

日本農芸化学会関西支部会

第 492 回 講演会

講演要旨集

日時:平成 27 年 12 月 5 日(土)

会場:神戸大学大学院農学研究科

日本農芸化学会関西支部 賛助会員

支部活動には、以下団体からのご援助いただきました。
関係者一同より御礼申し上げます。

アース製薬株式会社

築野食品工業株式会社

植田製油株式会社

東洋紡株式会社

株式会社ウォーターエージェンシー

ナカライテスク株式会社

江崎グリコ株式会社

株式会社日本医化器械製作所

株式会社カネカ

日本新薬株式会社

菊正宗酒造株式会社

ヒガシマル醤油株式会社

黄桜株式会社

不二製油株式会社

月桂冠株式会社

松谷化学工業株式会社

甲陽ケミカル株式会社

三井化学アグロ株式会社

三栄源・エフ・エフ・アイ株式会社

株式会社三ツワフロンテック

サントリーホールディングス株式会社

安井器械株式会社

住友化学株式会社

大和酵素株式会社

株式会社第一化成

理研化学工業株式会社

大日本除虫菊株式会社

和研薬株式会社

宝酒造株式会社

和光純薬株式会社

プログラム

●開会の辞 (13:00 ~ 13:05) 白井康仁 (神戸大院・農、幹事校代表)

●一般講演 (13:05 ~ 16:21) [講演 10 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)

座長 金丸研吾 (神戸大院・農)

*1. (13:05 ~ 13:19)

ダイズ根粒菌の *phaR* 欠損変異は多面的な表現型変化を引き起こす

○西畑省吾¹、田中耕生²、竹中慎治¹、吉田健一¹
(¹神戸大院・農、²神戸大・自然科学系)

*2. (13:19 ~ 13:33)

乳酸菌とその菌体外多糖 (Extracellular polysaccharides: EPS) の免疫賦活性に関する研究

○岸本真奈、水野雅史、大澤 朗
(神戸大院・農)

*3. (13:33 ~ 13:47)

B 型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質由来 Virosome の創製及び DDS への応用

○劉 秋実^{1,2}、黒田俊一^{1,2}
(¹大阪大・産研、²名大院・生命農)

*4. (13:47 ~ 14:01)

植物における環状アミノ酸ピペコリン酸生合成の解析

○松田達也¹、三宅良磨²、川端 潤²、杉本幸裕¹、水谷正治¹
(¹神戸大院・農、²三菱化学科学技術センター)

休憩 14 分 (14:01 ~ 14:15)

座長 田中耕生 (神戸大・自然科学系)

5. (14:15 ~ 14:29)

バイオリファイナリー利用に向けた稲わらの

希硫酸前処理後グルコース含量の自然変異

○合田 喬¹、寺村 浩²、末廣美紀¹、金丸研吾³、川口秀夫²、
荻野千秋²、近藤昭彦²、山崎将紀¹
(¹神戸大院・農・附属食資源教育研究センター、
²神戸大院・工、³神戸大院・農)

*6. (14:29 ~ 14:43)

大腸菌における新規な CysB レギュロンの探索と
システイン発酵生産への応用

○鶴岡 愛、大津巖生、高木博史
(奈良先端大・バイオ)

*7. (14:43 ~ 14:57)

ターミネーターが麹菌での導入遺伝子発現に及ぼす影響

○横河由樹子、山崎将太郎、出村 拓、加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)

8. (14: 57 ~ 15: 11)

チロシンリン酸化がジアシルグリセロールキナーゼ α のドメイン間相互作用及び高次構造に与える影響

○脇阪昌明¹、岩下智秋¹、濱田大三^{2,3}、祇園景子³、上田修司¹、
山之上稔¹、鶴田宏樹³、白井康仁¹
(¹神戸大院・農、²神戸大院・工、³神戸大・連携創造本部)

休憩 14 分 (15: 11 ~ 15: 25)

座長 水谷正治 (神戸大院・農)

*9. (15: 25 ~ 15: 39)

膵 β 細胞量におよぼす胎児期および性成熟期の男性ホルモンの影響

○與田安紘¹、甲木孝弘¹、原田直樹¹、乾 博²、山地亮一¹
(¹大阪府大院・生命環境、²大阪府大院・栄養)

*10. (15: 39 ~ 15: 53)

Heliolactone の合成研究

○新子大樹、久世雅樹、滝川浩郷
(神戸大院・農)

11. (15: 53 ~ 16: 07)

フタルアルデヒド誘導体を用いたローダミン合成とその性質

○岡本允志、橋床泰之、橋本 誠
(北大院・農)

*12. (16: 07 ~ 16: 21)

神経系におけるジアシルグリセロールキナーゼ γ の機能解析

○津曲涼介¹、菊永佐紀子¹、藤原祥高²、上田修司¹、山之上稔¹、
伊川正人²、白井康仁¹
(¹神戸大院・農、²大阪大・微研・感染動物実験施設)

休憩 14 分 (16: 21 ~ 16: 35)

● 特別講演 農芸化学奨励賞受賞講演

(16: 35 ~ 17: 20)

座長 白井康仁 (神戸大院・農)

光合成 CO_2 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究

○蘆田弘樹 (神戸大院・人間発達環境)

● 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)

安達修二 (京都大院・農、日本農芸化学会関西支部長)

● 懇親会

(17: 50 ~ 20: 00) 会場：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 / 学生無料

*01. ダイズ根粒菌の *phaR* 欠損変異は多面的な表現型変化を引き起こす

○西畑省吾¹、田中耕生²、竹中慎治¹、吉田健一¹

(¹ 神戸大院・農、² 神戸大・自然)

【目的】 ポリヒドロキシ酪酸 (PHB: poly-3-hydroxybutyrate) は多様な微生物の細胞内にエネルギー貯蔵物質として蓄積することが知られており、生分解性プラスチックの原料としても有用性がある。我々はダイズ根粒菌 *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 が C/N 比が高い培地で PHB を顕著に蓄積することに着目し、PHB 蓄積には細胞内 PHB 顆粒を安定化するファージン PhaP が重要な役割を果たすことを見出した。また、PHB 非蓄積時には PhaR が *phaP* の発現を抑制しているとされている。本研究では USDA110 の *phaR* 欠損変異株を作製して PhaR による *phaP* 発現制御を解析した。また、*phaR* 欠損変異株における表現型の変化について検討した。

【方法】 *B. japonicum* USDA110 の *phaR* 欠損変異株を作製し、YEM 培地 (PHB 蓄積培地) と TY 培地 (非 PHB 蓄積培地) で培養し全 RNA を抽出した。そして、4 種の *phaP* 遺伝子群ならびに PHB の合成・分解に関わる遺伝子群の転写量を定量 RT-PCR 法によって比較した。また、*phaR* 欠損変異株、そして PHB 安定化に最も重要な役割を果たすことが示唆される *phaP4* を破壊した変異株において、PHB 蓄積量、細胞増殖、エキソポリサッカライド (EPS) 分泌量、また熱ストレス耐性を比較検討した。

【結果】 TY 培地 (非 PHB 蓄積培地) での培養時には、*phaR* 欠損変異株で *phaP1*, *phaP4* の転写量が著しく増加した。従って、PhaR は実際に *phaP1* と *phaP4* の転写を抑制していることが確認された。また、PHB の合成と分解に関わる遺伝子群については *phbZ1* のみで転写量が増加した。YEM 培地 (PHB 蓄積培地) で培養した際、*phaP4* 欠損変異株での PHB の蓄積量は親株の半分以下となり、PhaP4 が PHB 顆粒安定化に重要な機能を果たすことが再度確認された。*phaR* 欠損変異株の場合も、PHB 蓄積量が大幅に減少したが、親株や *phaP4* 欠損変異株に比して細胞増殖が減退すると共に EPS 分泌量が約 2 倍となった。さらに、他の微生物の PHB 非蓄積株においては熱ストレス耐性が低下するという報告に反して、USDA110 の *phaR* 欠損変異株の場合には熱ストレス耐性が向上していた。以上より、*B. japonicum* USDA110 において *phaR* 欠損は PHB 蓄積の減少のみならず多面的な表現型変化を引き起こすことが示され、従って PhaR が様々な細胞機能の制御に関与する可能性が強く示唆された。

*02. 乳酸菌とその菌体外多糖 (Extracellular polysaccharides: EPS) の免疫賦活性に関する研究

○岸本真奈、水野雅史、大澤 朗
(神戸大院・農)

【目的】 乳酸菌の機能性は広く研究されており、多くの乳酸菌株で整腸作用や免疫賦活作用が報告されている。近年では、乳酸菌が産生する物質についても注目が集まっており、特に、乳酸菌が産生する菌体外多糖 (EPS) の構造・機能性に関する報告は多数なされている。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、さらに、その免疫学的効果が菌体そのものによるものか、あるいは菌体が産生する菌体外多糖によるものかは知られておらず、その作用機序は不明な点が多い。そこで、腸管共培養モデルを用いて、食品由来乳酸菌の死菌体、および EPS の腸管細胞を介した間接的な宿主の免疫システムへの影響の差異を検証し、その作用機序について新たな知見を得ることを目的とした。

【方法】 当研究室でヨーグルトから *L. delbrueckii* TU-1 株、漬物から *L. plantarum* KM-9 株を分離した。エタノール沈殿等をへた EPS の精製、紫外線処理による死菌体の精製を行った。ヒト小腸上皮様 Caco-2 細胞をトランズウェル膜の管腔側に、マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を基底膜側に配した腸管共培養モデルで、死菌体と粗精製 EPS を管腔側に処理した。サンプル処理 6 時間後に基底膜側の上清を回収し、TNF- α 産生量を Killing Assay 法および目的遺伝子の発現量を Real time PCR 法により測定した。

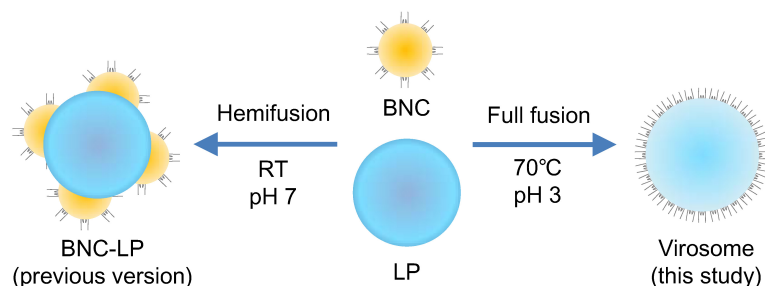
【結果と考察】 免疫賦活性試験においては、同じ菌株であっても、死菌体と EPS による刺激で応答するサイトカインの発現は異なり、死菌体よりも EPS の方が高い免疫賦活性を示した。これより、EPS の糖構成の違いが免疫賦活性に関与するのではないかと考え、HPLC による EPS の単糖構成解析を行った。その結果、TU-1 株・KM-9 株が産生する EPS はともに、Glucose と Galactose からなることが示されたが、構成糖のモル比は多少異なっており、繰り返し単位が異なる EPS であることが示唆された。現在、さらなるシグナル伝達のメカニズム解明として、EPS を認識する受容体の解明を行っている。

*03. B 型肝炎ウイルス外皮 L タンパク質由来 Virosome の創製 及び DDS への応用

○劉 秋実^{1,2}、黒田俊一^{1,2}
(¹大阪大・産研, ²名大院・生命農)

【目的】 バイオナノカプセル (BNC) は、B 型肝炎ウイルス (HBV) のヒト肝臓特異的感染機構を担う外皮 L タンパク質からなる中空ナノカプセルである。BNC は L タンパク質の膜融合ドメインによりリポソーム (LP) と融合し、従来型 LP 製剤に HBV 由来感染機構を付与できる。しかし、BNC-LP 複合体の構造は不定形で、体内及び細胞内動態にとって不都合であった。本研究では、BNC-LP 複合体製造法を改良し、抗がん剤ドキソルビシン (DOX) を封入し、そのがん治療効果を評価した。

【方法】 BNC-LP 複合体の形成条件を最適化し、CsCl 超遠心法で同複合体を回収した後、電子顕微鏡観察した。次に、同複合体のメンブレントポロジーをプロテアーゼ消化により解析した。さらに、DOX を封入し、ヒト肝がん細胞に対する細胞毒性や、同細胞移植マウスに対するがん治療効果及び DOX 由来の心臓毒性を評価した。



【結果】 BNC-LP 複合体形成には 70 °C、pH 3、60 分の条件が適しており、得られた複合体は従来と異なり、LP のような滑らかな球状を有していた。また、本複合体は BNC の L タンパク質がメンブレントポロジーを保って LP 上に再構成されており、HBV 表面構造を再現していると示唆された。そして、本複合体は DOX を効率よくかつ安定に包含でき、ヒト肝がん細胞に対して強い細胞毒性を示し、担がんマウスにおいて DOX 由来の心臓毒性を示さず、低薬量でも強いがん治療効果を示し、その効果は放射線照射により増強された。

1) Liu Q (劉 秋実) , et al., *Int. J. Nanomed.*, **10**, 4159-4172, (2015).

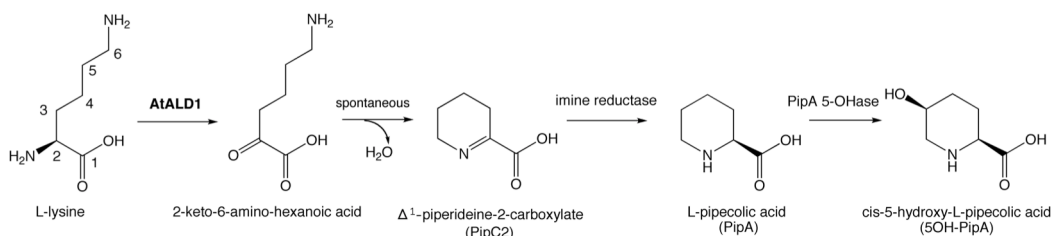
*04. 植物における環状アミノ酸ピペコリン酸生合成の解析

○松田達也¹、三宅良磨²、川端 潤²、杉本幸裕¹、水谷正治¹

(¹神戸大院・農、²三菱化学科学技術センター)

【目的】 水酸化された環状アミノ酸は医薬品合成中間体となる有用化合物であり、クワやハマエンドウなどいくつかの植物種にはリジン由来の環状アミノ酸であるピペコリン酸 (PipA) の5位が水酸化された5-ヒドロキシピペコリン酸 (5-OH-PipA)が豊富に蓄積している。しかし、植物における PipA および 5-OH-PipA の生合成に関わる酵素はほとんど明らかになっていない。シロイヌナズナの *agd2-like defense response protein1* (*ald1*) 変異株では内生 PipA の欠損により病原菌抵抗性が低下し、アミノ基転移酵素をコードする *ALD1* は PipA 生合成に関わることが示唆されたが、その酵素活性は明らかとなっていない¹⁾。植物における PipA 生合成経路では、L-Lys が脱アミノ化および閉環して中間体である Δ^1 -piperidine-2-carboxylate (PipC2) となり、続いてイミン還元酵素によって PipA へ変換され、さらに5位が水酸化されて 5-OH-PipA へ変換されると推定されている (図)。

そこで PipA 水酸化酵素を探索するにあたって、まず PipA 生合成の解析を行なった。本研究では、シロイヌナズナから *ALD1* をクローニングし、組換え酵素の機能解析を行い、また、クワおよびハマエンドウにおいても *ALD1* ホモログの機能解析を行った。



【方法・結果】 シロイヌナズナ *ALD1* (*AtALD1*) の配列情報を利用して *AtALD1* cDNA を単離した。大腸菌発現用ベクター pCold に *AtALD1* を挿入し、大腸菌 BLR 株を用いて組換え酵素の発現を行った。得られた組換え酵素を用いて L-Lys を基質に *in vitro* アッセイを行った。PipC2 の検出が困難なため、さらに、大腸菌発現系で発現させた *Pseudomonas putida* 由来の PipC2 還元酵素 (*dpkA*)²⁾を *ALD1* 酵素反応溶液に加えた *ALD1*-*dpkA* カップリングアッセイの結果、PipA を検出した。これにより *AtALD1* が L-Lys を PipC2 に変換する活性を確認した。またクワ *ALD1* ホモログ (*MaALD1*)でも同様の活性を確認した。ハマエンドウは引き続きクローニングを試みる予定である。

1) Navarova et al., Plant Cell 24: 5123 (2012).

2) Muramatsu et al., JBC 280: 5329 (2005).

05. バイオリファイナリー利用に向けた稲わらの 希硫酸前処理後グルコース含量の自然変異

○合田 喬¹、寺村 浩²、末廣美紀¹、金丸研吾³、川口秀夫²、荻野千秋²、
近藤昭彦²、山崎将紀¹

(¹ 神戸大院・農・附属食資源教育研究センター、² 神戸大院・工、³ 神戸大院・農)

【目的】 循環型社会の実現に向け、再生可能資源からバイオ燃料などを生産する技術はバイオリファイナリーと呼ばれる。日本ではイネ (*Oryza sativa*) から生じる未活用な資源である稲わらからのバイオエタノール生産が有力な手段の一つとされている。稲わらに含まれるデンプン等をグルコースに分解し発酵を行うことで、バイオエタノールが得られる。効率的な糖化・発酵にはリグノセルロースを分解する前処理が必須であり、前処理後の糖濃度がバイオエタノールの収量に大きく関わるため¹⁾、前処理後の糖収量が多い品種の選定が不可欠である。

ゆえに本研究では、多種多様なイネ品種のわらを材料として、希硫酸前処理後におけるグルコース含量について環境変動を考慮するために2カ年測定し、バイオリファイナリーに適した品種の探索と評価を行うことを目的とした。

【方法】 神戸大食資源教育研究センター内研究圃場(兵庫県加西市)で2013年と2014年に栽培されたイネ209品種・系統を用いた。また、同センター内の気象データも収集した。収穫した稲わらを粉砕し、希硫酸を加えて前処理を行った後に液体画分と固体画分を分離し、グルコース濃度の測定を行った。

【結果】 209品種から得られたグルコース量はイネ品種間で大きく異なることが確認され(2013年: 0.538~13.27 g/L、平均 4.93 g/L; 2014年: 0.79~17.17 g/L、平均 5.38 g/L)、バイオエタノール生産のために適切な品種を選択することの重要性が改めて示された。また、2013年と2014年の結果を比較すると、グルコース収量は環境の影響を受けやすい形質であることが明らかになった。しかし、両年ともに高いグルコース収量を示す有望な品種も存在していた。現存する品種と今後のイネ育種により、食料生産とバイオリファイナリー利用の両立は可能と考えられる。

1) Matsuda F., et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1603-1605, (2011).

*06. 大腸菌における新規な CysB レギュロンの探索と システイン発酵生産への応用

○鶴岡 愛、大津厳生、高木博史
(奈良先端大・バイオ)

【目的】 私達は、大腸菌を用いた低コスト・高収量なL-システイン (Cys) の発酵生産を目的として、大腸菌の硫黄代謝を完全に理解することを目指している。

大腸菌のCys生合成経路は、まずL-セリン (Ser) とアセチルCoAからセリンアセチルトランスフェラーゼ (CysE) によりO-アセチルセリン (OAS) が合成される。次のOASからCysへの合成には、Cys合成酵素 (CysK) によりOASと硫酸イオン由来の硫化物イオンから合成する「硫酸経路」と、スルホシステイン(SSC)合成酵素 (CysM) によりOASとチオ硫酸イオンから生じるSSCを経由する「チオ硫酸経路」の2つが存在する¹⁾。最近私達は、大腸菌において無機性硫黄源の選択的利用機構 (チオ硫酸リプレッション: TSR) が存在することを見出した。現在、TSRは硫酸同化経路を制御する転写因子CysBを介して硫酸経路によるCys合成を抑制する機構を提唱しており、TSRの解除がCys発酵生産の向上に繋がると考えている。そこで本研究では、CysBに制御される遺伝子 (CysBレギュロン) を新規に探索し、TSRとの関連性を解析するとともに、Cys発酵生産への効果を検証した。

【方法・結果】 配列検索ソフト「MEME」を用いて、新規な CysB レギュロンをゲノムワイドに探索した。その結果、機能未知の遺伝子である *yciW*^{2),3)} と RNA 5'ピロホスホヒドロラーゼをコードする *rppH* の上流に高度に保存された CysB 結合配列を見出した。また、両遺伝子が CysB レギュロンとして機能しているかを調べるため、ルシフェラーゼ発現プラスミド pLux に各遺伝子上流 300bp をクローニングし、プロモーター活性を測定した。その結果、*yciW* は TSR 条件下で活性が抑制されていたのに対し、*rppH* は構成的な発現を示したことから、TSR には CysB 依存的な硫酸同化経路の抑制以外の機構が存在する可能性が考えられた。以上の知見を Cys 発酵生産に応用したところ、両遺伝子の破壊株 ($\Delta yciW \Delta rppH$ 株) は野生型株の 2 倍以上の Cys を生産した。

1) Kredich NM, *Microbiol.*, **6**(19), 2747-2753, (1992).

2) Kawano Y *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**(2), 176-179, (2015).

3) Kawano Y *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.*, **119**(3), 310-313, (2015).

*07. ターミネーターが麴菌での導入遺伝子発現に及ぼす影響

○横河由樹子、山崎将太郎、出村 拓、加藤 晃
(奈良先端大・バイオ)

【目的】 麴菌は高いタンパク質生産能を持っており、遺伝子導入による有用タンパク質の大量生産にその活用が期待されている。一般的に遺伝子を細胞内で発現させるためには、プロモーター/遺伝子/ターミネーターよりなる発現カセットの構築が必要である。この中でターミネーターは転写終結および polyA 付加という mRNA の成熟化に関わっており、3'UTR として残る領域は mRNA の安定性に関与する。実際に、植物や酵母において、ターミネーターを最適化することで導入遺伝子の発現が従来の約 2 倍に上昇したという報告がある^{1,2}。しかし麴菌においては、植物や酵母のようなターミネーターに関する知見はほとんどない。そこで本研究では、麴菌内で高蓄積している mRNA について、そのターミネーター領域（3'UTR を含む）が遺伝子発現に及ぼす影響を評価することを目的とした。

【方法】 麴菌を培養中期である 24 時間と培養後期である 72 時間培養し、それぞれの細胞内の蓄積 mRNA 量を RNA-seq によって解析した。次に、培養中期と培養後期のどちらにおいても高蓄積している mRNA をランキングし、上位 10 位に位置する遺伝子のターミネーター領域を既知のプロモーターおよびレポーター遺伝子と連結した発現ベクターの構築を行った。最後に、相同組み換えによって麴菌形質転換体を作成し、レポーター遺伝子の発現量を指標として性能評価を行った。

【結果】 ターミネーター領域の違いが確かにレポーター遺伝子の発現量に影響することが明らかとなった。今後、レポーター遺伝子の発現量変化が蓄積 mRNA 量によるものなのか、あるいは mRNA の安定性によるものなのかを転写阻害剤等を用いて調べる予定である。

(1) Nagaya, S. et al. *Plant Cell Physiol.* (2010) 51:328-32

(2) Yamanishi, M. et al. *ACS Synth. Biol.* (2013) 2:337-47

08. チロシンリン酸化がジアシルグリセロールキナーゼ α の ドメイン間相互作用及び高次構造に与える影響

○脇阪昌明¹、岩下智秋¹、濱田大三^{2,3}、祇園景子³、上田修司¹、山之上稔¹、
鶴田宏樹³、白井康仁¹
(¹神戸大院・農、²神戸大院・工、³神戸大・連携創造本部)

【目的】 ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロールをホスファチジン酸に変換することから、生体内で重要な役割を持つと考えられている。また、その機能発現には局在変化が重要であると考えられている。例えば DGK α は、血清の有無により核-細胞質間をシャトリングし、核外移行には 218 番目のチロシン (Y218) のリン酸化が重要であることが知られている。また、先行研究より、DGK α の C1 ドメインと N 末端ドメイン RVH/EF との相互作用が DGK α の局在変化に重要であると推測されている。しかし、実際のドメイン間の相互作用及びドメイン間相互作用に対するリン酸化の影響は不明である。そこで本研究では、DGK α の高次構造変化とリン酸化との関係を明らかにすることを目的に、DGK α のドメイン間相互作用に対するリン酸化の影響を調べた。

【方法】 C1 ドメインと RVH/EF との相互作用について調べるため、細胞内の局在変化及び免疫沈降法により評価した。また、リン酸化状態を模倣した Y218E 変異体と脱リン酸化状態を模倣した Y218F 変異体を用いて同様の実験を行った。さらに、C1 ドメインのリン酸化状態が DGK α の構造変化に及ぼす影響について調べるため、レギュラトリックドメイン (RD) の Y218E 及び Y218F 変異体の CD スペクトルを測定した。

【結果】 C1 ドメインと RVH/EF は相互作用していることが明らかになり、変異体を用いた実験では、Y218F 変異体に比べ Y218E 変異体の方が強く C1 ドメインと RVH/EF が結合することが示唆された。また、CD スペクトル測定の結果、変異体間で、2 次構造レベルでは大きな違いは見られなかったが、3 次構造レベルで違いが見られたことから、DGK α の RD は C1 ドメインのリン酸化状態によって高次構造を変化させることが示された。以上のことから、DGK α の Y218 のリン酸化により高次構造変化がおこり、その結果ドメイン間相互作用が変化すること示唆された。

*09. 膵 β 細胞量におよぼす胎児期および性成熟期の男性ホルモンの影響

○與田安紘¹、甲木孝弘¹、原田直樹¹、乾 博²、山地亮一¹

(¹大阪府大院・生命環境、²大阪府大院・栄養)

【目的】 膵臓 β 細胞はインスリンを分泌する唯一の細胞であり、 β 細胞量の不足は2型糖尿病発症の要因となる。雄では、男性ホルモン（アンドロゲン）であるテストステロンの血中レベルが、性成熟期に加えて胎児期で一過的に上昇する。我々は、胎生19.5日目の雄性 Wistar ラットの β 細胞前駆細胞にアンドロゲン受容体（AR）が発現し、この時期にARのアンタゴニストであるフルタミドを母ラットに投与すると、出生時において雄特異的に β 細胞量が減少することを見出している。本研究では、①胎児期のテストステロンが成長後の β 細胞量へおよぼす影響と②性成熟期のテストステロンが β 細胞量におよぼす影響について検討を行なった。

【方法】 胎児期のテストステロンの影響を調べるため、母ラットにフルタミド（50 mg/kg）を妊娠16.5日目から出生まで毎日経口投与し、出生した雄仔ラットを6週齢および12週齢まで飼育した。また、性成熟期のテストステロンの影響を調べるため、6週齢で去勢を行ない7週齢からテストステロン誘導体を短期間（10日間）または長期間（9週間）投与した。両実験とも、解剖後に膵臓の解析を行なった。

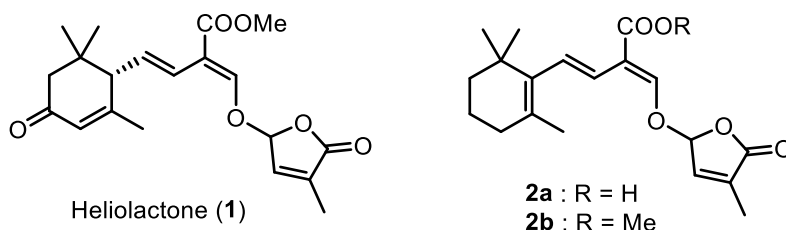
【結果】 膵臓の切片を作製して β 細胞マーカーであるインスリンの免疫染色を行った結果、胎児期にフルタミドを暴露された雄ラットでは、6 週齢および 12 週齢時の β 細胞量がコントロール群に比べそれぞれ約 65%および約 45%まで減少した。 β 細胞量の減少は、膵島の個数と β 細胞塊の大きさの両方が減少することに起因することが判明した。また、性成熟期に去勢すると、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性の β 細胞が有意に減少し、テストステロン誘導体の投与によりコントロール群と同程度まで回復した（短期試験）。長期試験では、去勢により β 細胞量がコントロール群に比べ約 30%まで減少し、テストステロン誘導体の投与により β 細胞量がコントロール群と同程度まで回復した。膵臓当たりの膵島の数や β 細胞塊の大きさは、去勢により有意に減少し、テストステロン誘導体の投与によりコントロール群と同程度まで回復した。本研究より、胎児期と性成熟期におけるテストステロンレベルの減少は β 細胞量を減少させるため、2 型糖尿病のリスクファクターとなることが示唆された。

*10. Helisolactone の合成研究

○新子大樹、久世雅樹、滝川浩郷

(神戸大院・農)

【目的】 Helisolactone (**1**) はヒマワリの根の滲出液から単離された新種のストリゴラクトンである¹⁾。ストリゴラクトン類の生合成の過程では、化合物 **2a** のような中間体が存在していると考えられており、helisolactone がこの仮想中間体と酷似している点は非常に興味深い。Helisolactone や生合成中間体を化学的に合成し、サンプル提供を行うことで、ストリゴラクトン類の研究に新展開がもたらされることが期待される。我々は helisolactone、及び、構造類縁化合物の化学合成に取り組んでいる。



【方法・結果】 Helisolactone の合成研究を進める中で、合成の終盤でのホルミル化が困難であることがわかった。そこで、後のホルミル化を省略できるような合成計画で helisolactone の合成を進めることとした。まず、生合成の中間体でもある化合物 **2b** をモデル化合物とし、その合成を行った。

市販の 2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexene-1-acetaldehyde にマロン酸ジメチルを縮合させ、ジエステルを得た後、DIBAL 還元、ブロモラクトンとのカップリングを行うことで、望みの構造を有するモデル化合物 **2b** の合成に成功した。現在、Helisolactone の合成を検討中である。

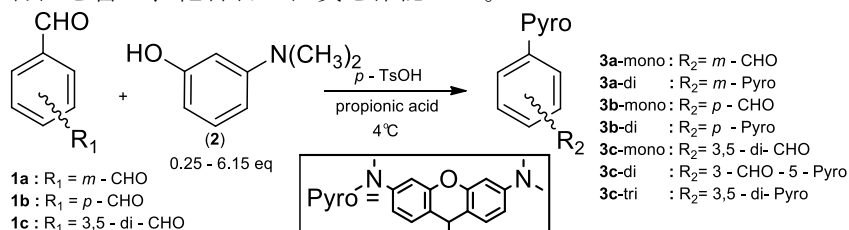
1) Ueno K, Furumoto T, Umeda S, Mizutani M, Takikawa, H, Batchvarova R, Sugimoto Y., *Phytochemistry*, **2014**, *108*, 122-128.

11. フタルアルデヒド誘導体を用いたローダミン合成とその性質

○岡本允志、橋床泰之、橋本 誠
(北大院農)

【目的】 ローダミンは細胞組織やタンパクの標識に利用される蛍光試薬の一種であり、pH 依存性が低く、光安定性が高いなどの性質を持つことが知られている。このローダミンの合成方法は複数報告されている¹⁾が、ベンズアルデヒド誘導体 (1) と 3-ジメチルアミノフェノール (2) を利用することで、穏和な条件下でもベンズアルデヒド部位に位置選択的に反応が進行することが知られる。本実験では、ローダミン合成後の修飾簡易化を図るため、フタルアルデヒド誘導体を用いることで、未反応のアルデヒド基を持つローダミン誘導体 (3a-mono, 3b-mono, 3c-mono, 3c-di) の合成を検討した。

【方法】 酸触媒 (*p*-トシル酸) 存在下でプロピオン酸溶媒中、(1) と (2) を 4 °C にて反応させた (Scheme 1)。(2) はアルデヒド基 1 つにつき 2.05 等量にて十分反応が進行したため、フタルアルデヒド (1a, b) では 4.10 等量、(1c) では 6.15 等量にて反応させた。続いて、(3a-mono, 3b-mono, 3c-mono, 3c-di) の合成を目指すため、(1a ~ c) に対して (2) の等量を上記より減らした状態で反応を進行させ、残った原料 (1a ~ c) と生成物 (3a-mono, di), (3b-mono, di), (3c-mono, di, tri) の生成比から最適な反応条件を検討した。(1a, b) を用いた場合は 0.25 ~ 2.05 等量、(1c) を用いた場合は 1.00 ~ 5.00 等量を検討した。反応系における (1a ~ c) と (3a-mono, di), (3b-mono, di), (3c-mono, di, tri) の生成比の推定は、反応系から得られた粗生成物の ¹H-NMR におけるシグナル積算値の比により算出した。さらに本実験により得られた化合物は報告の無い化合物であったため、光学特性を含め、化合物の性質を確認した。



Scheme 1. 各種ローダミン誘導体合成

【結果】 (1a, b) を用いて 1 分子中に 2 つのピロニル基を持つ (3a, b-di) の形成を検討した結果、(2) が 4.10 等量の時に 82%、86%の収率でそれぞれ得られた。同様に (1c) では (2) が 6.15 等量の時に (3c-tri) が 60%の収率で得られた。さらに (1a, b) において (2) の試薬等量を検討した結果、0.50 等量以下では (3a,b-mono) のみが生成された。1.00~2.05 等量では(3a-mono, di)、(3b-mono, di)の混合物が確認された。また、(2) が 2.05 等量の際に原料 (1a, b) の消費が確認できた。この時、単離収率は (3a-mono) で 72%、(3b-mono) で 70%となり、試行した反応条件の中で最大となった。未反応のアルデヒド基を持つ (3a, b-mono) の光学特性は、最大励起、放出波長共に既知のローダミン誘導体と類似の性質を示すことが確認できた。(1c) を用いた (3c-mono, di) の合成については現在検討中である。

1) Brandon D.Calitree, Michael R.Detty, *SYSNLETT*, **21** (1) 89-93, (2010).

*12. 神経系におけるジアシルグリセロールキナーゼ γ の機能解析

○津曲涼介¹、菊永佐紀子¹、藤原祥高²、上田修司¹、山之上稔¹、

伊川正人²、白井康仁¹

(¹ 神戸大院・農、² 大阪大・微研・感染動物実験施設)

【目的】 ジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) はジアシルグリセロール (DG) をホスファチジン酸 (PA) に変換する酵素であり、これまでに 10 種類のサブタイプが報告されている。そのうち DGK γ は神経系、特に小脳プルキンエ細胞に多く発現していることが知られている。DG によって活性化されるプロテインキナーゼ C (PKC) のうち、PKC γ もまた小脳プルキンエ細胞に多く発現しており、小脳の協調運動に関与している。この PKC γ と DGK γ は直接相互作用し、PKC γ は DGK γ をリン酸化して活性化させることが知られており、DGK γ も協調運動への関与が期待されるが、その機能については未だ明らかとなっていない。そこで、本研究では神経系における DGK γ の機能の解明を目的に以下の研究を行った。

【方法】 まず、DGK γ KO マウスを作製し、協調運動を測定する行動試験として rotarod 試験を行った。続いて、免疫組織染色により、小脳プルキンエ細胞の形態を観察した。最後に Neuro-2A 細胞に DGK γ を過剰発現させ、その形態変化を観察した。

【結果】 作製した DGK γ KO マウスの脳において DGK γ が KO されていることを確認し、rotarod 試験を行ったところ、DGK γ KO マウスは WT マウスと比較して落下するまでの時間が短く、協調運動に障害を受けていることが示唆された。次に、小脳プルキンエ細胞の形態を観察したところ、一見してその形態に変化は見られなかったが、細胞体の配列に少しばらつきがみられた。最後に Neuro-2A 細胞に DGK γ を過剰発現させると、神経突起の数と枝分かれの数が増加した。以上のことから DGK γ は神経細胞の形態を制御することで小脳協調運動に寄与していることが示唆された。

特別講演

農芸化学奨励賞受賞講演

光合成 CO_2 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究

蘆田弘樹

(神戸大院・人間発達環境)

光合成 CO₂ 固定酵素 RuBisCO の機能進化研究

○蘆田弘樹

(神戸大院・人間発達環境)

【目的】 光合成カルビンサイクルの初発において、リブローズビスリン酸に CO₂ を固定し、ホスホグリセリン酸を生成するカルボキシラーゼ反応を触媒する酵素が、リブローズビスリン酸カルボキシラーゼ／オキシゲナーゼ (RuBisCO) である。RuBisCO は光合成鍵酵素であるが、O₂ を CO₂ と誤認識し、同一触媒部位において、リブローズビスリン酸に対して、O₂ を結合するオキシゲナーゼ反応も触媒する。オキシゲナーゼ反応はカルボキシラーゼ反応を拮抗的に阻害するため、高濃度 O₂ を含む現大気下では、RuBisCO の CO₂ 固定能を大きく抑制する原因となっている。このような RuBisCO の非効率な CO₂ 固定酵素としての特性が、様々な局面において光合成生物の CO₂ 固定速度を律速する大きな原因となっている。このような背景から、RuBisCO は光合成機能改良の研究ターゲットとして、これまで注目されてきた。RuBisCO がなぜ CO₂ 固定酵素として非効率な性質を示すのか、その理由が分子進化過程に隠されていると考え、この酵素の機能進化に関する研究を行ってきた。

【方法】 非光合成生物が有する光合成 RuBisCO とアミノ酸配列相同性を示す RuBisCO-like protein (RLP) の機能解析から、RuBisCO 分子進化の解明を行った。また、光合成生物間の RuBisCO 酵素特性の違いから、この酵素の機能進化を解析した。

【結果】 枯草菌を用いて RLP の機能解析を行った結果、RLP がメチオニン再生経路において 2,3-ジケト-5-メチルチオペンチル-1-リン酸エノラーゼであることを明らかにし、光合成 RuBisCO との機能進化関係を考察した。また、地球上で最も高い植物 RuBisCO の 3 倍もの CO₂ 識別能を示す好熱性原始紅藻 *Galdieria* RuBisCO と他の RuBisCO の配列・構造比較により、*Galdieria* RuBisCO が高 CO₂ 識別能を示すための触媒ループ安定化残基を見出した。このような RuBisCO 機能進化研究の成果は、光合成能強化を介した植物生産性向上やバイオ燃料高生産に応用しようとしている。

＜お知らせ＞

- 第 492 回支部参与会は、2015 年 12 月 5 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。一般:3000 円、学生:無料
 - 次回例会(493 回)予定
日時:2016 年 2 月 6 日(土)
会場:京都大学楽友会館
講演申込締切:2016 年 1 月 5 日(火)
講演要旨締切:2016 年 1 月 12 日(火)正午
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
橋本 渉
Tel: 0774-38-3756
E-mail: whasimot@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:橋本 渉

E-mail : whasimot@kais.kyoto-u.ac.jp

Tel : 0774-38-3756、Fax : 0774-38-3767

会計幹事:安部 真人

E-mail : abe@kyoto-wu.ac.jp

Tel : 075-753-6405、Fax : 075-753-6408

2015 年 12 月 1 日 発行