

I 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者名	所属部局名	職名
老川 典夫	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科	教授

(2) プロジェクト参加研究者数 7 名

(3) 研究プロジェクトに参加する主な研究者

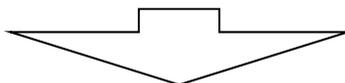
研究者名	所属・職名	プロジェクトでの研究課題	プロジェクトでの役割
老川 典夫	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	微生物のゲノム解析	全体総括、研究チーム1 の総括、D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種
松村 吉信	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	微生物のゲノム解析	環境ホルモン BPA 分解菌 <i>Sphingomonas</i> 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種
下家 浩二	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	動物細胞のエピゲノム解析	神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発(ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC 阻害剤系を中心に)
吉田 宗弘	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	植物細胞のエピゲノム解析	研究チーム3の統括、セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と機能性食品の開発
細見 亮太	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・准教授 (前:助教)	植物細胞のエピゲノム解析	セレン(Se)に着目した新しい機能性食品の開発
山中 一也	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・准教授	植物細胞のエピゲノム解析 微生物のゲノム解析	D-アミノ酸に着目した新しい機能性食品の開発
(共同研究機関等) 丸岡 弘規	倉敷紡績株式会社・ 技術研究所・研究員	植物細胞のエピゲノム解析	セレン耐性植物(及び神経細胞)のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究

<研究者の変更状況(研究代表者を含む)>

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
微生物のゲノム解析	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・教授	土戸 哲明	食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発

(変更の時期:平成 26 年 4 月 1 日)



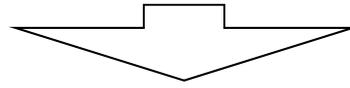
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
鳥取短期大学・ 生活学科・助教	先端科学技術推進機構・ 化学生命工学部・助教	細見 亮太	セレン(Se)に着目した新しい機能性食品の開発

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
動物細胞のエピゲノム解析	先端科学技術推進機構・ 研究員	池内 俊彦	神経細胞のエピゲノム解析と ゲノム DNA のメチル化機構 の研究

(変更の時期:平成 27 年 4 月 1 日)



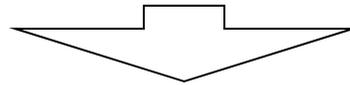
新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
JNC 株式会社・ 主任研究員	先端科学技術推進機構・ 理工学研究科・准教授	山中 一也	D-アミノ酸に着目した新しい 機能性食品の開発

旧

プロジェクトでの研究課題	所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割
動物細胞のエピゲノム 解析	大阪大学・ 蛋白質研究所・助教	木村 博信	神経細胞のエピゲノム解析と ゲノム DNA のメチル化機構 の研究

(変更の時期:平成 29 年 3 月 31 日)



新

変更前の所属・職名	変更(就任)後の所属・職名	研究者氏名	プロジェクトでの役割

## II 研究成果の概要

### (1) 研究プロジェクトの目的・意義及び計画の概要

これまでの生命科学の進歩は、遺伝子 DNA の塩基配列(ゲノム情報)の解読による所が大きい。この過程には、Sangerシーケンシング法を用いた蛍光キャピラリーDNAシーケンサーが貢献してきた。本学でも、ハイテク・リサーチ・センター整備事業や戦略的研究基盤形成支援事業で、当時の最新の蛍光キャピラリーシーケンサーが導入され、研究を促進してきた。しかし、近年の生命科学では、さらに進化した次世代 DNA シーケンサーが登場し、逐次 DNA 合成を用いた超並列シーケンシングとメタゲノム解析(生物群のなかの多数の個体のゲノム情報を同時に得る)が可能となり、これを用いたゲノムとエピゲノム解析が急速に進んでいる。本プロジェクトでは、次世代シーケンサーのベンチトップ型を導入し、従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同で行う。同一の研究方法のもとに連携し発展させ、シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させる。そして、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物(D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌)の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物(食品汚染菌)の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目的とする。また、多方面の研究分野を包括し発展させ、ヒトの健康向上と世界的な健康生命研究拠点形成を目指して、生物種の違いにより 3 研究チーム(微生物ゲノム研究チーム、動物細胞エピゲノム研究チーム、植物細胞エピゲノム研究チーム)が共同研究を行う。

### (2) 研究組織

#### 《 研究代表者の役割 》

研究代表者は、全体の責任者としてプロジェクト全体を統括し、研究を円滑に進めた。

#### 《 各研究者の役割分担や責任体制 》

研究体制は、対象とする生物種の違いにより 3 研究チームから構成するが、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて、同一の研究方法のもとに連携を図った。3 研究チームは、微生物ゲノム研究チーム(研究チーム 1)、動物細胞エピゲノム研究チーム(研究チーム 2)、植物細胞エピゲノム研究チーム(研究チーム 3)とし、研究チーム 1 を老川が、研究チーム 2 を下家(当初は池内が担当していたが退職に伴い平成 27 年 4 月から担当変更)、研究チーム 3 を吉田が統括した。また山中は、研究チーム 1 及び 3 に所属し、チーム間の連携を強化した。

#### 《 研究者間・研究チーム間の調整・連携の状況 》

各研究チーム内の研究発表会を 1 ヶ月に 1 度、全体のプロジェクト会議を 6 ヶ月に 1 度実施し、生物種の枠を越えて、またゲノム・エピゲノムの枠を越えて連携を図った。研究者が複数のチームに在籍し、連携の強化を図った。さらに研究チーム 1 と 3 の連携研究テーマを設定し、共同で研究活動を実施している。

#### 《 研究支援体制 》

本学先端科学技術推進機構による試薬や機器等の購入に際しての全面的な管理事務のバックアップの他、PD の雇用は関連部局の支援を、さらに進捗状況をチェックする研究推進部のサポートなど、万全の体制を整えた。

#### 《 大学院学生・PD、RA の活用状況 》

研究活動を推進するために、7 名の各研究者の下、研究チーム 1 では、PD1 名、定時職員 2 名、院生のべ 7 名(内 RA 3 名)、学部生のべ 9 名、研究チーム 2 では、院生のべ 6 名、学部生のべ 8 名、研究チーム 3 では定時職員 1 名、院生のべ 2 名がプロジェクトに参加し、若手の育成にも貢献してきた。また、当プロジェクトでポストドクトラルフェローとして勤務していた加藤志郎氏は、当プロジェクトでの研究業績が評価され、平成 28 年 12 月から香川大学の助教に着任し、若手研究者の育成を具体的な形に現すことができた。

#### 《 共同研究機関等との連携状況 》

客員研究員(中田氏)とは松村が月 1~2 回の頻度でメール会議を行ってきた。学外共同研究員(丸岡氏)とは下家が月 1~2 回の頻度で会議を行った。メールでも頻繁にやり取りし、学内研究発表会において進捗状況報告や研究に関する討論を行った。

### (3) 研究施設・設備等

#### 《 プロジェクトに適合した装置設備の整備 》

イルミナ次世代シーケンサーMiSeq システム、ロシュ次世代シーケンサーGSJunior システム、DNA 断片化解析システムを計画通り導入し、本研究に十分活用することができた。

#### 《 研究装置・設備の利用状況(利用時間数を含む) 》

HRC302 室:46.62 m<sup>2</sup>(6 名/日), HRC303 と 304 室:71.207 m<sup>2</sup>(6 名/日),

HRC305 室:101.678 m<sup>2</sup>(8 名/日)

イルミナ次世代シーケンサーMiSeq システム:350 時間/年

ロシュ次世代シーケンサーGSJunior システム:144 時間/年, DNA 断片化解析システム:30 時間/年

なお、平成 27 年度から動物実験室が整備された。動物実験は、関西大学動物実験委員会の規定に基づいて実施した。保有していた設備が有効に活用され、また、新たに導入された設備も有効に活用され、研究開発の進捗に大きく貢献した。

#### 《 外部の研究資金の導入状況等 》

学内の研究メンバーの外部資金導入状況は以下の通りである。

##### ・日本学術振興会科研費:

平成 25 年度 3 件 5,460 千円;平成 26 年度 3 件 4,290 千円;平成 27 年度 3 件 4,290 千円;

平成 28 年度 3 件 4,160 千円;平成 29 年度 3 件 4,290 千円

##### ・学外共同研究・受託研究・指定寄付等:

平成 25 年度 11 件 17,281 千円;平成 26 年度 3 件 4,159 千円;平成 27 年度 6 件 5,375 千円;

平成 28 年度 9 件 5,213 千円;平成 29 年度 15 件 7,443 千円

### (4) 研究成果の概要 ※下記、IIIに対応する成果には下線及び\*を付している。

以下に各テーマにおける進捗結果を記述する。特筆すべき成果については【★】を付記し、「13. 研究発表の状況」の業績と対応させた。

中間評価以降、研究チーム 1 および 3 の連携研究テーマとして、『シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を対象として、培地への亜セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響』と、『SMT のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (*At*-HMT-3)の *in vitro*における機能解析』を実施した。また、研究チーム 1 および 2 の連携研究テーマとして、『Bisphenol A による神経突起伸展と DNA の脱メチル化との関連性に関する研究』を新たに課題設定し、実施した。これらの連携研究テーマ実施により、世界的な健康生命研究拠点形成のための基盤を形成することができた。以下に、具体的な研究テーマ別の研究成果の概要を述べる。

#### [1] 微生物ゲノム研究

##### (a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発 \* 1a(チーム 1:老川・山中)

日本酒醸造工程から単離された乳酸桿菌 2 株(*Lactobacillus sakei* LT-13, *L. sakei* LK-145)及び乳酸球菌 2 株(*Leuconostoc mesenteroides* LT-38, *L. mesenteroides* LK-151)の 4 株の乳酸菌を対象として、本事業で導入した次世代シーケンサーを用いこれら乳酸菌ゲノムの *de novo* 解析を行った。*L. sakei* LK-145 及び *L. mesenteroides* LK-151 は酒造会社の酒蔵より単離された D-アミノ酸高生産株であり、*L. sakei* LT-13 及び *L. mesenteroides* LT-38 はその対照として用いた D-アミノ酸低生産株である。まず GS junior 454 を用いて 500 base read の shotgun 解析及び 8 kb span での paired end 解析を、Ion PGM を用いて 200 base read の shotgun 解析をそれぞれ行った。その結果、4 株すべての乳酸菌ゲノムのドラフト配列マップを構築することに成功した。推定ゲノムサイズは、それぞれ 1.95 Mbp(*L. sakei* LK-145)、1.94 Mbp(*L. sakei* LT-13)、2.07 Mbp (*L. mesenteroides* LK-151)、2.01 Mbp (*L. mesenteroides* LT-38)であることが明らかとなった。また、プラスミド保有数は、それぞれ 3 つ [*L. sakei* LK-145]、1 つ [*L. sakei* LT-13]、3 つ [*L. mesenteroides* LK-151]、1 つ [*L. mesenteroides* LT-38]であることが明らかとなった。得られたリードデータの解析と推定代謝経路の解析をそれぞれ MiGAP と KEGG Automatic Annotation Server (KAAS)を用いて行ったところ、D-アミノ酸生合成酵素遺伝子は両株に共通していたものの、その塩基配列及びアミノ酸配列には相違が認められ、また、種々の L-アミノ酸及びその中間体の代謝経路の保存性には複数の相違があることが明らかとなった。shotgun 解析を繰り返すことによりギャップ領域をすべて解読し、D-アミノ酸高生産及び低生産乳酸菌の全ゲノム解析、完了し、データバンク(DDBJ)に登録するとともに、それぞれの研究結果を米国の当該分野では著名な学術誌である Genome Announcements に投稿した。

また、シスタチオニン β-リアーゼ(*MalY*)遺伝子(*malY*)を大腸菌で発現させ、*in vitro*での機能解析を行った。

MalY の研究は大腸菌において最も進んでおり、大腸菌 MalY は maltose regulon の repressor であることが知られている。近年、同酵素が大腸菌における D-Ala 代謝に関与する可能性が示唆されたものの、その詳細は不明なままである。我々が同定した乳酸菌 MalY は大腸菌 MalY と高い相同性を示すことから、大腸菌 MalY もまた同様の活性を有する多機能型酵素である可能性が示唆され、その生理的機能に興味を持たれる。大腸菌ゲノム上において *malY* 遺伝子は maltose 代謝関連遺伝子とクラスターを形成している一方で、乳酸菌においては他の糖 (lactose, cellobiose) 代謝に寄与すると予測される PTS 関連遺伝子群とクラスターを形成している。また、*malY* 遺伝子を保持する乳酸菌 (*L. sakei* LT-13) ゲノム上には推定の maltose regulon 関連遺伝子が保存されていない。そこで我々は、前記 2 株の乳酸菌を用いて種々の糖に対する糖資化性試験を行った。その結果、両株ともに lactose および cellobiose に対する資化能を欠くとともに、*L. sakei* LT-13 株のみが maltose に対する資化能を有するということが明らかになった。この結果は、ゲノム情報に基づく代謝経路解析からの予測に反する結果であり、MalY の生理的機能の解明および D-アミノ酸生産との関連を明らかにするためには *in vivo* での解析が必要であることが明らかとなった。

さらに、黒酢醸造工程から単離した D-アミノ酸高生産乳酸菌の D-アミノ酸生産能や D-アミノ酸代謝関連酵素の酵素科学的性質を解明し、本菌を黒酢仕込み時に添加することによって、製品中の D-アミノ酸濃度を高めた D-アミノ酸強化黒酢を生産することに成功した (製法特許取得、詳細は項目 14「その他の研究成果等」に記載)。本 D-アミノ酸強化黒酢中には、D-アミノ酸 (美容アミノ酸、旨味アミノ酸) が通常仕込みの黒酢より多く含まれており、これに旬の生のフルーツを漬けて作った 3 種類の生フルーツ黒酢のセット (商標:ピュアミノセット) を、株式会社関大パンセを通じて平成 28 年 5 月から発売を開始した。本商品によって、健康増進効果が期待される生理活性 D-アミノ酸を含む食品の開発と発売を具体的な形として現すことができた。[参考資料 5]

#### **(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種 \* 1b (チーム 1: 松村)**

ビスフェノール A (BPA) 分解能を有する *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株を対象として、本事業で導入した次世代シーケンサーを用い本菌ゲノムの *de novo* 解析を行った。本菌の全ゲノム解析では 755,344 個の塩基配列断片が得られ、これらの塩基配列断片を 421 個の Contig に集約し、ゲノム長は約 5.3 Mb であることが明らかとなった。一方で、本解析のみでは完全なゲノム塩基配列が得られなかったため、PacBio RSII シーケンサーを用いた Long read 解析も行い、これらのデータを統合することで AO1 株の完全長の塩基配列データを解読することができた。その結果、AO1 株には 6 種類の環状 DNA が確認され、その 2 種類には機能性 RNA 遺伝子がコードされていることから生育に必須の染色体 DNA (Chromosome1 [3,731,049 bp] と Chromosome2 [956,822bp]) と予想され、その他はプラスミド (plasmid1 [263,320bp], plasmid2 [112,111bp], plasmid3 (pBAR1) [80,312bp], plasmid4 [66,398]) と判断された。得られた塩基配列情報を基に NMPDR データベース (<http://www.nmpdr.org/FIG/wiki/view.cgi/Main/WebHome>) を用いた RAST システム (<http://rast.nmpdr.org>) で AO1 株の遺伝子推定を行った結果、タンパク質をコードする遺伝子の約 72% が Chromosome1 に、約 16% が Chromosome2 に存在していた。使用したデータベースでは、それぞれの代謝系を subsystem というよく似た代謝系を一つの集団としてグルーピングされ、一方、遺伝子機能が推定されてもその代謝系に属するか推定できない遺伝子は全て Others に振り分けられる。今回の解析では subsystem にグルーピングされない遺伝子が多数存在しているが、AO1 株の特徴として芳香族化合物分解に関わる遺伝子が Chromosome1 (38 遺伝子) および Chromosome2 (19 遺伝子) に多数存在していた。また、Plasmid 1 には膜輸送に関わる遺伝子が、Plasmid 2 には病原因子に関わる遺伝子がコードされ、プラスミドの特徴を示していた。これまでの我々の研究で pBAR1 には、BPA 分解に関わる遺伝子が少なくとも 4 種類コードされていると予想されているが、現状ではそれらが subsystem に登録されていないため、芳香族化合物分解に関わる遺伝子が少なく見積もられた。以上の結果を統合すると、AO1 株による BPA 分解代謝経路はほぼ推定され、pBR1 にコードされた遺伝子産物によりプロトカテク酸まで変換された後、Chromosome2 にコードされたプロトカテク酸代謝経路および  $\beta$  ケトアジピン酸経路によりアセチル CoA およびスクシニル CoA に代謝され、TCA 回路などに吸収されるものと予想された。一方で、これらの代謝系に関わる一部の酵素構造遺伝子は未確認であった。そこで BPA 存在下で転写誘導される遺伝子の特定を、次世代シーケンサー-Miseq を用いた RNA-seq 法で試みた。なお、AO1 株細胞は L 培地または BPA (115mg/L) を含む L 培地で 30°C 振盪培養した対数増殖期後期のものを使用し、細胞破碎は Isogen II を用いたビーズ破碎法、mRNA 調製は MICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit (Thermo Fisher Scientific 社)、cDNA 合成は SMARTer® Stranded RNA-Seq Kit (Clontech 社)、シーケンス反応は MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 社) を用いた。なお、両試料とも約 20M reads の主にタンパク質をコードした mRNA から合成された cDNA 配列データを得ることができ、その結果を各遺伝子に分類分けし、特徴的な発現挙動を示した遺伝子をまとめた。その結果、タンパク質合成に関わる遺伝子は常に高い発現を示していた。また、pBAR1 の遺伝子は BPA 添加時に高い発現を示すことから BPA 分解に強く関わっているものと予想される。一方、*bisdAB* は構成的に発現し、特に *bisdB* は常に高い発現量を示して

いた。*bisdA* の発現量を効果的に高めることで AO1 株の BPA 分解活性は向上するものと予想された。一方、AO1 株の pBR1 の構造が非常に不安定であることが以前から知られていた。そこで pBAR1 の遺伝子を詳細解析した結果、93 個の遺伝子のうち、接合伝達関連遺伝子が 20 個、トランスポゾン配列が 14 個あることが明らかとなった。これら DNA の可動に関わる因子が pBAR1 の不安定性に関与していると予想され、pBAR1 の不安定化因子欠失も AO1 株の BPA 分解の向上に繋がると予想される。また、*bisdAB* は構成的に発現し、特に *bisdB* は常に高い発現量を示していた。一方で、Chromosome2 にコードされている BPA 分解関連予想遺伝子の発現量は非常に低く、これら発現量の低い遺伝子の発現効率の向上が BPA 分解活性の向上に繋がるものと予想された。さらに、AO1 株のゲノム構造が非常に不安定であると知られていたため、BPA 非分解変異株 AO1L 株のゲノム構造解析も行った。その結果、pBAR1 および Plasmid 4 でのみ多数の欠失領域が認められ、その他のゲノムには欠失を含む変異領域は認められなかった。pBAR1 では 93 遺伝子のうち、20 個の接合伝達関連遺伝子と 14 個の可動因子が、Plasmid4 では 76 遺伝子のうち、4 個の接合伝達関連遺伝子と 7 個の可動因子が予想されている。これら DNA 可動に関わる因子が pBAR1 や Plasmid4 の不安定性に関与していると予想され、可動因子の欠失や不活化が AO1 株の安定性向上や BPA 分解の向上に繋がるものと予想される。

最後に、本プロジェクトおよびこれまでの独自研究の結果では効果的な AO1 株の改良およびその能力検証は行えていないが、一方で本プロジェクトによって AO1 株の BPA を含む環境汚染物質分解能の安定化およびその向上に向けた可能性は示された。今後、それらの実現を通して環境汚染土壌や水質の改善に AO1 株が十分に活用できるものと期待される。

### **(c) 食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発 \* 1c (チーム 1: 土戸・松村)**

食品分野で耐性菌として問題となっている枯草菌を対象として、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、有機ペルオキシドなどの活性酸素種に対する防御因子をコードする遺伝子群(KATs、SODs、ORGs)の組合せの多重遺伝子破壊株を構築し、熱ストレスや種々の薬剤に対する感受性化および耐性化現象などの表現型を解析した。過酸化水素に対しては KATs の欠損により顕著な増殖阻害や感受性化が生じたが、ORGs の欠損では致死濃度での耐性化が確認された。*t*-ブチルペルオキシドでは KATs、SODs、ORGs ユニット単独や組み合わせでも致死濃度での耐性化が確認された。これらの結果から、枯草菌には過酸化水素や有機ペルオキシドに対する未知の耐性化因子が存在することが明らかとなった。

なお、当初計画では食品汚染菌として枯草菌を主な研究対象としていたが、平成 26 年 3 月に土戸が退職したため今後は大腸菌を中心に研究を展開することとした。

大腸菌細胞を抗菌性陽イオン界面活性剤(第四アンモニウム塩)である臭化トリメチルアンモニウム(CTAB)で処理すると一部の細胞が比較的高い耐性を示すことを我々は報告している。この研究で、野生型大腸菌 OW6 株から取得された CTAB 耐性株 OW66 株のゲノム構造を、DNA マイクロアレイ法を用いた野生型株との比較ゲノム構造解析により、7 カ所に変異が生じていることを確認し、これらの変異全てが薬剤耐性化につながっていることを明らかにした。また、OW66 株が多くの抗生物質を含む抗菌剤に耐性を示す多剤耐性株であると同時に *soxR66* 単独で CTAB 耐性化に寄与していることから、抗菌剤耐性化に最も重要な変異であるとして予想された。さらに、*soxR66* 変異は SoxR 機能を構成的とするため、結果として細胞のスーパーオキシド適応が向上していた。また、これとは別の CTAB 耐性株でも複数のゲノム上の変異が確認され、抗菌剤処理による変異の蓄積に再現性が確認された。耐性株 L-200 株では対数増殖期中の永生細胞(persister cell)割合が高い変異株であると確認された。さらに、得られていたその他の耐性菌の特性解析も試みた。次世代シーケンサーによるリシーケンス解析により CTAB 耐性変異株における遺伝子変異を確認した結果、多数の部位で遺伝子が確認されたため、耐性化の要因については推定できなかった。そこで、L-200 株で確認されていた永生細胞の出現割合をその他の変異株でも測定した。その結果、測定した CTAB 変異株全てにおいて永生細胞出現割合が野生型大腸菌に比べて増加していた。この永生細胞出現割合の増加も栄養細胞の CTAB 耐性化とともに寄与しているものと予想される。特に、CTAB 耐性の高い L-540 株はより高い永生細胞出現割合を示していた。これまでの CTAB 耐性 OW66 株と野生型 OW6 株において CTAB 処理時に OW6 株のみスーパーオキシドの発生が確認され、死滅とスーパーオキシド発生に強い相関が得られていた。そこで、永生細胞出現率の高い CTAB 耐性変異株における CTAB 処理時のスーパーオキシド発生をその特異的応答蛍光試薬 BES-So-AM を用いて検証した。その結果、これらの永生細胞高出現型の CTAB 耐性株では、OW66 株と異なり、一部の細胞で顕著なスーパーオキシド発生が確認され、これら耐性株の CTAB 耐性は休眠型細胞である永生細胞形成率の増加によるものであると一致していた。さらに CTAB 耐性株の栄養細胞および永生細胞における各種ストレス耐性を調査した結果、抗生物質を含む抗菌剤には永生細胞は高い耐性を示し、栄養細胞は感受性を示すが、高温や低温ストレス環境では栄養細胞が比較的高い耐性を示すのに対して永生細胞は感受性を示す結果が得られた。このことから、永生細胞を含むバクテリア細胞の殺滅処理には抗菌剤処理と加熱処理などの温度処

理の併用または連続処理が効果的であると予想された。

以上の結果、微生物制御において活性酸素発生が殺微生物細胞効果に重要であることを示すとともに耐性化の要因となるゲノム変異を誘発することを示している。本プロジェクトでは、ストレス耐性細胞を生まない微生物制御法は提案できていないが、今回得られた永生細胞の効果的な殺滅処理法は構築できた。今後、その他の要因で形成される永生細胞にも加熱処理と抗菌剤処理の併用が有効であるのか検証を行う。

## **[2] 動物細胞エピゲノム研究**

### **(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発 \* 2a (チーム 2: 池内, 下家)**

神経突起伸長作用を有する *nur77* 遺伝子(*nur77*)を対象として、まず本遺伝子のプロモーター結合遺伝子群の解析を行った。その結果、*nur77* のプロモーター領域は、HDAC (histone deacetylase)阻害剤である trichostatin A (TSA)やバルプロ酸(VPA)添加によりアセチル化ヒストン H3 の 14 番目のアセチル化リシン残基 (Ac14H3)と結合すること、その結合は C646 を共添加すると阻害されることが明らかになった。そこで、PC12 細胞の染色体 DNA から *nur77* のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の 5' 側に挿入したプラスミドを作成し、DLR (dual luciferase reporter) assay を行った。その結果、*nur77* のプロモーター活性は、TSA や VPA 添加により有意に上昇することが明らかとなった。このことから、*nur77* のプロモーターの活性化は、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな発現制御を受けていることが明らかとなった。そこで、HDAC 阻害剤 (MS-275) 添加後の細胞抽出液を回収し、本事業で導入した次世代シーケンサーを用いて抗 Ac14H3 抗体による ChIP-Seq(chromatin immunoprecipitation-sequence)解析を実施した。その結果、発現制御に関与する 20 個の遺伝子(*vom2r3*, *srd5a1*, *papd7*, *thbs2*, *wdr27*, *ythdc2*, *sel1l2*, *vrk1*, *papola*, *ephb1*, *nsg2*, *zfp958*, *tsn*, *cdh19*, *lphn3*, *pcdh17*, *exoc2*, *lrf4*, *prrr16*, *ftmt*)が同定された。また、細胞内 cAMP の濃度を上昇させる forskolin(FSK)が添加 24 時間以内に突起伸長作用を有することや、この突起伸長時に Immediate Early Genes の一つである *nur77* が関与していることを明らかにした。そこで、FSK が有するであろうエピジェネティックな遺伝子発現機構について、集中的に解析を行った。その理由は、そもそも HDAC 阻害剤では、エピジェネティックな遺伝子発現が惹起されることは当然であるが、クロマチン構造変化を引き起こす活性を持たない FSK がエピジェネティックな遺伝子発現機構を介して神経突起を伸長させているならば非常に興味深い知見となるからである。その結果、FSK 添加後、*nur77* 遺伝子発現が約 1 時間から 4 時間まで一過的に上昇することを再確認した。そして、ヒストン H3 テイル内に存在する 14 番目のリシン残基のアセチル化(K14AcH3)の上昇が同様のタイムコースで見られることを見出した。この時、*nur77* 遺伝子の 5' 側配列のプロモーター配列の一部をプライマーとした ChIP assay を実施したところ、確かに K14AcH3 はプロモーター領域に結合していることが明らかになった。次に、このプロモーター配列上には、リン酸化 CREB が結合し得る CRE 配列を 4 つ有しているため promoter assay を行い、CRE 配列の重要性について検討した。その結果、5'側から CRE 配列部分を欠失した変異体を 4 つ作製し、実験を行ったところ、欠失が多いほど promoter activity が減少することが分かった。従って、*nur77* 遺伝子のエピジェネティックな発現上昇には、リン酸化 CREB も関与していることが示唆された。ただし、4 つの CRE 配列におけるリン酸化 CREB がどの様に作用しているかについては、今後の課題である。さらに、神経突起伸長に関わるとされる遺伝子群から、FSK による突起伸長作用に関わる遺伝子群の探索を行ったところ、*neuroD* 遺伝子の発現は変化が無く、*synapsin1* と  $\beta$ III チューブリン遺伝子の発現上昇を見出した。 $\beta$ III チューブリン遺伝子は骨格タンパク質であることから、得られた結果については妥当であると判断される。*synapsin1* 遺伝子については、さらに実験を進めた。*nur77* 遺伝子の転写産物に対する siRNA を細胞内に導入し、*synapsin1* 遺伝子の発現が減少するのかを解析した。その結果、コントロール用 siRNA では *synapsin1* 遺伝子の発現は上昇したが、*nur77* 遺伝子の転写産物に対する siRNA では、ほぼ完全に *synapsin1* 遺伝子の発現を抑制していた。これらの結果から、FSK による神経突起に伸長には、PKA シグナルパスウェイが何らかの分子機構でクロマチン構造変化を引き起こし、リン酸化 CREB を *nur77* 遺伝子のプロモーター領域にリクルートし、遺伝子発現を上昇させ、その翻訳産物が *synapsin1* 遺伝子の発現を上昇させることが重要であることが強く示唆された。

以上から解析結果をヒトの治療薬開発として評価すると、FSK を介した細胞内 cAMP の上昇や HDAC 阻害剤によって神経細胞への細胞生存維持作用と神経突起伸長作用の解明が行われたことにより、サプリメントや食品添加物として利用されている FSK は、神経細胞での作用を謳った製品としては販売されておらず、神経変性疾患患者への機能性サプリメントとして活用することが期待される。また、HDAC 阻害剤 VPA は、既に上市されていることから、神経変性疾患患者への適応拡大することで薬剤としての開発を進めることが期待される。

### **(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究 \* 2b (チーム 2: 木村)**

*nur77* 遺伝子(*nur77*)の発現を上昇させる forskolin(FSK)を添加した条件と無添加の条件における *nur77* のプロモーター領域の CpG island (特に Sp1 binding sites)の DNA メチル化と脱メチル化を、パイサルフェート

シーケンス法によって比較解析した。その結果、*nur77* の第一エクソンを含む-306~+136 塩基配列における CpG island のメチル化は変動していないことが分かった。この時、*oct4* 遺伝子上流配列を陽性コントロールとし、実験におけるバイサルフェート反応効率が 99%であることも確認した。以上から、*nur77* 発現制御には、DNA 側のメチル化は無関係であることを示唆することができた。

一方、ヒストン修飾側のヒストンテイルへの作用では、FSK 添加後、すぐに *nur77* が発現し、ヒストンテイル部分には 14 番目のリシン残基のアセチル化が観察された。よって、予測した計画の存外ヒストン側の制御因子に注目すべき点があることが分かった。

### **(c) Bisphenol A による神経突起伸長と DNA の脱メチル化との関連性(微生物ゲノム研究チームとの共同研究課題)(チーム 2:下家、チーム 1:松村)**

本研究では、環境ホルモン的一种である bisphenol A(BPA)が神経突起を伸長させる作用を有していることを見出したことを起点とし、FSK との遺伝子の発現制御機構の違いについて検討を行った。そもそもエピジェネティックな遺伝子発現では、DNA 側の修飾(メチル化)と脱メチル化の関与を解析しなければならない。幸いに、DNA のメチル化阻害剤 decitabin(DCN)が存在することから、その薬剤添加後の神経突起の伸長作用を観察することで、DNA のメチル化と脱メチル化による遺伝子発現制御の有無を確認できる。適正濃度の DCN を添加した結果、FSK 添加後の神経突起伸長作用に対し、何の変化も引き起こさなかった。そこで、 $\beta$ -GT assay を用いて、本当に脱メチル化が引き起こされているかを確認したところ、確かにメチル化は減少していた。従って、FSK 単独添加時の神経突起伸長作用には、DNA の脱メチル化は重要ではないことが明らかになった。

さらに、BPA は PC12 細胞と大脳皮質神経細胞において神経突起を伸長させた。しかし、神経細胞の幼若マーカーである NeuroD の発現は、PC12 細胞では経時的に発現上昇していた。一方、大脳皮質神経細胞では減少していた。このことから、発生途上の神経細胞を幼若化させたまま脳が発生過程で形成されることから、環境ホルモンとして生体内の恒常性維持機構を破綻させることが予測された。BPA は除去されるべき物質であることから、分解菌から得られた結果(分解を担う遺伝子の情報)を踏まえた更なる応用化研究が期待される。

### **[3] 植物細胞エピゲノム研究**

#### **(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発 \* 3a (チーム 3:吉田・細見・丸岡、チーム 1:老川、チーム 1,3:山中)**

本研究テーマは、当プロジェクト研究を通じて築かれたセレン(吉田)、植物(細見)、エピゲノム解析(丸岡)、酵素科学・タンパク質工学(老川)、ゲノム工学(山中)を専門とする研究者の連携チームにより実施した。【★A】

まず、本実験系を確立するために吉田・細見が研究実績のある亜鉛を用いて研究を開始した。その後、確立した系による亜セレン酸を用いた実験に移行した。同様に、当初はカイワレダイコンを主な研究対象として実験計画を立案したが、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行うターゲット遺伝子を絞るため、はじめに双子葉モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を対象として、培地への亜セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響と、Selenocysteine methyltransferase のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (At-HMT-3)の *in vitro* における機能解析を行った。まず、DNA マイクロアレイを用い、培地に添加した亜セレン酸ナトリウム濃度と mRNA の発現量の関係を解析した。その結果、亜セレン酸ナトリウム濃度が 10  $\mu$ g/mL で生育障害が起こることが明らかとなった。また、生育したシロイヌナズナ茎頂部中のセレン濃度を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS)で測定したところ、培地中の亜セレン酸が取り込まれていることが明らかとなった。さらに網羅的な遺伝子発現解析による代謝変動予測を行うため、亜セレン酸濃度 0 及び 10  $\mu$ g/mL のシロイヌナズナ茎頂部より mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を行い、発現量が 10 倍以上変動しているものを抽出し、GO Biological Process のアノテーションに基づき Gene-Annotation Enrichment Analysis を行った。その結果、亜セレン酸代謝に関連するグルタチオン-S-トランスフェラーゼとセレノシステイン  $\beta$ -リアーゼの遺伝子の発現量が増加していることが明らかとなった。さらに、GC-MS を用い、亜セレン酸ナトリウム添加培地で生育させたシロイヌナズナ中のセレン化合物の解析を行ったところ、新奇なセレン化合物であることが明らかとなった。また、無機および有機セレン化合物をシロイヌナズナに曝露し、生長、セレン含量およびセレン代謝関連遺伝子発現量を評価した。シロイヌナズナは野生株(Columbia-0)を用いた。20 g/L スクロース、4.6 g/L ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、3 mg/L チアミン塩酸塩、5 mg/L ニコチン酸、5 mg/L ピリドキシン塩酸塩、8 g/L アガーを含む培地に、無機セレン化合物(亜セレン酸ナトリウム・セレン酸ナトリウム)および有機セレン化合物(L-セレノメチオニン(SeMet)・L-SeCys・MeSeCys)濃度が 1.0、2.5、5.0 ppm となるように添加した。培地溶液をオートクレーブ滅菌後、滅菌種子を播種し、長日条件の光周期のもと、無菌的に 25°C で栽培した。4 週間培養後、1 粒の種子から得られた葉と根を分別して採取し、重量および長さを測定した。葉および根の一部は、RNA later Tissue Storage Reagent に浸漬して -80°C で分析まで保管した。試料溶液中のセレンの定量は、誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)により行った。各セレン化合物曝露 4 週間後のシロイヌナズナの葉および根重量を測定したところ、セレン化合物無添加と比較し、各セレン化合物の曝露濃度依存的に葉および根重量の減少が観察された。また、それぞれのセレン含量を測定

したところ、葉のセレン含量では、セレン酸で他の化合物と比較し、セレンの高い蓄積が確認された。また、根のセレン含量では、SeMet 2.5 ppm 曝露群で他の化合物よりも高い結果が得られた。これらの結果から、セレン化合物の化学形態によって、セレンの蓄積する部位が異なることが確認された。セレン曝露したシロイヌナズナに含まれるセレンの化学構造の変換に関わる遺伝子を解析し、新奇セレン化合物の構造の予測するために、トランスクリプトーム解析結果から選抜したセレン代謝に関わる遺伝子について、各セレン化合物曝露 1 ppm の葉の mRNA 発現量を測定した。植物中の硫黄の取り込みに関わる sulfate transporter 4;2、システイン・シスタチオニン・メチオニン代謝酵素である homocysteine S-methyltransferase (HMT)-1、HMT-2、cystathionine beta-lyase、cystathionine gamma-synthase、methionine synthase-3 の発現量は試験群間で有意な差は確認されなかった。一方、HMT-3 遺伝子発現量は、各セレン化合物添加群で無添加群と比較し、上昇傾向がみられた。この遺伝子発現量の結果から、新奇セレン化合物にはメチル基が付加されている可能性があることが示唆された。セレン曝露したシロイヌナズナには、これまでに報告されていない新奇セレン化合物が含まれていることが予測できるが、その構造決定には至っていない。本成果を活かした機能性食品の開発には、新奇セレン化合物の構造決定及びその安全性試験が必須であるため、今後順次取り組んでいく予定である。以上の結果に基づき、本研究テーマの連携研究者である老川・山中は、HMT-3 を大腸菌で発現しこれまで報告のない HMT-3 の酵素科学的性質を解明することとした。本発現系の構築には、可溶性発現の向上に高い効果を有することが知られているマルトース結合タンパク質(MBP)との融合タンパク質として目的タンパク質発現を実現する新規 MBP 融合タンパク質発現ベクターを構築し、これを用いた。その結果、大量の At-HMT-3 を MBP 融合型可溶性タンパク質として得ることに成功した。得られた MBP 融合型 At-HMT-3 は、S-MeMet をメチル基供与体、Homocysteine をメチル基受容体基質とした *in vitro* 酵素反応において顕著な HMT 活性を示したことから、得られた MBP 融合型 At-HMT-3 の機能性についても確認した。At-HMT-3 は、At-HMT-1 や At-HMT-2 と比較して L-Homocysteine を基質とした場合に数百倍の比活性を示すことが明らかとなった。また、At-HMT-3 は、At-HMT-1 や At-HMT-2 と比較して L-Selenocysteine を基質とした場合に約 13 倍の比活性を示すことが明らかとなった。これらの結果から、At-HMT-3 は、*in vivo* で At-HMT-1 や At-HMT-2 とは異なる生理的機能を有している可能性が示唆された。特に、L-Selenocysteine に対して At-HMT-1 や At-HMT-2 より高い比活性を示したことは、At-HMT-3 のシロイヌナズナの Se 代謝への関与の可能性も考えられる。これらの新規な研究成果は、正に本プロジェクトで形成できた異なる研究分野の研究者間相互の連携協力によって得られたものである。

#### **(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究 \* 3b (チーム 3: 丸岡)**

モデル神経細胞である PC12 細胞を用い HDAC 阻害剤添加後に Nur77 が転写因子として作用し得る下流の遺伝子群についての解析を行った。まず、*nur77* のプロモーター領域の CpG island (特に Sp1 binding sites) の DNA メチル化と脱メチル化を、バイサルフェートシーケンス法によって比較解析した。その結果、*nur77* の第一エクソンを含む -306~+136 塩基配列における CpG island のメチル化は変動していないことが分かった。この時、*oct4* 遺伝子上流配列を陽性コントロールとし、実験におけるバイサルフェート反応効率が 99%であることも確認した。以上から、*nur77* 発現制御には、DNA 側のメチル化は無関係であることを示唆することができた。よって、目標としていた分子機構を経ずに神経細胞は形態変化を引き起こすことが分かった。一方、*nur77* から生じる mRNA に対する siRNA を細胞に導入することにより、HDAC 阻害剤で上昇する NeuroD1 と Synapsin1 の発現が見られないことがわかった。従って、Nur77 は *neuroD1* あるいは *synapsin1* の上流配列に結合し、両遺伝子を発現上昇させることが示唆された。よって、Nur77 の発現後の NeuroD と Synapsin の発現上昇機構についてさらに詳細に解析を行った。その際、同じく Nur77 を発現上昇させる天然物である forskolin (FSK) をも添加した実験と比較検討した。その結果、HDAC 阻害剤添加後には、ヒストン H3 テイル内に存在する 14 番目のリシン残基のアセチル化(K14AcH3)の上昇が確認された。この現象は、FSK 添加後でも同様であったことから、PKA を介するシグナル伝達機構がエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わることを明らかにした。また、HDAC 阻害剤添加後には NeuroD や Synapsin が発現上昇したが、FSK 添加後では NeuroD の発現上昇は見られず、Synapsin のみが発現上昇していた。表現型である神経突起の伸長作用には HDAC 阻害剤と FSK に有意な差は見られないことから、エピジェネティックな作用機序で発現誘導する際には 11 種存在する HDAC ファミリー内での特異的な役割が存在する可能性を見出した。

以上から、DNA のメチル化や脱メチル化における制御よりもヒストン側からの制御機構が神経細胞には重要であることを評価し、所期の目標を達成した。

**<優れた成果があがった点>**(以下では各サブテーマは記号((a)(b)等)のみを示す)

#### **[プロジェクト全体]**

本プロジェクトにより、原理や性能の異なる次世代シーケンサーのベンチトップ型を 2 台導入し、従来本学では本装置がないために研究することが困難であった有用微生物(D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌)の全ゲ

ノム解析、動物神経細胞のエピゲノム解析を行うことができた。またこの際、次世代シーケンサーを生物種や解析目的別に評価し、最適な次世代シーケンサーの選択方法と実験手法を体得でき、さらにこれらの研究を通じて、これまで本学にはなかった異なる研究分野の研究者間相互の連携協力体制を築くことができたことは、今後の本学における本研究分野の拠点形成に大きな意義を持つ。以下に主要な成果について記述する。

#### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 1) \* 1a, \* 1b**

(a) 日本酒醸造工程から単離された乳酸桿菌 2 株 (*L. sakei* LT-13 (= *L. sakei* NBRC 15893<sup>T</sup>), *L. sakei* LK-145) 及び乳酸球菌 2 株 (*L. mesenteroides* LT-38 (= *L. mesenteroides* NBRC 3426<sup>T</sup>), *L. mesenteroides* LK-151) の 4 株のドラフトゲノムの解析を終了し、比較ゲノム解析の結果、D-アミノ酸高生産に関与すると推定される遺伝子(シスタチオニン β-リアーゼ遺伝子他)を発見した。

また、黒酢醗から D-アミノ酸高生産乳酸菌を単離することに成功し、本乳酸菌を黒酢仕込み時に添加することにより、D-アミノ酸強化黒酢を製造することに成功し、これを用いた生フルーツ黒酢の上市へつなげた。[参考資料 5]

(b) ビスフェノール A(BPA)分解能を有する *S. bisphenolicum* AO1 株のドラフトゲノムと内在性プラスミド pBAR1 の全塩基配列の決定に成功し、pBR1には bisdAB を含む少なくとも 4 種類の BPA 分解に関与する遺伝子が存在することや BPA 分解に Chromosome2 の遺伝子の重要性を発見した。

(c) 主要な抗酸化システムの多重遺伝子破壊群の構築とその表現型解析により、細胞防御システムの遺伝子破壊による耐性化獲得機構など従来の常識では考え及ばない現象を見出し、その耐性化機構の解明や応用に関して研究を展開できた。また、抗菌剤耐性の非常に高い永生細胞の存在を明らかにし、その殺滅処理法の構築に成功した。

#### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2) \* 2a, \* 2b**

(a) Nur77 によって神経突起伸長が促進され、c-Fos によって神経突起伸長が抑制されることを明らかにした。また、神経突起伸長に関わる *nur77* のプロモーターの活性化は、ヒストン修飾を介したエピジェネティックな発現制御を受けていることを発見するとともに、その発現制御には、20 個の遺伝子が関与することを発見した。

(b) Nur77 の遺伝子発現の上昇には、DNA のメチル化に代表される DNA 側の制御ではなく、ヒストンのアセチル化やメチル化などのヒストン側の制御が重要であることを示唆することができた。

#### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3) \* 3a, \* 3b**

(a) 亜セレン酸ナトリウム添加培地で生育させたシロイヌナズナ中に蓄積したセレン化合物は、新奇なセレン化合物であることを明らかにした。培地に添加するセレン化合物の化学形態によって、シロイヌナズナ中にセレンの蓄積する部位が異なることを見出した。また、シロイヌナズナの *At*-HMT3 遺伝子は、大腸菌におけるレオコドン を多量に含んでおり、*Escherichia coli* BL21(DE3)など汎用発現用宿主ではほとんど発現が認められなかったが、*E. coli* Rosetta (DE3)を宿主として用いることにより、発現効率を著しく向上させることに成功した。

また、汎用性の高い新規マルトース結合タンパク質(MBP)融合発現ベクターを構築した。本発現ベクターを用いることにより、従来は不可能であった *At*-HMT3 の可溶性発現が可能となった。MBP 融合タンパク質として発現させた *At*-HMT3 を SDS-PAGE 上で単一のバンドを示す精製タンパク質として得ることに成功した。

さらに、この精製酵素標品の Factor Xa 切断により MBP タグを含まない可溶性 *At*-HMT3 を調製することに成功した。MBP 融合 *At*-HMT-3 は基質として Homocysteine、メチル基供与体として S-MeMet を含む反応液中で L-Met を生成する、すなわち HMT 活性を示すことを確認した。また、MBP 融合 *At*-HMT-3 活性の定量的評価系を確立した。

(b) *nur77* の下流に存在する分化制御遺伝子として *neuroD1* や *synapsin1* を見出した。さらに、*neuroD1* や *synapsin1* の mRNA に対する siRNA を用いた実験結果から、*Synapsin1* のみが神経細胞への表現型の変化に重要であることを明らかにした。

<課題となった点>(以下では各サブテーマは記号((a)(b)等)のみを示す)

#### **[1] 微生物ゲノム研究(チーム 2)**

(a) シスタチオニン β-リアーゼ遺伝子破壊乳酸菌株の調製を試みたが、調製することができなかった。しかし、本年度新規採用したドイツ人ポスト・ドクトラル・フェローが、新たな方法により遺伝子破壊乳酸菌株の調製を試みるとともに、破壊株の調製がうまく行かない場合であっても、過剰発現株の調製によって当該遺伝子産物の評価を実施することで、問題解決を試みた。

(b) *S. bisphenolicum* AO1 株の BAP 分解では、本菌株の全ゲノム配列が解読され、トランスクリプトーム解析もほぼ終了している。その結果、不必要な不安定化因子および BPA や環境汚染物質分解に必要な遺伝子のうち十分に機能発現していない遺伝子が特定された。今後、遺伝子組換え法を活用し、改良型 AO1 株の作

製が必要である。

### **[2] 動物細胞エピゲノム研究(チーム 2)**

(a) HDAC には、11 種のサブタイプがあり、どの HDAC を阻害することが神経突起伸長に関わるかを明らかにする必要がある。HDAC1 と HDAC2 についてはこれらに特異的な阻害剤の影響を検討した結果、少なくとも HDAC1 と 2 には、神経突起伸長に関する作用を有しないことを明らかにした。今後は、11 種の HDAC に特異的な siRNA を用いた解析により、神経突起伸長に重要な HDAC を明らかにし、HDAC ファミリーに対する総合的な機能評価が課題である。

### **[3] 植物細胞エピゲノム研究(チーム 3)**

(a) セレン曝露したシロイヌナズナ中に含まれる新奇セレン化合物の構造決定がなされていないために、最終目標である機能性食品の開発が実施できていない。現在、新しく導入した HPLC-ICPMS によるスペシエーション分析によって、化合物の構造を絞り込むことができたので、この情報をもとに研究を進め、問題を解消していく。

また、*At*-HMT3 の大腸菌での発現系の構築では、*E. coli* Rosetta (DE3) で高発現はしたが、*At*-HMT3 は不溶性画分に発現した。可溶性発現に効果が高いことが知られている Maltose Binding Protein タグとの融合タンパク質として発現することによってこの点は克服できる見込みである。

(b) Selenocysteine を基質とした反応においては L-Met の生成は検出されておらず、現時点では MBP 融合 *At*-HMT-3 の SMT 活性の検出には至っていない。基質として用いる Selenocysteine の Selenocysteine への還元が不十分であった可能性も考えられることから、現在、還元条件の見直しと及び嫌気条件下での酵素反応を試みた。

### **<自己評価の実施結果と対応状況>**

毎年予算配分額が確定した直後の 5 月に、プロジェクト会議を開催し、①当該年度の研究体制、②各プロジェクト参加研究者の研究状況の報告と今後の方針、③各プロジェクト参加研究者の成果公表計画及び投稿論文計画の確認、④プロジェクト購入研究装置・設備の稼働状況及び利用状況、⑤研究施設の利用状況及び安全管理、⑥関西大学先端科学技術シンポジウム講演者の選出及び特別講演講演者のコーディネーターの選出、⑦報告書の作成、⑧その他の各項目について審議し、その結果を考慮の上本年度予算配分の方法を審議し、当プロジェクト遂行上適切な予算配分を実施している。さらに、毎年 10 月に、再度プロジェクト会議を開催し、①各プロジェクト参加研究者の研究状況の報告と今後の方針、②各プロジェクト参加研究者の成果公表計画及び投稿論文計画の確認、③プロジェクト購入研究装置・設備の稼働状況及び利用状況、④研究施設の利用状況及び安全管理、報告書の作成、⑤予算の執行状況、⑥その他の各項目について審議し、その結果を考慮の上、当該年度の目標が達成できるよう研究を遂行するというルールを設定している。また、予算の執行状況については、予算管理を行っている先端科学技術推進機構から定期的に送付される各プロジェクト参加研究者の予算の執行一覧に基づき、各プロジェクト参加研究者が適切な予算執行を実施しているか、それに見合った成果の創出や成果公表が実施されているかどうかを分析し、予算の費用対効果に見合った追加予算の配分を実施している。

また、平成 26 年 12 月には、本学研究推進委員会外部資金審査・評価部会に同部会が指定する様式で「進捗状況チェックシート」及び「研究成果の概要(3 年目)」を提出し、同部会による内部評価が実施された。[参考資料 1] 評価項目は、【1】研究組織について、【2】研究施設・設備等について、【3】研究計画の進捗状況・研究成果等について、【4】評価体制について、【5】外部資金の導入状況について、【6】留意事項への対応について、【7】特記事項について、【8】総合所見の 8 項目で実施した。【1】については、問題なく順調に遂行しているとの評価を受けたが、その一方で研究組織の連携結果が成果にうまく反映できていないとの指摘もあった。この点については、本内部評価以降に、研究チーム 1 および 3 の連携研究テーマとして、『シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を対象として、培地への垂セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響』と、『SMT のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (*At*-HMT-3) の *in vitro* における機能解析』を実施した。また、研究チーム 1 および 2 の連携研究テーマとして、『Bisphenol A による神経突起伸長と DNA の脱メチル化との関連性に関する研究』を新たに課題設定し、実施した。これらの研究チーム間の連携課題の成果は、論文[査読あり]2 件と国内学会発表 3 件で報告し、組織内での連携による研究成果を公に示すことができた。【2】については、成果が上がっており装置の使用状況は適切であるとのコメントがあり、現状を維持できるように努めることとした。【3】については、問題ないと評価されている一方で、査読つき論文数の増加が期待されている。これについては、平成 29 年 5 月開催の当プロジェクト会議でも研究代表者から全プロジェクトメンバーに対して平成 29 年度の投稿論文計画の確認と積極的な成果の公表を指示しており、平成 29 年度の当プロジェクト全体で 9 報の原著

論文の投稿し、十分な成果を公表できた。【4】については、問題ないと評価されている。また、構想調書に記載の通り、3年目と5年目に外部評価を受けた。【5】については、科研費の取得が少ないとの指摘があったが、これについては項目 11(3)の【外部資金の導入状況等】に記載の通り、科研費を含めた外部資金の取得も積極的に行っている(学内メンバー総額 61,961 千円)。プロジェクト全体として、この5年間に本分野における研究拠点として基礎ができたため、今後より多くの外部資金獲得へ向けて準備を進めている。【6】、【7】については、問題ないと判断されている。【8】については、概ね良好であるとの評価を得たが、その一方で当プロジェクト終了後の「研究拠点形成」を意識した研究遂行と報告書の作成が求められた。この点については、本報告書の〈研究期間終了後の展望〉においてこれを反映することで対応する。また、毎年度末に成果報告集を発行し、学内外の関係部署に配布して広くその成果を公開した。[参考資料 6]

さらに、研究開始後5年目の平成29年9月には、本学研究推進委員会外部資金審査・評価部会による内部評価を実施した。[参考資料 2]内部評価では、戦略的基盤形成という観点からテーマの明確化が必要であるとの意見を受けたが、これに対しては、この5年間のプロジェクトを通じて今後は『D-アミノ酸』をテーマに拠点研究を継続していくことで一致することができた。これにより、課題としていた統合的健康生命についても取り組みを進めることができる。科研費については、次年度からは本研究プロジェクトの成果をふまえ、基盤研究Aをはじめとする大型研究費の申請を行っていく予定である。また、研究メンバー間のコミュニケーション不足の問題については、研究メンバーは当プロジェクト研究以外にも様々な教育研究関連業務に従事しており、全員揃って打ち合わせをする時間がなかなか取れないのは指摘の通りである。今後は対面型の研究打ち合わせだけでなく、メーリングリスト等を利用したメール会議等を行い、組織内の連携を強化していく。

#### ＜外部（第三者）評価の実施結果と対応状況＞

研究開始後3年目の6月には3名の外部評価委員による中間評価を実施した。[参考資料 3] 評価項目は、【1】本プロジェクトは、当初の計画に沿って着実に進展しているか？、【2】特に優れている点、【3】問題点・今後の課題、【4】期待される研究成果・総合評価の4項目で実施した。また各評価項目について、それぞれ4段階で評点を設け評価を受けた(4:研究活動設定された目的は十分達成され、期待以上の成果が上がっている、3:設定された目的は概ね達成され、期待通りの成果が上がっている、2:設定された目的はある程度達成されている、1:設定された目的は十分に達成されていない)。

その結果、研究チーム1および2については、当初の予定通り着実に研究を推進させていると判断された。研究チーム3では、亜鉛に関する研究についての指摘を受けたが、当初に研究実績のある亜鉛を用いて系を確立し、その後、確立した系にて亜セレン酸を用いた実験系に切り替えて研究を進めたため、構想調書における計画の逸脱はない。また、当初計画にある Selenocysteine methyltransferase(SMT)に着目した植物のセレン代謝の研究課題が、十分実施されていないとの指摘を受けた。その他、研究チーム1のD-アミノ酸高生産乳酸菌の全ゲノム解析、およびビスフェノールA分解菌のゲノム構造解析については、本研究プロジェクトのテーマに沿った着実な進展が認められると判断され、学会などにおける発表や外部資金の獲得努力も評価できると判断された。研究チーム間の連携については、より目に見える形で提示する必要があるとの意見があった。これらの外部評価者の意見を受けて、研究チーム1および3の連携研究テーマとして、『シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)を対象として、培地への亜セレン酸添加が同植物の mRNA の発現量に及ぼす影響』と、『SMT のホモログ遺伝子である Homocysteine S-methyltransferase (At-HMT-3)の *in vitro* における機能解析』を実施した。また、研究チーム1および2の連携研究テーマとして、『Bisphenol A による神経突起伸展と DNA の脱メチル化との関連性に関する研究』を新たに課題設定し、実施した。

また、研究開始後5年目の5月には、中間評価時と同一の3名の外部評価委員による最終評価を実施した。[参考資料 4] 3名の外部評価委員の最終評価結果は、中間評価時に比べて向上し、各項目の評価結果は、いずれの評価委員も3以上の評価を付けた。これは、中間評価時に各評価委員が指摘した事項について、プロジェクトメンバーがその改善を目指し努力したことが評価されたと判断できる。一方、共同研究者間・研究チーム間の連携については、未だに物足りない印象を与えていたが、先の中間評価後に開始した3つの研究チーム間の連携課題の成果を論文(査読有)2件と国内学会発表3件で報告した。このように、これまで当プロジェクトで実施してきた微生物、動物、植物それぞれの研究の進展が相互に影響を及ぼし生まれた新たな研究課題に基づく研究成果を提示し、組織内での連携による研究拠点が形成できた。また最終年度のため、研究成果への公開をより積極的に行うことが指摘されているが、この点については、本年5月開催の当プロジェクト会議でも研究代表者から全プロジェクトメンバーに対して本年度の投稿論文計画の確認と積極的な成果の公表を指示しており、本年度当プロジェクト全体で9報の原著論文(査読有)が掲載され、十分な成果を公表できた。

### <研究期間終了後の展望>

本プロジェクトでは、次世代シーケンサーのベンチトップ型を導入し、従来はできなかったメタゲノム解析を含むゲノム・エピゲノム解析を共同で行い、同一の研究手法のもとに連携し発展させ、シーケンサーを目的別に性能評価し、最適で能率的な解析手段を採用することにより、従来の研究成果を飛躍的に発展させることを目的とし、ヒトの健康向上を目指し、有用微生物(D-アミノ酸生産菌、環境ホルモン分解菌)の全ゲノム解析による分子育種、有害微生物(食品汚染菌)の全ゲノム解析による防除法開発、動物神経細胞のエピゲノム解析による神経変性疾患の治療法開発、植物細胞のエピゲノム解析による機能性食品の開発を行うことにより、世界的な健康生命研究拠点を形成することを目指し研究を推進してきた。研究開始当初は、外部評価委員や本学外部資金審査・評価部会による内部評価で指摘を受けたように、各プロジェクト参加研究者が個別の研究テーマに取り組み、最適で能率的な解析手段を開発することを主な目的としていたが、本プロジェクトを継続し、プロジェクト会議を重ねることにより、徐々にプロジェクト参加研究者間の連携による研究基盤が形成され、本プロジェクト終了時には一定の成果を上げることができた。本プロジェクト終了後、本プロジェクトで確立した研究手法や各研究者間の連携による研究基盤をより一層発展させ、『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発(仮称)』という研究課題で研究を継続していきたいと考えている。当該研究課題では、『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発』という具体的な新規機能性食品をターゲットに据えることにより、現プロジェクトより一層プロジェクト参加研究者間の連携を鮮明にするとともに、それぞれの研究者が得意とする分野で『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品』開発という共通のテーマによる連携研究を実施しようとするものである。

『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品』については、研究代表者の老川が、福山黒酢株式会社との共同研究により D-アミノ酸強化福山黒酢の開発に成功しており、同社と関西大学とのコラボ商品であるフルーツ黒酢『ピュアミノセット』の発売を平成 28 年 5 月から開始した。[参考資料 5-1] 本商品は、D-アミノ酸を含むことを明示した世界初の発酵食品であり、本製品には通常の商品に比べて 2 倍以上の D-アミノ酸(美容アミノ酸・旨味アミノ酸)が含まれている。したがって、『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品開発』について、本学は世界的にも先導的な位置にあり、『D-アミノ酸に着目した新規機能性食品の開発』に基づき世界的な健康生命研究拠点を形成することは、現プロジェクトを進展させたより一層具体的、かつ現実性の高い研究課題であると考えている。具体的には科研費の基盤研究 A や農林水産省農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業(一般型)などの大型研究費に申請したいと考えている。

### <研究成果の副次的効果(実用化や特許の申請など研究成果の活用の見通しを含む。)>

研究成果に基づいて、アミノ酸、D-アミノ酸の着目した新商品の開発は現在複数のメーカーで進んでおり、いずれも現在製法特許の申請と製品化を進めている。特許申請後、製造、販売へと進める予定である。

本研究の過程で開発した汎用 pET システムと互換性のある独自の MBP 融合タンパク質の発現系は、At-HMT3 だけでなく、可溶性発現が難しい各種組換え酵素の発現研究を強力にアシストするツールとなり得ることから、特許申請を行っていききたい。

また、環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種研究は、その成果をバイオマス分解に応用し、1社との共同研究に進んでいる。食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発で得られた成果はバイオフィルム制御に向けた研究に応用し、複数のメーカーの共同研究につながっている。

さらに、セレン曝露したシロイヌナズナ中の新奇セレン化合物の化学構造を決定し、その健康機能性を明らかにすることで、本研究成果に関わる特許申請及び製品化が実施できるため、今後これらの点について明らかにしていく予定である。

### <研究成果の副次的効果>

研究成果に基づいて、アミノ酸、D-アミノ酸の着目した新商品の開発は現在複数のメーカーで進んでおり、いずれも現在製法特許の申請と製品化を進めている。特許申請後、製造、販売へと進める予定である。

本研究の過程で開発した汎用 pET システムと互換性のある独自の MBP 融合タンパク質の発現系は、At-HMT3 だけでなく、可溶性発現が難しい各種組換え酵素の発現研究を強力にアシストするツールとなり得ることから、特許申請を行っていききたい。

また、環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種研究は、その成果をバイオマス分解に応用し、1社との共同研究に進んでいる。食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発で得られた成果はバイオフィルム制御に向けた研究に応用し、複数のメーカーの共同研究につながっている。

さらに、セレン曝露したシロイヌナズナ中の新奇セレン化合物の化学構造を決定し、その健康機能性を明らかにすることで、本研究成果に関わる特許申請及び製品化が実施できるため、今後これらの点について明らかにしていく予定である。

### III 研究発表一覧 ※上記、II(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付している。

#### <雑誌論文>

論文名、著者名、掲載誌名、査読の有無、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)について記入してください。(左記の各項目が網羅されていれば、項目の順序を入れ替えても可)。また、現在から発表年次順に遡り、通し番号を付してください。

<特筆すべき成果に対応した業績には【★】を付記した>

#### [1] 微生物ゲノム研究 (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)

**(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発 \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである (12 件)**

- (1) S. Kato, T. Oikawa, A Novel Bifunctional Amino Acid Racemase with Multiple Substrate Specificity, MalY from *Lactobacillus sakei* LT-13: Genome-Based Identification and Enzymological Characterization, *Frontiers in Microbiology* (2018). [DOI: 10.3389/fmicb.2018.00403] [査読有]【★】
- (2) T. Washio, T. Oikawa, Thermostable and highly specific L-aspartate oxidase from *Thermococcus litoralis* DSM 5473: cloning, overexpression, and enzymological properties, *Extremophiles*, 22(1), 59-71 (2018). [査読有]
- (3) 鷲尾翼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM5473 の耐熱性アスパラギン酸ラセマーゼ及び耐熱性 L-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D-および L-アスパラギン酸の新規酵素定量法, 微量栄養素研究, 34, 1-7 (2017). [査読有]【★】
- (4) S. Kato, T. Oikawa, Whole-Genome Sequence of *Lactobacillus sakei* LT-13 Isolated from Moto Starter of Sake, *Genome Announcements*, 5(31), e00651-17 (2017). [査読有]【★】
- (5) S. Kato, T. Oikawa, Genome Sequence of *Lactobacillus sakei* LK-145 Isolated from a Japanese Sake Cellar as a High Producer of D-Amino Acids, *Genome Announcements*, 5(33), e00656-17 (2017). [査読有]【★】
- (6) S. Kato, T. Oikawa, Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LK-151 Isolated from a Japanese Sake Cellar as a High Producer of D-Amino Acids, *Genome Announcements*, 55(30), e00661-17 (2017). [査読有]【★】
- (7) S. Kato, T. Oikawa, Whole-Genome Sequence of *Leuconostoc mesenteroides* LT-38, a Non-Spore-Forming Gram-Positive Lactic Acid Bacterium, *Genome Announcements*, 5(31), e00670-17 (2017). [査読有]【★】
- (8) T. Washio, S. Kato, T. Oikawa, Molecular cloning and enzymological characterization of pyridoxal 5'-phosphate independent aspartate racemase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* DSM 5473, *Extremophiles*, 20, 711-721 (2016). [査読有]【★】
- (9) T. Fujii, A. Sato, Y. Okamoto, T. Yamauchi, S. Kato, M. Yoshida, T. Oikawa, Y. Hata, The crystal structure of maleylacetate reductase from *Rhizobium* sp. strain MTP-10005 provides insights into the reaction mechanism of enzymes in its original family, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* (2016). [DOI: 10.1002/prot.25046] [査読有]
- (10) S. Kato, Y. Masuda, M. Konishi, T. Oikawa, Enantioselective analysis of D- and L-amino acids from mouse macrophages using high performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 116, 101-104 (2015). [査読有]【★】
- (11) Y. Uchida, H. Hayashi, H. Washio, R. Yamasaki, S. Kato, T. Oikawa, Cloning and characterization of a novel fold-type I branched-chain amino acid aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. CKU-1, *Extremophiles*, 18, 589-602 (2014). [査読有]【★】
- (12) K. Okada, Y. Gogami, T. Oikawa, Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake, *Amino Acids*, 44, 489-498 (2013). [査読有]【★】

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種** \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである (2 件)

- (1) Y. Matsumura, A. Akahira-Moriya, M. Sasaki-Mori, Bioremediation of bisphenol-A polluted soil by *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 and the inherent microbial community in the soil, *Biocontrol Science*, 20, 35-42 (2015). [査読有]
- (2) L. Badiefar, B. Yakhchali, S. Rodriguez-Couto, A. Veloso, José Ma García-Arenzana, Y. Matsumura, M. Khodabandeh, Biodegradation of bisphenol A by the newly isolated *Enterobacter gergoviae* strain BYK-7 enhanced using genetic manipulation, *RSC Advances*, 5, 29563-29572 (2015). [査読有]

**[2] 動物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)

**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \* 2a の内容に対応する成果は以下の通りである(4 件)

- (1) K. Matsuura, R. Yamazoe, H. Maruoka, K. Shimoke, Epigenetic Regulation by Bisphenol A as a Neuronal Morphogen, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 7(4), 1000e128 (2017). [査読有]
- (2) K. Shimoke, Epigenetic Regulation: Neurite Outgrowth by Hormonal or Chemical Mechanisms in PC12 Cells, *Journal of Bioengineering & Biomedical Science*, 6(5), 1000123 (2016). [査読有]
- (3) T. Tomioka, H. Maruoka, H. Kawa, R. Yamazoe, D. Fujiki, K. Shimoke, T. Ikeuchi, The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene, *Neuroscience Research*, 88, 39-48 (2014). [査読有]【★】
- (4) K. Shimoke, T. Tomioka, K. Okamoto, D. Fujiki, S. Uesato, H. Nakayama, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor for neurodegenerative diseases: A possible medicinal strategy by prevention of ER stress-mediated apoptosis and neurite elongation, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics*, S1, 1-4 (2013). [査読有]

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 2b の内容に対応する成果は以下の通りである (4 件)

- (1) S. Mori, S. Nada, H. Kimura, S. Tajima, Y. Takahashi, A. Kitamura, C. Oneyama, M. Okada, The mTOR Pathway Controls Cell Proliferation by Regulating the FoxO3a Transcription Factor via SGK1 Kinase, *PLoS ONE*, 9(2), e88891 (2014). [査読有]
- (2) J. Otani, K. Arita, T. Kato, M. Kinoshita, H. Kimura, I. Suetake, S. Tajima, M. Ariyoshi, M. Shirakawa, Structural basis of the versatile DNA recognition ability of the methyl-CpG binding domain of methyl-CpG binding domain protein 4, *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6351-6362 (2013). [査読有]
- (3) J. Otani, H. Kimura, J. Sharif, T. A. Endo, Y. Mishima, T. Kawakami, H. Koseki, M. Shirakawa, I. Suetake, S. Tajima, Cell cycle-dependent turnover of 5-hydroxymethyl cytosine in mouse embryonic stem cells, *PLoS ONE*, 8(12), e82961 (2013). [査読有]
- (4) T. Horii, S. Morita, M. Kimura, R. Kobayashi, D. Tamura, R. Takahashi, H. Kimura, I. Suetake, H. Ohata, K. Okamoto, S. Tajima, T. Ochiya, Y. Abe, I. Hatada, Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system, *PeerJ*, 1, e230 (2013). [査読有]

**[3] 植物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す論文には、【★】を付記)

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \* 3a の内容に対応する成果は以下の通りである (5 件)

- (1) 大塚政志, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 老川典夫, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物の曝露がシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, *微量栄養素研究*, 34, 8-13 (2017). [査読有]【★A】
- (2) 大津浩平, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, セレン強化スプラウトの抗酸化成分含量および抗酸化活性の評価, *微量栄養素研究*, 34, 27-32 (2017). [査読有]
- (3) 廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸またはセレンメチオニンの栄養有効性に及ぼす投与期間の影響, *微量栄養素研究*, 33, 9-12 (2016). [査読有]

- (4) 廣瀬侑太郎, 大塚政志, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)の生育抑制と遺伝子発現量の変化, 微量栄養素研究, 33, 112-117 (2016). [査読有]
- (5) 吉田宗弘, 高井彩帆, 山根綾子, 福永健治, 西山利正, 亜鉛強化カイワレダイコンsprautの調製と栄養有効性の評価, Biomedical Research on Trace Elements, 25, 8-13 (2014). [査読有]

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 3b の内容に対応する成果は以下の通りである(1件)

H. Maruoka, K. Shimoke, Mechanisms of neurotrophic activities via low-molecular-weight compounds: post-transcriptional regulation in PC12 cells and neurons, Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics, S1, 1-3 (2013). [査読有]【★】

#### <図書>

図書名、著者名、出版社名、総ページ数、発行年(西暦)について記入してください(左記の項目が網羅されていれば、項目の順序を入れ替えても可)。また、現在から発表年次順に遡り、通し番号を付してください。

**[1] 微生物ゲノム研究**(特に優れた成果を示す図書には、【★】を付記)

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種** \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである(1件)

- (1) 松村吉信, 片倉啓雄, 無菌操作, 「有用微生物培養のイロハ 試験管から工業スケールまで」, 監修:片倉啓雄, 大政健史, 長沼孝文, 小野比佐好, NTS, 総ページ数 337, 5-18 (2014.6).

**(c) 食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発** \* 1c の内容に対応する成果は以下の通りである(3件)

- (1) 松村吉信, 一般的なバイオフィルム構造とその形成過程、バイオフィルム評価, 「バイオフィルム制御に向けた構造と形成過程—特徴・問題点・事例・有効利用から読み解くアプローチ—」, 監修:松村吉信, シーエムシー出版, 総ページ数 209, 1-12 (2017.11).
- (2) 松村吉信, 殺菌・滅菌・除菌, 「食と微生物の辞典」, 編集:北本勝ひこ, 春田伸, 丸山潤一, 後藤慶一, 尾花望, 齋藤勝晴, 朝倉書店, 総ページ数 512, 284-285 (2017.7).
- (3) 松村吉信, 微生物細胞死滅の反応速度論, 「食と微生物の辞典」, 編集:北本勝ひこ, 春田伸, 丸山潤一, 後藤慶一, 尾花望, 齋藤勝晴, 朝倉書店, 総ページ数 512, 288-289 (2017.7).

#### <学会発表>

学会名、発表者名、発表標題名、開催地、発表年月(西暦)について記入してください(左記の項目が網羅されていれば、順序を入れ替えても可)。また、現在から発表年次順に遡り、通し番号を付してください。

【国際学会】

**[1] 微生物ゲノム研究**(特に優れた成果を示す図書には、【★】を付記)

**(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発** \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである(3件)

- (1) T. Oikawa, D-Amino acid in sake: Distribution production mechanism, and function, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR-2014), Tochigi, Japan (2014.9). [Invited] 【★】
- (2) K. Yamanaka, Direct cloning and refactoring of a silent lipopeptide biosynthetic gene cluster yields the antibiotic taromycin A, Korean Society of Microbiology and Biotechnology, International Symposium and Annual Meeting, Busan, Korea (2014.6). [Invited]
- (3) S. Kato, Y. Masuda, M. Konishi, T. Oikawa, Amino acid analysis of mouse macrophage, The 2nd International Conference of D-Amino Acid Research (IDAR-2014), Tochigi, Japan (2014.6).

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種** \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである(1件)

- (1) M. Koh, S. Koba, Y. Matsumura, Determination of the whole genome sequence of bisphenol A degradation bacterium *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1, 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (IUMS2017), Singapore (2017.7).

## **[2] 動物細胞エピゲノム研究**

**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \* 2a の内容に対応する成果は以下の通りである (5 件)

- (1) R. Yamazoe, D. Ido, K. Yatsuo, S. Genko, K. Shimoke, Upregulated expression of *nur77* gene is important for neurite outgrowth induced by HDAC inhibitors, 9th Annual Congress on Drug Design & Drug formulation, Seoul, South Korea (2017.10).
- (2) R. Yamazoe, D. Ido, K. Yatsuo, S. Genko, K. Shimoke, Upregulated expression of *nur77* gene is important for neurite outgrowth induced by three HDAC inhibitors, 72nd Fujiwara seminar: International Symposium on Molecular Mechanism of Molding and Disruption of the Epigenomes Underlying Cellular Community, Hokkaido, Japan (2017.9).
- (3) K. Shimoke, R. Yamazoe, T. Tomioka, K. Tsumura, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Involvement of specific *nur77* family genes during neurite outgrowth induced by forskolin and a histone deacetylase inhibitor in PC12 cells, 45th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago, USA (2015.10).
- (4) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Maruoka T. Ikeuchi, Up-regulation of *Nur77* by HDAC inhibitors is important for neurite outgrowth, 1st International Summit on Clinical Pharmacy, San Francisco, USA (2014.12).
- (5) K. Shimoke, T. Tomioka, H. Aoyama, Y. Nishihata, H. Maruoka, T. Ikeuchi, Tricostatin A induces neurite outgrowth via expression of *Nur77* in PC12 cells, World Congress on Neurotherapeutics, Basel, Switzerland (2014.9).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 2b の内容に対応する成果は以下の通りである (1 件)

- (1) K. Shimoke, H. Maruoka, Y. Hirata, D. Fujiki, S. Uesato, T. Ikeuchi, Histone deacetylase inhibitor (K-350) promotes neurite outgrowth and cell survival via histone H3 modification in neurons, Neuroscience 2013, San Diego, USA (2013.11).

## **[3] 植物細胞エピゲノム研究**

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \* 3a の内容に対応する成果は以下の通りである (2 件)

- (1) R. Hosomi, D. Yamamoto, T. Nishiyama, M. Yoshida, K. Fukunaga,  $\epsilon$ -Polylysine decreases micellar lipids solubility and enhances the fecal lipids excretion in rats, 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, San Antonio, USA (2014.5).
- (2) M. Takasugi, J. Kirikoshi, S. Sasayama, M. Hirata, A. Utsunomiya, R. Hosomi, K. Fukunaga, H. Arai, Inhibitory effect of  $\alpha$ -tocopherol and the analogues on release of chemical mediators from mast cells, 105th American Oil Chemists' Society Annual Meeting & Expo, San Antonio, USA (2014.5).

## **【国内学会】**

**[1] 微生物ゲノム研究** (特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)

**(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発** \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである (26 件)

- (1) 岩田音々, 山中一也, 老川典夫, 黒酢醪由来 D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* KTCC12 の D-セリンデヒドラターゼの機能解析, 日本農芸化学会関西支部例会 (第 502 回講演会), 9, 京都 (2018.2). 【★】
- (2) 宮本将崇, 花岡真弓, 山中一也, 老川典夫, D-アミノ酸高生産乳酸菌 *Lactobacillus casei* M10-8 由来新奇二機能グルタミン酸ラセマーゼの C 末端側ドメインの機能解析, ConBio2017, 兵庫 (2017.12).
- (3) 加藤志郎, 老川典夫, クエン酸による乳酸菌の D-アミノ酸生産量の変化とゲノム情報の統合的解析, 第 34 回日本微量栄養学会学術集会, O-8, 大阪 (2017.6). 【★】
- (4) 鷲尾翼, 老川典夫, 食品中の D-アスパラギン酸定量への応用を目的とした D-アスパラギン酸の酵素定量法の開発, 第 34 回日本微量栄養学会学術集会, O-1, 大阪 (2017.6).
- (5) 寺田俊輝, 山中一也, 吉田宗弘, 老川典夫, シロイヌナズナ由来ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ 3 遺伝子の大腸菌での高発現系の構築と *in vitro* での機能解析, 第 34 回日本微量栄養学会学術集会, P-14, 大阪 (2017.6). 【★】

- (6) 阿部修平, 吉村友宏, 老川典夫, 山中一也, epsilon-Poly-L-lysine 合成酵素(Pls)における縮合ドメインの機能解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都(2017.3)
- (7) 安田真央, 老川典夫, 山中一也, 微生物二次代謝産物生合成研究をアシストする高効率 TAR 直接クローニング法, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都(2017.3)
- (8) 加藤志郎, 老川典夫, *Lactobacillus sakei* 由来新規二機能性アミノ酸ラセマーゼ, MalY の機能解析, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 10, 高知 (2016.9). 【★】
- (9) 鷺尾翼, 老川典夫, *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来アスパラギン酸ラセマーゼとL-アスパラギン酸オキシダーゼを用いた D-および L-Asp の新規定量法の開発, 第 12 回 D-アミノ酸学会学術講演会, P11, 高知 (2016.9).
- (10) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, シロイヌナズナにおける微量 D-アミノ酸の吸収および生育阻害解析, 第 33 回日本微量栄養素学会学術集会, O-2, 京都 (2016.6). 【★】
- (11) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸桿菌 *Lactobacillus sakei* 由来シスタチオンinβ-リアーゼの機能解析, 第 11 回 D-アミノ酸学会学術講演会, 新潟 (2015.8). 【★】
- (12) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸を高生産する乳酸球菌のゲノム解析, 第 32 回日本微量栄養素学会学術集会, 京都 (2015.5). 【★】
- (13) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, D-アミノ酸高生産乳酸菌のドラフトゲノム解析, 第 62 回日本生化学会近畿支部例会, 滋賀 (2015.5).【★】
- (14) 加藤志郎, 高橋俊成, 老川典夫, ゲノム解析から見た乳酸菌の D-アミノ酸高生産機構, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山 (2015.3).【★】
- (15) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育と外因性アミノ酸取り込みとの関連, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (16) 鷺尾翼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のL-アスパラギン酸オキシダーゼ ホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の精製と酵素科学的性質の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (17) 井上淳, 老川典夫, *Flavobacterium indicum* DSM 17447 のスレオニンデヒドロゲナーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- (18) 加藤志郎, 山崎遼, 畑安雄, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 由来アスパラギナーゼの酵素科学的解析, 2014 年度日本農芸化学会関西支部大会(第 486 回講演会)日本農芸化学会創立 90 周年・関西支部創立 80 周年記念大会, 奈良 (2014.9).
- (19) 加藤志郎, 安原裕紀, 老川典夫, アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響, 第 31 回日本微量栄養素学会学術集会, 京都 (2014.6).
- (20) 須田理子, 宮内一匡, 細見亮太, 吉田宗弘, 福永健治, 魚肉タンパク質がリン過剰存在下におけるカルシウムの可溶性に及ぼす影響, 第 31 回日本微量栄養素学会, 大阪 (2014.6).
- (21) 山崎遼, 老川典夫, 超好熱アーキア *Thermococcus litoralis* DSM 5473 のアスパラギナーゼホモログ遺伝子のクローニングとその遺伝子産物の酵素科学的性質の解明, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 神奈川 (2014.3).
- (22) 老川典夫, 日本酒中の D-アミノ酸の定量的解析に基づく生成機構及び呈味機能の解明と D-アミノ酸に着目した新商品開発への展望, 新アミノ酸分析研究会第 3 回学術講演会, 東京 (2013.12). [招待講演] 【★】
- (23) 老川典夫, 食品中の D-アミノ酸とその機能, 日本ペプチド学会市民フォーラム 2013, 大阪 (2013.11). [招待講演]
- (24) 齊藤瑠実, 老川典夫, 乳酸菌 *Lactobacillus casei* M10-8 のアミノ酸ラセマーゼホモログ遺伝子の網羅的発現と遺伝子産物の酵素化学的性質の解明, 第 9 回 D-アミノ酸研究会学術講演会, 大阪 (2013.9).
- (25) 老川典夫, 食品中の D-アミノ酸の定量的解析と D-アミノ酸強化新規機能性食品の開発, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9). [招待講演] 【★】
- (26) 老川典夫, D-アラニンを利用した旨み増強日本酒の製造方法, 第 99 回清酒製造技術セミナー, 東京 (2013.4). [招待講演] 【★】

**(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種 \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである (9 件)**

- (1) 村上将和, 高未麗, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解の効率

化, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A06a14, 愛知 (2018.3).

- (2) 高未麗, 村澤友紀恵, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析と環境汚染物質分解能の安定化, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 4J27a02, 京都(2017.3).
- (3) 高未麗, 村澤友紀恵, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株の環境汚染物質分解の向上と安定化, 第 68 回日本生物工学会大会, 2P-1P105, 富山 (2016.9).
- (4) 中川直也, 木場悟, 松村吉信, Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株におけるビスフェノール A(BPA)分解遺伝子の探索と BPA 分解能の安定化に向けた研究, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山 (2015.3).【★】
- (5) 木場悟, 中川直也, 松村吉信, *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析とビスフェノール A 分解遺伝子組換え体による芳香族化合物分解能の調査, 第 66 回日本生物工学会大会, 北海道 (2014.9).【★】
- (6) 新居由莉, 高未麗, 岡本早紀, 松村吉信, バイオディーゼル燃料に利用可能な油脂を生産する微細藻類の単離, 第 66 回日本生物工学会大会, 北海道 (2014.9).
- (7) 木場悟, 石田哲, 松村吉信, Bisphenol A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム配列の解析と AO1 組換え体による BPA 分解能調査, 日本農芸化学会 2014 年度(平成 26 年度)大会, 神奈川 (2014.3).【★】
- (8) 木場悟, 石田哲, 松村吉信, ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析, 第 65 回日本生物工学会大会, 広島 (2013.9).【★】
- (9) 木場悟, 上村真央, 奥野将司, 小田佳孝, 土戸昇平, 松村吉信, ビスフェノール A 分解菌 *Sphingomonas bisphenolicum* AO1 株のゲノム構造解析, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).【★】

**(c) 食品汚染菌の全ゲノム解析と食品汚染菌の防除法の開発** \* 1c の内容に対応する成果は以下の通りである (12 件)

- (1) 野田浩史, 井上貴晴, 富岡敏一, 脇田克也, 松村吉信, 洗濯衣類のバクテリア叢と洗濯工程におけるバクテリア叢変動の解析, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 3A02a02, 愛知 (2018.3).
- (2) 安岡甫, 平山彩, 紅谷貴之, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析, 日本農芸化学会, 2A02a08, 愛知 (2018.3).
- (3) 紅谷貴之, 永村光一, 金本真治, 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現変異株の取得とそれらの抗菌剤耐性能評価, 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会, 2P-Aa67, 大阪 (2017.9).
- (4) 松村吉信, 抗菌剤連続処理による薬剤耐性株の出現とその耐性株の特性に関する知見, 日本防菌防黴学会第 44 回年次大会, 1S2-Bp05, 大阪 (2017.9).
- (5) 松村吉信, 井上貴晴, 佛淵健士, 富岡敏一, 脇田克也, 洗濯環境および衣類に付着するバクテリア叢の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 4C20a10, 京都 (2017.3).
- (6) 紅谷貴之, 金本真治, 永村光一, 御厨真幸, 松村吉信, 永生細胞高出現変異株の抗菌剤耐性能評価と変異領域の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2C17p10, 京都(2017.3).
- (7) 紅谷貴之, 永村光一, 金本真治, 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 永生細胞高出現株の抗菌剤耐性能評価とその変異領域の解析, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会, 27Pa-D19, 東京 (2016.9).
- (8) 御厨真幸, 中田訓浩, 松村吉信, 自然突然変異法で得られた抗菌性界面活性剤耐性大腸菌における変異部位の決定とその働きに関する研究, 日本農芸化学会 2015 年度(平成 27 年度)大会, 岡山 (2015.3).【★】
- (9) 守茂山礼乃, 太田美也子, 松村吉信, 抗菌性界面活性剤処理した *Staphylococcus aureus* 細胞における活性酸素ストレスとその応答の解析, 日本農芸化学会 2014 年度(平成 22 年度)大会, 神奈川 (2014.3).
- (10) 坂元仁, 御厨真幸, 西願文哉, 寺村憲一郎, 土戸哲明, 枯草菌の抗酸化遺伝子多重欠損株を用いた“定性的ストレス感受性/抵抗性マトリックス解析”とその応用, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).
- (11) 守茂山礼乃, 太田美也子, 中田訓浩, 松村吉信, *Staphylococcus aureus* における抗菌剤界面活性剤ストレス応答の解析, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).
- (12) 中田訓浩, 松村吉信, 抗菌剤処理した大腸菌細胞の死滅過程で重要となるスーパーオキシドの発生, 日本防菌防黴学会第 40 回年次大会, 大阪 (2013.9).

**[2] 動物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)

**(a) 神経細胞の分化のエピゲノム解析による神経変性疾患治療薬開発** \*2a の内容に対応する成果は以下の通りである (16 件)

- (1) 谷尾啓介, 瀧上祐希, 山添亮輔, 下家浩二, 神経突起伸長作用を有する Nr4a ファミリー遺伝子の発現制御機構, ConBio2017, 2P-1150, 兵庫 (2017.12).
- (2) 松浦玖実, 山添亮輔, 下家浩二, Bisphenol A が神経細胞に与える形態変化とその作用機構の分子生物学的解析, ConBio2017, 2P-1151, 兵庫 (2017.12).
- (3) 井戸大記, 高橋亮太, 山添亮輔, 下家浩二, HDAC 阻害剤による特定遺伝子群の発現上昇と神経突起伸長作用との関連, ConBio2017, 2P-1152, 兵庫 (2017.12).
- (4) 松浦玖実, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Bisphenol A attenuates neuronal differentiation in cerebral cortical neurons, 第 60 回日本神経化学学会大会, 2P-26, 宮城 (2017.9).
- (5) 井戸大記, 丸岡弘規, 山添亮輔, 谷尾啓介, 下家浩二, The effect of forskolin on the differentiation of PC12 cells via the histone H3 acetylation, 第 11 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京 (2017.5). 【★】
- (6) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Regulation mechanisms of expression of Nr4a1 gene related with neurite outgrowth, 第 59 回日本神経化学学会大会, 福岡 (2016.9).
- (7) 山添亮輔, 玄古宗一郎, 細見亮太, 福永健治, 富岡拓磨, 丸岡弘規, 下家浩二, nur77 gene is upregulated by histone H3 modification on specific lysine residue during neurite outgrowth, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会, 大阪 (2016.5).
- (8) 井戸大記, 山本宇晃, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Involvement of Nr4a1 family genes on neurite outgrowth induced by valproic acid in PC12 cells, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会, 大阪 (2016.5).
- (9) 谷尾啓介, 津村風帆, 島山恵利花, 山添亮輔, 丸岡弘規, 下家浩二, Molecular mechanisms on neurite outgrowth via binding between promoter region for Nr4a family genes and specific modified lysine residue on histone H3, 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会, 大阪 (2016.5).
- (10) 青山大輝, 篠崎遼太, 玄古宗一郎, 藤枝聡志, 水井利幸, 小島正己, 下家浩二, 低濃度 Bisphenol A による PC12 細胞と大脳皮質神経細胞への神経突起伸長への形態的変化作用, 第 37 回日本分子生物学会, 神奈川 (2014.11)
- (11) 富岡拓磨, 津村風帆, 西畑慶紀, 森田有貴, 山添亮輔, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, nur77 ファミリー遺伝子の発現と神経突起伸長作用との関連性, 第 87 回日本生化学会, 京都 (2014.10).
- (12) 富岡拓磨, 青山大輝, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 池内俊彦, 下家浩二, トリコスタチン A による神経突起伸長作用, 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京 (2014.5).
- (13) T. Ikeuchi, Epigenetic regulation of expression of nur77 gene during neurite outgrowth induced by low-molecular-weight compounds in PC12 cells, 第 18 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 大阪 (2014.1). 【★】
- (14) 藤木大地, 豊田雄資, 西畑慶紀, 青山大輝, 上里新一, 池内俊彦, 下家浩二, 新規 HDAC 阻害剤 K-350 による神経突起伸長作用の解析, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9). 【★】
- (15) 伏水貴穂, 豊田雄資, 池内俊彦, 下家浩二, PUMA と Bim の発現上昇を介した小胞体ストレス誘導型アポトーシスの誘導とその抑制機構, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9).
- (16) 中川一馬, 樽谷和馬, 岡野太一, 藤田亜弓, 下家浩二, 池内俊彦, PC12 細胞における小胞体ストレス誘導型アポトーシスの forskolin による抑制機構, 第 86 回日本生化学会大会, 神奈川 (2013.9).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \*2b の内容に対応する成果は以下の通りである (2 件)

- (1) 首浦武作志, 木村博信, 田嶋正二, 多田政子, マウス ES 細胞での 5hmC 化を介した脱メチル化後の Dnmt1 の役割, 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (2014.11).
- (2) 木村博信, 末武勲, 遠井紀江, 川上徹, 饗庭一博, 中辻憲夫, 田嶋正二, プロモーター領域でのヒドロキシメチルシトシンのメチルシトシンに対する相対位置は遺伝子発現と相関する, 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 東京 (2014.5).

**[3] 植物細胞エピゲノム研究** (特に優れた成果を示す発表には、【★】を付記)

**(a) セレン耐性植物のエピゲノム解析による分子育種と新規機能性食品の開発** \* 3a の内容に対応する成果は以下の通りである (8 件)

- (1) 大塚政志, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 老川典夫, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物曝露がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, 第 34 回日本微量栄養素学会, 大阪 (2017.6).
- (2) 大津浩平, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, セレン強化プラウトの抗酸化性の評価, 第 34 回日本微量栄養素学会, 大阪 (2017.6).
- (3) 大塚政志, 大津浩平, 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 無機および有機セレン化合物曝露がシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の生長と遺伝子発現量に及ぼす影響, 第 3 回セレン研究会, 東京 (2017.5).
- (4) 廣瀬侑太郎, 北川怜子, 下川真由子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 亜セレン酸とセレノメチオニンの有効性に及ぼす投与期間の影響, 第 33 回日本微量栄養素学会, 京都 (2016.6).
- (5) 由上文子, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 生およびローストした牛肉に含まれる鉄とセレンの栄養有効性, 日本ビタミン学会第 68 回大会, 富山 (2016.6).
- (6) 廣瀬侑太郎, 細見亮太, 吉田宗弘, 亜セレン酸曝露によるシロイヌナズナの生育抑制と遺伝子発現量の変化, 第 26 回日本微量元素学会学術集会, 北海道 (2015.7).【★】
- (7) 廣瀬侑太郎, 崔諤, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性, 第 32 回日本微量栄養素学会学術集会, 京都 (2015.5). [優秀発表賞受賞]
- (8) 丸岡弘規, 南條祐子, 松本勇樹, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 in vivo イメージングとその応用, 第 37 回日本分子生物学会年会, 神奈川 (2014.11).

**(b) セレン耐性植物および神経細胞のエピゲノム解析とゲノム DNA のメチル化機構の研究** \* 3b の内容に対応する成果は以下の通りである (5 件)

- (1) 島山恵利花, 津村風帆, 丸岡弘規, 富岡拓磨, 山添亮輔, 池内俊彦, 下家浩二, dbcAMP で誘導される神経突起伸長における最初期遺伝子の発現機構, 日本分子生物学会, 神奈川 (2014.11).【★】
- (2) 津村風帆, 富岡拓磨, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 下家浩二, 池内俊彦, HDAC 阻害剤で誘導される神経突起伸長における最初期遺伝子発現の解析, 第 87 回日本生化学会, 京都 (2014.10).
- (3) 丸岡弘規, 頼光花, 松本勇樹, 南條祐子, 大島邦裕, マルチスペクトル解析を利用した蛍光 in vivo イメージングとその応用, 分子イメージング学会, 大阪 (2014.5).
- (4) 富岡拓磨, 山添亮輔, 河広倫, 丸岡弘規, 下家浩二, 池内俊彦, HDAC 阻害剤で誘導される神経突起伸長における nur77 遺伝子発現の解析, 第 86 回日本生化学会年会, 神奈川 (2013.9).【★】
- (5) 豊田雄資, 丸岡弘規, 藤木大地, 上里新一, 池内俊彦, 下家浩二, ツニカマイシンによって誘導されるアポトーシスの抑制と神経突起伸長に寄与する HDAC 阻害剤の作用機構, 第 56 回日本神経化学会大会, 京都 (2013.6).

<研究成果の公開状況> (上記以外)

シンポジウム・学会等の実施状況、インターネットでの公開状況等

※ホームページで公開している場合には、URL を記載してください。

**[先端科学技術シンポジウム]** (URL: <http://www.kansai-u.ac.jp/ordist/symposium/index.html>)

- ・第 22 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2018.1.18-19).
- ・第 21 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2017.1.19-20).
- ・第 20 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2016.1.21-22).
- ・第 19 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2015.1.22-23).
- ・第 18 回関西大学先端科学技術シンポジウム, 関西大学 100 周年記念会館 (2014.1.23-24).

**[ゲノム・エピゲノム研究討論会]**

- ・第 2 回ゲノム・エピゲノム研究討論会(国際シンポジウム), 関西大学千里山キャンパス (2017.12.16). (URL: <http://www.kansai-u.ac.jp/ordist/news/info/2017/10/220171216.html>)
- ・第 1 回ゲノム・エピゲノム研究討論会, 関西大学千里山キャンパス (2016.3.12). (URL: <http://www.kansai-u.ac.jp/ordist/symposium/news/2016/02/post-44.html>)

#### IV その他の研究成果等

「III 研究発表一覧」で記述した論文、学会発表等以外の研究成果及び企業との連携実績があれば具体的に記入してください。また、上記Ⅱ(4)に記載した研究成果に対応するものには\*を付してください。

※ 論文や学会発表等になじまない研究である場合は、本欄を充実させること

##### 【特許】

###### [1] 微生物ゲノム研究 \* 1a

- (1) 老川典夫, 竹下義隆, 新山義友, 「食酢、及び、食酢の製造方法」, 特許第 6060456 号 (登録日: 2016.12.22).

##### 【受賞】

###### [1] 微生物ゲノム研究 \* 1a

- (1) 老川典夫, 「D-アミノ酸強化福山黒酢の開発と関大コラボ商品化の実現」, 平成 28 年度関西大学科学技術振興会「学の実化賞」受賞 (2016.5.21).[参考資料 5-1]

###### [3] 植物細胞エピゲノム研究 \* 3a

- (1) 廣瀬侑太郎, 崔認, 山川裕久, 細見亮太, 福永健治, 吉田宗弘, 「マグロ血合肉の低分子画分に含まれるセレンの栄養有効性」, 第 32 回日本微量栄養素学会学術集会 優秀発表賞受賞 (2015.5.30).

##### 【刊行物】

###### [1] 微生物ゲノム研究(特に優れた成果を示す図書には、【★】を付記)

(a) D-アミノ酸生産菌の全ゲノム解析と応用的分子育種と新規機能性食品の開発 \* 1a の内容に対応する成果は以下の通りである (7 件)

- (1) 老川典夫, シロイヌナズナのセレンの取り込み, 輸送, 耐性機構に関する研究の現状と展望, 微量栄養素研究, 34, 114-118 (2017.12). 【★】
- (2) 加藤志郎, 老川典夫, シロイヌナズナの D-アミノ酸代謝関連酵素, 微量栄養素研究, 33, 118-121 (2016.12). 【★】
- (3) Y. Mutaguchi, J. Kobayashi, T. Oikawa, T. Ohshima, D-Amino Acids, Physiology, Metabolism, and Application, In Part VI D-Amino Acids in Foods, 22 D-Amino Acids in Fermentative Foods, 341-357, Springer, Berlin Heidelberg New York (2016.10). 【★】
- (4) 加藤志郎, 老川典夫, 乳酸菌のゲノム解析: 現状と D-アミノ酸に着目したゲノム情報の活用に向けて, 微量栄養素研究, 32, 78-82 (2015.12). 【★】
- (5) 森田朱香, 老川典夫, クエン酸が乳酸の生育と代謝に及ぼす影響, 微量栄養素研究, 32, 86-89 (2015.12). 【★】
- (6) 加藤志郎, 老川典夫, D-及び L-アミノ酸添加が *Arabidopsis thaliana* 芽生えの生育に及ぼす影響, 微量栄養素研究, 31, 1-5 (2014.12).
- (7) 老川典夫, 食品に関連する乳酸菌の D-アミノ酸代謝関連酵素, バイオインダストリー, 31, 33-40 (2014.10). 【★】

(b) 環境ホルモン BPA 分解菌 *Sphingomonas* 属 AO1 株の全ゲノム解析と分子育種 \* 1b の内容に対応する成果は以下の通りである (1 件)

- (1) 松村吉信, バイオフィルムの生成メカニズムと洗浄・殺菌技術, クリーンテクノロジー, 26, 57-61 (2016.11).

##### 【テレビ報道】

- (1) NHK 総合ニュース「首都圏ネットワーク」, 「地域の魅力や課題を“大学発商品”に」 (2017.5.18 放映)

##### 【新聞報道】

###### [1] 微生物ゲノム研究 \* 1a

- (1) 「D-アミノ酸が関与 D-アラニンなど 3 種 生醗造りに多く含有」  
化学工業日報, 2013 年 10 月 16 日付 5 面.
- (2) 「大学活用法 企業の産学連携戦略 48 『菊正宗酒造 アミノ酸で伝統製法に風穴』」  
日刊工業新聞, 2013 年 10 月 4 日付 17 面.

【企業ホームページでの公開】[参考資料 5-1]

**[1] 微生物ゲノム研究 \* 1a**

- (1) 福山黒酢株式会社, 黒酢に含まれる「美容アミノ酸」  
URL : [http://www.kakuida.com/kurozu/post\\_43.htm](http://www.kakuida.com/kurozu/post_43.htm)
- (2) 株式会社関大パンセ, D-アミノ酸強化黒酢を用いたフルーツ黒酢「ピュアミノセット」の販売  
URL : <https://www.kandaipenseeshop.jp/products/detail/28>
- (3) 株式会社エトレ広報ソリューショングループ大学広報企画室, ほとんど 0 円大学  
D-アミノ酸を強化! 関大発の生フルーツ黒酢「ピュアミノセット」  
URL : [http://hotozero.com/knowledge/kansai-u\\_damino/](http://hotozero.com/knowledge/kansai-u_damino/)

【その他イベント】

**[1] 微生物ゲノム研究 \* 1a**

- (1) 生フルーツ黒酢, 第 10 回「大学はおいしいフェア」, 新宿高島屋 (2016.5.18-23).[参考資料 5-2].

【学外共同研究】

**[2] 動物細胞エピゲノム研究 \* 2a**

- (1) 2014 年度 蛋白質研究所共同研究員(研究チーム 2: 下家)  
大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質化学研究部門 エピジェネティクス研究室  
共同研究名「特定 HDAC を介した神経突起伸長に関するエピジェネティックな分子機構の解析」