

一般講演 講演要旨

22日(土) 9:10~10:58

13:20~16:20

A会場:2211 講義室

B会場:2212 講義室

C会場:2213 講義室

D会場:2214 講義室

E会場:2224 講義室

A-1	ヘッドスペース-マイクロ固相抽出-GC/MS 法によるフウラン花の放出する香氣成分の解析
	種田明子 ¹ 、○森山寛子 ² 、根岸晴夫 ^{1,2} (¹ 中部大 植物バイオ研究センター、 ² 中部大 応用生物学部)
<p>【目的】フウラン(<i>Neofinetia falcata</i>)は、日本に自生するらんで、古くから盛んに美しい突然変異株が選択栽培されてきた。また、開花時に強い芳香を放つことで人々を魅了してきた。これまでに、ガラス容器を花に被せ香氣成分を捕集剤に吸着させ分析した例¹⁾、バイヤルに詰めた花のヘッドスペースの香氣成分を分析した例²⁾、花から抽出した精油を分析した例³⁾などが見られる。我々は、フウランの生花が自然に発散する香り进行分析し、その系統間の差異を比較した。</p> <p>【方法】四国・大場ラン園から入手した 8 系統及び豊明花き(株)から入手した 5 系統、計 11 系統の <i>N. falcata</i> について、開花株の花茎から上部を樹脂製の袋で覆い、マイクロ固相抽出ファイバー(Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene)を挿入して 26±1℃、2 時間放置した後、ファイバーに吸着した成分を GC/MS に導入して、香氣成分を解析した。</p> <p>【結果】香氣成分を解析した結果 Methyl Tiglate、(Z)-3-Hexen-1-ol、Benzaldehyde、Linalool、Methyl benzoate、Farnesene、Benzyl alcohol などが観察された。これらは <i>N. falcata</i> の香氣成分としてすでに報告されているものであった。未同定成分については、今後解析を進める。また、系統間の香氣成分パターンに差異が観察された。</p> <p>1)Holman, R.T.,et al.,<i>Amer.Orchid Soc.,Bull.</i>42,678(1973) 2)Ono,T.,et al.,<i>Natural Product Letters</i>,13,53(1999) 3)Miyazawa, M.,et al.,<i>J.Essent.Oil Res.</i>,12,197(2000)</p>	

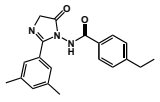
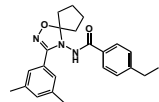
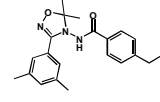
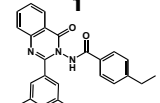
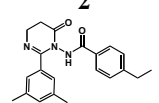
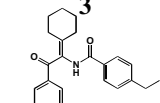
A-3	GC/MS 分析と感覚評価によるハーブの香りの解析とホエー飲料への応用
	○呂鋒 ¹ 、種田明子 ² 、根岸晴夫 ^{1,2} (¹ 中部大 応用生物学部、 ² 中部大 植物バイオ研究センター)
<p>【目的】ハーブ 6 種類の生葉の香りの特徴を感覚評価と GC/MS 分析によって検討し、ハーブの香りの良し悪しを決定する香氣物質について解析を行った。さらにハーブの香りを生かした飲料として、チーズ副産物のホエータンパク質を利用した飲料の開発を試みた。</p> <p>【方法】ハーブはレモンバーベナ、レモンユーカリ、フルーツ・セージ、ローズ・ゼラニウム、赤、および青紫蘇を取り上げた。分析試料はバイアル瓶に生葉入れてキャップで密栓後、インキュベーターで培養した。香氣物質は HS 法とマイクロ固相抽出法を用いて、GC/MS 分析を行った。香りの感覚評価は 2 段階アンケート調査により行った。ハーブエキスの抽出は、蒸留水 (pH2.6 調整) で 72℃、10 分間行った。ホエータンパク質は WPI(whey protein isolate)を用いた。</p> <p>【結果】6 種類のハーブ生葉が放出する香氣物質を GC/MS で同定し、香氣プロファイルを作成した。レモンバーベナとフルーツ・セージの香りが好まれ、α-Pinene、β-Pinene、Limonene などが芳香に寄与していると考えられた。ローズ・ゼラニウムが嫌われたのは、α-Cubebene、Isomenthone、Citronellol などが影響し、「青臭さ」の一因になっていると考えられた。これらのハーブに比べて赤、青紫蘇の香氣は弱く、HS 法では検出感度が不十分なためマイクロ固相抽出法で測定中。ハーブの香りがするホエー飲料の開発では、飲料として好まれるハーブと抽出方法を検討中である。レモンバーベナ、フルーツ・セージ、赤、青紫蘇が好まれた。生ハーブの香りから飲料から抽出された香氣物質との関係、および飲料の品質設計上の問題点について考察を行った。</p>	

A-2	ナスの皮に含まれるヒト白血病細胞増殖抑制物質
	○勝崎裕隆、国枝那美、岡田浩之、今井邦雄、樋廻博重* (三重大院 生資、* 三重大 看護)
<p>【目的】ナス(ナス科ナス属 <i>solanum melongena</i> L.)は、日本の家庭において日常的に食される馴染み深い食品の1つである。その大半は水分であり一般に栄養的価値は低いとされている。しかし一方で、ナスに含まれるアントシアニンが高い抗酸化能を持つことが報告されている。さらに、近年、アントシアニンにガン予防の効果が期待されている。そこで今回は、アントシアニンを含むナスの皮にヒト白血病細胞増殖抑制物質を見出すことを目的として研究を開始した。</p> <p>【方法】ナスの皮を 0.1%TFA-H₂O で抽出し、この抽出物を XAD-7 オープンカラムで分画した。得られた画分のうち、逆相の分取 HPLC によってさらに精製した。また、ヒト白血病細胞 HL-60 を用い、細胞増殖について細胞数を数えることで検討をした。</p> <p>【結果】これらの画分を逆相 HPLC により分析したところ、色素と思われる単一ピークが確認された。この物質をナスニンと同定した。また、得られたナスニンを用いてヒト白血病細胞 HL-60 に対する増殖抑制試験を行ったところ、増殖抑制の活性がみられた。また、増殖抑制の抑制はアポトーシスによることが判明した。ナスニンの部分構造を用いて、構造活性相関をについて検討したところ、特に活性にはアグリコンであるデルフィニジン部位が関与していることが明らかになった。</p>	

A-4	ニセアカシアに含まれるシアナミド
	○遠藤舞 ¹ 、加茂綱嗣 ¹ 、山谷紘子 ² 、平舘俊太郎 ² 、藤井義晴 ² 、廣田満 ¹ (¹ 信大農、 ² 農環研)
<p>【目的】シアナミド(NH₂CN)は天然には存在しないと考えられていたが、近年ソラマメ属のヘアリーベッチ(<i>Vicia villosa</i> subsp. <i>varia</i>)から単離された。高等植物 452 種の葉を対象に行ったシアナミド分布調査の結果から、シアナミドはソラマメ属のクサフジ(<i>V. cracca</i>)とハリエンジュ属のニセアカシア(<i>Robinia pseudo-acacia</i>)にも含まれていることが明らかになった。シアナミドの過剰摂取は皮膚炎や肝機能障害、急性アルコール中毒を引き起こす。長野県内ではニセアカシアの花が食材として用いられているため、本研究ではニセアカシアの花のシアナミド含量を定量し、食材としての摂取が人体に有害であるかを調べることを目的とした。</p> <p>【方法】ニセアカシアの花の調理法および摂取量について食習慣のある人を対象にしたアンケート調査を実施した。ニセアカシアの花の野外採集を行い、抽出物のシアナミド含量を GC-MS 分析のより定量した。</p> <p>【結果】アンケート調査の結果から、最も一般的な調理法は花の天ぷらで、1 度の食事で平均 3 房が食されていることがわかった。生のニセアカシアの花(2.6±0.6 gFW/房)には 58±30 μg/gFW のシアナミドが含まれていた。シアナミドの LD₅₀は 125 mg/kg であることから、通常の摂取量では生の状態であっても人体への影響はきわめて低いことが推測された。素揚げにすると、シアナミド含量は定量限界(1 μg/gFW)以下に低下したことから、天ぷらにした場合も生の状態より少なくなると推測される。ニセアカシアの花の摂取が人体に害を与える可能性は極めて低いと考えられる。</p>	

A-5	<p><i>Streptomyces</i> sp. USF-6280 株の生産する DPPH ラジカル捕捉物質 (第 2 報)新規 2-pyrone 化合物の単離</p> <p>○渡辺 圭、大家昭子、杉山靖正、廣田 陽 (静岡県立大・食品栄養)</p>
<p>【目的】 静岡市駿河区の土壌より分離した <i>Streptomyces</i> sp. USF-6280 株は複数の DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)ラジカル捕捉物質を生産する。本年度大会において、1 (germicidin)、2 (3-(2,5-dihydroxy-2-oxofuran-4-yl) propinoic acid)、3 (germicidin B)の単離、化学構造について報告した。本研究は、USF-6280 株が生産する DPPH ラジカル活性を有する新規 2-pyrone 化合物の単離、構造解析を目的としている。</p> <p>【方法及び結果】 USF-6280 株をベネット培地 (10L)で 30℃、4 日間振盪培養した。培養終了後、ろ過して得られた培養ろ液を塩酸で pH3 に調整した。その後、酢酸エチルで抽出し、中酸性画分を得た。この中酸性画分をシリカゲル (<i>n</i>-ヘキサン / 酢酸エチル)、Sephadex LH-20 カラム(メタノール) クロマトグラフィー、続いて逆相 HPLC (水 / アセトニトリル / TFA)を用いて精製し、DPPH ラジカル捕捉物質として、4 (49.1 mg)、5 (5.3 mg)、6 (1.4 mg)を得た。</p> <p>4、無色針状結晶、mp 191-193℃、の分子式は C₉H₁₂O₃ (高分解能 FABMS)であった。¹H、¹³C-NMR スペクトル、二次元 NMR スペクトルの解析から、4 を 4-hydroxy-6-isopropyl-3-methyl-2H-pyran-2-one と決定した。5、(C₉H₁₄O₃)、も同様に構造解析したところ、phomapyrone C と同一の 4-hydroxy-3-methyl-6-(1-methylpropyl)-2H-pyran-2-one であった。6も 2-pyrone 化合物であると推定され、現在構造解析を行っている。4 の DPPH ラジカル捕捉活性は、ED₅₀ 値 4260 μM (0.5 hr)であった。</p>	

A-7	<p>K⁺選択的イオノフォア機能解析のためのフォトプローブ分子設計</p> <p>○大石亜矢子、Arthit Makarasen、久世雅樹*、磯部 稔 (名大院生命農学、*名大物質国際セ)</p>
<p>【目的】嘔吐毒素セレウリドは、36 員環状デブシペプチドであり、カリウムイオンやアンモニウムイオンと 1 対 1 の錯体を形成する選択的なイオノフォア活性を有している。我々はこの特性に注目し、セレウリドに親和性を持つアンモニウム基とアジド基を含む化合物を合成し、セレウリドと錯体を形成させた後、光照射によりセレウリドに直接官能基を導入することを目的とした。そこで、セレウリドとアジド化合物の錯体を形成する条件について検討することとした。</p> <p>【方法と結果】まず、ヒドロキシルアンモニウム基を含むモデル化合物を用いて複合体形成について条件検討した。既に報告されているアルキルアンモニウムとセレウリドとの錯体形成の条件を参考にし、酸を加えることでわずかな錯体形成を NMR により確認した。さらに、インキュベートする温度を室温から 50 °C まで徐々に上げ、室温に戻してから NMR 測定したところ、錯体の形成が促進されることを見出した。そこで、溶媒を重クロロホルムから重ジクロロエタンに変え、80 °C で一晩加熱し、室温に戻してから NMR 測定したところ、50%程度錯体が形成されることを確認した。そして興味深いことに、高温 (80 °C) でインキュベートした後に低温 (5 °C) でインキュベートすると、錯体が解離することなく、Sephadex LH-20 クロマトグラフィーにより 100%錯体として初めて単離することに成功した。</p>	

A-6	<p>新規脱皮ホルモンアゴニストの創製に向けたジベンゾイルヒドラジンからの構造展開</p> <p>○増本寛、原田俊幸、小倉岳彦、中川好秋、宮川恒 (京都大学大学院農学研究所)</p>
<p>【目的】昆虫の脱皮、変態は脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクダイソンによって制御されている。脱皮ホルモンの分子レベルでの作用機構が詳細に調べられ、その受容体に対する脱皮ホルモンおよびそのアゴニストであるジベンゾイルヒドラジン(DBH)の結合様式が明らかとなった。本研究では、受容体に対する結合様式をもとにして、効率的に脱皮ホルモンのアゴニストを探索することを目的とした。</p> <p>【方法】既存の DBH の骨格を改変した化合物を選別し、それらの最安定構造を分子力学法を用いて構築した。DBH との類似性を平均二乗偏差 (RMSD) を指標として算出し、類似性の高い化合物のみ合成を行った。合成した以下の化合物について、鱗翅目昆虫由来の細胞 Sf-9 への [³H]ponasterone の取り込みにおよぼす濃度応答曲線から 50%効果濃度 (IC₅₀) を計算し、その値を活性の指標とした。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>1</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>2</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>3</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>4</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>5</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>6</p> </div> </div> <p>【結果】化合物 1、4、5 には活性が認められなかったが、化合物 2、3、6 に関しては活性が認められ、IC₅₀ 値はそれぞれ 0.32 μM、0.20 μM、10 μM であった。</p>	

A-8	<p>ジフルオロデヒドロセレンテラジンをを用いたトビカ短寿命発光中間体に関する立体過程</p> <p>○中島陽介、久世雅樹*、磯部 稔 (名大院生命農学、*名大物質国際セ)</p>
<p>【目的】沖縄海域に生息するトビカの発光タンパク (シンプレクチン) の活性中心を発光素子デヒドロセレンテラジン (DCL) サイドから動的解析し、その生物発光の分子機構を解明することを目的とした。これまでに、我々はモノフッ素化 DCL が活性中心と不可逆的に結合することを見だし、活性中心のシステイン残基の推定に成功している。そこで今回、フッ素基をさらにもう一つ導入したジフッ素化 DCL を化学合成し、その化学的性質と生物発光活性について検討した。</p> <p>【方法と結果】フッ素基の置換様式として 2,4-diF-DCL と 2,6-diF-DCL の 2 種類の発光素子を化学合成し、シンプレクチン生物発光活性測定を行った。その結果、2,4-diF-DCL は天然型 DCL に匹敵する発光活性を示すことが明らかとなった。一方、2,6-diF-DCL はチオール基への反応性が高いにもかかわらず天然型の 20%程度の発光活性しか示さない事が分かってきた。しかし、いずれの化合物もチオール基と結合しクロモフォアを形成した場合、化学発光効率に差は生じないことも確認できた。そこで、2,4-diF-DCL と 2,6-diF-DCL の安定構造の違いが、クロモフォア形成時の活性中心の立体化学に影響することが考えられた。すなわち、活性型と不活性型クロモフォアでは、活性中心の立体化学が逆転しているのではないかという一つの仮説を立てることができた。</p>	

A-9	ヘテロ共役付加反応を用いた多官能基化シクロブタン化合物の立体制御合成(2)
	○駒田武馬、安立昌篤、磯部 稔 (名大院生命農 応用分子生命科)
<p>【目的】当研究室では、鎖状不斉誘導法であるヘテロ共役付加反応の研究を行っている。この反応では、求核試薬が高立体選択的に共役付加し、さらに生じたスルホンカルバアニオンを用いた炭素-炭素結合形成が可能である。既に我々は、ホモアリル位に水酸基を持つ 1 に対して、ヘテロ共役付加を基盤とするシクロブタンの新たな合成法を報告した¹⁾。今回、さらに多官能基化されたシクロブタンの立体制御反応へと展開することを目的とした。</p> <p>【方法および結論】アリル位に水酸基を持つ 2 に対して、ホモアリルアルコール 1 で最適化した反応条件を適用し、シクロブタン合成を検討した。アセチドを求核試薬としたヘテロ共役付加反応を行い、生じたスルホンカルバアニオンとエポキシドによる連続的な環化反応が進行し、その結果多官能基化されたシクロブタン 3, 4 を合成することに成功した。また、X 線結晶構造解析により、シクロブタン 3 の相対立体化学を決定した。さらに、反応機構の解明を目的として、<i>syn</i>、<i>anti</i> のエポキシドを持つ基質をそれぞれ合成して同様の反応を行ったので、併せて報告する。</p> <p>1)山内英路、磯部 稔 日本農芸化学会 2006 年大会講演予稿集 3A04a01 p.173. 駒田武馬、安立昌篤、磯部 稔 日本農芸化学会 2007 年大会講演予稿集 3A26a03 p.251.</p>	

A-11	バンレイシ科アセトゲニン chamuvarinin の合成研究
	○提箸正義 ¹⁾ 、服部恭尚 ^{2,3)} 、今野博行 ⁴⁾ 、眞壁秀文 ¹⁾ (1 信州大院農、2 信州大 SVBL、3 信州大院総合工、4 京都府医大)
<p>【目的】バンレイシ科アセトゲニンは、熱帯・亜熱帯産のバンレイシ科植物より単離され、現在までに 400 種以上の化合物が単離されている。生物活性は抗腫瘍、殺虫など幅広い活性が報告されており、活性発現のメカニズムの 1 つとしてミトコンドリア電子伝達系の complex I を強力に阻害することが報告されている。本研究の目的化合物である chamuvarinin は、2004 年にバンレイシ科植物 <i>Uvaria chamae</i> より単離・構造決定された新規アセトゲニンである。¹⁾ 従来のアセトゲニンでは例のない、直結型 THP-bis-THF 環構造を有することが特徴であり、その相対立体配置および絶対立体配置は不明である。本研究では、chamuvarinin の合成経路の確立を行うと共に、絶対構造の決定を行うことを目的とした。</p> <p>【方法と結果】文献に従い、数工程で光学活性なエポキシアルコールを合成し、²⁾ ベンジル保護、Sharpless 不斉ジヒドロキシル化、酸処理による環化、アセトニド保護を行い bis-THF 環部分の合成を行った。現在、bis-THF 環部分からアリルエステル鍵中間体を合成し、2 価パラジウムを触媒とした立体選択的な THP 環形成反応の検討を行っている。</p> <p>1. Fall, D.; Duval, R. A.; Gleye, C.; Laurens, A.; Hocquemiller, R. J. <i>Nat. Prod.</i> 2004, 67, 1041-1043. 2. Hoye, T. R.; Ye, Z. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 1996, 118, 1801-1802.</p>	

A-10	バンレイシ科アセトゲニン pyranicin の合成研究
	○古畑真一 ¹⁾ 、服部恭尚 ^{2,3)} 、今野博行 ⁴⁾ 、後藤哲久 ³⁾ 、眞壁秀文 ^{1,3)} (1 信州大院農、2 信州大 SVBL、3 信州大院総合工、4 京都府医大)
<p>【目的】熱帯・亜熱帯地方に生息するバンレイシ科植物から生産されるバンレイシ科アセトゲニン類は、抗腫瘍や細胞毒性など非常に広範な生物活性が報告されている化合物群である。また、それらの活性発現メカニズムの一つとして、ミトコンドリア電子伝達系の complex I の強力な阻害が報告されている。今日まで様々な THF 型アセトゲニンで、この complex I 阻害活性試験が行われ、構造活性相関が明らかにされている。しかし、THP 型アセトゲニンでは未だにその報告がない。そこで今回、THP 型アセトゲニンの一種である pyranicin の THF 環部分を Pd(II) 触媒を用いた立体選択的な環化反応により構築し、pyranicin の全合成を行い、THP 型アセトゲニンでは未だに行われていない complex I 阻害活性試験を行うことを目的とした。</p> <p>【方法と結果】Acrolain 及び laurylmagnesium bromide を出発物質とし、Sharpless 不斉ジヒドロキシル化反応等を経て環化反応前駆体となるアリルエステルを得た。得られたアリルエステルに対し Pd(II) 触媒を用いた立体選択的な THF 環形成反応を行い、望む立体を有する 2,6-シス体とそのジアステレオマーである 2,6-トランス体を 93 : 7 という良好な立体選択性で得ることに成功した。今後、数工程で pyranicin の全合成を達成し、得られた pyranicin を用いて complex I 阻害活性試験を行う予定である。</p>	

A-12	6-および 7-ホスホメチルナフタレン-1-カルボン酸の化学合成
	○河村麻希、吉田真実、大西素子、堤内要(中部大 応用生物学部)
<p>【目的】セリン/スレオニンプロテインホスファターゼ 2C (PP2C) は細胞内に存在する主要なプロテインホスファターゼ(PP)の 1 種であり、脂質代謝やストレス応答等に関与している。PP2C は有効な阻害剤の報告例がほとんど無く、他の PP に比べて薬理学的アプローチによる研究が進んでいない。そこで本研究では、2003 年にホスファターゼ阻害剤として報告された 7-ホスホメチルナフタレン-1-カルボン酸(1)の合成例を参考に 6-ホスホメチルナフタレン-1-カルボン酸(2)および 1 の化学合成を行った¹⁾。</p> <p>【方法】トルエンとγ-ブチロラクトンを出発原料として、6-メチル-α-テトラロン(3)および 7-メチル-α-テトラロン(4)を合成した後、1 位をニトリル化すると共に 2, 3, 4 位の水素を脱離させてナフタレン環を形成し、ニトリル基をアルカリ加水分解によってカルボン酸にした。次に、6 および 7 位のメチル基を臭素化してからカルボン酸を <i>t</i>-Bu 基で保護した後、臭素をジエトキシリン酸基に置換した。塩酸を用いて脱保護を行い、2 および 1 を合成した。</p> <p>【結果】文献を参考に 4 の合成実験を始めたところ、報告とは異なり 3 が主生成物として得られ、3 および 4 の収率はそれぞれ 60%、15%となった²⁾。4 から 1 への合成例に従い、3 から 2 を合成した。その結果、2 を含め 5 つの新規化合物を得ることが出来た。1 の NMR データより既報の 1 は混合物であることが示唆された。</p> <p>1) K. Swireczek <i>et al.</i>, <i>J. Med. Chem.</i>, 46, 3703 (2003). 2) M. Pal <i>et al.</i>, <i>Indian J. Chem.</i>, 42B, 593 (2003).</p>	

A-13	銅触媒を用いたインダゾール誘導体の合成
	○ 家崎泰和、谷森紳治、切畑光統(阪府大院 生命環境科学研究科)

【目的】インダゾール誘導体は、抗がん剤、抗HIV剤、抗うつ剤など、医薬品開発上の重要な母核となる可能性が高い有機化合物群の1つである。しかしその合成法は、高価なパラジウムを要したり、多段階や厳しい反応条件を必要とするなど、コスト面や種々の誘導体合成に適していない場合も多い。そこで本研究は、安価な銅触媒を用いた分子内ウルマン型カップリング反応を鍵反応に、温和な条件下、簡便かつ柔軟性のある合成法の開発を行ない、それを用いた新規インダゾール誘導体の合成を行なうことにした。

【方法】出発物質に2-ハロ安息香酸**1**を選び、塩化チオニルと反応させ酸塩化物**2**にした。これに各種ヒドラジンと反応させ酸ヒドラジド**3**に導いた。得られた**3**を銅触媒を用いた分子内ウルマン型カップリング反応により閉環させたところ、目的とするインダゾール誘導体が31~62%の収率で得られた。

【結果】銅触媒を用いる分子内ウルマン型 C-N カップリング反応により、インダゾール誘導体の簡便な合成法を開発できた。反応は、ヨウ化物よりも反応性が低い臭化物を用いた場合においても、室温で速やかに進行した。今後、芳香環に様々な置換基が導入された2-ハロカルボン酸と種々のヒドラジンの組み合わせによる適用例の拡大、触媒の低減化、得られたインダゾール体からのさらなる誘導体化、生理活性の検討などの展開が望まれる。

A-15	海産天然物チャルテリンの合成研究
	○ 梶井重男、西川俊夫、磯部 稔(名大院生命農)

【目的】Chartelline A、B、C は北海に棲息するコケムシ *Chartella papyracea* より単離されたインドールアルカロイドである。本化合物は高度にハロゲン化されたインドレン spiro-β-ラクタムとイミダゾールが10員環を介して繋がった大変ユニークな構造を持っている。演者らはこれまでに chartelline の spiro-β-ラクタム部分の構築法を確立してきた。本研究では chartelline C の全合成に向けて、spiro-β-ラクタム前駆体となる12員環ラクタムの合成を検討した。

【方法と結果】12員環ラクタムの N-ヒドロキシエナミド部分をオキシムの窒素とカルボン酸との縮合環化反応によって合成する計画を立てた。しかし、このような形式の縮合反応は報告例がほとんどないため、簡単なモデル基質を用い、反応の開発と最適化を行った。フェニルアセトアルデヒド由来のオキシムをモデル基質として用い、活性エステルを作用させて、オキシム窒素での縮合反応が起こるかを確認した。するとオキシムをアセチルクロリドとジクロロメタン中で加熱すると期待した通りの縮合反応が起こり、N-ヒドロキシエナミドが得られた。またこの反応は酸クロリド側にインドール、オキシム側にイミダゾールをそれぞれ持つ場合でも進行することが分かった。

A-14	Larock インドール合成において糖アセチレンが示す位置選択性に関する研究
	○ 杉野公美、西川俊夫、磯部 稔(名大院 生命農)

【目的】1991年、Larockらはパラジウム触媒存在下、o-ヨードアニリンと内部アセチレンから一挙に2,3-二置換インドールを合成する方法を報告した。この反応ではアセチレン両端の置換基のうち、よりかさ高い方がインドール2位に導入される。従来の応用例では、かさ高いシリル系の置換基を持つアセチレンを用いて位置選択性を制御しているものがほとんどであった。そこで、より複雑な置換基を用いた場合の位置選択性について検討することとした。

【方法と結果】かさ高く、かつ複雑な置換基として糖を用いることとし、α-C-グルコシルアセチレン、α-C-マンノシルアセチレンをそれぞれ調製した。ヨードアニリンはアミノ基が無保護のものと Ts 基で保護されたものを用い、それぞれを組み合わせて位置選択性を検討した。

その結果、無保護のヨードアニリンとマンノシルアセチレンとの反応では、高い選択性でマンノースがインドール2位に導入された。一方、Ts 化されたヨードアニリンと2種の糖アセチレンとの反応では、それぞれ糖部位がインドール2位に導入された化合物が主生成物として得られたが、その選択性は低かった。以上の結果より、糖アセチレンが示す位置選択性は糖の種類に依存することがわかった。さらに、ヨードアニリンの保護基が位置選択性に影響を与えていることがわかった。

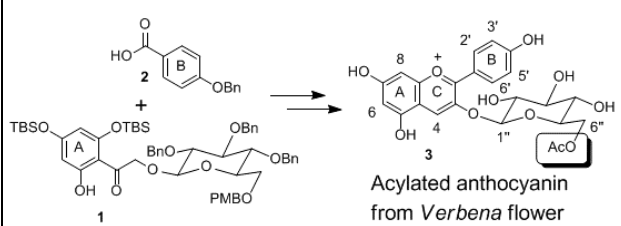
A-16	ヤドクガエルの毒ゼテキトキシンの構造確認を目的としたモデル化合物の合成研究
	○ 澤山裕介 ¹ 、内山真伸 ² 、畑野光賞 ^{2,3} 、古山深行 ^{2,3} 、西川俊夫 ¹ 、磯部 稔 ¹ (¹ 名大院生命農 ² 理研 ³ 東大院薬)

【目的】ゼテキトキシン(ZTX)はヤドクガエル *Atelopus zeteki* より単離された強力な神経毒であり、その構造は2004年に山下らのグループによってNMR、MSスペクトルを駆使して決定された¹。しかし解析に用いられたサンプルはごく微量であったため、演者らは以下に示すZTX中の2ヶ所の部分構造について対応するモデル化合物を合成し、その構造を確認することとした。

①10員環に含まれるN-アシルイソオキサゾリン構造
②グアニジン側鎖のN-ヒドロキシカルバメート構造

【方法と結果】N-アシルイソオキサゾリンのモデル化合物は文献記載の方法²によって導かれる二環性化合物中の不飽和結合をAdams触媒による水素添加反応により還元して合成した。合成したモデル化合物の¹³C NMRを測定したところ、カルボニル炭素の化学シフトは量子化学計算によって予測されたものよりも低磁場シフトしていた。またN-ヒドロキシカルバメートのモデル化合物の合成研究についても報告する。

¹ Yamashita, M. *et al. PNAS* **2004**, *101*, 4346.
² Blanchard, N. *et al. Org. Lett.* **2007**, *9*, 1485.

A-17	バーベナの赤紫色花弁に含まれるアシル化アントシアニンの全合成
	○尾山公一 ^a 、川口聡史 ^b 、吉田久美 ^c 、近藤忠雄 ^{bc} (名古屋大学 ^a 物質科学国際研究センター、 ^b 情報科学研究科、 ^c 生命農学研究科)
<p>【目的】花色素アントシアニンは、赤～紫～青色を呈する食用色素であり、抗酸化作用などの種々の生物機能を持つ成分として大きな需要を持つ。しかし、アントシアニンの効率的な合成方法は、未だ確立しておらず、中でもアシル化アントシアニンの合成は全く例がない。今回我々は、アシル化フラボノール配糖体からアントシアニンへの変換による 3 の全合成を達成した¹⁾。</p> <p>【方法】・【結果】 フロログルシノールから誘導したアセトフェノン誘導体、アセトニトリル溶媒中でベンジルグルコシルイミデートを用いて、グルコシル化反応を行い、1 を高β選択的に得た。さらに、1 と 2 を EDCI でエステル化した後、Baker-Venkataraman 反応により環化して C 環を構築した。得られた配糖化フラボノールを、塩化水素-メタノール中で Zn-Hg を作用させて還元することにより、赤紫色のバーベナ花弁色素である 3 の最初の全合成を達成した。</p>	
 <p>1) <i>Tetrahedron Lett.</i> 2007, <i>48</i>, 6005-6009.</p>	

B-1	ゼブラフィッシュ由来 S100A1 による Methionine aminopeptidase2 の阻害
	○大谷浩二、岩田央子、秋山真一、田中晶善、田丸浩、三宅英雄 (三重大学・生資・生物圏生命、わかやま産業)
<p>【目的】Methionine aminopeptidase2 (MetAP2) はタンパク質の N 末端メチオニンを切断するプロテアーゼの一種であり、N-ミストイ化など様々な生理的機能に関与する。カルシウム結合タンパク質である S100A1 は MetAP2 の活性を阻害することが示唆されている。本研究では、ゼブラフィッシュ由来の MetAP2、S100A1 を精製し、MetAP2 の活性および S100A1 の阻害活性を定量的に測定することを目的とした。</p> <p>【方法と結果】ゼブラフィッシュからクローニングした MetAP2 を大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。これを用いて methionin <i>p</i>-nitroanilide (Met-<i>p</i>NA) を基質として、Tris-HCl 緩衝液 pH7.5、37°C の条件で 1 時間反応させ、405nm の吸光度により活性を評価したところ、活性を有することが確認された。K_m は 0.24mM と求められた。</p> <p>一方で、大腸菌で発現させ精製したゼブラフィッシュ由来 GST-S100A1 を用いて GST プルダウンアッセイを行ったところ、MetAP2 と S100A1 が結合することが確認された。S100A1 を共存させて MetAP2 の活性測定を行い、MetAP2 に対する S100A1 の阻害活性を測定したところ、S100A1 が MetAP2 に対して活性を阻害することが示された。K_i はおよそ 0.1mM と求められた。</p>	

A-18	5-デオキシテトロドトキシンの合成研究
	○佐竹佳樹、荒木 宏、西川俊夫、磯部 稔 (名大院生命農)
<p>【目的】フグ毒として知られるテトロドトキシン (TTX) には、多数の天然類縁体が存在している。これら類縁体は、TTX の生合成前駆体または代謝産物と考えられているが、その明確な証拠は示されていない。そこで演者らは、TTX の生合成経路または代謝経路を解明するため、TTX に最も近い天然類縁体の一つである 5-デオキシ TTX の標識体を化学合成することにした。</p> <p>【方法と結果】まず 5-デオキシ TTX だけでなく、他の TTX 類縁体も効率的に合成することができる共通中間体をプロモレボグルコセノンとイソプレノール誘導体の Diels-Alder 反応から大量に合成する計画を立てた。</p> <p>Diels-Alder 反応のジェンであるイソプレノールの調製に関して、イソプレノキシドの開環を文献記載の LDA から LiHMDS に変更することで、収率を向上させた。鍵反応の Diels-Alder 反応においては、ジクロロメタン中で BF₃·OEt₂ を作用させることで、高い位置選択性と収率で望む環化付加体を得た。さらに Overman 転位によるアミノ基の導入を経て、共通中間体を 100 g スケールで合成することに成功した。</p> <p>現在、この中間体から 5-デオキシ TTX の標識体の合成に向けて検討中である。</p>	

B-2	Cloning, Expression and Biochemical Characterization of Novel Dihydrolipoamide Dehydrogenase Gene from <i>Clostridium kluyveri</i>
	○Saikat Chakraborty, Hiroshi Nonaka*, Masayuki Inui*, Hideaki Yukawa*, Makiko Sakka, Tetsuya Kimura, and Kazuo Sakka (Grad. Sch. Bioresources, Mie Univ., *RITE)
<p>Dihydrolipoamide dehydrogenase often termed as "Diaphorase" for its characteristic flavin moiety and NADH oxidase activity. Dihydrolipoamide dehydrogenase catalyzes the oxidation of dihydrolipoamide: dihydrolipoamide + NAD⁺ → lipoamide + NADH + H⁺. In case of bacteria and eucarya, this enzyme normally functions as an integral component of the pyruvate, 2-oxoglutarate, and branched chain 2-oxoacid dehydrogenase multienzyme complex or the glycine cleavage system. A novel 1368-bp <i>Clostridium kluyveri</i> gene codes for ~ 50 kDa protein was cloned and over expressed in <i>E.coli</i> system and further biochemical and spectral studies were sought to investigate its identity. The recombinant protein showed very strong dihydrolipoamide dehydrogenase and diaphorase activity. Non-covalently attached FAD was released at boiling temperature and quantified (7.2μM). UV-visible absorption spectra showed two peaks at 453nm and 270nm and the ratio of A_{280/450} = 4.98. Although the optimum temperature was 40°C at pH 7.0, the protein showed some stability as high as 70°C and 6.0-9.0 pH range. Fluorescent spectral study revealed the formation of NADH in forward reaction in presence of reduced lipoamide, in turn confirmed dihydrolipoamide dehydrogenase activity. Unlike other anaerobic bacterial dihydrolipoamide dehydrogenase enzyme, this enzyme had specificity to only NADH as coenzyme, where NADPH did not react at all.</p>	

B-3	<i>Vibrio proteolyticus</i> 由来 GH19 酵素遺伝子のクローニング
	○本多裕司、谷口肇、北岡本光* (石川県大 生物資源環境学部、 *農研機構・食総研)
<p>【目的】キチンは、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)がβ1,4グリコシド結合した多糖類であり、自然界に幅広く存在している。キチンを分解するキチナーゼについても多くの生物から発見されており、そのアミノ酸配列の違いから、糖加水分解酵素ファミリーの18と19(GH18とGH19)に分類されている。微生物 GH18 キチナーゼは“Substrate assisted catalysis”という基質の補助を受けて加水分解を触媒していることが明らかにされてきた。ところが、微生物 GH18 キチナーゼと比較して、微生物 GH19 キチナーゼの反応機構に関する情報はほとんど得られてきていなかった。</p> <p>本研究では、GH19 キチナーゼの反応機構を解明するために、<i>Vibrio proteolyticus</i> 由来 GH19 キチナーゼ遺伝子のクローニングと組み替え体酵素の大量発現系を確立する。</p> <p>【方法と結果】近年、様々な <i>Vibrio</i> 属のゲノム配列が解析されたので、それらの配列に存在した GH19 遺伝子 (vp19) の推定アミノ酸配列を参考にして保存領域をコードした縮重プライマーを設計した。設計した縮重プライマーと <i>V. proteolyticus</i> のゲノムを鋳型に用いて、vp19 遺伝子断片を PCR 法により増幅した。得られた vp19 遺伝子断片の塩基配列を基にして、TAIL(Thermal asymmetric interlaced)-PCR法を用いて vp 19 遺伝子全長の塩基配列を決定した。現在、vp 19 遺伝子の組み替え体酵素を得るために、大腸菌を宿主とした大量発現系を構築している。</p>	

B-5	H ⁺ -ピロホスファターゼの機能的中心領域における変異体解析により同定した H ⁺ 輸送およびエネルギー共役に関わるアミノ酸残基
	○広野めぐみ、中西洋一、前島正義 (名大院・生命農)
<p>【目的】H⁺-ピロホスファターゼ (H⁺-PPase) は、単一ポリペプチドから成り、基質ピロリン酸 (PPi) の構造も単純である。PPi 加水分解とそれに共役した H⁺の輸送について詳細な作動機構を解明するうえで、優れた H⁺ポンプのモデル分子と考えられる。本研究では、放線菌由来の H⁺-PPase (ScPP) を利用した網羅的な変異体解析によって、H⁺-PPase 機能のうち、特に、知見の少ない H⁺輸送およびエネルギー共役に関わるアミノ酸残基の同定を目指した。</p> <p>【方法】17 回膜貫通領域を持ち 794 残基から成る ScPP の全長を 4 分割し、各領域についてランダム変異導入ライブラリーを作製した。そのうち、基質結合部位を含めた高度保存領域を持つ 2 つのライブラリー領域 (183~586) について、活性低下および共役効率低下を示す変異体をスクリーニングした。さらに、部位特異的な変異導入による解析も行い、活性や共役効率への影響から、機能残基を同定した。</p> <p>【結果】ランダム変異体の分布から、基質結合部位を持つ細胞質側ループ e を支える膜貫通ドメイン TMS が特に重要であることが示された。さらに、基質結合部位近辺にエネルギー共役に関わる残基が位置していることが示された。2 つめの高度保存領域においては、TM12 に共役効率が上昇するタイプの変異体が偏って存在した。また、ルーメン側ループの機能関与も示唆された。網羅的解析により、個別のアミノ酸残基の機能のみならず、各ドメインの機能について推測できる結果が得られた。</p>	

B-4	ナメコ子実体由来チロシナーゼの大腸菌による発現
	○小西康子(石川県大)、辻茉莉子(北里大)、後藤秀幸(石川県大)、宗田典大(石川県林試)、鈴木春男(北里大)
<p>【目的】チロシナーゼ(EC 1.14.18.1)は、モノフェノールを水酸化して <i>o</i>-ジフェノールを生成し、さらに <i>o</i>-ジフェノールを酸化して <i>o</i>-キノンを生成する反応を触媒する酵素で、二核銅活性中心をもつ。ナメコ子実体のチロシナーゼ遺伝子は 625 アミノ酸残基をコードしているが、子実体から精製したチロシナーゼはC末端側 238 アミノ酸残基が切り取られていた。このC末端側残基の役割を明らかにする目的で、チロシナーゼ遺伝子(TYR67)と、C末端側 238 残基を欠く遺伝子(TYR42)を大腸菌で発現させた。</p> <p>【方法】それぞれの遺伝子は、N末端側にチオレドキシニンと His タグを持つ融合タンパク質 (Trx・TYR67、Trx・TYR42)として発現させ、SDS-PAGE 後に、抗 His タグ抗体あるいは抗チロシナーゼ抗体(IgG)を用いた免疫染色とチラミンを基質とした活性染色により検出した。</p> <p>【結果】Trx・TYR67 と Trx・TYR42 は、それぞれ 85 kDa と 60 kDa のタンパク質として発現された。いずれもチロシナーゼ活性を持たなかったが、銅イオンを添加して大腸菌を培養すると、Trx・TYR67 では活性を示すようになった。Trx・TYR67 を熱変性処理せずに SDS-PAGE にかけると、活性は、85 kDa の位置に泳動されるタンパク質ではなく、66 kDa のタンパク質に検出された。この 66 kDa のバンドは、熱変性処理した Trx・TYR67 の SDS-PAGE では認められなかった。SDS-PAGE 上の泳動位置は、子実体のチロシナーゼと培養菌系のチロシナーゼでは、熱変性処理の有無により変化しなかった。従って、発現した Trx・TYR67 のうち、コンパクトな構造を形成しているものが活性をもつと示唆される。</p>	

B-6	ソテツ由来 FamilyGH-18 キチナーゼの芳香族アミノ酸残基について
	○藤原麻帆 ¹ 、山内由佳 ¹ 、林比呂子 ² 、翁長彰子 ² 、平良東紀 ² 、作田庄平 ³ 、深溝慶 ^(¹近畿大・農、²琉球大・農、³東大・農)
<p>【目的】最近、我々はソテツ葉軸からクラスVに属する Family GH-18 キチナーゼ(CrChiA)を単離し、その構造と反応特性を明らかにした。本酵素は植物キチナーゼとしてはめずらしく、糖転移反応を触媒し、その構造と機能に興味もたれている。一方、アミノ酸配列において CrChiA と有意な相同性(約 35%)をもつヒキトリオシダーゼはその触媒部位近傍にいくつかの芳香族アミノ酸残基が存在しており、これらは CrChiA においても保存されている。本研究では、CrChiA の活性部位に存在する芳香族アミノ酸残基の重要性を明らかにすることを目的とし、それらの芳香族アミノ酸残基のうち Trp197、Phe166 を Ala に置換した変異体(W197A、F166A)を作成し、変異に伴う構造と機能の変化を調べた。</p> <p>【方法】野生型と変異型酵素を大腸菌の発現系で生産し、疎水性クロマトグラフィーおよびゲル濾過によって精製した。これらの酵素と(GlcNAc)_n (n=3-6)を反応させ、その生成物を TSK-gel G2000PW および Amide-80 カラムを用いた HPLC によって解析し、野生型と変異体での生成物組成の違いを調べた。また、円二色性分散計(CD)によって熱安定性を調べた。</p> <p>【結果】野生型と二つの変異体(W197A、F166A)で反応の経時変化を比較したところ、変異によって活性が減少し、また糖転移反応活性が著しく抑えられていた。また、生成物のアノマー型を解析したところ、変異体では野生型に比べて、切断箇所が還元末端側へ移動しており、Trp197、Phe166 は+1サイトでの糖残基との結合に関与していることがわかった。また、変異によって熱安定性も減少しており、これらのアミノ酸残基は構造の安定化にも寄与していることが分かった。</p>	

B-7	ラン藻由来β-1,3-1,4-グルカナーゼの加水分解特異性
	○藤村悠介 ¹ 、林加奈子 ¹ 、田茂井政宏 ¹ 、北岡本光 ² 、深溝慶 ¹ (¹ 近畿大・農, ² 食総研)
<p>【目的】ラン藻 <i>Synechocystis</i> PCC6803 由来のグルカナーゼ(SsGlc)はC末端側にFamily GH-9に属する触媒ドメインとN末端側に二つのセルロース結合ドメインを含む非触媒領域を有している。これまでの研究により、本酵素はβ-1,3-1,4-グルカナーゼであり、β-1,4結合の部分で切断されることが明らかにされている。しかし、本酵素の基質結合クレフト中のどの部分でβ-1,3結合が認識されているかは明らかではない。本研究では、SsGlc および非触媒領域を欠損させた変異体(SsGlcΔCBD)を用いて、β-1,3結合とβ-1,4結合の種々の配列からなるグルコシルオリゴ糖を基質として反応を行い、加水分解特異性を調べた。</p> <p>【方法】SsGlcおよびSsGlcΔCBDはpET3aを用い<i>E. coli</i> Origami(DE3)pLysSの発現系によって得た。発現した後、DEAEカラムを用い、0.2M~0.4MのNaClのグラジェントにより精製した。β-1,3結合とβ-1,4結合の種々の配列からなるグルコシルオリゴ糖を基質として、最適条件下で酵素反応を行い、その反応生成物をICS-3000を用いたHPAEC-PAD法によって解析した。</p> <p>【結果】同様の結合組成からなる三糖、Glcβ-1,3Glcβ-1,4Glc(G3G4G)とGlcβ-1,4Glcβ-1,3Glc(G4G3G)は明らかに異なる位置に溶出されHPAEC-PAD法は、このような結合順序の異なるオリゴ糖の分離に適していることがわかった。SsGlcとSsGlcΔCBDは両方ともに、G4G4G4G3GとG3G4G4G4Gだけを加水分解した。G4G4G4G3GはG4GとG4G3GあるいはG4G4GとG3Gに分解され、G3G4G4G4GはG3G4G4GとGに分解された。以上より基質のβ-1,3結合は、本酵素の基質結合クレフトの触媒中心から離れた位置で認識されるものと思われた。</p>	

B-9	<i>Methylobacterium extorquens</i> 由来ギ酸脱水素酵素の精製および特性評価
	○合田千秋、矢野成和、高木一好、若山守、立木隆(立命館大・理工)
<p>【目的】メチロトロフ細菌をメタノールを炭素源として培養した場合、メタノール脱水素酵素(MDH)を初発酵素とした呼吸鎖電子伝達系が発現されることが知られており、PQQ酵素であるMDHについては精力的な研究が展開されてきた。一方、草津市の土壌より単離されたメチロトロフ細菌である <i>Methylobacterium extorquens</i> No. 19株をメタノール含有培地で培養した結果、これまでに報告がないアルデヒド酸化還元酵素ならびにギ酸脱水素酵素が発現されていることを確認した。本研究では、<i>M. extorquens</i> No. 19株由来ギ酸脱水素酵素を精製し、本酵素の特性評価を行った。</p> <p>【方法及び結果】精製標品として得られたギ酸脱水素酵素は、電子受容体としてNAD⁺だけでなくPES⁺などの人工電子受容体にも効率良く電子移動を行った。また、電子供与体側の基質特異性は高く、ギ酸以外のカルボン酸に対しては機能しなかった。本酵素はSDS-PAGEとゲルろ過クロマトグラフィーの結果より、(αβγδ)₂のヘテロオクタマーのサブユニット構造を有することが明らかとなった。各サブユニットの詳細な分子質量については、MALDI-TOF MSによる解析を行った。本酵素溶液からは特徴的な紫外可視吸収スペクトルが観測され、フラビンならびに鉄硫黄クラスターの存在が示唆された。現在、本酵素に存在する金属イオンと有機コファクターの同定を行うと同時に、本酵素触媒反応の反応速度パラメーターについて検討を行っている。</p>	

B-8	<i>Bacillus circulans</i> KA-304 由来 Family19型キチナーゼの構造と機能
	○矢野成和、本多新、若山守、立木隆(立命館大 理工学部)
<p>【目的】<i>Bacillus circulans</i> KA-304が生成するキチナーゼIとα-1,3-グルカナーゼは、<i>Schizophyllum commune</i>のプロトプラスト生成に必須である(1)。キチナーゼIのC末端領域は、グリコシダーゼFamily19型の触媒ドメインと高い相同性を示す。一方、N末端領域は、<i>B. circulans</i> WL-12キチナーゼAのリンカードメインとわずかに類似しているが、その機能は不明である(2)。本報では、キチナーゼIの構造と機能を解析した。</p> <p>【方法】キチナーゼIのN末端領域欠失変異体(CatCHI)を作製した。また、キチナーゼIのN末端領域と緑色蛍光タンパク質(GFP)が融合したキメラタンパク質(NtermCHI-GFP)も調製した。</p> <p>【結果】キチナーゼIと各変異酵素の諸性質を比較し、以下の結果を得た。①キチナーゼIは、コロイダルキチンに対して、高い結合活性を示したが、CatCHIはほとんどコロイダルキチンに結合しなかった。②NtermCHI-GFPは、コロイダルキチンに結合した。この結果は、キチナーゼIのN末端領域が、キチン結合に関わることを示唆している。③NtermCHI-GFPの<i>S. commune</i>菌糸への結合活性を調べた。</p> <p>(1) 矢野ら、<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i>, 68, 1299-1305, 2004 (2) 矢野ら、<i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> 69, 602-609, 2005</p>	

B-10	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> 由来アミン脱水素酵素の酸化還元挙動解析
	○田中貴博、近藤徹弥 ¹ 、矢野成和、高木一好、立木隆、若山守(立命館大 理工学部、 ¹ 愛知県産技研食工技セ)
<p>【目的】<i>Achromobacter xylosoxidans</i>が生産するアミン脱水素酵素(AmDH)は、活性中心にトリプトファントリプトフィルキノン(TTQ)コファクターを有すると考えられている。TTQ酵素としては、メチルアミン脱水素酵素(MADH)、芳香族アミン脱水素酵素(AADH)について精力的な研究が展開されているが、それらのTTQ酵素と比較した場合、AmDHは、(1)各サブユニットのN-末端アミノ酸配列の相同性がない、(2)塩基性タンパク質である、(3)分子状酸素に対して極めて安定である、といった特徴を有している。そこで、本研究では、AmDHのコファクターの酸化還元挙動を中心に、分光学的あるいは電気化学的手法を用いて特性評価を行うと共に、AmDHの四次構造による酸化還元挙動の調節について検討した。</p> <p>【方法】未変性AmDH溶液、及び、グアニジン変性後単離したAmDHのコファクター含有サブユニット(βサブユニット)のみの溶液を用い、コファクターの酸化還元挙動について、電子伝達メドレーターを用いたカラム電解分光法により解析を行った。系の電位をシフトさせることによりTTQ特有の吸収スペクトル変化を観測した。</p> <p>【結果】未変性AmDH及びβサブユニットについて、系の電位に対するコファクターのUV-vis吸収スペクトル変化を解析した結果、2電子酸化還元反応に対するネルンスト式にフィットし、標準酸化還元電位がそれぞれ、+0.15V、+0.11V vs NHEであると見積もることができた。AmDHの活性中心に存在するTTQは、他のTTQ酵素のそれよりも標準酸化還元電位が正側にシフトしていた。一方、カルボニル試薬であるフェニルヒドラジンを変性AmDH溶液に添加した場合、添加量に応じた連続的なUV-vis吸収スペクトル変化が観測され、フェニルヒドラジンが不可逆的にコファクターに結合している様子が観測された。しかし、得られたスペクトル変化はMADHを用いた場合のものとは大きく異なり、コファクター近傍の環境が大きく異なることが示唆された。</p>	

B-11	植物細胞壁分解酵素ラムノガラクトナンリアーゼの構造・機能相関
	○川眞田明子 ¹ 、落合秋人 ¹ 、三上文三 ² 、橋本 渉 ¹ 、村田幸作 ¹ (¹ 京大院・農・食生科、 ² 京大院・農・応生科)
<p>【目的】細菌による植物細胞壁の分解は、細菌が植物に対する病原性や腐生性を示す上での初期応答の一つである。これら応答機構の詳細を明らかにするため、植物細胞壁の分解に関わる酵素群の構造と機能に関する解析が重要である。これまでに、植物細胞壁多糖ラムノガラクトナン(RG) -I の分解に関わる枯草菌の遺伝子クラスターを同定し、RG-I 主鎖を分解する RG リアーゼ YesW の機能及び立体構造を明らかにしてきた。本研究では、RG リアーゼの反応機構を明らかにするため、YesW の活性部位を構成するアミノ酸残基の同定を行った。</p> <p>【方法】SPring-8 の放射光を用いて、YesW とアナログ基質(ガラクトナン 2 糖)との複合体の結晶学的データを収集し、その立体構造を決定した。立体構造から触媒反応と基質認識に関わるアミノ酸残基を推定し、それらの部位特異的変異体の速度論的解析を行った。</p> <p>【結果】複合体の構造について、2.5 Å 分解能までのデータを収集し R = 16.6 % まで精密化した。アナログ基質は、YesW の β-プロペラ構造の中央に位置するクレフトに結合していた。基質と相互作用するアミノ酸残基について変異体を作製し、速度論パラメーターを決定したところ、Lys-535 及び Arg-452 が基質のカルボキシル基の認識に重要であることが明らかになった。活性部位近傍に位置するカルシウムイオンの配位に重要なアミノ酸残基における変異体は、その活性が顕著に減少したことから、カルシウムイオンが活性に必須であることが示唆された。尚、本研究は文科省ターゲットタンパク質研究プログラムの一環として行われた。</p>	

B-13	AMV 逆転写酵素と MMLV 逆転写酵素の熱安定性の比較
	○根本大資、保川 清、井上國世(京大院農・食生科)
<p>【目的】逆転写酵素(RT)は、分子生物学的研究や臨床診断において必要不可欠な酵素である。反応効率、耐熱性、転写の正確性という観点から、トリ骨髄芽球症ウイルス(AMV RT)とモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV RT)がよく使用されているが、反応効率や耐熱性の改良が求められている。本研究では、AMV RT と MMLV RT の反応速度の温度依存性、熱安定性、および鋳型プライマー(TP)の熱安定性に対する効果について比較検討した。【方法】TP として poly(rA)・p(dT)₁₂₋₁₈ を用いた。逆転写反応は、5 nM RT、25 μM TP (濃度は p(dT)₁₂₋₁₈ のモル換算)、0.4 mM [³H]dTTP で行い、経時的に反応液を採取し、酸不溶性画分への放射能の取込みから初速度を求めた。熱安定性は、100 nM RT を 28 μM TP 存在下あるいは非存在下に、40~55℃で一定時間熱処理を行った後に、37℃で逆転写反応を行った。【結果】反応至適温度は、AMV RT が 48~52℃、MMLV RT が 42~46℃であった。AMV RT の T₅₀(10 分間の熱処理により活性が 50%に低下する温度)は、TP 非存在下では 47℃、TP 存在下では 52℃であった。MMLV RT の T₅₀は、TP 非存在下では 44℃、TP 存在下では 47℃であった。以上の結果から、AMV RT は MMLV RT よりも熱安定性が高く、TP により熱安定性がより向上することが示された。熱力学的解析の結果、AMV RT および MMLV RT の熱失活には、熱失活の活性化エントロピーの寄与が大きいことが示された。</p>	

B-12	遷移状態アナログ阻害剤を用いた γ-グルタミルトランスぺプチダーゼの基質認識機構の解明
	○中嶋 麻童、韓 立友、平竹 潤(京大化研)
<p>【目的】γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)はグルタチオン(γ-L-Glu-L-Cys-Gly)やグルタチオン包合体を基質とし、γ-グルタミル結合を切断する酵素である。これまでに、我々は GGT を反応機構依存的に阻害する遷移状態アナログ阻害剤、グルタミン酸 γ-ホスホン酸ジエステル誘導体を開発し、本酵素に対する作用を調べてきた。本研究では、基質グルタチオンのシステイン側鎖の構造および立体化学に注目し、新たな阻害剤を設計し、GGT の基質認識機構の詳細を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】Cys-Gly に対応した構造を有する阻害剤 1-3 を立体選択的に合成した。これら阻害剤の活性を大腸菌 GGT を用いて評価した。</p> <p>【結果】側鎖を持たない阻害剤 1 と L アミノ酸構造をもつ阻害剤 2 は強い阻害活性を示したが、D アミノ酸構造を持つ阻害剤 3 では、活性が著しく低下したことから、GGT はシステイン部位の立体化学を厳密に認識することがわかった。また、阻害剤 2, 3 は、リン原子上の立体化学に基づくそれぞれ二種の立体異性体に分離することができた。一方の異性体には阻害活性があり、他方には阻害活性がないことから、リン原子上の特定の立体配置が、GGT の活性中心との反応に必須であることがわかった。</p>	

B-14	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 中性金属プロテアーゼ(BaNP)の酵素化学的性質の解析
	○福井善裕、橋田泰彦、井上國世(京大院農・食生科)
<p>【目的】<i>Bacillus</i> の産生する種々の中性亜鉛プロテアーゼは食品加工等に広く利用されている。それらのうちで好熱性・好塩性酵素 thermolysin (TLN)は加水分解の逆反応によりペプチド合成反応を触媒し、人工甘味料アスパルテームの前駆体合成に利用されている。本研究では TLN と高い相同性を持つ <i>B. amyloliquefaciens</i> 中性金属プロテアーゼ(BaNP)の酵素化学的性質を検討し、TLN と比較した。</p> <p>【方法】硫酸分画、陽イオン交換クロマトグラフィー、Affinity クロマトグラフィーにより <i>B. amyloliquefaciens</i> の培養液から BaNP を精製した。FA-Gly-L-Leu amide を基質として酵素活性を測定し、酵素活性に対する温度、pH の影響と NaCl の添加効果を調べた。</p> <p>【結果】BaNP の 25℃における酵素活性 (k_{cat}/K_m)は TLN と比べると 25%と低いものの、NaCl によって活性が指数関数的に上昇し、4 M NaCl 存在下では 13 倍に活性化した。その活性化度は TLN と同等であった。また、BaNP の至適温度は 55℃、30 分間熱処理により 50%失活する温度 T₅₀ は 65℃であり、TLN に比べて 10℃低い。至適 pH は 6.5 であり、k_{cat}/K_m の pH 依存性より pK_{e1} は 4.9、pK_{e2} は 8.0 と求められた。これらは TLN とほぼ同じであった。このことから、BaNP の活性解離基は Glu または Zn(H₂O) および His である可能性が高い。</p>	

B-15	サーモライシンの活性部位への変異導入による活性への効果
	○草野正雪, 保川 清, 井上國世(京大院農・食生科)
<p>【目的】サーモライシン (TLN) は中等度好熱菌 <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> が菌体外に生産する好熱性中性亜鉛プロテイナーゼである。本研究では、活性の pH 依存性が酸性側にシフトし、活性が向上した変異型 TLN を取得することを目的としている。われわれはこれまでに、活性部位に位置する Asn112 を Asp に置換することにより、活性は低下するが、酸性側の pK_a が 5.3 から 5.7 に変化することを報告した。今回、活性部位に位置する他のアミノ酸残基を荷電性アミノ酸残基および Ala に置換し、活性への効果を調べた。【方法】α-ヘリックス (Asn159-Ala180) に位置する Ile168, Ser169, Asp170 および活性部位間隙の C 末端ドメイン側の領域に位置する Tyr157, Val230, Ser234 を Asp, Glu, His, Lys, Arg, Ala に置換した。成熟型配列とプロ配列を共発現させることにより大腸菌で変異型 TLN を生産し、培養上清から精製した。変異型 TLN の FA-Gly-Leu amide (FAGLA) および Z-Asp-Phe methyl ester (ZDFM) 加水分解活性を測定した。【結果】Ile168, Ser169, Asp170 の変異型 TLN 17 種のうち、14 種がカゼインおよび FAGLA 加水分解活性を消失し、3 種 (I168A, I168H, S169A) がこれらの活性を有した。Tyr157, Val230, Ser234 の変異型 TLN 18 種のうち、12 種がカゼイン加水分解活性を有し、そのうち 3 種 (V230R, S234A, S234E) のみが FAGLA 加水分解活性を有した。I168A の FAGLA および ZDFM 加水分解活性が野生型 TLN の 2 倍に向上した。【考察】α-ヘリックス (Asn159-Ala180) が活性に重要であり、活性部位間隙の C 末端ドメイン側の領域が基質認識に重要であることが示された。Ile168 の側鎖は酵素分子内部を向いている。Ile168 を Ala に置換することにより、この領域の密度が低下し、活性中心近傍の柔軟性が向上し、活性が向上したと考えられる。</p>	

B-17	ヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ 7 (MMP-7) の活性解離基の推定
	○竹治仁詩, 保川清, 井上國世 (京大院農・食生科)
<p>【目的】MMP-7 の k_{cat}/K_m の pH 依存性は幅の広いベル型曲線を示し、酸性側の pK_a が 4.0、塩基性側の pK_a が 9.8 であることから、活性解離基は酸性側が Glu198 または亜鉛配位水、塩基性側が Tyr219 と考えられた。我々は MMP-7 のチロシン残基のニトロ化と部位特異的変異により、塩基性側活性解離基は Tyr219 でないことを示し、MMP-7 に結合した水分子の可能性を指摘した¹⁾。今回、熱力学的解析と部位特異的変異により、MMP-7 の活性解離基を推定した。【方法】大腸菌由来リコンビナントヒト MMP-7 による蛍光基質 MOCac-PLGL(Dpa)AR 加水分解活性 (k_{cat}/K_m) の pH 依存性を 15、25、35、45°C で測定した。van't Hoff plot (pK_a の温度変化) から活性解離基のプロトン解離に伴うエンタルピー変化 (ΔH°) を求めた。【結果】ΔH° は酸性側が -20.6 kJ/mol、塩基性側が 89.9 kJ/mol であった。アミノ酸やジペプチドの解離熱の報告値との比較により、酸性側活性解離基は COOH であり、Glu198 であると考えられた。一方、塩基性側活性解離基は NH_3^+ または $(NH_2)_2^+$ と考えられたが、活性部位には Lys または Arg が存在しない。そこで、MMP-7 とヒドロキサム酸の複合体の立体構造 (1MMQ) から、塩基性側活性解離基の候補として、Ala162 の主鎖の窒素原子に配位した水分子と Pro217 の主鎖の酸素原子に配位した水分子に注目した。変異型酵素 E198A の活性は消失し、A162G および P217G の k_{cat}/K_m は野生型酵素の 50% あるいは 70% に減少した。A162G の塩基性側 pK_a は 10.3 で、野生型酵素より 0.6 高かった。【結論】MMP-7 の活性解離基は、酸性側が Glu198、塩基性が Ala162 に配位した水分子と推定される。 1. Y. Muta et al., <i>Biochem. J.</i> 386, 263 (2005)</p>	

B-16	カテキンとヒトマトリックスメタロプロテイナーゼ 7 (MMP-7) の相互作用の蛍光測定による解析
	○三宅智子, 保川清, 井上國世(京大院農・食生科)
<p>【目的】MMP-7 は大腸癌などで過剰発現が認められているマトリックスメタロプロテイナーゼであり、癌の転移と浸潤に対する関与が示唆されている。我々はこれまでに、10 種類の緑茶カテキン類の MMP-7 に対する阻害効果を調べ、(-)-epicatechin-3-gallate (ECG) が最も強い阻害活性 ($K_i = 0.47 \mu M$) を有し、阻害様式は非拮抗型であることを報告した¹⁾。今回、カテキンの蛍光特性を指標として、ECG と MMP-7 の相互作用を解析した。【方法】ヒト成熟型 MMP-7 (分子量 19,000) を大腸菌でインクルージョンボディとして発現させ、可溶化後リフォルディングさせた。【結果】ECG (分子量 442) を 325 nm で励起すると 398 nm に極大をもつ蛍光スペクトルが生じた。ECG の 398 nm の蛍光強度 (FI_{398}) はエタノール濃度の上昇により直線的に増加し、20% エタノール存在下では非存在下の 1.4 倍に達した。また、1 μM ECG の FI_{398} は、1 μM MMP-7 存在下では非存在下の場合と比べて 12% 増加した。このとき MMP-7 に結合している ECG は、ECG の MMP-7 に対する K_i より、51% と計算された。したがって、すべての ECG が MMP-7 に結合すると、ECG の FI_{398} は MMP-7 非存在下と比べて 24% 増加するものと考えられる。これは、12.4% エタノール存在下での ECG の FI_{398} の増加率に相当する。すなわち、MMP-7 における ECG 結合部位は誘電率 62 の疎水性環境であることが示唆された。 1. H. Oneda et al., <i>J. Biochem.</i> 133, 571 (2003)</p>	

C-1	農作物中の硝酸イオン、亜硝酸イオン含有量調査と亜硝酸イオン低減化物質の探索
	○愛知真木子, 浅見典子, 岩田文子, 照屋俊明, 富成祥子, 長谷川森一, 南基泰, 禹濟泰, 王曉星, 永井和夫(中部大学, 応用生物学部)
<p>【目的】食事に含まれる硝酸イオンは、体内で亜硝酸イオンとなり、亜硝酸イオンはガンや糖尿病を引き起こすといわれている。しかしながら、我が国において野菜の含有硝酸塩量に関する規制はない。野菜の硝酸イオン含有量調査を行うと共に、亜硝酸を低減化する物質を探索することを目的とした。【方法】野菜中の硝酸イオン、亜硝酸イオンの分析は衛生試験法注解 2000 に従った。食品成分の抽出は、各サンプルをそのまま、あるいは細切後、沸騰水あるいはエタノールにより抽出、濃縮し、水あるいはメタノールに溶解後、亜硝酸低減化活性測定試験に供した。亜硝酸低減化活性の測定は、100 μM 亜硝酸溶液とポリフェノールや野菜抽出物を等量混合、定量を行い、残存量を%で示した。【結果】スーパーマーケットで手に入る野菜中の硝酸および亜硝酸イオン濃度を測定したところ、根菜類では ~2,100 mg/kg FW、果菜類では ~1,280 mg/kg FW であったのに比べて、葉菜類では ~7,000 mg/kg FW も含まれており、葉菜類に硝酸および亜硝酸イオンが多く含まれていることが明らかとなった。その大部分は硝酸イオンで、亜硝酸イオン濃度は、5mg/kg FW 以下であった。また、天然物由来の抽出物から亜硝酸低減化活性を探索するにあたって、すでにお茶成分が有用であることが明らかになっているので、お茶精製標品を用い、亜硝酸低減化活性を測定した。その結果、アスコルビン酸は 71.4% に、お茶のポリフェノール 3 種の場合は、90.9~92.7% に減少した。現在、天然物由来抽出物について同様の実験をおこなって、亜硝酸イオンを減少させる物質を探索中である。</p>	

C-2	海苔発酵エキスの血圧降下作用
	○王 姫、平山 碧、服部美香、辰野拓也 ¹ 、荒木利芳、梅川逸人、(三重大院生資、 ¹ (株)永谷園)
<p>【目的】海苔には生活習慣病の予防に効果のある機能性物質が多く含まれることが知られているが、細胞壁により消化吸収が妨げられている。我々は γ-アミノ酪酸 (GABA) を生産する乳酸菌 <i>Lactobacillus brevis</i> を用いて海苔を発酵させ、GABA を高含有する海苔発酵エキスを得た。本エキスは GABA に加えて海苔自身が持つ様々な機能を有していると考えられる。そこで今回、本エキスの機能性を明らかにする目的で、高血圧自然発症ラット (SHR) の血圧に対する影響について検討した。</p> <p>【方法・結果】まず 9 週齢の SHR/Izm、雄性ラット、1 群 7 匹を馴化させた。海苔発酵エキスを単回経口投与し、非観血的血圧装置を用いて SHR の血圧を経時的に測定したところ、低濃度 (2 mg/kg of body) で顕著な降圧効果が認められた。次に、5 週齢の SHR/Izm、雄性ラット (1 群 7 匹) を粉末飼料 SP にて 1 週間飼育した後、海苔発酵エキスを混合した飼料を 35 日間与え、血圧を経時的に測定したところ、本エキスを 0.003% 投与した群で有意な血圧上昇抑制作用が認められた。飼育終了後、解剖にて各臓器を摘出し、アンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の活性を測定したところ、肺および血清の ACE 活性について有意な低下が認められた。さらに、最高血圧が 190 mmHg 以上を示す 36 週齢の SHR/Izm に対して同様の摂食試験を行ったところ、エキス投与群について有意な血圧降下と肺の ACE 活性低下が認められた。</p> <p>以上のことから、本エキスは血圧降下作用を示す成分として、GABA に加えて何らかの ACE 阻害物質を含んでいることが示唆された。</p>	

C-4	多糖類との複合体形成による蕎麦主要アレルゲン Fag e 1 の分子表面機能特性の改善
	○鈴木泰裕、石川えり、薬師寿治、中村宗一郎 (信州大学・農学部)
<p>【目的】蕎麦タンパク質は必須アミノ酸であるリジン、バリン、ロイシンに富んでいることから高度利用が望まれる。一方で蕎麦は重篤なアレルギーを惹起する食素材でもある。本研究では蕎麦の高度利用に資するために主要アレルゲンである Fag e 1 に、限定メイラード反応を用いて多糖修飾し、多糖修飾が Fag e 1 の分子表面機能に及ぼす影響について検討した。</p> <p>【方法】Fag e 1 と 20kDa のアラビノガラクトサン (AG)、または 1.4kDa のキシログルカン (XG) の混合液を凍結乾燥し、得られた粉末を 60°C、RH65% で 1 週間ドライヒーティングすることによって多糖修飾した。サイズ排除クロマトグラフィーにより多糖修飾されたものと未修飾のものを分離し、多糖修飾された Fag e 1 のアレルギー性、溶解性及び乳化性について調べた。アレルギー性は 6 人の蕎麦アレルギー患者の血清を用い、ドットブロッキング法と ELISA によって調べた。</p> <p>【結果】ドットブロッキングの結果、多糖修飾によって Fag e 1 のアレルギー性が著しく低下していることが認められた。このことは ELISA によって、AG 修飾では 3.6~10.9%、XG 修飾では 1.9~10.7% まで減少していることが確認された。一方 50mMPBS (pH7.0) 中での Fag e 1 の溶解性は、多糖修飾によって ~3.5 倍に増加していることが明らかにされた。乳化性も著しく改善された。乳化活性は、AG 修飾では市販の乳化剤の 59.9%、XG 修飾では 39.7% にまで増加した。以上のことから、多糖鎖を用いた限定メイラード反応による多糖修飾は Fag e 1 のアレルゲンの低減化を含む分子表面機能特性の改善を誘導し、食品素材としての高付加価値化をもたらす可能性が示唆された。</p>	

C-3	グルテンのプロテアーゼ加水分解による溶解度の上昇
	○富永良太、保川清、井上國世 (京大院農・食生科)
<p>【目的】小麦グルテン (S) のプロテアーゼ (E) による加水分解における溶解度の上昇について検討した。</p> <p>【方法】①各種プロテアーゼの比較: S を 37°C で pH 8.0 のリン酸 Na 緩衝液中に懸濁し、ズブチリシン (SUB)、サーモライシン (TLN)、フィシン、トリプシン、α キモトリプシンにより分解した ([S]=1.0 mg/ml、[E]=27 units/ml、1 unit はカゼイン加水分解で 1 分間に、酸可溶性画分にチロシン 1 μg に相当する A₂₇₅ を与える活性)。②pH および温度の影響: S を、(i) 37°C で pH 6.0~8.0 のリン酸 Na 緩衝液、9.0、10.0 のホウ酸 Na 緩衝液中に、(ii) 37~60°C で pH 8.0 のリン酸 Na 緩衝液中に懸濁した。続いて、pH および温度を保ち、SUB、TLN により分解した ([S]=1.0 mg/ml、[E]=27 units/ml)。</p> <p>【結果】①S の溶解度は、反応前は 50 μg/ml であったが、E による分解で経時的に増大し、60 分間の反応でほぼ最大値 (SUB、TLN で 350 μg/ml、フィシン、トリプシン、α キモトリプシンで 200-250 μg/ml) に達した。分解過程を還元条件下の SDS-PAGE で観察したところ、反応前の S に含まれる 30 kDa 以上の成分 (グリアジン、グルテニン) は、2 分間の反応で 14 kDa 以下に分解した。このことは、グルテンの溶解には多段階の分解が必要であることを示唆する。②S の溶解度は、pH 10.0 で最も大きかった (50 μg/ml) が、SUB または TLN による分解により pH 8.0 で最も大きく上昇した。また、S の溶解度は、37~60°C でほぼ一定であったが、SUB による分解では 45°C で、TLN による分解では 50°C で最も大きく上昇し、最大値はともに 400 μg/ml であった。</p>	

C-5	タンニン親和性ペプチドの利用に関する研究
	○江角信治、岡田渉、笠井尚哉 (大阪府大院 生命環境科学)
<p>【目的】タンニンはタンパク質との吸着沈殿作用や酵素への吸着阻害作用を持つことが知られており、当研究グループではこれまでに紅茶由来タンニンとトリプシンの相互作用について検討してきた。その結果、塩基性アミノ酸やそのペプチドと紅茶由来タンニンとが強い親和性を持つことを見出し、既に報告してきた。これらの親和性を利用すれば、植物中のタンニン類の分析やタンパク質アフィニティーへの応用などが考えられる。そこで本研究では Arg タグを用いて、タンニン・タンパク質アフィニティーについて検討した。</p> <p>【方法】Glutathion S-Transferase (GST) の C 末端部に 『-(Gly)₅-(His)₆』 のペプチド配列を導入させた His タグ付加タンパク質、及び GST または Green Fluorescent Protein (GFP) の C 末端部に 『-(Gly)₅-(Arg)₆』 のペプチド配列を導入させた Arg タグ付加タンパク質をそれぞれ作成し、モデルタンパクとした。タンニンのポリフェノール部不溶化モデルとしては没食子酸類や紅茶由来タンニンなどの不溶化担体を作製し、これらのアフィニティーについて HPLC、LC、SDS-PAGE などを用いて検討した。</p> <p>【結果】担体となるゲルや、そのスパーサーに固定する没食子酸類や紅茶由来タンニン等のリガンドについて各種検討したところ、Sephadex LH-20 と没食子酸デシルとを混合して含浸させた担体に Arg タグ付加タンパク質との親和性を持つ可能性が示された。また、同様にして作成した担体をカラムに充填させて HPLC につなぎ Arg、Arg-Arg、Arg-Arg-Arg をロードさせたところ、重合度が増えるにつれて保持時間が長くなるという結果も得られた。現在、これらの吸着特性、再現特性、及び吸着したタンパク質の溶出方法などについて順次検討中である。</p>	

C-6	ラッカーゼ-カテキン重合物のトリブシン阻害によるタンニン分類の試み
	○岡田 渉、江角 信治、笠井 尚哉(大府大院 生命環境科学)
<p>【目的】縮合タンニンとは、果実などに広く分布し、フラバン-3-オール類であるカテキンやエピカテキンを基本ユニットとして重合した高分子ポリフェノールだと考えられている。高分子性の縮合タンニンはタンパクなどと複合体を形成するタンニン活性を示すとされているが、カテキンの単量体、2 量体ではタンニン活性を示さず、どの程度の重合度でタンニン活性を持つようになるかは明確にされていない。そこで本研究では、ラッカーゼによってカテキンを重合させたカテキン重合体が持つトリブシン阻害活性、牛血清アルブミン吸着作用、Lys や Arg 繰り返しペプチドとの相互作用を利用したタンニン評価を試みた。</p> <p>【方法と結果】カテキン(0.43%)は <i>Trametes</i> 属由来のラッカーゼを用いて 1 時間重合を行い(0.1M pH5.0 酢酸バッファー)、反応の経時変化を見るため 10 分ごとに反応液を採取した。反応時間により重合が進み、重合度が大きいほど疎水性を持つと思われたため、ODS カラムを用いて HPLC 分析を行った。また、カテキン重合体はトリブシンに対し吸着することで阻害活性を示すと考えられたため、カゼイン・フォーリン法を用いてトリブシン阻害活性を測定した。その結果、阻害活性は反応時間ごとに増加しその後は重合体の析出とともに減少した。HPLC 分析とトリブシン阻害活性結果の比較から、カテキン重合体のトリブシン阻害活性はある限られた重合体が大きく影響している可能性が示唆された。この重合体を評価するために、更にポリフェノール吸着性樹脂や SDS-PAGE 電気泳動などによる種々の検討を組み合わせ評価した。</p>	

C-8	小麦ふすま加熱処理物および酵素分解物の浸水ストレス潰瘍抑制効果
	吉澤みな子 1、○三枝尚洋 2、Florin BARLA2、林浩孝 3 山地亮一 2、乾博 2、三浦巧 2、中野長久 2 (1 大手前栄養学院、2 大阪府大院・生命環境、3 石川県立大・食品科学)
<p>【目的】小麦ふすまは小麦粒の皮部にあたる部分で、製粉過程での副産物であり不溶性食物繊維が多い。現在では牛や豚など家畜の飼料の他、パンやクッキーなどの小麦粉加工食品に利用されている。小麦ふすま含有成分の機能性に関する研究は多く行われているが、物理化学的処理後の成分についての、新しい機能性に関する研究は少ないのが現状である。そこで本研究では小麦ふすま加熱処理および酵素分解物に β-(1-4),(1-3)グルカンが含まれていたことから、ラットの浸水ストレス潰瘍発生に及ぼす影響について検討した。</p> <p>【方法】加熱処理した水溶性画分を A、その残渣にセルラーゼ処理した水溶性画分を B とした。実験には 5 週齢 SD 系雄ラットを用い、コントロール群と A および B 添加群(サンプル A、B をコントロール飼料の β スターチ 5% と置換)に分けた。各々 14 日間飼育後 24 時間絶食し、ストレスゲージに入れ 23°C の水槽内に頸部まで水浸しストレス負荷後、胃腺部に発生している胃粘膜損傷面積から潰瘍係数を求め、さらにコントロール群に対する各サンプル群の潰瘍係数の割合を 100 から差し引いて潰瘍抑制率とした。</p> <p>【結果】サンプル A および B の β-(1-4),(1-3)グルカン含有量は、1.0%と 3.3%であった。各群ともに、試料摂取量、体重増加量ともに有意差は認められなかった。潰瘍係数はコントロール群に対し、サンプル A、B ともに有意に低値を示し、潰瘍抑制効果が認められた。このことはサンプル A、B に含有される β-(1-4),(1-3)グルカンによる効果であると考えられる。</p>	

C-7	アムラのキサントンオキシダーゼ阻害活性およびマウスにおける血漿尿酸値低下作用について
	○近藤 誠、白 潔 ¹ 、村瀬史朗、濱渦康範、藤田智之(信州大院農、 ¹ 信州大農)
<p>【目的】痛風の発症は、血中の尿酸値の増加が一因と考えられている。一方、熱帯性の果実アムラ(<i>Emblica officinalis</i>)には、痛風を抑える効果があるとされている。しかし、この点に関して科学的なデータを示した報告はない。そこで本研究では、アムラ抽出物のキサントンオキシダーゼ阻害活性とマウスの血漿尿酸値に与える影響について検討した。</p> <p>【方法】ネパール産の乾燥果実を EtOH、70%熱 EtOH および熱水により抽出したのち、得られた各エキスを濃縮後、凍結乾燥し、実験に用いた。In vitro でのキサントンオキシダーゼ活性は、基質としてキサントンをを用いて 30 分間反応させ、産生した尿酸量を 290nm の吸光度で測定した。この系に各抽出物を加えて、無添加のコントロールと比較して阻害率を算出した。血漿尿酸値の低下作用の検証には、ICR 系雄性マウス(6~7 週齢)を用い、試験期間中、市販固型飼料(日本クレア、CE-2)を自由摂取させた。予備飼育後、アムラ投与群には体重 1 kgあたり 100, 200, 500mg の EtOH 抽出物を 3 日間経口投与し、normal 群と control 群(高尿酸モデル)には溶媒を投与した。control 群とアムラ投与群には 3 日目のサンプル投与 1 時間前に、オキシノン酸カリウムを投与した。採血はサンプルの経口投与 2 時間後に腹部大動脈より行い、得られた血漿中の尿酸量を HPLC により測定した。</p> <p>【結果】アムラの EtOH 抽出物、70%熱 EtOH 抽出物および熱水抽出物によるキサントンオキシダーゼに対する阻害活性は終濃度 100μg/ml において、それぞれ 46, 30, 30%であった。最も阻害活性が高かった EtOH 抽出物を用いてマウスへの投与実験を行ったところ、血漿尿酸値を低下させる傾向が認められた。</p>	

C-9	重金属蓄積能を有するハッカ属植物の形質転換体の作出の試み
	○ 杉浦 友美、油布悠太、大門正志、三枝 聡、田淵 晃 (信州大 農学部 応用生命)
<p>【目的】近年、重金属による土壌や水質の汚染は深刻な環境問題となっている。そこで注目を集めているのが植物を利用した環境浄化である。本研究は、高い重金属蓄積能をもち、すでに再生系が確立されている <i>Mentha arvensis</i>(日本ハッカ)に、ヒトのメタロチオネイン遺伝子を導入し、より高濃度に重金属を蓄積する形質転換体を作成することを目的としている。</p> <p>【方法】まず、ヒトのメタロチオネイン遺伝子である <i>MT</i> を in frame で、4つ繋げた遺伝子である <i>MTL4</i> をプラスミド pBI121へ挿入し、pBI121-<i>MTL4</i> を作製した。同様に、<i>MT</i> を pBI121へ挿入し、pBI121-<i>MTL1</i> を作製した。次に、これらのプラスミドを <i>Agrobacterium rhizogenes</i> MAFF 03-01724 株へ導入した後、直接接種法により、<i>M. arvensis</i> へ感染させ、毛状根の誘導を試みた。また、コントロールとして、<i>A. rhizogenes</i> 野生株のみ、並びに、pBI121 を保持する <i>A. rhizogenes</i> をも感染させ、毛状根の誘導を試みた。さらに、これら毛状根からのカルス誘導に引き続いて、不定芽の誘導を試みた。</p> <p>【結果】直接接種法により、各 <i>A. rhizogenes</i> を感染させた結果、それぞれから複数の伸長する毛状根を得た。さらに、これらの毛状根を Gamborg-B5 培地(1 μM NAA, 10 μM 4-CPPU を含む)へ置床し、26°C、16 時間明期で培養した結果、緑化したカルスを得た。さらにこのカルスを同組成の培地へ置床し、培養した結果、<i>MTL4</i> が導入されていると予想されるカルスから不定芽を得た。</p>	

C-10	<p><i>Agrobacterium tumefaciens</i> 変異株で形質転換したソバにおける遺伝子標的の解析</p> <p>○野川優洋¹、Putu Supartha¹、清水力²、野末雅之¹、小島峯雄¹(¹信州大 繊維学部、²クマイイ化学工業株式会社 生命科学研究所)</p>
	<p>【目的】相同組換えによる遺伝子標的法 (gene targeting) は遺伝子の機能解析に必須の手段である。しかし、高等植物では様々な試みにもかかわらず、実用可能な遺伝子標的法はまだ開発されていない。本研究では我々が分離した T-DNA の植物ゲノムへの挿入過程に欠陥をもつ <i>Agrobacterium tumefaciens</i> の 2 変異菌と LBA4404 菌で <i>in planta</i> 形質転換したソバ (<i>Fagopyrum esculentum</i>, T₁ 世代) における遺伝子標的の解析した。</p> <p>【方法】標的遺伝子としてソバの内在遺伝子 (acc No. AB327276, U-gene と仮称) を選び、targeting vector は U-gene の中央に pBluescript の multi-cloning site を含む 445 bp の断片を挿入し、pIG121-Hm binary vector の GUS 遺伝子部分と置換することにより構築した。この targeting vector を <i>A. tumefaciens</i> M1 と M-31 変異菌及び LBA4404 菌に導入した。この <i>A. tumefaciens</i> 菌を使い、我々の開発した <i>in planta</i> 形質転換法でソバ (信濃 1 号) を形質転換し、無作為に選んだ T₁ 植物における遺伝子標的の成否を、表現形質、Southern 分析及び PCR で確認した。</p> <p>【結果】3 菌株の <i>A. tumefaciens</i> で形質転換したそれぞれの T₁ 世代の transformants の表現形質は均質で、用いた菌株により異なっていた。この結果は菌株により targeting construct の genome 中の挿入部位が異なっていることを示唆している。Southern 分析に於いて、M-1 と M-31 変異菌による transformants で内在 U-gene の band の位置が移動した。この結果は targeting construct が内在 U-gene の部位かそのごく近傍に挿入されたことを強く示唆した。Targeting construct 中の塩基配列と U-gene の隣接部位の塩基配列を primers として用いた PCR を行ったところ、M-1 菌による transformants では期待通りの 3'-end flanking DNA が M-31 菌による transformants では期待通りの 5'-end flanking DNA が高頻度で増幅された。以上の結果より、M-1 と M-31 菌で形質転換すると高頻度で "non-precise" gene targeting が起きることが示唆された。</p>

C-12	<p>Molecular characterization of rice MAPK components that interact with OsMEK1</p> <p>○Guosheng Xie, 加藤英樹, 今井亮三 (農研機構・北海道農研)</p>
	<p>【Research purpose】Cold stress-related Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway has been extensively studied in Arabidopsis, tobacco and maize. We have shown that OsMEK1 (OsMCK1) and OsMAP1 (OsMPK3) are induced during a moderate chilling (12°C) stress in rice. Here report identification of rice MAPK components specifically interact with OsMEK1, and possible involvement of thioredoxin h in the regulation of this MAPK signaling pathway.</p> <p>【Methods】Yeast Two-hybrid system and PEX and ONPG methods were used in evaluating the physical interaction. In vitro kinase assay was carried out with myelin basic protein (MBP) as a substrate. Northern blots were done with plants treated for 12°C stress.</p> <p>【Results】Two-hybrid screening identified specific and strong interactions of OsMEK1 with OsMPK3 and OsMPK6, respectively. <i>In vitro</i>, OsMEK1 directly phosphorylated OsMPK3. A constitutive active OsMEK1 (OsMEK1^{DD}) strongly enhanced kinase activity of OsMPK3. These data indicated that OsMEK1 and OsMPK3 are the components of the same signaling pathway for moderate chilling stress. Two hybrid assay also identified thioredoxin h as an interactor of OsMPK3. Thioredoxin h inhibited MBP kinase activities of OsMPK3 and OsMPK6 <i>in vitro</i>. Interestingly, thioredoxin h is up-regulated in response to moderate chilling stress. Therefore it was suggested that thioredoxin h is a negative regulator of OsMEK1-OsMPK3 and OsMEK1-OsMPK6 pathways.</p>

C-11	<p>シロイヌナズナの明暗応答タンパク質 CCaP1 の遺伝子発現解析</p> <p>○大内雄矢¹、長谷あきら²、前島正義¹ (1名大院・生命農、2京大院・理)</p>
	<p>【目的】本研究室では、シロイヌナズナにおいて新規の Ca²⁺ 結合タンパク質を発見し、その細胞内局在から、CCaP1 (<i>A. thaliana</i> cytosolic Ca²⁺-binding protein)、CCaP2、CCaP3 と命名した。この 3 つのタンパク質間のアミノ酸配列は類似性が高い。本研究は、各 CCaP の生理機能の解明を目的とする。</p> <p>【方法】各 CCaP と GFP の融合タンパク質を培養細胞で発現させることにより、細胞内局在を同定した。またプロモーター-GUS 解析および免疫ブロッティングにより、発現部位を明らかにした。次に、様々な生育条件でシロイヌナズナを生育させ、CCaP1、CCaP2 の転写レベルをリアルタイム PCR により定量解析した。フィトクロームおよびクリプトクローム遺伝子破壊株においても同様に遺伝子発現解析を行った。</p> <p>【結果】GFP による解析から、CCaP は細胞質に存在する可溶性タンパク質であることが明らかになった。またプロモーター-GUS 解析の結果は、CCaP1 は葉柄特異的に、CCaP2、CCaP3 は根特異的に発現蓄積することを示した。リアルタイム PCR の結果から、CCaP1、CCaP2 は暗条件で転写レベルが増加し、さらに暗条件を続けると 24 時間後には日中レベルの 10 倍程度まで増加すること、また転写レベルはジベレリンによっても増加することが分かった。暗条件で転写レベルが増加することに加えて、長期 (60 時間) の暗条件の後、光を照射すると数時間以内に転写レベルが日中レベルまで急速に低下することを発見した。また発芽直後の実生においても、CCaP1、CCaP2 は光に対して、同様の発現応答を示した。</p>

C-13	<p>葉緑体形質転換技術による光合成強化植物での外来タンパク質生産</p> <p>○田茂井政宏¹、藪田行哲²、鈴木明子¹、富澤健一³、横田明穂⁴、重岡成¹ (1近畿大・農・バイオ、2鳥取大・農・生物資源、3RITE・植物生理、4奈良先端大・バイオ)</p>
	<p>【目的】葉緑体形質転換技術は、従来の核ゲノム形質転換に比べて高発現が期待でき、花粉を介した導入遺伝子拡散の恐れのないなど、植物での物質生産を行う上で多くの利点がある。この技術を有効に利用するためには、元来高濃度 (約 400 mg/ml stroma) のタンパク質が存在する葉緑体ストロマ内に、どの程度の外来タンパク質を蓄積することが出来るのかを明らかにする必要がある。また、我々はカルビンサイクルで機能する FBP/SBPase を葉緑体に導入することで生産性が向上することを明らかにしているが、限られた葉緑体でのタンパク質発現において、生育増強のための必要最低限の FBP/SBPase 発現量を明らかにすることは非常に重要である。本研究では、まず GFP を葉緑体ゲノムに導入した形質転換タバコを作出し、葉緑体ストロマでの GFP 蓄積量の検討を行った。さらに、種々のプロモーター制御下で FBP/SBPase を発現させた形質転換タバコを作出し、光合成機能増大に適した FBP/SBPase 発現量を検討した。</p> <p>【方法・結果】psbA プロモーター下流に GFP 遺伝子を連結し、葉緑体ゲノムに導入した形質転換タバコでは、GFP が約 200~260 mg/ml stroma 蓄積していた。形質転換体における Ribisco などの内在性葉緑体タンパク質量に変化はなく、生育、光合成活性は、野生株と比較して有意な差が見られないことから、高濃度の外来タンパク質が葉緑体の生理機能に悪影響を及ぼさないことが示唆された。一方、種々のプロモーター (PpsbA, Prn, Prsp2 及び Prsp12) に FBP/SBPase 遺伝子を連結して、葉緑体ゲノムに導入した形質転換タバコは、野生株の 1-30 倍の FBPase 活性を示した。形質転換体の生育および光合成活性を比較した結果、2-3 倍の FBPase 活性の上昇により光合成活性は上昇し、植物乾重量は 1.8 倍に増加した。この FBP/SBPase 量は葉緑体タンパク質量の 1% にも満たないことから、光合成強化タバコでは 200~260 mg/ml stroma の外来タンパク質を野生株の約 1.8 倍生産できることが明らかになった。</p>

C-14	強光応答性スプライシング制御因子 atSR45a の相互作用因子の同定
	○ 田部記章 1、木村彩子 1、高橋香織 2、吉村和也 3、重岡成 1,2 (1 近畿大・院・バイオ、2 近畿大・農・バイオ、3 中部大・食栄)
<p>【目的】植物のストレス応答や防御に関する多くの遺伝子が選択的スプライシングにより複数の転写産物を生成している。これまでに、シロイヌナズナにおいて、スプライシング制御因子の一つであるセリン-アルギニンリッチ (SR) タンパク質の中で、強光により発現誘導される新規 SR タンパク質、atSR45a を同定し、その分子特性を明らかにした (Plant Cell Physiol. 48: 1036-1049, 2007)。そこで本研究では、スプライセオソーム形成における atSR45a の果たす役割を明らかにするために、本タンパク質と他のスプライシング因子の相互作用を解析した。</p> <p>【方法・結果】atSR45a は選択的スプライシングにより 6 種類の mRNA (atSR45a-1a e, -2) を生成する。そこで、それらの中で成熟型タンパク質と推測される atSR45a-1a および atSR45a-2 と、その他の 19 種類のシロイヌナズナ SR タンパク質および snRNP との相互作用を酵母 two-hybrid 法により解析した。その結果、atSR45a-1a および atSR45a-2 は、snRNP の一つであり、5'-スプライス部位に機能する U1-70K および SC35-like SR タンパク質である atSCL28 とともに C 末端の RS ドメインを介して相互作用した。さらに、シロイヌナズナ cDNA ライブラリーからのスクリーニングにより、3'-スプライス部位認識に機能する U2AF₅₅ やスプライセオソーム形成の後期に 5'-スプライス部位で機能する PRP38 とともに atSR45a-2 と相互作用することが示唆された。以上より、atSR45a はスプライセオソーム形成における基本構成因子を含めた多様なタンパク質との相互作用により、スプライシング効率の制御に関与することが示唆された。</p>	

C-16	酸化的ストレス応答性遺伝子の発現を制御する HsfA2 の上流シグナル伝達経路の解明
	○ 西澤彩子 1、吉田絵梨子 1、泰中仁志 1、藪田行哲 2、重岡成 1 (1 近畿大・農・バイオ、2 鳥取大・農・生物資源)
<p>【目的】シロイヌナズナの熱ショック転写因子である HsfA2 は、強光や高・低温、H₂O₂ 処理などの種々の酸化的ストレスに対して迅速に応答し、HSP、APX2、ガラクトキナーゼ合成酵素などの下流遺伝子の発現を誘導することで、耐性能の獲得において重要な役割を担っている (Plant J., 48, 535-547, 2006)。本研究では、HsfA2 のストレス応答性の発現を制御するシグナル伝達経路の解明を試みた。</p> <p>【方法・結果】HsfA2 の酸化的ストレス応答に対する新規タンパク質合成の必要性を検討するために、シロイヌナズナ培養細胞 T87 をタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) で 1 時間前処理し、高温ストレスあるいは H₂O₂ 処理による HsfA2 の誘導に及ぼす影響を転写レベルで解析した。その結果、両ストレス下における HsfA2 の誘導は CHX 処理により完全には抑制されなかったが、顕著な遅延が認められた。これまでに、動物 Hsf の誘導には変性タンパク質の蓄積が関与すること、さらには HSP90 もしくは HSP70 が Hsf の発現制御に関与していることが明らかとなっている。そこでまず、プロテアソーム阻害剤 (MG132) 処理による HsfA2 発現を解析したところ、処理 15 分後より迅速に誘導された。しかし、CHX による前処理は、MG132 処理による HsfA2 の誘導を完全に阻害した。さらに、HsfA2 の発現は HSP90 阻害剤である geldanamycin に対して著しく誘導され、その誘導は CHX によって抑制された。以上のことから、酸化的ストレス条件下における HsfA2 のストレス応答性の制御には新規に合成されるタンパク質が関与する経路としない経路が存在し、前者にはプロテアソームと HSP90 を介した経路が関与していることが示唆された。現在、これらの経路と細胞内活性酸素レベルとの関係を解析している。</p>	

C-15	シロイヌナズナ 8-oxo-(d)GTP pyrophosphohydrolase, AtNUDX1 によるヌクレオチドプールの浄化
	○ 小川貴央 1、吉村和也 2、重岡成 1 (1:近畿大・農・バイオ、2:中部大・食栄)
<p>【目的】ヌクレオチドプールは酸化ストレス下において活性酸素種 (ROS) の主要な標的因子となる。ヌクレオチドの酸化体の一つである 8-oxo-(d)GTP はシトシンだけでなく鋳型のアデニンと誤対合を形成するため、DNA 突然変異および mRNA の転写エラーを引き起こす。我々はこれまでに、シロイヌナズナ Nudix hydrolase ファミリーの一つである AtNUDX1 は酸化ヌクレオチド [8-oxo-(d)GTP] に対する加水分解活性を有し、大腸菌 <i>mutT</i> 欠損株の突然変異を抑制することを示した (J. Biol. Chem. 2005 280: 25277-83)。そこで本研究では、詳細な AtNUDX1 の生理機能の解析を行った。</p> <p>【方法・結果】大腸菌 <i>mutT</i> 欠損株を用いて AtNUDX1 の 8-oxo-GTP による転写エラーの抑制効果について検討した。その結果、転写エラーの発生は、AtNUDX1 の導入により有意に抑制された。さらに、AtNUDX1 破壊株 (<i>KO-nudx1</i>) を用いて、パラコート (PQ) 処理による酸化的ストレス条件下におけるゲノム DNA 中の 8-oxo-グアニン量の測定を行った。<i>KO-nudx1</i> では、通常条件下における 8-oxo-グアニン量が野生株と比較して約 2.5 倍蓄積していた。さらに、PQ 処理により、<i>KO-nudx1</i> の 8-oxo-グアニン量は約 2 倍にまで増加した。以上より、シロイヌナズナにおいて AtNUDX1 は酸化ヌクレオチドプールの浄化に機能し、DNA や RNA を酸化傷害から保護していることが明らかになった (Plant Cell Physiol. in press)。</p>	

C-17	ハナショウガ由来 α -フムレン合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析
	○ 岡本 尚 ¹ 、余 豊年 ¹ 、山崎 和久 ¹ 、仲宗根 薫 ² 、足立 恭子 ³ 、松田 諭 ³ 、原田 尚志 ³ 、三沢 典彦 ³ 、内海 龍太郎 ¹ (1 近畿大院・農・バイオ・2 近畿大院・工・生化工・3 海洋バイオ研)
<p>【目的】ハナショウガ (<i>Zingiber zerumbet Smith</i>) は、東南アジアや南太平洋周辺に生息し、その根茎に多くの種類のテルペノイドを含む植物である。そのテルペノイドのうちのいくつかは、薬理的に重要な役割を果たすものが含まれている。特にハナショウガにしか存在しないゼルンボンには非常に反応性に富み、バクテリアの情報伝達阻害剤や、その他種々の有用な化合物へのリード化合物として期待されている。しかしながら、これらのテルペノイドの生合成経路や、生理機能は明らかとなっていない。そこで我々は、ゼルンボン生合成の中間体としても考えられる、α-フムレン合成酵素遺伝子のハナショウガからの単離を報告する。</p> <p>【方法】ジャスモン酸など、誘導処理を施したハナショウガから total RNA を単離し、RT-PCR、RACE-PCR の手法を用いて全長 cDNA を単離した。それを大腸菌で発現させ、前駆物質であるフルネシルリン酸 (FPP) とを反応させ機能を解析した。また、リアルタイム PCR によりジャスモン酸による、遺伝子の誘導効果を調べた。</p> <p>【結果】単離された cDNA は、548 アミノ酸残基をコードする 1644 bp の ORF を持ち、推定分子量は 64.5 kDa であった。この遺伝子の機能解析の結果、主生成物として α-フムレン (95%) が、副生成物として β-カリオフィレン (5%) が合成された。さらに我々は、FPP 合成に関わる放線菌由来のメバロン酸経路遺伝子群を導入した大腸菌で <i>zss1</i> を発現させた。その結果、<i>in vivo</i> において α-フムレンが 51.9 mg / 50 mL 文化で合成された。また、<i>zss1</i> の転写は根茎に顕著に見られ、ジャスモン酸によって正に制御されていることが明らかとなった。このことは、ハナショウガにおける <i>zss1</i> の外敵からの防御としての機能を示唆している。</p>	

C-18	新規カチオン結合タンパク質 AtPCaP1 の分子遺伝学的機能解析
	○水藤百江、富岡利恵、前島正義 (名大院・生命農)
<p>【目的】AtPCaP1 はシロイヌナズナで発見された新規のカチオン結合タンパク質である。この分子は膜貫通領域を持たない親水性分子でありながら生理条件下で細胞膜に結合している。また特定の酵素の一次構造との類似性は見られない。さらに各種ストレス処理によるリアルタイム PCR 解析より、金属や病原ストレスにตอบสนองして発現レベルの上昇が見られた。以上より、AtPCaP1 は細胞の情報伝達に関与している可能性が考えられたがその詳細な生理機能は明らかでない。そこで本研究では分子遺伝学的手法を用いてこの分子の機能解明を行った。</p> <p>【方法及び結果】はじめに <i>PCaP1</i> の T-DNA 挿入変異株を作製した。次にこの変異株と野生株を用いて金属ストレス処理による表現型解析を行った。通常のカチオン組成をもつ MS 培地に対して鉄および銅が過剰または欠乏の固体培地を作製し、植物体を播種して 2 から 4 週間後に植物体地上部の生重量を測定した。その結果、鉄欠乏ストレスには破壊株は耐性を持ったが、銅の過剰、欠乏のどちらのストレスに対しても弱まること示唆された。さらに栽培時の個体密度を高めた密集ストレスに対する表現型の解析も行った。その結果、野生株と破壊株の高密集状態での植物体の間に統計的に有意な差が見られた。また <i>PCaP1</i> プロモーター::GUS を挿入した株を作製し、病原菌エリシターである <i>flg22</i> を与えたところ、塗布部分で顕著な <i>PCaP1</i> 発現増大が見られた。以上のことから、<i>PCaP1</i> がこれらのストレスにตอบสนองしてシグナル伝達を担う分子である可能性が示唆された。</p>	

C-20	シロイヌナズナの葉の形態制御遺伝子解析のためにクラスタリングを用いた新アプローチの開発
	○中尾幸子、高橋広夫、小塩高広、岩川秀和、小島晶子、町田千代子、小林猛、(中部大学・応用生物学部)
<p>【目的】植物における葉は主要な器官だが、まだ葉がどのようなメカニズムで作られているかは十分に解析されておらず、その解明は基礎科学的にも農業生物学的にも重要だと考えられる。そこでPCを用いた遺伝子発現情報の解析で、葉の形態制御に関わる遺伝子の探索と、未知遺伝子の機能予測を行う。</p> <p>【方法】シロイヌナズナの播種 15 日目の茎頂メリステムからRNAを抽出し、Affymetrix 社 GeneChip ATH1で測定し、遺伝子発現データを得た。採取した株は野生株、葉の左右対称性や扁平さに関わる遺伝子 <i>as1</i> 欠損株、<i>as2</i> 欠損株、<i>ASI</i> 過剰発現株、<i>AS2</i> 過剰発現株で、そのデータをクラスタリングツール FuzzyART で解析した。</p> <p>【結果】知見を得ている <i>as2</i> 遺伝子に抑制されている遺伝子 6 個のうち 5 個が同じクラスタに分類され、適切に分類されていることがわかった。更に、機能予測を行うために、すでに知見を得おり、葉の形態制御に関わっている遺伝子のみでクラスタを作成し、そこに機能未知の遺伝子を割り振り、機能予測を行える改良版 FuzzyART も作成した。</p>	

C-19	シロイヌナズナ新規カチオン結合タンパク質 AtPCaP1 の細胞膜局在様式
	○長崎菜穂子、富岡利恵、前島正義 (名大院・生命農)
<p>【目的】シロイヌナズナの細胞膜に局在する新規カチオン結合タンパク質 AtPCaP1 (<i>Arabidopsis thaliana</i> plasma-membrane associated cation-binding protein 1) はアミノ酸 225 個で構成され、Glu と Lys の総含量が約 35%と多く、類似する既知タンパク質はない。膜貫通領域のないタンパク質であるにもかかわらず、細胞膜に安定的に結合するという特徴をもつ。生理的機能は不明である。本研究では生化学的機能解明の一環として、この分子の膜結合様式の解明を目的とした。</p> <p>【方法及び結果】N 端の Gly にミリストイル基が結合すると推測し、この Gly を Ala に置換した PCaP1 の C 端側に GFP を融合させて発現させると、本来、細胞膜に検出される PCaP1 が細胞質に観察された。また、PCaP1 の cDNA を含む無細胞転写翻訳系に 3H-ミスチン酸を加えて反応させるとこの RI は PCaP1 に取り込まれた。これらは PCaP1 がミリストイル化されることを直接的に証明している。さらにホスファチジルイノシトールリン酸との結合も見出したので、その詳細を解析した。高純度に精製したリコンビナント PCaP1 を試料として、疎水性の膜上に固定化したリン脂質との相互作用を分析したところ、PI(3,5)P₂ と PI(3,4,5)P₃ に対する特異的結合がみられた。これらの知見から、細胞膜上の局所的な部位への結合が予測され、かつシグナル伝達分子としての機能が推測された。</p>	

C-21	シロイヌナズナの葉の発生分化に関わる AS2 遺伝子による背軸化因子と低分子 RNA の制御機構の解析
	岩崎まゆみ ¹ 、岩川秀和 ¹ 、上野宜久 ² 、高橋広夫 ^{1,3} 、小島晶子 ^{1,3} 、小林猛 ^{1,3} 、町田泰則 ² 、○町田千代子 ^{1,3} (¹ 中部大・植物バイオ、 ² 名大・理、 ³ 中部大・応生)
<p>【目的】高等植物において葉や花の側生器官は、向背軸(表裏)、基部先端部軸、中央側方軸という三つの軸に沿って発生・分化する。また、向背軸(表裏)の形成には、低分子 RNA が重要な役割をはたしている。シロイヌナズナの <i>ASYMMETRIC LEAVES1 (AS1)</i>、<i>ASYMMETRIC LEAVES2 (AS2)</i> 遺伝子は、三つの軸形成すべてに関与し、向背軸(表)化に関わっている。本研究では、<i>AS1</i> と <i>AS2</i> 遺伝子がどのような機構で向軸化に関わっているかを明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】<i>as1</i>、<i>as2</i> 変異体、<i>AS1</i>、<i>AS2</i> 過剰発現体、野生型から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析、real-time PCR 解析、低分子 RNA のノザン解析を行った。</p> <p>【結果】マイクロアレイ解析の結果、<i>as1</i>、<i>as2</i> 変異体において発現が増加し、<i>AS2</i> 過剰発現体において発現が減少する遺伝子として、メリステムの維持に関わる class 1 <i>KNOX</i> の既知遺伝子に加えて、複数の遺伝子が抽出された。さらに、real-time PCR 解析により、<i>AS1</i>、<i>AS2</i> は、葉の背軸(裏)化遺伝子の発現抑制に関わっていることが示唆された。さらに <i>AS2</i> の発現誘導系を用いて発現解析したところ、器官の背軸(裏)化に関わり、オーキシン応答性の転写因子である <i>ETTIN(ETT)</i> の発現抑制が、誘導後数時間以内に検出された。<i>ETT</i> は ta-siRNA による分解制御をうけていることがわかっている遺伝子である。<i>AS1</i>、<i>AS2</i> 遺伝子は、背軸(裏)化に関わる <i>ETT</i> の発現抑制を通して、向軸(表)化にかかわっていると考えられる。</p>	

C-22	アグロバクテリウム由来の植物 oncogene 6b はグローバルに植物遺伝子の発現に影響を与える
	○町田泰則 ¹ 、寺倉伸治 ¹ 、上野宜久 ¹ 、田上英明 ² 、中村研三 ³ 、塚越啓央 ³ 、 ¹ 名大院・生命理学、 ² 名市大院・自然科学、 ³ 名大院・生命農学
<p>【目的】6b 遺伝子は、植物病原細菌アグロバクテリウム・ツメファシエンシスの T-DNA 領域に存在する遺伝子であり、植物細胞に転移し染色体に組み込まれると、発現する。この遺伝子は、腫瘍の形態に影響を与えること、タバコ細胞中で発現させると、ホルモンを添加しなくても、タバコ細胞の分裂を促進することが知られている。本研究の目的は、6b の植物細胞における分子機能を解明することである。</p> <p>【方法】酵母 Two-hybrid 法により 6b と相互作用するタバコのタンパク質を探索した。同定した 3 種類の相互作用因子について分子的特性を解析した。6b 形質転換体の DNA マイクロアレイ解析を行った。</p> <p>【結果】(1) 3 つの分子を同定した (NtSIP1, NtSIP2, NtSIP3)。今回は、NtSIP3 が、ヒストン H3 であったことを報告する。(2) 6b タンパク質は、ヒストン H3 のヒストン・ホールド・ドメインに結合した。また、6b には、ヌクレオソーム構造を作る機能、つまりヒストン・シャペロン活性があった。以上から、6b はクロマチン構造に影響を与え、遺伝子の転写レベルを変化させると考えられる。(3) 6b 形質転換シロイヌナズナと正常シロイヌナズナの RNA の蓄積レベルをマイクロアレイ解析により比較した。6b 形質転換体で 1.5 倍以上に上昇していた遺伝子は 10%、1/1.5 以下に減少していたものは 10%であった。6b は植物の多くの遺伝子の mRNA のレベルに影響を与えることがわかった。このような中には、オーキシン誘導遺伝子などがあることを報告する。</p>	

D-2	ビフィズス菌の新奇オリゴ糖トランスポーターに関する研究
	○和田 潤、鈴木 龍一郎 ¹ 、伏信 進矢 ¹ 、片山 高嶺、北岡 本光 ² 、杉本 華幸 ³ 、田中 晶善 ³ 、熊谷 英彦、芦田 久 ⁴ 、山本 憲二 ⁴ (石川県大・生資工研、 ¹ 東大院農生科・応生工、 ² 食総研、 ³ 三重大院・生物資源、 ⁴ 京大院生命・統合生命)
<p>【目的】ビフィズス菌はプロバイオティクスとして、また、その増殖に有効なオリゴ糖はプレバイオティクスとして共に注目されている。最近、北岡らは、ラクト-N-ビオース (LNB; Gal β 1-3GlcNAc) およびガラクト-N-ビオース (GNB; Gal β 1-3GalNAc) を加リン酸分解する酵素ラクト-N-ビオースホスホリラーゼ (LNBP) が種々のビフィズス菌の菌体内に存在することを明らかにした。これら 2 糖は、ヒトミルクオリゴ糖やムチン型糖鎖の構成成分であり、ビフィズス菌はラクト-N-ビオシダーゼおよびエンド-α-N-アセチルガラクトサミニダーゼを分泌して、2 糖を遊離し菌体内に取込むと推測される。そこで、我々は <i>lnbp</i> 遺伝子の近位に存在する ABC トランスポーターを構成する遺伝子群に注目し、LNB/GNB の取り込みに関わっているものと推測して解析を行った。</p> <p>【方法】<i>Bifidobacterium longum</i> JCM1217 株より本トランスポーター遺伝子群を単離して塩基配列を決定すると共に、基質結合タンパク質 (GL-BP) を T7 システムを用いて大量発現させた。GL-BP と種々のオリゴ糖との結合は等温滴定熱量計 (ITC) を用いて、熱力学的に評価した。</p> <p>【結果】ITC による結合測定においては、LNB および GNB を滴下した時に発熱が観察され、ラクトースを始めとする他の 2 糖や単糖の滴下時には発熱が見られなかった。結合等温線の解析結果から、GL-BP は 1 箇所の基質結合サイトをもち、LNB および GNB に対する K_d がそれぞれ 87.0 nM および 10.3 nM であること、その結合様式はエンタルピー駆動型であることが明らかとなった。また、基質複合体の共結晶化に成功した。</p>	

D-1	環境要因によりアルキルフェノールポリエトキシレート (APEO _n) の分解が変化する
	○堀田 雄大*、細田 晃文*、吉川 博道**、田村 廣人* (*名城大農・生環科、**福岡工大・工)
<p>【目的】非イオン系界面活性剤アルキルフェノールポリエトキシレート (APEO_n) は、合成洗剤、乳化剤および農薬補助剤として大量に使用されてきた。ところが、APEO_n は、河川および農耕地に存在する微生物により内分泌かく乱活性を示すアルキルフェノール (AP) 等へ代謝毒性化されることが明らかになった。演者らは、新たに APEO_n を AP まで好氣的に分解する菌を農耕地から単離した。本菌株は、栄養状態の違いにより、APEO_n の分解に違いが確認された。そこで、分解活性促進物質の探索を目的として本研究を実施した結果、分解活性促進物質を同定したので報告する。</p> <p>【方法】オクチルフェノールポリエトキシレート (OPEO_n) を炭素源とした栄養条件の異なる培地を用いて、本菌株による分解試験を行い、本菌株における分解活性促進物質を探索した。定量分析は、ガスクロマトグラフィー (GC-17A、SHIMADZU)、分解機構の確認は、MALDI-MS (Voyager-DE PRO) をそれぞれ用いた。</p> <p>【結果】本分解菌は、<i>gyrB</i> 遺伝子の塩基配列より、<i>P. putida</i> BSN22 株と命名した。分解機構は、1) OPEO_n の末端酸化による OPEO₃ までの分解、2) OPEO₃ から直接 OPEO₁ を生成、3) OPEO₁ から OPEO₁-カルボン酸体を經由し OP を生成するという 3 段階の分解により、OP を生成している可能性が示唆された。栄養状態を変えた分解試験の結果、本菌株の分解活性は硫酸鉄によって促進されていた。また、硫酸鉄は、本菌株の増殖に影響を与えなかった。この結果から、環境中の栄養条件の違いが、分解菌の増殖ではなく、酵素活性等の性質に影響を与えることにより、分解物の生成速度が促進されることが明らかになった。このことは、環境要因が内分泌かく乱化学物質による環境汚染度を左右している可能性があることが示唆された。</p>	

D-3	枯草菌由来新規リパーゼの機能解析
	昌山敦 ¹ 、○加藤志郎 ¹ 、寺島卓也 ¹ 、桑名律子 ² 、高松宏治 ² 、渡部一仁 ² 、吉村徹 ¹ 、邊見久 ¹ 、角田秀典 ³ 、木原智子 ³ 、森山龍一 ³ (¹ 名大院・生命農、 ² 摂南大・薬、 ³ 中部大・応用生物)
<p>【目的】細菌胞子の発芽は、胞子耐熱性を担う表層構造 (胞子固有のペプチドグリカン (コルテックス) 層、母細胞膜由来の外膜、及びコートタンパク質層) の自己分解過程と考え得る。近年、胞子膜脂質代謝と発芽との間の重要な関連性が示唆され、強い興味を持たれている。そこで我々は、枯草菌休眠胞子中に見出された新規リパーゼ様タンパク質 <i>YcsK</i> の機能解析を試みた。</p> <p>【方法】枯草菌胞子形成時における <i>ycsK</i> 遺伝子の転写解析、<i>ycsK</i> 欠損株胞子を用いた表現型の解析 (発芽応答能及び膜脂質の定量分析)、及び組み換え体を用いた <i>in vitro</i> における枯草菌及びセレウス菌 <i>YcsK</i> の酵素学的解析を行った。</p> <p>【結果】ノーザンブロットと GFP 融合タンパク質を用いた解析から、<i>ycsK</i> 遺伝子が σ^K 及び <i>GerE</i> に依存して胞子特異的に発現すること、及び <i>YcsK</i> がコート層へ局在することが示唆された。また、同遺伝子欠損により胞子の L-アラニンに反応する発芽能が消失した。大腸菌に発現させた組換え体を用いた Zymography の結果、<i>YcsK</i> がリパーゼ活性を有することが示唆されたことから、我々は本酵素を <i>LipC</i> と命名することを提唱した (<i>J. Bac.</i>, 189, 2369)。さらに、休眠胞子中の遊離脂肪酸量を定量した結果、野生株胞子と <i>lipC</i> 欠損株胞子に有意な差が見られ、<i>LipC</i> による胞子外膜の脂質代謝と L-アラニンによる発芽開始機構が密接に関連している可能性が示唆された。また我々は、セレウス菌 <i>LipC</i> ホモログがリパーゼ活性を有することも見出した。これらの結果から、<i>Bacillus</i> 属細菌ゲノムに広く保存されている本酵素の胞子発芽機構への関与が、少なくとも <i>Bacillus</i> 属細菌に普遍的な現象であると考えられた。</p>	

D-4	コリネ型アミノ酸生産菌のアルカリ性抵抗性に関わる機能の探索
	○中村美緒 ¹ 、深井理恵 ¹ 、大西淳子 ² 、竹野誠記 ¹ 、池田正人 ¹ (信州大農・応生科 ¹ 、協和発酵 ²)
<p>【目的】 中性微生物は、一般に、細胞外のpHが弱酸性や弱アルカリ性でも生育することができる。そのpH恒常性に関する仕組みは、<i>E. coli</i> など一部の細菌で解析が進められているが、アミノ酸発酵菌である <i>Corynebacterium glutamicum</i> では報告がない。今回、同菌における弱アルカリ性環境での生育の仕組みの解明を目的として、以下の検討を行った。</p> <p>【方法】 変異株の生育におけるpH依存性は、最少培地を用いた寒天培地および液体培養で調べた。培地のpHは、種々のバッファーを用いて調整した。相補遺伝子のショットガンクローニングやシーケンスは定法に従って行った。</p> <p>【結果】 我々は先に、<i>C. glutamicum</i> 野生株からランダム変異により弱アルカリ性の寒天培地で生育できなくなった変異株を多数取得して報告した(H19年3月農化大会)。これら変異株の多くは中性付近では野生株と同等に生育したが、pH9を超えるアルカリ性環境では野生株より著しい生育不良を示した。従って、これら変異株はアルカリ性抵抗性に関わる機能が欠損した株であると考えられた。本菌のゲノムライブラリからアルカリ性感受性を回復させるDNA断片の探索を試みた。その結果、各変異株から相補DNA断片が取得された。シーケンスの結果、これらの中には機能的に異なると推定される種々の遺伝子が含まれていた。この結果から、本菌のアルカリ性抵抗性の仕組みは1つではなく、複数の機能が関わっていることが示唆された。</p>	

D-6	Electrochemical regulation of metabolism in <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ET-3
	○Yung-Fu Wang, Masaki Masuda, Seiya Tsujimura, Kenji Kano Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University
<p>【Purpose】 In previous studies, it has been proved that some kinds of bacteria can utilize endogenous mediator for electron transfer to carbon electrode during substrate oxidation. This metabolism in microbe should be regulated by controlling the rate of electron transfer out of cell by adjusting the electrode potential. In this study, <i>P. freudenreichii</i> ET-3 was utilized to verify this purpose.</p> <p>【Methods】 <i>P. freudenreichii</i> ET-3 and glucose were used as a biocatalyst and a substrate (electron donor), respectively. All electrochemical experiments were carried out in a flow-type electrolysis cell filled with a carbon/graphite-felt electrode and the growth medium of <i>P. freudenreichii</i> ET-3. Amperometry was performed at 37 °C under anaerobic conditions. The profiles of end products were analyzed for the electrochemical growth medium under steady state conditions at given applied potentials.</p> <p>【Results】 After seeding bacteria into the electrolysis cell, the system produced an oxidation current in the presence of glucose when positive potentials were applied. This means that the microbial cells donate the electrons to the electrode during the glucose oxidation without artificial mediator. At a low applied potential of -260 mV vs. Ag/AgCl, lactate was the dominant end-product and reached 18 mM, however it decreased to 5 mM at a positive potential of 500 mV, in which formate became the dominant one. The concentration of propionate which was one of the typical end products also decreased when the potentials changed from -260 to 500 mV. It was considered that electrode at high applied potentials can work as the electron acceptor for microbial cells, which leads to the change in the end-product profile from that obtained under normal anaerobic conditions.</p>	

D-5	コリネ型アミノ酸生産菌の酸素利用に関わる機能の探索
	○小松朋葉 ¹ 、馬場将弘 ¹ 、大西淳子 ² 、竹野誠記 ¹ 、池田正人 ¹ (信州大農・応生科 ¹ 、協和発酵 ²)
<p>【目的】 アミノ酸発酵菌 <i>Corynebacterium glutamicum</i> は発酵条件として好気性の環境を要求する。このため、O₂ はアミノ酸の生産効率を左右する重要な要因の1つとなっている。我々は先に、<i>C. glutamicum</i> が寒天培地上でコロニーを形成できるO₂ 濃度の限界は0.5%付近にあることを報告した。しかし、本菌のO₂ 利用にどのような機能が関わっているか、その詳細は明らかでない。今回、本菌のO₂ 利用に関わる遺伝子の探索を目的に以下の検討を行った。</p> <p>【方法】 変異株の生育における酸素依存性は、最少培地を用い、振とう培養(高通気条件)と静置培養(低通気条件)の2条件で調べた。相補遺伝子のショットガンクローニングやシーケンスは定法に従って行った。</p> <p>【結果】 我々は先に、<i>C. glutamicum</i> 野生株からランダム変異により低O₂ (0.5% O₂) 環境下での寒天培地で生育できなくなった変異株を多数取得して報告した(H19年3月農化大会)。これら変異株の生育特性を液体培養で調べた。変異株の多くは振とう培養では野生株と同等に生育したが、静置培養では野生株より著しい生育不良を示した。従って、これら変異株は酸素の利用に関わる機能が損なわれた株であると考えられた。本菌のゲノムライブラリから酸素要求性を回復させるDNA断片の探索を試みた。その結果、各変異株から相補DNA断片が取得された。シーケンスの結果、これらの中には機能的に異なると推定される数種の遺伝子が含まれていた。</p>	

D-7	乳酸菌とプロピオン酸菌の共培養による細胞外電子移動の促進
	○増田真規、王永福、辻村清也、加納健司(京大院農)
<p>【目的】 微生物燃料電池は、微生物が有機物の代謝を行う際に産み出される還元力を電気エネルギーに変換して取り出すことができる装置である。今回は代表的な嫌気性菌の一つである乳酸菌 <i>Lactococcus lactis</i> を触媒として微生物燃料電池の基礎的な研究を行った。グルコースを基質として嫌気的に培養したとき、乳酸菌はNADHからの電子受容体としてピルビン酸を利用し、乳酸を生成する。本研究では細胞外電子受容体として電極を用い、適当な電位を印加して培養することで、NADHから電極への電子移動を引き起こすことを目的とした。また、著量の電子伝達メディエーターを生成することが報告されているプロピオン酸菌 <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ET-3との混合培養を行うことで、効率的な電子移動反応系の構築を目指した。</p> <p>【方法】 黒鉛化処理したカーボンフェルトを作用電極として用い、ポテンシオスタットで電極の電位を制御し、37°C、嫌気条件下で乳酸菌、プロピオン酸菌の培養、および両者の混合培養を行った。また、電極への電子移動を電流として測定した。</p> <p>【結果】 電極電位を一定に保った条件で乳酸菌を培養したところ、電流が観察され、生成物のHPLC分析では、乳酸生成量の減少と酢酸の生成がみられた。このことから、乳酸菌内のNADHから電極への電子移動が起こったと考えられる。また、電子移動の効率を高める目的で培地に少量のメディエーターを添加したところ、より大きな電流が得られ、乳酸の減少と酢酸の増加がより顕著に表れた。次に、乳酸菌とプロピオン酸菌の混合培養を行った結果、電流値の増加が見られたため、プロピオン酸菌の生成したメディエーターにより、電極への電子移動が促進される可能性が示唆された。</p>	

D-8	酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> における NADH キナーゼ活性の必須性
	○宮城 光、河井重幸、村田幸作 (京大院・農)
<p>【目的】NAD キナーゼは NAD のみをリン酸化して NADP を生合成するのに対して、NAD(H)キナーゼは NAD と NADH の両方をリン酸化する。酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> には、3 つの NAD(H)キナーゼ Utr1p(細胞質内に局在)、Pos5p(ミトコンドリアに局在)、及び Yef1p(局在性不明)が存在する。また、NAD(H)キナーゼの 3 重変異株 (<i>utr1yef1pos5</i>) は致死性を示す。本研究では、NADH キナーゼ活性を示さない大腸菌由来 NAD キナーゼ (YfjB) を用いて、細胞の生育とミトコンドリア (Mit) の機能に、NADH キナーゼ活性が必須であるかどうかを明らかにすることを試みた。</p> <p>【方法】<i>UTR1</i> と <i>yfjB</i> を、それぞれ <i>POS5</i> のプロモーター、及び <i>POS5</i> のプロモーターと Pos5p の推定 Mit リーダー配列の下流につないだキメラプラスミドを作製した。これらのキメラプラスミドを用いて、<i>utr1yef1pos5</i> を宿主としたプラスミド・シャッフリングを行い、細胞の生育性と <i>pos5</i> の表現型の相補性を観察した。また、推定 Mit リーダー配列の付加による Utr1p と YfjB の Mit への輸送を実証するために、酵母細胞を Mit 画分と細胞質画分に分画し、各画分における NAD キナーゼ活性を測定した。さらに、Utr1p と YfjB の下流に GFP を融合させたタンパク質を細胞内で発現させ、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。</p> <p>【結果】プラスミド・シャッフリングより、細胞の生育と Mit の機能に、NADH キナーゼ活性が必須ではないことが示唆された。また、分画実験より、推定 Mit リーダー配列を付加した Utr1p と YfjB が Mit へ輸送され、推定 Mit リーダー配列を付加していない Utr1p と YfjB が、Mit へ輸送されないことを示す結果が得られた。</p>	

D-10	メチロトロフ酵母 <i>Pichia methanolica</i> の 2 種のアルコールオキシダーゼ遺伝子プロモータの評価と発現制御
	○中川智行 ¹ 、藤村朱喜 ² 、宮地竜郎 ² 、富塚登 ² 、早川享志 ¹ (¹ 岐阜大 応用生物科学部、 ² 東農大 生物産業学部)
<p>【目的】<i>P. methanolica</i> はメタノール代謝の鍵酵素アルコールオキシダーゼ (AOD) をアイソザイムとして保持する。本アイソザイムは 2 種のサブユニットがランダムに 8 量体へ会合することにより形成され、両サブユニットをコードする AOD 遺伝子は共にメタノール (MeOH) で強力に誘導されるが、その発現は異なる制御をうけている。我々は、両遺伝子プロモータを異種タンパク発現系に用いることで、単に異種タンパク質を大量発現させるだけでなく、必要に応じて 2 種のタンパク質を個々に発現制御させることが可能であると考えている。そこで、本研究は 2 種の AOD プロモータを応用した新規 <i>P. methanolica</i> 異種タンパク発現系の開発を目的とする。</p> <p>【結果】出芽酵母の <i>PHO5</i> をレポーターとし、本遺伝子がコードする酸性フォスファターゼ (AP) の活性により 2 種の AOD プロモータ (P_{MOD1}、P_{MOD2}) の発現制御について評価した。AP は P_{MOD1} の支配下のもと、MeOH のみならずグリセロール (Gly) によっても強力に発現した。一方、P_{MOD2} による発現は Gly で完全に抑制されたが、Gly は MeOH による P_{MOD2} 発現を抑制しなかった。また、MeOH 濃度に対する発現応答にも差異がみられ、低 MeOH 下では P_{MOD1} が、高濃度下では P_{MOD2} の発現が支配的であった。さらに、酸素濃度が AOD 発現において重要であり、高酸素濃度条件で P_{MOD2} は P_{MOD1} よりもはるかに強い発現を示した。以上のことから、P_{MOD1} および P_{MOD2} は異種タンパク質の大量生産において、発現ステージおよび発現量をメタノール添加量・時期、さらには酸素供給量にて調節できる可能性が示された。</p>	

D-9	分裂酵母の経時寿命を延長させる新規遺伝子 <i>ecl1</i> ⁺
	○大塚北斗、三田知花、饗場浩文 (名大院・生命農学)
<p>【目的】出芽酵母、線虫、ショウジョウバエなどのモデル生物を用いた研究が、現在の老化遺伝学研究において大きな役割を果たしている。最近、分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) でも種をこえて保存された老化制御因子とその効果が一部証明された。我々は老化遺伝学研究において新たな知見を得ることを目指し、分裂酵母の定常期生存率 (経時寿命) を上昇させる新たな因子を同定することを目的とした。</p> <p>【方法】酵母の寿命は分裂寿命と経時寿命があり、経時寿命は増殖定常期における生存率を経時的に測定することで解析できる。我々は、経時寿命が短いとされるストレス応答性 MAP キナーゼ: Sty1 の欠損株を用い、経時寿命を延長させる多コピー数サプレッサー遺伝子を検索した。</p> <p>【結果】多コピー数サプレッサー遺伝子の検索結果、以前我々が高浸透圧感受性変異株として同定した <i>hos2</i> 変異株の高浸透圧感受性を相補する DNA 領域が <i>styl</i> 欠損株の経時寿命を延長させることがわかった。さらなる解析の結果、この DNA 領域には未同定の 80 アミノ酸から成るタンパク質をコードする遺伝子が存在すること、この遺伝子がコードするタンパク質は主に核に局在すること、そしてこの遺伝子の過剰発現は分裂酵母の野生株の経時寿命をも延長させ、さらに過酸化水素への耐性も上げることがわかった。ここで、我々はこの新規な遺伝子を <i>ecl1</i>⁺ (extended of chronological lifespan) と命名することにした。また、この遺伝子と、多くの生物種間で寿命を延ばす条件として知られているカロリー制限との関係も解析した。結果、野生株をカロリー制限すると経時寿命が延びるのに対し、<i>ecl1</i>⁺ を高発現させた野生株にカロリー制限を行っても経時寿命に大きな変化がないことがわかった。</p>	

D-11	麹菌 CCAAT-box 結合因子による転写制御ネットワークの網羅的解析
	○高橋 明珠 ¹ 、佐野 元昭 ² 、小林 哲夫 ¹ 、加藤 雅士 ¹ (1名大院生命農・生物機構、2金沢工大・ゲノム研)
<p>【目的】糸状菌 CCAAT-box 結合因子 (Hap 複合体) は産業上重要な酵素遺伝子を始めとする様々な遺伝子の転写を制御することが明らかになっている。近年、麹菌は全ゲノム配列が決定され、ゲノムワイドでの研究が可能となった。我々は Hap 複合体により転写制御される遺伝子を網羅的に同定し、Hap 複合体による麹菌転写制御ネットワークの全体像を理解することを目的とした。</p> <p>【方法及び結果】転写制御下の遺伝子群を網羅的に解析するため、Hap 複合体サブユニットの優勢阻害型変異株を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、多数の翻訳関連遺伝子が転写抑制されることが明らかとなった。麹菌ゲノム中に同定されている全てのリボソームタンパク質 (RP) は Hap 複合体により転写抑制されていた。麹菌に加え、遺伝学的解析に優れた <i>Aspergillus nidulans</i> の代表的な RP 遺伝子の発現についてもノーザン解析を行ったところ、Hap 複合体に依存した転写抑制が起こることが分かり、より普遍的な現象であることが明らかとなった。これら RP のプロモータ配列には CCAAT 配列を有するものと有さないもの両方があり、Hap 複合体による抑制はプロモータ領域への直接の結合によるものでなく、間接的なものであることが示唆された。この可能性を検証するために、代表的ないくつかの RP プロモータに <i>lacZ</i> 遺伝子を融合して <i>A. nidulans</i> に導入し、<i>in vivo</i> における CCAAT 配列の機能を解析した。その結果、予想通りプロモータ中の CCAAT 配列は RP の転写抑制に直接関与していないことが示された。プロモータ中の保存配列を詳細に調べると、全ての RP プロモータに共通する 9塩基の配列 (CTAAGCGAG) が存在していることが明らかとなった。現在、この配列が RP 遺伝子の発現に与える影響に関して詳細な解析を進めている。</p>	

D-12	アラキドン酸生産性系状菌 <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 の <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation (ATMT)法による脂肪酸組成改変
	○安藤晃規、角田洋輔、小川順、櫻谷英治、久保康之 ¹ 、清水昌 (京大院農・応用生命、 ¹ 京都府大院・農)
<p>【目的】我々はこれまでに <i>Mortierella alpina</i> 1S-4 及びその誘導変異株を題材とした、アラキドン酸をはじめとする各種の高度不飽和脂肪酸生産を報告してきた。また包括的な形質転換法を開発し、分子育種を行うことで脂肪酸組成の改変を実現してきた。従来 <i>M.alpina</i> 1S-4 における宿主ベクター系では、遺伝子銃を用いて直接胞子に形質転換ベクターを打ち込むことで形質転換を行ってきたが、今回新たに <i>Agrobacterium tumefaciens</i> を用いた遺伝子導入法により脂肪酸組成の改変を試みたので報告する。</p> <p>【方法】宿主として従来の宿主ベクター系におけるウラシル要求性変異株を用い、バイナリーベクターの T-DNA 領域に野生株由来の <i>ura5</i> 遺伝子発現用カセットおよび過剰発現を目的とした本菌株由来の $\omega 3$ 遺伝子発現カセットをタンデムに挿入した形質転換ベクター pBIG3ura5$\omega 3$ を構築した。本ベクターをエレクトロポレーションにより、<i>A. tumefaciens</i> C58C1 株に導入し、<i>Mortierella alpina</i> 1S-4 株の形質転換を行い、脂肪酸組成の分析を行った。</p> <p>【結果】従来にない安定性を示す、形質転換体の取得に成功した。またそれらの脂肪酸分析から宿主株とは有意な差を示す、$\omega 3$ 遺伝子の過剰発現に起因するエイコサペンタエン酸の蓄積を確認した。本結果より従来の遺伝子銃による形質転換法に変わる、ATMT 法による穏やかな条件下でのより安定した過剰発現系の構築に成功した。</p>	

D-14	バイオリファイナーを目的としたリボフラビン過剰生産 <i>Ashbya gossypii</i> に関する研究
	○田島諭 ¹ 、朴龍洙 ^{1,2} (¹ 静大 農 応 生 化、 ² 静大・創造科学技術大学院・総合バイオサイエンス)
<p>【目的】植物油の精製工程では、粗油脂に含まれる色素や臭気を除去するために酸性白土が用いられる。しかし、その吸着能力が低下すると油脂系廃棄物(廃白土)として毎年 10t以上が排出される。本研究室では、油脂を資化する <i>Ashbya gossypii</i> ATCC 10895 を用いることにより、廃白土に残留する植物油から、リボフラビン(ビタミン B2)の生産を行い、有価物の可能性を検討している。本研究では、アルキル化剤を用いてランダムに突然変異の誘発を行い、代謝拮抗阻害物質に耐性を有する変異株をスクリーニングし、リボフラビン高生産株を獲得することを目的とした。また、獲得した高生産変異株のプロテオーム解析により生化学的性質を検討する。</p> <p>【方法】イタコン酸は <i>A. gossypii</i> のリボフラビン合成に関与するグリオキシル酸経路の酵素イソクエン酸リアーゼを阻害する物質と知られる。これを利用して、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンによって突然変異処理した菌株をイタコン酸含有寒天培地に塗布し、イタコン酸耐性株を獲得した。リボフラビンは黄褐色の物質であり、コロニーの色の濃淡を指標として変異株を選別した。獲得した変異株のプロテオーム解析を行い、タンパク質発現を野生型株と比較した。</p> <p>【結果】3 Lリアクターにおいて野生株を用いた場合、純粋な菜種油を使用した培養では、リボフラビン濃度は 1.0 g/L である。一方、今回獲得した変異株は同様の培養条件で 3.6 g/L と生産性は 3 倍以上上昇した。また、炭素源を廃白土とした培養でも同様の結果を示した。今後は、変異株における代謝の変化について解析を行い、更なるリボフラビン過剰生産株の獲得を目指す。</p>	

D-13	知識情報処理を用いた高機能性酵素の効率的デザイン
	○富田康之、加藤竜司、大河内美奈(名大院・工)、本多裕之(名大院・工、名大・予防早期医療創成センター)、木村昌博、中野秀雄(名大院・生命農)、則武智哉、吉田洋一(宇部興産)
<p>【目的】酵素の活性を向上させるためのタンパク質工学的手法の多くは、置換の種類や組み合わせが膨大なため、多大な時間を必要とする非効率的なものが多い。本研究では、酵素活性の向上に関わる残基置換の組み合わせを情報処理によってルールとして抽出し、さらに高活性な酵素を効率的にデザインする新規手法の開発を目指した。</p> <p>【方法】本研究では、2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA)と基質との相互作用が考えられる 4 部位(73, 76, 238, 239 位)において、アミノ酸の変異 DNA ライブラリをスクリーニングした。結果得られた 40 個の変異体における残基置換の組み合わせを物理化学的な指標へと変換し、知識情報処理手法の 1 つである Fuzzy Neural Network (FNN)を用いて、組み合わせルールの探索を行った。</p> <p>【結果】FNN による解析の結果、73, 76, 238 位において、活性に寄与する重要なルールが得られ、そのルールに従い、実験的にはスクリーニングされなかった 12 の変異酵素を新たに合成したところ、12 個中 11 個の変異体が野生株以上の高活性(3 倍以上)を示した。更に、はじめのスクリーニングよりも高活性の変異体が観察され、本手法の有効性が示された。さらに、分子モデリング・シミュレーションにより、基質と酵素の立体構造の観点からも考察を行った。</p>	

D-15	2'-デオキシリボヌクレオシドの酵素合成に有用なホスホペントムターゼの機能解析
	○堀之内伸行、川野貴子、酒井隆史、小川順、清水昌 (京大院・農・応生科)
<p>【目的】2'-デオキシリボヌクレオシド(dNS)は PCR の普及、遺伝子治療の開発、核酸系抗ウイルス剤の開発に伴い需要の拡大が予想されている。我々はヌクレオシド分解系酵素群と解糖系をカップリングさせたマルチステップ酵素法による、グルコース、アセトアルデヒド、核酸塩基を原料とする dNS 合成法の開発を試みている。本研究では鍵酵素となるホスホペントムターゼ(PPMase)に関し、リン酸化合物耐性酵素の開発を試みた。</p> <p>【方法】本 dNS 生産プロセスは、パン酵母の ATP 再生系を利用するグルコースからのフルクトース 1,6-二リン酸(FDP)の誘導、デオキシリボアルドラーゼによる FDP とアセトアルデヒドからの 2-デオキシリボース 5-リン酸(DR5P)の合成、PPMase およびヌクレオシドホスホリラーゼによる DR5P と核酸塩基からの dNS 合成、の 3 ステップからなる。この生産プロセスにおいて、プロセス前半にて副生する FDP などのリン酸化合物は PPMase 反応に阻害的に作用する。そこで我々は、dNS 生産に有用なリン酸化合物耐性 PPMase 生産菌を探索し、<i>Bacillus sphaericus</i> AKU229 株を得た。さらに <i>B. sphaericus</i> 由来 PPMase(<i>Bacillus</i> PPMase)遺伝子を大腸菌にクローニングし、<i>E. coli</i> 由来 PPMase(<i>E. coli</i> PPMase)との機能比較を行なった。</p> <p>【結果】<i>Bacillus</i> PPMase の大腸菌での発現系を確立した。また、<i>Bacillus</i> PPMase がこれまでに我々が PPMase 触媒として用いていた <i>E. coli</i> PPMase よりも高いリン酸化合物耐性を示すことを明らかにした。さらに、グルコースから微生物調製した DR5P(FDP などのリン酸化合物を含有する)を基質とした反応において、<i>Bacillus</i> PPMase 発現大腸菌を PPMase 触媒とした場合、<i>E. coli</i> PPMase 発現大腸菌を用いるよりも効率的に dNS 合成が進行した。</p>	

D-16	超好熱性古細菌由来プレフォルデンによる有機溶媒耐性の向上
	○蟹江慧、栗本昌樹、大河内美奈、(名古屋大・工)、本多裕之(名古屋大・工、名大予防早期医療センター)
<p>【目的】微生物を用いた物質生産は、常温常圧で反応が進行し、反応ステップも短縮できることから、化学反応プロセスへの応用が期待されている。疎水性基質では有機溶媒-水二相系システムが有効であると考えられるが、微生物が有機溶媒に対して耐性を持つことが重要となる。本研究では、分子シャペロン関連遺伝子による有機溶媒耐性メカニズムへの効果を検討した。</p> <p>【方法】有機溶媒に接触後の遺伝子発現解析により、有機溶媒耐性に関与する遺伝子群の抽出・耐性株の作成を目指してきた。本研究では、遺伝子発現解析で定常的に高発現した遺伝子群に細胞のストレス応答に関与する分子シャペロンが多く見出されたことから、分子シャペロン関連遺伝子を大腸菌に導入した。これらのシャペロン導入株を、有機溶媒を重層した寒天培地で30℃、24h培養し、コロニー形成率により有機溶媒耐性を評価した。</p> <p>【結果】極限環境で生育する、超好熱性古細菌 <i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3 由来プレフォルデン遺伝子導入株において、有機溶媒耐性の向上が確認された。有機溶媒添加3時間後の細胞内ヘキサミン濃度を測定したところ、プレフォルデン遺伝子導入による有機溶媒取り込み量が減少した。更に、シャペロン活性の低下したプレフォルデン N 末、および C 末欠損変異体を用いて有機溶媒耐性を評価した結果、耐性の向上は確認されず、野性株のプレフォルデン高発現株のみ耐性が向上した。以上のことから、プレフォルデンの分子シャペロン活性により、有機溶媒耐性が向上したと考えられる。</p>	

D-18	グルタミン酸デカルボキシラーゼのバイオインフォマティクス解析と血球での C 末領域異常タンパク質の発現解析
	松川聡子、新田陽子、○植野洋志(奈良女大・院・食物)
<p>【目的】高等生物由来のグルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)は、抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸(GABA)の合成を担う酵素である。二種類の異なる遺伝子産物であるアイソフォームの存在が明らかにされており、脳などでは、同一細胞に両方のアイソフォームが同時に発現することより、局在性・活性制御など多くの疑問が投げかけられている。当研究では、アイソフォーム間の相同性、イントロンとエキソンの位置関係、立体構造上でのエキソン部位などの解析をバイオインフォマティクス手法を用いて行った。また、GAD は糖尿病の自己免疫抗原タンパク質であり、タンパク質としての異常発現の有無に関して注目されている。胎児期では、スプライシング異常による GAD25 の発現が報告されているが、その他の報告はまだなされていない。今回、血球における GAD 発現の解析を行ったので、その結果も合わせて報告する。</p> <p>【方法】バイオインフォマティクス解析は、Web 上で公開されているツールを用いて、ゲノム解析結果を基にして行った。ヒト由来の血球から、単球を取り出し、Western blot, RT-PCR により GAD の発現を解析した。</p> <p>【結果・考察】GAD は 16 のエキソンより構成され、エキソン 1~3 の相同性は低い。アイソフォーム間でイントロンの挿入箇所は保存されていた。末梢血では、30 と 80 KDa のバンドが GAD65C 末領域を認識する抗体により Western blot で確認された。GAD65/67C 末認識抗体では確認できず、RT-PCR 解析の結果、GAD65C 末特異的抗体のエピトープ領域は増幅されたが、GAD65/67 領域は増幅できなかった。エキソン 15 と 16 の境界に前者のエピトープが位置することより、発現タンパク質の C 末領域は、エキソン 16 が欠損している可能性、つまり、組織特異的スプライシング異常を示唆する。</p>	

D-17	降圧作用短鎖ペプチドのペプチドインフォマティクスによる活性向上
	○加藤竜司、加賀千晶、富田康之、大河内美奈(名古屋大学工学研究科)、本多裕之(名古屋大学工学研究科、名大予防早期医療センター)、国松己歳(名古屋女子大学)
<p>【目的】様々な機能的ペプチドの探索における最大の困難は、20 種類のアミノ酸の組み合わせ数が長鎖ペプチドや非天然アミノ酸の利用に応じて膨大となり、実験的な探索が不可能である点である。このような非効率的な探索では目的の機能を持ったペプチドを得られる確率が非常に低い。このため、実験データを情報処理技術で解析することで飛躍的に効率化する技術が求められている。本研究では、昇圧作用を持つ生体内ペプチドである Angiotensin II (AngII) に結合し、その生体活性を阻害するペプチド(VVIVIVY)を元に、ペプチドアレイと情報処理解析の両手法を用いて機能性がより向上するようなペプチドの探索を行った。</p> <p>【方法】ペプチドアレイを用いて、VVIVIVY 配列を元に 120 種類のペプチドライブラリをスクリーニングし、その結果を基に 1 残基置換効果の高いアミノ酸を網羅的に組み合わせたデザインランダムライブラリ 3360 配列をさらにスクリーニングした。その後、その結果を踏まえて Ang II 結合配列群の特徴を Fuzzy Neural Network を用いて情報解析し、ルール抽出し、ルールに沿ったペプチドをさらに 256 種類合成し、目的の機能性を持ったペプチドの存在率の向上を確認した。</p> <p>【結果】結果、6mer を網羅する 6400 万種類の配列の内、約 16000 分の 1 のサイズのスクリーニングを行うだけで VVIVIVY 以上の Ang II 結合ペプチドが 60 個以上得られた。また、単なるランダムライブラリからの探索に比べて、FNN によるスクリーニング方針の複数回の修正は、スクリーニング効率を大幅に向上する効果があった。</p>	

D-19	無細胞蛋白質合成系を用いた <i>Burkholderia cepacia</i> 由来リパーゼの基質特異性の改変
	○合田陽平、山崎浩子、加藤且也 ¹ 、中野秀雄(名大院生命農、 ¹ 産総研)
<p>【背景・目的】<i>Burkholderia cepacia</i> KWI-56 株由来のリパーゼは耐熱性や耐有機溶媒性に優れているため産業利用が期待される酵素であるが、光学活性化化合物である 2-phenyl propionic acid ester に対しては十分な加水分解活性および光学選択性を示さない。そこで本研究では、本リパーゼの変異ライブラリを構築し、2-phenyl propionic acid ester に対する高い加水分解活性ならびに光学選択性を保持した変異リパーゼを得ることを試みた。</p> <p>【方法・結果】以前に我々は、一分子 PCR 法と無細胞蛋白質合成系を組み合わせて変異蛋白質ライブラリを構築するシステム、SIMPLEX (Single-Molecule-PCR-linked <i>in vitro</i> expression) を開発した。このシステムで構築した変異ライブラリは、生細胞系では発現の難しい蛋白質でも迅速に合成できる点、酵素活性などを指標としてスクリーニングできる点等の特徴を有する。本研究では、リパーゼと対象基質の複合体構造モデルから、変異導入部位を疎水性ポケット内の 4 箇所のアミノ酸残基に絞り込み、それぞれを 9 種類の疎水性アミノ酸で系統的に置換した変異ライブラリを SIMPLEX により構築した。作製したライブラリを (S)-体基質に対する分解活性を指標としてスクリーニングを行った結果、(S)-体に対して優位な分解活性を示す変異リパーゼを得ることに成功した。</p>	

D-20	各種リパーゼによる生分解性プラスチックフィルム(PBSとPBS/A)の分解
	山根恒夫、○豊田好美、加藤歩、山根幸代、中原勇一(中部大学 応用生物学部)
<p>【目的】生分解性プラスチックフィルムである PBS と PBS/A は、エステル結合でつながった構造を持つ軟質フィルムである。しかし、PBS と PBS/A のエステル結合は、土中・水中等に存在する微生物由来の脂質分解酵素リパーゼによって容易に切断される。本研究では各種微生物由来のリパーゼを用いて、PBS と PBS/A のフィルムの分解能を比較した。リパーゼの特性と分解能との関係を分子レベルで明らかにすることで、これらフィルムの特性に合った応用法や使用後の迅速な分解法を模索することを目的とした。</p> <p>【方法】オリブ油乳化法を用いて、約25種類の微生物由来の酵素リパーゼの比活性(単位は unit/mL)を求めた。リン酸塩緩衝液にこれら酵素を同一の活性濃度になるように溶解させ、PBS/A フィルムを浸漬させて、分解能を比較した。PBS/A フィルムは超微量天秤(測定下限 0.001mg)を用いてフィルムの重量の減少を直接秤量し、PBS フィルムの分解量は溶出した全炭素量を TOC(全有機炭素測定装置)によって測定した。</p> <p>【結果】オリブ油乳化法で比活性を測定した結果、酵素の比活性値の大小とフィルムの分解速度との間には相関はないことが分かった。一般的傾向として、PBS/A の微生物リパーゼによる分解性は、細菌リパーゼ>カビリパーゼ>酵母リパーゼの順であった。分解速度は、酵素濃度が低い領域において、ほぼ濃度に比例し、酵素濃度の高い領域ではほぼ一定となり、飽和現象が見られた。これは、酵素分子のフィルム表面への吸着量の飽和のためと考えられる。細菌リパーゼを用いた TOC(全有機炭素測定装置)による結果、PBS/A フィルムは PBS フィルムよりも約150倍の高い速度で分解することが分かった。現在、酵素のフィルム表面への吸着を調べている。</p>	

D-22	DNA のビーズディスプレイ法を用いた DNA-転写因子間相互作用検出法
	○橋本陽子 ¹ 、児島孝明 ² 、加藤雅士 ¹ 、小林哲夫 ¹ 、中野秀雄 ¹ (¹ 名大院・生命農、 ² 阪府大院・理)
<p>【目的】本研究室では、W/O エマルジョン内でビーズ固定化 PCR プライマーを用いて行なう一分子 PCR(エマルジョン PCR)により、マイクロビーズ上に DNA ライブラリーを固定化する技術を開発し、これを用いてメタノール資化性細菌 <i>Paracoccus denitrificans</i> ゲノムライブラリーから、<i>P. denitrificans</i> 由来の転写因子 PhaR の新規結合領域の獲得に成功している。</p> <p>本研究では、糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> の転写因子である AmyR を取り上げ、系の確立とともに、AmyR が認識する DNA 配列を明らかにすることを目的としている。糸状菌 <i>Aspergillus nidulans</i> 由来の転写誘導因子 AmyR は、<i>Aspergillus</i> 属のアミラーゼ遺伝子群のプロモーター領域に結合し、転写を活性化する。</p> <p>【方法・結果】エマルジョン PCR により、マイクロビーズ上に DNA を固定化した。次に、MalE タグを付加した AmyR1-411 および蛍光標識した抗 MalE タグ抗体を加えた。この時、転写因子の認識する DNA が固定化されたビーズ上では、ビーズ-DNA-転写因子-蛍光標識抗体の複合体が形成される。この蛍光を有するビーズ複合体を FACS を用いて迅速に選択し、AmyR のターゲット配列が濃縮されることを確認した。</p>	

D-21	ポリ乳酸用の非可食性植物度 100%の改質剤
	山根恒夫・○宇佐美厚(中部大応用生物)、浜口隆司・堀ともみ(伊藤製油(株))、高木康雄・朝日真澄(名工研)
<p>【目的】ポリ乳酸は安価で優れた物性をもっているため、今後の生分解性ポリマー(植物プラスチック)としての市場拡大が期待される。しかし、柔軟性が乏しくまた耐衝撃性が弱いため、フィルムやシートなどの分野での応用に至っていない。本研究では、ポリ乳酸の軟質化のための可塑剤を植物由来の原料から作り出すことを目的とした。今後、深刻化が懸念される食糧問題を考慮し、非可食性の植物油であるヒマシ油を利用した改質剤の開発を目的とした。</p> <p>【方法】ポリ乳酸と可塑剤の相溶性を高めるために、オリゴ乳酸が結合したヒマシ硬化油をヒマシ硬化油とラクチドから触媒を用いて化学的方法で合成した。合成した可塑剤(HyCaLa と仮称)をポリ乳酸と混練し、ブレンド体の物性や生分解性を分析した。また、HyCaLa 自体の生分解性については BOD 法により判定した。</p> <p>【結果】ヒマシ硬化油とラクチドの混合割合を変えることにより平均分子量(Mw)が 2,000 から 5,000 の HyCaLa を合成した。ブレンド体の物性は引張り試験とシャルピー衝撃試験により評価を行い、それぞれの分子量の HyCaLa を 20~30%程度含むブレンドポリマーは伸び率において効果があることがわかった。また、酵素 Protinase K を用いた分解性の試験結果から、HyCaLa の配合量が多いほど分解が促進されることがわかった。BOD 法による生分解試験において、微粉化した HyCaLa は生分解性をもつことが確認された。本研究で合成した可塑剤は、ポリ乳酸に上述の諸性質を与えるため、柔軟性や速やかな生分解性が必要な分野にポリ乳酸を応用する際に利用されることが期待される。</p>	

D-23	表面プラズモン共鳴を用いた、核内受容体 LXR の新規リガンドスクリーニング法の確立
	○長尾匡則 ¹⁾ 、車炳允 ²⁾ 、米澤貴之 ²⁾ 、永井和夫 ^{1,2)} 、禹濟泰 ^{1,2)} ¹⁾ 中部大院応用生物、 ²⁾ 中部大学生物機能開発研究所
<p>【目的】核内受容体のリガンド活性の評価法は、生物活性と物理化学的性質の評価に大別される。我々は、標識や発色を介さず直接かつリアルタイムに LXR とコアクチベータの結合・解離の強弱と速度を測定できる表面プラズモン共鳴を利用して、LXR リガンドを物理化学的性質の面からスクリーニングする手法を確立するために条件検討を行った。</p> <p>【方法】測定には Biacore3000 (BiacoreAB, Uppsala, Sweden) を用いた。ヒトの p160 Steroid Receptor Coactivator のペプチド(aa.676-700)をビオチン化したものをセンサーチップ SA に固定化し、試験化合物と hLXR α-LBD (aa.207-447) の混合液を DMSO が終濃度 5%となるように調製してアナライトとして添加した。対照には既知 LXR アゴニストである T0901317(Cayman Chemical)を用いた。チップの再生には 0.5%SDS/10mM-NaOH を 1 分間添加した。ランニング緩衝液には 50mM-Tris-HCl(pH7.4)、150mM-NaCl、1mM-EDTA、0.005%Surfactant P20、5%DMSO を 0.22 μm のフィルターで濾過し、脱気して用いた。</p> <p>【結果】T0901317 は濃度依存的に LXR と SRC1 ペプチドとの相互作用を増強し、そのレスポンスは 25℃で 20 時間以上安定して得られることが確認された。T0901317 単独ではレスポンスを確認することができなかった。これらの結果から Biacore3000 が LXR リガンドのスクリーニングに利用できることが示された。以上を踏まえ、当研究室の所有する天然物由来の化合物ライブラリーを本法にてスクリーニングした結果、約 600 サンプル中 1 サンプルが、用量依存的に LXR と SRC1 ペプチドとの相互作用を増強することが確認された。</p>	

E-1	酵素処理で得られた低線維形成能 コラーゲン会合体の熱安定性
	○ 國井沙織 ¹ , 柴野三智子 ² , 齋藤卓也 ¹ , 外村辨一郎 ¹ , 森本康一 ¹ (¹ 近畿大院・生物工, ² 近畿大・医・細菌)
<p>【目的】I 型コラーゲンは、結合組織に含まれる最も豊富に存在するタンパク質であり、生理的条件下で自己会合して線維構造を形成する。しかしコラーゲン線維形成の分子メカニズムについては、未だ不明な点が多い。我々はこれまでに、アクチニジン(cysteine peptidase)で限定加水分解したコラーゲン(A-Col)の線維形成能が低下することを明らかにした。本発表では、示差走査熱量計(DSC)測定により、ペプシン処理コラーゲン(P-Col)会合体と A-Col 会合体の熱転移温度やピーク形状を比較することで、高次構造の差異から生じる熱力学的知見を得ることを目的とした。</p> <p>【方法】ニワトリ皮部から常法により酸可溶性 I 型コラーゲンを抽出し、それぞれ P-Col と A-Col を調製した。各コラーゲン単分子と会合体の熱安定性を調べるため、pH 4.0 と pH 6.5 で DSC 測定した。また、測定前の静置時間の影響を調べた。DSC 測定条件におけるコラーゲン会合体の高次構造の形態を走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。</p> <p>【結果】単分子状態(pH 4.0)の A-Col の熱転移曲線はシングルピーク (44°C)であり、P-Col と一致した。A-Col 会合体の DSC 曲線(pH 6.5)では、2 つのピークが認められたのに対し、P-Col 会合体では主に 1 つのピークが示された。さらに、両会合体でのピーク形状に顕著な違いが検出された。インキュベーション時間は、高温側のピーク形状に影響を及ぼすことが明らかになった。また A-Col 会合体は、I 型コラーゲンの特徴である線維形成能の低下が SEM により観察された。以上の結果より、アクチニジン処理はコラーゲン会合体に熱安定性変化をとまなう高次構造変化を引き起こすと推察された。</p>	

E-3	ニワトリ初期胚卵黄血管系におけるレニン・ アンジオテンシン系構成因子の遺伝子発現
	○ 中田智子 ¹⁾ 、渡部加予 ¹⁾ 、村松講子 ²⁾ 、鈴木文昭 ¹⁾²⁾ (¹⁾ 岐阜大・院・農・生物資源生産、 ²⁾ 同応用生科・食品生命)
<p>【目的】レニン・アンジオテンシン(RA)系の最終産物であるアンジオテンシン II は、血管内皮細胞増殖因子の遺伝子発現を促進することが報告され、RA 系と血管新生との関係が最近注目されている。本研究は、ニワトリ初期胚卵黄血管系において両者の関係を解明するために、まず Hamburger Hamilton Stage(HH) 17 における卵黄血管系における RA 系構成因子の mRNA の存在およびそれらのレベルを明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】ニワトリ受精卵を常法にしたがって HH 17 まで転卵培養した。将来薬剤添加のコントロールとして評価することを考慮して、卵黄血管系に PBS 100 μl を添加後さらに静置培養した。添加後 0.5 時間から 2.5 時間まで、0.5 時間ごとに卵黄血管系のみを採取した。採取サンプルをホモジナイズしたのち、常法にしたがい mRNA を抽出し、RT-リアルタイム PCR 法によって RAS 構成因子の mRNA を定量した。</p> <p>【結果】卵黄血管系において、RA 系構成因子すなわちアンジオテンシノーゲン(AngN)、レニン、アンジオテンシン変換酵素(ACE)、アンジオテンシン II タイプ 1(AT1)受容体、タイプ 2(AT2)受容体、(プロ)レニン受容体(PRR) mRNA のすべてが検出および定量された。</p> <p>その中で高濃度に存在したのが AngN、ACE、PRR、中濃度が AT1、AT2、最も低濃度がレニン mRNA であった。測定時間内における各 mRNA 量の変動は、AngN、ACE および PRR は有意な増加または減少がみられた。一方、レニン、AT1、AT2 受容体についての変動はほとんどなかった。</p> <p>以上より、HH 17 のニワトリ初期胚卵黄血管系における RA 系構成因子の mRNA 動態が観察できた。</p>	

E-2	A dipeptide YY derived from royal jelly proteins inhibits the renin activity.
	○Afroza Sultana ¹⁾ , A.H.M. Nurun Nabi ²⁾ , Uddin M. Nasir ²⁾ , Hiroe Maruyama ³⁾ , Kazu-michi Suzuki ³⁾ , Satoshi Mishima ³⁾ , and Fumiaki Suzuki ^{2,1)} (¹⁾ United Graduate School of Agric. Sci. and ²⁾ Fac. Appl. Biol. Sci., Gifu University, ³⁾ Nagaragawa Res. Ctr, API Co. Ltd.)
<p>Objective: Royal jelly has been recently reported to possess the antihypertensive effect by the inhibition of ACE in the spontaneously hypertensive rats (SHR). Renin is the key enzyme in the renin angiotensin system. In this study, we investigated the renin inhibition of royal jelly protein and its derived dipeptide YY.</p> <p>Methods: A dipeptide YY was isolated from digestive fraction of royal jelly protein fraction by HPLC. The renin activity was measured using recombinant sheep angiotensinogen at pH 7.0 under the standard assay conditions.</p> <p>Results and Conclusion: Inhibitory effects of renin activity were observed by the protein fraction and dipeptide YY. The K_m value of the substrate; angiotensinogen was 0.15 μM and the K_i of YY was 10 μM. Besides this, the dipeptide YY showed the systolic blood pressure lowering ability after the oral administration of it (10 mg/kg) in the SHR by approximately 12 mmHg.</p> <p>Therefore it can be assumed that the dipeptide YY could be beneficial for the supplement of anti-hypertension and prevention for its related complications.</p>	

E-4	DNA トポイソメラーゼのノックダウンによる 中心体複製への影響
	○水品善之、吉田弘美(神戸学院大・栄養・食品栄養、神戸学院大・ライフサイエンス産学連携研究セ)
<p>【目的】中心体(centrosome)は動物細胞の細胞内小器官であり、分裂期において娘細胞への染色体の均等分配のための分裂中心のはたらきをする。癌遺伝子抑制産物 p53 は中心体の複製を抑制的に調節している。DNA のねじれを巻き戻す DNA トポイソメラーゼ I, IIα (topo I, IIα) をノックダウンさせることによる中心体複製の影響を p53 欠損細胞・野生型細胞を用いて調査した。</p> <p>【方法】p53^(+/+) と p53^(-/-) のマウス繊維芽細胞(MEF cells)へマウス topo I, topo IIα の siRNA ベクター(pSUPER)を FuGENE 6 を使用して transfection した。positive control として 10 分の 1 量の GFP-C1 ベクターを同時に添加した。48 時間培養後の細胞を免疫染色してから蛍光顕微鏡で観察した。その際に topo I, topo IIα の発現量は anti-topo I, anti-topo IIα 抗体で、中心体は anti-γ-tubulin 抗体で染色して測定した。細胞核については DAPI で染色した。</p> <p>【結果】(1) p53^(+/+) MEF cells について p53^(+/+) MEF cells は、それ自身に中心体の異常複製は見られなかった。topo I, topo IIα によるノックダウンで中心体の異常複製が見られなかった。(2) p53^(-/-) MEF cells について p53^(-/-) MEF cells は、それ自身に中心体の異常複製が若干見られた。topo I, topo IIα によるノックダウンで中心体の異常複製が増加した。</p> <p>【考察】p53 は中心体複製を制御・調節していることが知られているが、topo 活性を阻害することで DNA 損傷を招き、細胞周期が遅延することで中心体の異常複製を引き起こすと考えられる。</p>	

E-5	Acetogenin 類の DNA ポリメラーゼ、トポイソメラーゼ阻害活性とヒト癌細胞増殖抑制活性
	○米澤裕子 ¹ 、水品善之 ^{1,2} 、吉田弘美 ^{1,2} (¹ 神戸学院大・栄養、 ² 神戸学院大・ライフサイエンス産学連携研究セ)
<p>【目的】 Acetogenin 類は、パンレイシ科の熱帯・亜熱帯植物から見出された脂肪酸誘導体であり、抗癌活性や免疫抑制活性が報告されている。各種 Acetogenin 類とその中間体を有機化学合成して、DNA ポリメラーゼ (pol)、トポイソメラーゼ (topo) の阻害活性とヒト癌細胞増殖抑制活性について調査した。</p> <p>【方法】 Acetogenin 類は、mucocin (1)、jimenezin (2)、19-epi jimenezin (3)、mucenin (4)、pyranicin (5)、pyragonicin (6)、10-epi pyragonicin (7)、3-hydroxy-4-methyl-2-tetradecyl-4-butanolide (8) の 8 物質を合成した。pol と topo 阻害活性は常法に従った。ヒト白血病細胞 (HL-60 cells) の増殖は MTT 法で測定した。</p> <p>【結果】</p> <p>① pol 阻害活性: Acetogenin 類 8 物質のうち pyranicin (5) が最も強く哺乳類由来 pol を阻害した。¹⁾ pol 分子種の中では pol λ に対する阻害が最も強く、IC₅₀ 値は 2.3 μM であった。</p> <p>② topo 阻害活性: pyranicin (5) はヒト由来の topo I および topo II を阻害した。IC₅₀ 値は 5.0 μM、7.5 μM であった。</p> <p>③ ヒト癌細胞増殖抑制活性: Acetogenin 類の細胞毒性は pol 阻害活性と同じ傾向を示し、pyranicin (5) が最も強く阻害した (LD₅₀ 値 = 9.4 μM)。</p> <p>④ pyranicin (5) の HL-60 への影響: 細胞周期を G2/M 期および G1 期で停止させた。 [³H]-thymidine の取り込みを阻害したことから DNA 合成を阻害することが示唆された。DNA の断片化が見られたことからアポトーシスを誘導すると考えられた。</p> <p>¹⁾ C. Ishimaru <i>et al.</i> (2007) <i>Lett. Drug. Design Discov.</i> 4, 239-245.</p>	

E-7	皮膚特異的トランスグルタミナーゼ (TGase 1) の高反応性基質配列の同定
	○細野真代、杉村禎昭、北村三矢子、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 (名大院 生命農 応用分子生命科学)
<p>【目的】 トランスグルタミナーゼ (以下 TG と略記) は、タンパク質中のグルタミン残基と、リジン残基または一級アミンとを共有結合レベルで架橋する酵素ファミリーで、高等動物には 8 つのアイソザイムが存在する。TG はタンパク質中の特定のグルタミン残基を認識して触媒反応を開始するため、その周辺配列には法則性が存在すると考えられる。我々はこれまでに、ファージ提示型ペプチドライブラリを用い、TG2 (組織型) や Factor XIII (血液凝固第 XIII 因子) それぞれに高反応性を示す、至適基質配列を同定する検索系を確立している (1)。TG1 は TG3, TG5 と共に表皮細胞に存在し、細胞内構造タンパク質群を架橋重合する事により、表皮の角化形成に関与している。これらのアイソザイム間の役割分担は不明であり、それぞれが好む基質配列に関する情報は未だない。本研究では、TG1 の高反応性基質配列の同定を目的とした。【方法・結果】 12 残基のランダムペプチドを提示したファージをグルタミン残基供与基質とし、TG1 によるピオチン標識一級アミンの取り込み反応を行った。アビジン親和性を利用して反応したファージを精製し、大腸菌に感染させて増幅するという一連の操作を繰り返し、選別したファージの提示するペプチド配列を決定した。その結果、多数の配列中に一定の法則性が認められた。TG1 との反応性を評価するため、それらのペプチド配列を含む組換えタンパク質を作製し、反応性を解析した。蛍光標識またはアイトープ標識した一級アミンの取り込み反応により、他のアイソザイムも含めて基質としての反応性を検討した。その結果、ほとんどの配列が TG1 に対して高い特異性と反応性を示した。現在一つを選別し、各アミノ酸残基をアラニンに変換した変異体を作製して反応性の変化を解析している。</p> <p>(1) Sugimura <i>et al.</i> <i>J. Biol. Chem.</i> 281, 17699 (2006)</p>	

E-6	トランスグルタミナーゼは動物細胞での物理的傷害の修復に必要である
	○河合良樹、和田文孝、杉村禎昭、柴田秀樹、牧正敏、人見清隆 名大院・生命農・応用分子生命科学
<p>【目的】 タンパク質架橋化酵素、トランスグルタミナーゼ (以下 TG) は、カルシウムイオン依存的に、タンパク質間に共有結合 (イソペプチド結合) の形成を触媒して、その形状や機能を変化させる。この酵素反応は、ヒトでは血液凝固や皮膚表皮形成など多彩な生命現象に関与している。これまで我々は、モデル下等生物 (真性粘菌) を用いて、細胞に対する物理的な傷害において、TG が修復に関与することを明らかにしてきた (1)。今回は、動物細胞を対象として物理的な傷害を与えた場合において、TG による架橋反応が傷害修復に関与する可能性について検討した。【方法】 解析対象としてはヒト肺由来の上皮系細胞株 A549 を用いた。物理的傷害は、培養皿で増殖させた細胞に対して、直接カミソリを用いて傷つけることにより行った。まず、2 種の異なる蛍光で標識したデキストランを用いて、傷害を与えた後に修復が行われた細胞だけを特異的に区別する方法を確立した。そのうえで、TG の阻害剤の添加による効果を検討した。また、アイソザイムのうち組織型 TG (TG2) のみが翻訳レベルで発現抑制される遺伝子安定導入株を樹立し、その細胞を用いた場合の物理的傷害に対する修復を観察した。そして、発現抑制株に TG2 遺伝子を入れ戻した安定導入株を樹立し、その傷害修復能を検討した。【結果・考察】 物理的傷害を受けた細胞の修復率は、TG の阻害剤を添加することで有意に減少した。また、TG2 発現抑制株においても傷害修復が妨げられた。発現抑制株に遺伝子を入れ戻し、TG2 の発現量が回復した細胞株では、物理的傷害に対する修復率が回復していた。これらの結果から、TG が細胞の物理的傷害からの修復に関与することが示された。</p> <p>(1) Wada <i>et al.</i> <i>FEBS J.</i> 274, 2766 (2007)</p>	

E-8	高脂肪食摂取下において作用する 2 型糖尿病遺伝子の解析
	○星野宏美 ¹ 、小林美里 ² 、岩井宏至 ² 、村井篤嗣 ² 、西村正彦 ³ 、大野民生 ³ 、森山龍一 ¹ 、堀尾文彦 ² (¹ 中部大・応用生物、 ² 名大院・生命農学、 ³ 名大院・医)
<p>【目的】 糖尿病を呈さないマウス SM/J 系統と A/J 系統から作出された SMXA-5 系統は糖尿病を発症し、この病態は高脂肪食摂取により増悪される。我々は、SMXA-5 の 2 番染色体に高脂肪食摂取下で作用する A/J 由来の糖尿病遺伝子座 <i>T2dm2sa</i> を検出し、この遺伝子座を含む A/J 由来の 2 番染色体領域 (約 120Mb) を SM/J に導入したコンジュニック系統が糖尿病を呈することを明らかにしてきた (1)。本研究では、<i>T2dm2sa</i> の責任遺伝子の同定を目指して、<i>T2dm2sa</i> の存在領域を限局することを目的とした。</p> <p>【方法】 コンジュニック系統の A/J 由来染色体領域を断片化したものを有するサブコンジュニック系統を 7 種類作出した。このうち、2 系統 (R1A, R2A) を用いて高脂肪食摂取下での糖尿病形質を SM/J と比較検討した。本研究では、マウス同士の攻撃による表現型への影響を失くし、再現性のあるデータを得られる飼育条件を確立するために、単独飼育による実験系を採用した。</p> <p>【結果】 R1A, R2A サブコンジュニック系統ではともに SM/J に比べて、肥満度の上昇、脂肪組織重量の増加を認め、R2A では耐糖能の低下も観察された。これらのことより、R1A の持つセントロメア側の約 5.6Mb の導入領域には肥満に関する遺伝子が存在し、R2A の持つテロメア側の約 26Mb の A/J 由来領域には肥満・糖尿病に関する遺伝子が存在することが示され、2 番染色体には複数の責任遺伝子が存在することが明らかとなった。</p> <p>(1) Kobayashi, M. <i>et al.</i>, <i>Diabetologia</i>, 49:486-495 (2006)</p>	

E-9	核酸関連物質の破骨細胞分化に対する影響
	○長谷川森一 ¹ 、米澤貴之 ² 、三浦信三 ³ 、芦田則之 ³ 、車炳允 ² 、永井和夫 ^{1,2} 、禹濟泰 ^{1,2} (¹ 中部大院応用生物、 ² 中部大学生物機能開発研究所、 ³ ヤマサ醤油株式会社)
<p>【目的】骨の機能と骨量は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスによって調節されている。閉経後骨粗鬆症は、破骨細胞数の増加による過剰の骨吸収が原因で骨量が減少する。破骨細胞の分化を阻害する物質または骨芽細胞の分化を促進する物質は骨粗鬆症の予防や改善に応用可能である。我々は核酸関連物質の破骨細胞と骨芽細胞の分化に対する阻害作用を検討した。その結果、破骨細胞分化を阻害する核酸誘導体化合物を見出したので報告する。</p> <p>【方法】破骨細胞分化誘導因子(ODF/RANKL)の存在下で、破骨細胞に分化する RAW264 細胞株及び M-CSF 依存性マウス骨髄由来細胞(BMM)を培養し、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ活性(TRAP)の測定と染色により、破骨細胞への分化を評価した。活性の得られた化合物に対しては BMM と骨芽細胞との共存培養法による破骨細胞分化及びピット形成に対する作用を検討した。また MC3T3-E1 細胞を用いて骨芽細胞の分化に対する作用をアルカリホスファターゼ(ALP)活性の測定と染色により評価した。</p> <p>【結果】核酸関連物質 116 種についてスクリーニングした結果、Ara AMP とその誘導体は 10 μg/ml で RAW264 細胞及び BMM の破骨細胞分化を阻害した。また 8-(1-Decyn-1-yl) cyclic AMP も 15 μg/ml で RAW264 細胞及び BMM の破骨細胞分化を阻害した。さらに共存培養法による破骨細胞分化及びピット形成に対する作用を検討したところ、これら化合物は骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性には影響せず、TRAP 活性に対してのみ濃度依存的な阻害を示した。これら化合物はピット形成を抑制したこと、骨吸収抑制物質として骨粗鬆症予防効果もあると考えられる。</p>	

E-11	ネオニコチノイドとの選択的相互作用に寄与するショウジョウバエ D α 2 サブユニット loop B 上流領域の構造因子
	○外島佳代子、金岡怜志、樽本潔、David B. Sattelle*、松田一彦(近大院・農・応生化、*オックスフォード大)
<p>【目的】ネオニコチノイド系殺虫剤イミダクロプリド(IMI)は、昆虫ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)に対して選択的にアゴニスト作用を発揮する。われわれはこれまでに、このような IMI の選択的活性に対して昆虫 nAChRαサブユニット上では loop C¹⁾、および loop B から N 末端にかけての領域²⁾が寄与することを明らかにしている。今回、ショウジョウバエ Dα2 サブユニットを対象として、その N 末端から loop B までの間で IMI との選択的相互作用に寄与する構造因子について調べたので報告する。</p> <p>【方法】ヒヨコ α4 サブユニットの N 末端から loop B までの領域と loop C 領域に存在するグルタミン酸残基を、それぞれ Dα2 サブユニットとプロリン残基に同時に置換したキメラαサブユニットをコードする cDNA を作成した。本 cDNA をヒヨコβ2 サブユニットをコードする cDNA とともにアフリカツメガエル卵母細胞の核にマイクロインジェクションすることにより、キメラ-ハイブリッド nAChR を発現させた。キメラ-ハイブリッド nAChR のアセチルコリンおよび IMI に対する応答は、膜電位固定法を用いて電気生理学的に計測した。</p> <p>【結果】ヒヨコ α4 サブユニットの N 末端に挿入したショウジョウバエ Dα2 サブユニットの領域を段階的に短縮したところ、ある段階を境にしてキメラ-ハイブリッド nAChR の IMI に対する受容体の応答が顕著に変化した。この結果から、Dα2 サブユニットの N 末端領域で IMI との選択的相互作用に関わる領域を部分的ながらも特定することができた。</p>	
<p>1) Shimomura et al., <i>Neurosci. Lett.</i> 363, 195-198 (2004). 2) Shimomura et al., <i>Neurosci. Lett.</i> 385, 168-272 (2005).</p>	

E-10	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> の細胞質遊離糖鎖の代謝経路の解析
	○加藤紀彦、川原彰人、北村久美子、前田恵 ¹ 、木村吉伸 ¹ 、片山高嶺 ² 、芦田久、山本憲二 (京大院生命、 ¹ 岡大院自科、 ² 石川県大・資源研)
<p>【目的】細胞質には有意な量の遊離オリゴ糖 (Free oligosaccharide; FOS) が存在している。小胞体関連分解における Peptide-N-glycanase (PNGase) などによって生成される FOS は、細胞質において endo-β-N-acetylglucosaminidase (ENGase) や α-mannosidase によって分解された後、リソソームに輸送されると考えられている。その詳細な解析を行うために、線虫 <i>C. elegans</i> の FOS について、その代謝経路の解明を試みた。</p> <p>【方法】<i>C. elegans</i> より FOS を抽出精製後、ピリジルアミノ化によって蛍光標識し、HPLC による分離精製および MS 分析を行った。また細胞質に含まれるタンパク質量当たりの FOS は HPLC のピーク面積より求めた。PNGase 活性は dansyl 化した sialylglycopeptide (SGP) を基質として行った。</p> <p>【結果】<i>C. elegans</i> の野生株より抽出した FOS は高マンノース型の遊離糖鎖であり、還元末端に GlcNAc を 2 残基有する FOS-GN2 と、GlcNAc を 1 残基有する FOS-GN1 がそれぞれ約 6%、94% 含まれていた。ENGase 欠損株 <i>eng-1(tm1208)</i> より抽出した FOS は、GN2 が GN1 よりも多く存在し、GN2 から GN1 への変換に ENGase が関与することが示された。また、<i>eng-1(tm1208)</i> に含まれる全 FOS 量は、野生株に比べ約 3 分の 1 程度減少していたことから、GN2 の蓄積によって PNGase が阻害されるのではないかと推察した。しかし、GN1 と GN2 について <i>in vitro</i> での PNGase 阻害効果を検証したところ、GN1 と GN2 の阻害の程度に差は見られなかったことから、FOS の減少は PNGase の阻害によるものではないと考えられた。</p>	

E-12	ハイパーサーミアと免疫治療の併用効果
	○横地佐世子、伊藤範親、藤森彩圭、小林猛(中部大学 応用生物学部)
<p>【目的】我々は、腫瘍組織のみを特異的に加温するために Magunetic Cationic liposome (MCL) による温熱治療を行ってきた。この MCL を腫瘍組織に局所的に注入し、交番磁界を照射することにより、腫瘍特異的な温熱治療が可能となる。我々はこの温熱治療において、抗腫瘍免疫が誘導されていることに着目した。これには、温熱治療によって発生する熱ショックタンパク 70(HSP70)が深く関わっている。そこで、抗原提示細胞の中で最も抗原提示作用が強く、また HSP70 によってその成熟が誘導されるといわれている樹状細胞(DC)による免疫治療と温熱治療、更に細胞性免疫を活性化の上で重要な IL-2 を併用し、その効果について研究を行った。</p> <p>【方法】腫瘍細胞としてマウスメラノーマ細胞 B16F0 を用い、実験動物は C57/BL6J マウスを用いた。この細胞を皮下に注射して担癌マウスを作製し、腫瘍の直径が約 7mm になった段階で、MCL による温熱治療を 43°C で 3 日間、24 時間毎で行った。また、温熱治療の翌日に未成熟 DC (2.0×10^6 cells/head) を腫瘍部局所に投与し、更にその 1 日後に IL-2 を局所に投与した。その投与量は 4.0 μg/head であった。その後、腫瘍の退縮、マウスの生存期間の測定を行ってその効果を調べた。</p> <p>【結果】温熱治療のみ、DC による免疫治療のみでは完全な腫瘍の退縮は起こらなかった。しかし、温熱治療 + DC 治療を施すことにより、8 匹中 2 匹で原発腫瘍の完全退縮に成功した。これらの退縮マウスの 3 匹中 1 匹で 2 度の Rechallenge においても腫瘍を拒絶した。また、拒絶を行わなかったマウスについても、生存日数が優位に上昇した。また、温熱治療 + DC 治療 + IL-2 では、4 匹中 2 匹で原発腫瘍の完全退縮に成功した。</p>	

E-13	温熱治療における matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) 阻害剤の細胞死滅促進効果
	○西村奈津実、奥田和智、尾藤宗俊、小林猛(中部大学、応用生物学部)
<p>【目的】温熱により誘導されるヒートショックタンパク質が温熱治療における細胞死を抑制することはよく知られている。我々は温熱により誘導される遺伝子を DNA チップにより網羅的に解析し、その1つである MMP-3 に注目し、その阻害剤を併用することで温熱治療効果の増強を目指した。我々が開発した機能性磁性微粒子(MCL)を腫瘍部にのみ局在させ、交番磁界を照射する温熱療法では腫瘍部のみを加温でき、46℃まで加熱することで皮膚癌、乳癌などで完全に退縮できる。本研究ではこの温熱方法を用い、MMP-3 阻害剤を併用することで細胞死滅が促進されることを明らかにした。</p> <p>【方法】①(in vitro) マウスメラノーマ細胞を 6well dish に培養し、MMP-3 阻害剤 (N-isobutyl-N-(4-methoxyphenyl-sulfonyl)glycyl hydroxamic acid) を 0.1, 3, 4, 8 μM/well の濃度で添加後、42℃の恒温槽で 60, 75, 90 分の温熱処理を行った。2 日後、生細胞数を測定し、MMP-3 阻害剤の効果を検討した。②(in vivo) マウス B16 メラノーマ細胞をメスの C57BL/6J マウスに注射した皮下モデルで検討した。MCL を腫瘍部に注射し、治療的にはあまり効果が無い 43℃、30 分間の温熱療法を行った。温熱 1 時間後もしくは 24 時間後に MMP-3 阻害剤を腹腔内に注入した。これらを 3 日間行い、経過を観察した。</p> <p>【結果】①温熱処理時間に関わらず MMP-3 阻害剤を添加することで濃度依存的に生細胞数が低下し、MMP-3 阻害剤が細胞死を濃度依存的に誘導していることがわかった。②通常 43℃の温熱治療では、ほぼ全てのマウスで処理後すぐに腫瘍が再増殖し、約 30 日で死亡していた。しかし、MMP-3 阻害剤を併用することで処理 30 日後でも約 4 割のマウスで腫瘍が確認されず退縮していた。残りのマウスでも腫瘍の再増殖時期、増殖速度ともに遅く、延命効果が見られた。</p>	

E-15	ゼブラフィッシュアディポネクチン cDNA のクローニングと発現および機能解析
	○上野明里、田中千絵、秦 健敏、秋山真一、田丸 浩、青木直人(三重大院・生資)
<p>【目的】ヒトとほぼ同様なゲノムセットを有するゼブラフィッシュを用いたメタボロームシンドローム研究の可能性を探る手始めとして、善玉アディポサイトカインとして知られるゼブラフィッシュアディポネクチン(zAdipo) cDNA のクローニングと発現・機能解析を試みた。</p> <p>【方法】ヒトおよびマウスアディポネクチン cDNA 配列を bait として BLAST search を行い、ゼブラフィッシュ相同遺伝子の同定を試みた。ヒットした配列を元に特異プライマーを設計し、RT-PCR により増幅後、哺乳動物遺伝子発現ベクターにクローニングし、培養下の哺乳動物細胞に導入した。細胞溶解液、培養培地を SDS-PAGE により分画後、エピトープタグに対する特異抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。各組織における発現は RT-PCR 法により実施した。</p> <p>【結果】ヒトおよびマウスアディポネクチンに対してそれぞれ 46.5%、48.3%の相同性を示す zAdipo cDNA をクローニングした。コラーゲン様ドメイン、C1Q ドメインに加え、多量体形成に必要なシステイン残基も保存されていた。興味深いことに、zAdipo は脂肪細胞での発現が認められず、脳、眼球、骨格筋、肝臓での発現が顕著であった。哺乳動物細胞で発現させると培地中に分泌され、マウス、ヒトの場合と同様にシステイン残基を介して三量体、六量体、多量体を形成することが明らかとなった。</p>	

E-14	熱ショックタンパク質の C 末端配列多様性を識別する受容体の探索
	○横山愛美、西川慧、野村昌代、陶雨風、谷史人、北畠直文(京大院農・食品生物)
<p>【目的】分子シャペロンである熱ショックタンパク質(Heat Shock Protein, HSP)は、近年、生体防御系に対する危険シグナルやクロスプレゼンテーションといった免疫調節機能をもつことが報告されており、多機能なタンパク質として注目されている。本研究では、lymphoid neoplasm P388D1 細胞が HSP70 の C 末端ドメインを見分けるということを明らかにするとともに、細胞上に存在する HSP 受容体を探索することを目的とした。</p> <p>【方法・結果】マウス細胞質由来の HSP72(MO-HSP72)をビオチン化し、P388D1 細胞との結合を SAy-FITC による間接蛍光法のフローサイトメーターで調べたところ、ビオチン化 MO-HSP72 は P388D1 細胞に対して飽和的な結合性を示した。また、この結合は非標識の MO-HSP72 存在下で拮抗されることから、特異的な結合であることがわかった。P388D1 の細胞表面をプロテアーゼで処理し、MO-HSP72 との結合を解析したところ、酵素量と反応時間に依存して結合が低下したため、P388D1 細胞上の HSP 受容体はタンパク質性であることが示唆された。</p> <p>HSP70 は原核生物から真核生物まで幅広く存在し、生物種により C 末端ドメインの配列に多様性が見られる。この点に着目して、マウス以外のホウレンソウ、乳酸菌、大腸菌由来の 3 種の HSP について P388D1 細胞との結合を調べたところ、真核生物(マウス・ホウレンソウ)由来の HSP は結合したが、原核生物(乳酸菌・大腸菌)由来の HSP は結合しなかった。そこで、HSP70 の結合性の相違を利用して、光反応性架橋剤 Sulfo-SBED による P388D1 細胞上の HSP 受容体のラベル化を比較した。その結果、MO-HSP72 をリガンドとして用いた場合では、乳酸菌由来の HSP70(LA-DnaK)の場合と比べて、65kDa 付近の 1 つのバンドと 200kDa 以上の 4 つのバンドに差が見られた。</p>	

E-16	ゼブラフィッシュ PAI-1 cDNA のクローニングと哺乳動物細胞における発現
	○田中千絵、上野明里、秦 健敏、秋山真一、田丸 浩、青木直人(三重大院・生資)
<p>【目的】ヒトとほぼ同様なゲノムセットを有するゼブラフィッシュを用いたメタボロームシンドローム研究の可能性を探る手始めとして、悪玉アディポサイトカインとして知られるゼブラフィッシュ PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) (zPAI-1) cDNA のクローニングと発現・機能解析を試みた。</p> <p>【方法】ヒトおよびマウス PAI-1cDNA 配列を bait として BLAST search を行い、ゼブラフィッシュ相同遺伝子の同定を試みた。ヒットした配列を元に特異プライマーを設計し、RT-PCR により増幅後、哺乳動物遺伝子発現ベクターにクローニングし、培養下の哺乳動物細胞に導入した。細胞溶解液、培養培地を SDS-PAGE により分画後、エピトープタグに対する特異抗体を用いてウェスタンブロット解析を行った。各組織における発現は RT-PCR 法により実施した。</p> <p>【結果】ヒトおよびマウス PAI-1 に対してそれぞれ 25.2%、23.4%の相同性を示す zPAI-1 cDNA を肝臓由来 cDNA プールよりクローニングした。N 末端には典型的なシグナル配列を有し、hydrophathy plot パターンは、ヒト、マウス PAI-1 と非常に類似していた。また zPAI-1 遺伝子は、ヒト、マウス同様 9 つのエクソンより構成され、脂肪組織における発現は雄より雌の方が顕著であった。哺乳動物細胞で発現させると培地中に分泌され、エピトープタグに対する特異抗体によりシングルバンドとして検出された。</p>	

E-17	北アフリカ原産植物由来抗酸化成分の脂肪細胞分化に及ぼす影響
	○平野貴子 ¹ 、宮崎均 ² 、青木直人 ¹ 、 ¹ 三重大院・生資、 ² 筑波大・北アフリカ研究センター
<p>【目的】北アフリカの過酷な気候帯で生育する植物は、何らかの抗ストレス機構を備えていると考えられる。一方、肥大化した脂肪組織では、活性酸素種による酸化ストレスが脂肪細胞の機能不全を引き起こすことが知られている。そこで今回我々は、これら植物から単離・精製された抗酸化成分に着目し、脂肪細胞の分化に対する効果を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】脂肪細胞のモデルとしてマウス 3T3-L1 細胞を用い、分化誘導時より北アフリカ原産植物由来の各種抗酸化成分を種々の濃度で添加した。中性脂肪の蓄積量とアディポサイトカイン(Adiponectin, Resistin)の発現・分泌量を分化の指標とし、それぞれ Oil red O による染色、リアルタイム PCR およびウエスタンブロット法により定量した。</p> <p>【結果】調べた 9 種の抗酸化成分の中で、Hydroxytyrosol および Resveratorl が 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を阻害し、中性脂肪の蓄積を顕著に抑制することが明らかとなった。両成分に注目してさらに詳細に検討したところ、分化誘導後 4 日目、8 日目において、添加した量に依存して Adiponectin および Resistin の発現および培養培地中への分泌量が減少した。また PPARγ や aP2 (FABP4) の発現も用量依存的に抑制された。</p>	

E-19	ヒト白血病細胞 HL-60 の様々な分化誘導過程における細胞内 NADH 量の変動について
	○緒方進、井田智恵利、小川瑠美子、奥村克純、田口寛(三重大院 生資)
<p>【目的】当研究室のこれまでの検討において、ヒト白血病細胞 HL-60 に対してニコチンアミドなどが顆粒球様細胞への分化を誘導することを見出してきた。ただ急性前骨髄性白血病の治療において、絶大な治療効果を挙げている ATRA (all-trans retinoic acid) による HL-60 の分化誘導過程と比較すると、イソニコチン酸はヒト表面抗原 CD38 の発現が転写レベルならびにタンパク質レベルでの上昇が認められるが、ニコチンアミドおよびニコチンアミド N-オキシドでは認められない事に着目し、我々は、ニコチンアミドによる分化誘導機構は、ATRA とは独立した、別の機構が存在するのではないかと想定するに至った。細胞増殖への影響を検討する際、常法である MTT アッセイは、その一部については、NADH 量をとらえているとの報告もあるが、ごく微量の変化のため、従来法の一つである酵素サイクリング法による我々の解析においても、その変化は捉えがたかった。細胞内の NAD/NADH 比の変動が、細胞内イベントにおよぼす影響が報告されつつあることから、今回は、分化誘導過程における細胞内 NADH 量の変動に特に着目することとし、以下の検討を行った。</p> <p>【方法と結果】ヒト白血病細胞 HL-60 に対して、ATRA およびニコチンアミドを始めとする各種関連化合物を、様々な条件にて処理し、MTT アッセイによる細胞増殖への影響を検討したところ、細胞分化におけるミトコンドリアの役割を示唆するに至った。さらに新規 NADH アッセイについても同様の処理条件にて解析を行った。その結果、ATRA では大きな変化が認められず、ニコチンアミドでは上昇傾向が認められ、イソニコチン酸では逆に減少傾向が認められた。これらの結果を鑑みて、主に NAD を基質とする種々の生化学反応に関与するタンパク質群 (PARP, SIRT1) との関連性について着目し、解析した結果についてもあわせて報告する。</p>	

E-18	ヒト白血病細胞 HL-60 の分化誘導過程におけるニコチン酸関連化合物の併用効果について
	○井田智恵利、緒方進、東川七瀬、奥村克純、田口寛(三重大院 生資)
<p>【目的】当研究室では、水溶性ビタミン B 群に属するニコチン酸およびその関連化合物の新規生理作用、薬理作用の探索を目的とした研究を展開してきた。その一環として、ヒト白血病細胞 HL-60 を顆粒球様細胞へと分化を誘導する化合物の検索を行ったところ、ニコチンアミド、イソニコチン酸、ニコチンアミド N-オキシドが分化誘導作用を示すことが明らかとなった。現在、急性前骨髄性白血病の治療において、白血病細胞を分化誘導するビタミン A 製剤である ATRA (all-trans retinoic acid) が臨床の現場で使用され、大きな効果を上げている。その一方で、レチノイン酸症候群の発症や、ATRA 耐性白血病があることや、再発の可能性が高いことが問題となっており、ATRA の濃度を下げて投与し、治療効果をあげることや、他の薬剤との併用により効果をあげることが治療の現場において必要とされている。そこで本研究では、分化誘導能を有するニコチン酸関連化合物であるニコチンアミド、イソニコチン酸に着目し、ATRA との併用効果について検討を行った。</p> <p>【方法と結果】ヒト白血病細胞 HL-60 培養し、ATRA 単独処理、ニコチン酸関連化合物単独処理、またポジティブコントロールとしてバルブプロ酸処理、レスヴェラトロール処理、およびそれらと ATRA の併用処理 (24 時間、または 48 時間) を行い、位相差顕微鏡で細胞の形態変化の観察および細胞増殖抑制効果を検討するため MTT アッセイを行った。その結果、特に、ATRA とイソニコチン酸との併用処理による増殖抑制が確認され、それらによる併用効果が期待された。さらに細胞増殖抑制が認められた条件において、フローサイトメーターを用いて細胞分化時に発現する表面マーカー CD11b の発現について解析した。その結果、ATRA 単独処理に比べ、特に ATRA とイソニコチン酸併用処理の場合において発現の増加が認められた。</p>	

E-20	ABCA1 と ABCG1 による脂質排出機構の解析
	○松尾道憲、佐野修、長尾耕治郎、小林綾、植田和光(京大院農 応用生命)
<p>【目的】ABCA1 と ABCG1 はマクロファージを含む末梢細胞で過剰の脂質を排出する ABC タンパク質である。ABCA1 がアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) にコレステロールとホスファチジルコリン (PC) を排出し、生じた高密度リポタンパク質 (HDL) に ABCG1 がさらにコレステロール、スフィンゴミエリン (SM)、PC を排出する。細胞膜にはスフィンゴ脂質とコレステロールに富むラフトが存在するが、ABCA1 と ABCG1 によって輸送されるコレステロールの領域は明らかになっていない。そこで、脂質排出の分子機構と膜脂質ラフト構造の関係を明らかにすることを目的とした。</p> <p>【方法】SM 合成に必須な CERT (ceramide transfer protein) の変異により細胞内 SM 量が低下した CHO-K1 細胞由来の LY-A 細胞と、その機能回復株 LY-A/CERT 細胞、CERT 過剰発現細胞に ABCA1 または ABCG1 を発現させ、脂質排出活性を測定した。</p> <p>【結果】LY-A 細胞の SM 量は、SM 不含有培地で培養すると LY-A/CERT 細胞の約 60% に低下し、ラフトの破壊によりノンラフトのコレステロールが LY-A 細胞において増加した。この条件下 LY-A 細胞からの ABCA1 による脂質排出は LY-A/CERT 細胞に比べて増加した一方、ABCG1 による脂質排出は減少した。CHO-K1 細胞に CERT を過剰発現、又は直接 SM を添加し細胞 SM 量が増加した条件下では、ABCA1 による脂質排出は減少し、ABCG1 による脂質排出は増加した。また、ABCA1 または ABCG1 の発現は、ノンラフトのコレステロール量を増加させることが分かった。これらの結果より、脂質トランスポーターが脂質排出を介して膜脂質環境を変える一方、トランスポーターが存在する場である膜の脂質環境が脂質トランスポーターの機能を制御することが示唆された。</p>	

E-21	ウシ乳汁に含まれる新規膜小胞-タンパク質複合体の調製と特徴づけ
	○村上 耕介 ¹ 、中谷 肇 ¹ 、岡島 徹也 ¹ 、青木 直人 ² 、灘野 大太 ¹ 、松田 幹 ¹ (1 名大院生命農・応用分子生命科、2 三重大生資)
<p>【目的】近年、マクロファージや樹状細胞などの細胞が、exosomeあるいはmicrovesicleと呼ばれる膜小胞を分泌することが明らかにされた。これらは、リン脂質膜と膜タンパク質から構成されており、免疫および生体防御において、重要な機能を担うことが示されている。演者らは、マウス乳腺上皮細胞株がexosome様の膜小胞を分泌していること、マウス乳汁中に、exosomeと密度が類似するタンパク質-リン脂質複合体が存在することを明らかにしている[Nakatani H. et al. Biochem J, 2006]。本研究では、十分な量を調製可能なウシ乳汁を用いて、乳汁中における膜小胞のタンパク質組成を調べることを目的とした。</p> <p>【方法】新鮮なウシ乳汁を遠心分離することで、膜小胞画分を分離し、さらにショ糖密度勾配超遠心分離により分画した。各画分に含まれるタンパク質を、乳脂肪球タンパク質(分泌膜小胞タンパク質 MFG-E8、および乳脂肪球特異タンパク質 butyrophilin)に対するモノクローナル抗体を用いた免疫プロット法、および質量分析を用いた PMF 法により解析した。</p> <p>【結果】免疫プロット法の結果、MFG-E8 のピーク密度は 1.14 g/ml で、butyrophilin の 1.17 g/ml とは異なり、ウシ乳汁には乳脂肪球とは異なる exosome 様膜小胞が含まれていることが示唆された。また、質量分析を用いた PMF 法より、ラクトフェリン、ラクトフォリン/PP3、MFG-E8 および免疫グロブリンといった、生体防御に関連するタンパク質が、密度 1.08-1.14 g/ml の画分に検出された。これらの結果から、ウシ乳汁には新規膜小胞-タンパク質複合体が含まれており、これらが、乳腺および乳児消化管の生体防御に関与することが示唆された。</p>	

E-23	Siglec-9 によるマクロファージのサイトカイン産生調節
	○屠 文杰、安藤 宗稔、山居 郁子、西島 謙一、飯島 信司 (名大院・工・生物機能工学)
<p>【目的】Siglec は主に免疫系の細胞表面に特異的に発現しているレクチンで、糖鎖末端に付加されているシアル酸を認識する。その多くは細胞内ドメインに Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) と呼ばれる抑制性のチロシンモチーフをもつ。そのチロシン残基がリン酸化を受けると、チロシンホスファターゼ (SHP-1、SHP-2) がリクルートされ、細胞内へのシグナルを調節するとの報告がある。本研究では、主に単球で発現する Siglec-9 に焦点を当て、初期炎症反応の誘導に重要な TLR に対してどのように作用するのかを解析した。</p> <p>【方法】まず、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 に遺伝子導入し、ヒト Siglec-9 を安定に発現させた細胞株を樹立し、実験に用いた。TLR2 のリガンドであるペプチドグリカン (PGN)、および TLR4 のリガンドであるリポポリサッカライド (LPS) で細胞を刺激し、分泌される各種サイトカインの発現量をリアルタイム RT-PCR 及び ELISA で定量した。</p> <p>【結果】コントロールの細胞株に比べ、Siglec-9 発現株では TLR の刺激で誘導される各種炎症性サイトカイン (TNF-α、IL-6) の発現が抑制された。また、Siglec-9 の ITIM 部位のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体を発現する細胞株では、Siglec-9 の抑制効果が見られなかった。さらに、Siglec-9 発現株では、Siglec-9 と SHP-1、SHP-2 が共沈することが確認された。以上より、Siglec-9 は ITIM のチロシンモチーフにより初期炎症反応で分泌されるサイトカインを抑制することが示され、その効果は SHP-1、SHP-2 を介する可能性が考えられた。</p>	

E-22	オボムコイド第 2 ドメインの立体構造依存性エピトープに対する IgE 結合特性の解析
	○早坂 郁、林 幸男、戸川 記衣、松原 毅、岡島 徹也、灘野 大太、松田 幹 (名大院生命農・応用分子生命科)
<p>【目的】これまでに、鶏卵主要アレルゲンであるオボムコイド (OM) に対する患者血清 IgE 抗体の大部分は、ウズラ OM との交差反応性を示さないことが明らかにしてきた。この低交差反応性を利用した解析により、ニワトリ OM エピトープは第 2 ドメインに集中しており、その中でも Asn⁸⁸-Pro⁹³ (D2L2 領域) が優勢なエピトープ領域であることが示唆されている。本研究では、ウズラ OM の第 2 ドメインを基本として、エピトープの存在が示唆された D2L2 領域のみをニワトリ OM に置換したキメラ第 2 ドメインを複数個直列に連結した組換え抗原 (D2L2\timesn) を調製し、エピトープの位置や密度が IgE 抗体との結合能に及ぼす影響を解析した。</p> <p>【方法及び結果】大腸菌で発現させ分離精製した各種キメラ OM は、トリプシン阻害活性および S-S 結合の位置から立体構造を保持していると推定された。2 系統のマウス (DBA/2、NC/Nga) から得られた OM 特異的 IgE 抗体との反応性を ELISA 法により調べた結果、第 2 ドメインをエピトープとして認識する個体において D2L2\times1、2、3、6、9、12 との高い反応性が示された。また、RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒誘導能の解析により、D2L2\timesn について n=6 以上で脱顆粒を誘導する傾向が見られた。これに対し、ウズラ OM の D2L2 領域のみをニワトリ OM に置換した組換えキメラ抗原については、IgE 抗体との反応性に個体差があり、ほとんど反応しない個体もあった。これらの結果より、このエピトープ領域への IgE 抗体結合には第 1 ドメインおよび第 3 ドメインが影響を与えている可能性が示唆された。</p>	

E-24	グルコシルチコイドレセプターと抑制性転写因子ポリコームの相互作用
	○山口 敬史、金岡 英徳、三宅 克英、飯島 信司 (名古屋大 工学研究科)
<p>【目的】ポリコーム群遺伝子は、ショウジョウバエのホメオボックス遺伝子群の領域特異的な発現パターンの維持に重要な遺伝子として同定された。ポリコーム複合体は主に 2 種に分類されており、Polycomb repressive complex 1 (PRC1) と Polycomb repressive complex 2 (PRC2) がある。このうち PRC1 複合体に含まれる Pc2 は、メチル化ヒストンに結合するクロモドメインを有しており、PRC2 のサブユニット Ezh2 によってメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基 (H3K27) に結合することができる。本研究はこの Pc2 と核内レセプターであるグルコシルチコイドレセプター (GR) の相互作用を明らかにすることを目的としている。</p> <p>【方法】Pc2 と GR の相互作用を明らかにするために、本研究では GST-pulldown 法と免疫共沈法を用いた。また、Pc2 の GR 標的遺伝子への作用を検討するために、siRNA 法とクロマチン免疫共沈法を用いた。</p> <p>【結果】In vivo と in vitro での GR と Pc2 の結合を免疫沈降法と GST-pull down assay を用いて解析し、この 2 つのタンパク質が直接結合することを見出した。また、ラットの幼若肝細胞において RNAi により Pc2 をノックダウンすると、成熟した肝細胞でのみ発現し、GR によってホルモン依存的に転写が活性化される tryptophan oxygenase (TO) 遺伝子の発現量が上昇することがわかった。肝細胞において、Pc2 の発現量は分化が進むに従って減少して行くので、GR による分化特異的遺伝子発現制御に、Pc2 が深く関与していることが示唆された。これらの結果から、核内受容体がポリコームの新たな標的となり得る可能性が示され、分化特異的に発現する遺伝子が有する制御メカニズムの解明につながると思われる。</p>	

日本農芸化学会

2007 年度(平成 19 年度)関西・中部支部合同大会

御寄贈会社名

本大会の開催に当たり下記 4 社より御芳志を頂きました。

この場をかりて篤くお礼申し上げます。

株式会社ミツカン グループ本社

アピ株式会社

株式会社 ポッカコーポレーション

愛知県酒造組合連合会

(順序不同)

2007 年度日本農芸化学会 関西・中部支部合同大会実行委員会

実行委員長：小林 猛（中部大学 応用生物学部）

総 務：森山龍一（中部大学 応用生物学部）

〒487-8501 愛知県春日井市松本町 1200

中部大学応用生物学部

TEL & FAX: 0568-51-6084（総務）

日本農芸化学会中部支部

〒464-8601 名古屋市千種区不老町

名古屋大学大学院生命農学研究科内

支部長：前島正義

庶務幹事：小田裕昭

Tel. 052-789-4124, Fax: 052-789-5050（庶務幹事）

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~jsbba/>

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

京都大学大学院生命科学研究科内

支部長：山本憲二

庶務幹事：中川好秋

TEL: 075-753-6117, FAX: 075-753-6123（庶務幹事）

<http://jsbba-kansai.kir.jp/>