

**日本農芸化学会関西支部
第470回講演会・ミニシンポジウム**

講演要旨集

平成23年7月2日（土）

大阪府立大学 学術交流会館

賛助会員（５０音順）

関西支部の活動は下記の賛助会員からの御支援により支えられています。

アース製薬(株)	東洋紡績(株) 敦賀バイオ研究所
アサヒビール(株) 吹田工場	長瀬産業(株)
味の素(株)	ナカライテスク(株)
(株) 東農園	日清食品(株)
植田製油(株)	(株) 日本医科器械製作所
江崎グリコ(株)	日本ケミカルリサーチ(株)
大関(株)	日本盛(株)
(株) カネカ高砂工業所	日本新薬(株)
菊正宗酒造(株)	日本ヘルス工業(株)
黄桜酒造(株)	白鶴酒造(株)
月桂冠(株)	ヒガシマル醤油(株)
三栄源エフ・エフ・アイ(株)	(株) ファーマフーズ
サントリー(株)	不二製油(株)
(株) 食品バイオ研究センター	松谷化学工業(株)
住友化学(株)	三井化学アグロ(株)
(株) 第一化成	明治製菓(株)
ダイセル化学工業(株)	ユニチカ(株)
大日本除虫菊(株)	理研化学工業(株)
武田薬品工業(株)	和研薬(株)
田辺三菱製薬(株)	和光純薬工業(株)
タマノイ酢(株)	

プログラム

1. ミニシンポジウム (13:00~15:05)

「植物生理機能の解明から活用へ」

- | | |
|---------------------------|---|
| 1. 「植物における小胞体ストレス応答の分子機構」 | 4 |
| 小泉 望 (大府大院・生命環境) | |
| 2. 「ストマジエンによる気孔密度の調節機構」 | 6 |
| 嶋田 知生 (京大・院理・植物) | |
| 3. 「フラボノイドの配糖体化酵素の機能進化」 | 8 |
| 小埜 栄一郎 (サントリー植物科学研) | |

休 憩 (15:05~15:20)

2. 一般講演 (15:20~17:15)

- | | |
|--|----|
| *1. 「Heterochromatin protein 1 (HP1)とEstrogen receptor α binding protein(ERBP)との相互作用について」 | 14 |
| ○岩井翔子, 佐々木勝彦, 杉本憲治 (大府大院・生命環境) | |
| *2. 「Wntシグナル経路を介するリポ蛋白質受容体ファミリーLRP10による骨芽細胞の分化制御」 | 15 |
| ○鏑方綾香, 幾原亜季, 平田倫子, 関家麻奈未, 細田明美, 福村智恵, 金 東浩, 佐伯 茂
(大阪市大・生活科学研究科・生体情報) | |
| *3. 「カーボンナノチューブ上での骨細胞の分化誘導」 | 16 |
| ○榎本健太 ¹ , 小倉悠湖 ¹ , 森英樹 ² , 原正之 ² , 北村進一 ¹ (¹ 大阪府大院・生命環境, ² 理) | |
| *4. 「水溶性フェルラ酸エステルの酵素合成およびアルツハイマー病改善効果に関する研究」 | 17 |
| ○菊川昌希 ¹ , 井田智章 ² , 村瀬仁章 ³ , 居原 秀 ² , 阪本龍司 ¹
(¹ 大阪府大院・生命環境, ² 理, ³ グロービア) | |
| *5. 「新しいホウ酸化合物ライブラリーの合成と生理活性」 | 18 |
| ○中川直道, 中村和寛, 谷森紳治, 切畑光統 (大府大院・生命環境) | |
| *6. 「大規模生体分子量子化学計算によるエイズ治療薬の評価」 | 19 |
| ○岩佐彰浩 ¹ , 矢城陽一郎 ^{1,2} , 直島好伸 ^{1,2} (¹ 岡山理大院・総合情報, ² 自然科学研) | |
| 7. 「量子化学計算手法による糖質や甘味タンパク質の甘味発現機構の検討」 | 20 |
| ○矢城陽一郎, 直島好伸 (岡山理大院・総合情報) | |

*「日本農芸化学会若手優秀発表賞」対象講演

3. 懇親会 (17:15~18:15) 会費 3,000円 (学生無料)

MEMO

●●●● ミニシンポジウム ●●●●

13:00～15:05 多目的ホール

「植物生理機能の解明から活用へ」

1. 植物における小胞体ストレス応答の分子機構

小泉 望（大府大院・生命環境）

2. ストマジェンによる気孔密度の調節機構

嶋田 知生（京大・院理・植物）

3. フラボノイドの配糖体化酵素の機能進化

小埜 栄一郎（サントリー植物科学研）

植物における小胞体ストレス応答の分子機構

(大阪府大院・植物バイオサイエンス) ○小泉 望

【背景と目的】何らかのストレスにより小胞体内のタンパク質にフォールディング異常が生じると、シャペロン遺伝子の発現誘導を介したフォールディング能力の増強や不良タンパク質の細胞質への逆輸送とプロテアソームでの分解が起こる。この一連の細胞応答は「小胞体ストレス応答」と呼ばれ真核生物で広く保存されている。酵母では小胞体膜に局在する受容体型タンパク質キナーゼ IRE1 の RNase ドメインにより、小胞体ストレス応答時に転写因子 *HAC1* mRNA が細胞質スプライシングを受ける。その結果、活性型 HAC1 タンパク質が合成され、シャペロン等の遺伝子の転写を活性化する。哺乳動物でも IRE1 が転写因子 *XBPI* mRNA の細胞質スプライシングを触媒し、その結果、活性型転写因子が作られる。加えて、タンパク質レベルで切断を受け、活性化される膜結合型転写因子 ATF6 も標的遺伝子の誘導に関わる。演者らはシロイヌナズナから小胞体ストレス誘導剤とした用いられる糖鎖合成阻害剤ツニカマイシン処理により転写誘導される転写因子 bZIP60 を単離していた。bZIP60 は C 末側に膜結合ドメインを有し、それ以降を欠失させた bZIP60 Δ C は BiP などの小胞体シャペロンのプロモーターを活性化する。全長型 bZIP60 は小胞体膜に局在するが、ツニカマイシン処理依存的に核に局在する低分子量のタンパク質が観察されることから bZIP60 は動物の ATF6 と同様タンパク質レベルでの切断により活性化されると考えられたが、その活性化機構は不明であった。演者らは IRE1 ホモログも 2 遺伝子 (*IRE1A*、*IRE1B*) もシロイヌナズナから単離していたが、これらの遺伝子の小胞体ストレス応答における役割は不明であった。そこで bZIP60 の活性化機構と IRE1 ホモログの標的の同定を目的とした。

【方法と結果】

IRE1 二重変異体はツニカマイシンに対する感受性が亢進する

シロイヌナズナの *IRE1A* と *IRE1B* を交配し二重遺伝子破壊株（以下、二重変異体）を作出した。二重変異体の芽生えは、野生型あるいは一重変異体と比べてツニカマイシンに高い感受性を示した。

IRE1 と bZIP60 の標的遺伝子の多くが重複する

野生型と二重変異体を用いて、マイクロアレイ解析を行った結果、ツニカマイシン処理で誘導される遺伝子の多くの誘導が二重変異体では抑制されていた。これらの遺伝

子の多くは *bZIP60* 破壊株において誘導が抑性されていた遺伝子と重複していた。

IRE1 二重変異体では活性型 *bZIP60* が検出されない

bZIP60 に対する抗体を用いてイムノブロットを行ったところ、ツニカマイシン処理により野生型あるいは一重変異体では見られる低分子量の *bZIP60* タンパク質が二重変異体では検出されなかった。

bZIP60 mRNA は特徴的なステムループ構造を取る

bZIP60 mRNA の二次構造予測を行ったところ、*HAC1* や *XBP1* mRNA において保存されているスプライシングに必要な 2 つのステムループ構造が見られた。さらに両者のスプライシングで保存されている塩基がシロイヌナズナの *bZIP0* およびデータベース上の他の植物の *bZIP60* ホモログにも完全に保存されていた。

bZIP60 mRNA は *IRE1* 依存的にスプライシングを受ける

in silico の解析から *bZIP60* mRNA が 23 塩基のスプライシングを受けることが示唆されたため、このスプライシングを検出するプライマーセットを設計し、ツニカマイシン処理を施した植物から調整した RNA を鋳型に RT-PCR を行ったところ、目的のサイズの増幅産物が見られた。この cDNA 断片をクローニングしてシーケンスしたところ予想配列と完全に一致した。この PCR 産物の増幅はツニカマイシン処理に依存するとともに *IRE1* 二重変異体では検出されなかった。

スプライシングされた *bZIP60* mRNA から活性型タンパク質が翻訳される

スプライシングを受ける前の *bZIP60* mRNA からは 295 アミノ酸のタンパク質が翻訳されると考えられ、スプライシングにより生じた mRNA からは 258 アミノ酸のタンパク質が生じると考えられた。人工的に膜結合ドメイン以降を欠落させた *bZIP60* ΔC は 216 アミノ酸からなる。この大きさの違いは 23 塩基のスプライシングの結果フレームシフトにより新しい ORF が生じた結果と考えられた。

【結論】

シロイヌナズナの小胞体ストレス応答では *IRE1* による 23 塩基の細胞質スプライシングにより生じた *bZIP60* mRNA から活性型 *bZIP60* タンパク質が合成される。つまり、植物の *IRE1* も酵母や動物と同じく転写因子の mRNA の細胞質スプライシングを触媒する。しかし、*HAC1*、*XBP1* の場合はスプライシングの結果、活性化ドメインを持った分子量の大きな転写因子が合成されるのに対し、*bZIP60* の場合はスプライシングの結果、分子量が小さなタンパク質が合成される。活性化される前の *bZIP60* はすでに活性化ドメインを持っており、活性化は *bZIP60* が小胞体膜から核への移行することで可能になると考えられた。

ストマジェンによる気孔密度の調節機構

(京大・院理・植物) ○嶋田知生, 菅野茂夫, 西村いくこ

気孔は植物体の地上部の表皮に存在し、二酸化炭素 (CO_2) の取込みや蒸散などガス交換を担う装置である。植物は環境に応じて気孔のガス交換能を制御し、光合成活性や耐乾燥性を調節している。すなわち、短期的な環境変化に対しては気孔開度を制御して対処しており、より長期的な環境変化には葉の発生を介した気孔密度の増減の制御を行っている。一般的に強光条件下では気孔密度が増加し、高 CO_2 条件下では気孔密度が減少すると言われている。

シロイヌナズナを用いた分子遺伝学的研究により、気孔分化に関与する因子とその分子メカニズムが急速に明らかになってきた (図 1)。気孔分化では EPF ファミリーと呼ばれる分泌性のシステインリッチペプチド群が分化とパターンニングを制御していることが分かってきた。EPF ファミリー内ではシステインの位置が高度に保存されており、多様な陸上植物に存在している。EPF1 と EPF2 はシロイヌナズナにおいて、気孔系列細胞で発現して未分化な表皮細胞に作用して気孔分化を抑制する負の制御を行っている。

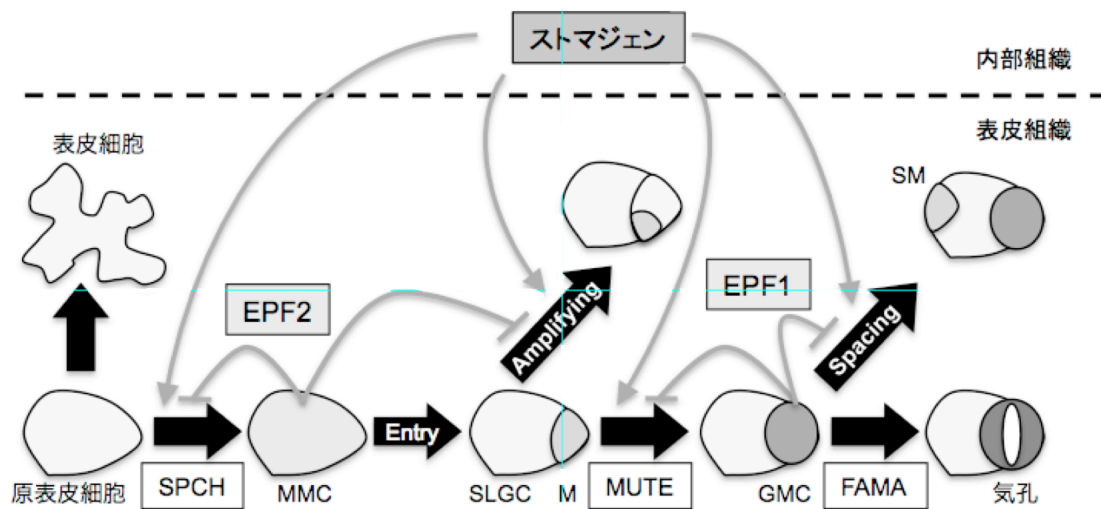


図 1 シロイヌナズナ葉における気孔分化の制御システム

私たちは、気孔密度を正に制御する分泌性ペプチド、ストマジェンを同定した¹⁾。ストマジェン遺伝子は発生途中の若い葉肉で発現し、分泌性ペプチドとしてアポプラストを拡散し、若い未分化な表皮細胞に作用し、気孔分化を促進していると考えられる(図2)。EPF1をはじめ、これまで同定された気孔分化を制御する多くの細胞間シグナル因子が気孔分化を抑制する因子であり、気孔分化を促進する因子は今のところストマジェンのみである。本シンポジウムでは、気孔分化における細胞間シグナル伝達について、ストマジェンを中心として概説するとともに、気孔分化と環境応答との関連についても議論したい。

1) Sugano et al. Nature 463, 241-244 (2010)

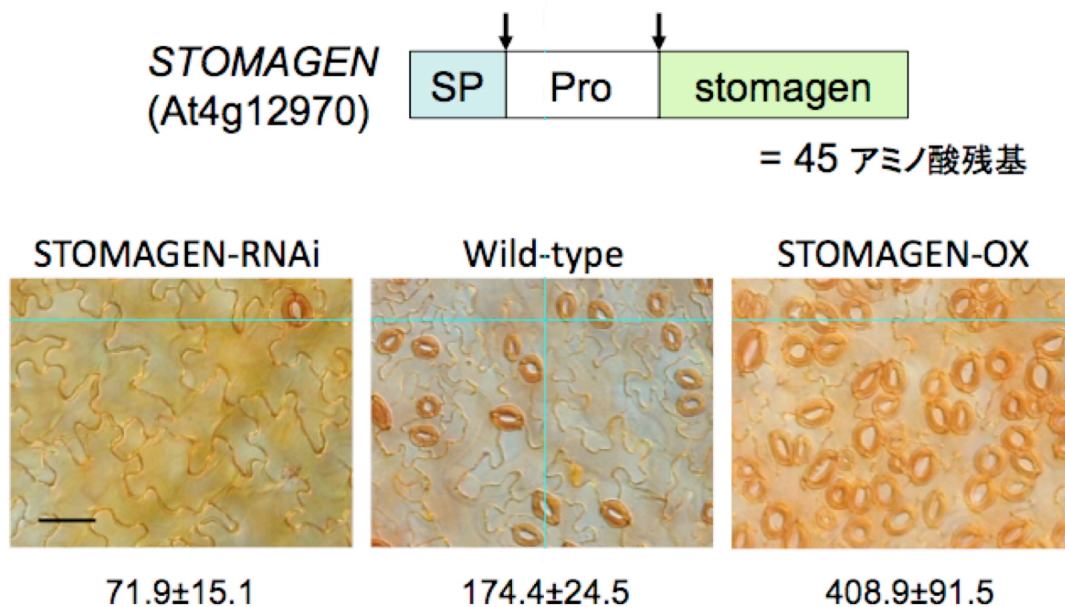


図2 ストマジェンは気孔分化を促進する分泌性ペプチドである

平行進化する基質特異性 ―フラボノイド配糖体化酵素からの知見―

小埜栄一郎（サントリー植物研）

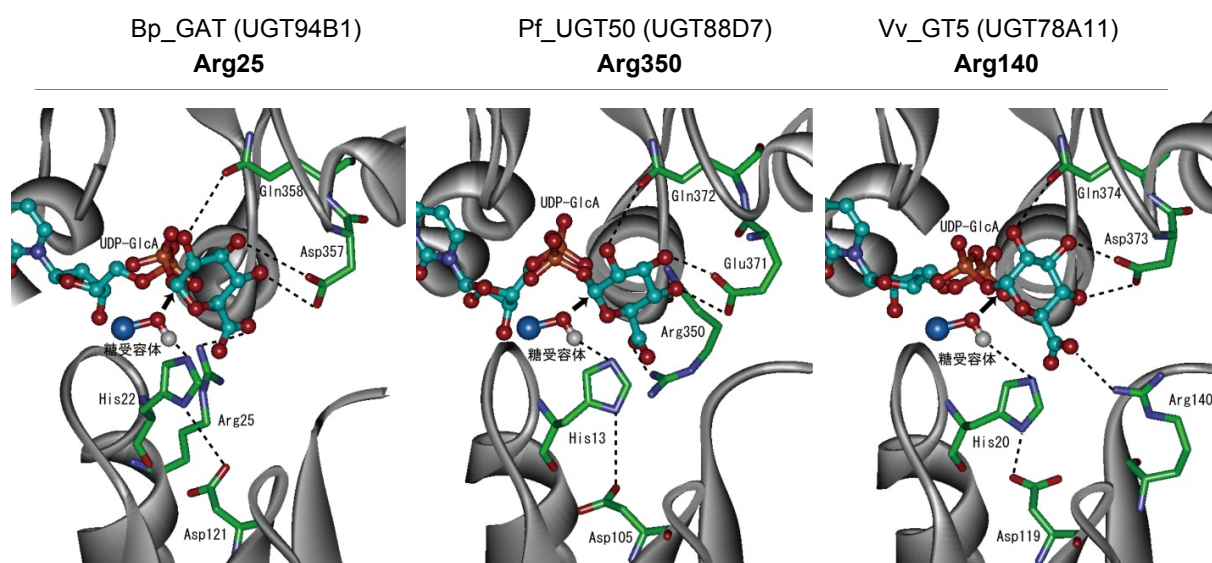
【目的】植物は環境への適応を高めるために多様な二次代謝産物を生産している。そのため自然界は多様な植物二次代謝産物で溢れているが、それらの多くは糖が付加された配糖体として蓄積されている。配糖体化は反応性の高いアグリコンを安定化し、代謝物の細胞内輸送や貯蔵を司る重要な反応である。フラボノイドは主要な植物二次代謝産物であるが、グルコースをはじめ、ラムノース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、グルクロン酸などの糖によって修飾されているが、それらのほとんどを UDP 糖依存型配糖体化酵素(UDP-sugar-dependent Glycosyltransferase: UGT)が触媒する。通常 UGT は一種類の糖供与体に対して選択性（基質特異性）を示す。この選択性こそが植物二次代謝の多様性の一因であることは疑いの余地がないが、その選択性がどのような分子機構によるものか、そしてどうやって生じて来たのかは謎である。フラボノイド配糖体化酵素遺伝子の糖供与体選択性の分子機構を明らかにすることで、植物二次代謝産物の構造多様性の一端を解明することを目指す。

【方法】フラボノイド配糖体の糖の種類や配糖体化の位置は植物系統にユニークであり、specialized metabolites と呼ばれる。異なる植物系統には配糖体化位置は異なるが同じ糖によって修飾されているフラボノイドが自然界にはよく見られる。シソ目の植物であればフラボノイドの 7 位がグルクロン酸で配糖体化されているが、一方ブドウではフラボノイドの 3 位がグルクロン酸で配糖体化されている。またキク科デージーではフラボノイドの 3 位の糖（グルコース）がさらにグルクロン酸で配糖体化されている。これら 3 種の specialized metabolite の生合成を司る UGT を同定し、それらの予測構造に基づく変異体の生化学解析を通じて糖供与体（UDP-グルクロン酸）に対する認識機構を解明することによって糖供与体選択性の起源を探る。

【結果】上記の specialized metabolite のグルクロン酸配糖体化反応を触媒する酵素としてレッドデージー Bp_UGAT(UGT94B1)、シソ Pf_UGT50(UGT88D7)、ブドウの Vv_GT5(UGT78A11)を同定した。これら UGT はお互いの相同性は低いものの、いずれの酵素も UDP-グルクロン酸に特異的な糖供与選択性を示した。ブドウのアントシアニン 3 位グルコース配糖体化酵素である Vv_GT1(UGT78A5)の結晶構造を基にこれ

らの UGT のホモロジー構造を構築したところ、いずれの UGT にも UDP-グルクロン酸の特徴的なカルボキシ基の近くにユニークなアルギニン残基(Arg)を有することが予測された。特筆すべきことにダイジーでは Arg25、シソでは Arg350、そしてブドウでは Arg140 といずれも一次配列上では明らかに位置が異なることため、これらは独立して生じたと考えられた。これらの Arg 残基を他のアミノ酸に置換した変異体ではいずれもグルクロン酸に対する特異性は消失し、代わってグルコースに対する特異性を示した。このことからこれらの Arg 残基の側鎖である正電荷のグアニジニウム基と負電荷のカルボキシ基との電気的な相互作用が UDP-グルクロン酸の認識の分子基盤であると示された。これらの祖先酵素はおそらくグルコース配糖体化酵素であり、重要な Arg 残基を獲得してグルクロン酸配糖体化酵素へと独立して機能分化（平行進化）したと考えられる。この 3 種の UGT 酵素の平行進化の例は酵素の可塑性が新たな基質特異性（糖供与体選択性）の獲得に寄与していることを強く支持するものである。

フラボノイド グルクロン酸配糖体化酵素と重要アルギニン残基



【参考文献】

- S. Sawada et al, *J. Biol. Chem.* **280**, 899 (2005).
A. Noguchi et al, *Plant Cell* **21**, 1556 (2009).
E. Ono et al, *Plant Cell* **22**, 2856 (2010).

●演者プロフィール

小泉 望 (Nozomu Koizumi)

連絡先：〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

E-mail address: nkoizumi@plant.osakafu-u.ac.jp

略歴：1991 年 3 月 京都大学大学院農学研究科博士後期課程研究指導認定

1991 年 4 月 日本学術振興会特別研究員

1993 年 4 月 奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター助手

2001 年 4 月 同 助教授

2007 年 4 月 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科准教授

2009 年 4 月 同 教授

現在に至る

主な研究テーマ：植物の小胞体ストレス応答の分子機構

今後の展望： 未解明の情報伝達経路を明らかにするとともに、小胞体ストレス応答に異常を持つ植物を使って、植物における小胞体ストレス応答の生理的意義を明らかにしたい。

嶋田 知生 (Tomoo Shimada)

連絡先：〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学大学院理学研究科植物学教室

E-mail address: tshimada@gr.bot.kyoto-u.ac.jp

略歴：1995 年 3 月 総合研究大学院大学生命科学研究科修了，博士(理学)

1995 年 4 月 日本学術振興会特別研究員（基礎生物學研究所）

1995 年 11 月 岡崎国立研究機構・基礎生物學研究所・助手

2000 年 2 月 京都大学大学院理学研究科・助手

2007 年 4 月 京都大学大学院理学研究科・助教

2008 年 7 月 京都大学大学院理学研究科・講師

現在に至る

主な研究テーマ：植物細胞におけるタンパク質輸送と内膜系動態，植物の生理活性ペプチドと細胞分化

今後の展望：植物の不思議を，進化的な視点から，分子レベルで解明したい。

小埜 栄一郎 (Eiichiro Ono)

連絡先：〒618-8503 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1 サントリー研究センター
サントリービジネスエキスパート（株）価値フロンティアセンター
植物科学研究所

E-mail address: eiichiro_ono@suntory.co.jp

略歴：1998 年 3 月 岡山大学農学部卒業（植物細胞遺伝学）

1998 年 4 月 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

2000 年 3 月 同大学院博士前期課程修了（植物分子遺伝学）

2000 年 4 月 サントリー株式会社 基礎研究所

2006 年 12 月 学位取得（バイオサイエンス博士）、現在に至る

主な研究テーマ：植物二次代謝酵素遺伝子の単離および機能解析。

今後の展望：二次代謝酵素の機能進化から植物の多様な生存戦略の成り立ちを理解したい。植物で世界を豊かにしたい。

（敬称略）

MEMO

●●●● 一 般 講 演 ●●●●

15:20～17:15 多目的ホール

(講演時間10分, 質疑応答2分)

- *1. 「Heterochromatin protein 1 (HP1)とEstrogen receptor α binding protein(ERBP)との相互作用について」 14
○岩井翔子, 佐々木勝彦, 杉本憲治 (大府大院・生命環境)
- *2. 「Wntシグナル経路を介するリポ蛋白質受容体ファミリーLRP10による骨芽細胞の分化制御」 15
○鑄方綾香, 幾原亜季, 平田倫子, 関家麻奈未, 細田明美, 福村智恵, 金 東浩, 佐伯 茂
(大阪市大・生活科学研究科・生体情報)
- *3. 「カーボンナノチューブ上での骨細胞の分化誘導」 16
○榎本健太¹, 小倉悠湖¹, 森英樹², 原正之², 北村進一¹ (¹大府大院・生命環境, ²理)
- *4. 「水溶性フェルラ酸エステルの酵素合成およびアルツハイマー病改善効果に関する研究」 17
○菊川昌希¹, 井田智章², 村瀬仁章³, 居原 秀², 阪本龍司¹
(¹大府大院・生命環境, ²理, ³グロービア)
- (16:10～16:20 休憩)
- *5. 「新しいホウ酸化合物ライブラリーの合成と生理活性」 18
○中川直道, 中村和寛, 谷森紳治, 切畑光統 (大府大院・生命環境)
- *6. 「大規模生体分子量子化学計算によるエイズ治療薬の評価」 19
○岩佐彰浩¹, 矢城陽一郎^{1, 2}, 直島好伸^{1, 2} (¹岡山理大院・総合情報, ²自然科学研)
7. 「量子化学計算手法による糖質や甘味タンパク質の甘味発現機構の検討」 20
○矢城陽一郎, 直島好伸 (岡山理大院・総合情報)

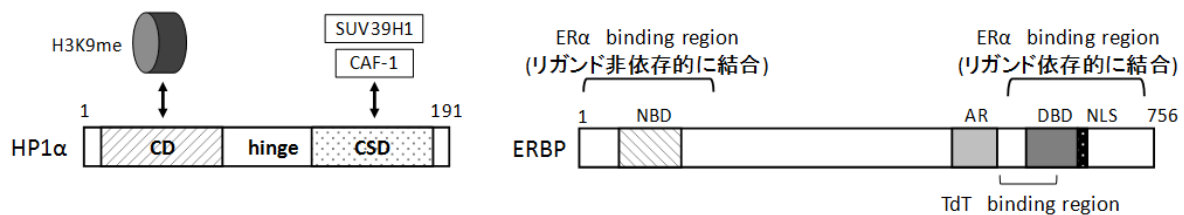
(17:10～17:15 表彰式)

*「日本農芸化学会若手優秀発表賞」対象講演

Heterochromatin protein 1 (HP1)と Estrogen receptor α binding protein(ERBP)との相互作用について

○岩井翔子、佐々木勝彦、杉本憲治（大阪府大院・生命環境）

【目的】 Heterochromatin protein 1 (HP1)はヘテロクロマチン構築や遺伝子発現の制御において重要な役割を担う。HP1 は、N 末側の chromo domain(CD)でヒストン H3 の 9 番目リシンのメチル化を認識・結合し、C 末側の chromo shadow domain(CSD)で転写制御に関わる核タンパク質(Suv39H1、CAF-1 等)と結合する。哺乳動物の HP1 には α 、 β 、 γ のホモログが存在し、HP1 α については両ドメイン間に存在する hinge 領域で DNA や RNA と結合することが知られている。estrogen receptor α binding protein (ERBP)は estrogen receptor α (ER α)と結合し転写活性を高める。ER α の結合部位は決定されているものの、転写制御の機構はまだ明らかにされていない。ERBP と HP1 の相互作用が確認できれば、estrogen 刺激による転写活性化機能の解明に繋がるかもしれない。そこで、両者の相互作用について解析することを目的とした。



【方法と結果】まず、HP1 α 、 β 、 γ のホモログと ERBP とが相互作用するかどうか調べた。大腸菌に発現させた GST 融合型 HP1 α 、 β 、 γ のそれぞれをグルタチオンビーズにて精製し、HEK293 細胞由来の核抽出液と反応させ、pull down assay を行った。ERBP が HP1 と共沈したかどうかは、抗 ERBP 抗体を用いた Western blotting で確認した。その結果、ERBP は HP1 α のみ特異的に結合し HP1 β 、 γ とは結合しないことがわかった。次に、ERBP と HP1 α とが他のタンパク質を介さないで結合していたかどうか調べた。大腸菌に発現させた GST 融合型 ERBP と His 融合型 HP1 α を混合し pull down assay を行ったところ、ERBP と HP1 α は直接結合することがわかった。さらに、両者の結合部位を決定するため、GST 融合型 ERBP または HP1 α の欠損変異体を作製した。それぞれを His 融合型 HP1 α 、内在性 ERBP を用いて pull down assay を行い、両者の結合に必要な領域を決定した。決定した結合領域内でのアラニン置換変異体を作製し同様に pull down assay を行うことで、両者の結合に必要なアミノ酸残基を特定した。今後は、HP1 α 、ERBP を細胞に発現させ、これらの結合を阻害する変異の HP1 α 、ERBP の細胞内局在に及ぼす影響を調べる予定である。

Wnt シグナル経路を介するリポ蛋白質受容体ファミリーLRP10 による骨芽細胞の分化制御

○ 鏑方綾香、平田倫子、関家麻奈未、細田明美、山岸あづみ、福村智恵
金 東浩、佐伯 茂（大阪市大・生活科学・生体情報）

【目的】間葉系幹細胞は骨芽細胞や脂肪細胞に分化し、骨粗鬆症や肥満症の発症に関与する。分泌糖蛋白質 Wnt は、骨芽細胞と脂肪細胞の分化を制御する重要な生体分子であることが報告されている。間葉系幹細胞は、Wnt と培養すると骨芽細胞に分化し、PPAR γ のアゴニストと培養すると脂肪細胞に分化するが、Wnt は PPAR γ による脂肪細胞の分化を抑制する。Wnt により活性化されるシグナル経路には、canonical 経路と non-canonical 経路とがあり、リポ蛋白質受容体ファミリーLRP5 や LRP6 は Wnt の共役受容体として機能し、canonical 経路を活性化するが、私たちが発見した LRP10 は、canonical 経路を阻害することを見出している。そこで私たちは、LRP10 の肥満、骨代謝に対する分子メカニズムを明らかにすることを最終目的に、本研究では、間葉系幹細胞から骨細胞と脂肪細胞への分化に果たす LRP10 の役割を検討した。

【結果】マウス骨髄間葉系幹細胞である ST2 細胞に、Wnt3a 遺伝子をトランスフェクションすると、ST2 細胞が骨芽細胞に分化することを、Alkaline phosphatase (ALP) 染色と ALP mRNA 発現量により確認した。ST2 細胞に、Wnt3a と LRP10 遺伝子を同時にトランスフェクションすると、ST2 細胞の骨芽細胞への分化が抑制されることを、ALP 染色と ALP mRNA 発現量によって明らかにした。canonical 経路の下流に位置する TCF 活性は、Wnt3a 遺伝子をトランスフェクションすると上昇し、Wnt3a と LRP10 遺伝子を同時にトランスフェクションすると低下した。次に、ST2 細胞を Troglitazone と培養すると脂肪細胞に分化するが、Wnt3a 遺伝子をトランスフェクションした ST2 細胞では Troglitazone による脂肪細胞への分化が抑制されることを、Oil-Red-O 染色、aP2 mRNA 発現量によって確認した。canonical 経路の下流に位置する TCF 活性は、Troglitazone によって変化が無く、Wnt3a 遺伝子をトランスフェクションすると上昇し、Wnt3a と LRP10 遺伝子を同時にトランスフェクションすると低下したが、LRP10 による脂肪細胞分化の影響については明確では無かった。以上の結果より、Wnt3a は、canonical 経路を介して骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ、LRP10 は canonical 経路を抑制することで骨芽細胞へ分化を抑制すると現在のところ考えている。

カーボンナノチューブ上での骨細胞の分化誘導

○榎本健太¹, 小倉悠湖¹, 森英樹², 原正之², 北村進一¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大院・理)

【目的】カーボンナノチューブ (CNT) は高強度かつ化学的安定性に優れた物質であり, 歯や骨疾患治療のための生体材料としての応用が期待されている. 本研究では細胞足場 (scaffold) として表面密度の異なる CNT コートガラスを作製して骨芽細胞様細胞株であるヒト骨肉腫由来細胞 (HOS 細胞) の培養を行い, CNT scaffold の表面特性と骨分化に及ぼす影響との相関性を調べた. その結果をもとにラット骨髄由来間葉系幹細胞 (rMSC) の培養を行い, CNT 上での細胞の骨分化に対する影響を解析した.

【方法】0.2% 4-*O*-メチル- α -D-グルクロノキシラン水溶液に単層ナノチューブ (SWNT) を添加後, 超音波処理により 0.005% および 0.05% SWNT 分散液を調製し, 各濃度の分散液をガラス表面に塗付した. 前者はガラス表面に SWNT が低密度 (LD) に, 後者は高密度 (HD) に存在していると定義した. それぞれの SWNT コートガラス上にて HOS 細胞を骨分化誘導条件下で 3 週間培養し, 誘導した細胞について細胞抽出液のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性量測定を行った. さらに, 高い活性を示した HD 条件で, rMSC を 4 週間骨分化誘導した. 誘導した細胞について ALP 活性量測定と誘導結合プラズマ (ICP) 発光分光分析によるカルシウム量の測定を行った. 次に, リアルタイム PCR 法により間葉系幹細胞の分化誘導過程における骨分化関連遺伝子の発現を解析した. 最後に, 走査型分析電子顕微鏡 (SEM-EDX) を用いて培養日数 28 日目の細胞におけるリンおよびカルシウムの元素分布と形成されたリン酸カルシウム結晶表面を解析した.

【結果】骨分化誘導した HOS 細胞の ALP 活性量を測定した結果, HD 条件で最も高い値を示した. HD 条件下で rMSC を骨分化誘導した結果, 通常の培養条件と比較して, SWNT 上で培養した細胞の ALP 活性量およびカルシウム量は高い値を有していた. また骨分化関連遺伝子である *Runx2*, *Alpl*, *Bglap* は, 通常の培養条件と比較して, SWNT 上で分化した細胞で高発現であった. これらのことから骨分化誘導条件下では SWNT を足場とした場合に骨分化が促進されることが示唆された. 元素分布分析の結果, リンおよびカルシウムの分布が確認でき, 特に SWNT における結晶の密度が高かった. 結晶表面を SEM 観察したところ, 通常のハイドロキシアパタイト表面と同じ針状構造を有していた. このことから SWNT 上で形成された結晶はハイドロキシアパタイトであることが示唆された.

水溶性フェルラ酸エステルの酵素合成およびアルツハイマー病改善効果に関する研究

○菊川 昌希¹, 井田 智章², 村瀬 仁章³, 居原 秀², 阪本 龍司¹
(¹大阪府大院・生命環境, ²大阪府大院・理, ³グロービア)

【目的】フェルラ酸 (FA) は植物細胞壁に偏在するポリフェノールで抗酸化能、抗炎症能を併せ持つ機能性物質である。近年はアルツハイマー病 (AD) などの予防効果が報告されているが、難溶性であるためサプリメントとしての高齢患者の服用には問題がある。AD は認知症のひとつであり、脳の萎縮、 β -アミロイド ($A\beta$) 凝集による老人斑形成などの病理的特徴を持つ神経変性疾患である。特に $A\beta$ の凝集は、アストロサイトやマイクログリアを活性化し、一酸化窒素 (NO)、活性酸素種や炎症性サイトカインの産生を促進し神経炎症を誘導するため、AD の発病・進行への関与が考えられている。本研究ではフェルラ酸エステラーゼ (FAE) による水溶性フェルラ酸エステルの合成を行い、その AD 改善の有効性メカニズムについて解析した。

【方法・結果】FA に対してグリセロール及びジグリセロールをアシル基受容体として、FAE によるエステル縮合反応を行った。得られた誘導体の水溶性はグリセロールエステルでは約20倍、ジグリセロールエステルにおいては1,000倍以上に増加した。

次にADモデルマウスを用いた行動解析により FA 誘導体の AD 改善効果を検討した。FA および FA 誘導体をマウスに 6 週間強制経口投与した後、 $A\beta$ を側脳室に投与し、恐怖条件付け試験にて行動を解析した。FA, FA 誘導体を経口投与した群は対照群と比較して有意に疎み反応が増加し、記憶力低下の抑制が認められた。また海馬を免疫染色にて観察したところ、対照群では健常マウス群と比べて神経細胞の脱落が見られたが、FA, FA 誘導体を経口投与した群ではそれが軽減されていた。

AD 有効性メカニズムを細胞レベルで検討した。大脳皮質神経細胞に対して FA, FA 誘導体と未凝集 $A\beta$ を混合して添加したところ、 $A\beta$ 誘導性の細胞死が抑制された。また未凝集の $A\beta$ に FA, FA 誘導体を添加して 37°C で凝集反応させた後、チオフラビン-T を用いて $A\beta$ の凝集強度を測定したところ、 $A\beta$ の凝集抑制効果が認められた。また凝集 $A\beta$ に FA, FA 誘導体を添加しても凝集が乖離されることが分かった。

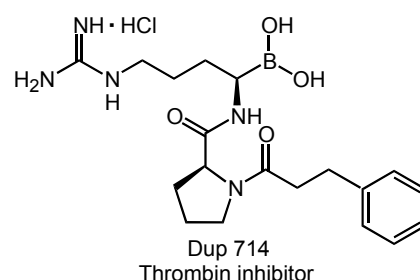
さらにアストロサイト異常活性化抑制効果について、NO 産生量を指標に検討した結果、FA 誘導体は FA よりも強い異常活性化抑制を示した。さらにウェスタンブロット解析より、誘導型 NO 合成酵素の産生抑制、転写因子 NF- κ B の核内移行抑制、細胞質内での I- κ B α の分解抑制が認められたことから、FA 誘導体は NF- κ B シグナル伝達経路を阻害することで、異常活性化を抑制することが明らかとなった。

以上より、FA 誘導体には FA と同じく AD 改善効果が認められ、そのメカニズムは $A\beta$ の凝集を抑制・乖離し、アストロサイトの異常活性化を抑制することで神経細胞を保護するためであると結論付けた。

新しいホウ酸化合物ライブラリーの合成と生理活性

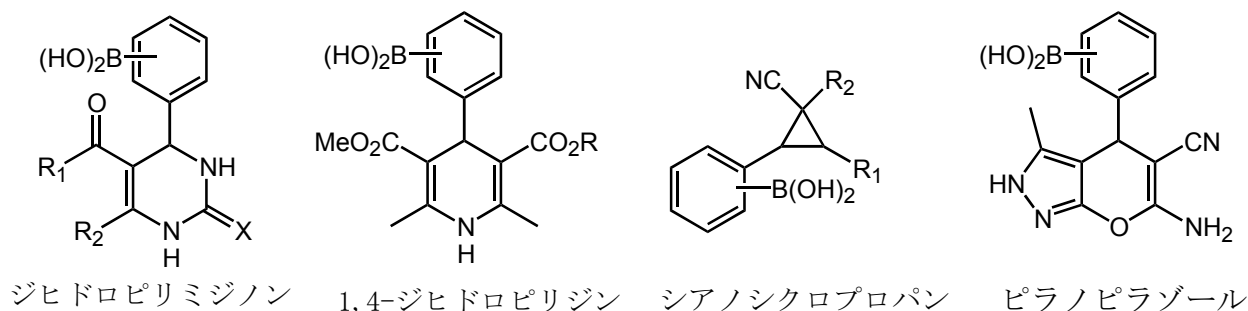
○中川直道, 中村和寛, 谷森紳治, 切畑光統 (大阪府大院・生命環境)

【目的】ホウ酸基を導入した薬剤は少数であり、未だ未知の領域である。例えばホウ素化合物 Dup 714 は、血液凝固に関係するプロテアーゼのトロンビンに対して強い阻害活性を示す。ホウ素は空軌道をもつために標的分子との結合性が強くなる可能性があり、さらに化合物自体の水溶性の向上も期待できる。申請者は生理活性を有することが知られている化合物にホウ酸基を導入すれば、さらに新たな生理活性物質が創製できるのではないかと考えた。本研究では、ホウ素化合物の誘導体合成に有利なワンポット反応を利用し新たなライブラリー構築を行い、生理活性を調べることを目的とした。



【方法】ホルミルフェニルボロン酸とβ-ケトエステル、尿素を反応させてホウ酸基含有ジヒドロピリミジノン誘導体を、ホルミルフェニルボロン酸とβ-ケトエステル、3-アミノクロトン酸メチルを反応させてホウ酸基含有1,4-ジヒドロピリジン誘導体を得、さらには、ホルミルフェニルボロン酸または、ホルミルピリジンとハロゲン化合物およびニトリル化合物を反応させてホウ酸基またはピリジン含有多置換シアノシクロプロパン化合物を、ホルミルフェニルボロン酸または、ホルミルピリジンとβ-ケトエステル、ヒドラジン、マロニトリルを反応させてホウ酸基またはピリジン含有ピラノピラゾール誘導体を得る。

【結果】本研究ではホルミルフェニルボロン酸を出発物質に用い、ホウ酸基を有する27のジヒドロピリミジノン誘導体(収率 2–86%)、6の1,4-ジヒドロピリジン誘導体(収率 23–80%)、10の多置換型シアノシクロプロパン化合物(収率 26–75%)、4のピラノピラゾール誘導体(収率 45–56%)の合成に成功した。得られた化合物の生理活性評価については現在検討中である。



大規模生体分子量子化学計算によるエイズ治療薬の評価

岩佐彰浩¹、矢城陽一朗^{1,2}、直島好伸^{1,2}
(¹岡山理大院・総合情報、²岡山理大自然科学研)

【目的】日本をはじめ世界中に急速に広がっているエイズ感染症の原因となるエイズウイルス (HIV) は、非常に変異しやすく、短期間で薬剤耐性をもつことが知られている。現在、様々なエイズ治療薬が認可、使用されているが、そのなかには薬剤効果は高いが重篤な副作用を起こすものもあり、そのため、効果が高く副作用のより少ない新しい治療薬の開発が喫緊の課題である。本研究は、計算化学的手法による医療・生命の革新研究への挑戦であり、フラグメント分子軌道 (FMO) 法を用いる大規模生体分子量子化学計算によって、HIV-1 プロテアーゼおよびヒトプロテアーゼの両者と HIV-1 プロテアーゼ阻害薬との結合エネルギーや相互作用エネルギーを算出し、それら計算値と阻害薬の薬剤効果ならびに副作用との関連性について検討する。

【方法】まず、Protein Data Bank からダウンロードした HIV-1 プロテアーゼタンパク質とリトナビル (RTV) やサキナビル (SQV)を含む6種類のペプチド系阻害薬からなる複合体について、その周囲 5Åに水分子を配置してエネルギー極小化計算を行い、それぞれの構造を調整した。ついで、それら複合体に対し、量子化学計算プログラム ABINIT-MP/BioStation による MP2/6-31G レベルでの FMO 計算を実行した。また、腎臓で生成されるヒトプロテアーゼのレニンと阻害薬 RTV の複合体について同様な FMO 計算を行った。

【結果】上述の FMO 計算で得られた HIV-1 プロテアーゼと阻害薬との結合エネルギー ΔE と、薬剤投与後の薬剤の最高血中濃度を示す $C_{\max}$ (最高血中濃度) との関連性を調べたところ、RTV のような $C_{\max}$ が大きい阻害薬は、SQV のような $C_{\max}$ が小さい阻害薬に比べ、結合エネルギーが負に大きいことが明らかになった。すなわち、阻害薬の結合エネルギー ΔE (計算値) と最高血中濃度 $C_{\max}$ (臨床値) との間に相関が認められ、 ΔE が大きいほど $C_{\max}$ が大きく、また、薬剤効果や副作用も比較的大きいことが判明した。さらに、腎機能障害などの重篤な副作用を示す RTV のヒトプロテアーゼレニンとの結合エネルギーは、HIV-1 プロテアーゼとの結合エネルギーと比較できる程大きく、加えて、レニンのアミノ酸残基との相互作用エネルギーを調べた結果、活性中心の ASP221 およびその付近の SER79、ALA224 などのアミノ酸残基と強く相互作用していることがわかった。これらのことは、大規模量子化学計算手法により、阻害薬の薬剤効果や副作用の大小の比較や予測が可能であることを示唆している。

量子化学計算手法による糖質や甘味タンパク質の 甘味発現機構の検討

矢城陽一朗、直島好伸
(岡山理大院・総合情報)

【目的】本研究は、計算化学によるライフ・イノベーション研究の一環であり、糖質や甘味タンパク質の甘味度とそれら甘味物質の量子化学計算により算出される電荷分布やフロンティア分子軌道の相関を検討し、甘味受容体タンパク質との相互作用および甘味を感じる機構に関する知見を得ることを目的とする。

【方法】スクロースなどの糖質分子については、水分子存在下のエネルギー極小化計算の後、B3LYP/6-31G(d)レベルでのGaussian量子化学計算を行った。一方、今回の計算に用いた甘味タンパク質の一つであるブラゼイン（アミノ酸53個）に関しては、まず、Protein Data Bankからダウンロードしたブラゼインの立体構造の周囲8.0Åに水分子を配置し、エネルギー極小化計算を行った。ついで、得られた極小化構造の周りの水分子を除去し、さらに、大規模タンパク質密度汎関数計算プログラムProteinDFに導入されているProteinEditorを用いてカウンターイオンを配置した後、ブラゼインの座標を固定した分子力学計算でカウンターイオンの位置を調整した。最後に、このようにして構造を調整したブラゼインに対し、ProteinDFによるSVWN汎関数での全電子量子化学計算を実行した。

【結果】甘味を呈するグルコース、スクロース、マルトースなどの糖、苦味糖質のゲンチオビオース、および無味の6-クロロデオキシスクロース分子の静電ポテンシャルマップの比較から、甘味の糖は正と負の電荷が偏在しているのに対し、苦味や無味の糖は正に帯電している部分が多く、負に帯電している部分は少ないことがわかった。また、ブラゼインの静電ポテンシャルマップから、Arg43などの塩基性アミノ酸は正に強く帯電し、Glu41などの酸性アミノ酸とC-末端のTyrは強く負に帯電していることが認められた。加えて、中性アミノ酸のTyr8が正に帯電していることが判明した。これらのアミノ酸残基全てが、ブラゼインの甘味度の変化に関与すると報告されているものであること、および甘味度が変化するGlu41Lys やArg43Ala のような変異体に関する同様なProteinDF 計算から算出した静電ポテンシャルマップやフロンティア分子軌道の解析から、正に帯電しているTyr8などの中性アミノ酸やHis31、Arg33、Arg43などの塩基性アミノ酸残基が、甘味の発現や受容体タンパク質との相互作用に重要な役割を果たしていることが推測される。上述の計算結果は、糖質や甘味タンパク質の正負の電荷分布が、甘味度やその増減、さらに甘味受容体タンパク質との相互作用に関連していることを期待させるものである。

MEMO

次回お知らせ

平成23年度中部・関西支部合同大会(471回講演会)

日 時： 平成23年10月1日(土)・10月2日(日)
会 場： 京都大学農学部

申込締切： 8月 19日(金)
要旨締切： 9月 2日(金)

問合せ先： 京都大学大学院農学研究科
間藤 徹
matoh@kais.kyoto-u.ac.jp
Tel 075-753-6109

同日開催： シンポジウム・支部評議員会・懇親会

詳細についてはホームページをご覧ください。

<http://www.jsbba-kansai.jp/>

お 知 ら せ

○支部評議員会は，12時00分より学術交流会館小ホールにて開催します．

○懇親会を17時15分より同会館サロンにて開催します．多数ご参加ください．

日本農芸化学会関西支部

<http://www.jsbba-kansai.jp/>
〒606-8502 京都市左京区北白川
京都大学大学院農学研究科内
Tel 075-753-6392

発行日 平成23年6月24日