

日本農芸化学会関西支部
第 488 回 講演会

講演要旨集

日時：平成 27 年 1 月 31 日 (土)
会場：京都大学楽友会館

日本農芸化学会関西支部

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(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)

(株)三ツワフロンテック

サントリーホールディングス(株)

安井器械(株)

住友化学(株)

理研化学工業(株)

(株)第一化成

和研薬(株)

大日本除虫菊(株)

和光純薬工業(株)

プログラム

一般講演(13:20~16:35)[講演9分:質疑応答3分]

(*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. PGC-1 α 遺伝子改変マウスにおける運動トレーニング・BCAA 摂取の効果
○南貴美子¹、吉村亮二¹、Mark Christian Manio²、井上和生²、三浦進司³、亀井康富¹
(¹京都府立大・生命環境、²京大院農・食品生物、³静岡県立大・食品栄養)
- * 2. 肥満に伴い脂肪組織へ浸潤したマクロファージが熱産生脂肪細胞の発現を抑制する
○新田貴大¹、坂本智弥¹、丸野晃嗣¹、後藤 剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、河田照雄^{1,2}
(¹京大院農・食品生物、²京大・生理化学研究ユニット)
- * 3. 機能性多糖レンチナンは小腸上皮細胞を介して免疫応答を制御する
○大浦圭吾、橋本堂史、水野雅史 (神戸大院・農)
- * 4. エピガロカテキンゲレートは GLP-1 を介して血糖値を調節する
○小田あかね、藍原祥子、橋本堂史、水野雅史 (神戸大院・農)
- * 5. 腸管セロトニン産生細胞における TRP チャネルの発現解析
○滝沢彰良、藍原祥子、橋本堂史、水野雅史 (神戸大院・農)
- * 6. HDL 産生時に ABCA1 は輸送したコレステロールを一時的に細胞外ドメイン内に蓄積する
○石神正登¹、長尾耕治郎²、木村泰久¹、木岡紀幸¹、植田和光^{1,3}
(¹京大院農・応用生命、²京大院工・合成・生物化学、³京大 iCeMS)
- * 7. 「細胞外マトリックスの硬さ」に依存した脂肪細胞分化には接着斑タンパク質ビンキュリンが必要である
○黒田美都¹、和田洋樹¹、植田和光^{1,2}、木岡紀幸¹
(¹京大院農・応用生命、²京大 iCeMS)

休憩(14:54~15:10)

- * 8. 小胞体関連分解における Trx2 の関与
○上野 豊¹、奥 公秀¹、寶関 淳^{1,2}、阪井康能^{1,2}
(¹京大院農・応用生命、²京大大学際融合・生理化学)
- * 9. ストレスセンサーWsc1 によるメタノール酵母ペキシソファジーの制御機構
○大澤 晋、由里本博也、奥 公秀、阪井康能 (京大院農・応用生命)
- *10. 微生物による 2'-O-メチルリボヌクレオシドの代謝に関する研究
○光川侑輝¹、日比 慎²、松谷成裕¹、堀之内伸行¹、高橋里美²、小川 順¹
(¹京大院農・応用生命、²京大院農・産業微生物)

*11. 微生物を用いたイソキノリンアルカロイド stylophine 生産系の構築

○岡野峻祐、堀健太郎、佐藤文彦（京大院生命・統合生命）

*12. *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は高分子多糖アルギン酸に走化性を示す

○小林将大¹、丸山如江^{1,2}、村田幸作^{1,2}、橋本 渉¹（¹京大院農・食品生物、現²摂南大・理工）

13. γ -Glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas syringae* with β -aspartyl transpeptidase activity

○Asep A. Prihanto¹, Yuki Nonomura¹, Kazuyoshi Takagi², Midori Umekawa¹, Mamoru Wakayama¹

(¹Dept. Biotechnology, Graduate School of Life science, Ritsumeikan University, ²Dept. Applied Chemistry, Graduate School of Life science, Ritsumeikan University)

休憩(16:22~16:35)

特別講演（16:35~17:15）

農芸化学奨励賞受賞講演 「構造生物学を基盤とした糖質の認識・輸送・分解機構に関する研究」

丸山如江（摂南大・理工）

若手優秀発表賞および支部賛助企業特別賞表彰式(17:15-17:20)

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

1 PGC-1 α 遺伝子改変マウスにおける運動トレーニング・BCAA 摂取の効果

○南貴美子¹、吉村亮二¹、Mark Christian Manio²、井上和生²、
三浦進司³、亀井康富¹

(¹ 京都府立大・生命環境、² 京大院農・食品生物、³ 静岡県立大・食品
栄養)

【目的】PGC-1 α は運動により骨格筋において発現が誘導される転写コアクチベーターである。骨格筋におけるPGC-1 α の発現増加はミトコンドリア生合成や脂肪酸酸化の促進、筋線維タイプの変化を引き起こす。また、骨格筋でPGC-1 α を過剰発現させたマウスは持久運動能力が向上することが報告されている。このようなことから、PGC-1 α は運動への適応反応の一部を媒介しているのではないかと考えられている。

分岐鎖アミノ酸(BCAA)は骨格筋で代謝される。運動時にBCAA代謝は亢進し、BCAAは運動時の重要なエネルギー源となる。最近、我々はPGC-1 α によってBCAA代謝が調節されていることを報告し、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。

本実験では骨格筋特異的PGC-1 α 遺伝子欠損マウスに運動させ、その表現型を解析することで、PGC-1 α が運動能力に与える影響を調べた。また、BCAA摂取が持久運動能力を向上させるのか、そしてそれはPGC-1 α によるものなのかを骨格筋特異的PGC-1 α 遺伝子改変マウスを用いて検証した。

【方法・結果】8週齢の骨格筋特異的PGC-1 α 遺伝子欠損マウスとコントロールの野生型マウスをトレッドミル走行運動させ、疲れ切るまでの時間を測定することで、持久運動能力をテストした。その後4週間、トレッドミル走行運動と回転かごを使った自発的走行運動を併用したトレーニングを行った。トレーニング群の半分にはBCAAを摂取させた。BCAA摂取はトレーニング期間中1.5% (w/v) BCAA水を自由に飲水させることによって行った。最後のトレーニングの翌日、マウスを解剖した。

8週齢時のトレッドミルによる持久運動能力テストの結果、PGC-1 α 欠損マウスは持久運動能力が低かった。PGC-1 α 欠損マウスの血中乳酸値は運動後に野生型マウスと比べて有意に高く、脂肪酸酸化を高めるPGC-1 α が欠損することで、代わりに糖質がエネルギー源として用いられていることが示唆された。回転かご自発運動量は遺伝子改変やBCAA摂取によって変わらなかった。また、遺伝子改変マウス・野生型マウスの両方で、トレーニングによって脂肪重量が減少し、赤筋であるヒラメ筋の重量が増加した。白筋の筋重量はほとんど変化しなかった。BCAA摂取による筋重量への変化も見られなかった。また、BCAA摂取による持久運動能力の向上も見られなかった。現在、遺伝子発現を解析中である。

* 2 肥満に伴い脂肪組織へ浸潤したマクロファージが熱産生脂肪細胞の発現を抑制する

○新田貴大¹、坂本智弥¹、丸野晃嗣¹、後藤 剛^{1,2}、高橋信之^{1,2}、河田照雄^{1,2}

(¹京大院農・食品生物、²京大・生理化学研究ユニット)

【背景・目的】脂肪細胞の一種である褐色脂肪細胞は、脱共役タンパク質 1 (UCP1) によってエネルギーを熱として放散する機能を持つ。また、UCP1 は交感神経刺激に伴い白色脂肪細胞にも発現し、その細胞はベージュ脂肪細胞と呼ばれる。近年、こうした熱産生脂肪細胞がヒト成人においても発現し、全身のエネルギー・糖・脂質代謝に寄与していることが明らかとなってきた。

しかし、熱産生脂肪細胞の発現は、加齢や肥満に伴って低下してしまう。この現象に伴うエネルギー消費量低下が所謂「中年太り」に関与すると推察されているが、その原因メカニズムの全貌は明らかとなっていない。一方で、肥満状態の脂肪組織においては、マクロファージ(M ϕ)の浸潤が起り、炎症が惹起されている。本研究では M ϕ 浸潤が熱産生脂肪細胞にどのような影響を与えるのか、動物個体レベルで検討した。

【方法・結果】(1) 3 週間高脂肪食負荷 KK-Ay マウス(肥満モデルマウス) に対して、クロドロネートリポソーム(Clo-Lip)の腹腔内投与(30 mg/体重 kg)を行い、M ϕ を除去した肥満マウスの作成を試みた。投与 48 時間後、鼠径部白色脂肪(IWAT)における M ϕ マーカー(*F4/80*)、炎症性 M ϕ のマーカー(*Il6*, *TNF α*)遺伝子発現が Clo-Lip 投与群において有意に減少した。また、病理切片解析でも IWAT における Crown-like structures の減少、M ϕ 表面抗原(*F4/80*) および炎症性 M ϕ 表面抗原(*CD11c*)陽性細胞数の減少が観察された。

(2) (1)の M ϕ 除去肥満マウスに対して寒冷刺激(24 時間, 4 $^{\circ}$ C)を行い、ベージュ脂肪細胞の発現を誘導した。その結果、IWAT において、M ϕ 除去群では *Ucp1* mRNA・タンパク発現誘導が有意に回復した。更に、M ϕ 除去群においてのみ、ベージュ脂肪細胞マーカー(*Tbx1*)の遺伝子発現が有意に上昇した。そして、このマウスでは体重、血漿 TG、血漿グルコース濃度がコントロール群と比較して有意に低下した。

(3) 肥満を誘導していない 5 週齢 C57BL/6J マウスに対して、*TNF α* の腹腔内投与(100 μ g/体重 kg)を行い、M ϕ の産生する炎症性サイトカインと UCP1 発現の関与を調べた。その結果、*TNF α* 投与群の IWAT および褐色脂肪組織では、寒冷刺激による *Ucp1* mRNA・タンパク発現誘導が有意に抑制された。

【考察】肥満に伴い脂肪組織に浸潤した M ϕ が、炎症性サイトカインを介して熱産生脂肪細胞の発現を抑制し、このことが全身のエネルギー代謝に影響を及ぼす、という新たなメカニズムが示唆された。

* 3 機能性多糖レンチナンは小腸上皮細胞を介して免疫応答を制御する

○大浦圭吾、橋本堂史、水野雅史
(神戸大院・農)

【目的】 本研究室では、シイタケ由来 β グルカンであるレンチナンを経口摂取することによりデキストラン硫酸ナトリウム(DSS)誘導性大腸炎を抑制すること、さらにその抑制効果はレンチナンが腸上皮細胞上の β グルカン受容体であるDectin-1を介して発揮されることを明らかにしてきた。しかし、Dectin-1は小腸上皮と大腸上皮どちらにおいても発現しており、レンチナンはそのどちらで認識されることが重要であるのかは不明である。本実験では、レンチナンを経口または経肛門投与することによる大腸炎抑制効果を調べることで、レンチナンが小腸と大腸のどちらに作用しているのかを検討し、その作用機序の解明を行うことを目的とした。

【方法】 C57BL/6マウス(雌・7週齢)に、レンチナン(100 μ g/mouse)を経口または経肛門により試験期間中、毎日投与した。レンチナンの投与開始7日後から、飲水に2%DSSを混ぜ7日間摂取させることで大腸炎を誘導した。さらにその後通常水に切り換えて2日間飼育した後、解剖を行い回腸と結腸を回収し、Real-time PCRによってサイトカインのmRNA発現を解析した。大腸炎の程度は、体重変動と結腸での炎症性サイトカインの発現によって評価した。

【結果】 DSS大腸炎による体重減少は、レンチナンの経口投与により有意に緩和された。一方、レンチナンの経肛門投与によっても体重減少は有意に緩和されたが、経口投与に比べるとその抑制効果は半分程度であった。さらに、DSS大腸炎によって結腸で増加することが確認されているサイトカインの遺伝子発現においても、レンチナンの経口投与によって有意に抑制、または抑制傾向を示した。しかし、レンチナンの経肛門投与では経口投与ほどの抑制傾向は見られなかった。このことから、レンチナンが大腸炎抑制効果を発揮するためには小腸を介することが重要であると考えられた。そこで、回腸でのサイトカイン発現を調べたところ、レンチナンの経口投与によってIFN- γ の発現が増加していた。さらに、IFN- γ 産生細胞であるTh1細胞の分化誘導に必須であるIL-12や、Th1細胞のマーカー遺伝子であるTbx21のmRNA発現も回腸において増加していた。これらのことから、経口投与されたレンチナンは小腸を介してTh1細胞を誘導することで、DSS大腸炎の発症を抑制するという新規抑制機構が明らかとなった。また、経肛門投与でも大腸炎の緩和が見られたことから、レンチナンの腸炎抑制効果には従来明らかにしてきたレンチナンが大腸上皮細胞のTNF- α 受容体を減少させることで炎症状態の認識を緩和するという機構も相乗的に働いていると考えられた。

* 4 エピガロカテキンガレートは GLP-1 を介して血糖値を調節する

○小田あかね、藍原祥子、橋本堂史、水野雅史
(神戸大院・農)

【目的】消化管ホルモンのひとつであるグルカゴン様ペプチド (GLP) -1は、腸管上皮に存在する内分泌細胞から分泌され、膵臓においてグルコース依存的なインスリン分泌を促進し血糖値を調節するほか、脳において摂食抑制を促す作用を有するペプチドである。食品に含まれる成分でこのホルモンの分泌に関与するものを培養細胞を用いてスクリーニングしたところ、茶に含まれるポリフェノールであるエピガロカテキンガレート (EGCG) が見出された。本研究ではEGCG刺激によるGLP-1分泌を介した生理機能を検証するため、マウスを用いて糖負荷試験を行い、血糖値調節に対する効果を検討した。

【方法】5週齢のマウス (ICR、雄) を日本クレアDC-8/20KGY飼料と水道水の自由摂取の条件下で飼育し9週齢または11週齢としたのち、糖負荷試験を実施した。マウスを16時間絶食後、①群には水を経口投与、②群にはEGCG水溶液 (2 mM) を経口投与、③群にはGLP-1受容体のアンタゴニストであるエキセンジン 5-39 (80 nmol/kg体重) を腹腔内投与後にEGCG水溶液を経口投与した。経口投与はすべて200 μ lずつ与えた。経口投与の15分後にグルコース溶液を2.5 g/kg体重となるように腹腔内投与した。腹腔内投与直前 (0) と、投与15、30、60、90、120分後に尾静脈から採血しグルコースオキシダーゼ法によって血糖値を測定した。

【結果及び考察】9週齢のマウスを用いた糖負荷試験の結果、②群の血糖値の上昇が①群と③群よりもやや緩やかとなる傾向が観察された。11週齢のマウスを用いた糖負荷試験では、①群の血糖値の推移を比較すると、9週齢のマウスに比べ糖負荷後の血糖値の変動が大きくなっており、3群間の差も大きくなった。すなわち、糖負荷30分後における血糖値は②群で①群と③群より有意に低く、2時間の血糖上昇曲線下面積 (AUC) も②群は①群と③群より有意に小さかった。これらの変化は、EGCG投与により血糖値の上昇が緩和されたこと、この血糖値の上昇緩和がGLP-1受容体アンタゴニストにより阻害されたことを示唆する。EGCGはわずかながらも血中に吸収されるため、これがGLP-1受容体に直接作用する可能性は完全には否定はできないが、血中EGCG量が最大濃度となるのは投与後1時間程度であり、今回得られた血糖値上昇変化とは時間にずれがある。本研究により、血糖値が高めの状態では、糖負荷試験においてEGCGによる血糖値上昇が調節され、その効果がGLP-1の分泌を介している可能性が示された。

* 5 腸管セロトニン産生細胞における TRP チャネルの発現解析

○滝沢彰良、藍原祥子、橋本堂史、水野雅史
(神戸大院・農)

【目的】腸管は食物の接触や圧迫による伸展の刺激を受け、蠕動運動や粘液分泌といった食物の消化、吸収を促す生理応答を誘起する。こうした応答を介する伝達物質であるセロトニンは、腸上皮細胞に含まれるエンテロクロマフィン (EC) 細胞で合成、貯蔵されており、分泌されると近傍の細胞や神経系に受容される。しかしながらEC細胞において機械刺激を受容しセロトニン分泌に至る分子メカニズムは不明である。Transient receptor potential (TRP) チャネル群は受容体機能をもつ非選択性の陽イオンチャネルであり、細胞膜近傍の電位を変化させることで細胞内シグナルカスケードを発生させる。これらの開口刺激は温度、浸透圧、化学物質など様々な要因が知られており、直接的な膜伸展刺激によって開口する分子も存在する。本研究では、腸管において機械刺激依存的にセロトニン分泌を誘起する分子メカニズムの解明を目指し、EC細胞におけるTRPチャネルの発現解析を行った。

【方法】雄性ICRマウス (7週齢) の小腸上皮をスライドガラスで削って採取した組織よりRNAを抽出し、機械刺激に応答することが報告されている *Trpc1*、*Trpm3*、*Trpm4*、*Trpm7*、*Trpv2*、*Trpv4* の発現を逆転写PCRで検討した。次にその結果から発現量の多かったTRPチャネルについて、発現細胞を同定するためマウス小腸組織切片に対し蛍光免疫染色を行った。続いて、抗セロトニン抗体との二重染色を行い、EC細胞での発現を解析した。

【結果】候補遺伝子のうち *Trpm3* と *Trpv4* のPCR産物は、陽性対照である脳または腎臓において検出されたが小腸上皮では検出されなかった。マウス小腸上皮において *Trpc1*、*Trpm4*、*Trpm7*、*Trpv2* のPCR産物が認められ、*Trpm4*、*Trpm7*、*Trpv2* は *Trpc1* より多かった。TRPM4、TRPM7、TRPV2の抗体を用いて免疫染色を行った結果、小腸上皮の細胞においてTRPM7とTRPV2の発現が観察された。一方、TRPM4の染色は観察されなかった。さらに、セロトニンと二重染色をした結果、TRPM7のみセロトニンとの共発現が観察された。小腸の各部位についてセロトニン陽性細胞、TRPM7陽性細胞、および両陽性細胞を計数したところ、十二指腸においてセロトニン陽性細胞数が最も多く、TRPM7陽性率が最も高かった。本研究により、直接的な膜伸展により活性化することが知られているTRPM7が、マウス小腸のEC細胞の一部に発現することが明らかになった。

* 6 HDL 産生時に ABCA1 は輸送したコレステロールを一時的に細胞外ドメイン内に蓄積する

○石神正登¹、長尾耕治郎²、木村泰久¹、木岡紀幸¹、植田和光^{1,3}
(¹京大院農・応用生命、²京大院工・合成・生物化学、³京大 iCeMS)

<背景・目的>

ABCA1 は、善玉コレステロールと呼ばれる高密度リポタンパク質 (HDL) の形成の鍵を握るトランスポーターであり、動脈硬化を防ぐ重要な役割を担っている。ABCA1 によって産生される新生 HDL は、200-700 分子のリン脂質とコレステロールが、2-4 分子のアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) によって包含された円盤状の粒子である。新生 HDL の産生機構は二つ提唱されており、apoA-I が ABCA1 から脂質を直接受け取る”Direct loading model”と、ABCA1 によってつくられた特殊な膜環境から apoA-I が脂質を引き抜く”Indirect model”がある。ABCA1 は約 900 アミノ酸からなる大きな細胞外ドメインをもつ。我々は、ABCA1 の細胞外ドメインが、ATP 加水分解に依存して大きく構造変化し、それが apoA-I の結合に必要であることを過去に報告した。この結果より、ABCA1 は輸送した脂質を細胞外ドメイン内に一時的に溜め込むことでその構造を変化させ、それにより apoA-I 結合部位が露出し、結合した apoA-I に溜め込んだ脂質を一度に直接受け渡すことによって、新生 HDL を産生するのではないかという仮説をたてた。本研究では、細胞外ドメイン内への脂質の蓄積を検証した。

<方法・結果>

ABCA1 誘導発現系 BHK 細胞の細胞膜上の ABCA1 の細胞外ドメインをトリプシンによって切断することで、培地中のコレステロール量が増加するかどうかを検討した。まず、ABCA1 発現細胞を apoA-I あるいはトリプシン処理後、培地中のコレステロール量を測定したところ、apoA-I に対しては直線的な増加がみられたのに対し、トリプシンに対しては 30 分以内に飽和する迅速な増加がみられた。続いて、トリプシン処理後の細胞を溶解し、抗 ABCA1 抗体を用いたウェスタンブロットを行ったところ、トリプシン処理時間依存的に、細胞表面の全長 ABCA1 が減少し、ABCA1 が切断されて生じるペプチド断片が増加した。断片のサイズから切断部位を予測したところ、ABCA1 の細胞外ドメインが切断されたことがわかった。一方、ABCA1 の ATP 加水分解活性欠損変異体や、ABCA1 と同様にコレステロール排出能をもつが、細胞外ドメインをもたない ABCG1 を発現した細胞に同様のトリプシン処理を行ったところ、培地中のコレステロール量の増加はみられなかった。以上の結果から、ABCA1 の細胞外ドメインには、ATP 加水分解依存的にコレステロールが蓄積していることが示唆された。

* 7 「細胞外マトリックスの硬さ」に依存した脂肪細胞分化には 接着斑タンパク質ビンキュリンが必要である

○黒田美都¹、和田洋樹¹、植田和光^{1,2}、木岡紀幸¹
(¹京大院農・応用生命、²京大 iCeMS)

【目的】細胞外マトリックス(ECM)は動物細胞の周囲をとり囲んで存在しており、分化や増殖、細胞遊走などの細胞の挙動に影響を与えている。間葉系幹細胞(様々な種類の細胞に分化する能力を持つ)の分化方向性はECMの種類だけでなく「硬さ」によっても制御されている。例えば、軟らかいECM上では間葉系幹細胞は脂肪細胞へと分化しやすくなる。しかし細胞がECMの硬さを感知して分化方向性を決定する仕組みはほとんど明らかではない。これまでに我々は細胞とECMの接着部位である接着斑に局在するタンパク質ビンキュリンが、繊維芽細胞においてはECMの硬さセンサーとして働いて、細胞遊走を調節していることを明らかにしてきた。そこで本研究では、ビンキュリンがECMの硬さに依存的な間葉系幹細胞の脂肪細胞分化を制御しているかを明らかにすることを目的とした。

【方法・結果】実験には間葉系幹細胞のモデルとして、マウス骨髄由来間葉系幹細胞株ST2細胞を用いた。まずECMの硬さが脂肪細胞への分化に与える影響を調べるため、ST2細胞をECMの硬さが異なる培養基板上で培養し、脂肪細胞へと分化誘導した。脂肪細胞マーカーのmRNA発現量をリアルタイムPCRにより定量したところ、ST2細胞においてもECMの硬さに依存した脂肪細胞への分化が観察された。繊維芽細胞では、ビンキュリンがECMの硬さに応じてTritonX-100不溶性となることで硬さセンサーとして働いていることが明らかにされている。そこでST2細胞をTritonX-100で処理後、不溶性のビンキュリンを免疫染色した。その結果、ECMが硬いほどTritonX-100不溶性のビンキュリンを含む接着斑の数と大きさが増加した。このことからST2細胞においても、ビンキュリンはECMの硬さに応じて挙動を変えて硬さセンサーとして働いている可能性が示唆された。さらに、ビンキュリンの発現を抑制したST2細胞を作製し、ビンキュリンが脂肪細胞分化に与える影響を調べた。硬い培養基板であるプラスチック上で脂肪細胞へと分化誘導したところ、ビンキュリンの発現抑制細胞では脂肪細胞マーカーのmRNA、タンパク質発現量がともに増加しており、脂肪滴の形成も増加していた。このことからビンキュリンは硬いECM上では分化を抑制していることが明らかになった。最後に、ビンキュリンの発現抑制細胞を硬さの異なるゲル上で脂肪細胞へと分化誘導した。その結果、野生型のST2細胞では硬い培養基板上では、軟らかい培養基板上に比べて脂肪細胞マーカーのmRNA発現量が低く、ECMの硬さに応じた脂肪細胞分化が観察されたのに対し、ビンキュリンの発現抑制細胞では硬さに応じた変化が見られなかった。以上より、間葉系幹細胞であるST2細胞において、ビンキュリンはECMの硬さに応じて挙動を変え硬さセンサーとして働き、ECMが硬いときに脂肪細胞分化を抑制することで、ECMの硬さに依存した脂肪細胞分化にビンキュリンが関与していることが明らかになった。

* 8 小胞体関連分解における Trx2 の関与

○上野 豊¹、奥 公秀¹、寶関 淳^{1,2}、阪井康能^{1,2}
(¹京大院農・応用生命、²京大大学際融合・生理化学)

【背景・目的】小胞体におけるタンパク質品質管理において、特に小胞体関連分解において還元力としてはこれまでグルタチオンが重要と考えられてきた。しかし *S. cerevisiae* においては、グルタチオン合成に必須の遺伝子 *gsh1* を欠損させても鉄硫黄クラスター合成に必要な最小限のグルタチオンが培地中に存在すれば致死でないことが明らかとなり、小胞体においてグルタチオン以外の還元力を利用できる可能性が示唆された。本研究では、小胞体関連分解におけるグルタチオン非依存的なレドックス経路の同定を目的とし、その還元力としてサイトゾルの抗酸化タンパク質であるチオレドキシニンに着目した。

【方法・結果】まず *gsh1* に加え、サイトゾルのチオレドキシニンをコードする *trx1*、*trx2* を欠損させた株を作製した。これらの欠損株において、ミスフォールドタンパク質として変異型プロインシュリン (Ins(C96Y)) を小胞体内で誘導発現させ、グルタチオン制限条件下での生育を寒天培地へのスポットにより測定した。その結果、*gsh1Δ* 株や *gsh1Δtrx1Δ* 株と比べ、*gsh1Δtrx2Δ* 株の生育が Ins(C96Y) の発現に伴って阻害した。*gsh1Δtrx2Δ* 株に Trx1 や Trx2 を過剰発現させると生育阻害が回復したが、活性部位である CXXC モチーフを AXXA に置換した Trx2は生育阻害を回復させなかった。さらに、小胞体に蓄積した Ins(C96Y) のシクロヘキシミド・チェイスを行い、その分解を追跡したところ、*gsh1Δtrx2Δ* 株では Ins(C96Y) の分解遅延が見られた。また、Ins(C96Y) 発現時における細胞全体の還元型グルタチオン量を LC-MS を用い、サイトゾルのレドックス状態を roGFP 改変体により、それぞれ測定したところ、*gsh1Δ* 株と *gsh1Δtrx2Δ* 株間でグルタチオン量及びレドックス状態に有意差は見られなかった。以上の結果から小胞体関連分解において、Trx2 がグルタチオン非依存的に還元力として寄与することが示唆された。

* 9 ストレスセンサーWsc1によるメタノール酵母ペキシファジーの制御機構

○大澤 晋、由里本博也、奥 公秀、阪井康能
(京大院農・応用生命)

【背景】細胞は、飢餓、炭素源の変化やストレスなどに応答して、細胞内構造を再構築する。その際に、オルガネラの分解機構についてはオートファジー（自食作用）が重要な役割を担っている。ほぼ全ての真核細胞が持つ細胞小器官ペルオキシソームもオートファジーによって特異的に分解される（ペキシファジー）。メタノール酵母はメタノール培養によりペルオキシソームが大きく発達する。この細胞をエタノール培地に移すとペキシファジーが誘導される。このことは、メタノール酵母がメタノールとエタノールを明確に区別できることを示している。しかし、そのセンシングやシグナル伝達といった分子機構は明らかになっていない。

【方法・結果】酵母などの真菌類において細胞表層ストレスを感知する細胞膜1回貫通型センサーとしてWscファミリータンパク質が知られている。我々はこれまでに、メタノール酵母*Pichia pastoris* Wsc1がメタノール誘導性遺伝子発現の正の制御に重要であることを見いだしている。一方、ペキシファジーにおいては蛍光顕微鏡での観察や生化学的手法による解析により負に制御していることが明らかとなった。メタノール酵母においては、エタノール培地に移された際にリン酸化型Atg30が増加する。そして、このリン酸化が引き金となりペキシファジーが誘導されることが知られている。しかし、*Ppwsc1Δ*株ではメタノール濃度が低くなるメタノール培養後期において、そのリン酸化型が増加していた。これらの結果から、PpWsc1はメタノール培養時において誤ってペキシファジーが誘導されないようにAtg30のリン酸化を負に制御していることが示唆された。

微生物による 2'-O-メチルリボヌクレオシドの代謝に関する研究

*10

○光川侑輝¹、日比慎²、松谷成裕¹、堀之内伸行¹、高橋里美²、
小川 順¹

(¹京大院農・応用生命、²京大院農・産業微生物)

【目的】核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬に続く次世代の医薬品として期待されており、その合成原料には高いヌクレアーゼ耐性をもつリボース誘導体が利用されている。2'-O-メチルリボヌクレオシド (2'-OMe-リボヌクレオシド) は核酸医薬原料として有望なリボース誘導体であり、実用的な利用に向けた効率的合成法についての研究が盛んに進められている。本研究では、生物的合成法の開発に向けて 2'-OMe-リボヌクレオシド類を変換する酵素を持った微生物を探索し、その代謝の解析を試みた。

【方法・結果】2'-OMe-ウリジン (UR) 資化能を持つ土壌分離菌および研究室の保存菌約 1,000 株を、それぞれ 2'-OMe-リボヌクレオシド類を基質とする菌体反応に供した。

反応に供試した菌株の多くで 2'-OMe-UR の加水分解活性が認められた。研究室の保存菌株のうち、乳酸菌では *Lactobacillus buchneri* LBK78 が 2'-OMe-UR に対して加水分解活性のほかに糖転移活性も持つことが示された。また、*E. coli* JM-109 株が 2'-OMe-アデノシン (AR) を 2'-OMe-イノシン (IR) に、2'-OMe-シチジン (CR) を 2'-OMe-UR にそれぞれ変換する脱アミノ化活性を有することが示された。2'-OMe-UR 資化性菌においても、2'-OMe-UR に対して加水分解活性および糖転移活性を持つものが見出された。16S rDNA の塩基配列解析の結果から、これらは *Microbacterium* sp. および *Agromyces* sp. と同定された。特に *Agromyces* sp. は 2'-OMe-AR、2'-OMe-CR、2'-OMe-IR、2'-OMe-グアノシンに対しても強い加水分解活性を示した。また、2'-OMe-UR 資化性菌の中には、2'-OMe-UR の加水分解産物である 2'-OMe-リボースに対して分解活性を持つものも見出された。現在、これらの微生物が保有する酵素の同定、およびより詳細な代謝経路の解明に取り組んでいる。

*11 微生物を用いたイソキノリンアルカロイド stylophine 生産系の構築

○岡野峻祐、堀健太郎、佐藤文彦
(京大院生命・統合生命)

【目的】高等植物の産生する二次代謝産物は医薬品成分として重要である。一方、その分子構造の複雑さから工業的的化学合成は困難であり、供給の多くを植物体からの抽出に依存している。また、植物体からの抽出には栽培の困難さや、含量の少なさという問題点がある。従って、近年、生合成酵素遺伝子を用いた微生物による生産方法が検討されている。当研究室でもオウレン(*Coptis japonica*)のイソキノリンアルカロイド(IQA)生合成系をモデルに検討が行われ、単純な炭素源からIQA生合成の重要な中間体であるreticulineの生合成経路の再構築に成功している(Nakagawa et al. 2011)。本研究では、更なるIQA生合成マシナリーの拡大を目指して、reticulineより下流の重要な代謝中間体であるstylophine生産系の構築について検討した。

【方法・結果】まず、reticuline から stylophine への変換反応を担う 3 つの生合成酵素 berberine bridge enzyme(BBE)、CYP719A5、CYP719A2 を出芽酵母において発現したが、その活性は非常に小さいものであった。そこで強力な発現系であるピキア酵母を用いることにした。まず生合成酵素を個別にピキア酵母に導入し、活性を測定したところ、出芽酵母を上回る強い活性を認めた。引き続き、3 遺伝子の同時形質転換を試みたが、マルチコピーの同時導入は確認できなかった。そこで 1 遺伝子ずつ導入した菌体の共培養による多段階反応の再構築を検討した結果、50 μ M (S)-reticuline から stylophine が効率的に変換することを認めた。一方、pAO815 ベクターを用い、3 遺伝子を単一菌体中で同時に発現するベクターを構築するとともに、3 遺伝子の同時発現を試みた結果、1 遺伝子導入体の共培養よりも効率的に変換反応が完了することを認めた。現在、反応条件のさらなる検討により、stylophine 生産系の最適化を行っている。

今回作製したピキア酵母を用いた生産系は、特に P450 などの膜タンパク質の発現に優れ、多様な植物二次代謝産物の生合成に利用できると考えられる(Nakagawa et al. 2012)。

*12 *Sphingomonas* 属細菌 A1 株は高分子多糖アルギン酸に走化性を示す

○小林将大¹、丸山如江^{1,2}、村田幸作^{1,2}、橋本 渉¹
(¹京大院・農、^{現2}摂南大院・理工)

【背景と目的】グラム陰性*Sphingomonas*属細菌A1株（A1株）は、酸性多糖であるアルギン酸やペクチンを資化する。軟寒天培地上での継代培養により、極単べん毛を用いて運動するA1-M5株を分離した。A1-M5株は三種類のフラジェリン（極毛型, p5とp5'；側毛型, p6）を用いてべん毛線維を形成する。これは、側毛型フラジェリンによる極単べん毛の線維形成の最初の例である。これまでの研究で、側毛型フラジェリンp6が、極単べん毛による運動性の発現に重要であることが明らかになっている。極毛型フラジェリンp5にアルギン酸結合能が示されているが、A1株におけるべん毛形成の生理的意義については不明な点が多い。一般にグルコースやマルトースといった低分子の糖質や、各種アミノ酸ならびに有機酸といった低分子化合物に対する細菌の走化性（誘引あるいは忌避）はよく研究されている。しかし、多糖であるアルギン酸やペクチンに対して走化性を示す細菌は見出されていない。そこで、本研究ではA1-M5株の走化性について解析した。

【方法】プレート濃度勾配評価法に従って、炭素源を含まない走化性評価培地（寒天濃度0.25%（w/v））上に、評価物質を含む水溶液を少量添加し、拡散により濃度勾配を形成させた。なお、培地中のアルギン酸濃度勾配が形成・維持されていることは、塩化セチルピリジニウムを用いたアルギン酸染色により確かめた。

【結果と考察】A1-M5株細胞は、炭素源としてアルギン酸あるいはペクチンを含む最少培地のいずれにおいても良好に生育した。そこで、アルギン酸あるいはペクチン水溶液を添加した走化性評価培地に、A1-M5株細胞懸濁液を播種し、静置した。その後、培地上での細胞の性状を解析したところ、A1-M5株は運動性を発揮して、アルギン酸に近寄ることが分かった。しかし、ペクチンには走化性を示さなかった。アルギン酸最少培地で顕著な生育遅延を示すアルギン酸資化能変異株（AL-LM株）の走化性についても検討した。その結果、AL-LM株はアルギン酸ではなくペクチンに誘引された。A1-M5株とAL-LM株のべん毛形態（極単べん毛、太さ、長さ）や、べん毛線維におけるフラジェリン構成比に、顕著な差は見られなかった。このことから、両株による各多糖の資化性や認識能の相違が、走化性に影響していることが示唆された。

本研究により、A1-M5株がアルギン酸に、AL-LM株がペクチンに誘引されることを見出すことができた。これは細菌が高分子多糖アルギン酸およびペクチンに対して正の走化性（誘引）を示すことを、初めて明らかにしたものである。

13 γ -Glutamyl transpeptidase from *Pseudomonas syringae* with β -aspartyl transpeptidase activity

O Asep A. Prihanto¹, Yuki Nonomura¹, Kazuyoshi Takagi², Midori Umekawa¹, Mamoru Wakayama¹

(¹Dept of Biotechnology, Graduate School of Life science, Ritsumeikan University, ²Dept of applied chemistry, Graduate School of Life science, Ritsumeikan University)

[Purposes] The Objectives of this study were to explore, purify and characterize the γ -Glutamyltranspeptidases (GGT) from *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* 1448A.

[Methods and Results] The complete gene of γ -Glutamyltranspeptidase from *Pseudomonas syringae pv phaseolicola* 1448A was cloned and expressed in *Escherichia coli*. *P. syringae* GGT (PsGGT) was purified through four steps purification, resulting in 12.56 fold with a specific activity 1.04 U/mg. Two appeared protein bands indicated that this enzyme is a dimer with the molecular weight of large and small subunits are about 34 kDa and 22 kDa, respectively. PsGGT exhibited different optimum temperature and pH in regard of its hydrolysis and transfer activities. The optimum temperature and pH for hydrolysis were 8 and 37°C, respectively, while for transfer they were 9 and 50°C. The transfer activity, but not hydrolysis was slightly enhanced by Zn²⁺ and Cu²⁺. Meanwhile, DDT, EDTA and 2-ME had enhancement effect on both activities. The enzyme showed the activities on both hydrolysis and transfer toward asparagine. PsGGT demonstrated for the first time an interesting catalysis reaction with respect to its abilities on both GGT and β -aspartyl transpeptidase (EC 2.3.2.7).

特別講演 農芸化学奨励賞受賞講演

構造生物学を基盤とした糖質の認識・輸送・分解機構に関する研究

摂南大学理工学部 丸山如江

はじめに

柑橘類などの植物に由来するペクチン、藻類に含まれるアルギン酸やカラギナン、マメ科植物のグアガム、ローカストビーンガム、微生物が生産するキサンタン、カードラン、ジェランなどの多糖は、食品分野をはじめ、化学や医薬分野でも増粘安定剤（増粘剤、安定剤、ゲル化剤、糊料）として広く用いられている。このような糖質（多糖）の分解や修飾に関わる酵素やタンパク質の機能解析、ならびにそれらの生産と機能発現を許容する細胞、特に微生物システムの理解は、食品・化学・医薬分野への応用のみならず、基礎生物学的にも重要な課題である。

アルギン酸は β -D-マンヌロン酸とそのC-5 エピマーである α -L-グルロン酸から成る直鎖状の酸性多糖である。グラム陰性のスフィンゴモナス属細菌 A1 株（以下 A1 株）は、アルギン酸の認識・輸送・分解に関して極めて巧妙な分子機構を発達させている。その特徴は、まず、アルギン酸レセプターにより細胞外のアルギン酸を認識し、細胞表層の体腔と連動した輸送体を介してペリプラズムに取り込み、ペリプラズム局在基質結合タンパク質で捕捉した後に内膜局在の ABC トランスポーターによって細胞質に輸送し、最終的に、細胞質局在のエンド型およびエキソ型アルギン酸リアーゼによって単糖に分解し、資化することにある（図 1）。

この A1 株の示すアルギン酸資化の全容を解明するため、そこに関与するタンパク質や酵素を構造生物学に重点を置いて解析してきた。また、糖質関連酵素の構造生物学的解析にも取り組んできた。本講演では、特にアルギン酸の取り込み系を中心に、これまでに得られた知見について紹介する。

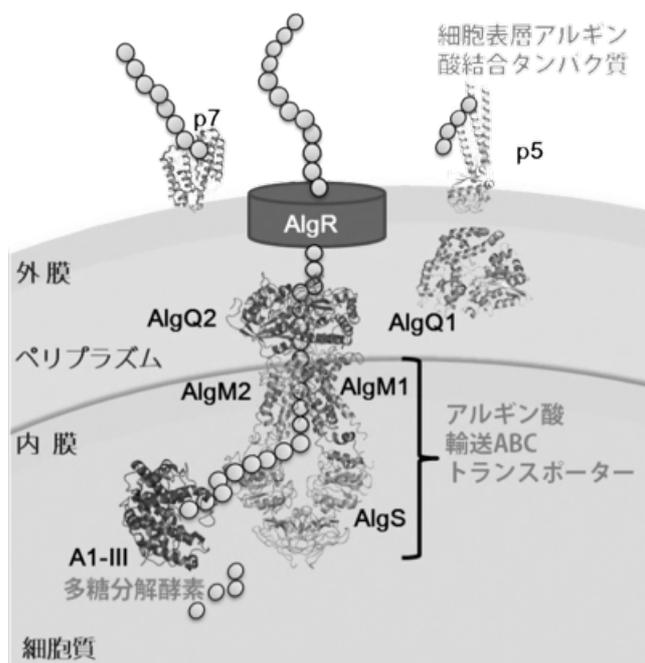


図 1: A1 株によるアルギン酸の取り込みと分解

1. 細胞表層局在アルギン酸認識タンパク質

A1 株の細胞表層でアルギン酸誘導的に発現するタンパク質のうち、アルギン酸に最も強い親和性 (K_d : $\sim 10^9$ M) を示すタンパク質 p5 は、細菌のべん毛繊維タンパク質であるフラジェリンのホモログであるにも拘らず、A1 株の細胞表層全体に存在する。本タンパク質の変異解析、X 線結晶構造解析、機能解析を行い、アルギン酸結合にはアミノ酸残基 21-41 と 363-373 の領域が重要であることを明らかにした。これらの領域は細菌フラジェリン間で高度に保存されており、べん毛繊維を構成する

場合、2つの α ヘリックスドメインを連結するループを形成する。しかし、繊維を形成しない p5 では2つのドメインをつなぐループ領域がなく、一続きの長い α ヘリックスを形成していた。

A1株の細胞表層タンパク質 p7 は、大腸菌の鉄取り込み系の構成分子と相同性を示す。ある種の金属イオンと結合する他、高分子アルギン酸特異的な結合活性 ($K_d: \sim 10^{-8}$ M) を持つ。決定した p7 の構造は、2つのアップダウンヘリックスバンドルから構成されており、分子表面には特徴的なイオンネットワークがみられた。

2. ペリプラズム局在アルギン酸結合タンパク質

外膜を通過したアルギン酸は、ペリプラズムの結合タンパク質 AlgQ1 もしくは AlgQ2 に捕捉される。アルギン酸は、その構成成分あるいは非還元末端の状態（不飽和、飽和）および鎖長により様々な分子形態をとる。AlgQ1 とアルギン酸オリゴ糖との共結晶構造解析により、AlgQ1 のサブサイト1にはアルギン酸の非還元末端が不飽和・飽和の区別なく結合するが、グルロン酸は結合しないこと、サブサイト2と3にはマンヌロン酸とグルロン酸が区別なく結合できること、およびその構造要因が明らかになった。アルギン酸結合に関わる構造要因は、AlgQ1 と AlgQ2 の間で保存されている。このような基質認識機構により、結合タンパク質はヘテロ多糖であるアルギン酸を認識し、輸送することができると考えられる。また、アルギン酸は、その生合成過程において、非還元末端にはグルロン酸を配置しないことから、AlgQ1 と AlgQ2 がアルギン酸生合成機構と連携した合理的な構造をとっていることがわかる。

3. 内膜局在 ABC トランスポーター

AlgQ1 もしくは AlgQ2 に捕捉されたアルギン酸は、内膜の ABC トランスポーターへと受け渡される。A1株のアルギン酸輸送 ABC トランスポーター (AlgM1M2SS: 内膜の AlgM1M2 ヘテロダイマーと細胞質の AlgSS ホモダイマーより構成される) は、AlgS の ATP 加水分解エネルギーを用いてアルギン酸を細胞質へと輸送する。大腸菌発現系を用いて発現させ、界面活性剤存在下で精製した AlgM1M2SS を AlgQ2 とアルギン酸オリゴ糖の存在下で結晶化し、3.2Å分解能で構造を決定した (図 2)。結晶中で、AlgQ2 はアルギン酸オリゴ糖を捕捉した状態で ABC トランスポーターと結合していた。AlgM1 と AlgM2 はどちらも6回膜貫通ヘリックスを持ち、ペリプラズム側 (AlgQ2 接触面) が閉じ、細胞質側 (AlgSS 接触面) に開いた状態 (inward-facing 構造) で2量体を形成していた。また、AlgSS ホモダイマーは、各モノマーの ATP 結合部位が離れた状態で、AlgM1M2 と結合していた。このような構造的特徴は、得られた結晶構造が基質を輸送する前の状態であることを示す。AlgQ2 は、AlgM1M2 と結合した状態でも外界から基質結合サイトへと続く長さ約 30Å (アルギン酸 8 糖相当) の AlgQ2 は、AlgM1M2 と結合した状態でも外界から基質結合サイトへと続く長さ約 30Å (アルギン酸 8 糖相当) のトンネル状の空洞を形成しており (図 2 中)、この構造が、高分子のアルギン酸をトランスポーターへと受け渡すために必須であると考えられた。実際に *in vitro* 測定系において、高分子アルギン酸と AlgQ1 もしくは AlgQ2 を加えると、リポソームに再構成した AlgM1M2SS の ATP 加水分解活性が上昇することを確認した。AlgM1M2 の内部には基質アルギン酸が通過するための空洞がみられた (図 2 右)。内腔の表面は、中性糖 (マルトース) 輸送 ABC ト

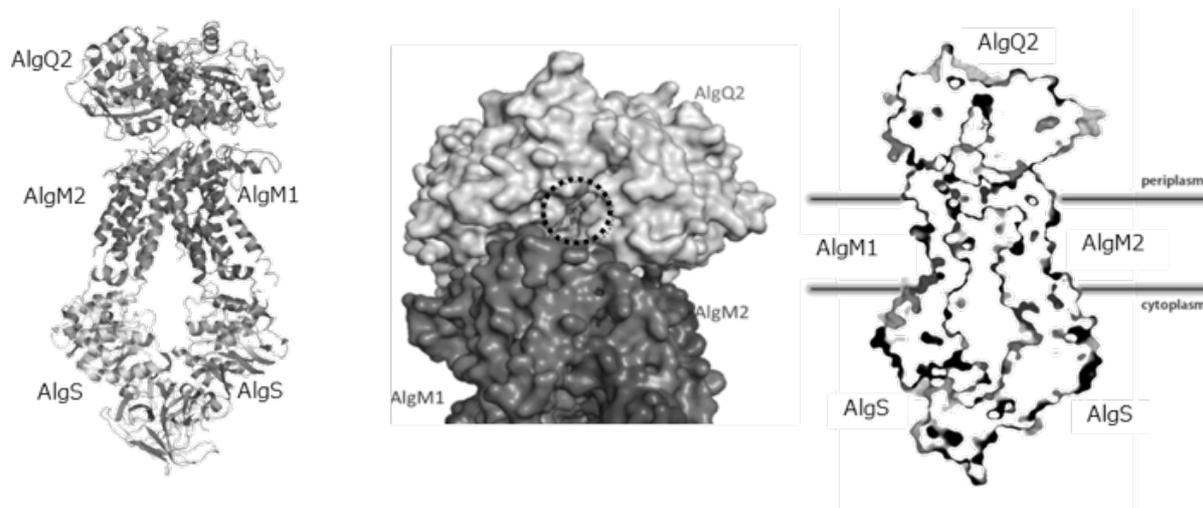


図 2 : アルギン酸輸送 ABC トランスポーター複合体の全体構造

ランスポーターとは異なり、酸性アミノ酸と塩基性アミノ酸が適度に配置されており、このような構造的特徴が、酸性糖であるアルギン酸の効率的な取り込みと排出を可能にしていると考えられる。一般的に、ABC トランスポーターは、結合タンパク質の結合・解離や ATP の加水分解に伴って構造が変化し、内腔の入り口（ペリプラズム側）と出口（細胞質側）が閉じたり開いたりすることにより基質を運搬する。A1 株のアルギン酸 ABC トランスポーターにおいて、この空洞の長さは約 27Å で、直鎖状のアルギン酸 6 糖分に相当する。したがって、多糖アルギン酸が AlgM1M2 の内腔を通過するためには、内腔の入り口と出口が共に開いた状態をとることが必要と考えられる。

おわりに

A1 株の高分子取り込み系の構造生物学を中心に研究を展開してきた。ABC トランスポーターは幅広い化合物を基質とすることが知られる一方で、その構造との関連の理解は限定的である。そのような状況下において、酸性多糖アルギン酸を基質とするトランスポーターの構造決定は、ABC トランスポーターの構造と機能の研究に大きく貢献すると思われる。ABC トランスポーターにより A1 株の細胞質に取り込まれたアルギン酸は、エキソ型およびエンド型アルギン酸リアーゼにより単糖にまで分解された後、代謝される。これまでに、アルギン酸リアーゼをはじめ、キサンタンリアーゼ（キサンタン側鎖を分解）、ラムノシダーゼ（ラムノース含有複合糖質を分解）、ポリガラクトuron酸リアーゼ（ペクチンを分解）などの多糖分解酵素の構造機能相関を明らかにしてきた。これらの知見は、多糖の性質を改変し、食品への応用用途を拡大するために有効と考えられる。また、近年、こうした多糖が食糧と競合しないバイオ燃料の原料として注目されるに伴い、これらの糖質の取り込み系、分解系の理解はますます重要となっている。

<お知らせ>

○第 488 回支部参与会は、12 : 00 より京都大学楽友会館（2 階会議・講演室）にて開催いたします。

○次回例会（489 回）予定

日時：平成 27 年 5 月 23 日（土）

会場：京都府立大学

講演申込締切：平成 27 年 4 月 17 日（金）

講演要旨締切：平成 27 年 4 月 24 日（金）

問い合わせ先：〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

京都府立大学生命環境科学研究科

森田重人

Tel: 075-703-5675

E-mail: s_morita@kpu.ac.jp

公益社団法人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 27 年 1 月 30 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/>