

日本農芸化学会関西支部 第473回 講演会 プログラム

日時：平成24年1月28日（土）13時30分 開会

会場：京都大学楽友会館 2階会議・講演室（京都市左京区吉田二本松町 TEL：075-753-7603）

一般講演（13:30～15:16）〔講演9分：質疑応答3分〕（*印は若手優秀発表賞対象講演）

- * 1. 嫌気性細菌による α , β -不飽和脂肪酸の不斉水素化反応 [13:30-13:42]
○佐藤奈津子、岸野重信、中川拓哉、川端 潤¹、小川 順（京大院農・応用生命、¹三菱化学科学技術研究センター）
- * 2. 植物と共生するメタノール産生性細菌の時計遺伝子ホモログの解析 [13:42-13:54]
○厚主聡美¹、井口博之¹、由里本博也¹、小山時隆²、阪井康能¹（¹京大院農・応用生命、²京大院理・植物）
- * 3. 出芽酵母における TOR シグナルと細胞内レドックス制御の関連 [13:54-14:06]
○白石晶子、奥 公秀、阪井康能（京大院農・応用生命）
- * 4. 亜鉛吸収に機能するトランスポーターZIP4の発現を促進する食素材成分の探索と精製 [14:06-14:18]
○橋本彩子¹、高橋正和²、木津久美子³、宮前友策¹、増田誠司¹、永尾雅哉¹、成田宏史³、大東 肇²、神戸大朋¹（¹京大生命・統合生命、²福井県立大院・生命資源、³京女大・家政・食物栄養）
休憩（14:18～14:40）
- * 5. がんの浸潤・転移に関与する亜鉛要求性酵素を活性化する亜鉛トランスポーターの同定 [14:40-14:52]
○辻徳治、逸村直也、宮前友策、増田誠司、永尾雅哉、神戸大朋（京大院・生命・統合生命）
- * 6. 超高性能なアラミド製ガス拡散型バイオカソードの開発と今後の展望 [14:52-15:04]
○浅野 達¹、赤松哲也²、白井 理¹、加納健司¹（¹京大院・農・応用生命、²東邦テナックス株式会社）
- 7. 鱗翅目幼虫腸管内エリシターFACsの多様性から見る寄主植物—植食性昆虫相互作用の研究 [15:04-15:16]
○吉永直子¹、森田沙代¹、網干貴子¹、西田律夫¹、森 直樹¹、James H. Tumlinson²（¹京大院・生命、²Penn State University）
休憩（15:16～15:30）

特別講演（15:30～16:10）

農芸化学奨励賞受賞講演 光合成電子伝達鎖を制御する葉緑体酸素発生系タンパク質の分子機能に関する研究
伊福 健太郎（京都大学大学院生命科学研究科）

若手優秀発表賞表彰式（16:10-16:15）

懇親会（16:30～18:30）京都大学楽友会館食堂 一般200円 学生 無料

光合成電子伝達鎖を制御する葉緑体酸素発生系タンパク質の

受賞講演

分子機能に関する研究

伊福 健太郎

(京大院・生命・統合生命, JST さきがけ)

光エネルギーを用いて水の完全分解を行う光化学系 II 複合体 (Photosystem II, 以下、PSII と略す) は、葉緑体のチラコイド膜に存在し、その内腔側に位置するマンガン (Mn) クラスターが水分解-酸素発生反応を触媒する。この Mn クラスターの周りは膜表在性のタンパク質で覆われており、これらのタンパク質は酸素発生系(OEC)タンパク質と呼ばれる。OEC タンパク質の組成は、緑色植物と葉緑体の祖先に近いと考えられているシアノバクテリアの間で異なり、進化の過程で生育環境の変化に適応するために変化したと考えられている。しかしながら、その組成変化がどのようなタンパク質の構造変化や機能分化を反映しているのかは不明であった。

我々はこの課題に対し、緑色植物に特異的な OEC サブユニットである PsbP と PsbQ タンパク質に着目した研究を行ってきた。これまでに PsbP の欠損が PSII 活性の低下や暗所における Mn クラスターの不安定化を引き起こし、PsbP は集光タンパク質を結合した活性型 PSII の蓄積に必須であることを報告した。またフーリエ赤外分光法 (FTIR) を用いた共同研究により、PsbP の結合に伴い PSII の Mn クラスター周辺構造が変化することを認めた。現在、PsbP が直接相互作用する PSII 膜内在性サブユニットの同定を進めている。さらに PsbQ の役割についても新しい知見が得られつつある。一方、緑色植物は PsbP と PsbQ に加えて、特有の PsbP と PsbQ ホモログ群を持つことがゲノム解析やプロテオーム解析で明らかになった。これらのホモログ群についても機能解析を行った結果、PsbP-like protein 1 (PPL1) が強光で障害をうけた PSII の修復過程に関わり、PPL2 と 3 種の PsbQ-like protein (PQL1-3) が強光耐性との関わりが報告されている循環的電子伝達を行う葉緑体 NAD(P)H dehydrogenase 複合体の新規サブユニットであることを明らかにした。

これら一連の結果は、酸素発生光合成生物の進化において、PsbP と PsbQ のホモログ群の多様な分子進化が生じて PSII 機能や光合成電子伝達鎖機能の制御が行われるようになり、その過程で緑色植物独自の機能を持つ OEC サブユニットとして PsbP と PsbQ が獲得されたことを示唆している。本発表では、我々の研究成果を踏まえながら、緑色植物の環境適応機構としての光合成電子伝達鎖調節のしくみを紹介する。

嫌気性細菌による α, β - 不飽和脂肪酸の不斉水素化反応

1 ○ 佐藤奈津子¹、岸野重信¹、中川拓哉¹、川端潤²、小川順¹
(¹京大院・農・応用生命、²三菱化学科学技術研究センター)

【目的】キラル化合物（光学活性体）は医薬・農薬中間体などに幅広く利用されており、通常化学的に合成されたラセミ体を光学分割することにより得られるが、微生物による高い立体選択性を活かした生産方法を取り入れることでより効率的な生産が可能となる。我々は微生物反応により炭素-炭素間二重結合を立体選択的に変換する研究を行っており、今回 α, β - 不飽和脂肪酸であるチグリン酸 (*(E)*-2-メチル-2-ブテン酸) を不斉水素化する嫌気性細菌の探索と、反応条件の検討を行った。

【方法】研究室保存の嫌気性細菌約 300 株を対象に、チグリン酸から 2-メチル酪酸への不斉水素化反応を行う微生物を探索した。その結果、(*R*) 体の特異的に生産する菌株と (*S*) 体の特異的に生産する菌株をそれぞれ取得した。不斉水素化反応を行う微生物の探索を行っていく中で、反応する際の嫌気条件が水素化の効率に影響を及ぼすことが示唆されたため、好気条件と嫌気条件(窒素・水素混合ガス雰囲気下、窒素・二酸化炭素混合ガス雰囲気下)で反応を行い、不斉水素化活性の比較を行った。どの条件においても (*S*) 体立体選択性及び水素化活性が高かった *Clostridium sporogenes* JCM 1416、*Propionibacterium acnes* JCM 6473 の 2 株を選抜し、詳細な培養条件、反応条件の検討を行った。その結果、基質チグリン酸濃度 50 mM の反応において、*C. sporogenes* JCM1416 では収率 45%、(*S*) 体光学純度 91% *e. e.*、*P. acnes* JCM6473 では収率 30%、(*S*) 体光学純度 88% *e. e.* で 2-メチル酪酸を得ることができた。

植物と共生するメタノール資化性細菌の時計遺伝子ホモログの解析

2 ○厚主聡美¹、井口博之¹、由里本博也¹、小山時隆²、阪井康能¹
(¹京大院農・応用生命、²京大院理・植物)

【目的】*Methylobacterium* 属細菌は、Pink-Pigmented Facultative MethyloTroph (PPFM)として知られるメタノール資化性細菌で、植物表層に広く生息し、植物に対する生長促進作用も知られている。植物上では、*Methylobacterium* 属細菌は、植物から放出されるメタノールを利用して生育しており、また、当研究室の研究によって、植物表層上のメタノール濃度は、日内で変動していることが明らかになっている (PLoS ONE 2011. 6: e25257)。しかし、*Methylobacterium* 属細菌がこの日内変動に対して、どのように応答しているかは分かっていない。植物をはじめとする真核生物には、環境の日周サイクルに適応する概日リズムが存在するが、原核生物において、概日リズム機構を持つことが明らかとなっているのは、光合成を行うシアノバクテリアのみである。本研究では、*Methylobacterium extorquens* AM1に、シアノバクテリア時計遺伝子の相同遺伝子を見出し、その解析を行った。

【方法・結果】シアノバクテリア *Synechococcus elongatus* PCC 7942において、概日リズムの特性全般を決める時計遺伝子は、*kaiA*, *kaiB*, *kaiC* であることが知られている。*M. extorquens* AM1の全ゲノムに対して、これら *kai* 遺伝子の相同性検索を行った結果、アミノ酸レベルで、50%~70%の類似性を示す *kaiB1*, *kaiB2*, *kaiC* を同定した。これらの遺伝子は、*kaiC*, *kaiB2*, *kaiB1*の順に同じ向きに並んでおり、その下流には、*S. elongatus* の *kaiA* と低い相同性を示す '*kaiA*' も存在した。本遺伝子の発現を調べるために、RT-PCR解析を行った。その結果、炭素源をメタノール・コハク酸とした場合について、それぞれ明・暗条件で培養し、いずれの場合においても、4つの遺伝子の転写が認められた。さらに、*kaiC* 遺伝子の破壊株を作成した。*kaiC* 遺伝子破壊株を、暗条件で液体培養し、野生株と生育を比較したところ、差は見られなかった。現在、*kaiC* 遺伝子破壊株の、植物上における生育能について調べている。

出芽酵母における TOR シグナルと細胞内レドックス制御の

3 関連

- 白石晶子、奥公秀、阪井康能
(京大院・農・応用生命)

【目的】 The target of rapamycin (TOR) は真核生物に広く保存されている Ser/Thr キナーゼであり、外部環境に応答し、細胞成長や代謝の中心的な制御を担う。TOR はラパマイシン感受性の TOR Complex 1 (TORC1)、及び非感受性の TORC2 の二つの異なる複合体で機能する。TORC1 は液胞膜上に局在し、タンパク質の転写調節、翻訳などに関わり、窒素飢餓条件において機能が抑制される。TORC2 は細胞質に局在するとされ、細胞骨格の組織化に関与する。

近年、Tor の活性制御は真核生物の寿命と密接に関係する事が示唆されているが、老化に関連すると考えられる細胞内のレドックス制御と TOR シグナルの関係はあまり明らかでない。そこで本研究では、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、細胞内の最も主要な抗酸化機構であるグルタチオン系と TOR シグナルの関連を調べる事を目的とした。

【方法】 *S. cerevisiae* の Tor1 及び Tor2 リン酸化活性亢進株、TOR1 遺伝子破壊株、TORC2 の構成因子の一つである AVO2 遺伝子破壊株を用い、栄養条件下、窒素飢餓時の両条件における細胞内のグルタチオン、グルタチオン合成に関わる化合物の量を LC-MS/MS を用いて測定した。

【結果】 TORC1 の活性が亢進する株では、野生株に比べ、還元型グルタチオン (GSH) 量が減少する事がわかった。特に TORC1 の主要な構成因子である Tor1 の活性亢進株では、窒素飢餓時だけでなく栄養条件下においても、GSH 量は半分以下と顕著に減少した。また TORC1、TORC2 両者の構成因子である Tor2 の活性亢進株でも GSH 量の減少が見られた。tor1Δ、avo2Δ 株では GSH 量の減少が見られず、野生株と同等程度の GSH 量が観察された。

Tor1 活性亢進株では、GSH 合成の前駆体であるシステイン(Cys)、γ-グルタミルシステイン(γ-GluCys)量が減少していた。この事から、TORC1 活性の亢進により、細胞内の Cys 量を始めとするアミノ酸プールが減少し、GSH 量が減少している事が示唆された。

亜鉛吸収に機能するトランスポーターZIP4 の発現を促進する

食素材成分の探索と精製

4

○ 橋本彩子¹、高橋正和²、木津久美子³、宮前友策¹、増田誠司¹、永尾雅哉¹、成田宏史³、大東 肇²、神戸大朋¹

(¹京大生命・統合生命、²福井県立大院・生命資源、³京女大・家政・食物栄養)

【目的】近年、亜鉛欠乏は途上国だけでなく先進諸国においても認められ、世界規模での栄養問題となりつつある。日本においても国民の2～3割が潜在的な亜鉛欠乏者であるという試算が出されており、日々の食生活を通して亜鉛を充足させることは極めて重要である。亜鉛は、タンパク質の構造や酵素活性、種々のシグナル調節の重要因子として機能する必須微量元素である。その為、亜鉛の不足は味覚障害や皮膚炎、成長遅延等種々の症状を引き起こす。消化管からの亜鉛吸収には先天性亜鉛欠乏症（腸性肢端皮膚炎）の原因遺伝子として同定されたトランスポーターZIP4 が必須の役割を果たす。亜鉛欠乏時、ZIP4 は分解を免れ、小腸上皮細胞管腔側に局在し亜鉛の取り込みに機能する。本研究は、亜鉛欠乏予防効果をもつ食品を創成するための基盤確立を目的として、ZIP4 の発現を促進する食品素材成分の探索、精製を実施した。

【方法】①探索スクリーニング系の構築：小腸上皮細胞と同様に亜鉛欠乏に応じてZIP4 を発現する性質を持つHepa細胞を見出した。ZIP4 検出のため、抗ZIP4モノクローナル抗体を作製した。種々の食素材試料存在下で培養したHepa細胞抽出液を用いて、Western blot法によりZIP4の発現変化に及ぼす影響を解析した。②細胞内亜鉛量の解析：食素材試料による亜鉛取り込み促進効果について、細胞内亜鉛量のマーカーであるメタロチオネインのmRNAの発現変動を指標に検討した。③食素材成分の精製：ZIP4発現促進活性の認められた食素材試料について、中圧カラムクロマトグラフィーとHPLCを用いて精製した。④作用機構の解析：ZIP4のmRNAならびにタンパク質の発現変化を経時的に観察し、食素材試料によるZIP4発現促進機構について検討した。

【結果・考察】大豆抽出物に、再現性よくZIP4の発現を増加させ、同時にメタロチオネインのmRNA発現を有意に増加させる活性が認められた。従って、本抽出物には、ZIP4の発現を促進し細胞内亜鉛量を増加させる成分が含まれると考えられた。本抽出物を中圧カラムクロマトグラフィー分画に供し、続いてprep-HPLCにより比活性が出発抽出物の約3倍となる単一活性成分を得た。現在、同成分の構造決定を進めている。一方、ZIP4発現促進効果については、解析の結果、ZIP4タンパク質の分解を抑制する効果により生じていることを示唆する結果を得た。

がんの浸潤・転移に関与する亜鉛要求性酵素を

5 活性化する亜鉛トランスポーターの同定

○ 辻徳治、逸村直也、宮前友策、増田誠司、永尾雅哉、神戸大朋
(京大院・生命・統合生命)

【目的】亜鉛はタンパク質の構造維持に不可欠となる金属元素である。なかでも重要な機能の一つは酵素の補因子となることであり、酵素活性を有するために亜鉛が必須である亜鉛要求性酵素は、ヒト体内には 1000 種類近く存在すると考えられている。これら酵素が亜鉛を獲得して活性化するまでの分子機構はほとんど明らかにされていない。これまで、我々の研究グループは、亜鉛要求性酵素の一つである tissue non-specific alkaline phosphatase (TNAP) において、分泌経路に局在する亜鉛トランスポーターが酵素タンパク質を安定化した後、亜鉛を供給し、不活性型のアポ酵素から活性型のホロ酵素へと変換するという 2 段階の制御機構が存在することを示してきた。本研究では、TNAP に関して得られた知見を一つの指標として用い、がんの浸潤・転移に関与する亜鉛要求性酵素を活性化する亜鉛トランスポーターを探索した。

【方法】我々の研究グループでは、相同組み換え効率の高いニワトリ DT40 細胞を用いて亜鉛トランスポーター多重欠損株を作成している。本研究では、DT40 野生株 (wild type 株 : WT) に加え、亜鉛トランスポーター ZnT5、ZnT6、ZnT7 の三重欠損株 (triple knock out 株 : TKO) や、TKO からさらに ZnT4 を欠損させた四重欠損株 (quadruple knock out 株 : QKO) を解析に用いた。がんの浸潤・転移に関与する亜鉛要求性酵素としては、matrix metalloproteinase 2 (MMP2) や carbonic anhydrase IX (CAIX) を選択し、各酵素をそれぞれの細胞株に安定発現させた。MMP2 は Zymography 法によって、CAIX ではベロナール緩衝液を用いた pH 測定法によって酵素活性を測定し、亜鉛トランスポーターが酵素活性に及ぼす影響を評価した。

【結果・考察】MMP2 活性は、TKO や QKO においても WT と比較して顕著な違いは認められなかった。しかしながら、CAIX 活性に関しては、TKO と WT との間に差異は認められなかったものの、QKO において活性が低下する傾向が認められ、CAIX の活性化に ZnT4 が寄与していることが示唆された。Western blot で検出される CAIX タンパク質の分子サイズに関しても、QKO と WT との間で明らかに異なっており、亜鉛トランスポーターによる CAIX タンパク質動態への影響が活性低下傾向の一因となっていることが予想される。現在、QKO-CAIX 発現株にヒト ZnT4 を始めとしたヒト亜鉛トランスポーターを発現させた細胞株による解析を進めており、今後、CAIX 活性化機構における亜鉛トランスポーターの作用機序の解明を目指して研究を進めていく予定である。

超高性能なアラミド製ガス拡散型バイオカソードの開発と今後

6 の展望

浅野 達¹、赤松哲也²、白井 理¹、加納健司¹

(¹京大院・農・応用生命、²東邦テナックス株式会社)

【目的】 バイオ電池は酵素を電極触媒として利用した次世代発電デバイスである。バイオ電池は植物由来の糖などの有機化合物と、普遍的に存在する酸素を燃料にして常温・常圧下で作動できるため、循環型社会へ調和した有望なデバイスとして注目されており、世界中で研究されている。

バイオ電池の課題は、従来の燃料電池に比べ低出力であることであり、特に正極（カソード）において高い電流密度を出すことが極めて難しかった。ガス拡散型のバイオ電池のカソードでは、酸素を4電子還元する酵素を触媒として用いる。このため空気中の酸素を供給する気相や、プロトンを供給する液相だけでなく、酵素を安定に保持し、直接電子移動の場として機能する固相を有する、特異なバイオ三相界面を形成させる必要がある。つまりガス拡散型バイオカソードには、導電性、撥水性、通気性だけでなく親水性も求められ、高い電流密度を出すにはこれらの相反する性質の最適なバランスを実現しなくてはならない。

この難題を解決するために、我々のグループでは電極材料にフィブリル化したアラミド繊維（パルプ状 Twaron®）に注目した。Twaron®パルプは、表面へ均一に PTFE などの疎水性高分子を定着させることが可能で、疎水性をコントロールすることができる。そこで本研究ではパルプ状の Twaron®、炭素微粒子、疎水性高分子（PTFE）を材料として電極基材を開発し、この電極に酵素を固定化することでバイオ三相界面を形成した電極を創製することを目的とした。

【方法】 我々のグループは、扱いやすい銅エフラックスオキシダーゼ（CueO）を電極触媒として用いることで、電極の最適な PTFE 組成、最適な電極厚み、安定性を評価した。次に、創製したアラミド電極が他の酵素でも機能するかどうかを確認するために、より優れた電極触媒であるが扱いにくいとされているピリルビンオキシダーゼ（BOD）を用いて電極を作成し、電流密度がどれだけ得られるかを調べた。

鱗翅目幼虫腸管内エリシターFACsの多様性から見る寄主植

7 物—植食性昆虫相互作用の研究

○ 吉永直子¹、森田沙代¹、網干貴子¹、西田律夫¹、森直樹¹、James H. Tumlinson²

(¹京大院・生命、²Penn State University)

【目的】鱗翅目幼虫腸内で産生される FACs (fatty acid amino acid conjugates) は、植物葉を餌とする幼虫にとって貴重な窒素の代謝促進に関わる化合物群である。ところが、幼虫の食草であるトウモロコシやタバコなどの植物は、食害を受けた際、傷口で FACs を検知して大量の揮発成分を放出する。この揮発成分が化学情報因子として働いて、幼虫の天敵である寄生蜂の寄主発見に利用される (植物の間接防御反応)。これまでの研究で、FACs には数種の類縁体があり、鱗翅目幼虫の FACs 類縁体組成は種特異的であること、一方で植物側は食害する幼虫が変われば組成の異なる揮発成分を放出し、スペシャリストの寄生蜂はそのパターンを学習して識別することが知られている。

そこで本研究は、FACs 類縁体の構造活性相関を明らかにするとともに、鱗翅目昆虫においてこれほど多様な FACs が派生してきた背景を生態学的見地から探る。

【方法・結果】研究室内で飼育された種及び野外で採集した合計 29 種の鱗翅目幼虫を液体窒素で凍結し、腸管内容物を 50% acetonitrile で抽出した。遠心した上清に内部標準として *N*-palmitoleoyl-L-glutamine を加えて LCMS 分析に供した。検出された *N*-(17hydroxylinolenoyl)-L-glutamine を始めとする 8 種の FACs は *tR* 及び *MS* のイオンを標品と比較して同定した。

合成・あるいは精製した各種 FACs それぞれ 4 nmol をリン酸緩衝液に懸濁し、播種後 2 週間で茎部切断したトウモロコシ *Zea mays* 幼苗に吸わせた。また、播種後 2 ヶ月のタバコ *Nicotiana attenuata* やナス *Solanum Melongena* の葉にも同量の FACs を傷口に塗布した。10 時間後、処理した植物をそれぞれガラス管内に設置し、放出される揮発成分をポンプ気流によりガラス管先端の吸着剤 Q-trap に捕集した。3 時間捕集した後、Q-trap から揮発成分を 100 μ L の dichloromethane で抽出し、400 ng の nonyl acetate を内部標準として GC 及び GCMS で分析・定量した。トウモロコシ及びナス科植物で比較した場合、それぞれの害虫である鱗翅目幼虫に特徴的な FACs 類縁体に強く応答して揮発成分が放出されることが明らかとなった。