

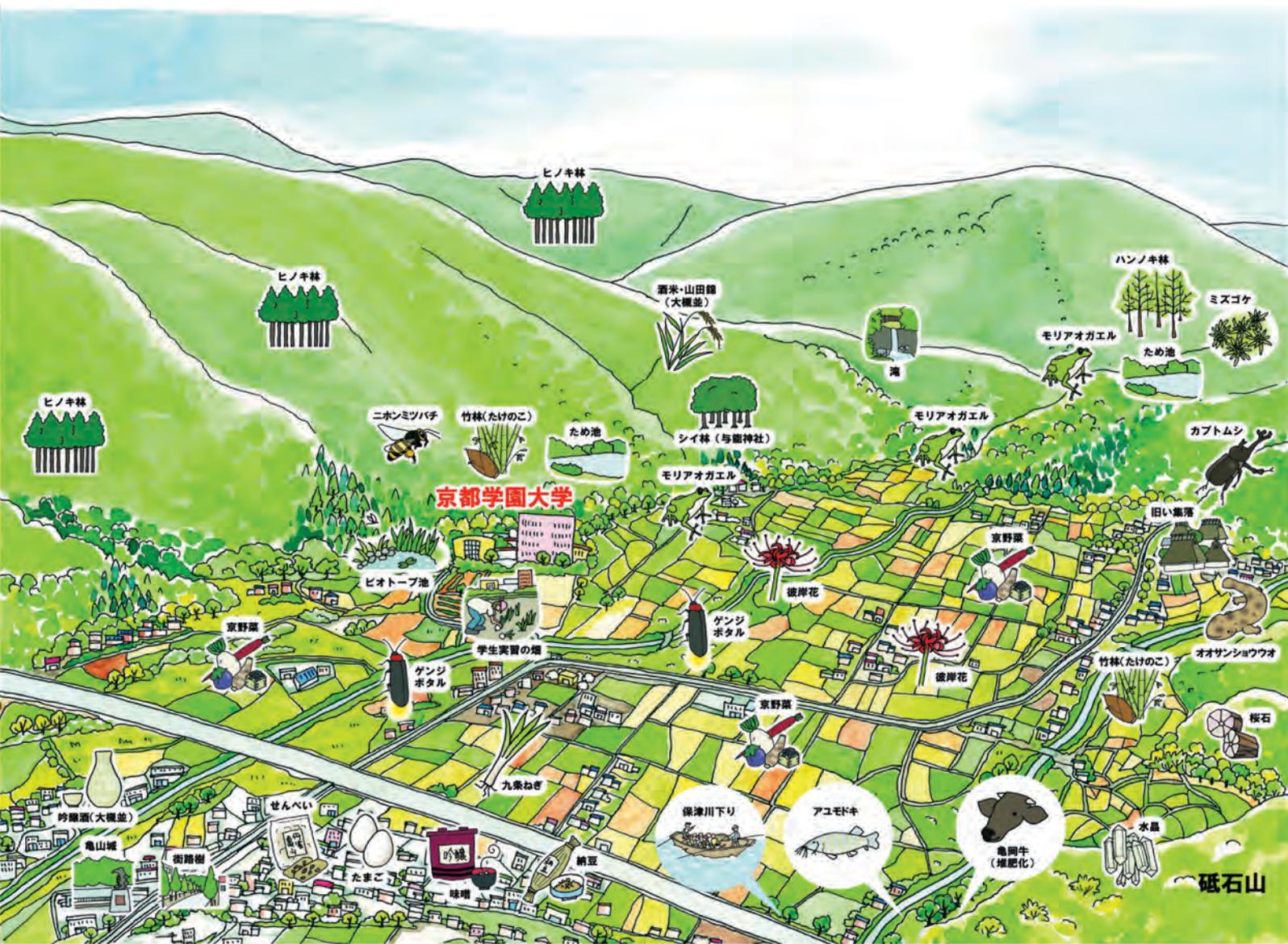
2012年度

日本農芸化学会 関西支部大会

(第476回講演会)

講演要旨集

平成24年 9月 29日 (土)
京都学園大学 バイオ環境館



2012年度 日本農芸化学会 関西支部大会 (第476回講演会)

主催：日本農芸化学会関西支部 共催：京都学園大学
後援：京都府南丹広域振興局, 亀岡市, 南丹市

2012年 9月29日 (土)
於 京都学園大学 バイオ環境学部

一般講演	(10:00-12:15)	会場: バイオ環境館 2F
支部参与会	(12:15-13:15)	会場: バイオ環境館 6F
一般講演	(13:20-14:20)	会場: バイオ環境館 2F
特別講演 (公開講演)	(14:30-16:45)	会場: バイオ環境館 4F

1. 「さとうきび害虫の性フェロモンの解明と防除技術開発

ーリュウキュウクロコガネとケブカアカチャコガネー」

京都学園大学バイオ環境学部 若村定男教授

2. 【平成 24 年度日本農芸化学会賞受賞講演】

「生物のストレス解消システムとその破綻による疾患」

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科 河野憲二教授

3. 【平成 24 年度学士院賞受賞講演】

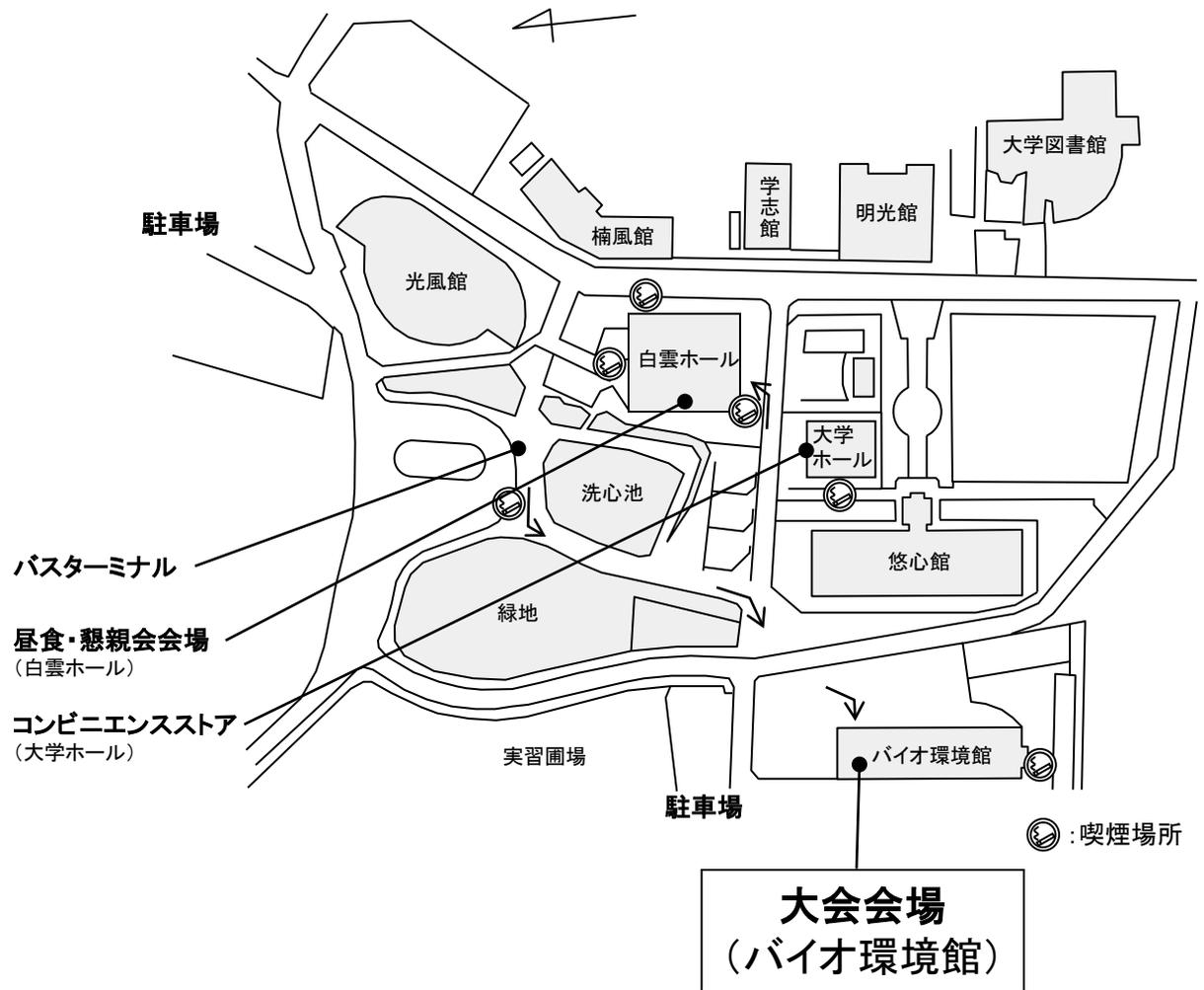
「植物の薬用成分を微生物に作らせる」

京都大学大学院生命科学研究科 佐藤文彦教授

懇親会	(17:00-19:00)	会場: 白雲ホール 2F
-----	---------------	--------------

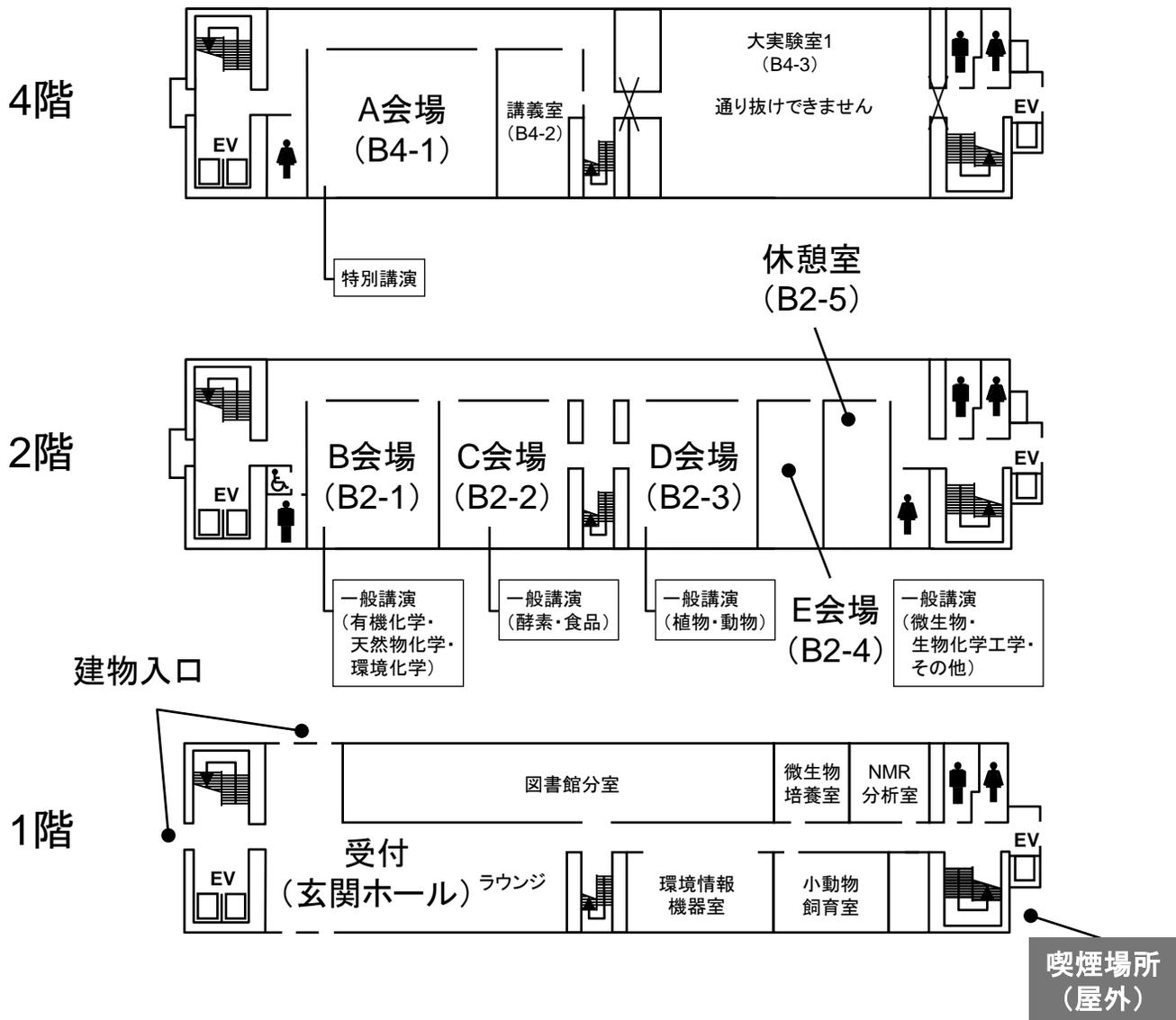
会場案内図

構内見取り図



- 受付 大会参加者の方は、最初にバイオ環境館1階玄関ホールにお越し下さい。
参加費 会員：3,000円、学生：無料
懇親会費 会員：5,000円、学生：1,000円
- 食事 白雲ホール1,2階の食堂が営業しています。(営業時間：11:00-14:00)
- 休憩 バイオ環境館2階の休憩室にコーヒーなどを用意してあります。
飲み物の自動販売機はバイオ環境館1階ラウンジにあります。
大学ホール1階にコンビニエンスストア (ファミリーマート) があります。(営業時間：8:30-17:00)
- お手洗い 右ページの案内図をご覧ください。3階北 (男子) 南 (男女) も使用できます。
5,6階の北側にはありません。
- 喫煙 バイオ環境館の北側 (屋外) などに喫煙スペースがあります。指定場所以外での喫煙はご遠慮下さい。

バイオ環境館（大会会場）



○バス JR亀岡駅（240円，10分）との間で，一部増便した路線バスを運行しています。
阪急桂駅東口經由JR桂川駅（810円，35分）との直通バスもあります。

JR亀岡駅→京都学園大学(8時以降) 京都学園大学→JR亀岡駅(午後)

08	13	31	44	59
09	19	32	53	
10	09	32	53	
11	08	32	53	
12	08	32	53	
13	08	32	53	
14	08	32	53	
15	08	32	53	
16	08	32	53	
17	09	34	50	
18	09	34		
19	09	34		
20		38		

12	12	32	52
13	12	32	52
14	12	32	52
15	12	32	52
16	12	32	52
17	10	26	52
18	10		42
19	12	[20]	30 [40]
20	12		
21	00		

京都学園大学⇔JR桂川駅(土曜A)
(出発時刻)

8:34
10:18
11:15
12:33
13:20
15:05
16:50

[]は支部大会のための増発便

- 連絡先 大会期間中の電話連絡先は0771-29-3421（大会本部）です。館内に公衆電話はありません。
- その他 その他，問題がありましたら，受付ないし大会本部のスタッフまでご連絡下さい。

参加者へのご案内とお願い

1. 参加章

ご氏名，ご所属を記入の上，会場内では見やすい場所にご着用ください。

2. 懇親会

17時00分より白雲ホール2Fで行います。奮ってご参加ください。

3. 喫煙について

館内は禁煙です。バイオ環境館南側屋外に喫煙所があります。

4. 携帯電話について

講演の妨げとなりますので，会場内ではマナーモードに設定していただくか，電源をお切りください。また，会場近くの廊下での通話をご遠慮ください。

座長・発表者へのお願い

座長は会場に来られましたら、入り口にある「座長一覧」にチェックをご記入ください。

一般講演の講演時間は1題14分（発表11分，討論3分，交替1分）です。9分で1鈴，11分で2鈴，14分で3鈴とします。活発な討論とともに，プログラムの進行にご協力ください。

本大会の一般講演は，講義室の液晶プロジェクターにより行います。パソコンは各自でお持ちいただき，コネクターケーブルにご自分で接続ください。

2台のパソコンを切り替えられるようになっていますので，前発表者の発表中に接続し，切り替えて発表を始めて頂くことが可能です。

ケーブルはVGA 15ピンです。Apple社製のパソコンを使う方は，アダプタをご用意下さい。

予鈴と本鈴

9分:	1鈴（予鈴）
11分:	2鈴（発表終了）
14分:	3鈴（討論終了）
1分で発表者の交替	



パソコン接続ケーブル形状

大会プログラム

特別講演（公開講演）（A会場）

14:30－15:15 SP01 さとうきび害虫の性フェロモンの解明と防除技術開発
ーリュウキュウクロコガネとケブカアカチャコガネー
京都学園大学バイオ環境学部
若村 定男 教授

座長 秋野 順治
(京都工芸繊維大学
生物資源フィールド科学教育研究センター)

【平成 24 年度日本農芸化学会賞受賞講演】

15:15－16:00 SP02 生物のストレス解消システムとその破綻による疾患
奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
河野 憲二 教授

座長 高瀬 尚文
(京都学園大学 バイオ環境学部)

【平成 24 年度学士院賞受賞講演】

16:00－16:45 SP03 植物の薬用成分を微生物に作らせる
京都大学大学院生命科学研究科
佐藤 文彦 教授

座長 深見 治一
(京都学園大学 バイオ環境学部)

B 会場（有機化学・天然物化学・環境化学）

午前の部（有機化学）

- 10:00 B01 *Penicillium griseofulvum* OK-17 株 が生産する cyclopiamine 類について
○三木沙織, 甲斐建次, 秋山康紀, 林 英雄
(阪府大院・生命環境)
- 10:15 B02 帰化雑草ヒキヨモギ属の滲出物中の成分と機能
○束村聡太, 森本正則, 松田一彦
(近畿大院農・応生化)
- 10:30 B03 ヤマトシロアリによる対蟻化学防御
○飯田真弘, Nguyen Trong Tuan, 秋野順治
(京工繊大・化学生態)
- 10:45 B04 トゲナシシロトビムシが分泌するアルカロイドの同定とその生物活性
○和田佑太, 高田侑介, 桑原保正, 清水伸泰
(京都学園大・バイオ環境)
- 11:00 B05 植物由来ジテルペンによるハンノキハムシ幼虫の化学防御
○奥田宣昭, 清水伸泰
(京都学園大院・バイオ環境)
- 11:15 B06 クチナシにおけるイリドイド *cerbinal* の生合成経路
○内藤裕彬, 網干貴子, 吉永直子, 西田律夫, 森 直樹
(京大院農・応用生命)
- 11:30 B07 Bis[4-oxo-6,7-dihydroxy (hexahydronaphtyl)]ethylene 誘導体の合成とブラシノライド
活性検定系を用いた活性評価
○瀧本征佑, 中川好秋, 宮川 恒
(京大院農・応用生命)
- 11:45 B08 低級脂肪酸アルキルエステルの保持指標による回帰分析およびそれを用いたハバネロ
唐辛子香氣成分の同定
○深見治一, 尼岡大輝, 尾張嘉平, 矢野善久
(京都学園大・バイオ環境)
- 12:00 B09 固相合成とフェージディスプレイ法を組み合わせた PFOS 結合タンパク質の探索
宮野友香¹, 九十田 千子¹, 崎元一平², 武内 亮¹, 志村聡美¹, 高橋徳行¹, 草柳友恵¹,
高草木 洋一¹, 岡戸真実¹, 松本勇記¹, 高草木 香織¹, 竹内倫文¹, 紙透伸治¹,
中崎敦夫³, 太田慶祐², 三浦雅彦², ○倉持幸司⁴, 水品善之⁵, 小林 進³, 菅原 二三男¹,
坂口謙吾¹
(¹東京理大理工, ²東京医歯大院口腔放射腫瘍, ³東京理大薬, ⁴京府大院生命環境,
⁵神戸学院大栄養)

午後の部（有機化学・天然物化学・環境化学）

- 13:20 B10 Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの 10 位メチル体の合成と細胞増殖抑制活性
○菊森将之¹, 柳田 亮^{1,2}, 徳田春邦³, 鈴木信孝³, 永井宏史⁴, 末永聖武⁵, 入江一浩¹
(¹京大院農, ²香川大農, ³金沢大医, ⁴東京海洋大, ⁵慶応大理工)
- 13:35 B11 カップリング反応を利用したレスベラトロールならびに類縁体の短段階合成
○諫山 篤, 切畑光統, 谷森紳治
(阪府大院生命環境)
- 13:50 B12 3-メチルコラントレンによるアリアル炭化水素受容体を介した多剤耐性遺伝子 *mdr1b* の
転写調節
○野村文乃, 木根原 匡希, 福田 伊津子, 芦田 均
(神戸大院農)
- 14:05 B13 アナモックス反応を利用したアンモニア含有廃水の簡易な新規処理方法の開発
○平岡弘成, 井原法人, 松本 怜, 金川貴博
(京都学園大・バイオ環境)

C 会場 (酵素・食品)

午前の部 (酵素・食品)

- 10:00 C01 マルタニシ (*Bellamyia chinensis laeta*) 由来の CMCase の精製・性質と遺伝子クローニング
○川崎恵子¹, 上田光宏¹, 丸山智史¹, 中澤昌美¹, 宮武和孝¹, 坂口 実², 井上國世³
(¹ 阪府大院・生環科, ² 大薬大・薬, ³ 京大院・食生科)
- 10:15 C02 *Thermotoga petrophila* K4 株由来ファミリーA DNA ポリメラーゼ変異型酵素 L329A の逆転写活性の解析
○保川 清¹, 小西 篤¹, 篠原まゆ¹, 長岡 英里子², 藤原伸介²
(¹ 京大院農・食生科 ² 関西学院大理工・生命)
- 10:30 C03 柔軟性に富む酵素 EstAC: ホモロジーモデリングに基づく基質特異性の解析
○村島 惇, 矢野克弥, 牧村美幸, 竹原宗範, 井上吉教, 熊谷 勉
(滋賀県大工)
- 10:45 C04 酵母カルボキシペプチダーゼ Y の V 形ヘリックスの固定化の検討
○牧野 舞¹, 佐原健彦², 森田直樹², 植野洋志¹
(¹ 奈良女大院・人間文化・共生自然科学, ² 産総研・生物プロセス研究部門)
- 11:00 C05 マトリプターゼ前駆体の酵素活性に対する LDL 受容体クラス A ドメインの役割解明
○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・食生科)
- 11:15 C06 *Burkholderia ambifaria* AMMD 由来 N 置換アミノ酸 B 位水酸化酵素の機能解析
○日比 慎¹, 笠原 拓也², 河嶋隆志², 横関健三¹, 清水 昌², 小川 順²
(¹ 京大院農・産業微生物, ² 京大院農・応用生命)
- 11:30 C07 ラッカーゼが触媒する反応を用いた不飽和脂肪酸のジカルボン酸への変換
○竹内道樹¹, 岸野重信^{1,2}, 日比 慎², 小川 順¹
(¹ 京大院農・応用生命, ² 京大院農・産業微生物)
- 11:45 C08 筋肉細胞におけるプロボリス抽出物の GLUT4 膜移行促進作用機構の解明
○上田 学, 芦田 均
(神戸大院農)
- 12:00 C09 ハナビラタケおよび脂質成分の免疫賦活作用の検討
○庄條愛子^{1,2}, 古郷加奈¹, 小林貴美子¹, 合田 (山本) 麗奈¹, 中 崇³, 藤原永年³, 北村進一², 水野浄子^{1,3}
(¹ 相愛大, ² 大阪府大, ³ 大阪市大)

午後の部 (食品)

- 13:20 C10 オカラおよびフスマ可溶化物の腸内菌叢改善効果
○今井 ももこ¹, 庄條愛子^{1,2}, 飯田聡史¹, 大串美沙¹, 原田直樹³, 山地亮一³, 乾 博⁴, 和田野 晃³, 中野長久^{3,4}, 吉澤 みな子⁵
(¹ 大阪府大・地域連携, ² 相愛大・人間発達, ³ 大阪府大院・生命環境, ⁴ 大阪女子短大, ⁵ 大手前栄養学院)
- 13:35 C11 メタボロミクスによる遺伝子組換えパレイシヨ代謝成分の網羅的解析
○岩城俊雄¹, L. Guo², JA. Ryals², 安田周平¹, 島崎高嘉³, 菊池 彰³, 渡邊和男³, 春日美江⁴, 篠崎和子⁴, 太田大策¹
(¹ 大阪府大・生命環境, ² Metabolon Inc., ³ 筑波大・生命環境, ⁴ 国際農林水産業研究センター)
- 13:50 C12 Properties of Rice Stem Extract Obtained by Subcritical Water/Ethanol Treatment
○TANGKHAVANICH Boonnakhom, 大石幸恵, 小林 敬, 安達修二
(京大院農・食生科)
- 14:05 C13 亜臨界状態のアセトン水溶液を用いて得られた脱脂米糠抽出物の 5 軸レーダーチャートによる抗酸化活性の評価
○謝 裕基, 邱 泰瑛, 小林 敬, 安達修二
(京大院農・食生科)

D 会場（植物・動物）

午前の部（植物）

- 10:00 D01 畑地根粒菌叢に関する研究
加藤浩一, プリエト ラファエル, 関谷次郎, ○高瀬尚文
(京都学園大・バイオ環境)
- 10:15 D02 “米のとぎ汁発酵液”の特性とトマトかいよう病菌の増殖抑制
○中田達矢¹, 河上晃平¹, プリエト ラファエル², 高瀬尚文^{1,2}, 川口 章³, 関谷次郎^{1,2}
(¹京都学園大院・バイオ環境, ²京都学園大・バイオ環境, ³岡山県農林水産総合センター・農業研究所)
- 10:30 D03 熱ストレス下での翻訳制御に関わるシス配列の解析
○畑 健介, 上田清貴, 米田 新, 出村 拓, 加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)
- 10:45 D04 イネにおいて熱ストレス下で翻訳を維持する 5'UTR の探索
○西垣 直哉, 上田 清貴, 米田 新, 出村 拓, 加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)
- 11:00 D05 成長と発達に伴う翻訳状態変化のゲノムワイドな解析
○山崎 将太郎, 上田清貴, 米田 新, 加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)
- 11:15 D06 シロイヌナズナにおける Ca²⁺シグナリングを介した熱ショック転写因子 HsfA2 の環境ストレス応答
○小林宏太¹, 野坂亮太¹, 丸田隆典², 藪田行哲³, 田茂井 政宏¹, 重岡 成¹
(¹近畿大院農・バイオ, ²島根大生資科・生命工, ³鳥取大農・生資環)
- 11:30 D07 葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) によるストレス/ホルモン応答のバランス制御
○吉田幸史¹, 辻村昌希¹, 問田英里¹, 丸田隆典², 田茂井 政宏¹, 吉村和也³, 重岡 成¹
(¹近畿大院農・バイオ, ²島根大生資科・生命工, ³中部大応生・食栄)
- 11:45 D08 経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化に関する研究
○佐生 愛¹, 重光隆成¹, 齊藤雄飛¹, 田中愛実¹, 森田重人^{1,2}, 佐藤 茂^{1,2}, 増村威宏^{1,2}
(¹京府大院・生命環境, ²京都農技セ・生資セ)
- 12:00 D09 ダイズ種子における種子貯蔵タンパク質をキャリアーとする生理活性ペプチドの蓄積挙動
○丸山伸之¹, 横山和典¹, 藤原圭吾¹, 澤田 真千子¹, 長谷川 久和³, 内海 成¹, 石本政男², 寺川輝彦³
(¹京大院農・農学, ²農生資研, ³北興化学)

午後の部（動物）

- 13:20 D10 ヒトのミトコンドリア NADP⁺合成酵素発見のインパクト
○河井重幸, 大橋一登, 川畑 豊, 村田幸作
(京大院農)
- 13:35 D11 前立腺におけるアンドロゲン受容体とタンパク質アルギニンメチル基転移酵素 10 の相互作用について
○高木俊樹¹, 原田直樹¹, 三谷墨一¹, 中野長久², 山地亮一¹, 乾 博³
(¹大阪府立大学・生命環境, ²大阪女子短期大学, ³大阪府立大学・栄養)
- 13:50 D12 ヤスデにおけるマンデロニトリル酸化酵素の検出
○市来弥生, 森田将史, 桑原保正, 浅野泰久
(富山県大・生工科・生工研セ, JST・ERATO)
- 14:05 D13 クローン病関連タンパク質 Dlg5 と TGF-βI 型及び II 型受容体との相互作用
○瀬崎拓人¹, Lucia Tomiyama^{1,2}, 植田和光^{1,2}, 木岡紀幸¹
(¹京大院農, ²京大 iCeMs)

E 会場（微生物・生物化学工学・その他）

午前の部（微生物）

- 10:00 E01 自然界からの油脂含有廃水処理に有用な微生物の探索
萩下大郎¹, ○奥 裕規¹, 黒住 悟², 篠田吉史¹, 清水 昌¹
(¹京都学園大院・バイオ環境, ²積水アクア)
- 10:15 E02 植物性乳酸菌 *Lactobacillus* sp. NCCB100334 の分類学的特性と GABA 生産
○瀧井幸男¹, 井上裕美², 永吉恵美¹, 立里 臨³, 大村聖子³, 關谷次郎¹
(¹京都学園大・バイオ環境, ²武庫川女子大・生活環境, ³(株)テクノスルガ)
- 10:30 E03 *Pseudomonas fluorescens* KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性
○藤岡 諒, 岩木宏明, 長谷川 喜衛
(関西大・化学生命工)
- 10:45 E04 細菌 ABC トランスポーターと連携する基質結合タンパク質によるヘテロ多糖アルギン酸の認識機構
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)
- 11:00 E05 ヒスチジンキナーゼ阻害剤シグナマイシン B の作用部位の解析
○犬飼洋一, 木野弘量, 岡島俊英¹, 五十嵐 雅之², 内海 龍太郎
(近畿大農・バイオ, ¹阪大・産研, ²微化研)
- 11:15 E06 細菌情報伝達コネクター分子, SafA の作用機構
○吉谷亘平, 石井英治, 江口陽子, 内海 龍太郎
(近畿大農・バイオ)
- 11:30 E07 TCS と PTS を繋ぐ ResG の遺伝学的解析
○深見知可, 加藤明宣, 萩原 慧, 内海 龍太郎
(近畿大農・バイオ)
- 11:45 E08 遺伝子組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* ET3-6 が生産する glucoamylase の酵素学的特性
○永吉恵美¹, 三浦由貴², 瀧井幸男¹, 坪井宏和³, 尾関健二⁴
(¹京都学園大・バイオ環境, ²武庫川女子大・生活環境, ³(株)大関, ⁴金沢工大)
- 12:00 E09 非天然型経路を導入した新規イソプタノール生産酵母の開発
○伊田賢吾¹, 松田史生², 近藤貴志², 石井 純², 近藤昭彦¹
(¹神戸大院工・応用化学, ²神戸大・自然科学系先端融合研究環)

午後の部（生物化学工学・その他）

- 13:20 E11 Mediated flavoenzymes/peroxidase sensing systems with pentacyanoferrate-bound polymer as a mediator.
○Chi-Hua Nieh, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kenji Kano
(京大院農・応用生命)
- 13:35 E12 膜酵素を用いた酵素電極反応効率改善へのアプローチ
○河井翔太¹, 薬師寿治², 松下一信², 北隅優希¹, 白井 理¹, 加納健司¹
(¹京大院農・応用生命, ²山口大農・生物機能)
- 13:50 E13 脂質二分子膜を介したチャネル形成剤アンホテリシン B による物質透過
○籠橋宏樹, 山内隆史, 北隅優希, 白井 理, 加納健司
(京大院農・応用生命)
- 14:05 E14 グラミシジン A チャネル輸送における分配項と拡散項の電気化学的評価
○窪田 慎太郎, 白井 理, 北隅優希, 加納健司
(京大院農・応用生命)

座長一覧

		B会場 (有機化学・天然物化学 ・環境化学)		C会場 (酵素・食品)		D会場 (植物・動物)		E会場 (微生物 ・生物化学工学・その他)	
時間	講演番号	座長		講演番号	座長	講演番号	座長	講演番号	座長
10:00	B01	吉永 直子		C01	太田 大策	D01	田茂井 政宏	E01	加藤 明宣
10:15	B02			C02		D02		E02	
10:30	B03			C03		D03		E03	
10:45	B04			C04		D04		E04	
11:00	B05			C05		D05		E05	
11:15	B06	清水 伸泰		C06	小林 敬	D06	加藤 晃	E06	萩下 大郎
11:30	B07			C07		D07		E07	
11:45	B08			C08		D08		E08	
12:00	B09			C09		D09		E09	
昼休み									
13:20	B10	倉持 幸司		C10	保川 清	D10	都築 巧	E10	日比 慎
13:35	B11			C11		D11		E11	
13:50	B12			C12		D12		E12	
14:05	B13			C13		D13		E13	

特別講演
(公開講演)

講演要旨

SP01

サトウキビ害虫の性フェロモンの解明と防除技術開発 ーリュウキュウクロコガネとケブカアカチャコガネー ○若村 定男 (京都学園大・バイオ環境)

サトウキビ栽培は沖縄県宮古島の基幹産業である。サトウキビが収穫直前になって枯死する現象が 90 年代後半に顕著になった。当初、枯死の原因はリュウキュウクロコガネ(*Holotrichia lochooana*; 以下、クロコガネ)幼虫による根部食害にあるとされた。当時農水省蚕糸・昆虫農業技術研究所(現: (独)農業生物資源研究所)にあった私たちは沖縄県農業試験場(現: 沖縄県農業研究センター)と共同して、まずクロコガネの配偶行動と解発因の解明研究にとりかかった。本種の雌が腹部末端の囊状部を反転させて露出する姿勢をとると、雄が飛来して交尾が成立する。腹部末端のエーテル抽出物に雄に対する性刺激活性が認められた。活性成分の分画を進めたところ **anthranilic acid** が得られた。宮古島現地で **anthranilic acid 10 mg** を含ませた綿球(脱脂綿を布地で包んで作製した直径約 1.5 cm の球)を示したところ、雄が飛来して綿球に直接着地し交尾器を出して後ずさりする行動が認められた。一方、綿球から約 1.5 m 以内に着地するものも相当数認められ、捕獲してみるとすべて雌であった。**Anthranilic acid** はクロコガネの雄には性誘引フェロモン、雌に対しては集合フェロモンとして機能する多機能フェロモンということになる。雄は、雌が放出する **anthranilic acid** を含む気流を遡及し、匂い源から 10~20 cm の地点に達すると、嗅覚定位から暗色の対象物に対する視覚定位に切り替え、雌の体にピンポイント着地する。すなわち、嗅覚定位と視覚定位を巧みに使い分けて、雌への定位を確実にしていると考えられる。一方、雌の **anthranilic acid** 放出量を個体別に測定してみると、多量に放出する少数の雌と、少量しか放出しない多数の雌がいることが分かり、行動生態学的に興味深いテーマを提供している。

クロコガネに着手して間もなく、サトウキビの枯死の原因は別種のケブカアカチャコガネ(*Dasylepida ishigakiensis*; 以下、ケブカ)の幼虫による根部食害であることが判明した。本種は石垣島と西表島に分布し採集例が少ない希少種とされ、これが宮古島と伊良部島での初記載となった。したがって、習性や生活史はごく断片的にしか知られていなかった。宮古島での精力的な野外調査により、本種は 2 年周期の生活史を持つこと、雌成虫は 2 月の温暖な日没直後の短時間の間に地表に出現して交尾すること、一度交尾すると地中に戻り二度と地表に現れないことなどが判明した。性誘引フェロモン解明のため、現地圃場で掘り取った幼虫を飼育して成虫を得ることにしたが、室内で配偶行動を再現することは容易ではなかった。多数の幼虫個体を飼育して、幼虫休眠や生殖休眠などの基礎的知見が得られてはじめて、性的に成熟した個体を確保することができ、性フェロモンの存在確認や抽出分析が可能になった。最終的には、フェロモン放出雌数頭の周囲の空気中の活性成分を SPME(固相微量抽出)法で直接 EAD(触角電図検出器)を装着した GC (GC-EAD)に導入して 2 つの活性ピークの特定に成功した。2 つのピークは GC-TOF-MS 分析により 2-propanol と 2-butanol と推定した。現地実験では(*R*)-2-butanol に雌放出量と同レベルの放出量で誘引活性が認められ、(*S*)-体やラセミ混合物には認められなかった。これにより、性フェロモン主成分は(*R*)-2-butanol と同定された。ところが、交信攪乱法を適用してみたところ、ラセミ混合物で(*R*)-体と同等の交尾阻害効果が認められた。チョウ目害虫の交信攪乱においては一般に、交尾阻害効果の直接評価は事実上不可能であるが、ケブカの場合はサトウキビ畑を目視探索することにより直接評価が可能である。現在、安価なラセミ混合物を使って交信攪乱剤の開発が進行中である。

SP02

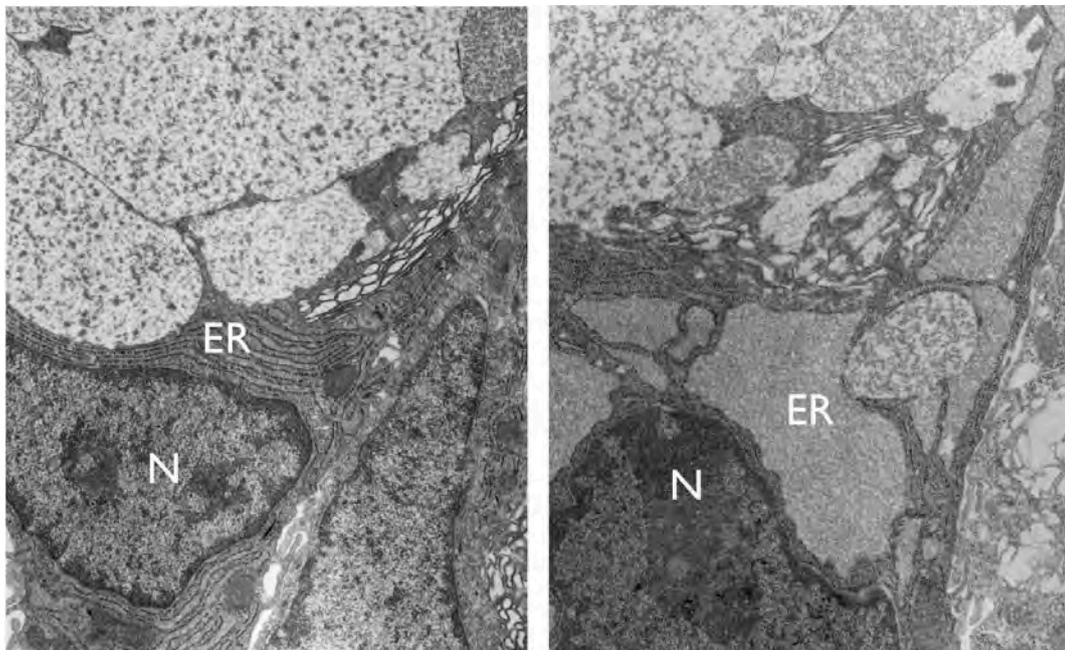
生物のストレス解消システムとその破綻による疾患

【平成 24 年度日本農芸化学会賞受賞講演】

○河野 憲二（奈良先端大・バイオサイエンス）

私達は「ストレスがたまった」とか「ストレス解消」などという言葉をよく口にします。私達の生活ではストレスは精神的・心理的なものです。現代はストレス過多の時代であり、私達は日々の生活の中で様々なストレスを受けています。ストレスが過度にたまると精神的に落ち込み、また度をすぎると鬱病などの原因にもなります。ストレスをためすぎないようにするという事は、生きるという点で非常に重要なことです。これと同様に私達を構成している一つ一つの細胞も、様々な環境変化や遺伝子変異によるストレスを受けています。細胞はこれらのストレスを解消するために、ストレスがたまったということを感じ取るセンサーを備え、ストレスに応じてシグナルを発信し適切な処置を施し、ストレスを解消しています。これをストレス応答とよんでいます。細胞にも様々なストレスがあるわけですが、私達はタンパク質が変性してたまったことにより起こる小胞体ストレス応答に関する研究をしています。

細胞内の小胞体は、分泌タンパク質や膜タンパク質を合成する工場に例えることができます。これらのタンパク質は小胞体膜上で合成されると同時に、小胞体内にとりこまれ、正しく折り畳まれ、タンパク質として完成すると次の運搬先へと出荷されていきます。小胞体は一般の生産工場と同様に、タンパク質が正しい立体構造をとっているかどうかをチェックし、完成品のみを出荷し、欠陥商品（欠陥タンパク質）は再生したり廃棄したりして、工場としての正常な機能を保っています。しかし細胞にストレスがかかり、異常構造をしたタンパク質が数多く生産されると小胞体内にそれらが蓄積するので、細胞はこれらの異常タンパク質を適切に処理し対応することになります。これは小胞体ストレス応答とよばれ、小胞体ストレスは分泌が盛んな細胞や増殖をしない細胞でおこりやすいことがわかっています。このストレス応答が破綻すると、ある種の糖尿病や神経変性疾患を起こす要因になることがわかりつつあります。ここでは、それらの研究に関して私達の研究を中心にをご紹介します。



IRE1 β +/+

IRE1 β -/-

ムチンを分泌する杯（さかずき）細胞の電顕写真。左は正常な細胞、右は小胞体ストレス応答を起こりにくくした細胞。右の細胞では、小胞体（ER）が構造異常ムチンを溜め込み超肥大化している。N:核

SP03

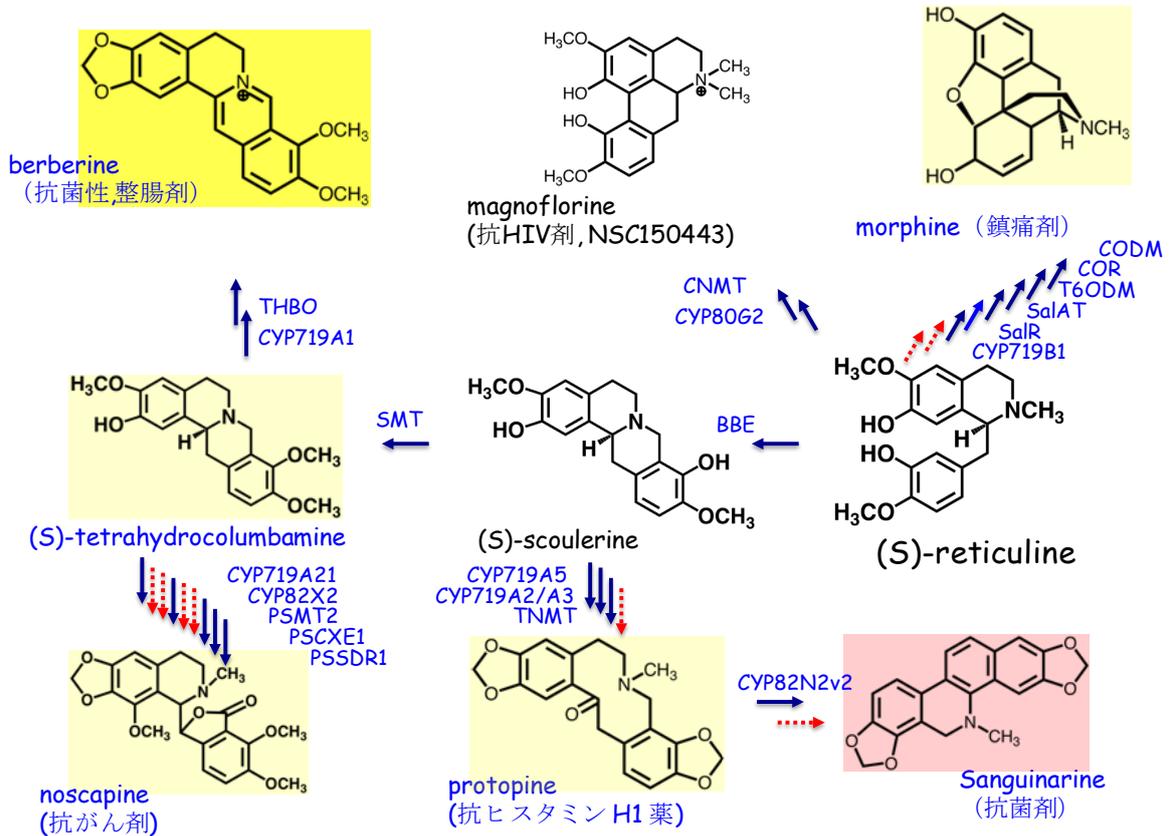
植物の薬用成分を微生物に作らせる

【平成 24 年度学士院賞受賞講演】

○佐藤 文彦 (京大院・生命科学)

植物が産生する多様な低分子化合物は、植物自身の環境応答・防御物質として機能するとともに、我々にとっては、香辛料や染料、香料、医薬品等として有用である。特に、植物が産生する含窒素化合物であるアルカロイドは、生理活性が高く、古来より、生薬、さらには、医薬品として、利用されている。これらの低分子生理活性物質の単離同定、ならびに、その生合成系の解析については、多くの研究が行われてきたが、近年、分子生物学の発展とともに、生合成酵素遺伝子の単離と同定、さらには、遺伝子組換え技術を用いた代謝経路の同定と改変、さらには、合成生物学が可能となりつつある。特に、多くの有用医薬品を含むベンズリソキノリンアルカロイド(BIA)生合成系については、培養細胞系において比較的容易にアルカロイドが産生されることから、代表的な BIA 類の生合成系遺伝子の単離が進むとともに、それら遺伝子を用いた代謝工学/合成生物学が進展している。今回、BIA を例に、微生物による合成生物学的手法による薬用成分生産の可能性と課題を紹介する。

微生物によるBIA生産の可能性



(S)-レチクリンの微生物発酵系が確立されるとともに、実線の生合成遺伝子は単離が報告されている。

一般講演

講演要旨

Penicillium griseofulvum OK-17 株が生産する cyclopiamine 類について

B01

○三木 沙織, 甲斐 建次, 秋山 康紀, 林 英雄 (阪府大院・生命環境)

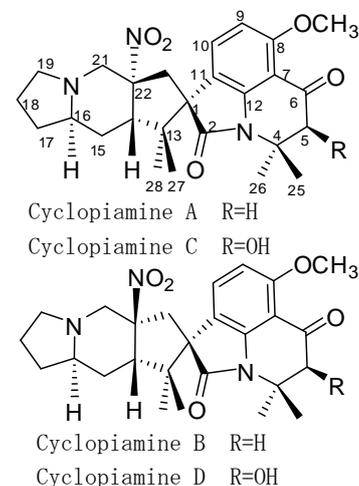
微生物は様々な二次代謝物を生産し、それらは薬剤やそのリード化合物として幅広く利用されてきた。我々は、カイコガの3齢幼虫を用いた探索の結果、麻痺性物質生産菌 *Penicillium griseofulvum* OK-17 株を得た。

本菌をオカラ培地 10 kg で培養後、活性物質の抽出・精製を行い、麻痺性化合物 **1, 2** を単離した。EI-MS より **1** 及び **2** はいずれも分子量 467, 分子式 $C_{26}H_{33}N_3O_5$ であることが明らかになり、各種スペクトルデータより化合物 **1** 及び **2** をそれぞれ既知物質 cyclopiamine A 及び B と同定した。

次に、TLC 上で本化合物に特異的に呈色する試薬であるジフェニルアミンを用いて類縁体を探索した結果、HR-MS より化合物 **1, 2** に比べ酸素が1つ多い $C_{26}H_{33}N_3O_6$ を分子式としてもつ2つの化合物 **3, 4** を単離した。化合物 **3, 4** は、化合物 **1, 2** で確認されたジェミナルカップリングした5位のメチンプロトンが1つ消失し、新たに低磁場側にメチンプロトンが確認されたことからそれぞれ5位がヒドロキシル化されていることが分かり、新規類縁体であったため cyclopiamine C, D と命名した。

化合物 **3, 4** の NOESY スペクトルにおいて、いずれの化合物も 14 位と 27 位、27 位と 26 位、26 位と 5 α 位のプロトン間に相関が見られたことから、水酸基を β 配置と決定した。

Cyclopiamine A, B, C, D の ED₅₀ はそれぞれ 8、100、7、>100 (μ g/g diet) であった。この結果より、ニトロ基が α 配置である cyclopiamine A, C において強い活性が見られたことから、ニトロ基の立体配座が麻痺活性に影響を与えていることが考えられた。また、水酸基の有無は麻痺活性には影響を与えないことが示唆された。



帰化雑草ヒキヨモギ属の滲出物中の成分と機能

B02

○東村 聡太, 森本 正則, 松田 一彦 (近畿大院農・応生化)

【目的】

近年、帰化植物であるハマウツボ科セイヨウヒキヨモギ (*Parentucellia viscosa*) とヒサウチソウ (*Bellardia trixago*) が急速に日本で分布拡大している。同属で生活環や生息地が同じベニヒキヨモギ (*P. latifolia*) も近年帰化が確認された。本研究では帰化植物の分布拡大に寄与する二次代謝産物生産性の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

各草種の葉表面の低真空 SEM ならびに光学顕微鏡観察により、葉の裏面に多くの腺毛が観察された。そこで各草種の地上部をジクロロメタンで洗浄し、腺毛に蓄積された滲出物を採取した。各滲出物中の主成分は、各種カラムクロマトグラフィーによって精製し、各種機器分析データによって同定した。セイヨウヒキヨモギからは、クレロダン型ジテルペンカルボン酸と対応するマロン酸エステル、ヒサウチソウからは単環性ジテルペンアルコールであるトリキサゴールと対応するマロン酸エステル、ベニヒキヨモギからはラブダン型ジテルペンアルコールであるラブダジエノールを単離・同定した。セイヨウヒキヨモギ由来のクレロダン型ジテルペンカルボン酸であるコラベン酸は、ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 3 齢幼虫に対して摂食阻害活性を示した。またヒサウチソウは自生地において成熟葉が全て食害されているものの、その新葉は無傷であることが多かった。本種の滲出物量は成熟葉では少量であるのに対して新葉では多く、自生地で観察された食害レベルと相関していた。これらの事実からヒサウチソウやセイヨウヒキヨモギにおいては滲出物成分が食害防御物質として機能していると考えられた。現在ヒサウチソウとベニヒキヨモギより単離・同定したジテルペン類の昆虫摂食阻害活性を検討中である。

B03

○飯田 真弘, Nguyen Trong Tuan, 秋野 順治 (京工織大・応用生物)

ヤマトシロアリ *Reticulitermes speratus speratus* は、主として倒木などに営巣するが、その生息環境中には多様な蟻の種が存在している。なかでもオオハリアリ *Pachycondyla chinensis* は、シロアリに対する攻撃性が高く、有力な捕食者として知られている。また、同シロアリの営巣木中にはケアリ類も営巣していることが珍しくない。これらの蟻類との関わり方は、ヤマトシロアリの生存にとっては重要な問題である。室内実験によってオオハリアリによるシロアリ捕食を検証したところ、職蟻は好んで捕食されたのに対し、兵蟻は忌避された。同様の傾向は、職蟻・兵蟻の抽出物を提示した場合にも認められた。この結果は、兵蟻がオオハリアリに対する化学防御物質を保有している可能性を示唆する。定法に従い活性成分を分画したところ、その活性は兵蟻由来の炭化水素画分に認められ、同画分の主要成分としては β -セリネンが同定された。この物質は、ヤマトシロアリの職蟻ではほとんど検出されず、兵蟻特異的な成分であった。同物質の種内コミュニケーションにおける機能を調べたところ、攪乱性の低い状況下では職蟻・兵蟻共に集合フェロモンとして作用した。その一方で、攪乱状況におかれた場合には、職蟻を離散させる一方で兵蟻を動員する効果が認められたことから、警報フェロモンとして作用する可能性が高い。実際、兵蟻が威嚇・噛付きなどの攻撃的行動をとる時には、揮発性成分として β -セリネンが体外に分泌されることを SPME 法により確認した。

ところが、ヤマトシロアリと同じ倒木中に営巣することがあるトビイロケアリ *Lasius japonicus* に対するシロアリ兵蟻の防御効果を調べたところ、ケアリに対する忌避的效果は全く認められないばかりか、ケアリの攻撃性を増長させ、シロアリへの定位を促がすことが明らかになった。これは、トビイロケアリがシロアリ兵蟻の分泌物をカイロモンのように利用していることを示唆する。ケアリ類はシロアリ専門の捕食者ではないため、シロアリの防御物質を利用できるように二次的に適応したものと考えられる。

トゲナシシロトビムシが分泌するアルカロイドの同定とその生物活性

B04

○和田 佑太, 高田 侑介, 桑原 保正, 清水 伸泰 (京都学園大バイオ環境)

【目的】トビムシ *Collembola* は腹側にたたまれた跳躍器を使ってジャンプし、捕食者から逃避することで身を守っている。しかし、シロトビムシ科のトゲナシシロトビムシ *Onychiurus folsomi* は跳躍器が退化して完全にないか、あるいは痕跡程度である。シロトビムシ科トビムシには各体節に擬小眼と呼ばれると分泌腺があり、なんらかの防御物質を分泌することで、捕食者から身を守っていると考えられる。またその分泌物を、種内の情報化学物質として利用している可能性も考えられる。そこで本研究では、本種トビムシの分泌成分を分析し、その生物機能を探索した。

【方法・結果】トゲナシシロトビムシをヘキサンで抽出し、GC-MS で分析すると特徴的な成分を検出した。そのマススペクトルは分子イオン 191、ベースイオン 191 を示し、含窒素化合物であると推定した。トビムシを大量抽出し、未同定物質をシリカゲルカラムで精製後、NMR 解析を行った。その結果、2つのメトキシ基を有するピラドピラジン誘導体と推定することができた。本化合物は2,3-ジアミノピリジンを原料として3段階で合成したところ、天然物と合成物のスペクトルデータは完全に一致した。よって、トビムシ由来のアルカロイドを、2,3-ジメトキシピリドピラジンと同定した。次に、トビムシのヘキサン抽出物に忌避行動を観察したため、合成物を用いて警報フェロモン活性を評価した。その結果、供試量 1 ng 以上で、忌避活性を示したため、本化合物を警報フェロモンと同定した。一方、供試量が 0.1 ng 以下では忌避行動を示すよりむしろ、誘引される行動が見られた。このことより、通常の生息環境では、本化合物はごく微量に分泌されており、種認識物質として機能し、ある程度の密度を保つのに利用されている可能性が示唆された。

B05

○奥田 宣昭, 清水 伸泰 (京都学園大院バイオ環境)

【目的】昆虫が外敵から身を守る方法には擬態、逃走、威嚇などが知られている。ハムシ類の幼虫の多くは化学防御で身を守っている。その化学防御に利用される化合物は、植物由来のものと生合成由来のものに大別できる。前者にはサリチルアルデヒドやベンズアルデヒドなどが、後者にはイリドイドモノテルペンが知られている。ハンノキハムシ *Agelastica coerulea* の幼虫は、ピンセットで軽く押さえると、反射出血 (reflex bleeding) と呼ばれる方法で、体内の貯蔵嚢を裏返し、粘性の液滴を出す。これはハムシ幼虫で見られる防御反応であり、この液滴には捕食者を忌避する物質が含まれていると推測した。そこで、この分泌物の成分分析を行った。さらに、分泌物の由来を解明するため、本種ハムシが寄主とするハンノキの葉の成分についても検討した。

【方法・結果】京都府亀岡市のハンノキから採取したハンノキハムシ幼虫をヘキサンで抽出し、その抽出物を GC-MS で分析した。その結果、特徴的な成分を検出し、NMR 解析によりジテルペンの kaurene と決定した。さらに同じ場所の異なるハンノキから採取した幼虫を分析したところ、kaurene と異なる成分を検出した。構造解析により、同じジテルペンの sclarene であった。次に、ハムシ幼虫を採取したハンノキの葉を成分分析した結果、幼虫の場合と同様に、kaurene を含むものと sclarene を含むものに分けられることが判明した。そこで、kaurene と sclarene を含むハンノキ葉を、別々にハムシ幼虫に与え飼育したところ、成長過程で物質の相互変化は見られず、両化合物とも幼虫の成長とともに分泌量は増加した。よって本種ハムシ幼虫は、植物由来の 2 種のジテルペンを取り込み、そのまま分泌腺から放出することで化学防御していると推察できる。

クチナシにおけるイリドイド cerbinal の生合成経路

B06

○内藤 裕彬, 網干 貴子, 吉永 直子, 西田 律夫, 森 直樹 (京大院農・応用生命)

【目的】クチナシ (*Gardenia jasminoides*) の葉をホモジナイズすると、イリドイドの一種 cerbinal [1] が得られる。傷害を与えていない葉や加熱処理した葉からはほとんど検出されないので、[1] は植物体内に前駆体として蓄積されており、ストレスをきっかけとする酵素反応によって生成すると考えられる。しかし、これまでその生合成経路は不明であった。本研究ではクチナシの葉における [1] の生合成経路を調べた。

【方法と結果】イリドイドは多くの場合、植物中に配糖体として存在する。そこで、LCMS を用いてクチナシ葉抽出物中のイリドイド配糖体の探索を行った。その結果、若葉からイリドイド配糖体の gardenoside [2] と geniposide [3]、成熟葉からは [2] を検出した。成熟葉からも [1] が生成するので、前駆体候補は [3] ではなく [2] と仮定した。葉に傷害を与える前後における [2] 量と [1] 量を比較したところ、前者の減少に伴い後者の増加を確認した。また、[2] を添加した葉片で [1] の生成量を測定したところ、[2] を加えない葉と比べ生成量が増加した。以上から、[1] の前駆体は [2] であると考えられる。さらに、窒素雰囲気下で [1] 生成量が減少し、¹⁸O 雰囲気下において ¹⁸O ラベル化された [1] が生成したので、[1] の生合成に分子状酸素が必要と示唆された。



B07

Bis[4-oxo-6,7-dihydroxy (hexahydronaphtyl)]ethylene 誘導体の合成とブラシノライド活性検定系を用いた活性評価

○瀧本 征佑, 中川 好秋, 宮川 恒 (京大院農・応生化)

ブラシノステロイド (BR) は、ブラシノライド (BL) をはじめとする植物ステロイドホルモンの総称で、伸長成長や細胞分裂の促進、ストレス耐性の誘導などの活性を示す。また、BR には果実重量の増加効果が認められており、植物生長調節剤としての利用が期待されている。実用化にあたってはそのステロイド構造の簡略化が一つの鍵と考えられるが、そのような試みとして Andersen ら (2001) は、BL の水酸基の立体的な配置に着目して非ステロイド型化合物を合成し、その活性をイネラミナジョイント法によって評価した結果、化合物 1 (Bis[4-oxo-6,7-dihydroxy(hexahydronaphtyl)]ethylene 誘導体, Fig.1) を含むいくつかの化合物に BL 様活性を認めた。ただしその活性評価には、1) 活性測定の際に被験化合物の最大 50 万倍に及ぶインドール-3-酢酸 (IAA) が共処理されている、2) BL のような濃度応答曲線が得られない、などの問題点があり、結果は疑問視されている。

そこで本研究では、報告されている活性化合物の中で最も高活性な化合物 1 を合成し、活性を再評価した。合成は 1,3-ブタジエンと 1,4-ベンゾキノンを出発物質として、8 段階の反応により行い、総収率 0.027% で化合物 1 を得た。BR 生合成阻害剤 Brassinazole (Brz) の存在下クレスに処理したところ、Brz による矮化作用を打ち消す効果は見られず、化合物 1 には BL 様活性は認められなかった。BL と受容体の複合体結晶構造をもとに、化合物 1 の受容体結合様式を、ドッキングシミュレーションを用いて検討し、活性を示さなかった原因を考察した。

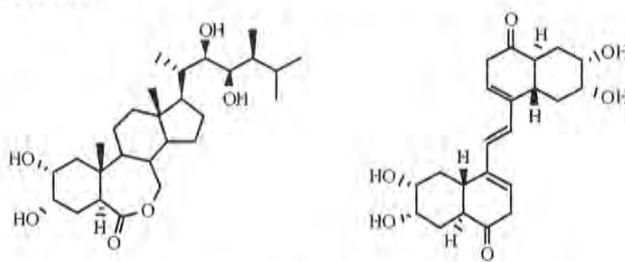


Fig.1 Brassinolide (左) と化合物 1 (右)

B08

低級脂肪酸アルキルエステルの保持指標による回帰分析およびそれを用いたハバネロ唐辛子香気成分の同定

○深見 治一, 尼岡 大輝, 尾張 嘉平, 矢野 善久 (京都学園大バイオ環境)

【目的】炭素数 4-7 の低級飽和脂肪酸の炭素数 4-8 のアルキルエステルの GC における保持指標 (RI) を従属変数とし、総炭素数および分枝の数を独立変数とした回帰分析を行い、その回帰式からハバネロ唐辛子の香気成分を同定する。

【方法】炭素数 4-7 の飽和脂肪酸の酸クロリドを相当するアルコールとともに塩化メチレン中で Et₃N 存在下、または脂肪酸およびアルコールを塩化メチレン中で WSC を用いて縮合し、相当するエステルを得た (61 化合物)。これらの GC/MS (HP-5MS キャピラリーカラム) を測定し、Aroma Office で保持指標 (RI) を得た。得られた RI 値を用いて、総炭素数および分枝の数を独立変数として、重回帰分析を行った。また、ハバネロ唐辛子の GC/MS による同定は 2012 年度農芸化学学会大会で示した通りである。

【結果と考察】低級脂肪酸アルキルエステル類の RI は用いた回帰式は以下の通りであった。

$$RI = 98.78 (\pm 0.33) \times \text{総炭素数} - 38.62 (\pm 0.79) \times \text{分枝数} + 201 (\pm 3.82)$$

$$(n=61, R^2=0.9994, F = 8.58 \times 10^{-94})$$

この結果を用いて、ハバネロ唐辛子オレンジライプ (*Capsicum chinense* cv. 'Habanero orange') における RI=1402 (R.T. 約 12 分) の物質はその MS スペクトルおよび RI の計算値 1408 から *i*-octyl isovalerate と同定した。また、他のハバネロ唐辛子に含まれる低級脂肪酸アルキルエステル類も標品と同様に RI の計算値がよく一致した。

【文献】1) 深見治一, 尼岡大輝, 尾張嘉平, 矢野善久 2012 年度農芸化学学会大会講演要旨

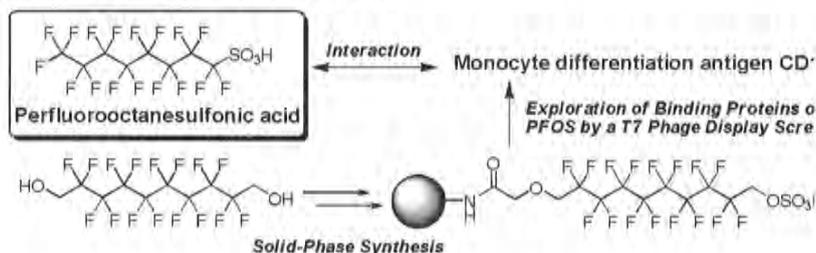
固相合成とファージディスプレイ法を組み合わせた PFOS 結合タンパク質の探索

B09

宮野 友香¹, 九十田 千子¹, 崎元 一平², 武内 亮¹, 志村 聡美¹, 高橋 德行¹, 草柳 友恵¹, 高草木 洋一¹, 岡戸 真実¹, 松本 勇記¹, 高草木 香織¹, 竹内 倫文¹, 紙透 伸治¹, 中崎 敦夫³, 太田 慶祐², 三浦 雅彦², 〇倉持 幸司⁴, 水品 善之⁵, 小林 進³, 菅原 二三男¹, 坂口 謙吾¹ (1東京理大理工, 2東京医歯大院口腔放射腫瘍, 3東京理大薬, 4京府大院生命環境, 5神戸学院大栄養)

ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS) は強力な界面活性剤として、撥水剤、表面処理剤、消火剤等に用いられてきた。しかしながら近年 PFOS の環境残留性及び生体蓄積性が明らかとなり、環境中の分布や挙動、生体に対する毒性に関する研究が世界各国で行われている。我々は固相合成樹脂 PEGA 上に PFOS 誘導体を合成し、合成した PFOS 固定樹脂を用い、ファージディスプレイ法により PFOS 結合タンパク質を探索した。その結果、CD14 を結合タンパク質として同定することに成功した。また PFOS / 可溶性 CD14 (sCD14) 間相互作用は表面プラズモン共鳴装置 Biacore 3000 を用いて解析し、解離定数を $K_D = 5.83 \times 10^{-6} \text{ M}$ と算出した。ヒト sCD14 タンパク質はラットマクロファージ RAW264.7 細胞に炎症性サイトカイン TNF- α の産生を誘導するが、PFOS は CD14 の TNF- α の産生誘導を阻害することがわかった。この結果から CD14 は PFOS の結合タンパク質の一つであることを明らかにした。

図. PFOS 結合タンパク質の探索

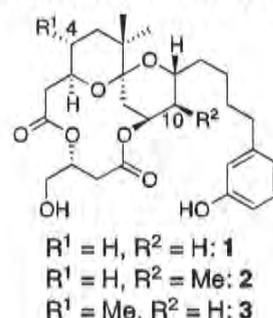


B10

Debromoaplysiatoxin 単純化アナログの 10 位メチル体の合成と細胞増殖抑制活性

○菊森将之¹, 柳田 亮^{1,2}, 徳田春邦³, 鈴木信孝³, 永井宏史⁴, 末永聖武⁵, 入江一浩¹ (1京大院農, 2香川大農, 3金沢大医, 4東京海洋大, 5慶応大理工)

近年当研究室において開発された **1** は、アメフラシ由来の発がん促進物質・debromoaplysiatoxin (DAT) の骨格を有するにもかかわらず、発がん促進活性をほとんど示さず、各種がん細胞増殖抑制活性を示すユニークな化合物である¹⁾。ごく最近、**1** のがん細胞増殖抑制活性が、スピロケタール部分の疎水性度に大きく依存することが当研究室において見いだされた。本研究では、**1** のがん細胞増殖抑制活性の発現に重要な構造要因を調べることを目的として、**1** のスピロケタール部分の 10 位にメチル基を導入した誘導体 (**2**) を、*m*-hydroxycinnamic acid から 8 段階で誘導した既知のアルデヒドを出発原料として、20 段階・0.85% の収率で合成した²⁾。化合物 **2** は、発がんの抑制に関わる PKC アイソザイムの一種である PKC δ の α ドメインに対してサブナノモルオーダーで結合した。その結合能は、**1** よりも約 20 倍高いものであった。さらに、多くのヒトがん細胞株に対して、**2** は **1** と比べて 10 倍以上高い増殖抑制活性を示した。一方、昨年支部大会で合成を報告した **1** の 4 位メチル体 (**3**) のこれらの生物活性は、**1** と同等であった。本結果より、10 位メチル基は PKC δ に対する結合と、がん細胞増殖抑制活性の発現にきわめて重要であることが判明した。また、**2** の発がん促進活性をマウス皮膚発がん 2 段階試験により評価したところ、**2** は DAT とは異なり、DAT の 5 倍量の塗布によっても発がん促進活性をまったく示さなかった。以上の結果より、**2** は PKC 活性化能を有する新しいタイプの抗がん剤シーズになる可能性が示唆された。1) *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 7573; 2) *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5614.



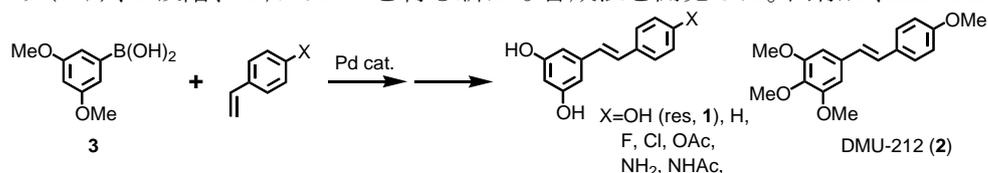
カップリング反応を利用したレスベラトロールならびに類縁体の短段階合成

B11

○諫山 篤, 切畑 光統, 谷森 紳治 (阪府大院生命環境)

スチルベン骨格を有するポリフェノールであるレスベラトロール (res, **1**) は、ブドウの皮やピーナッツ等に含まれ、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事が指摘され、注目されている。また、DMU-212 (**2**) などの脂溶性誘導体の中には、高い抗癌活性を有するものもある。このため、res は類縁体を含め、多くの合成法が報告されているが、多段階を要し、誘導体合成に向かない等、効率性の点で問題がある。本研究では、出発物質として入手容易なボロン酸とスチレン誘導体を用い、酸化的 Heck 反応による短段階で効率的な res の合成法を確立し、さらに類縁体合成に取り組んだ。

まず、3, 5-ジメトキシフェニルボロン酸 (**3**) と 4-アセトキシスチレンをモデル基質に用い、カップリング反応を種々の条件で試みた。その結果、触媒にビスアセトニトリルジクロロパラジウム (II) (10 mol%) を用い、炭酸ナトリウム (2 当量) を塩基として、無水ジメチルホルムアミド溶液中、酸素雰囲気下、50°C の反応条件で、目的としたカップリング体が 84% と高収率で得られた。次に本条件下、ニトロ基やアミノ基、メトキシ基、ハロゲン等を有するスチレン誘導体を用い反応を行った結果、38%~85% の収率で相当するスチルベン体を得、さらに脱メチル化を行うことにより様々な res 類縁体を得た。また、ボロン酸 (**3**) と 4-メトキシスチレンの反応では、触媒に酢酸パラジウム (II) (5 mol%)、配位子に 1, 10-フェナントロリン (5 mol%)、溶媒に無水ジメチルアセトアミドを用いることで、res 前駆体を 90% と高収率で得た。さらに脱保護により (83%)、2 段階、75% で res を得る新たな合成法を開発した。同様に、DMU-212 (**2**) は、3, 4, 5-トリメトキシフェニルボロン酸を用い、1 段階、67% で合成が可能となった。



3-メチルコラントレンによるアリアル炭化水素受容体を介した多剤耐性遺伝子 *mdr1b* の転写調節

B12

○野村 文乃, 木根原 匡希, 福田 伊津子, 芦田 均 (神戸大院農)

【目的】多剤耐性遺伝子 *mdr1b* は、ABC 輸送体の一つであり、環境汚染物質である 3-メチルコラントレン (3MC) により誘導される。すなわち、3MC とアリアル炭化水素受容体 (AhR) との結合により誘導された薬物代謝酵素 CYP1A1 は 3MC を代謝する。転写因子 p53 は 3MC の代謝物により活性化され、*mdr1b* のプロモーター領域に結合することで *mdr1b* の発現を誘導する。先行研究により *mdr1b* のプロモーター領域にダイオキシン応答配列のコンセンサス配列 (GCGGG) とその類似配列を含む AhR 結合領域が存在することが明らかにされた。しかし、*mdr1b* の発現誘導に AhR が直接関与するかは不明である。そこで本研究では、p53 結合領域または AhR 結合領域を含むプロモーター領域を欠損させたレポーターベクターを用いて、3MC により活性化された AhR がレポーター活性に与える影響を検討した。

【方法】マウス肝がん由来 Hepa-1c1c7 細胞に、AhR のリガンドである 3MC または 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) を作用させ、*cyp1a1* と *mdr1b* の mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法により、CYP1A1 と p53 のタンパク質発現量をウエスタンブロット法により検討した。また、この細胞に p53 結合領域または AhR 結合領域を含む *mdr1b* プロモーター領域を組み込んだプラスミドを導入し、それぞれのレポーター活性を測定した。

【結果・考察】3MC と TCDD はいずれも *cyp1a1* mRNA とそのタンパク質量を増加させた。TCDD は *mdr1b* mRNA 量を増加させなかったが、3MC は *mdr1b* の mRNA 量およびレポーター活性を増加させた。このとき、p53 結合領域だけでなく AhR 結合領域が存在した場合、レポーター活性がより増加した。これらの結果から、3MC により活性化された AhR が *mdr1b* プロモーター領域に直接結合し、転写活性を促進している可能性が示唆された。現在、AhR タンパク質と *mdr1b* プロモーター領域 DNA との結合を調べている。

アナモックス反応を利用したアンモニア含有廃水の簡易な新規処理方法の開発

B13

○平岡 弘成, 井原 法人, 松本 怜, 金川 貴博 (京都学園大バイオ環境)

【目的】アナモックス反応とは、嫌気性のアナモックス菌が、アンモニアと亜硝酸を基質にして窒素ガスを生成する反応である。この反応を用いて、廃水中のアンモニア性窒素を除去する方法が開発され、実用化が進みつつある。この反応を廃水処理に利用するには、前段階として、好気性菌である亜硝酸菌を使って廃水中のアンモニアの半量を亜硝酸に酸化させるプロセスが必要であるため、処理装置としては、好気槽と無酸素槽とを使う 2 槽型の装置が開発されているが、最近の主流はこの 2 つのプロセスを同一の槽内で行わせる 1 槽型の装置である。1 槽型では、担体を用いる方法と、粒状化した菌を用いる方法がある。私たちは、粒状化したアナモックス菌とフロック状の亜硝酸菌を混合して、好気槽に投入するという簡単な方法で、高速度にアンモニアを窒素ガスに変換することができることを発見した。そこで、この装置を 1 年以上にわたって運転して、処理性能を検討した。

【方法】曝気部の有効容積が 1 L の実験装置に菌を投入し、硫酸アンモニウム (濃度 1 g-N/l) を主成分とする無機の合成廃水を連続的に流した。装置は 30°C の恒温水槽に漬けた。装置内の液の pH を 7.8 に維持した。曝気量は、処理水の亜硝酸濃度を見ながら調節した。曝気量が少ないと菌の大部分が沈んだままになるので、途中からは、曝気部の攪拌が可能な容積 2 L の装置を用い、曝気部内の菌が全体に分散するようにした。装置を 2 つ用いて、装置 A では 負荷を 2.0 kg-N/m³・day にして処理の安定性を試験し、装置 B では負荷を 4.0 kg-N/m³・day にして処理速度の向上を目指した。

【結果と考察】装置 A では、除去率 80% 以上を維持することができた。そこで、より簡単に処理ができるようにと、合成廃水に炭酸水素ナトリウムを添加して、曝気部の pH 調整をやめたところ、処理が悪化した。そこで、炭酸水素ナトリウムの添加量を減らしたところ、再び順調に処理できた。装置 B では、最大で 2.9 kg-N/m³・day の処理速度が得られた。現在、粒子状の菌を使う 1 槽型装置では 1.5 kg-N/m³・day の負荷での運転が世界最高であり、これよりも高い負荷での運転が可能であった。

C01

マルタニシ (*Bellamyia chinensis laeta*) 由来の CMCCase の精製・性質と遺伝子クローニング

○川崎 恵子¹, 上田 光宏¹, 丸山 智史¹, 中澤 昌美¹, 宮武 和孝¹, 坂口 実², 井上 國世³ (1 阪府大院・生環科, 2 大薬大・薬, 3 京大院・食生科)

【目的】近年、化石燃料に代わる燃料として木質系バイオマスを原料とするバイオ燃料の開発が行われている。しかし、従来の方法では糖化を行う際に高温での処理が必要となるため、エネルギーが多量に必要となる。そこで、低温環境の中で生息するマルタニシ (*Bellamyia chinensis laeta*) に着目した。本研究では、循環型社会の構築や水質浄化に寄与できるツールを見出し、利用するためにマルタニシ由来のカルボキシメチルセルロース分解酵素 (CMCase) を単離・精製し、その性質を調べた。さらに遺伝子クローニングを行い全長遺伝子配列の取得を試みた。

【方法・結果】マルタニシを凍結乾燥後に破碎し、緩衝液に懸濁して酵素の抽出を行い、遠心分離後の上清を粗酵素液とした。この粗酵素液を陰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とクロマトフォーカシング等により CMCase を精製し、SDS-PAGE の結果より本酵素の分子質量が 70 kDa であることを明らかにした。最適 pH は 5.5、最適温度は 50°C で低温下でも活性を保持していた。また、セロオリゴ糖を用いた分解産物の解析から本酵素はエンド型の酵素であることを明らかにした。N 末端アミノ酸配列の分析を行ったところ、他の貝類由来のセルラーゼ (Glycoside hydrolase Family 9) と相同性が見られた。本酵素の N 末端アミノ酸配列と、内部アミノ酸配列、および他の貝類由来のセルラーゼで保存されたアミノ酸配列を基に縮重プライマーを設計し、PCR を行ったところ、1761 bp からなる全長遺伝子配列の取得に成功した。

C02

Thermotoga petrophila K4 株由来ファミリー A DNA ポリメラーゼ変異型酵素 L329A の逆転写活性の解析

○保川 清¹, 小西 篤¹, 篠原 まゆ¹, 長岡 英里子², 藤原 伸介² (1 京大院農, 2 関西学院大理工)

【目的】逆転写反応は RNA やプライマーの二次構造を減少させ反応効率を高めるために高温で行うことが望まれるが、逆転写酵素の熱失活が問題となる。好熱性細菌 *Thermotoga petrophila* K4 株由来ファミリー A DNA ポリメラーゼ (K4pol) は高い耐熱性と校正活性を有する。本酵素は逆転写活性をもたないが、本酵素の変異体 L329A は、RNA との結合においてリボース 2'位水酸基と立体障害を起こすと予測された Leu329 が Ala に置換されており、逆転写活性を有する¹⁾。本研究では、L329A の逆転写活性の酵素化学的な諸性質を検討した。

【方法】逆転写反応: poly(rA)-p(dT)₄₅ (T/P)、³H]dTTP 存在下で反応を行い、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反応速度を求めた。54°C 以上では T/P の解離がみられたため、反応温度は 37–52°C とした。

【結果と考察】1) L329A の 10 μM T/P 存在下、50°C での $K_{m,dTTP}$ と k_{cat} はそれぞれ $280 \pm 80 \mu\text{M}$ 、 $1.7 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$ であり、モロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV RT) の 37°C での値 (それぞれ $250 \pm 60 \mu\text{M}$ 、 $35 \pm 6 \text{ s}^{-1}$) を 100% とすると、 $K_{m,dTTP}$ は 110%、 k_{cat} は 5% であった。2) L329A の 200 μM dTTP 存在下、50°C での反応速度は、T/P 濃度の増加 (10–100 μM) に伴い減少し、100 μM での反応速度は 10 μM のときの 50% であった。このような活性低下は、MMLV RT では見られなかった。このことから、高濃度の鋳型プライマーが存在すると L329A による cDNA 合成反応の効率が下がる可能性が示唆された。3) L329A の活性は反応温度の上昇 (37–52°C) に伴い増加した。アレニウスプロットより、L329A の 65°C での活性は MMLV RT と同程度と考えられた。

【文献】1. S. Sano, Y. Yamada, T. Shinkawa, S. Kato, T. Okada, H. Higashibata, S. Fujiwara (2012) *J. Biosci. Bioeng.* 113, 315-321

C03

○村島 惇, 矢野 克弥, 牧村 美幸, 竹原 宗範, 井上 吉教, 熊谷 勉 (滋賀県大工)

【緒言】芳香族カルボン酸エステルの加水分解酵素は、環境負荷物質の分解に加え、香料や保存料などの生産への寄与が期待されているが、既知のエステラーゼは比較的狭い基質特異性を示す。当研究室では、Dethyl terephthalate (DET) を資化する *Sporosarcina* sp. SP-04 株より新規エステル加水分解酵素遺伝子をクローニングし、組換え酵素を精製した。基質特異性試験により本酵素 (EstAC) は、芳香族カルボン酸エステル以外にも短鎖脂肪酸エステルなどに対しても加水分解活性を示し、広範な基質に対応できる柔軟性に富む酵素であると考えられた。EstAC は桂皮酸エチルに対しても活性を示したことから、本研究ではフェルラ酸エステルに対する活性を測定した。またより詳細な触媒機構を明らかにするために、ホモロジーモデリングに基づき活性部位についての解析を行った。

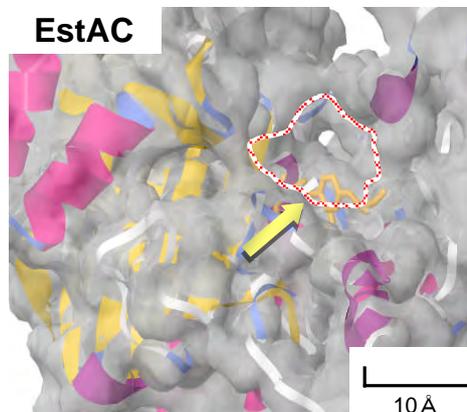


Figure 1. Catalytic site of EstAC.

【実験方法】フェルラ酸エステルに対する活性を pH stat により測定した。また、ホモロジーモデリングにより EstAC の三次元構造を予測し、さらに本酵素と相同性を示す酵素の三次元構造との比較も行った。

【結果と考察】活性測定の結果、本酵素はフェルラ酸エステルに対しても活性を示すことが確認された。また本酵素の活性部位 (Figure 1) の入り口は、27.2%の配列相同性を示す *Burkholderia gladioli* EstB と比べると、約 14 Å と広く、DET などの芳香族カルボン酸エステルを取り込むのに十分な広さであることがわかった。さらに、基質結合部位付近には芳香族アミノ酸残基が高い頻度で見出されたことから、 π - π スタッキングによる親和性を示す芳香族カルボン酸エステルを取り込めることが考えられた。

酵母カルボキシペプチダーゼ Y の V 形ヘリックスの固定化の検討

C04

○牧野 舞¹, 佐原 健彦², 森田 直樹², 植野 洋志¹¹奈良女大院・人間文化・共生, ²産総研・生物プロセス研究部門

カルボキシペプチダーゼ Y (CPY) は *Saccharomyces cerevisiae* の代表的な液胞加水分解酵素である。不活性型の前駆体タンパク質として合成されたのち、糖鎖修飾を受けて液胞へと輸送されることから、液胞タンパク質輸送の分子メカニズムの研究においてモデルタンパク質として扱われる。N 末端のプロペプチドが切断されて得られる活性を持つ成熟型 CPY の立体構造は α/β hydrolase fold family に属しヒトカテプシン A などと類似する。立体構造の詳細な検討から、2 本の α ヘリックスによって形成された特徴的 V 形ヘリックス構造の存在が判明し、分子内に 5 つ存在する SS 結合のうち 4 つが本構造の近傍に集中していることが示され、V 形ヘリックス構造の役割に注目することにした。V 形ヘリックスは活性中心ポケットへの入口を覆うように位置していることから、基質取り込み機構への関与を考えた。V 形ヘリックスの開閉が基質との結合にどのように影響するかを調べるために、V 形ヘリックスを固定するような変異型 CPY の作製を計画した。固定には V 形ヘリックスの一端と基質結合ドメイン側との間で SS 結合を形成させるように分子モデリングソフトウェアを用いたシミュレーションから置換させるアミノ酸残基を検討した。結果、Y225C 及び P315C の組み合わせ、並びに、Q228C 及び K314C の組み合わせを設計した。酵母のゲノム DNA から増幅した全長 CPY をコードする遺伝子 *prc1* 配列に部位特異的変異導入法により変異を導入し、酵母低温発現ベクターを用いて変異型 CPY を酵母内で発現させた。溶菌処理後、疎水性相互作用クロマトグラフィーによる精製を試みた。それぞれの変異型 CPY の可溶画分への回収量や酵素活性を野生型と比較し、変異の導入による影響を検討したので報告する。

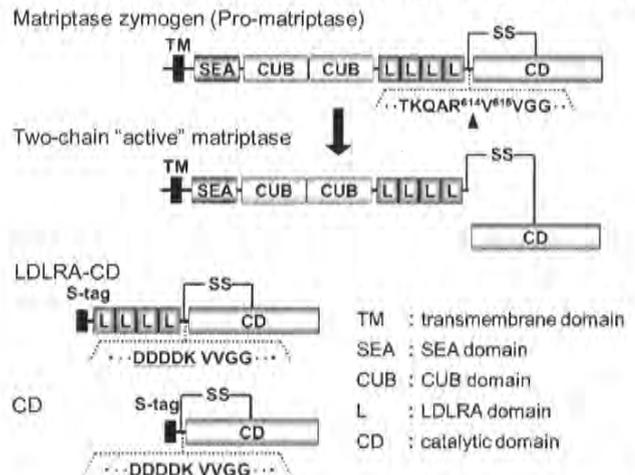
C05

マトリプターゼ前駆体の酵素活性に対する LDL 受容体クラス A ドメインの役割解明

○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・食生科)

【背景・目的】マトリプターゼは高等動物の上皮細胞に発現する膜結合性セリンプロテアーゼである。本酵素の前駆体（プロマトリプターゼ）はプロテアーゼ活性を有しており、この活性を用いて自己触媒的活性化が起こると考えられる。マトリプターゼは触媒ドメイン（CD）とその N 末端側に低密度リポタンパク質受容体クラス A (LDLRA) ドメインなどからなるステムドメインとから構成されている。本研究の目的は、マトリプターゼ前駆体の活性に対する LDLRA ドメインの機能を明らかにすることである。

【方法・結果】LDLRA ドメインと CD ドメインとからなる偽前駆体 LDLRA-CD と CD ドメインのみからなる偽前駆体 CD を CHO-K1 細胞を用いて生産した。偽前駆体では前駆体の自己活性化部位をエンテロキナーゼで切断されるように改変したものであり、これらは S-protein アガロースを用いてアフィニティー精製した。合成基質 Ac-KTKQLR-MCA および Ac-FTKQAR-MCA に対し、LDLRA-CD は CD よりも顕著に高い加水分解活性を示した。また、不活性型プロマトリプターゼ S805A の活性化部位の加水分解も、LDLRA-CD が CD よりも顕著に高い活性を示した。この結果から、LDLRA ドメインはマトリプターゼ前駆体の活性を高める効果があることが示された。



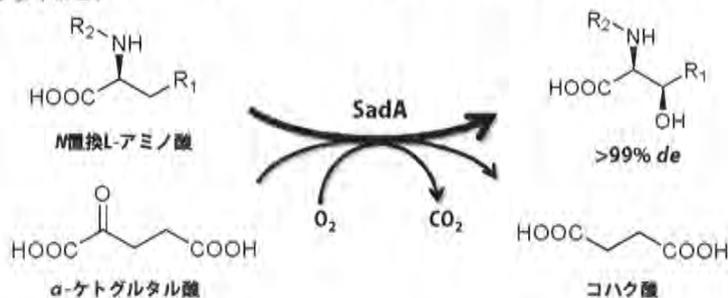
C06

Burkholderia ambifaria AMMD 由来 N置換アミノ酸β位水酸化酵素の機能解析

○日比 慎¹, 笠原 拓也², 河嶋 隆志², 横関 健三¹, 清水 昌², 小川 順²

(¹京大院農・産業微生物, ²京大院農・応用生命)

本研究室において見いだされた *Burkholderia ambifaria* AMMD 株由来の SadA は、Fe(II)/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼファミリーに属する酵素であり、様々な種類の N置換アミノ酸のβ位を高い立体選択性で水酸化する活性を有している。本酵素の詳細な基質特異性解析の結果より、SadA は N置換基としてアシル基やカルバミル基を持ったアミノ酸と反応する一方で、N置換基としてアルキル基を持つアミノ酸や N置換基を持たないアミノ酸とは反応しないことが明らかになった。また SadA は L 体の N置換アミノ酸のみと反応し、D 体の N置換アミノ酸とは全く反応しなかった。SadA が主に基質とすることができるアミノ酸骨格としては L-イソロイシン、L-ロイシン、L-バリンといった分岐鎖アミノ酸類であった。また、*B. ambifaria* AMMD 株のゲノム配列中において、*sadA* は十数個の遺伝子から成るある種の生合成遺伝子オペロンに含まれていた。このオペロン中にはアミノ酸スクシニラーゼをコードする遺伝子が存在しており、SadA との協調的な作用によりスクシニルアミノ酸の水酸化体を生合成しているものと考えられた。



C07

ラッカーゼが触媒する反応を用いた不飽和脂肪酸のジカルボン酸への変換

○竹内 道樹¹, 岸野 重信^{1,2}, 日比 慎², 小川 順¹

(¹京大院農・応用生命, ²京大院農・産業微生物)

【目的】ジカルボン酸は、ナイロンやポリエチレンテレフタラートのような各種高分子の共重合に用いられていることから需要の多い化合物である。我々は、以前より微生物機能を用いた不飽和脂肪酸の変換反応に関する研究を行っており、不飽和脂肪酸の水和・脱水反応や異性化反応、不飽和化反応、飽和化反応など、様々な新規反応を見出している。本研究では、その一環として、ラッカーゼを用いる不飽和脂肪酸の変換について検討し、ジカルボン酸生産の可能性を見いだしたので報告する。

【方法・結果】*Trametes* sp. Ha1 株由来のラッカーゼを用いて、1-hydroxybenzotriazole (HBT) をメディエーターとして添加し、様々な不飽和脂肪酸やその誘導体の変換を試みた。反応後、基質や生成物を10%メタノール含有酢酸エチルで抽出し、4%塩酸メタノールを用いてメチルエステル化した。得られたメチルエステル化物をガスクロマト (GC) 分析に供した。その結果、基質よりも炭素数の少ない化合物の生成が示唆された。そこで、未知化合物の同定を GC-MS 分析により試みたところ、標品との GC 保持時間や MS スペクトルの比較から、生成物は酸化炭素-炭素結合開裂により生成するジカルボン酸であることがわかった。さらに、銅イオン濃度の検討や、様々なメディエーターの検討、メディエーター濃度の検討を行ったところ、メディエーターは HBT が最も適しており、銅イオン濃度やメディエーター濃度が高いほどジカルボン酸の生成量が増加することがわかった。最終的に、約 10 mM の種々の脂肪酸から約 1 mM の対応するジカルボン酸の生産が可能となった。水酸基やカルボニル基を有する炭素数 18 の不飽和脂肪酸や二重結合の位置が異なる不飽和脂肪酸を基質としてジカルボン酸生産を試みた結果、開裂位置は基質分子内の二重結合位置や置換基の位置に影響を受けることが判明した。

筋肉細胞におけるプロポリス抽出物の GLUT4 膜移行促進作用機構の解明

C08

○上田 学, 芦田 均 (神戸大院農)

【目的】プロポリスは、古くから薬用として使用されており、様々な生理活性を有していることが知られている。近年、ブラジル産プロポリス抽出物が 1 型糖尿病モデルラットにおいて、血糖値低下作用を有することが示されたが、その作用機構は不明である。そこで本研究では、インスリン応答性糖輸送担体 (GLUT4) に着目し、糖の取り込み量が最も多い組織である筋肉において、プロポリス抽出物が GLUT4 の細胞膜移行を促進するか否か検討した。

【方法】*In vivo* 試験では、ICR マウスにプロポリス抽出物を 50 mg/kg BW または陰性対照としてポリソルベート 80(P80)を強制経口投与し、投与 1 時間後に摘出した筋肉を用い細胞膜上の GLUT4 の存在量をウェスタンブロット法により検出した。*In vitro* 試験では、ラット骨格筋由来 L6 細胞にプロポリス抽出物を様々な濃度で 15 分間作用させ、³[H]-2-デオキシグルコースを用いて糖取り込み活性測定を行った。また、細胞膜上の GLUT4 の存在量、GLUT4 細胞膜移行に関与するタンパク質のリン酸化および発現量はウェスタンブロット法により検出した。

【結果】*In vivo* 試験の結果より、プロポリス抽出物投与群では P80 投与群に比べて筋肉細胞膜上の GLUT4 の存在量が増加していた。*In vitro* 試験の結果より、プロポリス抽出物は濃度依存的に糖取り込みを促進し、1 μg/mL で有意であった。また、同濃度において GLUT4 の膜移行促進効果も確認された。これらの結果より、プロポリス抽出物は筋肉細胞において GLUT4 の細胞膜移行を促進することが判った。プロポリス抽出物による GLUT4 細胞膜移行促進作用機構を検討したところ、プロポリス抽出物は PI3K および AMPK のリン酸化を濃度依存的に促進した。さらに、プロポリス抽出物中の主要な成分であるケンフェライド、アルテピリン C、およびクマル酸が GLUT4 膜移行促進に寄与していることが明らかとなった。これらの結果より、プロポリス抽出物は筋肉において GLUT4 の膜移行を促進することで血糖値を低下させ、その有効成分はケンフェライドなどのポリフェノール類であることが示唆された。

ハナビラタケおよび脂質成分の免疫賦活作用の検討

C09

○庄條 愛子^{1,2}, 古郷 加奈¹, 小林 貴美子¹, 合田(山本) 麗奈¹, 中 崇³, 藤原 永年³, 北村 進一², 水野 淨子^{1,3} (1相愛大、2大阪府大、3大阪市大)

【目的】ハナビラタケはβ-グルカンを高濃度に含有し、抗腫瘍作用、血糖値低下作用および全身性の免疫賦活作用が報告されている。これらの作用はハナビラタケに含まれるβ-グルカンによるものと報告されているが、β-グルカンの含まれない低分子画分においても、高い損傷治癒効果が報告されている。また、キノコに含まれる微量な脂質成分が免疫賦活作用、抗酸化作用を示すことが明らかにされていることから、ハナビラタケおよび脂質成分の免疫賦活作用および腸内菌叢改善作用について検討を行った。

【方法】ハナビラタケ子実体は凍結乾燥後、粉末化してマウス基礎飼料(AIN-93)に2%添加した。凍結乾燥ハナビラタケ子実体2%等量から水:クロロホルム:メタノールを用いて脂質成分を抽出し、窒素乾固させた後に70%エタノールで再溶解して、AIN-93に添加した。マウスは自由摂食・摂水条件下で2週間飼育し、飼育期間終了時に4時間絶食させてサンプリングを行った。ハナビラタケおよび脂質成分投与前および24時間後に新鮮糞を回収し、糞IgA濃度を測定した。またサンプリング時の盲腸内容物を用いて腸内菌叢解析を行った。【結果と考察】対照餌、ハナビラタケ子実体および脂質添加餌飼育マウスでは、摂食量及び体重増加量には差は認められなかった。飼育期間終了時の血糖値は、ハナビラタケ子実体および脂質成分投与マウスで低下する傾向が認められた。小腸パイエル板の表面積は、ハナビラタケ子実体および脂質成分投与マウスで増加する傾向が認められた。ハナビラタケ子実体および脂質成分投与前および投与24時間後の新鮮糞を用いてIgA濃度を計測した結果、投与により糞IgA濃度が増加することが明らかとなった。さらに腸内菌叢解析の結果から、ハナビラタケ子実体投与マウスでは、LactobacillusおよびBifidobacteriumの著しい増加が観察された。またハナビラタケ脂質成分投与マウスにおいても、これらの腸内細菌数は高い値を示した。以上の結果から、ハナビラタケ子実体および脂質成分のパイエル板を介した腸管免疫賦活作用が示唆され、腸内菌叢の改善作用を有することが明らかとなった。

オカラ及びフスマ可溶化物の腸内菌叢改善効果

C10

○今井 ももこ¹, 庄條 愛子^{1,2}, 飯田 聡史¹, 大串 美沙¹, 原田 直樹³, 山地 亮一³, 乾 博³, 和田野 晃³, 中野 長久^{3,4}, 吉澤 みな子⁵
(¹大阪府大・地域連携, ²相愛大・人間発達, ³大阪府大院・生命環境, ⁴大阪女子短大, ⁵大手前栄養学院)

【目的】食素材加工の際に副生されるオカラおよびフスマについて、我々はこれまでに、加工処理を施し、水溶性の素材に仕上げることに成功している。それらを飼料として動物実験を行い、生理機能を検討し、その機能を加味した食材として、新規に開発することを目指し、腸内菌叢改善作用、脂質吸収抑制作用等の検討を行った。

【方法】加水下でオカラ、フスマ乾燥物をオートクレーブ処理し、セルラーゼ、ペクチナーゼ処理を行い、さらにガラスフィルターでろ過した液体部分を凍結乾燥し、可溶化物を得た。このオカラ、フスマの可溶化物を、マウスの標準食(AIN-93)および高脂肪食に3%添加し、Ba1b/cマウス(雄)を2週間飼育した。飼育後、血液、小腸組織、盲腸内容物を回収し、下記に示す各種分析を行った。

【結果と考察】高脂肪食に3%オカラ、オカラ可溶化物添加飼育マウスでは、盲腸内容物中の乳酸菌数が、普通食対照区の約10倍、高脂肪食対照区の約60倍にまで増加することがわかった。ビフィズス菌数は、高脂肪食摂取により、著しい減少がみられたが、フスマ可溶化物添加飼育マウスでは、高脂肪食対照区の約4倍に増加していることが分かった。また、3%オカラおよびフスマの、可溶化物添加飼育したマウスでは、対照区に比べて血中中性脂肪濃度が有意に低下し、また、オカラおよびフスマ添加飼育マウスでも、有意差は見られなかったものの、対照区に比べて血中中性脂肪の低下傾向がみられた。これらの結果より、オカラおよびフスマ可溶化物には腸内菌叢改善効果かつ脂質吸収抑制効果が期待できると考えられる。

C11

メタボロミクスによる遺伝子組換えバレイシヨ代謝成分の網羅的解析

○岩城 俊雄¹, L. Guo², JA. Ryals², 安田 周平¹, 島崎 高嘉³, 菊池 彰³, 渡邊 和男³, 春日 美江⁴, 篠崎 和子⁴, 太田 大策¹ (1大阪府大・生命環境, 2Metabolon Inc., 3筑波大・生命環境, 4国際農林水産業研究センター)

遺伝子組換え作物を食品として利用する場合には、慎重な安全性評価が求められる。すなわち、導入遺伝子の影響によって予期し得ない代謝成分変化が生じていないかどうかを検証することは、食品として利用する際の必須項目である。近年、ストレス耐性転写因子などを導入した遺伝子組換え作物が開発されているが、このような第3世代に分類される遺伝子組換え作物では意図しない生体成分組成の変動や好ましくない化合物が蓄積する可能性を完全には否定できない。

本研究では、第3世代遺伝子組換え作物の実例として、*AtDREB1A* 遺伝子が導入された組換えバレイシヨ塊茎のメタボローム解析を実施した。*AtDREB1A* は、シロイヌナズナにおいて低温および乾燥耐性に関わる転写調節因子である。供試バレイシヨ塊茎は、*AtDREB1A* を *CaMV35S* プロモーターにより構成的に発現させた系統 (35S)、乾燥・塩・低温ストレス誘導性の *rd29a* プロモーター下で発現させた系統 (D163, D164)、およびコントロール (NT) 植物体から収穫した。

35S, D163, D164 のそれぞれの組換え体では酸化型グルタチオン (GSSG) やγ-グルタミルアミノ酸のレベルが増加していた。同時に、γ-アミノ酪酸 (GABA) レベルも有意に増加していたことから、組換え体では、ストレス応答に関わる GSH および GABA 代謝の亢進が示唆された。さらに、ストレスホルモンであるエチレンの生合成に伴い産生されるβ-シアノアラニン (β-CA) が組換え体において有意に蓄積していた。但し、これらは毒性を示す値に比べ十分低い量であった。メタボローム解析に続いて、エチレンおよびβ-CA 代謝に関連する数種の遺伝子の転写産物蓄積量の比較を行ったところ、一部を除き組換え体において明確な発現量の違いは観察されなかったが、さらに解析が必要であることがわかった。以上より、遺伝子組換え作物の安全性評価には、予期されない代謝物変動の可能性のために、メタボロミクスなどの解析手法を適用する必要があることが確認された。

Properties of Rice Stem Extract Obtained by Subcritical Water/Ethanol Treatment

C12

○TANGKHAVANICH Boonnakhom, 大石 幸恵、小林 敬、安達 修二
(京大院農・食生科)

Rice straw is very abundant and considered as an agricultural waste. Many applications of rice straw as by-products have been investigated, but the used amount of rice straw is still small compared to the world wide annual production. Therefore, another application of rice straw should be investigated. At high temperature (100 to 374°C), water can maintain its liquid state by pressurizing and is called subcritical water. Because subcritical water has a low dielectric constant and a high ion product, the subcritical water treatment of rice stem is a promising mean to recover the beneficial substances through hydrolysis and extraction.

In this study, the stem of rice straw was treated with subcritical water, ethanol, and their mixture at 170 to 230°C. The extracts were subjected to measure their yield, total carbohydrate, and phenolic contents, as well as the UV-Vis absorption spectra, HPLC profile, and the radical scavenging activity.

The higher yield and total carbohydrate content of stem extract were achieved at the higher treatment temperature and at the higher ethanol content. The maximum yields and total carbohydrate content were achieved when rice stem was treated with 50% (v/v) subcritical ethanol/water at 230°C. The different HPLC patterns of phenolic compounds of extracts were obtained using different extractants. The extract obtained using 75% (v/v) subcritical ethanol/water at 230°C had the highest total phenolic content and radical scavenging activity

C13

亜臨界状態のアセトン水溶液を用いて得られた脱脂米糠抽出物の5軸レーダーチャートによる抗酸化活性の評価

○謝 裕基, 邱 泰瑛, 小林 敬, 安達 修二 (京大院農・食生科)

【目的】

臨界点以下の温度において、圧力をかけることにより液体状態を保った水を亜臨界水という。当研究室では、亜臨界水ならびに亜臨界状態の水/有機溶媒混合液を用いて、農産廃棄物の1つである脱脂米糠を処理し、得られた抽出物の特性を評価してきた。これまでの研究で、亜臨界状態の40% (v/v) アセトンを用いて脱脂米糠を処理して得られた抽出物のアセトン可溶画分が、とくに高いDPPHラジカル消去活性を示すことを明らかにした[1]。しかし、DPPHラジカルは、本来、生体内には存在しないラジカルであるため、抽出物の抗酸化活性を十分に評価できないと考えられる[2]。そこで本研究では、寺嶋らが考案した5軸レーダーチャート[2]により、抽出物の抗酸化活性を総合的に評価した。

【方法・結果】

脱脂米糠3gに対して抽出溶媒を72mL加え、回分式耐圧装置を用いて230°Cで5分間処理した。抽出溶媒には、水と40% (v/v)アセトンの2種類を用いた。得られた抽出液から溶媒を減圧除去した。得られた抽出物にアセトンを加え、十分に混合した後に遠心分離を行い、上清を得た。これを減圧乾燥して、アセトン可溶画分を得た。得られた抽出物およびアセトン可溶画分について、5種類のラジカルまたはイオン(DPPHラジカル、ペルオキシラジカル、ヒドロキシラジカル、次亜塩素酸イオンおよびパーオキシナイトライト)に対する抗酸化能を評価した。その結果、亜臨界状態の40% (v/v)アセトンによる脱脂米糠抽出物は、亜臨界水による抽出物よりも高い抗酸化活性を示した。また、アセトン可溶画分は、分画前の抽出物よりも抗酸化活性が高かった。

【文献】

[1] Chiou *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (in press)

[2] Terashima *et al.*, *Food Chem.*, **120**, 150-155 (2010).

畑地根粒菌叢に関する研究

D01

加藤 浩一, プリエト ラファエル, 関谷 次郎, ○高瀬 尚文
(京都学園大・バイオ環境)

【背景】 土壌評価は、物理的要素、化学的要素、生物的要素からなされるが、生物的要素に関しては、十分な評価基準が定まっているとは言い難い。本研究では、畑地土壌の生物的要素に関する情報を収集することを目的に、京都学園大学実験圃場を対象地を選び、同圃場土壌に生息する根粒菌を分子生物学的手法による同定に取り組んだ。

【方法】 各種マメ科作物の市販種子を同圃場に直接播種し、開花期にある植物体から根粒を取得した。根粒から抽出した DNA を鋳型に、窒素固定酵素をコードする *nifH* 遺伝子の部分 DNA を縮合プライマーで PCR 増幅したものを TA クローニングし、塩基配列を決定した。NCBI に登録されている *nifH* 遺伝子の塩基配列を元に、各 PCR クローンに対して ClustalW による系統解析を行い、帰属された微生物を同圃場土壌に生息する根粒菌とした。

【結果と考察】 ダイズ、エンドウ、インゲン、ササゲ、ラッカセイ、ナタマメの根粒に含まれる *nifH* 遺伝子の系統解析の結果、京都学園大学実験圃場土壌には、*Bradyrhizobium elkanii*、*B. japonicum*、*Rhizobium etli*、*R. phaseoli*、*R. leguminosarum* あるいはこれら近縁種の生息が確認された。また、*B. japonicum* に帰属した *nifH* 遺伝子のコード領域内には、アミノ酸置換に加え、欠失が認められる PCR クローンがあり、同土壌に生息する *B. japonicum* の遺伝的多様性が示唆された。

“米のとぎ汁発酵液”の特性とトマトかいよう病菌の増殖抑制

D02

○中田 達矢¹, 河上 晃平¹, Rafael Prieto², 高瀬 尚文^{1,2}, 川口 章³, 関谷 次郎^{1,2}
(¹京都学園大院・バイオ環境, ²京都学園大・バイオ環境, ³岡山県農林水産総合センター・農業研究所)

【目的】 さまざまな民間農業資材が植物病害の防除に用いられているが、米のとぎ汁と牛乳から調製した発酵液（以後とぎ汁発酵液と称す）もその一つであり、病害防除に効果をあげていると報告されている。しかし、とぎ汁発酵液の特性などは明らかにされていない。今回は、このとぎ汁発酵液の特性について知見を得たので報告する。

【方法】 米のとぎ汁発酵液は、密閉容器に精白米を洗ったとぎ汁と市販の牛乳をを 4 : 1 の割合でよく混合し、25℃暗所で 2 週間以上静置培養して調製した。トマトかいよう病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* は岡山県のトマト圃場から分離されたものを使用した。*C. michiganensis* はポテトショ糖培地 (PS 培地) で培養した。増殖に与える影響は、PS 液体培地に *C. michiganensis* を一定量移植し、これにとぎ汁培養液を加えて 30℃で 24 時間振とう培養した後、660 nm の濁度から評価した。乳酸の定量はロシェ・ダイアグノスティクス社製のキットを用いた。

【結果】 とぎ汁発酵液は、培養開始後可燃性のガスを生成しながら発酵した。とぎ汁発酵液の当初の pH は 6.9 であったが、発酵の進行とともに pH が低下し、10 日目には pH は約 3.6 となり、以後この pH であった。14 日目の発酵液の乳酸の定量を行うと、当初は存在しなかった D-乳酸が生成した。またオクタン酸などの脂肪酸も検出された。これらの結果から乳酸菌の関与が示唆された。とぎ汁発酵液はトマトかいよう病菌の *in vitro* 増殖を抑制したが、牛乳の代わりにホエーを用いてもとぎ汁の場合と同様な増殖抑制活性を示した。しかし、とぎ汁の代わりに米ぬか、あるいは牛乳の代わりに脱脂粉乳を用いた場合は増殖抑制活性は弱かった。

熱ストレス下での翻訳制御に関わるシス配列の解析

D03

○畑 健介, 上田 清貴, 米田 新, 出村 拓, 加藤 晃 (奈良先端大・バイオ)

植物が環境ストレスに曝されると大部分の mRNA からの翻訳は著しく抑制されるが、一部 mRNA からの翻訳は環境ストレス下においても維持される。この様なストレス下での翻訳制御には 5'非翻訳領域(5'UTR)が大きく関わる事が報告されている。当研究室ではこれまでに、熱ストレス下での翻訳制御に関わる 5'UTR 内の 2 つのシス領域(region1:5'端側から 1~7 nt, region2:12~32 nt)を同定しおり、さらに翻訳制御には region1 が主要な役割を担っており、region2 は region1 の補助的に機能することを明らかとしている。また、この 2 つの領域はその塩基配列のみだけではなく、それぞれの配列の位置関係も翻訳制御に重要であると考えられていた。そこで、環境ストレス下での翻訳制御機構を解明するために、この 2 つの領域の位置関係を詳細に解析した。具体的には、熱ストレス下において翻訳を維持する 5' UTR と翻訳が抑制される 5' UTR の region1 と region2 を入れ換えた 5' UTR を作製し、その region1 と region2 を本来の位置から移動させた様々な 5' UTR を持つレポーター mRNA (CAP-5' UTR - F-luc - AAAn) をシロイヌナズナプロトプラストに導入する、一過性発現実験を行った。熱ストレス下での翻訳状態をレポーター F-luc (Fire Luciferase) 活性値として評価し、region1 と region2 の位置関係が翻訳制御にどのように影響するのかを解析した。結果、region1 と region2 の位置を共に 5' 端側から少し移動させるだけで、翻訳状態が大きく変化することが示された。このことから、ストレス下での翻訳制御には、この 2 つのシス領域と 5' CAP 構造からの距離が重要であることが示唆された。特に、region2 のみを移動させた場合、5' CAP 構造からの距離が±1 nt 変化するだけで翻訳状態が大きく変化したことから、region2 が region1 の補助的機能を発揮するためにも、5' CAP 構造との距離が重要な役割を果たすことが考えられた。

イネにおいて熱ストレス下で翻訳を維持する 5'UTR の探索

D04

○西垣 直哉, 上田 清貴, 米田 新, 出村 拓, 加藤 晃 (奈良先端大・バイオ)

『目的』植物は、高低温、塩、乾燥などの様々な環境ストレスによる生育阻害を回避するために、種々の環境ストレス応答機構を有しており、遺伝子発現制御はその根幹である。近年、特に翻訳段階での制御もストレス応答において重要であることが明らかとなってきた。この翻訳制御の鍵となるのが 5'非翻訳領域(5'UTR)である。これまでにシロイヌナズナ *ADH* 由来の 5'UTR などが熱ストレス下での翻訳維持に寄与することが明らかにされているが、イネをはじめとする単子葉植物においてこれら 5'UTR は翻訳維持能力を発揮しない。そこで、本研究ではマイクロアレイ解析を用い、イネにおいて熱ストレス下での翻訳維持に寄与する 5'UTR をゲノムスケールで探索した。

『方法』イネ培養細胞を通常条件(28°C)と熱ストレス条件(41°C)でそれぞれ 10 分間処理し、細胞抽出液をポリソーム解析に供した。多数のリボソームが結合しているポリソームフラクションとリボソームが結合していないノンポリソームフラクションに存在する mRNA をそれぞれ回収し、マイクロアレイ解析に供した。解析結果を基に両フラクションにおける個々の mRNA の存在比率をポリソームスコア(PS)として数値化した。PS(28°C)と PS(41°C)、両スコアの差を ΔPS で表し、「熱ストレス下での翻訳状態変化」の指標とした【PS(41°C)-PS(28°C)= ΔPS 】。その結果を踏まえ、約 90 個の候補 5'UTR をレポーター遺伝子に連結した RNA コンストラクトを作製した後、PEG 法を用いてイネプロトプラストに導入した。28°Cおよび 41°Cで 20 分間のインキュベーション後、レポーター活性を測定する一過性発現実験を行った。

『結果と考察』一過性発現実験の結果、熱ストレス下においても通常条件と同程度の翻訳活性を示す候補は見つからなかった。しかし、翻訳が著しく抑制される候補がある一方で、ある程度翻訳を維持する候補が存在することが分かった。また、 ΔPS 値と一過性発現実験による実測値との間で緩やかな相関が認められた。

D05

成長と発達に伴う翻訳状態変化のゲノムワイドな解析

○山崎 将太郎, 上田 清貴, 米田 新, 出村 拓, 加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)

[背景・目的]

植物の遺伝子発現は成長に伴って変化している。遺伝子発現は転写・転写後・翻訳・翻訳後など複数の段階を経て行われているが、近年この中で翻訳段階での制御も重要であると考えられるようになってきている。そこで本研究では植物の成長における翻訳状態変化をゲノムスケールで解析することにより、翻訳段階での制御、およびその意義を明らかにすることを目的としている。

[方法]

シロイヌナズナ植物体の成長に伴う全体的な翻訳状態変化をポリソーム解析によって評価した。続いて個々の mRNA の翻訳状態変化を調べるためにポリソーム/マイクロアレイ解析を行った。さらに特徴的に翻訳状態が変化した mRNA について、ポリソーム/定量 RT-PCR 解析を行い、マイクロアレイ結果を追試した。

[結果]

ポリソーム解析の結果、全体的な翻訳状態は成長と共に抑制されていくことが明らかとなった。さらにポリソーム/マイクロアレイ解析より、個々の mRNA の翻訳状態変化を解析すると、多くの mRNA が、全体的な挙動と同じく抑制されていた。しかし、mRNA の中には翻訳状態が変化せず、維持されているものも存在していた。これらの翻訳状態変化を遺伝子の機能集団別に分類したところ、特に抑制されるまたは維持される機能集団が見つかった。また今回の結果と、当研究室でこれまでに解析した熱や塩などの環境ストレス下での翻訳状態変化の結果をゲノムスケールで比較した。これらの結果についても合わせて報告する。

シロイヌナズナにおける Ca^{2+} シグナリングを介した熱ショック転写因子 HsfA2 の環境ストレス応答

D06

○小林 宏太¹, 野坂 亮太¹, 丸田 隆典², 薮田 行哲³, 田茂井 政宏¹, 重岡 成¹
(¹近畿大院・農・バイオ, ²島根大・生資科・生命工, ³鳥取大・農・生資環)

高等植物は種々の環境ストレスに迅速に応答するストレス防御機構を進化の過程で獲得してきた。熱ショック転写因子 HsfA2 は種々の細胞防御関連遺伝子を誘導することで酸化的ストレス耐性能の獲得に寄与する重要な転写因子である (Plant J. 2006)。これまでに、Hsf ホモログである HsfA1d および HsfA1e が HsfA2 のプロモーター領域に保存されている熱ショックエレメント (HSE) を介して HsfA2 の発現を制御していることを明らかとした (Plant Cell Physiol. 2011)。しかしながら、ストレス条件下における HsfA1d および HsfA1e の活性化機構とより初期のシグナル伝達の詳細は不明である。ところで、高等植物の熱ストレス応答の初期において細胞質内の Ca^{2+} 濃度が上昇し、これがセカンドメッセンジャーとして機能する (Ca^{2+} シグナリング) ことが明らかとなっている。また近年、熱ストレス応答性の Ca^{2+} 受容体である Calmodulin (CaM) 3 が HsfA2 の標的因子である Hsp の発現制御に関与しているという報告があり、HsfA1d および HsfA1e を介した HsfA2 の熱ストレス応答に Ca^{2+} シグナリングが関与する事が示唆された。

そこで本研究では、HsfA2 の環境ストレス応答機構の解明を目的として、HsfA2 の熱ストレス応答に Ca^{2+} シグナリングが関与しているか解析を試みた。まず、シロイヌナズナに Ca^{2+} キレート剤である EGTA (1-5 mM)、 Ca^{2+} チャネル阻害剤である塩化ランタン (25-100 μM) およびベラパミル (0.5-3 mM) により 20 min 処理し、その後熱ストレス処理 (37°C、15 min) を施した野生株を用いて HsfA2 の発現レベルを real-time PCR により解析した。その結果、すべての薬剤処理において濃度依存的な HsfA2 の熱ストレス応答の抑制が認められた。さらに、CaM3 欠損株における HsfA2 の熱ストレス応答 (37°C、30 min) を解析したところ、HsfA2 の熱ストレス応答の抑制が認められた。

以上のことから、HsfA2 の熱ストレス応答性の発現には Ca^{2+} シグナリングが関与していること示唆された。

葉緑体型 NADPH 加水分解酵素 (AtNUDX19) によるストレス/ホルモン応答の バランス制御

D07

○吉田 幸史¹, 辻村 昌希¹, 間田 英里¹, 丸田 隆典², 田茂井 政宏¹, 吉村 和也³,
重岡 成¹

(¹近畿大院・農・バイオ, ²島根大・生資科・生命工, ³中部大・応生・食栄)

高等植物において NAD(P)(H) は、種々の代謝の補因子として必須であるとともに、細胞内レドックス状態の決定因子でもある。よって、細胞内における NAD(P)(H) レベルおよびレドックス状態の厳密な制御は成長やストレス・ホルモン応答の調節に重要である。最近我々は、シロイヌナズナ葉緑体型 NADPH 加水分解酵素、Nudix hydrolase 19 (AtNUDX19) の欠損は NADPH ステータスの変化、光合成および抗酸化系の活性化を引き起こし、光酸化的ストレス耐性能の向上につながることを明らかにした。よって、AtNUDX19 は NADPH 代謝を介した細胞内レドックス状態の調節因子として光合成やストレス応答に重要であることが示唆された。そこで本研究では、AtNUDX19 を介したストレス応答の制御機構のより詳細な解明を行なうために、マイクロアレイ解析を試みた。

通常光、強光照射下の野生株および AtNUDX19 欠損株 (KO-*nudx19*) を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、KO-*nudx19* 株では 1700 以上の遺伝子群の発現が変化していた。NADPH ステータス変化と発現に相関性が認められる遺伝子群の中で、耐病性ホルモンであるサリチル酸 (SA) 生合成・応答性遺伝子が多く存在していた。事実、KO-*nudx19* 株では SA レベルが有意に増加しており、本欠損株は SA に高感受性を示した。さらに、SA と拮抗的に作用するアブシジン酸 (ABA) およびジャスモン酸 (JA) 応答への関与について解析した。その結果、KO-*nudx19* 株は MeJA および ABA 処理に対して非感受性を、傷害および浸透圧ストレスに高感受性を示した。以上より、AtNUDX19 は NADPH ステータスの調節を介して SA 生合成・応答を負に制御することで、ストレス・ホルモン応答の全体的なバランス制御に関与していることが示唆された。現在、SA 欠乏変異株との二重変異株を用いた解析を行っている。

D08

経口ワクチン用キャリアーを目指したイネ種子 PB-I の特定部位への外来タンパク質局在化に関する研究

○佐生 愛¹, 重光 隆成¹, 齊藤 雄飛¹, 田中 愛実¹, 森田 重人^{1,2}, 佐藤 茂^{1,2},
増村 威宏^{1,2} (¹京府大院・生命環境, ²京都農技セ・生資セ)

近年、感染症を予防するための新たなアプローチとして、形質転換植物を用いたヒト用経口ワクチンの開発が試みられている。しかし、ワクチンタンパク質を消化管内の胃酸や消化酵素の分解作用から保護し、免疫原性を保ったまま、粘膜免疫の誘導に関与する腸管上皮組織まで到達させなければならず、その実用化は難しいのが現状である。そこで本研究では、イネ種子のタンパク質貯蔵オルガネラであるI型プロテインボディ (PB-I) を、腸管へ目的タンパク質を輸送するキャリアーとして利用することを考えた。これまでの研究で、PB-Iには10, 13, 16 kDaのプロラミンが層状に蓄積しており、ヒトの消化管では難消化性であることが明らかとなっている。研究の第一段階として、GFPをワクチンタンパク質のモデルとし、各種プロラミン-GFP融合タンパク質を胚乳組織で発現する形質転換イネを作出した。

それらのイネ種子を粉末化し、*in vitro*消化実験を行った後の試料を用いてSDS-PAGEとウェスタンブロット解析を行った。その結果、各種プロラミン-GFP融合タンパク質のPB-I内部における局在部位と消化酵素への耐性には関連性がある事が明らかとなった。さらに、透過型電子顕微鏡による形態観察では、消化実験後もGFPがPB-I内に残存している事が示された。以上の結果より、PB-Iに蓄積した外来タンパク質は、胃を通過して腸管まで到達する可能性が示唆された。さらにPB-I内部における局在部位によって、外来タンパク質の消化耐性能に差がある事が示唆された。これらのことより、PB-I内部におけるワクチンタンパク質の局在制御を人為的に行えば、将来腸管免疫をより効果的に誘導することができるキャリアーとしてPB-Iを利用することが出来ると考えられた。

D09

ダイズ種子における種子貯蔵タンパク質をキャリアーとする生理活性ペプチドの蓄積挙動

○丸山 伸之¹, 横山 和典¹, 藤原 圭吾¹, 澤田 真千子¹, 長谷川 久和³, 内海 成¹, 石本 政男², 寺川 輝彦^{**} (1京大院農・農学、²農生資研、³北興化学)

【目的】低コストでの生産が可能であることなどから、医薬用タンパク質などの有用タンパク質を植物を利用して生産する技術が注目されている。ダイズ種子はタンパク質含量が約 35%と高く、経口摂取も可能であることから、有用タンパク質生産のプラットフォームとして有望である。本研究は、主要な種子貯蔵タンパク質である 11S グロブリン(11S)をキャリアータンパク質として、そのディスオーダー領域に生理活性をもつペプチドを挿入した 11S(導入型 11S)を設計し、その蓄積挙動を解析することにより、ダイズ種子において有用ペプチドを大量生産するための基礎的知見を得ることを目的として行った。

【結果および考察】導入型 11S を発現させるダイズ系統として 11S および 7S グロブリンを欠損している JQ を用いた。野生型の 11S(WT)を発現させるとダイズ種子中においてタンパク質貯蔵液胞に輸送され特定の部位でプロセッシングを受ける。導入型 11S を発現させた種子を分析した結果、導入型 11S では WT でみられるプロセッシング部位に加えて、生理活性ペプチドを挿入した部位でも切断を受けていた。ゲル濾過クロマトグラフィーでの解析から、導入型 11S は内在性 11S と同様に部分的に分解を受けながらも WT と同様に 6 量体の会合体を形成していると考えられた。また、コンストラクトによっては分解を受けずに不溶性の状態でもプロ型として蓄積しやすいものもあり、そのようなものでは免疫電子顕微鏡観察においてタンパク質貯蔵液胞に加え、小胞体由来の構造体への局在も高頻度に見られた。このことは小胞体由来の構造体への蓄積が生理活性ペプチドの分解を回避する一つの方策となることを示唆している。さらに、小胞体由来の構造体を誘導するための予備的知見を得るために、小胞体への局在化配列を付加した 11S (WT-HDEL)を発現させた。一部が分解を受けているものの主にプロ型で存在し、小胞体由来の構造体に局在していた。現在、WT-HDEL の溶解性および会合体形成について導入型 11S との比較を行っている。

ヒトのミトコンドリア NADP⁺合成酵素発見のインパクト

D10

○河井 重幸, 大橋 一登, 川畑 豊, 村田 幸作 (京大院農)

【背景】NADP(H)は、細胞質やミトコンドリア(Mit)において、活性酸素種 (ROS) からの防御やレドックス制御などにおける還元力の供給源として不可欠である。Mit の NADP(H)供給源としては、(i) Mit 内膜の NADP(H)トランスポーター、(ii) NAD キナーゼ (NADK) による、ATP をリン酸供与体とした NAD⁺のリン酸化 (NADP⁺合成) 反応、(iii) NADH キナーゼ (NADHK) による、NADH のリン酸化 (NADPH 合成) 反応などが考えられるが、既報により、(i) は存在しないと考えられる。一方、(ii)と(iii)に関しても、ヒトの細胞質局在性の NADK の存在は知られているが、Mit 局在性の NADK あるいは NADHK のホモログがヒトゲノムに見出されない。すなわち、ヒト Mit の NADP(H)供給系の実体は不明であった。

【結果】NADK あるいは NADHK グループの中で、一次構造上、最も遠縁なシロイヌナズナ NADHK (NADK3) の一次構造に基づくデータベース検索の結果、N 末端に Mit 輸送配列をもつ機能未知タンパク質 C5orf33 をヒトゲノム上に見出した。出芽酵母の NAD(H)K 遺伝子の三重欠損株を用いた *in vivo* アッセイ、大腸菌で発現させ精製した C5orf33 タンパク質の酵素科学的諸性質の決定、ヒト HEK293A 細胞を用いた免疫蛍光染色および細胞分画実験、ならびに各臓器における C5orf33 遺伝子とヒト NADK 遺伝子の転写量の qPCR による絶対定量などにより、C5orf33 タンパク質がヒトの Mit 局在性 NADK (NADP⁺合成酵素)であることが証明された。すなわち、ヒト Mit の NADP(H)供給系の実体が明らかとなった。C5orf33 はリン酸供与体としてポリリン酸も利用した。これは、既知の真核生物の NAD(H)K には見られない、グラム陽性細菌や古細菌の NADK に特有の性質であった。ヒトの Mit 局在性 NADK とヒト細胞質局在性 NADK の性質と構造上の相違点、ならびに当該 Mit 局在性 NADK 発見の意義を生理的および進化的観点から考察する。

前立腺におけるアンドロゲン受容体とタンパク質アルギニンメチル基転移酵素 10 の相互作用について

D11

○高木 俊樹¹, 原田 直樹¹, 三谷 壘一¹, 山地 亮一¹, 中野 長久², 乾 博³
(¹大阪府大・生命環境, ²大阪女子短大, ³大阪府大・栄養)

【目的】核内受容体ファミリーの一員であるアンドロゲン受容体 (AR) は、男性ホルモンであるジヒドロテストステロン (DHT) をリガンドとして機能する受容体型転写因子で、正常な前立腺組織の発達や維持のみならず、前立腺がん細胞の増殖にも寄与する。AR の転写活性制御機構の破綻による機能亢進が前立腺がん進展の一因となるために、AR と複合体を形成して AR 機能を調節する転写共役因子は、創薬のターゲットとなる可能性を秘めており、その同定と活性制御機構の解明が課題となる。そこで本研究では、AR の転写活性を特異的に制御する転写共役因子を探索するために、他の核内受容体と相同性が低い N 末端ドメインに結合するタンパク質の検索を行った。

【方法・結果】AR の N 末端ドメインのうちアミノ酸配列 1-98 の領域 (AR(1-98)) をベイトとし、酵母の栄養要求性の回復と β -ガラクトシダーゼ活性の上昇を指標とした酵母 two-hybrid スクリーニングを行った結果、候補タンパク質としてタンパク質アルギニンメチル基転移酵素 10 (PRMT10) を獲得した。獲得した PRMT10 の C 末端領域 (アミノ酸配列 796-845) と AR の N 末端ドメインを含む領域 AR(1-660) は、前立腺がん細胞内でも相互作用することが判明した。ラット組織における PRMT10 の発現を RT-PCR で解析した結果、PRMT10 は生殖器官である前立腺、精巣上体、精巣で発現量が多く、AR の組織分布と類似していた。また、免疫組織化学染色の結果、PRMT10 は AR と同様に前立腺上皮細胞の核内に多く見られた。次に、前立腺がん細胞株 LNCaP の増殖に及ぼす PRMT10 の影響を調べたところ、siRNA により PRMT10 をノックダウンすると DHT 依存的な細胞増殖が抑制された。さらに、DHT 依存的に PRMT10 の mRNA レベルが減少することが判明した。これらの結果から、AR と結合する因子として同定した PRMT10 は、前立腺上皮細胞に多く発現して AR の機能を促進する因子として作用すること、また AR 機能の亢進に伴って PRMT10 自身の発現を下げることで AR 機能の恒常性を保つ因子として働くと考えられた。

ヤスデにおけるマンデロニトリル酸化酵素の検出

D12

○市来 弥生, 森田 将史, 桑原 保正, 浅野 泰久
(富山県大・生工科・生工研セ, JST・ERATO)

【目的】オビヤスデ目ヤスデ類は、mandelonitrile などのシアン含有化合物やベンゼン誘導体を防御物質として放出する。さらに、分泌された mandelonitrile がその酸化物である benzoyl cyanide と反応することでシアン化水素と mandelonitrile benzoate が生じること、この反応は漏れ出たアルカリ性の体液による Schotten-Baumann 反応であることが報告されている。しかし、ヤスデ分泌腺中には主成分として mandelonitrile しか検出されない。おそらく分泌された mandelonitrile が酸化されて benzoyl cyanide が生じると推測されるが、その反応経路は不明である。そこで本研究ではヤンバルトサカヤスデを用いて、mandelonitrile の酸化に関与している酵素を検討した。

【実験方法および結果】ヤンバルトサカヤスデを Tris-HCl バッファー (pH 8) 中で破碎し、ヘキサンを加え脱脂した。得られたホモジネートに mandelonitrile のヘキサン溶液を添加し、二相系で反応させた。インキュベーション後、ヘキサン層を GC-MS で分析した。その結果、mandelonitrile benzoate の生成を確認した。これはホモジネート液に含まれる物質により mandelonitrile が酸化されて生じた benzoyl cyanide が、アルカリ条件下で速やかに mandelonitrile と反応したと考えられる。Amicon を用いて回収した高分子画分 (>10 kDa) とろ液に対して同様の処理を行った結果、高分子画分でのみ mandelonitrile benzoate の生成が見られた。一方、90°C で 30 分加熱処理したホモジネート液を用いた場合、mandelonitrile benzoate は生成されなかった。これらの結果は、mandelonitrile から benzoyl cyanide への変換に酵素が関与していることを示唆している。

D13

クローン病関連タンパク質 Dlg5 と TGF- β I 型及び II 型受容体との相互作用

○瀬崎 拓人¹, Lucia Tomiyama^{1,2}, 植田 和光^{1,2}, 木岡 紀幸¹

(¹京大院・農, ²京大 iCeMS)

クローン病関連タンパク質 Dlg5 は、N 末側から CARD ドメイン、coiled-coil ドメイン、4 つの PDZ ドメイン、SH3 ドメイン、GUK ドメインを持つ、MAGUK ファミリータンパク質に属するアダプター型のタンパク質である。Dlg5 は細胞-細胞間接着領域に局在し、接着装置の一部として働いていると考えられている。これまでに我々は、Dlg5 が TGF- β 受容体に依存したシグナルを抑えることで上皮間葉転換を抑制することを明らかにしてきた。本研究では、Dlg5 が TGF- β 受容体に与える影響について明らかにするために、Dlg5 と TGF- β 受容体との結合、さらに TGF- β 受容体の分解に与える Dlg5 の効果について検討を行った。

TGF- β 受容体はホモ 2 量体の I 型受容体とホモ 2 量体の II 型受容体からなるヘテロ 4 量体で機能することが知られている。まず、293T 細胞を用いて Dlg5 と TGF- β I 型受容体 (T β RI) および II 型受容体 (T β RII) の共免疫沈降実験を行ったところ、Dlg5 は T β RI および T β RII と結合しうることが分かった。また免疫染色の結果から、Dlg5 と T β RI は細胞の細胞膜上で共局在することを見いだした。次に、Dlg5 と T β RI および T β RII の結合部位の同定を行うために、様々な Dlg5 の欠失変異体を作製し、TGF- β 受容体との共免疫沈降実験を行った。その結果、T β RI は Dlg5 の 3 番目、4 番目の PDZ ドメインを含む領域と GUK ドメインを含む領域の少なくとも 2 か所と結合することが分かった。また T β RII は Dlg5 の T β RI 結合領域の 2 か所に加え、Dlg5 の N 末半分 (CARD ドメイン、coiled-coil ドメイン、1 番目、2 番目の PDZ ドメインを含む) にも結合することが分かった。これらの結果から、Dlg5 は複数の領域を介して TGF- β 受容体と複合体を形成することが明らかになった。次に Dlg5 が T β RI の分解に与える効果について調べた。Dlg5 を細胞に強制発現させると、T β RI の分解が促進された。

以上の結果から、Dlg5 は TGF- β 受容体と複合体を形成し、TGF- β 受容体の分解を促進することで、TGF- β シグナルを抑制していると考えられる。

E01

自然界からの油脂含有廃水処理に有用な微生物の探索

萩下 大郎¹, ○奥 裕規¹, 黒住 悟², 篠田 吉史¹, 清水 昌¹

(¹京都学園大・バイオ環境, ²積水アクア)

【目的】産業廃水・生活廃水に含まれる油脂を効率的に処理することが課題となっている。これまでに油脂含有廃水の処理を目的とした数多くの微生物製剤が開発されているが、実際の廃水処理において、微生物製剤の能力や廃水の性質等の影響で十分な効果が認められていないものが多い。よって、本研究では処理環境に適した多様な微生物のスクリーニングを目的として、油脂を分解する能力が高い微生物の探索を行った。

【方法】土壌・水田などから微生物源を採取し、食用油を単一炭素源として生育できる微生物を単離収集した。その単離株の培養液、菌体、培養上清をそれぞれ用いて、食用油を基質とする反応を行った。24時間の反応後、Bligh-Dyer法によって油脂成分を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて分析した。

【結果】土壌などの312サンプルから油脂を資化した微生物377株が単離された。油脂の分解反応(24時間)を行ったところ、単離株の培養液では156株、菌体反応では61株、培養上清を用いた反応では96株にTLC上のスポットに変化が見られた。油脂を分解した菌株は178株であった。これらについては、さらに油脂を短時間に分解する能力を調べた。短時間(8時間)の反応の間に、TLC上のスポットを完全に消失させる能力を持つものが7株確認された。これらの菌株については同定を行っている。

E02

植物性乳酸菌 *Lactobacillus* sp. NCCB100334 の分類学的特性と GABA 生産

○瀧井幸男¹, 井上裕美², 永吉恵美¹, 立里臨³, 大村聖子³, 關谷次郎¹

(¹京都学園大バイオ環境, ²武庫川女子大生活環境, ³(株)テクノスルガ)

【目的】ヘテロ発酵型乳酸菌は炭素源、生育環境 pH、共存酸素有無の培養条件によって代謝に大きい変化を起し多様な機能を発現することから食品産業上有用で、またその菌学的特性から分類学的研究の対象ともなっている。京漬物より得た乳酸菌 NSB1 は多様な炭素源資化性と γ -aminobutyric acid (GABA) 生産性を示し、当初その分類学的諸性質から *L.keferii* (Kandler and Kunath 1983^{vp}) に帰属するとしていた。しかしいくつかの炭素源資化性において *L.keferii* よりも *L.buchneri* に近似する性質を示したことから、詳細な 16S rDNA-Full 塩基配列解析を実施した。

【方法】嫌気条件下 GABA 生産は GYP 液体培地を用いて 28℃ で培養することにより求めた。炭素源資化能は、API50CHL のほか炭素源最少培地及び MRS 培地を併用して検討した。基準株との 16S rDNA 塩基配列では、アポロン DB-BA7.0 に対する BLAST 相同性検索により検討した。

【結果】乳酸菌 NSB1 は arabinose, ribose, galactose を発酵し mannose, cellobiose を発酵せず、15℃ で生育しアルギニンジヒドロラーゼ活性を示したことから *L.buchneri* の性状と一致したが、45℃、50℃ で生育する点は *L.buchneri* とは異なっていた。NSB1 は基準株 JCM1115 株に対し、99.8% の高い相同性を示した。さらに上位基準株 10 株の 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子解析の結果、*L.buchneri* とクラスターを形成し、このクラスターは 93% の高いブーストラップ値で支持された。しかし primer 箇所を除く NSB1 と基準株の塩基配列間には 4 塩基の明確な相違点 (G→A, C→T, C→T, T→C) が認められた。以上の結果、菌株 NSB1 は *L.buchneri* に最も近縁な *Lactobacillus* sp. NCCB100334 として寄託された。本菌株を 3% L-glutamic acid を含む GYP 液体培地 (培養初発 pH5.0 : GABA 量:0.005g/100 ml 以下) で 28℃ で嫌氣的に培養した結果、5 日目まで生育が最大に達し (培養後 pH6.15)、培養液内の GABA 量は 0.78g/100 ml に達した。

E03

Pseudomonas fluorescens KU-7 株の 2-ニトロ安息香酸に対する走化性

○藤岡 諒, 岩木 宏明, 長谷川 喜衛

(関西大・化学生命工)

【目的】細菌は、化学的環境変動を効果的にかつ速やかに感知して、生存に有利な環境に向かって移動することが知られている。このような細菌の応答システムは走化性と定義されている。細菌の中には、芳香族化合物に対し走化性を示す菌株も存在することから、それらの走化性能を利用することで、効率的な環境汚染物質の分解法の開発への応用が期待される。*Pseudomonas fluorescens* KU-7 株は、2-ニトロ安息香酸 (2-NBA) を 3-ヒドロキシアントラニル酸 (3-HAA) を經由して分解し、2-NBA に対し走化性を示す。我々は、これまでに、*P. fluorescens* KU-7 株の 2-NBA 分解系酵素遺伝子の解析を行うとともに、2-NBA に対する走化性レセプターであると推定される methyl-accepting chemotaxis protein 様遺伝子 (*nbaY*) の存在を明らかにしている。本研究では、*NbaY* の受容基質について検討を行った。

【実験方法と結果】*NbaY* が 2-NBA を認識しているかどうかを確認するため、相同組み換え法により 2-NBA ニトロレダクターゼ (*nbaA*) 遺伝子欠損変異株を造成した。この変異株は、2-NBA に対し走化性を示さず、3-HAA に対して誘因性の走化性を示したことから、*NbaY* は、2-NBA ではなく 2-NBA 中間代謝物を受容し走化性を示すことが分かった。そこで、*NbaY* が受容している中間代謝物を確認するため、3-HAA 3,4-ジオキシゲナーゼ 遺伝子 (*nbaC*)、2-アミノ-3-カルボキシムコン酸-6-セミアルデヒドデカルボキシラーゼ遺伝子 (*nbaD*)、2-アミノムコン酸 6-セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ遺伝子 (*nbaE*) 欠損変異株を造成した。これらの変異株について 2-NBA に対する走化性試験を行ったところ、*nbaC* 欠損変異株は走化性を示さず、*nbaD*、および *nbaE* を欠損させた変異株は忌避性の走化性を示した。これらの遺伝子欠損変異株の 2-NBA に対する忌避性については、現在検討中である。また、*nbaC* 欠損変異株が走化性を示さなかったことから *NbaY* が 3-HAA 以降の中間代謝物により、誘導されていることが示唆された。現在、*NbaY* の誘導についても検討を行っている。

E04

細菌 ABC トランスポーターと連携する基質結合タンパク質によるヘテロ多糖アルギン酸の認識機構

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)

【背景と目的】アルギン酸はグルロン酸 (G) とその C5 位エピマーであるマンヌロン酸 (M) から構成されるヘテロ多糖であり、分子内に G と M が各々豊富に存在する G-rich ブロックと M-rich ブロック、並びにランダムに結合する MG ブロックが存在する。アルギン酸資化性を示すグラム陰性 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株 (A1 株) では、ペリプラズムに局在する基質結合タンパク質 (AlgQ1 或いは AlgQ2) がアルギン酸を捕捉し、内膜 ABC トランスポーター (膜タンパク質 AlgM1-AlgM2 及び ATP 加水分解酵素 AlgS-AlgS からなる四量体) に運搬することにより、アルギン酸が高分子多糖のまま細胞質に輸送され、資化される。本研究では、互いに類似した立体構造を示す基質結合タンパク質 AlgQ1 と AlgQ2 に焦点を当て、それらのアルギン酸ヘテロ多糖の認識機構を解析した。【方法と結果】M/G 構成糖比の異なる 3 種類のアルギン酸を用いて、A1 株のアルギン酸資化性を調べたところ、A1 株はブロック特異性を示さず、何れのアルギン酸も良好に資化することが分かった。そのため、A1 株のアルギン酸輸送に関わる各タンパク質は、M と G の両方を認識できることが示唆された。AlgQ1 と AlgQ2 について、グルロン酸三糖 (GGG) とマンヌロン酸三糖 (MMM) に対する結合能を、リガンド結合によるタンパク質の熱変性挙動 (differential scanning fluorimetry: DSF) を調べることにより解析した。両タンパク質の融解温度 (T_m) は GGG と MMM の存在下で上昇し、その T_m の上昇度はオリゴ糖の濃度に依存するが、構成糖比には影響されなかった。このことから、AlgQ1 と AlgQ2 は G と M の両方を許容する結合サイトをもつことが考えられた。そこで、AlgQ1 と種々のアルギン酸オリゴ糖との複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により決定した結果、オリゴ糖のカルボキシル基は特定残基により特異的に認識されるのに対し、水酸基は柔軟に認識されることによって、M と G の両方が AlgQ1 と結合することが明らかになった。【結論】基質結合タンパク質のヘテロ糖認識機構が、ブロック特異性を示さない A1 株のアルギン酸資化性に対する要因の一つであると考えられた。Nishitani *et al.* (2012) *Biochemistry*, **51**: 3622-3633.

E05

ヒスチジンキナーゼ阻害剤シグナマイシン B の作用部位の解析

○犬飼洋一¹, 木野弘量¹, 岡島俊英², 五十嵐雅之³, 内海龍太郎¹

(¹近大・農・バイオ, ²阪大・産研, ³微化研)

近年、既知の抗生物質に対して耐性をもつメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)の発生が問題になっている。当研究室では、新規抗生物質の探索を土壌放線菌の天然抽出物から行った。その結果、MRSA、VRE、枯草菌などのグラム陽性菌の細胞壁合成制御を担う 2 成分情報伝達系(TCS)、WalK(HK, ヒスチジンキナーゼ)/WalR(RR, レスポンスレギュレーター)の WalK 阻害剤としてシグナマイシン B を見出した(1)。シグナマイシン B は、WalK の二量体形成ドメインに結合し、WalK の自己リン酸化を阻害し、WalK/WalR 制御下の遺伝子の発現を制御し、枯草菌や MRSA に対して、細胞分裂抑制と致死効果を示す。本研究では、シグナマイシン B が、実際に細菌細胞内の WalK の特定アミノ酸残基を標的にしているかどうかを明らかにするために、WalK の 2 量体ドメインの各種変異体を作成し、それらの変異体のシグナマイシン B に対する MIC を評価した。

WalK の 2 量体ドメインとしては、N 末端から、376 番目から 443 番目の領域を用いて、部位特異的な変異法によって、12 個の特定アミノ酸変異体を作成した。ついで、これらの変異体 WalK を過剰生産するために、発現ベクター pHT10 にクローニングした。その後、枯草菌 168 に形質転換後、IPTG 存在下で培養した、細胞抽出物に対して、抗 WalK 抗体を用いて、ウェスタンブロッティングを行い、変異体 WalK の発現条件を検討した。その結果、12 個の変異体 WalK が枯草菌において、高発現していることを確認した。IPTG 存在下、野生型 WalK の過剰生産株は、シグナマイシン B に耐性を示すが、12 個の変異体 WalK 過剰生産株においても、同様に耐性を示した。これらの結果は、シグナマイシン B の結合部位が、今回確認した以外のアミノ酸部位に存在することを示した。

1) Watanabe, T *et al.*, *Antimicrob. Agents Chmother.*56, 3657-3663 (2012)

細菌情報伝達コネクター因子、SafA の作用機構

E06

○吉谷 亘平, 石井 英治, 江口 陽子, 内海 龍太郎 (近大農・バイオ)

細菌には様々な外部の環境に適応するための情報伝達機構を持っており、そのうち、センサータンパク質と転写制御因子レスポンスレギュレーター (RR) から構成される二成分制御系が存在する。近年、二成分制御系の機能を修飾するコネクター因子が発見され研究が進められている。PhoQ/PhoP は Mg^{2+} に応答する二成分制御系で、ペリプラズム領域に存在する PhoQ のセンサードメイン (SD) が Mg^{2+} を感知すると、PhoQ/PhoP 系は抑制されるが、コネクター因子 SafA が PhoQ-SD に作用することで高 Mg^{2+} 濃度でも活性化する。その作用機構は不明である。

本研究においては、最初に SafA が PhoQ のどの SD 領域に作用しているかを明らかにするために、PhoQ に Mg^{2+} と SafA が競合的に結合しているのかを検討した。PhoQ-SD には Mg^{2+} が結合する酸性クラスターが存在するため、 Mg^{2+} 非感受性の酸性クラスター変異体を用いて SafA による PhoQ の活性化を PhoP レポーター株による β -galactosidase assay により比較したところ、SafA による活性が見られた。このことから SafA と Mg^{2+} は異なる領域で作用していることが示された。次に、PhoQ の活性に重要であると報告されているアミノ酸の変異体を作成し、PhoP レポーター株による β -galactosidase assay により活性を比較したところ、ペリプラズム領域に位置する PhoQ-SD の二量体形成に重要である R50A と D179R の変異体において SafA による活性化が低下した。このことから、D179 と R50 は SafA による PhoQ の活性化において重要な部位があることが示唆された。我々は PhoQ-SD の立体構造を見た際に D179 と R50 の側鎖周辺に空洞が存在していることから、その空洞に SafA がはまりこむことにより PhoQ を活性化しているのではないかと考え、その空洞に側鎖を向けているアミノ酸のアラニン置換変異体を作成し、SafA による活性を測定した。

TCS と PTS を繋ぐ RcsG の遺伝学的解析

E07

○深見 知可, 加藤 明宣, 萩原 慧, 内海 龍太郎 (近畿大院・農・バイオ)

細菌の情報伝達機構として二成分制御系(TCS)が知られる。サルモネラ菌染色体上には約 30 対の TCS がコードされている。これらが相互作用し高次なネットワークを形成することで、病原性調節に重要な役割を担っていると考えられる。我々は、コネクター因子を介する機構の更なる解明のため、新たなコネクター候補の探索を行っている。最近得られた RcsG について報告する。

莢膜多糖合成遺伝子群を活性化する RcsC/RcsD/RcsB 系は、histidine phosphotransferase (Hpt) ドメインを単独のリン酸基転移部位として保持する RcsD が、ヒスチジンキナーゼ RcsC とレスポンスレギュレーター RcsB の間でリン酸リレーを中継する変則的な TCS を形成している。RcsC を構成的に活性化したサルモネラの変異株は、その病原性を減弱させることがこれまでに報告されている。本研究では、この RcsC/RcsD/RcsB 系の活性化に関わる RcsG の分子機構について幾つかのヒントを得た。

RcsG の過剰発現によって、莢膜多糖合成関連遺伝子 *wzc* が活性化されるが、*rcsB*、*rcsC*、*rcsD* をそれぞれ欠損させた株では *wzc* は活性化されなかった。このことから、RcsG は RcsC/RcsD/RcsB 依存的に *wzc* を活性化することが示され、リン酸リレーの関与が示唆された。RcsG の直接的な標的を調べるために bacterial two-hybrid system (BACTH) による解析を行ったところ RcsD と RcsG 間で相互作用が検出された。しかし、RcsD のリン酸化部位を変異させると相互作用が失われた。さらに、*rcsG* は phosphotransferase system (PTS) の転写調節因子 *rcsH* や PTS regulatory domain (PRD) *rcsI* といった、他のスモールタンパク質をコードする遺伝子等とクラスターを形成しており、それらの遺伝子欠損による *wzc* 発現への影響が調べられた。その結果、*rcsG* 欠損株と *rcsH* 欠損株では、アンピシリンを含む LB 培地において *wzc* の顕著な発現低下が認められた。

遺伝子組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* ET3-6 が生産する glucoamylase の酵素学的特性

E08

○永吉 恵美¹, 三浦 由貴², 瀧井 幸男¹, 坪井 宏和³, 尾関 健二⁴

(¹京都学園大バイオ環境、²武庫川女子大生活環境、³(株)大関、⁴金沢工業大)

[目的]

麹菌(*Aspergillus oryzae*)のグルコアミラーゼ B (glaB) は、固体培養条件下において特異的に発現するが、固体培養に比べより扱いやすい液体培養での発現は固体培養時の 1/20 にすぎない。一方 *A.oryzae* から取得した高発現形質転換株 ET3-6 株は液体培養に於いて親株に比べ 55 倍に増加することが分かった。その高発現力をバイオマス資源からの効率的なグルコース生産に資することを目的として、ET3-6 株培養液より glaB を精製し、その酵素学的特性を調べた

[方法]

A.oryzae RIB40 をセルフクロニングし、窒素源選択性により glaB 高生産株 ET3-6 を取得した。ET3-6 株を DP 培地にて液体培養し、得られた上清を DEAE-cellulose イオン交換および、Sephacryl S-200 ゲル濾過を組み合わせた 2 段階のクロマトグラフィーを行い、純化標品を得た。酵素活性はキッコーマンの糖化力測定キットを用いて求め、1 ユニット(U) は、1 分間に 1 μ mol の基質を分解する力価とした。

[結果]

SDS-PAGE で単一タンパク質バンドを示す分子量 57,000 の純化標品を得たが、構造遺伝子領域から予測したアミノ酸 493 残基とよく一致していた。培養上清 (430ml) より得られた標品の回収率は 29.5% で 1.2 倍に精製され、比活性 5.66U/mg protein を示す純化標品 883mg が得られた。本酵素は、等電点 4.26 で、56°C において最大酵素活性を示し、15 分間処理後の活性は 56°C まで 100% 保持されていた。また pH4.5 で最大酵素活性を示し、pH3.05~5.13 の範囲で安定であった。

ET3-6 株が生産する glaB は、様々なデンプン質の糖化に有用であることから、今後は未利用バイオマス資源からの効率的なグルコース生産と利用について検討していきたい。

E09

非天然型経路を導入した新規イソブタノール生産酵母の開発

○伊田 賢吾¹, 松田 史生², 近藤 貴志², 石井 純², 近藤 昭彦¹

(¹神戸大院工, ²神戸大自然科学)

【目的】近年、微生物を用いた高級アルコール生産が注目されている。これまでに、アーリッヒ経路を導入し、バリン生合成中間体の 2-ケトイソ吉草酸から高効率にイソブタノールを生合成する大腸菌やコリネ菌が報告されている。本研究では、工業化に有利な酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にイソブタノール高生産能を付与することを旨とし、アーリッヒ経路の強化及び、非天然型経路の導入を試みた。

【方法】バリン生合成経路の酵素遺伝子 *ILV2*, *ILV5* 及び *ILV3* を酵母からクローニングし、それらのミトコンドリア移行シグナルを削除して *ILV2c*, *ILV5c* 及び *ILV3c* を作成した。2 μ 型複製起点を持つプラスミドベクターを構築し、酢酸リチウム法を用いて酵母 YPH499 に導入した。形質転換体を 5 mL の SD 選択培地中で培養し、72 時間後に培地中のイソブタノール含量を GC-MS を用いて測定した。

【結果】酵母 YPH499 に *Lactococcus lactis* 由来の遺伝子 *kivd* 及び酵母由来の *ADH6* を導入しアーリッヒ経路を強化した株は、野生株の約 3 倍である 30 mg/L のイソブタノールを生産した。更に、ミトコンドリアに局在するバリン生合成経路の一部をサイトゾルにも構築し、生産量向上を試みた (Fig. 1 点線経路:非天然型経路)。ミトコンドリア移行シグナルを削除した *ILV2c*, *ILV5c* 及び *ILV3c* を導入し非天然型経路を構築した株のイソブタノール生産量は 62 mg/L まで向上した。また、*ILV2c*, *ILV5c* 及び *ILV3c* のいずれかを持たない株では、イソブタノール生産量の向上が見られなかったことから、サイトゾルに構築した非天然型経路が機能している事が確かめられた。

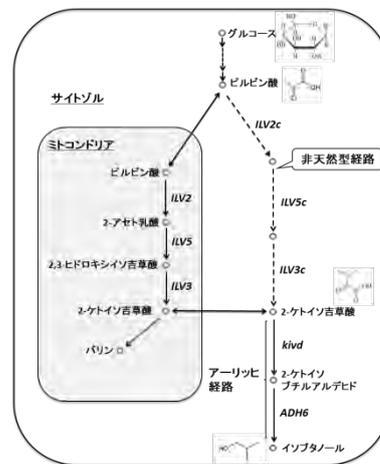


Figure 1 Metabolic pathway in yeast.

E10

Mediated flavoenzymes/peroxidase sensing systems with pentacyanoferrate-bound polymer as a mediator.

○Chi-Hua Nieh, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kenji Kano (京大院農)

Pentacyanoferrate-bound poly(1-vinylimidazole) polymer (PVI[Fe(CN)₅]), PVI[Os(dcbppy)₂Cl] (dcbppy=4,4'-dicarboxy-2,2'-bipyridine) and PVI[Os(dmebpy)₂Cl] (dmebpy=4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) were utilized to investigate the interactions with some flavoenzymes. Negatively-charged PVI[Fe(CN)₅] and PVI[Os(dcbppy)₂Cl] showed low activities as an electron acceptor for the flavoenzymes, while the catalytic oxidative current of PVI[Os(dmebpy)₂Cl] with neutral ligands was clearly observed. The results indicate that one of the factors to determine the mediating efficiency is related to the electrostatic interaction between enzyme and redox polymer. On the other hand, PVI[Fe(CN)₅] is a good electron donor for peroxidase (POD) to give a large catalytic reductive current of H₂O₂. The specific catalytic property of PVI[Fe(CN)₅] on POD and flavoenzymes shows its potential in the application of being the mediator in flavoenzymes/peroxidase bienzyme biosensors.

PVI[Fe(CN)₅] was then used as a mediator for the amperometric creatinine biosensor coupled with creatininase, creatinase, sarcosine oxidase and POD. It was applicable for urine creatinine tests and it showed a good correlation with Jaffe method. D-Amino acid oxidase/POD biosensor mediated by PVI[Fe(CN)₅] was also successfully constructed for determination of D-amino acids of low concentration. Interferants of high concentrations were eliminated by coupling with Nafion film and ascorbate oxidase, which shows its intended use in physiological samples.

膜酵素を用いた酵素電極反応効率改善へのアプローチ

E11

○河井 翔太¹, 薬師 寿治², 松下一信², 北隅 優希¹, 白井 理¹, 加納健司¹
(¹京大農, ²山口大農)

Gluconobactor sp. 由来のフルクトース脱水素酵素 (FDH) は FAD とヘム *c* を有するヘテロトリマーな膜結合酸化還元酵素であり, 生体内ではフルクトースの酸化反応を触媒する. また, 電極への直接電子移動 (DET) 反応を行うことができ, その反応性は非常に高い (Fig. 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. FDH のように DET 反応を行う酵素の報告例は少なく, その反応メカニズムの詳細は未だに不明な点が多い. 酵素によって DET 反応が行われる際, 実際に反応しているのはコファクターであるため, その種類や位置が DET 反応効率を左右する重要な要素であると推測される. 本研究では FDH を電極に対し, DET 反応が起きやすくなるように配向性をそろえる方法を検討し, 電極反応効率をさらに高めることを目的とした.

FDH と種々のキノン類との反応性を調べた結果, FDH はヘム *c* サイトによってメトキシ基を特異的に認識している可能性が高いことが判明した. また, これまでの研究により FDH はヘム *c* を介して DET 反応を行っている可能性が高いことが判明していた. そこで, 自己組織化単分子膜 (SAM) を用い, 電極上にメトキシ基を修飾させることにより, FDH のヘム *c* サイトにメトキシ基を認識させ配向性をそろえることを試みた.

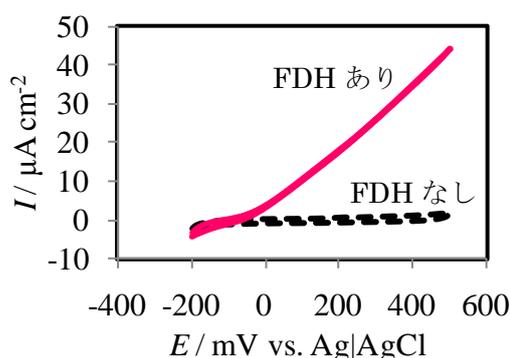


Fig. 1 FDH の DET 反応

脂質二分子膜を介したチャネル形成剤アンホテリシン B による物質透過

E12

○籠橋 宏樹, 山内 隆史, 北隅 優希, 白井 理, 加納 健司 (京大院農)

【目的】抗生物質のアンホテリシン B (AmB) はステロール類と 1 : 1 で結合し, それが凝集して孔径の異なるイオンチャネルを生体膜上に形成することが知られている. 本研究では, 平面脂質二分子膜 (BLM) 及びリポソーム膜を生体膜モデルとして用い, AmB によるイオン及びグルコースの膜透過挙動を調べ, 透過機構の経時変化を念頭に置いた解析を行った.

【方法】フォスファチジルコリンおよびステロール類より構成された平面 BLM を介した 2 水相間でのイオン透過は, 2 水相にそれぞれ挿入した Ag|AgCl 電極間に印加した電位差と 2 水相間で流れる電流 (2 水相にそれぞれ挿入した Pt 電極により測定) の関係曲線の解析によって調べた. また, グルコース溶液を封入したリポソームから, 外部水相に添加した AmB によるグルコースのリポソーム外への流出挙動についてもグルコース濃度の経時変化の解析結果より検討した.

【結果】コレステロールを含む系では, 時間の経過と共にアニオン透過選択性が顕著となった. また AmB 添加直後からグルコースの流出が観察されたが, 時間経過と共に流出が抑制され, 約 500 s 後には流出が停止した. ステロール類を含まない系では, AmB 添加によってカチオン透過選択性が現れた. また, グルコースの流出は遅いものの完全に流出した. これらの現象は AmB によるキャリア輸送とチャネル輸送の二種類の膜透過機構が組み合わさって生じており, 速度論的な解析によって透過挙動の詳細を解明した.

E13

○窪田 慎太郎, 白井 理, 北隅 優希, 加納 健司 (京大院農)

【目的】生体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機能の発現に重要な役割を演じている。特にチャネルによるイオンの膜透過は中心的な役割を果たしており、本研究では生体膜モデルである平面脂質二分子膜 (BLM) を用いてその特性を調べた。用いたチャネルは 2 分子で 1 つのチャネルを形成するポリペプチドとして知られるグラミシジン A (GA) で、GA によるイオン透過電流、特に単一チャネル電流の解析より透過特性について調べた。電解質としてはカリウム塩 (KF, KCl, KBr, KSCN など) と塩化物塩 (NaCl, KCl, RbCl, CsCl など) を用いた。水相の電解質濃度を非対称にして測定することでイオンのチャネル輸送を分配過程と拡散過程とに分けて評価することを試み、透過イオン選択性の発現機構や共存イオンによる阻害機構について検討した。

【方法】中央に小孔をあけたテフロンシートで隔てられた電気化学セルの 2 室に電解質を含む緩衝液を満たした後、phosphatidylcholine および cholesterol を含む *n*-decane 溶液を小孔部分に塗りつけて平面 BLM を作製した。なお、GA は BLM 作製溶液に溶解させて使用した。電気化学測定は、水相に挿入した Ag|AgCl 電極を用いて 2 水相間に電位差を印加し、その際流れる膜透過電流を 2 水相に挿入した Pt 電極を用いて検出した。2 水相の電解質濃度を非対称にする際は、濃度が等しい系でのチャネル活性の確認後に水相を交換することで行った。

【結果】GA を含む BLM 系では 2 水相間に電位差 (膜電位) を印加するとチャネル輸送に特徴的なステップ状の電流変化が観測された。今回は一つのチャネルの開閉に対応すると考えられるステップ一つ分の電流 (単一チャネル電流) について、非対称な系での結果から各電解質カチオン・アニオンの分配係数比と拡散係数比を評価した。その結果、GA チャネル孔 (孔半径 0.18 nm) より小さいイオンでは分配項が、大きいイオンでは拡散項が主に関わることで透過イオン選択性が発現されていることが示唆された。

2012日本農芸化学会関西支部大会 賛助社芳名 (五十音順)

大石酒造株式会社
株式会社 三煌産業
有限会社 篠ファーム
関酒造有限会社
有限会社 丹山酒造
ひろ季や

上記企業に協賛していただきました。

紙上を借りて厚く御礼申し上げます。(2012 日本農芸化学会関西支部大会実行委員会)

2012 日本農芸化学会 関西支部大会 実行委員会

実行委員長： 深見治一

顧問： 清水 昌， 關谷次郎

庶務： 坂本文夫

会計： 萩下大郎

プログラム： 篠田吉史， 清水伸泰， 高瀬尚文， 藤井康代

会場： 篠田吉史

受付： 藤井康代

懇親会： 金川貴博， 坂本文夫， 清水伸泰

日本農芸化学会関西支部 (<http://www.kansai-jsbba.jp/>)

〒 606-8502 京都市左京区北白川追分町 京都大学大学院農学研究科内

支部長： 加納健司

副支部長： 河田照雄

庶務幹事： 森 直樹 (TEL: 075-753-6307, FAX: 075-753-6312)

会計幹事： 白井 理 (TEL: 075-753-6394, FAX: 075-753-6456)