

---

---

---

---

---

---

**日本農芸化学会関西支部  
第480回講演会・ミニシンポジウム**

---

---

---

---

---

---

**講演要旨集**

**平成25年7月6日(土)  
大阪府立大学 学術交流会館**

# 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)

東洋紡(株)

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

江崎グリコ(株)

日本盛(株)

(株)カネカ

日本新薬(株)

菊正宗酒造(株)

ヒガシマル醤油(株)

黄桜 (株)

不二製油(株)

月桂冠 (株)

松谷化学工業(株)

三栄源エフ・エフ・アイ (株)

三井化学アグロ(株)

サントリーホールディングス(株)

理研化学工業(株)

住友化学(株)

和研薬(株)

(株)第一化成

和光純薬工業(株)

大日本除虫菊(株)

## プログラム

- ミニシンポジウム (13:00~15:05)  
『重力にあらがう ~動植物の支持組織と力学応答~』
  - 1 「硬組織におけるメカニカルストレスの作用」 4  
石橋 宰 (大阪府大院・生命環境)
  - 2 「筋肉機能の維持・増進に有効な食品素材の開発」 6  
大野木 宏 (タカラバイオ(株)・バイオ研究所)
  - 3 「植物の抗重力反応」 8  
保尊 隆享 (大阪市大院・理学)
  
- 一般講演 (15:25~16:37)
  - \*1 昆虫の脱皮ホルモン受容体リガンドを検出するレポーターアッセイ酵母の樹立 14  
○松浦 麻衣<sup>1</sup>、原島 小夜子<sup>1</sup>、川西 優喜<sup>1</sup>、中川 好秋<sup>2</sup>、八木 孝司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪府大院・理・生物、<sup>2</sup>京大院・農・応用生命)
  - \*2 *Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソーム形成マンナーゼの酵素学的諸性質 15  
○石川 岳<sup>1</sup>、中島 大地<sup>1</sup>、柴田 敏行<sup>1,2</sup>、田中 礼士<sup>1,2</sup>、黒田 浩一<sup>3</sup>、植田 充美<sup>3</sup>、田丸 浩<sup>1,2,4</sup>、  
三宅 英雄<sup>1,2,4</sup> (<sup>1</sup>三重大院・生資、<sup>2</sup>三重大・新産業、<sup>3</sup>京大院・農、<sup>4</sup>三重大・生命支セ)
  - \*3 男性ホルモンは膵β細胞の分化と増殖を促進する 16  
○甲木 孝弘<sup>1</sup>、原田 直樹<sup>1</sup>、中野 長久<sup>2</sup>、乾 博<sup>3</sup>、山地 亮一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・生命環境・応用生命、<sup>2</sup>大阪女子短大、<sup>3</sup>大阪府大院・総リハ・栄養)
  - \*4 細胞外マトリクスの硬さの感知におけるピンキュリン-ビネキシンα相互作用 17  
○市川 尚文<sup>1</sup>、山下 寛<sup>1</sup>、木村 泰久<sup>1</sup>、植田 和光<sup>1,2</sup>、木岡 紀幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京大・iCeMS)
  - \*5 *Kitasatospora* sp. MK-1785 由来マルトトリオース生成アミラーゼに関する研究 18  
○掃部 正浩、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司 (阪府大院・生命環境)
  - \*6 日本晴と組換えワクチン発現イネにおけるコメアレルゲンRAG2タンパク質の  
種子内局在部位 19  
○黒河 志保<sup>1,2</sup>、黒田 昌治<sup>3</sup>、目島 未央<sup>2</sup>、中村 里香<sup>4</sup>、高橋 裕子<sup>2</sup>、相良 洋<sup>2</sup>、竹山 夏実<sup>5</sup>、  
佐藤 茂<sup>1</sup>、清野 宏<sup>2</sup>、手島 玲子<sup>4</sup>、増村 威宏<sup>1</sup>、幸 義和<sup>2</sup> (<sup>1</sup>京府大院・生命環境、  
<sup>2</sup>東大・医科研、<sup>3</sup>中央農研・北陸セ、<sup>4</sup>国立衛研・代謝生化学、<sup>5</sup>日生研)  
\*「農芸化学会関西支部若手優秀発表賞・賛助企業特別賞」対象講演
  
- 特別講演 (16:45~17:25)  
農芸化学奨励賞受賞講演  
『酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学』 22  
水谷 公彦 (京大院・農)
  
- 懇親会 (17:40~18:40) 会費 3,000 円 (学生無料)

# MEMO

13:00~15:05 多目的ホール

# 重力にあらがう ～動植物の支持組織と力学応答～

「硬組織におけるメカニカルストレスの作用」

石橋 宰（大阪府大院・生命環境）

「筋肉機能の維持・増進に有効な食品素材の開発」

大野木 宏（タカラバイオ(株)・バイオ研究所）

「植物の抗重力反応」

保尊 隆享（大阪市大院・理学）

## 硬組織におけるメカニカルストレスの作用

(大阪府大院・生命環境) ○石橋 幸

生物は外部から様々なメカニカルストレス (MS) の影響を受けて生息している。そのなかでも、重力は、地球上のすべての生物が関わることになる MS であり、生物はそれぞれ重力に対する独自の受容応答メカニズムを発達させてきた。特に、脊椎動物の硬組織である骨は、重力に抗して体を支持し、また骨格筋と連動して様々な運動を可能にするという組織の特性上、MS との関わりは深い。すなわち、骨組織は MS に対してきわめて敏感に反応し、状況に応じてその代謝を制御している。しかしながら、MS が骨組織に受容され、骨代謝シグナルに変換される過程の分子メカニズムについては不明な点が多い。我々は、このメカニズムの一端を明らかにすべく、マウスの骨組織および歯周組織の細胞を用いて *in vitro* 研究を行ってきた。本講演では、我々が得た実験結果を中心に紹介し、これまでに提唱されている仮説について概説する。

### ① マウス頭頂骨縫合部への張力刺激負荷による骨形成促進の分子機構

我々は、マウス頭頂骨縫合部に張力刺激を負荷することにより骨形成が刺激されることを確認し、この実験モデルを用いて骨芽細胞の分化および骨形成の分子メカニズムの解析を試みた。

生後 4 日齢マウスの頭頂骨縫合部を切り出し、歯科矯正用のワイヤーで作製したバネを用いて 0.2 g 重の張力を連続的に負荷すると、縫合部は経時的に伸展し内部の未分化線維芽細胞様細胞は扁平化する。また、これに伴い骨芽細胞数および前骨芽細胞数が増加し、さらに類骨（石灰化が始まる前の骨）も著明に増加する。これらの変化は縫合部の中心へと移動し、類骨は次第に石灰化し骨形成が完了する。我々は、張力負荷開始後 3~6 時間で、骨形成促進因子である *bmp-4* の遺伝子発現が、前骨芽細胞やその先端部に並ぶ線維芽細胞様細胞に誘導されることを見出した。*bmp-4* 陽性の細胞は次第に縫合部の中心に向かって伸びて行くが、これらの細胞はその後骨芽細胞特異的な転写因子 *Runx2* を発現して骨芽細胞へと分化し、さらに活発に骨基質を合成して石灰化が進行する。以上より、張力負荷に应答して線維芽細胞様細胞において発現が惹起された *BMP-4* が *autocrine/paracrine* 因子として働き、その結果として骨芽細胞分化が促進することが示唆された。

そこで、張力刺激がもたらす骨形成作用にかかわる遺伝子をさらに調べるために、

我々は、ダイファレンシャルディスプレイ法を用いた網羅的遺伝子検索を試みた。その結果、張力刺激負荷後3時間で発現が変動する3種類の遺伝子の断片を得た。本講演では、特にその中の1つである *α-adaptin C* についての解析結果について紹介する。

## ② 歯根膜の細胞における石灰化抑制機構

歯根膜（歯周靭帯）は、歯周組織において歯牙と歯槽骨という異なる2種類の硬組織の間に位置する線維性結合組織である。骨組織と異なり、歯根膜は生体内で常にMSを受けながらもその恒常性を維持しており、通常石灰化が誘導されることは無い。我々は、歯根膜における細胞の特性を調べるため、マウス歯根膜由来線維芽細胞株 PDL-L2 を樹立し、遺伝子レベルでの解析を行ってきた。その結果、本細胞は骨芽細胞の分化決定遺伝子である *runx2* や *osterix* の発現を含め、骨芽細胞前駆細胞と極めて類似した遺伝子発現プロファイルを呈することが明らかになった。一方、本細胞を骨芽細胞分化・石灰化誘導条件に暴露しても、石灰化は認められなかった。したがって、PDL-L2 細胞では何らかの石灰化抑制機構が働いていることが示唆され、我々はその機構の1つとして *Msx2* の関与を明らかにした。さらに、歯根膜細胞がMSを受容しても石灰化が誘導されないのは、骨芽細胞とは異なる独自のMS受容・応答機構が存在するためであると仮定し、以下の実験を行った。

まず、FLEXERCELL（伸展刺激負荷装置）を用いて、PDL-L2 細胞のMSに対する応答を調べた。その結果、前骨芽細胞株 MC3T3-E1 ではMSにより FAK、ERK1/2、および *Runx2* が活性化され、石灰化が促進したが、PDL-L2 細胞ではいずれの活性化も認められなかった。一方、これらの上流のMS受容分子と考えられてきた *Integrin α2/α5/β1* は、PDL-L2 細胞と MC3T3-E1 細胞において同等に発現されていることから、歯根膜細胞にはMSによる FAK リン酸化の段階において抑制的に働く独自の機構が存在することが示唆された。そこで、これらの細胞に発現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて網羅的に比較解析したところ、PDL-L2 細胞のみに発現する遺伝子の1つとして *integrin α7* を見出したため、この関与について検討した。PDL-L2 細胞における *Integrin α7* 発現を恒常的にノックダウンしたところ、MSに応答して FAK、ERK1/2、および *Runx2* の活性化と、石灰化が認められるようになった。以上の結果から、*Integrin α7* は、MS 依存的な FAK のリン酸化を抑制することにより、歯根膜細胞の骨芽細胞様細胞への分化を抑制し、石灰化を阻害する因子の1つであると考えられる。

## 筋肉機能の維持・増進に有効な食品素材の開発

(タカラバイオ (株)、京都府立医大・生体食品機能学講座) 大野木 宏

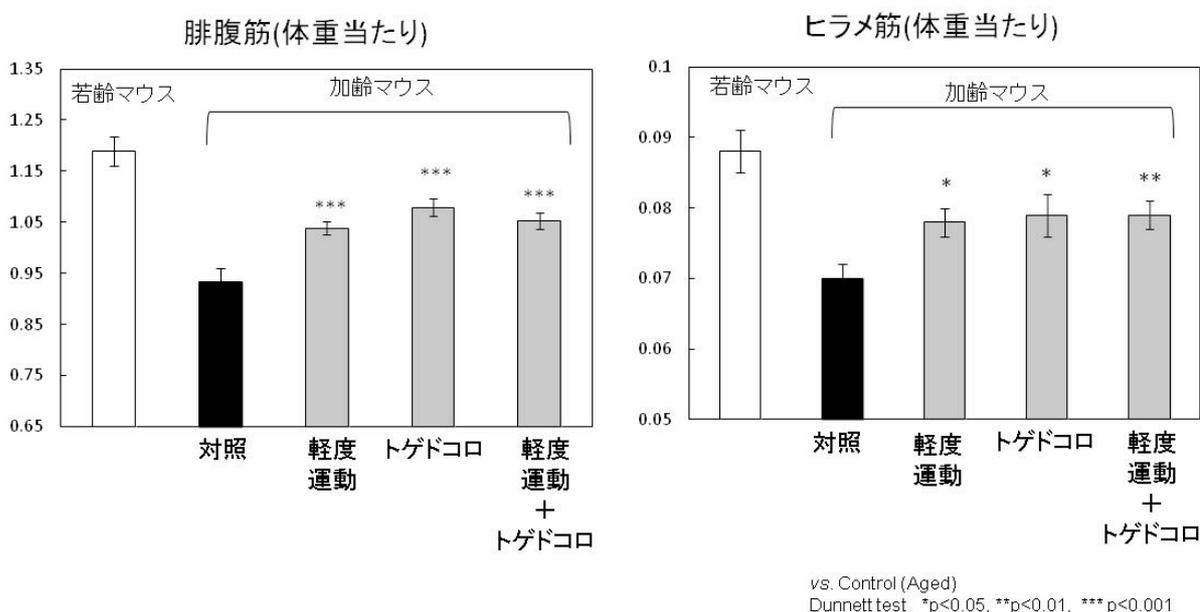
【目的】われわれの骨格筋量は 20 代をピークに徐々に減少してゆく。筋肉は最大のエネルギー代謝器官であり、年齢と共にその代謝レベルが落ちると、処理しきれない摂取カロリーが脂肪として蓄積され、肥満や生活習慣病の原因となる。また、筋肉の減少は次第に運動機能を制限しはじめ、高齢者の転倒・骨折を誘発し、寝たきりや要介護状態に至らしめる。このように、加齢による筋肉機能の低下を予防することは、健康寿命を延ばす点において極めて重要である。近年、加齢性の筋肉機能低下症状はサルコペニアとも呼ばれ、発症や進行に関する研究が盛んに行われている。私たちが日常生活において実行できるサルコペニア予防策としては、やはり運動が有効であると考えられているが、運動器官（骨、関節）や循環器に負担をかけられない人、毎日忙しい人にとっては継続することが難しい。演者らは、筋肉機能の維持・増進に有効な食品の開発を目的として、わが国において古くから滋養強壮作用の伝承があるヤマイモ類ならびにその機能性成分であるジオスゲニン配糖体に注目して研究を進めた。

【方法】日本で栽培されているヤマイモ類の中から、ジオスゲニン配糖体を多く含む品種を探索した。ヤマイモ類の筋肉機能に対する有効性は、正常マウス、自然加齢マウスならびに老化促進マウスを用いた運動モデル（トレッドミルおよび水泳）において評価し、筋肉重量や血液成分の測定、遺伝子発現解析を行った。ジオスゲニン配糖体の作用機序については、培養筋肉細胞（C2C12）及び培養肝臓細胞（Hepa1c1c7）を用いて解析した。

【結果】ヤマイモ類の中で、沖縄地方で食用とされているトゲドコロ（*Dioscorea esculenta*）が最も多くジオスゲニン配糖体を含有していた。正常マウスを用いた運動試験において、トゲドコロの経口投与は水泳時間ならびにトレッドミル走行時間を延長させた。骨格筋の遺伝子発現解析の結果、核内転写因子の PGC（PPAR- $\gamma$  co-activator）-1 $\alpha$  ならびに脂肪酸酸化酵素の発現亢進が認められた。自然加齢マウス（C57BL/6J, 48 週齢, ♂）への 8 週間のトゲドコロ投与は骨格筋の増大ならびに脂肪の減少を示した。この効果は軽度トレッドミル運動（8 週間）に匹敵するものであった（図 1）。さらに、老化促進マウス（SAM-P1, 21 週齢, ♂）は対照マウス（SAM-R1）

に比べて骨格筋の減少を示したが、10 週間のトゲドコロ投与と軽度トレッドミル運動を併用させると、筋肉減少が明らかに抑制された。骨格筋の遺伝子発現解析の結果、筋萎縮遺伝子の発現がトゲドコロ投与と運動の併用時に抑制していた。培養細胞を用いた試験において、トゲドコロから単離精製されたジオスゲニン配糖体は濃度依存的に PGC-1 $\alpha$  ならびに脂肪酸酸化酵素の遺伝子発現を促進した。また、ジオスゲニン配糖体は細胞内の AMPK の遺伝子発現ならびに活性を促進し、AMPK 阻害剤の添加によりジオスゲニン配糖体の PGC-1 $\alpha$  発現促進作用が抑制された。

図 1 自然加齢マウスにおけるトゲドコロならびに運動の効果



【考察】トゲドコロはマウスの運動機能を高め、単独あるいは運動との併用で加齢マウスの筋肉量低下を抑制することが示された。この作用機構として、AMPK-PGC-1 $\alpha$  経路の活性化に伴うエネルギー代謝の亢進や筋萎縮経路の抑制などが考えられた。今後、さらに詳細な研究が必要とされるが、トゲドコロのジオスゲニン配糖体は運動模倣成分 (Exercise mimetic) としてサルコペニアの予防に期待できると考えられる。

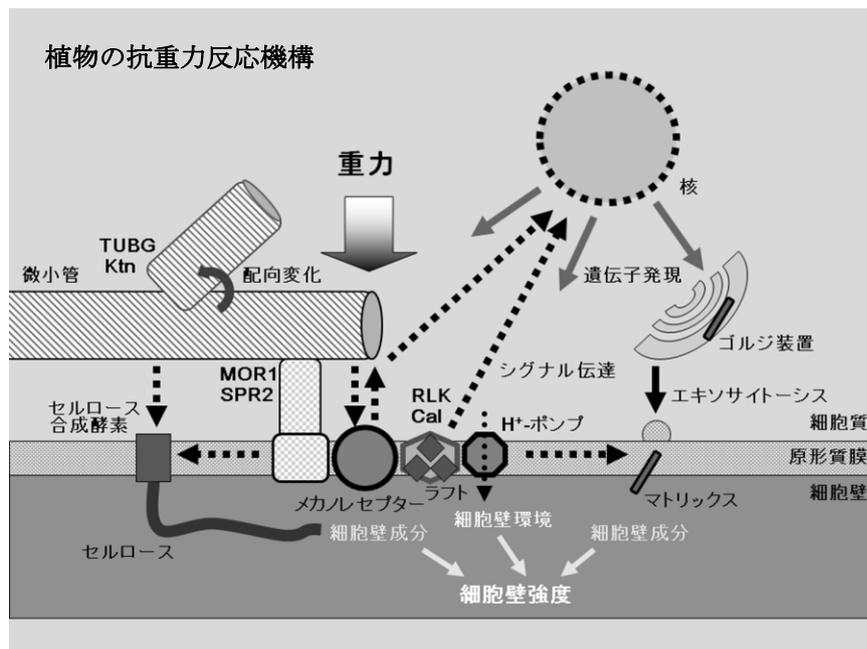
本研究の一部は、平成 23 年度 JST 研究成果最適展開支援プログラム A-STEP (シーズ顕在化) の支援を受けている。

## 植物の抗重力反応

(大阪市大院・理) 保尊隆享

植物は、約5億年前のオルドビス紀に海から陸地に進出し、陸上植物として飛躍的な繁栄を遂げてきた。この過程は、植物ばかりでなく、私たち動物の進化の上でも大きな意味を持つ。陸上に定着するため、植物は様々な環境ストレスに適応する必要があったが、中でも1gの重力に抵抗する能力を獲得することは不可欠であり、そのために自身の構造や機能を大きく変化させてきた。このように、重力に対する抵抗反応は、植物の進化と生命活動を特徴づける重要な生理機能である。しかし、植物の重力反応としては、重力屈性のみが注目され、他の反応の存在は明確に認識されていなかった。そこで、これを「抗重力反応 (Gravity Resistance)」と名づけ、その実態やメカニズムの解明をめざして研究を行ってきた。

抗重力反応は、他の環境シグナルに対する反応と同様に、シグナルの受容、受容シグナルの変換・伝達、そして伝達されたシグナルに対する応答、の3つの過程に分けられる。地上では微小重力環境を十分な時間得ることは困難であるので、逆の遠心過重力環境を設定し、様々な変異系統を用いて各過程のメカニズムを解析した。まず、抗重力反応における重力シグナルの受容に関しては、重力屈性における受容機構とは独立であり、原形質膜上のメカノレセプター（機械的刺激受容イオンチャネル）が関与することが示された。植物におけるメカノレセプターの候補としては、シロイヌナズナにおいてMCAが単離されている。そこで、MCA遺伝子を改変した変異系統を用いて解析したところ、これを欠損させると過重力に対する感受性が低下し、逆に過剰発現させると感受性が高くなることがわかった。すなわち、MCAが抗重力反応におけるシグナル受容に関わることが示された。次に、シグナル変換・伝達過程を解明するために遺伝子発現解析を行ったところ、過重力環境下では、原形質膜の構築と機能に関与する遺伝子群のうち、ステロール合成経路を律速するHMG遺伝子の発現のみが促進され、膜ステロールレベルが特異的に増加した。一方、 $\alpha$ -および $\beta$ -チューブリン遺伝子ファミリーの多くのメンバーの発現レベルが重力刺激に応じて速やかに増加し、それらによって構築される表層微小管の配向が細胞長軸と直角方向から平行へと変化した。さらに、hmgノックアウト系統と数種のチューブリンおよび微小管結合タンパク質変異系統は、野生型では過重力環境下でのみ見られる矮化やねじれなどの形質変異を既に1g下で示し、過重力はそれ以上の変化をもたらさなかった。すな



わち、これらの変異系統では重力に抵抗する能力が損なわれており、膜ステロール・ラフトと表層微小管が抗重力反応におけるシグナルの変換・伝達において不可欠な機能を果たしていることが明らかになった。抗重力反応における最後の応答過程を司るのは、植物体の構造を力学的に支えている細胞壁である。過重力環境下では細胞壁の力学的強度が著しく増加し、これが主に2種の抗重力細胞壁多糖（キシログルカン及び1,3,1,4-β-グルカン）の代謝の変化に起因することがわかった。さらに、細胞壁環境の変化、特に細胞壁pHの上昇が細胞壁内での分解活性の低下に貢献することも示された。このように、植物は、重力シグナルに応じて特定の細胞壁多糖の代謝と細胞壁環境を変えて細胞壁物性を制御し、重力に抵抗することが明らかになった。

地上実験では、植物試料を遠心過重力環境に曝して1g下と比較する実験系を利用してきた。しかし、1gの重力に対する抗重力反応が過重力に対する反応と同じであるかどうかは定かでない。したがって、宇宙の微小重力を対照とし、そこに1gの重力刺激を与えた時に同様の結果が得られて、初めて抗重力反応のしくみが解明されたといえる。この目的のため、私たちの研究グループでは6テーマの宇宙実験を実施あるいは準備してきた。RICE (PI: 保尊) 及び Ferulate (PI: 若林) では、抗重力反応における細胞壁の機能が確認できた。また、Resist Wall (PI: 保尊) 及び Space Seed (PI: 神阪) では、表層微小管が抗重力反応において果たす役割が検証された。現在、Resist Tubule (PI: 保尊) 及び Aniso Tubule (PI: 曾我) の準備を進めており、これらを通して抗重力反応のメカニズムがさらに解明できるものと期待している。

## ● 演者プロフィール

名前：石橋 宰 (Osamu Ishibashi)

連絡先：〒599-8531 大阪府堺市中区学園町 1-1

大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 応用生命科学専攻

E-mail address: ishibashi@biochem.osakafu-u.ac.jp

略歴：1991年3月 東京工業大学 理学部 生命理学科 卒業

1993年3月 東京工業大学大学院 生命理工学研究科 修士課程修了

1993年4月 日本チバガイギー株式会社 国際科学研究所 研究員

1997年1月 新潟大学 歯学部 助手

2000年12月 博士（工学）取得 [長岡技術科学大学]

2002年9月 マックスプランク生化学研究所 ポストドクトラルフェロー

2004年11月 新潟大学大学院 医歯学総合研究科 助手

2006年10月 日本医科大学 医学部 解剖学講座（分子解剖学） 講師

2012年4月 大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 准教授

現在に至る

主な研究テーマ：ノンコーディング RNA の構造と機能の解析、およびその医療への応用

今後の展望：骨・軟骨、胎盤、および各種腫瘍組織などにおけるノンコーディング RNA の発現を網羅的に解析し、病態生理との関連について追及したい。

名前：大野木 宏 (Hiromu Ohnogi)

連絡先：〒520-2193 滋賀県大津市瀬田三丁目 4 番 1 号

タカラバイオ株式会社バイオ研究所

E-mail address: onogih@takara-baio.co.jp

略歴：1993年3月 岡山大学大学院薬学研究科修士課程修了

1993年4月 宝酒造株式会社入社

2003年4月 タカラバイオ株式会社（分社化）主任研究員

2010年4月 京都府立医科大学特任助教

2012年9月 鹿児島大学大学院連合農学研究科 博士（学術）

2013年4月 京都府立医科大学特任講師

現在に至る

主な研究テーマ：生活習慣病や加齢性疾患の予防に向けた機能性食品素材の研究開発

今後の展望：わが国の伝承食品をバイオ技術によって解明し、健康寿命の延伸につながるような食品を世に出してゆきたい。

名前：保尊 隆享 (Takayuki Hoson)

連絡先：〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

大阪市立大学大学院理学研究科生物地球系専攻

E-mail address: hoson@sci.osaka-cu.ac.jp

略歴：1980年 9月 東北大学大学院理学研究科博士後期課程退学

1980年 10月 大阪教育大学助手

1985年 10月 大阪市立大学理学部助手

1993年 4月 同 理学部助教授

2000年 10月 同 大学院理学研究科教授

2013年 4月 同 理学研究科長

現在に至る

主な研究テーマ：植物の成長調節及び環境応答機構

今後の展望：宇宙実験を通して植物の抗重力反応の全容を解明したい。

# MEMO

●●● 一般講演 ●●●

15:25~16:37 多目的ホール

(講演時間9分、質疑応答3分)

- \*1 昆虫の脱皮ホルモン受容体リガンドを検出するレポーターアッセイ酵母の樹立  
○松浦 麻衣<sup>1</sup>、原島 小夜子<sup>1</sup>、川西 優喜<sup>1</sup>、中川 好秋<sup>2</sup>、八木 孝司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>阪府大院・理・生物、<sup>2</sup>京大院・農・応用生命)
- \*2 *Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソーム形成マンナーゼの  
酵素学的諸性質  
○石川 岳<sup>1</sup>、中島 大地<sup>1</sup>、柴田 敏行<sup>1,2</sup>、田中 礼士<sup>1,2</sup>、黒田 浩一<sup>3</sup>、植田 充美<sup>3</sup>、  
田丸 浩<sup>1,2,4</sup>、三宅 英雄<sup>1,2,4</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資、<sup>2</sup>三重大・新産業、<sup>3</sup>京大院・農、<sup>4</sup>三重大・生命支セ)
- \*3 男性ホルモンは隣β細胞の分化と増殖を促進する  
○甲木 孝弘<sup>1</sup>、原田 直樹<sup>1</sup>、中野 長久<sup>2</sup>、乾 博<sup>3</sup>、山地 亮一<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>大阪府大院・生命環境・応用生命、<sup>2</sup>大阪女子短大、<sup>3</sup>大阪府大院・  
総リハ・栄養)
- \*4 細胞外マトリクスの硬さの感知におけるビンキュリン-ビネキシンα相互作用  
○市川 尚文<sup>1</sup>、山下 寛<sup>1</sup>、木村 泰久<sup>1</sup>、植田 和光<sup>1,2</sup>、木岡 紀幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農、<sup>2</sup>京大・iCeMS)
- \*5 *Kitasatospora* sp. MK-1785 由来マルトトリオース生成アミラーゼに関する研究  
○掃部 正浩、谷 修治、炭谷 順一、川口 剛司  
(阪府大院・生命環境)
- 6 日本晴と組換えワクチン発現イネにおけるコメアレルゲンRAG2タンパク質の  
種子内局在部位  
○黒河 志保<sup>1,2</sup>、黒田 昌治<sup>3</sup>、目島 未央<sup>2</sup>、中村 里香<sup>4</sup>、高橋 裕子<sup>2</sup>、相良 洋<sup>2</sup>、  
竹山 夏実<sup>5</sup>、佐藤 茂<sup>1</sup>、清野 宏<sup>2</sup>、手島 玲子<sup>4</sup>、増村 威宏<sup>1</sup>、幸 義和<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>京府大院・生命環境、<sup>2</sup>東大・医科研、<sup>3</sup>中央農研・北陸セ、<sup>4</sup>国立衛研・  
代謝生化学、<sup>5</sup>日生研)

\* 「農芸化学会関西支部若手優秀発表賞・賛助企業特別賞」対象講演

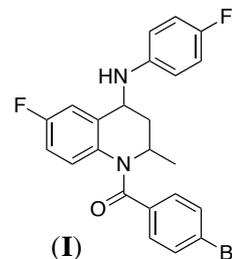
## 昆虫の脱皮ホルモン受容体リガンドを検出する レポーターアッセイ酵母の樹立

松浦麻衣<sup>1</sup>, 原島小夜子<sup>1</sup>, 川西優喜<sup>1</sup>, 中川好秋<sup>2</sup>, 八木孝司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪府大院・理・生物, <sup>2</sup> 京大院・農・応用生命)

【目的】昆虫特有の脱皮・変態過程を制御する脱皮ホルモンは核内受容体であるエクジソン受容体 (ecdysone receptor ; EcR) を介して作用する。近年 EcR を標的とした複数の人工化合物が新たな殺虫剤として開発されており、各々の化合物の作用は昆虫の分類学上の”目 (order)”に特異的で、化合物ごとに害虫特異的に殺虫効果をもたらすことができる。しかし、環境中に排出されたこれらの人工化合物は害虫以外に作用する可能性もある。本研究では、モデル生物であるキイロショウジョウバエ(双翅目)の EcR を発現するレポーターアッセイ酵母株を樹立し、さらに環境試料に含まれるリガンド様活性の検出を試みた。

【方法】キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster* ; Dm)の EcR とそのヘテロダイマーパートナーをコードする USP 遺伝子を、無細胞系発現プラスミドから PCR 法によって増幅し、酵母での EcR-USP 発現プラスミドを作製した。またキイロショウジョウバエの mRNA から RT-PCR 法で転写共役因子 DmTai 遺伝子をクローニングして酵母発現ベクターに組み込み、各種応答配列をもつ *lacZ* レポータープラスミドとともに、酢酸リチウム法により野生酵母株 W303a に導入して、アッセイ酵母株を作製した。次に、昆虫体内で脱皮ホルモンとして働いている 20-hydroxyecdysone (20E) を 96 穴マイクロプレートに添加し、アッセイ酵母菌液を加えて 18 時間培養した後、新しいプレートに ONPG を含む発色溶液とリガンド曝露した酵母菌液を混合して 37°C でインキュベートし、発色 OD<sub>405</sub> と酵母濁度 OD<sub>595</sub> を測定した後、β-ガラクトシダーゼ活性を算出した。レポーター活性の高い酵母株を選抜し、20E の前駆体である α-ecdysone、植物由来のエクジステロイドであるポナステロン A、またキイロショウジョウバエと同じ双翅目であるヒトスジシマカ (*Aedes aldopictus* ; Aa) の EcR と結合することが知られている Tetrahydroquinolin 系の新規化合物(I)の応答性を調べた。さらに環境試料に含まれるリガンド物質の検出に本アッセイ系を用いた。

【結果】作製した酵母株は 20E とポナステロン A に対して濃度依存的な応答性を示したが、α-ecdysone ではレポーター活性が高濃度のときのみで誘導されたため、DmEcR-USP 発現酵母を用いたレポーターアッセイは生体内での EcR の応答を反映していると考えられる。化合物(I)は AaEcR と同様に DmEcR に結合して、アゴニストとして作用することが示された。また、環境試料として大阪府立大学構内の池の水と底泥試料のアッセイを行ったところ、EcR リガンド応答活性が見いだされた。以上のことから、新たに樹立したアッセイ酵母株を用いたレポーターアッセイは、環境サンプルなど様々な試料に含まれる微量な EcR リガンド活性化合物の検出および同定のための一次スクリーニング系として、また、EcR を標的とした殺虫剤を開発するための新規化合物のリガンド活性を測定するアッセイ系としても有用であると期待できる。



## *Clostridium cellulovorans* が生産するセルロソーム形成マンナーゼの酵素学的諸性質

○石川岳<sup>1</sup>, 中島大地<sup>1</sup>, 柴田敏行<sup>1,2</sup>, 田中礼士<sup>1,2</sup>, 黒田浩一<sup>3</sup>, 植田充美<sup>3</sup>, 田丸浩<sup>1,2,4</sup>, 三宅英雄<sup>1,2,4</sup>  
(<sup>1</sup>三重大院・生資, <sup>2</sup>三重大・新産業, <sup>3</sup>京大院・農, <sup>4</sup>三重大・生命支セ)

【目的】*Clostridium cellulovorans* は、大小異なる骨格タンパク質に様々な糖質関連酵素が結合した「セルロソーム」と呼ばれる超高分子複合体を生産し、セルロースだけでなくヘミセルロースも分解することができる。骨格タンパク質とのセルロソームの形成にはドックリンドメインが必要不可欠であり、このドメインを保持している酵素をセルロソーム形成酵素と呼ぶ。当研究グループによる全ゲノム解析の結果、セルロソーム形成可能なマンナーゼ遺伝子は GH5 ファミリーに 2 種、GH26 ファミリーに 4 種の計 6 種あることが確認された。GH5 ファミリーに属す *manA* は、通常 C 末端側に存在するドックリンドメインが N 末端側に存在している。また、GH26 ファミリーに属し新規マンナーゼ遺伝子である *manGH26A* は、糖質結合モジュール (CBM) を 4 つ保持している。このように、ManA および ManGH26A は、他のマンナーゼと比べ特殊なドメイン構造を有している。また、トランスクリプトーム、プロテオーム解析により、これら 2 種のマンナーゼは高い発現量を示した。一方、*C. cellulovorans* は 4 種の骨格タンパク質を生産し、その中でも CbpB は一つの CBM とコヘシンドメインから構成される最小の新規骨格タンパク質であり、ガラクトマンナンで培養したときに発現することが確認された。そこで本研究では、ManA および ManGH26A の酵素学的諸性質を明らかにし、CbpB との相互作用解析を行った。

【方法・結果】大腸菌を宿主として ManA、ManGH26A および CbpB の組み換え体を作製した。得られた ManA および ManGH26A を用いて、ガラクトマンナンを基質としたときの速度パラメータを算出した。その結果、 $k_{cat}$ 、 $K_m$  はそれぞれ  $19.9 \text{ s}^{-1}$ 、 $2.69 \text{ mg mL}^{-1}$  および  $148 \text{ s}^{-1}$ 、 $4.20 \text{ mg mL}^{-1}$  であり、ManGH26A は ManA よりも高い酵素活性を示した。ManA もしくは ManGH26A と CbpB との結合力を等温滴定型熱量計により評価した。その結果、ManA もしくは ManGH26A と CbpB との解離定数  $K_d$  は  $4.79 \times 10^{-10} \text{ M}$  および  $1.56 \times 10^{-7} \text{ M}$  であり、その相互作用は両者ともエントロピー駆動であることが示された。ドックリンドメインを構成するアミノ酸はセルロソーム生産菌性 *Clostridium* 属の種間で異なるが、同じ種内では高く保存された領域がある。ManA のドックリンドメインは同じ種内のセルロソーム形成酵素のものと異なり、一部の保存領域を保持していない。この保存領域の違いが CbpB との結合力の違いをもたらしたと考えられる。

## 男性ホルモンは膵 $\beta$ 細胞の分化と増殖を促進する

○甲木孝弘<sup>1</sup>, 原田直樹<sup>1</sup>, 中野長久<sup>2</sup>, 乾博<sup>3</sup>, 山地亮一<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>大阪府大院・生命環境・応用生命, <sup>2</sup>大阪女子短大,

<sup>3</sup>大阪府大院・総リハ・栄養)

【目的】膵  $\beta$  細胞は血糖降下作用を持つインスリンを分泌する唯一の細胞であり、 $\beta$  細胞の減少は糖尿病発症や進行の要因となる。我々はこれまでに、男性ホルモンであるテストステロンがアンドロゲン受容体 (AR) を介して  $\beta$  細胞の増殖を亢進させることを培養細胞レベルで明らかにしてきた。男性の糖尿病患者ではテストステロンレベルが低いことから、AR を介したテストステロンの作用が低いことは  $\beta$  細胞の機能低下を招き、糖尿病発症の一因になると考えられる。テストステロンレベルは、第二次性徴期から 20 代にかけてピークとなるとともに、胎児期と新生児期にも一過的に上昇する。特に、胎児期での上昇は膵  $\beta$  細胞への分化や増殖が最も盛んな時期と一致する。そこで本研究では、ラット個体レベルで、テストステロンが成長期 (性成熟期) または胎児期の  $\beta$  細胞の増殖や分化に及ぼす影響を検討した。

【方法・結果】8 週齢の Wistar 雄性ラットの膵臓切片を用いた免疫組織染色により、成長期には AR が  $\beta$  細胞の核内に局在することを明らかにした。成長期のラット  $\beta$  細胞の増殖におけるテストステロンの作用を調べるため、6 週齢のラットを去勢し、1 週間後から去勢ラットにプロピオン酸テストステロン (0.4 mg/kg body weight) を 10 日間皮下注射した。膵臓切片の proliferating cell nuclear antigen (PCNA、細胞増殖マーカー) とインスリンを免疫染色し、PCNA の発現が高い  $\beta$  細胞の割合を計測した。その結果、PCNA 発現が高い  $\beta$  細胞の割合は、去勢によって有意に減少し、プロピオン酸テストステロン投与によってその割合が回復することが明らかとなった。胎児期のテストステロンサージが発生した胎生 19.5 日目の雄性ラットの膵臓では、AR は抗 NKX6.1 抗体で染色された細胞 ( $\beta$  細胞前駆体細胞) で高発現しており、細胞膜に局在することが明らかとなった。一方で、抗インスリン抗体で染色された細胞 (分化した  $\beta$  細胞) では、AR の発現は減弱していた。胎児期の  $\beta$  細胞分化に対するテストステロンの影響を調べるため、AR のアンタゴニストであるフルタミド (50 mg/kg body weight) を妊娠 16.5 日目から出生まで毎日母ラットに経口投与した。出生した雄では、体重に有意な差は無かったが、膵臓重量と  $\beta$  細胞面積比から算出した  $\beta$  細胞量は、フルタミド投与によって有意に減少した。以上の結果から、テストステロンは成長期の  $\beta$  細胞増殖と胎児期の  $\beta$  細胞の分化を促進することが明らかとなった。

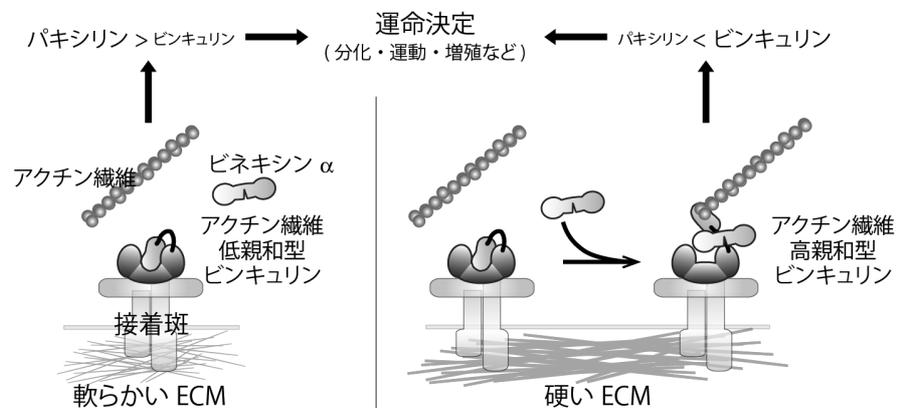
## 細胞外マトリクスの硬さの感知における ビンキュリン-ビネキシン $\alpha$ 相互作用

○市川尚文<sup>1</sup>, 山下寛<sup>1</sup>, 木村泰久<sup>1</sup>, 植田和光<sup>1,2</sup>, 木岡紀幸<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京大院・農, <sup>2</sup>京大・iCeMS)

【目的】細胞はコラーゲンなどの細胞外マトリクス (ECM) が作り出す物理的な硬さを感知し、それに基づいて自身の分化や運動、増殖などの運命を決定していることがわかってきた。例えば、間葉系幹細胞は ECM が軟らかいと神経へ、硬いと骨へと分化することがわかっている。これまでのところ、細胞は ECM との接着部位である接着斑タンパク質複合体にアクチン繊維を繋ぎ留め、接着斑ごと ECM を引っ張ることで ECM の硬さを感知していると考えられているが、その詳細はわかっていない。本研究では、アクチン繊維と直接結合し、実際に分子内に細胞内張力がかかっている接着斑タンパク質「ビンキュリン」と、ビンキュリン結合タンパク質である「ビネキシン $\alpha$ 」が ECM の硬さの感知を担うメカノセンサーである可能性について検証した。

【方法・結果】様々な硬さのアクリルアミドゲル培養基板上にマウス胚性繊維芽細胞 (MEF) を培養し、ビンキュリンの挙動を比較したところ、培養基板が硬いときほどビンキュリンは接着斑上でのターンオーバーが遅く、アクチン繊維と強く結合した状態で存在していた。こうした基板の硬さに依存したビンキュリンの挙動の変化には、ビンキュリンのプロリン豊富領域と、そこに結合するビネキシン $\alpha$ が必要であった。興味深いことに、別の接着斑タンパク質「パキシリン」も基板の硬さに依存した挙動の変化を示し、それにはビンキュリンとビネキシン $\alpha$ の両方が必要であった。また、精製タンパク質を用いた *in-vitro* 実験において、ビネキシン $\alpha$  はビンキュリンに結合することでビンキュリンとアクチン繊維との結合活性を上昇させた。これらの結果から、

ビンキュリンはビネキシン $\alpha$ との相互作用を介して ECM の硬さを感知し、接着斑の構成因子を変化させるメカノセンサーとして機能していることが明らかになった。



## ***Kitasatospora* sp. MK-1785 株由来マルトトリオース生成アミラーゼに関する研究**

○掃部正浩<sup>1</sup>、西村重徳<sup>1</sup>、谷修治<sup>1</sup>、炭谷順一<sup>1</sup>、多田俊治<sup>2</sup>、川口剛司<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup> 阪府大院・生命環境・応用生命、<sup>2</sup> 阪府大院・理・生物科学)

【目的】マルトオリゴ糖生成アミラーゼは澱粉からある大きさのマルトオリゴ糖を生成する酵素であり、さらに分解様式によってエンド型、エキソ型に分けられる。その中でもエキソ型は澱粉を特異的にある大きさのオリゴ糖に分解するため、マルトオリゴ糖製造に非常に有用な酵素であるが、エンド型比べると報告例が非常に少ない。当研究室でもマルトオリゴ糖生成アミラーゼ生産菌に注目し、抗生物質などさまざまな分野に利用されている放線菌をターゲットにスクリーニングを行った。さらに単離した酵素について、酵素化学的性質の解析および触媒機構の解明を行うことにした。

【方法と結果】約 2000 株の放線菌についてスクリーニングを行った結果、マルトトリオース (G3) を特異的に生成する G3 生成アミラーゼ (G3Amy) 生産菌 MK-1785 株を単離した。本菌株の 16S rRNA 遺伝子を解析したところ、*Kitasatospora* 属に分類されることが明らかとなり、本菌株を *Kitasatospora* sp. MK-1785 株と命名した。次に、MK-1785 株が生産する G3Amy を精製し澱粉と反応させ TLC により確認したところ、反応初期から G3 のみ生成したことから、本酵素はエキソ型 G3 生成アミラーゼであることが強く示唆された。さらに、G3Amy をマルトオリゴ糖に作用させたところ、基質よりも大きいオリゴ糖が確認され、本酵素が糖転移活性を有することがわかった。そこで澱粉を G3 供与体とし、アルコール、フェノール、ポリフェノールといった水酸基を有する化合物に対して G3 転移活性の有無を調べたところ、ほとんどの化合物に対して G3 を転移できることがわかった。本酵素のように、ある大きさのオリゴ糖を転移する配糖体化酵素はあまり知られておらず G3 配糖体合成酵素としての応用も期待できることがわかった。

触媒機構の解明を目指し、触媒ドメインのみ有する G3Amy-CD を大腸菌で発現させ精製後、結晶化スクリーニングを行ったところ、G3Amy-CD で良好な結晶を得ることに成功した。この結晶を用いて X 線結晶構造解析を行い、2.4 Å の分解能で G3Amy 触媒ドメインの構造を決定した。

## 日本晴と組換えワクチン発現イネにおけるコメアレルゲン RAG2 タンパク質の種子内局在部位

○黒河志保<sup>1,2</sup>, 黒田昌治<sup>3</sup>, 目島未央<sup>2</sup>, 中村里香<sup>4</sup>, 高橋裕子<sup>2</sup>, 相良 洋<sup>2</sup>,  
竹山夏実<sup>5</sup>, 佐藤 茂<sup>1</sup>, 清野 宏<sup>2</sup>, 手島玲子<sup>4</sup>, 増村威宏<sup>1</sup>, 幸 義和<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>京府大院・生命環境, <sup>2</sup>東大・医科研, <sup>3</sup>中央農研・北陸セ,  
<sup>4</sup>国立衛研・代謝生化学, <sup>5</sup>日生研)

【目的】 コメ型経口コレラワクチン (MucoRice-CTB-RNAi) は、RNAi 技術を用いてイネの主要貯蔵タンパク質の発現を抑制するとともに、ワクチン抗原としての CTB (コレラ毒素 B 鎖) を発現した組換えイネである。MucoRice-CTB-RNAi はコメ粉末を精製することなく経口投与するため、内在アレルゲンタンパク質に関する安全性の懸念からその発現と局在を明らかにしておくことは重要である。本研究では、既に局在部位が明らかな 19kDa globulin と、米アレルギー患者の主要アレルゲンとして重視されているが、その局在部位が未知である RAG2 タンパク質の発現と局在を日本晴 (WT)、および 3 種類の組換えイネの種子を用い比較、解析することを目的とした。

【方法・結果】 組換えイネとして上記の MucoRice-CTB-RNAi、ワクチン抗原のみを発現した MucoRice-CTB、RNAi のみを導入した MucoRice-RNAi の 3 種類を作出し、対照として WT を用いた。ウエスタン分析に加え、これらイネの種子より超薄組織切片を作製し、蛍光免疫組織観察および免疫電顕観察を行った。RNAi (13kDa プロラミンとグルテリン A を同時に抑制) を導入した 2 種類の組換えイネにおいて、プロラミンが蓄積する Protein body-I (PB-I)、およびグルテリン・グロブリンが蓄積する PB-II の数が WT や MucoRice-CTB に比べて著しく減少し、形状も小さくいびつであった。CTB の局在は MucoRice-CTB では PB-II、細胞質に観察されるのに対し、MucoRice-CTB-RNAi では PB 以外に細胞壁や PB 様構造体に多数観察された。また、アレルゲンタンパク質である 19kDa globulin と RAG2 は MucoRice-CTB-RNAi においてのみ発現量が減少していた。両アレルゲンの局在部位は、WT において非常に似ており、主に PB-II に存在した。しかし RAG2 は、3 種類の組換えイネにおいて細胞膜あるいは細胞壁にも局在し、MucoRice-RNAi で顕著であった。この傾向は MucoRice-CTB-RNAi における CTB の局在とも似ていることから、組換えイネにおける RAG2 の局在部位の変化や発現量の減少は、RNAi 効果による CTB の過剰発現が RAG2 の合成、集積過程と競合していると予想された。

# MEMO

●●● 特別講演 ●●●

16:45~17:25 多目的ホール

## 農芸化学奨励賞受賞講演

『酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学』

水谷 公彦（京大院・農）

## 酵母発現系を用いたハイスループット構造生物学

(京大院農・応用生命) ○水谷公彦

【はじめに】構造生物学は、農芸化学を含む生命科学の発展にとって欠くことのできない分野となった。筆者は、これまで一貫して X 線結晶構造解析を手法とする分泌タンパク質、膜タンパク質の構造と機能の研究に取り組んできた。特に、鉄を結合輸送するタンパク質であるトランスフェリンの X 線結晶構造解析を中心として研究を行い、鉄結合に伴うドメインの大きな動きのしくみ、鉄放出のしくみの詳細などを解明した。このような構造生物学的研究において、目的タンパク質の調製を効率的に行う必要から、筆者は酵母 *Pichia pastoris* 発現系を用いており、トランスフェリンの大量調製と X 線結晶構造解析に成功した。また、*P. pastoris* を用いた発現系をハイスループットで構築する方法を新たに開発し、今まで構造が不明であったメダカの  $\alpha$ -アミラーゼなどの X 線結晶構造解析に成功した。さらに、数種類のヒト、メダカなどの膜タンパク質の発現にも成功し、本方法が膜タンパク質、分泌タンパク質の発現系構築、構造決定に広く応用可能であることを示した。

【1. ハイスループット発現系構築法の開発】メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* は高密度で培養が可能なこと、強力なプロモーターを持つことなどから、真核生物の分泌タンパク質や膜タンパク質の有用な発現ホストとして知られる。近年、*P. pastoris* による発現タンパク質は結晶構造解析にも用いられ、G タンパク質共役受容体(GPCR)の構造決定などの成功を収めている。通常、*P. pastoris* の発現系構築は煩雑なものであるが、筆者は *P. pastoris* 細胞内での DNA 相同組換えを利用してハイスループットで簡単に発現系を構築する方法を開発、発表した。PCR でプラスミドと相同な配列を両端に付加した目的遺伝子と直線化したプラスミドを用いて通常の *P. pastoris* の形質転換操作を行うことで、酵母細胞内で DNA 間の相同組換えが起こり発現プラスミドの構築と発現系の構築が同時に出来る。実際にメダカのアンモニウムトランスポーター、メラトニンレセプター、*Saccharomyces cerevisiae* の CTR1、HSP30、ヒトの苦味受容体 TAS2R16、トランスフェリンレセプターなど膜タンパク質 (GFP 融合体) の発現系を構築し、誘導後に蛍光顕微鏡観察による細胞内での局在の確認、蛍光強度測定による発現量の決定などの評価を行った (図 1)。今後、*P. pastoris* によるハイスループットでの様々な膜タンパク質の発現系構築とその評価、およびタンパク質の調製、機能解析、結晶化等に応用可能である。

【2. ハイスループット発現系構築法の分泌タンパク質生産への応用】ハイスループット発現系構築法は、分泌シグナルとタンパク質本体を正確、簡単につなぐことも出来るため、分泌タンパク質にも広く応用可能である。実際に、メダカの分泌タンパク質  $\alpha$ -アミラーゼについて、発現系構築、精製、結晶構造解析を行い報告した。メダカの  $\alpha$ -アミラーゼは、ブタやヒトなど哺乳類の  $\alpha$ -アミラーゼと立体構造が非常によく似ており、ほぼ同様のアミロペクチンに対する酵素活性を保持していた。しかし、メダカの  $\alpha$ -アミラーゼは生デンプンに対する活性が低く、これは活性部位から離れた生デンプン吸着残基と考えられるトリプトファン残基がメダカ  $\alpha$ -アミラーゼには存在しないためであることが立体構造から示唆された。なお、これはメダカのタンパク質の結晶構造を報告した世界で初めての論文である。同様に、メダカのリゾチームについても発現系を構築し、1.2 Å 分解能で結晶構造解析を行った。立体構造はニワトリリゾチームとよく似ていたが、酵素活

性の至適 pH が大きく異なることが明らかになった。立体構造から活性中心付近では 31 番目のロイシンのみがニワトリのもの（アラニン）と異なっていることが分かったため、この部分に関する変異体 L31A を前述のハイスループット発現系構築法で構築した（組み込む遺伝子を PCR で二断片にして、断片が重なる部分のプライマーに変異を入れることで簡単に変異体を作成できる）。その結果、メダカリゾチーム L31A 変異体は至適 pH が、ニワトリのものと近くなることが明らかとなった。また、メダカリゾチームはニワトリリゾチームの 4 倍程度の活性があることが分かり、医薬への応用が期待される。

**【3. 分泌タンパク質の結晶構造解析】** 筆者は、これまで多くの分泌タンパク質（巻貝アメフラシの $\beta$ -1,4-マンナーゼ、真核微生物 *Myrothecium verrucaria* のビリルビン酸化酵素、ニワトリのリゾチーム、トランスフェリンなど）の結晶構造解析と生化学的な研究を行ってきた。特にトランスフェリンの鉄結合に関する構造生物学的研究を中心に行ってきた。トランスフェリンは二つのローブ状ドメインからなり、それぞれに一つの鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) を結合する。筆者はニワトリトランスフェリン N ローブのアポ型、ホロ型（鉄結合型）、および C ローブのアポ型の結晶構造を明らかにした。N ローブ、C ローブは、それぞれが 2 つのドメインからなりドメイン間のクレフトに 4 つの残基を介して鉄を結合する。アポ型はドメイン間のクレフトが大きく開いた構造を持ち、鉄の結合に伴いホロ型の閉じた構造へと変化する。この動きでドメイン間の 2 つの  $\beta$  ストランドおよび C 末端付近のファンデルワールス結合がヒンジとして働くことを明らかにした(図 2)。さらに、鉄結合中間体の構造を初めて決定し、まずドメイン間が開いた構造で片方のドメインの 2 つのチロシン残基のみに鉄が結合し、その後ドメインが閉じることを明らかにした。また、アルミニウムが結合したトランスフェリンの構造も初めて明らかにした。アルミニウムは鉄と同様に各ローブの 4 つの残基と結合し、ドメイン間のクレフトは鉄結合型より少し閉じた構造を取っていた。アルミニウムは認知症などの原因となる脳のタンパク質のアミロイド化に関わり、トランスフェリンがアルミニウムの輸送も担うことから、この構造は鉄の結合を阻害せずアルミニウムの結合・輸送を阻害する薬剤の設計・探索などに役立つ。

また、筆者はニワトリとヒトトランスフェリンについて、*P. pastoris* での大量発現系を初めて構築した。どちらの組換えタンパク質も細胞外に分泌され、ハイマンノース型の糖鎖が付加していた。また、どちらも天然のものと同様の構造を持ち、2 つの鉄イオンを結合した。（他グループもトランスフェリンの生産に成功し、ヒト細胞の無血清培地添加用などに市販されている。）トランスフェリンは血中で鉄を輸送し、細胞膜のトランスフェリンレセプターと結合することで細胞内に取り込まれ、酸性のエンドソーム中で鉄を放出する。トランスフェリンは鉄と同時に炭酸イオンなどのアニオンと結合することから、薬剤となるアニオンを開発できれば、トランスフェリンにより薬剤を細胞まで運ぶこと（ドラッグデリバリー）が可能になる。鉄やアニオンの結合放出の構造機構を解明するため、*P. pastoris* で発現したニワトリトランスフェリン N ローブの結晶構造解析を行った。分解能は 0.93 Å であり、これはトランスフェリンで最初の超高分解能構造解析である。超高分解能の構造解析により水素原子の観察が可能になった。酸性条件下でドメイン間のクレフトを開いて鉄を放出する働きをもつ（二つのリシン残基が向かい合う）dilycine trigger について水素を可視化する水素原子マップで水素原子を観察し、片方のリシン残基が中性条件で解離せずに水素結合を形成していることを明らかにした。また、鉄と共に結合する炭酸イオン周辺の水素を観察したところ、水素結合のパターンから炭酸イオンの解離状態が  $\text{CO}_3^{2-}$

であることが明らかになった。また，超高分解の構造解析により精密な C-O 間の原子間距離の測定が可能になり，その結果からも解離状態が  $\text{CO}_3^{2-}$  であることが確認された。このタンパク質について国際宇宙ステーション・きぼう実験棟の微小重力環境下で結晶化を行ったところ，良好な結晶が得られたため，さらに解析を進めている。

**【おわりに】** 酵母 *P. pastoris* を用いたハイスループット発現系構築法を利用して，さらに多くのタンパク質，酵素の構造解析を行い，得られた構造を基に，ドラッグデリバリー等の応用的研究にも取り組み，その研究で農芸化学を含む生命科学の発展に貢献したい。

本研究は，京都大学食糧科学研究所食品分子構造分野ならびに京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻応用構造生物学分野において行われたものです。本研究を行う機会を与えていただき，学生時代よりご指導いただきました京都大学名誉教授・廣瀬正明先生に心より御礼申し上げます。自由な研究環境をあたえていただき，本奨励賞にご推薦くださいました京都大学教授・三上文三先生に厚く御礼申し上げます。また多くのご助言，ご支援を賜りました相原茂夫先生，高橋延行先生，山下穂波先生に心より感謝申し上げます。さらに，インペリアルカレッジロンドンおよび京都大学教授・岩田想先生，京都大学教授・加納健司先生をはじめとしました多くの共同研究者の皆様にも厚く感謝いたします。また，研究の楽しさ，厳しさについて温かくご指導いただきました名古屋大学教授・故 坂神洋次先生には，心より御礼申し上げるとともに，ご冥福をお祈りいたします。本研究成果は，共に研究を行った卒業生・在学生の協力によるものであり，また，多くの方々のご指導の賜物であります。この場を借りて，深く御礼申し上げます。

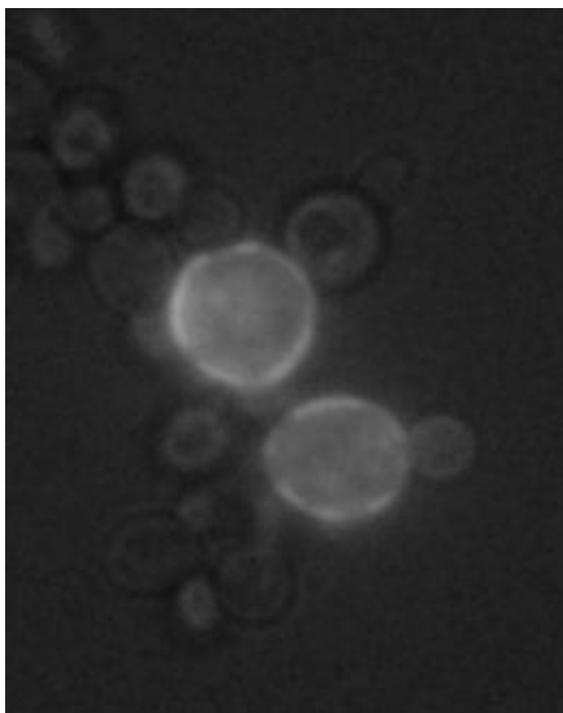


図1 酵母 *P. pastoris* で発現した膜タンパク質(CTR1)GFP 融合体の蛍光顕微鏡写真



図2 ニワトリトランスフェリンNローブの結晶構造（黒,ホロ型; グレー,アポ型）

# MEMO

## 次回のお知らせ

### 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部および 日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区 合同大会（第 481 回講演会）

日 時：平成 25 年 9 月 5 日（木）～6 日（金）

会 場：県立広島大学広島キャンパス

申込締切：7 月 12 日（金）17:00

要旨締切：7 月 26 日（金）17:00

問合せ先：〒727-0023

広島県庄原市七塚町 562 番地 県立広島大学

2013 合同広島大会実行委員会 武藤徳男

E-mail: muto@pu-hiroshima.ac.jp

同日開催：支部参与会、懇親会

詳細についてはホームページをご覧ください。

<http://kansai-jsbba.jp>



# お知らせ

- 支部参与会は、12:00 より学術交流会館小ホールにて開催します。
  - 懇親会を 17:40 より同会館サロンにて開催します。
- 奮ってご参加ください。

---

## 日本農芸化学会関西支部

<http://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

庶務幹事：由里本 博也

E-mail: [yury@kais.kyoto-u.ac.jp](mailto: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](mailto:matsuo@kais.kyoto-u.ac.jp)

TEL: 075-753-6106、FAX: 075-753-6104

発行日 平成25年6月29日