

日本農芸化学会関西支部会
第 477 回 講演会

講演要旨集

日時:平成 24 年 12 月 1 日(土)
会場:神戸大学大学院農学研究科

日本農芸化学会関西支部

支部賛助企業(50音順)

関西支部の活動は下記の賛助企業からの御支援により支えられています。

アース製薬(株)	東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所
植田製油(株)	ナカライテスク(株)
(株)ウォーターエージェンシー	(株)日本医化器械製作所
(株)カネカ	日本盛(株)
菊正宗酒造(株)	日本新薬(株)
黄桜酒造(株)	ヒガシマル醤油(株)
グリコ(株)	不二製油(株)
月桂冠(株)	松谷化学工業(株)
サントリー(株)	三井化学アグロ(株)
住友化学(株)	理研化学工業(株)
(株)第一化成	和研薬(株)
大日本除虫菊(株)	和光純薬工業(株)

プログラム

開会の辞(13:10-13:15) 山形裕士(神戸大院・農／幹事校代表)

<一般講演>

* 印は若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞対象講演

01. (13:15-13:27) デイラトメトリによるデュラムセモリナ中の水の部分モル体積の測定
○長谷川絢子, 小川剛伸, 安達修二(京大院・農・食品生物)
- *02. (13:27-13:39) 灌流誘起赤外分光法による光合成光捕集膜蛋白質複合体の構造解析
○永麗¹, 木村行宏^{1,2}, 大野隆¹(¹神戸大院・農、²神戸大・自然)
- *03. (13:39-13:51) ピペリンの筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進効果について
○白尾健、芦田均(神戸大院・農)
座長: 久世雅樹(神戸大院・農)
- *04. (13:51-14:03) 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構
○清水優子、鈴木悦子、佐々木俊弥、高木博史(奈良先端大・バイオ)
- *05. (14:03-14:15) 酵母における NO 合成酵素 Tah18 の活性制御メカニズム
○川原寛弘、西村明、高木博史(奈良先端大・バイオ)
06. (14:15-14:27) シロイヌナズナ ABA 応答性 MAP3K $\delta 4$ 過剰発現による成長促進および塩耐性の向上
○下道奈里子¹, 松岡大介¹, 南森隆司^{1,2}(¹神戸大院・農、²神戸大・遺伝子実験センター)
座長: 金丸研吾(神戸大院・農)

休憩 15 分 (14:27-14:42)

07. (14:42-14:54) NAD-非依存型ギ酸脱水素酵素を用いたバイオアノードへの展開
○丸山晃弘¹, 河井翔太¹, 高木一好², 北隅優希^{1,3}, 白井理¹, 加納健司^{1,3}
(¹京大院・農、²立命館大・応化、³CREST)
- *08. (14:54-15:06) 基質特異性を利用したバイオカソードの高性能化
○宋慶盛¹, 河井翔太¹, 北隅優希¹, 白井理^{1,2}, 加納健司^{1,2}(¹京大院・農、²CREST)
- *09. (15:06-15:18) *Chryseobacterium* sp.5-3B 由来 N-アセチルトランスフェラーゼの酵素化学的性質と遺伝子クローニング
○吉田健二、竹中慎治、吉田健一(神戸大院・農)
座長: 木村行宏(神戸大院・農)
- *10. (15:18-15:30) 新規リゾチーム阻害剤, N-アセチルキトオリゴシルモラノリン (GNn-M): リゾチームおよび Family GH-19 キチナーゼに対する阻害機構
○梅本尚之、尾形慎¹, 新家粧子、鈴木亜日里², 大沼貴之、沼田倫征³, 碓氷泰市¹, 深溝慶(近畿大院・農・バイオ,¹静岡大・創科技,²静岡大・農・応生化,³産総研・バイオメディカル)

*11. (15:30-15:42) プテロカルパン骨格の新規構築法に関する研究

○河野雄太、久世雅樹、滝川浩郷(神戸大院・農)

12. (15:42-15:54) ヒカリカモメガイ発光タンパク質のクロモフォア形成部位に関する研究

○久世雅樹、古市卓也¹、南郷成子、久保尚洋²、滝川浩郷
(神戸大院・農、¹名大・エコトピア、²神戸大・農)

座長: 竹中慎治(神戸大院・農)

休憩 11 分 (15:54-16:05)

<特別講演>

(16:05-16:40) [NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明

—放射光 X 線利用による精密構造化学—

○樋口芳樹(兵庫県大院・生命理)

座長: 白井康仁(神戸大院・農)

(16:40-17:15) X 線結晶構造解析による酵素機能の解明

○三上文三(京大院・農)

座長: 山形裕士(神戸大院・農)

(17:15-17:25) 若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞表彰・閉会の辞

加納健司(京大院・農/日本農芸化学会関西支部長)

*「神大文理農学部前」から阪急六甲, JR 六甲道へのバス時刻(36 系統 土曜日)

17 時 44 分 54 分

18 時 03 分 14 分 24 分 33 分

<懇親会>

「アカデミア館 3 階 さくら」(講演会場より徒歩約 10 分) にて 17:50 から

*「神大正門前」から阪急六甲, JR 六甲道へのバス時刻(36 系統 土曜日)

19 時 03 分 13 分 23 分 34 分 44 分 57 分

20 時 11 分 22 分 34 分 50 分

21 時 06 分 28 分 53 分(最終)

01. ディラトメトリによるデュラムセモリナ中の水の部分モル体積の測定

○長谷川絢子, 小川剛伸, 安達修二

(京大院・農)

【目的】 パスタの原料はデュラム小麦を粗挽きしたデュラムセモリナである。水とデュラムセモリナの相互作用の把握は、パスタの製造時の乾燥条件や保存時の貯蔵条件を決定するのに必要である。また、 α 化処理や乾熱処理により、デュラムセモリナ中の鎖状高分子の配列やデンプン表面の疎水度が変わることが知られている。本研究では、ディラトメトリによりデュラムセモリナ中の水の部分モル体積を、また、重量法により水分収着等温線を測定し、デュラムセモリナの処理方法が水の容量特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 試料として、未処理、乾熱処理および α 化処理を施したデュラムセモリナを用いた。乾熱処理では、試料を 200°C のオーブンで8時間乾熱させた。また α 化処理では、 160°C のホットプレートに $40\%(\text{w/v})$ デュラムセモリナ懸濁液を流し入れ、 160°C にあたためたヒートブロックで上から押し固めた。ディラトメトリは、非相溶性の溶媒としてドデカンを用い、含水率 $0.02\sim 0.3\text{ kg-H}_2\text{O/kg-d.m.}$ の範囲で、 25°C における水の部分モル体積を測定した。また水分収着等温線は、 25°C において、飽和塩溶液を用い、 $11\sim 84\% \text{RH}$ に調湿した雰囲気下で重量法により測定した。

【結果および考察】 未処理のデュラムセモリナに対する水の部分モル体積は、含水率 $0.03\text{ kg-H}_2\text{O/kg-d.m.}$ では $9\text{ cm}^3/\text{mol}$ あったが、含水率の増加に伴い増加し、含水率が $0.2\text{ kg-H}_2\text{O/kg-d.m.}$ 以上では、 $17\sim 18\text{ cm}^3/\text{mol}$ の値で一定となった。デュラムセモリナの水分収着等温線はII型となり、領域IIIの、水との相互作用が非常に弱い領域で、水の部分モル体積が一定となった。また、デュラムセモリナのガラス転移温度は含水率 $0.2\text{ kg-H}_2\text{O/kg-d.m.}$ では約 25°C であり、デュラムセモリナのガラス転移に伴う比容の変化が水の部分モル体積に影響を及ぼしていることが示唆された。水分収着等温線は、未処理、 α 化処理、乾熱処理のデュラムセモリナの順に収着量が減少したが、水の部分モル体積は、デュラムセモリナの処理方法によって大きな違いは見られなかった。【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」の一部として実施した。

*02. 灌流誘起赤外分光法による光合成光捕集膜蛋白質複合体の構造解析

○永麗¹、木村行宏^{1,2}、大野隆¹

(¹神戸大院・農、²神戸大・自然)

【目的】好熱性紅色光合成細菌 *Thermochromatium(Tch.) tepidum* は紅色細菌の中で最も高い温度(58°C)で生育する菌である。*Tch. tepidum* 由来の光捕集 1 反応中心(LH1-RC)複合体は Ca^{2+} の結合により熱耐性を獲得することが知られているが、その構造的役割や Ca^{2+} 結合サイトの詳細については明らかにされていない。本研究では、高感度の灌流誘起赤外分光システムを新規に構築し、金属結合に伴う LH1-RC の蛋白質及びアミノ酸の微小な構造変化を解析することを目的とした。

【方法】*Tch. tepidum* は 50°C で白熱電球照射下、嫌気条件で 7-10 日間培養した。細胞を超音波破碎した後、各種界面活性剤で LH1-RC 粗画分を抽出し、陰イオン交換カラムにより高純度 LH1 及び LH1-RC を精製した。減衰全反射フーリエ変換赤外分光法(ATR-FTIR)では、アクリル板で作製したフローセルにペリスタポンプを接続したフローシステムを構築し、既存の赤外分光光度計に高感度 MCT 検出器、Si/ZnSe の ATR プリズム、Si ロングパスフィルターを組み込むことにより S/N 比を向上させた。ATR プリズムに試料を吸着させ、異なるバッファーを灌流させることにより誘起される赤外スペクトルの変化を観測した。

【結果】野生型 *Tch. tepidum* 由来の LH1-RC では、LH1 を構成する α β ポリペプチドの末端に Ca^{2+} が結合すると考えられており、 Ca^{2+} を他の金属で置換することにより熱耐性が大きく変化することが知られている。 Ca^{2+} バッファーから Sr^{2+} バッファーに変化させたことによる LH1-RC の ATR-FTIR 差スペクトル($\text{Sr}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 差スペクトル)を測定した結果、蛋白質骨格のアミド I やアミド II およびアミノ酸側鎖由来と思われるバンドのシフトが観測された。更に、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ 差スペクトルでは $\text{Sr}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ 差スペクトルと対称的な逆符号のスペクトルが出現し、 Ca^{2+} と Sr^{2+} の置換に伴う構造変化が可逆的であることが示された。一方、類縁菌である常温性の *Allochromatium vinosum* では、上記測定により有意の差スペクトルが観測されなかった。従って、観測された変化は Ca^{2+} 結合能を有する *Tch. tepidum* 由来 LH1-RC に特異的であることが判明した。次に、得られた構造変化の部位を特定するため、RC を含まない LH1 複合体の灌流誘起差スペクトルを測定した。その結果、LH1-RC とほぼ同じスペクトル変化が検出されたことから、金属置換に由来する構造変化は LH1 に由来することが明らかになった。また、 Ca^{2+} から Sr^{2+} 以外の Mg^{2+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} に置換した場合の差スペクトルを測定した結果、それぞれの金属イオンについて可逆的な構造変化が観測されたが、 Cd^{2+} 置換では蛋白質の骨格構造に由来するアミドバンドの変化に明確な違いが見られた。 Cd^{2+} 置換サンプルで熱耐性が最も低下することから、 Cd^{2+} の結合特性に由来する骨格構造の変化が LH1-RC の不安定を引き起こしていることが強く示唆された。

*03. ピペリンの筋肉細胞におけるグルコース取り込み促進効果について

○白尾健、芦田均

(神戸大院・農)

【目的】 筋肉細胞は食後高血糖の消費の約 80%を担うため、血糖調節に重要な組織である。本研究では、筋肉細胞内へのグルコース取り込みを促進する新たな香辛料成分の探索、有効成分の同定、ならびに作用機序の解明を試みた。

【方法】 香辛料粉末 24 種について熱水と 90%エタノールで順次抽出を行い、有効な抽出物の水懸濁液をヘキササン、酢酸エチル、クロロホルム、ならびにブタノールを用いて分配した。得られた抽出液や画分を濃縮乾固後に DMSO に再溶解させ、ラット骨格筋由来 L6 細胞に 0.1,1,10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 4 時間作用させた。グルコース取り込み活性は、1 mM 2-deoxyglucose (2DG) の細胞内への取り込み量を測定した。糖輸送担体 4 型 (GLUT4) の細胞膜移行促進効果は、ブラックペッパーおよびホワイトペッパーの酢酸エチル分配物、ならびにピペリンを 15 分間作用した L6 細胞、あるいはこれらの画分やピペリンを 50 mg/kg BW で ICR マウスに投与して 1 時間後に摘出した筋肉組織を用いてウェスタンブロッティングにより検討した。抽出物中の成分は、ODS カラムを接続した HPLC で分析した。

【結果】 グルコース取り込み促進効果を示す香辛料抽出物として、ターメリック、ブラックペッパー、ホワイトペッパーならびにナツメグを見出した。これらのうち、特に高い活性を示したブラックペッパーおよびホワイトペッパーに着目し、溶媒分配を行った。その結果、ヘキササンと酢酸エチル画分に強いグルコース取り込み促進効果が認められ、HPLC を用いた成分分析からブラックペッパーおよびホワイトペッパーの酢酸エチル画分に、辛味の主成分であるピペリンとその関連物質が含まれていることを見出した。次に、ピペリンを L6 筋管細胞に作用させたところ、濃度依存的なグルコース取り込み促進効果を示し、30 μM で有意差が認められた。一方、ピペリンの主要な代謝産物であるバニリン酸、ピペロニルアルコールならびにピペロニル酸にはグルコース取り込み促進効果が認められなかった。さらに、酢酸エチル画分ならびにピペリンは、L6 細胞および ICR マウスの筋肉組織において GLUT4 の膜移行を促進することが認められた。これらのことより、ピペリンは GLUT4 の細胞膜移行を介して、筋肉細胞内へのグルコース取り込みを促進することが明らかとなった。現在、GLUT4 細胞膜移行の作用機序解明を進めている。

*04. 酵母ユビキチンリガーゼ Rsp5 によるストレス下での原形質膜タンパク質の品質管理機構

○清水優子、鈴木悦子、佐々木俊弥、高木博史
(奈良先端大・バイオ)

【目的】 Rsp5 は酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼの内、唯一生育に必須のタンパク質であり、原形質膜タンパク質のエンドサイトーシスをはじめ多様な生命現象に関与している。我々は基質の認識に関与する WW ドメインにアミノ酸置換 (Ala401Glu) の入った *rsp5*^{A401E} 変異株が、細胞内に異常タンパク質生成を誘導する様々なストレスに感受性を示すことから、ストレス下で変性した原形質膜タンパク質の Rsp5 を介したエンドサイトーシスがストレス耐性に重要であると考えている。そこで、ストレス下における Rsp5 の機能を解析し、原形質膜タンパク質の品質管理機構を検証することを目的とした。

【方法】 ストレスに伴う原形質膜タンパク質のエンドサイトーシスを解析するため、GFP を融合した Gap1 を野生株および *rsp5*^{A401E} 変異株、エンドサイトーシス経路欠損株 ($\Delta end3$)、非ユビキチン化型 Gap1 発現株 (*gap1*^{K9R/K16R}) に導入し、ストレス添加後の Gap1 の細胞内局在を観察した。また、エタノールストレスによる Gap1 の変性を確認するため、シトルリンの細胞内取り込み量から Gap1 活性を算出した。一方、これまでに観察された Gap1 の局在移行が、ユビキチン化を介したものであること、これによって細胞内 Gap1 量が減少することを確認するため、エタノールストレス下における Gap1 のウェスタン解析を行った。

【結果】 Gap1-GFP の局在観察の結果から、エタノール添加後、Rsp5 の基質である Gap1 が原形質膜上から消失すること、および *rsp5* 変異株、エンドサイトーシス経路欠損株、非ユビキチン化型 Gap1 発現株では Gap1 は原形質膜上に留まり続けることを見出した。また、エタノール存在下で Gap1 活性は顕著に低下しており、Gap1 が変性している可能性が考えられた。他のストレス条件下 (高温、過酸化水素、塩化リチウム、飢餓) で Gap1-GFP の局在を観察したところ、これらのストレスによっても Gap1 は積極的に液胞へ輸送されていた。さらに、ウェスタン解析の結果から、エタノールストレス下では、非ストレス条件下に比べ Gap1 存在量が減少していることが示された。一方、ユビキチン化 Gap1 量は増加しており、エタノールにより Gap1 のユビキチン化が誘導され、分解されることが明らかとなった。

*05. 酵母における NO 合成酵素 Tah18 の活性制御メカニズム

○川原寛弘、西村 明、高木博史

(奈良先端大・バイオ)

【目的】 我々は真核生物のモデルとして酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、環境ストレスに対する細胞の応答機構を解析している。その中で、酵母も哺乳類と同様に高温ストレスに応答して一酸化窒素 (NO) が合成され、細胞のストレス耐性に寄与することが判明した。しかし、酵母はゲノム上に哺乳類の NO 合成酵素 (NOS) のオルソログが存在しておらず、どのように高温ストレス下で NO 合成が誘導されるかについては不明である。最近我々は、酵母の機能未知・推定オキシドレダクターゼの中から、NOS 活性に関与するタンパク質として Tah18 を同定した。本研究では、酵母における NOS 活性の制御機構を解析することを目的とした。

【方法】 これまでに、大腸菌から精製した組換え Tah18 を用いた酵素学的実験によって、Tah18 が NOS 活性を有していることを示唆するデータを得ているが、Tah18 の一次構造上には NOS 活性に必須であるオキシゲナーゼドメインが欠落している。このため、Tah18 と相互作用する Dre2 タンパク質が NOS 活性の発現に関与しているのではないかと考え、Dre2 が NOS 活性に及ぼす影響を解析した。染色体上の Dre2 遺伝子をガラクトース誘導性プロモーターの支配下に置くことで、炭素源がグルコースの時には発現が抑えられ、ガラクトースに変換すると発現が誘導される Dre2 遺伝子の条件的破壊株を作製し、細胞内の NOS 活性を測定した。また、高温ストレス下における Tah18 や Dre2 の転写レベルをリアルタイム PCR にて測定した。

【結果】 組換え Tah18 を用いてキネティクスを測定すると、 K_m 値、 V_{max} 値ともに哺乳類の NOS と同等の値を示し、Tah18 が NOS 活性に関与することが強く示唆された。また、Dre2 遺伝子の条件的破壊株をグルコースで培養し、Dre2 の発現量を低下させると、NOS 活性が有意に増加したことから、Dre2 が NOS 活性を阻害している可能性が示された。さらに、リアルタイム PCR の結果では、高温ストレス下において Tah18 や Dre2 の転写量に変化はなかったことから、NOS 活性の発現は転写レベルではなく、翻訳後の制御によるものであると考えられた。以上の結果から、通常 Dre2 は Tah18 と複合体を形成し、NOS 活性を抑制しているが、細胞が高温ストレスに曝されると、未知のシグナルを介して、または Dre2-Tah18 複合体が直接ストレス状態を感知することで、NOS 活性が発現するモデルを考えている。

06. シロイヌナズナ ABA 応答性 MAP3K $\delta 4$ 過剰発現による 成長促進および塩耐性の向上

○下道奈里子¹、松岡大介¹、南森隆司^{1,2}

(¹神戸大院・農、²神戸大・遺伝子実験センター)

【目的】 植物をはじめ真核生物に高度に保存されているシグナル伝達系の一つである Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) カスケードは、プロテインキナーゼによる 3 段階のリン酸化を介したシグナル伝達系であり、成長や発達、環境応答の制御に関与している。カスケードの最上流に位置する MAP3K (MAPKKK) は、シロイヌナズナに 80 種類以上存在すると報告されているが、機能未解明のものが多く、下流の MAPKK が同定された例も少ない。本研究ではシロイヌナズナ MAP3K のうち N 末端側に PAS ドメインという特徴的なドメインを有する MAP3K $\delta 4$ に着目しシロイヌナズナにおいてどのような機能を有しているかを検討した。

【方法】 *MAP3K $\delta 4$* 遺伝子発現の局在、及び環境ストレスや植物ホルモンの応答性を RT-PCR 法で調査した。また特異抗体を用いた免疫沈降により内在性 MAP3K $\delta 4$ を精製し、その活性を測定した。*MAP3K $\delta 4$* の全長遺伝子、及びキナーゼドメインを不活性化した遺伝子を pBI121 ベクターに組み込み、アグロバクテリウム法によりシロイヌナズナに導入し過剰発現体を作製し、その生理的特徴の調査や発芽時のホルモン等による生理応答性、ストレス耐性評価を行った。

【結果】 *MAP3K $\delta 4$* はシロイヌナズナ全組織で発現が確認された。また塩や乾燥等のストレス条件下で発現が誘導され、これらの環境ストレス耐性を制御する植物ホルモン：アブシジン酸(ABA)によっても転写および活性レベルが増加し、MAP3K $\delta 4$ が環境ストレスや ABA 応答過程で機能する可能性を見出した。過剰発現体は野生型に比べ大型となり、成長が旺盛となった。不活性化型植物では顕著な枝分かれや種子数の増加も見られた。発芽抑制作用をもつ ABA やグルコースに対して過剰発現体は活性の有無に関わらず感受性を低下させ、また塩ストレスに耐性を示した。このように MAP3K $\delta 4$ が ABA のシグナル伝達に関係して植物のバイオマス増産やストレス耐性に寄与することが明らかになった。

07. NAD-非依存型ギ酸脱水素酵素を用いたバイオアノードへの展開

○丸山晃弘¹、河井翔太¹、高木一好²、北隅優希^{1,3}、白井理¹、加納健司^{1,3}

(¹京大院・農、²立命館大・理工、³CREST)

【目的】近年、バイオ電池の研究の一つの方向性として水素やギ酸を燃料とする完全酸化系の構築が検討されている。このような完全酸化系は、CO₂やH₂Oが生成物となり、有機生成物の蓄積が起きないことが利点として挙げられる。ギ酸を利用した場合、NAD依存性ギ酸脱水素酵素の利用が考えられるが、電極によってNADHを酸化するには非常に大きな過電圧を要するため、diaphorase等の別の触媒系が必要となる。そこで本研究では、*Methyrobacterium extroquens* AM1由来のNAD-linked type II ギ酸脱水素酵素(FDH II)に着目した。本酵素は分子質量約190 kDaであり、4つのサブユニットabgdから構成され、コファクターとしてMo、FMN、非ヘム鉄を有する。また、NAD⁺以外の電子受容体と反応する可能性があると考えられる。そこで、本酵素の電子受容体特性ならびに、電極特性について検討することを目的とした。

【方法】FDH IIは、*Methyrobacterium extroquens* AM1より単離精製し、各種電子受容体と酵素間の二分子反応速度定数を、分光学的及び電気化学的に評価した。また、多孔性電極を含む各種電極を用いて酵素機能電極反応を観察し、酵素-電極間の反応特性を調べた。多孔性電極としてはKetjen Black (KB)などを用いた。

【結果】FDH IIの電子受容体としては、NAD⁺のほか、viologen類、phonotiazin系およびキノン系色素が機能することが判明した。さらに、酵素-電子受容体間の二分子反応速度定数と、電子受容体の酸化還元電位の間には自由エネルギーの直線関係が観測された。ギ酸からの電子移動駆動力が非常に小さいviologen類へ電子移動できたことは興味深い。速度論的観点からは電池には適用できないと判断した。一方、種々のメディエータを検討した結果、平衡論的ならびに速度論的観点から9,10-phenanthrenequinoneがバイオ電池のメディエータに最も相応しいと結論した。また、平面固体電極では明瞭な酵素触媒電極反応の触媒電流を観測できたが、KBを主体とする多孔性炭素電極ではまったく観測できなかった。これは、FDH IIのサイズが多孔性炭素の細孔系より大きく、その細孔に酵素が入ることができなかったためだと考えた。本発表では、より大きな細孔系をもつ多孔質電極での反応特性についても報告する予定である。

*08. 基質特異性を利用したバイオカソードの高性能化

○宋慶盛¹、河井翔太¹、北隅優希¹、白井理^{1,2}、加納健司^{1,2}

(¹京大院農、²CREST)

【目的】 ビリルビンオキシダーゼ(BOD)はO₂のH₂Oへ4電子還元と共役し、ビリルビン、ヘミン、カテコール、ヒドロキノン、ピロガロール等を酸化する。我々は固体電極もBODの電子供与体として機能することを明らかにし、本酵素が直接電子移動(DET)型バイオ電池のカソードに頻繁に用いられるようになってきている。現状のDET型バイオ電池研究では、電池の出力を向上させるため、電極材料や電極への酵素吸着時の配向性の改良によって、界面電子移動速度を速め、高電流密度で過電圧を小さくすることが課題のひとつに挙げられており、そうした方面での試みが全世界で行われている。本研究では、BODの基質をあらかじめ多孔性炭素電極上に吸着させておくことで、BOD吸着時の配向性を向上させ、より過電圧の小さいバイオカソードを構築することを試みた。

【方法】 ケッチェンブラック(KB)を用いた多孔性炭素電極を作成し、基質溶液を電極上に滴下し吸着させた。その電極を洗浄後、BOD溶液を電極上に滴下し吸着させた。酵素機能電極特性評価は、酸素濃度分極効果を見捨てる条件として、酸素雰囲気下にて回転電極法(回転数: 4000 rpm)を用い、界面電子移動速度定数、有効酵素吸着量、及び移動係数を求めた。さらに、同様の条件でクロノアンペロメトリーにて、定常電流値を比較し、1週間における安定性を調べた。また、アラミド繊維とKBから構成した新奇の多孔性炭素電極にも、本ビリルビン修飾法を適用し、ガス拡散型のカソードを作成し、パルス条件下で、バイオカソードの性能を評価した。

【結果】 多孔性炭素電極上に基質(あるいは類縁体)を吸着させることにより、BODの酸素還元電極反応における過電圧が小さくなった。また、界面電子移動速度定数が約4倍、有効酵素吸着量が約2倍になった。これらの結果から、基質の吸着によってBODの配向性が向上したと推定した。さらに、ビリルビンを修飾することによって、1週間における安定性が大幅に増加することを明らかにした。ガス拡散型のバイオカソードにおいても、過電圧が小さくなり、高性能化を実現した。そして、本手法を用いることで、DET型バイオ電池の出力を大きく改善できた。

*09. *Chryseobacterium* sp. 5-3B 由来 *N*-アセチルトランスフェラーゼの

酵素化学的性質と遺伝子クローニング

○吉田健二、竹中慎治、吉田健一

(神戸大院・農)

【目的】我々はこれまでに芳香族および脂肪族アミンのアミノ基を位置または立体選択的に *N*-アセチル化する酵素の特性について報告してきた。単離菌 5-3B 株の生産するアセチル CoA 依存的 *N*-アセチルトランスフェラーゼは、キラルな脂肪族アミンである 2-フェニルグリシン(2PG)の L-体に対してのみ活性を示す特異な酵素であった。¹⁾本研究では、酵素化学的諸性質を調べることを目的とし、同酵素の遺伝子(*natA*)のクローニングおよび発現を試みたので報告する。

【方法】酵素活性:アセチル CoA 共存下、2PG の *N*-アセチル化物である 2-アセチルアミノ-2-フェニル酢酸の生成量または遊離 CoASH 量を定量し、算出した。遺伝子発現:*natA*断片を pET28b ベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株に導入して得られた形質転換株で発現させた。

【結果】5-3B 株の細胞抽出液から各種クロマトグラフィーにより本酵素をほぼ単一に精製した。SDS-PAGE およびゲル濾過法から、本酵素は 18 kDa のモノマー酵素であることがわかった。本酵素の N 末端アミノ酸配列(20 a.a.)および *Chryseobacterium* 属細菌のゲノム情報を基に見出した保存領域を参考に、5-3B 株ゲノム DNA から PCR にて目的とする遺伝子をクローニングした。塩基配列から推定される一次配列は 162 a.a.であり、分子質量は 18.1 kDa であった。同配列は酵素の性質や機能が明らかとなっている既報の芳香族および脂肪族アミン *N*-アセチル化酵素とはほとんど類似性がなかった。形質転換株を 37°C で培養して組み換え酵素(rNatA)を発現させるとほとんどが不溶性タンパク質であったが、IPTG 添加後に 15°C で 24 時間培養すると活性体を回収することができた。rNatA は親株由来 NatA と同じく、2PG の L-体にのみ活性を示した。2PG および類縁化合物について基質特異性を調べたところ、L-2PG に対して高い活性を示した。また、類縁化合物には阻害を受けなかった。最適条件下で L-2PG に対する酵素反応速度論量を求めたところ、 K_m 値および V_{max} 値はそれぞれ $175 \pm 18 \mu\text{M}$ および $42 \pm 4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ であった。

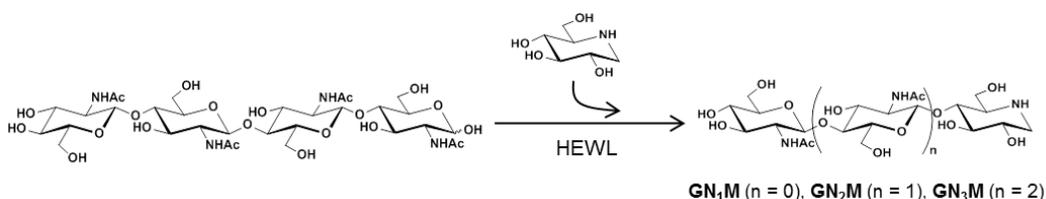
1) 日本農芸化学会 2012 年度大会(京都、3C23a01)

*10. 新規リゾチーム阻害剤, N-アセチルキトオリゴシルモラノリン (GN_nM):

リゾチームおよび family GH-19 キチナーゼに対する阻害機構

○梅本尚之、尾形慎¹, 新家粧子、鈴木亜日里², 大沼貴之, 沼田倫征³, 碓氷泰市¹,
深溝慶(近大院・農, ¹静大・創科技, ²静大・農, ³産総研・バイオメディカル)

【目的】グルコシダーゼ阻害剤として知られているモラノリン (M; 1-デオキシノジリマイシン)とキチンオリゴ糖とのハイブリッド、N-アセチルキトオリゴシルモラノリン(GN_nM)は、キチンオリゴ糖を認識する酵素リゾチームやキチナーゼの有効な阻害剤となりうるものと思われる。演者らは GN_nM (n = 2, 3) を合成し、それらのリゾチームおよび Family GH-19 キチナーゼに対する阻害活性および結合様式を明らかにすることを試みた。



【方法】上に示すように、ニワトリ卵白リゾチームの糖転移反応を利用して GN_nM を合成した。溶菌法によってリゾチーム活性に対する阻害を調べ、さらに X 線結晶構造解析、等温滴定型熱量計 (ITC) によって結合様式を調べた。また、ナガハリガネゴケ由来 FamilyGH-19 キチナーゼ(BcChi-A)に対する阻害活性をオリゴ糖分解活性によって調べ、ITCおよびNMRによって結合様式を調べた。

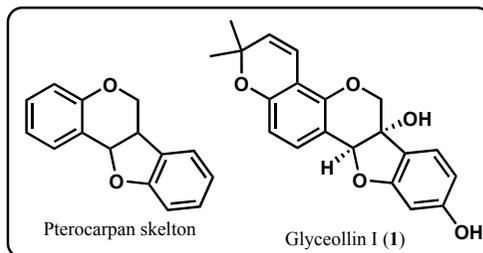
【結果】GN₃M はリゾチームに対して極めて強い阻害活性を示し、ITCによって定量的に得られる酵素に対する結合力も天然オリゴ糖に比べ高かった。リゾチーム-GN₃M 複合体の結晶構造より、GN₃Mのモラノリン残基のC1は-1サブサイト上でsp³混成軌道を取り、リゾチーム触媒反応は共有結合中間体を経て進むものと考えられた。一方、キチナーゼ BcChi-A に対しては GN₂M が強い阻害活性を示した。また、ITC、NMRで調べても天然のオリゴ糖に比べ GN₂M は強い結合力を示し、BcChi-A の活性中心近傍に結合していることがわかった。なお、Family GH-19 キチナーゼに対する阻害剤についてはこれが初めての報告例である。

*11. プテロカルパン骨格の新規構築法に関する研究

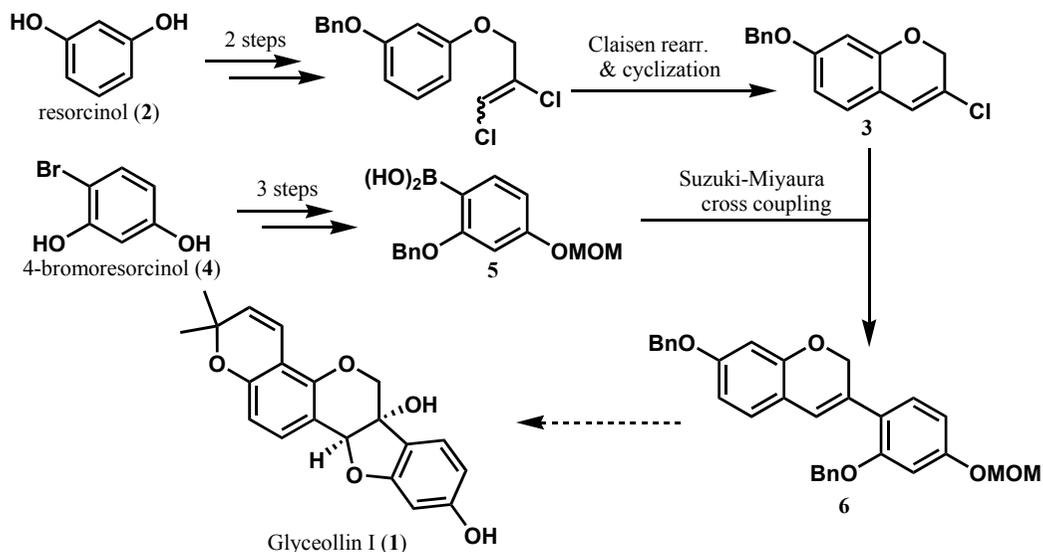
○河野雄太、久世雅樹、滝川浩郷

(神戸大院・農)

【目的】 プテロカルパン骨格は、1-benzofuranと2*H*-chromeneが縮環した4環性骨格である。これまでに、この骨格を有する生物活性天然物も多く報告されている。我々は、大豆のファイトアレキシンである Glyceollin I (1)を標的化合物とし、プテロカルパン骨格の新規構築法の開発を目的として研究を行った。



【方法・結果】 様々な経路の検討を行った結果、プテロカルパン骨格の構築における中間体(6)を既報^(a)の経路より短工程で合成することに成功した。すなわち、市販の resorcinol (2)を出発原料とし、Claisen 転位およびそれに引き続く環化反応により2*H*-chromene (3)を得た。また、市販の 4-bromoresorcinol (4)より3段階で boronic acid (5)へと誘導し、3と5の Suzuki-Miyaura クロスカップリングにより中間体(6)を4段階で合成した。現在は保護基の脱保護条件の検討および標的化合物の合成について検討中である。



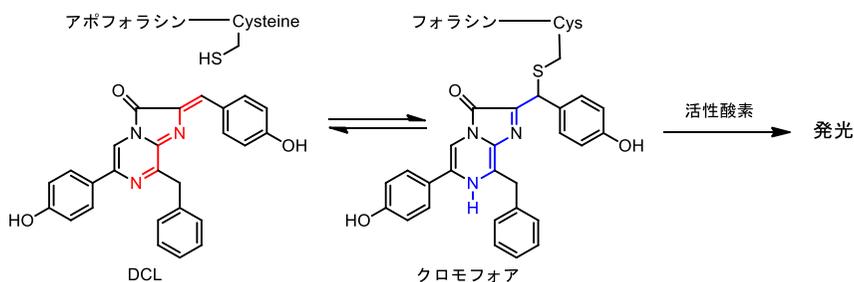
(a) R. S. Khupse & P. W. Erhardt, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 5007-5010

12. ヒカリカモメガイ発光タンパク質のクロモフォア形成部位に関する研究

○久世雅樹、古市卓也¹、南郷成子、久保尚洋²、滝川浩郷

(神戸大院・農、¹名大・エコトピア、²神戸大・農)

【目的】 ヒカリカモメガイの発光タンパク質 (Pholasin) は活性酸素種の刺激で発光する。我々は、発光を司る化学構造 (クロモフォア) がデヒドロセレンテラジン (DCL) とアポタンパク質中のシステイン残基が結合して構成されていることを明らかにしている。本研究では、クロモフォア形成部位の特定を目的とした。



クロモフォア形成と発光の分子機構

【方法】 臭素を導入した DCL 誘導体を合成し、Pholasin を再構成し、引き続きプロテアーゼにより消化し、LCMS により解析することにした。臭素の同位体による特徴的な分子イオンピークを手がかりとして、クロモフォアを形成しているシステイン残基の特定が容易だと考えられた。

【結果】 Bromobenzaldehyde と glycine から azlactone を合成し、その後加水分解して phenylpyruvic acid を合成した。別途合成した coelenteramine と縮合し dehydroamino acid とした後、無水酢酸で脱水縮合して臭素化 DCL を得た。臭素化 DCL で Pholasin を再構成して発光活性を測定したところ、弱いながらも活性を示した。発光前と発光後の Pholasin をそれぞれプロテアーゼで消化し、LCMS 解析したが、クロモフォア由来の分子イオンピークを検出することはできなかった。

そこで、Pholasin のシステイン残基をアルキル化し、遊離のシステイン残基の特定を試みたところ一つのシステイン残基が遊離であることが特定できた。現在、このシステイン残基がクロモフォア形成部位であると推定している。

特別講演 1

[NiFe]ヒドロゲナーゼの酸素耐性機構の解明

—放射光 X 線利用による精密構造化学—

樋口芳樹

(兵庫県大院・生命理)

水素をエネルギーとして利用しても、最終的には水を生成するだけで CO₂ や有害物質を発生しない。従って水素は究極のクリーンエネルギーとしてその研究・開発が急がれてきた。微生物がもつヒドロゲナーゼは下記の単純な化学反応触媒する。



ヒドロゲナーゼのもつこの触媒機能は、水素を燃料とする新規の燃料電池の開発に利用可能である。しかし、これまでによく研究されていたヒドロゲナーゼ(標準型[NiFe]ヒドロゲナーゼ)は酸素条件下におかれると酸素が活性部位に結合し、その酵素活性が失われることが知られていた。最近、ある種の細菌に酸素耐性能力をもつ膜結合型[NiFe]ヒドロゲナーゼが見出された。我々は、この酸素耐性ヒドロゲナーゼのX線結晶構造解析に成功した。構造解析の結果、ヒドロゲナーゼ分子が 3 個もつ鉄-硫黄クラスターのうち、Ni-Fe 活性部位(触媒反応中心)の一番近くに位置する鉄-硫黄クラスターが、標準型酵素にみられる[4Fe-4S]-4Cys 型ではなく、新規の構造 [4Fe-3S]-6Cys 型であることを見出した。さらにヒドロゲナーゼを強い酸化剤によって酸化した酵素の構造解析をしたところ、この[4Fe-3S]-6Cys クラスターが特徴的な構造変化を起こしていた。これまでに得られていた EPR, FT-IR, 電気化学, およびメスバウアー効果による実験結果と合わせて、本酸素耐性酵素は、クラスターの構造を変化させることにより、Ni-Fe 活性部位に電子を 1 個余分に与え、酸素による「活性部位の不活性化」を免れていることを結論づけた。今回の研究成果は、ヒドロゲナーゼの酸素による機能の損失を克服するために重要な知見であり、水素をエネルギーとして利用するための、酸素に安定な新たな水素合成化学触媒や新規の燃料電池の開発研究への応用が期待される。

特別講演 2

X線結晶構造解析による酵素機能の解明

三上文三

(京大院・農)

酵素の機能発現には、酵素タンパク質の様々な構造変化や動きが関わっている。酵素の活性部位では、基質結合部位を取り囲むループの構造変化が重要な場合が多い。このような構造変化を高精度で捉えるには、X線結晶構造解析法が有力な方法であり、回折データの収集にはスプリング8に代表されるシンクロトロンが日常的に利用されている。結晶構造解析は本来、静的な方法であるため、酵素の動きを捉えるためには多数のスナップショットが必要である。また、結晶格子による制約により、酵素の機能発現に重要なループが同時に結晶中でのパッキングにも重要である場合、ループの構造変化を観察することは困難になる。この問題を解決するには徹底的な結晶化のスクリーニングにより、問題部分のパッキングを回避した結晶を得ることが重要である。このような戦略によって結晶中での酵素タンパク質の構造変化を調べた例としてβ-アミラーゼの活性部位に存在する2種類の可動ループと周辺のアミノ酸残基の機能解析について紹介する。それぞれの構造変化を総合して酵素反応を理解することを試みている。また、シンクロトロンでの結晶回折データの収集には結晶を凍結することが常套手段となっているが、非凍結状態で構造解析を行うことによって、構造変化を捉えることができた例としてアルギン酸リアーゼの可動ループについて紹介する¹⁾。一方、酵素と基質の複合体形成が困難な場合に、プロ酵素に存在する成熟酵素の活性部位を覆うループを改変して、酵素・基質複合体の形成に成功した例として、プロテイングルタミナーゼのプロ酵素の構造解析について紹介する²⁾。これらの例から、結晶構造を利用した酵素機能の解明の限界と可能性について考察したい。

1. Mikami B. *et al. Acta Crystallogr. D* **68**, 1207-1216 (2012).

2. Hashizume R. *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 38691-38702 (2011).

<お知らせ>

○ 第 477 回支部評議員会は、2012 年 12 月 1 日(土)12:00 より
神戸大学大学院農学研究科 A 棟 3 階大会議室 にて開催いたします。

○ 次回例会(478 回)予定

日時:2013 年 2 月 2 日(土)

会場:京都大学楽友会館

講演申込締切:2013 年 1 月 4 日(金)

講演要旨締切:2013 年 1 月 11 日(金)

問い合わせ先:〒605-8502 京都市左京区北白川追分町

京都大学大学院農学研究科

森直樹

Tel: 075-753-6307

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

日本農芸化学会関西支部

〒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

庶務幹事:森 直樹

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

Tel : 075-753-6307、Fax : 075-753-6312

会計幹事:白井 理

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

Tel : 075-753-6394、Fax : 075-753-6456

支部ホームページ <http://www.jsbba-kansai.jp/>

2012 年 11 月 22 日 発行