHS technology for sewage treatment and microbiology there, International Workshop on “UASB-DHS integrated system – a sustainable sewage treatment technology”, New Delhi and Agra, India, Oct., 2014.
8. Akihiro Nagamachi, Yuta Seto, Tadashi Tagawa, Tsutomu Okubo, Shigeki Uemura, Nobuo Araki, Akinori Iguchi, Kengo Kubota, Masanobu Takahashi and Hideki Harada : “Evaluation of a novel sewage treatment system by combining a primary settled + DHS reactor”, International Workshop on “UASB-DHS integrated system – a sustainable sewage treatment technology”, New Delhi and Agra, India, Oct., 2014.

国内学会

1. 中島加奈子, 山崎 京子, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨「糞の抗酸化活性評価と関連するポリフェノールの分析」日本農芸化学会2015年度大会, 岡山大学津島キャンパス (2015. 3. 26–29)
2. 木戸みゆ紀, 内藤 広賢, 五十嵐 友, 神保 真優香, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨, 高久 洋暁, 田中 宥司「焼酎開発を目的とした圧力処理による大麦澱粉の糊化・糖化」日本農芸化学会2015年度大会, 岡山大学津島キャンパス (2015. 3. 26–29)
3. 千葉 有紀, 佐藤 江美, 井口 晃徳, 林 真由美, 重松 亨, 山口 隆司, 原田 秀樹「下水処理UASB汚泥から高頻度に検出される未培養微生物の基質利用推定」第49回 日本水環境学会年会, 金沢大学 (2015. 3. 16~18)
4. 平澤 貴昭, 中原 健太, 小林 裕紀, 中島加奈子, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨「枯草菌胞子の不活性化を目的とした高圧力発芽および, 吸光度による発芽モニタリング」新潟県生物教育研究会第50回新津大会, 新潟薬科大学 (2014年12月7日)
5. 伊藤 俊輔, 佐藤 寛美, 古寺 和人, 中島加奈子, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨「*Escherichia coli*のコロニー形成能に及ぼす培養条件および遺伝子欠損の影響」新潟県生物教育研究会第50回新津大会, 新潟薬科大学 (2014年12月7日)
6. 重松 亨, 氏家沙織里, 波多野ちひろ, 山田一穂, 中島加奈子, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳「耐塩性酵母*Zygosaccharomyces rouxii* 圧力感受性変異株の探索」日本高圧学会第55回高圧討論会要旨集 p. 162, 徳島大学 (2014. 11. 22~24)
7. 千葉 有紀, 佐藤 江美, 林 真由美, 井口 晃徳, 重松 亨「下水処理嫌気性汚泥から高頻

度に検出される未培養微生物の基質利用推定」
第32回土木学会関東支部新潟会研究調査発表
会論文集 p 470-471, ハイブ長岡 (2014. 11.5)

8. 重松 亨, 桑原 夕紀, 金子 裕太, 高橋 裕幸, 中島加奈子, 木戸みゆ紀, 林 真由美, 井口 晃徳「圧力感受性酵母*Saccharomyces cerevisiae* a924E1の温度・圧力不活性化挙動および代謝解析」日本食品工学会第15回 (2014年度) 年次大会講演要旨集p. 34, つくば国際会議場 (2014年 8月 7日～9日)

9. 内田 翔太, 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, 下水の灌漑利用における病原性微生物を対象とした定量的微生物リスク評価, 第49回日本水環境学会年会, 金沢大学, 2015.3.16

10. 瀬戸 雄太, 長町 晃宏, 多川 正, 久保田 健吾, 井口 晃徳, 大久保 努, 上村 繁樹, 高橋 優信, 原田 秀樹 最初沈澱池-DHSシステムを用いた灌漑再利用のための都市下水処理, 第49回日本水環境学会年会, 金沢, 2015.3.18

11. 内田 翔太, 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 定量的微生物リスク評価に基づいた下水の灌漑利用時における複合感染リスクの評価 第51回土木学会環境工学研究委員会 環境工学研究フォーラム 日時: 2014年12月20日(土)～12月22日(月) 会場: 山梨大学甲府キャンパス 2014.

12. 瀬戸 雄太, 多川 正, 竹村 泰幸, 久保田 健吾, 井口 晃徳, 大久保 努, 上村 繁樹, 高橋 優信, 原田 秀樹 最初沈澱池-DHSシステムを用いた灌漑再利用のための都市下水処理 第51回土木学会環境工学研究委員会 環

境工学研究フォーラム 日時: 2014年12月20日(土)～12月22日(月) 会場: 山梨大学甲府キャンパス 2015.

13. 井口 晃徳, 佐々木波輝, 原田 秀樹, 重松 亨「ファージディスプレイ法を利用した特定微生物検出・回収技術のハイスループット化の検討」土木学会 土木学会平成26年度 全国区大会 第68回年次学術講演会 2014年 9月(大阪)

14. 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』, 東京, 2014年 3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

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

挑戦的萌芽研究

課題名: セシウムの吸収・濃縮に関わるきのこ遺伝子の特定とこれを利用した革新的技術の開発

研究代表者: 鹿児島工業高等専門学校・都市環境デザイン工学科・教授 山内 正仁

研究分担者: 重松 亨, 井口 晃徳

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「食品加工による血管拡張機能の効率的な増強」重松亨(研究代表者:西田 浩志)

受託/共同研究(民間等)

重松 亨: 1件

その他研究費

1. 文部科学省 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「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の開発」
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「エネルギー最小消費型下水処理技術の開発」
代表機関: 国立大学法人東北大学
共同研究者: 井口 晃徳
3. 公益財団法人内田エネルギー科学振興財団 試験研究費助成
「ファージディスプレイ法を利用した特定微生物の検出・回収技術の高度化 - 有用資源回収技術の確立を目指して -」
研究代表者: 井口 晃徳

2) 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(その他)

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. 国立大学法人 山形大学 非常勤講師
4. 青少年科学の祭典上越大会 演示実験 講師
5. 日本食品分析センター 食品品質保持技術研究会 講師
6. 新潟県立新潟西高等学校 大学講義体験 講師
7. 長野県松本美須ヶ丘高等学校 大学模擬講義 講師
8. 新潟県立新潟工業高等学校 課題研究講演会 講師
9. 新潟県立加茂高等学校 大学模擬授業 講師

井口 晃徳:

1. 新潟県立新潟南高校 SSH「SSEI臨地研修」講師
2. 新潟県立高田高校 高大連携実習講座 講師
3. 放送大学 分担講師「暮らしに役立つバイオサイエンス」担当
4. 青少年科学の祭典上越大会 演示実験 講師
5. 新潟県立小千谷高等学校 大学模擬授業 講師

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

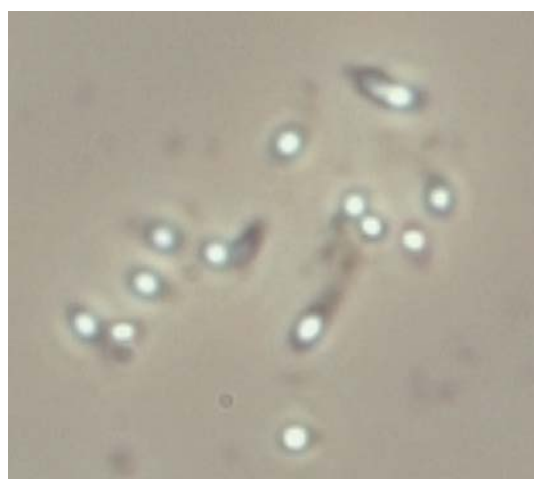
食の安全・安心という標語をよく見かけるが、安心は心理的なものであるのに対して安全は客観的、科学的なものである。食品の安全を脅かす最大の脅威は、一般に恐れられているような残留農薬でも放射性物質でもましてや食品添加物ではなく、微生物である。私たちは食品安全の最大の脅威である有害な微生物から食品を守ることを目標に研究を行っている。

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。



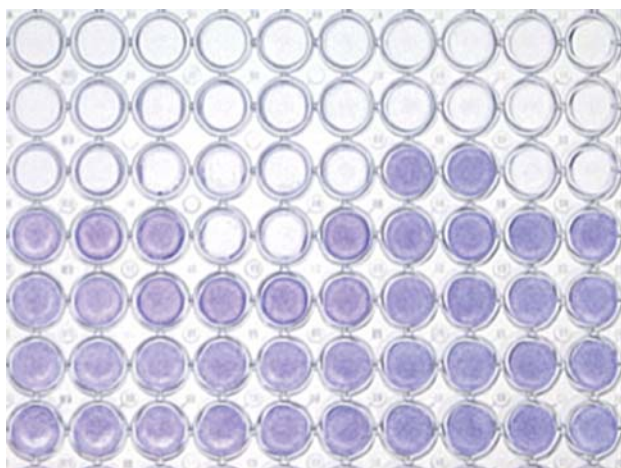
ボツリヌス菌の孢子

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。

2014年の研究成果

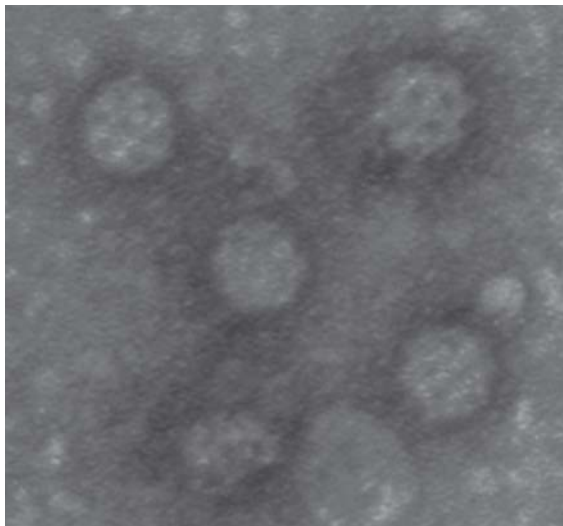
1) 米に含まれる孢子形成菌の制御因子

生化学的な分析により有効成分の特定に大きく近づいた。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ノロウイルスへの有効性を謳っている市販の消毒剤の比較を行っている。2014年には手指用のFCVに対する消毒剤の消毒効果をFCVを実際に手に塗布して測定した。掌では試験管内での消毒効果に比べて概ね1/100の効力しか示さなかった。これは皮膚の細かい皺の奥に入り込むことが一因と言われている。そのような中でも、ヨウ素系の消毒剤が最も有効であることが明らかになった。



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、おそらくはアミノ酸との相乗効果を持つ物質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った。



学術的な議論だけでは、HACCPの普及はできないと考え、新潟バイオリサーチパーク(株)と共同で、食品企業に対してHACCPを含む食品安全のコンサルティングを開始した。1社に対しては、経験が豊富なコンサルタントと組んで行った。1社では我々が単独で行い、業界団体からのHACCP認証を取得することができた。この経験により、HACCPが現場で実施することがむずかしいと言われる理由が理解でき、それへの対応という新しい研究の方向を見出すきっかけとなった。

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. To understand the difficulty we started a consultation for food industry, and found a new idea to adopt the HACCP concept to food industries selling hundreds of products.

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

Analyses of antigenic types of *Orientia tsutsugamushi* in naturally infected *Leptotrombidium* colonies by improved immunofluorescent microscopy using monoclonal antibodies. Hiroshi Urakami, Koji Okubo, Masahiro Fukuhara, Hitoko Misumi and Mamoru Takahashi, Med. Entomol. Zool., 2014, 65 (2):73-77

著書および総説

小長谷幸史, 月刊HACCP 2015年1月号 自主的な微生物検査を行う際の留意事項
～これから微生物検査を始める施設が考慮すべきこと～

学会発表

国内学会

1. 恙虫病患者発生地（有毒地）が無毒地になる過程 ツツガムシの側からの一考察 高橋 守, 三角 仁子, 中嶋 智子, 浦上 弘 第21回リケッチア研究会, 2015/11/20-21
2. 「ダチョウ油脂の抗菌活性成分」小長谷幸史 他 第107回日本食品衛生学会学術講演会 平成26年5月16日 タワーホール船堀（東京）

その他特記事項

1) 外部資金

受託／共同研究（民間）

浦上 弘：2件

2) 学外活動

学外活動（その他）

浦上 弘：

1. 新潟市 食の安全意見交換会 議長
2. 新潟県・食の安全・安心審議会 委員
3. 新潟県福祉保健部 食の安全危機管理研修 講師 「フードディフェンスの現状と対策」
4. 日本HACCPトレーニングセンター 理事長 講師
5. コーディネーター・ワークショップ 講師
6. フード・ディフェンス・ワークショップ 副講師
7. 上級コーディネーター・ワークショップ 副講師
8. 新潟バイオリサーチパーク(株) 食品安全部門顧問 講師
9. HACCP入門ワークショップ 新潟市 メディアシップ
10. 東洋環境分析センター平成26年度食品・衛生実務者セミナー「HACCPの考え方や最近の動向について」
11. International Conference on Food for Health in Niigata 2014 ランチョンセミナー 講師 食品安全と食品防御

小長谷幸史：

1. 日本HACCPトレーニングセンター理事

食品酵素学研究室

Laboratory of Food Enzymology

■ 教授 井 深 章 子 Prof. Akiko SHIMIZU-IBUKA, Ph.D.



立体構造解析および酵素学的解析手法を用いた食品関連タンパク質・病原菌由来タンパク質の機能解明



・ 味覚修飾タンパク質 ・ 甘味タンパク質 ・ 白癬菌 ・ 薬剤耐性菌

研究概要

I. 味覚修飾タンパク質の構造と機能の解明

味覚修飾タンパク質（酸味を甘味に変換する機能を持つタンパク質）にはミラクリンとネオクリンの2種類が知られている。また、味覚修飾活性はないが、ミラクリンとアミノ酸配列の相同性が高いタンパク質群の存在が知られており、“ミラクリン類似タンパク質(Miraculin-Like Protein, MLP)”と呼ばれている。我々は、組換えタンパク質の発現が比較的容易な複数のミラクリン類似タンパク質を研究対象とし、味覚修飾活性発現メカニズムの分子レベルでの解明を目指している。

II. 白癬菌の感染メカニズムの解明

白癬菌と呼ばれる真菌は、白癬（一般には水虫とも呼ばれる）という感染症の原因菌である。この菌は、皮膚・爪などに含まれる難分解性タンパク質ケラチンを栄養源として増殖する。しかしながら、これまで白癬菌について分子レベルでの解析はほとんどなされておらず、白癬に対して特異的に作用する薬剤も開発されていない。

近年の白癬菌研究により、システインジオキシゲナーゼ(CDO)あるいは亜硫酸排出ポンプ(Ssu1)遺伝子を欠損した変異株は、ケラチンを栄養源と

した場合の生育が著しく悪くなることが明らかになった。我々は、これらのタンパク質およびケラチン分解性プロテアーゼ（ケラチナーゼ）が白癬菌の感染・増殖に重要であると考え、X線結晶構造解析によりその構造を明らかにすることを目的としている。

III. β -ラクタマーゼの構造と基質特異性の関連

抗生物質は感染症に有効な薬剤として広く使用されている。 β -ラクタム剤はペニシリンに代表される抗生物質であるが、薬剤の使用に伴って薬剤耐性菌が多く出現するようになってきた。細菌が β -ラクタム剤に対する薬剤耐性を獲得するメカニズムは何通りかが知られているが、その中でも β -ラクタム剤耐性獲得で最も多いのが β -ラクタム剤分解酵素(β -ラクタマーゼ)の生産である。基本骨格や置換基の異なる新しい薬剤が開発・使用される度に、細菌の酵素が“進化”し、新規 β -ラクタム剤に対して分解活性を持つ“基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ”を生産する薬剤耐性菌が次々と出現し、医療現場では問題となっている。我々は、 β -ラクタム剤投与患者から単離された菌が生産する複数の β -ラクタマーゼを対象とし、X線結晶構造解析、変異型酵素を用いた基質特異性解析、熱安定性-薬剤耐性の相関解析を行って

いる。

2014年度の研究成果

I. ミラクリン類似タンパク質の大量発現系構築

本研究室では、ミラクリン類似タンパク質 (MLP) の中でも特にミラクリンとアミノ酸配列相同性が高いブドウ、ダイズ、ナンヨウザンショウ由来 MLP 遺伝子試料を保有している。本年度はブドウ由来 MLP の発現系構築を行った。大腸菌での発現を試みたところ、pColdを用いた系において可溶性画分に大量の目的タンパク質が得られた。酵母についても、pPICZ α ベクターを利用し *Pichia pastoris* GS115 を宿主とした発現系を構築し、目的タンパク質の培地への分泌が確認された。

II. 白癬菌由来システインジオキシゲナーゼの発現系構築

共同研究者である帝京大学医真菌研究センター・山田 剛准教授から遺伝子の提供を受け、白癬菌 *Arthroderma venbreuseghemii* がケラチンを栄養源として生育するのに重要な酵素システインジオキシゲナーゼの大量発現系を構築した。

III. β -ラクタマーゼ MOX-1 の立体構造解析

Mox-1 はプラスミド伝達性のクラス C β -ラクタマーゼであり、広い範囲の β -ラクタム薬に対し分解能を有する。このようなユニークな基質特異性を理解するために、本研究室では Mox-1 の X 線結晶構造を 1.5 Å 分解能で決定した。全体的な構造は既知のクラス C 酵素と類似していたが、構造の詳細を比較すると、いくつかの構造上の特徴が確認された。その 1 つは、主鎖の電子密度が、 Ω ループの一部と B3 β -ストランドの N 末端側で見えなかったという点である。この結果は、これらの領域が比較的動きやすい状態にあることを示唆しており、この構造的特徴が Mox-1 の基質特異性に影響している可能性がある。

Research projects and annual reports

Research projects

I. Structures and Functions of taste-modifying proteins.

Miraculin and neoculin are taste-modifying proteins, which have taste-modifying activity to convert sourness to sweetness. In order to reveal the taste-modifying mechanism of miraculin, we are now trying to give taste-modifying activity to miraculin-like proteins (MLPs) from various plants.

II. Pathomechanisms of dermatophytes

Dermatophytes are responsible for millions of superficial mycoses, including common diseases such as athlete's foot and nail infections. These fungi exclusively infect keratin-rich host structures such as hair, nails, and skin. The pathomechanisms of these filamentous fungi have remained largely elusive, due to the fact that they have not much studied at the molecular level. However, recently, it was discovered that the growth of dermatophytes is largely affected by the loss of two genes that encode cysteine dioxygenase (CDO) and sulfite efflux pump Ssu1. We try to analyze the structures of these proteins and keratin-hydrolyzing proteases to investigate the infection mechanism of dermatophytes.

III. Structure-function correlation in β -lactamases.

β -Lactam antibiotics represent the most widely used clinical antibiotics due to their efficacy and safety. In bacteria, resistance to β -lactams occurs by several mechanisms. Among Gram-negative bacteria, the most important mechanism is production of β -lactamases, the enzymes that hydrolyze and inactivate β -lactams. As clinical use of new β -lactam antibiotics increased, enzymes have evolved to hydrolyze wider range of β -lactam antibiotics. We perform structural study of several β -lactamases to investigate their substrate-recognition mechanism.

Annual reports

I . Over-expression of Miraculin-like protein (MLP).

This year, we tried to over-express MLP from *Vitis venifera* (grape). In the *E. coli* expression system, we obtained the recombinant grape MLP in soluble fraction using pCold vectors. In the case of the yeast, soluble recombinant protein was detected in the medium, using pPICZ α C vector in *Pichia pastoris* GS115.

II . Over expression of cysteine dioxygenase (CDO).

The CDO gene from *Arthroderma venbreuseghemii* was provided by our co-worker, Dr. Tsuyoshi Yamada from Teikyo University Institute of Medical Mycology. We constructed over-expression system of cysteine dioxygenase in *E. coli*, using pCold vectors. The enzyme was purified with TALON resin.

III . Crystal structure of Mox-1

Mox-1 is a unique plasmid-mediated class C β -lactamase that hydrolyzes wide range of β -lactams, including the expanded-spectrum cephalosporins cefepime and moxalactam. In order to understand the unique substrate profile of this enzyme, we determined the X-ray crystallographic structure of Mox-1 β -lactamase at a 1.5-Å resolution. The overall structure of Mox-1 β -lactamase resembled that of other class C enzymes, with some notable exceptions. In Mox-1, the main-chain electron density is not observed in two regions, one in the Ω loop and the other in the N terminus of the B3 β -strand. It suggests that there is significant structural flexibility of these regions, a property which may impact the recognition and binding of substrates in Mox-1.

発表論文

Oguri T, Furuyama T, Okuno T, Ishii Y, Tateda K, Bonomo RA, Shimizu-Ibuka A. “Crystal structure of Mox-1, a unique plasmid-mediated class C β -lactamase with hydrolytic activity towards

moxalactam.” *Antimicrob Agents Chemother.* 58, 3914-3920 (2014).

学会発表

国内学会

平成26年度化学系学協会東北大会「微生物感染におけるタンパク質の働き」(2014年9月20日, 山形大学工学部米沢キャンパス)

その他特記事項

1) 外部資金

科研費

基盤研究 (C)

課題名：味覚受容体における味物質認識機構の解析

研究代表者：井深 章子

基盤研究 (A)

課題名：味物質シグナルの末梢応答・中枢認知・その連動系の解析および食と健康の科学への応用
研究代表者：東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任教授 阿部 啓子

研究分担者：井深 章子

2) 学外活動

学会活動

日本農芸化学会英文誌 (Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry) 編集委員

学外活動 (その他)

1. 山形県科学技術会議委員

2. 山形県科学技術奨励賞審査委員

3. 安積黎明高校 学部学科ガイダンス

4. 新発田農業高校 出前授業

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。

2014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

昨年に引き続き4-フルオロフェニルグリオキシムを有する錯体の合成固相気相酸素挿入反応を行い好結果を得た。また、キラルな軸配位子をキラルハンドルとしたキラルな結晶を作成し、このキラルな結晶格子に制御された不斉酸素挿入反応を行い、不斉選択性を得た。

2) 天然物化学

前年に引き続きダチョウ脂の抽出物において、抗菌活性を有する分画の追跡を行った。また、ダチョウ脂よりメタノール抽出物を再現性良く大量に得られる方法確立した。

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. And, Chiral oxygen insertion reaction controlled by chiral Crystal lattice was occurred by irradiation of visible light.

2) Bioactive natural products

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

学会発表

国内学会

1. アルキルコバロキシム錯体の固相気相酸素挿入反応, 高橋 麻実, 川本 美咲, 阿部 優斗,

新井 祥生, 大胡 恵明, 第68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.82-83 (新潟, 2014年11月)

2. ジ (4-フルオロフェニル) グリオキシムを平面配位子とするアルキルコバロキシム錯体の固相気相酸素挿入反応, 新井 祥生, 高橋 麻実, 川本 美咲, 阿部 優斗, 大胡 恵明, 日本化学会 第95春季年会 (2015), 要旨集2PB-117 (千葉, 2015年 3 月)

3. ダチョウ油脂の抗菌活性成分, ○小長谷幸史, 浦上 弘, 藤田 光之, 飯島 浩幸, 入山 悠樹, 新井 祥生, 第107回日本食品衛生学会学術講演会, 講演要旨集 p.74 (千葉, 2014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

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)

1. 新潟県立新津高等学校学校評議員

2. 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

**新潟薬科大学 応用生命科学部
研究年報 2014 (平成 26 年)**

発行日：2015 年(平成 27 年) 9 月 1 日

発行者：新潟薬科大学 産官学連携推進センター

〒956-8603 新潟市秋葉区東島字山居265番地1

TEL 0250-25-5402 FAX 0250-25-5021

<http://www.nupals.ac.jp/liaison/>

■研究に関するご相談・お申し込み

新潟薬科大学 産官学連携推進センター

〒956-8603 新潟市秋葉区東島字山居265番地1 E-mail:liaison@nupals.ac.jp 事務局

<http://www.nupals.ac.jp/liaison/>

TEL 0250-25-5402 FAX 0250-25-5021

業務時間 平日9:00～17:00（土日祝日は休業）



新潟薬科大学は、2015年4月
財団法人大学基準協会から、
協会の定める大学基準に
適合していると認定されました。