

日本農芸化学会関西支部
第479回 講演会

講演要旨集

日時：平成25年5月25日（土）

会場：京都府立大学

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支部賛助企業様からのご支援により支えられています

アース製薬(株)

ナカライテスク(株)

植田製油(株)

(株)日本医化器械製作所

(株)ウォーターエージェンシー

日本盛(株)

江崎グリコ(株)

日本新薬(株)

(株)カネカ

ヒガシマル醤油(株)

菊正宗酒造(株)

不二製油(株)

黄桜酒造(株)

松谷化学工業(株)

月桂冠(株)

三井化学アグロ(株)

三栄源エフ・エフ・アイ(株)

理研化学工業(株)

サントリー(株)

和研薬(株)

住友化学(株)

和光純薬工業(株)

(株)第一化成

大日本除虫菊(株)

東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所

プログラム

特別企画：産学交流・展示会1（11：30～13：00 3階ロビー）
亀田製菓、塩野義製薬、資生堂による展示

一般講演（13:00～15:05） [講演8分、質疑応答3分]

(* 印は若手優秀発表賞・賛助企業特別賞対象講演)

- *1. 分岐鎖アミノ酸過剰摂取が可欠アミノ酸代謝酵素の遺伝子発現に及ぼす影響
○吉村 亮二¹、水重 貴文^{2,3}、大日向 耕作³、金本 龍平^{1,3}
(¹京府大院・生命環境、²京大・学際融合、³京大院・農)
- *2. 木質バイオマス由来発酵阻害物質による酵母mRNP granuleの形成誘導及び翻訳抑制
○岩城 理、河合 孝朗、Trinh TM Nguyen、井澤 真吾（京工織大院・工芸）
- *3. カフェイン耐性に関与する酵母ABCトランスポーターSnq2pとPdr5pの蛍光基質（Rhodamine6G）を用いた機能解析
○清水 義弘、中村 達也、辻本 善之、渡部 邦彦（京府大院・生命環境）
- *4. 微生物由来トランスグルタミナーゼの活性部位とプロ領域との相互作用
○森 光平¹、小林 淳¹、吉村 卓也¹、水谷 公彦¹、高橋 延行¹、星 由起子²、
山口 庄太郎²、三上 文三¹（¹京大院・農、²天野エンザイム）
- 5. 亜臨界含水アルコール中でアルコールの種類がグルコースの異性化反応に及ぼす影響
○高 大明、小林 敬、安達 修二（京大院・農）
- 6. ヒト血中に移行した大豆由来ペプチドの同定
○木村 桂太¹、重村 泰毅²、朴 恩榮¹、中村 考志¹、佐藤 健司¹（¹京府大院・生命環境、²東京家政大）
- *7. 時計転写因子NPAS2のDNA結合活性へのNAD(P)H効果とpH効果
○芳井 克洋、石嶋 純男、佐上 郁子（京府大院・生命環境）
- 8. Effects of mutations of thermolysin, Asn116 to Asp and Asp150 to Glu, on its salt-induced activation and stabilization
○Evans Menach, Kiyoshi Yasukawa, and Kuniyo Inouye (Grad. Sch. of Agric., Kyoto University)
- 9. Pulse proteolysis法による超好熱菌由来Tk-RNase H2の変性過程の解析
○岡田 淳、長尾 藍、島 佳菜子、佐野 智、高野 和文（京府大院・生命環境）
- 10. 経口コメ型ワクチンMucoRice-CTBにおける主要アレルゲンのプロテオーム解析
○黒河 志保^{1,2}、中村 里香³、目島 未央²、秦 裕子²、黒田 昌治⁴、竹山 夏実^{2,5}、尾山 大明²、
佐藤 茂¹、清野 宏²、増村 威宏¹、手島 玲子³、幸 義和²
(¹京府大院・生命環境、²東大・医科研、³国立衛研・代謝生化学、⁴中央農研・北陸セ、⁵日生研)
- 11. 天然ベンゾフラノイド類の合成研究
○倉持 幸司、椿 一典（京府大院・生命環境）

特別企画：産学交流・展示会2（15：05 ～ 15：30 3階ロビー）

亀田製菓、塩野義製薬、資生堂による展示

特別講演（15：30 ～ 16：10）

農芸化学奨励賞受賞講演

光合成生物における生存戦略の分子機構に関する研究

石崎 公庸（神戸大院・理）

特別企画：産学交流・講演会（16：10 ～17：30）

1. 産学連携による研究開発事例

熊谷 武久 氏（亀田製菓株式会社 お米研究所）

2. 製薬会社における新薬創製研究

山野 佳則 氏（塩野義製薬株式会社 創薬・疾患研究所）

（特別企画の一部は、「公益社団法人日本農芸化学会関西支部提案公募事業」として開催します）

若手優秀発表賞・賛助企業特別賞表彰式（17：30 ～ 17：40）

ミキサー（18：00より、京都府立大学合同講義棟 地下生協食堂）

学生、教員、研究者、産業人を交えて、農芸化学の世界について語り合いませんか。

参加費：一般2,000 円 学生無料

分岐鎖アミノ酸過剰摂取が可欠アミノ酸代謝酵素の遺伝子発現に及ぼす影響

1

○吉村 亮二¹、水重 貴文^{2,3}、大日向 耕作³、金本 龍平^{1,3}
(¹京府大院・生命環境、²京大・学際融合・生理化学研究ユニット、
³京大院・農・食品生物)

【目的】Leu のタンパク質合成促進作用はよく知られている。その一方で低タンパク質栄養時に Leu を過剰に摂取すると摂食抑制や成長阻害が起こることも古くから知られているが、その発生機構はいまだ解明されていない。本研究室はこれまで、いくつかの可欠アミノ酸代謝酵素の発現がタンパク質必要量に鋭敏に応答して制御されることを報告してきた。そこで、これら遺伝子の発現に対する Leu の影響を検討したところ、摂食抑制や成長阻害が起こるとともに、ラット肝臓で Asn 合成酵素 (AS)、Ser 合成の律速酵素である 3-ホスホグリセリン酸脱水素酵素 (PHGDH) 遺伝子の発現が抑制され、Ser を異化する Ser 脱水酵素 (SDH) 遺伝子が誘導されていることを見出した。今回は、この作用が分岐鎖アミノ酸に共通したものかを評価するため、Ile と Val 食を用いて実験を行った。また、摂食量の減少と酵素遺伝子発現との関連性も検討した。

【方法】10 週齢の SD 系雄ラットに 6%カゼイン食、6%カゼイン食に分岐鎖アミノ酸を 8%添加した Leu 食、Ile 食、Val 食を 1 週間自由摂食させた。その後肝臓を採取し、RT-PCR 法、ウエスタンブロット法で酵素 mRNA、タンパク質量を測定した。次に、摂食量の減少が酵素遺伝子発現へ影響するのか評価するため、6%カゼイン食、6%カゼイン+8%Leu 食を自由摂食させる群、6%カゼイン食自由摂食群の摂食量の 90、70、50、30%の食餌を与える制限群を設け、1 週間飼育した。その後、上記の方法で酵素遺伝子の発現量を測定した。

【結果・考察】Leu、Ile、Val 食を与えた場合、摂食量は Leu 食群に比べ Ile、Val 食群で増加した。しかし、AS、PHGDH の mRNA 発現量およびタンパク質量は Leu 食群のみで著しく減少し、SDH の mRNA 発現量およびタンパク質量は増加した。このことから、Leu 摂取により変化した可欠アミノ酸代謝酵素遺伝子発現の変化は Leu に特異的な作用であることが明らかとなった。摂食量が Leu 食群と同等であった 50%摂食群において AS、PHGDH の mRNA 発現量およびタンパク質量は増加し、SDH の mRNA 発現量およびタンパク質量は減少した。一方、Leu 食群では AS、PHGDH 発現量は減少し、SDH 発現量は増加した。このことから、Leu 摂取による可欠アミノ酸代謝酵素の遺伝子発現変動は摂食量の減少による作用ではなく、Leu による作用であることが明らかとなった。

木質バイオマス由来発酵阻害物質による酵母 mRNP granule の形成誘導及び翻訳抑制

2

○岩城 理、河合 孝朗、Trinh TM Nguyen、井澤 真吾
(京都工繊大院・応生)

【目的】 廃木材や稲藁などの木質バイオマスを原料として製造される第二世代バイオエタノールは、食糧資源と競合しないことや未利用資源活用の観点から今後の需要と製造規模の拡大が期待されている再生可能エネルギーである。セルロース・ヘミセルロース・リグニンを主成分とする木質バイオマスを酵母によるアルコール発酵に用いるためには、酸や加圧熱水による糖化前処理を通常おこなうが、この際に糖だけでなく、フルフラールや5-ヒドロキシメチルフルフラール (HMF)、バニリンなどの発酵阻害物質が副産物として生じてしまう。これらの発酵阻害物質は酵母の生育や発酵能を著しく抑制するため、技術面およびコスト面で大きな障壁となっている。これまでに、細胞内エルゴステロールレベルがバニリン耐性に関与すること (Endo *et al.* 2008)などが報告されているが、これらの発酵阻害物質が酵母細胞に及ぼす影響や作用機構は十分に解明されていないのが現状である。本研究では、バイオエタノール製造技術を改良する上で有用な新規知見を収集するために、これらの発酵阻害剤が酵母の mRNA flux や翻訳活性に及ぼす影響について検討した。

【方法・結果】非翻訳状態の mRNA によって形成される P-body やストレス顆粒 (SG) などの細胞質 mRNP granule の形成は、それぞれの構成因子の GFP fusion 発現系を構築して蛍光顕微鏡解析をおこなった。また、酵母の翻訳活性はポリソーム解析によって検討した。解析の結果、木質バイオマスに由来する発酵阻害物質は酵母の翻訳活性の低下を引き起こし、mRNP granule の形成を誘導することを見出した。また、その効果は濃度依存的かつ可逆的であった。さらに、各々単独では SG の形成や翻訳抑制をほとんど誘導しない低濃度であっても、複数の阻害物質や低濃度エタノールストレスと組み合わせることによって、深刻な翻訳抑制が誘導されることを明らかにした。発酵阻害物質の影響が mRNP granule の形成に反映されることから、P-body や SG の GFP マーカーが発酵状況の管理指標として活用できるのではないかと考えられた。

参考文献 [1] Endo *et al.* (2008) *Biotechnol. Biofuels* 1:3. [2] Iwaki *et al.* (2013) *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2765-2774. [3] Iwaki *et al.* (2013) *PLoS One* 8:e61748.

カフェイン耐性に関与する酵母 ABC トランスポーター Ssq2p と Pdr5p の蛍光基質 (Rhodamine6G) を用いた機能解析

3

○清水 義弘、中村 達也、辻本 善之、渡部 邦彦
(京府大院・生命環境)

【背景・目的】カフェイン (CF) はヒトや酵母などのあらゆる細胞に対して様々な生理作用を示すが、細胞レベルでの CF 耐性機構は未解明のままである。そこで、真核細胞のモデル生物である酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の多コピーゲノムライブラリーを用いて CF 耐性遺伝子のスクリーニングを行った結果、ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターをコードする *SNQ2* を選択・同定することができた。これまで *SNQ2* は、発がん性物質と知られる 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) に対する耐性関与することが報告されていたが、CF 耐性に関わる分子として初めて単離することができた。加えて、*SNQ2* と高い相同性を持ち、両親媒性蛍光色素の rhodamine6G (R6G) や抗真菌剤の clotrimazole (CTZ) の耐性に関与する *PDR5* の過剰発現株は *SNQ2* 過剰発現株よりも低い CF 耐性を示すことが判った。そこで、CF 耐性機構における *SNQ2* と *PDR5* の機能を R6G を用いて解析を行うこととした。

【方法】YPH250 株において、*SNQ2* と *PDR5* を二重に欠損させた *snq2,pdr5* 株 (DK) を作製した。多コピーベクター YEp24 を用いて、プラスミド YEp24-*SNQ2*、YEp24-*PDR5* を作製し、これらで DK をそれぞれ形質転換して各過剰発現株 Ssq2p/DK、Pdr5p/DK、そしてコントロール株として YEp24/DK を得た。各種薬剤 (20 mM CF、2 μ M 4NQO、2 μ M CTZ、100 μ M R6G) を含む YPD (1% yeast extract、2% peptone、2% glucose (Glc)) 培地とこれら過剰発現株を用いて、薬剤耐性試験を行った。R6G 輸送活性測定のために、まず各過剰発現株を YPD 培地、30°C で OD₆₆₀ = ~1.5 まで振盪培養し、0.5% yeast extract と 1% peptone を添加後、OD₆₆₀ = ~3.5 まで増殖させた。次に、得られた細胞を R6G 溶液 (100 μ M R6G、10 mM sodium azide、5 mM 2-deoxy-D-glucose (2DG)) で OD₆₆₀ = 1.0 となるように懸濁し、30°C、30 分間の処理により R6G を細胞内に取り込ませた。その後、R6G で処理した細胞を各反応液 (5 mM Glc、5 mM 2DG、5 mM Glc+20 mM CF) で再度懸濁し、細胞外に排出される R6G 量を経時的に蛍光で測定した。

【結果と考察】薬剤耐性試験で、Ssq2p/DK は CF や 4NQO だけでなく、R6G に対しても耐性を示したが、Pdr5p/DK の方が Ssq2p/DK より R6G 耐性が強かった。さらに、Ssq2p/DK は CTZ 耐性を示さないのに対し、Pdr5p/DK は 4NQO 耐性を示さないことから、Ssq2p と Pdr5p は異なる基質特異性を持つが、CF と R6G を共通の基質として認識することが示唆された。R6G 輸送活性は、Ssq2p/DK と Pdr5p/DK で共に検出でき、YEp24/DK では検出できなかったことから、*SNQ2* と *PDR5* が R6G 輸送に関与することが示された。さらに CF は、Ssq2p/DK と Pdr5p/DK の R6G 輸送活性を阻害することが判った。今後、CF の R6G 輸送阻害の様式についてさらに詳細な解析を行う予定である。

微生物由来トランスグルタミナーゼの活性部位とプロ領域ペプチドとの相互作用

4

○森 光平¹、小林 淳¹、吉村 卓也¹、水谷 公彦¹、
高橋 延行¹、星 由起子²、山口 庄太郎²、三上 文三¹
(¹京大院・農、²天野エンザイム)

【目的】トランスグルタミナーゼ (TG, EC 2.3.2.13) は Cys-His-Asp 触媒トリアドを持ち、2つのタンパク質間で Gln 残基と Lys 残基間のアシル基転移反応を触媒してタンパク質間に架橋を形成する。特に *Streptomyces mobaraensis* 由来の TG は食品工業において食品結着用酵素として用いられている。この TG はプロ体で発現され、プロテアーゼによるプロセッシングを受けて成熟体となり、酵素活性を発現するが、プロセッシングの過程で一部が「安定体」を形成し、安定体は成熟型に比べて pH 安定性、温度安定性、酸化安定性が向上していることが知られている。また、安定体の結晶構造解析の結果、安定体はプロ領域が切断後も成熟体に結合していることが示されている。そこで、本研究ではプロ領域ペプチドと成熟体酵素との相互作用について研究を行った。

【方法】24 残基のプロ領域ペプチドを合成し、二次構造を CD スペクトルで測定した。このプロ領域ペプチドの成熟体 TG の酵素活性に及ぼす影響をヒドロキサム酸-鉄キレート法で測定した。さらにプロ領域ペプチドと成熟体 TG を共結晶化し、X 線結晶構造解析を行った。

【結果】遠紫外領域の CD スペクトルから、プロ領域ペプチドは溶液中で完全な二次構造を取っていないことが判明した。プロ領域ペプチドは濃度依存的に成熟体 TG の酵素活性を阻害した。阻害様式は混合型阻害であり、 $K_i = 25 \mu\text{M}$ であった。複合体の結晶構造を決定し、 3.1\AA 分解能で精密化した結果、プロ領域ペプチドの構造はプロ酵素および安定体とほぼ同じであった。

【考察】プロ領域ペプチドと成熟体 TG との複合体では、プロ領域ペプチドが安定体の二次構造とほぼ同じ構造を形成していたことから、成熟体 TG がプロ領域ペプチドの折り畳みを助けていると推測した。またプロ領域ペプチドは成熟体 TG の阻害剤として作用することが明らかとなり、安定体 TG が酵素活性を示すためにはプロ領域ペプチドが酵素から解離する必要があることが示唆された。現在、シンクロトロンを用いてより高分解能の複合体の構造解析を試みている。

○高 大明、小林 敬、安達 修二*
(京大院・農)

【目的】 亜臨界水とは、100℃から臨界点（374℃、22 MPa）までの温度範囲で、加圧することにより、液体状態を保った水である。亜臨界水は比誘電率が低く、イオン積が非常に大きいため、疎水性の有機化合物などをよく溶解し、加水分解や異性化反応などを触媒する。演者らは、亜臨界水中および亜臨界含水エタノール中での、単糖や二糖の分解と異性化反応の速度解析を行ってきた。また、亜臨界含水エタノール中でグルコース、マンノースおよびフルクトースが相互に異性化し、グルコースおよびマンノースが高い選択率でフルクトースに異性化する現象を見いだした[1]。本研究では、エタノール以外のアルコールを用い、亜臨界含水アルコール中でアルコールの種類がグルコースの異性化反応に及ぼす影響を検討した。

【方法】 アルコールとして、メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノールおよび *tert*-ブチルアルコールを用い、アルコールの濃度は0~80% (v/v)とした。グルコースの濃度は0.5% (w/v)で一定とした。ステンレス管（0.8 mm φ ×1 m または2 m）を所定温度（180 または 200℃）に保持したオイルバスに漬けて連続反応器とし、そこに HPLC ポンプを用いて、グルコース溶液を所定の流量で供給した。反応液中に残存するグルコースや生成物は、RI 検出器を備えた HPLC により定量した。

【結果】 一級および二級アルコールを用いた場合には、亜臨界水中と比較して、グルコースの異性化反応が速くなり、高い選択率でフルクトースが生成した。一方、マンノースの生成率は低かった。アルコール濃度の影響を検討したところ、アルコール濃度が高いほど、フルクトースの生成率が高かった。しかし、マンノースの選択率はアルコールの濃度の影響をほとんど受けなかった。これらのことから、一級および二級アルコールについては、アルコールの種類は、グルコースの異性化反応の挙動にほとんど影響を与えないと言える。

tert-ブチルアルコールを用いたところ、一級および二級アルコールの場合と異なり、グルコースの異性化反応が抑制された。また、*tert*-ブチルアルコールの濃度が高いほど、グルコースの反応率もフルクトースの生成率も低かった。さらに、マンノースは検出されなかった。

[1] 化学工学会秋季大会講演要旨集, 44, A117 (2012).

*E-mail: adachi@kais.kyoto-u.ac.jp

ヒト血中に移行した大豆由来ペプチドの同定

6

○木村 桂太¹、重村 泰毅²、朴 恩榮¹、中村 考志¹、佐藤 健司¹
(¹京府大院・生命環境、²東京家政大)

【目的】大豆ペプチドには脂質代謝改善機能があることが報告されており、その作用は消化吸收の過程でさらに低分子化されたペプチドの機能であると考えられている。しかし、その体内での作用機序は十分には明らかとなっていない。その原因として、生体に吸収される活性ペプチドが同定されていないことが挙げられる。本研究では活性ペプチドの候補として、ペプチド経口摂取後のヒト血中の食事由来ペプチド、および *in vitro* での難消化性ペプチドを同定することを目的とした。

【方法】実験①大豆タンパク質加水分解物(25g/体重 60kg)を経口摂取した被験者(n=5)から 0、30、60 分後に採血を行った。血漿をエタノール処理による除タンパク質後、サイズ排除クロマトグラフィーにより分画し、サンプルを 1 分ごとに分取し、更に逆相クロマトグラフィーにより分画した。この分画物を AccQ 誘導化を行い、蛍光を持つ AccQ による誘導化物を逆相クロマトグラフィーにより分離した。逆相クロマトグラフィー分画物を ESI-MS/MS を用いて直接注入法で分析した。

実験②大豆タンパク質加水分解物(5mg)を 0.1MHCl に溶解し、ペプシン 50 μ g を加え、37.0 $^{\circ}$ C で 3 時間人工消化を行った。その後、0.2ml の Tris HCl Buffer pH8.0 を加え、1M NaOH で pH8.0 に調整し、パンクレアチン 0.2mg、ロイシンアミノペプチダーゼ 4.9unit、カルボキシペプチダーゼ 15.4unit を加え、37 $^{\circ}$ C で 24 時間人工消化を行った。サンプルをサイズ排除クロマトグラフィーにより分画し、サンプルを 1 分ごとに分取した。この分画物を PITC 誘導化後、アミノ酸分析を行い、アミノ酸以外のピークを分取し、プロテインシーケンサーで解析した。

【結果・考察】実験①大豆たんぱく質加水分解物摂取前には検出できていない蛍光を持つピークが摂取 60 分後に検出された。この蛍光を持つピークを分取し、ESI-MS 分析した結果、Glu-Leu/Ile の他、Tyr-Gly を同定した。また、これらのペプチドは大豆タンパク質コングリニン中のアミノ酸配列中に存在した。

実験②PITC 誘導化した分画物のアミノ酸以外のピークをすべてプロテインシーケンサーで解析した結果、Ile-Pro、Phe-Pro、Arg-Pro などの C 末端に Pro を含む幾つかの低分子難消化性ペプチドを同定した。

時計転写因子 NPAS2 の DNA 結合活性への NAD(P)H 効果と pH 効果

7

○芳井 克洋、石嶋 純男、佐上 郁子
(京府大院・生命環境)

【背景・目的】 時計転写因子 NPAS2 (Neuronal PAS domain protein 2)は、DNA 結合ドメインである bHLHドメイン、ダイマー形成に関わりヘムを結合する2つの PASドメイン、及び転写活性化ドメインをもつ。NPAS2 は BMAL1 とヘテロダイマーを形成し、時計遺伝子の E-box 配列に結合しその転写を促進する。ヘテロダイマーの DNA 結合活性は NAD(P)H/NAD(P)⁺の濃度比に依存すると報告されているが詳細は不明である。また最近、動物培養細胞を用いた実験で時計遺伝子発現リズムが培地の pH により変動すると報告された。そこで本研究では、時計遺伝子発現制御に対する NAD(P)H や pH の効果を明らかにするために NPAS2 の DNA 結合活性の解析をおこなった。

【方法】 大腸菌発現系で、NPAS2 bHLH-PASA (1-240 aa)及びNPAS2 bHLH (1-116 aa)、(1-79 aa)、(1-61 aa)を His-tag つきで精製した。別途 MBP-tag つき BMAL1 bHLH-PASA/B 及び BMAL1 bHLH-PASA を精製した。EMS assay を用いて、各種 NPAS2 及び BMAL1 の DNA 結合活性に対する NAD(P)H とその類似化合物の効果、及び pH の効果を調べた。

【結果・考察】 はじめに、NPAS2 bHLH-PASA と BMAL1 bHLH-PASA/B を用いた EMS assay の結果から、NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性に対する NADPH の EC₅₀は 2.3 mM であった。また、各種 NPAS2 bHLH を用いて同様の実験を行ったところ、NPAS2 は N 末端 61 アミノ酸(1-61 aa)だけで BMAL1 とヘテロダイマーを形成して DNA に結合し、その活性は NADPH 濃度依存的に増加した(EC₅₀ = 2.1 mM)。これより NADPH との相互作用に必要な NPAS2 の領域が 1-61 aa にあることが示唆される。また、BMAL1 のみの系に NADPH を加えると、濃度依存的に BMAL1 の DNA 結合活性が阻害された。よって、NADPH は NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性には正の、BMAL1 ホモダイマーの DNA 結合活性には負の制御効果を持つと示唆される。さらに、NAAD、2', 5'-ADP、nicotinamide、nicotinic acid の各種 NAD(P)H 類似化合物に加えて NAD(P)⁺は、単独、及び NAD(P)H との競合条件下において NPAS2/BMAL1 ヘテロダイマーの DNA 結合活性に影響を与えなかった。よって、NPAS2 の DNA 結合活性は NAD(P)H/NAD(P)⁺濃度比というよりは NAD(P)H 依存的に制御されると考えられる。一方、反応溶液の pH を 6.5-8.5 に変化させた EMS assay で、NPAS2 の DNA 結合活性は低 pH 側で小さく、高 pH 側で大きくなった。このことは pH 変化による時計遺伝子発現リズムの変動に NPAS2 が関与する可能性を示唆する。

Effects of mutations of thermolysin, Asn116 to Asp and Asp150 to Glu, on its salt-induced activation and stabilization

○Evans Menach, Kiyoshi Yasukawa, and Kuniyo Inouye

(Div. of Food Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto University)

[Purpose] We previously found that two single mutations, Asn116→Asp¹⁾ and Asp150→Glu,²⁾ increase the activity of thermolysin. In the present study, we examined their effects on NaCl-induced activation³⁾ and stabilization.

[Methods] (i) Production of enzyme: Thermolysin was produced by co-expressing in *Escherichia coli* the mature and pro domains as independent polypeptides.

(ii) Hydrolysis of *N*-[3-(2-furyl)acryloyl]-glycyl-L-leucine amide (FAGLA): The reaction was carried out with 0–4.0 M NaCl at pH 7.5 at 25°C. The A_{345} of the reaction solution was measured continuously. The amount of FAGLA hydrolyzed was evaluated using the molar absorption difference due to hydrolysis, $\Delta\epsilon_{345} = -310 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, at 25°C.

(iii) Thermal inactivation of thermolysin: Thermolysin was incubated with 0–4.0 M NaCl at 70°C for 6–30 min, and the FAGLA hydrolysis activity was measured at 25°C.

[Results] In the hydrolysis of FAGLA, the relative activities (the ratios of the specificity constant, k_{cat}/K_m , at x M NaCl to that at 0 M NaCl) at 0.5–4.0 M NaCl of D150E and N116D/D150E were lower than those of wild-type thermolysin (WT) and N116D, respectively. In thermal inactivation at 70°C, the relative stabilities (the ratios of the first-order rate constant, k_{obs} , at 0 M NaCl to that at x M NaCl) at 0.5–4.0 M NaCl of D150E and N116D/D150E were lower than those of WT and N116D, respectively.

[Discussion] These results indicate that unlike Asn116→Asp, Asp150→Glu reduced NaCl-induced activation and stabilization, suggesting that the binding of ions with certain residues of thermolysin is involved in the activation and stabilization.⁴⁾

[References] 1. Menach E, Yasukawa K, and Inouye K, *J. Biochem.* **152**, 231–239 (2012).
2. Kusano M, Yasukawa K, and Inouye K, *J. Biochem.* **145**, 103–113 (2009).
3. Inouye K, *J. Biochem.* **112**, 335–340 (1992).
4. Menach E, Yasukawa K, and Inouye K, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press (2013).

Pulse proteolysis 法による超好熱菌由来 Tk-RNase H2 の変性過程の解析

9

○岡田 淳、長尾 藍、島佳 菜子、佐野 智、高野 和文
(京府大院・生命環境)

【背景】

いくつかの超好熱菌由来タンパク質は非常に遅い変性反応によって高い安定性を維持していることが知られている。しかし、この遅い変性反応がどのような機構によって引き起こされているのかはまだ十分には理解されていない。タンパク質の変性過程を実験的に探ろうとする場合、重要になるのはその中間状態の検出・解析である。一般的には、円二色性測定 (CD 測定) やトリプトファン蛍光測定等の分光学的な手法が用いられる。しかし、中間状態におけるタンパク質の構造は部分的な不安定さを有することから、その測定や解析は困難である。

【結果】

本研究では超安定なプロテアーゼとして知られる超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 subtilisin (Tk-subtilisin) を用いた Pulse proteolysis 法による遅い変性反応の解析を行った。本解析法は中間状態におけるタンパク質の安定な領域のみを検出・解析することができる新しい手法である。観測対象として、非常に遅い変性反応を示す超好熱古細菌 *Thermococcus kodakarensis* 由来 RNase H2 (Tk-RNase H2) とその変性速度が速くなった変異体 (L33A、I102A) を選出し、それぞれの変性反応を比較解析した。その結果、Pulse proteolysis 法によって観測することができた Tk-RNase H2 の中間状態の一つが、L33A と I102A 変異体では観測することができなかった。さらに、それぞれの CD 測定による変性反応も比較したところ、Tk-RNase H2 の遅い変性反応には L33A と I102A 変異体で観測できなかった中間状態が強く関係していることが示唆された。

【結論】

Tk-subtilisin を用いた Pulse proteolysis 法により、既存の分光学的手法による解析のみでは捕捉できなかった変性過程の中間状態を検出することができた。それは、Tk-RNase H2 の遅い変性反応を引き起こす機構に強く関係する中間状態であった。

経口コメ型ワクチン MucoRice-CTB における主要アレルゲンのプロテオーム解析

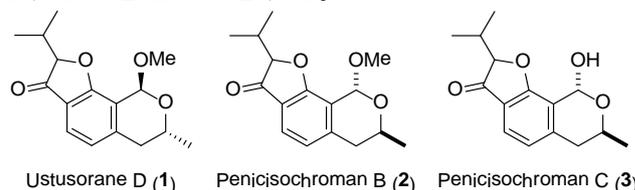
10

○黒河 志保^{1,2}、中村 里香³、目島 未央²、秦 裕子²、黒田 昌治⁴、
竹山 夏実^{2,5}、尾山 大明²、佐藤 茂¹、清野 宏²、増村 威宏¹、
手島 玲子³、幸 義和²
(¹京府大院・生命環境、²東大・医科研、³国立衛研・代謝生化学、
⁴中央農研・北陸セ、⁵日生研)

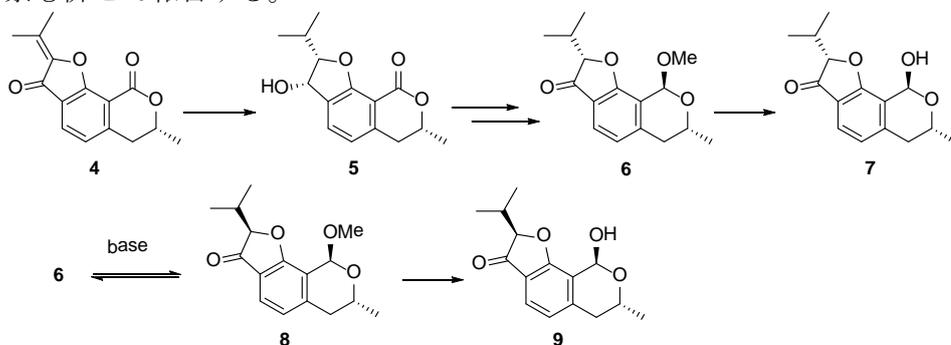
【目的】これまで、RNAi 技術を用いて米の主要貯蔵タンパク質 13kDa プロラミンおよびグルテリン A をノックダウンすることによりコレラトキシン B サブユニット(CTB) を過剰発現させた経口ワクチン米「MucoRice-CTB」の開発を進めてきた。ヒトへの実用化を目指すにあたり、MucoRice-CTB は米粉末を精製することなく経口投与することになるため、遺伝子導入による内在アレルゲンタンパク質の発現蓄積への影響を無視できない。そこで、本研究ではプロテオーム解析手法を用いて野生米(日本晴:WT) との比較を行うことにより、MucoRice-CTB における米の主要アレルゲンタンパク質の発現差異を評価した。

【方法および結果】 1M NaCl で抽出した WT と MucoRice-CTB を米アレルギー患者血清を用いて IgE イムノブロットにて解析したところ、MucoRice-CTB において分子量 10-15kDa のアレルゲンタンパク質が WT と比べて顕著に減少していた。そこで、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)法を用いて分離された単一のタンパク質スポットを詳細に比較した。その結果、 α -amylase/trypsin inhibitor-like protein family のうち 10 個のスポットの発現レベルが WT と比較して MucoRice-CTB で有意に減少を示した。分離ゲル上で分子量 14-16kDa を示すスポット群は、先行研究の MALDI-TOF-MS/MS 解析によって米の主要アレルゲンとして同定されており、今回の米アレルギー患者血清のイムノブロットの結果とも相関した。その他、既にアレルゲンとして同定されている 19kDa globulin のうち 4 スポットで発現レベルの減少が認められた。さらに、52kDa-、63kDa globulin、glyoxalase I の各スポットについては有意な増減はみられなかった。この結果を裏付けるために、さらに Shotgun-MS 解析を用いて米のアレルゲンタンパク質の網羅的な発現差異解析を行った。その結果、RAG2 をはじめとする α -amylase/trypsin inhibitor-like protein family の 5 種類のタンパク質および 19kDa globulin が予想通り MucoRice-CTB で減少しており、2D-DIGE の結果とも相関した。今回の結果はアレルゲン発現の観点から、経口ワクチン米としての MucoRice-CTB の安全性を評価する指標の一つとなり得るものと考えられた。

【目的】 Ustusorane D (**1**) は *Aspergillus ustus* 094102 から単離・構造決定されたベンゾフラノイドであるが、この化合物の相対及び絶対立体配置は完全に決定されていない¹。一方、化合物 **1** と同一の平面構造を有する penicisochroman B (**2**) が *Penicillium* sp. PSU-F40 から単離・構造決定されている²。化合物 **1** と **2** の各種スペクトルデータは類似しているものの、完全に一致していない。このことは、化合物 **1** と **2** がジアステレオマーの関係であることを示唆する。また化合物 **2** と共に、アセタール部位が加水分解された penicisochroman C (**3**) の単離も同時に報告されている。しかし、化合物 **2** や **3** の相対及び絶対立体配置も決定されていない。そこで本研究では、天然ベンゾフラノイド **1** ~ **3** を化学合成することで、未決定である天然物の立体配置を確定することを目的とする。



【方法と結果】我々が既に合成を報告している化合物 **4** を出発原料として合成に着手した。化合物 **4** の立体選択的な還元反応により化合物 **5** へ変換した。さらに、化合物 **5** から数工程の官能基変換を経て化合物 **6** ~ **9** を合成することに成功した。合成した化合物 **6** の NMR スペクトルは、化合物 **1** と一致した。しかしながら **1** の比旋光度は $[\alpha]^{20}_D -1$ (c 0.1, MeOH) であるのに対し、**6** の比旋光度は $[\alpha]^{17}_D -67.9$ (c 0.61, MeOH) であった。この結果から天然の ustusorane D はラセミ体であることが示唆された。一方、**8** のスペクトルデータは **2** と一致した。化合物 **2** の比旋光度は $[\alpha]^{25}_D -57$ (c 0.08, CHCl₃) であるのに対し、合成品の比旋光度は $[\alpha]^{22}_D + 54.9$ (c 0.21, CHCl₃) であった。この結果から天然の penicisochroman B は **8** のエナンチオマーであることが分かった。しかしながら、天然の penicisochroman C のスペクトルデータは、化合物 **7** や **9** と一致しなかった。現在、その原因を追及しており、これらの結果や考察も併せて報告する。



【参考文献】 1. Lu, Z.; Wang, Y.; Miao, C.; Liu, P.; Hong, K.; Zhu, W. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1761–1767. 2. Trisuwan, K.; Rukachaisirikul, V.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Preedanon, S.; Sakayaroj, J. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 4484–4489.

特別講演 農芸化学会奨励賞受賞講演

光合成生物における生存戦略の分子機構に関する研究

神戸大学大学院理学研究科 准教授

石崎 公庸

はじめに

固着性である植物は、刻一刻と変化する外的環境に適応する仕組みを発達させてきた。私は、光合成生物が外的環境に巧みに適応し、子孫を残すための分子機構を理解することを目指し研究している。特に生物機能発現の基盤であるゲノムを意識し、被子植物に加え陸上植物進化の基部に位置するコケ植物を材料に研究を行ってきた。まず光合成を十分に行うことができないストレス条件下で植物が生存するための分子機構について、ゲノム情報を生かした網羅的アプローチから着想を得、分子遺伝学とメタボロミクス技術を駆使して解析した。また、陸上植物としての体制の成り立ちと進化を解析するため陸上植物進化の基部に位置するコケ植物ゼニゴケに着目し、ゲノム解析に基づく分子遺伝学の基盤を構築した。特に植物細胞の分化全能性に基づく繁殖様式である栄養繁殖に着目し、ゼニゴケをモデルとして研究している。以下に各研究成果の概略を述べる。

1. 植物の糖欠乏におけるミトコンドリアの機能

植物は光エネルギーを用いて、大気中の CO₂ を固定することができる。しかし光が不十分な環境やストレス条件下では光合成が十分に行えず、しばしば糖欠乏状態になることが知られている。私はシロイヌナズナのマイクロアレイデータの解析から、電子伝達フラビン蛋白質複合体 (ETF/ETFQO) が糖欠乏条件下で誘導されることを見出し、糖欠乏環境における ETF/ETFQO 複合体の機能解析を開始した。電子伝達フラビン蛋白質 (ETF) はミトコンドリアマトリクスに局在する種々の脱水素酵素群の電子受容体であり、ETF によって受け取られた電子は、ミトコンドリア内膜に結合する電子伝達フラビン蛋白質-ユビキノン酸化還元酵素 (ETFQO) を介してミトコンドリア電子伝達系のユビキノンを渡される。動物において ETF/ETFQO 電子伝達系は、脂肪酸のβ酸化、アミノ酸分解、コリン代謝に必須の役割をもつことが知られているが、植物におけるミトコンドリア ETF/ETFQO 電子伝達系に関する知見は皆無であった。動物ではミトコンドリアに局在する脂肪酸のβ酸化経路が、植物ではペルオキシソームに局在することが知られており、ETF/ETFQO 電子伝達系が関わる代謝経路の違いとその意義を調べる観点からも興味深い。そこでシロイヌナズナ ETF および ETFQO 遺伝子の機能欠損変異体を単離し解析を行ったところ、ETF/ETFQO 電子伝達系が糖欠乏条件下における生存に重要な役割を持つことを見出した。さらに糖欠乏条件下における野生株と変異体のメタボロミクス解析を行い、ETF/ETFQO 複合体が分岐鎖アミノ酸代謝およびリジン代謝に関わることを明らかにした (図 1)。植物は日照不足など種々のストレスにより糖が枯渇した条件下においては、タンパク質分解により生成されたアミノ酸の分解を亢進することでエネルギー (ATP) を獲得しており、ミトコンドリア ETF/ETFQO 電子伝達系は糖欠乏時のエネルギー供給の鍵であることを示唆した。

2. 基部陸上植物ゼニゴケにおける分子遺伝学研究基盤の構築

植物は、約 5 億年前に水中の環境から陸上へと進出したと考えられている。陸上は水中に比べ気温や湿度の変化が大きく紫外線も降り注ぐ過酷な環境である。固着性の生活様式をとる植物はどのように過酷な陸上の環境に適応し、現在の体制に進化したのか? そのような問題に答えを見つけるべく、私達は陸上植物進化の基部に位置するコケ植物ゼニゴケに注目し、分子遺伝学の基盤となる実験手法の開発を進めた。ゼニゴケは半数体が主となる生活環、高い分化能と増殖能、雄雌異株であり交配による遺伝学が簡便であ

ること、など実験モデルとして様々な利点を備えている。我々は、ゼニゴケが植物として比較的小さな性染色体をもつことに着目し、ゼニゴケを材料として世界に先駆けて植物の性染色体の構造解析を行う成果を挙げた。さらに近年、進化的位置づけの重要性から、米国エネルギー省 Joint Genome Institute による全ゲノム解析プロジェクトに採択され、現在までに常染色体を含む全ゲノム解析がほぼ完了している。ゲノム解析に加え、私たちは、光質による成長相転換制御技術、アグロバクテリウムを介した高頻度形質転換系、選抜マーカーとレポーター遺伝子の開発、葉状体再生断片を用いた形質転換系、T-DNA タグgingを基盤とする順遺伝学アプローチ、相同組換えの原理に基づくジーンターゲットング法等の実験基盤を確立した。これまで私達が開発したゼニゴケの研究基盤を軸に、細胞生物学から発生学まで、陸上植物の生存戦略の成り立ちと進化に着目した研究が国内外に広がりを見せている。

3. ゼニゴケにおける栄養繁殖の分子機構の解析

動物とは異なり植物は、体細胞が分化してもなお様々な種類の細胞に分化できる能力、「分化全能性」を有する。この性質に基づき植物は、交配/受精による有性生殖の他に、栄養器官に分化した体細胞から個体を再生する無性生殖の様式・栄養繁殖を行うものが多い。「交配」を経ずに次世代を増殖することができる栄養繁殖は、農業や園芸の分野でも重要な繁殖様式である。しかし、順遺伝学が可能な栄養繁殖のモデル植物がなく、陸上植物における栄養繁殖の詳細なメカニズムについては、ほとんど知見がない。私は、ゼニゴケの分子遺伝学研究基盤を活用し、栄養繁殖機構の研究を進めてきた。ゼニゴケは、受精による有性生殖に加え、栄養成長期に無性芽という組織を分化し多数のクローンを増殖する栄養繁殖を行う(図 2a)。これまで無性芽の発生過程において顕著なレベルのオーキシンが杯状体の底部に蓄積することを明らかにした。つぎに 20 万株の T-DNA タグラインの選抜から 10 株のオーキシン低感受性株を単離し、6 株において杯状体もしくは無性芽の発生に異常を確認した。それらのうち 2 株はオーキシン応答を制御する転写活性因子をコードする *ARF1* の破壊株であることを同定した。これらのことから、オーキシンの蓄積と *ARF1* を介した転写活性化が無性芽発生プロセスの鍵となることを示唆した(図 2b)。本研究で得られた知見は、植物における栄養繁殖の機構解明に貢献するだけでなく、オーキシンを介した転写制御の仕組みが植物の陸上進出の時点で獲得されていたことを示唆している。今後、配偶体優占の生活環をもつゼニゴケにおけるオーキシンの機能について、進化発生学の視点からも研究を深めたい。

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻遺伝子特性学分野で行われたものです。本研究を行う機会を与えて頂き、日頃よりご指導ご鞭撻を賜りました京都大学教授・河内孝之先生に深甚なる感謝の意を表します。そして学生時代より温かいご指導をいただいた京都大学名誉教授・大山莞爾先生(残念ながら平成 24 年 9 月にご逝去されました)に心より御礼申し上げます。また学生時代より長年に渡り数々の激励とご助言を賜りました福澤秀哉先生(現 京都大学教授)、大和勝幸先生(現 近畿大学准教授)に深謝いたします。同様に多大なご協力をいただきました当研究室の多くの卒業生、在学生、スタッフの方々に心より感謝いたします。ポストドクとして在籍したオックスフォード大学植物科学部(Christopher J. Leaver 教授)では、多くの研究成果を得ることが出来ただけでなく、様々なことを学ぶことができました。Christopher J. Leaver 教授と研究室のメンバーに深く御礼申し上げます。また共同研究者として多大なご協力をいただきましたマックス・プランク研究所の Alisdair R. Fernie 博士と研究室の方々に深く感謝いたします。本研究を行うにあたってご協力いただきましたすべての共同研究者の皆様にも厚く御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました河内孝之先生ならびにご支援賜りました京都大学大学院農学研究科応用生命科学科の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

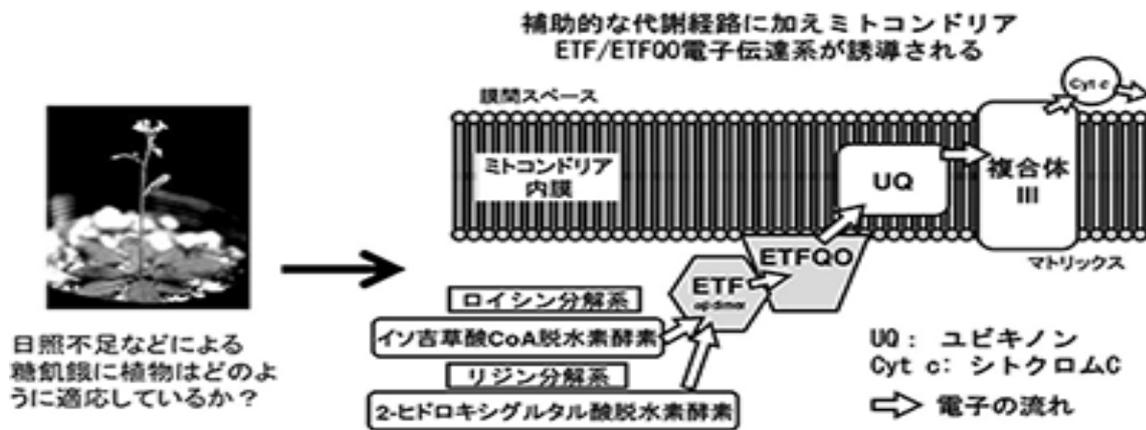


図1：植物の糖飢餓状態におけるETF/ETFQO電子伝達系の機能

植物は糖飢餓条件になると、ETFQOの発現が上昇し、ETF/ETFQO電子伝達系の機能が誘導される。ETFはロイシン分解系のイソ吉草酸CoA脱水素酵素、およびリジン分解系の2-ヒドロキシグルタル酸脱水素酵素の電子受容体である。糖飢餓で誘導されるタンパク質分解から生成されたアミノ酸を呼吸基質とし、ETF/ETFQO電子伝達系を介して、生存に必要なエネルギー（ATP）が生産されると考えられる。

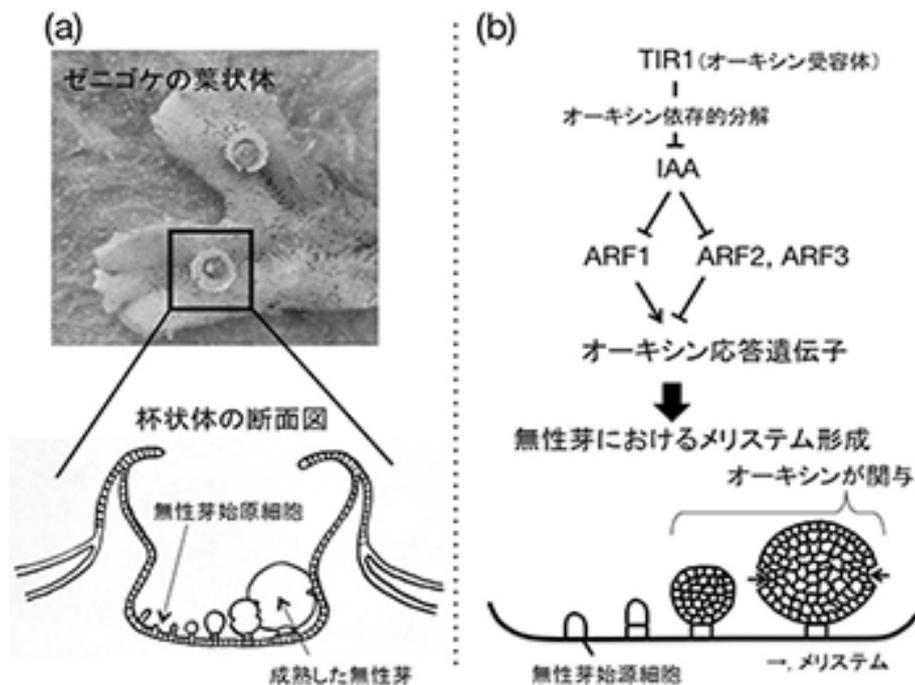


図2：ゼニゴケの栄養繁殖におけるオーキシンの役割

a: ゼニゴケの栄養繁殖。ゼニゴケは、その栄養成長期の植物体（葉状体）の背面に、杯状体と呼ばれる器官を形成し、その中に多数のクローン個体（無性芽）をつくる。無性芽が雨水等によって離脱し散布されることでクローン個体が迅速に繁殖する。b: ゼニゴケの栄養繁殖におけるオーキシンの機能モデル

特別企画 産学交流・講演会

1. 産学連携による研究開発事例

熊谷 武久 氏（亀田製菓株式会社 お米研究所）

特別企画 産学交流・講演会

2. 製薬会社における新薬創製研究

山野 佳則 氏（塩野義製薬株式会社 創薬・疾患研究所）

<お知らせ>

○支部参与会は、12：00より京都府立大学 第5講義室（合同講義等棟3階）にて開催いたします。

○次回例会（第480回）予定

日時：平成25年7月6日（土）

会場：大阪府立大学

講演申込締切：平成25年6月7日（金）

講演要旨締切：平成25年6月14日（金）

問い合わせ先：〒599-8531 大阪府堺市学園町1-1

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

山地 亮一

Tel & Fax: 072-254-9453

E-mail: yamaji@biochem.osakafu-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

京都大学農学研究科内

庶務幹事：由里本 博也

E-mail：yury@kais.kyoto-u.ac.jp

Tel：075-753-6387、Fax：075-753-6454

会計幹事：松尾 道憲

E-mail：matsuo@kais.kyoto-u.ac.jp

Tel：075-753-6106、Fax：075-753-6104

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