

日本農芸化学会関西支部
第484回 講演会

講演要旨集

日時：平成26年5月24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)

大日本除虫菊(株)

植田製油(株)

東洋紡(株)

(株)ウォーターエージェンシー

ナカライテスク(株)

江崎グリコ(株)

(株)日本医化器械製作所

(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)

プログラム

一般講演 (13:00~15:40) [講演9分:質疑応答3分]

(* 印は若手優秀発表賞・支部賛助企業特別賞対象講演)

- *1. 好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株が産生するケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体に関する研究—複合体構成タンパク質の同定と局在性および膜小胞との関連—
○俣野明日香¹、山岡昂太¹、片岡真亜知¹、増村威宏¹、川崎一則²、茂里康²、渡部邦彦¹
(¹京府大院・生命環境、²産総研・健康工学)
 - *2. 乳酸菌、特に *Lactobacillus delbrueckii* のイヌリン資化性に関する研究
○高木理沙¹、辻川勇治¹、野本竜平²、大澤朗^{1,2}
(¹神戸大院・農、²神戸大・自然科学系先端融合研究環)
 - *3. グラム陽性細菌のテルル酸還元に関わる遺伝子の同定
○名田イサナ¹、山際恭平¹、永野知哉¹、田島寛隆^{1,2}、斎藤茂樹^{1,2}、谷泰史^{1,2}、Prakash N. Tejo³、三原久明¹
(¹立命館大・生命科学、²立命館大・R-GIRO、³Dept. Biotech. Environ. Sci.・Thapar Univ.)
 - *4. 転写共役因子 PGC1 α は骨格筋 BCAA 代謝を調節する
○畑澤幸乃^{1,2}、只石幹³、小川佳宏¹、北浦靖之⁴、下村吉治⁴、亀井康富²、三浦進司⁵
(¹東京医科歯科大、²京府大院・生命環境、³国立健康栄養研、⁴名古屋大、⁵静岡県大)
 - *5. mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 の複合体形成の違いを制御する蛋白質領域の同定
○藤田賢一、伊藤慶紗、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司
(京大院・生命科学)
 - *6. 多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の神経突起伸長作用
○中塔充宏¹、松尾道憲²、磯部洋輔³、有田誠³、新井洋由³、小川順¹、植田和光^{1,4}
(¹京大院・農・応用生命、²京女・家政・食物栄養、³東大院・薬・衛生化学、⁴京大 iCeMS)
- 休憩 (14:15~14:25)**
- *7. 動物培養細胞での組換え蛋白質高生産に向けた mRNA の効率的核外輸送機構の開発
○猪瀬春子、松村嘉員、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司
(京大院・生命科学)
 - *8. 抗菌タンパク質ディフェンシンを発現させたイネカルス of 解析
○菊田桃香¹、佐生愛¹、重光隆成¹、森田重人^{1,2}、佐藤茂^{1,2}、増村威宏^{1,2}
(¹京府大・生命環境、²京都農技セ・生資セ)
 - *9. キノン二量化反応による 2H⁻クロメンの合成とさらなる光二量化反応
○太田元博¹、笹森貴裕²、水品善之^{3,4}、時任宣博²、倉持幸司¹、椿一典¹
(¹京府大院・生命環境、²京大化研、³神戸学院大・栄養、⁴神戸学院大・LSC)
 - 10. 新規 γ -ラクタム形成反応の開発とその反応を利用した天然物合成
小森健太、水谷将馬、○倉持幸司、椿一典
(京府大院・生命環境)
 - 11. *Thermococcus kodakarensis* 菌体外分泌プロテアーゼ Tk-2168 の諸特性解析
○中村友美¹、大田黒晴樹²、平田あずみ¹、佐野智¹、劉東周²、古賀雄一²、金谷茂則²、高野和文¹
(¹京府大院・生命環境、²阪大・工)

12. シロイヌナズナ由来 CorA family タンパク質 AtMRS2-10 による、大腸菌 Mg^{2+} 要求性変異株の相補と Al^{3+} による生育阻害

○宇田美沙紀、佐上郁子、石嶋純男
(京府大院・生命環境)

休憩 (15:40~15:50)

特別企画:産学交流・講演会 (15:50 ~ 17:10)

1. 現代社会における化粧行為の役割~脳科学研究からみた化粧行為の有用性~
鳥居宏右 氏 (株式会社ノエビア グループ総合研究開発部)
2. ダチョウに魅せられて
塚本康浩 氏 (オーストリッチファーマ (株) / 京都府立大学)

若手優秀発表賞・支部賛助企業特別賞表彰式(17:10~17:20)

ミキサー (17:30~18:30、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

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株が産生する ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体に関する研究 —複合体構成タンパク質の同定と局在性および膜小胞との関連—

1

○俣野明日香¹、山岡昂太¹、片岡真亜知¹、増村威宏¹、川崎一則²、
茂里康²、渡部邦彦¹

(¹ 京都府大院生命環境・応用生命、² 産総研・健康工学)

【背景・目的】

好熱性細菌 *Meiothermus ruber* H328 株はケラチン分解性プロテアーゼを分泌し、難分解性トリ羽毛ケラチンを強力に分解する。ケラチン分解性プロテアーゼは 10^8 Da に達する巨大分子複合体を形成し、驚異的な変性剤耐性を有する¹⁾。これまで、H328 株が脂質二重膜様構造を有する膜小胞を細胞外に放出し、巨大分子複合体が膜小胞画分にも含まれることを見出しているが、未だその詳細は未解明である。そこで、ケラチン分解や変性剤耐性機構に関係する膜小胞の構造・形成のメカニズムを明らかにすることを目的に、巨大分子複合体の構成タンパク質を MALDI-TOF/MS 解析により同定し、それらに対する抗体を用いた Western blot 解析および免疫電子顕微鏡解析による局在性の調査を行った。

【方法・結果】

ケラチン分解性プロテアーゼ巨大分子複合体の調製は、培養上清（羽毛含有 YS 培地 55°C、72 時間培養）を限外濾過濃縮（排除分子量 5×10^5 ）からゲル濾過クロマトグラフィー（分画分子量 1×10^8 ）に供し、得られる 2 つの画分（Peak 1 画分と Peak 2 画分）のうち、高分子側 Peak 1 画分をショ糖密度勾配超遠心にかけて、最終サンプルとしてプロテアーゼ活性を有する超遠心活性画分と 10% 未満画分を得て行った。構成タンパク質の MALDI-TOF/MS 解析は AXIMA Performance（島津@京都市バイオ計測センター）を用い、ゲノム情報²⁾と照合し行った。その結果、超遠心活性画分および Peak 2 画分から、唯一のセリンプロテアーゼとして Protein B (MrH_0844) と、その 4 bp 上流に位置する機能未知タンパク質 Protein A (MrH_0843) を同定した。そこで Protein A、B を大腸菌 BL21 (DE3) 株にて発現させ、精製したタンパク質を抗原に、ウサギ抗体を得た。各抗体を用いた Western Blot 解析より、Protein A、B は全精製画分に局在した。更に、超遠心活性画分に対する抗 Protein B 抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析では、 $\phi 100$ nm の膜小胞上に Protein B の局在を確認することができた。Protein A についても現在同様に局在性を解析中である。さらに、大腸菌において Protein B 遺伝子を Protein A 遺伝子と共発現させた場合のみ、プロテアーゼ活性を示すことから、Protein B の発現には Protein A が必須であり、巨大分子複合体と膜小胞においても Protein B と強く関与して存在することが示唆された。

1) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:2973–2980 (2014); 2) *Genome Announc.* 1: e00176–13 (2013)

2

乳酸菌、特に *Lactobacillus delbrueckii* のイヌリン資化性に関する研究

○高木理沙¹、辻川勇治¹、野本竜平²、大澤朗^{1,2}

(¹神戸大院・農、²神戸大・自然科学系先端融合研究環)

【目的】近年、乳酸菌やビフィズス菌といった有用細菌の増殖を促進するプレバイオティクスが注目されており、研究が盛んに行われている。イヌリン型フルクタンもその一つであり、*Lactobacillus delbrueckii*や*L. paracasei*等の有用細菌の増殖を促進するという報告がある。このイヌリン型フルクタンの取り込みメカニズムについて、*L. paracasei*はイヌリン型フルクタンを細胞外で短鎖にまで分解した後に細胞内に取り込んで代謝する一方で、*L. delbrueckii*はイヌリン型フルクタンを直接細胞内に取り込み、細胞内で短鎖に分解して代謝するという異なった機構が示唆されている。しかし、どちらが増殖に優位であるかについては不明な点が多い。従って本研究では、イヌリン資化のメカニズムが増殖に及ぼす影響について検討するために、イヌリンを単一糖源とした培養条件において*L. delbrueckii*と*L. paracasei*の2菌種、またはフルクトースは利用できるが、イヌリンは利用できない*L. plantarum* 22A-3を加えた3菌種共培養実験を行い、それぞれの単培養時との増殖を比較した。

【材料と方法】乳酸菌の基礎培地であるMRS培地から糖成分を除去した培地(mMRS培地)に糖成分として終濃度2%でイヌリンを添加した培地及びコントロールとして終濃度2%でグルコースを添加した培地を作製し、*L. delbrueckii*と*L. paracasei*の単培養試験、共培養試験そして*L. plantarum* 22A-3を加えた3菌種共培養実験を行った。それぞれの菌数をqPCR法を用いて測定した。

【結果・考察】グルコースを糖源とした場合、*L. delbrueckii*は単培養に比べて共培養の際に増殖が抑制されたのに対し、*L. paracasei*は単培養と共培養の際の増殖には変化が見られなかった。一方で、イヌリンを糖源とした場合、*L. delbrueckii*は単培養と共培養の際の増殖に変化が見られなかったのに対し、*L. paracasei*は単培養に比べて共培養の際に増殖が抑制された。さらに、*L. plantarum* 22A-3を加えた3菌種共培養試験において、イヌリンを糖源とした際、*L. paracasei*の増殖は単培養時や2菌種共培養時に比べて更に抑制されたのに対し、*L. delbrueckii*の増殖には影響がみられなかった。以上の結果より*L. delbrueckii*は、*L. paracasei*とは異なったイヌリン取り込みメカニズムを有しているために、イヌリンの資化性において他菌種の存在の影響を受けにくいことが推察され、ヒト腸内におけるイヌリンが存在する環境下での増殖は、*L. paracasei*よりも*L. delbrueckii*の方が有利であることが示唆された。

グラム陽性細菌のテルル酸還元に関わる遺伝子の同定

3

○名田イサナ¹、山際恭平¹、永野知哉¹、田島寛隆^{1,2}、斎藤茂樹^{1,2}、
谷泰史^{1,2}、Prakash N. Tejo³、三原久明¹

(¹立命館大・生命科学、²立命館大・R-GIRO、³Dept. of Biotech. and Environ. Sci., Thapar Univ.)

【目的】

硫黄やセレンの同族元素であるテルルは、太陽電池や電子部品材料として先端産業分野で利用されている。テルルのオキシアニオン（テルル酸、亜テルル酸）は細胞毒性を示し、水に可溶性で工業廃水や環境中で比較的安定して存在する。そのため、これらを不溶性の元素状テルルに還元する微生物が注目されている。これまでに、亜テルル酸還元に関わる複数のメカニズムが報告されている一方で、テルル酸還元については *Escherichia coli* でモリブデン酵素が関与することを示唆する報告のみであり、メカニズムは解明されていない。そこで本研究では、高濃度セレン地帯の土壌から単離したグラム陽性細菌 *Cellulomonas* sp. D3a 株および *Bacillus* sp. NTP-1 のゲノムDNAへのトランスポゾン挿入変異により、テルル酸還元に関与する遺伝子の同定を試みた。

【方法・結果】

D3a 株および NTP-1 株は、5 mM テルル酸を含むTSB寒天培地において、好気および嫌気下でテルル酸を還元し元素状テルルに由来する黒色のコロニーを生じる。テルル酸還元に関与する遺伝子を同定するため、トランスポゾンTn916をもつ *Enterococcus faecalis* CG110 株を D3a と接合させ、テルル酸還元能の低下したコロニーを単離した。その結果、好気条件下におけるテルル酸還元速度が野生株に比べて著しく低下した変異株が 4 株得られた。カセットPCR法により解析したところ、これら変異株 4 株において、Tn916 は同一遺伝子 (*ybbP*) の上流に挿入されていた。従って、変異株においては、Tn916 の挿入が *ybbP* の発現に影響を及ぼすことにより、テルル酸還元能が低下したものと考えられた。

また、トランスポゾン遺伝子破壊法で得られた NTP-1 のテルル酸還元変異株の粗抽出液を Native-PAGE で分離し、テルル酸を基質として活性染色を行った結果、変異株においてテルル酸還元活性が低下するタンパク質バンドが観察された。このバンドに含まれるタンパク質をSDS-PAGEで分離し野生株と変異株と比較したところ、変異株で存在量が減少しているものが複数見つかった。これらのタンパク質を ESI-Qq-TOF MS 解析で同定した結果、sulfite reductase など 5 つのタンパク質が同定された。

転写共役因子 PGC1 α は骨格筋 BCAA 代謝を調節する。

4

○畑澤幸乃^{1,2}、只石幹³、小川佳宏⁵、北浦靖之⁴、下村吉治⁴、
亀井康富²、三浦進司⁵

(¹東京医科歯科大学、²京都府立大学、³国立健康栄養研究所、
⁴名古屋大学、⁵静岡県立大学)

【目的】

転写共役因子PGC-1 α は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの生合成・筋線維タイプの変化・脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。我々はこれまでに、骨格筋特異的PGC-1 α 過剰発現マウス(PGC-1 α Tgマウス)を作製し、PGC-1 α の過剰発現により骨格筋の顕著な赤筋化が生じ、持久運動能力が向上したことを報告した(Tadaishi et al. Plos one, 6: e28290, 2011)。本実験ではこのPGC-1 α Tgマウスの表現型を説明する代謝変化を調べることを目的とした。

【方法・結果】

マイクロアレイ法を用いて網羅的な遺伝子発現解析を行い、PGC-1 α Tgマウスで発現増加した遺伝子についてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、PGC-1 α によって活性化することが知られている脂肪酸代謝などのほか、これまでにPGC-1 α との関連が知られていなかった分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝関連経路が検出された。すなわち、BCAA代謝酵素であるBCAT(branched-chain aminotransferase)やBCKDH(branched-chain α -keto acid dehydrogenase)の発現増加が認められた。つづいて、PGC-1 α Tgマウスの骨格筋においてBCAA代謝酵素の発現が増加していることをReal time PCR法及びウエスタンブロット法を用いて確認した。さらにin vitroにおいてもPGC-1 α がBCAA代謝を活性化するか否かを検討するために、PGC-1 α をレトロウイルスで過剰発現させたC2C12筋芽細胞を用いて、BCAA代謝酵素の遺伝子発現増加を確認した。また、これらの結果と一致してPGC-1 α Tgマウスの骨格筋及びPGC-1 α 過剰発現C2C12筋芽細胞においてBCAA含有量が減少していた。これらの結果から、骨格筋におけるPGC-1 α はBCAA代謝に貢献し、運動により生じるPGC-1 α の発現増加はBCAA代謝に関与している可能性が示唆された。(Hatazawa et al. Plos one, 9: e91006, 2014)

5

mRNA 核外輸送因子 UAP56 ならびに URH49 の複合体形成の違いを制御する蛋白質領域の同定

○藤田賢一、伊藤慶紗、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司
(京大院・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酵母からヒトまで進化的に保存された TREX 複合体が機能する。その複合体形成に中心的な役割をもつ構成因子 UAP56 は酵母やハエなどで単一で存在するのに対して、哺乳類では 90% 以上の相同性を持つ 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 複合体を形成し、両者は選択的な mRNA 輸送に機能することが示された。しかし非常に相同性の高い UAP56 と URH49 による異なる複合体の形成機構と、両者が輸送する mRNA の選択性を決定する分子機構は不明である。そこで最初に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】

UAP56 と URH49 で相同性の低い両末端領域を入れ替えたキメラ変異体、ならびに両末端領域を除いたコア領域内で異なるアミノ酸を入れ替えた点変異体を網羅的に作成し、複合体形成能を解析した。複合体形成能は変異体が TREX 複合体または AREX 複合体のどちらを形成するか、免疫沈降法により解析した。例えば UAP56 キメラ変異体が本来 URH49 の形成する AREX 複合体を形成する場合、変異を入れた領域は複合体形成能を決定する領域であると判断出来る。解析の結果、驚くべき事に相同性の低い両末端ではなく、相同性の高いコア領域の 1 アミノ酸が複合体形成能制御に重要であることが明らかになった。次にこれらの変異体の選択的 mRNA 輸送能を RNA-FISH 法により、UAP56 または URH49 の KD により生じる Poly (A)⁺ RNA の核内蓄積が変異体発現時に回復するかを指標に解析した。その結果、複合体形成能が逆転した変異体は選択的 mRNA 輸送能も逆転した。つまり UAP56 と URH49 の複合体形成の違いが両者の mRNA 選択性を決定することが示唆された。

現在、1 アミノ酸変異による両者の複合体形成能の制御機構解明のため、UAP56 と URH49、ならびに変異体の結晶構造解析を試みている。

6

多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質の神経突起伸長作用

○中塔充宏¹、松尾道憲²、磯部洋輔³、有田誠³、新井洋由³、
小川順¹、植田和光^{1,4}

(¹京大院・農・応用生命、²京女・家政・食物栄養、
³東大院・薬・衛生化学、⁴京大 iCeMS)

【目的】

魚に多く含まれるドコサヘキサエン酸(DHA)に代表される多価不飽和脂肪酸は脳の発達や機能に重要であり、神経突起伸長促進作用を持つことが知られている。神経細胞への脂質の供給は、グリア細胞から分泌されるリポタンパク質を介して行われる。そのため、食餌成分中の多価不飽和脂肪酸は、まずグリア細胞のリン脂質に組み込まれた後、リポタンパク質の構成成分として神経細胞に作用すると予想されるが、それを実証した研究はない。そこで本研究では、添加した多価不飽和脂肪酸がリポタンパク質中のリン脂質に取り込まれるかどうか、多価不飽和脂肪酸を含有するリポタンパク質が神経突起伸長作用を示すかどうかを検討した。

【方法・結果】

ラット初代培養大脳皮質グリア細胞に多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)、DHAを添加して24時間静置し、細胞に取り込ませた。培地交換後、さらに72時間静置し、分泌されたりポタンパク質を含む条件培地を回収した。この条件培地でラット初代培養海馬神経細胞を72時間培養し、神経細胞を免疫染色して神経突起の長さを測定した。その結果、溶媒のみを添加したグリア細胞条件培地と比較して、AA、EPA、DHAを添加したグリア細胞より得られた条件培地は高い神経突起伸長作用を示すことが分かった。この効果がリポタンパク質によることを確かめるため、グリア細胞条件培地からリポタンパク質を密度勾配超遠心によって精製し、神経細胞に添加して同様に神経突起伸長への影響を調べた。その結果、AA、EPA、DHAを添加したグリア細胞から分泌されるリポタンパク質は、コントロールに比べて神経突起伸長促進作用が大きいことが分かった。さらに、これらのリポタンパク質中のホスファチジルコリンの脂肪酸鎖をLC-MSで解析したところ、AA、EPA、DHAと考えられる脂肪酸のピークが検出された。以上の結果から、グリア細胞に添加した多価不飽和脂肪酸はリン脂質に取り込まれた後リポタンパク質として分泌され、神経細胞に供給されて神経突起伸長促進作用を示すことが示唆された。

本研究は、生研センタープロジェクトの一環として行われた。

動物培養細胞での組換え蛋白質高生産に向けた mRNA の効率的核外輸送機構の開発

○猪瀬春子、松村嘉員、宮前友策、神戸大朋、永尾雅哉、増田誠司
(京大院・生命科学)

【目的】

バイオ医薬品は、特効性が高く副作用も少ないため、疾病治療において非常に有用である。しかし、単価が非常に高いという問題点がある。その原因として、バイオ医薬品の大多数を占める抗体医薬品等は蛋白質生産効率が低い動物細胞での製造を必要とすることが挙げられる。したがって、動物細胞において組換え蛋白質を効率よく生産する発現系の開発が求められてきた。これまで組換え蛋白質発現の各段階のうち、転写および翻訳の段階について強力なプロモーターの探索および効率的翻訳開始配列の探索によって各々の効率化がすでに達成されている。しかし、遺伝子発現において重要な段階となる mRNA の核外輸送機構についてはこれまで十分な検証が行われていない。そこで本研究では、mRNA の核外輸送機構の効率化に焦点を当てることで、従来よりも組換え蛋白質を高生産する新規動物細胞発現系の開発を試みた。

【方法・結果】

本研究では、2つの効率的 mRNA 核外輸送システムを考案し、検証した。

① type D レトロウイルスで見られる mRNA 核外輸送機構を模倣したシステムを構築した。type D レトロウイルスの mRNA は CTE (Constitutive Transport Element) と呼ばれる RNA エlement を持ち、これが宿主細胞の mRNA 核外輸送受容体である TAP との結合性を持つために、ウイルスの mRNA は効率的に核外に輸送される。そこで、レポーター遺伝子に CTE 配列を結合したプラスミドを構築し、これを HEK293 細胞および CHO 細胞において細胞に一過的に発現させコントロールと比較することでその効果を検証した。その結果、HEK293 細胞に CTE システムを適用した場合、レポーター遺伝子の発現効率が向上した。一方、CHO 細胞では効果は見られなかった。

② MS2 フェージにおいて、その mRNA 上のある特定の配列部分に MS2 蛋白質が結合する現象を利用したシステムを構築した。このシステムでは、レポーター遺伝子に MS2 蛋白質結合配列を付加したプラスミドと、TAP と MS2 蛋白質を融合した蛋白質を発現するプラスミドを用意した。これらのプラスミドを細胞において共発現させることで、MS2 結合配列が付加されたレポーター遺伝子 mRNA が MS2-TAP 融合蛋白質によって効率的に核外に輸送されると考えた。CTE システムと同様に、HEK293 細胞および CHO 細胞に一過的に発現させコントロールと比較することでその効果を検証した。その結果、HEK293 細胞および CHO 細胞の両方においてレポーター遺伝子の発現効率が向上した。

本研究では、これら2つの方法を用いることで、mRNA 核外輸送の効率化により動物細胞における組換え蛋白質の生産性を向上できることが示唆された。

抗菌タンパク質ディフェンシンを発現するイネカルスの解析

8

○菊田桃香¹、佐生愛¹、重光隆成¹、森田重人^{1, 2}、佐藤茂^{1, 2}、
増村威宏^{1, 2}

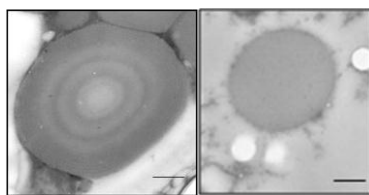
(¹京府大院生命環境・応用生命、²京都農技セ・生資セ)

【目的】

遺伝子組換え技術を用いて生産した有用タンパク質を蓄積するキャリアーとして、植物種子のオルガネラを利用した経口医薬品の開発が注目されている。植物種子は、室温で長期間の保存に適しており、簡便でありコスト面からも有望なシステムだと考えられている。その中で、イネ種子には、プロラミンが蓄積するI型プロテインボディ(PB-I)が存在しており、ヒトの消化管で難消化性であることが知られている。そこで、有用タンパク質をPB-I様の構造体へ蓄積させることで、胃酸や消化酵素の影響を受けずに目的タンパク質を腸へ輸送することが可能だと考えた。本研究では、抗菌タンパク質であるマウス由来のディフェンシン4をイネカルスで発現し、PB-I様構造体へ蓄積させ、家畜の腸炎などに有効な経口薬の作出を行うことを目的とした。

【方法・結果】

これまでの研究で、イネカルスにおいてプロラミン配列を発現するとPB-I様構造体を形成することが明らかになっている(図1右)。そこで、プロラミンとディフェンシンの融合タンパク質をカルスで発現させ、PB-I様構造体にディフェンシンが特異的に蓄積するようにデザインした。また、イネカルスにおいて形質転換体の選抜を容易にするためにDsRedを選抜マーカーとして使用した(図2)。ウエスタンブロット法により、カルス中にプロラミン+ディフェンシン融合タンパク質が発現していることを確認した。また、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、顆粒状の構造物が確認された。以上より、融合タンパク質がイネカルス中でPB-I様構造体に存在している可能性が示唆された。



Rice seed PB-I 13a prolamin+GFP

bars : 500 nm

図1.イネカルス中でのPB-I様構造体の形成

Shigemitsu et. al., Plant Cell Reports (2013)

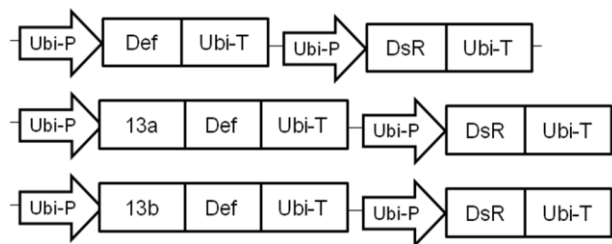


図2. カルス発現用遺伝子コンストラクト

Def:Defensin 4 Ubi-P:ユビキチンプロモーター

Ubi-T:ユビキチンターミネーター

13a:13a プロラミン 13b:13b プロラミン

9

キノン二量化反応による 2H-クロメンの合成とさらなる光二量化反応

○太田元博¹、笹森貴裕²、水品善之^{3,4}、時任宣博²、倉持幸司¹、
椿一典¹

(¹京府大院生命環境、²京大化研、³神戸学院大栄養、⁴神戸学院大LSC)

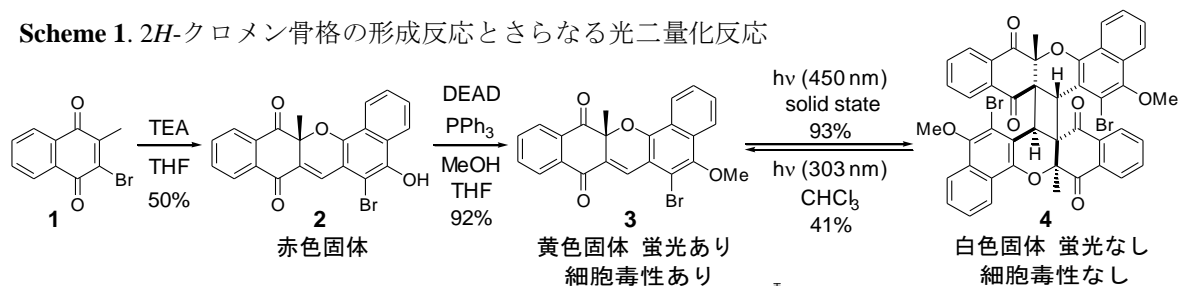
【目的】

キノン類はその反応点の多さから、一般に反応制御が困難とされる。しかし、その一方で反応条件を精査し、反応を厳密に制御できれば、選択的な反応を進行させることが可能になるとも考えられる。当研究室では、これまで 2-ブロモ-3-メチル-1,4-ナフトキノン (**1**) の多様な二量化反応の開発を行い、様々な骨格を選択的に構築することに成功している。¹⁾ そこで我々は化合物 **1** を用いた新たなナフトキノン二量化反応の開発と合成した二量体の物性評価を目指した。

【方法・結果】

化合物 **1** に対して種々溶媒や塩基の検討を行ったところ、テトラヒドロフラン中、トリエチルアミンで処理することで、2H-クロメン骨格を有する二量体 **2** を収率 50% で得る新規ナフトキノン二量化反応が進行することを見出した。二量体 **2** は鮮やかな赤色を呈しているが、二量体 **2** のメチル化体 **3** は黄色を呈した。この化合物 **3** に固体状態で 450 nm の光を照射すると収率 93% で分子間 [2+2] 環化付加反応が進行し、白色の環化付加体 **4** を得た。また、無色・無蛍光である化合物 **4** のクロロホルム溶液に 303 nm の光を照射することで、収率 41% で逆環化反応が進行し、橙色の蛍光性溶液に変化した (Scheme 1)。

Scheme 1. 2H-クロメン骨格の形成反応とさらなる光二量化反応



また、光反応の前後における細胞毒性について調べたところ、反応前の化合物 **3** は細胞毒性を示すのに対し、化合物 **4** は細胞毒性をほとんど示さないことが分かった (Figure 1)。劇的な色調の変化や細胞毒性の変化を、光によってスイッチすることができる本反応は、光応答性分子やケージド化合物、ドラッグデリバリーシステムなどへの応用展開が今後期待される。

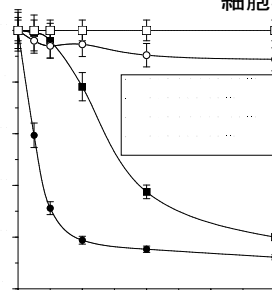


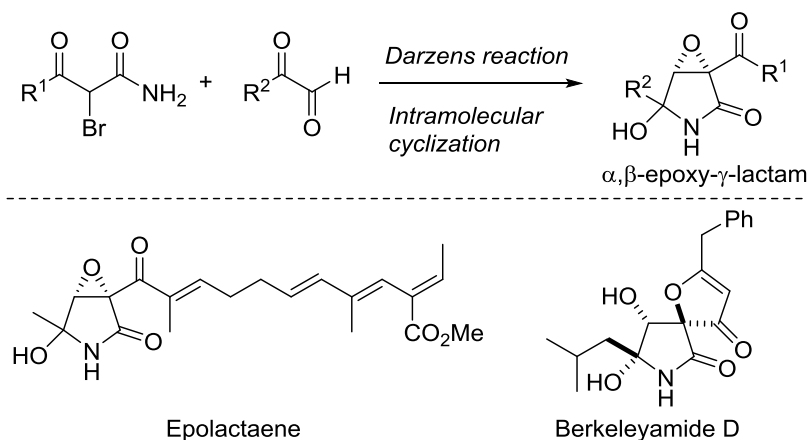
Figure 1. 化合物 **3**, **4** の細胞毒性

1) Azuma, S.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. et al. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 4812.

【発表概要】

γ -ラクタム化合物は天然に広く存在し、特異な構造のみならず多様な生物活性を有するものが知られている。それら複雑な構造は多くの合成化学者を惹きつけるものであり、現在までに多数の γ -ラクタム天然物の全合成研究が行われている。しかしながら、天然の γ -ラクタム化合物の中には、その複雑な構造のため既存の合成法の単純な組み合わせでは合成できない化合物が多数存在する。したがって、現在でもなお γ -ラクタムの効率的かつ汎用性の高い合成法の開発が必要とされている。

我々は、新たな γ -ラクタム形成手法として、Darzens 反応を利用した新規 γ -ラクタム形成反応の開発を計画した (Scheme 1)。この方法の利点は、 α -ブロモ- β -ケトアミドとグリオキサールからわずか一段階で α,β -エポキシ- γ -ラクタムを形成できる点である。本発表では、この新規 γ -ラクタム形成反応の開発と、本反応を利用した天然物 Epolactaene と Berkeleyamide D の全合成について発表する。



Scheme 1. 新規 γ -ラクタム形成の概要 (上)、この反応を利用して合成した天然物 (下)

【謝辞】北海道大学 大学院先端生命科学研究院の門出 健次 教授、谷口 透 助教には、Berkeleyamide D の VCD スペクトルの測定並びに絶対立体配置の決定でたいへんお世話になり、深く感謝を申し上げます。

【参考文献】

Komori, K.; Taniguchi, T.; Mizutani, S.; Monde, K.; Kuramochi, K.; Tsubaki, K. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1386-1389.

Thermococcus kodakarensis 菌体外分泌プロテアーゼ Tk-2168 の諸特性解析

○中村友美¹、大田黒晴樹²、平田あずみ¹、佐野智¹、劉東周²、
古賀雄一²、金谷茂則²、高野和文¹

(¹京府大院生命環境、²阪大院工)

【目的】

SerとLysを触媒中心に持つプロテアーゼLon proteaseは、6~ 8量体の多量体構造を形成し、ATPase活性と連動した触媒メカニズムにより細胞内の不要なタンパク質を分解する。超好熱古細菌*Thermococcus kodakarensis*が持つ菌体外分泌プロテアーゼの一つTk-2168は、Lon proteaseと類似した触媒ドメインを持つプロテアーゼである。本酵素はATPaseドメインの代わりに、既知のLon proteaseには見られない約400残基からなるC末端延長鎖（Cドメイン）とその末端に約20残基からなる疎水性領域を有しているが、その機能は明らかでない。本研究では、Tk-2168の諸特性解析を行い、Lon proteaseとの相違点や、Cドメインの役割、自然環境下での挙動について明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】

大腸菌内で発現させ精製したTk-2168は、ゲルろ過クロマトグラフィーの結果、溶液中では10量体や4量体で存在していた。これら10量体と4量体を分画し、それぞれの酵素活性を比較したところ、ペプチダーゼ活性は、10量体より4量体の方が高く、4量体では活性部位がより露出して小さな基質を認識しやすいことが示唆された。一方、4量体はほとんどプロテアーゼ活性を持たず、10量体構造がタンパク質分解に必須であることが示された。またLon proteaseとは異なり、中性付近で最大活性を持ち、ATPによる活性の上昇や金属イオンによるオリゴマー構造の変化といった特徴は見られなかった。

次にCドメインの役割を解析するため、Cドメイン欠損変異体（Protease domain変異体）と末端の疎水性領域欠損変異体（ Δ C変異体）を構築した。両変異体は活性を保持しており、Cドメインおよび疎水性領域は、酵素活性には直接関与していないと考えられる。WTおよび Δ C変異体は90°Cにおいても熱変性は観察されなかったが、Protease domain変異体は約70°Cで変性した。また、Protease domain変異体は溶液中でモノマーもしくはダイマーで存在し、Cドメインは構造の安定性やオリゴマー構造の形成に必要であることが分かった。一方、 Δ C変異体は溶液中で10量体を形成していたため、末端の疎水性領域がWTにおいて確認された不均一なオリゴマー構造に関与しており、本酵素が自然環境では、C末端疎水性領域を膜に貫通させ10量体を形成していると示唆された。

【目的】

Mg²⁺は細胞内に最も豊富に存在する2価カチオンであり、生体内において重要な役割を果たしている。また、細胞内全Mg濃度は15-25 mMであるが、遊離Mg²⁺濃度は0.25-1.0 mMとかなり低く厳密に制御されているため、Mg²⁺流入を制御するMg²⁺輸送タンパク質が注目されてきた。シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) より同定された AtMRS2 familyタンパク質は、原核生物のMg²⁺輸送タンパク質であるCorAと類似した二次構造を持ち、CorA保存モチーフであるGMN (Gly-Met-Asn) モチーフを含む。その中でも、AtMRS2-10は精製タンパク質を用いた実験から、Mg²⁺輸送とAl³⁺によるMg²⁺輸送阻害、そしてGMNモチーフMet変異によるMg²⁺輸送活性の低下が報告されている。これまで、AtMRS2 familyを含むMg²⁺輸送タンパク質の細胞レベルでのMg²⁺輸送能の評価はサルモネラ (*Salmonella typhimurium*) のMg²⁺要求性変異株 ($\Delta corA$, $\Delta mgtA$, $\Delta mgtB$) を用いて行われてきた。しかし、その病原性のために利用し難い面を持ち合わせている。一方で、本研究室の先行研究により大腸菌Mg²⁺要求性変異株TM2 ($\Delta corA$, $\Delta mgtA$, $\Delta yhiD$) が作製された。TM2は生育の際、培地に10 mM Mg²⁺の添加を要求する。ここで本研究では、大腸菌Mg²⁺要求性変異株TM2を用いて、AtMRS2-10およびGMNモチーフM400I変異タンパク質を発現させ、Mg²⁺輸送能を評価することを目的とした。

【方法・結果】

pUC系統のベクターであるpTV118NにAtMRS2-10およびGMNモチーフM400I変異cDNAを組み込み、発現プラスミドを作製した。その後、各発現プラスミドで大腸菌W3110のMg²⁺要求性変異株TM2を形質転換した。そしてこれらの菌株における、低Mg²⁺濃度条件下またはAl³⁺存在下での成長曲線を作製し、AtMRS2-10のMg²⁺輸送能を評価した。すると、AtMRS2-10発現プラスミドで形質転換したTM2 (TM2/2-10) において、1 mM MgSO₄存在下で生育が可能となった。この結果から、大腸菌で発現したAtMRS2-10のMg²⁺輸送を確認することができた。また、1 mM MgSO₄存在下においてTM2/2-10の生育が0 - 2 mMの範囲でAlCl₃濃度依存的に阻害された。この結果から、Al³⁺によるAtMRS2-10のMg²⁺輸送阻害の可能性と、AtMRS2-10によるAl³⁺輸送の可能性が示唆された。さらに、GMNモチーフM400I発現プラスミドで形質転換したTM2 (TM2/M400I) において、増殖速度の低下がみられた。この結果から、AtMRS2-10の機能発現におけるGMNモチーフの重要性が示唆された。

特別企画 産学交流・講演会

1. 現代社会における化粧行為の役割

～脳科学研究からみた化粧行為の有用性～

鳥居 宏右 氏（株式会社ノエビア グループ総合研究開発部）

この半世紀の間、日本では平均寿命の20年延長という驚異的な寿命革命を達成しました。一方で新たな多くの問題が発生しているのはご存知の通りです。なかでも医療分野では「どれだけ生きるか」のみでなく「どのように生きるか」に目が向けられ、自分らしい生活が送れているか、人生を幸福に感じているかを尺度としたQuality of life (QOL)がテーマとして取り上げられています。高齢化社会における企業の課題のひとつは、お客様がいかに健康で、若々しく、充実した人生を送れるよう、身体的、精神的に抗老化をコンセプトにした商品やサービスを提供していくことにあると考えます。化粧の役割も人類学的にみると古代から現在においてその役割も大きく変化しており、現代社会における新たな役割を担っていると考えられます。基本的に化粧とは社会が持つ美意識に基づいて顔や身体に意図的に手を加えて外見的にも内面的にも理想の自分になろうとする行為のひとつです。しかし化粧の心理的効果には、積極性を上げ、安心感を与える、いわゆる「はげみ」や「いやし」の効果があることも一般的に認知されつつあります。化粧行為による皮膚感覚刺激がもたらす心理的効果や、加齢に伴う脳機能低下に対して有効なフェイシャルマッサージ手技の開発など、脳科学的視点から化粧行為の有用性や応用例を示し、高齢化社会における自社の取り組みを紹介したいと思います。

特別企画 産学交流・講演会

2. ダチョウに魅せられて

塚本 康浩 氏（オーストリッチファーマ（株）／京都府立大学）

<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485回）予定

日時：平成26年7月12日（土）

会場：大阪府立大学

講演申込締切：平成26年6月13日（金）

講演要旨締切：平成26年6月20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

京都大学大学院農学研究科内

発行日：平成26年5月16日

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：matsuomi@kyoto-wu.ac.jp

Tel：075-531-7129、Fax：075-531-7170

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