

**2011 年度日本農芸化学会
関西・中部支部合同大会**
(関西支部第 471 回講演会) (中部支部第 162 回例会)

平成 23 年 10 月 1 日 (土)・2 日 (日)
京都大学農学部総合館

第 1 日目 10 月 1 日 (土)

一般講演 (10:00-11:20)

会場：農学部総合館 1-4 階

関西支部評議員会 (12:00-12:50)

会場：D 会場 (3 階 W314 室)

中部支部評議員会 (12:00-13:20)

会場：B 会場 (2 階 W214 室)

受賞講演 (13:30-17:10)

会場：A 会場 (1 階 W100 室)

【農芸化学奨励賞】

伊福 健太郎 (京都大学大学院生命科学研究科)

「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」

田茂井 政宏 (近畿大学農学部)

「光合成炭素代謝の制御機構に関する研究」

片山 高嶺 (石川県立大学生物資源工学研究所)

「腸内細菌における新規な代謝機能の発見と解析およびその高度利用」

柴田 秀樹 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

「細胞内物流システムを制御するカルシウム結合タンパク質に関する研究」

【日本農芸化学功績賞】

山本 憲二 (石川県立大学生物資源工学研究所)

「微生物によるヘテロオリゴ糖代謝の分子細胞学的解析と複合糖質工学の新展開」

【日本農芸化学会賞】

佐藤 文彦 (京都大学大学院生命科学研究科)

「特性を持つ高等植物培養細胞を用いた機能の解析と再構築」

懇親会 (18:00 開始)

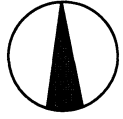
会場：カンフォーラ (京大正横)

第 2 日目 10 月 2 日 (日)

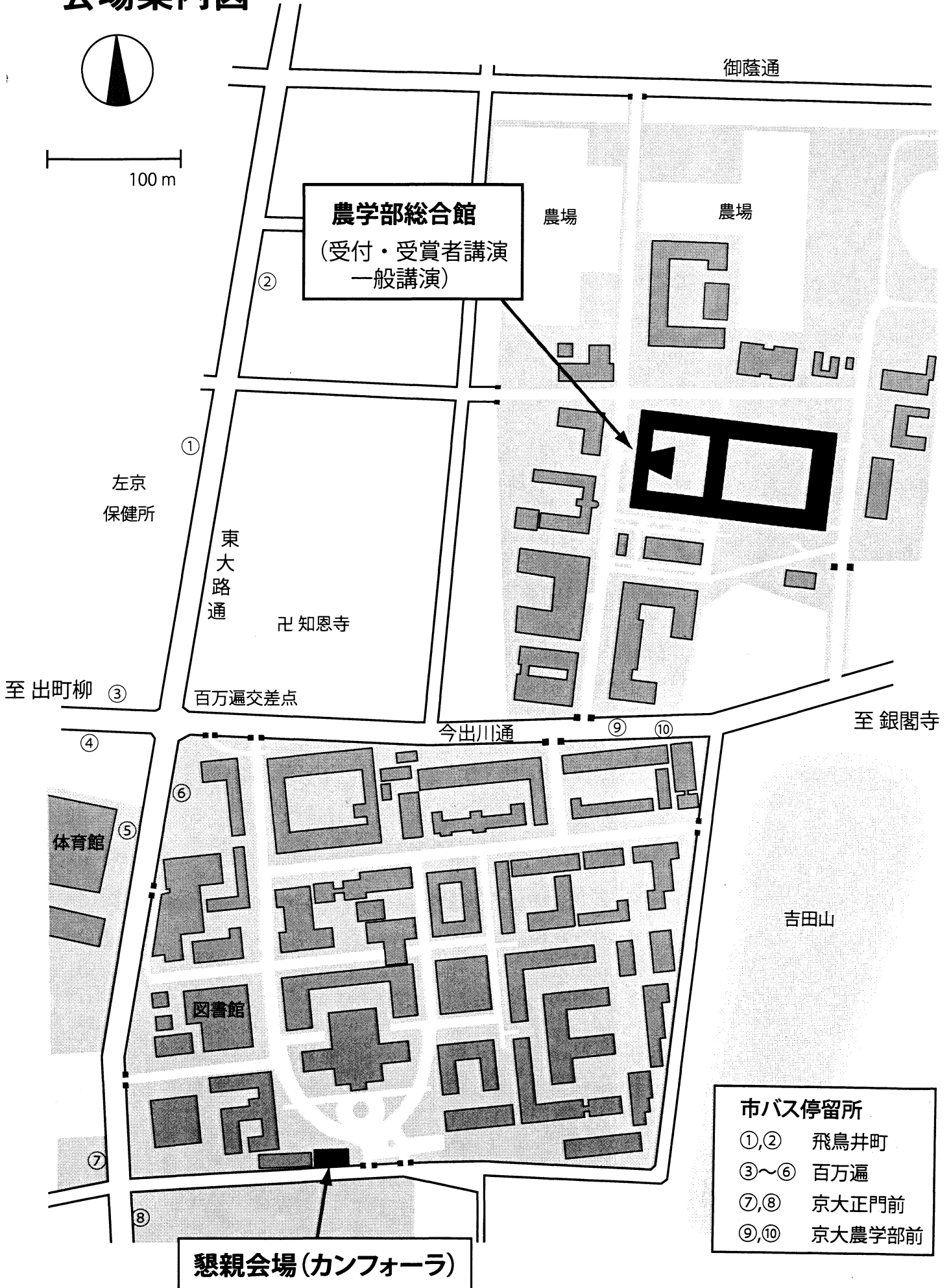
一般講演 (9:30-16:20)

会場：農学部総合館 1-4 階

会場案内図

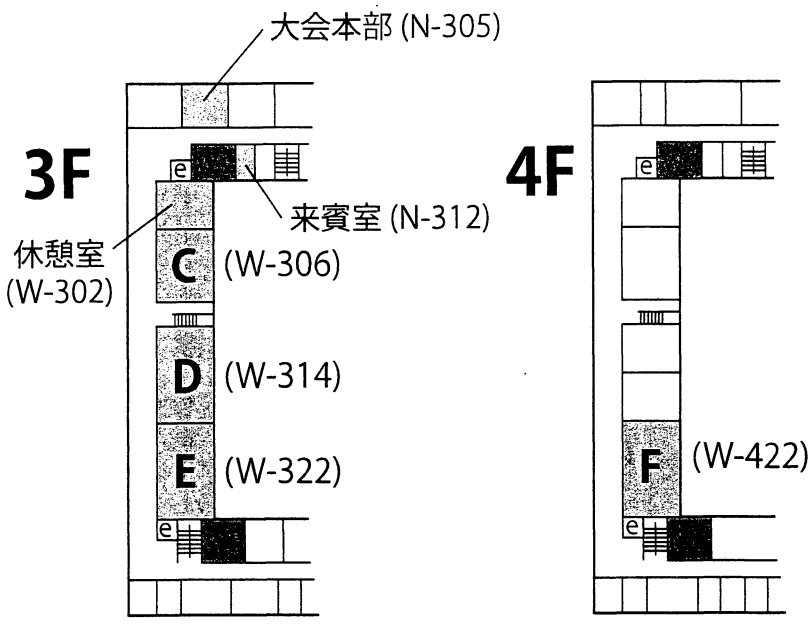
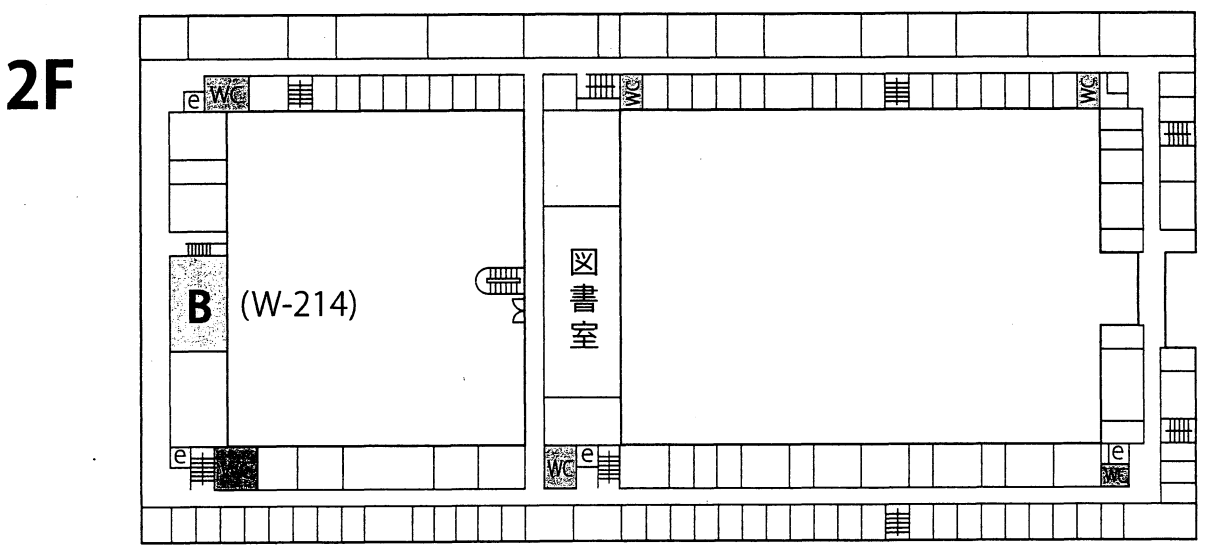
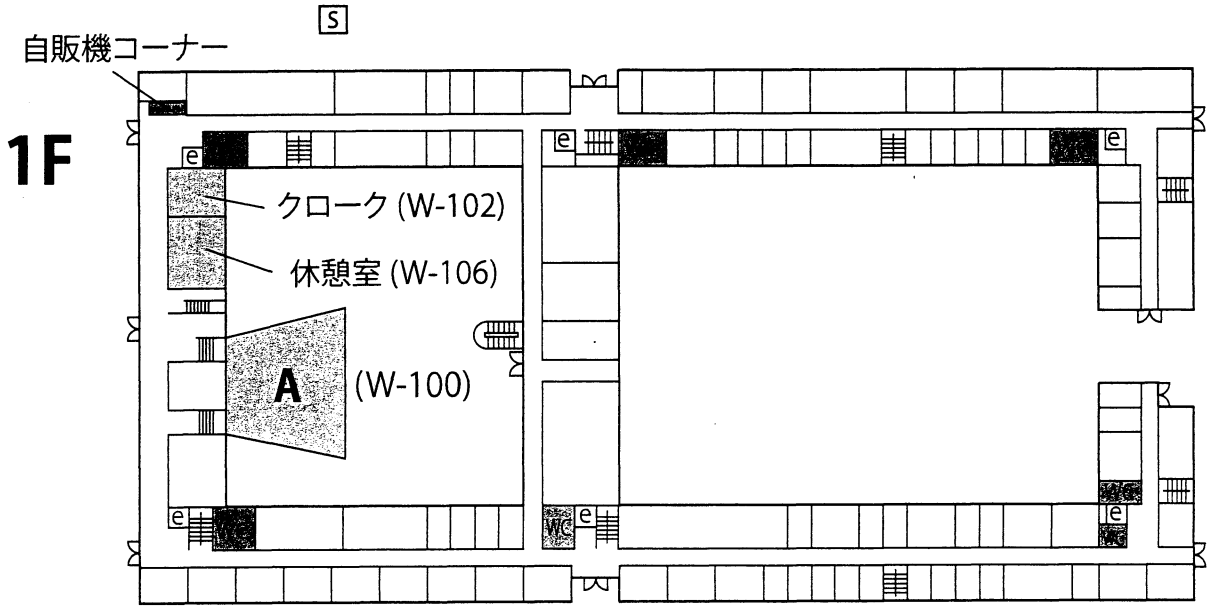


100 m



- 市バス停留所**
- ①,② 飛鳥井町
 - ③~⑥ 百万遍
 - ⑦,⑧ 京大正門前
 - ⑨,⑩ 京大農学部前

農学部総合館



- A 会場 : W-100
- B 会場 : W-214
(中部支部評議委員会)
- C 会場 : W-306
- D 会場 : W-314
(関西支部評議委員会)
- E 会場 : W-322
- F 会場 : W-422

e: エレベーター
 S: 喫煙所
 WC: トイレ



【農芸化学奨励賞】

座長 間藤 徹 (京都大学大学院農学研究科)

13:30 伊福 健太郎 (京都大学大学院生命科学研究科)

AW1 「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」

13:55 田茂井 政宏 (近畿大学農学部)

AW2 「光合成炭素代謝の制御機構に関する研究」

座長 河田 照雄 (京都大学大学院農学研究科)

14:20 片山 高嶺 (石川県立大学生物資源工学研究所)

AW3 「腸内細菌における新規な代謝機能の発見と解析およびその高度利用」

14:45 柴田 秀樹 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

AW4 「細胞内物流システムを制御するカルシウム結合タンパク質に関する研究」

休憩 (20分)

【日本農芸化学会功績賞】

座長 牧 正敏 (名古屋大学大学院生命農学研究科)

15:30 山本 憲二 (石川県立大学生物資源工学研究所)

AW5 「微生物によるヘテロオリゴ糖代謝の分子細胞学的解析と複合糖質工学の新展開」

【日本農芸化学会賞】

座長 加納 健司 (京都大学大学院農学研究科)

16:20 佐藤 文彦 (京都大学大学院生命科学研究科)

AW6 「特性を持つ高等植物培養細胞を用いた機能の解析と再構築」

発表者の方へのお願い

- 1) 発表中は、スクリーンセーバーや省電力モードにならないように設定を解除しておいてください。
- 2) 前発表者の討論が終了（発表開始19分後）したら、各自で液晶プロジェクターに接続してください。
- 3) Mac ユーザーは、必ず VGA アダプタをご準備ください。

予 鈴		
12分：	1回	
15分：	2回	（発表終了）
19分：	3回	（討論終了）
1分間でPC接続交換		

一般講演

一日目 10/1 (土)

会場A (W100)

座長：河井 重幸 (京大院・農)

10:00 1Aa1 イネ苗立枯細菌病原菌 *Burkholderia plantarii* の病原毒素トロポロンの生合成関連遺伝子の探索と阻害剤の単離

○紀平 絵梨、岡本 尚、仲宗根 薫*、関根 光雄**、藤田 信之**、波多野 和樹***、五十嵐 雅之***、内海 龍太郎

近大院・農・バイオ、*近大工・生化工、**NITE、***微化研

10:20 1Aa2 細菌ヒスチジinkinナーゼを標的とする新規抗生物質 signermycin B

○木野 弘量、渡邊 崇史、五十嵐 雅之*、岡島 俊英**、波多野 和樹*、石井 英治、江口 陽子、内海 龍太郎

近大院・農・バイオ、*微化研、**阪大・産研

10:40 1Aa3 細菌増殖に必須なレスポンスレギュレーター WaiR を標的にした新規抗菌剤の作用部位解析

○平井 有紀、土井 章弘、後藤 恭宏、岡島 俊英*、内海 龍太郎

近大院・農・バイオ、*阪大・産研

会場B (W214)

座長：中川 好秋 (京大院・農)

10:00 1Ba1 アスパラギン合成酵素阻害剤の創製—急性リンパ性白血病の新規治療剤を目指して—

○池内 秀幸、Yong-Mo Ahn*、音川 拓哉、渡辺 文太、Nigel G. J. Rich*、平竹 潤

京大・化研、*フロリダ大

10:20 1Ba2 エポラクタエン及び誘導体の特異なチオリシス反応

○倉持 幸司*、小林 進**、椿 一典*

*京府大院・生命環境、**東理大・薬

10:40 1Ba3 機能性ユビキノンプローブの合成と結合タンパク質の同定

○土生 沙綾子、村井 正俊、横山 実、三芳 秀人

京大院・農

11:00 1Ba4 代謝阻害剤が酵母中心代謝プロファイルに及ぼす影響

○松田 史生*、近藤 昭彦**

*神大・自然科学、**神大・工応化

会場C (W306)

座長：由里本 博也 (京大院・農)

- 10:00 1Ca1 AMV 逆転写酵素 $\alpha\beta$ ヘテロダイマーと α サブユニットの安定性の比較
小西 篤、根本 大資、○保川 清、井上 國世
京大院・農
- 10:20 1Ca2 D-Fructose Dehydrogenase における heme c の有無による電極応答変化
○河井 翔太*、合田 真衣子*、薬師 寿治**、松下 一信**、白井 理*、加納 健司*
京大*、山口大**
- 10:40 1Ca3 かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus glaucus* MA0196 由来アスパルティックプロテアーゼの精製と特性解析
○竹中 慎治、深見 高志、吉田 健一、小山 大*、土居 幹治*、青木 健次**
神大院・農、*マルトモ (株)、**相模女子大・栄養
- 11:00 1Ca4 出芽酵母 NADH キナーゼ Pos5 が NADH と NAD⁺ を識別する構造要因
○大橋 一登、河井 重幸、村田 幸作
京大院・農

会場D (W314)

座長：梶田 哲哉 (京大院・農)

- 10:00 1Da1 パスタの乾燥過程における力学特性
○水野 奈穂、小川 剛伸、小林 敬、安達 修二
京大院・農
- 10:20 1Da2 熱分析に基づく小麦ドウの乾燥挙動の解析
○小泉 智史、小川 剛伸、小林 敬、安達 修二
京大院・農
- 10:40 1Da3 パスタの乾燥時に発生するクラックのデジタル画像処理による定量化
○小川 剛伸、小林 敬、安達 修二
京大院・農
- 11:00 1Da4 粒子径の異なる米粉ペーストの加熱による物性変化
○下間 早織*、松宮 健太郎*、奥野 勇樹*、南部 優子*、岡留 博司**、Md. Sharif Hossen**、松村 康生*
*京大院・農、** (独) 食総研

会場E (W322)

座長：大日向 耕作 (京大院・農)

- 10:00 1Ea1 腸間膜リンパ節のT細胞活性化機能に及ぼすストレスタンパク質の影響
 ○橋本 恵以*, 榊田 哲哉*, **, 北畠 直文†, §、谷 史人*, **
 *京大院・農・食品生物、**京大院・地球環境、†ノートルダム清心女大・食品
 栄養、§京大
- 10:20 1Ea2 大腸がん細胞における相乗的COX-2発現誘導へのストレス応答MAPK経路の関与
 ○藤岡 沙弥、乾 悠香、福田 卓、野村 歩未、小川 智大、佐伯 徹、金本
 龍平
 京府大院・生命環境
- 10:40 1Ea3 大腸菌GroELによるCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺制御性T細胞の産生誘導
 ○大植 隆司*, 橋本 恵以*, 中元 昌広*, 古川 祐一*, 榊田 哲哉*, **, 北
 畠 直文†, §、谷 史人*, **
 *京大院・農・食品生物、**京大院・地球環境、†ノートルダム清心女大・食品
 栄養、§京大
- 11:00 1Ea4 タンパク質架橋化酵素ファミリーの組織特異的発現の解析
 ○清水 由隆、伊藤 みほ、鞍本 克真、福井 美奈、柴田 秀樹、牧 正敏、
 人見 清隆
 名大院・生命農

会場F (W422)

座長：丸山 伸之 (京大院・農)

- 10:00 1Fa1 イネ胚乳分化期に組織特異的に発現する遺伝子群の網羅的解析
 ○東田 潤1、斉藤 雄飛1、土居 誠1、森田 重人1,2、佐藤 茂1,2、石丸
 努3、近藤 始彦3、増村 威宏1,2
 1京府大院・生命環境、2京都農技セ・生資セ、3農研機構・作物研
- 10:20 1Fa2 イネ種子発芽期における貯蔵タンパク質分解に関わる遺伝子群の発現解析
 ○山口 雅祥1、斉藤 雄飛1、中塚 信明1、森田 重人1,2、佐藤 茂1,2、
 石丸 努3、近藤 始彦3、増村 威宏1,2
 1京府大院・生命環境、2京都農技セ 生資セ、3農研機構・作物研
- 10:40 1Fa3 二重変異体 (*wx ae*) 米におけるスクロースと脂質の局在および関連遺伝子の発現
 ○藤原 美乃里1、Guray Akdogan1、中屋 慎1、財満 信宏2、河村 幸雄2、
 佐藤 光3、北村 進一1
 1阪府大院・生命環境、2近大院・農、3九大院・農

二日目 10/2 (日)

会場 A (W100)

午前の部)

座長：渡部 邦彦 (京府大院・生命環境)

09:30 2Aa1 多糖アルギン酸を取り込む細菌由来 ABC トランスポーターと基質結合タンパク質の相互作用に関する構造機能解析

○西谷 悠、丸山 如江、伊藤 貴文、三上 文三、橋本 渉、村田 幸作
京大院・農

09:50 2Aa2 アルギン酸で誘導発現する *Sphingomonas* 属細菌由来鉄輸送オペロンタンパク質の構造と機能

○橋本 渉、丸山 如江、三上 文三、村田 幸作
京大院・農

10:10 2Aa3 1型繊毛による surface motility に必要な大腸菌の新規プロテシントランスポーター, YeeF

○鈴木 秀之*、栗原 新*、**、***、押田 麻由*、**、辨野 義己***
*京工繊大・応用生物、**京大・生命科学、***理化学研

10:30 2Aa4 カリウムチャネル KAT1 の平面膜法による電気化学的評価

○窪田 慎太郎*、白井 理*、日比 隆雄**、加納 健司*
*京大院・農、**福井県大・生物資源

座長：橋本 渉 (京大院・農)

10:50 2Aa5 Overexpression of L-pantoyl lactone dehydrogenase by disrupting its putative transcriptional regulator in *Rhodococcus erythropolis*

○Dayong Si, Nobuyuki Urano*, Sakayu Shimizu, Michihiko Kataoka*
Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., *Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.

11:10 2Aa6 プロテシン代謝の転写抑制因子 PuuR の認識配列解析

○根本 直樹*、栗原 新*、**、北原 譲*、**、朝田 圭*、**、加藤 健二**、鈴木 秀之*
*京工繊大院・応生、**京大院・生命

11:30 2Aa7 好熱菌 *Meiothermus ruber* H328株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の構造解析

○野村 圭史1、片岡 真亜知1、川崎 一則2、加藤 智樹2、茂里 康2、渡部 邦彦1
1 京府大院・生命環境、2 産総研・健康工学

午後の部)

座長：内海 龍太郎 (近大院・農)

- 13:20 2Ap1 大学附属農場の花弁からの酵母の分離と大学ブランド清酒開発への利用
○吉田 幸代*、三井 俊**、中村 恵子*、林 真梨菜*、清崎 みなみ*、伊藤 彰敏**、安田(吉野) 庄子**、土屋 照二*、北本 則行**、加藤 雅士*
*名城大・農、**愛知県産技研・食工技
- 13:40 2Ap2 出芽酵母のエタノール発酵から乳酸発酵への代謝変換制御
○松山 崇、山西 守
(株)豊田中央研究所
- 14:00 2Ap3 出芽酵母による NAD⁺合成経路中間体キノリン酸の分泌と再利用
○河井 重幸、大橋 一登、村田 幸作
京大院・農
- 14:20 2Ap4 MALDI-TOF MS を用いた *S10*-GERMS 法による *Bacillus* 属細菌の分類
○堀田 雄大、細田 晃文、田村 廣人
名城大・農
- 座長：鈴木 秀之(京工織・応生)
-
- 14:40 2Ap5 枯草菌によるイノシトール異性体変換の効率化
○山岡 優、竹中 慎治、吉田 健一
神大院・農
- 15:00 2Ap6 サルモネラ RcsBCD 系の発現調節に関わるコネクター様因子の単離と解析
○萩原 慧、千種 佐貴子、加藤 明宣、内海 龍太郎
近大院、近大
- 15:20 2Ap7 細菌情報伝達ネットワーク間で働く、新規コネクター因子の探索とその機能解析
○植田 健陽、石井 英治、江口 陽子、仲宗根 薫*、内海 龍太郎
近大院・農・バイオ、*近大・工・生化工
- 15:40 2Ap8 アラミド骨格のガス拡散型バイオカソードの高出力化
○浅野 達、赤松 哲也*、白井 理、加納 健司
京大院・農、*東邦テナックス(株)

会場B (W214)

午前の部)

座長：倉持 幸司(京府大院・生命環境)

- 09:30 2Ba1 カイコ幼虫腸管組織における脂溶性抗酸化物質の解析
○網干 貴子、西田 律夫、森 直樹
京大院・農
- 09:50 2Ba2 タキシフォリンによるアミロイドβの凝集抑制機構
○佐藤 瑞穂、村上 一馬、井久保 遥子、増田 裕一*、竹腰 清乃理*、入江 一浩
京大院・農、*京大院・理

10:10 2Ba3 ニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性決定に対する非古典的 loop の寄与

○松井 美佳奈*、浅野 拓也*、伊原 誠**、山下 敦子**、岡島 俊英***、松田 一彦*

*近大院・農・応生化、**理研・播磨、***阪大産研

座長：森 直樹（京大院・農）

10:30 2Ba4 Acylglyceride の抗菌活性の検討

○上浦 一葉*、秋山 朋美*、西崎 綾*、真壁 秀文**、廣田 満*
信州大・農*、信州大院・農**

10:50 2Ba5 NMR による茶ポリフェノールとシクロデキストリンとの相互作用に関する研究

○西澤 正人、黒田 哲矢、杉山 靖正、熊澤 茂則
静岡県立大院・生活健康科学

11:10 2Ba6 沖縄産野生種ベリーのアントシアニン分析と抗酸化活性

○久保田 通代*、石川 千絵*、杉山 靖正*、福本 修一**、宮城 健***、熊澤 茂則*

*静岡県立大・食品栄養科学、**（株）ポッカコーポレーション、***沖縄県森林資源研究センター

午後の部)

座長：入江 一浩（京大院・農）

13:20 2Bp1 ガレート型タンニンとカフェインの分子間相互作用の解析

○太田 有香、石井 剛志、中山 勉
静岡県大・食栄

13:40 2Bp2 化学分析とミツバチの行動学的観察による韓国済州島産プロポリスの起源植物の解明

○下村 幸佑*、杉山 靖正*、中村 純**、安木 蓮***、熊澤 茂則*

* 静岡県立大・食品栄養、** 玉川大・ミツバチ科学研究センター、*** 韓国東亜大・食品栄養

14:00 2Bp3 Cyclolobatriene, a New Ten-Membered-Ring Lobane Diterpene from Soft Coral *Lobophytum pauciflorum*

○Sudhakar V. S. Govindam, Yukio Yoshioka*, Akihiko Kanamonoto**, Takeshi Fujiwara**, Tetsuji Okamoto*, Makoto Ojika †

Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ., *Grad. Sch. Biomed., Hiroshima Univ., **OP Biofactory Co. Ltd.

14:20 2Bp4 Structure-activity relationship of alpha hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*

○Shylaja D. Mollu, Jianhua Qi, Arata Yajima, Keisuke Shikai, Tadashi Imaoka, Tomoo Nukada, Goro Yabuta, Tomoyo Asano, Youji Sakagami and Makoto

Ojika

Grad. Sch. Bioagric., Nagoya Univ.

座長：三芳 秀人 (京大院・農)

- 14:40 2Bp5 C-N軸性キラリティを利用した3,3-二置換オキシインドールの新規立体制御法
中崎 敦夫1、○森 綾子1、小林 進2、西川 俊夫1
1名大院・生命農、2東理大・薬
- 15:00 2Bp6 両極性炭素を持つイミダゾロン化合物の化学合成研究
○宮田 典明、久世 雅樹*、西川 俊夫
名大院・生命農学、*名大・物質国際セ
- 15:20 2Bp7 ボロン酸とスチレンの酸化的 Heck 反応によるレスベラトロールとその誘導体の新規効率的合成
○諫山 篤、谷森 紳治、切畑 光統
阪府大院・生命環境
- 15:40 2Bp8 Surugapyrone Bの全合成による絶対構造の解明ならびに誘導体の合成と抗酸化性評価
○大向 宏明、谷森 紳治、切畑 光統
阪府大院・生命環境

会場C (W306)

午前の部)

座長：白井 理 (京大院・農)

- 09:30 2Ca1 部位特異的変異導入によるサーモライシンの熱安定化機構の解明
○川崎 雄一、保川 清、井上 國世
京大院・農
- 09:50 2Ca2 ポリウロン酸の代謝に関わる細菌由来 α -ケト酸還元酵素の構造機能相関
○高瀬 隆一、三上 文三、橋本 渉、村田 幸作
京大院・農
- 10:10 2Ca3 食虫植物ウツボカズラ消化液キチン質分解酵素の機能解析
○石崎 佳奈*、新井 祥子*、濱田 達朗**、本多 裕司*
石川県立大院・生資環境*、石川県立大・生資工**
- 10:30 2Ca4 アノマー反転型エキソ β -D-グルコサミニダーゼの糖鎖合成酵素化
○新井 祥子、鳥本 真理恵、本多 裕司
石川県立大院・生資環境
- 座長：吉田 健一 (神戸大院・農)
-

- 10:50 2Ca5 ミミズ (*Eisenia foetida*)由来のメタロプロテアーゼ遺伝子のクローニング
○谷川 元子、中澤 昌美、宮武 和孝、大木 理、脇本 吉清1、坂口 実2、井上 國世3、上田 光宏

- 阪府大院・生環科、1 ワキ製薬 (株)、2 大薬大・薬、3 京大院・食生科
- 11:10 2Ca6 ミミズ (*Eisenia foetida*) 由来の 1, 4- β -グルカナーゼ遺伝子のクローニングと発現
 ○伊藤 彰紘、山之内 佑輔、中澤 昌美、宮武 和孝、坂口 実 1、井上 國世 2、上田 光宏
 阪府大院・生環科、1 大薬大・薬、2 京大院・食生科
- 11:30 2Ca7 シロイヌナズナにおける ppGpp pyrophosphohydrolase (AtNUDX26) の分子特性
 ○加藤 貴大 1、伊藤 大輔 1、石川 和也 2、田茂井 政宏 1, 2、吉村 和也 3
 重岡 成 1, 2
 1 近大院・農・バイオ、2 近大・農・バイオ、3 中部大・応生・食栄

午後の部)

座長：宮武 和孝 (阪府大院・生環科)

- 13:20 2Cp1 ブタ臍臓由来ホスホリパーゼ A₂ の大腸菌発現系の構築
 ○大熊 彩喬、中野 秀雄、岩崎 雄吾
 名大院・生命農学
- 13:40 2Cp2 放線菌由来ホスホリパーゼ A₂ の大腸菌を用いた生産
 ○竹森 大樹、吉野 健太、江場 知聡、中野 秀雄、岩崎 雄吾
 名大院・生命農学
- 14:00 2Cp3 ヒト蛋白質架橋化酵素の新規アイソザイムにおける高反応性基質配列の解析
 ○鞍本 克真、福井 美奈、伊藤 みほ、柴田 秀樹、牧 正敏、人見 清隆
 名大院・生命農
- 14:20 2Cp4 連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼのヘパリン二糖認識機構
 ○中道 優介、丸山 如江、三上 文三、橋本 涉、村田 幸作
 京大院・農

座長：保川 清 (京大院・農)

- 14:40 2Cp5 セルラーゼ複合体の配向制御を応用したエチレン生産系の構築
 ○神藤 定生、伊藤 ユキ*、植松 桂司*、松田 隆之介*、細田 晃文*、田村 廣人*
 名城大・理工、*名城大・農
- 15:00 2Cp6 ヒト核内 RNA 品質管理機構におけるポリアデニル化およびエキソヌクレアーゼ hRrp6 の関与について
 ○藤原 奈央子、弓立 涼介、呉 攸、増田 誠司
 京大院・生命科学
- 15:20 2Cp7 マトリプターゼの分子間相互作用による活性化
 ○友石 満里絵、都築 巧、安元 誠、伏木 亨、兒島 憲二、井上 國世
 京大院・農
- 15:40 2Cp8 一遺伝子から生じるカイコ抑制性グルタミン酸受容体の構造と薬理学的特性の多様

性

○古谷 章悟*、山口 武則*、神橋 貴彦*、入江 貴裕**、尾添 嘉久**、松田 一彦*

近大院・農、*近大・農、**島根大院・生資科

会場D (W314)

午前の部)

座長：小林 敬 (京大院・農)

09:30 2Da1 クリームの特処理が脂肪球やタンパク質に与える影響

○堀口 早苗、西村 公雄、松宮 健太郎*、小杉 達也**、野田 正幸**、武藤 高明**、松村 康生*

同志社女大・食、*京大院・農、** (株) 雪印・ミルクサイエンス研究所

09:50 2Da2 キレート樹脂による魚醤油中の重金属除去

○新城 良平、笹木 哲也*、道島 俊英*、中村 静夫*、河道 真理**、油谷 美幸**、徳田 耕二**、小柳 喬、榎本 俊樹

石川県立大・食品科学、*石川県工試、** (株) 車多酒造

10:10 2Da3 魚醤油中の重金属の存在形態評価と除去機構の解明

○笹木 哲也、新城 良平*、道島 俊英、中村 静夫、河道 真理**、油谷 美幸**、徳田 耕二**、小柳 喬*、榎本 俊樹*

石川県工試、*石川県立大・食品科学、** (株) 車多酒造

10:30 2Da4 トマト果汁に含まれるウレアーゼ阻害物質の検索

○村松 由季子、藤田 智之、吉留 哲郎*

信大院・農、*ナガノトマト

座長：都築 巧 (京大院・農)

10:50 2Da5 ヤナギモクの糖質分解酵素阻害作用

○西塔 美希、松本 健司、小西 康子

石川県立大院・食品科学

11:10 2Da6 ドリアン中の含硫 TRPA1・TRPV1 アゴニストの同定と定量

○寺田 祐子*、細野 崇**、関 泰一郎**、有賀 豊彦**、佐藤 努*、渡辺 達夫*

*静岡県大院・食栄、**日本大・生物資源

11:30 2Da7 エポキシリノール酸付加体に対するモノクローナル抗体の作製

○占部 由重、西村 泰斗、柴田 貴広、河合 慶親、内田 浩二

名大院・農

午後の部)

座長：谷 史人 (京大院・農)

- 13:20 2Dp1 抗炎症性ペプチド pGlu-Leu の発酵食品中での分布
○清野 珠美、朴 恩榮、中村 考志、佐藤 健司、木村 紫晃*、大塚 真帆*
京府大院・生命環境、*招徳酒造（株）
- 13:40 2Dp2 黒米アントシアニンの脂質代謝におよぼす影響
○吉城 由美子、市川 美緒、畷ヶ山 由佳梨、為本 祐二、関位 真美
石川県立大・食科
- 14:00 2Dp3 食餌性肥満マウスの脂質代謝に及ぼす酵素合成グリコーゲンの影響
○小川 瑠衣 1、古屋敷 隆 2、中山 陽子 1、本田 和久 1、上曾山 博 1、高
田 洋樹 2、保田 倫子 3、芦田 均 1
神大院・農 1、江崎グリコ・健康科学研 2、神大・自科 3
- 14:20 2Dp4 ケルセチンによる GLUT4 細胞膜移行促進効果の作用機構について。
○蘇 鐘侃、芦田 均
神大院・農
- 14:40 2Dp5 ルテオリンが AhR と Nrf2 を介した薬物代謝系第 I、II 相酵素の誘導発現に及ぼす影
響
○姜 嵩岩、北野 嶺、芦田 均
神大院・農
- 座長：芦田 均（神大院・農）
-
- 15:00 2Dp6 テアフラビン類の味覚特性解析
○上園 博美、石井 剛志、中山 勉
静岡県立大・食栄
- 15:20 2Dp7 甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討
○塚原 礼恵*、榎田 哲哉**、谷 史人**、北畠 直文†, §
*京大院・農・食品生物、**京大院・地球環境、†ノートルダム清心女大・食品
栄養、§京大
- 15:40 2Dp8 甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用 (1) ヒト-マウス複合型甘味受
容体を用いた解析
○太田 圭介*、田口 若奈**、榎田 哲哉**、谷 史人**、北畠 直文
#, †
*京大ア資七、**京大院・農・食生物、***京大院・地球環境、#ノートルダム清心
女大・食品栄養、†京大
- 16:00 2Dp9 甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用 (2) 点変異甘味受容体を用い
た解析
○田口 若奈*、太田 圭介#、榎田 哲哉*、谷 史人*、北畠 直文†, §
*京大院・農・食品生物、#京大ア資料七、**京大院・地球環境、†ノートルダム
清心女大・食品栄養、§京大

会場 E (W 3 2 2)

午前の部)

座長：永尾 雅哉 (京大院・生命科学)

- 09:30 2Ea1 中枢神経系におけるプロスタグランジン E₂ の抗不安機構
○宮本 知京*、鈴木 千尋*、古屋敷 智之**、成宮 周**、大日向 耕作*
*京大院・農・食品生物、**京大院・医・神経・細胞薬理学
- 09:50 2Ea2 可欠アミノ酸代謝酵素の発現変動とタンパク質栄養への適応
○中瀬 純平、二川 みどり、津崎 洋平、吉村 亮二、佐伯 徹、金本 龍平
京府大院・生命環境
- 10:10 2Ea3 mRNA 核外輸送因子 UAP56 と URH49 の形成する複合体の分子基盤解析
○藤田 賢一、栗原 朋也、山崎 智弘、増田 誠司
京大・生命科学
- 10:30 2Ea4 乳脂肪球皮膜タンパク質、MFG-E8 のニワトリホモログー組換えタンパク質の調製と卵・精子相互作用における機能解析—
○西尾 俊亮、大島 健司、日野 真吾*、奥村 裕紀**、灘野 大太、松田 幹
名大院・生命農学、*静大・農、**名城大院・農

座長：佐伯 徹 (京府大院・生命環境)

- 10:50 2Ea5 カルシウム結合タンパク質 ALG-2 と P-body 構成因子 PATL1 の細胞内局在および機能解析
○大杉 桂奈江、人見 清隆、柴田 秀樹、牧 正敏
名大院・生命農
- 11:10 2Ea6 ALG-2 と CHERP のカルシウム依存的相互作用および核内における共局在
○井元 千晶、大杉 桂奈江、人見 清隆、柴田 秀樹、牧 正敏
名大院・生命農
- 11:30 2Ea7 DNA メチル化レベルの減少が複製フォーク進行に与える影響
○来馬 啓介、杉浦 健太、杉村 和人、奥村 克純
三重大院・生資

午後の部)

座長：木岡 紀幸 (京大院・農)

- 13:20 2Ep1 培養細胞を用いた人工消化—腸管吸収モデル系機能性評価試験の構築
○原田 哲平、渡辺 章夫、吉田 泉、三嶋 隆、渡井 正俊
(財) 日本食品分析センター・機能科学研究チーム
- 13:40 2Ep2 レポーターアッセイ系を用いた脂肪細胞炎症状態のモニタリング
○長崎 はるか、吉村 健、小木曾 豊史
三重大院・生資
- 14:00 2Ep3 SMXA-5 マウスの脂肪肝感受性遺伝子座の候補遺伝子
○立石 壮志、小林 美里、都築 佳奈、大野 民生*、村井 篤嗣、堀尾 文

彦

名大院・農、*名大院・医

14:20 2Ep4 細胞内における calpain-7 の活性化と C 末端欠損 Alix の分解

○前本 佑樹、大迫 洋平、人見 清隆、柴田 秀樹、牧 正敏

名大院・農

座長：増田 誠司（京大院・生命科学）

14:40 2Ep5 一過性高眼圧における β -1, 3-glucan による網膜保護効果について

○汲田 友佑、西尾 昌洋、磯野 直人、梅川 逸人

三重大院・生物資源学

15:00 2Ep6 低酸素応答性オートファジーによるアンドロゲン受容体の分解について

○南 真人*、三谷 壘一*、山地 亮一*、原田 直樹*、中野 長久**、乾 博*

*阪府大院・生命環境、**大阪女子短大

15:20 2Ep7 Phospholipid scramblase 3 のパルミトイル化およびセラミド依存的な細胞外分泌

○犬塚 達俊¹、猪川 亮¹、陳 岑¹、木津 久美子²、柴田 秀樹¹、成田 宏史²、牧 正敏¹

1 名大院・生命農、2 京女大・食物栄養

15:40 2Ep8 高密度リポタンパク質 (HDL) 産生機構の解析 ①ABCA1 の ATP に依存した構造変化と apoA-I 結合

○長尾 耕治郎、木村 泰久、松尾 道憲、木岡 紀幸、植田 和光

京大・物質-細胞統合システム拠点 (京大 iCeMS)

16:00 2Ep9 高密度リポタンパク質 (HDL) 産生機構の解析 ②細胞膜上の ABCA1 動態の 1 分子可視化

○永田 紅¹、中田 千枝子^{1, 2}、楠見 明弘^{1, 2}、植田 和光^{1, 3}

1 京大・物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS)、2 京大・再生医科学、

3 京大院・農

会場 F (W 4 2 2)

午前の部)

座長：森田 重人（京府大院・生命環境）

09:30 2Fa1 強光応答性選択的スプライシング制御因子 atSR30 および atSR45a の核局在化制御機構の解析

○小池 佳之¹、森 達也²、田部 記章²、丸田 隆典^{2, 3}、田茂井 政宏^{1, 2}、吉村 和也⁴、重岡 成^{1, 2}

1 近大院・農・バイオ、2 近大・農・バイオ、3 島根大・生資料・生命工、4 中部大・応生・食栄

09:50 2Fa2 植物特異的 SR-like タンパク質 atSR45a による強光ストレスに応答した選択的スプライシング制御

○吉村 和也、森 達也*、横山 国大、小池 佳之*、田部 記章*、佐藤 信雄**、高橋 広夫**、丸田 隆典*、重岡 成*
中部大院・応生、*近大院・農、**中部大・応生

10:10 2Fa3 ストレス応答における葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) の役割
○辻村 昌希 1、池本 圭輔 2、丸田 隆典 2, 3、田茂井 政宏 1, 2、吉村 和也 4、重岡 成 1, 2
1 近大院・農・バイオ、2 近大・農・バイオ、3 島根大・生資料・生命工、4 中部大・応生・食栄

座長：伊福 健太郎 (京大院・生命科学)

10:30 2Fa4 FBP/SBPase 導入による光合成能強化が窒素代謝に及ぼす影響
○丸山 俊樹 1、大鳥 久美 2、西山 和樹 1、Daniel Padilla 1、作山 治美 2、田茂井 政宏 1, 2、重岡 成 1, 2
1 近大院・農・バイオ、2 近大・農・バイオ

10:50 2Fa5 葉緑体由来の H₂O₂ 応答性遺伝子群の機能解析
○松田 峻 1、中村 茉樹 2、野志 昌弘 2、田茂井 政宏 1, 2、丸田 隆典 2, 3、藪田 行哲 4、吉村和也 5、石川孝博 3、重岡成 1, 2
1 近大院・農・バイオ、2 近大・農・バイオ、5 島根大・生資料・生命工、4 鳥取大・農・生資環、5 中部大・応生・食栄

11:10 2Fa6 ショ糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響
○大鳥 久美 1、丸山 俊樹 2、Daniel Paddila 1、田茂井 政宏 1, 2、重岡 成 1, 2
1 近大・農・バイオ、2 近大院・農・バイオ

午後の部)

座長：田茂井 政宏 (近大院・農)

13:20 2Fp1 植物が光化学系の高温障害を回避するメカニズムの解析
○丸谷 曜子*、山内 靖雄*、秋本 誠志**、木村 行宏***、水谷 正治*、杉本 幸裕*
*神大院・農、**神大院・理学、***神大院・自然科学研究環

13:40 2Fp2 ハツカダイコンβ-アミラーゼ過剰発現シロイヌナズナの特徴解析
○高橋 郁夫、原 正和
静大・農学部

14:00 2Fp3 液胞膜 H⁺-ピロホスファターゼの可視化と液胞動態の解析
○瀬上 紹嗣、牧野 沙知、前島 正義
名大・生命農学

14:20 2Fp4 単子葉型新規翻訳エンハンサーの探索
○矢村 寿啓、上田 清貴、大河原 錬也、山口 雅利、出村 拓、加藤 晃
奈良先端大・バイオ

座長：増村 威宏（京府大院・生命環境）

- 14:40 2Fp5 植物培養細胞定常期における翻訳状態の網羅的解析
○大河原 錬也、上田 清貴、矢村 寿啓、山口 雅利、出村 拓、加藤 晃
奈良先端大・バイオ
- 15:00 2Fp6 アブシジン酸受容体アンタゴニスト AS n
○武藤 拓也*、岡本 昌憲**、Sean Cutler**、平井 伸博***、轟 泰司****
*静岡大院・農、**University of California, Riverside、***京大院・農、****
静岡大・農
- 15:20 2Fp7 組換え型 AhR/GUS レポーター遺伝子系導入シロイヌナズナを用いた PCB 同族体のア
ッセイにおける重金属の影響
○嶋津 小百合、大川 秀郎*、芦田 均
神大院・農、*早大・ナノ理工研
- 15:40 2Fp8 ヒスチジン及び関連ペプチドによる植物金属ストレスの緩和
○小林 大記、鹿島 大樹、篠田 友里、原 正和
静岡大・農

一般講演座長一覧

日程	会場	午前		午後	
10/1 (土)	A	1Aa1 - 1Aa3			
		河井 重幸 (京大院・農)			
	B	1Ba1 - 1Ba4			
		中川 好秋 (京大院・農)			
	C	1Ca1 - 1Ca4			
		由里本 博也 (京大院・農)			
D	1Da1 - 1Da4				
	榊田 哲哉 (京大院・農)				
E	1Ea1 - 1Ea4				
	大日向 耕作 (京大院・農)				
F	1Fa1 - 1Fa3				
	丸山 伸之 (京大院・農)				
10/2 (日)	A	2Aa1 - 2Aa4	2Aa5 - 2Aa7	2Ap1 - 2Ap4	2Ap5 - 2Ap8
		渡部 邦彦 (京府大院・生命環境)	橋本 渉 (京大院・農)	内海 龍太郎 (近大院・農)	鈴木 秀之 (京工繊・応生)
	B	2Ba1 - 2Ba3	2Ba4 - 2Ba6	2Bp1 - 2Bp4	2Bp5 - 2Bp8
		倉持 幸司 (京府大院・生命環境)	森 直樹 (京大院・農)	入江 一浩 (京大院・農)	三芳 秀人 (京大院・農)
	C	2Ca1 - 2Ca4	2Ca5 - 2Ca7	2Cp1 - 2Cp4	2Cp5 - 2Cp8
		白井 理 (京大院・農)	吉田 健一 (神大院・農)	宮武 和孝 (阪府大院・生環科)	保川 清 (京大院・農)
D	2Da1 - 2Da4	2Da5 - 2Da7	2Dp1 - 2Dp5	2Bp6 - 2Dp9	
	小林 敬 (京大院・農)	都築 巧 (京大院・農)	谷 史人 (京大院・農)	芦田 均 (神大院・農)	
E	2Ea1 - 2Ea4	2Ea5 - 2Ea7	2Ep1 - 2Ep4	2Ep5 - 2Ep9	
	永尾 雅哉 (京大院・生命科学)	佐伯 徹 (京府大院・生命環境)	木岡 紀幸 (京大院・農)	増田 誠司 (京大院・生命科学)	
F	2Fa1 - 2Fa3	2Fa4 - 2Fa6	2Fp1 - 2Fp4	2Fp5 - 2Fp8	
	森田 重人 (京府大院・生命環境)	伊福 健太郎 (京大院・生命科学)	田茂井 政宏 (近大院・農)	増村 威宏 (京府大院・生命環境)	

受賞講演

講演要旨

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

(京大院生命/JST さきがけ) 伊福 健太郎*

【緒言】

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) クラスタが水分解酸素発生反応を触媒する。この Mn クラスタ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。この 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。そこで本研究では、緑色植物に特異的な OEC タンパク質である PsbP タンパク質の構造と機能の解析を中心とする研究を行った。以下に研究成果の概略を記す。

1. PsbP タンパク質の構造と機能

PsbP は、PSII の水分解反応に必要なコファクターである Ca^{2+} と Cl^{-} の結合に関わる。そこで PsbP 中の PSII 活性化 (イオン保持) に必須なアミノ酸残基を詳細に解析し、PsbP の N 末端配列が PSII 活性維持に重要な役割を持つことを見出した。さらに X 線結晶構造解析によって PsbP 立体構造解析を行い、PsbP が当時知られていたシアノバクテリアの OEC タンパク質とは全く異なる新奇な立体構造を持つことを明らかにした。フーリエ変換赤外分光測定を用いた共同研究により、PsbP の結合に伴い PSII の Mn クラスタ周辺構造が変化すること、及び、PsbP が Mn クラスタ周辺の構造変化を引き起こすためには PsbP の N 末端配列が必須であることを明らかにした。これら一連の研究成果から、緑色植物特有の膜表在性 OEC サブユニットである PsbP による PSII 活性制御の分子機構を明らかにした。

2. RNAi の利用開発による酸素発生系タンパク質の機能解析

RNA 干渉法 (RNAi) を用いて PsbP と PsbQ の発現抑制植物の作製を行い、PsbQ ではなく、PsbP の欠損が PSII 活性の低下や暗所における Mn クラスタの不安定化などを引き起こすことを示した。さらに Differential RNAi (dRNAi) と呼ばれる手法を開発して PsbP の発現量や種類を人為的に操作したタバコを作成し解析した結果、PSII 活性は PSII 反応中心タンパク質ではなく、PsbP 量と直線的な関係があることを明らかにし、PsbP が

生体内で PSII 活性調節に重要な役割を持つことを明らかにした。

3. 酸素発生系タンパク質の分子進化に関する研究

緑色植物の PsbP や PsbQ の起源については長らく未解明であったが、ゲノム解析やプロテオーム解析の進展に伴い、原核生物であるシアノバクテリアにも PsbP や PsbQ のホモログが広く存在することが判明した。さらに緑色植物において機能未知の PsbP や PsbQ のホモログが多数存在していることも明らかとなった。そこで転写プロファイル解析に基づいて、各々のシロイヌナズナ遺伝欠損突然変異体の表現型解析を行った。その結果、最も原核生物型 PsbP に似た配列をもつ PsbP-like protein 1 (PPL1) が、強光で障害を受けた PSII の修復過程に関わることを、及び、別の PPL タンパク質である PPL2 が光化学系 I 周辺での循環的電子伝達に関わる葉緑体 NAD(P)H デヒドロゲナーゼ複合体 (NDH) の新規サブユニットであり、かつ、他に 3 種の PsbQ ホモログ (PQL1-3) も全て葉緑体 NDH 複合体活性に必須であることを明らかにした。これらの結果から、PsbP および PsbQ ファミリーが光合成電子伝達鎖において多様かつ重要な機能を担っていることを明らかにした。

【結言】

本研究によって、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 が獲得されたことが明らかとなった。PsbP や PsbQ、及び、そのホモログ群の分子機能解析は、緑色植物が獲得した独自の環境適応機構の解明につながると期待している。

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科全能性統御機構学分野において行いました。学生時代から温かいご指導ご鞭撻を賜りました京都大学教授・佐藤文彦先生に心より御礼申し上げます。また、共に研究を行いました全ての共同研究者・卒業生・在学生の皆様に深く感謝いたします。最後に、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部の井上國世前支部長、ならびにご支援賜りました諸先生に厚く御礼申し上げます。

*Tel: 075-753-6384, Fax: 075-753-6398
e-mail: ifuku@kais.kyoto-u.ac.jp

光合成炭素代謝の制御機構に関する研究

AW2

(近畿大・農・バイオ) 田茂井政宏

光合成生物における炭素代謝は広く知られている一方で、その詳細な制御機構に関しては、未だ未知な部分が多く残されている。本研究では、植物および藻類の光合成炭素代謝の制御機構を明らかにすることを目的として、藻類カルビン回路構成酵素の分子特性と制御機構解明、またこれらの遺伝子を導入した形質転換植物を用いて、光合成炭素代謝能（炭素分配）、および窒素を含めた他の代謝系への影響、さらには生産性増大に関する研究成果へと結びつけてきた。その主な成果を以下に述べる。

【藻類における光合成カルビン回路の制御機構】

高等植物のカルビン回路で機能するチオール酵素 (FBPase、GAPDH、PRK、SBPase) は、葉緑体内のレドックス状態により活性調節を受けることが知られているが、藻類のチオール酵素には、高等植物のチオール酵素に保存されている活性調節に必要なシステイン残基が欠損しており、レドックス調節を受けないことを明らかにした。一方、藻類では、明暗条件下で変化する NADP(H)/NAD(H) 比を感知して、CP12 という小タンパク質が PRK および GAPDH と複合体を形成/解離することによって、細胞内の活性および代謝調節を行うことを明らかにした。さらに、ラン藻では、真核光合成生物には存在しない新規酵素フルクトース-1,6-/セドヘプツロース-1,7-ビスホスファターゼ (FBP/SBPase) が機能していることを明らかにした。この様に、高等植物と藻類においては、カルビン回路の制御機構が異なることを明らかにした。

【高等植物における光合成炭素代謝制御機構】

高等植物における光合成炭素代謝能の制御機構を明らかにするために、藻類の遺伝子を導入することによるカルビン回路の強化が、光合成能および炭素代謝系に及ぼす影響を検討した。ラン藻由来の FBP/SBPase 遺伝子を核ゲノムに導入し、葉緑体で発現させた形質転換植物 (TpFS) は、大気条件下 (360 ppm CO₂) において光合成能が 1.24 倍に増加していた。形質転換体は野生株よりも生育が速く、最終的な背丈および乾燥重量は 1.5 倍に上昇し、根、茎、葉なども著しく発達してい

た。光合成最終産物であるヘキソース、ショ糖、デンプンは野生株と比較して有意な増加が認められた。さらに、ラン藻およびクラミドモナスより単離した FBPase および SBPase をそれぞれ単独で葉緑体で発現させた形質転換植物の解析により、FBPase および SBPase のいずれもカルビン回路での炭素の流れの調節に重要であるが、特に SBPase は RuBP 再生に、FBPase はデンプン合成への炭素の流れを制御していることが明らかになった。一方、細胞質で FBP/SBPase を発現させることにより、ショ糖合成系を強化した形質転換タバコは、通常 CO₂ 環境下では植物の生育に大きな影響を及ぼさないが、高 CO₂ 環境下では側枝が増加し、光合成機能および形態形成能に大きく影響を及ぼすこと、すなわち光合成産物の分配比が、植物の生長や形態形成を制御する大きなファクターであることを明らかにした。また、高濃度のショ糖存在下において、発芽時の葉緑体構築に異常を示す変異体を解析することにより、光合成機能と窒素代謝能のバランス制御にはプラスチド局在のインベルターゼが機能しており、葉緑体内のショ糖/ヘキソースがシグナルとなり光合成および窒素代謝に関わる遺伝子群の発現制御を行っていることを明らかにした。現在、これらの形質転換植物を用いて、炭素・窒素代謝制御に関わる分子機構解明を試みている。

【光合成炭素代謝能改変による植物の生産性向上に関する研究】

導入遺伝子を高発現できる葉緑体形質転換技術の確立により、タバコおよびレタス葉緑体ゲノムに FBP/SBPase 遺伝子を導入した植物を作出したところ、葉緑体内での高タンパク質蓄積により、光合成能は野生株の約 1.7 倍に、乾燥重量は約 1.8 倍に上昇した。これらの成果は、光合成機能増大、代謝バランス改善による植物バイオマス増産に大きく貢献すると考え、イネ、ジャガイモ、サツマイモなどの作物へと応用し、収量増大の成果が得られつつある。

Tel:0742-43-8196, Fax:0742-43-8976
e-mail:tamoi@nara.kindai.ac.jp

応用微生物学の発展は、微生物の有する多機能性に支えられている。微生物にその多機能性を求めるとき、我々は、彼らが生息する環境の多様性（極限環境など）を想像しがちであるが、たった1つの環境中においてさえ、そこに生息する微生物は驚くほどの多機能性を備えている。本研究では、腸内という環境に生息する幾つかの細菌に、これまで知られていなかった新規な代謝機能を発掘するとともに、その経路上の遺伝子やタンパク質の機能解析を行った。また、それらの機能を改変することで、物質生産への展開を図った。その内容は、「ビフィズス菌とヒトとの共生を支える分子基盤の解明および応用への展開」および「芳香族アミノ酸代謝に関わる機能タンパク質の解析とその高度利用」に分けられる。

1. ビフィズス菌とヒトとの共生を支える分子基盤の解明および応用への展開

ビフィズス菌はヒトの腸管に生息する嫌気性細菌である。本菌が生産する乳酸や酢酸は、腸管内のpHを低下させることで有害菌の増殖を妨げるだけでなく、腸管上皮細胞から取り込まれて宿主のエネルギー源として利用されたり、消化管ホルモンや炎症性サイトカインの発現を制御するシグナル分子としても機能する。ビフィズス菌は小腸下部から大腸に生息しているが、宿主が摂取した糖質成分は宿主自身による消化吸収および消化管上部に生息する腸内細菌によって消費されてしまうため、本菌の生息する消化管下部には容易に分解し得る糖質成分はほとんど届かない。では、ビフィズス菌はどのようにして栄養源を得ているのであろうか。我々はビフィズス菌がヒト自身の分泌する糖質を資化する特異な代謝経路を有していることを見出し、その経路上の酵素について構造機能解析を行うことで、ビフィズス菌とヒトの共生を支える分子基盤の一端を明らかとした。従来、ビフィズス菌はヒトの食餌由来の難分解性オリゴ糖を栄養源としていたと考えられていたが、実はヒト自身が分泌する糖質をも利用して共生を成立させているのである。特に、乳幼児の糞便から頻繁に単離されるビフィズス菌種に、母乳に含まれるオリゴ糖成分（ヒトミルクオリゴ糖）を資化する経路が特異的に存在することを発見したことは、「なぜ、母乳栄養乳児の腸管では生後速やかにビフィズス菌優勢な腸内細菌叢(ビフィズスフローラ)が形成されるのか」

という長年の疑問を解決する端緒となったと共に、ヒトとビフィズス菌の共進化という新しいパラダイムを立てることとなった。

2. 芳香族アミノ酸代謝に関わる機能タンパク質の解析とその高度利用

腸内においては、しばしばフェノールの遊離が観察されるが、これに関わる酵素がチロシンフェノールリアーゼ(TPL)である。本酵素はチロシンをピルビン酸、アンモニアおよびフェノールへと加水分解する。この反応は可逆的であり、フェノールをカテコールと置換することにより、パーキンソン病の治療薬として使用される L-ドーパ(3,4-ジヒドロキシフェニル-L-アラニン)を合成することが出来る。現在、年 250 トン程度の L-ドーパが供給されているが、その約 50%は TPL を用いた酵素合成法によって製造されている。本法では TPL 高発現株である *Erwinia herbicola* を用いるが、TPL がチロシンによる誘導酵素であるために培養時に多量のチロシンを添加せねばならず、このことが L-ドーパの分離精製を困難にしていた。当初、この問題は *tpl* 遺伝子を単離して強力なプロモーター制御下におくことで簡単に回避できると考えられたが、組換え株の生産能は野生型 *E. herbicola* よりも低く、実用化には適さなかった。我々は、*E. herbicola* における TPL の発現調節機構の解明に取り組み、転写調節因子 TyrR を同定する共にその誘導メカニズムを解明した。また、TyrR 変異株を作製することで、現行株よりも 30 倍高い L-ドーパ生産能を示す組換え株の取得に成功した。これらの成果は、機能タンパク質のチューニングを行うことで、目的産物の生産効率を飛躍的に高めるモデルケースとなった。

本研究は、京都大学大学院農学研究科食品工学専攻微生物生産学研究室・同生命科学研究所統合生命科学専攻分子応答機構学研究室・石川県立大学生物資源工学研究所応用微生物学研究室において行われたものです。本研究を行う機会を与えて下さり、また、自由に研究することを認めてくださいました恩師・熊谷秀彦先生（現石川県立大学特任教授）並びに山本憲二先生（現石川県立大学教授）に心よりお礼申し上げます。

Takane Katayama

Tel: 076-227-7513, Fax: 076-227-7557

E-mail: takane@ishikawa-pu.ac.jp

AW4

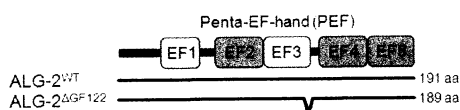
細胞内物流システムを制御するカルシウム結合タンパク質に関する研究

(名大院生命農) ○柴田秀樹

ヒトゲノムには Ca^{2+} 結合モチーフである EF-hand のコード領域が 600 以上存在する。それらを持つカルシウム結合タンパク質の生理機能解明は、 Ca^{2+} シグナル伝達の理解に必須である。筆者らは、5 つの EF-hand を連続して有するカルシウム結合タンパク質 ALG-2 が、エンドソーム経路と初期分泌経路で機能することを見出した。

1. ALG-2 標的タンパク質と ALG-2 結合モチーフ

ALG-2 の Ca^{2+} 依存的相互作用タンパク質、つまり標的タンパク質を同定した (図 1)。次に、ALIX、PLSCR3 及び Sec31A の ALG-2 結合領域を十数アミノ酸まで絞り込んだ。ヒトとマウスには、選択的スプライシングにより 2 アミノ酸短いアイソフォーム (ALG-2^{ΔGF122} と表記) が存在するが、ALG-2 結合領域は ALG-2^{ΔGF122} が結合しない ALIX 型と、両アイソフォームが結合する非 ALIX 型に分類された。ALG-2 アイソフォームの発現割合により ALG-2 が Ca^{2+} シグナルを伝達する場が調節されている可能性がある。



標的タンパク質	報告されている生理機能	結合特異性	
		ALG-2 ^{WT}	ALG-2 ^{ΔGF122}
ALIX	*エンドソーム内部小胞形成 細胞質分裂	+	-
TSG101	*エンドソーム内部小胞形成 細胞質分裂	+	-
Annexin A7	*リン脂質結合、*小胞融合 Ca ²⁺ チャンネル	+	-
Annexin A11	*リン脂質結合、細胞質分裂	+	-
PLSCR3	*ミトコンドリアの脂質輸送	+	+
Sec31A	*COPII小胞の形成	+	+

*物流システムに関連する機能

図 1. ALG-2 の構造と標的タンパク質

2. ALG-2 と MVB 経路

ALG-2 の標的タンパク質 ALIX の相互作用タンパク質として新規タンパク質 CHMP4 を同定した。酵母ホモログの先行研究から、CHMP4 はエンドソ

ーム膜を内腔へ陥入させることで内部小胞を形成し、同時にモノユビキチン化された積荷タンパク質を選択的に内部小胞に選別する過程 (MVB 経路) で機能することが予想されたが、ALIX と CHMP4 は協調的にエンドソームへ動員された。また、ALG-2 はモノユビキチン化タンパク質を認識する TSG101 と結合した。一方、ALG-2 と ALIX の ALG-2 結合領域ペプチドの共結晶の構造解析結果から、ALG-2 のホモ二量体が二種の標的タンパク質を橋渡しするアダプターとして機能しているモデルを提唱した。実際に、生化学的解析から ALIX と TSG101 の結合を、ALG-2 がカルシウム依存的に仲介していることを証明した。MVB 経路制御タンパク質は、ウィルスの出芽や細胞質分裂など、脂質二重層膜を細胞質から遠位にくぶり切る場面で利用されている。ALG-2 は MVB 経路制御タンパク質を標的としてこれらの局面で機能している可能性も考えられる。

3. ALG-2 と初期分泌経路

間接蛍光抗体法および蛍光タンパク質を用いた生細胞観察により、ALG-2 が細胞質 Ca^{2+} 上昇に応答して、標的タンパク質のひとつ Sec31A が豊富に存在する小胞体の COPII 小胞出芽領域 (ERES) に動員されることを見出した。Sec31A は COPII 被覆構成タンパク質であり、細胞質と ERES を循環している。被覆タンパク質の小胞体膜での滞在時間は COPII 出芽のタイマーであり、また被覆タンパク質の COPII からの解離はその後の膜融合に必須である。Sec31A の ERES 膜との結合を光褪色後蛍光回復法 (FRAP) により速度論的に解析したところ、Sec31A の ALG-2 結合領域の欠損は Sec31A の ERES 滞在時間を有意に減少させた。この結果は、Sec31A の安定な ERES 局在化に、ALG-2 が必要であることを示唆している。

ヘテロオリゴ糖はデンプンやセルロースなどのように単純な構造を持つホモ多糖とは異なり、数種の糖によって構成された複雑な構造を持ち、生体内では主としてタンパク質や脂質に結合して複合糖質を形成している。ホモ多糖がエネルギー源や生体保護物質としての役割を持つ一方、ヘテロオリゴ糖は細胞間の認識や発生・分化、疾病の発症など、さまざまな生命現象に深く関与している。筆者は応用微生物学・分子細胞学の立場から、ヘテロオリゴ糖の構造や機能、あるいはその代謝機構を明らかにする目的で研究を行った。さらに、ヘテロオリゴ糖の分解と生合成に関わる微生物酵素を有用物質の生産などに応用して、新規な複合糖質工学を進展させた。

ヘテロオリゴ糖鎖の生合成に関わる糖ヌクレオチドの発酵生産法の開発

糖ヌクレオチドは多糖類や複合糖質の生合成において糖転移酵素の糖供与体基質となる重要な化合物である。ヘテロオリゴ糖鎖の重要な構成糖である *N*-アセチルアミノ糖や *L*-フコースの供与体として働く糖ヌクレオチドの UDP-*N*-アセチルガラクトサミン、GDP-*L*-フコースは、その生合成に関わる酵素系が複雑なために多量生産が困難であった。筆者は酵母の高エネルギー共役発酵と細菌の酵素を利用して、上記の糖ヌクレオチドの多量生産法を開発した。これらの糖ヌクレオチドは判定が困難な変異血液型に対する新しい血液型判定試薬として市場に供給され、輸血や親子鑑定などの法医学領域に貢献している。

ヘテロオリゴ糖鎖の構造・機能の解明に有用な微生物グリコシダーゼ群の発見

筆者は糖タンパク質や糖脂質のヘテロオリゴ糖鎖の複雑な構造や多彩な機能を解明するための手段として、土壌などより分離同定した種々の微生物が生産するさまざまな糖質分解酵素を単離精製するとともに、諸性質を解明した。これらの酵素はさまざまな糖鎖の構造や機能の解明に用いられ、汎用性のある酵素は上市された。

ヘテロオリゴ糖鎖を付加する新奇な微生物酵素の発見と機能性糖鎖複合体の化学-酵素合成

糖質分解酵素は加水分解活性とともに、遊離した糖を水の代わりに水酸基を持つ化合物に転移付加する糖転移活性を有する。筆者は土壌より単離同定した糸状菌 *Mucor hiemalis* が生産する新奇なエンド型グリコシダーゼ (エンド- β -*N*-アセチルグルコサミニダーゼ) を発見し、その酵素源に因んで Endo-M と名付けた。Endo-M は水酸基を持つ化合物に糖鎖供与体から糖鎖を転移付加する高い糖転移活性を有し、その特異な活性を活用してさまざまな化合物に糖鎖を付加することに成功した。細胞内では小胞体とゴルジ体で数十にも及ぶ段階を経て行われる糖鎖の付加反応が

Endo-M のみを用いて一段階の酵素反応で行うことが可能で、革新的技法として汎用されている。筆者は本酵素を用いた糖ペプチドの化学-酵素合成法を開発し、「生理活性糖ペプチドの合成」に初めて成功した。すなわち、骨粗鬆症の治療薬のカルシトニンを初めとするさまざまな生理活性ペプチドに糖鎖を付加した糖ペプチドの合成に成功するとともに、本技法によってグルタミン残基にも糖鎖を付加することが可能であり、天然界では見出されないグルタミン結合糖鎖を持つサブスタンス P などの生理活性糖ペプチドの合成に成功した。得られたさまざまな生理活性糖ペプチドについて解析を行い、糖鎖が安定性などに影響を与えることを明らかにした。また、この方法を活用して、ヒトインフルエンザウィルスの感染阻害剤やヒト型糖鎖を持つ糖タンパク質の合成などを行った。さらに、Endo-M の活性中心付近のアミノ酸残基の置換変異を行うことにより、加水分解活性が抑制され、糖転移活性が著しく上昇した変異酵素の取得に成功して、機能性糖鎖複合体を収率良く合成できるようになり、Endo-M を物質生産を目的とした合成触媒に発展させた。

糖鎖を介した乳酸菌の腸管接着機構の解析

筆者は腸内の善玉菌の代表であるビフィズス菌がヒト腸管に分泌されるムチン糖タンパク質の糖鎖を分解する特有の酵素 (エンド- α -*N*-アセチルガラクトサミニダーゼなど) を生産することを見出し、これらの酵素と糖鎖との相互作用を介して腸管へ接着することを示唆した。さらに、ラクトバチルス属乳酸菌が宿主の腸管表面に存在する特定の糖鎖に結合することを見出し、乳酸菌をプロバイオティクスとして活用することに分子レベルでの根拠を与えた。

母乳に含まれるビフィズス菌増殖因子オリゴ糖の代謝経路の解明

整腸作用のみならず免疫賦活作用などを発現するビフィズス菌は母乳により育てられた乳幼児の腸管に優勢に棲息することが知られている。それ故に母乳中にビフィズス菌の増殖を促進する因子が存在すると考えられ、探索が行われて来た。筆者は母乳中のヘテロオリゴ糖群に着目し、それらの構成単位であるラクト-*N*-ビオースがビフィズス菌の増殖促進因子であることを明らかにした。また、ヘテロオリゴ糖をラクト-*N*-ビオースにまで代謝分解する一連の酵素群を見出すとともに遺伝子解析や結晶構造解析を行った。さらに、ラクト-*N*-ビオースのみを特異的に取り込むトランスポーターを菌体膜に見出した。また、ラクト-*N*-ビオースを培地に添加するとビフィズス菌が特異的に増殖することを明らかにした。

植物は地球の一次生産者として太陽エネルギーの固定を行うとともに、多様な代謝産物を生産する。植物機能の理解において、特徴的な植物機能を有する細胞系を確立することが重要と考え、光合成能を有する光独立栄養培養細胞ならびに、局方医薬品ベルベリンを高産生するオウレン培養細胞を確立するとともに、その機能の解析と再構築を行ってきた。これら研究は、現在、形質転換植物体の解析へと展開されつつある。以下、研究の概要を紹介する。

【光独立栄養 (PA) 培養細胞と葉緑体機能】

個体から切り出した植物細胞の光合成機能は大きく低下するが、様々な試みの結果、光合成機能を発現する緑色細胞を選抜し、タバコからPA培養系を確立した。同細胞系は、光合成に作用する様々な生理活性物質や耐性株のスクリーニングが可能であり、光化学系II (PSII) のD1タンパク質を標的とするDCMUに対する初めての耐性株の単離と解析など、植物化学調節研究において重要な材料となった。

また、同細胞系を用いて葉緑体DNA と結合するCND41 が同定された。さらに、CND41が葉緑体遺伝子発現の負の制御因子であるとともに、緑葉の主要タンパク質であるRubisco の分解と転流に関わるプロテアーゼとして老化制御への関与することが明らかとなるなど、葉緑体機能制御による多面的植物生長制御機構の一端が解明された。

一方、PA細胞から確立された耐塩性細胞におけるPSIIの耐塩性解析は、その後のPSII 酸素発生系 (OEC) を構成するPsbP タンパク質の3次元構造の決定とともに、個体レベルでのPsbPの必須性の解明に至っている。また、近年、注目の高いNAD (P)H 脱水素酵素複合体 (NDH) の構成因子を数多く単離同定し、電子伝達系の制御機構の解明と光合成機能の再構築の分子基盤構築に貢献した。

【イソキノリンアルカロイド (IQA) 生合成系】

高いベルベリン (Ber) 生合成活性を示すオウレン細胞を用いることにより、チロシンに由来するノルコクラウリンからBer に至る9段階のうち7段階の酵素遺伝子、さらには、関連する生合成系遺伝子の

新規な単離と同定を行い、IQA生合成系の解明に大きく貢献した。また、詳細は省略するが単離した生合成酵素、特にP450には特異的酵素が多く、反応機構に関して興味ある知見が得られた。

【IQA生合成系における代謝工学】

我々が単離した生合成酵素遺伝子は、IQA生合成系の量的・質的改変の技術基盤の構築に極めて有用であった。まず、RNAi法を用いた遺伝子機能の解析手法を確立し、IQA生合成系の包括的転写制御因子を単離した。さらに、6OMT がIQA生合成の律速酵素であることを実証するとともに、Ber生合成系のSMT遺伝子を導入することによりBer型アルカロイドを含む新規なIQAプロファイルをもつハナビシソウ細胞の創出に成功した。一方、RNAi法を用いた遺伝子発現抑制により、任意の中間体の蓄積の実証にも成功し、IQA生合成系の代謝工学の分子基盤、並びに二次代謝の可塑性を実証した。

【IQA生合成系の微生物細胞における再構築】

植物細胞工学/代謝工学の課題を解決するために、単離した生合成遺伝子を用いて、生育の早い微生物系における生合成系の再構築を行った。当初、ドーパミンを基質とした再構築であったが、現在、グルコースからの発酵的レチクリン合成を実証している。

【終わりに】

遺伝子組換え技術の発展は細胞工学の可能性をさらに広げている。今後も細胞から個体機能の開発を目指していきたい。

参考文献

Nakagawa et al. (2011) *Nat. Comm.* 2,
doi:10.1038/ncomms1327

【謝辞】

山田康之先生をはじめ、ご指導戴きました諸先生、本研究に共に携わった研究室の教員、卒業生、在校生、共同研究者の方々に厚くお礼申し上げます。

Tel: 075-753-6381, Fax: 075-753-6398,

e-mail: fsato@lif.kyoto-u.ac.jp

一般講演

講演要旨

イネ苗立枯細菌病原菌 *Burkholderia plantarii* の病原毒素 トロポロンの生合成関連遺伝子の探索と阻害剤の単離

1Aa1

(近畿大院・農・バイオ、*近畿大工・生化工、**NITE、***微化研)

○紀平 絵梨、岡本 尚、仲宗根 薫*、関根 光雄**、藤田 信之**、
波多野 和樹***、五十嵐 雅之***、内海 龍太郎

【緒言】

Burkholderia plantarii はイネへ感染し、イネ苗の立ち枯れ細菌病を引き起こす。本菌は植物毒素としてトロポロンとよばれる化合物を産生する。トロポロンは7員環の芳香族化合物で、三価の鉄とキレート化し赤褐色のトロポロン第二鉄錯塩を形成するといった特徴を有する。このことから、本菌が感染するとイネ内の鉄とトロポロンとが錯体を形成し、鉄が欠乏することでイネの発根、根の伸長・緑化が阻害され特徴的な病徴を発現すると考えられている。現在、日本の主要な農作物に対して甚大な影響を及ぼしているにも関わらず、病原性に関与する遺伝子やメカニズムの詳細は解明されていない。本研究では、*B. plantarii* の全ゲノム解析情報をもとに同定された二成分制御系のヒスチジンキナーゼ(HK) 遺伝子群(54 個)について、網羅的にそれらの遺伝子破壊株を作製し、それら破壊株のトロポロン産生と病原性に及ぼす影響を明らかにした。また、これらの遺伝子発現に対して、トロポロン産生抑制剤(MM326-95F4)が及ぼす効果についても研究を行なった。

【実験方法】

網羅的 HK 破壊株の作製とトロポロンの産生

標的とした HK の 3 分の 2 の領域のクローニングを行い、エレクトロポレーション法によって *B. plantarii* に導入した。相同組換えにより HK 破壊株が作製され、これらを鉄含有寒天培地に植菌し、コロニー内に形成される錯体の有無でトロポロン産生抑制株のスクリーニングを行なった。

MM326-95F4 の作用機構解析

B. plantarii を植菌した培地に、MM326-95F4

を添加し培養した。培養後、total RNA を抽出し cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR を用いて HK3 遺伝子の転写に対して MM326-95F4 が及ぼす影響を解析した。

【結果と考察】

網羅的な破壊株作製によって、36 の HK 破壊株が得られた。これらの破壊株について、鉄含有寒天培地に植菌し、トロポロン産生抑制株のスクリーニングを行なった。その結果、染色体 1 に存在する HK3 遺伝子の破壊株において、トロポロンの産生が検出されなかった。また、HK3 遺伝子に隣接する 2 つのレスポンスレギュレーター遺伝子(RR1 と RR2) の破壊株においても、同様にトロポロン産生の抑制が確認された。HK3 はアミノ酸残基 467 で、2 つの膜貫通領域を有する細胞膜タンパク質である。また、HK3 と対をなす RR1 と RR2 はそれぞれアミノ酸残基 225 と 227 の DNA 結合タンパク質で、これらの遺伝子はトロポロン産生制御遺伝子の発現制御に関与している新規な二成分制御系であることが示唆された。

トロポロンの産生に関わる HK3 遺伝子の転写発現に対して、MM326-95F4 の及ぼす影響について解析を行なった。その結果、MM326-95F4 の濃度依存的に HK3 の転写量が減少した。このことから、MM326-95F4 は HK3 の遺伝子発現に影響を及ぼし、トロポロンの産生を抑制していることが示唆された。

† Tel: 0742-43-7306, Fax: 0742-43-7306

e-mail: 1033690011t@nara.kindai.ac.jp

細菌ヒスチジinkinナーゼを標的とする新規抗生物質 signermycin B

1Aa2

(近畿大院・農・バイオ、*微化研、**阪大・産研) ○木野弘量、渡邊崇史、五十嵐雅之*、岡島俊英**、波多野和樹*、石井英治、江口陽子、内海龍太郎

【諸言】

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) といった、既知抗生物質が効果を示さない多剤耐性菌の出現が問題となっており、多剤耐性菌に有効な新規抗生物質の開発が必要となっている。

既知抗生物質とは異なる作用点を持つ新規抗生物質の開発を目指し、枯草菌や MRSA、VRE 等のグラム陽性菌に広く保存されている二成分制御系 WalK(ヒスチジinkinナーゼ, HK)/WalR(レスポンスレギュレーター, RR) に注目した。WalK/WalR は細胞壁代謝に関する遺伝子群を制御し、増殖、細胞分裂に必須である。WalK (HK) を標的とする新規抗生物質は MRSA や VRE にも効果を示すと考えられる。(1, 2)

本研究室で構築された HK 阻害剤の選択的単離法 (Ts 法) (3) を用いて放線菌から HK 阻害剤の探索を行った結果、signermycin B が得られた。本研究では signermycin B の WalK に対する阻害作用を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

WalK 阻害実験

4 種の WalK に種々の濃度の signermycin B を加え、30°C で 5 分間反応させ、ATP mix を加え 30°C で 10 分間反応させた後、SDS-PAGE を行い、FLA-7000 (FUJIFILM) を用いてバンドの強度を測定し、signermycin B の HK に対する 50% 阻害濃度 (IC50) を算出した。

WalK/WalR 制御下遺伝子発現解析

枯草菌 168 株を 37°C で培養し OD660 ≒ 0.3 で種々の濃度の signermycin B を添加し、添加 5 分後の菌液から RNA 抽出を行った。cDNA 合成後、リアルタイム PCR を用いて、枯草菌

WalK/WalR 制御遺伝子群 (*yocH*, *yvcE*, *yjeA*, *yoeB*) 遺伝子発現に及ぼす signermycin B の影響を調べた。

【結果と考察】

signermycin B の 4 種の WalK に対する IC50 は 37-62 μM であった。枯草菌、MRSA、VRE に対する最少生育阻止濃度 (MIC) は、3-6 μg/ml であった。また、signermycin B は *yocH*, *yvcE* 遺伝子の発現は抑制し、*yjeA*, *yoeB* の発現は促進した。これらの結果は、signermycin B が細菌細胞中で WalK に作用し、その増殖に必要な遺伝子発現を制御して、細菌を致死に至らす効果を示している。さらに、*in vitro* において、WalK のどの部位に signermycin B が作用して、HK 活性を阻害するかを調べるために、Biacore を用いた SPR 解析とグルタルアルデヒドを用いたクロスリンク実験に及ぼすシグナマイシンの効果を調べた。これらの結果は、signermycin B は WalK の二量体形成ドメインに作用し、HK 活性を阻害するモデルを強く示唆した。

引用文献

- 1) 岡本尚、江口陽子等、病原細菌に対する新しい薬剤標的一二成分情報伝達システム(2011)、日本薬学会誌
- 2) Gotoh Y. and Eguchi Y. *et al.*, *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 232-239 (2010).
- 3) Okada A. *et al.*, *Methods Enzymol.* **422**, 386-395 (2007).

*Tel : 0742-43-7306, Fax : 0742-43-7306
email : 1133690019h@nara.kindai.ac.jp

細菌増殖に必須なレスポンスレギュレーターWalRを標的にした新規抗菌剤の作用部位解析

(近畿大院農・バイオ, *阪大・産研)○平井有紀†, 土井章弘, 後藤恭宏, 岡島俊英*, 内海龍太郎

【緒言】

近年、様々な抗生物質に対して耐性を持つ多剤耐性菌の広がり、人類に生命の危機をもたらしており、新規抗菌剤の開発が必要となっている。そこで、新規抗菌剤の標的として、細菌の情報伝達システムである二成分制御系(TCS)に着目した(1, 2)。増殖に必須な TCS として WalK/WalR があり、この TCS は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRSA) 等の多剤耐性菌が含まれる低 G+C グラム陽性菌に広く保存されている。これまでの研究から WalR 阻害剤の選択的スクリーニング法により、WalR 阻害剤である walrycin B が得られた(3)。

本研究では、WalK/WalR のレスポンスレギュレーターである WalR を特異的に阻害する walrycin B の作用部位を解析することを目的とした。

【実験方法】

枯草菌、MRSA において、対数増殖期における、walrycin B の存在下での WalR 制御遺伝子群の転写量を、リアルタイム PCR 法により定量化することによって、WalR への阻害効果を調べた。また、WalR は、細胞壁代謝に関わる TCS であるため、walrycin B の添加による細胞増殖、分裂に及ぼす影響を検討した。さらに、walrycin B と WalR との詳細な作用機構を解明するため、WalR を用いて表面プラズモン共鳴法(SPR)による相互作用解析を行った。

【結果と考察】

定量的リアルタイム PCR の結果、黄色ブドウ球菌においては *isaA* や *ssaA*、枯草菌においては *yocH* や *yoeB*、*yjeA* などの WalR 制御遺伝子の発現においてのみ、walrycin B による転写制御阻害

が見られた。また、walrycin B による細胞形態への影響を検討した結果、walrycin B 添加の影響により、枯草菌では細胞のフィラメント化、黄色ブドウ球菌では細胞の凝集化が観察された。これは、細胞壁代謝を制御している WalK/WalR の機能を抑制した場合の表現型と一致している。また、SPR の結果、walrycin B は WalR と相互作用することが示され、WalR の二量体形成ドメインに作用することが示唆された(図 1)。

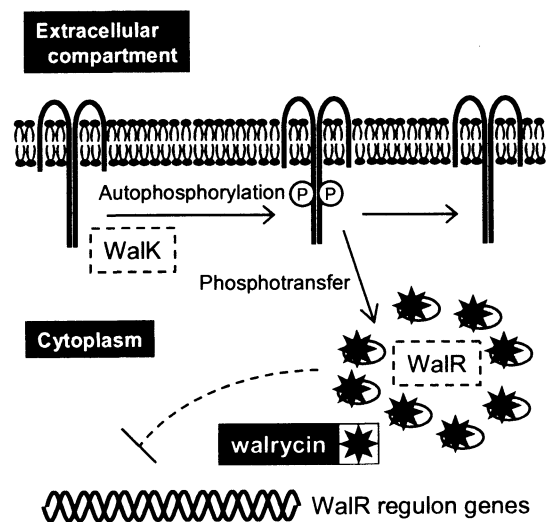


図.1 walrycin B の作用機構

引用文献

- 1) 岡本尚、江口陽子等, 日本薬学会誌, 病原細菌に対する新しい薬剤標的一二成分情報伝達システム(印刷中)
- 2) Gotoh Y. and Eguchi Y. *et al.*, *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 232-239 (2010).
- 3) Gotoh Y. *et al.*, *J. Antibiotics*, **63**, 127-134 (2010).

† Tel: 0742-43-7306, Fax: 0742-43-7306
e-mail: 1033690012p@nara.kindai.ac.jp

アスパラギン合成酵素阻害剤の創製

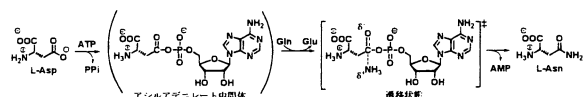
1Ba1

-急性リンパ性白血病の新規治療剤を目指して-

(京大化研、*フロリダ大学) ○池内 秀幸、Yong-Mo Ahn *、渡辺 文太、Nigel G. J. Richards *、平竹 潤

【諸言】

現在、急性リンパ性白血病 (ALL) に対する化学治療の第一選択肢にアスパラギナーゼ療法があり、血中 Asn 濃度を下げることによって腫瘍細胞の増殖を阻害する副作用の少ない化学治療法である。しかし、ヒトのアスパラギン合成酵素 (hAS) を高発現している腫瘍細胞に対しては効果が薄く、十数%の割合で再発を招く。その原因のひとつが、腫瘍細胞による hAS の高発現である。従って、hAS の特異的阻害剤は、アスパラギナーゼと併用することで ALL の治療効果を高め、再発の克服を可能にするばかりでなく、hAS を発現する他のがん種に対してもアスパラギナーゼ療法が適用できる。我々は、hAS の酵素反応の遷移状態に基づいて阻害剤 1 を開発した。本阻害剤は、*in vitro*



で強く阻害するが ($K_1^* = 2.5 \text{ nM}$)¹⁾、白血病細胞の増殖阻害活性は十分ではない ($IC_{50} = 1 \text{ mM}$)²⁾。一昨年度、1 のリン酸基をスルホンアミド基、スルファメート基に置換した化合物 2、3 を合成したが、その hAS 阻害活性は弱いものだった³⁾。これらの結果から、hAS の阻害剤にはリン酸基の負電荷が必須で、かつ、細胞透過性を上げる分子設計が必要である。そこで、今回、新たな hAS 阻害剤を合成し、有望な結果を得たので報告する。

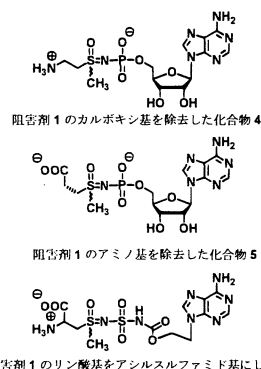
【実験方法】

阻害剤 1 のカルボキシ基やアミノ基を除去した化合物 4、5 を合成し、hAS に対する構造活性相関を調べた。また、細胞膜透過性を向上させるため、リン酸基のミミックとなり、かつ、リン酸

基の負電荷を除去した *N*-アシルスルファミド 6 を合成し、hAS に対してアッセイした。

【結果と考察】

化合物 4、5 の阻害結果より (4: $K_1^* = 7.6 \text{ nM}$; 5: $K_1^* = 141 \text{ nM}$)、hAS は、阻害剤のアミノ酸部位のアミノ基を強く認識しているが、カルボキシ基はあまり認識していないことが示唆された。化合物 4 は、分子内のアミノ基とリン酸基が zwitterion を形成しており、分子の電荷がゼロになるため、細胞膜透過性の向上が期待される。化合物 6 も優れた阻害結果を示し ($K_1^* = 42.6 \text{ nM}$)、リボース環を開環し、構造を大幅に変えてもこれほどの強い阻害活性があったことから、*N*-アシルスルファミド基はリン酸基のミミックとなることが示唆され、細胞膜透過性に優れた新たな構造として期待できる。最後に、化合物 4、5、6 の細胞レベルでの結果についても報告する。



- 1) Koizumi, M.; Hiratake, J.; Nakatu, T.; Kato, H.; Oda, J. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 5799-5800.
- 2) Gutierrez, J. A.; Pan Y.-X.; Koroniak, L.; Hiratake, J.; Kilberg, M. S.; Richards, N. G. *J. Chem. & Biol.* 2006, 13, 1339-1347.
- 3) Ikeuchi, H.; Hiratake, J.; Meyer, M. E.; Ding, Y.; Richards, N. G. *J. Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 6641 - 6650. Tel: 0774-38-3233, Fax: 0774-38-3229 e-mail: h.ikeuchi@hy5.ecs.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

エポラクタエン(**1a**)は海底土壌由来真菌 *Penicillium sp.* BM1689-P より単離された化合物で、ヒト神経芽腫細胞 SH-SY5Y 細胞に対して神経突起伸長作用や細胞周期阻害作用を有する。我々はエポキシラクトン由来のオキシラニルアニオンを利用したエポラクタエン及び誘導体の効率的な合成法を開発することに成功し、合成した化合物を用いて新規生物活性評価や作用機構解析などの生物学的研究を行った。エポラクタエンと標的タンパク質の結合様式を解析する目的で、エポラクタエンと 20 種類の天然アミノ酸とそれぞれ反応させたところ、エポラクタエンはシステインと特異的に反応することが分かった。この反応でシステインはシスチンに変換され、エポラクタエンは α -acyl- α,β -epoxy- γ -lactam 骨格を失いカルボン酸へと変換されることを見出した。我々は、この興味深いジスルフィド形成反応に興味を持ち、反応の詳細な解析を行うこととした。

【結果と考察】

1. エポラクタエン及び誘導体とシステイン誘導体との反応について

エポラクタエン及び誘導体 **1 (a-d)** とシステイン誘導体 **2** を 0.5 M NaHCO₃ : MeOH = 1 : 1 中で反応させ、誘導体の側鎖がジスルフィド形成に与える影響を検討した (Table 1)。その結果、側鎖に不飽和ケトンをもつ誘導体 **1a** 及び **1d** からは、良好な収率でジスルフィド **3** とカルボン酸 **4a** 及び **4d** が得られた (entry 1 and 5)。一方、飽和ケトン誘導体 **1b** と 1.2 当量の **2** との反応では化合物 **5b** が単一の生成物として得られ (entry 2)、**1b** と過剰量の **2** との反応からは **5b** と共に **3** と **4b** が得られた (entry 3)。また、**1c** の反応ではジスルフィド **3** とカルボン酸 **4c** と共に化合物 **5c** が得られた (entry 4)。

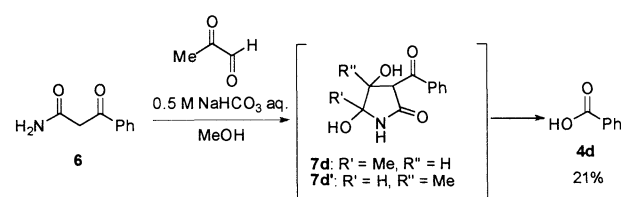
2. 反応機構解析

この反応におけるカルボン酸の生成機構を明らかにするため、側鎖にフェニル基を有する β -ケトアミド **6** とメチルグリオキサールとを 0.5 M NaHCO₃ : MeOH = 1 : 1 中で反応させたところ、安息香酸 **4d** が収率 21% で得られた。**4d** は、Knoevenagel 反応の中間体 **7d** もしくは **7d'** から *retro*-Claisen 反応により生成したと考えられる。この結果から推定した Scheme 2 に示す。まず化合物 **1** のエポキシドにチオールが付加し、**8** が生成する。ここで、もう一分子のチオール

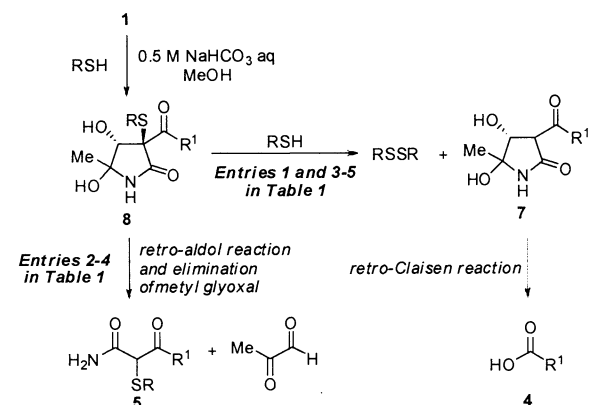
Table 1. Disulfide formation by epolactaene and its derivatives

Entry	Yield (%)				
	1	2 (eq)	3	4	5
1	1a	1.2	63	4a : 60	—
2	1b	1.2	—	—	5b : 82
3	1b	2	64	4b : 42	5b : 13
4	1c	1.3	48	4c : 29	5c : 25
5	1d	1.3	56	4d : 58	—

a: R¹ =
 b: R¹ = n-C₁₁H₂₃
 c: R¹ = n-C₆H₁₁
 d: R¹ = Ph

Scheme 1. Reaction of **6** with methylglyoxal

Scheme 2. Proposed reaction mechanism



が付加体 **8** の硫黄原子を攻撃すれば、ジスルフィドと中間体 **7** が生成する。また中間体 **7** は *retro*-Claisen 反応を受け、カルボン酸を与える。一方、付加体 **8** の *retro*-aldol 反応とメチルグリオキサールの脱離反応が進行すれば、化合物 **5** が生成する。

参考文献

1) Kuramochi, K. *et al. Biorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 4162.

[†]Tel & Fax: 075-703-5603

e-mail: kuramoch@kpu.ac.jp

【背景と目的】ユビキノンはほぼ全ての生物種に存在する生理活性分子であり、主に呼吸鎖酵素における電子伝達担体として機能している。一方、近年の研究から、呼吸鎖酵素以外にもユビキノンの酸化還元能を利用して生理活性を発揮するタンパク質が多数存在することが示唆されている。本研究では、生体におけるユビキノンの機能の詳細を明らかにすることを目指し、機能性ユビキノンプローブのデザイン合成を行い、光親和性標識実験により、ユビキノンに対し一定の親和性を持つタンパク質を網羅的に同定することを試みた。

【ユビキノンプローブのデザイン】光反応基のアジド基をユビキノン環へ、検出タグのビオチンを分子末端に導入した合計6種類のユビキノンプローブを合成し、その例を図1に示した。ウシ心筋垂ミトコンドリア粒子(SMP)を用いた活性測定の結果、合成したユビキノンプローブは天然型ユビキノンに遜色のない電子受容活性を保持することを確認した。

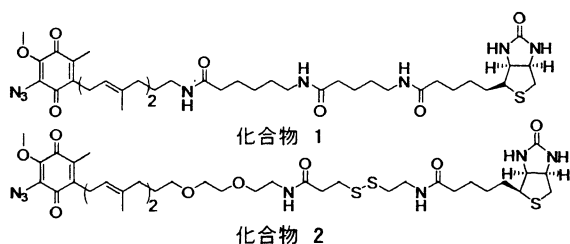


図1: 合成したユビキノンプローブの例。

【ユビキノン結合性タンパク質の捕捉】ウシ心筋SMPを実験材料として、化合物1を用いて光親和性標識実験を行い、特異的に標識を受ける複数のタンパク質をウエスタンブロットにより検出した。続いて、分子内にジスルフィド結合を有する化合物2を用いて固定化アビジンから標識されたタンパク質を特異的に精製/溶出し(アビジン沈降)、

SDS-PAGEのゲル上で複数の候補タンパク質のバンドを検出した(図2)。これらのバンドをMALDI-TOFMSに供した結果、呼吸鎖酵素のサブユニットに加えて、ADP/ATPキャリアー等のミトコンドリアに内在する複数の膜タンパク質が同定された。

一方、NADH-ユビキノン酸化還元酵素(複合体-I)は、ウシ心筋SMPに存在する代表的な呼吸鎖酵素である。複合体-Iのサブユニットについては、質量分析での検出には至らなかったが、特異的抗体を用いることで、ND1やPSSTサブユニットといったユビキノン結合部位を構成すると考えられているタンパク質を、上記のアビジン沈降物から特異的に検出することができた。

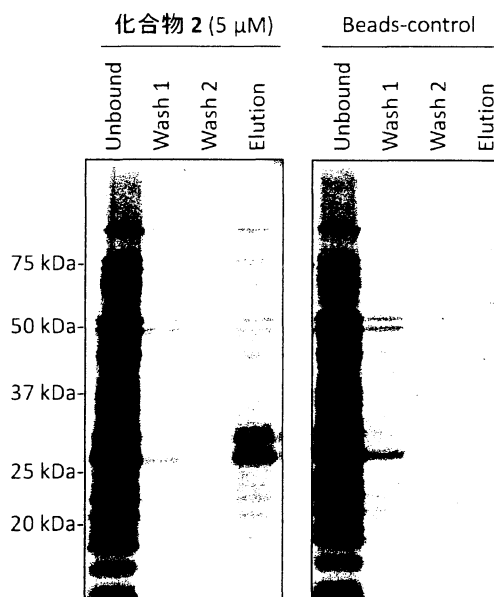


図2: 固定化アビジンを用いたユビキノン結合タンパク質の捕捉。

【まとめ】光反応性ユビキノンプローブをデザイン合成し、呼吸鎖酵素のサブユニットを含めた複数の膜タンパク質を特異的に捕捉・検出することに成功した。

Tel: 075-753-6406, Fax: 075-753-6406

E-mail: miyoshi@kais.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

代謝阻害剤は医薬、農薬として活用されているが、薬剤の処理を受けた生物では、さまざまな応答機構を活性化させて恒常性の維持を図ると考えられる。しかしながら薬剤による害と拮抗するためにどのような機構が誘導されるのかなどの詳細については不明な点が多い。そこで本研究では、真核生物のモデル生物である出芽酵母に代謝阻害剤を処理し、中心代謝経路に生じる変化を代謝プロファイル分析法を用いて解析した。

【実験方法】

出芽酵母実験室株(*Saccharomyces cerevisiae*, YPH499 株)を 96 穴ウェルプレート中、YPD (Yeast extract-Peptone-D-glucose)培地中で培養し(30°C、200 rpm)、濁度の上昇から増殖速度を検定するハイスループットな系を構築した。生育阻害活性の見られた代謝阻害剤について、500 mL の YPD 培地中で浸とう培養を行い、代謝物プロファイルの経時的な比較を行った。酵母菌体はフィルターでろ集後、クロロホルム—メタノール—水法をもちいて、代謝物を抽出した。代謝物プロファイル分析は、糖リン酸、 α ケト酸、補酵素については液体クロマトグラフィー—タンデム四重極型質量分析計の MRM モードで行い、(LC-MS/MS, Agilent 6460)、有機酸、アミノ酸、糖については、GC-MS を用いたメタボローム分析法に従って実施した。

【結果と考察】

3 種の代謝阻害剤、エコナゾール (ステロール生合成阻害)、グリホサート (芳香族アミノ酸生合成阻害)、メナジオン (TCA サイクル阻害) について、96 穴プレートを用いたアッセイ法で培養開始 18 時間後の生育阻害活性を調べたところ、エコナゾール、メナジオンは強い活性を示した。50%生育阻止濃度 pIC_{50} はエコナゾール、メナジオンでそれぞれ 6.1, 4.3 だっ

た。一方、グリホサートは全く活性を示さなかった。その原因は今のところ不明である。活性の見られたエコナゾール、メナジオンについてフラスコスケールでの培養を行い、培養開始 16 時間後に薬剤を投与した。投与後、0, 2, 4, 7, 24 時間後に菌体を回収し、代謝物プロファイル分析を行った。分析の結果、40 以上の中心代謝関連化合物を同時に定量できた。

エコナゾール処理後の代謝物プロファイルをコントロールと比較したところ、大きな変化が見られず、静菌的な作用が起きていると推測された。一方、メナジオン処理区では、TCA サイクルの中間体である、クエン酸の増加と、フマル酸、リンゴ酸、コハク酸の減少が起きた。これはメナジオンのターゲットであるアコニターゼの阻害を反映したものであると考えられた。また、メナジオン処理区ではペントースリン酸経路の中間体の含量が著しく増加していた。これは、メナジオン処理により生じた酸化還元バランスの変化に対抗するために、酵母代謝経路中では、酸化的リン酸化経路を活性化して、NADPH の再生を行っていると考えられた。

Tel & Fax: 078-803-6462

Email: fmatsuda@ruby.kobe-u.ac.jp

1Ca1

AMV 逆転写酵素 α β ヘテロダイマーと α サブユニットの安定性の比較

(京大院農) 小西篤, 根本大資, ○保川清[†], 井上國世

【目的】

トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, AMV RT) は cDNA 合成に広く用いられている。AMV RT は 63 kDa の α サブユニットと 95 kDa の β サブユニットからなる。 α サブユニットは fingers, palm, thumb, connection, RNase H の 5 個の領域からなる。 β サブユニットはこの 5 個の領域と integrase 領域からなる。本研究では, AMV RT の熱安定性における α サブユニットと β サブユニットの相互作用の役割を解析した。

【方法】

AMV RT

α β ヘテロダイマーは AMV から精製された市販品を購入した (Life Sciences Advanced Technologies, St. Petersburg, FL)。 α サブユニットは昆虫細胞で発現させ, 細胞から精製した。

熱安定性の評価

α β ヘテロダイマーあるいは α サブユニット (100 nM) を 10 mM potassium phosphate, 2.0 mM DTT, 0.2% Triton X-100, 10% glycerol, pH 7.6 中で, 28 μ M poly(rA)•p(dT)₁₅ (鋳型プライマー, template primer, T/P) (濃度は p(dT)₁₅ のモル換算) 存在下あるいは非存在下で, 44~52°C で一定時間熱処理した。その後, 逆転写反応を 10 nM RT, 25 μ M poly(rA)-p(dT)₁₅, 0.4 mM [³H]-dTTP, 37°C で行い, 経時的に反応液を採取し, 酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。

熱失活の速度解析には式 1 を適用した。

$$\ln B = A - k_{\text{obs}} t \quad (1)$$

ここで, A は積分定数 (=4.6), B は熱処理前の活性を 100% としたときの相対活性 (%), k_{obs} は一次の熱失活速度定数 (s^{-1}), t は時間 (s) を表す。

【結果と考察】

α β ヘテロダイマーと α サブユニットは, T/P 非存在下と存在下のいずれにおいても, すべての温度で一次の熱失活曲線を示した。アレニウスプロットを

図 1 に示す。 α β ヘテロダイマーでは, 10 分間の熱処理で活性を熱処理前の 50% に低下させる温度 (T_{50}) は T/P 非存在下存在下でそれぞれ 48°C, 51°C であった。 α サブユニットでは, T_{50} は T/P 非存在下存在下ともに 45~46°C であった。

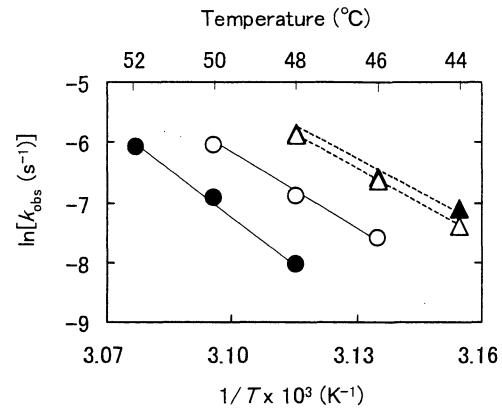


図 1 アレニウスプロット

- : α β ヘテロダイマー, T/P 非存在下,
●: α β ヘテロダイマー, T/P 存在下,
△: α サブユニット, T/P 非存在下,
▲: α サブユニット, T/P 存在下。

【結論】

α サブユニットは α β ヘテロダイマーよりも熱安定性が低かった。また, α サブユニットは α β ヘテロダイマーと異なり, 鋳型プライマーにより安定化されなかった。これらの結果は, α サブユニットと β サブユニット間の相互作用が AMV RT の安定性に重要であることを示唆する。

引用文献

- 1) A. Konishi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1618-1620

[†]Tel: 075-753-6267, Fax: 075-753-6265

e-mail: yasukawa@kais.kyoto-u.ac.jp

D-Fructose Dehydrogenase における heme c の有無による電極応答変化

(*京大院農, **山大院農) ○河井翔太*, 合田真衣子*, 薬師寿治**, 松下一信**, 白井理*, 加納健司*

【緒言】

Gluconobacter sp.由来の D-フルクトースデヒドロゲナーゼ(FDH)は FAD と heme c を有するヘテロリマーの膜結合酸化還元酵素であり, 生体内では D-フルクトースの酸化反応を触媒する. 本酵素は電極との直接電子移動(DET)反応を行うことができ, 他の酵素と比べその反応性も高い[1]. そのためバイオ電池やバイオセンサへの応用としても世界から注目されているが, 電極との反応メカニズムの詳細は未だ不明である. 本研究ではFDHのDET反応解明の一環としてFDHの wild 型と膜結合サブユニットの欠損体(Δc FDH)を発現させ, それらの生物電気化学的特性から電子移動特性を支配する因子を考察することを目的とした.

【実験方法】

FDHをクローニングし *Gluconobacter oxydans* にて発現系を構築した. また Δc FDHはfusion PCRによって発現系を構築した. 酵素濃度, 活性はそれぞれheme cまたはFADの吸光係数, Prussian blueによる吸光度の変化を測定することで求めた[2]. 電気化学測定には作用電極としてグラッシーカーボン(GC)電極, 参照電極として銀/塩化銀, 対極として白金を用い, MacIlvain 緩衝液中にて掃引速度5 mVs⁻¹で行った.

【結果と考察】

DNA配列より, Native型は開始コドンがTTGである可能性が示唆されたため, これをATGとした改変型で発現したところ, 膜画分での比活性の大幅な上昇が観測された. heme c由来と思われる膜画分の赤さも上昇していたことから比活性の上昇は発現量が増えたためと結論した. また改変した遺伝子領域はシグナル配列であると予測されFDHの構造に影響はないと推測された.

FDH精製後サイクリックボルタンメトリー(CV)を行ったところFDHのDET反応が観察された(Fig.1). 触媒電流が増加し始める電位から判断すると電極とDET反応を行っているのはheme cであると考えた. そこでheme cを有するサブユニットを欠損させたFDH変異種(Δc FDH)を構築したところ, 可溶性画分にて酵素活性を有する Δc FDHの発現に初めて成功した. CV測定の結果, 予想通り, DET反応には, heme c含有サブユニットが必須であることを明らかにした.

【結言】

FDHのDET反応においてheme cが重要な役割を担っていることが示唆された.

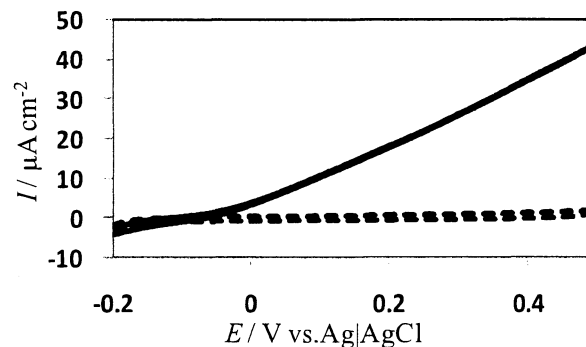


Fig.1 FDHの触媒電流
実線:FDHあり,破線:FDHなし

引用文献

- [1] Y. Kamitaka, S. Tsujimura, N. Setoyama, K. Kano, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **9**, 1793-1801(2007).
- [2] M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, O. Adachi, *J. Bacteriol.*, **145**, 814-823 (1981).

Tel: 075-753-6393, Fax: 075-753-6456

e-mail: tensho44@kais.kyoto-u.ac.jp

1Ca3

かつお節のかび付けに使用される *Aspergillus glaucus* MA0196 由来アスパルティックプロテアーゼの精製と特性解析 (神戸大院農, *マルトモ (株), **相模女子大栄養) ○竹中 慎治[†], 深見 高志, 吉田 健一, 小山 大*, 土居 幹治*, 青木 健次**

【緒言】

我々は、かび付けによる色相変化の機構を明らかにすることを目的とし、かび付けに用いられる *Aspergillus repens* MK82 の生成する脱色因子の特性解析を行ってきた。その結果、MK82 株の生産するアスパルティックプロテアーゼが脱色因子の一つであることを見出し、その特性を報告した^{1, 2)}。かつお節製造における「かび付け」工程では、複数種の *Aspergillus* 属のカビが使用される。そこで、発酵中の枯れ節から分離されたカビにおけるプロテアーゼの生産特性や性質を比較した結果、*A. glaucus* MA0196 由来プロテアーゼは、MK82 株由来プロテアーゼとは異なる酵素化学的性質を有することを見出したので、その精製と性質を報告する。

【実験方法】

試験菌株

マルトモ (株) より分譲された *A. repens* MA0198、MA0201、MA0301 の 3 株と *A. glaucus* MK82、MA0196、MA0202 の 3 株を用いた。

培養

MY20 培地¹⁾ を用いて試験菌株を 30℃ で 3 から 15 日間振とう培養した。

酵素活性測定

プロテアーゼ活性には、ヘモグロビン (酸性条件下) またはカゼイン (中性条件下) を基質として用いた。脱色活性には、ヘモグロビンまたはミオグロビンを基質として用い、既報の方法に従って基質由来の吸光度の減少を測定した。¹⁾

【結果と考察】

A. glaucus MA0196 および MA0202 由来培養上清は、酸性および中性条件下でプロテアーゼ活性を示した。酸性条件下で高活性を示す MA0196 株

由来プロテアーゼについてイオン交換およびゲルろ過カラムクロマトグラフィーにより精製した。精製酵素は MK82 株由来プロテアーゼと同じくミオグロビンおよびヘモグロビン溶液を脱色した。MA0196 由来プロテアーゼは、ゲルろ過法で分子量 243,000 であることがわかった。また、PAS 染色から糖タンパク質であることが明らかとなった。同酵素を TFMS 処理し、SDS-PAGE に供したところ、分子量は 46,000 であった。本酵素は pH 2.0 で最大活性を示し、pH 3.0~6.0 の範囲で安定であった。また、40℃において最大活性を示し、40℃まで安定であった。プロテアーゼ阻害剤の中で Pepstatin A により顕著な阻害が見られた。活性に与える pH の影響、pH 安定性、阻害剤の影響試験結果等を参考に、本酵素はアスパルティックプロテアーゼ属すると思われる。現在、MA0196 由来プロテアーゼの性質について MK82 株由来プロテアーゼや市販の類縁酵素と比較しながら特性解析を進めている。

【結言】

かび付け工程に用いられる *Aspergillus* 属のカビについて、かつお肉の色相の変化に関わるプロテアーゼを検索した。MA0196 株由来プロテアーゼは多量の糖鎖を有するなど既報の MK82 株由来プロテアーゼとは異なっていた。

引用文献

- 1) 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集 (p. 115)。
- 2) 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 (p. 313)。

[†]Tel: 078-803-5893, Fax: 078-803-5893
e-mail: hakko3@kobe-u.ac.jp

出芽酵母 NADH キナーゼ Pos5 が NADH と NAD⁺ を識別する構造要因

(京大院農) ○大橋一登, 河井重幸, 村田幸作†

【背景】 NAD キナーゼ (NADK) は NAD⁺ のリン酸化による NADP⁺ 合成反応を触媒する。一方, NADH キナーゼ (NADHK) は NADH のリン酸化による NADPH 合成反応を触媒する。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のミトコンドリアに局在する Pos5 は, NADK 活性よりも強い NADHK 活性を示すため, NADHK とみなされている。本研究では, Pos5 が NADH と NAD⁺ を識別し, 強い NADHK 活性を示す構造要因の特定を試みた¹⁾。

【方法・結果】 X 線結晶構造解析により, Pos5 と NADH の複合体の立体構造を分解能 2.0 Å で決定した。Pos5 とヒト NADK (HsNADK) 及び結核菌 NADK (Ppnk) の立体構造を比較したところ, NADH と相互作用する Pos5 のアミノ酸残基の多くは, HsNADK と Ppnk において保存されていた。しかし, Pos5 の Arg-293 は, HsNADK と Ppnk において保存されておらず, それぞれ His-351 と His-226 に相当した。次に表面電荷に着目したところ, Pos5 の NADH 結合部位の表面は正に荷電していたが, HsNADK 及び Ppnk の NAD⁺ 結合部位の表面は負に荷電していた。Arg 残基と His 残基の p*K_a* は各々 12 と 6 であることなどから, Pos5 の Arg-293 が Pos5 の NADH 結合部位表面の正電荷に寄与すると考えられた。これらの知見から, Pos5 の Arg-293 が探索している構造要因の一つと推察された。

そこで, Pos5 の Arg-293 の機能を確かめるため, Pos5 の Arg-293 を His 残基へと置換した Pos5 R293H の機能解析を行った。本置換により, NADK 活性は 0.7 U/mg から 1.7 U/mg へと増大したのに対し, NADHK 活性は 6.0 U/mg から 3.6 U/mg へと減少した (表 1)。また, 置換により, NAD⁺ に対する *K_m* は 4.5 mM (Pos5) から 1.3 mM (Pos5 R293H) へと減少し, NAD⁺ への親和性は高くなった。つまり, Pos5 の Arg-293 は Pos5 の NAD⁺ への低い親和性に寄与すると考えられた。さらに, NADH に対する *k_{cat}* は 16.1 s⁻¹ (Pos5) から 7.7 s⁻¹ (Pos5 R293H) へと減少した。これは, Pos5 の Arg-293 が Pos5 の強い NADHK 活性に寄与することを示した。以上の結果より, Pos5 の Arg-293 は, NADH と NAD⁺ を識別し, 強い NADHK 活性を示す構造要因の一つと考えられた。また, Pos5 は, NADH 結合部位表面の正電荷により, NADH と正に荷電した NAD⁺ とを識別していると推測された。

次に, Pos5 の Arg-293 に相当する HsNADK の His-351 を Arg 残基に置換し, HsNADK への高い NADHK 活性の付与を試みたが, NADK 及び NADHK 活性は共に失われた (表 1)。この原因として, Pos5 では Arg-293 の側鎖は他のアミノ酸残基と

の相互作用により正しい配向をとるのに対し, HsNADK では His-351 と置換した Arg 残基の側鎖が正しい配向をとれていない可能性が考えられた。そこで, Pos5 の Arg-293 と相互作用するアミノ酸残基に着目し (図 1), Pos5 と HsNADK の立体構造を比較した。その結果, Pos5 の Ser-272 (HsNADK の Ala-330 に相当) が Arg-293 の側鎖の配向を助ける残基と推測された。そこで, HsNADK H351R の Ala-330 を Ser 残基に置換したところ, HsNADK H351R A330S では, NADK 及び NADHK 活性は共に回復した (表 1)。両活性は, HsNADK のそれらと比べて低下していたが, NADK 活性に対する NADHK 活性の比 (NADHK/NADK) は両残基の置換により, 0.043 から 1.39 へと約 32 倍に増加した (表 1)。つまり, HsNADK の His-351 と Ala-330 を Arg 残基と Ser 残基にそれぞれ置換することにより, HsNADK に NADK 活性よりも強い NADHK 活性が付与された。この結果は, Pos5 の Arg-293 の重要性をさらに裏付けるとともに, Pos5 では Ser-272 が Arg-293 の側鎖の正しい配向に寄与することを強く示唆した。

表 1. NADK 及び NADHK 活性

	NADK (U/mg)	NADHK (U/mg)	NADHK/ NADK
Pos5	0.7	6.0	8.6
Pos5 R293H	1.7	3.6	2.1
HsNADK	14	0.6	0.043
HsNADK H351R	nd ^a	nd ^a	-
HsNADK H351R A330S	0.00192	0.00266	1.39

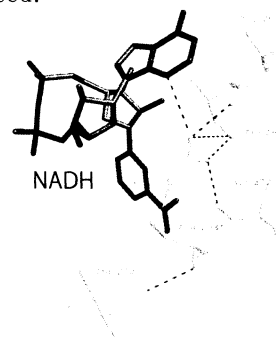
^anot detected.

図 1. Pos5 の NADH 結合部位の Arg-293 と相互作用するアミノ酸残基。

引用文献

1) *J. Biol. Chem.*, 286(34), 29984-29992 (2011)

†Tel: 0774-38-3766, Fax: 0774-38-3767

e-mail: kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

【諸言】

工業的な乾燥パスタの製造工程では、主に高品質な製品を生産するため、温度、湿度および時間等の乾燥条件が段階的に変化されるが、これらの条件は経験的な知見に基づき決められている。品質の向上と製造効率の改善を図るには、乾燥条件を合理的に決定できることが望まれる。そこで本研究では、品質を著しく低下させるクラックの原因となる乾燥時の力学的挙動の把握を目的に、収縮（収縮係数）と引張応力（ヤング率）を測定した。

【実験方法】

パスタの作製

デュラムセモリナ（日清フーズ、東京）に加水、混練後、減圧しながら電動式パスタマシン（Magica, Bottene, Italy）で押し出し、平板状（50×20×1.5 mm (W×D×H)）または円柱状（Φ = 3.6 mm）パスタを作製した。その後、50°C、40%RH または 80%RH の雰囲気中で任意の含水率まで乾燥させたサンプル、および 50°C、80%RH の雰囲気中で任意の含水率まで乾燥後、サンプル内の水分分布を均一としたサンプルを作製し（以後、それぞれ 40%RH サンプル、80%RH サンプル、平衡化サンプルと略記）、収縮および引張応力の測定に供した。なお、すべてのサンプルの含水率は、乾燥減量法（135°C、5 時間乾燥）により算出した。

収縮および引張応力の測定

収縮歪みは、式 (1) で表し、長さはノギスで測定した。

$$\varepsilon = (L_1 - L_2) / L_1 \quad (1)$$

ここで、 ε は収縮歪み[-]、 L_1 は乾燥前の長さ[m]、 L_2 は乾燥後の長さ[m]を表す。

引張応力は、レオメータ（RE2-33005S、山電、東京）で測定した（引張速度：0.5 mm/s）。

【結果と考察】

各方向の収縮係数を表 1 に、ヤング率の含水率依存性を図 1 に示す。40%RH サンプル、80%RH サンプルおよび平衡化サンプルのすべてのサンプルについて、各方向の収縮係数はわずかではあるが異なっており、収縮に異方性が見られた。これは、成形時に各方向で押し出し圧力が異なるためであると考えられる。また、パスタがガラス転移すると、含水率が低下してもヤング率はほとんど変わらず一定となった。

40%RH サンプルおよび 80%RH サンプルは、表面に近いほど含水率が低く、40%RH サンプルの方が、表面と中心の含水率の差が大きい。このようなサンプル内の水分分布の不均一性が大きいほど収縮係数は小さくなったが、ヤング率は不均一性の影響をほとんど受けなかった。急速に含水率が低下して硬化した表面は、収縮を妨害するが、引張に対するサンプル全体の強度には支配的な要因とならないことが示された。

表 1 各方向の収縮係数

Shape	Direction	Shrinkage coefficient		
		40%RH	80%RH	Equilibrated
Sheet	Width	0.13	0.20	0.29
	Depth	0.12	0.21	0.26
	Height	1.04	1.14	—
Cylinder	Length	—	0.23	—
	Diameter	—	0.21	—

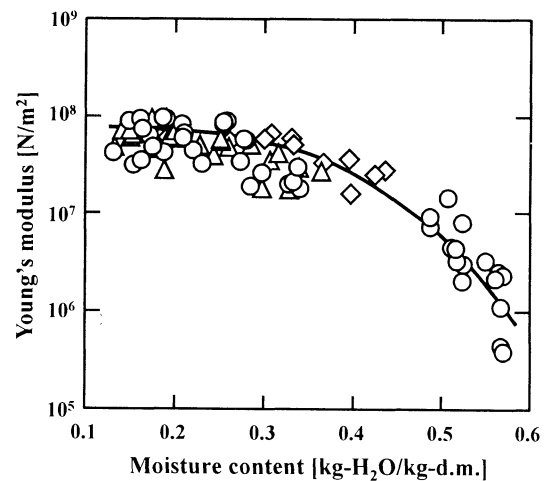


図 1 ヤング率の含水率依存性;◇:40%RH サンプル, △:80%RH サンプル, ○:平衡化サンプル。

【結言】

成形時の押し出し方向により圧力が異なるため、異方的に収縮したと考えられる。急速に含水率が低下して硬化した表面は、収縮を妨害するが、引張に対するサンプル全体の強度には支配的な要因とならないことが示唆された。

謝辞

本研究は「京都大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」により実施した。

†Tel:075-753-6286 FAX:075-753-6285
E-mail:adachi@kais.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

工業的な乾燥パスタの製造において、乾燥工程はもっとも時間とエネルギーを要する工程である。製造効率の向上には、乾燥工程の温度、湿度および時間などの操作条件の合理的な最適化が必要である。そこで本研究では、パスタの主原料である小麦ドウの熱分析に基づいて、乾燥過程の速度論的な知見の深化を図ることを目的として、小麦ドウの熱重量測定 (TGA) および示差走査熱量測定 (DSC) を行った。

【実験方法】

ドウの作製 デュラムセモリナ (日清フーズ, 東京) に湿量基準で 30%の水を加え、5 分間混練した。その後、所定量を各種熱分析装置の開放型専用セルに入れ、3.82 MPa の印加圧で平板状の試料を調製した。

熱分析 熱重量分析 (TGA-50, 島津, 京都) は、等温 (30, 50, 70, 90°C) または定速昇温 (0.4 ~ 5.0°C/min) の条件で測定した。測定部の湿度は窒素を流すことより 0%RH に調節した。また、示差走査熱量測定 (DSC-50, 島津) は、TGA と同様の定速昇温の条件下で行った。標準物質には Al_2O_3 を用いた。

乾燥過程の速度解析

湿度が 0%RH の条件における乾燥速度は、推進力は平衡含水率への未到達度 $Y (= w/w_0 : w$ は含水率 [kg-H₂O/kg-d.m.], w_0 は初期含水率 [kg-H₂O/kg-d.m.]) のみの関数で表されるとした式(1)で表現できると仮定した。比例定数である物質移動係数 k [1/(m²·s)] の温度依存性を式(2)のアレニウス式で表現すると、式(3)の関係が得られる。

$$-dY/dt = kf(Y) \quad (1)$$

$$k = k_0 \exp(-E/RT) \quad (2)$$

$$\ln(-dY/dt) = -E/RT + \ln[k_0 f(Y)] \quad (3)$$

ここで、 t は時間[s], T は絶対温度[K], k_0 は頻度因子[1/m²·s], R は気体定数[J/mol·K], E は活性化エネルギー[J/mol]である。

【結果と考察】

TGA で得られた乾燥過程から乾燥特性曲線を得た。含水率が約 0.15 kg-H₂O/kg-d.m.を下回ると乾燥速度は急激に低下した。また DSC では、含水率が 0.10~0.20 kg-H₂O/kg-d.m.で吸熱ピークが

認められた。乾燥速度が急激に低下する温度および吸熱ピークの温度は、デュラムセモリナのガラス転移温度¹⁾とほぼ一致し (図 1), ドウのガラス転移が乾燥挙動に大きな影響を及ぼすことが示唆された。パスタは含水率を約 0.11 kg-H₂O/kg-d.m.まで乾燥するため、速度の観点からは 80°C以上での乾燥が望ましいことが示された。

また、異なる昇温速度で得られた乾燥曲線について、所定の平衡未到達度 Y における温度 T と乾燥速度 $-dY/dt$ を求め、それらを式(3)に従って片対数プロットすると直線が得られ、勾配と切片からその Y における E と $k_0 f(Y)$ が得られた。例を図 2 に示す。

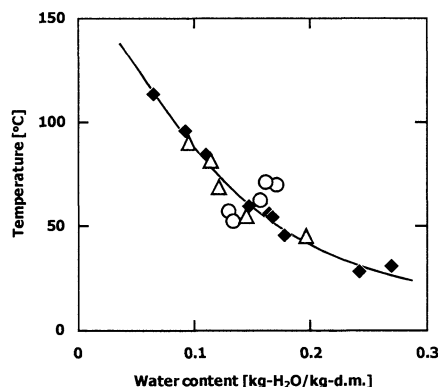


図 1 ガラス転移温度との関係

○ : 乾燥特性曲線の変曲点, △ : DSC の吸熱ピーク, ◆ : デュラムセモリナのガラス転移温度¹⁾.

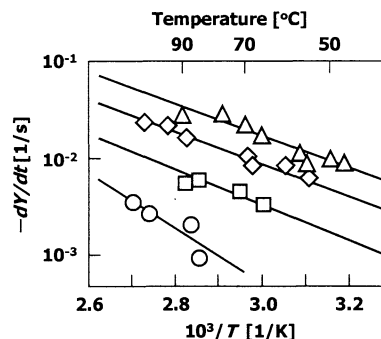


図 2 見かけの活性化エネルギーの算出。Y=(△) 0.7, (◇) 0.5, (□) 0.3, (○) 0.2.

引用文献

1) B. Cuq *et al.*, *J. Cereal Sci.*, **33**, 213-221 (2001).
謝辞 本研究は、「京都大学・日清製粉グループ穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した。

†Tel: 075-753-6286, Fax: 075-753-6285

e-mail: adachi@kais.kyoto-u.ac.jp

パスタの乾燥時に発生するクラックの デジタル画像処理による定量化

(京大院農) ○小川剛伸, 小林敬, 安達修二†

【緒言】乾燥パスタは、クラックが発生すると商品価値が著しく低下するため、製造および保存の際にクラックを防止することは重要である。クラックの発生機構は未解明な部分が多いものの、応力-ひずみ方程式（構成式）に基づき、クラックの発生を予測する試みが行われている。しかし、クラックの確認は目視により判別されており、計算によるクラックの予測の実験的な検証には精度が不十分である。そこで本研究では、クラックを定量的に検出する方法の開発を目的とした。

【実験方法】パスタ試料の背面から光を当て、透過光をデジタルカメラで撮影し、この画像を数値化することでクラックを定量化した。クラックを検出するための画像処理法には二値化法やエッジ検出法等があり、米や卵のひび割れの検出に適用されている。しかし、ブロンズダイスを用いて製造した伝統的なパスタは表面がザラザラであり、また、パスタの内部には小麦粉特有の斑点が見られ、これらの画像処理法が適用できない。そこで、画像の濃淡ヒストグラムから複数のパラメータを算出し、これらの値を組み合わせることで、クラックを定量化する方法を考案した。パラメータには、平均（MEN）、コントラスト（CNT）、分散（VAR）、エネルギー（EGY）、エントロピー（EPY）、歪度（SKEW）および尖度（KURT）の7つを用いた。

【結果と考察】ブロンズダイスで作製した正常な試料（B1）、クラックが発生した試料（B2）、パスタの工業的な製造で広く用いられているテフロンダイスで作製した正常な試料（T1）、正常ではあるが斑点が見られる試料（T2）およびクラックが発生した試料（T3）を本測定に供した。全試料の青色の濃淡ヒストグラムおよび濃淡ヒストグラムから算出した各種パラメータをそれぞれ図1および表1に示す。ブロンズダイスで作製した試料（B1、B2）については、クラックと表面のザラザラを識別し、クラックのみを検出する必要がある。クラックが発生するとCNTおよびKURTが顕著に小さな値になった。一方、テフロンダイスで作製した試料（T1～T3）につい

ては、クラックと斑点を識別し、クラックの発生したT3のみを検出する必要がある。ブロンズダイスで作製した試料とは異なり、テフロンダイスで作製した試料に発生したクラックのみをCNTで識別することはできなかった。T1のSKEWおよびKURTに比べ、T2のそれらは大きな値になるが、T3のそれらは逆に小さな値になった。これらのことより、テフロンダイスで作製した試料に発生したクラックの検出にはSKEWおよびKURTが有効であることが示された。

【結言】正常な試料の濃淡ヒストグラムを基に、複数のパラメータの閾値を予め設定しておくことで、パスタ特有の表面のザラザラや斑点を識別し、クラックのみを定量的に検出できることを明らかにした。

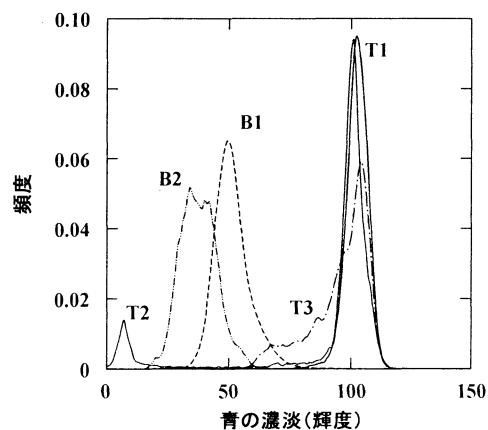


図1 青色の濃淡ヒストグラム
--- : B1, ... : B2, — : T1, - · - : T2, - - - : T3.

表1 青色の濃淡ヒストグラムの各種パラメータ

	B1	B2	T1	T2	T3
MEN	51	38	102	91	96
CNT	2.7×10^3	1.5×10^3	1.1×10^4	9.0×10^3	9.3×10^3
VAR	58	56	22	780	141
EGY	4.2×10^{-2}	3.8×10^{-2}	6.5×10^{-2}	5.1×10^{-2}	3.2×10^{-2}
EPY	1.47	1.48	1.27	1.49	1.60
SKEW	3.65	3.11	4.08	4.43	3.06
KURT	15.7	11.3	19.0	23.0	12.2

謝辞 本研究は「京都大学・日清製粉グループ 穀物科学コンソーシアム」の一部として実施した。

†Tel: 075-753-6286, Fax: 075-753-6285
e-mail: adachi@kais.kyoto-u.ac.jp

粒子径の異なる米粉ペーストの加熱による物性変化

1Da4

○下間 早織*、松宮 健太郎*、奥野 勇樹*、南部 優子*、岡留 博司**

Md. Sharif Hossen**, 松村 康生*

*京大院・農、** (独) 食総研

【目的】

近年、製粉技術の向上により、従来の米粉（数 100 μm ）よりも微粒子化した米粉（数 10 μm ）が生産可能になった。米粉のような固体粒子は、粒子径の違いによりその物理化学的性質が変化し、それに伴い、含まれるデンプンの糊化・老化挙動が影響を受ける可能性が高い。本研究では、粒子径の異なる米粉を用いてペーストを作製し、その加熱後の物性が粒子径の違いによりどのように変化するか明らかにすることを目的とした。また、それぞれの米粉ペーストのデンプンの老化挙動を観察するとともに、デンプン修飾酵素の添加により、老化抑制が可能なのか検討した。

【方法】

コシヒカリ精白米（平成 19 年度茨城県産）を 2 種類の製粉機を用いて粉碎し、米粉を調製した。各米粉の粒子径、損傷デンプン率を測定するとともに、SEM で微細構造を観察した。また、米粉ペーストは米粉と純水を 1:1 で混合して作製した。作製したペーストに酵素を添加あるいは添加しないで加熱し、作製後すぐおよび 1 日後、3 日後にテクスチャプロファイル分析、伸展性測定、動的粘弾性測定を行った。さらに、DSC 測定により、酵素添加、無添加の米粉ペーストの糊化温度および 7 日後の再糊化温度を測定した。

【結果および考察】

各米粉の調製に用いた製粉機および平均粒子径を表 1 に示す。SEM において、S3 は S1 よ

表 1. 各米粉の平均粒子径

サンプル名	S1	S3
平均粒子径 (μm)	107.4	15.3
製粉機	ハンマーミル	ジェットミル

りも小さい粒子が観察された。損傷デンプン率測定の結果、S3 は S1 よりも値が高くなり、製粉時の物理的ストレスが影響していると考えられた。テクスチャプロファイル分析により、S3 ペーストは S1 ペーストよりも柔らかいことが明らかになった。酵素無添加のものでは、時間の経過とともに硬さの値が上昇し、付着性の値が低下したため、デンプンの老化が進んだことが示唆された。酵素添加したものではこれらの変化が抑制された。動的粘弾性測定において、保存時間の短い場合、S3 ペーストの方が S1 ペーストに比べて低周波数領域での弾性率の周波数依存性が顕著になった。酵素処理により、S3 だけでなく S1 ペーストにおいても、また長時間保存しても、低周波数領域での顕著な弾性率の周波数依存性が観察された。DSC 測定において、S3 ペーストの糊化エンタルピーは、S1 ペーストよりも小さかった。酵素添加ペーストの再糊化エンタルピーは、酵素無添加ペーストに比べて小さくなったことから、酵素処理により米粉ペーストの老化が抑制されることが示された。

Tel : 0774-38-3747

Fax : 0774-38-3746

E-mail : ssaori@kais.kyoto-u.ac.jp

腸間膜リンパ節の T 細胞活性化機能に及ぼす ストレスタンパク質の影響

1Ea1

(*京大院・農・食品生物, **京大院・地球環境, #ノートルダム清心女大・食品栄養, \$京都大) ○橋本恵以*†, 梶田哲哉***, 北島直文#\$, 谷史人* **

【緒言】

ストレスタンパク質(Heat shock protein: HSP)は、進化的に広く生物に保存されているタンパク質である。近年、HSP を粘膜に免疫することにより、動脈硬化や関節炎等を改善できる可能性が示唆されてきた。我々は、微生物由来 HSP である GroEL が、腸間膜リンパ節(Mesenteric Lymph Nodes; MLNs)の naive T 細胞を制御性 T 細胞(regulatory T cells; Tregs)へと産生誘導することを見出したが、炎症誘発性のエフェクター T 細胞に対する HSP の作用については不明な点が多い。本研究では、MLNs 由来の T 細胞画分に対する HSP の作用について検討した。

【実験方法】

マウス MLNs からコラゲナーゼ処理により細胞懸濁液を調製した。ナイロンウールと磁気細胞分離法を用いて細胞懸濁液から全 T 細胞画分、および CD25 陽性を示す細胞を除去した T 細胞画分を調製した(図 1)。各画分の細胞 2×10^5 個を、HSP 存在下あるいは非存在下において抗 CD3/CD28 抗体で刺激し 48 時間培養した。HSP としては、HSP60 ファミリーであるマウス Hsp60 (MO60)および大腸菌 GroEL (EC60)を用いた。培養後、培養上清中のサイトカイン IL-2 の産生量を ELISA 法にて測定した。また、T 細胞の表面抗原および細胞内転写因子の変化をフローサイトメーターにて解析した。

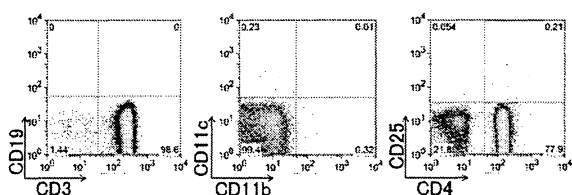


図 1 CD25 陽性細胞を除去した T 細胞画分

【結果と考察】

MLNs 細胞懸濁液を抗 CD3/CD28 抗体で刺激したとき T 細胞から IL-2 が産生されるが、この IL-2 産生は HSP 存在下において著しく減少した。この作用への抗原提示細胞(APCs)の関与を調べるために全 T 細胞画分に対する作用を調べた。用いた T 細胞の純度は 97.3%以上であった。精製した全 T 細胞画分を刺激して産生される IL-2 量は HSP 存在下において同様に低下した。また、CD25 陽性細胞を除去した T 細胞画分においても同様の傾向が観察された(図 2)。さらに、IL-2 産生量と相関して、HSP 存在下では、培養後の細胞における CD25 の発現が抑制されていた。これらの結果から、HSP による IL-2 産生抑制作用には、抗原提示細胞や CD4⁺ CD25⁺ Tregs は関与しないことが判明した。

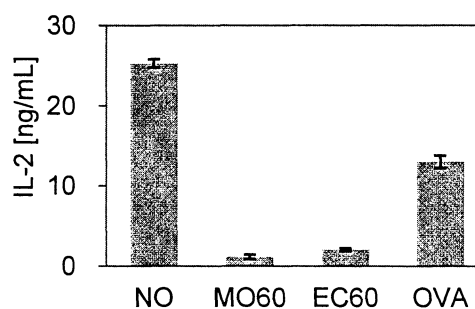


図 2 CD4⁺CD25⁺除去 T 細胞に対する HSP の IL-2 産生抑制作用

【結言】

抗 CD3/CD28 抗体による MLNs 由来 T 細胞の活性化に対して HSP は抑制的に作用し、その作用は抗原提示細胞や CD4⁺ CD25⁺ Tregs を介するものではないことが示された。

†Tel: 075-753-9381, Fax: 075-753-6128
e-mail: keih@kais.kyoto-u.ac.jp

1Ea2

大腸がん細胞における相乗的 COX-2 発現誘導へのストレス 応答 MAPK 経路の関与

(京府大院生命環境) ○藤岡 沙弥、乾 悠香、福田 卓、野村 歩
未、小川智大、佐伯 徹、金本 龍平

【目的】

食餌性脂質に反応してコレステロールから合成、分泌される胆汁酸は、大腸がんのリスクの増加に関与すると考えられている。様々な大腸がん細胞において、二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA) によってシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) の発現が誘導されることが報告されている。COX-2 はエイコサポリエン酸からプロスタノイドへの合成を開始する酵素であり、COX-2 は発がんプロモーター、サイトカイン、成長因子あるいは腫瘍遺伝子などによって急速に誘導され、腫瘍形成に関与することが知られている。我々の以前の研究において、DCA による COX-2 の発現誘導に、非選択的 PKC 阻害剤であるスタウロスポリン (sts) が相乗的な効果を示すことを明らかにした。そこで本研究は、高分化型直腸腺がん細胞 (RCM-1) を用いて DCA と sts による相乗的な COX-2 発現誘導機構を解明するとともに、DCA の発がんプロモーション作用を明らかにすることを目的とする。

【実験方法】

RCM-1 細胞に sts と DCA を処理し、COX-2 発現量をタンパク質レベル・mRNA レベルで、ウエスタンブロット法またはリアルタイム PCR により測定した。また、MAPK 経路や PI3K 経路などのシグナル伝達分子阻害剤を用いて、DCA と sts による相乗的な COX-2 発現誘導に与える影響を調べた。さらに、p38 アクチベーターとしてアニソマイシンを用いて、DCA による COX-2 発現誘導に対する影響を調べた。転写阻害剤であるアクチノマイシン D を用いて、sts が COX-2 mRNA の安定化に関与するかどうか検討した。

【結果および考察】

sts の前処理により DCA による COX-2 mRNA 発現量はタンパク質と同様に著しく増加した。このことから、DCA と sts による相乗的 COX-2 発現誘導は mRNA レベルから引き起こされていると考えられる。また、sts は前処理だけで十分であったことから、DCA の作用と sts の作用は区別することができると考えられる。この sts 作用段階には p38 MAPK が主に関与していることが示唆されたが、ストレス応答 MAPK アクチベーターであるアニソマイシンによる前処理は、DCA による COX-2 発現誘導を増強しなかったことから、p38 MAPK の活性化は sts の相乗効果において十分条件ではないようである。また sts は COX-2 mRNA の安定化には大きく関与していないようなので、sts は COX-2 プロモーター活性化へ関与すると考えられる。

Tel: 075-703-5663

e-mail: tsaeki@kpu.ac.jp

大腸菌 GroEL による CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の産生誘導

(*京大院・農・食品生物, **京大院・地球環境, #ノートルダム清心女大・食品栄養, §京都大) ○大植隆司^{*†}, 橋本恵以^{*}, 中元昌広^{*}, 古川祐一^{*}, 榎田哲哉^{*,**}, 北島直文^{#,§}, 谷史人^{*,**}

【緒言】

熱ショックタンパク質(Heat shock protein: HSP)は免疫調節機能を有し、生体への粘膜免疫によって全身性の免疫応答を制御することが報告されている¹⁾。そこで、本研究では HSP による粘膜機能の制御機構を明らかにすることを目的とし、①消化管管腔内における HSP の存在の観察、② HSP と免疫担当細胞との応答性の検討、③ HSP による腸管粘膜免疫系での CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の産生誘導を調べることを試みた。

【実験方法】

①腸管内容物の Western Blotting による解析

無菌および conventional マウスから小腸近位部、小腸遠位部、盲腸、大腸の 4 つの部位を摘出し、それぞれ EDTA とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 1.5 mL の PBS で腸管内容物を洗い出し、腸管内容物サンプルとした。Laemmli の方法に従い電気泳動を行った後、ゲルを PVDF 膜に転写した。1 次抗体として抗 Hsp60 抗体(clone LK-2)を、2 次抗体としてヤギ抗マウス IgG 抗体-HRP を用いて抗 Hsp60 抗体と反応性を示す物質を検出した。

②HSP に対する脾細胞増殖試験

無菌および conventional マウスから脾細胞を調製し、96 穴プレートに 1 ウェルあたり、20×10⁴ 個播種した。20 μg/mL の Hsp60 の存在下および非存在下にて 5% CO₂, 37°C, 96 時間培養した。Cell Counting Kit-8 にて、生細胞数を計測した。

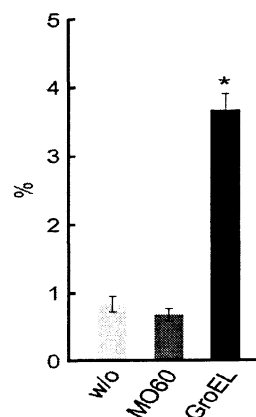
③In vitro Differentiation Assay

C57BL/6マウスの腸間膜リンパ節から naïve T 細胞(Th0)と抗原提示細胞(APC)を各々単離した。96 穴プレートの 1 ウェルあたり、APC を 5×10⁴ 個、Th0 を 50×10⁴ 個播種し、20 μg/mL の Hsp60 の存在

下にて 5% CO₂, 37°C, 6 日間培養した。抗 CD4-FITC、抗 CD25-PE の各抗体にて表面抗原を、抗 Foxp3-allophycocyanin 抗体にて細胞内をそれぞれ染色した後、FACSCalibur にて CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞の存在を観察した。

【結果と考察】

①conventional マウスの盲腸、大腸の腸管内容物から Hsp60 様反応物が検出され、腸内細菌由来であることを示唆した。②大腸菌由来の Hsp60 である GroEL は、conventional マウスよりも無菌マウス由来の脾細胞と強く応答したことから、



GroEL による恒常的な免疫制御が成立することが示唆された。③GroEL は、マウス由来の Hsp60(MO60) と比べ有意に CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T 細胞を産生誘導することが観察された(Fig.1)。

Fig.1. The frequency of Treg cells generated in the in vitro differentiation assay. * $p < 0.001$ compared with the control group in the absence of HSP(w/o).

【結言】

腸内共生細菌由来の大腸菌 GroEL は、腸管粘膜免疫系における CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 制御性 T 細胞の産生誘導に寄与することが示された。

引用文献

1) R. Maron *et al.*, *Circulation*, **106**, 1708–1715 (2002).

[†]Tel: 075-753-9381

e-mail: oueryuji@kais.kyoto-u.ac.jp

タンパク質架橋化酵素ファミリーの組織特異的発現の解析

1Ea4

(名大院生命農) ○清水由隆、伊藤みほ、鞍本克真、福井美奈、柴田秀樹、牧正敏、人見 清隆

【諸言】

タンパク質架橋化酵素トランスグルタミナーゼ (TGase) は、カルシウムイオン依存的に、基質タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間に架橋形成反応を触媒する (図 1)。

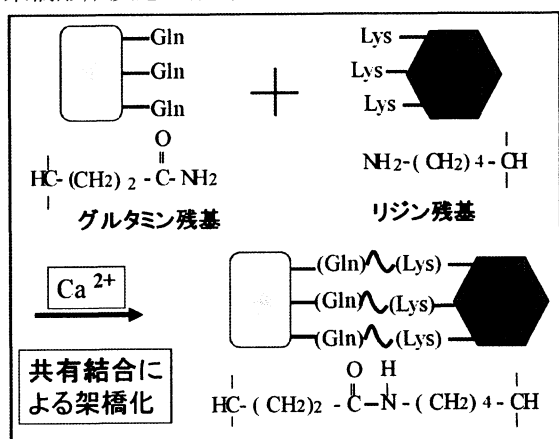


図 1 トランスグルタミナーゼによる反応

この酵素反応は多彩な生命現象に関与し、高等動物では、8つのアイソザイムが酵素ファミリーを形成している。これらは様々な組織で特異的に発現して生理的役割を果たしていると考えられている (表 1)。しかし、TGase 1 (皮膚型)、TGase 2 (組織型)、Factor XIII (血漿型) に比較して、新規アイソザイムの TGase 6 及び TGase 7 については、未だ組織分布や生理学的意義についての情報は少ない。また、すでに研究の進んでいるアイソザイムについても、活性分布と合わせた詳細な組織分布は情報が少ない。本研究では、これら 2つの新規なメンバーを含めたアイソザイムについて、組織特異的な発現解析を目的とした。

【実験方法】

マウス各組織から RNA を抽出し、各アイソザイムに特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行い、mRNA の発現を調べた。さらに、リアルタイム PCR により、組織毎の発現量の比較を行った。主要な

名称	存在部位	生理的意義
Factor XIII	血漿	血液凝固
TGase 1	上皮組織	角質化等
TGase 2	全組織	細胞死・細胞接着など
TGase 3	皮膚表皮・毛包	角質化等
TGase 4	前立腺	交尾栓形成 (げっ歯類)
TGase 5	表皮・胎盤・子宮	表皮形成?
TGase 6	脳? 神経系?	?
TGase 7	精巣・肺	?

表 1 TGase のアイソザイム

アイソザイムについては、我々の得てきた高反応性な蛍光標識基質ペプチドによる活性の可視化解析と並行してその結果を比較した。

【結果・考察】

TGase1 は表皮、前胃、脾臓、TGase 2 は肺、小腸に mRNA レベルで高く発現しており、組織における酵素活性の発現分布とほぼ一致した。また、TGase6 は表皮、精巣、脳で、TGase 7 は腎臓、精巣、脳、胎児の肝臓において高い mRNA 発現を見いだした。

【結言】

本研究において、主要なアイソザイムも含め TGase 6、TGase 7 の組織特異的な発現分布を明らかにした。今後は蛍光標識基質ペプチドを用いた活性可視化に加え、さらに詳細な発現部位の解析を行う。

引用文献

- Itoh M. *et al.* J. Cytochem. Histochem. (2011)
 Fukui M. and Yamane A. *et al.* FEBS J. (2010)
 Hitomi K. *et al.* Amino Acids (2009)

Tel: 052-789-5541 Fax: 052-789-5542
 e-mail: a2740586ahr@hotmail.co.jp

1Fa1

イネ胚乳分化期に組織特異的に発現する遺伝子群の網羅的解析

(¹京府大院・生命環境, ²京都農技セ 生資セ, ³農研機構・作物研)

○東田潤¹, 斉藤雄飛¹, 土居誠¹, 森田重人^{1,2}, 佐藤茂^{1,2}, 石丸努³,
近藤始彦³, 増村威宏^{1,2}

【背景】

イネ種子胚乳組織は、デンプンやタンパク質を貯蔵するデンプン性胚乳組織、および脂質やフィチン酸を貯蔵するアリューロン組織から構成されている。これらの異なる二種類の組織は、単一の胚乳母細胞に由来する。未分化胚乳組織は開花後3日目(3 DAF)ごろから細胞分裂が活性化し、4日目以降にデンプン性胚乳組織とアリューロン組織の分化が起こる。しかし、イネ種子における胚乳形成・分化に関する分子機構は未解明であった。本研究では、Laser capture microdissection (LCM)を用いて単離した5 DAFのデンプン性胚乳組織およびアリューロン組織をそれぞれ単離し、Total RNAを抽出し、遺伝子発現プロファイルリング解析を行った。

【材料と方法】

5 DAFのイネ(日本晴)種子を液体窒素で瞬間凍結させた後、カルボキシメチルセルロースゲルで包埋し、クライオミクロトームによって凍結切片を作製した。LCMを用いて5 DAFデンプン性胚乳組織およびアリューロン組織を回収した(図1)。それぞれの組織についてtotal RNAを抽出し、イネ44Kオリゴマイクロアレイ解析を行い、各組織で特異的に発現する遺伝子群を探索した。

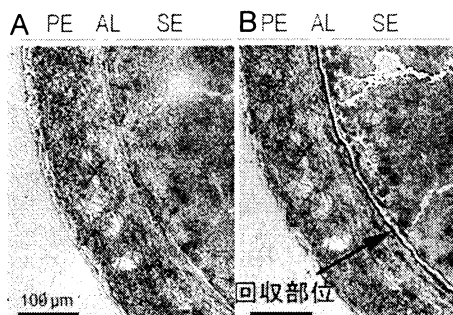


図1 LCMによるアリューロン組織の回収
LCM回収前(A)と回収後(B)のイネ種子の観察像
PE,果皮; AL,アリューロン組織; SE,デンプン性胚乳

【結果および考察】

イネ44Kオリゴマイクロアレイ解析を行い、5 DAFデンプン性胚乳組織とアリューロン組織で発現する遺伝子群を比較したところ、3倍以上発現差のある遺伝子がデンプン性胚乳組織で241個、アリューロン組織で501個明らかになった。これらの遺伝子群を翻訳産物の機能予測で分類したところ、デンプン性胚乳では、デンプン合成関連遺伝子、貯蔵タンパク質遺伝子が見出され、一方、アリューロン組織では、脂質輸送、脂質代謝関連遺伝子が多数見出された(図2)。また、アリューロン組織では、diacylglycerol acyltransferase や phospholipid/glycerol acyltransferase family proteinなどの貯蔵脂質合成に関与する遺伝子が見出された。これらは、アリューロン組織における貯蔵脂質合成の鍵酵素であると推定された。

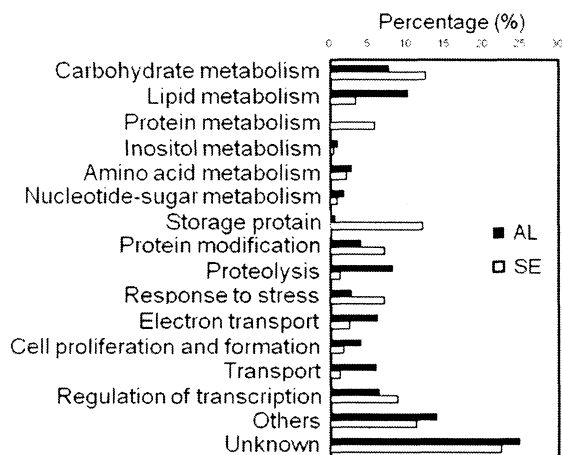


図2 5 DAFのデンプン性胚乳組織(241個)およびアリューロン組織(501個)で特異的に発現する遺伝子の機能分類
AL,アリューロン組織; SE,デンプン性胚乳

Tel : 0774-93-3261 Fax : 0774-93-3261

Mail : s810631043@kpu.ac.jp

イネ種子発芽期における貯蔵タンパク質分解に関わる 遺伝子群の発現解析

(¹京府大院・生命環境, ²京都農技セ 生資セ, ³農研機構・作物研)

○山口雅祥¹, 齊藤雄飛¹, 中塚信明¹, 森田重人^{1,2}, 佐藤茂^{1,2}

石丸努³, 近藤始彦³, 増村威宏^{1,2}

1Fa2

【背景と目的】

植物種子は、発芽時の栄養源としてデンプンや貯蔵タンパク質を蓄積している。発芽過程における物質代謝に関してオオムギを材料として研究がなされ、種子の貯蔵物質は発芽期に種子外周部から分解されるモデルが提唱されている。しかし、当研究室のこれまでの研究より、イネ種子では貯蔵物質の分解は外周部より胚周辺部から先に分解が起こることが明らかにされた。イネのデンプン分解酵素については、 α -アミラーゼが発芽期の胚盤およびアリュuron層で発現することが示されている。一方、貯蔵タンパク質の分解に関わるプロテアーゼに関しては、イネ種子主要貯蔵タンパク質であるグルテリンの分解に主に Rep1 が関与することが明らかとなっているが、もう一種のプロラミンに関してはこれまで明らかにされていなかった。そこで、本研究では発芽期のイネ種子胚盤およびアリュuron層における貯蔵タンパク質分解酵素遺伝子の網羅的な発現解析を行い、発芽期に発現量の上昇するプロテアーゼの中からプロラミンの分解に関与するプロテアーゼを探索することを目的とした。

【材料と方法】

顕微鏡型レーザーメスであるレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) を用いて、イネ (日本晴) 完熟種子、吸水後 3 日目、7 日目の発芽種子より胚盤およびアリュuron層をそれぞれ限定的に回収し (図 1)、total RNA を抽出した。これらの total RNA を用いてイネ 44K オリゴマイクロアレイを用いた網羅的な発現解析を行った。

マイクロアレイ解析で見出した発芽期において発現量の上昇するプロテアーゼ遺伝子を 4 個選び、完熟期～発芽期 (吸水後 10 日目) に関して RT-PCR 解析を行った。

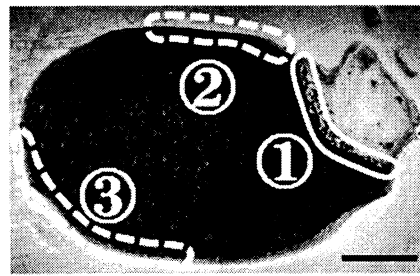


図 1 LCM による組織回収部位 Bar:1mm

【結果と考察】

完熟期と発芽期の胚盤、完熟期と発芽期のアリュuron層との組み合わせで 1 色法によるマイクロアレイ解析を行った。これにより α -アミラーゼおよび Rep1 は、吸水後 3 日目で胚に近いアリュuron層 (図 1-②) で、吸水後 7 日目は胚から遠いアリュuron層 (図 1-③) で発現が強かった。同様の発現パターンを示す酵素遺伝子としてセリンプロテアーゼ、セリンカルボキシペプチダーゼなどが存在した。それらの遺伝子群の RT-PCR 解析の結果、吸水後 3～7 日目にかけて発現量の高い遺伝子が多く存在した。これらの酵素中にプロラミン分解に関与する分解酵素が存在すると推測された。今後はこれらの分解酵素の機能解析を行う予定である。

Tel ; 0774-93-3261 Fax ; 0774-93-3261

e-mail ; doraemon19870622@yahoo.co.jp

1Fa3

二重変異体 (*wx ae*) 米におけるスクロースと脂質の局在および関連遺伝子の発現

(阪府大院生命,*近畿大院農,**九州大院農)○藤原美乃里†, Guray Akdogan, 中屋慎, 財満信宏*, 河村幸雄*, 佐藤光**, 北村進一

【緒言】

二重変異体 (*wx ae*) 米は、デンプン合成に関わる二つの酵素 Granule Bound Starch Synthase I (GBSS I) および Starch Branching Enzyme II b (BE II b) が欠損しており、難消化性デンプンを蓄積する¹⁾。また、開花後 15 日目 (15DAF) のイネ種子において、*wx ae* におけるデンプン量は WT と比較すると一粒あたり約 12% 減少しているのに対し、スクロースの含有量は 2 倍以上増加している。また興味深いことに、脂質は約 2 倍増加する事が分かっている。しかし、それらの局在性についてはこれまで明らかにされていない。

本研究では、収穫米および 15DAF の *wx ae* とその野生型米 (WT : cv.Kinmaze) を用いて成分分析を行うとともに、スクロースと各種脂質の局在性について質量顕微鏡を用いて調べた。さらに、網羅的遺伝子発現解析のデータベースを用いて、スクロースおよび脂質代謝に関連する遺伝子の発現について検索を行った。

【実験方法】

本研究の実験試料として、収穫米および 15DAF の *wx ae* と WT を用いた。

質量顕微鏡法による局在解析

厚さ 20 μm の薄切切片を作成し、一切片あたり 500 ml の DHB マトリックス (5.0% (w/v), in MeOH:H₂O=7:3) を切片上に均一に噴霧した。次に、MALDI-LTQ-XL (Thermo Fischer Scientific) を用いて、スクロースおよび各脂質 (トリグリセリド: TG, ホスファチジルコリン: PC, リゾホスファチジルコリン: LPC) の局在解析を行った。

遺伝子発現解析

High Coverage Expression Profiling (HiCEP) 法で得られた網羅的遺伝子発現解析のデータベー

スを用いて、15DAF の種子でのスクロースおよび脂質代謝の関連遺伝子の発現解析を行った。

【結果】

スクロースおよび各脂質の局在

局在解析の結果、TG は糊粉層および胚乳の外側に分布していた。*wx ae* においてはより胚乳の内側にも分布していた。スクロースは TG の局在とおおよそ一致していた。PC は糊粉層に分布しており、WT と *wx ae* で差は見られなかった。また、LPC は胚乳に分布していたが、LPC の分子種の一つである LPC (1-acyl (18:2)) については、*wx ae* ではほとんど観察されなかった。

遺伝子発現解析

HiCEP 法による網羅的遺伝子発現解析の結果、スクロースの代謝に関わる Sucrose transporter 1 (*SUT1*), Invertase α (*INVa*), Sucrose Synthase 3 (*SuSy3*) の発現量が低下していた。デンプンの分解に関連する、*AAmy1A*, *AAmy3E*, *PhoH*, *DPE2* の発現量は上昇していた。また、脂肪酸合成に関連する 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein]synthase II (*KS*) および 3-ketoacyl-CoA synthase (*KCS*) の発現量が上昇していた。

【結言】

以上の結果より、*wx ae* ではデンプンの合成量が減少し、その結果スクロースの濃度が増大するものと考えられる。そのスクロースの一部は代替の貯蔵化合物である脂質の生合成に使われていることが示唆された。また *wx ae* においては LPC のアシル基に特徴が見られた。

引用文献

1) A. Kubo et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58(7), 4463-4469

† Tel: 072-254-8163, Fax: 072-254-8163

e-mail: fminor@bioinfo.osakafu-u.ac.jp

多糖アルギン酸を取り込む細菌由来 ABC トランスポーターと
基質結合タンパク質の相互作用に関する構造機能解析

(京大院農) ○西谷 悠、丸山如江、伊藤貴文、
三上文三、橋本 渉、村田幸作[†]

【諸言】

細菌から植物、動物に至る幅広い生物の細胞膜に局在する ABC (ATP-Binding Cassette) トランスポーターは、ATP の加水分解により生じるエネルギーを用いて物質を膜内外へ輸送する分子装置である。その立体構造と機能との相関を明らかにする研究が、主に細菌由来 ABC トランスポーターを対象に行われている。しかし、その多くは低分子物質の輸送に限定されている。グラム陰性細菌では、ペリプラズムに局在する基質結合タンパク質が、細胞外膜から基質を捕捉し、ABC トランスポーターと接触することにより基質を送達する。

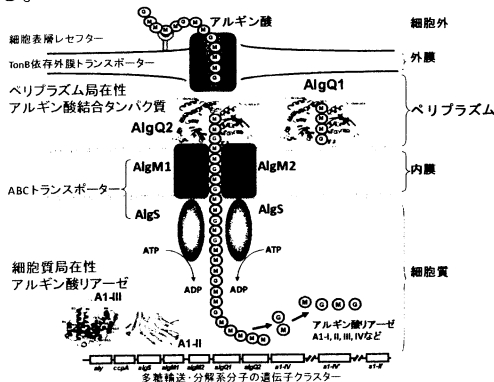


図1 A1株におけるアルギン酸の取り込みと分解の全体像

アルギン酸は α -L-グルロン酸とその C5 位エピマーである β -D-マンヌロン酸から構成される直鎖状多糖である。グラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株 (A1 株) では、基質結合タンパク質 (AlgQ1 あるいは AlgQ2) と ABC トランスポーター (膜タンパク質 AlgM1-AlgM2 ヘテロ二量体及び ATP 加水分解酵素 AlgS-AlgS ホモ二量体からなる四量体) が、細胞質へのアルギン酸の取り込みに関与する。その後、アルギン酸は細胞質に局在するアルギン酸リアーゼにより、不飽和オリゴ糖を経て単糖にまで分解される (図 1)。

本研究では、細菌における高分子物質の取り込み機構を明らかにするため、A1 株のアルギン酸 ABC トランスポーターと基質結合タンパク質との相互作用に関する構造機能解析を行った。

【方法と結果】

相互作用解析

アルギン酸の送達に伴う ABC トランスポーターと基質結合タンパク質との相互作用を表面プラズモン共鳴法により解析した。ニッケルイオンを吸着させたセンサーチップ表面上にヒスチジンタグを付加した ABC トランスポーターを固定化し、種々の濃度の基質結合タンパク質 (AlgQ2) を供した。ATP とアルギン酸オリゴ糖の共存下で ABC トランスポーターと基質結合タンパク質と

の複合体形成とその解離が認められた (図 2)。

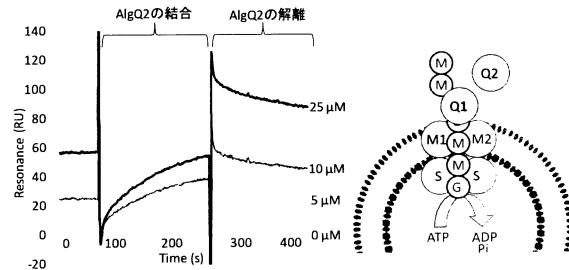


図2 表面プラズモン共鳴法による相互作用解析

図3 プロテオリポソームへの再構成

機能解析

オリゴ糖存在下で両者の相互作用が認められたので、ATP 加水分解に伴う多糖輸送の解析系を構築した。ABC トランスポーターをプロテオリポソームに再構成し (図 3)、その ATP 加水分解活性を測定した。基質結合タンパク質とアルギン酸 (多糖またはオリゴ糖) 存在下で、ATP 加水分解活性の上昇が見られた。このことから、ABC トランスポーターはオリゴ糖のみならず多糖を捕捉した基質結合タンパク質とも相互作用することが示唆された。

構造解析

ABC トランスポーターの構造と機能との相関を明らかにするため、X 線結晶構造解析を行った。可溶化した ABC トランスポーターを蒸気拡散平衡法により結晶化し、大型放射光施設 SPring-8 にて X 線回折実験に供したところ、分解能 7 Å 程度の回折点を確認できた。さらに、相互作用解析で見出した条件 (ATP とオリゴ糖共存下) で、ABC トランスポーターと基質結合タンパク質との複合体を結晶化し、本結晶から分解能 3.3 Å の回折データが得られた。一方、基質結合タンパク質について、サブサイトにおけるグルロン酸とマンヌロン酸の認識に関わる構造要因を解析した。

【結論】

- ABC トランスポーターと基質結合タンパク質は、離合集散可能な過渡的複合体を形成する。
- 多糖を捕捉した基質結合タンパク質との相互作用により、ABC トランスポーターは ATP 加水分解活性を亢進する。
- オリゴ糖を捕捉した基質結合タンパク質との複合体形成により、ABC トランスポーターは良質な結晶を与える。

尚、本研究は文科省ターゲットタンパク研究プログラムの一環として行われた。

[†]Tel:0774-38-3766, Fax:0774-38-3767
e-mail:kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

アルギン酸で誘導発現する *Sphingomonas* 属細菌由来鉄輸送オペロンタンパク質の構造と機能

(京大院農) ○橋本 渉、丸山如江、三上文三、村田幸†

【緒言】

Sphingomonas 属細菌 A1 株は、細胞表層に大きな孔「体腔」を形成し、そこから高分子多糖アルギン酸を取り込む。体腔は、細胞外に存在するアルギン酸を濃縮する機能を示す。その細胞表層では、レセプターの細胞外アルギン酸認識に伴って、アルギン酸結合タンパク質 Algp7 が誘導発現し、本タンパク質が体腔におけるアルギン酸濃縮に寄与することを示してきた¹⁾。

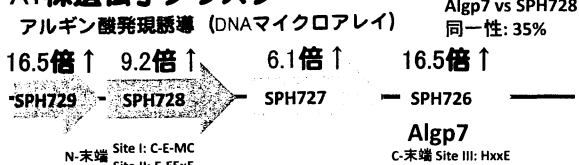
A1 株ゲノムにおいて、Algp7 遺伝子上流には三つの遺伝子 (SPH729, SPH728, SPH727) が存在する (図 1)。これら四つの遺伝子は、オペロン構造を形成し、アルギン酸存在下で顕著に誘導発現する²⁾。SPH729, SPH728, SPH727 と各々相同性を示す EfeU, EfeO, EfeB が、大腸菌ゲノムで遺伝子クラスターを形成し、低 pH における Fe²⁺ の取り込みに機能が報告されている³⁾。アルギン酸は鉄イオンをキレートするため、Algp7 は細胞表層で鉄イオンの輸送にも関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では、鉄輸送オペロンタンパク質としての Algp7 の構造と機能を解析した。

【方法と結果】

・遺伝子クラスターとモチーフ

大腸菌では、細胞外から外膜を通過してペリプラズムに輸送された Fe²⁺ が、酸化還元タンパク質 EfeO と結合した後、EfeO とペロキシダーゼである EfeB との協調作用により、Fe²⁺ が Fe³⁺ に酸化され、Fe³⁺ が膜輸送体である EfeU により細胞質に取り込まれると考えられている⁴⁾。金属イオンの結合と酸化のため、EfeO に三つの金属結合モチーフ (sites I, II, III) が存在する。一方、A1 株の場合、EfeO と相同性を示すタンパク質 SPH728 は、二つの金属結合モチーフ (sites I と

A1株遺伝子クラスター



大腸菌遺伝子クラスター

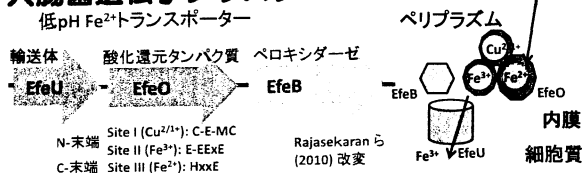


図 1. 遺伝子クラスター

II) しか含まない。また、Algp7 は SPH728 或いは EfeO と相同性を示し、EfeO の site III に相当する金属結合モチーフをもつ (図 1)。したがって、A1 株では、Algp7 と SPH728 が協調して EfeO 様タンパク質として機能することが考えられる。

・金属結合

鉄輸送遺伝子クラスターにおいて、タンパク質レベルでの金属結合は明らかにされていない。そこで、リガンド結合によるタンパク質の熱変性挙動を調べることにより (differential scanning fluorimetry: DSF)、Algp7 の金属結合特性を解析した。Algp7 の融解温度 (T_m) は、Fe²⁺ や Zn²⁺ などの金属イオン存在下で上昇した (図 2 枠内)。

その T_m の上昇度は、金属イオンの濃度に依存する。このことから、Algp7 は金属イオンと結合することが示唆された。

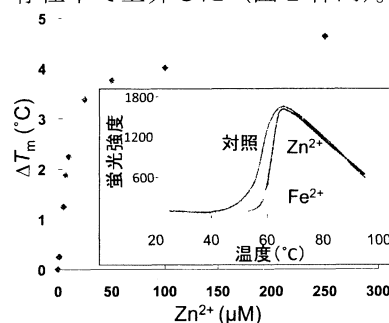


図 2. Algp7 による金属結合

・構造解析

Algp7 の金属結合に関わる構造要因を明らかにするため、金属イオン (Zn²⁺) 存在下で Algp7 (Algp7-Zn) の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した。Algp7 は、Zn²⁺ 結合による大きな構造変化を示さない。Algp7-Zn において Zn²⁺ は、Glu79, Glu82, Asp96, Glu178 の四つの酸性残基と結合していた。これは、site III の近傍に位置する。また、この周辺部位には、他の酸性残基も配置していることから、Algp7 は多様な金属と結合することが考えられる。

【結論】

Algp7 は金属イオンとも結合性を示すことから、金属イオンの輸送にも関わっていることが示唆された。

引用文献

- 1) He *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* **288**, 221-226 (2008).
- 2) Maruyama *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **405**, 411-416 (2011).
- 3) Cao *et al.*, *Mol. Microbiol.* **65**, 857-875 (2007).
- 4) Rajasekaran *et al.*, *Biomaterials* **23**, 1-17 (2010).

†Tel:0774-38-3766, Fax:0774-38-3767
e-mail:kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

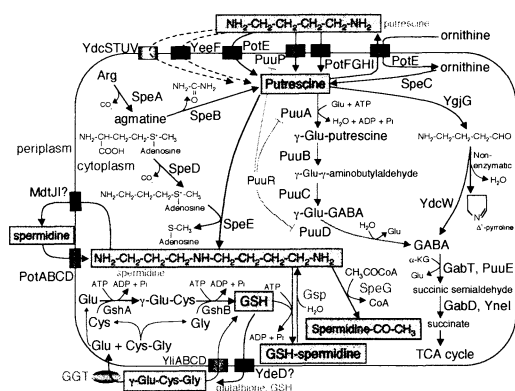
2Aa3

1型繊毛による surface motility に必要な大腸菌の新規プロテシントランスポーター, YeeF

(京都工繊大応生、**京大院生命、***理研) ○ 鈴木秀之*,†, 栗原新*,**,***, 押田麻由**, 辨野義己***

【緒言】

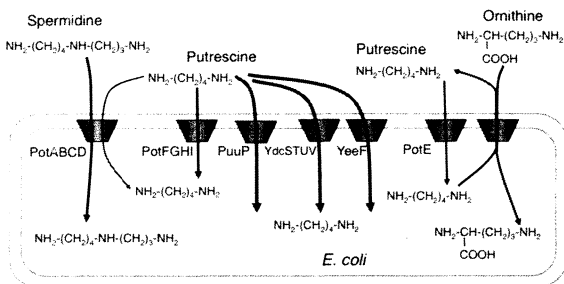
私たちは、大腸菌のグルタミン代謝を研究する過程で、それまで全く知られていなかった菌体外のプロテシンの取り込み, N源C源として利用するためのプロテシンの異化経路を発



見した.¹⁾以来, 私たちは大腸菌のポリアミン代謝に関する研究を行ってきた. 大腸菌は主たるポリアミンとしてプロテシンとスペルミジンを生成し, それらの一部を菌体外に排出している. プロテシンを取り込むトランスポーターとしては3種類が知られていたが, 新たに PuuP²⁾, YdcSTUV, YeeF³⁾の3種類を見つけた.

大腸菌はこれらのトランスポーターを状況に応じて使い分けている.

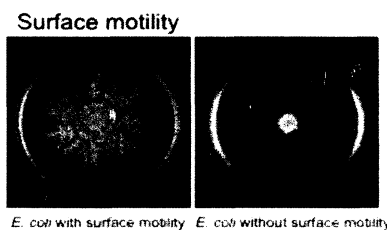
大腸菌のプロテシン輸送



【結果】

大腸菌は軟寒天培地表面を集団で活発に動き回ることができ, surface motility と呼ばれる. ところがこの surface motility は, 大腸菌が菌体外からのポリアミン取り込み能を失うと失われることが分かった. これまでにスペルミジンを生合成できない株がスペルミジントランスポーターである PotABCD を欠損すると surface motility を失うことを報告した⁴⁾.

今回, プロテシンの取り込むことのできるトランスポーター6



種のうち, YeeF を欠損すると surface motility を失うことを明らかにした. さらに, この surface motility は一般に考えられている *fliC* によってコードされている鞭毛ではなく, *fimA* によってコードされる繊毛によって引き起こされていることを示した.

引用文献

- 1) *J. Biol. Chem.* **283**, 19981-19990 (2008).
- 2) *J. Bacteriol.* **191**, 2776-2782 (2009).
- 3) *J. Biol. Chem.* **286**, 10185-10192 (2011).
- 4) *FEMS Microbiol. Lett.* **294**, 97-101 (2009).

†Tel: 075-724-7763, Fax: 075-724-7766

e-mail: hideyuki@kit.ac.jp

2Aa4

カリウムチャネル KAT1 の 平面膜法による電気化学的評価

(京大院農,*福井県大生物資源) ○窪田慎太郎¹, 白井 理, 日奔隆雄*, 加納健司

【緒言】膜を介したイオン透過は呼吸や代謝、神経伝達などの生体反応に関わっており、チャネルによるイオンの膜透過はその透過特性と機能から興味を持たれている。チャネルの研究においてはパッチクランプ法による測定が有名だが、生体膜が含む様々な脂質、タンパク質等の影響を受ける可能性があり、個々のチャネルの詳細な反応解析は困難であった。そのため本研究では、生体膜モデルである平面脂質二分子膜(BLM)を利用した平面膜法を用いてチャネルの反応解析を行った。この平面膜法は、BLM に標的のチャネルタンパク質を再構成して、その反応を直接電気化学的に評価できるという点がパッチクランプ法より優れている。本研究で、*Arabidopsis thaliana* 由来の電位依存性カリウムチャネルである KAT1 を対象に、チャネルを BLM に再構成した際に、水相のイオン組成や添加した阻害剤がチャネルによって生じる膜透過電流に与える影響について調べた。

【実験方法】中央に小孔をあけた極薄いテフロンシート(~0.2 mm)で隔てられた電気化学セルの 2 室(W1, W2)に電解質(0.3 M KCl 等)を含む緩衝液(20 mM Tris pH 7)を満たした後、ホスファチジルコリンおよびコレステロールを含む *n*-デカン溶液を小孔部分に塗りつける刷毛塗り法によって平面 BLM を作製した。BLM 形成後、W2 に KAT1 を含むプロテオリポソームを添加し、攪拌を行った。プロテオリポソームはエクストルーダー等を用いて調製したりポソームと、バキュロウイルス-SF9 細胞系を用いて発現させ可溶化・精製を行った KAT1 チャネルを混合し、凍結・融解することで調製した。電気化学測定は、W1 および W2 に挿入した電位測定用電極(Ag|AgCl 電極: RE1, RE2)を用いて RE2 に対する RE1 の電位として 2

水相間に電位差を印加し、W1 および W2 に挿入した電流測定用電極(Pt 電極: CE1, CE2)を用いて膜透過電流を記録した。

【結果と考察】KAT1 を含むプロテオリポソームの水相への添加によりプロテオリポソームが BLM と融合した場合、膜を介した二水相間に電位を印加すると、チャネル透過に特徴的なステップ状のイオン透過電流が観察された。この電流振幅についてヒストグラム波形解析を行い、チャネル特性を示す単一チャネル電流(ステップ 1 つ分の大きさ)と開閉頻度を評価した。水相が KCl を含む系では、単一チャネルの開閉に対応するコンダクタンス変化(単一チャネル電流を印加電位で除したものは 5~10 pS となり、既報の値(5~6 pS)に近いものが得られた。また、水相に 4 級アンモニウムイオンや Cs⁺、ClO₄⁻ や SCN⁻ のような K⁺ や Cl⁻ よりサイズの大きなイオンが存在するような系では、単一チャネル電流や開閉頻度の低下が観測された。当日は、平面膜法でチャネルを電気化学的に評価する方法の紹介と、KAT1 のイオン半径に対する電流振幅挙動の変化が Gramicidin A チャネルでの透過阻害挙動¹⁾と同様であったことを念頭に置いたそのイオン透過および阻害様式について報告を行う予定である。

引用文献

- 1) S. Kubota, *et al.*, *Anal. Sci.*, **25**, 189 (2009).

¹TEL : 075-753-6393, FAX : 075-753-6456

e-mail : kubota@kais.kyoto-u.ac.jp

Overexpression of L-pantoyl lactone dehydrogenase by disrupting its putative transcriptional regulator in *Rhodococcus erythropolis*

○Dayong Si, Nobuyuki Urano*, Sakayu Shimizu, Michihiko Kataoka*†
 Grad. Sch. Agric., Kyoto Univ., *Grad. Sch. Life & Environ. Sci., Osaka Pref. Univ.

Introduction

D-Pantolactone (D-PL) is an important chiral intermediate for D-pantothenate production. It is obtained by optical resolution of DL-PL in commercial production. As one of D-PL production processes, stereoinversion of L-PL to D-PL via ketopantolactone (KPL) was proposed (Fig. 1). In this process, L-PL dehydrogenase (LPLDH) from *R. erythropolis* AKU2103 catalyzes stereoselective dehydrogenation of L-PL to KPL. In *R. erythropolis* AKU2103, LPLDH is induced by 1,2-propanediol (1,2-PD) addition, but LPLDH activity was not so high to satisfy industrial production even in induced condition. If *lpldh* gene can be expressed in high level, bioconversion of L-PL to D-PL should be achieved successfully by combination with KPA reduction system (Fig. 1) [1]. Here, we describe the overexpression of *lpldh* and its application to L-PL dehydrogenation.

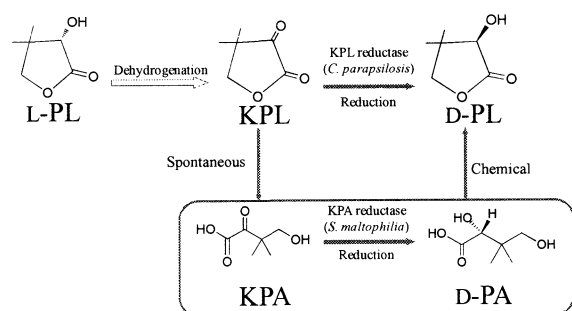


Fig. 1. Enzymatic process for D-PL synthesis from DL-PL via KPL and KPA. KPA reduction system was shown in rectangle.

Methods

The *lpldh* was cloned into cloning vector pK4 together with its upstream region (Fig. 2) to construct pKLPLDH and introduced into wild type strain or $\Delta lplR$ strain [2] of AKU2103. LPLDH activity assay and bioconversion of L-PL were performed.

Results and discussion

Firstly, general expression systems for *E. coli* or *R. erythropolis* were attempted to overexpress *lpldh*, but their activities were not sufficient as well as wild type AKU2103. The LPLDH activity and conversion ability of L-PL to D-PL of recombinant AKU2103

bearing pKLPLDH were higher than those of wild type strain (Fig. 3). In a previous study [2], $\Delta lplR$ strain was found to produce LPLDH even without 1,2-PD induction. Thus, introduction of pKLPLDH into $\Delta lplR$ was also examined, and consequently this recombinant strain expressed *lpldh* without 1,2-PD.

Conclusion

Overexpression of *lpldh* was succeeded in wild type and $\Delta lplR$ strains of AKU2103 by introducing pKLPLDH. However, addition of 1,2-PD was necessary to completely overexpress *lpldh* in wild type AKU2103. Therefore, the promoter/operator sequence of the operon containing *lpldh* should be located on the inserted region to pK4. LplR might bind to this region to repress *lpldh* expression in wild type AKU2103.

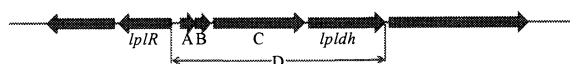


Fig. 2. The ORFs map around *lpldh*. Fragment D was inserted into pK4 to construct pKLPLDH.

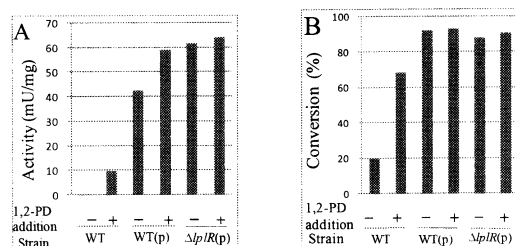


Fig. 3. A, LPLDH activity; B, bioconversion of L-PL. +/-, with or without 1,2-PD induction; WT, wild type strain of AKU2103; WT(p), recombinant AKU2103 bearing pKLPLDH; $\Delta lplR(p)$, recombinant $\Delta lplR$ strain of AKU2103 bearing pKLPLDH

References

- Kataoka, M., et al., in *Annual Meeting of JSBBA 2010*, 2AU12.
- Si, D., et al., in *Annual Meeting of JSBBA 2011*, 2C29p10.

†Tel.: 072-254-9923; fax: 072-254-9923

E-mail: kataoka@biochem.osakafu-u.ac.jp

【緒言】

我々はこれまでに、ポリアミンの一種であるプトレッシンの新規代謝経路 (Puu 代謝経路) を大腸菌で発見し、報告している。ポリアミンはアミノ基を複数含む脂肪族アミンである。正に帯電しているため核酸やタンパク質と相互作用して構造安定化を引き起し、翻訳や細胞内構成成分の合成を促進する重要な生体物質である。その中でもプトレッシンは、他のポリアミン生合成の基本となる分子構造を持つ。

Puu 代謝経路はプトレッシンを γ -グルタミル化した後、6段階の反応によってコハク酸に代謝して炭素源、窒素源として利用する経路である。我々は生体内で重要な役割を持つプトレッシンが、どのような条件の時に栄養源として代謝されるのか、転写制御因子の解析をもとに制御機構の解明を試みている。今回は転写制御因子による制御機構に加えて DNA 認識配列の解析について発表を行う。

【実験方法】

Puu 代謝系の酵素群をコードする遺伝子 *puu* 遺伝子群は、大腸菌ゲノム内でクラスターを形成している。そのひとつ *puuR* は、*puu* 遺伝子群の転写を調節する転写抑制因子をコードしていることがわかった。精製 PuuR を用いたゲルシフトアッセイと DNase I フットプリンティング解析から PuuR 結合領域を 4 カ所同定し、15 bp から成る DNA 認識配列を推定した。QuikChange 法で推定認識配列に変異を導入した DNA プローブを作成し、ゲルシフトアッセイで PuuR が認識する配列をより詳細に検討した。

【結果と考察】

PuuR は、*puu* 遺伝子クラスターの一カ所に結合して 7 つの *puu* 遺伝子全てを負に転写制御していることが PuuR 変異体を用いたマイクロアレイ解析、遺伝子間領域をプローブとして用いたゲルシフトアッセイ、RT-PCR による転写単位の解析の各実験から明らかとなった。

また、PuuR と DNA プローブの複合体は、プトレッシン濃度を高くしていくに連れて濃度依存的に解離することが分かった。すなわちプトレッシンがエフェクターとして機能しており、細胞内濃度が高くなると、DNA 鎖から PuuR が解離して Puu 代謝遺伝子群を発現誘導し、プトレッシンを代謝するという制御の仕組みが明らかとなった。

DNase I フットプリンティング解析で見つかった 4 カ所の PuuR 結合領域のうちの 1 カ所の配列保存性は他と比べて低かったが、そのモチーフを単独で導入した DNA プローブを用いたゲルシフトアッセイでは、部分的ではあるがシフトバンドが見られ、PuuR が結合することが確認できた。そのモチーフに部位特異的に変異を導入した DNA プローブを作成してゲルシフトアッセイしたところ、シフトバンドが消失した。このことから PuuR は、15 bp の認識配列のうち中央部分の配列に対しては認識が甘いものの、末端近くの配列をより厳密に認識して DNA と結合していることが分かった。

Tel: 075-724-7766, Fax: 075-724-7766

E-mail: hnemoto4@kit.ac.jp

2Aa7

好熱菌 *Meiothermus ruber* H328 株が生産するケラチン分解性プロテアーゼ 巨大分子複合体の構造解析

○野村圭史¹、片岡真亜知¹、川崎一則²、加藤智樹²、茂里康²、渡部邦彦¹ (1京府大院・生命環境、²産総研・健康工学)

【諸言】

好熱菌 *M. ruber* H328 株は、本研究室で有馬温泉から単離され、難分解動物性タンパク質であるトリ羽毛ケラチンを強力に分解する。このケラチン分解を担うケラチン分解性細胞外プロテアーゼは、動的光散乱により分子量 1.5×10^8 Da と推定される巨大分子複合体を形成する。さらに界面活性剤、有機溶媒等の変性剤 (30% SDS、60% エタノール、1 M 2-メルカプトエタノールなど) に対して非常に高い耐性を示す。この未だ報告例のない驚異的な安定性には、巨大分子複合体の分子構造が関与している可能性がある。そこで、本研究ではこの巨大分子複合体の精製を進めるとともに、電子顕微鏡による構造の解析を行った。

【実験方法】

ケラチン分解性プロテアーゼの調製

3% (w/v) 羽毛含有 YS 培地 (0.5% yeast extract、0.5% sucrose、0.5% CaCO_3)、60°C、48 h 振盪培養後の培養液から、遠心分離で上清を回収後、限外濾過 (分画分子量 500 KDa) 濃縮、透析 (50mM Tris-HCl (pH 8.5)) を行い、ゲル濾過クロマトグラフィー (Sephacryl S-1000、分画分子量 1.0×10^8 Da) によりプロテアーゼ活性画分を分離した。

得られたサンプルに対し、ネガティブ染色 (1% 酢酸ウラニル) を行い、透過型電子顕微鏡 (FEI、Tecnai G2F20) による観察を行った。また、限外濾過濃縮サンプルの断面構造をフリーズ・フラクチャー・レプリカ電子顕微鏡によって観察した。

脂質の検出

Sephacryl S-1000 から得られた強いケラチン分解活性を持つ画分に対し、クロロホルム・メタ

ノール抽出を行い、薄層クロマトグラフィー (TLC) 分離後、dittmer 試薬または 50%硫酸・加熱による発色から脂質を検出した。

【結果と考察】

まず、限外濾過したサンプルでは、分子直径約 30-40 nm の粒子を中心に、より小さな微粒子から約 200-300 nm の大きな粒子まで様々なサイズの粒子が観察された。

そして、Sephacryl S-1000 では、排除容積に溶出される高分子で強いケラチン分解活性を持つ画分と、それより低分子として溶出される弱いケラチン分解活性を持つ画分の 2 画分が得られた。強いケラチン分解活性を持つ高分子画分では分子直径 30-40 nm の粒子を中心に、より大きいサイズの直径 100-400 nm の粒子が確認できた。一方で、弱いケラチン分解活性の低分子画分では直径約 10 nm 以下の小さい粒子だけが確認できた。

また、フリーズフラクチャー法による観察では、分子直径 100-300 nm の粒子凝集体、およびより小さい粒子が確認でき、粒子凝集体は脂質二重膜様の構造であることが示唆された。そこで、TLC での分析を行ったところ、ホスファチジルグリセロールに近い Rf 値を持ったリン脂質とリン酸基を持たない脂質が含まれていることが確認された。

Tel:075-703-5667

e-mail:kwatanab@kpu.ac.jp

大学附属農場の花弁からの酵母の分離と大学ブランド清酒開発への利用 (名城大農、*愛知県産技研) ○吉田幸代、中村恵子、三井俊*、伊藤彰敏*、安田(吉野) 庄子*、林真梨菜、清崎みなみ、土屋照二、北本則行*、加藤雅士†

【緒言】清酒醸造において、酒質は使用する酵母の種類に大きく左右される。若い世代の清酒離れが深刻な問題となっており、多様なニーズに合う清酒の開発が望まれている。清酒に新たな特徴を付加するため、花や果実など、自然界から酵母を分離して清酒醸造に用いる試みが盛んになされている¹⁾。本研究では、特徴のある味と香りを有する大学ブランドの清酒の開発を目的とし、大学キャンパス内から花を採取し、酵母の分離・育種を行い、清酒醸造試験を行った。

【実験方法】 花からの酵母の分離

附属農場(愛知県春日井市)を含む愛知県、岐阜県内各所より、各種植物(120種以上)の花部分を252試料採取し、酵母選択的集積培地にて30℃で静置培養した。1週間後、濁りのみられた培養液より、YM寒天培地上で菌株を分離した。顕微鏡下で形態を観察し、出芽酵母様の菌株を選別した。

18S rRNAのITSおよびD1/D2領域の塩基配列確認による酵母の同定

得られた菌株からPCRによりITSおよびD1/D2領域を増幅した。DNAシーケンサー(ABI310)により、塩基配列の解析を行い、*Saccharomyces cerevisiae*を選出した。

セルレニン耐性株の取得

YPD培地で24時間培養した酵母菌体をEMSで変異誘起処理を行った後、セルレニンを含む培地上に塗布し、耐性株を取得した。

清酒醸造(小仕込)試験

対照用酵母として協会酵母(K701)を使用した。総米150gの小仕込試験を二段仕込で実施した。

発酵過程は、発酵に伴って生成する炭酸ガスの飛散によるモロミ重量の減量でモニタリングした。発酵終了後、もろみを遠心分離し、得られた上清液をの成分分析を行った。日本酒度、酸度、アミノ酸度を国税庁所定分析法で、香气成分はヘッドスペース法で測定した。アルコール分はアルコメイト(AL-2型 理研計器)で測定した。

【結果と考察】

252サンプルの試料から得られた菌株の18S rRNAのITSおよびD1/D2領域の塩基配列の解析を行ったところ、6種類の*S. cerevisiae*が得られた。

このうち、附属農場より最初に得られたカーネーションに由来する菌株より、セルレニン耐性株(MC-1, MC-3, MC-7, MC-8, MC-9, MC-13)を取得した。得られた耐性株を用いて、清酒醸造試験を行った。その結果、協会酵母K701に比べ、やや発酵能が劣っていることが明らかとなり、エタノール生成能が協会酵母に比べ低いことが予想された。また、変異株のうち、MC-8はさらに、発酵能が低いことから、変異処理により、生育あるいは発酵過程の重要な遺伝子に変異を生じていることが示唆された。発酵終了後の上清液のMC-8をのぞく各変異株の成分分析値の平均値を表1に示した。

表1 清酒中の成分分析値

	平均値 (標準偏差)	K701
日本酒度	-47.9 (9.1)	-11.9
アルコール(%)	14.0 (1.2)	18.2
酸度(ml)	3.9 (0.1)	2.8
アミノ酸度(ml)	2.0 (0.1)	2.3
酢酸イソアミル(ppm)	1.1 (0.1)	4.9
カブロン酸エチル(ppm)	1.9 (0.3)	1.5
クエン酸(mg/100ml)	6.9 (1.7)	4.6
リンゴ酸(mg/100ml)	17.8(2.0)	26.6
コハク酸(mg/100ml)	38.0 (3.6)	28.9
乳酸(mg/100ml)	9.3 (2.0)	9.6

アルコール度数は予想通り、協会酵母に比べてやや低い値を示していた。酸度が協会酵母に比べ高い数値を示していた。コハク酸とクエン酸が多く生成していることが明らかとなった。また、香气成分に関しては、酢酸イソアミル値が低いのに比べカブロン酸エチル値が高い特徴的な香気を有することが明らかとなった。

【結言】今回得られた酵母は、協会酵母とはかなり特徴が異なり、低アルコールで酸味と果実様の香りのする特徴的な清酒の製造に向くものであることが明らかとなった。

引用文献

1) 木下、門倉、数岡、穂坂、中田、東京農大農学集報, 53, 100-106 (2008).

†Tel: 052-838-2453, Fax: 052-838-2453
e-mail: mkato@meijo-u.ac.jp

2Ap2

出芽酵母のエタノール発酵から乳酸発酵への代謝変換制御

(豊田中研) ○松山崇†, 山西守

【緒言】

発酵プロセスにおいて、生産効率向上のため、菌体増殖期から物質生産期への切り替えが、従来、通気・添加物・培地等で制御されてきた。近年、遺伝子工学を取り入れた代謝工学の発展に伴い、従来は困難であった代謝主経路の大幅な改変や菌体増殖を阻害する物質の生産が可能となって、バイオ燃料やバイオ樹脂原料物質の発酵プロセスが実現化しつつあるものの、生産効率の低さがしばしば問題となっている。

これらの導入形質の適切な制御は、発酵工学的な手法では困難と考えられる。そこで、遺伝子組換え酵母を用いた乳酸発酵をモデルとして、菌体増殖と生産の切り替えを Cre DNA 組換え酵素により制御する新技術の開発を行った。

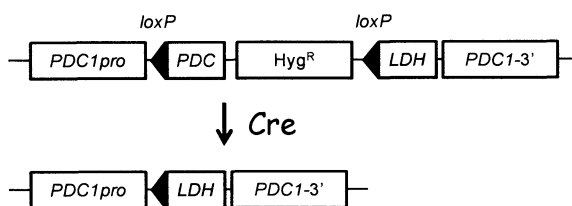
【実験方法】

解糖系の中間産物・ピルビン酸を基質として、PDC (ピルビン酸デカルボキシラーゼ) が働くとエタノール発酵、LDH (乳酸デヒドロゲナーゼ) が働くと乳酸発酵となる。Δ*pdc* 形質は菌体増殖を強く阻害するため、LDH 遺伝子を導入した乳酸生産酵母において、エタノール生成を抑制しつつ、乳酸の生産速度を向上させることは困難となる。酵母の乳酸発酵の理想的な形質と考えられる

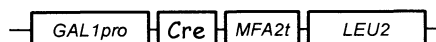
- ・増殖期にエタノール発酵 (PDC on, LDH off)
- ・生産期に乳酸発酵 (PDC off, LDH on)

を実現するため、PDC-LDH 遺伝子カセットを出芽酵母の *PDC1* 座に導入した。PDC1→LDH の切り替えは、*loxP* 部位をターゲットにした Cre DNA 組換え酵素により制御される (コンストラクト 1)。Cre 酵素遺伝子は、ガラクトース誘導性 *GAL1* プロモーターにより制御する (コンストラクト 2)。これらの遺伝子は、ガラクトース応答性を高めた遺伝子組換え酵母¹⁾ に導入した。

〈コンストラクト 1〉



〈コンストラクト 2〉



【結果と考察】

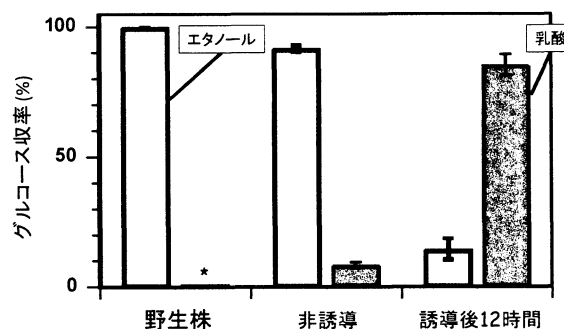


図 1. Cre の誘導による代謝変換。

図 1 に示したように、主代謝物が、エタノール (非誘導株 : 91.7%) から乳酸 (誘導後 12 時間株 : 85.4%) に変換された²⁾。

【結言】

増殖期と生産期の代謝をゲノムレベルで厳密に制御する新たな発酵制御法の開発に成功した。高出力ターミネーター³⁾と組み合わせて、出芽酵母の有用物質生産の可能性を広げていきたい。

引用文献

- 1) T. Matsuyama *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 175-177 (2011).
- 2) M. Yamanishi, T. Matsuyama, *submitted*
- 3) M. Yamanishi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, in press (2011).

†Tel: 0561-71-7424, Fax: 0561-63-6498

e-mail: e1215@mosk.tytlabs.co.jp

2Ap3

出芽酵母による NAD⁺合成系中間体キノリン酸の分泌と再利用

(京大院農) ○河井重幸, 大橋一登, 村田幸作†

【背景】 NAD⁺ は、補酵素としての機能以外にも様々な機能（寿命の延長への関与など）を示すため、NAD⁺ 合成系の重要性が再認識されている。ほ乳類や出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、NAD⁺ は、サルベージ経路およびキヌレニン経路により合成される。サルベージ経路はニコチン酸 (NA)、ニコチンアミド、ニコチンアミドリボースなどの代謝中間体を利用する経路である。NA は Npt1 のはたらきでニコチン酸モノヌクレオチド (NaMN) へと変換され NAD⁺ へと至る (図 1)。一方、キヌレニン経路は、*de novo* 経路とも呼ばれ、トリプトファン (Trp) からキノリン酸 (QA) を経由して NAD⁺ へと至る経路である。Bna4 などにより合成された QA は、Bna6 により NaMN へと変換される (図 1)。

サルベージ経路とキヌレニン経路の両方を欠損した出芽酵母 *npt1bna4* は、NAD⁺ を合成できないために致死性を示すが (図 1)、ある特定の場合には致死性を示さない。この現象を基に、出芽酵母は増殖中に著量の QA を培地中に分泌すること、細胞外 QA を NAD⁺ 前駆体として再利用すること、本再利用には高親和性 NA トランスポーター (Tna1) が関与することなどを明らかにしている (図 1)。また、高感度な QA のバイオアッセイ法も確立している。ただし、本 QA 分泌の生理的意義は不明である。他方、定常期細胞内の NAD⁺ 恒常性維持の仕組みに関しても不明点が多いが、細胞内 NAD⁺ 濃度の低下が、Sum1/Hst1 を介した *BNA4* や *TNA1* の転写量の増大を引き起こすことは分かっている (図 1)。

【結果・考察】 出芽酵母野生株ならびに *tna1*, *bna4*, および *bna6* (*Tna1*, *Bna4*, および *Bna6* 各遺伝子の欠損株; 図 1) を通常の完全合成 (SC) 液体培地 (3.3 μM NA を含む) ならびに NA 非含有液体 SC 培地で 2 週間培養し、各株の生育性ならびに定常期における生存数 (chronological life span) を調べた。その結果、NA 非含有 SC 培地において、*tna1* が培養 2 週間後に最も顕著な生存数の低下を示した。これは、細胞外 QA 再利用の重要性を示唆した。

次に、同培地で培養したこれらの株の定常期および対数期における *BNA4*, *BNA6*, *TNA1*, および *NPT1* (*Bna4*, *Bna6*, *Tna1*, および *Npt1* 各遺伝子) の転写挙動を qPCR で調べた。その結果、全ての株において *NPT1* の転写量の変動はほと

んど見られなかった。一方、*BNA4*, *BNA6*, および *TNA1* の転写量は、*tna1*, 就中 *bna4* および *bna6* において著しく (NA 非存在下や定常期においてより著しく) 上昇した。他方、野生株ではこれらの転写が抑制された (NA 非存在下の対数期細胞においてのみ上昇した)。本結果から、細胞内 NAD⁺ を低下させるような細胞内 (*BNA4* や *BNA6* の欠損によるキヌレニン経路の遮断, *TNA1* の欠損による QA 再取り込み能の喪失) および細胞外 (NA 非存在下, 定常期) の環境に、NAD⁺ 濃度の恒常性を維持するために、これらの遺伝子が柔軟に応答したと考えられた。また、*tna1* における転写量の増大は、QA の再取り込みの、細胞内 NAD⁺ 濃度の恒常性維持への重要性を示唆した。

以上の結果から、出芽酵母は、分泌した QA を、必要時 (細胞内 NAD⁺ 濃度の低下時) に再取り込みし、これを NAD⁺ 合成に再利用して、細胞内 NAD⁺ 濃度の恒常性を維持していると考えられた。すなわち、QA の分泌と再利用は、NAD⁺ 合成系の重要な要素である可能性が示された。

他方、QA が出芽酵母 *bna6* やキヌレニン経路を持たない分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* によっても NAD⁺ 前駆体として利用されることを見出した。これは、出芽酵母において、QA は *Bna6* 以外の酵素によっても利用されること、さらに QA が広く真菌 (*Tna1* ホモログを有する) に利用されうる NAD⁺ 前駆体である可能性を示した。

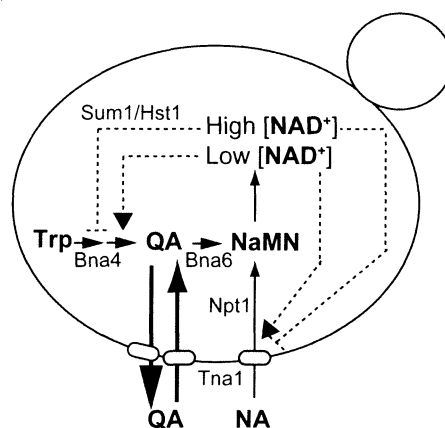


図 1 出芽酵母の NAD⁺ 合成系ならびに細胞内 NAD⁺ 恒常性維持の仕組み

†Tel: 0774-38-3766, Fax: 0774-38-3767
e-mail: kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

これまでの研究で、*S10-spc-alpha* オペロンにコードされたリボソームタンパク質サブユニットをバイオマーカーとした MALDI-TOF MS 測定による微生物同定法 (*S10-GERMS* 法) は、グラム陰性菌である *Pseudomonas* 属細菌の株レベルの識別能を示した¹⁾。本法の確立により、バイオインフォマティクスに基づく微生物同定に重要なリボソームタンパク質データベースの構築が可能となった。

本研究では、*S10-GERMS* 法の適用範囲の拡大を目的として、グラム陽性菌である *Bacillus* 属細菌をモデル微生物として使用した。

【実験方法】

リボソームタンパク質データベースの構築

Bacillus 属菌株の *S10-spc-alpha* オペロンの塩基配列は、ゲノム解読株の塩基配列に基づき設計したプライマーを使用して決定し、その塩基配列に基づき、リボソームタンパク質の理論分子量データベースを構築した。

S10-GERMS 法による微生物同定

Bacillus 属細菌は、リボソームタンパク質を精製することなく、直接 MALDI-TOF MS に供され、そのマススペクトルは、構築したデータベースと比較されることで、菌種を同定した。次に、リボソームタンパク質に基づく系統解析結果を、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析と比較した。

【結果および考察】

Bacillus 属細菌を MALDI-TOF MS 分析した結果、*S10-spc* オペロンにコードされている 8 種のリボソームタンパク質 (S10, S14, S19, L18, L22, L24, L29 および L30) が、*Bacillus* 属細菌の MALDI-TOF MS 分析による種および株レベルの系統解析において、有用かつ再現性の高いバイオマーカーとして選択された。*S10-GERMS* 法は、*B. subtilis* の亜

種、*B. subtilis* subsp. *subtilis* および *B. subtilis* subsp. *spizizenii* の識別において、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析よりも明確な識別能を示した (図 1)。これらの結果から、*S10-GERMS* 法が、グラム陽性菌である *Bacillus* 属細菌において有用な微生物同定法であることが示された²⁾。

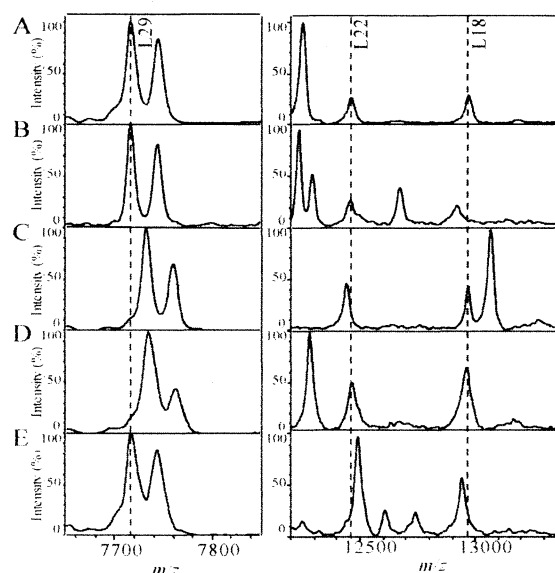


図 1. *B. subtilis* の MALDI-TOF MS スペクトル (A) *B. subtilis* NBRC 13719T, (B) *B. subtilis* NBRC 101246, (C) *B. subtilis* NBRC 13722, (D) *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NBRC 101239T, (E) *B. subtilis* NBRC 104440

引用文献

- 1) Y. Hotta *et al.*, *J. Proteome Res.* **9**, 6722–6728 (2010).
- 2) Y. Hotta *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5222–5230 (2011).

Tel: 052-838-2446, Fax: 052-833-5524

e-mail: n0861503@ccalumni.meijo-u.ac.jp

2Ap5

枯草菌によるイノシトール異性体変換の効率化 ○山岡優、竹中慎治、吉田健一（神戸大院・農）

イノシトール（1,2,3,4,5,6-シクロヘキサンヘキサオール）には、6つの水酸基の立体配座の組み合わせによって9種の異性体が存在する。中でも天然に最も多く見られる異性体は*myo*-イノシトールであり、米ぬかなどから安価に供給される。他の異性体は希少であり、 β -アミロイドの凝集を抑制しアルツハイマー病への効果が期待される*scyllo*-イノシトールや、ブドウ糖の吸収を促し血糖値を降下させるため糖尿病への効果が期待される*D-chiro*-イノシトールなど有用な生理活性を示すものが含まれる。しかし、これらの効率的な生産手段は未だ確立しておらず、ほとんど利用されていない現状にある。我々は、枯草菌の*myo*-イノシトール代謝経路を応用して、*myo*-イノシトールを*scyllo*-イノシトールへと選択的に変換するバイオコンバージョンを開発した（図1）。

このバイオコンバージョンの効率を定量的に評価するためにGC-TOFMS分析を導入した。これによって可能となった正確なイノシトール類の濃度分析を用いて培地条件（*myo*-イノシトール、Soytone、NaCl、およびグルコースの濃度）の最適化を検討した。その結果、特にN源となるSoytone濃度を適度に高めた場合に、細胞の増殖に大きな変化はないが、バイオコンバージョン効率が大きく向上することが見出された。その他の培地成分を含めて最適化された条件においては培地中の*myo*-イノシトールの50%が*scyllo*-イノシトールへと変換され、高効率なバイオコンバージョンが可能となった（図2）。効率向上の根拠を遺伝子発現のレベルで把握するため、現在この最適化された培地条件において発現量に顕著な増加あるいは減少が見られた遺伝子の抽出に取り掛かっており、更なる変換効率向上を目指してその方法論の立案を進めている。

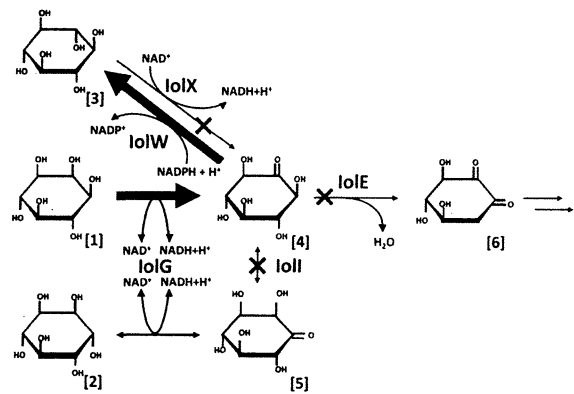


図1 *scyllo*-イノシトールバイオコンバージョンのための代謝経路デザイン

[1]: *myo*-イノシトール、[2]: *scyllo*-イノシトール、
[3]: *D-chiro*-イノシトール、[4]: *scyllo*-イノソース、
[5]: 1-ケト-*D-chiro*-イノシトール、[6]: 3D-(3,5/4)-トリヒドロキシシクロヘキサン-1,2-ジオン

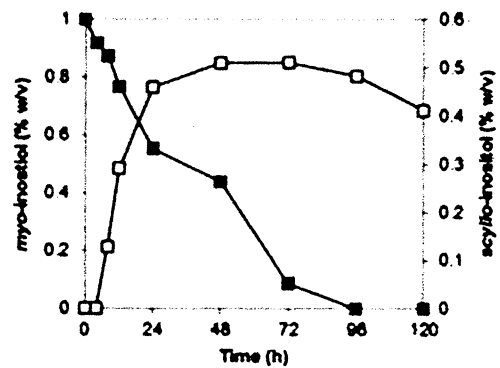


図2 バイオコンバージョンにおけるイノシトール類濃度の経時変化

■: *myo*-イノシトール濃度、□: *scyllo*-イノシトール濃度

Tel: 078-803-5891, Fax: 078-803-5891

e-mail: kenyoshi@kobe-u.ac.jp

2Ap6

サルモネラ RcsBCD 系の発現調節に関わるコネクター様因子の単離と解析

(近畿大院農・バイオ) ○萩原慧, 加藤明宣, 内海龍太郎

【緒言】

細菌は、外部の環境に自身を適応させるための情報伝達系機構として、二成分制御系(TCS)を有する。サルモネラ (*Salmonella typhimurium*) の病原性ネットワークにおいて、複数の TCS を仲介するスモールタンパク質である“コネクター”が重要な役割を担っていることが最近明らかになった。本実験ではこの新規調節因子の単離と、その機能の解析を目的とした。

【方法と結果】

サルモネラの RcsC/RcsD/RcsB 系は莢膜多糖合成遺伝子の調節に関わる TCS であり、このシステムが構成的に活性化された変異株では病原性が減弱することが知られている。そこで、RcsC/RcsD/RcsB 系を活性化する新規調節因子の単離を試みた。

まず、RcsB によって制御されている *wzc* 遺伝子に *lacZ* を融合させたレポーター株を作成した。次に、サルモネラ染色体上で 130aa 以下のタンパク質をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)として選択し、発現ベクターに組み込むことで small ORF ライブラリーを作成した。*wzc-lacZ* レポーター株にこのライブラリーを導入・発現し、*lacZ* の発現を上昇させるクローンを探索した結果、LB/X-gal プレート上で青色を呈するコロニーから pKH1 を単離した。シーケンス解析から pKH1 は 100aa の可溶性タンパク質をコードする ORF を含むことが判明し、この遺伝子を *rscG* とした。

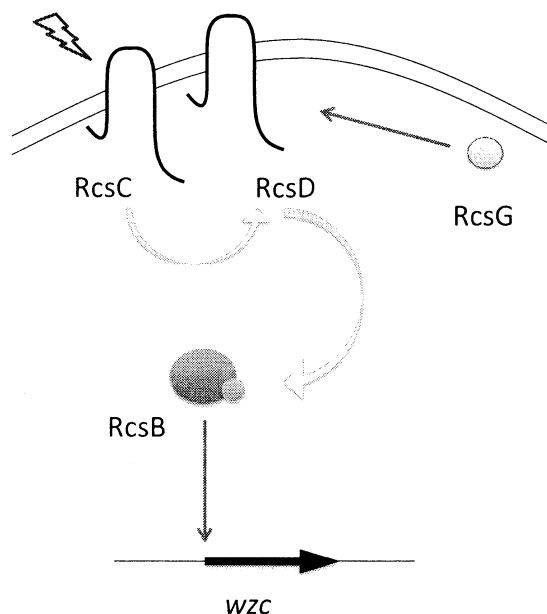
つぎに、*rscC*、*rscD*、*rscB* それぞれの欠損株では RcsG の過剰発現による *wzc-lacZ* の活性化は確認されなかった。よって、RcsG による *wzc* の活性化は RcsC/RcsD/RcsB に依存的であることが示され、リン酸リレーの関与が示唆された。

また、RcsG の直接的な標的を探索するために bacterial two-hybrid (BACTH)法を用いて、RcsC/RcsD/RcsB 系を構成する個々のタンパク質と RcsG 間の相互作用の解析を行った。その結果、RcsD と RcsG の間で相互作用が認められた。

【考察】

rscG は phospho-transferase system (PTS) や PTS regulation domain (PRD)といった他のスモールタンパク質等をコードする遺伝子群とオペロンを形成している。一方、RcsC/RcsD/RcsB 系は莢膜多糖を細胞外に形成する遺伝子の活性化に関与しているため、この TCS と糖代謝制御を仲介する因子として RcsG が機能していることが示唆された。

今後、このような RcsG の生理学的役割、また RcsG による RcsC/RcsD/RcsB 系活性化の詳細な分子機構の解明が期待される。



Tel: 0742-43-7306, Fax: 0742-43-7306

e-mail: 1033690017f@nara.kindai.ac.jp

細菌情報伝達ネットワーク間で働く、新規コネクター因子の探索と機能解析

(近大院・農・バイオ, *近畿大・工・生化工) ○植田 健陽,
石井 英治, 江口 陽子, 仲宗根 薫*, 内海 龍太郎

【緒言】

細菌細胞には、熱、pH、浸透圧など様々な環境ストレスに柔軟に適應するために、二成分情報伝達制御系 (two-component system, TCS) が広く保存されている。TCS は、環境からのストレスを感知するヒスチジinkinナーゼ (HK)、DNA 結合ドメインを有する転写制御因子であるレスポンスレギュレーター (RR) の二つタンパク質から構成されている。TCS は大腸菌において、少なくとも 29 組存在するとされているが環境中に存在する多種多様な環境ストレスに適應するために、TCS 間で複雑なネットワークが存在すると考えられている(1)。近年、この複雑なネットワークの一つとして、TCS 間をつなぐコネクタータンパク質の存在が知られてきた(2)。我々は、HK(PhoQ)を活性化し、ヒスチジinkinナーゼ活性を制御するコネクターとして、B1500(SafA) 遺伝子を初めて見出した(3)。本研究では、このような、HKの活性を制御する新たな膜タンパク質 Sensor modifying membrane protein (SMP) の探索と機能解析を行った。

【実験方法】

大腸菌のゲノム塩基配列データベースから 51~200a.a.までの膜タンパク質と推定される遺伝子 28 個を SMP 候補遺伝子として選出した。この 28 の SMP 候補と大腸菌に存在する 29 の二成分制御系の HK との相互作用を検証するため Bacteria two hybrid 法を用いて、網羅的な解析を行った。また、BasS(HK)/BasR(RR) TCS 制御下の *arnB* 遺伝子の発現を調べるために、*arnB-lacZ* 融合遺伝子株を作成し、そのベクターガラクトシダーゼ活性を測定して、*arnB* 遺伝子発現に及ぼす SMP 候補遺伝子 (*yibN*) の機能を

明らかにした。

【結果と考察】

新規 SMP 候補として、2 つの orphan(機能未知)遺伝子、*yibN*, *yceO* と 2 つの既知遺伝子、*fxsA*、*mgrB*が見出された。YibN は BasS (HK) と FxsA は 3 種の HK, EnvZ, PhoR, RstB と MgrB は EnvZ (HK), YceO は EnvZ (HK)と相互作用することが見出された。本研究では鉄に応答し、*arnB* 遺伝子を制御する BasS(HK)/BasR(RR) と機能未知である *yibN* の相互作用に着目し、その作用機構解析を行った。

arnB-lacZ レポーターアッセイ及び Real time PCR 法を用いて、*yibN* 遺伝子欠損株における *arnB* の遺伝子発現に及ぼす影響を評価した。その結果、*yibN* を欠損させることで *arnB* 遺伝子の発現量が増大した。また、YibN を過剰発現させると、*arnB* 発現量の減少が見出された。これらの結果から YibN は BasS と相互作用することで BasS の活性を制御し、BasS/BasR 制御下の遺伝子(*arnB*)の発現が抑制されることが示唆された。

引用文献

- 1) Utsumi, R. (Ed) Bacterial signal transduction : networks and drug targets. Springer (2008)
- 2) Eguchi, Y et al. Trends Biochem. Sci. 30, 70-72 (2005)
- 3) Eguchi, Y. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 18712-18717 (2007)

† Tell: 0742-43-7306, Fax: 0742-43-7306
e-mail: 1133690017w@nara.kindai.

【緒言】

アラミド(全芳香族ポリアミド)は高耐熱性・高耐薬品性を有するエンジニアリングプラスチックであり、中でも高強度であるバラ型アラミド(Twaron®)をフィブリル化したパルプは粉体担持能力に優れており、多様な材料を分散し定着することができる。このため Twaron® は、高分子複合材料として、高い導電性、撥水性、通気性が求められる無機触媒燃料電池のガス拡散層基材として検討されている。

一方、ガス拡散型バイオ燃料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、プロトンを提供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有効に機能する固相を有する、特異なバイオ三相界面構造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。

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、容易に疎水性をコントロールすることができる。そこで本研究ではアラミド Twaron® に焦点をあて、炭素微粒子、疎水性高分子(PTFE)とともに、電極基材を創成し、この電極に酵素を固定化することで、理想的な三相界面を形成することを目的とした。

またこの場合、電極の疎水性度の主な制御因子として、PTFE 量に注目し、理想的な三相界面モデルを提案することを目的とした。

【実験方法】

適量のパルプ状 Twaron® と炭素微粒子 KetjenBlack (以下 KB) と、水分散タイプの PTFE を、水中で攪拌した。その混合溶液をブフナー漏斗でろ過し水を取り除き、漏斗に残った混合物をプレス・加熱した。そこへ銅エフラックスオキシダーゼ

(以下 CueO) を固定化した。それを作用電極に、対極に白金線、参照電極に銀/塩化銀電極を用いたガス拡散型セルにて、酸素雰囲気下でサイクリックボルタメトリーを行った。電極へ加えた PTFE の量と、その各々の電極におけるの-0.3 V での電流密度をプロットした。

【結果と考察】

PTFE 含有量が 20% の電極で 40 mAcm^{-2} 以上の極めて高い電流密度が記録された(Fig 1)。これは世界的にもトップクラスの性能である。一方、PTFE 含有量が 20% 以上の電極では、電極の疎水性度が高すぎたため、電極と電解質との接触面積が小さく、その結果低い電流密度となったと考えられた。また、PTFE 含有量が 20% 以下の電極では、疎水性度が低すぎたため電解質が気相側にまで浸透し、酸素を供給する経路を遮断したため、低い電流密度となったと考えられた。

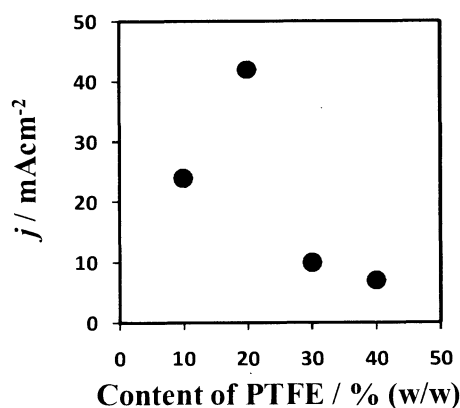


Fig 1 電極に含まれる PTFE 量と電流密度の関係

【結言】

パルプ状 Twaron® は炭素微粒子の良好な担体として機能し、添加する PTFE の量で疎水性度を制御し、高機能なバイオ三相界面形成に適した電極を創成した。

Tel: 075-753-6393, Fax: 075-753-6456

e-mail:itaruA@kais.kyoto-u.ac.jp

2Ba1

カイコ幼虫腸管組織における脂溶性抗酸化物質の解析

(京大院農応用生命) ○網干貴子, 西田律夫, 森直樹

【緒言】

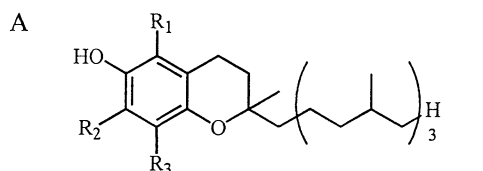
植物は病原菌の感染や昆虫の食害を受けると、体内で活性酸素種が増加することが知られている。昆虫腸管内においても植物成分の消化により活性酸素種の増加が報告されているが、抗酸化物質や抗酸化酵素の活性化により細胞傷害を抑制していると考えられる。そこで、本研究では特に脂溶性の抗酸化物質に注目し、カイコ幼虫体内における分布を解析した。

【実験方法】

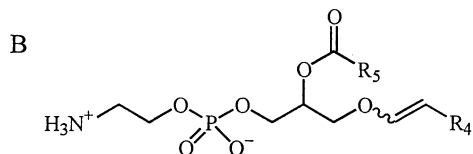
カイコ 5 齢幼虫を解剖し、各組織の極性脂質を Bligh-Dyer 法に従って抽出し、tocopherol を diethylether で抽出した。各抽出溶液の一部を窒素気流にて濃縮乾固し、methanol に溶解させて LCMS-IT-TOF に供試した。なお、極性脂質のイオン化には ESI 法、tocopherol のイオン化には APCI 法を用いた。

【結果】

カイコ幼虫組織より plasmalogen phosphatidylethanolamine (pPE) (18:1p-18:3PE, 18:1p-18:2PE) と tocopherol (α -tocopherol, β -



α -Tocopherol, $R_1=R_2=R_3=CH_3$; β -Tocopherol, $R_1=R_3=CH_3$, $R_2=H$; γ -Tocopherol, $R_1=H$, $R_2=R_3=CH_3$; δ -Tocopherol, $R_1=R_2=H$, $R_3=CH_3$



18:1p-18:3PE, $R_4=C_{16}H_{33}$, $R_5=C_{17}H_{29}$;
18:1p-18:2PE, $R_4=C_{16}H_{33}$, $R_5=C_{17}H_{31}$

図 1. Tocopherol (A) と pPE (B) の構造.

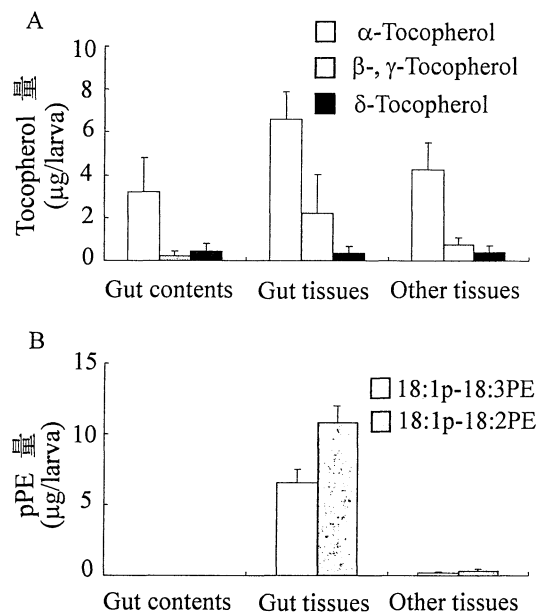


図 2. カイコ幼虫各部位の tocopherol (A) と pPE (B) の量 ($n=3$, mean \pm SEM).

γ -tocopherol, δ -tocopherol)を同定した (図 1). Tocopherol は幼虫の様々な部位から検出されたのに対し、pPE は主に腸管組織のみから検出された (図 2). また、pPE は幼虫の餌である人工飼料やクワの葉から検出されず、幼虫体内での生成が示唆された。

【結言】

カイコ幼虫組織より脂溶性抗酸化物質 pPE と tocopherol を同定した。pPE は主に腸管組織に局在することから、植物成分の消化の過程で生じる酸化ストレスの抑制に関与している可能性がある。

TEL: 075-753-6307, FAX: 075-753-6312

E-mail: frecher@kais.kyoto-u.ac.jp

【目的】

アルツハイマー病 (AD) の原因物質である 42 残基のアミロイド β (A β 42) は, 凝集することにより神経細胞毒性を示す。最近, 本研究グループは, マリアアザミ種子の抽出物である silymarin が *in vitro* 及び *in vivo* において抗 AD 活性を示すことを明らかにした¹⁾。また, Silymarin に含まれるフラボノイドのうち, (+)-taxifolin (Fig.1) が A β 42 の凝集を抑制すること, B 環の 3', 4' 位の水酸基が凝集抑制活性に重要であることを見いだした。本研究は, (+)-taxifolin による A β 42 の凝集抑制機構を解明すること目的として, まず固体 NMR を用いた相互作用部位の解析を行った。一方, カテコール構造を有する A β 42 の凝集抑制物質の多くは, 酸化体 (*o*-キノン体) の形成が活性発現に重要であることが報告されている²⁾。そこで, (+)-taxifolin による A β 42 の凝集阻害活性に B 環カテコール構造の酸化が関わっているかどうかについても検討した。

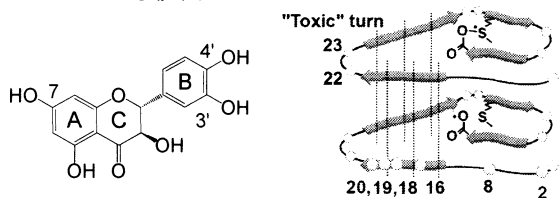


Fig.1 (+)-Taxifolin と A β 42 の毒性コンホマー³⁾
右図内の点線は水素結合を, 2-20 の数字は ¹³C 標識アミノ酸残基を示す。

【方法・結果】

ベンゼン環を ¹³C 標識した vanillin を出発原料として, 6 段階で ¹³C₆-(±)-taxifolin を得たのち, Daicel CHIRALCEL OJ-RH を用いて光学分割し, ¹³C₆-(+)-taxifolin を光学純度 98% ee で得た。一方, A β 42 の N 末端及び分子間 β -シート領域にある 6 つのアミノ酸残基を, 選択的に ¹³C, ¹⁵N 標識した (Fig.1)。標識 A β 42 と ¹³C₆-(+)-taxifolin を PBS (pH 7.4) 中, 37 °C で 48 時間インキュベートし, 得られたフィブリルを二次元固体 NMR 測定 (DARR 法) に供した。その結果, A β 42 に対して 10 倍量以上の ¹³C₆-(+)-taxifolin を添加したにも関わらず, 非常に弱いクロスピークしか観測されなかった。これより, A β 42 と (+)-taxifolin の相互作用は水素結合や共有結合を介したものではない可能性が考えられる。

次に, *o*-キノン体が A β 42 の凝集抑制活性に関わっているかどうかを検証するため, (+)-taxifolin の UV スペクトルを経時的に調べたところ, (+)-taxifolin は A β 42 の凝集を抑制するとともに *o*-キノン体を形成していることが明らかになった。さらに, 酸化剤である NaIO₄ を添加すると A β 42 の凝集抑制能は増大した (Fig. 2)。このとき生成した *o*-キノン体はフェニレンジアミンで

捕捉することにより確認した。興味深いことに, 嫌氣的条件下では (+)-taxifolin は *o*-キノン体を形成せず, 凝集をほとんど抑制しなかった (Fig. 2)。以上の結果より, 空気酸化による (+)-taxifolin の酸化体の形成が凝集抑制活性に不可欠であることが示唆された。

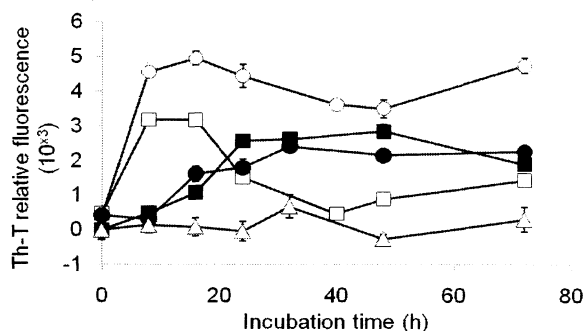


Fig. 2 (+)-Taxifolin による A β 42 凝集阻害活性 (好氣的条件下) ○; A β 42, □; A β 42:(+)-tax = 1:2, △; A β 42:(+)-tax:NaIO₄ = 1:2:4 (嫌氣的条件下) ●; A β 42, ■; A β 42:(+)-tax = 1:2

【結語】

本研究グループはこれまで, A β 42 の 35 番目のメチオニン残基 (Met35) が凝集能に重要な役割を果たすことを明らかにしている⁴⁾。Tyr10 のラジカルから生じた Met35 の硫黄ラジカルが, C 末端のカルボキシアニオンと共有結合することで安定化し, これにより形成された疎水性領域を核として A β 42 の凝集が促進される。Met35 が酸化されると硫黄ラジカルの形成が抑制されることから, A β 42 の凝集能は低下するものと考えられる。本研究より, A β 42 と (+)-taxifolin は直接相互作用するのではなく, 空気酸化された (+)-taxifolin が A β 42 の Met35 を酸化することによって凝集を抑制する機構が考えられる (Fig. 3)。現在, LC-MS を用いて Met35 酸化体の解析を行っている。

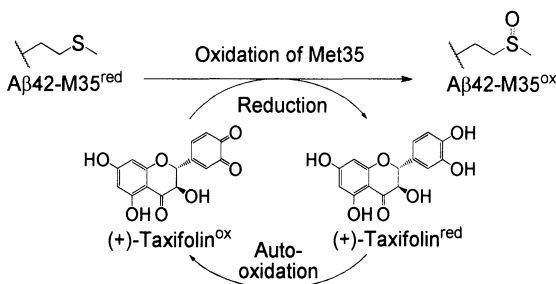


Fig. 3 (+)-Taxifolin による A β 42 の凝集抑制機構

- 1) Murata, N. *et al.*, *BBB* **2010**, 74, 2299.
- 2) Lashuel, H. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 42881.
- 3) Masuda, Y. *et al.*, *ChemBioChem* **2009**, 10, 287.
- 4) Murakami, K. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 15168.

†Tel: 075-753-6281, Fax: 075-753-6284
E-mail: irie@kais.kyoto-u.ac.jp

2Ba3

ニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性決定に対する非古典的 loop の寄与

(近大院農、*理研播磨, **阪大産研) ○松井美佳奈, 浅野拓也, 伊原誠*, 山下敦子*, 岡島俊英**, 松田一彦

【緒言】

殺虫剤ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に対して選択的に作用する. 演者らは nAChR のリガンド結合部位をつくる6種の古典的 loop (loop A~F) のうち, loop C および D との相互作用が選択的な活性発現に重要であることを明らかにしてきた¹⁾.

ネオニコチノイドの一種イミダクロプリド(IMI)の C=N-NO₂ 結合を C=CH-NO₂ に置換し CH-IMI に変化させると神経活性が上昇するが, その機構は不明であった(図 1). そこで本研究では, nAChR のサロゲートタンパク質 acetylcholine binding protein (AChBP) との共結晶構造をもとに, これまで未同定の, ネオニコチノイド感受性に影響する受容体因子を見出したので報告する.

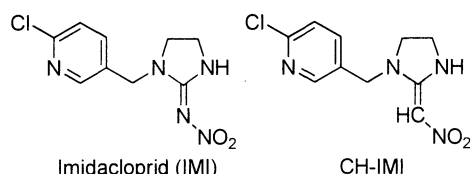


図 1. イミダクロプリドと CH-IMI

【実験方法】

AChBP との相互作用の解析

AChBP と化合物との相互作用はトリプトファン蛍光消光法および Isothermal Titration Calorimetry (ITC) により測定した.

X線結晶構造解析

AChBP は酵母を用いて発現させ, 各種のクロマトグラフィーで均一に精製した. そして様々な沈殿剤条件下で AChBP を試験化合物とともに結晶化させた. 結晶の X 線回折データは SPring8 で収集し, 共結晶の 3 次元構造を決定した.

α7 nAChR に対するアゴニスト活性

野生型および変異を有する α7 nAChR は核インジェクション法によりアフリカツメガエル卵母細胞で発現させた. 受容体に対する化合物のアゴニスト活性は, 二極膜電位固定法により測定した.

【結果と考察】

トリプトファン蛍光消光法および ITC のいずれの手法で測定しても, CH-IMI は IMI よりも AChBP に対して高い親和性を示した.

AChBP との結晶構造中で IMI のイミダゾリジン環は loop C の Tyr185 とスタッキングし, ピリジン環は loop E の主鎖と水を介して水素結合した. そしてネオニコチノイドに特有の IMI のニトロ基は loop D の Gln55 と水素結合した. 一方 AChBP-CH-IMI 複合体では, AChBP-IMI 複合体で見られた相互作用のみならず, 古典的 loop に属さない Lys34 との水素結合も見られた.

以上の知見をもとに, α7 nAChR において AChBP の Lys34 に対応するアミノ酸をリシンに置換すると, 受容体のネオニコチノイド感受性は有意に増大した. このことから, 当該位置のアミノ酸は nAChR のネオニコチノイド感受性の決定に貢献していることが示唆された.

【結言】

nAChR の非古典的 loop に位置するアミノ酸の構造変化が受容体のネオニコチノイド感受性に対して有意に影響することが示された. 当該アミノ酸は昆虫 nAChR では塩基性であることから, 昆虫に対するネオニコチノイドの選択的毒性発現に関わっているものと推察された.

引用文献

1) K. Matsuda et al., *Mol. Pharmacol.*, **76**, 1-10 (2009).

2Ba4

Acylglyceride の抗菌活性の検討

(信州大農, *信州大院農) ○上浦一葉, 秋山朋美, 西崎 綾, 真壁秀文*, 廣田 満†

食品や化粧品の保存にはソルビン酸やパラベンなどの抗菌剤が用いられてきたが, 安心の面から使用が控えられる傾向があり, 毒性の少ない安全な抗菌物質が求められている。

我々は, 植物から抗菌活性物質を探索する過程で, トチュウ (*Eucommia ulmoides* Oliv.) の葉から抗菌活性物質として, 1-linolenoylglyceride (1) と, 1 と 2-linolenoylglyceride (2) の混合物を得た。これらの抗菌活性を調べたところ, 1 単独よりも 1, 2 混合物の方が強いと考えられた。

monoacylglyceride の抗菌性については, すでに知られており, 食品用の日持向上剤や化粧品の乳化剤として利用されている^{1,2)}。しかし, 文献調査した限りでは, monoacylglyceride の詳細な抗菌活性については報告がない。そこで, 1-acylglyceride と 2-acylglyceride を位置選択的に合成し, それぞれの抗菌活性を調べることを目的として研究を行った。

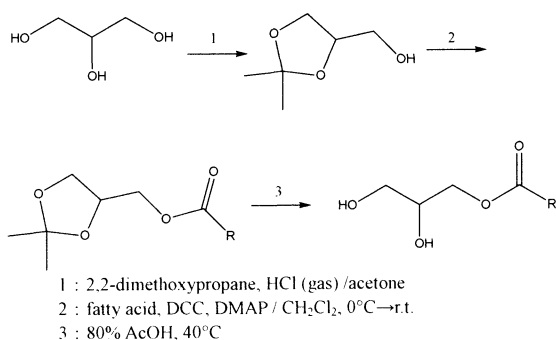


図1 1-Acylglyceride の合成スキーム

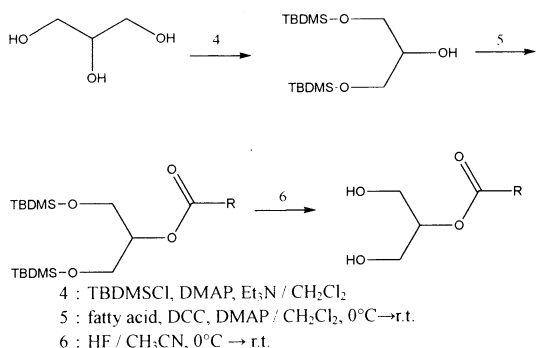


図2 2-Acylglyceride の合成スキーム

1-Acylglyceride の合成

1-acylglyceride の合成は図1に示すスキームで行った。

glycerol の 1, 2 位水酸基をアセトナイドとして保護し, 脂肪酸, DCC, DMAP を用いてエステル化を行った。得られたエステルを, 80%酢酸で脱保護をおこない 1-acylglyceride を得た。

2-Acylglyceride の合成

2-acylglyceride の合成は図2に示すスキームで行った。glycerol の 1 級水酸基を TBDMS で保護したのち, 脂肪酸, DCC, DMAP による反応でエステルを得た。TBN[†]による脱保護を行ったが, 2 位から 1 位への acyl 基の転移が認められた。そこで, 試薬を HF に変更し, 脱保護を行ったところ 2-acylglyceride を得た。2-acylglyceride は NaHCO₃ 水溶液で処理するだけでも, 容易に 1-acylglyceride へと異性化する。塩基性条件にしないことで転移が抑えられると考えられる。

抗菌試験

合成化合物を MeOH で溶解し, ペーパーディスク法にて抗菌活性試験を行った。Control としては *p*-hydroxybenzoic acid を用いた。

1-acylglyceride は *B. subtilis* 及び *S. aureus* のグラム陽性菌だけでなく, グラム陰性菌である *E. coli* に対しても抗菌活性を示した。またその抗菌活性は炭素数 12 の 1-lauroylglyceride の場合で最も強い。また, 炭素数 18 の長鎖の脂肪酸では, 2 重結合を持つと抗菌活性が認められた。2-acylglyceride の抗菌活性は現在検討中である。

表1 1-Acylglyceride の抗菌活性

Sample (1.0 × 10 ⁴ ppm)	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	+	+	+
1-octanoylglyceride	++	++	+
1-decanoylglyceride	++	++	+
1-lauroylglyceride	+++	+++	-
1-stearoylglyceride	-	-	-
1-oleoylglyceride	-	+	+
1-linoleoylglyceride	+	++	++
1-linolenoylglyceride	+	++	+

阻止円直径 > 20 mm, +++: 20-10 mm, ++: 9-7 mm, +: < 7 mm, -

文献

- 1) Anti-microbial effects of 1-monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids, J. Ruzicka, et al., *Eur. Food Res. Technol.*, **217**, 329-331, 2003.
- 2) Esterification of fatty acids with glycerol over Fe-Zn double metal cyanide catalyst, M. Kotwal, et al., *Catalysis Communications*, **12**, 1302-1306, 2010.

†Tel: 0265-77-1605 Fax: 0265-77-1629

e-mail: hirotam@shinshu-u.ac.jp

NMRによる茶ポリフェノールとシクロデキストリンとの相互作用に関する研究

2Ba5

(静岡県大院生活健康・食栄)

○西澤正人, 黒田哲矢, 杉山靖正, 熊澤茂則*

【緒言】

茶に含まれるポリフェノール的一种であるカテキン類は特有の苦味・渋味を持つことが知られている。茶の発酵過程でカテキン類は重合して紅茶の主要ポリフェノールであるテアフラビン類を生成するが、テアフラビン類もカテキン類と同様に苦味・渋味があると考えられている。カテキン類にシクロデキストリン(CD)を添加することによって苦味・渋味は低減することが知られており、カテキン類とCDとの相互作用は一部研究されている。しかし、テアフラビン類とCDとの詳細な相互作用は明らかにされていない。そのため、本研究ではNMRを用いてテアフラビン類およびカテキン類とCDとの相互作用の解析を試みた。

【実験方法】

テアフラビン類およびカテキン類とCD(α -, β -, γ -)のモル濃度比を変えて重水(D₂O)中で¹H-NMRを測定し、化学シフトの変化から相互作用の有無を確認した。また、連続変化法により各ポリフェノール類とCDとの化学量論比を求めた。さらに、DOSY(Diffusion ordered spectroscopy)法を用いてCDとの包接評価のために拡散係数を算出した。これらの結果より、各ポリフェノール類とCDとの包接の判定を行った。

【結果と考察】

図1に示すように、Theaflavin 3,3'-di-O-gallate(TFDg)はCD共存下において、モル濃度比を変えることで¹H-NMRの化学シフト値が変化した。特に、 β -CDの共存下においてTFDgの化学シフト値は大きな変化を示すことが明らかとなった。また、(-)-Epigallocatechin gallate(EGCg)においても、 β -CDの共存下において化学シフト値は大きな変

化を示した。これは、TFDgおよびEGCgと β -CDとの相互作用による磁気的環境の変化によるものと考えられた。TFDgと各CDとの化学量論比はTFDg:CD=1:1であった。さらに、DOSYの結果を解析したところ、TFDgのみの場合と、CDが共存した場合の拡散係数では違いがみられた。特に β -CD共存下におけるTFDgの拡散係数は、 β -CDの拡散係数と非常に近い値を示した。EGCgの場合においても同様であった。したがって、TFDgおよびEGCgはCDに包接されていることが推定された。

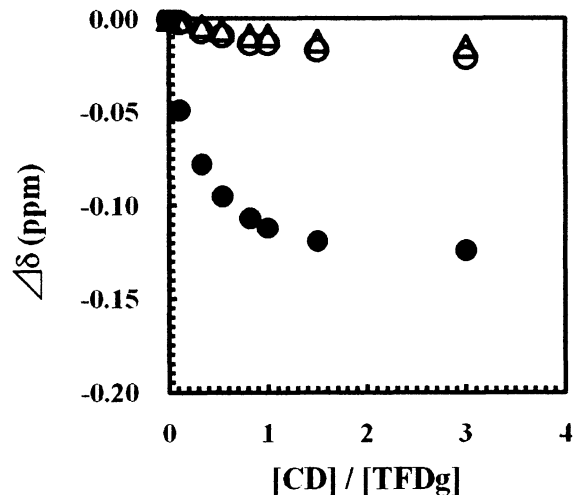


図1. TFDgと各CDとの濃度変化による化学シフト変化量 (H-3位)

○: α -CD, ●: β -CD, △: γ -CD

*TEL: 054-264-5523, FAX: 054-264-5523
e-mail: kumazawa @ u-shizuoka-ken.ac.jp

沖縄産野生種ベリーのアントシアニン分析と抗酸化活性

(静岡県大・食品栄養, *(株)ポッカコーポレーション,

**沖縄県森林資源研究センター)

○久保田通代, 石川千絵, 杉山靖正, 福本修一*, 宮城健**,

熊澤茂則†

2Ba6

【目的】

アントシアニンとは植物に含まれる紫色の天然色素成分であり、近年、その色調以外にも、抗酸化活性や視覚改善機能などの機能が注目されるようになってきた。ベリー果実にはアントシアニンが豊富に含まれており、その機能性に寄せられる期待は大きい。世界には何種類もの野生種ベリーが自生しているが、その利用に関しては、未だ手つかずのものも多く、品種によっては研究例のないものもある。そこで本研究では、これらベリー類の有効活用を目的として、沖縄産の野生種ベリーであるリュウキュウバライチゴ (*Rubus croceacanthus*) とハウロクイチゴ (*Rubus sieboldii*) について、アントシアニン成分の分析および抗酸化活性評価を行った。

【アントシアニン成分の単離と同定】

リュウキュウバライチゴとハウロクイチゴの凍結乾燥粉末を 80% メタノールで抽出した。得られた抽出物を、各種クロマトグラフィーにより精製し、それぞれのイチゴから、2種類ずつのアントシアニン成分を単離した。

単離したアントシアニン成分については、¹H および ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC, MS スペクトルにより同定を行った。その結果、リュウキュウバライチゴには、cyanidin-3-glucoside (1) および pelargonidin-3-glucoside (2)、ハウロクイチゴには、pelargonidin-3-glucoside (2) および pelargonidin-3-rutinoside (3) が含有されていることが明らかとなった (図 1)。

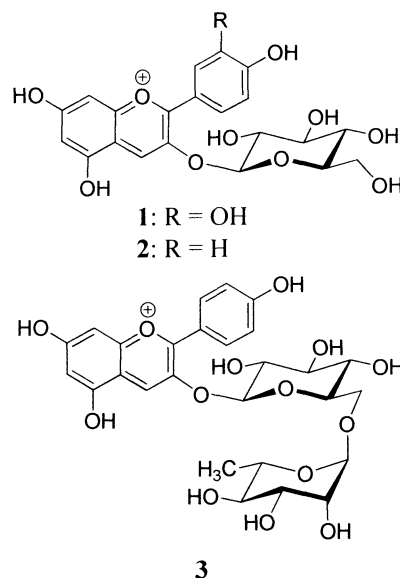


図 1. 沖縄産野生種ベリー中のアントシアニン

【抗酸化活性評価】

2種の沖縄産野生種ベリーと同じバラ科イチゴ属のラズベリー (*Rubus idaeus*) を比較対象とし、ORAC 法による抗酸化活性評価を行った。その結果、沖縄産野生種ベリー、特にリュウキュウバライチゴは、ラズベリーよりも高い抗酸化活性を示した (図 2)。

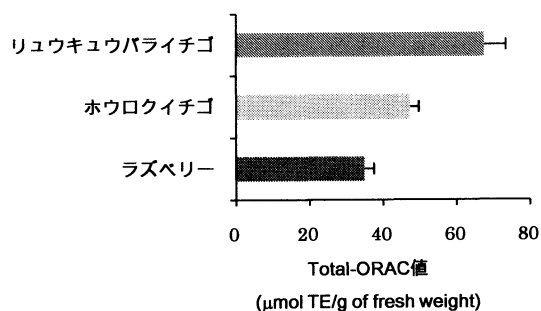


図 2. 沖縄産野生種ベリーの抗酸化活性

†Tel: 054-264-5523, Fax: 054-264-5523

e-mail: kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp

2Bp1

ガレート型タンニンとカフェインの分子間相互作用の解析

(静岡県大院食栄) ○太田有香, 石井剛志[†], 中山勉

【諸言】

クリームダウンは、紅茶や緑茶などが冷却されて溶液が白濁する現象である。白濁は、含有成分同士の凝集により生成した不溶化物（クリーム）であり、分子内にガロイル基を持つガレート型タンニンやカフェイン（CF）を主成分として含んでいる。これらの成分は苦渋味や生理活性を有するために、クリームの形成により茶の風味や機能性は損なわれる可能性がある。クリームの形成機構は、ガレート型タンニンと CF の分子間相互作用に起因すると考えられているが、その詳細は明らかになっていない。本研究では、クリームダウンを成分間の分子間相互作用の観点から解析し、クリームの形成機構に関する新たな知見を得ることを目的とした。

【実験方法】

分子内にガロイル基を 5 つ持つタンニン酸（TA）をガレート型タンニンのモデルとして用いた。室温下において、TA と CF を異なる濃度比で混合し、濁度測定を行うことによりクリームの形成を評価した。混合物を遠心分離して上清と沈殿を回収し、TA と CF の含有量を HPLC 法により評価した。等温滴定型カロリメトリー（ITC）により TA と CF の分子間相互作用を熱力学的に分析し、クリームの形成と分子間相互作用との関連性を解析した。

【結果と考察】

濁度測定により、TA と CF を混合することで室温下においてもクリームが形成されること、クリームの形成には一定量以上の CF を必要とすること、混合する TA の量が増加することで一定時間後に形成されるクリームの量が増加することを明らかにした。また、クリームの形成は溶液の温度、溶液の pH、およびカルシウムイオンなどの夾雑成分の濃度に影響されることを確認した。

ITC により、クリームの形成が認められる条件下では TA と CF の分子間相互作用は発熱反応であり（図 1）、両者が水溶液中で相互作用することを確認した。分子間相互作用の熱力学特性はエンタルピー・エントロピー両駆動型であり、相互作用の形成に水素結合と疎水性相互作用が関与することが示唆された。クリームの形成が殆んど認められない条件下でも熱量変化が観測されたことから、TA と CF の相互作用はクリーム形成を惹起する初期要因であることが推察される。

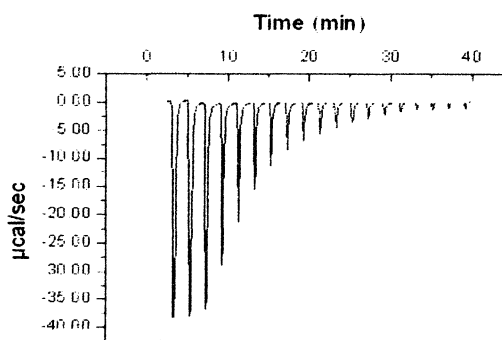


図 1 ITC による TA と CF の相互作用解析
負の熱量変化は分子間相互作用が
発熱反応であることを示す。

【結言】

ガレート型タンニンのモデルとして TA を用いることで、クリームダウンを室温下で分析する実験系を確立した。TA と CF は水素結合と疎水性相互作用を介して複合体を形成することが予想されるが、分子間の相互作用はクリームの形成が殆んど認められない条件下でも観測された。クリームの形成には複数の TA や CF を介した複雑な複合体の形成を必要とする可能性がある。

Tel: 054-264-5525, Fax: 054-254-5551

e-mail: ishii_t@u-shizuoka-ken.ac.jp

2Bp2

化学分析とミツバチの行動学的観察による 韓国済州島産プロポリスの起源植物の解明

(静岡県大院生活健康・食栄, *玉川大ミツバチ科学研究センター, **韓国東亜大食品栄養) ○下村幸佑, 杉山靖正, 中村 純*, 安 木蓮**, 熊澤茂則†

【背景・目的】

プロポリスは、ミツバチが植物の樹脂状物質を巣内に塗布したものであり、様々な生理作用をもつことから健康素材として広く利用されている。ミツバチは、巣の周辺に生育する植物の中からプロポリスの材料とする植物（起源植物）を選定する。この為、プロポリスの形態、成分、生理作用は採取地域によって様々であり、世界各地のプロポリスを的確に有効利用するには採取地域別にプロポリスを研究する必要がある。また、プロポリス中の生理活性成分は起源植物から大量抽出することが期待できる為、起源植物の解明は産業的にも重要である。

これまでに我々は、韓国の済州島で採取されるプロポリスが他のいずれの地域のプロポリスとも異なる成分組成をもつことを明らかにした¹⁾。そこで、済州島産プロポリスの有効利用を目的に、本研究では同プロポリスの成分分析を行った。また、化学分析とミツバチの行動学的観察によって、同プロポリスの起源植物を探索した。

【成分分析】

済州島産プロポリスのエタノール抽出物を主に分取 HPLC によって分画し、27 個の化合物を単離した。NMR や MS による構造解析の結果、これらは 8 個の新規カルコン類、10 個の既知カルコン類及び 9 個の既知クマリン類であることが明らかになった。

【起源植物の探索】

済州島産プロポリスから単離された既知化合物の多くは、明日葉 (*Angelica keiskei*) の含有成分として報告されていた。そこで、明日葉が同

プロポリスの起源植物であると推測し、済州島でミツバチの行動学的観察を行った。その結果、済州島に存在する明日葉の栽培場で、明日葉をプロポリスの材料として利用するミツバチを観察することに成功した。すなわち、ミツバチは、明日葉の収穫後の切断面や節等から滲出する黄色の粘性物質を、口を用いて後脚の花粉籠に集めていた。また、栽培場で採取した明日葉の滲出液と、同栽培場近辺の養蜂場で採取したプロポリスのメタノール抽出物は、非常に近い HPLC パターンを示した (図 1)。これらの結果から、韓国済州島産プロポリスの起源植物は明日葉であることが明らかになった。

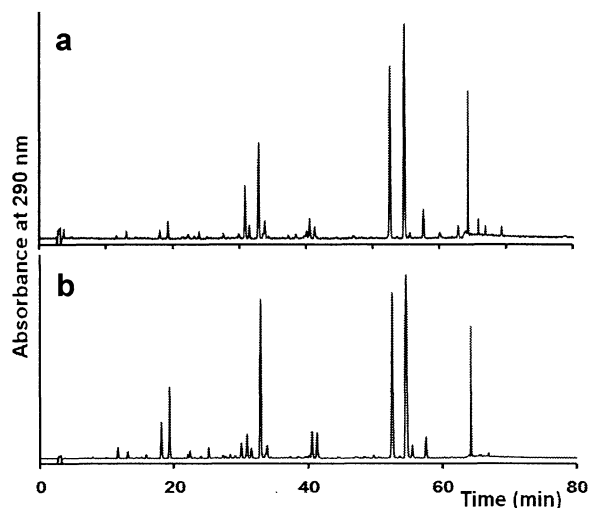


図 1. メタノール抽出物の HPLC パターン

- (a) 韓国済州島産プロポリス
(b) 明日葉滲出液

引用文献

- 1) S. Kumazawa *et al.*, *Food Sci. Technol. Res.*, 12, 67-69 (2006).

†Tel: 054-264-5523, Fax: 054-264-5523

e-mail: kumazawa@u-shizuoka-ken.ac.jp

Cyclolobatriene, a New Ten-Membered-Ring Lobane Diterpene from Soft Coral *Lobophytum pauciflorum*

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University. *Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University. **OP Biofactory Co. Ltd.) ○Sudhakar V. S. Govindam, Yukio Yoshioka*, Akihiko Kanamoto**, Takeshi Fujiwara**, Tetsuji Okamoto*, Makoto Ojika†.

[Introduction]

The soft corals are known as rich sources of sesquiterpenes and diterpenes with wide structural diversity and pronounced bioactivities. The lobane diterpenes are elemenes or germacrenes with an additional isoprenyl unit. In the present paper, we describe the isolation, structure elucidation and cytotoxic effect of a new lobane diterpene named cyclolobatriene (**1**) along with three other known diterpenes, lobatriene (**2**), eunicol (**3**), and fuscol (**4**) from an Okinawan soft coral *Lobophytum pauciflorum*.^{1,2}

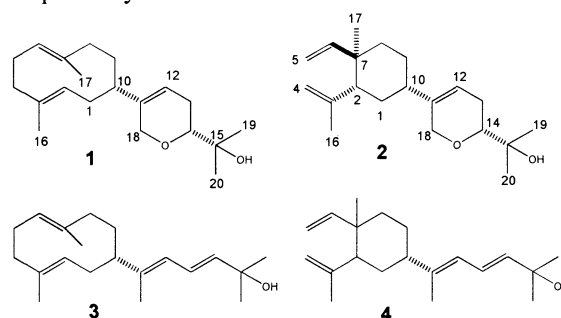
[Method]

The *L. pauciflorum* collected off Taketomijima Island, Okinawa were extracted with MeOH, followed partitioning with EtOAc and water. Bioassay guided separation of the EtOAc extract on silica gel flash column, followed by recycling HPLC, afforded four cytotoxic compounds **1–4**. Cytotoxic assay was performed on human epidermoid carcinoma A431 cells by a coulter counter.

[Results and Discussion]

Compounds **1–4** were obtained in the yields of 0.13, 0.020, 0.011, and 0.003%, respectively, from 210 g (wet wt.) of the soft coral. The structures of **2–4** were established by comparing their ¹H NMR data with published data.^{1,2} Cyclolobatriene (**1**), [α]_D²⁶ +56.5° (*c* 0.139, CHCl₃), appeared as a colorless oil and exhibited IR absorption at 3472 cm⁻¹ due to hydroxyl groups. It showed a molecular ion peak at *m/z* 329.2334 [M+Na]⁺ in the HRESI-TOF-MS, that is compatible with the molecular composition of C₂₀H₃₂O₂. The ¹H NMR spectrum in CDCl₃ at 7 °C exhibited six olefin signals for two protons, which confirmed the existence of three conformational isomers of **1**. The ¹H and ¹³C NMR data of the three conformers of **1** were unambiguously assigned by the DQF-COSY, HMQC and HMBC correlations. The

conformers of **1** exist in a ratio of 44:32:24 at 7 °C in CDCl₃, and were thermally unstable and converted into **2** through Cope rearrangement upon heating at 70 °C. Compound **3** also exists as three conformers in CDCl₃, and isomerised to **4** upon heating at 70 °C. All the four compounds **1–4** showed cytotoxic effect with IC₅₀'s of 0.21, 0.15, 0.14 and 0.18 μg/mL, respectively.



[Summary]

A new ten-membered-ring diterpene, cyclolobatriene (**1**), along with three known diterpenes (**2–4**) were isolated from the soft coral *L. pauciflorum*. The compounds **1** and **3** exist as a mixture of three conformers in CDCl₃. **1** and **3** are thermally unstable and tend to isomerise to **2** and **4** through Cope rearrangement, respectively. This fact suggests that the elemene-type diterpenes (e.g., **2** and **4**) are the artifacts of their ten-membered-ring diterpene congeners (e.g., **1** and **3**). All the four diterpenes showed cytotoxic effect.

References

- 1) R. A. Edrada *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 358-361(1998)
- 2) M. B. Saleh and R. G. Kerr, *Aust. J. Chem.*, **63**, 901-906 (2010)

† Tel: 052-789-4284

e-mail: ojika@agr.nagoya-u.ac.jp

Structure-activity relationship of α hormones, the mating factors of phytopathogen *Phytophthora*

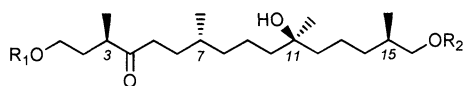
(Bioagricultural Sci., Nagoya Univ., * Pharmaceutical Sci., Zhejiang Univ., China, ** Applied Biosci., Tokyo Univ. of Agriculture) ○Shylaja D. Molli, Jianhua Qi*, Arata Yajima**, Keisuke Shikai**, Tadashi Imaoka**, Tomoo Nukada**, Goro Yabuta**, Tomoyo Asano, Youji Sakagami and Makoto Ojika†

[Introduction]

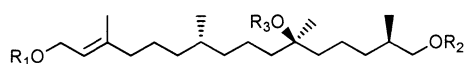
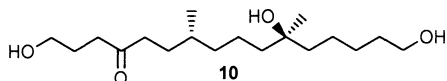
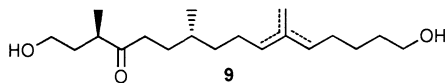
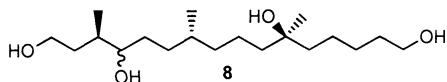
The species of the agricultural pest *Phytophthora* destroys numerous crops world-wide every year. The heterothallic species of this Oomycete utilises two mating hormones $\alpha 1$ (1)¹ and $\alpha 2$ (2)² to regulate sexual reproduction in A2 and A1 mating type strains, respectively. The main focus of the study was on the relationship between the hormonal activity and the chemical structures of these hormones.

[Method]

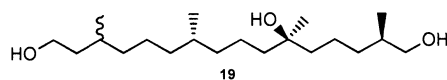
Eight derivatives of $\alpha 1$ (1) and eight derivatives of $\alpha 2$ (2) were synthesized from natural hormones or total synthesis. To evaluate the hormonal activity,



- $\alpha 1$ (1): $R_1 = R_2 = H$
 3: $R_1 = R_2 = Ac$ 4: $R_1 = R_2 = p\text{-}BrC_6H_4CO$
 5: $R_1 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$, $R_2 = H$
 6: $R_1 = H$, $R_2 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$
 7: $R_1 = R_2 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$



- $\alpha 2$ (2): $R_1 = R_2 = R_3 = H$
 12: $R_1 = Ac$, $R_2 = R_3 = H$ 13: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = Ac$
 14: $R_1 = R_2 = Ac$, $R_3 = H$ 15: $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Ac$
 16: $R_1 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$, $R_2 = R_3 = H$
 17: $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$
 18: $R_1 = R_2 = p\text{-}BrC_6H_4NHCO$, $R_3 = H$



Phytophthora nicotianae (A1 types) were cultured on 20% V-8 juice media. An $\alpha 1$ derivative on a paper disc was placed on the A2 colony, and after 3 days, oospores were counted. An $\alpha 2$ derivative on a membrane filter was placed on the A1 colony, and after 4 days oospores were observed.

[Results and Discussion]

The hormonal activity is based on their oospore inducing ability. The terminal ester derivatives of $\alpha 1$, 3 and 4, retained the activity. Hydrolysis of 3 and 4 by the non-specific esterases of the organism may occur to recover the terminal OH groups of 1. Introduction of carbamoyl group(s) to the terminal hydroxyls (5 - 7) suppressed the activity, which may be due to the inability to hydrolysis. Dihydro (8), dehydro (9), and demethyl (10) derivatives showed least activity. Contrary to $\alpha 1$, acetates of $\alpha 2$ (12 - 15) showed no or least activity. The carbamoyl derivatives 16 - 18 completely suppressed the activity. The saturation of double bond at C-2 (19) position showed almost no activity.

[Summary]

The structural features required for the hormonal activity of $\alpha 1$ (1) are, (a) all the three hydroxyl groups, (b) carbonyl group at C-4, (c) the methyl group at C-3. In the case of $\alpha 2$ (2), (a) all the three OH groups, (b) double bond at C-2 are required for oospore formation. The modification of the original structures didn't show any advantage over the natural ones.

[References]

- 1) Qi, J. *et al.*, *Science*, **309**, 1828 (2005).
- 2) Ojika, M. *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 591-593 (2011).

†Tel: 052-789-4284, e-mail: ojika@agr.nagoya-u.ac.jp

2Bp5

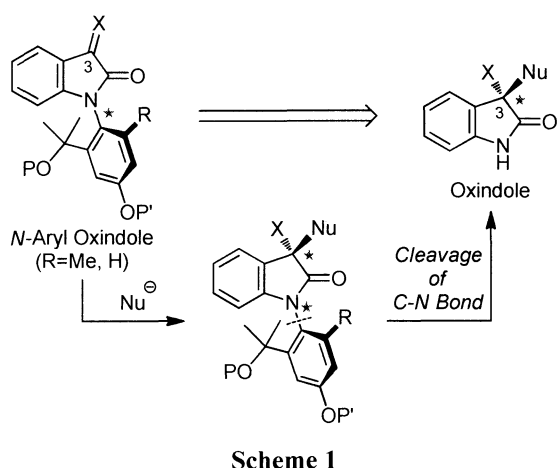
C-N 軸性キラルティを利用した 3,3-二置換オキシインドールの新規立体制御法

(¹名大院生命農, ²東理大薬)

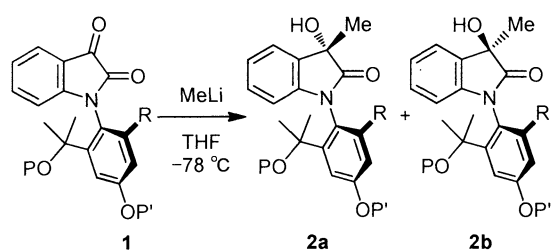
中崎敦夫¹, ○森 綾子^{1†}, 小林 進², 西川俊夫¹

【緒言】

3 位に不斉四置換炭素を有するオキシインドール骨格は生理活性を示す天然物に広く見受けられ、この骨格の構築法は現在までに種々開発されている。今回我々は、*N*-アリールイサチン ($X=O$) の分子内軸性キラルティを利用して、オキシインドールの 3 位に不斉四置換炭素を構築する新たな立体制御法の開発を目指した(Scheme 1)。



【実験方法・結果】



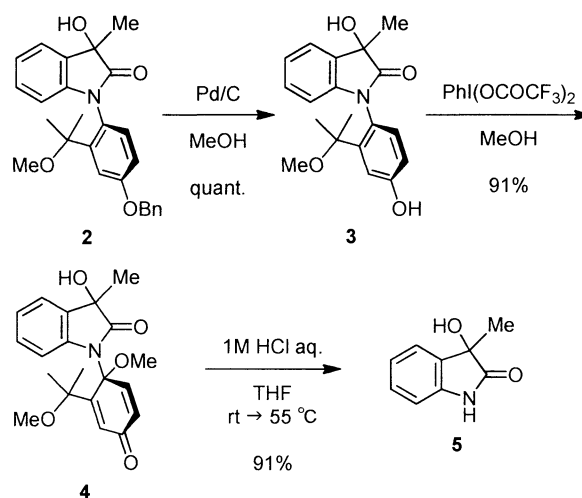
entry	R	P	P'	yield	dr (2a:2b)
1	Me	Me	Me	quant.	75:25
2	Me	Bn	Me	63%	78:22
3	Me	TBS	Me	93%	33:67
4	H	Me	Me	70%	88:12
5	H	Me	Bn	85%	94:6

Table 1

市販の置換フェノールとインドールから合成した二置換及び一置換 *N*-アリールイサチン **1** に、

MeLi を作用させてジアステレオ選択性を検討した(Table 1)。二置換 *N*-アリールイサチン ($R=Me$) の側鎖の水酸基に様々な保護基を導入してジアステレオ選択性を調べた結果、中程度のジアステレオ選択性を示すことが分かった。一方、側鎖の高さの差が大きな一置換 *N*-アリールイサチン ($R=H$) は、高いジアステレオ選択性を示した。

次に、C-N 結合の切断を行った(Scheme 2)。一置換 *N*-アリールオキシインドール **2** の脱 Bn 化を行い、フェノール **3** へと変換した。**3** から *N,O*-アセタール **4** を合成して酸加水分解を行うことで、オキシインドール **5** が高収率で得られた。



Scheme 2

【結言】

一置換 *N*-アリールイサチンを基質として用いることで、高いジアステレオ選択性が得られることが明らかとなった。C-N 結合の切断は、*N,O*-アセタールへ変換して酸を作用させることで容易に切断できることがわかった。

[†]Tel: 052-789-4112, Fax: 052-789-4111

e-mail: mori.ayako@b.mbox.nagoya-u.ac.jp

【緒言】

炭素-炭素結合形成反応は有機合成化学における重要な反応の1つである。通常、反応に関与する炭素は、求核的か求電子的か、どちらかの極性を持つ。しかしカルベンやイソニトリルなど、この両方の極性を同じ炭素上に持つ両極性炭素と呼ばれる炭素を持つ化学種も存在し、これらは多くの合成研究で利用されている。

本研究では、Figure 1 に示したイミダゾロン化合物が両極性化合物となり得るのか検討する。イミダゾロンはアミノ酸から容易に誘導できる化合物であると予想されるので、本研究では様々な誘導體を合成し、この炭素の極性を制御できる条件(構造・反応剤)を見つけることを目標とした。

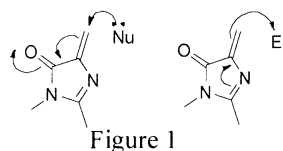


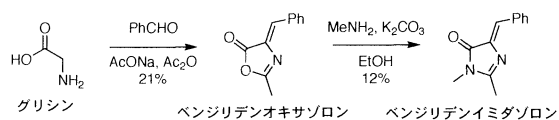
Figure 1

【合成計画】

グリシンもしくは、馬尿酸を出発原料として、無水酢酸、ベンズアルデヒドと反応させることでベンジリデンオキサゾロンを合成しようと考えた。その後、ベンジリデンオキサゾロンをメチルアミンと反応させることによって、ベンジリデンイミダゾロンを合成することにした。

【結果と考察】

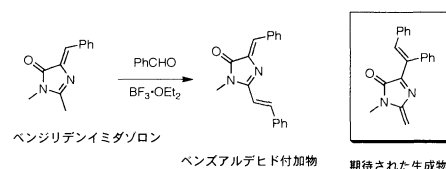
上記の合成計画に従って、ベンジリデンオキサゾロン、ベンジリデンイミダゾロンを合成することに成功した(Scheme 1)。



Scheme 1

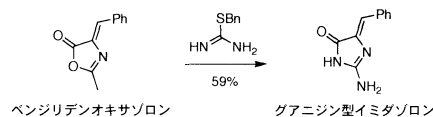
このベンジリデンイミダゾロンの求核性の有無を確認するために、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を触媒として加え、ベンズアルデヒドと反応させた。その結果、望む炭素での反応は進行することなく、別の炭素がベンズアルデヒドに求核攻撃を起

こした化合物が得られた(Scheme 2)。この付加物は Kaede 蛍光タンパク質のクロモフォア構造¹であり、黄色の蛍光を発した。



Scheme 2

この結果を受け、反応に用いる基質をグアニジン構造をもったイミダゾロンに変更した²。理由は、上記のイミダゾロンに比べ、より強い電子の押し込みを期待できるほか、Scheme 2 のような反応を抑制できるのではないかと考えたためである(Scheme 3)。保護基として窒素上にベンジル基、アセチル基を導入することに現在成功している。



Scheme 3

【結言】

グリシン、馬尿酸からベンジリデンイミダゾロンを合成できることがわかった。このイミダゾロンについてわかったことは次の二点である。一点目は、得られたイミダゾロンは、望むベンジル位の炭素とは、異なった炭素において求核性を示すことである。二点目はグアニジン型のイミダゾロンは、合成が可能であり、ベンジル基、アセチル基が保護基として使用可能であるということである。

引用文献

- 1 Chuang, W.T. et al. *Chem. Commun.* **2009**, 6982-6984.
- 2 Ahmad, M.T. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1988**, 1659-1662.

[†]Tel: 052-789-4112, Fax: 052-789-4111
e-mail: miyata.noriaki@e.mbox.nagoya-u.ac.jp

ボロン酸とスチレンの酸化的 Heck 反応による レスベラトロールとその誘導体の新規効率的合成

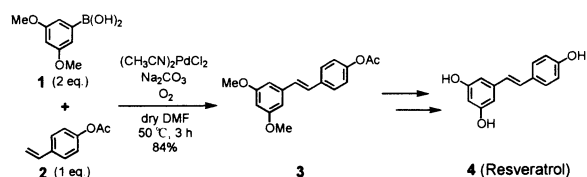
(阪府大院生命環境) ○諫山 篤, 谷森紳治[†], 切畑光統

【緒言】

レスベラトロール(Res)は、ブドウの皮やピーナッツ等に含まれるポリフェノールであり、神経変性、発癌、動脈硬化等、高齢に伴う疾患の緩和や予防効果を示す。また最近、サーチュイン遺伝子活性化による寿命延長効果が報告され注目されている。このため多くの合成法が報告されているが、それらには原料が不安定であったり、多段階を要し、誘導体合成に向かないなど様々な問題点がある。そこで本研究では出発物質として安定で、入手容易なボロン酸を用い、スチレン誘導体とのパラジウム触媒下、カップリング反応による効率的な Res の合成法を確立し、さらにその誘導体を合成することに取り組んだ。

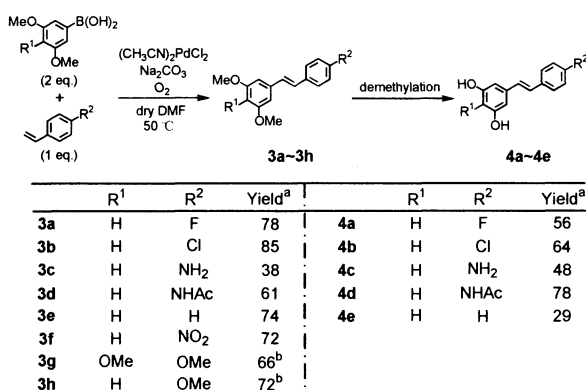
【実験方法と結果】

まず、3, 5-ジメトキシボロン酸(1)と *p*-アセトキシスチレン(2)を用いて、カップリング反応の最適条件を検討した¹⁾。触媒にビスアセトニトリルジクロロパラジウム(II) (10 mol%)、塩基に炭酸ナトリウム(2当量)を用い、無水ジメチルホルムアミド溶液中、酸素存在下、50°Cで3時間反応させ、スチルベン 3 が 84%と良い収率で得られた。次に 3 を用いて、三塩化ホウ素、*n*-テトラブチルアンモニウムヨード存在下、無水ジクロロメタン溶液中、-78°Cから室温で2時間反応させ、収率 73%で脱メチル化を行い、さらに水酸化ナトリウム存在下、テトラヒドロフラン溶液中、加熱還流下2時間反応させ脱アセチル化を行い、Res (4)を収率 73%で得た(全収率 45%)。



Scheme 1. Res の効率的合成

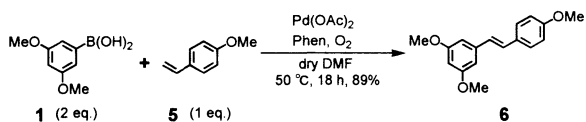
次に、トリメトキシボロン酸誘導体や、ニトロ基、アミノ基、メトキシ基、ハロゲン等の置換したスチレン誘導体を用いて、最適条件下でカップリング反応を行ったところ、38%~85%の収率でスチルベン 3a~3h を得、さらに脱メチル化を行うことにより 29%~78%の収率で Res 誘導体 4a~4e を得た。



^aIsolated yields. ^b(CH₃CN)₂PdCl₂ (20 mol%).

Scheme 2. さまざまな Res 誘導体の合成

上述のカップリング反応は過剰量の塩基が必要であったが、触媒に酢酸パラジウム(II) (5 mol%)、配位子として 1, 10-フェナントロリン (5 mol%)を用い、無水ジメチルホルムアミド溶液中、酸素存在下、50°Cで18時間反応させたところ無塩基下、1とスチレン 5 との反応で、Res 前駆体 6 が 89%と高い収率で得られた。



Scheme 3. カップリング反応の最適化

参考文献

1) Y. C. Jung *et al.*, *Org. Lett.*, **5**, 2231-2234 (2003).

[†]Tel: 072-254-9469, Fax: 072-254-9469

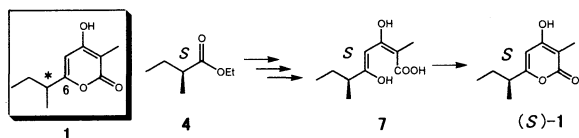
e-mail: tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp

Surugapyrone B の全合成による絶対構造の 解明ならびに誘導体の合成と抗酸化性評価

(阪府大院生命環境) ○大向宏明, 谷森紳治[†], 切畑光統

【緒言】

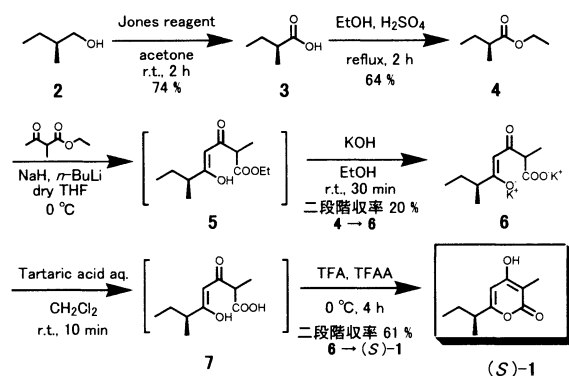
Surugapyrone B は、静岡県立大学の杉山、廣田らにより放線菌 *Streptomyces* sp. USF-6280 から単離された、DPPH ラジカル捕捉活性物質であり、その平面構造は α -ピロン誘導体 1 のように決定された。¹⁾ しかし、6 位側鎖の不斉炭素原子の立体配置は解明されていない。本研究では、入手容易な (*S*)-2-methyl-1-butanol (2) を出発物質に用い、そのキラリティーを保持したまま (*S*)-1 を合成し、天然物との比旋光度の比較から、1 の絶対立体構造を決定することにした。合成は、2 から調製したエステル 4 のクライゼン型縮合による増炭反応を鍵段階とした。また、様々な側鎖類縁体を合成し、DPPH ラジカル捕捉活性評価を行った。



Scheme 1. Surugapyrone B の平面構造 1 と合成計画

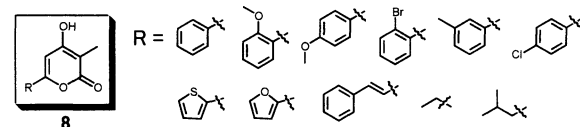
【方法と結果】

まず、(*S*)-2-methyl-1-butanol (2) をジョーンズ試薬によって酸化し、カルボン酸 3 を収率 74% で得た。続いて 3 に対し、エタノールと触媒量の硫酸を用いたフィッシャーエステル化によって、エステル 4 を収率 64% で得た。これに、2-メチルアセト酢酸エチルから、2 等量の強塩基により発生させたジアニオン体を反応させ、縮合物 5 を得た後、水酸化カリウムによるアルカリ加水分解によって、カリウム塩 6 を二段階収率 20% で得た。最後に 6 に対し、酒石酸水溶液によって塩交換を行い、カルボン酸 7 とした後、トリフルオロ酢酸を用いて環化させ、目的物である (*S*)-1 を二段階収率 61% で得た (全収率 6%)。



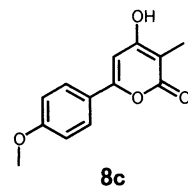
Scheme 2. (*S*)-1 の合成

合成した (*S*)-1 の比旋光度を測定したところ $[\alpha]_D^{23} = +27$ であった。Surugapyrone B の比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +22.2$ との比較から、側鎖の不斉炭素原子の立体配置は *S* であることが決定された。また、同様の方法で様々な置換基をもつエステルを原料として用い、surugapyrone B の類縁体を合成した。



Scheme 3. Surugapyrone B 類縁体 8 の合成

合成した surugapyrone B 類縁体 8 について吸光度計を用い、DPPH ラジカル捕捉活性評価を行った。反応 45 分後でのラジカル捕捉率が最も高かった *p*-メトキシ体 8c についてさらに様々な濃度と時間変化での測定を行ったところ、反応 48 時間後、63 μ M で 55% のラジカル捕捉活性を示した。



参考文献

- 1) 杉山 靖正, 廣田 陽ら, 天然有機化合物討論会講演要旨集 (49), 323-328, 2007.

[†]Tel: 072-254-9469, Fax: 072-254-9469

e-mail: tanimori@bioinfo.osakafu-u.ac.jp

【目的】

サーモライシン (thermolysin, TLN) は *Bacillus thermoproteolyticus* 由来の好熱性中性亜鉛プロテイナーゼである。TLN に部位特異的変異 Gly8→Cys/Asn60→Cys/Ser65→Pro を導入すると熱安定性が向上し、30 分間熱処理で 50% 失活する温度 (T_{50}) は 73°C から 80°C に上昇する¹⁾。本研究では、この変異による TLN の熱安定化機構を解明することを目的とした。

【方法】

TLN の発現と精製

大腸菌 JM109 を宿主として、野性型 TLN (WT), G8C/N60C (M2), S65P, G8C/N60C/S65P (M3) を発現させ、培養上清から精製した。

TLN の S-S 結合の定量

100 mM dithiothreitol (DTT) 存在下あるいは非存在下で熱変性させた 2 μM の WT, M2, M3 を 100 μM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 存在下、25°C で 1 時間、SH-SS 交換反応を行った。生じた thiobis(2-nitrobenzoic acid) (TNB) アニオンを A_{412} ($\epsilon_{412}=13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) により定量した。

TLN の熱安定性の評価

TLN (200 nM) を 40 mM HEPES-NaOH, 1–100 mM CaCl₂, pH 7.5 において 70–95°C で 2–120 分間熱処理した。その後、25°C で *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-Gly-L-Leu amide 加水分解活性を測定した。熱処理前の k_{cat}/K_m に対する熱処理後の k_{cat}/K_m の相対値を熱処理時間に対してプロットすることにより、一次の熱失活速度定数 (k_{obs}) を求めた。

【結果と考察】

S-S 結合

DTT 存在下で熱変性させたときと DTT 非存在下で熱変性させたときの A_{412} の差は、WT では 0, M2 では 0.04, M3 では 0.04 であった。これより、WT では S-S 結合が架かっているが、M2 と M3

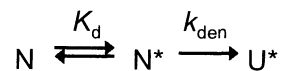
では全分子に架かっていることが示唆された。

熱安定性

WT, M2, S65P, M3 の T_{50} はそれぞれ 77, 85, 79, 86°C であり、WT>S65P>M2, M3 であった。また、いずれの TLN も CaCl₂ 濃度の増加に伴い k_{obs} が減少し、すべての CaCl₂ 濃度において k_{obs} は WT>S65P>M2, M3 であった。

Ca²⁺との親和性

TLN の熱失活を以下のスキームで解析した。



N は Ca²⁺を保持した TLN, N*は Ca²⁺が解離した TLN, U*は不可逆的に熱失活した TLN を示す。K_d は N*と Ca²⁺の解離定数, k_{den} は N*の熱失活速度定数を表す。これより式 1 が得られる²⁾。

$$1/k_{\text{obs}} = (1/k_{\text{den}}) + [\text{Ca}^{2+}] / (K_d k_{\text{den}}) \quad (1)$$

$1/k_{\text{obs}}$ を CaCl₂ 濃度に対してプロットし、 k_{den} と K_d を求めた。WT, M2, S65P, M3 の k_{den} はそれぞれ 5.1, 3.7, 5.7, $4.3 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ であり、大きな差はなかった。一方、K_d はそれぞれ 47, 9.3, 17, 8.3 mM であり、WT>S65P>M2, M3 であった。

【結論】

TLN に対する Gly8→Cys/Asn60→Cys の熱安定化効果は Ser65→Pro よりも大きい。この 2 種類の変異を組み合わせたときの熱安定化効果は Gly8→Cys/Asn60→Cys 単独と同程度である。Gly8→Cys/Asn60→Cys と Ser65→Pro はともに TLN と Ca²⁺の親和性を上げることで熱安定性を向上させると考えられる。

引用文献

- 1) Yasukawa, K. and Inouye, K. (2007) *Biochim. Biophys. Acta* **1774**, 1281-1288
- 2) Lee, S. et al. (2006) *J. Biochem.* **139**, 1007-1015

†Tel: 075-753-6266, Fax: 075-753-6265

e-mail: inouye@kais.kyoto-u.ac.jp

ポリウロン酸の代謝に関わる細菌由来 α -ケト酸還元酵素の構造機能相関

(京大院農) ○高瀬隆一, 三上文三, 橋本 渉, 村田幸作[†]

【緒言】

アルギン酸は褐藻中に多く含まれるポリウロン酸であり、酸性糖であるマンヌロン酸とグルロン酸から成る。近年、海洋バイオマスの利活用の観点から、アルギン酸の有効利用が望まれている。当研究室では、エタノール合成能を付与したアルギン酸資化性細菌 (*Sphingomonas* sp. A1 株) を用いて、アルギン酸からエタノールを生産できることを示した¹⁾。A1 株において、アルギン酸は単糖 [α -ケト酸: 4-デオキシ-L-エリスロ-5-ヘキソースウロースウロン酸 (DEH)] に分解される。 α -ケト酸は NADPH 依存型還元酵素 A1-R の作用により、2-ケト-3-デオキシ-D-グルコン酸 (KDG) となる。その後、ピルビン酸に変換され、一部はエタノールとなる。A1 株におけるエタノールの収量を増大させるため、還元酵素 A1-R の補酵素利用能に着目した。A1-R の補酵素要求性を NADPH から NADH へ変換することで、細胞内の補酵素バランスを最適化し、エタノール生産能が向上すると考えられる。A1-R の補酵素認識に関わる構造要因を明らかにするため、A1-R の X 線結晶構造解析を進めた²⁾。本研究では、NADPH と NADH の両方を利用でき、且つ A1-R と類似の酵素 KduD について、その結晶構造を決定し、A1-R と KduD の構造比較を行った。

【方法と結果】

植物の細胞壁に存在するペクチンも、アルギン酸と同様ポリウロン酸であり、植物軟腐性細菌 *Dickeya dadantii* などによって資化される。その代謝中間産物として、 α -ケト酸である 3-デオキシ-D-グリセロ-2,5-ヘキソジウロソン酸 (DDH) が生じ、還元酵素 KduD によって KDG へと変換される³⁾。A1-R と KduD は、異なる α -ケト酸を還元するが、同一反応産物を生成し、さらに高い相同性を示すことから (相同性 47%)、活性中心の構造は似ていると予想される。しかし、補酵素として A1-R が NADPH を用い

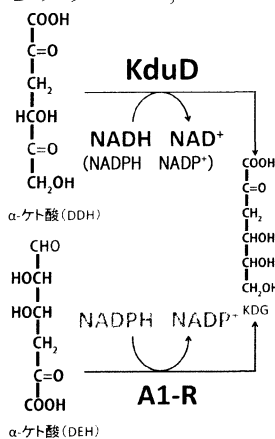


図1 α -ケト酸の代謝

るのに対して、KduD は NADH と NADPH の両方を用いる³⁾。このことから、両酵素の構造を詳細に比較することにより、A1-R の補酵素要求性を変換できると考えた。

植物軟腐性細菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* よりペクチン由来 α -ケト酸 (DDH) 還元酵素 KduD の遺伝子をクローニングし、その大量発現系を大腸菌を用いて構築した。KduD を精製し、その補酵素要求性に関わる酵素学的特性を決定した (NADH; $k_{cat}/K_m = 11.19$ [mM⁻¹s⁻¹], NADPH; $k_{cat}/K_m = 4.24$ [mM⁻¹s⁻¹])。さらに本酵素の結晶化を行い、X 線結晶構造を初めて決定した。KduD は A1-R と同様、 $\alpha/\beta/\alpha$ の三層から成り、中央に大きなクレフトが存在する。さらに、補酵素結合ドメインである Rossmannfold が見られ、触媒三残基 (Ser、Tyr、Lys) も保存されている。両酵素の補酵素結合部位を重ねて比較すると、多くのアミノ酸残基が保存されていることが分かった。分子表面電荷に関して、両者に大きな違いが見られた。その相違として、A1-R においては NADPH のリボース 2' 位のリン酸基周辺に Arg-39 や Lys-40 が配置しており、これによりリン酸基周辺が正電荷を帯びている。一方、KduD においては該当部位周辺に Asp-19 が位置し、リン酸基周辺が負に帯電している。この電荷の違いが補酵素要求性に影響を与えている可能性がある。今後、A1-R に変異導入を行い、補酵素要求性を解析する。



図2 A1-R 及び KduD の補酵素結合部位

- 引用文献
- 1) Takeda *et al.*, *Energy Environ. Sci.* **4**, 2575-2581 (2011).
 - 2) Takase *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* **1804**, 1925-1936 (2010).
 - 3) Preiss *et al.*, *J. Biol. Chem.* **238**, 1577-1583 (1963).

[†]Tel:0774-38-3766, Fax:0774-38-3767

e-mail:kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

ウツボカズラ (*Nepenthes* sp.) をはじめとする食虫植物は、熱帯地方を中心に広く分布している。その生息地の多くは栄養素が乏しい土地であり、食虫植物は昆虫をとらえて消化することで不足した栄養素を補っていると考えられている。

食虫植物には様々な捕虫様式がみられるが、ウツボカズラは葉の内腔を袋状に変化させたポット型の捕虫器を持ち、その中に蓄えた消化液によって昆虫を消化する。

近年、ウツボカズラ (*Nepenthes alata*) 消化液のプロテオーム解析が行われ、消化液にはクラスⅢおよびⅣキチナーゼを含む 12 種のタンパク質が含まれることが明らかになった⁽¹⁾⁽²⁾。昆虫の外骨格の主成分はキチンであるため、消化液に含まれるキチナーゼは昆虫消化において重要な酵素だと考えられる。

本研究では、ウツボカズラ (*N.alata*) 消化液に含まれるキチナーゼの機能を酵素学的に解析し、その諸性質を解明する。

【実験方法】

大腸菌による大量発現と精製

ウツボカズラ (*N.alata*) 捕虫器由来のキチナーゼ遺伝子 *NaCHIT1* 及び *NaCHIT3* をそれぞれ pET50b 及び pET30b に組み込み、作成したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) 株に形質転換した。この大腸菌により *NaCHIT1* 及び *NaCHIT3* を大量発現させた後、Ni-NTA アガロースゲル(キアゲン)を用いて精製した。

キチナーゼの活性測定

基質としてキチンオリゴ糖 (NAGn :n=重合度) およびグライコールキチンを用いた。50 mM 酢酸バッファー(pH 5.5)中にて基質とキチナーゼ (*NaCHIT1* 及び *NaCHIT3*) を 37°C で反応させた。酵素活性の pH 依存性は pH 3.7-7.5 の範囲で測定し、温度依存性は 25°C-85°C の範囲で測定した。

酵素活性は酵素反応により生成した還元糖の定量あるいは生成物の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析による定量で評価した。HPLC のカラムは糖のアノマー分析においては TSK-gel Amide-80(東ソー)を用い、その他の分析には Shodex Asahipak NH2P-50(昭和電工)を用いた。

【結果と考察】

糖質加水分解酵素をアミノ酸配列の類似性で分類した Glycoside Hydrolase family(GH ファミリー)によれば、キチナーゼは GH19 及び 18 の二種類のみ分類されている。ところが、植物キチナーゼはそのドメイン構造等によってさらに 5 つのクラスに分けられている。このうちクラス I、II、および IV は GH19 キチナーゼである。一方、クラス III と V は GH18 キチナーゼに分類されている。

クラス IV に分類される *NaCHIT1* の加水分解活性を調べたところ、キチンなどのポリマー基質よりも NAGn(n=4-6) に対する活性が高かった。*NaCHIT1* の加水分解様式を HPLC を用いて調べてみると、エンド型の作用様式であった。また、生成物のアノマー型を調べたところ、アノマー反転型の反応機構で加水分解が進行することが明らかになった。

クラス III に分類される *NaCHI3* の加水分解活性についても現在検討中である。

引用文献

- 1) N.Hatano & T.Hamada, *J.Proteome Res.*, 7, 809-816(2008)
- 2) N.Hatano & T.Hamada, *in preparation.*

Tel: 076-277-7453

e-mail: p1093003@ishikawa-pu.ac.jp

【緒言】

糖質加水分解酵素(GH)は、アミノ酸配列の類似性により 100 以上のファミリーに分類されている。最近、我々は *Photobacterium profundum* SS9 由来 GH9 酵素の機能解析を行なった。その結果、本酵素はキトサンオリゴ糖の非還元末端から D-グルコサミン(GlcN)を遊離させる、アノマー反転型エキソβ-D-グルコサミニダーゼであった。

GH は反応機構の違いにより、アノマー保持型 GH とアノマー反転型 GH に大別される。アノマー保持型 GH は糖転移反応を触媒できるが、アノマー反転型 GH は加水分解反応しか触媒できない。アノマー保持型 GH は触媒に関与しているアミノ酸残基を不活性化した変異型酵素をフッ化糖に作用させると、糖鎖合成反応のみを触媒することが数多く報告されていた。

一方、アノマー反転型 GH による上記のような糖鎖合成酵素化は報告されていなかった。ところが、アノマー反転型 GH も同様の手法を用いて糖鎖合成酵素化できることが最近報告された²⁾。

本研究では、アノマー反転型である本酵素の糖鎖合成酵素化を目的とし、触媒に関与しているアミノ酸残基を置換した様々な変異型酵素を作成した。さらに、これらの酵素の加水分解活性とフッ化糖に対する反応性を検討した。

【実験方法】

触媒基変異型酵素の作成と精製

GH9 ファミリーに属する他の酵素の立体構造を参考にして、本酵素の立体構造をモデリングした。このモデル構造から、触媒に関与している 3 種のアミノ酸残基を推定した。部位特異的変異導入法により、3 種類の変異型酵素(D139A、D143A、E555A)遺伝子を作成した。これらは大腸菌 BL21(DE3)株に形質転換して大量発現させた後、Ni-NTA アガロースゲル(キアゲン)を用いて精製した。

D139X 変異型酵素の作成と精製

D139 に Saturation mutagenesis を導入した。すなわち、D139 のコドンに NNN(N=A,T,G,C) の変異を導入し、様々な変異型酵素遺伝子(D139X)を得た。本手法によって D139X は、10 種類のアミノ酸に置換されていた。残り 8 種類の D139X は部位特異的変異導入法により作成した。以上の野生型酵素と D139A を含む 20 種類の酵素は、前述の方法で発現および精製した。

加水分解活性および糖鎖合成活性の測定

加水分解反応の基質には GlcN₂を用いた。0.1 M MES buffer(pH 7.0)中にて基質と酵素を 30°C で反応させた後、反応液を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。

糖鎖合成反応の基質には GlcN-F(α-D-glucosaminy fluoride) と GlcN または GlcN-F のみを用いた。加水分解反応と同条件で反応させ、反応液を TLC で分析した。

【結果と考察】

D139A および D143A、E555A の加水分解活性を測定した結果、全ての変異型酵素で大幅に活性が低下していた。このことから、変異を導入した 3 個のアミノ酸残基が本酵素の触媒に重要であることが示唆された。

次に、これらの変異型酵素に GlcN-F を作用させると、D139A のみ GlcN₂の生成が確認できた。

現在、本酵素の糖鎖合成酵素化に最適なアミノ酸残基を探索するために、D139X 変異型酵素の加水分解活性および糖鎖合成活性を検討している。

引用文献

- 1) Y. Honda et al. *Glycobiology* 21, 503-511(2011)
- 2) Y. Honda and M. Kitaoka *J. Biol. Chem.*, 281, 1426-1431(2006)

Tel: 076-227-7453

e-mail: p1193001@ishikawa-pu.ac.jp

ミミズ (*Eisenia foetida*) 由来のメタロプロテアーゼ遺伝子の クローニング

2Ca5 (阪府大院・生環科, ¹ワキ製薬(株), ²大薬大・薬, ³京大院・食生科)

○谷川元子*, 中澤昌美, 大木理, 宮武和孝, 脇本吉清¹, 坂口実², 井上國世³,
上田光宏

【諸言】 世界中で植物ウイルスによる農作物の被害は甚大なものとなっている。しかし、植物ウイルスの増殖や感染を抑える抗ウイルス剤はほとんど開発されていないのが現状である。遺伝子操作によるウイルス耐性植物の作出、ウイルスを媒介する虫の農薬による駆除が行われているが、これらは安全性が高いとはいえない。食糧をより安全に供給するためにも抗植物ウイルス剤の研究は必要である。我々はシマミミズ (*Eisenia foetida*) から抗植物ウイルス性物質を既に単離・精製し、その物質がプロテアーゼであることを確認し、その性質も明らかにしてきた^{1,2,3}。そこで本研究では、ミミズ由来のメタロプロテアーゼをコードする遺伝子のクローニングを行い、異種宿主を用いてプロテアーゼ遺伝子を大量発現させることを目的とした。

【実験方法】 シマミミズの乾燥粉末から total RNA を単離し、逆転写により cDNA を合成した。さらに、これを鋳型として PCR を行った。この PCR に用いた縮重プライマーは、すでに解析されている本酵素の N-末端アミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計した。また、5' RACE 法を用いて 5' 上流領域の塩基配列を明らかにした。

異種宿主を用いた発現にはまず大腸菌を用いた。ベクターに pET Blue1 を用い、触媒ドメイン部分の配列をベクターに挿入した。このプラスミドを用いて大腸菌を形質転換し、発現を試みた。

【結果と考察】 BLAST による相同性検索を行った結果、本酵素がメタロプロテアーゼファミリーのひとつである M14 (メタロカルボキシペプチダーゼ) に属することが分かった。本ファミリーに属するプロテアーゼは多くの脊索動物で見出されている。本酵素をコードする遺伝子は 351 bp からなるシグナルペプチド・プロペプチド領域と 918 bp からなる触媒ドメインから構成されていた。

大腸菌における発現タンパク質は菌体内で封入体を形成し不活性の状態であった。そのため、現在宿主を酵母 *Pichia pastoris* に変えて発現 (発現ベクターには pPICZ αA を使用) を試みている。

【結言】 本研究ではミミズ由来のメタロプロテアーゼをコードする全長遺伝子を取得することに成功した。本酵素は M14 ファミリーに属し、M14 で一般に保存されている亜鉛結合部位や活性部位が、本酵素でも保存されていることが示された。

引用文献

- 1) M. Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol., B 150, 125-130 (2008).
- 2) 上田ら、平成 22 年度日本農芸化学会大会講演要旨集、講演番号 2XDa07.
- 3) M. Ueda et al., Process Biochem., 46, 1711-1716 (2011).

*Tel : 072-254-9468

e-mail : sr201026@edu.osakafu-u.ac.jp

ミミズ (*Eisenia foetida*) 由来の1,4-β-グルカナーゼ遺伝子の 2Ca6 クローニングと発現

(阪府大院・生環科, ¹大薬大・薬, ²京大院・食生科)

○伊藤彰紘[†], 山之内佑輔, 中澤昌美, 宮武和孝, 坂口実¹, 井上國世², 上田光宏

【諸言】 植物バイオマスの糖化は高温条件でなく低温条件で糖化の方が加温するためのエネルギーを節約できることから、低温条件での糖化が望まれる。しかしながら、高温条件で耐熱性酵素を用いて糖化されているのが現状である。そこで、これまでの酵素の弱点を補える能力を有するとともに、工業的に利用価値の高い酵素のスクリーニングを行ったところ、土壌動物であるシマミミズ (*Eisenia foetida*) に目的に見合う糖質分解酵素が存在することを見出した^{1, 2, 3)}。ミミズ破碎後の粗抽出液中には結晶性セルロースやヘミセルロースに対する分解能力が高く、しかも低温・酸性条件下でも高活性を示す酵素が存在することを見出した。そこで、まず Carboxymethyl cellulase (CMCase) を精製し、その酵素化学的性質を調べた³⁾。その結果、本酵素は ①セルローソーム様の複合体を形成し、その複合体は少なくともβ-グルコシダーゼとβ-1,3 グルカナーゼを含むこと、②ミミズ由来 CMCase は従来法では高い活性を得ることが困難であった低温 (20°C) 条件でも高い活性を示す事を見出した。本研究では、ミミズ由来の 1,4-β-グルカナーゼ (EF-EG2) のクローニングと大腸菌での発現を行ったので報告する。

【実験方法】 シマミミズの乾燥粉末から total RNA を単離し、逆転写により cDNA を合成した。さらに、これを鋳型として PCR を行った。この PCR に用いたプライマーは、*E. foetida* の近縁種である *E. andrei* 由来の 1,4-β-エンドグルカナーゼ (EA-EG2) の mRNA 情報を元に設計し、酵素遺伝子のクローニングを行った。

異種宿主を用いた発現には大腸菌を用いた。

pCold 1 ベクターを用い、mature な配列をベクターに挿入した。このプラスミドを用いて *E. coli* ArcticExpress を形質転換し、低温条件下で発現を行った。

【結果と考察】 *E. foetida* 由来の EF-EG2 遺伝子の ORF は 1368 bp からなり、456 アミノ酸をコードしていた。推定分子量は 50843 であることが明らかとなった。BLAST による相同性検索を行った結果、本酵素は糖質分解酵素 GH family 9 に属することが分かった。また、本酵素は無脊椎動物由来の GH family 9 に属する 1,4-β-エンドグルカナーゼと高い相同性が見られた。*E. coli* ArcticExpress を用いて発現させたところ、分子量は 50,000 で、可溶性画分に CMCase 活性が見られた。本酵素の最適 pH は 5.5、最適温度は 40°C で低温活性も見られた。

【結言】 ミミズ由来の EF-EG2 をコードする遺伝子を取得することに成功した。本酵素は GH family 9 に属し、GH family 9 で保存されている触媒残基が、本酵素でも保存されていた。大腸菌における異種宿主発現に成功し、組換え型酵素は低温活性が見られた。

引用文献

- 1) M. Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. Part. B., 151, 381-385 (2008).
- 2) M. Ueda et al., Comp. Biochem. Physiol. Part. B., 157, 26-32 (2010).
- 3) M. Ueda et al., Carbohydr. polymer., 46, 1711-1716 (2011).

[†]Tel & Fax: 072-254-9468

e-mail: sr201007@edu.osakafu-u.ac.jp

シロイヌナズナにおけるppGpp pyrophosphohydrolase (AtNUDX26) の分子特性

(¹近畿大院・農・バイオ、²近畿大・農・バイオ、³中部大・応生・食栄)

○加藤貴大^{1,†}、伊藤大輔¹、石川和也²、田茂井政宏^{1,2}、
吉村和也³、重岡 成^{1,2}

【緒論】

Guanosine-3,5-tetraphosphate (ppGpp) は、原核微生物の緊縮応答を支配するバクテリアアラモンとして認知されている。すなわち、ppGpp はアミノ酸欠乏などの貧栄養条件下において RNA polymerase と結合することで、アミノ酸代謝関連遺伝子などの転写を制御する。また、高等植物の葉緑体においても ppGpp 合成/分解酵素 (RelA/SpoT) の存在および ppGpp による RNA ポリメラーゼの阻害が報告され、本分子の生理的重要性が注目されてきている。

最近、好気性真正細菌 *Thermus thermophilus* において、ヌクレオシド 2 リン酸類縁体加水分解酵素 Nudix hydrolase (NUDX) が ppGpp の分解に寄与していることが報告された¹⁾。これまでに当研究室では、高等植物シロイヌナズナには 28 種類の Nudix hydrolase (AtNUDX1-27, AtDCP2) が存在し、それらは NAD(P)H や ADP-ribose の加水分解を介して生物的/非生物的ストレス応答など様々な細胞応答の制御に関与していることを示してきた^{2,3)}。そこで本研究では、シロイヌナズナから ppGpp pyrophosphohydrolase 活性を有する AtNUDX の同定およびその生理機能解析を目的とした。

【実験方法】

AtNUDX リコンビナントタンパク質の精製

大腸菌を用いて His-tag 融合 AtNUDX リコンビナントタンパク質を生成し、His-Trap アフィニティーカラムを用いて精製を行った。

ppGpp に対する AtNUDX の基質特異性の検討

各精製リコンビナントタンパク質 (0.2 ng-1 μg)、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、5 mM MgCl₂、25 μM ppGpp を含む 40 μl の反応系を 37°C、10 分間インキュベートし、10 μl の 100 mM EDTA の添加により反応停止後、HPLC により ppGpp pyrophosphohydrolase 活性を測定した。

【結果と考察】

His-Trap アフィニティーカラムにより精製した、AtNUDX リコンビナントタンパク質 (AtNUDX1-27) を用いて ppGpp pyrophosphohydrolase 活性を測定した。その結果、細胞質型 AtNUDX11, 25, ミトコンドリア型 AtNUDX15 および葉緑体型 AtNUDX26 に ppGpp pyrophosphohydrolase 活性を有することが明らかになった。次に、それらのカイネティクスパラメーターを測定した結果、AtNUDX26 は最も高い触媒効率 ($2.3 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$) を示した。

さらに、種々のストレス条件に対する AtNUDX26 および RelA/SpoT (AtRSHs) 遺伝子群の発現応答を解析した結果、塩および光酸化的 (PQ) ストレス下において、AtNUDX26 および ppGpp 合成酵素 AtRSH2 の発現レベルはそれぞれ減少および増加していた。これらの結果から、AtNUDX26 はストレスに応答した葉緑体内 ppGpp 量の制御に機能していると考えられた。現在、AtNUDX26 および AtRSHs の遺伝子破壊株を用いた生理機能解析を行っている。

引用文献

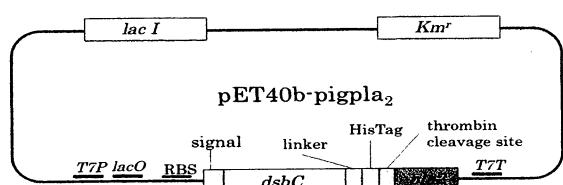
- 1) T. Ooga *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **284**, 15549-15556 (2009)
- 2) K. Ishikawa *et al.*, *Plant Physiol.*, **151**, 741-754 (2009)
- 3) K. Ishikawa *et al.*, *Plant Signal. Behav.*, **152**, 2000-2012 (2010)

[†]Tel : 0742-43-8083, Fax: 0742-43-8083
e-mail:1033690016x@nara.kindai.ac.jp

【緒言】

ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)は、リン脂質の2位エステル結合を加水分解する反応を触媒する酵素である。PLA₂はリゾレシチンの製造や、脂肪酸のリン脂質への導入反応等に応用出来る有用酵素である。ブタ膵臓由来 PLA₂は酵素化学的にも、応用酵素学的にも非常によく研究されてきた PLA₂の一つである。本酵素は14kDaの小型のタンパクでありながら、7個ものジスルフィド結合を含んでいる。このため、大腸菌で発現させるとインクルージョンボディを形成し、活性型酵素の調製には可溶化、及びリフォールディングが必要となる。

本研究では、組換え大腸菌を用いてブタ膵臓由来の PLA₂をジスルフィド結合異性化酵素である DsbC との融合タンパクとして可溶性発現させる事を目的とした。

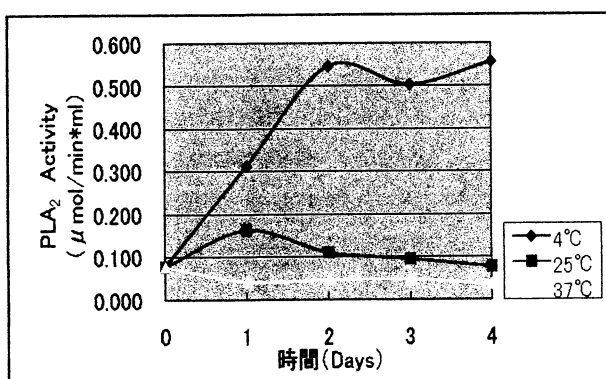
図1 PLA₂発現プラスミドの構造

【方法と結果】

ブタ膵臓 PLA₂ 遺伝子の発現ベクターとして pET40b-pigPLA₂ を構築した (図1)。このプラスミドでは、ブタ膵臓 PLA₂ は DsbC との融合タンパクとして発現し、ペリプラズムに移行する。なお、ブタ膵臓 PLA₂ 遺伝子配列は大腸菌のコドン利用頻度を考慮して、コドンを最適化してある。

pET40b-pigpla₂ とシャペロンプラスミド pTf16 を保有する *E.coli* BL21(DE3) を培養し、20℃ で DsbC-pigPLA₂ 融合タンパクと Tig (トリガーファクター) を発現させた。菌体を超音波破碎して可溶性画分を SDS-PAGE で解析したところ、目的の融合タンパクが可溶性蛋白として発現している事を確認した。

発現した融合タンパクの酵素活性は非常にわずかであったが、菌体破碎液を低温で数日間放置すると、破碎直後と比較して酵素活性が上昇する事を見いだした (図2)。DsbC-pigPLA₂ 融合タンパクを含む粗酵素を4℃で2日間静置した場合、その PLA₂ 活性は破碎直後の活性と約7倍であった。

図2 DsbC-pigPLA₂ 融合タンパクの活性化

【結言】

ブタ膵臓由来 PLA₂ を組換え大腸菌を用いて可溶性蛋白として活性型で発現させる事に成功した。今後、融合タンパクの精製及び DsbC 部分の切断除去の検討を行う予定である。

TEL : 052-789-4143, FAX : 052-789-4145

e-mail : iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

【緒言】

ホスホリパーゼ A₂(PLA₂)は, リン脂質の 2 位エステル結合を加水分解する反応を触媒する酵素であり, 油脂加工分野で幅広く用いられている. PLA₂ はこれまで真核生物由来のものしか知られていなかったが, 2002 年に放線菌 *Streptomyces violaceoruber* 由来の分泌型 PLA₂ が報告された. 本研究はこの放線菌由来 PLA₂ の大腸菌における大量発現系を確立することを目的とする.

【方法と結果】

S. violaceoruber 由来 PLA₂ を, 遺伝子のコドン頻度を大腸菌のものに最適化し, *pelB* シグナル配列を付加して pET システムにて発現させた結果, 培養上清中に活性型の PLA₂ が確認できた (図 1). この PLA₂ を硫安沈殿とイオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて精製した (表 1). 50 mL の培養液から約 1.9 mg の精製酵素を得ることができた. 発現した PLA₂ の N 末端アミノ酸は野生型 PLA₂ と同一であり, *pelB* シグナル配列が正しく除去されていることを確認した.

表 1 組換え大腸菌からの PLA₂ の精製

精製ステップ	総活性 (U)	総蛋白 (mg)	比活性 (U/mg)
培養上清	140	12.4	11.2
硫安沈殿	43.7	5.0	8.61
Resource Q	27.2	1.9	14.0

さらに, PLA₂ の活性中心である 64 位の His を Ala に置換した変異体を作製し発現させたところ, 変異 PLA₂ は同様に培養上清中に分泌された (図

1). このことから, PLA₂ の分泌発現は PLA₂ 自身の酵素活性とは無関係であることが分かった.

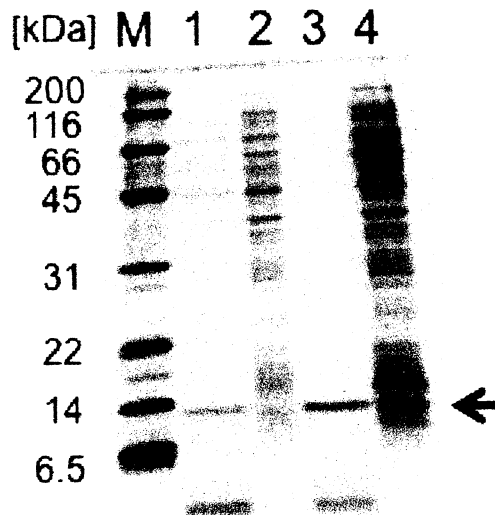


図 1 発現した PLA₂ の SDS-PAGE による分析
M: マーカー, レーン 1: 野生型 PLA₂ 発現株の培養上清, レーン 2: 野生型 PLA₂ 発現株の細胞内蛋白, レーン 3: H64A 変異体発現株の培養上清, レーン 4: H64A 変異体発現株の細胞内蛋白

【結言】

組換え大腸菌を用いて *S. violaceoruber* 由来 PLA₂ を活性型で培養上清中に発現させる発現系を確立した. この発現系を用いれば, PLA₂ を分子進化工学的に改変することが可能となる.

TEL:052-789-4143, FAX: 052-789-4145

e-mail: iwasaki@agr.nagoya-u.ac.jp

ヒト蛋白質架橋化酵素の新規アイソザイムにおける 高反応性基質配列の解析

2Cp3

(名大院生命農) ○鞍本 克真、福井 美奈、伊藤 みほ、
柴田 秀樹、牧 正敏、人見 清隆

【諸言】

高等動物の蛋白質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼ (以下 TGase) は、8 種類アイソザイムからなる酵素ファミリーで、特定の基質タンパク質のグルタミン残基とリジン残基の間に架橋形成する反応を触媒する。また、一級アミンのグルタミン残基への取り込み反応も触媒する。アイソザイム毎にそれぞれ異なる基質タンパク質に作用するが、TGase はまずタンパク質中の特定のグルタミン残基を認識することから酵素反応が開始される。このファミリーの中で新規なメンバーである、TGase 6 と TGase 7 は未だその認識機構の解析はない。我々は近年、M13 ファージ提示型ランダムペプチドライブラリーを用いて、高反応性を示すグルタミン残基の周囲の配列を各アイソザイム毎に明らかにし、アイソザイム特異的な高反応性基質配列を探索するシステムを確立してきた。本研究では、これらの新規なアイソザイム (TGase 6、TGase 7) についても、同様のアプローチで解析を行うことを目的とした。

【実験方法】

ランダムペプチドを提示しているファージに、グルタミン残基の受容基質となる、ビオチン標識した一級アミンを TGase 存在下で反応させた。アビジンカラムを用い、標識した一級アミンを取り込んだファージを親和性を利用して精製した。精製で得られたファージ群を感染させて増幅し、再び酵素反応に用いた。このサイクルを計 5 回繰り返し、一級アミンと架橋形成しやすい配列を提示しているファージを選別し、提示配列を決定した。以上の実験系の模式図を図 1 として示す。TGase 6 については、ペプチドを融合させた組み換えタンパク質を作製して反応性と、他のアイソザイムと

の交差反応性を検討した。TGase 7 の基質配列についても現在解析している。

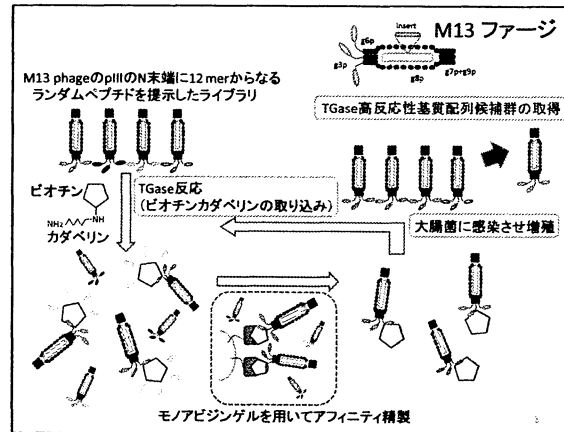


図 1 高反応性基質配列の探索系

【結果・考察】

高反応性基質配列の探索系によって、TGase 6 および TGase 7 についてそれぞれ約 50 種類の配列を得た。これらの配列は一定の収束が見られた。TGase 6 については、組み換えタンパク質の解析から高反応性を示す 7 種類の配列を選別した。さらに、各アイソザイムとの交差反応性を見た結果、TGase 6 と特異的に反応する配列 1 つを得た。

【結言】

TGase 6 に特異的な高反応性基質配列を取得でき、基質認識機構に関する知見が得られた。TGase 7 についても、同様の解析を行い、基質解析と生理機能解明に向けた、基質ペプチドの獲得をめざす。

引用文献

J Biol Chem 281, 17699 (2006), FEBS J 275, 5667 (2008), Amino Acids 36, 619 (2009), FEBS J 277, 3564 (2010)

Tel: 052-789-5541, Fax: 052-789-5542

e-mail: iloveouo@yahoo.co.jp

2Cp4

連鎖球菌由来不飽和グルクロニルヒドロラーゼの ヘパリン二糖認識機構

(京大院農) ○中道 優介, 丸山 如江, 三上 文三, 橋本 渉, 村田 幸作[†]

【背景】

哺乳類の細胞外マトリックスを構成するグリコサミノグリカン (GAG:コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸など) は、ウロン酸 (グルクロン酸とイズロン酸) とアミノ糖から成り、高度に硫酸化されている。ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸ではウロン酸とアミノ糖が 1-3 結合した二糖を、ヘパリンやヘパラン硫酸ではウロン酸とアミノ糖が 1-4 結合した二糖をそれぞれ基本単位とする (図 1)。

溶血性連鎖球菌 *Streptococcus agalactiae*、*S. pneumoniae*、及び *S. pyogenes* は、GAG の分解に関わる不飽和グルクロニルヒドロラーゼ (UGL)

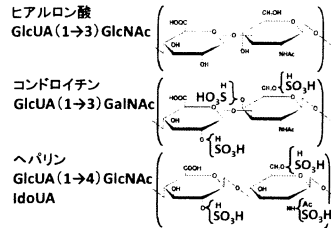


図 1. 代表的な GAG

遺伝子をゲノムにもつことから、それらの酵素学的特性を解析した。連鎖球菌 UGL は、GAG からリアーゼ反応によって生じる不飽和コンドロイチン二糖を優先的に分解することを示し、その構造要因を X 線結晶構造解析により明らかにした¹⁾。一方、*Pedobacter heparinus* 由来の UGL (*PedobacterUGL*) は 1-4 結合を有する不飽和ヘパリン二糖にのみ作用することが報告されている²⁾。本研究では、連鎖球菌 UGL のヘパリン二糖に対する作用機構を酵素学と構造生物学の観点から解析した。

【方法と結果】

3 種の連鎖球菌 UGL (*SagUGL*, *SpnUGL*, 及び *SpyUGL*) について、硫酸化様式の異なる種々の不飽和ヘパリン二糖を用いて基質特異性を調べた。その結果、3 種の連鎖球菌 UGL は全てアミノ糖の N 位が硫酸化された不飽和ヘパリン二糖 (*HANS*) に対して特異的に作用した (表 1)。

SagUGL が *HANS* に特異性を示す構造要因を明らかにするため、*SagUGL* と *HANS* との複合体構造を予測した。*SagUGL* は不飽和コンドロイチン二糖 6 硫酸 (*CA6S*) に対して高い酵素活性を示し (*HANS* の 25 倍)、その硫酸基認識に Ser-365, Ser-368, 及び Lys-370 が寄与する³⁾。既存の構造情報から、1-4 グリコシド結合を有する *HANS* のウロン酸に対するアミノ糖の向きが、1-3 グリコシド結合を有する *CA6S* とは異なることが分かった。そのため、*SagUGL* の基質結合部位において、*HANS* と *CA6S* の各硫酸基はほぼ同様の位置に配置することが予測され、Ser-365, Ser-368, 及び Lys-370 が *HANS* 認識に重要であることが考えられた。

PedobacterUGL は、不飽和コンドロイチン二糖よりも *HANS* に対して高い親和性を示す。そこで、*SagUGL* と *PedobacterUGL* の基質認識に関わる構

表 1. *SagUGL*/ヘパリン二糖比活性

Substrate	<i>SagUGL</i>	<i>SpnUGL</i>	<i>SpyUGL</i>
Relative activity (%)			
<i>HA0S</i>	2.2	4.0	3.3
<i>HANS</i>	100	100	100
<i>HA6S</i>	1.8	1.3	0.96
<i>HANS6S</i>	1.5	2.2	ND ¹
<i>HA2'SNS</i>	0.31	1.8	ND
<i>HA2'SNS6S</i>	0.16	1.4	0.82

¹ND, Not detected

造要因を比較するため、既に決定した *SagUGL* の構造モデル (PDB ID: 3ANJ) を使用したホモロジーモデリングにより、*PedobacterUGL* の構造モデルを作製した。サブサイト-1 (不飽和ウロン酸結合部位) に位置する基質認識残基は高度

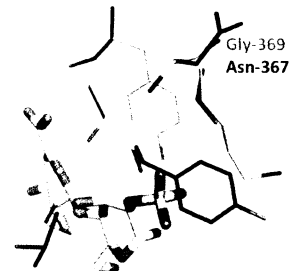


図 2. サブサイト+1 認識残基の比較 (淡, *SagUGL*; 濃, *PedobacterUGL*)

に保存されていた。一方、サブサイト+1 を構成するアミノ糖認識残基には、多くの相違が見られた (図 2)。そこで、両者の間で違いが確認できたアミノ酸残基について、*SagUGL* に部位特異的の変異を導入し、それぞれの変異体について *CA6S* と *HANS* に対する速度パラメーターを測定した。その結果、Gly-369 を Asn に置換した変異体 (*G369N*) において、*HANS* に対する親和性が向上した。

【考察】

- ・不飽和ヘパリン二糖と不飽和コンドロイチン二糖とのグリコシド結合の様式が異なることから、*SagUGL* において、Ser-365, Ser-368, 及び Lys-370 が *CA6S* と *HANS* の各硫酸基の認識に寄与することが考えられた。
- ・*SagUGL* の Gly-369 を Asn へ置換することにより、*HANS* への親和性が向上したことから、*PedobacterUGL* の *HANS* 認識にはこのアミノ酸残基が寄与していることが示唆された。

引用文献

- 1) Maruyama *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **284**, 18059–18069 (2009)
- 2) Myette *et al.*, *Biochemistry*, **41**, 7424–7434 (2002)
- 3) Nakamichi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **286**, 6262–6271 (2011)

[†]Tel: 0774-38-3766, Fax: 0774-38-3767

e-mail: kmurata@kais.kyoto-u.ac.jp

セルラーゼ複合体を応用したエチレン生産系の構築

(名城大理工,*名城大農) ○神藤定生[†]、伊藤ユキ*、植松桂司*、

松田隆之介*、細田晃文*、田村廣人*

【緒言】

セルロース分解性嫌気性菌は、酵素複合体・セルロソームを形成し、バイオマスの分解効率を高めている。その形成に必須であるコヘシンドックリン結合は厳密な結合特異性と高い結合親和性を持つことが明らかにされている(1)。一方、エチレンは石油から大量に生産され、様々な石油化学製品を製造する初発物質として極めて重要な工業用原料ガスである。

本研究ではエチレンをターゲットとした炭素循環型社会構築を目的に、セルロソームの結合特性を応用したエチレン合成人工酵素複合体の構築を試みた。

【実験方法】

かずさ DNA 研究所より分譲されたトマト EST クローンライブラリーから 1-アミノ-1-シクロプロパンカルボン酸 (ACC) 酸化酵素および ACC 合成酵素をそれぞれ PCR 法により増幅し、結合特異性が異なるドックリン遺伝子とドッキング PCR 法でキメラ酵素サブユニット遺伝子を調製した。また、人工酵素複合体の骨格タンパク質 (Cip2) は、2 種類の結合特異性の異なるコヘシを用い、ドッキング PCR 法によって、その遺伝子を構築した。得られた PCR 産物を任意の制限酵素で消化後、発現用ベクター pET-28a(+) に導入し、発現用大腸菌 Rosetta2 (DE3) 株を形質転換した。IPTG による組換えタンパク質の発現誘導を行い、集菌を行った。超音波破碎後、遠心分離により得た上清画分中に目的タンパク質が可溶性画分として発現したことを SDS-PAGE およびウェスタン

ブロットイング解析により確認した。

キメラサブユニットと骨格タンパク質の複合体形成は、ゲル濾過クロマトグラフィーによる複合体形成の分子量変化、および、ネイティブ-PAGE によるバンドシフトで確認した。

酵素活性試験は、酵素反応溶液に S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) を用い最終濃度 1 mM となるよう添加し 30°C で一晩インキュベートした。エチレン合成型人工酵素複合体が出発基質 SAM から 2 段の触媒反応を経てエチレンを合成することをガスクロマトグラフィー分析により確認した。また、複合体形成による酵素反応の相乗効果を定量した。

【結果と考察】

ほぼ単一バンドに精製した 2 種のキメラ酵素サブユニットと Cip2 が自発的に酵素複合体を形成したことを確認した。また、SAM 基質および中間反応産物 ACC からエチレンが合成されたことを確認した。さらに、低濃度の酵素量条件下において複合体のほうがフリーのものより高いエチレン活性を示した。よって、2 種の酵素の局在化の実現による酵素複合体化の優位性が強く示唆された。

引用文献

- 1) S. Jindou et al., FEMS Microbiology Letters, 285, 188-194 (2008).

[†]TEL: 052-838-2394, Fax: 052-832-1170

e-mail: sjindou@meijo-u.ac.jp

ヒト核内 RNA 品質管理機構におけるポリアデニル化および 2Cp6 エキソヌクレアーゼ hRrp6 の関与について

(京大院生命科学) ○藤原奈央子 弓立涼介 吳攸 増田誠司

【前述】

真核細胞において RNA は核内で前駆体として転写された後、種々のプロセッシングを経て成熟型分子となる。その際、プロセッシングの不良により異常 RNA 分子も生じる。このような RNA 分子が蓄積すると、細胞にとって致命的となる。したがって細胞は、不良 RNA を速やかに除去する品質管理機構を備えている。Exosome とよばれる 3' -5' exonuclease 複合体は核内においてこの品質管理に重要な役割を果たしている。核内 Exosome は rRNA、mRNA、tRNA、アンチセンス RNA など多種多様な RNA を基質として分解している。

出芽酵母では、Exosome の基質 RNA 分子の 3' 末端に短い poly(A)⁺RNA が付加される。この poly(A) 付加により Exosome は基質 RNA を効率よく分解することができる。Exosome の基質 RNA への poly(A) 付加は、Exosome と相互作用する TRAMP (Trf4/5- Air1/2-Mtr4 Polydenylation) 複合体の Trf4/5 により行われる。

一方、ヒトの核内 RNA 品質管理機構における poly(A) 付加の重要性はまだ明らかではない。

また、核内 Exosome には、exonuclease 活性を持つ Rrp6 や RNA 結合因子 Mpp6 といった補因子が結合するものの、これらがどのように Exosome の機能に関与するかについても解析されていない。

これらの点について明らかにすべく、ヒト細胞を用いて、ノックダウンによる遺伝学的解析と生化学的解析を組み合わせた解析を行った。

【実験方法】

ヒト核内 RNA 品質管理機構におけるポリアデニル化の関与について

Exosome 構成因子やその補因子をノックダウンし、核内 poly(A)⁺RNA の安定性や局在の変化を RNA-FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) 法によって観察した。また、Trf4/5 のヒトホモログ候補として PAPD5 に注目し、PAPD5 の *in vitro* および *in vivo* における poly(A) 付加活性を評価するとともに、PAPD5 と Exosome の遺伝学的相互作用を、上記 poly(A)⁺RNA-FISH 法により評価した。

さらに、PAPD5 と Exosome との物理的相互作用を免疫沈降法によって評価した。

hRrp6 の機能について

hRrp6 や hMpp6 のノックダウンが Exosome とヒト Mtr4 ホモログ (hMtr4) との相互作用に与える影響について免疫沈降法を用いて評価した。また、

このときの poly(A)⁺RNA の核内における安定性や局在の変化を RNA-FISH 法により観察した。さらに hRrp6 の exonuclease 活性の重要性について明らかにすべく、hRrp6 変異体を発現する細胞を用いて同様の解析を行った。

【結果と考察】

Exosome あるいはその補因子をノックダウンした際、核内に poly(A)⁺RNA の蓄積が顕著に観察された。この poly(A)⁺RNA は本来 Exosome によって分解されるべき基質 RNA 分子を反映していると考えられ、ヒト Exosome による RNA 分解におけるポリアデニル化の重要性が示唆された。

ヒト Trf4/5 ホモログ PAPD5 について *in vitro* および *in vivo* の両方で poly(A) 付加活性を検出した。また、Exosome ノックダウン時にみられる核内への poly(A)⁺RNA 蓄積は、PAPD5 との同時ノックダウンによって解消した。さらに、ヒト細胞内で Exosome と PAPD5 との相互作用を検出した。これらの結果より、核内 Exosome の基質 RNA に poly(A) 付加を行う因子は PAPD5 であることが示唆された。

hRrp6 あるいは hMpp6 をノックダウンすると Exosome と hMtr4 との相互作用が著しく減少した。また、hRrp6 と hMpp6 の同時ノックダウンによって核内に poly(A)⁺RNA の蓄積が顕著に観察された。注目すべきことに、これらの表現型は、hRrp6 の野生型のみならず exonuclease 活性欠失型 hRrp6 変異体の発現によっても回復した。これらの結果より、核内 RNA 品質管理機構において、hRrp6 は exonuclease としてではなく、hTRAMP 複合体と Exosome を物理的に結ぶ分子として機能している可能性が考えられる。

【結言】

ヒト核内 Exosome による RNA 分解において PAPD5 による基質分子への poly(A) 付加が重要である。

今後は、個別の基質 RNA 分子のアデニル化の程度や安定性について、Exosome や PAPD5 をノックダウンした際にどう変化するかを評価していく。加えて、RNA 品質管理における hRrp6 の役割について、Exosome と hTRAMP との相互作用に重要な hRrp6 内ドメインを決定し、その欠失変異体を用いてさらに解析を進めていく。

tel:075(753)9430, fax:075(753)6274
e-mail:naory@lif.kyoto-u.ac.jp

【緒言】

マトリプターゼは 855 アミノ酸残基からなる II 型の膜結合型セリンプロテアーゼであり, sea urchin sperm protein-enterokinase-agrin (SEA) ドメイン, 2 個の complement factor 1R-urchin embryonic growth factor-bone morphogenetic protein (CUB) ドメイン, 4 個の low density lipoprotein receptor A module (LDLR) ドメインを含むステム領域と触媒ドメインから成る¹⁾. 本酵素前駆体はプロテアーゼ活性を有し, Arg⁶¹⁴ と Val⁶¹⁵ の間での自己触媒的な開裂により活性化すると考えられている²⁾. 切断後も触媒ドメインは S-S 結合によりステム領域と結合したままである. 本研究ではマトリプターゼ前駆体の自己触媒的な活性化における LDLR ドメインの役割を明らかにすること, またマトリプターゼの活性化が分子間相互作用により起こることを確認することを目的とした.

【実験方法】

変異型マトリプターゼ, HAI-1 の作製

Chinese hamster ovary (CHO) -K1 細胞に遺伝子を導入し, 目的のタンパク質が分泌された培地を濃縮後, S-protein アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製した.

前駆体マトリプターゼの加水分解活性測定

反応は, 55.2 nM の変異型 hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 (HAI-1) 溶液と acetyl-L-Lys-L-Thr-L-Lys-L-Gln-L-Leu-L-Arg-4-methylcoumaryl-7-amide (Ac-KTKQLR-MCA) 溶液 (終濃度 0-125 μM) を含む緩衝液 [100 mM MES-NaOH, 5.3 mM NaCl, 0.011% Triton X-100, pH 6.0] 15 μl に, 15 μl の 100 nM または 1 μM の酵素溶液を添加することにより開始した. 37°C で 70 時間反応させ, 放出された AMC の濃度を測定し, 反応速度を算出した. 反応速度からミカエリス定数 (K_m) と分子活性 (k_{cat}) を求めた.

開裂部位変異体と活性部位変異体の反応

酵素としてマトリプターゼの活性化開裂部位

変異体, 基質としてマトリプターゼの活性部位変異体を用いて反応を行った. 基質溶液を含む緩衝液に酵素溶液を添加することにより開始し, 37°C で約 70 時間反応させた. 反応溶液を還元下で SDS-PAGE に供し, ウサギ抗ラットマトリプターゼ抗体を用いたウェスタンブロットティングにより前駆体と活性体を検出した.

【結果と考察】

LDLR ドメインの役割

低分子の合成基質 Ac-KTKQLR-MCA に対する加水分解活性は, LDLR ドメインと触媒ドメインから成る LDLR-CD が触媒ドメインのみの CD よりも顕著に高かった. また, 実際に COS-1 細胞に発現させた場合においても, LDLR ドメインと触媒ドメインから成る LDLR+ が触媒ドメインのみの LDLR- よりも多く前駆体から活性体に変換された. これらの結果より, LDLR ドメインはマトリプターゼ前駆体の活性を増強することが示唆された.

分子間相互作用による活性化

活性化開裂部位変異体と活性部位変異体の反応において, それぞれ単独では活性体が生じなかったが, 混合して反応させると活性体が生じた. このことから, 分子間相互作用により活性化が起こることが確認された.

【結言】

LDLR ドメインはマトリプターゼ前駆体の活性を増強することが示唆された. また, マトリプターゼの活性化が分子間相互作用により起こることが確認された.

引用文献

- 1) K. Inouye et al., *J. Biol. Chem.*, **285**, 33394-33403 (2010).
- 2) K. Inouye et al., *J. Biochem.*, **147**, 485-492 (2010).

†Tel: 075-753-6266, Fax: 075-753-6265

e-mail: inouye@kais.kyoto-u.ac.jp

一遺伝子から生じるカイコ抑制性グルタミン酸受容体の構造と薬理学的特性の多様性

(近大院農、*近大農、**島根大院生資科) ○古谷章悟, 山口武則, 神橋貴彦*, 入江貴裕**, 尾添嘉久**, 松田一彦

【緒言】

抑制性リガンド作動性イオンチャネルは即動性の神経シナプス伝達において負の調節基盤としてはたらいており, 昆虫や線虫などの無脊椎動物では, GABAR と抑制性グルタミン酸受容体 (GluCl) がその役目を担っている. とくに GluCl は脊椎動物では見られないことから, 昆虫あるいは線虫制御剤開発のターゲットとして重要であり¹⁾, 実際 GluCl を活性化するイベルメクチン (IVM) は動物駆虫薬として広く使用されている.

昆虫では GluCl 遺伝子は一遺伝子しか存在しないが, その転写産物は単一ではない. これまで, GluCl 遺伝子産物の多様化の機構ならびにそれにとともなう受容体機能の変化について検討されていなかったことから, 脳神経細胞で GluCl の応答を観察した自身の知見をふまえ²⁾, カイコを用いて当該問題の解明を試みた.

【実験方法】

カイコ GluCl 遺伝子の解析

カイコ P-50 系統の終令幼虫の脳から得た RNA を鋳型として 50 種の GluCl cDNA を獲得し, その全長配列を解析した. さらに, 同終令幼虫の脳および胸部第 3 神経節における各アイソフォームの発現を定量的 PCR により解析した.

GluCl の機能的発現と薬理学的性質の解析

カイコ GluCl のアイソフォームをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ, それらの電気生理学的応答を二極膜電位固定法により測定した. また, アイソフォームを動物細胞でも発現させ, [³H]-IVM の特異的結合を測定した.

【結果と考察】

カイコ脳から単離した GluCl cDNA の配列を解析し, エクソン 3 での選択的スプライシングによ

り 4 type のアイソフォームが, またエクソン 9 での部分的欠損により 2 種のアイソフォームが生じることが明らかとなった. エクソン 3 では b type が最も多く検出され, 次いで c, a type と続き, 本エクソンを欠損した type が最も低い頻度で検出された. 一方エクソン 9 の部分欠損は, 完全長 type に比べて低い頻度で検出された.

カイコ終令幼虫の脳および胸部第 3 神経節でのそれぞれのバリエーション遺伝子の発現を定量した結果, 器官によらずエクソン 3 では $b > c > a >>$ 完全欠損 type の順で, またエクソン 9 では完全長 type > 一部欠損 type の順で遺伝子が発現することが判明し, cDNA の配列解析結果を支持した.

エクソン 3 欠損 type を除く全てのアイソフォームはアフリカツメガエル卵母細胞で機能的に発現した. それぞれの受容体について L-グルタミン酸および IVM の濃度応答関係を測定したところ, エクソン 9 の一部欠損の有無によらず, 2 種の化合物に対してエクソン 3c type は 3a および 3b type よりも大きな応答を示した. また動物細胞に発現させた受容体に対する [³H]-IVM の最大結合量でも 3c type が最も大きな値を示したことから, エクソン 3 の構造は機能を有する GluCl の量に影響を及ぼすことが示された.

【結言】

カイコ終令幼虫では多様な GluCl が生じ, その構造に応じて膜での機能的なアイソフォームの量が調節されることが示唆された.

引用文献

- 1) V. Raymond and D. B. Sattelle, *Nat. Rev. Drug. Discov.* **1**, 427-436 (2002).
- 2) K. Hirata, S. Kataoka, S. Furutani, H. Hayashi and K. Matsuda, *PLoS One* **6**, e18354 (2011).

2Da1

クリームの熱処理が脂肪球やタンパク質に与える影響

(同志社女大食, *京大院農, **雪印メグミルク(株)ミルクサイエンス研)

○堀口早苗[†], 西村公雄, 松宮健太郎*, 小杉達也**, 野田正幸**,

武藤高明**, 松村康生*

【目的】

クリームの特性に、製造時の殺菌条件が影響することが知られている。その原因を調べるために殺菌条件の異なる 2 種類のクリームを用いて、加熱条件の違いが、脂肪球やタンパク質の状態に与える影響を検討した。

【実験方法】

製造工程において、加熱殺菌を 1 回(種類別クリーム①)および 2 回(種類別クリーム②)行ったクリームを用いて、以下の実験を行った。

平均粒子径の測定

レーザー回折式粒度分布測定装置 SALD-2200(島津製作所製)でクリームの平均粒子径を測定した。

電子顕微鏡観察

S-4100 クライオ SEM ((株)日立ハイテクノロジー製)によってクリームの脂肪球の状態を観察した。

合一のしやすさ

脂肪球の合一のしやすさを調べるために 215,000 ×g で 40 分間、クリームの遠心分離を行った。分離した油の重量を測定し、クリーム全体の脂肪含量に対する割合を求めて、合一のしやすさの指標とした。

ゼータ電位測定

脂肪球表面の荷電状態を調べるためにゼータ電位測定(大塚電子社製ゼータ電位装置)を行った。

タンパク質の分析

クリームを、72,400 ×g 15 分間 4℃で遠心分離し、脂肪層、水層、沈殿に分けて以下のタンパク質に関する分析を行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(以下、SDS-PAGE)により脂肪球吸着タンパク質、水層、沈殿のタンパク質組成の観察を行った。水層に含まれるタンパク質については、

さらに二次元電気泳動法により、その組成分析を行った。タンパク質の定量法に関しては、クリーム、脂肪層、沈殿については Kjeldahl 法を、水層については Lowry 法を用いた。

【結果と考察】

平均粒子径は、クリーム②の方が有意に大きかった。電子顕微鏡観察の結果からも、クリーム②に、より大きなサイズの脂肪球が存在することが確認された。両クリームにおける脂肪球の合一のしやすさを比較したところ、クリーム②に含まれる脂肪球の方が、合一しやすいことが明らかとなった。両クリームのゼータ電位測定を行ったところ、脂肪球表面のゼータ電位に有意な差はなかった。

脂肪球吸着タンパク質、水層、沈殿に含まれるタンパク質の SDS-PAGE 分析を行った結果、タンパク質組成にクリーム間で特徴的な違いは見られなかった。しかし、水層中のタンパク質を二次元電気泳動で調べたところ、クリーム間で、泳動位置の異なる数種のタンパク質が確認された。また、脂肪層と沈殿に含まれるタンパク質量には違いが見られ、クリーム①では脂肪球吸着タンパク質量が多いのに対して、クリーム②では沈殿のタンパク質量が多かった。このことから、異なる加熱殺菌条件により、脂肪球に吸着されるタンパク質量及び変性状態や吸着挙動に違いが生じ、その違いが両クリームの乳化能に影響を与え、その結果クリームの特性に差が生じるものと考えた。

[†]Tel:075-251-4214,Fax:075-251-4289

E-mail: isd003@dwc.doshisha.ac.jp

2Da2

キレート樹脂による魚醤油中の重金属除去

(石川県大・食品科学、*石川県工試、**榊車多酒造) ○新城良平,
笹木哲也[†], 道島俊英[†], 中村静夫[†], 河道真理^{**}, 油谷美幸^{**}, 徳田耕二^{**},
小柳喬, 榎本俊樹[†]

【緒言】

魚醤油は魚介類を食塩と共に発酵させた液体調味料であるが、一部の魚醤油は微量の有害な重金属を含有していることが報告されている。しかし、ほとんどの魚醤油の重金属含有量は健康を害す程度ではないものの、安心を担保するためには、重金属除去技術の開発が必要である。我々は、凝集剤を用いた魚醤油中の重金属除去方法について報告した。本研究では、既報の方法で除去できなかった重金属を除去するため、キレート樹脂を用いたカラム通液処理について検討したので報告する。

【実験方法】

キレート樹脂処理

キレート樹脂は、イミノ二酢酸型(CR11、三菱化学(株)製)、ポリアミン型(CR20、三菱化学(株)製)、ヒドロキシル基型(ホクエツ PF、味の素(株)製)の3種類を用い、処理はカラム法により行った。すなわち、カラム(φ4mm×90mm)にキレート樹脂を充填し、魚醤油を流速 5ml/h で通液し、2 時間毎(10ml 毎)に分画した。各分画の Cd 濃度は ICP 発光分光分析により測定した。

成分・機能性評価

キレート樹脂 CR11 で処理した魚醤油の全窒素量、遊離アミノ酸量、抗酸化性等を測定した。

【結果と考察】

キレート樹脂の選択

キレート樹脂処理による Cd 濃度変化を図 1 に示す。凝集剤で重金属除去処理した魚醤油の Cd 濃度は 0.28 mg/100ml であった。キレート樹脂 CR11 及び CR20 で処理した、最初のフラクションの Cd 濃度は 0.05 mg/100ml であり、共に低値であった。その後、CR11 処理液の Cd 濃度は低値を維持するのに対し、CR20 のそれは純増

した。ホクエツ PF 処理液の Cd 濃度は、処理前の魚醤油と比較して、ほとんど減少しなかった。したがって、カラム通液処理において最適なキレート樹脂は、CR11 であると判断できる。

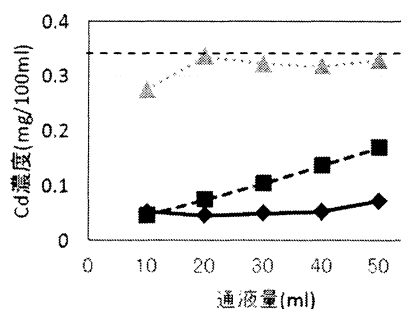


図1 キレート樹脂処理前後の Cd 濃度

◆ : CR11 ■ : CR20 ▲ : ホクエツ PF
-- : 魚醤油原液の Cd 濃度 0.34mg/100ml

成分・機能性評価

全窒素量の分析結果を図 2 に示す。キレート樹脂(CR11)処理後も全窒素量に変化は見られなかった。また、その他の成分(遊離アミノ酸)や機能性(タウリン、抗酸化性)についても、ほとんど変化は認められなかった。

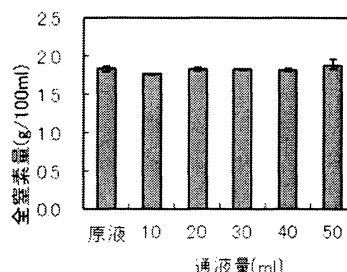


図2 キレート樹脂(CR11)処理前後の全窒素量

【結言】

魚醤油の有効成分を損なうことなく、Cd を除去するキレート処理技術を確立した。

[†]Tel: 076-227-7452, Fax: 076-227-7452

e-mail: enomoto@ishikawa-pu.ac.jp

魚醤油中の重金属の存在形態評価と除去機構の解明

(石川県工試、*石川県大・食品科学、**㈱車多酒造) ○笹木哲也[†],
 新城良平*, 道島俊英, 中村静夫, 河道真理**, 油谷美幸**, 徳田耕二**,
 小柳喬*, 榎本俊樹*

【緒言】

魚醤油は魚介類を食塩と共に発酵させた液体調味料である。これまで、我々は清澄剤やキレート樹脂を用いた魚醤油中の重金属除去方法を開発してきた。これらの方法を用いて、重金属を安定的に除去するためには、除去機構を把握する必要がある。本研究では、魚醤油中のカドミウム (Cd) について、存在形態をゲルろ過クロマトグラフィーで評価し、各形態の重金属除去方法について検討した。また、Cd のキレート樹脂への吸着機構を、速度論解析により評価した。

【実験方法】

ゲルろ過クロマトグラフィー

イカの内臓を原料とする魚醤油 2ml を、ゲルろ過クロマトグラフィー(樹脂: Sephadex G-15、カラム: $\phi 15 \times 500$ mm) にチャージした後、0.1N NaCl 水溶液を流速 1ml/min で展開した。得られた画分の Cd 濃度、吸光度 (280nm)、ニンヒドリン呈色値を測定した。

速度論解析

魚醤油 100 ml とキレート樹脂 10 ml を混合し、1 時間以内の Cd 濃度の経時変化を測定し、下記の 1 次、及び 2 次反応速度論式(式 1、2) にフィッティングした。

【結果と考察】

ゲルろ過クロマトグラフィー

魚醤油のゲルろ過クロマトグラフィーの分析結果を図 1 に示す。魚醤油中の Cd はタンパク質に結合した高分子成分と遊離した低分子成分の 2 種類の形態で存在することが確認された。続いて、清澄剤及びキレート樹脂で処理した魚醤油の Cd 存在形態を、ゲルろ過クロマトグラフィーで評価した。その結果、清澄処理は

タンパク質に結合した Cd を、キレート樹脂処理は遊離した Cd を除去できることが確認された。キレート樹脂処理、及び清澄処理を併用もしくは選択することで、魚醤油中の遊離、及びタンパク質結合 Cd を共に除去できることが明らかとなった。

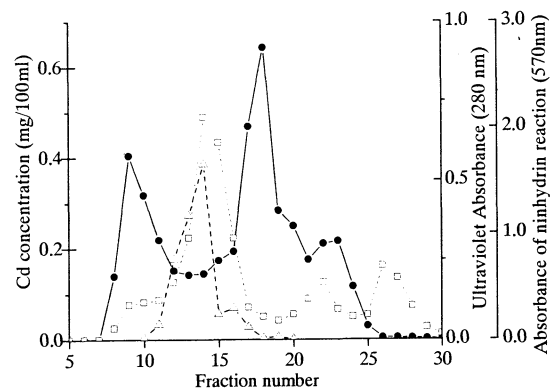
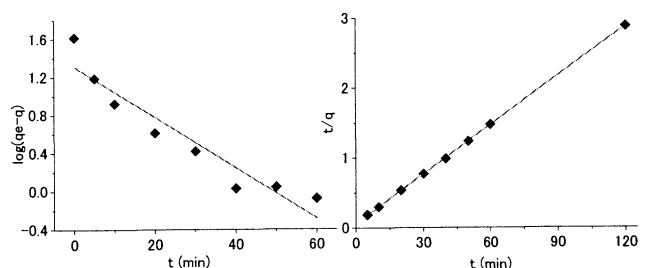


図 1 ゲルろ過クロマトグラフィー

● : Cd 濃度 (mg/100ml), □ : 吸光度 (280nm),
 △ : ニンヒドリン呈色値 (吸光度 570nm)

速度論解析

反応速度論式のフィッティング結果を図 2 に示す。1 次式の相関係数は 0.9303 であり、2 次式は 0.9999 であった。この結果から、キレート樹脂処理は Cd を 2 次反応により吸着することが確認できた。

図 2 反応速度論式のフィッティング結果
(左 : 1 次式、右 : 2 次式)

[†] Tel: 076-267-8086, Fax: 076-267-8090

e-mail:t-sasaki@irri.jp

【緒言】

Helicobacter pylori (以下ピロリ菌) はヒトや霊長類の胃粘膜に感染し、胃潰瘍や十二指腸潰瘍を引き起こすことで知られている。ピロリ菌が分泌するウレアーゼは尿素をアンモニアと二酸化炭素に加水分解する。ピロリ菌はこの酵素を利用してアンモニアを生成し、胃酸を中和することにより強酸性下での生息を可能としている。本研究では、ピロリ菌の感染・定着を防ぐ目的で、ウレアーゼ阻害活性を指標とし、トマト果汁に含まれるウレアーゼ阻害物質の検索を行った。

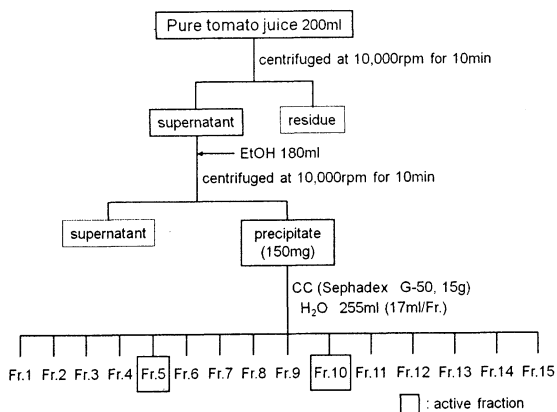
【実験方法】

ウレアーゼ阻害活性の評価

酵素はjack bean 由来の urease (東洋紡製) を用いた。基質は 100 mM urea を用いた。0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 4.1) に酵素および基質を加えて反応を開始し、37°C で 5 分間インキュベートした。発生したアンモニア量をインドフェノール法 (640 nm における吸光度) で測定した。この系に阻害剤を加えて、反応前後の吸光度の差を求め、阻害剤未添加のコントロールとの比較によって阻害率を算出した。

トマト果汁中のウレアーゼ阻害物質の分画

無添加の市販トマトジュースを下記の手順で分画した。阻害活性を指標として精製を行い、活性画分 Fr.5 および Fr.10 を得た。



【結果と考察】

活性画分 Fr.5 および Fr.10 の ¹H MNR 分析を行った結果、いずれも多糖類と予想された。Fr.10 のシグナルを詳細に解析した結果、ガラクトースおよびガラクトuron酸の部分構造の存在が示唆され、Fr.10 の活性成分はペクチンであると推定した。(図1) ペクチン標品のスペクトルデータと Fr.10 のシグナルを比較したところ、共通するシグナルが観測され、Fr.10 に含まれる活性成分をペクチンと同定した。現在、糖組成については調査中である。

数種のペクチン標品の活性を比較した結果、メチル化度の違いによって活性に差異が認められ、低メトキシペクチンの方がより高い活性を示すことが明らかになった。

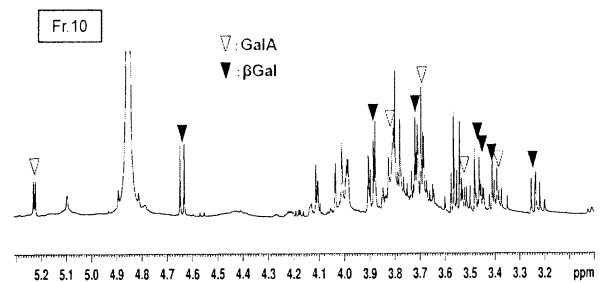


図1 Fr.10 の ¹H NMR スペクトル

【結言】

トマト果汁に含まれるウレアーゼ阻害物質の検索を行い、活性成分の一つをペクチンと同定した。また、低メトキシペクチンがより高いウレアーゼ阻害活性を示すことを明らかにした。ペクチンは食経験があり、日常的に摂取できる成分であるため、食品由来のウレアーゼ阻害物質として疾病の予防に利用できる可能性がある。

Tel:0265-77-1600

[†] e-mail:10aa414h@shinshu-u.ac.jp

2Da5

ヤナギモクの糖質分解酵素阻害作用

(石川県大院食品) ○西塔美希[†], 松本健司, 小西康子

【緒言】

糖質分解酵素の阻害により食後血糖値の急激な上昇が抑えられることから、糖質分解酵素阻害剤を含む食品の摂取は糖尿病に対する予防手段として期待できる。我々は、能登半島で採取した海藻を対象に糖質分解酵素阻害活性のスクリーニングを実施したところ、ヤナギモク (*Sargassum ringgoldianum* subsp. *Coreanum*) にアミラーゼに対する強い阻害活性が見出され、そのエタノール抽出液には食後血糖値を抑制する成分が含まれている可能性があることを報告した^{1,2)}。本研究ではその成分について精製を進め、得られた標品のアミラーゼおよびグルコシダーゼに対する阻害活性と、紫外・可視・赤外領域における吸収スペクトルを測定した。

【実験方法】

アミラーゼ阻害成分の精製

ヤナギモクの凍結乾燥粉末からエタノール抽出液を得た後、図1の分画方法に従って Ph-2 を精製した。

アミラーゼおよびグルコシダーゼに対する阻害

Ph-2 存在下および非存在下でヒト唾液 α -アミラーゼをアミロペクチンと 37 °C で 5 分間反応させ、生成した還元糖量をフェリシアン化カリウム法で測定した。Ph-2 存在下または非存在下で、ラット腸管グルコシダーゼ溶液をマルトースまたはスクロースと 37 °C で 30 分間反応させ、生成したグルコース量をグルコース C-II テストワコーを用いて測定した。

【結果と考察】

Ph-2 のアミラーゼ阻害に対する IC₅₀ 値は 11 μ g/ml であった。この値は、アミラーゼ阻害剤として知られているアカルボースの IC₅₀ 値 (10 μ g/ml) とほぼ等しかった。グルコシダーゼ活性は、3 mg/ml の Ph-2 存在下で 43 % (マルトース) および 46 % (スクロース) 阻害された。Ph-2 の赤外吸収スペクトルは、フロログルシノール重合物の

のそれとよく似ていた。

【結言】

ヤナギモクから得た Ph-2 は、アカルボースと同程度のアミラーゼ阻害活性を有し、グルコシダーゼに対しても阻害活性を示すフロログルシノール重合物であると考えられる。現在、糖尿病モデルマウスへのヤナギモク抽出液の長期投与を行っており、その効果について検討中である。

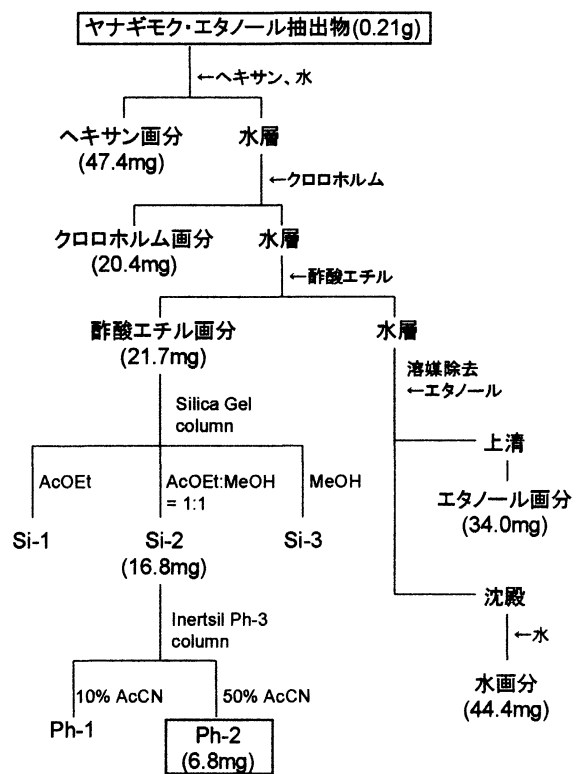


図1 ヤナギモク・エタノール抽出物の分画

引用文献

- 1) 日本食品工学会第 11 回年次大会講演要旨集 p.122
- 2) 日本農芸化学会 2011 年度大会講演要旨集 p.227

[†]Tel : 076-227-7454, Fax : 076-227-7410

Email : p1093006@ishikawa-pu.ac.jp

ドリアン中 TRPA1・TRPV1 アゴニストの同定と定量

2Da6 ○寺田祐子*、細野崇**、関泰一郎**、有賀豊彦**、佐藤努*、渡辺達夫*

*静岡県大院・食栄、**日本大・生物資源

【目的】

温度感受性 TRP 受容体のうち、TRPA1・TRPV1 の活性化は体熱産生を引き起こし、エネルギー代謝を亢進させる。ワサビの辛味成分であるアリルイソチオシアネートは TRPA1 を、トウガラシの辛味成分カプサイシンは TRPV1 を活性化して体熱産生を誘発する。よって、TRPA1・TRPV1 活性化成分の摂取は、肥満予防に有効であると考え、食品中から活性化成分の探索を行ってきた。

ドリアン (*Durio zibethinus* Murr.) は、インド本草において熱性食品の筆頭であり、摂取すると口内や腹部が熱くなることが知られている。ドリアンは diethyl disulfide (DEDS) や diethyl trisulfide (DETS) などの独特の香気成分を含むが、これらはニンニク中の TRPA1・TRPV1 含硫アゴニスト [diallyl disulfide・diallyl trisulfide]¹⁾ と類似の化合物である (図 1)。よって、ドリアン中の含硫成分が TRPA1・TRPV1 を活性化する可能性は高いと考え、含硫化合物の TRPA1・TRPV1 活性及び、果実中の含量を測定した。

【方法】

《TRPA1・TRPV1 活性の測定》

ヒト-TRPA1 または TRPV1 を発現させた HEK 細胞を用い、サンプルによる細胞内 Ca²⁺濃度の変化を FLEX station™ II (Molecular Devices) にて測定し、活性を評価した。含硫化合物は、多種のドリアンに高含量の DEDS・DETS を使用した。

《果実中の含硫化合物の定量：ヘッドスペース-マイクロ固相抽出 (SPME) 法》

ドリアン (品種名: D24) の果実をバイヤル瓶に封入し、ヘッドスペースに SPME ファイバー (SUPELCO, CAR/PDMS) を挿入して、香気成分を捕集した。捕集した香気成分を GC-MS にて分析し、各含硫化合物を定量した。

【結果】

DEDS・DETS は TRPA1・TRPV1 を活性化し、TRPV1 よりも TRPA1 に強く作用することを明らかにした。果実中の含硫化合物を定量した結果、DEDS・DETS の果実中濃度と TRPA1・TRPV1 に対する EC₅₀ 値が近い値を示したことから、果実摂取で受容体を活性化し得ることが判明した。加えて GC-MS 分析において、DEDS・DETS の類縁体が複数検出されたことから、現在、それら類縁体の TRPA1・TRPV1 活性を測定している。

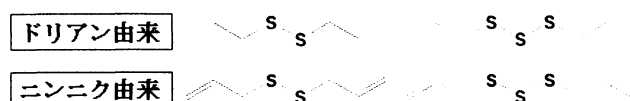


図 1 ドリアンとニンニク中の TRPA1・TRPV1 アゴニスト

1) Koizumi K, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **382**, 545-548 (2009)

2Da7 エポキシリノール酸付加体に対するモノクローナル抗体の作製

(名大院生命農) ○占部 由重、西村 泰斗、柴田 貴広、河合 慶親、内田 浩二

【緒言】

食品中や生体内に多く存在するリノール酸は、活性酸素種による過酸化反応の標的となり、最終的にアルデヒドなどを含む親電子性化合物へと変換される。これらの活性種は、タンパク質中の Cys、His、Lys などの求核性アミノ酸残基と反応するだけでなく、種々の疾病に関与することも示唆されている。当研究室において、His 残基と反応性を有するリノール酸酸化物のひとつとして、epoxy-keto octadecenoic acid (EKODE) を同定した。EKODE は、リノール酸過酸化反応によって、6つの構造異性体として生成することが知られているが(図1)(参考文献1,2)、求核性アミノ酸残基との反応性は未解明であり、生体内における EKODE 修飾タンパク質の検出例もない。そこで本研究において、抗 EKODE 修飾タンパク質抗体を作製し、そのエピトープ解析を行うこととした。

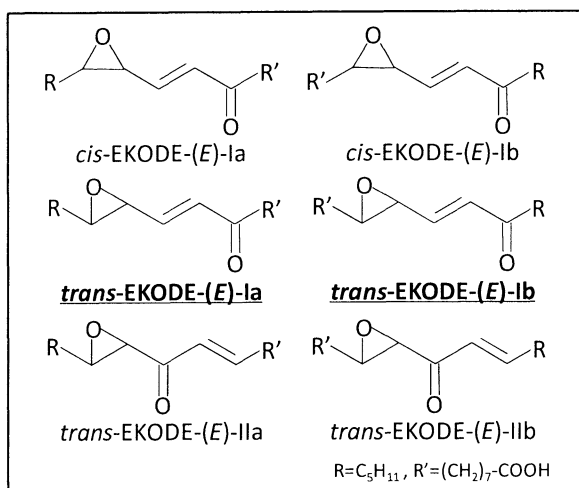


図1、EKODEの構造異性体

【実験方法、結果】

本実験では、6つの構造異性体の中でも生成量の多い、*trans*-EKODE-(*E*)-Ia/b を用いて以下の検討を行った。

抗 EKODE 修飾タンパク質抗体の作製

EKODE と反応させた KLH を、Balb/C マウ

スに免疫したところ、3回目の追加免疫後の血清において、抗体価の有意な上昇が確認された。そこで定法に従って細胞融合を行い、モノクローナル抗体 mAb-07A を取得した。さらにこの抗体が EKODE 修飾タンパク質を特異的に認識することを確認した。

mAb-07A のエピトープ解析

EKODE と Cys、His、Lys、Arg の各 *N*-アセチル誘導体との反応液を用いて、競合 ELISA を行ったところ、Cys、及び His 反応液に対して交差性を確認した。そこで、より反応性の高い Cys について注目することとし、HPLC による検討を行ったところ、mAb-07A が交差性を示す画分に、*S*-13-hydroxy-9-keto-10-octadecenoic acid-cysteine、および *S*-9-hydroxy-13-keto-11-octadecenoic acid-cysteine (図2) が含まれていることを見出した。今後、これらの付加体のエピトープ活性の違いや、EKODE 修飾 His についての詳細な検討を進める予定である。

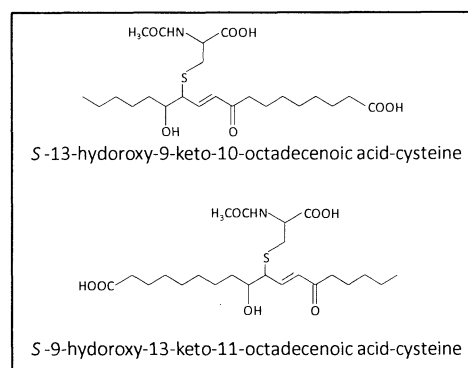


図2、同定した付加体の構造

参考文献

- (1) H.W. Gardner *et al.*, *Lipids*, 1974
- (2) De Lin *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2007

Tel:052-789-4126

FAX:052-789-5741

e-mail:wa87475@yahoo.co.jp

2Dp1

抗炎症性ペプチド pGlu-Leu の発酵食品中での分布

(京府大院・生命環境, *招徳酒造(株))

○清野珠美[†], 朴恩榮, 中村考志, 佐藤健司, *木村紫晃, *大塚真帆

【緒言】

タンパク質を加水分解して生成されるペプチドは、製造中に化学的修飾を受けるものがある。代表的なものとして、ペプチドN末端GlnのpGlu化がある。近年、このpGluペプチドの一部に抗炎症作用のような生理活性があることが明らかになってきた。また、我々が日常的に食する発酵食品もタンパク質分解物であるため、pGluペプチドが多く含まれている可能性がある。しかし発酵食品中のpGluペプチドに関する研究はまだ少ない。

我々は、これまでに発酵食品の1つである日本酒から、抗炎症性作用を持ったpGluペプチド、pGlu-Leuを同定した。そこで今回は、発酵食品中での抗炎症性pGluペプチドの分布を調べるため、日本酒に加え、他の発酵アルコール飲料(甘酒、ビール、赤ワイン)、そして大豆発酵食品(しょうゆ、ミソ、納豆)、およびヨーグルト中のpGlu-Leu含量を調べ、比較することを目的とした。

【実験方法】

サンプル中のpGluペプチド画分の調製

分析するサンプルのうち、固体のものは、同量の蒸留水を加えてホモゲナイズし、さらに3倍量のエタノールを加えて懸濁後、3000 rpmで10分間遠心し、その上清をサンプルとして用いた。液体のものはそのまま実験に用いた。これらサンプルは適時、蒸留水で希釈した。このサンプル希釈液を用いて、スピнкаラムによる強カチオン交換樹脂(AG50W-x8, Bio Rad)固相抽出を行い、サンプルから樹脂素通り画分を回収した。この画分をpGluペプチド画分とした。

LC/MS/MSによるサンプル中pGlu-Leuの定量

上記で調製した各サンプルのpGluペプチド画分中のpGlu-LeuをLC/MS/MSで分析した。pGlu-Leuは、プレカーサーイオンm/z 243、およびプロダクトイオンm/z 84, m/z 86により検出した。LC部は、カラムCadenza CD-C18 (2.0 × 150 mm, 3 μm, Imtakt Corp.), 溶離液Aに0.1%ギ酸-5%アセトニトリル, Bに0.1%ギ酸-5%アセトニトリルを用い、溶出グラジエント: 0-15分; B 0-80%, 15-20分; B 100%, 流速0.2 mL/min, カラム温度40°Cで分析を行った。

【結果・考察】

LC/MS/MS分析により、今回用いたサンプルすべてに、pGlu-Leuに一致するピークが確認できた。発酵アルコール飲料中のpGlu-Leu濃度を比較すると、日本酒は約46 μMであるのに対し、他のアルコール飲料は10 μM程度、あるいはそれ以下であった。また大豆発酵食品中のpGlu-Leuは0.06-0.08 μmol/gであるのに対し、ヨーグルトは約0.01 μmol/gであった。

発酵食品は、微生物が分泌する酵素によって食品のタンパク質が分解される。納豆では納豆菌、しょうゆやミソではコウジカビ、日本酒ではコウジカビに加えて酵母や乳酸菌が、その製造に利用されるこのような発酵微生物が発生させるプロテアーゼやペプチダーゼの働きにより、抗炎症ペプチドが特異的に生成されている可能性が示唆された。

[†] 食品科学研究室 Tel: 075-723-3503

Fax: 075-723-3503

e-mail: tamako1119@gmail.com

【緒言】

近年、脂肪組織が単に余剰のエネルギーを貯蔵する機能だけでなく、様々なアディポサイトカインを分泌する内分泌器官としての機能が知られるようになった。肥満時に見られる多臓器の深刻な機能異常は、組織へ蓄積した過剰な脂肪とアディポサイトカインの分泌機能異常が主因となる。これら観点から、脂肪蓄積抑制や脂質代謝障害を低減させる食品の機能性が注目されている。

これまで高脂肪食摂取時において黒米アントシアニンが、肝臓中 GPAT の発現量に影響を与えることで、蓄積脂肪を低減することを明らかにした。本研究では、運動負荷時における黒米アントシアニンの脂肪合成系酵素の発現量を調べ、脂質代謝への有効性を検討した。

【実験方法】

C57BL/6J マウス (雄、4 週齢) を実験動物として用いた。1 週間の予備飼育後、コントロール食 (脂質含量 5% : C 群)、アントシアニン食 (脂質含量 5%、アントシアニン含量 0.2% : CA 群)、高脂肪食 (脂質含量 33%、H 群)、高脂肪食・アントシアニン食 (脂質含量 33%、アントシアニン含量 0.2% : HA 群) を与え、10 週間飼育した。また、各群に運動負荷群 (Cex 群、CAex 群、Hex 群、HAex 群) を設定した。運動負荷は、水深 12cm、水温 34°C、負荷時間 40 分間の条件下での遊泳とし、飼育開始から 51~69 日目に 3 日毎に実施した。

解剖後、肝臓、精巣上体、腎周囲脂肪の重量測定、血液、肝臓の脂質分析 (FFA、コレステロール等) の一般分析を行った。肝臓はパラフィン包埋後、HE 染色を行い、組織および脂肪滴の形成状態を調べた。また、肝臓の脂肪酸合成系および脂肪酸 β 酸化系に関与する SREBP-1 および FAS

を中心に mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。

【結果と考察】

C 群と CA 群間、H 群と HA 群間、Cex 群と CAex 群間では体重増加に変化はなく、マウスの成長に対する黒米アントシアニンの影響は見られなかった。しかしながら、HAex 群は Hex 群と比較し、7 週目以降、有意に体重が減少した。また、アントシアニンの高脂肪・運動負荷時における影響は、血中の脂質分析から求めた動脈硬化指数および肝臓重量でも見られ、HAex 群では HA 群と比較し有意に ($P < 0.05$) 減少した。

脂肪合成系に関連する酵素とタンパク質の mRNA 発現量を比較した結果、H 群および HA 群では GPAT および SREBP-1 の発現量が低く、脂肪蓄積に対し抑制的に働いていると考えられた。FAS の発現量は C 群と比較し H 群で減少したが、運動負荷 (Hex 群) およびアントシアニン摂取 (HA 群、HAex 群) による回復が見られた。また、すべての群間で ACS の発現量に差がなかったことから、黒米アントシアニンが acylCoA を分岐点とした脂質代謝経路に影響することが示唆された。

【結言】

黒米アントシアニンは高脂肪食摂取における脂肪合成系に影響し、脂質代謝を改善する。また、その作用は運動負荷により、より有効化することが示唆された。

*Tel&FAX: 076-227-7457

e-mail:yoshiki@ishikawa-pu.ac.jp

食餌性肥満マウスの脂質代謝に及ぼす酵素合成グリコーゲンの影響

2Dp3

(†神大院農, *江崎グリコ健康科学研, **神大自科) ○小川瑠衣†, 古屋敷 隆*, 中山陽子†, 本田和久†, 上曾山 博†, 高田洋樹*, 保田倫子**, 芦田 均†

【緒言】

グリコーゲンは、筋肉や肝臓に貯蔵される多糖であり、運動時のエネルギー源としての作用や、血糖維持機能を持つことが知られている。近年、我々はデンプンからグリコーゲンを酵素的に合成する方法を確立し、この方法により製造されたグリコーゲン（酵素合成グリコーゲン：ESG）は、天然グリコーゲンと物性および構造上の差異がほとんど見られないことを確認している。これまでに、ESG は免疫賦活作用および食物繊維様作用を持つことが知られており、ラットに ESG を長期間摂取させると腸内環境が改善されることも報告されている。そこで、本研究では ESG が食餌性肥満を呈したマウスの脂質代謝におよぼす影響について検討した。

【実験方法】

C57BL/6NCr マウスを対照食群および高脂肪食群（35%脂肪食）に分け、さらに各群を3群に分け、ESG を0、10あるいは20%添加した飼料を自由摂取させ、15週間飼育した。飼育中にX線CT装置LCT-100を用いて、体脂肪率（内臓脂肪率および皮下脂肪率）を計測し、また、安静時の直腸体温を計測した。飼育終了後に肝臓、脂肪組織、盲腸ならびに盲腸内容物の重量を計量し、血糖値および血漿脂質量を測定した。さらに、飼育終了前日に回収した糞と飼育終了後の肝臓中の脂質含量についても測定すると共に、肝臓、筋肉および脂肪組織における脂質代謝およびエネルギー代謝関連遺伝子の mRNA 発現の変化について RT-PCR を用いて評価した。

【結果と考察】

高脂肪食摂取により、飼育終了時の血糖値および血漿中総コレステロール量は有意な高値が認められ、体脂肪率、白色脂肪重量および肝臓脂質含量は著しく増加した。これにより、本条件下で高脂肪食摂取

により肥満を呈することを確認した。それに対して、ESG を摂取することで、血糖値は低下傾向がみられ、血漿中総コレステロール量は ESG20%摂取群で顕著な低値が認められた。体脂肪率および皮下脂肪、腸間膜脂肪重量は ESG20%摂取群で有意に低値を示した。褐色脂肪重量についてはいずれの群でも差はみられなかった。また、肝臓中の脂質含量は ESG 濃度依存的に減少し ESG20%摂取群で著しく低下した。

一方、対照食群と高脂肪食群のいずれにおいても ESG 摂取により盲腸および盲腸内容物重量が増加し、さらに糞中脂質量は顕著に増加した。これらのことから、ESG は食物繊維様作用を有し脂質の排泄を促進することが示唆された。直腸体温は対照食群と高脂肪食群いずれにおいても ESG により上昇することが認められた。褐色脂肪に存在する uncoupling protein 1 (UCP1) は体温上昇に関与すると報告されているが、本条件下では ESG による mRNA の発現変化はみられなかった。また、脂質代謝関連遺伝子についても ESG の影響は見られなかった。

【結言】

ESG は食餌性肥満による脂肪蓄積および総コレステロール値の上昇を抑制することで、脂質代謝を改善することが考えられた。これらの作用機序の一つとして、糞中への脂質の排泄促進の関与が示唆された。一方、ESG 摂取により体温の上昇がみられたが、その作用機序については現時点で不明なため、今後検討していく予定である。

引用文献

- 1) Ryoyama K. et al *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 2332-2340 (2004)
- 2) Furuyashiki, T., et al., *Food Funct.*, 2(3-4) 183-189 (2011)

†Tel: 078-803-5878, Fax: 078-803-5878

e-mail: kurige_305@yahoo.co.jp

【緒言】

グルコースの取り込みを促進させる機能を持つグルコース輸送担体 (GLUT4) は、インスリンの標的組織である骨格筋、心筋、脂肪において、血糖調節の役割を担っている。通常は、細胞内小胞膜に局在していて、インスリン刺激により、細胞膜上に移行し、グルコースの細胞内への取り込みを 10~20 倍程度増加させる。日常的に摂取する食品成分によりこの情報伝達系を調節できれば、高血糖の予防、改善につながることを期待される。

我々は放射性標識をしていないグルコース類縁体である 2-デオキシグルコースを用いて、細胞内へのグルコース取り込み活性の簡易測定法を開発した¹⁾。この方法を用いて約 50 種のポリフェノールの活性を評価したところ、ケルセチンを処理した L6 筋管細胞において、グルコース取り込み活性が上昇することを見出した²⁾。そこで本研究では、ケルセチンによる糖取り込み促進作用が GLUT4 の細胞膜移行に依存しているか否かを検討し、その作用機序の解明を目的とした。

【実験方法】

分化したラット骨格筋由来 L6 筋管細胞に、ケルセチンを 1 nM-10 μ M で 15 分間作用させた後に細胞膜タンパク質画分と全タンパク質画分を調製した。GLUT4 の細胞膜移行とその上流にあるタンパク質 (IR、IRS-1、PI3K、PKC、Akt、AMPK) のリン酸化および発現量はウェスタンブロット法を用いて評価した。

【結果と考察】

ケルセチンは L6 筋管細胞において、濃度依存的に GLUT4 の膜移行を誘導し、作用濃度 10-100

nM で細胞膜上における GLUT4 の存在量が顕著に増加することが判った。この結果から、ケルセチンによるグルコースの取り込み促進作用は、GLUT4 の細胞膜移行に依存することが示唆された。作用機構解明のため、免疫沈降法を用いてインスリン受容体 (IR) のリン酸化を検討したところ、IR はリン酸化されていなかった。このことから、ケルセチンの標的分子はインスリンとは異なると考えられたが、その下流のタンパク質である IRS-1、PI3K ならびに PKC のリン酸化は促進されていた。また、インスリン依存的な PI3K のリン酸化は Akt のリン酸化を誘導するが、ケルセチンは Akt をリン酸化させなかった。さらに、ケルセチンは細胞のエネルギー恒常性の調節因子である AMPK のリン酸化も促進させた。これらの結果から、ケルセチンはインスリン伝達経路の一部と AMP 経路とを介して GLUT4 の膜移行を誘導するが、その作用はインスリンとは異なることが明らかとなった。

【結言】

ケルセチンは、L6 筋管細胞においてインスリン伝達経路の一部と AMPK 経路を介して GLUT4 の膜移行を促進し、グルコースを細胞内に取り込ませる作用を有していることが判った。

引用文献

- 1) Yamamoto, N. et al., Anal Biochem., 404, 238, 2010.
- 2) Kawabata, K. et al., Mol. Nutr. Food Res., 55, 467, 2011.

[†] Tel: 078-803-5878, Fax: 078-803-5878
e-mail: suzhongkan@hotmail.com

ルテオリンが AhR と Nrf2 を介した薬物代謝系第 I、II 相酵素の誘導発現に及ぼす影響

(神大院農) ○姜 嵩岩[†], 北野 嶺, 芦田 均

【緒言】

Aryl hydrocarbon receptor (AhR)はダイオキシン類などのリガンドと結合することで活性化して、薬物代謝酵素の遺伝子発現を誘導する転写因子である。近年、薬物代謝第 II 相酵素の遺伝子の発現を担う nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)と AhR とがクロストークして薬物代謝酵素の発現を制御する可能性が報告されている。我々はこれまでに、フラボンのひとつであるルテオリンが AhR の活性化を抑制することを見出した^{1, 2)}。本研究では、AhR と Nrf2 を介した薬物代謝酵素の発現において、ルテオリンが及ぼす影響について検討した。

【実験方法】

マウス肝癌由来 Hepa-1c1c7 細胞とラット肝上皮由来 RL-34 細胞に AhR リガンドである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)、あるいは Nrf2 の活性化剤である *tert*-butylhydroquinone (tBHQ)を作用させ、薬物代謝系第 I 相酵(CYP1A1)と第 II 相酵素(NQO1、GST α 、GST μ 、GST π)の発現量をウェスタンブロットにより検討した。次に、ルテオリンをこれらの細胞に 10 分間作用させた後に、1 nM TCDD あるいは 30 μ M TBHQ を 24 時間作用させ、ルテオリンが薬物代謝系第 I、II 相酵素の発現誘導に及ぼす影響を検討した。

【結果と考察】

薬物代謝第 I 相酵素 CYP1A1 の発現は、Hepa-1c1c7 細胞と RL-34 細胞において TCDD により顕著に誘導され、薬物代謝第 II 相酵素 GST α 、 μ ならびに π の発現は、RL-34 細胞において tBHQ により誘導された。これらのことから、CYP1A1 と GST はそれぞれ AhR と Nrf2 により発現が制御されていることが確認された。一方、薬物代謝第

II 相酵素 NADP(H):quinone oxidoreductase 1 (NQO1)の発現は、RL-34 細胞においては tBHQ によるのみ誘導されたが、Hepa-1c1c7 細胞においては TCDD と tBHQ のどちらによっても誘導された。従って、NQO1 は AhR と Nrf2 の 2 つの転写因子による発現制御を受けている可能性が考えられた。ルテオリンは TCDD によって誘導された CYP1A1 の発現を Hepa-1c1c7 細胞および RL-34 細胞のいずれにおいても濃度依存的に抑制した。また、ルテオリンは RL-34 細胞において tBHQ によって誘導された GST α 、 μ ならびに π の発現を濃度依存的に抑制した。ルテオリンは TCDD と tBHQ によって誘導された NQO1 の発現を Hepa-1c1c7 細胞および RL-34 細胞のいずれにおいても抑制した。さらに、ルテオリンは TCDD および tBHQ によってそれぞれ誘導される AhR と Nrf2 の核内移行を抑制した。

【結言】

ルテオリンは AhR と Nrf2 の核内移行を抑制することで薬物代謝系第 I、II 相酵素の発現を負に制御することが明らかとなった。また、NQO1 は AhR と Nrf2 の 2 つ転写因子による発現制御を受けていることから、今後は AhR と Nrf2 の相互作用などについて検討する予定である。

引用文献

- 1) Ashida, H., *et al.*, *FEBS Lett.*, 476, 213-217 (2000).
- 2) Fukuda, I., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359, 822-827(2007).

[†]Tel: 078-803-5878, Fax: 078-803-5878

e-mail: jiangsongyan@hotmail.co.jp

【緒言】

茶の苦渋味は、苦渋味物質と味細胞に存在するリン脂質膜や受容体との相互作用により生じる味覚刺激であると考えられる。当研究室ではこれまでに、カテキン類とリン脂質膜との結合親和性の強弱 (ECg > EGCg >> EC > EGC) が、カテキン類が示す苦渋味の強弱と高い相関関係にあることを報告してきた。しかし、紅茶の赤色色素であるテアフラビン類 (TF1, TF2A, TF2B, TF3) に関しては、苦渋味に関する知見が得られていない。本研究ではテアフラビン類の苦渋味に関する新たな知見を得ることを目的とし、テアフラビン類のリン脂質膜やヒト由来舌上皮がん細胞に対する結合親和性を評価した。また味認識装置を用いてテアフラビン類の味覚特性を評価した。

【実験方法】

リン脂質膜あるいはヒト由来舌上皮がん細胞を接着させた96穴プレートに試料溶液 (TF1, TF2A, TF2B, TF3, EC, ECg, EGC, EGCg) を添加し、一定時間インキュベートした。試料を除去し洗浄後、試料を特異的に検出する染色法を用いて、リン脂質膜およびヒト由来舌上皮がん細胞に対する結合親和性を評価した。また味認識装置に渋味センサーおよび苦味センサーを装着し、両者を試料溶液に浸漬した。センサーに試料が吸着することで生じた膜電位の変化量から試料が示す渋味および苦味の数値化を行った。

【結果と考察】

リン脂質膜に対する結合親和性の強弱は TF2A > TF2B > TF3 > TF1 > ECg > EGCg >> EC > EGC、舌上皮がん細胞膜に対する結合親和性の強弱は TF2B > TF2A > TF3 >> TF1 > ECg > EGCg > EC, EGC であった。両者の結果から、ガロイル基を有するテアフラビン類 (TF2A, TF2B, TF3) が TF1 やカテキン類に比べて強い結合親和性を

示すことが明らかになった。味認識装置により測定した渋味の強弱は TF3 >> TF2B, TF2A > EGCg, ECg > TF1 > EC, EGC、苦味の強弱は TF3 > TF2B, ECg > TF2A, TF1 > EGCg > EC, EGC であった。

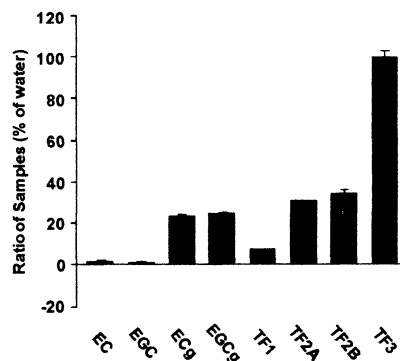


図1: 味認識装置による渋味の測定

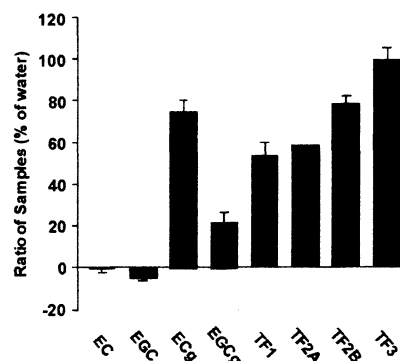


図2: 味認識装置による苦味の測定

【結言】

テアフラビン類と脂質膜との結合親和性の強弱 (TF2A, TF2B > TF3 > TF1) は、必ずしも苦渋味の強弱 (TF3 > TF2B, TF2A > TF1) と一致しないことが明らかになった。今後は、テアフラビン類の苦渋味の強弱に影響する因子として唾液タンパク質との凝集沈殿性の強弱にも着目し、知見を集める予定である。

Tel: 054-264-5522, Fax: 054-264-5551

e-mail: nkymttm@u-shizuoka-ken.ac.jp

甘味タンパク質ソーマチンの苦味抑制機構の検討

(*京大院・農・食品生物, **京大院・地球環境, #ノートルダム清心女大・食品栄養, §京都大) ○塚原礼恵*,†, 梶田哲哉**, 谷史人**, 北畠直文#,§

【緒言】

甘味タンパク質ソーマチンはショ糖に比べモル比で10万倍と非常に強い甘味を呈するタンパク質であり、その甘味閾値はヒトにおいて50 nMである。また、ソーマチンは強い甘味を呈する一方で、苦味をマスキングする作用や風味を増強する作用など、多面的な性質を有することが報告されている。しかしながらその詳細は明らかではない。そこで本研究では、ソーマチンの苦味抑制効果について、苦味受容体を安定発現させた細胞を用いて検討を行った。

【実験方法】

植物ソーマチンの精製

陽イオン交換クロマトグラフィーにて精製した。実験にはソーマチンIを用いた。

ソーマチン変異体の精製

ソーマチン変異体は酵母 *Pichia pastoris* を用いて発現させ、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、native-PAGEにより純度を確認した。

苦味受容体安定発現株の作製

キメラGタンパク質($G_{\alpha 16\text{gust44}}$)を発現しているHEK293細胞に、ヒト苦味受容体(T2R16)をトランスフェクトした。その後、抗生物質によるセレクションを行い、苦味受容体安定発現株を作製した。

Cell-based assay

苦味受容体の応答は、カルシウム蛍光指示薬 Fluo-8AM (ABD Bioquest) を用い、細胞内カルシウム動員による蛍光強度変化(励起波長 490 nm, 蛍光波長 514 nm) $\Delta F/F$ を指標とした。

$$\Delta F/F = (F_{\text{max}} - F_0)/F_0 - \Delta F/F_{\text{buffer}}$$

(ここで、 F_0 はリガンド添加前の蛍光値、 F_{max} はリガンド添加後の蛍光値のピーク、 $\Delta F/F_{\text{buffer}}$ は buffer のみを添加した時の $\Delta F/F$ を表す)

【結果と考察】

苦味受容体 T2R16 を安定的に発現させた細胞に植物ソーマチン存在下と非存在下で3 mM サリシンを添加し、応答を比較すると植物ソーマチン存在下ではサリシンに対する応答が抑制された。また、甘味発現に重要な残基である R82 を変異させた R82A, R82E でも抑制がみられた。しかし、卵白リゾチームや α -ラクトアルブミン存在下では、サリシンに対する応答が抑制されなかった。

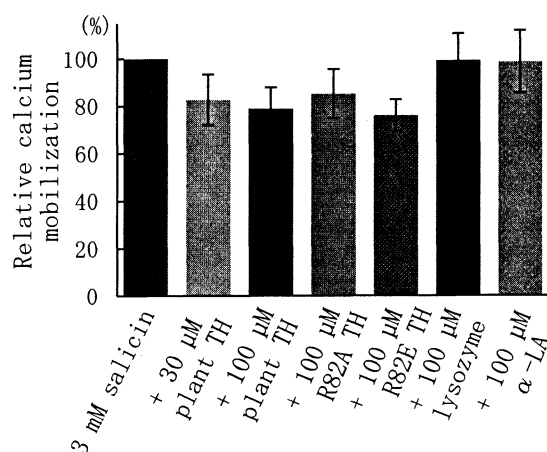


図1 3 mM サリシンの苦味発現に対するソーマチンの苦味抑制効果

【結言】

卵白リゾチーム、 α -ラクトアルブミンではサリシンによる苦味応答が抑制されなかったが、ソーマチン存在下では抑制された。以上の結果より、サリシンに対する苦味抑制効果はソーマチン特異的であることが示された。また、ソーマチンの強い甘味発現に必須である R82 の変異体でも苦味抑制効果がみられたことから、この効果には甘味発現と別の作用部位が関与することが示唆された。現在、その抑制機構について検討している。

†Tel:0774-38-3739, Fax:0774-38-3740

e-mail:a.tsukahara@at7.ecs.kyoto-u.ac.jp

甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用

(1) ヒト-マウス複合型甘味受容体を用いた解析

([†]京大ア資セ, *京大院・農・食品生物, **京大院・地球環境, #ノートルダム清心女大・食品栄養, §京都大)

○太田圭介[†], 田口若奈*, 榎田哲哉**, 谷史人**, 北島直文# §

【緒言】

ソーマチンは西アフリカ原産植物の果実の仮種皮に存在する甘味タンパク質である。その甘味閾値は 50 nM と非常に強い甘味を呈する。しかし、ソーマチンと甘味受容体の相互作用についての知見は乏しい。甘味受容体は G タンパク質共役型受容体である T1R2 と T1R3 のヘテロ二量体であり、それぞれ大きな細胞外 N 末端領域 (NTD)、膜貫通領域 (TMD)、それらをつなぐシステインリッチ領域 (CRD) からなる。本研究では、ソーマチンの応答に必要な甘味受容体の部位の特定を目的としている。

【実験方法】

ヒト型、マウス型の T1R2 と T1R3 の作製

ヒトはソーマチンの甘味を感知できるが、マウスは感知できない。この種間感受性の違いを利用するために、ヒト型とマウス型の甘味受容体を作製した。また、T1R3 については、ヒト由来の部位とマウス由来の部位を連結させたキメラ T1R3 を作製した。

HEK293 細胞を用いた T1R2-T1R3 の発現

Gα_{16gust44} を安定発現させた HEK293 細胞に、様々な組み合わせのヒト型あるいはマウス型の T1R2 と T1R3 を一過的に発現させた。細胞内カルシウム濃度変化を応答の指標とし、ヒト型およびマウス型甘味受容体の、ソーマチンに対する応答を観察した。

【結果と考察】

図 1 に、ソーマチンに対する各組み換え型受容体の応答を示した。T1R3 がヒト型である場合、ソーマチンと応答したが、マウス型では応答が消失していた。このことから、ヒト型の T1R3 がソーマチンとの応答に必須であることが明らかとなった。

さらに、ヒト型 T1R3 のどの部位が必要であるのかを明らかにするため、ヒトとマウスのキメラ T1R3 を作製し、ソーマチンとの応答について検討した (図 2)。NTD のみヒト型で、CRD と TMD がマウス型の甘味受容体はソーマチンに反応しなかったが、NTD と CRD がヒト型で、TMD がマウ

ス型の甘味受容体は応答を示した。この結果から、ヒト型の T1R3 の CRD がソーマチンとの応答に不可欠であることが明らかとなった。

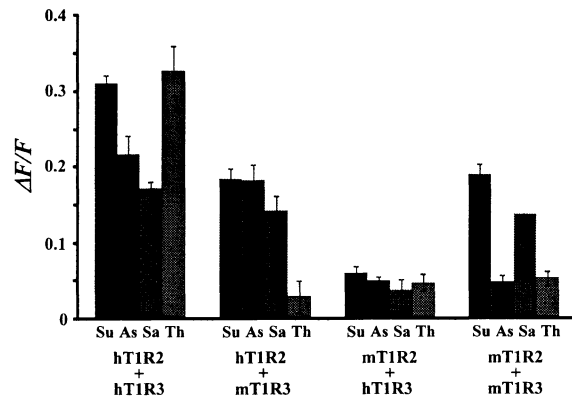


図 1 各甘味物質に対するヒト-マウス複合型甘味受容体の応答

Su:スクラロース、As:アスパルテーム、Sa:サッカリン、Th:ソーマチン、h:ヒト型、m:マウス型

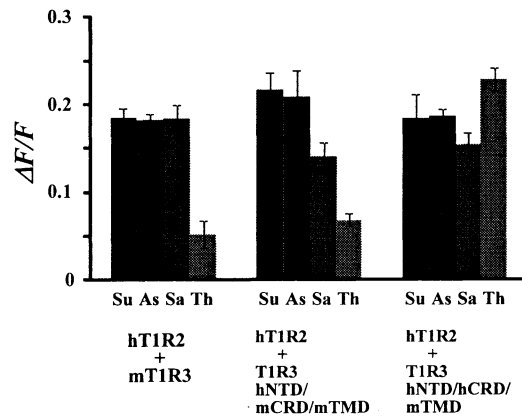


図 2 各甘味物質に対するキメラ T1R3 の応答

Su:スクラロース、As:アスパルテーム、Sa:サッカリン、Th:ソーマチン、h:ヒト型、m:マウス型

【結言】

ヒト型の T1R3 の CRD 領域がソーマチンとの応答に必要不可欠であることが示された。

[†]Tel: 0774-38-3739, Fax: 0774-38-3740

e-mail: k_oota@kais.kyoto-u.ac.jp

甘味タンパク質ソーマチンと甘味受容体の相互作用

(2) 点変異甘味受容体を用いた解析

(*京大院・農・食品生物, **京大ア資セ, ***京大院・地球環境, #ノートルダム清心女大・食品栄養, §京都大) ○田口若奈^{*,†}, 太田圭介^{**}, 梶田哲哉^{***}, 谷史人^{***}, 北島直文^{*,§}

【緒言】

甘味タンパク質であるソーマチンは、西アフリカ原産植物の果実の仮種皮に存在している。ヒトの甘味閾値は、50 nMであり非常に強い甘味を呈する。甘味受容体はGタンパク質共役型受容体であるT1R2とT1R3のヘテロ二量体であり、それぞれ大きな細胞外N末端領域(NTD)、膜貫通領域(TMD)、それらをつなぐシステインリッチドメイン(CRD)からなっている。我々は、ソーマチンの応答にはヒト型T1R3のCRDが不可欠であることを明らかにしてきたが¹⁾、本研究では、この応答に必須であるCRD内のアミノ酸残基の同定を目的とした。

【実験方法】

ヒト型T1R3(hT1R3)変異体の作製

ヒトはソーマチンの甘味を受容できるが、マウスは感知できない。そこで、ヒトとマウスのCRD領域のアミノ酸配列の比較を行い、双方で異なる16アミノ酸残基に着目し、点変異体(ヒト→マウス)を作製した。

HEK293細胞を用いた T1R2-T1R3の発現

Gα16gust44を安定的に発現しているHEK293細胞に、hT1R2とhT1R3もしくはその変異体を一過的に発現させ、甘味物質(サッカリン、スクラロース、アスパルテーム、ソーマチン)との応答を観察した。受容体の応答は、細胞内へのカルシウム動員による蛍光強度変化(励起波長490 nm, 蛍光波長514 nm) $\Delta F/F$ を指標に行った。

$\Delta F/F = (F_{max} - F_0) / F_0$ (F_0 : リガンド添加前の蛍光値, F_{max} : リガンド添加後の最大蛍光値)

【結果と考察】

図1に、点変異体と各種甘味物質との応答を示した。hT1R3点変異体(Ala537Thr、Gln531Lys)の

サッカリン、スクラロース、アスパルテームに対する反応は、hT1R3と比べ変化が見られなかった。しかしながら、Ala537Thrではソーマチンに対する応答は減少しGln531Lysでは変化がなかった。

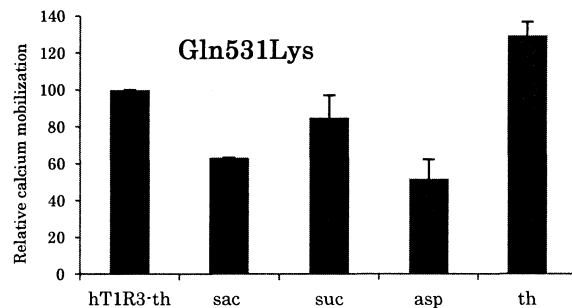
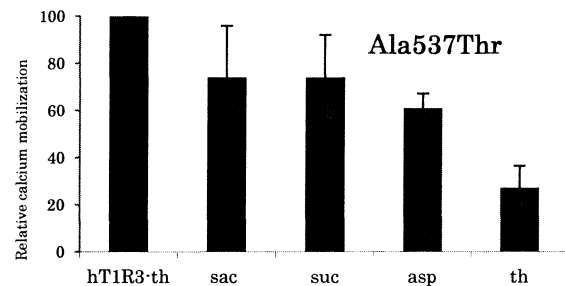


図1 各甘味物質に対するヒト甘味受容体変異体の応答 sac:サッカリン 1 mM suc:スクラロース 1 mM asp:アスパルテーム 1 mM th:ソーマチン 50 μ M (n=3)

【結言】

ヒト型T1R3のCRD領域のうち、少なくとも537番目のアラニン残基はソーマチンとの応答に必要であることが示された。

引用文献

1) K. Ohta *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **406**, 435-438 (2011).

[†]Tel: 0774-38-3739, Fax: 0774-38-3740

e-mail: taguchi.wakana@a06.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

2Ea1

中枢神経系におけるプロスタグランジン E₂ の抗不安機構

○宮本知京*、鈴木千尋*、古屋敷智之**、成宮周**、大日向耕作*

(*京大院農、**京大院医)

【緒言】

末梢において、プロスタグランジン (PG) 類は発熱や発痛、平滑筋収縮など多彩な生理作用を示すことが知られている。一方、中枢神経系にもPG類が存在し、それらの役割が解明されつつある。疾病以外の心理的ストレスにより中枢のPG合成が促進されることが報告されている。PG類を介して抗不安作用を示す生理活性ペプチドも存在する¹⁾。本研究では特に中枢PGE₂の情動調節に着目し、PGE₂の4種類の受容体サブタイプ (EP₁~EP₄) に対する特異的リガンド、およびEPノックアウト (KO) マウスを使用し、その作用機構を検討した。

【実験方法】

抗不安作用は高架式十字迷路試験およびオープンフィールド試験により行動薬理的に検討した。腹腔内投与の場合は試験の30分前、脳室内投与の場合は試験の20分前にマウスにサンプルを投与し5分間行動を観察した。

【結果と考察】

PGE₂ (100 pmol/mouse) の脳室内投与により、高架式十字迷路のオープンアームでの滞在時間および侵入回数の割合が有意に増加した。オープンフィールド試験ではPGE₂投与により中心円での滞在時間の割合が増加した²⁾。したがって、PGE₂が抗不安作用を示すことを2つの評価系で確認した。続いてPGE₂の抗不安作用がどの受容体サブタイプの活性化を介しているか検討した。PGE₂の4種類の受容体サブタイプ (EP₁~EP₄) に対するアゴニストのうち、EP₁およびEP₄アゴニストの脳室内投与により抗不安作用を示すことがわかった。PGE₂の抗不安作用はEP₄アゴニストにより阻害され、EP₄ノックアウト (KO) マウスで認められなかった。したがってPGE₂の抗不安作用はEP₄受容体を介していることが判明した。一方、PGE₂の抗不安作用は、EP₁アゴニストで阻害されるが、EP₁KOマウスでは認められた。この原因としてEP₁KOにおける何らかの代償による影響も否定できない。なお、EP₁アゴニストによる抗不安

作用はEP₁アンタゴニストおよびEP₁KOにより消失することから、少なくともEP₁シグナルも抗不安作用に関与していることが明らかとなった。以上PGE₂の抗不安作用は主にEP₄を介しているがEP₁も一部寄与しているものと考えられる。さらに、EP受容体の下流の作用機構について検討した。PGE₂の抗不安作用はセロトニン5-HT_{1A}受容体、ドーパミンD₁受容体、GABA_A受容体に対するアンタゴニストによって阻害されたことから、これらの受容体の活性化を介することが明らかとなった (図1)。

以上、PGE₂が主にEP₄受容体を介して抗不安作用を示すことを見出した。発熱を仲介するEP₃とは異なる受容体サブタイプであった。

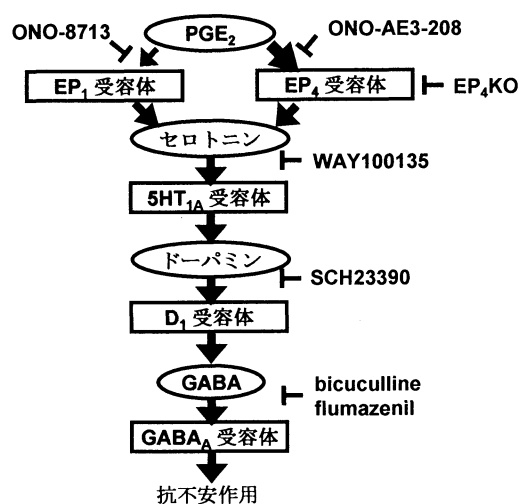


図1 予想されるPGE₂の抗不安作用

【結論】

PGE₂はEP₁/EP₄を介して抗不安作用を示すと考えられる。さらに、その下流で5-HT_{1A}、D₁、GABA_A受容体の活性化を介して抗不安作用を示すことが明らかとなった。

引用文献

- 1) 大日向耕作、吉川正明. 化学と生物:764-771 (2010)
- 2) C. Suzuki., C. Miyamoto., *et al.*, *FEBS Lett.*, 585:2357-62 (2011)

Tel.: 0774-38-3733, Fax: 0774-38-3774

E-mail: ohinata@kais.kyoto-u.ac.jp

2Ea2

可欠アミノ酸代謝酵素の発現変動とタンパク質 栄養への適応

(京都府大院生命環境) ○中瀬純平、二川みどり、津崎洋平、吉村亮二、
佐伯徹、金本龍平

【緒言】本研究室では、ラット肝臓において、3-ホスホグリセリン酸デヒドロゲナーゼ(PHGDH;セリン合成の律速酵素)やアスパラギン合成酵素(AS)など、可欠アミノ酸の代謝に関わる酵素の発現が、タンパク質必要量に应答して変動することを見いだした。この機構の分子機序を明らかにすることを目的に、タンパク質含量の異なる餌にシフトし与えた時の、これら遺伝子の mRNA とタンパク質の発現変動を経時的に測定した。その結果、摂食した餌のタンパク質含量に应答し mRNA の発現は直ちに变化するが、タンパク質発現量の変化となって現れるのには 24 時間以上を要することが示された。これらのことから、タンパク質栄養に関わるシグナルは摂食によって認識されるが、異なるタンパク質栄養への代謝適応には摂食毎のシグナルの集積が必要であると考えられた。

本研究では、この考えの妥当性を検証することを目的に、タンパク質含量の異なる餌を交互に与えた時の、PHGDH と AS 遺伝子の mRNA とタンパク質の発現変動を測定した。

【実験方法】成熟(6 カ月齢)SD 系雄ラットを用い、以下の 2 つの実験を行った。

実験 1: 25%カゼイン食、0%カゼイン食、およびこれらの餌を 25%→0%あるいは 0%→25%の順に交互に与え(以下、25%群、0%群、25→0%群、0→25%群とする)、7 日間飼育した。餌は 20:00 - 8:00 の暗期にのみ与え、自由摂水とした。8 日目の 8:00 に屠殺し、肝臓を摘出、各遺伝子の mRNA およびタンパク質発現量をリアルタイム PCR 法およびウエスタンブロット法により測定した。

実験 2: 25%カゼイン食と 0%カゼイン食を 25%→25%→0%あるいは 0%→0%→25%の順に与え(以下、25→25→0%群、0→0→25%群とする)、上述と

同様の給餌法で飼育し、7, 8, 9, 10 日目の 8:00 に各 3 匹ずつ屠殺し、肝臓での mRNA およびタンパク質発現量を測定した。

【結果】

実験 1: 0%群では、AS, PHGDH 両遺伝子の mRNA およびタンパク質の高い発現が認められたが、25%群では、ほとんど認められなかった。一方、交互に与えた場合、mRNA の発現量は前日の食餌に依存し、屠殺前日が 0%カゼイン食となる 0→25%群では高い発現がみられ、25%カゼイン食となる 25→0%群では極低い発現しか認められなかった。しかし、屠殺時の mRNA 量に関係なくタンパク質発現量は 25%群と 0%群の間中となり、かつ、両群に差は見られなかった。

実験 2: 25→25→0%群と 0→0→25%群とも、mRNA 発現量は屠殺前日の食餌カゼイン含量が 0%か、25%かで大きく変動したが、この間のタンパク質発現量は両群ともほぼ一定で変化しなかった。しかし、25→25→0%群と 0→0→25%群を比較すると、0→0→25%群の発現量が顕著に高くなっていた。

【結言】以上の結果は、タンパク質栄養に应答した PHGDH と AS 遺伝子発現のシグナルは食餌に含まれるタンパク質によって素早く切り替わるが、mRNA の発現とタンパク質発現の間にはラグがあり、新しい栄養環境に代謝が適応するには、シグナルの集積が必要であるという当初の考えを支持している。この適応機構は、おそらく mRNA とタンパク質の半減期の差からもたらされると思われるので、今後はこの点について検討を進める予定である。

TEL & FAX: 075-703-5661

e-mail: kanamoto@kpu.ac.jp

【前述】

真核生物では mRNA は核内で転写された後、5' 末端のキャッピング、スプライシング、3' 末端のポリアデニル化などのプロセッシングを受けて成熟 mRNA となる。これらのプロセッシング反応は、お互いに共役している。細胞は、全てのプロセッシングを完了して成熟した mRNA だけを核外に輸送する。mRNA プロセッシング間の共役は、共役因子と呼ばれるタンパク質 (複合体) が制御している。

TREX 複合体は mRNA のスプライシングと核外輸送を共役する機能を持つ共役因子である。その構成因子 UAP56 は、進化的に保存されている。また UAP56 の相同遺伝子は、酵母やハエでは 1 種類であるのに対して、ヒトやマウスでは 90% の相同性を持つ URH49 も存在する。当研究室ではこれまで、UAP56 は 8 因子から構成される TREX 複合体を、URH49 は 2 因子から構成される新規の AREX 複合体を形成し、それぞれの複合体の機能が異なっていることを明らかにした¹⁾。

今回、UAP56 が形成する TREX 複合体と URH49 が形成する AREX 複合体の複合体形成能を比較した。また複合体形成の違いは、UAP56 と URH49 で比較的異なっている N 末端や C 末端領域に依存している可能性を想定して、非常に相同性の高い両因子が異なる複合体形成を決定するアミノ酸の同定を試みた。

【実験方法】

UAP56 と URH49 の複合体形成様式の比較

UAP56 と URH49 の形成する複合体構成因子について Flag タグを付けた UAP56 や URH49 を発現する細胞株を取得し、免疫沈降法を用いて同定した。次いで各因子が形成する複合体の機能について、機能相補性を RNA-FISH 法を用いて解析した。

UAP56 と URH49 の特異的複合体形成に関わるアミノ酸配列部位の解析

UAP56 と URH49 の N 末端、C 末端欠損変異体を作成し、複合体形成にもたらす変化を免疫沈降法により観察した。ついで UAP56 と URH49 の末端配列を入れ替えたキメラ変異体を作成し、複合体形成に与える影響について免疫沈降実験によ

り、また細胞機能に与える影響について機能相補実験を行って評価した。

【結果と考察】

Flag 抗体を用いた精製と銀染色、ウエスタンブロット法により Flag タグを付けた UAP56 あるいは URH49 の形成する複合体は、これまで通り、UAP56 は TREX 複合体を、URH49 は AREX 複合体を形成することを確認した。また UAP56 をノックダウンした細胞は、URH49 を発現させても機能回復しないこと、逆も同様であることを観察した。

次いで N 末端、C 末端欠損変異体の解析から、UAP56 と URH49 のいずれの欠損変異体も、TREX あるいは AREX 複合体形成能が低下することが判明した。

最後にキメラ変異体について複合体の形成並びに細胞機能の実験を行った。キメラ変異体は、いずれも元の UAP56 あるいは URH49 と同じ複合体形成能を示した。また細胞機能についても同様の結果であった。

【総括】

それぞれの末端欠損体の解析から、TREX、AREX 複合体形成において UAP56 や URH49 の N 末、C 末端領域は重要であることを明らかにした。しかしキメラ変異体の解析から、TREX や AREX 複合体の形成を制御している領域は他に存在している可能性が示唆された。すなわち末端領域を除いたコア部位が重要であることが想定された。現在複合体形成において重要なアミノ酸を同定するためにコア領域のアミノ酸を置換した変異体を作成し、この仮説を検証中している。

【引用文献】

1) Yamazaki, T., Fujiwara, N., Yukinaga, H., Ebisuya, M., Shiki, T., Kurihara, T., Kioka, N., Kambe, T., Nagao, M., Nishida, E. and Masuda S., *Mol. Biol. Cell*, **21**, 2953-2965, 2010

tel:075(753)9430, fax:075(753)6274
e-mail:kfujita.m11@lif.kyoto-u.ac.jp

2Ea4

乳脂肪球皮膜タンパク質, MFG-E8 のニワトリホモログ

-組換えタンパク質の調製と卵・精子相互作用における機能解析-

(名大院農, *静岡大農, **名城大農)

○西尾俊亮[†], 大島健司, 日野真吾*, 奥村裕紀**, 灘野大太, 松田幹

【緒言】

MFG-E8(Milk fat globule epidermal growth factor 8)は、乳腺から分泌される脂肪球を覆う乳脂肪球皮膜に存在する膜糖タンパク質として多くの哺乳類で同定されている。MFG-E8 は EGF-like domain と C domain で構成されており、C domain はホスファチジルセリン(PS)との結合能やレクチン活性をもつ。MFG-E8 はマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に関わっていることや、透明帯(zona pellucida)の ZP 糖タンパク質に結合すること、精子頭部の細胞膜上に存在していること、さらに MFG-E8 KO マウスでは受精率が低下することなどが報告されている。これらはすべて哺乳類に関する研究のみで、他の脊椎動物に関する報告はされていない。本研究では MFG-E8 の多様な機能を明らかにすることを目的として、鳥類(ニワトリ)の MFG-E8 ホモログ(以下 chMFG-E8)の探索と受精における機能解析を行った。

【方法】

cDNA の取得と組換えタンパク質の調製

マウス MFG-E8 の配列を元にニワトリ EST database から chMFG-E8 の ORF を含む塩基配列を得た。この配列を元にニワトリ肝臓 mRNA から RT-PCR によって chMFG-E8 cDNA を増幅した。chMFG-E8 の各ドメインおよび全長を昆虫細胞用発現ベクター pMT/BiP/V5-His へ組み込み、ショウジョウバエ S2 細胞で一過性に発現させた。

相互作用解析(ドットプロット、ELISA)

ニワトリ精子を窒素ガスキャビテーターで破碎し、超遠心分離により膜画分を調製した。また、卵膜(哺乳類透明帯に相当)から尿素を用いて ZP 糖タンパク質を可溶化・抽出した。これらをニト

ロセルロース膜上にスポット、あるいは ELISA プレートにコートし、組換え chMFG-E8 タンパク質を含む S2 細胞培養上清とインキュベートし結合能を解析した。また、PS 結合能は PS を固相化し、ELISA 法で解析した。

【結果と考察】

chMFG-E8 は、3 つの EGF-like domain(ヒトでは 1 つ、マウスでは 2 つ)と C1 domain、C2 domain を持ち、RGD 配列が 2 番目の EGF-like domain 中に含まれていた。S2 細胞で発現させた chMFG-E8 は培養上清中へ分泌されたが、EGF domain 単独では、C domain および全長 chMFG-E8 に比べ多く分泌されていた。ドットプロット解析において、EGF domain が精子膜画分との結合能を示し、また ELISA 解析によって全長 chMFG-E8 および C domain が卵膜 ZP 糖タンパク質と結合することが示された。これらの結果から、EGF domain を介して精子細胞膜と、一方で C domain を介して卵膜 ZP 糖タンパク質と結合することが示唆された。

【結言】

鳥類においても MFG-E8 は存在し、組換え chMFG-E8 が精子膜画分および卵膜 ZP タンパク質の双方とドメイン依存的に結合したことから、chMFG-E8 は、鳥類卵膜への精子の結合と貫通において機能する細胞間認識分子としての役割を持つことが示唆された。

[†]Tel:052-789-5514

e-mail:nishio.shunsuke@c.mbox.nagoya-u.ac.jp

2Ea5

カルシウム結合タンパク質ALG-2とP-body構成因子PATL1の細胞内局在および機能解析

(名大院生命農・応用分子生命科)

○大杉 桂奈江、柴田 秀樹、人見 清隆、牧 正敏

[緒言]

ALG-2 (Apoptosis-Linked Gene 2) は、カルシウム結合モチーフであるEF-handを5つ連続してもつpenta-EF-handファミリーに属し、カルシウムに依存して様々なタンパク質と相互作用することが知られている。ALG-2には121番目のGlyと122番目のPheが欠損した選択的スプライシングアイソフォームΔGFと非欠損型(WTと表記)が存在する。

ALG-2の新規相互作用因子の探索を行った結果、数種類の候補が得られた。その1つであるPATL1/Pat1bは、酵母Pat1のヒトホモログタンパク質として同定され、mRNAの分解や翻訳抑制、小分子RNAのプロセッシングに関わる、RNAとタンパク質の集合体であるP-bodyに局在することが報告されている。

[実験方法]

PATL1とALG-2の相互作用を詳細に解析するために、以下の方法を用いた。

- ・HEK293T細胞にGFP-PATL1を発現させ、破碎し、その上清を用いて、GST-ALG-2 WT/ΔGFプルダウンアッセイを行った。

- ・GFP-PATL1欠損変異体の発現プラスミドを作製し、biotin標識ALG-2を用いたFar Westernを行った。

- ・抗PATL1ポリクローナル抗体を作製し、HEK293T細胞の破碎液上清を用いて免疫沈降を行った。

PATL1とALG-2の細胞内局在を解析するために、以下の方法を用いた。

- ・HeLa細胞を用いて、内在性ALG-2、PATL1、P-body構成因子DCP1Aの抗体による三重免疫染色を行った。

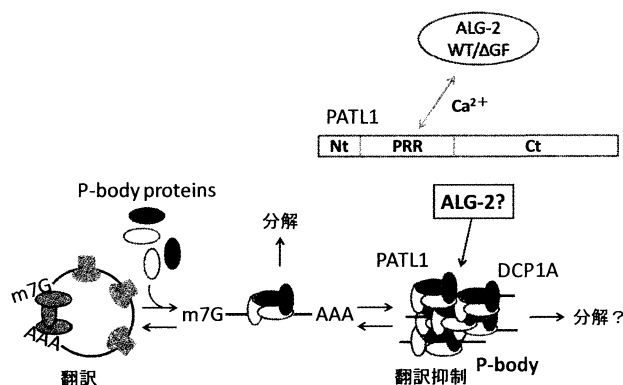
[結果]

PATL1とALG-2の詳細な相互作用解析を行ったところ、PATL1はALG-2 WTおよびΔGFとカルシウム依存的に相互作用し、その結合にはPATL1のProに富む領域 (Proline-Rich Region, PRR) が重要であることが明らかになった。HeLa細胞を用いてPATL1とALG-2の免疫染色を行ったところ、PATL1およびDCP1AとALG-2の共局在が、一部観察された。

[結言]

ALG-2はWT、ΔGF共に、PATL1のPRRにカルシウム依存的に結合する。ALG-2はPATL1およびDCP1Aを含むP-bodyにおいて、一部局在する。

現在、PATL1によるmRNA分解作用に与えるALG-2の影響を検討中である。



ALG-2とPATL1の関係

[引用文献]

Suzuki *et al.* Structure (2008)

Ozgur *et al.* Mol Cell Biol (2010)

e-mail: osugi.kanae@c.mbox.nagoya-u.ac.jp

2Ea6

ALG-2 と CHERP のカルシウム依存的相互作用 および核内における共局在 (名大院生命農・応用分子生命科)

○井元千晶、大杉桂奈江、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏

【緒言】

ALG-2 は、カルシウム結合モチーフである EF-hand が 5 つ連続した penta-EF-hand ドメインが存在し、カルシウムに依存して様々なタンパク質と相互作用することが知られている。CHERP (Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein) は小胞体に局在し、細胞内のカルシウム濃度や細胞の成長・分裂に関与することが報告されている。また、最近では骨格筋細胞の筋小胞体膜に存在する Ryanodine receptor 1 と相互作用するといった報告もある。CHERP には ALG-2 と相互作用すると考えられる PPYP motif が存在するため、我々は ALG-2 と相互作用する可能性を検討した。

【実験方法】

内在性 CHERP の細胞内局在解析

HeLa 細胞を用い、作製した ALG-2 および CHERP 特異的なポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行い、細胞内における内在性の ALG-2 ならびに CHERP の細胞内局在解析を行った。同時に、スプライシングに関与するとされ、核内にスペックルを形成する SF3A2 も免疫染色を行った。

また、HEK 293T 細胞を用いた細胞分画による細胞内局在解析も行った。

CHERP と ALG-2 の相互作用解析

HEK 293T 細胞の核画分を用いた、GST 融合 ALG-2 によるプルダウン実験、および作製した CHERP 特異的なポリクローナル抗体を使って免疫沈降を行い、カルシウムキレート剤 EGTA を加えた条件、または、カルシウムを加えた条件における CHERP と ALG-2 の相互作用解析を行った。

【結果と考察】

CHERP の細胞内局在解析の結果、CHERP は小胞

体や核周辺ではなく、主に核質に観察された。

CHERP は核質内に濃淡を形成しており、CHERP が形成する濃淡と ALG-2 が形成する濃淡はほぼ一致していることが明らかとなった。さらに、SF3A2 が形成するドットとも一部で一致していることが観察された。

また、細胞分画による細胞内局在解析では CHERP は核画分に分画された。

さらに、核画分における CHERP と ALG-2 の相互作用解析により、CHERP が ALG-2 とカルシウム依存的に相互作用することが明らかとなった。GST 融合 ALG-2 によるプルダウン実験では、CHERP と共に SF3A2 もプルダウンされた。

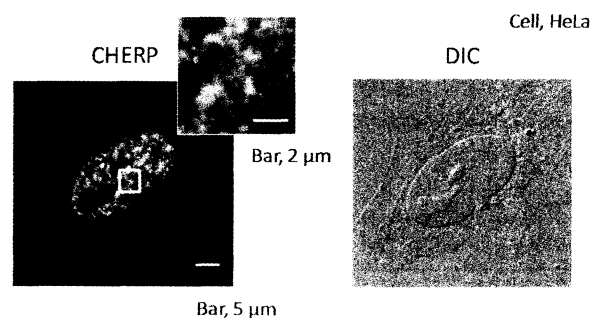


図 1 内在性 CHERP の細胞内の局在

【結言】

以上のことより、CHERP は従来の報告とは異なり、核内において未知の機能を果たしていることが示唆された。

引用文献

- 1) Laplante JM *et al.* Biochem J. 2000;348 Pt 1:189-99.
- 2) Ryan T *et al.* J Biol Chem. 2011;286(19):17060-8.

e-mail: imoto.chiaki@c.mbox.nagoya-u.ac.jp

2Ea7

DNA メチル化レベルの減少が複製フォーク進行に与える影響

○来馬啓介¹、杉浦健太¹、杉村和人²、緒方正人²、奥村克純^{1,3}

(¹三重大院生資、²三重大院医、³三重大院地域イノベ)

【緒言】

DNA メチル化は遺伝子発現制御やクロマチン構造の制御に関わるエピジェネティック修飾のひとつである。一方、DNMT の欠損や減少により DNA 損傷が誘導されることから、ゲノム安定性に寄与していると考えられている。

DNMT1 ノックダウン細胞または DNMT 阻害剤である 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) 処理細胞では DNA 二本鎖切断が生じることがわかった。また、DNA 二本鎖切断は細胞周期の複製期で顕著に増加したことから、DNA 複製依存的に DNA 損傷が誘導されることが示唆された。そこで、DNMT1 特異的 siRNA や DNMT 阻害剤で処理した細胞を用いて、複製フォーク進行に着目しメカニズムの解析を行った。

【実験方法】

分子コーミング法

新生 DNA 鎖を 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU)、5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) で 20 分ずつ標識した。標識した細胞をアガロースゲルに包埋し、ゲル中でタンパク分解処理を行い、DNA 溶液を調製した。その後、シランコートカバーガラス上に DNA を伸展、固定した。DNA 鎖に取り込まれた IdU、CldU を免疫蛍光検出することによって蛍光顕微鏡下で解析した。

【結果と考察】

5-aza-dC 処理細胞または DNMT1 ノックダウン細胞において複製フォーク進行速度を解析した結果、通常時より複製フォーク進行速度が減速した。

一方、ヘミメチル化 DNA に特異的に結合する UHRF1 を DNMT1 と同時にノックダウンすると複製フォーク進行速度の減速が有意に回復した。また、DNMT1 ノックダウン細胞または 5-aza-dC 処理細胞において、1 つの複製起点から両方向に進行する複製フォーク進行速度を解析した。その結果、左右それぞれの複製フォーク進行速度に有意な差が生じた。また、DNMT1 と UHRF1 を同時にノックダウンした細胞では左右それぞれの複製フォーク進行速度に有意な差は生じなかった。

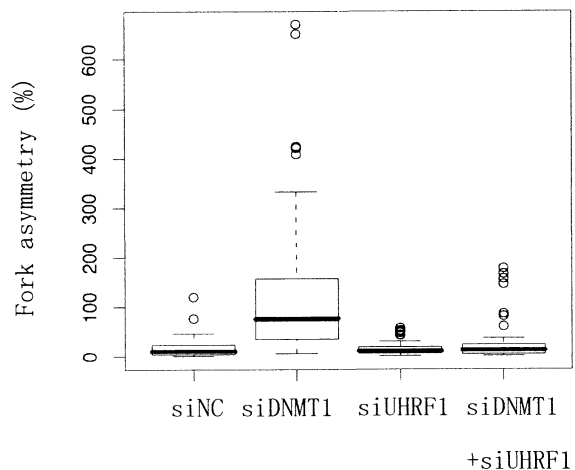


図1 複製フォーク進行解析

【結言】

DNMT1 ノックダウン細胞または 5-aza-dC 処理細胞では複製フォーク進行が遅延するが、それはメチル化阻害により生じたヘミメチル化 DNA に恒常的に結合した UHRF1 が複製フォークと衝突することで引き起こされることが示唆された。

TEL: 059-231-9616 FAX: 059-231-9540

e-mail: 510M303@m.mie-u.ac.jp

2Ep1

培養細胞を用いた人工消化-腸管吸収モデル系機能性評価試験の構築

((財)日本食品分析センター)

○原田哲平, 渡辺章夫, 吉田泉, 三嶋隆, 渡井正俊

【緒言】

現在, 培養細胞を用いた食品の機能性評価試験では, 食品に対して, 熱水抽出, EtOH抽出, Hexane抽出などの前処理を施し, 得られた抽出液で試験を行うのが一般的である。しかし食品成分が生体に作用するには, 主に胃や腸内にて消化された後, 小腸上皮より吸収されることが前提であり, そのことを考慮したスクリーニング試験が必要不可欠である。そこで本研究では, 人工消化-腸管吸収モデルを用いた, 培養細胞による機能性評価試験の構築を目的とした。

【実験方法】

実験試料を図1に示した。各試料を人工胃液(ペプシン, pH1.8)および人工腸液(胆汁酸+パンクレアチン, pH6.7)を用いて消化した。得られた消化液を, Transwell上に約20日間培養し, 小腸上皮様細胞に分化させたCaco-2単層膜の管腔側に添加した。一定時間反応後, 基底膜側の液を回収し透過液とした¹⁾。得られた消化液および透過液について, 機能性評価の一例として, RAW264マクロファージ様細胞を用いて, リポ多糖(LPS)刺激一酸化窒素(NO)産生能の抑制効果(抗炎症作用)を調べた。あわせて, 逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて, 消化液および透過液中のフラボノイド類の定量分析を行い, 膜透過性を評価した。

【結果と考察】

結果を図1に示した。

ローズマリー

消化液では強い抗炎症作用を示したのに対し, 透過液ではその作用は見られなかった。HPLC測定の結果, 消化液中にはローズマリン酸など多くの物質が検出されたのに対し, 透過液中にはそれらのピークは検出されなかった。ローズマリーには強い抗炎症作用があるものの, その作用を持つ物質の膜透過率が低いため, 透過液では機能性が消失したと考えられた。

黒ウコン, シークワーサー果汁

これらの試料は, 消化液および透過液の両方で抗炎症作用を示した。HPLC測定の結果, 消化液および透過液中にポリメトキシフラボン類が検出された。ポリメトキシフラボンには強い抗炎症作用が知られており, かつ膜透過性が高かったため, ポリメトキシフラボン

がこれらの結果に寄与していることが考えられた。

人参, 鮭

これらの試料は, 消化液および透過液ともに抗炎症作用が認められなかった。人参や鮭に含まれるカロテノイド(β -カロテン, アスタキサンチン等)は強い抗炎症作用が期待されているが, それらは疎水性が極めて高いため分散しにくく, 消化・吸収効率が良くないと言われており, それを反映する結果となった。

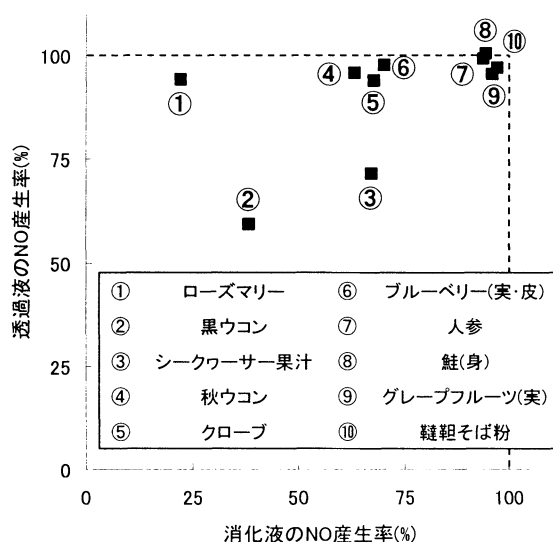


図1 実験試料とそれらの消化液および透過液のNO産生率(%)

【結言】

従来の食品機能性評価のためのスクリーニング試験に比べ, 人工消化-腸管吸収モデルを用いることで, 消化作用や小腸膜透過性を考慮し, より生体内の挙動を反映したスクリーニング試験が行えつつある。今後の課題として, 疎水性の高い物質の評価方法, 食べ合わせによる効果, および代謝前後での機能性の変化などについて検討していきたい。

引用文献

1) C.-S. Liu *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4330-4337 (2004).

Tel:072-641-8958, FAX:072-641-8969

e-mail:haradat@jfri.or.jp

2Ep2

レポーターアッセイ系を用いた脂肪細胞炎症状態の モニタリング

(三重大院生資) ○長崎はるか, 吉村健, 小木曾豊史

【緒言】

脂肪組織に浸潤したマクロファージが分泌する TNF- α などの炎症性サイトカインの作用により, 脂肪細胞は機能不全に陥ることが知られている。脂肪細胞の機能不全状態を解析するには高価な ELISA キットや細胞の破壊が必要であるが, 抗炎症成分の大規模なスクリーニングには障害となる。そこで本研究では, より安価で簡便な脂肪細胞の炎症センシング法の確立を試みた。

【実験方法】

3T3-L1-NF- κ B-RE-GLuc 細胞株の樹立

分泌性ルシフェラーゼ (GLuc) 遺伝子を有する pGLuc Mini-TK Vector (NEB) に NF- κ B 応答配列 (NF- κ B-RE) を組み込み, 3T3-L1 細胞にトランスフェクションした後, G418 選択により恒常発現株を樹立した。

炎症性サイトカインによる GLuc 活性の変化

炎症性サイトカインである TNF- α あるいは IL-1 β を上記で樹立した脂肪細胞 (分化誘導後 8 日目) へ添加し (終濃度 1 pg/mL-10 ng/mL), 72 時間後, もしくは経時的に培養上清を回収し, GLuc 活性を測定した。

マクロファージ共培養による GLuc 活性の変化

上記で樹立した脂肪細胞 (分化誘導後 8 日目) とマクロファージ (RAW264.7) を共培養し, 経時的に培養上清を回収して GLuc 活性を測定した。また同様の実験をあらかじめ LPS 処理 (終濃度 100 ng/mL) したマクロファージを用いて行った。NAC, BAY-11-7085 および天然化合物による GLuc 活性の変化

マクロファージとの共培養条件下において, NAC (終濃度 10 mM), BAY-11-7085 (終濃度 10 μ M) および天然化合物であるレスベラトロール, ヴェニフェリン, カルノシン酸, ローズマリー酸, ウルソリン酸, EGCG (それぞれ終濃度 10 μ M) を処理した。8 時間後に培養上清を回収し, GLuc 活性を測定した。

【結果と考察】

樹立した 3T3-L1-NF- κ B-RE-GLuc 脂肪細胞に TNF- α , IL-1 β を添加すると, 用量依存的に培養上清中の GLuc 活性が上昇し, 100 pg/mL でも活性測定が可能であった。またマクロファージと共培養すると GLuc 活性が上昇し, あらかじめ LPS 処理したマクロファージと共培養するとさらに活性が上昇した。炎症性サイトカインやマクロファージとの共培養により NF- κ B 経路が活性化され, GLuc 活性が上昇したと考えられる。

またマクロファージ共培養時に NAC, BAY-11-7085 および天然化合物を加えると GLuc 活性が減少した。これらはマクロファージによって活性化された NF- κ B 経路を抑制し, GLuc 活性を減少させたと思われる。

【結言】

以上より, 3T3-L1-NF- κ B-RE-GLuc 細胞を用いることで, 細胞を破壊することなく継続的に脂肪細胞炎症状態のモニタリングが可能となった。

Tel:059-231-2641

e-mail:510M307@m.mie-u.ac.jp

SMXA-5 マウスの脂肪肝感受性遺伝子座の候補遺伝子

(名大院農, *名大院医)

○立石壮志, 小林美里, 都築佳奈, 大野民生*, 村井篤嗣, 堀尾文彦†

2Ep3

【背景・目的】

SM/J と A/J マウスの組み換え近交系統である SMXA-5 マウスは、高脂肪食により脂肪肝を呈する。SMXA-5 のゲノムは、SM/J と A/J マウスから由来している。我々は SM/J と SMXA-5 の F2 交雑群を用いた遺伝解析により第 12 番染色体上に脂肪肝感受性遺伝子座(*Fli1sa*)を検出し、この遺伝子座が A/J アレルの場合に脂肪肝形質が顕著になることを示した(1)。そこで、*Fli1sa* の感受性アレルを有する A/J の第 12 番染色体を抵抗性の SM/J の染色体に置換したコンソミックマウス(A/J-12SM)を用いて *Fli1sa* の効果を確認し、遺伝子発現量の観点から 1 つの候補遺伝子を選抜した。本研究では①この候補遺伝子の発現特性と塩基配列を解析し、②得られた塩基配列の多型と脂肪肝との関連について検討した。

【実験方法】

表現型の解析

6 週齢から高脂肪食で 10 週間飼育した各系統のマウスの肝臓を採取し、肝臓重量、肝臓トリグリセリド含量、肝臓総脂質量を測定した。

塩基配列の解読

各系統の尾から抽出したゲノム DNA を用いて、候補遺伝子の 5' 上流 449bp とエキソン領域の DNA シークエンシングを行った。

遺伝子発現レベルの測定

高脂肪食で 7 週間飼育したマウスの各臓器の mRNA レベル、タンパク量をそれぞれ Real-time RT-PCR 法、Western blot 法で測定した。

【結果・考察】

① 候補遺伝子の発現特性と塩基配列の決定

A/J マウスと *Fli1sa* の抵抗性アレルを有する A/J-12SM マウスにおいて候補遺伝子の肝臓での遺伝子発現レベルを比較したところ A/J-12SM で

有意に高く、タンパク質レベルにおいても同様の結果が得られた。また、腎臓の候補遺伝子の遺伝子発現レベルにおいても A/J-12SM が有意な高値を示したが、精巣上体脂肪では 2 系統間に差は見られなかった。

候補遺伝子の塩基配列を SM/J と A/J 間で解読したところ、A/J において候補遺伝子の 5' 上流に 119bp の欠失とエキソン領域に 2 つのアミノ酸置換を伴う塩基配列の多型が見出された。また、他系統のマウスにおけるこの多型の有無を確認したところ、A/J 型の多型を持つマウス系統が複数存在することが見出され、それらの系統では候補遺伝子の遺伝子発現レベルは A/J 同様に低値を示した。

② 塩基配列の多型と脂肪肝との関連

候補遺伝子に A/J 型の多型を持つ系統として DBA/1、SM/J 型として DBA/2 を選択して飼育した結果、DBA/2 に比べて DBA/1 では肝臓トリグリセリド含量が高い傾向を示し、候補遺伝子の塩基配列の多型が脂肪肝感受性に寄与している可能性が示唆された。

【結語】

候補遺伝子の塩基配列の A/J 型変異が、肝臓でのこの候補遺伝子の発現量を低下させ、脂肪肝感受性を高める可能性が示された。現在、この候補遺伝子を保有するコンジェニックマウスの脂肪肝形質の表現型解析を進めている。

引用文献

- 1) Kumazawa, M. *et al.*, *J. Lipid Res.*, **48**, 2039-2046 (2007)

† Tel:052-789-4075

Fax:052-789-4077

e-mail: horiof@agr.nagoya-u.ac.jp.

2Ep4

細胞内における calpain-7 の活性化と C 末端欠損 Alix の分解 (名大院生命農・応用分子生命科)

○前本佑樹、大迫洋平、人見清隆、柴田秀樹、牧正敏

【緒言】

システインプロテアーゼ calpain-7 は 2 つの連続する MIT ドメインを有している。MIT ドメインはエンドサイトーシス経路において、多胞性エンドソームの内部小胞形成を制御する ESCRT 関連因子の一部にみられる相互作用ドメインである。

一方、コウジカビ (*Aspergillus nidulans*) のアルカリ応答経路においては calpain-7 オルソログの PalB が中心的な役割を果たす。この経路では PalB が基質の転写因子 PacC をエンドソーム膜上で限定分解することが必要であり、PalB のリクルートには Vps24 が PacC のリクルートには Vps32 と PalA が必要である (図 1 参照)。

以上の知見から、ヒトにおいても MIT ドメイン結合因子である ESCRT-III (CHMPs) が calpain-7 の活性化に関連している可能性があった。

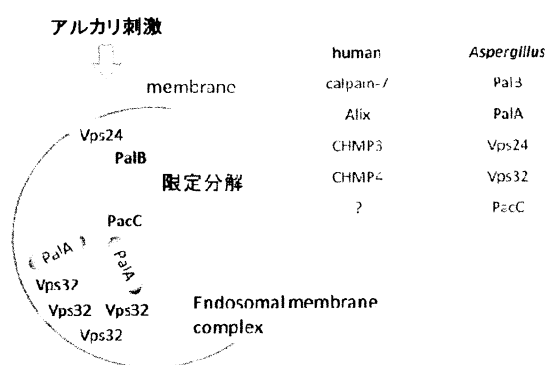


図 1 アルカリ応答経路とオルソログ対応

【実験方法】

細胞内における calpain-7 の活性測定実験

HEK293T 細胞に mGFP 融合 calpain-7 を発現させ、その細胞破碎液を解析した。

同時に活性化因子候補や基質候補を発現させ、calpain-7 の自己消化促進や基質の分解を検討した。

Calpain-7 の局在に関する実験

細胞分画実験および免疫染色実験により観察した。

【結果と考察】

カビにおける知見より PalA オルソログの Alix が calpain-7 の活性に影響する可能性が考えられ、検討したところ、calpain-7 の自己消化活性には影響を与えなかったが、C 末端欠損 Alix (AlixΔC) が野生型 calpain-7 依存的に分解された。

また calpain-7 の自己消化は calpain-7 結合因子により促進され、特に細胞内で IST1 と CHMP1B が mGFP-calpain-7 の自己消化促進及び、C 末端欠損 Alix の分解に対し協調的に働くことを明らかにした。局在解析により CHMP1B や IST1 が calpain-7 の局在に影響を与えることが明らかになったため、calpain-7 と CHMP1B、IST1 の三者複合体モデルが考えられた (図 2 参照)。

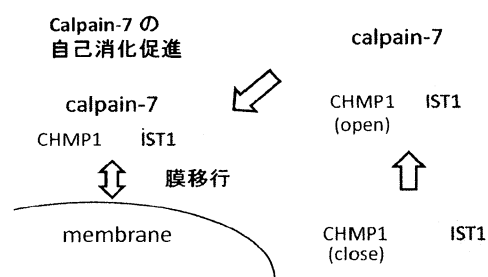


図 2 calpain-7 活性化モデル

【緒言】

Calpain-7 の活性化条件は明らかになりつつあるが、生理的基質は不明である。本研究の活性化条件等を利用し、生理的基質同定を目指したい。

引用文献

- 1) Olga Rodríguez-Galan *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* 284: 4404-4412
- 2) Maemoto *et al.*, *Journal of Biochemistry* in press

Tel: 052-789-4183, Fax: 052-789-5542

e-mail: maemoto.yuki@h.mbox.nagoya-u.ac.jp

【目的】

緑内障は眼疾患における失明の第一位であり、眼圧が主要な原因である。緑内障は網膜に加圧がかかることにより視野障害・視力障害を引き起こす。一過性高眼圧は、緑内障の症状の一つである。

β -1,3-glucanは、Zymosan (酵母抽出液)の主成分であることが知られている。Zymosanは、視神経圧迫・硝子体注入により眼内マクロファージの活性化・グリア細胞刺激で軸索再生を引き起こすことが報告されている。しかし、生物由来の β -1,3-glucanは β -1 \rightarrow 6の側鎖があるものが多く、その間隔・側鎖の長さは多様である。そこで今回、側鎖のない β -1,3-glucan (分子量は約10,000でグルコース重合度70程度の純品¹⁾)を用い、高眼圧モデルを作成し、 β -1,3-glucanによる網膜保護効果を検討した。

【実験方法】

β -1,3-glucanに細胞増殖阻害があるかを種々の細胞 (HL-60, HeLa, VSMC, NB2a, Colon26)にて検討した。また、 β -1,3-glucanが眼圧を調整するかを β -1,3-glucan溶液 (Rat: 0.01%, Rabbit: 0.1%)の点眼による眼圧の測定を行った。

*in vivo*の実験は、ラット (SD, ♂, 6 wk)の網膜電図 (ERG)を測定した。高眼圧モデルは、高眼圧処置を行った後、24時間後に β -1,3-glucanをDMSOに溶解し、硝子体内注入した。コントロール眼にはDMSOのみを硝子体内注入した。高眼圧負荷6日後、ERGを測定し、高眼圧負荷前後のERGの比較することにより、 β -1,3-glucanの網膜保護効果を検討した。また、ERG測定後、ラット眼を摘出し、切片作製した後、HE染色・TUNEL法で神経細胞死等網膜の組織的観察を行った。

【結果及び考察】

β -1,3-glucanには、細胞増殖阻害試験で 10^{-2} ~ 10^{-7} mg/mLの濃度では細胞に影響がないことが明らかとなった。また、眼圧測定では β -1,3-glucan投与による眼圧の有意な変動は見られなかった。高眼圧モデルでのERGにおいて、a波 (双極細胞・ミュラー細胞由来)はコントロール眼ではAmplitudeが大きく減少していたが、 β -1,3-glucan投与眼では保護作用が有意にみられた。また、網膜切片では、高眼圧による内網状層 (IPL)の薄化が抑制されており、神経線維層の形状も無処置眼と似ていた。また、高眼圧処理により、網膜神経節細胞の数も減少するが、 β -1,3-glucan投与群ではその減少も抑制されており網膜神経節細胞の保護が示された。TUNEL法にて高眼圧による網膜神経節細胞のアポトーシス陽性細胞は、 β -1,3-glucan投与群で抑制されていた。 β -1,3-glucanが高眼圧処理後の網膜神経節細胞のアポトーシスを抑制することや網膜細胞及び構造の破壊も抑制することから、 β -1,3-glucanはERGに見られる視機能を保護していることが示唆された。

【結言】

β -1,3-glucanが高眼圧による網膜細胞、主に網膜神経節細胞のアポトーシスによる細胞死と網膜の構造的破壊を抑制することから、ERGに見られる視機能を保護することが示された。

引用文献

- 1) Isono, N., *et al.*, β -1,3-glucan manufacturing method, WO/2010/092997

*Tel: 059-231-9612, Fax: 059-231-9684

e-mail: nishio@bio.mie-u.ac.jp

2Ep6

低酸素応答性オートファジーによるアンドロゲン受容体の分解について

(大阪府大院生命環境, *大阪女子短大)

○南 真人, 三谷壘一, 山地亮一, 原田直樹, 中野長久*, 乾 博

【緒言】

前立腺がんは高齢者で発症することが多いことから、高齢社会である我が国では罹患率が急増しており問題となっている。初期前立腺がんは男性ホルモンのアンドロゲンとアンドロゲン受容体 (AR) に依存した増殖を示すが、悪性化や転移した前立腺がんでは AR の発現量が減少し、AR 非依存的に増殖することが報告されている [1]。しかし、AR の発現量減少を引き起こす因子は未だ不明である。前立腺がんを含む多くの固形がんの生育環境は低酸素状態であり、低酸素はがんの悪性化に関与することが知られている。そこで前立腺がん細胞を低酸素に暴露した結果、AR の発現量は常酸素下の細胞に比べて減少することを見出したので、本研究では低酸素下における AR の減少機構について検討した。

【実験方法】

低酸素が AR の発現量に及ぼす影響

AR を発現するアンドロゲン依存性前立腺がん細胞株 (LNCaP) を、常酸素下 (21% O₂) または低酸素下 (1% O₂) で培養し、AR のタンパク質および mRNA レベルを検討した。

AR の半減期に及ぼす低酸素の影響

GFP タンパク質を融合させた AR をアンドロゲン非依存性前立腺がん細胞株 (PC-3) に安定的に発現させ、タンパク質合成阻害剤 (CHX) で処理することで、AR のタンパク質レベルを蛍光強度として数値化し、低酸素下での AR の半減期を検討した。

AR の分解経路の検討

LNCaP 細胞をプロテアソーム阻害剤 (MG132) もしくはオートファジー阻害剤 (NH₄Cl、3-MA) の存在下で低酸素に曝露し、AR の分解経路を検

討した。

【結果】

LNCaP 細胞を低酸素下で培養した結果、AR の mRNA レベルに影響は無かったが、AR のタンパク質レベルと AR の標的遺伝子の mRNA レベルは経時的に減少した。低酸素下の AR の半減期を検討したところ、低酸素曝露開始 6 時間から AR の急激な減少が観察された。低酸素による AR の分解は、MG132 で阻害されなかったが NH₄Cl および 3-MA で阻害された。細胞分画および蛍光顕微鏡観察から、低酸素により核内の AR が減少し、リソソームを含む顆粒画分への蓄積が増加することが確認された。低酸素下でオートファジーを正に調節する AMPK が活性化し、それに伴いオートファジーマーカーである LC3-II が蓄積した。AMPK の活性化剤である AICAR の処理により常酸素下でも AR の分解が亢進し、AMPK の阻害剤である Compound C の処理により低酸素下での AR の分解亢進は抑制された。一方、AMPK とは異なる経路でオートファジーを正に調節する低酸素誘導因子-1α (HIF-1α) を siRNA でノックダウンさせても、低酸素による AR の分解亢進に影響はなかった。

【まとめ】

低酸素下での AR タンパク質の分解亢進はユビキチン・プロテアソーム系によるものではなく、低酸素状態で活性化した AMPK がオートファジーを誘導することで生じていることが示唆された。

引用文献

[1] G. Chen *et al.*, *Cancer*, 101, 1345-56 (2004).

Tel: 072-254-9454, Fax: 072-254-9454

e-mail: sr201042@edu.osakafu-u.ac.jp

2Ep7

Phospholipid scramblase 3のパルミトイル化

およびセラミド依存的な細胞外分泌

○犬塚達俊¹、猪川亮¹、陳岑¹、木津久美子²、柴田秀樹¹、成田宏史²、
牧正敏¹ (¹名大院・生命農・応用分子生命科、²京女大・食物栄養)

Phospholipid scramblase(Scr)ファミリーには5種類のアイソフォーム(Scr1-5)が存在する。Scr1は主に細胞膜に局在するが、パルミトイル化されない変異体は核に移行して、転写活性を制御する。また、最近Scr1の立体構造のモデリングが行われ、膜貫通領域だと考えられていたC末端領域はβ-バレル構造の内部に存在するモデルが示された。

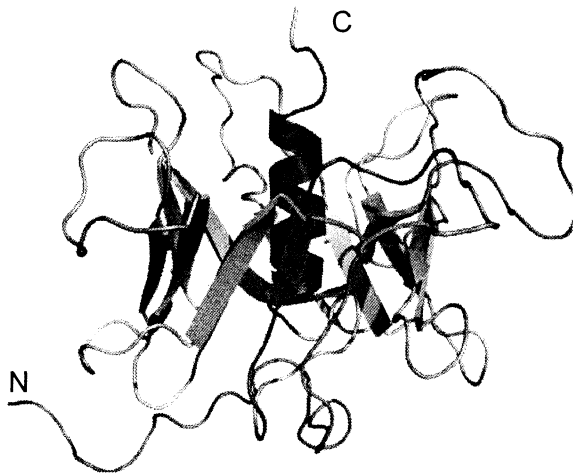


Figure.1 Scr1の立体構造モデル

このことからScr1の膜への結合、その機能にパルミトイル化が重要であることが考えられたが、他のグループからパルミトイル化非依存的なScr1の細胞外分泌も報告されるなど、依然として不明な点が多い。一方、Scr3はカルジオリピンの合成やミトコンドリアの内膜から外膜への移動に関与や、Scr3ノックアウトマウスは異常な脂肪蓄積が生じることが報告されている。しかし、未だScr3の局在や分布、そして機能について不明な点が多い。

我々はHEK293細胞中でScr3を検出することが出来なかったため、恒常発現するHEK293細胞(HEK293/Scr3)を樹立した。そ

して、この細胞の培養上清を作製した特異抗体を用いてウエスタンブロットした結果、Scr3が検出された。次に、Scr3の分泌形態を調べるために、HEK293/Scr3培養上清を100,000 x gで遠心し、回収した沈降物をショ糖密度勾配による遠心分画法で分画したところ、エキソソームが検出される密度の画分でScr3が検出された。Scr1とScr3は相同性が高いことからScr1と同様に、Scr3の局在にもパルミトイル化の関与の可能性を検討した。HEK293/Scr3をパルミトイル化阻害剤で24時間処理した後に、細胞分画を行った結果、核画分と膜画分だけでなくサイトソール画分にもScr3が検出された。また、パルミトイル化阻害剤処理により培養上清へのScr3の分泌は減少した。さらに、一般にエキソソームがセラミド依存的に放出される報告があり、本研究においてもHEK293/Scr3をセラミド合成酵素スフィンゴミエリナーゼ阻害剤で24時間処理した結果、Scr3の分泌は減少した。これらの結果から、Scr3は細胞外にエキソソームとして分泌されるが、その分泌はパルミトイル化やセラミドに依存することが示唆された。

引用文献

Bateman A. *et al.*, (2009), *Bioinformatics*.
Shibata H *et al.*, (2008), *J. Biol.Chem.*

連絡先

Tel: 052-789-4183

E-mail:

inuzuka.tatsutoshi@f.mbox.nagoya-u.ac.jp.

高密度リポタンパク質 (HDL) 産生機構の解析

① ABCA1 の ATP に依存した構造変化と apoA-I 結合

(*京大 iCeMS, **京大院農)

○長尾耕治郎^{*†}, 木村泰久^{**}, 松尾道憲^{**}, 木岡紀幸^{**}, 植田和光^{* **}

【緒言】

ABC トランスポーターである ABCA1 は血液中の apoA-I と結合し、その apoA-I に細胞の過剰なコレステロールを受け渡すことで、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質 (HDL) を産生する。ABCA1 は ATP の加水分解を駆動力として HDL を産生するが (1)、その機構は不明である (2, 3)。これまでに、HDL 形成の第一段階である ABCA1 と apoA-I の結合が静電相互作用であること、ABCA1 の細胞外領域の正電荷のアミノ酸が apoA-I との結合に重要であることを報告した (4)。本研究では、apoA-I との結合において、ABCA1 がどのように ATP 加水分解のエネルギーを利用するのかを解析した。

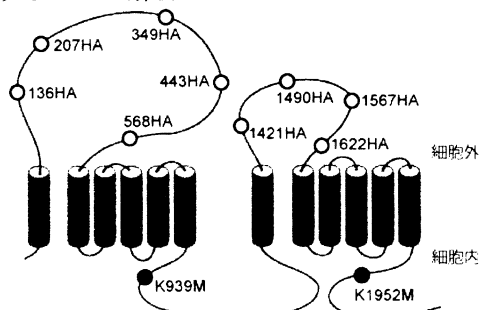


図1 ABCA1 の二次構造

○; HA タグ挿入部位, ●; リシン-メチオニン変異.

【実験方法】

ApoA-I 結合実験

ABCA1 発現細胞を Alexa546 で蛍光標識した apoA-I と 37°C でインキュベートし、固定後に共焦点顕微鏡により観察した。

抗 HA 抗体染色

ABCA1 発現細胞を抗 HA 抗体と 37°C でインキュベートし、固定後に蛍光標識した 2 次抗体と反応させ、共焦点顕微鏡により観察した。

【結果と考察】

ABCA1 発現細胞への蛍光標識した apoA-I の結合は、NaN₃ と 2-deoxy-glucose により細胞の ATP を枯渇させることで消失した。このことから、ABCA1 と apoA-I との結合が ATP 依存であることが示された。次に、ABCA1 の細胞質側に存在する 2 つのヌクレオチド結合ドメイン (NBD) の関与を調べた。2 つの NBD のどちらか一方にリシン-メ

チオニン変異 (K939M, K1952M) を導入すると (図 1)、apoA-I との結合が起こらなくなった。また、放射性同位体標識した ATP アナログを用いた光親和性標識実験により、リシン-メチオニン変異により、ATP との結合は影響を受けないが、ATP 加水分解が阻害されることが示された。このことから、ABCA1 の両方の NBD での ATP 加水分解が apoA-I との結合に必要であることが明らかになった。そこで、ATP 加水分解により ABCA1 の細胞外領域の構造が変化し、apoA-I との結合部位が形成されるという仮説を立てた。構造変化を検出するために、ABCA1 の細胞外領域の 9 か所に HA タグ (YPYDVPDYA) をそれぞれ挿入した変異体を作製し (図 1)、HEK293 細胞に発現させた。作製した 9 種の変異体のうち、6 種は野生型と同様に機能的に発現した。これらのうち、136、207、349、1421、1490 番目のアミノ酸に挿入した HA タグの抗 HA 抗体による認識は ATP 枯渇処理で変化しなかったが、443 番目のアミノ酸に挿入した HA タグの認識は ATP 枯渇処理により低下した。さらに、443 番目に挿入した HA タグの認識はどちらか一方の NBD にリシン-メチオニン変異を導入することによっても低下した。しかし、207 番目に挿入した HA タグの認識はリシン-メチオニン変異を導入しても変化しなかった。以上の結果から、ABCA1 の 2 つの NBD での ATP 加水分解により細胞外領域の 443 番目周辺の構造が変化し、apoA-I 結合部位が形成されることが示唆された。

【結語】

ATP 加水分解によって引き起こされる構造変化により、ABCA1 の細胞外領域に正電荷のアミノ酸からなる apoA-I 結合部位が形成されるのだと考えられる。

引用文献

- 1) K. Nagao *et al.*, *J. Lipid Res.*, **50**, 1165-1172 (2009)
- 2) K. Nagao *et al.*, *FEBS Lett.*, **584**, 2717-2724 (2010)
- 3) K. Nagao *et al.*, *FEBS J.*, *in press* (2011)
- 4) K. Nagao *et al.*, *Biochim Biophys Acta.*, *in press* (2011)

†TEL & FAX : 075-753-6104

e-mail : knagao@kais.kyoto-u.ac.jp

高密度リポタンパク質 (HDL) 産生機構の解析

② 細胞膜上の ABCA1 動態の 1 分子可視化

(*京大 iCeMS, **京大再生研, ***京大院農)

○永田 紅^{*†}, 中田千枝子^{**}, 楠見明弘^{**}, 植田和光^{***}

【緒言】

ABCA1 は、善玉コレステロールとして知られる高密度リポタンパク質 (HDL) 産生に必須の膜タンパク質である。ABCA1 は細胞内の過剰なコレステロールやリン脂質を ATP 加水分解依存的にアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) に受け渡すことで HDL 産生の初期段階を担うが (図 1)、その機構には不明な点が多い。また、ABCA1 は apoA-I 非存在下でも脂質を動かし、微小膜構造を変化させると考えられている。ABCA1 タンパク質分子が細胞膜上でどのような挙動を示し apoA-I と相互作用して脂質を受け渡すのか、1 分子レベルでリアルタイム解析を行った研究は現在までに例がない。本研究では、全反射照明蛍光 (TIRF) 顕微鏡を用いて、生細胞の細胞膜二次元平面上での ABCA1 と apoA-I との相互作用、および apoA-I による ABCA1 の挙動変化を 1 分子可視化により解析した。

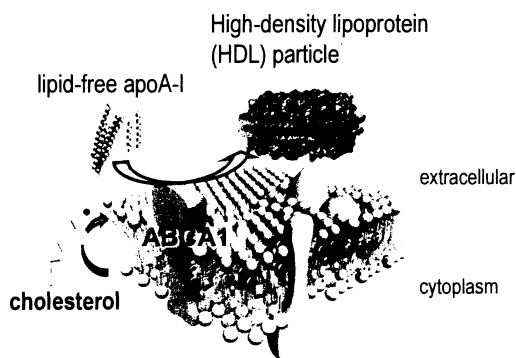


図 1 ABCA1 による HDL 産生の概念図

【実験方法】

細胞膜上の ABCA1 の 1 分子追跡

野生型 ABCA1 あるいは ATP 加水分解活性をもたない非機能性 ABCA1-MM と EGFP との融合タンパク質を HeLa 細胞に一過的に発現させ、TIRF 顕微鏡で観察した。30 フレーム/秒で撮影した画像から、解析ソフトを用いて分子の軌跡や拡散係数を求めた。

ApoA-I と ABCA1 との相互作用の検討

ABCA1 発現細胞の培地に ATTO594 で蛍光標識した apoA-I を添加し、ABCA1 と apoA-I の 2 色蛍光同時 1 分子観察を行った。

【結果と考察】

まず apoA-I 非存在下では、ABCA1 分子の運動性は低く、約 7 割が静止し、3 割が拡散運動をした。一方、非機能性の ABCA1-MM では、約 2 割が静止し、8 割が拡散運動をした。ABCA1 の拡散係数の中央値は $0.0034 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、ABCA1-MM では $0.12 \mu\text{m}^2/\text{s}$ だった。このことから、ABCA1 の機能発現により、細胞膜上での ABCA1 の運動性が低下することが示された。

ABCA1 の運動性がアクチン細胞骨格によって影響を受けているかどうかを検討するために、ラトランキュリンによってアクチン細胞骨格を破壊したところ、ABCA1 の運動性が回復した。このことから、ABCA1 の不動化にはアクチンの膜骨格フェンスが関与することが示唆された。

次に、蛍光標識した apoA-I を ABCA1 発現細胞に添加して 2 色蛍光同時 1 分子観察を行ったところ、添加後数分間はほとんどの apoA-I が ABCA1 と共局在したが、時間経過とともに ABCA1 と共局在しない apoA-I が増加した。これは、ABCA1 から脂質を受け取った apoA-I (新生 HDL) が今度は非特異的に再び膜に結合したものと考えられ、ABCA1 から apoA-I への脂質の受け渡しプロセスを間接的に可視化したことが示唆された。

さらに、apoA-I 添加によって ABCA1 の易動性が上昇し、10-15 分後には ABCA1-MM と同等の運動性を示すようになった。

【結語】

ApoA-I 非存在下では、コレステロールやアクチン細胞骨格の関わる何らかの機構が ABCA1 分子の運動性を抑制しているが、apoA-I 添加により ABCA1 から apoA-I へ脂質が受け渡されると、その抑制が解除され、ABCA1 の運動性が上昇すると考えられる。本研究において、apoA-I による ABCA1 の動態変化、HDL 産生の初期段階を 1 分子レベルで可視化することに世界ではじめて成功した。

† TEL & FAX : 075-753-6104

e-mail : knagata@kais.kyoto-u.ac.jp

強光応答性選択的スプライシング制御因子 atSR30 および atSR45a の核局在化制御機構の解析

(¹近畿大院・農・²近畿大・農、³中部大・応生) ○小池佳之^{1,†}、森達也²、
田部記章²、丸田隆典²、田茂井政宏^{1,2}、吉村和也³、重岡 成^{1,2}

【諸言】選択的スプライシングは一つの遺伝子から局在や機能の異なる複数のタンパク質を生成する合理的な転写後発現制御機構の一つであり、真核生物のタンパク質機能の多様化に大きく貢献している¹⁾。セリン/アルギニンリッチ(SR)タンパク質は、RNA 認識モチーフ(RRM)およびアルギニン/セリンリッチドメイン(RS)からなり、恒常的スプライシングだけでなく、濃度依存的に特定の遺伝子の選択的スプライシング効率の促進/抑制にも機能している。我々はシロイヌナズナにおけるSRタンパク質ファミリー(20種類)の中で、atSR30 および atSR45a は強光ストレスに応答した選択的スプライシングの制御に機能することを明らかにしてきている²⁾。atSR30 は動物の主要な選択的スプライシング制御因子 ASF/SF2 と同様に、N 末端側の 2 つの RRM(RRM1/RRM2) と C 末端側の RS ドメイン(C-RS)からなる³⁾。一方、atSR45a は N 末端側にも RS ドメイン(N-RS)を有する植物特有のドメイン構造からなる。興味深いことに、これまでにいくつかの SR タンパク質は固有のスペckルと呼ばれる核内小器官を形成することが知られており、それら個々のスペckル形成の選択的スプライシング制御の特異性への関係が示唆されている⁴⁾。そこで本研究では、atSR30 および atSR45a の各ドメインが核内スペckルへの局在化に果たす役割を解析した。

【実験方法】

atSR30 および atSR45a の全長および各ドメイン(N-RS および C-RS、RRM ドメイン)の欠損させた変異型遺伝子を、赤色蛍光タンパク質(RFP)もしくは青色蛍光タンパク質(CFP)融合一過的発現用ベクター(UGW2-TagRFP)に導入した。これらのコンストラクトを、パーティクルガンを用いてタマネギ表皮細胞に一過的に発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光を観察した。

【結果と考察】atSR30 の全長および RRM ドメイン欠損コンストラクトを導入したタマネギ表皮細胞では、核内にスペckル状の蛍光が認められた。一方、C-RS 欠損コンストラクトでは核スペckル蛍光が観察されず、ゴルジ体様の蛍光が観察された。atSR45a の全長および C-RS を欠損させたコンストラクトでは核内にスペckル状の蛍光が認められた。また、N-RS もしくは N-RS と

RRM を欠損させたコンストラクトでは核内スペckルに加え、ゴルジ体様の蛍光が観察された。一方、N-および C-RS の両方を欠損させたコンストラクトではゴルジ体様の蛍光のみが観察された。これらの結果から、atSR30 の核内スペckル形成には C-RS が、atSR45a には N-および C-RS の両方が必要であることが示唆された。

atSR30 の全長のコンストラクト導入細胞にリン酸化阻害剤スタウロスポリン(100 μM)処理を行った結果、C-RS 欠損コンストラクトと同様に核スペckル蛍光が観察されなかった。一方、スタウロスポリン処理は atSR45a の局在性に影響を及ぼさなかった。したがって、atSR30 の核内スペckル形成には C-RS のリン酸化が関与しているが、atSR45a はリン酸化/脱リン酸化制御を受けていないことが示唆された(図 1)。

atSR45a-CFP および atSR30-RFP 融合タンパク質を同時に導入した結果、それらのスペckル状の蛍光は完全にオーバーラップしていた。このことから、両タンパク質は同一の核内スペckルに局在し、共役して選択的スプライシング制御に機能していることが示唆された。

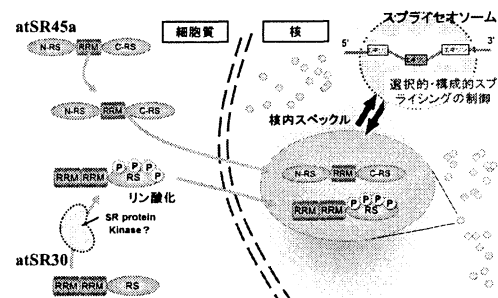


図 1 atSR30 および atSR45a の核局在化制御機構

引用文献

- 1) E. T. Wang *et al.*, *Nature*, **456**, 470-476 (2008)
- 2) K. Yoshimura *et al.*, *Plant. Cell. Physiol.*, in press (2011)
- 3) N. Tanabe *et al.*, *Plant. Mol. Biol.*, **70**, 241-252 (2009)
- 4) Z. J. Lorkovic *et al.*, *Exp. Cell Res.*, **314**, 3175-3186 (2008)

†TEL:0742-43-8083, FAX: 0742-43-8083
e-mail:133690015a@nara.kindai.ac.jp

植物特異的 SR-like タンパク質 atSR45a による 強光ストレスにตอบสนองした選択的スプライシング制御

2Fa2

(中部大院・応生, *近畿大院・農・バイオ, **中部大・応生・応化, ***島根大・生資科・生命工) ○吉村和也[†], 森 達也*, 横山国大, 小池佳之*, 田部記章*, 佐藤信雄**, 高橋広夫**, 丸田隆典***, 重岡 成*

【緒言】近年、選択的スプライシングを含めた転写後遺伝子発現制御機構が重要視されてきている。事実、トウモロコシやシロイヌナズナでは40%以上の遺伝子が選択的スプライシングにより複数の転写産物を生成している¹⁾。興味深いことに、それら選択的スプライシングを受ける遺伝子には多くの環境ストレス応答/耐性に関連するものが含まれる。選択的スプライシング制御因子の一種であるセリン-アルギニンリッチ (SR) タンパク質はシロイヌナズナにおいて20種類存在する²⁾。それらの中で、植物特有のドメイン構造を有する atSR45a はスプライセオソーム構成因子として機能し、強光ストレスにより迅速に発現誘導される。したがって、atSR45a は強光ストレスにตอบสนองした選択的スプライシング制御に重要な役割を果たしていることが示唆される。そこで本研究では、atSR45a 遺伝子破壊株 (*KO-sr45a*) を用いたタイリングアレイ解析により、atSR45a によりスプライシング効率を制御される遺伝子群の同定を試みた。

【実験方法】強光ストレス (800 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 1 h) 下におけるシロイヌナズナ野生株と *KO-sr45a* の全トランスクリプトームをタイリングアレイ法により解析した。タイリングアレイ結果の検証は、半定量的 RT-PCR により行った。

【結果と考察】2回のタイリングアレイ解析データから、強光ストレス下で野生株と比較して *KO-sr45a* 株において発現レベルが2倍以上に変化した426ヶ所のコーディング領域 (406 遺伝子) および480ヶ所のノンコーディング領域を同定した。それらの中から、 $P < 0.05$ およびシグナル値 > 500 の領域を抽出した結果、233ヶ所のコーディング領域 (217 遺伝子) が選抜された。それらにはシグナル伝達、細胞周期、DNA プロセッシング、タンパク質ターンオーバー、および転写制御に関わる遺伝子が多数含まれていた。

半定量的 RT-PCR による検証の結果、強光ストレス下における選択的スプライシング効率および転写レベルの変化が、各々10個および8個の遺伝子において認められた (図1)。また、At1g26780 (MYB117), At5g04620 (BIOF), および At1g21160 (eIF family protein) の強光ストレス下 (0~3 h) での選択的スプライシング効率の変化および At3g48560 (CSR1) の転写量の変化は、atSR45a の発現誘導のタイミングと一致していた。シーケンス解析の結果、*KO-sr45a* 株ではイントロンリテンション型の選択的スプライシング産物の生成効率が抑制されていることが明らかになった。以上より、atSR45a はイントロンリテンション型のスプライシング抑制因子として機能していることが示唆された³⁾。

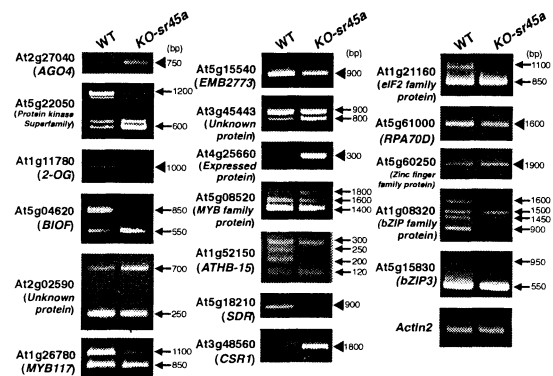


図1 atSR45a により選択的スプライシング効率もしくは転写が制御される遺伝子の半定量的 RT-PCR 解析

引用文献

- 1) S. A. Filichkin *et al.*, *Genome Res.*, **20**, 45-58 (2010)
- 2) N. Tanabe *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1036-1049 (2007)
- 3) K. Yoshimura *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, in press

[†]Tel: 0568-51-9681 Fax: 0568-52-6594
e-mail:k-yosi@isc.chubu.ac.jp

ストレス応答における葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) の役割

2Fa3

(近畿大院・農・バイオ¹、近畿大・農・バイオ²、島根大・生資科・生命工³、中部大・応生・食栄⁴) ○辻村昌希^{1,†}、池本圭輔²、丸田隆典^{2,3}、田茂井政宏^{1,2}、吉村和也⁴、重岡 成^{1,2}

【緒言】

高等植物において、ピリジンヌクレオチド [NAD(P) (H)] は光合成、呼吸および抗酸化系などの主要代謝の補因子として必須である。また、本分子のレドックス状態は環境ストレス下における活性酸素種 (ROS) の生成や消去に多大な影響を及ぼす。従って、細胞内におけるピリジンヌクレオチドレベルおよびレドックス状態はオルガネラレベルで厳密に制御されなければならない¹⁾。これまでに当研究室では、シロイヌナズナ Nudix hydrolase (AtNUDX) ファミリーの酵素学的性質および生理機能を網羅的に解析する過程で、葉緑体型 AtNUDX19 が NADPH ピロホスホハイドロラーゼ活性を有することを見出した²⁾。そこで本研究では、AtNUDX19 による葉緑体内ピリジンヌクレオチドレベルおよびレドックス状態の制御が種々のストレス応答に果たす役割について解析した。

【結果および考察】

先ず T-DNA 挿入による AtNUDX19 遺伝子発現抑制株 (KD-*nudx19*) および破壊株 (KO-*nudx19*) を単離した。通常光 (100 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) 下において、野生株と比較して KD-および KO-*nudx19* 株では NADPH および NADP⁺ レベルがそれぞれ増加および減少しており、それらの変化は強光 (1200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) 下でより顕著であった。興味深いことに、KD-および KO-*nudx19* 株では強光 (1200 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$) 下でのカルビン回路の酵素群 (FBPase、SBPase) のイニシャル活性および CO₂ 固定能が増加しており、それらの生育は野生株よりも促進していた。また、強光下での KD-および KO-*nudx19* 株で

は種々の抗酸化酵素 (APX、MDAR、DHAR、SOD) の活性の増加が認められた。従って、AtNUDX19 は光環境順応における光合成能や抗酸化能の制御に関与し、それに伴い葉緑体内 NADPH レベルもしくはレドックス状態がシグナルとして、植物のストレス応答に関与している可能性が示唆された。そこで、マイクロアレイ解析により AtNUDX19 による NADPH 代謝が遺伝子発現制御に及ぼす影響を検討した。その結果、通常光および強光照射下において野生株と比較して AtNUDX19 欠損株ではストレスホルモン代謝/応答に関連する遺伝子群の発現が変化していた。そこで次に、KD-および KO-*nudx19* 株の種々のホルモンやストレス処理に対する感受性を評価した。その結果、KD-および KO-*nudx19* 株はジャスモン酸やアブシジン酸処理に対して非感受性、傷害や浸透圧ストレスに対して高感受性を示した。一方、KD-および KO-*nudx19* 株はサリチル酸処理に対して高感受性を示した。よって、AtNUDX19 は植物ホルモンを介したストレス応答のコアレギュレーターとして機能していることが示唆された。

引用文献

- 1) C. H. Foyer and S. Shieyoka, *Plant Physiol.*, 155, 93-100 (2011)
- 2) T. Ogawa *et al.*, *Plant Physiol.*, 148, 1412-1424 (2008)

†Tel:074-243-8083, Fax:074-243-8083
e-mail:1133690008t@nara.kindai.ac.jp

2Fa4

FBP/SBPase 導入による光合成能強化の窒素代謝に及ぼす影響

(¹近畿大院・農・バイオ、²近畿大・農・バイオ)○丸山俊樹^{1,†}、大鳥久美²、西山和樹¹、Daniel Padilla²、作山治美²、田茂井政宏^{1,2}、重岡 成^{1,2}

【緒言】植物は炭素と窒素の代謝調節に関する個別の調節機構に加えて、細胞内の炭素(C)および窒素(N)代謝物の相対量比(C/N バランス)を感知し、環境に適応する能力を備えているが、その詳細は明らかにされていない。これまでに我々は、ラン藻由来 FBP/SBPase を葉緑体で発現させることにより光合成能が増大し、生育促進が見られることを明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。これらの形質転換体ではCO₂固定能の増大に伴い窒素代謝系が促進されていると考えられる。そこで、C/N バランスの制御機構を明らかにすることを目的として、シロイヌナズナ葉緑体での FBP/SBPase 発現による光合成能強化にともなう炭素代謝の変化が窒素代謝系の代謝産物、関連酵素の活性および遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

【実験方法】35S プロモーター制御下で FBP/SBPase を葉緑体で発現させたシロイヌナズナ(35S-ApFS)と野生株をMS培地(-Suc)および土耕で栽培(23°C、連続光)し、2週齢および5週齢のロゼッタ葉を用いて炭素・窒素代謝系の代謝産物、関連酵素群の活性および遺伝子発現量を比較した。

【結果と考察】2週齢における ApFS 株では野生株と比較してカルビン回路中間体やデンプンおよびシヨ糖量の増加、種々のアミノ酸量の減少が認められたが、C/N バランスに有意な差は認められなかった。シヨ糖合成に関連する酵素遺伝子の発現量は増加していたが、カルビン回路および窒素代謝に関連する酵素遺伝子の発現量に変化は認められなかった。

一方、5週齢の ApFS 株では野生株と比較してデンプン、シヨ糖量の増加、一部のアミノ酸量の増加が認められた。カルビン回路に関連する酵素

遺伝子の発現量の減少やシヨ糖合成および窒素代謝に関連する酵素遺伝子の増加が認められた。

これらの結果より、生育初期では光合成能の上昇により光合成代謝物量が増加し、生育の促進に伴って窒素がタンパク質合成などに用いられることから一時的に遊離アミノ酸が減少したと考えられる。成熟期では、これらの代謝産物量の変化がシグナルとなり、カルビン回路関連遺伝子の発現を抑制、窒素代謝系遺伝子を誘導することで、成熟期では C/N バランスを維持していると考えられる。

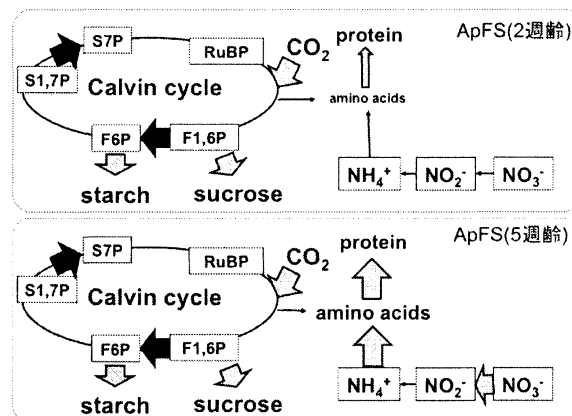


Fig. 1 FBP/SBPase 導入による光合成能強化が炭素・窒素代謝に及ぼす影響

引用文献

- 1) Y. Miyagawa *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 19, 965-969 (2001)
- 2) M. Tamoi *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 47, 380-390 (2006)
- 3) Y. Yabuta *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 49, 375-385 (2008)
- 4) Y. Ichikawa *et al.*, *GM Crops*, 1, 322-326 (2010)

[†]Tel: 0742-8083, Fax: 0742-43-8083

e-mail: 1133690018w@nara.kindai.ac.jp

葉緑体由来の H₂O₂ 応答性遺伝子群の機能解析

(¹近畿大院・農・バイオ、²近畿大・農・バイオ、³島根大・生資科・生命工、⁴鳥取大・農・生資環、⁵中部大・応生・食栄)

○松田 峻^{1,†}、中村 菜樹²、野志 昌弘²、田茂 井政宏^{1,2}、丸田 隆典^{2,3}、
藪田 行哲⁴、吉村 和也⁵、石川 孝博³、重岡 成^{1,2}

2Fa5

【緒論】

活性酸素種 (ROS) を介した酸化的シグナリングは種々の環境ストレス応答に重要な役割を担っている。これまでに我々は、葉緑体由来の酸化的シグナリングの分子機構を明らかにするために、チラコイド膜結合型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (tAPX) 発現の誘導抑制系を用いて、葉緑体由来の H₂O₂ に応答する遺伝子群を同定してきた。そこで今回は、同定した遺伝子群を欠損させたシロイヌナズナよりパラコート感受性株を選抜し、それらの原因遺伝子の機能解析を行った。

【方法】

葉緑体由来の H₂O₂ 応答性遺伝子群の破壊株を 241 ライン単離した。2 日齢の野生株および破壊株を 0.1 μM パラコートを含む培地に植え替え、連続光照射下 (100 μmol/m²/s, 25°C) で生育させた。14 日後の表現型を指標に、光酸化的ストレス高感受性および非感受性変異株 (*pss* および *psi*) を単離した。また、それらの他のストレスに対する感受性や、原因遺伝子のストレス応答性について解析した。

【結果と考察】

パラコート感受性評価の結果、7 つの *psi* 株および 8 つの *pss* 株が得られた。これらの原因遺伝子群は tAPX 誘導抑制に反応するだけではなく、強光、パラコートおよびサリチル酸 (SA) に対しても応答性を示した (図 1.)。PSS4 および PSS7 は転写因子を、PSS6 はタンパク質キナーゼをそれぞれコードしており、酸化的シグナリングとの関連性が示唆された。興味深いことに、それらの遺伝子破壊株はパラコートだけではなく、SA やエリシター (flg22) 処理にも高感受性を示した (図

2.)。よって、PSS4、PSS6 および PSS7 は生物学的および非生物学的ストレス応答のクロストークに関与する可能性が示唆された。現在、これらのタンパク質の細胞内局在性および下流遺伝子の同定を進めている。

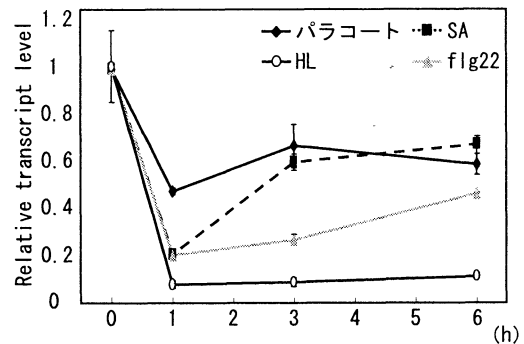


図 1. *pss7* のストレスおよびホルモン応答性

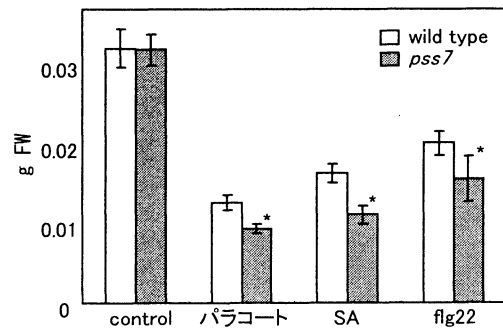


図 2. *PSS7* のストレスおよびホルモン感受性

【結言】

このように、我々は生物学的および非生物学的ストレス応答のクロストークに関与する新奇の転写因子およびタンパク質キナーゼを同定した。また、その他の変異株の原因遺伝子の機能解析により、葉緑体由来の酸化的シグナリングへのγ-アミノ酪酸代謝およびフラボノイド代謝の関与が示唆されており、合わせて報告する。

†Tel : 0742-43-8083, Fax : 0742-43-8083
e-mail: 1033690009f@nara.kindai.ac.jp

2Fa6

シヨ糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響

(¹近畿大・農・バイオ、²近畿大院・農・バイオ)

○大鳥久美^{1,†}、丸山俊樹²、Daniel Paddila¹、田茂井政宏^{1,2}、重岡 成^{1,2}

【緒言】

シヨ糖合成系の律速因子の1つである細胞質FBPaseを強化した形質転換タバコは、通常CO₂環境下では野生株と有意な差が見られないが、高CO₂環境下では側枝数、葉数が野生株より増加する¹⁾。この事実は、植物体内におけるシヨ糖分配の変化がシグナルとなり、側枝数、葉数を制御することを示唆していた。そこで、シヨ糖分配の変化が側枝形成に及ぼす影響を分子レベルで明らかにするために、ラン藻由来FBPase-IIを細胞質で発現させたシロイヌナズナ(AcF)を作出し、形態形成に関わる植物ホルモン関連遺伝子群の発現解析を行った。

【方法・結果】

形質転換タバコと同様に、通常CO₂(360 ppm)環境下ではAcF株は野生株と同様の生育を示したが、高CO₂(1000 ppm)環境下では、AcF株の側枝数が野生株と比較して有意に増加した。この時、AcF株におけるヘキソース量、シヨ糖量は野生株と比較して増加しており、生重量は野生株の1.2~1.5倍に増大していた。

そこで、形態変化が見られる直前の5週齢のロゼッタ葉からRNAを単離し、糖応答遺伝子や側枝形成に関与する植物ホルモンの生合成および応答遺伝子群の発現量をReal-time PCRにより比較した。糖応答遺伝子であるSUS1, pGlcT, TPTの発現量はAcF株と野生株間で有意な差は認められなかった。また、AcF株ではオーキシンの合成に関与するNIT3、貯蔵に関与するGH3、極輸送に関与するPIN1、ジベレリンの合成に関与するGA3ox1や応答遺伝子のGAI、ストリゴラクトンの合成遺伝子であるMAX3, MAX4, CRISTOや応答遺伝子MAX2, KAO2は、それぞれの植物ホルモン量の減少を示唆する変化が見られた。一方、サイトカイニン分解に関与するCKX4や応答遺伝子のARR4, ARR7, AtMYB2は、サイトカイニン量の増加を示唆する変化が見られた。

以上の結果より、高CO₂(1000ppm)環境下において、AcF株は野生株と比較して、ヘキソース、シヨ糖量が増加し、これらの糖分配の変化がシグナルとなって側枝形成を抑制するオーキシンやストリゴラクトン、ジベレリン、側枝形成を促進するサイトカイニンの生合成および応答に影響を及ぼし、側枝数が増加したと考えられる。(Fig. 1)

現在、内在性の糖分配の変化によるこれら植物ホルモン関連遺伝子群の発現制御機構を明らかにするために、糖応答遺伝子および糖センサー、変化が見られた植物ホルモンに関与する遺伝子について解析中である。

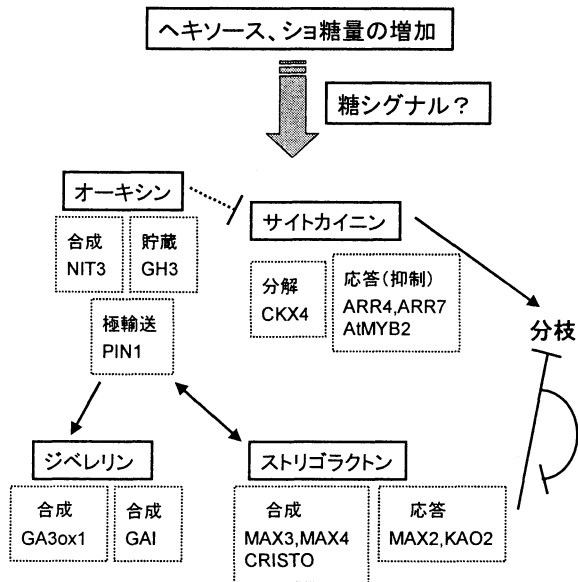


Fig. 1 AcF株における側枝増加の分子機構予想図

引用文献

- 1) M. Tamoi *et al.*, *Photosynth. Res.*, 108, 15-23 (2011)

[†]Tel:0742-43-8083, FAX:0742-43-8083

e-mail:nb_otori@nara.kindai.ac.jp

植物が光化学系の高温障害を回避するメカニズムの解析

(神戸大院農, *神戸大院理, **神戸大自環) ○丸谷曜子, 山内靖雄†, 秋本誠志**, 木村行宏**, 水谷正治, 杉本幸裕

【目的】

高温ストレスを受けた植物は光照射下では光合成活性にほとんど変化を受けないが、暗所下では光合成活性が低下する。本研究では、光照射下または暗所下で植物に高温ストレスを与えたときの光化学反応系における障害回避メカニズムを解明する。

【方法と結果】

コムギ、アラビドプシスに 40°C の高温ストレスを与え、PAM クロロフィル蛍光測定法により光化学系 II (PSII) 活性の指標である Fv/Fm を測定した。その結果、暗所下で Fv/Fm が低下した。

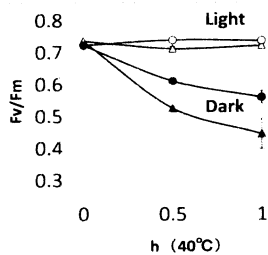


Fig. 1 PSII 活性指標である Fv/Fm の測定 ○●: アラビドプシス, △▲: コムギ

暗所における光化学系の高温障害

ウェスタンブロット (WB) 解析の結果、暗所下 40°C、30 分処理 (D40°C) のコムギ、アラビドプシスで PSII コアの D1 タンパク質の分解が確認されたことから、D1 の分解が PSII 活性を低下させると考えられた。コムギ、アラビドプシスを用いてサイクリック電子伝達 (CEF) 経路の活性を測定したところ、25°C に比べ、40°C における活性が増加した。さらに、CEF 経路を形成する NAD(P)H 脱水素酵素 (NDH) アラビドプシス欠損変異株 (*ndh0*) 及びフェレドキシン酸化還元酵素 (LFNR) 欠損変異株 (*lfnr1*) の PSII が野生株に比べて高温耐性を示した。これらの結果から、40°C における PSII への障害は、CEF を介したチラコイド膜への電子の流入によるものと考えられた。

光照射下での光化学系高温障害回避メカニズム

光照射下 40°C、30 分間処理 (L40°C) したコムギの時間分解蛍光スペクトル (TRFS) を測定したところ、コントロールと比較して、光化学系 I (PSI) へのエネルギー分配が増加した。

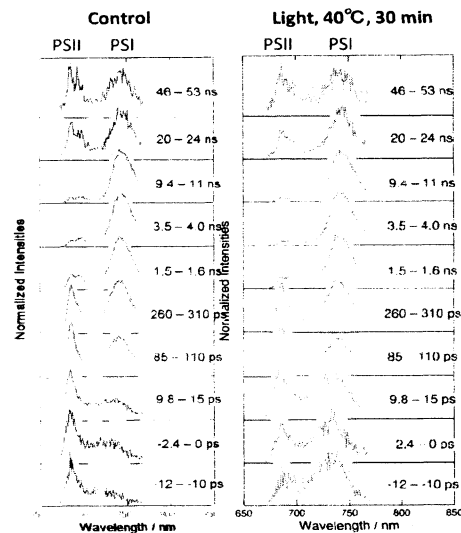
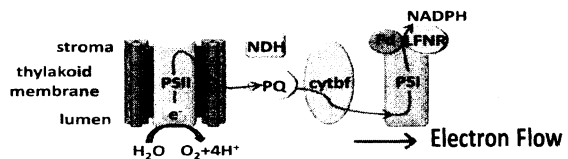


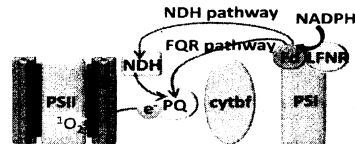
Fig. 2 TRFS によるエネルギー移動解析

PSII 超複合体を分離し、WB 解析を行った結果から、L40°C 処理コムギにおいて、ステート遷移により 4 種の LHCII (Lhcb1, Lhcb2, CP29, CP26) がリン酸化され、PSI へ移動したことを確認した。移動した LHCII が PSI 周りの CEF 経路を活性化させることで PSII への電子の逆流を防ぎ、高温障害を回避すると考えている。

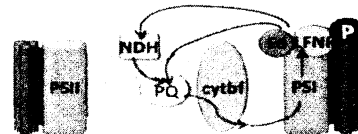
- ・ リニア電子伝達経路 (通常の電子伝達)



- ・ 暗所における高温障害



- ・ 光照射下における高温障害回避メカニズム



†Tel: 078-803-5886, Fax: 078-803-5886

e-mail: yamauchi@kobe-u.ac.jp

【目的】β-アミラーゼは、デンプンの非還元末端からマルトースを生成する加水分解酵素である。近年、プラスチド型β-アミラーゼが、シロイヌナズナのデンプン分解に関与することが証明された。一方、幼植物や、成熟植物の光合成器官及び貯蔵器官には、しばしば、高いβ-アミラーゼ活性が検出される。こうしたβ-アミラーゼは、プラスチド外に存在することから、非プラスチド型β-アミラーゼと呼ばれ、植物体内でのデンプン分解に直接関与しないと考えられており、機能不明とされている。最近、われわれは、ハツカダイコンの胚軸が肥大する際に、非プラスチド型β-アミラーゼRsBAMY1の発現が高まることを見出した。この肥大過程では、新鮮重量の急増に伴って、胚軸あたりの少単糖含量が増加する。しかし、それまで蓄積していたデンプン量は不変か漸増するにとどまる。そこでわれわれは、ハツカダイコンにおけるデンプン蓄積から少単糖蓄積への代謝シフトに、非プラスチド型β-アミラーゼが関与するのではないかと推察している。本研究では、ハツカダイコンにおけるRsBAMY1の役割を解明するため、RsBAMY1の誘導条件を調査するとともに、RsBAMY1を過剰発現させたシロイヌナズナを用いて、デンプン及び少単糖の含量と植物体の成長についても解析をおこなった。

【結果と考察】RsBAMY1の発現は、ハツカダイコンの胚軸肥大に伴って高まることは分かっていたが、その誘導要因は明らかにしていなかった。これまでに、いくつかの植物種において、糖により誘導される非プラスチド型β-アミラーゼが報告されている。そこで、ハツカダイコンの幼胚軸にスクロース(0-200 mM)を与え、RsBAMY1タンパク質の発現をイムノブロットにより調査した。すると、未処理の胚軸ではわずかにしか検出されなかったRsBAMY1は、スクロース処理後、経時的かつ濃度依存的に蓄積することがわかった。一方、ソルビトールやマンニトール処理によっては誘導されなかった。この結果、ハツカダイコン胚軸におけるRsBAMY1発現の増加には、スクロースが必要であることが示唆された。

次に、高いRsBAMY1活性を有する植物を得るため、カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターでRsBAMY1を発現させ、β-アミラーゼ活性を100倍以上に高めたシロイヌナズナ変異株を複数ライン作出した。変異体を3週齢まで栽培したところ、野生株に比べ、ロゼット葉の新鮮重量は約1.2倍に増加した。また、変異体ではロゼット葉面積の拡大がみられた。一方、新鮮重量当たりのデンプン含量は約8割に減少し、少単糖含量はほぼ不変であった。つまり、RsBAMY1は、シロイヌナズナのロゼットの新鮮重量を増加させ、個体あたりのデンプン含量をほぼ一定に保ちつつ、少単糖量を増加させた。こうした成長および代謝の変化は、ハツカダイコンの肥大時にみられる変化と類似している。

以上の結果、ハツカダイコンの胚軸では、スクロースによって誘導されたRsBAMY1が、何らかのメカニズムによって代謝シフトを誘発し、肥大を促進していると考えられる。このメカニズムを研究することにより、非プラスチド型β-アミラーゼの機能が解明できると考えられる。

連絡先：Tel：054-238-5134、メール：amhara@ipc.shizuoka.ac.jp

液胞膜 H⁺-ピロホスファターゼの可視化と液胞動態の解析

(名大院農) ○瀬上紹嗣, 牧野沙知, 前島正義

2Fp3

【緒言】

植物の液胞を酸性化するプロトンポンプ H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) は、核酸・タンパク質・セルロースなどの高分子合成反応で生成するピロリン酸 (PPi) を基質とし、ATP を基質とする V-ATPase と協調的あるいは協働的な働きをしていると考えられる。一方、細胞免疫化学的手法により細胞膜への局在を主張するグループもある。本研究では、モデル植物シロイヌナズナの H⁺-PPase (VHP1: At1g15690) に対し機能を有した形での GFP 融合タンパクを構築し own promoter 下で植物に発現させてその組織・細胞内局在や環境に対する応答を可視化して、VHP1 の蓄積量と液胞動態の解析をすることを目的とした。

【実験方法】

VHP1 は N 末端、C 末端共に液胞内腔側に配向すると予想され、蛍光タンパクの末端への融合が不利であると推定した。末端に sGFP, EGFP を融合したコンストラクトに加え、細胞質側の最も配列保存性の低い「a ループ」に sGFP を挿入した VHP1-A-sGFP を設計し、それぞれシロイヌナズナに形質転換させた。

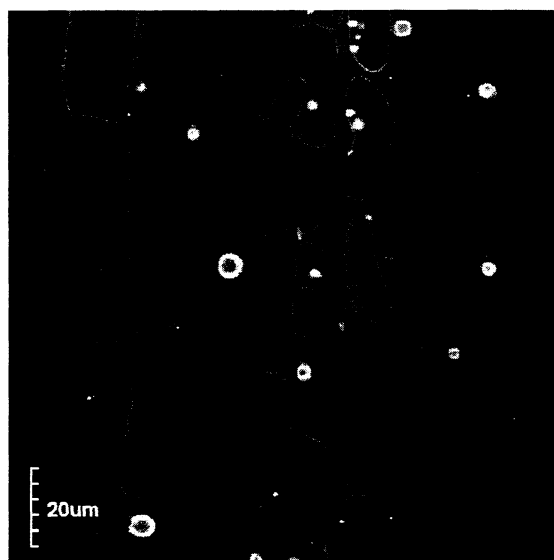


図1 根における VHP1-A-sGFP の蛍光

【結果と考察】

VHP1 の末端に sGFP, ECFP を融合したコンストラクトは蛍光を示さず、VHP1 の立体構造上、末端への結合は不適當であることが証明された。一方、VHP1-A-sGFP は強い蛍光を示し、さらに PPi 加水分解活性・H⁺ポンプ活性を有し、ショ糖密度勾配遠心法により内在性の VHP1 と同一の密度分布を示したことから、本来の立体構造を保ち、局在部位の変化は起こしていないと考えられる。

共焦点レーザー顕微鏡の観察により、VHP1-A-sGFP は液胞膜に局在すると共に、液胞膜の新規サブドメインであり機能未知の二重膜構造であるバルブ構造に局在することが分かった (図1)。バルブ構造は、必ず液胞膜か transvacuolar strand に接しており、接触面は穴として観察された。そのため液胞膜の流動により動き、ときおり形を激しく変化させる様子も観察された。

VHP1-A-sGFP はほぼすべての組織で観察されたが、基質である PPi が多く生成すると考えられる分裂・伸長活性が高い細胞において多く存在し、またそのような細胞ではバルブ構造が多く観察された。また、VHP1-A-sGFP の発現量の高いラインではバルブ構造の数が増加していたことから、おそらく余剰の液胞膜タンパク質を蓄積する構造であると予想している。

【結言】

VHP1-A-sGFP の作成により、VHP1 の可視化に成功し、液胞膜と共にバルブ構造へも局在することを明らかにした。今後は環境応答に対する VHP1 や液胞動態の変化を追っていきたい。

Tel, Fax: 052-789-4096

e-mail: segami.shoji@f.mbox.nagoya-u.ac.jp

【緒言】

近年、遺伝子導入による植物の改良や利用が盛んに研究されている。有用組換え植物作出の鍵は、どのような遺伝子を導入するかという点に加え、導入した遺伝子が機能を発揮するタンパク質として十分に発現するかという点にある。しかし、残念ながら導入した遺伝子の発現レベルは低いのが現状である。そのため、転写レベルに加えて、翻訳レベルで発現効率を向上させる翻訳エンハンサーの取得・活用が強く望まれている。今回、農業分野で重要な単子葉において、効率的に機能する翻訳エンハンサーの探索するため、ゲノムスケールでポリソーム/マイクロアレイ解析を行った。

【実験方法】

ポリソーム解析

イネの培養細胞のRNA粗抽出液をショ糖密度勾配液上に重層し、超遠心を行い、リボソームの結合数に応じてmRNAの分画を行った。254 nmの吸光度を記録し、リボソームが2個以上結合しているmRNAが存在する画分をポリソーム画分とし、また、ポリソーム画分を3分割し、最も重い画分をラージポリソーム画分とした。この画分に存在するmRNAは効率的に翻訳されていると考えられる。

マイクロアレイ解析

それぞれの画分を、赤と緑の蛍光色素でラベルし、Agilent oligoarrayを用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供し、ポリソーム画分に対するラージポリソーム画分の存在比率(LPR=Large polysome[Cy3] / polysome[Cy5])を各種mRNAについて求めた。また、LPRとORFの長さとの関連性についても調べた。

【結果と考察】

ポリソーム/マイクロアレイ解析の結果を図1に示す。各mRNAのLPR値は幅広い値を示したが、中には1近く、すなわちほぼすべてがラージポリソーム画分にあるmRNAも存在した。これらmRNAはより多くのリボソームと結合していると考えられることから、効率良く翻訳されているmRNAと思われる。一方でリボソーム-RNA複合体の重さはmRNAの長さにも依存すると考えられる。そこでLPRとORFの長さとの関連性を調べると、概ね相関した。(図2)

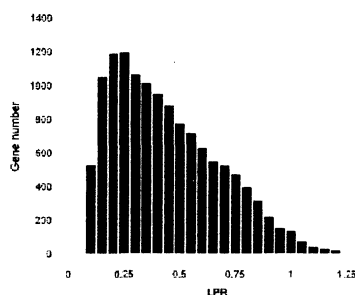


図1. ポリソームマイクロアレイ解析結果

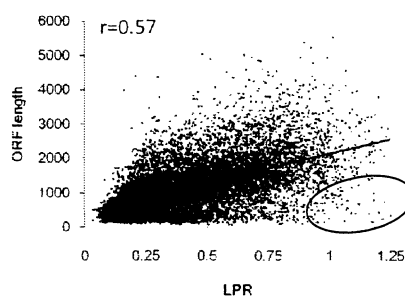


図2. LPRとORF lengthとの相関

【結言】

LPR値が高いものの中で、真に効率良く翻訳されているmRNAはより短いmRNAと考えられる。そこで今回の結果を踏まえ、今後図2中の円で囲ったmRNAを候補として単子葉型新規翻訳エンハンサーを取得する予定である。

†Tel: 0743-72-5461, Fax: 0743-72-5469

e-mail: kou@bs.naist.jp

【緒言】

近年、植物培養細胞を用いて有用物質を生産させる試みが盛んに行われているが、商業化された例はほとんどない。その主な原因の一つに導入した外来遺伝子の発現量が低いことが挙げられる。植物の生育環境には温度、塩、浸透圧などの環境ストレスが存在し、これら環境ストレスに曝された細胞では、翻訳過程が著しく抑制される。植物培養細胞においても培養経過に従って栄養飢餓や酸素欠乏といったストレスが生じることが予想され、定常期に達した細胞では著しい翻訳抑制が起きていると思われる。このことは、導入した有用遺伝子も翻訳レベルで抑制されることを意味する。そこで本研究では、植物培養細胞定常期における翻訳状態の網羅的解析を行い、定常期においても翻訳が抑制されない mRNA の 5'UTR を利用した、植物培養細胞における導入遺伝子高効率発現システムの開発を目指した。

【実験方法】

シヨ糖密度勾配遠心法を用いたポリソーム解析

回収したシロイヌナズナ培養細胞 T87 から調製した RNA 粗抽出液をシヨ糖密度勾配液上に重層し、超遠心を行った。超遠心後、シヨ糖密度勾配液の下部から 254 nm の吸光度を記録した。

ポリソーム/マイクロアレイ解析

培養 1 日目及び 8 日目の細胞から調製した RNA 粗抽出液を重層したシヨ糖密度勾配液を超遠心後、8 つの画分に分画（底側が 1 番）し、ポリソーム画分（1-3 番目）とトータル画分（1-8 番目）から、それぞれ polysome RNA、total RNA を回収後、Agilent oligoarray を用いた競合ハイブリダイゼーション実験に供した。その後、ポリソーム画分に存在する mRNA の比率である Polysome ratio ($PR = \log_{10} [\text{Polysome}/\text{Total}]$) 及

び培養 1 日目から 8 日目への移行に伴う個々の mRNA 種の Polysome ratio の変化である ΔPR ($\Delta PR = PR_{8d} - PR_{1d}$) 値を算出した。

ポリソーム/定量 RT-PCR

培養 1 日目及び 8 日目の細胞から調製した RNA 粗抽出液を重層したシヨ糖密度勾配液を超遠心後、8 つの画分に分画し、それぞれから RNA を精製し、逆転写反応後、PCR 反応を行った。

【結果と考察】

- ① 各培養日数（0-9 日目）の細胞を用いたポリソーム解析の結果、培養経過に従って翻訳過程が抑制されていた。
- ② ポリソーム/マイクロアレイ解析の結果、定常期においても Polysome ratio が変化しない、要するに活発な翻訳状態を維持している mRNA がわずかながら存在していた。
- ③ ②の結果から、翻訳が維持された mRNA の 5'UTR を連結した *GUS* 遺伝子を導入した安定形質転換培養細胞を用いたポリソーム/定量 RT-PCR の結果、*GUS* 遺伝子は翻訳抑制されることなく、活発な翻訳状態を維持した。

【結言】

定常期においても翻訳が維持される mRNA の 5'UTR を導入遺伝子に連結することで、定常期においても活発な翻訳を維持できる発現システムを開発した。この発現システムは植物培養細胞を用いた有用物質生産を行う上で、培養経過による翻訳抑制を避け、高生産性を可能にする有用なツールとなることが期待できる。

[†]Tel:0743-72-5461, Fax:0743-72-5469
e-mail:kou@bs.naist.jp

2Fp6

アブシジン酸受容体アンタゴニスト AS_n

(静大院農*, University of California, Riverside**, 京大院農***, 静大農****)○武藤拓也*, 岡本昌憲**, Sean Cutler**, 平井伸博***, 轟泰司****

アブシジン酸(ABA)は、種子休眠や気孔閉鎖など、植物の環境ストレス耐性誘導において重要な役割を果たす植物ホルモンである。ABAのシグナル伝達機構に関する化学生物学的研究において、ABA受容体アゴニストおよびアンタゴニストは有用なケミカルツールとして機能する。これまでにABA受容体アゴニストは数多く報告されているが、ABA受容体アンタゴニストについての報告例はない。そこで本研究では、ABA受容体アンタゴニストに注目し、その合理的な創出を試みたので報告する。シロイヌナズナのABA受容体14分子種(PYR1, PYL1-13)のうち、PYR1およびPYL1-4はABA依存的にプロテインホスファターゼ2C(PP2C)に結合してその酵素活性を阻害する。一方、PYL5-13はABA非依存下でもPP2Cに結合してその酵素活性を阻害する。最近PYR/PYLs-ABA-PP2C複合体結晶構造が報告され、植物細胞におけるABA認識機構とシグナル伝達機構の構造的基盤が明らかになった。ABA受容体への高い親和性と受容体-PP2C結合阻害活性とを同時に実現するデザイン戦略は、ABA受容体アンタゴニストを創出するための合理的な手法であると考えられる。そこで本研究では、受容体との高い親和性が保証された天然リガンドであるABAをリード化合物とし、ABA構造修飾によってABA受容体アンタゴニストの創出が可能であるかをABA構造活性相関と受容体結晶構造の知見に基づいて検討した。

ABAは、疎水的なトリメチルシクロヘキセノン環に親水的なジエンカルボン酸側鎖が結合した分子構造を持つ。ABAの側鎖カルボン酸は受容体ポケット奥のリジン側鎖と塩橋を形成して固定される。したがって、側鎖の修飾は受容体との親和性を著しく損ねると考えられ、構造活性相関もこれを強く支持している。一方、環部エノンは受

容体ポケットの入り口付近に位置しており、疎水性のトンネルによって受容体表面のPP2C結合部位と通じている。環部エノン(2'-4'位)に長い疎水基をもつABAアナログは、受容体との複合体形成時に、疎水基がトンネルを通過して外に突き出してPP2Cとの結合を妨げるため、ABA受容体アンタゴニストとして機能すると予想される。

この戦略に基づいて、ABAの3'位に硫黄を介して炭素数 n 個の直鎖アルキルを導入したAS_n($n=2-10, 12, 14$)をデザイン・合成した。これらAS_nを生物試験に供したところ、AS5-10はABAによる発芽阻害作用を抑制しアンタゴニストとして機能したのに対し、AS2とAS3は単独で発芽阻害作用を示しアゴニストとして機能した。一方、AS4はアゴニスト活性とアンタゴニスト活性の両方を有していた。さらにAS_nのアンタゴニスト活性を確認するため、ABA応答性トランスジェニック植物(MAPKKK18)を用いたABA応答遺伝子の発現およびPP2C活性試験によるPYR/PYLs-PP2Cs相互作用に対するAS_nの影響を評価した。いずれも予備的な結果ではあるが、AS6はABAとの共処理によりABA応答遺伝子発現とPP2C活性阻害を抑制した(アンタゴニストとして機能)。一方、AS2は単独でABA応答遺伝子発現を誘導し、PP2C活性を阻害した(アゴニストとして機能)。

*Tel: 054-238-4871, Fax: 054-238-4871

e-mail: happydesuka987654321box@yahoo.co.jp

【緒言】

ダイオキシン類、すなわち、ダイオキシン、ダイベンゾフランおよびコプラナーポリ塩化ビフェニル (コプラナー-PCB) には芳香環に結合する塩素の数と位置の異なる多くの同族体が存在する。そのうち、最も毒性の高い 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (2,3,7,8-TCDD) の毒性を 1 としたときの毒性等価係数 (TEF) が決まっているのは 29 種の同族体である。また、ダイオキシン類の毒性には種差が認められる。一方、ある種のダイオキシン類は生体内においてアрилハイドロカーボン受容体 (AhR) に特異的に結合してシトクロム P450 1A1 などの遺伝子発現を誘導するとともに毒性を発現する。また、ダイオキシン類の AhR への結合親和性と毒性の間には相関性があり、AhR を用いてダイオキシン類を測定する受容体アッセイ方法が開発されている。一方、PCB 同族体と共汚染している重金属による環境の複合汚染が問題となっている。そのため、それらの複合的な影響評価と汚染浄化が求められている。

そこで本研究では、哺乳類の中で 2,3,7,8-TCDD に対して最も感受性の高いモルモット AhR (gAhR) のリガンド結合領域、LexA の DNA 結合領域および VP16 の転写活性化領域からなる組換え型 mAhR と β -グルクロニダーゼ (GUS) レポーター遺伝子発現系¹⁾を導入した組換え体シロイヌナズナ²⁾を用いて、PCB 同族体のアッセイにおける重金属の影響について検討した。

【実験方法】

組換え型 gAhR/GUS レポーター遺伝子系導入シロイヌナズナ XgD2V11-6 系統を PCB 同族体 (PCB126 (TEF:0.1)、PCB169 (TEF:0.03)、PCB80 (TEF:0)) または重金属 (Fe、Cu、Zn、Cd、Pb) を

添加したムラシゲ・スクーグ培地で 2 週間栽培し、植物体の GUS 活性を測定した。

【結果と考察】

PCB126 (TEF:0.1) と PCB169 (TEF:0.03) のアッセイにおいては、PCB126 が最も高い GUS 誘導活性を示し、PCB169 はそれよりも低かったことから PCB 同族体の TEF 依存的な GUS 誘導活性が認められた。さらに、PCB126 と PCB169 の混合条件では相加的な GUS 活性の上昇が認められた。それに対して、PCB126 と PCB80 (TEF:0) のアッセイでは PCB80 による GUS 誘導活性は認められなかった。PCB126 添加培地における重金属の添加効果を検討したところ、Fe、Cu および Zn の添加では変化が認められなかったのに対し、Cd と Pb の添加で相加的な GUS 誘導活性の上昇が認められた。また、Cd と Pb による相加的作用は重金属の濃度依存的であった。

【結言】

煩雑な抽出・前処理操作を必要とする機器分析や動物細胞や抗体を用いる簡易測定方法と違い、組換え体植物の栽培により、抽出・前処理することなく、根系を介した受動拡散による取込みにより、誘導発現した GUS 活性により PCB 同族体をアッセイすることができた。また、重金属を含む環境共汚染物質の複合的な毒性影響を評価できる可能性が示された。

引用文献

- 1) S. Shimazu *et al.*, *J. Environ. Sci. Health B.*, **45**, 741-749 (2010).
- 2) S. Shimazu *et al.*, *J. Environ. Sci. Health B.*, **45**, 773-779 (2010).

[†]Tel: 078-803-5878, Fax: 078-803-5878

e-mail: sayuri.shimadzu@gmail.com

【はじめに】重金属汚染土壌を緑化するためには、重金属耐性植物が有効である。重金属土壌に生息するメタロファイトや、遺伝子組換えによって重金属耐性を向上させた植物は、有望な候補であるが、栽培や管理が難しいものが多い。栽培が容易な作物や緑化植物に対し、簡便に重金属耐性を付与する方法があれば有益である。以前、Ni 超集積植物には、金属結合アミノ酸の一種であるヒスチジン (His) を蓄積するものがあり、非集積植物へのヒスチジンの添加は、Ni 耐性を高めることが報告された。しかし、これらの研究は一部のアブラナ科植物を使って行われ、効果の普遍性を疑問視する見方もある。そこでわれわれは、タバコに His を与え、重金属耐性が向上するかを調査した。さらに、細胞内の His をペプチドとして蓄積した状態を作るため、シロイヌナズナの His 高含有ペプチド (AtHIRD11=At1g54410、His 含有率 13.3%) を発現させたタバコの重金属耐性を調査した。

【材料と方法】**金属結合物質の投与試験**: 播種後 12 日目のタバコ (キサンチ品種) の幼植物を、金属結合剤 (His、イミダゾール、システイン、各 500 μM) と金属 (NiCl_2 :150 μM 、 ZnCl_2 :1500 μM 、 CuCl_2 :100 μM 、 CdCl_2 :200 μM) を加えた MS プレートに移植し、30 日間培養した。別に、播種後 12 日目の植物を、あらかじめ金属結合剤を含む培地に 2 日間前培養し、金属のみを含む培地に 32 日間培養した試験も行った。収穫後、新鮮重量を測定した。また、タバコの葉切片を、金属結合剤と金属 (NiCl_2 :150 μM 、 ZnCl_2 :1500 μM 、 CuCl_2 :100 μM 、 CdCl_2 :200 μM) 及び植物ホルモン (NAA:0.5 μM 、BA:5 μM) を含む MS プレートに移植し、30 日間初代カルスを誘導した。カルス形成後、新鮮重量を測定した。

AtHIRD11 発現タバコの金属耐性試験: カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターで AtHIRD11 を恒常的に発現させたタバコ (T1 世代) の幼植物を、金属 (NiCl_2 :150 μM 、 ZnCl_2 :1500 μM 、 CuCl_2 :100 μM 、 CdCl_2 :200 μM) を加えた MS プレートに移植し、36 日間培養した。

【結果と考察】まず、本実験系におけるタバコの金属耐性を調査するため、異なる金属濃度におけるタバコ幼植物の成長を計測した。その結果、それぞれ、 NiCl_2 :150 μM 、 ZnCl_2 :1500 μM 、 CuCl_2 :100 μM の場合に、タバコの成長に抑制傾向がみられた。なお、 CdCl_2 については、成長阻害はないが、白化が見られた。以後、タバコ成長抑制効果が明瞭な CuCl_2 について調査した。His の場合、 CuCl_2 と His を同時に投与しても、あらかじめ His を投与したのちに CuCl_2 培地で培養しても、His 無添加条件に比べ、 CuCl_2 による成長阻害が緩和される傾向があった。 CuCl_2 と His の同時投与の効果は、カルスでも確認された。さらに、AtHIRD11 発現タバコは、 NiCl_2 、 ZnCl_2 、 CuCl_2 、 CdCl_2 の金属処理において、ベクターコントロール株に比べて成長が改善された。以上の結果、タバコにおいて、His の投与、及び His 高含有ペプチドの発現は、重金属耐性を向上させることが示された。His の投与は、様々な植物種の金属耐性を向上させる可能性がある。

連絡先: Tel: 054-238-5134、メール: amhara@ipc.shizuoka.ac.jp

日本農芸化学会関西支部賛助会員 一覧

支部活動には、以下団体からのご援助をいただきました。関係者一同より御礼申し上げます。

アース製薬（株）開発部	田辺三菱製薬（株）研究本部
アサヒビール（株）吹田工場	タマノイ酢（株）中央研究所
味の素（株）アミノサイエンス研究所 （株）東農園	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所 長瀬産業（株）研究開発センター
植田製油（株）	ナカライテスク（株）北営業所
江崎グリコ（株）中央研究所	日清食品（株）中央研究所
大関（株）総合研究所 （株）カネカ	（株）日本医化器械製作所 研究所 日本ケミカルリサーチ（株）研究所
菊正宗酒造（株）開発本部	日本盛（株）研究室
黄桜酒造（株）	日本新薬（株）食品開発研究所
月桂冠（株）総合研究所	日本ヘルス工業（株）
三栄源エフ・エフ・アイ（株）	白鶴酒造（株）研究開発室
三井化学アグロ（株）農業科学研究所	ヒガシマル醤油（株）研究所
サントリー（株）研究センター （株）食品バイオ研究センター 研究開発 本部	（株）ファーマフーズ 開発部 不二製油（株）研究所
住友化学（株）農業化学品研究所 （株）第一化成 研究所	松谷化学工業（株） 明治製菓（株）食料健康総合研究所
ダイセル化学工業（株）総合研究所	ユニチカ（株）中央研究所
大日本除虫菊（株）中央研究所	理研化学工業（株）
武田薬品工業（株）医薬研究本部	和研薬（株）営業推進部 和光純薬工業（株）試薬営業本部

50音順 敬称略

日本農芸化学会中部支部賛助会員 一覧

支部活動には、以下団体からのご援助をいただきました。関係者一同より御礼申し上げます。

アサヒビール（株）名古屋工場	太陽化学（株）研究所
旭松食品（株）食品研究所	大和製罐（株）清水研究所
アステラス製薬（株）CSR部	竹本油脂（株）情報調査室
天野エンザイム（株）岐阜研究所	辻製油（株）
イチビキ（株）研究開発部	デザイナーフーズ（株）
（株）伊藤園 中央研究所	東海漬物（株）漬物機能研究所
伊藤忠製糖（株）	東海物産（株）食品研究所
伊那食品工業（株）	（株）東洋発酵
科研製薬（株）生産技術研究所	東洋紡績（株）敦賀バイオ研究所
加藤化学（株）	中日本冰糖（株）
カネハツ食品（株）技術部	名古屋製酪（株）
（株）岐阜セラック製造所	（株）ニッポンジーン
麒麟ビール（株）名古屋工場	日本食品化工（株）研究所
金印（株）	フジ日本精糖（株）
サンエイ糖化（株）	物産フードサイエンス（株）
サンジルシ醸造（株）	（株）ポッカコーポレーション
（株）三和化学研究所 三重研究所	三井農林（株）食品総合研究所
（株）J-オイルミルズ	（株）ミツカングループ本社
敷島スターチ（株）	名糖産業（株）
敷島製パン（株）研究部	盛田（株）小鈴谷工場
（株）真誠 企画開発部	ヤマモリ（株）
新日本化学工業（株）	養命酒製造（株）中央研究所

50音順 敬称略