

日本農芸化学会関西支部 第 478 回 講演会

日時：平成 25 年 2 月 2 日（土）13 時 30 分 開会

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

〔京都駅より市バス A2 乗場、206 系統「東山通 北大路バスターミナルゆき」乗車、「近衛通（このえどおり）」下車徒歩すぐ；
京阪電車「神宮丸太町駅」下車徒歩 10 分〕

一般講演（13:30～17:10）〔講演 8 分：質疑応答 2 分〕（＊印は若手優秀発表賞または賛助企業特別賞対象講演）

- * 1. 家族性遺伝病 LCCS1 の原因遺伝子 hGLE1 の mRNA 輸送における機能解析 [13:30-13:40]
○岡村真純、志岐拓哉、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司（京大院生命・統合生命）
- * 2. mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 の複合体形成能を支配する領域の同定と機能解析 [13:40-13:50]
○藤田賢一、平山瑞季、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司（京大院生命・統合生命）
- * 3. 低亜鉛母乳をもたらず亜鉛トランスポーター ZnT2 の複合ヘテロ接合体変異 [13:50-14:00]
○逸村直也¹、稲毛康司²、寺西文恵¹、岡崎文子³、成田宏史³、児島浩子⁴、神戸大朋¹（¹京大院生命・統合生命、²日大・練馬光が丘病院・小児、³京大・食物栄養、⁴帝京平成大・健康メディカル・健康栄養）
- * 4. 乾燥肌モデルマウス試験におけるパイナップル果実由来グルコシルセラミド経口摂取の皮膚機能改善効果及び *in vitro* 腸管モデルへの影響 [14:00-14:10]
○湯浅弘樹¹、西谷洋輔²、白井康仁¹、馬場健史³、野嶋潤⁴、大戸信明⁴、栗原浩誠⁴、水野雅史¹（¹神大院農・応用生命、²神大・自然科学、³阪大院工・生命先端、⁴丸善製薬）
- * 5. 消化管ホルモンによる肝脂質代謝制御の機構解析 [14:10-14:20]
○飯塚みあき¹、高橋信之^{1,2}、新谷紗織¹、宗像樹子¹、後藤剛^{1,2}、河田照雄^{1,2}（¹京大院農・食品生物、²京大大学際融合・生理化学）
休憩（14:20～14:30）
- * 6. ABCG1 による HMG-CoA 還元酵素の新規活性制御機構の解析 [14:30-14:40]
○渡邊太郎¹、平井絢子²、植田和光^{1,2}、松尾道憲¹（¹京大院農・応用生命、²京大・iCeMS）
- * 7. Procyanidin-B1-3,3'-di-*O*-gallate は EGCG と異なる作用で HeLa S3 細胞の増殖を阻害する？ [14:40-14:50]
○石原沙也加¹、綾野義博²、岡本修平¹、土井翔馬¹、岡本泰輔¹、須藤龍彦³、長田裕之³、中島範行⁴、齊藤安貴子^{1,2}（¹大阪電通大院工、²大阪電通大工、³理研基幹研・ケミカルバイオロジー、⁴富山県大工）
- * 8. イネにおけるエリシター誘導性代謝物の品種間比較 [14:50-15:00]
○網干貴子¹、松本ふう香²、寺石政義³、奥本裕³、西田律夫¹、森直樹¹（¹京大院農・応用生命、²京大農・応用生命、³京大院農・農学）
- 9. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるペルオキシソーム内レドックス制御因子の解析 [15:00-15:10]
○島並祐子¹、奥公秀¹、寶関淳²、阪井康能¹（¹京大院農・応用生命、²京大大学際融合・生理化学）
- 10. Improvement in mitochondrial function by antioxidants protects cellular oxidation caused by proteasome inhibition [15:10-15:20]
○Sunita Maharjan¹、寶関淳²、奥公秀¹、阪井康能¹（¹京大院農・応用生命、²京大大学際融合・生理化学）
休憩（15:20～15:30）
- 11. 酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における脂肪滴分解のためのオートファジー経路の機能解析 [15:30-15:40]
○山田麻衣、奥公秀、阪井康能（京大院農・応用生命）
- 12. 固相-気相バイオフィーム培養が大腸菌の persister cell 形成に及ぼす影響 [15:40-15:50]
○宮上沙貴¹、杉浦千明¹、世古口歩華¹、前田純夫^{1,2}（¹奈良女大院人間文化・食物栄養、²奈良女大生活環境・食物栄養）
- 13. 大腸菌標準野生株におけるファージ産生株の網羅的探索 [15:50-16:00]
○柴田有加¹、高橋杏奈²、鶴久森千里²、世古口歩華¹、前田純夫^{1,2}（¹奈良女大院人間文化・食物栄養、²奈良女子大生活環境・食物栄養）
- 14. 野生大腸菌株を用いた遺伝子水平伝播の解析 - モデル実験系の確立と食品成分の影響評価 [16:00-16:10]
○世古口歩華¹、宮上沙貴¹、柴田有加¹、前田純夫^{1,2}（¹奈良女大院人間文化・食物栄養、²奈良女大生活環境・食物栄養）
- 15. グアノシンの生体内酸化因子は脂質ヒドロペルオキシドである [16:10-16:20]
○坂本未来、藍原祥子、橋本堂史、金沢和樹（神戸大院農・生命機能）

休憩 (16:20~16:30)

16. 抱合性フラボノイドの拮抗的腸管吸収について [16:30-16:40]

○土井彩友美、藍原祥子、橋本堂史、金沢和樹 (神戸大院農・生命機能)

17. Interaction of wheat β -amylase with maltose and glucose as examined by fluorescence [16:40-16:50]

○Tadessa Daba, Kenji Kojima, and Kuniyo Inouye (Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

18. 肥満に伴う炎症状態が脂肪組織における UCP1 発現誘導に与える影響 [16:50-17:00]

○丸野晃嗣¹、坂本智弥¹、後藤剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、河田照雄^{1,2} (¹京大院農・食品生物、²京大大学際融合・生理化学)

19. メタボローム解析を用いた PPAR 活性化により変動する生体内代謝物の探索 [17:00-17:10]

○山崎陽太¹、高橋春弥¹、後藤剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、柴田大輔³、河田照雄^{1,2} (¹京大院農・食品生物、²京大大学際融合・生理化学、³かずさDNA研)

若手優秀発表賞表彰式 (17:10-17:15)

懇親会 (17:30~19:00) 京都大学楽友会館食堂 一般 2,000 円 学生 無料

お知らせ ○支部参与会は、12:00 から京都大学楽友会館 2 階会議・講演室にて開催いたします。

○次回例会 (第 479 回講演会) 予定

日時: 平成 25 年 5 月 25 日 (土) 場所: 京都府立大学

講演申込締切: 平成 25 年 4 月 19 日 (金) 講演要旨締切: 平成 25 年 4 月 26 日 (金)

連絡先: 〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5 京都府立大学生命環境科学研究科応用生命科学専攻

増村威宏 (TEL:075-703-5675 E-mail:masumura@kpu.ac.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 日本農芸化学会関西支部

TEL:075-753-6307 (庶務幹事) / TEL:075-753-6394 (会計幹事) / FAX:075-753-6312

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

家族性遺伝病 LCCS1 の原因遺伝子 hGLE1 の mRNA 輸送における機能解析

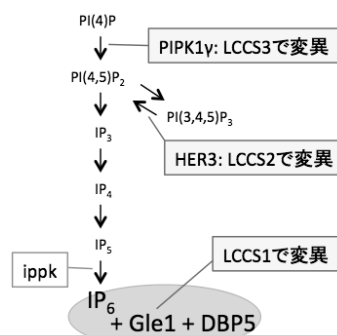
1

○岡村真純、志岐拓哉、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司
(京大院・生命科学・統合生命)

【目的】真核細胞において、mRNA は一次転写産物として転写された後、スプライシングやポリアデニル化などの各種プロセッシングを受け成熟 mRNA となる。成熟 mRNA は細胞質へ輸送されタンパク質へと翻訳される。mRNA の細胞質への輸送には多くのタンパク質因子が関与している。そのひとつ GLE1 に生じた変位が、胎性致死の遺伝病 LCCS1 の原因であることが報告された(*Nat. Gen.* 40, 155-158, 2008)。さらに類似の遺伝病 LCCS2 と 3 の原因遺伝子は、IP6 の合成経路の酵素の変異であることもわかった。IP6 は GLE1 と結合して機能する因子である。酵母を用いた先行研究において、*Gle1* の変異体に mRNA の核内蓄積が見られている。以上のことから、これらの遺伝病は mRNA の輸送動態に異常を生じたものと考えられるが、詳しいメカニズムは不明である。本研究の目的は、LCCS1-3 の原因遺伝子の変異による mRNA の輸送動態の解析である。

【方法】GLE1 機能不全もしくは IP6 の合成阻害が mRNA の細胞質への輸送に影響を与えるか検証するため、U2OS 細胞を用いて、siRNA による各種因子のノックダウンを行った。ノックダウンした因子は *GLE1* と IP6 合成経路上の酵素をコードする *IPPK*・*PIP5K1C* である。siRNA をトランスフェクションした後、RNA-FISH 法により poly(A)RNA の局在を検出した。

【結果】いずれの因子も、単独でのノックダウンでは poly(A)RNA のはっきりした核内蓄積は確認できなかったが、*IPPK* と *GLE1* のダブルノックダウンでは poly(A)RNA の蓄積を確認することができた。*PIP5K1C* と *GLE1* ダブルノックダウンでは *GLE1* 単独のノックダウンとあまり違いが見られなかった。これは、*PIP5K1C* が合成する PI(4,5)P₂ の合成経路が 1 つだけではないからと推測された。現在、LCCS1 において見られた *GLE1* の変異体と同様の *GLE1* 変異体を用いて、mRNA 輸送能について解析を行っており、細胞内の局在は野生型の *GLE1* と同様であることを示唆する結果が得られている。



3因子の相互作用→mRNAの核外輸送

図1 LCCS1-3原因遺伝子とPI合成経路

mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 の複合体形成能を支配する領域の同定と機能解析

2

○藤田賢一¹、平山瑞季¹、宮前友策¹、神戸大朋¹、永尾雅哉¹、
増田誠司¹（¹京大院生命・統合生命科学）

【目的】真核生物において核内で転写された前駆体 mRNA は、様々な mRNA プロセッシングを受けて成熟 mRNA となり、細胞質に輸送されて蛋白質へと翻訳される。成熟 mRNA の核内から細胞質への輸送には TREX 複合体が機能する。UAP56 は TREX 複合体の機能中心となって働く因子であり、酵母からヒトまで進化的に保存されている。一方、酵母やハエなどで、UAP56 は単一で存在するのに対して、哺乳類では 90% 以上もの相同性を持つ URH49 が存在する。当研究室での先行研究から、ヒトにおいて URH49 は、UAP56 の形成する TREX 複合体とは全く異なる新規の AREX 複合体を形成することが明らかにされた。また両者が輸送する mRNA には相違がみられ、選択的 mRNA 輸送に機能することも明らかにされた。mRNA の選択的な輸送には、複合体形成の違いが mRNA の選択性を決定していると予想されるが、非常に相同性の高い両者が、異なる複合体を形成する分子機構は不明である。そこで複合体形成の違いを制御する、UAP56 と URH49 の蛋白質領域の同定を試みた。

【方法・結果】解析方法として、両者で比較的相同性の低い両末端領域をはじめ、UAP56 と URH49 で異なる様々な領域を入れ替えた UAP56 と URH49 キメラ変異体を作成し、複合体形成能、ならびに細胞内 mRNA 輸送能を解析した。複合体形成能は免疫沈降法により、変異体が TREX 複合体を形成するか、AREX 複合体を形成するか解析した。mRNA 輸送能は RNA-FISH 法により、UAP56 または URH49 の KD により生じる核内の Poly (A)⁺ RNA の蓄積が、変異体発現時に回復するか解析した。例えば UAP56 のキメラ変異体が、本来 URH49 の形成する AREX 複合体を形成し、URH49 と同じ細胞内 mRNA 輸送能をもつ場合、変異を入れた領域が複合体形成を制御する領域と判断できる。これら 2 種類の解析法により詳細な複合体形成の分子基盤解明を行った。

まず両末端配列を欠損させた欠損変異体と、末端配列を入れ替えた UAP56 と URH49 のキメラ変異体を解析した。欠損変異体の解析から、両末端配列は複合体形成に必要であることが判明した。しかし両末端のキメラ変異体の解析から両末端は複合体形成の違いを制御しないことが判明した。続いて両末端以外のコア領域で異なるアミノ酸を 1 残基ずつ入れ替えたキメラ変異体を解析した。その結果ある 1 アミノ酸を入れ替えた URH49 変異体が UAP56 と同様の複合体形成能と mRNA 輸送能をもつことが判明した。現在、この 1 アミノ酸を入れ替えた UAP56 変異体が URH49 と同様の複合体形成能と mRNA 輸送能をもつのか、さらになぜこのアミノ酸が複合体形成を制御するのか、解析を進めている。

低亜鉛母乳をもたらす亜鉛トランスポーターZnT2 の複合ヘテロ接合体変異

3

○逸村直也¹、稲毛康司²、寺西文恵¹、岡崎文子³、成田宏史³、児島浩子⁴、
神戸大朋¹ (¹京大院生命・統合生命、²日大・練馬光が丘病院・小児、³京女
大・食物栄養、⁴帝京平成大・健康メディカル・健康栄養)

【目的】

亜鉛は、ヒトにとって欠かせない必須微量元素である。とくに、体重当たりで成人の約 3 倍もの亜鉛を必要とする乳児は、亜鉛欠乏になると重篤な皮膚炎や成長の遅延といった症状を示す。乳児の亜鉛欠乏の要因として、母乳中の亜鉛の減少があげられる。我々は、亜鉛欠乏により重篤な皮膚炎を発症した乳児と、その母親で、母乳中亜鉛量が 90%以上減少した低亜鉛母乳患者を見出した。低亜鉛母乳の原因として、母乳中への亜鉛輸送を担う亜鉛トランスポーター ZnT2 の遺伝子変異が知られていることから、我々は母親の ZnT2 遺伝子に着目して解析を行った。

【方法・結果】

- 1) 母親のゲノム DNA から、ZnT2 遺伝子に 2 つの新規ミスセンス変異 (W152R・S296L)をそれぞれ別のアリルに見出した。また、ZnT2 遺伝子のプロモーター領域に変異はみられなかった。
- 2) 各 ZnT2 の亜鉛輸送活性を、亜鉛感受性の細胞株を用いて評価した結果、ZnT2 S296L は ZnT2 野生型とほぼ同等の亜鉛輸送活性をもつが、ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性をもたないことが示された。
- 3) ZnT2 は二量体を形成してはじめて亜鉛輸送活性を発揮する。ZnT2 各変異型の二量体形成能を評価するため、野生型や変異型の ZnT2 を二重発現させた細胞株により共免疫沈降実験を行った。その結果、ZnT2 S296L は野生型と二量体を形成するが、ZnT2 W152R は野生型と二量体を形成しないこと、また、ZnT2 W152R と ZnT2 S296L の組み合わせも、二量体を形成しないことが示された。
- 4) 各 ZnT2 のタンパク質安定性を解析するため、ZnT2 発現細胞株をタンパク質合成阻害薬で処理し、タンパク質量の経時的変化を求めた。結果、ZnT2 S296L のタンパク質は、野生型に比べて著しく不安定になっていることが示された。

【考察】

ZnT2 W152R は亜鉛輸送活性をもたず、また複合体形成能がないことから、優性阻害活性はないことが示唆された。一方、ZnT2 S296L は、亜鉛輸送活性と複合体形成能をもつが、タンパク質が非常に不安定であることが判明した。以上から、母親の ZnT2 遺伝子が、W152R と S296L の複合ヘテロ接合体であることが、母親の低亜鉛母乳の原因と考えられた。

乾燥肌モデルマウス試験におけるパイナップル果実由来グルコシルセラミド経口摂取の皮膚機能改善効果及び *in vitro* 腸管モデルへの影響

4

○湯浅弘樹¹、西谷洋輔²、白井康仁¹、馬場健史³、野嶋 潤⁴、大戸信明⁴、
衆原浩誠⁴、水野雅史¹（¹神大院農・応用生命、²神大・自然科学、³阪大院
工・生命先端、⁴丸善製薬）

【目的】スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは角質層の細胞間隙を埋めている主要成分である。主に保湿など皮膚のバリア機能に重要な役割を果たしており化粧品などにも多く含まれる。本研究ではパイナップル果実より得られたグルコシルセラミド含有画分を乾燥肌モデルマウスに経口投与し、皮膚機能に与える影響及び *in vitro* 腸管モデルを用いてその作用機構を検討した。

【方法】Hos:HR-1 ヘアレスマウス（雄性 5 週齢）を用いた乾燥肌モデルマウス試験では、特殊飼料（HR-AD）で誘導した乾燥肌に対する粗パイナップル果実由来グルコシルセラミド 0.1%配合飼料（PG）の影響を検討した。さらに経口摂取による腸管免疫への影響を検討するため、パイナップル果実由来グルコシルセラミド 12 µg/ml をヒト小腸上皮様細胞 Caco-2 細胞とマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞の共培養系に供した。管腔側からサンプル処理 3 時間後に LPS で RAW264.7 細胞を刺激し、さらに 3 時間培養後 RAW264.7 細胞の全 RNA を抽出し、定量 RT-PCR 法で IL-23 mRNA 発現量を測定した。また、腸管上皮を介した代謝物の影響を検討するため、トランズウェル膜上に分化させた Caco-2 細胞に対して、管腔側からパイナップル果実由来グルコシルセラミドを添加し、3 時間後に基底膜側に透過した培地を RAW264.7 細胞へと添加した。3 時間後、LPS 刺激を行い、さらに 3 時間培養した後に IL-23 mRNA 発現量を測定した。

【結果】通常飼料群に比べ、特殊飼料群で TEWL 値の上昇が認められた。一方、PG 群では TEWL 値の上昇を有意に抑制した。また 4 週間飼育後、マウスの背部表皮を観察したところ、特殊飼料群では顕著なシワの形成及び皮膚の肥厚が確認できたのに対し、PG 群では通常飼料群と同等の外観を示した。このことからパイナップル果実由来グルコシルセラミドには皮膚機能改善効果があることが示唆された。これまでの研究から精製パイナップル果実由来グルコシルセラミド（Pure PG）を *in vitro* 腸管モデルに供することで RAW264.7 細胞中の IL-23 mRNA 発現量が増加することが分かっている。トランズウェル膜上の Caco-2 細胞単層膜に Pure PG を添加し基底膜側培地を RAW264.7 細胞に直接添加したところ、共培養時と同様に RAW264.7 細胞中の IL-23 mRNA 発現量を亢進した。これまでの実験から、Pure PG を添加し、3 時間培養後の残存量は約 40%であったことを考慮すると、パイナップル果実由来グルコシルセラミドは腸管上皮を介した代謝を受けており、その代謝物がマクロファージへと影響を及ぼしている可能性が示唆された。

消化管ホルモンによる肝脂質代謝制御の機構解析

5

○飯塚みあき¹、高橋信之^{1,2}、新谷紗織¹、宗像樹子¹、後藤 剛^{1,2}、
河田照雄^{1,2}（¹京大院・農・食品生物、²京大学際融合・生理化学）

【目的】生体内の脂質代謝は神経や液性因子を介して多臓器間で制御されることが近年明らかにされている。当研究室の先行研究により、小腸由来の消化管ホルモンである cholecystokinin (CCK) は肝細胞での脂肪蓄積を抑制することが示され、CCK が小腸、肝臓間の脂質代謝情報を伝達する重要な因子である可能性が考えられた。ところが最近、CCK 欠損マウスは脂肪肝を発症しないことが報告され、先行研究からの予測と矛盾することが明らかとなった。そこで本研究では CCK と同一の受容体である CCKB Receptor (CCKBR) を認識する消化管ホルモン、gastrin が CCK による作用を代償しているものと仮定し、gastrin が肝脂質代謝に及ぼす影響、並びに CCKBR を介した肝脂肪蓄積抑制機構の詳細を解明することを目的とした。

【方法・結果】ヒト肝細胞モデルである HepG2 細胞に gastrin を処理した結果、脂肪蓄積は有意に抑制され、その作用は CCKBR に対する阻害剤により有意に消失した。先行研究より、CCK は肝細胞において脂肪酸 β 酸化を亢進させることで脂肪蓄積を抑制することが示唆されている。そこで、CCKBR から脂肪酸 β 酸化の亢進に至るシグナル伝達経路に関する検討を行った。CCKBR は G protein coupled receptor であり、その下流は Ca^{2+} が位置することが知られている。そこで、HepG2 細胞を用いて $[\text{Ca}^{2+}]_i$ に関する検討を行った結果、gastrin は Ca^{2+} の経路を介することが示唆された。次に、 Ca^{2+} の下流のシグナル伝達経路を明らかにするため、各種阻害剤を用いた検討を行った。その結果、gastrin による脂肪蓄積抑制作用は CaMKK および AMPK に対する阻害剤により有意に消失し、CCK を処理した場合と同様の結果となった。さらに、CCK および gastrin による作用を生体内で検討するため、肝臓特異的な遺伝子導入試薬を用いて CCKBR に対する siRNA をマウスに導入した。その結果、CCKBR-siRNA を導入したマウスの肝脂肪蓄積が有意に増加した。以上の結果より、gastrin は CCK と同様に肝細胞において CCKBR $\rightarrow$ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ $\rightarrow$ CaMKK $\rightarrow$ AMPK を介して脂肪蓄積抑制作用を示すこと、および肝脂肪蓄積に対する CCKBR の生体内での関与が示唆された。

ABCG1 による HMG-CoA 還元酵素の新規活性制御機構の解析

6

○渡邊太郎¹、平井絢子¹、植田和光^{1,2}、松尾道憲¹（¹京大院農・応用生命、²京大・iCeMS）

【目的】コレステロールは生体膜の重要な構成成分だが、過剰な蓄積は細胞毒性を示す。そのため、細胞内のコレステロール濃度は厳密な調節を受ける。ATP-binding cassette G1 (ABCG1) は、細胞内の余剰コレステロールを ATP 加水分解依存的に細胞外へと排出することで、コレステロール恒常性に重要な役割を果たす。核内転写因子 Liver X receptor (LXR) はオキシステロールをリガンドとすることから、LXR 活性は細胞内コレステロール量と正の相関関係がある。そのため、LXR 活性を指標とすることで細胞内コレステロール量を間接的に評価できる。ABCG1 を HEK293 細胞に発現させると細胞内コレステロールが排出されるため、LXR 活性は減少した。興味深いことに、ATP 加水分解活性を持たずコレステロールを排出できない ABCG1 変異体を発現させた場合も、同様に LXR 活性が大きく減少した。これより、ABCG1 が脂質排出に依存せず、コレステロール生合成を抑制することで細胞内コレステロール量を調節していると仮説を立て、この仮説を検討することを本研究の目的とした。

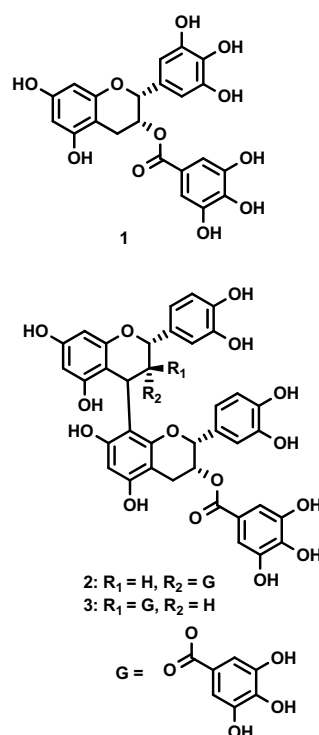
【方法・結果】動物細胞におけるコレステロール生合成は、HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) により HMG-CoA がメバロン酸へ変換される反応が律速段階となる。そこで、ABCG1 がコレステロール生合成に与える影響を、HMGCR 発現量とコレステロール合成量を測定し HMGCR 活性を算出することで評価した。その結果、HEK293 細胞の ABCG1 及び ABCG1 変異体安定発現株において、HMGCR の活性が低下していることが明らかとなった。逆に、THP-1 マクロファージ細胞において ABCG1 をノックダウンすると、HMGCR 活性が上昇した。これらの結果は、ABCG1 が脂質排出に依存せずに HMGCR の活性を制御することを示唆した。しかし、HMGCR の活性制御機構として報告されている AMPK による HMGCR リン酸化レベルは、ABCG1 発現により変化しなかった。次に、ABCG1 が HMGCR と直接相互作用することにより HMGCR 活性を制御するという可能性を検討するため、免疫共沈降実験を行った。その結果、ABCG1 と HMGCR が直接相互作用することが示唆された。以上より、ABCG1 が HMGCR と相互作用することで HMGCR の活性を抑制するという、新規の HMGCR 活性制御機構の存在が示唆された。

Procyanidin-B1-3,3"-di-O-gallate は EGCG と異なる作用で HeLa S3 細胞の増殖を阻害する？

7

○石原沙也加¹、綾野義博²、岡本修平¹、土井翔馬¹、岡本泰輔¹、須藤龍彦³、長田裕之³、中島範行⁴、齊藤安貴子^{1,2} (¹大阪電通大院・工、²大阪電通大・工、³理研基幹研・ケミカルバイオロジー、⁴富山県大・工)

【目的】 Proanthocyanidin(PAs)は、多くの植物に含まれる高機能性ポリフェノール化合物であり、お茶やカカオの嗜好品、ブドウ等の果物類、スギ等の樹皮などに含まれていることが知られている。これらは極めて強い抗酸化活性・抗炎症作用等、様々な生物活性を示すが、天然から高純度のサンプルを得ることは非常に困難であり、系統的な構造-活性相関はほとんど解明されていない。その一方で、お茶カテキンとして知られる (-)-Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) **1** は、細胞膜上の受容体として同定された 67 kDa ラミニンレセプター (67LR)を介して様々な生理活性を示すことが報告されている¹。さらに、EGCG は 67LR を介する情報伝達の過程で p38MAPK を含む MAPK のリン酸化を阻害することが報告された²。我々は、PAs の抗炎症作用などの活性発現が EGCG と同様の経路によるものか、化学的・生物学的に証明するため研究を進めている。



【方法と結果】 立体選択的合成によって純粋に得られた種々の PAs を用いて HeLa S3 細胞に対する増殖抑制活性試験を行った。その結果、B1-3,3''-di-O-gallate (**2**)と B4-3,3''-di-O-gallate (**3**)が、EGCG よりも高い増殖抑制活性を示した。さらに、これらの化合物が細胞内 p38MAPK 量に影響を与えることが確認できた。EGCG では同様な現象が見られないことから、EGCG とは異なる機構で活性を発揮している可能性が示唆された。加えて、他の官能基で修飾した化合物についても検討を行っており、それらをまとめて報告する。

参考文献) 1. Tachibana H, *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 2004, **11**, 380-381

2. Eui-Baek Byun, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, **426**, 480-485

イネにおけるエリシター誘導性代謝物の品種間比較

8

○網干貴子¹、松本ふう香¹、寺石政義²、奥本 裕²、西田律夫¹、森 直樹¹
(¹ 京大院農・応用生命、² 京大院農・農学)

【目的】

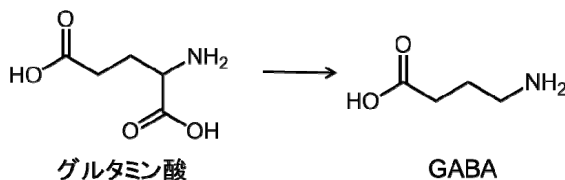
病原菌の感染や植食性昆虫の食害から身を守るために、植物は抗菌活性や毒性、忌避活性のある化合物などを生合成し、蓄積している。近年、植食性昆虫の食害や産卵により誘導される植物の代謝物が抵抗性を示す現象が報告されている。興味深いことに、数種の昆虫の吐き出し液（腸管内容物）中から、トウモロコシ、タバコやダイズに揮発成分を放出させるエリシターが同定されている。本研究では、鱗翅目幼虫の腸管内容物や傷害応答に関わるジャスモン酸処理により誘導されるイネ不揮発性代謝物に注目した。また、その品種間における応答の比較から、害虫の食害を防ぐ誘導性代謝物の生合成経路の解明やその生合成に関わる遺伝子の同定を目指している。

【方法・結果】

植物からはタンパク質を構成する 20 種のアミノ酸の他、多くの非タンパク性アミノ酸が同定されており、一部は植食者に対して毒性や成長阻害活性が報告されている。そこでまず、エリシター処理時のイネ幼苗におけるアミノ酸の変動を調べた。

イネ幼苗 (4 葉完全展開期) の葉に穴を開け、アワヨトウ幼虫腸管内容物の緩衝液抽出液を塗布し、2、4、24、48 時間後にアミノ酸を抽出し、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate で誘導体後、LC/MS に供試した。イネの品種は日本晴、銀坊主、kasalath を用いた。日本晴では腸管内容物抽出液塗布 2 日後、 γ -aminobutylic acid (GABA) が増加したが、銀坊主、kasalath では増加せず、品種間による応答に差があった。日本晴では GABA の前駆体であるグルタミン酸が減少しており、腸管内容物抽出液塗布により glutamine decarboxylase の活性化が予想された。

一方、幼苗にジャスモン酸を塗布すると、kasalath において GABA の増加が確認され、処理方法によっても品種間の応答に差が生じることがわかった。



酵母 *Saccharomyces cerevisiae* におけるペルオキシソーム内レドックス制御因子の解析

9

○島並祐子¹、奥公秀¹、寶関淳²、阪井康能¹ (¹京大院農・応用生命、²京大大学際融合・生理化学)

【目的】ペルオキシソームはオレイン酸などの脂肪酸の β 酸化を行う細胞小器官である。オレイン酸を単一の炭素源とした培地で酵母の培養を行うと、ペルオキシソーム内で脂肪酸の代謝が行われ副産物として活性酸素の一種である H_2O_2 が発生する。活性酸素は非常に反応性が高く、タンパク質の変性やDNAの損傷を引き起こすなど細胞に害を与えることが知られている。そのため生物には活性酸素を無毒化する抗酸化酵素を産生し、細胞内のレドックス状態を一定に保つ機能が備わっている。しかし、生化学的解析の難しさから細胞小器官内におけるレドックス制御システムについて詳しいことは未だ解明されていない。

そこで本研究では、生きた細胞内の酸化還元状態を可視化できる蛍光タンパク質プローブである **Redoxfluor** を酵母ペルオキシソーム内に発現させ、ペルオキシソーム内のレドックス制御に関わる因子の解析を行っている。

【方法・結果】ペルオキシソーム内で働くカタラーゼである *CTA1* 遺伝子破壊株、レドックス制御に重要な働きを行っている分子の1つである *TRX2* 遺伝子破壊株、*CTA1TRX2* の二重破壊株を作成した。これらの遺伝子破壊株についてオレイン酸を単一の炭素源とする培地で生育を行ったところ、*CTA1* 遺伝子破壊株では生育度の低下が見られ *CTA1TRX2* 二重破壊株ではさらに生育度が低下するという結果が得られた。これらの株のペルオキシソーム内レドックス状態を調べるため、ペルオキシソームへの移行シグナル配列を付けた **Redoxfluor** をそれぞれの株に発現させ蛍光顕微鏡観察を行った。その結果 *CTA1* 破壊株において蛍光強度の低下が見られ、*CTA1TRX2* 二重破壊株では更にその低下が顕著に見られた。この時のペルオキシソーム内における **Redoxfluor** の発現量を調べるため細胞抽出液を遠心分離によって細胞質画分とオルガネラ画分に分画し、オルガネラ画分に含まれる **Redoxfluor** 量の比較を行った。その結果、*CTA1TRX2* 二重破壊株に関しては野生株と比較してペルオキシソーム内の **Redoxfluor** 量の減少があまり見られなかった。このことから *CTA1TRX2* 遺伝子の破壊がペルオキシソーム内 **Redoxfluor** の蛍光タンパク質の機能低下を引き起こすことが分かった。

Improvement in mitochondrial function by antioxidants protects cellular oxidation caused by proteasome inhibition

10

Sunita Maharjan¹, Jun Hoseki^{1,2}, Masahide Oku¹, Yasuyoshi Sakai^{1,2}

(¹Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture and

²Research Unit for Physiological Chemistry, the Center for the Promotion of Interdisciplinary Education and Research, Kyoto University)

【Objective】 Ubiquitin proteasome system is essential for multiple physiological processes via selective degradation of target proteins. Proteasome impairment is linked to aging and many pathological conditions from cancer to neurodegenerative disorders like Alzheimer's and Parkinson's disease. We found that proteasome inhibition resulted in cellular oxidation. In this study, we aimed to investigate molecular mechanisms underlying protective effects of several antioxidant compounds from food against cellular oxidation caused by proteasome inhibition.

【Methods and Results】 Intracellular redox state was observed with Redoxfluor following treatment with a proteasome inhibitor in mammalian cells, stably transfected with the redox probe. Redoxfluor detects intracellular redox state by its fluorescence resonance energy transfer (FRET) efficiency with a concomitant redox-dependent structural change of the protein. The proteasome inhibition induced cellular oxidation. Simultaneous treatment with antioxidants in food prevented the cellular oxidation caused by proteasome inhibition and ultimately improved survival rate of cells under the proteasomal inhibition. Furthermore, treatment with the antioxidants maintained mitochondrial membrane potential and significantly reduced radioactive oxygen species (ROS) in mitochondria by using mitochondrial targeted molecular probes. Moreover, pretreatment with the antioxidants was found to significantly increase protein level of a mitochondrial antioxidative enzyme suggesting that the pretreatment of the antioxidants might stimulate a relevant signaling pathway(s) which subsequently increases antioxidant capacity in cells. The results suggest that improvement in mitochondrial function by the antioxidants prevents cellular oxidation caused by proteasome inhibition.

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における脂肪滴分解のためのオートファジー経路の機能解析

11

○山田麻衣、奥 公秀、阪井康能（京大院農・応用生命）

【目的】脂肪滴は真核細胞に広く保存されたエネルギー貯蔵器官であり、トリアシングリセロールやステロールエステルなどの中性脂質がリン脂質一重膜に覆われた構造をもつ。現在、脂肪滴の分解機構の一つとして、オートファジーの存在が示唆されている。オートファジーとは、細胞質成分を分解コンパートメント（液胞／リソソーム）へ輸送する分解系であり、マクロオートファジーとミクロオートファジーの2種類の機構が存在する。前者では、分解対象を新生膜が包み込み、形成されたオートファゴソームと呼ばれる構造体が、液胞膜と融合することで液胞内へ放出する。一方、後者では液胞膜の陥入により対象を直接包み込む。オートファジーは一般的に非選択的なタンパク質分解経路として知られるが、ペルオキシソーム等のオルガネラ特異的なものもあり、哺乳類において脂肪滴選択的な「リポファジー」が提唱されている。しかし酵母においてはその存在やアッセイ系は確立されていない。そこで本研究では、出芽酵母を用いてリポファジーの定量的なアッセイ系を構築し、リポファジーに機能する遺伝子の探索および解析を行うことを目的とした。

【方法・結果】脂肪滴の液胞内輸送および分解を検出するため、緑色蛍光タンパク質 GFP の液胞内での安定性を利用したプロセッシングアッセイ系を構築した。まず、脂肪滴局在タンパク質と GFP の融合タンパク質を発現する酵母株を作製した。融合タンパク質発現株から抽出したタンパク質を分離し GFP 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行ったところ、野生株では融合タンパク質の分解産物である遊離型 GFP が検出された。一方、液胞内分解の欠損を示す遺伝子破壊株では遊離型 GFP は検出されなかった。また蛍光顕微鏡により、液胞内分解欠損株において GFP の液胞内拡散が観察されたことから、脂肪滴がオートファジーにより液胞内に輸送された後、分解を受けることが明らかとなった。さらに、プロセッシングアッセイにより、リン脂質 PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) を産生するタンパク質や PI3P に結合するタンパク質がリポファジーに関与していることが明らかとなった。

固相-気相バイオフィルム培養が大腸菌の persister cell 形成に及ぼす影響

12

○宮上沙貴¹、杉浦千明¹、世古口歩華¹、前田純夫^{1,2}（¹奈良女子大学大学院 食栄専攻、²奈良女子大学 食物栄養学科）

【目的】近年、細菌において persister cell と呼ばれる抗生物質耐性細胞の存在が注目されている。persister cell とは細菌集団中の一部の細胞が一時的に休眠状態となり抗生物質耐性を示すようになったものである。persister cell は変異や遺伝子の獲得などの遺伝的変化を伴わない第三の抗生物質耐性細胞として、細菌生理および衛生管理の観点からもその重要性が認識されつつある^[1,2]。persister cell は母集団に対する存在割合の小ささから、これまで十分研究が進んでいなかった。しかし近年、persister cell 形成が遺伝的にプログラムされた現象であることを示唆する報告が相次いでなされ、その現象の詳細および機構の解析が研究の焦点となってきている。そこで本研究では、新たな観点から persister cell 形成を解析するため、一般的な研究で用いられている液体培養ではなく、固相-気相バイオフィルム培養に着目し、その条件下での大腸菌の persister cell 形成の詳細解明を試みた。

【方法・結果】大腸菌を抗生物質無添加の LB 培地で 37℃、24 時間の液体培養あるいは固相-気相バイオフィルム培養後、それぞれの細胞を抗生物質添加 LB 培地に懸濁し、37℃、3-24 時間の処理を行った。処理後の細胞を抗生物質無添加の LB 寒天上にプレーティングし、生残細胞 (= persister cell) 数を測定した。生残細胞から生じたコロニーは抗生物質プレートに再ストリークし、恒久的な耐性獲得変異が起こっていないことを確認した。各種条件検討の結果、固相-気相バイオフィルム培養後の細胞では、抗生物質処理の特定条件下で検出される persister cell が、液体培養後の細胞と比べ最大 10⁵ 倍もの高い頻度で出現することを明らかにした。この傾向は作用様式の異なるほとんどの抗生物質においても同様であり、抗生物質の種類に特異的な耐性機構の発現ではないことが示唆された。また上記と同様の特定条件下での抗生物質処理時間の検討を行ったところ、液体培養後の細胞では 120 時間以内に生細胞が消失するのに対し、固相-気相バイオフィルム後の細胞では 240 時間後も高い割合で persister cell が存在し続けることが明らかとなった。この結果から、24 時間の固相-気相バイオフィルム培養によって、その後、細胞が液体浮遊状態になっても十日間以上にわたって保持される非遺伝的な生理変化が生ずる可能性が示唆された。

[1] Keren, I. *et al.* FEMS Microbiol lett. 230, 13-18. 2004

[2] Kim, L. Annual Review of Microbiology. 64, 357-372. 2010

大腸菌標準野生株におけるファージ産生株の網羅的探索

13

○柴田有加¹、高橋杏奈²、鵜久森千里²、世古口歩華¹、前田純夫^{1,2} (¹ 奈良女子大院人間文化・食物栄養、² 奈良女子大生活環境・食物栄養)

【目的】近年、世界各国で単離されている種々の病原性大腸菌株では、遺伝子群の多重獲得による高病原性化や多剤耐性化が問題となっている。こうした遺伝子群の獲得は、菌から菌への遺伝子の水平伝播によって行われており、その主要機構の一つに、ファージによる形質導入がある。しかしファージによる遺伝子水平伝播が、実際の環境中でどのように起こるのかという点については、十分な研究がなされていない。そこで我々は環境中でイベントをより忠実に反映できるモデル実験系を構築するために、大腸菌の標準野生株コレクションである ECOR (*E. coli* Collection of Reference) 7 2 株¹⁾の利用を考えた。ECOR 株のファージ保有・産生に関しては、過去二、三の報告例^{2), 3)}はあるものの未だ十分な説明はなされていない。本研究では、ECOR 株を用いた形質導入モデル実験系を構築するための第一段階として、ECOR 株中のファージ保有・産生株の網羅的探索を試みた。

【方法】各 ECOR 株を Mitomycin C 添加による SOS 応答誘導および無処理の非誘導の 2 つの条件下で培養後、遠心分離とフィルター滅菌あるいはクロロホルム処理により上清を調製した。これらの上清を別の実験室株に添加し、スポットアッセイおよびブラークアッセイにより放出ファージの検出を行った。

【結果】上記探索の結果から、ECOR 7 2 株から計 3 6 株のファージ産生株を特定した。この内、1 4 株はこれまでにファージ保有・産生の報告のない株であった。現在、これらファージの単離・同定を進めている。

1) Ochman, H., and Selander, R. K. 1984. J. Bacteriol. 157: 690-693.

2) Riley, M. A., and Gordon D. M. 1992. J. Gen. Microbiol. 138: 1345-1352

3) Nilsson, A. S., Karlsson, J. L., and Haggard-Ljungquist, E. 2004. Mol. Biol. Evol. 21 : 1-13

野生大腸菌株を用いた遺伝子水平伝播の解析 -モデル系の確立と食品成分の影響評価

14

○世古口歩華¹、宮上沙貴¹、柴田有加¹、前田純夫^{1,2} (¹ 奈良女大院人間文化・食物栄養、² 奈良女大生活環境・食物栄養)

【目的】近年、多数の病原性や抗生物質耐性を獲得した新たな病原性大腸菌の出現が世界的な問題となっている。大腸菌では一般に自然環境下での形質転換はほとんど起こらないとされてきたが、近年我々の研究室では、混合培養の大腸菌株間で形質転換により非接合性プラスミドが水平伝播する現象を発見した。この発見は、環境中での大腸菌の遺伝子水平伝播に関する定説の再検討を促すものである。環境中の現象を正確に再現するためには、汎用の実験室株ではなく野生菌株を用いた実験系が必須となる。そこで本研究では、野生大腸菌株の代表として、ECOR (*E. coli* Collection of Reference) の利用を考えた。ECOR とは 1984 年に Ochman らが選抜した、野生大腸菌株の数千種類を 72 株で代表する標準株コレクションである。本研究では、まず ECOR 株を用いた遺伝子水平伝播モデル実験系の確立と伝播様式の判別を行い、次いで同実験系を用い、食品が栄養源となる条件下での遺伝子水平伝播の発生検証と、ヨーグルトに含まれる乳酸や酢酸に着目した影響評価を試みた。

【方法】菌株は、天然プラスミド保有／非保有の ECOR 株、人工プラスミド導入／未導入の ECOR 株、および実験室株を用いた。遺伝子水平伝播は、2 種の菌株を共培養後、新たな抗生物質耐性を獲得したコロニーの発生数から定量化した。遺伝子水平伝播の機構は、DNase およびメンブレンを用いた実験により判別した。食品抽出液は遠心分離後の上清をフィルター滅菌して用いた。固形／半固形食品では食品上に置いたメンブレン上で菌を培養した。

【結果】上記菌株から、抗生物質耐性の水平伝播が起こる組み合わせを選択後、機構判別実験から形質転換あるいは接合（可動化）が起こる代表的組み合わせをそれぞれ 2 種類ずつ（計 4 種類）選定した。次いでこれら菌株を用いて各種食品成分での培養を行い、遺伝子水平伝播の発生を検証した。その結果、各種抽出液中や固形食品上でも通常の実験培地とほぼ同等レベルの遺伝子伝播が起こることを明らかにした。またその中でヨーグルトの液体成分が遺伝子水平伝播の顕著な抑制効果を示したため、その主な成分である乳酸や酢酸の作用に関し、さらに詳細な解析を行った。その結果、乳酸や酢酸は遺伝子水平伝播に対し、塩酸では見られない独自の抑制作用を発揮する可能性が示唆された。

【謝辞】本研究は、財団法人日本環境財団の研究助成金および H23 奈良女子大学研究推進プロジェクト経費の助成を受けて実施した。

グアノシンの生体内酸化因子は脂質ヒドロペルオキシドである

15

○坂本未来、藍原祥子、橋本堂史、金沢和樹（神戸大院農・生命機能）

【目的】遺伝子変異の原因の一つに、2'-デオキシグアノシン（dG）の 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン（8-OHdG）への酸化がある。生体内酸化因子は、一般的に、過酸化水素から生じるヒドロキシラジカルと考えられている。しかし、ヒドロキシラジカルの半減期は 1 ナノ秒と短く、また、その生成には遷移金属を必要とする。したがって、過酸化水素は生体内酸化因子と考えにくい。一方、脂質ヒドロペルオキシドの分解で生じるペルオキシラジカルの半減期は 7 秒である。本研究では、非細胞系と細胞系で、過酸化水素と脂肪酸ヒドロペルオキシドの 8-OHdG の生成量を比較した。また、dG の酸化を抑制する生体内で有効と思える抗酸化成分を検索した。

【方法・結果】リノール酸ヒドロペルオキシド（LAHPO）は、リノール酸を自動酸化して得た過酸化水素から、HPLC で 98%以上の純度に精製して用いた。dG 250 μ M、dG 250 μ M を含むリポソーム、あるいは 10 μ g / ml の仔ウシ胸腺 DNA に、50 μ M の LAHPO あるいは過酸化水素を添加し、生成した 8-OHdG を電気化学検出器と UV 検出器を備えた HPLC で定量した。LAHPO を dG に添加すると 10^5 dG あたり 3.35 の 8-OHdG が、リポソームでは $6.04 / 10^5$ dG が、胸腺 DNA では $27.16 / 10^5$ dG の生成が認められ、過酸化水素添加ではそれぞれ $1.91 / 10^5$ dG、 $2.17 / 10^5$ dG、 $9.28 / 10^5$ dG であった。LAHPO は過酸化水素よりも有意に 8-OHdG を多く生成した。また、これらの系に 10 μ M の FeSO_4 を加えると、LAHPO と過酸化水素の間に 8-OHdG の生成量の差はなくなった。そこで、ラット肝ミトコンドリアに 100 μ M の LAHPO を添加すると $34.43 / 10^5$ dG の 8-OHdG が、過酸化水素の添加では $23.96 / 10^5$ dG が生成した。そして、メルカプトコハク酸で 24 時間処理した HepG2 細胞に 200 μ M の LAHPO を与えると $0.61 / 10^5$ dG が、過酸化水素では $0.34 / 10^5$ dG の 8-OHdG が生成した。このように LAHPO が有意に 8-OHdG を生成した。そこで、10 μ M の α -トコフェロール、ルテオリンまたはケルセチンを HepG2 細胞に 1 時間与えた後、その核を単離して、核に 100 μ M の LAHPO を添加して 8-OHdG 生成を定量することで抗酸化効果を測定した。いずれの成分も 8-OHdG 生成を約 60% 抑えた。以上の結果から、遷移金属が高濃度で存在しない生体内条件では、dG の酸化因子は過酸化水素ではなく脂質ヒドロペルオキシドであり、また、その酸化を α -トコフェロールやカテコール構造のフラボノイドが抑えることができると考えた。

抱合性フラボノイドの拮抗的腸管吸収について

16 ○土井彩友美¹、藍原祥子¹、橋本堂史¹、金沢和樹¹（¹神戸大院農・生命機能）

【目的】植物性食品に含まれている多様なフラボノイドは、抗酸化能やタンパク質機能調節作用を介した生活習慣病予防効果が期待されている。予防効果を期待するならば、そのフラボノイドの体内吸収濃度が高い方が望ましい。また、フラボノイドは体内吸収時にグルクロン酸あるいは硫酸抱合を受けるが、抱合体よりもアグリコンの方が生理活性は高いので、体内アグリコン濃度が高いことが好ましい。本研究では、フラボノイドの中でも抱合を受けやすいと報告されているケルセチンに着目し、ケルセチン、その誘導体および類縁化合物を組み合わせでラットに投与することで、ケルセチンの体内循環濃度を上げる組み合わせを探し出すことを試みた。

【方法・結果】一晩絶食させた Wistar ST ラット（雄、11 週齢）に、50 mg/kg 体重ずつのケルセチンとイソケルセチン、ケルセチンとプロトカテク酸、ケルセチンとイソケルセチンおよびプロトカテク酸を組み合わせた試料をプロピレングリコールに溶解して経口投与し、ケルセチンを単独で与えた場合と比較した。投与後 0.5、1、2、4、6 時間に尾静脈採血し、血漿中のケルセチンアグリコンとケルセチン抱合体量を、クーロアレイ検出器を備えた HPLC で定量した。ケルセチン単独投与と比較して、イソケルセチンを同時投与すると、血漿中のケルセチン抱合体量は有意に増加した。また、同時投与するイソケルセチン量をケルセチンに対して 1/1、1/2、1/4、1/10 として、0.5、1、2、5 時間後のラットの血漿中のケルセチンのアグリコンと抱合体量を比較した。いずれの混合比率でもケルセチン抱合体量もアグリコンの量も変わらなかった。しかし、ケルセチンとイソケルセチンを等量投与した群のみ、ケルセチン単独投与と比較して、血漿中のケルセチン抱合体量が有意に増加した。そこで、ケルセチンにアピゲニン、アピゲニン *O*-配糖体のアピゲトリン、アピゲニン *C*-配糖体のビテキシンを混合して投与した。ケルセチン単独投与と比較して、アピゲトリンの同時投与群でケルセチン抱合体量の有意な増加が観察された。そして、ビテキシン同時投与では有意な影響は認められなかった。以上のように、フラボノイド *O*-配糖体の同時投与はケルセチンの体内濃度を増加させ、その抱合体量を増加させるが、アグリコン量には影響を与えなかった。

Interaction of wheat β -amylase with maltose and glucose as examined by fluorescence

17

OTadessa Daba, Kenji Kojima, and Kuniyo Inouye (Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

【Objective】 β -Amylases [EC 3.2.1.2] are exo-acting enzymes, with successive removal of β -anomeric maltose from the non-reducing ends of polysaccharides. The fluorescence quenching effects of maltose and glucose on wheat β -amylase (WBA) were studied by fluorescence titration. The temperature and pH-dependences of the dissociation constants (K_d) of WBA-maltose and WBA-glucose complexes were evaluated.

【Methods and Results】 The source of WBA, Himaltosin which is an industrially-applicable commercial preparation from wheat bran, was purchased from HBI Enzymes, Osaka¹⁾. The fluorescence emission of WBA was observed by excitation at 280 nm at 25°C, pH 5.4. The fluorescence intensity (FI) of WBA was partly quenched by the addition of maltose and glucose. The K_d values of the enzyme-inhibitor complexes (EI) dissociations determined by titration of FI were 0.20 ± 0.12 M for maltose and 0.36 ± 0.11 M for glucose. The K_d values slightly increased while the Gibbs energy changes (ΔG°) decreased with increasing temperature. The respective K_d values were 0.22 ± 0.09 , 0.20 ± 0.12 , and 0.17 ± 0.04 M for maltose and 0.29 ± 0.04 , 0.36 ± 0.11 , 0.26 ± 0.07 M for glucose at pH 3.0, 5.4, and 9.0, respectively at 25°C. The inhibitor constants (K_i) of our previous inhibition kinetics data²⁾ are in reasonable agreement with the K_d values obtained in this study. The ΔH° and ΔG° values indicate that the EI dissociations are endothermic and enthalpy-driven. The temperature and pH-dependences of the K_d values suggest that the changes in conformation and the environment of tryptophan and/or tyrosine residues around the binding site of WBA are governed by pH and temperature. It is therefore, essential to consider the temperature and pH of starch hydrolysis to reduce the end-product inhibition.

1. Daba T, Kojima K, Inouye K, *Enzyme. Microb. Technol.* **51**, 245-251 (2012)

2. Daba T, Kojima K, Inouye K, submitted

肥満に伴う炎症状態が脂肪組織における UCP1 発現誘導に与える影響

18

○丸野晃嗣¹、坂本智弥¹、後藤 剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、河田照雄^{1,2} (¹ 京大院・農・食品生物、² 京大大学際融合・生理化学)

【目的】哺乳類に存在する褐色脂肪細胞は、そのミトコンドリア内膜に存在する uncoupling protein-1 (UCP1) の働きによりエネルギーを消費し、熱を産生する。UCP1 を発現する脂肪細胞は、褐色脂肪組織 (BAT) として肩甲骨周辺などに存在する。さらに寒冷などの刺激により、鼠蹊部白色脂肪組織 (I-WAT) など一部の白色脂肪組織においても、UCP1 の発現量が増加し、エネルギー消費量が増大することが明らかとなった。一方で、肥満と UCP1 の発現量の間には高い相関がみられ、肥満状態の脂肪組織では UCP1 の発現が低下している。本研究では、そのメカニズムを明らかにすることを目的として、肥満状態の脂肪組織で生じる炎症状態に着目し、炎症状態が BAT および I-WAT の両脂肪組織における UCP1 の発現誘導に与える影響を動物個体レベルで検討した。

【方法・結果】肥満状態の BAT および I-WAT の両脂肪組織における UCP1 発現誘導について調べるため、高脂肪食 (HFD) を 16 週間摂食させた C57BL/6J マウスを用いた検討を行った。マウスに寒冷刺激 (4℃、24 時間) を与えると、HFD 摂食群の BAT および I-WAT で誘導される UCP1 の発現量が、普通食 (ND) 摂食群と比較して有意に減少した。また、HFD 摂食群の BAT および I-WAT では、*F4/80* (マクロファージのマーカー遺伝子) と炎症性サイトカイン *tumor necrosis factor α* (*TNF α*) mRNA の発現量が ND 摂食群と比較して有意に増加した。以上の結果より、マクロファージが浸潤し炎症状態が惹起された BAT および I-WAT では、寒冷刺激により生じる UCP1 の発現誘導が抑制される可能性が考えられた。

次にマクロファージが浸潤し炎症状態が惹起された脂肪組織で発現が増加する *TNF α* が、BAT および I-WAT における UCP1 発現誘導に与える影響を調べた。非肥満状態の 5 週齢 C57BL/6J マウスに *TNF α* タンパク質 (100 mg/kg body weight) を腹腔内に投与した。その結果、BAT および I-WAT において寒冷刺激により誘導される UCP1 の発現量が、生理食塩水を投与したマウスと比較して有意に減少した。以上の結果より、肥満によって生じる炎症状態が BAT および I-WAT の両脂肪組織において、UCP1 発現誘導を抑制することが示唆された。

メタボローム解析を用いた PPAR 活性化により変動する生体内代謝物の探索

19

○山崎陽太¹、高橋春弥¹、後藤 剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、柴田大輔³、河田照雄^{1,2}

(¹ 京大院農・食品生物、² 京大学際融合・生理化学、³ かずさ DNA 研)

【目的】 Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) は、核内受容体型転写調節因子であり、糖・脂質代謝の主要な制御因子である。PPAR には、 α 、 γ 、 δ の 3 つのサブタイプが存在する。その中で、PPAR γ は主に脂肪組織に発現し、脂肪細胞分化やインスリン感受性の調節に関与している。そのため、PPAR γ の生理機能を理解することは、糖尿病や脂質異常症といった生活習慣病の予防・改善につながることを期待できる。PPAR γ 活性化は、一般的に、その標的遺伝子の発現変動で評価される。しかし、PPAR γ の生理機能を包括的に理解するためには、生命システムの見終産物である代謝物のレベルで、PPAR γ 活性化を評価することも重要である。そこで本研究では、代謝全体を俯瞰的に把握することができるメタボローム解析を用いて、PPAR γ 活性化により変動する生体内代謝産物の探索を行った。

【方法・結果】 PPAR γ アゴニストである pioglitazone (以下 pio) を肥満モデルマウスに投与し、4 週間飼育した。その後、解剖を行い、脂肪組織抽出物の分析により、薬剤が脂肪組織へ到達していることを確認した。さらに、脂肪組織中の標的遺伝子発現が有意に増加していることから、PPAR γ が活性化されていることを確認した。その後、このマウスの血漿・脂肪組織を 80% methanol で抽出し、LC-MS を用いて代謝物の網羅的な解析 (メタボローム解析) を行った。解析の結果、pio を投与したマウスの血中・脂肪組織中において、アミノ酸が有意に増加することを見出した。次に、増加したアミノ酸が脂肪細胞由来であるかをマウス由来前駆脂肪細胞 3T3-L1 を用いて検討した。分化誘導後の 3T3-L1 脂肪細胞に pio を一週間添加した後、細胞内の代謝物を 80% methanol で抽出し、LC-MS を用いて解析した。その結果、pio 添加により、動物実験で増加が見られたアミノ酸が有意に増加することが明らかとなった。また、これらのアミノ酸の変動は、pio 投与マウスの肝臓中において認められなかった。さらに、PPAR α アゴニスト投与マウスの血中、肝臓中、脂肪組織中のメタボローム解析を行った結果、PPAR α アゴニストの投与では、pio 投与により増加したアミノ酸の変動が認められない、または変動率が小さいことが示された。これらの結果から、PPAR γ の新たな機能として、脂肪細胞におけるアミノ酸代謝への関与が示唆された。