

日本農芸化学会関西支部会  
第 482 回 講演会

講演要旨集

日時：平成 25 年 12 月 7 日(土)  
会場：神戸大学大学院農学研究科

# 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

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)

黄桜酒造(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(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

- 開会の辞 (13:00-13:05) 水野雅史 (神戸大院・農、幹事校代表)
- 一般講演 (13:05 ~ 16:36) (\* 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)
1. (13:05 ~ 13:17)  
Pulse proteolysis 法を用いた未精製超好熱菌由来タンパク質のフォールディング解析  
○島佳菜子、岡田淳、長尾藍、佐野智、高野和文 (京府大院・生命環境)
  2. (13:17 ~ 13:29)  
フコキサンチノールが誘導するアポトーシスはアクチン重合を伴う  
○大原佳樹<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、藍原祥子<sup>1</sup>、金沢和樹<sup>1,2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>吉備国際大・地域創成農)
  - \*3. (13:29 ~ 13:41)  
*Lactobacillus plantarum* 22A-3 による腸管炎症抑制効果の作用機序の解明  
○Jarukan Lamubol<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、林 多恵子<sup>2</sup>、奥田 洋<sup>2</sup>、水野 雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>丸善製薬・研究開発)
  - \*4. (13:41 ~ 13:53)  
経口摂取を想定した抗アレルギー効果を有する食品因子探索法の確立  
○横山友紀、橋本堂史、水野雅史 (神戸大院・農)
  - \*5. (13:53 ~ 14:05)  
鉄欠乏性貧血による冷え症への醤油多糖類 SPS の改善効果  
○太田由香、鈴木誠、松下裕昭 (ヒガシマル醤油・研)
  - \*6. (14:05 ~ 14:17)  
ロイシン摂取による mTORC1 経路活性化に及ぼす PGC-1 $\alpha$  の影響  
○吉村亮二<sup>1</sup>、佐藤沙耶<sup>1</sup>、南貴美子<sup>1</sup>、只石幹<sup>2</sup>、三浦進司<sup>3</sup>、亀井康富<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京府大院・生命環境、<sup>2</sup>国立健康栄養研究所・基礎栄養、<sup>3</sup>静岡県立大・食品栄養科学)
  - \*7. (14:17 ~ 14:29)  
Structural and functional analysis of bacterial cell-surface protein involved in alginate import  
○Kanate Temtrirath, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto  
(京都大院・農・食品生物)
  - \*8. (14:29 ~ 14:41)  
インスリン産生細胞における小胞体ストレスセンサーIRE1 $\alpha$  の機能解析  
○土屋雄一<sup>1</sup>、齊藤美知子<sup>1</sup>、岩脇隆夫<sup>2</sup>、宮崎純一<sup>3</sup>、河野憲二<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup>群馬大・先端科学指導者育成ユニット、<sup>3</sup>大阪大院・医学)
- 休憩 19 分 (14:41 ~ 15:00)
- \*9. (15:00 ~ 15:12)  
シロイヌナズナ MAPKKK18 は ABA シグナル依存的に老化を制御する  
○安福拓斗、松岡大介、南森隆司 (神戸大院・農)
  - \*10. (15:12 ~ 15:24)  
酵母に見出した抗酸化酵素 N-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の機能解析  
○関口春菜、西村 明、那須野 亮、高木博史 (奈良先端大・バイオ)
  - \*11. (15:24 ~ 15:36)  
*Pichia pastoris* メタノール誘導性遺伝子発現に関わる Wsc タンパク質の解析  
○大澤 晋、由里本博也、阪井康能 (京都大院・農・応用生命)

\*12. (15:36 ~ 15:48)

ABCG1 と ABCG4 による脂質ラフト構造の破壊

○伊藤志帆<sup>1</sup>、佐野修<sup>1</sup>、植田和光<sup>1,2</sup>、松尾道憲<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>京都大院・農・応用生命、<sup>2</sup>京大 iCeMS)

\*13. (15:48 ~ 16:00)

超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株に見出された新奇オルガネラ「オリゴボディー」の解析

○藤好 拓也<sup>1</sup>、岩野 恵<sup>1</sup>、永井 里奈<sup>2</sup>、西田 倫希<sup>2</sup>、吉田 信行<sup>1</sup>、高木 博史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup>大阪大・超高压電顕セ)

\*14. (16:00 ~ 16:12)

Interaction of 8-anilino-naphthalene 1-sulfonate (ANS) and thermolysin as examined by ANS fluorescence

○Vimbai Samukange, Masayuki Kamo, Kiyoshi Yasukawa, and Kuniyo Inouye  
(京都大院・農・食品生物)

\*15. (16:12 ~ 16:24)

Sorgomol の光学活性体の合成研究

○秦大介、北原彩子、久世雅樹、滝川浩郷 (神戸大院・農)

\*16. (16:24 ~ 16:36)

発光波長を改変する生物発光基質アナログの化学合成

○松岡絢香<sup>1</sup>、南郷成子<sup>1</sup>、古市卓也<sup>2</sup>、久世雅樹<sup>1</sup>、滝川浩郷<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>岐阜女子大・家政)

休憩 14 分 (16:36 ~ 16:50)

●特別講演 (16:50 ~ 17:20)

農芸化学奨励賞受賞講演

海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究

○ 久世雅樹 (神戸大院・農)

●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 (17:20 ~ 17:30)

内海龍太郎 (近畿大院・農、日本農芸化学会関西支部長)

●懇親会 (17:50 ~ 20:00、神戸大学アカデミア館 3 階「さくら」)

神戸の夜景を眺めながら、学生、教員、研究者、産業人を交えて熱い忘年会を。

参加費：一般 3,000 円 / 学生 500 円

## 01. Pulse proteolysis 法を用いた未精製超好熱菌由来タンパク質の フォールディング解析

○島佳菜子、岡田淳、長尾藍、佐野智、高野和文(京府大院 生命環境)

### [目的]

近年、タンパク質の安定性測定に pulse proteolysis 法を用いた解析が開発されている。この手法では、天然状態と変性状態タンパク質の混在した溶液中において、変性状態タンパク質のみをプロテアーゼで分解し、電気泳動により溶液中の天然／変性状態タンパク質の存在比を検出し、安定性を算出する。これはライセート中の未精製タンパク質の安定性測定にも適用できる。本研究では、この手法を応用して、超安定なプロテアーゼを用いて、未精製の超好熱菌タンパク質のフォールディング反応を解析することを目的とする。

本研究で用いるプロテアーゼ *Thermococcus kodakarensis* (Tk) 由来 subtilisin は、熱や変性剤に対して高い耐性を持つ。測定対象とする超好熱菌由来タンパク質は、Tk-RNase H2 と *Thermotoga maritima* (Tm) 由来 RNase H2 で、ともに高い安定性を有し、4 M GdnHCl 存在下でも遅い変性反応を示す。これらをライセート中 GdnHCl で変性させ、その遅い変性反応を pulse proteolysis 法を利用して解析した。この手法によって、より簡便に未精製超好熱菌由来タンパク質のフォールディング反応を解析することが可能となる。

### [方法]

ライセートに目的タンパク質と GdnHCl を加え、タンパク質の変性を開始した。各変性時間において、Tk-subtilisin を加え 45 s 反応させた。その後、8.5%(w/v) TCA によりタンパク質を沈殿させ、70%アセトンで洗浄し、SDS-PAGE によって Tk-subtilisin で全く分解されていない目的タンパク質を観測した。SDS-PAGE によって得られた目的タンパク質のバンドは Image J で数値化し変性速度を求めた。精製タンパク質も同様の操作を行い、ライセート中での変性速度と比較した。

### [結果・考察]

4 M GdnHCl 存在下におけるライセート中と精製タンパク質との変性速度に差は見られず、CD によって求めた精製タンパク質の変性速度とも近い値であった。

以上より、pulse proteolysis によって未精製状態の超好熱菌由来タンパク質の変性速度が観測できる可能性が示された。

## 02. フコキサンチノールが誘導するアポトーシスはアクチン重合を伴う

○大原佳樹<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、藍原祥子<sup>1</sup>、金沢和樹<sup>1,2</sup>、水野雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>吉備国際大・地域創成農)

**【目的】** 褐藻類に含まれるフコキサンチンは消化管から吸収される際にフコキサンチノールへと変換され吸収される。我々はこれまでにフコキサンチノールがヒト白血病由来 HL-60 細胞に対して death-inducing signaling complex (DISC) 形成を促進することでアポトーシスを誘導することを明らかにした。近年、アポトーシス誘導の初期段階においてアクチン重合体が DISC 形成の足場タンパク質として機能することが報告された。本研究では、フコキサンチノールが誘導するアポトーシスにおよぼすアクチン重合の関与について検討した。

**【方法】** アクチン重合阻害剤ラトランクリンAであらかじめ処理した HL-60 細胞をフコキサンチノールで処理することにより、フコキサンチノールによるアポトーシス誘導におけるアクチン重合の関与を評価した。アポトーシスの指標としてフローサイトメトリーによる Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期の測定およびウェスタンブロッティングによる開裂型カスパーゼ3の発現解析を行った。また、アクチン重合体と特異的に結合する FITC 標識ファロイジンを用い、蛍光顕微鏡下での観察を行った。さらにフコキサンチノールを結合させた磁性ビーズを用いアクチンへの結合について調べた。

**【結果】** フコキサンチノールで処理した細胞では Sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期細胞数が増えると共に、開裂型カスパーゼ3発現量も増加した。一方、ラトランクリンAで処理した細胞では、これらのアポトーシス誘導の指標が有意に抑制された。また、アクチン重合体を FITC 標識ファロイジンにより蛍光染色を行ったところ、フコキサンチノール処理によりアクチン重合体の形成が促進されることが明らかとなった。さらに、フコキサンチノール結合磁性ビーズを用いて回収したタンパク質を電気泳動に供し、ウェスタンブロッティングによりアクチンの存在を確認した。以上の結果から、フコキサンチノールはアクチンと相互作用することにより、アクチン重合を誘導し、DISC を形成することによりアポトーシスを誘導すると考えた。

### \*03. *Lactobacillus plantarum* 22A-3 による腸管炎症抑制効果の作用機序の解明

○Jarukan Lamubol<sup>1</sup>、橋本堂史<sup>1</sup>、林 多恵子<sup>2</sup>、奥田 洋<sup>2</sup>、水野 雅史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>神戸大院・農、<sup>2</sup>丸善製薬・研究開発)

【目的】 プロバイオティクスである乳酸菌は腸炎抑制効果をもつと報告されている。しかし、プロバイオティクスの免疫学的効果は株特異的なものであり、作用機構も異なることが知られている。これまでに我々は、*in vivo* デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導性腸炎マウスモデルを用いて、*Lactobacillus plantarum* 22A-3 の経口投与により腸炎を改善することを明らかにした。また腸管組織における抗炎症性サイトカインである TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現増加が認められた。そこで本研究では、*L. plantarum* 22A-3 による腸管炎症抑制効果における TGF- $\beta$ 1 の寄与を調べるため、*in vitro* 腸管炎症モデルを用いて検討した。

【方法】 小腸上皮様 Caco-2 細胞をトランズウェル膜の管腔側に、マクロファージ様 RAW264.7 細胞を基底膜側に配置した共培養系で、*L. plantarum* 22A-3 の死菌体および細胞壁画分を  $1 \times 10^8$  cfu/ml で管腔側に処理した。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 時間後に基底膜側の上清を回収し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  産生量を Killing Assay 法および活性型 TGF- $\beta$ 1 産生量を ELISA 法で測定した。また Caco-2 細胞の全 RNA を抽出し、Real time PCR 法により炎症性ケモカインである IL-8 mRNA と TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現量を測定した。TGF- $\beta$ 1 の RAW264.7 細胞への影響を検討するため、Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 を 0 時間および 3 時間後に RAW264.7 細胞単層に直接添加し、上清中の TNF- $\alpha$  産生量を上述の方法で測定した。

【結果】 *L. plantarum* 22A-3 株の死菌体あるいは細胞壁画分処理区では、LPS 処理による TNF- $\alpha$  産生増加がそれぞれ 53%と 41%、IL-8 mRNA 発現増加が 80%と 72%抑制された。さらに、Caco-2 細胞中の TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現はそれぞれ 238%と 170%に亢進され、活性型 TGF- $\beta$ 1 産生量は 60–80 pg/ml であった。このことにより、22A-3 株の細胞壁画分が抑制能を有することが示唆された。そこで同濃度の Recombinant Human TGF- $\beta$ 1 処理を行った結果、RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生量は有意に減少した。以上の結果から、*L. plantarum* 22A-3 の細胞壁画分が Caco-2 細胞に対して TGF- $\beta$ 1 の産生を誘導することにより、RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生を抑制し、腸管炎症を抑制する可能性が示唆された。

#### \*04. 経口摂取を想定した抗アレルギー効果を有する食品因子探索法の確立

○横山友紀、橋本堂史、水野雅史  
(神戸大院・農)

【目的】 花粉症、食物アレルギーなどに代表される I 型アレルギー反応の原因の一つとして、肥満細胞からの過剰な脱顆粒が挙げられる。この現象を指標としたこれまでの抗アレルギーの評価系は、肥満細胞に対する食品因子の直接的な作用を検討したものが多く、しかし、食品因子は口から摂取され、小腸で吸収されるものである。つまり、小腸上皮での吸収・代謝およびそれらの応答を無視して、食品因子の抗アレルギー作用を議論することは出来ない。そこで、本研究では、I 型アレルギーを抑制する食品因子探索のために、経口摂取を想定した簡便かつ少量の試料での測定が可能となる網羅的 *in vitro* 測定法の構築を試みた。

【方法】 トランズウェルの管腔側に小腸上皮様 Caco-2 細胞、基底膜側に肥満細胞 (RBL-2H3) を配置した共培養系を作成した。RBL-2H3 をあらかじめ抗 DNP-IgE 抗体で感作させた後、管腔側に種々の食品因子を添加し、6 時間反応させた。その後、基底膜側に抗原として DNP-albumin を添加することで脱顆粒を誘引し、RBL-2H3 から放出される  $\beta$ -hexosaminidase 活性を指標として脱顆粒反応を測定した。ポジティブコントロールには、脱顆粒抑制剤である Go6976 を使用した。また、同時に RBL-2H3 から産生される TNF- $\alpha$  量も killing assay で測定した。

【結果】 共培養系において、RBL-2H3 は抗原の濃度依存的に脱顆粒を起こし、ポジティブコントロールである Go6976 は RBL-2H3 の脱顆粒を 97%抑制した。また、フラボノイドの一種であるルテオリンは 94%、ケルセチンは 78%の抑制が確認できた。今回の実験では小腸を透過するフラボノイド類をサンプルとして用いたが、今後は小腸を透過しない食品因子についても検討を行い、RBL-2H3 単培養試験では見られない小腸を介した食品因子の機能性を評価していく予定である。

## \*05. 鉄欠乏性貧血による冷え症への醤油多糖類 SPS の改善効果

○太田 由香、鈴木 誠、松下 裕昭  
(ヒガシマル醤油・研究所)

### 【目的・背景】

成人女性の約半数以上が「冷え」を自覚している。また、女性は男性に比べ冷え症が多い原因の一つに「貧血」が挙げられ、冷えと貧血との関連性を指摘した報告が多い。冷え症対策として柑橘由来のヘスペリジンやいちじく葉エキスなどの血流改善素材の摂取が行われているが、貧血患者には有効ではないと推察された。そこで、鉄および鉄吸収促進作用を有する SPS(醤油多糖類, *shoyu polysaccharides*)、糖転移ヘスペリジン(G-ヘスペリジン)の補給が鉄欠乏性貧血に起因する冷えに対して改善効果を有するか検討した。

### 【方法】

1. Balbc/A マウス(5 週齢・雌性)を鉄欠乏飼料で 3 週間飼育し、貧血状態を誘導した。その後、①鉄欠乏群、②鉄添加群、③鉄・SPS 添加群、④G-ヘスペリジン添加群、⑤鉄・SPS・G-ヘスペリジン添加群の 5 群(10 頭/群)に分け、各実験飼料を 3 週間自由摂食させた後、冷却負荷試験を実施した。冷却負荷は、マウスを 4℃の室内に 30 分間入れその後、室温(25℃)に戻した。冷却負荷時および、室温に戻した回復時における体表温度変化を非接触型皮膚赤外線体温計にて測定した。
2. 冷え症の自覚があり、「冷え症質問紙」により「冷え症」に該当された被験者を対象にヒト介入試験を実施した。被験者を①プラセボ群(n=7)と②試験食群(n=8)の 2 群に分け、プラセボ群にはデキストリンを、試験食群には 1 日あたり鉄(3mg)・SPS(200mg)・G-ヘスペリジン (100mg)を含むカプセルを 3 週間継続摂取させた。摂取前・摂取 1・2・3 週間後、手掌部に 15℃の冷水負荷を 1 分間行い、皮膚表面温度の変化をサーモグラフィにより測定した。

### 【結果】

1. 動物試験では、②鉄添加群、③鉄・SPS 添加群、⑤鉄・SPS・G-ヘスペリジン添加群における血清鉄は、①鉄欠乏群、④G-ヘスペリジン添加群に対して有意に高かった。また、冷却負荷試験の結果では、⑤鉄・SPS・G-ヘスペリジン添加群のマウス体温は冷却負荷時および、回復時において①鉄欠乏群よりも有意に高かった。このことから、鉄・SPS・G-ヘスペリジン混合物の冷え抑制効果および、冷え回復促進効果が認められた。
2. ヒト介入試験では、試験食群において摂取 3 週目で、手の甲の温度回復が摂取前に比べて有意に速かった。また、冷えの自覚症状を示す全般重症度(6 項目)は、摂取 3 週目において、プラセボ群に比べて試験食群は、有意な改善を示しており、冷え症改善効果が実感として認められた。

以上の結果から、鉄欠乏性貧血による冷え症状の改善に対する鉄・SPS・G-ヘスペリジン混合物の有効性が示唆された。

## \*06. ロイシン摂取による mTORC1 経路活性化に及ぼす PGC-1 $\alpha$ の影響

○吉村亮二、佐藤沙耶、南貴美子、只石幹<sup>1</sup>、三浦進司<sup>2</sup>、亀井康富  
(京都府立大 生命環境科学、<sup>1</sup>国立健康栄養研究所・基礎栄養、  
<sup>2</sup>静岡県立大・食品栄養科学)

**【目的】** ロイシンは筋タンパク質合成を促進し、筋タンパク質分解を抑制することが知られている。その合成促進効果は、mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) を活性化、その基質である eukaryotic initiation factor 4-binding protein 1 (4EBP1)、70-kDa ribosomal protein S6 kinase (S6K1) のリン酸化を介していると考えられている。一方、転写共役因子である PPAR $\gamma$  co-activator -1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の過剰発現により筋萎縮が抑制され、さらに PGC-1 $\alpha$ 1 のアイソフォームである PGC-1 $\alpha$ 4 の過剰発現では筋線維が肥大することが報告されている。そこで本研究では、ロイシンによる mTORC1 経路の活性化の条件を検討し、PGC-1 $\alpha$  骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いてロイシンによる mTORC1 経路活性化は PGC-1 $\alpha$  を介するか検討した。

**【方法】** 11 週令の C57BL/6 雄性マウスを 18 時間絶食させ、ロイシン (1.35 mg/10  $\mu$  l/g body weight) を胃管により投与した。投与 30 分後に解剖し、骨格筋 (腓腹筋) を採取した。その後、腓腹筋からタンパク質を抽出し、mTORC1 経路関連分子をウエスタンブロット法により検出した。

**【結果】** mTORC1 の標的分子である 4E-BP1 のリン酸化量は、ロイシン投与により顕著に増加した。そこで現在、絶食状態の PGC-1 $\alpha$  骨格筋特異的遺伝子改変マウスを用いて、ロイシンによる 4E-BP1 のリン酸化に及ぼす影響を検討中である。

\*07. Structural and functional analysis of bacterial cell-surface protein involved in alginate import

○Kanate Temtrirath, Kousaku Murata, and Wataru Hashimoto  
(Div. of Food Sci. Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto University)

**【Purpose】** A Gram-negative bacterium, *Sphingomonas* sp. strain A1, inducibly forms a mouth-like pit on the cell surface in the presence of alginate polysaccharide. After accumulated on the cell surface, alginate is directly incorporated into the cytoplasm as a macromolecule via the pit called “superchannel”. Among cell-surface proteins involved in the formation of the pit and/or import of alginate, Algp7 (27 kDa), a protein localized in the outer membrane, shows a capability to bind alginate, suggesting its contribution to accumulate alginate. Binding mode of alginate to Algp7, however, remains to be clarified. In the present study, structure and function relationship of Algp7 was analyzed.

**【Methods】** Tertiary structure of Algp7 was determined by X-ray crystallography. A model for Algp7/alginate complex was constructed by docking simulation with a program of *AutoDock*. Binding affinity of wild-type Algp7 and its mutants with alginate was analyzed by UV absorption difference spectroscopy and differential scanning fluorimetry (DSF).

**【Results and Discussion】** Crystals of Algp7 formed in droplets containing alginate oligosaccharides were subjected to X-ray crystallography. Crystal structure of Algp7 was determined at a higher resolution (1.99 Å), although no oligosaccharides were included in the structure. Thus, docking simulation was carried out to investigate interaction between Algp7 and alginate. *In silico* model of Algp7/oligosaccharide was constructed by using atomic coordinates of Algp7 and oligosaccharides. In the model, some charged residues were found to be potential candidates for alginate binding. Subsequently, site-directed mutagenesis was carried out and four purified mutants, E79A, E194A, N221A, and K68A/K69A, were subjected to binding assay. The profile of UV absorption difference spectroscopy indicated that K68A/K69A exhibited a significant reduction (at least 20-fold decrease) in binding affinity with alginate compared with wild-type Algp7 ( $K_d = 7.19 \times 10^{-7}$  M). Binding affinity of E79A, E194A, and N221A mutants with alginate was comparable with that of wild-type Algp7. This result was also supported by the DSF analysis. On the basis of these data, Lys68 and Lys69 residues of Algp7 probably play an important role in binding alginate.

## \*08. インスリン産生細胞における小胞体ストレスセンサーIRE1 $\alpha$ の機能解析

○土屋雄一、斉藤美知子、岩脇隆夫<sup>1</sup>、宮崎純一<sup>2</sup>、河野憲二

(奈良先端大・バイオ、<sup>1</sup>群馬大・先端科学指導者育成ユニット、<sup>2</sup>阪大院・医学)

【目的】小胞体内に構造異常のタンパク質が蓄積すると、無秩序なタンパク質の凝集体を形成し、細胞の機能を低下させる。このような状態のことを小胞体ストレスと呼ぶ。小胞体ストレスセンサーは、小胞体ストレス時に活性化し、小胞体で働く遺伝子群の転写を誘導することで小胞体ストレスに対処する。哺乳動物では、ユビキタスに発現する小胞体ストレスセンサーとして IRE1 $\alpha$ 、PERK、ATF6 $\alpha$ の3つが存在する。本研究室では、小胞体ストレスセンサーが膵臓 $\beta$ 細胞では生理的に活性化されていることを見出した。しかし、なぜ膵臓 $\beta$ 細胞で IRE1 $\alpha$ が活性化しているのか分かっていない。そこで本研究では膵臓 $\beta$ 細胞における IRE1 $\alpha$ の生理的な機能を明らかにすることを目的とした。

【方法】本研究では、下記の①個体レベル、②細胞レベルで解析を行なった。

- ①個体レベルでの解析：膵臓 $\beta$ 細胞特異的な IRE1 $\alpha$ の遺伝子欠損マウスの機能解析  
・膵臓 $\beta$ 細胞特異的 IRE1 $\alpha$ の遺伝子欠損マウスを作製し、血糖値、糖負荷試験や膵島の形態学的観察などの表現型を解析した。
- ②細胞レベルでの解析：膵臓 $\beta$ 培養細胞での IRE1 $\alpha$ の機能解析  
・IRE1 $\alpha$ 遺伝子改変マウスより膵臓 $\beta$ 細胞株を樹立し、IRE1 $\alpha$ 遺伝子を欠損させるとインスリン合成・分泌、および遺伝子発現にどのような影響が現れるのかを細胞レベルで解析した。

【結果】①膵臓 $\beta$ 細胞特異的な IRE1 $\alpha$ の遺伝子欠損マウスは、生後16週齢あたりからインスリンの分泌低下による高血糖と耐糖能の低下を示した。また、膵島の形態学的観察では対照群と比べ目立った形態異常は観察されなかった。②膵臓 $\beta$ 細胞株で IRE1 $\alpha$ 遺伝子を欠損させると、糖濃度の変化に応じたインスリン分泌量の低下が観察された。また、細胞内インスリン量も低下していた。この原因を調べたところ、プロインスリンからインスリンへの成熟過程に大きな欠陥を生じていることが示唆された。今後さらにパルスチェイス実験をしてさらに詳しく検討する予定である。

## \*09. シロイヌナズナ MAPKKK18 は ABA シグナル依存的に老化を制御する

○安福拓斗、松岡大介、南森隆司  
(神戸大院・農)

【目的】 アブシジン酸 (ABA) は植物の環境ストレス応答あるいは発芽や老化など植物にとって重要な生理機能の調節に関わる植物ホルモンである。しかしこのように多岐にわたる生理機能を ABA がどのように制御しているのかといったシグナル伝達については不明な点が多い。我々のグループではこれまでにシロイヌナズナ MAPKKK18 が ABA 処理依存的に転写誘導されることを明らかにしており、本研究では MAPKKK18 の ABA シグナル伝達における役割を検証するため下流因子の同定や過剰発現植物の表現型解析を行った。

【方法】 Yeast Two-Hybrid 法によるタンパク質間相互作用解析により MAPKKK18 下流経路の検索を行った。さらに 3xFLAG タグを融合した MAPKKK18 遺伝子を過剰発現させた形質転換植物 (*MAPKKK18* 過剰発現植物) 及びプロテインキナーゼ活性を欠損する変異を導入した遺伝子を過剰発現させた形質転換植物 (*MAPKKK18 KN* 過剰発現植物) を作製した。過剰発現した MAPKKK18 の活性測定や過剰発現植物の成長解析を行い、ABA シグナルにおける役割を調査した。

【結果】 MAPKKK18 は MKK3 と相互作用し、ABA 処理依存的に MKK3 をリン酸化した。MKK3 は MPK1/2 と相互作用したことから MAPKKK18-MKK3-MPK1/2 経路が ABA シグナル伝達において機能することが示唆された。*MAPKKK18* 過剰発現植物は野生型植物より小型化し、重量も少なかった。一方 *MAPKKK18 KN* 過剰発現植物は大型化し、種子数も増加した。また発芽後 40 日目から 60 日目のロゼット葉を観察したところ、*MAPKKK18* 過剰発現植物では黄化葉の割合が高く葉の老化が促進されていた。一方 *MAPKKK18 KN* 過剰発現植物では葉の老化は抑制されており、MAPKKK18 のキナーゼ活性の有無により老化が制御されていた。過剰発現植物間で見られた大きさや種子数の違いは老化の早さが影響していると考えられた。以上より MAPKKK18 は ABA に応答して発現し、MKK3-MPK1/2 経路を介してシグナルを伝達すること、また ABA の生理機能の中でも特に老化の制御に関与することが明らかになった。

## \*10. 酵母に見出した抗酸化酵素 *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 の機能解析

○関口春菜、西村 明、那須野 亮、高木博史  
(奈良先端大・バイオ)

【目的】 当研究室で酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に見出した *N*-アセチルトランスフェラーゼ Mpr1 は、抗酸化酵素としての機能を有している。これまでに、遺伝学的な解析等から Mpr1 がプロリン (Pro) とアルギニン (Arg) の代謝を連結し、Arg 合成を亢進すること、Mpr1 依存的な Arg 合成が酸化ストレス耐性に関与すること、さらに Arg から生成する一酸化窒素が細胞に酸化ストレス耐性を付与することが分かっている。一方 Mpr1 は、Pro 代謝中間体である L- $\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボン酸 (P5C) の細胞毒性を抑えることから、Mpr1 は P5C またはその平衡反応の互変異性体である L-グルタミン酸- $\gamma$ -セミアルデヒド (GSA) をアセチル化し、Arg 合成中間体である *N*-アセチル-GSA に変換すると考えられる。しかし、大腸菌から組換え酵素として精製した Mpr1 では、*in vitro* で P5C/GSA に対するアセチル化活性が再現よく検出されないことから、Mpr1 による Pro・Arg 代謝の連結反応には別のタンパク質との相互作用や翻訳後修飾などが必要だと考えている。本研究では、Mpr1 の生理機能と活性の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

【方法】 Mpr1 を介した Arg 合成が、Mpr1 の活性やタンパク質量に依存しているか検証するため、野生型および不活性変異型 Mpr1 (Asn178Asp) を過剰発現させた株を構築し、Arg 無添加の液体培地での生育を測定した。また、これまでの遺伝学的解析からは、グルタミン酸が Mpr1 の細胞内基質である可能性を否定できていない。そこで、関連酵素の遺伝子破壊株を作製し、それらの生育を観察した。

【結果】 Arg 無添加の培地において、野生型 Mpr1 の過剰発現株では生育が向上したが、変異型 Mpr1 の過剰発現株では生育が著しく悪化したことから、Pro・Arg 代謝の連結には Mpr1 の酵素活性が必要であり、タンパク質量に依存することが示された。また、*N*-アセチルグルタミン酸を Arg 合成系に供給する酵素の遺伝子破壊株 ( $\Delta arg5/6$ ) は Arg 要求性を示さないことから、Mpr1 の細胞内基質はグルタミン酸ではなく、P5C/GSA であると結論付けた。現在、Arg 無添加培地で培養した細胞の抽出液を用いて *in vitro* の活性を測定するとともに、酵母細胞から精製した Mpr1 を用いてプルダウンアッセイを行い、活性発現に必要な因子 (相互作用タンパク質やタンパク質修飾) の探索を試みている。

## \*11. *Pichia pastoris* メタノール誘導性遺伝子発現に関わる Wsc タンパク質の解析

○大澤 晋、由里本博也、阪井康能  
(京都大・院農・応用生命科学)

【目的】 メタノール資化性酵母はメタノールによって特異的かつ強力に誘導されるプロモーターを有しており、異種遺伝子高発現のための宿主として利用される。我々はこのメタノール誘導性プロモーターを用いた有用タンパク質生産ならびに、メタノール誘導性遺伝子発現に関連する転写制御因子についての研究を進めている。メタノール誘導性に関わるシグナル伝達に関してはまったく研究が進んでいなかったことから、メタノール誘導性遺伝子発現に関わるシグナル伝達関連因子を当研究室のスクリーニングによって探索したところ、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞膜におけるストレスセンサーとして知られる Wsc タンパク質がメタノール誘導性遺伝子発現に関連していることが示唆された。そこで本研究では、メタノール資化性酵母における Wsc タンパク質のメタノール誘導性遺伝子発現における機能解析を目的とした。

【方法・結果】 *S. cerevisiae* Wsc タンパク質を用いた BLAST 検索により、メタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* において Wsc タンパク質をコードし得る *PpWSC1*, *PpWSC2*, *PpWSC3* の 3 遺伝子を同定した。次にそれぞれの遺伝子破壊株を作成し、メタノール培地での生育を調べたところ、*PpWSC1* Δ 株においてのみ特徴的な生育遅延が見られた。また、*PpWSC1* Δ 株においては、ホルムアルデヒド代謝関連遺伝子を含むメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが低下しており、毒性の強いメタノール代謝中間体であるホルムアルデヒドが培地中に大量に蓄積していることが分かった。次に、3 つの Wsc タンパク質の機能重複を検討した。*PpWSC1* Δ 株において *PpWSC2* を過剰発現させると、メタノールでの生育は野生株同等となった。また、*PpWSC1* Δ *PpWSC2* Δ 二重破壊株においては、*PpWSC1* Δ 株よりさらにメタノール誘導性遺伝子の発現レベルが低下した。以上の結果から、*PpWSC1* はメタノール誘導性遺伝子発現に重要な機能を持っており、*PpWSC2* も重複した機能を持っていることが示された。

## \*12. ABCG1 と ABCG4 による脂質ラフト構造の破壊

○伊藤志帆<sup>1</sup>、佐野修<sup>1</sup>、植田和光<sup>1,2</sup>、松尾道憲<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>京大院・農・応用生命、<sup>2</sup>京大 iCeMS)

**【目的】** ABCG1 と ABCG4 は ABC タンパク質スーパーファミリーに属し、脂質トランスポーターとして、コレステロールやスフィンゴリエリンを細胞膜から排出する。ABCG1 は高密度リポタンパク質 (HDL) の形成に関与し、動脈硬化に対して抑制的に働く。脂質ラフトはコレステロールやスフィンゴリエリンに富んだ細胞膜上の領域であり、エンドサイトーシスやシグナル伝達の場合として細胞機能の調節に重要な役割を果たす。本研究では、ABCG1 と ABCG4 が脂質ラフトに多く存在する脂質を輸送することから、ABCG1、ABCG4 と脂質ラフト構造との関係を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** HEK293 細胞の ABCG1、ABCG4 安定発現株を界面活性剤で処理し、密度勾配超遠心法によって ABCG1 と ABCG4 の局在を調べた。また、ABCG1、ABCG4 あるいは脂質輸送機能を持たない変異体 (ABCG1KM、ABCG4KM) を一過的に発現させた HEK293 細胞において、蛍光標識したコレラトキシンで脂質ラフトを染色し、脂質ラフト構造の変化を検討した。

**【結果】** 密度勾配超遠心法によって、脂質ラフトマーカーであるカベオリン-1 と ABCG1、ABCG4 が同じフラクションに分画されることを確認した。この結果から ABCG1 と ABCG4 が脂質ラフトに局在することが示唆された。また、脂質ラフトに集積するガングリオシド GM1 と結合するコレラトキシンで脂質ラフトを染色した。その結果、ABCG1KM もしくは ABCG4KM を発現している細胞では、親株細胞と同様に細胞膜が染色されたのに対して、ABCG1 もしくは ABCG4 を発現させた細胞では、ほとんど染色されなかった。このことから ABCG1 や ABCG4 が脂質を動かすことによって脂質ラフトを破壊していることが示された。ABCG1 や ABCG4 が脂質ラフトに局在し、脂質ラフト構造を破壊することで、コレステロールなどの脂質が HDL によって引き抜かれやすくなり、HDL 形成の促進につながると考えられる。

### \*13. 超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T-4 株に見出した 新奇オルガネラ「オリゴボディー」の解析

○藤好拓也<sup>1</sup>、岩野 恵<sup>1</sup>、永井里奈<sup>1</sup>、西田倫希<sup>2</sup>、田口英次<sup>2</sup>、吉田信行<sup>1</sup>、高木博史<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>奈良先端大・バイオ、<sup>2</sup>阪大・超高压電顕セ)

【目的】 当研究室で備蓄原油より単離した超低栄養性細菌 *Rhodococcus erythropolis* N9T- 4 株は炭素源無添加の条件で CO<sub>2</sub> を利用して生育する。本菌を低栄養条件下で生育させると、細胞内に比較的大きな球形の構造体が形成されることが分かった。我々はこの構造体を「オリゴボディー」と名付け、低栄養生育との関連を解析している。今回はこのオリゴボディーの染色を種々の方法で試み、その構成成分を解析したので報告する。

【方法】 これまで、オリゴボディーの形態の観察、形成条件の検討などは主に透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて行ってきた。今回、オリゴボディーの観察をより容易に行うこと、および構成成分の予想を立てることを目的として、様々な染色法により蛍光顕微鏡及び光学顕微鏡による可視化を試みた。また、透過型エネルギー分散型 X 線分光法 (TEM-EDX) により、オリゴボディー内の元素分析を行った。

【結果】 4,6-ジアミジノフェニルインドール (DAPI)、ナイルレッド (NR)、トルイジンブルー (TB) の 3 種類の試薬を用いて細胞を染色し、DAPI および NR 染色は蛍光顕微鏡で、TB 染色は光学顕微鏡でそれぞれオリゴボディーの観察を試みた。染色は低栄養条件 (BM 培地) と富栄養条件 (LB 培地) のそれぞれで生育した細胞に対して行った。その結果、TB 染色細胞においてのみ、細胞内で特異的に濃く染まる構造体が観察された。TB は塩基性色素で、微生物では無機ポリリン酸 (polyP) からなる顆粒を染色する際に用いられている。このことからオリゴボディーの主成分は polyP であると予想された。そこで、ガラスミルク法により細胞破碎液から polyP を抽出し、加水分解を行った後にモリブデン-マラカイトグリーン法を用いて、無機リン酸の定量を行った。その結果、BM 培地で生育させた細胞において顕著な無機リン酸量の増加が確認された。また、酸加水分解を行うことで無機リン酸量が増加することから、N9T-4 株は低栄養生育時に細胞内に polyP を蓄積していることが示唆された。TEM-EDX による元素分析では、オリゴボディー内に細胞質よりも高いリンとカリウムのピークが見られ、polyP の蓄積を裏付ける結果が得られた。さらに、ポリリン酸合成遺伝子の破壊を試みたので併せて報告する。

\*14. Interaction of 8-Anilinoanthralene 1-Sulfonate (ANS) and  
Thermolysin as Examined by ANS Fluorescence

OVimbai Samukange, Masayuki Kamo, Kiyoshi Yasukawa, and Kuniyo Inouye  
(Div. of Food Sci. and Biotechnol., Grad. Sch. of Agric., Kyoto University)

**[Objective]** Thermolysin is a thermostable neutral metalloproteinase produced in the culture broth of *Bacillus thermoproteolyticus*. It consists of 316 amino acid residues with one zinc ion required for enzyme activity and four calcium ions required for structural stability. Thermolysin activity increases with increasing concentrations of neutral salts in an exponential fashion.<sup>1)</sup> ANS is a fluorescent probe. It emits a large fluorescence energy when the anilinoanthralene group binds with proteins through hydrophobic interaction. The objective of this research is to examine the interaction of ANS and thermolysin.

**[Methods]** Native thermolysin purified from *B. thermoproteolyticus* was used. Fluorescence spectra were measured with excitation at 380 nm and emission at 400-600 nm for 25  $\mu$ M ANS at 25°C.

**[Results]** Without NaCl at pH 7.5, the fluorescence intensity at 490 nm ( $FI_{490}$ ) increased by 20%, and the wavelength giving the maximum fluorescence ( $\lambda_{F_{max}}$ ) decreased from 524 to 510 nm with increasing concentrations of thermolysin from 0 to 2.0  $\mu$ M, suggesting that ANS binds thermolysin through hydrophobic interaction. With 1.0  $\mu$ M thermolysin,  $FI_{490}$  increased by 15%, and  $\lambda_{F_{max}}$  decreased from 519 to 504 nm with increasing concentrations of NaCl from 0 to 4.5 M, suggesting that the interaction of ANS with thermolysin is enhanced by NaCl.<sup>2)</sup>

**[References]** 1. Inouye K, *J. Biochem.*, **112**, 335–340 (1992). 2. Kamo M and Inouye K, Annual Meeting of JSBBA, p. 65 (2007).

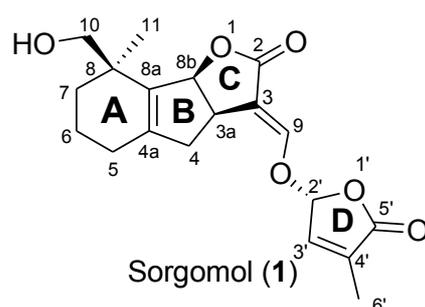
## \*15. Sorgomol の光学活性体の合成研究

○秦大介、北原彩子、久世雅樹、滝川浩郷  
(神戸大院・農)

【目的】 ストライガおよびオロバンキは、イネ科、マメ科植物に対して深刻な被害を与えている根寄生植物である。そしてそれらは世界で膨大な農作物の損害をもたらしている。ストリゴラクトン類には根寄生植物の種子の発芽を誘導する活性があり、その活性をうまく利用すれば寄生植物を死滅させることが出来ると考えられている。Sorgomol (1) は *Sorghum bicolor* の根滲出物から単離され、構造が解明された新種のストリゴラクトンであり、根寄生植物に対し強い発芽刺激活性を示すことが明らかになっている。本研究では、sorgomol (1) の光学活性体の合成を目的としている。

【方法】 市販の ethyl 2-oxocyclohexanecarboxylate を出発物質とし、6段階で中間体である三環性ラクトンを合成した。三環性ラクトンの酵素分割を試み、得られた三環性ラクトンのヒドロキシル体およびアセテート体の鏡像体純度を HPLC により評価した。

【結果】 一回目の光学分割により得られたアセテート体、ヒドロキシル体を同様の条件下で再び光学分割を行ったところ、二回目の酵素分割後、それぞれ 96%ee となり高い鏡像体純度をもった三環性ラクトンの両鏡像体を得た。



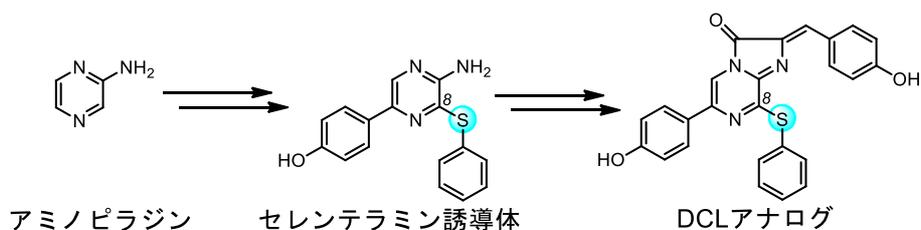
## \*16. 発光波長を改変する生物発光基質アナログの化学合成

○松岡絢香、南郷成子、古市卓也<sup>1</sup>、久世雅樹、滝川浩郷  
(神戸大院・農、<sup>1</sup>岐阜女子大・家政)

【目的】 発光タンパク質は細胞内における生体成分の濃度変化をリアルタイムで可視化する。ヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシン）は活性酸素種（ROS）の刺激により発光する。この性質を利用すれば、生細胞中における ROS の濃度変化が計測できる。フォラシンは 490 nm の発光を示すが、発光基質の分子構造を修飾して異なる波長で発光させることが可能になれば、この発光系の利用範囲は広がる。本研究では生物発光基質アナログによる発光波長の改変を目的とした。

【方法】 フォラシンの発光基質であるデヒドロセレンテラジン（DCL）について、その分子構造を修飾して発光波長を改変させることにした。DCL の 8 位にフェニルチオール基を導入できれば、硫黄原子の置換基効果により発光波長をシフトさせることが可能になる。そこで、DCL の 8 位にフェニルチオール基を導入する新規方法を確立することにした。

【結果】 市販のアミノピラジンを出発原料として臭素化、フェニルチオール基の導入、Suzuki-Miyaura カップリング反応によって、セレンテラミン誘導体を化学合成した。これをフェニルピルビン酸と縮合してデヒドロアミノ酸へと誘導し、最後に無水酢酸で処理して、DCL アナログの化学合成を達成した。



## 特別講演

### 農芸化学奨励賞受賞講演

海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究

久世雅樹（神戸大院・農）

# 海洋生物由来の発光タンパク質に関する生物有機化学的研究

久世雅樹（神戸大院・農）

## 1. はじめに

生物発光に関する生物有機化学的研究の目的と意義は、以下の通りである。

1. 神秘的に発光する生物を目の当たりにし、「一体どのようにして発光しているのだろうか？」と素朴に抱く疑問が本研究における原点である。有機化学でどのように答えられるのか、という天然物化学の中心的題目に挑戦する学術的意義がある。生物種によって発光機構は異なるため、個々の生物に対する研究手法を確立しなければならない難しさが常につきまとう。そうした状況において本研究では、発光を司る化学構造に着目し、有機合成化学を駆使して分子プローブを合理的に設計し、機器分析を用いた分子間相互作用の解析による生物発光機構の解明を目指している。
2. 生物発光に必要となる分子種（生体成分）が明らかになると、これら生体成分の可視化手段として生物発光は利用できる。そのため、研究成果は周辺の研究分野における利用価値が極めて大きい。本研究は有機合成化学を基盤として展開しており、研究結果に基づいて非天然型分子を合理的に設計し、化学合成により供給できる長所がある。発光効率の向上や発光波長の改変が発光基質の化学修飾によって可能になるので、共同研究を展開する上で大きく貢献できる。

本研究では、海洋発光生物であるトビイカとヒカリカモメガイについて、その発光タンパク質に関する生物有機化学的研究を行ってきた。この発光タンパク質は活性酸素種（ROS）で発光を開始する特徴があるので、ROS シグナル伝達の新しい可視化手段として利用が期待されるが、発光機構の詳細は不明であった。この発光を司る化学構造に着目し、発光機構を解明することを目的とした一連の研究により、以下に詳細を示す成果を挙げることができた。

## 2. 発光タンパク質について

発光タンパク質には、アポタンパク質と発光基質が結合したクロモフォア（発光を司る化学構造）があり、このクロモフォアが酸化されると発光する。この酸化には発光を誘発する因子が必要であり、トビイカとヒカリカモメガイの発光タンパク質では活性酸素種（ROS）である。クロモフォアは酸化され過酸化物となり、これが分解するとき生じるエネルギーを光として放出し、発光後は酸化物となる（図1）。

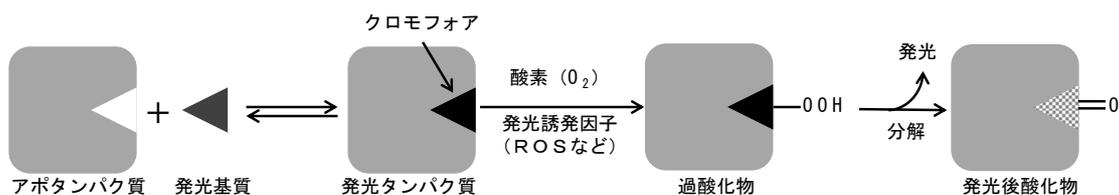


図1：発光タンパク質における発光機構の概略図。

### 3. トビイカの発光タンパク質（シンプレクチン）

シンプレクチンは発光基質としてデヒドロセレンテラジン (DCL) を利用し、クロモフォア（発光を司る化学構造）を形成する発光タンパク質である。このクロモフォアの構造を証明するために、DCL を  $^{13}\text{C}$  (100%) で同位体標識する独自の化学合成経路を開発した。安価なヨウ化メタン- $^{13}\text{C}$  を出発原料として DCL を同位体標識することができた (図2)。

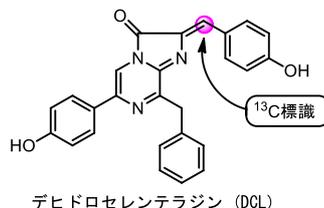


図2：デヒドロセレンテラジンの構造と同位体標識部位。

この  $^{13}\text{C}$  標識 DCL と低分子チオール化合物からシンプレクチンモデルを再構成し、シンプレクチンの発光を再現することに成功した。同位体標識した炭素を手がかりに、発光前と発光後のクロモフォア構造を解析することで、シンプレクチンの発光機構を明らかにした。

次に、クロモフォア形成部位の特定を試みた。クロモフォアはシンプレクチンの状態では安定だが、ペプチド断片としたところ、DCL が脱落してしまい形成部位は解析できなかった。クロモフォアは DCL と平衡関係にあり、シンプレクチン中ではクロモフォアに偏っているが、タンパク質による安定化が消失すると DCL を放出した遊離型の方が安定であった。そこで、DCL にフッ素を導入した非天然型基質を創製したところ、安定なクロモフォアが不可逆的に生成することがわかった (図3)。このフッ素化 DCL をもちいてシンプレクチンを再構成し、発光前と発光後のシンプレクチンをプロテアーゼで消化し、クロモフォアを含むペプチド断片を切り出し、質量分析で解析した。その結果、390 番目のシステイン残基に DCL が結合してクロモフォアを形成していることを明らかにした (図3)。これは DCL を発光基質としている発光系で最初の証明例とな

った。

フッ素を2個導入した DCL 誘導体は天然型基質よりも明るく発光することを明らかにし、シンプレクチンを生体成分の高感度検出手段として利用する上で、最適な非天然型基質が創製できた。実際、フッ素化誘導体は共同研究者らにより植物細胞におけるカルシウムイオンの可視化に利用されており、本研究成果を学際的な領域へと展開することができた。

また、発光タンパク質と基質がどのように相互作用して効率の良い発光を可能としているのか解明するために、光親和性基を導入した誘導体を合成した。この誘導体を用いた光標識実験により、活性部位における発光タンパク質の構造変化を明らかにした。これにより、発光タンパク質の活性部位における分子間相互作用を解明するための研究手法も確立できた。

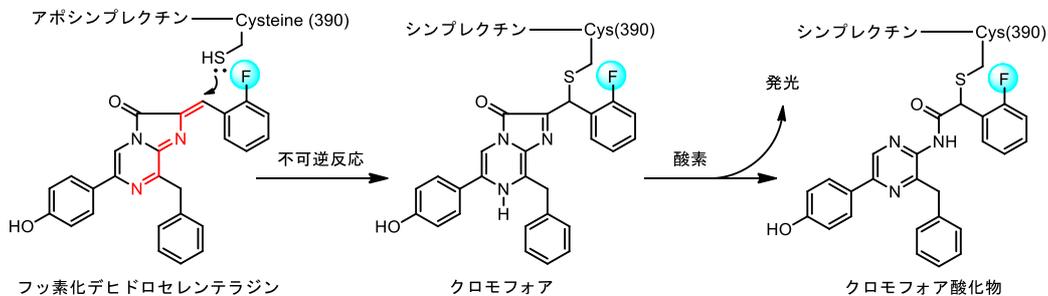


図3：フッ素化 DCL はシンプレクチンの 390 番目のシステイン残基と安定なクロモフォアを不可逆的に生成し発光する。

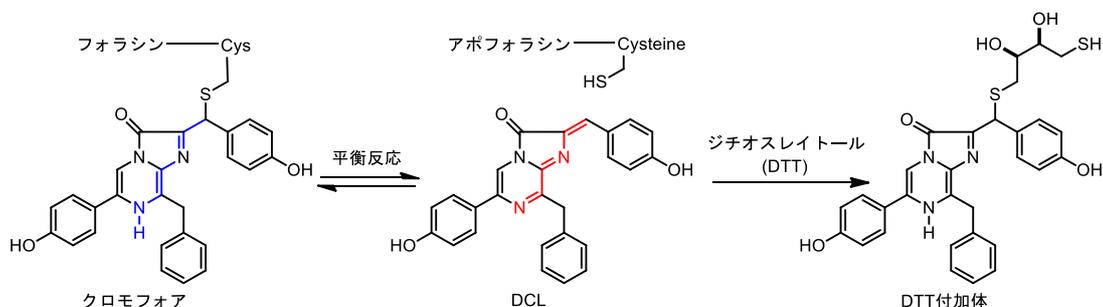
#### 4. ヒカリカモメガイの発光タンパク質（フォラシン）

フォラシンは ROS で発光するヒカリカモメガイの発光タンパク質であるが、発光に関与している低分子有機化合物の構造は 120 年以上も謎のままであった。ROS で発光する点がシンプレクチンと類似していることに着目し、DCL が発光基質ではないかと予想して研究を進めた。その結果、DCL を加えるとフォラシンの発光強度が増加することを明らかにした。

フォラシンにはクロモフォアがあることは予想されていたが、誰もその構造を決定することには成功していなかった。実際にクロモフォアの抽出を試みたが、タンパク質に安定に結合しているため直接抽出できなかった。DCL とタンパク質が安定に結合しているならば抽出は容易でないが、過剰の低分子チオールを加えれば、このクロモフォアを誘導体へと変換して溶出できるのではないかと予想した。実際にフォラシンをジチオスレイトール (DTT) で処理したところ、DCL の DTT 付加体としてクロモフォアを溶出させることに成功し、その

分子構造を決定することに成功した。

以上の成果に加え、DCLを加えて再構成したフォルアシンの発光スペクトルが天然型フォルアシンの発光スペクトルと一致したことから、フォルアシンの発光基質はDCLであり、タンパク質と結合して発光を司るクロモフォアを形成していることを世界で初めて解明し、120年以上続いた謎に終止符を打った(図4)。



## おわりに

以上、DCLを基質とする発光タンパク質について、「発光を司る化学構造」に着目し、クロモフォア構造の解析手法の確立、効率よく発光する非天然型基質の創製、そして未解明だった分子種を特定し、発光機構を解明することに成功した。ROSで発光するタンパク質に関するこれらの生物有機化学的研究は世界的に例のない独創的なものであり、周辺領域への応用を見据えた学際的な研究へと発展させることができた。本研究成果はROSシグナル伝達を可視化する新たな手段を提供するものであり、今後の農芸化学分野において大きな貢献が期待できるものである。

**謝辞** 本研究は名古屋大学大学院生命農学研究科、名古屋大学化学測定機器センター、名古屋大学物質科学国際研究センター、神戸大学大学院農学研究科において行われたものです。本研究の機会を与えてくださり、終始、ご指導ならびにご鞭撻を賜りました磯部 稔先生(名古屋大学名誉教授、台湾國立清華大學教授)に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり有益なご助言や多くの励ましを賜りました西川俊夫先生(名古屋大学大学院生命農学研究科教授)、ならびに滝川浩郷先生(神戸大学大学院農学研究科教授)に心より感謝いたします。松田 幹先生(名古屋大学大学院農学研究科教授)、古市卓也博士(岐阜女子大学)をはじめ、本研究を支えてくださった多くの共同研究者の皆様に深く御礼申し上げます。最後になりましたが、農芸化学奨励賞にご推薦いただき、暖かい励ましを賜りました日本農芸化学会 前関西支部長・加納健司先生に厚く御礼申し上げます。



## <お知らせ>

- 第 482 回支部参与会は、2013 年 12 月 7 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。
  
  - 懇親会を 17 :50 より神戸大学アカデミア館 3 階「さくら」にて開催しま  
す。奮ってご参加ください。
  
  - 次回例会(483 回)予定  
日時:2014 年 2 月 1 日(土)  
会場:京都大学楽友会館  
講演申込締切:2014 年 1 月 6 日(月)  
講演要旨締切:2014 年 1 月 10 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  
由里本 博也  
Tel: 075-753-6387  
E-mail: yury@kais.kyoto-u.ac.jp
- 

日本農芸化学会関西支部

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

〒606-8502 京都市左京区北白川追分町  
京都大学大学院農学研究科内

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

2013 年 12 月 1 日 発行